

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－スウェーデン研究交流）

1. 研究課題名：「一細胞遺伝子発現解析技術の開発」
2. 研究期間：平成21年7月～平成25年3月
3. 支援額： 総額 29,000,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	神原 秀記	(株) 日立製作所中央研究所	フェロー
研究者	白井 正敬	(株) 日立製作所中央研究所	主任研究員
研究者	梶山 智晴	(株) 日立製作所中央研究所	主任研究員
研究者	谷口 紀代美	(株) 日立製作所中央研究所	研究員
研究者	金野 智浩	東京大学大学院工学系研究科	特任准教授
研究者	西田 洋一	(株) 日立製作所中央研究所	主任研究員
研究者	松永 浩子	(株) 日立製作所中央研究所	研究員
研究者	田邊 麻衣子	(株) 日立製作所中央研究所	研究員
参加研究者 のべ 8名			

相手側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	S. Linnarsson	Karolinska Institutet, MBB	准教授
研究者	U. Kjallquist	Karolinska Institutet, MBB	博士課程
研究者	M. Akhras	Karolinska Institutet, MBB	ポスドク
研究者	P. Zajac	Karolinska Institutet, MBB	ポスドク
参加研究者 のべ 4名			

5. 研究・交流の目的

本研究は組織中の1細胞ごとの遺伝子発現を高精度かつ安価に定量解析する手法を開発することを目的とする。具体的にはスウェーデン側の STRT 法に基づいて、数百～1万細胞中の全遺伝子についての発現解析法を開発し、日本側の cDNA ライブラリ作製技術と増幅技術に基づいて特定の遺伝子を数千～100万細胞中の mRNA をより安価に高精度に定量する解析法を開発する。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

研究は次の2つの方向で行った。第1に単一細胞解析に利用可能な高感度な大規模パイロシーケンサを開発した。第2に低コストで数十万個の細胞に対する単一細胞解析を実現するためにナノポラスメンブレン上に細胞の位置を保存して cDNA ライブラリを構築する方法を開発し、蛍光イメージによって単一細胞中の遺伝子発現量を定量する方法を開発した。特に第2の方法についてスウェーデン側との議論によって蛍光計測のためのサンプル処理方法を議論した。

まず、第一の研究結果について報告する。単一細胞中の遺伝子を安価な装置で大規模にDNAシーケンシングを実現するためには、高解像度・高感度カメラを必要としないパイロシーケンシング技術の感度向上とパイロ用微小反応槽の高集積化が有効である。本研究では、微小反応槽の高集積化を行うために、高感度化をすることが必要であることから、パイロシーケンスに必要な酵素による生物発光強度を増強することが本質的な課題であると考えた。そこで、従来技術では磁性ビーズなどの表面にパイロシーケンスに必要な酵素を固定され、パイロシーケンスが行われており、酵素固定がビーズの内部にはできないことに着目した。この酵素固定に活用できていない反応槽中の領域を有効に生物発光に利用するために、光硬化性ゲルを酵素固定に活用し、生物発光強度の40倍以上の増強とS/Nを20倍改善することができた。図1にS/N比の改善の結果を示す。

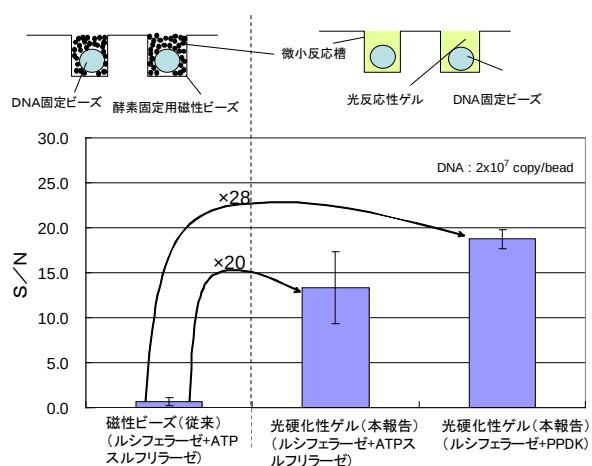


図1 光硬化性ゲルを用いた生物発光強度の増強

また、この光硬化性ゲル酵素固定方式を応用して、直径 $6.5 \mu\text{m}$ の微小反応槽をもったパイロシーケンシングを実現した。図2の(1)及び(2)に、微小反応槽アレイの顕微鏡写真とこれに対応する化学発光像を示した。一つの反応槽が撮像素子の1ピクセルに対応しており、撮像素子のピクセル数を最小限まで減らすことに成功した。この微小反応槽アレイで100万並列のパイロシーケンサを開発し、シーケンスを行った結果を図2の(3)に示す。グラフの縦軸は横軸に記された塩基種の試薬が導入されたときの生物発光強度を示している。また、グラフの上部に計測に使用したビーズ固定DNAシーケンスを示しているが、これに対応した発光強度パターンを得ることができたことから、図2(3)に示されているような20塩基程度までのパイロシーケンス可能であることが確認できた。

