



大阪大学
OSAKA UNIVERSITY



CoMIT Omics Center 「オミックスセミナー」

空間トランスクリプトーム解析

野島 聡

大阪大学 大学院医学系研究科 病態病理学

CoMIT Omics Center (COC) 副責任者

空間トランスクリプトームとは？

空間トランスクリプトーム (Spatial Transcriptomics)

= 遺伝子の発現状態を網羅的に解析する手法であるトランスクリプトームを、組織切片上で行う先端技術である。

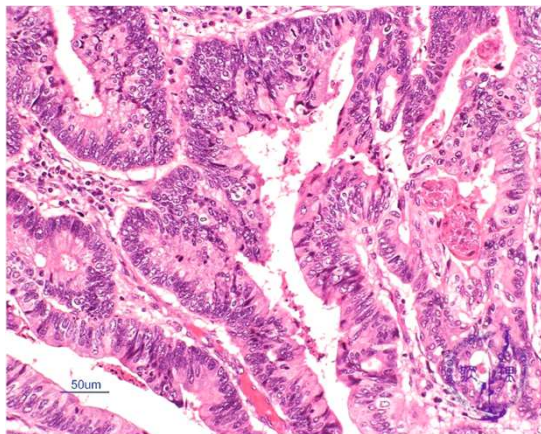
組織切片上の位置情報を保持したまま遺伝子発現を解析できる！

= シングルセル化した細胞を用いてRNAシーケンシング法で行っていた従来のトランスクリプトーム解析と比較して、特定の遺伝子の発現量をその遺伝子を発現する細胞が組織内のどの部位に局在しているかという空間的位置情報と合わせて評価できるという利点がある。

遺伝子発現情報を空間的位置情報と合わせて評価することの利点

H&E histology と対比ができる

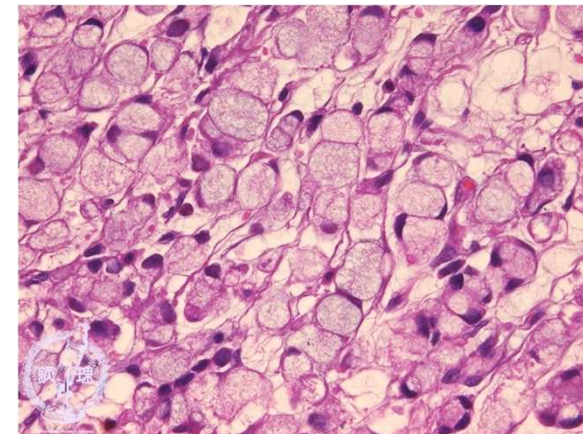
- 多くの空間トラスクリプトームではHE染色標本の形態像がマージされた状態でデータが得られるため、これらと対比できることが大きなメリット。
- 形態像のみからでも腫瘍の分化度や分化の方向性、血管との位置関係、炎症の程度やこれを構成する免疫細胞種等さまざまな情報が得られるため、多面的な考察ができる。



高分化型腺癌



腫瘍の分化の違い（胃癌）



印環細胞癌

空間トランスクリプトームとは？

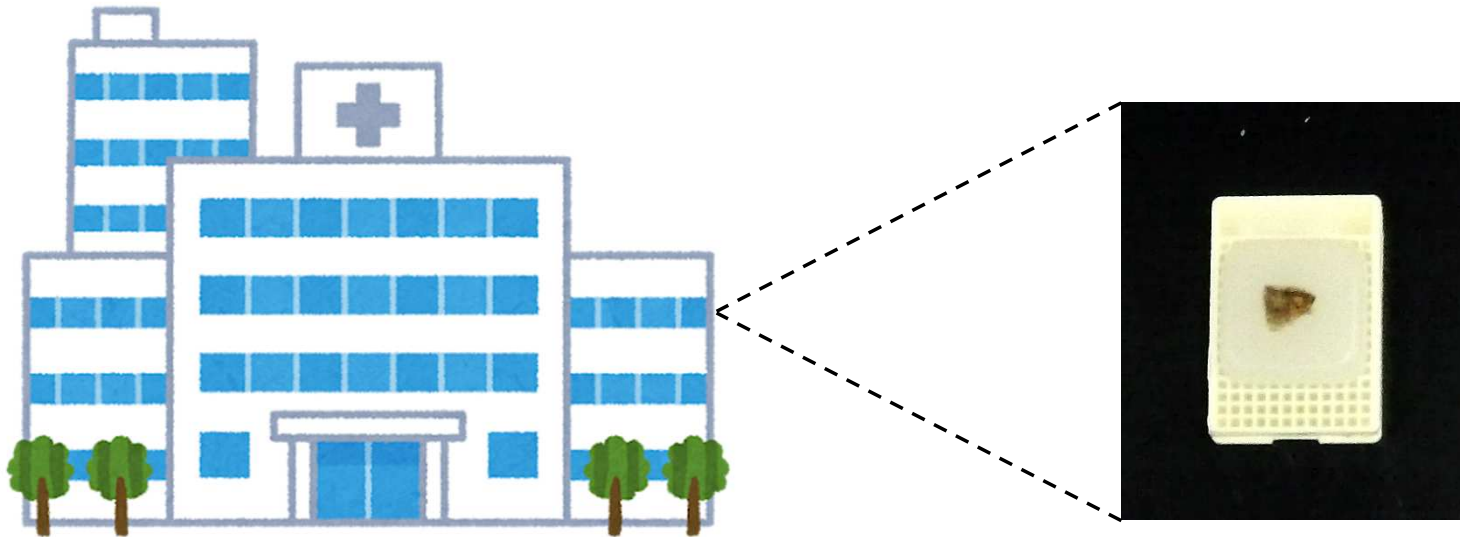
主な空間トランスクリプトームとその分類

カテゴリ	名称	ベンダー	対象分子	評価可能な分子数	使用可能な組織
Imaging-based	CosMx	NanoString/Bruker	RNA タンパク質	約6,000 (6K panel)	FFPE, FF
	Xenium In situ	10x Genomics	RNA	約5,000 (5000-gene panel)	FFPE, FF
	MERSCOPE Ultra	Vizgen	RNA タンパク質	約960	FFPE, FF
Sequencing-based	Visium-HD	10x Genomics	RNA	約20,000–25,000 (全トランスクリプトーム)	FFPE, FF
	STEREO-SEQ	STOmics Tech	RNA	25,000以上	FFPE, FF
Probe-based	GeoMx DSP	NanoString/Bruker	RNA タンパク質	約20,000–25,000 (全トランスクリプトーム)	FFPE, FF

Formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE
Fresh Frozen; FF

検体に FFPEが使用可能であることの意義

- ほとんどの空間トラスクリプトーム・プラットフォームは、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) サンプルに対応！
- 医療施設の病理組織検体（ヒト組織）はほぼすべてがFFPEブロックの状態では保管されており、これらを用いた解析が速やかに可能。



空間トランスクリプトームを牽引する企業

空間トランスクリプトームは創薬や診断領域において大きな着目を集める次世代技術であるが、その急速な成長はベンチャー企業によって担われてきた。

NanoString Technologies / Bruker Corporation (米国)

