

FFPE組織切片の ハイプレックスな 空間プロテオゲノミクス

星状細胞腫と膠芽腫の組織構造を
明らかにする

- NanoString GeoMx[®] Digital Spatial Profiler (DSP) は、タンパク質ターゲットと転写産物を *in situ* で同時にデジタル処理して定量化します
- 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
- DRAGEN[™] Bio-IT Platform 上および BaseSpace[™] Sequence Hub で使用できる統合型のソフトウェアツールが効率化されたデータ解析を提供します

空間プロテオゲノミクスの提供元

 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発現パターンを理解するには、遺伝子およびタンパク質のプロファイリングにハイブリックスな空間技術が必要です。翻訳制御によって遺伝子とタンパク質の発現に差異が生じる可能性があります。次世代シーケンサー (NGS) ベースのプロテオミクス法によってトランスクリプトームプロファイリングを補完できます。

NanoString GeoMx DSPは、組織の形態学によって定義された選択した関心領域 (ROI) 内のRNAとタンパク質レベルの発現差異の変化を測定します。イルミナの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と検出力が劇的に向上します。空間プロテオミクスをアッセイする場合、GeoMx DSP上のNGSに基づくリードアウトにより、全トランスクリプトームとともに数百のタンパク質ターゲットのプロファイリングが可能になります。

以前のアプリケーションノートではイルミナのNGSリードアウトを用いたGeoMx DSP上での空間トランスクリプトミクスについて説明しました。このアプリケーションノートでは、NanoString GeoMx DSP、イルミナシーケンスおよびデータ解析を使用したRNAとタンパク質の同時空間解析からなる、空間プロテオゲノミクスの包括的なワークフローの概要を説明します (図1)。このワークフローは、遺伝子転写とタンパク質への翻訳に関する洞察を結び付けることで、特定のサンプルにおける生物活性の全体像を提供します。この空間解析法の卓越したパフォーマンスは、ヒト星状細胞腫と膠芽腫サンプルを解析することによって実証します。

方法

サンプル調製

NanoString GeoMx DSPは、新鮮凍結サンプル、固定凍結サンプル、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルと互換性があります。この研究では、24個のヒト星状細胞腫 (グレード2~3) および膠芽腫 (グレード4) からの5 µmのFFPEコアサンプルを解析用に取得しました (US BioMax, Inc., カタログ番号: BS17016c)。形態マーカーによる染色は手作業またはBOND RX Fully Automated Research Stainer (Leica Biosystems) で実施でき、標準的な組織学プロトコルを採用しています。

画像と収集

GeoMx Whole Transcriptome Atlas (WTA) およびGeoMx Protein Assaysには、それぞれGeoMx RNA *in situ*ハイブリダイゼーション (ISH) プロブまたはタンパク質抗体のカクテルが提供されます。いずれのキットもカスタムターゲットを加えることができ、実験のニーズに応じてアッセイを調節できます。空間プロテオゲノミクスのワークフローは、標準的な顕微鏡スライドにマウントされた組織切片を、DNAバーコード付きRNA ISHプロブのカクテルとともに一晩インキュベートすることから始まります。バーコード付きISHプロブとともにインキュベートしたスライドは、翌日処理する必要があります。これらのスライドを、DNAバーコード付き抗体とともに一晩インキュベートします (図2)。¹

スライドの画像はGeoMx DSPを使用して取得し、ROIを選択します。ROIは順次UV光に曝され、このUV光によりDNAバーコードが放出され、このバー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。ROIは、形態マーカーの視覚化に基づいてさらに複数の関心エリア (AOI) へセグメント化し、プロファイリングすることができるため、腫瘍や腫瘍微小環境のような個々の組織コンパートメントのプロファイリングが可能になります。

サンプル調製

画像と収集

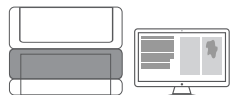
ライブラリー調製

シーケンス

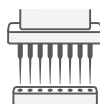
データ解析



新鮮凍結、固定凍結、
またはFFPE



NanoString GeoMx Digital Spatial Profiler
GeoMx Whole Transcriptome Atlas
GeoMx Protein Assay



