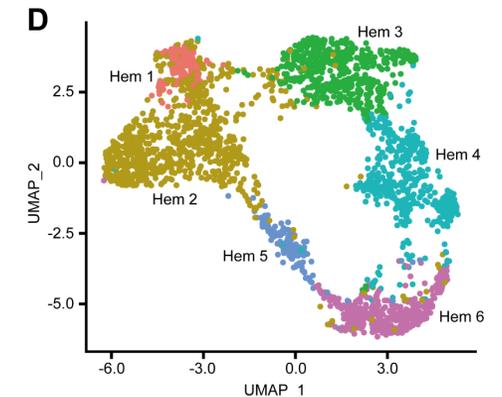
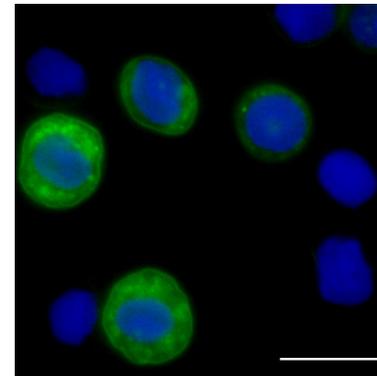
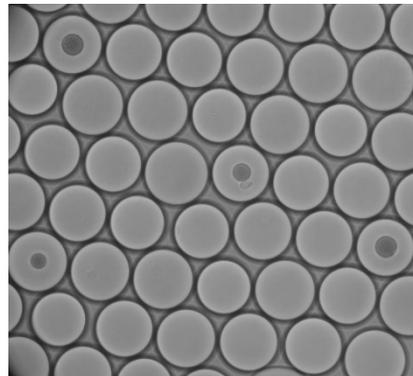
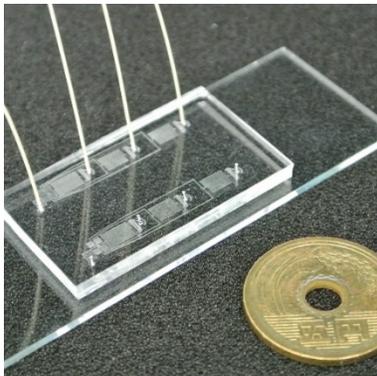


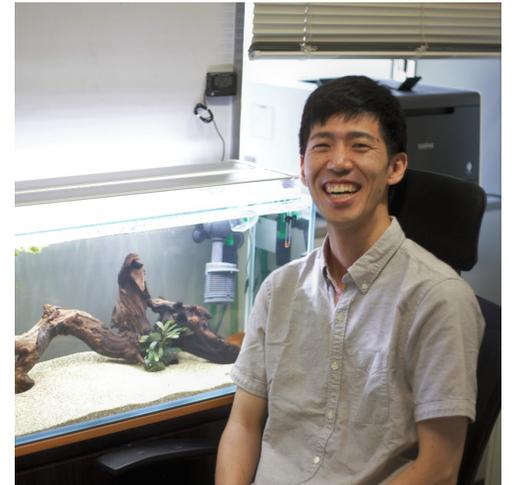
水産無脊椎動物へのシングルセルmRNA解析 適用の実際と工夫

東京海洋大学 学術研究院 助教
小祝 敬一郎



➤ 自己紹介

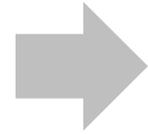
- 2013年～2019年 東京海洋大学
廣野教授研究室で、甲殻類（クルマエビ）の免疫システムについて研究
- 2019年 博士（海洋科学）取得
- 2019年～2020年 中央大学 日本学術振興会特別研究員PD
鈴木教授研究室で、マイクロ流路作製手法を取得
- 2020年～2021年 東京農工大学 特任助教
川野教授研究室で、マイクロ流路活用研究に従事
- 2021年～現在 東京海洋大学 助教
廣野教授研究室で、水産生物の免疫システムの研究に従事



➤ 水産生物免疫学研究の実際

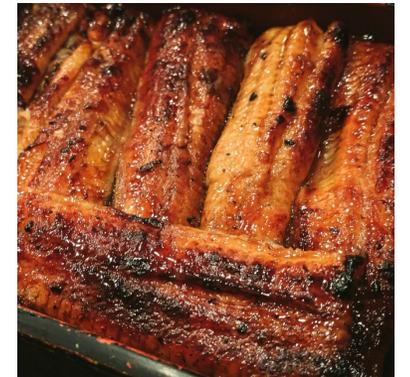
□ 非モデル生物であるがゆえの制限

- 細胞種情報の不足
- 細胞検出マーカーの不足
- 細胞培養条件の不足
- 研究者の不足



□ 既存の解決策

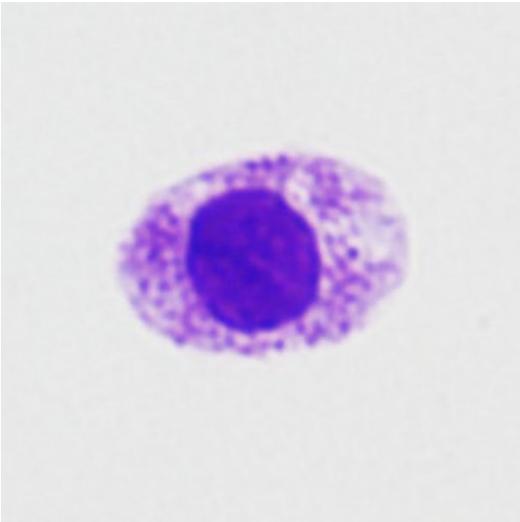
- 他生物との比較
- 他生物マーカー遺伝子の適用
- 地道な条件検討



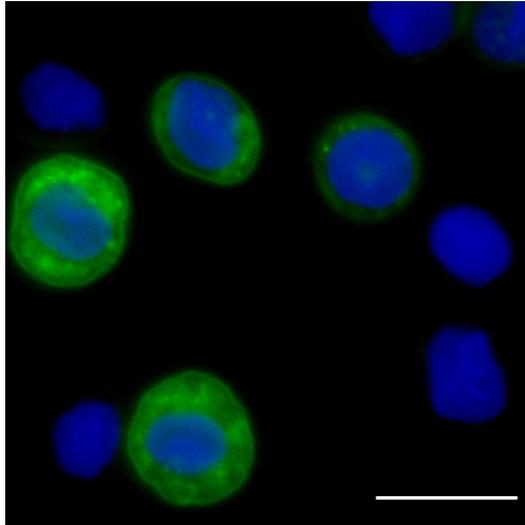
➤ シングルセル解析は新しいのか？

□ イメージングやサイトメトリーもシングルセル解析

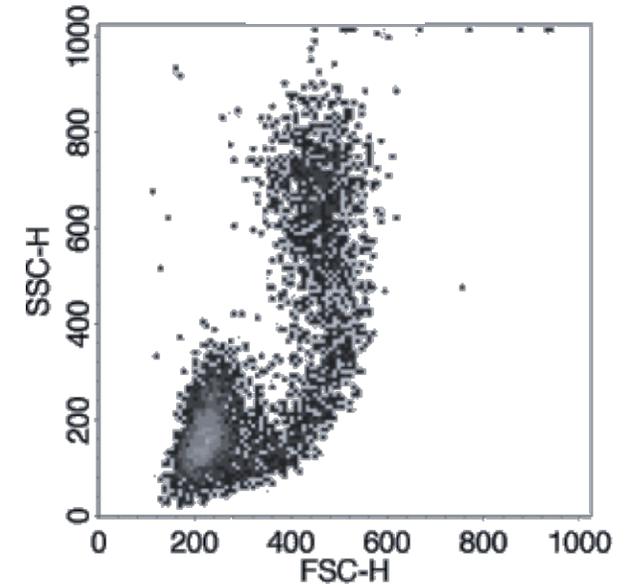
細胞内の構造が見える！



タンパク質の局在が見える！



細胞の大きさ・複雑性がわかる！

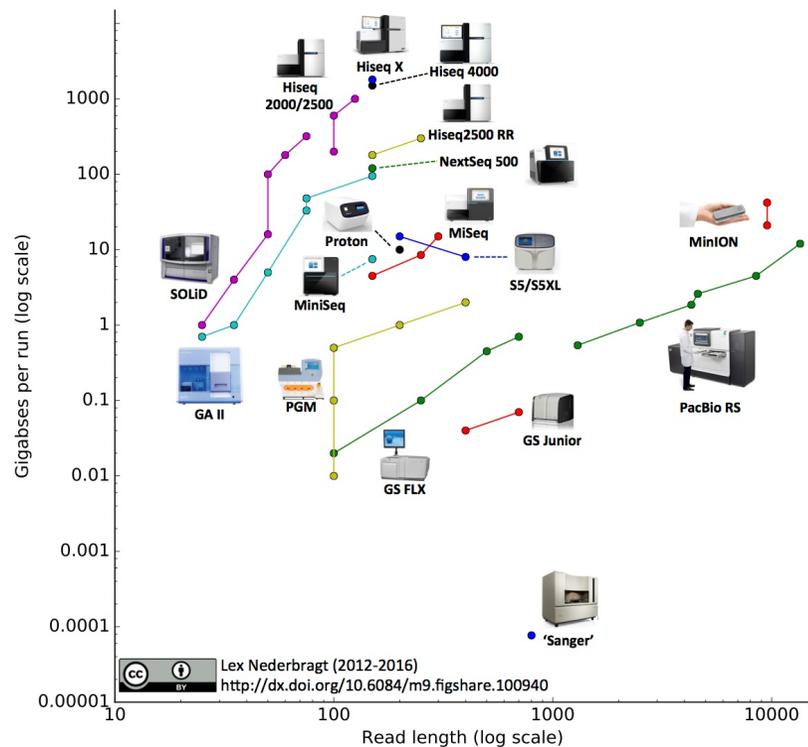


→ではシングルセルmRNA解析は何が新しいのか？

➤ シングルセル+トランスクリプトーム解析

□ NGS技術の発展・普及

→トランスクリプトーム解析の価格低下・クラスター数増加



ex.)

使用機種：NextSeq

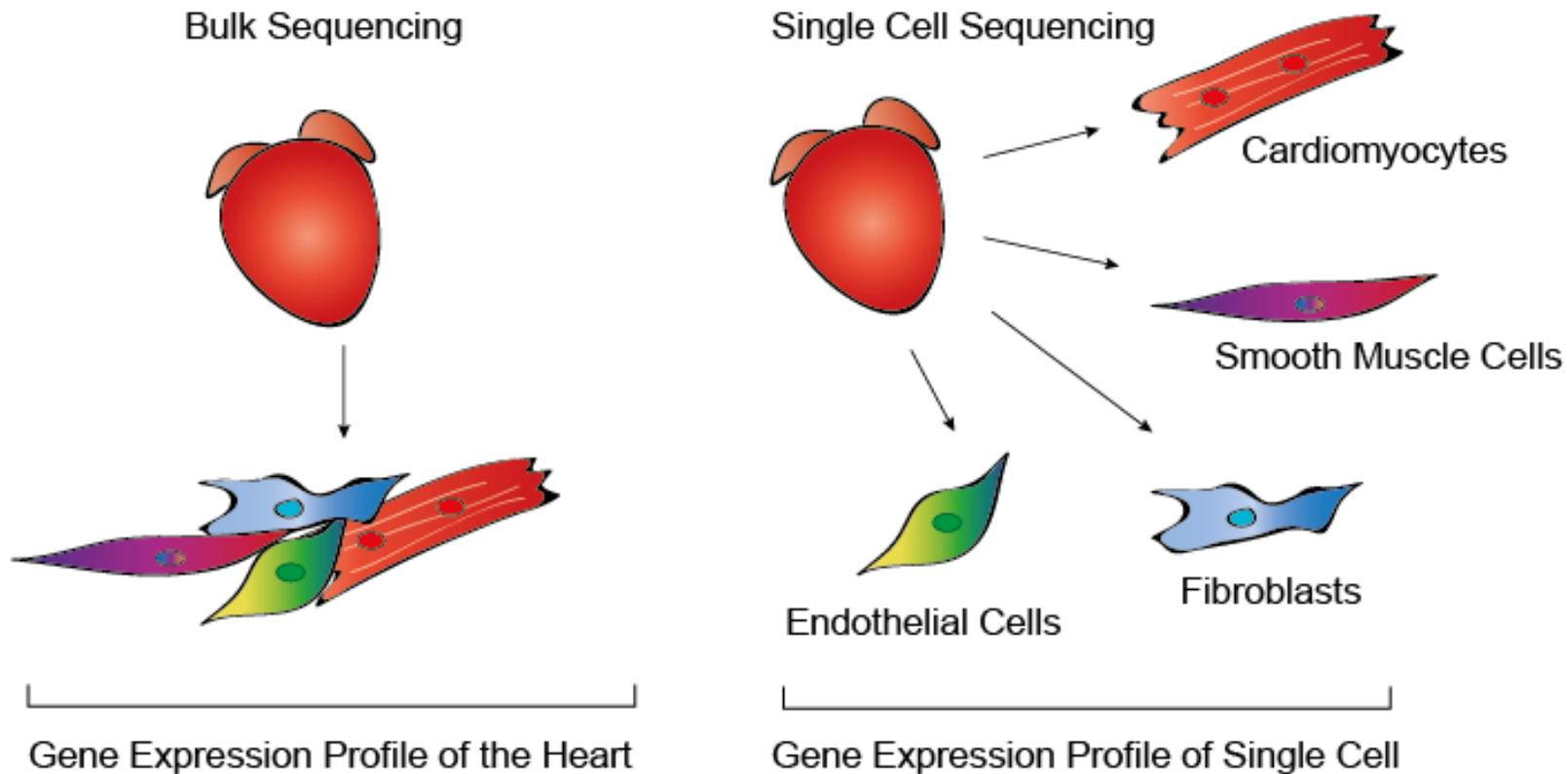
カートリッジ：75Cycle (Single End) High Outputキット

解析リード数：400,000,000 read (4億リード)

希望販売価格：約27万円

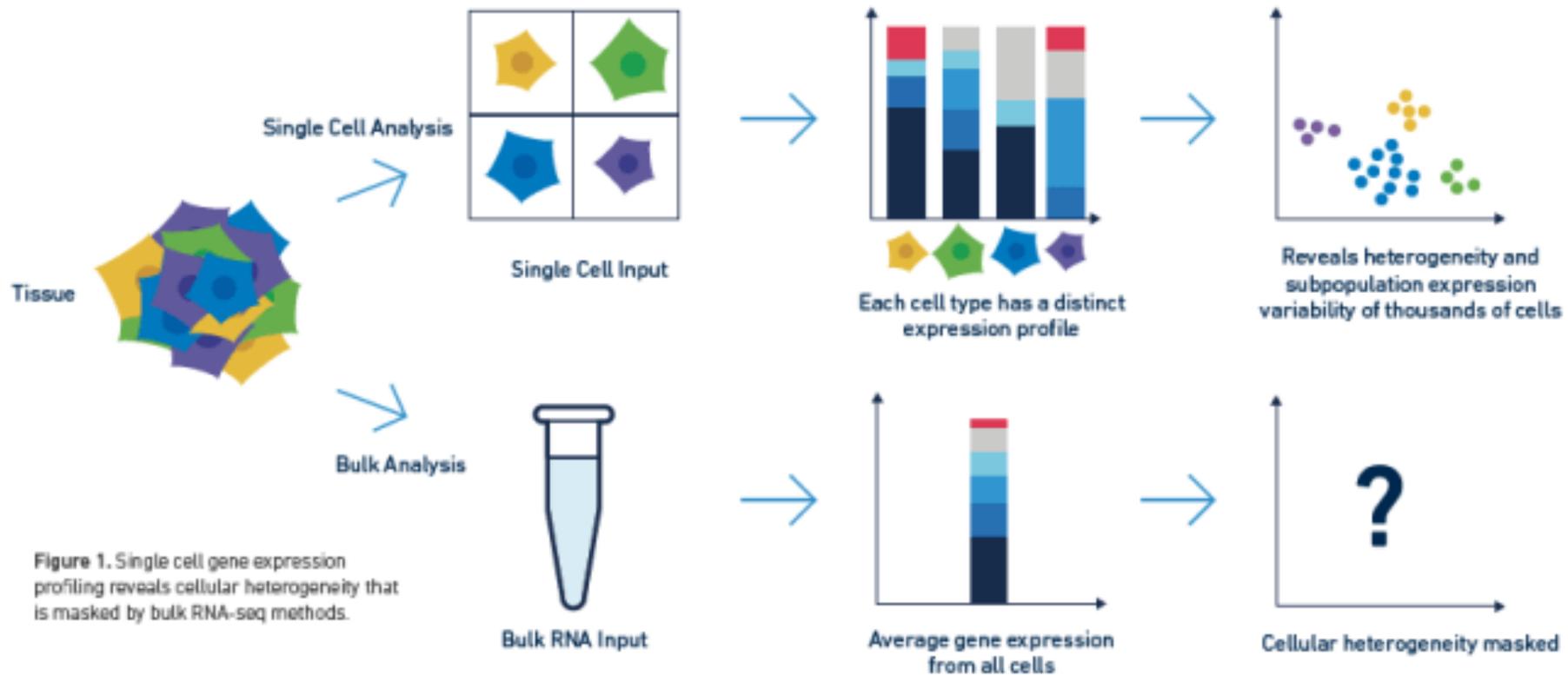
➤ シングルセルで研究する利点

□ 不均一な細胞集団の解析が可能



➤ シングルセルで研究する利点

□ 出力結果が平均化されない



➤ シングルセルmRNA解析から得られる情報

- 細胞集団の分類
- 細胞種の同定
- マーカー遺伝子の推定
- 疑似時間軸解析 (Pseudo-time analysis)
- 希少細胞の発見
- 空間的位置の予測

