

注目を集める シングルセル トランスクリプトミクス

シングルセルの解像度で複雑な
細胞生物学にさらに深い洞察を
切り開く

illumina®

はじめに

トランスクリプトームは、さまざまな状況下にあるゲノムの機能的な要素に関する主要な情報を明らかにします。次世代シーケンス (NGS) テクノロジーは、ゲノムワイドな規模で同時に数千の遺伝子をプロファイリングすることでトランスクリプトミクス分野に変革をもたらし、健康と疾患における遺伝子発現に幅広い洞察を与えます。NGSベースのRNAシーケンス (RNA-Seq) は各遺伝子に対する転写産物の数を定量することができ、動的な状況下で活発に発現した遺伝子のある時点での偏りのない全体像を提供します。RNA-Seqの柔軟性と正確性により、研究者は予備知識に制限されることなく、ストランド特異的に、転写産物アイソフォーム、融合遺伝子、1塩基多型などの新しい現象を明らかにできます。^{1,2}

トランスクリプトミクスに対する従来のアプローチでは、サンプル中の数千個の細胞を平均化した遺伝子発現をバルクで解析します。バルクRNA-Seqは集団規模での差次的遺伝子発現を理解するためにうまく応用されてきましたが、組織内の細胞に内在する不均一性は定量しません。転写産物は、経時的に生じる環境的シグナルや確率的变化が原因となり、細胞集団内にさまざまなレベルで発現しえます。また、遺伝子発現は起源となる組織によって大幅に変化します。さらに、バルクRNA-Seqは、幹細胞や血中循環腫瘍細胞 (CTC) などの、希少ではあるが生物学的に重要な亜集団からの転写産物を捉えられない可能性があります。バルクRNA-Seqで同定された低発現遺伝子は、むしろ希少な細胞種で盛んに発現している可能性があります。シングルセルからのデータを得ることでこれらの限界を取り払い、シングルセルの解像度で細胞機能のより明確な理解を得ることができます (図1)。

過去10年にわたり、シングルセルトランスクリプトミクスまたはシングルセルRNA-Seq (scRNA-Seq) の分野は飛躍的な成長を遂げ、細胞の機能と細胞の亜集団がどのように微小環境と相互作用するかについてこれまでにない洞察が得られています。³ 早期のシングルセル遺伝子発現アプローチでは、個々の細胞を評価するために、マイクロピペティングなどを用いて細胞分離を行う手作業での方法を用いていました。現在では、シングルセルを捉えるために、さまざまなハイスループットメソッドが利用できます。使用するシングルセル抽出手法にかかわらず、イルミナのNGSテクノロジーはシングルセルの遺伝子発現研究の検出力を最大に高め、1回のアッセイで数百万の個別細胞を高い正確性と感度でアッセイできます。イルミナのシーケンシングプラットフォームにはNextSeqTM 500システム、NextSeq 550システム、NextSeq 1000システム、NextSeq 2000システム、NovaSeqTM 6000システム、NovaSeq Xシステムなどがあり、さまざまな範囲のスループットで、非常に高いデータ品質と正確性を生

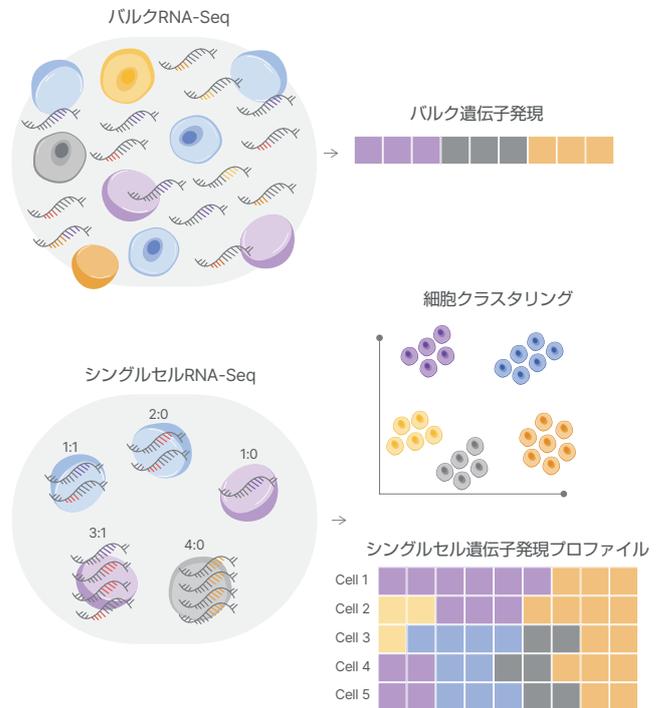


図1: バルクとシングルセルのRNA-Seqアプローチの比較: バルク解析 (上) では、遺伝子発現はサンプルに含まれる細胞すべての平均になります。しかし、scRNA-Seqの遺伝子発現 (下) データは個別の細胞に対して生成されるため、同一サンプル内の細胞間における微妙な違いに対して、より深い洞察が可能です。

み出します。DRAGENTM Bio-IT Platformシングルセル解析パイプラインとの統合およびサードパーティー社製のシングルセルプラットフォームとの互換性により、scRNA-Seq実験で生成された大量のデータを解析するための効率的なソリューションを提供します。柔軟性のあるNGSのリードアウトを使用してゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノムおよびプロテオームを解析できることから、大規模なマルチオミクスアプリケーションによく適しています。

本アプリケーションノートは、急速に発展するシングルセルトランスクリプトミクス分野における最新の進歩と新しい動向を取り上げています。また、拡大中のscRNA-Seqメソッドのポートフォリオと、シングルセルの研究を支援するイルミナから購入可能なテクノロジーソリューションの概要もご紹介します。

scRNA-Seqアプリケーション

scRNA-Seqはさまざまなアプリケーションでの有用性が示されており、その範囲は基礎研究から、トランスレーショナル研究や臨床研究に及びます。このパワフルなアプローチは発生生物学、神経生物学、免疫学、がん生物学などのさまざまな分野で応用されており、複雑な生物系の理解に飛躍的な発展をもたらすことが可能です(図2)。また、scRNA-Seqメソッドは、分化、増殖、腫瘍形成などの時間依存的過程におけるさまざまな遺伝子発現と細胞不均一性の研究にも使用することができます。

細胞アトラスの作成

ヒトおよびモデル生物組織の完全な分子細胞アトラスは疾患病期、老化または治療に対する反応による細胞の変化を評価するために必須となる第一歩です。しかし、哺乳類の組織は存在量の変化を伴う多様な種類の細胞から成り、非常に複雑な構造をしていることから、バルクRNA-Seqだけを用いて細胞の不均一性の全体像を捉えることは困難です。シングルセルアプローチは組織の詳細な細胞マップを構築できる手段であるため、生物学と疾患の理解に転換をもたらしました。^{3,4} 例えば最近、シングルセルトランスクリプトミクス解析と抗体ベースのタンパク質プロファイリングの手法を用いて、13種類のヒト組織を対象に、すべてのタンパク質コード遺伝子に対するデータを含んだシングルセルのトランスクリプトミクスマップが作成されました。⁴ この進歩を基に、ヒト細胞アトラス(HCA)プロジェクトではハイスループットのscRNA-Seqデータを用いて、複雑な組織全体の全細胞種の包括的なマップを作成中であり、個々の細胞から組織や臓器系に至るまでの細胞の機能と制御に関する必須の情報を明らかにし、将来の生物学的研究の強固な基盤を構築しています。⁵

