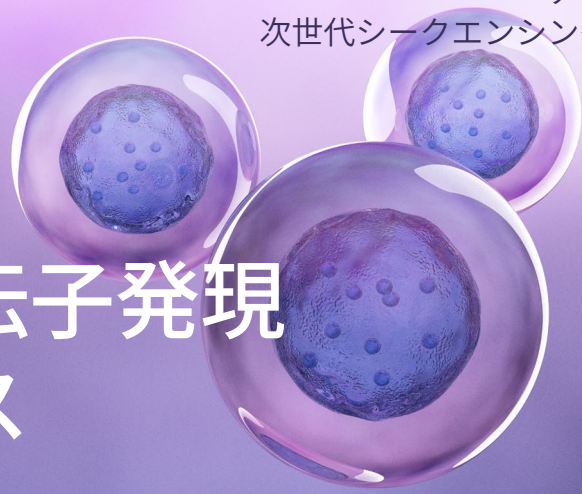


# 10x Genomics シングルセル遺伝子発現 受託解析サービス

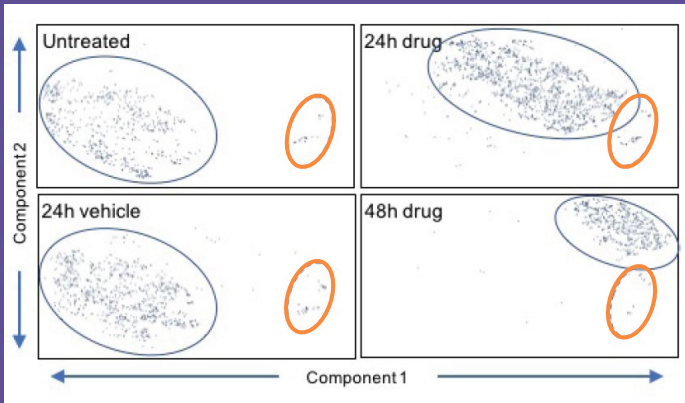


## シングルセルレベルでの解析の意義

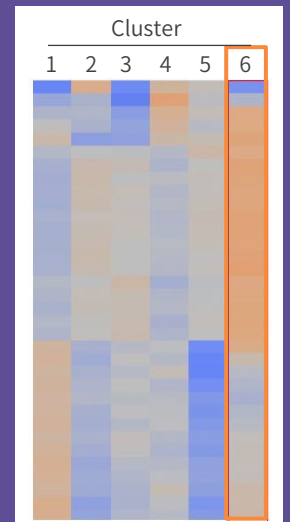
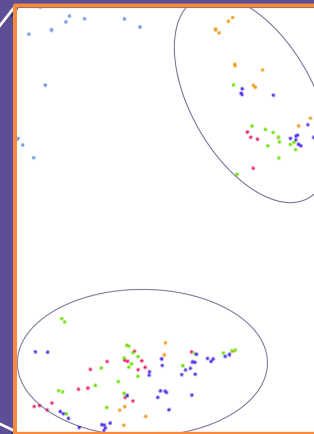
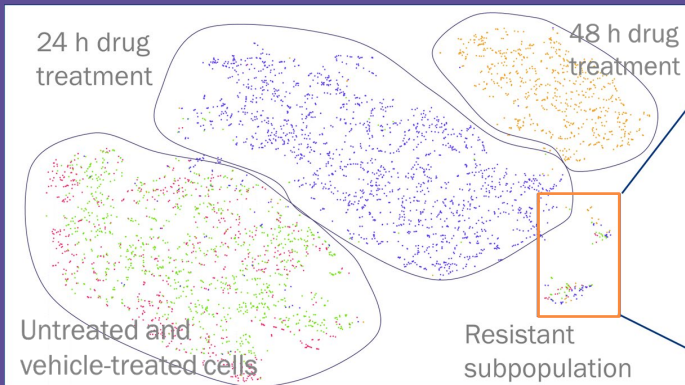
シングルセル遺伝子発現解析では、従来のバルクRNA-Seqでは検出の困難な、個々の細胞集団の区別と細胞集団間での遺伝子発現比較が可能です。

