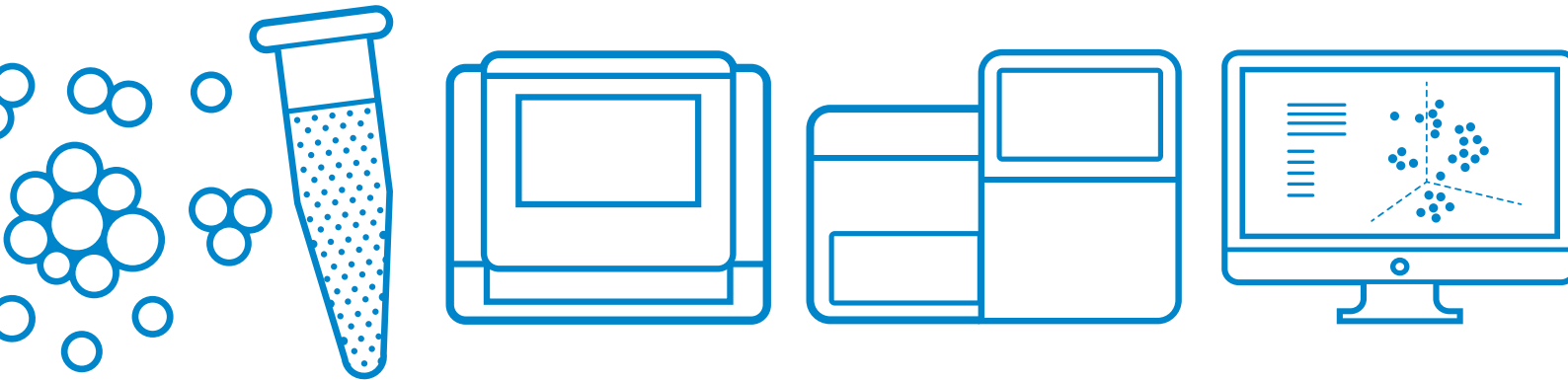


# シングルセル 遺伝子発現実験を はじめよう

実験計画ガイド



サンプルの  
種類と調製

ライブラリー調製

シーケンス

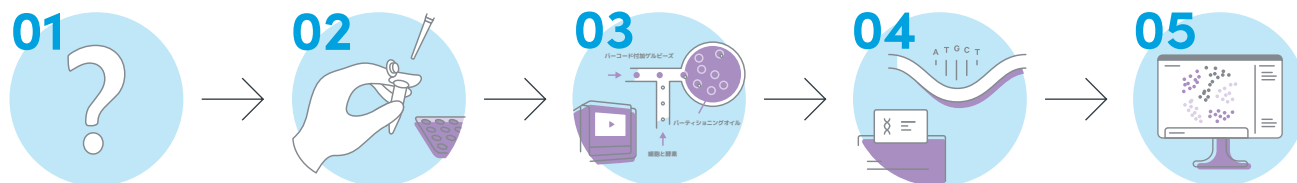
データ解析

# シングルセル遺伝子発現 実験の準備

従来の遺伝子発現解析を超えて、細胞の集団、種類、状況などを個々の細胞ごとにより詳細に特徴づけると何がわかるのでしょうか？

生物や組織、病気の進行による遺伝子発現の違いは、これまではin situハイブリダイゼーション(ISH)やマイクロアレイ法、バルクRNAシーケンシング(RNA-seq)などといった手法によって定量化されてきました。しかしこれらの手法は、細胞集団全体の平均値の測定であり、またISHについてはスループットが高くありません。Chromiumシングルセル遺伝子発現をはじめとしたシングルセルのトランスクリプトミクス技術によって、細胞1個単位での遺伝子発現を直接測定することが可能になり、細胞集団内の不均一性を定量化し、細胞種や状態、動的な細胞分化の遷移などを個々の細胞について特徴づけることができます。

本書は、シングルセル遺伝子発現実験を始めるにあたってのガイドをまとめています。実験のデザイン、実験パラメータの最適化、シングルセル遺伝子発現データを解析する適切な計算/解析ツールの特定を行うための参考にして下さい。



シングルセル実験を開始する前に、まず実験デザインを定めて、研究課題に対し最良の答えを得る方法を決定づけるため、以下の5つのステップを一通り検討することをお勧めします。

