

# 装置を使用せずに実施した マウス膵島細胞でのシングルセルトランスクリプトーム解析

Dilyana Dimitrova , Alexandrine Liboz , Stanislav Lipin , Carine Beaupere , Natacha Roblot , Jun Komatsu<sup>1</sup>, Ghislaine Guillemain , Bertrand Blondeau .

<sup>1</sup>Scipio bioscience, Paris, France. <sup>2</sup>Sorbonne Université, Inserm UMRS 938, Saint-Antoine Research Institute, F-75012 Paris, France.

## 概要:

1型糖尿病は、インスリンを産生するβ細胞のほぼ完全な枯渇によって起こるため、β細胞新生によるβ細胞の新生は、この病気を治すための主要な治療戦略となる。我々は以前、インスリンの大量分泌と大量のβ細胞新生をもたらす重度のインスリン抵抗性マウスモデルを報告した<sup>(a)</sup>。新たに形成されたβ細胞の起源と、高インスリン分泌に関する遺伝子プログラムを理解するために、我々は現在、膵島細胞のトランスクリプトームを細胞ごとに高解像度で定義することを目指している。

## 方法

膵島は、C57BL/6J雄マウスから1mg/mlのコラゲナーゼ溶液を総胆管に注入することにより単離した。洗浄後、膵島を双眼顕微鏡下でハンドピックし、1%トリプシンで解離した後、血清を含むEDTA-PBSに再懸濁した。Scipio bioscience社の可逆的ハイドロゲル技術RevGel-seq™と、装置不要の3' scRNA-seqベンチトップ・キットAsteria™を用いて、2つのテクニカルレプリケートから成るシングルセル懸濁液を調製した。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、cDNA配列決定を行った。シーケンシングの結果、分析された細胞あたり約176,000リードが得られた。

バイオインフォマティクス解析は、Cytonaut™クラウドソフトウェアv1.4を用いて以下のように行った： 1) 自動細胞検出を用いたFASTQファイルの各ペアに適用される前処理ステップ、2) 以下の主要パラメータを用いたScanpyに基づく、2サンプルレプリケートのプールされたカウントマトリックスに適用される後処理ステップ：遺伝子あたり3細胞以上、細胞あたり200遺伝子以上、細胞あたり20%以下のミトコンドリア転写産物、トップ2000のHVG、UMAPエンベディング、分解能0.8のLouvainクラスタリング、ウィルコクソンの順位和検定によるDGE。Baron et al. 2016<sup>(b)</sup>で発表されたバイオマーカーの遺伝子発現の視覚的解析に基づき、Cytonaut™ Roverを用いて手動クラスタリングを行った。