10x Genomics (米国)

Vizgen (米国)

Curio Bioscience, Inc. (米国)

STOmics / BGIグループ (中国)

NanoString Technologies / Bruker Corporation

の開発した空間トランスクリプトーム

nanoString[®]



NanoString Technologies / Bruker Corporation



NanoString社は**2003年**、シアトルシステム生物学研究所で発明された **Digital molecular barcoding technology** を活用するために設立された。

2008年、同社の最初の製品である **nCounter** を発売。PCR増幅や逆転写酵素反応を必要とせず、カラーバーコード（Reporter Probe）とキャプチャプローブを標的RNAにハイブリダイゼーションさせ、デジタルイメージングで分子を直接カウントできる装置。キャッチコピーは、「**次世代シーケンシング（NGS）よりも高速で、定量PCR（qPCR）よりも簡便**」。

2019年には **GeoMx DSP** を発売、続いて **CosMx SMI** を発売、空間トランスクリプトームに本格的に参入する。**2024年**にBrukerがNanoString Technologies, Inc.の事業を買収。経営が一本化する。

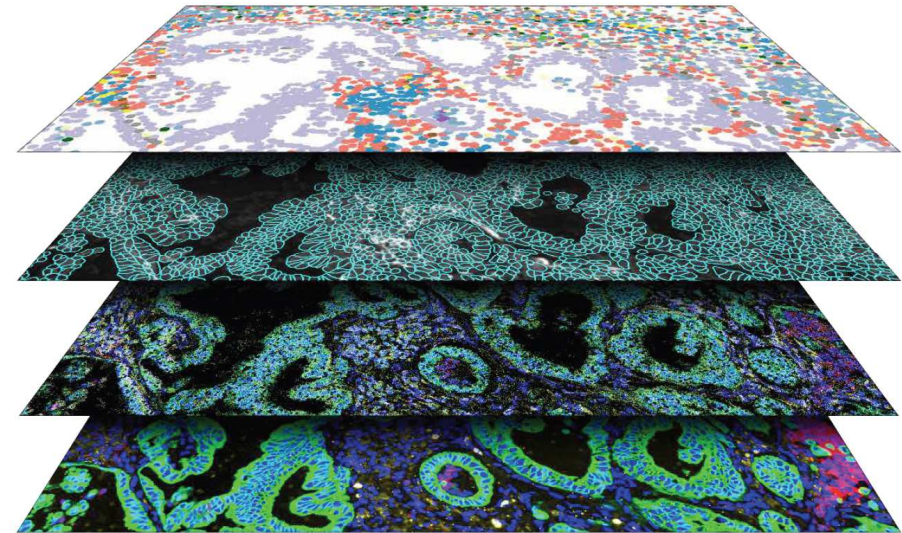
CosMx™ 空間分子イメージャー (Spatial Molecular Imager: SMI)

by NanoString/Bruker

FFPE組織切片や凍結組織において、細胞レベル（シングルセル）および細胞内レベル（サブセラー）の解像度で、RNAとタンパク質の空間的発現情報を一度に解析できる次世代の空間バイオロジー技術。

基本原理は、「**In situ ハイブリダイゼーション**」「**反復蛍光イメージング（サイクリックイメージング）**」に基づく。

各細胞における解析対象の RNA/タンパク質は、独自のバーコードシステムで標識した特異的プローブ（または抗体）とのハイブリダイゼーションにより識別した後、SMI 装置を用いて**蛍光標識レポータープローブ画像を繰り返し取得**することによりバーコードを読み出す。各RNAは細胞内で単一のスポットとして表示され、この可視化されたスポットの数を計測することによりデジタル定量化する。



CosMx™ 空間分子イメージャー (Spatial Molecular Imager: SMI)

by NanoString/Bruker

CosMxにおいては、専用の機器を用いて解析を行う。

CosMx™ 空間分子イメージャー



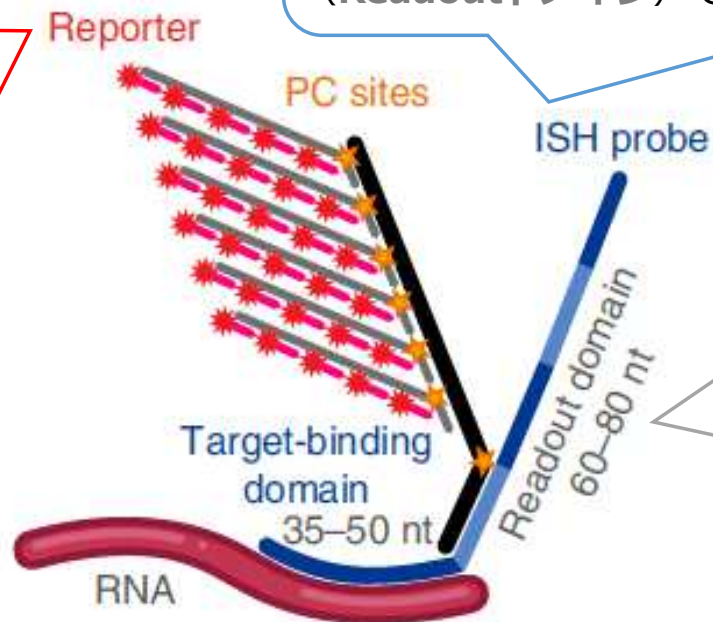
CosMx™ SMI で用いられるプローブ

レポーター =

15~60個の蛍光色素を持ち、**光分解性 (PC) リンカー**を介して蛍光色素結合オリゴで組み立てられている。
ひとつひとつは単色で、4種類の蛍光色素 (Alexa Fluor-488、ATTO 532、Dyomics-605、Alexa Fluor-647) のいずれかを含む。

ISHプローブ =

組織内の標的RNAとハイブリダイズする35~50塩基対 (nt) のDNA (**標的結合ドメイン**) と、RNA同定のための60~80塩基対のDNA (**Readoutドメイン**) で構成される。



Readoutドメインは、4つの連続した10~20塩基対配列からなり、4つの個別のSMIイメージングバーコード (**レポーター**) が結合できる。

各遺伝子に対して、RNA標的の異なる領域を検出する**5種類**のRNA検出用オリゴヌクレオチドプローブ (「**タイル**」) が設計されており、各タイルが独立してRNAの位置情報を記録する。