免疫学

免疫系は非常に複雑で、環境的なきっかけによって遺伝子発現プロファイルを変化させる可能性のあるさまざまな種類の細胞から構成されています。フローサイトメトリーおよび蛍光活性化セルソーティング(FACS)は免疫表現型研究の主力を担ってきました。しかし、これらの単一のアプローチはロースループットであり、関心のある細胞集団を分離するために適切な抗体を必要とすることから限界があります。

scRNA-Seq法の進歩により、免疫細胞の表現型に対する大規模かつ偏りのない研究が推し進められています。これにより、研究者は免疫細胞の発達、活性化誘導反応、希少な免疫細胞の亜集団、ワクチン接種や感染への反応に対する新しい洞察にアクセスできるようになりました(図3)。

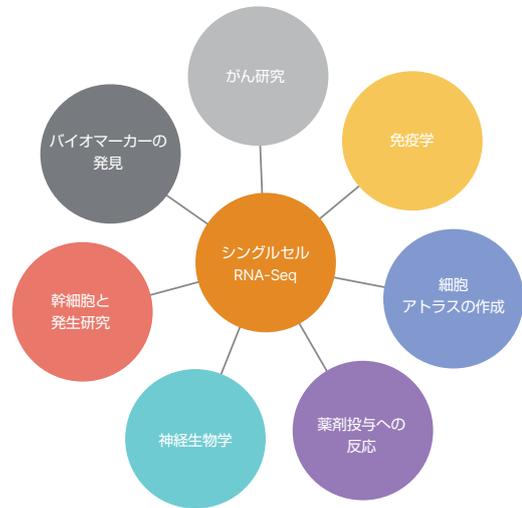


図2 : scRNA-Seq アプリケーション : シングルセルアプローチは多様な研究分野にわたる幅広いアプリケーションがあります。

免疫レパートリープロファイリング

獲得免疫応答の決定的な特徴は、幅広い病原体に対して迅速な免疫応答を造り出す免疫受容体の能力です。TおよびB細胞受容体(それぞれ、TCRおよびBCR)は、可変(V)、多様(D)、結合(J)遺伝子断片のランダムな組み換えを経て、多様性のある抗体レパートリーを産生します。また、BCRは体細胞超突然変異を経て、さらに抗原結合親和性を高めます。scRNA-Seqは非常に多様性の高い免疫受容体が高い正確性と解像度で検証するための唯一の機会を提供します。例えば、T細胞のクローン性を正しく同定することで、病原性と関連する可能性があるT細胞サブセット特異的なTCR多様性が明らかになる可能性があります。^{6,7} 免疫レパートリーシーケンスに不均一なバルクサンプルを用いた場合に課題となるのが、機能的なTCRまたはBCRユニットを形成するためにどのα鎖とβ鎖が組み合わさっているかを特定することです。バルクRNA-Seqと異なり、scRNA-SeqはTCRとBCRの両方のα鎖とβ鎖を対合することが可能であるため、抗原特異性に関するより全体的な視点が明らかになります。



図3:免疫学におけるscRNA-Seqアプリケーション:免疫系は侵入する病原体、がん細胞、および自己抗原からホストを保護するために協調して作用する高度に特化した細胞タイプで構成されています。scRNA-Seqとマルチオミクスアプローチを用いることで、研究者はシングルセル解像度で免疫系の複雑な生物学を解明することができます。

scRNA-SeqによるTCRの抗原特異性プロファイリングからは、T細胞機能性、細胞表現型、受容体配列およびペプチドと主要組織適合性複合体 (MHC) に関する重要な情報が得られます。⁸ また、このアプローチは腫瘍特異的T細胞を同定するために応用されており、養子細胞免疫療法⁹に使用したり、キメラ抗原受容体 (CAR) T細胞療法への反応を特定したりするために使用することができます。¹⁰

感染とワクチン接種に対する免疫応答

感染に応答するBCRレパートアの変化を明確にすることで、バイオマーカーの発見や新規治療法の開発に役立つ重要な情報が得られます。BCR-SeqおよびscRNA-Seqは、ニューモシスチス感染の生命を脅かす免疫抑制の合併症への応答におけるTCR¹¹とBCR¹²の免疫レパートリープロファイルの特性評価に応用されています。LIBRA-Seq (linking BCR to antigen specificity through sequencing) は、感染やワクチン接種によるBCRレパートリー変化を評価するために使用が増加しつつあるシングルセル手法です。¹³ このアプローチを用いて、インフルエンザ感染後の肺、流入領域リンパ節および脾臓におけるクローナル増幅とBCRレパートリーの主要な変化が同定されました。¹⁴ 同様に、LIBRA-Seqを用いて、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染に反応した時のメモリーB細胞のトランスクリプトミクスシグネチャーに関する包括的なプロファイルが作成されました。¹⁵ さらに、LIBRA-Seqから複数のSARS-CoV-2中和抗体が同定されたことで、これらの抗体がコロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する治療候補としてさらに検証される可能性があります。¹⁶

i 免疫受容体プロファイリングに関するより詳細な情報については、『[Multiomic interrogation of the immune system at single-cell resolution](#)』アプリケーションノートをご覧ください。

自己免疫

自己免疫疾患は疾患の表現型が不均一であり、治療に対する反応が変化しやすいことから、研究することは困難です。また、自己免疫の根底をなす分子メカニズムも十分理解されていないため、診断と治療がより複雑になっています。scRNA-Seqとシングルセルエピゲノミクスの組み合わせを用いて、胚中心 (GC) の多様な免疫サブセットが特徴づけられました。¹⁷ この研究では、GCで主要な免疫制御遺伝子の発現の調節に異常が見られたことから、自己免疫疾患の原因に異常なGC反応の関与を示しました。¹⁷ scRNA-Seqを用いて潰瘍性大腸炎に関わる主要な細胞集団の転写プロファイルが特徴づけられ、健康な結腸と疾患を発症した結腸の包括的なシングルセルアトラスが作成されました。¹⁸ 最近では、マルチプレックス化されたscRNA-Seqは全身性エリテマトーデス (SLE) における血中循環免疫細胞集団の特性評価と転写シグネチャーの同定に用いられています。¹⁹

神経生物学

シングルセルアプローチは、脳の生理学と病理学を理解するために、基礎およびトランスレーショナル神経科学の幅広い領域に対応できる可能性があります。しかし、凍結したヒトの脳組織などのサンプルからのシングルセル分離は困難です。単一核RNA-Seq (snRNA-Seq) はscRNA-Seqに代わり、シングルセルの解像度で転写プロファイリングが可能です。²⁰ アレン脳科学研究所の研究者たちは、snRNA-Seqデータを用いて、皮質、海馬および視床を含む主要な脳領域の転写プロファイルを用いて包括的な脳アトラスを作成しています。²¹ 同様のアプローチを用いて発育中のヒト脳のシングルセルアトラスが作成されています。²² 単一核のクロマチンアクセシビリティとトランスクリプトミクスプロファイリングを応用して、アルツハイマー病における疾患特異的転写因子とこれらの因子が調節す

