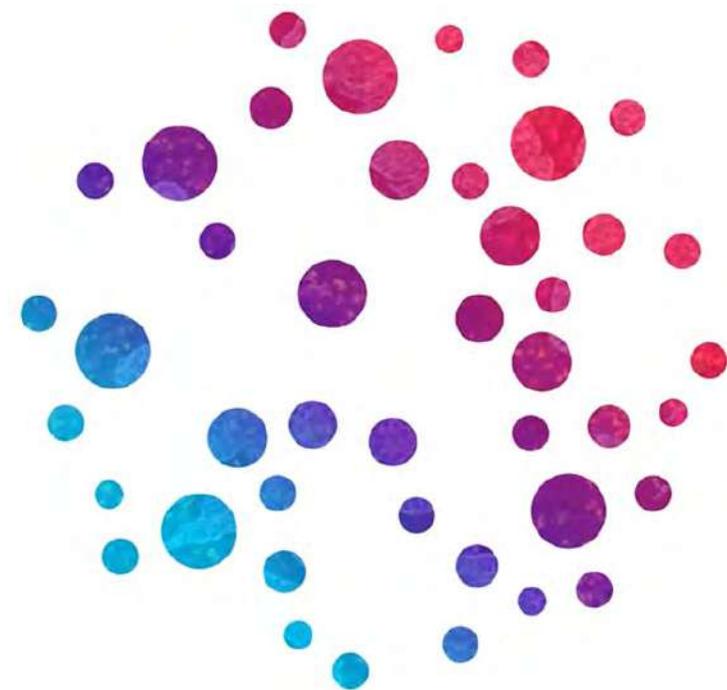


# 組織微小環境における空間的シングルセル解析の最新技術 AkoyaBioScience社 PhenoCyclerシステム

## PhenoCycler-Fusionシステム



## PhenoCycler-Openシステム



～66種類のタンパク質を標的に凍結切片、FFPE切片  
で空間的シングルセル解析を可能にするシステム

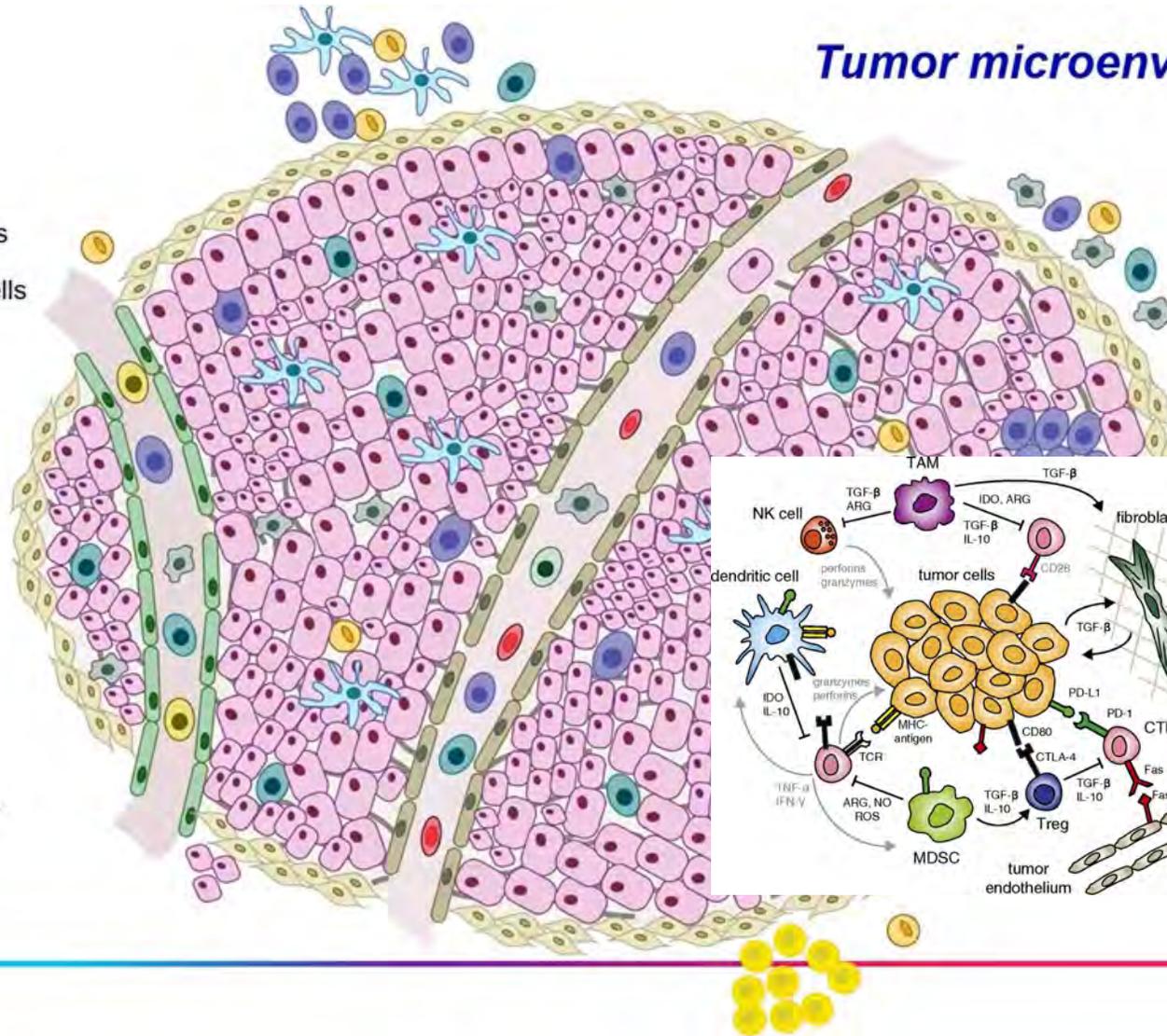
バイオストリーム株式会社 細野直哉

# 本日の内容

- 空間的シングルセル解析の重要性
- PhenoCyclerシステムの検出原理とワークフロー
- PhenoCycler Openシステムの特徴
- PhenoCycler Fusionシステムの特徴
- 空間的シングルセルデータ解析
- PhenoCyclerシステムの使用例
- 今後の展開

# 空間的シングルセル解析の重要性

- Malignant cells
- ECM
- CAFs
- Vascular endothelial cells
- Lymphatic endothelial cells
- Helper T cells
- Killer T cells
- B cells
- NK cells
- DC cells
- Macrophages
- Red blood cells
- Adipocytes
- Mesenchymal stem cells



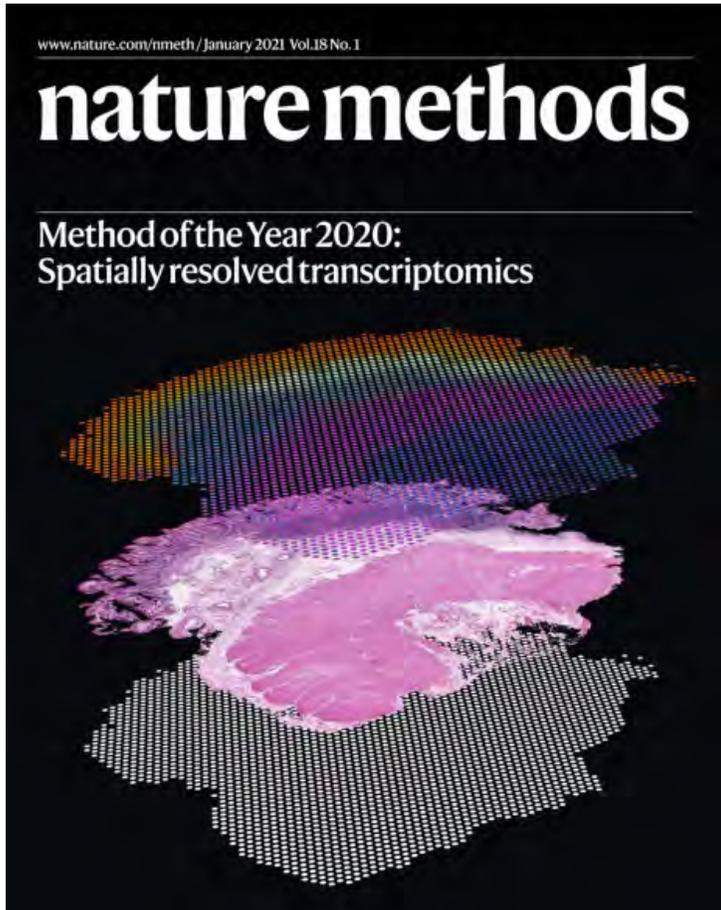
組織は個々の細胞の相互作用で成り立っており、サイトメトリーやscRNAseqに代表される細胞サスペンションの解析ではその情報が失われてしまう。

がんや様々な組織の微小環境の解析には空間情報（位置情報）を保持した切片でのシングルセル解析が重要。

しかし、現状の数マーカー免疫染色では、微小環境に存在する個々の細胞のセルタイプやその状態を把握することはできない。

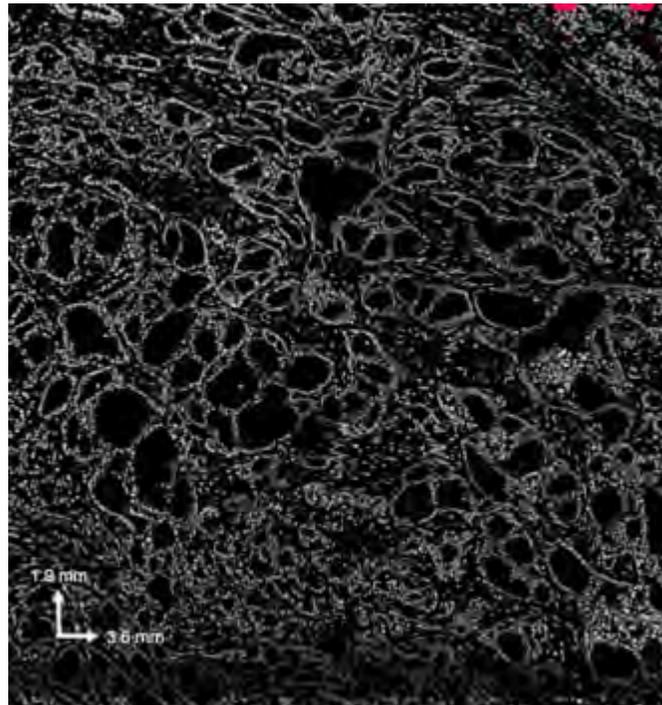
細胞表面マーカーや機能マーカーも含め包括的に解析できる高度な（～100）多重免疫染色の解析システムが必要。

# Spatial Transcriptomics is Hot, Rapidly emerged field



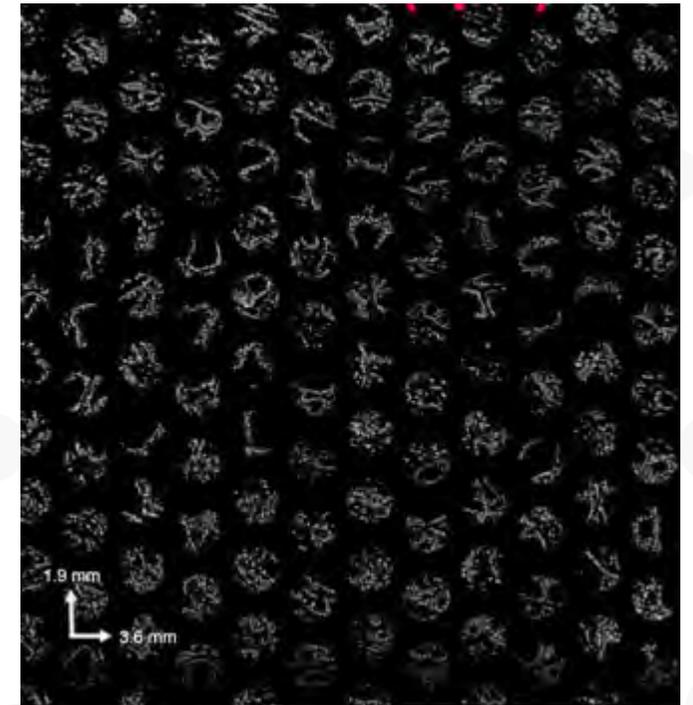
Spatial Whole Transcriptome解析は微小環境解析の有力なディスカバリーツールとして普及しつつあるが、解像度と検出力が問題 (55um)。高解像度で検出力の高いSpatial Proteomicsでのセルタイプの確認やデータ統合によるマルチオミックス解析がトレンドになりつつある。

PhenoCycler(0.37um)



Visium(55um)

VS



In his view, researchers will want single-cell resolution, which scRNA-seq provides but tissue imaging, as of yet, does not. Resolution matters because in a region of interest tissues can have a mix of cell types but "a completely wrong picture" can emerge

# PhenoCycler is the leading Spatial Phenotyping solution for Global Cell Atlas Efforts

Global program to create cell atlas

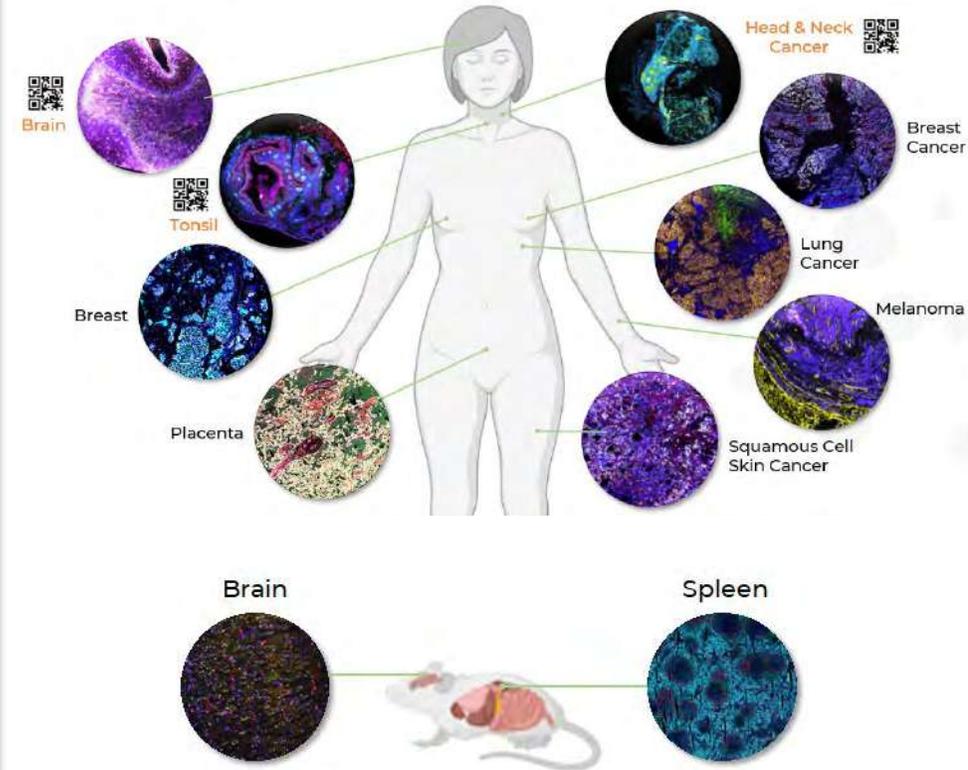


Top tier institute participation



Pacific Northwest  
NATIONAL LABORATORY

UC San Diego



Nearly 100 datasets contributed to public domain  
Over 50 publications

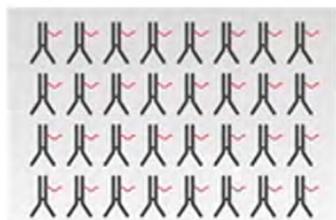
# PhenoCyclerシステムの検出原理とワークフロー



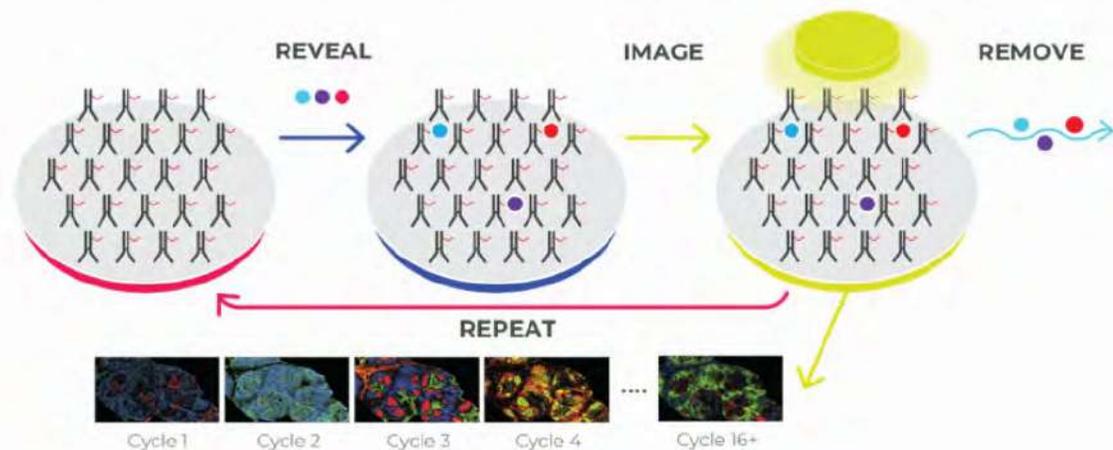
## フィルターセット

Filter	Excitation (nm)	Emission (nm)	凍結切片	FFPE
DAPI Filter – Nuclear Stain	358	461	●	●
AF488/FITC/GFP	492	517	●	×
Atto550/TRITC	560	575	●	●
Cy5	648	668	●	●
AF750 (Cy7)	753	775	×	●

