

シングルセルシーケンスの 課題と可能性

近年の技術的進歩により、シングルセルシーケンスは、生物学的機序と細胞機能の理解、疾患診断、治療反応予測および治療選択のためのますます強力なツールとなってきています。従来、シーケンス技術では全細胞集団における平均的な値を示す解析のみが可能でした。これに対して今日では、単一の組織検体または患者から採取した数万の細胞を個別に分析することができ、従来は不可能であった個々の細胞集団の理解と病変組織におけるそれらの挙動の理解が可能となっています。

次世代シーケンス (NGS) 技術の開発が大幅に進んできたと同時に研究コストが低下してきたことが、シングルセルシーケンスの発展を支えています。本ホワイトペーパーでは、シングルセルシーケンス法の進歩、そのワークフローとアプリケーション、およびシングルセルワークフローの GMP 準拠をご紹介します、多くの研究分野におけるシングルセルシーケンスの重要性を明らかにします。

シングルセルシーケンスの登場

2013 年、「Nature Methods」の最優秀技術賞に選ばれたシングルセルシーケンスは、個々の細胞のゲノムおよびトランスクリプトームの特性解析を可能とします (1)。従来のシーケンス法では多くの細胞を使用し、個々の細胞や少数の細胞を分析する感度は達成できません。その結果、これらのシーケンス手法では、細胞集団全体における不均一性に関する情報が失われます。これとは対照的に、シングルセルシーケンス法では、個々の細胞の不均一性を測定できるという利点を生かして (2)、細胞の大きな集団内の小さな部分集団を識別することができます。

当初、シングルセルシーケンスはコストが高く、技術的に困難であったため、その利用は少数の研究室に限られていました。しかし現在、シングルセルゲノムシーケンスおよびシングルセルトランスクリプトームシーケンスは、多くの研究室で広く利用可能でロバストな技術となっています。シングルセルワークフローの概要を図 1 に示します。

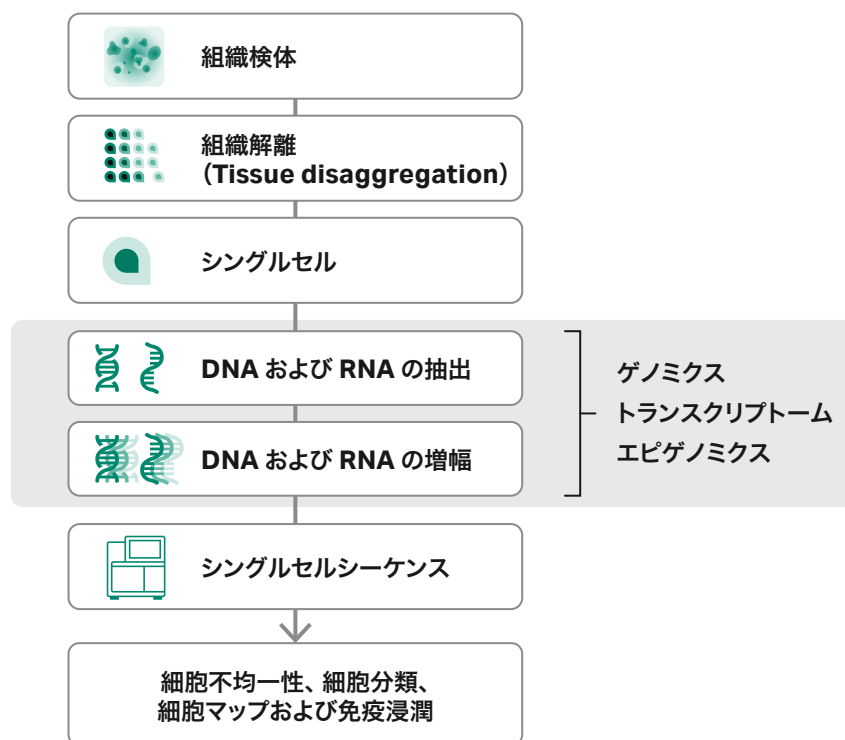


図 1. 検体採取、分離、増幅、シーケンスおよびデータ解析を含む、シングルセルシーケンスのワークフローの概要。

シングルセルシーケンスが広く利用可能となった理由の一つとして、新しいシーケンス技術および試薬の出現によるコストの大幅な低下が挙げられます。これらの技術改良およびコスト低下により、シングルセルシーケンスは多くの分野で、特に腫瘍学の分野で広く受け入れられています。がん生物学者は、シングルセルシーケンスを組織生検やリキッドバイオプシーと関連付け、治療抵抗性を示す部分集団の同定、転移の理解および腫瘍の不均一性の研究に使用しています。

シングルセルシーケンス法の開発

現在、標準化されたシングルセルシーケンス法は存在せず、幅広い選択肢から選択する必要があります。通常、マイクロ流体をベースとしたアプローチが最も一般的であり、その一部について以下に示します。

Drop-seq

Drop-seq は、シングルセル研究にマイクロ流体法を利用した最初の方法です。この方法では、細胞を微小な液滴にカプセル化して分離することにより個々の細胞内の遺伝子発現を解析します。ラージスケールのシングルセル解析を複雑な組織に適用することができ、細胞集団全体を費用対効果の高い方法で解析できることが実証されています (3)。

High-throughput and low-deviation single-cell sequencing (SiC-seq)

Drop-seq と同様に、**SiC-seq** では液滴マイクロ流体を使用して、シングルセルのゲノムの分離、増幅およびバーコード化を行います。この方法は、さまざまな細胞集団を対象とした、より広範なゲノム研究に使用できます (4)。マイクロ流体工程により、各ゲノムに独自のシングルセルバーコードが付され、最大 5 万のシングルセルのシーケンスが行えます。

