

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06328

研究課題名(和文) マイクロ流体アプローチによる1細胞トランスクリプトーム解析とその応用展開

研究課題名(英文) Microfluidic approach to single cell transcriptome analysis and its applications

研究代表者

藤井 輝夫 (FUJII, Teruo)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：30251474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 136,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロ流体技術とシリコン集積回路技術を融合することで、単一細胞や微小粒子を指定の場所に捕捉し、同時並列に解析可能なマイクロ流体デバイスを開発した。また、2種類のDNAバーコードの組み合わせで個々の細胞を標識し、次世代シーケンサを用いて遺伝子配列を解析することで、単一細胞の遺伝子情報を網羅的に解析することが可能な新しい遺伝子解析方法を確立した。これらの手法を用いて子宮頸癌患者の臨床検体の解析を行い、タンパク質、遺伝子発現に基づいた子宮頸癌診断が可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞を一つずつ解析可能な1細胞解析は、細胞の多様性を把握できるため基礎研究が活発に進められている。本研究では、臨床検体を1細胞レベルで確実に捕捉する方法を確立するとともに、トランスクリプトーム解析が医療分野へ応用できることを確認した。これらにより、病態と各細胞の性質との関係を理解することが可能になれば、細胞の多様性に基づく新しい診断方法の創出が期待できる。

研究成果の概要(英文)：By integrating microfluidics and CMOS technologies, a novel microfluidic system has been developed for trapping single cells and/or microparticles into designated locations, followed by parallelized analysis of trapped single cells. Moreover, a new protocol for cap analysis of gene expression has been established by utilizing combinatorial DNA barcodes for efficient labeling of single cells. By using these methods, clinical samples from cervical cancer patients were successfully analyzed, and it was confirmed that the cervical cancer could be detected by analyzing RNA or protein expression level.

研究分野：ナノマイクロバイオシステム

キーワード：マイクロ流体デバイス 1細胞解析 ゲノム工学

1. 研究開始当初の背景

同一の遺伝的背景を有する細胞集団において、個々の細胞における遺伝子発現には大きなばらつきがあることが指摘されている。細胞集団に含まれる個々の細胞について調べない限り、細胞毎の分布はどのようなものであるかを知ることはできない。マイクロ流体デバイス分野では、微細加工技術によって形成する流路やウェルなどの微小構造を用いることが前提であり、細胞と同程度の寸法で構造を作ることが容易であることから、単一細胞を対象とする操作は古くから行われてきた。これに対して研究代表者らのグループでは、1個～数個の単一細胞操作ではなく、多数の単一細胞を同時に解析するプラットフォームとして、Electroactive Microwell Array (EMA)を開発し、「多能性幹細胞の未分化マーカー発現分布」、「細胞内の酵素活性分布」などの解析が行えることを示してきた。

一方、次世代シーケンサの登場によって、比較的安価にかつ大量のシーケンスデータが得られるようになったことと相俟って、単一細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する1細胞トランスクリプトームが可能になった。これまで1細胞トランスクリプトーム解析を実現する手法に関しては、主として少数の単一細胞を取り扱い、その解析の高感度化を目指す報告が主流であった。研究開始時点では、DNAの配列情報をシーケンスすることを前提とし、単一細胞内の状態を網羅的に計測しようとするシステムとしては、Fluidigm社のC1 systemなど限られたものしか存在しておらず、またC1 systemにおいても一度に扱えるのは最大96細胞であった。しかし、細胞集団における不均一性を把握するためには多数の単一細胞を同時に解析できるシステムの開発が必要である。例えば、複雑な組織サンプルについて1細胞単位でなおかつ高スループットに遺伝子発現解析を行うことができる方法の確立が望まれるようになった。またCold Spring Harbor LaboratoryにおいてSingle Cell Analysesに関する国際会議が開催され、1細胞トランスクリプトーム解析の高スループット化のため、Genomics/TranscriptomicsとMicrofluidicsの応用に関するセッションによってプログラムが編成されるなど、マイクロ流体デバイス分野とゲノム科学分野とを統合した新しいアプローチも広く注目を集めるに至っている。研究代表者らのグループも招待され、講演をしており(CSHL 2013 Meeting on Single Cell Analyses)、ゲノム科学に関わる1細胞解析について国際的な議論にも大きく貢献している。

