

シングルセル マルチオミックス解析において、 セルソーティングは、 細胞サブセットの デコンボリューションと希少な 細胞集団の特定を可能にする

ソーティングを行ったサンプルとソーティングを行わなかったサンプルのクラスタリング比較を行い、シングルセルマルチオミックスのデータ解析におけるセルソーティングのメリットが明らかに

特徴

- BD FACSymphony™ S6 セルソーターを用いて腫瘍微小環境から6種類の免疫細胞集団を同時にソーティング
- セルソーティングにより、シングルセルマルチオミックス解析で希少な細胞を容易に検出
- セルソーティングにより、シングルセルマルチオミックス解析でより多くの細胞サブセットを検出し、細胞集団のより詳細な特性解析が可能

シングルセルマルチオミックス解析は、細胞の不均一性と進化経路を明らかにすることを目的に、基礎研究と臨床研究の両方で急速に普及しています。しかし、シングルセルマルチオミックスアプローチによる希少な細胞集団のプロファイリングでは、非常に多くの細胞から希少な細胞を検出するため、試薬と

シーケンスの費用がかかるという問題点があります。セルソーターを使用して不均一で複雑な生体サンプルから希少な細胞を単離できれば、不要な細胞が排除され、シングルセルマルチオミックス解析で使用する細胞の数を増やすことができます。

今回の研究では、BD FACSymphony™ S6 セルソーターによる6wayセルソーティングと、BD Rhapsody™ シングルセル解析システムによるシングルセルマルチオミックス解析を含む総合的なワークフローを構築しました。ソーティングを行ったサンプルとソーティングを行わなかったサンプルでシングルセルマルチオミックス解析を行い、結果を比較しました。ソーティングを行うことにより、希少な細胞種の濃縮、さらに細胞サブセットのより詳細な区別が可能であることを示します。



