

次世代シーケンサーを用いたシングルセル遺伝子解析 AS ONE Cell Picking System 活用法

背景

いまシングルセル（一細胞）遺伝子解析が注目されています。近年の研究において、がん細胞の不均一性をはじめとした細胞集団には多様性があることが明らかになりました。組織や細胞集団の遺伝子解析では細胞集団の平均値が得られるものの、個々の細胞の特長や機能など、僅かではあっても重要な情報が埋もれてしまう可能性があります。微量サンプルからの高感度な遺伝子解析法の確立や、細胞分離回収技術の向上に伴い、細胞間の生物学的ばらつきの解明や、希少細胞の遺伝子解析が現実味を帯びてきました。

本稿では、生きた細胞を一細胞ずつ分離回収できる AS ONE Cell Picking System により単離した細胞を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を実施した結果をご紹介します。

方法

細胞回収

マイクロチャンバー（図 1）に細胞が接着するのを防ぐため、ポリビニルピロリドン K-90（PVP、ナカライテスク）の 1% 溶液に、直径 ϕ 30 μ m のマイクロチャンバーを浸漬し、室温で 1 時間コーティングしました。その後、滅菌水を用いて洗浄し、実験に用いました。

細胞は、骨髄転移性ヒト乳癌細胞株 BM2¹（GFP 標識、以下 cellA）およびヒト乳癌細胞株 MDA-MB231-D3H2LN（以下 cellB）を使用しました。両者はサブクローン株と親株の関係にあります。細胞を各々剥離後、PBS (-) により $2\sim 3 \times 10^5$ 個に調整し、マイクロチャンバーに添加しました。その後、マイクロチャンバーを遠心（50g, 2分）してウェルに細胞を充填後、ウェルに入りきらなかった細胞を PBS (-) で 5 回洗浄して除き、再び PBS (-) で満たしました。

AS ONE Cell Picking System（図 2）を用いて、マイクロチャンバー上の細胞について透過光および FITC で解析を行った後、Ovation[®] SoLo RNA-Seq System Human（NuGEN）の lysis buffer を添加した PCR チューブ内に細胞を 1, 3, 10 個ずつ回収しました（図 3）。

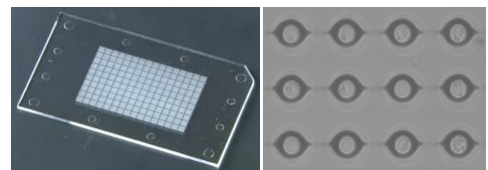


図 1. マイクロチャンバー
AS ONE Cell Picking System 専用。細胞の大きさに応じて、直径 ϕ 10, 20, 30 μ m の 3 種類があり、約 8~34 万個の微細なウェル（右図）を有する。



図 2. AS ONE Cell Picking System

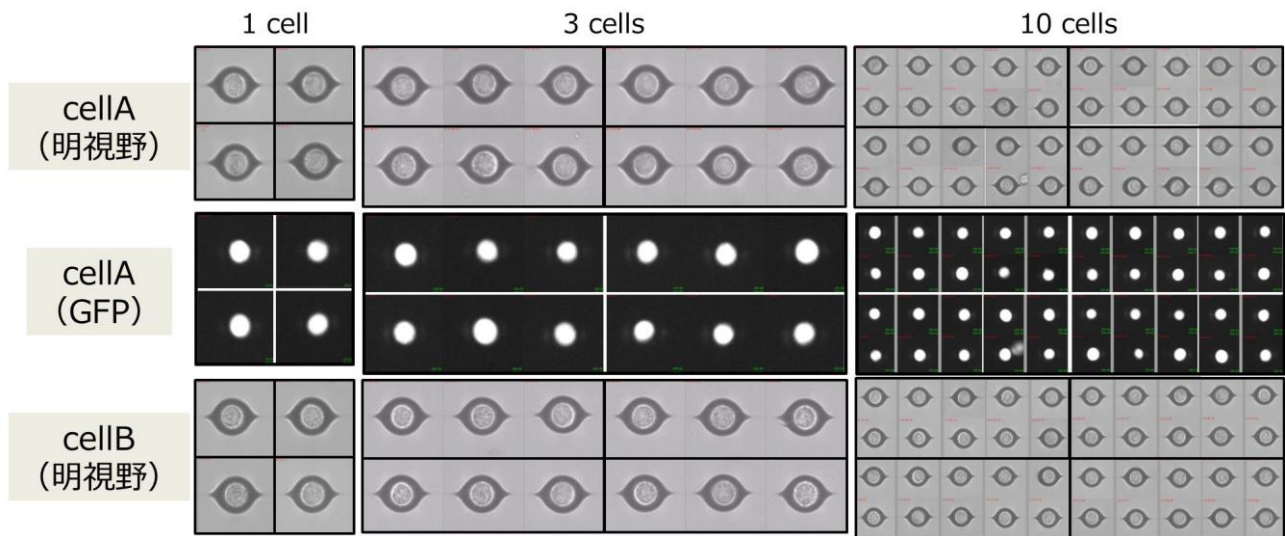


図 3. AS ONE Cell Picking System にて回収前の細胞の写真
 cellA：骨髄転移性ヒト乳癌細胞株 BM2（GFP 標識）
 cellB：ヒト乳癌細胞株 MDA-MB231-D3H2LN
 マイクロチャンバーのウェルに細胞が 1 個ずつ充填されている。

