

Illumina-NanoStringジョイントセミナー
次世代シーケンサーにより高解像度
の空間的プロファイリングを可能に

小林 孝史

イルミナ株式会社シニアアプライドゲノミクススペ
シャリスト

2020/6/9



イルミナ次世代シーケンサーは全世界で15,000台以上の導入実績 (~2019年末)

~150 Pb

Sequence Data
in 2019



◆ = Illumina Distribution and Commercial Centers

BaseSpace®

High Throughput

~920 ~1,300

NovaSeq™ HiSeq™

Mid Throughput

~3,600

NextSeq™

Low Throughput

~7,400 ~1,100 ~860

MiSeq™ MiniSeq™ iSeq™

*Excluding HiSeq, this includes all systems that have been shipped to customers and may include some decommissioned or inactive systems.

2020年1月JP Morganカンファレンスでの発表より

製品の使用目的は研究に限定されます。

illumina®

現在販売中のイルミナシーケンサー



ライブラリー調製は全機種共通

2020年1月発表
新製品



iSeq™ 100

MiniSeq™

MiSeq™

NextSeq™ 550

NextSeq™ 2000

NovaSeq™ 6000

16S rRNAアンプリコンシーケンス
単離菌の解析、遺伝子パネル

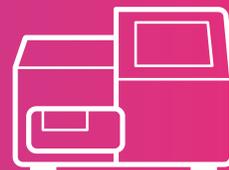
ショットガンメタゲノム解析、RNA-seq
シングルセル解析、全エキソーム、全ゲノム解析

製品の使用目的は研究に限定されます。

illumina®

イルミナシーケンスワークフロー

全てのアプリケーションで共通のワークフロー



サンプル調製

次のステップのライブラリー調製に使用するために、サンプルから核酸を抽出し精製する作業

ライブラリー調製

シーケンサーで認識されるためのアダプター配列をサンプルに付加しシーケンスできるようにする作業

シーケンス

サンプルのシーケンスを読み、生データを作成する作業

データ解析

一次解析、二次解析、そして結果の解釈と3ステップに分けられるシーケンスデータの解析作業

空間的なオミックス解析の広がり

ゲノムデータを空間的に把握する

バルクシーケンス



Photo by [Monsieur Boukaih](#) on [Unsplash](#)
Accessed 2020-04-23

シングルセルシーケンス



Photo by [Amy Shamblen](#) on [Unsplash](#)
Accessed 2020-04-23

空間的シーケンス (Spatial sequencing)



Photo by [Anastasiia Rusaeva](#) on [Unsplash](#)
Accessed 2020-04-23

Adapted from images shown by professor Aviv Regev at Broad Institute.

製品の使用目的は研究に限定されます。

illumina®

空間的なオミックス解析の広がり

Nature Methods
“Method to Watch”

》Spatial transcriptomics

It will soon be commonplace to localize gene expression in tissues.

Space has been a formidable, if not final, frontier in gene expression. But that frontier is eroding as methods developers put transcripts onto various tissue maps. The variety and creativity of these approaches makes this a fascinating area to watch.

Spatial gene expression is critical for understanding cell identity and function in the tissue context. The popularity of model organism expression atlases and the Allen Institute for Brain Science's mouse and human brain atlases attest to the power of spatial gene expression. However, existing atlases were largely created using reporter genes or *in situ* hybridization—low throughput methods that make it painstaking to construct references and that limit the ability to assess multiple samples.

A bevy of recent tools offer greater flexibility and scale; highly multiplexed fluorescence *in situ* hybridization, *in situ* sequencing of imaged sections or three-dimensional tissues, and algorithmic methods that project gene expression onto limited existing spatial information, among others, offer very different solutions.

