

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14516

研究課題名(和文)細胞間相互作用の理解に向けたin situ 1細胞タイムラプスRNA-seqの開発

研究課題名(英文)Development of in situ single-cell time-lapse RNA-seq for understanding cell-cell interactions

研究代表者

金子 泰洸ポール (Kaneko, Taikopaul)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：80873504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間相互作用は、遺伝子発現に動的に作用して細胞の機能や運命を転換させる重要な因子であるが、既存の1細胞遺伝子解析技術(scRNA-seq)ではある時刻における遺伝子発現のスナップショットしか得られないため、細胞間相互作用が細胞機能・運命を決定する分子カスケードについては十分に理解されていない。そこで本研究では、細胞を生かしたままその場でmRNAを抽出し、次世代シーケンス解析できる「in situ 1細胞タイムラプスRNA-seq法」の開発を行なった。要素技術として、ナノ局所電気穿孔法による非殺傷的なmRNA抽出技術と、細胞画像と遺伝子発現の統合解析が可能なカラーコードの技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、静的な遺伝子発現の情報しか得られない既存の1細胞遺伝子解析技術の限界を打破するものであり、これまで得ることが出来なかった遺伝子発現の実時間変動の計測を可能にする点で学術的意義が大きい。本研究で開発するin situ 1細胞タイムラプスRNA-seq法は、例えばがん細胞が免疫細胞から逃れる能力を獲得する過程など、がん細胞の免疫逃避能の分子機序の理解にも役立つと考えられ、その社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Cell-cell interactions are critical factors that temporally influence patterns of gene expression and thereby alter cellular function and fate. However, existing single-cell RNA sequencing techniques only provide snapshots of gene expression at a single time point, leaving the molecular cascades through which cell-cell interactions determine cellular function and fate poorly understood. To address this limitation, we developed in situ single-cell time-lapse RNA-seq, which allows in situ mRNA extraction from living cells and subsequent next-generation sequencing analysis. As elementary technologies, we have established a non-lethal mRNA extraction method using nano-localized electroporation and a color-coding method that allows joint profiling of cellular images and transcriptomes.

研究分野：ナノバイオエンジニアリング

キーワード：時系列RNA-seq ナノ局所電気穿孔 カラーコード 細胞間相互作用 細胞画像と遺伝子発現の統合解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含むあらゆる生物は多細胞生物であるが、これらを多細胞生物たらしめているのが細胞間相互作用である。組織・器官は異種の細胞集団から構成されており、これらの細胞集団が動的に相互作用することで、様々な機能や形態を生み出している。

これまでに1細胞遺伝子発現解析やイメージング技術により、細胞間相互作用に関わる遺伝子群や相互作用ネットワークの一端が解明されてきた。しかし、例えばがん細胞が免疫細胞から逃れる能力を獲得する場合など、細胞間相互作用がどのような機序で遺伝子発現を変化させて細胞機能の転換を引き起こすかについては、未だ理解が十分ではない。これは、現状の遺伝子発現解析で得られるのはある時刻での遺伝子発現のスナップショットに過ぎないため、細胞間相互作用と遺伝子発現がどのように影響し合っているのかを調べることが困難なためである。

2. 研究の目的

細胞を生かしたままその場で mRNA をサンプリングすることで、細胞間相互作用と遺伝子発現変化の影響関係を調べることができる「in situ 1細胞タイムラプス RNA-seq 法」を新規に開発することを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

提案する in situ 1細胞タイムラプス RNA-seq 法の確立に向けて、以下の(1)、(2)の要素技術の開発を行なった。

(1) ナノ局所電気穿孔法による mRNA の非殺傷的サンプリング法の開発

直径約 100 nm の微小な穴 (ナノポア) を有する絶縁性ポリマー膜 (ナノポア膜) に細胞を接触させて電圧を印加すると、ナノポアに電場が集中して細胞膜に直径数 10 nm の穴が生じる。この穴は可逆的に塞がるために、細胞の活動を停止させることなく、mRNA やタンパク質などの分子をサンプリングすることが可能である。本研究では市販の浄水フィルター (トラックエッチドメンブレン) を用いることで、低コストかつ簡便に構築可能なナノエレクトロポレーション実験系を開発した。

