

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)の CITE-seq 解析

KOTAIバイオテクノロジーズ株式会社
石川 昌和 山下 和男

BioLegend製品
Application
Note

はじめに

シングルセルシーケンス技術の発達により、個々の細胞のmRNA遺伝子発現を調べることで細胞集団の不均一性を明らかにすることができるようになった。さらに、DNAタグが付加された細胞表面タンパク質特異的抗体を用いることにより、mRNAと同時に表面タンパク質の発現量を次世代シーケンサーを用いて測定すること(CITE-seq: Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by sequencing)が可能になった。TotalSeq™抗体はBioLegend社が提供するCITE-seq用のDNAタグ付き抗体シリーズである。本アプリケーションでは、CITE-seqの有用性を検証するため、免疫細胞に関係のある12種類のTotalSeq™抗体を用い、末梢血単核細胞 (PBMC) のCITE-seqを行った。

実験と方法

12種類のTotalSeq™抗体を用いた（P4 表 1）。まず、反応に用いる抗体の濃度を定めるため、TotalSeq™抗体と同クローンのフローサイトメトリー（FCM）用抗体を用いてタイトレーションを行った。PE標識された同クローンの抗体を用い、いくつかの濃度で抗体をPBMCに反応させ、蛍光強度をFCMで測定した（図1）。

次に、FCMを使ったタイトレーションの結果を参考に、TotalSeq™抗体の使用濃度を決定し、それらの抗体を市販の健常人PBMC 2検体に反応させた。

その後、10x Genomics社のChromium Single Cell V(D)J Reagent Kitsを用いて、CITE-seqのLibrary preparationを行い、次世代シーケンサーによりシーケンスを行った。シーケンスにより生成されたFastqファイルは、10x Genomics社のCell Ranger (version 3.1.0)でデフォルトのパラメーターで解析を行い、同じく10x Genomics社のLoupe browserを用いてクラスタリングの可視化を行った。

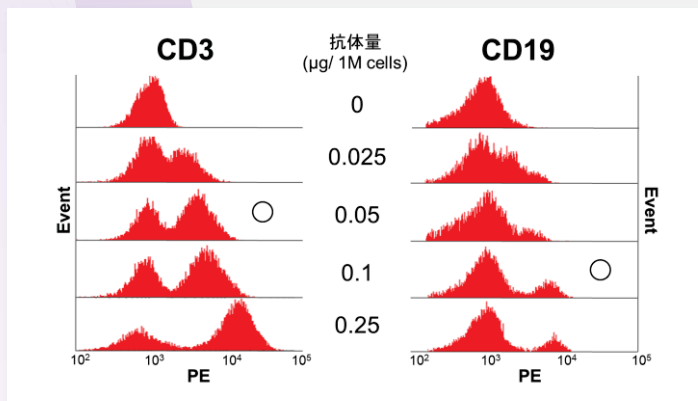


図1 PE抗体によるタイトレーション。TotalSeq™抗体と同クローンのPE標識された抗体を用いタイトレーションを行った。抗体に反応しないNegative Fractionと比べて、Positive Fractionのスペクトルが有意に離れ、かつ最も薄い濃度を採用し、TotalSeq™抗体の付加に用いた。CD3とCD19では○印がついている抗体濃度を採用した。

結果

mRNAと表面タンパク質の発現量によるクラスタリングの違い

CITE-seqでは、mRNAまたは表面タンパク質の発現量を使用したクラスタリングを示すことができる。図2では、それぞれをUMAPという計算手法で計算したクラスタリングの結果を示す。色の違いは、検体の違いを示している。mRNA発現量を用いたクラスタリングでは、検体によってクラスターが分かれているのに対し、表面タンパク質発現量を用いたクラスタリングでは、同じクラスターに異なる検体が共存している。

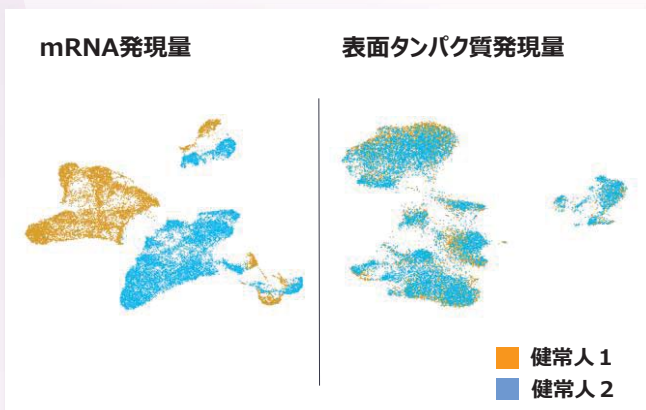


図2 UMAPによるクラスタリング。左図はmRNAの発現量を、右図は表面タンパク質発現量をそれぞれ使用し、UMAPという手法でクラスタリングを行った。色の違いは検体の違いを表す。

