

# 2022年度 iSAL 全体利用説明会

## 医学研究支援センター 先端バイオメディシン解析技術室について

2022年6月8日

京都大学



# 先端バイオメディシン解析技術室

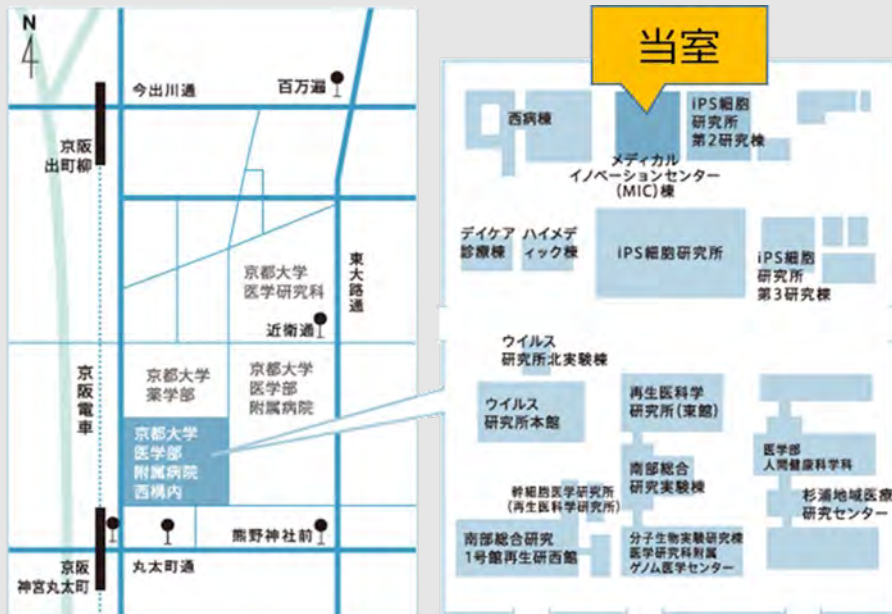
- 医学研究支援センターの分室として2021年に開室（室長：服部雅一特定教授）
- オープンイノベーション促進のための研究施設である医学研究科のメディカルイノベーションセンター内に設置された最先端のシングルセル解析機器を備えた共用機器室
- BSL2対応で、附属病院にアクセスしやすいロケーションのため、迅速処理の必要な患者由来検体にも対応可
- インフォマティックスの導入教育セミナー等学内外のアカデミア及び企業の研究者への教育プログラムを提供（芝蘭会/KUMBL※が支援）
- リバーstransレーショナルリサーチによる創薬研究を目指した産学での共同研究の実施をKUMBLのアライアンスマネージャーが支援

※「医学領域」産学連携推進機構



# 当室の場所及び当室で管理運用する機器

京都市左京区聖護院川原町53  
 メディカルイノベーションセンター 2階及び5階



| ユニット                              | 機器名称  | 設備                                       |
|-----------------------------------|---|--|
| Single Cell Seq<br>ユニット<br>(2・5階) | 10xGenomics<br>Chromium Controller                        | シングルセル解析装置                               |
|                                   | テカンジャパン<br>Fluent® ラボラトリーオートメーション<br>ソリューション (Fluent 780) | NGSライブラリー自動化システム<br>細胞自動試薬分注・遺伝子増幅<br>装置 |
|                                   | サーモフィッシャー<br>QuantStudio 6 リアルタイムPCR                      | qPCR装置                                   |
| Imaging<br>ユニット (2階)              | Agilent2100 バイオアナライザ                                      | 電気泳動装置                                   |
|                                   | オリンパス<br>FLUOVIEW FV3000                                  | 共焦点レーザー顕微鏡                               |
|                                   | 浜松ホトニクス<br>NanoZoomer S60                                 | バーチャルスライドスキャナ装置                          |
| FACS/CyTOF<br>ユニット (5階)           | BDセルソーター<br>FACSAria Fusion                               | 自動細胞解析分取装置                               |
|                                   | FRUIDIGM<br>Helios, a CyTOF System                        | 細胞機能解析装置                                 |
|                                   | FRUIDIGM<br>Hyperion Imaging System                       | 細胞機能解析イメージング装置                           |

連絡先メールアドレス : [mic\\_biomedicine@support-center.med.kyoto-u.ac.jp](mailto:mic_biomedicine@support-center.med.kyoto-u.ac.jp)



