令　和　３　年　７　月　２１　日

科学技術振興機構（ＪＳＴ）
九　　州　　大　　学
京　　都　　大　　学

光照射を用いた超高解像度な遺伝子解析技術の開発に成功
～組織内に潜むがん細胞の病理診断などに応用可能～

ポイント

- 組織内に潜むがん細胞や、ごく少数しか存在しない細胞の遺伝子解析は困難だった
- 半導体製造技術をヒントに、光を照射した細胞だけの遺伝子発現を調べる超高解像度な解析技術の開発に成功
- ＣＯＶＩＤ－１９による炎症組織や、がん組織標本の病理診断を、低コストで行うことが可能になる

ＪＳＴ 戦略的創造研究推進事業において、九州大学 生体防御医学研究所の大川 恭行教授と京都大学大学院 医学研究科の沖 真弥　特定准教授らの研究グループは、光単離化学（Ｐｈｏｔｏ－Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ＝ＰＩＣ）という技術を開発し、非常に小さな細胞集団や細胞の中の微小構造体で機能する遺伝子を光照射により検出することに成功しました。

ヒトやその他の多細胞生物は少なくとも１００種類以上の細胞タイプから構成され、空間的な配置や場所によってさらに細分化された機能や特性を持つことが知られています。一方で、これらの細胞を臓器や組織から取り出すと本来の特性を失うため、組織を破壊することなく特定の細胞のみを解析する必要がありますが、従来の手法では不可能とされてきました。

本研究グループは、半導体製造工程の光による超微細加工技術をヒントに、光を照射したエリアからのみ、遺伝子の発現情報を取り出す（＝単離する）技術を開発しました。ＰＩＣと名付けられたこの技術により、脳のさまざまな領域に光を照射して、領域ごとに働きが異なる遺伝子のみを検出することに成功しました。さらにマウス胎児の非常に小さな細胞集団や、従来不可能であった細胞内の１０００分の１ミリ以下の微小構造体からも遺伝子を網羅的に検出することができました。

空間オミクスと呼ばれる研究分野の成果である本技術分野は、現在、国際的な開発競争が激化しています。こうした技術の多くは、利用に高額の費用を要しますが、ＰＩＣは既存の遺伝子解析手法にたった数百円追加するだけで実施できるため、国際的な普及が見込まれる日本発の独自技術です。今後、この技術によってがんやＣＯＶＩＤ－１９による炎症など、正常と異常な細胞が入り混じった臨床組織の病理診断への応用が加速すると期待されます。

本研究成果は、２０２１年７月２１日（日本時間）に科学誌「Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ」のオンライン版で公開されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。
戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（ＣＲＥＳＴ）
研究領域：「統合１細胞解析のための革新的技術基盤」
（研究総括：菅野 純夫　千葉大学 未来医療教育研究機構　特任教授）
研究課題名：「細胞ポテンシャル測定システムの開発」
研究代表者：大川 恭行（九州大学 生体防御医学研究所　教授）
研究期間：２０１６年度～２０２１年度
ＪＳＴはこの領域で、少数の細胞を対象とした解析技術の開発を支援し、上記研究課題では、その空間的な測定システムの開発を実施しています。

戦略的創造研究推進事業 個人型研究（さきがけ）
研究領域：「多細胞システムにおける細胞間相互作用とそのダイナミクス」
（研究総括：高橋 淑子　京都大学 大学院理学研究科　教授）
研究課題名：「位置情報レコーディングによる多細胞システム解析」
研究者：沖 真弥（京都大学 大学院医学研究科　特定准教授）
研究期間：２０１９年度～２０２２年度
ＪＳＴはこの領域で、組織・器官・個体などを構成する細胞集団を時空間的に解析することによって生命現象を１つのシステムとして理解することを目指します。

＜研究の背景と経緯＞

ヒトの体は数十兆個の細胞から構成され、少なくとも１００種類以上の細胞タイプが存在します。また、立体的な配置や場所によってさらに多様で細分化された機能や特性を生み出します。このような多様性は遺伝子発現の違いによって与えられます。

