

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05411

研究課題名（和文）シンギュラリティ細胞の内部状態を同定するための細胞操作&遺伝子発現解析法の開発

研究課題名（英文）Single cell manipulation and gene expression analysis for "Singularity Biology"

研究代表者

城口 克之（Shiroguchi, Katsuyuki）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00454059

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 75,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、“シンギュラリティ細胞”や“シンギュラリティ現象”が起きる際の細胞の内部状態（遺伝子発現）はどのようなになっているのかという問いに向けて技術開発を行った。まず、顕微鏡観察と1細胞分取を自動で繰り返すロボット「ALPS（Automated Live imaging and cell Picking System）」を開発し、観察した細胞を分取してRNA-seqを実施することで、細胞の動画像と網羅的遺伝子発現のデータセットを同一の細胞から得た。これらのデータにAI解析（深層学習）を適用し、細胞の動画像から遺伝子発現状態を推定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した、細胞の顕微鏡画像から細胞の遺伝子発現状態を推定するアプローチは、より多くの細胞種や状態の推定・同定ができる可能性を示した。細胞を壊さずに細胞の状態を推定できるため、例えば、細胞治療に用いる細胞を移植前に評価することなどに役立つ可能性がある。基礎研究においても、細胞種の同定に用いられてきた分子マーカーが不要になる可能性があり、手順の簡易化やコストの削減になる。さらに、これまでに適切なマーカーを得ることができていない細胞種や状態の同定にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To understand “singularity cell” or “singularity phenomena”, we developed a new technology. We first developed a multifunctional robot, the Automated Live imaging and cell Picking System (ALPS), and used it to perform single-cell RNA sequencing for microscopically observed cells. Using robotically obtained data that linked cell images and the whole transcriptome, we successfully predicted transcriptome-defined cell types and states using cell image-based deep learning. This noninvasive approach opens a new window to determine the live-cell whole transcriptome in real time. Moreover, this work, which is based on a data-driven approach, is a proof-of-concept for determining the transcriptome-defined (omics-based) phenotypes (i.e., not relying on specific genes) of any cell from cell images using a model trained on linked datasets.

研究分野：生物物理学

キーワード：1細胞解析 イメージング 網羅的遺伝子発現解析 AI 機械学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 細胞 RNA sequencing 法が報告されて以来、様々な関連技術が開発され、細胞集団内の個々の細胞の特徴や状態の違いが記述されるなど、生命科学研究に強いインパクトを与えている。一方で、計測する際に対象の細胞を破碎する必要があり、生きた状態での細胞の状態を網羅的に計測することは困難である。生きた細胞を計測するという点では、光学顕微鏡が重要なツールとして広く使われているが、遺伝子網羅的に解析することは難しい。このような状況から、細胞を破碎せずに遺伝子網羅的に解析できる技術が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、“シンギュラリティ細胞”や“シンギュラリティ現象”が起きる際の細胞の内部状態(遺伝子発現)はどのようにになっているのかという問いに向けた技術開発を目的とした。具体的には、細胞を破壊せず、顕微鏡で撮影した細胞の動画像から、網羅的計測により規定される細胞の内部状態を推定する技術の開発を課題とした。この実現により、“シンギュラリティ細胞”の状態を細胞を破壊せずに計測することができる。また、例えば細胞治療に用いる細胞を移植前に評価することなどに役立つ可能性があり、基礎研究においても、細胞種の同定に用いられてきた分子マーカーが不要になる可能性がある。このように、本開発により生命科学研究に新しいツールをもたらすことができる。

3. 研究の方法

顕微鏡観察と1細胞分取を自動で繰り返すロボット「ALPS(Automated Live imaging and cell Picking System)」を開発し、観察した細胞を分取してRNA-seqを実施することで、細胞の動画像と網羅的遺伝子発現のデータセットを同一の細胞から得た。これらのデータにAI解析(深層学習)を適用し、細胞の動画像から遺伝子発現状態を推定した。

