



GeoMx[®]プロテオゲノミクス ワークフローの開発とその性能： 1枚のFFPEスライドから RNAとタンパク質を同時検出

Shilah A. Bonnett
Giang Ong
John Lyssand
Gary Geiss
Alyssa Rosenbloom
Joseph Beechem

本製品の使用目的は研究用で、診断には使用できません。

NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA 98109

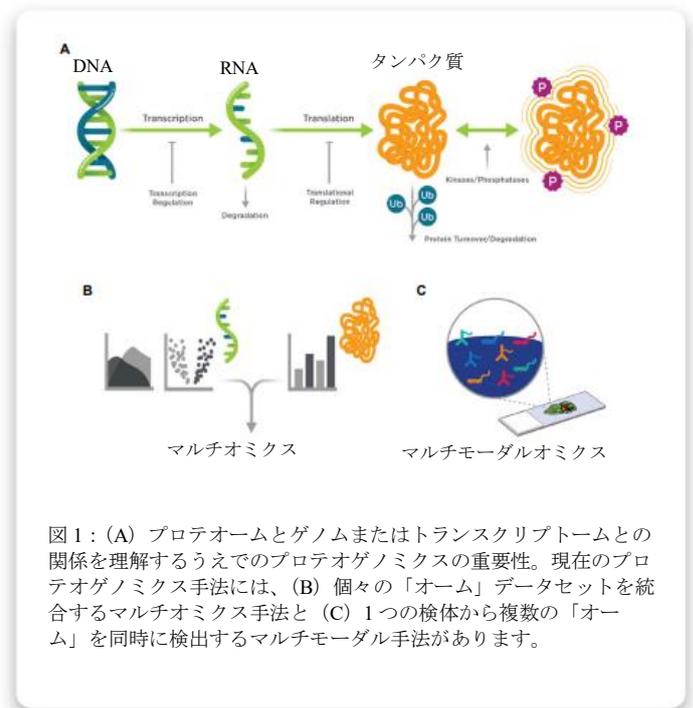
MK4240 | Jan 2022

要旨

GeoMx®デジタル空間プロファイラー (DSP) は、1枚のスライドでタンパク質または RNA のハイプレックス・ハイスループット空間プロファイリングと定量化を行うことができる装置です。今回、組織中の RNA とタンパク質の相互作用を詳細に把握することを目的とし、1枚のスライドで各関心領域 (ROI) における両解析対象物をプロファイリングできる新しい NGS リードアウト用 GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローを開発しました。本書では、ハイプレックス GeoMx® Protein Assay および GeoMx® Human Whole Transcriptome Atlas (GeoMx® Hu WTA) を用いて、細胞ペレットアレイ (CPA) および非小細胞肺癌 (NSCLC) や大腸癌 (CRC) などの各種組織を解析するプロテオゲノミクスワークフローの開発とその性能について報告いたします。既知の発現プロファイルを有する細胞株のプロファイリングを行った結果、両解析対象物に対する感度および特異性は、プロテオゲノミクスワークフロー条件下と単一解析対象物ワークフロー条件下で同等であることが確認されました。また、ワークフローの性能は組織検体でも維持されていました。プロテオゲノミクスワークフローと単一解析対象物ワークフローの性能指標に高い相関性が認められたことは、1つの FFPE 組織検体から RNA 転写産物とタンパク質を適切に検出できたことを示しています。したがって、空間プロテオゲノミクスワークフローにより、量が限られている貴重な生体検体についてより深い特性解析を行うことが可能です。

緒言

空間分解マルチプレックス技術の進歩により、組織の不均一性や腫瘍微小環境、細胞の相互作用、細胞の多様性、治療効果に関する複雑な生物学的疑問解決のための手法は大きな変革を遂げ、その定義も変わりました (1)。GeoMx® デジタル空間プロファイラー (DSP) を含むこれらの技術では、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体または新鮮凍結 (FF) 検体から空間的に分解されたプロテオームデータセットやトランスクリプトームデータセットを取得することが可能ですが、多くの空間的解析技術は、プロテオームまたはトランスクリプトームのいずれかのデータセットに特化しています。一方、RNA とタンパク質の相関関係は弱く、解析対象の遺伝子や組織によってしばしば変化することが報告されています (2)。転写、翻訳、タンパク質の代謝回転や動きを制御する生物学的プロセスを詳細に把握するには、RNA とタンパク質を正確に同時測定できるワークフローが必要です (図 1A)。これらの異なる「オーム間のプロテオゲノミクスの関係を十分に理解するには、様々な技術により得られた個々のデータセットをマルチオミクスの手法により統合しなければなりません (3-6) (図 1B)。



この手法では、解析対象の体系についてより深く理解することが可能ですが、データの解析および解釈にあたっては、プラットフォーム (RNA およびタンパク質) による変動を考慮する必要があり、単独のプラットフォームでも切片間の変動を考慮し、複数のスライド間で関心領域 (ROI) を精密にマッチさせなければなりません。より深い知見を得るとともにこれらの変動要因を制御するために、代替的手法として、1つの検体から複数の「オーム」を同時検出するマルチモーダルオミクスが用いられてきました (7,8)。空間生物学では、免疫組織化学法 (IHC) または免疫蛍光法 (IF) と *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) を組み合わせたマルチモーダルオミクスワークフローを開発する動きが強まっています (8-16) (図 1C)。しかし、分析対象物の超ハイプレックス同時検出力を備えたマルチモーダルオミクスワークフローはこれまでありませんでした。

GeoMx® DSP は、FFPE または FF 検体からタンパク質 (100 種類以上) および RNA (最大 21,000 種類) を、ハイプレックスにデジタル定量化できる空間解析プロファイラーです (17-20)。この技術では、タンパク質については独自の親和性試薬抗体、RNA については ISH プローブに UV 光開裂性オリゴヌクレオチドバーコードを付加した試薬を使用しており、組織検体をこれらの親和性試薬および蛍光マーカーとともにインキュベートした後、蛍光顕微鏡を用いて画像を取得します。