**01 解決したい科学的な問題は何か？**

**02 実験に使うサンプルの調製や処理について最良の方法は何か？**

**03 この実験に必要なとされる細胞数とリプリケートの数はいくつが適当か？**

**04 シーケンスはどれくらい読めば十分か？**

**05 データを解析し視覚化するにはどうしたら良いか？**

## 01 解決したい科学的な問題は何か？

シングルセル遺伝子発現の解析からは、さまざまな種類の研究課題に対する答えが得られます。これら課題の例を以下に示します。

**細胞集団の不均一性はどの程度か？** こちらの論文を参照: [3](#), [4](#), [7](#), [10](#), [12](#)

**どのような新しい種類および状態の細胞が組織中に存在するか？** こちらの論文を参照: [1](#), [2](#), [8](#)

**細胞の状態や分化を促進する少量の転写産物が存在するか？** こちらの論文を参照: [7](#), [14](#)

**細胞は治療によってどのように反応するか？あるいは、病態の層別化にどのように寄与するか？** こちらの論文を参照: [5](#), [11](#), [13](#)

## 02 実験に使うサンプルの調製や処理について最良の方法は何か？



### サンプルの種類と調製

まず最も重要なのは、細胞片を含まず、凝集塊が最小限で、生細胞率が高い(70%超)、きれいな細胞懸濁液を得ることです。また、実験対象の細胞の大きさがどの程度かをしておくことも重要です。細胞の大きさは通常、細胞内で発現している転写産物の数と相関します。ChromiumシングルセルNext GEMチップは様々な細胞サイズ(最大30  $\mu\text{m}$ )に対応しています。一般に、細胞懸濁液の調製プロトコールは、研究対象となる組織の起源および細胞種によって異なります。組織の種類はそれぞれ特徴があるため、シングルセル実験の開始前にサンプル調製方法を最適化する必要があります。はじめに[細胞調製ガイド](#)を参照ください。サンプル調製に関する一般的な質問については「[サンプル調製についてのよくある質問](#)」のページを参照ください。また、サンプル調製をテーマとしたオンラインセミナーもあります。[ビデオライブラリー](#)からご覧ください。



### サンプルの採取と保管

サンプルをすぐに処理できる場合は、新鮮な組織を用いて細胞を単離することをお勧めします。採取から処理までに時間がかかる場合は、[凍結の方が適している場合があります](#)。どちらの場合も、サンプルの生物学的な状態を維持するために、迅速な処理と保存が極めて重要です。サンプルを他の施設に輸送する必要がある場合は、細胞を凍結保存し[ドライアイス上で輸送することが最善の方法](#)です。組織解離に関するガイダンスは、こちらの[プロトコールの解説](#)を参照ください。



### 細胞の濃縮

希少な細胞集団や生存率の低いサンプルの特性解析を行う際は、シングルセル分画を作成する前に目的の生細胞を濃縮すると、適切な数の目的細胞を確保しやすくなります。Chromiumシステムは、[FACS](#)、およびビーズまたはカラムベースの細胞濃縮法に対応しています。細胞の濃縮に関する詳細なガイダンスは、当社の[プロトコールの解説](#)を参照ください。



### 細胞と核

細胞と核のどちらを材料として使用するかは、サンプルの種類やサンプルの取り扱い方法など、いくつかの要因によって決まります。新鮮組織を入手できる場合は、細胞を単離して用いることをお勧めします。凍結組織または保存サンプルの場合は、[プロトコールの解説](#)のガイダンスにしたがって核を直接単離する必要があります。あるいは、組織を分離した後は[プロトコールの解説](#)を用いてただちに凍結保存すると、細胞の長期保存が可能です。

### サンプル調製の最良の方法

- 最初にサンプル調製法を最適化する
- シングルセルの生存率を70%超で維持する
- 細胞または核の懸濁液が清浄で、細胞の破片を含まないことを確認する
- 細胞の洗浄、ソーティング、濃縮に関するすべてのステップが完了した後に細胞数をカウントする

