

組織構造内の 全遺伝子発現 (トランス クリプトーム) の解明

- 10x GenomicsのVisium空間的遺伝子発現を活用して
組織切片全体の遺伝子発現をプロファイリング
- 空間的RNA-SeqライブラリーをNovaSeq™ 6000システム、
NextSeq™ 2000システム、NextSeq 1000システム、
NextSeq 550システムでシーケンス
- 組織形態を遺伝子活動と重ね合わせて視覚化し、正常組織内の
細胞と疾患組織内の細胞の空間的關係を理解

提携先



illumina®

はじめに

発生および疾患の基礎を理解するために、研究者は複雑かつ多細胞組織の構造を解明する必要があります。組織学および免疫蛍光法は、組織形態やバイオマーカーを明らかにします。空間的RNAシーケンス (RNA-Seq) は次世代シーケンサー (NGS) の力を活用し、空間的解像度から遺伝子発現をプロファイルします。¹

空間的遺伝子発現解析実験は、分子と形態的特性解析を組み合わせ、これまでにアクセスできなかった組織生物学の理解をもたらしめます。組織全体におよぶ全トランスクリプトーム解析によって、真の探索的科学研究が実現し、正常状態の細胞と疾患状態の細胞両方の空間的関係の解明に役立ちます。²⁻⁷

本テクニカルノートは、形態的状况を保持したまま、組織切片から全トランスクリプトームをマッピングするためのプロトコルを概説します。

プロトコル概要

典型的な空間的RNA-Seq実験は、組織検体準備、画像取得、ライブラリー調製、シーケンスおよび解析を行います (図1)。本プロトコルでは、10x GenomicsのVisium空間的遺伝子発現とイルミナの実績あるシーケンス力を活用します。新鮮凍結組織またはホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から切片を作製し、Visiumガラススライドに貼り付けます。染色した組織切片を用いて、Visium

試薬を使用してバーコード付加された空間的に認識する全トランスクリプトームライブラリーを生成します。ライブラリーのシーケンスは、NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、NextSeq 1000システム、NextSeq 550システムなどのイルミナのハイスループットシーケンスシステムで実施します。データ解析はSpace Rangerパイプライン (10x Genomics) を使用し、トランスクリプトミクスの遺伝子発現結果を、Visiumスライドからの空間的バーコードを利用して組織の位置に結び付けます。Loupe Browserソフトウェア (10x Genomics) は、組織画像からの形態学的データを処理して、空間的遺伝子発現データを簡単に視覚化し探索します。

組織切片の準備

検体の種類 (新鮮凍結またはFFPE) に応じて適切なVisium空間的遺伝子発現プロトコルを選択します。Visiumの検体準備のデモプロトコルは10x Genomicsサポートウェブサイトでご覧いただけます。⁸⁻⁹ これらのデモプロトコルは、組織検体の薄切方法やVisiumスライドへの切片の貼り付け方法を含む検体処理方法の説明を含んでいます。10x Genomicsではヒトおよびマウスのさまざまな種類の組織に関してVisium空間的遺伝子発現アッセイを検証しています。¹⁰

適切な組織処理方法と調製方法により、組織切片の形態学的品質とmRNA転写産物の完全性が保持されます。これは、下流のライブラリー調製や高品質なシーケンスデータの生成には非常に重要です。



図1: 空間的RNA-Seq実験のワークフロー: 新鮮凍結またはFFPE組織切片をVisium空間的遺伝子発現スライドに貼り付け、組織切片を染色し画像を取得します。ガラススライドはバーコード付加オリゴヌクレオチドプローブでmRNAを捕捉し、cDNA合成後にライブラリーを構築します。全トランスクリプトーム遺伝子発現ライブラリーをイルミナ装置でシーケンスします。10x GenomicsのSpace RangerおよびLoupe Browserを用いて遺伝子発現位置と組織形態を結び付けます。

組織染色と画像取得

標準的な方法を用いて、Visiumスライドに貼り付けた組織切片のヘマトキシリンエオジン (HE) 染色または免疫蛍光染色を実施します。顕微鏡を用いて染色した組織切片の画像を取得します。遺伝子発現の視覚化の成功は、良好な染色と画像取得に大きく左右されます。¹¹

組織の透過処理とライブラリー構築

組織切片の画像を取得した後、新鮮凍結組織またはFFPE組織に対するVisium空間的遺伝子発現キットを用いた転写産物捕捉の準備が整います。Visium空間的遺伝子発現スライドは4つの区画、すなわちキャプチャーエリアがあり、スライドごとに最大4つの組織切片を解析できます。^{*} 各キャプチャーエリアは数千のバーコードスポットがあり、各スポットに固有の空間的バーコードが付加された数百万のキャプチャー用ヌクレオチドが含まれています (図2)。

