

ヒト細胞アトラス時代の高精度1細胞RNA-seq法

二階堂 愛[♂] (Itoshi NIKAIDO)

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム機能情報分野 教授

理化学研究所 生命機能科学研究センター バイオインフォマティクス研究開発チーム チームリーダー

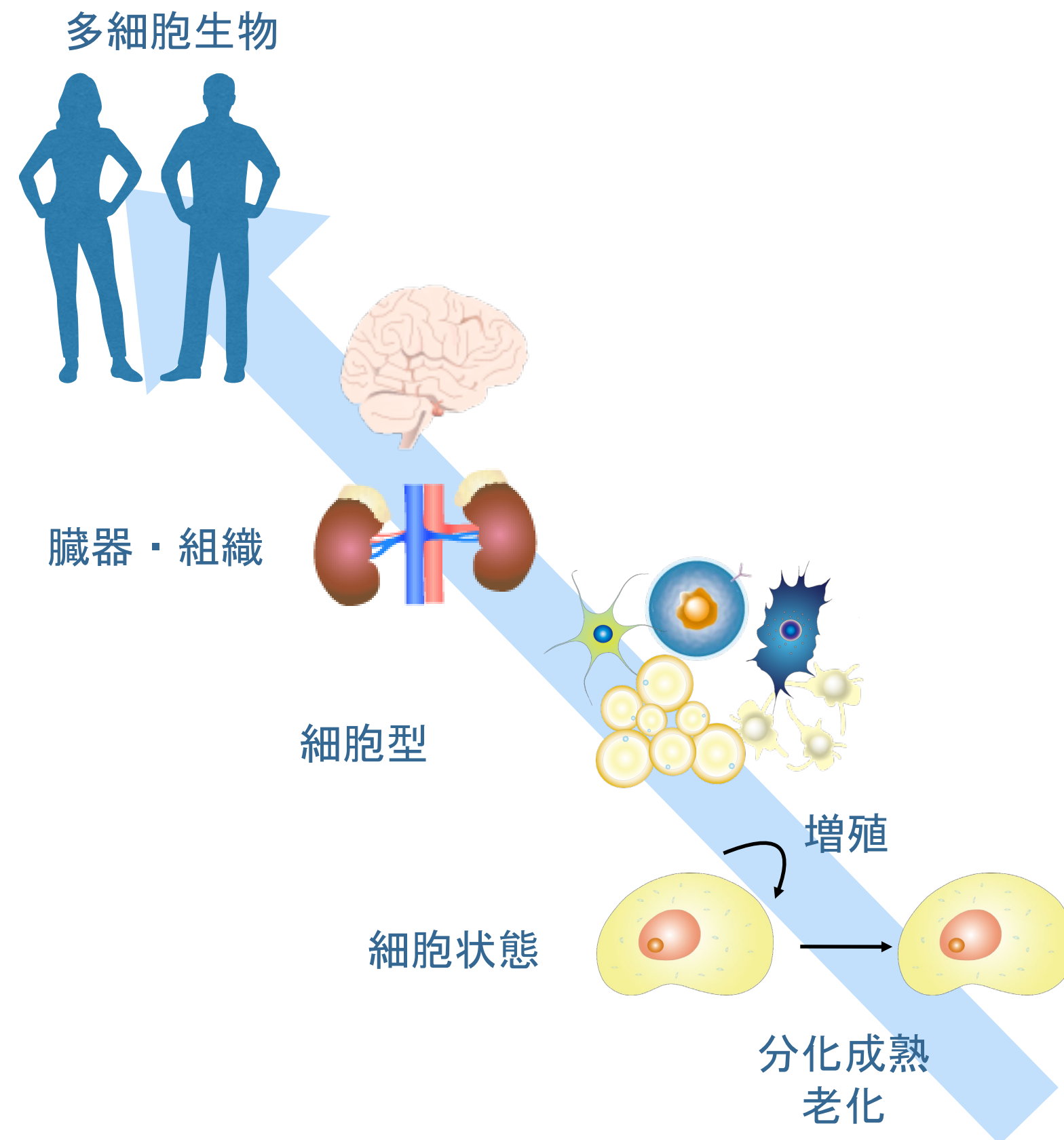
dritoshi@gmail.com / @dritoshien

Agenda

- なぜ1細胞トランスクリプトーム解析が必要か? (3分)
- 高精度&高出力型1細胞RNA-seq: Quartz-Seq2 (15分)
- Human Cell Atlas計画とベンチマーキング (15分)
- おわりに (2分)

多細胞生物を理解するには、細胞型や状態を計測する必要がある

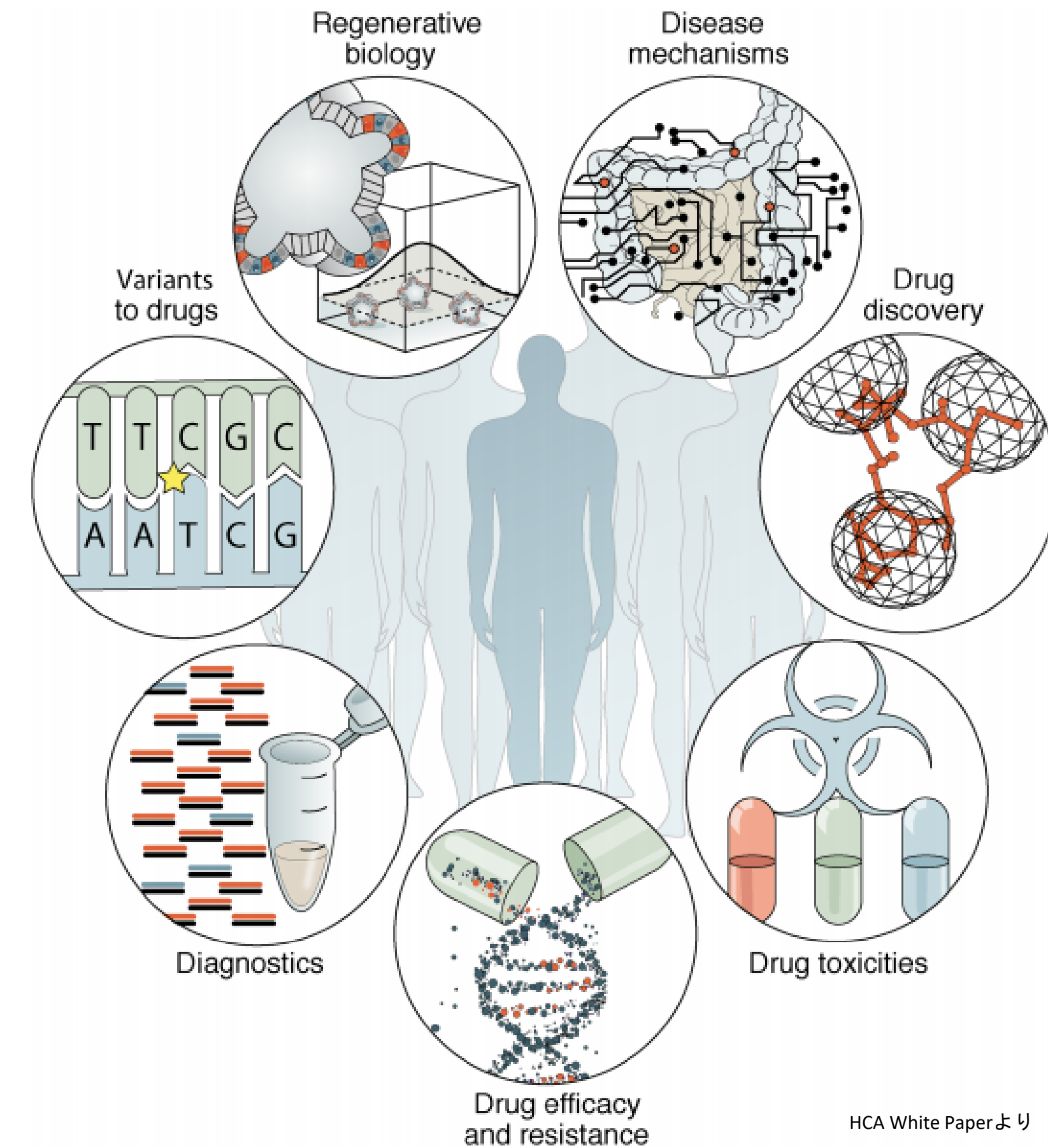
細胞型と細胞状態からの生命現象の理解



<http://g86.dbcls.jp/~togoriv/>

- ・臓器の振舞は、多様な細胞型や細胞状態の平均値
- ・細胞型・状態を単離・培養することは困難

1細胞生物学によるヒト疾患の理解と制御



HCA White Paperより

- ・生命科学のあらゆる分野で必要とされる

Agenda

- なぜ1細胞トランスクリプトーム解析が必要か? (3分)
- 高精度&高出力型1細胞RNA-seq: Quartz-Seq2 (15分)
- Human Cell Atlas計画とベンチマーキング (15分)
- おわりに (2分)

RNA-Seq

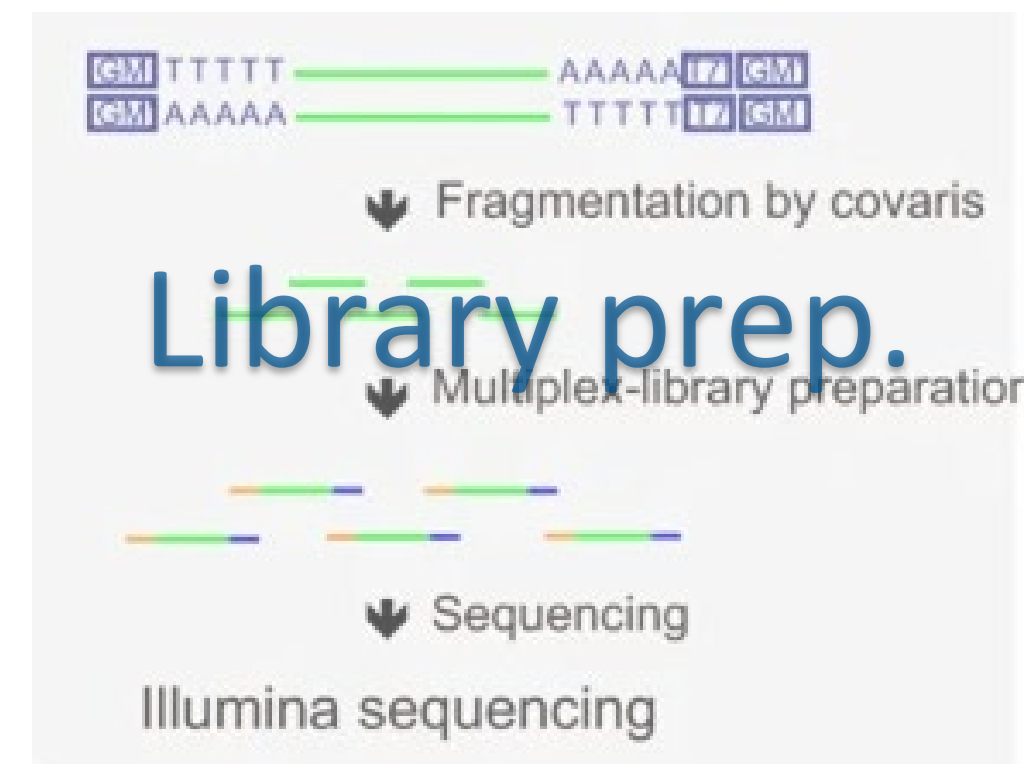
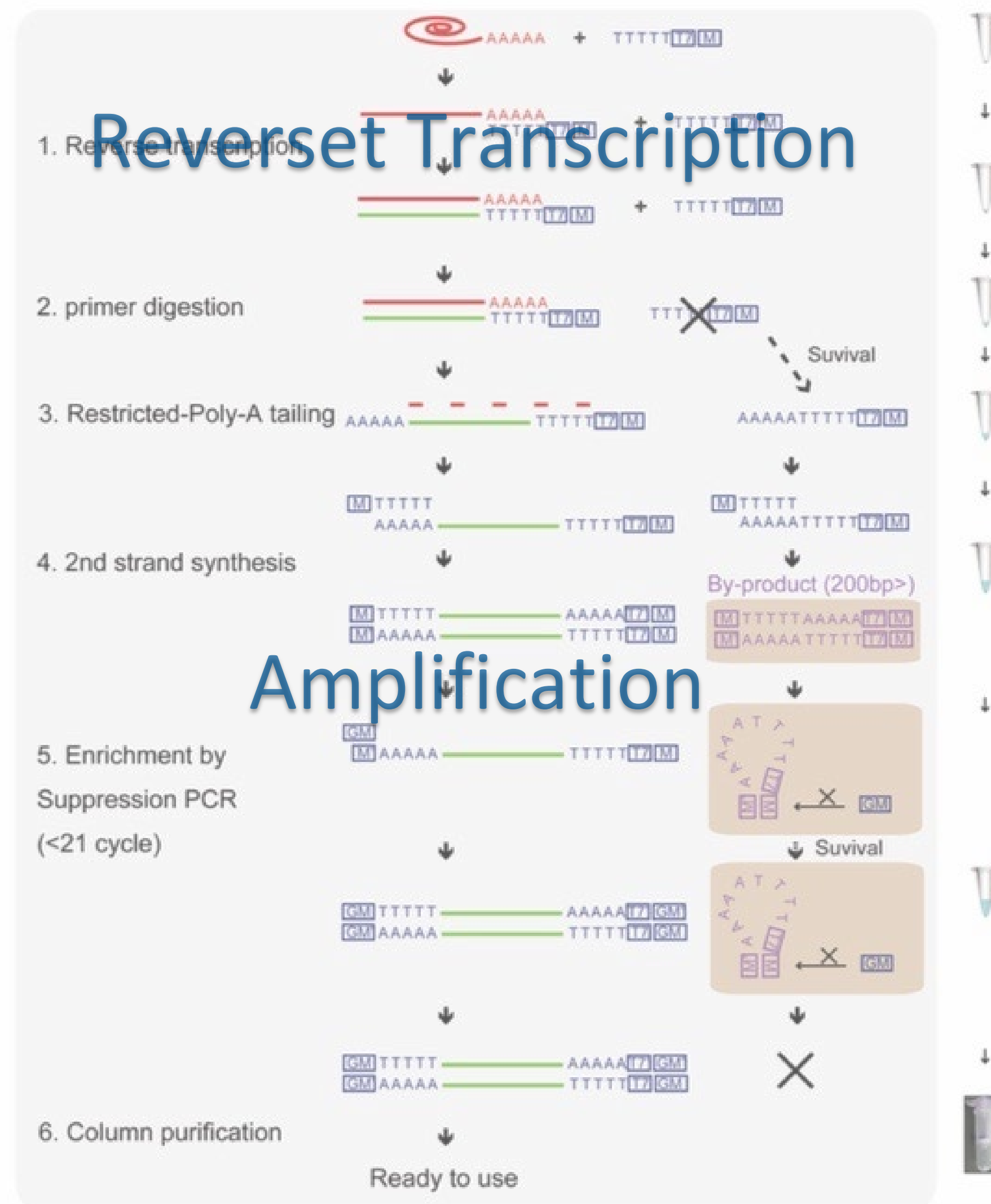
>100,000 cells (10 ng Total RNA)



Single-Cell

= 0.01-0.1 pg mRNA (1-10 pg total RNA)

1細胞RNAシーケンス法の基本原理



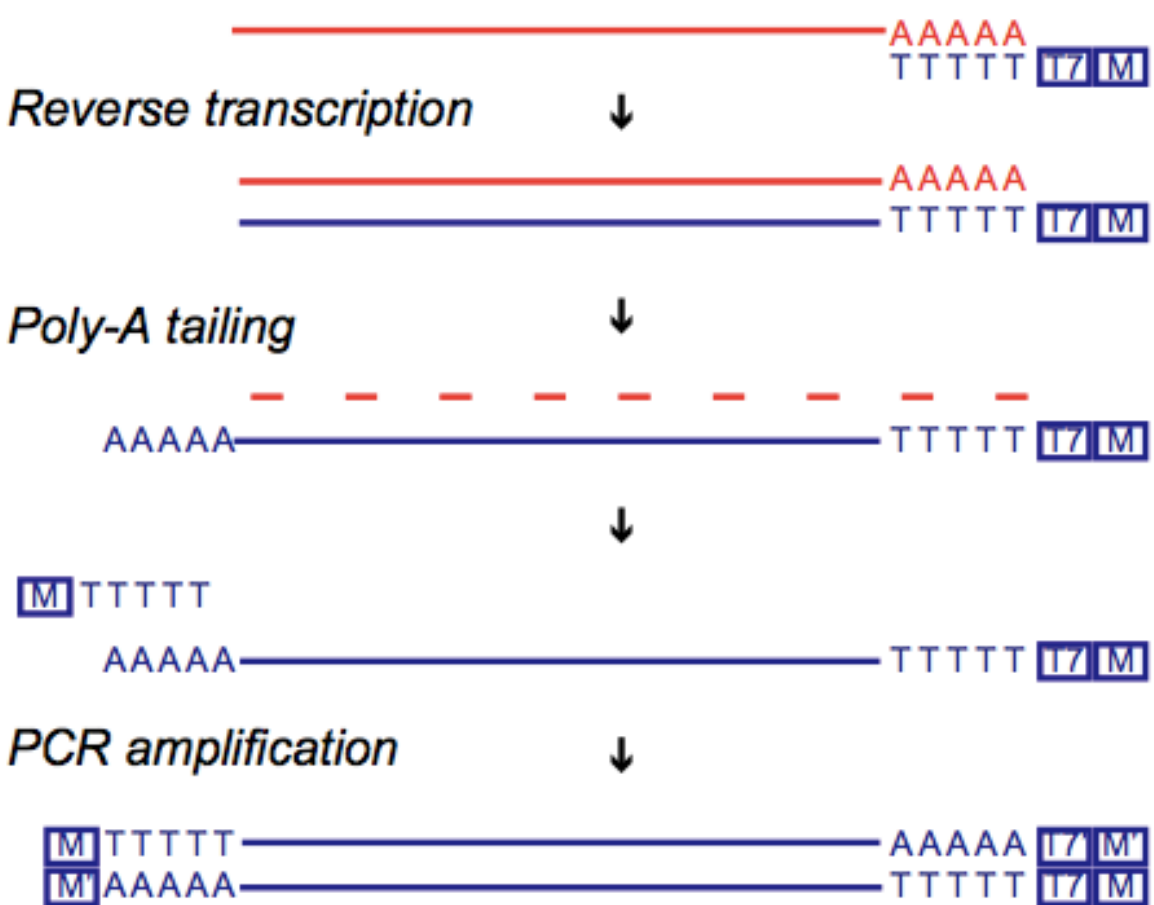
- 逆転写・増幅・ライブラリ作製の3ステップ
- 増幅可能な分子への変換と増幅の2ステップ
- 1チューブ/細胞で多段階の複雑な反応



Whole-transcriptome Amplification (WTA)

Highest reproducible and sensitive scRNA-seq
 Quartz-Seq (Sasagawa Y. et al. 2013)
 Quartz-Seq2 (Sasagawa Y. et al. 2018)

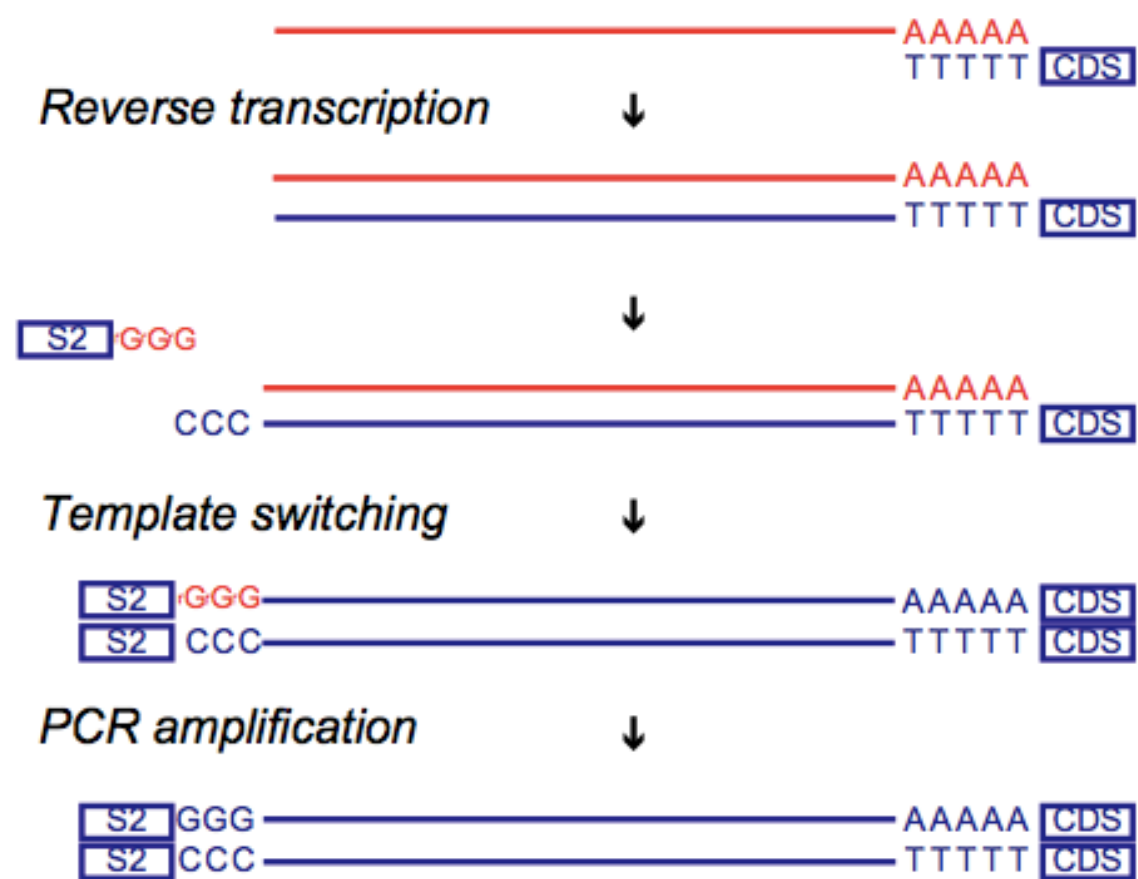
1. poly-A tailing



- 逆転写が途中でもタギング可能
 - 遺伝子検出感度が高い
 - TruncateなRNAも捉える
- cDNA長が均一でPCR増幅バイアスが少ない
- 反応条件が厳しめ

