

BD FACSMelody™ セルソーターを用いた、 Single Cell 解析の有効性

黒木 義人^{1,2}、阿形 清和²、嘉陽 啓之³

¹ 学習院大学大学院 理学部 生命科学専攻、² 基礎生物学研究所 再生生物学研究室、³ 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

はじめに

現在のバイオサイエンス研究において、Single Cell 解析は細胞を個々のレベルで解析をおこなうために非常に重要な解析方法です。特に、セルソーターを用いた Single Cell Sorting は重要な手法であり、高度な研究手法として、免疫学における個々の免疫細胞の機能解析、造血幹細胞や組織幹細胞など様々な幹細胞・前駆細胞の同定、近年ではがん細胞の不均一性 (heterogeneity) の解明など、細胞生物学研究における様々な発見に貢献してきました¹⁾。

今日、セルソーターの技術革新が進み、自動化技術とともに、操作性に優れたコンパクトなセルソーターが登場しています。そこで本稿では BD FACSMelody™ セルソーターを用いた 96 well plate への Single Cell Sorting、さらに Index Sorting 機能を使用した Single Cell 解析の有効性について検討しました。



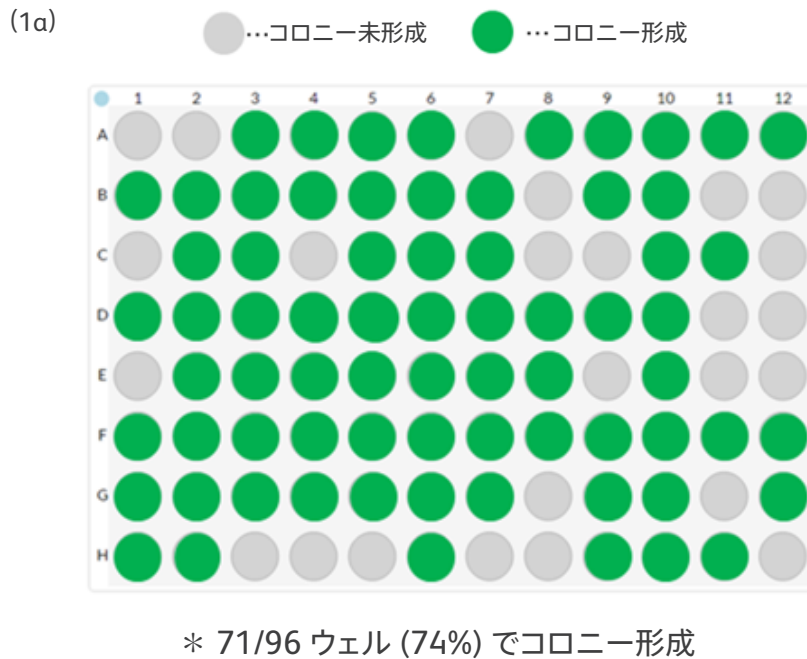
BD FACSMelody™ セルソーター

マウス ES 細胞 (EB5 細胞株) を用いた Single Cell 解析

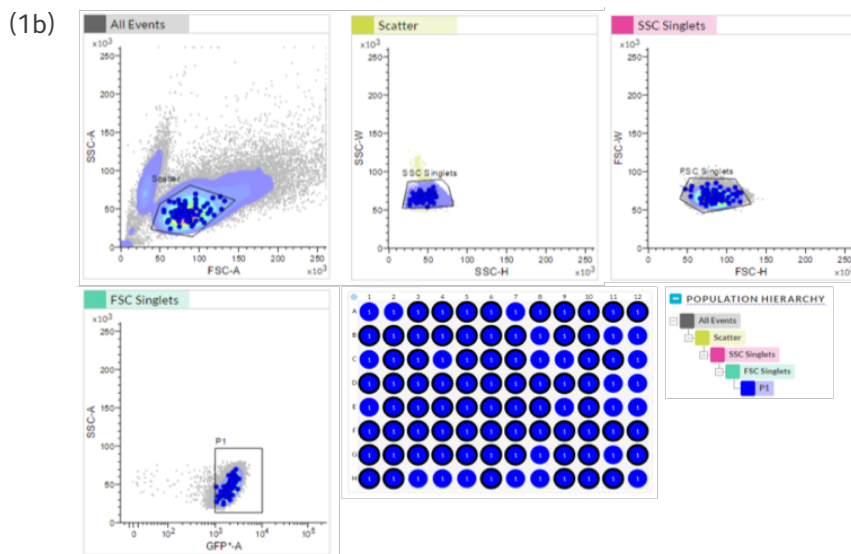
マウス ES 細胞 (EB5 細胞株) に EF1 α -EGFP plasmid をエレクトロポレーションで遺伝子導入した後、BD FACSMelody™ セルソーターを用いて 96 well plate (丸底) の各ウェルに Single Cell Sorting を行い、3 週間後に GFP 陽性の細胞クローンの単離を行いました。培養後の観察では、74% と高い効率でコロニーを形成するクローンを得られたことが確認されました (Fig.1a)。