# セルソーター FACSAria Fusion

— 研究者を危険なサンプルの曝露から守る —

安全キャビネット付  
(ClassII TypeA2)



BSL2レベルサンプルの解析が可能  
例) インフルエンザウイルス感染患者リンパ球

5レーザー搭載



20パラメーターによる解析・ソーティングが可能  
(18カラー+FSC, SSC)

高速解析  
ソーティング能力



解析スピード : 70,000 events/sec  
ソーティングスピード : 30,000 events/sec

マルチウェルプレートインデックスソーティング機能



6, 24, 96, 384 ウェルプレートへの直接ソーティングが可能

V. ソーティング回収細胞の温度コントロールが可能



生存率の向上, 機能維持

| 搭載レーザー | 色素名         | カラー数 |   |
|--------|-------------|------|---|
| 488 nm | FITC        | 1    |   |
|        | Alexa488    |      |   |
|        | BB515       |      |   |
|        | PerCP       | 2    |   |
|        | 7-AAD(Blue) |      |   |
|        | PerCP-Cy5.5 |      |   |
| 640 nm | BB700       | 3    |   |
|        | APC         |      |   |
|        | Alexa647    |      |   |
|        | Alexa700    |      | 4 |
|        | Red718      |      |   |
| 405 nm | APC-H7      | 5    |   |
|        | APC-Cy7     |      |   |
|        | BV421       | 6    |   |
|        | BV510       | 7    |   |
|        | BV605       | 8    |   |
| 561 nm | BV650       | 9    |   |
|        | BV711       | 10   |   |
|        | BV786       | 11   |   |
|        | PE          | 12   |   |
|        | PE-CF594    | 13   |   |
|        | PE-Cy5      | 14   |   |
|        | PE-Cy5.5    |      |   |
| 355 nm | 7-AAD(YG)   | 14   |   |
|        | PE-Cy7      |      |   |
|        | BUV395      | 16   |   |
|        | BUV737      | 17   |   |
|        | BUV805      | 18   |   |

# セルソーター FACSAria Fusion ご利用にあたっての注意点



- BDによるFusionの講習（有償）を受講いただく必要があります（基本的に随時申込を解析技術室までお願いします）。
- 但し、Ariaの講習既受講者は、解析技術室が提供する簡易講習（動画視聴と説明書の確認、無償）を受講いただければFusionの使用が可能です。

**Fusionのご希望の研究者は解析技術室にご連絡ください。**

# バーチャルスライドスキャナ NanoZoomer S60

一般的な顕微鏡は見ている視野しか撮影（画像化）できず  
標本全体を画像化するためには視野をずらして画像を合成する必要あり

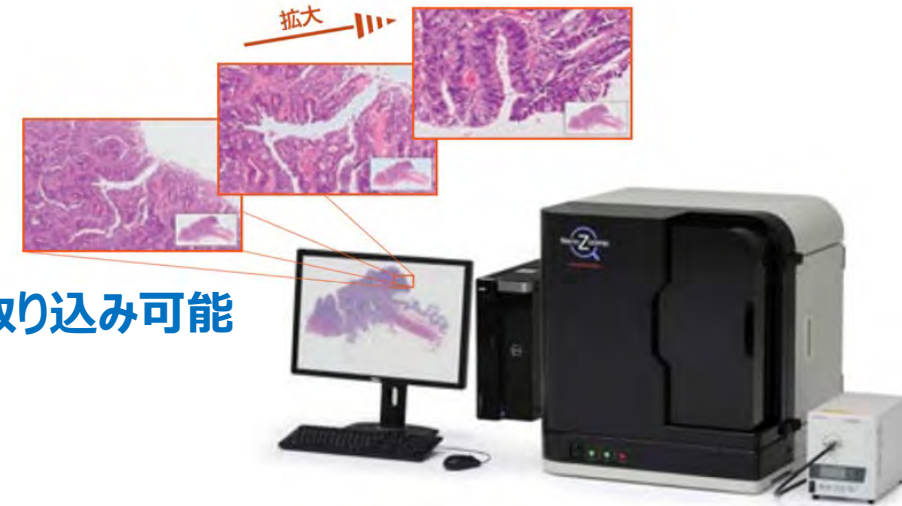


## スライドスキャナ

スライド全面を高精細画像データに→最大100億画素以上、微細な構造まで取り込み可能  
(高速でスキャンし、高解像度なデジタルデータに変換)

