

# 研究終了報告書

## 「細胞間相互作用の理解に資するゲノムワイド1分子遺伝子空間分布解析」

研究期間：2019年11月～2023年3月

研究者：小口 祐伴

### 1. 研究のねらい

近年の遺伝子発現解析技術の進捗は目覚ましく、1細胞単位に遺伝子発現を定量することができ、加えて、ある組織に属する数万といった細胞を一度に解析することも可能である。1細胞単位の遺伝子発現情報に基づき、組織に属する細胞の種類と同定、分類が可能で、より定量的な生命現象の理解に繋がっている。しかし、これら解析のために細胞は組織から分離する必要があり、また遺伝子は細胞から抽出される必要があるため、これらの組織内・細胞内における位置情報は失われてしまう。組織内における各細胞群の機能、細胞間で生じるやり取り(細胞間相互作用)を理解するためにも、細胞や遺伝子の位置情報も重要である。その解決を図る技術として、空間遺伝子発現解析技術が注目を集めている。これは従来の遺伝子発現解析術とは異なり、組織や細胞の構造を維持したままに遺伝子の発現量と位置情報を取得するものである。

空間遺伝子解析技術の開発競争は激化しており、すでに多数の技術が存在する。これらの技術は、基本原理をもとに大きく2つに分類できる。1つは蛍光イメージングを活用し、位置情報を取得する方式。もう1つは、従来のシーケンサーのみで位置情報をも取得する方式である。前者は空間解像度に優れるが(1分子空間解像度)、対象遺伝子ごとに検出プローブを必要とするために、検出できる遺伝子数に制限がある。後者は検出の網羅性が担保されるが、空間解像度が劣る。後者の位置情報の取得は、DNA バーコード配列を導入することで実現する。DNA バーコード配列を有する逆転写プライマーは、ガラス基板の区画情報とバーコード配列を対応付けて配向する。この基板上に組織切片を載せ cDNA にバーコード配列を付加することで、塩基配列として位置情報を取得できる。この空間解像度は、DNA バーコード分子の基板上の配向技術によって左右される。現状、サブ細胞サイズの解像度(直径数  $\mu\text{m}$  程度の円領域)を実現しているが、蛍光イメージングを活用する方式が実現する1分子単位の解像度には至っていない。

本研究は新規の空間遺伝子発現解析技術を開発し、多細胞現象の解明に資することを目的とする。実現を目指す技術は、上記の後者の方式に分類されるものである。しかし、DNA バーコード分子を基板上の位置情報と対応付けて配向固定する必要がない。ランダムに固定し、非増幅シーケンス法によってバーコード分子の配列、および基板上での位置情報を1分子単位に識別する。これにより1分子単位の空間解像度と検出の網羅性を両立する空間遺伝子発現解析の実現を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究を実現する技術の概要は図 1 に示す通りで、本研究実施者がこれまでに独自に開発を進めてきた非増幅シーケンサーのシーケンス原理 (single-molecule sequence-by-synthesis) を応用し、非増幅シーケンサーと既存の次世代シーケンサーを併用することで、網羅性と1分子単位の空間精度を兼ね備えた空間遺伝子発現解析の実現を目指す。各遺伝

子の細胞内での空間情報を保持するために、シーケンス基板上にて in-situ cDNA synthesis (2本鎖化まで)を実施する。この際、cDNAにはバーコード配列が逆転写プライマーを介して付加される。第2鎖cDNAは基板から分離回収後、既存のシーケンサーで解析することで遺伝子と組み込まれたバーコード配列の両方が取得される。また、基板上に細胞の位置情報を維持したままに残る第1鎖cDNAを非増幅シーケンス法により解析することで、バーコード配列とその空間座標情報を取得する。両鎖cDNAのバーコード配列を参照することで、1分子単位の遺伝子配列と空間座標を決定することができ、網羅性と1分子空間解像度を備えた空間遺伝子発現解析が可能となる。