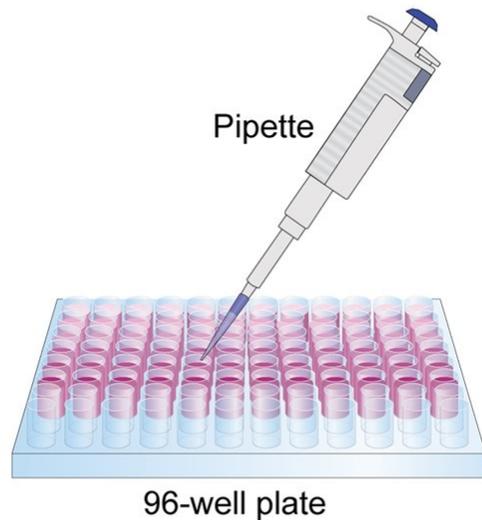
水産生物 (非モデル生物) で
知りたい情報ばかり！！

→ある程度のオーダーの細胞数が必要 (数千以上が望ましい)

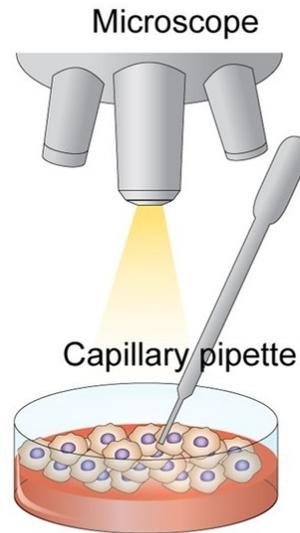
➤ シングルセルmRNA解析の従来手法

□ 従来手法の概要と欠点

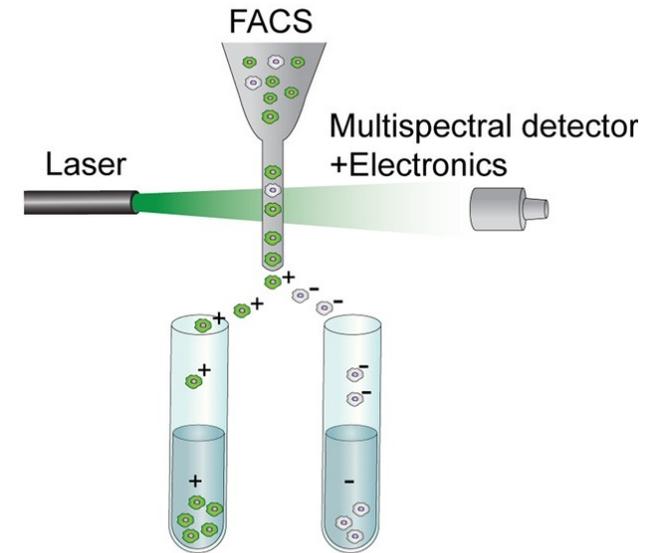
限界希釈法



キャピラリー分注



セルソーターの活用



利点

安価

安価・形態情報の取得

形態・タンパク質情報の取得・自動化

欠点

スループット

スループット

装置のコスト・スループット

➤ マイクロ流路型シングルセルmRNA解析の登場

□ Drop-seqの発表

Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets

Evan Z. Macosko,^{1,2,3,*} Anindita Basu,^{4,5} Rahul Satija,^{4,6,7} James Nemesh,^{1,2,3} Karthik Shekhar,⁴ Melissa Goldman,^{1,2} Itay Tirosh,⁴ Allison R. Bialas,⁸ Nolan Kamitaki,^{1,2,3} Emily M. Martersteck,⁹ John J. Trombetta,⁴ David A. Weitz,^{5,10} Joshua R. Sanes,⁹ Alex K. Shalek,^{4,11,12} Aviv Regev,^{4,13,14} and Steven A. McCarroll^{1,2,3,*}

¹Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

²Stanley Center for Psychiatric Research, Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA 02142, USA

³Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA 02142, USA

⁴Klarman Cell Observatory, Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA 02142, USA

⁵School of Engineering and Applied Sciences, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

⁶New York Genome Center, New York, NY 10013, USA

⁷Department of Biology, New York University, New York, NY 10003, USA

⁸The Program in Cellular and Molecular Medicine, Children's Hospital Boston, Boston, MA 02115, USA

⁹Department of Molecular and Cellular Biology and Center for Brain Science, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

¹⁰Department of Physics, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

¹¹Ragon Institute of MGH, MIT, and Harvard, Cambridge, MA 02139, USA

¹²Institute for Medical Engineering and Science and Department of Chemistry, MIT, Cambridge, MA 02139, USA

¹³Department of Biology, MIT, Cambridge, MA 02139, USA

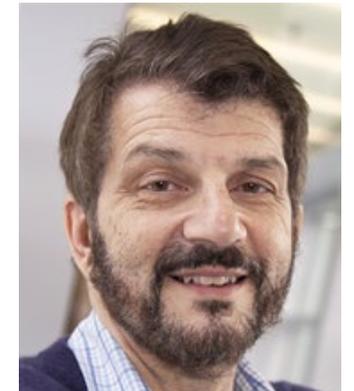
¹⁴Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD 20815, USA

*Correspondence: emacosko@genetics.med.harvard.edu (E.Z.M.), mccarroll@genetics.med.harvard.edu (S.A.M.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002>



Evan Z. Macosko



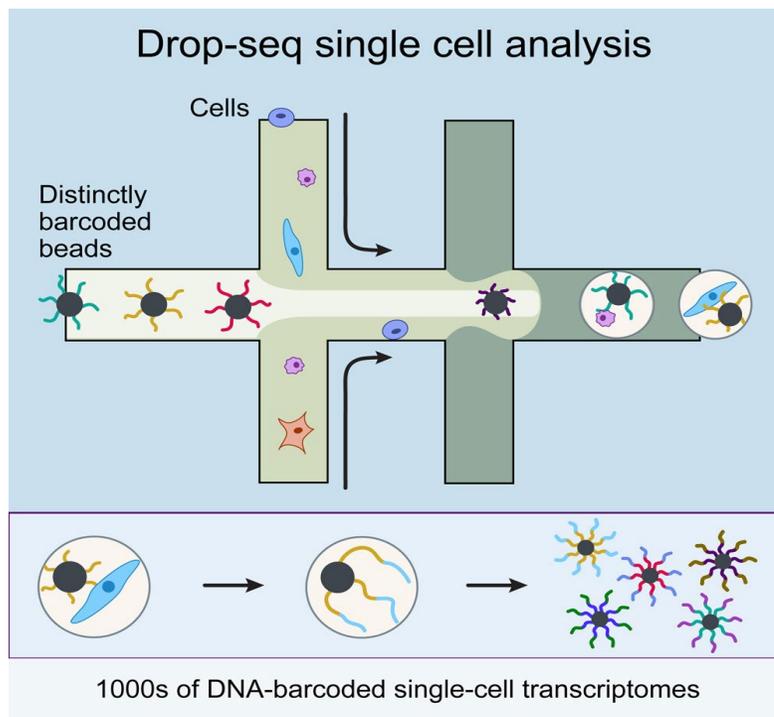
David A. Weitz



Steve McCarroll

➤ Drop-seqの概要

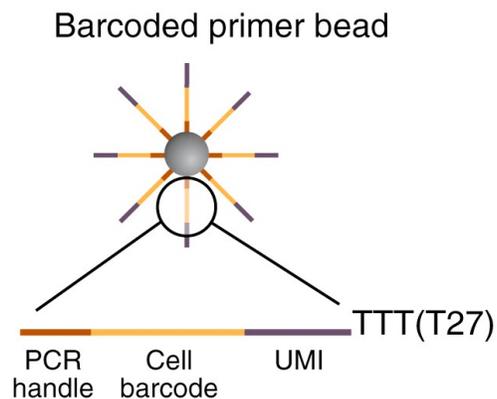
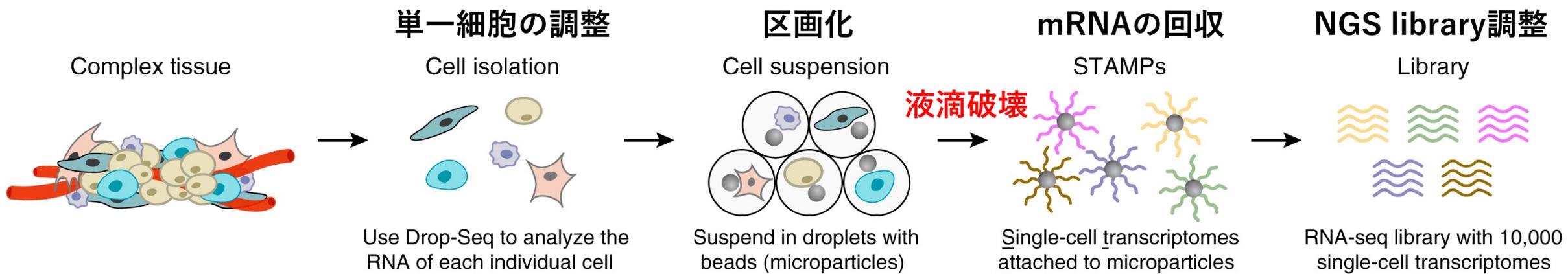
□ Drop-seqはシングルセルmRNA解析を並列化した



- マイクロ流路内で，細胞が**受動的に**区画化される。
- Drop-seqはDNAバーコードビーズと単一細胞を**ナノリットルの液滴**にカプセル化できる。
- Drop-seqは単一細胞のRNA-seqの**並列化**を可能にした。
- この論文では，44,808細胞のmRNAを分析し，網膜の39種類の細胞集団を同定した。

➤ Drop-seqの概要

□ 区画された中で，細胞由来のmRNAがビーズに結合



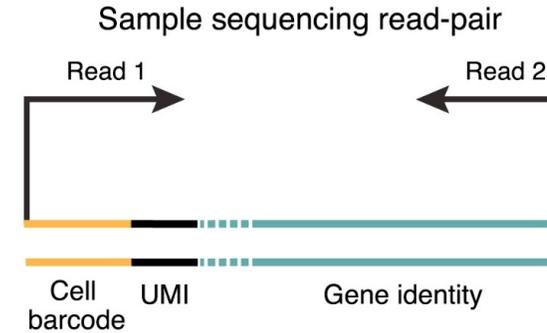
このビーズを使用することが本研究の肝

- **各ビーズに特異的な配列**が付与されている。
= 1細胞由来の解析が可能
- **mRNAハイブリ部分に多様な配列**が付与されている。
= mRNA発現の数値化が可能

▶ バーコードビーズの概要

- ライブラリーのシーケンシング
- シングルセルデータの解析

クラスターの両端を読む



各ビーズに特異的な配列

mRNAハイブリ部分に多様な配列



```

AAATTATGACGAAGTTGCTTG.....GACTGCAC
CGTTAGATGGCAGGGCCGGG.....CTCATAGT
GACCTACGAGTTAGTTTGT.....GCTCATAA
GTTAAACGTACCTAGCTGT.....GATTTTCT
ACGTCACCTTTGTGGGGT.....ATAAGCTC
TTGCCGTGGTGTATGGAGG.....CCAGCACC
AGTCCATGTGCGGCAGGTTT.....GTTGGCGT
AAATTATGACGAAGTTTGT.....AGATGGGG
CCAAAGATGCTCTAGGCT.....GGGGACGA
GTTAAACGTACCAAGGCTTG.....CAAAGTTC
TTTTTGACCAAGTCGTGAGGG.....TTCCAAGG
ACTGTCCATGCCCTGTGTA.....TGGTACGT
CGTAAACAATAATCCGGTG.....TTAAACCG
.....
.....
.....
    
```

(Hundreds of millions of reads)

cDNA alignment to genome and group results by cell

```

Cell 1 { TTGCCGTGGTGTGGCCGGG.....CGGTGTTA } DDX51
        { TTGCCGTGGTGTATGGAGG.....CCAGCACC } NOP2
        { TTGCCGTGGTGTCTCAAGT.....AAAATGGC } ACTB
        { ..... }
Cell 2 { CGTTAGATGGCAGGGCCGGG.....CTCATAGT } LBR
        { CGTTAGATGGCAACGTTATA.....ACGCGTAC } ODF2
        { CGTTAGATGGCATCGAGATT.....AGCCCTTT } HIF1A
        { ..... }
Cell 3 { AAATTATGACGAAGTTTGT.....GGGAATTA } ACTB
        { AAATTATGACGAAGTTTGT.....AGATGGGG }
        { AAATTATGACGATGTGCTTG.....GACTGCAC } RPS15
        { ..... }
Cell 4 { GTTAAACGTACCTAGCTGT.....GATTTTCT } GTPBP4
        { GTTAAACGTACCGCAAGT.....GTTGGCGT } GAPDH
        { GTTAAACGTACCAAGGCTTG.....CAAAGTTC } ARL1
        { GTTAAACGTACCTCCGGTC.....TCCAGTCG }
        { ..... }
        { ..... }
        { ..... }
    
```

(Thousands of cells)