これにより、各細胞集団の特徴付け、細胞集団の不均一性や希少な細胞集団の同定を実現します。

## シングルセル遺伝子発現解析の例 — 薬剤抵抗性集団の検出



- がん細胞株に抗がん剤を投与、一定時間後に細胞を採取、シングルセルレベルで発現を解析。
- 投薬に反応しない細胞集団を検出。同細胞集団では、他の細胞集団に比べ、分化多能性マーカーとABCトランスポーター遺伝子群が有意に高く発現。
- 薬剤抵抗性集団は、遺伝子発現の特徴から更に二つの集団に区別。



(上) 薬剤投与なし、投薬後24時間・48時間および投薬なし24時間後の細胞群での遺伝子発現のtSNEプロジェクション。投薬に反応しない細胞集団を検出。(左下) 上図のパネルを合わせたもの。(右下) 投薬に反応しない細胞集団 (Cluster 6) での、他の集団に対する遺伝子発現のヒートマップ表示。各サンプル3,000細胞、5万リード/細胞を解析。



# 10x Genomics Chromium システムの特長



- **ハイスループット**  
1ウェルあたり最大約10,000細胞を同時解析、細胞あたりの費用対効果に優れる。
- **多様なアプリケーション**  
遺伝子発現、レパトア解析、細胞表面タンパク質同定、マルチオーム（遺伝子発現+ATAC）など。
- **データ解析までの一貫したサポート**  
マッピングからクラスタリングまで簡単なコマンドで実施できるCell Ranger、細胞集団のアノテーション、再クラスタリング、発現比較が直感的に実施できるLoupe Browserが無償提供、初めての方でも安心。
- **高い市場シェア**  
多数の実績。プロトコルなどの豊富なリソースが利用可能。公表データとの直接的な比較も可能。

## 10x Genomics Chromiumによる解析実施の例

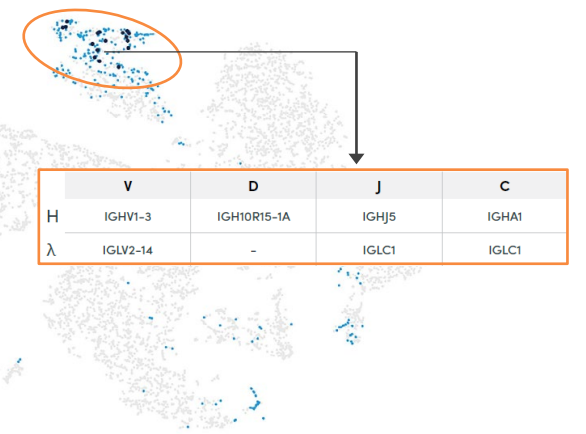
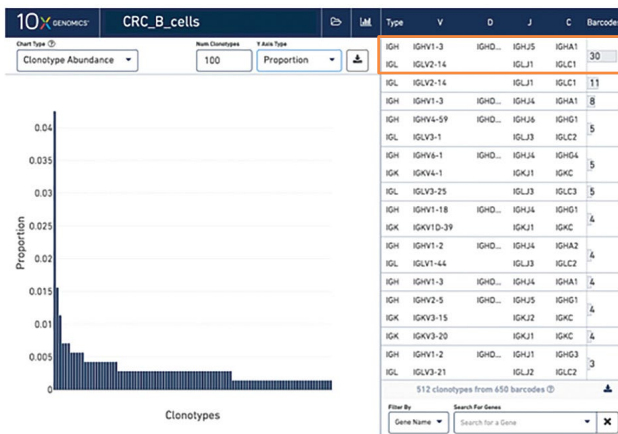
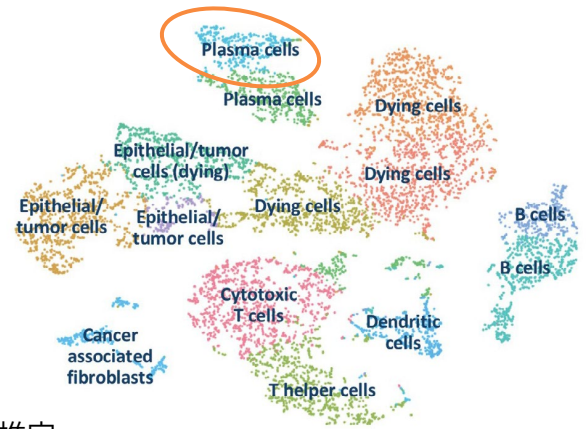
### Characterization of the tumor microenvironment (10x Genomics Application Noteより引用・改変)