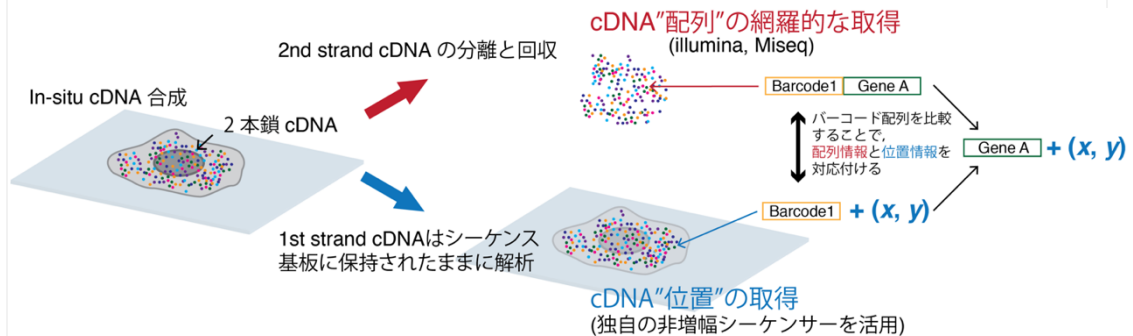


図 1. 本研究が確立する技術の概要

上記を実現するために、まず基盤技術となる以下の事項を確立した(後述、詳細 1. 本技術の基盤技術を確立するための検討の項目に対応)。

- 非増幅シーケンス基板上で細胞由来の mRNA を2本鎖 cDNA 化し、加えて DNA バーコード配列を各 cDNA に組み込む技術
- 基板上で作成した 2 本鎖 cDNA のうち第 2 鎖 cDNA を回収する技術(後段で市販のシーケンサーで遺伝子配列とバーコード配列を取得)
- 基板上に残る第 1 鎖 cDNA の DNA バーコード配列を1分子単位の空間解像度で識別する技術

また、上記技術の確立の過程において、基板上に固定する mRNA 捕捉プローブ(図 2. 細胞中の mRNA を捕捉し、cDNA 合成逆転写プライマーとなるもの)の密度を高くすることが、遺伝子の高感度検出(第2鎖 cDNA の回収効率の向上)に繋がることを見出した。しかし、同時に mRNA を捕捉しないプローブを増加することにもなり、第 1 鎖 cDNA の 1 分子単位の識別を困難にした。この問題の直接的な解決に加えて、代替技術の確立も目指した。代替技術は非増幅シーケンス基板外にて mRNA を cDNA 化・バーコーディング化し、あとからこれらを基板上に転写して解析する方式である。これにより基板上に第 1 鎖 cDNA を転写し、それらを非増幅シーケンス法で解析できることを示し、成果を論文として報告した(研究成果論文 1)。当初の計画を変更し、代替技術を用いることで基盤技術を実現した。

これらの基礎技術の確立後、多細胞サンプルとして組織切片などの固定サンプルの解析を計画。事前の検討として、固定除膜操作をした NIH/3T3 を対象に実施した(後述、詳細 2. 細胞サンプルの計測のための基本検討の項目に対応)。細胞固定の操作は競合の空間遺

伝子発現解析に適用されるものと同様であったが、本計測系に適応した場合、細胞内部からの cDNA の漏出が顕著であった。現状、培養細胞を活用した条件検討中にもあり、最終的な目標である多細胞サンプルの計測には至っていない。この問題は、本技術が遺伝子を 1 分子単位、高感度に検出を試みているがために、より顕著に生じているものと考えられる。他の競合技術にも本質的には同様に生じている問題であり、引き続きこの解決を図ることは、周囲技術の発展にも寄与するものと考えられる。

## (2) 詳細

### 1. 本技術の基盤技術を確立するための検討

#### 非増幅シーケンス基板上での 2 本鎖 cDNA の作成と第 2 鎖 cDNA の回収技術の確立

シーケンスフローセル表面には、細胞由来の mRNA を基板上に捕捉するための mRNA 捕捉プローブが固定されている(図 2)。また、mRNA 捕捉プローブには基板上での位置情報を mRNA に付加するために DNA バーコード配列が挿入されており、cDNA 化の際にこの配列が組み込まれることで、空間情報と配列情報の紐づけが可能となる。cDNA 化は 2 本鎖化

まで実施する。この 2 本鎖 cDNA のうち、第 2 鎖 cDNA を基板から解離・回収し、市販の次世代シーケンサー (illumina 社のシーケンサー) で解析する。このために、第 2 鎖 cDNA の解離・回収技術を確立する必要がある。

非増幅シーケンスフローセルにはサンプルや反応試薬を流入・排出するための 2 つの流路が接続されている(図 3)。第 2 鎖 cDNA を基板から解離・回収するために、50% ホルムアミド溶液(50°C)を流入側から導入すると、2 本鎖 cDNA が変性、第 2 鎖 cDNA のみが基板から解離し、これが排出側の流路内へと流れ込むことが期待される。この操作の後、一旦、溶液の流れを停止し、排出側の流路をフローセルから外して、流路内の溶液を逆流させることで第 2 鎖 cDNA の回収を試みた。

この方法により第 2 鎖 cDNA が回収できていることの確認と、その回収効率を qPCR により定量した。まずサンプルとして配列と濃度が既知である合成 RNA を活用し、フローセル内に捕捉される RNA 分子数(図 4a)を定量したところ、投入量の 60%の RNA