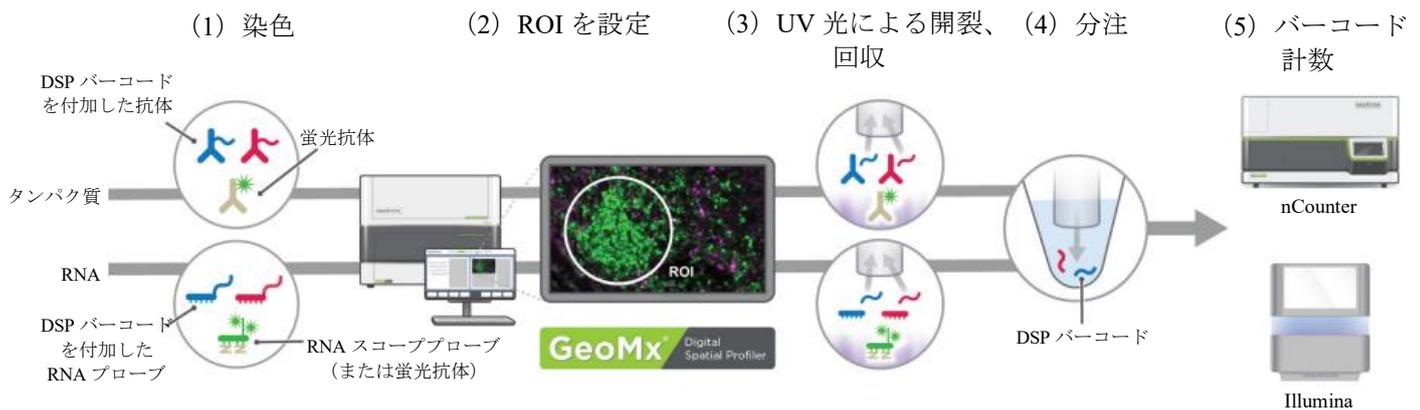


図 2：2022 年 3 月時点で市販されている GeoMx[®] Assay では、nCounter または NGS 定量的リードアウトを用い、別々の組織切片でタンパク質および RNA ターゲットのハイプレックス空間解析を行うことが可能です。プロテオゲノミクスへの対応予定は 2022 年 6 月以降の予定です。

UV 光を照射して、オリゴヌクレオチドバーコードを各関心領域 (ROI : Region of Interest) の UV 照射エリア (AOI : Area of Illumination) から正確に分離させた後、回収されて、nCounter[®]プラットフォームまたは次世代シーケンサー (NGS) を用いて定量化します (図 2)。

GeoMx[®] DSP は幅広いマルチプレックス能力を備えていますが、GeoMx[®] Protein Assay および GeoMx[®] RNA Assay はこれまで、単一分析対象物の検出についてバリデートされてきました。空間プロテオゲノミクスプロファイリングには、各分析対象物に 1 枚ずつ、計 2 枚の FFPE 検体または新鮮凍結検体が必要ですが、マルチモーダルオミクス手法を GeoMx[®]ワークフローに組み込むことにより、量が限られている貴重な生体検体について、より深い特性解析を行うことが可能です。また、1 つの AOI において RNA とタンパク質を同時に評価することにより、2 つの異なるワークフローで各分析対象物を解析することに伴う技術的な変動を低減することができます。そこで、GeoMx[®] DSP 技術を土台に、1 枚の FFPE 組織切片で関心領域 (ROI) から RNA とタンパク質双方のプロファイリングを行うことができる新たな NGS リードアウト用同時検出ワークフローを開発しました。本書では、ハイプレックス GeoMx[®] Protein Assay および GeoMx[®] Cancer Transcriptome Atlas (GeoMx[®] CTA) または GeoMx[®] Human Whole Transcriptome Atlas (GeoMx[®] Hu WTA) を用いて、細胞ペレットアレイ (CPA) および各種組織を分析するプロテオゲノミクスワークフローの技術開発とその性能について報告いたします。

Experimental Design

FFPE 検体

本研究では、厚さ 5 μm のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 細胞ペレットアレイ (CPA) および組織切片を使用しました。

GeoMx[®] Protein Assay

タンパク質のみのコントロールスライドは、GeoMx[®] NGS Slide

Preparation User Manual (MAN-10115-05) の Protein FFPE Manual Slide Preparation Protocol および関連する公表文献 (17) に従って手作業で処理しました。

GeoMx[®] RNA Assay

RNA のみのコントロールスライドは、GeoMx[®] NGS Slide Preparation User Manual for FFPE (MAN-10115-05) の RNA FFPE BOND RX Slide Preparation Protocol および関連する公表文献 (17, 18) に従って処理しました。

GeoMx[®]空間プロテオゲノミクスワークフローの検体調製

Leica Bond-RX システム (Leica Biosystems、オーストラリア、メルボルン) を用いて、RNA コントロールスライドと同様のワークフローでスライドを処理しました。すなわち、FFPE 切片を載せたスライドを熱し、脱パラフィン処理を行い、エタノールで再水和した後、Leica BOND Wash Solution で洗浄しました。塩基性条件下 (Tris-EDTA、pH 9.0) で 85°C で 10 分間 (細胞ペレット) または 100°C で 20 分間 (組織) 処理してエピトープ回復を行った後、検体を Bond Wash Solution で洗浄し、0.1 μg/mL プロテイナーゼ (ProK) による消化を 37°C で 5 分間 (細胞ペレット) または 15 分間 (組織) 行いました。スライドを Leica から取り出し、1 回 (1X PBS で 5 分間) 洗浄しました。次に、GeoMx[®] Cancer Transcriptome Atlas (GeoMx[®] CTA、NanoString) または GeoMx[®] Whole Transcriptome Atlas (GeoMx[®] WTA、NanoString) オリゴ結合 RNA プローブセットを Buffer R (NanoString) で希釈した液を検体に添加し、HybriSlip Hybridization Cover (Grace BioLabs) で覆い 37°C で一晩インキュベートしました。翌日、スライドを厳しい条件下 (50%ホルムアミド/2X SSC、37°C) で 25 分間ずつ 2 回洗浄し、非結合プローブを除去した後、2X SSC (室温、各 5 分間) で 2 回、1X-TBS-T (5 分間) で 1 回洗浄しました。検体を Buffer W (NanoString) で 60 分間室温でブロックした後、閉鎖したモイストチャンバーにて積層した NGS リードアウト用ハイプレックスヒト GeoMx[®] Protein Assay (オリゴ結合抗体ミックス、NanoString) とともに 4°C で一晩インキュベートしました。

組織切片の場合は、抗体カクテルミックスとともに蛍光マーカーを添加して一晚インキュベートしました。翌日、スライドを 1X TBS-T で 10 分間ずつ 3 回洗浄した後、閉鎖したモイストチャンパーにて 4%PFA とともに 30 分間室温でインキュベートしました。1X TBS-T で 5 分間ずつ 2 回洗浄した後、SYTO 13 で 15 分間室温で対比染色し、下記のとおり GeoMx[®] DSP 装置プラットフォームに設置しました。

