

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18194

研究課題名（和文）ナノ電気穿孔を用いた1細胞ダイナミクス計測法の創成

研究課題名（英文）Measurement of single-cell dynamics with nanoelectroporation

研究代表者

新宅 博文（Shintaku, Hirofumi）

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：80448050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：1細胞オミクス計測は基本的にエンドポイントの計測であり、計測時に対象1細胞の生命活動を中断してしまう。そのため、その後の現象を追跡することは不可能であり、非定常かつ時系列の現象に対しては多くの1細胞サンプルを取得して平均的な描像を推定するほか解析手段が無かった。我々はナノスケールの電場を活用して非殺傷的にRNAを細胞から抽出し、その極微量RNAから細胞の遺伝子発現を計測すると共にその後の生命現象を追跡する新しい計測方法を開発した。この方法は細胞周期進行など基本的な生命現象には顕著な摂動を与えることなく、時系列の遺伝子発現を計測できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは受精卵と呼ばれる1つの細胞から始まり、最終的に数十兆の細胞から構成される生命体へと変化します。1細胞オミクス解析は、そのダイナミクスを生み出す分子の量を1細胞解像度で捉える強力なツールですが、ほとんどの場合、対象の1細胞を計測時により損なってしまいます。本研究で開発したELASTomics、Live-organismal transcriptomicsおよびopto-combinatorial indexingはそのような1細胞オミクス解析の根源的課題を解決し得る1細胞オミクス解析法群であり、例えば、非殺傷的に受精卵の遺伝子発現を計測しながら発生過程を観察することが可能です。

研究成果の概要（英文）：Single-cell omics approaches are fundamentally endpoint measurements, interrupting the biological activity of a single cell at the time of measurement. Current methods track the consensus dynamics of single cells by ensemble averaging omics data from a large number of cells. Consequently, these methods cannot link the individual dynamics of single cells to their specific omics states. To overcome this challenge and track the dynamics of individual single cells from an omics perspective, we have developed techniques that utilize nanoelectroporation for the extraction or delivery of charged molecules with minimal invasiveness. Here, we present ELASTomics, live-organismal transcriptomics, and opto-combinatorial indexing, which respectively link individual cellular dynamics with their transcriptomics profiles.

研究分野：機械工学

キーワード：1細胞 RNA-sequencing マイクロ流体工学 オミクス

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1 細胞 RNA-sequencing (scRNA-seq)は、個々の細胞の網羅的遺伝子発現を計測する方法として近年目覚ましい技術革新を遂げている。現在では現実的な費用で数千から数万個の細胞から遺伝子発現情報を取得可能であり、細胞分化、発生、組織再生など様々な生命現象における分子制御機構理解の深化に貢献している。scRNA-seq は基本的にエンドポイント解析 (計測に際して細胞の生命活動を停止させる方法) である。そのため、scRNA-seq より得られる遺伝子発現情報は瞬時の状態量であり、背景にある遺伝子発現制御ダイナミクスの追跡には数理的な推定が不可欠である。ダイナミクスの追跡方法として、例えば pseudotime 解析 (Trapnell et al. Nat Biotech 2014), RNA velocity (Manno et al. Nature 2018)あるいは研究代表者らが開発した SINC-seq 法(Single-cell Integrated Nuclear and Cytoplasmic RNA-Sequencing) (Genome Biol 2018, Anal Chem 2018a, 2018b, 2020)等が報告されている。しかし、これらの方法は、双安定状態が存在する現象、特に遺伝子発現制御ネットワークにおいてネガティブフィードバックやリブッシュレーター (ネガティブフィードバックの回路) が存在する系においてその追跡精度が極端に低下するという課題がある(Weinreb et al. PNAS 2018)。さらに、遺伝子発現とは異なる階層に現象の支配パラメーターが存在する場合(例えば epigenetics)は、scRNA-seq だけでは二状態の存在すら検出できない(Wang et al. Sci Adv 2020)。

### 2. 研究の目的

以上から、研究代表者らは数値流体力学から着想を得て、1 細胞における二つの異なる階層の計測値 (細胞質 RNA と核 RNA) から遺伝子発現の微分量、すなわちダイナミクスに関係する状態量を同一の 1 細胞から取得する SINC-seq 法を開発した(Genome Biol 2018, Anal Chem 2018a, 2018b, 2020, Sci Adv 2021)。SINC-seq 法は、ゲノムの遺伝情報が細胞核において RNA に転写され、細胞質において RNA からタンパクへ翻訳されるというセントラルドグマに則り、核 RNA は細胞質 RNA よりも未来の細胞状態を反映していると仮定する。SINC-seq 法は細胞分化等いくつかの動的な生命現象の理解に有用であることが示されたが、他のダイナミクス推定方法と同様に、依然として仮想的な時系列データを再構成する方法であり、真のダイナミクス計測法ではない。一方、本研究課題は真の網羅的遺伝子発現ダイナミクス計測を実現しようとする挑戦的な研究計画である。本研究計画は、研究代表者らがこれまでに進めてきたマイクロ・ナノ電気穿孔に関する研究 (基盤研究(B) 26289035(H26-H30)), 1 細胞シーケンス解析に関する研究(挑戦的研究(萌芽) 26630052 (H26-H28))およびその大規模化に関する研究 (挑戦的研究(萌芽) 19K22121(R1-R2))等で得られた研究成果に基づくものであり、挑戦的ではあるが高い実現性が見込める提案内容である。さらに、学際色の強い本研究を推進するため、複数の専門分野かつ比較的若い研究者で構成された研究グループを形成した。本申請課題の採択により世界に先駆けて 1 細胞 RNA-seq による真の遺伝子発現ダイナミクス計測を実現する。