例えば脳の海馬は立体的に湾曲した構造のＣＡ１野、ＣＡ３野、歯状回などの領野に大別され､それぞれが異なる遺伝子を発現することで記憶に関する特有の機能を果たします。さらにミクロな視点で見ると、発生段階のまだ小さな胎児でも空間的に特異的な発現をする遺伝子があり、それによって三胚葉や神経などさまざまな細胞タイプが整然と形成されます。

また１個の細胞の中でさえ、場所によって異なる遺伝子（ＲＮＡ）が局在しており、細胞の機能や恒常性を維持する役割を担います。したがって空間的に複雑な多細胞システムを理解するためには、生体内の場所や微小領域でどの遺伝子が発現するかを知ることが重要となります。

また、がんや炎症などの病理組織では正常と異常な細胞が複雑に混在しているため、両者をきちんと区別する必要があります。つまり異常な細胞だけを分離して遺伝子を調べることができれば、正確な診断や治療戦略の立案につながると期待されます。

では遺伝子発現の空間的な分布はどのように調べればいいのでしょうか。古くよりＩＳＨ法[注1)]や免疫染色法などの技術があり、目的の遺伝子産物（ＲＮＡやたんぱく質）を染色することによって、空間的な分布が調べられてきました。基礎生命科学分野では今でも多くの研究者が用いる実験技術ですが、一度の実験で２～３個の遺伝子しか調べることができないのが欠点です。

現在では高速シーケンス技術の普及により、すり潰した臓器や組織から一度に数万もの遺伝子を調べることができます。ただし、目的の細胞に特化して遺伝子を解析するには、その細胞を周りの組織から取り出す（単離する）必要があります。

しかし従来の物理的な切除法や、酵素などによる生化学的な分離法では、細胞にとって刺激やダメージとなるため､本来の遺伝子発現情報が損なわれてしまうことが問題でした。また、個々の細胞やマイクロメートル以下の構造体を正確に単離するのは非常に難しいため、微小環境における遺伝子発現を網羅的に調べることは不可能でした。

＜研究の内容＞

微小領域の遺伝子発現を解析する技術を開発するため、本研究グループは全く異なる科学技術に着目しました。それは半導体の製造技術です。フォトエッチングと呼ばれる製造工程では、シリコン基板の表面に１マイクロメートルよりも細い光を照射し、基板の性質を変化させて超微細な配線や素子を形成します。これは、毛髪の断面に１００本以上の線を引けるほどの微細加工技術です。つまり光は超微細に照射でき、なおかつ化学的な変化を与えることができます。

これをヒントに本研究グループは、組織や細胞内の超微細な領域に光を照射し、化学的に性質が変化した遺伝子情報だけを単離するというアイデアを着想しました。今回開発された光単離化学（Ｐｈｏｔｏ－Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ＝ＰＩＣ）は、１）逆転写反応[注2)]、２）光照射、３）遺伝子増幅反応という３つのステップからなります（図１）。

１）まず、凍結した臓器や組織の薄いスライス（切片）を作ります。その上に、遺伝子配列を読み取るための短鎖ＤＮＡ（プライマー）を滴下すると、逆転写反応によって遺伝子のＲＮＡがＤＮＡに変換されます。ＰＩＣではそのプライマーに光照射によって開裂する化合物（光開裂性ブロッカー）を結合させています。
２）次に、目的の細胞に光を照射します。このとき、照射された領域においてのみ、プライマーからブロッカーが外れます。
３）全ての細胞を溶解し、逆転写されたＤＮＡを抽出しますが、この中にはブロッカーが付いたものと、光照射で外れたものが混在しています。これをＩＶＴとＰＣＲという手法で遺伝子増幅反応を行うと、ブロッカーが外れたものだけが増幅され、遺伝子配列を読み取ることができます。