1細胞トランスクリプトーム解析の高スループット化のため、液滴内に細胞を一つずつカプセル化してcDNAの合成反応を行う系が幅広く研究されている。実際に研究代表者らのグループでもこのような系で解析を試みているが、液滴への細胞のカプセル化が確率的にならざるを得ず、個々の細胞を識別する場合には、さらなる工夫が必要であることなどから、高スループット化することは困難である。

本研究では、並列で単一細胞操作・解析を行うことが可能なEMAの内部に各細胞を識別するためのindex配列を予め導入し、少量サンプルでのトランスクリプトーム解析が可能なCap Analysis of Gene Expression (CAGE)法を行うことにより1細胞解析システムを実現する。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らのグループで研究を進めてきたマイクロ流体アプローチによる単一細胞捕捉・解析デバイスと研究分担者らが有する解析手法とを組み合わせ、それらをより一層発展させることによって、1細胞トランスクリプトーム解析法の確立を目指す。具体的には、多数の単一細胞操作・解析を行うことが可能なエレクトロアクティブマイクロウェルアレイ (Electroactive Microwell Array (EMA))と少量サンプルでのトランスクリプトーム解析が可能なnanoCAGE法とを、それぞれ高度化して、融合することにより、単一細胞トランスクリプトーム解析法を実現する。この手法の具体的な応用として、子宮頸部上皮組織におけるウイルス感染と腫瘍化に関する解析の可能性について検討する。

3. 研究の方法

本研究で実現しようとするシステムは、Electroactive Microwell Array (EMA)をベースとしたデバイス上のマイクロウェル内に細胞がトラップされるとともに、EMAの機能によって細胞が電氣的に破砕された後、このウェル内においてpicoCAGEのプロトコルに従ってcDNA (First Strand)が合成される。picoCAGEによる反応後に得られたFirst Strandを次世代シーケンサによってindex配列とともにシーケンスすることにより、発現プロファイルを得ることができる。

【1細胞操作技術の高度化】

細胞の高精度操作を可能とするマイクロ流体技術を活かして、高効率で細胞を捕捉した後、個々の細胞を区画化・解析可能なシステムを開発する。EMAはアレイ化されたマイクロウェルの底面部分に電極を配置することで、解析対象物を誘電泳動によってウェル内に捕捉することがで

きるだけでなく、エレクトロポレーションにより細胞内物質を溶出させてウェル内に保持し、その内物質を解析することが可能な技術である。この EMA をさらに改良し、各ウェル構造の最適化することで 1 細胞を高精度で操作可能な技術を開発する。

【Index 配列導入法の確立】

Index 配列を有する DNA (以下 Index オリゴと呼ぶ) の EMA への導入については、マイクロウェルの配列パターンに合わせて、これらの Index オリゴのペアがスポットされた基板を予め形成しておく必要がある。その際、細胞を捕捉してマイクロウェルを完全に閉じるまでの間、他のチャンバに Index オリゴが漏出するのを防ぐため、Index オリゴを温度感応性のゲルなどにあらかじめ担持させておいたものをスポットする必要がある。これにより、細胞破碎後に RT 反応を行うためにウェル内の温度を上昇させるのにもなって、Index オリゴをゲルからリリースさせることにより、個々の細胞毎に異なる Index を付加した cDNA の合成が可能となる。

【picoCAGE プロトコルの開発】

単一細胞を対象とし、なおかつワンステップの逆転写(RT)反応のみでシーケンシングするための cDNA を得ることができるプロトコルとして、新たに picoCAGE を開発する。picoCAGE では、従来の nanoCAGE と同様に Cap 構造側に Template Switching (TS) オリゴ、また RT プライマーが 3'末端側にハイブリダイズし、逆転写反応によって得られる First Strand cDNA を直接次世代シーケンサでシーケンスしようとするものである。