### 3. 研究の方法

より具体的には、本研究ではナノエレクトロポレーションを使った 1 細胞分子サンプリングにより細胞の生存状態を維持したまま内在性分子の一部を採取し、それをを用いて時空間に広がる網羅的遺伝子発現情報を取得する。そして、scRNA-seq 解析において完全に欠落している動的表現型(dynamic phenotype: time dependent morphology, cell proliferation, cell-cell

interaction, etc.)と遺伝子発現表現型 (molecular phenotype)を接続する解析法を構築し、見過ごされてきた動的表現型に潜む遺伝子発現制御パラメターの探索を行う。

#### 4. 研究成果

##### (A) 細胞動態および運命決定と遺伝子発現の時系列解析法の開発

ナノスケールの内径を有するキャピラリーを用いたナノエレクトロポレーションによる非殺傷的な RNA 抽出法について、HeLa 細胞を用いて電圧条件を検討し、2.5 時間おきに 4 回、すなわち 7.5 時間、断続的に RNA を抽出することに成功した。

抽出した RNA から次世代シーケンス用の RNA-seq ライブラリを作製し、データを取得したところ、細胞周期進行に応じた遺伝子発現変動が観測された。顕微鏡観察から得られた細胞周期進行と時系列遺伝子発現の統合解析により、細胞周期進行速度に観察された細胞間のばらつきを説明する遺伝子制御ネットワークの部分グラフを抽出することに成功した。開発した RNA 抽出法を線虫の受精卵に適用し、1 細胞期、2 細胞期および 4 細胞期の各段階で遺伝子発現を計測しながら、胚発生過程を観察できることを示した。低温度培養環境においておよそ 50%の胚致死性を示す *oma-1* 変異体に対して本方法を適用し、時空間遺伝子発現と胚発生の観察結果から胚致死性を決定づける遺伝子発現量の特徴を特定した。トラックエッチドメンブレンを用いたナノエレクトロポレーションにより細胞非殺傷的に RNA を抽出できる条件について探索した。

##### (B) 顕微鏡観察と 1 細胞遺伝子発現解析を統合する opto-combinatorial index の開発

顕微鏡観察により取得した細胞画像と次世代シーケンシング解析により取得した 1 細胞遺伝子発現データを統合するためのカラーコードハイドロゲルビーズを開発した。ハイドロゲルビーズは DNA バーコードを表面に修飾したものであると同時にそれに対応した蛍光色が付与されている。四色の蛍光色素の明暗の組み合わせから 16 通りの蛍光色コードを設計した。これに加えて DNA バーコードおよび蛍光色コードで構成した 16 通りのカラーコードを付与した細胞を用いて 16x16 通り、すなわち 256 通りの組み合わせから 1 細胞を特定する opto-combinatorial index 法を開発した。本手法を活用して、パクリタキセルに対するがん細胞の応答を 1 細胞解像度で解析した。

##### (C) ELASTomics の開発

細胞表面張力と遺伝子発現を 1 細胞解像度で計測する ELASTomics (electroporation-based lipid-bilayer assay for cell surface tension and transcriptomics) という新しい方法を開発し、悪性の異なるがん細胞、複製老化を示す TIG-1 細胞、およびマウス造血前駆細胞における細胞の力学特性と遺伝子発現制御の関係について探索した。ELASTomics は、track etched membrane という絶縁性フィルムを活用して形成したナノスケールの集中電場を利用して細胞膜に微小孔を形成する際、その半径が細胞表面張力依存的に決まることを活用した方法である。微小孔を介して DNA タグがついた様々な大きさのデキストラン分子を細胞内部へ導入し、導入されたデキストラン分子の量と大きさ分布から細胞表面張力を推算する。デキストラン分子の特定と定量は次世代シーケンシングを利用した DNA タグの定量により実施し、1 細胞の遺伝子発現解析との統合解析により細胞表面張力と遺伝子発現の大規模解析を実現した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Shiomi Akifumi, Kaneko Taikopaul, Nishikawa Kaori, Tsuchida Arata, Isoshima Takashi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Doi Kentaro, Nishikii Hidekazu, Shintaku Hirofumi	4. 巻 15
2. 論文標題 High-throughput mechanical phenotyping and transcriptomics of single cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-48088-5	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 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 無
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 Misa Minegishi et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Secretory GFP reconstitution labeling of neighboring cells interrogates cell-cell interactions in metastatic niches	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-43855-2	査読の有無 無
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24件（うち招待講演 9件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 新宅博文
2. 発表標題 1細胞の表現型と遺伝子発現をつなぐ
3. 学会等名 電気学会全国大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新宅博文
2. 発表標題 マイクロ・ナノエレクトロポレーションと1細胞オミクス解析
3. 学会等名 定量生物学の会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新宅博文
2. 発表標題 マイクロ・ナノ電場を活用した1細胞マルチオミクス解析
3. 学会等名 シングルゲノミクス研究会2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳥井 孝太郎, 渡邊 慶子, 西川 香里, 武石 明佳, 新宅 博文
2. 発表標題 揺らく遺伝子ネットワークと表現型の因果を結ぶLive cell RNA-seq法の開発
3. 学会等名 シングルゲノミクス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩見 晃史, 金子 泰洸, 西川 香里, 新宅 博文
2. 発表標題 微小電気穿孔法を用いた細胞の膜張力と遺伝子発現の統合解析
3. 学会等名 シングルゲノミクス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 峯岸 美紗, 西川 香里, 新宅 博文, 口丸 高弘
2. 発表標題 近接細胞蛍光標識技術を用いたがん細胞と相互作用した細胞の1細胞トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 シングルゲノミクス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土田 新, 金子 泰洸ポール, 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