る標的が明らかにされています。²³ scRNA-Seqを用いた脳脊髄液の循環細胞の解析は、アルツハイマー病²⁴、多発性硬化症^{24,25}およびCOVID-19の神経学的後遺症などの神経学的疾患を研究するための有望なアプローチとして登場しました。²⁷ 近年、CITE-Seq (single-cell cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing) として知られるシングルセルアプローチを用いて、てんかん病変の特性評価が行われました。²⁸ これら病変の広範囲なミクログリア活性化と炎症性免疫細胞の浸潤は、薬剤耐性てんかんに対する今後の治療薬開発のヒントになる可能性があります。²⁸

幹細胞および発生生物学

scRNA-Seq領域の急速な発展により、胚形成と幹細胞生物学に対してさらに深い洞察が促進されています。²⁹ 人工多能性細胞 (iPSC) は形質転換成功率が比較的低く³⁰、この不均一性をもたらず根底にある因子を理解することは有望な再生医療を達成するために不可欠です。scRNA-Seqは複数のヒトiPSCの内胚葉発生を評価するために用いられています。³¹ この研究では、初期発生段階中の規定の時点における一般的な遺伝的バリエーションとそれらの影響を評価し、発達障害における遺伝的バリエーションの因果的役割に関する重要な情報が示されました。また、scRNA-Seqは間葉幹細胞³²と辺縁系幹細胞の転写不均一性の評価にも用いられています。³³ scRNA-Seqを用いて脳損傷に反応して活性化し、組織修復を担う可能性がある成人の神経幹細胞の希少な亜集団が解明されています。³⁴ がん幹細胞 (CSC) プロファイリングはscRNA-Seqを用いて活発に研究されている別の領域です。CSCは腫瘍内の希少な亜集団であり、従来の治療法に抵抗性を示すことが多く、転移と再発の促進に重要な役割を担っています。scRNA-Seqはさまざまな再発がんのCSCの評価に応用されており³⁵⁻³⁸、治療のための候補となる標的を明らかにしています。

がん研究

シングルセルメソッドは腫瘍内の不均一性と腫瘍微小環境に関する重要な情報を解き明かすことでがん研究の状況を変化させています (図4)。腫瘍は不均一性が高く、がん細胞の複数のクローンが微小環境内の細胞との相互作用で構成されていることが知られています。バルクRNA-Seqアプローチは複数種の腫瘍の遺伝子発現シグネチャーを広範囲に同定するために用いられていますが³⁹⁻⁴¹、腫瘍内と腫瘍間に存在する高い複雑性により、これらの結果に一定した再現性はありません。また、固形腫瘍はさまざまな浸潤免疫細胞や間質細胞を含んでおり、それぞれの細胞は腫瘍進行、転移および治療反応に影響する可能性のある自身の転写プログラムを持っています。scRNA-Seqは新しい治療標的を発見し、臨床試験に進むことができる薬剤候補を同定するために活用することも可能です。⁴²

腫瘍の不均一性

シングルセルトランスクリプトミクスはトランスクリプトームの不均一性を検証し、生物学的に重要な希少なクローンを同定し、これらのクローンがどの分子パスウェイを利用するかを評価し、がん研究における治療応答を予測するための力強いメソッドとして登場しました (図5)。scRNA-Seqは原発性膠芽細胞腫⁴³と乏突起膠腫における多様な腫瘍構成と幹細胞性の調節因子を明らかにするために応用されました。⁴⁴ 同様のアプローチを用いて、結腸がん (CRC) における腫瘍内多様性が検証され、CRCクローンには抗癌剤への反応に影響し得る相当数の体細胞変異が含まれることが明らかになりました。⁴⁵ scRNA-Seqを用いてバルクRNA-Seqデータがさらに精緻化され、肺がん⁴⁶および頭頸部がん⁴⁷のサブタイプの再定義と転移の傾向予測が行われました。

腫瘍不均一性

腫瘍微小環境

免疫療法選択

治療応答

血中循環腫瘍細胞

図4: がん研究におけるscRNA-Seqアプリケーション: scRNA-Seqは、腫瘍進化と不均一性を理解し、疾患進行と転移をモニタリングし、免疫療法への反応を予測し、化学療法抵抗性を克服する際にブレークスルーとなる発見の原動力となっています。

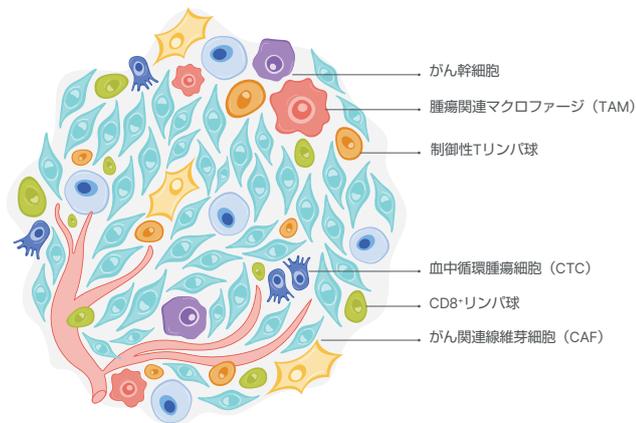


図5：scRNA-Seqによって解明された腫瘍不均一性：シングルセルトランスクリプトミクス研究を活用して、希少ながん細胞の亜集団、血中循環腫瘍細胞、腫瘍浸潤免疫細胞の特性を高解像度で評価できます。

免疫療法への反応

免疫細胞の浸潤は複数の腫瘍で一般的に認められます。これらの免疫細胞の生物学的特性は腫瘍の進行に大きな影響を及ぼすことがあり、免疫療法の成功を予測することができます。現在、このような免疫細胞集団の多様な転写プロファイルの特性評価は、scRNA-Seqにより実現しています。⁴⁸ 例えば、scRNA-Seqは、腫瘍浸潤骨髄細胞の遺伝子発現シグネチャーに基づき、これらの細胞を25以上の異なる段階に分類することに応用されました。⁴⁹ scRNA-Seqを用いて、浸潤したCD8⁺ Tリンパ球の割合が高いことが非小細胞肺癌の良好な転帰と関連することが同定されました。⁵⁰ 同様に、CD8⁺ Tリンパ球の希少な亜集団は黒色腫における養子細胞移植免疫療法への良好な反応と関連付けられました。⁵¹ 逆に、scRNA-Seqにより、制御性T細胞の浸潤割合が高いことは肝がんの予後不良と関連することが同定されました。⁵¹ また、シングルセルアプローチは、肉腫⁵³や転移性黒色腫におけるチェックポイント阻害剤の免疫療法反応を決定するためにも用いられています。⁵⁴⁻⁵⁶

治療選択

scRNA-Seqからのデータは不均一な腫瘍内の希少な治療抵抗性細胞集団を検出できるため、適切な治療アプローチの選択に役立てることができます。例えば、scRNA-Seqによって、AXLの発現量が多い転移性黒色腫細胞の小さな集団が同定されました。⁵⁷ この治療抵抗性亜集団の細胞からは、RAFまたはMEK阻害剤を用いた従来の治療の反応にクローン選択を経ることを予測することができます。その代わりに、AXLhiの転写シグネチャーのある腫瘍は、AXL阻害剤による治療法に反応する可能性が高いことが考えられます。⁵⁸ 同様に、scRNA-Seqデータを用いて予測モデルを作成し、乳がん細胞株の薬剤反応が特定されました。⁵⁹