【子宮頸癌への応用】

実際に構築した手法に基づいて臨床サンプルの解析へ応用する。具体的には、子宮頸癌の細胞診検査で得られる子宮頸部上皮組織由来の細胞について、1 細胞レベルでの解析を行うことにより、HPV 遺伝子の宿主へのインテグレーションの状態と腫瘍化との相関などを 1 細胞単位で調べることを試みる。

4. 研究成果

【1 細胞操作技術の高度化】

高スループット 1 細胞トランスクリプトーム解析を実現するためには、まず細胞を捕捉した後、高効率に個々の細胞を区画化が必要がある。個々の細胞の捕捉と区画化を行うため EMA に基づいたマイクロ流体デバイスを開発した。しかし、当初の EMA の細胞捕捉率はわずか 10% 程度であり、サンプル中の細胞を効率よく解析するのが困難であった。本研究では、細胞

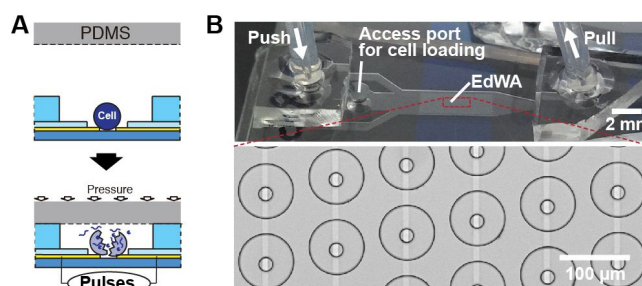


図 1 A) EdWA を用いた細胞の区画化 B) 製作した EdWA

捕捉効率を向上するため Electroactive doubleWell Array (EdWA)を開発した。EdWA では、マイクロウェルをその機能の違いによって捕捉用ウェルと反应用ウェルに分離することで、それぞれのウェルの寸法を最適化することが可能である。細胞に作用する静電力・流れのシミュレーション結果に基づき、各ウェル構造の最適化を行い、細胞と同程度(直径: 20 μ m、高さ: 4 μ m)の捕捉用ウェル上に細胞を区画化するための大きい反应用ウェル(直径: 80 μ m、高さ 15 μ m)を配置した(図 1)。この構造では、細胞がマイクロ流路を流れる時、細胞と電極間の距離が短くなるため、大きな誘電泳動力で細胞を効率良く捕捉することが可能になる。また、捕捉用ウェルはその直径が細胞と同程度であるため、ウェルに細胞が捕捉されると同じウェルには追加の細胞が捕捉されない(図 2)。この EdWA を使用した結果、95%の高効率細胞捕捉率の達成と、個々の細胞を区画化することに成功した。

さらに、マイクロ流体技術とシリコン集積回路技術の融合により EdWA を高度化することで、決定論的単一細胞組み合わせを可能にした。具体的には、反应用のマイクロリアクターの底面に、複数の単一細胞捕捉マイクロウェルを配置し、細胞やマイクロビーズを指定の場所を選択的に捕捉することを可能とする Addressable Electroactive Microwell Array (AEMA)を開発した (Kim et al.

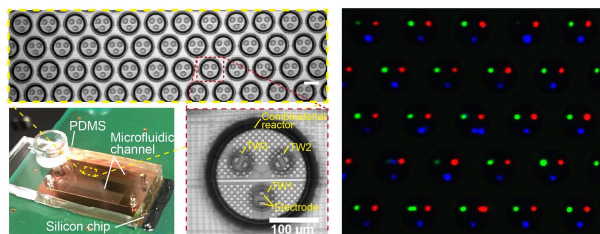


図 2 AEMA で実現した一細胞の組み合わせ

2017)。捕捉マイクロウェルの基盤をシリコン集積回路製作に利用されている back-end-of-line (BEOL)プロセスで製作することで、各電極の個別制御を可能にした。AEMA の電極を個別に制