Single-cell combinatorial marker (SCI-seq)

SCI-seq では数千のシングルセルライブラリーを同時に構築し、体細胞コピー数変異を検出することができます (5)。この方法では、個別に検出可能な細胞数が増加するため、ライブラリー構築のコストが大幅に低下します。

Linear amplification via transposon insertion (LIANTI)

LIANTI では、キロベース単位でのコピー数多型 (CNV) 検出が可能となり、多数の組織検体、特に生検検体において変異を特定することができます (6)。この方法により、例えばガンマ線照射後など、さまざまな条件下で個々の細胞により異なる、DNA 複製起点の直接観察が可能となります。

Single-cell COOL-seq (scCOOL)

scCOOL-seq では、シングルセルのクロマチン状態、CNV、DNA メチル化および倍数性を同時に解析できます。これらにより、シングルセル内のクロマチン状態と遺伝子発現の異なる機能およびパターンが示されます (7)。scCOOL-seq では、シングルセル内のクロマチン、ヌクレオソームの位置、DNA メチル化、CNV、倍数性を同時に解析することができます。

Topographic single cell sequencing (TSCS)

TSCS は、各細胞の正確な空間的情報を、組織切片中での空間的コンテキストを保持した状態で明らかにします。これにより、組織内の個々の腫瘍細胞に特異的な特徴を空間的にマッピングすることが可能となり、クローン増殖、腫瘍細胞浸潤および転移を明らかにすることができます (8)。

これらの流体アプローチには、各 mRNA 転写物またはゲノムの起源となる細胞を同定できない限りならないという課題があります。この課題を克服するために、これらの流体アプローチでは分子バーコード法を使用して起源となる細胞を同定しています。この画期的な方法のおかげで、マイクロ流体アプローチは幅広く利用されるようになり、多くのシングルセル研究に適用されています。

さらに最近、高スループット用の低コストな scRNA-seq プラットフォームとして、**Microwell-seq** 法が開発されています (9)。Microwell-seq では、コーティング油滴ベースの方法と比較して、検出コストが低下します。同様に、**SPLit-seq** 法でも同一の技術に低コストの複合バーコードが使用されています。これらにより、シングルセルのトランスクリプトームシーケンスのコストがさらに低下しています (10)。

これらのモダリティのそれぞれが、シングルセルシーケンス研究をより身近で、コスト効率を高いものとしたことにより、シングルセルシーケンス技術はさまざまな分野の多くの研究者に利用されるようになっていきます。

ゲノミクスにおけるシングルセルシーケンスの重要性

腫瘍学におけるシングルセル DNA シーケンス

シングルセルシーケンスが腫瘍学に及ぼしている影響は注目に値し、近年インパクトの強い研究が多数行われています。全ゲノムシーケンスおよびエクソームのシングルセルシーケンスを使用して、エストロゲン受容体陽性乳がん組織中で分裂している細胞の測定が行われました。この研究により、細胞染色体数がハプロイドセットの倍数とは異なる、異数体の再構成が、乳がんのクローン性増殖において非常に安定であることが明らかとなりました (11)。一方、点突然変異は徐々に進行し、広範なクローン多様性が形成される頻度は高くありません。多くのがん細胞が異数性を示し、染色体数が異常であることが、本研究の制約の一つとなっています (図 2)。したがって、この方法は異数性を示さないがんのみに有用な可能性があります。

小児リンパ性白血病患者におけるシングルセルキャプチャーおよび全ゲノム解析により、患者には異なる共優性クローンが存在することが明らかとなりました。疾患の悪性度および治療抵抗性の両方に関する重要な知見が報告されています (12)。これにより、患者により悪性度が異なる原因となる遺伝的事象に関する知見が初めて得られ、治療抵抗性の新たな機序が示されました。

結腸がん細胞のシングルセル DNA シーケンスを利用して T 細胞免疫受容体マッピングを行うことで、患者における組織分布、腫瘍の不均一性および発現の変動が明らかとなりました (13)。この技術により、これらのがんにおける T 細胞の動的関係および免疫療法の適用に関する知見が得られています。