(2) 1細胞ごとに mRNA を分画して回収可能な DNA バーコード付きマイクロビーズの開発

抽出した mRNA は、ポリ A 配列を介して DNA バーコード付きのマイクロビーズに捕捉することで、1細胞ごとに分画して回収する。ビーズ表面に捕捉された mRNA は、逆転写および PCR による増幅により、バーコード配列を付与して識別する。ビーズを入れ替えて繰り返し mRNA をサンプリング・分画回収することで、各細胞の遺伝子発現の時系列変化を取得可能である。各時刻での細胞の位置と mRNA を補足したビーズの固有 ID との対応を得るために、以下の2つの機能を開発した。

(2-1) 光学顕微鏡および次世代シーケンスで読み出し可能なカラーコードの開発

DNA バーコードの配列と対応した蛍光波長を持つ、カラーコードビーズを開発した。DNA バーコードの配列を特定の蛍光分子の組み合わせへと変換する branch オリゴを設計することで、in situ hybridization の原理で蛍光分子をビーズへと修飾した。4種類の蛍光色素の組み合わせにより、合計で $2^4 = 16$ 通りのカラーコードを有するカラーコードビーズを開発した。

(2-2) 隣り合っていたビーズの組み合わせを記録するプロキシ配列の導入

抽出した mRNA は DNA バーコードビーズの単層シートで捕捉させて回収し、次世代シーケンス解析後にビーズの配置を再構築することにより、遺伝子発現の空間情報を得て、細胞間相互作用の様子を記録する。前述のカラーコードによりビーズの配置を記録可能であるが、1 cm 四方のビーズシートを用いる場合、ビーズの総数は 10^4 個程度になるために、16通りのカラーコードのみでは各ビーズを重複なしに識別することができない。そこで、隣り合うビーズのバーコード配列が連結するような相補鎖配列 (プロキシ配列) を導入することで、隣接ビーズのバーコードの組合せを記録する。互いに近接している7個のビーズの色の組み合わせは $16^7 \approx 10^8$ 通りあるので、総数が 10^4 個でも各ビーズの識別が可能である。

4. 研究成果

(1) ナノ局所電気穿孔法による mRNA の非殺傷的サンプリング法の開発

ナノ局所電気穿孔法による非殺傷的な mRNA 抽出条件の最適化を行い、次世代シーケンス解析が可能な量の mRNA の抽出を細胞の生存率を損なわずに行うことができる実験条件を探索した。具体的には、細胞に印加するパルスの波形、使用するバッファの組成を網羅的に検討した。結果、印加パルスの波形が細胞の生存率および mRNA の抽出量に大きく影響を与えることが分かり、電圧が三段階で変化する多段矩形パルスが最適であることを見出した。最適化された三段

階パルス波形を用いた場合、1細胞あたり0.4 pg程度のRNAを抽出可能であり、かつ生存率を80%に保つことができた。

また、バルク抽出でナノ局所電気穿孔法による時系列RNA-seq解析を行った。細胞周期を同期させたHeLa/Fucci2細胞に対し約4時間ごとにナノ局所電気穿孔を行ない、回収したmRNAからcDNAライブラリ調整および次世代シーケンスによるRNA-seq解析を実施した。結果、S期マーカー遺伝子(PCNA)が時間経過とともに発現レベルが変動する様子が観察され、その増減のタイミングは蛍光プローブの輝度から推測される細胞周期と対応していた。これより、ナノ局所電気穿孔で遺伝子発現の時系列変動を捉えることができることを確認した。