御し、異なる種類の細胞を指定のマイクロウェルに順番に捕捉することで、決定論的単一細胞の組み合わせを実現した。試作した AEMA を用いた検証実験として、青、緑、赤色の蛍光色素で染色した PC 3 (前立腺癌腫瘍細胞株) 細胞群を用意し、90%の効率で3つの単一細胞を区画化することに成功した(図 2)。AEMA を活かしてインデックス配列を持つバーコードビーズと細胞を一つのマイクロウェルに確実にトラップすることで、各細胞を効率良く標識することが可能になる。

1 細胞解析を医療への応用として、安定的に細胞を保持できる EMAB (EMA with barrier) を開発し、液状化細胞診法の検討を行った。既存の EMA では、誘電泳動を切ると捕捉された細胞が流れ出してしまう問題があったため、導電率が高い細胞解析用試薬をデバイス内に導入することが困難であった。この課題に対して、各マイクロウェルの後ろに微小壁を形成することで捕捉した細胞を安定的に保持できる EMAB を開発した。EMAB では、誘電泳動を切ったときに、捕捉された細胞が微小壁に引っかかることで、細胞を安定的に保持することが可能である。EMAB を用いた実証実験として、子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞を用いた免疫染色を行った。具体的には、臨床応用を視野に HPV 感染マーカーとして子宮頸部前癌病変の検出で利用されている p16 と、増殖マーカーである Ki67 の 2 重染色を、EMAB を用いて行った。p16/Ki67 マーカーは子宮頸部病変診断において臨床応用されており、細胞診の補助診断として用いられている。HeLa 細胞を EMAB に捕捉した後、免疫染色用の様々な試薬をデバイスへ順番に導入することで、1 細胞捕捉・細胞固定・透過処理・染色の一連のプロセスをデバイス上で行うことが可能になり、1 細胞免疫染色を高精度で実現することに成功した(図 3)。

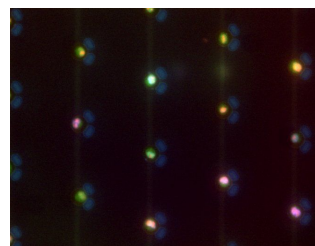


図 3 EMAB を用いた一細胞解析

【Index 配列導入法の確立】

Linear polyacrylamide (LPA)オリゴを、インクジェット式ナノリットルスポッターを用いてマイクロデバイスへスポットングする方法を確立した。スポットングした LPA オリゴは、ダウンストリームの実験においてマイクロデバイス内での溶液の交換が可能となることが求められる。そのために、LPA オリゴをアガロースゲルと混合し、その溶液をスポットングしてゲル化させることで、高分子の LPA オリゴがアガロースゲル内に保持することが可能になる。ピエゾアクチュエータを用いたインクジェットタイプのナノスポッターを用いて、LPA オリゴアガロース溶液をスポットングした上にさらにアガロース溶液をスポットングしてカバーすることで、溶液中においても拡散を防ぎ LPA オリゴをゲル内に保持できることを確認した。しかし、ノズル径 125 μ m のノズルを用いた場合、ノズル先端部においてアガロース溶液の温度が低下し、乾燥、増粘、ゲル化する事などによって詰まりなどが起こり、スポットングが不安定であった。そこで、度調節器とシリコンラバーヒーターをインクジェットヘッドに固定し、ノズル部を部分的に加熱しアガロース溶液を加温して詰まりを防ぐことで、PDMS マイクロウェルに吐出量 4 nl/drop でのスポットングが実現できた。これにより、細胞破碎後に RT 反応を行うためにウェル内の温度を上昇させるのにもなって、Index オリゴをゲルからリリースさせることにより、個々の細胞毎に異なる Index を付加した cDNA の合成が可能となる。

