iPS 細胞から心筋分化する過程におけるシングルセル解析

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、すなわち同一の培養単位や組織における細胞群にも不均一性があることがわかってきました。例えば、幹細胞が組織特異的な細胞に分化する過程では、細胞ごとに分化の速度が異なるため、シングルセルレベルで解析を行う事で細胞分化に関わる遺伝子発現の変化をより高解像度に捉える事が期待できます。これは、従来の細胞塊を用いるバルク解析では “平均値” の中に埋もれていた遺伝子を発見し、分化過程を鮮明に記述できる可能性があります。

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約 1,200～1,500 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 iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導する過程をこの ICELL8 システムとイルミナ社 HiSeq を用いて解析した例をご紹介します。

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

ヒト iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導する過程(図 1)において、それぞれ Day01、03、09、21 のポイントで細胞をサンプリングしました。各サンプルの細胞濃度を調整した後、SMARTer ICELL8 Single-Cell System および ICELL8 チップを用いてシングルセル化から cDNA 合成までを行い、イルミナ社の次世代シークエンサーにより遺伝子発現解析を行いました(図 2)。取得したシングルセル由来の発現遺伝子情報の tSNE 解析による可視化、更に iPS 細胞に特異的な遺伝子 / 心筋細胞に特異的な遺伝子の発現量の推移を観察しました。

図 1)　iPS 細胞から心筋細胞への分化過程イメージ

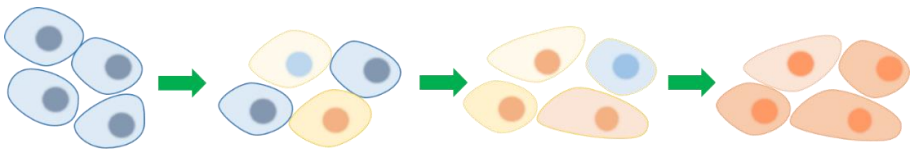
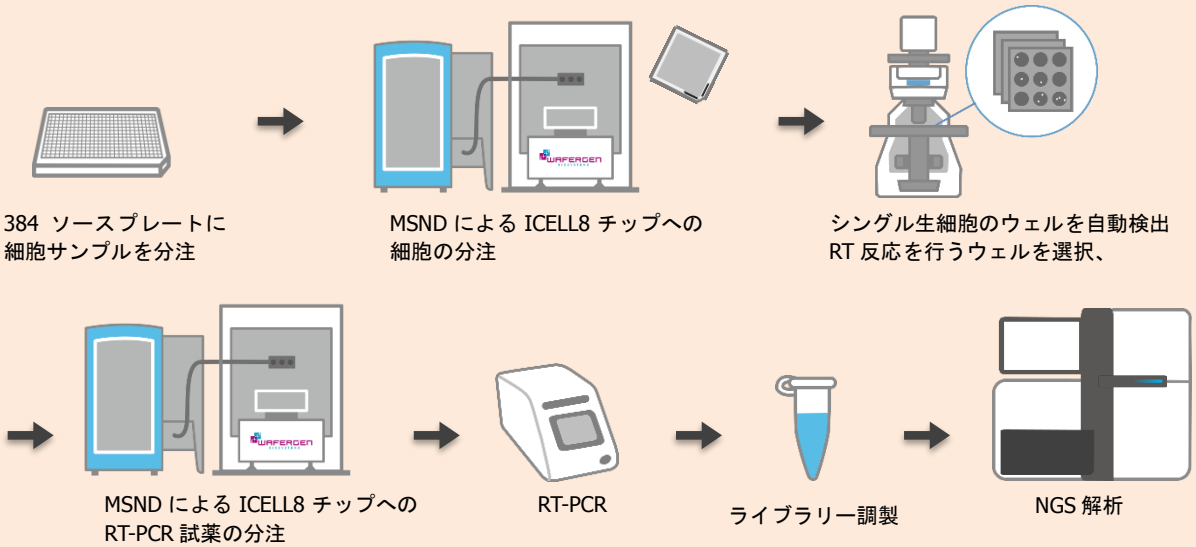