## CODEX ANTIBODY PANEL



## TISSUE STAIN



- 抗体にリンクしているDNAバーコードと蛍光プローブのハイブリによりタンパク質を検出
- ハイブリと変性（室温）を繰り返し、3色の蛍光をサイクルで検出することで高度な多重染色を実現（3色X20サイクルで60ターゲットなど。35サイクル以上安定）
- 切片の再ランも可能
- バックグラウンド減算で自家蛍光の影響を最小化（PhotoBleachingで自家蛍光を実験的に減少させるプロトコールも公開）
- 抗体はバーコード付きでready-to-useの117種類とカスタムコンジュゲーションが可能（400種類以上のバリデート済み抗体）

# 自家蛍光低減のプロトコール



**Autofluorescence  
Reduction:**  
**LED + Incubation**  
**4.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +**  
**20mM NaOH in PBS**  
**2x 45 min**

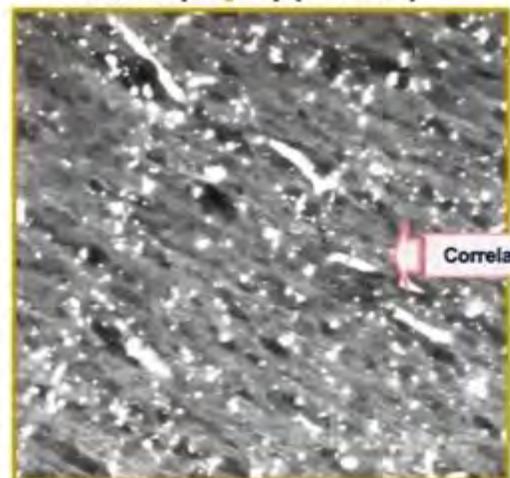


# Quantitative Evaluation of Autofluorescence Reduction

FFPE Human Brain: Two serial sections

No AF Reduction

Blank | Cy3 | (350ms)



CD31 | Cy3/ATTO550 | (350ms)

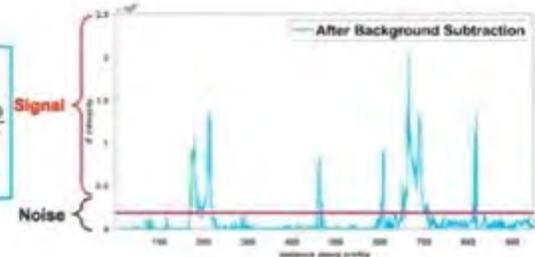


Correlation = 0.9227

After Background Subtraction



SNR:  
 $\frac{\text{mean}(\text{Signal})}{\text{mean}(\text{Noise})}$   
 = 25.908



AF Reduction

Blank | Cy3 | (350ms)



CD31 | Cy3/ATTO550 | (350ms)

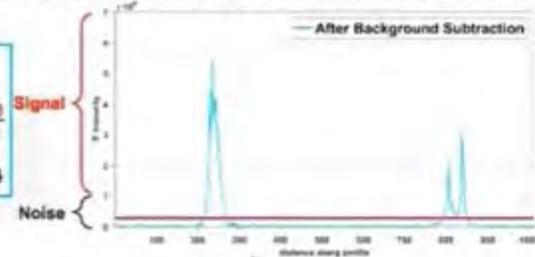


Correlation = 0.1061

After Background Subtraction



SNR:  
 $\frac{\text{mean}(\text{Signal})}{\text{mean}(\text{Noise})}$   
 = 108.614



# PhenoCycler抗体リスト (バーコードコンジュゲート済み-117)

Human FFPE			Human FF	Mouse FF
Anti-Hu ATM	Anti-Hu CD107a	Anti-Hu LAG3	Anti-Hu CD2	Anti-Mu CD3
Anti-Hu b-Catenin1	Anti-Hu CD141	Anti-Hu LIF	Anti-Hu CD3	Anti-Mu CD4
Anti-Hu Bcl-2	Anti-Hu CD163	Anti-Hu Mac2/Galectin-3	Anti-Hu CD4	Anti-Mu CD5
Anti-Hu Beta-actin	Anti-Hu Collagen IV	Anti-Hu MPO	Anti-Hu CD8	Anti-Mu CD8a
'Anti-Hu Beta-actin	Anti-Hu E-cadherin	Anti-Hu Pan-Cytokeratin	Anti-Hu CD11c	Anti-Mu CD11b
Anti-Hu Caveolin	Anti-Hu EpCAM	'Anti-Hu Pan-Cytokeratin	Anti-Hu CD19	Anti-Mu CD11c
Anti-Hu CD3e	Anti-Hu ER	Anti-Hu PCNA	Anti-Hu CD21	Anti-Mu CD19
Anti-Hu CD4	Anti-Hu FOXP3	Anti-Hu PD-1	Anti-Hu CD31	Anti-Mu CD21/35
Anti-Hu CD8	Anti-Hu GATA3	Anti-Hu PD-L1	Anti-Hu CD34	Anti-Mu CD24
Anti-Hu CD11c	Anti-Hu GP100	Anti-Hu Podoplanin	Anti-Hu CD38	Anti-Mu CD31
Anti-Hu CD14	Anti-Hu Granzyme B	Anti-Hu SMA	Anti-Hu CD45	Anti-Mu CD38
Anti-Hu CD20	Anti-Hu HIF1A	Anti-Hu SOX2	Anti-Hu CD45RO	Anti-Hu/Mu CD44
Anti-Hu CD21	Anti-Hu Histone H3 Phospho	Anti-Hu T-bet/TBX21	Anti-Hu/Mu CD49f	Anti-Mu CD45
Anti-Hu CD31	Anti-Hu HLA-A	Anti-Hu TCF-1	Anti-Hu CD69	Anti-Mu CD45R/B220
Anti-Hu CD34	Anti-Hu HLA-DR	Anti-Hu TFAM	Anti-Hu CD90	Anti-Hu/Mu CD49f
Anti-Hu CD38	'Anti-Hu HLA-DR	Anti-Hu TOX	Anti-Hu CD104	Anti-Mu CD71
Anti-Hu CD39	Anti-Hu HLA-E	Anti-Hu TP63	Anti-Hu CD138	Anti-Mu CD90.2
Anti-Hu CD40	Anti-Hu ICOS	Anti-Hu Vimentin	Anti-Hu CD278	Anti-Mu CD169
Anti-Hu CD44	Anti-Hu IDO1	Anti-Hu VISTA	Anti-Hu HLA-DR	Anti-Mu IgD
Anti-Hu CD45	Anti-Hu IFNG		Anti-Hu/Mu Ki67	Anti-Mu IgM
Anti-Hu CD45RO	Anti-Hu iNOS		Anti-Hu Pan-Cytokeratin	Anti-Hu/Mu Ki67
Anti-Hu CD56	Anti-Hu Keratin 5		Anti-Hu PD-1	Anti-Mu Ly6g
Anti-Hu CD66	Anti-Hu Keratin 8/18		Anti-Hu Podoplanin	Anti-Mu MHC II
Anti-Hu CD68	Anti-Hu Keratin 14			Anti-Mu TCRb
Anti-Hu CD79a	Anti-Hu/Mu Ki67			Anti-Mu Ter119

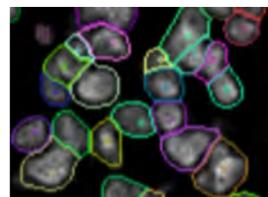
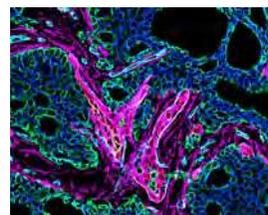
カスタムでのコンジュゲートも可能。カスタムコンジュゲートで確認されているものも含めると~400種類  
(HubMAPなどのプロジェクトで確認された抗体リストも順次アップデートされている)

# PhenoCycler-Openシステムの特徴

## PhenoCycler-Openシステム



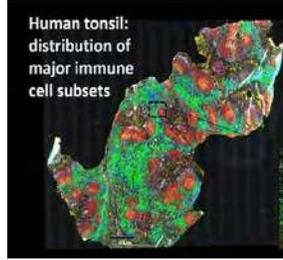
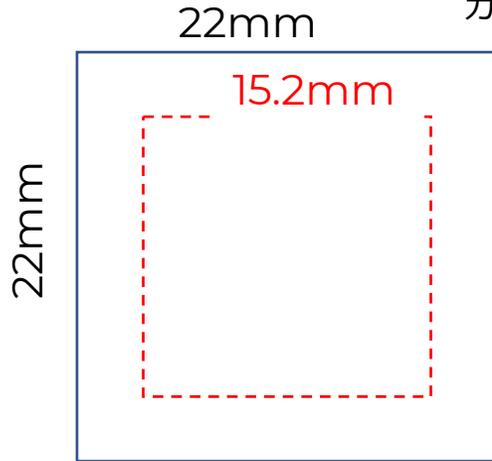
22mm四方のカバースリップ、開放系のシステム



- キーエンスBZX-700シリーズ, 800シリーズまたはZEISS Axio Oberver7と組み合わせて使用
- 凍結切片、FFPE切片を用いて~66種類のタンパク質をシングルセルの解像度でイメージングが可能 (解像度はそれぞれ0.37um, 0.33um)
- 専用のカバースリップに組織切片をマウント (切片の厚みは5-10um) (イメージエリア15 x 15 mm)
- 開放系での反応システム
- イメージエリア内で領域を設定してイメージング (Zスタックを利用)
- イメージデータから個々の細胞をセグメント化し、次元削減、クラスタリング解析や細胞間距離を指標にした細胞間相互作用の解析が可能。
- 通常の顕微鏡として利用する際に切り替えが容易
- システム価格 : 2698万円 (PhenoCycler+解析ソフト) (別途キーエンス社の顕微鏡 (約930万円) と解析コンピュータ (約120万円) が必要になります)
- 国内で20台の実績 (トータルで約300台の実績)

# Openシステム-イメージ領域と測定時間

イメージ可能エリア：  
カバースリップの中央15.2mm四方

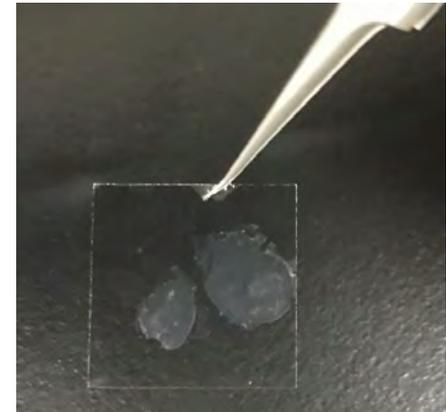


Microscope	Targets	# of Cycles	Sample Size (# of tiles)	Total Time
Keyence BZ-X700	24	10	2x2 mm (16 tiles)	4:47
			4x4 mm (49 tiles)	9:40
BZ-X800	40	17	2x2 mm (16 tiles)	8:23
			4x4 mm (49 tiles)	16:56

細胞の平均サイズが10umと仮定すると2mmx2mmで40000細胞、4mmx4mmで160000細胞

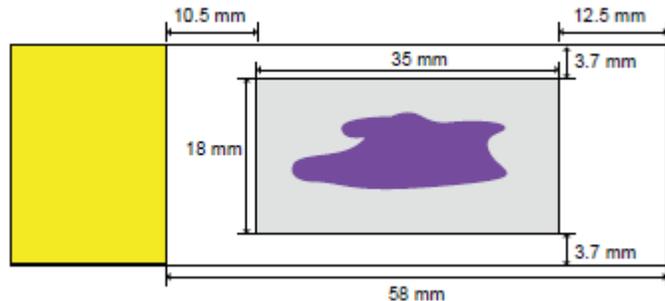
## Openシステムでの留意点

- カバースリップが割れやすく、取り扱いに注意が必要
- PhenoCyclerでの反応・検出時間が長い（1cmを超える全面スキャンは困難）  
例：1cm四方の切片で24マーカーを解析する際、ランの時間は約2日間
- Zスタックデータの利用でデータ量が多く画像処理時間が長い  
画像処理用にハイスペックのコンピュータを必要とする  
例：1cm四方の切片で24マーカーデータの場合、生データ850Gb、処理されたイメージデータ73.4Gb  
Zスタックデータを用いた合成イメージの作成、各種補正、スティッチング等に2日間