アプリケーション：5' 遺伝子発現 + TCR/BCR

サンプル：ヒト大腸がん (colorectal cancer/CRC)

解析対象細胞数：約8,500 (うち、約900がT細胞、約700がB細胞)

- がん微小環境由来の各細胞集団を既知の発現マーカーを用いてアノテーション (右; tSNEプロジェクション)。
- B細胞クロナイプでは、単クローンが特異的に増大 (全体の>4%; 左下)、これに対し、T細胞クロナイプでは、クローンの増大は限定的 (結果省略)。
- 遺伝子発現とレパトア解析の結果を統合。形質細胞の多くが、免疫グロブリンを産生 (右下、薄い青色の点)。
- 一部の形質細胞は、特異的に増大を示した抗体クローンを発現 (右下、濃い青色の点)。 がん特異的な抗体を産生する形質細胞と推定。



### Improving Single Cell Characterization with Simultaneous Gene Expression and Cell Surface Protein Measurements at Scale (10x Genomics Application Noteより引用・改変)

アプリケーション：

3' 遺伝子発現 + 細胞表面タンパク質同定 (15種類のBioLegend TotalSeq-B抗体)

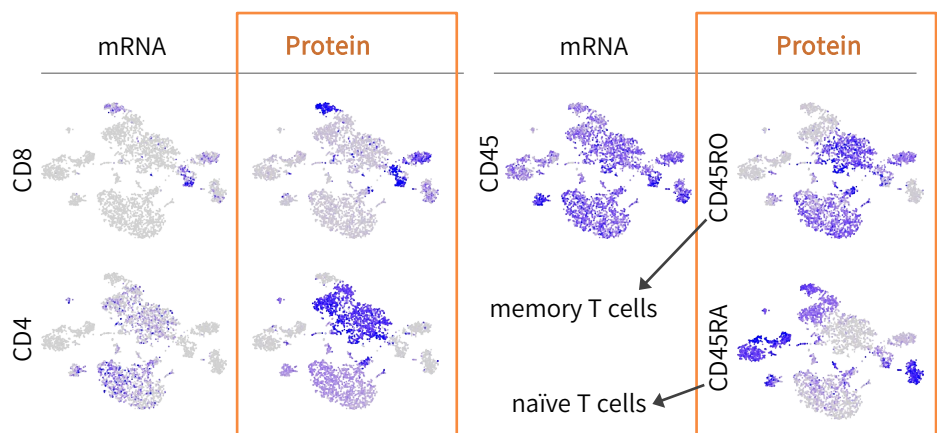
サンプル：ヒトPBMC

解析対象細胞数：約5,000

ペアエンドリード数：

25,000 (遺伝子)、5,000 (タンパク質)

転写物とタンパク質で検出した場合の遺伝子発現量の違い。発現量の少ない遺伝子や区別の困難なアイソフォームでは、細胞表面タンパク質同定がより正確なアノテーションに有効。





