

iPS細胞研究における トランスクリプトーム解析

2014/11/18

中村 正裕

京都大学iPS細胞研究所

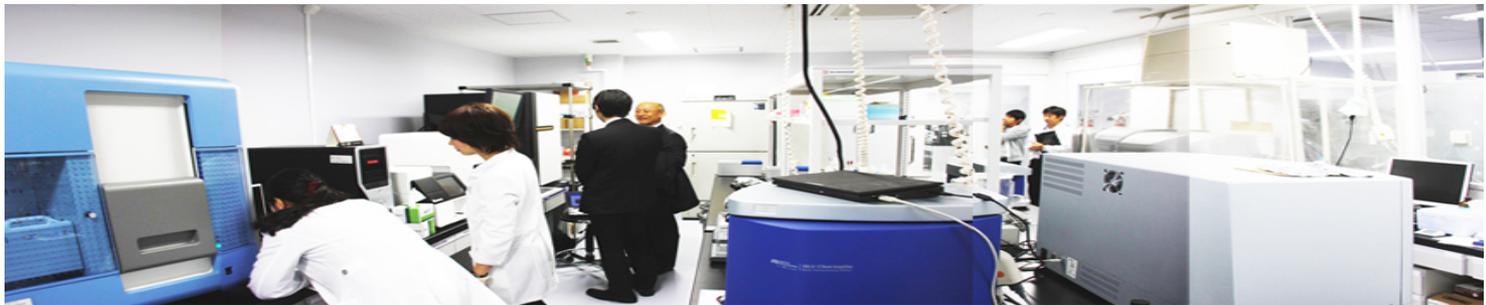
自己紹介

中村 正裕 (なかむら まさひろ)

東京大学大学院 医学系研究科にて学位取得後、
2012年より、京都大学iPS細胞研究所にて
研究員をしております。

大学院時代：脂肪細胞分化のエピゲノム解析

現在：コアファシリティにて、iPS細胞に関する
ゲノム・エピゲノム解析



本日のアジェンダ

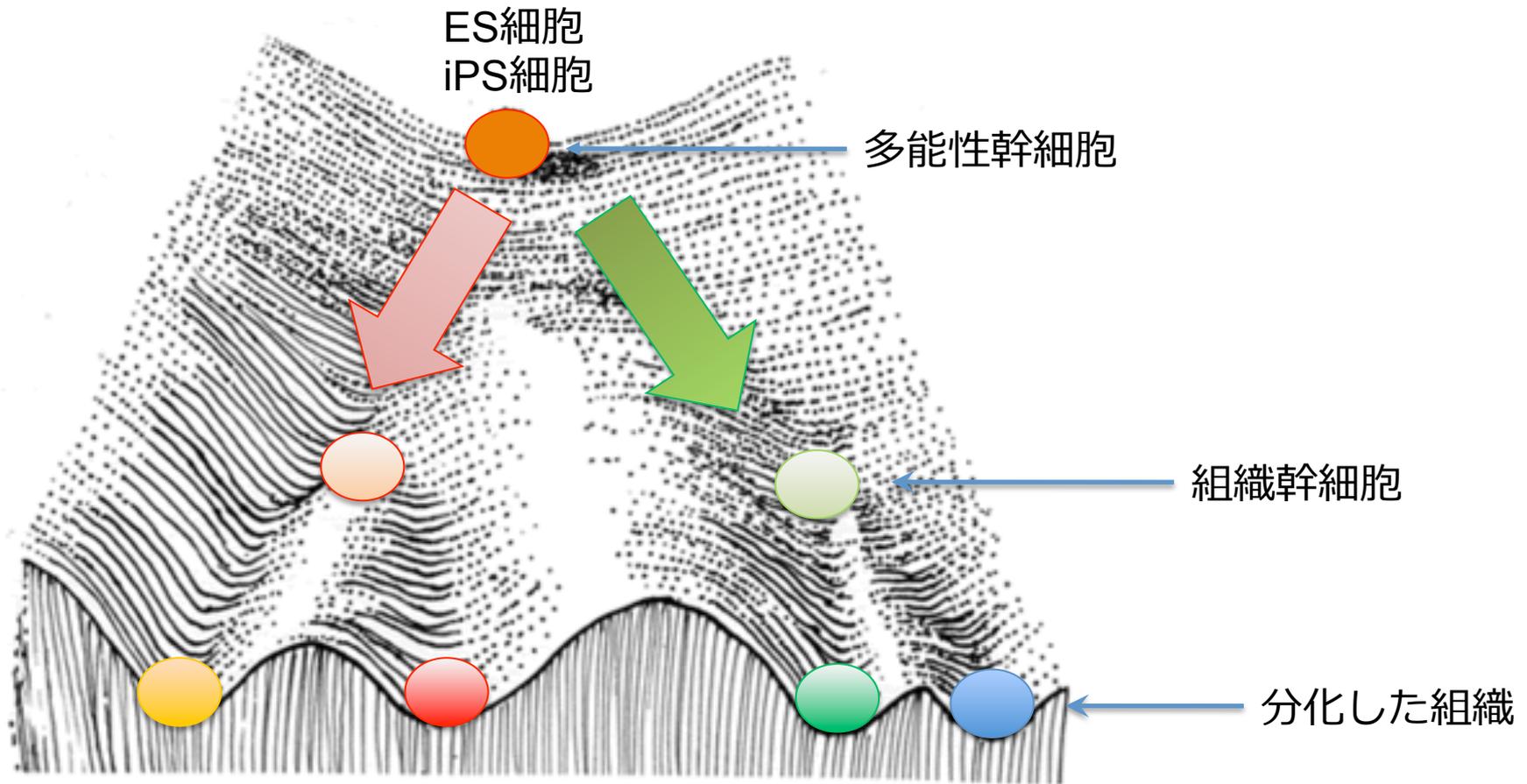
- iPS細胞研究におけるトランスクリプトーム解析
- RNA-seq解析におけるピットフォール
- NextSeq と HiSeq の比較

