

シングルセル解析をより身近にするサンプル 多重化新技術

所属 理化学研究所
バイオリソース研究センター
氏名 阿部訓也

従来技術とその問題点

シングルセル遺伝子発現解析は生命科学分野において非常に有効な解析手法であるが、遺伝子発現検出感度、実験エラー、実験操作の煩雑さ、コスト面などいまだ複数の課題を抱えている。

サンプル多重化はそれらの課題の多くを解決するために有用である。しかし、あらゆる細胞タイプやさまざまな生物種由来の細胞に適用可能な汎用性の高いサンプル多重化技術は確立されていなかった。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術は、サンプル多重化の細胞標識のステップに細胞表面蛋白質に対する抗体を利用している。しかし、すべての細胞に均しく発現する細胞表面蛋白質の利用は非現実的で、あらゆる細胞タイプを漏れなく捕捉し、多重化することは困難であった。
- USB法は抗体を用いず、細胞表面蛋白質をビオチン化することにより細胞標識を行う。これによりあらゆる細胞タイプ、生物種に適用可能なサンプル多重化が可能となった。
- 本技術の適用により、実験操作の効率化、実験エラーの低減、コストの大幅削減、サンプリング自由度の増大が達成可能となり、シングルセル解析を身近なものにすることが出来た。

概要

シングルセル遺伝子発現解析ーその有用性

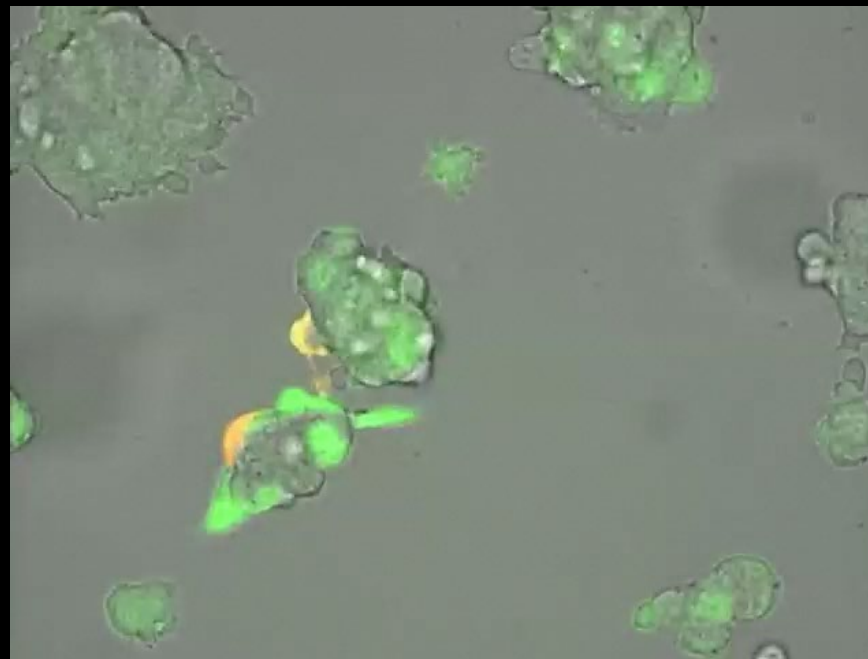
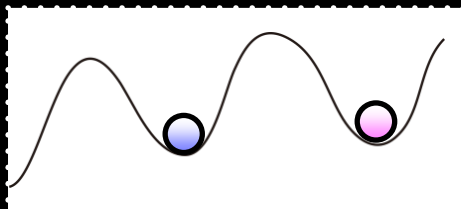
シングルセル遺伝子発現解析ー問題点

サンプル多重化技術

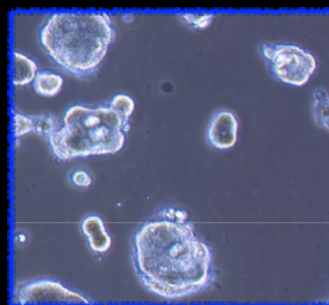
シングルセル解析をより身近にーUSB法の紹介

細胞集団の不均一性

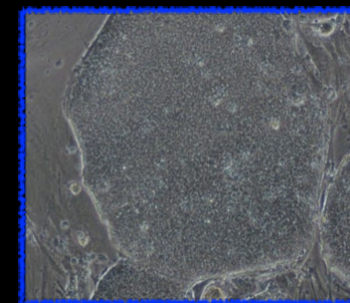
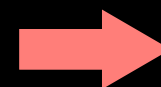
Heterogeneities



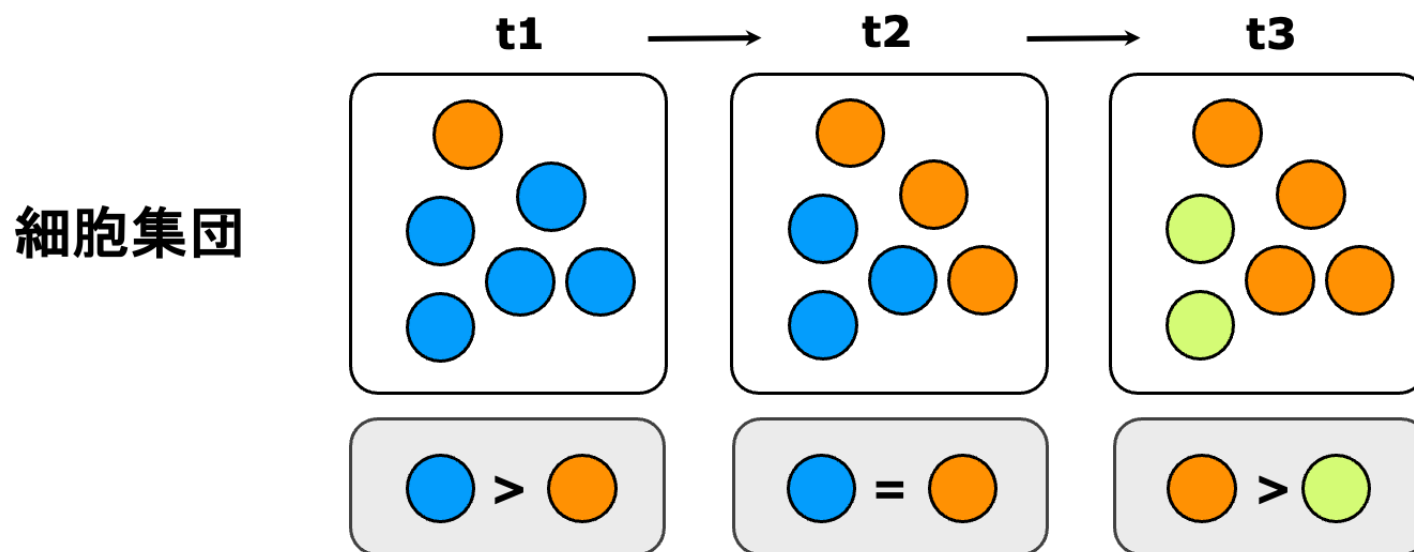
Dynamics



ナイーブ型



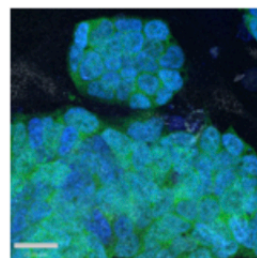
プライム型



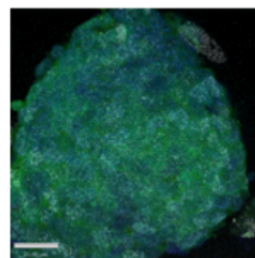
平均化
(バルク解析)