→ 感度・厳密性がより向上。

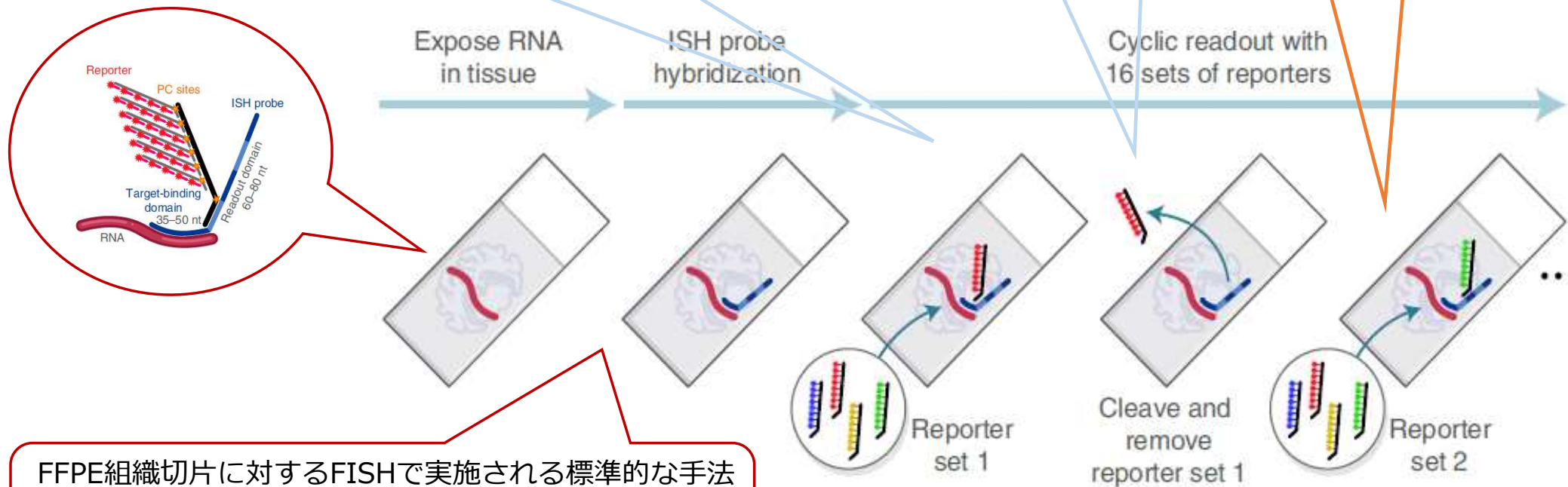
He S, et al. *Nature Biotechnology*. 40:,1794-1806 (2022)

CosMx™ SMI ワークフロー

16セットの蛍光レポーターと順次ハイブリダイズされる（各レポーターセットは4つの単色レポータープールを含む）。インキュベーション後、高解像度の蛍光画像が取得される。

UV照射によりPCリンカーを切断、切り出された蛍光色素を洗浄により除去する。

このサイクルを反復する。（20~40サイクル程度）

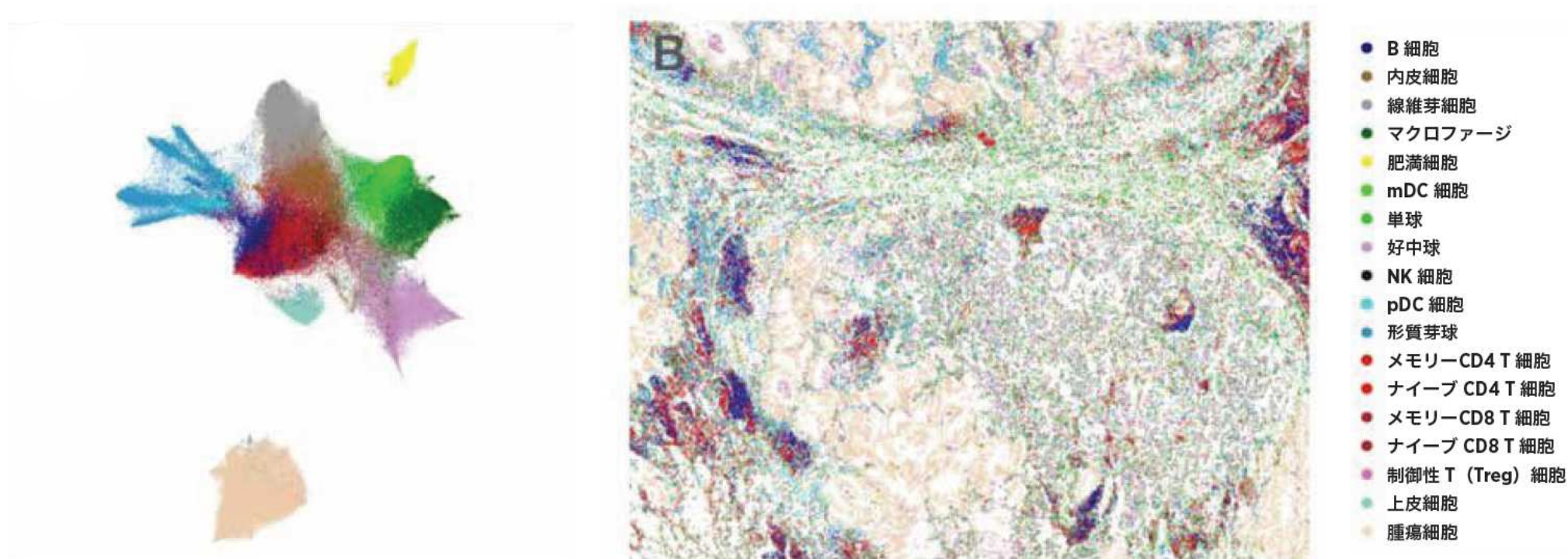


FFPE組織切片に対するFISHで実施される標準的な手法にて、標的RNAの露出、プローブのハイブリダイゼーションが行われる。

He S, et al. *Nature Biotechnology*. 40:,1794-1806 (2022)

