BioSkryb GENOMICS

Technical Note
シングルセルエクソームシーケンシング

ResolveDNA®およびResolveOME™ 増幅産物における高プール数・シングルセルエクソームハイブリッドキャプチャ

個々の細胞レベルでトランスクリプトーム、ゲノム、およびその他のオミクス情報を取得できるようになったことで、生物学的発見は大きく前進しました。従来のバルクシーケンシングでは見過ごされていた細胞不均一性の拡大が、ゲノムやトランスクリプトームをシングルセルレベルで解析することで、明らかになっています。これにより、腫瘍サンプル内における遺伝子発現サブグループの理解が深まり、クローン進化の再構築が支援されることで、薬剤耐性のPersister細胞に対するメカニズム仮説に貢献しています。それにもかかわらず、シングルセルトランスクリプトーム解析と比べ、シングルセルゲノムシーケンスの普及は遅れています。その主な理由は、解析するシングルセルの数が増えるにつれて全ゲノムシーケンシング（WGS）のコストが高騰するためです。

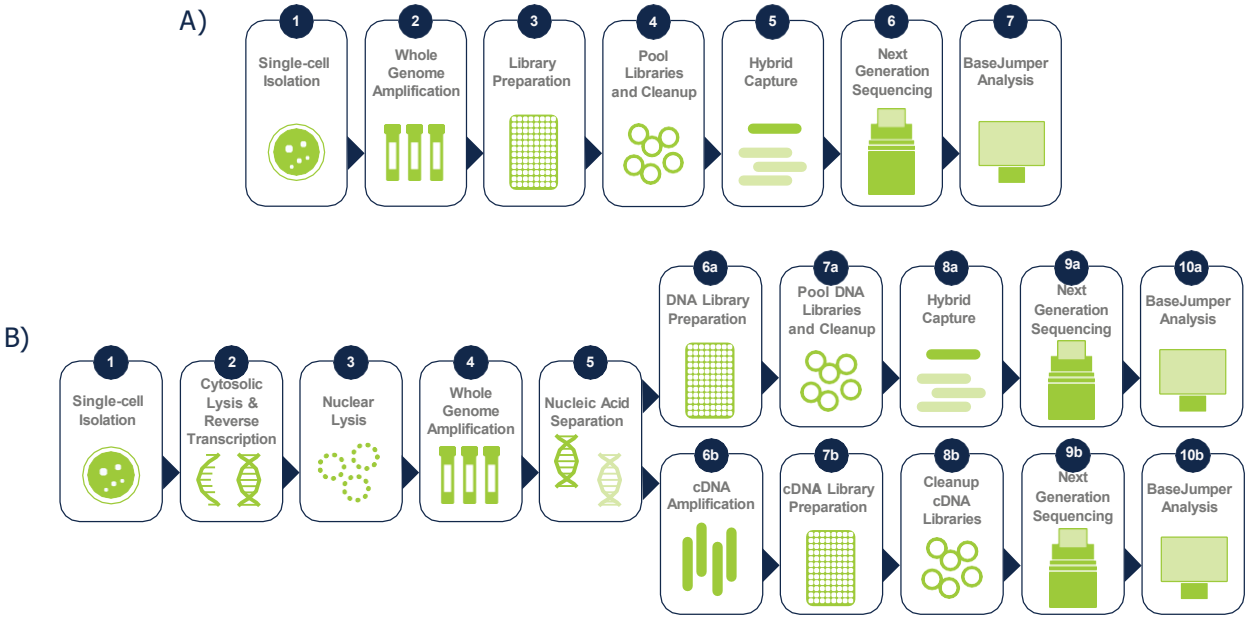

図1: 下流でハイブリッドキャプチャと組み合わせたResolveDNA（A）とResolveOME（B）のワークフロー。
シングルセルのゲノム増幅後、増幅産物はBioSkryb社のUDIライゲーション法により、ライブラリ調製します。DNA断片は酵素処理により、エクソーム濃縮に最適なサイズにします。ResolveDNAでは、ライブラリをプールした後、ビーズ精製し、真空遠心乾燥vacufuge dry-downを経て、ハイブリッドキャプチャにかけられます。ResolveOMEマルチオミクスワークフローでは、ゲノム（DNA）画分も同様にキャプチャ用のライブラリ調製、プール、エクソーム濃縮を行います。一方で、トランスクリプトーム（RNA）画分は、標準のワークフローに従ってライブラリ調製され、エクソームキャプチャ済みのライブラリとは別にシーケンスされます。BaseJumperソフトウエアは、キャプチャ前のQC（希望に応じ）およびキャプチャ後のゲノム増幅ライブラリ解析、加えてResolveOMEのRNAライブラリに対する転写解析にも対応しています。