腫瘍微小環境

ほとんどの固形腫瘍は、腫瘍形成と転移に関与する可能性のあるがん関連線維芽細胞 (CAF) を含有します。これらの細胞は腫瘍微小環境を確立し維持する際に重要な役割を担うことが知られていますが⁶⁰、これらの細胞がどのようなメカニズムでその役割を担っているかについては活発な研究が行われています。CAFに対する信頼できるバイオマーカーがないことから、従来のメソッドを用いてこれらの細胞を研究することは困難となっています。研究者はscRNA-Seqをうまく活用して、乳がん^{61,62}と結腸がん⁶³において、CAFの細胞起源を含むCAFの複数の集団を同定しました。この重要な情報は、CAFに対して治療標的候補としての今後の研究への道を切り開きました。⁴²

血中循環腫瘍細胞 (CTC)

scRNA-Seqの新しい応用方法では、非侵襲的な液体バイオプシーに対してCTCの特性を評価し、早期または再発性のがんを検出します。腫瘍由来CTCは非常に高い不均一性を示します。シングルセルトランスクリプトミクスはCTCを正確に評価するための有望なアプローチであり、がん進行と治療への反応を予測することが可能です。scRNA-Seqは、乳がん⁶⁴⁻⁶⁷、肝がん⁶⁸、前立腺がん^{69,70}および膀胱がん⁷¹など、複数種類のがんにおけるCTC解析に応用されています。

scRNA-Seqワークフロー

scRNA-Seqワークフローは、組織調製、シングルセル分離とライブラリー調製、シーケンス、データ解析の主に4つのステップから成ります(図6)。イルミナはシーケンスとデータ解析ソリューションのポートフォリオを拡大しており、これらは市販されているシングルセルプラットフォームと統合でき、さまざまなscRNA-Seq研究のニーズに対応します。

 詳細なメソッドについては、[イルミナシングルセルメソッドガイド](#)をご覧ください。

組織調製

scRNA-Seq実験の成功は、生細胞が高品質かつ均一に分離された懸濁液から始まります。関心のある組織を機械的手段、酵素的手段、またはこれらの手段を組み合わせることで、細胞外マトリクスを破壊し、以降の工程に用いる生きた細胞の懸濁液が得られます。このステップは、勾配遠心分離、フローサイトメトリー、磁気ビーズベースの濃縮方法などのプロトコールに従って特定の細胞集団を濃縮または除外することができます。最適化した濃縮と品質管理(QC)ステップがscRNA-Seqに適した高収量の生細胞の確保には不可欠です。

シングルセル分離

トランスクリプトミクス研究で使用するシングルセル抽出手法はscRNA-Seq結果全体に大きな影響を及ぼします。ライブラリー調製とシーケンスを行うために細胞懸濁液からシングルセルを分離するには、ハイスルーブットとロースルーブットの多くのメソッドを利用することができます。

頻繁に用いられるシングルセル抽出方法は以下のような方法があります：

- **フローソーティング**：シングルセルを含んだマイクロドロプレットを、電荷を用いて分離します。このメソッドは、大きさ、形態、内部複雑性および抗体標識によるタンパク質発現に基づいて正確に細胞の種類を選択します。
- **ドロプレット流体プラットフォーム**：このアプローチはマイクロ流体デバイスを用いてドロプレット中に個別に細胞を分け、その後溶解し、標的DNAとRNAをキャプチャーします。⁷²⁻⁷⁴ 分子バーコード(UMI)と細胞バーコードの使用により、細胞や遺伝子特異的な識別が可能です。
- **マイクロウェル**：加工されたアレイを含んだマイクロウェルを用いて、個別の細胞をキャプチャーします。^{75,76} このメソッドは接着細胞に適しており、UMIや細胞バーコードとも互換性があります。
- **インデックスまたはプレートベースのメソッドの組み合わせ**：無傷細胞または核に対して分離、プーリング、ライゲーションを複数回実施してタグ付けし、異なるバーコードの組み合わせを造り出すことで、数千個の細胞を同時にプロファイリングすることが可能です。^{77,78}

ライブラリー調製

シングルセル分離の次はライブラリー調製です。幅広いライブラリー調製メソッドを、イルミナのシステムでシーケンスできる状態のバーコード付加したシングルセル遺伝子発現ライブラリーの作製に利用できます(表1)。調製したライブラリーはシーケンスに進む前に定性および定量評価を行います。ライブラリーQCおよびプールのサンプルのリバランスにはiSeqTM 100システムなどのロースルーブットのイルミナシーケンスシステムを使うことができます。

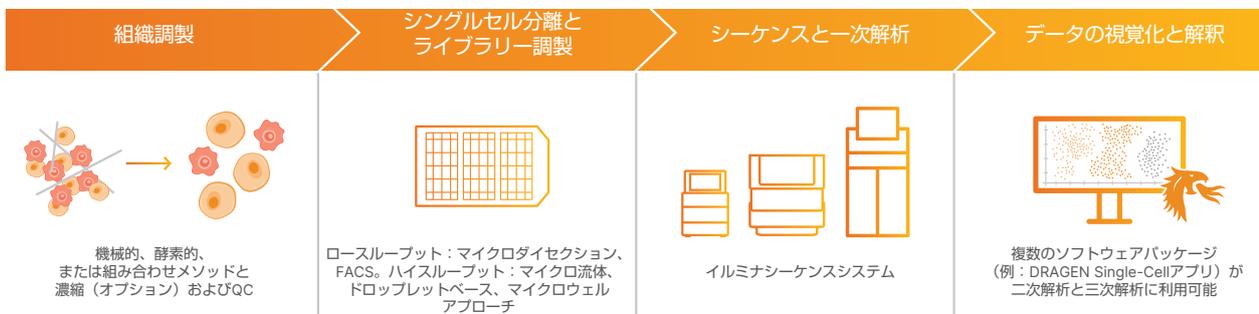


図6：シングルセルシーケンスワークフロー：scRNA-Seqワークフローは、最初に組織分離、続いてシングルセルの分離、ライブラリー調製、シーケンス、そして最後にデータ解析と視覚化を行います。FACS：蛍光活性セルソーティング。

表 1: scRNA-Seq アプリケーション用のライブラリー調製メソッド

メソッド	説明	シーケンス深度
全長RNA-Seq	Switching mechanism at 5' end of template (SMART) テクノロジーにより、全長cDNAの増幅が可能です。	細胞あたり10,000~20,000リードペア
mRNA末端タグ付け増幅 (3' WTAまたは5' WTA)	3'ポリアデニル化 (poly-A) 末端からmRNAをキャプチャーすることでストランド特異的情報を含むコーディングトランスクリプトームのシーケンスが可能です。	細胞あたり15,000~50,000リードペア
ターゲット化したパネル	事前にデザインされたシングルセルターゲットRNAシーケンスパネルは、T細胞、乳がんなどのプロファイリングを可能にします。	細胞あたりのアンプリコンにつき200リード
免疫レパートリーシーケンス (IR-Seq)	BCRまたはTCRのレパートリーの構成を定量するために使用するターゲット化したシーケンスメソッドです。	細胞あたり5,000リード