## 03 この実験に必要なとされる細胞数とリプリケートの数はいくつが適当か？

### 細胞数

必要な細胞数の決定は、サンプルの細胞において予想される不均一性、利用できる細胞の数、希望する亜集団について予想される最小の出現頻度、データ解析をしたい各細胞種の最小数に依存します([オンラインツールを参照ください](#))。サンプルの多様性が不明の場合は、細胞集団の代表的な割合や生物学的に意味のある情報を得るために、浅いシーケンシング深度で細胞数を多くすることがもっとも適切な方法です。多くの場合、シーケンス深度を深くすることよりも細胞数を多くすることの方が細胞分類能が高まります([Ding et al. 2020](#))。不均一性の高いサンプルの場合、細胞を各亜集団に完全に分けるためには数千個の細胞が必要になる場合があります。

### リプリケートの数

リプリケートの数の決定は、研究プロジェクトの内容、サンプルの種類、実験に必要な細胞数に大きく依存します。生物学的リプリケートについては、この分野でも[未解決な問題](#)の1つです。各細胞が生物学的リプリケートを示しており、別々の個体から得られた異なるサンプルが特定の生物学的プロセスのばらつきを説明しているような場合、実験によっては、1つのサンプルだけで十分であるようにみえるかもしれませんが。また別の実験では、小さな細胞集団において時間とともに生じる生物学的なばらつきを小さくするために、異なるサンプルから得られた細胞をプールして、実験対象となる細胞集団のすべての側面をカバーすることが有利な場合もあります。あるいは、1つのサンプルから複数のリプリケートを得て、実験における総細胞数を増やす必要もあります。

### バッチ効果

ワークフローのあらゆる段階においてバッチ効果が生じる可能性はありますが、そのほとんどはサンプルの調製時間、実験者、および取り扱いプロトコルの違いをもたらすような技術的な制限によるものです。10x GenomicsのChromiumシステムは、さまざまな[技術上のリプリケート](#)について、技術的変動を最小に抑えることが実証されています。[Seurat](#)や[scran](#)、[scrone](#)といった数々の計算ツールによってバッチ効果を補正することが可能です。Cell Rangerも、複数のバージョンの当社シングルセル3'遺伝子発現ケミストリーを用いて作製したライブラリーについてのバッチ補正を行うことができます。

## 実験に適したシングルセル遺伝子発現製品の選択

### シングルセル遺伝子発現LTキット

- ターゲットは1サンプルあたり100~1,000細胞
- パイロット実験や助成金申請のための予備的データの取得
- 実験デザインまたはサンプル調製の最適化
- 低い細胞スループットが求められる試験の実施

### シングルセル遺伝子発現キット

- ターゲットは1サンプルあたり500~10,000細胞
- 複雑な細胞集団および組織の特性解析
- 希少な細胞種の発見
- 細胞数が限られている貴重なサンプルの分析
- シングルセルCRISPRスクリーニングの実施
- ほとんどの研究上の疑問に対応

## 04 シーケンスはどれくらい読めば十分か？

遺伝子発現ライブラリーに関する1つの実験あたりのシーケンス深度は、個々の細胞に含まれる総mRNA量と、細胞内mRNA分子の多様性に依存します。一般的に、転写産物の多様性が同じであれば、発現mRNA量が少ない細胞の方が、発現mRNA量が多い細胞よりも浅いシーケンス深度で十分です。シーケンシングのコストまたは能力に制限がある場合、幅と深度はトレードオフの関係となることがしばしばあります。すなわち、多数の細胞についての浅いシーケンス深度(幅)と、少数の細胞についてのより多くのリード(深度)のトレードオフです。

10x Genomicsのシングルセル遺伝子発現ライブラリーはショートリードシーケンサーに対応しており、デュアルインデックス構成で利用できます。当社のシングルセル遺伝子発現ワークフローでは、増幅の前に独自の分子識別子(UMI)を各転写産物分子にバーコードとして付与するため、PCR増幅による影響を最小限に抑えながらデジタルの遺伝子発現プロファイルが得られます。

## 05 データを解析し視覚化するにはどうしたら良いか？

### シーケンスデータの処理と解析

10x Genomicsのシングルセル遺伝子発現には、データの解析および視覚化のための無料で使いやすいソフトウェアが附属しています。Cell Rangerは、リードのアライメント、フィルタリング、バーコードおよびUMIのカウント、Feature Barcodeマトリックスの生成、およびクラスタリングと遺伝子発現解析を行います。この一連の解析パイプラインは、シーケンス生データを処理して結果を出力します。Cell Rangerでは、複数の実験結果の統合、同一のシーケンシング深度への平均化、結合データの再解析を実施可能です。Cell Rangerはまた、データに対して実行可能な品質管理指標も提示し、サンプルがどの程度きれいであったか、結果がどの程度安定であるかを確認することができます。Cell Rangerの主な出力はカウントマトリックスで、各列はすべての細胞バーコード、各行は測定されたすべての特性(トランスクリプトーム解析用の遺伝子など)で構成されています。それぞれの特性について、検出されたユニーク分子の数がデジタルな数値として示されます。Cell Rangerで処理されたデータは、他社の解析ツールにエクスポートしたり、10xの画像化ソフトウェアであるLoupe Browserでそのまま可視化したりすることができます。Cell RangerはLinux環境でコマンドラインツールとして実行できます。