また、がんなどの疾患を研究する方にとっては、非コード領域や遺伝子発現調節領域に見られる配列変異よりも、コード領域内に存在する、解釈しやすい変異や臨床的な応用が可能な変異のほうが直接的な関心の対象となることが多くあります。このニーズに応じて、BioSkryb社のResolveDNA®シングルセル全ゲノム増幅コアキットおよびResolveOME™シングルセル全ゲノム・トランスクリプトーム増幅コアキットは、他社のハイブリダイゼーションキャプチャ法を組み合わせることで、シングルセルに対する全エクソームシーケンシング（WES）を実現するワークフローを提案します（図1参照）。本研究で使用したエクソーム濃縮パネルは、IDT™社の xGen™ Exome Hyb Panel v2 と、Twist Bioscience社の Exome 2.0 plus comprehensive spike-in です。BioSkryb社のシングルセルエクソーム濃縮ワークフローは、以下の特長があります：

- **生物学的な目的に応じて、シングルセル全ゲノムシーケンシング（WGS）の代替として「最適なスケール」で実施可能な全エクソームシーケンシング（WES）を提供。**
- **既存のResolveDNAおよびResolveOMEコアキットと組み合わせて使用可能。**
- **シングルセルエクソームの97.5%以上をカバーし、変異検出感度は90%以上、陽性適中率（PPV）は98%以上。**
- **96サンプルを一度に濃縮処理でき、ワークフローの簡略化と試薬コストの削減を実現。**

異なる情報を捉える：シングルセル vs. バルクエクソーム

希少なゲノム変異を特定する際、通常のバルク（集団）レベルでの細胞測定では、シグナルが平均化されてしまい、サンプル内に存在する本来の不均一性（ヘテロジェネイティ）が見えなくなってしまいます。一方で、シングルセルレベルでシーケンシングを行うことで、希少な変異であってもシグナルが明確で「デジタル的」に検出されます。例えば、ヘテロ接合性の変異はリードの50%に現れることで確認できます（図2参照）。これはつまり、通常の体細胞エクソーム解析で求められる感度は、複数の細胞を低カバレッジ（10x未満）で解析することで実現でき、全体としてはより高いシグナル強度が得られることを意味します。

さらに、シングルセルレベルの全エクソーム解析（WES）では、複数のゲノム変異が同一細胞内に共存しているかどうかを記録することも可能です。通常のバルクエクソーム解析では、サンプル中に高いアレル頻度で存在する変異を検出することはできますが、変異Aと変異Bが同じ細胞に存在しているかどうか、加えてそれらの遺伝的相互作用に関する仮説を検証することはできません。