細胞数 × 遺伝子数の行列

Count unique UMIs for each gene in each cell

	Cell: 1	2	...	N
GENE 1	1	2		14
GENE 2	4	27		8
GENE 3	0	0		1
⋮	⋮	⋮		⋮
GENE M	6	2		0

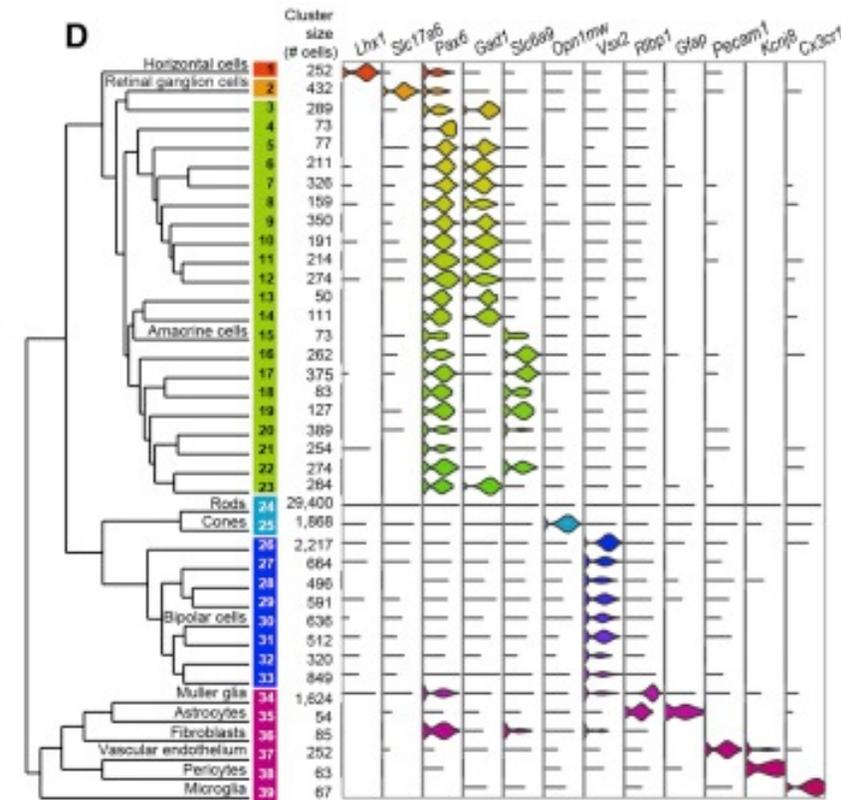
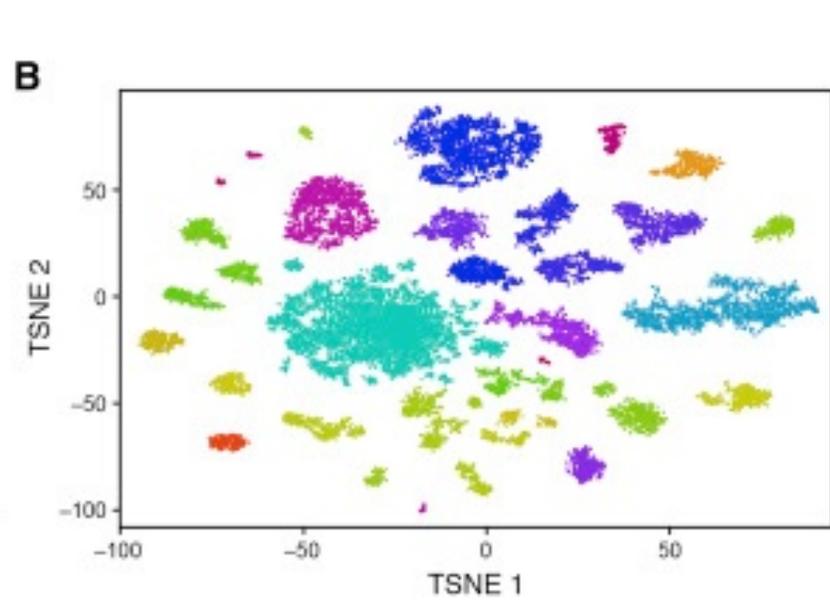
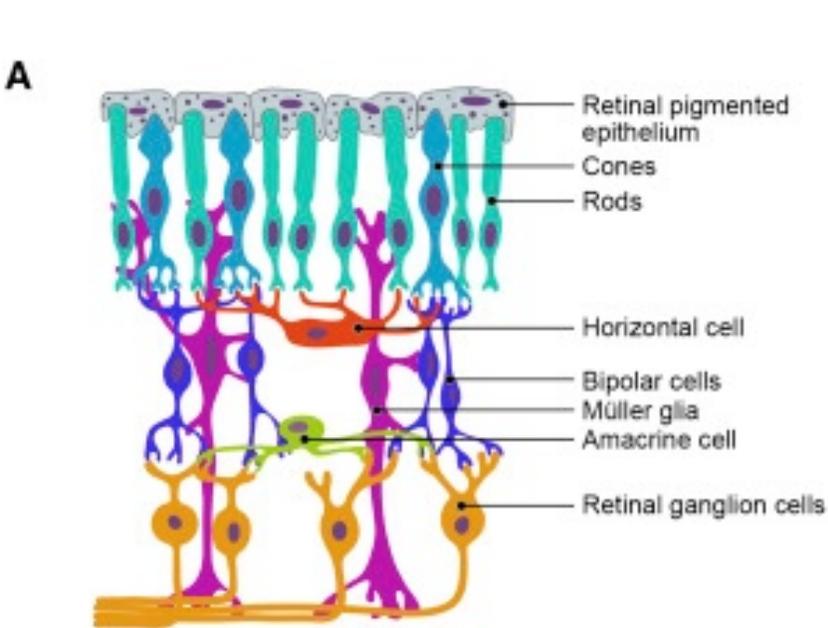
Create digital expression matrix

➤ Drop-seqの結果

マウス網膜の細胞群

1細胞解析により分類された細胞クラスター

各クラスターのマーカー



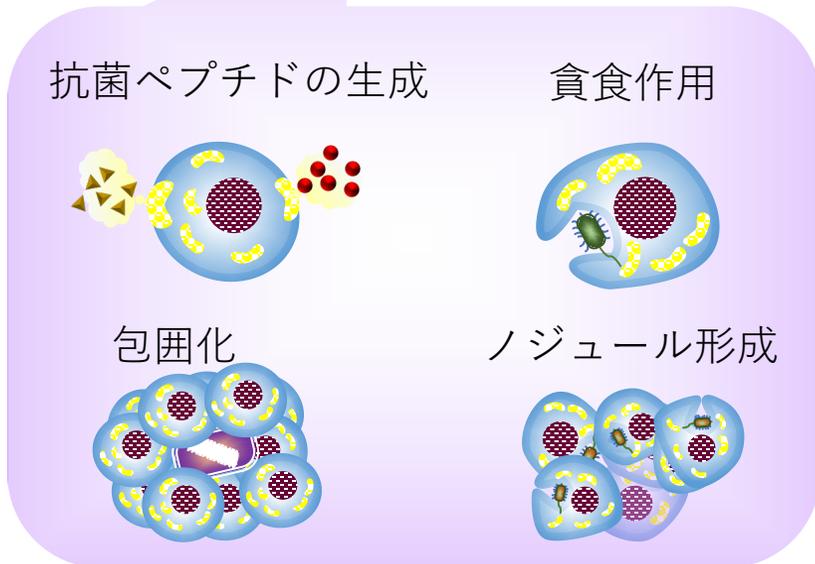
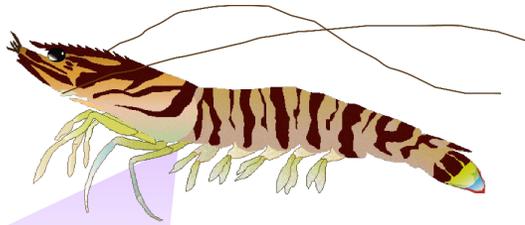
(Macosko et al., *Cell*, 2015)

→私の研究対象 (クルマエビ) に適用できないか？

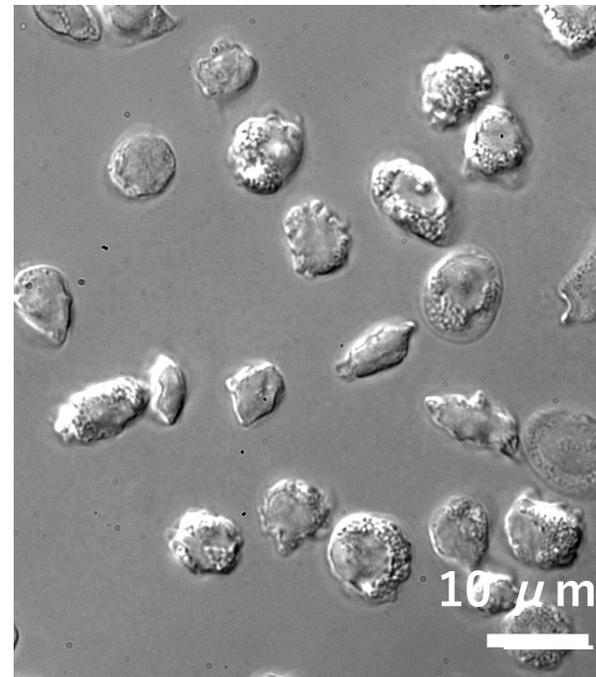
➤ クルマエビへの適用

□ なぜクルマエビを研究しているか？

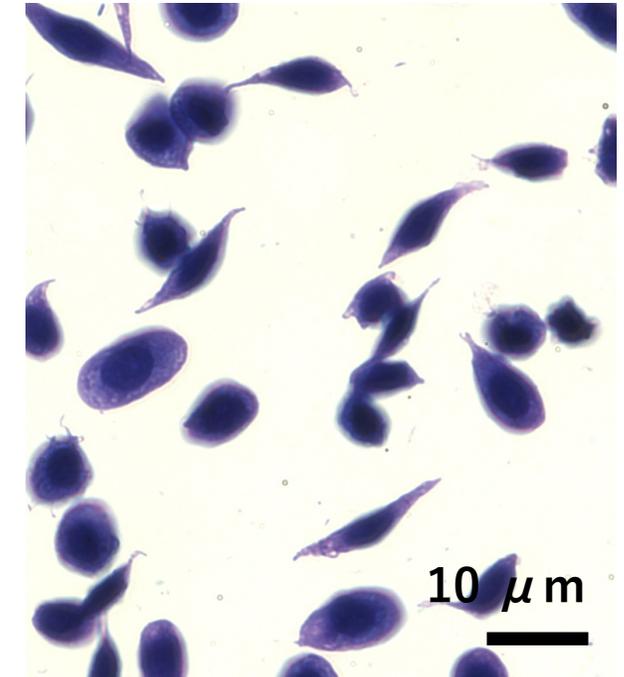
養殖が盛んなクルマエビ類だが，感染症の報告も多い。
クルマエビ類を病原菌から防除するためには，免疫システムを研究する必要がある。



微分干渉顕微鏡撮影像



MGG染色像



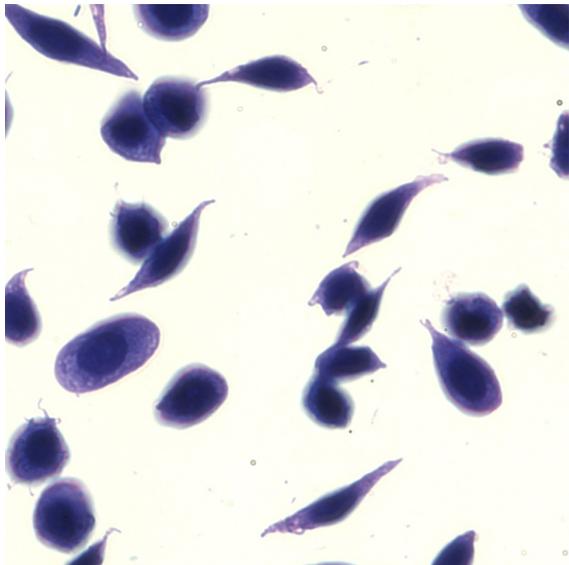
➤ クルマエビ免疫細胞の分類

□ なぜクルマエビを研究しているか？

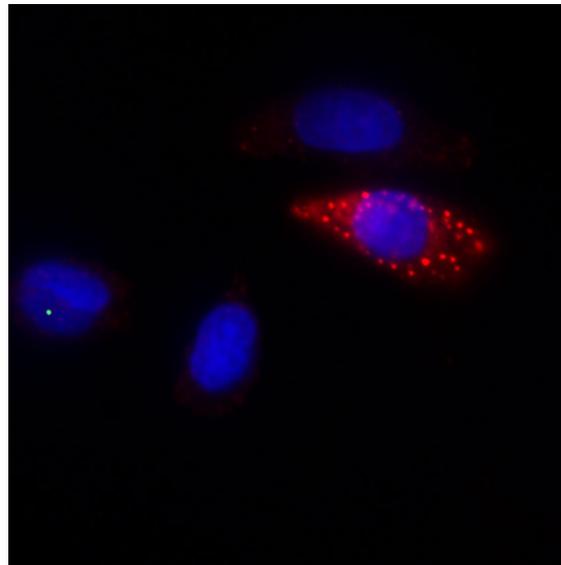
免疫担当細胞である血リンパ中の血球細胞の分類体系が確立されていない。

色素染色やポリクローナル抗体，レクチンによる分類手法の報告もあるが，客観性が乏しく細胞機能との比較も少ない。

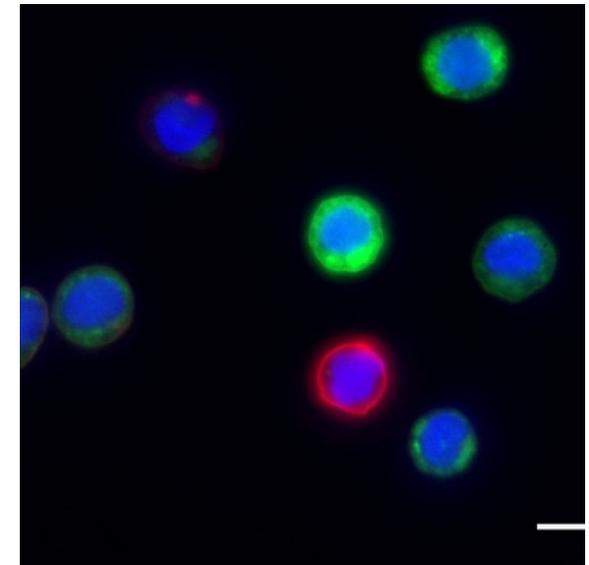
色素染色



ポリクローナル抗体

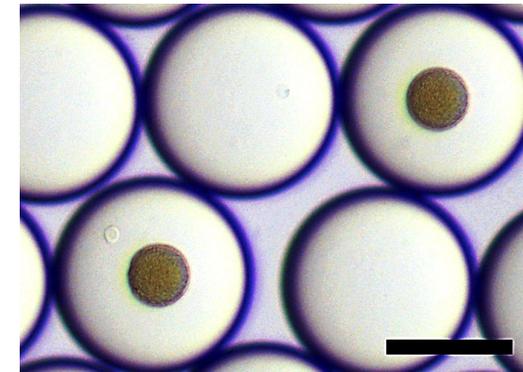


レクチン

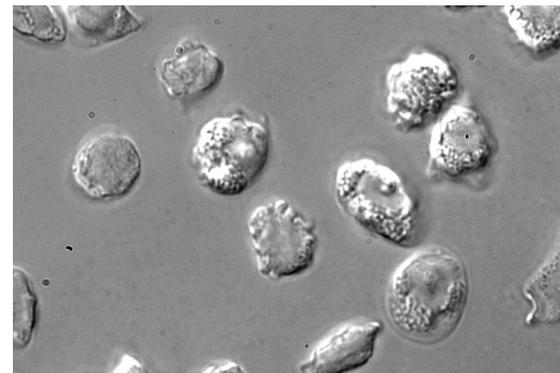


➤ Drop-seq適用への課題

1. 流路の調製



2. 単一細胞の調整



```
Welcome to Ubuntu 20.04.2 LTS (GNU/Linux 5.10.43.3-microsoft-standard-WSL2 x86_64)

* Documentation:  https://help.ubuntu.com
* Management:    https://landscape.canonical.com
* Support:       https://ubuntu.com/advantage

System information as of Sun Sep  5 15:13:01 JST 2021

System load:  0.24      Processes:            8
Usage of /:   0.6% of 250.98GB  Users logged in:    0
Memory usage: 1%      IPv4 address for eth0: 192.168.68.116
Swap usage:   0%

0 updates can be applied immediately.

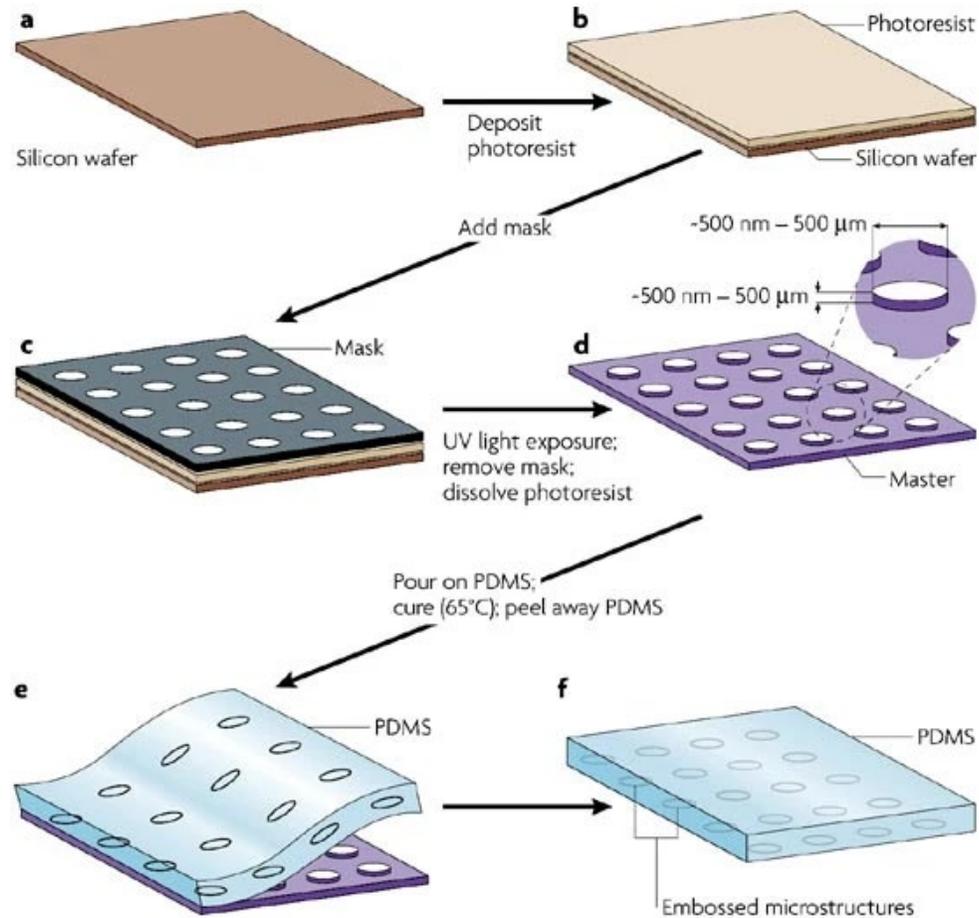
The list of available updates is more than a week old.
To check for new updates run: sudo apt update

This message is shown once a day. To disable it please create the
/home/koimai/.hushlogin file.
(base) koimai@KOIMAI-AHS:~$
```

