

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02790

研究課題名(和文) 光遊離バーコードを用いた時空間的組織細胞解析

研究課題名(英文) Spatial transcriptome analysis using photoreleasing barcodes

研究代表者

橋本 真一 (Shinichi, Hashimoto)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授

研究者番号：00313099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、光応答性人工核酸を使ったバーコードビーズを作製し、同一空間で紐付けされたキャプチャービーズを使用することにより、組織の位置情報を観察し、1細胞の遺伝子発現や変異などの複数の要素を測定可能とすることである。これまで、1細胞レベルでのゲノム中のKras, Tp53の幾つかの変異部位などの任意のDNAの一部が観察に成功した。一方、組織中の細胞の空間情報を維持して解析する為に行ってきた検討に関して、マウス脳組織や乳がん組織の細胞クラスターの情報を持ったまま、解析することにも成功した。現在、核酸をトラップしたビーズの位置情報の観察に一部成功しているが、さらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、光応答性人工核酸を使ったバーコードビーズを開発・作製し、同一空間で紐付けされたキャプチャービーズを使用することにより、1細胞の遺伝子発現や変異などの複数の要素を測定可能とすることである。本法は、組織での位置情報を持った1細胞情報の取得と細胞間の相互作用の関係を明らかでき、この研究はまさに革新的でありマーカー遺伝子の探索、創薬ターゲット、診断、治療法にとって非常に重要である。さらに、我々の開発する方法は、研究室、臨床サイドでも安価かつ簡単に使用できることを利点とする。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to create barcode beads using photoresponsive artificial nucleic acids and capture beads strung in the same space to enable the observation of tissue location information and the measurement of multiple elements such as gene expression and genome mutations in one cell. So far, parts of arbitrary DNA, such as Kras and several mutated sites of Tp53 in the genome at the one-cell level, have been successfully observed. On the other hand, with regard to the studies that have been carried out to maintain and analyse the spatial information of cells in tissues, we have also succeeded in analysing mouse brain tissue and breast cancer tissue with the information of the cell clusters. Currently, we have partially succeeded in observing the positional information of nucleic acid-trapped beads, but further validation is required.

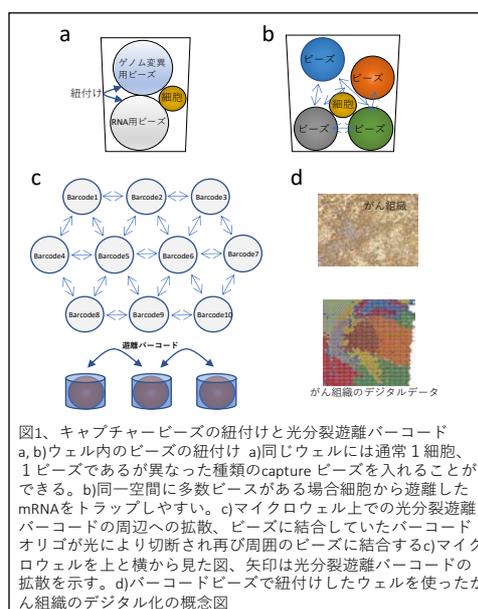
研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：single cell spatial transcriptome microenvironment cancer Genome mutation

## 1. 研究開始当初の背景

組織や細胞の複雑性/多様性を特徴付けるために最近、1細胞の解析手法が多く開発されている。しかしながら数千から数万の細胞を調べる包括的な解析では、遺伝子発現の感度ならびに、1細胞中の複数の要素を簡単にかつ同時に測定できる状態には至っていない。また、組織内の細胞の空間的位置は生理機能に強く関与するが、位置情報をもった1細胞のデータが欠けている。これらの問題を解決する為、本研究では、光分裂オリゴバーコードを使用し空間内にあるバーコードビーズを紐付けすることでこれらの問題点を解決する研究を提案する。

