

ICELL8 システムを用いた画像確認に基づく心筋細胞のシングルセル解析

イントロダクション

研究者たちは、特定の生物学的現象に魅力を感じ、心を惹きつけられます。選んだ研究トピックに基づく特定の細胞型や生物学的モデルの取扱いが求められますが、実験系を進める上で思いもよらない制限に直面することもあります。研究者が経験する可能性がある葛藤の1つは、研究対象の細胞型が市販の手法に適合せず、希望する実験が実施できないことです。

当社は、細胞型が原因で生じるこのような制限をなくし、これまで実施が困難とされてきた細胞型も含めて、研究者がシングルセルシーケンシングの恩恵を享受できるように、柔軟性と開放性のある ICELL8 システムをデザインしました。本テクニカルノートでは、ICELL8 システムを用いて、インタクトなマウス成体由来の心筋細胞で scRNA-Seq を行う手法を開発した Max Planck Institute for Heart and Lung Research (マックスプランク心肺研究所) の Yekelchyk らの研究を紹介します(Yekelchyk et al. 2019)。

ICELL8 システムを使ったマウス心筋細胞の調製方法を段階的に説明したプロトコールもご参考ください。

[今すぐ読む »](#)

多くの体細胞は 2 倍体であり、1 細胞あたり 2 個の核と 2 対の染色体が最も一般的ですが、成体の心筋細胞における染色体数は多様です。著者らは、単核及び多核の心筋細胞のトランスクリプトームを調べ、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 シーケンシング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たことはありませんでした。これは、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主な理由です。また、単核シーケンシングの実施では、核の数に基づいた厳格な事前仕分けを行わない限り、核の数に関する情報が失われてしまう点も問題でした。

「細胞核に関連する相違点の検討を可能にしてくれたのは、ICELL8 システムだけでした。また、心筋細胞のようなサイズの大きい細胞は単離時にダメージを受けやすく、RNA 成分に重大な変化をもたらします。ICELL8 システムでは、画像確認による細胞の厳格な品質確認が可能なので、シーケンシングデータの誤った解釈を防ぐのにとても有用です。」と連絡著者の Thomas Braun 博士は述べています。

ICELL8 Chip 上での心筋細胞のシングルセル化

著者らは、心筋細胞の大きさ (最長 200µm) による制限を克服するため、大きなサイズの細胞の分注に対応できる大口径ノズルを特長とする ICELL8 システムに注目しました。心筋細胞は ICELL8 による Chip への分注前にソースプレートのウェルに分注されますが、心筋細胞は比重が大きいため、細胞懸濁液中で時間が経つにつれて沈殿し、Chip 上で効率にシングルセルを取得することが難しいという問題がありました。本研究では、ICELL8 システムの分注プロトコールを修正し、ICELL8 Chip への細胞分注の途中で、分注を一時停止できるようにし、その間ソースプレートのウェル内で細胞懸濁液を穏やかに振盪しました。これにより、細胞懸濁液中の細胞濃度が均一になり、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)。

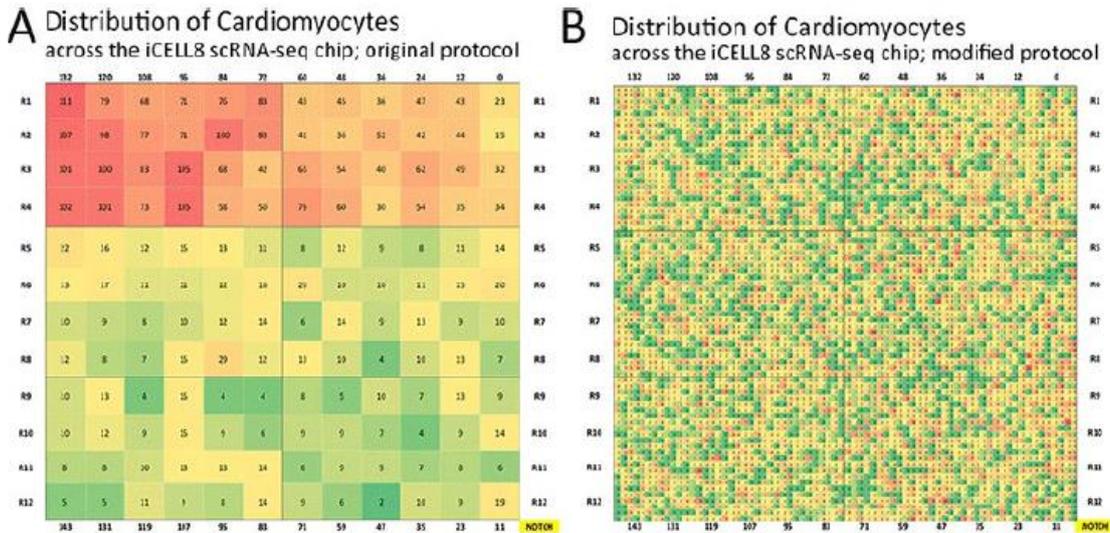


図 1. ICELL8 Chip における心筋細胞の分布 (Yekelchik et al. 2019 から図を抜粋)

