

シングルセル マルチオミックス解析による メラノーママウスモデルにおける 腫瘍由来造血システム摂動の評価

BD FACSMelody™ セルソーターを用いて
4種類の希少細胞集団を同時に分離

特徴

- BD FACSMelody™ セルソーターにより、4種類の希少なマウス造血幹・前駆細胞 (HSPC) 集団を同時に分離精製することが可能。これによりシングルセルマルチオミックス解析をする前に貴重なサンプルを無駄にせず、ソーティングにかかる時間の短縮も可能。
- BD® Mouse Immune Single-Cell Multiplexing Kit を使用することで複数サンプルの同時解析が可能。
- 腫瘍移植マウスと健常マウスから調製した個々の造血細胞における細胞表面タンパク質と全トランスクリプトームの発現量の変化を同時評価することが可能。

造血過程は高度に調節されており、造血幹細胞から連続して産生される一連の中間前駆細胞の分化能が徐々に限定されていくことによって多系統の血液細胞が産生されます (図 1)。成人期における定常状態では、HSPC の大半が骨髄 (BM) ニッチに局在しています。しかし、癌などの病態生理学的状態においては、脾臓 (SP) などの髄外組織で造血を生じることがあります。

多くの場合、腫瘍の進展は骨髄性抑制細胞 (MDSC)、腫瘍随伴マクロファージ (TAM)、および腫瘍随伴好中球 (TAN) などの免疫抑制性骨髄細胞の増加と関連しています。これらの細胞は、癌細胞の幹細胞化、浸潤性、および免疫回避を亢進する免疫応答を調節していることが知られています。腫瘍が進展するに従い、産生される骨髄細胞が腫瘍促進機能を有する細胞へと変化することで正常な骨髄造血を阻害し、脾臓での髄外造血を誘発することで継続的な造血補給を後押ししている可能性があります。このため、腫瘍が引き起こす造血システム摂動メカニズムを解明することは重要です。



本データシートでは、腫瘍が引き起こす造血過程の摂動についてメラノーマモデルマウスを用いて調べました。BD FACSMelody™ セルソーターを使用して健常マウス（コントロール）のBM、および腫瘍移植マウスのBMとSPのそれぞれの組織から4種類のHSPC細胞集団をソーティングしました。ソーティングした細胞集団を全トランスクリプトーム解析（WTA）と細胞表面タンパク質解析を行うためにBD Rhapsody™ シングルセル解析システムを用いてキャプチャーし、これらの細胞集団において変化したそれぞれの発現パターンを同定しました。