Full-length scRNA-seq
 Smart-Seq (Ramskold D. 2012), Smart-Seq2

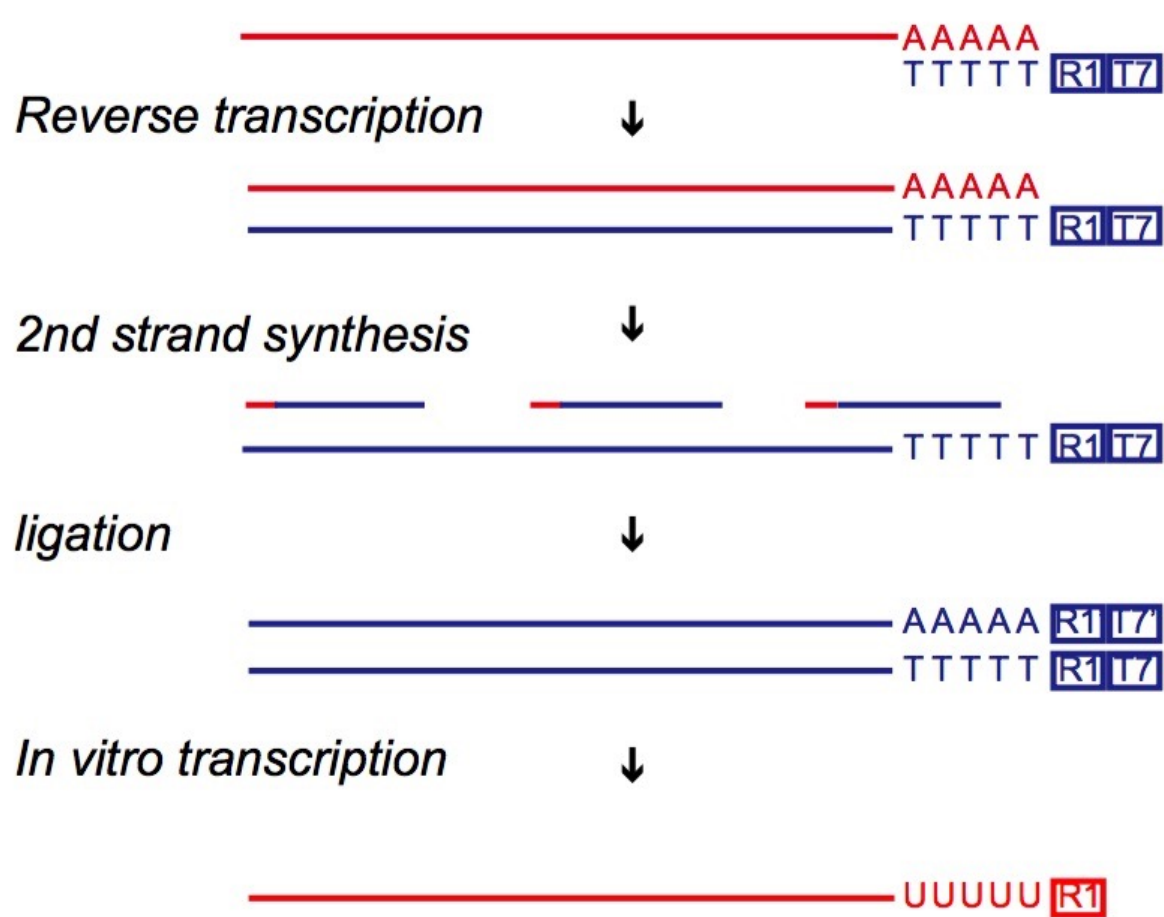
2. Template-switching



- 最後まで逆転写できるとタギングされる
 - 完全長に近い
 - 遺伝子検出感度が高くない
- cDNA長がまちまちでPCR増幅バイアスが多い
- 逆転写中にタギングできる (1 stepで簡便)

scRNA-seq with linear amplification
 CEL-seq, CEL-seq2

3. In vitro transcription

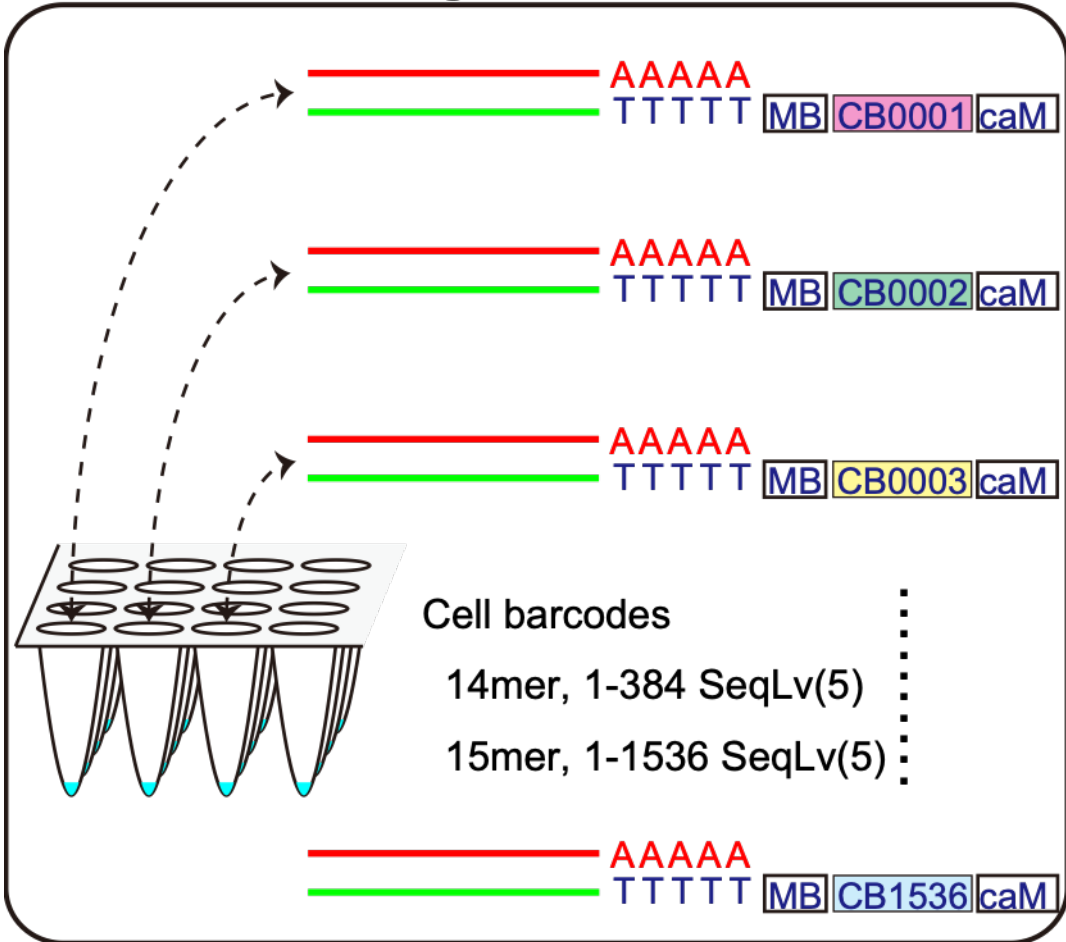


- IVTによる線形増幅
 - 遺伝子検出感度が高め
 - 2nd合成効率が改善されていない?