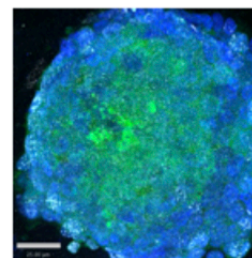
現実



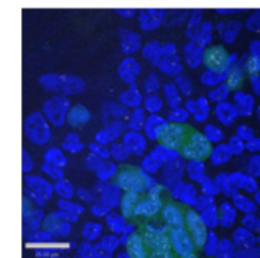
Day1



Day2



Day3



Day4







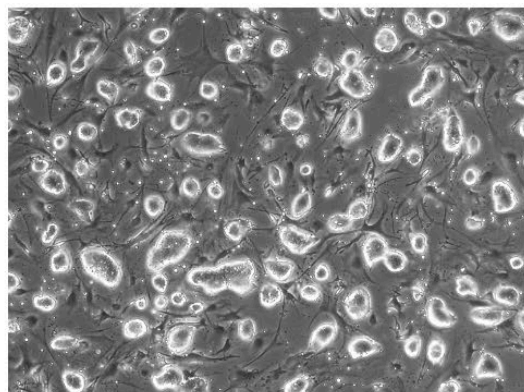
バルク解析



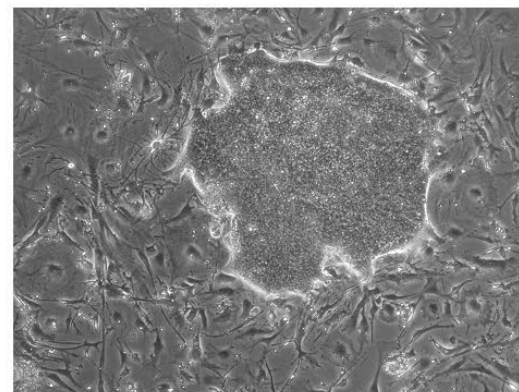
シングルセル解析

幹細胞分化過程のシングルセル解析

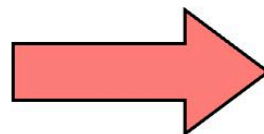
ナイーブ



プライム型



分化遷移



Day0

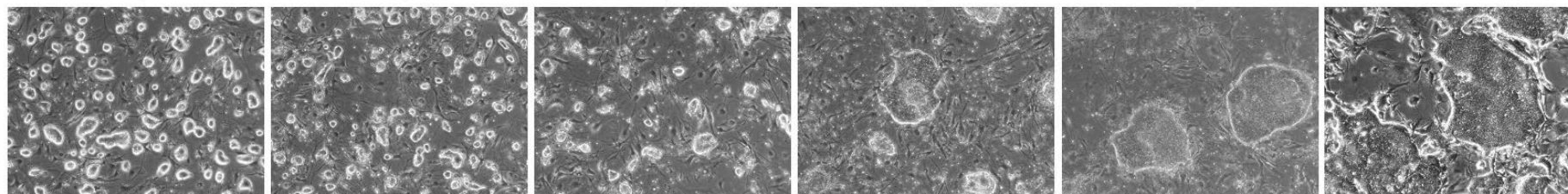