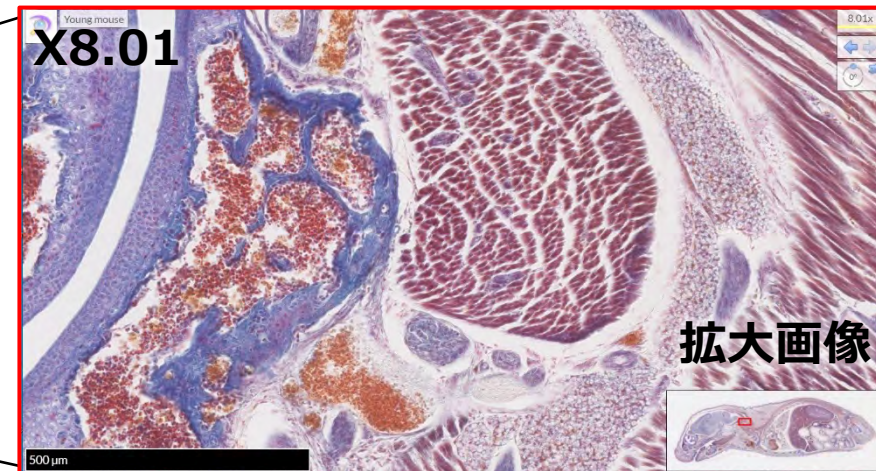
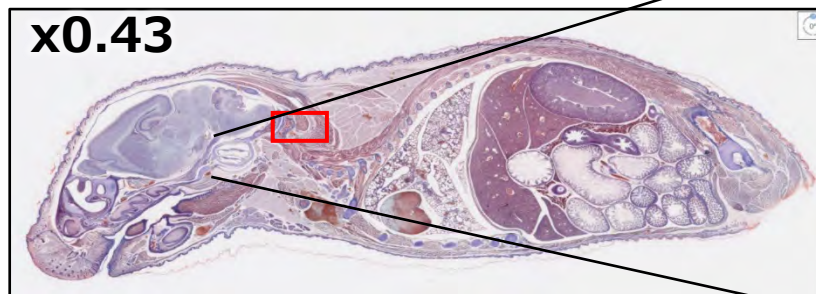
- ✓ PC上で顕微鏡同様の拡大縮小移動等の操作が可能
- ✓ 同時表示機能により、複数のスライドを一つの画面で確認・比較することが可能
- ✓ コピーや管理、記録が容易になり、ネットワークを介した利用も可能