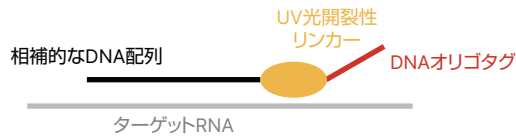
NovaSeq 6000または
NextSeq 2000システム



DRAGEN GeoMx NGS Pipeline
DSP GeoMx Software

図1: 空間プロテオゲノミクスワークフロー: NanoString GeoMx DSPは、空間的に分解したプロテオミクスとトランスクリプトミクス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、NovaSeq 6000システムまたはNextSeq 2000システム上での実証済みのイルミナシーケンスと、DRAGEN GeoMx NGS PipelineおよびGeoMx DSPソフトウェアによるデータ解析が含まれます。

A. オリゴ標識RNAプローブ



B. オリゴ標識抗体

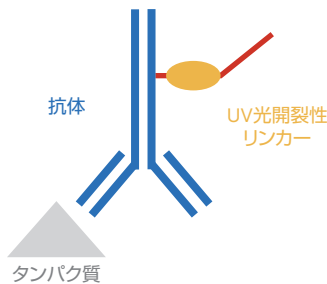


図2: GeoMxイメージングプローブ: GeoMxイメージングプローブは、(A) RNA用のISHプローブ、または(B) タンパク質用の抗体に結合したUV光開裂性オリゴヌクレオチドのカクテルです。

最大4つの形態マーカーはすべてのGeoMxアッセイに使用でき、組織の視覚化、適切なROIの選択、および組織の形態学に基づくセグメント化に使用します。組織切片は抗PanCK (AF532)、抗CD45 (AF594)、SYTO-13などの蛍光標識抗体のカクテルで染色し、上皮細胞、免疫細胞、核をそれぞれ視覚化しました。

ライブラリー調製

ライブラリーはGeoMx Seq Code PCRプライマーを使って調製します。ライブラリー調製のステップで、組織切片から収集したROIは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化されます。インデックスが付いたすべての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ます (図3)。

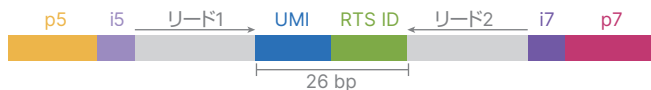


図3: GeoMxライブラリー: 調製したライブラリー断片には、分子カウント用の14 bp UMI、ターゲット識別用の12 bp RTS ID、リード1とリード2のプライマー結合部位、および全イルミナシーケンスシステムと互換性のあるi5/i7ユニークデュアルインデックスとアダプターが含まれています。

シーケンス

GeoMx NGSライブラリーはどのイルミナシーケンスシステムとも互換性があります。必要なシーケンス出力を生成するためには、NovaSeq™ 6000システムおよびNextSeq™ 2000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。* 統合型のエンドツーエンドのワークフローが利用でき、ユーザーはGeoMx DSP上でNextSeq 2000システム用のシーケンスランをセットアップできるようになります。このワークフローによりタッチポイントが減り、二次解析が自動で行われます。

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、8 bpのインデックス1 (i7) およびインデックス2 (i5) 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。5% PhiX標準添加 (v/v) が推奨されます。各GeoMxアッセイで推奨されるリードペアの数は、UV照射の総面積とタンパク質ターゲットの数 (n) に基づいて計算できます (表1)。

表1: GeoMxアッセイ用のリードペアのガイドライン

検体	アッセイ	シーケンス深度係数	計算
RNA	WTA	100	
タンパク質	タンパク質	(2 × n)	シーケンスクラスターの数 = 合計AOI面積(μm ²) * シーケンス深度係数
RNA + タンパク質	WTA + タンパク質	100 + (3.5 × n)	

シーケンス深度は、サンプルの品質、組織の種類、発現レベルなどの固有の実験変数に基づいて変化する可能性があります。最初のシーケンス深度が十分ではない場合は、同じライブラリーをリシーケンスし、リードを統合してシーケンス深度を増やすことができます。

