



Asteria™キットを用いたシングルセルRNAシーケンスによって示された細胞増幅後のhiPSCからの心室心筋細胞の濃縮

Laetitia Duboscq-Bidot¹, Hélène Eckert², Damien Ulveling², Vincent Fontaine¹, Eric Villard¹, Jun Komatsu^{2*}

¹INSERM UMRS1166, Sorbonne université, 91 Bd de l'hôpital 75013 Paris, France

²Scipio bioscience, Paris Santé Cochin, 29 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France, *contact: jun.komatsu@scipio.bio

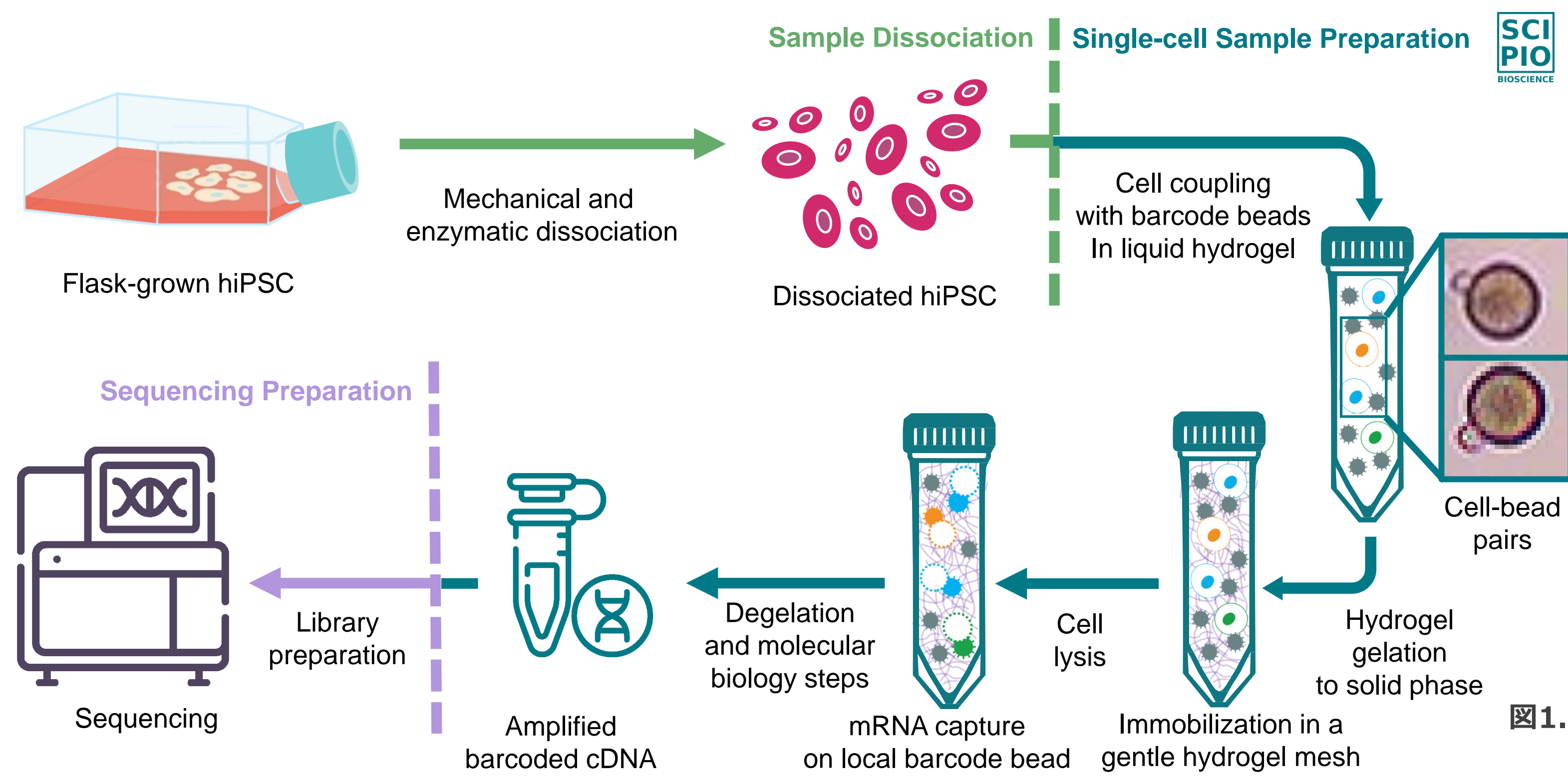
UMR CAN
UMRS 1166

Inserm
La science pour la santé
From science to health

SORBONNE
UNIVERSITÉ

概要: ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 由来のヒト心筋細胞 (CM) は、心臓病のin vitroモデルとして広く用いられており、疾患のモデル化、薬剤スクリーニング、細胞を用いた治療への応用のための戦略に有望である。成体の心筋細胞を模倣したhiPSC由来の心筋細胞を作製することは、モデルの妥当性を確実にする上で極めて重要である。しかしながら、標準的な分化プロセス "A" では、成熟細胞の不完全な特徴を示す心筋細胞への濃縮がまちまちで、不均一な細胞集団が得られる。より最近のプロトコル "B" は、細胞産生を増加させ (10倍)、心筋細胞に強く濃縮される。本研究では、細胞の不均一性、心筋細胞の収量、細胞の表現型をより明確にするために、これら2つのプロトコルから得られたhiPSC由来心筋細胞のトランスクリプトームを、シングルセルの分解能で比較した。