4. 研究成果

(1) 自動細胞観察分取ロボットの開発(図1)

細胞の分取を正確に行うために、コンピュータでニードルを操作し、モニタに写る細胞をクリックすることで、その細胞を分取するシステムを開発した。これにより、実験者のトレーニングや操作技術によらず、安定して細胞を分取できるようになった。細胞の密度が濃い時でも、ターゲットとした細胞のみを分取するためには、ニードルで吸い上げる溶液量を少なくする必要があるが、ポンプを調整してより少量の溶液を安定して扱えるようになった。さらに、顕微鏡下で分取した1つの細胞がウェル内に確実に吐き出されたかを確認するために、ニードルの先と細胞がウェル内の溶液に位置した時の様子を観察・記録できるシステムを開発した。この際、通常のウェルでは吐き出される細胞を確認することが困難だったため、市販のウェルに工夫を加えることで、再現良く細胞を確認できるようになった。また、顕微鏡のソフトウェアを用いた細胞の位置計測、細胞分取装置への情報送信、分取装置での分取と吐出し、といったそれぞれの要素を自動化した。

その後、細胞を観察するシステムと分取するシステムの間でシグナルをやり取りできるようにし、全体を統合して制御できるようにした。この結果、細胞の観察 分取 観察、というサイクルの自動化に成功した。この自動システムを用いて、プレート中の96個のウェルそれぞれに1つずつ細胞を分取することができた。この工程にかかる時間、細胞の分取に失敗してしまう率、どのような失敗があるのかなどを評価した。かかる時間は観察・記録するモードに依存するが、96個の細胞を16分程度で分取することができた。また、通常の細胞よりもより大きなもの、そして小さいものも分取できることを確認し、本装置の応用範囲を示した。具体的には、3-300 μm の直径のビーズやオルガノイドを分取することができ、効率は下がるが、より小さな大腸菌(1-2 μm) の分取も実施した。

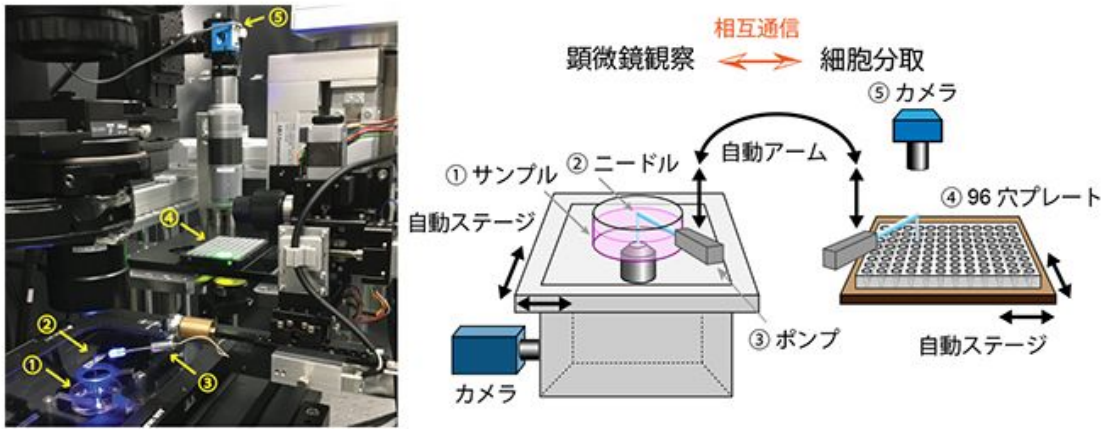


図1 自動細胞観察分取ロボット「ALPS」

細胞観察、画像撮影、細胞位置決定、細胞分取、プレートへの吐出を自動で繰り返すことができるロボット。明視野観察、複数波長での蛍光観察など、顕微鏡の多様な機能を利用できる。細胞の吐出も動画記録することで、一つの細胞が吐出されたことを確実に確認できる。さらに絶対数の少ない細胞や細胞塊などの精製にも利用できる。(理研プレスリリースからの転用)