スライドあたり12のAOIと147のタンパク質ターゲットのプレキシティを想定した場合、シーケンスランあたりに含めることができるサンプル (スライド) の最大数は、シーケンスシステムに応じて異なります (表2)。例えば、200 μm × 200 μmの正方形の各AOIを含むサンプルの場合、サンプルあたり12 AOIを含む一般的なワークフローには、サンプルあたり2億8,200万のペアエンドリードが必要です。†

* インサートサイズが短いため、NextSeq 2000 P3 (50 cycles)およびNovaSeq S4 Reagent Kit v1.5 (35 cycles)を使用するシーケンスが最もコスト効率の高いオプションです。

† NanoStringが推奨するペアエンドリードシーケンスでは、クラスターごとに2つのペアエンドリード (順方向と逆方向) を生じます。これは1つのリードペアとして説明されることもあります。

表2: イルミナシーケンスシステム上での単一検体を対象としたGeoMxタンパク質アッセイライブラリーのサンプルスルーブットの例

イルミナプラットフォーム	NanoString GeoMx Protein Assaysのサンプル数 ^a (1億4100万リードペア ^b)	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 2000システム	8	P3	NextSeq 2000 P3 Reagents (50 cycles)	20046810	12億
NovaSeq 6000システム	70	S4	NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (35 cycles)	20044417	80億-100億

a. 計算されたリードは、GeoMx Protein Assaysの単一検体のワークフローのものです。GeoMx Spatial Proteogenomicsワークフローに関する情報については、NanoStringにお問い合わせください。

b. NanoString GeoMx Protein Assaysでは、141のリードペアは、シーケンスリード1の1億4,100万リード、シーケンスリード2の1億4,100万リード (2億8,200万ペアエンドリード) に相当します。

データ解析

シーケンス後、データ処理と解析はラボの設備に応じたさまざまな形式で使用できるGeoMx NGS Pipelineで開始されます。オプションには、NanoStringのスタンドアロンパイプライン、またはイルミナのBaseSpace Sequence Hub上またはNextSeq 2000システム上で使用可能なDRAGEN Platformのパイプラインが含まれます (図4)。DRAGENソフトウェアは、GeoMxソフトウェアを使用して空間的な発現解析および視覚化のために、シーケンスリードをカウントに変換するための信頼性が高く効率的な方法を提供します。データ解析には、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。DRAGENパイプラインで生成されたデジタルカウント変換 (DCC) ファイルは、DSP Data Analysisソフトウェアを使用してGeoMx装置でさらに処理されます。[‡] 最終出力DCC

[‡] GeoMx Spatial Proteogenomicsワークフローの解析は、2022年後半に利用可能になる予定です。

ファイルは、インタラクティブな視覚化のためにGeoMx DSP Data Analysis Suiteにアップロードできます。[‡] 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

組織構造の空間プロテオミクス

上皮細胞 (PanCK) と免疫細胞 (CD45) をターゲットとする2つの蛍光標識抗体と核酸染色 (SYTO-13) を使用し、セグメンテーションを介して組織のサブ構造を同定し、識別しました。それぞれの異なるセグメント化された組織コンパートメント (CD45+またはPanCK+) からのバーコード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つの固有のプロテオミクスプロファイルが得られました (図5)。