WTA: 全トランスクリプトーム増幅、BCR: B細胞受容体、TCR: T細胞受容体。

シーケンス

調製したシングルセルライブラリーをイルミナシーケンスシステムでシーケンスし、幅広いスループットに対して正確かつ信頼性の高いシーケンスデータを生成します。イルミナのNextSeq 550システム、NextSeq 1000システム、NextSeq 2000システムはミッドスループットからハイスループットのシングルセル研究に適しています。NovaSeq 6000システムおよびNovaSeq Xシステムはパワフルかつ拡張性のあるイルミナプラットフォームであり、ハイスループットアプリケーションに最適です。すべてのイルミナシーケンスシステムは、scRNA-Seq、空間RNA-Seq、シーケンシングを用いたAssay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-Seq)、免疫受容体シーケンス (IR-Seq)、CITE-Seq、および多くの新たなアプリケーションを含む、幅広いシングルセルアプリケーションに適用可能な単一のNGSのリードアウトを提供します。

 イルミナプラットフォームでの10x Genomics Chromium Single-Cell Gene Expressionを用いた詳細なscRNA-Seq プロトコールについては、『[Explore the transcriptome at single-cell resolution](#)』テクニカルノートをご覧ください。

データ解析

シングルセル実験の解析パイプラインは、一次解析またはベースコーリング、二次解析、および三次解析とデータ視覚化の3つの段階からなります。

- **ベースコーリング:** イルミナシーケンスシステムはバイナリーベースコール (BCL) 形式で生データファイルを生成します。イルミナの独立型のBCL Convertアプリまたは10x GenomicsのCellRangerソフトウェアを用いて、BCL出力を幅広い二次データ解析ツールの入力として使用できるFASTQ形式に変換します。

- **二次解析:** 一次解析に続き、scRNA-Seqデータは、データ解析用のクラウドベース環境であるイルミナの[BaseSpace Sequence Hub](#)で、安全に転送、保存、解析することができます。DRAGEN Single-Cellアプリなどのソフトウェアパッケージは、アライメント、バリエーションコール、データQCに用いることができます。また、10x Genomics CellRangerソフトウェアもscRNA-Seqデータに対応した複数の二次解析パイプラインを搭載しています。

- **三次解析とデータ視覚化:** このステップは、データ解釈と視覚化が含まれ、シングルセルの解像度で細胞機能に新しい洞察が得られます。シングルセルデータに対応する定評のある三次解析ツールは、Seurat、Scanpy、AnnData、10x Genomics Loupe Cell Browser、MissionBio Tapestry Insightsなどが挙げられます。SeqGeqはBD Biosciencesが開発したデスクトップ型のアプリケーションセルであり、BaseSpace Sequence Hubと直接統合できるため、シングルセルデータのクラスタリング解析と視覚化が簡単に行えます。DRAGEN Single-Cellアプリが生成した細胞×遺伝子発現マトリクス出力はこれらの三次解析ソフトウェアツールと互換性があります。

 DRAGEN Single-Cellアプリの情報については、『[DRAGEN v3.7: Single-cell RNA, PrecisionFDA accuracy gains, and more](#)』ブログ記事をご覧ください

 イルミナシーケンスシステムでのscRNA-Seqのサンプルデータセットおよびテストランは[BaseSpace Sequence Hub](#) データページをご覧ください

シングルセルトランスクリプトミクス 研究の最新の動向

マルチオミクス

マルチオミクスは、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、エピゲノミクス、プロテオミクスなどの複数の「オミクス」アプローチを介して収集された洞察の組み合わせであり、細胞の過程に関する高次元の視点を提供します(図7)。CITE-Seqは、オリゴヌクレオチド標識した抗体を使用して、NGSによるタンパク質検出を定量アッセイに変換するマルチオミクスアプローチです。⁷⁹ CITE-Seqはシングルセルトランスクリプトミクスと細胞のタンパク質発現を関連づけることで、細胞表現型解析の新しいアプローチを提供します。CITE-Seqのより新しい応用であるexpanded CRISPR-compatible cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing (ECCITE-SeqまたはPerturb-Seq)は、CRISPRスクリーニングで、シングルセルトランスクリプトミクスと細胞表面タンパク質マーカーを調べるためのパワフルなマルチオミクスアプローチです。⁸⁰ Perturb-Seqは、免疫細胞の遺伝子発現シグネチャーと共に、これらの細胞の表現型とクロノタイプに関する重要な洞察を与えます。Single-cell ATAC-Seq and Gene Expression (ATAC-Seq + GE)⁸¹は、別のマルチオミクスツールであり、同一細胞から遺伝子発現とクロマチンアクセシビリティを同時に検出できます。シングルセル解像度でのトランスクリプトームとエピゲノムのマルチオミクスプロファイリングにより、健康と疾患における遺伝子制御ネットワークと細胞不均一性に対してより深い洞察が得られます。⁸²

 マルチオミクスに関する詳細情報については、[イルミナマルチオミクス eBook](#)をご覧ください。

 BioLegend TotalSeqを用いたCITE-Seqの詳細については、『[Correlated expression of protein and RNA reveals a unique molecular signature in Th1 polarized cells](#)』アプリケーションノートをご覧ください。

 Single-cell ATAC-Seq + GEの詳細については、『[シングルセル遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティの統合](#)』テクニカルノートをご覧ください。

空間解析

自然な組織微小環境は遺伝子発現に大きな影響を及ぼします。シングルセルトランスクリプトミクスデータは細胞の表現型と機能特性に関する重要なデータを提供しますが、個別細胞の分離により細胞の位置に関する重要な情報が失われます。空間トランスクリプトミクスでは、組織内の細胞ネットワークを明らかにし、細胞間のコミュニケーションについてより深い理解を得ることができます。⁸³ 空間的に解像されたscRNA-Seqは、骨髄⁸⁴の組織構造と細胞動態の評価のほか、乳がん⁸⁵、結腸がん⁸⁶および膵臓がん^{42,87}の評価に応用されています。



図7: シングルセル研究におけるマルチオミクス: 情報の多層化は、scRNA-Seqだけでは解明できない複雑な生物系に新しい洞察を与えます。

 NanoString GeoMx[®] Digital Spatial ProfilerとイルミナNGSのリードアウトを使用した空間分解トランスクリプトミクスの概要については、『[High-resolution, high-throughput spatial transcriptomics of complex tissues](#)』アプリケーションノートをご覧ください。

 空間プロテオゲノミクスに関する詳細については、『[High-plex spatial proteogenomics of FFPE tissue sections](#)』アプリケーションノートをご覧ください。

 10x Genomics Visium Spatial Gene Expressionを用いて組織切片から空間分解トランスクリプトームをマッピングするための詳細なプロトコールについては、『[組織構造内の全遺伝子発現 \(トランスクリプトーム\) の解明](#)』テクニカルノートをご覧ください。

時間解析

現在のscRNA-Seqメソッドは静止状態の遺伝子発現を捉え、細胞表現型と機能を評価します。しかし、組織内の遺伝子発現過程は本質的に動的で、ライブラリー調製メソッドの革新により、シングルセルの固定が可能になり、手頃になったscRNA-Seqを組み合わせることで、シングルセル解析における経時的なサンプル採取を可能にしました。シングルセルRNA速度 (scVelo) は細胞集団における転写産物の動態を調べる便利な指標です。⁸⁸ RNA速度はスプライスされたリードに対するスプライスされていないリードの割合を測定し、これを利用して一時点で採取したサンプルからでも、遺伝子発現の時間的変化を推測することができます。これは、活発に研究が行われている分野であり、シングルセルにおける遺伝子発現の時間的特性を解明するために計算とモデルメソッドの開発が行われています。⁸⁹