ライブラリ調製・シーケンシング

Ovation[®] SoLo RNA-Seq System Human のプロトコルに従ってライブラリ調製を行い、AnyDeplete モジュールを用いて rRNA の除去を行いました。ライブラリ増幅 PCR サイクルは細胞数に応じて検討後決定し、Agilent Bioanalyzer にてライブラリ品質を確認しました。次世代シーケンサーとして illumina NextSeq500 を用いて、75 bp SE 1,000 万リード/サンプルの条件にてシーケンス配列を取得しました。

発現データ解析

シーケンスに含まれるアダプター配列の除去（トリミング）、リファレンスゲノム（human hg19）へのアライメントの後、NuGEN 社の提供する分子バーコード技術により PCR 重複リードの除去を行いました。続いて RefSeq データベースに基づいて遺伝子発現をカウントし、TMM 法により正規化発現値を取得しました。

結果と考察

1 細胞、3 細胞、10 細胞の 3 通りのシーケンスデータを詳細に解析しました。各サンプルの総リード数は想定どおり約 1,000 万リードが得られました (図 4 A)。そのうち遺伝子領域にマップされたリード数は、サンプル毎にばらつきを認めるものの約 40 万リードで、細胞数依存的に増加する傾向にありました (図 4 B)。また、分子バーコードによる重複除去後のリード (図 4A, 黄色の上端) は、1, 3 細胞と比べて 10 細胞で多く認めましたが、これらの多くは遺伝子間領域にマップされており、発現カウントへの寄与は限定的でした。一方で 1, 3 細胞の一部では、遺伝子領域のリード数が少ないサンプルも認めました (図 4B, 中央)。

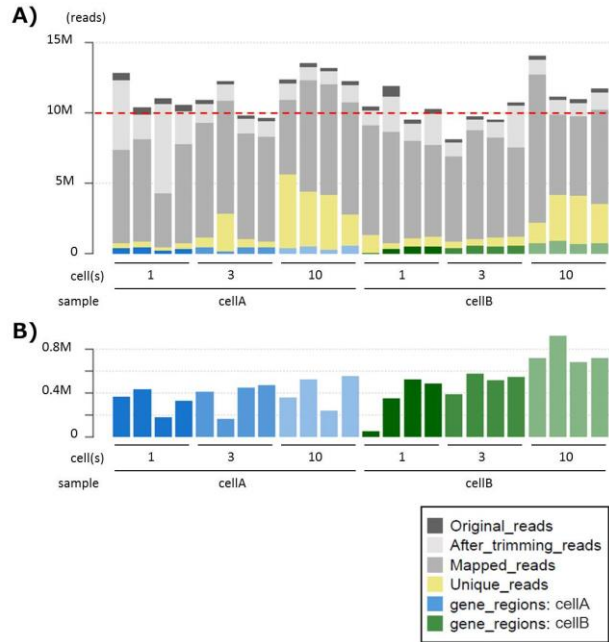


図 4. シーケンス総リード数と内訳
各サンプルとも約 1,000 万リードが得られた

NGS ライブラリの品質評価を行うため、遺伝子領域にマップされたリードについて、遺伝子の 5' 端から 3' 端にかけてリードの分布に偏りが無いかを GeneBody 解析により評価しました (図 5)。一部のサンプルではやや不均一なリード分布を認めましたが、全体としては 1 細胞から 10 細胞まで遺伝子全長を網羅する均一な NGS ライブラリが作製できていたと考えられます。すなわち、Ovation[®] SoLo RNA-Seq System を使用すれば、1 細胞から抽出した RNA から均一な NGS ライブラリを合成できます。