図 2)　SMARTer ICELL8 Single-Cell System を用いた解析の流れ



実験計画

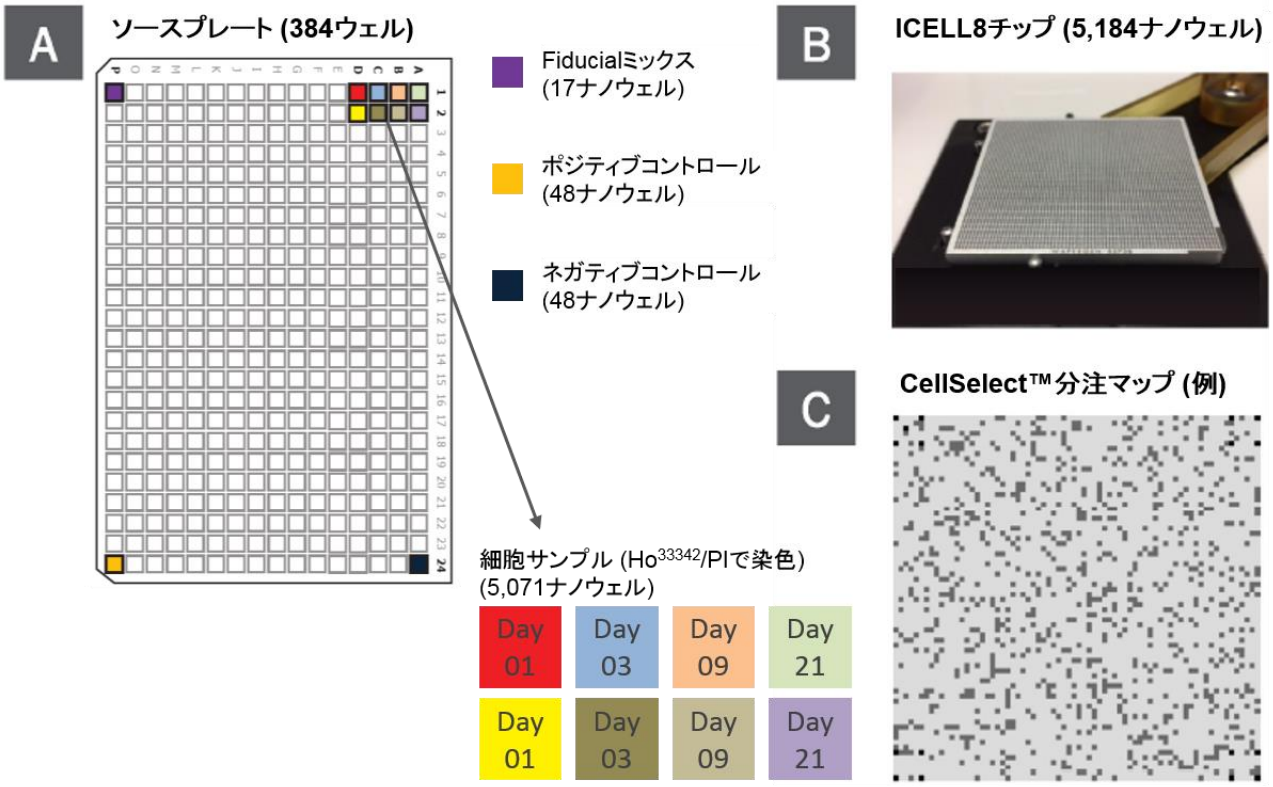


図 3)　ICELL8 チップに分注された心筋分化誘導 iPS 細胞のシングルセルシーケンスライブラリー作製のための実験計画
A：384-well ソースプレートには、二重染色した心筋分化誘導ヒト iPS 細胞、ポジティブコントロール RNA、および位置基準用 Fiducial ミックス(FM)を所定の位置に分注しました。　B：インプット(細胞、コントロール、または FM)を、MSND を用いてプレプリントされた ICELL8 チップに分注しました。　C：CellSelect™ソフトウェアでウェルの画像取得および解析を行った結果、約 1,000 個のシングルセルが識別され、ライブラリー調整のための RT 反応液の分注マップを作成しました。

結果

ICELL8 システムを用いた心筋分化誘導ヒト iPS 細胞のシングルセルシーケンスデータ解析

4 ポイントを合計して約 1,000 細胞のシングルセルを取得、1 細胞あたり平均 12 万リード、1,200 遺伝子（最大で 75 万リード、4,500 遺伝子）を検出しました。tSNE 解析の結果（図 3）は分化誘導による遺伝子発現の違いが高解像度に捉えられていることが分かります。また、Day01 の集団に Day03 の細胞が見られることから、同一と考えられる細胞集団の中にも不均一性が存在し、遺伝子発現のゆらぎが有る事が示唆される結果が得られました。
iPS 細胞に特異的な遺伝子（DPPA4, NANOG, SOX2, OCT4, LIN28A, DPPA2, ZFP42）の発現は分化が進むにつれてカウントが減少する一方で、心筋細胞に特異的な遺伝子（ACTN2, HCN4, MYH6, MYH7, MYH7B,SIPRA, TNNI1）の発現は分化が進むにつれてカウントが増加しました。(図 4,5）これらの特異的な遺伝子以外においても、クラスター間での詳細な比較を行う事によって、それぞれの集団に寄与する遺伝子の同定が可能であると考えられます。