また、Index Sorting 機能を用いた再解析により、コロニーを形成した細胞のプロット上の位置を確認することができました (Fig.1b)。さらに、細胞増殖に伴って GFP のシグナル強度が落ちるものがほとんどの中、増殖した細胞にムラなく強い GFP シグナルを発するクローンを 3 種得ることができました。

Fig.1 96 well plate に 1cell/well で Single Cell Sorting を行い、培養 3 週間後にコロニー形成が見られたウェルの割合と Index Sorting 機能による plot の追跡



(1a) 96 well plate (丸底) に細胞を 1cell/well で Index Sorting を行い、3 週間培養してコロニーの形成が見られたウェルを緑色 (71 ウェル) に、形成が見られなかったウェルを灰色 (25 ウェル) に塗り分けた模式図。Sorting 後、Single Cell からコロニーを形成する割合は 74% であった。



(1b) 上記 (1a) でコロニーの形成が見られたウェルの細胞を Index Sorting で解析した。96 well plate (丸底) に 1 細胞ずつ P1 フラクシオンの GFP ポジティブ細胞が Sorting された。

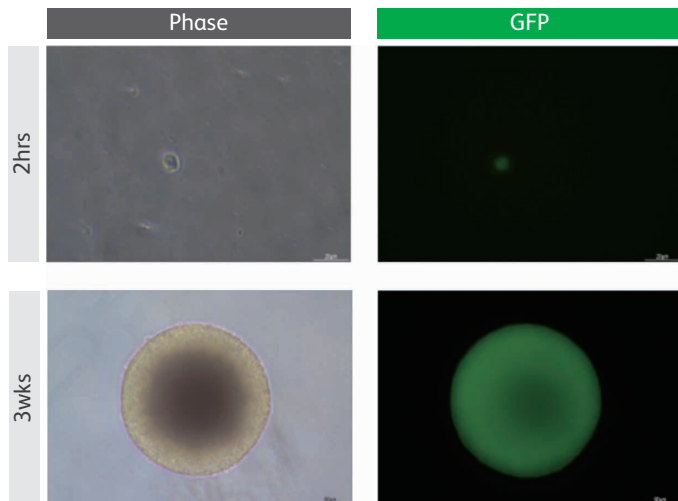
Single Cell Sorting 後の細胞の検証

Single Cell Sorting 後の細胞について、培養 2 時間および 3 週間後のコロニー形成状況を顕微鏡で観察し、Index Sorting の機能を用い、個々の Sorting した細胞を plot 上に追跡しました。顕微鏡での観察により、コロニー形成がみられたウェルだけでなく、コロニー形成が見られなかったウェルにも細胞が正

確にソーティングされていることが確認されました (Fig.2a, 2c)。また、Index Sorting 機能による再解析から、コロニーを形成した細胞と形成しなかった細胞では、plot 上のパターンに違いがあることが示唆されました (Fig.2b, 2d)。

