

複雑な組織の 高解像度、 ハイスループットの 空間トランス クリプトーム解析

腎臓疾患の組織構造を
明らかにする

- NanoString GeoMx[®] Digital Spatial Profilerは、*in situ*での転写産物の画像を解像、定量化します
- イルミナのシーケンスシステムにより空間解析法のスループットが大幅に向上します
- BaseSpace[™] Sequence Hubで使用できる統合型のソフトウェアツールがデータ解析を効率化します

空間トランスクリプトーム解析の提供元

nanoString

illumina[®]

はじめに

分離したサンプルを使用する従来のシーケンス手法では、*in vivo*で存在する重要な空間情報が失われる可能性があります。組織構造に関する情報を維持しながら局所的な転写変化を理解するには、遺伝子およびタンパク質のプロファイリングのためのハイレキシティな空間解析技術が必要です。空間的手法は、組織内の生体分子の正確な位置情報を保持することで、健康と疾患のメカニズムの理解をさらに深めることができます。

NanoString GeoMx Digital Spatial Profiler (DSP) は、組織形態、タンパク質発現、または遺伝子発現によって定義される関心領域 (ROI) 内の分析物を測定します (図1)。イルミナの次世代シーケンサー (NGS) システムからのリードアウトと組み合わせると、数万のターゲットを同時にプロファイリングでき、空間解析法のスループットが劇的に向上します。

このアプリケーションノートでは、NanoString GeoMx DSPを使用した空間トランスクリプトーム解析とそれに続くイルミナシーケンスおよびデータ解析のための包括的なワークフローの概要を説明します (図2)。この空間解析法の卓越したパフォーマンスは、健康な腎臓サンプルと病変した腎臓サンプルを解析することによって実証します。

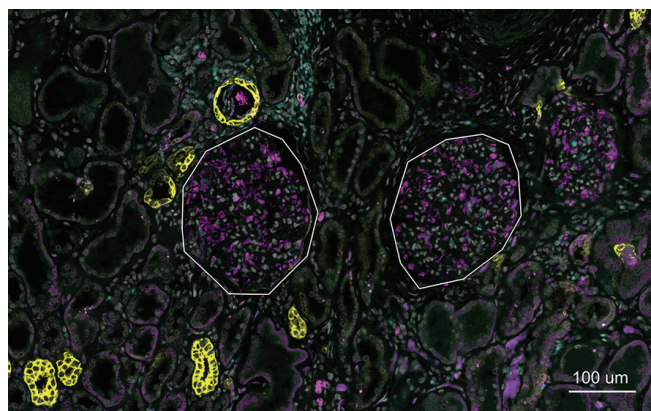


図1: NanoString GeoMx DSPを使用した空間解析: GeoMx形態マーカーによって視覚化およびプロファイリングされたヒト腎臓糸球体の周囲に描画されたROI選択の例。ポドサイトをWT1 (マゼンタ)、免疫細胞をCD45 (シアン)、遠位尿細管をPanCK (黄色)、DNAをSYTO13 (グレー) を用いて識別しています。

方法

サンプル調製

3つの正常なヒト腎臓と4つの糖尿病患者の腎臓から採取したホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを解析しました。NanoString GeoMx DSPプロトコールは標準的な組織学プロトコールから構築され、手動または自動化されたLeica Bond Rxシステムで実行できます。NanoString GeoMx DSPは、新鮮冷凍サンプル、固定凍結サンプル、またはFFPEサンプルと互換性があります。詳細についてはNanoStringのガイドラインをご覧ください。