There is good reason to expect the innovation to continue. Many methods are currently being optimized, and each has unique strengths and limitations with



There are many ways to map cellular transcriptomes.

respect to ease, speed, spatial resolution, quantitative accuracy, and the number of genes than can be profiled. Recent initiatives, including the Human BioMolecular Atlas Program of the US National Institutes of Health and the Human Cell Atlas, a major international undertaking, have strong technological components and define spatial mapping as an explicit goal.

How to integrate gene expression data into a spatial coordinate system, and how to visualize and compare these kinds of data sets are difficult open questions for the computational community, which has had little data to work with so far. We anticipate that improvements in data generation and analysis will bring spatial transcriptomics into wider practice and will be transformative for biology.

Tal Naway

Naway T. Spatial transcriptomics. *Nature Methods* 2018

Nature Methods
“Method of the Year 2019”
Multimodal omics analysis



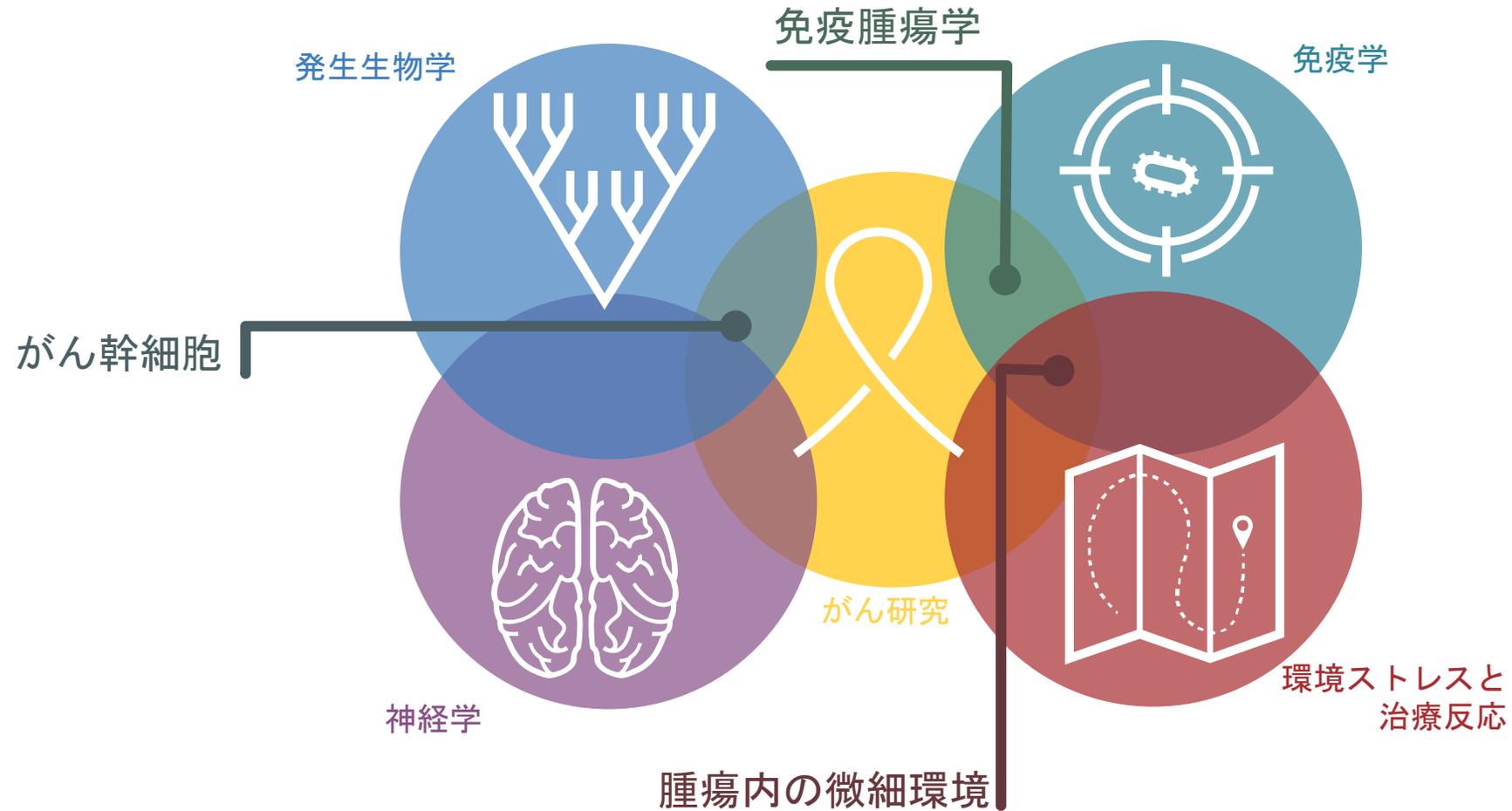
<https://www.nature.com/nmeth/volumes/17/issues/1>