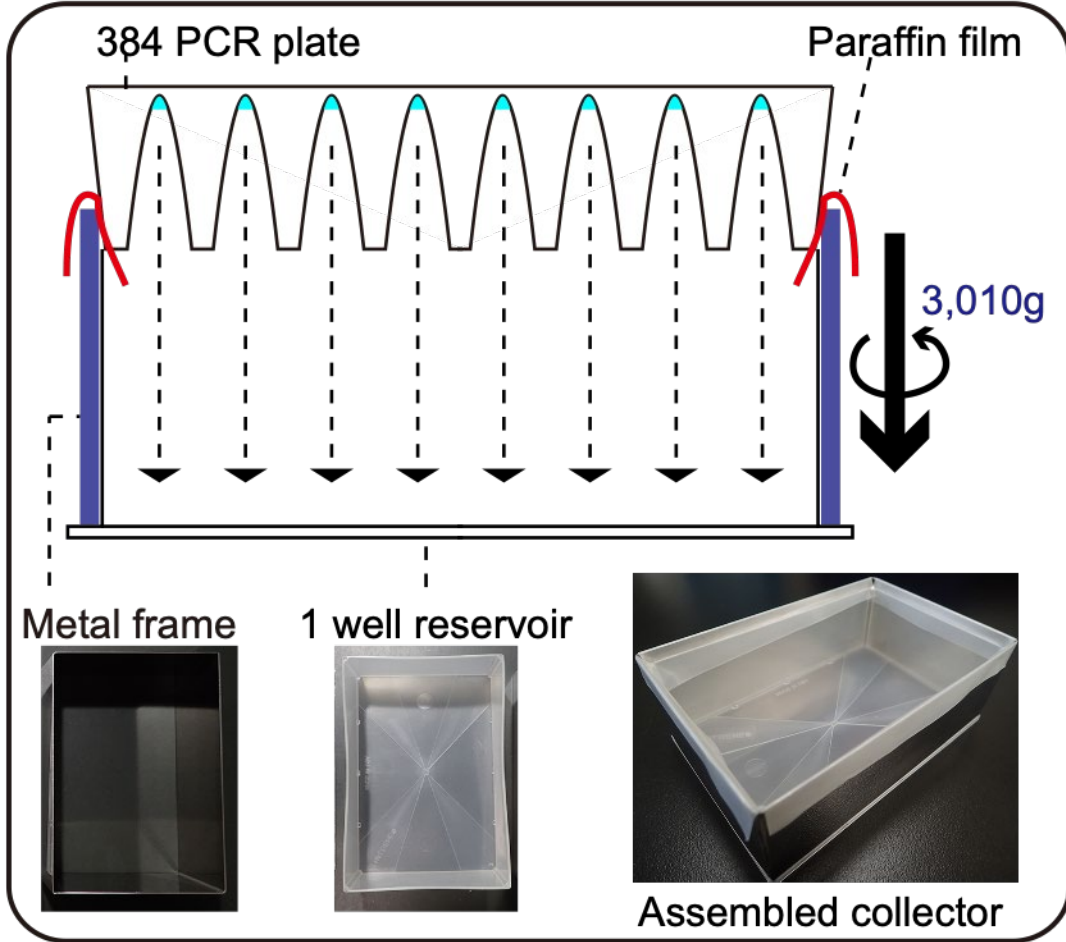
Quartz-Seq2: 高出力・高精度化の原理

1. Cell barcode法による簡便化

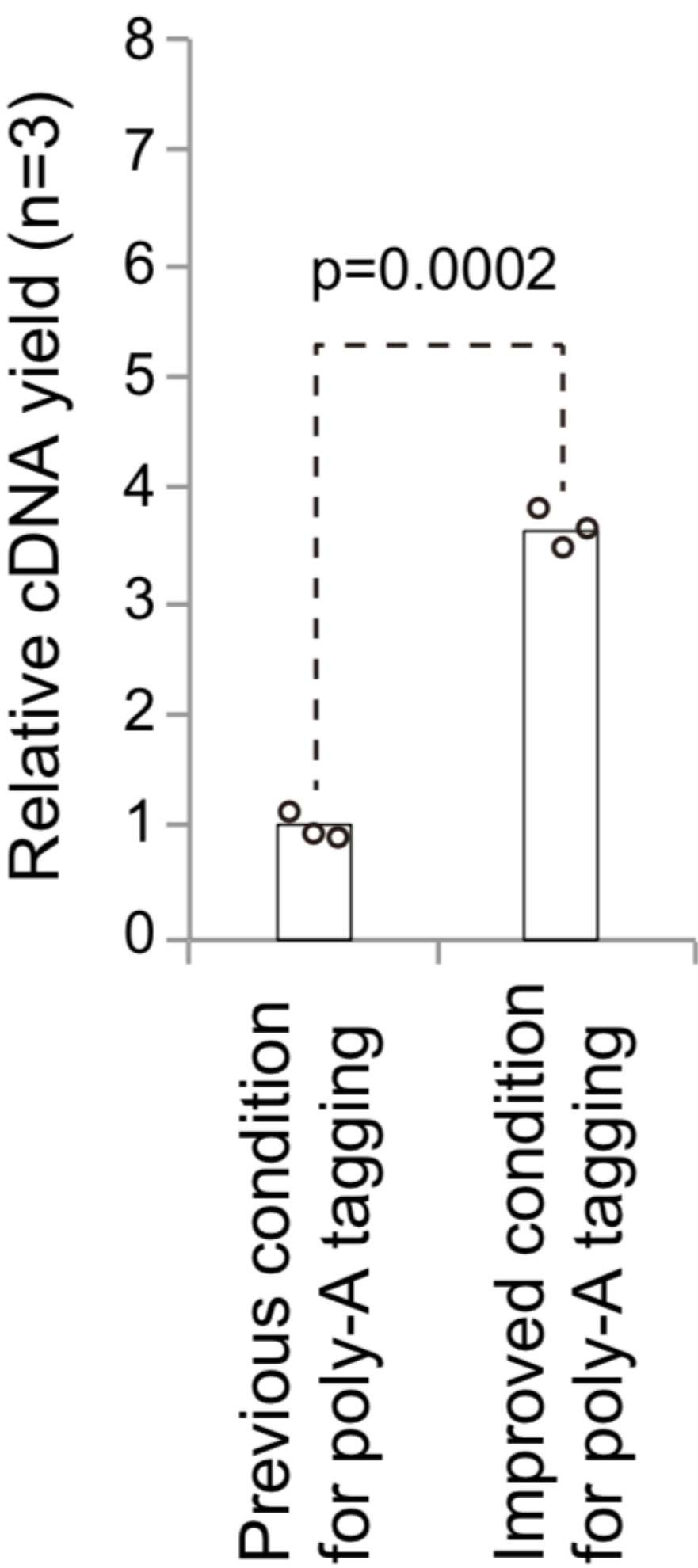
2. Cell barcoding



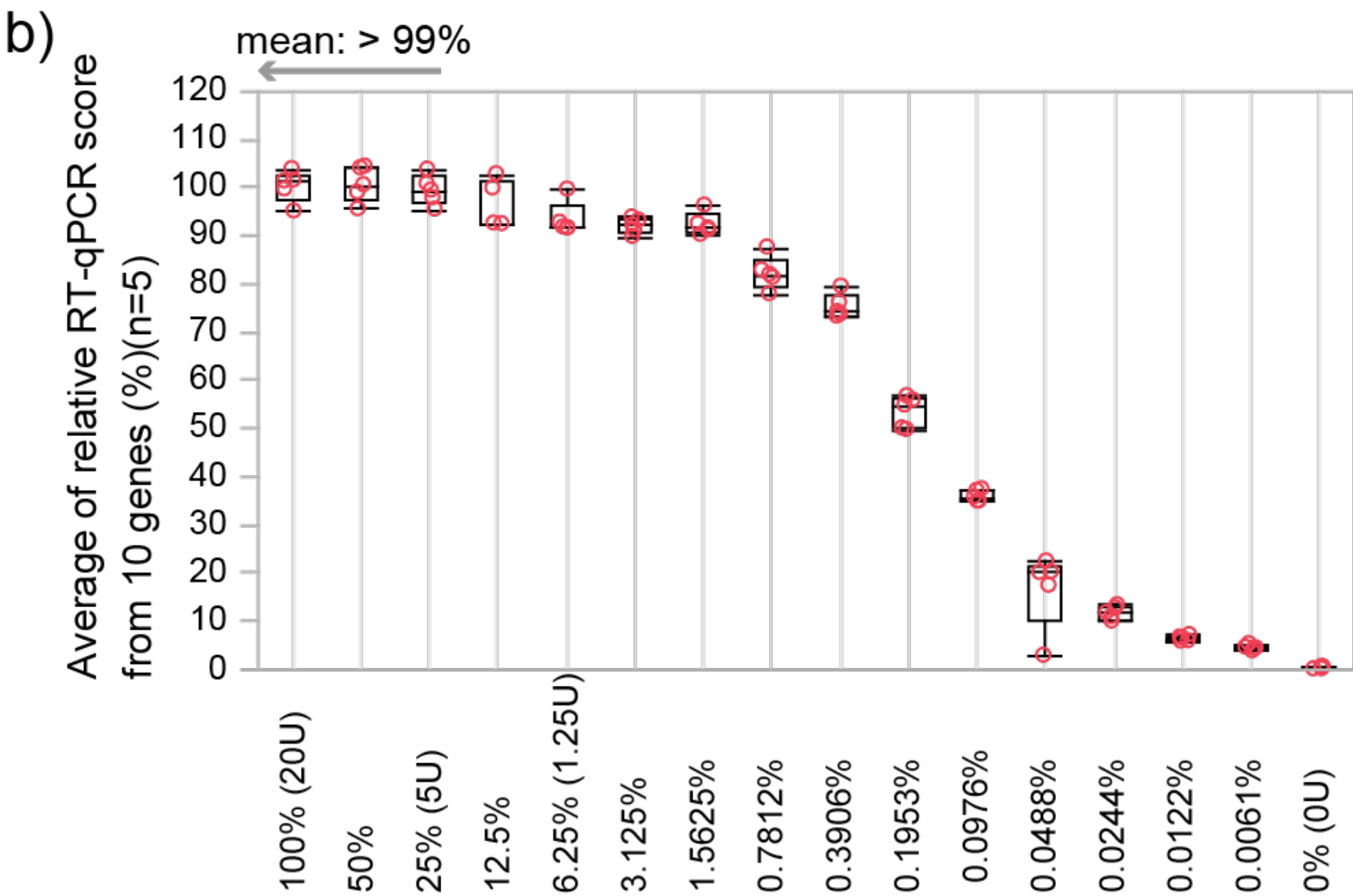
3. Spindown collection



2. cDNA合成率上昇による分子捕捉改善

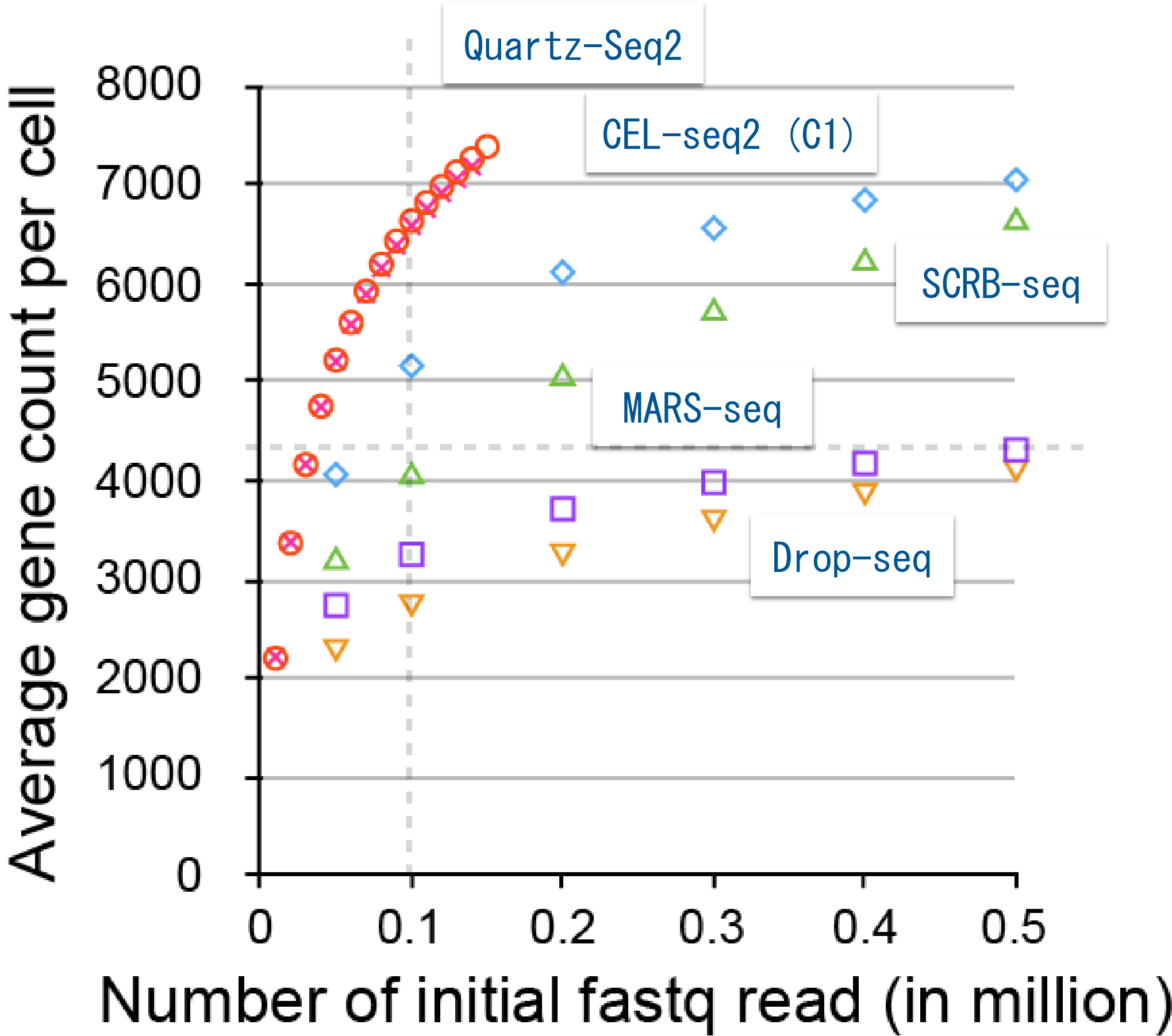


3. 逆転写反応のコスト削減

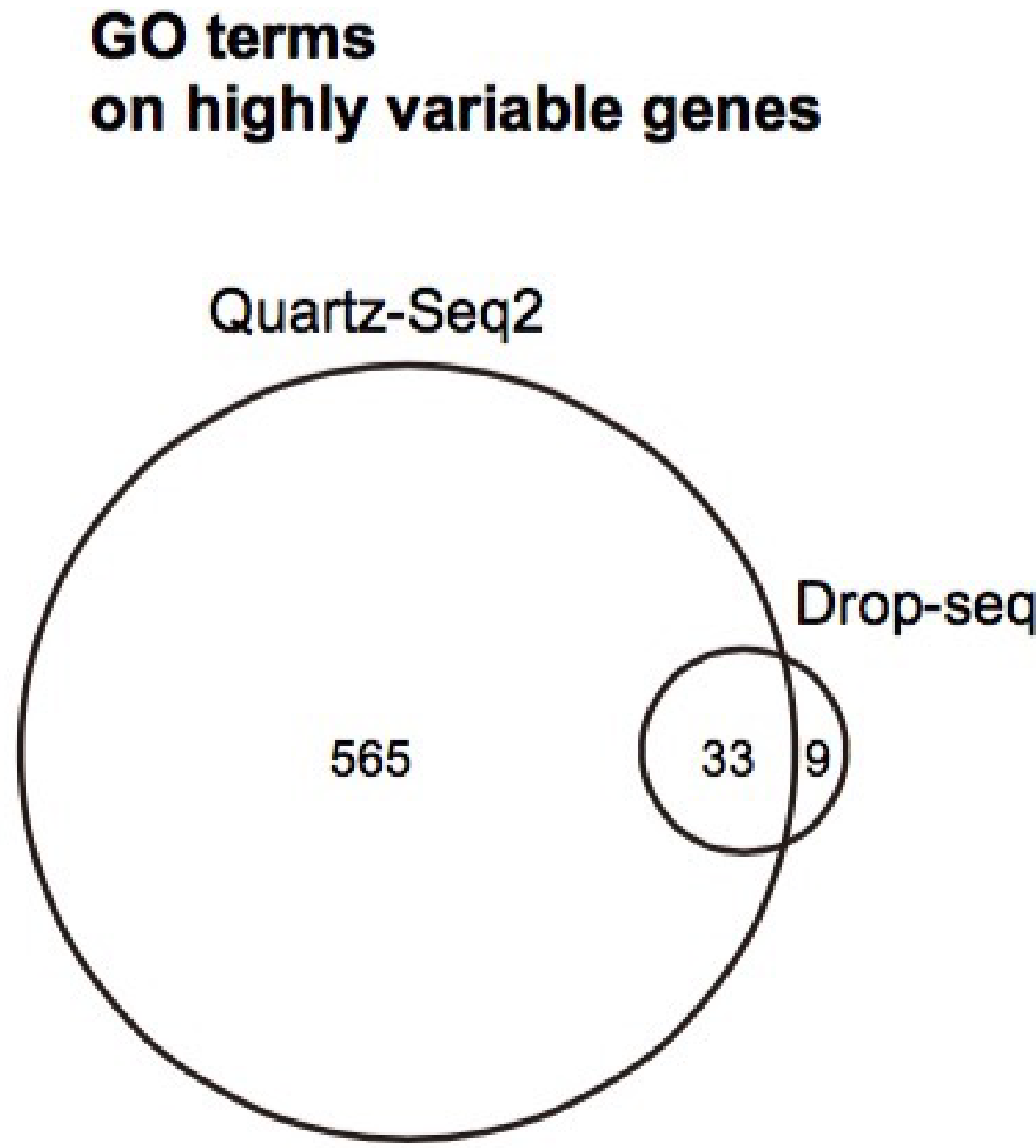


Quartz-Seq2: 検出遺伝子数と機能数

検出遺伝子数が世界最高

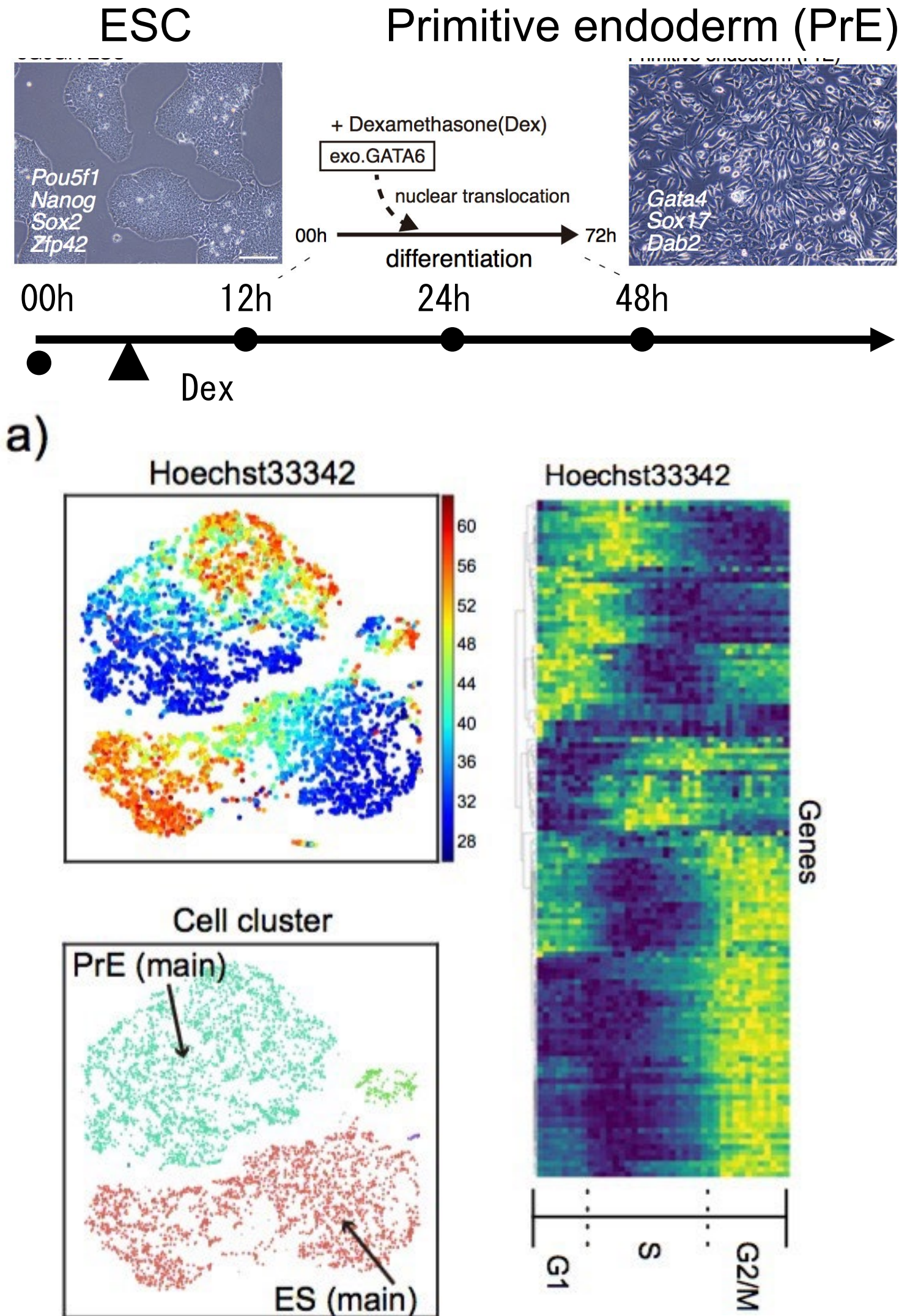


検出遺伝子数が高いと検出機能数が多くなる (14倍)

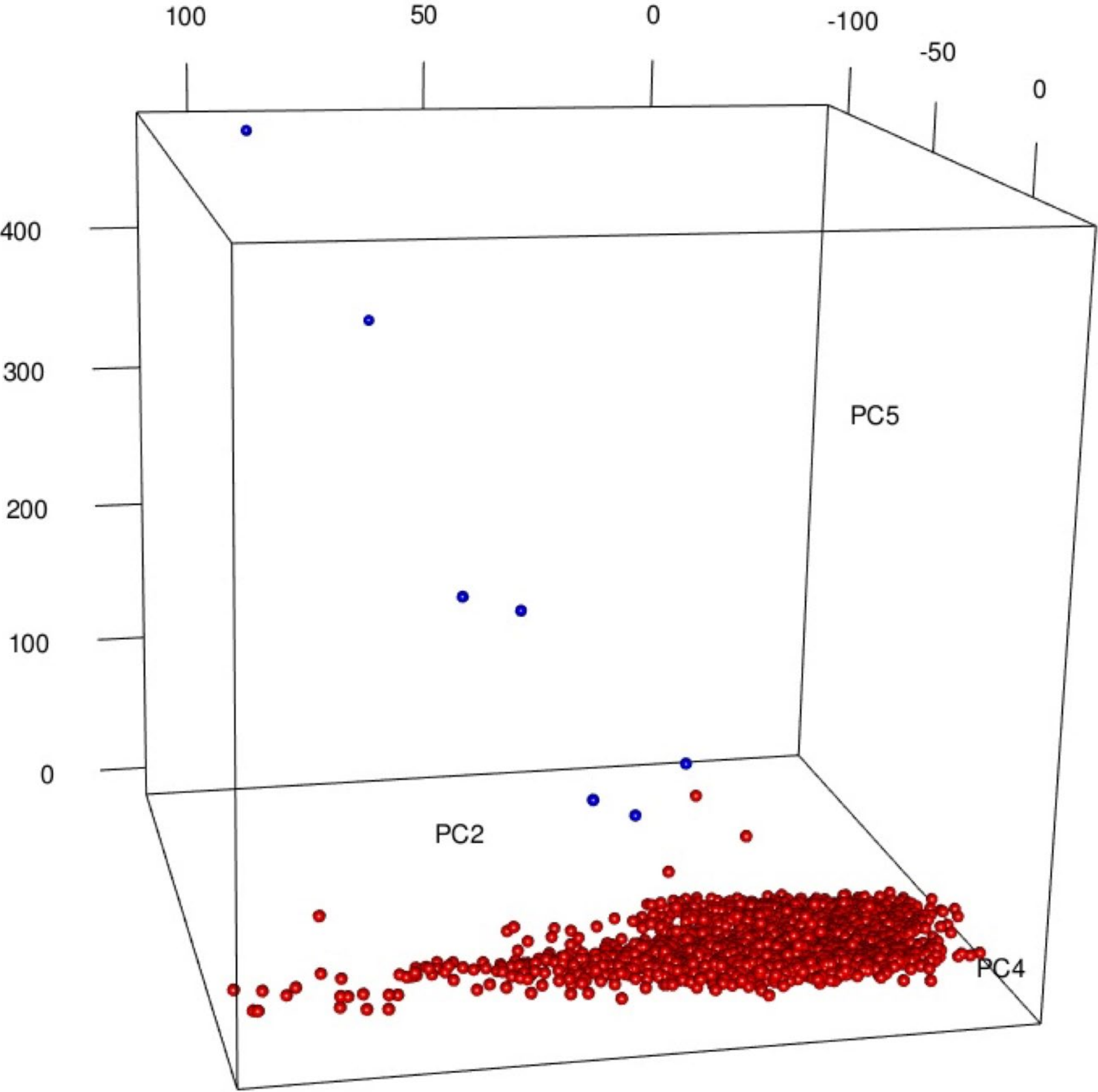


Quartz-Seq2: 検出遺伝子数と機能数

1. 細胞状態の検出 (cell cycle)



2. 希少細胞の検出率

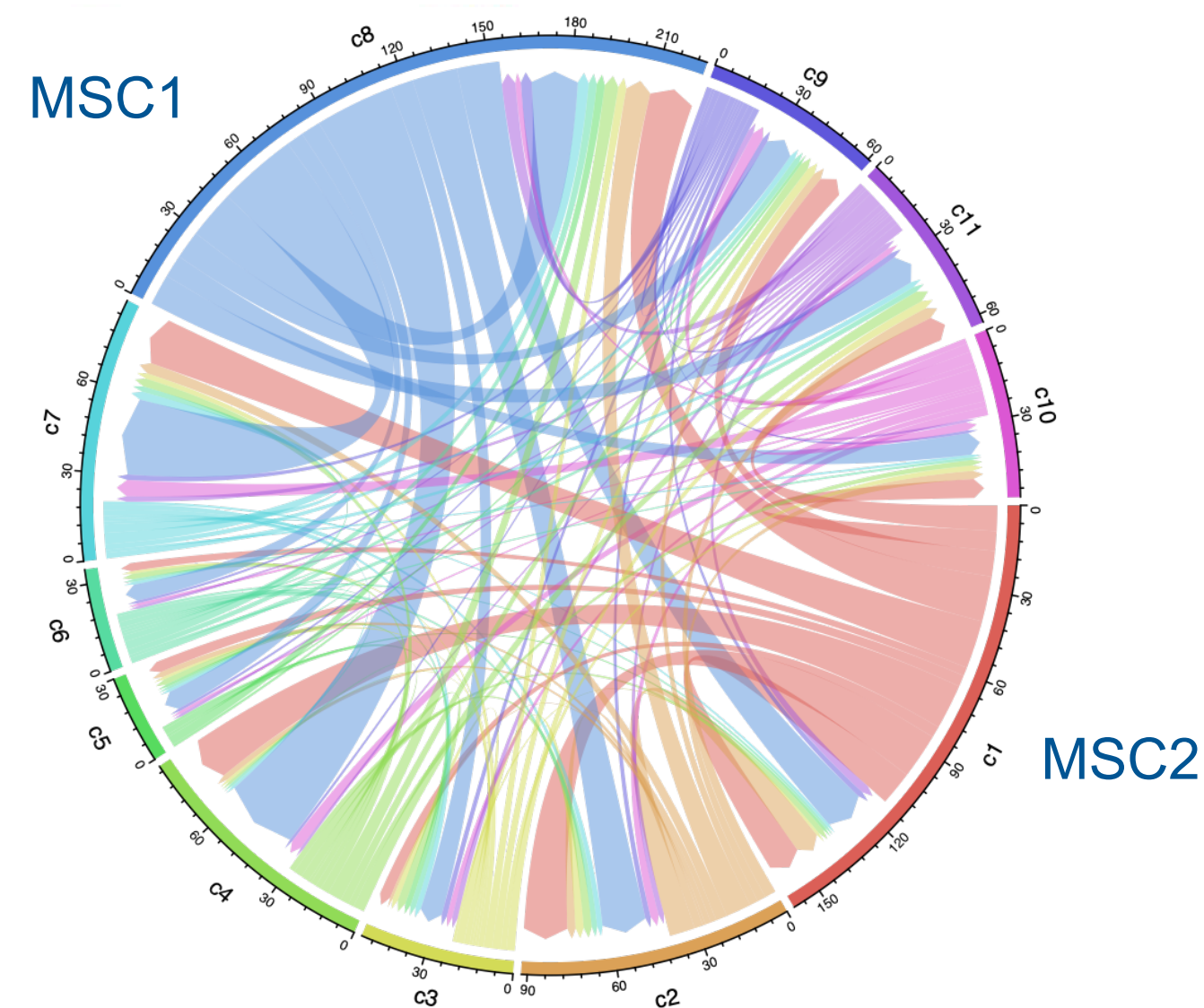
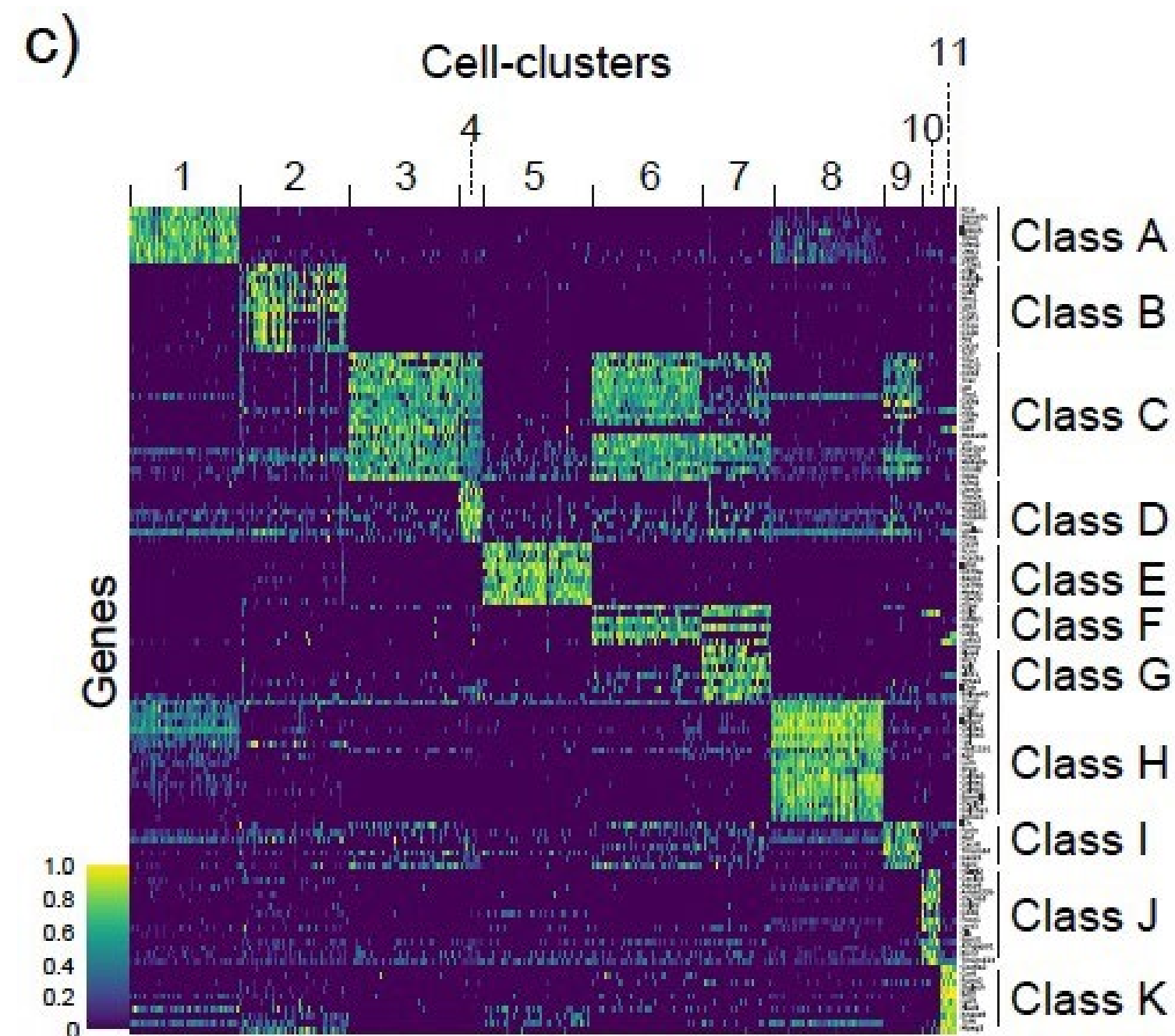
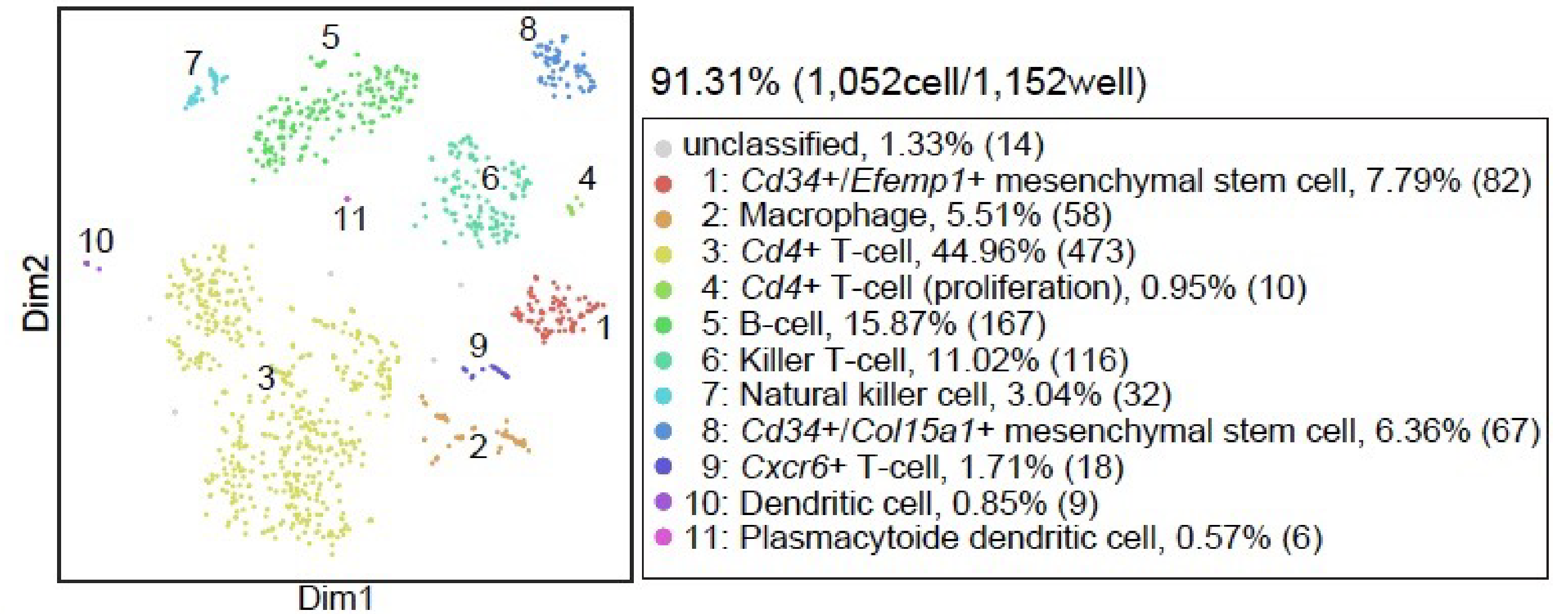
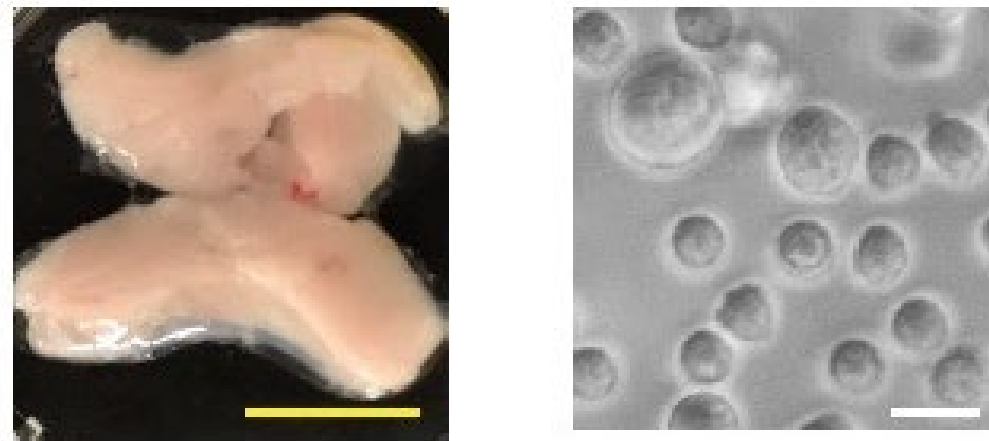


1/2000個の希少細胞を99%検出

Quartz-Seq2: 検出遺伝子数と機能数

1,500 SVF (stromal vascular fraction) cells

- ・細胞治療に利用されている
- ・vivo のサンプルのデモ
- ・細胞サイズが多様

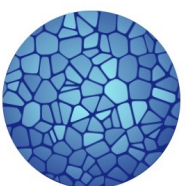


- ・2種の間葉系幹細胞を発見
- ・一方はElastic fiberに関わる遺伝子発現が高い
- ・間葉系幹細胞は細胞相互作用のソース

Agenda

- なぜ1細胞トランスクリプトーム解析が必要か? (3分)
- 高精度&高出力型1細胞RNA-seq: Quartz-Seq2 (15分)
- Human Cell Atlas計画とベンチマーキング (15分)
- おわりに (2分)