Day1

Day2

Day3

Day4

EpiSC



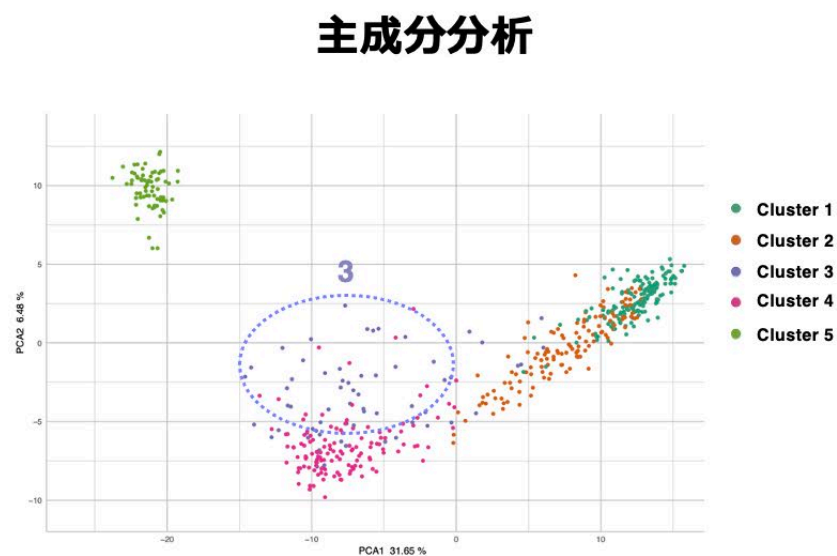
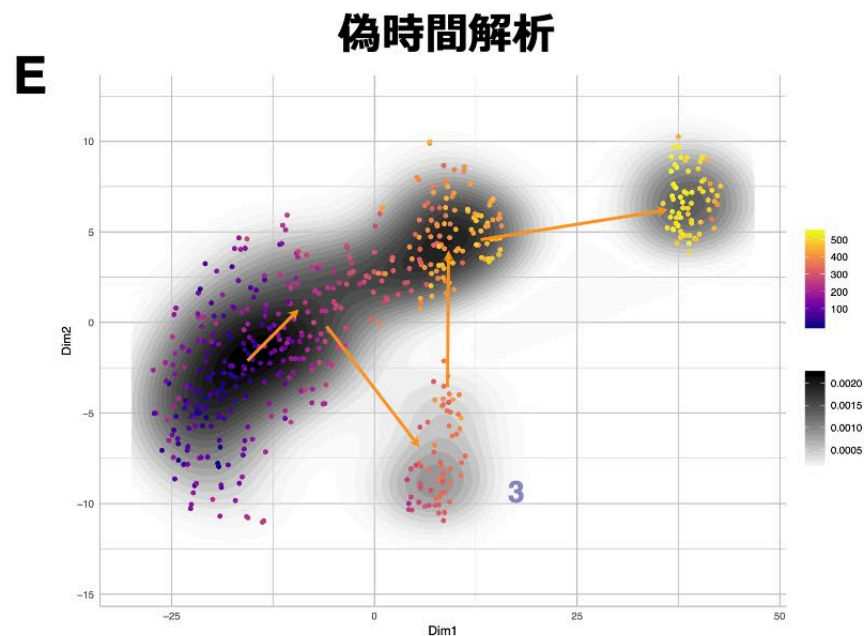
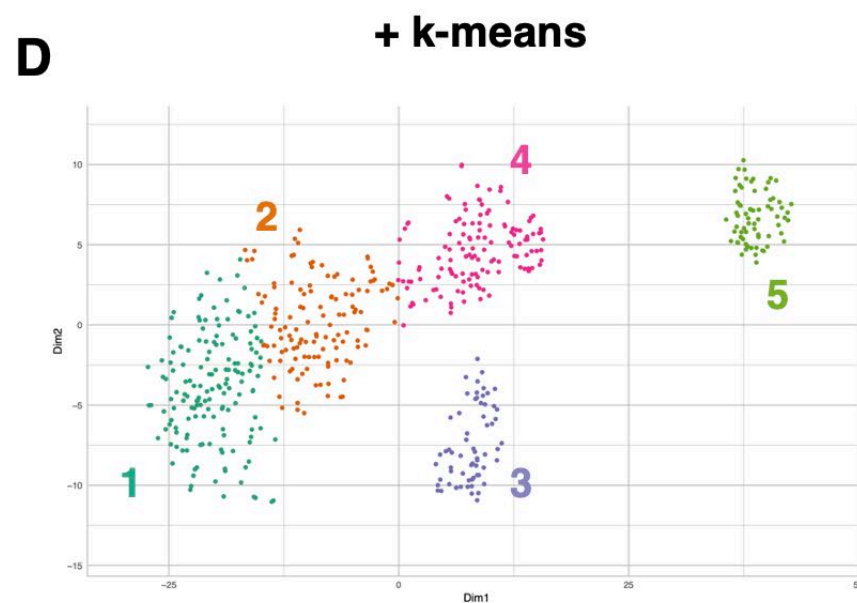
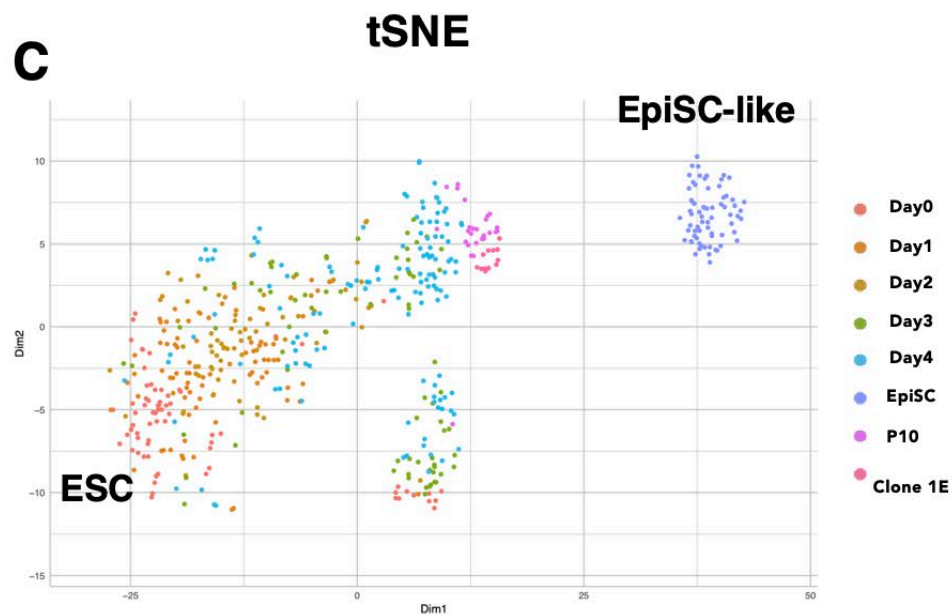
Cell



**C1
SMART-Seq2**

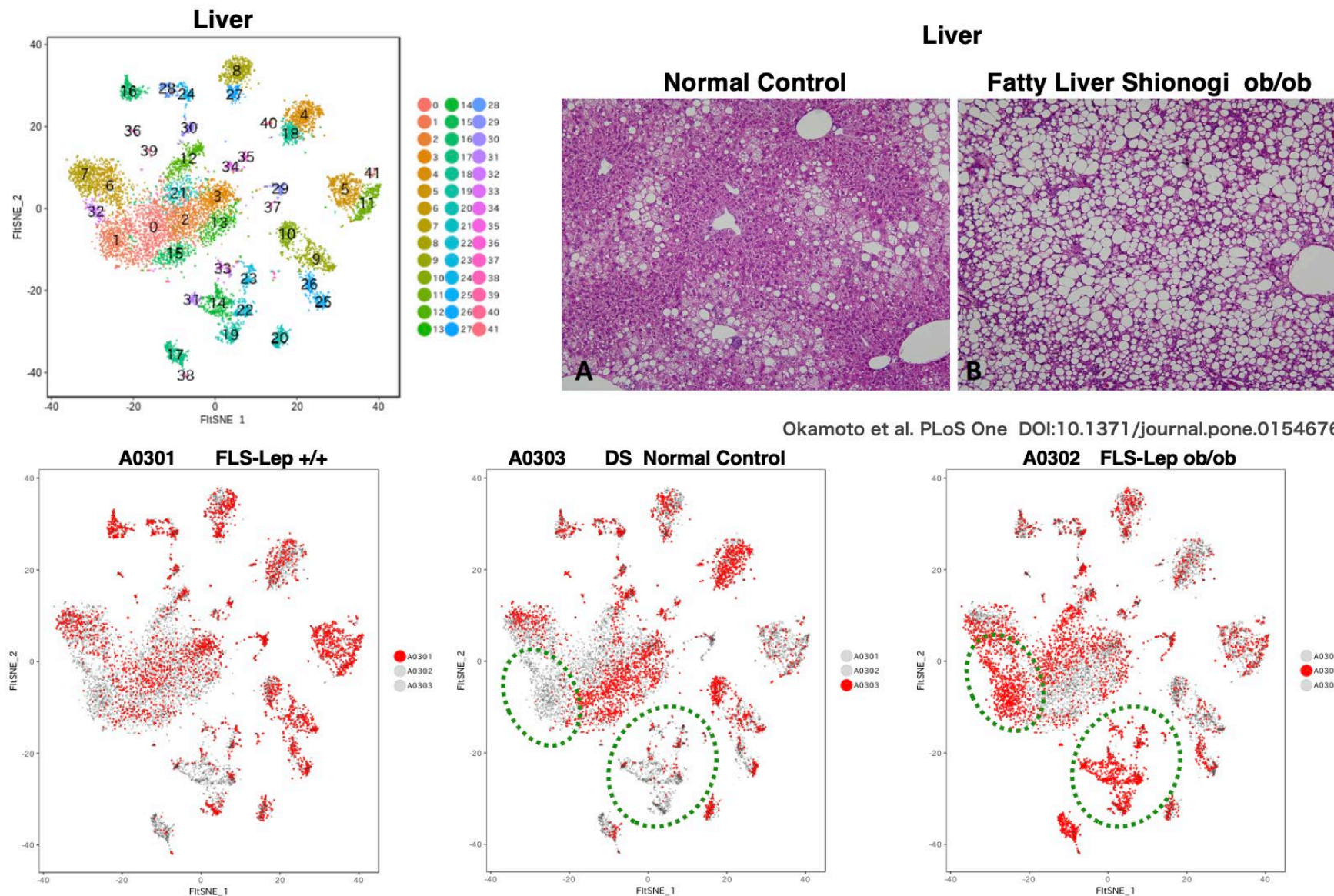
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.25.313239v1>