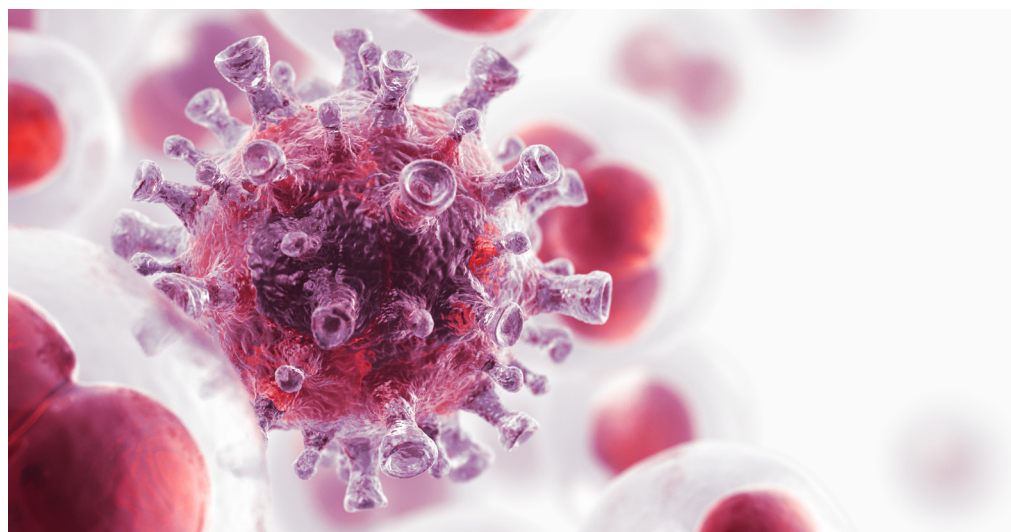


図 2. 多くのがん細胞は異数体であり、染色体数は通常と異なる。

成人の高悪性度神経膠腫では、星状細胞腫と乏突起膠腫は異なるタイプの細胞に由来すると考えられていました。シングルセル DNA シーケンスにより、形質転換された神経膠腫は共通の起源を有することが明らかになりました(14)。そして、これらの差はそれぞれの腫瘍の微小環境に由来するという重要な知見が得られました。治療の観点からは、このシングルセルシーケンス研究により、細胞分化の誘導がこれらの腫瘍の増殖を停止させる可能性があることが示唆され、脳腫瘍治療への新たな道の可能性が示されました。

腫瘍学以外のシングルセルシーケンスの応用

シングルセルシーケンスは、生物学全体、例えば神経発達にも応用されています。シングルセルシーケンスにより、脳の特定領域における複数の細胞集団の特性解析が可能となり(図3)、これらの領域内の神経細胞成熟プロファイルを解明し、それらを遺伝子発現と関連付けることができます(15)。これらの知見は、神経疾患、特に自閉症スペクトラムの機構の解明に新たな手掛かりを与え、脳内の領域化の理解に大きく貢献しています。このような研究により、脳の発達および疾患の分子的小および細胞的機序を細胞レベルで解明するための基盤が提供されます。

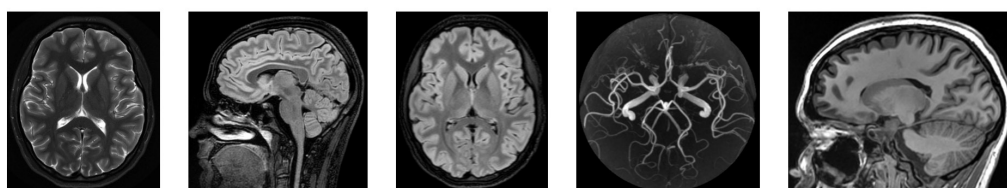


図3. シングルセルシーケンスにより、脳内の特定の領域における複数の細胞集団の特性解析が可能となります。

トランスクリプトームのシングルセルシーケンス

腫瘍学におけるシングルセル RNA シーケンス

ゲノミクスと同様に、シングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq) も、疾患の診断および治療失敗の原因解明のために、腫瘍学で広く使用されています。例えば、膵がんへと進行する前がん性病変である、膵管内乳頭粘液性腫瘍組織の新鮮検体においてシングルセルが分離されています。これらの組織検体から分離されたシングルセルにより、腫瘍の進展がこれまで考えられていたよりも複雑なパターンを示すことが明らかとなり、患者の治療および疾患の診断に影響が表れています(16)。

食道腺がんの前がん状態であると考えられるバレット食道を有する患者の新鮮な組織検体に関しても、同様の研究が行われています。これらの組織検体を用いた scRNA-seq により、非腫瘍性粘膜下腺細胞とバレット食道細胞には、類似した転写プロファイルを示す細胞集団が存在することが明らかになりました。これらの結果から、患者の治療計画において重要な生物学的特性が明らかとなりました(17)。

発生生物学におけるシングルセル RNA シーケンス

腫瘍学以外では、scRNA-seq は細胞発生の理解にも大きく貢献しています。2018 年、scRNA-seq によって、胚の発生過程におけるヒト前頭前皮質のトランスクリプトームマップを作成することに成功しました(18)。このシングルセルマップにより、特異性の高いこの脳領域の発生過程において、ニューロンおよび回路の形成を調節する、内因性の発生依存型シグナルが明らかとなりました。

免疫学におけるシングルセル RNA シーケンス

この手法は、免疫学の分野全体にも大きな影響を及ぼしています。scRNA-seq により、脾臓または血液検体由来のナチュラルキラー細胞の部分集団が同定され、これらに特有な特徴が明らかになりました (19)。同様に、scRNA-seq により単球および樹状細胞 (DC) のサブタイプが同定されました。同定された新たなサブタイプの DC は、大量の 1 型インターフェロンを分泌する稀なタイプの免疫細胞である形質細胞様 DC の特性を示していました (20)。同様の方法で、腸上皮細胞のトランスクリプトームをマッピングし、これらの細胞がどのように恒常性を維持し、病原体に反応するかを明らかにしました (21)。

これらの例ではすべて scRNA-seq を使用していますが、新鮮で高品質な組織が入手可能な場合に限られます。しかし、そのような検体を入手することは必ずしも可能ではありません。その代替法の一つとして、各細胞の核の RNA シーケンス (Single-Nuclei RNA sequencing: **snRNA-seq**) があります。この方法では、核解離プロトコルを用いて、核内の RNA の分離およびシーケンスを行います。この手法は、新鮮で品質の高い組織が利用できない場合に有用です。

snRNA-seq を用いて、凍結した網膜組織検体のプロファイリングが行われました。その結果、網膜のすべての主要な細胞型が観察され、各細胞型のマーカー遺伝子が特定されました (22)。本研究では、マウスのシングルセル RNA-seq およびヒトのバルク RNA-seq のいずれよりも、ヒト網膜疾患に関連する遺伝子の重要性の差異を明確にできることが示されました。ヒト凍結組織からのシングルセルトランスクリプトームにより、ヒトのバルク RNA-seq モデルや動物モデルでは見落とされていた、疾患に関する重要な洞察を提供できることが明確に示されています。