“今後は、この手法を導入することにより
これまで細分化された
シングルセルサンプルで解析されていた
データを2次元や3次元でマッピング
しながら解析できる可能性がある”

“要するに、こういった解析は
組織内のそれぞれの細胞の
たくさんの側面を
量的におよび表現型的に把握すること
を可能にするということだ”

Efremova M and Teichmann SA. Computational methods for single-cell omics across modalities. *Nature Methods* 2020; 17(1):14-17. doi.org/10.1038/s41592-019-0692-4

シングルセルシーケンスや空間的なオミックス解析は さまざまな領域で使用される

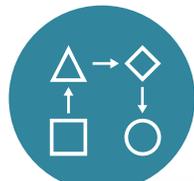


製品の使用目的は研究に限定されます。

イルミナシーケンサーのラインナップは シングルセルや空間把握のアプリケーションを幅広くサポート



RNA



シグナル伝達



たんぱく質



DNA



400万 リード

1.2 Gb*

200億 リード

(フローセル2枚使用)

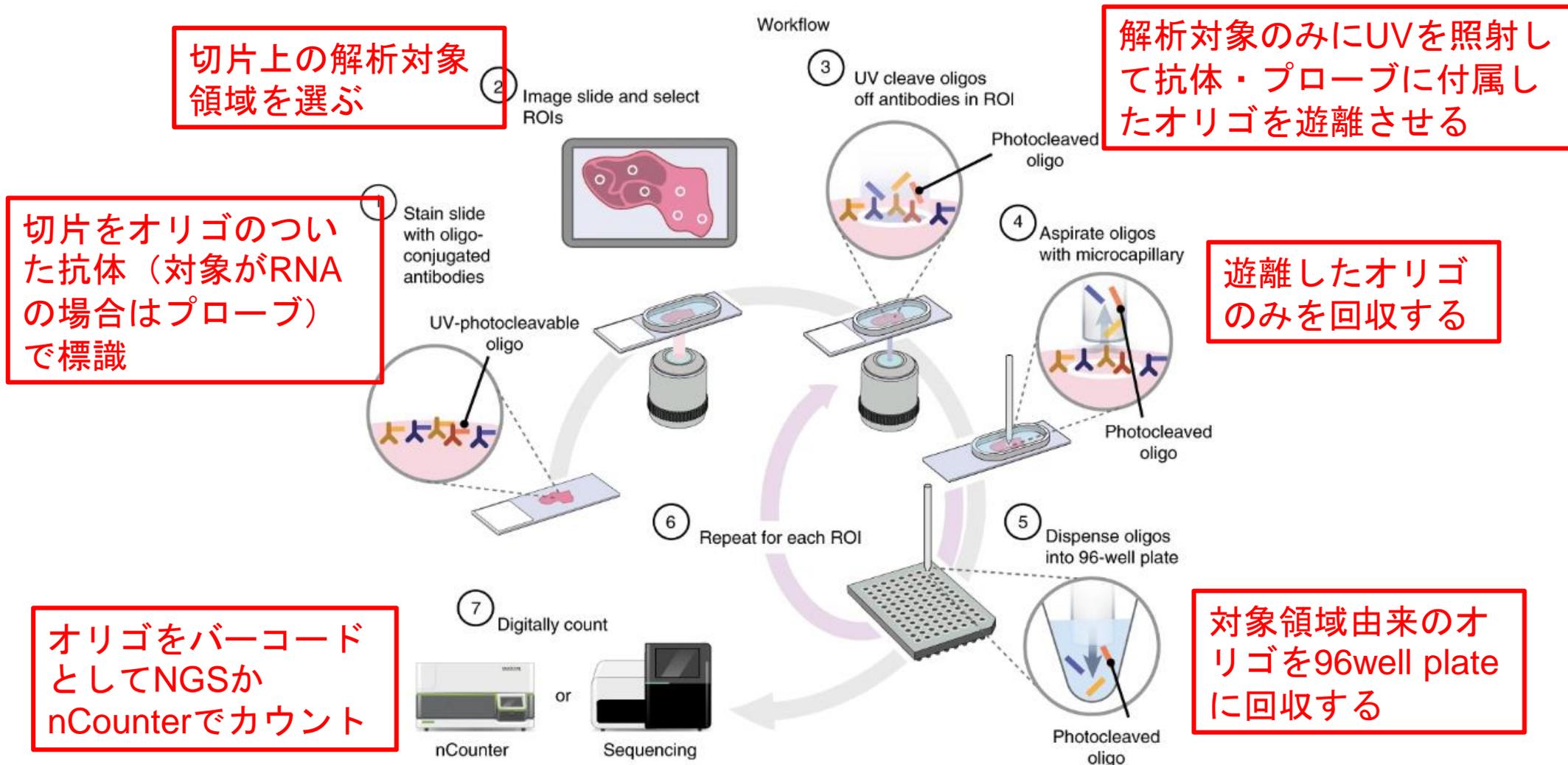
6000 Gb*

*2 x 150 bpでの解析をもとにした仕様.

製品の使用目的は研究に限定されます。

illumina®

イルミナシーケンスはNanoString GeoMx DSPワークフローに対応

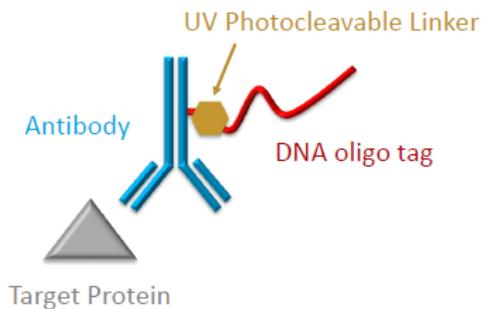


Merritt, C.R., Ong, G.T., Church, S.E. *et al.* Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue. *Nat Biotechnol* **38**, 586–599 (2020)

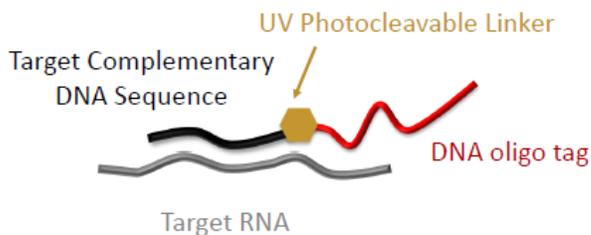
製品の使用目的は研究に限定されます。

NanoString GeoMxライブラリーの構造

DSPバーコード領域には、Rd1/Rd2のシーケンスプライマー領域とUMI, GeoMxID領域を含む。抽出後、Sample Index(Dual)付きプライマーで増幅しライブラリー化。

