

# 皮膚炎症性疾患研究のための 免疫細胞の装置を必要としない シングルセルRNAシーケンス



Grolleau C<sup>2,3</sup>, Poisot T<sup>2</sup>, Poncin R<sup>1</sup>, Lipin S<sup>1</sup>, André B<sup>1</sup>, Demouche S<sup>2,3</sup>,  
Chaumat P<sup>1</sup>, Komatsu J<sup>1</sup>, Bouaziz JD<sup>2,3</sup>, Le Buanec H<sup>2</sup>.

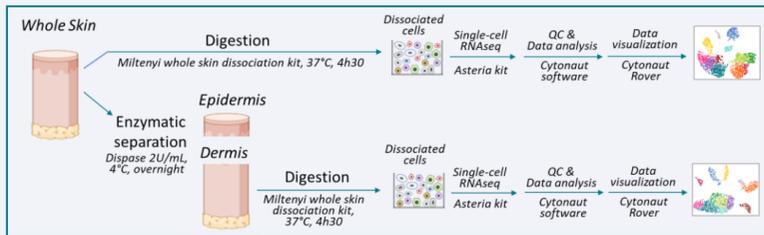
<sup>1</sup>Scipio bioscience, Paris, France. <sup>2</sup>HIPI, INSERM U976, Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

<sup>3</sup>Department of Dermatology, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.



**概要:** 炎症性皮膚疾患の根底にあるメカニズムの理解を深めるには、不均一な細胞とその複雑な相互作用を特徴づけるための高解像度のツールが必要である。ここでは、Scipio bioscience社が開発した、皮膚のトランスクリプトームを高分解能で研究するための新しいシングルセルRNAシーケンス技術について説明する。

**方法:** Saint Louis Hospitalの倫理承認に基づき、ヒト乳房形成外科用皮膚サンプルを健康なドナーから採取し、全皮膚(whole skin)と真皮(dermis)サンプルに分けた(図1にプロトコルの概要を示す)。全皮膚サンプルの一部は直接解離し、もう一部は酵素的に消化して真皮画分を得、真皮サンプルとした。7AAD標識を用いたFACSにより、細胞生存率は88%以上で、凝集は最小限であることが確認された。細胞解離の直後に、Scipio bioscience社独自の可逆的ハイドロゲル技術RevGel-seq™技術を用いた装置不要の3'シングルセルRNAシーケンス(scRNA-seq)ベンチトップ・キットAsteria™を使用し、シングルセルRNA懸濁液を調製した(a)。工程は次のとおりである: 固体ポリマーバーコードビーズと細胞の均一な相での結合、細胞キャプチャに続いて、細胞溶解、バーコード付きビーズ上でのmRNAキャプチャ、逆転写、PCR増幅。シーケンスライブラリへの調製後、cDNA配列決定を行った。サンプルは、全皮膚と真皮の両方とも、解析細胞あたり少なくとも平均150,000の生リード数が得られるようにシーケンシングを行った。バイオインフォマティクス解析はCytonaut™ v1.4クラウドソフト



ウェア(b)を用い、カウントマトリクス生成までの前処理解析、Scanpyに基づくフィルタリング(遺伝子あたり3細胞以上、細胞あたり200以上の転写産物、細胞あたり20%以下のミトコンドリア転写産物)、細胞クラスタリング(Louvain法での分解能: 皮膚全体は0.8、真皮は0.6)、2Dエンベディング(UMAP法)を含む後処理解析を行った。He et al. 2020(c)およびGao et al. 2021(d)で発表されたバイオマーカーの遺伝子発現を視覚的に探索するために、Cytonaut Roverを用いて手動クラスタアノテーションを行った。