### 10x Genomics Cloud Analysis

- Cell Ranger解析パイプラインとCloud Analysisを用いることで無料\*でデータを処理
- シンプルなウェブインターフェイスを介した分析の開始と管理
- 高速でスケーラブルなクラウドプラットフォームによる迅速な結果入手
- 米国でのみ利用可能

Cloud Analysisがお客様に適しているかどうかの確認は[こちら](#)から

\*制限事項および詳細については、10x Genomics Cloudの[利用規約](#)を参照ください。





### シングルセル解析結果のインタラクティブな探索

Loupe Browserは、シングルセル関連データの可視化をすばやくインタラクティブに実施できるようデザインされたデスクトップアプリケーションです。データの探索を加速するように構築されたLoupe Browserを使えば、細胞種の特異性、希少な細胞集団の発見、生物学的なサブ構造の探索、新たなマーカー遺伝子の特定などが可能です([オンラインチュートリアルを参照ください](#))。関連コミュニティで開発された多数の解析ツールを使用することで、データ解析をさらに拡張することができます。Cell Rangerからデータをエクスポートして、SeuratやScanpy、Monocle、Bioconductorなどの一般的なツールにインポートすることができます。シングルセル解析の最良の方法に関する概説についてはLuecken and Theis (2019) を参照ください。

## 使用事例

文献	 実験の概要	 目的	 影響
<p><b>多発性硬化症におけるヒトオリゴデンドロサイトの不均一性の変化</b></p> <p>Jäkel S, et al. <i>Nature</i> 566: 543–547, 2019.</p>	<p><b>研究分野:</b> 神経変性疾患</p> <p><b>生物種:</b> ヒト</p> <p><b>サンプルの種類:</b> 脳白質由来の核</p>	<p>多発性硬化症(MS)の重症度におけるオリゴデンドロサイトの不均一性の役割を検討する</p>	<p>対照のヒト白質におけるオリゴデンドログリアのサブクラスターが、MS組織では発現量が減少または増加していることが特定され、オリゴデンドログリアの不均一性の変化が疾患重症度に影響を与える可能性が示唆されました。</p>
<p><b>ヒト胸腺発達の細胞アトラスはT細胞レパトアの形成を定義する</b></p> <p>Park JE, et al. <i>Science</i> 367: eaay3224, 2020.</p>	<p><b>研究分野:</b> 免疫生物学</p> <p><b>生物種:</b> ヒトおよびマウス</p> <p><b>サンプルの種類:</b> 胎児から成人に至る発達段階ごとの胸腺細胞、および骨髄、脾臓</p>	<p>発達中および成人のヒト胸腺に存在するすべての細胞種および状態を特定する</p>	<p>ヒト胸腺に存在する50以上の細胞状態、細胞種ごとの存在量の変化、発達過程における遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにしました。シングルセルRNA-seqおよびTCRシーケンスで同定されたユニークなマーカー遺伝子シグネチャーを用いて、新しい細胞集団を <i>in situ</i> でマッピングし、あわせて擬時系列解析を実施したところ、V(D)J使用率の偏りが発達段階と相関していることが明らかになりました。</p>
<p><b>シングルセル解析は小細胞肺癌における治療抵抗性発現後の腫瘍内不均一性の増加を明らかにする</b></p> <p>Stewart CA, et al. <i>Nat Cancer</i> 1: 423–436, 2020.</p>	<p><b>研究分野:</b> 標的療法</p> <p><b>生物種:</b> ヒト</p> <p><b>サンプルの種類:</b> 異種移植腫瘍細胞、および血液から単離された循環腫瘍細胞</p>	<p>化学療法に対する分子反応および細胞反応を調べる</p>	<p>治療抵抗性を呈した後に腫瘍内の不均一性が増加することが観察されましたが、シングルセルシーケンスによって得られた分離能によって生物学的リプリーケートや異種移植モデルの影響が排除されました。患者血液から直接採取した少数の循環腫瘍細胞を用いて所見が再現されました。</p>
<p><b>転移性胃腺癌における腫瘍内不均一性および系統多様性のシングルセル詳細解析</b></p> <p>Wang R, et al. <i>Nat Med</i> 27: 141–151, 2021.</p>	<p><b>研究分野:</b> がん生物学</p> <p><b>生物種:</b> ヒト</p> <p><b>サンプルの種類:</b> 胃癌患者の腹腔内悪性腹水</p>	<p>腫瘍内の不均一性の原因と結果を判定する</p>	<p>シングルセルのデータを Human Cell Landscape(ヒト細胞全体像)と比較することで、腫瘍細胞の系統や細胞状態の構成の多様性が腫瘍内の不均一性の重要な要因であることを発見しました。腫瘍内の不均一性および腫瘍細胞の起源と患者の生存率との相関関係に関する結論を得ることができました。</p>
<p><b>BACH2は幹細胞様CD8+ T細胞の転写プログラムおよびエピジェネティックプログラムを促進する</b></p> <p>Yao C, et al. <i>Nat Immunol</i> 22: 370–380, 2021.</p>	<p><b>研究分野:</b> 免疫療法</p> <p><b>生物種:</b> マウス</p> <p><b>サンプルの種類:</b> 脾臓</p>	<p>慢性感染中のCD8+ T細胞の分化および細胞状態に関する分子機構の特性を明らかにする</p>	<p>リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)感染後のマウスCD8+ T細胞を、対照、BACH2過剰発現、BACH2欠損の三者で比較し、BACH2が細胞固有の方法で幹細胞様の転写プログラムを確立して細胞分化を妨げていることが示唆されるシングルセル遺伝子発現シグネチャーを同定しました。</p>