本日のアジェンダ

- iPS細胞研究におけるトランスクリプトーム解析
- RNA-seq解析におけるピットフォール
- NextSeq と HiSeq の比較

幹細胞とは何か

生命を形づくるもととなる幹細胞の状態を知りたい

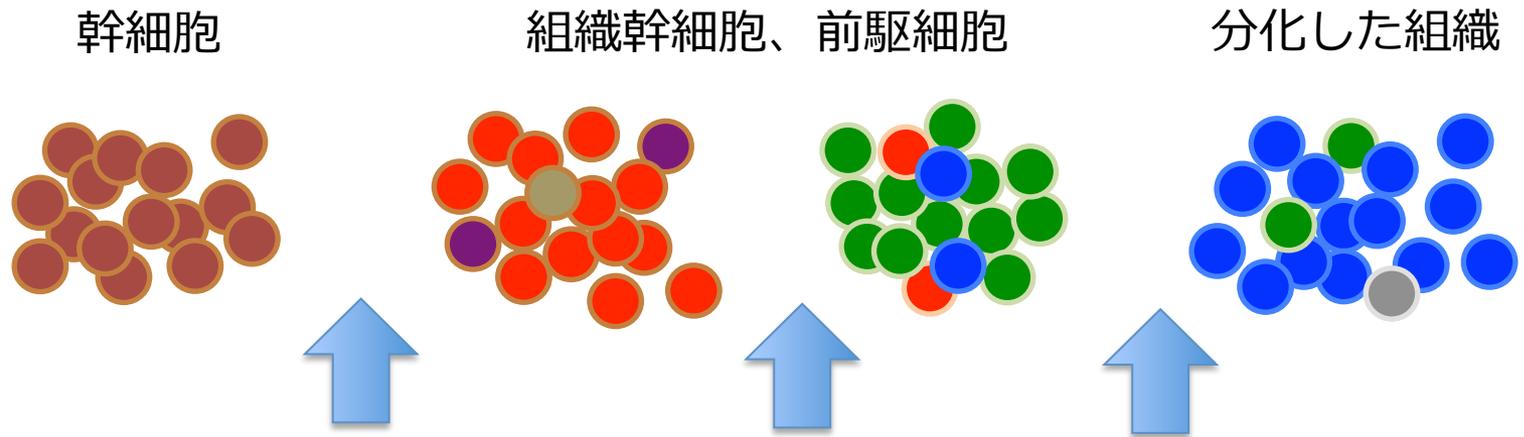


Waddington's Model

分化を知る

分化の過程を追うことで、**分化に必要な因子**を見出したい

時間の流れ

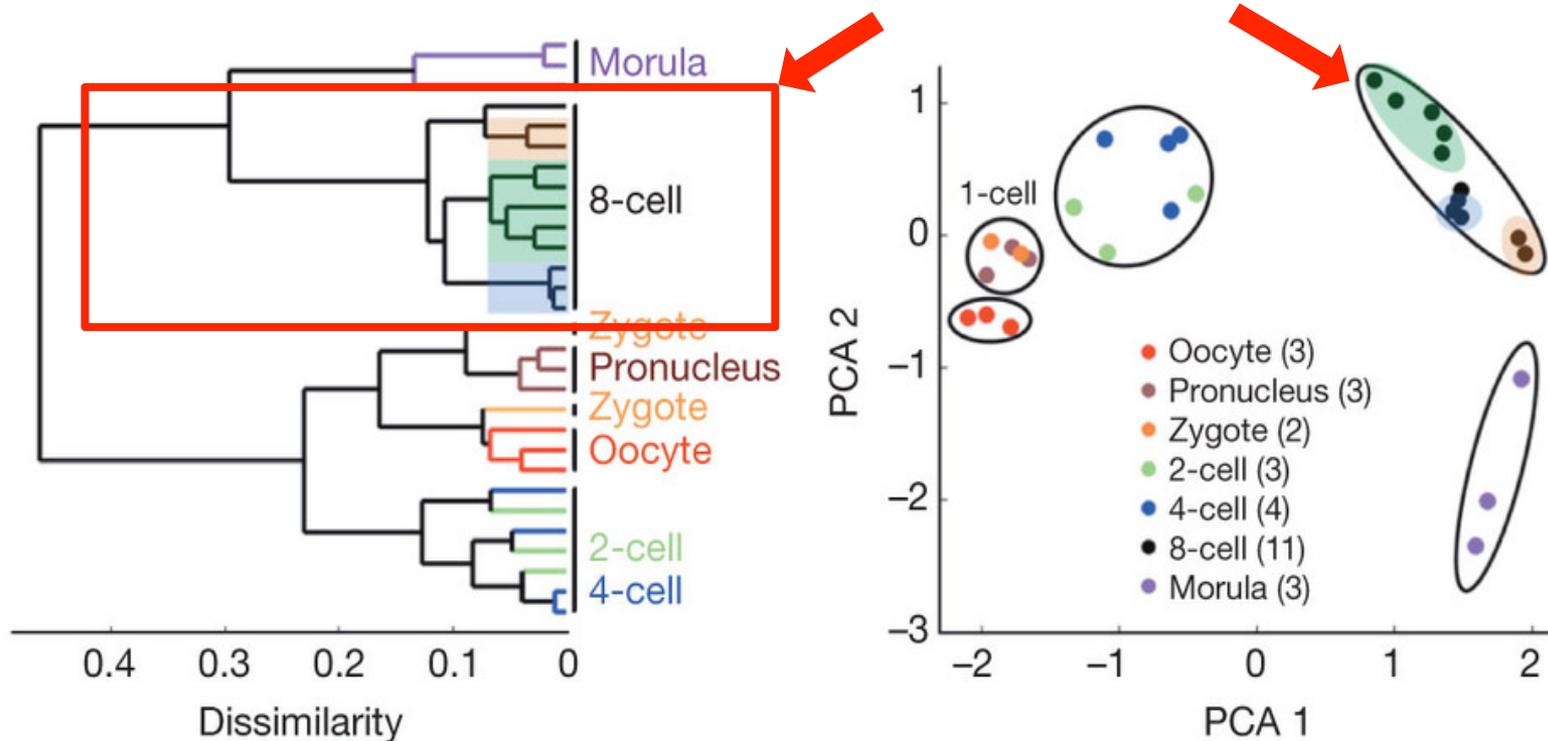


増殖因子、分化促進剤など

発生・分化過程に見られる細胞間のheterogeneity

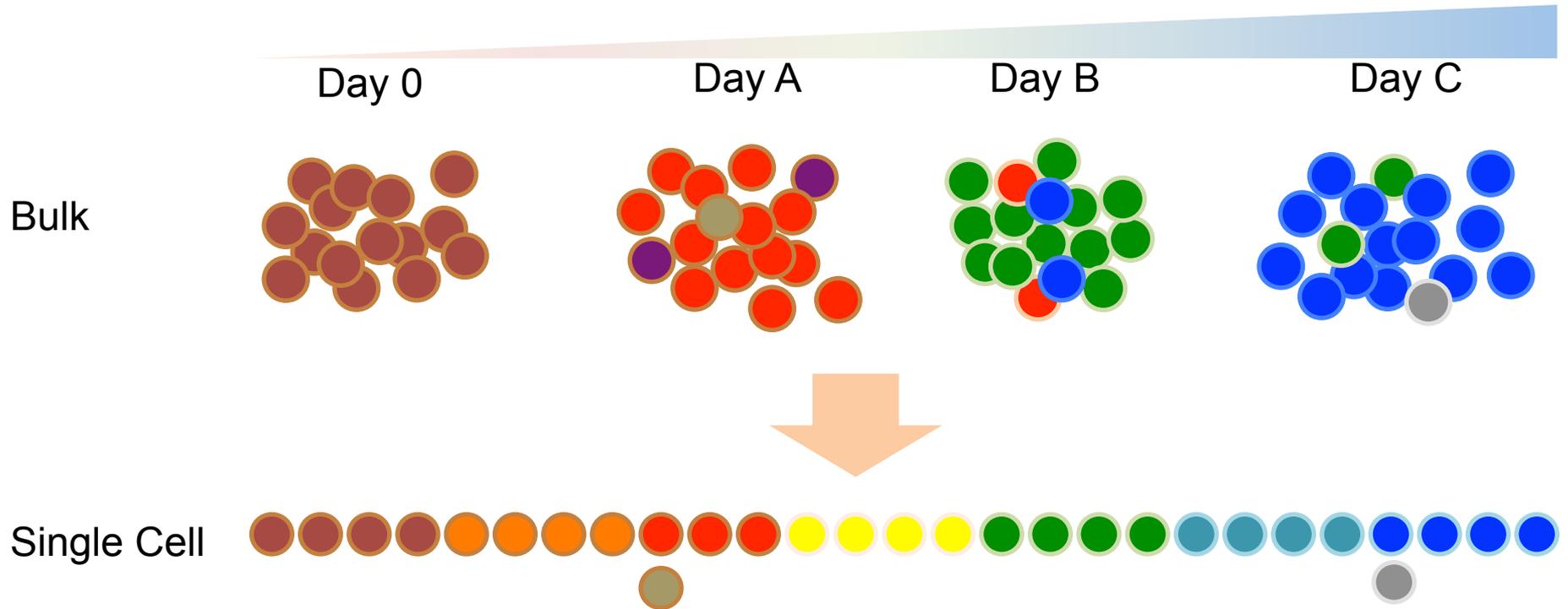
着床前発生段階のヒト細胞におけるシングルセル解析

8細胞期は**複数のクラスター**に分かれる