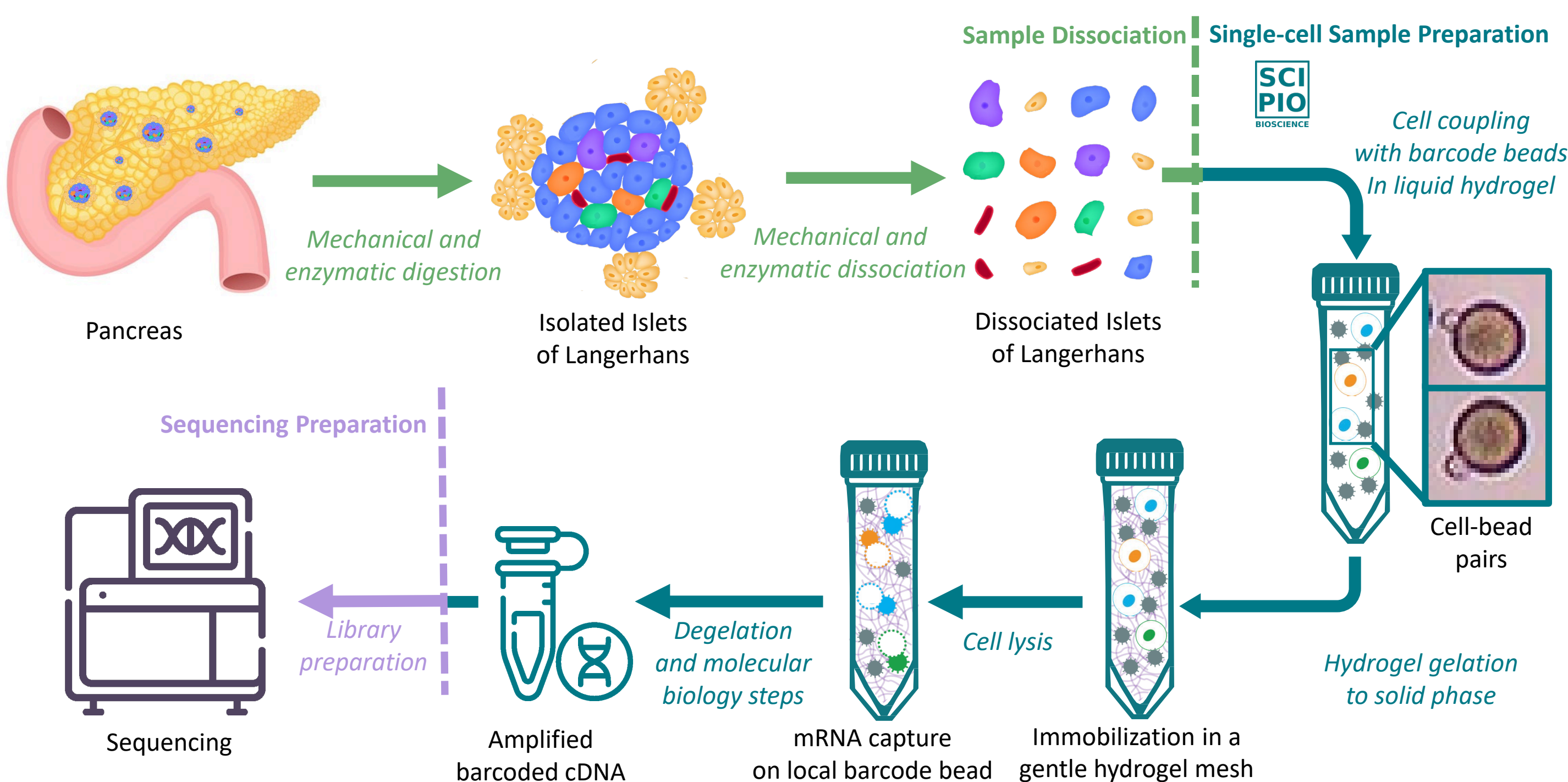


図 1. 膵臓のシングルセルでバーコード付き cDNA を得るためのプロトコルの概要。

## 結果

後処理工程での細胞フィルター処理後、1,529個の健康マウス細胞が検出され、14クラスターに自動的に分類された。プールされた2つのテクニカルレプリケートの細胞の分布はきれいに重なっており（図2）、これはバッチ効果を排除し、Asteria™キットによるサンプル調製の技術的再現性を示している。Cytonaut™ RoverとBaron et al., 2016<sup>(b)</sup>の遺伝子のリファレンスセットを用いた手動のクラスタリングにより、よく知られているβ細胞やα細胞、δおよびγ細胞を含む、膵島に関連する主要な細胞タイプが同定され、一般的に文献に記載されている割合で同定された（図4A）。このような明白で独立したアノテーションにより、両ホルモン性α/γ細胞のクラスターを同定することができた。これらの細胞は以前にも報告されており<sup>(c)</sup>、共通の前駆細胞の研究にとって非常に重要である。高分解能解析では、星状細胞、管状細胞、血管細胞、免疫細胞など、膵島で時折見られる希少な細胞タイプも検出され、健康な膵島での役割はまだ不明である<sup>(d)</sup>。このような細胞の多様性の高さは、2Dエンベディングによる可視化（図3A）と、クラスタリングに用いたマーカー遺伝子の発現を示すバルーンプロット（図3B）によって強調される。興味深いことに、β細胞と両ホルモン性α/γ細胞は、それぞれ3つのクラスターに分離した（図3A）。トランスクリプトームシグネチャーをさらに詳しく調べることで、この現象が単純なオーバーセグメンテーションによるものなのか、あるいは遺伝子発現の差に基づいて、近いトランスクリプトームシグネチャーを持つ細胞を区別できたのかが結論づけられるだろう。このような細胞の高い不均一性は、高いシーケンス深度（細胞あたり176kのrawリード）により、また細胞タイプごとに転写産物や遺伝子を効率的にキャプチャしたことにより、一部説明できる（図4B、C）。

