

2024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

2024年7月30日

先端バイオメディシン解析技術室

mic_biomedicine@support-center.med.kyoto-u.ac.jp

京都大学



先端バイオメディシン解析技術室

2021年開室



室長：竹内 理 教授（2023年度より）

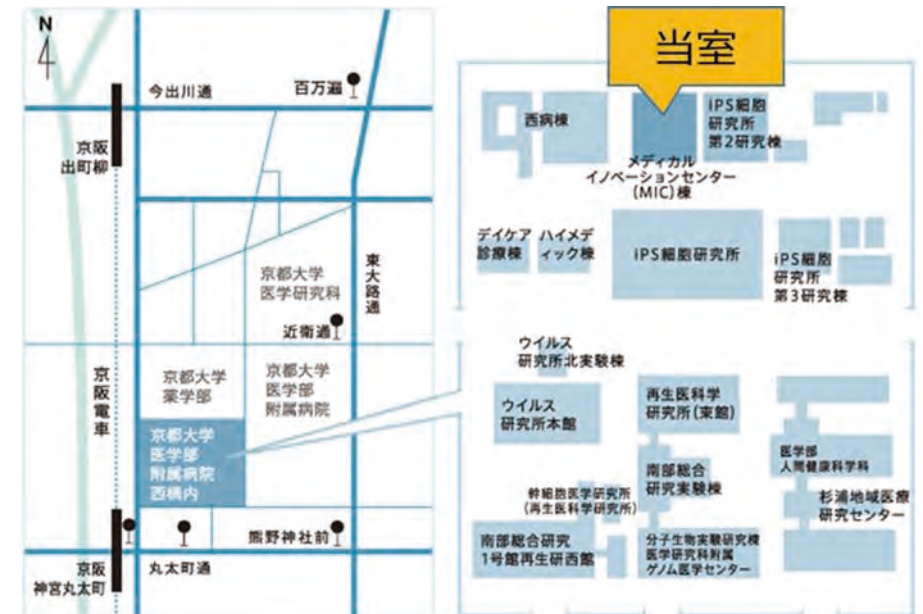
オープンイノベーションの促進を目的にメディカルイノベーションセンター内に設置
令和3年8月より当室の各種機器の本格運用を開始

- 最先端のシングルセル解析機器を備えたBSL2対応の共用機器室
- 附属病院に近く、患者由来検体の迅速処理による創薬標的の同定やバイオマーカー探索などの研究が実施可能
- 創薬研究を希望する研究者に対し、幅広い分野で積極的に産学・学学連携を行うための研究プラットフォームを整備
- 学内外のアカデミア及び企業の研究者への種々トレーニングの提供（「医学領域」産学連携推進機構（KUMBL）も支援）

管理運用している機器

| 機器名称 | 設備詳細 |
|----------------------------------------------|-----------------------|
| 10xGenomics Chromium Controller | シングルセル遺伝子発現等のシングルセル解析 |
| サーモフィッシャー QuantStudio 6 リアルタイムPCR | qPCR |
| Agilent2100 バイオアナライザ | 電気泳動 |
| エビデント FLUOVIEW FV3000 | 共焦点レーザー顕微鏡 |
| 浜松ホトニクス NanoZoomer S60 | バーチャルスライドスキャナ |
| BDセルソーター FACS Aria Fusion | 自動細胞解析分取装置 |
| Standard Biotools Helios, a CyTOF System | 細胞機能解析 |
| Standard Biotools Hyperion Imaging System | 細胞機能解析 (イメージング) |

当室の場所
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



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
ソートが可能

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

セルソーター FACSAria Fusion

ご利用にあたっての注意点

初めてFusionの使用を希望される研究者は当室ご連絡ください

- **BDによるFusionの講習（有償）を受講いただく必要があります**
- 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。