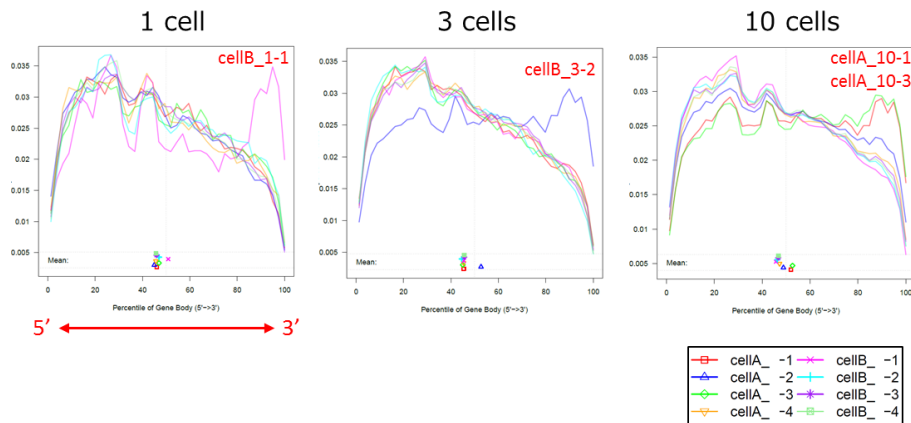


図 5. GeneBody 解析
大多数のサンプルで遺伝子全域のリードが得られた

今回用いた2種類の細胞株（親株とそのサブクローン株）間の正規化発現値の相関性を細胞数毎に比較したところ、10細胞では発現全域にわたって相関性が保たれていました。一方で、細胞数の減少に従い個々の遺伝子発現の変動は大きくなる傾向にありました

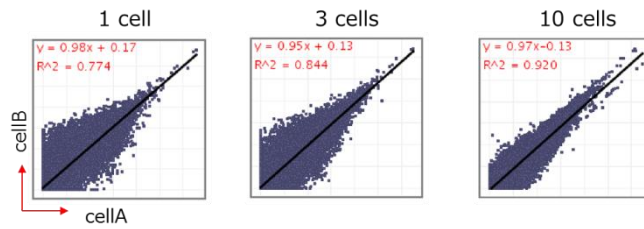


図 6. 2種類の細胞間の遺伝子発現量の差異
TMM 正規化後の発現量について、2種類の細胞間にて細胞数毎に比較

(図6)。これは、同じ細胞株でも個々のサンプル間で発現量に差異があるのか、または1サンプルあたりの細胞数が少ないことによる実験的な誤差であるのかについては、議論の余地があります。解決法として、N数を増やして検討する必要があると考えられます。

今回のシーケンス条件が、遺伝子発現解析に十分なデータ量であるかを検討するために、遺伝子領域のリード数と検出される遺伝子数の関係を rarefaction curve にて評価しました(図7)。細胞数の増加に従い遺伝子数も増加する傾向にあり、例えば1細胞では約6,000種類、3細胞では8,000種類、10細胞では約13,000種類の遺伝子が検出されました。また検出される遺伝子数が飽和状態に達する(曲線の傾きが0に近くなる)ためには、1,3細胞では約20万リード、10細胞では約40万リードが必要であることが推定されました。これは図4Aで示した総リード数で考えると、500万、1,000万リードに相当することから、今回の実験では十分なデータ量を得ることができたと考えられます。

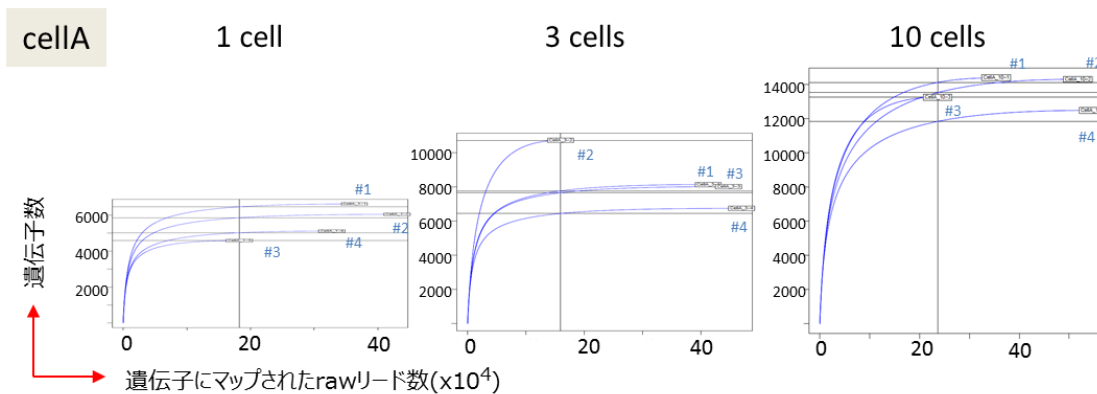


図 7. 遺伝子領域のリード数と検出された遺伝子数の関係

また検出された遺伝子の共通性について評価したところ、1細胞では約2,000種類、3細胞では約5,000種類、10細胞では約11,000種類の遺伝子がすべてのサンプルで共通して認められました(図8)。

