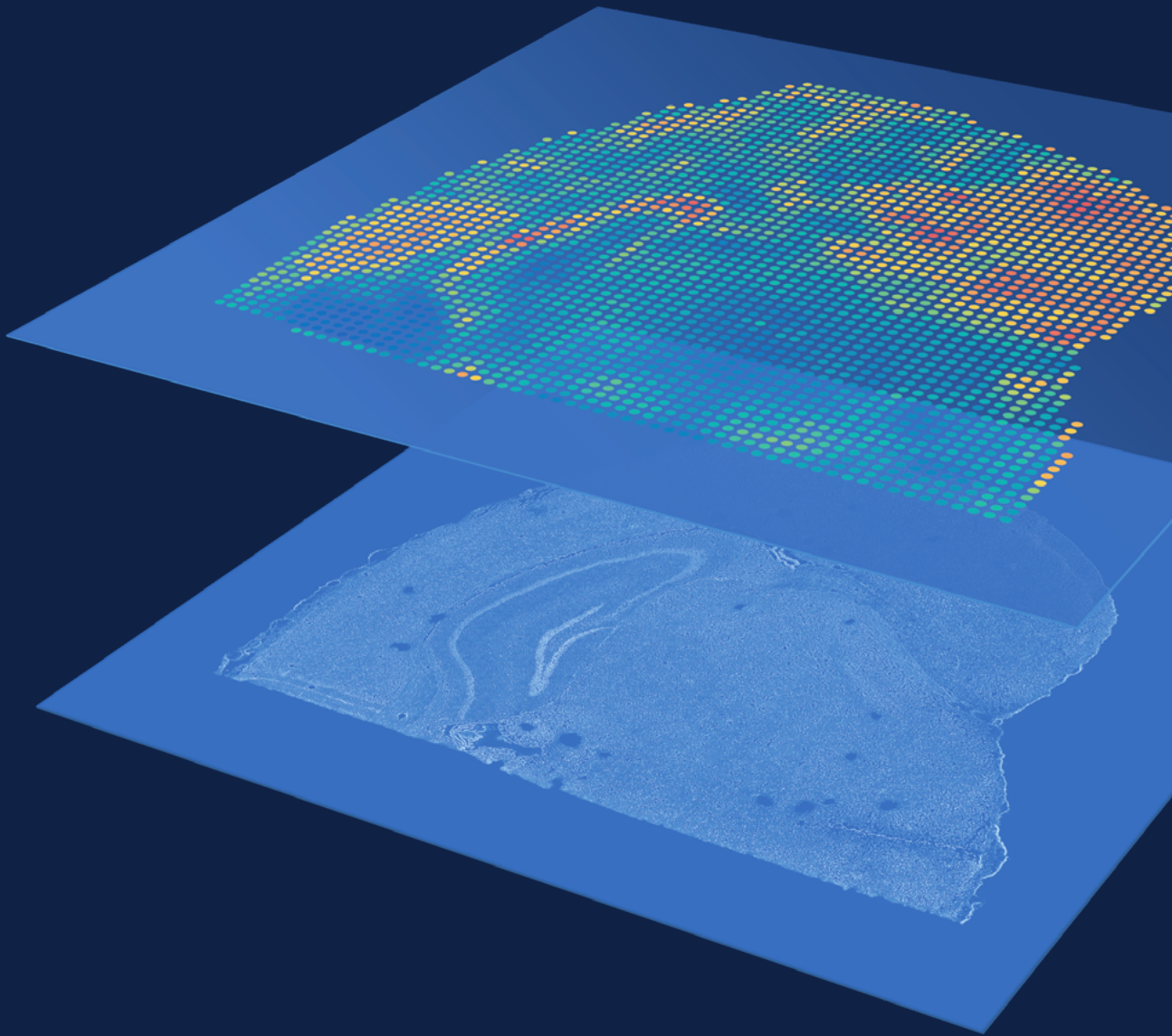


Visium空間的 キャプチャー テクノロジーのすべて



2種類の情報を統合： 遺伝子発現のマッピングと測定

Visium空間的遺伝子発現は、組織切片全体を対象とした全トランスクリプトーム解析を形態学的情報と統合します。これらの補完的な手法を組み合わせることで、これまでは知ることのできなかった組織生物学の新しい視点が得られます。

