

シングルセル解像度での 免疫系のマルチオミクス 解析

- 10x Genomics Chromium Single Cell Immune Profilingを使用して、シングルセルのB細胞またはT細胞受容体の全長ペア配列、細胞表面タンパク質発現、抗原特異性、および遺伝子発現を解析
- イルミナシーケンスシステムでV(D)J転写産物、抗原受容体、細胞表面タンパク質発現ライブラリー、および5'遺伝子発現ライブラリーを高い精度でシーケンス
- 健康な状態と疾患状態における適応免疫系の応答と遺伝子制御を駆動する明確なメカニズムを解明

連携企業



illumina®

はじめに

適応免疫系は非常に複雑かつ動的であり、細菌やウイルスなどの感染性病原体や、がんなどの疾患の原因となる細胞の変化に対して、私たちの体が反応を起こすことができます。この複雑なプロセスは、主要組織適合性複合体 (MHC) により細胞表面に抗原を提示するB細胞とT細胞の活性化によってもたらされます。B細胞とT細胞受容体は、広範囲にわたる可能性のある抗原を認識するために、認識部位の多様なレパートリーを必要とします。この多様性は、B細胞の免疫グロブリン重鎖、 $\alpha\beta$ T細胞受容体の β 鎖、および $\gamma\delta$ T細胞受容体の δ 鎖における可変 (V)、多様 (D)、および連結 (J) 遺伝子セグメントの再構成 (V(D)J再構成) によって生み出されます。¹ V(D)Jの再構成は、免疫細胞成熟中の他のイベントと同様に、ヒトでは 10^{18} 以上の固有のT細胞受容体とより多様性のあるB細胞レパートリーを生成する潜在能力があります。^{2,3}

次世代シーケンサー (NGS) は、無数の標的を認識できる免疫細胞の膨大なレパートリーをマッピングするための強力な免疫ゲノミクス研究ツールであることが証明されています。⁴ 感染症、自己免疫、がん、その他の病態における免疫応答をより完全に把握するには、関与するB細胞とT細胞の遺伝子発現プロファイル以上の情報を得る必要があります。適応免疫系がどのように機能するかを理解するには、細

胞表面タンパク質マーカーに関する細胞表現型のプロファイリングを含むマルチオミクスアプローチが必要です (図1)。

このテクニカルノートでは、10x Genomics Chromium Single Cell Immune Profilingおよびイルミナシーケンスシステムを使用して、シングルセル解像度で遺伝子発現、B細胞/T細胞受容体、抗原特異性、および細胞表面タンパク質 (CSP) をプロファイリングするためのプロトコルの概要を説明します。10x Genomics Cell RangerおよびLoupe Browserで解析された生成データは、免疫応答に関与するB細胞とT細胞を完全に特徴付けるのに役立ちます。

プロトコルの概要

免疫系のマルチオミクスプロファイリングのワークフローには、通常、最初のサンプル調製、下流検出用のバーコードを使ったcDNAの標識、ライブラリー調製、シーケンス、およびデータ解析が含まれます (図2)。このプロトコルは、10x GenomicsのNext GEMテクノロジーを用いる高度なChromiumシステムと実績のあるイルミナシーケンステクノロジーを使用します。