方法: 線維芽細胞の初期化^aにより得られたヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) を、各プロトコルA^bおよびB^cに従って分化培養した。細胞 (hiPSC由来心筋細胞) を培養フラスコから剥離し、洗浄して単細胞懸濁液を得た。2つの分化プロトコルそれぞれについて、5,000個のhiPSC由来心筋細胞の全細胞を、Scipio bioscience社の可逆性ハイドロゲル技術^d RevGel™を用い、装置不要の3'シングルセルRNAシーケンスベンチトップキットAsteria™ v1.0を用いて処理した。その後、ライブラリー調製とcDNAのシーケンシングを行った (図1)。サンプルは、100サイクルのS1試薬キットを用いて、NovaSeq 6000イルミナシーケンサーでシーケンスされ、解析細胞あたり平均約100,000の生リードが得られた。



生シーケンスデータの前処理は、Cytonaut™ v1.4 (Scipio bioscience, <https://cytonaut-scipio.bio>) を用いて、knee detection法に基づく自動細胞検出を行い、カウントマトリックスを作成した。細胞周期の不均一性を避けるため、CellCycleScoringでG1期に分類された細胞のみを考慮する予備フィルタリングを行った後に、Seurat v4.9を用い、デフォルトのパラメータ (2,000 top HVG, 30 PCA dimensions, UMAP dimension reduction, Louvain clusteringの分解能0.8) で後処理を行った。バッチ補正は、生物学的多様性を最大化しつつ、2つのバッチ条件間の技術的ばらつきを除去するために、Harmony法を用いて行った。得られたクラスターは、文献^fで報告されている細胞種特異的バイオマーカー遺伝子を用いて手動でアノテーションした。最後に、カイニ乗検定を用いて、細胞タイプの割合の統計的比較を行った。遺伝子発現値は $\ln(10000 \cdot X + 1)$ という式を適用して対数正規化した: Xは目的の遺伝子について細胞内で検出された転写産物の比率であり、 $\ln()$ は自然対数である (図3)。