サンプルマルチプレックス

シングルセルトランスクリプトミクス研究は進歩し続けており、実験あたりにより多くのサンプルを検証するためにコスト効率の良いアプローチの必要性が高まっています。MULTI-Seqとして知られているサンプルマルチプレックスメソッドの1つでは、インデックスでタグ付けした脂質を使用してサンプルにバーコードを付加します。⁹⁰別のアプローチでは、フィンガープリントとしてサンプル特異的遺伝的多型を使用し、プールしたサンプル中で個々の細胞を同定します。⁹¹細胞のハッシングは、CITE-Seqメソッドを基盤としたマルチプレックスアプローチであり、デマルチプレックスを行うためのフィンガープリントとしてバーコード付加した抗体シグナルを使用し、ロバストなサンプルマルチプレックスと「マルチプレート」の決定を可能にし、scRNA-Seqデータ全体の品質を高めます。⁹²超ハイスループットアプリケーションでは、透過処理した細胞内のトランスクリプトーム全体に対してコンビネーションなプレインデックスを付加することで、数百万個の個々の細胞に対してコスト効率の良いscRNA-Seqを可能にします。^{78,93}使用するメソッドにかかわらず、サンプルマルチプレックスを用いて、ライブラリー調製のサンプルあたりのコストを削減し、ダブルレットやその他の技術的なアーティファクトを検出し、バッチ効果を軽減するためのサンプルプーリングを行うことができます。最終的に、高度にマルチプレックス化された実験は、大規模なスクリーニングアプローチと同様に、多くの処理方法を組み合わせることができます。⁷⁸

VASA-Seq

従来のscRNA-Seqメソッドはポリアデニル化された転写産物の末端を増幅するため、長いノンコーディングRNA、短いノンコーディングRNA、細胞のトランスクリプトームに存在する可能性のあるポリアデニル化されないタンパク質コード転写産物をキャプチャーすることができません。dA-tailingまたはVASA-Seqによるシングルセルの広範なトランスクリプトーム解析は、シングルセルの全トランスクリプトームを捉えるscRNA-Seqメソッドです。⁹⁴また、VASA-Seqを用いて得られたデータは、改良されたオルタナティブスプライス検出やRNA速度解析の結果も提供します。

まとめ

シングルセルトランスクリプトミクスはパワフルな検出ツールであるため、複雑な生物系における細胞の不均一性に対してより深い洞察が可能となります。scRNA-Seqは幅広い研究領域に応用でき、健康と疾患における細胞機能の理解を転換する可能性を秘めています。イルミナはシングルセル研究の風景の変革を支援するテクノロジーソリューションの開発に尽力しています。研究者はイルミナシーケンスシステムを活用し、正確で高感度なscRNA-Seqデータにアクセスできます。柔軟性のあるNGSのリードアウトはハイスループットのマルチオミクスワークフローでの使用に適しています。DRAGEN Single-Cellアプリとの統合により、データ解析が簡素化され、市販で購入できるシングルセルデータ視覚化パイプラインと互換性のある出力を生成します。

詳細はこちら

Single-cell RNA-Seq : jp.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/ultra-low-input-single-cell-rna-seq.html

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

イルミナDRAGEN Bio-IT Platform : jp.illumina.com/products/by-type/informatics-products/dragen-bio-it-platform.html

参考文献

1. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10:57–63.
2. Wilhelm BT, Landry JR. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA sequencing. *Methods.* 2009;48:249–57.
3. Aldridge S, Teichmann SA. Single cell transcriptomics comes of age. *Nat Commun.* 2020;11(1):4307. doi:10.1038/s41467-020-18158-5
4. Karlsson M, Zhang C, Méar L, et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv.* 2021;7(31):eabh2169. doi:10.1126/sciadv.abh2169
5. Human Cell Atlas. humancellatlas.org. Accessed November 8, 2022.

6. Bilate AM, London M, Castro TBR, et al. T Cell Receptor Is Required for Differentiation, but Not Maintenance, of Intestinal CD4⁺ Intraepithelial Lymphocytes. *Immunity*. 2020;53(5):1001-1014.e20. doi:10.1016/j.immuni.2020.09.003
7. Lee B, Namkoong H, Yang Y, et al. Single-cell sequencing unveils distinct immune microenvironments with CCR6-CCL20 crosstalk in human chronic pancreatitis. *Gut*. 2022;71(9):1831-1842. doi:10.1136/gutjnl-2021-324546
8. Zhang SQ, Ma KY, Schonnesen AA, et al. High-throughput determination of the antigen specificities of T cell receptors in single cells. *Nat Biotechnol*. Published online November 12, 2018. doi:10.1038/nbt.4282
9. Bentzen AK, Marquard AM, Lyngaa R, et al. Large-scale detection of antigen-specific T cells using peptide-MHC-I multimers labeled with DNA barcodes. *Nat Biotechnol*. 2016;34(10):1037-1045. doi:10.1038/nbt.3662
10. Sheih A, Voillet V, Hanafi LA, et al. Clonal kinetics and single-cell transcriptional profiling of CAR-T cells in patients undergoing CD19 CAR-T immunotherapy. *Nat Commun*. 2020;11(1):219. doi:10.1038/s41467-019-13880-1
11. Yang HQ, Wang YS, Zhai K, Tong ZH. Single-Cell TCR Sequencing Reveals the Dynamics of T Cell Repertoire Profiling During Pneumocystis Infection. *Front Microbiol*. 2021;12:637500. doi:10.3389/fmicb.2021.637500
12. Sun H, Yang HQ, Zhai K, Tong ZH. Signatures of B Cell Receptor Repertoire Following Pneumocystis Infection. *Front Microbiol*. 2021;12:636250. doi:10.3389/fmicb.2021.636250
13. Setliff I, Shiakolas AR, Pilewski KA, et al. High-Throughput Mapping of B Cell Receptor Sequences to Antigen Specificity. *Cell*. 2019;179(7):1636-1646.e15. doi:10.1016/j.cell.2019.11.003
14. Mathew NR, Jayanthan JK, Smirnov IV, et al. Single-cell BCR and transcriptome analysis after influenza infection reveals spatiotemporal dynamics of antigen-specific B cells. *Cell Rep*. 2021;35(12):109286. doi:10.1016/j.celrep.2021.109286
15. He B, Liu S, Wang Y, et al. Rapid isolation and immune profiling of SARS-CoV-2 specific memory B cell in convalescent COVID-19 patients via LIBRA-seq. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):195. doi:10.1038/s41392-021-00610-7
16. Shiakolas AR, Kramer KJ, Johnson NV, et al. Efficient discovery of SARS-CoV-2-neutralizing antibodies via B cell receptor sequencing and ligand blocking. *Nat Biotechnol*. 2022;40(8):1270-1275. doi:10.1038/s41587-022-01232-2
17. King HW, Wells KL, Shipony Z, et al. Integrated single-cell transcriptomics and epigenomics reveals strong germinal center-associated etiology of autoimmune risk loci. *Sci Immunol*. 2021;6(64):eabh3768. doi:10.1126/sciimmunol.abh3768
18. Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J, et al. Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis. *Cell*. 2019;178(3):714-730.e22. doi:10.1016/j.cell.2019.06.029
19. Perez RK, Gordon MG, Subramaniam M, et al. Single-cell RNA-seq reveals cell type-specific molecular and genetic associations to lupus. *Science*. 2022;376(6589):eabf1970. doi:10.1126/science.abf1970
20. Ding J, Adiconis X, Simmons SK, et al. Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):737-746. doi:10.1038/s41587-020-0465-8
21. Allen Brain Map.Cell Types Database:RNA-Seq Data. portal.brain-map.org/atlasses-and-data/rnaseq. Accessed November 7, 2022.
22. Eze UC, Bhaduri A, Haeussler M, Nowakowski TJ, Kriegstein AR.Single-cell atlas of early human brain development highlights heterogeneity of human neuroepithelial cells and early radial glia. *Nat Neurosci*. 2021;24(4):584-594. doi:10.1038/s41593-020-00794-1
23. Morabito S, Miyoshi E, Michael N, et al. Single-nucleus chromatin accessibility and transcriptomic characterization of Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2021;53(8):1143-1155. doi:10.1038/s41588-021-00894-z
24. Gate D, Saligrama N, Leventhal O, et al. Clonally expanded CD8 T cells patrol the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Nature*. 2020;577(7790):399-404. doi:10.1038/s41586-019-1895-7
25. Beltrán E, Gerdes LA, Hansen J, et al. Early adaptive immune activation detected in monozygotic twins with prodromal multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2019;129(11):4758-4768. doi:10.1172/JCI128475
26. Ramesh A, Schubert RD, Greenfield AL, et al. A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(37):22932-22943. doi:10.1073/pnas.2008523117
27. Song E, Bartley CM, Chow RD, et al. Divergent and self-reactive immune responses in the CNS of COVID-19 patients with neurological symptoms. *Cell Rep Med*. 2021;2(5):100288. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100288
28. Kumar P, Lim A, Hazirah SN, et al. Single-cell transcriptomics and surface epitope detection in human brain epileptic lesions identifies pro-inflammatory signaling. *Nat Neurosci*. 2022;25(7):956-966. doi:10.1038/s41593-022-01095-5
29. Cao J, Spielmann M, Qiu X, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*. 2019;566(7745):496-502. doi:10.1038/s41586-019-0969-x
30. Al Abbar A, Ngai SC, Nograles N, Alhaji SY, Abdullah S. Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *BioResearch Open Access*. 2020;9(1):121-136. doi:10.1089/biores.2019.0046
31. Cuomo ASE, Seaton DD, McCarthy DJ, et al. Single-cell RNA-sequencing of differentiating iPSCs reveals dynamic genetic effects on gene expression. *Nat Commun*. 2020;11(1):810. doi:10.1038/s41467-020-14457-z

