

単一細胞エピゲノム解析のための基盤技術創成

研究代表者

馬渡和真 東京大学大学院工学系研究科 准教授



1. 研究の背景と達成目標

エピジェネティクスは、内因性・外因性のシグナルに応じて同一配列のゲノムを多様なパターンに読み分け生命現象を制御する最も基本的な機構であり、バイオ（細胞分化や発現など）や医療分野（ガンなど）など幅広い分野において非常に重要である。そして、エピジェネティクスの機構を理解するためには、エピゲノム解析のための方法論が必要となる。特に最近では、細胞毎に機能発現レベルが大きく異なることが指摘され、エピゲノム解析において少数細胞（究極的には単一細胞）で実現できる方法が求められている。これら分析プロセスは、(1)前処理、(2)検出の大きく2つに分けられる。(2)においては、米国発の次世代シーケンサが Moore の法則で急速に進展しており、産業技術において日本は大きく遅れをとっている。しかし、現在最も欠けているのは(1)の前処理である。エピゲノム解析には、細胞捕捉・溶解・DNA 切断・ヒストン捕捉・精製・ヒストン遊離・アダプタ付加など非常に複雑な化学プロセスとなる。また、複雑さに加えて、単一細胞は $10\mu\text{m}$ スケール、体積で pL となるため、これまでの分析化学で扱ったことのない極微量体積・可算個レベルの分子数を取り扱う極限化学プロセスで非常に挑戦的な課題である。現在のボトルネックはこの前処理が非常に困難でツールがないことである。したがって、現在分析では、1,000,000 個の細胞を必要としており、細胞数を大幅に減らすための新しい方法論が求められている。

そこで、本研究では、申請者独自の方法論である、マイクロ・ナノ流体デバイス技術をベースとして、単一細胞レベルの分析の基盤技術を確立することを目的とする。特に、エピゲノム解析で難しいクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) の集積化をターゲットとして開発に取り組む。ChIP-Seq では、細胞を選定して、核溶解、フラグメント化、抗体によるヒストン捕捉、DNA の溶出、アダプタ付加、PCR、塩基開発解析という多くのプロセスからなる。ここで、少数細胞になると重要なのは、①細胞を確実に捕まえること、②ヒストンを確実に捕まえる、③DNA を確実に取り出し DNA シーケンサに導くことが重要である。そこで、マイクロ・ナノ流体の特徴を生かして、これらの基盤技術を確立する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ① 細胞を 95% の確立で捕捉する技術を確立した。
- ② タンパク質を 90% 以上の確立で抗体捕捉する技術を確立した。
- ③ pL 液体を外部へ確実に導出するロジスティック技術を確立した。
- ④ ①~③の基盤技術をベースに、プロセスを集積化して約 60 細胞からのシーケンスを測定した。

以上から将来重要になるエピゲノム解析を少数細胞で実現する技術ができ、シーケンス技術が浸透しつつある医学や医療に新しいツールを提供することが期待される。

3. 研究成果

① 細胞捕捉

今回用いる HAEC 細胞はサイズが約 $10\text{-}20\mu\text{m}$ 程度の大きさである。そして、これら貴重な細胞試料を確実に分析プロセスへ導くことが重要である。そこで、申請者らの独自技術であるガラスのマイクロ・ナノ加工技術を利用して、ギャップ $4.5\mu\text{m}$ 程度のダム構造を作成した。そして、細胞の変形能を利用して、ギャップを利用した細胞の確実な捕捉を試みた。その結果、実験で使用する平均流速 0-

10mm/s の範囲において、HAEC を 95%以上の確率で捕捉できることを実証した。

② ヒストン（タンパク）捕捉

ナノ流路に近いギャップ 2 μ m の流路壁面に抗体（長さ 10mm）を固定化することで、高比界面積を利用した効率的な免疫捕捉を試みた。C 反応性タンパク（CRP）をモデル試料として ELISA により捕捉率を測定した。その結果、抗体領域への滞在時間 1 秒で 90%以上の効率で捕捉できることがわかった。

③ 外部への確実な輸送（ロジスティックス）

DNA 溶液を外部に取り出して、シーケンサに導入する必要があるが、液体のままでは取り出し時に壁面やデッドボリューム部に残ったりして、確実な回収は困難である。そこで、溶液を液滴に変換して、極微量（pL）液滴を冷却により氷に相転移させて空気圧により外部に取り出すロジスティックスを確立した。

以上をベースに集積化したデバイス（図 1）を作成して、今回は全ヒストンをターゲットにシーケンスを試みた。その結果、約 60 細胞からからのシーケンスが得られ、従来 1,000,000 細胞を要していた手法が大きく進展した。

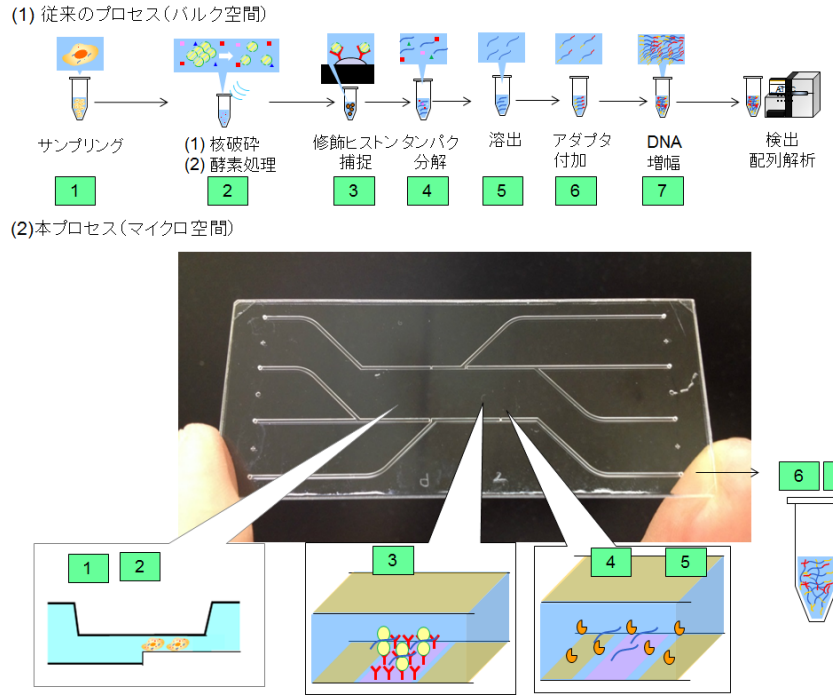


図 1 細胞プロセスから溶出までの集積化

4. 今後の展開

- ① 本手法の最適化により可算個や単一細胞レベルでの分析が期待される。
- ② 早期がん診断などの医療分野、遺伝子組み換えなどをする農林水産分野に波及効果が期待される。

5. 発表実績

[学会発表]

・国際会議 microTAS2017 Industrial 講演（2017 年 10 月 24 日、サバンナ、USA）

[招待講演]

・ Post-Genomic Technology and the 11th International Workshop（2018 年 10 月 21-22 日、南京）

[特許]

・馬渡和真他、吸光分析用光ファイバーカプラ、吸光分析装置、特願 2017-251662