Fluidigm C1: SMART-Seq2



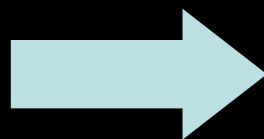
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.25.313239v1>

A model for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス



バルク
RNA-seq
遺伝子発現解析

多数の細胞に
おける平均値
の測定

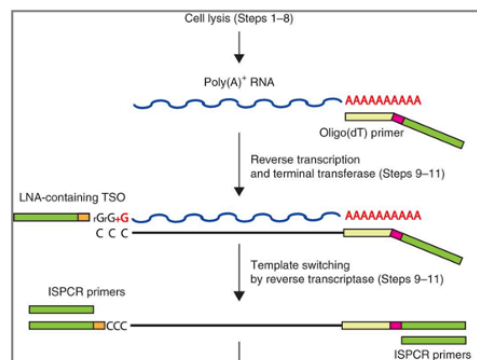


シングルセル
RNA-seq

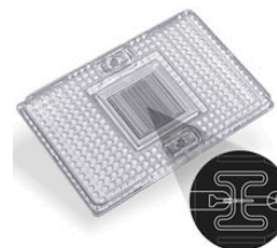
個々の細胞
における全
遺伝子発現
解析

分子レベルの
病理学解析
表現型解析

よりリッチな生物学的情報



SMART-Seq2



Fluidigm C1



10x Chromium

全長cDNA

全長cDNA

3'端配列

FACS or マニュアル

cDNAまで自動

細胞捕捉後は手動

~500細胞/run

96 細胞/run

10000 細胞/run

1細胞あたりリード数

50万~100万

5万~

遺伝子検出数

>8000 遺伝子

1000~2000 遺伝子

シングルセルRNA-Seq：課題

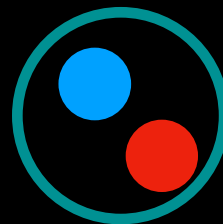
高感度化

実験操作の効率化

実験エラーの低減

(バッチ効果、ダブレット)

コストの削減



シングルセルRNA-Seq：課題

高感度化



TAS-Seq

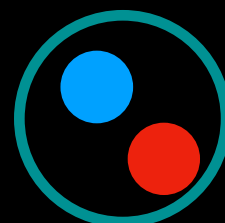
東京理科大 七野博士

実験操作の効率化

実験エラーの低減

(バッチ効果、ダブレット)

コストの削減



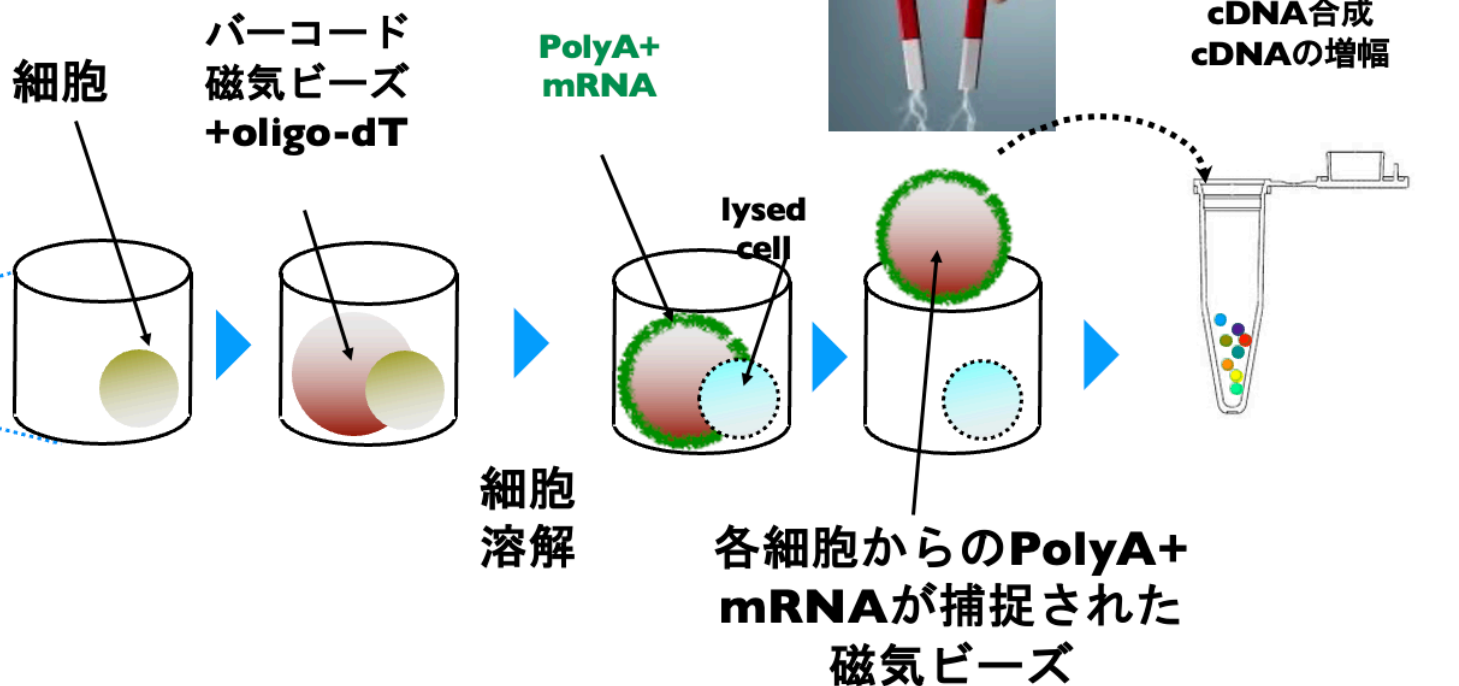
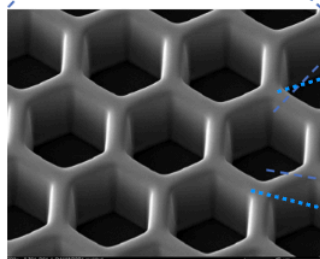
サンプル
多重化