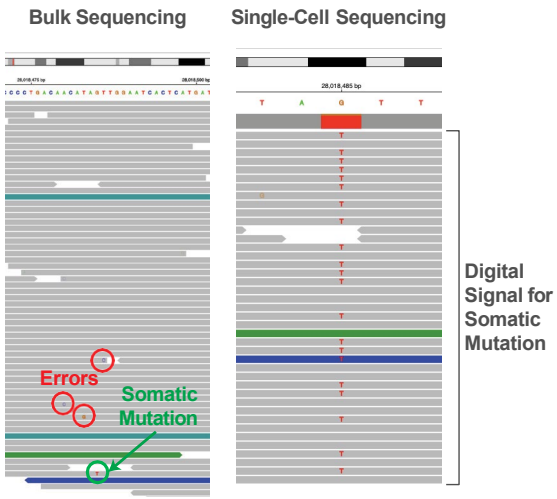

図2:シングルセルにおけるデジタルな変異検出シグナル。
アレル頻度の低いSNV（一塩基変異）を検出する場合、シングルセルにおけるリード構造はデジタル的であり、ヘテロ接合（0/1、リファレンス／変異アレル）の変異は～50%のリードに出現します（右図）。
同様に、ホモ接合変異（1/1）の場合は、すべてのリードに変異アレルが検出されます。これに対して、バルクエクソーム解析（左図）では、サンプル全体に平均化された中で、希少な変異（緑）をシーケンスエラーや増幅エラー（赤）と区別することは困難です。

「良質なインプットが良質なアウトプットを生む」：ターゲットキャプチャの成功には忠実なシングルセルゲノム増幅が必須

シングルセルに特化したエクソーム解析の報告や市販プロトコールは、これまで限られた例しかありません。Borgström et al.[1]では、複数のシングルセルゲノム増幅法（Ampli1、MALBAC、REPLI-g、PicoPLEX）について、それぞれにIllumina TruSeqを用いて下流のエクソームキャプチャを組み合わせた比較研究を実施しました。この研究では、使用された増幅法に固有するアレル表現の不完全さと不均一性が、ハイブリッドキャプチャの効率に悪影響を与え、シングルセルエクソームにおけるターゲット領域のカバレッジが7～68%にとどまる結果が示されました。これは、バルクエクソームのコントロールにおいて見られた約90%のターゲット回収率とは大きく異なります。ターゲットカバレッジが比較的低いため、バルクエクソームで確認されたSNVsのうち、シングルセルエクソームで検出できたのは多くても25%に過ぎませんでした。

一方、ResolveDNAおよびResolveOMEを用いた全ゲノム増幅では、ゲノム回収率97%、アレルバランス>85%が達成されており[2]、これはBorgström et al.[1]の研究で用いられた増幅法とは**まったく異なる高品質なプレキャプチャマテリアルを提供します**。ResolveDNAおよびResolveOMEが実現した忠実なゲノム増幅は、エクソームパネルにおけるビオチン標識プローブによるキャプチャの対象となるゲノム領域を大幅に増やすことができます。本研究では、この「良質なインプットが良質なアウトプットを生む」という原則が、シングルセルエクソーム濃縮でも成立することを示しました。その成果として：ゼロカバレッジのターゲット領域はわずか（約0.02）、ターゲットの～75-85%が10xでカバーされ、SNV検出感度の中央値は>90%を達成しています（図4A, C–D）。さらに、表1には、キャプチャ後の指標を示しています：ターゲット領域の平均カバレッジ、アレルバランス、GC/AT領域におけるドロップアウト、重複率（duplication rate）。

シングルセルワークフローによって観察される細胞の挙動を最も正確に示すために、図4では96個の細胞にわたるデータを提示し、外れ値（オレンジ色の点）を明示しています。細胞の分注精度や細胞生存率に配慮することでライブラリ多様性の低い細胞の混入を最小限に抑えることは可能ですが、96細胞中にはどうしても一定数の外れ値が存在します。それでも、これらの外れ値となる細胞からも、有意義な情報を得ることは十分可能です。

変異検出性能を維持しながら、キャプチャのプール数Plexityの限界に挑む

通常のバルクエクソーム濃縮実験では、6-12程度のライブラリを一度にプールしてハイブリッドキャプチャにかけるのが一般的です。それに対して、Bioskrybのシングルセルワークフローの大きな特長のひとつは、96ライブラリを1回のハイブリッドキャプチャにプールできる点です（図3）。この高プール数に応じて、ライブラリ全体の投入量を調整し、ハイブリッドキャプチャ用パネルの量は一定のままにしつつ、重複率の増加やその他の悪影響を抑える工夫を施しています。96-plexでのキャプチャは、複数回に分けてのキャプチャと比べて大幅な時間とコストの削減が可能でありながら、性能も犠牲にしないです。各種指標による実証は、図4および表1で示されています。