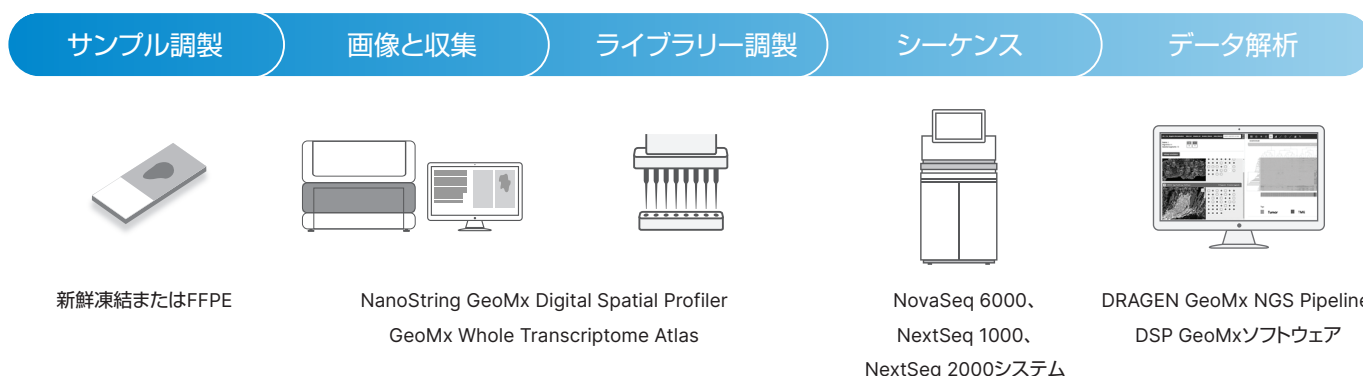
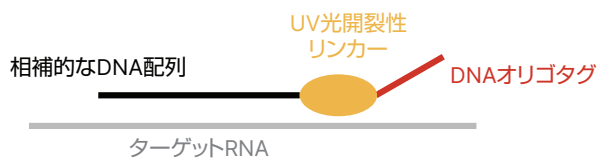


図2: 空間トランスクリプトーム解析ワークフロー: NanoString GeoMx DSPは、空間トランスクリプトーム解析のためのサンプルからデータ取得までの統合型ワークフローの一部であり、ワークフローにはNovaSeq 6000システム、NextSeq 1000システム、またはNextSeq 2000システムでの実証済みのイルミナシーケンスと、DRAGEN GeoMx NGS PipelineおよびDSP GeoMxソフトウェアによるデータ解析が含まれます。

画像と収集

GeoMx Whole Transcriptome Atlas (WTA) と GeoMx Protein Assays には、それぞれ GeoMx RNA *in situ* ハイブリダイゼーションプローブまたはタンパク質抗体のカクテルが提供され (図3)、これらを標準的な顕微鏡スライド上に載せた組織切片上で一晩インキュベートします。蛍光標識された GeoMx 形態マーカー (最大4つ) は、イメージング中の視覚化のためにスライド調製中に追加します。スライドの画像は、NanoString GeoMx DSP を使って取得し、ROI を選択します (図1)。これらの領域に集束光を照射し、この集束光により DSP バルコードが放出され、このバルコードがライブラリー調製とシーケンス用に収集されます。

A. オリゴ標識RNAプローブ



B. オリゴ標識抗体

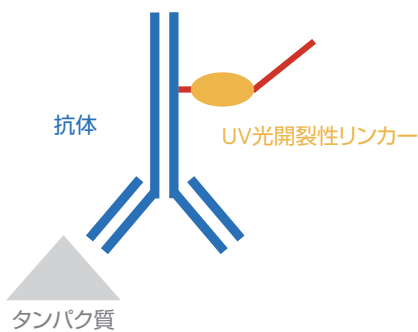


図3: GeoMx イメージングプローブ: GeoMx イメージングプローブは、(A) RNA用の *in situ* ハイブリダイゼーションプローブまたは (B) タンパク質用の抗体に結合した UV 光開裂性オリゴヌクレオチドのカクテルです。

ライブラリー調製

ライブラリーは、GeoMx Seq Code PCRプライマーを使用して調製します。組織切片から収集された各ROIは、ライブラリー調製中に異なるペアのi7およびi5のユニークデュアルインデックスでインデックス付けされます。その後、すべてのインデックス付きROIをプールし、精製します。得られたライブラリー断片には、分子バーコード (UMI)、標的検体識別子 (RTS ID)、およびイルミナプラットフォームでのシーケンスに必要な領域が含まれています (図4)。

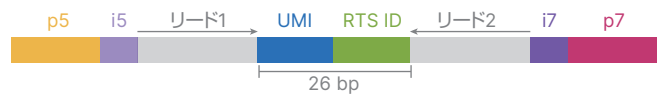


図4: GeoMxライブラリー: 調製したライブラリー断片には、分子カウント用の14 bp UMI、ターゲット識別用の12 bp RTS ID、およびすべてのイルミナシーケンスシステムと互換性のあるi5/i7ユニークデュアルインデックスとアダプターが含まれています。