シングルセル遺伝子発現解析の実例例

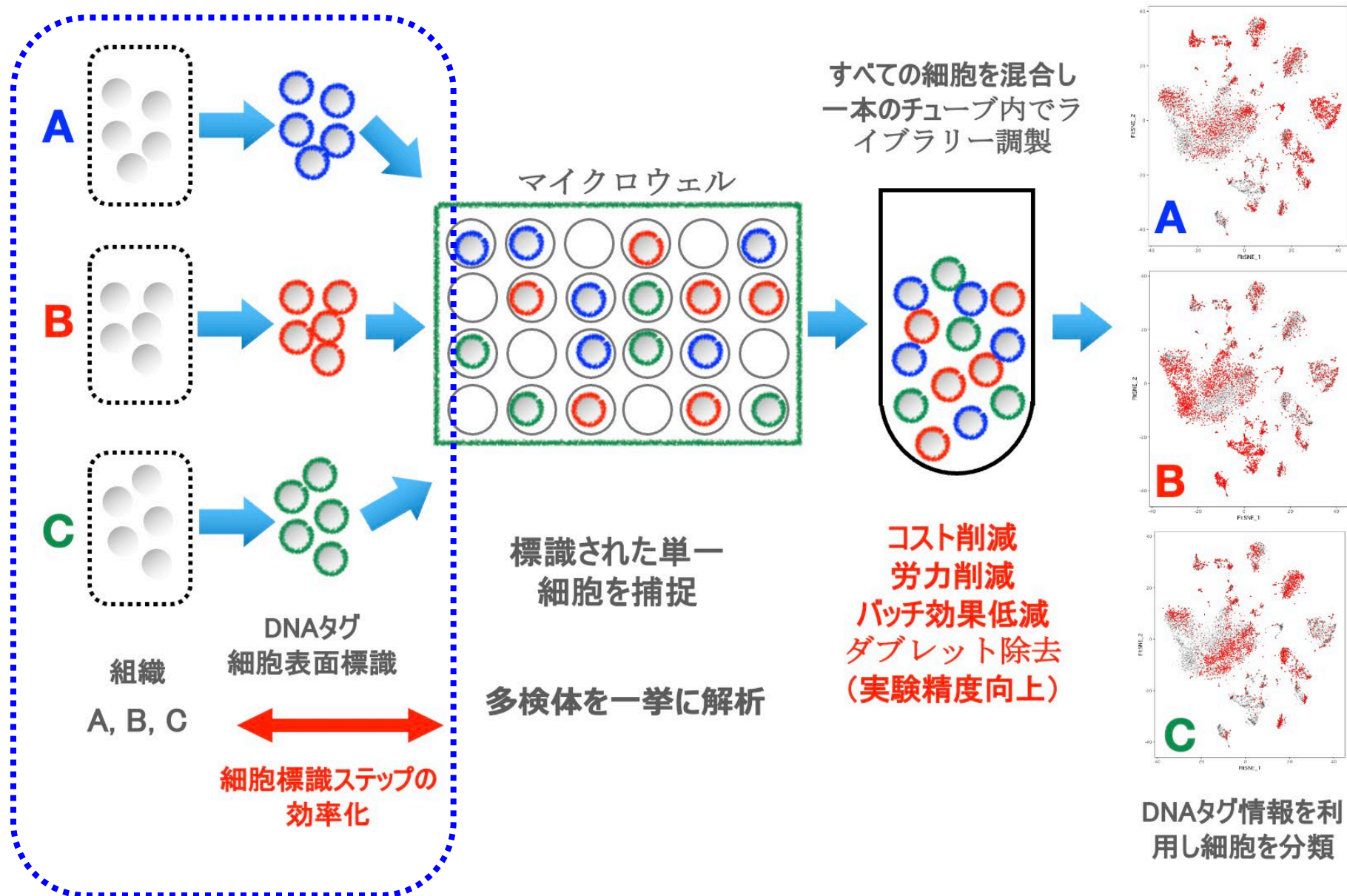


Rhapsody

Cartridge



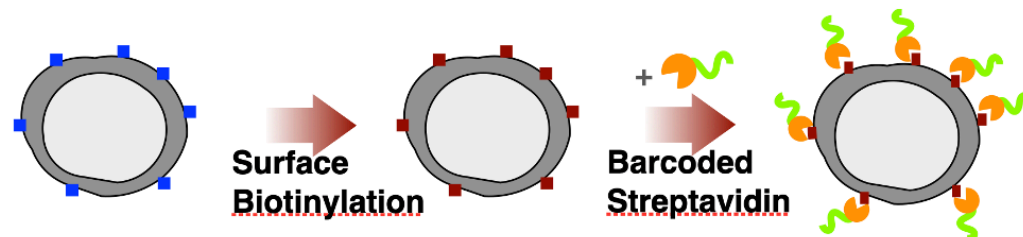
Multiplexing (サンプル多重化)の流れとその効果



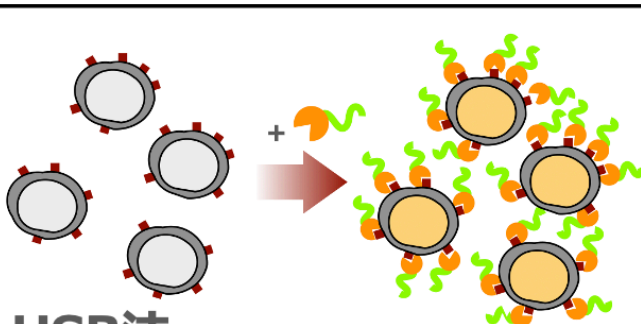
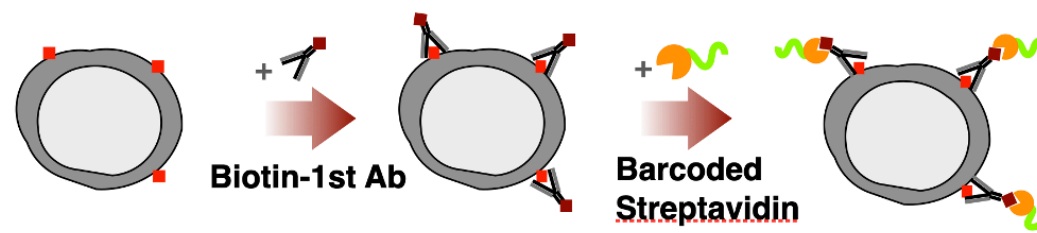
シングルセル遺伝子発現解析の高度化： サンプル多重化新技術USB法の開発

(DNA Res. 29:dsac017, 2022, 特許出願)