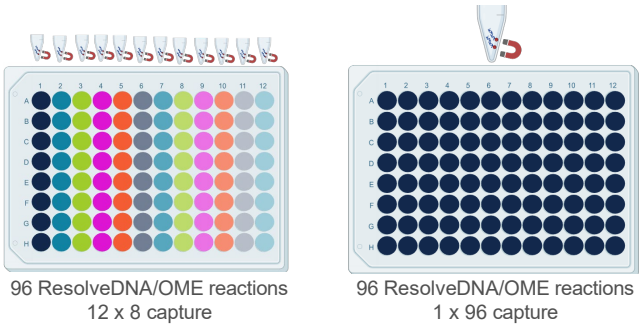

図3：シングルセルエクソーム解析におけるプール数の最大化。
96ウェルプレートでシングルセルResolveDNAまたはResolveOME反応の増幅産物全体を、1本のチューブでエクソーム濃縮できます（右図）。これは、通常のバルクエクソーム濃縮で推奨されるプール数とは違い、バルクは8サンプルずつの並列反応を複数回行う必要があります（左図）。この図は BioRender.com にて作成されました。

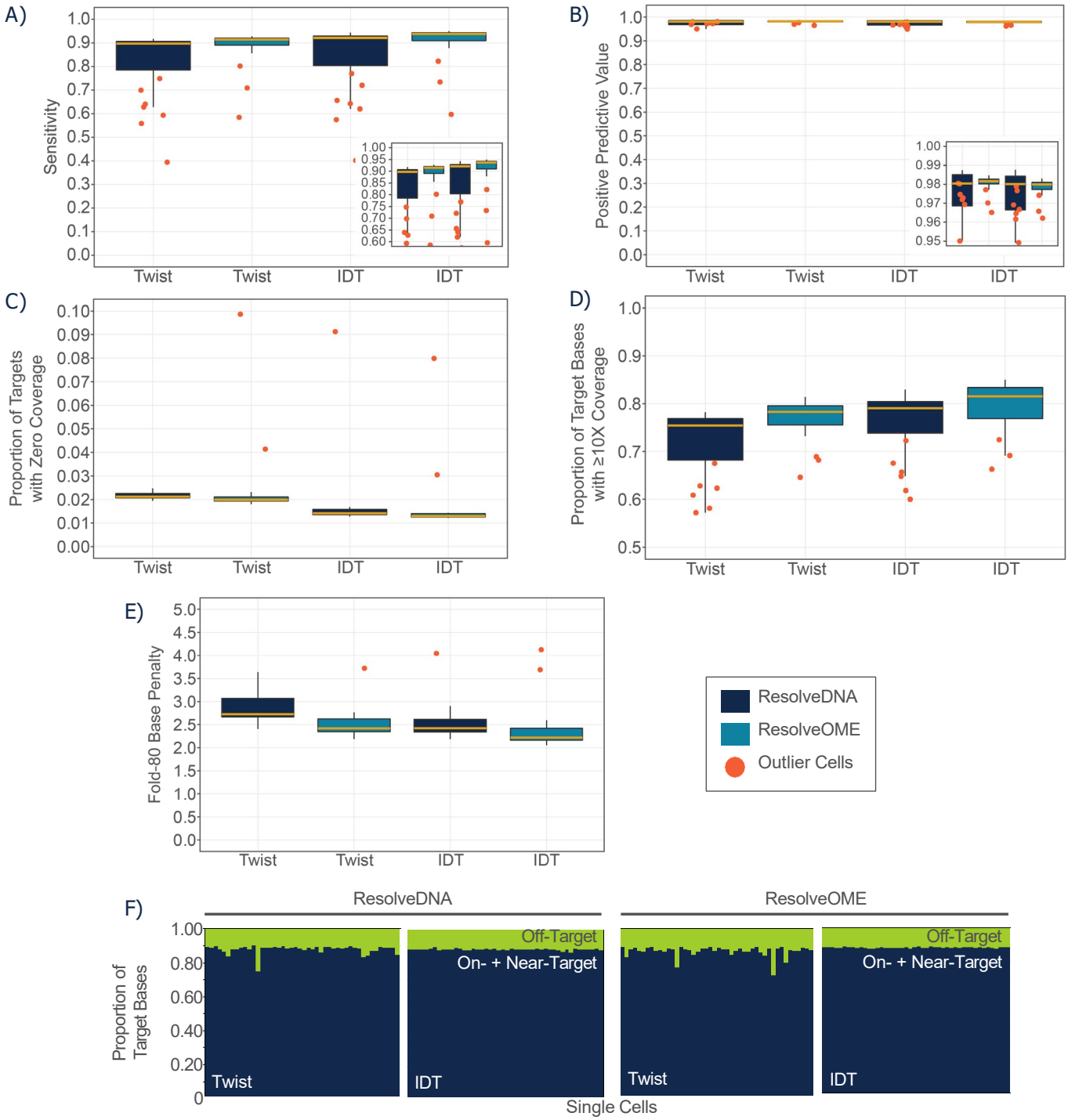

図4：96-plexでシングルセルエクソーム解析の性能評価。
Twist Exome 2.0 plus comprehensive spike-in または IDT xGen v2 エクソームパネルを用いた解析において、ResolveDNA由来のシングルセルは青色のボックスプロット、ResolveOME由来のシングルセルは水色のボックスプロットで表されています。黄色の線は中央値を示し、オレンジ色の点はライブラリの複雑性が低い細胞を示しており、これらの細胞が高プール状態に与える影響を示唆しています。挿入図では、外れ値となる、複雑性が低い細胞を詳細に拡大表示しています。すべてのデータは、各シングルセルライブラリあたり20M総ペアエンドリードもしくは10Mクラスター（150 bp）にダウンサンプリングされています。
変異検出の評価指標：Genome in a Bottle由来のHG002細胞を用い、**（A）**感度（Sensitivity: TP / (TP + FN)）、**（B）**陽性適中率（Postive Predict Value: TP / (TP + FP)）を示します。