スポットを覆っている細胞のそれぞれの小さなクラスターからの転写産物にバーコードが付加され、スライド上の位置が追跡されます。組織を透過処理することで、mRNA (新鮮凍結組織用) またはライゲーションされたプローブペア (FFPE用) が放出され、これらがスポット上に存在する、空間的バーコードが付加されたプローブに結合

^{*} 各キャプチャーエリアもライブラリー調製中に検体バーコードを取得するため、異なるキャプチャーエリアからの複数のライブラリーを1回のシーケンスランにプールできます。スライドあたり2つまたは8つのキャプチャーエリアがある他のVisiumスライドもご利用いただけます。

します。新鮮凍結組織では、逆転写反応により、捕捉したmRNAからcDNAを産生します。FFPE組織では、RNAをテンプレートにしたライゲーション方法を用いて、転写産物を捕捉し、バーコードを付与します。次にバーコードの付加された分子を下流ステップのためにプールし、シーケンス用ライブラリーを構築します。¹⁰

イルミナ装置を用いたシーケンス

このアプリケーションに必要なシーケンス出力を扱う上で、イルミナではNovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、NextSeq 1000システム、NextSeq 550システムでVisium空間的遺伝子発現ライブラリーをシーケンスすることを推奨しています (表1)。iSeq™ 100システムのような小型の装置もライブラリー品質確認に使用できます。¹²

Visium空間的遺伝子発現ライブラリーは、イルミナフローセルへの結合に必要なi5とi7インデックスが付いた標準的なイルミナペアリング構造から構成されています (表2、図3)。リード1プライマーは16 bpの空間的バーコードおよび12 bpの分子バーコード (UMI) のシーケンスに使用されます。リード2プライマーは、インサートであるcDNAまたはライゲーションされたプローブのシーケンスに使用されます。2つの10 bpのサンプルインデックスはi5リードとi7リードでシーケンスされます。¹³

Visiumライブラリーの推奨シーケンス深度は、組織複雑性、組織の被覆、実験的目標など、さまざまな要素に応じて異なります。空間的遺伝子発現ライブラリーはペアエンドシーケンスランでシーケンスする必要があります。

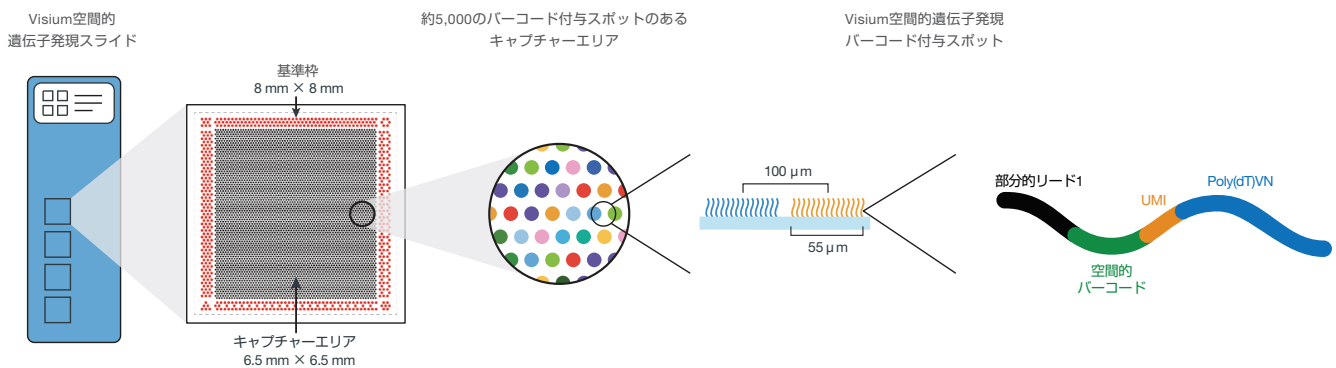


図2: Visium空間的遺伝子発現スライドのデザイン: Visium遺伝子発現スライドは4つのキャプチャーエリアがあり、各キャプチャーエリアは5,000のバーコード付加スポットがあります。組織切片を透過処理することで、空間的なバーコード付加オリゴヌクレオチドに結合するmRNAが放出され、遺伝子発現情報を捕捉することができます。cDNAは捕捉したmRNAから合成され、空間的遺伝子発現シーケンスライブラリーが調製されます。