つまりＰＩＣでは､光照射された領域だけの遺伝子情報を読み取ることができるのです。その原理を証明するために本研究グループは、脳の海馬のＣＡ１野、ＣＡ３野、または歯状回のそれぞれに光照射してＰＩＣを行いました（図２）。その結果、各領野で特異的に発現する遺伝子が約１，０００種類も特定されました。特にＣＡ１野では、*Ｏｃｉａｄ２*と*Ｗｆｓ１*、ＣＡ３野では*Ｄｋｋ３*、歯状回では*Ｐｒｏｘ１*と*Ｐｄｚｄ２*遺伝子の発現量が高いと判定され、すでに報告されていたＩＳＨ法による組織染色の結果と発現パターンが一致しました。これによりＰＩＣは光照射した領域に存在する遺伝子のみを検出できることが証明されました。

次に本研究グループはさらに小さな細胞集団に対してＰＩＣを行いました（図３）。マウス胎児には神経管と呼ばれる、将来の脊髄の元になる細胞集団があります。その背側、腹側、中央部では異なる種類の遺伝子を発現し、違うタイプの神経を生み出すことが知られていますが、あまりに小さいため各領域の遺伝子発現の全貌は不明でした。

本研究グループはその３つの領域のそれぞれに、直径７５マイクロメートル（毛髪の直径とほぼ同じ）の光を照射してＰＩＣを行いました。その結果、それぞれの領域から約１万種類の遺伝子が検出されました。そのうち約２００個の遺伝子が各領域で特異的に発現することが分かりました。

特に背側で特異的と判定された遺伝子をＩＳＨ法で確認したところ、確かに神経管の背側で強く発現することが証明されました。これにより、ＰＩＣは毛髪の断面ほどの微小領域に存在する遺伝子を検出できることが示されました。

最後に、本研究グループはさらに小さな微小構造体にＰＩＣを活用しました（図４）。細胞の中には直径数マイクロメートルの核があり、その中には核スペックルと呼ばれる数百ナノメートル（毛髪の太さの１００分の１程度）の粒子があります。核スペックルの中にはさまざまなＲＮＡが豊富に含まれることは知られていましたが、具体的にどの遺伝子のＲＮＡなのかはほとんど不明でした。

本研究グループは核スペックル、もしくはそれ以外の核内領域に光を照射し、ＰＩＣを行いました。その結果、両者ともに１万種類もの遺伝子情報を検出でき、また両者の比較から、約１，０００種類の遺伝子のＲＮＡが核スペックルに多く含まれることが分かりました。その中には、核スペックルに豊富に含まれることが知られているＭＡＬＡＴ１遺伝子のＲＮＡがありました。

さらにこれまで局在が不明だった、その他の核スペックルに多く含まれる遺伝子をＩＳＨ法で解析したところ、例えばＡＫＲ１Ｃ２遺伝子のＲＮＡが核スペックルやその周辺に局在することが証明されました。

＜今後の展開＞

従来、核スペックルのような微小構造体を物理的、生化学的に取り出すことは不可能だったため、そこに含まれる遺伝子の全貌は解明できていませんでした。ＰＩＣは微小構造体そのものを取り出すのではなく、遺伝子情報だけを光でピックアップするという新しい概念です。

今回、核スペックルのような微小構造体から１万種類もの遺伝子情報を定量的に検出できたのはまさに快挙であり、微細領域に対するＰＩＣの検出感度と解像度は世界最高レベルです。ＰＩＣは半導体の製造技術にヒントを得て、化学、光学、分子生物学の知識を結集し、オールジャパンで開発された遺伝子解析技術です。

本開発は空間オミクスと呼ばれる研究分野の成果であり、この分野では空間的な遺伝子発現を調べるための技術を求めて国際的な開発競争が激化しています。そのほとんどが高額な機器やランニングコストを必要とする技術ですが、ＰＩＣは既存の遺伝子解析手法にたった数百円追加するだけで実施できるのが大きなメリットです。

そのため、従来のＩＳＨ法や免疫染色などの染色技術よりもはるかに多くの遺伝子の空間的な分布を､低コストかつ高解像度で解析することができます｡これはヒトや動物など、あらゆる多細胞生物の基礎研究において直ちに活用できるため、立体的な組織形成や細胞分化に関わる遺伝子を解明し、再生医療につながる研究を加速させます。

