

2015年度 中央大学共同研究費 ー研究報告書ー

研究代表者	所属機関	理工学部		2015年度助成額
	氏名	鈴木 宏明		2,500 (千円)
	NAME	Hiroaki Suzuki		
研究 課題名	和文	超並列・高密度1細胞遺伝子発現解析へ向けた マイクロデバイス開発	研究 期間	2014年度 ～2015年度
	英文	Development of microdevices for highly parallel and dense single-cell gene-expression analysis		

1. 研究組織

	研究代表者及び研究分担者		役割分担	備考
	氏名	所属機関/部局/職		
1	鈴木 宏明	中央大学・理工学部・教授	研究総括、マイクロチップの作製、総合評価	研究代表者
2	土肥 徹次	中央大学・理工学部・准教授	チップ製造プロセス最適化	研究分担者
3	城口 克之	独立行政法人理化学研究所・統合生命医 科学研究センター・上級研究員	遺伝子解析の最適化、マ イクロチップの評価	学外研究分担者
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
合計 3 名				

2. 2015年度の研究活動報告

(和文)

【研究の遂行状況】

2014年度において、計画通りに1細胞解析のための3次元形状マイクロチャンバーの基本的な製造方法を確立した。2015年度には、細胞アッセイのための試薬を保持する容積をより大きくするための、製造上の条件検討を行った。材料力学のアプローチから数理モデルも併用し、現在確立した製造方法（光造形装置で鋳型を作り、シリコーンゴムに転写する方法）において製造可能なチャンバーのスケールの範囲を明らかにした。

また、製造したデバイスを用い、研究開始時に提案した1細胞由来の遺伝子発現解析(RT-PCR法)に加え、1細胞ゲノムのDNA配列解析に向けた等温ゲノム増幅反応を行うための条件検討を行った。前者は、PCR反応時の温度制御中に、極微量の反応液が蒸発してしまうという問題解決に手間取り、現在も条件検討を継続中である（改善は続いている）。後者は、1細胞由来のゲノムがマイクロチャンバー内で増幅可能であることを確認した。現在、マイクロチャンバーの中から増幅産物を取り出す方法を試しており、その後共同研究者の城口氏の機関が所有する次世代シーケンサーで配列解析を行う予定である。

【研究成果】

提案した3次元形状を有するマイクロチャンバーの作製方法、その適用範囲、および1細胞解析への適用に関する基礎的条件については十分な理解が得られ、国内外の学会で発表し、かつ現在国際ジャーナルに投稿中である。本研究では、提案したマイクロチャンバーの製造技術そのものが新規性を有するものであり、当該分野の進展に貢献できたと考えている。一方、研究申請時に目標とした、1細胞RT-PCR法の確立については、一定の進展があるものの道半ばである。今後もデバイスを構成する材料や試薬導入法の詳細な検討を継続し、1~2年のうちに達成する予定である。本提案デバイスを用いた1細胞解析の応用として、1細胞遺伝子配列解析に向けた上記の遺伝子増幅法を新たに開始したが、こちらは1年以内に原著論文というアウトプットまで出せそうな感触を得ている。

【共同研究の状況】

本研究は、当初の計画どおり、研究代表者と研究分担者が並列に個別の研究テーマを遂行する共同研究方式ではなく、具体的な実験作業は鈴木研究室で集約して行う方式をとった。研究分担者である城口と土肥は、主に鈴木研究室での研究計画の検討、トラブルに対するアドバイス、データの解析等に協力するという共同研究形態をとった。一部の条件出しは共同研究者自身の研究室で行ったため、その消耗品等を本プロジェクトより支出した。土肥と精密機械工学科の辻智章教授は、2015度にマイクロチャンバー製造プロセスの数値および理論解析を主に行った。鈴木は、実験全般に加え、結果の集約と論文執筆を行った。プロジェクト開始当初に雇用した実験補助者が辞めた影響で、特に細胞解析に関する実験が多少遅延したが、2015年度末に新たなバイオ系実験補助者を雇用し、遅延を回復させつつある。なお、本研究には大学の2名の大学院生と1名の学部生も参画し、理化学研究所への訪問ミーティングや、スカイプ等での研究進捗報告を通じて、教育活動としても実りがあったと考えている。

(英文)

It has been widely recognized that individual cells in the identical population has large heterogeneity, and exploring such property is important for understanding the mechanisms of cancer and immune systems. We aimed to develop a microwell device for the gene expression analysis of a large number of single cells ($> 10^3$ cells) in a highly parallelized manner. In 2014 we established the novel (patented) fabrication process for the proposed 3D microwell device, and in 2015 we further examined the limit and applicability of this device for the single-cell analysis. Especially we confirmed that single leukemia cells were entrapped within the tiny opening of the well at $> 60\%$ efficiency, which could be subjected to the enzyme-based assay. Application of this device for the gene-expression analysis and DNA sequencing, at single-cell level, is currently under study, and we keep our effort to realize the single-cell genomic analysis in a high-throughput manner at previously unattained level.

3. おもな発表論文等（予定を含む）

【学術論文】（著者名、論文題目、誌名、査読の有無、巻号、頁、発行年月）
1. K. Mistuno, H. Ikeda, M. Tsugane, T. Okano, K. Shiroguchi, H. Suzuki, “3D-shaped microchamber for the single-cell analysis,” Proc. μ TAS 2015, pp. 522-524, Gyeongju, Korea. (査読有)
2. 鈴木, 三野, 池田, 津金, 岡野, 城口, 「1細胞解析に向けた3次元マイクロチャンバー」電気学会バイオ・マイクロシステム研究会資料, BMS-15, pp. 17-20, 2015. (査読有)
3. H. Suzuki, K. Mitsuno, K. Shiroguchi, T. Okano, T. Dohi, T. Tsuji, “One-step PDMS micromolding process for tapered three-dimensional structures,” Proc. APCOT 2016, 2016年6月. (査読有)
【学会発表】（発表者名、発表題目、学会名、開催地、開催年月）
1. H. Suzuki, K. Mitsuno, M. Tsugane, T. Okano, K. Shiroguchi, “3D Microchamber with Reagent reservoir for the single-cell analysis,” Pacificchem 2015, Hawaii, US.
【図 書】（著者名、出版社名、書名、刊行年）
【その他】（知的財産権、ニュースリリース等）