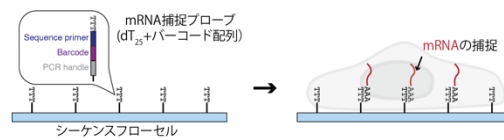


図 2. DNA バーコードを有する mRNA 捕捉プローブ。シーケンス基板上に固定されている mRNA 捕捉プローブを介し、細胞内 mRNA の位置情報を保持したままに捕捉し、cDNA 化・バーコード配列を付加する。

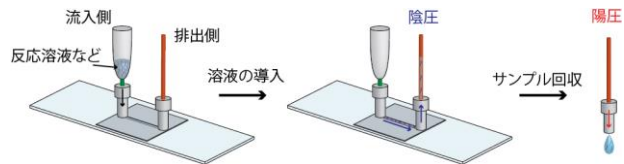


図 3. 第 2 鎖 cDNA の回収法の概略図。

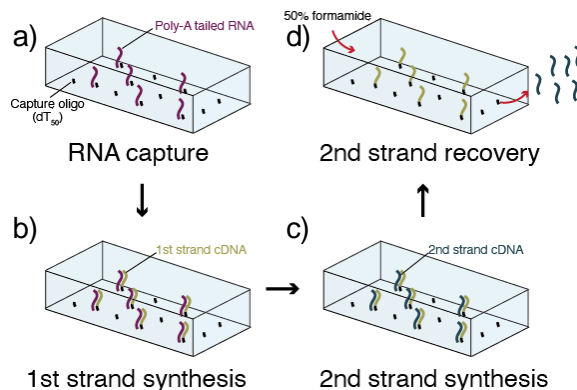


図 4. シーケンスフローセル内での 2 本鎖 cDNA の作成と第 2 鎖 cDNA の回収定量

が捕捉された。RNA を捕捉後、逆転写酵素により第 1 鎖 cDNA を作成(図 4b)、続けて RNaseH、DNA polymerase I、DNA ligase により第 2 鎖 cDNA (図 4c)を作成し、2 本鎖化する。最後に、フローセルの容積の 10 倍量(10 µl)の 50%のフォルムアミド溶液を流し込むことで第 2 鎖 cDNA のみを基板から解離する(図 4d)。フローセルから解離した第 2 鎖 cDNA は上記(図 3)の通りに回収し、捕捉 RNA 分子の約 40%相当の回収を確認することができた。

#### 高密度捕捉プライマーによる遺伝子検出感度の向上とそれに伴う問題発生

上記の方法による cDNA の回収量(遺伝子の検出感度)の向上に、mRNA 捕捉プローブの密度が重要であることを見出した。既存の空間遺伝子発現解析技術は、遺伝子の検出感度の低さが問題となっているが、mRNA 捕捉プローブの密度を高くすることで高感度検出に寄与することが期待される。しかしこれは同時に mRNA の捕捉に関与しなかった捕捉プローブを増加することにも繋がる。本技術は第2鎖 cDNA の分離回収後、基板に残る第 1 鎖 cDNA の DNA バーコード配列を非増幅シーケンス法で解析することとなるが、この前に未捕捉の mRNA 捕捉プローブを分解する工程を必要とする。この分解を当初、Exonuclease I にて試みたが、十分な分解には至らなかった。別の方法による分解等も試みたが、現状、第 1 鎖 cDNA 解析のために十分な分解状況は得られず、以下に示す全く別の様式による基盤技術の構築を目指した。

#### 非増幅シーケンスフローセル外にて cDNA 化を済ませて解析する方法の確立

上記の問題解決と並行し、フローセル外にて細胞内 mRNA を cDNA 化後、これをシーケンスフローセルに導入、細胞内での位置情報を維持したままに cDNA 分子をシーケンス基板上に転写する方法の確立を目指した。

この方法は上記の方法とは異なり、mRNA 捕捉プローブをシーケンス基板に予め固定しないことが特徴となる。遺伝子の検出感度を高くするために mRNA 捕捉プローブを高濃度に細胞に投入しつつ、未捕捉の mRNA 捕捉プローブは分解することなく、洗浄操作のみで除去することが可能となる。このようなフローセル外での cDNA 化、余剰の mRNA 捕捉プローブを除去後、シーケンス基板上に cDNA 分子を転写するために、biotin-avidin 相互作用を活用した。具体的には、mRNA 捕捉プローブに biotin 分子を付加、他方、シーケンス基板には avidin 分子を結合した。