3. バイオインフォ解析

➤ マイクロ流路の作製

□ 設備さえあれば意外と簡単につくれます。



(Weibel et al., *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007)

2inch ウェハ



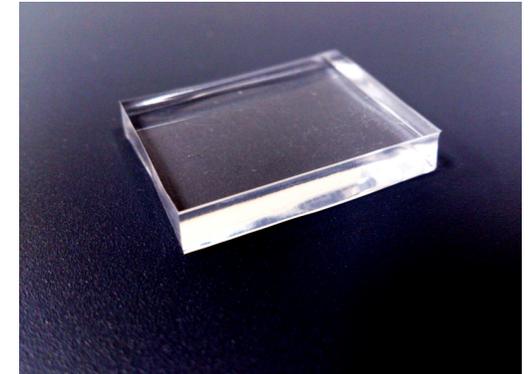
PDMSの調整



成型



流路の完成



➤ マイクロ流路運用に必要な設備

実際に使用している流路用設備

制御用PC

流路観察用
倒立顕微鏡



ビーズ混合用
ボルテックス

送液用
圧力ポンプ

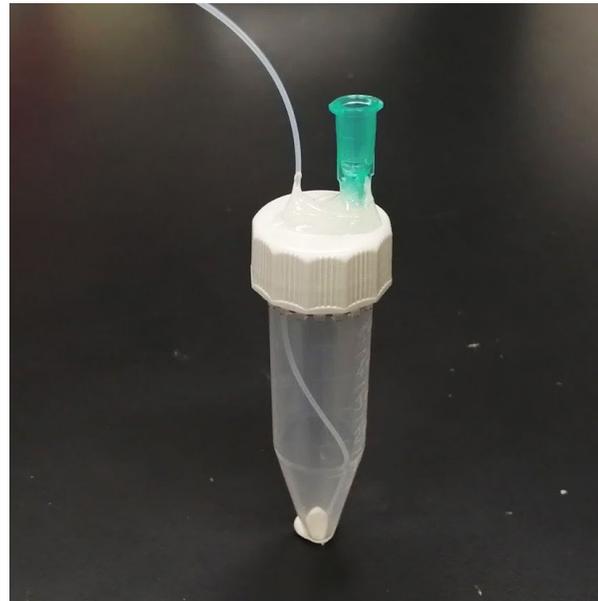
➤ 研究費の節約工夫

- 安価なディスポーザブル送液ボトルの作製
- 条件検討用ビーズ (Drop-seqで使用されているビーズの担体)

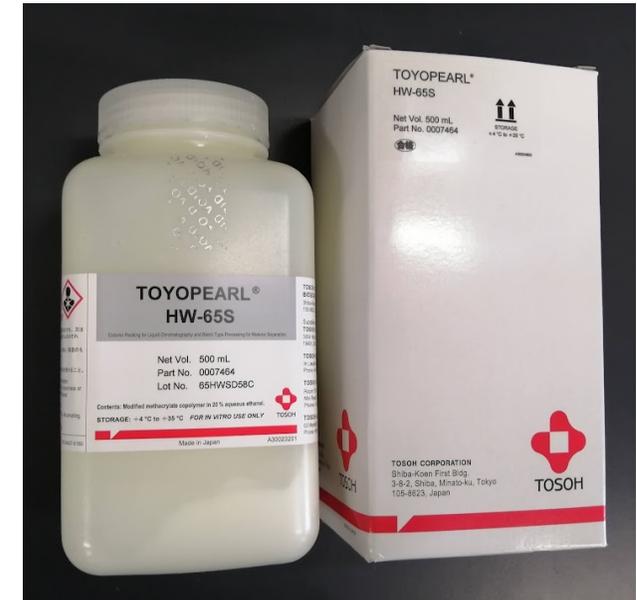
細胞やビーズの送液に



オイルの送液に



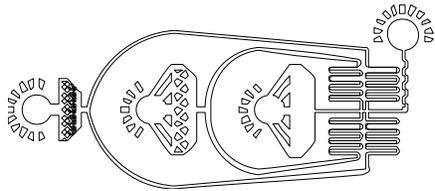
粒子の径が同じ



➤ Drop-seq実際の送液時の様子と生成される液滴

□ 細胞とビーズ液の調整から，ビーズの回収までは1時間で終了

流路のデザイン

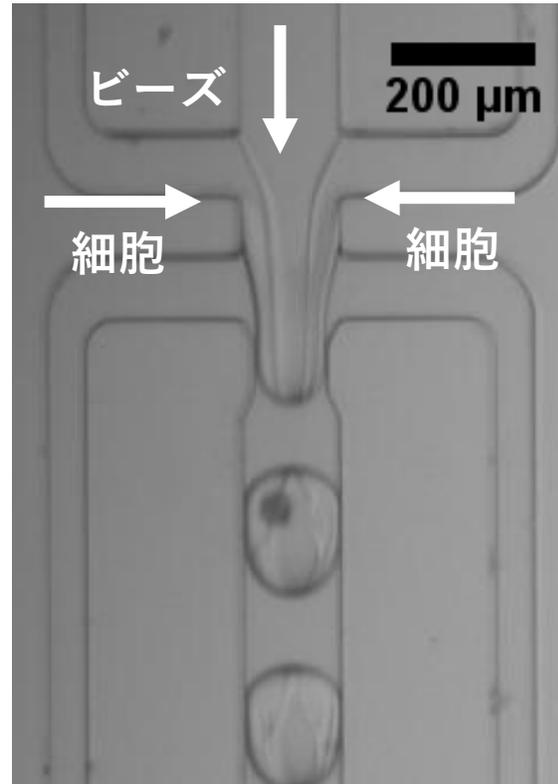


(Macosko et al., *Cell*, 2015)

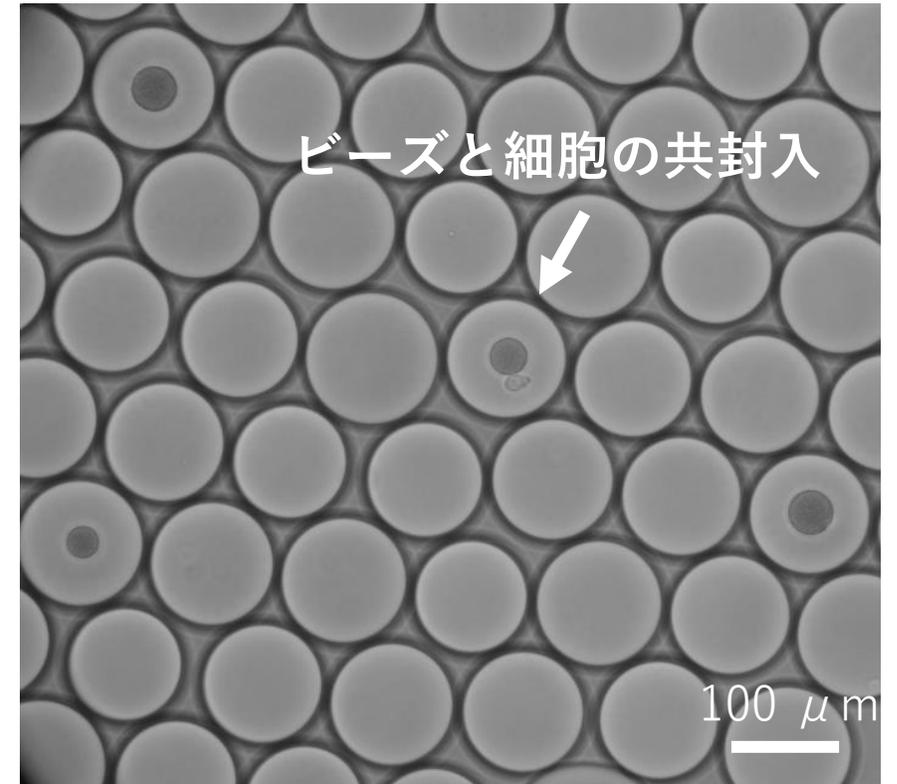
作製した流路



送液の様子



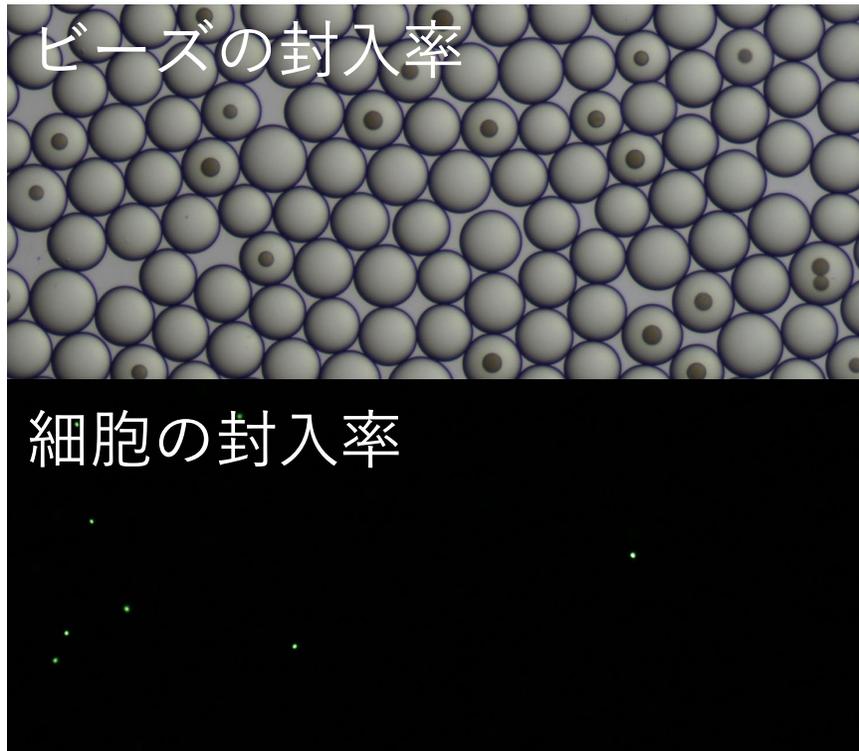
作製された液滴



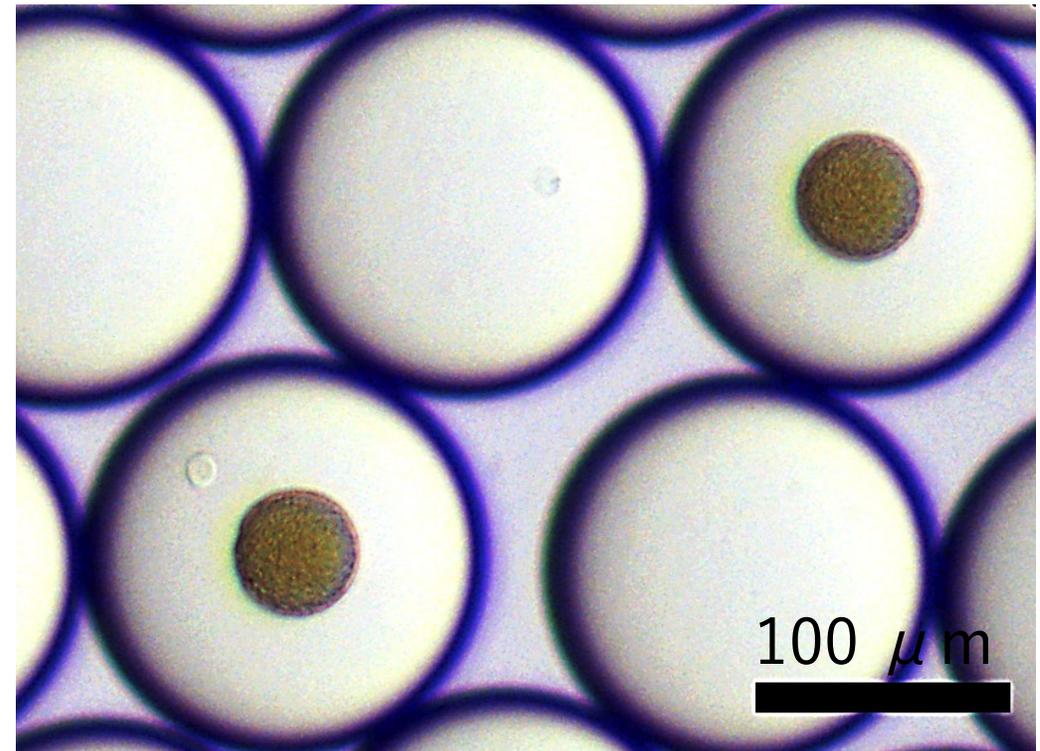
➤ Drop-seqを運用するうえでの検討事項

□ 送液条件の検討

封入率の計算



液滴サイズの計測



➤ Drop-seqを運用するうえでの検討事項

□ 1回のRunで何細胞の解析が可能か？

液滴の直径は125 μm , 球体の体積は $\frac{4}{3} \pi r^3 = 1 \text{ nL}$

1 mLの液滴を作製すると, $1 \text{ mL} \div 1 \text{ nL} = 1,000,000$

封入率の計算: 5% (細胞) \times 5% (ビーズ) = 0.25%の液滴が細胞とビーズを封入している.

1 mLの液滴から $1,000,000 \times 0.0025 = 2,500$ 個の細胞の情報を得られる可能性がある.

cDNA合成過程で6割のビーズが遠心操作などにより消失するため,
1回の液滴生成操作により, 1,000細胞のライブラリーを作製可能である.

