

免疫学 X AI技術 シングルセルを用いた遺伝子解析

KOTAIバイオテクノロジーズ株式会社
山下和男様 代表取締役
石川昌和様 研究開発部研究員

使用機種

セルソーター『MA900』

主な用途

AI技術による遺伝子解析用のシングルセルソーティング



KOTAIバイオテクノロジーズ社は2016年に設立された大阪大学発のバイオベンチャーです。最先端の人工知能技術を取り入れた独自の情報解析技術により医療への貢献を目指す、近年最も注目されている企業の一つです。KOTAIバイオテクノロジーズ社をけん引する山下社長と石川研究員にお話を聞きました。

―御社の技術とビジネスをキーワードで表すと何でしょうか？

「免疫」と「情報解析」です。免疫学分野では既に膨大な情報量がありますが、次々に新しい知見や方法論が登場して、情報量は指数関数的に増加しています。この中から有用な情報を取り出すには、実験的なデータに加えて情報解析の技術も重要になってきます。「免疫」と「情報解析」、この両方をしっかりと研究開発することが重要と考えています。

「免疫」では「シングルセル」、「情報解析」では「AIの活用」がキーワードとなります。当社は、これらを通じてアカデミアの研究機関や製薬会社との共同研究、そして遺伝子解析などの受託サービスでビジネスを展開しています。

―「情報解析」では具体的にどのような強みをお持ちでしょうか？

当社は免疫系疾患のマーカー探索を実施しており、この解析には情報解析が非常に重要です。コホート研究において、疾患によっては数万単位のサンプル数が必要になりますが、免疫系希少疾患の検体収集は容易ではなく、10前後のサンプル数しか集まらないケースもあります。このような場合、通常の方法では解析しきれず、AIなど最新の知見によるアルゴリズムを用いた解析が必要となります。

そこで重要になるのが、特徴量選択 (Feature selection) です。

AIのような機械学習の場合、データセットに依存して、解析結果が学習した教師セットに最適化されてしまうケースがあります。これを過学習と呼びますが、このような過学習によって、肝心の教師セット以外への適用を試みたときに、学習効果が教師セット以外にフィットしないケースがでてきてしまいます。これを回避するには、特徴量を最大限までに落とす必要がありますが、ランダムに情報量を落としてしまうと、当然、予測に必要なものも落としてしまう可能性があります。

当社独自のAI解析技術は、この特徴量選択に強みを持っており、臨床試験の前期から後期にかけて治験数を増加させるタイミングでの患者 Enroll (登録) などに重要な役割を果たします。また、投薬の際に、分子的な指標としてコンパニオン診断薬の開発にもつながります。



山下社長

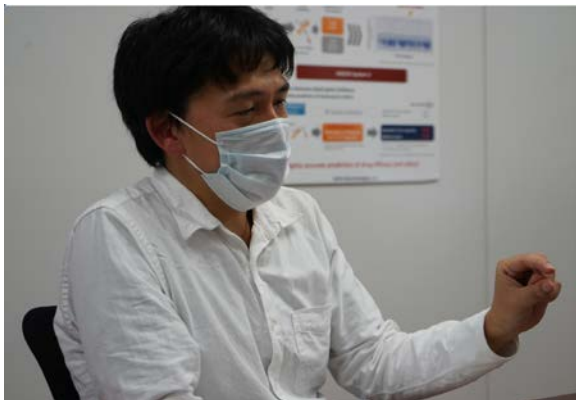
免疫系疾患に用いる投薬マーカーが特殊なものであると、使い勝手が悪くなります。遺伝子解析やフローサイトメトリーで検査することを考えたとき、市中の病院でも使用できるような一般的な標的分子や方法論である必要があります。このようなことも考慮して、マーカー探索を行っています。

—免疫学的な強みはいかがでしょうか？

免疫学に限ったことではないですが、今後はシングルセルの解析が非常に重要になると考えています。外敵たる抗原に対応する免疫細胞の多様性は、シングルセル解析による理解がカギになるでしょう。

抗体の多様性をもたらすTCR・BCRレパトアは、T細胞やB細胞のシングルセルにおいて、抗体遺伝子の組み合わせの多様性により発揮されます。つまり、シングルセルレベルで遺伝子を解析し、特異的に抗原に反応する抗体タンパク質を調べる必要があります。しかし、タンパク質間相互作用の評価においては、ATGCを読み解くだけの遺伝子の一次配列解析だけでは限界があり、AIの技術を応用して、より最適な抗体を産生する免疫細胞を探索しています。

当社では、セルソーター『MA900』で末梢血等から免疫細胞をソーティングし、それをNGSライブラリ前処理装置のChromium Controller (10x Genomics社) でバーコード化してライブラリを作製して、シングルセルレベルでの遺伝子発現解析をしています。メモリー細胞やエフェクター細胞を分取するケースもあり、より多くのマーカーを用いて細胞をソーティングするケースが増えています。シングルセルの遺伝子解析を実施するにあたって、色々なメーカーから機種が発売されていますが、現在『MA900』とChromium Controllerの組み合わせが最も優れています。免疫細胞の対象はレアポピュレーション（存在比率が極めて低い細胞群）であることが多いですが、そのような希少な細胞をロスすることなく、かつ生きたまま迅速にソーティングすることが重要です。



石川研究員

『MA900』はその条件をすべて満たしています。他の手法も試しましたが、細胞の回収率悪化や、生細胞の減少、赤血球や他細胞の混入、準備に手間がかかり迅速に実験できないなど、不都合が色々ありました。『MA900』は使い勝手の良さが気に入っています。他のセルソーターでは時間をかけて手動で調整する必要がある部分があるが、『MA900』では全自動になっているため非常に簡単です。また操作する部分も、ウィザードを見れば一目瞭然です。セルソーター初心者の研究者でも、一度説明を聞くだけで、初日から積極的に使用できています。