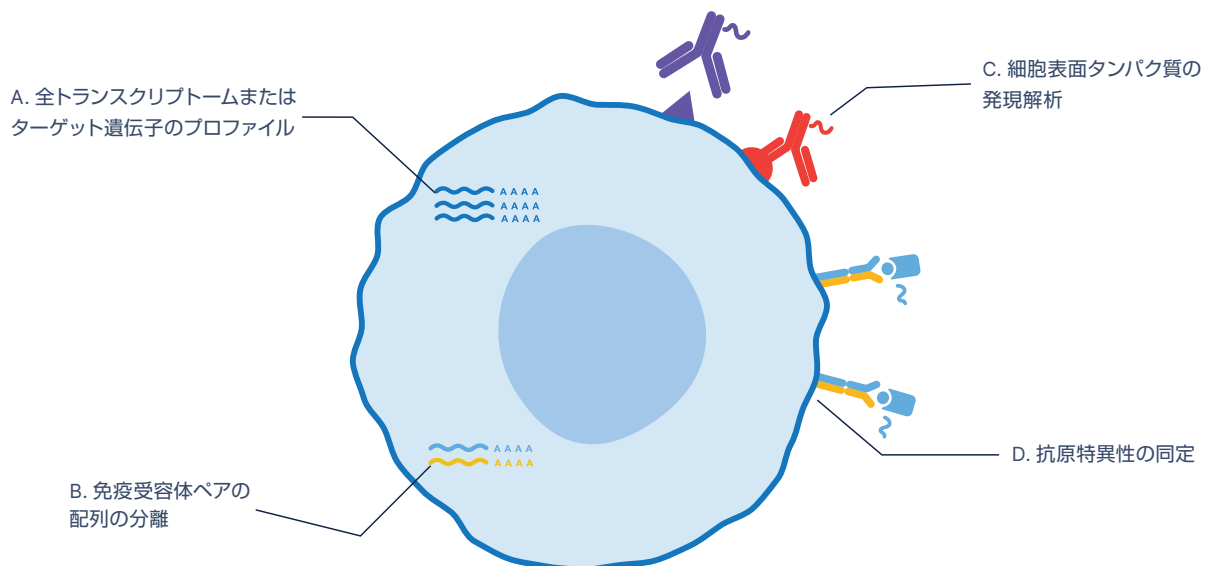


図1:マルチオミクスプロファイリングによる適応免疫応答の完全な特性評価: (A) Chromium Single Cell Immune Profilingを使用して、反応ごとに数百から数万の細胞のmRNAまたはターゲット遺伝子の発現を解析します。(B) 対応する免疫受容体の全長ペア配列を通じて異なるクロータイプを同定します。(C) Feature Barcodeテクノロジーを使用して、シングルセル解像度で最大数百の細胞表面タンパク質を測定します。(D) Feature Barcodeテクノロジーを使用して、B細胞またはT細胞の抗原特異性をスクリーニングします。CおよびDの方法には、互換性のあるパートナー製品が必要です (詳細は3ページ)。

ワークフローはChromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2を使って開始し、ユーザーが生成した分離済みの細胞を、Chromium装置内のエマルジョンすなわちGEM (ゲルビーズインエマルジョン) に個別に分画化します。続いて、GEM内で溶解とcDNA生成が行われます。逆転写後、エマルジョンは破壊され、バーコード付加されたcDNAが大量に増幅されます。同時に、細胞表面タンパク質に特異的な、バーコード付き抗体^{*} に結合したオリゴが増幅されます。抗原特異性を測定する場合、このステップでMHCペプチド多量体からのバーコードが増幅されます。[†] 増幅されたcDNAからは、B細胞受容体 (BCR) またはT細胞受容体 (TCR) の全長配列を濃縮するのに十分な材料が生成されます。

ユーザーは、免疫細胞を用いて、遺伝子発現、BCR、TCR、および10x Genomics Feature Barcodeライブラリーを含む4種類ものライブラリーを生成し、NovaSeq™ 6000システム、NextSeq™ 2000システム、NextSeq 1000システム、またはNextSeq 500/550システムなどのさまざまなイルミナ装置でシーケンスできます。Feature Barcodeテクノロジーにより、シングルセルからの表面タンパク質発現と抗原特異性の解析が可能になります。データ解析は、Cell Rangerパイプラインを使って実施することで、遺伝子発現ライブラリーのデータを、対応するBCRまたはTCRライブラリーのデータと関連付けが可能になります。Loupe Browserソフトウェアを使用すると、シングルセルの免疫プロファイリングデータを簡単に視覚化して探索することができます。

* BioLegend TotalSeq Reagentsは遺伝子発現解析と何百もの細胞表面タンパク質の高分解能検出を組み合わせ、超高パラメーターのマルチオミクスサイトメトリーを実現します。

† Immudex dCODE Dextramers は T 細胞プロファイリング用のオリゴ結合 MHC を提供します。

サンプル調製

サンプル調製は、細胞培養物、初代細胞、または新鮮な組織から懸濁液を生成することから始まります。[‡] 良好な結果を得るには、高品質なシングルセル懸濁液が不可欠です。さまざまな種類のサンプルからサンプルを調製するための実証済みのプロトコールは、10x Genomicsサポートウェブサイトです。⁵

