

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）1 細胞遺伝子発現解析技術のシステム化
（英語）Development of system for single-cell gene expression analysis

補助事業担当者 （日本語）早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構 招聘研究教授 神原秀記
所属 役職 氏名：（英語）Hideki Kambara, Distinguished Guest Research Professor,
Research organization for nano & life innovation,
Waseda University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

(支援)

本事業では、課題管理者がこれまでに開発した「1 細胞遺伝子発現解析技術」を利用して、次世代 DNA シーケンサで遺伝子発現網羅解析するための試料調製を支援することを目的とした。具体的には、受領した 1 細胞試料より cDNA ライブラリーを作製し、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行うこととし、3 年間で計 19 件の支援解析依頼を受け入れた。内 12 件については、領域 A のシーケンスを含めた試料調製から解析までの一貫支援であり、他 4 件は cDNA ライブラリー作製に加えて個々の要望に応じた解析を含めた支援内容であった。受入試料の例としては、分化制御した幹細胞の他、生体由来組織(腫瘍細胞、免疫細胞、成体幹細胞などを含む)があり、再生医療やがん・免疫など医療・創薬の重要課題にある対象が選抜された。依頼主の試料準備に要する課題により、2 件が取り下げとなったが、他 17 件は期間中に支援を完了した。支援完了後も、依頼者の要望に応じて解析のフォローアップと情報交換を行い、内 5 件については共同研究としての研究を継続している。高度化研究により、試料調製ロボットシステムが早期確立できたため、処理細胞数は当初予

定を大きく超え、2300 細胞以上となった。以上より、支援として掲げた目的を十分に遂行できたと考えられる。

(高度化)

高度化では、これまで手作業で行ってきた 1 細胞の遺伝子発現解析のための試料調製プロセスを自動化し、多数の 1 細胞試料を一括処理するための技術開発を行った。市販の自動分注ロボットシステムに独自のプログラムを搭載し、96個の1細胞試料から同時並行に増幅cDNAライブラリーを調製するシステムを構築した。このcDNAライブラリーに細胞タグを導入し、96試料を一括シーケンシング可能とした。これにより、予定を超える試料の支援が可能となった。本開発では、磁気ビーズを利用したcDNAライブラリー構築法と現在広く利用されているSMART-seq2法の双方を 1 つのシステム上で実行出来るように設定し、ライブラリー構築の再現性や検出精度を改善した。本システム開発を前倒して計画を進行することができたため、支援解析に活用した。また、支援解析の中で試料解析のニーズ調査を経た結果、対象試料は浮遊性の細胞、接着細胞、生体から採取した組織やその一部など多岐に渡りこれら全てに対応する必要があることが分かった。そこで、あらゆる形状の試料を 1 つのフォーマットで 1 細胞あるいは微小切片として採取できる機構を備えたシステムの開発を行った。本機では、培養皿や組織切片をモニターで観察しながら狙った箇所や細胞をニードルで回収し、ウェルプレートに次々回収する。また回収位置を記憶させ、試料採取箇所とデータの紐付けが出来るように設計した。回収した試料は、別途開発している試料調製ロボットシステムにそのまま移行させ、試料調製を自動で行えるよう想定した。凍結組織試料の解析を進め、マウス脳組織やがん組織の局所的な遺伝子発現解析を実施した。マウス脳組織からは解剖学的な知見に基づく組織領域に特異的な遺伝子発現を捉えることができおり、直径100マイクロメートル、厚さ10~20マイクロメートルの微小な組織領域毎の遺伝子発現の変動を比較できるようになった。これは、1 採取当たり 5 秒の速度で 4 8 箇所を連続採取できる本システムの利点を活かしたものであり、試料の劣化がなく短時間に微小組織を採集できるようになったことで、空間的な遺伝子発現を高解像度に捉えることが可能となった。上記の成果により、高度化研究として本事業で掲げた目標を達成できたと考えている。

(Support)