GeoMx[®] DSP 実験：ROI の設定および収集

組織の GeoMx[®] デジタル空間プロファイリングは、GeoMx[®] NGS DSP 装置マニュアル (MAN-10116-05) および Merritt et al. (17) の報告に従って行いました。

細胞ペレットアレイ (CPA) では、各細胞株について 2 つの幾何学的関心領域 (ROI) (直径 200 μm) のプロファイリングを行いました。組織切片については、ROI のサブサンプリングとして関心領域 (ROI) の設定を容易にするため、蛍光形態マーカーで染色しました。ヒト大腸癌 (CRC) および非小細胞肺癌 (NSCLC) は抗 CD45 抗体 (免疫) および抗 PanCK 抗体 (腫瘍) で染色しました。NSCLC では、各マーカー特異的な関心エリア (AOI) について、直径 100 μm の円形の幾何学的 ROI を収集しました。ROI は検討対象の全ての試験スライドでマッチさせました。CRC では高度な ROI 設定法 (セグメンテーション) を実施し、セグメンテーション実験では、DSP オートセグメンテーションツールを用いて、直径 300 μm の円形 ROI をマーカー特異的な関心エリアにセグメント化しました。

次世代シーケンシングおよびデータ解析

GeoMx[®] NGS Readout Library Prep Manual (MAN-10117-05、NanoString) にわずかな修正を加え、ライブラリを調製しました。ライブラリのシーケンシングは、Illumina NextSeq2000 または NovaSeq6000 を使い、それぞれの取扱説明書に従って実施しました。

得られた FASTQ ファイルは、NanoString GeoMx[®] NGS Pipeline v2.0 または v2.3 を使い、GeoMx[®] DSP NGS Pipeline User Manual (MAN-10118-04、NanoString) に従って、修正後の GeoMx[®] NGS Pipeline 構成ファイルとともに処理しました。解析は、社内データ処理スクリプトを用いて行いました。

定量限界 (LoQ) を $\text{GeoMean}(\text{NegProbes}) * \text{GeoSD}(\text{NegProbes})^2$ とし、シグナル対ノイズ比 (SNR) が 4 以上であった場合に、遺伝子が検出されたものとみなしました。遺伝子カウントは検出閾値未満の遺伝子を除外したうえで、Q3 正規化により正規化しました。Cancer Cell Line Encyclopedia RNAseq データセット (CCLE、Broad Institute) から真の発現遺伝子セット (TPM 1 超) を特定し、それを用いて細胞ペレットにおける WTA の感度および特異性を算出しました。組織の場合は、遺伝子をフィルタリングし、15% 超の AOI において検出閾値を上回っていた遺伝子のみとしました。タンパク質については、シグナルを 3 つの IgG 陰性コントロール (マウス IgG1 およびウサギ IgG アイソタイプコントロール) の幾何平均値で除してシグナル対ノイズ比を算出し、SNR が 3 以上の場合にタンパク質ターゲットが検出されたものとみなしました。

pheatmap R パッケージを用いてクラスターヒートマップを作成しました。クラスターリングは pheatmap の「correlation (相関)」法を

用い、対数変換スケールのカウントで実施しました。組織については異なる細胞集団間の差次的遺伝子解析を rstatix R パッケージの対応のない両側 t 検定を用いて行いました。有意水準は、p 値 0.05 未満とし、Benjamini-Hochberg 法により多重比較 (または多重仮説検定) の調整を行いました (21)。

結果および考察

空間プロテオゲノミクスワークフローの開発

これまでの GeoMx[®] DSP による空間分解マルチオミクスプロファイリングでは、各分析対象物に 1 枚ずつ計 2 枚の連続 FFPE 組織切片が必要でした (図 2)。しかし、連続切片に含まれている細胞集団は同一ではなく、遺伝子発現量およびタンパク質量がそれぞれどのように制御されているかについて明確かつ直接的に把握することもできません。1 枚の組織切片内の同一の細胞集団からハイブレックストランスクリプトームおよびプロテオームデータを収集することにより、マルチオミクス解析をさらに進化させてマルチモーダルオミクスリードアウトおよび解析が可能となります。そこで、1 枚の FFPE 組織切片で関心領域 (ROI) 内のシングルセル集団からハイブレックストランスクリプトームおよびプロテオームを同時にプロファイリングできる新たな NGS リードアウト用空間マルチモーダルオミクスワークフローを開発しました。我々はこの空間的解析ワークフローを「プロテオゲノミクス」ワークフローと呼んでいます。

NGS リードアウト用 GeoMx[®] Protein Assay および GeoMx[®] RNA Assay はそれぞれ既存の免疫組織化学法 (IHC) または *in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH) を用いています。GeoMx[®] Protein Assay では、高圧高温下での酸性熱誘導性エピトープ回復 (heat-induced epitope retrieval: HIER) 緩衝剤 (pH 6.0) を用いた単一の抗原回復プロセスを行い、GeoMx[®] RNA Assay では、塩基性 HIER 緩衝剤 (pH 9.0) を用いた組織依存性エピトープ回復プロセスの後、タンパク質分解誘発性エピトープ回復 (PIER) を行う 2 段階の処理を行います。2 つの分析対象物は、全く異なる抗原回復条件を必要とすることから、まず、両分析対象物に適合するスライド処理条件を検討しました。

染色法の戦略

ISH 法では、高塩濃度や、高温およびホルムアミドへの長時間の曝露など厳しい条件が必要であり、それらはいずれも FFPE 組織検体中のタンパク質抗原が検出されにくくなる要因となる可能性があります。ISH 条件がタンパク質抗原の検出にどのような影響を与えるか調べるため、各種染色法を比較しました。

評価したのは、ISH の後 IHC (ISH>IHC) を行う方法とその逆 (IHC>ISH) の 2 種類の逐次染色法です。まず IHC 染色を行った後、ISH を行った場合、相関性の低下 (R=0.86) が認められるとともに、検出ターゲット数、すなわち感度が 36% 減少しました。一方、まず ISH を行った後 IHC 染色を行った場合には、タンパク質相関性 (R=0.95) および感度 (5% 減少) に対する影響はわずかでした。

また、抗体 (IHC) と RNA (ISH) を同時に染色するという方法も評価しました。ISH 法で使用される高濃度のホルムアミドはタンパク質ターゲットの検出に悪影響を及ぼすことが知られています。ホルムアミドを使用することにより、より低い温度でハイブリダイゼーションを行うことができるとともに、RNA プローブの非特異的結合を低減させることが可能ですが、抗体と抗原の相互作用が阻害され、その結果、抗体染色の質が低下する可能性があります (8, 22)。同時染色法では、タンパク質ターゲット検出率が 45% 減少したことから、抗体-抗原結合が阻害されたことがわかりました。したがって、RNA およびタンパク質ターゲット検出のための最適な染色方法は、ISH の後 IHC を行う逐次染色法であると判断しました (データ省略)。