**事前のご相談～  
お見積依頼・ご注文**

アゼンタの専任スタッフが対応。仕様、サンプル調製の注意点などを確認。技術相談もお気軽にどうぞ。



**サンプルのご用意**

ガイドラインを参考に、分散済みの細胞をご用意。全血からのPBMC調製、細胞分散もご相談ベースで対応。



**サンプルのご提出**

サンプルの特性・ご希望に応じてサンプル提出方法の選択が可能：  
1) 凍結での送付  
2) 弊社まで直接持ち込み  
3) お客様のラボで出張実施

**細胞数・生存率の確認**

10x Genomicsガイドラインを参考に細胞を調製。プロジェクトの成否にかかわる最重要部分。

**GEMエマルジョン生成  
ライブラリ調製**

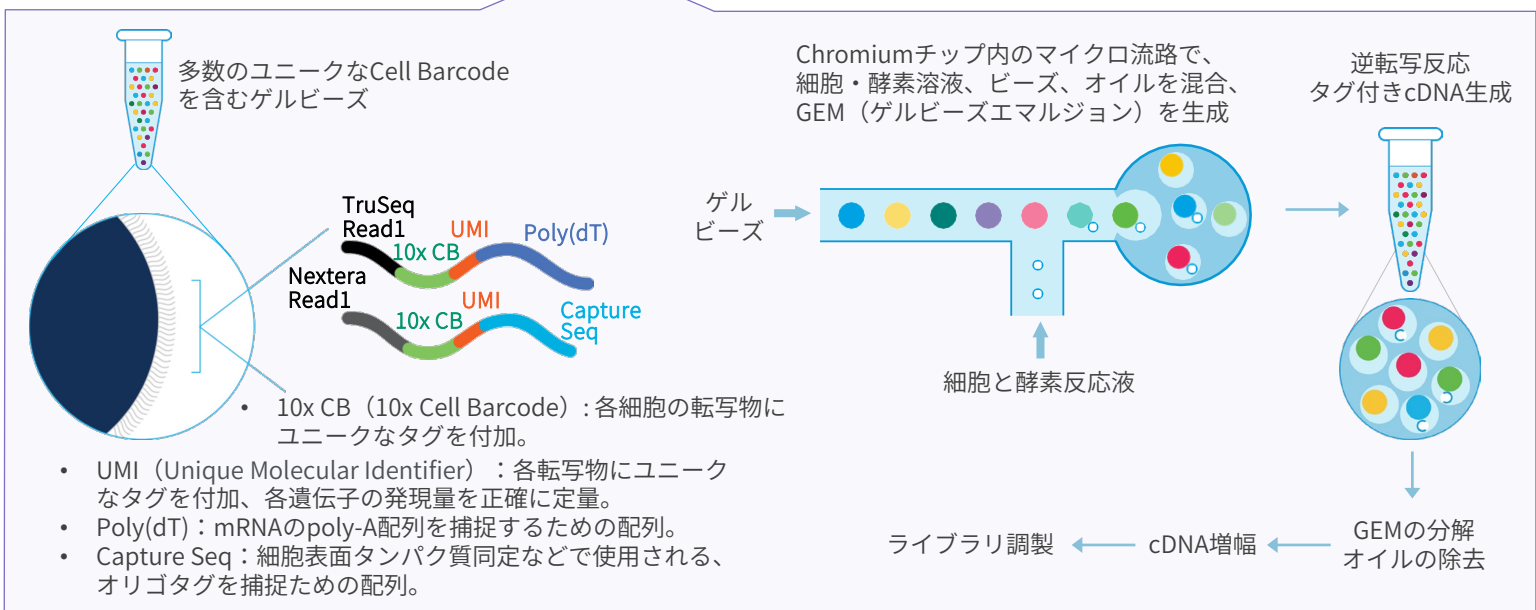
Chromium Controllerによりシングルセル化。詳細は以下をご参照。