Human Cell Atlas



HUMAN
CELL
ATLAS



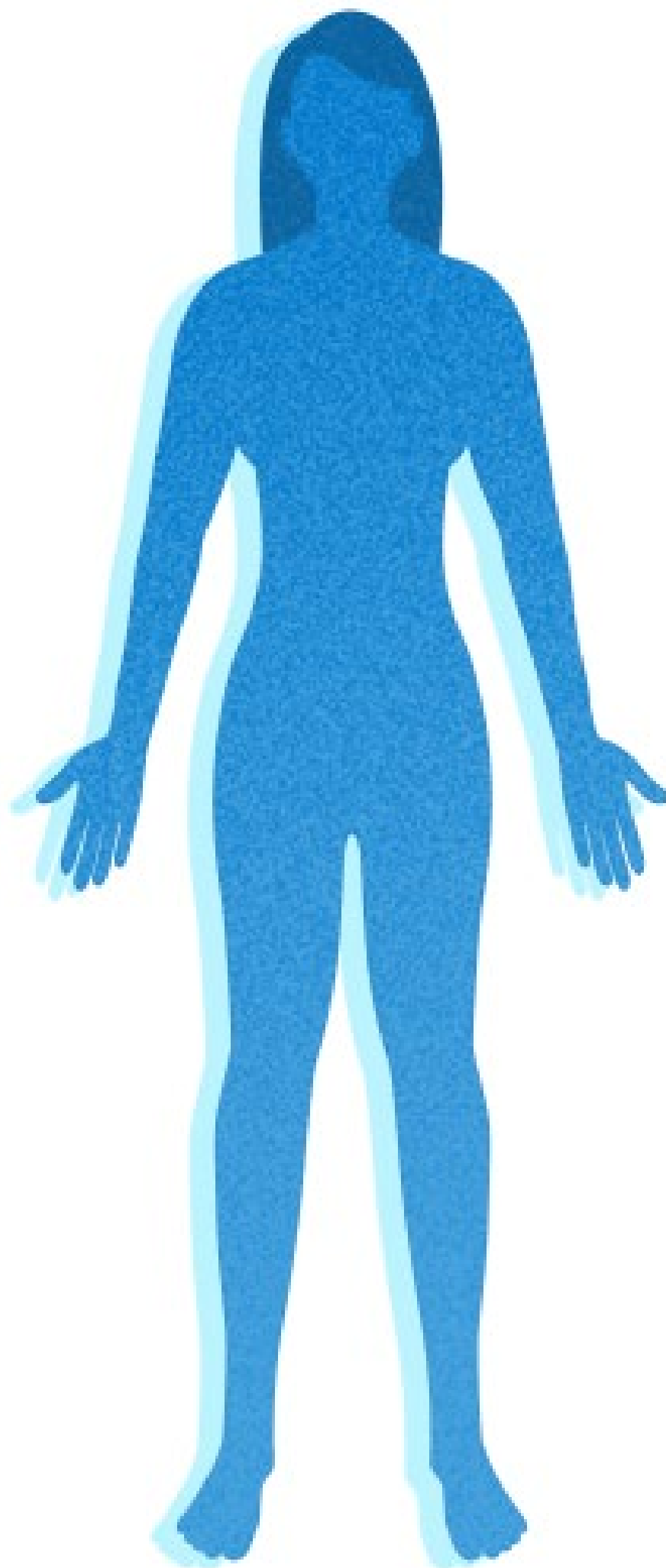
CHAN
ZUCKERBERG
INITIATIVE

AREAS OF RESEARCH

include

14 ORGAN SYSTEMS

1095 members ▾



RESPIRATORY
SYSTEM

CARDIOVASCULAR
SYSTEM

NERVOUS
SYSTEM

FEMALE
REPRODUCTIVE
SYSTEM

ENDOCRINE
SYSTEM

DIGESTIVE
SYSTEM

URINARY
SYSTEM

INTEGUMENTARY
SYSTEM

SKELETAL
SYSTEM

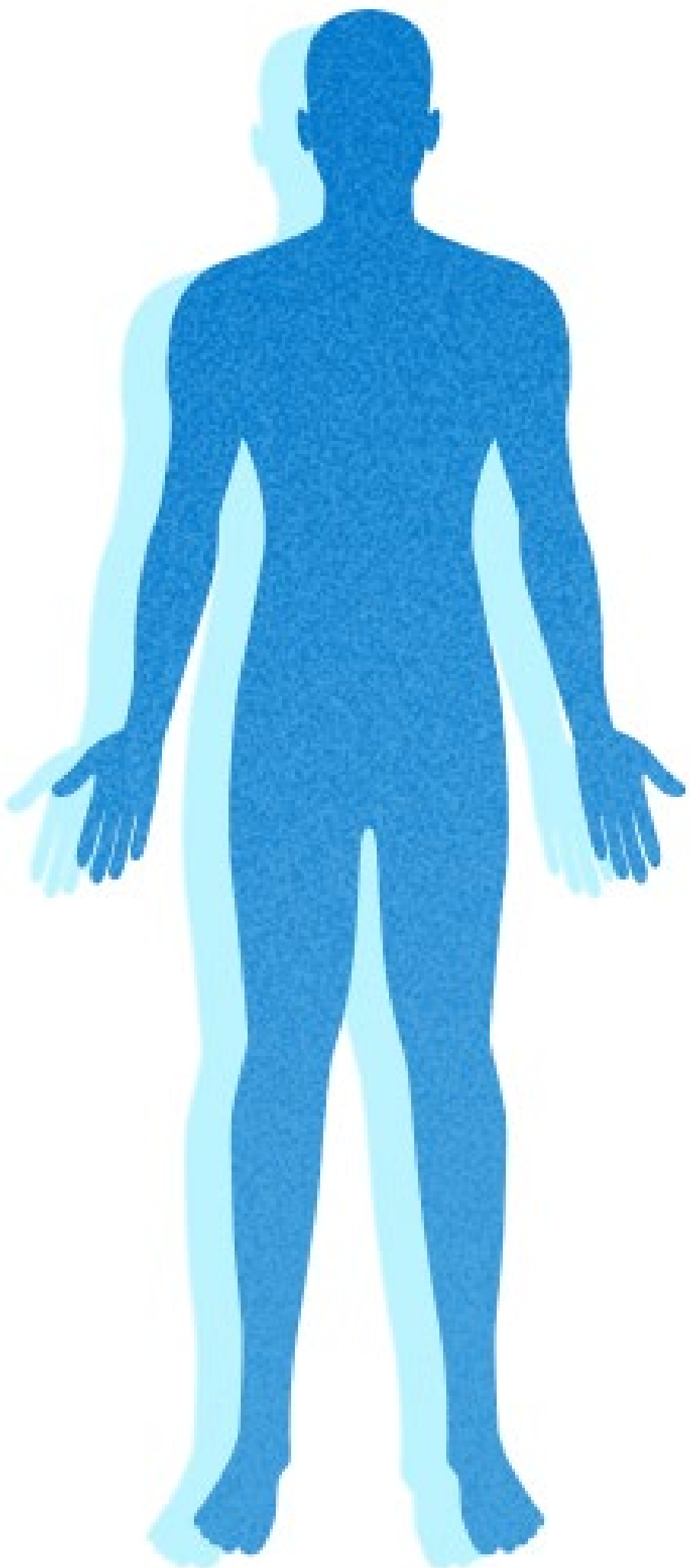
MUSCULAR
SYSTEM

MALE
REPRODUCTIVE
SYSTEM

LYMPHATIC
SYSTEM

IMMUNE
SYSTEM

ALL





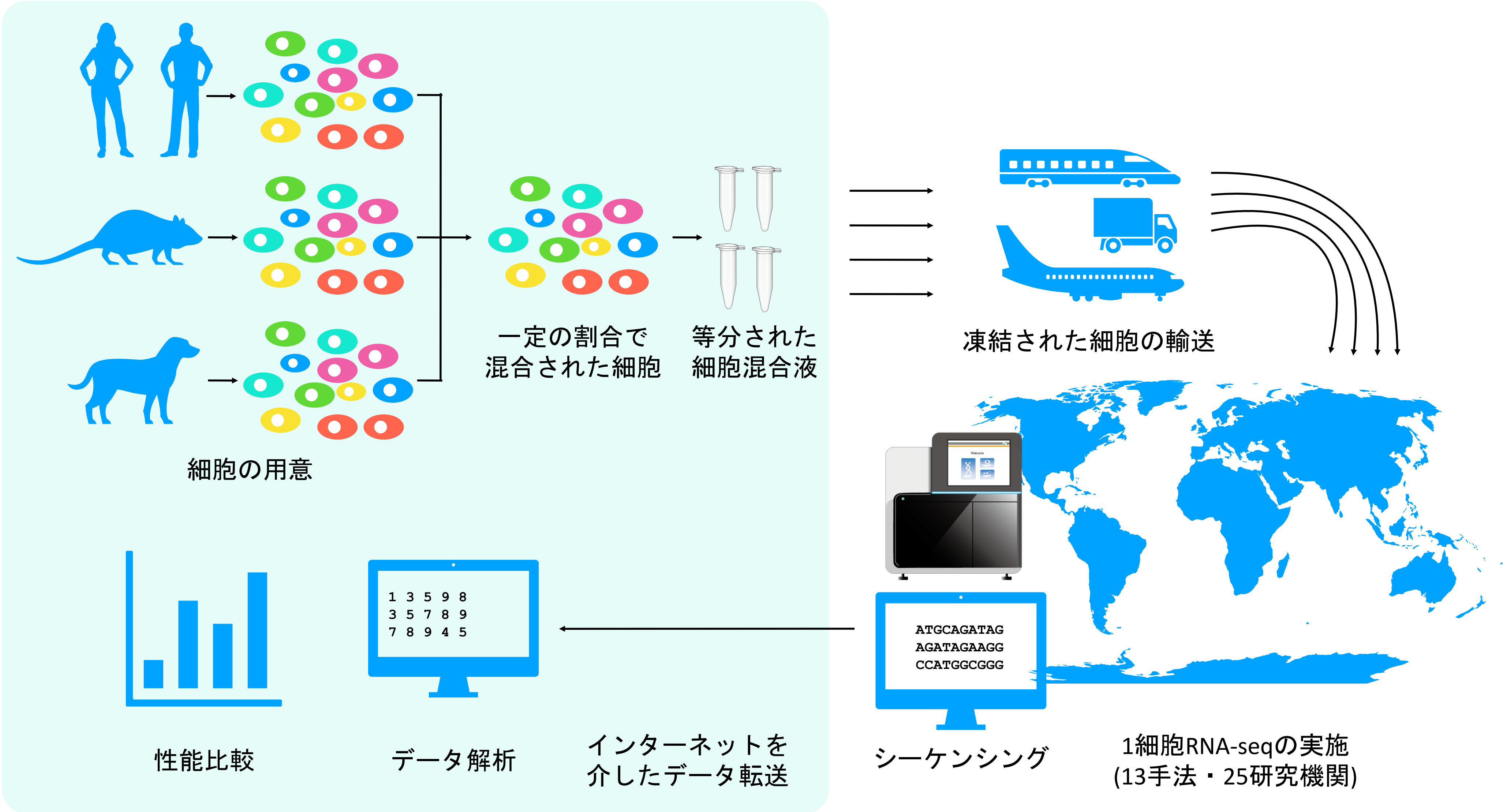
71
COUNTRIES

1115 INSTITUTES

1827 Members



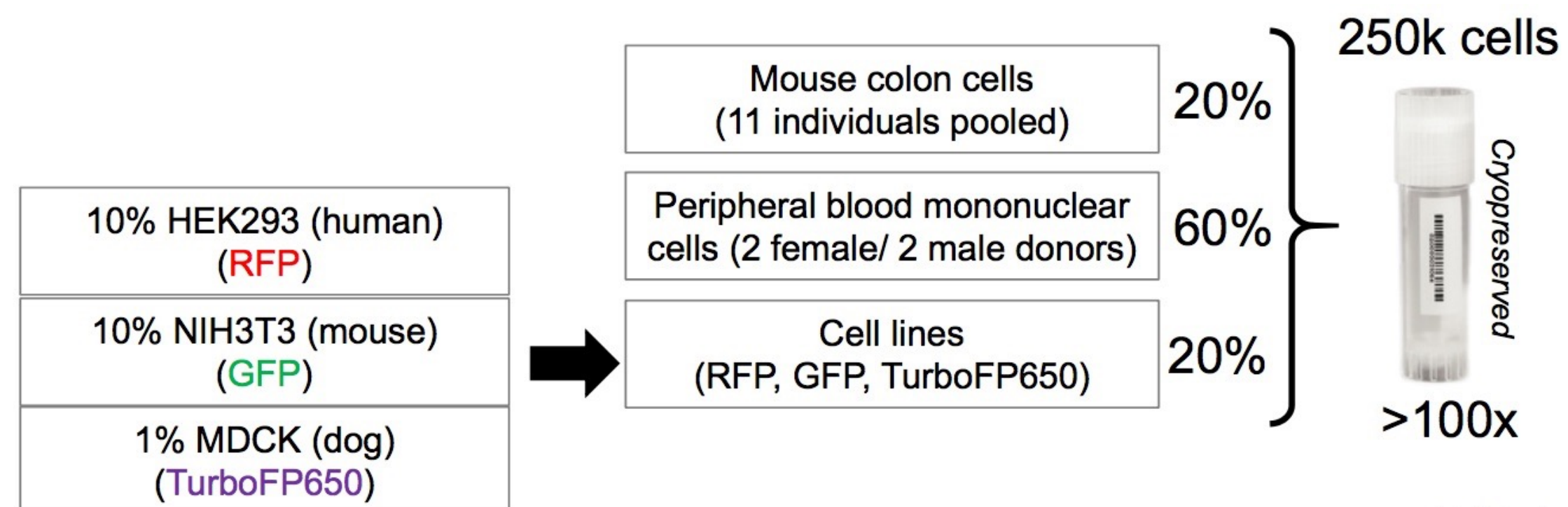
Benchmarking single-cell RNA-sequencing protocols for cell atlas projects



Design of benchmarking study

13 methods:

- Karolinska Institutet, Sweden (Sandberg): Smart-seq2
- MPI Immunology, Germany (Grün): CEL-seq2
- **CNAG, Spain (Heyn): MARS-seq**
- **RIKEN, Japan (Nikaido): Quartz-Seq2**
- LMU, Germany: gmsSCRB-seq
- Biorad/Illumina, US (Martino): ddSEQ
- Fluidigm, US (Lynch): C1 HT IFC (small, meddle)
- 10xGenomics, US (Church): Chromium (cell, sn)
- Dolomite: Drop-seq
- TaKaRa Biotech.: iCELL8
- 1CellBio: inDrops-seq



nature > nature biotechnology > analyses > article



Analysis | Published: 06 April 2020

Benchmarking single-cell RNA-sequencing protocols for cell atlas projects

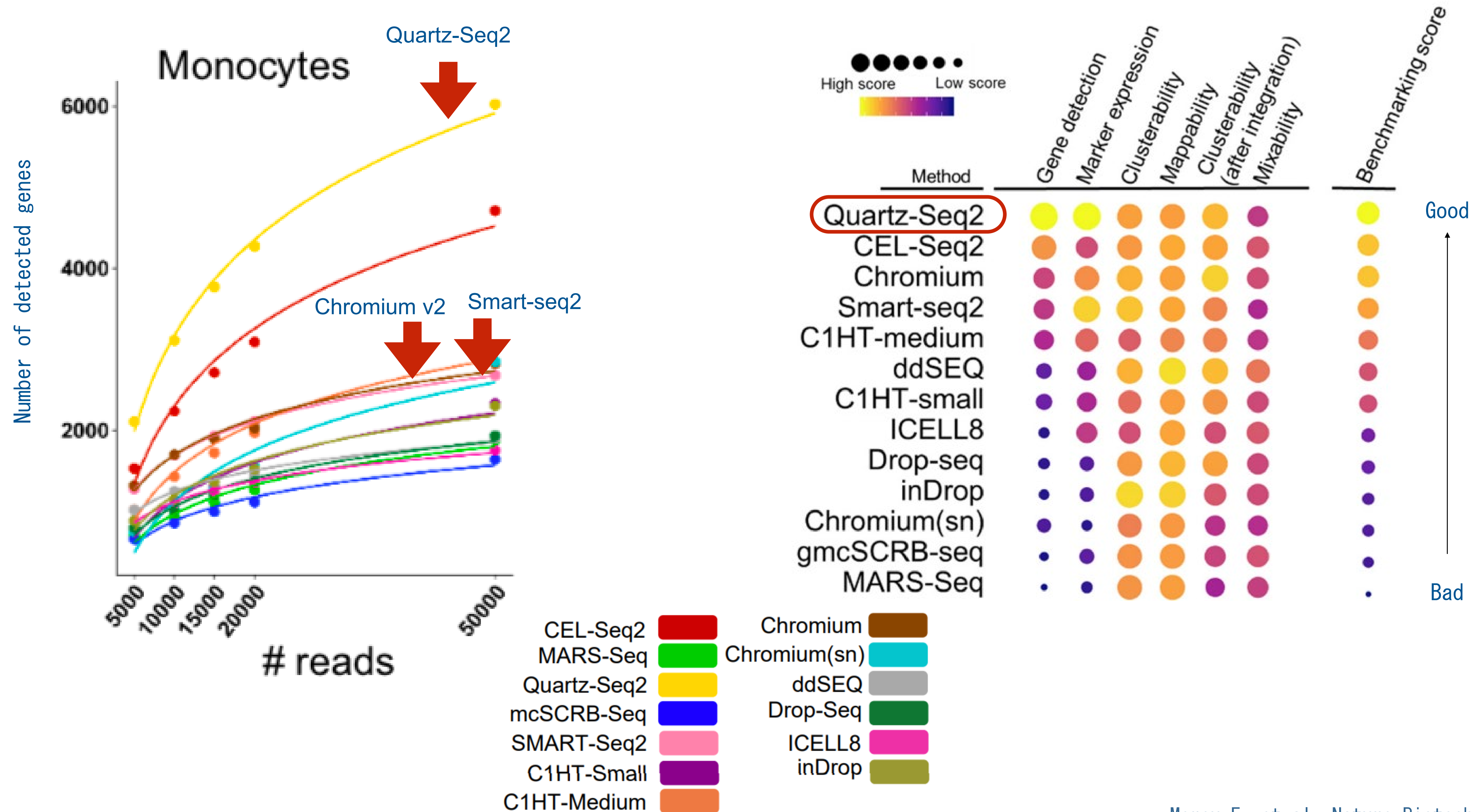
Elisabetta Mereu, Atefeh Lafzi, Catia Moutinho, Christoph Ziegenhain, Davis J. McCarthy, Adrián Álvarez-Varela, Eduard Batlle, Sagar, Dominic Grün, Julia K. Lau, Stéphane C. Boutet, Chad Sanada, Aik Ooi, Robert C. Jones, Kelly Kaihara, Chris Brampton, Yasha Talaga, **Yohei Sasagawa, Kaori Tanaka, Tetsutaro Hayashi**, Caroline Braeuning, Cornelius Fischer, Sascha Sauer, Timo Trefzer, Christian Conrad, Xian Adiconis, Lan T. Nguyen, Aviv Regev, Joshua Z. Levin, Swati Parekh, Aleksandar Janjic, Lucas E. Wange, Johannes W. Bagnoli, Wolfgang Enard, Marta Gut, Rickard Sandberg, **Itoshi Nikaido**, vo Gut, Oliver Stegle & Holger Heyn ✉ - Show fewer authors

Nature Biotechnology (2020) | Cite this article

7768 Accesses | 411 Altmetric | Metrics

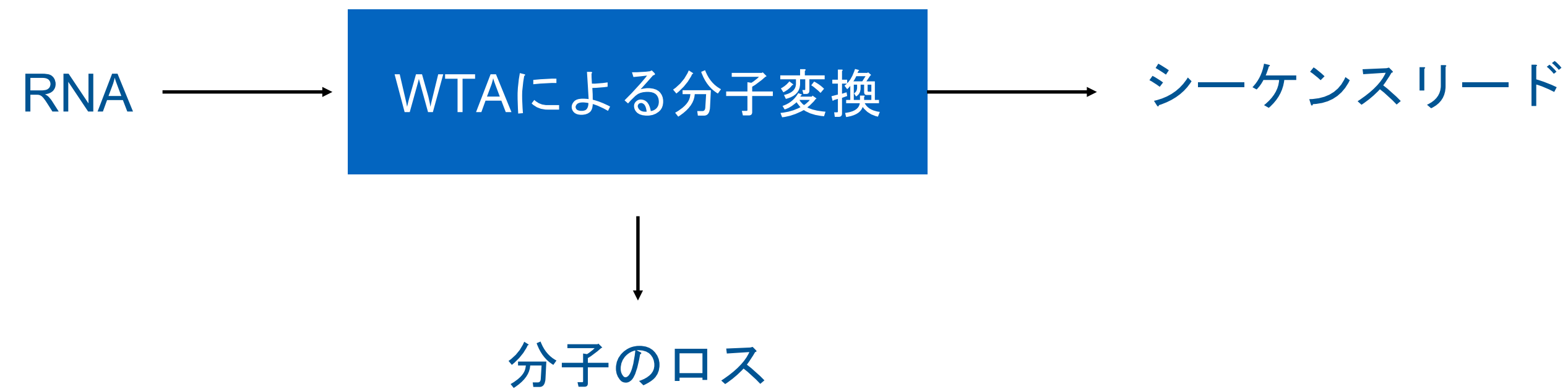
Template switching vs. IVT vs. PolyA tailing
10 : 2 : 1

Design of benchmarking study

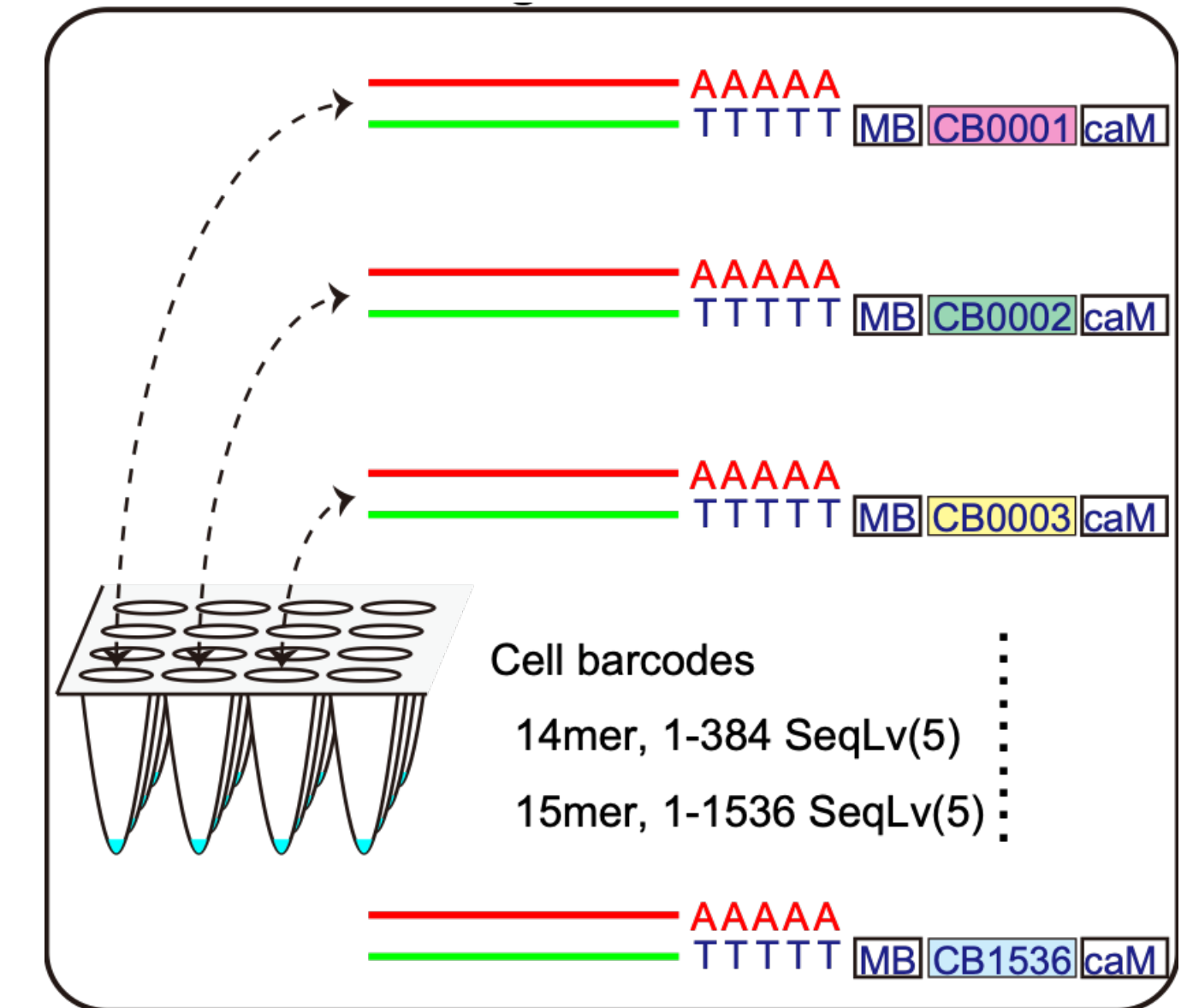
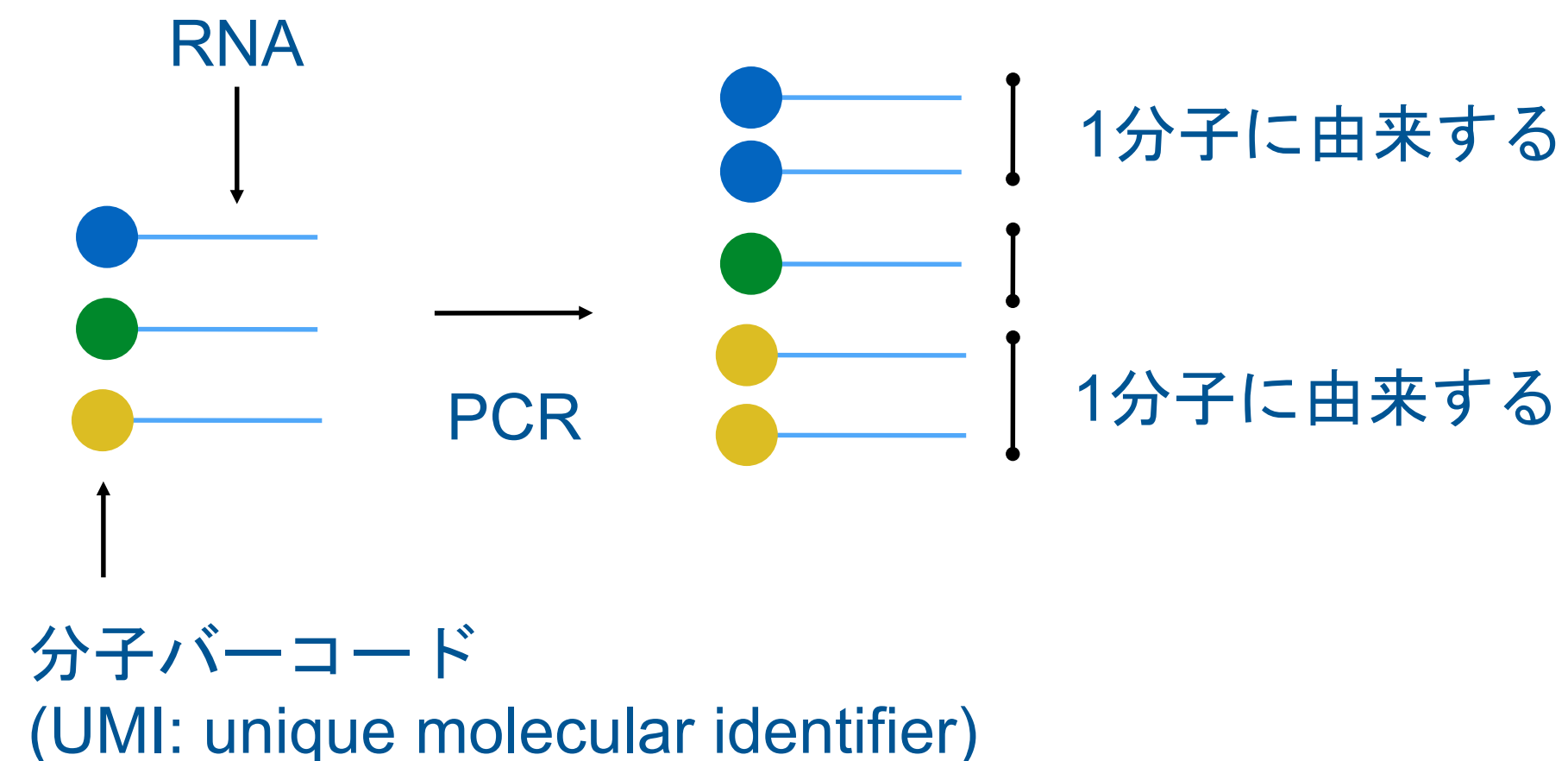