シーケンス

GeoMx NGSライブラリーは、あらゆるイルミナシーケンスシステムと互換性があります (図2)。必要なシーケンス出力を生成するためにはNextSeq™ 1000システム、NextSeq 2000システム、NovaSeq™ 6000システムなどのよりハイスループットな装置が推奨されます。シーケンスランごとのサンプル数はシーケンスシステム (表1) およびROIの大きさと数によって異なります。

GeoMx NGSライブラリーは、27 bp × 2のペアエンドリードでシーケンスし、インデックス1 (i7) およびインデックス2 (i5) には8 bpを用いるユニークデュアルインデックスワークフローを使用します。シーケンスランごとのサンプル数はシーケンスシステム (表1) およびサンプルあたりのROIの数と大きさによって異なります。例えば、300 μm × 300 μmの面積を測定する各ROIを含むサンプルの場合、サンプルあたり12 ROIを含む一般的なWTAワークフローには、サンプルあたり1億リードが必要です。

データ解析

シーケンス後、データ処理と解析はBaseSpace Sequence Hubで利用できるIllumina DRAGEN™上のGeoMx NGS Pipelineで開始されます。* このソフトウェアは、GeoMxソフトウェアを使用した空間的な発現解析および視覚化のために必要なシーケンスリードのカウントへの変換のために、信頼性が高く効率的な方法を提供します。DRAGENパイプラインで生成されたファイルは、NanoString DSP装置でさらに処理されます。

* アプリを起動してデータを保存するには、BaseSpace Sequence Hubサブスクリプション (プロフェッショナルまたはエンタープライズ) が必要です。

表1: イルミナシーケンスシステム上のGeoMxライブラリーのサンプルスループットの例

イルミナプラットフォーム	NanoString GeoMx WTAサンプル数 (1億リード)	フローセル	シーケンスキット	カタログ番号	フローセルあたりの転写産物数
NextSeq 550 システム	4	高出力	NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 cycles)	20024906	400
NextSeq 1000またはNextSeq 2000 システム	4	P2	NextSeq 1000/2000 P2 Reagents (100 cycles) v3	20046811	400
NextSeq 2000 システム	11	P3	NextSeq 2000 P3 Reagents (50 cycles)	20046810	1,100
	6.5	SP	NovaSeq 6000 SP Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028401	650
	13	S1	NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028319	1,300
	33	S2	NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (100 cycles)	20028316	3,300
NovaSeq 6000 システム	80	S4	NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (35 cycles)	20044417	8,000

DRAGEN GeoMx NGS Pipelineには、NanoString GeoMx DSPからの設定ファイルと、イルミナシーケンスシステムからのFASTQシーケンスファイルの2つの入力ファイルが必要です。ラン完了後にシーケンスデータは自動的にBaseSpace Sequence Hubに転送されますが、ユーザーは本アプリを選択した後に設定ファイルを手動でアップロードする必要があります。約192のROIと約4億リードを含む一般的な実験の解析時間は1~2時間です。GeoMx NGS Pipelineは、Nanostring DSP装置でインタラクティブに視覚化するために、GeoMx DSP Data Analysis Suiteにアップロードできるデジタルカウント変換 (DCC) ファイルを出力します。また、DCCファイルは、[GeoScript Hub](#)上のオープンソースの解析スクリプトとも互換性があります。

結果

組織構造の空間解析

上皮細胞 (PanCK)、免疫細胞 (CD45)、および糸球体 (WT1) をターゲットとする3つの蛍光標識抗体と核酸染色 (SYTO-13) を使用して、構造的特徴のサブ領域を同定、識別しました。尿細管は視覚的に同定し、遠位尿細管 (PanCK+) と近位尿細管 (anCK-) に自動的に分割されました。それぞれの異なる組織コンパートメントは独立して収集され、2つのコンパートメントが隣接していたり、相互に入り組んでいる場合でも、領域ごとに2つのユニークな全トランスクリプトームプロファイルが得られました。

糸球体の明確な球状構造とWT1による陽性染色により、周囲の組織から独立して各糸球体を同定することが可能になりました。各サンプル内で、個々の糸球体に病理学的特徴の注釈が付けられ、正常サンプルと糖尿病サンプルの両方の病理学的に健康な糸球体と異常な糸球体からデータが収集されました (図5A)。さらなる解析により、免疫関連パスウェイの上方制御など、糖尿病性腎疾患 (DKD) に伴って発現を変化させるパスウェイが特定され、免疫浸潤と炎症の増加による既知の影響が確認されました。翻訳やミトコンドリア呼吸などの多くの重要な細胞プロセスが病気の腎臓では下方制御されており、正常な細胞機能が失われていることが示されました (図5B)。