シングルセル解析の利点

各細胞の時間的な位置を推定し、分化の方向性を明らかにできる

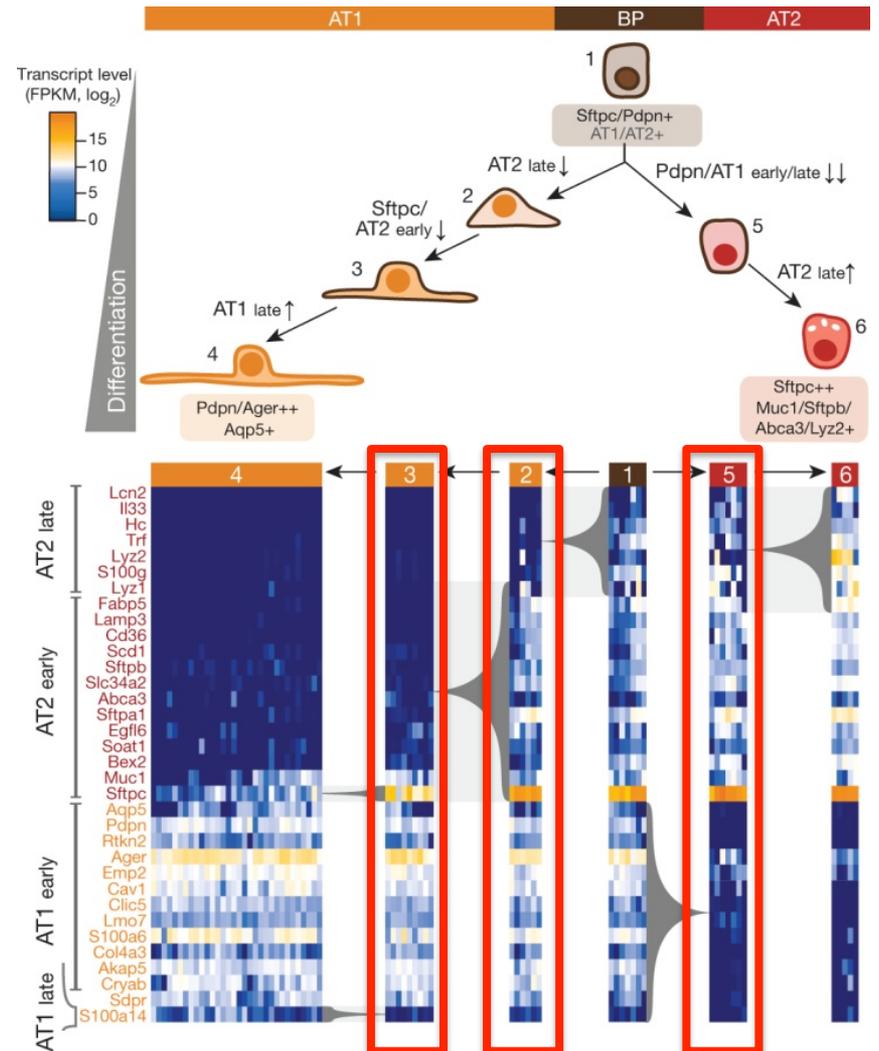


	Bulk	Single cell
Data point	Low	High
Resolution	fragmentary	Continuous

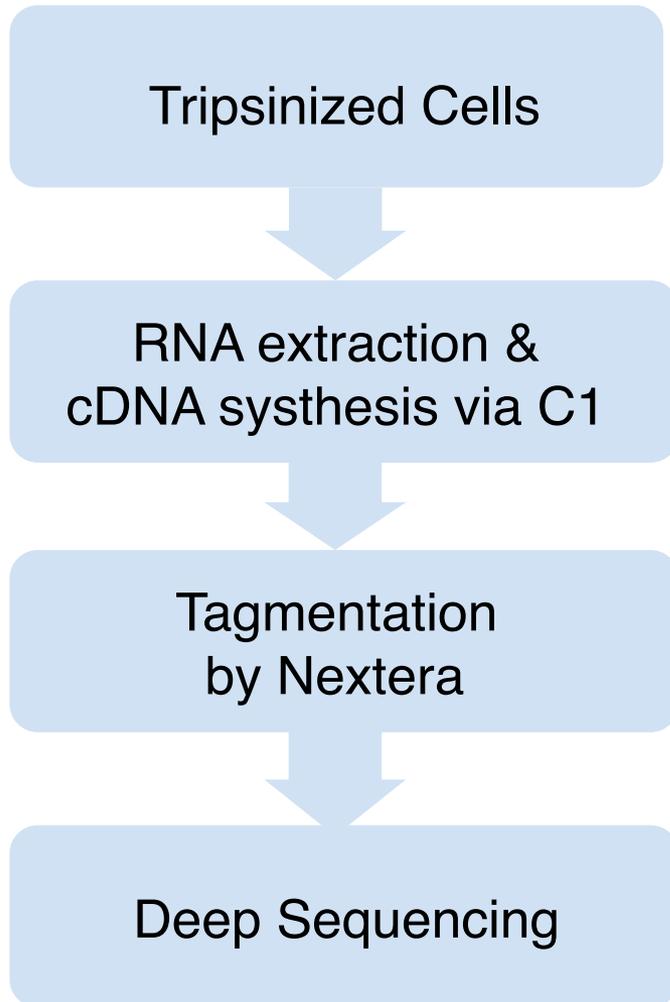
シングルセル解析の例

前駆細胞から
I型 (AT1) 肺胞細胞および
II型 (AT2) 肺胞細胞への分化

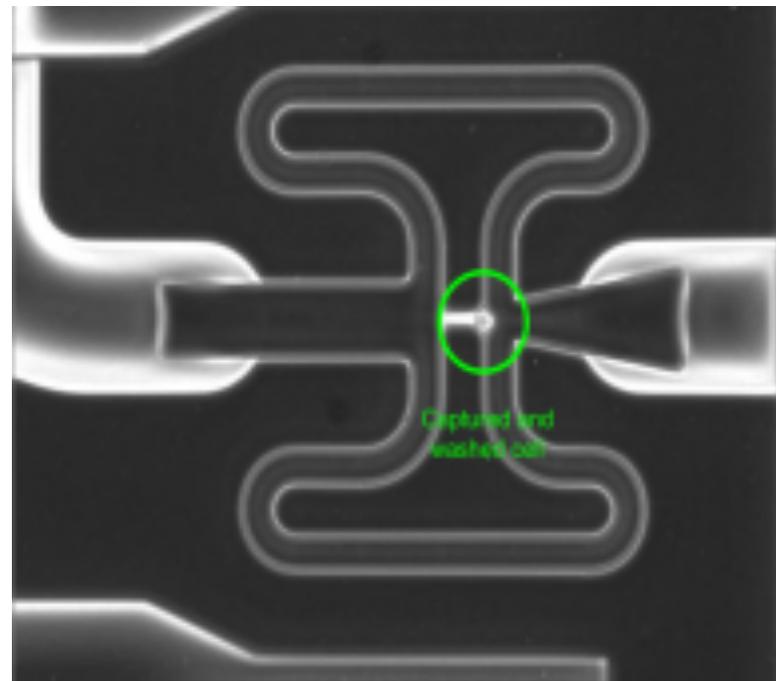
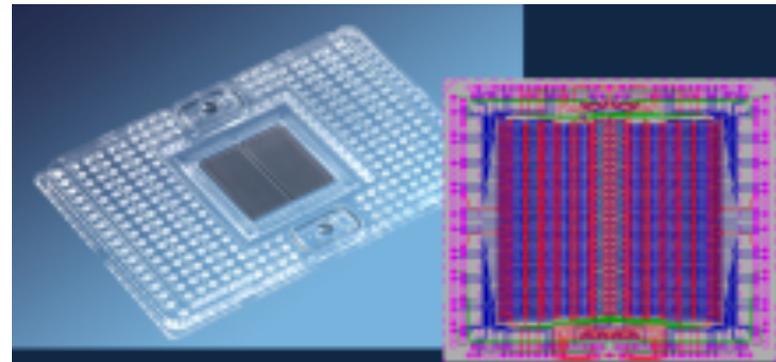
分化途中の細胞を同定



当グループにおけるシングルセル解析



integrated fluidic circuits (IFCs)