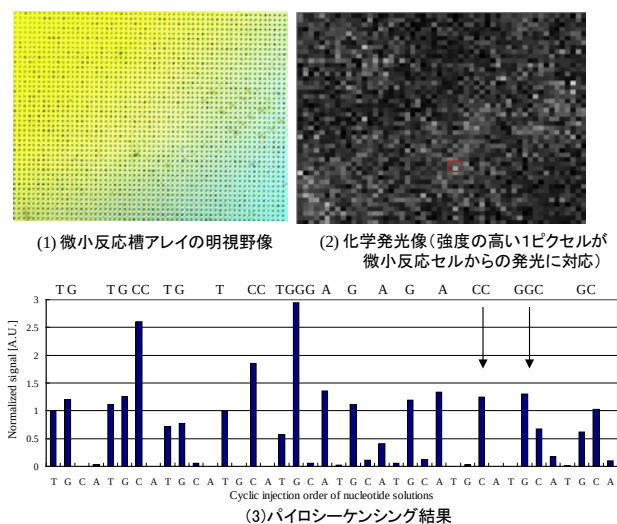


図2 大規模パイロシーケンサのデバイスとシーケンシング結果

次に第2の研究として、新規に提案した安価で多数細胞の遺伝子発現解析を実現可能なデバイスおよび計測方法について報告する。図3にデバイスおよび計測方法の概略を示す。試みた方法は平面上のポーラス（多孔質）メンブレン（アルミナ製）を用いて、多数の細胞から mRNA を抽出し、細胞のデバイス上の位置に対応して mRNA の相補鎖である cDNA をデバイス中で合成する。得られたポーラスメンブレンデバイス上の cDNA（これを cDNA ライブラリアレイと呼ぶ）を計測したい遺伝子に対応するプローブを導入し蛍光計測することによって、多数の細胞中の遺伝子発現量を定量する。多項目の遺伝子について定量するためには、保存された cDNA を繰り返し利用して定量する。

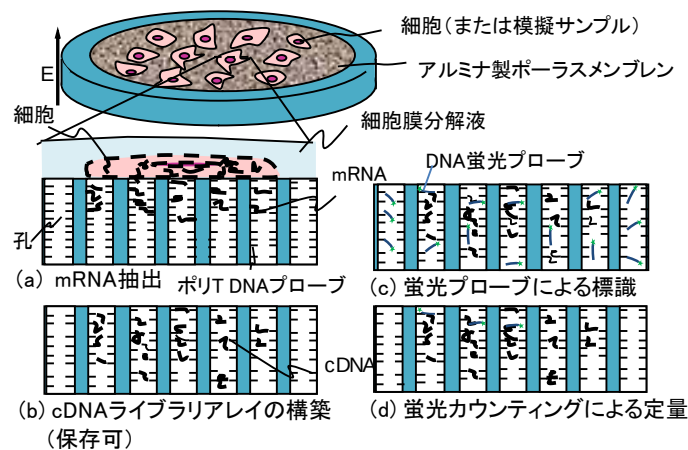


図3 ポーラスメンブレンを用いた cDNA ライブラリアレイ法の計測法の概略図

この方法を実現するためのキーとなる課題は、多孔質デバイス中での高効率な mRNA の捕捉と逆転写反応であった。図4に両者を合わせた効率の評価のために行った定量 PCR 結果を示す。メンブレン (赤)、とスライドガラス (青) について投入 mRNA 量に対して、合成された cDNA 量を示した。反応領域が細孔（ポーラス）中であるために、cDNA 合成阻害が生じる懸念があったが、ガラスと同様ほぼ理想的な反応効率を得ることができた。また、スライドガラスについては、十分なサンプル mRNA 量があるときには高効率であるが、サンプルが微量な場合には定量データが得られなかった。一方、ポーラスメンブレンについては、表面積が増大していることから微量な mRNA からの定量が確認できた。これによって、