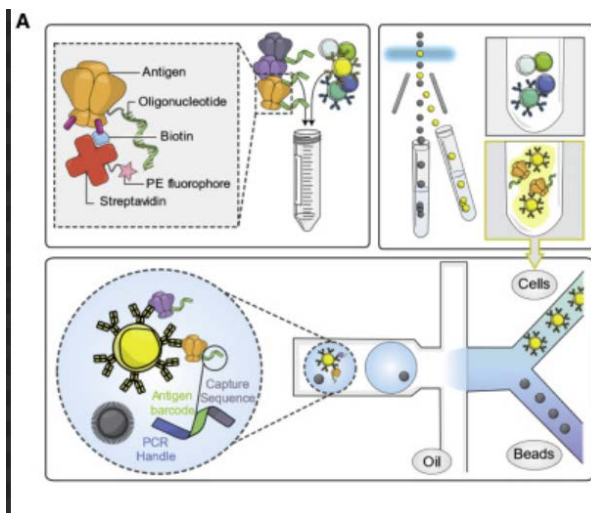
また、特殊な遺伝子発現情報を観察する場合は、『MA900』で384ウェルプレートに直接シングルセルで分取します。ウェル側には1ul程度のLysis bufferなどを予め分注しておき、そこにシングルセルをソーティングし、PCRや遺伝子配列解析などを実施します。PCRプレートに直接分取できると、そのままPCR用サーマルサイクラーにセットすることができるので大変便利です。このようにシングルセル解析の目的や手法によって、チューブにバルクソーティング（大量ソーティング）した後にChromium Controllerを使用する場合と、384ウェルプレートにシングルセルを直接ソートする方法とで使い分けています。



そしてNGSライブラリの作製方法も余多ありますが、現状では10x Genomics社のChromium Controllerがデファクトスタンダードになりつつあります。スループットが高く、回収率が50%程度あり、他の方法と比較して抜きん出ています。そして細胞抽出の直前まで、生細胞の状態を保持することができます。細胞の生死はとても重要です。ミトコンドリア遺伝子の増加などで細胞の生死を判定して、死細胞は解析のデータセットから除去します。その点で、死細胞を除去して高い確率で生きたまま細胞を分取可能な『MA900』とChromium Controllerのコンビを重宝しています。

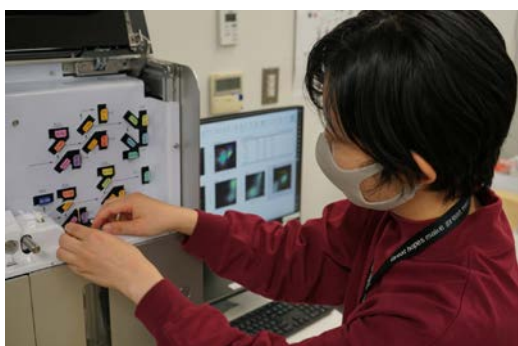
ーシングルセル解析は今後どのようなようになっていくでしょうか？

シングルセルを用いた遺伝子解析は、更に拡大していくと確信しています。当社では遺伝子発現やTCR/BCRレパトアに注目しているだけでなく、エピジェネティクスにも注力しています。そして、Libra - Seq (linking B cell receptor to antigen specificity through sequencing)という手法も取り入れました。この技術をB細胞探索に導入しているのは、今のところ日本で当社と共同研究機関だけです。



(図A) Libra-seqの概要

抗原を蛍光物質と拡散バーコードタグで標識し、抗原と相互作用するB細胞をセルソーターで分取する。ソーティングされた細胞をChromium Controllerでシングルセル解析を実施し、抗原情報と同時に、シングルセルからの遺伝子情報を取得する。



ー最後に一言お願いします。

今後、さらに免疫学をとりまく情報は増加するでしょう。最近では、細胞の位置情報に着目したシステムも立ち上げており、細胞免疫療法などに貢献したいと考えています。細胞免疫療法の効果として、どこにどのような細胞が誘導されているのか？よりIn vivoに近い環境で確認することが重要です。治療においても、どの場所に薬剤を局所的に届けるのか、という情報が必要になってきます。このように細胞の位置情報が加味されると、さらに有用な情報が増加します。

当社は新しい技術手法があれば積極的に取りこみたいと考えています。ベンチャー企業は資金に限界がありますから、数をこなすことはできません。しかし、新しい手法でユニークな情報を集めて解析することにより、勝ち筋があると考えています。

新しい方法論はさらに増加していくでしょう。実験手段も情報量も増加する一方で、それらをハンドリングできる人材は逆に減少すると思います。当社は決して大きくないですが、『MA900』とChromium Controllerの組み合わせのようなユニークな実験的な方法論と、算出された有用なデータセットを用いた情報解析、つまりWetとDryの両輪でシナジー効果を狙い、医療に貢献できる会社になりたいと考えています。

KOTAIバイオテクノロジー社のWeb site
<https://www.kotai-bio.com/jp/>

セルソーター-MA900

最大12色の蛍光同時検出と4方向ソーティングに対応

- ・様々な要求に対応出来る先進のソーティングシステム
- ・どなたでもすぐ使える全自動セットアップ
- ・12色解析を支えるソフトウェア



発行元

ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株)

ライフサイエンス営業部

〒243-0014 神奈川県厚木市旭町 4-14-1

Tel: 0120-667-010

Fax: 0120-388-060

E-mail: cytometry@sony.com

URL: <http://www.sony.co.jp/LS>

