

幹細胞の不均一性を 一細胞リアルタイム PCRで解明



中川 俊徳 先生

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構
基礎生物学研究所 生殖細胞研究部門

先生のご研究内容を教えてください。

私は哺乳類の組織が、いかにして保たれるのかということに興味があり、その問いに対し細胞および遺伝子レベルの解析を行うことで明らかにしようと試みています。特に精子幹細胞に焦点を当て、遺伝子発現の不均一性と幹細胞機能との関係を明らかにしたいと思っています。

Fluidigm の製品をどのように使われていますか？

私の研究では、精子幹細胞集団の不均一性を明らかにし、亜集団に分類することが最重要となります。そこで、FACS で回収した未分化な細胞を、C1 System で単一細胞に分け、逆転写して、その後 Biomark HD System を用いて、限られた遺伝子ではあるのですが、それらの発現を qRT-PCR にて発現量を正確に調べています。

Fluidigm 製品を選択された理由は？ どんなところに利点や魅力がありますか？

幹細胞の不均一性を調べる上で、正確に遺伝子発現を定量でき、かつ検出感度が高いシステムが必須だと考えました。おそらく幹細胞は不均一だと言っても、特定の遺伝子の発現が数倍違う程度だろうと予想したからです。しかも発現がそれほど高くない遺伝子が重要かもしれないわけです。実際に使用してみて、申し分のない性能でした。しかも、実験間の再現性についても満足のいくものでした。

今後の研究ビジョンを教えてください。

遺伝子発現の情報と、その他の情報を組み合わせることをしたいと考えています。つまり、幹細胞の機能や状態、リアルな時間軸の情報、細胞の位置情報をリンクさせることが次の課題であると考えています。精子幹細胞や精子形成の特性を利用して、これらの問題に挑戦できるのではと考えています。

同分野の研究者へのアドバイスをお願いします。

Drop-Seq など大まかに組織の細胞を調べるような、いわば「森を見る研究」は海外で盛んに行われています。個人的には、日本人は C1 System などを使った「徹底的に木を見る研究」の方が合っているような気がしています。私のような若輩者がアドバイスとはおこがましいのですが、森も意識しつつ、マニアックに木を見る研究が、大きな発見につながるのではと思います。

CUSTOMER FOCUS | October 2019

アプリケーション

一細胞リアルタイム PCR

フリューダイトテクノロジー

C1™ System

Biomark HD™ System

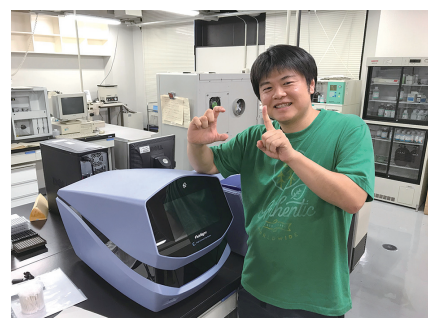


Figure 1. 中川先生と C1 System



Figure 2. 中川先生と Biomark HD System

Workflows

1 細胞高並列リアルタイム PCR

今回の中川先生の研究では、マウスの精巣を酵素処理によって単一細胞に分散し、FACS によって未分化型精原細胞を回収しています。その細胞懸濁液を C1 System で IFC の流路に流して最大 96 細胞を単離し、そのまま流路内で細胞の溶解から cDNA 合成までを自動で行い、得られた cDNA サンプルをすぐに Biomark HD System を使用して一細胞リアルタイム PCR に使用しています。1 回のランで 96 サンプル× 96 遺伝子のリアルタイム PCR 反応が可能で、トータル 2 日間で一細胞遺伝子発現解析の結果を得ることができます。アッセイについて、幹細胞の不均一性を捉えるため、今回、NGS とマイクロアレイの解析から分化状態などに関与する可能性のある 95 遺伝子を選定し、解析を行っています。