現在の1細胞解析法の多くはRNAやDNAをキャプチャーする担体を使用するが、1細胞に対して1つの担体を使用されているのが現状であり、1種類の担体に依存した解析になる。そこで、それぞれのビーズに結合しているバーコードオリゴが光により遊離する光分裂オリゴバーコードを用い、周辺のビーズだけに結合することによって、ビーズ同士の空間位置情報を紐付けすることを考えた(図1ac)。本研究では、このオリゴバーコードを光切断修飾因子を用いて作製すると共に多要素を同時に測定出来るビーズを開発する。この方法は、遺伝子とゲノム変異など複数の要素を測定可能(図1b)とするが、さらにウェル内に入っているビーズを紐付けし、それぞれのビーズの位置情報を相対的に把握できれば組織切片においても利用可能である(図1c)。最終的に本法を使用し、特にがん微小環境における細胞の多様性について複数の要素を交えて詳細に検討する(図1d)。この研究はまさに革新的でありマーカー遺伝子の探索、創薬ターゲット、診断、治療法にとって非常に重要である



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、光応答性人工核酸を使ったバーコードビーズを開発・作製し、同一空間で紐付けされたキャプチャービーズを使用することにより、1細胞の遺伝子発現や変異などの複数の要素を測定可能とすることである。また、ウェル内に入っているビーズを紐付けし、それぞれのビーズの位置情報を相対的に把握することで、組織切片においても測定することを目的とする。最終的に本法を用いて、特にがん微小環境における細胞の多様性について複数の要素を交えて詳細に検討する。具体的には、まず、1細胞レベルでのゲノム変異と細胞変化の相関を調べる。また、がん組織での位置情報を持った1細胞情報の取得と細胞間の相互作用の関係を明らかにする。学術的独自性と創造性としては、FISH-seqのような位置情報を担保しながら1細胞解析する方法は、世界でいくつか開発されている。一方で、我々も組織の1細胞解析は図1で述べたように近隣にあるcaptureビーズをお互い認識出来ることで、ウェル内だけでなく病理組織のような2次元のシート状でも展開できる。すなわち、整列したウェル内に入っているビーズを紐付けすることで、captureビーズの相対的な位置情報が把握できる。このことは、予め位置情報を保持している基板を利用するVisiumやビーズを利用するSlide-seqと同様な解析が可能となる。しかし、今までの方法は基板やビーズを予めシークエンスすることでコスト的にも非常に高額になり、どこの研究室でも使用できる技術ではない。我々の開発する方法は、研究室、臨床サイ

ドでも安価かつ簡単に使用できることを利点とする。

### 3. 研究の方法

ウェル内の複数ビーズによる紐付け：10  $\mu$  m 径のバーコードビーズを用意し、45  $\mu$  m 径のウェルに複数個になるように挿入した。それぞれのビーズはビーズ特有の光切断性バーコードオリゴ配列を含むように設計された。また、このビーズは、オリゴ dT と末端が polyA を含んだ光切断性バーコードオリゴ配列を有している。330nm の光照射し、ウェル内のそれぞれのビーズを紐付けし、ウェルを洗浄後に単一細胞を付加してアッセイを行った。

ウェル間のビーズによる紐付け：10  $\mu$  m 径のバーコードビーズを用意し、15  $\mu$  m 径のウェルに1個になるように入れた。それぞれのビーズはビーズ特有の光切断性バーコードオリゴ配列を含むように設計されている。上記と同様に光を照射し、ウェル外に拡散するようにした。その後、ビーズを回収して近接したウェルかどうかを観察できるかを検討した。

フィルターメンブランによる組織の解析(図2)：生検のサンプルは、非常に小さい為、単一細胞解析において分散が難しい場合がある。本法は、生検サンプルをフィルターメンブランに固定化し、ウェルに対して上から垂直方向に遺伝子をマイクロウェルに移動させるので、組織を1細胞に分散した場合と同様な結果が得られる。今回、マイクロウェル(ウェル径；45  $\mu$  m)と32  $\mu$  m 径のバーコードビーズを使用した。図2に示すように凍結組織を10  $\mu$  m にスライスし、フィルターメンブランに接着させた。その後、直ちにメンブランをメータノールで固定し、バーコードビーズの入ったマイクロウェルに貼り付けた。今回、研究開発に用いた検体は、マウスの乳がんモデルである MMTV-PyMT マウスのがん組織を用いた。マイクロプレートの貼り付けたメンブランの上から濾紙を載せ、続いて Lysis buffer を加えた。5 分間放置し、組織から mRNA を溶出させ capture ビーズにトラップさせた。その後、ビーズを回収しバーコードとキャプチャーした mRNA を NGS にてシークエンスした。

