

ポスターノート

アミロイド前駆体タンパク質のノックアウトによって引き起こされる神経新生促進過程でのヒト神経前駆細胞(NPC)におけるトランスクリプトームの変化を装置不要のシングルセル解析で解明する

Jun Komatsu¹, Khadijeh Shabani², Azadeh Saffarian¹, Carlos Parras², Bassem Hassan², Stuart Edelstein¹

1. Scipio bioscience, Paris Santé Cochin, France

2. Paris Brain Institute, Paris, France

要約

ヒト神経幹細胞がニューロンを生成する際に前駆細胞の状態を長期間維持する特徴的な可能性には、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が必要であることを示した。我々は、APPノックアウトヒトiPSCを作製し、独自の可逆性ハイドロゲル技術に基づく新しい装置不要のRevGel-seq法を用いて、そのトランスクリプトームを単一細胞レベルで特徴づけた。ハイドロゲルのポリマーの網目構造が個々の細胞-バーコードビーズタンデムを捉える役割を担い、個々の細胞からのmRNA分子は、細胞と化学的に結合したセルバーコードビーズ上で、細胞溶解時にハイドロゲル中でキャプチャされる。続いて、逆転写、PCR増幅、cDNA塩基配列決定、バイオインフォマティクス解析を行うことで、コントロール細胞とAPPノックアウト細胞を比較することができた。細胞クラスタリングの結果、観察された差異が、APPの欠損がAP1転写因子の活性化とWNTシグナリングの抑制を通じて神経発生を促進するメカニズムを指し示していた。

方法

ヒトiPS細胞由来の神経前駆細胞 (NPC) とそのAPP遺伝子ノックアウト細胞 (APP-KO) をCRISPR/Cas9で作成した。コントロール細胞とAPP-KO細胞の両方から、RevGel-seqを用いてシングルセルRNA seqサンプルを調製した。細胞は表面を二官能性化学リンカーで修飾することで、物理的衝突によりバーコードビーズと物理的に結合する。続いて、細胞-ビーズタンデムを希釈してハイドロゲル中に封入する。このハイドロゲル中では、細胞溶解試薬は拡散できるが、mRNAの拡散はポリマーの網目構造によって阻止される。mRNAは、バーコードビーズ上の細胞バーコーディングオリゴヌクレオチドの3'オリゴTテールにキャプチャされる。キャプチャされたmRNAはバーコーディングcDNAに変換され、その後シーケンスライブラリーに調製した。ペアエンドシーケンスデータをUMI-toolで処理し、データ解析はSeurat v3.1.4で行った。

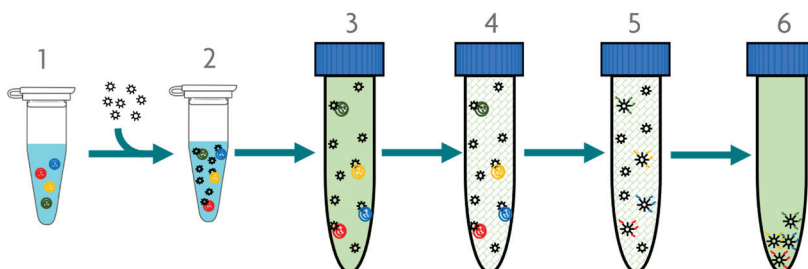


図1. 装置不要のscRNAサンプル前処理法、RevGel-seqの細胞およびmRNAキャプチャの模式図。1) 細胞表面の処理、2) バーコードビーズとの物理的カップリング、3) ゲル溶液中での希釈、4) ハイドロゲルへの封入、5) ハイドロゲル中での細胞溶解とmRNAのキャプチャ、6) 脱ゲル化によるビーズの回収

結果

シングルセルRNA-seq解析により、コントロールとAPP-KOに密接に関連するクラスターとして、放射状グリア細胞 (RGC)、循環前駆細胞1および2 (CP1およびCP2)、中間前駆細胞 (IP)、神経細胞 (N)、さらに神経原形前駆細胞 (NP) クラスターと呼ばれるクラスターの存在が確認された。NPは、放射状グリアマーカーと神経分化マーカーの両方を発現し、高い神経原性を有している。NPクラスターには、コントロール細胞とAPP-KO細胞の両方が含まれ、大多数はAPP-KO細胞であった (全集団の13%)。

APP-KO細胞では、コントロール細胞と比較してNEUROG2+細胞の数が約15倍増加しており (図3)、細胞周期の早期終了と分化の増加が示唆された。scRNA seqデータの疑似時系列解析では、APP-KO集団ではコントロールと比較して分化状態への時間的シフトが見られ、これは増殖性細胞周期の終了を支持している (図4)。