表1: イルミナシーケンスシステムでのVisium空間的遺伝子発現アッセイに対するサンプルスルーブットの例

サンプルの種類	組織スポットあたりの最小リードペア数 ^a	組織切片あたりの推奨リード数	ランあたりのキャプチャーエリア数 ^b						
			NextSeq 550システム	NextSeq 2000システム		NovaSeq 6000システム			
				高出力	P2 ^c	P3	SP	S1	S2
新鮮凍結組織	50,000 ^a	2億5,000万	3	3	8	5	10	26	64
FFPE組織	25,000 ^a	1億~1億2,500万	6	6	16	10	20	52	128

- a. 最小リード数は10x Genomicsの承諾により提供された推奨値です。
- b. キャプチャーエリアあたり1億2,500万リードペア (2億5,000万リード)、キャプチャーエリアあたり5,000組織スポット、組織切片に平均50%覆われたキャプチャーエリアに基づいて算出。Visium空間的遺伝子発現スライドは、4つのキャプチャーエリアがあり、スライドあたり最大4つの組織切片を解析できます。
- c. NextSeq 1000システムでも同一のサンプルスルーブットを用いたP2フローセルをご使用いただけます。

表2: Visium空間的遺伝子発現ライブラリーの推奨リード構成

	リード1	i7インデックス	i5インデックス	リード2 新鮮凍結	リード2 FFPE
目的	細胞バーコードとUMI	サンプルインデックス	サンプルインデックス	cDNAインサート	ライゲーションされたプローブインサート
長さ	28 bp	10 bp	10 bp	90 bp	50 bp

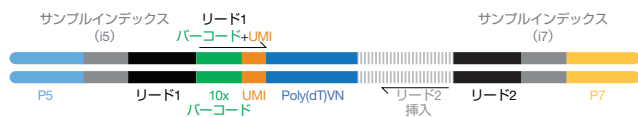


図3: Visium空間的遺伝子発現ライブラリーの構成: Visium空間的遺伝子発現ライブラリーは、イルミナシーケンスシステムに互換性のある標準的なペアエンド構造で構成されています。

10x Genomicsは、新鮮凍結組織では組織が被覆したスポットあたり最低50,000リードペア、FFPE組織ではスポットあたり25,000リードペアを推奨しています。[†] 10x Genomicsは、空間的遺伝子発現ライブラリーには1%以上のPhiXライブラリーの添加を推奨しています。空間的遺伝子発現ライブラリーのシーケンスメトリクスの例は、10x Genomicsサポートウェブサイト¹³、およびイルミナBaseSpace™ Sequence Hubの公開データページでご覧いただけます。¹⁴

[†] ミトコンドリアやリボソーム遺伝子を除外する最新かつ効率の高いケムストリーであるため、FFPE組織に対する最小のシーケンスリードの推奨値が低く設定されています。

データの解析と視覚化

Visiumワークフロー中に、2種類の主要データである組織画像とBCLまたはFASTQ形式のシーケンスデータが捉えられます。Space Ranger解析パイプラインは、これら2種類のデータインプットを使ってVisiumシーケンスデータと画像をアライメントします。検出され補足された各遺伝子転写産物は、関連する空間的バーコードに基づいて組織画像上の空間的位置に割り当てられます。データを処理した後は、Loupe Browser視覚化ソフトウェアを用いて空間的遺伝子発現データのさまざまなビューを簡単に検証できます。Loupe Browserから、重要な遺伝子の検証、クラスターの特性解析および絞り込み、発現差解析が可能です。その他に、サードパーティーツールを用いてさらにデータを処理することができます。