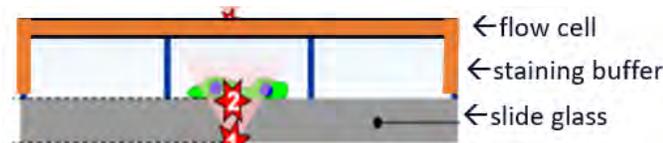
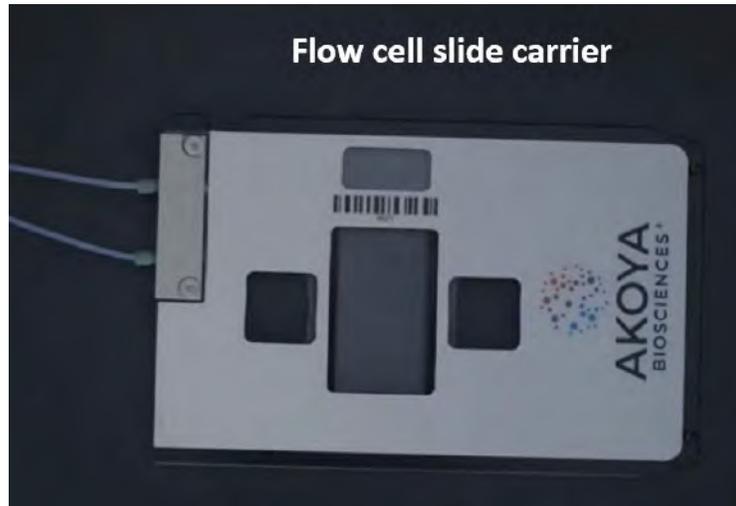
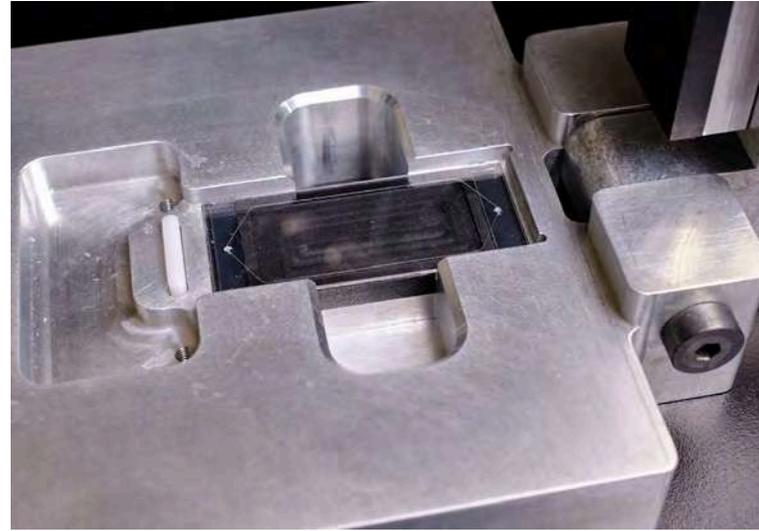
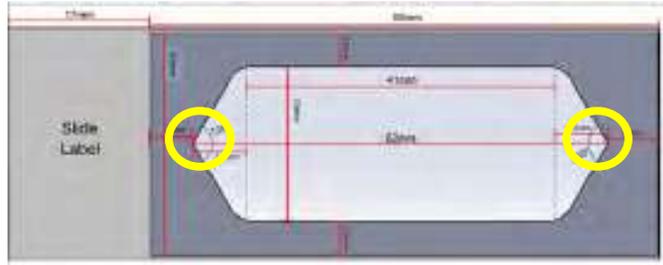
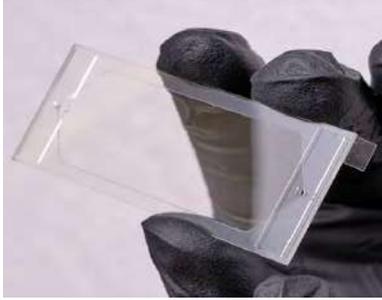
大きなイメージエリアでは染色からデータを得るまでに1週間

# PhenoCycler-Fusion System の特徴

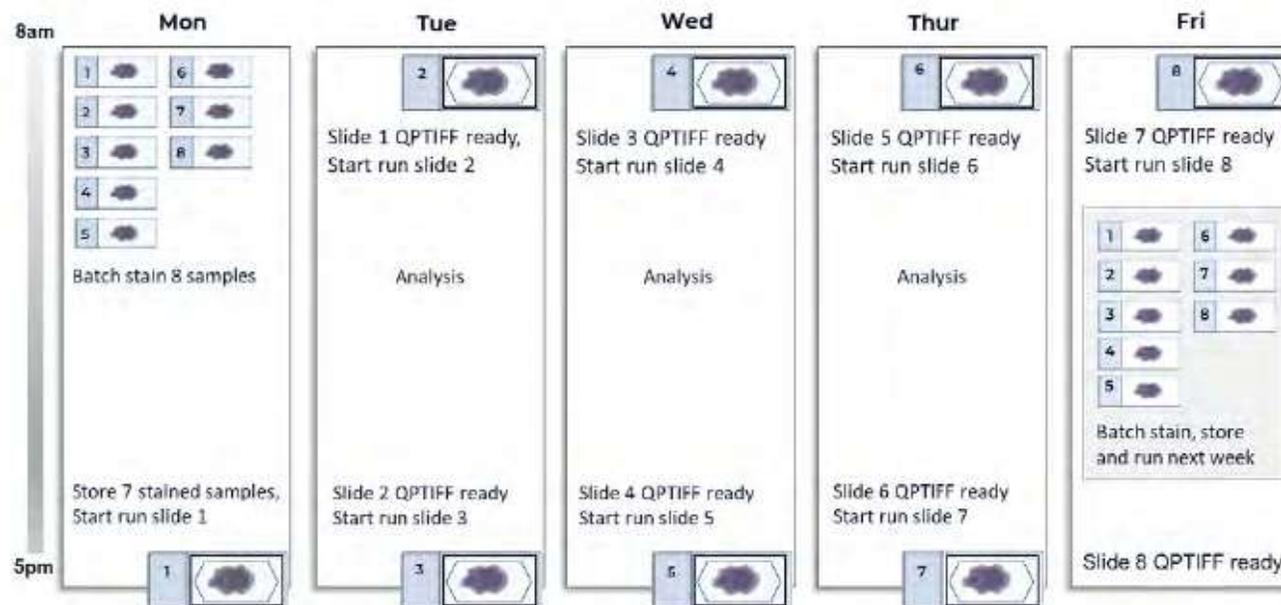
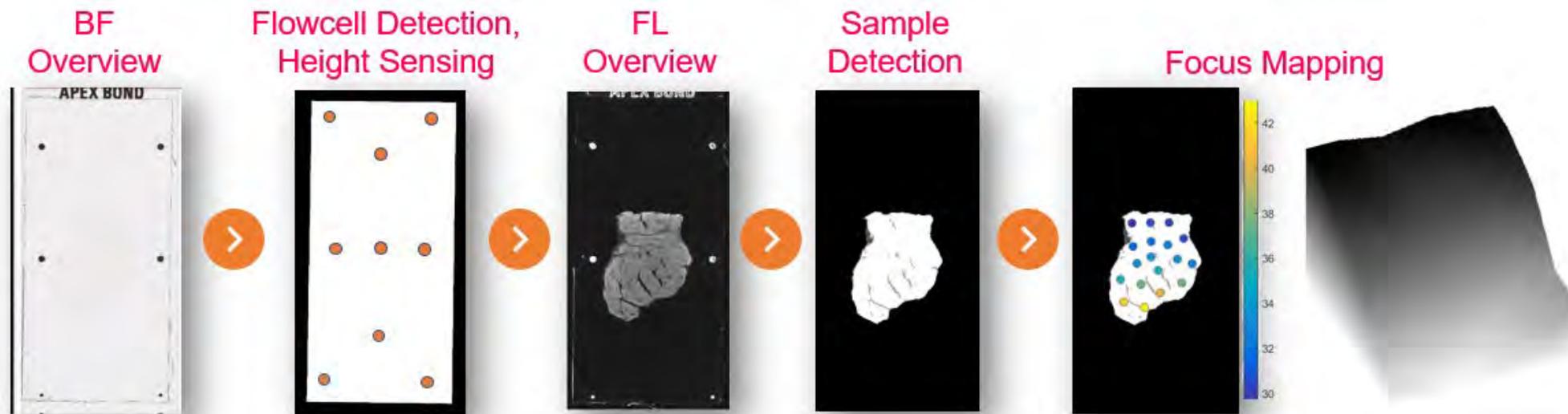


- Akoya BioSicence社自家発のFusionシステムと組み合わせて使用
- 凍結切片、FFPE切片を用いて～66種類のタンパク質をシングルセルの解像度でイメージングが可能---解像度は0.5um
- 通常のスライドガラスでランを行える(切片の厚みは5-10um) アーカイブされているスライドガラスも利用可能
- プロセル技術を利用した閉鎖系で反応を効率化
- 全面スキャン(18 x 35mm)で領域の選択が必要ない
- Zスタックが不要で高速なスキャンスピードと画像処理を実現 (10 x 10mm切片で24マーカの場合、8スライド/week vs 1カバースリップ/週) (生データのサイズ : 62Gb vs 850Gb, 処理後のデータサイズ : 4.5Gb vs 73.4Gb)
- イメージデータから個々の細胞をセグメント化し、次元削減、クラスタリング解析や細胞間距離を指標にした細胞間相互作用の解析が可能。
- チラミド蛍光増幅試薬Opalの系も利用可能 (一度に4スライド)
- RNAの検出も可能に (12plex RNAScope, 100plexのmRNA検出)
- システム価格 : 6400万円 (PhenoCycler+Fusion+解析ソフトInform)

# フローセル技術

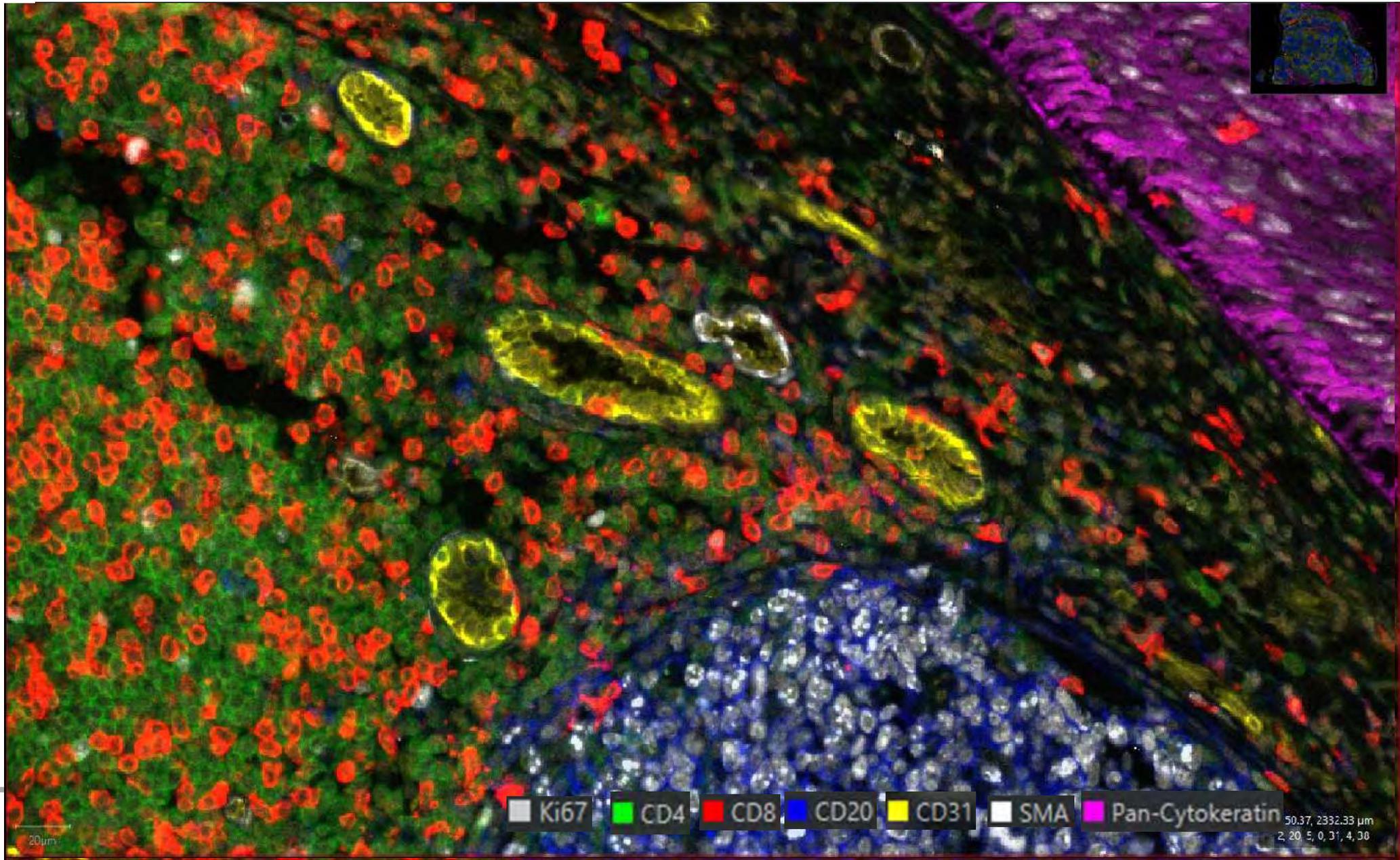


# 組織切片の自動検出とFocus Mapping機能による高速化



- 24マーカー(10サイクル) のラン時間は約9時間
- ランの終了と同時に解析も終了
- 8サンプル/週の解析が可能

# Human Tonsil (24plex) 12.2mm x8.9mm, >1M cells



# 空間的シングルセル解析の流れ

## 1次解析(QuPathなど)

イメージデータの取得



解析領域の指定



Cell Segmentation



Cell Classification / Clustering  
—教師あり機械学習ベースの分類  
—教師無しクラスタリング

## 2次解析(CytoMAPなど)

細胞レベルの解析

次元削減 (UMAPなど)



フェノタイプマッピング



細胞間相互作用の解析

Cellular Neighborhood (CN)レベルの解析

CNの検出



CNの領域へのマッピング



CN間相互作用の解析

# 核シグナルによる細胞のセグメンテーション

## Watershed Algorithm

DAPI Image



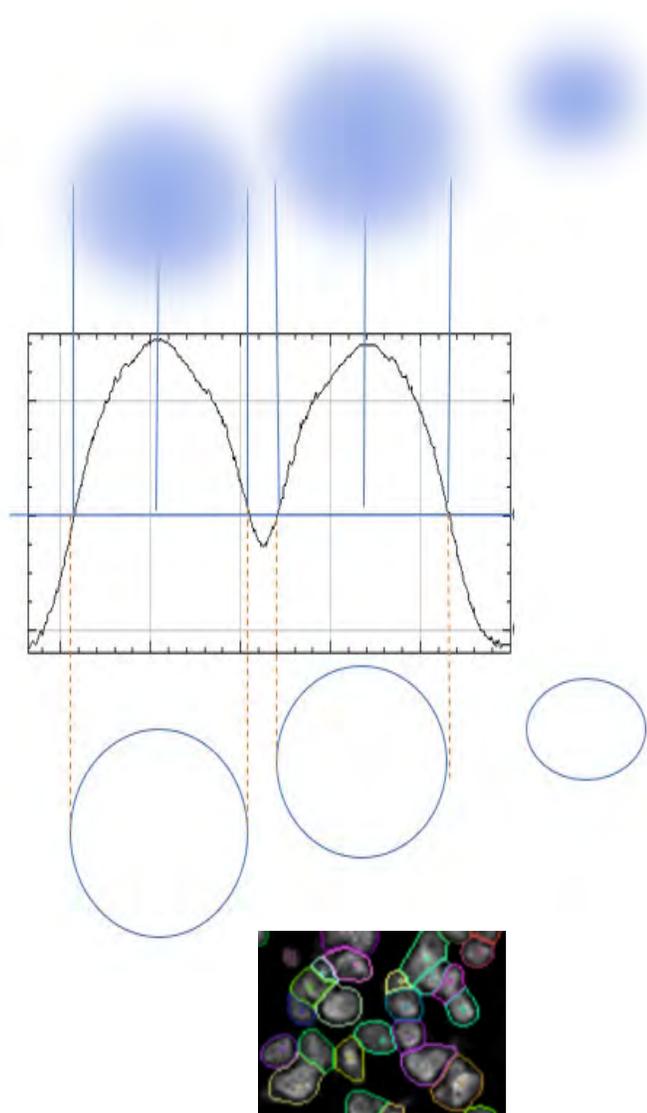
Intensity Profile

極大値の探索  
と領域拡張

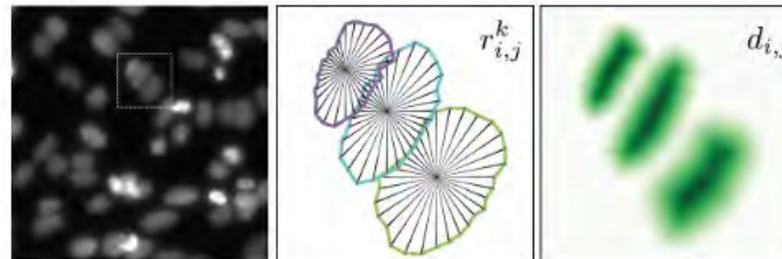


距離、近隣シグナル  
ベースで細胞の境界  
を推定

Cells Outline



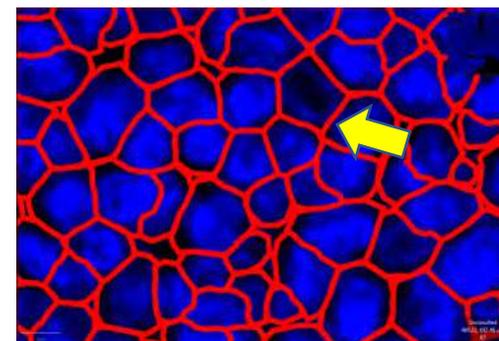
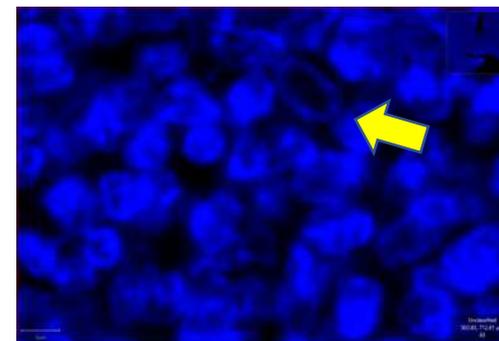
## StarDist Algorithm (HubMap) (<https://github.com/stardist/stardist>)