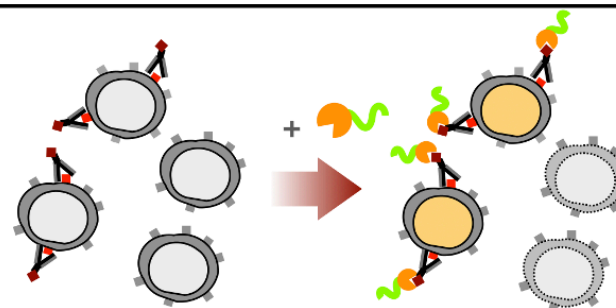
USB法



抗体を用いた従来法



USB法

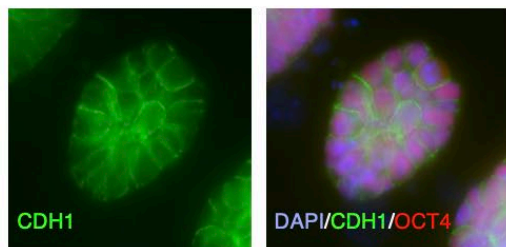


抗体法

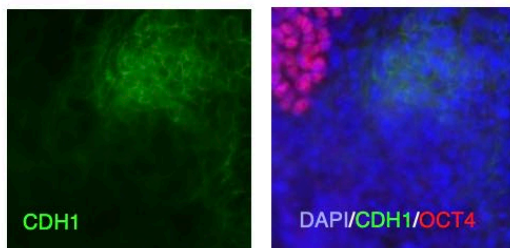
ビオチン化によりすべての細胞タイプ
を漏れなく標識可能

抗原陰性細胞は標識されない
すべての細胞を均しく標識する抗体が必要

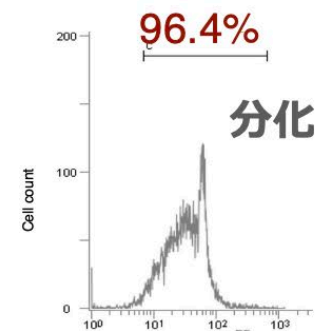
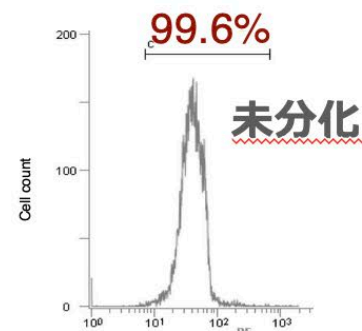
未分化ES細胞



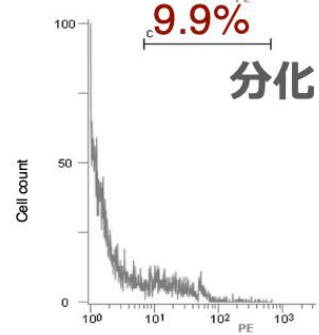
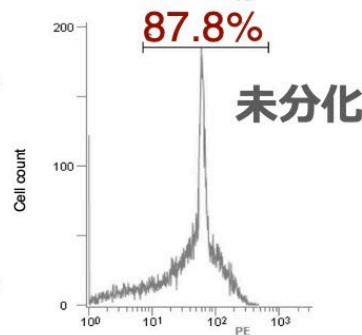
分化



USB法



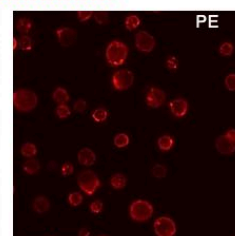
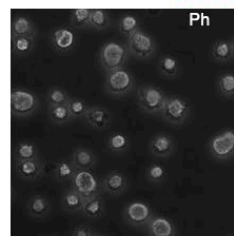
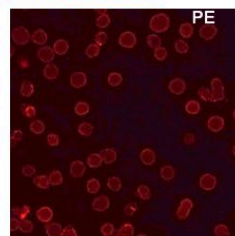
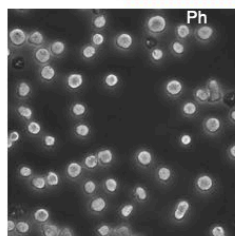
抗体法
(anti-CDH1)



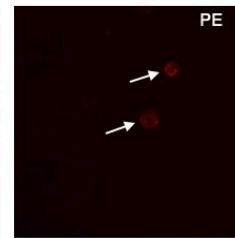
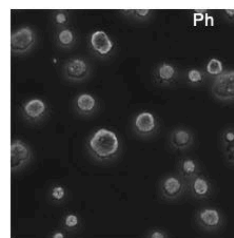
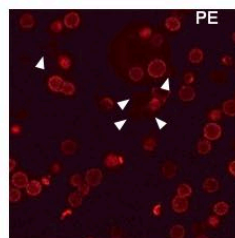
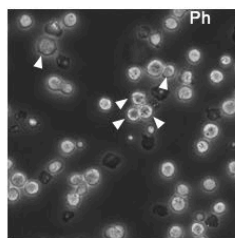
未分化ES細胞

分化細胞

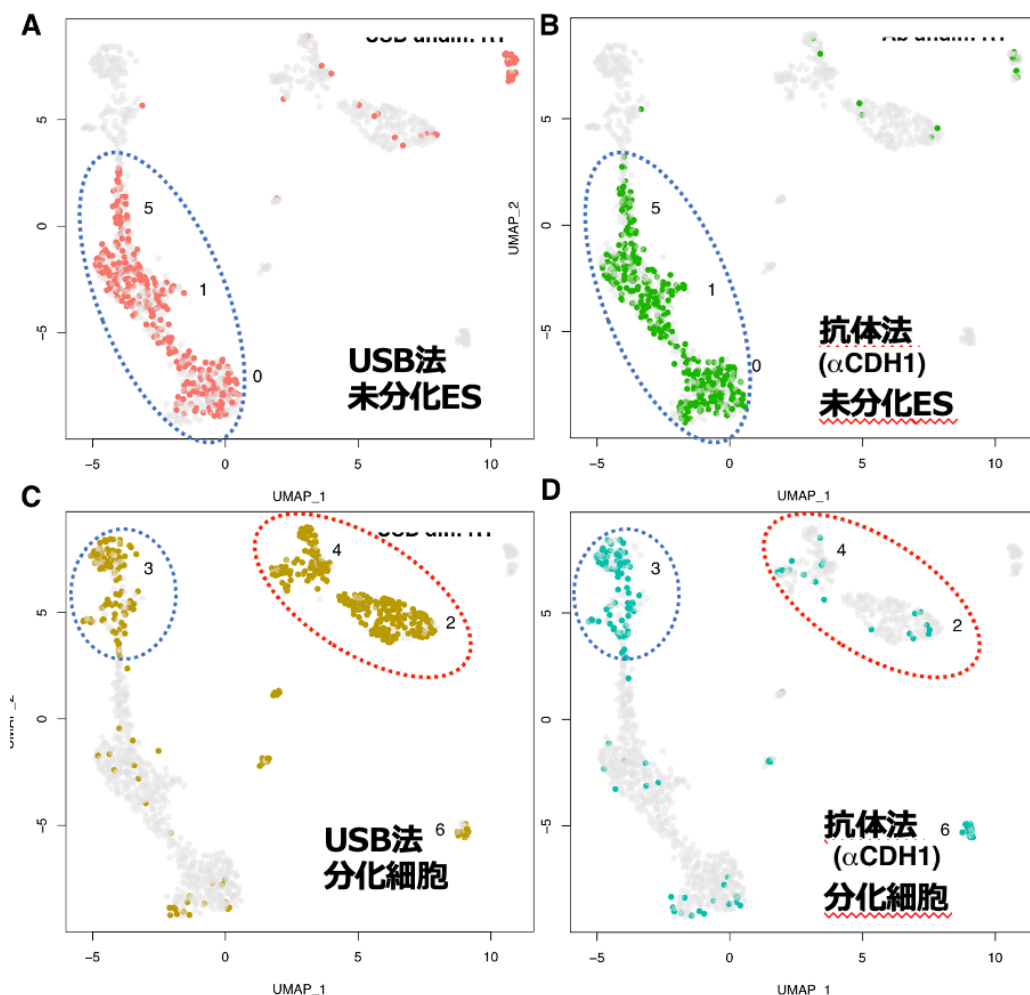
USB法



抗体法
(anti-CDH1)