組織スライド以上の情報を

スライド上でポリ(A)による転写産物捕捉と空間的バーコードの付加技術。これらをライブラリー調製に用いて複雑な組織サンプルの空間的遺伝子発現をマッピングします。

Visium空間的遺伝子発現のスライドには、空間的バーコードを付加したmRNA結合用オリゴヌクレオチドが結合しています(図1)。新鮮凍結組織中の遺伝子発現情報を捕捉するには、処理後の組織切片からmRNAを遊離させ、近接した位置にある捕捉用オリゴと結合させます。これは組織がスライド上にある間に行われます。そして逆転写の際に空間的バーコードの相補鎖が組み込まれ、空間的情報(バーコード配列)が保存されたcDNAライブラリーが作製されます。ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織の場合、遺伝子発現情報を捕捉するには、遺伝子発現はプローブで捉えます。組織の透過処理時にライゲーションされたプローブペアを遊離させ、これをスライド上の捕捉プローブに結合させます。プローブペアを伸長し空間的バーコードの相補鎖が組み込まれ、同じく空間的情報(バーコード配列)が保存されたライブラリーを作製します。

バーコード付きライブラリーは、キャプチャー領域の特定の位置にマッピングされます。この遺伝子発現データを、組織切片の高解像度顕微鏡画像に重ねることで、組織の形態における任意のmRNAの発現、またはmRNAの発現の組み合わせを、空間的な視野と共に視覚化することが可能になります。

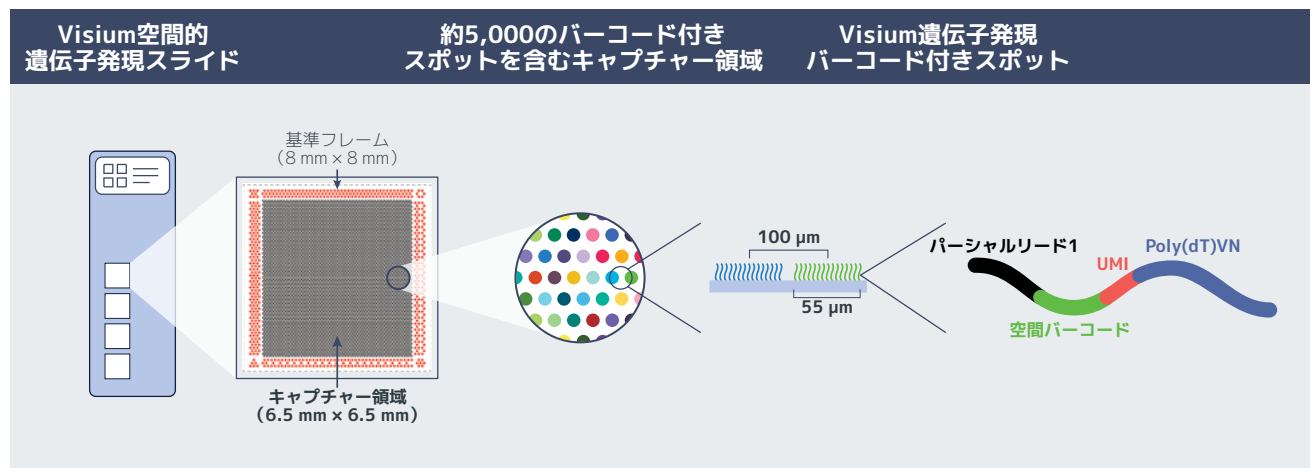


図1. Visium空間的遺伝子発現スライドの構成

各スライドにはキャプチャー領域が2つまたは4つある。キャプチャー領域はそれぞれ約5,000のバーコード付きスポットを有し、各スポットは数百万個の空間的バーコード付き捕捉用オリゴを含む。遊離した組織mRNAがこれらのオリゴに結合することで遺伝子発現情報が捕捉される。