予約変更・取り消しはお早めに！

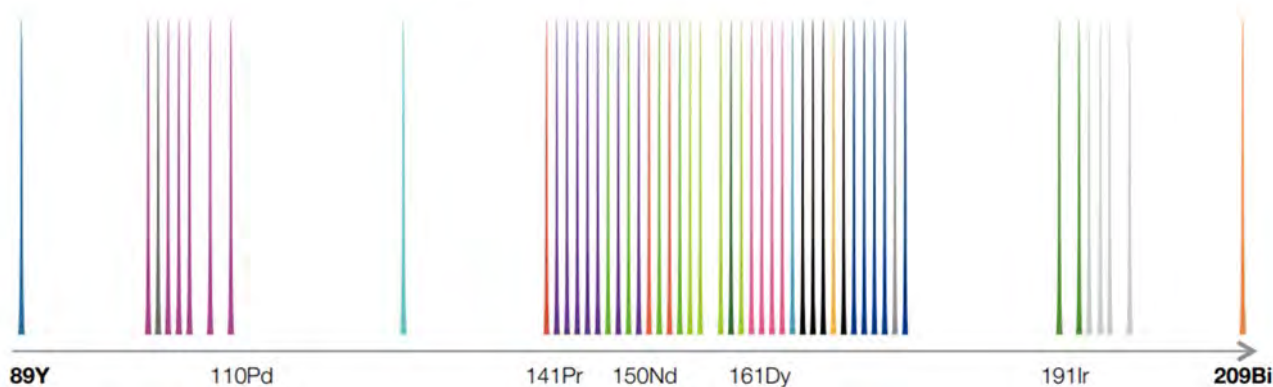
- 多くの研究者に利用いただけるようになってきました。予定の変更があった場合は出来るだけ早くKUMaCoから予約の変更や取り消しをお願いします。

| 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 | |
| BB700 | | |
| 640 nm | APC | 3 |
| | Alexa647 | 4 |
| | Alexa700 | |
| | Red718 | |
| | APC-H7 | 5 |
| APC-Cy7 | | |
| 405 nm | BV421 | 6 |
| | BV510 | 7 |
| | BV605 | 8 |
| | BV650 | 9 |
| | BV711 | 10 |
| | BV786 | 11 |
| 561 nm | PE | 12 |
| | PE-CF594 | 13 |
| | PE-Cy5 | 14 |
| | PE-Cy5.5 | |
| | 7-AAD(YG) | |
| PE-Cy7 | 15 | |
| 355 nm | BUV395 | 16 |
| | BUV737 | 17 |
| | BUV805 | 18 |

マスサイトメーター Helios™ a CyTOF System

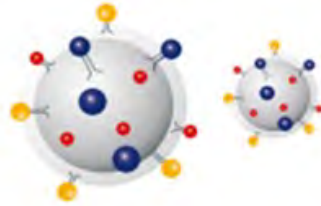
- ✓ 細胞を1細胞レベルで高速に解析をするフローサイトメトリーと、元素の質量に基づいて物質を高次元、高分解能で解析できる誘導結合プラズマ（ICP）-TOF-MSを融合した『マスサイトメトリー』の技術を応用
- ✓ 検出は、金属元素の安定同位体が標識された抗体を使用。金属元素の安定同位体による検出は各々の同位体に固有の離散値で、シャープなピークとして検出
- ✓ そのため30種類以上のパラメーターを超える抗体を同時に測定する場合であっても『コンペーション』不要

金属安定同位体のスペクトル



マスサイトメーター Helios™ a CyTOF Systemの技術

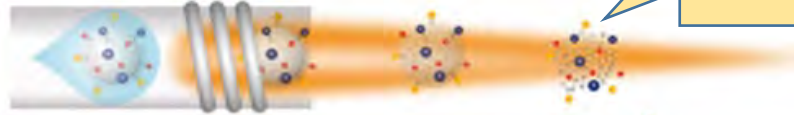
1 - 金属標識抗体で細胞染色



2 - 噴霧 (エアロゾル化)



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℃で燃焼することにより誘導結合プラズマ (ICP) を発生



