

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	1細胞分析法が拓く受精卵および幹細胞の新規品質評価システムの開発
研究機関・部局・職名	東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
氏名	珠玖 仁

【研究目的】

少子化・高齢化の問題が大きく取り上げられており、不妊治療を目的とした生殖補助医療技術が急速に進歩をとげている。しかし、不妊治療の成功率は依然として低いのが現状である。本研究では、多機能ナノプローブと精密位置決め装置を組合せたシステムを構築し、1細胞レベルで[遺伝子-タンパク質-代謝]の階層横断的情報統合により、受精卵や幹細胞の複合的品質評価の指標を提供することを目標とする。これまで、受精卵の品質評価は形態観察に基づきおこなわれてきた。本研究代表者は本研究開始前に単一受精卵ごとの呼吸活性を指標とした客観的な受精卵の品質評価法を開発した。我々の特許をもとに「受精卵呼吸測定装置」が装置化・実用化され、ウシ・マウス・ヒトの受精卵移植試験実施に至っている。本研究では、これまで我々が開発してきた1細胞分析システムを、受精卵および幹細胞の品質評価に応用する。(1) 細胞塊から1細胞を回収するプローブの開発 (2) 回収後並列・多項目分析を可能にするシステムの開発 (3) システムのハイスループット化・自動化 (4) 1細胞エピジネティクスの4つの小課題ごとに研究を推進する。本研究により、受精卵品質評価の判定精度が向上し、不妊治療や臍島移植・再生医療の基盤となる分子レベルの知見が得られることが期待できる。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題は、研究代表者が開発してきた1細胞分析システムを受精卵、幹細胞の品質評価に応用することを目的として、システムの高度化と分子レベルでの生理現象の観測を目指している。1細胞電場破碎技術や、細胞回収のためのシート型2チャンネルガラスキャピラリーの開発、また走査型プローブ顕微鏡開発など、個々の要素技

術において先駆的な成果をあげ、一流の国際誌に発信している点は高く評価できる。研究の最終目的である1細胞内の「遺伝子、タンパク質、代謝、そしてエピゲノム解析」をシステムとして実現すれば、医療診断や再生医療において大きく活用され、その社会的意義は極めて大きい。そのためには、要素技術をしっかりと集約して、実現可能性を高めていくことが重要であるが、1細胞エピゲノミクスの自動解析システム開発が残念ながらまだ完了していない。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

研究の最終目的は、1細胞内の遺伝子、タンパク質、代謝、そしてエピゲノムを解析するシステムの構築にある。1細胞内の階層情報を取得し統合できる技術はこれまでに存在せず、期待される技術提案である。この目的を達成するために、4つの課題を設定し研究を遂行した。

課題1の1細胞を回収するシステムは、ガラスキャピラリーの工夫や電場破碎技術を開発し、期待通りの成果を達成している。また遺伝子解析のために導入したBioMarkシステムが有効に稼働し、遺伝子発現解析の準備は整っている。さらに、独自の技術であるSECMについても、タンパク質解析技術として進展が見られた点は高く評価できる。

課題2に設定されている「細胞回収後の並列・多項目分析を実現するためのマイクロ流体デバイス」の開発については前項(1)で開発した様々な多機能プローブを用い、並列・多項目分析を試みた。本研究事業開始前に立ち上げた走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)システムは、細尖化したピペットに電解質水溶液を充填したプローブにより、イオン電流をフィードバック信号として探針-サンプル間距離を100nm以下に一定に保つことが可能であった。また有機溶媒と電解質をピペットに充填したプローブを作製し、液間電位で油水界面を移動させることで1pL以下の液滴を回収可能であることを確認した。さらに、SICMプローブと有機溶媒充填プローブを集積化し、2チャンネルSICMプローブを作製した。これにより、高解像度SICM形状画像を取得し、同プローブで1pL以下の核酸サンプルの回収に成功した。

課題3に設定されているシステムのハイスループット化・自動化については、1細胞レベルで[遺伝子-タンパク質-代謝]の階層横断的情報統合のモデルとして、細胞塊の呼吸活性と網羅的遺伝子発現解析を実施した。走査型電気化学顕微鏡(SECM)により無侵襲的に呼吸活性を数値化した個々のサンプルに対し網羅的遺伝子発現解析を行うことで遺伝子-代謝間の階層横断的データ解析を実施した。同様にして、未分化マーカーアルカリホスファターゼ(ALP)活性を無侵襲的に評価し胚様体の拍動率との相関を調査した。マウス受精卵に対しても網羅的遺伝子発現解析から発生ステージによる遺伝子発現プロファイルの違いを確認した。1細胞解析のスループット向上のために高性能FACSを活用した。マウスES細胞から胚様体を経て分化誘導したのちFACSにより1細胞ごとにソーティングした。この大量1細胞サンプルの網羅的遺伝子発現結果より主成分解析を経て細胞の分化状態を1細胞ごとに分類することに成