シングルセルライブラリーの生成

シングルセル懸濁液を得たら、Chromium Next GEM Single Cell 5' Kit v2を使用してライブラリーを調製します。シングルセル懸濁液をマイクロ流体チップにロードし、Chromium Controller、Chromium X/iXまたはChromium Connectでランを実行します。これらのシステムは、固有のバーコードを含む単一のゲルビーズを使用して、個々の細胞をドロップレットに分割します。次に、ドロップレット (GEM) をインキュベートして、mRNAをcDNAに逆転写し、mRNAにバーコードを付加します (図3)。

このインキュベーション後、GEMは破壊され、プールされた画分を回収し精製します。これらの画分は、前増幅PCRステップを経て取得し、10x Genomicsのバーコード付きの全長cDNAフラグメントが増幅されます。増幅により、同じ細胞から複数のライブラリー、たとえばB細胞またはT細胞ライブラリーおよび5'遺伝子発現ライブラリーを構築するのに十分な材料が生成されます。

‡ このアッセイは、末梢血単核球 (PBMC) およびさまざまな種類の困難な細胞で検証されています。このアッセイは、新鮮な組織を含む他の種類のサンプルに適用できますが、新鮮組織または凍結組織から分離された核には適合しません。

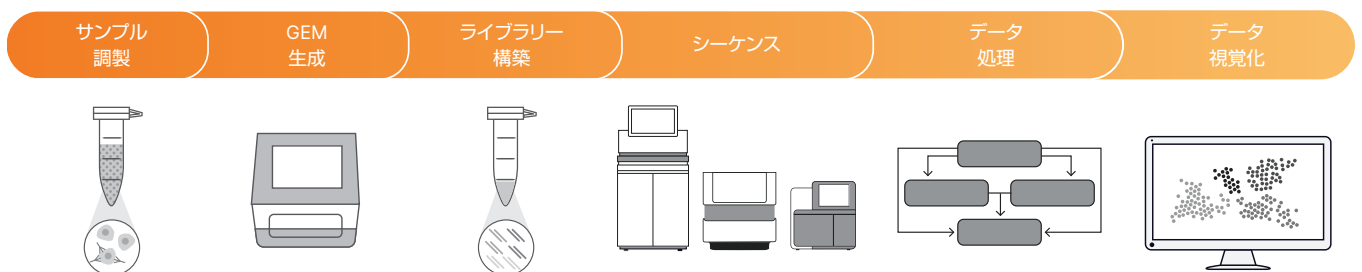


図2: 免疫系のマルチオミクスプロファイリングのワークフロー: 細胞懸濁液は、Chromiumシステム上でマイクロ流体によりシングルセルに分画化され、GEMにバーコードが付加されます。得られたV(D)Jおよび遺伝子発現ライブラリーは、イルミナ装置でシーケンスします。データは、Cell RangerとLoupe Browserソフトウェアを使用してそれぞれ解析と視覚化が行われます。

