

(様式 5)

指導教員 承認印	
-------------	--

2019 年 9 月 23 日
Year Month Day

学位（博士）論文要旨

(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 (Ph. D. candidate)	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 (major) 2016 年度入学 (Admission year) 学籍番号 16831702 氏名 白井 正敬 (student ID No.) (Name)  (Seal)
主指導教員氏名 (Name of supervisor)	養王田 正文
論文題目 (Title)	診断応用のための高スループット・高感度 単一細胞解析法の開発
論文要旨 (2000 字程度) (Abstract (400 words))	<p>将来の単一細胞を用いた医学応用, 特になん免疫治療薬の体外診断や臨床検査を実現するための基本的な技術課題の解決に向けた研究を行った。採取した組織や血液中のわずかな細胞集団の変化を検出できる単一細胞レベルでの体外診断・臨床検査を実現するため, 単一細胞解析デバイスとそれを用いた解析方法の開発を目的とした。これを実現するために, 高感度かつ高スループットな単一細胞解析を実現する次世代シーケンサ向けサンプル調製デバイス (Vertical Flow Array Chip: VFAC) とその解析方法を開発した。また, 単一細胞解析結果から信頼度の高いクラスター (細胞集団) を抽出することで, サンプル集団を“純化”し診断の精度を向上できる解析法を開発した。さらに, 細胞集団ごとのバイオマーカーの機序を解析することに役立つと考えられる FFPE 上の単一細胞中 mRNA を高分解能に採取するレーザー破砕採取法を開発した。</p> <p>それぞれの開発項目に対して以下の結論を得た。</p> <p>高感度・高スループット単一細胞解析デバイスの開発については, まず, 標準試料として既知量の mRNA を用いることで, 開発したデバイス (VFAC) の定量性に関わる基本性能を評価し, 以下の結果と結論を得た。</p> <p>(1) 細胞を単離するための微小反応槽に分注された mRNA 中の 10 コピー以上の遺伝子発現の検出と定量が可能であった。</p> <p>(2) 個々の微小反応槽に分注された mRNA サンプルの調製効率の平均は 48% であった。これらの結果から, 開発した VFAC を用いて高感度な単細胞解析が可能であることが示された。</p> <p>次に, 開発したデバイスの高スループット性については, 培養細胞を用いた評価を実施</p>

し、以下の結果と結論を得た。(1) 複数の VFAC を組み込んだフローセルデバイスを試作し、VFAC 1 個当たり、50 個以上の細胞のデータを取得することができた、これより、サンプル処理コストが 1/50 以下にすることができると分かった。

(2) 2580 個の培養細胞を一括して処理し、約 2000 個の細胞の単一細胞解析データを取得できた。

(3) 細胞からのサンプル調製でも 100 コピー以下の低発現遺伝子の単一細胞解析が可能であることを示した。

これらの結果から高感度かつ高スループットな単一細胞解析が開発したデバイスによって実現できることを示した。

次に単一細胞解析結果から得られるクラスタリング（細胞集団抽出）に信頼度を付与するために pq-値という指標を提案し、以下の結果と結論を得た。

(1) pq-値は与えられた測定誤差に対して妥当な最適クラスタ数を与える。

(2) pq-値はパラメータを変更することで擬陽性率を制御して、最適クラスタ数を与える。

(3) pq-値はデータ数や測定誤差、クラスタ間距離、データ分布のガウス分布からのずれに対して連続的で安定した挙動を示す。

(4) 未分化と分化誘導細胞の種類が存在すると期待されるサンプルに対して、開発した単一細胞解析デバイス VFAC で得られたデータに pq-値を適用したところ、クラスタ数が 2 のときに pq-値が極大値をとり、妥当なクラス多数を与えた。

以上より、pq-値は生成データに対して安定で妥当な最適クラスタ数を与えるクラスタ信頼度評価指標であることを示した。

最後に、従来のレーザーマイクロダイセクションのようにレーザー照射によるサンプルの切り出すのではなく、サンプルの破碎と採取を溶液中で行うレーザー破碎採取法を開発し、FFPE 切片上の隣接する 2 細胞由来の mRNA を採取可能であることを自家蛍光イメージングと RT-qPCR および RNA-seq による遺伝子発現解析結果と組み合わせることで示した。

(英訳) ※和文要旨の場合(400 words)

We have developed basic technologies to solve potential problems for applying single cell analysis to clinical applications like in-vitro diagnostics and clinical test. Our target is to develop a device and a method to enable the diagnostics and tests to detect a change in small population in heterogeneous tissue samples or blood samples. To this end, we developed a novel device (Vertical Flow Array Chip: VFAC) for preparing samples for next generation sequencers. We also developed a statistical a method to select highly reliable subgroups of cells for high quality diagnostics based on purified subgroups of the sample. We also developed a novel sampling technique based on laser induced lysis from FFPE section. The technique may be useful to analyze mechanism of function of the biomarkers based on single cell analysis.

Results and conclusions for the development issues are following. As for the development of the device for high sensitive and high throughput single cell analysis, we evaluated the basic performance of the VFAC for calibrated mRNA samples.

(1) The developed method based on VFACs enables as high sensitive gene expression analysis as 10 copies per micro-chamber.

(2) Efficiency of the sample preparation from mRNA was 48 % for the sample with more than 10 copies of mRNA in the individual micro-chambers on VFACs.

These results show that VFACs enable high sensitive single cell analysis.

Next we have evaluated the throughput of the method based on VFACs.

- (1) A Flow-cell device integrated with VFACs reduce the cost of reagents and labor costs more than 50 times.
- (2) VFACs demonstrated that the high throughput data acquisitions of around 2000-single-cells from 2580 cells of cell line (THP1).
- (3) It was possible to acquire data for low-expressed genes less than 100 copies per cells.

These results show that VFACs have capability of high throughput and high sensitive analysis.

Nest, we have developed novel statistical index called pq-value for evaluating reliability of clusters based on single-cell data.

- (1) The pq-value can indicate optimum number of clusters under the given measurement noise level.
- (2) The pq-value can indicate optimum number of clusters under controlling false positive rate.
- (3) The pq-value varies continuously for the continuous changes of number of data, noise level and distances between clusters.
- (4) The pq-values for the sample composed of undifferentiated cells and differentiated cells indicate two clusters as most reliable grouping, which is quite reasonable.

These results show that pq-value is appropriate to evaluate the reliability of clusters.

Finally, we developed novel method of sampling mRNA from single cells in the FFPE section based on laser induced lysis. RT-qPCR data and RNA-seq data indicates that the sampling is possible by using the developed method.