図1. hiPSC由来心筋細胞からシングルセルバーコード化cDNAを得るプロトコルの概要

結果: Asteria™キットで処理された10,000個の入力細胞のうち、合計4,483個の細胞 (プロトコルAから2,391個、プロトコルBから2,092個) が、処理されたサンプルのシーケンスデータから自動的に検出された (細胞キャプチャ率45%)。細胞あたりの遺伝子数とトランスクリプト数の中央値は二つのプロトコル間で同等で、それぞれ約4,100遺伝子と約13,000トランスクリプトであった。細胞周期の分類では、G1期にある3,450個の細胞 (プロトコルAから1,771個、プロトコルBから1,679個) が同定され、残りの細胞はフィルターで除去された。G1期細胞は、サンプル統合後に10のクラスターに分類され (図2B)、すべて中胚葉系であった。特定の遺伝子発現に基づいたクラスターの手動アノテーション (図2C) により、心筋細胞 (バイオマーカー: MYH7, MYOM1, TTN, POPDC2, FABP3) の割合が多いことが明らかになったが、残りのほとんどの細胞は線維芽細胞 (バイオマーカー: THY1, DDR2, COL1A2) または周皮細胞 (バイオマーカー: VTN, KCNJB) と同定された。線維芽細胞様細胞のうち、平滑筋細胞 (バイオマーカー: MYH11) と内皮細胞 (バイオマーカー: KDR, EMCN) はほとんど検出されなかった。2つのプロトコルを比較すると (図2D)、プロトコルBでは心筋細胞が90%、線維芽細胞が6%、周皮細胞が4%得られたのに対し、プロトコルAでは心筋細胞が78%、線維芽細胞が14%、周皮細胞が8%得られた。統計解析の結果、プロトコルBはプロトコルAよりも有意に多くの心筋細胞を産生していた (p 値 < 0.01)。この心筋細胞分画の濃縮は文献^cでも報告されている。

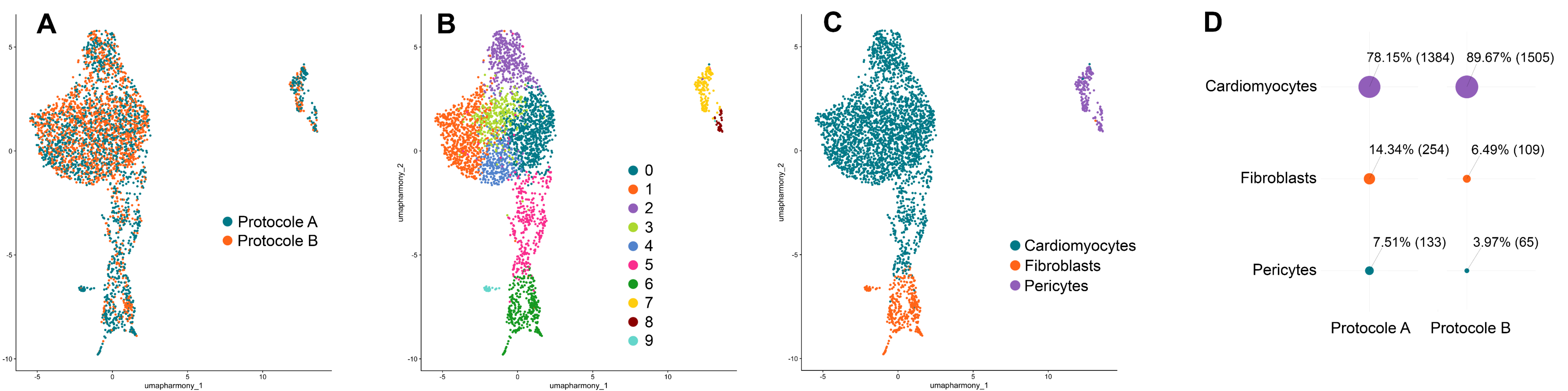
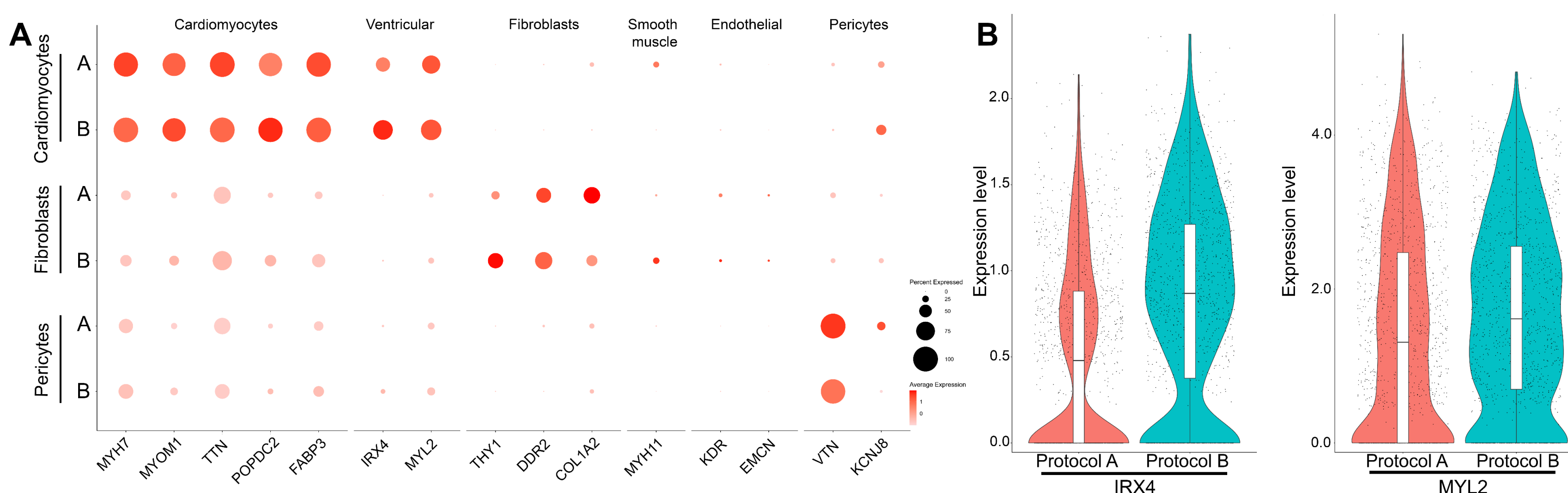