**シーケンシング**

Illumina NovaSeq、HiSeqあるいはMGI tech DNBSEQ-G400でシーケンシング。

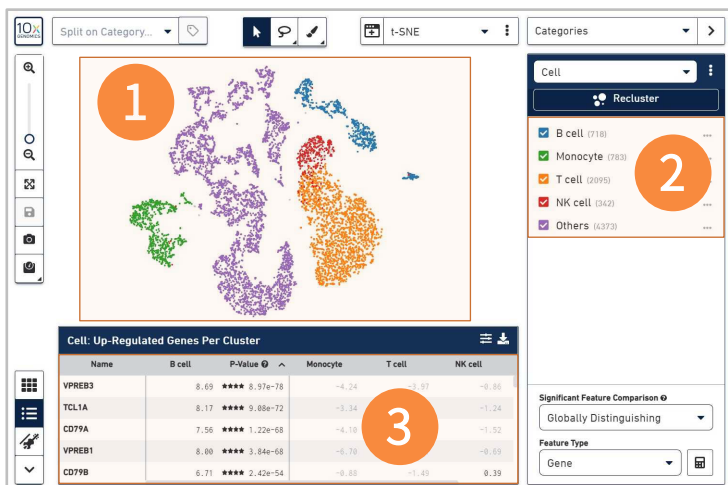
**データ解析 (一次解析)**

Cell Rangerパイプラインにより一次解析。Loupe Browserで二次解析が可能なデータセットを納品。



**データ解析 (二次解析)**

お客様ご自身でLoupe Browserを用いて二次解析を実施。Loupe Browserは10x Genomicsより無料提供 (Win/Mac版)。分かりやすい画面表示で直感的な操作が可能。



- クラスタリングの結果の表示**  
t-SNEまたはUMAPにより表示。任意の集団のみで再度クラスタリングを行うことも可能。
- 発現マーカーを用いて集団をアノテーション**  
クラスタリングに基づく集団、あるいは任意の条件に合う細胞群を分類、特徴付けを実施。
- 細胞集団間での発現差異を解析**  
任意の集団 vs 残りの集団あるいは、任意の集団 vs 別の集団、での発現を比較。特定の細胞集団について、サンプル間での発現変動比較も可能。

細胞表面タンパク質同定、レパトア解析でのクロノタイプ同定・遺伝子発現情報とのデータ統合、遺伝子発現 + ATACのマルチオーム解析にも対応。



## アゼンタの特長と強み

- 米国ラボでは2016年から、日本では2018年から、10x Genomics Chromium Controllerを用いた受託サービスを業界に先駆けて開始。実績豊富。
- 2022年、世界で3社、国内では唯一の10x Genomics グローバルCROプログラムに採択。
- 凍結送付のほか、弊社ラボへの直接持ち込み、お客様ラボでの出張解析に対応。凍結が困難な細胞でも安心。
- シークエンシング～データ解析まで国内ラボでの一貫したサービスを提供。
- ヒト全血からのPBMC調製、組織からの細胞分散など、ご要望に応じ、細胞調製からご対応。
- プロジェクトのご相談から納品後のサポートまでPh.D.レベルのスタッフが担当。

## ご提供中のシングルセル解析関連サービス



### 3' 遺伝子発現解析

10x Genomics Chromiumを用いた標準のシングルセル遺伝子発現解析。  
細胞表面タンパク質同定にも対応。



### 細胞表面タンパク質同定

BioLegendより提供のオリゴ付き抗体を用いることで、細胞ごとの表面タンパク質同定と遺伝子発現の同時解析を実現。発現量の少ないmRNAなどに対してクラスタリングを改善。



### ヒト全血からのPBMC調製

抗凝固剤入りの採血管で全血を提出。弊社でPBMC調製から実施。



### 免疫レパトア解析

### 5' 遺伝子発現 + TCR/BCR

TCR/BCRの多様性・特異性と同一細胞での遺伝子発現解析を実施。シングルセルでは、バルクRNA-Seqでは困難な、鎖ペアとアイソタイプの組み合わせも同定。ヒト・マウス対象。



