

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） 包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析
（英語） Comprehensive single-cell transcriptome analysis

補助事業担当者 （日本語） 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 特任教授 橋本真一
所属 役職 氏名：（英語） Shinichi Hashimoto, Project Professor,
Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa 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）

和文

トランスクリプトーム解析は、組織、臓器、あるいは分化状態や応答状態の異なる細胞が混合した細胞集団において行われてきた。ところが個々の細胞がどのような遺伝子を発現し、機能を担っているのかはほとんど明らかにされていない。そこで、細胞集団における各 1 細胞の性格を明らかにし、真の細胞状態を把握することは生物学の研究にとって非常に重要である。

本課題では、各研究分野で少量の細胞数での研究を希望している外部研究者に対して、微量トランスクリプトーム解析の支援を行った。これらは微量細胞（数十細胞程度まで）から SAGE-Seq、RNA-Seq を行うものである。さらに微量細胞ではなく単一細胞での解析を希望する外部研究者に対しては、我々が開発した包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析技術(Nx1-Seq)の支援を行った。この技術は、1 細胞由来の mRNA とバーコード配列を含んだ DNA 結合ビーズを特異的に結合させることで、数千から数万細胞での 1 細胞の遺伝子発現解析が可能となる方法である。

支援実績として、平成 26 年度 10 研究室 120 検体、平成 27 年度 5 研究室 32 検体、平成 28 年度 7 研究室 68 検体に対して、微量/1 細胞トランスクリプトーム解析技術の提供、支援を行った。この

うち Nx1-Seq の支援実績は、平成 28 年度 4 研究室 10 検体である。微量トランスクリプトーム解析の支援案件は多くが詳細なデータ解析にまで至っており、いくつかのグループでは学会発表、論文作成まで順調に進んでいる。

一方、我々が開発した包括的 1 細胞遺伝子発現解析技術のさらなる高度化を進めた。得られたシーケンスデータ中の非特異配列が多かったことから、真の配列を得られる確率を高めるための効率化を図った。中でも cDNA 合成効率は一番大きな要因を占めると考えられ、逆転写の際に用いるテンプレート・スイッチング用オリゴ (TSO) に修飾を加えた。TSO の 3' 末端はグアニン残基を含むが、LNA 加工により、cDNA 末端のシトシンリッチな配列との特異的相補鎖形成能を格段に向上させた。一方、TSO の 5' 末端はビオチンによるブロッキングを行い、TSO 同士が非特異的に結合することを妨げた。この 2 種類の修飾により、cDNA 合成の効率改善に成功した。さらに PCR に用いるプライマーにも非特異的な反応を妨げるブロッキング修飾を行うことで、さらに非特異的な配列を減らせるかの検討を続けた。

この方法を用いて PBMC を初めとする幾つかの細胞、組織を用いてこの方法の有用性を確かめた。さらに HBV 陽性の Hepatocellular carcinoma から樹立された細胞株の 1 細胞遺伝子発現解析を行い、約 3,000 細胞中、たった 1 つの細胞が HBV mRNA を高発現していることを見いだした。その HBV RNA 維持細胞とそれ以外の細胞の比較により HBV を細胞に維持する為の遺伝子 X の同定に成功した。同定遺伝子の shRNA による knockdown により HBV 感染細胞内の HBV cccDNA が低下したことからこの分子が創薬ターゲットとなると考えられた。

全補助事業期間における特許出願に関して、Nx1-Seq 法の基本特許 (1 細胞由来核酸の解析方法)、並びに抗 HBV 薬標的分子の基本特許、(抗ウイルス薬) を申請する共に、これらの特許を企業に導出した。

英文

An individual cell is the smallest functional and universal unit of an organism. Gene expression is regulated within or between individual cells, and so ideally, analysis of gene expression should best be performed using single cells; however, gene expression profiling has traditionally been performed using rather large samples and plenty of material. Single-cell transcriptome technologies serve as powerful tools to comprehensively dissect cellular heterogeneity and identify distinct cell phenotypes.

Our project provided technical support for conducting a transcriptome analysis to other researchers in various fields whose samples consist of only a few cells. To analyze samples of limited size (up to dozens of cells), SAGE-Seq and RNA-Seq are performed. When researchers want single cell analysis, we provided comprehensive single-cell transcriptome analysis (Nx1-Seq) developed by using a technique of randomly barcoded mRNA from a single cell.