【picoCAGE プロトコルの開発】

定量ハイスループット遺伝子発現解析法である Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 方法は、テンプレートスイッチングオリゴヌクレオチド (TS オリゴ) とランダム逆転写プライマー (RT プライマー) を用いて、cDNA の両末端にアダプターを導入し、増幅・配列決定をすることで、定量ハイスループット遺伝子発現解析が可能である。CAGE 法の特徴は、RT プライマーの末端をランダムにすることで、ヒストン mRNA やノンコーディング RNA などの非ポリアクリル化 RNA の解析が可能であり、TS オリゴを用いることで高い特異性でキャップ付き mRNA 末端を解析することが可能である。そこで、ナノグラム量の total RNA を解析可能な nanoCAGE 方法では、TS オリゴの配列に Unique Molecular Identifiers が含まれており、シーケンスデータ中の PCR 重複を除去することで 1 分子計数を行うことができる。本研究では、マイクロウェルに捕捉した単一細胞のトランスクリプトーム解析方法として、nanoCAGE 法をさらに改良し単一細胞からのピコグラムの RNA から CAGE 解析が可能な picoCAGE 方法を開発した。特に、RT プライマーと TS オリゴにそれぞれ Index 配列を入れることで、Index 配列の組み合わせで各細胞を効率よく標識することができる。

まず、picoCAGE の反応条件を網羅的に検討するため、Labcyte Echo 525 を利用して様々な濃度の RT プライマーと TS オリゴとを用いた反応効率と、逆転写酵素である SuperScript III (SS III) と SuperScript IV (SS IV) の反応効率の検討も行った (図 4)。384 ウェルプレートの各ウェルに様々な濃度 RT プライマーと TS オリゴを入れた後、64 個のバーコード配列と 6 個のインデックス配列の組み合わせで各ウェルを識別した。ウェルプレートで逆転写反応とテンプ

レートスイッチング反応を行った後に、バーコード配列とインデックス配列を含む cDNA を回収し、次世代シーケンサでシーケンスする事で、RT プライマーと TS オリゴの濃度による反応効率を確認した。検討の結果、1 細胞からの RNA を解析するためには SSIV を用いた反応が適切であることを確認した。これにより、picoCAGE の反応を用いて単一細胞からの RNA から CAGE 解析が可能であることを確認した。

さらに、RNA の全ての配列を解析するため、Oxford Nanopore MinION シーケンサーを用いた picoCAGE 方法を確立した。具体的には、RT プライマーと TS オリゴに Nanopore の標準配列を導入し、Labcyte Echo を用いて反応条件の検討による最適化することで、picoCAGE 方法を確立した。picoCAGE のベンチマーク実験のため、すでにその濃度と長さが分かっている External RNA Controls Consortium (ERCC) スパイクイン合成 RNA コントロールを用いてシーケンスライブラリーを生成し、Oxford Nanopore MinION シーケンサーで解析した結果、ERCC 合成コントロールによる良好な検出感度、良好なアライメント精度 (~ 85%) 満足できる総検出遺伝子数(7000 ~ 14000 個)などが確認できた。最後に、単一細胞(マウス 3T3 細胞 29 個、ヒト CAPAN-2 細胞 54 個 + ERCC スパイク 5%)から得られた 83 個のバーコード付き逆転写産物のプールから調製した picoCAGE ライブラリーのシーケンスに成功した。

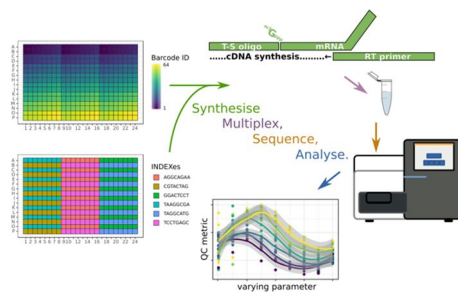


図 4 picoCAGE 方法の概念図と
反応条件の網羅的な検討

【子宮頸癌への応用】

ヒトパピローマウイルスに感染された患者に対して、HPV 遺伝子の宿主へのインテグレーションの状態と腫瘍化との相関など解析するため、宮頸部組織検体を用いた CAGE 解析を行い、一塩基解像度で HPV が持つトランスクリプトームの転写開始点 (TSS) パターンを視覚化した。TSS パターンは 2 つあり、HPV 早期プロモーター優位の A、後期プロモーター優位の B パターンと名付けた。B パターンであった臨床検体は子宮頸部の病変が後退して正常化していた。また複合感染型でも同様のパターンをそれぞれの HPV が発現していることもわかった。ウイルスの TSS パターンを視覚化することで病勢を評価できることがわかった。病勢を評価した診断が可能となる可能性が高いことを確認した。