(2) 網羅的遺伝子発現解析法の改良

網羅的遺伝子発現解析において、これまでに独自に開発してきた DNA 分子バーコードの新しい機能を導入した。分子バーコード法を用いた cDNA ライブラリ合成によるシーケンス結果を得て、細胞内の mRNA の分子数を計数する解析パイプラインの基盤部分を完成させた。また、シーケンシング用のサンプル準備において、独自に開発してきた cDNA を作製する工程を自動分注機にプログラムし、96 個の単一細胞 (1 プレート) から cDNA ライブラリを一度に合成するシステムを構築した。

(3) データの取得と AI (深層学習) を用いた細胞動画からの遺伝子発現状態の推定 (図 2)

実際に 1,000 以上の培養細胞について観察・分取し、その後に網羅的遺伝子発現解析を実施した。細胞を適切にラベルすることにより、観察した細胞画像と網羅的遺伝子発現解析の結果を間違いなく対応できることが確認できた。また、マウスの血液細胞に対しても同様の実験を実施し、本システムが広い範囲のサンプルに応用できることを示した。得られたデータに対して適切な深層学習のモデルとパラメータを選定することで、深層学習を用いて細胞画像から遺伝子発現状態を推定することができた。これは、網羅的な計測から得られる細胞の内部状態を、細胞を壊さずに知ることができる成果である。

さらに、同一細胞から得られた細胞画像と網羅的遺伝子発現データを対象に、深層学習を用いて細胞画像から細胞状態を推定する時、遺伝子発現状態がどの程度異なった場合に、その違いを細胞画像から推定できるかを評価した。また、細胞画像から個々の遺伝子の発現量がどの程度推定できるかも検討した。これまでの成果をまとめ、国際一流紙に発表した (文献 1、特許取得)。

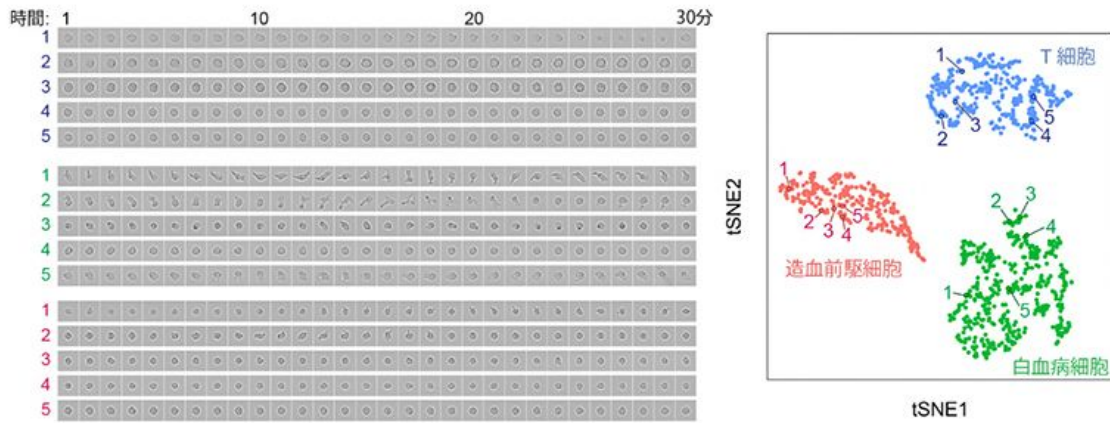


図2 同じ細胞の画像と遺伝子発現解析のデータセット

左図は、T細胞(青)、白血病細胞(緑)、造血前駆細胞(赤)を経時観察して撮影した細胞画像(30分間にわたり1分に1回の撮影)。右図は、観察した細胞をALPSで分取した後に遺伝子発現解析をした結果。t分布型確率的近傍埋め込み法(tSNE法)というデータ解析手法を用いて、遺伝子発現のばらつきを2次元のグラフで表現したもので、一つの点が一つの細胞を示す。遺伝子発現のパターンが三つに分かれ、それぞれの集団が細胞の種類を示している。両方の図で示されている番号は、同じ細胞であることを示している例であり、全ての細胞について、画像と遺伝子発現解析の双方を得ている。(理研プレスリリースからの転用)