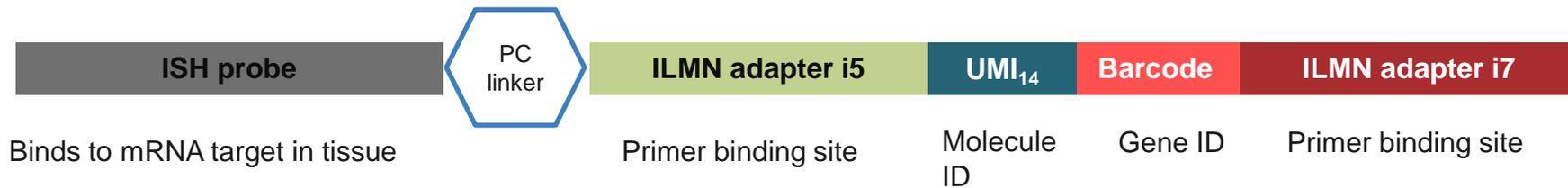


対象がたんぱく質

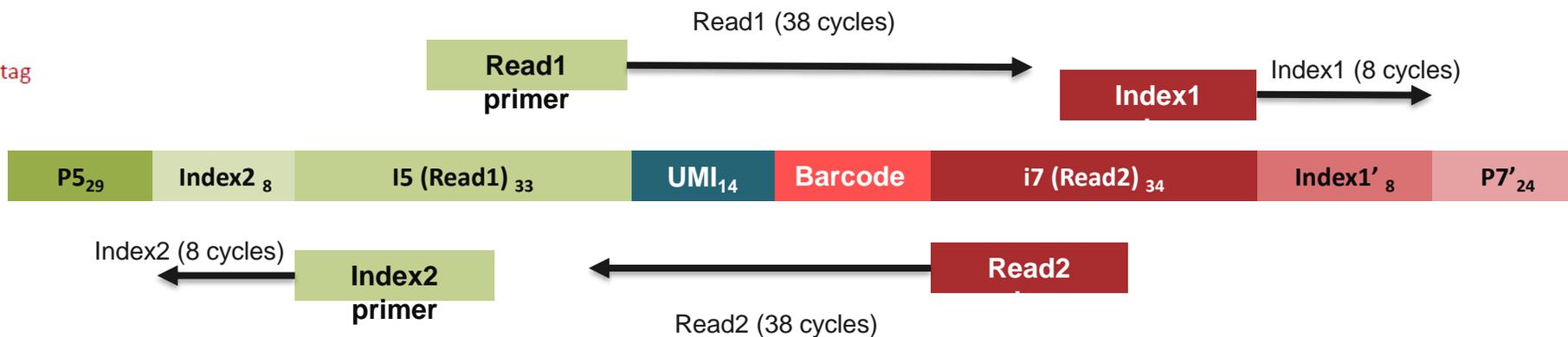


対象がRNA

NanoString社から提供

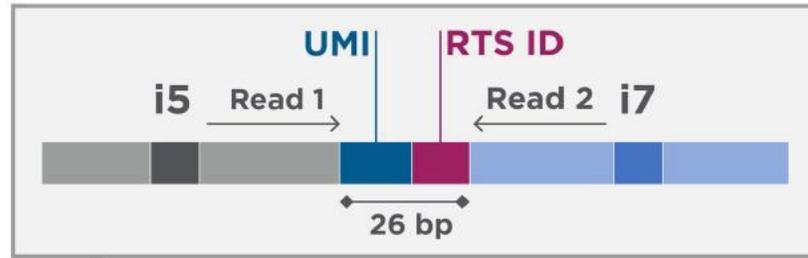


Read1-Index1-Index2-Read2で38-8-8-38 cycleで解析。
計92サイクル（100 cycleか150 cycleキットでラン）。