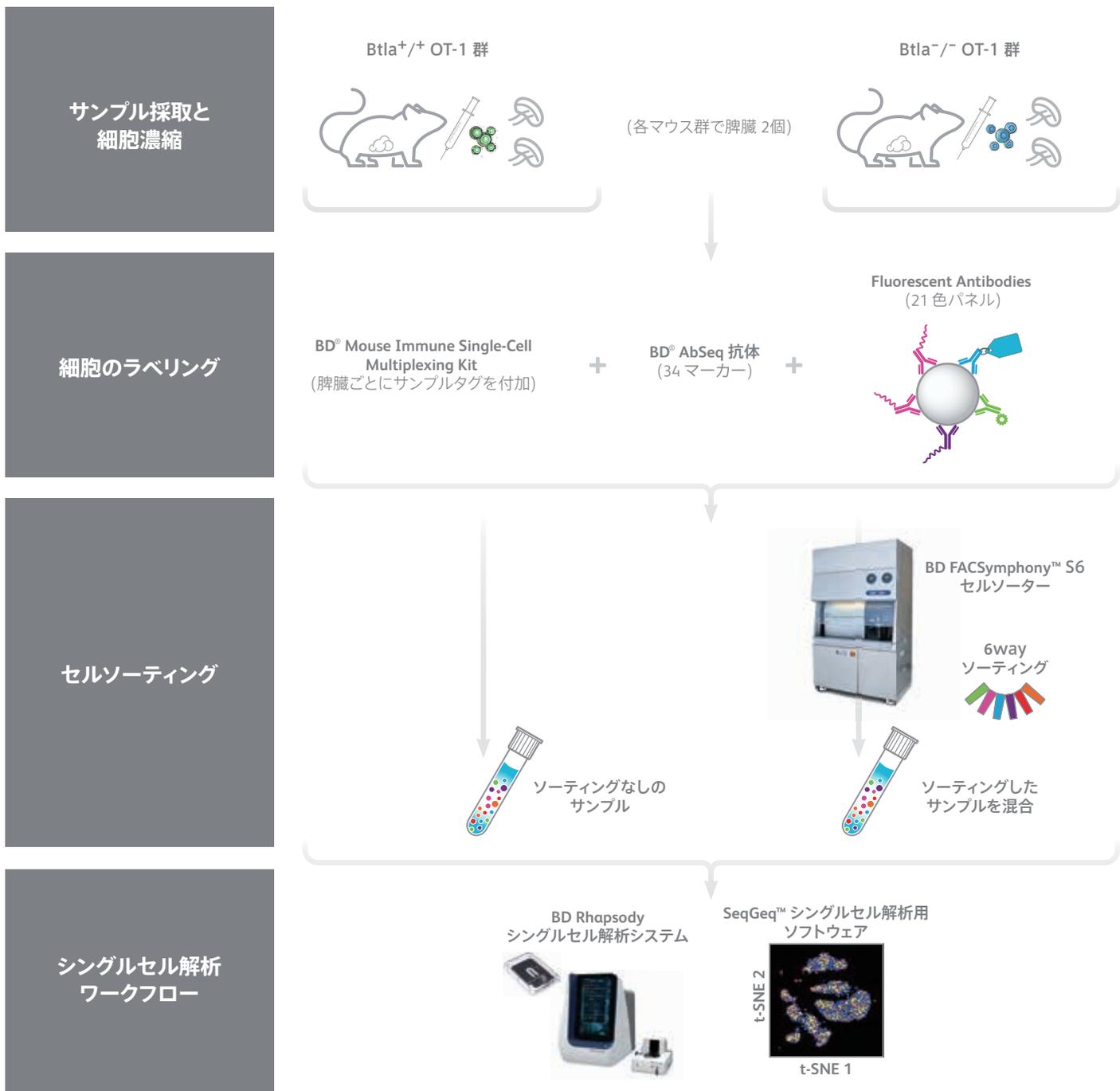


図 1. BD FACSymphony[™] S6 セルソーターによるセルソーティングと BD Rhapsody[™] シングルセル解析システムによるシングルセルマルチオミックス解析の実験概要

CD90.2 C57BL/6 マウスにリンパ腫細胞を接種後、CD90.1 BTLA^{+/+} または CD90.1 CD90.2 BTLA^{-/-} OT-1 T 細胞のいずれかを養子細胞移植しました。BD Pharmingen[™] Biotin Rat Anti-Mouse CD19 で脾細胞を標識し、B 細胞と CD19⁺ リンパ腫細胞の両方を BD IMag[™] Streptavidin Particles Plus-DM により除去しました。次に、濃縮した細胞を、BD[®] AbSeq 抗体 - オリゴヌクレオチド複合体と蛍光抗体を用いて BD Pharmingen[™] Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block[™] Reagent) と BD Horizon[™] Brilliant Stain Buffer Plus の存在下で同時染色しました。また、各脾臓を BD[®] Mouse Immune Single-Cell Multiplexing Kit の固有の DNA バーコード付き抗体で染色することで、各マウスに由来する脾臓を混合しました。同一マウス群に由来する混合済みサンプルを BD FACSymphony[™] S6 セルソーターでソーティングして 6 種類の免疫細胞集団 (M-MDSC、G-MDSC、外来および内在の CD8 T 細胞、エフェクター CD4 T 細胞、NK 細胞) を分取しました。また、混合済みサンプルの一部はソーティングせずに残りました。2 群のマウスに由来するソーティングした細胞集団を混合し、BD Rhapsody[™] シングルセル解析システムを用いて細胞を単離しました。ソーティングなしの細胞分画もシングルセルシーケンス用に処理しました。ソーティングなしのサンプルとソーティングしたサンプル間で、1 細胞あたり同等量のシーケンスリードと同様なシーケンス飽和状態を示しました。BD Rhapsody[™] 解析パイプラインと SeqGeq[™] v1.6 シングルセル解析ソフトウェアによりシーケンスデータを解析しました。

ソーティングを行ったサンプルとソーティングを行わなかったサンプルの両方で、mRNA と AbSeq タンパク質のシングルセルシーケンスデータを組み合わせて t-SNE 解析を実施し細胞種特異的のマーカを用いて免疫細胞集団を特定しました (図 2)。ソーティングなしのサンプル解析では、希少な NK 細胞集団などのソーティングした 6 種類の免疫細胞集団を検出できませんでした。また、ソーティングなしのサンプル解析で検出された CD4 T 細胞の数は少なかったため (図 2A、白色の四角)、さまざまな CD4 サブセットを詳細に解析することは困難でした。予測した通り、ソーティングしたサンプル解析では、NK 細胞を含む 6 種類すべてのソーティングした細胞集

団が確認され、他との識別が可能なクラスターが形成されました (図 2B)。セルソーティングにより、t-SNE 解析にてエフェクター CD4 T 細胞が検出でき、シングルセルマルチオミクスアプローチにより腫瘍微小環境内に存在するこの希少な細胞集団を解析することが出来ました。mRNA とタンパク質 (BD[®]AbSeq 抗体) を組み合わせた解析により、CD90.1 CD90.2 BTLA^{-/-} 移植 OT-1 細胞 (図 2B、黄色) を明瞭にデコンボリューションできました。ソーティングなしのサンプルの t-SNE 解析ではこの細胞を識別できませんでした。興味深いことに、単球系骨髄由来免疫抑制細胞 (M-MDSC) 内に 3 種類のクラスターがソーティングしたサンプルで識別されたことから、セルソーティングを行うシングルセルマルチオミクス解析では、同じ細胞数の解析による未ソーティングサンプルでは明らかにできないが、ソーティングされた細胞集団内の細胞の不均一性を検出できることが示唆されます。