キャプチャ性能の評価指標：**（C）**リードがカバーしていないエクソームターゲット領域の割合。**（D）**10倍以上のカバレッジを達成しているターゲット塩基の割合。**（E）**Fold-80 base penalty：ターゲット全体の80%が平均カバレッジに到達するために必要な追加シーケンスの倍数（キャプチャの均一性の指標）。**（F）**ターゲット領域およびその周辺（±250 bp）にマッピングされた塩基の割合と、オフターゲットにマッピングされた塩基の割合。
略語：TP = 真陽性（True Positive）；FN = 偽陰性（False Negative）；FP = 偽陽性（False Positive）

Metric	BioSkryb Platform	Twist, Mean ± SD	IDT, Mean ± SD
Target Coverage	ResolveDNA	21.39 ± 1.35	22.76 ± 0.85
	ResolveOME	21.52 ± 1.08	22.01 ± 3.37
Allelic Balance	ResolveDNA	0.67 ± 0.24	0.69 + 0.24
	ResolveOME	0.79 ± 0.13	0.80 ± 0.14
Proportion Duplication	ResolveDNA	0.05 ± 0.02	0.12 ± 0.03
	ResolveOME	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.06
GC Dropout	ResolveDNA	16.22 ± 1.27	9.96 ± 1.04
	ResolveOME	13.47 ± 0.64	7.50 ± 0.86
AT Dropout	ResolveDNA	0.35 ± 0.06	0.28 ± 0.17
	ResolveOME	0.48 ± 0.05	0.74 ± 0.25

