



## アプリケーションノート

# サイトカイン発現のためのRNA FISHの単一細胞解析

### 背景

一部の細胞タイプは著しい異質性を示し、qPCRなどの技術で遺伝子発現を分析する場合、解像度が制限されることがあります。近年、単一分子RNA FISHの開発により、単一細胞レベルでのRNA発現の検出が可能になりましたが、従来の共焦点イメージングでは、細胞集団のより小さなサブセットを調査するにはスループットが不十分です。RNA FISH技術は、免疫蛍光法によってタンパク質レベルで染色することが難しいターゲットの発現を視覚化する機会も提供します。

Hermesハイコンテンツ広視野顕微鏡は、単一細胞レベルで細胞内特徴を調査すると同時に、大きなサンプルサイズで作業する機能を提供します。この技術は、自動計算分析を必要とする大量の画像を生成します。個々の細胞ごとの特徴を定量化することで、細胞生物学に関する新たな洞察が得られます。

このアプリケーションノートでは、WiScan® Hermesハイコンテンツ顕微鏡を使用して、異なる細胞間で遺伝子発現に大きなばらつきを示す初代ヒト単球由来マクロファージによる刺激に対する免疫応答を調査しました。

### 材料と手法

7日目のヒト単球由来マクロファージ (MDM) を、先天性免疫アゴニストのザイモサン、LPS、またはポリ I:C で4時間刺激し、固定しました (図 1)。ViewRNA FISHキット (Thermo Fisher) を使用して、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- $\alpha$ ) とインターロイキン-10 (IL-10) mRNA を、それぞれ炎症誘発性および調節性シグナル伝達のマーカーとして染色しました。細胞は、Hermes Wiscan® (IDEA Bio-Medical) ハイコンテンツ顕微鏡を使用して画像化した後、Metamorph 7 (Molecular devices) およびRを使用して定量化しました。

個々の細胞におけるRNA発現は、個々のスポットをカウントするには高すぎる場合が多かったため、各細胞の核を囲む領域で平均蛍光強度 (MFI) を評価しました (図 2)。これにより、二次細胞マスクや個々のスポットのセグメンテーションを必要とせずに、RNA発現の代表的なサンプルが得られました。

In recent years the development of single molecule RNA FISH has enabled the detection of RNA expression at the single cell level, however traditional confocal imaging lacks sufficient throughput to investigate smaller subsets of cell populations. WiScan® Hermes High content wide field microscope offers the ability to work with large sample sizes while investigating subcellular features at the single cell level.