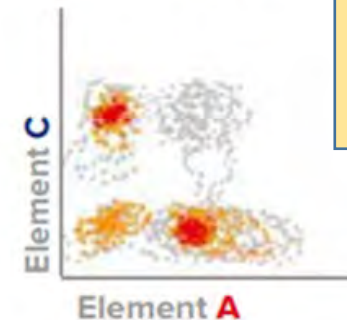
4 - 四重極型イオンフィルターによるクリーニング



6 - 一細胞ごとにデータ統合、FCS ファイルを作成

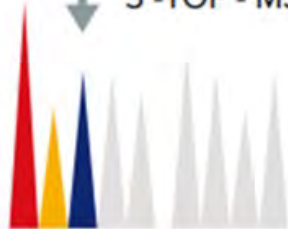
| | Element | | | | |
|--------|---------|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | E |
| Cell 1 | 7 | 3 | 5 | 5 | 4 |
| Cell 2 | 1 | 6 | 3 | 5 | 3 |
| Cell 3 | 2 | 4 | 5 | 7 | 9 |
| Cell 4 | 3 | 2 | 6 | 7 | 8 |
| Cell 5 | 1 | 5 | 3 | 1 | 2 |

7 - データ解析



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

5 - TOF - MS による質量解析



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**
- **細胞を固定するため、感染性の試料も扱いが容易。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）

- 1.0×10^6 細胞 あたり30分から1時間程度が目安
（ $0.5-1.0 \times 10^6$ 細胞 / mLに希釈し30 μ L/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