(2) 1細胞ごとにmRNAを分画して回収可能なDNAバーコード付きマイクロビーズの開発

(2-1) 光学顕微鏡および次世代シーケンスで読み出し可能なカラーコードの開発

Alexa488, Alexa555, Alexa647, Alexa750の4色の蛍光が、それぞれ光る/光らないの2通り、すなわち $2^4 = 16$ 通りのカラーコードを有するカラーコードビーズを開発した。カラーコード配列と相補的な配列を持つオリゴを介して、規定された色と数の蛍光修飾オリゴをビーズに結合させた。染色したビーズの蛍光撮影および各チャンネルでの輝度の測定を行ったところ、各ビーズはそれぞれのカラーコードに対応する蛍光を有していることが確認された。

開発したカラーコードビーズを用いて、細胞画像と遺伝子発現の紐付け解析を行った。細胞とバーコードビーズに、光学顕微鏡および次世代シーケンスの両者から読み出しが可能なカラーコードを付与して、細胞とビーズをマイクロウェルに捕捉した後にSeq-Wellによる1細胞遺伝子発現解析を行うことで、細胞画像と遺伝子発現を紐付けた形で読み出した。抗がん剤であるパクリタキセルで処理したHeLa細胞に対して本手法を適用することで、多核体として現れる薬剤応答の不均一性とその背後にある遺伝子発現応答の紐付け解析を行い、結果、多核体を示す細胞群はERストレス関連の遺伝子が高発現しており、アポトーシス誘導されていることが示唆された。これらを論文としてまとめ、Lab-on-a-Chip誌へ出版した。

(2-2) 隣り合っていたビーズの組み合わせを記録するプロキシ配列の導入

シーケンス解析データを用いたビーズ配置の再構築実験を行った。Split-and-pool法によるバーコード配列の大規模合成を行ない、タイプA, Bそれぞれ3,072通りバーコードを持つマイクロゲルビーズを作製した。ビーズ配置の再構築シミュレーションを実施し、3,000個のビーズで形成されたビーズシート(約2 mm x 2 mm)であれば、カラーコード配置の撮影画像とビーズの接続情報を対応づけることで、ビーズの配置を再構築できることを示した。約600個のビーズで形成される小規模のビーズシート(直径1 mm)に対して、カラーコードの配置の撮影と接続情報のシーケンス解析を行うことで、ビーズ配置再構築の実証実験を行った。シーケンス解析で得られた隣接ペアの情報からビーズのネットワークを構築し、ネットワークの構造がビーズの配置を反映しているか検証した。結果、隣接ペアはビーズ間でランダムに形成されているのではなく、実際のビーズの配置をある程度反映していたものの、ノイズ成分が大きいため、再構築の精度は30%程度に留まった。SN比(Signal-to-noise ratio)を向上させるために、ペアの形成に用いる相補配列の融解温度、逆転写反応に使用する逆転写酵素の種類、反応温度の検討を行った。結果、逆転写酵素としてMaxima Hを使用して50°Cで逆転写反応を行った場合にSN比が最大となった。現在は最適な反応条件を用いて、再度ビーズ配置再構築の実証実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchida Arata, Kaneko Taikopaul, Nishikawa Kaori, Kawasaki Mayu, Yokokawa Ryuji, Shintaku Hirofumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Opto-combinatorial indexing enables high-content transcriptomics by linking cell images and transcriptomes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 2287 ~ 2297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d3lc00866e	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Taikopaul Kaneko, Arata Tsuchida, Mayu Kawasaki, Kaori Nishikawa, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Optically color-coded beads for multiplexed co-profiling of image-based phenotype and transcriptome
3. 学会等名 Serendipity Symposium 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Arata Tsuchida, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Ryuji Yokokawa, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Profiling transcriptomic and phenotypic responses to chemical perturbation by opto-combinatorial indexing
3. 学会等名 Serendipity Symposium 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Arata Tsuchida, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Ryuji Yokokawa, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Opto-combinatorial indexing enables high content transcriptomics by linking cell images and the whole transcriptome
3. 学会等名 Physics and Chemistry of Microfluidics, Gordon research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土田新, 金子泰洸, 川崎真由, 横川隆司, 新宅博文
2. 発表標題 DNAバーコード技術を用いた1細胞画像・遺伝子発現量解析の統合1細胞多階層相関解析
3. 学会等名 日本機械学会2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------