

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：iPS・分化細胞集団の不均質性を1細胞・全遺伝子解像度で高速に測定する技術の開発
2. 研究開発代表者：二階堂 愛（理化学研究所情報基盤センター）
3. 研究開発の成果

### 1. 1細胞採取とRNA増幅反応の高速化

マルチウェルプレートを利用し、多数の1細胞を同時に処理する1細胞RNAシーケンス法 Quartz-Seq の改良版を完成させた。セルソーターを改良して、マルチウェルプレートへ高精度に1細胞ソーティングを可能にした。実際に数百個の1細胞RNAシーケンスを実施したところ、Quartz-Seq Next と同等の性能を示した。ほかのハイスループット型1細胞RNA-seq法と比較すると、検出遺伝子や相関係数で勝り、かつ、そのばらつきが少ないことを示せた。

### 2. 1細胞RNA-seqの低コスト化と短時間化

Quartz-Seqの実験時間の短時間化のために、ベンチトップ型の新型RNAシーケンサー(illumine NextSeq 500)の導入した。目標の通りに、シーケンス受託サービスを利用した場合に比べて、シーケンスコストをリードあたり1/6に抑えることができた。シーケンス受託サービスでは、納品までに2-3ヶ月以上の期間を要していたところを、約11-29時間(約20-90倍の速度)までに削減できた。

### 3. 事業内連携

本年度はハイスループット1細胞RNA-seq法の開発を進めた。また新規RNA増幅法による1細胞RNA-seq法やQuartz-Seqを用いて、事業内連携を実施した。まず、事業内連携を進めるために、これらの方法の自動化を進めた。その自動化ラインを利用して、2つの拠点のiPS細胞由来分化細胞集団のサンプル300-700細胞程度について1細胞RNA-seqを実施し、移植細胞となる分化細胞集団の不均質性を示すことができた。またそれらの細胞不均質性マーカーをそれぞれ発見できた。さらに、別の2拠点との連携について、連携協議会を開催し、議論を進めた。

### 4. 細胞状態の不均質性の定量化ソフトウェア開発

高精度でハイスループットな1細胞RNA-Seq法からの不均質性の判定システムを構築し、10,000個細胞に1個の不均質な細胞の混在を検知できるようになった。

まず、1万個のRNA-Seqデータ解析を高速に解析するデータ解析パイプラインをプライベートクラウド上に構築した。転写産物中のユニークなk-merとデータ中のk-merをハッシュ化し、事前にカウントしておくことで、発現量を高速に定量できた。これにより1細胞あたり12時間から2日かかっていた計算が、5分程度で終了できた。

### 5. 再生医療の重要遺伝子群を対象とした高精度な不均質性検査法の開発

大量のRNAに混入する微量なRNAを検出する方法について開発を進めた。特に新しいRNA増幅法により微量なRNAを検出する方法について検討した。特許取得のため、詳細な説明は省略する。