事前学習されたモデルを利用した深層学習で各ピクセルのシグナル、バックグラウンドを判別し核の境界をポリゴンで予測

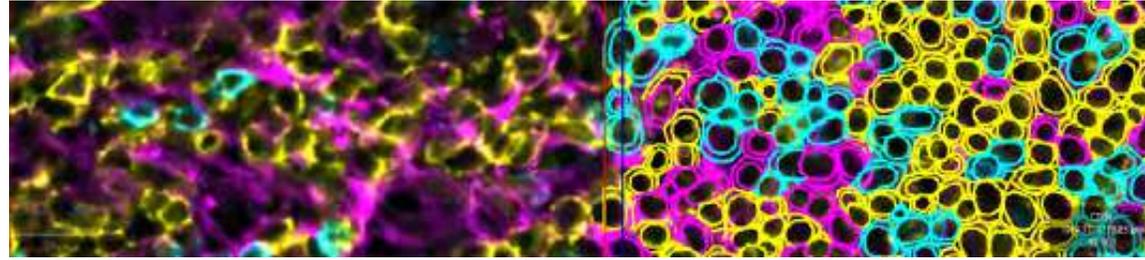


距離、近隣シグナル  
ベースで細胞の境界  
を推定



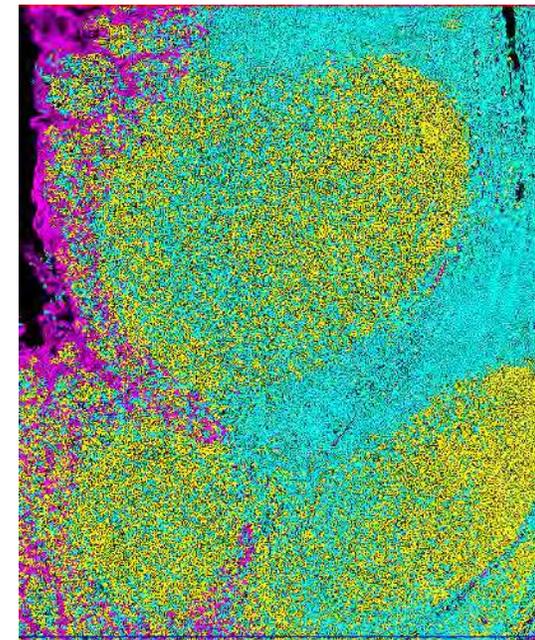
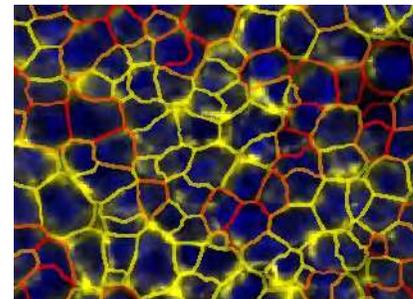
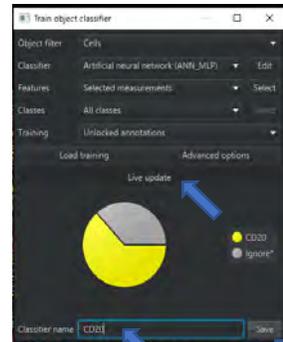
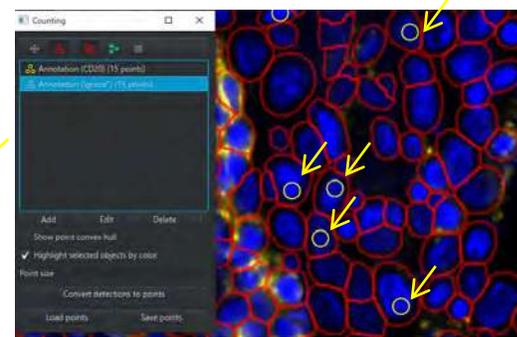
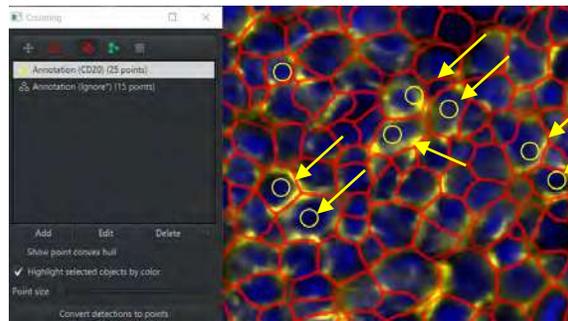
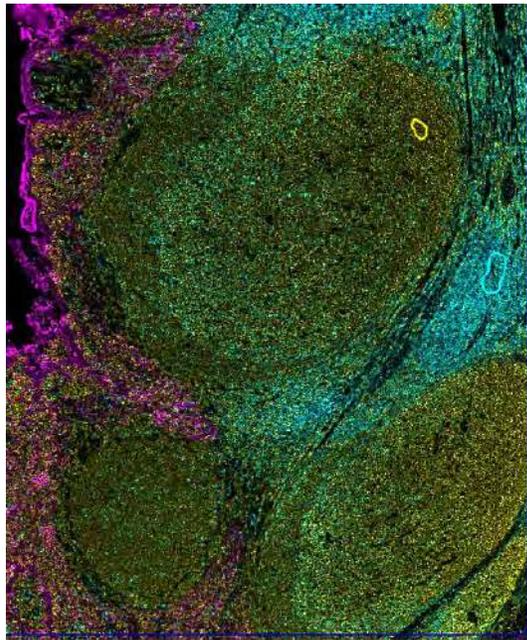
# QuPath (無償のツール) による細胞のセグメンテーションと分類

Cell Segmentation (QuPath original & StarDist)  
DAPIを利用したクラスタリング



Cell Classification

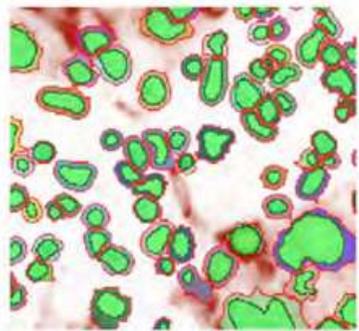
(教師付き機械学習でトレーニングされた分類子でテストデータの予測を行う)



# 核、細胞質、細胞膜のマーカなどマルチパラメーターを利用した Cell Segmentation & Cell Classificationの解析ツール

## Commercial

Akoya Informソフトウェア &  
PhenoptrReport



More flexible in cell  
segmentation options →



Indicalabs HALOソフトウェア



VISIOPHARMソフトウェア



## Public open source

bioRxiv

### Evaluation of cell segmentation methods without reference segmentations

Haoran Chen, Robert F. Murphy

doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.17.460800>

Table 3 Segmentation methods evaluated

Method	Inputs					Output
	Cytoplasm	Cell Membrane	Nucleus	Dimension	Requires scale	Nuclear mask
DeepCell 0.6.0		X	X	2D	No	Yes
DeepCell 0.6.0	X		X	2D	No	Yes
DeepCell 0.9.0 (new)		X	X	2D	No	Yes
DeepCell 0.9.0 (new)	X		X	2D	No	Yes
Cellpose 0.0.3.1	X		X	2D/3D	No	Yes
Cellpose 0.6.1 (new)	X		X	2D/3D	No	Yes
CellSegm		X		2D/3D	Yes	No
CellIX		X		2D	Yes	No
CellProfiler		X	X	2D	Yes	No
AICS (classic)		X	X	2D/3D	Yes	No
Voronoi			X	2D	No	Yes

論文ではDeepCell、Cellposeのクオリティスコアが高くなっている

# 空間的シングルセル解析の流れ

## 1次解析(QuPathなど)

イメージデータの取得



解析領域の指定



Cell Segmentation



Cell Classification / Clustering  
—教師あり機械学習ベースの分類  
—教師無しクラスタリング



## 2次解析 (CytoMAPなど)

細胞レベルの解析

次元削減 (UMAPなど)



フェノタイプマッピング



細胞間相互作用の解析



Cellular Neighborhood (CN)レベルの解析

CNの検出



CNの領域へのマッピング

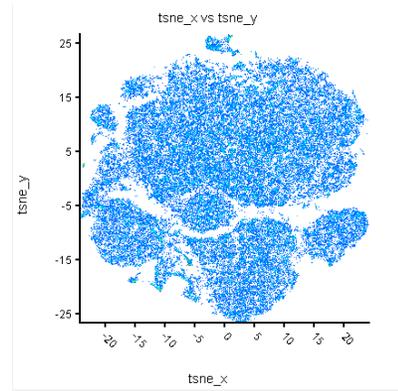


CN間相互作用の解析

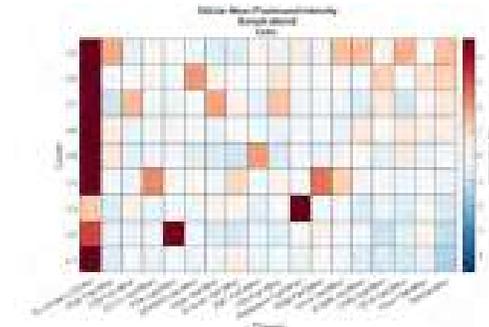
# 細胞レベルの解析 (無償の解析ツールCytoMAP)

フェノタイプマッピング

tsNE/UMAP(次元削減)

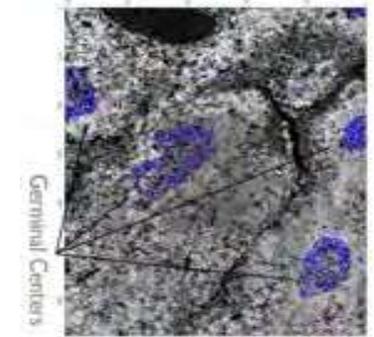
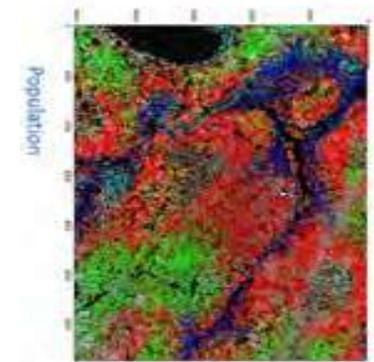


教師なしクラスタリング

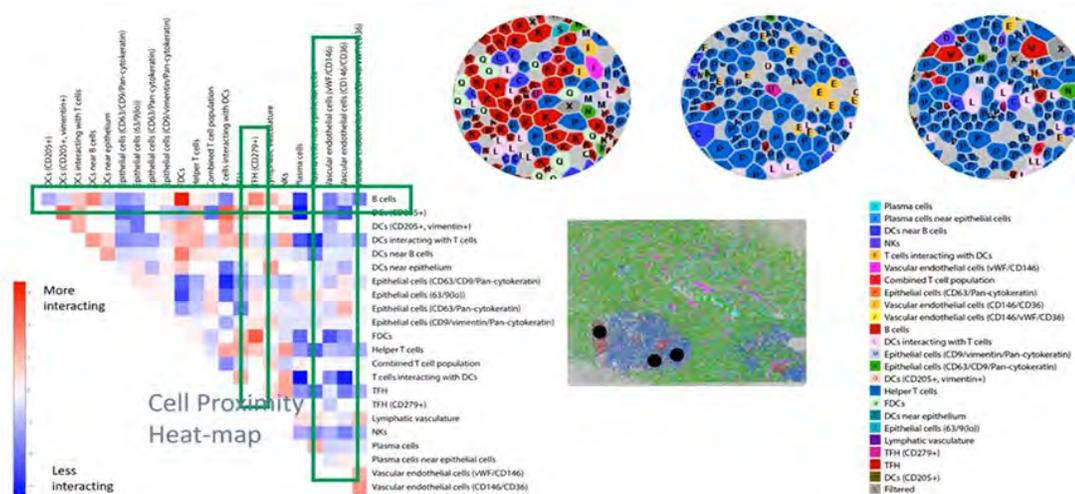


アノテーション (マニュアル)

Phenotype Assignment	Population	Positive Markers (All CD45+)
Stromal Cells	3414	CD90+, CD9+, HLA-DR+, Cytokeratin+
Stromal Cells in connective regions	807	CD31+, CD90+, Collagen IV+
T <sub>H</sub> Cells	328	CD3+, CD4+, CD7+, CD278+, CD279+
Activated T <sub>H</sub> Cells	1459	CD3+, CD4+, CD40+, CD278+, CD279+
Activated Helper T cells	11866	CD3+, CD4+, CD7(+)
T Cells near connective regions	222	CD3+, CD29+, CD90(+), Collagen IV(+)
Proliferating Th-1 cells	2411	CD4+, Ki67+
Dendritic Cells	135	CD4+, HLA-DR+
Dendritic Cells	366	CD4+, CD11c+
Dendritic Cells	429	CD11c+, HLA-DR+
NK cells	126	CD3-, CD7+
Plasma Cells	2180	CD31+, CD38+, CD40+
Lymphatic Vasculature Cells	1336	CD9+, Podoplanin+
Mature, proliferating B cells near follicular matrix	960	CD19+, CD22+, CD21+, CD90+, Ki67+
Mature B cells	32840	CD19+, CD22+



細胞間相互作用の解析



Cell Proximity Heat-map

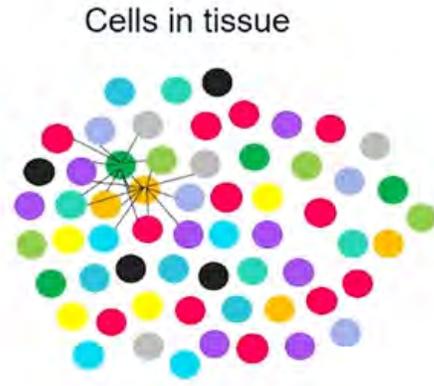
More interacting  
Less interacting

- Plasma cells
- Plasma cells near epithelial cells
- DCs near B cells
- NKs
- T cells interacting with DCs
- Vascular endothelial cells (vWF/CD146)
- Combined T cell population
- Epithelial cells (CD63/Pan-cytokeratin)
- Vascular endothelial cells (CD146/CD36)
- Vascular endothelial cells (CD146/vWF/CD36)
- B cells
- DCs interacting with T cells
- Epithelial cells (CD63/vimentin/Pan-cytokeratin)
- Epithelial cells (CD63/CD4/Pan-cytokeratin)
- T cells interacting with DCs
- Helper T cells
- Combined T cell population
- T cells interacting with DCs
- TH1 (CD279+)
- Lymphatic vasculature
- NKs
- Plasma cells
- Plasma cells near epithelial cells
- Vascular endothelial cells (vWF/CD146)
- Vascular endothelial cells (CD146/CD36)
- Filtered