➤ Drop-seqを運用するうえでの検討事項

□ ライブラリー構築

実際には，1 mL x 2本分回収し，1サンプルから2,000細胞以上解析している。

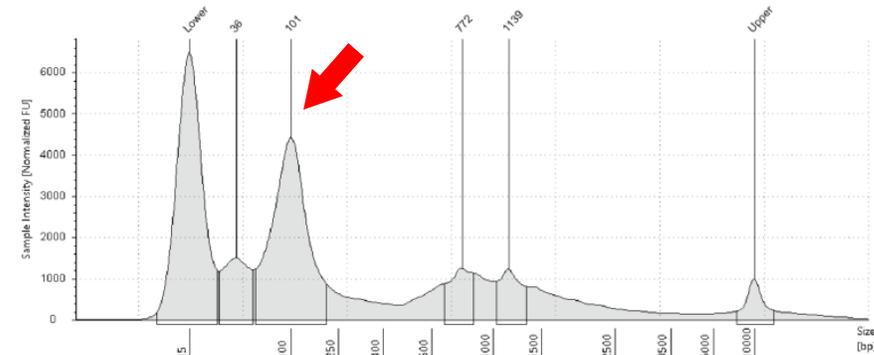
a. ビーズ上でのcDNA合成

b. ビーズ上の余剰オリゴのExo I処理

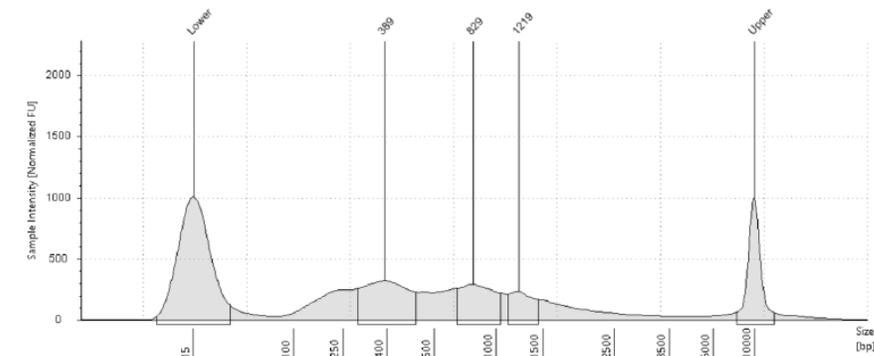
c. PCR反応

d. タグメンテーション

PCR反応産物の
AMPure精製 (1回目)



PCR反応産物の
AMPure精製 (2回目)



➤ シークエンシングの実際

□ シークエンシングの深度計算

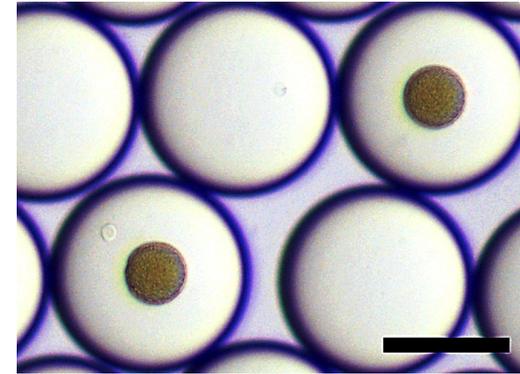
- カスタムプライマーでのシークエンシングなので、相乗りは不可
- 経験的に50,000-100,000 reads/cellは欲しい (特に初めてのサンプル)
- Miseqの場合
 $25,000,000 \div 50,000-100,000 = 250-500$ cells/run
- NextSeqの場合
 $400,000,000 \div 50,000-100,000 = 4,000-8,000$ cells/run
- 希少な細胞グループ (数%) があると仮定すると、数百の細胞スケールでは不十分

➤ Drop-seq適用への課題

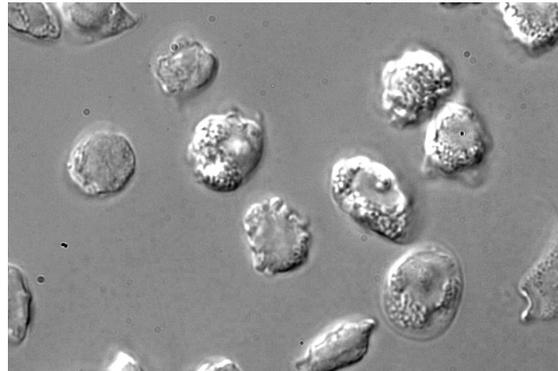
✓ 1. 流路の調製



✓ 2. 単一細胞の調整



✓ 3. バイオインフォ解析



```
Welcome to Ubuntu 20.04.2 LTS (GNU/Linux 5.10.43.3-microsoft-standard-WSL2 x86_64)

+ Documentation: https://help.ubuntu.com
+ Management:   https://landscape.canonical.com
+ Support:      https://ubuntu.com/advantage

System information as of Sun Sep  5 15:13:01 JST 2021

System load:  0.24          Processes:      8
Usage of /:   8.6% of 250.98GB  Users logged in:  0
Memory usage: 1%           IPv4 address for eth0: 192.168.68.116
Swap usage:   0%

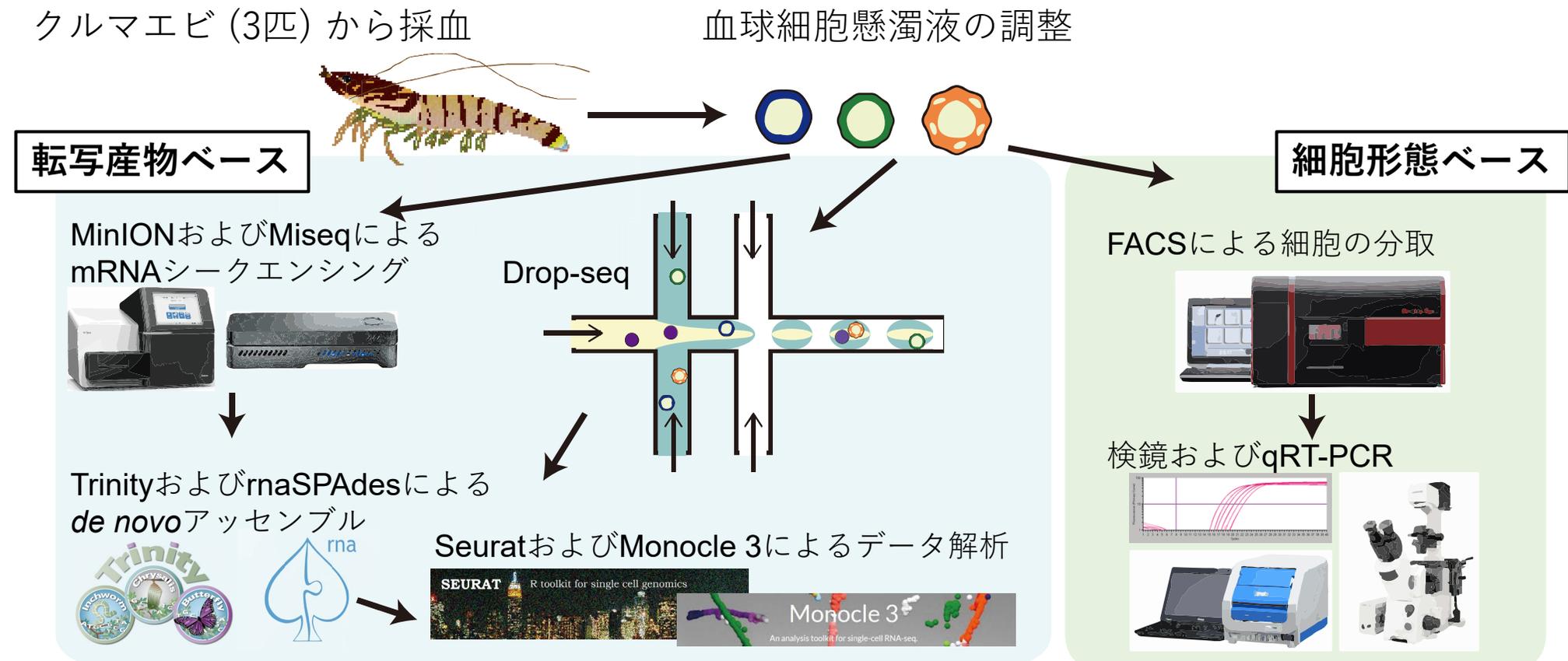
0 updates can be applied immediately.

The list of available updates is more than a week old.
To check for new updates run: sudo apt update

This message is shown once a day. To disable it please create the
/home/koiwai/.hushlogin file.
(base) koiwai@KOIWAI-AHS:~$
```

▶ クルマエビでの実際の結果

□ 概要



➤ バイオインフォの実際

- 得られたリード数
shrimp1: 284,925,008 reads
shrimp2: 241,540,942 reads
shrimp3: 294,330,840 reads
- mapping時のリード数 (Quality-trimming後)
shrimp1: 132,001,633 reads
shrimp2: 106,395,757 reads
shrimp3: 132,001,633 reads
- 解析時のPCのスペックなど
CPU: AMD Ryzen 5 2600, 6 Cores 12 Threads
RAM: 32 GB
WSL2上のubuntuで解析



```
Welcome to Ubuntu 20.04.2 LTS (GNU/Linux 5.10.43.3-microsoft-standard-WSL2 x86_64)

* Documentation:  https://help.ubuntu.com
* Management:    https://landscape.canonical.com
* Support:       https://ubuntu.com/advantage

System information as of Sun Sep  5 15:13:01 JST 2021

System load:  0.24          Processes:            8
Usage of /:   8.6% of 250.98GB  Users logged in:    0
Memory usage: 1%           IPv4 address for eth0: 192.168.68.116
Swap usage:   0%

0 updates can be applied immediately.

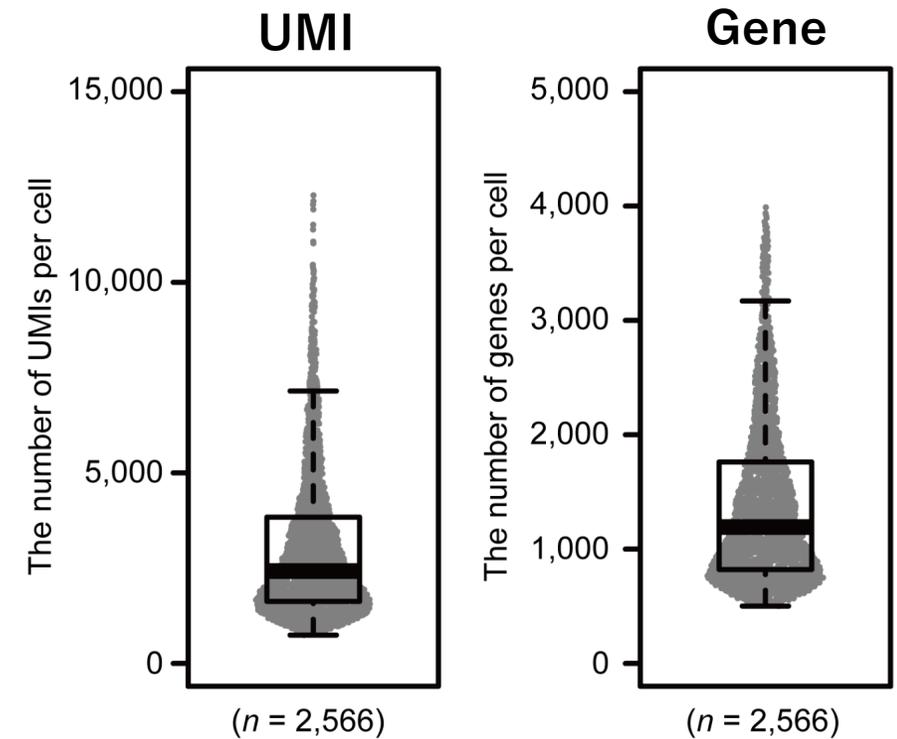
The list of available updates is more than a week old.
To check for new updates run: sudo apt update

This message is shown once a day. To disable it please create the
/home/koiwai/.hushlogin file.
(base) koiwai@KOIWAH-AH5:~$ |
```

➤ クルマエビでの実際の結果

□ 解析した細胞の数と検出遺伝子数など

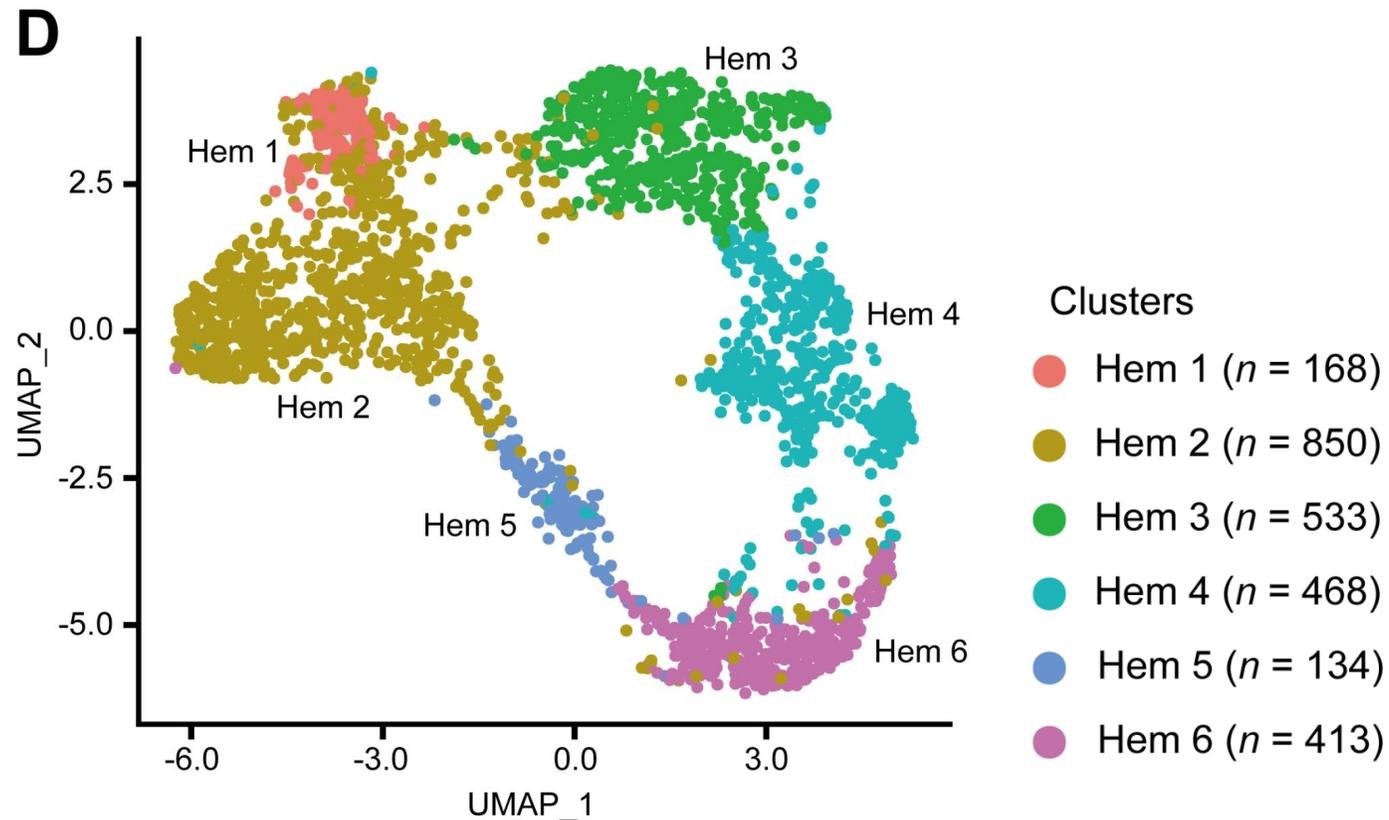
- 細胞数 : 2,566 細胞の解析に成功
- Mapping率 : 得られたトランスクリプトームの *de novo* assembled配列へのmapping率は50%強
- 検出されたUMI数 : 2,427 UMIs/cell
- 検出されたGene数 : 1,193 Genes/cell
- 結果としてUMI x 細胞数 ÷ 400,000,000 = 1.6 %