当グループにおけるシングルセル解析

Smart-seq

Annealing oligo dT primer



cDNA synthesis



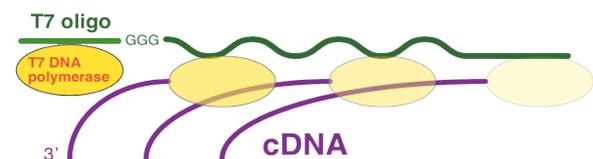
Terminal transfer
& Digesting RNA



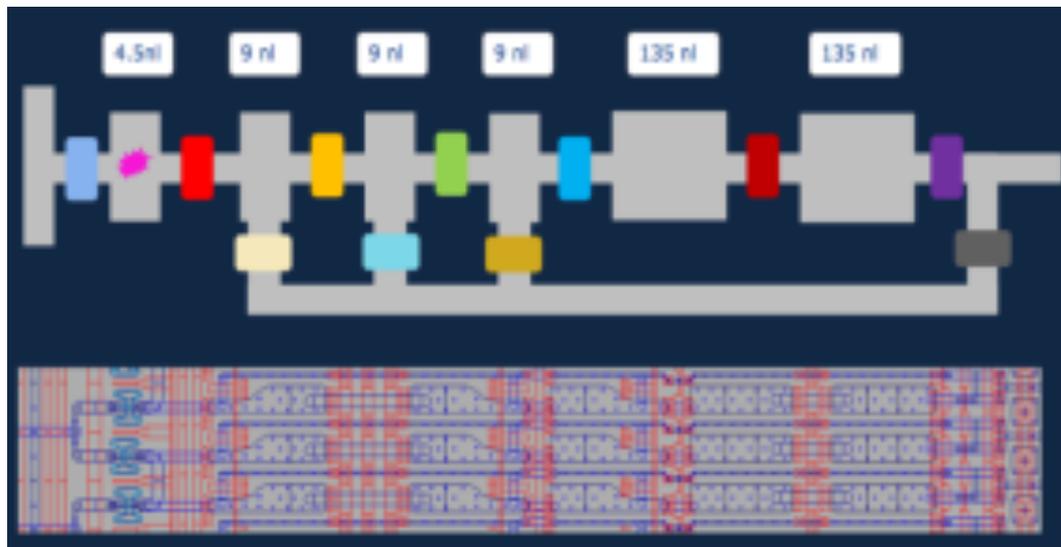
Template switch



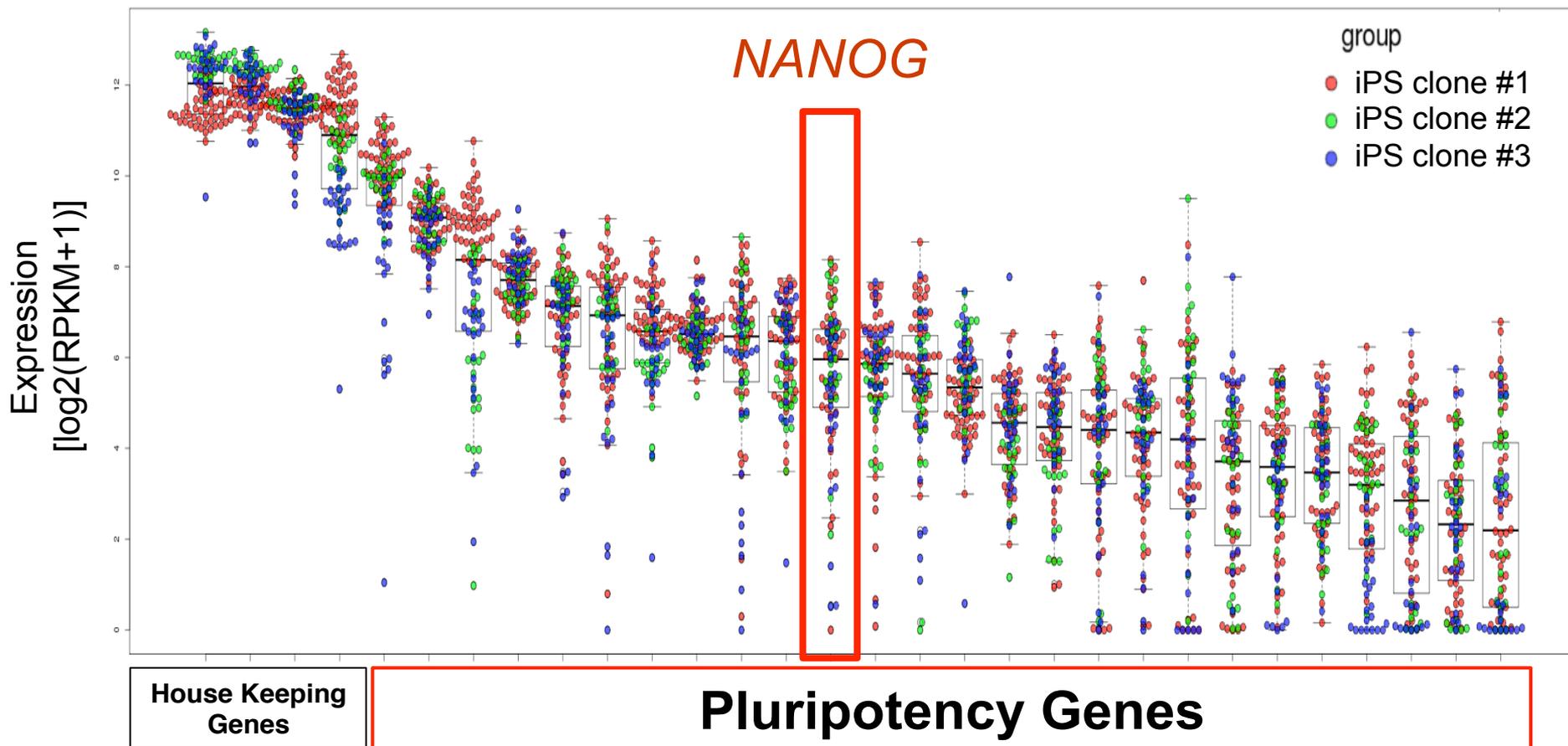
T7 transcription



少ない反応液量で
効率的に酵素反応を進められる



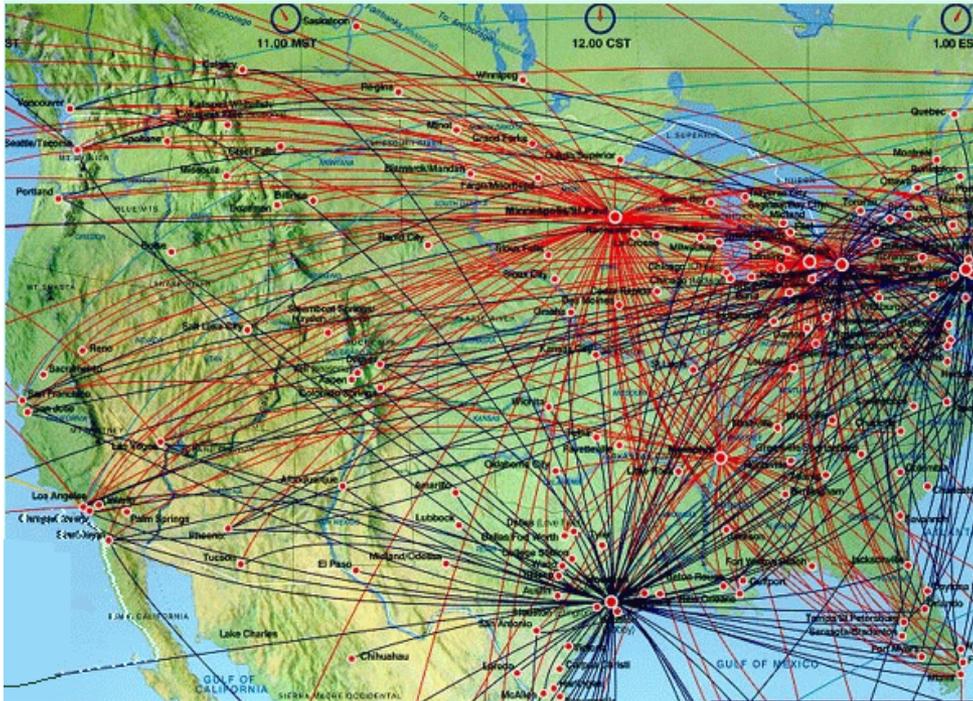
iPS細胞における 幹細胞関連遺伝子の発現のゆらぎ



遺伝子発現ネットワークの探索

遺伝子発現ネットワークにおいて、重要な遺伝子を探したい

各空港をつなぐ航空機の接続図



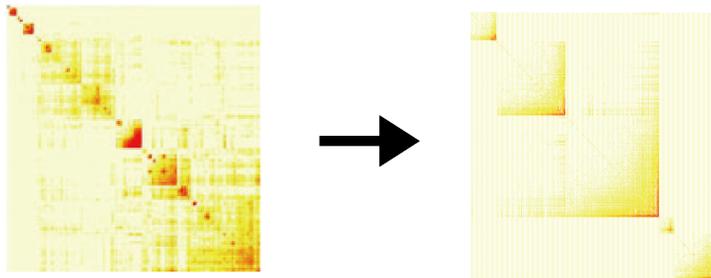
路線の数が多い空港ほど、重要なハブ空港である

遺伝子共発現ネットワークの探索

WGCNA: Weighted Gene Co-expression Network Analysis

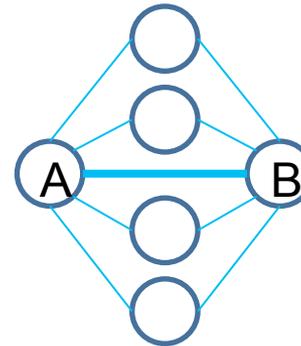
共発現している遺伝子を見つける

遺伝子同士の相関係数を累乗し
遺伝子間の関係性を強化する

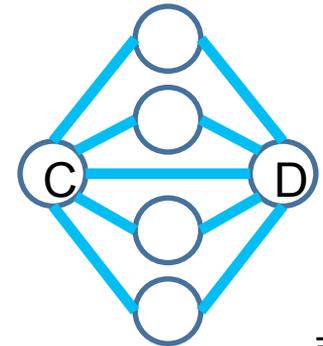


強い相関をもつ遺伝子を共有する
遺伝子についてグループ化する

Weak correlation

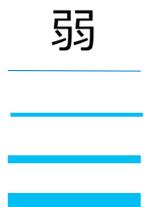


Strong correlation



○ Gene

Correlation Value

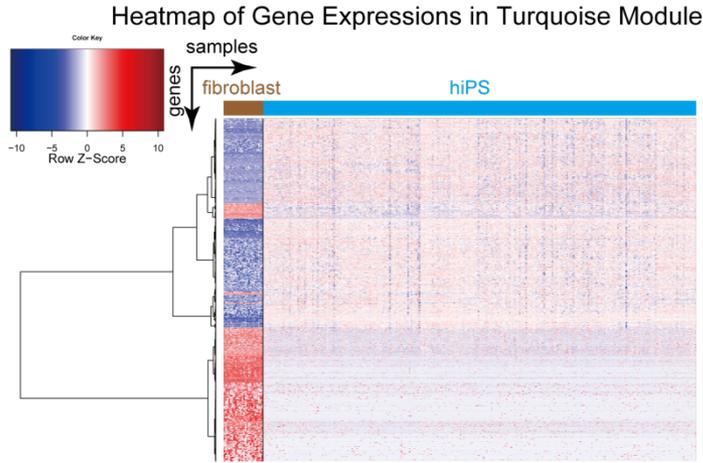


弱

強

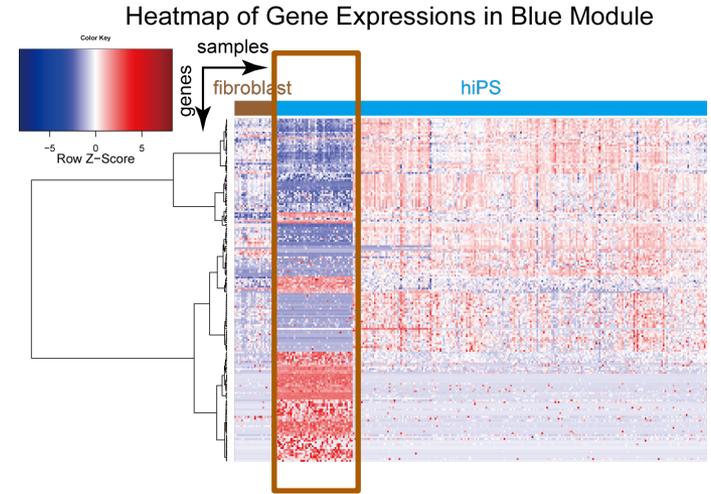
線維芽細胞株とiPS細胞株を解析して得られた 4つの遺伝子グループ

Group A



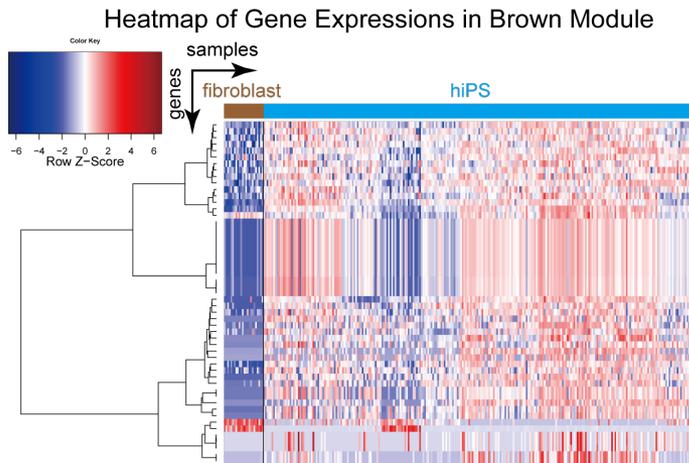
“fibroblast v.s. iPSC”