 サンプル調製	 ライブラリーの調製	 シーケンス	 解析ツール
<p>新鮮凍結した死後ヒト脳の白質から単離された核</p> <p>合計20サンプル(対照被験者5名からそれぞれ1サンプル、およびMS患者4名のそれぞれ最大5部位から採取)</p>	<p>Chromium Single Cell 3' kit v2</p> <p>ターゲット：1サンプルあたり8,000個の核</p> <p>20ライブラリー</p>	<p>核数合計：17,799</p> <p>核1個あたりの遺伝子数の平均：1,096</p>	<p>Seurat2：対照サンプルとMSサンプル間の核クラスタリングおよび正準相関分析</p>
<p>マーカー遺伝子の発現に基づいて細胞をソートし、間質細胞集団を濃縮するためにCD45<sup>+</sup>およびCD45<sup>-</sup>の細胞を同数ずつサンプリングしました。</p> <p>合計34サンプル(胚および胎児の胸腺：15サンプル、新生児胸腺：9サンプル、対応する骨髄または脾臓：10サンプル)</p>	<p>Chromium Single Cell 3' kit v2</p> <p>Chromium Single Cell 5' kit</p> <p>Chromium Single Cell V(D)J Enrichment kit, Human T cell</p> <p>ターゲット：1サンプルあたり8,000個の細胞</p> <p>13個の3'遺伝子発現ライブラリー</p> <p>17個の5'遺伝子発現ライブラリー</p> <p>17個のTCRライブラリー</p>	<p>細胞数合計：255,901</p> <p>Illumina HiSeq 4000</p> <p>最大8個のライブラリーを多重化して配列決定し、4レーンに配分</p>	<p>Cell Ranger：シングルセルデータのアライメントと定量化</p> <p>Scanpy：正規化、PCA、クラスタリングなどのダウンストリーム解析</p>
<p>循環腫瘍細胞(CTC)由来異種移植片および血液から単離したヒト細胞</p> <p>合計19サンプル(別々のマウスで増殖させたCTC由来異種移植片(CDX)8サンプルをそれぞれ2つずつリプリケート、および3つの時点でSCLC患者から採取したCTCサンプル)リプリケートのデータはシーケンス後にプールしました。</p>	<p>Chromium Single Cell 3' kit v2</p> <p>1サンプルあたり12,200個の細胞をロード</p> <p>19ライブラリー</p>	<p>細胞数合計：36,353(各CDXモデルの細胞が約2,000~9,000個、およびCTC細胞712個)</p> <p>HiSeq Illumina 4000</p> <p>比較のため、最終データはCDXモデル1件あたり2,000個までダウンサンプリング</p>	<p>Seurat：細胞周期効果の検討、PCA、クラスターの識別</p>
<p>胃癌患者から採取した癌性腹膜炎(PC)細胞</p> <p>合計15サンプル(短期生存群10名および長期生存群10名から採取)患者5名は腫瘍細胞の回収率が低い(&lt; 50%)のために除外しました。</p>	<p>Chromium Single Cell 3' kit v2</p> <p>15ライブラリー</p>	<p>細胞数合計：45,048</p> <p>Illumina NovaSeq6000</p> <p>すべてのライブラリーを1つのS2フローセルで同時にシーケンス</p>	<p>Seurat：PCA、細胞クラスタリング、細胞種アノテーション</p> <p>Monocle 3：クラスター解析、シングルセル分化経路の構築</p> <p>inferCNV：染色体の腕(arm)レベルのイベントに関するコピー数変異体の推論、および系統樹の構築</p>
<p>LCMVを認識するTCRを発現する遺伝子改変P14 CD8<sup>+</sup> T細胞をマウスに移植し、その後LCMVに感染させました。感染7日後に脾臓からP14細胞を選別しました。</p> <p>合計4サンプル(それぞれ3匹以上のマウスからプールした4,000個以上の細胞を含む)</p>	<p>Chromium Single Cell 3' kit v2</p> <p>4ライブラリー</p>	<p>細胞数合計：21,520</p> <p>Illumina HiSeq 3000</p>	<p>Cell Ranger、Seurat、Monocle：シングルセルデータの解析</p>