マスサイトメーター Helios™ a CyTOF System利用の流れ

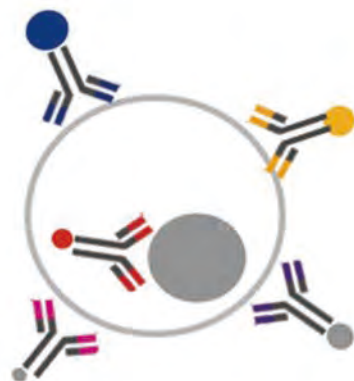
※FACS経験者になじみやすいシステム

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

コンペンセーションは不要



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ーと同程度）

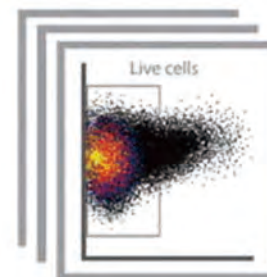


2, 染色
Fluidigm社で検証されたプ
ロトコルとバッファーを使用し
て細胞を染色

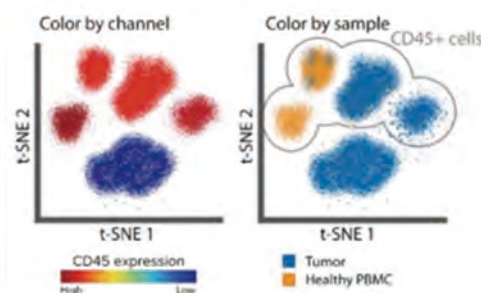


3, 検出
Heliosマスサイトメーターに
よる数十～数百万個の細
胞の複数のパラメータでの
データを産出

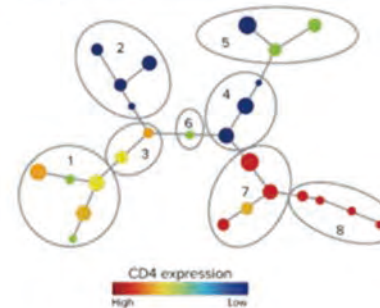
a. Biaxial gating



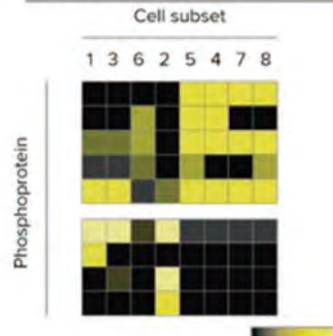
b. viSNE analysis



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

Hyperion™ Imaging System 原理

- 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

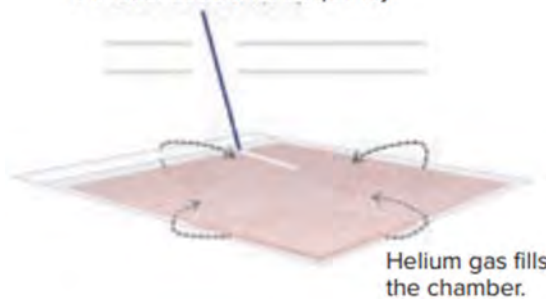
※医学研究科附属総合解剖センターにて切片の準備及び染色のサポートをいただけます

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。

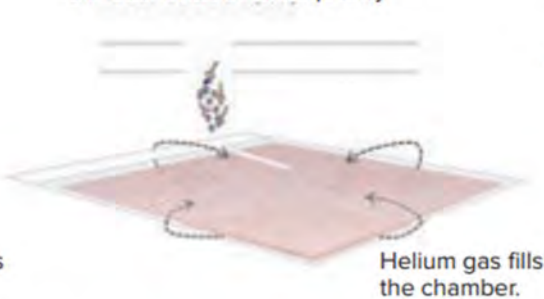
UV laser ablates tissue 1 μm² at a time

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 →



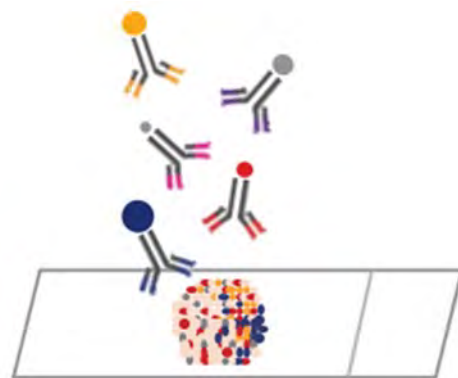
Motorized stage in sample ablation chamber

Hyperion™ Imaging System 利用の流れ（1）

- ◆ 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 マーカーまでを一度に高精度解析
- ◆ 多様な解析ソフトに対応



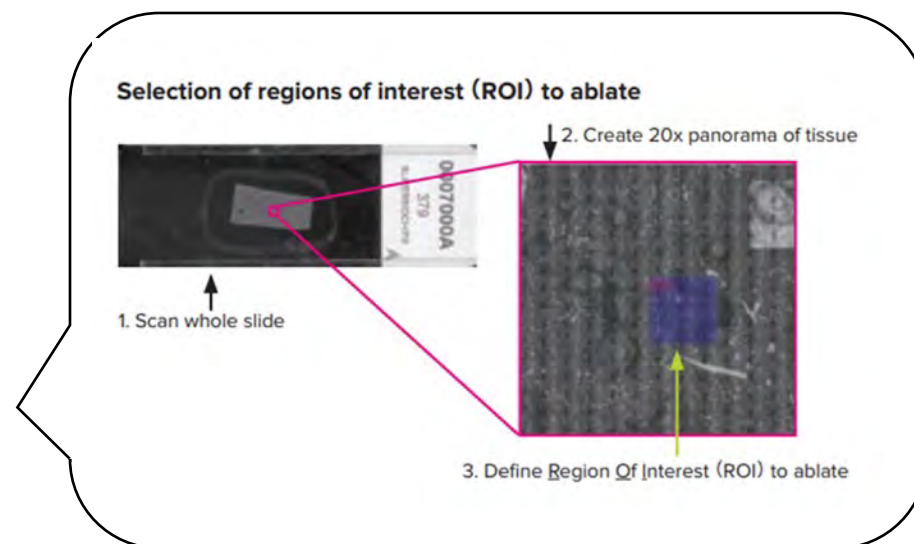
1, 実験デザイン
金属標識抗体（最大 37 個）を用いて実験パネルをデザイン



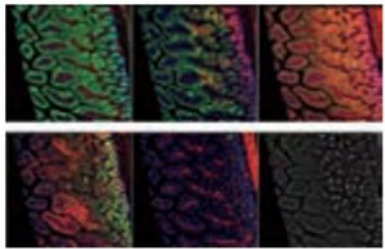
2, 染色
組織切片（FFPE or 凍結）または固定した細胞の金属標識抗体での染色（蛍光免疫染色と基本的には同じ染色法）