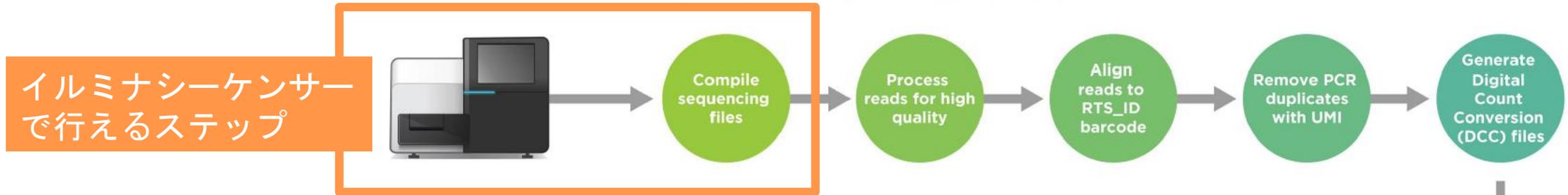


製品の使用目的は研究に限定されます。

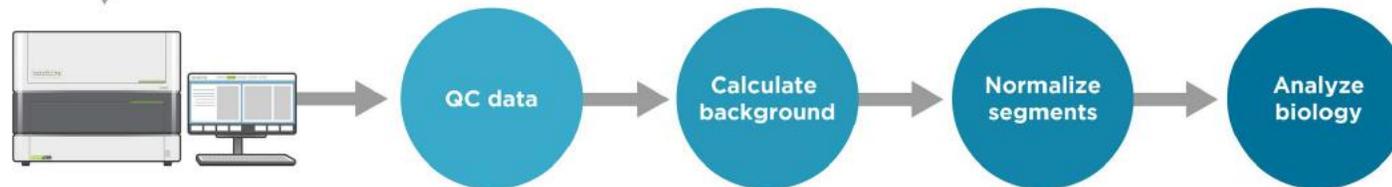
シーケンスデータをカウントデータに変換し解析



AUTOMATED DATA PROCESSING PIPELINE



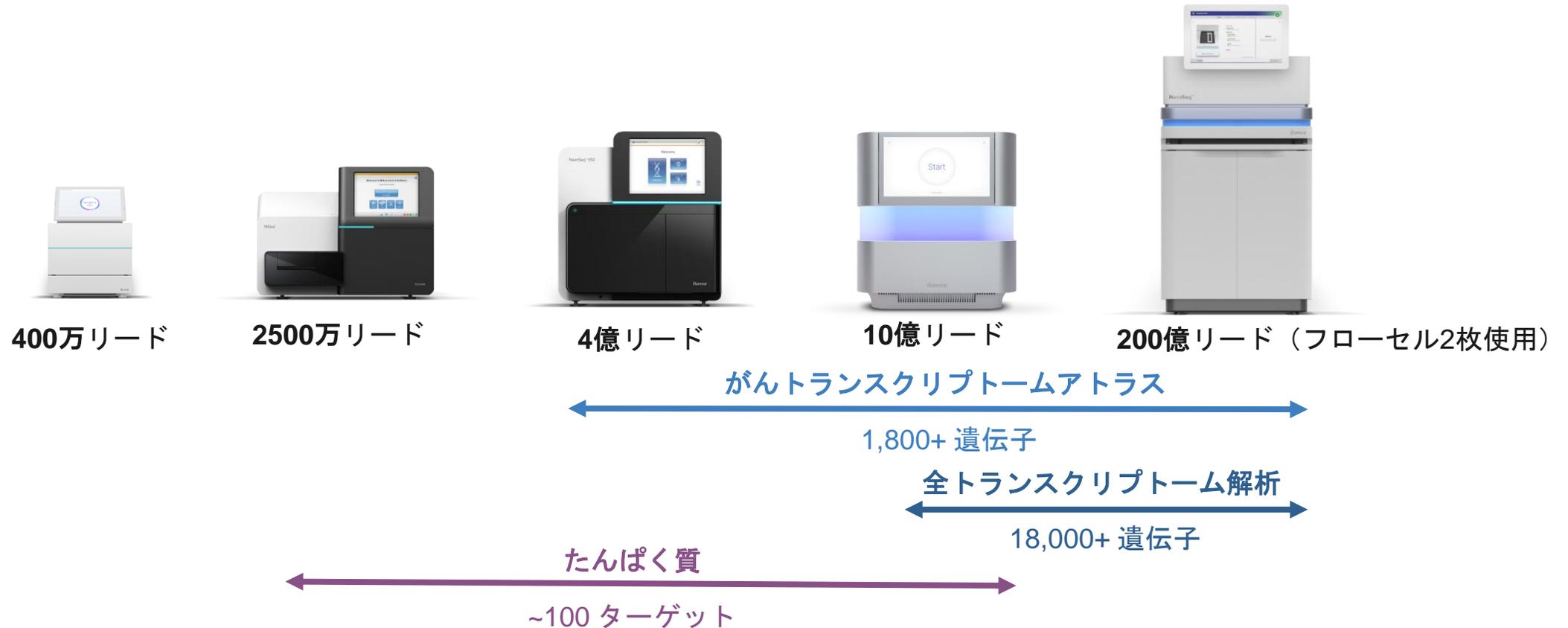
INTERACTIVE DATA ANALYSIS AND VISUALIZATION