表1：キャプチャ後のResolveDNA/OMEライブラリにおける追加の性能特性。この表では、総ペアエンドリード数が20Mのとき、達成された平均Target Coverageに加えて、HG002ゲノムのヘテロ接合部位における両アレルの検出能力を示すAllelic Balanceにも注目しています。 Allelic Balanceの値は、変異アレル頻度（variant allele frequency）が0.2-0.8の範囲にあるものを対象に評価されます。Proportion Duplication（重複率）は、シーケンスおよびキャプチャ後に生じた（光学的やPCR）全体の重複の割合を反映しています。Picard MetricsのGC Dropout値は、本来>50%のGC含量領域にマッピングされるべきリードが、別の領域にマッピングされた割合を示します。一方、ATドロップアウトは、本来<50%のGC含量領域にマッピングされるべきリードが、他の領域にマッピングされた割合を示します。SD = 標準偏差。

BioSkrybのシングルセルWESワークフローにおけるシーケンシング推奨事項

Bioskryb社は、各シングルセルライブラリ（およびそれに対応するエンリッチメントplex全体）に対するシーケンシング推奨量を決定するにあたり、ターゲットカバレッジの最大化と重複率の低減の両立を重視して検討しました。定義された96-plex内の各シングルセルライブラリには、総ペアエンドリード数20Mリードもしくは10Mクラスター（150 bp）を推奨しています。これにより、平均カバレッジは20xとなり、重複率も<15%に抑えられています。

96細胞分すべてのリード数を合計すると、約20億リードが必要となり、高出力シーケンサーのレーンのかなりの部分を占めますが、シングルセルWESから得られる情報は従来のバルクWESとは全く異なる価値を持っています。シングルセルWESでは、ゲノム変異の共存の検出や希少変異の発見が可能であり、さらに腫瘍サンプル内の主要なトランカル変異の確認もできます。

この96-plexシングルセルエクソームワークフローは、豊富で大規模なデータセットを生成します。これらのデータは、バルクエクソーム解析とは異なるシングルセル特有の解析特性を持ち、扱いやすく柔軟な解析ソリューションが必要とされています。BaseJumper®ソフトウェアは（希望に応じ）、ライブラリ複雑性の事前推定（preseq estimate）を含む、エンリッチメント前ライブラリの品質管理（QC）を実行することが可能です。本ノートで示しているキャプチャ後の各種メトリクスは、BaseJumperのBJ-WESパイプラインを使用して生成することができます（plex内のシングルセル群にわたる変異のフィルタリングや層別化（stratification）など）。

結論

これまで、シングルセルエクソーム解析を協同的に実施できるワークフローは限られていました。本技術ノートで紹介する高プール数対応のシングルセルワークフローは、腫瘍サンプルの不均一性を明らかにし、さまざまな応用にも、新たなスピードで道を開きます。本ワークフローは、ResolveDNAおよびResolveOMEによるゲノム増幅技術を基盤としております。これはエクソームエンリッチメントの前段階で行われ、シングルセルレベルで存在するゲノム変異に対して、最も高い検出可能性を提供します。

方法

図1は、BioSkrybのシングルセルエンドツーエンドエクソームワークフローを、ResolveDNAゲノム増幅とResolveOMEマルチオミクス増幅の両モダリティで示しています。

シングルセル単離

本研究では、Genome in a Bottle Consortium[3]による広範なシーケンシング特性評価がなされている、SNV検出性能の評価が可能なHG002 Bリンパブラスト細胞を使用しました。HG002細胞はFACS（蛍光活性化細胞ソート）により96ウェルPCRプレートに分注されました。各ウェルにはBioSkryb Cell Bufferが入っており、細胞の生存率を確保するために2種類の染色法を用いています：ヨウ化プロピジウム染色による、膜が損傷した細胞のネガティブセレクション；Calcein-AM染色による、細胞内エステラーゼ活性に依存のポジティブセレクション。分注されたHG002細胞入りプレートは、増幅反応の準備が整うまで-80°Cで凍結保存されました。

ResolveDNAやResolveOMEによる増幅

ResolveDNAによるゲノム増幅またはResolveOMEによるマルチオミクス増幅は、それぞれのユーザーガイドに従って実施されました。増幅されたResolveDNAまたはResolveOMEのゲノム産物は、ハイブリッドキャプチャに特化したBioSkrybライブラリ調製プロトコルに従って処理されました（該当プロトコルはユーザーガイドTAS-081およびTAS-082に記載）。一方、ResolveOMEマルチオミクスワークフローにおけるRNAライブラリは、ハイブリッドキャプチャの対象とはならないため、ResolveOMEユーザーガイドに記載された標準のライブラリ調製プロトコルを用いて別途作製されました。