In this project, we aimed to support the gene expression analysis with next generation DNA sequencer by using "single-cell RNA-seq technology". Specifically, cDNA libraries were prepared from received single cell samples, and comprehensive gene expression analysis by RNA-seq was carried out, and in total, 19 support analysis requests were accepted over 3 years. With regard to 12 of them, they were the request for total supporting from sample preparation including sequence in region A (RIKEN team) to analysis, and the other 4 requests were support contents including analyzes according to individual demands. Examples of accepted samples include biological tissues including tumor cells, immune cells, adult stem cells, and differentiation-regulated stem cells, which are important issues for regenerative medicine and drug discovery. Two requests were withdrawn due to the task required for client's sample preparation, but 17 other cases completed support during the period. Even after the support is completed, follow-up of analysis and exchange of information are continued according to the client's request, and five of them are continuing research as collaborative research. As the sample preparation robot system could be established early by advanced research, the number of treated cells greatly exceeded the original schedule and became 2300 cells or more.

Based on the above, we considered that we were able to fully accomplish the purposes stated as support.

(Advanced research)

In the advanced research project, we have developed technologies to automate the sample preparation process for single-cell gene expression analysis, which has been carried out by manual so far. We installed a unique program in a commercially available automatic dispensing robot system and constructed a system for preparing amplified cDNA libraries simultaneously from 96 single cell samples in parallel. A cell tag was introduced into this cDNA library, enabling collective sequencing of 96 samples. We were able to advance the support project with this system. In addition, we realized that clients really required for sample collection technique which can be utilized for abroad specimens including floating cells, adherent cells, and tissues. To address these demands, we developed a system with a mechanism which can isolate single cells or micro-dissections. In this machine, we can observe the target cell and tissue area and select the area for sample collection with the developed software. The cells were isolated with a needle and collect them one after another on the well plate. In addition, the collection position was memorized, and it was designed to be able to correlate data with sampling place. We analyzed frozen tissue samples and conducted spatial gene expression analysis of mouse brain tissue and cancer tissue. From the mouse brain tissue, we could detect the site-specific gene expression. The gene expression of each minute tissue region having a diameter of 100 micrometers and a thickness of 10 to 20 micrometers. The present system can continuously collect 48 sites at a rate of 5 seconds per collection, and it became possible to collect microstructures in a short time without deterioration of samples. This system would be a useful tool for spatial gene expression analysis of various tissues toward understanding the tissue function at high-resolution. Based on the above results, we believe that we achieved the goals set forth in this project as advanced research.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Yoda T, Hosokawa M, Takahashi K, Sakanashi C, Takeyama H, Kambara, H. Site-specific gene expression analysis using an automated tissue micro-dissection punching system. Sci. Rep. 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Single-cell transcriptome analysis of beating cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cell, ポスター, Takuya Yoda, Masahito Hosokawa, Yuji Haraguchi, Katsuhisa Matsuura, Tatsuya Shimizu, Hideki Kambara, Haruko Takeyama, Pacificchem2015, ホノルル(USA), 2015/12/18 国外
2. Site-specific gene expression analysis with a rapid automated system for capturing many small dissected tissue fragments from a frozen sample, ポスター, Takuya Yoda, Masahito Hosokawa, Kiyohumi Takahashi, Chikako Sakanashi, Haruko Takeyama, Hideki Kambara, International Conference on Single Cell Research 2016, 2016/11/17, 国内

3. Reproducible sample preparation for single-cell RNA-seq with a commercially available dispenser, ポスター, Kiyofumi Takahashi, Takuya Yoda, Chikako Sakanashi, Hiroko Matsunaga, Masato Kogawa, Haruko Takeyama, Masahito Hosokawa, Hideki Kambara, International Conference on Single Cell Research 2016, 2016/11/16, 国内
4. Site-specific gene expression analysis for frozen tissues with small fragments captured by an automated punching system, ポスター, Hiroko Matsunaga, Takuya Yoda, Koji Arikawa, Kiyofumi Takahashi, Masahito Hosokawa, Haruko Takeyama, Hideki Kambara, International Conference on Single Cell Research 2016, 2016/11/16, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願