効率的なワークフロー： 標準的な実験手順の利用

Visium空間的遺伝子発現ワークフローは、標準的な組織の薄切・染色方法に、空間的トランスクリプトミクス技術を導入しやすくします。

すぐに使えるアッセイ

サンプルの準備

新鮮凍結組織またはFFPE組織を薄切し、遺伝子発現スライドのキャプチャー領域に置きます。

組織の染色とイメージング

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色などの標準的な固定・染色技術を利用して、明視野顕微鏡を用いてスライド上の組織切片を可視化したり、スライド上の組織切片中で検出されるタンパク質を免疫蛍光法(IF)で染色し、蛍光顕微鏡を用いてイメージングします。

組織の透過処理とライブラリー構築

組織を透過させて細胞からmRNA(新鮮凍結組織の場合)またはライゲーション済みプローブペア(FFPE組織の場合)を遊離させ、キャプチャー領域に存在する空間的バーコードが付加されたオリゴヌクレオチドに結合させます。空間的バーコードの相補鎖が、逆転写によるcDNAの合成(新鮮凍結組織の場合)、または伸長反応(FFPE組織の場合)の際に組み込まれます。バーコードが付加されたサンプルは下流のプロセスのためにプールされ、シーケンス可能なライブラリーを作ります。

シーケンス

得られた10x バーコード付加ライブラリーはIlluminaシーケンサーによる標準的なNGSショートリードシーケンスと互換性があり、組織切片全体の大規模な転写プロファイリングが行われます。

データの解析と視覚化

Space Ranger解析ソフトウェアを使用して、空間的遺伝子発現データを処理し、さらにLoupe Browser視覚化ソフトウェアを使用して結果をインタラクティブに探索します。

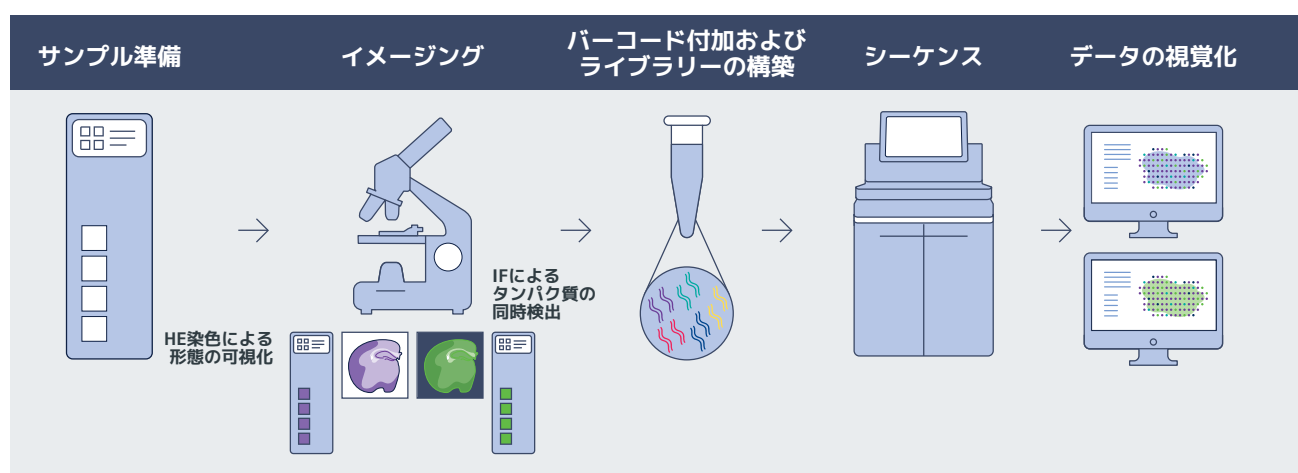


図2. Visium空間的遺伝子発現のワークフロー

新鮮凍結組織またはFFPE組織を切片にしてライブラリー作製用スライドに置き、固定してHEまたは免疫蛍光法(IF)で染色する。イメージングした後、空間的バーコード付加とライブラリー構築を行う。次いで、ライブラリーのシーケンスを行い、データを視覚化する。