マルチオミクスにおけるシングルセルシーケンスのアプリケーション

これらのシングルセルシーケンスのパワーは、マルチオミクス解析に使用するとさらに明らかになります (図 4)。

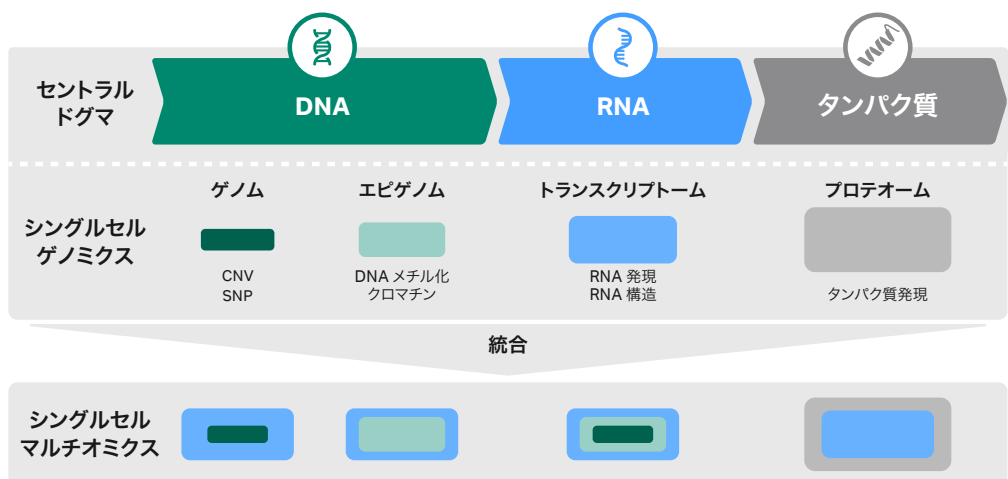


図 4. シングルセルのマルチオミクスプロファイリング戦略。ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームおよびプロテオームをプロファイリングするシングルセルマルチオミクスの手法が、それぞれ異なる形および色で示されています。

マルチオミクスは、特に疾患進行における腫瘍微小環境の役割、薬剤耐性の機序、または細胞分化プロセスに関して、より多くの情報を提供することができます。2016 年、メラノーマの遺伝子型および表現型を調べるために、scRNA-seq を使用して、腫瘍細胞、免疫細胞、間質細胞および内皮細胞のプロファイリングが行われました。scRNA-seq およびプロテオミクスのデータを統合することで、これらの腫瘍では悪性細胞が、AXL キナーゼタンパク質のレベルが異なる 2 つの転写細胞状態で存在することが明らかになりました。これらの組織のシングルセル解析から、腫瘍微小環境および細胞間相互作用がこのキナーゼに影響を及ぼしていることが示唆されました。このマルチオミクス法は、メラノーマの標的療法および免疫療法のいずれにも多くの影響を与えます (23)。

これとは別のマルチオミクス法である **CITE-seq** (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing) では、scRNA-seq が細胞表面タンパク質に関する定量的および定性的情報の取得と共に行われます。この二重のアプローチにより、同一細胞からゲノム変異とタンパク質発現を同時に検出することができます。CITE-seq を使用して、6 例の急性骨髄性白血病患者由来の末梢血単核細胞中の変異状態およびタンパク質発現の関係が解析されました。本研究では、特定のクローンにおける病原性変異および変異の同時発生パターンが示され、これらが各患者の治療に大きな影響を与えることが明らかになり、マルチオミクス研究の重要性が明確に示されました (24)。

この手法を DNA シーケンスに応用することで、一塩基多型 (SNV) および CNV などの遺伝子変異を特定のタンパク質と共に検出することも可能となります。より多くの抗体のパリテーションが行われ、より多くのターゲット NGS パネルが利用可能になるにつれて、このようなマルチオミクス法は急速に拡大しています。

シングルセルシーケンスのワークフロー

シングルセルシーケンス実験には幅広い種類の方法がありますが、すべての方法には共通した重要なステップが含まれます。これらの工程を通して考慮すべき重要な点がいくつかあります。

- 組織採取からダウストリームのアプリケーション用のシングルセル懸濁液を得るまでの時間の最小化。
- ワークフロー全体におけるバラつきを最小限に抑えるための、プロトコールの一貫性。
- 単離細胞の高い収量および生存率。
- 各細胞のトランスクリプトームプロファイルと最初の組織検体との対応性および一貫性。

いずれの場合も、出発検体は可能な限り最高品質であることが必要です。検体の品質はその起源となる組織の品質に大きく左右されます。新鮮な組織検体から抽出された DNA および RNA は多くの場合品質が高く、凍結組織またはホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出された核酸の品質は、一般的にかなり低くなります。

検体の解離および分離

組織検体採取後は、できる限り速やかに処理およびシングルセル分離を行い、高い生存率を確実に維持し、細胞のトランスクリプトームの変化を最小限に抑える必要があります。凍結組織の融解は損傷を引き起こす可能性が高いため、組織はできる限り凍結させません。ただし、新鮮な組織検体を処理する場合でも、解離工程において細胞の破裂または付着により検体の損失が生じる可能性があり、そのような検体はライブラリー調製に適切ではありません。実際、多くの場合、これがシングルセル研究における望ましくない技術的変動およびバッチ間の不一致の主な原因となっています (25)。

