

従来比コストを1/10,
スループットを20倍とした
シングルセルRNA-seq法sci-TAS-seq

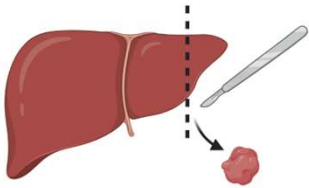
東京理科大学 生命医科学研究所

講師 七野 成之

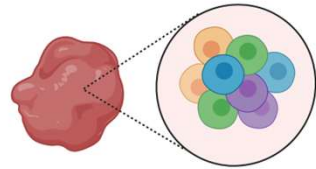
2026年2月5日

シングルセルRNAシーケンス(scRNA-seq)解析

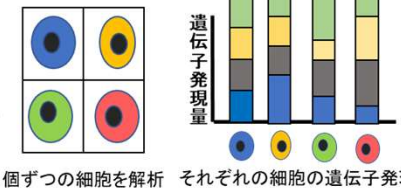
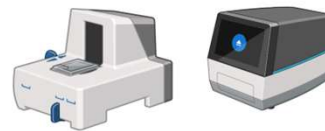
① 組織サンプル採取



② 組織や細胞塊からの単細胞取得



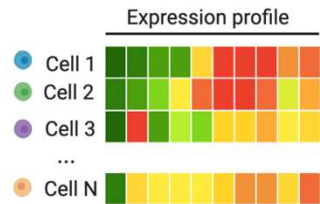
③ 単細胞の分離と細胞固有DNAバーコードの付加



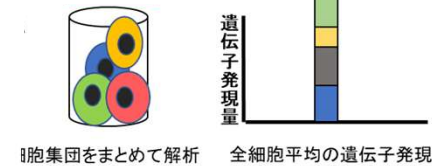
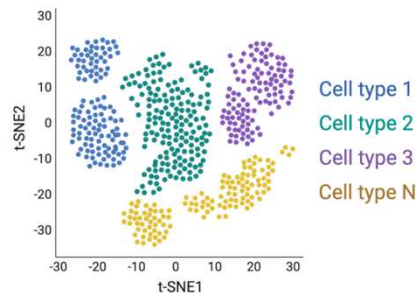
④ 次世代シーケンス



⑤ 細胞ごとの遺伝子発現量の取得



⑥ クラスタ解析、細胞種同定



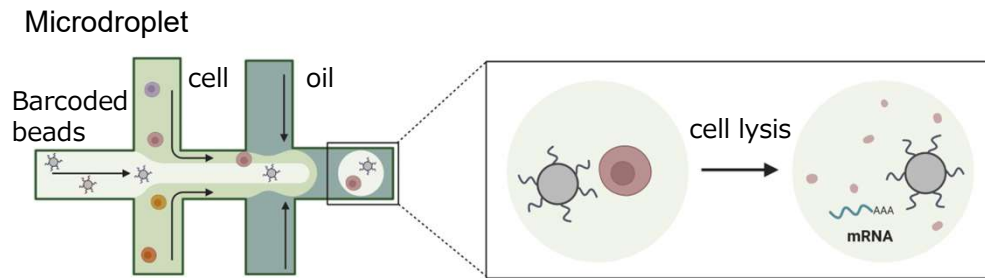
検体中の個々の細胞の遺伝子発現を網羅的に捉え、
個々の細胞の性質の違いを詳細に解明できる技術

シングルセルRNAシーケンス(scRNA-seq)解析

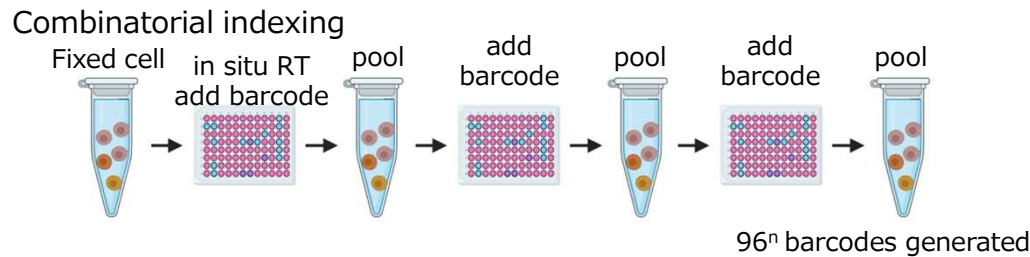
検体中の個々の細胞の遺伝子発現を網羅的に捉え、
個々の細胞の性質の違いを詳細に解明できる技術
従来解析とくらべ数万倍のデータを得られる。