データハイライト

空間的遺伝子発現解析では、新鮮凍結組織検体 (図4)¹⁵またはFFPE検体 (図5) のどちらの組織状況でも高解像度の遺伝子発現特性解析が可能です。¹⁶

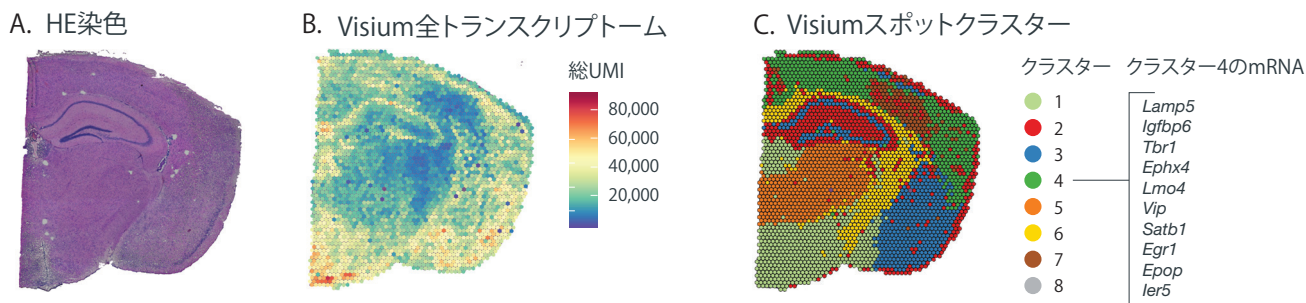


図4: 新鮮凍結マウス脳データのハイライト: (A) マウス脳冠状断切片のHE画像。(B) 全トランスクリプトーム解析に対する総UMI、または発現変動遺伝子の総数に基づく空間的ナイーブスポットクラスタリングを示すVisiumデータのオーバーレイ画像。(C) クラスタ4で最も高発現した遺伝子のリスト。¹⁵

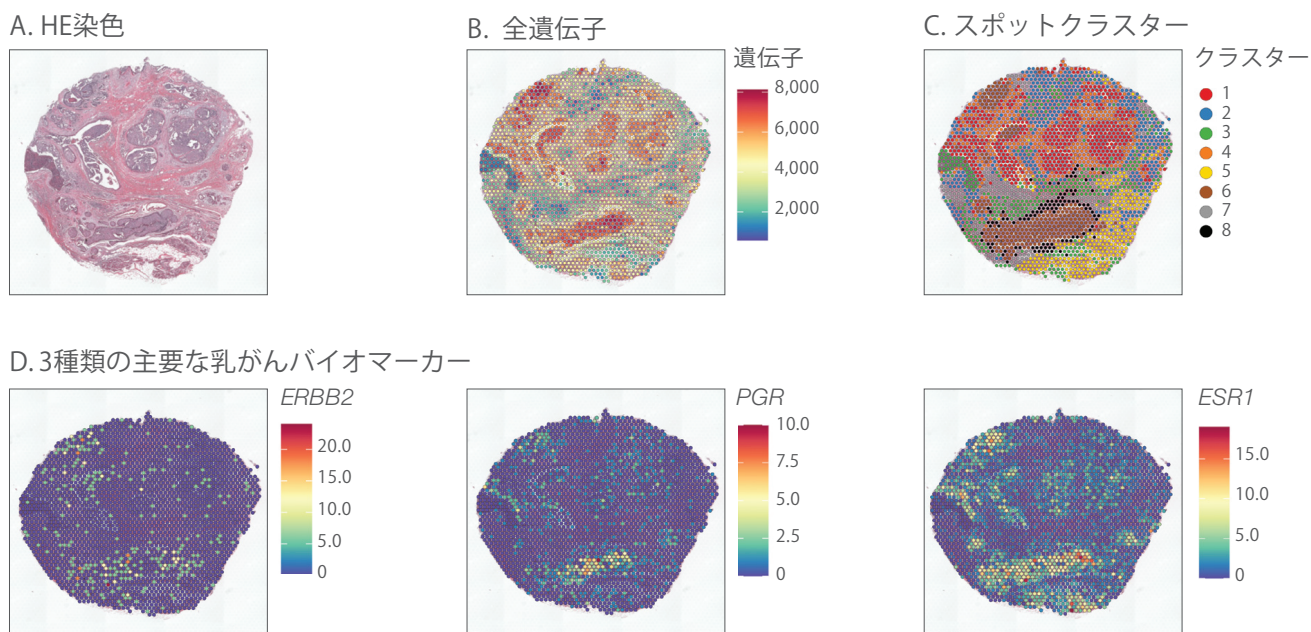


図5: 非浸潤性乳がんFFPE乳房組織データのハイライト: FFPE用のVisium空間的遺伝子発現を用いて、ヒトの非浸潤性乳がんFFPE乳房組織の約18,000の遺伝子を検証しました。(A) HE染色画像。FFPEの全トランスクリプトーム解析を目的としてVisiumデータとHE画像を重ね合わせ、ここでは、(B) 全遺伝子、(C) スポットクラスタリング解析のオーバーレイ画像を示しています。(D) 次の主要な乳がん遺伝子の発現量と空間的機構を示しています: *ERBB2* (*HER2*)、プロゲステロン受容体 (*PGR*)、エストロゲン受容体 (*ESR1*)。¹⁶

専門家のサポートへのアクセス

10x Genomicsとイルミナチームは連携し、Visium空間的遺伝子発現ライブラリーをシーケンスする際のワークフロー全体を通じた完全なサポートをいたします。アッセイおよび解析のご質問については10x Genomicsサポート (support@10xgenomics.com)、シーケンスのご質問についてはイルミナサポート (techsupport@illumina.com) にお問い合わせください。チームでは、より複雑な問題を共同で対応する体制も整えています。

