骨髄性白血病由来細胞のシングルセル解析

イントロダクション

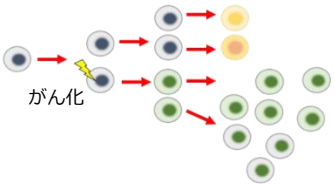
近年の研究において、見た目が同じ細胞であっても細胞周期や発現している遺伝子に違いがある事、すなわち細胞の不均一性が明らかになってきました。一方、血球系の細胞においてはフローサイトメトリーを用いて膜表面タンパクに注目した新規サブセットの同定が行われてきましたが、シングルセルレベルにて細胞内の遺伝子発現を網羅的に解析することによりさらに詳細な解析が可能となってきました。

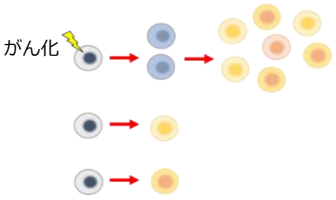
タカラバイオの ICELL8 システムは、ナノスケールの微細なウェルを用いて最大約 1,800 個のシングルセルを取得します。各ウェルにはバーコードが付与されており、シングルセル由来の cDNA 合成をチップ上で行い、NGS を用いたシングルセル RNA-Seq を行うことができます。システムにはイメージング機能が備わっており、バーコード情報と実際のシングルセル画像が関連付けられ、確実なシングルセル解析を可能にします。今回は性質の類似した骨髄性白血病由来の細胞を ICELL8 システムとイルミナ社 HiSeq を用いて解析し、検出された遺伝子に注目をした細胞の分類と発現値の比較を行った例を紹介します。

ICELL8 を用いたシングルセル化からシーケンスライブラリー調製までのワークフロー

慢性骨髄性白血病由来の K562 細胞、急性骨髄性白血病由来の MOLM13 細胞、P31FUJ 細胞、各細胞の Mix サンプル（図 1）を用いたシングルセルレベルでの遺伝子発現解析実験を SMARTer ICELL8 Sinlgle-Cell System を用いて行いました。一定の濃度に調製した細胞を ICELL8 Chip にディスペンス後、シングルセルを選択、RT 溶液を添加し cDNA 合成を行い、イルミナ社次世代シークエンサーによる遺伝子発現解析を実施しました（図 2）。取得したシングルセル由来のデータのうち、取得リード数の多い 800 細胞のみを選抜・細胞毎のリード数による標準化を行った上で、発現遺伝子情報を tSNE 解析によってクラスター解析を行い、クラスター分類に寄与する遺伝子群を調べました。