新鮮凍結組織からのライブラリー構築： 機能と仕組み

新鮮凍結組織を対象としたVisium空間的遺伝子発現では、ポリ(A)による捕捉法を用いることで、さまざまな生物種において偏りのない全トランスクリプトームを検出しています。

段階的なライブラリー構築

染色とイメージング

新鮮凍結組織サンプルを薄切して、Visium空間的遺伝子発現スライドのキャプチャー領域に置きます。HEや免疫蛍光染色などの標準的な固定・染色技術を用いて、組織切片の画像を撮ります。

透過処理

次いで、組織を透過させて細胞からmRNAを遊離させます。mRNAはキャプチャー領域に存在する空間的バーコードが付加されたオリゴヌクレオチドに結合します。逆転写反応により、捕捉されたmRNAからcDNAを合成します。

cDNAの合成

その後、cDNAの2本目の鎖を合成し、変性させます。なお、新鮮凍結組織を初めてVisiumソリューションで使用する場合は、あらかじめ組織の最適化を行う必要があります。バーコードが付加されたcDNAはダウンストリームプロセス、ライブラリー作製、cDNA増幅のためにプールされます。続いてcDNAの断片化と処理を行い、シーケンスに適したライブラリーを完成させます。この後、最終のサンプルインデックスPCRを行います。標準的なショートリードシーケンサーを用いてVisium空間的遺伝子発現ライブラリーをシーケンスし、そのデータを10x Genomicsのソフトウェア(解析用パイプラインSpace Rangerおよび視覚化ソフトウェアLoupe Browser)で処理します。

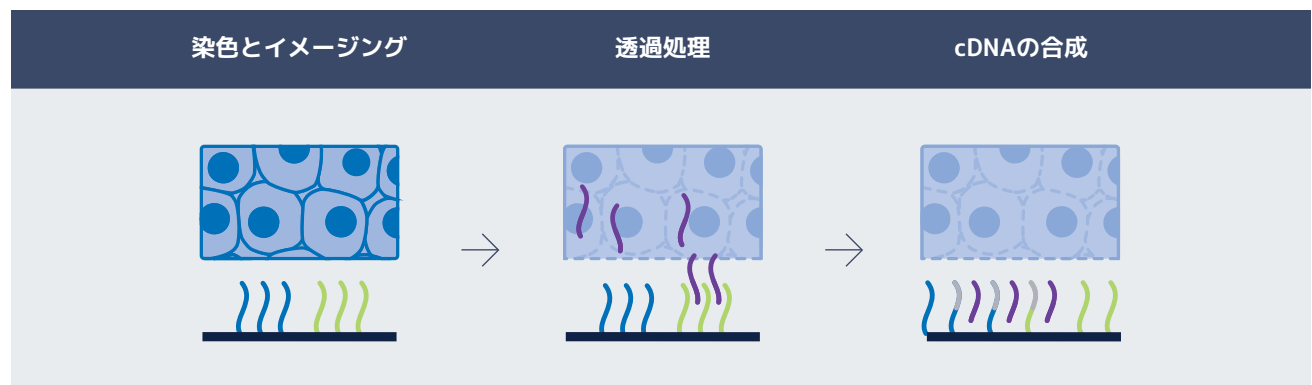


図3. Visium空間的遺伝子発現を用いたシーケンスライブラリーの構築

ライブラリー構築の準備が整ったら、キャプチャー領域の新鮮凍結組織を透過処理する。遊離したmRNAを空間的バーコードが付加された捕捉用オリゴに結合させ、遺伝子発現情報を捕捉する。この捕捉されたmRNAからcDNAを合成し、続いてスライドを洗浄してからシーケンスライブラリーを構築する。その後、全トランスクリプトームライブラリーまたはターゲット遺伝子発現ライブラリーをシーケンスする。