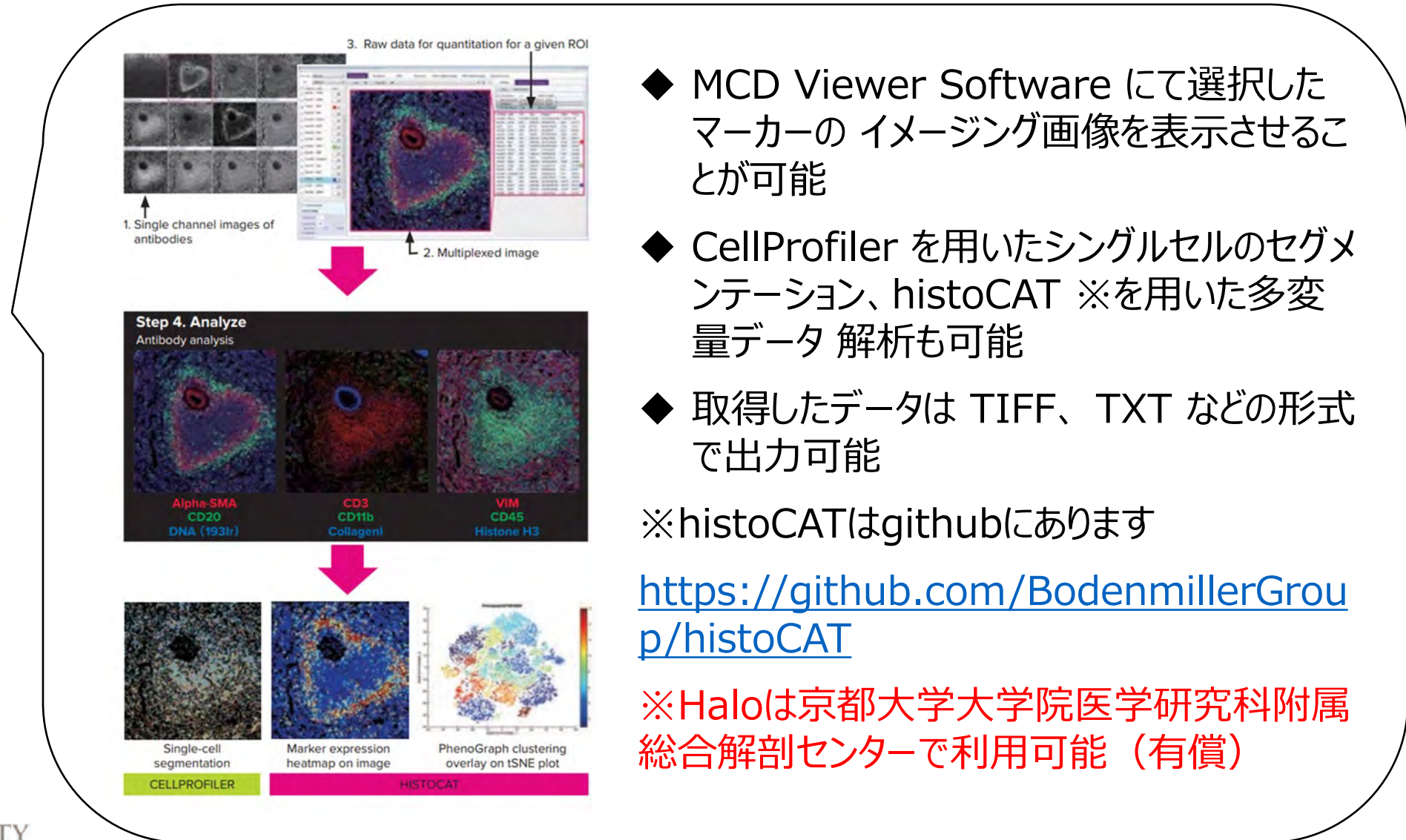
3, 検出
スライド標本をセット後、UVレーザーが1 μmの精度で組織を切り出し、Heliosにより金属を検出