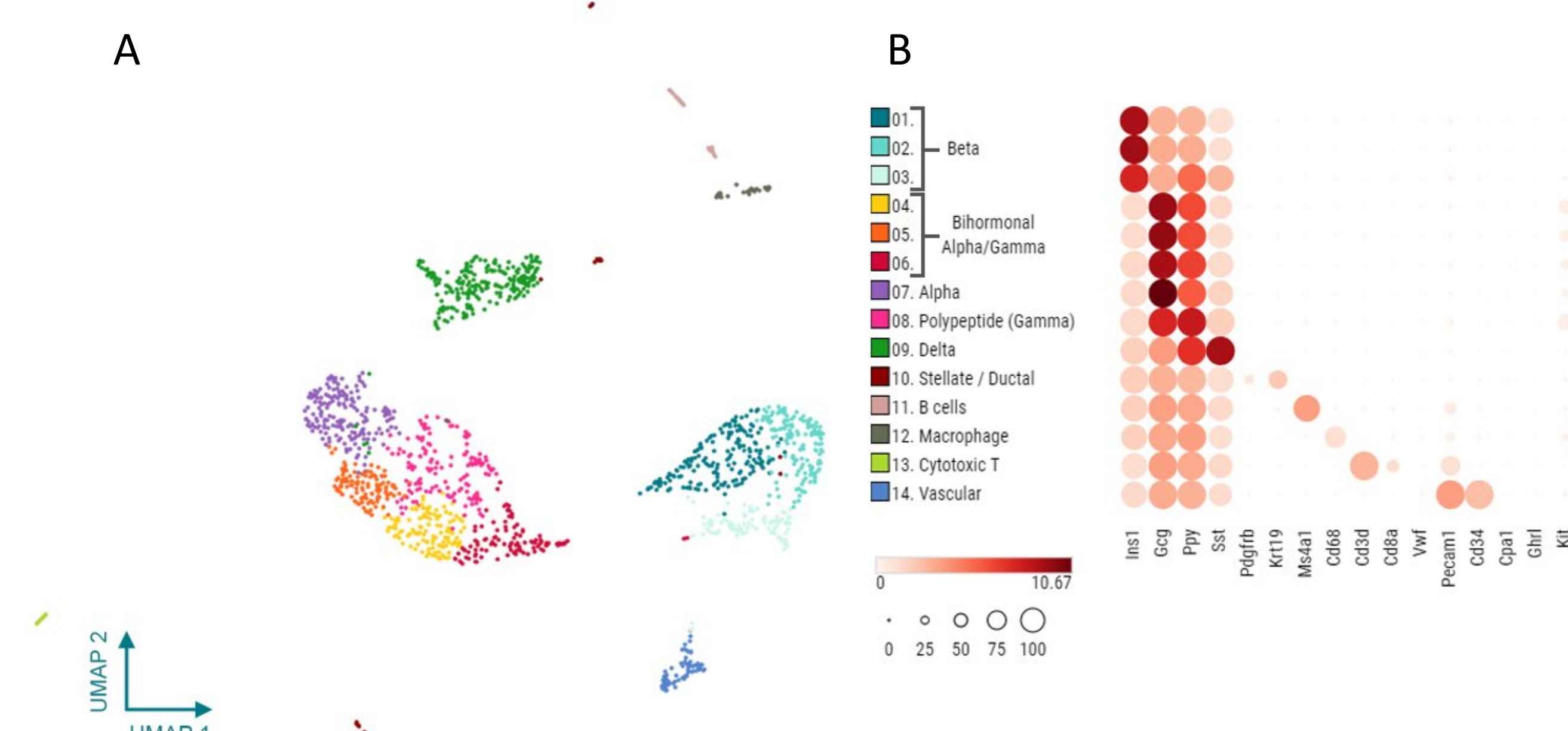


図3. マウス膵島における細胞タイプの同定。(A) 2D UMAP可視化でのマニュアルアノテーションを行ったクラスターのCytonaut™解析結果、(B) 選択したマーカー遺伝子それぞれのバルーンプロット。バルーンの色はlog2でノーマライズした遺伝子発現の平均値で、バルーンの大きさはその遺伝子を発現している細胞の割合である。