ゲノム変異は配列 capture ビーズ：p53 と kras 変異部分に相補的なオリゴを合成しバーコードビーズを作製した。加えてゲノム変異と mRNA の双方を同時に観察するための capture ビーズを作製した。これは、調べたいゲノム配列の相補的なオリゴとオリゴ dT を両方、アビジン-ビオチンの系を用いてビーズに連結し作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) ウェル内の複数ビーズによる紐付け

①光照射し、ウェル内のそれぞれのビーズを紐付けしたものに関して、まず細胞を付加しない状態で解析を行った。それぞれのビーズについているバーコードを計算したところ非特異な結合が多数確認され、現在、光照射時間やウェル内のビーズ数等、非特異的な結合を軽減する検討を行っている。さらに細胞を入れた状態でも上記同様、非特異が確認され合わせて検討中である。

#### ②ウェル間のビーズによる紐付け

図3に示すように紐付けバーコードが拡散しやすいようにマイクロウェル間同士にトンネルがあるデバイスを作製した。10  $\mu$  m 径のバーコードビーズを用意し、15  $\mu$  m 径のウェル(図3d)

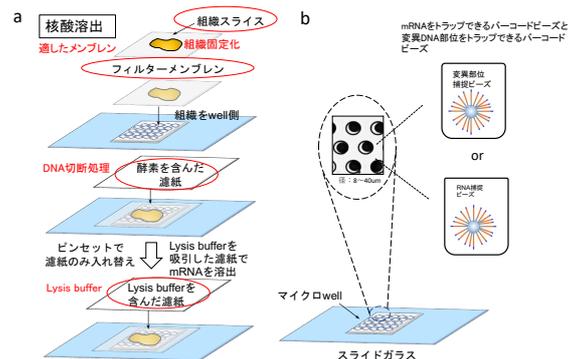


図2 組織からそのまま細胞内の核酸を抽出する方法。a) 組織切片を特殊なフィルターメンブランに接着させ、メンブラン上で核酸を加工し、それをマイクロウェル上に接着させる。その後、DNAまたはmRNAをウェル中のキャプチャービーズに上から垂直方向に移動させ、核酸をトラップする。b) 核酸をキャプチャーするビーズは、変異部分に特異的な配列を持ったバーコードビーズまたはoligo(dT)を持ったバーコードビーズをウェルに配置する。

に 1 個入るように挿入した。それぞれのビーズはビーズ特有の光切断性バーコードオリゴ配列を含むように設計されている。光を照射しウェル外に紐付けバーコードオリゴが拡散した後、ビーズを回収して近接したウェルのビーズが観察できるかを検討した。光照射によりビーズから遊離したバーコードオリゴが周囲に拡散し、近接したビーズにトラップされる。用度勾配に従って近接したバーコードオリゴがコピー数が多いことを利用してその位置関係を計算した(図 3e)。図が示す通り相対的な紐付けが観察され、

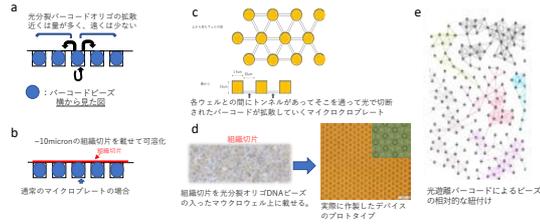


図3. 組織の細胞情報を測定するデバイス。a. マイクロウェルに挿入された光切断性バーコードビーズに光を当てると光切断性バーコードが拡散する。近接したビーズに光切断性バーコードが結合する。そのバーコード数を測定することでビーズ間の距離を推定する。b. 組織切片をマイクロプレートに載せ可溶化して細胞由来のmRNAをビーズに結合させる。c. 光切断性バーコードが方向性をもって拡散するように作製したマイクロウェル。d. 組織切片を解析する際のイメージ。e. 光照射によりビーズから遊離したバーコードオリゴが周囲に拡散し、近接したビーズにトラップされる。用度勾配に従って近接したバーコードオリゴがコピー数が多いことを利用して計算した一例

本法により位置情報が得られる可能性が示唆された。しかしながら、紐付けが出来ていないウェルが多数確認されたことから、本法ではさらに拡散の時間や非特異なシークエンスの調整が必要であることが明らかとなった。今後、この点についてもさらに検討する。