結論

- ヒト神経前駆細胞におけるAPPの欠失は、脳皮質の神経新生を増加させる。
- APP-KO細胞において、放射状グリアマーカーと神経分化マーカーの両方を発現する神経前駆細胞の存在が、シングルセルRNA-seqによって示された。
- APPの欠失は、ヒト皮質前駆細胞において神経新生への促進を生じさせることから、APPが皮質NPCを前駆状態に維持するのに必要な下流のメカニズムを制御していることが示唆される。

ご注文情報

Asteria シングルセルRNA-seqキット
(型式 001-1000)



お問合せ：
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 小石川大国ビル 2F
 Phone : 03-3816-0851 (代表) Fax : 03-3814-5080
 E-mail : reagents@primetech.co.jp

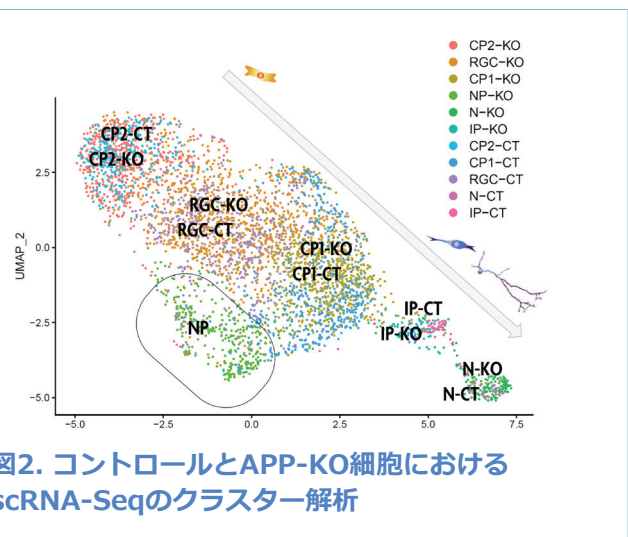


図2. コントロールとAPP-KO細胞におけるscRNA-Seqのクラスター解析

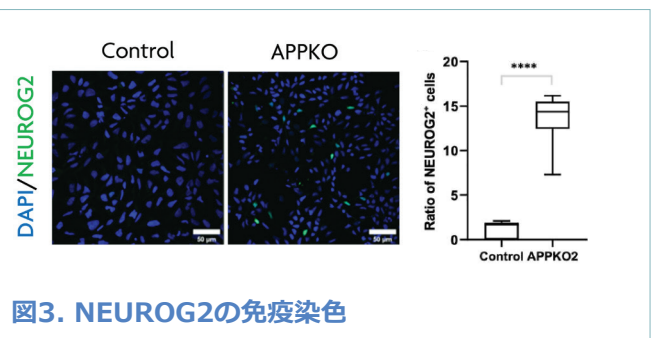


図3. NEUROG2の免疫染色

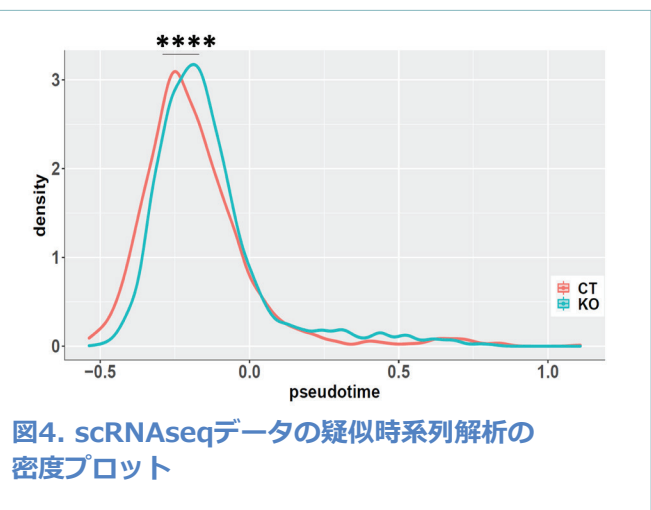


図4. scRNAseqデータの疑似時系列解析の密度プロット

当ポスターノートを含む論文はbioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.431707> でご覧いただけます。

Scipio bioscience

Pépinière Paris Santé Cochin
 29 rue du Faubourg Saint Jacques 75014
 Paris, France

本製品は研究用です。
 診断用には使用しないでください。

© Copyright 2022, Scipio bioscience. All rights reserved.
 Asteria and RevGel-seq are trademarks of Scipio bioscience.
 All other trademarks are the property of their respective owners.