さらに組織検体は、細胞外マトリックス (ECM) の組成、細胞の不均一性および硬さにおいてもそれぞれ異なる可能性があります。このため、検体の解離法には広範な最適化および注意が必要であり、解離が不適切な検体では、細胞の生存率および細胞分画化の効率が低下し、ダウンストリームの解析が不可能となります (図 5)。分離工程には、組織の切開、機械的解離および ECM の酵素分解が含まれます。これらの工程を機械的撹拌と並行して行うことで、ダウンストリームの解析が可能な細胞のシングルセル懸濁液が得られます。品質の高いシングルセル溶液を一貫して入手できるようにするためには、固体組織検体の消化および解離を標準化できる組織解離システムが必要とされていることは明かです。

解離システム

数種類の機械的ホモジナイザーが、シングルセルシーケンスに利用されています。しかし、これらのシステムはビーズ、ピストンまたはふるいを利用しており、細胞破壊による検体損失が生じる傾向があります。細胞の高い収量および完全性を確実に維持するために、分離工程は緩和な操作である必要があります。細胞の起源である検体との関連付けが可能な一貫性のあるオミクスプロファイルを得るために、細胞環境が維持されていることも必要です。



図 5. 組織解離においては、細胞生存率を確実に維持するために広範な最適化と注意が必要です。

このような観点から、これらのアプリケーションには酵素法が適しており、コロイド培地を使用して密度遠心分離により細胞を分離することが可能です。この培地は生体物質に対して非毒性であり、膜に付着しません。多くの場合、解離した細胞からコロイド培地を除去する必要はなく、直接細胞培養系に移すことも、核酸の単離のために個々の細胞を直接分離することも可能です (26)。

組織検体の消化および解離に専用の解離システムを使用することは、研究者にとって非常に望ましいことです。そのシステムにシングルユースの検体パウチを使用することで、外部環境への曝露を制限し、汚染のリスクを最小限に抑えることが可能となります。このアプローチにより、組織検体の解離およびシングルセルの分離をトラッキングして GMP ワークフローに統合させることで、プラットフォームを GMP に確実に準拠させることも可能となります。

ワークフローにおける遠心分離の最小化

さまざまなシングルセルシーケンス法において、複数の遠心分離工程は、分離される細胞や核酸の損傷につながる可能性があります。この損傷を最小限に抑えるために、磁気ビーズベースの方法をワークフローに組み込むことが可能です。細胞分離に磁気ビーズベースの方法を組み込むことで、細胞や核酸に繰り返し機械的な力が加えられることにより生じるリスクを軽減し、サイズ範囲に基づいて DNA を分離することが可能となります。試験の実験要件に適合させてこの方法を調整し、ワークフローの一貫性を高めることが可能です。

シングルセルシーケンス検体採取の標準化

現在、標準化された検体採取方法はなく、そのためにプロトコール全体に一貫性が保たれなくなる可能性があります。例えば、検体を共同研究者やサービス提供者に輸送するために凍結させる必要がある場合には、凍結保存工程自体が不均一である可能性があるため、品質のバラツキの要因が増える可能性があります。現在、凍結保存工程は一般的に手動で行われており、操作者間でバラツキがあります。さらに、採取後の全組織の凍結保存は、検体全体の広範な細胞死につながる可能性もあります。また、採血直後の検体への血液供給が制限されることにより、虚血性障害が生じる危険性もあります。これらの問題それぞれが組織の品質を損傷させる可能性があり、ダウンストリームの研究前のシングルセルの生存率が大幅に低下する可能性があります。

さらに、既存の凍結保存システムが開放系であり、多くの場合手動で、GMP に準拠していないという点も考慮する必要があります。また、粒子が放出される傾向があり、これがシングルセルの選択およびソーティングの両方に影響を及ぼす可能性があります。標準化された自動化法では細胞生存率が最大化され、GMP 環境でのスケールアップに適していることから、シングルセルシーケンス研究を使用する多くの分野で大きな関心を集めています。クリーンルーム適合液体窒素 (LN2) を使用しない凍結保存システムにより、LN2 依存技術に付随するリスクと高い設備コストを低減できます。現行の GMP 規制に適合したプラットフォームが使用可能であり、シングルセルシーケンスのパイプラインに GMP に準拠した凍結保存工程を組み込むことができます。

これらの手順は、それぞれが分離された細胞における発現特性に影響を及ぼす可能性があるため、最適化と注意を必要とします。明確に規定された一貫性のある組織解離プロトコールにより、各細胞の発現特性の、選択的な枯渇、実質的な改変、または変化を生じることなく、最大の生存率で細胞が確実に分離されます。

ライブラリー調製および NGS

シングルセルシーケンスは、NGS の大きな進歩により支えられています。NGS は、超低濃度の核酸の検出のために最適化された多くの試薬および方法を使用して確立された手法であり、平均して約 20 ピコグラムの DNA しか有しないシングルセルには極めて重要です。

NGS で信頼性が高く安定したデータを取得できるか否かは、使用する核酸の量、完全性および純度という 3 つの主要な因子、すなわち核酸の品質に依存しています (図 6)。分離された DNA や RNA は増幅を必要としますが、マイクログラム単位の DNA を生成することが可能な、NGS およびジェノタイピングに用いられる幅広い種類の試薬やキットが市販されています。シングルセルシーケンス研究においては感度を考慮することが必要不可欠であるため、フェントグラム (fg) のゲノム DNA (gDNA) の感度を提供できる PCR ベースのキットの存在は重要です。10X Genomics など複数のメーカーから、超低濃度の核酸の分離、検出およびシーケンス用の幅広い種類の試薬が提供されています。

