

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域  
「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」  
研究課題  
「1 細胞遺伝子発現解析による組織微小環境情報の構築」

研究終了報告書

研究期間 2015年4月～2021年3月

研究代表者:橋本 真一  
和歌山県立医科大学 先端医学研究所  
分子病態解析研究部、  
教授

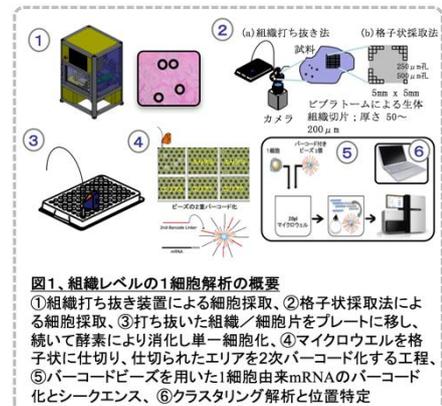
## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

腫瘍組織を構成する様々な細胞集団(微小環境状態)を理解する事は、診断や病態を改善する上で非常に重要である。どの細胞集団が起因となり、腫瘍組織を構成するのか、という疑問だけではなく、その腫瘍組織に免疫担当細胞がどのように浸潤し、あるいはなぜ免疫担当細胞が浸潤しないのか、などを解決できる。そのためには組織において個々の細胞の場所(位置情報)を保持したまま、数千以上の 1 細胞の遺伝子発現情報を明らかにする必要がある。

本研究では、1 細胞由来の mRNA にランダムにバーコードをつける技術を用いて、組織から数千~数万レベルの1細胞の位置情報を保持したまま遺伝子発現解析を行うことを目的としている。この位置情報を保持したまま微小组織片を採取するシステム開発により、がん細胞等に対する創薬ターゲットの同定、診断基準の決定が可能となる。

右に示す概略を基にして、位置情報を保持したまま 1 細胞遺伝子発現解析を実施することが可能になった。具体的な工程は、①,② ビブラトームなどで新鮮な腫瘍組織を薄切し、細胞採取装置のニードル、または格子状細胞打ち抜き装置で生きたままの組織を単離、③ 打ち抜いた組織片をプレートに移し、酵素により消化して 1 細胞化、④ サイズの小さいマイクロウェルを打ち抜いた組織片分、準備する、あるいは格子状に仕切り、仕切られたエリアを 2 次バーコード化する工程、⑤,⑥ 包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析(Nx1-seq)を行うものである。



これら一連の中で特に②の格子状採取法の改良として、様々な装置、治具を和歌山県立医科大学、日立グループ共同で開発し、最終的にはハンドプレス型と、その小型版のレバー式デバイスプレス装置が完成した。それらを利用してヒト大腸がんを中心とした臨床試験で実際に位置情報を保持しながら包括的 1 細胞遺伝子解析が実施できた。その際、1細胞 cDNA ライブラリーの作成法の検討と共にシークエンスは東京大学で行い、解析は遺伝学研究所で新たな解析方法の開発を含め実施した。

④にあたる細胞をマイクロウェルに播種するデバイスの開発は和歌山県立医科大学で実施し、細胞数に依存しない、また腫瘍細胞の凝集を抑制できるデバイスの開発を行った。一方で臨床検体のような多種多様な組織が入り混じった場合、効率的かつ生存率が高い細胞を分散する技術が必要となり、デバイスの性能を試す上で分散効率の研究を実施することが必要となった。和歌山県立医科大学と札幌医科大学で 30 例以上の臨床検体を用いて、各種分解酵素の選定、処理時間の違いによる生存率の評価などを行った。まだ明確な分散手法の確立には至っていないが、実施当初よりも小スケールで包括的 1 細胞遺伝子解析が可能となった。

## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:組織中の微小環境の位置情報を保持したまま 1 細胞遺伝子発現解析を感度が高く簡便に解析できる系として、小型で汎用性が高い格子型採取装置を市販できる状態まで開発した。この微小組織片の細胞採取システム開発によって得られた細胞の 1 細胞遺伝子発現解析により、がん細胞等に対する創薬ターゲットの同定、診断基準の決定が高感度で探索可能となる。

2.

概要:微量組織サンプルからの細胞分散法を確立し、開発した格子型の組織採取装置を用いてマウス乳がん組織およびヒト大腸がん組織の 1 細胞遺伝子発現解析を行った。その結果、がん細胞と免疫細胞を含んだ間質細胞の多様性は組織内の位置によって異なり、その比率が、がん細胞の維持に重要であると考えられた。さらに得られた結果からヒトの生存率に寄与していると考えられる細胞集団の同定に成功し、今後、創薬ターゲット並びに診断基準として検討する。

3.

概要:ヒトがん組織のシングルセル解析によって、がん種を問わず免疫微小環境を 4 種のカテゴリーに分類できることを発見し、それぞれで免疫治療の感受性や予後に差があることが判明した。本研究成果の一部は、国際共著論文として *Lancet* 2018, *J Clin. Oncol.* 2020 に発表した。大腸がんの個別化治療に向けた病理診断に応用され、医療に貢献することが期待される。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要:1種類のバーコード配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した、単一細胞由来の核酸の構成を解析するためのビーズを作製する方法、当該作製方法により作製されたビーズ、および当該ビーズを用いた単一細胞由来の核酸の構成を解析する方法に関する Nx1-seq(Next Generation 1-cell Sequencing)の基本特許が成立した(特許第 6593710 号)。

2.

