

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

今号のポイント: 「ICELL8® cx Single-Cell System」を使うことで、インタクトな心筋細胞でのシングルセルRNA-Seqが可能になりました。

【キーワード】 シングルセルRNA-Seq、トランスクリプトーム解析、心筋細胞

ICELL8®システムを用いた心筋細胞のシングルセルRNA-Seq

■ 心筋細胞のシングルセル解析における課題

多くの体細胞は2倍体であり、1細胞あたり1個の核と2対の染色体が存在することが一般的ですが、成体の心筋細胞における染色体数は多様です。ある研究者は単核および多核の心筋細胞を調べ、トランスクリプトームに違いがあるのか、その違いによって機能面に影響があるのかを検討したいと考えました。この疑問の解明にはシングルセルRNA-Seq(scRNA-Seq)が最適であることは明白ですが、この手法はこれまでインタクトな成体心筋細胞に適用されていませんでした。その理由としては、心筋細胞のサイズがかなり大きく、マイクロフルイディクスやドロップレットをベースとしたscRNA-Seq法と相性が良くないことが挙げられます。また、核の数の情報を厳密に確認して単一核RNA-Seqを実施しない限り、核の数とトランスクリプトームの関係性が分からなくなる点も問題です。このような課題を克服するため、大きなサイズの心筋細胞(最長 200 μm)に対応可能な大口径ノズルを特長とするICELL8システムに注目しました。心筋細胞の懸濁液は時間が経つと沈殿を起こしやすいため、心筋細胞の分布に偏りが生じてしまいます。そこで、ICELL8システムの柔軟性を活用し、細胞懸濁液を穏やかに振盪するよう分注プロトコルを改変した結果、心筋細胞がICELL8チップ全体により均等に分布されるようになりました(図1)。