➤ クルマエビでの実際の結果

□ クラスタリング結果

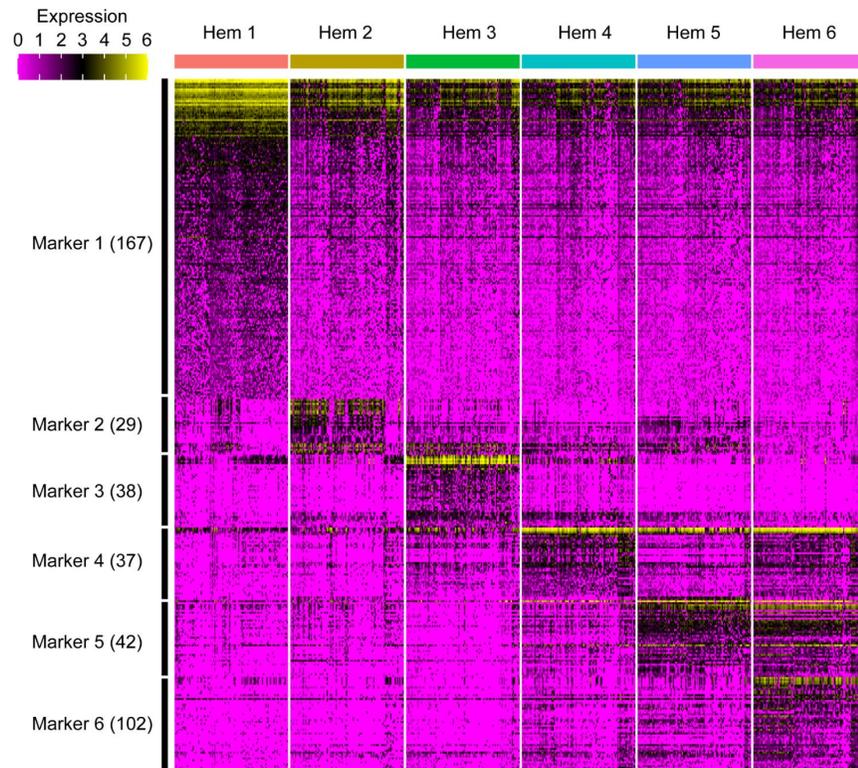
転写産物ベースで血球細胞は6つのクラスターに分類された。



➤ クルマエビでの実際の結果

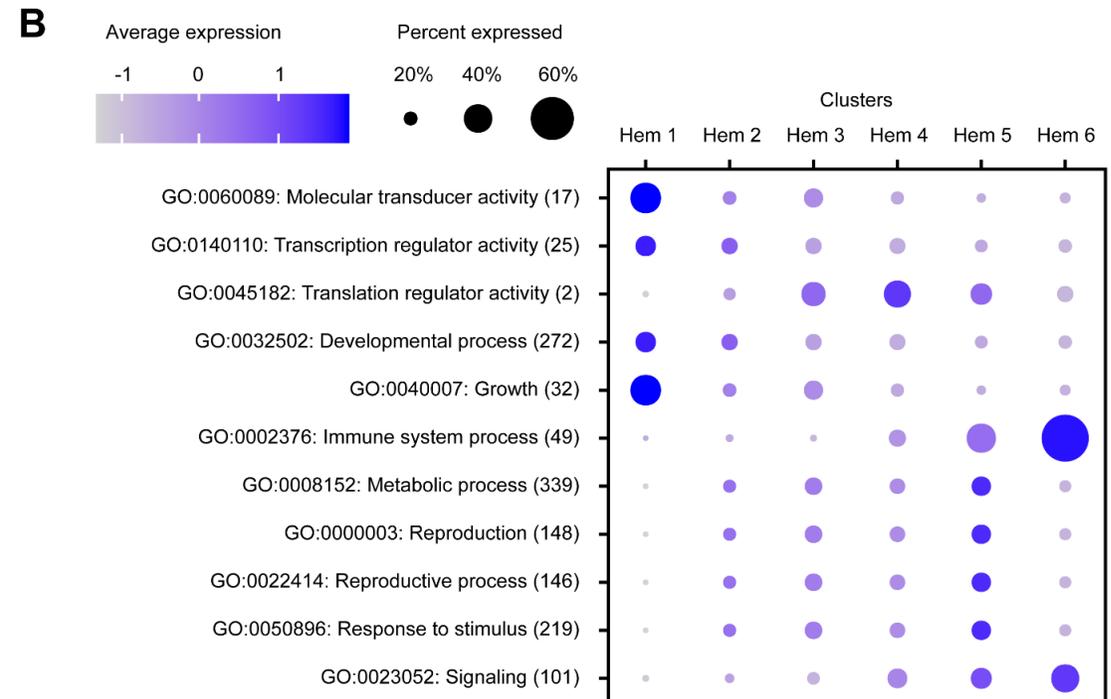
□ 予測マーカー遺伝子

各クラスターのマーカー遺伝子が予測可能



□ GO解析

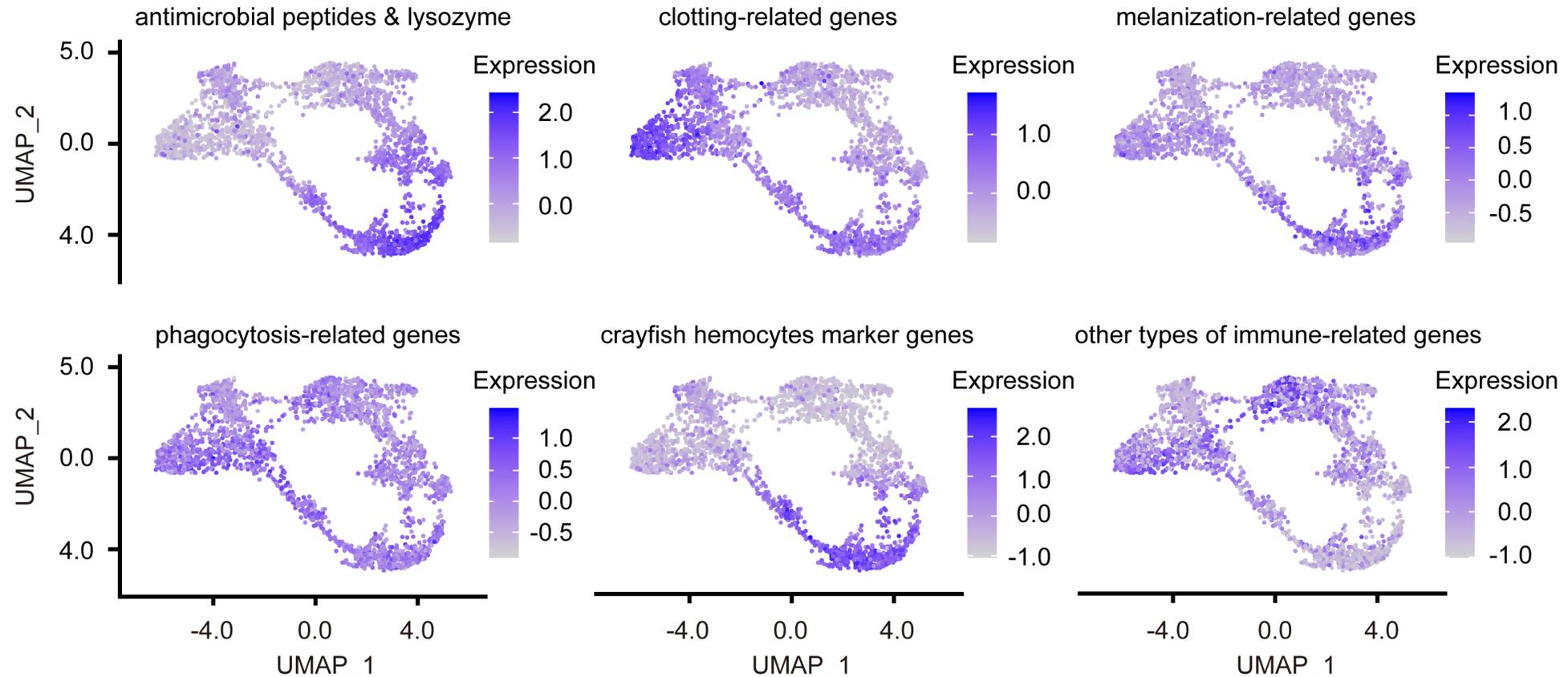
各クラスターでのGO解析も可能



➤ クルマエビでの実際の結果

□ 特定遺伝子の1細胞レベルでの発現解析

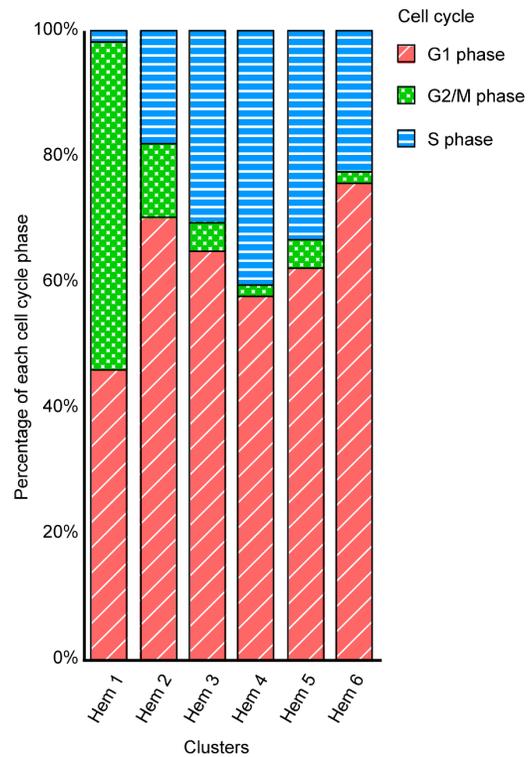
免疫関連遺伝子の細胞毎の発現解析が可能



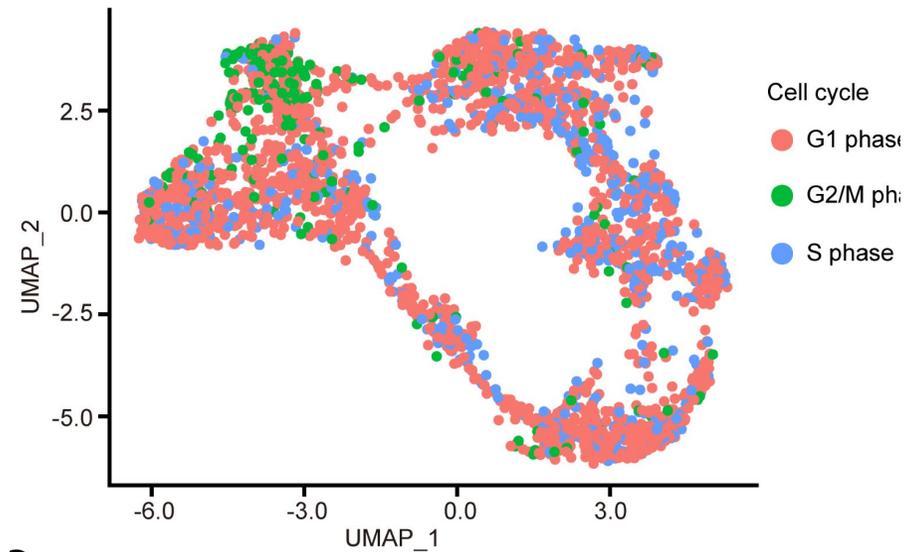
➤ クルマエビでの実際の結果

□ 分化経路予測

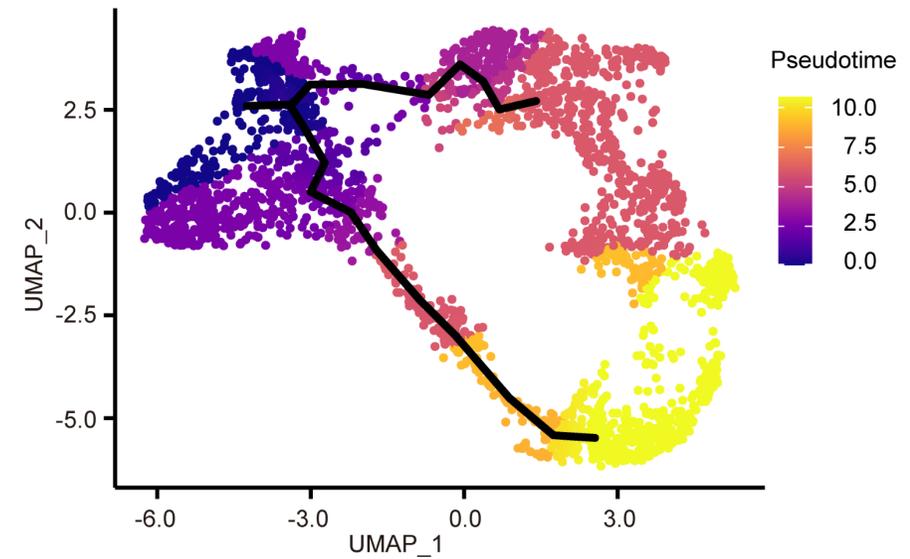
クラスターごとの細胞状態



クラスターごとの細胞状態

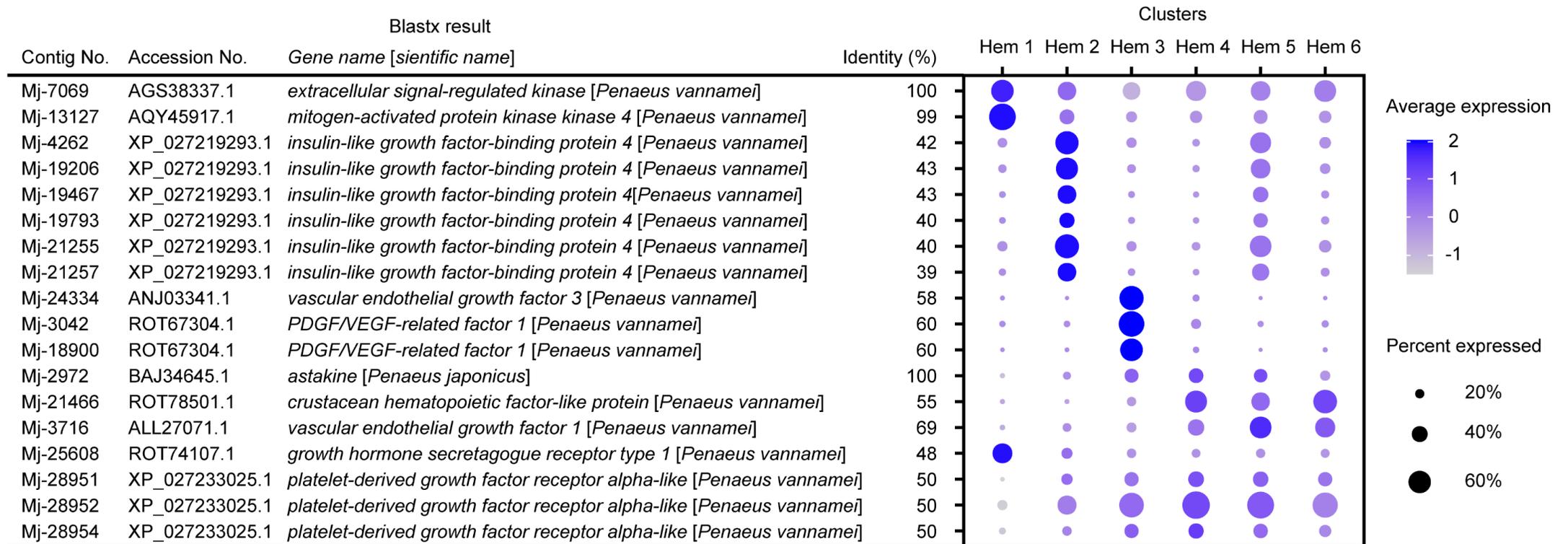


予測された分化経路



➤ 各クラスターへの分化に関連している遺伝子

□ 細胞の成長・分化に関連する遺伝子の発現



➤ 本結果を受けて今後実施できそうな研究

- 造血組織/他の組織中の血球細胞との比較
- 病原体感染時の挙動
- マーカー分子に対する抗体作製
- 分化因子の機能アッセイ
- ゲノム情報を利用したより正確な分類・分化経路推定

→研究の(強力な)イントロダクションになりそう…?