図1. プロトコルの概要

**結果: 全皮膚**では、シーケンシングデータから14のクラスターに分離した4659個の細胞が検出された。そのマニュアルアノテーション(図2A)により、表皮細胞(ケラチノサイト: 4サブセット)、間葉系細胞(線維芽細胞: 4サブセット、内皮細胞(EC): 2サブセット、平滑筋細胞(SMC))、免疫細胞(抗原提示細胞、マクロファージ、顆粒球、Tリンパ球)の主要な集団とそのサブセットが同定された。ケラチノサイトのサブタイプをよく観察すると(図2B)、基底層から始まり有棘層、顆粒層へと細胞分化が連続していることがわかる。scRNA-seqデータではよく見られることだが、角質細胞は転写産物数が非常に少ないため、一番上の角質層では数個の細胞(顆粒細胞クラスターの一部)しか検出されなかった。しかし、scRNA-seq研究では通常課題となる、メラノサイトのサブセットを明確に同定した(図2C)。真皮では、文献に記載されているものと一致する12のクラスターに分離した2937個の細胞をシーケンスデータから検出した(図3A)。細胞あたり115kリードという高いシーケンス深度により、CD3+/CD8+、CD3+/CD8-、NK、メモリー、細胞傷害性T細胞といった、異なるリンパ球サブタイプを識別することができた(図3B)。重要なことは、細胞あたりの生リード数を33kから115kに増やしたときに、シーケンス深度の影響を実証したことである(図3Aと図4の比較)。シーケンス深度が高いと、クラスタリングの分解能が向上し、さらにマーカー遺伝子(CD68とMRC1)が明らかになることで、マクロファージの検出がより精密になった。

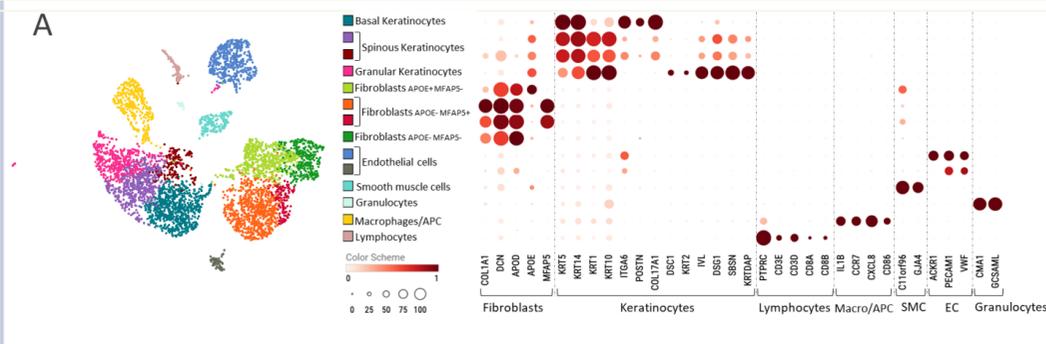


図2. 細胞あたり115k生リードのシーケンス深度における全皮膚での結果。A: 手動でアノテーションしたクラスターと、選択した各マーカー遺伝子の正規化した遺伝子発現のバルーンプロットを示すUMAPビュー。B: ケラチノサイトサブタイプマーカー遺伝子の発現分布を示すUMAPビュー。C: メラノサイトのマーカー遺伝子の発現分布を示すUMAPビュー。灰色から赤へのカラーキーは、遺伝子発現レベルの低いものから高いものを示す。

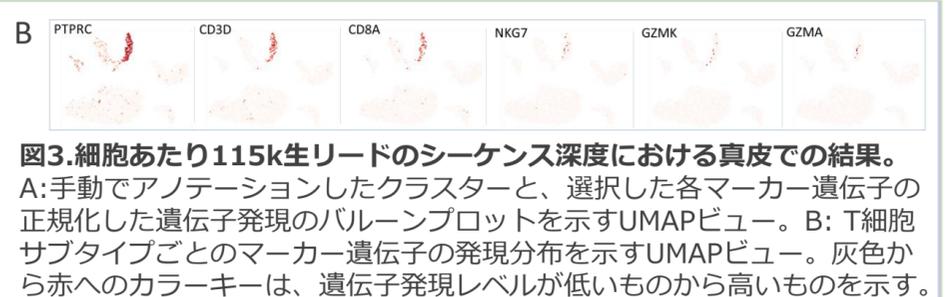
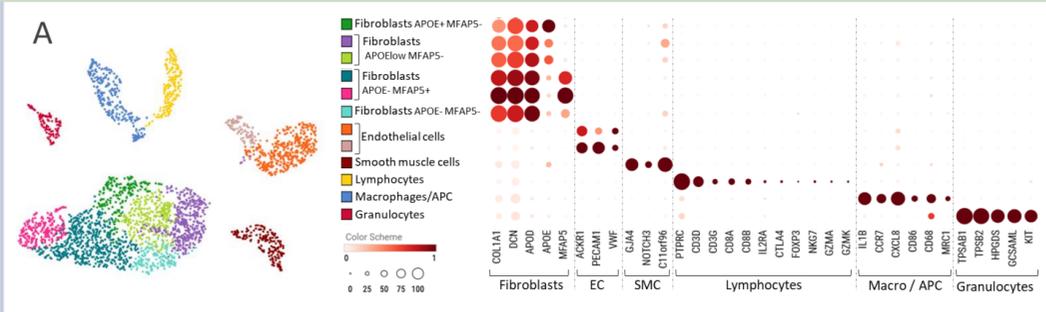