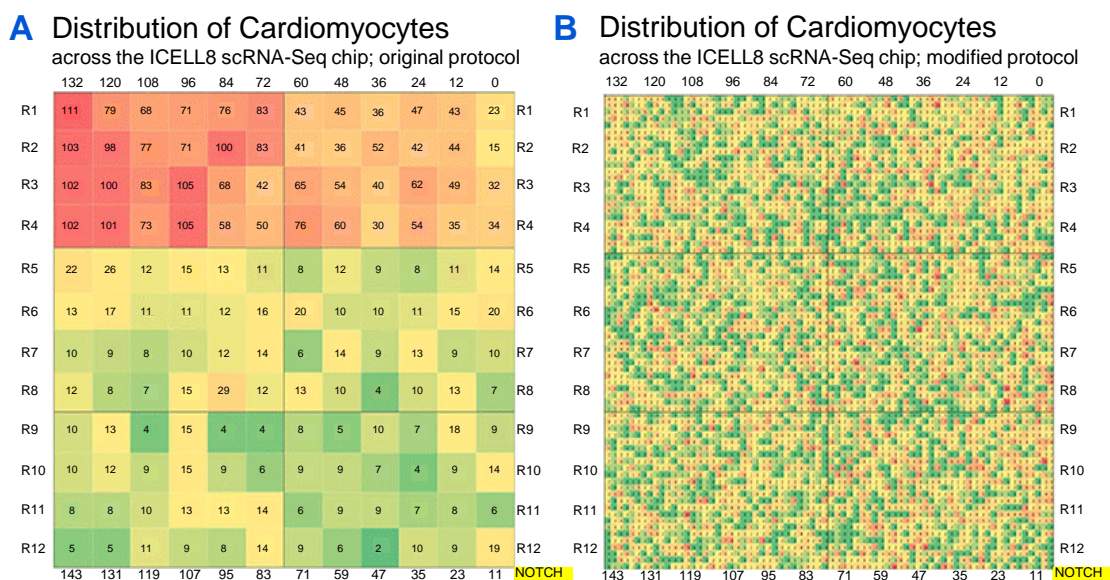


図1 ICELL8チップにおける心筋細胞の分布

パネルの色は、マイクロウェルにおける細胞の相対数を示す。

パネルA. 初期設定の分注プロトコルでは、沈殿率が高かったため、心筋細胞の分布は不均一でした。

パネルB. 改変した分注プロトコルでは、心筋細胞がチップ全体に均一に分布されました。



裏面につづく ➡

シーケンスデータと細胞の画像を組み合わせて解釈することで、さらに深い解析が可能

scRNA-Seqデータを用いた予備的なPCA解析では、心筋細胞が2つのクラスターに分かれました。さらに詳細な解析を行うと、クラスターは検出された遺伝子数と関連性があることが明らかになりました(図2、パネルA)。ICELL8システムには細胞分注後に画像を取得するステップが内蔵されているため、各細胞を観察してその画像をシーケンスデータと関連づけることが可能です。この詳細な解析により、クラスター1を形成した細胞では棒状構造の消失、サイズの縮小、不明瞭な細胞輪郭が確認され、細胞損傷を原因とするRNAの分解が起きていると考えられます(パネルAおよびB)。そこで、ICELL8システムの柔軟性を活用して画像に基づく細胞選定基準を調整し、インタクトで損傷のない心筋細胞のウェルのみが解析されるようにしました。その結果、1細胞あたり平均60万リードおよび3,900個の遺伝子が検出され、細胞の大きさが多様であったにもかかわらず、心筋細胞は比較的均一に分布していました。また倍散性が高くなっても、心筋細胞の遺伝子発現にはほとんど影響がないことが示されました(パネルC)。

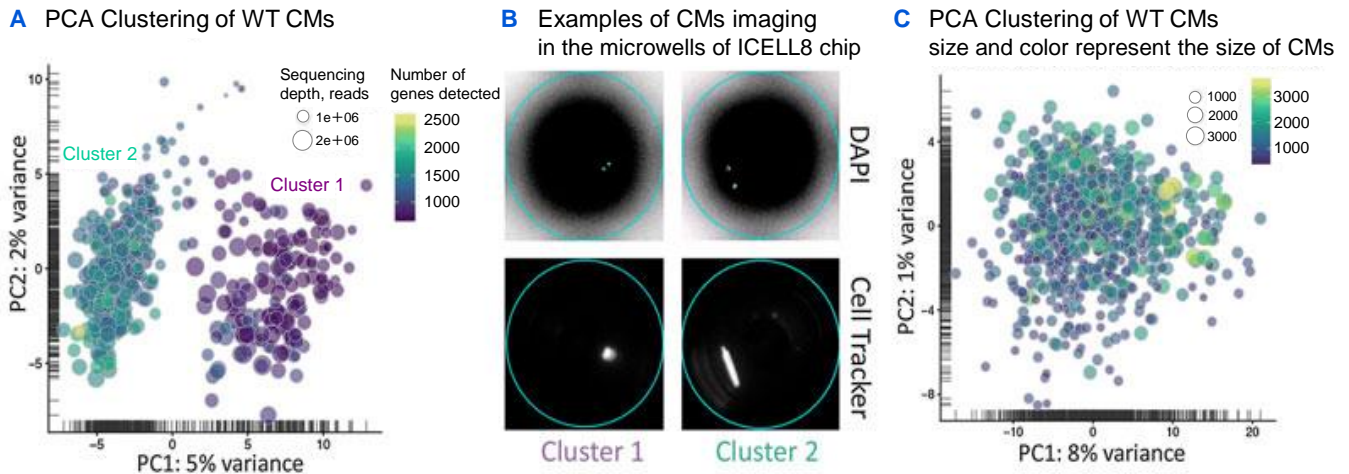


図2 scRNA-Seqで個々の心筋細胞に対して画像データを取得することにより、誤った細胞クラスタリングを防止

パネルA. 予備的なPCA解析では、心筋細胞において2つのクラスターが認められました。
 パネルB. ライブラリー作製前のクラスター1およびクラスター2における心筋細胞の画像(2つのチャンネルによる反射モード: DAPIおよびCell Tracker [Texas Red])。解析結果から、クラスター1の細胞が損傷していたことが分かりました。
 パネルC. インタクトな棒状の心筋細胞のPCA解析

まとめ

シングルセルRNA-Seqは、疾患状態における細胞のタイプを理解するには有用な手法です。しかし、これまでは適切なツールがなかったため、どのような細胞でも解析できるというわけではありませんでした。ICELL8システムは、小さな核から大きな心筋細胞まで、幅広いサイズの細胞の分注および解析が可能になるようにデザインされています。また、カスタムアプリケーション用に新たなアッセイを開発および最適化することができるため、シーケンスデータと細胞画像を紐づけることができ、研究者がデータを深く理解することができます。ICELL8システムを用いることで、インタクトな心筋細胞のscRNA-Seqが可能になりました。

参考文献

Yekelchik, M., Guenther, S., Preussner, J. & Braun, T. Mono- and multi-nucleated ventricular cardiomyocytes constitute a transcriptionally homogenous cell population. *Basic Res. Cardiol.* **114**, 36 (2019).

様々なシングルセルやシングル核からのRNA-Seqが可能なシステム

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
ICELL8® cx Single-Cell System	一式	640190	お問い合わせください

※本システムの総販売元は、ワケンビーテック株式会社です。



・本チラシ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、臨床診断用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・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
 ・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。・本チラシ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。
 ・本チラシ記載の価格は2020年3月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2020年3月作成G

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

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店