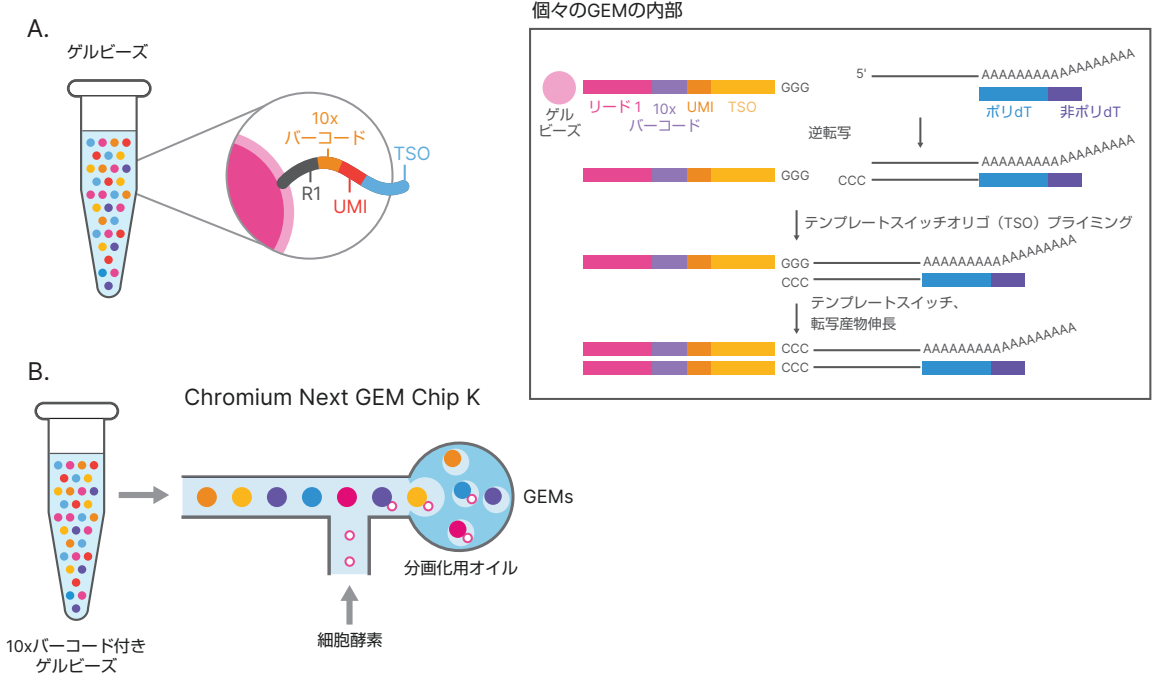


図3：シングルセル懸濁液は10xバーコードで標識されます：(A) 10x Chromiumシステム上で、シングルセルは個々のGEMに分画化されます。(B) GEM内でmRNAが分離され、GEM/バーコードが付加されます。標識されたmRNAは逆転写され、得られたcDNAはライブラリー調製に使用します。

増幅されたcDNAを使用して、BCRまたはTCR定常領域のいずれかに特異的なプライマーを使用したPCR増幅により、全長のV(D)Jセグメント (10xバーコード付き) を増幅します。B細胞とT細胞の両方が分画化された細胞集団に存在すると予想される場合、増幅された同じcDNA材料を使用して、免疫グロブリン (Ig) とTCR転写物を別々の反応で増幅できます。酵素による断片化とサイズ選択を使用して、ライブラリー構築前に、増幅されたBCRまたはTCR転写物のV(D)Jセグメントに集積的にまたがる可変長断片を生成します。

増幅されたcDNAおよびV(D)Jセグメントは、ライブラリー構築のインプットとして使用します。得られたバーコード付きシングルセルの免疫プロファイリング遺伝子発現ライブラリーとV(D)JライブラリーはイルミナNGSシーケンスシステムを用いるシーケンスに使用します (図4)。

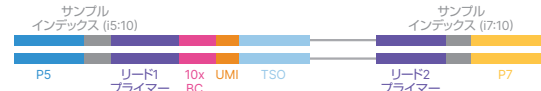
イルミナ装置を用いたシーケンス

このアプリケーションに必要なシーケンス出力に対応するには、NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、NextSeq 1000システム、またはNextSeq 500/550システムで、V(D)J、CSPおよび遺伝子発現ライブラリーをペアにしてシーケンスすることが推奨されます (表1)。10x Genomicsは、V(D)J、CSP、遺伝子発現ライブラリーに対して1% PhiXを標準添加することを推奨しています。この標準添加はランのコントロールとして機能し、エラー率メトリクスに関する情報を提供します。これらのライブラリーの予測されるシーケンスメトリクスは、10x Genomicsサポートウェブサイトです。

Chromium Single Cell V(D)J Dual Indexライブラリー



Chromium Single Cell 5' Gene Expression Dual Indexライブラリー



Chromium Single Cell 5' Surface Protein Dual Indexライブラリー

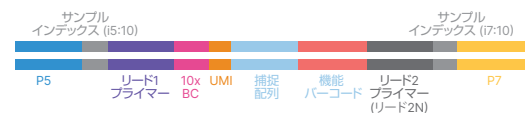


図4：シーケンス用のシングルセルライブラリーの構成：Chromium Single Cellの5' Gene Expression、V(D)J、およびCell Surface ProteinのDual Indexライブラリーは、イルミナシーケンスシステムと互換性のある標準のペアエンド構造を有しています。Chromium Single Cellの5'遺伝子発現およびV(D)JのSingle Indexライブラリー (図示せず) もイルミナシステムと互換性があります。BC=バーコード、TSO=テンプレートスイッチオリゴ、UMI=固有分子識別子