ＰＩＣは臨床組織の病理診断にもそのまま活用できます。がん患者の診断では、組織標本を染色して悪性度の判定や治療戦略の立案がなされますが、がん組織には正常と異常な細胞が入り混じっているため、それらを分離して遺伝子を解析するのは困難です。また潰瘍性大腸炎やＣＯＶＩＤ－１９などによる炎症組織では正常組織に異常な炎症性リンパ球が複雑に入り乱れるため、それらを区別して解析するのも困難です。

そこにＰＩＣを活用すれば、異常な細胞だけに光を照射して、それらの遺伝子情報を一挙に読み取ることができます。したがって異常な細胞の性質を深く調べ上げ、より正確な診断や効果的な治療方針の立案に応用できると期待されます。

＜参考図＞

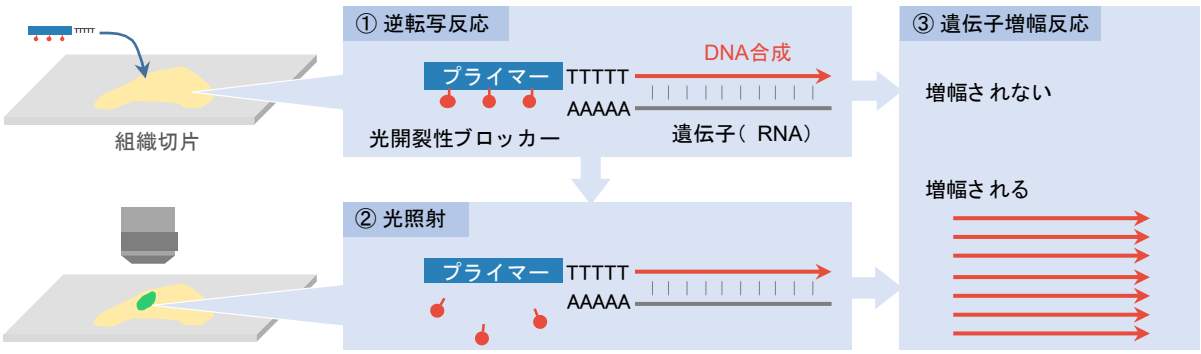

図1　**PIC** の原理　① 光開裂性ブロッカーのついたプライマーを切片に滴下する。その後、逆転写反応によって遺伝子の RNA が DNA に変換さ れる。② 目的の細胞に光照射すると、プライマーからブロッカーが外れる。③ 光照射し た細胞の遺伝子だけが増幅さ れる。

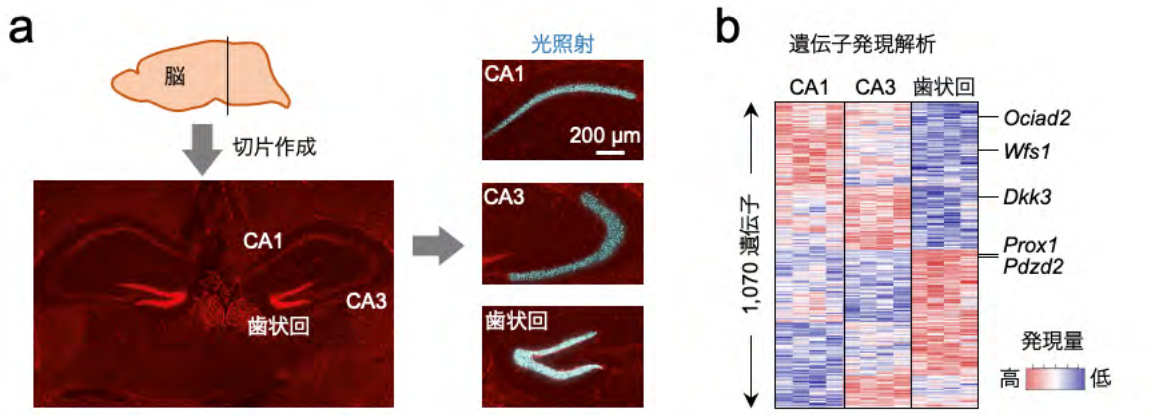

図２ 海馬に対する PIC　(**a**) 脳の切片を作製し、海馬の CA1、CA3、または歯状回に光を照射して PIC を行った。(**b**) その結果、CA1 では *Ociad2* と *Wfs1*、CA3 では *Dkk3*、歯状回では *Prox1* と *Pdzd2* 遺伝子の発現量が高いと判定され、これは ISH をおこなった先行論文の結果と一致する。