概要:Nx1-seq のデバイスシステム化に関して、デバイス表面の親水性長期間保持のために温度依存的ゼラチンの検討を行い、親水性状態の維持とビーズによる RNA capture 効率の上昇の大きな改善が見られることを確認した。また自由落下で細胞を播種する際に溶液中でがん細胞集団が凝集する問題が懸念されていたが、独自のチャンバーを開発することで回避できた。

3.

概要:薄い金属板を腐食させ機械制御で切削して自動車部品の製作に用いられていた腐食刃クロムダイを格子状にすることで、生組織を打ち抜けると考えた。従

来の寸法(刃高、刃幅)とは異なる試作を繰り返した結果、直径 0.5-1.5mm の格子状打ち抜き型の試作品が完成した。実際に生組織を打ち抜いた際、均等に生組織を打ち抜く必要がある事が判明し、この型をハンドプレスに取り付ける格子状打ち抜き装置を開発できた。

<代表的な論文>

1.

Hashimoto S., et al. Comprehensive single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity in endometrioid adenocarcinoma tissues. Sci Rep. doi:10.1038/s41598-017-14676-3, (2017)

概要: 包括的 1 細胞遺伝子発現解析法である Nx1-seq を用いてヒトがん組織の多様性を検証する為、臨床検体として同一の子宮体がん組織から内膜側と筋層浸潤側の 2 部位における1細胞解析の実験を行い、がん細胞の悪性度の領域の存在と浸潤免疫細胞の多様性を示した。この方法を用い腫瘍内異質性を解析することで、がんのマーカー遺伝子の探索、創薬ターゲット、診断、治療法の開発に役立つと考えられた。

2.

Yukie Kashima, Ayako Suzuki, Ying Liu, Masahito Hosokawa, Hiroko Matsunaga, Masataka Shirai, Kohji Arikawa, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Haruko Takeyama, Katsuya Tsuchihara & Yutaka Suzuki, Combinatory use of distinct single-cell RNA-seq analytical platforms reveals the heterogeneous transcriptome response, Scientific Reports volume 8, Article number: 3482, (2018)

概要: シングルセル RNA-Seq は、がん細胞の不均一性を明らかにする効果的な方法であるが、現在の各プラットフォームには、それぞれ長所・短所がある。そこでがんの転写不均一性を解明するため、異なるプラットフォームを組み合わせることにより、発現の違いや細胞集団についての完全な情報を得て、情報の不足を補完することが可能であることを検証した。また個々の遺伝子の正確な情報を割り出せない場合であっても、与えられた転写モジュールの作用を分析することができることを示した。さらに興味深いことに、少数の細胞集団においてオーロラキナーゼ遺伝子と DUSP 遺伝子に関連する 2 つの転写モジュールに異常が認められ、休眠状態や薬物耐性に寄与する可能性が示唆された。

3.

International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. Lancet. 391:2128-39. 2018.

概要: 札幌医科大学共同研究。進行大腸がん組織の免疫病理学的解析によってがん免疫微小環境を分類し、がん患者の予後を高い確率で予測できることを証明した国際共著論文。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### 1. 和歌山県立医科大学グループ

① 研究代表者:橋本 真一(公立大学法人・和歌山県立医科大学・医学部・先端医学研究所・分子病態解析研究部・教授)

② 研究項目

- ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析システムの開発
- ・がん細胞/組織の包括的 1 細胞の解析
- ・新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に関する研究

#### 2. 札幌医科大学グループ

① 主たる共同研究者:鳥越 俊彦(公立大学法人・札幌医科大学・医学部病理学第一講座、教授)

② 研究項目

- ・ヒトがん組織からの 1 細胞分離法と位置情報保持の最適化
- ・ヒトがん組織からの 1 細胞遺伝子発現解析
- ・新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に関する研究

#### 3. 東京大学グループ

① 主たる共同研究者:鈴木 穰(国立大学法人・東京大学・大学院新領域創成科学研究科・メディカル情報生命専攻、教授)

② 研究項目

- ・次世代シーケンサーによる測定と他システムを用いたシングルセル cDNA ライブラリーの作成/測定
- ・がん細胞/組織の包括的 1 細胞の解析
- ・新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に関する研究

#### 4. 国立遺伝学研究所グループ

① 主たる共同研究者:池尾 一穂(大学共同利用機関法人・情報・システム研究機構・国立遺伝学研究所・生命情報研究センター遺伝情報分析研究室、准教授)

② 研究項目

- ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析と組織多様性のバイオインフォマティクス
- ・クラスタリングソフトの開発
- ・データ解析
- ・新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に関する研究

#### 5. 日立製作所グループ

① 主たる共同研究者:田邊 麻衣子(株式会社日立製作所・研究開発グループ・基盤研究センター・研究員)

② 研究項目

- ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析システム開発及びデバイスの研究

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

各種デバイスの開発においては、北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス系 生命機能工学領域 高村教授、株式会社オプトジェネシス、三友製作所、株式会社ノダなどと連携して開発してきた。また位置合わせ情報のソフトは日本コンピュータシステム株式会社と共同開発した。

また多種多様な臨床検体を入手するため、国立がん研究センター東病院、札幌医科大学医学部の臨床講座(消化器、総合・乳腺内分泌外科学講座、皮膚科学講座、呼吸器内科学講座、婦人科学講座、泌尿器学講座、口腔外科学講座、放射線医学講座、病理診断学講座)と連携し、臨床検体の取得と臨床情報の共有ネットワークを構築した。