エピトープ回復条件の影響

次に、空間プロテオゲノミクスワークフローに最適なエピトープ回復条件を検討しました。標準的な GeoMx[®] RNA Assay および GeoMx[®] Protein Assay は、相反する HIER (塩基性、酸性) について最適化されていますが、単一のプロテオゲノミクスワークフローでは、1 種類のエピトープ回復条件が必要です。FFPE 細胞ペレットアレイ切片に対し、ヒト GeoMx[®] Cancer Transcriptome Assay (GeoMx[®] CTA) の後、6 つの GeoMx[®] Protein Module からなる 59-plex タンパク質パネル (表 1) で染色する逐次染色を行いました。各細胞株について、複製させた AOI のシグナルの平均値を求め、タンパク質および RNA それぞれのシグナル対ノイズ比 (SNR) を算出し、空間プロテオゲノミクスワークフローの性能を単一分析対象物ワークフローのコントロールスライドと比較しました。

FFPE 細胞株について、RNA (GeoMx[®] CTA) 単一分析対象物コントロールワークフローと空間プロテオゲノミクスワークフローを比較したところ、HIER 前処理条件 (酸性または塩基性) にかかわらず強い相関関係 (R: 0.95 超) が認められました。また、HIER 前処理条件 (酸性または塩基性) は、空間プロテオゲノミクスワークフローと RNAseq CCLE データベースとの相関関係にほとんど影響を与えませんでした (23)。塩基性 HIER 条件下での空間プロテオゲノミクスワークフローの擬陽性率 (FPR) は 10% 未満であったのに対し、酸性 HIER 条件下でのワークフローの FPR は 30% でした。この高い FPR は、エピトープ回復を酸性条件下で行った場合には非特異的ハイブリダイゼーションが増加したとの既報と一致しています (20)。

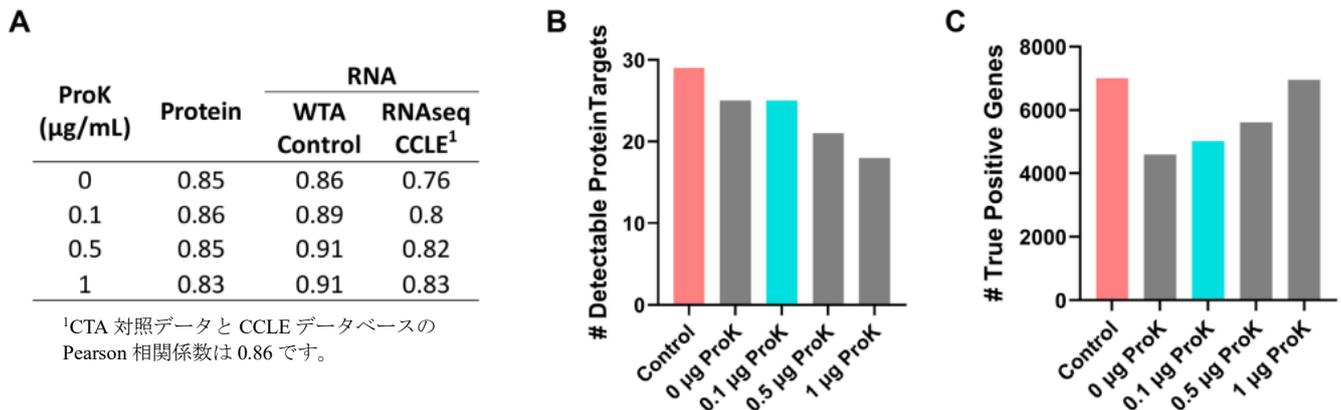


図 3 : 各種濃度のプロテイナーゼ K が空間プロテオゲノミクスワークフローの性能に及ぼす影響の評価。エピトープ回復工程において各種濃度のプロテイナーゼ K (ProK) で処理した細胞ペレットアレイ (CPA) をプロテオゲノミクスワークフロー条件下で 6 層の GeoMx[®] NGS Protein Module (59-plex) および GeoMx[®] Hu WTA で染色しました。(A) log₂ 変換 SNR データにおけるプロテオゲノミクスワークフローと単一分析対象物対照ワークフローおよび CCLE RNAseq データベースとの Pearson 相関。図は、(B) 検出可能であったタンパク質ターゲットの数および (C) 検出可能であった真陽性 RNA ターゲットの数を示しています。

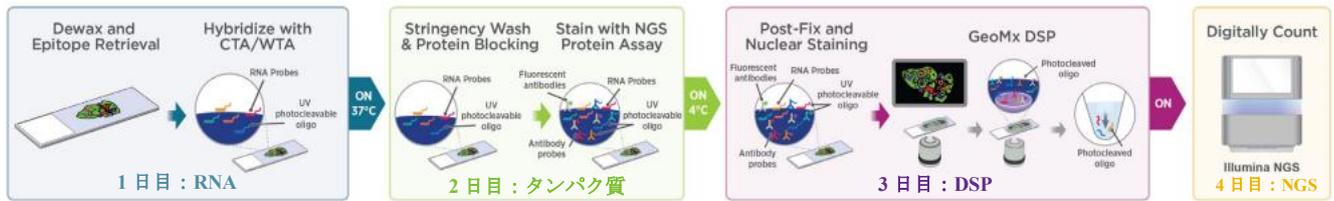


図 4 : GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローは、1枚のスライドでマルチモーダルオミクスプロファイリングを行うことができます。

タンパク質単一分析対象物コントロールワークフローとプロテオゲノミクスワークフローを比較したところ、酸性 HIER 条件下で前処理した FFPE 細胞株は、コントロールとの相関性が $R=0.86$ と、塩基性 HIER 処理の場合 ($R=0.77$) よりも高値を示しました (データ省略)。

酸性および塩基性 HIER 条件を比較評価した結果、タンパク質検出は酸性 HIER 条件で、RNA 検出は塩基性条件で最適となり、標準的な GeoMx®単一分析対象物ワークフローと一致しました。一方、比較的高濃度 ($1 \mu\text{g/mL}$) のプロテイナーゼ K (ProK) を PIER エピトープ回復ステップに使用したときには、タンパク質ターゲット感度の低下が認められました。そこで次に、塩基性 HIER 条件下での ProK 濃度が空間プロテオゲノミクスワークフローによるタンパク質および RNA ターゲット検出に及ぼす影響について評価しました。