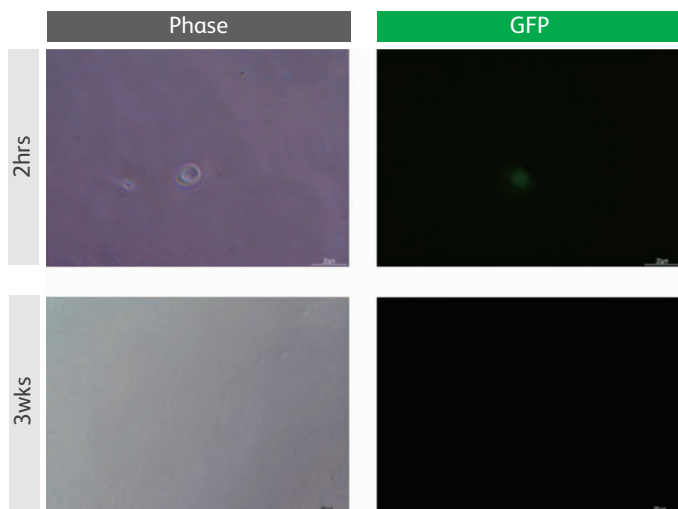
Fig.2 コロニー形成状況と Index Sorting 機能用いた plot 追跡

(2a)



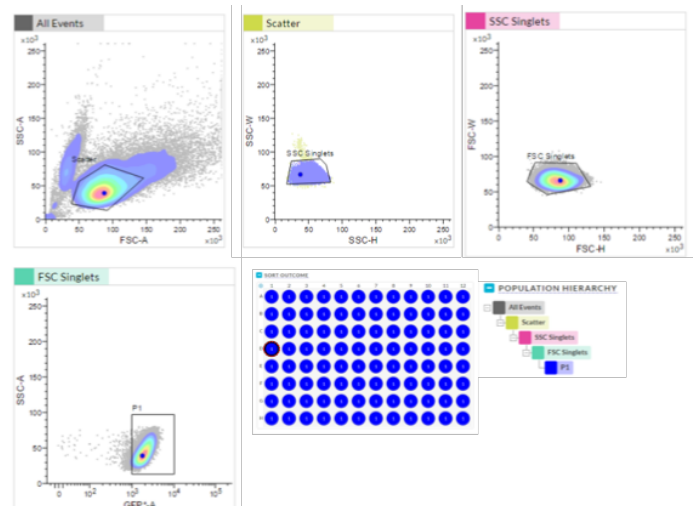
(2a) Fig.1 で Sorting を行い、培養後コロニー形成が見られた D1 well の細胞の顕微鏡写真。Sorting から 2 時間培養後と 3 週間培養後の細胞についてそれぞれ位相差顕微鏡の画像と GFP 蛍光を確認した画像。

(2c)



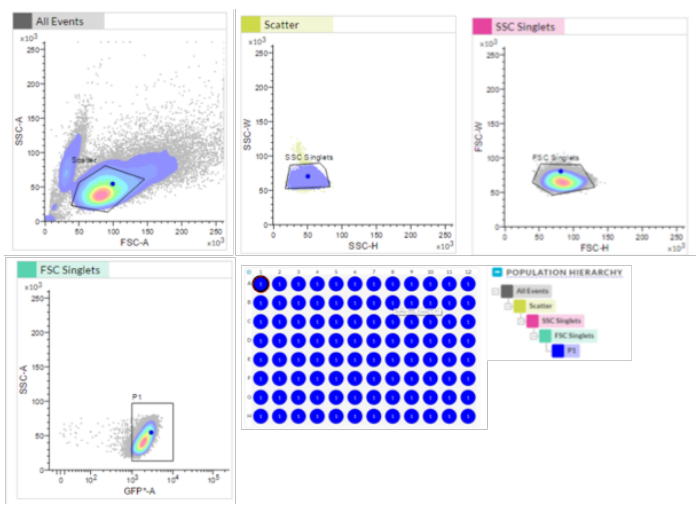
(2c) Fig.1 で Sorting を行い、培養後コロニー形成が見られなかった A1 well の細胞の顕微鏡写真。Sorting から 2 時間培養後と 3 週間培養後の細胞についてそれぞれ位相差顕微鏡で観察した場合と GFP 蛍光を確認した画像。培養 3 週間後にコロニーは形成されなかったが、ウェルに細胞が Sorting されていたことは確認できた。

(2b)



(2b) D1 well の細胞について Index Sorting 情報の plot 解析。

(2d)