なぜQuartz-Seq2が天下一なのか？

分子変換効率を定量化する

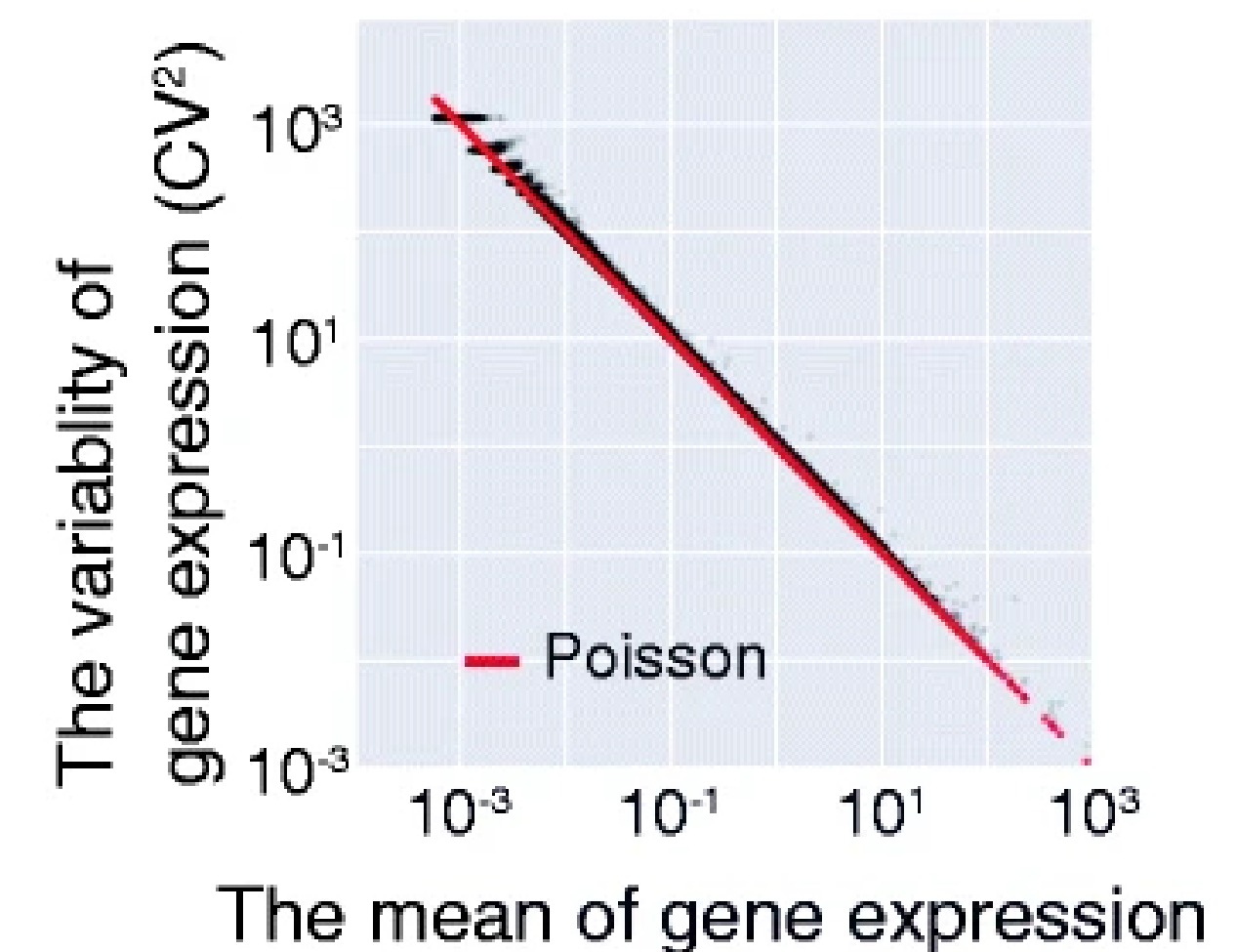


分子バーコード(UMI): PCR増幅バイアスの低減



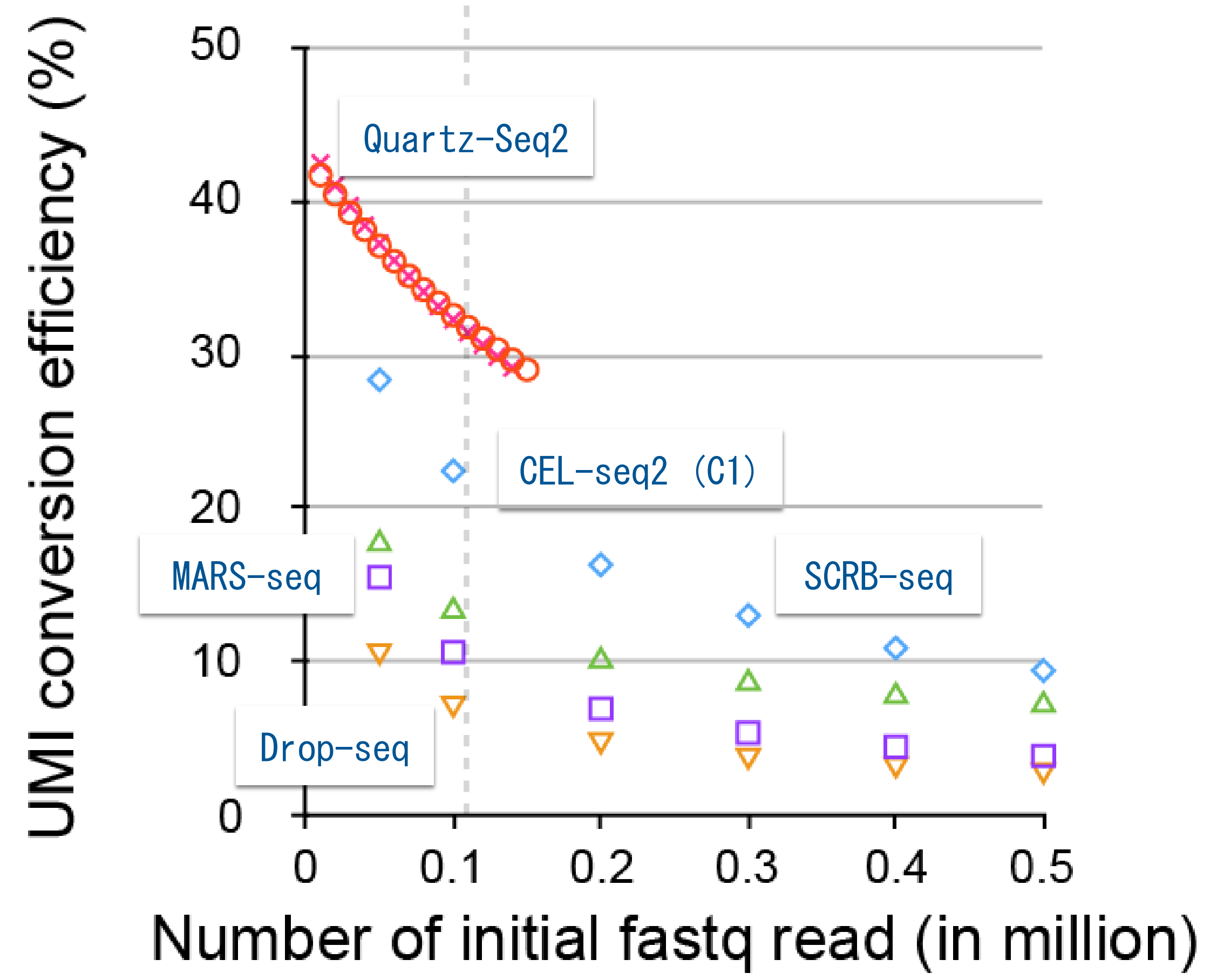
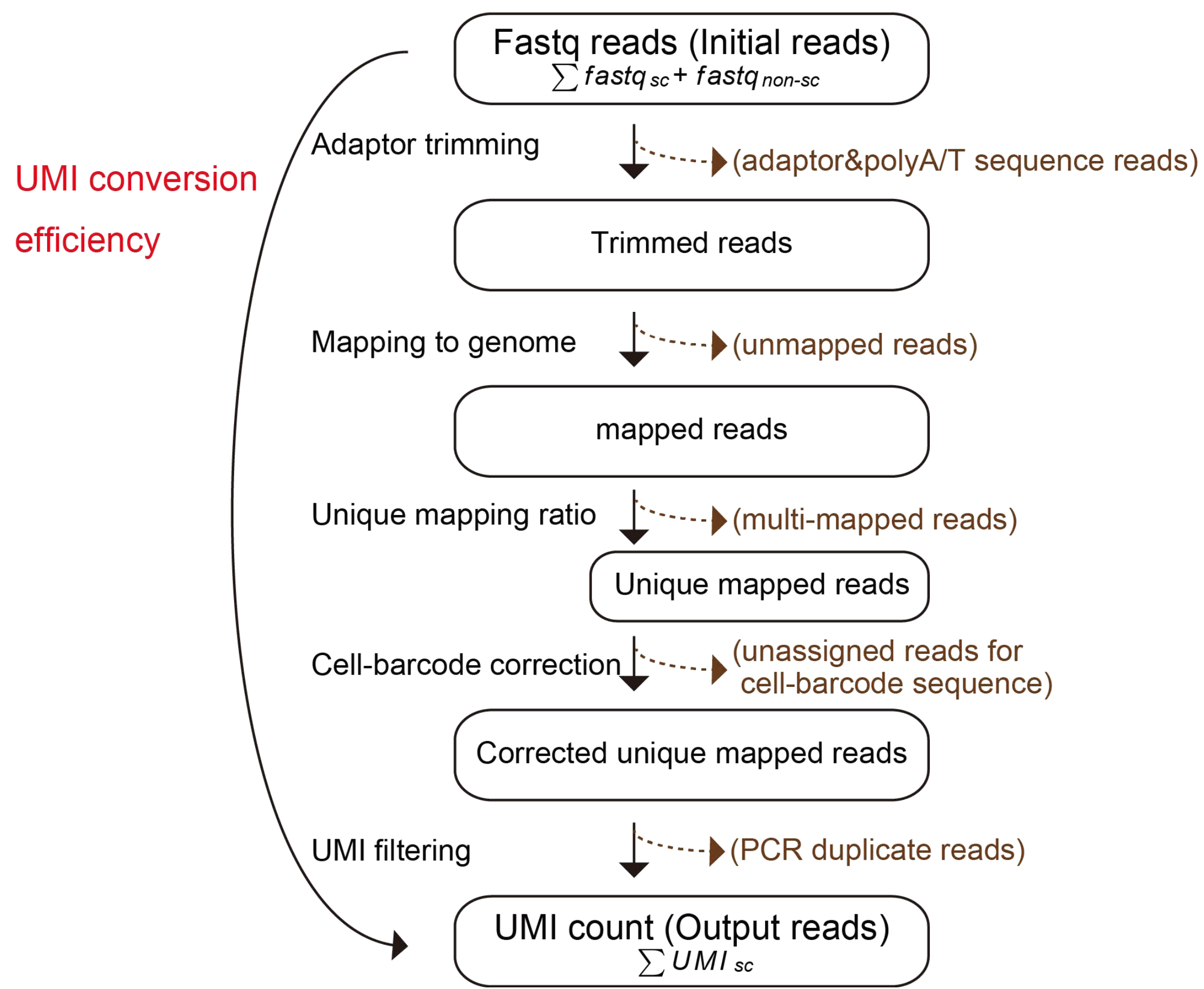
d

Quartz-Seq2 (n=1,152)



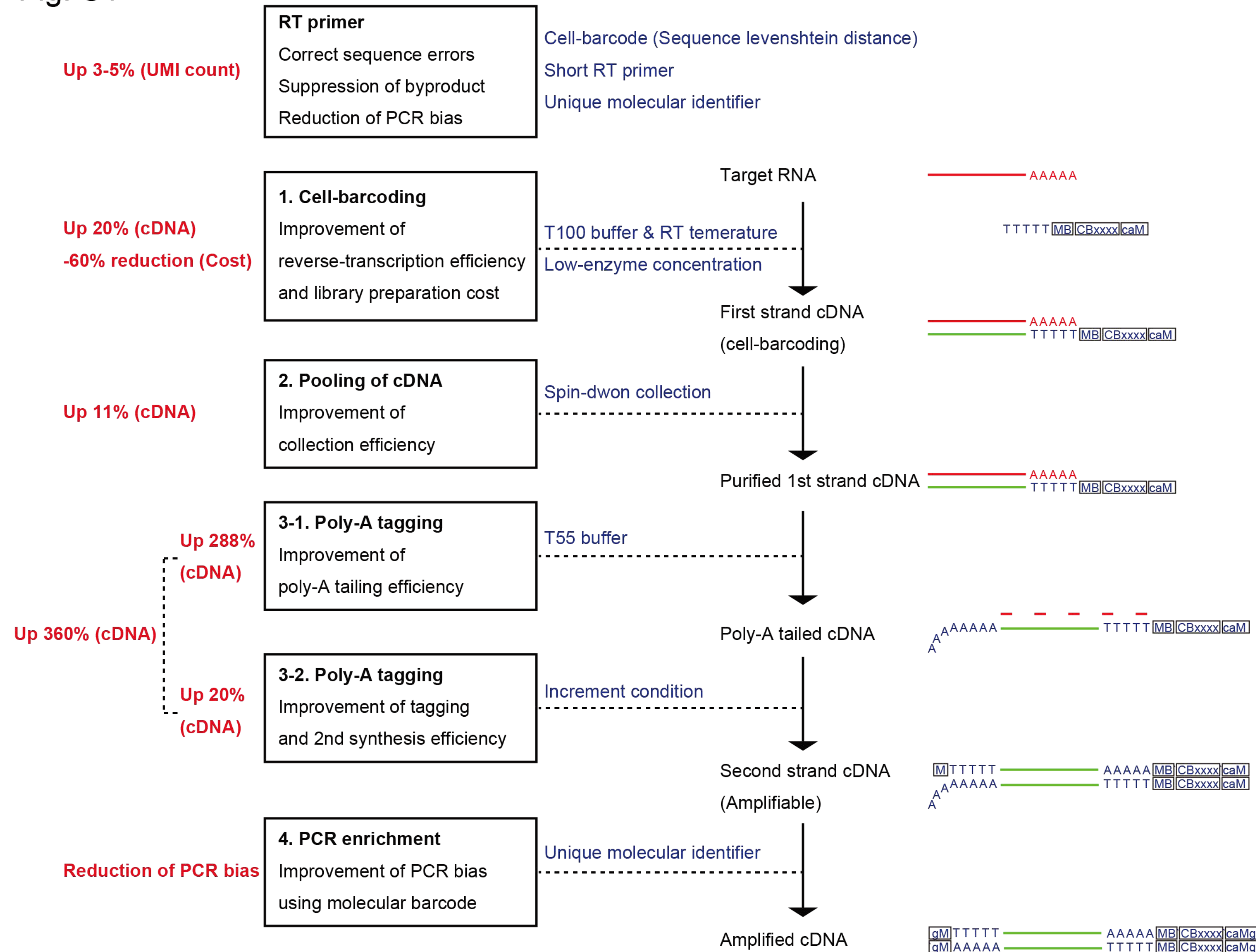
Quartz-Seq2は分子捕捉率が高い

$$\text{UMI conversion efficiency} = \frac{\sum UMI_{sc}}{\sum fastq_{sc} + fastq_{non-sc}}$$



分子捕捉率からQuartz-Seq2の素過程の効率を類推する

Fig. S1



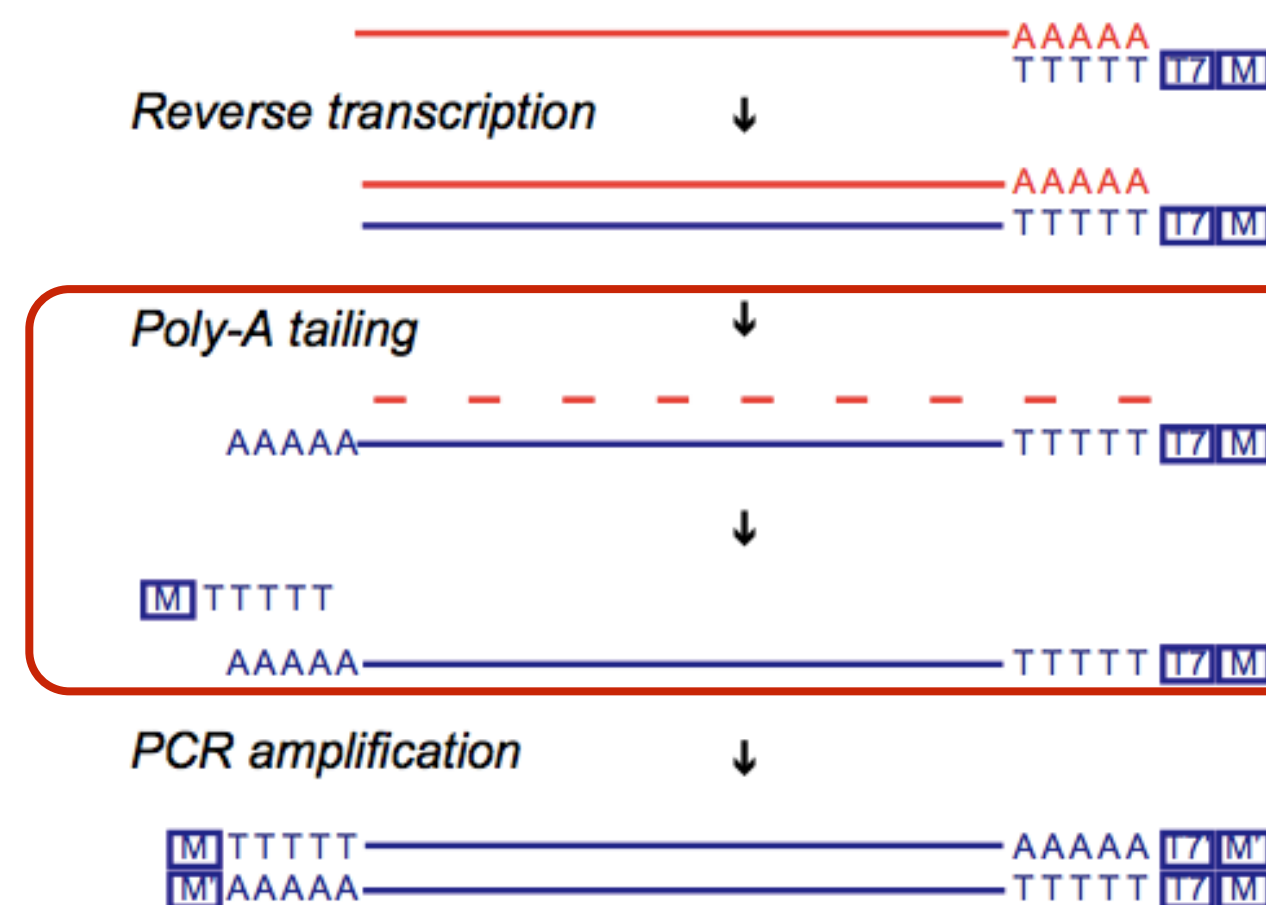
Whole-transcriptome Amplification (WTA)

Highest reproducible and sensitive scRNA-seq
Quartz-Seq (Sasagawa Y. et al. 2013)
Quartz-Seq2 (Sasagawa Y. et al. 2018)

Full-length scRNA-seq
Smart-Seq (Ramskold D. 2012), Smart-Seq2

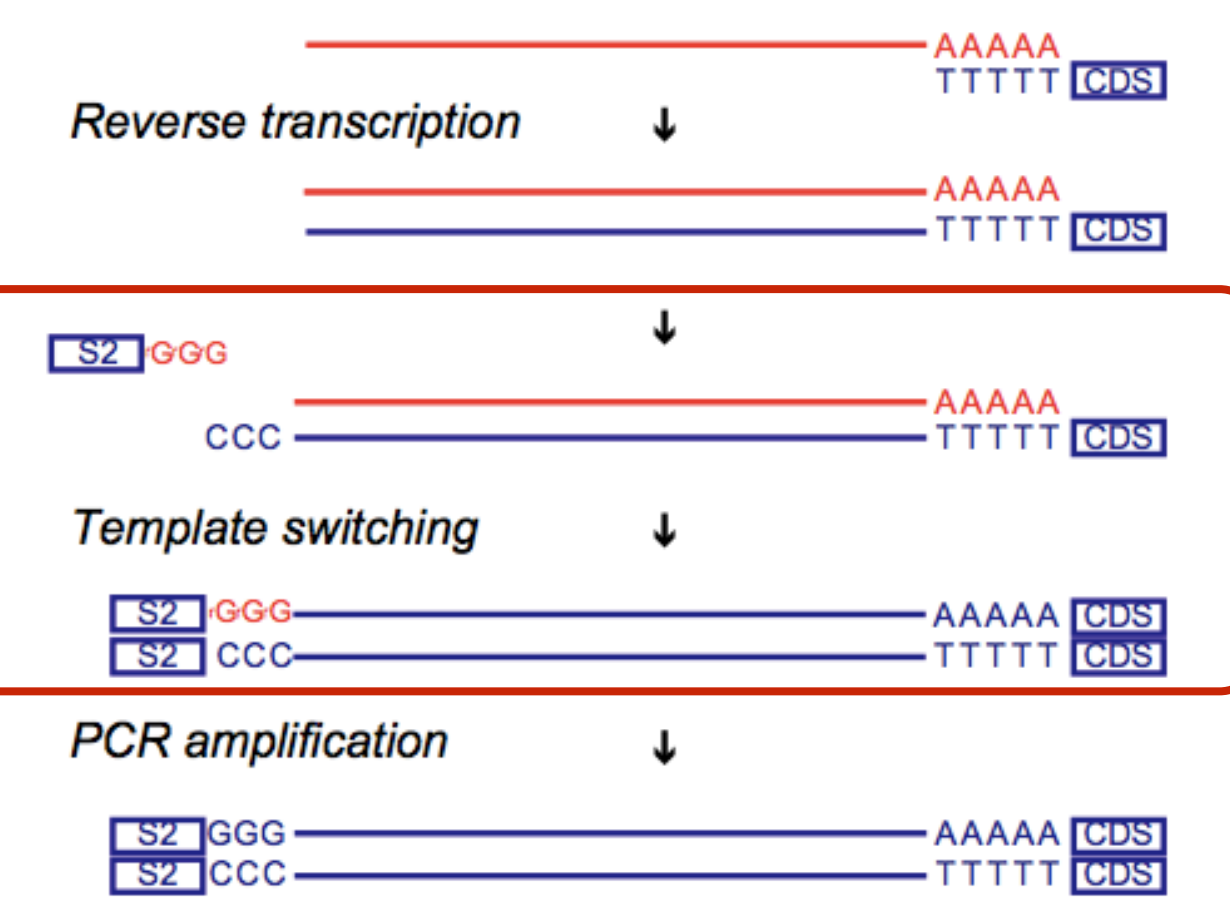
scRNA-seq with linear amplification
CEL-seq, CEL-seq2