FFPE組織からのライブラリー構築： 機能と仕組み

FFPE組織を対象としたVisium空間的遺伝子発現では、遺伝子ターゲットプローブペアのRNAテンプレートライゲーションを利用して、ヒトおよびマウスのFFPE組織切片に含まれる全トランスクリプトームを高特異性かつ高感度で検出します。

段階的なライブラリー構築

染色とイメージング

FFPE組織サンプルを薄切して、Visium空間的遺伝子発現スライドのキャプチャー領域に置きます。HEや免疫蛍光染色などの標準的な染色技術を用いて、スライド上の組織切片の画像を撮ります。

プローブのハイブリダイゼーションとライゲーション

組織の脱架橋処理を行い、ホルマリン固定のせいで隔絶されていたmRNAを遊離させます。その後、ヒトまたはマウスの全トランスクリプトームプローブ（各標的遺伝子に特異的なプローブのペアで構成）を組織に加えます。これらのプローブペアは、それぞれの標的遺伝子にハイブリダイズしてから互いにライゲーションされます。

RNase処理と透過処理

組織のRNase処理および透過処理を行い、ライゲーション産物を遊離させます。ライゲーションされたプローブペアは、キャプチャー領域に存在する空間バーコードが付加された捕捉オリゴ配列と結合します。

プローブの伸長反応

プローブペアの伸長反応を行い、空間バーコードの相補鎖を組み込みます。空間バーコードが付加されたライゲーションプローブ産物をスライドから遊離させ、PCR増幅します。プローブ産物をさらに処理してシーケンスライブラリーとします。標準的なショートリードシーケンサーを用いてVisium空間的遺伝子発現ライブラリーをシーケンスし、そのデータを10x Genomicsのソフトウェア（解析用パイプラインSpace Rangerおよび視覚化ソフトウェアLoupe Browser）で処理します。

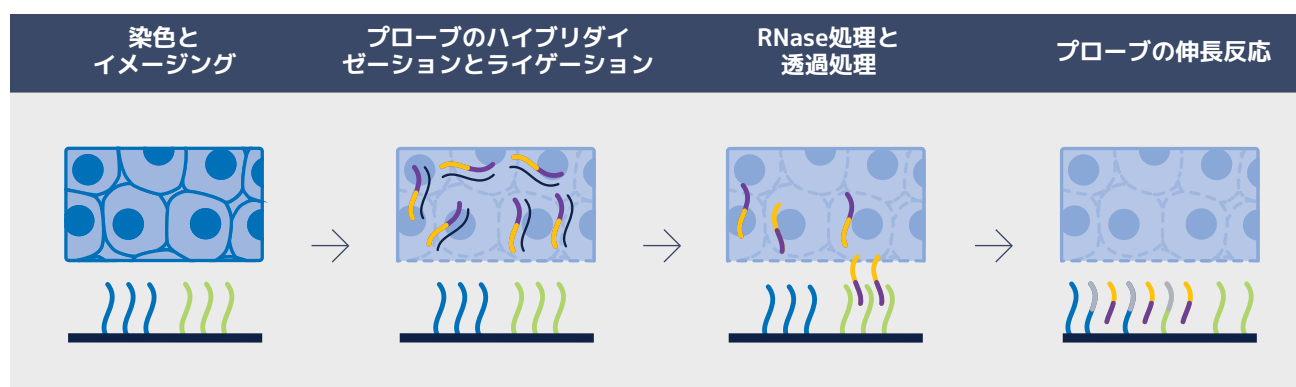


図4. FFPE組織を対象としたVisium空間的遺伝子発現を用いたシーケンスライブラリーの構築

ライブラリー構築の準備が整ったら、キャプチャー領域のFFPE組織を透過処理し、ライゲーションされたプローブペアをスライド上の捕捉用プローブに結合させ、遺伝子発現情報を捕捉する。プローブペアの伸長反応を行い、空間的バーコードの相補鎖を組み込んで、シーケンスライブラリーを調製する。