Our project carried out analyses on 120 samples in 2014, 32 samples in 2015, and 68 samples in 2016, with 10 samples in 2016 analyzed by Nx1-Seq. Most studies that employed our technical support to analyze limited cell sample sizes carried out detailed data informatics, resulting in some groups presenting their data at meetings or writing up papers.

Simultaneously, we pushed forward with further advancement of the comprehensive single-cell transcriptome method. Because a large amount of non-specific sequences were present in the sequence data, we attempted to raise

efficiency to obtain the true sequence. cDNA synthesis efficiency was thought to be the largest limiting factor with regard to sequence accuracy; however, we were able to modify the oligo (TSO) for template switching for reverse transcription. The 3' end of TSO includes a guanine residue, but through LNA processing, complementary cytosine-rich sequence-specific chain formation was able to be improved markedly. Additionally, the 5' end of TSO is blocked with biotin, preventing TSO-TSO nonspecific binding. Through these two types of modifications, we succeeded in improving the efficiency of cDNA synthesis. Furthermore, we continued to examine ways of further reducing the amount of nonspecific sequence by using modified PCR primers.

We confirmed the usefulness of this method using various cell and organ samples such as PBMCs. Furthermore, we also carried out a Nx1-seq using a cell line established from HBV-positive Hepatocellular carcinoma and found that only one cell in approximately 3,000 expressed a high level of HBV mRNA. By comparing cells without HBV RNA, we identified Gene X, a gene important for cellular retention of HBV. Such molecules represent prime innovative drug development targets since HBV cccDNA level in HBV-infected cells decreased after shRNA knockdown of Gene X.

During the project, we filed for a basic patent (method of analysis of nucleic acids derived from a single-cell) for the Nx1-Seq method and a basic patent for anti-HBV medicine target molecules (anti-viral drugs), and have also licensed out these patents to a company.

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 1件、国際誌 1件）

1. Soichiro Sasaki, Tomohisa BaBa, Tatsunori Nishimura, Yoshihiro Hayakawa, Shin-ichi Hashimoto, Noriko Gotoh, Naofumi Mukaida. Essential roles of the interaction between cancer cell-derived chemokine, CCL4, and intra-bone CCR5-expressing fibroblasts in breast cancer bone metastasis. *Cancer Letters*. 2016, 378(1), 23-32.
2. 橋本真一. 一細胞遺伝子発現解析法による細胞集団解析. *医学のあゆみ*. 2016, 258(4), 287-291.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. がん組織における包括的1細胞遺伝子発現解析, 口頭, 橋本真一, 鳥越俊彦, 山下太郎, 本多政夫, 鈴木穰, 菅野純夫, 松島綱治, 金子周一, 第74回日本癌学会学術総会, 2015/10/08, 国内.
2. Comprehensive single-cell transcriptome reveals heterogeneity in cancer tissue, ポスター, Shinichi Hashimoto, Hideaki Yurino, Cold Spring Harbor Laboratory, Single Cell Analyses Meeting, 2015/11/12, 国外.
3. 1細胞遺伝子発現解析による子宮体がんの多様性, 口頭, 橋本真一, 田淵雄大, 廣橋良彦, 金子周一, 松島綱治, 鳥越俊彦, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/07, 国内.

4. Single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity in endometrioid adenocarcinoma tissue, ポスター, Shinichi Hashimoto, Kouji Matsushima, Toshihiko Torigoe, Hideaki Yurino, The American Society of Human Genetics 2016 Annual Meeting, 2016/10/18-22, 国外.
5. Analysis of infiltrating leukocytes in the tumor microenvironment by single cell transcriptome, ポスター, Shinichi Hashimoto, Yuta Tabuchi, Yoshihiko Hirohashi, Shuichi Kaneko, Kouji Matsushima, Toshihiko Torigoe, 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016/12/05-07, 国内.
6. Cell Plasticity and heterogeneity in endometrioid adenocarcinoma tissue by single-cell transcriptome analysis, ポスター, Hideaki Yurino, Toshihiko Torigoe, Kouji Matsushima, Shinichi Hashimoto, KEYSTONE SYMPOSIA Cell Plasticity within the Tumor Microenvironment, 2017/01/08-12, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願

PCT/JP2015/060841

PCT/JP2016/082957