32. Sun C, Wang L, Wang H, et al. Single-cell RNA-seq highlights heterogeneity in human primary Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells cultured in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):149. doi:10.1186/s13287-020-01660-4
33. Sun C, Wang H, Ma Q, et al. Time-course single-cell RNA sequencing reveals transcriptional dynamics and heterogeneity of limbal stem cells derived from human pluripotent stem cells. *Cell Biosci.* 2021;11(1):24. doi:10.1186/s13578-021-00541-4
34. Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K, Martin-Villalba A. Single-Cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury. *Cell Stem Cell.* 2015;17(3):329-340. doi:10.1016/j.stem.2015.07.002
35. Wang H, Mei Y, Luo C, et al. Single-cell analyses reveal mechanisms of cancer stem cell maintenance and epithelial-mesenchymal transition in recurrent bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27(22):6265-6278. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-4796
36. Couturier CP, Ayyadhury S, Le PU, et al. Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nat Commun.* 2020;11(1):3406. doi:10.1038/s41467-020-17186-5
37. Johansson E, Ueno H. Characterization of normal and cancer stem-like cell populations in murine lingual epithelial organoids using single-cell RNA sequencing. *Sci Rep.* 2021;11(1):22329. doi:10.1038/s41598-021-01783-5
38. Zheng H, Pomyen Y, Hernandez MO, et al. Single-cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Hepatal Baltim Md.* 2018;68(1):127-140. doi:10.1002/hep.29778
39. Han LO, Li XY, Cao MM, Cao Y, Zhou LH. Development and validation of an individualized diagnostic signature in thyroid cancer. *Cancer Med.* 2018;7(4):1135-1140. doi:10.1002/cam4.1397
40. Zhou JG, Liang B, Jin SH, et al. Development and Validation of an RNA-Seq-Based Prognostic Signature in Neuroblastoma. *Front Oncol.* 2019;9:1361. doi:10.3389/fonc.2019.01361
41. Shukla S, Evans JR, Malik R, et al. Development of a RNA-Seq Based Prognostic Signature in Lung Adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(1). doi:10.1093/jnci/djw200
42. Cui Zhou D, Jayasinghe RG, Chen S, et al. Spatially restricted drivers and transitional cell populations cooperate with the microenvironment in untreated and chemo-resistant pancreatic cancer. *Nat Genet.* 2022;54(9):1390-1405. doi:10.1038/s41588-022-01157-1
43. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* 2014;344(6190):1396-1401. doi:10.1126/science.1254257
44. Tirosh I, Venteicher AS, Hebert C, et al. Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma. *Nature.* 2016;539(7628):309-313. doi:10.1038/nature20123
45. Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, et al. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature.* 2018;556(7702):457-462. doi:10.1038/s41586-018-0024-3
46. Wu F, Fan J, He Y, et al. Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):2540. doi:10.1038/s41467-021-22801-0
47. Puram SV, Tirosh I, Parkh AS, et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell.* 2017;171(7):1611-1624.e24. doi:10.1016/j.cell.2017.10.044
48. Andreatta M, Corria-Osorio J, Müller S, Cubas R, Coukos G, Carmona SJ. Interpretation of T cell states from single-cell transcriptomics data using reference atlases. *Nat Commun.* 2021;12(1):2965. doi:10.1038/s41467-021-23324-4
49. Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, et al. Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species. *Immunity.* 2019;50(5):1317-1334.e10. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.009
50. Guo X, Zhang Y, Zheng L, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat Med.* 2018;24(7):978-985. doi:10.1038/s41591-018-0045-3
51. Krishna S, Lowery FJ, Copeland AR, et al. Stem-like CD8 T cells mediate response of adoptive cell immunotherapy against human cancer. *Science.* 2020;370(6522):1328-1334. doi:10.1126/science.abb9847
52. Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma. *Cell.* 2019;179(4):829-845.e20. doi:10.1016/j.cell.2019.10.003
53. Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: Clinical impact and mechanisms of response and resistance. *Annu Rev Pathol.* 2021;16:223-249. doi:10.1146/annurev-pathol-042020-042741
54. Wu TD, Madireddi S, de Almeida PE, et al. Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature.* 2020;579(7798):274-278. doi:10.1038/s41586-020-2056-8
55. Fairfax BP, Taylor CA, Watson RA, et al. Peripheral CD8+ T cell characteristics associated with durable responses to immune checkpoint blockade in patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 2020;26(2):193-199. doi:10.1038/s41591-019-0734-6
56. Jerby-Arnon L, Shah P, Cuoco MS, et al. A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade. *Cell.* 2018;175(4):984-997.e24. doi:10.1016/j.cell.2018.09.006

57. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. [Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq.](#) *Science*. 2016;352(6282):189-196. doi:10.1126/science.aad0501
58. Nyakas M, Fleten KG, Haugen MH, et al. [AXL inhibition improves BRAF-targeted treatment in melanoma.](#) *Sci Rep*. 2022;12(1):5076. doi:10.1038/s41598-022-09078-z
59. Gambardella G, Viscido G, Tumaini B, Isacchi A, Bosotti R, di Bernardo D. [A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response.](#) *Nat Commun*. 2022;13(1):1714. doi:10.1038/s41467-022-29358-6
60. Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. [Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment.](#) *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:60. doi:10.3389/fcell.2019.00060
61. Anjanappa M, Cardoso A, Cheng L, et al. [Individualized breast cancer characterization through single-cell analysis of tumor and adjacent normal cells.](#) *Cancer Res*. 2017;77(10):2759-2769. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3308
62. Bartoschek M, Oskolkov N, Bocci M, et al. [Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing.](#) *Nat Commun*. 2018;9(1):5150. doi:10.1038/s41467-018-07582-3
63. Bian S, Hou Y, Zhou X, et al. [Single-cell multiomics sequencing and analyses of human colorectal cancer.](#) *Science*. 2018;362(6418):1060-1063. doi:10.1126/science.aao3791
64. Cheng YH, Chen YC, Lin E, et al. [Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA-sequencing for circulating tumor cells.](#) *Nat Commun*. 2019;10(1):2163. doi:10.1038/s41467-019-10122-2
65. Powell AA, Talasaz AH, Zhang H, et al. [Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines.](#) *PLoS One*. 2012;7(5):e33788. doi:10.1371/journal.pone.0033788
66. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. [Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis.](#) *Cell*. 2014;158(5):1110-1122. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013
67. Aceto N, Bardia A, Wittner BS, et al. [AR Expression in breast cancer CTCs associates with bone metastases.](#) *Mol Cancer Res*. 2018;16(4):720-727. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0480
68. D'Avola D, Villacorta-Martin C, Martins-Filho SN, et al. [High-density single cell mRNA sequencing to characterize circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma.](#) *Sci Rep*. 2018;8(1):11570. doi:10.1038/s41598-018-30047-y
69. Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, et al. [RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance.](#) *Science*. 2015;349(6254):1351-1356. doi:10.1126/science.aab0917
70. Chen CL, Mahalingam D, Osmulski P, et al. [Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer.](#) *The Prostate*. 2013;73(8):813-826. doi:10.1002/pros.22625
71. Negishi R, Yamakawa H, Kobayashi T, et al. [Transcriptomic profiling of single circulating tumor cells provides insight into human metastatic gastric cancer.](#) *Commun Biol*. 2022;5(1):20. doi:10.1038/s42003-021-02937-x
72. Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. [Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets.](#) *Cell*. 2015;161(5):1202-1214. doi:10.1016/j.cell.2015.05.002
73. Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al. [Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells.](#) *Cell*. 2015;161(5):1187-1201. doi:10.1016/j.cell.2015.04.044
74. Zheng GXY, Terry JM, Belgrader P, et al. [Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells.](#) *Nat Commun*. 2017;8:14049. doi:10.1038/ncomms14049
75. Rettig JR, Folch A. [Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays.](#) *Anal Chem*. 2005;77(17):5628-5634. doi:10.1021/ac0505977
76. Han X, Wang R, Zhou Y, et al. [Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq.](#) *Cell*. 2018;172(5):1091-1107.e17. doi:10.1016/j.cell.2018.02.001
77. Cao C, Lemaire LA, Wang W, et al. [Comprehensive single-cell transcriptome lineages of a proto-vertebrate.](#) *Nature*. 2019;571(7765):349-354. doi:10.1038/s41586-019-1385-y
78. Srivatsan SR, McFaline-Figueroa JL, Ramani V, et al. [Massively multiplex chemical transcriptomics at single-cell resolution.](#) *Science*. 2020;367(6473):45-51. doi:10.1126/science.aax6234
79. Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. [Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells.](#) *Nat Methods*. 2017;14(9):865-868. doi:10.1038/nmeth.4380
80. Mimitou EP, Cheng A, Montalbano A, et al. [Multiplexed detection of proteins, transcriptomes, clonotypes and CRISPR perturbations in single cells.](#) *Nat Methods*. 2019;16(5):409-412. doi:10.1038/s41592-019-0392-0
81. Buenrostro JD, Wu B, Chang HY, Greenleaf WJ. [ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide.](#) *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;109:21.29.1-21.29.9. doi:10.1002/0471142727.mb2129s109
82. Muto Y, Wilson PC, Ledru N, et al. [Single cell transcriptional and chromatin accessibility profiling redefine cellular heterogeneity in the adult human kidney.](#) *Nat Commun*. 2021;12(1):2190. doi:10.1038/s41467-021-22368-w
83. Longo SK, Guo MG, Ji AL, Khavari PA. [Integrating single-cell and spatial transcriptomics to elucidate intercellular tissue dynamics.](#) *Nat Rev Genet*. 2021;22(10):627-644. doi:10.1038/s41576-021-00370-8

84. Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat Cell Biol.* 2020;22(1):38-48. doi:10.1038/s41556-019-0439-6
85. Andersson A, Larsson L, Stenbeck L, et al. Spatial deconvolution of HER2-positive breast cancer delineates tumor-associated cell type interactions. *Nat Commun.* 2021;12(1):6012. doi:10.1038/s41467-021-26271-2
86. Pelka K, Hofree M, Chen JH, et al. Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer. *Cell.* 2021;184(18):4734-4752.e20. doi:10.1016/j.cell.2021.08.003
87. Moncada R, Barkley D, Wagner F, et al. Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Nat Biotechnol.* 2020;38(3):333-342. doi:10.1038/s41587-019-0392-8
88. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, et al. RNA velocity of single cells. *Nature.* 2018;560(7719):494-498. doi:10.1038/s41586-018-0414-6
89. Ranek JS, Stanley N, Purvis JE. Integrating temporal single-cell gene expression modalities for trajectory inference and disease prediction. *Genome Biol.* 2022;23(1):186. doi:10.1186/s13059-022-02749-0
90. McGinnis CS, Patterson DM, Winkler J, et al. MULTI-seq: sample multiplexing for single-cell RNA sequencing using lipid-tagged indices. *Nat Methods.* 2019;16(7):619-626. doi:10.1038/s41592-019-0433-8
91. Kang HM, Subramaniam M, Targ S, et al. Multiplexed droplet single-cell RNA-sequencing using natural genetic variation. *Nat Biotechnol.* 2018;36(1):89-94. doi:10.1038/nbt.4042
92. Stoeckius M, Zheng S, Houck-Loomis B, et al. Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* 2018;19(1):224. doi:10.1186/s13059-018-1603-1
93. Datlinger P, Rendeiro AF, Boenke T, et al. Ultra-high-throughput single-cell RNA sequencing and perturbation screening with combinatorial fluidic indexing. *Nat Methods.* 2021;18(6):635-642. doi:10.1038/s41592-021-01153-z
94. Salmen F, De Jonghe J, Kaminski TS, et al. High-throughput total RNA sequencing in single cells using VASA-seq. *Nat Biotechnol.* Published online June 27, 2022. doi:10.1038/s41587-022-01361-8

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。