まとめ

この空間的遺伝子発現プロトコールは、完全な組織切片に対する全トランスクリプトーム解析と形態学的状況を組み合わせています。遺伝子発現と組織形態の補完的手法の橋渡しをすることで、研究者が空間的機構をより理解しやすくなり、組織の発生、機能、疾患状態に空間的機構がどのように関与しているかを理解することに役立ちます。

詳細はこちら

NovaSeq 6000システム、jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html

NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム、jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-1000-2000.html

NextSeq 550システム、jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq.html

Visium空間的遺伝子発現、10xgenomics.com/products/spatial-gene-expression

製品情報

シーケンス試薬	カタログ番号
NovaSeq 6000 SP Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028401
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028319
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028316
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (200 cycles)	20028313
NextSeq 1000/2000 P2 Reagents v3 (100 cycles)	20046811
NextSeq 2000 P3 Reagents (100 cycles)	20040559
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 cycles)	20024907

参考文献

1. Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al. [Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics.](#) *Science*.2016;353(6294):78-82. doi:10.1126/science.aaf2403
2. Ji AL, Rubin AJ, Thrane K, et al. [Multimodal Analysis of Composition and Spatial Architecture in Human Squamous Cell Carcinoma.](#) *Cell*.2020;182(6):1661-1662. doi:10.1016/j.cell.2020.08.043
3. Maynard KR, Collado-Torres L, Weber LM, et al. [Transcriptome-scale spatial gene expression in the human dorsolateral prefrontal cortex.](#) *Nat Neurosci*.2021;24(3):425-436. doi:10.1038/s41593-020-00787-0
4. Boyd DF, Allen EK, Randolph AG, et al. [Exuberant fibroblast activity compromises lung function via ADAMTS4.](#) *Nature*.2020;587(7834):466-471. doi:10.1038/s41586-020-2877-5
5. Fawcner-Corbett D, Antanaviciute A, Parikh K, et al. [Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution.](#) *Cell*.2021;184(3):810-826.e23. doi:10.1016/j.cell.2020.12.016
6. Janosevic D, Myslinski J, McCarthy TW, et al. [The orchestrated cellular and molecular responses of the kidney to endotoxin define a precise sepsis timeline.](#) *Elife*.2021;10:e62270. doi:10.7554/eLife.62270
7. Grauel AL, Nguyen B, Ruddy D, et al. [TGFβ-blockade uncovers stromal plasticity in tumors by revealing the existence of a subset of interferon-licensed fibroblasts.](#) *Nat Commun*.2020;11(1):6315. doi:10.1038/s41467-020-19920-5
8. 10x Genomics. [Visium Spatial Protocols – Tissue Preparation Guide.](#) support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression/sample-prep/doc/demonstrated-protocol-visium-spatial-protocols-tissue-preparation-guide. Accessed June 3, 2021.
9. 10x Genomics. [Spatial Gene Expression for FFPE Support.](#) support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression-ffpe/. Accessed June 14, 2021.
10. 10x Genomics. [Spatial Gene Expression Support.](#) support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression. Accessed June 3, 2021.
11. 10x Genomics. [Visium Spatial Gene Expression Imaging Guidelines.](#) support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression/index/doc/technical-note-visium-spatial-gene-expression-imaging-guidelines. Accessed June 3, 2021.
12. Illumina. [QC and rebalancing of single-cell gene expression libraries using the iSeq 100 System.](#) jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/systems/iseq/single-cell-library-qc-app-note-770-2019-029.PDF. Published 2020. Accessed June 3, 2021.
13. 10x Genomics. [Sequencing Metrics & Base Composition of Visium Spatial Gene Expression Libraries.](#) support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression/sequencing/doc/technical-note-sequencing-metrics-and-base-composition-of-visium-spatial-gene-expression-libraries. Accessed June 3, 2021.
14. Illumina. [BaseSpace Sequence Hub Demo Data.](#) basespace.illumina.com/datacentral. Accessed June 3, 2021.
15. 10x Genomics. [Visualize gene expression within the tissue context.](#) pages.10xgenomics.com/rs/446-PBO-704/images/10x_LIT059_ProductSheet_VisiumSpatialGeneExpression_Letter_digital.pdf. Accessed June 3, 2021.
16. 10x Genomics. [Spatial biology without limits: Spatially resolve gene expression in FFPE samples.](#) pages.10xgenomics.com/rs/446-PBO-704/images/10x_LIT000128_PS_Spatial_biology_without_limits_Spatial_gene_expression_in_FFPE.pdf. Accessed June 3, 2021.

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. M-GL-00177-JPN v1.0 13AUG2021