実証実験として、まず細胞を模擬するもの(疑似細胞)を作成し(磁気ビーズに polyA 配列を有する ssDNA をクロスリンク後、biotin 化 mRNA 捕捉プローブによって二本鎖化)、これをシーケンスフローセルに導入、biotin-avidin 相互作用によるフローセル表面への捕捉を確認した(図 5a)。疑似細胞はこの後、2 本鎖 cDNA を変性することで再び表面より解離する(図 5b)。この変性の際、第 1 鎖 cDNA はフローセル表面に(疑似細胞上での位置情報を反映して)保持される。実際に第 1 鎖 cDNA がフローセル表面にあることを非増幅シーケンス法の蛍光シグナルにより確認した(図 5c)。他方、図 2 に示す方法により疑似細胞も同様にフローセルより回収できることを確認した(回収溶液内に疑似細胞が含まれることを顕微鏡上で確認。加えて、qPCR に疑似細胞から第 2 鎖 cDNA を検出)。

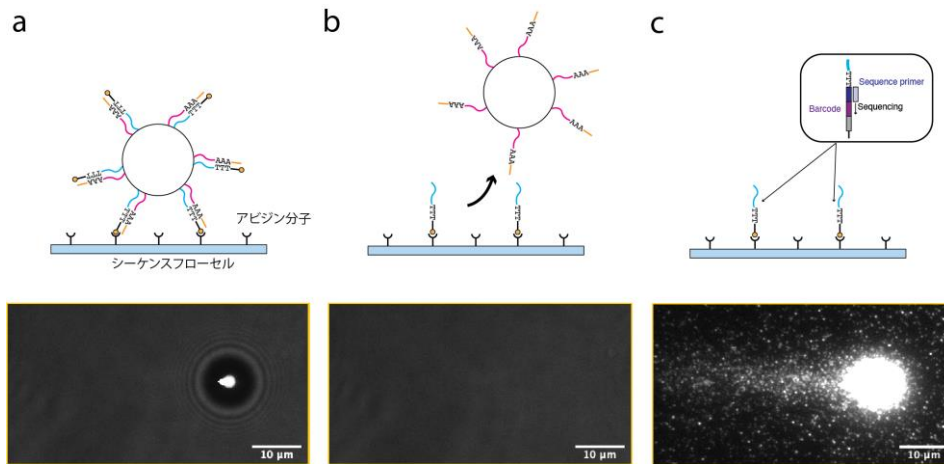


図 5. 疑似細胞による cDNA のシーケンス基板への転写、実証実験. a&b)疑似細胞の基板への捕捉(a)と基板からの解離(b). c)シーケンス基板に残る第 2 鎖 cDNA のシーケンスによる可視化. 下段の画像は全て同一視野で、a と b は明視野像、c は蛍光画像.

## 2. 細胞サンプルの計測のための基本検討

### 細胞の固定操作と cDNA の漏出・合成効率に関する検討

最終的に組織切片等のサンプルを解析の対象とするが、基礎検討のため固定・除膜処理した NIH/3T3 細胞を対象として検討を行った。固定・除膜処理は他の空間遺伝子解析技術のサンプル処理としても適用されている標準的な操作(ホルムアルデヒドによる固定と界面活性剤による除膜処理)に従った。このような細胞サンプルに対して、疑似細胞で確立した方法を適用し、細胞に由来する cDNA がシーケンス基板に転写されることを確認した(図 6)。しかし、疑似細胞時の cDNA の転写の様子とは異なり、細胞から cDNA が漏出したために生じたと考えられるバックグラウンドノイズの高い状況であった(図 6a 下段蛍光像)。

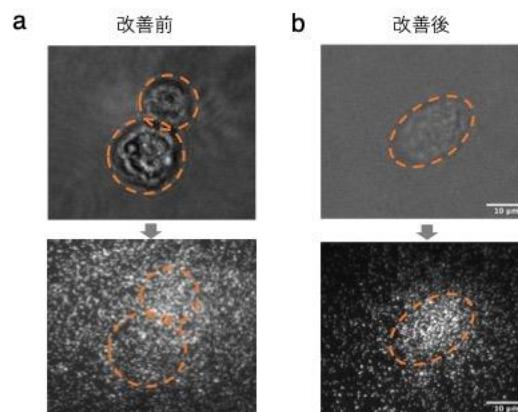


図 6. NIH/3T3 細胞より転写される cDNA 分子の検出. 処理法改善前(a)改善後(b). 各上段の画像は明視野像で図 5 疑似細胞における a の状況に対応。下段は蛍光画像で c の状況に対応。