多大な労力が必要



**HAMAMATSU**  
PHOTON IS OUR BUSINESS

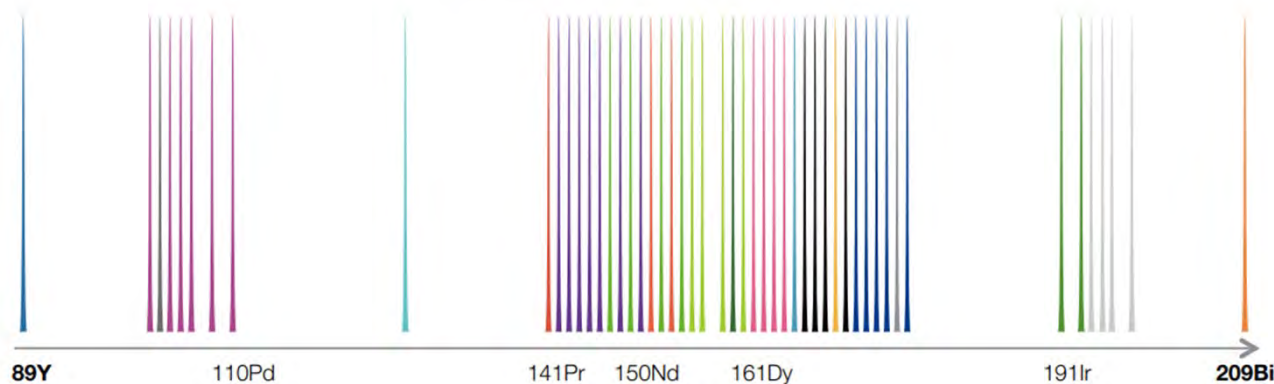
## Young Mouse



# マスサイトメーター Helios™ a CyTOF System

- ✓ 細胞を1細胞レベルで高速に解析をするフローサイトメトリーと、元素の質量に基づいて物質を高次元、高分解能で解析できるICP-TOF-MSを融合した『マスサイトメトリー』の技術を応用
- ✓ 検出は、金属元素の安定同位体が標識された抗体を使用。金属元素の安定同位体による検出は各々の同位体に固有の離散値で、シャープなピークとして検出。
- ✓ そのため30種類以上のパラメーターを超える抗体を同時に測定する場合であっても『コンペンセーション』不要

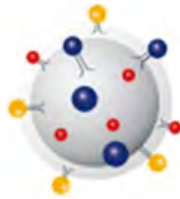
金属安定同位体のスペクトル



# マスサイトメーター Helios™ a CvTOF System

## Helios™ の技術

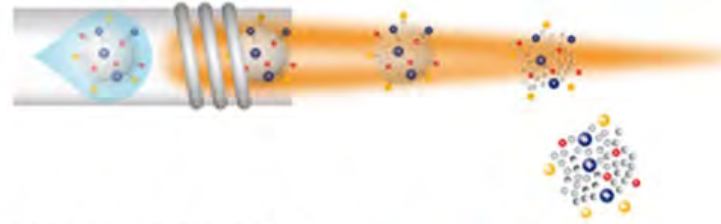
1 - 金属標識抗体で細胞染色



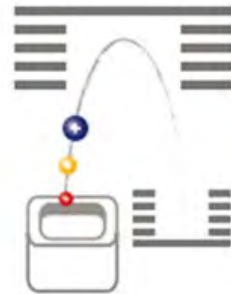
2 - 噴霧 (エアロソル化)



3 - ICP (誘導結合プラズマ) で細胞をイオン化



純度99.999%のアルゴンガスを6000°Cで燃焼することにより誘導結合プラズマ (ICP) を発生



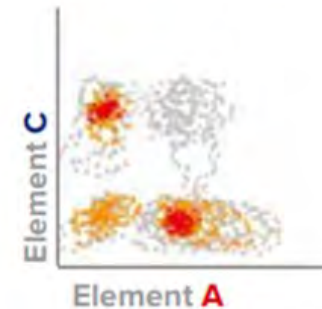
4 - 四重極型イオンフィルターによるクリーニング



6 - 一細胞ごとにデータ統合、FCS ファイルを作成

|        | Element |   |   |   |   |
|--------|---------|---|---|---|---|
|        | A       | B | C | D | E |
| Cell 1 | 7       | 3 | 5 | 5 | 4 |
| Cell 2 | 1       | 6 | 3 | 5 | 3 |
| Cell 3 | 2       | 4 | 5 | 7 | 9 |
| Cell 4 | 3       | 2 | 6 | 7 | 8 |
| Cell 5 | 1       | 5 | 2 | 1 | 7 |

7 - データ解析



5 - TOF - MS による質量解析



金属で標識した細胞をICPにより燃焼し、1細胞単位でイオン化



# マスサイトメーター Helios™ a CyTOF System

## ● 金属安定同位体をラベリングした抗体により細胞を染色

- 金属安定同位体は、シグナルのオーバーラップがなく、細胞内在性成分による自家蛍光の影響を受けないため、**細胞表面と細胞内タンパクを40種類以上のパラメーターで解析可能。細胞内シグナル伝達系の可視化も可能。**
- パラジウムやカドミウムでバーコーディングすると**最大35 sampleを同時解析可能**（実験者の技術的なノイズを取り除き、より精度の高い解析ができる）。

## ● 一サンプルあたりの測定時間（目安）

- 1.0 x 10<sup>6</sup> 細胞あたり30分から1時間程度が目安（0.5-1.0 x 10<sup>6</sup> 細胞 / mLに希釈し30μL/minで流した場合）

## ● 800種類以上のヒト・マウスなど標識抗体やパネルが市販。

## ● 自前の抗体への金属安定同位体標識もラベリングキットで可能

# FLUIDIGM® マスサイトメーター Helios™ a CyTOF System

※FACS経験者になじみやすいシステム

コンペンセーションは不要

データは FCS File として出力  
Dot Plots や Histogram  
等のデータ解析に加え、  
Cytobank を用いた多変量  
データ解析 が可能



