

ICELL8 による抗体染色を用いた細胞選択

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こと、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こと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。これにより、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見つけ出し、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持つ ICELL8 Chip を用いて約 1,200~1,500 個のシングルセルを取得します。各ウェルにはウェル識別バーコードが付与されており、シングルセル由来の cDNA 合成をチップ上でを行い、NGS を用いたシングルセル RNA-Seq を行うことができます。システムには蛍光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。

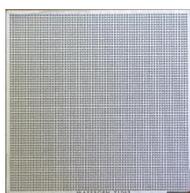
ICELL8 システムの蛍光イメージング機能では、通常、青色蛍光 (Hoechst33342、以下 Hoechst) で細胞数、赤色蛍光 (Propidium iodide、以下 PI) で死細胞を測定して生死判定を行い、生きたシングルセルを選択して遺伝子発現解析を行います。このイメージング機能を応用することで、蛍光抗体を用いて特定の膜表面タンパクを発現している細胞を検出することができます。これにより、特定のタンパク質を発現している細胞のみを選択し、遺伝子発現解析を行うことが可能です。今回は、数種類の細胞サンプルを混合し、ICELL8 システムを用いて特定の細胞を蛍光抗体を用いて検出した例をご紹介します。

細胞株を用いた細胞選択検討実験 (実験①)

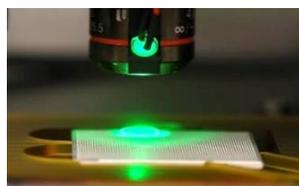
実験方法

青色蛍光 BV421 または赤色蛍光 PE-CF594 で標識された CD45 抗体を使用して (表 1)、ICELL8 システムで特定のタンパク質を発現している細胞を検出できるかを確認しました。細胞はヒトリンパ腫由来の U937 (CD45 発現細胞) とマウス繊維芽細胞由来の STO (CD45 非発現細胞) を使用しました。まず、U937 および U937・STO 混合サンプルを下記の染色条件 (表 2) で抗体染色しました。各サンプルを染色後、細胞濃度を調整し、ICELL8 システムを用いて ICELL8 Chip (図 1, A) へ細胞を分注しました。その後、蛍光標識された細胞の画像を ICELL8 システムで取得し、付属の解析ソフトウェア CellSelect を用いて取得した画像から染色細胞数を検出しました。なお、各サンプルの CD45 陽性率は BD FACSCanto™ II フローサイトメーター (FCM) にて測定しました。

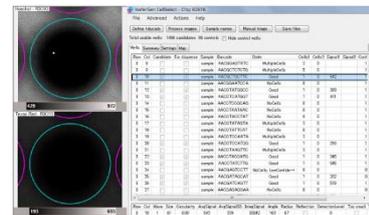
図 1) ICELL8 Chip と蛍光イメージング機能の概要



A. ICELL8 Chip



B. 蛍光イメージング



C. CellSelect ソフトウェア解析例

A: 5184 のウェルが存在する ICELL8 Chip (4cm 四方)。各ウェルにウェル識別バーコードが付加された oligo Td primer があらかじめ分注されている。B: 蛍光イメージングの様子。5,184 ウェル全ての蛍光イメージング画像を取得しシングルセルの判定に用いられる。C: CellSelect ソフトウェアの解析結果例。取得された画像は CellSelect ソフトウェアで解析され、シングルセルで生きている細胞を含むウェルを自動判別する。

表 1) 使用した抗体

名称	メーカー	型番
BD Horizon™ BV421 Mouse Anti-Human CD45	BD Biosciences	563880
BD Horizon™ PE-CF594 Mouse Anti-Human CD45	BD Biosciences	562312
BD Horizon™ BV421 Mouse Anti-Human CD3	BD Biosciences	562427

表 2) 染色条件

条件	細胞	青色蛍光	赤色蛍光
1	U937	Hoechst	CD45-PE-CF594
2	U937+STO	Hoechst	CD45-PE-CF594
3	U937	CD45-BV421	PI
4	U937+STO	CD45-BV421	PI