### マルチオーム解析 New!

### 3' 遺伝子発現 + ATAC

近日サービス提供開始。同一核での遺伝子発現とオープンクロマチン領域を検出。



### 組織からの細胞分散 New!

GentleMACS (Miltenyi Biotech) と酵素法による組織からの細胞分散を実施。

## アゼンタで解析実施した生物種・組織の例



- PBMC (遺伝子発現解析のほか、細胞表面タンパク質同定、レパトア解析、全血からの調製)
- 各種リンパ球
- 胃がん組織
- iPS細胞
- 破骨細胞
- 線維芽細胞
- 神経細胞
- 肝細胞
- 脂肪組織 (抽出核)
- オルガノイド (肝臓、大腸上皮など)



- PBMC
- 脳由来のリンパ球
- 気管上皮細胞
- 生殖巣
- 神経節
- 腫瘍微小環境
- 腸内免疫細胞
- 胎児肺
- 皮下組織

その他生物種：マーモセット、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、カイコ、ホタテガイ、カタユレイボヤ

処理条件等：FACSやEasySep (STEMCELL Technologies)、MACS Cell Separation (Miltenyi Biotech) により選択済みの細胞、GFP/tdTomatoなど外来配列を持つトランスジェニック個体、マウスジェノグラフトモデル

## 納品物に含まれるデータ



生データ (FASTQファイル)



解析結果の統計値を含む解析レポート

## 納品データのご説明、再解析にもご対応いたします。



Loupe Browserで解析をするためのファイルを含む、Cell Ranger出力データ



弊社作成の納品データ解説書。データ解析の流れ、Loupe Browserのチュートリアル、よくある質問集など。



**凍結で送付の場合**

- 分散済み凍結細胞：細胞数  $5 \times 10^6 \sim$  (最低  $1 \times 10^5$ 、ただし細胞数不足等のリスクあり)
- 生存率：80%以上 (凍結融解後の生存率。ご提出前の事前確認を強く推奨。)
- 細胞サイズ：直径  $\sim 40 \mu\text{m}$
- $30 \sim 40 \mu\text{m}$  のストレイナーによるフィルター処理。
- 細胞凝集、細胞片、粘性のないこと。
- 凍結は市販のセルバンカーあるいは細胞凍結溶液 (終濃度 10% DMSO、20% FBS を含む DMEM 等の培養液) を使用、緩慢冷却により凍結、凍結後は  $-80$  度以下で保管。
- 1~2 ml のクライオチューブを使用、推奨 2 チューブ (予備 1 本含む) を提出

※ 弊社への持ち込み、あるいは出張での実施をご希望の場合のガイドラインはお問い合わせください。  
 ※ 細胞表面タンパク質同定、ヒト全血からの PBMC 調製、組織からの細胞分散をご検討の場合はご相談ください。