シングルセル遺伝子発現解析の高度化：サンプル多重化新技術USB法の開発



CDH1陽性細胞

Cluster ID	Undiff. USB (A951)	Undiff. Ab (A953)	Diff. USB (A952)	Diff. Ab (A954)
0. Naïve cells	126 (40.0%)	152 (48.1%)	20	18
1. Pluripotent cells	138 (44.4%)	153 (49.2%)	13	7
3. Epithelial cells	1 (0.6%)	1 (0.6%)	97 (57.7%)	69 (41.1%)
5. Primed pluripotent cells	43 (46.2%)	41 (44.1%)	3 (3.2%)	6 (6.5%)

CDH1陰性細胞

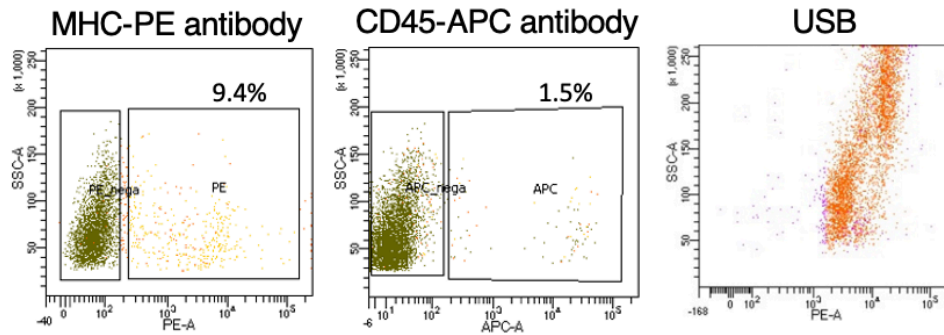
Cluster ID	Undiff. USB (A951)	Undiff. Ab (A953)	Diff. USB (A952)	Diff. Ab (A954)
2. Vascular smooth muscle cells	9	4	183 (86.7%)	15 (7.1%)
4. Neural cells	3	1	108 (88.5%)	10 (8.2%)
6. Macrophage	1	11	27 (48.2%)	17 (30.4%)

USB法により全ての細胞を漏れなく標識・解析可能

USB法は細胞のトランスクリプトームに影響を与えない

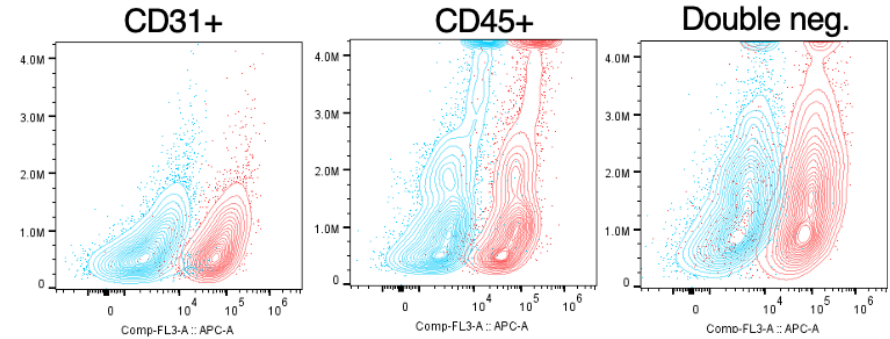
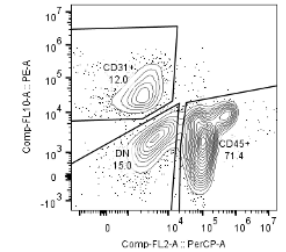
USB法：細胞種、生物種によらない標識法

Mouse 成長板軟骨



京都大学・妻木博士提供

Rat 肺細胞



Unlabeled USB labeled

東京理科大学・七野博士提供

Kamatani T et al. Human iPS cell-derived cartilaginous tissue spatially and functionally replaces nucleus pulposus. Biomaterials. 284, 121491. (2022)

サル*iPS*細胞由来軟骨

Abe *et al.*, "Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect" Nat. Commun., 14(1) 804 (2023).