### (2) フィルターメンブレンによる組織による 1 細胞発現解析(メンブレン-seq)

組織による解析では、メンブレンに接着させた組織を、キャプチャービーズを引き詰めたマイクロプレートに接着、Lysis buffer によって上から垂直方向に核酸を移動させてキャプチャービーズにトラップさせ、細胞のクラスターが観察できるかを調べた(図 4)。フィルターメンブレンに接着させた組織の可溶化を検討した結果、0.4%ドデシル硫酸ナトリウムまたは0.1%SDSでの可溶化がRNAの溶出に良く capture ビーズへの mRNA の結合が多く認められた。しかし、検討した組織によりその効率が異なるため、検体によりその都度検討する必要がある。これらの条件で、マウス乳がんの原発組織と転移組織について検討した結果、細胞クラスターの情報を持ったまま、ビーズに mRNA を結合させることに成功した。図 4 は、組織スライスとメンブレン-seq の結果である。乳がんの原発と肺転移組織それぞれから 10 以上の細胞のクラスター観察された。これらの結果は、組織からの mRNA を 60  $\mu$ m のウェル内に落としたことからおよそその中には 1 から数個の細胞が含まれている。今後、複数の細胞入ったウェルの細胞種の比率についていくつかの解析プログラムで解析し、どの細胞同士が近接しているかを調べ、細胞間相互作用を解析する。また、継続して多様な臨床検体で検証も含めて解析を進めている。さらに今後、細胞の位置情報を得る検討を行う。

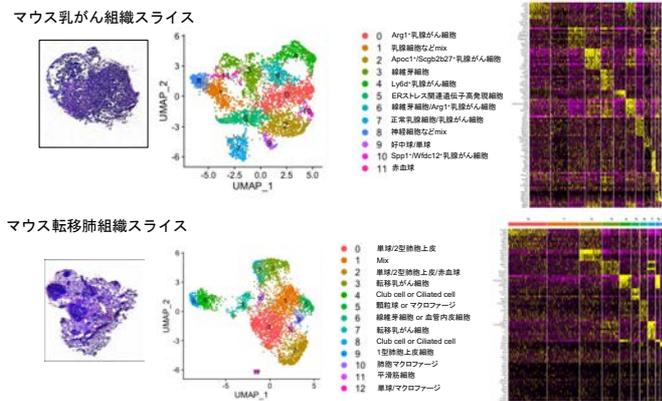


図4. メンブレンに接着させた組織からのmRNAの溶出、組織からバーコードビーズの入ったマイクロプレートにmRNAを垂直方向に溶出し、解析した。mRNAの水平方向への漏れはなく、組織の位置のまま細胞がクラスター化している。

### (3) ゲノム変異ビーズの作製

がん微小環境における細胞の多様性

についてゲノム変異の要素を交えて検討した。作製したゲノム変異 capture ビーズに細胞のゲノム変異 DNA 部分がトラップ出来るかを細胞のゲノム DNA の処理法も含めて検討した。その結果、メタノールによる固定、さらには、DNaseI を含んだいくつかの制限酵素でゲノム DNA が切断、1 本鎖になり Kras, Tp53 の幾つかの変異部位が作製したビーズにトラップされることが確認された。さらに変異部位多様な配列に関して検討を進めていくとともにメンブレンに接着させた組織においてもゲノムの溶出できるかを詳細に検討する。今後、これらの結果をもとに、1 細胞の遺伝子発現や変異などの複数の要素を測定可能とすると共に細胞の位置情報を相対的に把握できるようにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今福 匡司, 岩淵 禎弘, 橋本 真一
2. 発表標題 Development of the tissue section-based transcriptomics analysis for metastatic lung tissue
3. 学会等名 第83回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今福 匡司, 岩淵 禎弘, 橋本 真一
2. 発表標題 Development of the section-based transcriptomics analysis without enzymatic treatment for single-cell dissociation
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Single cell analysis
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今福 匡司, 岩淵 禎弘, 橋本 真一
2. 発表標題 Investigation the association between tumor cells and macrophages by the tissue section-based transcriptomics analysis for metastatic lung tissue of MMTV-PyMT mice
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Cancer Immunology and Immunotherapy
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 組織の核酸の構成を解析するための解析プレート	発明者 橋本 真一, 岩淵禎弘, 今福匡司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-099093	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	高村 禪  (Takamura Yuzuru)  (20290877)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授    (13302)	
研究分担者	藤渕 航  (Fujibuchi Wataru)  (60273512)	京都大学・iPS細胞研究所・教授    (14301)	

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