# Cellular Neighborhood解析 (CytoMAP)

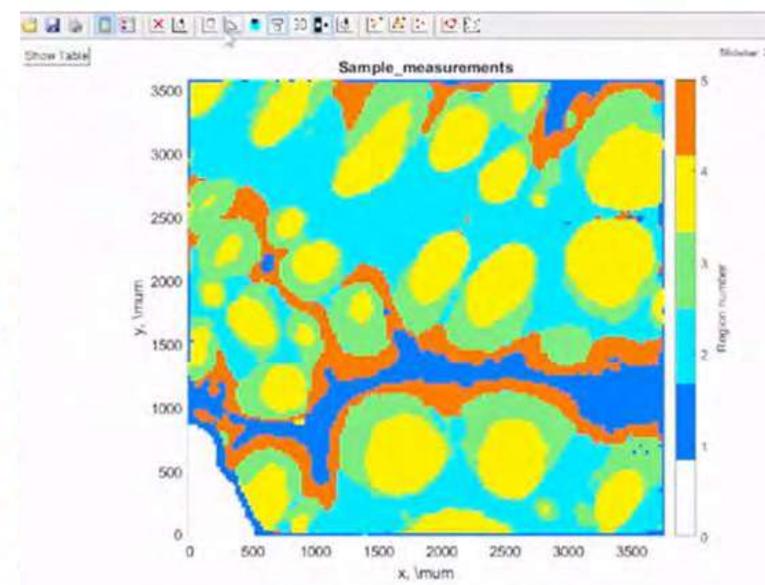
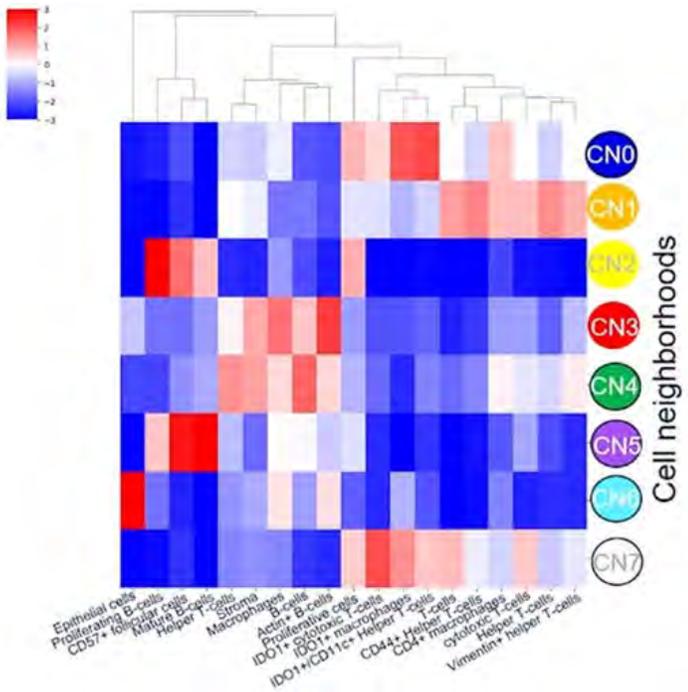
<https://www.akoyabio.com/webinar/codex-with-seurat-a-high-dimensional-approach-to-unlocking-spatial-insights/>

## Cellular Neighborhood解析

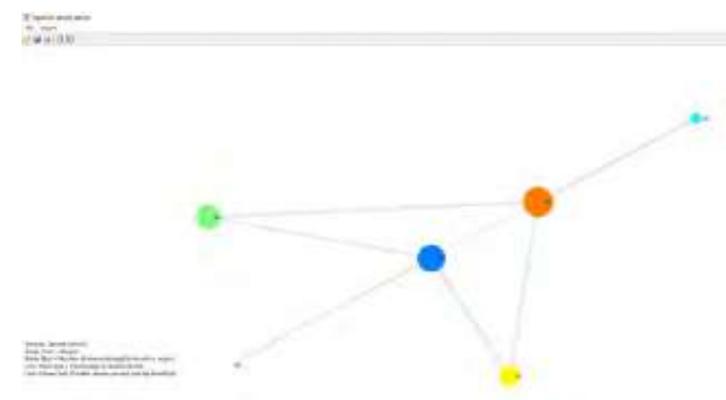


Cluster spatial windows to find common patterns of proximity, i.e., cell neighborhoods

- ● ● ● ● ● ● ● ● ● Cell 1 neighbors (window 1)
- ● ● ● ● ● ● ● ● ● Cell 2 neighbors (window 2)
- 
- 
- 



## Cellular Neighborhood Interaction



解析可能なツール  
Neighborhood Coordination  
CytoMAP,  
VisioPharm

# MAV, QuPathの使い方はYoutubeにて公開しております。

<https://www.youtube.com/channel/UCKgB6yUz-cVef-l-3U4siNQ/videos>



## バイオストリーム株式会社

チャンネル登録者数 25人

登録済み



ホーム

動画

再生リスト

チャンネル

概要



アップロード済み

並び替え



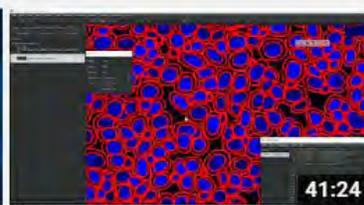
20分でわかる！Akoya PhenoCycler-Fusion (旧名...

24回視聴・3週間前



PhenoCyclerのデータ解析：QuPath後のCytoMapによる...

48回視聴・1か月前



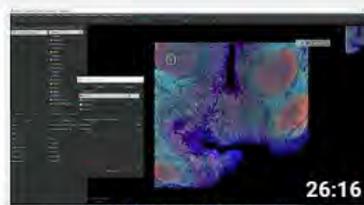
PhenoCycler (旧名CODEX)データのQuPathでのCell...

48回視聴・1か月前



Akoya PhenoCycler (旧名CODEX)の抗体のcustom...

14回視聴・1か月前



PhenoCyclerデータのQuPathでの解析。データのインポ...

73回視聴・1か月前



PhenoCycler-FusionシステムデータのPhenochartソフト...

17回視聴・1か月前



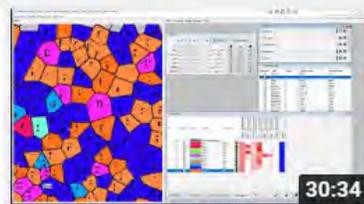
PhenoCycler (旧名CODEX)データのQupahおよび...

58回視聴・1か月前



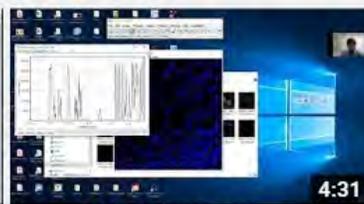
Akoya PhenoCycler (旧名CODEX)システムのご紹介...

213回視聴・1か月前



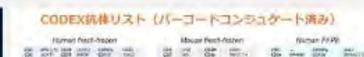
Akoya CODEX MAV(イメージビュー、Spatial解析など) ...

121回視聴・10か月前



ImageJでCODEXデータのSNを確認する方法

19回視聴・11か月前



## 組織マイクロアレイを用いた効率的な大腸がんの微小環境の解析

Cell

### Coordinated Cellular Neighborhoods Orchestrate Antitumoral Immunity at the Colorectal Cancer Invasive Front

Cell. 2020 Oct 29;183(3):838.

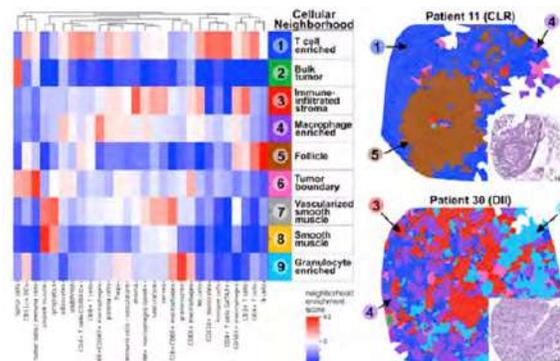
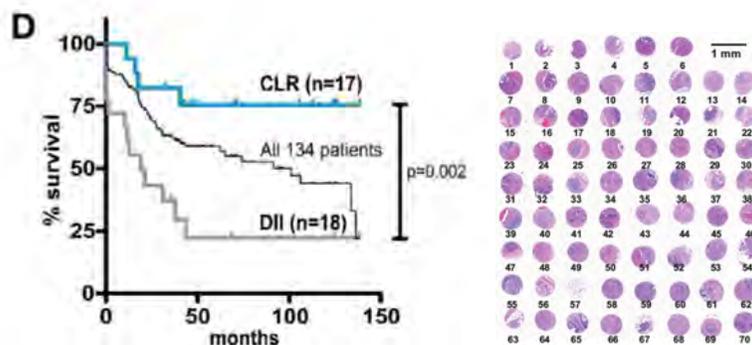
Resource

関連論文



CODEX multiplexed tissue imaging with DNA-conjugated antibodies

Sarah Black<sup>1,2,6</sup>, Darci Phillips<sup>1,2,6</sup>, John W. Hickey<sup>1,2,6</sup>, Julia Kennedy-Darling<sup>1,4</sup>, Vishal G. Venkataraman<sup>1,2</sup>, Nikolay Samusik<sup>1,5</sup>, Yuri Goltsev<sup>1,2</sup>, Christian M. Schürch<sup>1,2,3,7,8</sup> and Garry P. Nolan<sup>1,2,7,8</sup>

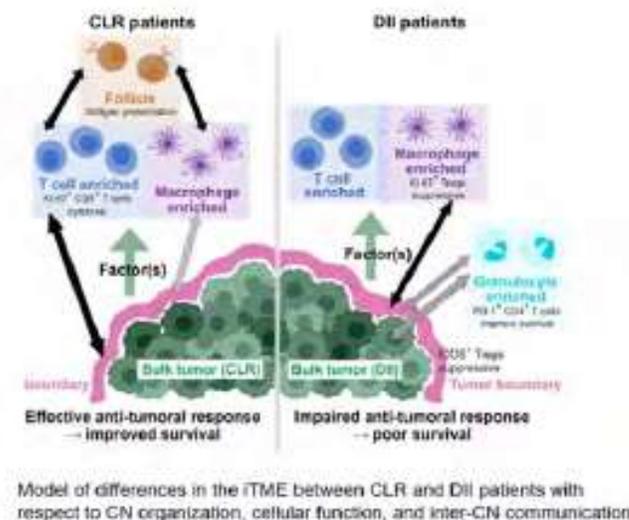
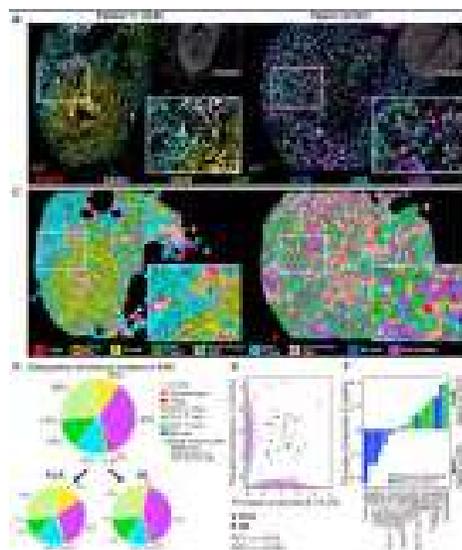


- PhenoCyclerシステムの原理、方法を詳述
- 組織マイクロアレイとの組み合わせでハイスループット解析を実現

• 2枚のカバースリップに140組織スポット (0.6mm)をマウントし、大腸がん35検体 (17 CLR vs 18 DII)を解析。

• 56タンパク質を同時に解析して28のセルタイプを同定し、シングルセルレベルの細胞間相互作用を解析。

• 細胞間相互作用だけでなく領域としての特徴づけを行い (CN: Cellular Neighborhood)、領域間の相互作用解析により予後に関連する微小環境の特徴を同定。



Model of differences in the iTME between CLR and DII patients with respect to CN organization, cellular function, and inter-CN communication

# New Biomarkers are Needed to Better Predict Patient Response



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26974-6>

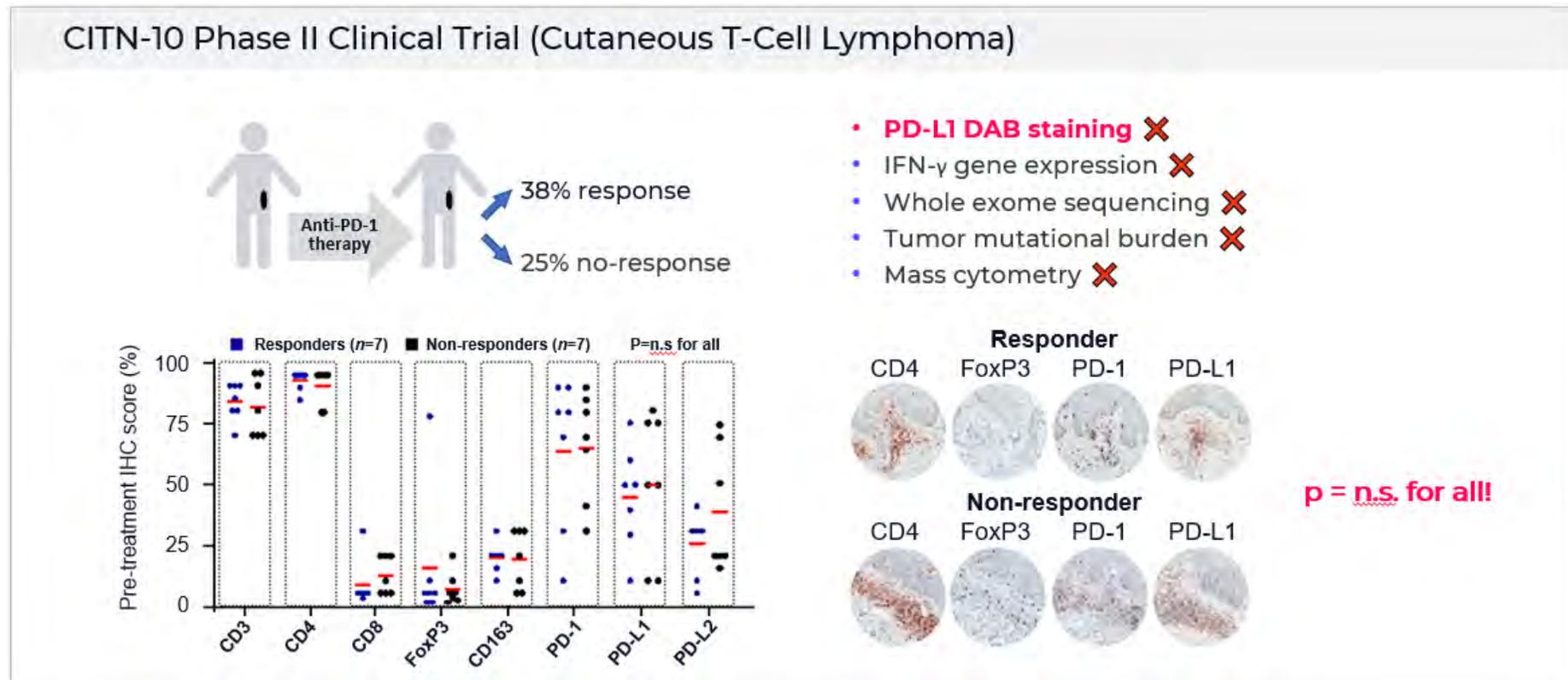
OPEN

Check for updates

## Immune cell topography predicts response to PD-1 blockade in cutaneous T cell lymphoma

Darci Phillips<sup>1,2,3,9</sup>, Magdalena Matusiak<sup>3,9</sup>, Belén Rivero Gutierrez<sup>3</sup>, Salil S. Bhate<sup>1,3,4</sup>, Graham L. Barlow<sup>1,3</sup>, Sizun Jiang<sup>1,3,5</sup>, Janos Demeter<sup>1</sup>, Kimberly S. Smythe<sup>6</sup>, Robert H. Pierce<sup>6</sup>, Steven P. Fling<sup>6</sup>, Nirasha Ramchurren<sup>6</sup>, Martin A. Cheever<sup>6</sup>, Yury Goltsev<sup>1,3</sup>, Robert B. West<sup>3</sup>, Michael S. Khodadoust<sup>7,10</sup>, Youn H. Kim<sup>2,7,10</sup>, Christian M. Schürch<sup>1,3,8,10</sup> & Garry P. Nolan<sup>1,3,10</sup>