功し、ほぼ目的は達成したと考えられる。

課題4に設定されている、1細胞エピジネティクスについてはクロマチン免疫沈降法(ChIP)とメチル化特異的PCR法(MSP)を検討し、エピジネテクス関連のデータ収集が可能であることを確認した。特にChIPに関しては磁気ビーズを利用しメチル化領域の配列をPCR増幅で検出できた。しかし1細胞レベルの感度を達成することや多次元・異階層の情報を比較するモデル系としては達成までにまだ期間を要する。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

1細胞電場破碎技術、細胞回収のためのシート型2チャンネルガラスキャピラリーの開発や、走査型プローブ顕微鏡開発など、個々の要素技術において先駆的な成果をあげ一流の国際誌に論文を発表している。特に電気化学顕微鏡SECM関連の成果は、提案者の世界を先導する技術であり、本研究提案との融合研究が期待される。またmicroRNAの一細胞定量に成功したとあるが、分析化学的に信頼性あるデータであればその意義は大きい。

細胞塊の1細胞をねらい打ちして、その内容物を抽出する技術は独創的であり今後の実用化が期待できる。また、独自の技術であるSECMでは、生細胞のトポロジーと電気化学イメージを同時取得する技術を世界に先駆けて開発している。生細胞から多次元情報を1本のチップ探針で獲得できるようになったことは、高く評価されるべき研究成果である。しかし、1細胞分析システムは他の研究者がすでに開発してきたものであり、応用研究が中心であった。受精卵・幹細胞の分子レベルの知見に関してのブレークスルー的情報の取得にはまだ至っていない。

概ね当初の計画に基づいた進捗であり、特筆すべき成果は得られていない。強いて言えばマウス初期胚の遺伝子解析やMCF-7スフェロイドの遺伝子発現解析の結果が得られているが、生命科学研究では一般的なデータ取得技術により得られた成果であり、データから特記するほどの発見には至っていない。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

1細胞分析は、細胞のサンプリング技術により、結果が大きくばらつくことになる。今回開発した細胞塊や組織において、細胞をねらい打ちしてその内容物を取り出す技術は、重要な基盤技術の一つに位置づけることができる。

一方、電気化学的測定法による「ES細胞の分化判定試験」は、今後の展開次第では実用性が期待される技術である。しかし、本研究課題の原点は、細胞の品質評価には一次元情報では無く「遺伝子-タンパク質-代謝-エピゲノム」等の階層を統合した情報が必要であるというコンセプトの元にスタートしている。この課題設定と、「電気化学的測定による1次元情報でES細胞判定できる」という結論とは、相矛盾することになることが危惧される。

個々の要素技術・基盤技術は、分析化学的發展のみならず診断や医療に大きく活用されうる技術である。とくに今後は再生医療において、未分化細胞の維持や分化誘導確認など、1細胞分析が期待される。1細胞からの多次元情報取得は、実現すれば今後の医療を大きく発展させる期待がある。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

4項目の研究課題を設定し、3項目については順調に研究が進んだ。1細胞抽出液を4～8分割するマイクロ流路の設計と、エピゲノミクスの自動解析システム開発は完了していないが、研究目的達成への研究計画、研究実施体制、マネジメントは適切であったと判断される。実施体制は、大学院生や共同研究者を含め計画通りであり問題ない。助成金はFACSとBioMarkHDNを大型備品として購入し、有効活用されており問題ない。指摘事項の対応についても、ほぼ適切な改善が施されおり問題ない。

論文発表は、量と質ともに一流の国際誌に発信しており、高く評価できる。特に、電気化学顕微鏡関連の成果は、PNASやAnal. Chem.などに掲載されており、この分野を先導していることが伺える。また、成果発表も国内外で行っており問題ない。ただし、corresponding authorとしての論文は多くはなく、各々の成果についてどの程度リーダーシップを発揮し貢献したかについては疑問が残る。また、知財関連への出願・取得が無かった点は残念である。