単球由来マクロファージは個々の細胞間で大きな異質性を示すため、集団全体を評価するために、各条件について少なくとも 5,000 個の細胞が分析されました。

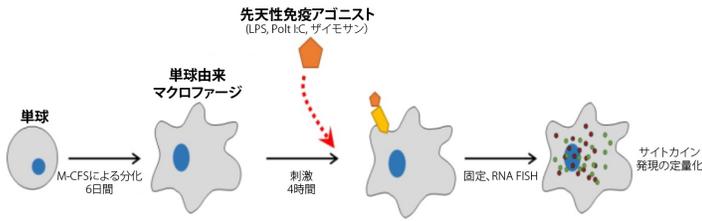


図 1 - 実験の概要

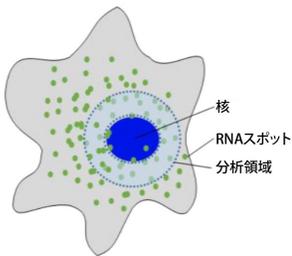


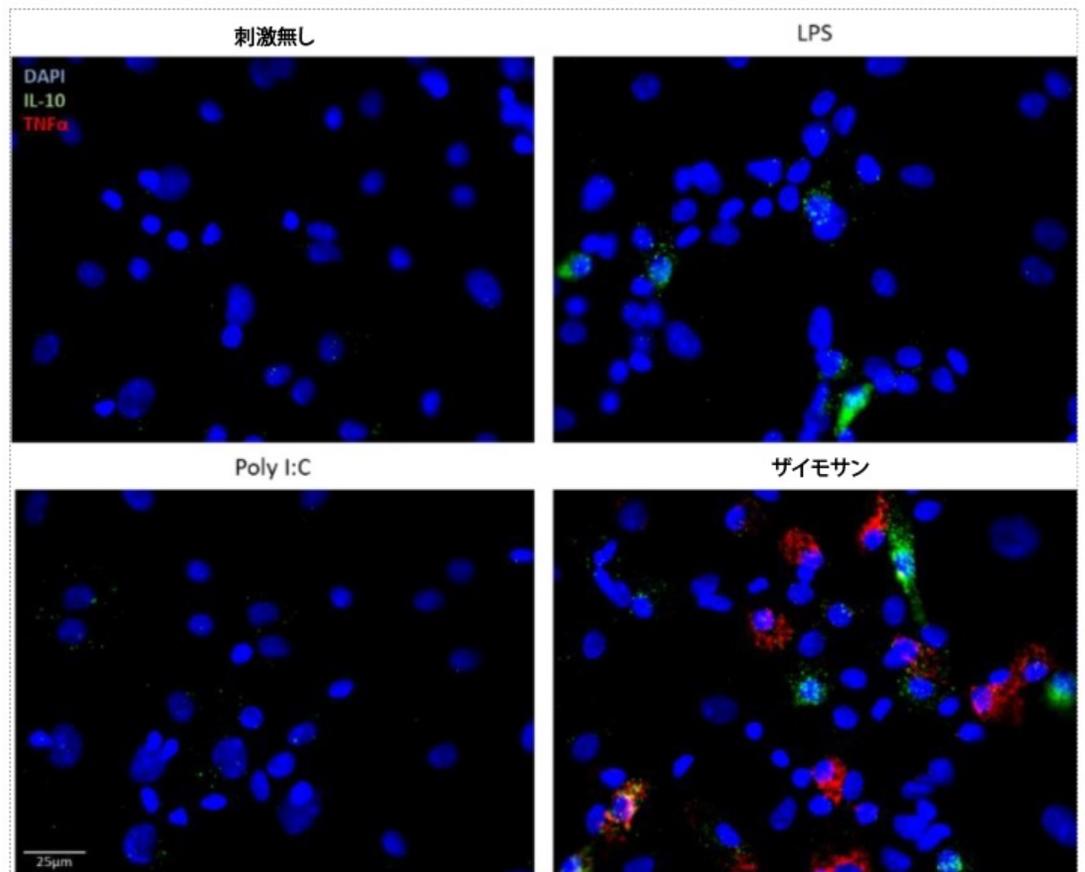
図 2 - 画像解析戦略。各核の周囲にリング状の対象領域が生成されました。各領域内の平均蛍光強度が各RNA染色ごとに決定されました。

## 結果

Hermes システムは11分で1116枚の画像のスキャンを完了したため (12 個のウェルのそれぞれで20倍の倍率、フィールドあたり3つの蛍光チャンネルで31枚の画像をキャプチャ)、分析に十分なサンプル サイズが迅速かつ容易に提供されました。MDMは刺激がない場合、IL-10およびTNF mRNAのコピーをほとんど発現しませんでした。サイトカインの反応は、与えられた刺激によって大きく異なりました。個々の細胞間で発現レベルにかなりのばらつきがありました (図 3)。

各細胞のRNA染色を定量すると、多くの細胞がIL-10もTNF- $\alpha$ も発現していない一方で、一部の細胞が大量のサイトカインRNAを産生していることが明らかになりました (図 4)。これは刺激によって異なり、Poly I:C は弱いTNF- $\alpha$  応答を産生し、IL-10は最小限でしたが、LPSとザイモサンは両方の発現を誘導しました。ザイモサンはLPSよりも大幅に多くのTNF- $\alpha$ を誘導しましたが、LPSはより多くのIL-10誘導を引き起こしました。これらの違いは、各リガンドに対する応答を生成する異なるパターン認識受容体 (LPSの場合はTLR4、ザイモサンの場合はTLR2/Dectin-1、Poly I:Cの場合はTLR3) を反映している可能性があります、発現は用量依存的である可能性もあります。