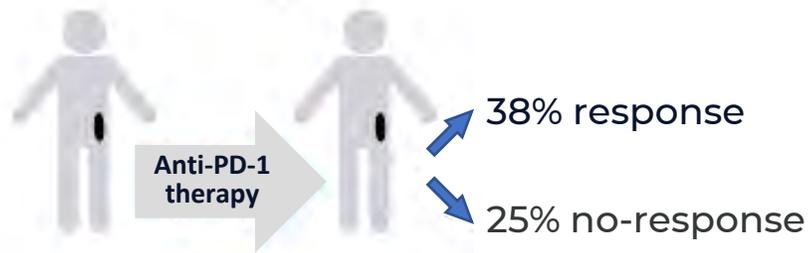
## Conventional Biomarkers Fail to Predict Outcomes in Lymphoma



# Context Matters: Spatial Neighborhoods Predict Response

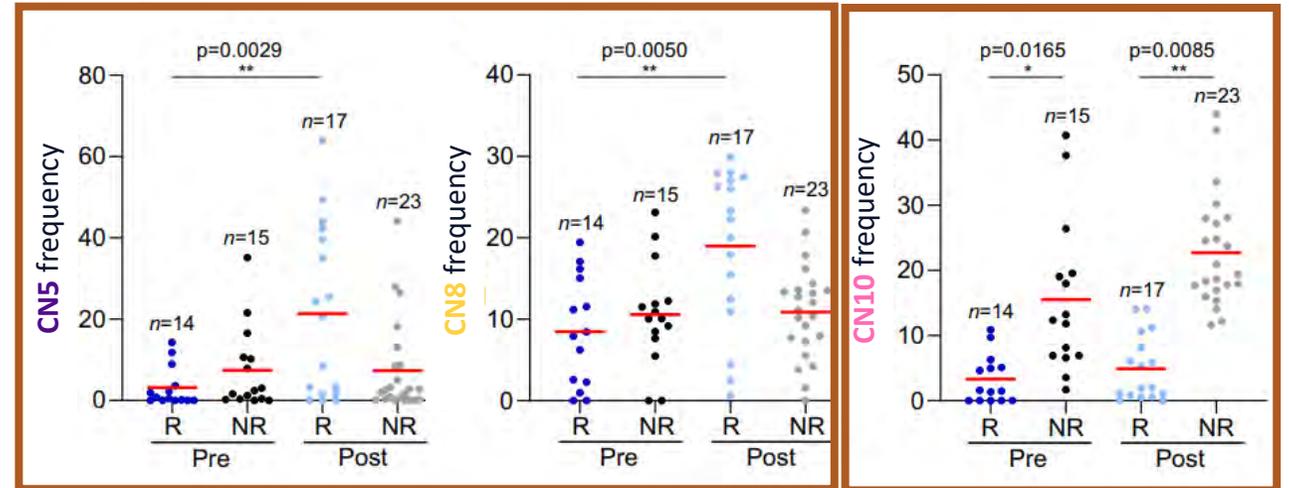
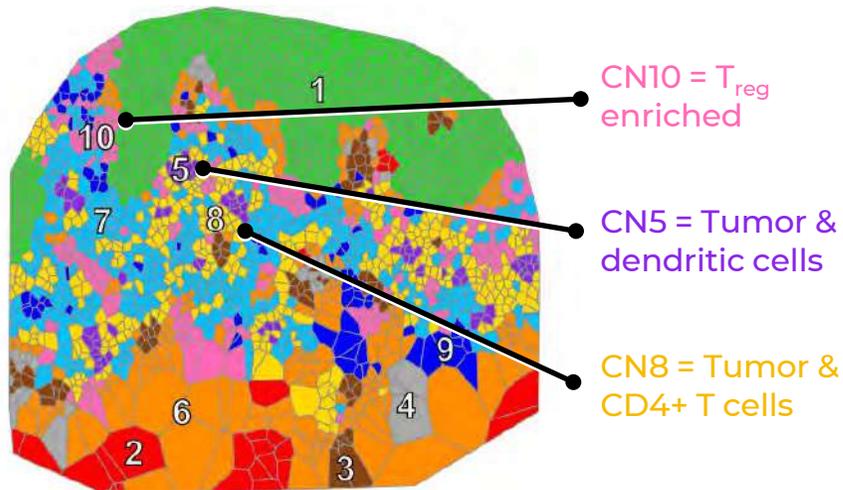
## Discovery Uncovers Predictive Potential of Spatial Neighborhoods

### CITN-10 Phase II Clinical Trial (Cutaneous T-Cell Lymphoma)



- 56-plex IO Panel
- Multiple spatial neighborhoods differentiate responders vs. non-responders!

Spatial Neighborhood Map Responder



# Spatial Neighborhoods in Today's Literature

## Rapid Adoption of SNs as Potential Biomarkers Across the Biomedical Literature

**Cell** Resource

### Coordinated Cellular Neighborhoods Orchestrate Antitumoral Immunity at the Colorectal Cancer Invasive Front

Graphical Abstract

**Technology**  
CODEX + Optimization for Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue (FFPE)

**Data Collection**  
Colorectal Cancer (High Risk, Low Risk) → FFPE → Tissue Microarray

**Computation**  
Cell Types, Cell Neighborhoods  
① Coupling  
② Functional State  
③ Communication

**Authors**  
Christian M. Schürch, Salil S. Bhate, Graham L. Barlow, ..., Nikolay Samusik, Yury Goltsev, Garry P. Nolan

**Correspondence**  
christian.m.schuerch@gmail.com (C.M.S.), gnolan@stanford.edu (G.P.N.)

**In Brief**  
A multiplexed tissue imaging and computational analysis framework applied to colorectal cancer allows interrogation of how spatial organization of the immune tumor microenvironment is linked to clinical outcomes.

**Highlights**

- FFPE-CODEX multiplexed tissue imaging of 56 markers in 140 tissues of 35 CRC patients
- Cellular neighborhoods reveal spatial organization of the tumor microenvironment

**nature COMMUNICATIONS**

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20803-7> OPEN

### An N-Cadherin 2 expressing epithelial cell subpopulation predicts response to surgery, chemotherapy and immunotherapy in bladder cancer

Kenneth H. Gouin<sup>1,2,3,9</sup>, Nathan Ing<sup>12,8</sup>, Jasmine T. Plummer<sup>1,2</sup>, Charles J. Rosser<sup>3,4</sup>, Bassam Ben Cheikh<sup>1,2</sup>, Catherine Oh<sup>12</sup>, Stephanie S. Chen<sup>12</sup>, Keith Syson Chan<sup>4,5</sup>, Hideki Furuya<sup>3,4</sup>, Warren G. Tourtellotte<sup>4,5,6,7</sup>, Simon R. V. Knott<sup>1,2,4,8</sup> & Dan Theodororescu<sup>3,4,5,8</sup>

**Cell Systems** Article

### Tissue schematics map the specialization of immune tissue motifs and their appropriation by tumors

Graphical abstract

**Tissue Schematics**  
Cellular Neighborhoods (CNs): regions with characteristic local processes

**Spatial Contexts**  
Fluctuations in cell states indicate local CN interactions

**Assembly Rules**  
Align tissue types, Evaluate mutations  
Good survival, Poor survival

**Authors**  
Salil S. Bhate, Graham L. Barlow, Christian M. Schürch, Garry P. Nolan

**Correspondence**  
gnolan@stanford.edu

**In brief**  
We present Tissue Schematics, a computational and conceptual framework for using high-parameter imaging data to map how tissues are formed by the assembly of cellular neighborhoods into tissue motifs. Applying our framework to human lymphoid tissues and the colorectal cancer immune-tumor microenvironment suggests mechanistic insights into the specific biology of these tissues, as well as general principles of tissue organization.

**nature COMMUNICATIONS**

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20194-4> OPEN

### Immune cell topography predicts response to PD-1 blockade in cutaneous T cell lymphoma

Darci Phillips<sup>1,2,3,9</sup>, Magdalena Matusiak<sup>3,9</sup>, Belén Rivero Gutierrez<sup>3</sup>, Salil S. Bhate<sup>3,3,4</sup>, Graham L. Barlow<sup>1,3</sup>, Sizun Jiang<sup>1,3,5</sup>, Janos Demeter<sup>1</sup>, Kimberly S. Smythe<sup>6</sup>, Robert H. Pierce<sup>6</sup>, Steven P. Fling<sup>6</sup>, Nirasha Ramchurren<sup>6</sup>, Martin A. Cheever<sup>6</sup>, Yury Goltsev<sup>1,3</sup>, Robert B. West<sup>3</sup>, Michael S. Khodadoust<sup>7,10</sup>, Youn H. Kim<sup>2,7,10</sup>, Christian M. Schürch<sup>1,3,8,10,11</sup> & Garry P. Nolan<sup>1,3,10,12</sup>

**Blood Cancer Journal**

ARTICLE OPEN

### Lack of intrafollicular memory CD4+ T cells is predictive of early clinical failure in newly diagnosed follicular lymphoma

Patrizia Mondello<sup>1,2,13</sup>, Angelo Fania<sup>1,12</sup>, Melissa C. Larson<sup>1</sup>, Andrew L. Feldman<sup>1</sup>, Jose C. Villalobos<sup>1</sup>, Zhi-Zhang Tang<sup>1</sup>, Ilya Galkin<sup>1</sup>, Viktor Svedkolkin<sup>1</sup>, Ekaterina Postovalova<sup>1</sup>, Alexander Bagashev<sup>1</sup>, Pavel Ovcharov<sup>1</sup>, Arina Varlamova<sup>1</sup>, Sarah Huet<sup>1,9</sup>, Bruno Teisson<sup>1</sup>, Karlijn B. McGrath<sup>1</sup>, Susan Slager<sup>1</sup>, Brian K. Link<sup>1,2</sup>, Sergei Syrbu<sup>1</sup>, Anne J. Novak<sup>1</sup>, Thomas M. Habermann<sup>1</sup>, Thomas E. Witzig<sup>1</sup>, Grzegorz S. Nowakowski<sup>1</sup>, Gilles Salles<sup>1</sup>, James R. Cocharn<sup>1</sup> and Stephen M. Ansell<sup>1,14</sup>

**CSH Cold Spring Harbor Laboratory bioRxiv**

### High Resolution Single Cell Maps Reveals Distinct Cell Organization and Function Across Different Regions of the Human Intestine

John W. Hickey<sup>1\*</sup>, Winston R. Becker<sup>2\*</sup>, Stephanie A. Nevins<sup>2\*</sup>, Aaron Horning<sup>2</sup>, Almudena Espin Perez<sup>2</sup>, Roxanne Chiu<sup>2</sup>, Derek C. Chen<sup>2</sup>, Daniel Cotter<sup>2</sup>, Edward D. Esplin<sup>2</sup>, Annika K. Weimer<sup>2</sup>, Chiara Caracciolo<sup>1</sup>, Vishal Venkataramanan<sup>1</sup>, Christian M. Schürch<sup>1,7</sup>, Sarah Black<sup>1</sup>, Maria Bribi<sup>4</sup>, Kaidi Cao<sup>5</sup>, Jure Leskovic<sup>6</sup>, Zhengyan Zhang<sup>1</sup>, Shin Lin<sup>1</sup>, Teri Longacre<sup>1</sup>, Sylvia K. Plevitis<sup>1</sup>, Ying Lin<sup>5</sup>, Garry P. Nolan<sup>1@</sup>, William J. Greenleaf<sup>6@</sup>, Michael Snyder<sup>2@</sup>

**Footnotes:**  
1 Department of Pathology, Stanford School of Medicine, Stanford, CA, 94305  
2 Department of Genetics, Stanford School of Medicine, Stanford, CA, 94305  
3 Department of Biomedical Data Science, Stanford School of Medicine, Stanford, CA, 94305  
4 Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, 98195  
5 Department of Surgery, Washington University, St Louis, MO 63110  
6 Department of Computer Science, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA  
7 Department of Pathology and Neuropathology, University Hospital and Comprehensive Cancer Center Tübingen, Tübingen, Germany

\*These authors contributed equally  
@Correspondence should be addressed to: gnolan@stanford.edu; wg@stanford.edu; mpsnyder@stanford.edu

**Research Square**

Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review. They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice, or referenced by the media as validated information.

### A tissue atlas of ulcerative colitis to guide TNF inhibitor therapy

Aaron Mayer, Derek Holman, Utkarsh Tandon, Salil Bhate, Sunil Bodapati, Graham Barlow, Jeff Chang, Sarah Black, Erica Crenshaw, Brigid Boland, Sarah Streett, William Sandborn, John Chang, Sanjiv Gambhir, Garry Nolan, Christian Schürch, Stephan Rogalla

**Abstract**  
Ulcerative colitis is a chronic-relapsing inflammatory disease of the large intestine with a complex, multifactorial pathogenesis. TNF inhibitors are widely used to suppress immune-mediated tissue damage in ulcerative colitis patients; however, therapy failures are common. Predicting TNF inhibitor response requires an understanding of the architectural features that underlie mucosal inflammation and those responsible for resistance. Here, we used highly multiplexed immunofluorescence to uncover the spatially resolved tissue architectures underlying disease progression and treatment response in 42 tissue regions from 34 individuals. We created a tissue atlas and performed spatial analysis to identify cell-cell contacts and cellular neighborhoods. We observed that cellular functional states depend on cellular neighborhood and that a subset of inflammatory cell types and cellular neighborhoods in ulcerative colitis patients persisted even during treatment with TNF inhibitor, indicating resistant niches. A computer vision model, with no *a priori* assumptions regarding cellular architectural features, was able to predict TNF inhibitor resistance. This spatial model significantly outperformed classification models based on single-cell data alone. Our results demonstrate the value of a spatial tissue atlas as a precision medicine tool to guide treatment of patients suffering from autoimmune diseases.