➤ 他非モデル生物との比較

Species	Paper	Tissue	Technique	Cells	Genes	UMIs	Mapping ratio
ショウジョウバエ	Tattikota et al., <i>eLife</i> , 2020	Hemocytes	inDrop 10X Chromium Drop-seq	19,458	1,010	2,883	N/A?
卵生メダカ	Ayana et al., <i>bioRxiv</i> , 2021	Brain	10X Chromium	2,923	531	1,000?	69% (49%)
タイセイヨウダラ	Guslund et al., <i>Front. Immunol.</i> , 2020	Immune cells	Drop-seq	8,180	409	884	61%
ホタテガイ	Sun et al., <i>Genomics</i> , 2021	Muscles	10X Chromium	10,889 3,833	230 650	N/A?	95% 85%
ナメクジウ	Satoh et al., <i>Front. Cell Dev. Biol.</i> , 2021	Embryonic cells	10X Chromium	14,016	N/A?	N/A?	N/A?
クルマエビ	Koiwai et al., <i>eLife</i> , 2021	Hemocytes	Drop-seq	2,566	1,193	2,427	50%

➤ Drop-seqのメリット・デメリット

□ メリット

- mRNAをターゲットにするため、
どんな真核生物にも適用可能
- 数千-数万規模の細胞を一度に解析可能
- 分化経路が予測可能
- 比較的安価
- カスタム性が高い

□ デメリット

- 細胞の形態情報が消失
- 細胞の位置情報が消失
- オペレーターの必要性
- ポンプなどの必要性
- 応用性が乏しい

➤ 想定されるコストや機器

□ 流路系統

- 流路 数万円以下
- 3系統圧力ポンプ 80-250万円

□ 消耗品

- バーコードビーズ 80万円
- 逆転写プライマー 1万円
- 逆転写酵素など 8万円 (複数回使用可能)
- ライブラリー作製キット (Nextera XT) 15万円
- AMPure/Sera-Magビーズ 15万円
- シークエンシング費用 30万円

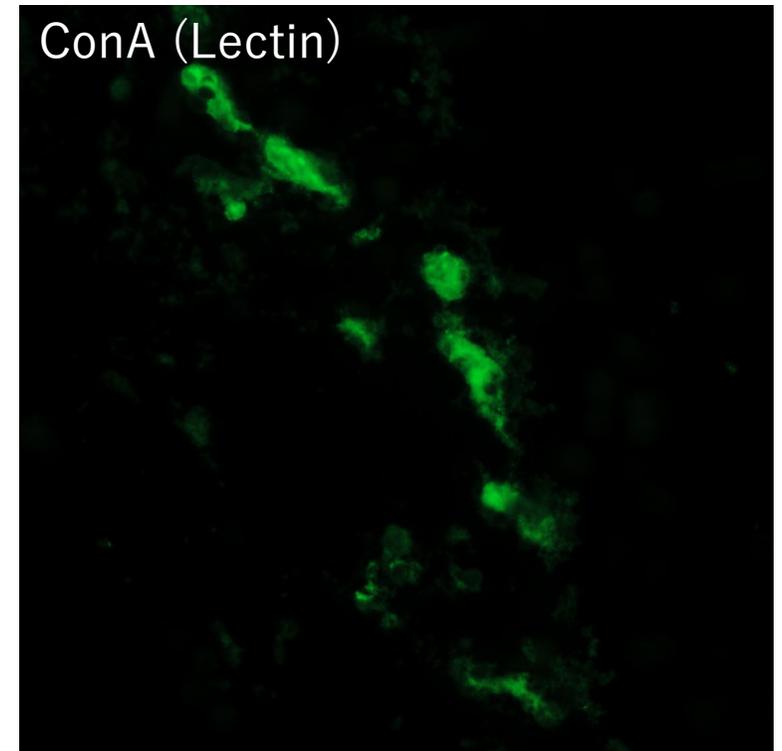
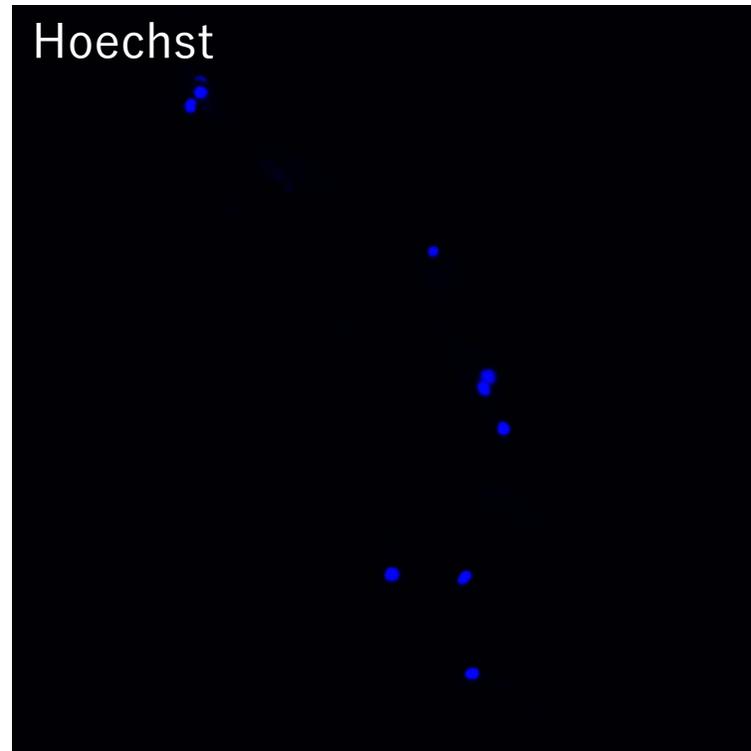
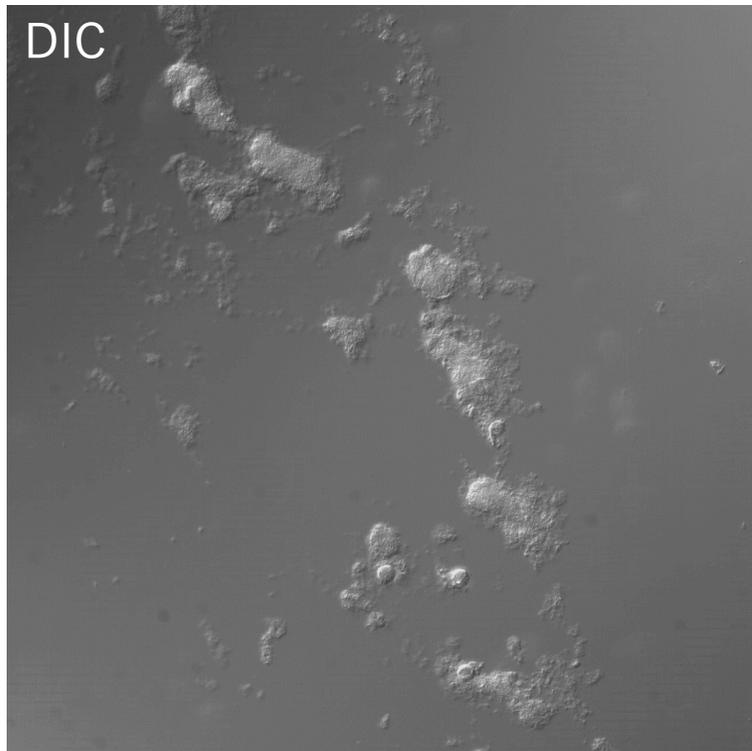
合計

150万円前後

➤ 組織を構成する細胞への課題

□ 組織の単細胞への分離 (García-Castro et al., *Genome Biol.*, 2021)

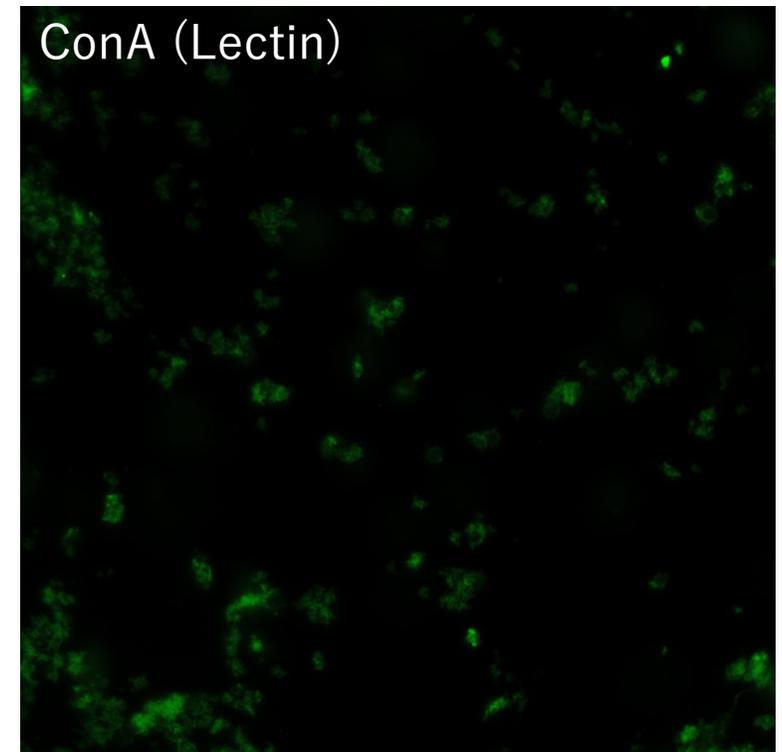
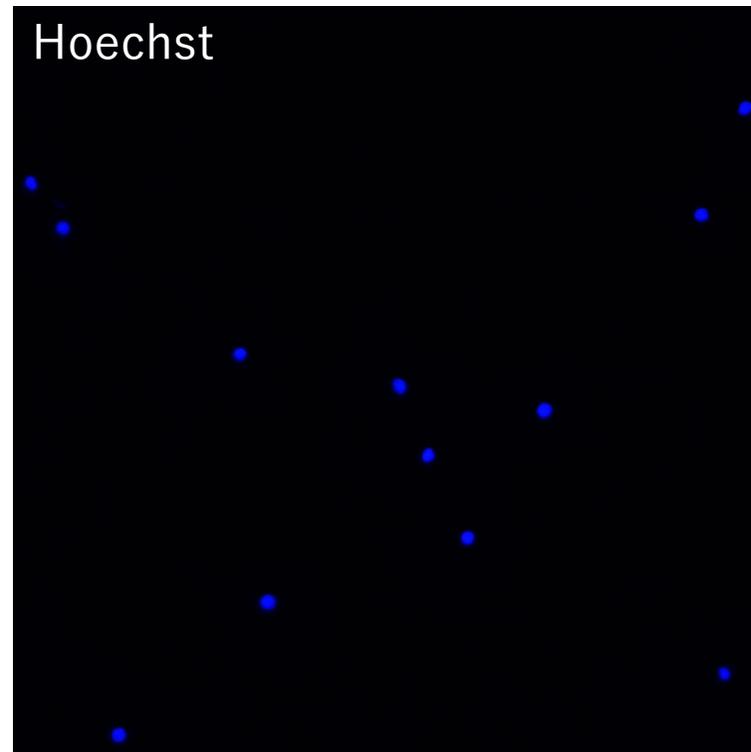
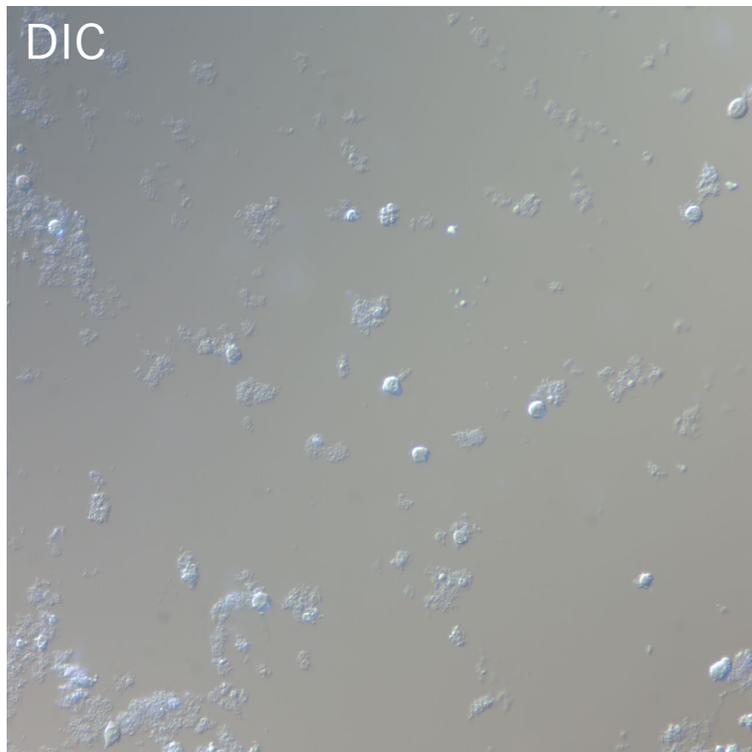
クルマエビのエラ組織を分離した例



➤ 組織を構成する細胞への課題

□ 組織の単細胞への分離 (García-Castro et al., *Genome Biol.*, 2021)

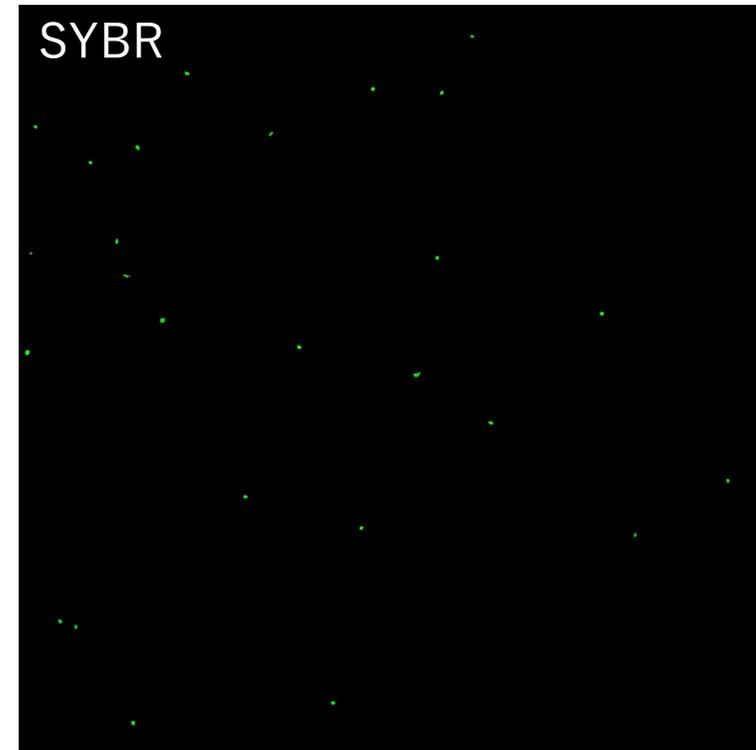
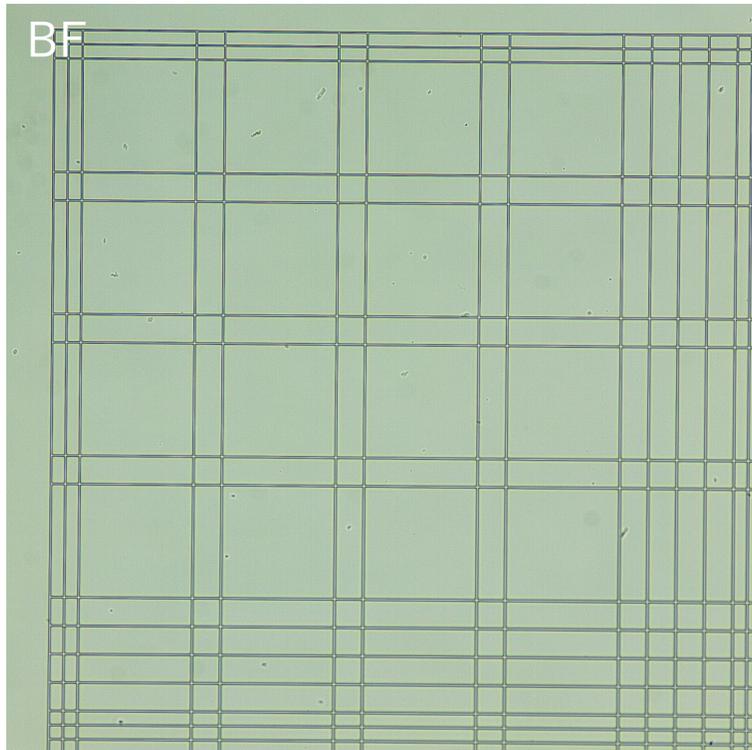
クルマエビの造血組織を分離した例



➤ 組織を構成する細胞への課題

□ 組織から核の抽出 (Ernst et al., *bioRxiv*, 2020)