データ解析： 遺伝子発現が生じた場所での視覚化

Space Ranger解析ソフトウェアを使用してデータ処理することで、遺伝子やタンパク質の発現の不均一性を解析し、さらにLoupe Browser視覚化ソフトウェアを使用して結果をインタラクティブに探索します。

データ解析

Visium空間的遺伝子発現で生成されたデータでは、関心のある遺伝子を選択して、元の組織切片上で空間的に発現状態を表示することができます。全トランスクリプトーム全体がプロファイリングされているので、1種類の遺伝子だけに注目することに限らず、任意の数の遺伝子を任意の組み合わせで選択し、同時に表示・解析することができます。さらに、切片全体の遺伝子発現データが捕捉されているので、好きなときに切片中の別の領域を再び検討して再探索することができます。

Visiumのワークフローでは、組織画像とFASTQフォーマットのシーケンスデータという2種類の主要なデータ種類が捕捉されます。Space Rangerの解析パイプラインは、これらの2つの入力データを用いて、Visiumワークフロー中に捕捉された各遺伝子転写産物を、関連付けられた空間的バーコードに基づいて組織画像上の空間的な位置に割り当てることで、Visiumのシーケンスデータと画像の位置合わせを行います。データの処理後は、Loupe Browser視覚化ソフトウェアを使って、空間的遺伝子発現データのさまざまなビューを簡単に調べることができます。Loupe Browserでは、重要な遺伝子の調査、クラスターの特性解析と精緻化、発現量の差分解析を行うことができます。また、サードパーティのツールを使ってさらにデータを処理することもできます。