CosMx™ SMI で取得されたデータの例

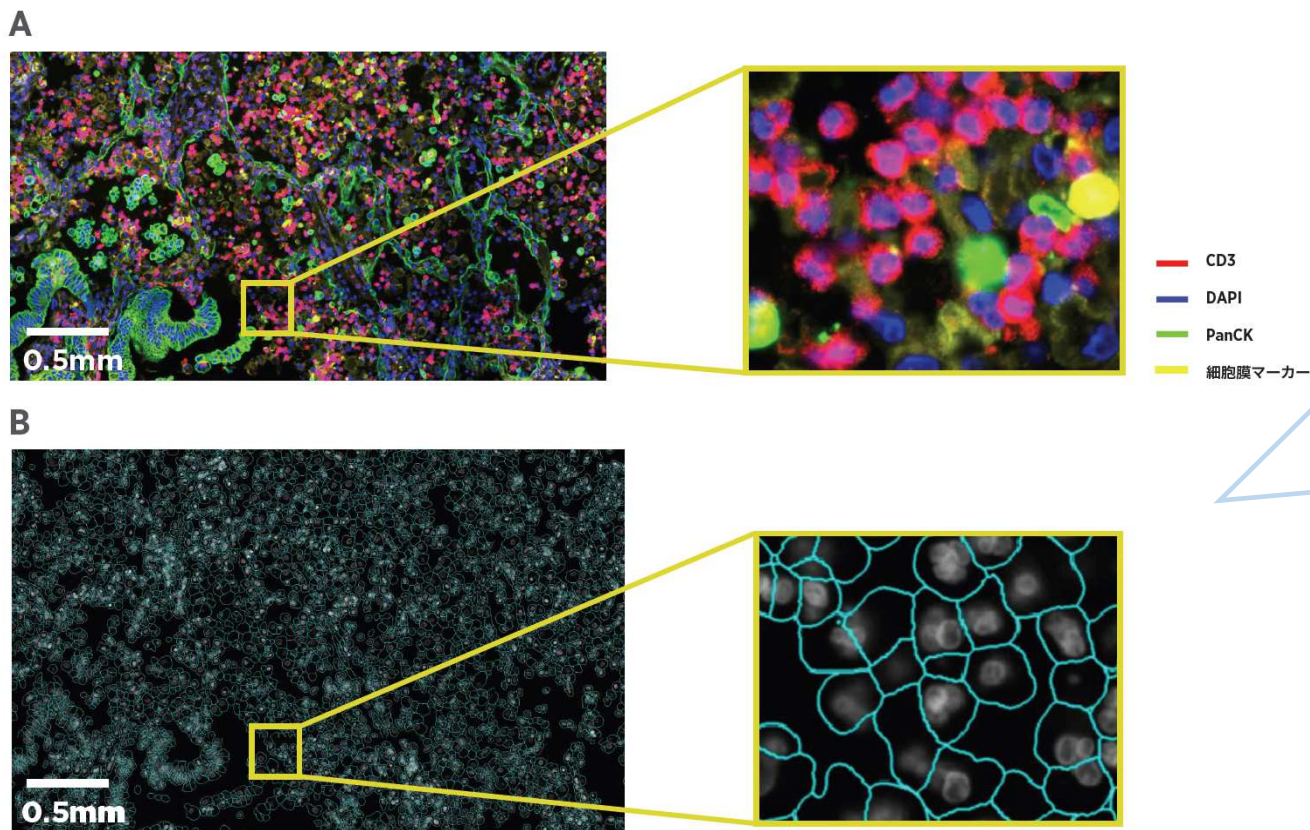
非小細胞肺癌（NSCLC）のFFPE組織を用いた960項目の遺伝子発現アッセイの結果。



NSCLC 組織の細胞タイプマップ。マップ上には、面積約 20 mm²の細胞切片における 135,707 個の細胞が表示されている。細胞タイプを色別に示す。(A) UMAP 投影図 (B) 空間解析された細胞タイプのマップ

CosMx™ SMI で取得されたデータの例

CosMx SMI は、高機能の細胞セグメンテーションを搭載している。



転写産物を細胞位置に割り当てるために、細胞セグメンテーションを正確に行うことが重要である。

核および細胞膜マーカーのイメージ、機械学習によるアルゴリズム、転写産物によるアルゴリズムを組み合わせ、高度な細胞境界の描出を可能としている。

空間解析に基づくマクロファージの遺伝子発現。(A) 全ニッチにおける遺伝子 960 個の発現のヒートマップ。(B) SPP1 発現の空間マップ。SPP1 発現量を色別に表示。

10x Genomics Technology

の開発した空間トランスクリプトーム



10x Genomics Technology



2012年に既存のゲノム技術の限界を克服することを目標に設立される。当初は Single-cell 遺伝子発現解析に注力していたが、2015年に同社の主力製品となる **Chromium** プラットフォームを発売。その後、空間トランスクリプトミクスおよびエピジェネティクス分野において研究開発と買収を組み合わせ、成長してきた。2018年には Spatial Transcriptomics 社の買収を通じて **Visium** プラットフォームの技術を獲得。2020年には Readcoor 社, Cartana 社を買収することで **Xenium** プラットフォームを獲得。これらのプラットフォームは短期間に目覚ましい発展を遂げており、最新版の **Visium-HD, Xenium, 5k** はシングルセルレベルの解像度と対象遺伝子の大幅な増加を達成している。

Xenium In Situ by 10x Genomics



組織切片上のmRNA発現をシングルセルレベルを上回る解像度（サブセルラーレベル）で可視化・定量する空間的トランスクリプトーム解析プラットフォームである。

行程は、

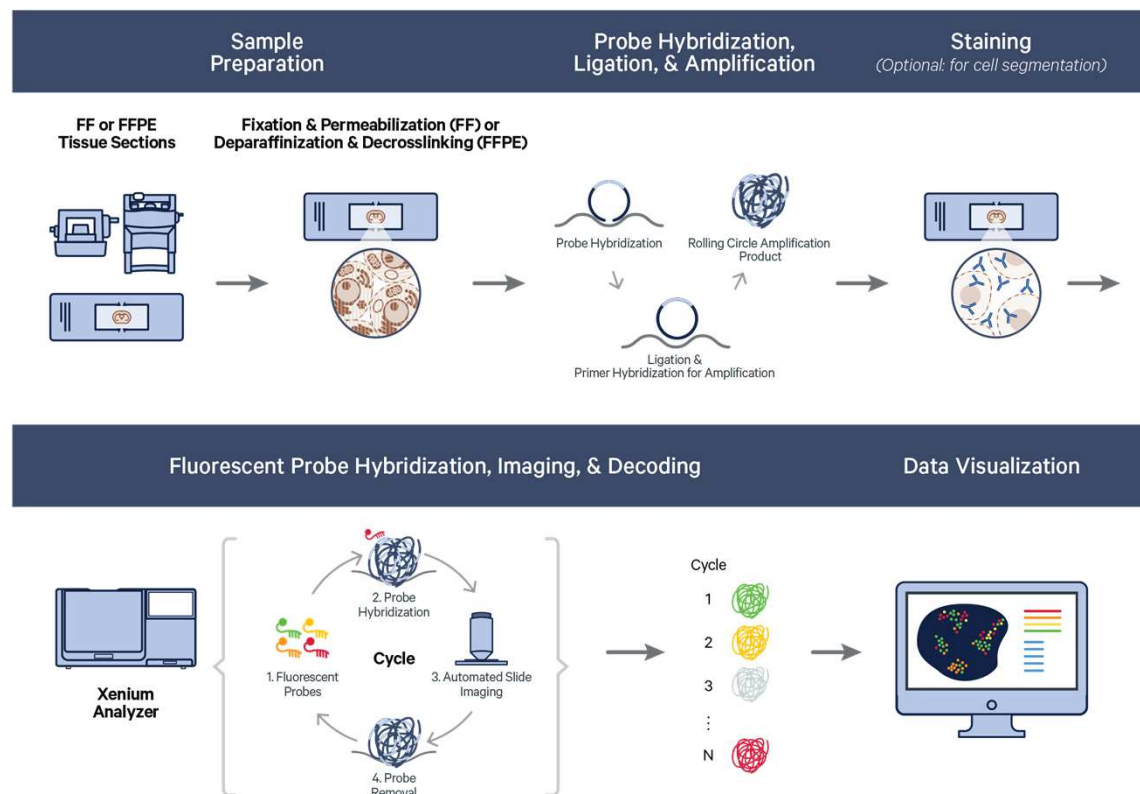
「パドロックプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション」