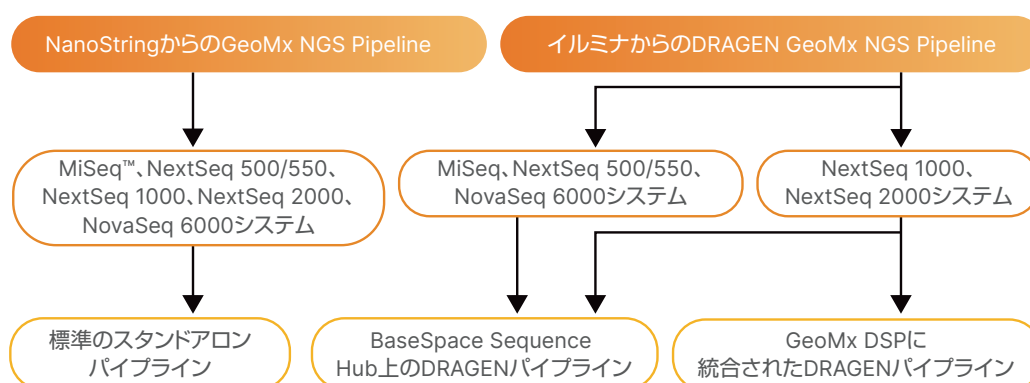


図4: GeoMx NGS Pipelineのプロセス: ユーザーは、GeoMx NGS Pipelineをホストする方法を選択できます。NanoStringの標準スタンドアロンパイプラインは、ローカルの設備にホストできます。イルミナのDRAGEN Platform上のGeoMx NGS Pipelineは、BaseSpace Sequence Hub上のクラウド内、またはNextSeq 1000およびNextSeq 2000システムでローカルに使用できます。

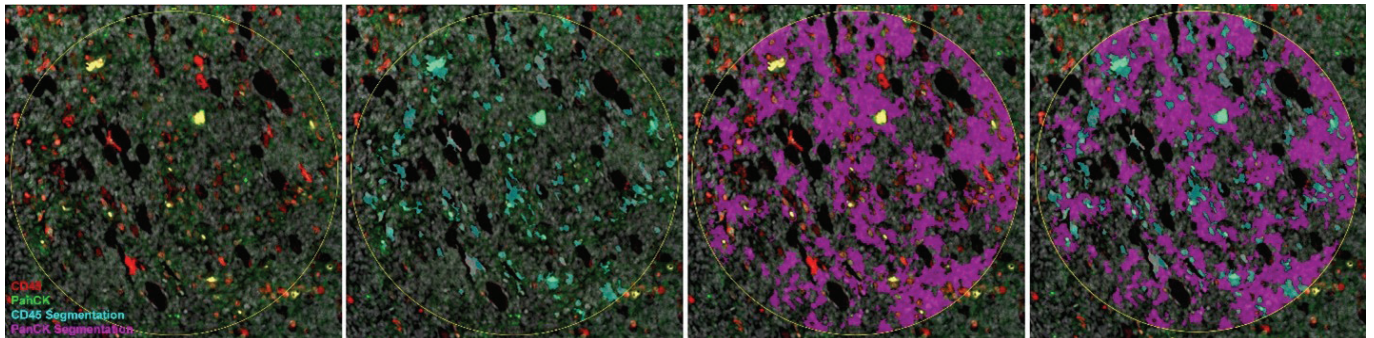


図5: GeoMx DSPによる組織のコンパートメント化: グレード2~3のヒト星状細胞腫 (n=12, n=20) およびグレード4のヒト膠芽腫 (n=16) のFFPEコアを、蛍光標識されたCD45 (赤) 抗体とPanCK (緑) 抗体で染色しました。600 μm のROIを免疫 (CD45+, シアン) AOIと腫瘍 (PanCK+, マゼンタ) AOIにセグメント化しました。

星状細胞腫および膠芽腫は、隣接する正常組織と区別することが難しいびまん性腫瘍です。グレード4の膠芽腫は、正常な脳から最も大きな組織変化を示します。グレード2およびグレード4の腫瘍サンプルの免疫セグメント (CD45+) は、異なるプロテオミクスシグネチャーを示します。グレード4の膠芽腫の免疫セグメントでは、グレード2の星状細胞腫の免疫セグメントと比較して、腫瘍関連マクロファージ (TAM) マーカーのCD68、CD14、および抗炎症性CD163の増加と、炎症誘発性TAMのCD80の減少が示されています (図6)。²

