

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Projects for Technological Development, Research Center Network for
Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Development of a high throughputsingle-cell RNA-sequencing for
realization of effective regenerative medicine

研究開発担当者 (日本語) 理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニ
ット ユニットリーダー 二階堂愛

所属 役職 氏名： (英語) Itoshi Nikaido, Unit Leader. Bioinformatics Research Unit, RIKEN
Advanced Center for Computing and Communication.

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

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニ
ット 上級センター研究員 笹川洋平

所属 役職 氏名： (英語) Yohei Sasagawa. Senior Research Scientist. Bioinformatics Research
Unit, RIKEN Advanced Center for Computing and Communication.

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニ
ット センター研究員 林哲太郎

開発課題名： (英語) Tetsutaro Hayashi. Research Scientist. Bioinformatics Research Unit,
RIKEN Advanced Center for Computing and Communication.

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニット 上センター研究員 團野宏樹

所属 役職 氏名: (英語) Hiroki Danno, Research Scientist, Bioinformatics Research Unit, RIKEN Advanced Center for Computing and Communication.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

2016年度は、昨年度までに開発した新しいハイスループット型の1細胞RNA-sequencing法であるQuartz-Seq HTXのさらなる性能改善を行った。まず、微量分注装置を利用することで、逆転写反応時の液量を減らした。その結果、使用する逆転写酵素量を減らすことでコストを低減させつつ、細胞あたりの検出遺伝子数などの性能も維持することができた。数千個の細胞に数個の細胞が含まれているときに、正しく発見できるかを調べるために、4,000-6,000個の未分化細胞と分化細胞の1細胞RNA-seqを実施した。そのなかに含まれる数個の希少細胞集団を発見できることを示した。さらに、それらの希少細胞を代表する遺伝子発現マーカーを複数個発見できることを示した。これらのデータを利用して、シミュレーション実験を行ったところ、99%の割合で、0.05%の希少細胞を発見できた。

これまで開発してきた1細胞RNA-sequencing法を用いて、数チームとのプログラム内連携を実施した。その結果、各連携にて不均質性の指標となるバイオマーカーを発見することができた。

1細胞RNA-sequencingのデータから希少細胞を発見するために、データ解析パイプラインを実装した。このデータパイプラインは、ウェブブラウザ上から実行できるようパイプラインマネジメント管理システムGalaxy上に実装した。このパイプラインを、誰でも簡単に、パソコンやクラウドコンピュータで実行できるようにした。

1細胞RNA-seqで発見した希少細胞を、移植用細胞から発見する方法の開発を行った。そのために、移植する分化細胞から得られる大量のRNAから、数コピーの標的遺伝子を検出するための方法を検討した。我々が新規に開発した逆転写・cDNA増幅法であるRT-RamDA法とTaqManプローブを利用することで、 10^8 個の細胞由来のRNAから、数コピーの標的mRNAを精度よく検出できた。これまで用いていた特異的PCRプライマーによる定量RT-PCR法と比較して、シグナルノイズ比が改善できた。

英文

In FY2016, we continued to develop a high-throughput single-cell RNA-sequencing method, so-called Quartz-Seq HTX. Notably, we reduced a cost of cDNA synthesis to reduce reaction volume in reverse transcription step by using a micro liquid dispenser. To find rare cell type in the cell population, we performed approximately 6,000 single-cell RNA-seqs with pluripotent cells and differentiated cells.

Quartz-Seq HTX and our data analysis pipeline could be found rare cellular population which included only seven individual cells of rare cell type. We also found some biomarker of rare cell type from single-cell RNA-seq data. To evaluate safety and effectiveness of cell of transplant in retentive medicine, we provided our single-cell RNA-sequencing techniques to some research group in this program. As a result, collaborator and our group revealed novel biomarkers of representation for cellular heterogeneity in cell of transplantation.

To detect rare cell types from a differentiated cell by single-cell RNA-sequencing, we implemented data analysis pipeline of single-cell RNA-sequencing on the data pipeline management system. The data analysis environment work on a virtual machine which deploys any personal computer and cloud computer system. The data analysis pipeline can be performed on Web browser without a knowledge of command line operations.

To evaluate whether correct marker genes of cell type express or not in cells for transplantation, we should measure small copy target genes from an enormous amount of RNAs. We developed a novel RT-qPCR with TaqMan Probe and RT-RamDA. As a result, we found that the method could detect five copy target mRNA in RNAs derived from 10^8 cells. Evaluating signal noise ratio in TaqMan probe method and gene-specific PCR primer method, we found that signal-noise ratio of TaqMan method is less than its of specific PCR method.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

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. Matsumoto H, Kiryu H, Furusawa C, Ko MSH, Ko SBH, Gouda N, Hayashi T, Nikaido I. SCODE: An efficient regulatory network inference algorithm from single-cell RNA-Seq during differentiation. *Bioinformatics*. 2017.

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

国際会議（招待講演）

1. Itoshi NIKAIDO. Disassembling regionalization of neuroectoderm by single-cell transcriptome analysis. International Conference on Single Cell Research 2016. Tokyo. 16-17th November, 2016. 国内.

2. Itoshi NIKAIDO. A highly quantitative single-cell transcriptome method for realization of effective regenerative medicine. 2nd Kumamoto IRCMS Symposium. Kumamoto. October 31 - November 2, 2016. 国内

国内学会 (招待講演)

3. 二階堂愛. Single-cell transcriptome analysis for realization of effective regenerative medicine. 第 31 回日本薬物動態学会. (Invited)
4. 二階堂愛. Biochemistry of single-cell RNA-sequencing. ゲノム解析と生化学. 第 89 回日本生化学会大会. 2016/09/25-27. 仙台.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 移植細胞に含まれる亜集団を同定する 1 細胞 RNA-seq 法. SONY ライフサイエンス学術セミナー. 二階堂愛. 東京. 2016/7/23. 国内

(4) 特許出願

WO2016052619 「核酸の増幅法」