高効率な cDNA ライブラリアレイが構築できることが分かった。

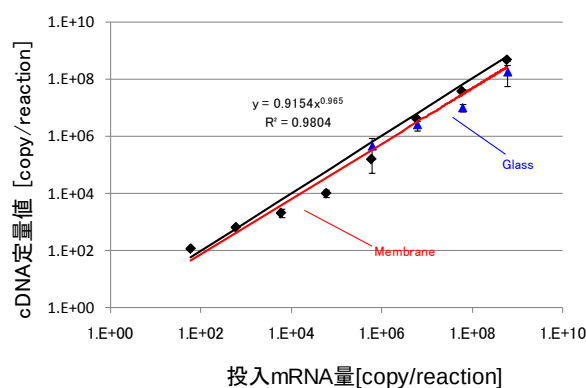


図4 ポーラスメンブレン cDNA ライブラリ構築効率の評価

次に、特定の遺伝子に対応する cDNA に対応する蛍光プローブを導入し、イメージングによって cDNA 量を定量する方法を試みた。図5に蛍光プローブ合成のためのプライマとサンプル細胞と蛍光体のすべてを含む場合のポーラスメンブレンに転写された cDNA ライブラリアレイの共焦点蛍光顕微鏡イメージとプライマを含まないネガティブコントロールのイメージを示す。プライマのある場合のイメージでは細胞の形状に対応し、cDNA の量を反映した蛍光像を得ることができた。

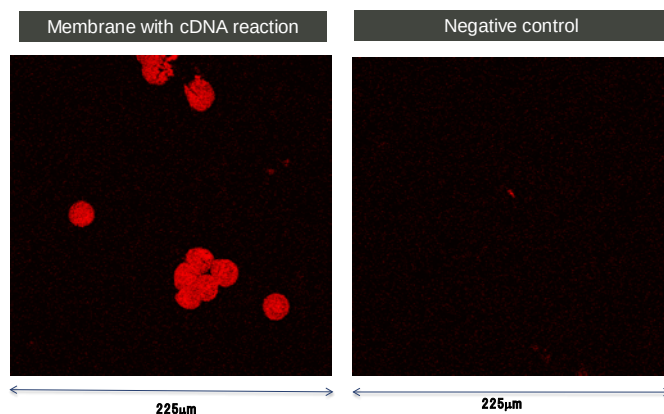


図5 ポーラスメンブレン上 cDNA ライブラリの共焦点蛍光顕微鏡イメージ

この方法の開発によって安価に多数の細胞に対する単一細胞レベルでの遺伝子発現解析が可能な基本記述を構築することができた。

6-2 人的交流の成果

特にポーラスメンブレン計測法に関する議論を行い良好な cDNA ライブラリに対応する蛍光イメージを取得できる技術を構築することができた。また、単一細胞解析技術に関するワークショップ・シンポジウムは合計4回開催した。2011年3月および11月に東大および早稲田大学でワークショップを、2012年の11月には京都リサーチパークにてシンポジウムを共催し、サテライトミーティングとして早稲田大学でワークショップを開催した。これによって Linnarsson 研究室の研究者のみならず、より広い単一細胞研究にかかわる研究者と交流を深めることができた。

① 2011 年 3 月のワークショップの詳細

神原フェロー、石原教授(東大)がチェアを務める、国際ワークショップ” The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis” を、日立製作所、日立ハイテク、独立行政法人科学技術振興機構、フリーダタイム株式会社、ライフサーベイヤー研究会、東京大学の共催により、3/3(木)~3/4(金)に東京大学武田先端知ビル武田ホールで開催した。国内外から約 160 名の第一線の研究者が参加し、3 件の Plenary Lecture と 20 件の口頭発表、61 件のポスターセッションが行われ、一細胞定量解析の最前線のディスカッションがされた。

② 2011 年 11 月のワークショップの詳細

神原フェロー、竹山教授(早大)が発起人となり国際ワークショップ” Workshop on Single-cell Analysis” をライフサーベイヤー研究会、早稲田大学先端科学・健康医療融合研究機構(ASMeW)、独立行政法人科学技術振興機構が主催し 11/26 に東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設(TWIns)にて開催した。約 60 名の研究者が参加して、単一細胞解析に技術とその応用について活発な議論が行われた。

③ 2012 年 11 月のシンポジウムおよびワークショップの詳細

神原フェロー、植田教授(京大)がチェアを務める国際シンポジウムを、ライフサーベイヤー研究会、独立行政法人科学技術振興機構、日立などの共催・協賛により東京(11/26)と京都(11/27-28)で開催した(※1)。国内外から約 200 名の第一線の研究者が参加し、32 件の口頭発表と 74 件のポスターセッションによる一細胞定量解析の最前線の議論が活発に行われた。

(※1)

- ・東京(11/26)開催:The 1st Single-Cell Surveyor Symposium
- ・京都(11/27-28)開催:International Joint Symposium on Single-Cell Analysis
(The 6th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & The 8th International Forum on Post-Genome Technologies)



図 7 International Joint Symposium on Single-Cell Analysis(2012/11)の集合写真

7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	"Highly sensitive pyrosequencing system with polymer-supported enzymes for high-throughput DNA analysis." Anal Chem. 2011 Oct 1;83(19):7560-5.	