グレード3の星状細胞腫の免疫セグメントと腫瘍セグメントは、予想どおり隔たりのあるプロテオームシグネチャーを示しますが、星状細胞腫の腫瘍間での不均一性も示しています (図7)。例えば、EGFRは有名な治療ターゲットですが、腫瘍ごとのEGFR発現の不均一性により、さまざまな小分子阻害剤の有効性が理解しにくくなっています。^{3, 4} Ki-67発現レベルは、生存の予後マーカーとして機能する可能性があります。腫瘍サンプル全体で、Ki-67発現は大きく異なり、グレード3の星状細胞腫間の不均一性をさらに示しています。⁵

空間プロテオゲノミクスによる組織複雑性の解明

空間プロテオゲノミクスには、GeoMx Protein Assaysのパフォーマンスを大幅に低下させることなく、GeoMx WTAにプロテオミクスコンテキストを追加できるという利点があります。⁶ すべての腫瘍グレード、患者サンプルおよび腫瘍/免疫セグメントにわたって、GeoMx Protein Assaysのみ (15モジュール、147タンパク質)、またはGeoMx Human WTAとGeoMx Protein Assaysの両方を使用する空間プロテオゲノミクスワークフローのいずれかを使って評価したところ、マッチするROI間で高い一致 (平均ピアソン相関係数 > 0.90) が観察されました (図8)。

RNAターゲットとタンパク質ターゲットの両方の発現差異を評価しました (図9)。免疫ターゲットと腫瘍ターゲットを表すRNAとタンパク質の予想された発現がそれぞれのセグメントで見られましたが、RNAまたはタンパク質のいずれかの発現量の違いも観察されました。多くの細胞プロセスが翻訳を制御し、タンパク質は頻繁に分解を受けるという事実を考慮すると、この不一致は驚くべきことではなく、むしろ細胞プロセスの生物学的な洞察を示しています。したがって、同じサンプルからRNAとタンパク質を同時にプロファイルできる空間プロテオゲノミクスは、健康な組織と病気の組織に空間的および生物学的コンテキストを与える強力なツールになります。