## 使用例 2:セルタイプの同定によるSpatial Transcriptomeデータのバリデーション

# Single-cell resolution is the key!

PhenoCycler image



Other systems

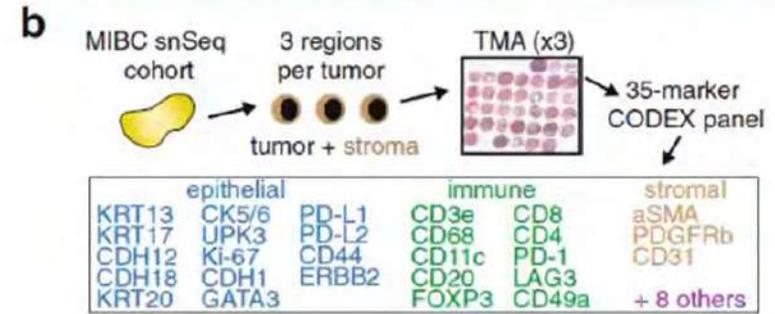


- 組織の連続性がなく、シングルセルデータではない
- データの49%が失われている (Visium)

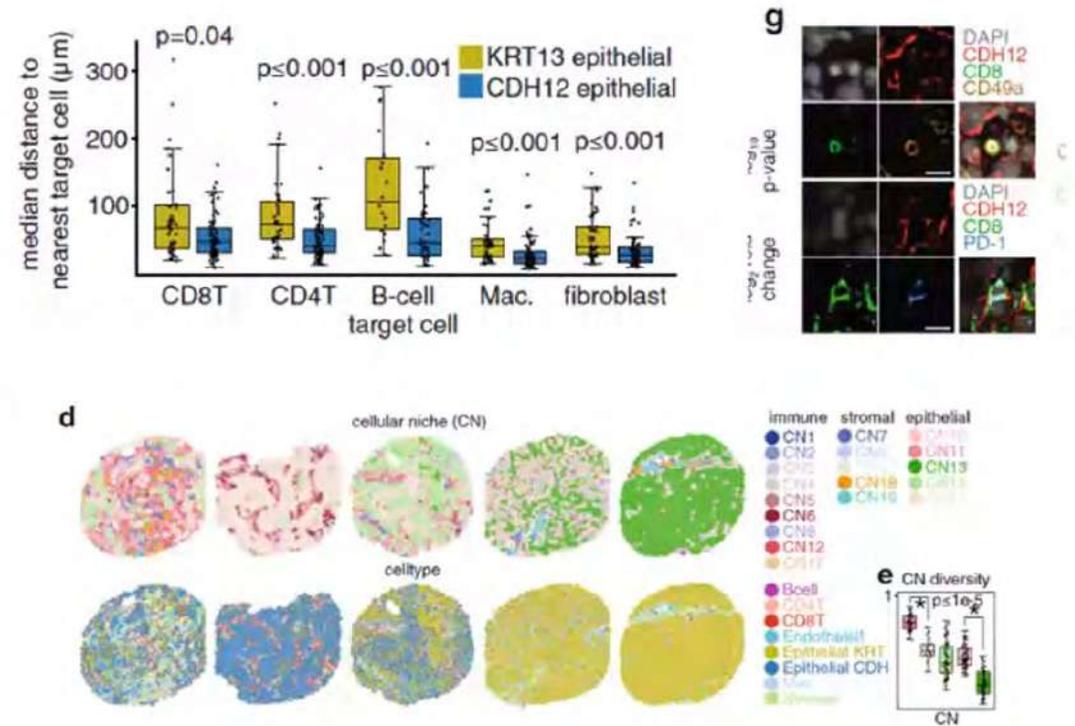
PhenoCyclerによるValidationが有用

# CODEX, Together with Sn-Sequencing, Identifies Bio-marker for Cancer

An N-Cadherin 2 expressing epithelial cell subpopulation predicts response to surgery, chemotherapy and immunotherapy in bladder cancer



- 25検体の浸潤性膀胱がんのsnRNAseqで、ネオアジュバント化学療法を伴う/伴わない術後の予後マーカー（予後不良）として、および癌免チェックポイント阻害剤の予後マーカー（予後良好）としてCDH12を同定
- Validationの過程で初めにVisiumを使用し、CDH12が強く発現しているエリアに、疲弊CD8陽性T細胞マーカーであるPDCD1, LAG3, HAVCR2などの発現を確認
- 最終的にPhenCyclerでシングルセルレベルでのCDH12陽性腫瘍細胞と疲弊CD8陽性T細胞の共在（細胞間相互作用）を確認
- CNを利用した相互作用解析



# CODEX : True Single Cell Level Protein Expression With Spatial Information

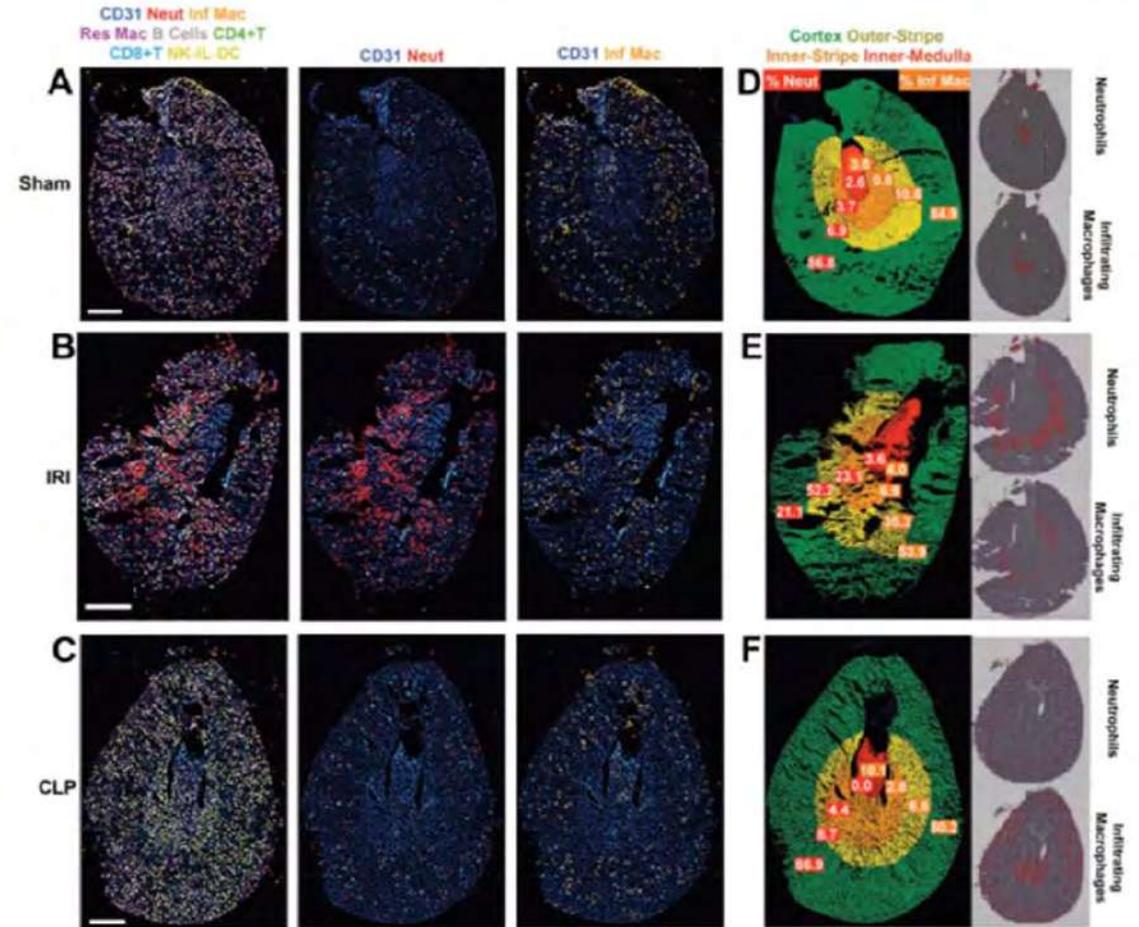
JCI insight

## Integration of spatial and single-cell transcriptomics localizes epithelial cell-immune cross-talk in kidney injury

Ricardo Melo Ferreira, ... , Tarek M. El-Achkar, Michael T. Eadon

JCI Insight. 2021;6(12):e147703. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147703>.

- マウスの急性腎臓損傷モデルで空間的トランスクリプトーム解析を実施 (Visium)
- セルタイプ情報をVisiumの各スポットにマップするためにscRNAseq, snRNAseqのデータセットを使用
- Visiumのスポットサイズが55umとシングルセルサイズではなく、メジャーなセルタイプが各スポットにアサインされやすい傾向を観察
- 最終的にCODEXでセルタイプの分布と頻度を検証している



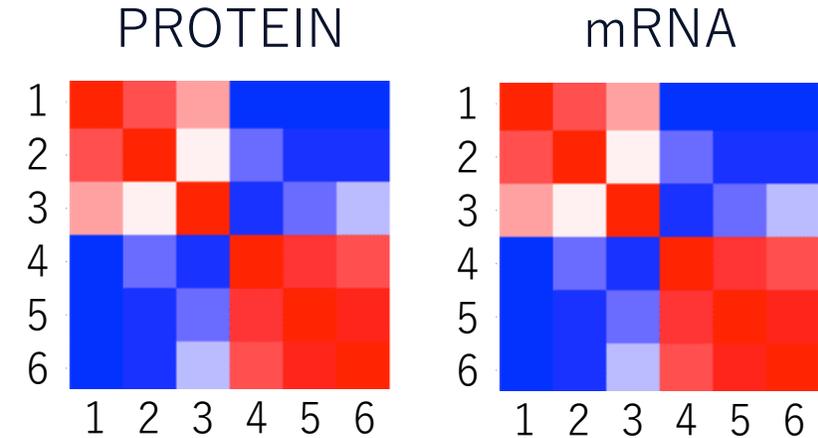
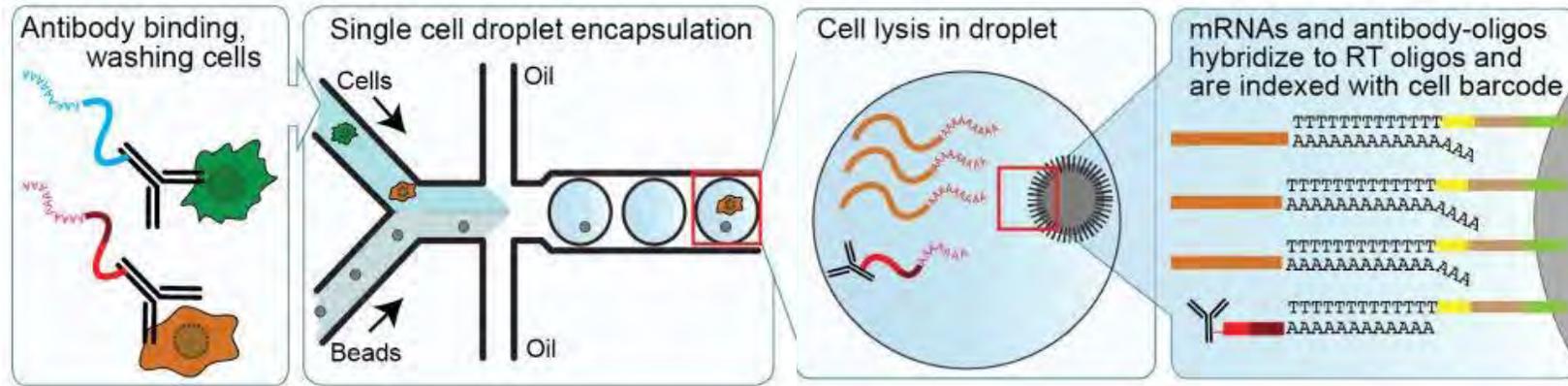
Multiplexed imaging of proteins in toto with **CODEX** validates the localization of immune cell clusters inferred by Spatial Transcriptomics

# PhenoCyclerシステムの空間的シングルセルトランスクリプトーム解析への応用

## Merger of CITE-Seq and PhenoCycler data

CITE-Seq produces multiplexed PROTEIN and mRNA expression data

CITE-Seq workflow



PhenoCycler (CODEX) results are multiplexed PROTEIN expression data

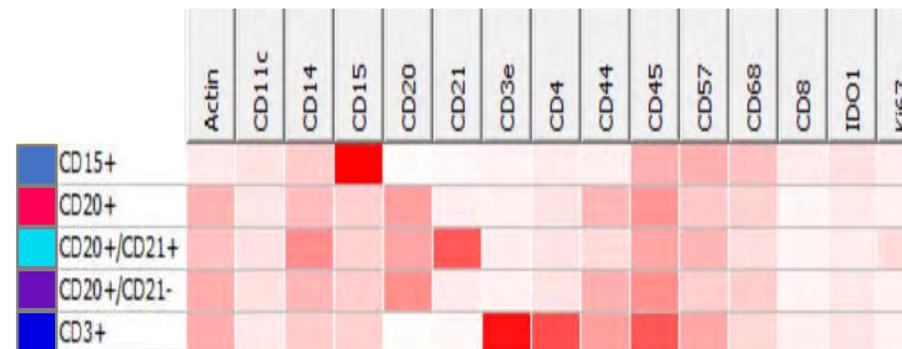
Cell

マウスの脾臓の凍結切片の解析データ

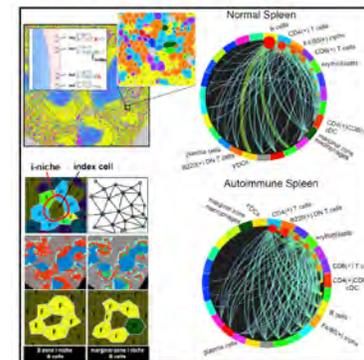
Resource

**Deep Profiling of Mouse Splenic Architecture with CODEX Multiplexed Imaging**

Cell. 2018 Aug 9;174(4):968-981.e15. doi: 10.1016



Graphical Abstract



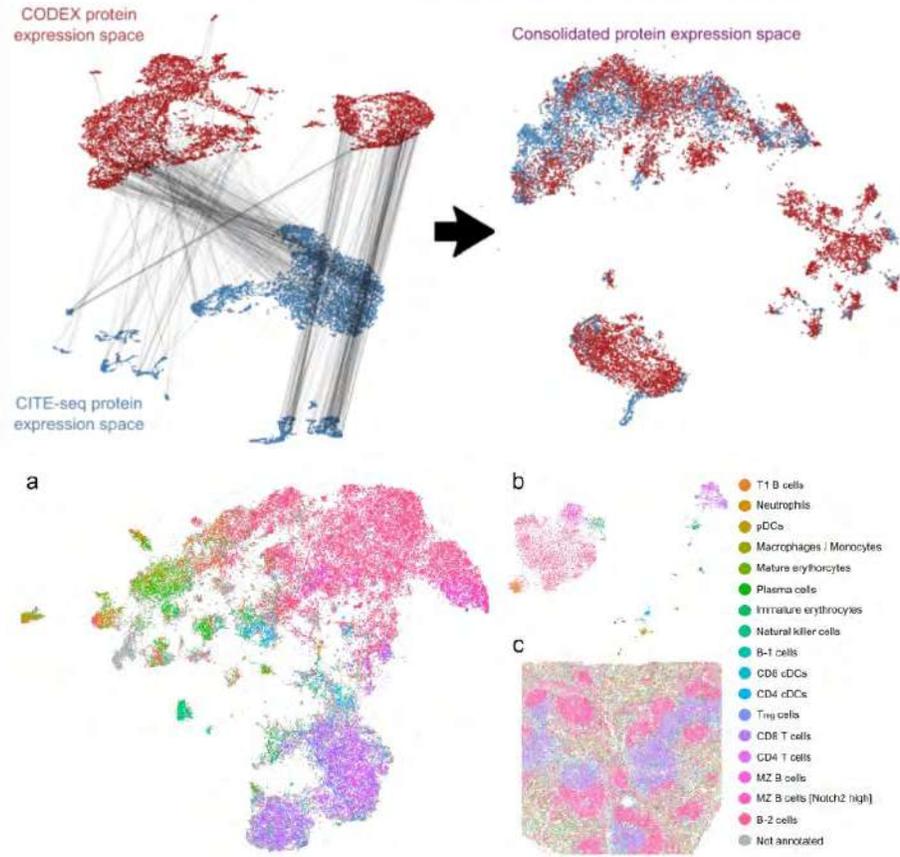
# 使用例 3 : 空間的シングルセルトランスクリプトーム解析への応用 CITE-Seq データと PhenoCycler データの統合

ScienceAdvances

## Single-cell transcriptomic analysis of mIHC images via antigen mapping

Science Advances 05 Mar 2021:  
Vol. 7, no. 10, eabc5464  
DOI: 10.1126/sciadv.abc5464

Kiya W. Govek\*, Emma C. Troisi\*, Zhen Miao, Rachael G. Aubin, Steven Woodhouse, Pablo G. Camara†



- マウスの脾臓サンプルで33の細胞表面タンパク質をターゲットとしてCITE-seqを実施（7097細胞）。
- 33の表面タンパク質データを相関解析ベースにした独自のアルゴリズム（**STVEA**）でCITE-seqのデータをPhenoCyclerのデータ（Cell. 2018）にマッピング。
- 73%のPhenoCyclerデータ（57819細胞）にマッピングされ、トランスクリプトームをベースにした空間的シングルセル解析が可能に。
- 解析ツール**STVEA**がGitHubに公開されており、利用可能。
- Original Citation:  
<https://advances.sciencemag.org/content/7/10/eabc5464>