図2. ABC: Harmony法によるサンプル統合後のG1期細胞のUMAP表示。(A)プロトコル別に色分けした細胞分布、(B)0から9のクラスターID、(C)手動アノテーション後の細胞タイプ。D: プロトコルA(左)とプロトコルB(右)におけるG1期細胞の割合。カッコ内は細胞数を表す。



検出された各細胞タイプにおいて、各バイオマーカーを発現する細胞のパーセンテージを平均発現値とともに、2つのプロトコルのそれぞれについて図3Aに示し、アノテーションされた細胞集団内でのマーカー遺伝子発現の特異性を検証した。図3Bに示すように、心筋細胞としてアノテーションされたクラスターを精密に解析することで、心室細胞のマーカー遺伝子 (IRX4とMYL2) を発現する細胞を同定することができた。興味深いことに、心室細胞バイオマーカーの心筋細胞の発現中央値は、プロトコルA (対数正規化値: IRX4で0.48、MYL2で1.3) よりもプロトコルB (対数正規化値: IRX4で0.87、MYL2で1.6) の方が高かった。

図3. A: 2つのプロトコルのそれぞれについて、アノテーションされた細胞タイプ (縦軸) ごとのマーカー遺伝子発現 (横軸) をドットプロットで表したものである (プロトコルAは上段、プロトコルBは下段)。ドットの大きさ (対応するドットの色) は、アノテーションされた細胞のうち遺伝子を発現している細胞の割合 (対応する遺伝子発現の平均値) を示す。B: 心筋細胞としてアノテーションされた細胞の遺伝子発現値の分布。2つのプロトコルのそれぞれについて (オレンジ: プロトコルA、青緑: プロトコルB) 2つの心室細胞マーカー遺伝子 (左: "IRX4", 右: "MYL2") を示す。箱ひげ図はq1-中央値-q3を示す。

結論: シングルセルRNA-seqサンプル調製キットであるAsteria™により、分化hiPSCから産生された心筋細胞集団の効率的かつ高感度な探索が可能となり、遺伝性心疾患の研究に関連するin vitroモデルの開発を支援できることを実証する。

和訳: プライムテック株式会社



お問い合わせ: **プライムテック株式会社**
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

To learn more

- Find case studies, user guides, and application notes, at scipio.bio
- Test Cytonaut™ for free at cytonaut-scipio.bio
- Ask our dedicated team to ensure project success: info@scipio.bio



Asteria™および Cytonaut™ は研究用です。診断用には使用しないでください。

参考文献 (a) Ader et al., 2022. (b) Lian et al., 2013. (c) Buikema et al., 2020. (d) Komatsu et al., 2023. (e) Grancharova et al., 2021. (f) Cell annotation | CLARA (baker.edu.au)