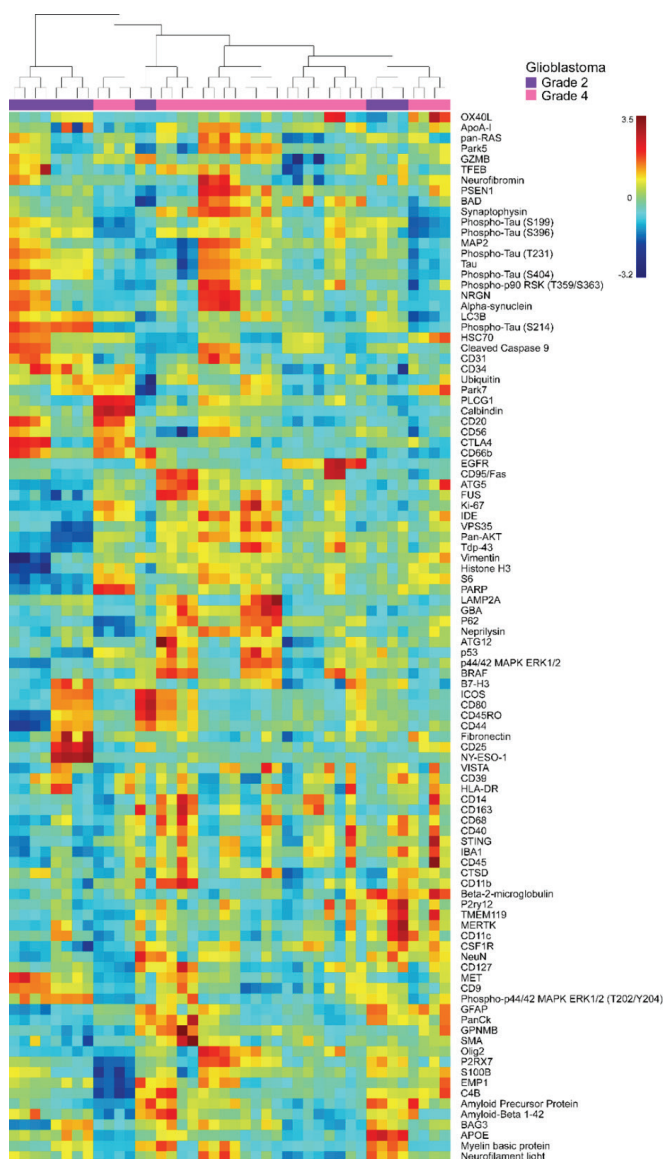


図6：グレード2の星状細胞腫およびグレード4の膠芽腫のプロテオミクス：グレード2およびグレード4の免疫セグメントからの検出可能なタンパク質ターゲット (SN比 (SNR) ≥ 3) の偏りのない階層的クラスタリング。グレード2の星状細胞腫およびグレード4の膠芽腫のコアを、15のNGSリードアウト用GeoMx Human Protein Moduleからなるパネル (147ブレックス) で染色しました。免疫細胞 (CD45+) はグレード2の星状細胞腫およびグレード4の膠芽腫のコア内の600 μm^2 のROIからセグメント化しました。

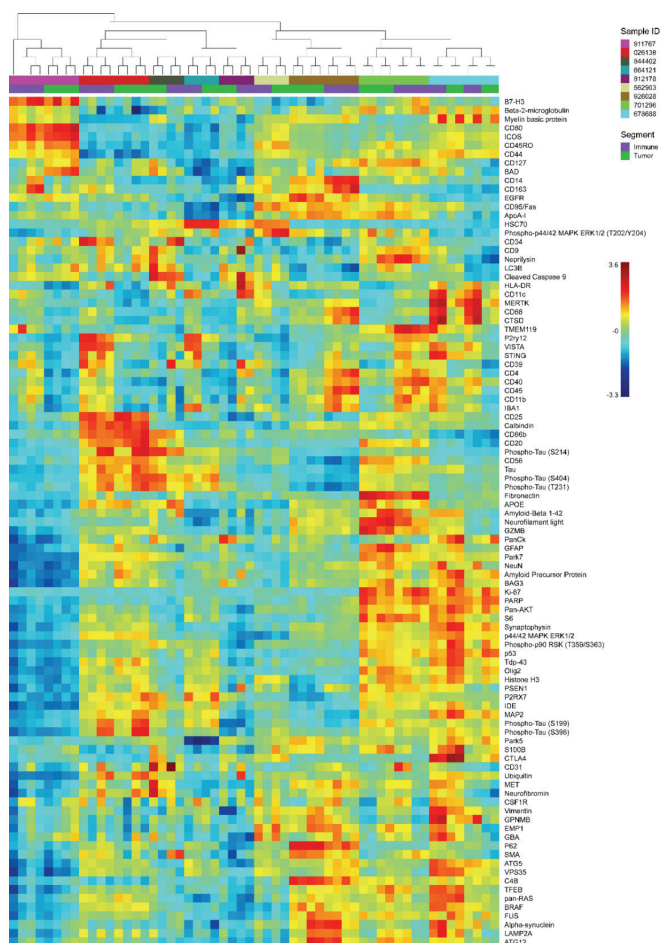


図7：グレード3の星状細胞腫の免疫セグメントと腫瘍セグメントのプロテオミクス：グレード3の免疫セグメントと腫瘍セグメントの検出可能なタンパク質ターゲット (SNR ≥ 3) およびサンプルIDの偏りのない階層的クラスタリング。グレード3の星状細胞腫のコアは、15のNGSリードアウト用GeoMx Human Protein Moduleからなるパネル (147ブレックス) で染色しました。免疫細胞 (CD45+) と腫瘍細胞 (PanCK+) はグレード3の星状細胞腫のコア内の600 μm^2 のROIからセグメント化しました。