「ライゲーション」

「ローリングサークル増幅（RCA）」

「蛍光イメージング」

の順に進む。



Xenium In Situ by 10x Genomics



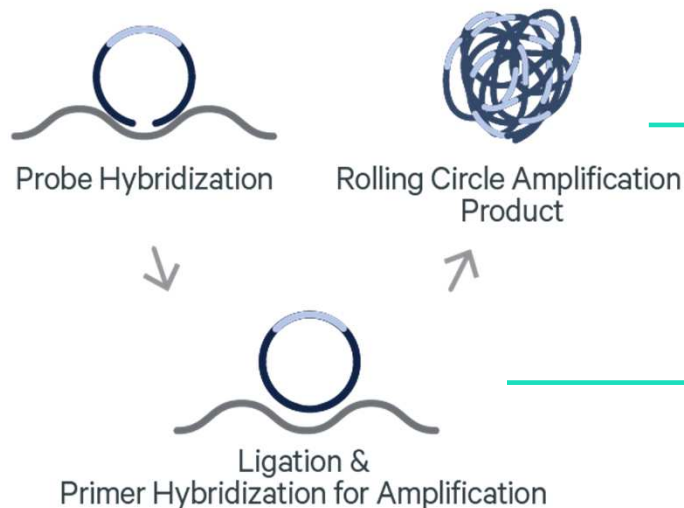
専用の機器を用いて解析を行う。

Xenium Analyzer

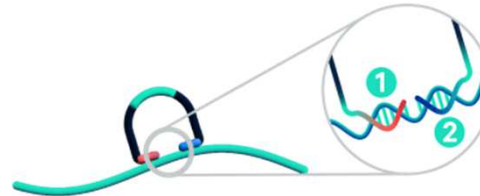
- Xeniumにおけるデータ取得のために設計された装置
- 転写物検出のワークフロー、高解像度イメージング、デコーディング、データ解析をシームレスに統合
- 1回のランで472 mm²の組織を解析し、480遺伝子を<3日で、または5000遺伝子を<6日でターゲット

Xenium In Situ ワークフロー

Probe Hybridization, Ligation, & Amplification



2つのターゲット認識とハイブリダイゼーション



両側アームのプローブを、標的mRNAの2ヶ所にハイブリダイズさせる。

※一方のアームしかハイブリダイズしていない場合、プローブは不安定でありハイブリダイゼーション後の洗浄時に洗い落とされる。

※パドロックプローブには遺伝子固有のバーコード配列も含まれている。

プローブのライゲーション

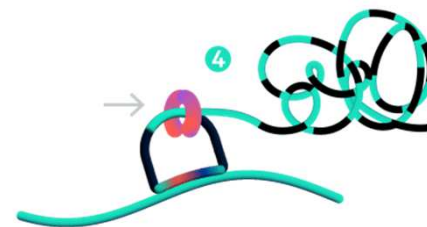


2ヶ所のプローブをリガーゼを用いてライゲーション

※プローブの両アームがターゲットと完全にマッチして安定的にハイブリダイズした場合にのみ、近接プローブのライゲーションが起こる。

※部分的に結合している、またはミスマッチを含んでいるプローブではライゲーションが起こらないため次のステップでの増幅が不可能となる。

ローリングサークル増幅 (RCA)



ポリメラーゼを用い、プローブの配列を増幅

※ライゲーションされたプローブだけが増幅されるため、オフターゲットイベントは最低限に抑制される。

※RCAアプローチは安定して強力なシグナルを生み出し、これがシングルプローブでの検出を可能にしている。

Xenium In Situ ワークフロー

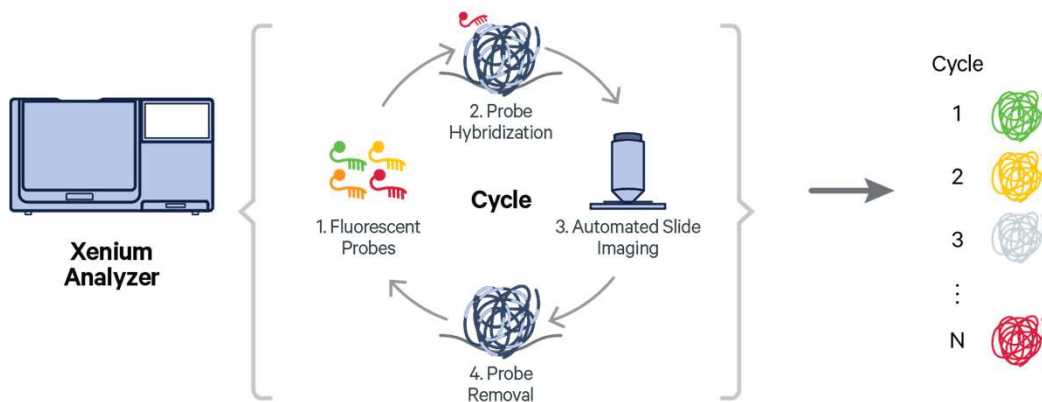
Xeniumアナライザー上でサイクルごとのイメージングが行われる。

各サイクルでは、蛍光標識プローブによる **in situ ハイブリダイゼーション** → **イメージング** → **プローブの除去**の行程が行われる。

内蔵のイメージセンサーは、ユーザーが選択した領域内の各視野（FOV）においてデータを取得する。

各サイクルで複数の蛍光チャネルの画像データが取得され、これらが処理されることで選択された組織切片全体にわたる転写産物の空間マップが構築される。

Fluorescent Probe Hybridization, Imaging, & Decoding



Codebook

	Cycle						
	1	2	3	4	...	N	
Gene 1							Codeword
Gene 2							
Gene 3							
...							

- 蛍光信号は、**確率的モデリング**に基づくアルゴリズムを用いて、コードブックと比較される。（各コードワードに確率を割り当て、最も確率の高いものを選択する）
- 各転写産物は、**60のサイクル・チャネル（15サイクル×4チャネル）**にわたって、発光状態を5回撮影される。

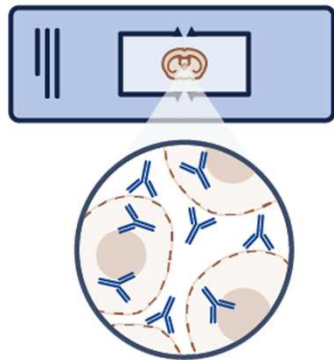
Xenium In Situ ワークフロー

Staining

(Optional: for cell segmentation)

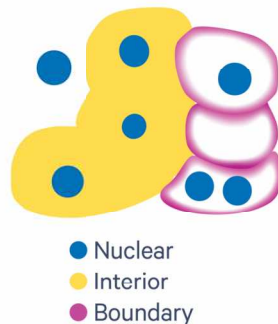
Xenium においても、転写産物を細胞位置に正確に割り当てるために細胞セグメンテーションが行われている。

上皮マーカー (ATP1A1, E-Cadherin)、免疫細胞マーカー (汎リンパ球: CD45)、内部染色マーカー (18S rRNA)、DAPI核染色のシグナルを用いてなされる。