## 結論

我々は、Scipio bioscience社のAsteria™キットを用いた3'シングルセルRNAシーケンス解析が、マウス膵島の不均一性と複雑性を解き明かし、各細胞の遺伝子発現シグネチャーを同定する効果的な戦略であることを実証した。聖アントワヌ病院研究センターとScipio bioscience社との現在進行中の共同研究は、新規薬物治療との関連において、β細胞の新生に関する詳細な研究を進めている。

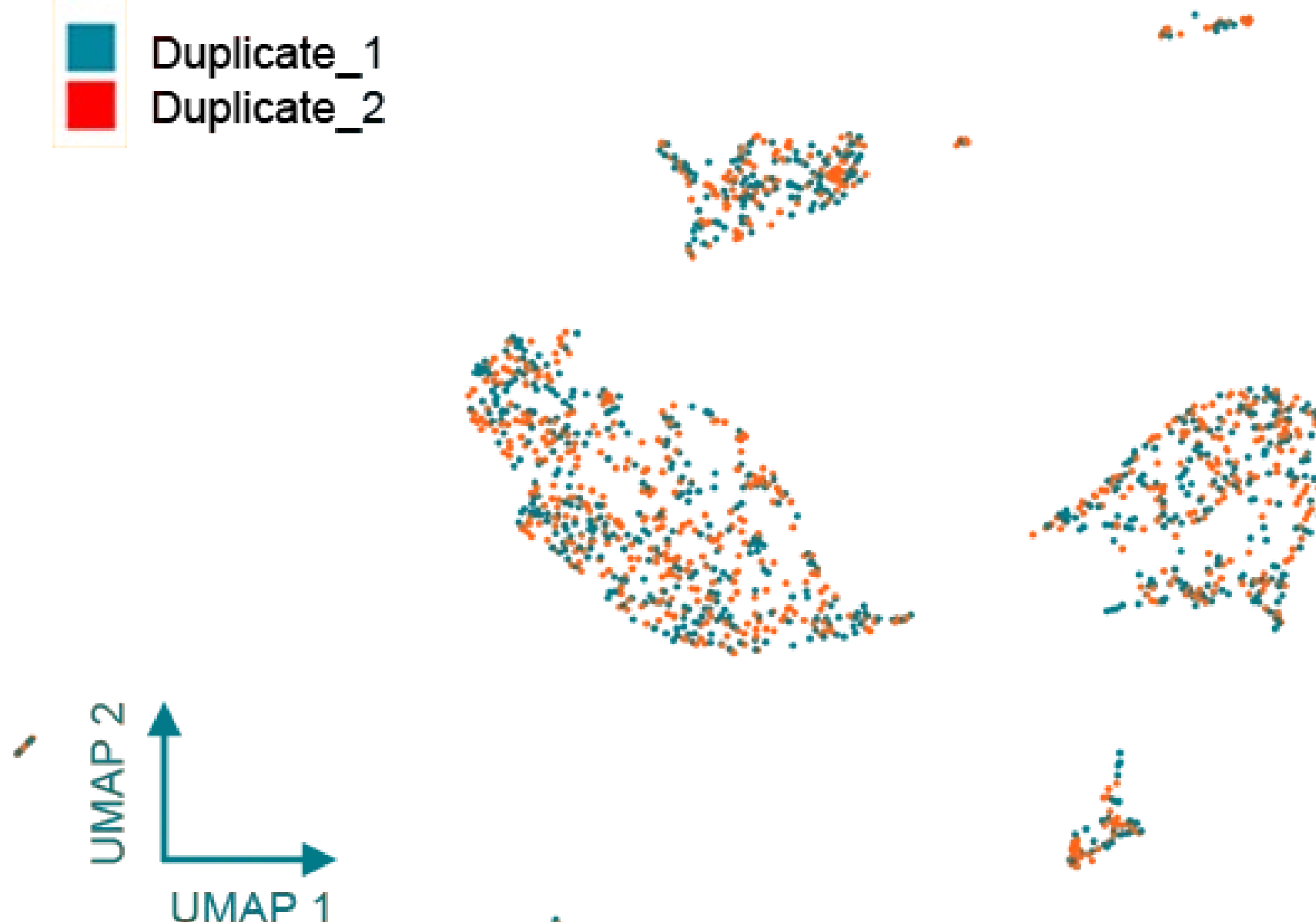


図2. バッチ効果の不在。Cytonaut™の2D UMAP可視化でプールされた2つのテクニカルレプリケートの細胞分布の重複を示す。