図 1

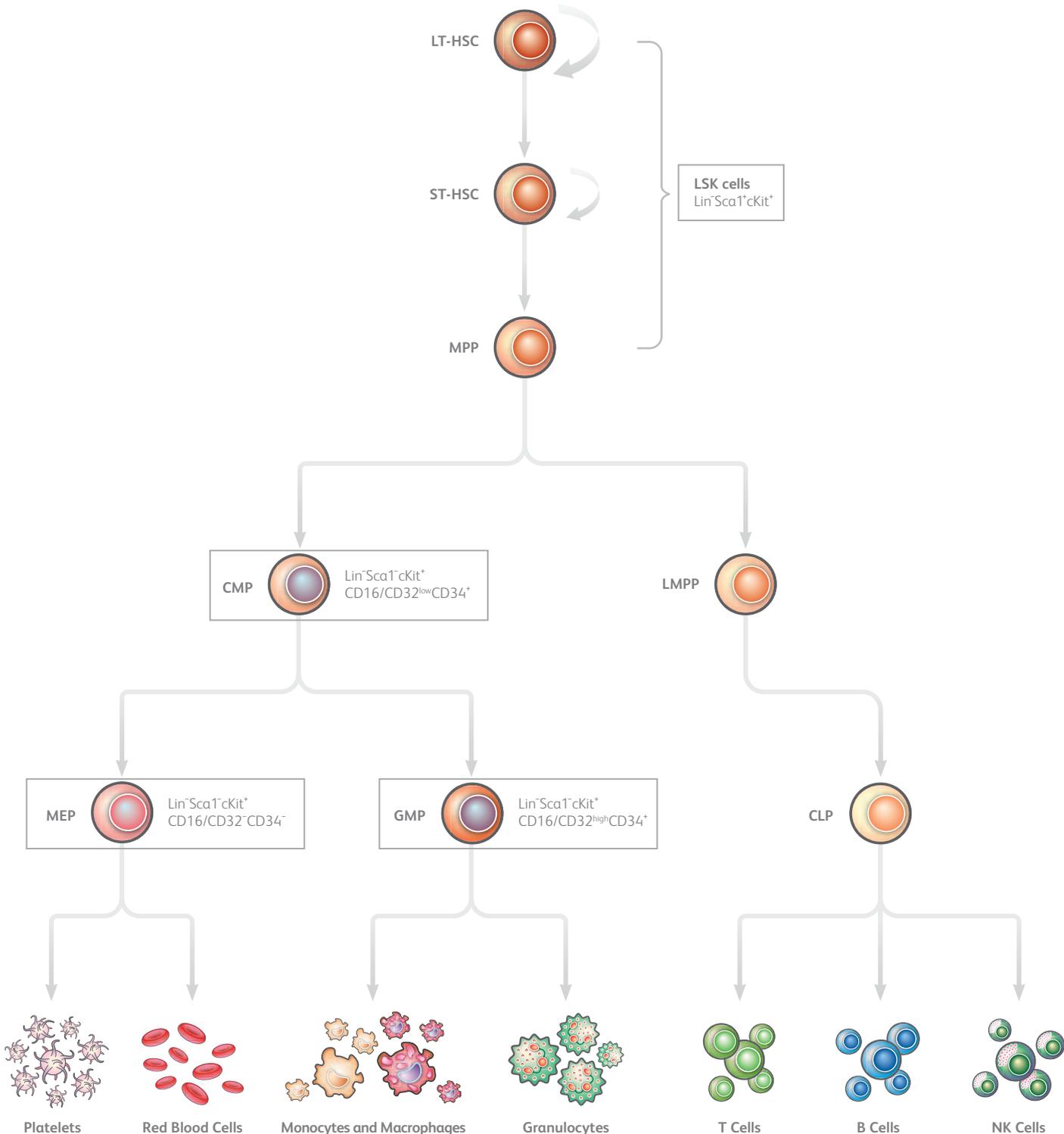


図 1. 成体マウス骨髄における造血の概要

造血幹細胞（HSC）は、複製能に基づき長期造血幹細胞（LT-HSC）と短期造血幹細胞（ST-HSC）に分類することができる。HSC は多能性前駆細胞（MPP）に分化する。これらの MPP 細胞からは、細胞分化能が制限された骨髄系共通前駆細胞（CMP）およびリンパ球系前駆細胞（LMPP）が生じる。骨髄系共通前駆細胞（CMP）からは、巨核球・赤芽球系前駆（MEP）細胞や顆粒球・マクロファージ系前駆（GMP）細胞が生じ、これらから赤血球（RBC）、単球/マクロファージ、顆粒球、および血小板に最終的に分化する。図には、シングルセルマルチオミクス解析のため各細胞集団のソーティングの実験で用いた表現型マーカー（枠内）も記載した。

メラノーマモデルマウスを用いた実験におけるワークフロー（図2）の第1段階として、腫瘍移植マウスのBMおよびSP、健常マウスのBMそれぞれから細胞を回収し、lineage 陰性（Lin⁻）細胞を磁気ビーズにより濃縮しました。次に、BD[®] Mouse Immune Single-Cell Multiplexing Kit (SMK) を使い、それぞれの組織から異なる Lin⁻ 細胞サンプルをラベル化してプールしました。その後、タグを付加した細胞を、ソーティングのために6色パネル（表1）で蛍光標識し、さらに36-plex BD[®] AbSeq 抗体（表2）で標識しました。