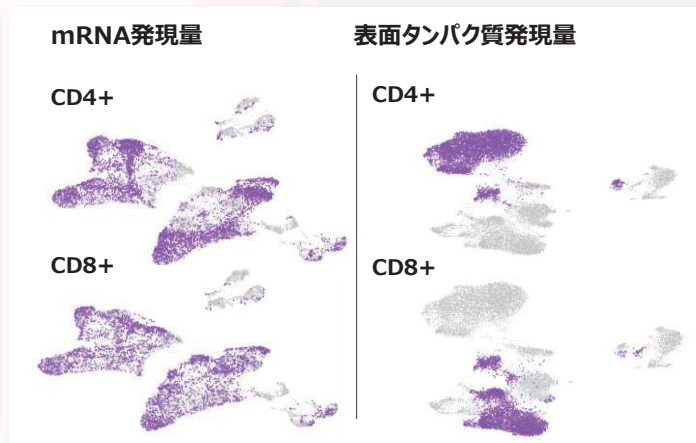


図3 UMAPによるクラスタリング。上図では、CD4 TotalSeq™: log2 Exp > 8.5以上、下図では、CD8 TotalSeq™: log2 Exp > 10 以上の細胞を色付きで示している。

図3は、CD4またはCD8の、表面タンパク質の発現量が一定以上ある細胞（以降CD4+またはCD8+と記載）に色を付けて示したものである。mRNAの発現量を用いたUMAPでは、CD4+とCD8+の細胞は同一クラスターとしてまとめられている。一方、表面タンパク質の発現量を用いて行ったクラスタリングでは、CD4+とCD8+の細胞集団はそれぞれ独立のクラスターとして形成されている。

これらのことから、mRNA発現量を用いてクラスタリングを行った場合には、検体の違いによりクラスターが形成されているのに対し、表面タンパク質を用いたクラスタリングでは、細胞種の違いによりクラスターが形成され、異なる検体であっても同一の細胞種である場合には同じクラスターを形成するということがわかる。

このようにシングルセル解析で見られる検体(batch)間の違いをbatch effectと呼ぶ。通常、batch effectを取り除くための解析ステップを加える場合、データの品質や細胞種によりケースバイケースの対応になることも多く、解析と解釈には経験の豊富なバイオインフォマティシャンが必要である。その点でCITE-seqはbatch effectに対してより頑強で、信頼される結果を得やすいと言えよう。

1細胞でのmRNA発現量と表面タンパク質の発現量の違い

次に、1細胞当たりのmRNAまたは表面タンパク質の発現量のばらつきを比較した(図4)。バイオリン図のくびれの部分よりも発現量が高い細胞を陽性、低い細胞を陰性だと判断すると、mRNAの発現量の場合、CD3以外の遺伝子ではほとんどの細胞で発現量が0であり、陽性と判断できる細胞がほとんどない。一方、表面タンパク質の発現量の場合、陽性と陰性の発現量の差がはっきりとし、かつ陽性の細胞が一定数以上存在することがわかる。

シングルセル解析の際、特徴的な遺伝子の発現量に着目し、細胞種を同定する作業が一般的に行われている。検体間の品質や検出された遺伝子数に違いがある場合など、興味ある遺伝子の発現が細胞種同定に使いつらい場合があるが、CITE-seqではより頑強な細胞種同定が可能である。また、これまでFCM等による細胞表面マーカーを用いて細胞種同定を行っていた場合、CITE-seqを用いればそれをそのままシングルセル解析に適用できる。また、FCMなどの既存のサイトメトリー技術とは異なり、原理的に近傍のチャンネルからのシグナル漏れこみ等の懸念もない。