Hyperion™ Imaging System 利用の流れ（2）



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

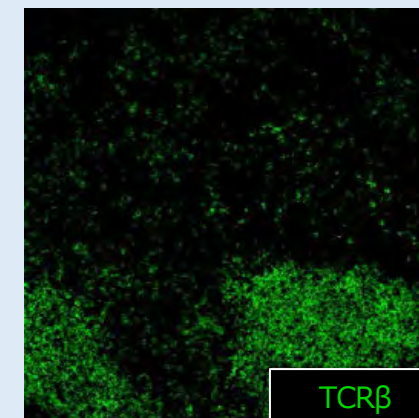
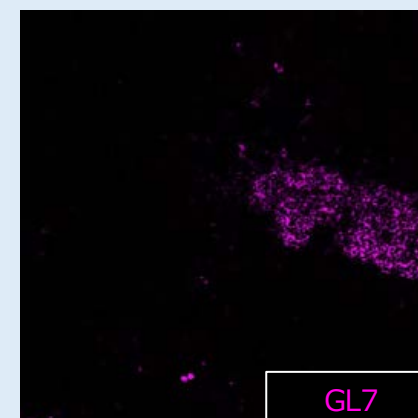
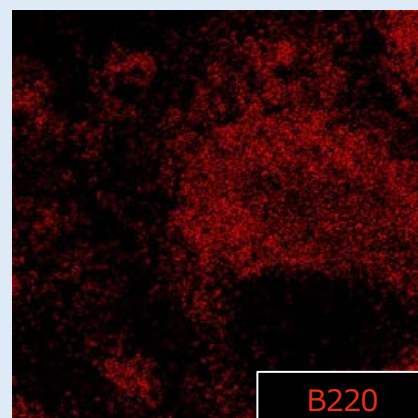
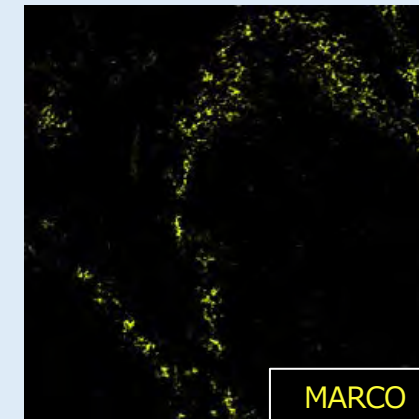
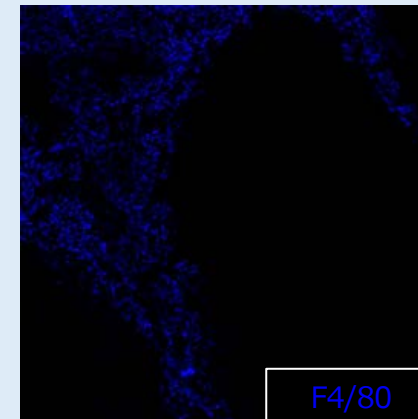
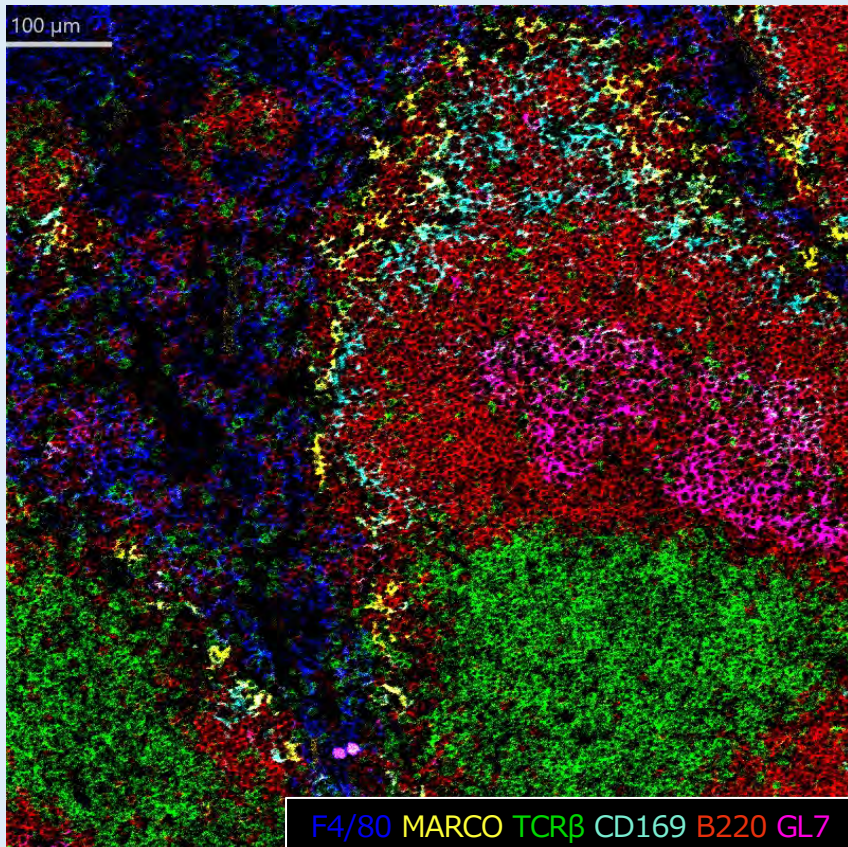
<https://github.com/BodenmillerGroup/histoCAT>