1. poly-A tailing



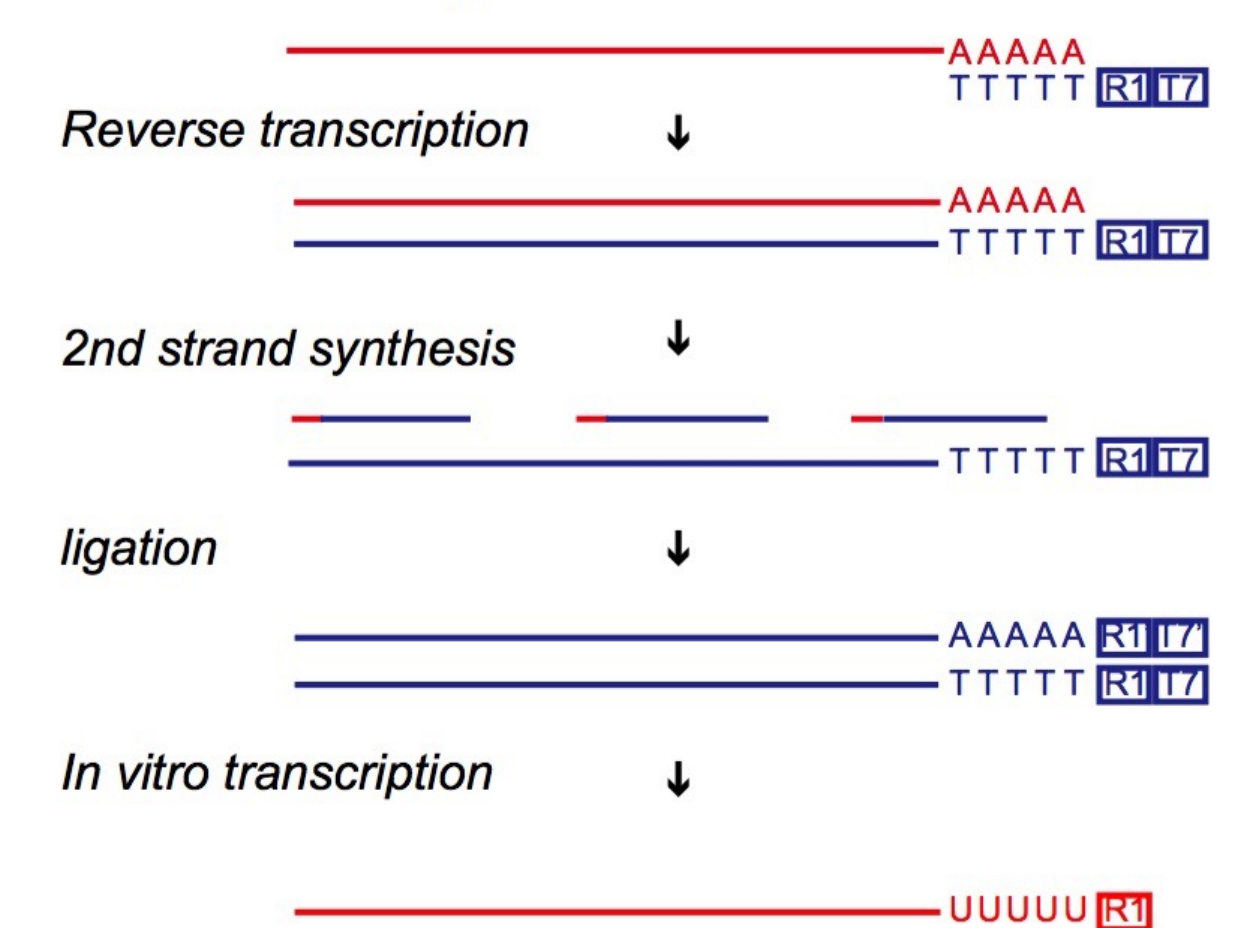
- 逆転写が途中でタギング可能
 - 遺伝子検出感度が高い
 - TruncateなRNAも捉える
- cDNA長が均一でPCR増幅バイアスが少ない
- 反応条件が厳しめ

2. Template-switching



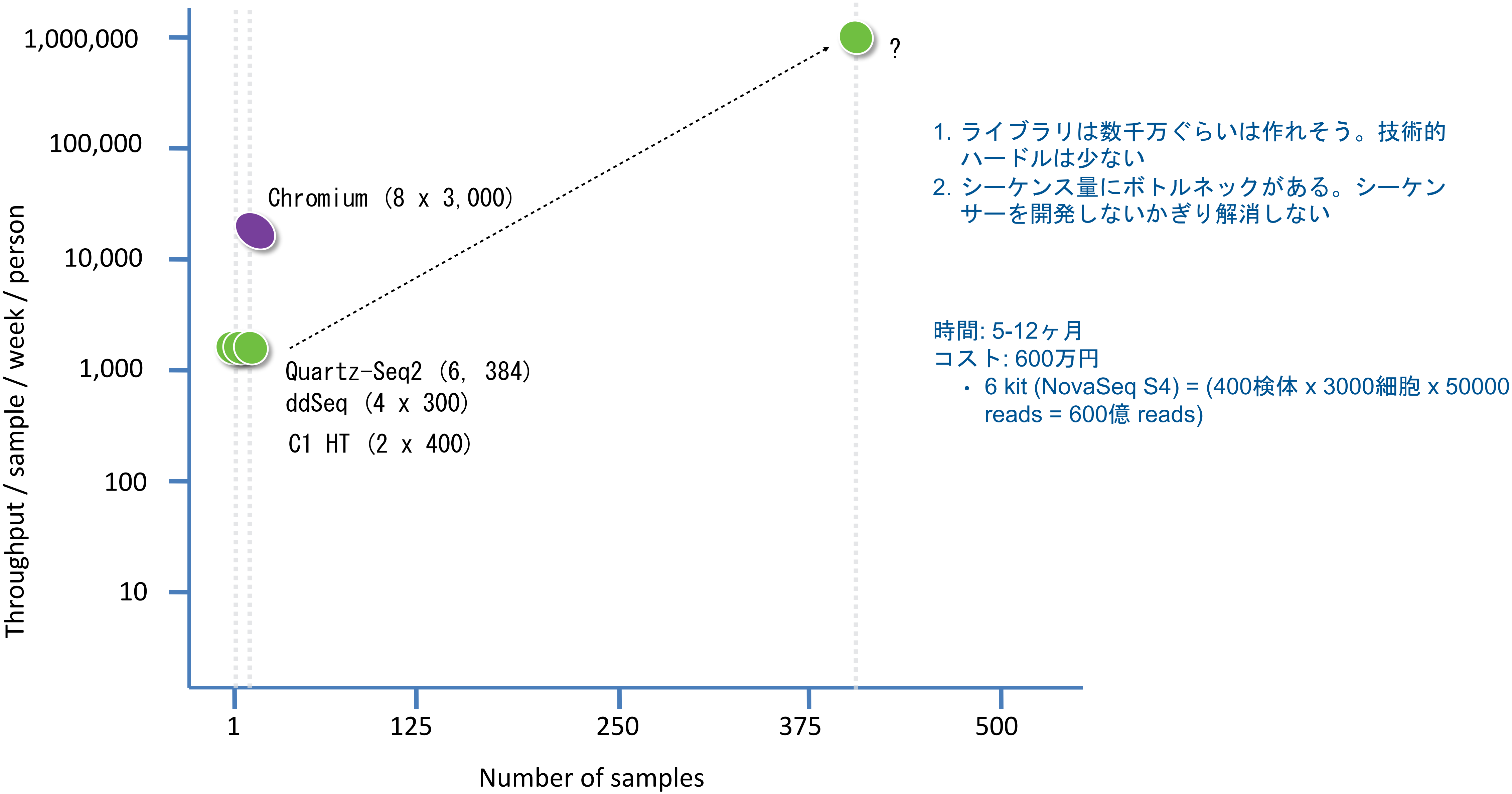
- 最後まで逆転写できるとタギングされる
 - 完全長に近い
 - 遺伝子検出感度が高くない
- cDNA長がまちまちでPCR増幅バイアスが多い
- 逆転写中にタギングできる (1 stepで簡便)

3. In vitro transcription



- IVTによる線形増幅
 - 遺伝子検出感度が高め
 - 2nd合成効率が改善されていない?

たくさんの細胞からたくさんの検体へ: 1細胞RNAシーケンスは多検体に向かない



Agenda

- なぜ1細胞トランスクリプトーム解析が必要か? (3分)
- 高精度&高出力型1細胞RNA-seq: Quartz-Seq2 (15分)
- Human Cell Atlas計画とベンチマーキング (15分)
- おわりに (2分)

Total RNA-sequencingと1細胞トランスクリプトーム

- 1細胞RNA-seqは3'端にリードが偏る

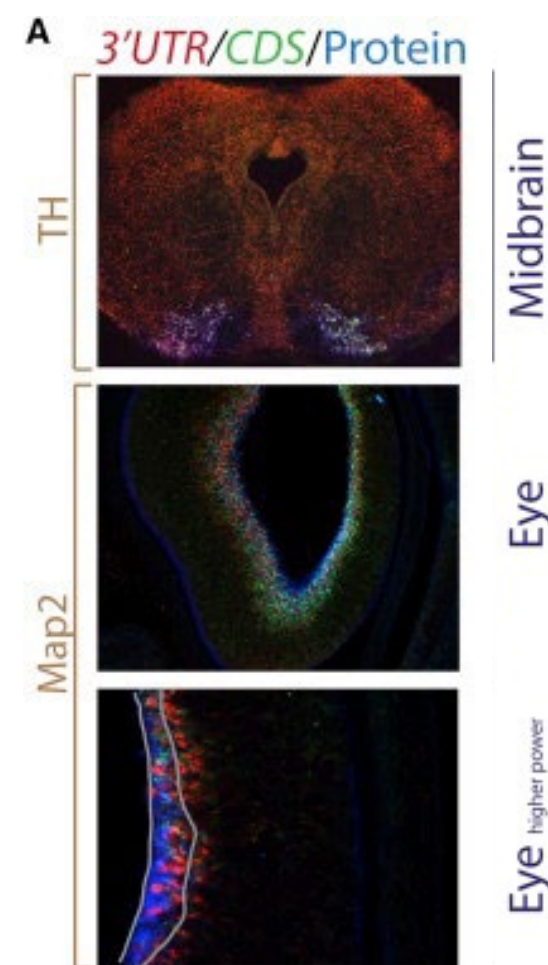


- RNA病
1塩基多型疾患の15%はRNA構造異常による

It is estimated that up to 15% of all point mutations causing human genetic disease result in an mRNA splicing defect.

Krawczak M. et. al. 1992

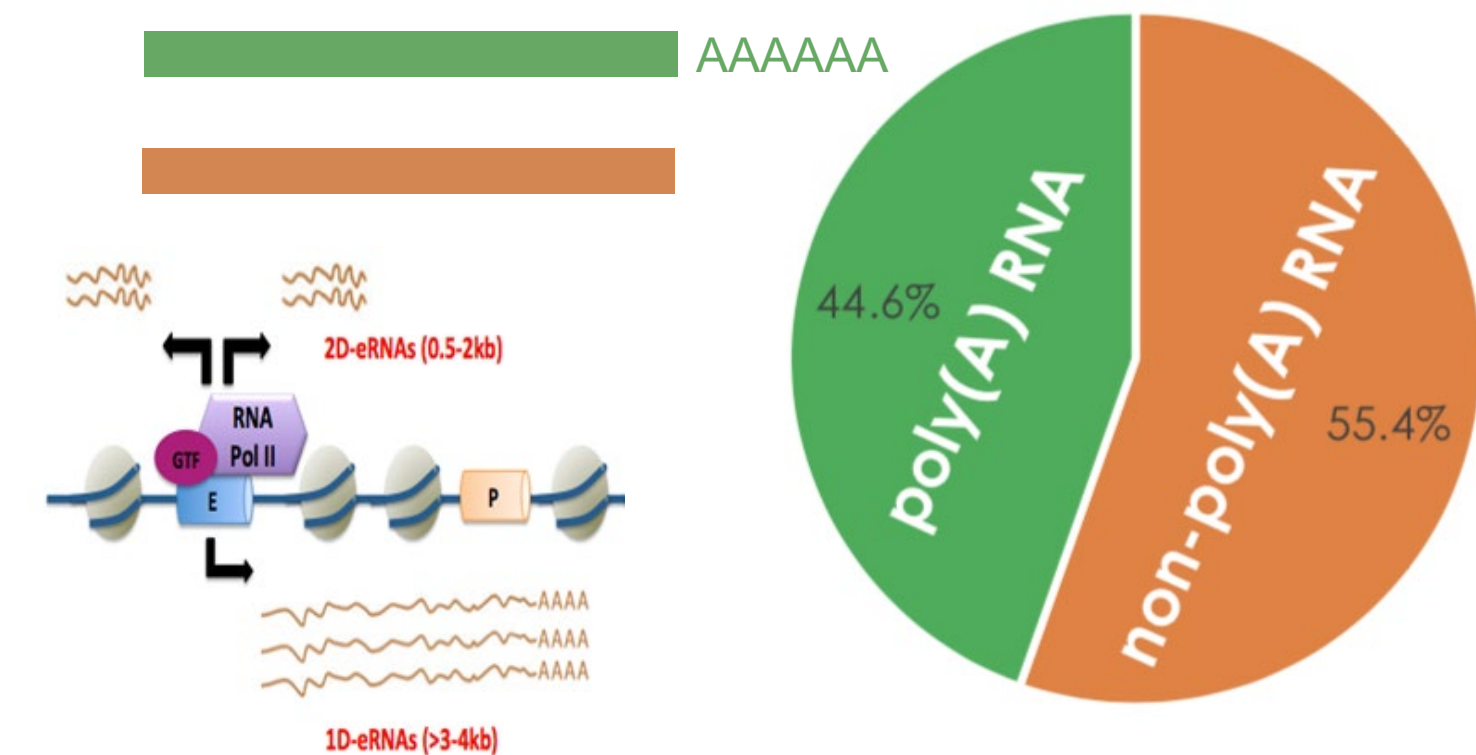
- 3' UTRは、CDSやタンパク質の発現量と不一致?



- 3'端から500 bp CDSが含まれる遺伝子は7割程度
- ハイスループット
scRNA-seqでは3'端を短く読む

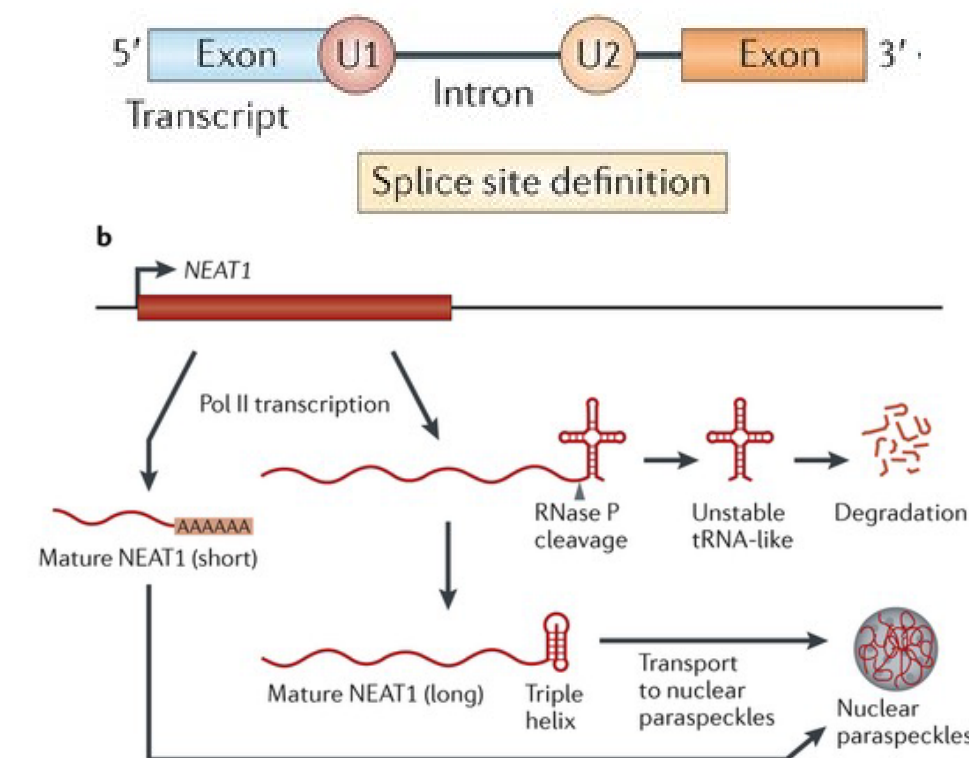
(Kocabas A. et. al. Neuron, 2015)