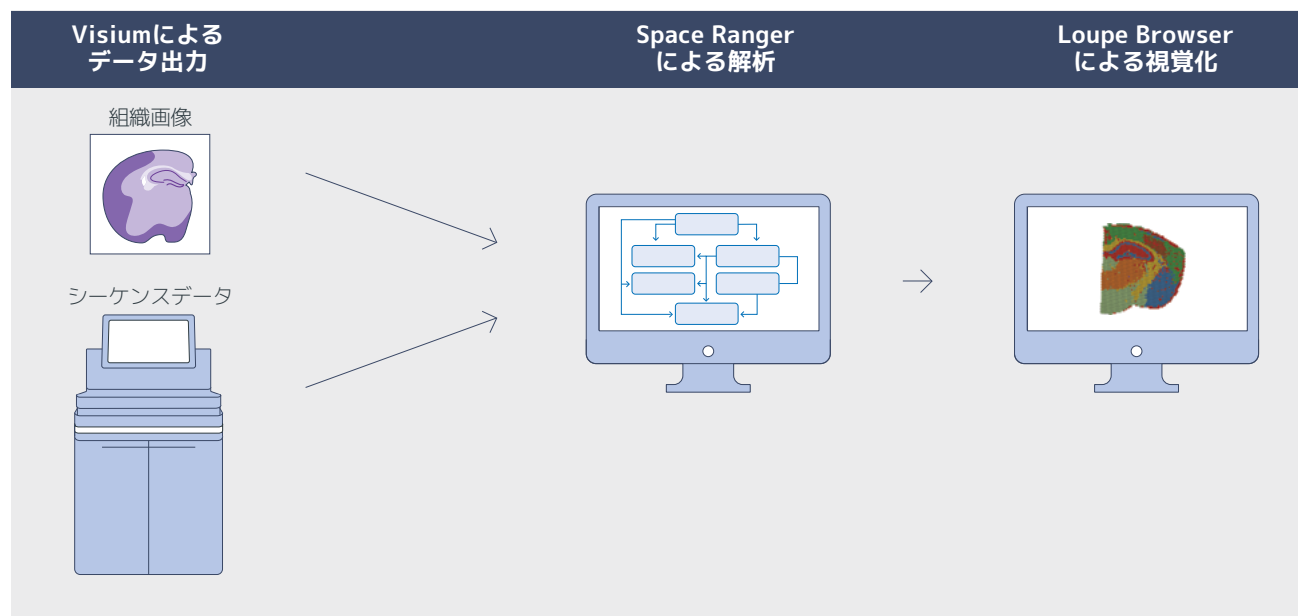


図5. Visiumのデータ解析ワークフロー

Visiumのワークフローでは、組織画像と、遺伝子発現ライブラリーのシーケンスデータを含むFASTQファイルという2種類の主要なデータ種類が得られます。Space Rangerは解析ソフトウェアで、組織画像に空間的な遺伝子発現情報を自動で重ね合わせ、類似の転写プロファイルを持つスポットのクラスターを特定できる。さらに、視覚化ソフトウェアであるLoupe Browserを使用することで、結果をインタラクティブに探索することができる。

さらなる視点を得る： 複数の対象物や標的遺伝子を空間的に解析する

全トランスクリプトームの空間的な解析と蛍光タンパク質の検出、またはターゲットパネルの使いやすさと幅広さを組み合わせることで、組織スライド上に捕捉された生物学的情報のより包括的な画像によって、ヒトの健康と病気に関する理解を深めることができます。

タンパク質の同時検出

遺伝子発現とタンパク質検出の空間的パターンを、免疫蛍光法(IF)により同じ組織切片中で視覚化します。Visium空間的遺伝子発現および免疫蛍光法のワークフローは、標準的な組織切片作成法や現在使用している抗体を用いたIF染色法に簡単に組み込むことができます。タンパク質、総mRNA、組織学的解析を同一組織切片上で組み合わせることによって貴重なサンプルを最大限に活用します。

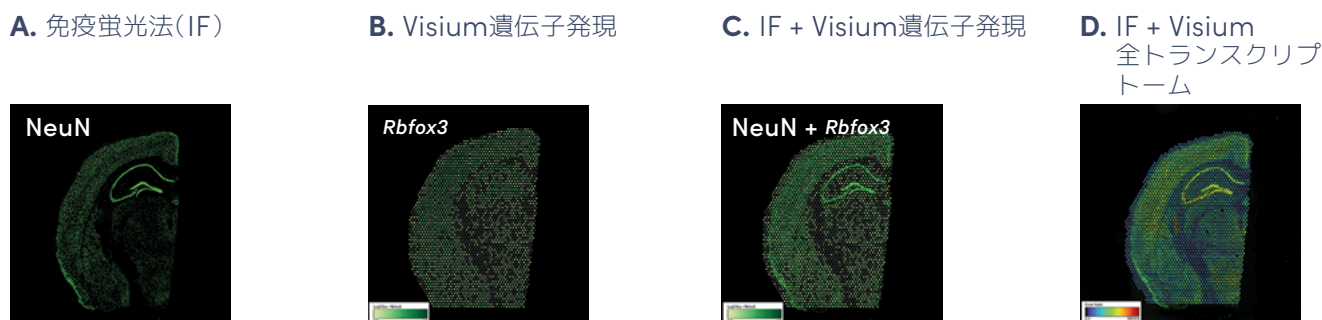


図6. Visium空間的遺伝子発現および免疫蛍光法を用いたタンパク質とRNAの同時検出

マウス冠状断脳切片をNeuNについてIF画像取得後、Visium空間的遺伝子発現ワークフローで処理した。左から順に、(A) NeuN IF、(B) Rbfox3 (NeuNをコードする遺伝子)のVisium空間的mRNA発現、(C) NeuN IF画像とVisium空間的Rbfox3 mRNAデータの重ね合わせ、(D) NeuN IF画像とVisiumワークフローで得られたトータルUMIカウントデータの重ね合わせ。

もっとも重要な遺伝子に注目する

関連する遺伝子を包括的に標的とすることで、研究にもっとも重要な生物学的情報を得ることができます。新鮮凍結組織用のVisium空間的遺伝子発現に対応しており、あらかじめデザインされたパネル(がん、免疫、神経科学、および遺伝子シグネチャー用)を用いて、所定の転写産物のセットについてプロファイリングすることができます。あらかじめデザインされた包括的なパネルの中から1つを選択し、オプションで最大200のカスタム遺伝子を追加することで、シーケンスの前にVisium空間的遺伝子発現ライブラリーを充実させます。