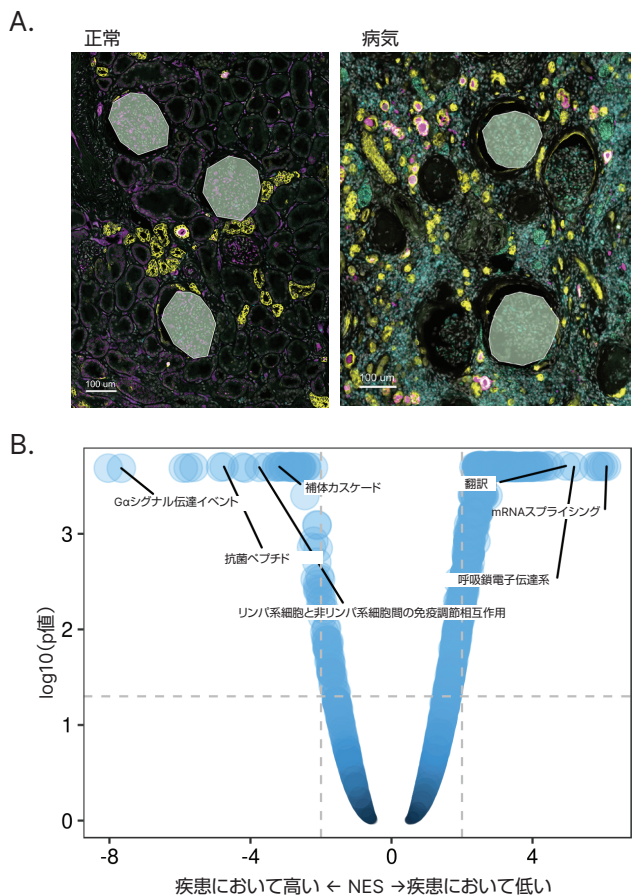


図5：発現差解析により、疾患で変化するパスウェイが明らかになります：(A) 正常および疾患のあるヒト腎臓サンプルの糸球体の輪郭を示すROIの画像。(B) 解析により、免疫関連パスウェイの上方制御、翻訳およびミトコンドリア呼吸の下方制御など、正常な腎臓と比較してDKDの糸球体での発現を変化させたパスウェイが同定されます。

空間解析による疾患の不均一な性質の解明

個々の糸球体は各サンプル内の病理の程度によってアノテーションされ、健康な糸球体と異常な糸球体の両方からトランスクリプトームをプロファイリングしました。各糸球体に存在する細胞タイプは、公開されているシングルセルデータセットからの遺伝子シグネチャーを使用して同定しました。細胞タイプデコンボリューションにより、免疫細胞の増加および疾患のサンプルにおけるポドサイトの喪失が示されました(図6A)。これらの変化は、疾患の腎臓サンプル内であっても、異常な糸球体ではより顕著であり、健康な糸球体ではあまり認められませんでした(図6B)。さらに検証するために、疾患の腎臓内の糸球体を空間的に解析し、各糸球体について各細胞タイプの相対的な割合を決定しました。正常な細胞タイプの比率を持つ健康な糸球体が、ポドサイトの完全な喪失と免疫浸潤の大幅な増加を

