

2014年度 中央大学共同研究費 一研究報告書一

研究代表者	所属機関	理工学部	2014年度助成額
	氏名	鈴木 宏明	7,500 (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に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 Microdevice for highly parallelized, high-density gene expression analysis from single cells		

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・准教授	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. 研究の概要（背景・目的・研究計画・内容および成果 和文 1000 字程度、英文 100word 程度）

（和文）

【背景・目的】

ヒトのゲノムには約 2 万の遺伝子があり，同種類とされている細胞集団の中でも，どの遺伝子 (mRNA) をどれだけ発現するかで個々の細胞が多様性を持つことが知られている．そして，ごく少数の集団が全体（例えば個体や組織）の機能や応答に大きく影響する．細胞の多様性の全貌把握を目指し，網羅的遺伝子発現解析技術の開発が世界の大学および企業で進められている．

本研究では，1 細胞毎の遺伝子発現解析を，オンチップで数千から数十万個並列して行うマイクロデバイス開発を行う．個々の細胞を並列・高密度マイクロウェルに封入し，その中で細胞破碎→逆転写反応→遺伝子増幅反応→特定遺伝子発現量の定量という一連の反応を簡便な操作で実現可能にする．

【研究計画・内容】

本研究は以下の計画で行う．まず，従来技術に比べて解析可能な細胞数を大幅に増加させるため，複雑な流体制御システムを排除し，可能な限り単純化したマイクロ高密度チャンバーアレイの開発を行う．次に，遺伝子発現解析に必要なプロトコールの各操作について，上記のマイクロチャンバー内で行うための最適化を行う．最終的に，モデルとしての細胞およびターゲット遺伝子を用いて発現計測を行い，開発したマイクロチャンバーアレイの有効性を示す．

【成果】

1 年目が終了した時点で，研究は計画通り順調に進行している．鈴木グループにおいて，マイクロ光造形装置を用いたマイクロウェルの鋳型形成プロセスを確立し，1 細胞を捕獲しかつ試薬供給を実現する 3 次元的な形状を，1 ステップでシリコンゴムに転写・成形するための基礎条件を確立した．本手法はマイクロ加工およびバイオチップの分野で先例のないものであり，中央大学と理化学研究所の共同で 2015 年 3 月に特許を出願した．（特許出願がなされるまで 2014 年度は学会や論文発表を控えたが，2015 度は国内外の学会発表および原著論文執筆を行う）．今後，土肥が中心となり製造プロセスの最適化，大面積化を行う．試作したマイクロチャンバーを用い，白血病がん由来の培養細胞でアポトーシス（細胞死）のアッセイを行ったところ，各マイクロウェルに個別の細胞が高効率で封入され，1 細胞由来の酵素活性が計測可能であることを確認した．現在，城口の指導の下，遺伝子発現解析に必要な細胞破碎および RT-PCR プロセスの最適化を行っている．

なお，2014 年度は研究室所有の共焦点レーザー顕微鏡に紫外域レーザーユニットを追加して，オンチップ RT-PCR における核酸増幅の定量を可能とした．また，細胞培養に必要なテクニシャンを雇用した．

（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 aim 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 succeeded in fabricating the 3D microwell device using a single-mold process, offering the entrapment of single cells as well as providing the extra reagent volume for the RT-PCR (patent pending). We are optimizing the cell-lysis and RT-PCR steps to complete the high-throughput gene expression analysis.