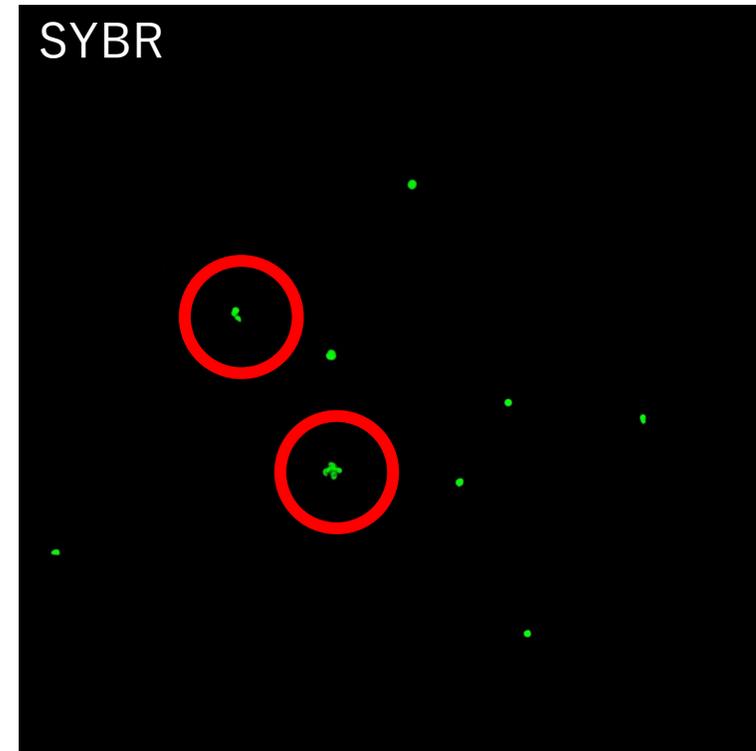
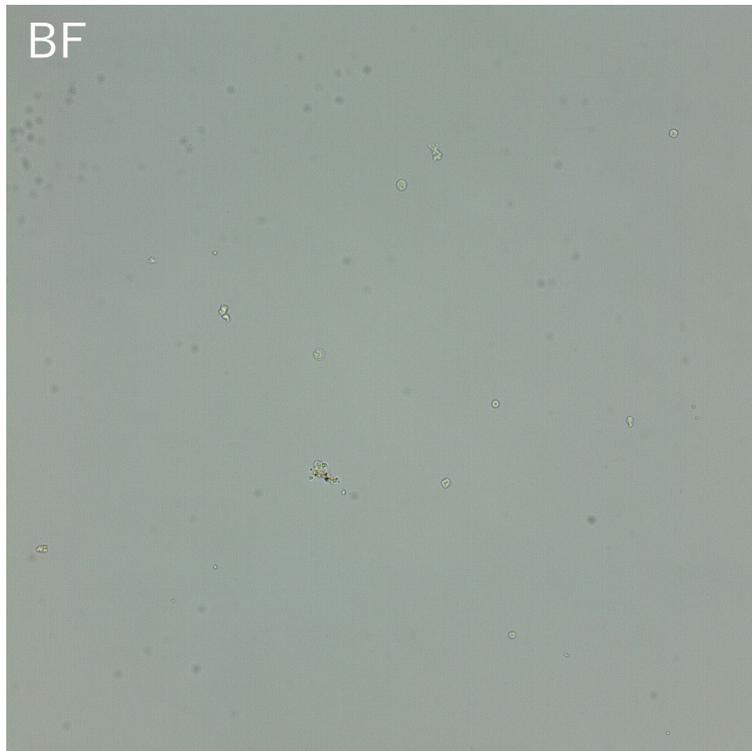
クルマエビの造血組織から核を抽出した例



➤ 組織を構成する細胞への課題

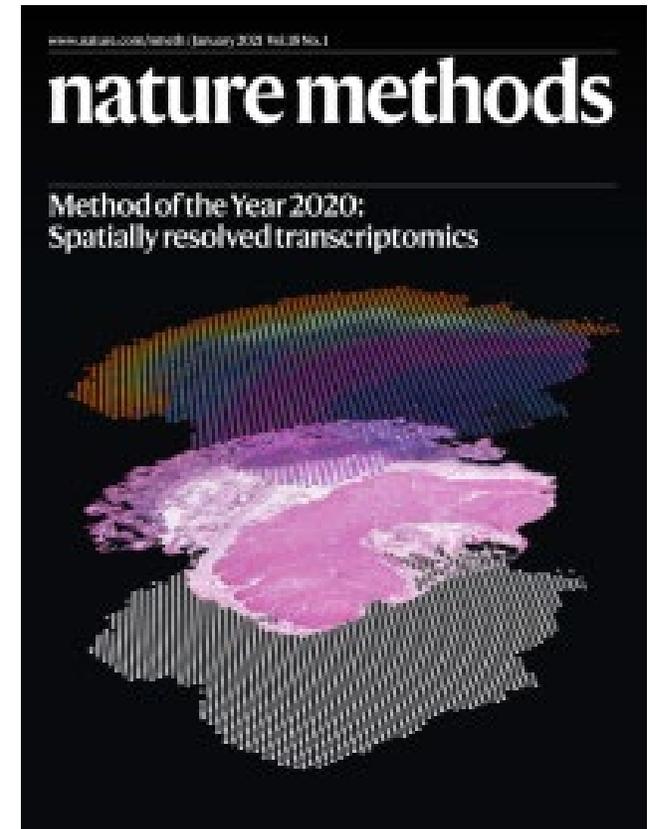
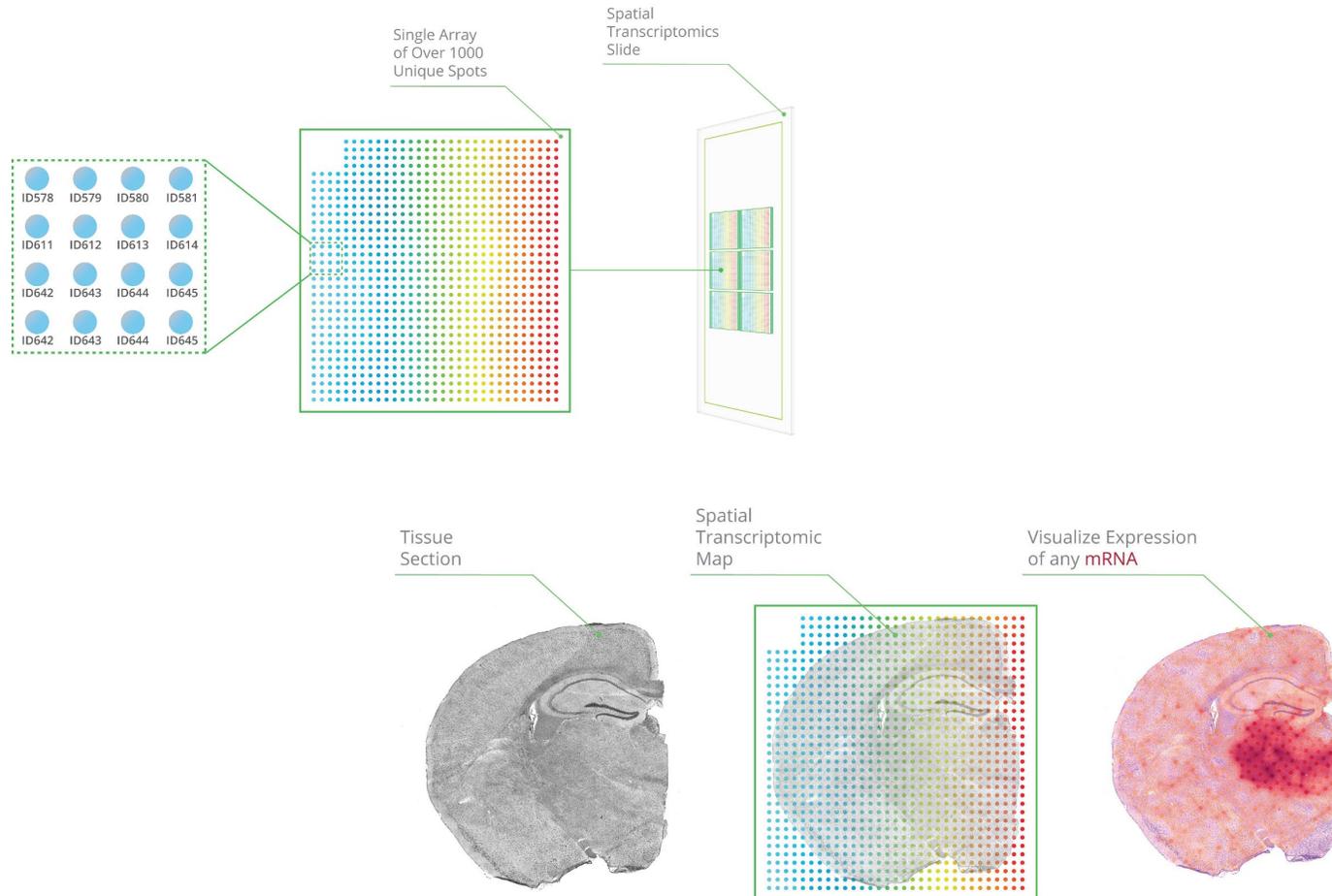
□ 組織から核の抽出 (Ernst et al., *bioRxiv*, 2020)

クルマエビの造血組織から核を抽出した例



➤ 空間トランスクリプトーム解析

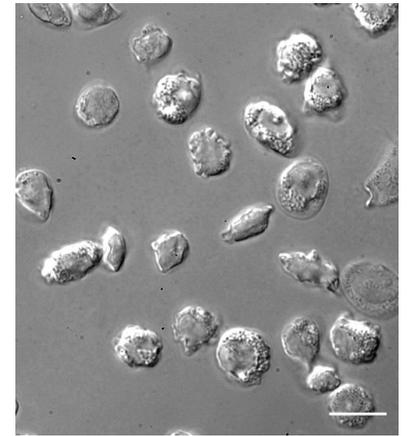
□ Method of the Year (2020): spatially resolved transcriptomics



➤ 大量にやる必要がある研究か…？

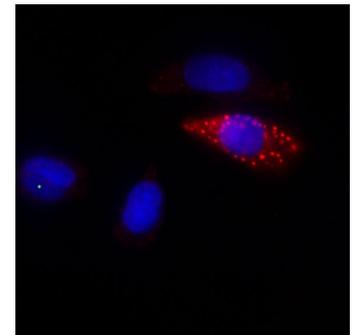
□ Drop-seqなどラージスケールでの細胞解析に適した研究とは？

- 解析対象の細胞群の分類体系が不明
- マーカーがない
- 形態的な差も不明瞭
- 細胞の位置情報がさして重要でない



□ 一方で…

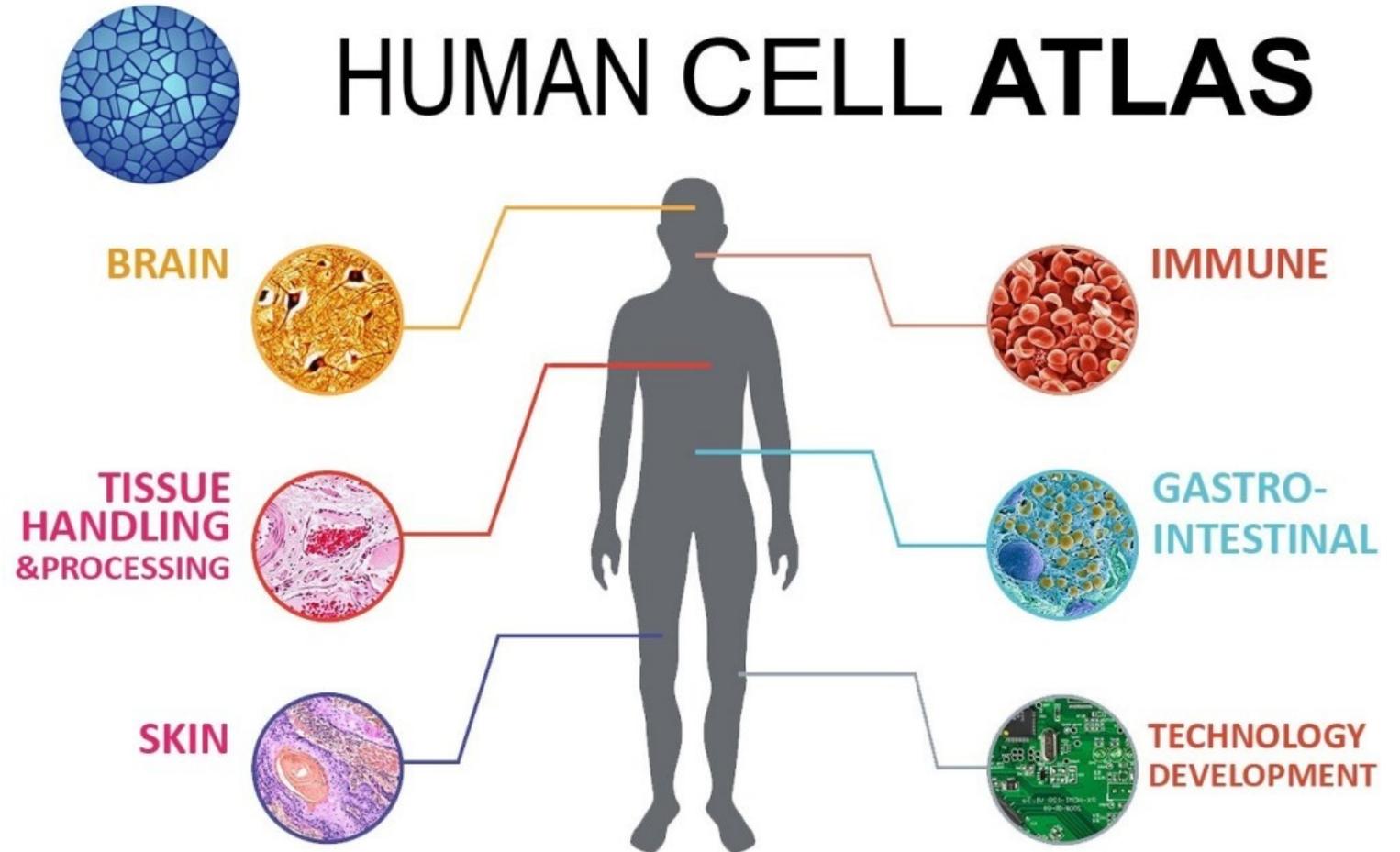
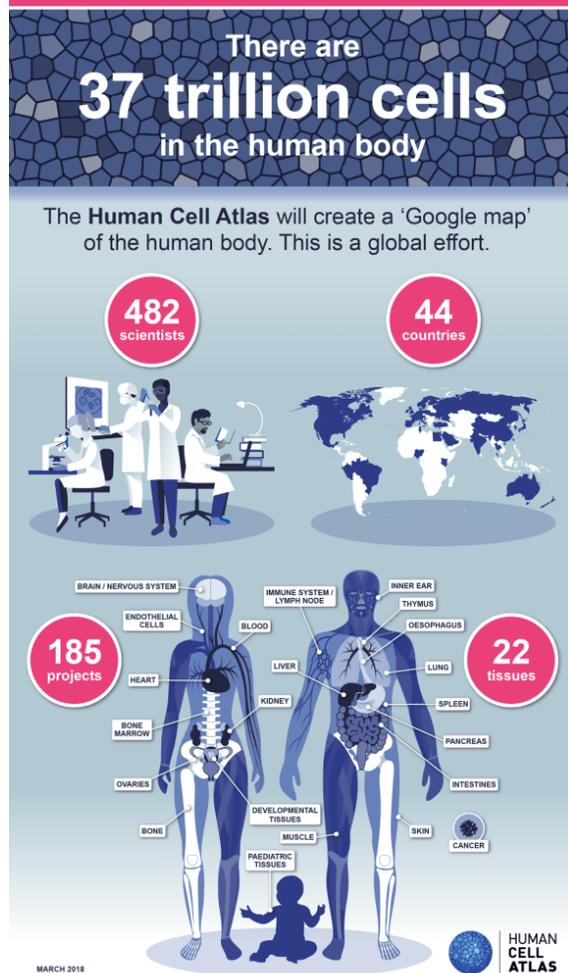
- ソーターがあるならば…
- (良い) マーカーがあるならば…



➤ すでに展開もされている今後の展望

- 価格競争による低価格化
- 空間的な細胞の位置情報の付与
- ゲノムやタンパク情報の同時取得
- ロングリードでのシーケンシング
- 多種細胞間での遺伝子発現パターンの検索？ Blastのようなもの？

➤ ゲノム研究の次に1細胞研究が来るのでは??



➤ 謝辞

□ 本研究の実施には、多くの先生方にお世話になりました。

廣野育生 先生 (東京海洋大学)

小山喬 先生 (長崎大学)

近藤秀裕 先生 (東京海洋大学)

津田宗一郎 様(bitBiome社)

鈴木宏明 先生 (中央大学)

菊池潔 先生 (東京大学)

川野竜司 先生 (東京農工大学)

豊田敦 先生 (遺伝研)

□ シングルセル研究に興味を持ってくださる方が増えれば幸いです。

コメント・ご質問よろしくお願いたします。