また、マイクロ流体デバイスを用いて液状化細胞診サンプルの解析を行うことで病変の進行を評価できるシステムを開発した。子宮頸部異形成・子宮頸癌患者の子宮頸部より採取した擦過細胞を固定後、p16/Ki67 二重免疫染色を施行し、デバイス内で細胞を捕捉・観察を行なった。マイクロ流体デバイスと誘電泳動を利用することで、不均一な形状を持つ細胞や細胞塊を高効率で捕捉可能であることが可能である。高リスクヒトパピローマウイルス検査陽性の液状化細胞診サンプルを用いた評価を行なった結果、細胞集団における診断マーカーの p16 と Ki67 の染色陽性染色細胞は、子宮頸部病変の重症度に応じてそれぞれ増加することが確認でき、マイクロ流体デバイスによる p16/Ki67 二重免疫染色が診断に使用可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 11件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Danoy Mathieu, Tauran Yannick, Poulain Stéphane, Jellali Rachid, Bruce Johanna, Leduc Marjorie, Le Gall Morgane, Gilard Françoise, Kido Taketomo, Arakawa Hiroshi, Araya Karin, Mori Daiki, Kato Yukio, Kusahara Hiroyuki, Plessy Charles, Miyajima Atsushi, Sakai Yasuyuki, Leclerc Eric	4. 巻 118
2. 論文標題 Multi omics analysis of hiPSCs derived HLCs matured on chip revealed patterns typical of liver regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 3716 ~ 3732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.27667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Poulain Stephane, Arnaud Oph?lie, Kato Sachi, Chen Iris, Ishida Hiro, Carninci Piero, Plessy Charles	4. 巻 48
2. 論文標題 Machine-driven parameter screen of biochemical reactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e37 ~ e37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Taguchi Ayumi, Nagasaka Kazunori, Plessy Charles, Nakamura Hiroe, Kawata Yoshiko, Kato Sachi, Hashimoto Kosuke, Nagamatsu Takeshi, Oda Katsutoshi, Kukimoto Iwao, Kawana Kei, Carninci Piero, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Use of Cap Analysis Gene Expression to detect human papillomavirus promoter activity patterns at different disease stages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75133-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Park Jongho, Komori Takayuki, Uda Toru, Miyajima Keiichi, Fujii Teruo, Kim Soo Hyeon	4. 巻 11
2. 論文標題 Sequential Cell-Processing System by Integrating Hydrodynamic Purification and Dielectrophoretic Trapping for Analyses of Suspended Cancer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 47 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11010047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi Makoto, Nagasaka Kazunori, Yoshida Mina, Kawata Yoshiko, Miyagawa Yuko, Tago Saori, Hiraike Haruko, Wada-Hiraike Osamu, Oda Katsutoshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, Ayabe Takuya, Kim Soo Hyeon, Fujii Teruo	4. 巻 13
2. 論文標題 On-chip immunofluorescence analysis of single cervical cells using an electroactive microwell array with barrier for cervical screening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 044107 ~ 044107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5089796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kim Soo Hyeon, Ito Hiroshi, Kozuka Masahiro, Takagi Hidenori, Hirai Mitsuharu, Fujii Teruo	4. 巻 19
2. 論文標題 Cancer marker-free enrichment and direct mutation detection in rare cancer cells by combining multi-property isolation and microfluidic concentration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 757 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8LC00772A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lereau Bernier Myriam, Poulain St?phane, Tauran Yannick, Danoy Mathieu, Shinohara Marie, Kimura Keiichi, Segard Bertrand David, Kato Sachi, Kido Taketomo, Miyajima Atsushi, Sakai Yasuyuki, Plessy Charles, Leclerc ?ric	4. 巻 142
2. 論文標題 Profiling of derived-hepatocyte progenitors from induced pluripotent stem cells using nanoCAGE promoter analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 7 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bej.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawata Yoshiko, Nagasaka Kazunori, Matsumoto Yoko, Oda Katsutoshi, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Mori-Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Arimoto Takahide, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Usefulness of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy in the therapeutic management of advanced ovarian cancer patients with massive ascites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 420 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1371-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kim Soo Hyeon, Ito Hiroshi, Kozuka Masahiro, Hirai Mitsuharu, Fujii Teruo	4. 巻 11
2. 論文標題 Localization of low-abundant cancer cells in a sharply expanded microfluidic step-channel using dielectrophoresis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 054114 ~ 054114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.4998756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Antfolk Maria, Kim Soo Hyeon, Koizumi Saori, Fujii Teruo, Laurell Thomas	4. 巻 7
2. 論文標題 Label-free single-cell separation and imaging of cancer cells using an integrated microfluidic system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kim, S.-H., and Fujii, T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Efficient Analysis of a Small Number of Cancer Cells at the Single-cell Level using Electroactive Double-well Array	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 2440-2449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C6LC90066F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 13件)