各種プロテイナーゼ K 濃度が与える影響

各種 ProK 濃度が与える影響を評価するため、FFPE 細胞ペレットアレイ切片を GeoMx® Human Whole Transcriptome Atlas (GeoMx® Hu WTA) プローブセットおよび6つの GeoMx®Protein Module からなる 59-plex タンパク質パネルで染色し、FFPE 細胞株を塩基性 HIER 条件下で評価した後、各種濃度の ProK でタンパク質分解処理 (PIER) を行いました。タンパク質単一分析対象物コントロールワークフローと空間プロテオゲノミクスワークフローを比較したところ、比較的強い相関関係が維持されており、ProK 濃度にかかわらず FPR は 10%未満でした (図 3A)。しかし、 $1 \mu\text{g/mL}$ を上回る ProK 濃度では、タンパク質ターゲット検出率 (SNR 3 以上) に 37%超と有意な減少が認められました。濃度が $0.1 \mu\text{g/mL}$ の場合には、空間プロテオゲノミクスワークフローの感度はコントロールと同等でした (図 3B)。

一方、RNA 単一分析対象物コントロールワークフローとプロテオゲノミクスワークフローの相関関係は、ProK 濃度が高いほど強くなり、同様の傾向は、プロテオゲノミクスワークフローで検出された RNA ターゲットと Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) RNAseq データベースとの比較でも認められました (図 3A)。さらに、真陽性数も ProK 濃度が高いほど増加しました (図 3C)。これらの結果から、重要な ProK によるタンパク質分解とのバランスを保つことが最適な RNA 検出のためには必須であること、一方、最低濃度の ProK でもタンパク質ターゲットの検出にはある程度の悪影響を及

ぼすことが明らかとなりました。プロテイナーゼ K 濃度による影響を最も受けたのは、量の少ないタンパク質および RNA ターゲットの検出でした。

GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフロー

最適な GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローの構築にあたっては、染色法、HIER 条件 (酸性、塩基性) および ProK (PIER) 濃度がタンパク質・RNA ターゲット双方の検出感度と特異性に与える影響を考慮しました。その結果、最適な GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローは、ISHを行った後、塩基性 (pH 9.0) HIER 条件および低濃度 ($0.1 \mu\text{g/mL}$) での ProK 消化 (PIER) ステップを組み込んだ IHC を行う逐次染色法から構成されるワークフローであると判断しました。GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローの所要時間は、スライド調製からデータ解析までを含め 4 日間です。GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローには、RNA プローブセットとして GeoMx® Hu WTA または GeoMx® CTA を使用していることから、ワークフロー全体が NGS リードアウトのみに対応しています (図 4)。

FFPE 検体のワークフローは以下のとおりです。

1 日目 : 塩基性条件下での熱誘導性エピトープ回復 (HIER) の後、タンパク質分解誘導性エピトープ回復 (PIER) ($0.1 \mu\text{g/mL}$ ProK) を行う 2 段階のエピトープ回復プロセスを実施しました。次に、スライドを GeoMx® Hu WTA または GeoMx® CTA RNA プローブカクテルで染色した後、 37°C で一晩ハイブリダイゼーションを行いました。

2 日目 : 検体をホルムアミドを用いた厳しい条件下で洗浄した後、非特異的抗体結合を防ぐためブロッキング液で処理しました。次に GeoMx® Protein Assay による染色を 4°C で一晩行いました。組織形態を可視化するため、このステップで蛍光結合一次抗体を添加することも可能です。

3 日目：4%PFA で後固定を行い、核マーカー (Syto13) で染色した後、GeoMx®デジタル空間プロファイラーで処理し、実験デザインの項に示すとおり Illumina NextSeq2000 または Illumina NovaSeq6000 でシーケンシングを行いました。

4 日目：実験デザインの項に示すとおり GeoMx® NGS Pipeline を用いてデータを処理しました。

最適化された GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローを用いた細胞株のプロファイリング

最適化された GeoMx®空間プロテオゲノミクスワークフローを用いて、GeoMx® Hu WTA および6つの GeoMx® Protein Module からなる 59-plex タンパク質パネル (表1) で染色した FFPE 細胞ペレットアレイ (CPA) 切片のプロファイリングを行いました。また、CPA を 59-plex タンパク質パネルまたは GeoMx® Hu WTA のいずれかで染色し、それぞれタンパク質コントロールおよび RNA コントロールとしました。

まず、プロテオゲノミクスワークフローとタンパク質コントロールワークフローで検出されたタンパク質の質を比較評価しました。全ての細胞株間および全ての検出可能ターゲット間で対相関解析を行ったところ、細胞株間の比較では、検討した細胞株において同細胞株間で一貫して高い相関性が認められました (図 5A)。さらに、プロテオゲノミクスワークフローとタンパク質コントロールワークフローで検出された同一タンパク質ターゲット間にも高い相関性が認められました (図 5B)。

次に、プロテオゲノミクスワークフローと RNA コントロールワークフローで検出された RNA の質を CCLE RNAseq データセットと比較評価したところ、GeoMx® Hu WTA と CCLE RNAseq データセット間で重複する全てのターゲットについて、プロテオゲノミクスワークフローおよび RNA コントロールデータの各細胞株は、CCLE データセットの全細胞株 (1012 株) と相関していました。CCLE データセットと重複している各 CPA 細胞株の Pearson R 分布を図 5C に示します。細胞株ラベルは、各実験および細胞株比較において最も高い相関を示した CCLE 細胞株を示しています。RNA コントロールワークフローおよびプロテオゲノミクスワークフローのいずれにおいても、同細胞株間で比較した時に CCLE RNAseq データセットとの相関性は最も高くなりました。また、ワークフローのタイプにかかわらず、同一 RNA ターゲット間にも高い相関性が認められました (図 5D)。

プロテオゲノミクスワークフローは、2枚の異なる切片を用いたマルチオミクス解析と比べ、同一の細胞集団から完全なタンパク質および RNA データが得られるという利点を持っています。均質な細胞株集団内においても、プロテオゲノミクスワークフローは、単一分析対象物ワークフローによるコントロールスライドのマルチオミクス解析と比較し、同様またはより高い相関性を示しました。また、よく知られているとおり、RNA とタンパク質の間には 1:1 の関係はなく、むしろ RNA の安定性や翻訳制御、タンパク質の分解などの重要な細胞プロセスが各時点における RNA およびタンパク質量を決定します。RNA ターゲットと、対応するタンパク質ターゲットとの間には正 (PTPRC/CD45) または負 (FN1/フィブロネクチン 1) の相関関係が認められ、既報の翻訳制御およびタンパ