ハイブリッドキャプチャ用ライブラリ調製

20 ngのResolveDNAまたはResolveOMEによるゲノム増幅産物を、ハイブリッドキャプチャに対応したBioSkrybライブラリ調製プロトコルに投入しました（ユーザーガイドTAS-081およびTAS-082に記載）。この改良プロトコルでは、酵素的断片化により、ハイブリッドキャプチャに適した小サイズのライブラリを作製します。また、ライブラリのプールには、UDI（Unique Dual Index）付きのアダプターのライゲーションとPCR増幅を行った後に、ビーズクリーンアップ工程をまとめて処理することが可能です。最終的にライブラリプールは、キャプチャ性能を損なわないよう、ユーザーガイドで推奨されているRT-PCRグレードの水に溶出されました。

ハイブリッドキャプチャ

本研究におけるエンリッチメントplexの構成を決定するにあたり、各plexのシングルセルライブラリの20%に、増幅が不完全または不均一（preseq[4]によるライブラリ多様性推定値が3.5×10^9未満）なライブラリを意図的に含めました。この設計の理由は、ResolveDNA/OME実験の現実的な状況を反映させ、細胞の損傷や技術的・操作上のエラーに起因する一部の増幅失敗を考慮に入れることです。また、この設計により、不完全に増幅されたゲノムがターゲットキャプチャに与える影響を明らかにし、同一エンリッチメント内で最適なライブラリ多様性を持つシングルセルライブラリとの比較が可能になりました。

エクソームエンリッチメントには、以下の2種類のプロトコルを製造元の手順に従って使用しました（ただし、ライブラリプールの投入量については一部修正を加えています）：1)Twist Exome 2.0 + Comprehensive Spike-in; 2) IDT xGen v2 Exome。96-plexityに最適化した投入量は、Twistでは8 µg、IDTでは12 µgのライブラリプールをしており、いずれも製造元推奨量の2倍に相当します。両プロトコルにも、4時間のハイブリダイゼーションを行いました。

シーケンシング

各96-plexエンリッチメントは、Illumina NovaSeq Xを用いてシーケンスされました。各シングルセルライブラリあたりペアエンド150 bpリードで合計20Mリードまたは10Mクラスターを目標とし、96-plexあたり96 × 20M = 合計1.92Bリードに相当します。各ライブラリでこの最小リード深度を確保するため、必要量を上回るリード数を取得し、その後ダウンサンプリングを行い、推奨される1ライブラリあたり合計20Mリードに調整しました。

解析

データ解析には、BaseJumper解析パイプラインを使用し、エンリッチメント前ライブラリの品質評価には BJ-DNA-QC、キャプチャ後の性能評価には BJ-WESを適用しました。これらの解析手法は、Bioskryb社のクラウドポータル（basejumper.bioskryb.com）およびオンラインGitHubページ（https://github.com/BioSkryb）からご利用いただけます。

参照文献

1. Borgström E, et al. PLOS One 2017, 12(2):e0171566. DOI 10.1371/journal.pone.0171566
2. Data on file.
3. Zook JM, et al. Sci Data 3, 160025 (2016). https://doi.org/10.1038/sdata.2016.25
4. Daley T and Smith AD. Nature Methods 2013, 10:4, 325-327. DOI 10.1038/nmeth.2375

For more information or technical assistance:
techsupport@bioskryb.com

Published by:

BioSkryb GENOMICS

2810 Meridian Pkwy, Suite 110, Durham, NC 27713
bioskryb.com

All data on file.
BIOSKRYB, RESOLVEDNA, RESOLVEOME, BASEJUMPER, and RESOLVESERVICES are trademarks of BioSkryb, Inc. All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Version: TAS_084 | 03/2025

© 2025. BioSkryb, Inc. All rights reserved.