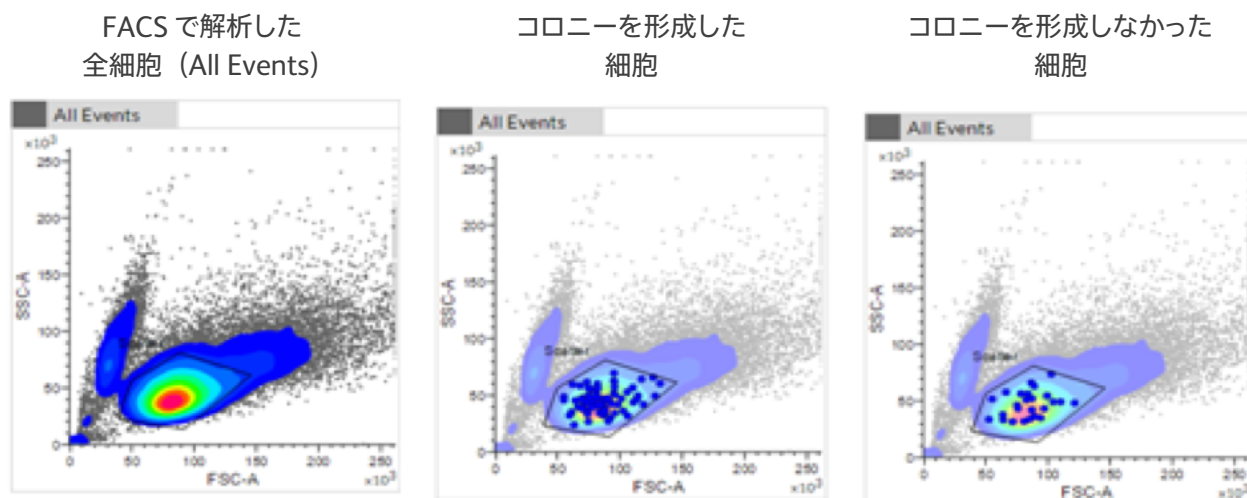
(2d) A1 well の細胞について Index Sorting 情報の plot 解析。

Counter plot を用いた解析

Single Cell Sorting を行った細胞について、All Events のサンプル、培養後にコロニー形成した 71 ウェルの細胞 (Fig.1a 緑色のウェル)、コロニー形成しなかった 25 ウェルの細胞 (Fig.1a 灰色のウェル) の 3 つのパターンで plot を比較しました。コロニー形成した細胞の plot はコロニー形成しなかった細胞の plot に比べ

て Counter plot の赤いゾーンにより多くの細胞が位置していました。これらの結果から、3 週間の培養によってコロニーを形成する能力を有する細胞は、plot 上の表現型からコロニーを形成しない細胞と比較してばらつきの少ない細胞であることが確認されました (Fig.3)。