図2

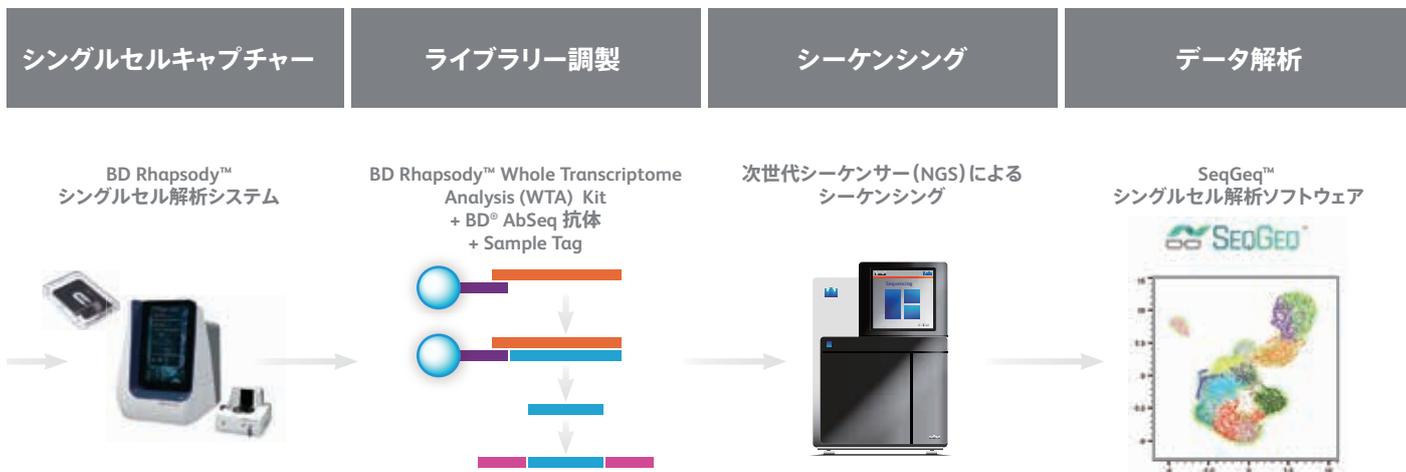
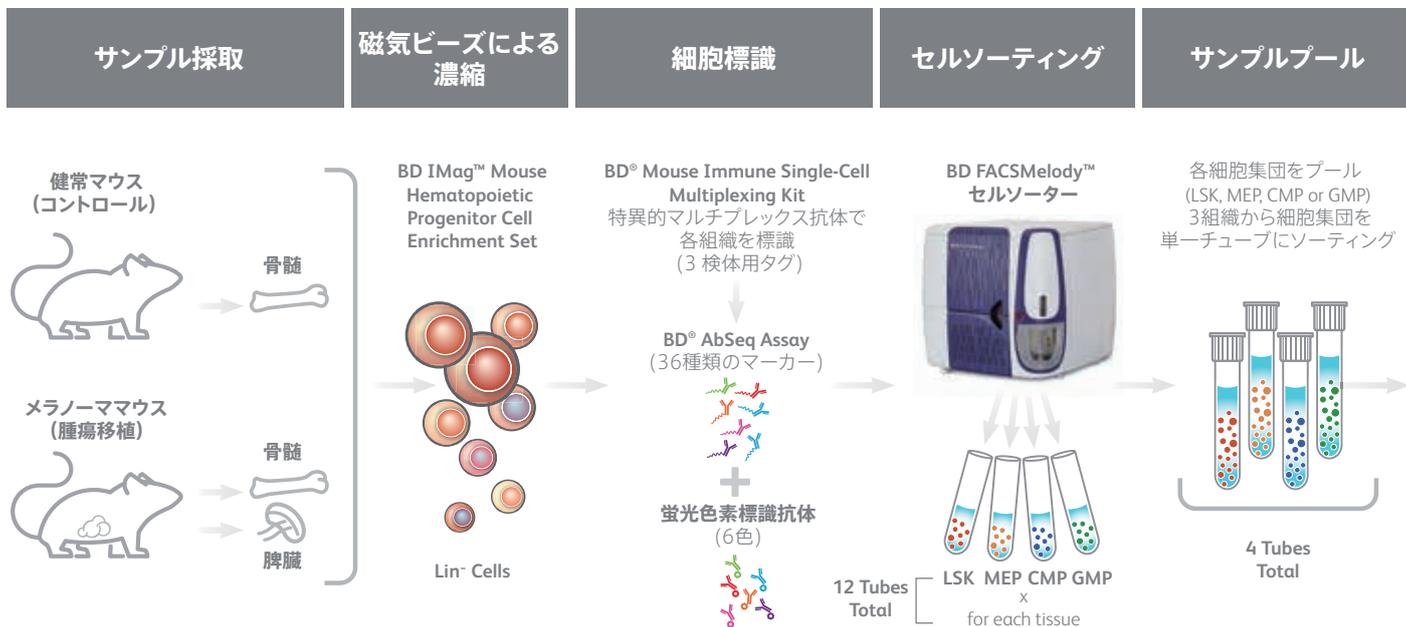