Group B



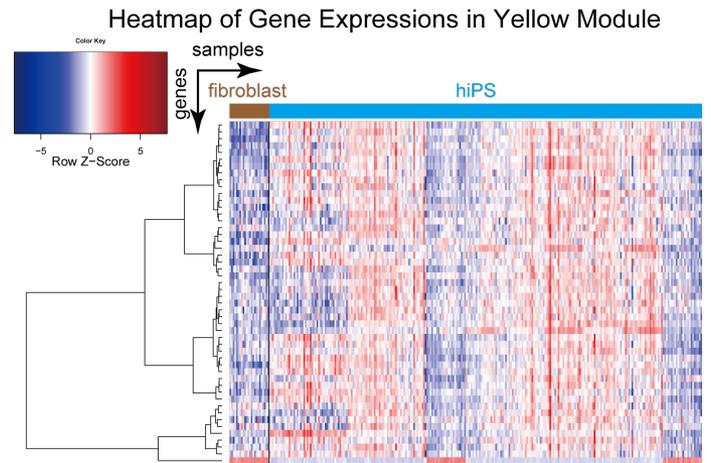
“iPSC clonal differences”

Group C



“cell to cell differences”

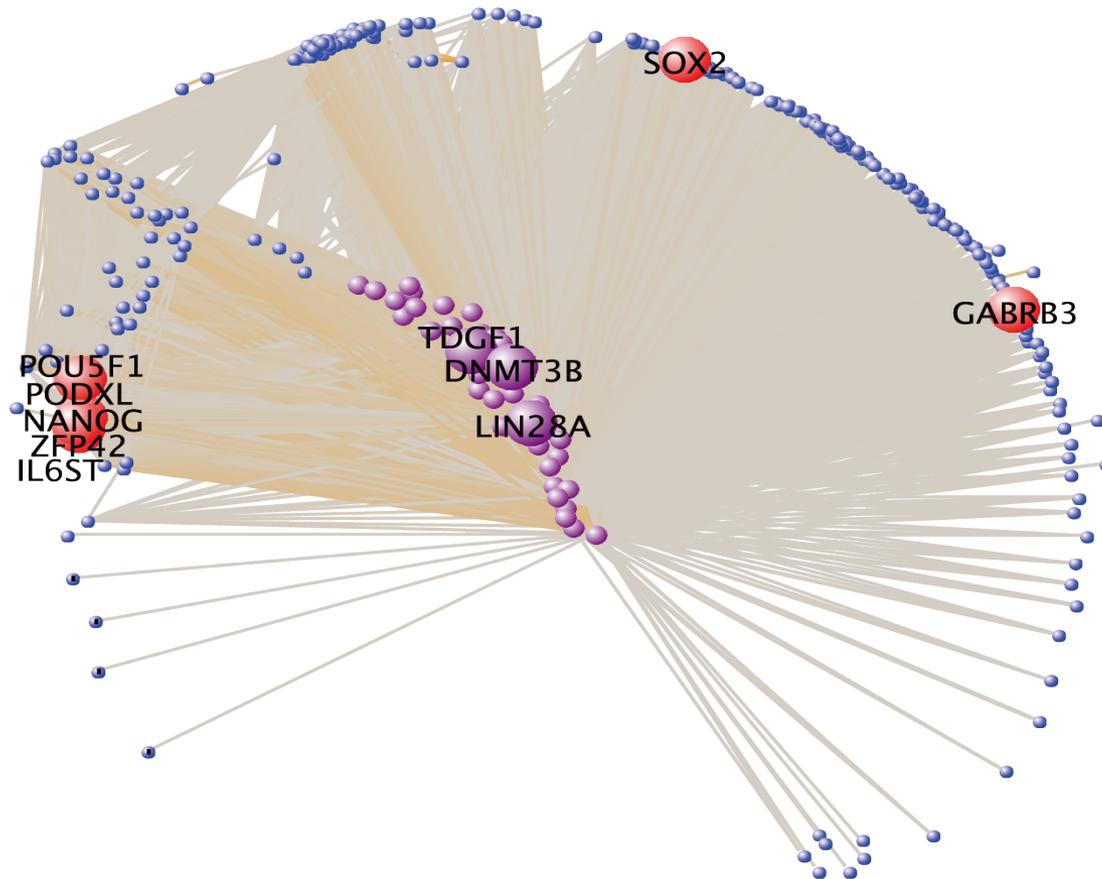
Group D



“cell to cell differences”