Fig.3 Counter plot を用いた細胞の比較



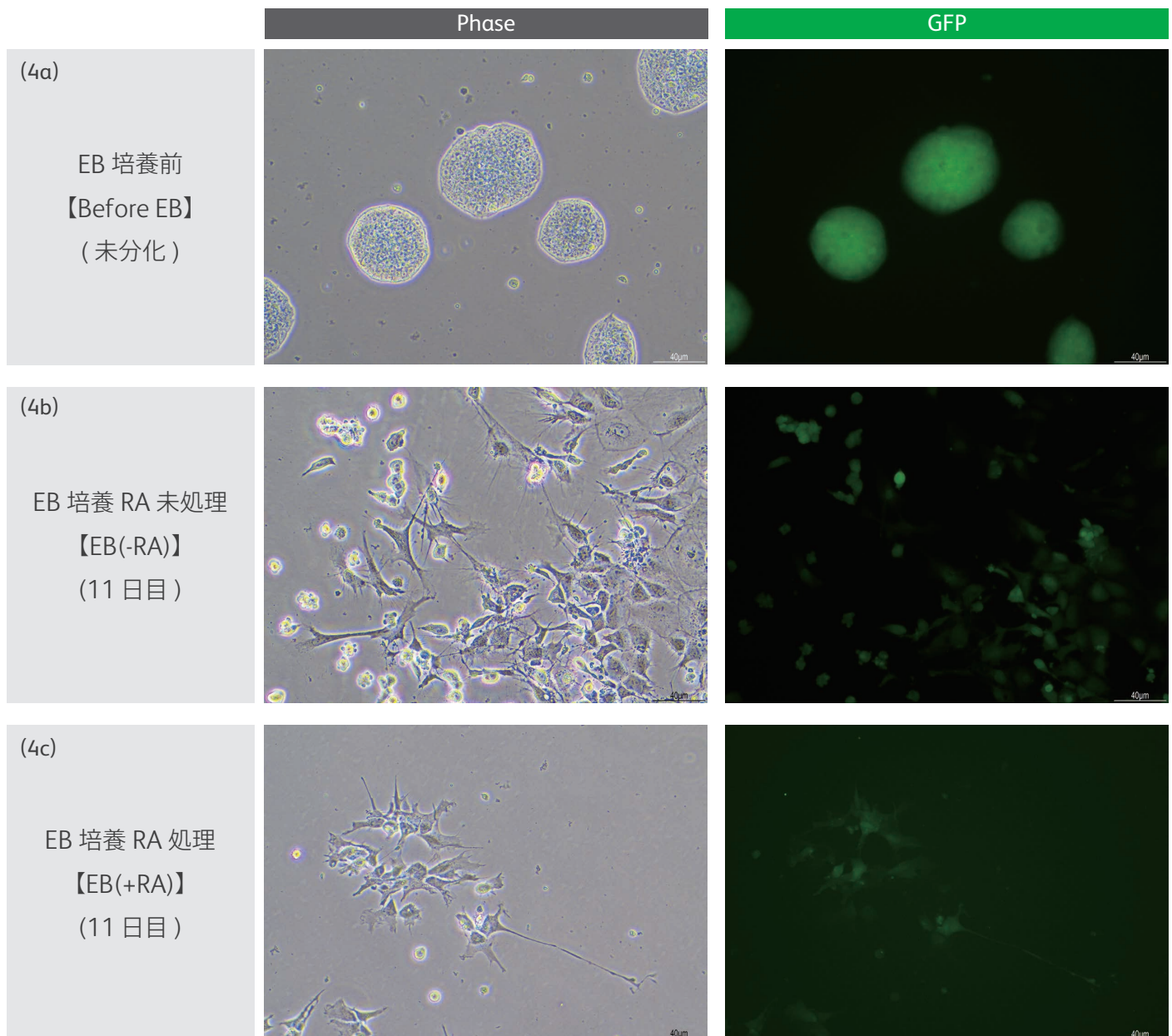
Majority の細胞は培養 3 週間後にコロニーを形成することを Counter plot から確認できた

Embryoid Body(EB) 培養による Sorting 後の細胞の分化誘導

Sorting 後にコロニーを形成した細胞 (Fig.2a) の分化能を EB 培養によって検証しました。EB 培養では、EB 形成後にレチノイン酸 (RA) を加え、さらに分化を誘導しました。EB 培養前の未分化状態の細胞の形態、EB 培養後レチノイン酸 (RA) 未処理の細胞 [EB(-RA)] の形態、EB 培養後 RA 処理 [EB(+RA)] を行った細胞の形態について観察しました。EB 培養前の細胞はマウス ES 細胞に特徴的なドーム状の丸い形態でしたが、EB(-RA) の細胞は短い神経突起を伸ばしている細胞が見られ、EB 培養によって ES 細胞が分化し始めていると考えられます (Fig.4a、4b)。また、

EB(+RA) は、EB(-RA) の細胞に比べてより長い神経突起を持つ細胞が見られ、EB 培養とその後の RA 処理によって ES 細胞が成熟した神経細胞へと分化したことが示唆されました (Fig.4b、4c)。さらに、逆転写 PCR (RT-PCR) によって、EB(-RA) と EB(+RA) について遺伝子発現解析を行いました。外胚葉マーカー遺伝子の Nestin の発現量は増加した一方で、内胚葉マーカー遺伝子の Gata6 の発現量は減少しました。このことから、RA 処理によって EB 培養細胞はより積極的に外胚葉の細胞へと分化したのではないかと示唆されます (Data not shown)。