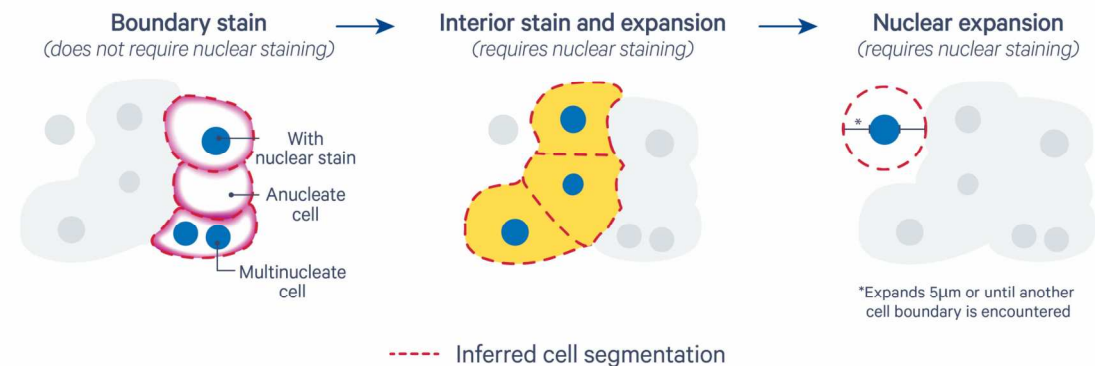


DAPIによる核のセグメンテーション後、3つのアルゴリズムを用いて細胞のセグメンテーションを行っている。

Types of Stains



Types of Cell Segmentation



Overview of Xenium Algorithms. <https://www.10xgenomics.com/>

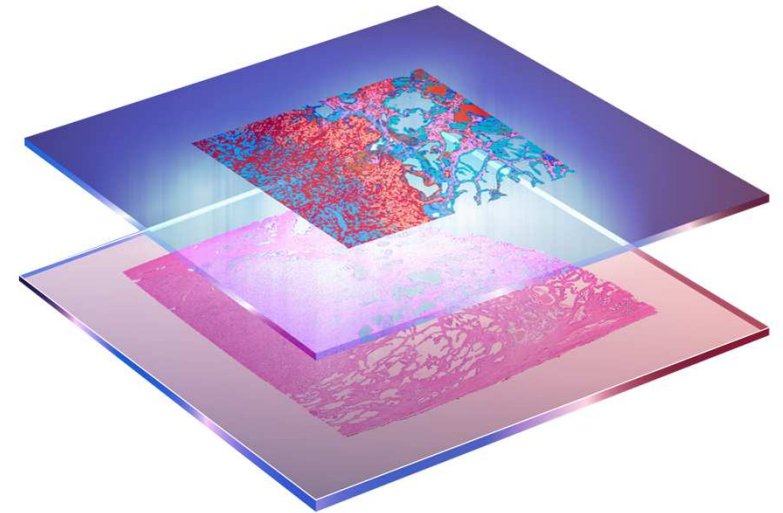
Visium by 10x Genomics



網羅的に遺伝子発現の解析を行うトランスクリプトームを、細胞の空間的位置情報を保ったまま組織切片上において行う先端技術である。

NGS（次世代シーケンサー）ベースで全遺伝子を網羅的にシーケンシングすることを基本原理としており、この点が CosMx, Xenium といったイメージングベースの手法とは異なる。

初期は解像度の低さが問題であったが、最新版の **Visium-HD**（2024年）では、ほぼシングルセルレベルの解像度を達成している。



Visium by 10x Genomics



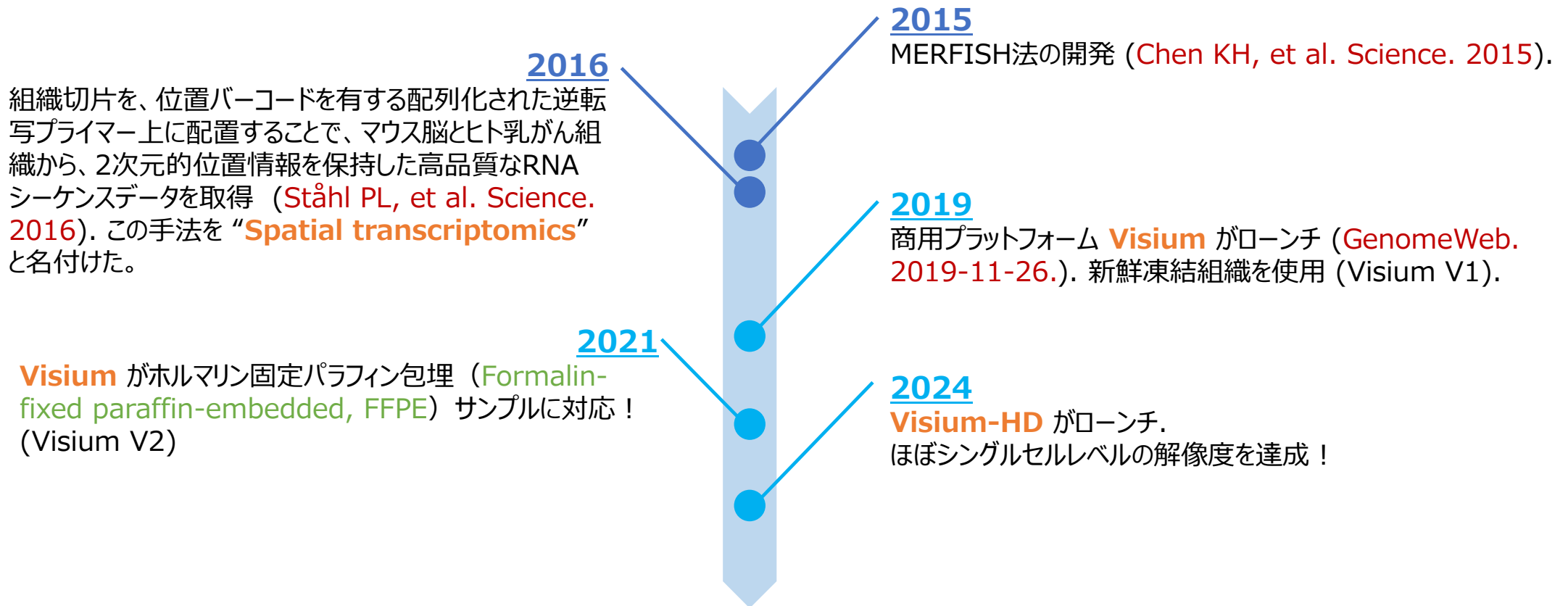
専用の機器を用いて解析を行う。

Visium CytAssist

- Visiumワークフローを簡略化するために設計された装置
- トランスクリプトームプローブをガラススライド上の組織から Visiumスライドに移す操作を行うのに必要
- FFPEサンプルにもFFサンプルにも対応します。