## 参考文献

1. Al-Dalahmah O, et al. Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states. *Acta Neuropathol Commun* 8:19, 2020.
2. Gillen AE, et al. Single-cell RNA sequencing of childhood ependymoma reveals neoplastic cell subpopulations that impact molecular classification and etiology. *Cell Rep* 32: 108023, 2020.
3. Huang W, et al. Origins and proliferative states of human oligodendrocyte precursor cells. *Cell* 182: 594–608.e11, 2020.
4. Jäkel S, et al. Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis. *Nature* 566: 543–547, 2019.
5. Kim D, et al. Targeted therapy guided by single-cell transcriptomic analysis in drug-induced hypersensitivity syndrome: a case report. *Nat Med* 26: 236–243, 2020.
6. Luecken MD & Theis FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol* 15: e8746, 2019.
7. Nehar-Belaid D, et al. Mapping systemic lupus erythematosus heterogeneity at the single-cell level. *Nat Immunol* 21: 1094–1106, 2020.
8. Park JE, et al. A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation. *Science* 367: eaay3224, 2020.
9. Richards LM, et al. Gradient of Developmental and Injury Response transcriptional states defines functional vulnerabilities underpinning glioblastoma heterogeneity. *Nat Cancer* 2: 157–173, 2021.
10. Schlesinger Y, et al. Single-cell transcriptomes of pancreatic preinvasive lesions and cancer reveal acinar metaplastic cells' heterogeneity. *Nat Commun* 11: 4516, 2020.
11. Stewart CA, et al. Single-cell analyses reveal increased intratumoral heterogeneity after the onset of therapy resistance in small-cell lung cancer. *Nat Cancer* 1: 423–436, 2020.
12. Wang R, et al. Single-cell dissection of intratumoral heterogeneity and lineage diversity in metastatic gastric adenocarcinoma. *Nat Med* 27: 141–151, 2021.
13. Wang S, et al. Anti-human TREM2 induces microglia proliferation and reduces pathology in an Alzheimer's disease model. *J Exp Med* 217: e20200785, 2020.
14. Yao C, et al. BACH2 enforces the transcriptional and epigenetic programs of stem-like CD8+ T cells. *Nat Immunol* 22: 370–380, 2021.

お問い合わせ先

[10xgenomics.com/jp/](https://10xgenomics.com/jp/) | [info@10xgenomics.com](mailto:info@10xgenomics.com)

© 2021 10x Genomics, Inc. FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.  
LIT000027-JP - Rev E - Brochure - Getting Started with Single Cell Gene Expression