シーケンスランあたりのシーケンス深度とサンプル数

10x Genomics Chromium Controller, Chromium X/iX, Chromium Connectで実行する各標準アッセイは最大10,000細胞をターゲットにでき、Chromium Xで実行するハイスループットアッセイは最大20,000細胞をターゲットにできます。⁶ 特定のシーケンスランでプールできるサンプル数の計算は、サンプルあたり平均5,000個細胞に基づいています (表1)。ユーザーは、細胞の回収量に基づいてランごとのライブラリー数を調整する必要があります。

最小シーケンス深度は、遺伝子発現ライブラリーの場合は1細胞あたり20,000リードペア、V(D)JまたはCell Surface Protein (CSP)ライブラリーの場合は1細胞あたり5,000リードペアです。⁷ 必要なパフォーマンスまたはアプリケーションに合わせてシーケンス深度を調整します。特異的な種類のサンプルでは、V(D)J (形質細胞) または遺伝子発現 (細胞株) 研究のためにさらに多くのリードが必要になる場合があります。

 イルミナシーケンスシステムの選択:
jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html

表1: イルミナシーケンスシステム上の10x Chromium Single Cellライブラリーのサンプルスループット例

10xライブラリーの種類	シーケンス深度B (細胞あたりのリードペア) ^a	ライブラリー プーリング比 ^b	サンプルあたりの 平均細胞数 ^c	システムおよびフローセルタイプ別のランあたりのサンプル数								
				NextSeq 550システム		NextSeq 2000システム			NovaSeq 6000システム			
				中出力	高出力	P1 ^d	P2 ^d	P3	SP	S1	S2	S4
フローセルタイプあたりのシングルリード				1.3億	4億	1億	4億	12億	6.5億	13億	33億	80億
V(D)JまたはCSP	5,000 ^e	n/a	5,000	5	16	4	16	48	26	52	132 ^g	320 ^g
V(D)J + CSP	5,000 (V(D)J) ^e	1	5,000	2	8	2	8	24	13	26	66 ^g	160 ^g
	5,000 (CSP) ^e	1	5,000	2	8	2	8	24	13	26	66 ^g	160 ^g
V(D)JまたはCSP および5' GEx	5,000 (V(D)JまたはCSP)	1	5,000	5 ^f	8	4 ^f	8	24	12	24	64	152 ^g
	20,000 (GEx) ^e	4	5,000	または1 ^f	2	または1 ^f	2	6	3	6	16	38 ^g
	5,000 (V(D)J)	1	5,000	より高いスループットを備えた シーケンスシステムが必要です			4	16	8	16	40	100 ^g
V(D)J + CSP + 5' GEx	5,000 (CSP)	1	5,000				4	16	8	16	40	100 ^g
	20,000 (GEx) ^e	4	5,000				1	4	2	4	10	25 ^g

シーケンスランごとのシングルセルサンプルの数は、サポートされているクラスター密度/ローディング濃度でのイルミナPhiXコントロールライブラリーに基づいて算出されています。実際の性能パラメータは、サンプルの種類、サンプル品質、パスフィルタークラスターにより異なる場合があります。詳細は各装置の仕様ページをご覧ください。CSP=細胞表面タンパク質、GEx=遺伝子発現、n/a=該当なし