図 4) tSNE 解析結果

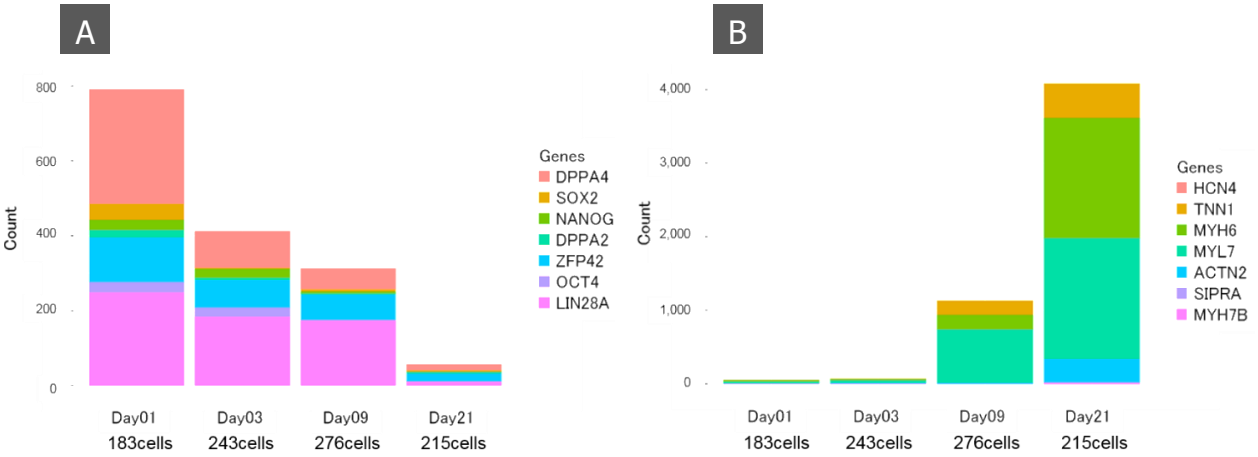
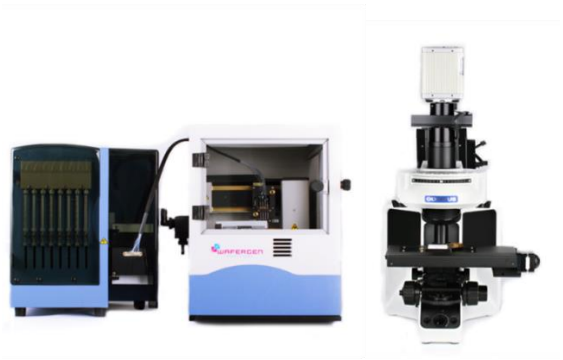


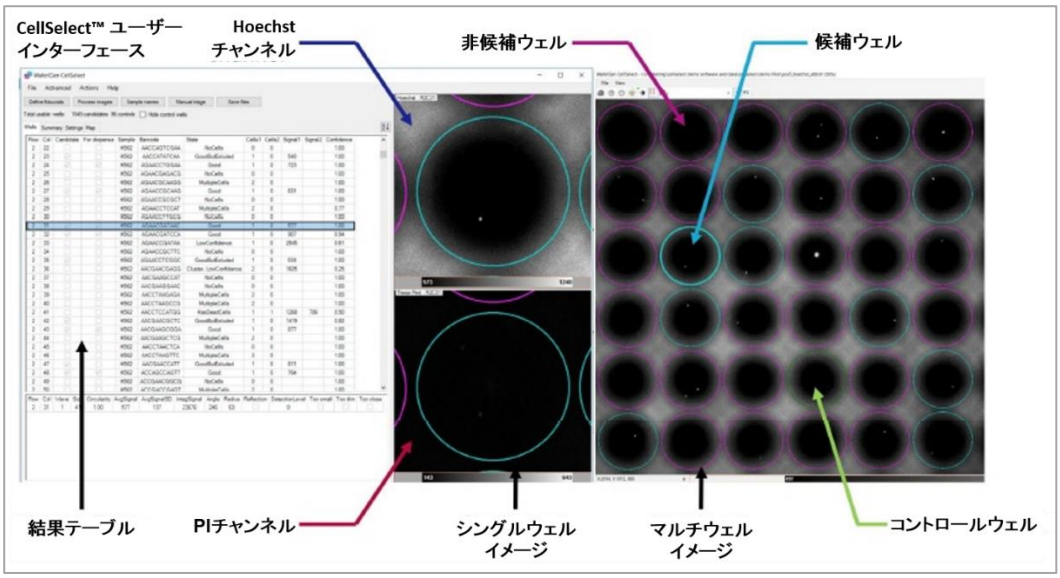
図 5)　A：iPS 細胞に特異的な遺伝子の発現の変動　　B：心筋細胞に特異的な遺伝子の発現の変動

本稿の作成に関して、京都大学　ｉ Ｐ Ｓ細胞研究所 未来生命科学開拓部門 渡辺亮先生に細胞のご提供を頂きました。

SMARTer™ ICELL8® Single-Cell System 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