結果

表 3 の条件 1 の結果を見てみると、全細胞が染色される Hoechst の検出細胞数 (372 個) と、U937 で発現している CD45 検出細胞数 (364 個) がほぼ同等であることから、赤色蛍光 PE-CF594 標識抗体は ICELL8 で使用できることが分かりました。また、条件 2 の結果から、U937 と STO を混合した条件では CD45 検出細胞数 (178 個) が Hoechst の検出細胞数 (267 個) の 66.6% となっており、FCM での CD45 陽性率 59.8% (図 2, A) と近い比率でディスパンスされていることが分かります。実際に蛍光イメージングシステムで撮影された画像からも、Hoechst と PE-CF594 が染まっている U937 細胞 (図 3, A) と Hoechst のみが染まっている STO 細胞 (図 3, B) が存在していることが分かります。さらに、表 3 の条件 3 および 4 の結果から、U937・STO 混合サンプル (条件 4) における CD45 検出細胞数 (193 個) は U937 のみのサンプル (条件 3) の検出細胞数 (402 個) の 48.0% となっており、条件 4 の FCM での CD45 陽性率 51.3% (図 2, B) と近い比率でディスパンスされていました。この結果から、青色蛍光 BV421 標識抗体は ICELL8 で使用できることが分かります。以上のことから、青色蛍光 BV421 標識抗体および赤色蛍光 PE-CF594 標識抗体を用いて特定のタンパク質を発現している細胞を検出できることが分かりました。

表 3) 染色結果(CellSelect ソフトウェアによる検出細胞数)

条件	細胞	青色蛍光	検出細胞数	赤色蛍光	検出細胞数
1	U937	Hoechst	372	CD45-PE-CF594	364
2	U937+STO	Hoechst	267	CD45-PE-CF594	178
3	U937	CD45-BV421	402	PI	11
4	U937+STO	CD45-BV421	193	PI	9

図 2) FCM 解析結果

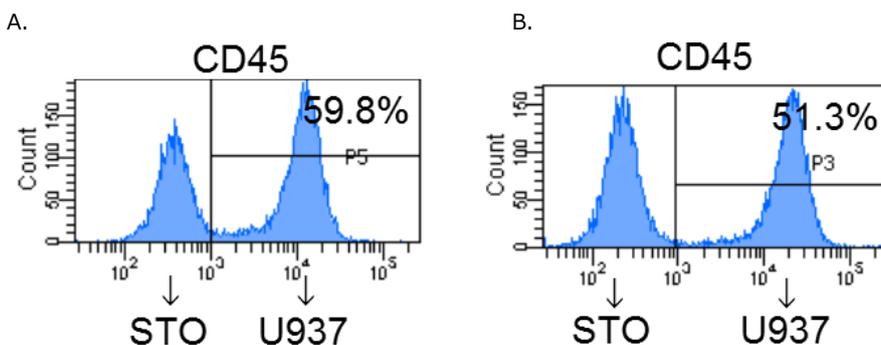
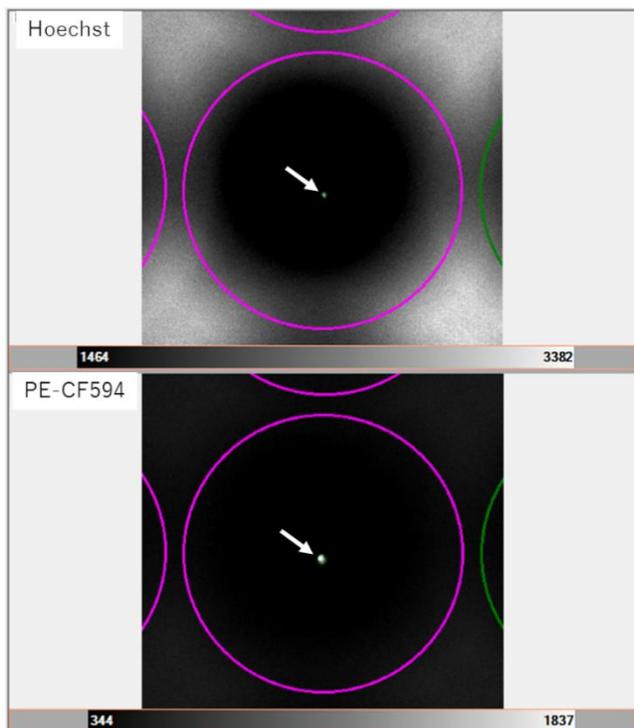
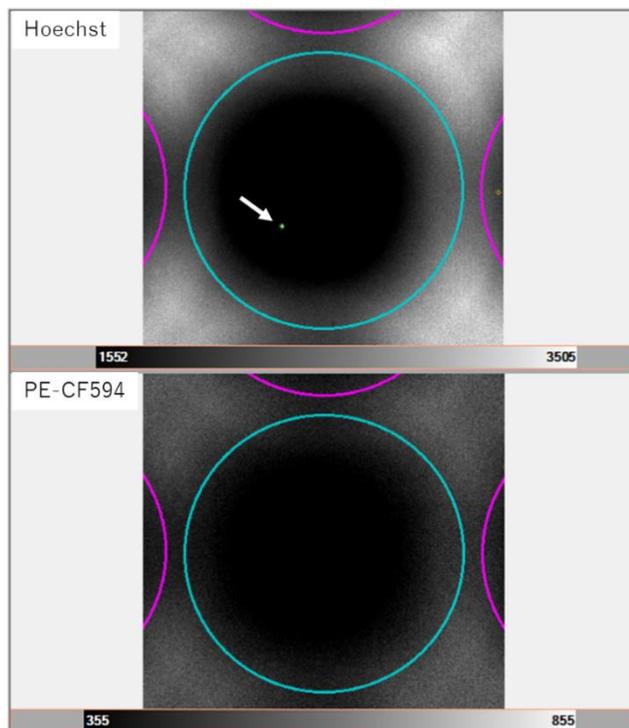


図 3) 蛍光イメージング機能で取得した細胞画像 (染色条件は表 3 条件 2)

A. 条件3 U937細胞



B. 条件3 STO細胞



A は Hoechst および PE-CF594 が染まっていることから U937 細胞であると判別できる。一方、B は Hoechst のみ染まっていることから STO 細胞であると判別できる。

末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた CD45・CD3 陽性細胞選択実験 (実験②)

実験方法

末梢血単核細胞 PBMC において、青色蛍光 BV421 または赤色蛍光 PE-CF594 で標識された CD45 抗体および青色蛍光 BV421 で標識された CD3 抗体を使用して (実験①—表 1)、ICELL8 システムで特定のタンパク質を発現している細胞を検出できるかを確認しました。染色条件は下記 (表 4) の通りです。

表 4) 染色条件

条件	細胞	青色蛍光	赤色蛍光
1	PBMC	Hoechst	CD45-PE-CF594
2	PBMC	CD45-BV421	PI
3	PBMC	CD3-BV421	PI

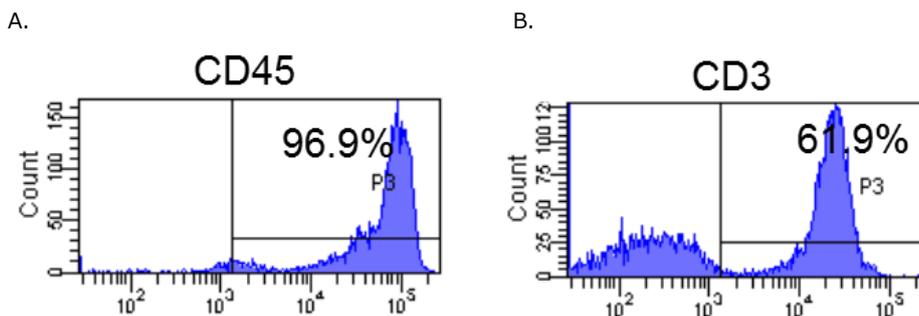
結果

表 5 の条件 1 と 2 の結果を見てみると、PBMC の FCM での CD45 陽性率は約 97% (図 4, A) なのに対して、青色蛍光 BV421 および赤色蛍光 PE-CF594 標識抗体による CD45 検出細胞数はいずれも 340 個前後となっています。それに対して、条件 3 では CD3 の検出細胞数は 176 個 (総細胞数の約 57%) であり、FCM での CD3 陽性率 61.9% (図 4, B) と近い比率でディスペンスされていることが分かります。この結果から、PBMC においても青色蛍光 BV421 標識抗体および赤色蛍光 PE-CF594 標識抗体を用いて特定のタンパク質を発現している細胞を検出できることが分かりました。

表 5) CellSelect ソフトウェアによる検出細胞数

条件	細胞	青色蛍光	検出細胞数	赤色蛍光	検出細胞数
1	PBMC	Hoechst	310	CD45-PE-CF594	343
2	PBMC	CD45-BV421	335	PI	8
3	PBMC	CD3-BV421	176	PI	8

図 4) FCM 解析結果



結論

以上の結果から、青色蛍光 BV421 標識抗体および赤色蛍光 PE-CF594 標識抗体は ICELL8 で使用可能であること、どちらの蛍光を使用しても同等の細胞数が検出できる事が分かりました。また、ICELL8 で検出された混合サンプルの混合比は FCM のデータと高い相関があることが分かりました。

現在、CD マーカーの多くに対して BV421 標識抗体および PE-CF594 標識抗体が販売されており、ビオチンラベル抗体での検出も可能であることから、特定のタンパク質を発現している様々な細胞の検出への応用が期待でき、ICELL8 システムは特定表面タンパク質を発現しているシングルセルのみを選択した RNA-Seq が可能であると考えられます。

製品情報

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

© 2018 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