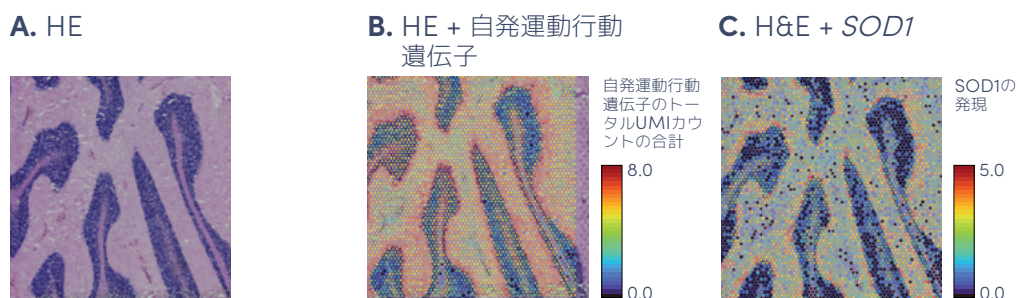


図7. Visium空間的ソリューションによる空間的に解析された標的遺伝子の発現プロファイリング

ヒト小脳組織切片をHE染色し、Visium空間的遺伝子発現ワークフローを用いて処理した後、ヒト神経科学用パネルに含まれる標的遺伝子発現を用いてプロファイリングした。(A) HE画像、(B) HE画像と神経科学パネルに含まれる36個の自発運動行動遺伝子のトータルUMI数の重ね合わせ、(C) HE画像とSOD1発現量の重ね合わせ。

論文

1. Ståhl PL, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 353: 78–82, 2016. doi: [10.1126/science.aaf2403](https://doi.org/10.1126/science.aaf2403)
2. Ji AL, et al. Multimodal analysis of composition and spatial architecture in human squamous cell carcinoma. *Cell* 182: 497–514.e22, 2020. doi: [10.1016/j.cell.2020.05.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.039)
3. Maynard KR, et al. Transcriptome-scale spatial gene expression in the human dorsolateral prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 24: 425–436, 2021. doi: [10.1038/s41593-020-00787-0](https://doi.org/10.1038/s41593-020-00787-0)
4. Boyd DF, et al. Exuberant fibroblast activity compromises lung function via ADAMTS4. *Nature* 587: 466–471, 2020. doi: [10.1038/s41586-020-2877-5](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2877-5)
5. Fawcner-Corbett D, et al. Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell* 184: 810–826.e23, 2021. doi: [10.1016/j.cell.2020.12.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.016)
6. Janosevic D, et al. The orchestrated cellular and molecular responses of the kidney to endotoxin define a precise sepsis timeline. *eLife* 10: e62270, 2021. doi: [10.7554/eLife.62270](https://doi.org/10.7554/eLife.62270)
7. Grauel AL, et al. TGFβ-blockade uncovers stromal plasticity in tumors by revealing the existence of a subset of interferon-licensed fibroblasts. *Nat Commun* 11: 6315, 2020. doi: [10.1038/s41467-020-19920-5](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19920-5)
8. Chen WT, et al. Spatial transcriptomics and in situ sequencing to study Alzheimer's disease. *Cell* 182: 976–991.e19, 2020. doi: [10.1016/j.cell.2020.06.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.038)

リソース

製品情報

<https://www.10xgenomics.com/jp/products/spatial-gene-expression>

技術の概要

<https://www.10xgenomics.com/jp/spatial-transcriptomics>

空間的遺伝子発現のサポート

support.10xgenomics.com/spatial-gene-expression

お問い合わせ先

10xgenomics.com/jp/ | info@10xgenomics.com

© 2021 10x Genomics, Inc. FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
LIT000060-JP - Rev D - Brochure - Inside Visium Spatial Technology