1, 抗体の選択  
パネル、または適切な複数の  
抗体を選んで混合（抗体の  
値段設定はフローサイトメ  
トリと同程度）

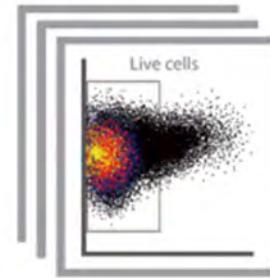


2, 染色  
Fluidigm社で検証され  
たプロトコルとバッファーを  
使用して細胞を染色

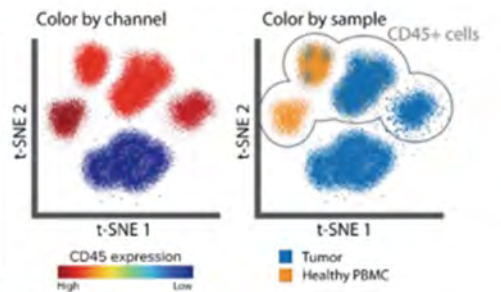


3, 検出  
Heliosマスサイトメーター  
による数十～数百万個  
の細胞の複数のパラメ  
ータでのデータを産出

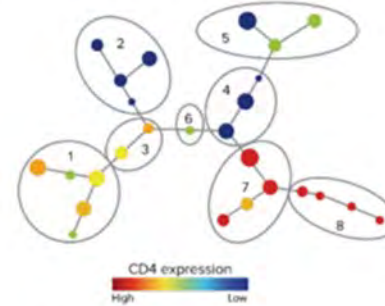
a. Biaxial gating



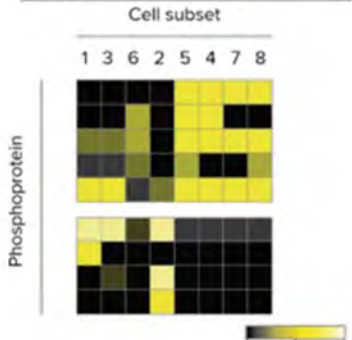
b. viSNE analysis



c. SPADE



d. Heat maps

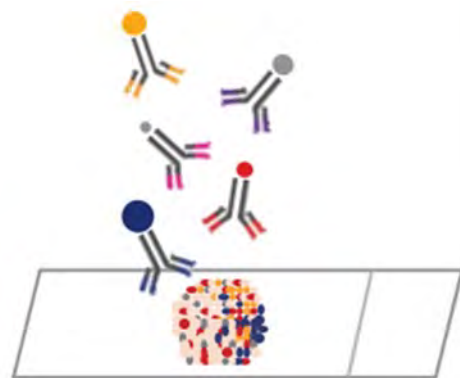


4, 解析  
実績のある解析ツールを使ってデータを解析

- ◆ FFPE（ホルマリン固定パラフィン包埋）組織切片、凍結組織切片を用いて、1マイクロメートルの高解像度で解析が可能
- ◆ 金属安定同位体がラベリングされた抗体を用いることで自家蛍光の影響を受けずに37マーカまでを一度に高精度解析
- ◆ 多様な解析ソフトに対応