- RNAの約半分は非ポリA配列

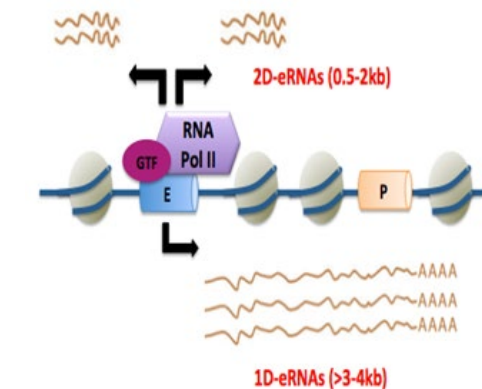


- 多様な機能性非ポリA RNAが存在

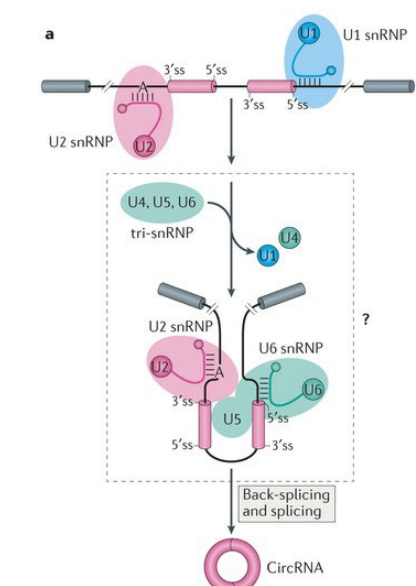
1. Pre-mRNA/RNA degradation



2. Enhancer RNA

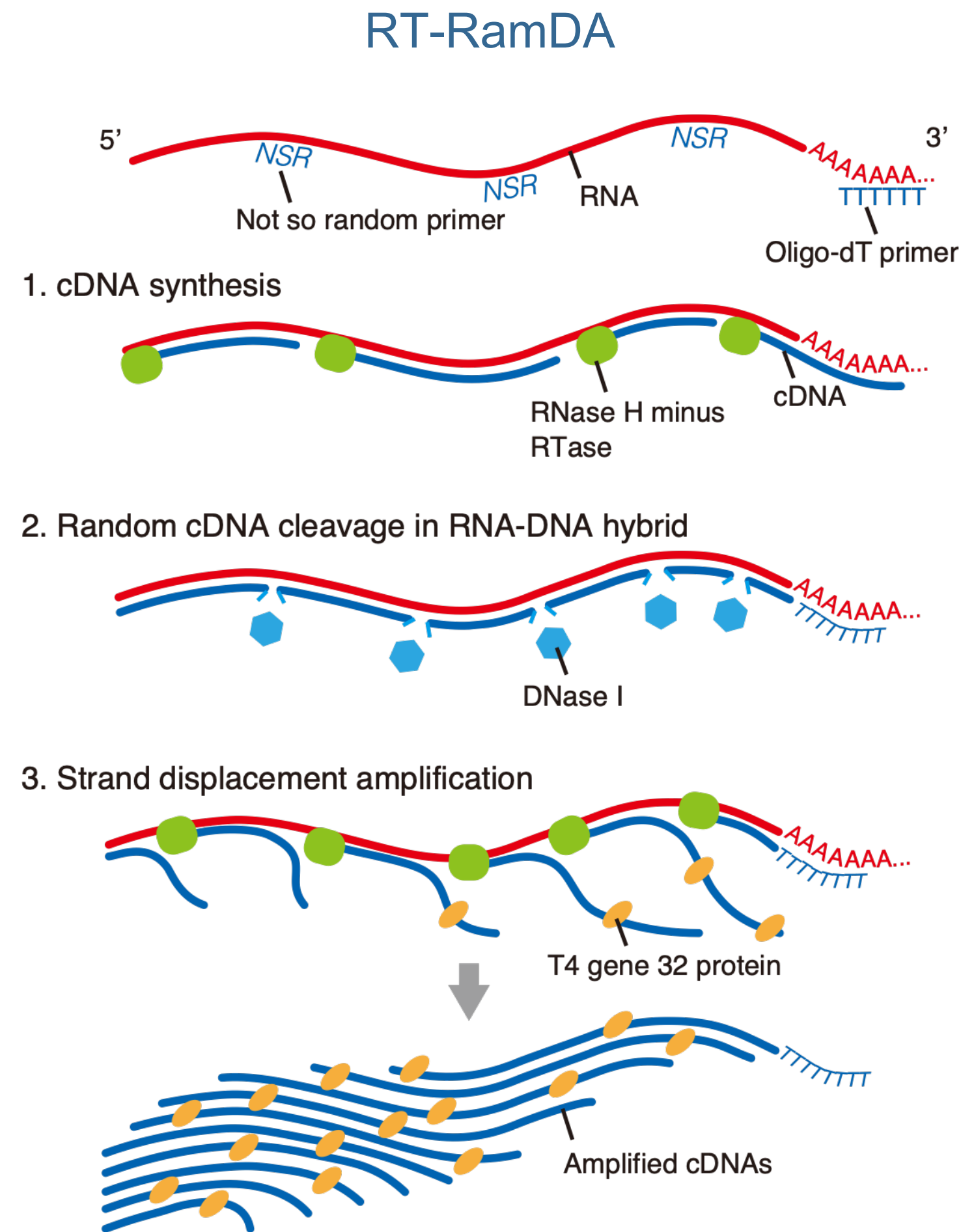


3. CircRNA

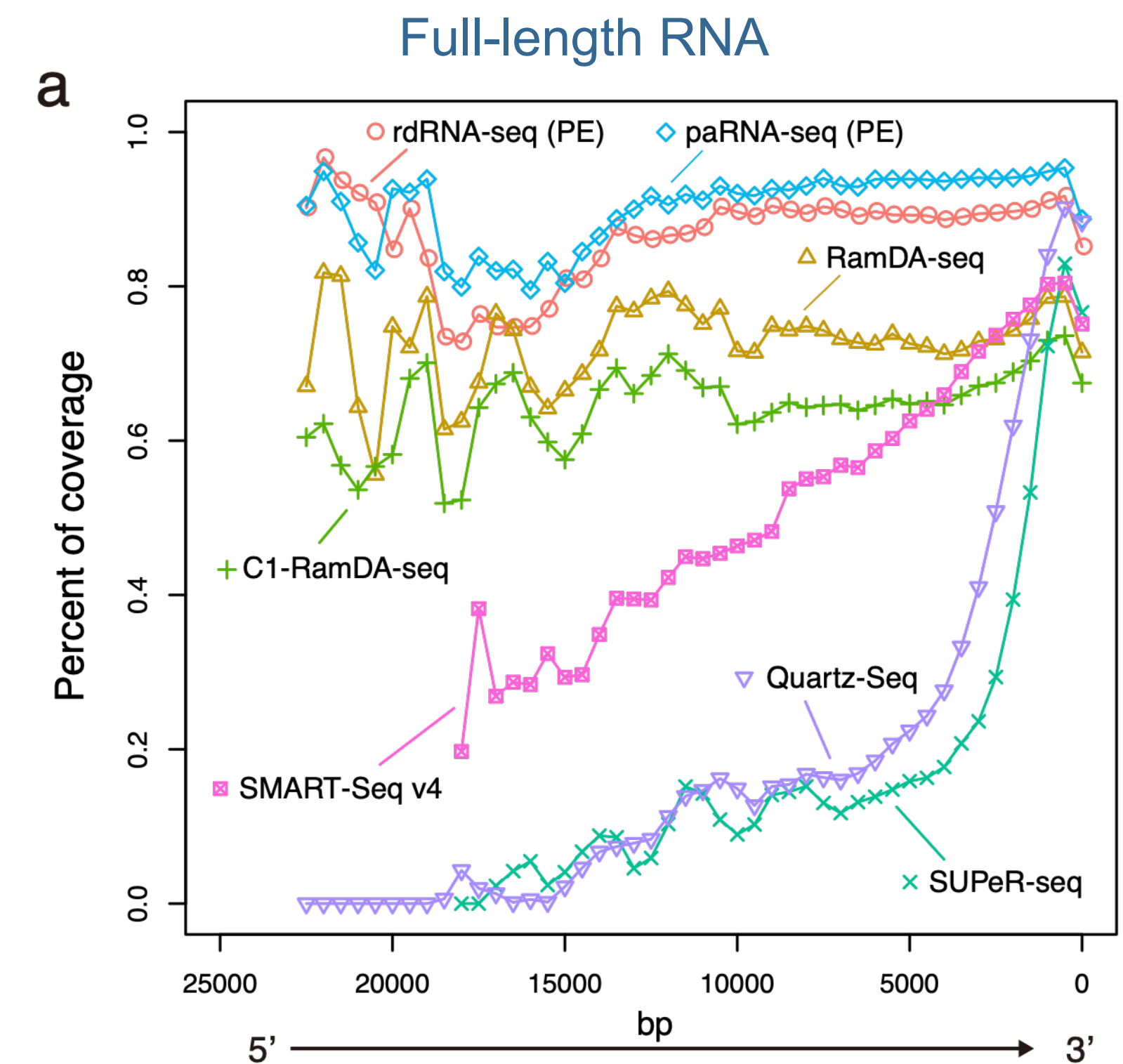
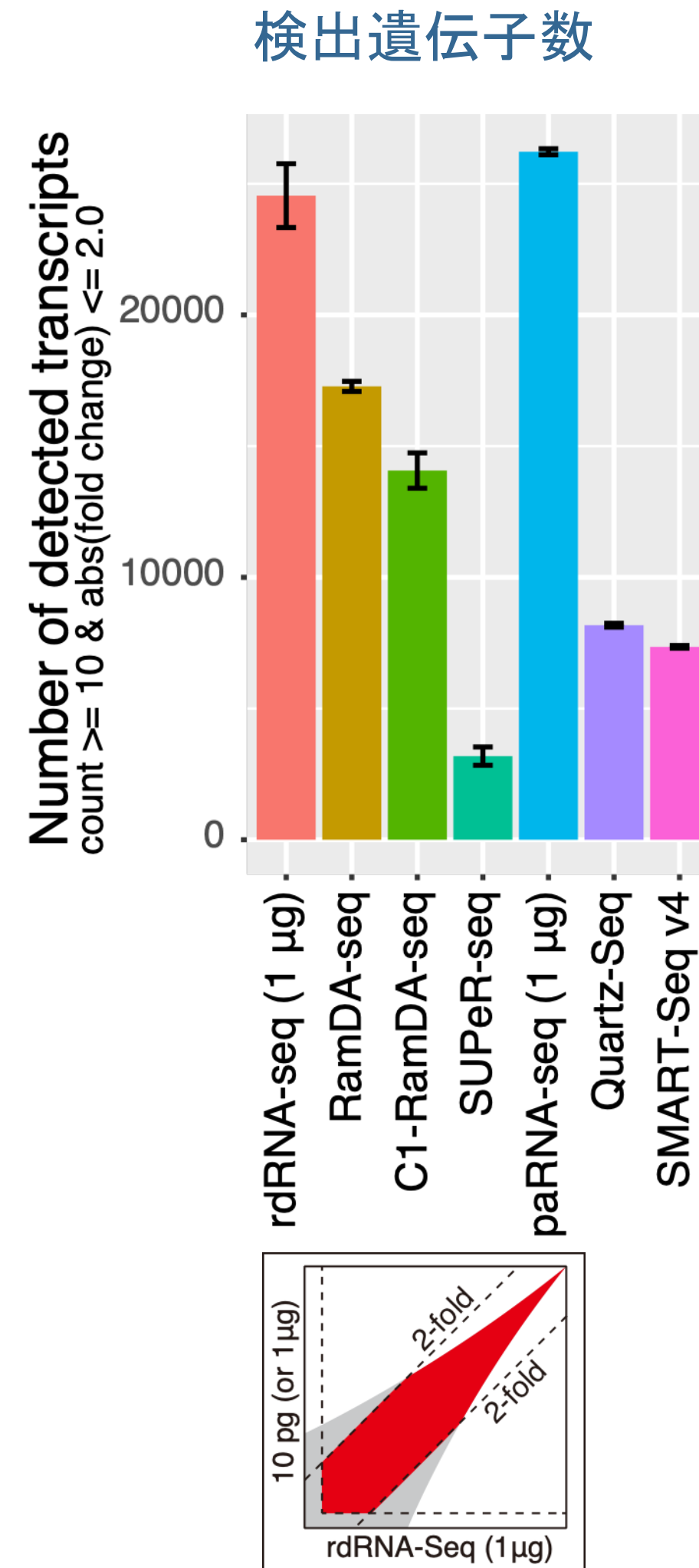


Bulk RNA-seqのほとんどがPoly-A RNA。1細胞はほぼすべてPoly-A RNAのみ

RamDA-seq: 世界初の1細胞完全長Total RNA-seq法



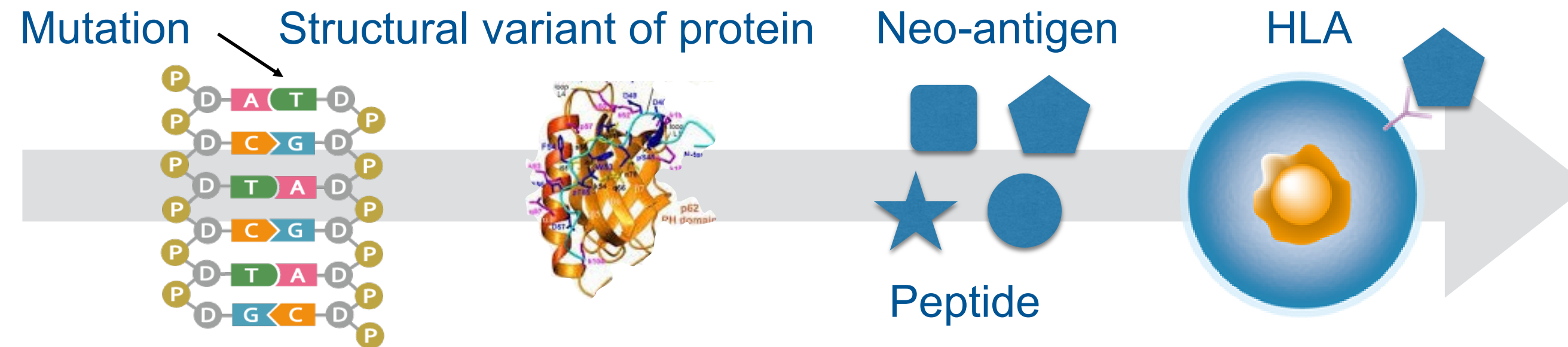
Hayashi T. et al. Nature Comm. 2018
Patent: WO2016052619A1



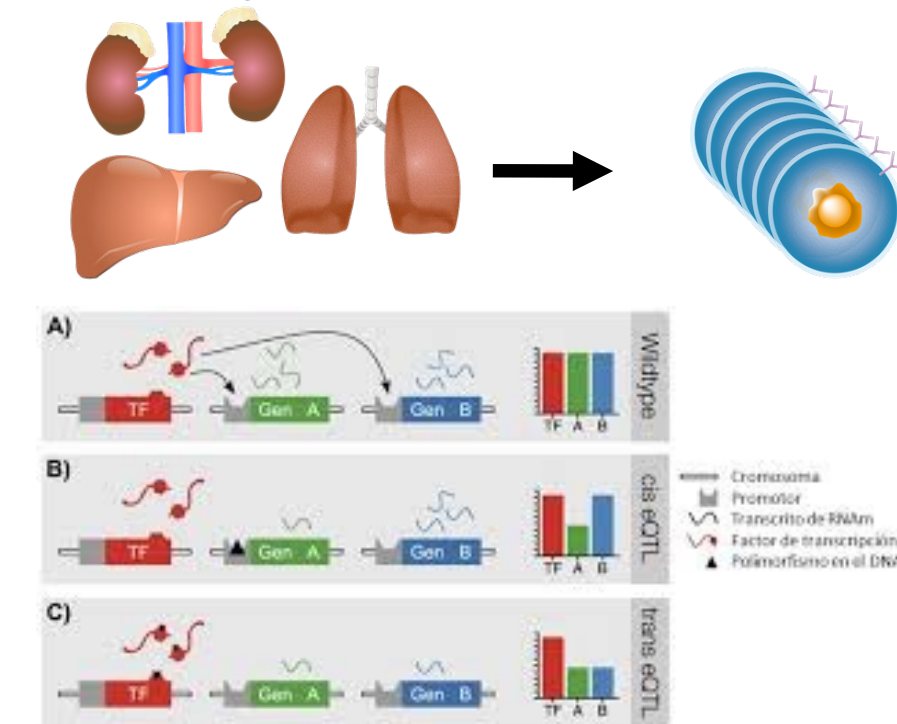
Single-cell total RNA-sequencingのメ ディカルサイエンスへの応用

1. 多型と発現制御の関連

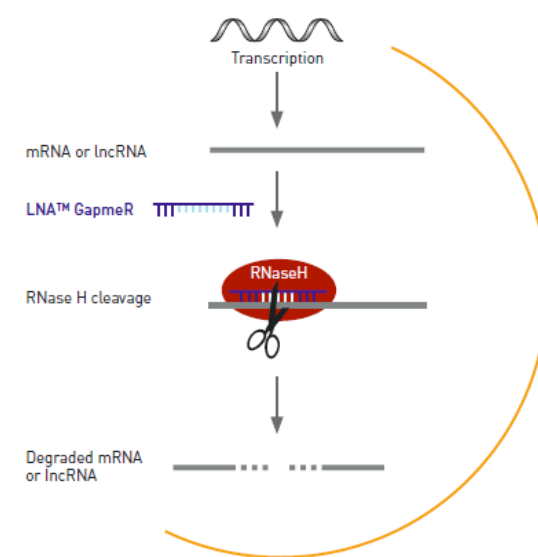
A. Neo-antigenとがん



B. cell typeごとのeQTL



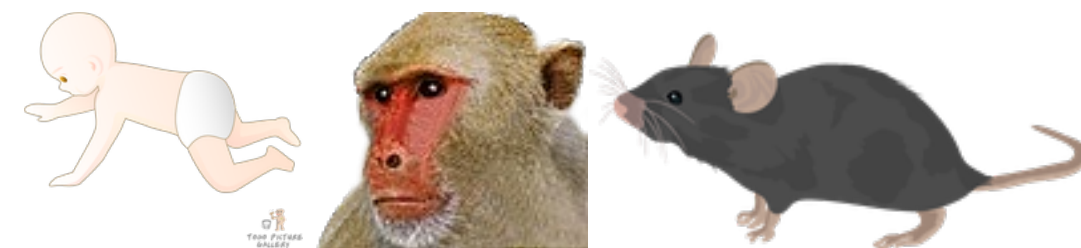
2. pre-mRNA/mRNAを標的とした核酸医薬



スピンラザ
乳児型脊髄性筋萎縮症薬
(SMA)

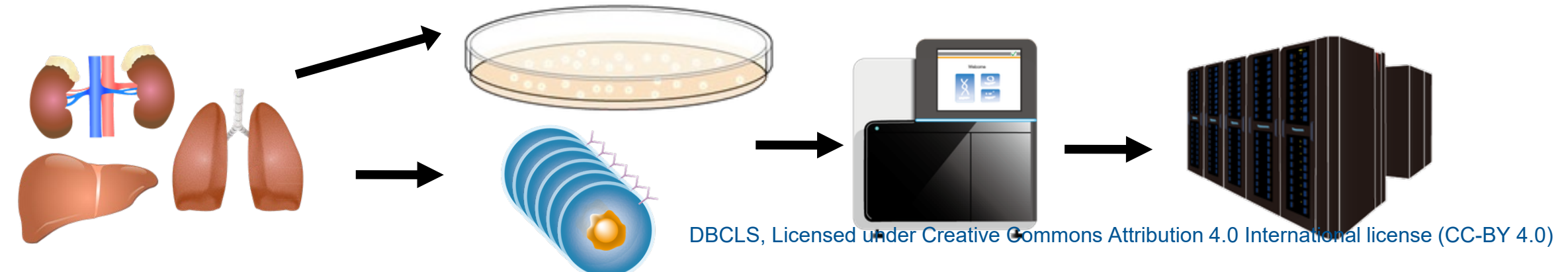
- 核酸医薬は種特異性が高く動物実験で効能・副作用を評価できない
- RNA DBによるオン/オフターゲット効果の評価が最重要

現在のRNA DBは種レベル



細胞ごとに違うRNA構造がキメラになっている

Single-cell Total RNA-seqでは単離できない細胞型のRNA DBも構築可能



Human Cell Atlas時代にこそ、先行したFull-length RNA Atlasの整備が急務

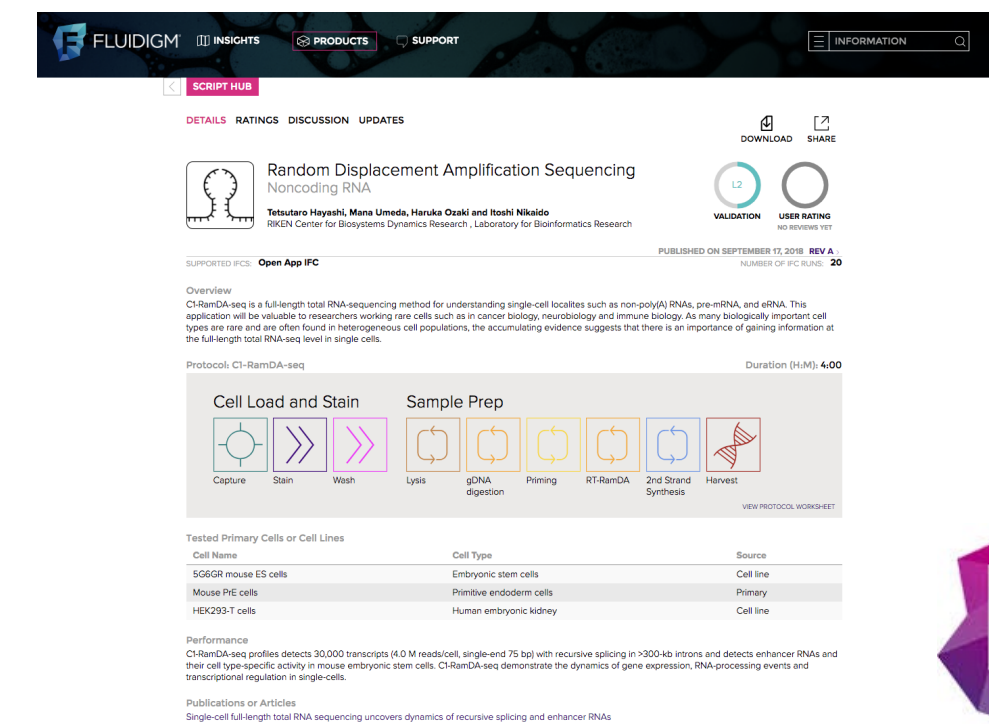
RamDA-seqの製品化

RamDA-seq試薬キット



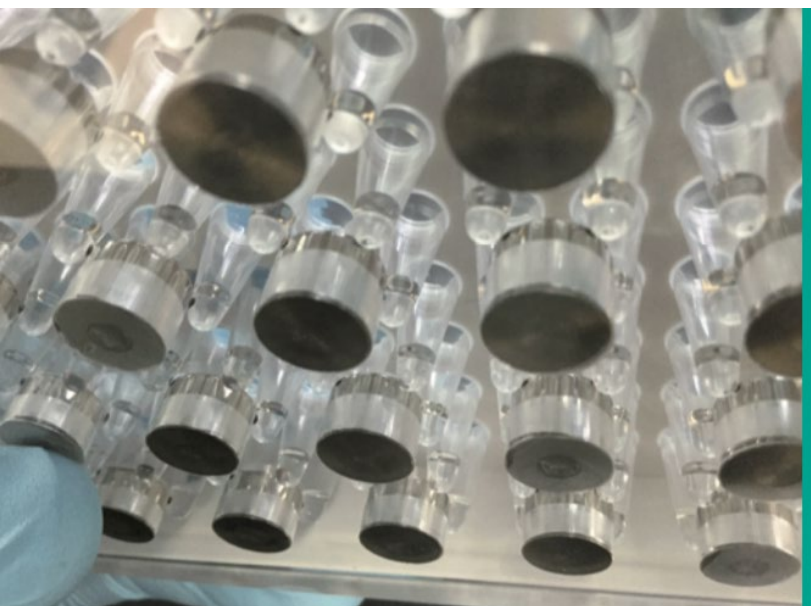
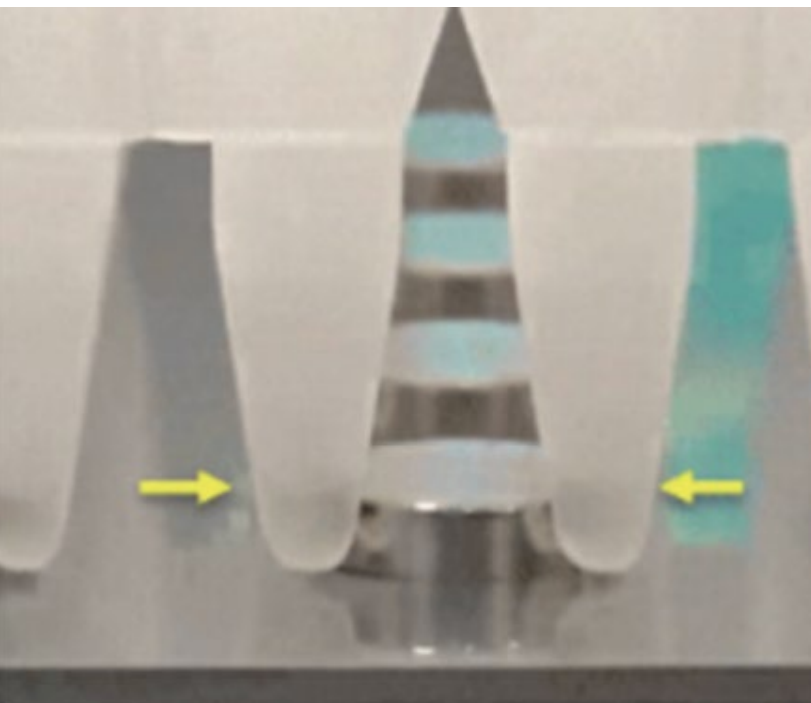
RamDA-seq用試薬
RT-qPCR用試薬

Fluidigm C1用プログラム

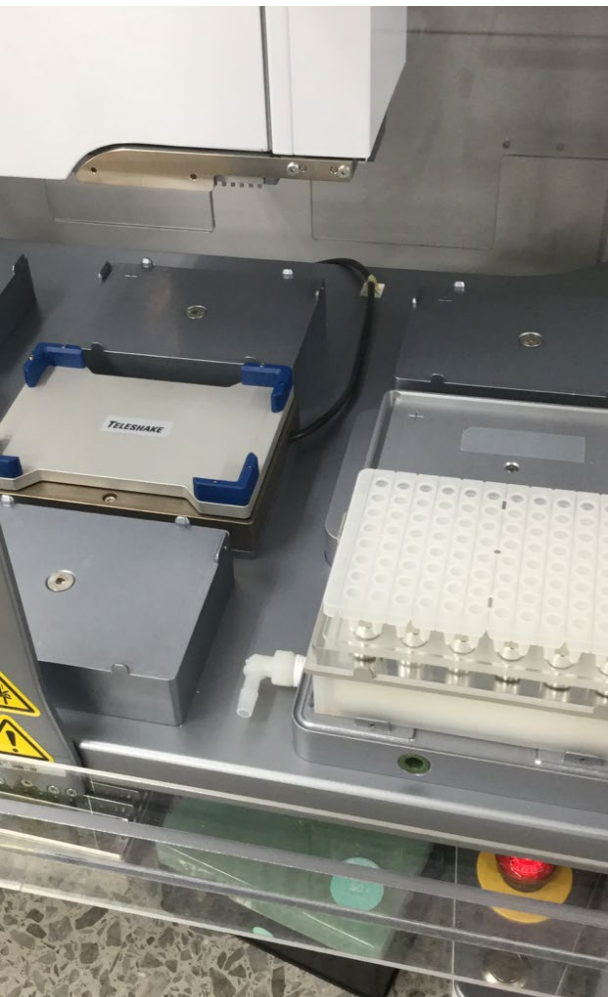


DNA精製用マグネットプレート

- 最新のネオジウム磁石N53を使用
- ウェルとの接着面が低い (3 uLに対応)
- 異極配置により強力な磁場を実現
- プラスチック製のため軽量・透明
- 分注ロボットに対応