高感度に加えて、ライブラリー調製における検体のコンタミネーションを最小限に抑えることも極めて重要です。Multiple strand displacement amplification (MDA) は、微量の DNA を、ゲノム解析用にマイクログラム単位まで増幅することができます。この方法では、ランダムヘキサマーのプライマーと高度フィデリティーΦ29DNA ポリメラーゼを利用して細胞の DNA を合成します。PCR ベースの方法と比較して、MDA は、NGS 研究用のはるかに長いアンプリコンを生成し、PCR ベースの方法でよくみられる増幅バイアスを大幅に低下させます (27)。

GenomiPhi DNA Amplification システムは、MDA 法を利用して gDNA を均一に増幅することが可能であり、1 fg の gDNA の増幅感度を実現しています。キットには酵素によるクリーンアッププロトコルが含まれており、存在する可能性のある DNA 夾雑物が各反応前に確実に除去されます。このため、シングルセルの実験の一般的な問題である DNA のコンタミネーションが効果的に排除されます。

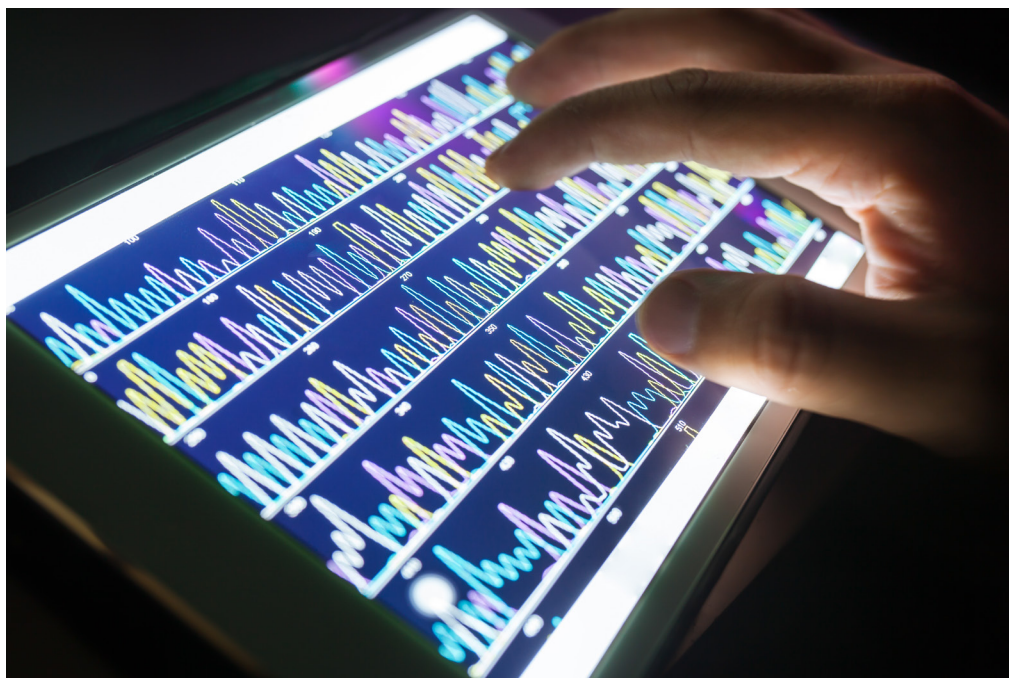


図 6. NGS で信頼性が高く安定したデータを取得できるか否かは、使用する核酸の品質に依存します。

シングルセルシーケンスの現在の課題

実験デザイン

シングルセルシーケンスにおいては、ダウンストリーム分析に必要な強度のデータ取得を可能にする細胞数を決定することが大きな課題となっています。この点では、組織検体あたりの細胞数が多いほど有利です。しかし、検出するべき核酸の各細胞中の量は極めて少量です。しかも、検出後、全細胞それぞれからのシーケンスデータを識別することが必要であることから、状況はさらに複雑です。シングルセルおよびそのシーケンスデータを識別するためには、シングルセルワークフロー全体における細胞および検体のバーコード化が極めて重要です。

実験デザインに関しては、組織処理およびシングルセル分離の工程において、ストレスが誘発する細胞変化を最小限に抑えなければならないという課題もあります。ストレスが誘発するすべての変化を最小限に抑えることが重要であることは、表面に代表的なエピトープを有する高品質の細胞を入手すること、処理組織からすべてのサブポピュレーションを回収すること、全転写物を効果的にキャプチャーすること、および gDNA のバイアスのない増幅を行うことが絶対に必要であることから明確です。

これらの課題に加えて、ダウンストリーム解析を強化するための統計モデルも提案されています。これらの計算モデルでは、検体内の細胞や細胞集団の数と期待度数を推定することが必要です。これらの値は、実際に利用可能な細胞数および実験当たりのコストにより異なります (28)。多くの場合、関心のある特定の細胞集団が同定されたと考えられるまで、個々の細胞のシーケンスが行われます。

組織の処理および解離のための閉鎖系

組織検体の採取および調製は、分離したシングルセルの品質を規定し、ダウンストリームのデータの品質にも影響を与える重要な工程です。現在、これらの工程を一貫して実施し GMP 準拠を追跡できる統合されたプラットフォームは存在しません。検体の採取、品質、量および生存率には大きなバラつきが存在し、それが検体の損失、エラーの発生およびシングルセルのシーケンスパイプライン全体の一貫性の欠如につながる可能性があります。