この漏出問題を解決するために固定条件・cDNA 合成条件等を検討した。ホルムアルデヒド濃度(1~4%という範囲)、反応時の温度(氷上、及び室温)を高くすることで、固定の程度が強くなり、漏出も低減する傾向にあることを確認した。一方、固定を強めることで、cDNA の合成効率が下がることも明らかとなった。このように cDNA の漏出を防ぐことと、cDNA の合成効率を高めることはトレードオフの関係にあったが、第 1 鎖 cDNA の合成の前に加熱処理を加えることによって、最終的に 4%のホルムアルデヒドによる比較的強固な固定状況にあっても cDNA の合成量を高め、バックグラウンドノイズの低減しつつ高効率に細胞内より cDNA を転写することに至った(図 6b)

### 3. 今後の展開

空間遺伝子発現解析技術は、直近の数年のうちに急激な成長を見せている。アカデミックな研究グループにより開発された技術もあれば、Visium(10x Genomics, Inc.)や GeoMX DSP(NanoString Technologies, Inc.)といった装置のように既に企業より市場化された技術もある。特に Visium は、2020-22 年に発表された空間遺伝子発現解析に関連する論文の半数程度に活用されるほど、主流な技術となっている(Moses, L. and L. Pachter, *Museum of spatial transcriptomics*. Nat Methods, 2022. **19**(5): p. 534-546.,

及び、[https://pachterlab.github.io/LP\\_2021/future.html](https://pachterlab.github.io/LP_2021/future.html) を参考)。しかし、この方法は1細胞レベルの空間解像度の欠如、さらには低検出感度などの問題も抱えており、比較的広域な解析領域(6.5 mm x 6.5 mm)の組織切片への活用に留まる。遺伝子の細胞内局在の検出など、より高空間解像度、高検出感度を必要とする解析対象の場合は smFISH ベース(蛍光プローブを活用する方式)の方が適する。しかし、こちらの技術は個々の研究グループによって確立されたものが多く、簡単には活用できない現状にもある。このような状況も市場化されている Visium の利用が高いことを助長しているように思われる。蛍光プローブを活用する方式(高空間解像度・狭領域向き。網羅検出不可・高検出感度)、そして、シーケンサーを活用する方式(低空間解像度・高領域向き。網羅検出可・低検出感度)、どちらも一長一短があるが、しばらくは共存し、計測の対象によって選択される状況が続くものと見込まれる。本技術の完全な確立・計測による性能実証には至っていないが、このような一長一短のギャップを補完するものとして、引き続き実現の価値の高い技術であると考ええる。

また近年の Visium の活用の高さに見られるように、技術へのアクセスの簡便さ、利用者の獲得は、ひいてはその技術発展にも繋がるものと考えられる。本技術は現状、個人のグループ特有の技術に留まっており、広く活用できるようなプラットフォームの構築を考えることも今後の発展に重要であると考ええる。

### 4. 自己評価

研究目的の達成のため基盤技術の確立に取り組んだが、当初の計画において問題が生じ、この問題を解決(代替案の確立も含めて)想定以上の時間を要した。このため、実際に細胞サンプルでの検討に着手することに遅れが生じた。加えて、細胞由来の cDNA が形成する密度は非常に高密度であり、これを全ての分子を対象に 1 分子単位に解析するという問題を解決する途中の状況にある。細胞内すべての cDNA を 1 分子単位に解析するという最終的な研究目標の達成には至っていないが、これらの分子の一部を限定的に 1 分子単位に、解析する状況には至ることができた。研究開発当初と比べると、競合の空間遺伝子発現解析技術は多数開発されている状況にあるが、本質的に網羅・1 分子単位に解析できる技術は未だに存在しない。本研究を通じて達成の困難さが改めて明らかとなったものの、引き続き、達成の価値の非常に高い技術であると考ええる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. Oguchi, Y., Shintaku, H., Uemura, S., Development of a sequencing system for spatial decoding of DNA barcode molecules at single-molecule resolution., Commun. Biol., 2020, 3(1): 788

独自にシーケンサーを構築し、1分子単位に DNA バーコード分子を1分子単位に配列情報だけでなく、シーケンス基板上での位置情報を1分子単位に識別したことを報告(独自シーケンサーの構築自体はさきがけ研究以前からの活動内容)。この独自シーケンサーを活用したユニークな遺伝子発現解析例に加え、本さきがけ研究の活動によって開発した biotin-avidin を活用した cDNA 分子のシーケンス基板への転写する方法を実証する結果も発表した。

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 小口祐伴, 次世代シーケンサーの自作とそれを活用した新規の遺伝子解析手法の開発, JST CREST バイオ DX 領域キックオフシンポジウム, 2021.11, (招待講演)