1, 実験デザイン  
金属標識抗体（最大37個）を用いて実験パネルをデザイン

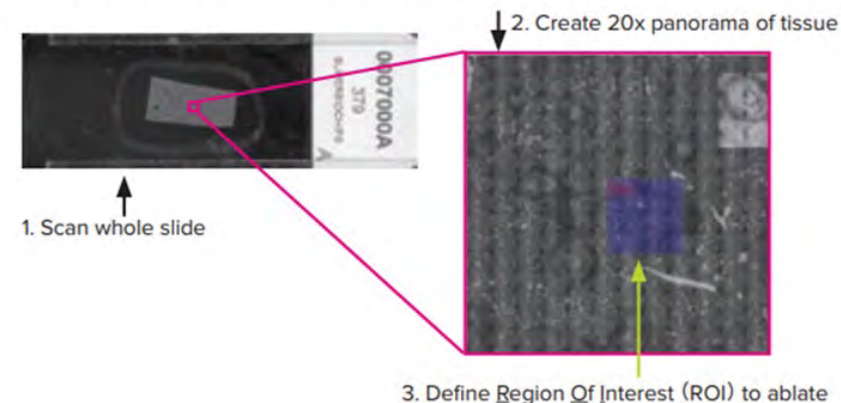


2, 染色  
組織切片（FFPE or 凍結）または固定した細胞の金属標識抗体での染色（蛍光免疫染色と基本的には同じ染色法）



3, 検出  
スライド標本をセット後、UVレーザーが1 μmの精度で組織を切り出し、Heliosにより金属を検出

Selection of regions of interest (ROI) to ablate



# Hyperion™ Imaging System

## イメージングマスサイトメーター

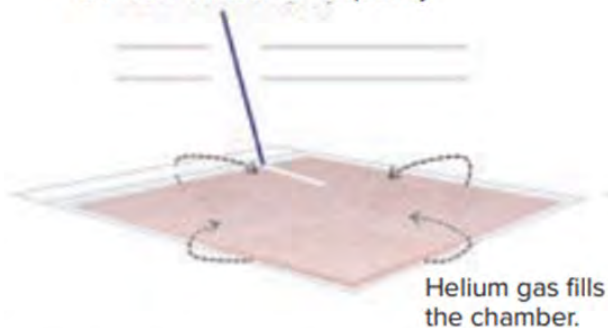
- 最大で1.5mmx1.5mmの面積の切片が撮影可能（正方形である必要はない）  
（この場合の撮影時間は約 3 時間、切片の厚み3～ 4 μm、レーザーの強度は2～4）
  - 撮影が3時間以内の面積のROIでは、撮影を望む部位を複数個設定することで0/Nでの撮影も可能
  - 金属で標識するため、染色とHyperionの解析に時間が空いても問題ない
- ※医学研究科附属総合解剖センターにて切片の準備及び染色のサポートをいただけます

### 検出の原理

Tissue imager にスライドをセットすると、UV laser が 1 μm の精度で組織を ablation し、CyTOF の技術を用いて金属を検出します。

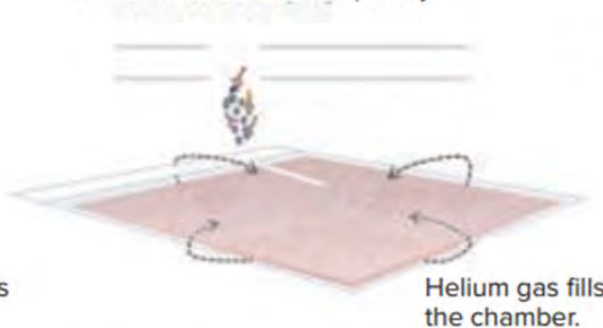
**UV laser ablates tissue 1 μm<sup>2</sup> at a time**