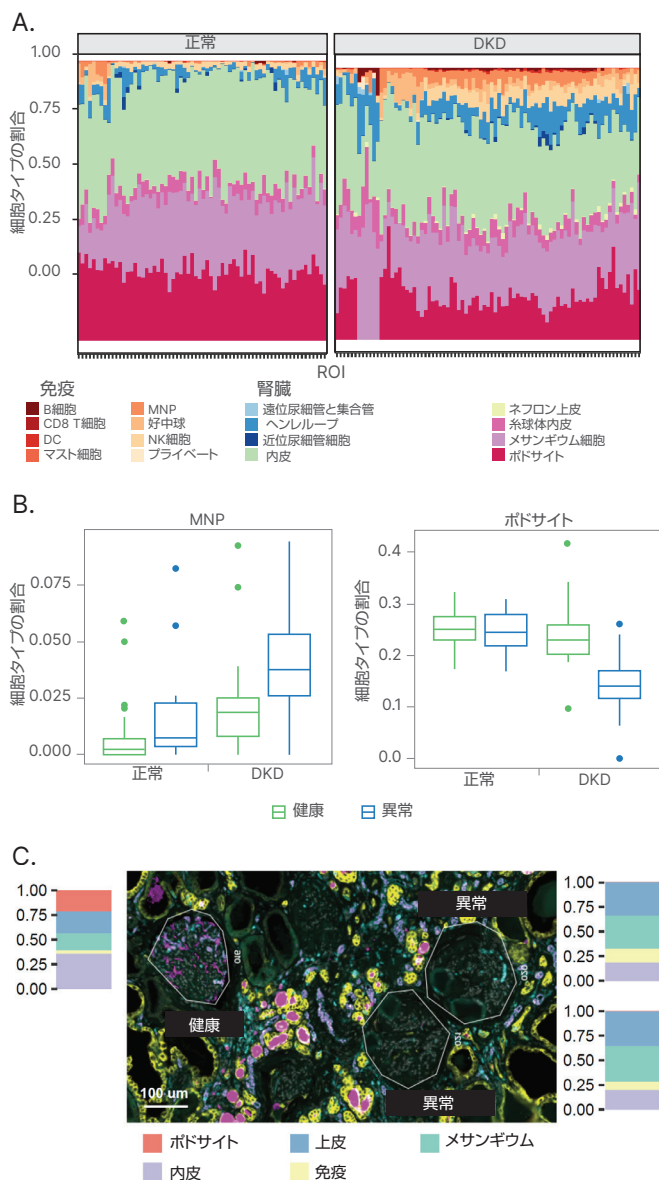


図6：細胞タイプデコンボリューションにより、糸球体における細胞タイプの不均一性が明らかになります：(A) 健康な腎臓サンプルとDKD腎臓サンプルの各糸球体内の細胞タイプの割合。(B) 正常およびDKD腎臓サンプルにおける病理学的に同定された異常および健康な糸球体における単核食細胞(左)およびポドサイト(右)の細胞タイプ画分の分布のボックスプロット。(C) DKD腎臓の画像。3つの糸球体の例を示しており、各細胞タイプの相対比率を横にプロットしています。空間的に隣接しているにもかかわらず、健康な糸球体は予測された細胞タイプの比率を示していますが、2つの異常な糸球体はポドサイトの完全な喪失と免疫浸潤の大幅な増加が認められます。

伴ったより病的な糸球体のすぐ近くで観察されました (図6C)。これらの結果は、糖尿病性腎疾患の不均一な病態を示しており、一部の糸球体は重篤な疾患であっても正常な細胞構造を保持していることを示しています。

まとめ

技術の進歩により、複雑な生物学的システムに対する洞察を提供し続ける新しいNGS手法が可能になりました。しかし、分離した組織で実施する解析では、*in vivo*で存在する重要な空間情報が失われます。NanoString GeoMx DSPと実証済みのイルミナシーケンスを組み合わせることで、遺伝子とタンパク質のプロファイリングに必要な組織構造に関するハイプレキシティな空間解析と情報を提供します。このアプリケーションノートでは、空間トランスクリプトーム解析のために統合されたワークフローの概要を説明し、糖尿病性腎疾患の不均一な病理をプロファイリングするためのソリューションの優れたパフォーマンスを実証しています。

実験への協力

NGSをリードアウトとして使用することでより高いスループットを実現するだけでなく、イルミナとNanoStringのチームは協力してデータ解析時間を最小限に抑え、ワークフローを合理化してカスタマーエクスペリエンスを向上させてきました。

GeoMxアッセイまたはBaseSpace AppのGeoMx NGS Pipelineを使用したデータ解析に関するサポートが必要な場合は、こちらにお問い合わせください:

geomxsupport@nanosttring.com

シーケンスに関する質問への回答については、こちらにお問い合わせください:

techsupport@illumina.com

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

NanoString GeoMx DSP: www.nanosttring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-dsp-overview/

NanoString GeoMx WTA: www.nanosttring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-rna-assays/geomx-whole-transcriptome-atlas/

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

© 2023 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。

illumina[®]