グループAにおける遺伝子同士の関係性

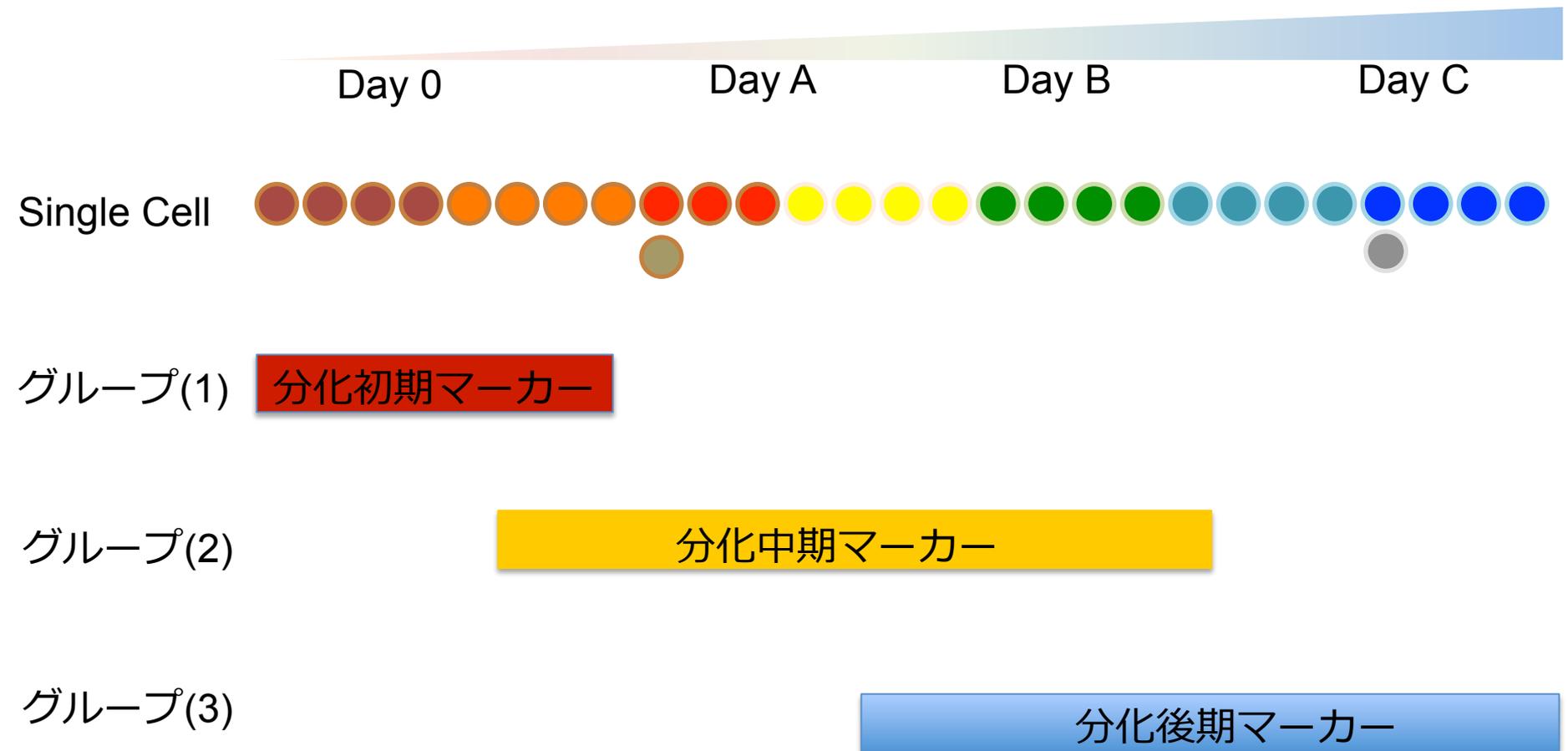
WGCNAにおいて、関係性の強い遺伝子を線でつないだ図



幹細胞関連遺伝子がネットワークを作っている

今後の展望

分化の過程で、遺伝子ネットワークの変化を観察し、
鍵となる遺伝子を探索したい

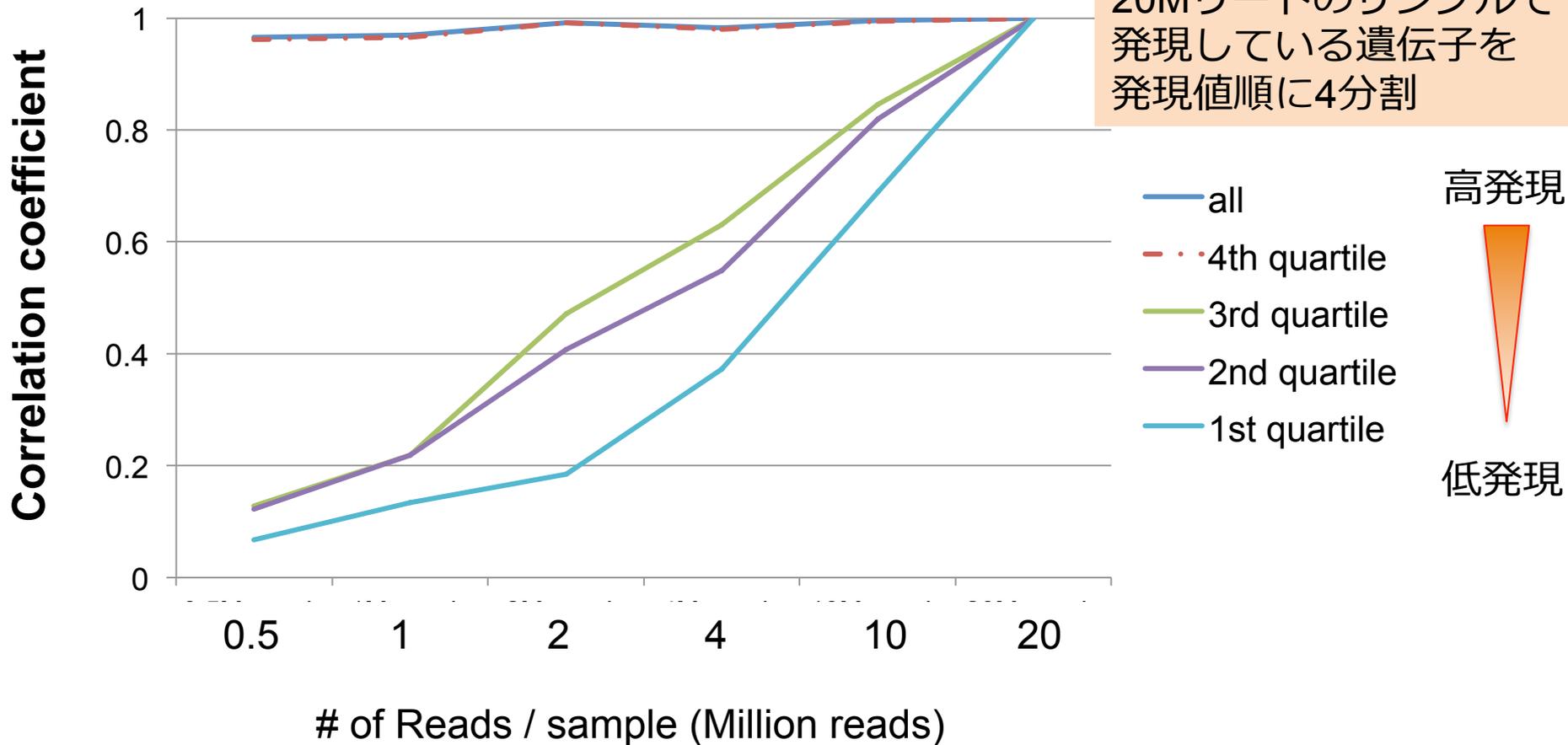


本日のアジェンダ

- iPS細胞研究におけるトランスクリプトーム解析
- RNA-seq解析におけるピットフォール
- NextSeq と HiSeq の比較

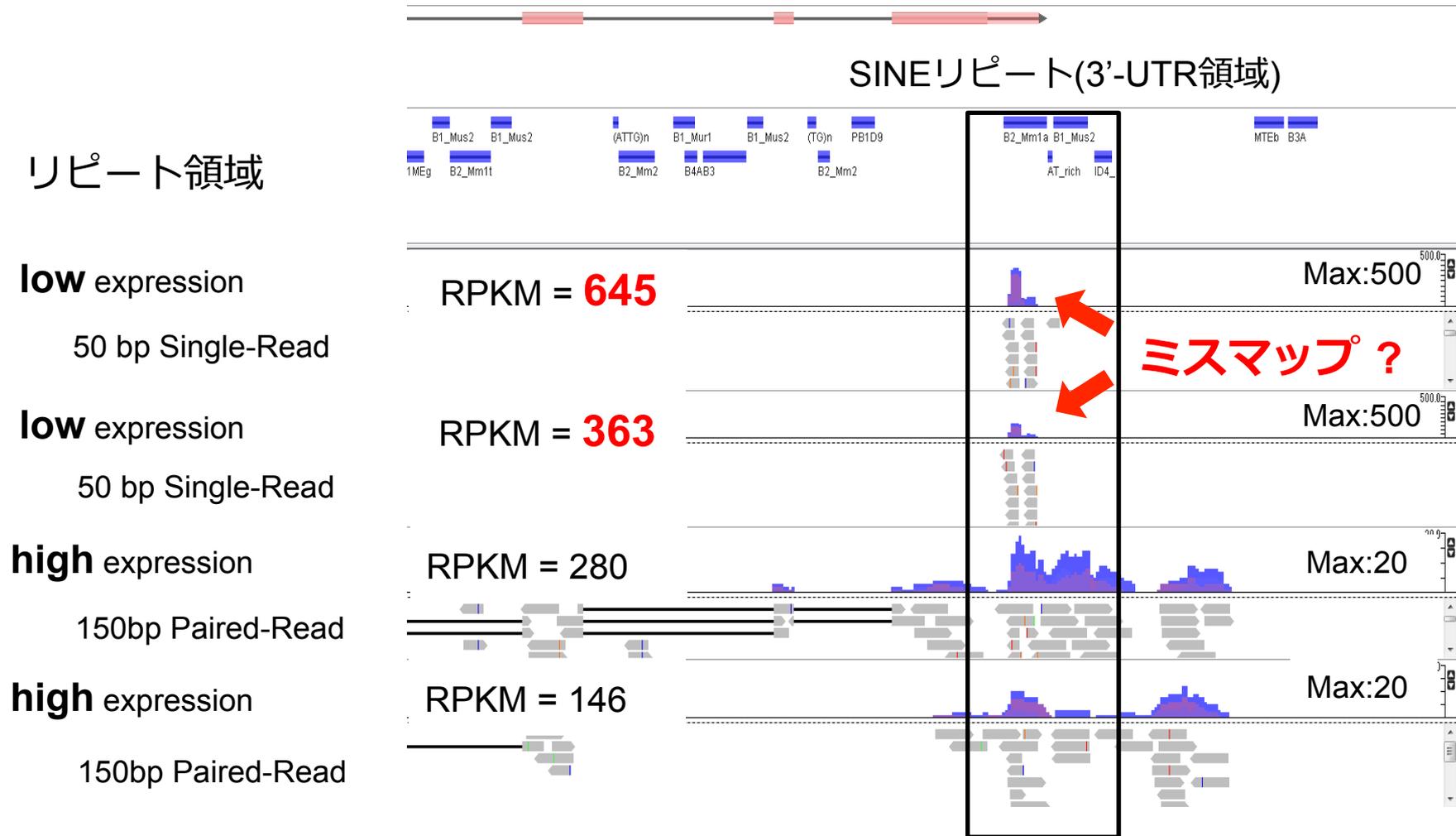
ピットフォール1：リード数の影響

リード数を間引きしたサンプルにおける
20Mリードのサンプルに対する相関



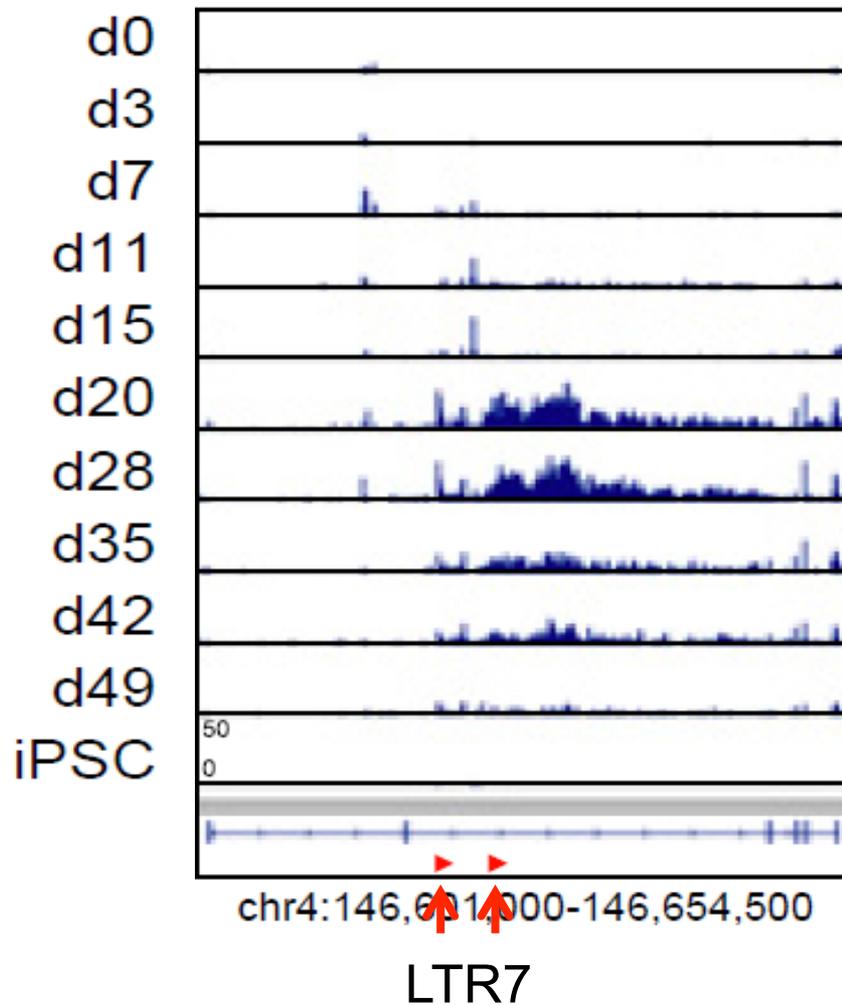
リード数を少なくすると、低発現の遺伝子発現値が影響を受ける

ピットフォール2 : リードのミスマップ



リード長の調整、ミスマップに対する処理が必要

ピットフォール3：ノンコーディングRNAの存在



LTR7領域から転写される

ノンコーディングRNA (HERV-H) は
iPS作製過程において
重要な働きを担っている。

LTR7領域からの発現が残るiPS細胞株は、
神経細胞への分化抵抗性を示す。

ブラウザでタグを確認し、遺伝子モデルを再定義することが重要

本日のアジェンダ

- iPS細胞研究におけるトランスクリプトーム解析
- RNA-seq解析におけるピットフォール体験談
- NextSeq と HiSeq の比較

NextSeq と HiSeqの比較

同一RNA-seqライブラリを両者でシーケンスし、比較する

サンプル：ヒト臓器由来のRNAおよび、iPS/線維芽細胞から抽出したRNA

方法

NextSeq 75 bp x2 4億クラスター、8億リード

- 12 サンプル (9 stranded mRNA, 3 stranded Total RNA)
- 平均 3333万クラスター、6666万リード / サンプル

HiSeq 100 bp x2 3億クラスター、6億リード