UV laser at 200 Hz frequency



Motorized stage in sample ablation chamber

UV laser at 200 Hz frequency



Motorized stage in sample ablation chamber

**Ablated sample is lifted by helium gas and introduced into Helios™**

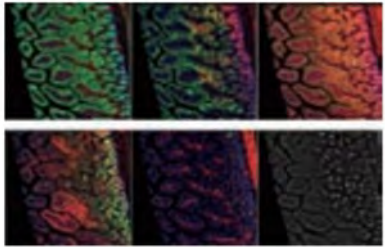
Argon gas flow →



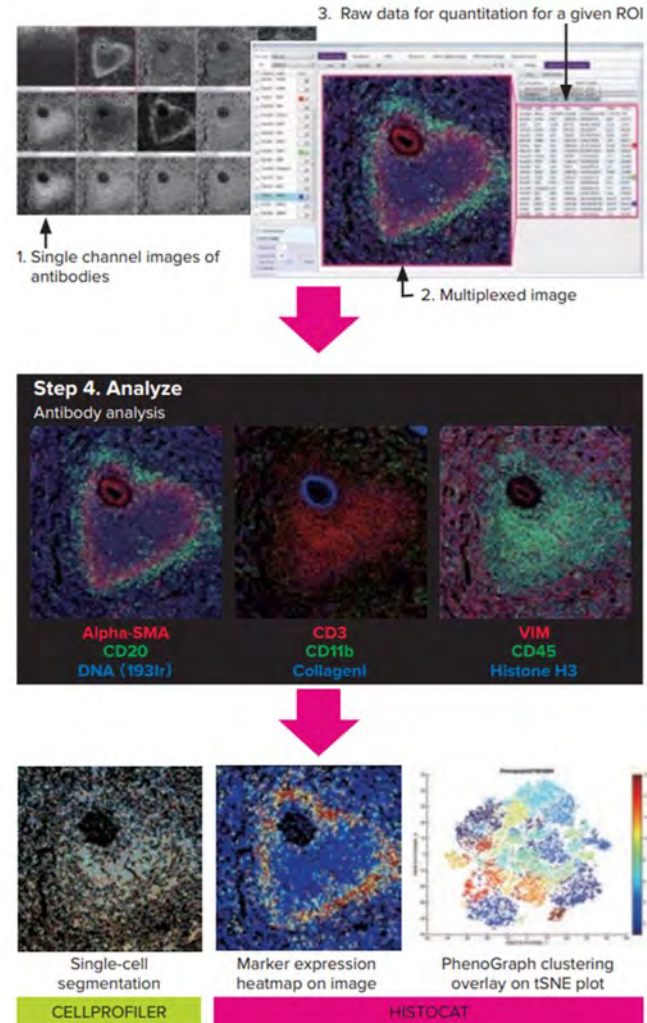
Motorized stage in sample ablation chamber

# Hyperion™ Imaging System

## イメージングマスマイター



4, 解析  
様々なイメージング  
ソフトに対応可能



- ◆ MCD Viewer Softwareにて選択したマーカーのイメージング画像を表示させることが可能
- ◆ CellProfilerを用いたシングルセルのセグメンテーション、histoCAT※を用いた多変量データ解析も可能
- ◆ 取得したデータは TIFF、TXT などの形式で出力可能

※histoCATはgithubにあります  
<https://github.com/BodenmillerGroup/histoCAT>

# 受託について

(令和4年1月より)

シングルセル遺伝子発現解析、RNA-seq及び微量RNA-seq

(令和4年4月より)

イメージングマスサイトメーター Hyperion™ Imaging Systemを用いたデータ取得

オプション：バーチャルスライドスキャナ NanoZoomer S60による画像取り込み

※ BDセルソーターFACSAria Fusion、Helios、Hyperionの立ち上げサービスは実施中

※※組織切片の準備、染色については総合解剖センターと連携

**ご希望の研究者は解析技術室にご相談ください**

# 企業による産学連携活動への解析技術室の利用

疾患関連遺伝子の探索、新規創薬ターゲットの発見とバリデーション  
薬剤の効果や副作用・耐性メカニズムの解析 などのために

- 実験計画の立案からフォローアップまで研究全体の相談にのってほしい
- 得られた解析データについて相談がしたい
- 患者由来の細胞を用いたデータが欲しい
- 受託会社の品質基準を満たしていないが希少性の高いサンプルで解析がしたい
- 目的に合った共同研究相手を紹介してほしい
- 事務手続きを円滑に進めて早く研究を始めたい

研究者によるコンサルティング

医学研究科による研究支援

附属病院  
(臨床講座)

ヒト臨床検体の提供  
知識・ノウハウの提供

企画立案支援  
臨床研究者

医学研究科  
(基礎講座)

実験技術の提供  
知識・ノウハウの提供

企画立案支援  
基礎研究者

KUMBL

研究者とのマッチング  
事務手続き・契約サポート

共同研究支援

先端バイオメディシン  
解析技術室

シングルセルテクノロジーの提供  
試験の実施サポート

実験支援

# 当室に関するご案内

## 開室時間は平日9時半から17時半です

- 解析技術室へのお問い合わせはこちらのお時間の中でお願いいたします。
- Helios、Hyperion等、機器によっては時間外（平日17時半から翌9時半及び土日祝日）使用も可能。時間外利用には条件がありますので、お問い合わせください。

## 臨床サンプルを使用される際は事前に当室にご相談ください

## 機器利用ご希望の方はまずはKuMACOへのご登録をお願いします。

- 当室への入室方法は別途ご案内します（HPもご高覧ください）
- ご不明な点は解析技術室までお問い合わせください。
- 機器によっては利用にあたり講習を受講いただく必要があります。

連絡先：[mic\\_biomedicine@support-center.med.kyoto-u.ac.jp](mailto:mic_biomedicine@support-center.med.kyoto-u.ac.jp)

担当：安倍、内海