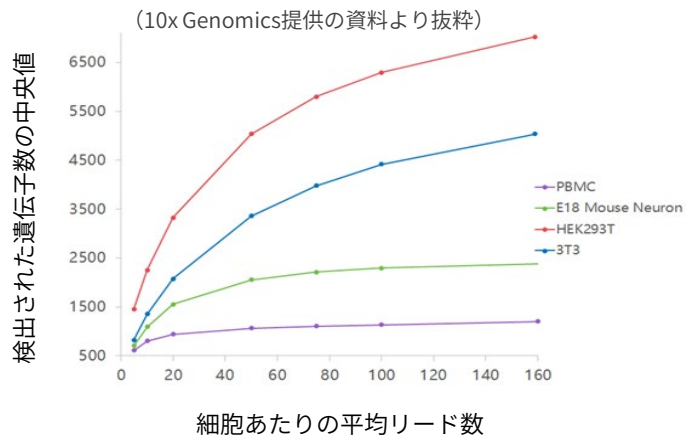
**解析対象細胞数とシーケンシングのリード数**

**解析対象細胞数**

- 解析対象細胞数の目安 (Chromium Chip の 1 ウェルあたり) : 1,000~10,000 の範囲でご希望に応じて指定。  
 ※ 解析対象細胞数は、細胞カウント・生存率など様々な要因により左右されるため、保証値ではなく、目安。
- 実際に Chip にロードする細胞数：解析対象細胞数の約 1.5~2 倍 (GEM への細胞補足率：約 65%)  
 解析対象細胞数 10,000 の場合、約 18,000 細胞を Chip にロード。
- 一つの GEM に二つ以上の細胞が取り込まれる確率：解析対象細胞数に応じて上昇  
 1,000 細胞  $\rightarrow$  0.8%    5,000 細胞  $\rightarrow$  4%    10,000 細胞  $\rightarrow$  8%

**細胞あたりの推奨リード数の基準**

- **25,000 ペアエンドリード**  
 PBMC など発現している遺伝子数が比較的少ない細胞種の場合
  - **50,000~ ペアエンドリード**  
 腫瘍など含まれる細胞種が多様、発現している遺伝子数が多いと推測される場合
- ※ 細胞あたりの推奨リード数は、目的、生物種、細胞種細胞あたりの RNA 量および発現遺伝子や細胞集団の多様性・均一性などに依存します。



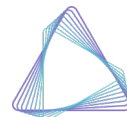
**仕様例と必要合計リード数の計算**

1. 3' 遺伝子発現、腫瘍組織由来の細胞  
 3,000 細胞対象、細胞あたり 100,000 ペアエンドリード
  2. 3' 遺伝子発現、ヒト PBMC  
 10,000 細胞対象、細胞あたり 30,000 ペアエンドリード
  3. 5' 遺伝子発現 + TCR および BCR (ライブラリプール比 8:1:1)、腫瘍組織由来の細胞  
 3,000 細胞対象、細胞あたり、遺伝子発現 80,000 リード、TCR/BCR 各 10,000 リード
  4. 3' 遺伝子発現 + 細胞表面タンパク質同定 (ライブラリプール比 4:1)、ヒト PBMC  
 10,000 細胞対象、細胞あたり、遺伝子発現 24,000 リード、タンパク質 6,000~ リード
- 『解析対象細胞数』 × 『細胞あたりのリード数』 = 『サンプルあたりの合計リード数』  
 仕様例 1 の場合、 $3,000 \times 100,000 = 3$  億ペアエンドリード

**シーケンシングプラットフォームとレーンあたりのデータ出力**

- MGI tech DNBSEQ-G400            3.5 億ペアエンドリード
- Illumina HiSeq                    3.5 億ペアエンドリード
- Illumina NovaSeq 6000 S4        26 億ペアエンドリード

※ リード数は弊社実績に基づきます。実際のリード数はライブラリの品質などに影響を受けるため、保証値ではなく、目安となります。



## 3' 遺伝子発現解析

NeuroD1 Dictates Tumor Cell Differentiation in Medulloblastoma.  
Cheng Y, et al., Cell Rep. 2020 Jun 23;31(12):107782. PMID: 32579914.

\* Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution.  
Tsukasaki M, et al., Nat Metab. 2020 Dec;2(12):1382-1390. PMID: 33288951.

Single-cell RNA sequencing reveals differential cell cycle activity in key cell populations during nephrogenesis.  
Bais AS, et al., Sci Rep. 2021 Nov 17;11(1):22434. PMID: 34789782.

Role of HRTPT in kidney proximal epithelial cell regeneration: Integrative differential expression and pathway analyses using microarray and scRNA-seq.  
Shrestha S, et al., J Cell Mol Med. 2021 Nov;25(22):10466-10479. PMID: 34626063.

## 3' 遺伝子発現解析 + 細胞表面タンパク質同定

\* Circulation of gut-preactivated naïve CD8+ T cells enhances antitumor immunity in B cell-defective mice.  
Akrami M, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Sep 22;117(38):23674-23683. PMID: 32907933.

## 5' 遺伝子発現解析 + レパトア解析

\* Features of repertoire diversity and gene expression in human cytotoxic T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation.  
Nakasone H, et al., Commun Biol. 2021 Oct 11;4(1):1177. PMID: 34635773.