細胞不均一性

発生生物学では、組織や器官を構成する特定の領域や細胞が明確に定義されています。一方、腫瘍学では、クローン選択、微小環境の影響およびゲノムの不安定性により、腫瘍塊は不均一で明確に定義されていません (29)。これらの腫瘍塊のシングルセルシーケンス研究では、関心のある細胞集団を見落とししたり、腫瘍全体の中で特に大量に存在する細胞集団のみを解析するリスクがあります。技術面および検体採取の両方の限界を考えると、低頻度または特定のサブクローンが分離されない可能性もあります。組織を採取する起源となる検体によっても問題が生じる可能性があります。例えば、脳組織は脂質含有量が高いため、その分解、処理およびシーケンスが困難となる可能性があります。さらに、これらの検体中の個々のニューロンは極めて不安定です。その結果、脳組織検体の処理においては、各分離細胞の全体的な生存率が低くなることから、実験のデザイン、検体採取工程および検体の調製には注意を払う必要があります。

データ解析

バルク細胞集団では、検体の分離、NGS、ゲノムおよびトランスクリプトームデータの解析は比較的容易に行えます。一方、シングルセル解析では、少数のシーケンスリード (従来の NGS との比較)、データが限られていることおよび細胞の不均一性がデータ解析を非常に困難にしています。数多くの計算生物学者がこれらの課題に取り組み始めていますが、シングルセルシーケンス実験全体において対処すべき重要な課題がいくつか残っています (30, 31)。

scRNA-seq によるトランスクリプトームプロファイリングでは、増幅に供する出発物質が少量であることに加えて、検体採取にも課題があることがデータに影響を与え、バルクの RNA-seq よりもはるかにノイズが高くなっています。トランスクリプトーム研究における各遺伝子の確認および検出も非常に重要です。DNA-seq においても、RNA-seq においても、NGS 実験には数千のバーコードシーケンスのマルチプレックス化が必要です。これらのバーコードシーケンスでは、解析時に振り分けを行うことが必要です。また一般的に、外部のバックグラウンドに加えて、バーコードの振り間違えによってもエラーが生じます。技術的な進歩により、1 回の研究で数千もの細胞を個々に検討することが可能となってきたことから、シングルセルシーケンス実験はますます複雑になり、これらの課題を解決することは極めて困難になっています。

シングルセルシーケンスの将来

ヒトゲノムプロジェクトに続き、ヒト体内の 37 兆個の細胞をマッピングするヒト細胞アトラスプログラム (Human Cell Atlas) が進行中です。シングルセルシーケンスは、このプロジェクトに必要不可欠な技術です。収集されたデータにより、多数の種類の細胞中で個々の細胞を識別することができ、細胞間の関係についての理解をさらに深めることができます。この特異的なシングルセルシーケンス研究によって、シングルセルレベルでの疾患の生理学的過程および病理学的機序の理解が実質的に深まることが期待されます。これらの研究により、新たな診断マーカーや治療標的が発見される可能性もあります。

シングルセルシーケンスは、腫瘍学において疾患および治療の理解に革命をもたらしています。がんが発生すると、ゲノムの不安定性により、腫瘍内の遺伝的多様性およびエピジェネティックな多様性が高まります。これらの腫瘍塊内のサブクローンは異なる分子シグネチャーを示し、転移、内因性の化学療法耐性および獲得性の化学療法耐性を誘発する、不均一性を生じます。そのため、すべての細胞集団、特に稀な細胞集団の特性を明らかにする必要があります。組織全体の平均的な分析ではこの多様性を明らかにすることは不可能であり、稀ではありますが臨床的に重要な細胞集団を無視することになります。ゲノム、トランスクリプトームおよびプロテオームのシングルセル解析により、腫瘍内の細胞種の詳細な分子マップが提供され、がんの発生、転移および薬剤耐性の根底にある機序を明らかにすることができます。

シングルセルシーケンスには多くの利点がありますが、もちろん完璧ではありません。シングルセルシーケンスおよびシングルセル全ゲノムシーケンスのデータ取得のためには、非常に多くの方法があり、それぞれの方法に特異的な利点および欠点があります (32、33)。本ホワイトペーパーでは、腫瘍学、微生物学、神経学および免疫学におけるシングルセルシーケンスの方法およびワークフローをご紹介します。不均一性の高い細胞集団の研究におけるシングルセルシーケンスの利点を明らかとしました。シングルセルのシーケンスのワークフローが最適化され、専用の試薬やキットが入手できるようになるに従い、シングルセルシーケンス技術の全体的なコストはさらに低下します。

新鮮組織検体または凍結組織検体の細胞解離プラットフォームが導入され、さまざまな方法が研究に利用できるようになってきたことから、シングルセルシーケンスプロジェクトに新たな可能性が広がり、特に腫瘍学においては重要な技術となっています。それと同時に、現在の計算生物学の検出力の向上および人工知能の利用により、以前には限られた研究室でのみ可能であった大規模のシングルセルシーケンス実験の実施が可能となっており、シングルセルシーケンスは疾患の診断、理解および治療においてますます重要な役割を果たすようになってきています。

シングルセルシーケンスのワークフローの改善に関する詳細および組織処理および NGS に関しては、当社の Scientific Support チームまでご連絡ください。