NanoString社から提供

製品の使用目的は研究に限定されます。

NanoString GeoMx DSPワークフローに対応する イルミナシーケンサーのデータ量



それぞれの装置の特徴



2011年販売開始、世界で7,400台導入（2019年末まで）
最大2500万リードまで可能だが、様々なデータ量に対応する試薬を用意。2x300 bpなどより長鎖にも対応



2020年販売開始。
最大10億リードまで可能。ほぼメンテナンス不要なオールインワンカートリッジを採用。シングルセル解析に使用されるリード数。



2017年販売開始、世界で920台導入（2019年末まで）
1フローセルで**最大100億リード**、3Tbまで可能
4種類のリード数に対応するキットを用意。
一部2x250 bpに対応。

NanoString CTA (Cancer Transcriptome Atlas) Panelに対応するシーケンスのリード数

スライド	ターゲット領域 ~ 12 / slide	ターゲットエリア ~ 24 / slide	シーケンスリード数*	シーケンサー	使用するキット
1	12	24	2500 – 3000万		MiSeq V3 Reagent Kit (150 cycles)
12	144	288	3 – 3.6 億		NextSeq 1000/2000 P2 flowcell Reagent Kit (100 cycles)
24	288	576	6 – 7.2億		NextSeq 2000 P3 flowcell Reagent Kit (100 cycles)**
48	576	1152	12 – 15億		NovaSeq 6000 S1 flowcell Reagent Kit (100 cycles)