1. 発表者名 塩見 晃史, 金子 泰洸ポール, 西川 香里, 新宅 博文
2. 発表標題 細胞の機械特性と遺伝子発現の統合解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩見 晃史, 金子 泰洸ポール, 西川 香里, 新宅 博文
2. 発表標題 老化における細胞の膜張力と遺伝子発現の統合解析
3. 学会等名 第13回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳥井 孝太郎, 渡邊 慶子, 西川 香里, 武石 明佳, 新宅 博文
2. 発表標題 Live-cell RNA-seq links time-evolving fluctuations between cellular phenotypes and gene regulation
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩見 晃史, 金子 泰洸ポール, 西川 香里, 新宅 博文
2. 発表標題 A combined analysis of membrane-mechanical phenotyping and transcriptomics using nanoelectroporation
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土田 新, マハムド N. アブディルモエズ, 金子 泰洸ポール, 横川 隆司, 新宅 博文
2. 発表標題 1 細胞電気泳動および遺伝子発現の統合解析に向けた並列マイクロ流体システムの開発
3. 学会等名 第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩見 晃史, 金子 泰洸ポール, 西川 香里, 新宅 博文
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析を組み合わせた細胞膜の機械特性計測
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新宅 博文
2. 発表標題 マイクロ・ナノ電気穿孔を用いた1細胞ダイナミクス分析
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度 年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新宅 博文
2. 発表標題 核と細胞質に存在するトランスクリプトノイズの1細胞定量
3. 学会等名 情報計算法学生物学会 2021年大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Exploring transcriptional noise in subcellular compartments with on-chip electrophoretic fractionation of cytoplasmic versus nuclear RNAs
3. 学会等名 Human Cell Atlas Asia General Meeting 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akifumi Shiomi, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 ELASTomics: High-throughput mechanical phenotyping and transcriptomics of single cells
3. 学会等名 The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Misa Minegishi and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Microgels for a large-scale screening and longitudinal observations of cancer cell dormancy
3. 学会等名 The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akifumi Shiomi, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 ELASTomics: Combined analysis of mechanical phenotype of cellular surface and transcriptome at single-cell resolution
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 Kotaro Torii, Keiko Watanabe, Kaori Nishikawa, Asuka Takeishi, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Micro- and nanoscale electroporation for single-cell multiomics: live organismal transcriptomics
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 Arata Tsuchida, Taikopaul Kaneko, Mayu Kawasaki, Kaori Nishikawa, 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 Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Micro- and nanoscale electrokinetics for single-cell multimodal analyses
3. 学会等名 uTAStic (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hirofumi Shintaku, Akifumi Shiomi, Taikopaul Kaneko, Kaori, Nishikawa
2. 発表標題 Nanopore electroporation enables profiling cell surface tension and gene expression at single-cell resolution
3. 学会等名 the 61th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Micro- and nanoscale electroporation for single-cell multiomics
3. 学会等名 The 29th EAJS -East Asia Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mahmoud N. Abdelmoez and Hirofumi Shintaku	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 11
3. 書名 Single Cell Assays	

〔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
研究分担者	口丸 高弘 (Kuchimaru Takahiro) (10570591)	自治医科大学・医学部・准教授  (32202)	
研究分担者	錦井 秀和 (Nshikii Hidekazu) (30512834)	筑波大学・医学医療系・准教授  (12102)	
研究分担者	塩見 晃史 (Shiomi Akifumi) (60880557)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・基礎科学特別研究員  (82401)	
研究分担者	金子 泰洸ポール (Kaneko Taikopaul) (80873504)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・特別研究員  (82401)	
研究分担者	鳥井 孝太郎 (Torii Kotaro) (80878463)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・特別研究員  (82401)	

## 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