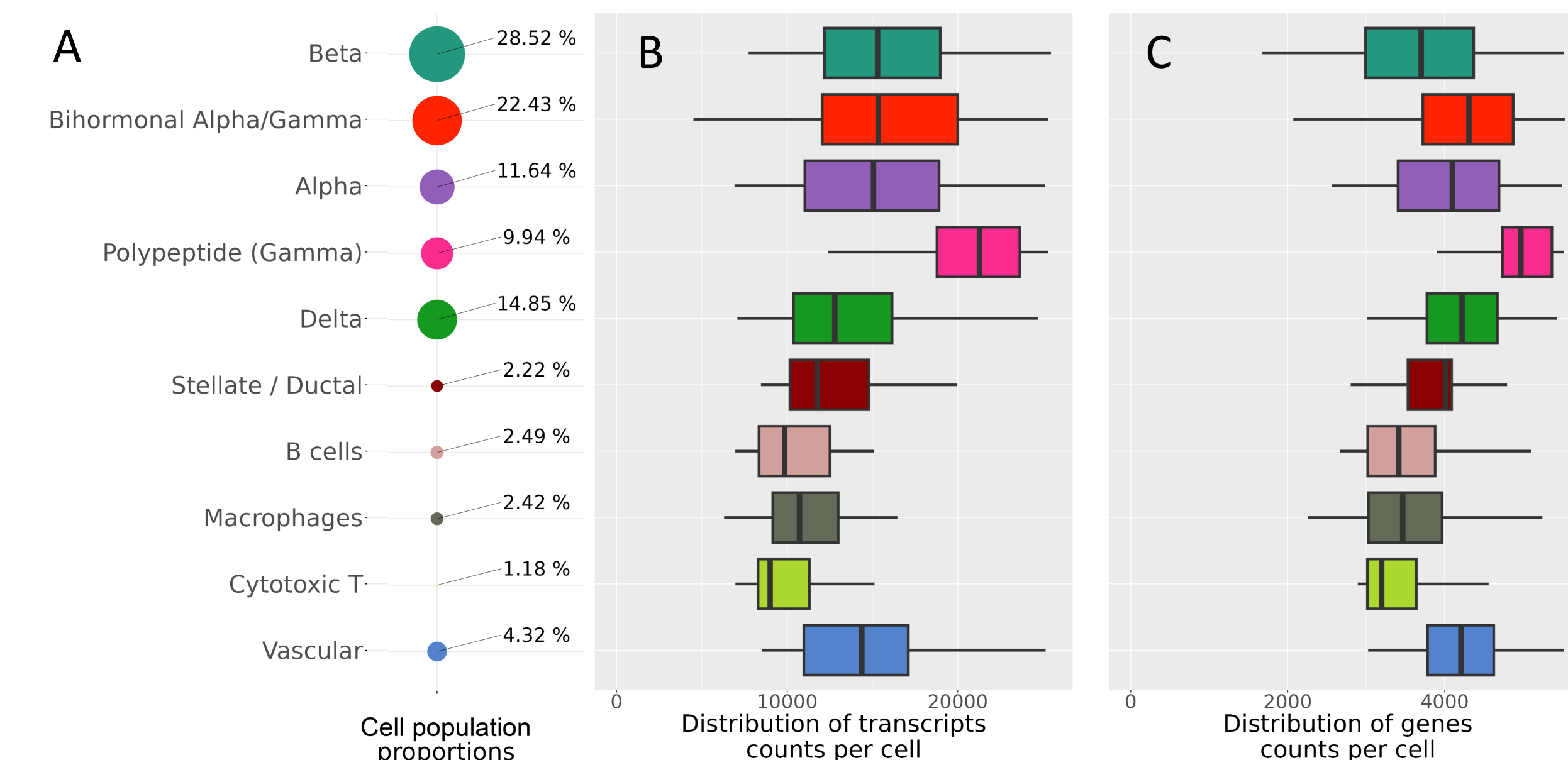


図4. マウス膵島から単離された細胞のAsteriaキットでのパフォーマンス。(A) 検出された細胞タイプそれぞれの細胞の割合。細胞あたり平均176,000 rawリードでシーケンシングした際の、検出された細胞タイプでの細胞あたりの(B)トランスクリプト数、(C)遺伝子数の分布。

## To learn more\*

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



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