Fig.4 EB 培養による分化能の検証



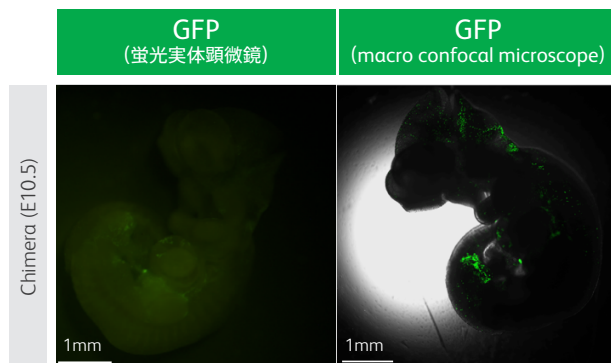
位相差顕微鏡にて観察した画像と GFP 蛍光画像

追加実験

—キメラ解析による分化能検証

GFP 陽性マウス ES 細胞 (Fig.2a) の in vivo での分化能を検証するため、blastocyst injection によるキメラ解析実験を行いました。

Sorting 後にコロニーを形成した細胞 (Fig.2a) を blastocyst injection 後、E10.5 と E11.5 の胚を得ました。胚の GFP 蛍光を観察した結果、キメラになった胚と、ならなかった胚が得られました。キメラ胚では心臓の一部、手足や尾の表皮、眼などの箇所で GFP 陽性の細胞が見られ、ES 細胞の寄与が示唆されました。



結論

BD FACSMelody™ セルソーターを用いて、96 well plate の各ウェルに精度よく Single Cell での Sorting を行うことができました。また、デリケートな ES 細胞を Sorting し、培養、分化誘導することが確認できました。これにより、FACSMelody™ セルソーターを用いた Sorting は細胞機能へ影響がないことを検証できました。

BD FACSMelody™ セルソーターはコンパクトであるため、研究室のスペースを効率よく使用することができました。搭載されている BD FACSCorus™ ソフトウェアはシンプルで、操作性に優れているため、フローサイトメーター初心者でも簡単に使用することができました。Single Cell 解析のみならず、今後 Sorting が必要な研究領域において、有用なセルソーターであると期待できます。

Material and Method

● Cell

マウス ES 細胞株 EB5(H Niwa et al., 2002) に pEF1 α -EGFP を遺伝子導入した細胞 (GFP-EB5) を全ての実験に使用した²⁾³⁾。

● Cell culture

GFP-EB5 培養時の基本培地の組成を以下に記す²⁾³⁾。

G-MEM with L-Glutamine and Phenol Red (Wako) + 10% FBS(Biowest)
+ 1mM Sodium Pyruvate(Nacalai Tesque) + 0.1mM MEM Nonessential Amino Acids(Nacalai Tesque)
+ 0.1mM 2-Mercaptoethanol(Nacalai Tesque) + 1000U/ml ESGRO® LIF(Merck Millipore)
+ PD0325901 (Wako) 1 μ M + CHIR99021 (Wako) 3 μ M
ゼラチンコートをした 6cm シャーレで 37°C, 5% CO₂ で培養した。

● Embryoid Body(EB) culture and Retinoic acid(RA) treatment for differentiation induction

Hanging drop 法によって GFP-EB5 から EB を形成した。40,000cells/ml の GFP-EB5 細胞懸濁液を 1drop あたり 20 μ l で 10cm シャーレのフタに垂らした (day0)。翌日丸いコロニー状の EB が形成されたことを確認後、EB を壊さないよう慎重にゼラチンコートをした 6cm シャーレに 50 個の EB を移した (day1)。RA 処理を行ったサンプルは day2 で培地を三胚葉誘導培地に交換し 1 μ M RA(Wako) を加えた。RA 未処理の EB と RA 処理の EB をそれぞれ day3 にトリプシンによって細胞を解離しゼラチンコートの 6cm シャーレに播いて三胚葉誘導培地で day11 まで培養した⁴⁾⁵⁾。

● 三胚葉誘導培地の組成

G-MEM with L-Glutamine and Phenol Red + 1mM Sodium Pyruvate
+ 0.1mM MEM Nonessential Amino Acids + 0.1mM 2-Mercaptoethanol