- 9 サンプル (9 stranded mRNA)
- 平均 3333万クラスター、6666万リード / サンプル

BaseSpaceを利用し、TopHatにてマッピング後、遺伝子発現値を比較

サンプル概要

Sample	ライブラリ名	HiSeq 計 9 サンプル	NextSeq 計 12 サンプル	ライブラリ作製
#1	Kidney	○	○	
#2	Brain	○	○	
#3	Liver	○	○	
#4	Heart	○	○	
#5	Fetal Brain	○	○	TruSeq stranded mRNA Kit
#6	Fetal Liver	○	○	
#7	Fetal Heart	○	○	
#8	iPSC	○	○	
#9	Fibroblast	○	○	
#10	Brain	N.A.	○	TruSeq stranded total RNA Kit
#11	Liver	N.A.	○	
#12	Heart	N.A.	○	

シーケンス結果

HiSeq

Rapid mode: 100bp Paired-end

NextSeq

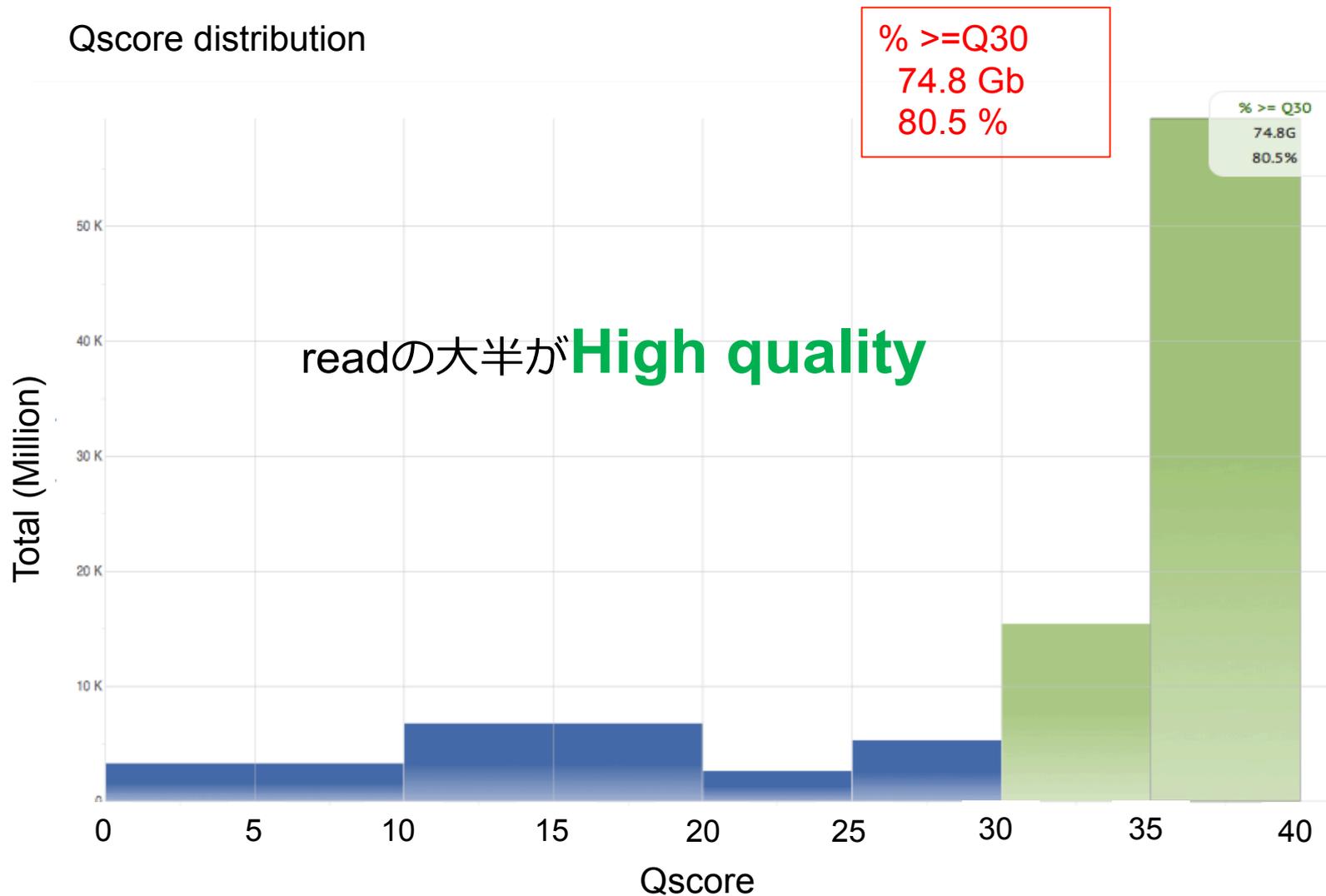
High-Output mode: 75bp Paired-end

Sample	# of Cluster	Mb	# of Cluster	Mb
#1	37.7 M	7,533	49.5 M	7,427
#2	37.1 M	7,417	53.8 M	8,076
#3	36.0 M	7,200	49.7 M	7,457
#4	37.1 M	7,430	42.0 M	6,296
#5	33.1 M	6,623	52.2 M	7,832
#6	36.6 M	7,311	51.6 M	7,734
#7	35.8 M	7,156	50.7 M	7,603
#8	36.6 M	7,318	45.3 M	6,791
#9	38.8 M	7,756	49.7 M	7,458
#10			41.6 M	6,244
#11			47.5 M	7,129
#12			40.1 M	6,022
Total	328.7M	65,743	573.8M	86,069
標準スペック			400.0M	60,000

