

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月11日現在

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

Microfluidic approach to single cell transcriptome
analysis and its applications

課題番号：16H06328

藤井 輝夫 (FUJII, TERUO)

東京大学・生産技術研究所・教授



研究の概要（4行以内）

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。この手法につい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への応用可能性を検討する。

研究分野：総合理工

キーワード：ゲノム工学、1細胞解析

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。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解析を行うことが可能になった。しかし、これまでの1細胞トランスクリプトーム解析を実現する手法においては、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。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。

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、10,000個規模の1細胞トランスクリプトーム解析を可能にする超並列1細胞トランスクリプトーム解析システムの確立を目指す。

3. 研究の方法

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))

とトランスクリプトーム解析が可能な Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法とを、それぞれ高度化して、融合することにより、1細胞トランスクリプトーム解析法を実現する (図1)。具体的には、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 picoCAGE 法を行うことにより、超並列1細胞トランスクリプトーム解析システムを実現する。

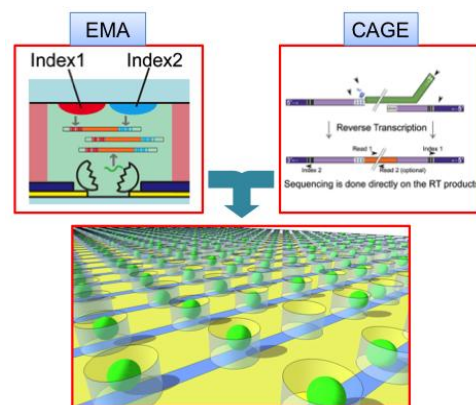


図1 1細胞トランスクリプトーム解析

4. これまでの成果

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する必

要がある。個々の細胞の捕捉と区画化を行うため Electroactive Microwell Array (EMA) に基づいたマイクロ流体デバイスを開発した。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システムである。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ことが困難であった。本研究では、この細胞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できる。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反应用ウェル（直径：80 μ m、高さ 15 μ m）を配置した。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。この EdWA を使用した結果、95% の高効率で細胞を捕捉するとともに、それぞれの細胞の区画化に成功した。

また、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 オリゴを用いた反応効率を確認した。384 ウェルプレートの各ウェルに様々な濃度の 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を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サする事で、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。網羅的な検討の結果、RNA の濃度が低い時も “strand invasion” と言われるオリゴによるアーティファクトを押さえるためには、RT プライマーと TS オリゴの濃度を高くする必要があることが確認できた。この網羅的な検討方法を用いて逆転写酵素である SuperScript III (SS III) と SuperScript IV (SS IV) の反応効率の検討も行った。検討の結果、低濃度 TS オリゴには SS IV の方が SS III より反応効率が高いことが確認できた。特に RNA の濃度が高い時には TS オリゴの濃度が低くなると SS III では効率よく cDNA を合成することが困難であることが確認できた。マイクロウェルはその

体積が小さいため 1 細胞からの RNA もその濃度が高くなり (100 ng/ μ L)、導入可能な TS オリゴの濃度は低くなるため、SS IV を用いた反応が適切であることを確認した。

5. 今後の計画

インクジェットスポッティング方法を用いて Index オリゴを担持した温度感応性のゲルを基板上にスポッティングすることで Index オリゴ基板を製作する。Index オリゴ基板と EdWA を結合させることで高スループット 1 細胞トランスクリプトーム解析デバイスを製作する。このデバイスを用いて細胞を破碎した後に RT 反応を行うことで 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。この cDNA ライブラリを、次世代シーケンサを用いてシーケンサすることで 1 細胞トランスクリプトーム解析を実現する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

S. H. Kim, H. Ito, M. Kozuka, H. Takagi, M. Hirai and T. Fujii, “Cancer marker-free enrichment and direct mutation detection in rare cancer cells by combining multiproperty isolation and microfluidic concentration,” *Lab on a Chip* 19, 757, 2019, featured as Back Cover of the issue.

M. Lereau-Bernier, S. Poulain, Y. Tauran, M. Danoy, M. Shinohara, K. Kimura, B.D. Segard, S. Kato, T. Kido, A. Miyajima, Y. Sakai, C. Plessy, É. Leclerc, “Profiling of derived-hepatocyte progenitors from induced pluripotent stem cells using nanoCAGE promoter analysis,” *Biochem Eng J.* 142, 7–17, 2019.

Y. Kawata, K. Nagasaka, Y. Matsumoto, K. Oda, M. Tanikawa, K. Sone, M. Mori-Uchino, T. Tsuruga, T. Arimoto, Y. Osuga, T. Fujii, “Usefulness of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy in the therapeutic management of advanced ovarian cancer patients with massive ascites” *Int J Clin Oncol.* 24, 420–427, 2018.

S. H. Kim, H. Ito, M. Kozuka, M. Hirai and T. Fujii, “Localization of low-abundant cancer cells in a sharply expanded microfluidic step-channel using dielectrophoresis,” *Biomicrofluidics* 11, 054114, 2017.

M. Antfolk, S. H. Kim, S. Koizumi, T. Fujii and T. Laurell, “Label-free single-cell separation and imaging of cancer cells using an integrated microfluidic system,” *Scientific Reports* 7, 46507, 2017.

7. ホームページ等

<http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp/>