ク質分解制御と一致していました (24-27) (図 5E)。

組織を用いた GeoMx®空間プロテオゲノミクス

FFPE 細胞株は、新しい空間プロテオゲノミクスワークフローの開発に有用な均質な検体であり、組織の連続切片で認められることの多い変動を低減することが可能です。しかし、複雑な空間的状況に関する生物学的疑問を解決するには組織を用いるしかありません。そこで、各種組織を対象に、空間プロテオゲノミクスワークフローと GeoMx® Hu WTA または GeoMx® Protein Assay による単一分析対象物ワークフローの比較評価を行いました。連続 FFPE NSCLC 組織切片を GeoMx® Hu WTA (RNA コントロール)、6つの GeoMx® Protein Module からなる 59-plex タンパク質パネル (タンパク質コントロール) または両方で同時に染色するプロテオゲノミクスにより染色し、マッチする免疫 (CD45 濃染色) および腫瘍 (PanCK 濃染色) 領域を比較しました (表1)。各 CD45+または PanCK+関心領域 (ROI) について直径 100 μm の円形 ROI を収集したところ (図 6A)、タンパク質分析対象物については感度が約 25%低下し (図 6B)、RNA コントロールとの比較では、CD45 および PanCK 濃染色部における SNR 4 以上の遺伝子数がそれぞれ 20%および 12%減少しました (図 6C)。感度の低下は過去の観察所見と一致しており、主に影響を受けたのはシグナルが検出閾値付近の少量ターゲットでした。

6つの NGS 用 GeoMx® Human Protein Module (59-plex)