1. 発表者名 S. Tago, K. Iizuka, T. Mitsunaka, D. Sato, T. Shindo, T. Fujii and S. H. Kim
2. 発表標題 Two-dimensional flow cytometry realized by using an array of time-gated single photon avalanche diodes
3. 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 C. Trzeciakowski, D. Sato, T. Shindo, T. Mitsunaka, Y. Fujimoto, K. Iizuka, S. Tago, T. Fujii and S. H. Kim
2 . 発表標題 Parallelized flow cytometry realized by array of time-gated single photon avalanche diodes
3 . 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2020) (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 D. Sato, T. Shindo, T. Mitsunaka, Y. Fujimoto, K. Iizuka, S. Tago, Y. Takayama, T. Fujii and S. H. Kim
2 . 発表標題 Integrated parallel flow cytometry device with time gated spads
3 . 学会等名 Transducers 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 H. Saito, S. H. Kim, I. Tsuchiya, S. Nagasawa, M. Seki, Y. Komazaki, T. Torii, Y. Suzuki and T. Fujii
2 . 発表標題 Integration of on-chip cluster purification and compartmentalization for rna-seq analysis of cluster
3 . 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2019) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 S. H. Kim, M. Yoshida, S. Tago and T. Fujii
2 . 発表標題 Efficient pairing of single cells using trap-and-drop microwell array
3 . 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 C. J. Park, S. H. Kim, T. Fujii
2 . 発表標題 Electroactive microwell array for separate trapping of single cells and clusters
3 . 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 C. Plessy, S. Poulain, S. Kato, O. Arnaud, P. Carninci
2 . 発表標題 Machine-driven parameter-space exploration of biochemical reactions
3 . 学会等名 41st annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 S. H. Kim, T. Mitsunaka, Y. Fujimoto, K. Iizuka and T. Fujii
2 . 発表標題 Addressable electroactive microwell array capable of deterministic combinatorial trapping of single cells
3 . 学会等名 Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 S. H. Kim, H. Ito, M. Kozuka, H. Takagi, M. Hirai and T. Fujii
2 . 発表標題 Highly efficient rare cancer cells isolation and concentration by combining label-free isolation and dielectrophoretic concentration in a microfluidic step-channel
3 . 学会等名 Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 M. Takeuchi, S. H. Kim, K. Nagasaka, M. Yoshida, Y. Kawata, K. Oda and T. Fujii
2 . 発表標題 Highly efficient trapping and analysis of rare cells using an electroactive microwell array with barriers
3 . 学会等名 Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 S. H. Kim, T. Mitsunaka, Y. Fujimoto, K. Iizuka and T. Fujii
2 . 発表標題 Highly efficient compartmentalization of multiple single cells using addressable electroactive microwell array
3 . 学会等名 2017 meeting on Single Cell Analyses (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 S. H. Kim, M. Yoshida, and T. Fujii
2 . 発表標題 Label-free selective trapping of single cancer cells using electroactive microwell array
3 . 学会等名 Proceedings of 9th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 M. Takeuchi, S. H. Kim, K. Nagasaka, M. Yoshida, Y. Kawata, K. Oda, T. Fujii
2 . 発表標題 Highly Efficient Trapping and Analysis of Rare Cells using an Electroactive Microwell Array with Barriers
3 . 学会等名 The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Fujii
2. 発表標題 Microfluidics for Innovative Biological Experimentations - from Single Cell Analysis to Organ-on-a-Chip
3. 学会等名 The 9th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金秀炫, 藤井輝夫
2. 発表標題 希少細胞の1細胞解析を実現するマイクロ流体デバイスの開発
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ogata, K., Kim, S.-H., and Fujii, T.
2. 発表標題 Electroactive trap-well array coupled with PDMS reaction-well array allows highly efficient single-cell trapping followed by on-chip analysis with a controllable dilution ratio of cell lysates
3. 学会等名 MicroTAS2016 conference (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Antfolk, M., Kim, S.-H., Saori, K., Kaneda, S., Fujii, T., and Laurell, T.
2. 発表標題 An integrated acousto- and dielectrophoresis device for tumor cell separation, concentration, and single-cell trapping
3. 学会等名 MicroTAS2016 conference (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計10件