急性骨髄性白血病（Acute Myeloid Leukemia）
造血幹細胞ががん化して分化できなくなるため、白血球、赤血球や血小板が正常に作られなくなる





慢性骨髄性白血病（Chronic Myeloid Leukemia）
造血幹細胞から血球が必要以上に生産されるため、身体に異常が起こる

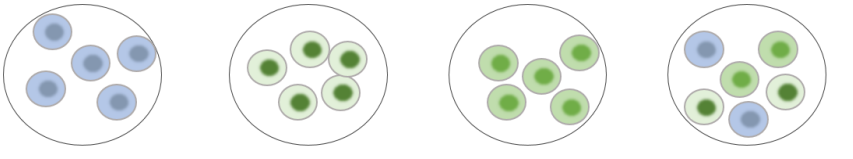
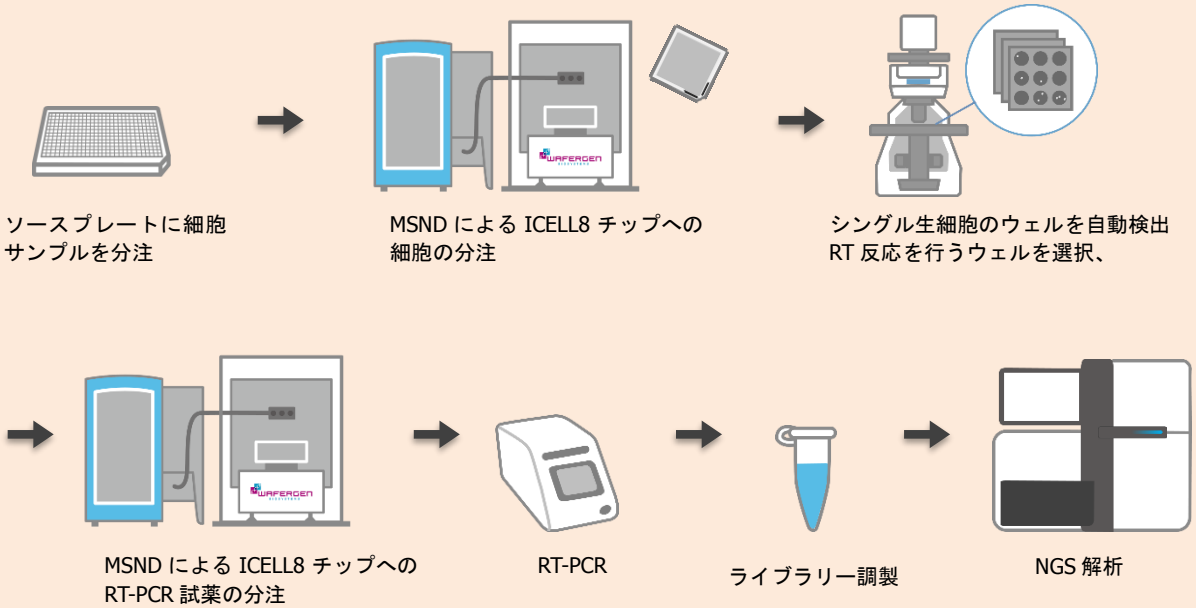


図 1)　K562，MOLM13，P31FUJ の特徴

図 2)　SMARTer ICELL8 Single-Cell System を用いた解析の流れ



実験計画

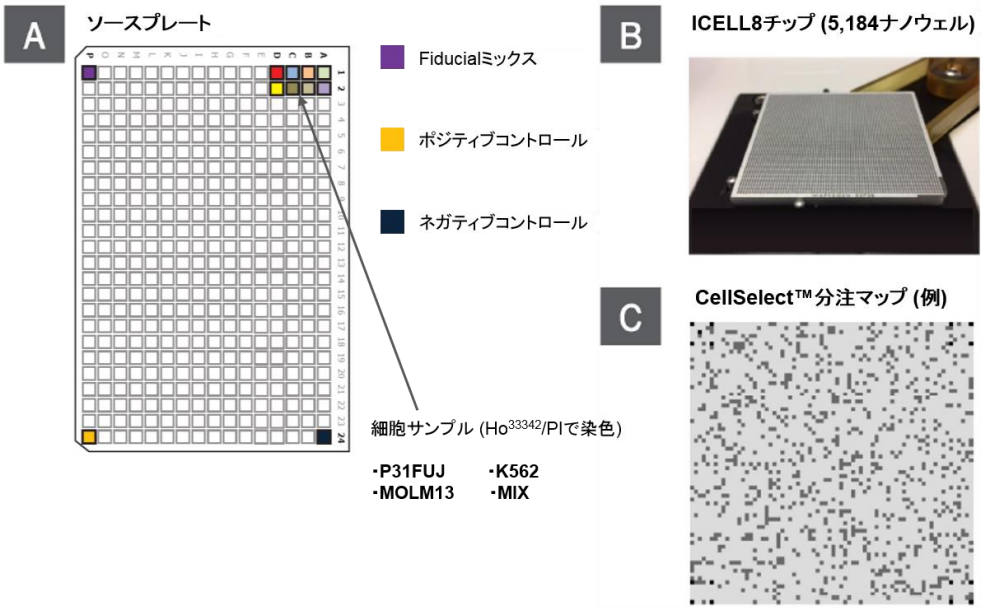


図 3)　ICELL8 チップに分注された細胞のシングルセルシーケンスライブラリー作製のための実験計画

A：ソースプレートには、二重染色した細胞サンプル、ポジティブコントロール RNA、および位置基準用 Fiducial ミックス(FM)を所定の位置に分注しました。　B：インプット(サンプル細胞、コントロール、または FM)を、MSND を用いてプレプリントされた ICELL8 チップに分注しました。　C：CellSelect™ソフトウェアでウェルの画像取得および解析を行った結果、約 1,400 個のシングルセルが識別され、ライブラリー調整のための RT 反応液の分注マップを作成しました。