* 上記のサンプル数はおおよその見積もりです。ターゲット領域は300 um x 300 umとして計算。 ** 2020年末までにリリース予定

製品の使用目的は研究に限定されます。

illumina®

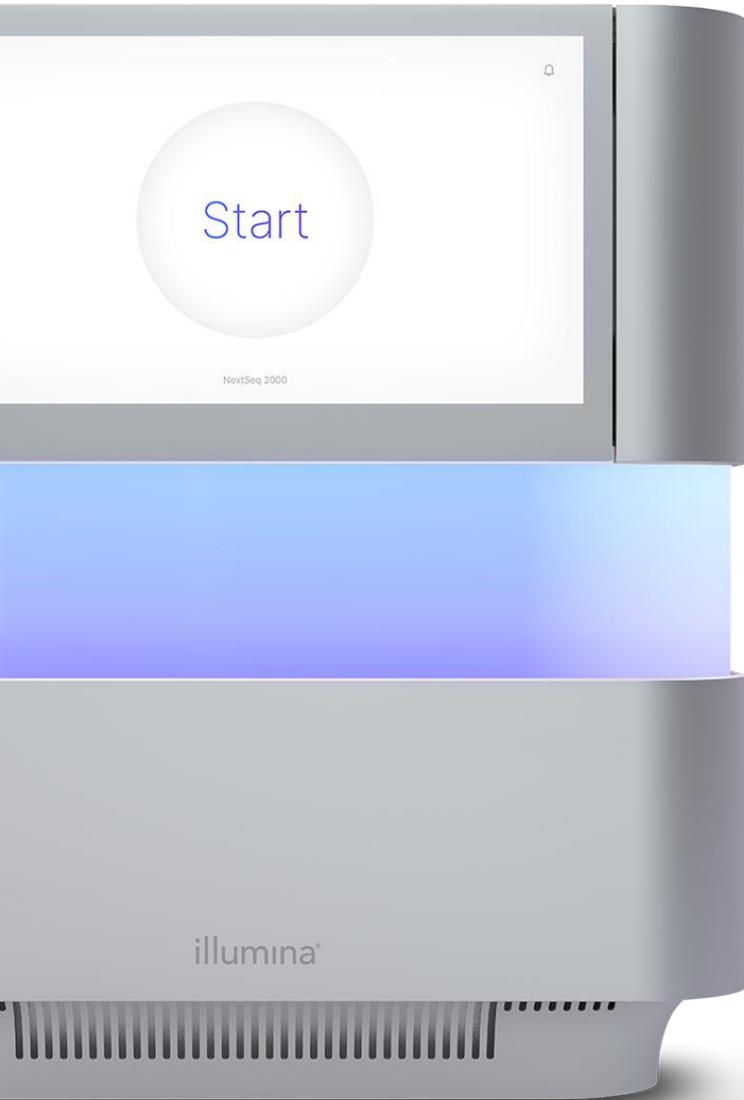
NanoString CTA (Cancer Transcriptome Atlas) Panelに対応するシーケンスのリード数

スライド	ターゲット領域 ~ 12 / slide	ターゲットエリア ~ 24 / slide	シーケンスリード数*	シーケンサー	ターゲット領域 (ROI) あたりのコスト
1	12	24	MiSeq V3 Reagent Kit (150 cycles) 158,400円		13,200円/ROI 6,600円/AOI
12	144	288	NextSeq 1000/2000 P2 flowcell Reagent Kit (100 cycles) 187,400円		1,301円/ROI 651円/AOI
24	288	576	NextSeq 2000 P3 flowcell Reagent Kit (100 cycles)** 429,000円		1,490円/ROI 745円/AOI
48	576	1152	NovaSeq 6000 S1 flowcell Reagent Kit (100 cycles) 656,700円		1,140円/ROI 570円/AOI

*上記のサンプル数はおおよその見積もりです。ターゲット領域は300 um x 300 umとして計算。** 2020年末までにリリース予定
価格は2020年6月時点

製品の使用目的は研究に限定されます。

illumina®



2020年の新製品NextSeq™ 2000

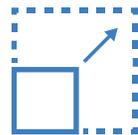
illumina webinar:

小型化、操作性、コスト効率を兼ね備えたNextSeq 2000 システムの魅力をわかりやすくご紹介(2020/3/18実施)

<https://jp.illumina.com/events/webinar/2020/webinar-200318-j.html>



ハイスループット解析にも対応できるシーケンスデータ量



NextSeq500・550に比べてリード数が多くデータあたりのコストも小さいので、深く詳細な解析が可能に



DRAGENプラットフォームをバンドルした一体型装置で情報解析

まとめ

- イルミナシーケンスはNanoString GeoMx DSPワークフローに対応しており、MiSeq以上のシーケンサーを必要リード数に応じて使い分けていただく。
- NanoString GeoMx DSPワークフローでは38-8-8-38 cycleの計92サイクルを通常使用する。そのため100 cycleあるいは150 cycleキットを使用するのが最も効率的。
- 2020年新製品NextSeq2000も、NanoString GeoMx DSPワークフローに対応するシーケンサーでサンプル当たりのコストを抑えてシーケンスすることが可能である。

ご清聴いただきありがとうございました

ご質問等はtkobayashi@illumina.comまで