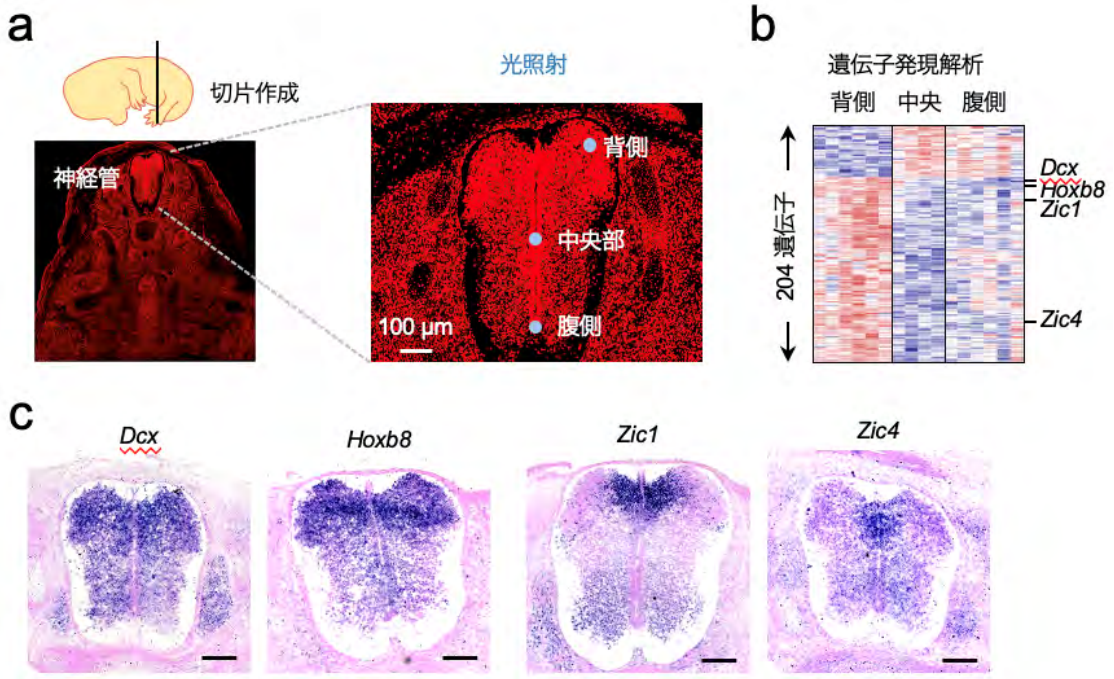

図３ マウス胎児に対する PIC　(**a**) マウス胎児の切片を作製し、神経管の背側、腹側、または中央部に光を照射して PIC を行った。(**b**) その結果、*Dcx*、*Hoxb8*、*Zic1*、*Hoxb8* 遺伝子などの発現量が背側で高いと判定された。(**c**) 上記の遺伝子の ISH を行った結果、全て背側で強く発現することが証明された。