- 10x Genomicsの提供による推奨される最小リード数。必要なパフォーマンスまたはアプリケーションに合わせてシーケンス深度を調整します。10x Cell Rangerのランサマリーのシーケンス飽和メトリクスと曲線を使用して特異的な種類のサンプルについてシーケンス深度の最適化が行えます。
- プールされたライブラリー間の深度要件の違いを考慮して、シーケンス用にV(D)J、CSP、および5' GExライブラリーをプールすることができます。ライブラリープーリング比: ライブラリーは同じ濃度にし、次に1:4の比率 (V(D)J量: GEx量、またはCSP量: GEx量) でプールすることができます。V(D)J量: GEx量を1:10の比率でプールすることもできます。その場合、ランごとのサンプル数を調整する必要があります。
- 使用するChromiumシステムに応じて、回収できる最大細胞数を理解するには、「シーケンス深度」と「ランあたりのサンプル数」を参照してください。
- 同一サンプルスループットのP1およびP2フローセルは、NextSeq 1000システムでも使用可能です。
- V(D)JとCSPライブラリーの場合、5,000リードペア (または10,000個別リード) は5,000クラスター、またはリード1からの5,000リードおよびリード2からの5,000リードを意味します。遺伝子発現ライブラリーの場合、20,000リードペア (または40,000個別リード) は20,000クラスター、またはリード1からの20,000リードおよびリード2からの20,000リードを意味します。
- ユーザーは、指定された数のV(D)J/CSPライブラリーまたは1つの遺伝子発現ライブラリーのランを実行できます。2、3種類のライブラリーのランを実行する場合は、より高出力のフローセルの使用をお勧めします。
- 個別のレーンにローディングできるNovaSeq XPワークフローを使用する必要があります。

推奨されるリード長

10x Genomics Dual IndexのV(D)JライブラリーおよびChromium GExライブラリーをシーケンスするための推奨されるリード長は、リード1は26 bp (10xバーコード、固有分子識別子 (UMI))、インデックス1は10 bp、インデックス2は10 bp、リード2は90 bpです (表2)。リードが短くなると、アプリケーションのパフォーマンスが低下する可能性があります。特に、リード2の長さは、V(D)J接合部をまたぐために重要です。CSPライブラリーを独自にシーケンスする場合、約25塩基以降では多様性が欠如することを考慮して、26 × 10 × 10 × 25 bp のリード長を使用することをお勧めします。CSPライブラリーをV(D)JライブラリーやGExライブラリーとともにシーケンスする場合、26 × 10 × 10 × 90 bpのリード長が推奨されます。サンプルのインデックスリードは、指定された長さよりも短くしてはいけませんが、リードは長くすることはできません。サンプルインデックスリードの追加の塩基は、詳細な解析の前にCell Rangerのmkfastqまたはイルミナのbcl2fastqを使用してトリミングする必要があります。

ほとんどの場合、V(D)JおよびCSPのDual Indexライブラリーの標準推奨値 (90 bp × 26のリード長構成でターゲット細胞あたり5,000リードペア) で十分です。一部のサンプルの種類は、これらのシーケンス深度では飽和に達せず、より深いシーケンスが必要になる場合があります。この最も一般的な原因は、サンプル内の細胞間の発現レベルの極端なバリエーションによるものです。ほとんどのシーケンスデータは高発現細胞を反映しています。低発現細胞の回収が実験計画にとって重要であり、サンプルの種類に高いバリエーションが認められる傾向がある場合は、より高いシーケンス深度を使用してください。



実験計画:

[10x Genomicsサポートウェブサイト](#)


シーケンス構成:

[10x Genomicsサポートウェブサイト](#)

表2: 10x Genomicsライブラリーに対する推奨されるリード長

ライブラリーの種類	リード1 (bp)	i7インデックス (bp)	i5インデックス (bp)	リード2 (bp)
目的	10xバーコード, UMI	サンプルインデックス	サンプルインデックス	インサートまたはcDNA
V(D)JおよびGEx Single Cell 5' v2 Dual Index	26	10	10	90
CSP v2 Dual Index	26	10	10	25
CSP + V(D)JまたはCSP + GExまたはCSP (Dual Index) + V(D)J + GEx	26	10	10	90
V(D)JおよびGEx Single Cell 5' (v1/v1.1) Single Index	26	8	0	91

データの解析および視覚化

遺伝子発現、V(D)J、およびCSPライブラリーの解析は、標準的なイルミナFASTQ生成パイプラインと互換性があります。シーケンス後、デマルチプレックスしたFASTQファイルの完全なランフォルダーをCell Rangerソフトウェアに入力できます。Cell Rangerは、遺伝子発現および細胞表面タンパク質ライブラリーのカウントマトリックスを生成し、V(D)Jライブラリーのアノテーションおよびクロノタイプのグループ化を実施します。Cell Rangerの現行バージョン (6.1.1) では、ユーザーはマルチパイプライン (推奨) を使用して一度に解析を実施することも、カウントパイプラインとV(D)Jパイプラインを個別に使用して解析を実施することもできます。Cell Rangerは、実験およびシーケンスの成功を評価できるQCメトリックスを含むウェブサマリーを出力します。