図3. 細胞あたり115k生リードのシーケンス深度における真皮での結果。A: 手動でアノテーションしたクラスターと、選択した各マーカー遺伝子の正規化した遺伝子発現のバルーンプロットを示すUMAPビュー。B: T細胞サブタイプごとのマーカー遺伝子の発現分布を示すUMAPビュー。灰色から赤へのカラーキーは、遺伝子発現レベルが低いものから高いものを示す。

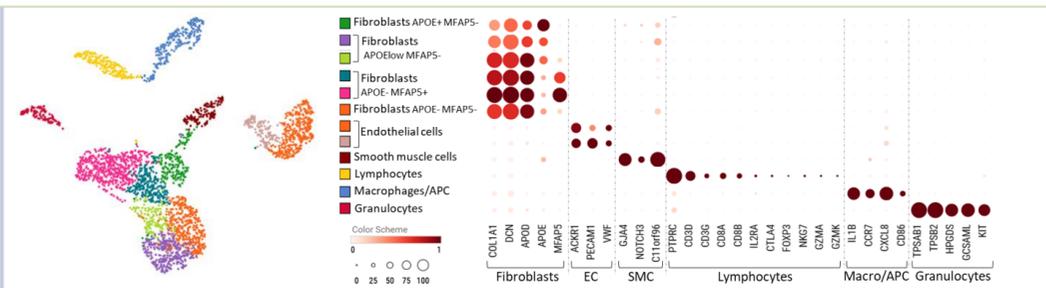


図4. 細胞あたり33k生リードのシーケンス深度における真皮での結果。手動でアノテーションしたクラスターと、選択した各マーカー遺伝子の正規化した遺伝子発現のバルーンプロットによるUMAPビュー。図3の結果と比較すると、シーケンシング深度が低いとクラスターの分離性が低くなり、2つのマクロファージマーカー、CD68とMRC1が失われることがわかる。

**結論:** 我々は概念実証アッセイとして、Scipio bioscienceの技術が健康な皮膚の複雑性と不均一性を分析するのに効率的であることを示し、真皮の免疫細胞のサブタイプをより細かくクラスタリングし解像するためのシーケンスの深さの影響を確認した。現在、ケラチノサイトとT細胞間の相互作用に焦点を当てた炎症性皮膚疾患に関するscRNA-seqでの共同研究が進行中である。

**References:** (a) Komatsu, J., Cico, A., Poncin, R. et al. RevGel-seq: instrument-free single-cell RNA sequencing using a reversible hydrogel for cell-specific barcoding. *Sci Rep* 13, 4866 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31915-y>. (b) [www.cytonaut-scipio.bio](http://www.cytonaut-scipio.bio) (c) He, Helen et al. *The Journal of allergy and clinical immunology* vol. 145,6 (2020): 1615-1628. (d) Gao, Yuge et al. *Cell death & disease* vol. 12,5 450. 6 May. 2021

和訳: プライムテック株式会社



お問合せ:  
**プライムテック株式会社**  
[www.primetech.co.jp](http://www.primetech.co.jp)

ライフサイエンス事業部 バイオ試薬ソリューション部  
東京都文京区小石川1-3-25 小石川大田ビル2F  
Phone: 03-3816-0851(代表) Fax: 03-3814-5080  
E-mail: reagents@primetech.co.jp

For more information on the Asteria™ scRNA-seq Kit or the Cytonaut™ data analysis software, contact us at [scipio.bio](http://scipio.bio) or write to [info@scipio.bio](mailto:info@scipio.bio)!