図2. 実験概要とシングルセル解析ワークフロー

3～4週齢のC57BL/6マウスにB16-F10メラノーマ細胞（腫瘍移植マウス、n=4）またはコントロール培地（健常マウス、n=4）を皮下投与した。投与21日後にBM組織とSP組織を摘出し、機械的に細胞を単離した。赤血球はBD Pharm Lyse™ Lysing Bufferにより除去した。その後、このサンプルをBD Pharmingen™ APC Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Fcγ III/II Receptor) 抗体を用いて染色し、BD IMag™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Set（抗CD2/CD5/CD19ビオチン標識抗体を含む）を使って濃縮した。腫瘍移植マウスのBMとSP組織、および健常成体マウスのBM組織から回収・濃縮したLin⁻細胞に、BD[®] Mouse Immune Single-Cell Multiplexing Kitに含まれている特異的DNAバーコード付き抗体で染色し、6色の蛍光標識抗体パネルと36-plex BD[®] AbSeq抗体Panelにより標識した。4-wayソーティング機能を搭載したBD FACSMelody™ セルソーターを使用して、それぞれの組織から同時に異なる4種類の細胞集団をソートした（全12チューブ）後、細胞集団ごとに1つのチューブにプールした（全4チューブ）。次にシングルセルキャプチャーを行うために、プールした4本のチューブサンプルをBD Rhapsody™ シングルセル解析システムの4つのカートリッジにそれぞれロードした。シングルセルサンプルを回収後、シーケンス用に、AbSeq、Sample TagおよびmRNA（BD Rhapsody™ WTA）のライブラリーを調製をした。

表 1. FACS に使用した 6 色の蛍光標識抗体パネル

Cell Sorting Panel	
Marker	Dye
Live/Dead	7-AAD
Lineage	PerCP-Cy ⁵ .5
CD127	PE-Cy ⁷
cKit (CD117)	BB515
Sca1	BV421
CD16/CD32	APC
CD34	PE

7-AAD and PerCP-Cy5.5 are detected in the same channel

表 2. シングルセルの表面タンパク質発現解析に使用した 36-Plex BD[®] AbSeq 抗体パネル

36-Plex BD AbSeq Reagents			
CD9	CD44	CD62L	CD196*
CD11a	CD45RA	CD84	CD197
CD24	CD47	CD103	CD229*
CD27*	CD48	CD105	CD244.2*
CD29	CD49b	CD106	CD370
CD31	CD49d	CD150*	CD90.2
CD38*	CD49e	CD183*	CD93
CD41	CD49f	CD184	CXCR2
CD43	CD61	CD185*	Ly-108

*カスタムBD[®] AbSeq 抗体

6 色の蛍光標識抗体パネルを使用することで、HSPC 集団を LSK、CMP、MEP、および GMP の 4 集団に分離することができました (図 3A)。腫瘍移植マウスの BM と SP、および正常マウスの BM それぞれの組織から、これらの解析対象の 4 細胞集団を同時に分取するために BD FACSMelody[™] セルソーターの 4-way ソーティング機能を使用しました。SP 組織中に存在する HSPC 量の比率は、ソートした各細胞集団において健康マウスより腫瘍移植マウスで一貫して高く、腫瘍移植条件下での髄外造血の発生と一致していました (図 3B)。尚、健康マウスの SP 組織からは、十分量の細胞数を調製できなかったためソーティングしませんでした。