GeoMx Human NGS Core

GeoMx Human NGS Immune Cell Typing Panel

GeoMx Human NGS IO Drug Target Panel

GeoMx Human NGS Immune Activation Status Panel

GeoMx Human NGS Pan-Tumor Panel

GeoMx Human NGS Myeloid Panel

表 1：6つの GeoMx® Human Protein Module には 59 種類の抗体-抗原ターゲットが含まれています。

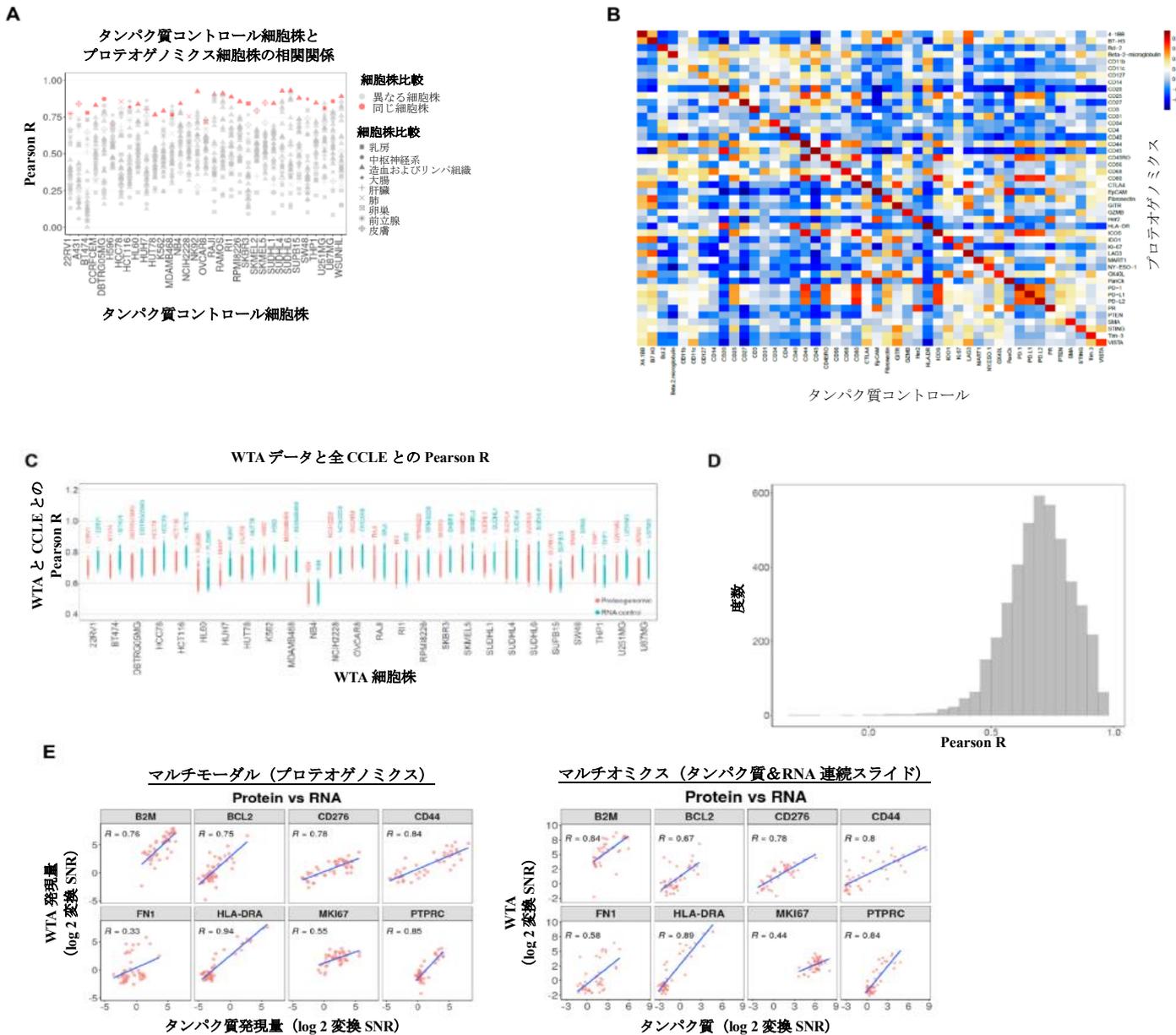


図5：細胞株における空間プロテオゲノミクスデータとRNAおよびタンパク質コントロールデータの品質比較。細胞バレットアレイ（CPA）を、プロテオゲノミクスおよび標準ワークフロー条件下で6層のGeoMx® NGS Protein Module（59-plex）およびGeoMx® CTAで染色しました。（A）タンパク質コントロールデータとプロテオゲノミクスタンパク質データの細胞株別比較。SNR 3以上のタンパク質ターゲットについて、空間プロテオゲノミクススライドの全細胞株とタンパク質コントロールスライドの各細胞株とのPearson Rを算出しました。各種組織の細胞株をそれぞれ異なる形のマークで示し、タンパク質コントロール細胞株とマッチする空間プロテオゲノミクスワークフローの細胞株を赤色で表示しています。（B）タンパク質コントロールデータとプロテオゲノミクスタンパク質データのターゲット別比較。SNR 3以上のタンパク質ターゲットについて、空間プロテオゲノミクススライドの全タンパク質ターゲットとタンパク質コントロールスライドの各タンパク質ターゲットとのPearson Rを算出し、ヒートマップを作成しました。（C）RNAコントロールおよびプロテオゲノミクスワークフローのGeoMx® Hu WTAデータと全CCLLE RNAseqデータセットの細胞株別比較。CCLLEとGeoMx® Hu WTAデータ間で重複する全てのターゲットについて、CCLLE RNAseqの全細胞株とタンパク質コントロールおよび空間プロテオゲノミクスGeoMx® Hu WTAデータとのPearson Rを算出しました。図中の細胞株ラベルは、GeoMx® Hu WTAデータとの相関性が最も高かったCCLLE細胞株を示しています。（D）GeoMx® Hu WTAコントロールデータとプロテオゲノミクスGeoMx® Hu WTAデータとのターゲット別比較。15%の検体においてSNRが4以上であった各RNAターゲットについて、GeoMx® Hu WTAコントロールのlog₂変換SNRデータとプロテオゲノミクスGeoMx® Hu WTA log₂変換SNRデータとのPearson Rを算出し、Pearson Rの分布を示すヒストグラムを作成しました。（E）タンパク質ターゲットと各GeoMx® Hu WTA RNAターゲットとの比較。SNR 3以上のタンパク質ターゲットおよびSNR 4以上のGeoMx® Hu WTAターゲットについて、プロテオゲノミクスワークフロー（左）およびマルチオミクスワークフロー（右）により検出された各タンパク質およびRNA分析対象物を比較しました。

GeoMx[®]空間プロテオゲノミクスワークフローと GeoMx[®] Protein Assay による単一分析対象物ワークフローのマッチする ROI について教師なし階層的クラスタリングを行ったところ、プロテオゲノミクスワークフローと単一分析対象物タンパク質コントロールワークフローのマッチする ROI 間に高い一致性が認められ、また、CD45 濃染色 ROI 間および PanCK 濃染色 ROI 間にも高い相関性が認められました (図 6D)。次に、GeoMx[®]空間プロテオゲノミクスワークフローと GeoMx[®] Hu WTA による単一分析対象物ワークフローのマッチする ROI について教師なし階層的クラスタリングを行ったところ、2つのワークフローによるタンパク質検出と同様に、プロテオゲノミクスワークフローと単一分析対象物コントロールワークフローのマッチする ROI 間に高い一致性が認められ、また、CD45 濃染色 ROI 間および PanCK 濃染色 ROI 間にも高い相関性が認められました (図 6E)。

NSCLC 連続切片では、GeoMx[®]空間プロテオゲノミクスワークフローと標準的な GeoMx[®]単一分析対象物ワークフローによるターゲット検出力は同等でしたが、特に少量又は低発現量のターゲットでは感度にわずかな低下が認められました。また、連続切片のマッチする ROI 間で高い一致性が認められるとともに、免疫または腫瘍濃染色 ROI 内でも高い相関性が認められました。そこで、次に、プロテオゲノミクスワークフローの GeoMx[®]セグメンテーション機能 (光学的解剖) および 2 倍以上向上したハイブレックスタンパク質解析能力を評価しました。

空間プロテオゲノミクスワークフローによるセグメンテーション

組織を光学的に解析する機能は、明確な空間コンテキストと特定の細胞亜集団のプロファイリングを結びつけることができます。そこで、GeoMx[®] DSP プラットフォームの組織セグメンテーション機能を利用し、ヒト大腸癌を対象に空間プロテオゲノミクスワークフローを評価しました。確立された空間プロテオゲノミクスワークフローにおいて、組織切片を GeoMx[®] Hu WTA (RNA ターゲット数: 18,000) および 15 つの GeoMx[®] Protein Module からなる 147-plex タンパク質パネルで染色するとともに、CD45 および PanCK に対する蛍光結合一次抗体で染色することにより免疫および腫瘍細胞亜集団を特定し (表 2)、直径 300 μm の ROI を CD45 濃染色免疫細胞亜集団および PanCK 濃染色腫瘍細胞亜集団にセグメント化しました。ROI は、免疫細胞の多い領域または免疫細胞の少ない領域に近接する腫瘍領域を含め、組織切片内の様々な腫瘍領域について設定しました (図 7A)。検出された RNA ターゲット (SNR 4 以上) およびタンパク質ターゲット (SNR 3 以上) について教師なし階層的クラスタリングを行ったところ、予想されたとおり、免疫セグメントおよび腫瘍セグメント内に明確なクラスタリングが認められました (データ省略)。腫瘍および免疫セグメント間でタンパク質および RNA ターゲット双方の差次的発現解析を行った結果、各セグメントタイプ内の両分析対象物に対する堅牢な同時検出力および特異性が確認されました (図 7B)。

15 層の NGS 用 GeoMx[®] Human Protein Module (147-plex)

GeoMx Human NGS Core	GeoMx Human NGS Myeloid Panel	GeoMx Human NGS Cell Death Panel
GeoMx Human NGS Immune Cell Typing Panel	GeoMx Human NGS MAPK Signaling Panel	GeoMx Human NGS Parkinson's Pathology Panel
GeoMx Human NGS IO Drug Target Panel	GeoMx Human NGS PI3K/AKT Signaling Panel	GeoMx Human NGS Alzheimer's Extended Pathology Panel
GeoMx Human NGS Immune Activation Status Panel	GeoMx Human NGS Neural Cell Typing Panel	GeoMx Human NGS Autophagy Panel
GeoMx Human NGS Pan-Tumor Panel	GeoMx Human NGS Alzheimer's Pathology Panel	GeoMx Human NGS Glial Cell Subtyping Panel