(4) ALPSと広視野顕微鏡の統合

細胞の分取システムを領域内で開発した広視野顕微鏡に実装するため、動作範囲に影響する設置位置や、顕微鏡の動きと連携させるための方法などについて検討した。広い視野内に存在する細胞を効率よく分取できるように、ニードルの操作や可動域などを含めて本システムを改良し、広視野顕微鏡と統合した。これにより、たくさんの細胞の中に存在する稀な(特徴的な)細胞を検出、分取することができている。

(5) 領域内外での共同研究

領域内の研究者が“シンギュラリティ現象”を見出しているサンプルに対して本細胞分取システムを適用できるように改良を加え、“シンギュラリティ現象”に関連する目的細胞の分取と、分取した細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。また、領域内外との共同研究として網羅的遺伝子発現を実施し、共同研究の成果発表に貢献した(文献2,3など)。

<引用文献>

- 1) Jin J. et al. “Robotic data acquisition with deep learning enables cell image-based prediction of transcriptomic phenotypes” Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 120 (1) e2210283120 (2022).
- 2) Cui G. et al. “A circulating subset of iNKT cells mediates antitumor and antiviral immunity” Sci. Immunol. 7, eabj8760 (2022).
- 3) Zhang B. et al. “B cell-derived GABA elicits IL-10+ macrophages to limit anti-tumour immunity” Nature 599, 471-476 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nishida Mikako, Yamashita Nahoko, Ogawa Taisaku, Koseki Keita, Warabi Eiji, Ohue Tomoyuki, Komatsu Masaaki, Matsushita Hirokazu, Kakimi Kazuhiro, Kawakami Eiryu, Shiroguchi Katsuyuki, Uono Heiichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Mitochondrial reactive oxygen species trigger metformin-dependent antitumor immunity via activation of Nrf2/mTORC1/p62 axis in tumor-infiltrating CD8T lymphocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e002954 ~ e002954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-002954	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 -

1. 著者名 Zhang Baihao, Vogelzang Alexis, Miyajima Michio, Sugiura Yuki, (), Shiroguchi Katsuyuki, (), Fagarasan Sidonia	4. 巻 599
2. 論文標題 B cell-derived GABA elicits IL-10+ macrophages to limit anti-tumour immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 471 ~ 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-04082-1	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 -

1. 著者名 Ogawa Taisaku, Ochiai Koji, Iwata Tomoharu, Ikawa Tomokatsu, Tsuzuki Taku, Shiroguchi Katsuyuki, Takahashi Koichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Different cell imaging methods did not significantly improve immune cell image classification performance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0262397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0262397	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 -

1. 著者名 Jin Jianshi, Yamamoto Reiko, Takeuchi Tadashi, Cui Guangwei, Miyauchi Eiji, Hojo Nozomi, Ikuta Koichi, Ohno Hiroshi, Shiroguchi Katsuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 High-throughput identification and quantification of single bacterial cells in the microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28426-1	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 -

1. 著者名 Aso H, Nagaoka S, Kawakami E, Ito J, Islam S, Tan B J Y, Nakaoka S, Ashizaki K, Shiroguchi K, Suzuki Y, Satou Y, Koyanagi Y, Sato K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Multiomics Investigation Revealing the Characteristics of HIV-1-Infected Cells In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107887	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 -

1. 著者名 3.Yazaki J*, Kawashima Y, Ogawa T, Kobayashi A, Okoshi M, Watanabe T, Yoshida S, Kii I, Egami S, Amagai M, Hosoya T, Shiroguchi K, Ohara O	4. 巻 48
2. 論文標題 HaloTag-based conjugation of proteins to barcoding-oligonucleotides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1086	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 -