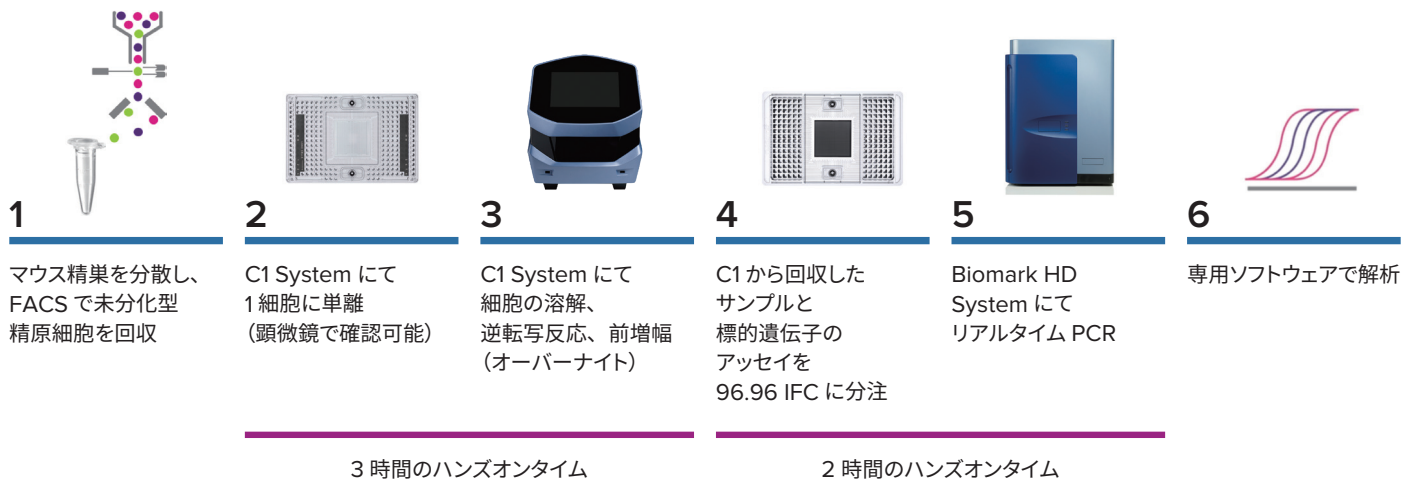


Figure 1. C1 System と Biomark HD System を使用したリアルタイム PCR による発現解析のワークフロー

C1 System によりシングルセルの単離が行われ、96 細胞× 96 種の領域についての発現解析は、Biomark HD System で実施します。

Biomark HD System

マイクロフリューディクス技術によりナノリットアスケールで、多検体を一度に解析可能で、リアルタイム PCR、SNP ジェノタイピング、デジタル PCR のアプリケーションを可能にした装置です。

製品名	製品コード
Biomark HD System	BMKHD-BMKHD

C1 System

マイクロフリューディクス技術によって最大 800 個の細胞の単離から、ナノリットアスケールで細胞の溶解、増幅、反応産物の回収までの反応を自動で行うシステムです。得られた反応産物は、Biomark HD System を用いた遺伝子の発現解析や RNA/DNA シーケンス、エピゲノム解析など、様々なシングルセル解析に用いることが可能です。

製品名	製品コード
C1 System	100-7000

Learn more at fluidigm.com/biomark
fluidigm.com/products/c1-system

References

- Nakagawa T, et al. "Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment." *Science* 328 (2010): 62-67.
- Nakagawa T, et al. "Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis." *Dev. Cell* 12 (2007):195-206.
- Klein AM, et al. 2010. "Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover." *Cell Stem Cell* 7 (2010): 214-224.
- Hara K, et al. 2014. "Mouse Spermatogenic Stem Cells Continually Interconvert between Equipotent Singly Isolated and Syncytial States." *Cell Stem Cell* 14 (2014): 658-672.
- Kitadate Y, et al. 2019. "Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche." *Cell Stem Cell* 24 (2019): 79-92.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Information in this publication is subject to change without notice. **Patent and license information:** fluidigm.com/legalnotices. Fluidigm, the Fluidigm logo, Biomark, D3, Dynamic Array, C1 and Juno are trademarks and/or registered trademarks of Fluidigm Corporation in the United States and/or other countries. All other trademarks are the sole property of their respective owners. © 2019 Fluidigm Corporation. All rights reserved. 09/2019