共通するタンパク質のデータで相関解析→  
mRNAデータを組織切片データにマッピングして空間的シングルセルトランスクリプトーム解析に応用

# 今後の展開① >100Plexのタンパク質検出の実現 (今年中の予定)

Industry's First 103-plex Whole-Slide Dataset

Immune Cell Profiling Core	Advanced Lymphocyte Module	Advanced Myeloid Module	Structural Module	Metabolism	Stress & Death	Advanced Immune Module
CD4	CD107a	CD163	E-cadherin	ASCT2	PARP	HLA-DPB1
CD68	CD21	CD11b	CD31	Na/K ATPase	BAK	LEF1
CD20	Pax5	MPO	Histone H3	HK1	BCL-XL	GAL9
CD11c	FOXP3	CD141	β-actin	LDHA	BAX	CD138
CD8	Gran B	iNOS	Podoplanin	G6PD	BAD	MC Tryptase
HLA-DR	CD38	Immune Activation Module	SMA	IDH2	Cyt. c	OX40
Ki67	CD39		Vimentin	GLUT1	LC3B	ZAP70
CD45RO	CD79D	PD-1	Collagen IV	pNRF2	Beclin-1	CD7
PanCK	TIGIT	PD-L1	CD34	ATPA5	H2AX	CIQA
CD3D	Tissue Specific/ Custom	ICOS	β-catenin	SDHA	Proliferation	CCR6
CD44		TIM3	MMP-9	Cit. Syn		CD15
CD45	TP63	LAG3	ZEB1	CPT1A	pRPS6	AXL
HLA-A	S100A4	IDO1			PCNA	CD227
CD14	TFAM	CD40			Cyc D1	
CD56	GP100	HLA-E				
CD57	LaminB1	IFNG				
CD19	CK17	CD69				
CD2	CK19					
CD1a	GATA3					
	SOX2					
	EpCAM					
	Caveolin					

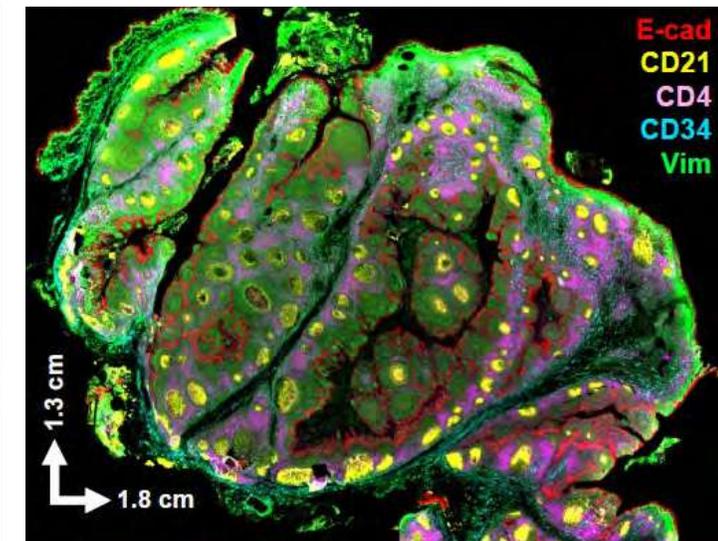
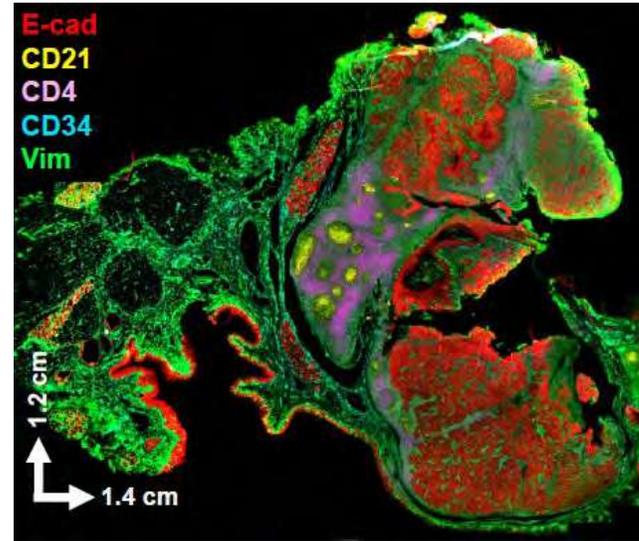
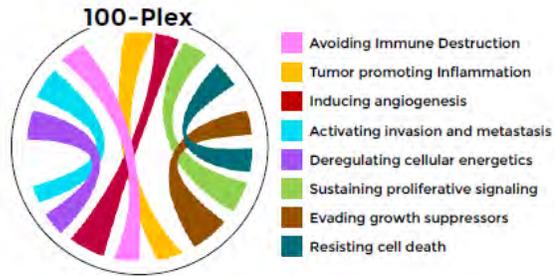


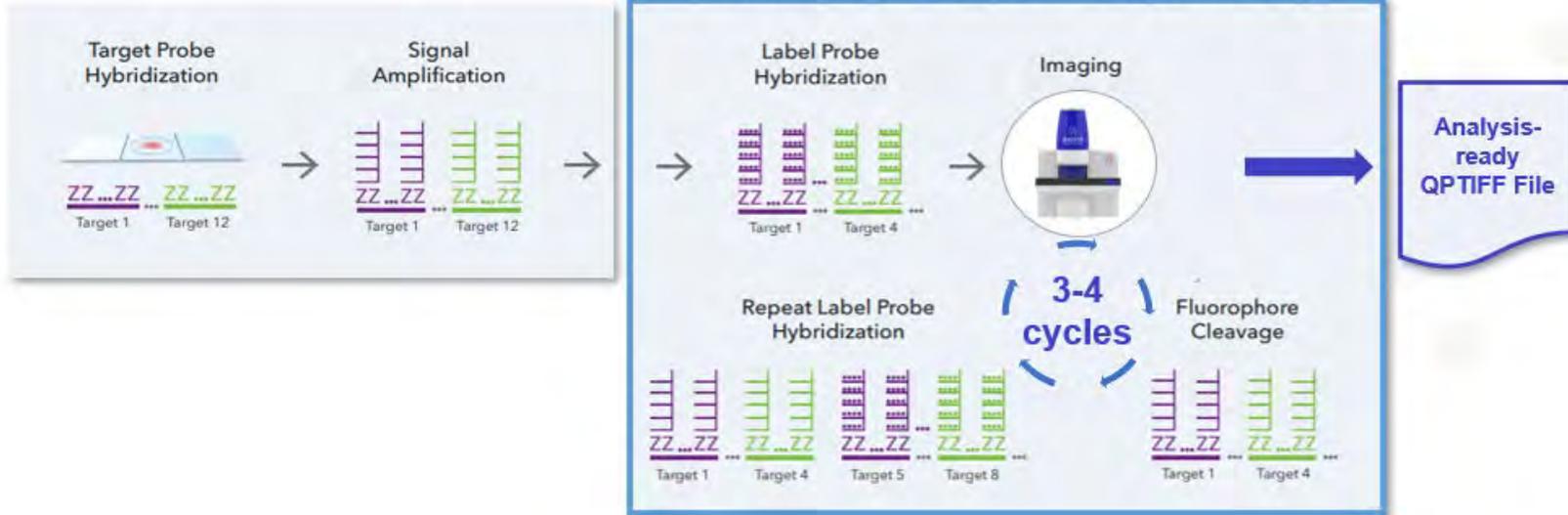
TABLE 1	SPECIMEN	
Tissue Type	FFPE Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma	FFPE Human Tonsil
Markers	103 Antibodies	103 Antibodies
Tissue imaging area	1.2 cm x 1.4 cm	1.3 cm x 1.8 cm
Fluidics time	38 cycles   44 hours	38 cycles   50 hours
Data size	24 gigabytes	46 gigabytes
Number of cells	832,823 cells	2,253,539 cells

# 今後の展開② 12plex RNAScopeの実現 (今年中の予定)

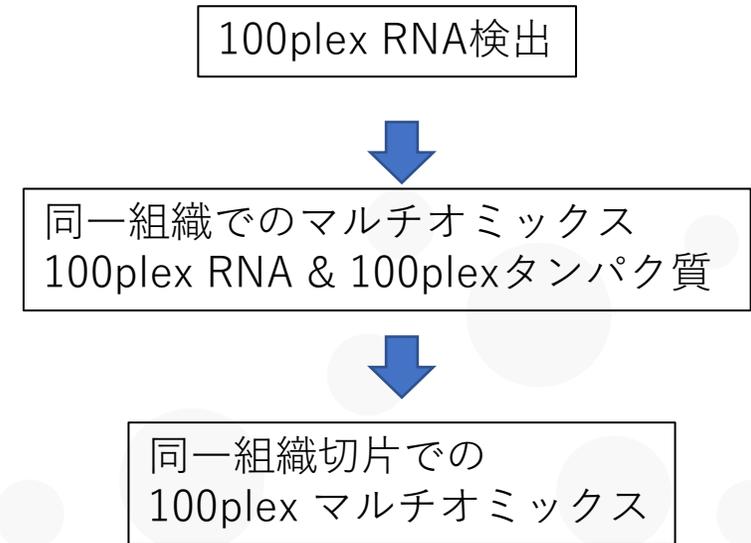
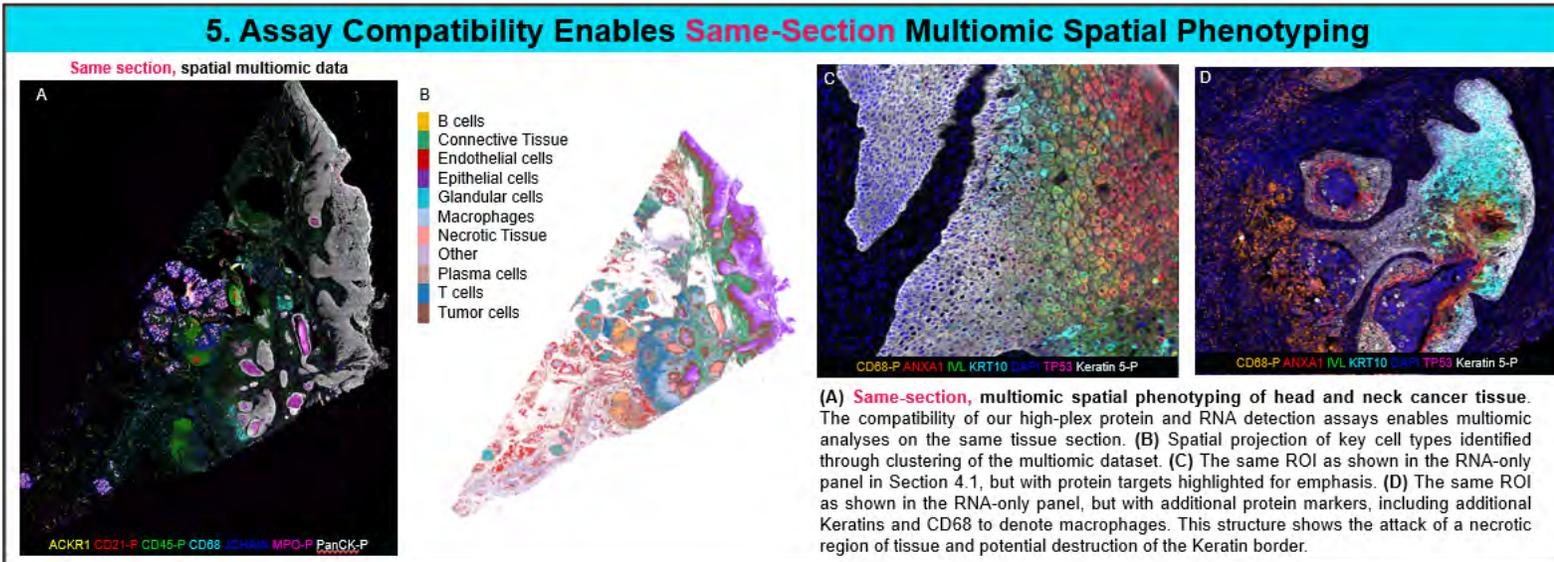
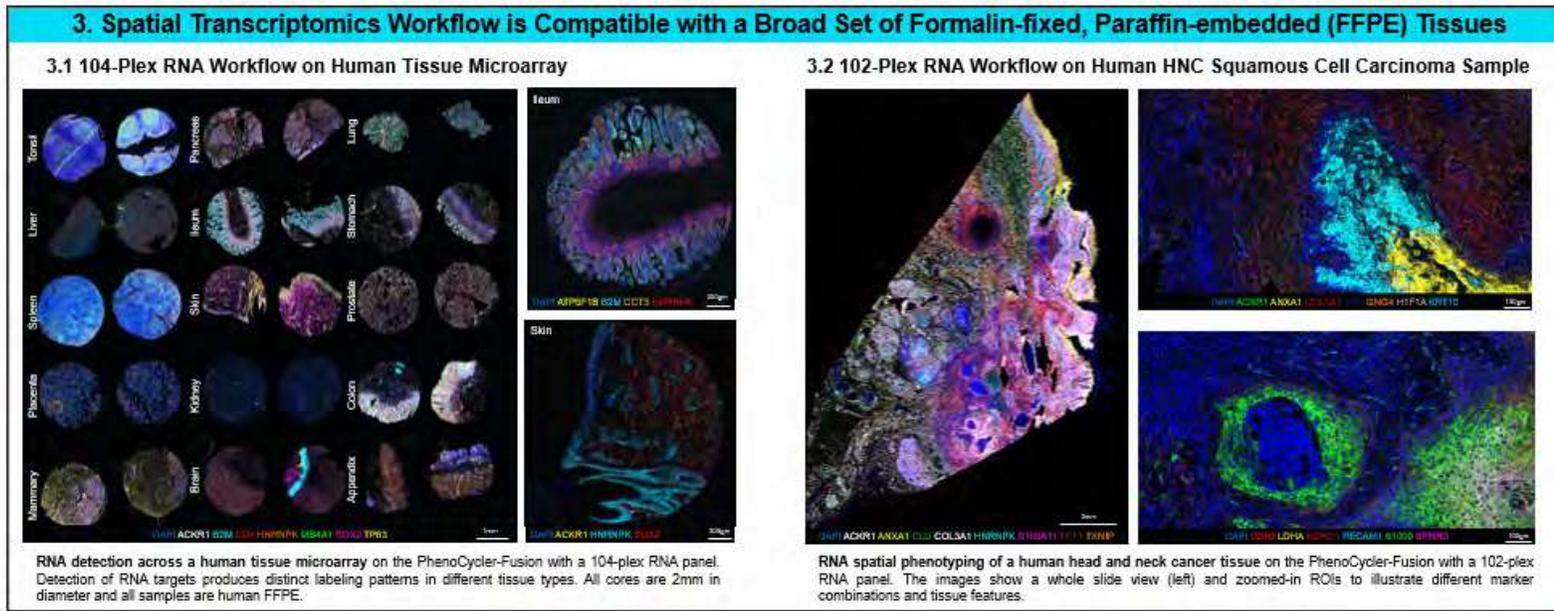
## RNAScope HiPlex v2



Automated HiPlex v2 Workflow on PhenoCycler-Fusion System



# 今後の展開③ 独自開発の100plex RNA検出、タンパク質とRNAの同時検出の実現 (来年前半の予定)



# Akoya PhenoCycler システムまとめ

- ~66種類のタンパク質を標的にシングルセルの解像度での多重蛍光免疫染色が可能で、微小環境における細胞間および領域間相互作用解析、他の空間的トランスクリプトーム解析のバリデーション、scRNAseq (CITE-seq)との組み合わせによる空間的シングルセルマルチオミックス解析などに応用ができる
- 広い領域やスライドの全面スキャン (18mmx35mm)、サンプルのスループットを高めたい場合はAkoya Fusion システムとの組み合わせがおすすめ
- PhenoCycler-OpenシステムではKeyence BZX-700/800, ZEISS Axio Observer7のいずれかとの組み合わせが可能
- 無償 (QuPath+CytoMAP)、有償 (Inform, HALO, VisioPharmなど) のソフトウェアに対応しており、サポートも充実
- RNA単独、またはRNAとタンパク質の同時検出も可能になる予定

# お問い合わせ先：バイオストリーム株式会社

〒105-0021

東京都港区東新橋2-7-3 昭和アステック 1号館

Tel: 03-6869-4402

Email: [info@biostream.co.jp](mailto:info@biostream.co.jp)

Web site: <http://www.biostream.co.jp/>