図 3 - 先天性免疫アゴニストで刺激されたマクロファージの RNA FISH (20 倍の倍率)用 Hermes自動広視野顕微鏡の代表的な画像。核はDAPI (青) で染色され、IL-10 (緑) と TNF- $\alpha$  (赤) はViewRNA FISHで染色されました。



また、各細胞内で2つのサイトカインの発現を直接比較することも可能でした(図5)。これにより、IL-10単独ではなく、TNF- $\alpha$ とIL-10の両方が発現する傾向が明らかになりました。これは、炎症反応の一部として発現される免疫調節性サイトカインとしてのIL-10の役割を反映している可能性があります。

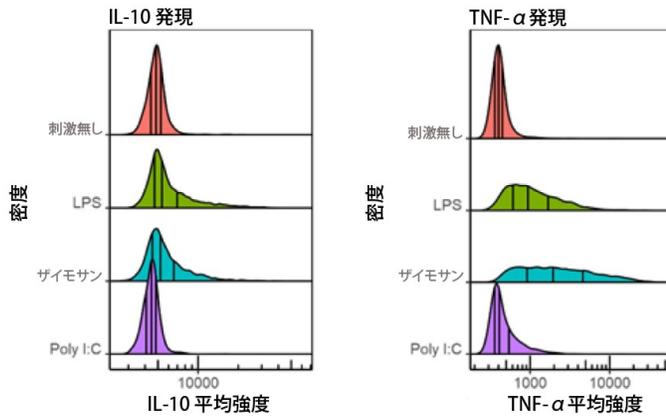


図4 - 単一細胞レベルでのIL-10およびTNFの染色の定量化。密度は、特定のMFIを持つ細胞の割合を表します。

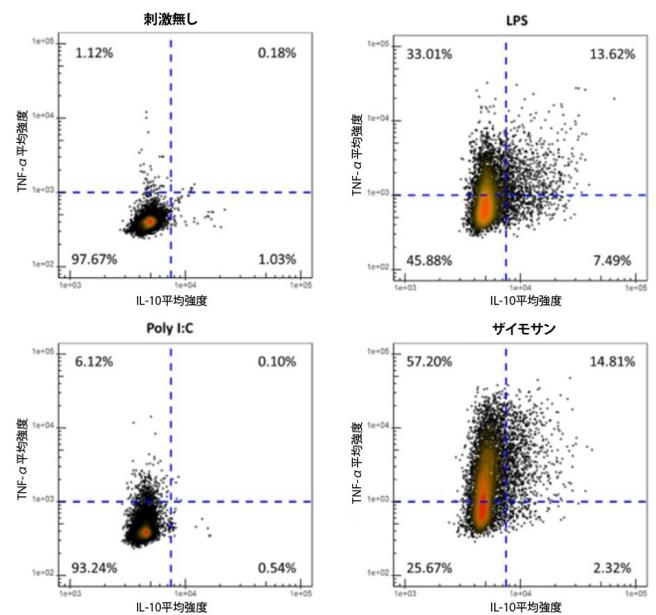


図5 - TNF RNAに対するIL-10 RNAの発現の散布図/密度プロット。プロットの各セグメント内のイベントのパーセンテージが示されています。

## 結論

HermesシステムはRNA FISH染色のハイスループット画像化が可能で、単一細胞レベルでのサイトカイン発現の定量化が可能でした。サイトカイン反応は刺激によって異なり、IL-10とTNFの共発現の傾向が見られました。今後の研究では、刺激量が炎症性サイトカインと調節性サイトカインのシグナル伝達のバランスに与える影響を評価すること、およびアッセイを拡張して追加のマーカーを染色することに重点を置く必要があります。

データ提供: David Stirling 氏と Matthew Solomons 氏 (Noursadeghi 研究室、感染免疫部門、ロンドン大学ユニバーシティ カレッジ)。

詳細については、[www.idea-bio.com](http://www.idea-bio.com)をご覧ください。

IDEA Bio-Medical LTD.

2 Professor Bergman St., Rabin Science Park, Rehovot 76705, Israel

Tel: 972-732-732-500 Fax: 972-8-9469556

info@idea-bio.com; www.idea-bio.com