.cloupeファイルや.vloupeファイルなどの追加の出力ファイルは、Loupe Browserソフトウェアによる二次解析に使用できます。ここで、ユーザーは低品質の細胞/外れ値を除外し、データを再クラスター化し、差次的遺伝子発現解析を実施し、V(D)Jおよび細胞表面タンパク質の情報を遺伝子発現データに重ね合わせることもできます。サードパーティーのツールを使用して追加の解析を行うこともできます。

データの特長

Loupe V(D)J Browserを使用すると、Chromiumプラットフォームによって生成されたシングルセルの5' データからV(D)J配列とクロノタイプを解析、検索、視覚化することができます (図5)。Loupe V(D)J Browserを使用すると、BCRおよびTCRのクローン性と多様性をシングルセルレベルですばやく調べることができます。Loupe V(D)J Browser内で、ユーザーはサンプル内の最も高頻度に認められるαとβペアのTCR鎖またはBCRの重鎖と軽鎖をすばやく特定でき、CDR3領域内のモチーフの検索、V(D)J転写産物内のバリエーションの検出、サンプル間のクロノタイプ頻度の比較が行えます (図6)。

専門家のサポートにアクセス

Chromium Single Cell Immune Profilingライブラリーのシーケンスについては、イルミナチームと10x Genomicsチームが協力して、ワークフロー全体にわたる完全なサポートを保証しています。アッセイおよび解析に関する質問については10x Genomicsサポート (support@10xgenomics.com)、シーケンスに関する質問についてはイルミナサポート (techsupport@illumina.com) にお問い合わせください。これらのチームでは、より複雑な問題にも協力して対応します。

まとめ

このプロトコールにより、遺伝子発現、BCR、TCR、抗原特異性、および細胞表面タンパク質をシングルセル解像度で同時にプロファイリングできます。マルチオミクスアプローチを使用することで、健康な状態と疾患状態の違いを含む、適応免疫系の応答と遺伝子制御を駆動する細胞メカニズムの解明に役立ちます。

詳細はこちら

NovaSeq 6000システム: <https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html>

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム: <https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-1000-2000.html>

NextSeq 500/550システム: <https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq.html>

10x Genomics Chromium Single Cell Immune Profiling: 10xgenomics.com/products/single-cell-immune-profiling

参考文献

1. Illumina. Immunology Research Review. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/publications/scientific-publication-review-immunology-research.pdf. Accessed October 28, 2021.
2. Vahedi G, Takahashi H, Nakayamada S, et al. STATs shape the active enhancer landscape of T cell populations. *Cell*. 2012;151(5):981-993. doi:10.1016/j.cell.2012.09.044
3. Venturi V, Price DA, Douek DC, Davenport MP. The molecular basis for public T-cell responses?. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):231-238. doi:10.1038/nri2260
4. Woodsworth DJ, Castellarin M, Holt RA. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med*. 2013;5(10):98. Published 2013 Oct 30. doi:10.1186/gm502
5. 10x Genomics. Sequencing Requirements for Single Cell V(D) J. support.10xgenomics.com/single-cell-vdj/sequencing/doc/specifications-sequencing-requirements-for-single-cell-vdj. Updated August 26, 2020. Accessed October 28, 2021.
6. 10x Genomics. What is the maximum number of cells that can be profiled? kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/360001378811-What-is-the-maximum-number-of-cells-that-can-be-profiled-. Accessed October 28, 2021.
7. 10x Genomics. Experimental Design for Immune Profiling. support.10xgenomics.com/single-cell-vdj/software/pipelines/latest/design. Accessed October 28, 2021.

製品情報

シーケンス試薬	カタログ番号
NovaSeq 6000システム試薬	
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028401
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028319
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028316
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (200 cycles)	20028313
NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム試薬	
NextSeq 2000 P1 Reagents (300 cycles)	20050264
NextSeq 1000/2000 P2 Reagents v3 (100 cycles)	20046811
NextSeq 2000 P3 Reagents (100 cycles)	20040559
NextSeq 500/550システム試薬	
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles)	20024904
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles)	20024907

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2023 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

illumina®