産業財産権の名称 生体粒子捕集装置	発明者 満仲健、飯塚邦彦、 幡井徹也、藤井輝 夫、金秀炫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-192797	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 流路デバイスおよび流体中粒子解析システム	発明者 満仲健、飯塚邦彦、 幡井徹也、藤井輝 夫、金秀炫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-180308	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 細胞捕捉装置	発明者 藤井輝夫、金秀炫、 朴致済	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-210761	出願年 2018年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 対象物捕捉装置、および対象物捕捉装置ユニット	発明者 飯塚邦彦、満仲健、 藤本義久、藤井輝 夫、金秀炫	権利者 東京大学、 シャープ株式会 社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-085579	出願年 2017年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 液体中微粒子分析システムおよび液体中微粒子分析方法	発明者 飯塚邦彦、藤本義 久、満仲健、藤井輝 夫、金秀炫	権利者 東京大学、 シャープ株式会 社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-149018	出願年 2017年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 細胞捕捉装置	発明者 小森隆幸、金秀炫、 藤井輝夫	権利者 東京大学、NOK株 式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-193145	出願年 2017年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 蛍光検査システム及び細胞検査手法	発明者 飯塚邦彦、藤本義 久、金秀炫、藤井輝 夫	権利者 東京大学、 シャープ(株)
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-211121	出願年 2016年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 蛍光検査システム	発明者 飯塚邦彦、藤本義 久、金秀炫、藤井輝 夫	権利者 東京大学、 シャープ(株)
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-211120	出願年 2016年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 誘電泳動デバイス	発明者 飯塚邦彦、藤本義 久、金秀炫、藤井輝 夫	権利者 東京大学、 シャープ(株)
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-211119	出願年 2016年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 DEPピンセット	発明者 佐藤大紀、飯塚邦 彦、齋藤晶、満仲 健、金秀炫、藤井輝	権利者 東京大学、 シャープ(株)
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-201779	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 粒子捕捉用マイクロデバイス、試料中の粒子を捕捉する方法及びそれを用いた粒子の濃縮、観察又は回収方法	発明者 藤井輝夫、金秀炫、伊藤博史	権利者 アークレイ株式会社、東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7032725号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長阪 一憲 (NAGASAKA Kazunori) (30624233)	帝京大学・医学部・准教授 (32643)	
研究分担者	PLESSY Charles (PLESSY Charles) (60391984)	沖縄科学技術大学院大学・ゲノム・遺伝子制御システム科学ユニット・研究員 (38005)	
研究分担者	Kim SooHyeon (KIM SooHyeon) (80709189)	東京大学・生産技術研究所・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------