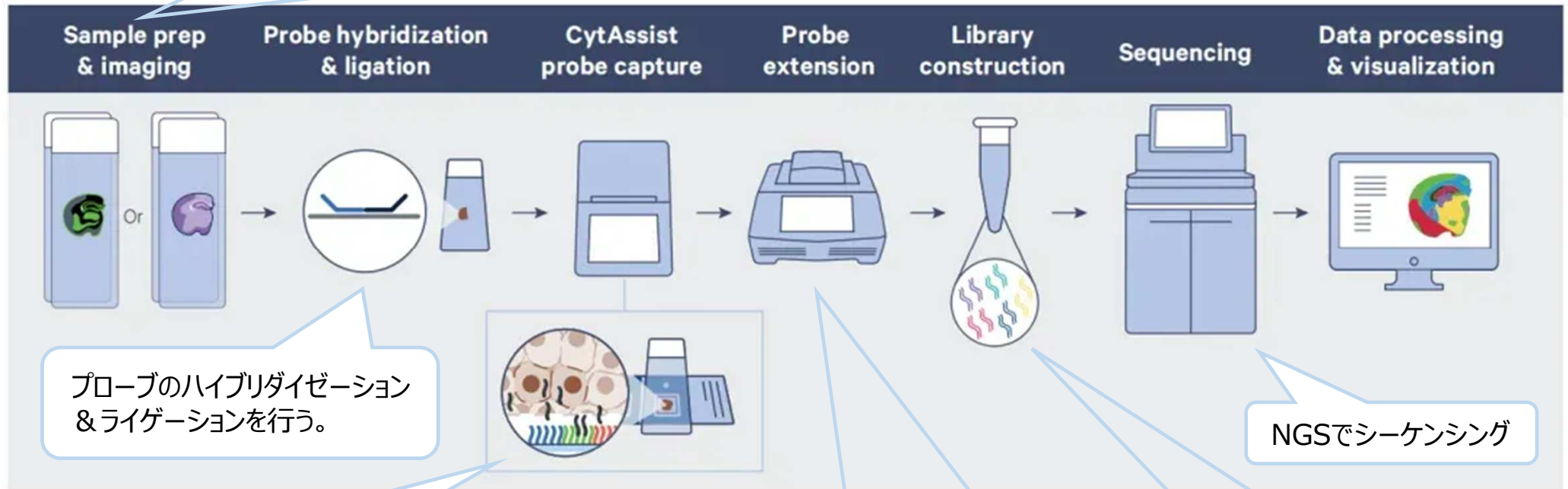
Visium の歴史

Visiumは、近年目覚ましい発展を遂げている。



Visium の原理

Visiumは、専用のスライドガラスに組織を薄切して行う。
貼り付けられた組織切片からはHE染色とその組織像の取得も行われ、発現遺伝子との比較ができる。



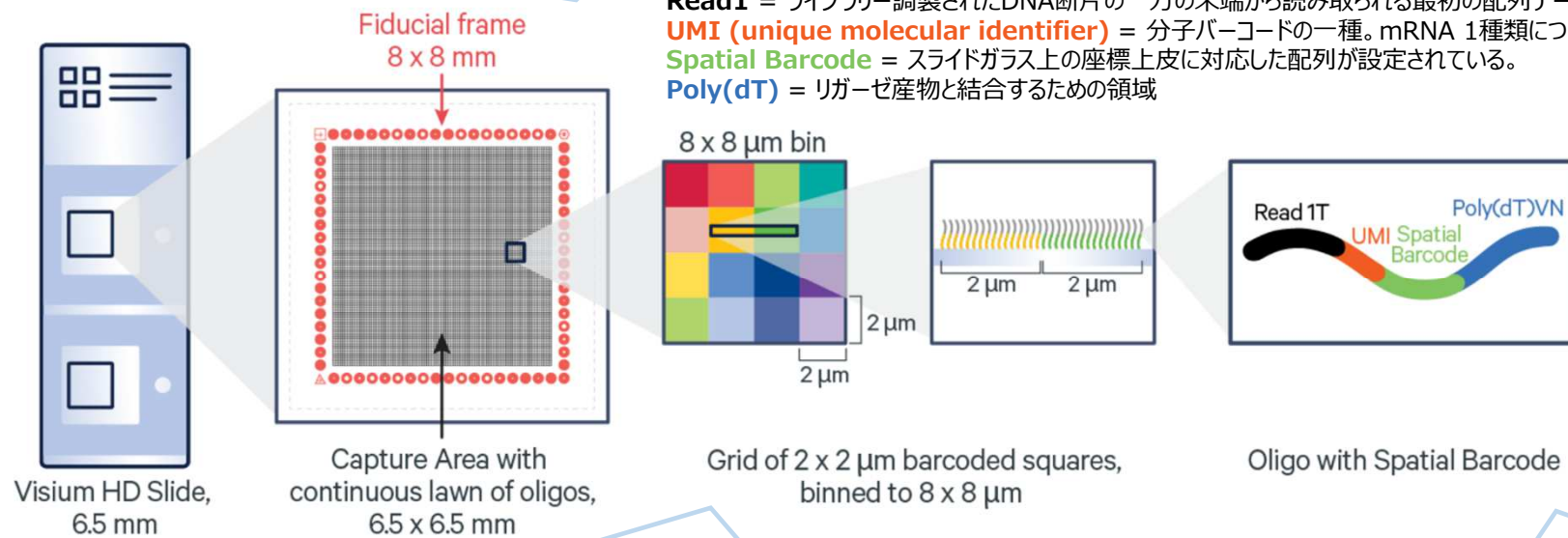
CytAssist装置により組織→スライドへ核酸のトランスファーが行われる。

サーマルサイクラーを用いて、Visium スライド上でプローブを伸長させる。

捕捉されたプローブを溶出させ、ライブラリ構築を行う。

Visium の原理

Visiumのスライドガラスの表面には、mRNAが結合するための oligo dT primerを含むプローブが格子状に配置されたスポット状に接着されている。

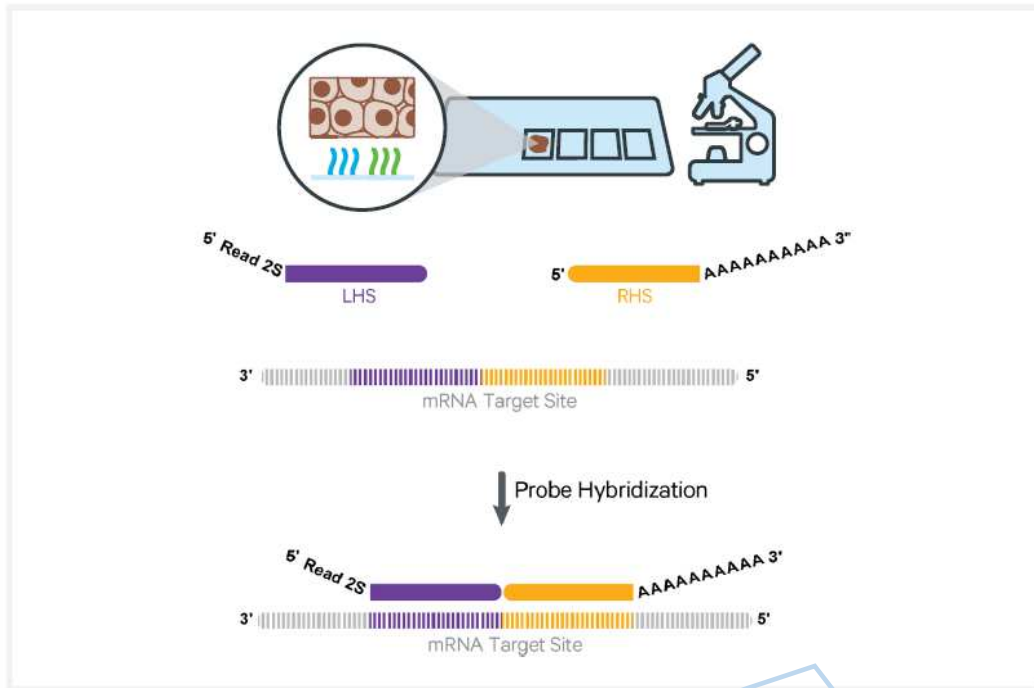


2×2μm四方ごとに、異なる座標 barcode の核酸が接着されている → 最高の解像度は 2μm となる。

Probe extension のステップにおいて、プローブに位置情報が付与される。

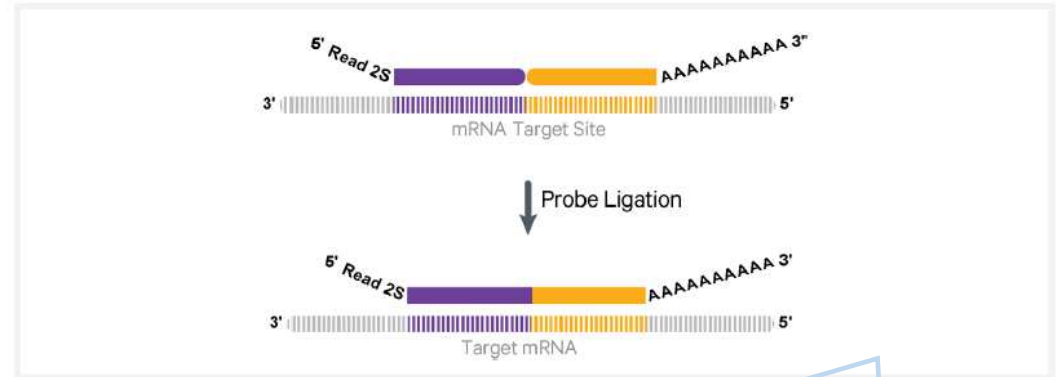
Visium の原理