引用文献

1. Editorial. Method of the year 2013. *Nat Methods*. **Jan;11**(1):1. (2014).
2. Wen L., *et al.*, Boosting the power of single-cell analysis. *Nat Biotechnol*. **May 9;36**(5):408-409 (2018).
3. Macosko EZ *et al.* Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. **May 21;161**(5):1202-1214 (2015).
4. Demaree B., *et al.* An Ultrahigh-throughput Microfluidic Platform for Single-cell Genome Sequencing. *J Vis Exp*. **May 23**;(135) (2018).
5. Vitak SA., *et al.* Sequencing thousands of single-cell genomes with combinatorial indexing. *Nat Methods*. **Mar;14**(3):302-308. (2017).
6. Chen C., *et al.* Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science*. **Apr 14;356**(6334):189-194. (2017).
7. Guo F., *et al.* Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells. *Cell Res*. **Aug;27**(8):967-988. (2017).
8. Casasent AK., *et al.* Multiclonal Invasion in Breast Tumors Identified by Topographic Single Cell Sequencing. *Cell*. **Jan 11;172**(1-2):205-217 (2018).
9. Han X., *et al.*, Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell*. 2018 May **17;173**(5):1307 (2018).
10. Rosenberg AB., *et al.*, Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. *Science*. **Apr 13;360**(6385):176-182 (2018).
11. Wang Y., *et al.*, Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*. **Aug 14;512**(7513):155-60 (2014).
12. Gawad C., *et al.* Dissecting the clonal origins of childhood acute lymphoblastic leukemia by single-cell genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec **16;111**(50):17947-52 (2014).
13. Zhang L., *et al.*, Lineage tracking reveals dynamic relationships of T cells in colorectal cancer. *Nature*. **Dec;564**(7735):268-272. (2018).
14. Venteicher AS., *et al.*, Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science*. **Mar 31;355**(6332). (2017).
15. Fan X., *et al.* Spatial transcriptomic survey of human embryonic cerebral cortex by single-cell RNA-seq analysis. *Cell Res*. **Jul;28**(7):730-745 (2018).
16. Kuboki Y *et al.* Single-cell sequencing defines genetic heterogeneity in pancreatic cancer precursor lesions. *J Pathol*. **Mar;247**(3):347-356 (2019).
17. Owen RP *et al.* Single cell RNA-seq reveals profound transcriptional similarity between Barrett's oesophagus and oesophageal submucosal glands. *Nat Commun*. **Oct 15;9**(1):4261 (2018).
18. Zhong S., *et al.* A single-cell RNA-seq survey of the developmental landscape of the human prefrontal cortex. *Nature*. **Mar 22;555**(7697):524-528. (2018).
19. Crinier A., *et al.*, High-Dimensional Single-Cell Analysis Identifies Organ-Specific Signatures and Conserved NK Cell Subsets in Humans and Mice. *Immunity*. **Nov 20;49**(5):971-986 (2018)
20. Villani AC., *et al.*, Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. **Apr 21;356**(6335). (2017).
21. Haber AL., *et al.*, A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature*. **Nov 16;551**(7680):333-339. (2017).
22. Liang Q *et al.* Single-nuclei RNA-seq on human retinal tissue provides improved transcriptome profiling. *Nat Commun*. **Dec 17;10**(1):5743 (2019).
23. Tirosh I., *et al.*, Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. **Apr 8;352**(6282):189-96. (2016).

24. Martelli MP *et al.* CD34+ cells from AML with mutated NPM1 harbor cytoplasmic mutated nucleophosmin and generate leukemia in immunocompromised mice. *Blood*. **Nov 11;116**(19):3907-22 (2010).
25. Tung PY., *et al.*, Batch effects and the effective design of single-cell gene expression studies. *Sci Rep*. **Jan 3;7**:39921. (2017).
26. Pertoft H., *et al.*, The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll™. *Exp Cell Res*. **Dec;110**(2):449-57. (1977).
27. Dean FB., *et al.*, Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **Apr 16;99**(8):5261-6. (2002).
28. Nguyen QH., *et al.*, Experimental Considerations for Single-Cell RNA Sequencing Approaches. *Front Cell Dev Biol*. **Sep 4;6**:108. (2018).
29. Sandberg R. Entering the era of single-cell transcriptomics in biology and medicine. *Nat Methods*. **Jan;11**(1):22-4. (2014).
30. Skylaki S., *et al.*, Challenges in long-term imaging and quantification of single-cell dynamics. *Nat Biotechnol*. **Nov 8;34**(11):1137-1144. (2016).
31. Buettner F., *et al.*, Computational analysis of cell-to-cell heterogeneity in single-cell RNA-sequencing data reveals hidden subpopulations of cells. *Nat Biotechnol*. **Feb;33**(2):155-60. (2015).
32. de Bourcy CF., *et al.*, A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PLoS One*. **Aug 19;9**(8):e105585. (2014).
33. Ahsanuddin S., *et al.*, Assessment of REPLI-g Multiple Displacement Whole Genome Amplification (WGA) Techniques for Metagenomic Applications. *J Biomol Tech*. **Apr;28**(1):46-55. (2017).



cytiva.com

Cytiva および Drop のロゴは、Global Life Sciences IP Holdco LLC または関連会社の商標です。

Percoll は、Global Life Sciences Solutions USA LLC または Cytiva 関連会社の商標です。

© 2020 Cytiva

すべての商品およびサービスは、Cytiva 事業内で運営されている供給会社の販売条件に従って販売されています。

これらの条件の写しはご請求に応じてご提供可能です。

最新の情報に関しては、お近くの Cytiva 担当者までお問い合わせください。

ローカルオフィスの連絡先情報に関しては、cytiva.com/contact をご参照ください。

CY12246-17Apr20-WP