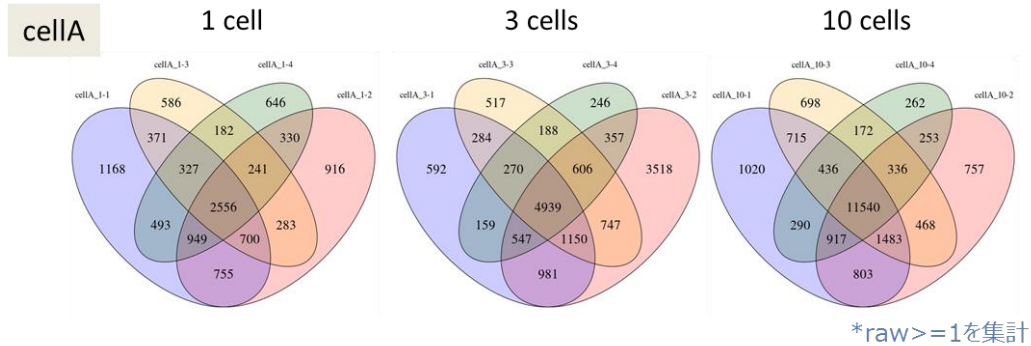


図 8. 細胞数ごとに検出された遺伝子の共通性の評価

2 種類の細胞株間で 4 倍以上発現変動した遺伝子を抽出して階層的クラスタリングによる検討を行いました (図 9)。1, 3 細胞による解析では、発現パターンが cellA と cellB で分類されました。また、1, 3 細胞による解析では、同じ細胞株であってもサンプル間で発現パターンの局所的な差異を認めました。この結果より、1 細胞から抽出した RNA サンプルを RNA-Seq に用いることで、細胞間の遺伝子発現量の差異を検出可能であることが示されました。

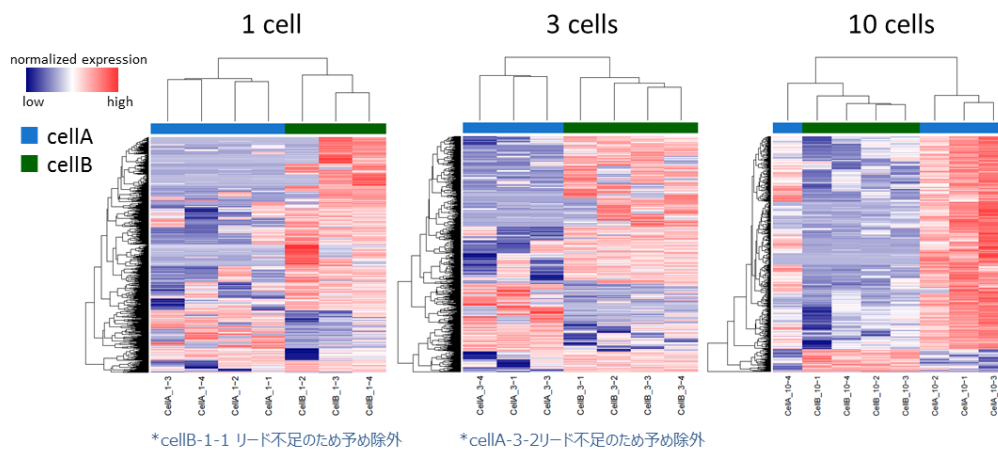


図 9. 遺伝子発現量の変動の比較

2 種類の細胞間で 4 倍以上変動した遺伝子を抽出後の階層的クラスタリングおよびヒートマップ

結論

AS ONE Cell Picking System で回収した 2 種類のヒト乳腺癌細胞について、Ovation[®] SoLo RNA-Seq System による RNA-Seq 解析を行った結果、個々の細胞の遺伝子発現量のばらつきや多様性を検出できました。したがって、AS ONE Cell Picking System とシングルセル RNA-Seq 解析を組み合わせることで、個々の細胞が多様性を示すがん細胞や ES/iPS 細胞、または希少細胞などの遺伝子発現解析に有用であると考えられます。一方で、発現量のばらつきが実験的な誤差である可能性は否定できないため、N 数の検討は必要であると示唆されます。

参考文献

- 1) Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, Yoshida M, Tsuda H, Tamura K, Ochiya T. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal*. 2014 Jul 1;7(332):ra63.

※当データは、国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 特任研究員の小坂展慶先生よりサンプルをご提供いただき、(株)DNA チップ研究所様に解析していただきました。

お問い合わせ

アズワン株式会社 バイオサイエンスグループ

E-mail : BIO@so.as-1.co.jp

HP : <https://axel.as-1.co.jp/contents/bio>

<本社>

〒550-8527 大阪府大阪市西区江戸堀 2-1-27

TEL : 06-6447-8633 FAX : 06-6447-8683

<東京オフィス>

〒104-0032 東京都中央区八丁堀 2-23-1

TEL : 03-6222-0180 FAX : 03-6222-0270

<殿町ソリューションリサーチラボ>

〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-22

TEL : 044-577-7210 FAX : 044-577-7211