固定サンプルのサンプル多重化

シングルセル解析: 生細胞を使う必要あり

希少サンプル（臨床検体、胚体組織等）

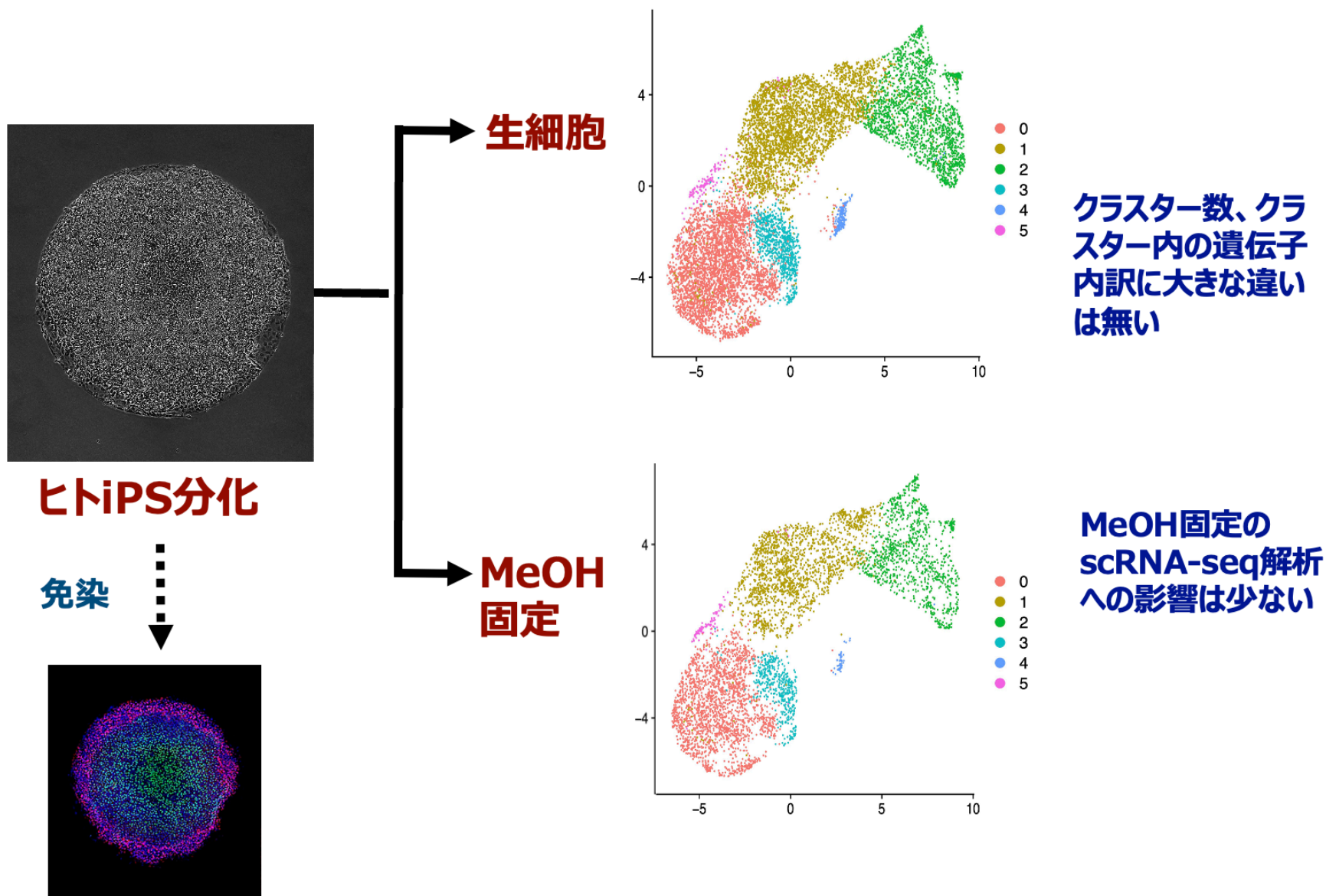
時系列サンプル（発生・分化など）



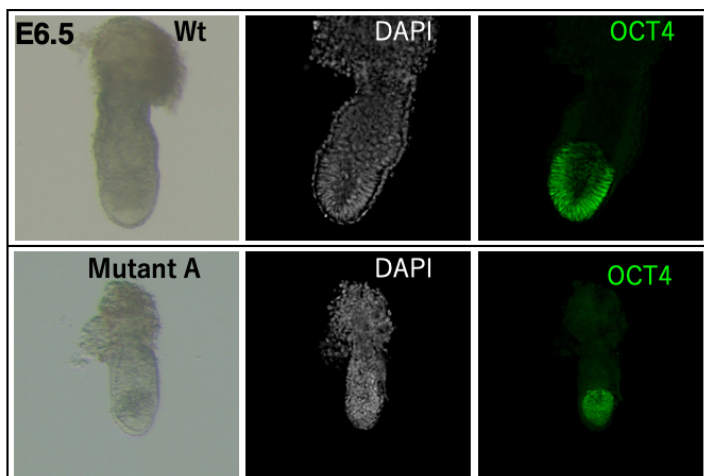
固定サンプル利用のメリット

サンプリングの自由度大 = 時間・労力・コストの削減と実験精度の向上

MeOH固定サンプルのシングルセル解析



応用例：発生致死変異マウス系統のシングルセル解析



課題：約1000個の細胞からなるマウス胚の解析

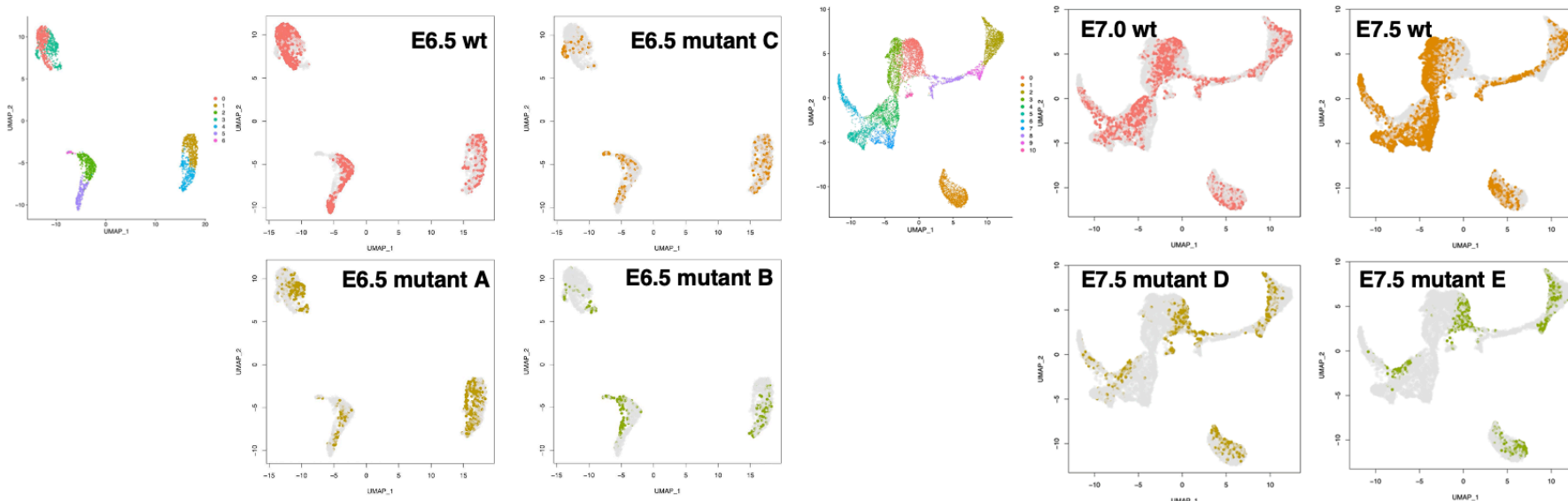
細胞数が少ない

遺伝型の判定後に解析する必要

一旦MeOH固定した後に解析

細胞数確保、遺伝型判定

サンプル多重化して解析



サンプル多重化：労力削減、バッチ効果低減、ダブレット除去 (実験精度向上)、コスト削減

- USB法により全ての細胞を漏れなく標識・解析可能
 - USB法は細胞のトランスクリプトームに影響を与えない
 - 細胞種、生物種によらない標識法
 - 細胞核に適用可
 - 固定細胞に適用可
 - 既存のRNA-seqプロトコルとcompatible
 - サンプル多重化によるコスト削減
- 30000細胞・10サンプル（3000細胞/サンプル）を一回のランで解析可能

想定される用途

- シングルセル解析全般（生命科学研究全般に大きな波及効果）
- 特に多検体解析を行う用途に適用
- サンプル固定化と組み合わせ、さらに広い応用範囲（臨床検体等の希少検体、時系列サンプル）

実用化に向けた課題

- 技術的には完成。**DNAタグの種類**を増やすことによりさらに多種類のサンプルの同時解析が可能
- USB法に必要な試薬、DNAタグ等を**パッケージ化しキット化**するノウハウ必要
- 実験操作自体は単純であるので、**実験操作の自動化**が可能になれば、より大規模な多検体解析の用途に適用可

企業への期待

- 実用化（キット化）、あるいは自動化に協力していただける企業との**共同開発**を希望
- 本技術を用いたシングルセル受託解析を行う企業と提携

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：細胞の標識法
- 出願番号：特願2022-16576
- 出願人：理化学研究所
- 発明者：杉本道彦、阿部訓也

お問い合わせ先



株式会社理研鼎業（りけんていぎょう）

新技術説明会事務局

E-mail: senryaku@innovation-riken.jp