● RNA extraction ,cDNA synthesis and RT-PCR

基本培地で 2 日間培養した GFP-EB5、EB 培養後 10 日間三胚葉誘導培地で培養した細胞 (EB;-RA)、EB 培養後 RA 処理をして 9 日間三胚葉誘導培地で培養した細胞 (EB;+RA) のそれぞれ 1 \times 10⁶ cells から Isogen(NIPPON GENE) を用いて mRNA を抽出した。その後 QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を使って cDNA を合成した。GAPDH の mRNA を internal control とし、Oct3/4,Gata6,Brachyury,Pax6,Nestin の mRNA の発現を RT-PCR で解析した。用いたプライマーは論文 (Xu J et al., 2011 , Poh YC et al., 2014) に記載されたものを使用した⁴⁾⁵⁾。RT-PCR で得られた PCR 産物を電気泳動し、バンドのシグナル強度を imageJ によって解析し、遺伝子発現量を定量化した。

● FACS Analysis and Single Cell Sorting

BD FACSMelody セルソーター 3 レーザー 9 カラー (488nm/640nm/405nm) プレートソートオプション付きを使用した。

〈追加実験〉

● キメラ解析

ICR マウス由来の Blastocyst(E3.5) に GFP-EB5 をインジェクションした。偽妊娠マウスの子宮に移植後、E10.5 または E11.5 まで発生が進んだ胚を取り出して蛍光実体顕微鏡または macro confocal microscope を用いて GFP 蛍光を観察した。

Reference

1. Hayashi T, Shibata N, Okumura R, Kudome T, Nishimura O, Tarui H, Agata K.
Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its "index sorting" function for stem cell research.
Dev Growth Differ. 2010 Jan;52(1):131-44.
2. Niwa H, Masui S, Chambers L, Smith A, Miyazaki J
Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells
Mol. Cell Biol. 22(5):1526-1536(2002 March)
3. Ogawa K, Matsui H, Ohtsuka S, Niwa H
A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells
Genes to Cells 9(5):471-477(2004 May)
4. Xu J, H Wang, T Liang, X Cai, X Rao, Z Huang, G Sheng.
Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture
Mol Biol Rep. 39(2):789-95(2012 February)
5. Poh YC, Chen J, Hong Y, Yi H, Zhang S, Chen J, Wu DC, Wang L, Jia Q, Singh R, Yao W, Tan Y, Tajik A, Tanaka TS, Wang N
Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell
Nat Commun. 30;5:4000.(2014 May)

Acknowledgements

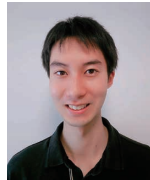
学習院大学卒業後、総合研究大学院大学に進学してキメラ解析の追加実験をしました。
キメラ解析の実験にあたり、基礎生物学研究所 初期発生研究部門 藤森俊彦教授と研究室スタッフの皆様にご指導を賜りました。
厚く御礼申し上げます。

PROFILE

黒木 義人

学習院大学 理学部 生命科学科 阿形研究室 卒業研究生

H30年度の学習院大学・生命科学科・卒業研究として GFP-ES 細胞株の単離を行い、
H31年度より基礎生物学研究所の総合研究大学院1年生として基礎生物学研究所で
藤森俊彦教授の指導のもとキメラマウス胚の作成を行った。



阿形 清和

基礎生物学研究所 所長

経歴

1983年 京都大学大学院理学研究科・生物物理学教室・卒業
1991年 姫路工業大学（現・兵庫県立大学）生命科学科・助教授
2000年 岡山大学理学部・教授
2002年 理化学研究所発生再生科学総合研究センターグループディレクター
2005年 京都大学大学院理学研究科・生物物理学教室・教授
2016年 学習院大学 理学部生命科学科 教授
2019年 基礎生物学研究所 所長



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

本社:〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ
カスタマーサービス ☎ 0120-8555-90 FAX: 024-593-3281
(ご注文・納期・資料請求)

bdbiosciences.com/jp/

機器・試薬の使用方法および学術に関するサポート
☎ 0120-4890-77 E-Mail: tech.cell@bd.com

機器のトラブルに関するサポート
☎ 0120-7099-12