図 3A

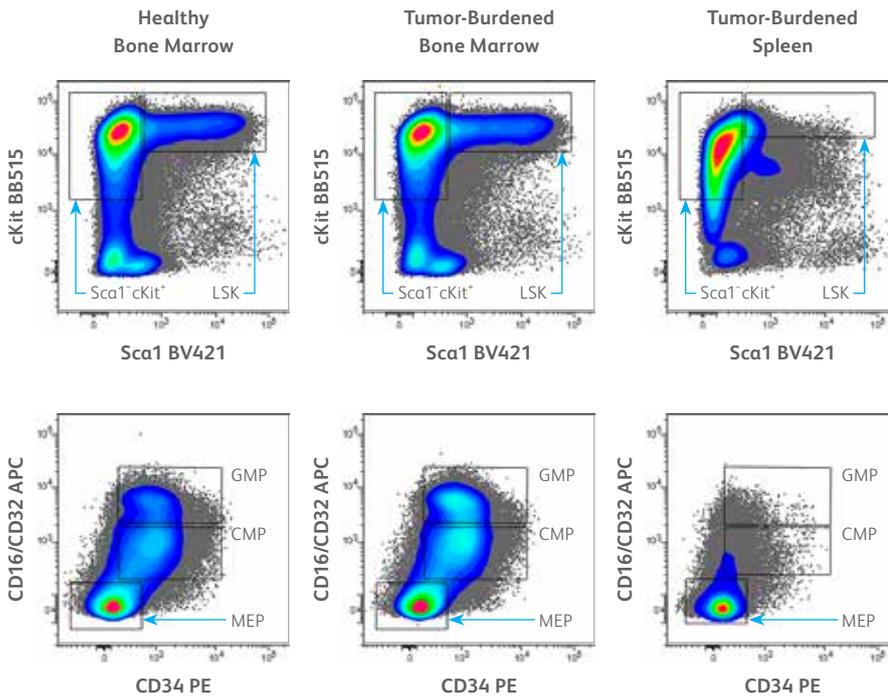


図 3B

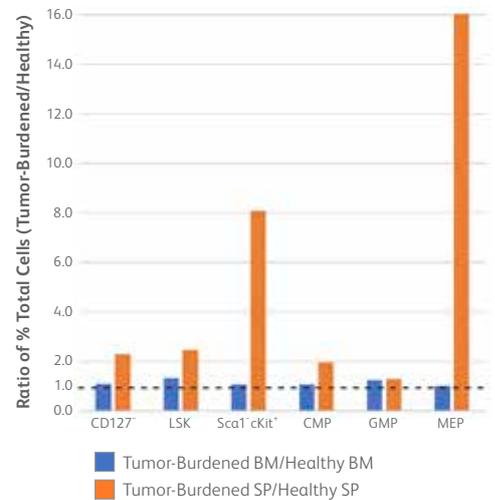


図 3. BD FACSMelody[™] セルソーターの 4-way ソーティングに用いたゲーティング戦略

BD FACSMelody[™] セルソーターを用いて BM および SP の各組織から HSPC のサブセットを分取した。最初に Lin⁻ および生細胞をゲーティングし、ダブルレット除去してから CD127 細胞をゲーティングしてリンパ系前駆細胞を除去した (データ未掲載)。

- A. LSK 造血幹細胞は、CD127⁻ 細胞集団を Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ でゲーティングした (上段パネル)。他の造血前駆細胞集団である MEP、CMP、GMP は、Sca1⁻cKit⁺ ゲート内の細胞を CD16/CD32 および CD34 発現に基づいて同定した (下段パネル)。
- B. 移植 BM 組織と SP 組織それぞれからソートした各細胞集団における腫瘍移植マウスと健康マウス間の HSPC 存在比率

各サンプルタグに存在する特異的バーコードを用いて各組織サンプルのバイオインフォマティクス解析を SeqGeq™ シングルセル解析ソフトウェア v1.6 を用いて行いました。SeqGeq™ ソフトウェア用のプラグインである次元削減アルゴリズム TriMap を用い、高次元空間データの近似を低次元空間に圧縮し、3 種類（健康 BM、腫瘍移植 BM、腫瘍移植 SP）の組織からソートした細胞集団を可視化しました（図 4）。健康マウスと腫瘍移植マウスそれぞれの BM 組織からソートした個々の細胞集団では、TriMap 空間において互いの分布に類似性が認められました。しかし、同じ TriMap 空間における、腫瘍移植マウスの SP 組織からソートした細胞集団の分布との比較では、健康マウスや腫瘍移植マウスの BM 組織からの細胞集団の分布と異なることが示されました。

図 4A

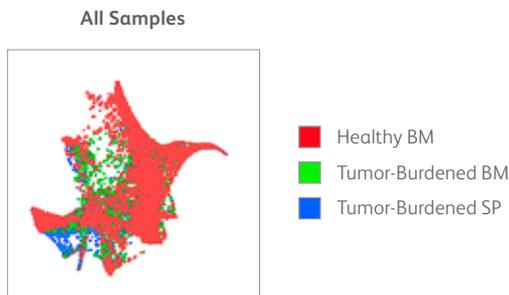


図 4B



図 4. ソートされた造血幹/前駆細胞集団の教師なし解析

シングルセルデータの TriMap による可視化結果を示す。細胞集団 4 種類の全細胞数は最大約 31,000 個。

A. サンプルタグによって同定した各組織試料の分布データのオーバーレイ解析

B. ソートされた各細胞集団の分布

最初に健常マウスの BM 組織試料を対象とし、ソートした 4 種類の細胞集団それぞれに関する免疫表現型および分子マーカーの発現量の解析を行いました。その結果、細胞集団 4 種類それぞれにおいて発現量が増加したタンパク質と mRNA 転写産物を特定しました (図 5)。これらは、文献で既に報告されている結果と一致しており、LSK 細胞では CD43 や CD49b などのようなタンパク質、*Hlf* や *Fosb* などのような mRNA の発現量が増加していました。CMP 細胞では、骨髄細胞系列の分化決定マーカーである *Irf8* の発現量が増加していることが確認されました。また、*Car1/2* および *Mpo* は、巨核球-赤芽球および顆粒球-マクロファージのそれぞれの分化系列決定細胞 (すなわち MEP および GMP) のマーカーであることも既報文献と一致していました。