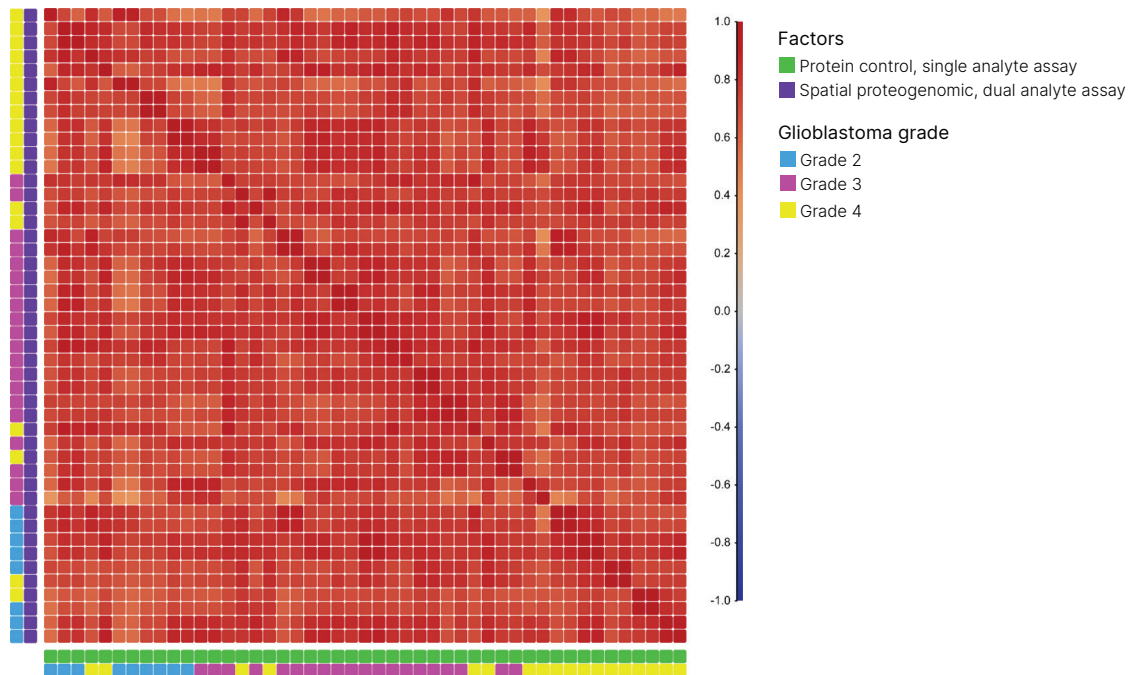


図8：空間的に分解したGeoMxプロテオミクスワークフローとGeoMxプロテオゲノミクスワークフロー間のマッチしたROIとROIの一致：グレード2～3の星状細胞腫およびグレード4の膠芽腫の連続したコアを、15のNGSリードアウト用GeoMx Human Protein Moduleからなるパネル（147プレックス）で染色しました。連続コアセクションの各ペアについて、マッチするROIを評価しました。マッチする各ROIとROIの検出可能なプロテオミクスデータ（SNR ≥ 3 ）のピアソンRを計算しました。