結果

4 種のサンプルを合計して約 1,400 細胞のシングルセルを取得、1 細胞あたり平均 85,000 リード、1,500 遺伝子を検出しました。tSNE 解析の結果（図 4）、K562・MOLM-13・P31FUJ はそれぞれ三つのクラスターに分類されました。そして MIX サンプルは由来であると予想される細胞種のクラスターに散らばって分類されました。

それぞれのクラスター間にて各遺伝子発現値の比較（t 検定）を行った所、各群間において数百～数千の遺伝子について統計学的有意差（q < 0.01）が確認できました。これらの遺伝子群を KEGG Pathway 上で確認してみると、ACUTE MYELOID LEUKEMIA における MAPK signaling pathway に集中していることが確認されました。また、白血病に関連する事が知られている HOXA9 遺伝子について注目した所、MOLM13 及び P31-FUJ で強く発現している事が確認できました（図 5, 図 6）。

ICELL8 を用いる事で①細胞の分類に寄与する複数の遺伝子の同定と機能の推定、②任意の遺伝子発現値の定量が可能である事が示されました。

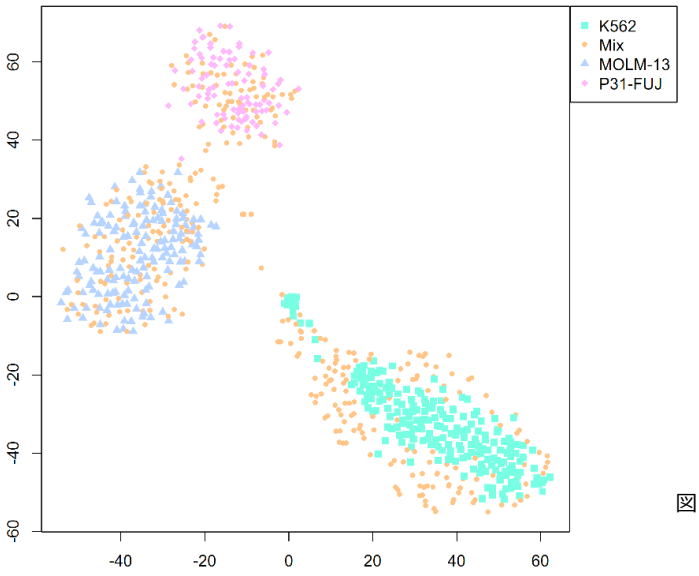


図 4) tSNE 解析結果

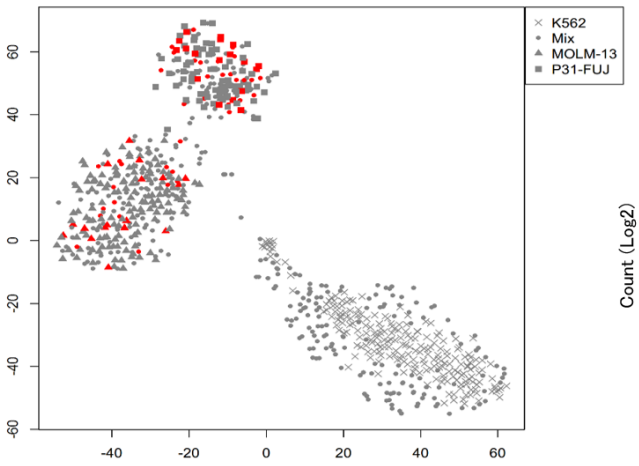


図 5) HOXA9 を発現する細胞（Count>1）の分布（赤）

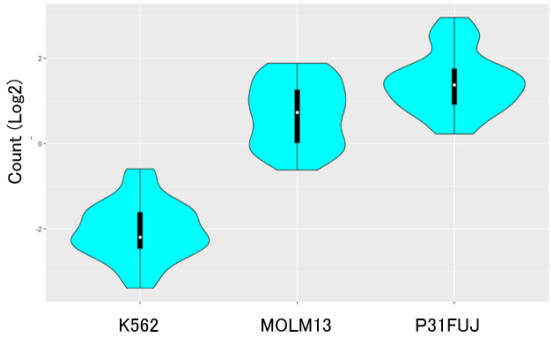
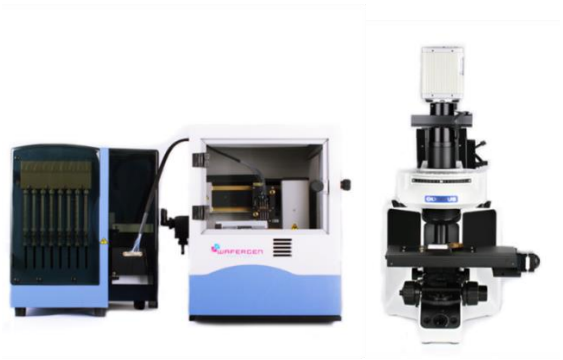