※Haloは京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センターで利用可能（有償）

Hyperion™ Imaging System 利用例



マウス脾臓凍結切片サンプル



先端バイオメディシン解析技術室にて染色・測定

Helios™ a CyTOF System及びHyperion™ Imaging System

機器ご利用にあたっての注意点

ご興味をお持ちの研究者は解析技術室にご連絡ください

初回利用時には、いずれも講習（有料）を受講いただきます

- Helios™ a CyTOF System機器利用のため、**メーカーによる講習（有償）**を受講いただく必要があります（詳細はHPもご覧ください）。
- Hyperion™ Imaging Systemについては、**メーカーから認定された当室員からの講習（有償）**を受講ください（当室にお問い合わせください）。

※ Hyperion/Heliosを利用希望される方は、ガスの準備の都合上、なるべく利用希望日の1～2週間前までに解析技術室までお問い合わせください。

詳細は、**当室のホームページにてご確認ください。**

HP : https://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/mic_biomedicine



先端バイオメディシン解析技術室が提供しているサービス

- ◆ FACS Aria Fusion、Helios、Hyperionの立ち上げサービス
- ◆ Heliosを用いた金属抗体染色済み細胞サンプルの測定サービス
- ◆ Hyperionを用いた金属抗体染色済みの組織切片の測定サービス
 - ◆ マウス組織凍結切片のみ受託染色可能
 - ◆ ヒト組織切片の準備、染色については総合解剖センターにご相談ください
 - ◆ マウス組織凍結切片用金属ラベル化抗体の提供
 - ◆ 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

先端バイオメディシン
解析技術室 HP



詳細は、当室のホームページにてご確認ください。

HP : https://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/mic_biomedicine

研究者支援のためのコミュニティ形成

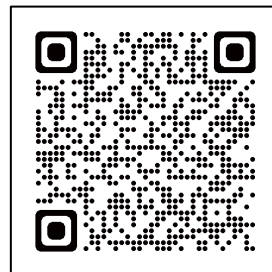
共通機器利用者間のコミュニティを形成し、研究支援体制の充実化と研究者間ネットワーキングの支援を行う

- 技術的な情報の提供や学内・学外向けの学術セミナーの実施
- トラブルの発生情報やトラブルシューティングのための情報共有

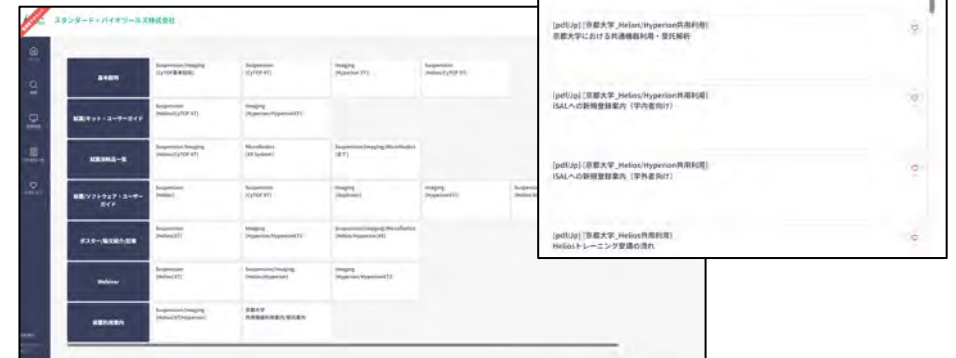


Slack for
FACS

- BDセルソーターFACSAria Fusion利用者向けSlackチャンネル開設
- Helios及びHyperion利用者・利用希望者のための“Makers-Hub”



Makers-Hub



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当室よりご案内します（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。

先端バイオメディシン
解析技術室 HP



HP : https://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/mic_biomedicine

連絡先 : mic_biomedicine@support-center.med.kyoto-u.ac.jp

担当 : 安倍、内海