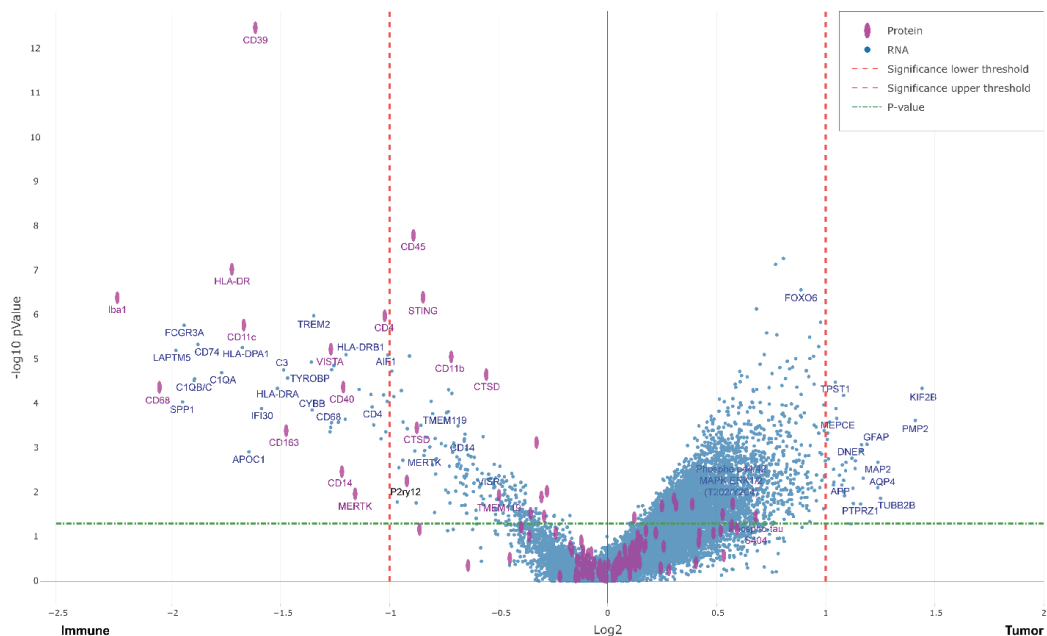


図9：タンパク質発現とRNA発現の統合ボルケーノプロット：GeoMx Spatial Proteogenomicワークフローを使用して、グレード2～3の星状細胞腫およびグレード4の膠芽腫のコアを、GeoMx Human (Hu) WTAおよび15のNGSリードアウト用GeoMx Human Protein Moduleからなるパネル（147プレックス）で染色しました。検出可能なタンパク質ターゲット（SNR ≥ 3 ）およびRNAターゲット（SNR ≥ 4 ）について、すべての免疫セグメントをすべての腫瘍セグメントと比較しました。差別的に発現するRNA転写産物ターゲット（青）およびタンパク質ターゲット（マゼンタ）のサブセットを、比較のために標識しています。

まとめ

技術の進歩により、健康と疾患の背後にある生物学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コンテキストが失われます。NanoString GeoMx DSPと実証済みのイルミナシーケンスリードアウトを組み合わせることで、組織構造と固有の細胞集団に関するハイプレックスなマルチオミクス情報を提供します。このアプリケーションノートでは、空間的に分解したプロテオミクスとプロテオゲノミクスのために統合されたワークフローの概要を説明し、星状細胞腫サンプルと膠芽腫サンプルの不均一な病理をプロファイリングするためにこれら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、ワークフローを効率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

DRAGENソフトウェアを使用したシーケンスまたはデータ解析に関する質問は、次のアドレスに送信してください：

techsupport@illumina.com

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

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。

詳細はこちら

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

NextSeq 1000 and NextSeq 2000システム : jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-1000-2000.html

NanoString GeoMx DSP, www.nanostring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-dsp-overview/

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

NanoString GeoMx DSP user guide, nanosttring.com/wp-content/uploads/2022/06/MAN-10153-01-GeoMx-DSP-NGS-Readout-User-Manual.pdf

参考文献

- Rosenbloom A, Demirkan G, et al. [Multi-step Antibody Validation for the GeoMx Digital Spatial Profiler](#). Nanostring. 2020.
- Landry AP, Balas M, Alli S, Spears J, Zador Z. [Distinct regional ontogeny and activation of tumor-associated macrophages in human glioblastoma](#). *Sci Rep*. 2020;10(1):19542. doi:10.1038/s41598-020-76657-3.
- Eskilsson E, Røslund GV, Solecki G, et al. [EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma](#). *Neuro Oncol*. 2018;20(6):743-752. doi:10.1093/neuonc/nox191.
- Walentynowicz KA, Engelhardt D, Yadav S, et al. [Single-cell genetic heterogeneity linked to immune infiltration in glioblastoma](#). bioRxiv.2021. doi:10.1101/2021.09.20.461080.
- Lu WC, Xie H, Yuan C, et al. [Identification of potential biomarkers and candidate small molecule drugs in glioblastoma](#). *Cancer Cell Int*. 2020;20:419. doi:10.1186/s12935-020-01515-1.
- Bonnett SA, Ong G, Lyssand J, et al. [The Development and Performance of a GeoMx Based Proteogenomic Workflow for the Detection of Both RNA and Protein on a Single FFPE Slide](#). Nanostring.2020.

販売店