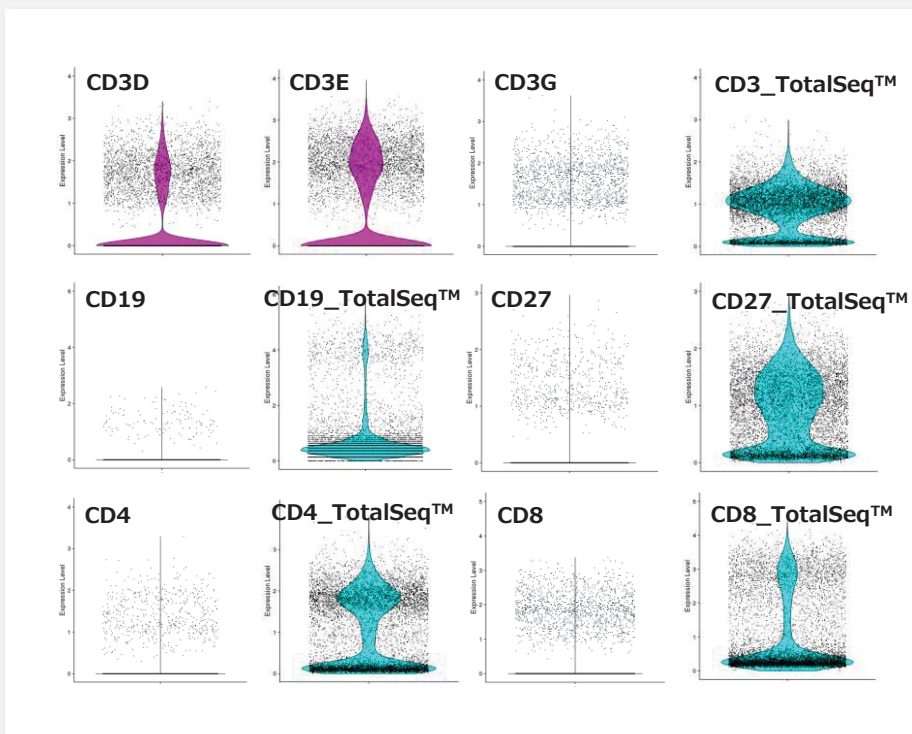


図4 1細胞当たりのmRNAまたは表面タンパク質発現量のバイオリン図。各点は細胞を表し、分布はその発現量の細胞の密度を表す。CD3分子は、CD3γ、CD3δ、CD3ε、のタンパク質から形成されるため、mRNAはCD3G、CD3D、CD3E、に分かれる。

結論

シングルセル解析では、各細胞を変動の大きな遺伝子の発現量でクラスタリングし、特徴的な遺伝子の発現量に着目してそのクラスターがどの細胞種であるかを同定することが一般的な解析の流れである。クラスタリングをする際、複数検体を扱う場合には、検体の違いではなく、細胞種の違いによってクラスタリングが行われる必要がある。mRNAの発現量でクラスタリングをした場合、検体の違いがクラスタリングに影響を与えることがわかった。一方、TotalSeq™抗体を用い表面タンパク質の発現量でクラスタリングを行った場合には、細胞種の違いによってクラスターが分かれることが分かった。さらに、各遺伝子の発現量に着目した際、mRNAの発現量はほとんどの細胞が陰性と判断されるのに対し、表面タンパク質の発現量では陽性と陰性の細胞がはっきりとわかれていた。このことは細胞種の同定に役立つと思われる。TotalSeq™抗体を用いても従来のmRNA発現量を用いたシングル解析は行うことができるため、シングルセル解析には、TotalSeq™抗体を使用することをお勧めする。

執筆者紹介



氏名：石川 昌和

所属：KOTAIバイオテクノロジー株式会社（代表 山下 和男）

KOTAIバイオテクノロジー株式会社博士研究員。2016年総合研究大学院大学遺伝学専攻博士課程修了。2016年よりスウェーデンのカロリンスカ研究所で博士研究員として従事した後、2018年から現職。現在所属している、KOTAIバイオテクノロジー株式会社は、世界でも数少ない免疫AI解析の専門企業。これまで独自の研究開発、およびアカデミア、製薬企業等との共同研究を通じ、がん、免疫、感染症といった領域の免疫データ解析、特にシングルセル解析やT-/B細胞レパトア解析を行なっている。2020年1月より米国10x Genomics社のChromiumを用いたシングルセル解析の受託サービスを開始。日本の受託サービス業者として初めて10x Genomics社から認証サービスプロバイダー（CSP: Certified Service Provider）として認定を受けた。

TotalSeq™製品情報

表1 使用TotalSeq™-C抗体のリスト

製品名	カタログ番号	製品名	カタログ番号
TotalSeq™-C0034 anti-human CD3	300479	TotalSeq™-C0046 anti-human CD8	344753
TotalSeq™-C0088 anti-human CD279 (PD-1)	329963	TotalSeq™-C0136 anti-human IgM	314547
TotalSeq™-C0375 anti-human IgG Fc	410727	TotalSeq™-C0151 anti-human CD152 (CTLA-4)	369621
TotalSeq™-C0085 anti-human CD25	302649	TotalSeq™-C0100 anti-human CD20	302363
TotalSeq™-C0072 anti-human CD4	300567	TotalSeq™-C0154 anti-human CD27 Antibody	302853
TotalSeq™-C0224 anti-human TCR a/b	306743	TotalSeq™-C0050 anti-human CD19 Antibody	302265

BioLegend社のTotalSeq™製品ページ（英語）



TotalSeq™製品リーフレット（日本語）



TotalSeq™に関するお問い合わせなどございましたら、下記にご連絡ください。

Phone 03-6240-0451

E-mail info_ap@digital-biology.co.jp

製品輸入販売元・発行元



Digital Biology®

トミーデジタルバイオロジー株式会社

〒112-0002

東京都文京区小石川1-1-17 日本生命春日駅前ビル3階

Phone 03-6240-0843

E-mail info_ap@digital-biology.co.jp