- 細胞種のunbiasedな分類とそれを定義づける遺伝子の同定
 - 細胞間相互作用、細胞分化系譜の推定
 - 細胞検体のQC、バッチ間の違いの解明
 - 限られた臨床検体からの可能な限りの多量のデータ取得。新規病態特異的細胞の同定
- 等で有用

scRNA-seq解析 (従来技術)

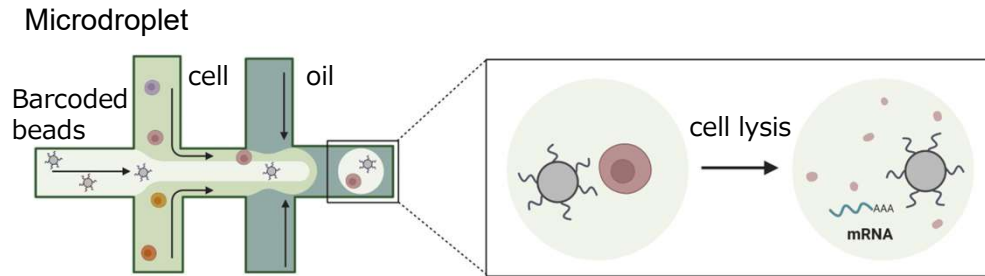


微細なマイクロ流路内で液滴を形成、
1細胞と、固有のDNAバーコードを有する
ゲルビーズを閉じ込める



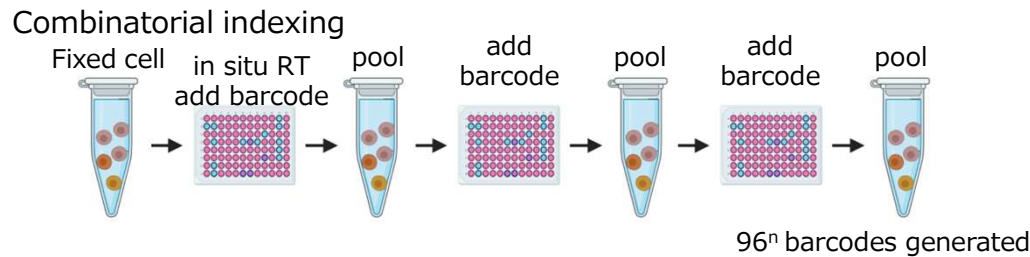
固定した細胞を一つの入れ物とし、細胞
内のRNA由来のcDNAに固有のバーコ
ードを”混合→再分散”を繰り返して確率
論的に付加

scRNA-seq解析 (従来技術)の問題点



微細なマイクロ流路内で液滴を形成、1細胞と、固有のDNAバーコードを有するゲルビーズを閉じ込める

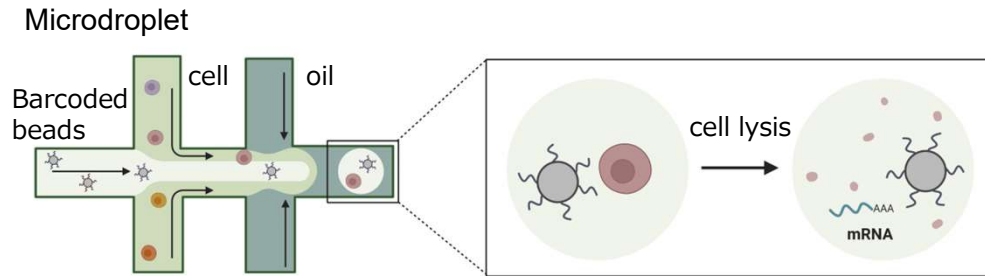
一般に高価 (75~100万円 / 20000細胞)
微細流路の詰まりによるサンプルロストの危険性がある(とくに希少な検体時に問題)、細胞分離へのバイアス