Step 1. Probe Hybridization



脱パラフィン処理、染色、および脱架橋処理後、各標的遺伝子に対して一対の特異的プローブがハイブリダイズする。

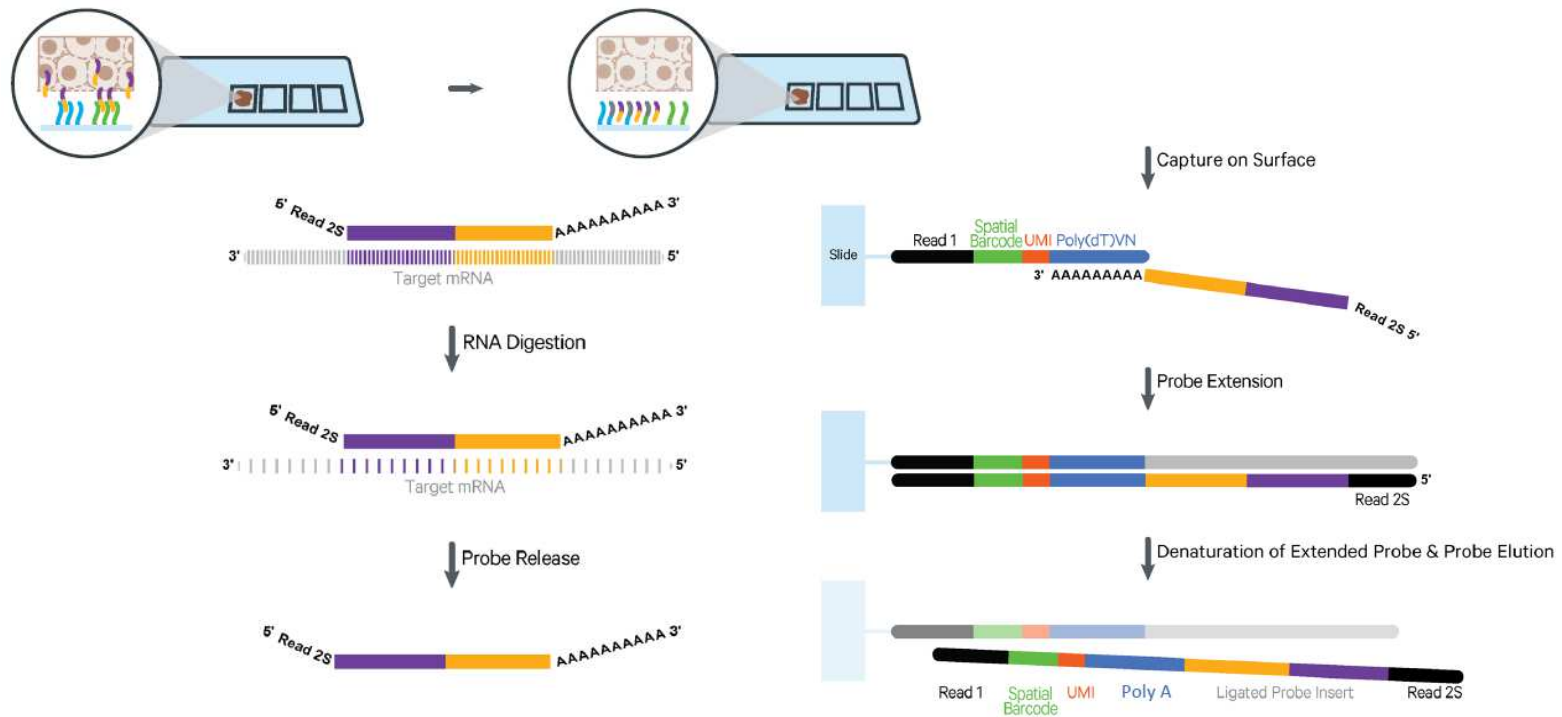
Step 2. Probe Ligation



リガーゼを添加、RNAとハイブリダイズしたプローブ対間の接合部を結合させ、リガーゼ産物を形成する。

Visium の原理

Step 3. Probe Release & Extension



組織から作製されたライゲーション産物は、PolyA/polydT配列を介してスライド上の核酸に補足される。
→ プロブが伸長されることで、空間バーコード化されたライゲーション済みプロブ産物が生成される
→ これを用いてライブラリ調製&シーケンシングへ。

まとめ

- **空間トランスクリプトーム解析**は、遺伝子の発現状態を網羅的に解析する手法であるトランスクリプトームを組織切片上で行う先端技術であり、特定の遺伝子の発現量を空間的位置情報と合わせて評価できるという利点がある
- **CosMx (NanoString Technologies / Bruker Corporation)** については、CoMIT Omics Center (COC) にて近日に受託サービスを開始予定である。