図 6) 各群における HOXA9 遺伝子の発現値の比較

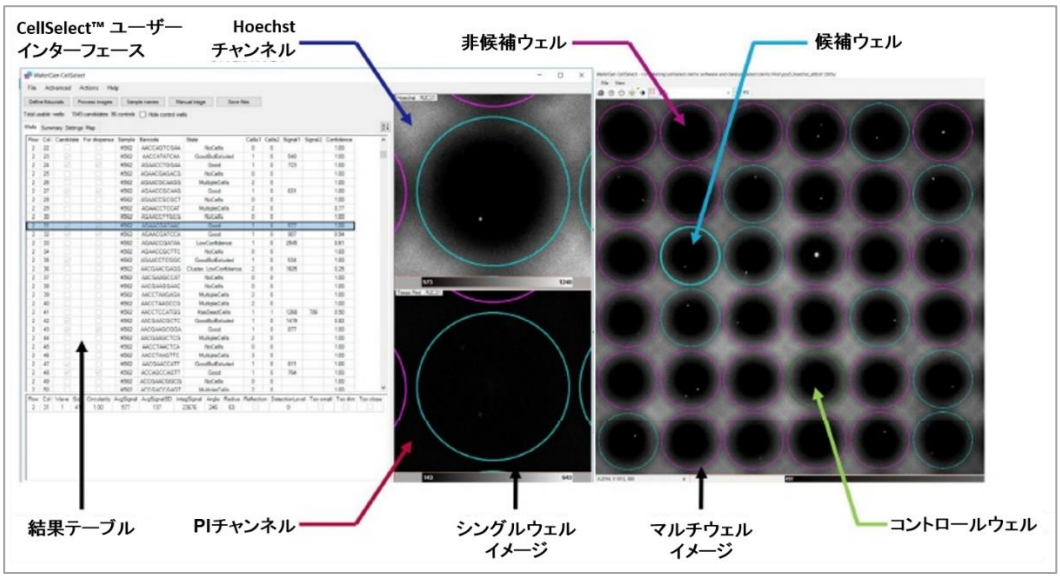
MOLM13 では強力ながん融合遺伝子 MLL-AF9 が、一方 P31-FUJ では CALM-AF10 が発現しており、がん関連遺伝子である HOXA9 の発現に影響する事が知られています。

本稿の作成に関して、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 様に細胞とシークエンスデータのご提供を頂きました。

SMARTer™ ICELL8® Single-Cell System の概要



左：マルチサンプル・ナノディスペンサー (MSND) が ICELL8 チップのウェルにナノリッター量の試薬や細胞を分注し、**右：**イメージングステーションにて ICELL8 チップ内で蛍光標識された細胞のイメージを一度に 36 ウェル分ずつ取得します。**下：**取得された画像は CellSelect™ ソフトウェアにて解析し、シングルセルを含むウェルを特定します。RT-PCR を行うウェルの数や種類は任意に決定することが可能です。



製品情報

製品コード	製品名
640000	SMARTer™ ICELL8® Single-Cell System
640142	SMARTer® ICELL8® Chip and Reagent Kit v2

この製品に関する詳細情報は、製品ページをご覧ください。

© 2016 Takara Bio Inc. All Rights Reserved.
本紙で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販または譲渡、およびこれらのための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。本紙に記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。

タカラバイオ株式会社
東京支店　TEL：03-3271-8553　FAX：03-3271-7282
関西支店　TEL: 077-565-6969　FAX：077-565-6995
テクニカルサポートライン、受託窓口　TEL：077-565-6999　FAX：077-565-6995
ウェブサイト　http://www.takara-bio.co.jp

Clontech TaKaRa cellartis