Eppendorf epMotion



Agilent Bravo

Quartz-Seq2の産業応用を目指したスタートアップ



- ・再生医療等製品のトランスクリプトームによる評価、開発
- ・トランスクリプトームとAIを用いた創薬

ライフイノベーションセンター (LIC) @神奈川県川崎市殿町



團野宏樹. PhD. / Co-CEO
・二階堂研出身
・Quartz-Seq2論文の co-first author



福田 雅和. PhD. / Co-CEO
・和光純薬工業株式会社にて、複数の幹細胞培地を上市
・製品設計、製造工程や品質試験の立案の実務を経験

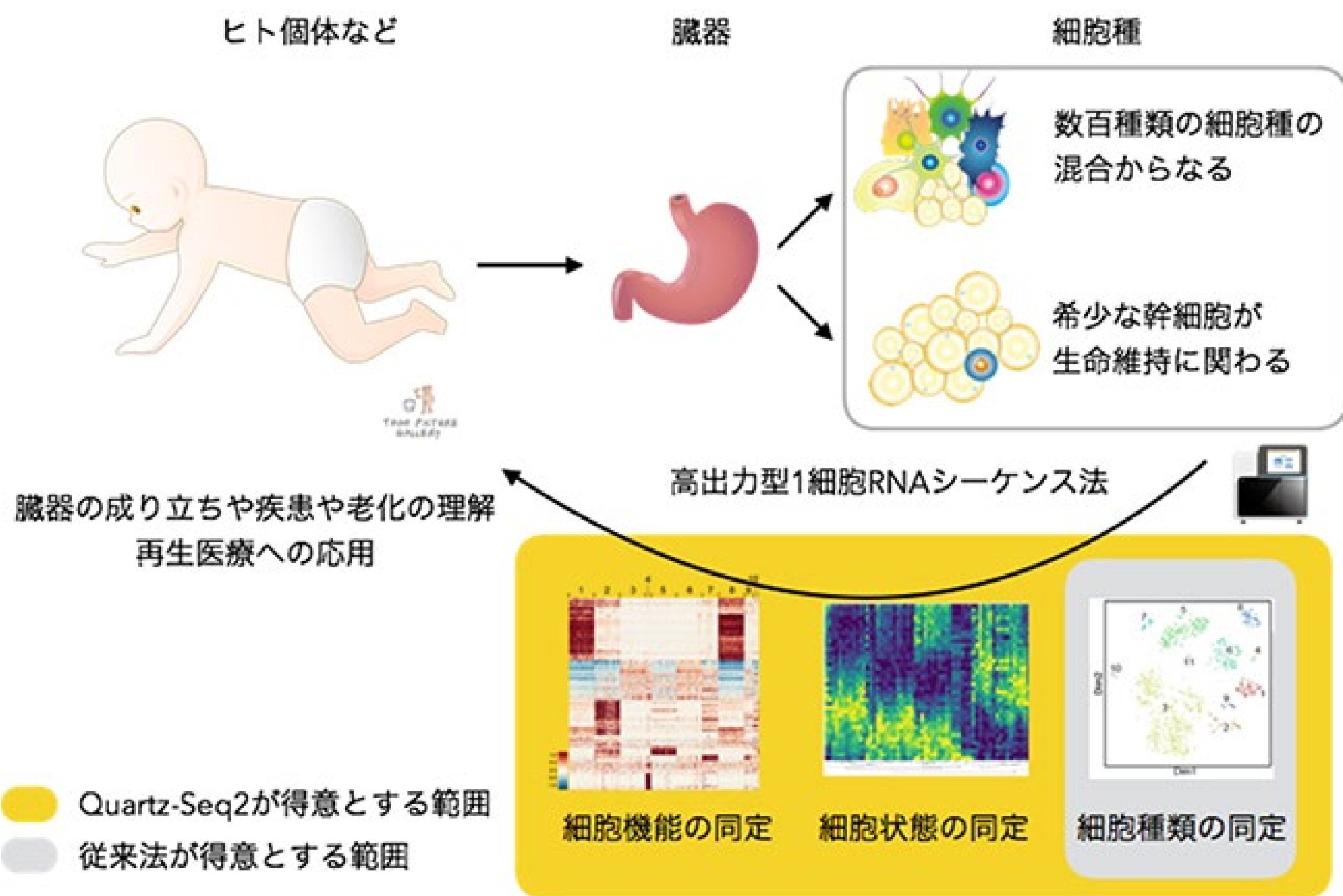


顧問
・二階堂愛
・笹川洋平



Quartz-Seq2とRamDA-seq

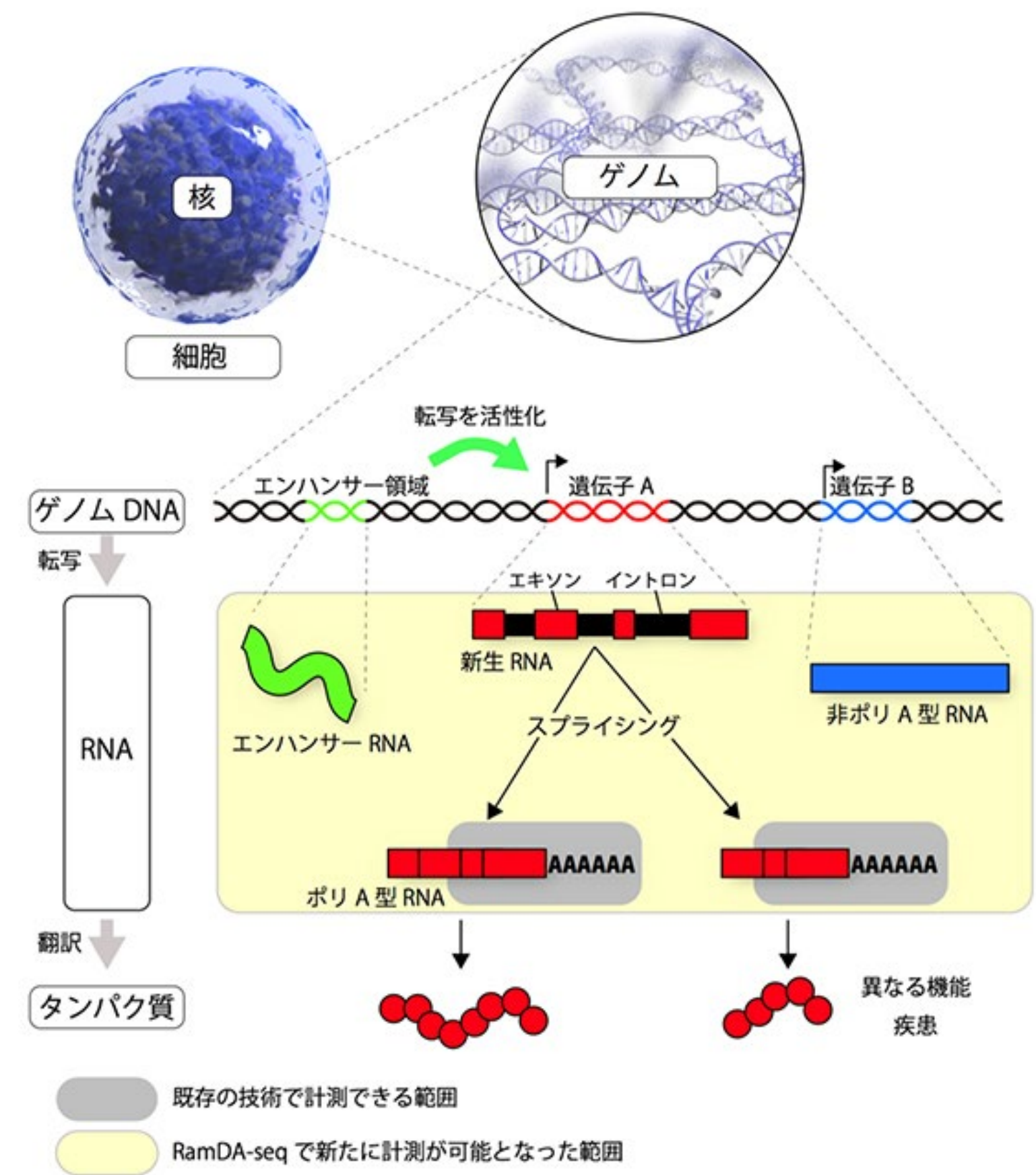
Quartz-Seq2: 高精度・高出力1細胞RNA-seq
細胞機能から細胞状態へ



© 2016 DBCLS TogoTV / CC-BY-4.0

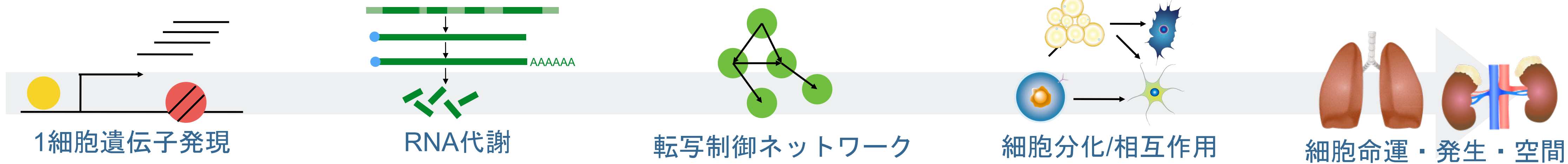
Sasagawa Y. et. al. Genome Biol.. 2013
 Sasagawa Y. et. al. Genome Biol.. 2018
 Sasagawa Y. et. al. Adv. Exp. Med. Biol. 2019
 Mereu E. et al. Nature Biotech 2020

RamDA-seq: 1細胞完全長Total RNA-seq
遺伝子のかげらから遺伝子の全体像へ

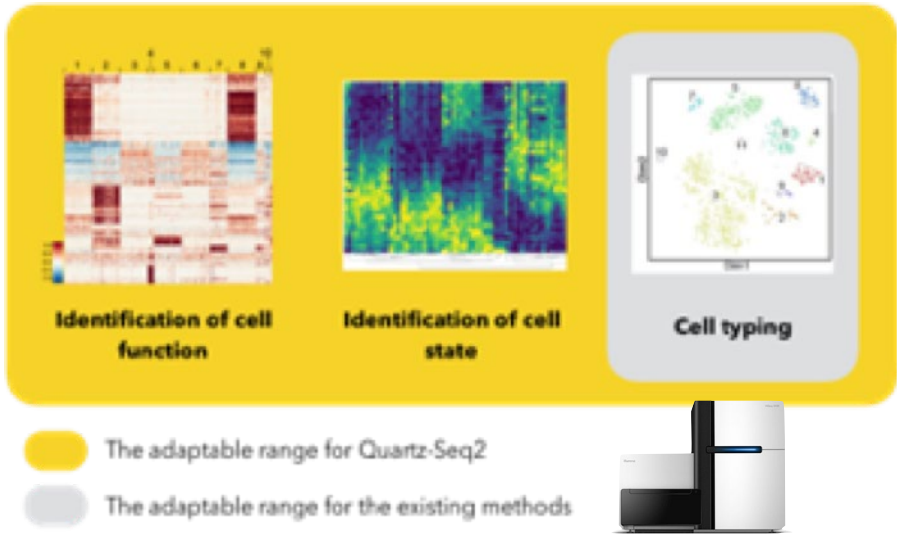


Hayashi T. et. al. Nature Comm. 2018
 Sasagawa Y. et. al. Adv. Exp. Med. Biol. 2019
 Patent: WO2016052619A1

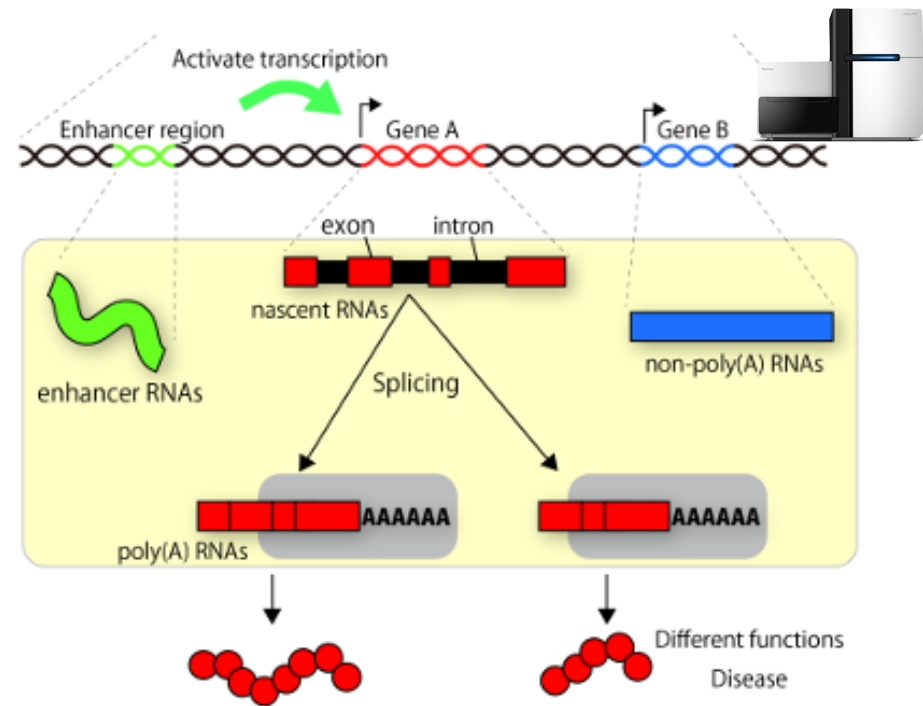
Achievements (-2013.4)



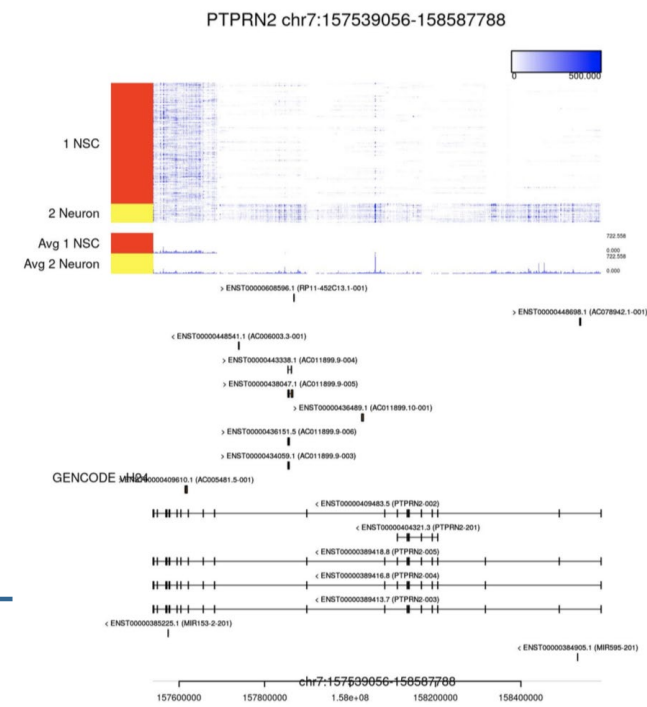
Quartz-Seq2: highest sensitive and high-throughput single-cell RNA-seq (Sasagawa Y. Genome Bio. 2018, Mereu E. bioRxiv)



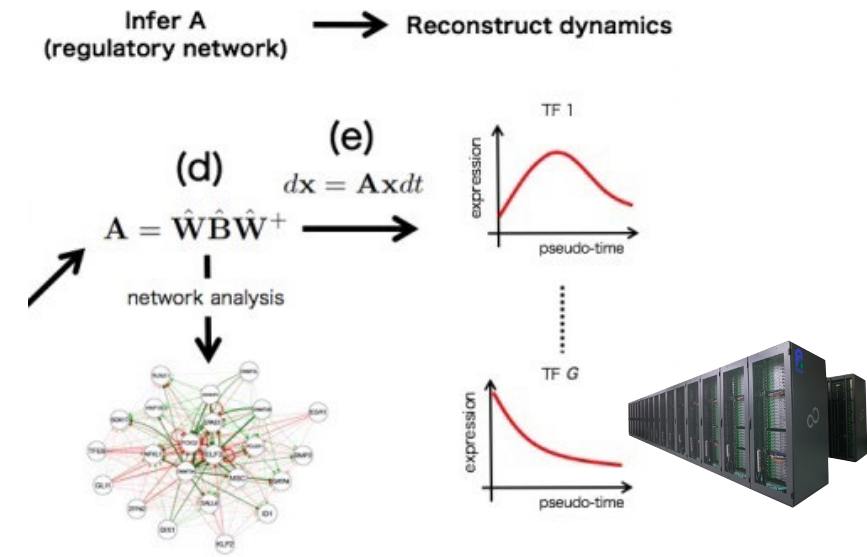
RamDA-seq: Single-cell Full-length Total RNA-seq (Hayashi T. Nat. Comm. 2018)



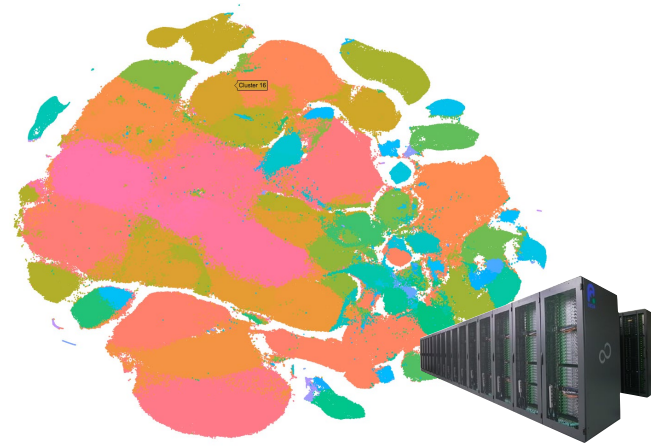
ODEGRfinder: De novo transcriptional region finder (Matsumoto T. NARGAB, 2019)
Millfey: scRNA-seq viewer on genome context (Ozaki H. BMC Bioinformatics)



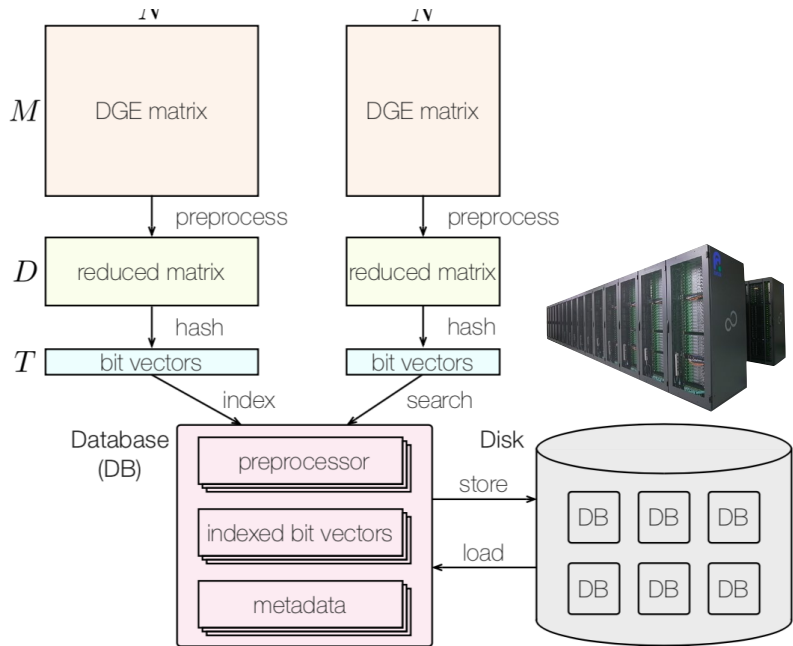
SCODE: prediction of transcriptional regularity network (Matsumoto T. Bioinformatics 2017)



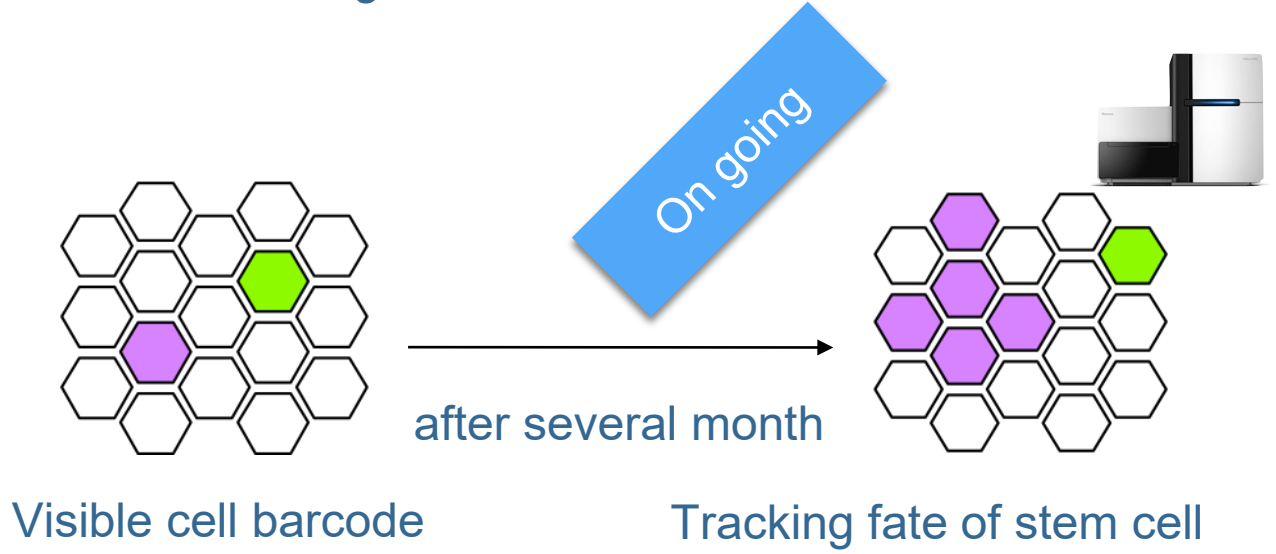
OnlinePCA.jl: PCA algorithm for large-scale scRNA-seq data (Tsuyuzaki K. Genome Biol. 2019)



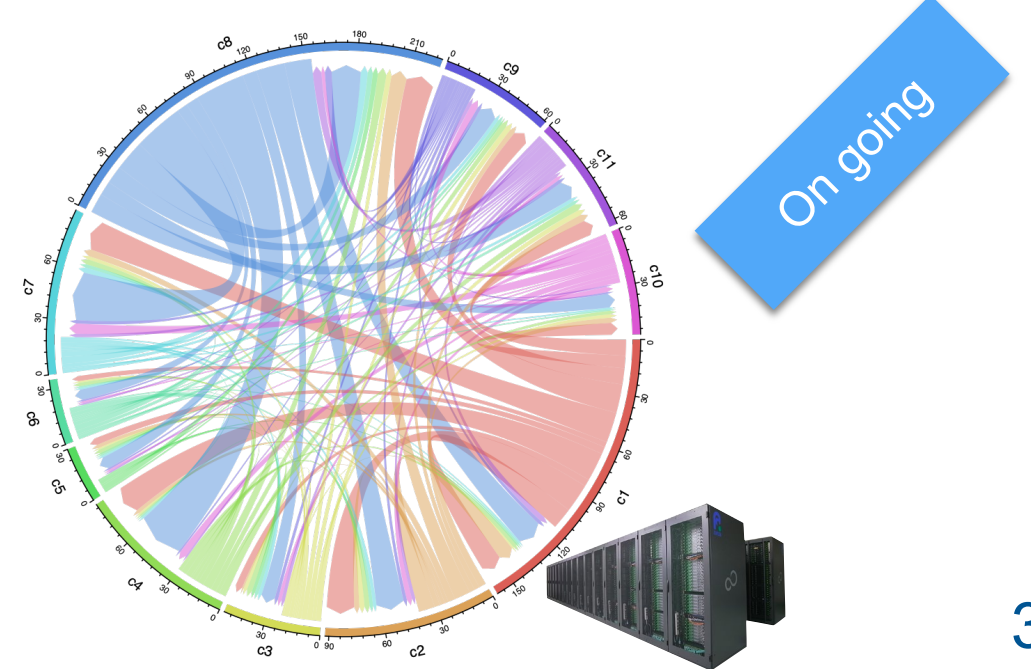
Cellfishing.jl: Cell Similarity search (Sato T. Genome Biol. 2019)



Fate-seq/Fluoro-coding
Measurement of Cellular function, fate, position in vivo at a same single-cell



scTensor: Prediction of cell-cell communication from single-cell RNA-seq (Tsuyuzaki K. bioRxiv. 2019)



我々の研究室に参加しませんか？

- ・ 1細胞ゲノム科学研究のハイウェイがある
 - ・ 世界最高の技術
 - ・ 1細胞採取やシーケンス、自動分注、データ解析環境、様々な暗黙知、ドライで解くべきか、ウェットで解くべきか？
- ・ 人手 << アイディア
 - ・ 半年から1年ぐらい真剣に研究すれば、論文になりそうなネタがたくさんある
- ・ キャリアパス: PIやスタートアップ創始者での転出、フェローシップや学位の獲得や、技術支援スタッフの無期雇用転換の実績がある
- ・ 学生
 - ・ 東京医科歯科大学 (御茶ノ水)
 - ・ 入試: 修士 8月, 博士: 9月, 2月
 - ・ 社会人大学院生も募集
 - ・ 理研インターンシップ (和光・神戸)
- ・ 研究員
 - ・ 随時募集
 - ・ 理研基礎特研、学振PD

Acknowledgments

- RIKEN BiT
 - Yohei Sasagawa
 - Hiroki Danno
 - Kaori Tanaka
 - Tetsutaro Hayashi
 - Haruka Ozaki
- Holger Heyn, CNAG-CRG

理研和光



理研神戸



国立大学法人
東京医科歯科大学
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY



理化学研究所



@dritoshien

<https://nikaidolab.org/>

<https://bit.riken.jp/>

敬称略