1. 著者名 2.Kimura S*, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi K, Kawakami E, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Yamada T, Hisamoto M, Nakamura M, Udagawa N, Sato S, Kaisho T, Iwanaga T, Hase K	4. 巻 11
2. 論文標題 Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13883-y	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 -

1. 著者名 Miyamoto C., Kojo S., Yamashita M., Moro K., Lacaud G., Shiroguchi K, Taniuchi I., Ebihara T	4. 巻 10
2. 論文標題 Runx/Cbf complexes protect group 2 innate lymphoid cells from exhausted-like hyporesponsiveness during allergic airway inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08365-0	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

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 城口克之
2. 発表標題 実験自動化ロボットの開発と統合データ解析による 1 細胞decoding
3. 学会等名 バイオDXの最前線 CRESTバイオDXキックオフシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuyuki Shiroguchi
2. 発表標題 An automated microscopy-based picking system for single cells which links dynamic behavior with whole gene expression
3. 学会等名 Pacifichem2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城口克之
2. 発表標題 細胞動態観察・オミックス解析・機械学習を融合した 新規 1 細胞解析法の開発と免疫研究への応用
3. 学会等名 東京理科大学 総合研究院合成生物学研究部門シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城口克之
2. 発表標題 バイオイメージングとRNAシーケンシング（と機械学習）の融合による 1 細胞動態解析
3. 学会等名 九州大学先端物質化学研究所 非常勤講師セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城口克之
2. 発表標題 1 細胞を観て採る自動システム
3. 学会等名 Laboratory Automation Developers Conference 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城口克之
2. 発表標題 1 細胞統合解析： ライブイメージングと 網羅的遺伝子発現解析の融合
3. 学会等名 広島県立大学 生命システム科学特別講義 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城口 克之
2. 発表標題 Linking cell dynamics and gene expression by integration of live imaging and RNA sequencing
3. 学会等名 LSBM Symposium 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城口 克之
2. 発表標題 新規手法開発により生命システムの理解へ迫る： 核酸・細胞の“デジタル”定量法の開発 シークエンシングとライブイメージング法の融合
3. 学会等名 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城口 克之
2. 発表標題 細胞動態と遺伝子発現を結ぶイメージングとシーケンシングの統合解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 泰策、城口 克之
2. 発表標題 顕微鏡ライブイメージングと1細胞RNA-seqを組み合わせた自動化システムの開発とシンギュラリティ生物学への応用
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城口 克之
2. 発表標題 細胞動態と遺伝子発現状態を繋ぐ：顕微鏡ライブイメージングと1細胞RNAシーケンシングの融合と自動化
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会バイオフィジックスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuyuki Shiroguchi
2. 発表標題 Automation of live imaging, single cell picking, and sequencing system
3. 学会等名 ICSB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taisaku Ogawa, Katsuyuki Shiroguchi
2. 発表標題 Development of an automated system to take datasets of images and sequences for the same single cells
3. 学会等名 AGBT2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城口 克之
2. 発表標題 An automated system of single cell picking and sequencing for dynamic observation of living cells
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川 泰策, 伊川 友活, 城口 克之
2. 発表標題 A robotic system for combining single-cell RNA-seq with live cell imaging
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城口 克之
2. 発表標題 細胞の網羅的遺伝子発現の経時"計測"と未来予測に向けて
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 城口克之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 108
3. 書名 1細胞, 1分子における核酸配列決定・定量技術の現状と展望	

1. 著者名 城口克之、小川泰策	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 255
3. 書名 DNA分子バーコード法とその新機能 バイオイノベーションに向けて ~ バイテクノロジーの新技术からの新しい視点 ~	

1. 著者名 城口克之	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本工業出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 光アライアンス	

〔出願〕 計1件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 核酸をシーケンシングする方法および解析する方法	発明者 城口克之	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、JP7160349	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞搬送システム	発明者 城口克之、小川泰策、他	権利者 理化学研究所、他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-203728	取得年 2023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
研究協力者	川上 英良 (Kawakami Eiryo)		

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