パネル A : 初期設定の分注プロトコルでは、ICELL8 Chip 上で心筋細胞は不均一に分布していました。

パネル B : 修正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。

シーケンスデータと細胞画像を紐付けることで、さらに深い解析が可能に

scRNA-seq による分析では、当初、2つの細胞クラスターの形成を確認しました。しかし、さらに詳細な調査を行った結果、クラスタリングは検出された遺伝子の絶対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)。また、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ことから、著者らは、各細胞の画像を観察し、その所見をシーケンス結果と関連づけることが可能でした。この詳細な分析によって、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観測され、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ることが明らかになりました (図 2、パネル A 及びパネル B)。

そこで、著者らは、さらに画像確認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を含むウェルのみを処理し解析に用いるようにしました。1細胞あたり平均 60 万リード及び 3900 個の遺伝子が検出された scRNA-seq データでは、サイズ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おり、倍数性が高くなっても心筋細胞のトランスクリプトームにはほとんど影響がないことが示されました (図 2、パネル C)。

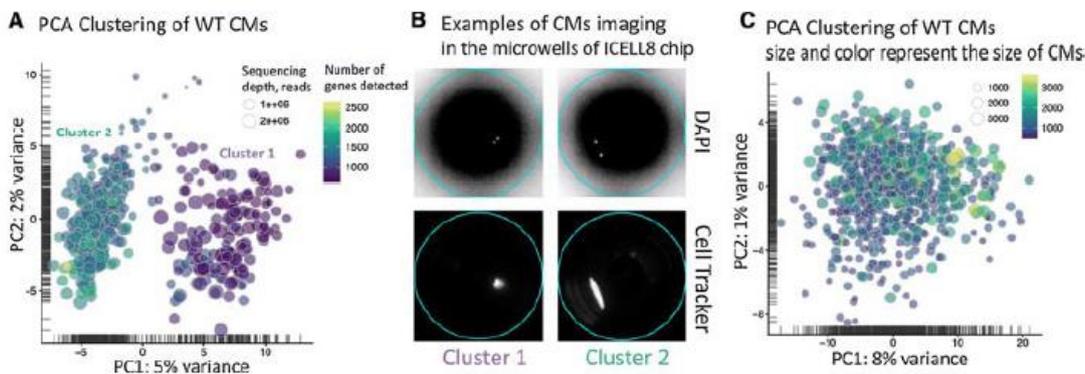


図 2. 個々の心筋細胞について、シーケンスデータと細胞画像を紐付けた解析 (Yekelchik et al. 2019 から図を抜粋)

パネル A : 初回の PCA プロットでは、2つのサブグループにおける心筋細胞のクラスタリングが認められました。

パネル B : ライブラリー作製前のクラスター1 及びクラスター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 及び

Cell Tracker [Texas Red])。画像確認による品質管理により、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みを解析した際の PCA プロット。

さらに、著者らは、心筋細胞の不均一性が心肥大などの病態を通して惹起される可能性を検討しました。その結果、心肥大の誘発後、心筋細胞の倍数性ではなく、局所組織の環境における差によって転写に差が生じていることが発見されました。

結論

本研究では、マックスプランク研究所の研究者が、大きなサイズの細胞に対応する ICELL8 システムを利用して、心筋細胞のシングルセル解析を実施した例を紹介しました。ICELL8 システムでは、得られたシーケンスデータを個々の細胞の画像と紐づけて解析できるため、データをより深く理解することが可能です。本研究では、ICELL8 システムの特長を利用し、細胞損傷を受けていると考えられる心筋細胞を解析から除外し、インタクトな心筋細胞のみを使用した scRNA-seq を実施しました。ICELL8 システムは画像確認により目的となる細胞のみを解析することができるので、データの再現性が高まり、従来の方法では埋没していた新たな知見が得られる可能性が示されました。

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).

<https://doi.org/10.1007/s00395-019-0744-z>

製品情報

製品コード	製品名	容量
640190	ICELL8® cx Single-Cell System	一式

© 2019 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

首都圏支店 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

Clontech Takara cellartis