固定した細胞を一つの入れ物とし、細胞内のRNA由来のcDNAに固有のバーコードを”混合→再分散”を繰り返して確率的に付加

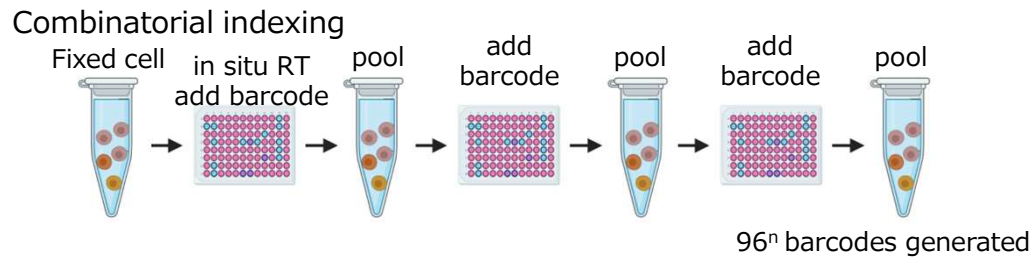
比較的安価(25万円 / 20000細胞)だが操作が煩雑、感度が低い

scRNA-seq解析 (従来技術)の問題点



微細なマイクロ流路内で液滴を形成、
1細胞と、固有のDNAバーコードを有する
ゲルビーズを閉じ込める

これら二つの技術を組み合わせ、マイクロドロプレット法のコストを
combinatorial indexing法なみに落とした技術もあるが、
ヒト/マウスに限定され、解析可能な遺伝子も限定され、
配列情報が得られないプローブ法に限定される

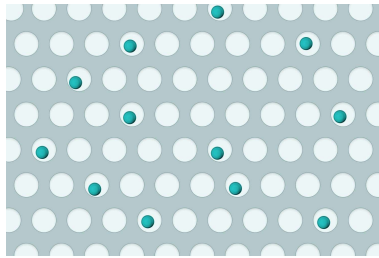


固定した細胞を一つの入れ物とし、細胞
内のRNA由来のcDNAに固有のバーコ
ードを”混合→再分散”を繰り返して確率
論的に付加

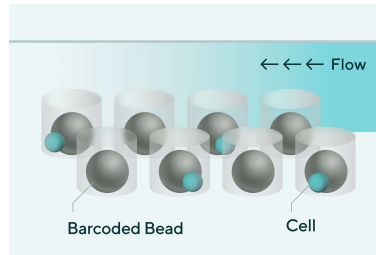
汎用されているscRNA-seq解析の問題点と その解決策

- ・煩雑さ、系としての安定性の低さ
 - 既存技術nanowell法をベースに新技術を開発
 - 新開発した固定細胞の後処理法により、大幅解析コスト低下の前提である大量細胞解析時の安定性を大幅に向上
- ・従来解析(bulk RNA-seq)と比べた際、10倍以上とその高い解析コスト
 - 既存技術nanowell法とcombinatorial indexing法の組み合わせにより大幅にコストを低下(最大1/10)
- ・遺伝子検出感度と解析コスト/解析可能な遺伝子や生物種の種類のトレードオフ
 - 既存のRNAを修飾しない細胞固定法、発表者らの特許技術である高感度cDNA増幅法TAS-Seq, セミランダムプライミングを組み合わせ、低コスト・高感度・広い解析対象を両立。