## よくあるご質問

オンラインでの技術相談も承っております。お気軽にご相談ください。

## Q1. 生物種や細胞の種類の種類はありますか？

リファレンス配列およびアノテーションが利用できれば基本的にどの生物種でも対応可能です（レパトア解析は、ヒト・マウスのみ対応）。ただし、細胞壁のある植物等では、あらかじめ細胞壁を除いた細胞をご提出いただく必要があります。また、マイクロ流路の仕様上、脂肪細胞等サイズの大きい細胞にはご対応できません（細胞直径~40 μm程度まで）。

## Q2. 細胞数のカウント、生存率の確認はどのように行えば良いでしょうか？

トリパンブルーによる死細胞の染色、血球計算盤と顕微鏡による直接確認を標準にしています。Countess等のオートカウンターの使用も可能ですが、細胞サイズや染色状態により誤差が見られることがあります。FACSによるカウントは、一般に、過剰に見積もる傾向があるため、推奨されません。

## Q3. 細胞を凍結、融解したら生存率がガイドラインを満たしていませんでした。どうすれば良いですか？

凍結前の生存率、適切な操作で凍結が行われているかをご確認ください。生存率が低い場合、死細胞由来の遊離のRNA・デブリによるバックグラウンドの上昇等のリスクがあります。低速遠心あるいは市販のキット（Miltenyi Dead Cell Removal Kitなど）により、最終的な生存率が改善できることがあります。凍結でご提出の場合には、事前にご相談の上、低速遠心・キットによる死細胞除去を試みます。ただし、回収される細胞へのバイアスや細胞のロスを生じる恐れがあります。凍結が困難な細胞種の場合には、弊社への直接持ち込み、あるいは出張実施でのご依頼も可能です。

## Q4. 細胞ではなく、核をインプットに使用できますか？

核の調製方法については以下のリンクをご参照ください。なお、シングルセル遺伝子発現解析とシングルセルATACを目的にした場合とで方法が異なります。ご注意ください。洗浄懸濁溶液にRNaseフリーのBSAを用いること、溶解条件が適切であること、核が正しい形態を保っているか顕微鏡観察で確認することが重要とされています。

<https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/sections/360009922192-Sample-Prep-Nuclei>

## Q5. 外来遺伝子を導入した個体で実験しました。外来遺伝子の発現も検出できますか？

poly-AをもつmRNAとして発現されていれば検出可能です。注意点として、3' 遺伝子発現ではmRNAの3' 端に近い部分を、5' 遺伝子発現ではmRNAの5' 端に近い部分を読むため、非翻訳領域（UTR）を含む完全な配列情報をご提供いただく必要があります。エクソン領域のみですと、UTRが長い場合、検出感度が落ちるあるいは検出できない可能性があります。

## Q6. 複数サンプル間で比較することは可能ですか？また、以前に実施した結果と比較することは可能ですか？

データ解析の際、比較対象のサンプルを統合（aggregation）することでサンプル間の比較が可能です。以前の結果とのaggregationも可能です。ただし、リファレンス・ゲノムビルドが異なる場合、フィーチャーリファレンス（細胞表面タンパク質同定やCell Hashingで使用されるオリゴ付き抗体のバーコード情報）が異なる場合は、aggregationできません。データ解析のやり直しが必要になります。

©2022 Azenta Life Sciences, Inc. 本サービスは研究用のみに使用できます。診断目的に使用することはできません。当印刷物に記載されている会社名および商品名などは、各社の商標または登録商標です。本印刷物記載の内容は2022年7月現在のものです。



アゼンタ株式会社（旧社名 日本ジーンウィズ株式会社）  
〒142-0043 東京都品川区二葉二丁目9番15号 NFパークビルディング 4F  
電話：03-6628-2950 FAX：03-6628-2951 メール：sales.japan@azenta.com

代理店・取扱店記入欄