図 5A

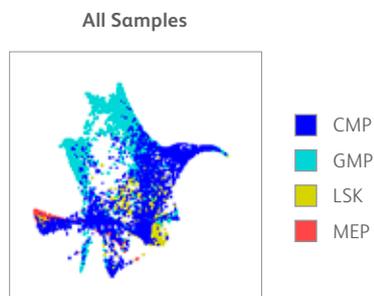


図 5B

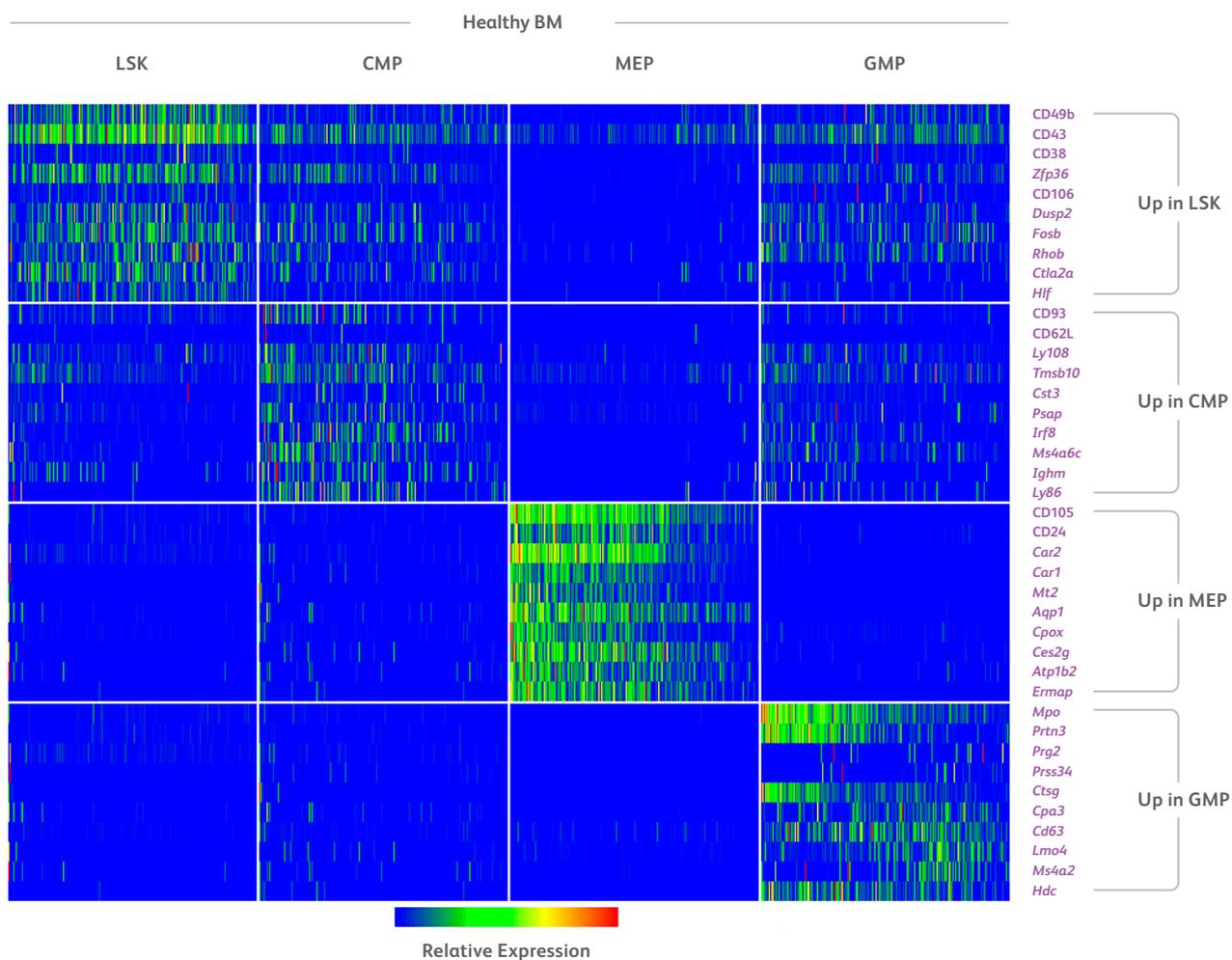


図 5. シングルセルでの細胞表面タンパク質および全トランスクリプトーム解析により明らかにされる正常な造血における各細胞集団間の発現量変化

A. 健常 BM 組織からソートした CMP、GMP、LSK、および MEP の各細胞集団をプロットした TriMap オーバーレイ解析

B. ソートした各細胞集団における発現量変化トップ 10 のタンパク質と mRNA (イタリック体) について、他 3 種類の細胞集団との比較を示す。ヒートマップには、各細胞集団において典型的な 200 細胞のデータを示した。

腫瘍がもたらす造血システムの摂動についてさらに深い洞察を得るために、腫瘍移植および健常マウスの BM 組織、および腫瘍移植マウスの SP 組織それぞれからソートした CMP 細胞集団のタンパク質と mRNA の発現量の変化について調べました (図 6)。健常マウスと腫瘍移植マウスの BM 組織間の発現量の差は、これらの BM 組織と腫瘍移植マウスの SP 組織との間における発現量の差ほど顕著ではなく、TriMap で得られた結果と一致していました。Ccl4 mRNA を発現している細胞の個別サブセットは、健常マウスの BM 組織からソートした CMP 細胞集団にほぼ限定されることが確認されました。Gata2 は、HSC の増殖や生存において極めて重要な役割を担っていることが確認されている遺伝子ですが、腫瘍移植マウスの SP 組織からソートした CMP 細胞集団において発現量が増加していました。また、同じ腫瘍移植マウス SP 組織の CMP 細胞集団では、腫瘍移植マウス BM 組織の CMP 細胞集団に比べ CD47 タンパク質と Itga4 の発現量が増加していたことも確認されました。これらのマーカー (CD47 と Itga4) が、HSPC のトラフィッキングやホーミングに関与していることがこれまでの研究によって示されています。これらの結果から、CMP における発現の違いは、血中の HSPC が SP および/または腫瘍の影響を受け、脾臓ニッチへ選択的にリクルートされた結果であることを示唆しています。この発現量変化の機能的な効果と細胞のメカニズムを詳細に解明するためのさらなる研究が求められます。

図 6

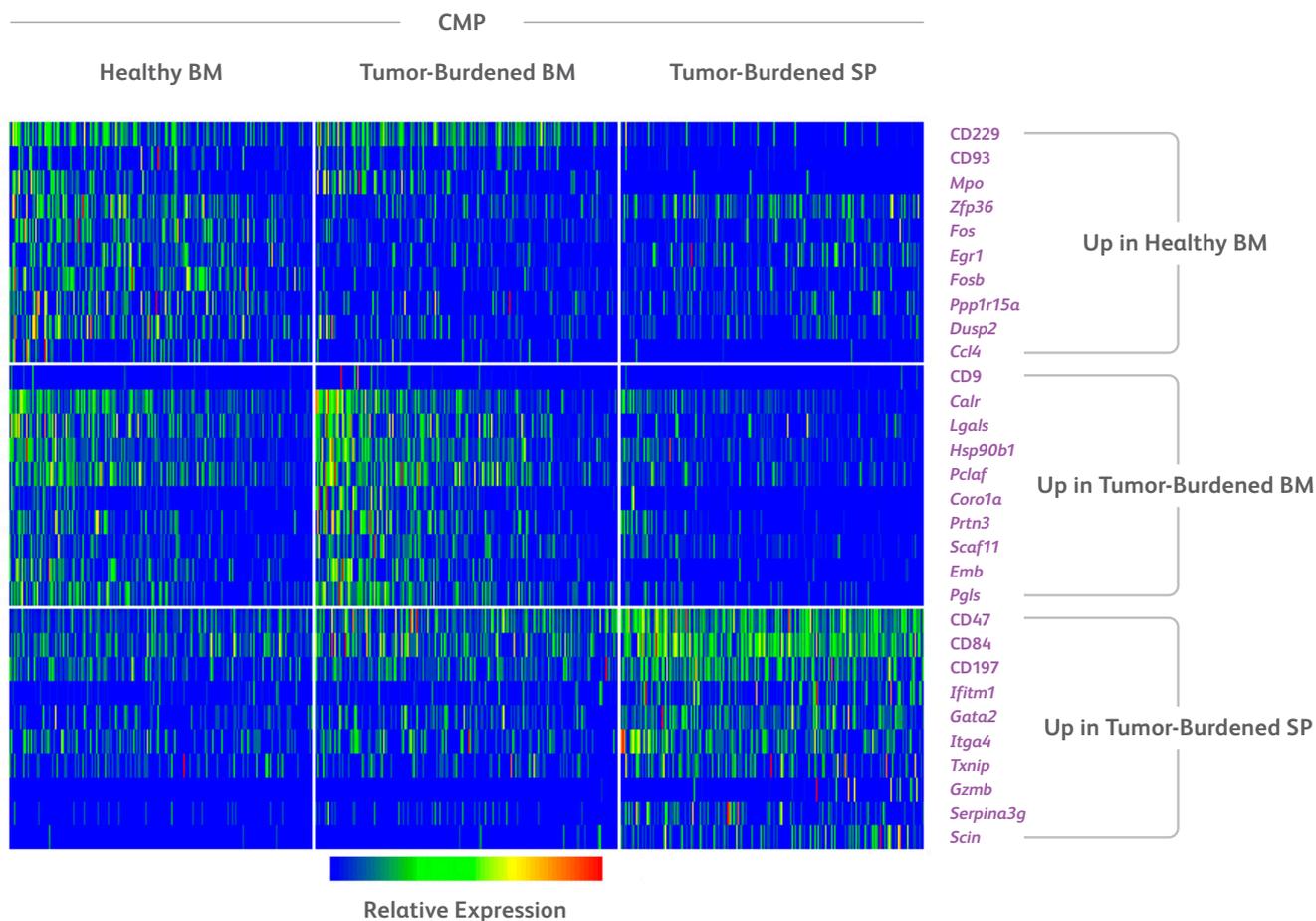


図 6. シングルセルでの細胞表面タンパク質と全トランスクリプトーム解析により明らかにされる健常マウスと腫瘍移植マウスの造血における発現量変化

健常マウスの BM 組織、および腫瘍移植マウスの BM と SP の組織からソートしたそれぞれの CMP 細胞において、発現量が増加しているトップ 10 の細胞表面タンパク質と mRNA 転写産物 (イタリック体) をシングルセルのヒートマップにより示す。ヒートマップには、各細胞集団において典型的な 200 細胞のデータを示した。

以上の結果から、BD FACSMelody™ セルソーターは希少な 4 細胞集団を同時にソーティングできることが確認されました。貴重なサンプルを無駄にせず、ソート時間を最小限に抑えたい実験系では極めて重要です。さらに今回得られた結果は、希少な細胞種の詳細な特性解明や細胞内プロセスの変化に伴うマーカーの潜在的な探究において、BD FACSMelody™ セルソーターと BD Rhapsody™ シングルセル解析システムを組み合わせた包括的ワークフローが極めて有効であることを実証するものです。

Ordering information

Systems and software

Description

BD FACSMelody™ Cell Sorter

BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System

SeqGeq™ v1.6 Software

Reagents

Description

Cat. No.

BD Pharmingen™ 7-AAD

559925

BD Pharmingen™ PerCP-Cy™5.5 Mouse Lineage Antibody Cocktail, with Isotype Control

561317

BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD127

560733

BD Horizon™ BB515 Rat Anti-Mouse CD117 (cKit)

564481

BD Horizon™ BV421 Rat Anti-Mouse Ly-6A/E (ScaI)

562729

BD Pharmingen™ APC Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Fc γ III/II Receptor)

558636

BD Pharmingen™ PE Rat Anti-Mouse CD34

551387

BD IMag™ Mouse Hematopoietic Progenitor (Stem) Cell Enrichment Set - DM

558451

BD Pharmingen™ Biotin Rat Anti-Mouse CD2

553110

BD Pharmingen™ Biotin Rat Anti-Mouse CD5

553019

BD Pharmingen™ Biotin Rat Anti-Mouse CD19

BD® AbSeq Assay

Contact Your
BD Sales
Representative

BD® Single-Cell Multiplexing Kit

BD Rhapsody™ Whole Transcriptome Analysis Kit

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

本社: 〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ
カスタマーサービス ☎ 0120-8555-90 FAX: 024-593-3281
(ご注文・納期・資料請求)

bdbiosciences.com/jp/

機器・試薬の使用方法および学術に関するサポート

☎ 0120-4890-77 E-Mail: tech.cell@bd.com

機器のトラブルに関するサポート

☎ 0120-7099-12