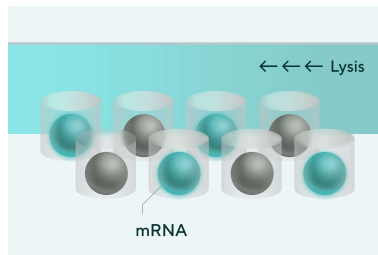
nanowell法は安定したscRNA-seq解析を可能に



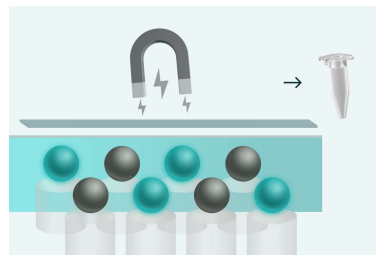
① 細胞のnanowellへのロード
(自然落下、ポアソン分布)



② 細胞バーコード-polyT
付加磁気ビーズの充填

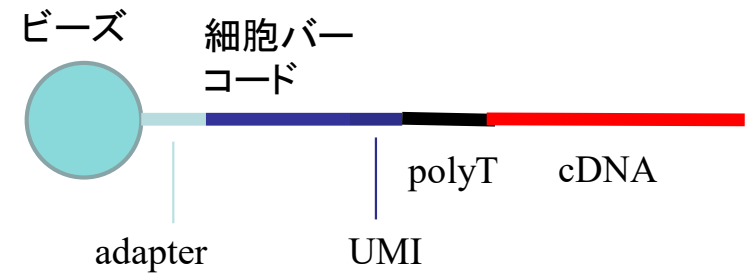


③ 細胞溶解 RNA捕捉



④ 磁気ビーズの回収と
cDNA合成

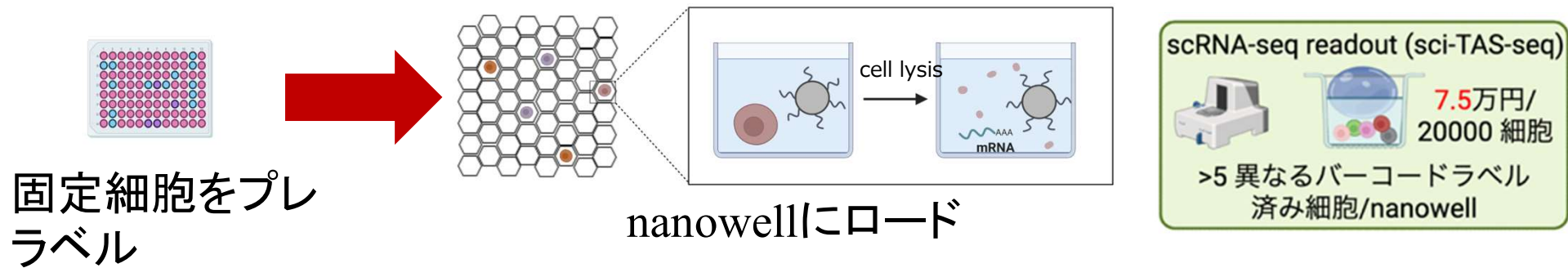
* 既存技術



⑤ 逆転写後のライブラリ構造

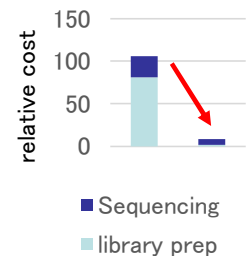
細胞を27万wellを有するnanowellに自然落下させ、各細胞を微小なwellに隔離するので、well上部の流路が十分にひろく、つまりのリスクは全くない
nanowell法はmicrodroplet法の1/3程度のライブラリ調整コスト

nanowell法とcombinatorial indexing法の組み合わせ

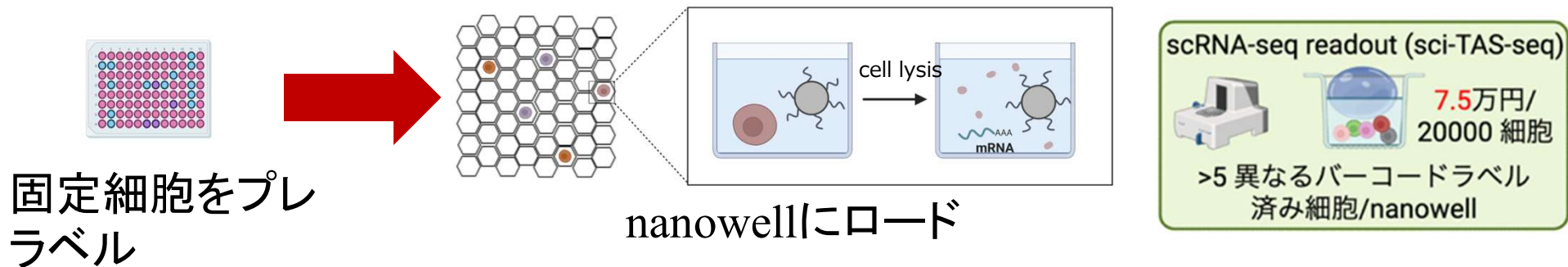


複数細胞が1 wellに入っている場合、あらかじめそれらを区別できるようにプレラベルしているため、後でデータを分離可能

- 5~20倍の細胞を1反応で処理可能に (最大100万細胞)
- 細胞あたりライブラリ作成コストが1/5 ~ 1/20に
- シーケンスを含め、細胞あたりコストが50円/細胞を 3.5円/細胞にすることができる



nanowell法とcombinatorial indexing法の 組み合わせの問題点を新技術では解消



- ・大量に細胞をロードすると、高密度nanowell (27万well)を用いると、反応中に激しく凝集し解析困難に
 - ・低密度well (8000wellほど、wellあたり体積も大きい)の場合はそのような問題は生じないが、細胞スループットがあがらずコスト低下効果が限定的に
- 新開発した固定細胞の後処理法により、大幅解析コスト低下の前提である大量細胞解析時の安定性を大幅に向上

* 新技術

汎用されているscRNA-seq解析の問題点と その解決策

- ・煩雑さ、系としての安定性の低さ
 - 既存技術nanowell法をベースに新技術を開発
 - 新開発した固定細胞の後処理法により、大幅解析コスト低下の前提である大量細胞解析時の安定性を大幅に向上
- ・従来解析(bulk RNA-seq)と比べた際、10倍以上とその高い解析コスト
 - 既存技術nanowell法とcombinatorial indexing法の組み合わせにより大幅にコストを低下(最大1/10)
- ・遺伝子検出感度と解析コスト/解析可能な遺伝子や生物種の種類のトレードオフ
 - 既存のRNAを修飾しない細胞固定法、発表者らの特許技術である高感度cDNA増幅法TAS-Seq, セミランダムプライミングを組み合わせ、低コスト・高感度・広い解析対象を両立。

汎用されている固定法の問題点とその解決策

* 既存技術

ホルマリンによる細胞固定

→病理検査等で汎用されているが、RNAも架橋するため断片化し解析が困難に

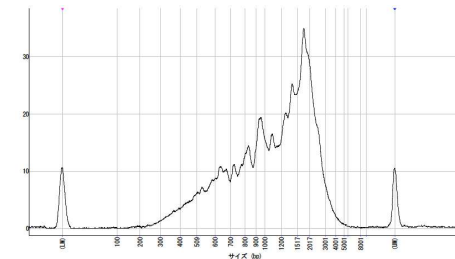
メタノール + NHS ester + DEPCによる細胞固定 (Martin et al. Nat Prot 2023)

→RNAの修飾は少ないため、RNAが断片化せず全長cDNA解析が可能

→NHS esterによる、第一級アミン(リジン残基)を標的とした架橋により、メタノール単剤よりも固定細胞を頑健に

→DEPCにより、しばしば問題になるRNA分解酵素RNaseを不可逆的に阻害

→この技術を、新開発解析系では採用



TAS-Seq法による安定した高効率なcDNA増幅

- ターミナルトランスフェラーゼ(TdT)は、極めて高効率にホモポリマーを1本鎖DNA末端に付加 (>90%)
- TdTに基づく微量cDNA増幅法は最も高感度 (Mereu et al Nat Biotechnol 2020)
- 一方、TdTのその高い反応性が、シビアな反応条件コントロールを要求し安定性を損なっている

* 特許技術

Terminator-assisted solid phase cDNA amplification and sequencing (TAS-Seq)

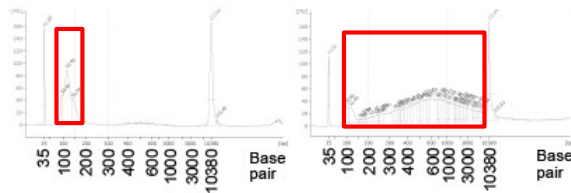


ddNTPターミネーターの微量添加により、TdT反応によるホモポリマー伸長反応を、反応時間やテンプレート量によらず、確率論的に停止。

RT primer-derived biproducts

ddCTP⁺

no ddCTP



→TdT法の安定性を大幅に向上

→本技術のエッセンスを新開発技術にも適用

Patent pending (US/JP/CN) established (EP), Shichino *et al.* *Commun Biol* 2022

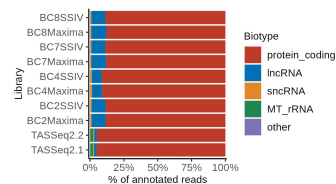
ランダムプライマー法により全RNAを解析可能に

固定細胞用の従来法1 (プローブ法)は、特定の遺伝子を標的としたDNAプローブを用いるので、解析可能な生物種・RNAの種類に限られる他、RNA(cDNA)の配列情報は得られない

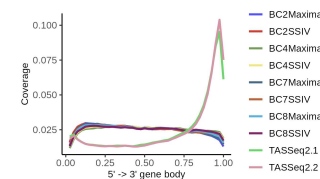
リボソームRNAへの結合や、polyA配列への結合を抑制したセミランダムプライマーを用いたRNA捕捉、cDNA合成を採用し、解決。

- 生物種を問わず利用可能(ヒトマウス以外もOK)、
- 配列情報を含むシーケンスデータが得られる(変異を有する細胞も同定できる)
- non-coding RNAも含むRNAを広範に補足可能
- RNA全長領域を補足可能

could detect non-coding RNAs



Covering whole gene body



新技術の特徴(まとめ)

固定細胞スタート : 試験計画を柔軟に調整可能 (検体を随時凍結固定ストックし、ある程度貯まった段階で解析) 最大48検体/1反応

高い細胞スループット(~100万細胞/ラン)、低いコスト(7万円 / 20000細胞)

高い系の安定性・感度(高密度nanowell法の採用と独自の固定細胞処理方法、TAS-Seqの採用)

分解しやすいRNAもRNaseの不可逆的不活化で安定化 : 長期検体保管が可能 (~1年)

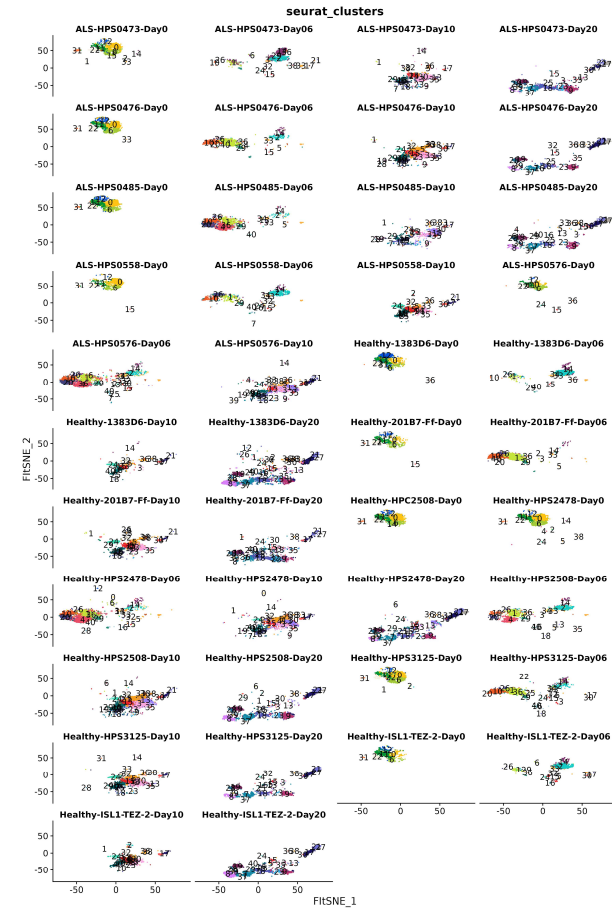
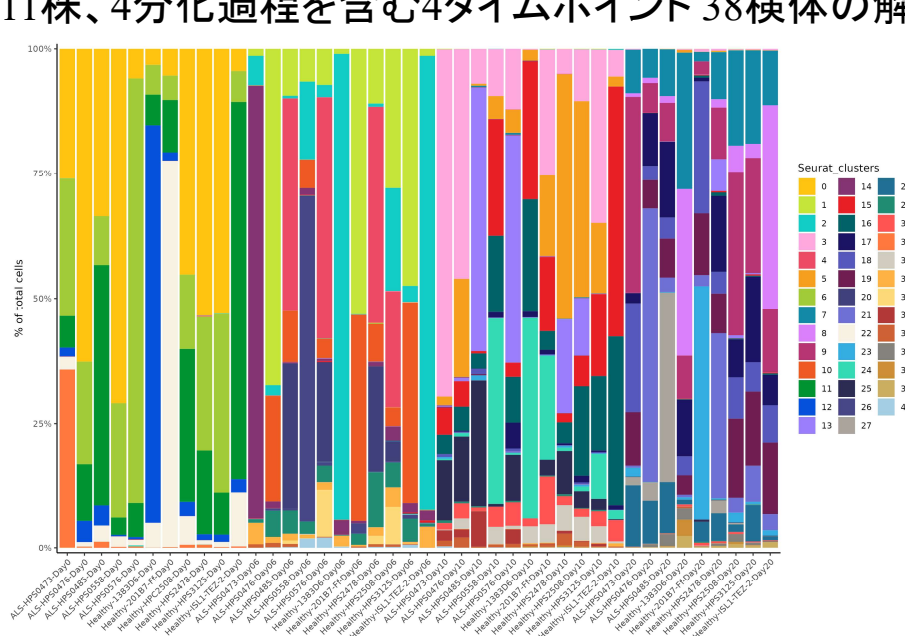
固定細胞で汎用されている生物種特異的DNAプローブではなく、独自のセミランダムDNAプライマーを利用しているので

- ・生物種を問わず利用可能(ヒトマウス以外もOK)、
- ・配列情報を含むシーケンスデータが得られる(変異を有する細胞も同定できる)
- ・ non-coding RNAも含むRNAを広範に補足可能
- ・ RNA全長領域を補足可能

今後タンパク質発現解析も可能なように拡張予定

新技術での解析例

iPS細胞11株、4分化過程を含む4タイムポイント 38検体の解析例



- 従来技術だと1000万円の解析コストがかかるのを、約100万円で実施
- 1反応で処理が完了するので、右に示すようにバッチエフェクトの低い安定したデータが得られている。
- 細胞クラスター特徴的な遺伝子として、従来困難であったnon-coding RNAも多数検出 (従来30000程度のところ、50000以上の遺伝子を検出)
- 遺伝子スプライスバリエントや 遺伝子変異も捉えられる(プローブ法では困難)

想定される用途

- 本技術の特徴は高スループット、柔軟性、安定性、低コスト性なので、たとえば大規模な細胞株ライブラリー/スクリーニング検体の解析、臨床検体の大規模解析、等に有用
- 異なる試験の相乗り解析で、解析案件あたり的大幅なコスト低下を見込める
- 解析細胞数を求められるアプリケーション(例：Slide-tags空間遺伝子発現解析)への適用
- 従来困難であったnon-coding RNAの解析、遺伝子中間領域の変異と細胞性質との間の関係性の解析等でも有用
- 標準固定細胞を用いた細胞製剤のQC(=異常細胞の有無の判別、ロット間の性質の違い)といった用途に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 本解析の受託解析としてのサービス展開(特に相乗り解析)においては、検体をいかにあつめるか、の部分の仕組みづくりが課題。
- とくにPhase Ia/Ib臨床試験付随研究の層別化マーカー探索等の用途においては、より解析が容易な細胞表面タンパク質発現とのリンクが重要。そのため、タンパク質パネル解析との同時解析が可能なよう解析系を発展させることが重要
- FFPE検体由来の細胞/細胞核への適用可能性の検討が課題(解析二ーズが大きく、アーカイブされているので検体ボリュームも大きい)
- シーケンスコスト部分の低下が今後の課題

社会実装への道筋

時期	取り組む課題や明らかにしたい原理等	社会実装へ取り組みについて記載
現在	解析系の確立が完了	代表者の設立した大学発ベンチャーイムノジェネテクス社での解析サービスの実装(2026年度より)
1年後	<ul style="list-style-type: none">・タンパク質との同時解析を実現・空間遺伝子発現解析への適用を実現・FFPE検体の適用の検討を開始	JSTの創発的研究支援事業等へ応募し研究資金獲得 シーケンス解析関連企業との共同研究を展開
2年後	<ul style="list-style-type: none">・シーケンスコストの1/4低下の実現・FFPE検体解析を開始・遺伝子検出感度の向上	各種競争的研究資金への応募

企業への期待

- 未解決のシーケンスコスト低下については、特殊なライブラリ作成法と次世代大型シーケンサーの導入により克服できると考えている。
- 細胞製剤を開発中で、大規模scRNA-seq解析から細胞品質基準や品質測定用ターゲット解析パネルを策定しようとする企業との共同研究を希望。
- タカラバイオ社Curio Trekker技術を使い、高分解能・高感度空間オミクスデータを蓄積し、AIを含むあらたな病理評価プラットフォームを構築しようとしている企業との共同研究を希望。
- また、治療薬を開発中の企業で層別化マーカーを網羅的に探索している企業や、大規模なscRNA-seqデータからデータドリブンに新たな介入標的を探索している企業には、本技術の導入が有効と思われる。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は大規模解析を低コストに可能なため、同一予算でより多数の開発案件や症例数でマーカー/メカニズムの探索的解析を可能とすることで開発効率の上昇が見込め、企業に貢献できると考えている。
- 本技術の導入にあたり、開発者が設立した大学発ベンチャーイムノジェネテクス社を通じ、必要なfeasibility試験/比較検討試験を低価格で行うことが可能
- 本格導入にあたっての、臨床検体scRNA-seq解析実績を有する、イムノジェネテクス株式会社を通じた、scRNA-seq検体の前処理もふくめたワンストップ型解析サービスの提供が可能

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ビーズ担体を用いたcDNA増幅方法
- 出願番号 : PCT/JP2020/027123
- 出願人 : 東京理科大学
- 発明者 : 松島綱治・上羽悟史・七野成之・伊藤哲・青木寛泰
- * イムノジェネテクス社に専用実施権付与済み * 特許査定済み(EP/CN/JP)

- 発明の名称 : 相補DNA鎖を増幅する方法
- 出願番号 : 2023-036275, PCT/JP2024/008998
- 出願人 : イムノジェネテクス株式会社
- 発明者 : 七野成之
- * 特許査定済み(JP)

産学連携の経歴

- 2019年- 大学発ベンチャーイムノジェネテクス株式会社設立
- 令和2年度 AMED-PRIME 生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出、代表者
- 令和5年度 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム（疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明・創薬研究課題）分野2 代表者
- 令和7年度 AMED-PRIME 性差・個人差の機構解明と予測技術の創出、代表者

お問い合わせ先

東京理科大学
産学連携機構 イノベーション創成部門

T E L 03-5228-8244

e-mail ura@admin.tus.ac.jp