イルミナ社スペックシートとの **143%** の出力

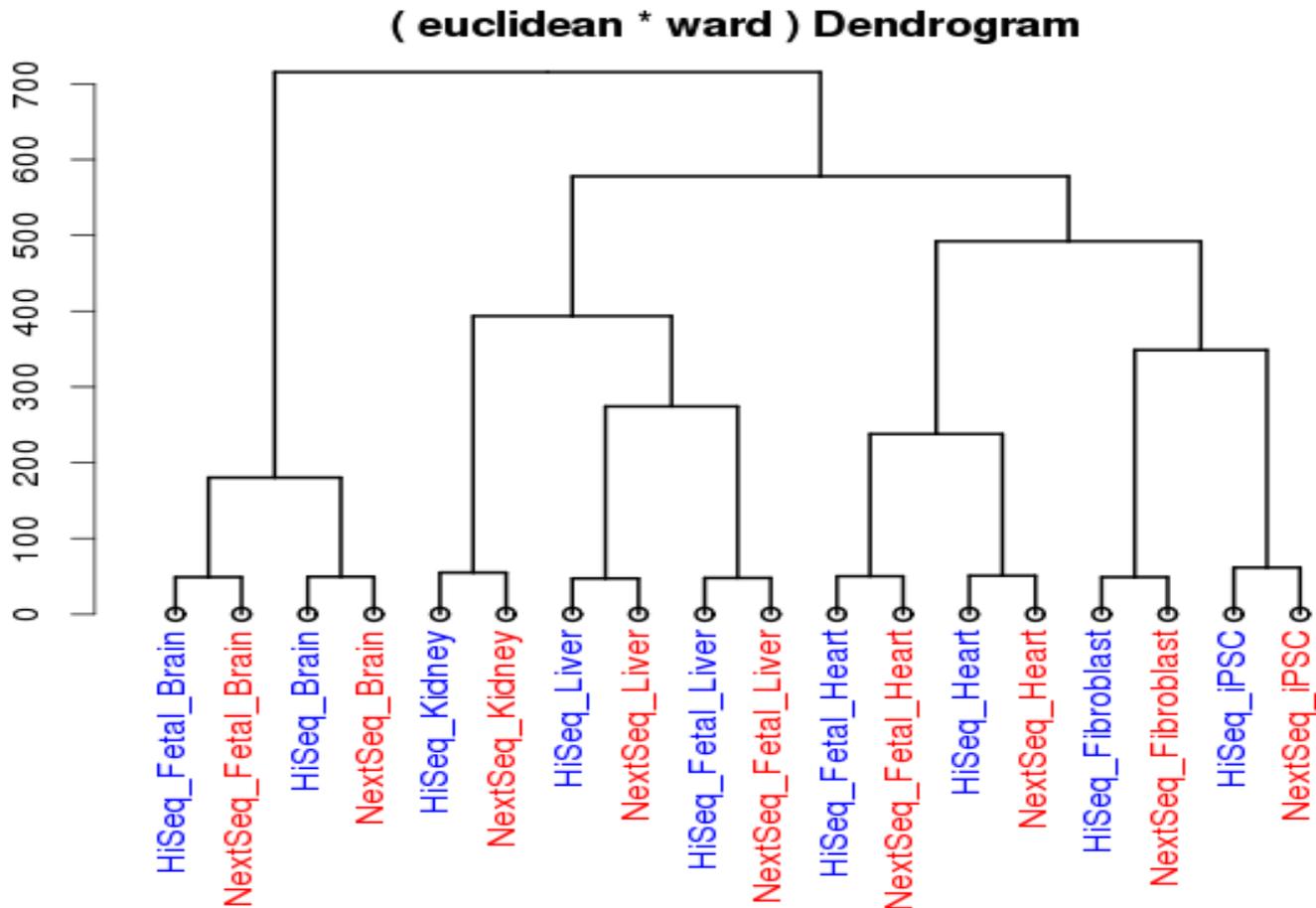
NextSeqランでの Qscore distribution

Qscore distribution



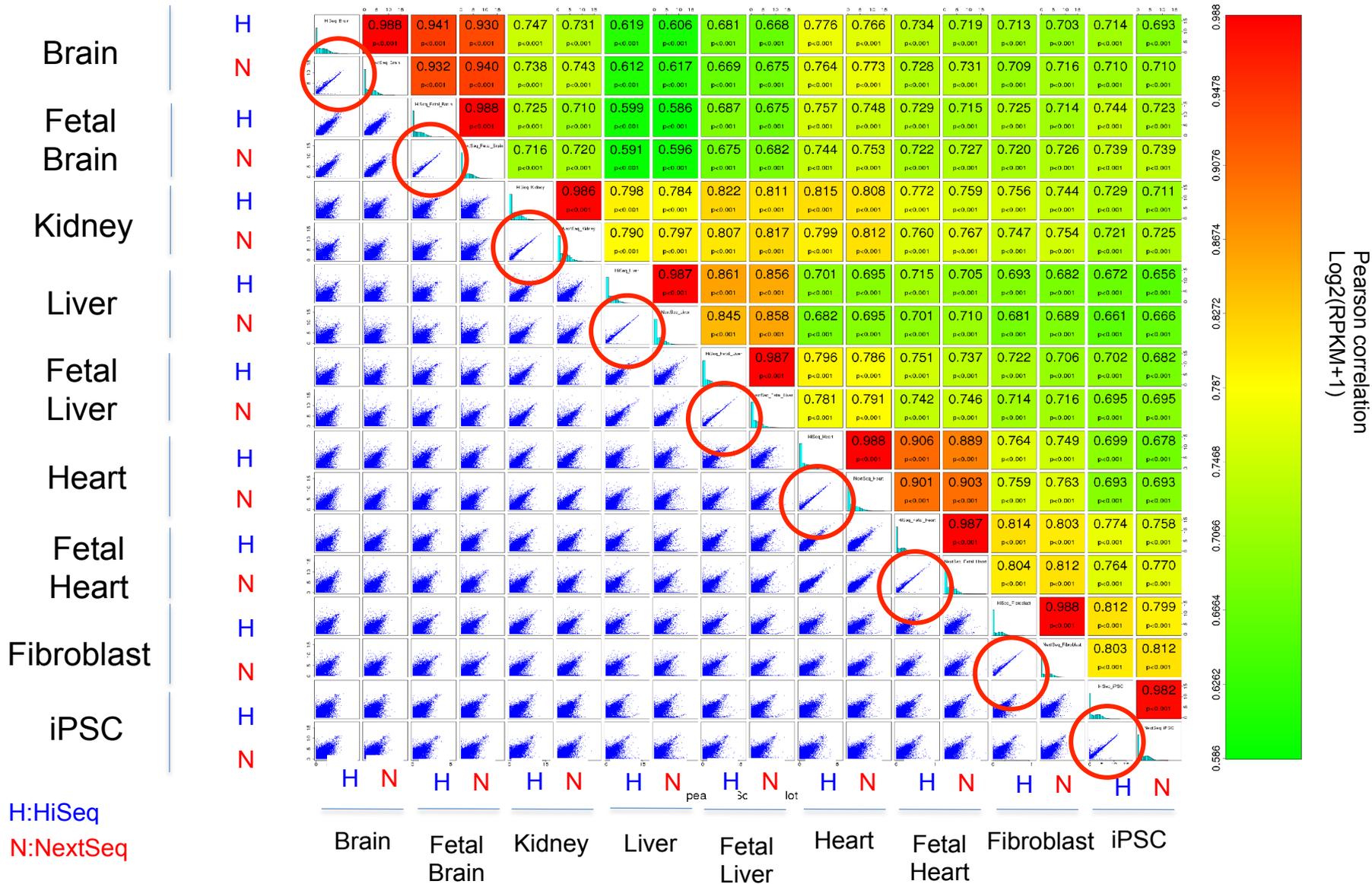
クラスタリング結果

同一ライブラリ由来のサンプルは、同じクラスター内に存在。



同一ライブラリ由来のサンプルは良い相関を示した

TruSeq stranded mRNA Kitにおけるプロット



本日のまとめ

- iPS細胞研究において、**シングルセル解析は、転写ネットワークの解明や、分化の方向性を知るための良いツール**である。
- RNA-seqでは、リード長やキットの選択、マッピング状況について考慮することが重要。
- NextSeqはHiSeqと同様のシーケンス品質を持ち、解析結果も遜色ないと考えられる。

本日のまとめ

- iPS細胞研究において、シングルセル解析は、転写ネットワークの解明や、分化の方向性を知るための良いツールである。
- RNA-seqでは、**リード長**や**キットの選択**、**マッピング状況**について考慮することが重要。
- NextSeqはHiSeqと同様のシーケンス品質を持ち、解析結果も遜色ないと考えられる。

本日のまとめ

- iPS細胞研究において、シングルセル解析は、転写ネットワークの解明や、分化の方向性を知るための良いツールである。
- RNA-seqでは、リード長やキットの選択、マッピング状況についても考慮することが重要。
- NextSeqはHiSeqと**同等のシーケンス品質**を持ち、解析結果も遜色ないと考えられる。

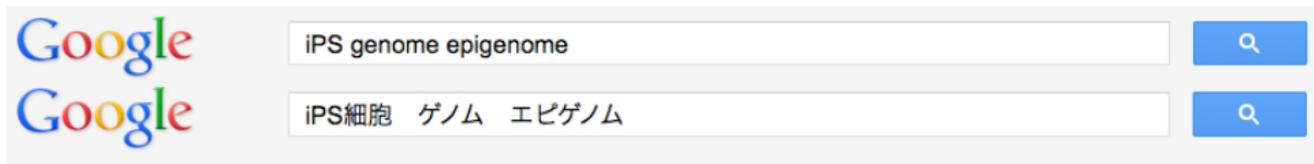
謝辞

京都大学 iPS細胞研究所

Masaki Nomura Chihiro Okada
Yasutaka Mizoro Azusa Tanaka
Shiori Furukawa Naoki Amano
Kazuhiko Kitajima Mori Noriko
Fumiyo Kitaoka Yui Nomiya
Yuko Kitano Junko Kuwahara
Kouichi Kaneko Tomoko Takahashi
Yoshinori Yoshida Shinya Yamanaka
Akira Watanabe



<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/watanabe>



<https://www.facebook.com/epigenomecira>