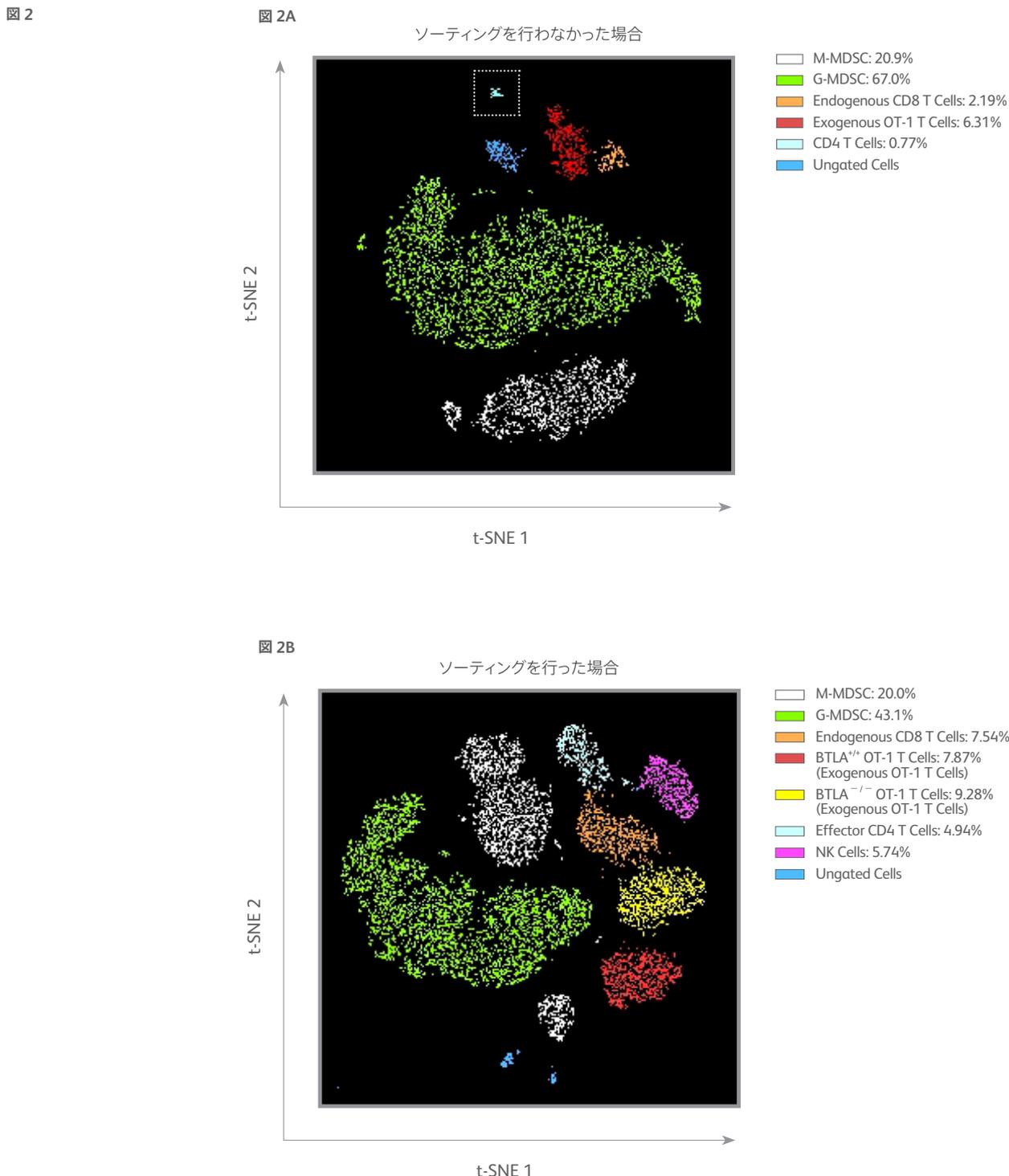


図 2. ソーティングを行ったサンプル (図 2A) とソーティングを行わなかったサンプル (図 2B) の t-SNE 解析

2つのサンプルで同一のパラメーターを用いて t-SNE 解析しました。免疫細胞集団を、細胞種に特異的な mRNA や Ly6G/C、CD115、CD90.1、CD90.2、CD4、NCR1 などを使用して特定し、t-SNE プロットに重ね合わせました。全生細胞内の各細胞種の割合を示しました。

製品情報

システムとソフトウェア

BD FACSymphony™ S6 セルソーター

BD Rhapsody™ シングルセル解析システム

SeqGeg™ シングルセル解析用ソフトウェア

Class 1 Laser Product.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

BD-21436-00 (0920)

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