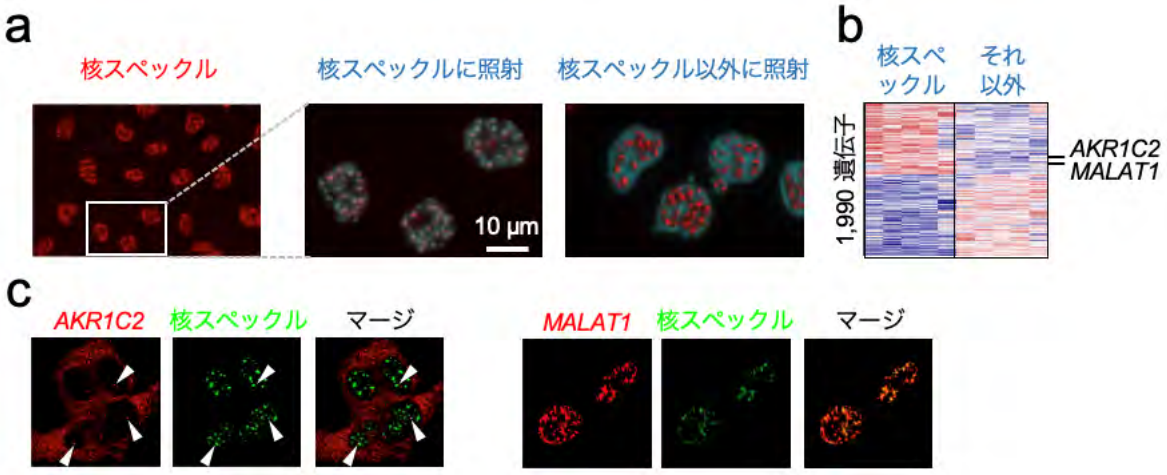

図４ 核スペックルに対する PIC　(**a**) 細胞の核の中にある核スペックル、またはそれ以外の核内領域に光を照射して PIC を行った。(**b**) その結果、*AKR1C2* と *MALAT1* 遺伝子が核スペックルに多いと判定された。(**c**) 上記の遺伝子の ISH を行った結果、どちらも核スペックルやその周辺に局在すること証明された。

＜用語解説＞

注１）ＩＳＨ（ｉｎ　ｓｉｔｕ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ）法

細胞には数万種類の遺伝子がＲＮＡとして転写されるが、その中の１種類のＲＮＡだけを染色するための技術。図３ｃや図４ｃのように、個々の遺伝子の空間的な分布を見ることができる。

注２）逆転写反応

現在広く普及している高速シーケンス技術はＤＮＡの塩基配列を読み取ることはできるが、ＲＮＡを読み取ることはできない。つまり、ＲＮＡとして発現した遺伝子は直接読み取ることができない。そのためＲＮＡを逆転写という反応によってＤＮＡに変換させるのが一般的である。その逆転写反応にはプライマーが必要であり、そこに光開裂性ブロッカーを付加することでＰＩＣの発明に至った。

＜論文タイトル＞

“High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry”

（光単離化学による高感度の空間的な遺伝子発現解析技術の開発）

ＤＯＩ：10.1038/s41467-021-24691-8

＜お問い合わせ先＞

＜研究に関すること＞

大川 恭行（オオカワ ヤスユキ）

九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野　教授

〒812-0054 福岡市東区馬出３－１－１・コラボステーション２Ｆ ２０５室

Tel：092-642-4531

E-mail：yohkawa@bioreg.kyushu-u.ac.jp

沖 真弥（オキ シンヤ）
京都大学 大学院医学研究科 創薬医学講座　特定准教授
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町５３・南部総合研究１号館 ４０４号室
〒812-0054 福岡市東区馬出３－１－１・コラボステーション２Ｆ ２０５室
Tel：075-366-7479
E-mail：oki.shinya.3w@kyoto-u.ac.jp

＜ＪＳＴ事業に関すること＞
保田 睦子（ヤスダ ムツコ）
科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ
〒102-0076 東京都千代田区五番町７ Ｋ’ｓ五番町
Tel：03-3512-3524　Fax：03-3222-2066
E-mail：crest@jst.go.jp

＜報道担当＞
科学技術振興機構 広報課
〒102-8666 東京都千代田区四番町５番地３
Tel：03-5214-8404　Fax：03-5214-8432
E-mail：jstkoho@jst.go.jp

九州大学 広報室
Tel：092-802-2130　Fax：092-802-2139
E-mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp

京都大学 総務部 広報課 国際広報室
Tel：075-753-5729　Fax：075-753-2094
E-mail：comms@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp