

単一細胞レベルでのmRNA発現解析の定量評価

Quantitative Assessment of mRNA Expression Analysis at the Single-Cell Level

米川 侑希*
Yuuki YONEKAWA

鈴木 幸栄*
Koei SUZUKI

黒澤 信幸**
Nobuyuki KUROSAWA

磯部 正治**
Masaharu ISOBE

要 旨

近年、個々の細胞の機能や性質を知るための単一細胞を対象としたmRNA (messenger ribonucleic acid: 伝令RNA) 発現解析が注目されている。しかし、濃度の測定精度が確保された核酸を用いた評価は十分に行われておらず、単一細胞のmRNA発現解析の精度は明確ではない。そこで、濃度が既知の認証標準物質である定量解析用リボ核酸 (RNA) 水溶液を用いて、mRNA発現量の定量可能な範囲の特定を行った。RNA抽出とcDNA (complementary deoxyribonucleic acid: 相補的DNA) 合成は、独自開発中の自動cDNA合成装置で行い、RNAから合成したcDNAをリアルタイムPCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) 装置で検出し、検出対象RNAの量を定量化した。その結果、単一細胞レベルであればmRNAは $3 \sim 10^7$ コピーと少ないコピー数から定量的に解析可能であることが確認された。この定量評価により、認証標準物質を用いて、mRNA発現解析の精度の評価ができることを示すことができた。

ABSTRACT

Recently, messenger ribonucleic acid (mRNA) expression analysis at the single-cell level has attracted attention for investigating the function and properties of individual cells. However, little has been reported on the accuracy of gene expression analysis for a single cell. Therefore, we investigated the dynamic range of this analysis using certified reference material (CRM) containing a defined concentration of RNA. The methods of RNA capture and complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis were both performed with our automated cDNA synthesizer and the quantity of copies of cDNA was measured by real-time polymerase chain reaction (PCR).

Results showed that RNA molecules from 3 to 1.0×10^7 copies at the single-cell level can be accurately quantified using our system. This demonstrates that expression analysis of very low copy numbers of mRNA molecules at the single-cell level can be performed. In this work, we demonstrate that the use of CRM enables us to evaluate the accuracy of mRNA expression analysis.

* 研究開発本部 リコー未来技術研究所 バイオメディカル研究室
Biomedical Research Department, Ricoh Institute of Future Technology, Research and Development Division

** 富山大学大学院 理工学研究部
Graduate School of Science and Engineering for Research, University of Toyama

1. 背景と目的

1-1 mRNA発現解析

細胞内には、デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid: DNA) とリボ核酸 (ribonucleic acid: RNA) があり、これらは生命活動の維持に重要な働きをする。遺伝子は遺伝情報の単位で、遺伝子発現とはDNAの遺伝情報がmRNA (messenger RNA: 伝令RNA) に転写され、mRNAの遺伝情報を翻訳してタンパク質を合成する過程のことをいう (Fig. 1)²⁾。細胞の構造や機能を決める遺伝子の発現情報解析は、タンパク質を解析するよりも高感度に評価が行えることから、微量の細胞内の状態把握に適している。さらにmRNAの発現量は日々変化するため、細胞状態の変化を検出するのに役立つ。

一般的に、mRNA発現解析はリアルタイムPCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) 装置を用いて行う。本装置では、リファレンスとなる材料を用いて検量線を作成し、測定したいmRNA発現量を定量することができる。リアルタイムPCR装置の詳細は、次章で説明する。

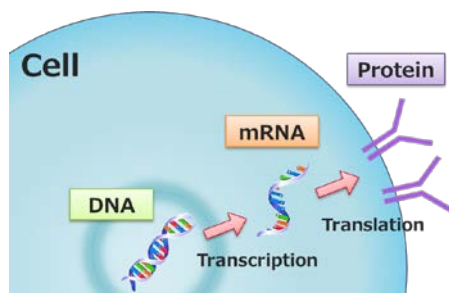


Fig. 1 The process of gene expression involves two steps. The first is transcription, where the DNA sequence of a gene is copied into mRNA. mRNA carries genetic information for making protein. The second step is translation. In this step, the sequence of mRNA is translated to the amino acid sequence in protein.

1-2 単一細胞のmRNA発現解析

細胞は一つひとつが異なった役割を担っており、同一種の細胞でもmRNA発現量は異なっている。しかし、従来のmRNA発現解析は細胞集団を対象としていたため、個々の細胞のmRNA発現量は、平均化されて把握できなかった (Fig. 2)³⁾。そこで近年、個々の細胞の状態を把握できる単一細胞のmRNA発現解析が注目されている⁴⁾。個々の細胞を解析することで、細胞間のmRNA発現量の不均一性を把握できるため、細胞培養の周期や品質の評価をより正確に行える。特に人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞) 由来の細胞移植においては、iPS細胞が対象組織の細胞に正しく分化誘導されたかどうかの評価に用いられており、再生医療分野で有用である⁵⁾。また、がん組織内の細胞を個々で解析し、腫瘍内不均一性を調べることは、がんの基礎研究や治療方針の決定に役立つ。

しかし、単一の細胞に含まれる総RNA (total RNA) 量は約0.01 ngとされ、その中でmRNAが占める割合は1~2%であり、わずか約 1.0×10^{-4} ngしか存在しない⁶⁾。これは、単一細胞のmRNA発現解析では、数コピーのmRNAを定量化する必要があることを意味する。

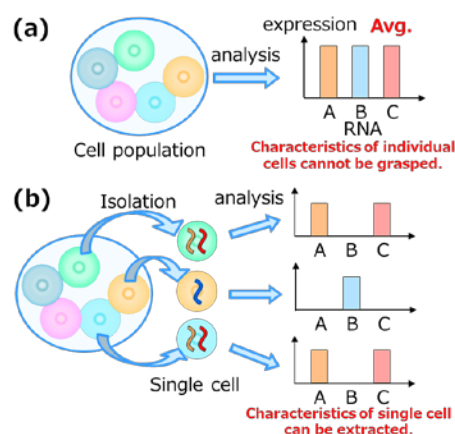


Fig. 2 mRNA expression analysis at the cell-population and single-cell level. (a) Analysis at the cell population provides an averaged mRNA expression profile that is insensitive to variation between individual cells. (b) In contrast, single-cell analysis enables us to detect mRNA expression heterogeneity among cells.

1-3 mRNA発現解析の現状と課題

リアルタイムPCR装置を用いたmRNA発現解析では、検量線を作成してmRNA発現量を定量する。その際にリファレンスとするサンプルは、一般的に核酸濃度を測定し、濃度を定める。しかし、核酸濃度を測定する装置の測定妥当性の検討は十分ではない。代表的な核酸濃度の測定方法として、吸光度から核酸濃度を測定する方法がある。本測定は、核酸の塩基が260 nm付近の紫外線を吸収する性質を利用する。核酸濃度 ρ_B [ng/ μ L]は式(1)に示すように、測定した吸光度 A 、波長に依存する吸光係数 ϵ [ng-cm/ μ L]、光路長 l [cm]を用いて算出される。吸光係数 ϵ は核酸の配列や塩基数によって異なるにもかかわらず、一般的に一定値として計算される⁷⁾。したがって、算出される核酸濃度は吸光係数 ϵ による誤差が含まれ、正確な濃度は不確かである。リアルタイムPCR装置で定量評価を行う際は、既知濃度で測定誤差が明確な核酸で検量線を引く必要がある。

$$\rho_B = (A * \epsilon) / l \quad (1)$$

近年、再生医療の発展やバイオテクノロジーの産業化の進展に伴い、国際標準化委員会のISO/TC 276で核酸の定量法の国際規格が提案され、核酸濃度の定量に関する標準化の必要性が高まりつつある⁸⁾。アメリカでは、2005年にMAQC (MicroArray Quality Control) プロジェクトでマイクロアレイを用いたRNAの解析方法や品質管理の標準化に取り組んだ。その際に、RNAの外部標準試料 (Universal Human Reference RNA: UHRR) を用いた評価を実施した⁹⁾。しかし、RNAの外部標準試料は複数種のRNAが混合したtotal RNAの濃度しか定義されておらず、リアルタイムPCRのような個々のmRNA発現量の定量には用いることはできない。また、ERCC (External RNA Control Consortium) でも外部標準試料が作製されたが、濃度の測定方法は明らかではなく、相対的な濃度比較用のため、リアルタイムPCRでの定量評価に適用できるかは不明である¹⁰⁾。

国内では、2013年に国立研究開発法人産業技術研究所が認証標準物質として定量解析用リボ核酸(RNA) 水溶液を開発した¹¹⁾。本標準物質は、自然界に存在するゲノム配列などと類似性が低い人工的な塩基配列を有するRNAで構成され、ISO GUIDE 34: 2009およびISO/IEC 17025: 2005に適合するマネジメントシステムに基づき生産されている。RNAの濃度は同位体希釈質量分析法と誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いて国際単位系 (SI) にトレーサブルに定量されて値付けされている。本標準物質を用いてmRNA発現解析の定量評価が行われているが、低濃度のmRNA発現解析に関しては報告例がない¹²⁾。

そこで、我々は本標準物質を用いて、リアルタイムPCR装置で定量可能なmRNAの濃度範囲を特定する方法を検討した。

2. mRNA発現解析の定量評価

2-1 定量評価方法

2-1-1 サンプルの調製

mRNA発現解析の定量評価には、1章で示した外部標準試料 (UHRR) と定量解析用リボ核酸水溶液 NMIJ CRM 6204-1 No.032 (RNA1000-B) をサンプルとして用いた。UHRRはヒトの10種類の細胞株からプールされたtotal RNAの混合物で、RNAの総質量が定められている。RNA1000-Bは、塩基長や質量濃度、物質濃度などが定められている (Table 1)。また、RNA1000-Bは塩基配列の片側の末端にmRNA特有のポリA配列が付加されている。そこで、本評価ではRNA1000-BをmRNAのモデルサンプルとして用いた。

本評価では、検出可能なmRNAのコピー数を定量するため、サンプルをUHRRとRNA1000-Bの混合物、ターゲットを既知濃度のRNA (RNA1000-B) とした。UHRRの質量は、単一細胞、100細胞、10万細胞を想定して、0.01, 1, 1000 ngとした。検出するRNA

(RNA 1000-B) のコピー数は、3, 6, 13, 25, 50, 100, 500, 1000, 1.0×10^4 , 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 コピーとした⁶⁾。それぞれの量を変えることで、夾雑物となる total RNA の割合に対して検出可能な mRNA の濃度範囲を定量できる条件とした。なお、コピー数 x は式(2)に示すように、アボガドロ定数 N_A [mol⁻¹]、物質濃度 c [mol/μL]、液量 V [μL] を用いて算出される。

$$x = N_A * c * V \quad (2)$$

Table 1 Concentration of RNA1000-B.

	Reference value	Expanded uncertainty
Mass concentration	59.5 ng/μL	5.3 ng/μL
Substance concentration	0.179 pmol/μL	0.018 pmol/μL

2-1-2 mRNA抽出・cDNA合成

mRNA発現解析では、まず前処理として、サンプルから mRNA を抽出し、抽出した mRNA を鋳型に DNA 合成を行う逆転写プロセスを行う (Fig. 3)。mRNA は微量で不安定な物質のため、解析する際は、逆転写酵素を用いて cDNA (complementary DNA: 相補的 DNA) 合成をしてから解析する。

本評価では、ポリ A 配列が付加された RNA および mRNA の抽出と cDNA 合成を、独自開発中の自動 cDNA 合成装置を用いて行った。自動 cDNA 合成装置は懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応法 (MAGnetic beads Reaction through Arrayed Hanging Drops: MAGrahd 法) を応用した装置で、反应用プレート上に反応液滴を分注し、mRNA 抽出と cDNA 合成を自動で行うことができる (Fig. 4)¹³⁾。

反応としては、ポリ A 配列をもつ RNA (mRNA) を捕捉するポリ T 配列を表面に付加したオリゴdT 磁気ビーズを用いて mRNA 抽出を行い、磁気ビーズ上で mRNA 全長の cDNA 合成を行う。試薬には、mRNA 抽出に Dynabeads mRNA DIRECT Purification Kit, cDNA 合成に SuperScript III Reverse Transcriptase,

RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, dNTP Mix を用いた。

装置の特徴としては、微量の液滴で反応を行うため、低濃度の mRNA を高効率で抽出可能なこと、最大 144 サンプルが同時に処理可能でハイスループットなことがある。

しかし、検出可能な mRNA のコピー数は定量化されていないため、今回の評価で夾雑物中から検出可能な mRNA のコピー数を明らかにした。なお、本評価では初期のサンプル量および反応液量を 3 μL で実施した。

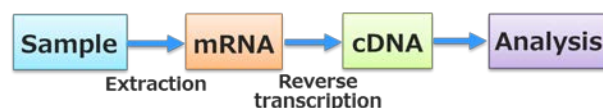


Fig. 3 Workflow of mRNA expression analysis.

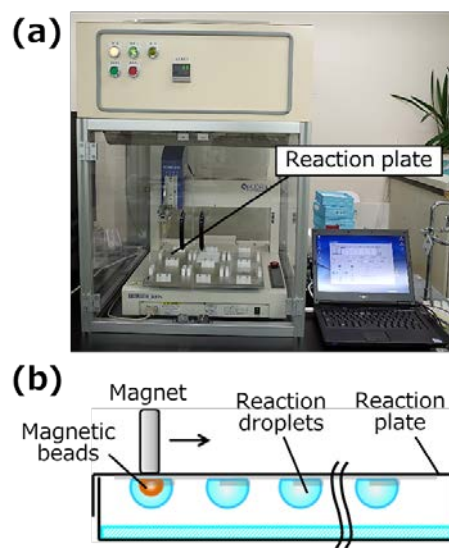


Fig. 4 Automated cDNA synthesizer based on MAGrahd method (currently under development). (a) Image of cDNA synthesizer. (b) Schematic illustration of reaction plate for cDNA synthesis.

2-1-3 DNA増幅・検出

自動 cDNA 合成装置で合成した cDNA は、リアルタイム PCR 装置を用いたインターカレーター法で検出した。一般的に、cDNA は微量であるため、検出

可能な量までDNAを増幅して検出する。PCR法は、熱変性→アニーリング→伸長反応の3ステップを1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことでDNAを増幅する方法である。まず熱変性を行い、熱を加えて二本鎖DNAを一本鎖DNAに解離させる¹⁴⁾。次にアニーリングを行い、一本鎖DNAの相補的な部分にプライマーを結合させる。プライマーは検出したいDNAの特定部分に特異的に結合する塩基配列をもつ合成オリゴDNAで、温度を下げると鋳型DNAに結合する。最後の伸長反応では、プライマーを起点としてDNAポリメラーゼ酵素によってDNA合成が起こり、任意の領域のDNAを二本鎖に合成する。このサイクルを繰り返すと、1コピーのDNAは理論的には指数関数的に増幅される¹⁵⁾。

リアルタイムPCR法は、二本鎖DNAに結合することで蛍光を発する試薬を用い、その蛍光量を測定することで増幅していくDNA量を算出する方法である (Fig. 5)¹⁵⁾。リアルタイムPCR装置では、主に以下の3つの結果を図で表すことが可能である。

(1) 増幅曲線

1サイクルごとのDNA量を蛍光のシグナル強度で測定し、横軸をサイクル数、縦軸を蛍光のシグナル強度でプロットした図である。増幅曲線は、増幅産物 (DNA) 量が蛍光検出できる量になると立ち上がり、DNAポリメラーゼ酵素の活性の低下やプライマーの減少などで反応が進まなくなるとプラトーに達する過程を示す。ターゲットの初期のDNA量が多いほど増幅産物量は検出可能な強度に早く達する。理論的にはターゲットの初期のDNA量が2倍になると、立ち上がりは1サイクル早くなる。

(2) 検量線

増幅曲線で蛍光のシグナル強度が立ち上がり始めた後、ある一定のシグナル強度の時のサイクル数をCt (Threshold Cycle) 値とし、横軸を濃度、縦軸をCt 値でプロットした図である。Ct値とターゲットの初期のDNA量の間には直線関係があるため、検量線が作成可能である。検量線の傾きから反応効率の算出、検量線に

未知濃度のターゲットのCt値をプロットすることで濃度の定量ができる。

(3) 融解曲線

増幅後、PCR反応液の温度を徐々に上げ、熱変性で二本鎖DNAが一本鎖に解離する過程のシグナル強度を測定し、横軸を温度、縦軸を $-\Delta F/\Delta T$ (蛍光変化/温度変化) でプロットした図である¹⁶⁾。融解曲線は、二本鎖DNAが解離し、シグナル強度が急激に低下する温度がピークとして示される。シグナル強度の変化のピークが複数回ある場合、ターゲット以外の産物が増幅していると判断できる。

本評価では、サンプルをUHRRとRNA1000-Bの混合物、ターゲットをtotal RNA中に含まれる既知濃度のRNA (RNA1000-B) とした。そして、RNA1000-Bを用いて合成したcDNAを鋳型として、リアルタイムPCR装置による検出を行った。試薬はSsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix、プライマーは増幅長が150 bpのものを、リアルタイムPCR装置はQuant Studio 7 Flex Real-Time PCR Systemを用いてサンプル以外の試薬組成や反応条件は全て統一した。なお、ターゲットのRNA1000-Bは他の遺伝子中には含まれない人工配列を有しており、夾雑物となるUHRR由来のcDNAからは増幅されない。

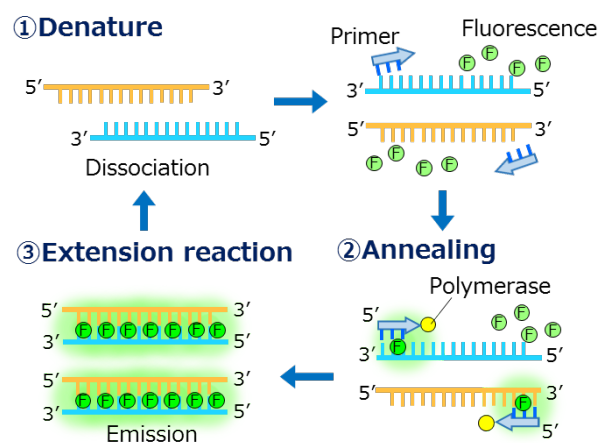


Fig. 5 Principle of real-time PCR.

2-2 定量評価結果

Fig. 6に、Ct値の測定結果を示す。サンプルの細胞数（total RNAの質量）別に、ターゲットのRNA1000-Bのコピー数に対するCt値をプロットしている。Ct値はリアルタイムPCR装置が定めたシグナル強度をThresholdと増幅曲線の交点のサイクル数とした。単一細胞レベルのtotal RNAをサンプルに用いた結果では、低濃度側でCt値のバラツキがあったが、Ct値は直線上にプロットされた。一方、100細胞や10万細胞レベルのtotal RNAをサンプルに用いた結果では、ターゲットのRNA1000-Bが低濃度になるにつれてCt値の変化がなくなった。この原因を確認するために、融解曲線を確認した。

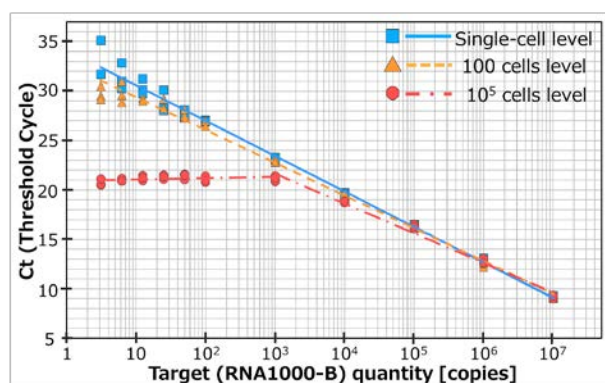


Fig. 6 Determination of the limit of quantification for detecting RNA1000-B in total RNA from different number of cells.

Fig. 7に融解曲線データを示す。サンプルの細胞数（UHRRの質量）別の融解曲線の結果を表している。Fig. 7より、サンプルが単一細胞レベルの時、熱変性によるシグナル強度の変化が1回で、ターゲットのみを特異的に検出できることがわかった。したがって、単一細胞レベルの夾雑物中から、RNA1000-Bは3から 1.0×10^7 コピーの範囲で検出可能なことが確認された。一方、サンプルが100細胞と10万細胞レベルの時は、夾雑物となるUHRRの濃度が高く、かつターゲットのRNA1000-Bの濃度が低くなるにつれ、ピークの数が増えて別のピークが大きくなった。融解曲線のピークの数が増えるにつ

れてFig. 6のCt値の検量線の傾きは緩やかになり、別のピークが大きくなるにつれてCt値の変化はなくなった。この原因は、ターゲット以外の産物の増幅がシグナルとして検出され、その強度を含めたCt値になったことで、定量ができなかったことを示している。

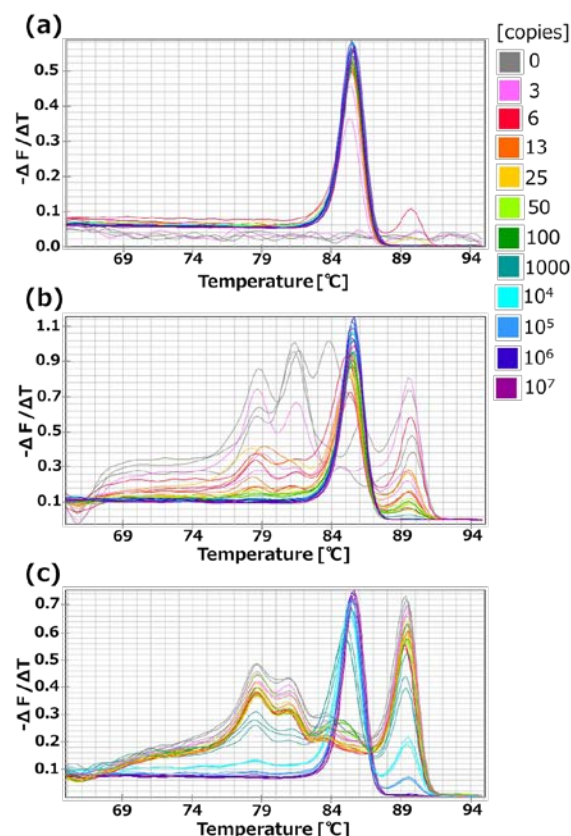


Fig. 7 Melting curve analysis at (a) single-cell level, (b) 100 cells level, and (c) 10^5 cells level. The shape of the curve varies with different DNA sequences, enabling us to check the presence of nonspecific amplification products.

2-3 考察

単一細胞レベルのtotal RNAからRNA1000-Bを検出した際、Fig. 6とFig. 7より、直線上にCt値がプロットされ、非特異的な産物も検出されなかった。しかし、低濃度側はCt値のバラツキが大きかった。この原因は、RNA1000-Bを段階希釈する過程、低濃度RNAの分注で生じるバラツキによるもので100コピー以下では許容されるバラツキと考えられる。

Table 2に定量評価結果をまとめた。融解曲線の結果を基に、ターゲットのRNA1000-Bのみを検出した条件を○、ターゲット以外の産物を検出した条件を×で表している。この結果より、サンプルが単一細胞レベルの時、RNA1000-Bは全ての条件の3から 1.0×10^7 コピーと広いダイナミックレンジで検出可能なが示された。しかし、100細胞レベルでは100コピー以下、10万細胞レベルでは 1.0×10^5 コピー以下のRNA1000-Bの時にターゲット以外の産物が検出され、他の産物の量も含めてシグナル強度が検出された。この結果を質量比に変換すると、ターゲット対サンプルが 1.9×10^{-7} 以上であればターゲットのみを検出可能なが確認された。

以上より、単一細胞レベルのtotal RNAから低濃度の3コピーのRNA1000-Bを自動cDNA合成装置で抽出し、リアルタイムPCR装置で検出可能なが定量的に示された。また、トレーサビリティの確保された材料を用いて、検出精度をターゲット対サンプルの質量比が示せた。なお、RNA1000-Bは、mRNA特有のポリA配列をもっているため、本評価の方法は実際の実験系における数コピーのmRNA検出に適応可能と考える。

Table 2 Summary of quantitative assessment.

Sample	Target quantity [copies]	Target/Sample [ng/ng]	Specificity
Single-cell level	3- 10^7	1.9×10^{-7} - 3.7×10^{-1}	○
100 cells level	10^3 - 10^7	6.0×10^{-7} - 5.9×10^{-3}	○
	3-100	1.9×10^{-9} - 6.0×10^{-8}	×
10^5 cells level	10^6 - 10^7	6.0×10^{-7} - 6.0×10^{-6}	○
	3- 10^5	1.9×10^{-12} - 6.0×10^{-8}	×

3. 単一細胞レベルでのmRNA発現解析

2章より、自動cDNA合成装置でRNA抽出、cDNA合成を行った結果、単一細胞レベルのtotal RNAから3コピー以上のRNA1000-BをリアルタイムPCR装置で検出可能なが明らかになった。そこで、ア

プリケーションの検討例として、皮膚の細胞の分化状態を評価することを想定し、単一細胞レベルの細胞溶解液においてmRNA発現解析を実施した。

3-1 方法

mRNA発現解析を行う細胞のサンプルに、表皮の角化細胞PR3D-HPEK-50を未分化状態で培養した細胞を用いた。表皮の角化細胞は、未分化度や分化度で発現が異なり、状態別で特異的に発現するmRNAが発見されている¹⁷⁾。表皮は層になっており、基底層で細胞分裂することで角化細胞が生成される。そして、分化が進むと古くなり、角質になる。つまり、細胞は基底層の時は未分化状態となる。本実験では、ほとんど全ての細胞で一定量発現するリファレンスのハウスキーピング遺伝子GAPDHと、表皮の角化細胞が未分化状態の時に特異的に発現するマーカー¹⁸⁾ KERATIN 14の発現解析を行った。本実験はサンプルが未分化状態で培養した細胞のため、KERATIN 14の発現量は多いことが想定される。

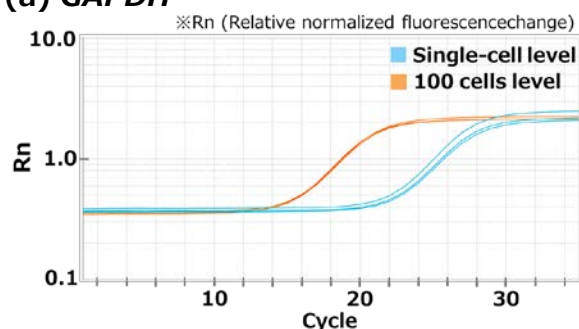
サンプルは10万個の細胞を溶解液で溶かした後、100細胞、単一細胞レベルに希釈したものを用いた。

mRNA発現解析は、2章と同様の反応試薬を用いて、自動cDNA合成装置でmRNA抽出とcDNA合成を実施し、リアルタイムPCR装置で検出した。なお、プライマーは、GAPDHは増幅長が138 bp、KERATIN 14は増幅長が126 bpのものを使用した。

3-2 結果

Fig. 8に増幅曲線データ、Fig. 9に融解曲線データを示す。ハウスキーピング遺伝子GAPDH、表皮の角化細胞が未分化の時のマーカーKERATIN 14の発現解析の結果、単一細胞、100細胞レベルのサンプルの時、ともにDNAの増幅が確認された。また、融解曲線からターゲットのみが検出されていることが確認された。よって、細胞の状態を表すマーカーを自動cDNA合成装置で抽出し、リアルタイムPCR装置でmRNA発現解析を行えることが検証された。

(a) *GAPDH*



(b) *KERATIN 14*

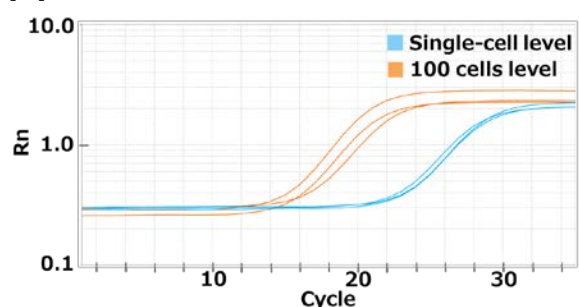
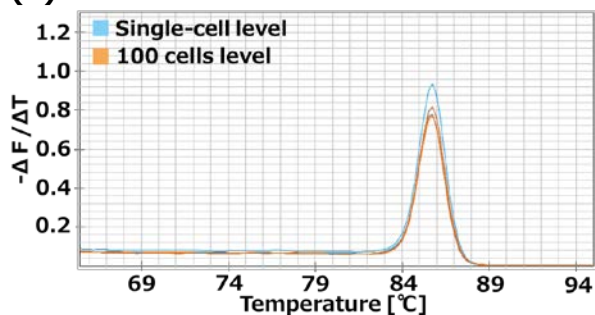


Fig. 8 Amplification curve of (a) *GAPDH* and (b) *KERATIN 14* at single-cell and 100 cells level.

(a) *GAPDH*



(b) *KERATIN 14*

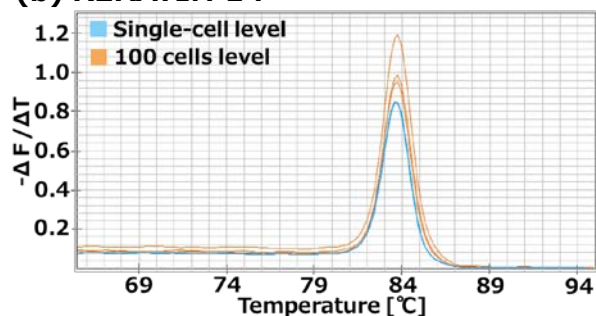


Fig. 9 Melting curve analysis for (a) *GAPDH* and (b) *KERATIN 14* at single-cell level and 100 cells level. Note that a single peak was observed for each reaction, indicating that a specific sequence was amplified by PCR.

3-3 考察

本実験で、開発中の自動cDNA合成装置を用いた mRNA抽出とcDNA合成、リアルタイムPCR装置を用いたDNA増幅で、細胞特異的なマーカーの mRNA発現解析が単一細胞レベルのサンプルで実証された。PCRにおいて、サンプルの細胞数が100倍になると、理論値では立ち上がりサイクル数は約6.7サイクル異なる。Fig. 8より、細胞数の差に対する曲線の立ち上がりサイクル数の差は、*GAPDH*で6サイクル、*KERATIN 14*で7サイクル程度であり、理論値に近い値となった。よって、本手法で単一細胞レベルのサンプルを用いても100細胞レベルのサンプルの時と同等の効率でmRNA捕捉、cDNA合成が行える可能性が示せた。

細胞特異的なmRNAマーカーの発現解析を行うことで、細胞の分化やがん化などの状態を調べることができる。よって、そのような用途における本手法の適用可能性が示せたと考える。ただし、本実験は発現量の多いmRNAをターゲットとしているため、今後は発現量の少ないmRNAをターゲットとした発現解析の検討も必要と考える。

4. まとめ

トレーサビリティの確保された既知濃度の認証標準物質を用いて、リアルタイムPCR装置で検出可能なRNA量の定量評価を実施した。評価は、開発中の自動cDNA合成装置でRNA抽出・cDNA合成をした後、リアルタイムPCR装置でDNA増幅をして、ターゲットのRNAを検出した。その結果、本手法は単一細胞レベルのtotal RNAから、3から 1.0×10^7 コピーと低濃度から広いダイナミックレンジでRNAが検出可能なことを定量的に確認した。この評価では、これまで取り組まれていなかったトレーサビリティの確保された材料を用いてリアルタイムPCR装置で検出可能なRNA量を定量した。そして、従来よりも低濃度のRNAの定量に成功し、精度を初めて明らかにした。評価に用いたRNA1000-Bは、

mRNA特有のポリA配列をもっているため、本評価の方法は実際の実験系における数コピーのmRNA検出に適応可能と考える。また、単一細胞レベルの細胞溶解液をサンプルとし、細胞の状態を表すマーカーのmRNA発現解析が行えることも検証された。

今後、再生医療の実用化が進み、加工した細胞の移植機会の増加が予想される。再生医療の実用化におけるレギュラトリーサイエンスの課題として、移植細胞の品質や安全性の確保がある¹⁹⁾。また、自己iPS細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標として、未分化細胞が混在していないことをPCRで確認できることが示されている²⁰⁾。よって、PCRのトレーサビリティの管理が必要となると考える。細胞加工や組織形成をする際の工程検査として、トレーサビリティが管理されたPCRを用いて単一細胞レベルでの評価が行えれば、高品質の細胞を確実に培養して安全で信頼性の高い移植も実現可能と考える。我々はバイオ分野への貢献を目指し、他分野で培ってきた品質管理に対する考えを基に定量評価の必要性や測定妥当性の重要性を今後も広めていきたい。

参考文献

- 1) 松村明: 大辞林, 第3版, 三省堂 (2006).
- 2) 井出利憲: 分子生物学講義中継 Part 1, p. 151, 羊土社 (2002).
- 3) 細野直哉: 幹細胞研究における単一細胞遺伝子発現解析, 細胞, Vol. 44, No. 9, pp. 398-402 (2012).
- 4) A. Ståhlberg, M. Bengtsson: Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR, *Methods*, Vol. 50, No. 4, pp. 282-288 (2010).
- 5) 杉田直: iPS細胞の網膜再生医療-網膜変性疾患への臨床応用, 日本臨床免疫学会会誌, Vol. 38, No. 2, pp. 79-85 (2015).
- 6) G. S. Ginsburg, H. F. Willard: Genomic and Personalized Medicine, Academic Press, p. 159 (2008).
- 7) 柴山祥枝: 核酸標準物質の現状と動向, 産総研計量標準報告, Vol. 8, No. 1, pp. 141-153 (2010).
- 8) 日置達男, 柳田豊: 標準化部会国際標準化関連活動報告, FIRM (2016).
- 9) MAQC Consortium: The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter-and intraplatform reproducibility of gene expression measurements, *Nature Biotechnology*, Vol. 24, No. 9, pp. 1151-1161 (2006).
- 10) The External RNA Controls Consortium: The External RNA Controls Consortium: a progress report, *Nature Methods*, Vol. 2, No. 10, pp. 731-734 (2005).
- 11) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所: 計量標準総合センター 標準物質認証書 (2015).
- 12) H. Akiyama et al.: A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms, *Analytical Bio-chemistry*, Vol. 472, pp. 75-83 (2015).
- 13) M. Yoshioka, N. Kurosawa, M. Isobe: Target-selective joint polymerase chain reaction: A robust and rapid method for high-throughput production of recombinant monoclonal antibodies from single cells, *BMC Biotechnology*, Vol. 11, pp. 75-86 (2011).
- 14) タカラバイオ(株)編: PCR実験の手引き, pp. 6-8 (2016).
- 15) 田村隆明編: 遺伝子工学実験ノート (上巻), 第3版, pp. 175-176, 羊土社 (2010).
- 16) サーマフィッシャーサイエンティフィック(株)編: リアルタイムPCRハンドブック, p. 8 (2016).
- 17) 清水宏: あたらしい皮膚科学, 第2版, pp. 3-9, 中山書店 (2011).
- 18) 川内康弘: 表皮角化細胞の分化と転写因子, 日本皮膚科学会雑誌, Vol. 114, No. 2, pp.143-152 (2004).
- 19) 佐藤陽治: 再生・細胞医療の事業化におけるレギュラトリーサイエンスの役割, かながわ再生・細胞医療産業化ネットワークキックオフフォーラム, pp. 11-21 (2016).
- 20) 西田幸二: 次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査WG報告書, p. 20 (2013).