表 2: 15 つの GeoMx[®] Human Protein Module には 147 種類の抗体-抗原ターゲットが含まれています。

免疫または腫瘍セグメントに関連する重要な RNA/タンパク質ターゲットペアの発現量を調べたところ、明確な免疫または腫瘍 AOI (UV 照射領域) において一部のターゲットに変動が認められました (図 7C)。免疫または腫瘍セグメント AOI において検出可能であった全てのタンパク質ターゲットと RNA ターゲットの相関関係を検討すると、明確な相関 (赤) および反相関 (青) パターンが認められました。例えば、IGHG1-4 RNA ターゲットは CD44、IDO1、CD8 などの免疫タンパク質ターゲットと強く相関していましたが (赤矢印)、Epcam、CD56 などの細胞接着タンパク質ターゲットおよび腫瘍ターゲット B7-H3 とは反相関していました (青矢印) (図 7D)。腫瘍セグメントでは、杯細胞の粘液産生に関連する MUC5AC の RNA ターゲットとタンパク質ターゲット PanCK (腫瘍細胞マーカー) との間に反相関 (青矢印) が認められました (28)。逆に MUC5AC RNA ターゲットと自食作用に関連するタンパク質ターゲットである ATG5、ATG12、Lamp2a および Bag3 の間には正の相関関係 (赤矢印) が認められました。一般的に、正常な粘液産生制御には、ムチンの制御および分泌のための自食作用が関与しています (29)。また、悪性大腸癌細胞では MUC5AC の異常発現が認められることが多いことも報告されています (28) (図 7E)。以上のとおり、GeoMx[®] DSP を用いた新規 GeoMx[®]空間プロテオゲノミクスワークフローを適用することより、空間解析された個々の CRC 細胞亜集団から明確な腫瘍または免疫関連 RNA およびタンパク質ターゲットを同時にハイブレックスで検出することが可能であることが確認されました。

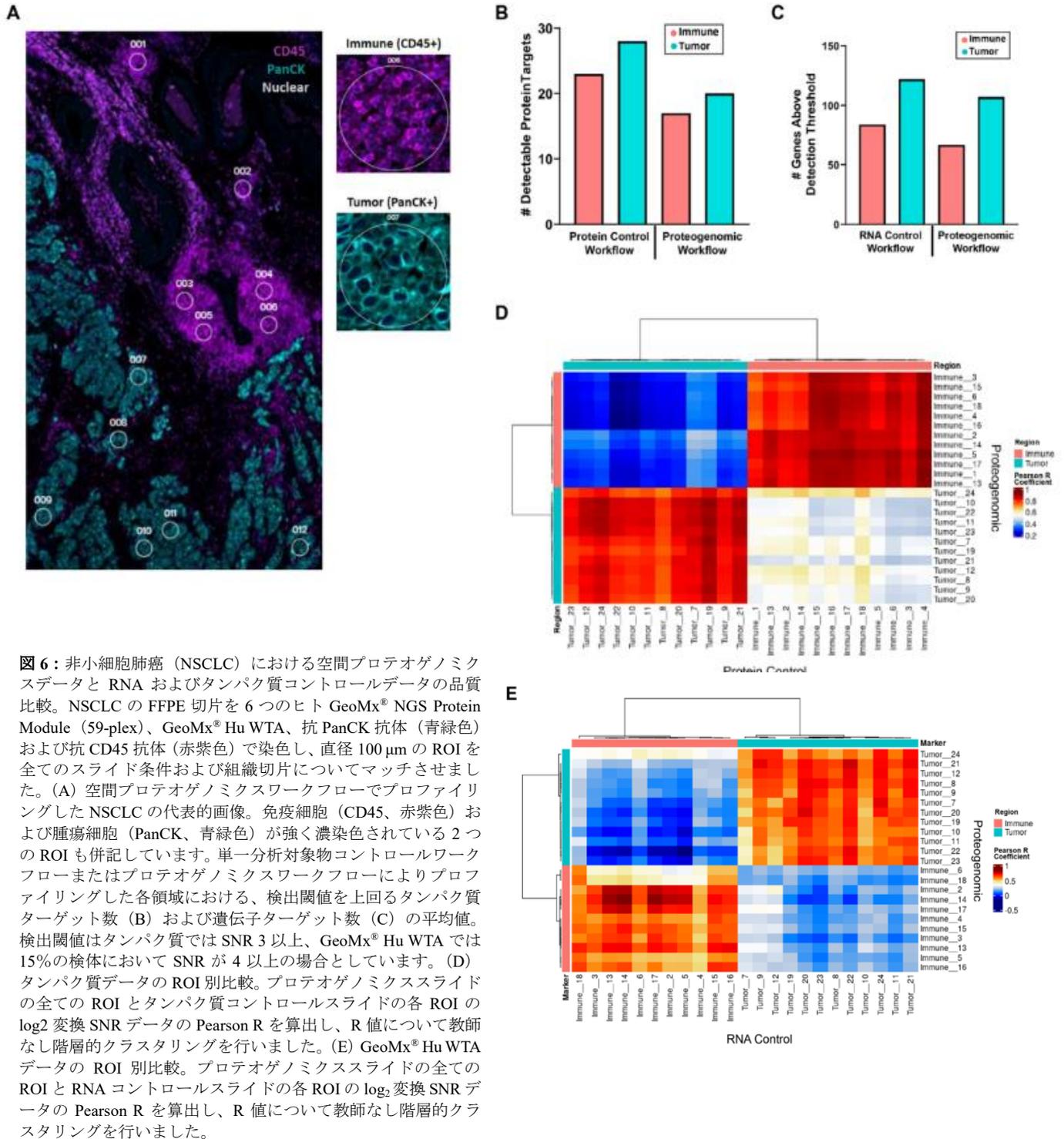


図 6：非小細胞肺癌（NSCLC）における空間プロテオゲノミクスデータと RNA およびタンパク質コントロールデータの品質比較。NSCLC の FFPE 切片を 6 つのヒト GeoMx® NGS Protein Module (59-plex)、GeoMx® Hu WTA、抗 PanCK 抗体（青緑色）および抗 CD45 抗体（赤紫色）で染色し、直径 100 μm の ROI を全てのスライド条件および組織切片についてマッチさせました。(A) 空間プロテオゲノミクスワークフローでプロファイリングした NSCLC の代表的画像。免疫細胞（CD45、赤紫色）および腫瘍細胞（PanCK、青緑色）が強く濃染色されている 2 つの ROI も併記しています。単一分析対象物コントロールワークフローまたはプロテオゲノミクスワークフローによりプロファイリングした各領域における、検出閾値を上回るタンパク質ターゲット数 (B) および遺伝子ターゲット数 (C) の平均値。検出閾値はタンパク質では SNR 3 以上、GeoMx® Hu WTA では 15% の検体において SNR が 4 以上の場合としています。(D) タンパク質データの ROI 別比較。プロテオゲノミクススライドの全ての ROI とタンパク質コントロールスライドの各 ROI の \log_2 変換 SNR データの Pearson R を算出し、R 値について教師なし階層的クラスタリングを行いました。(E) GeoMx® Hu WTA データの ROI 別比較。プロテオゲノミクススライドの全ての ROI と RNA コントロールスライドの各 ROI の \log_2 変換 SNR データの Pearson R を算出し、R 値について教師なし階層的クラスタリングを行いました。

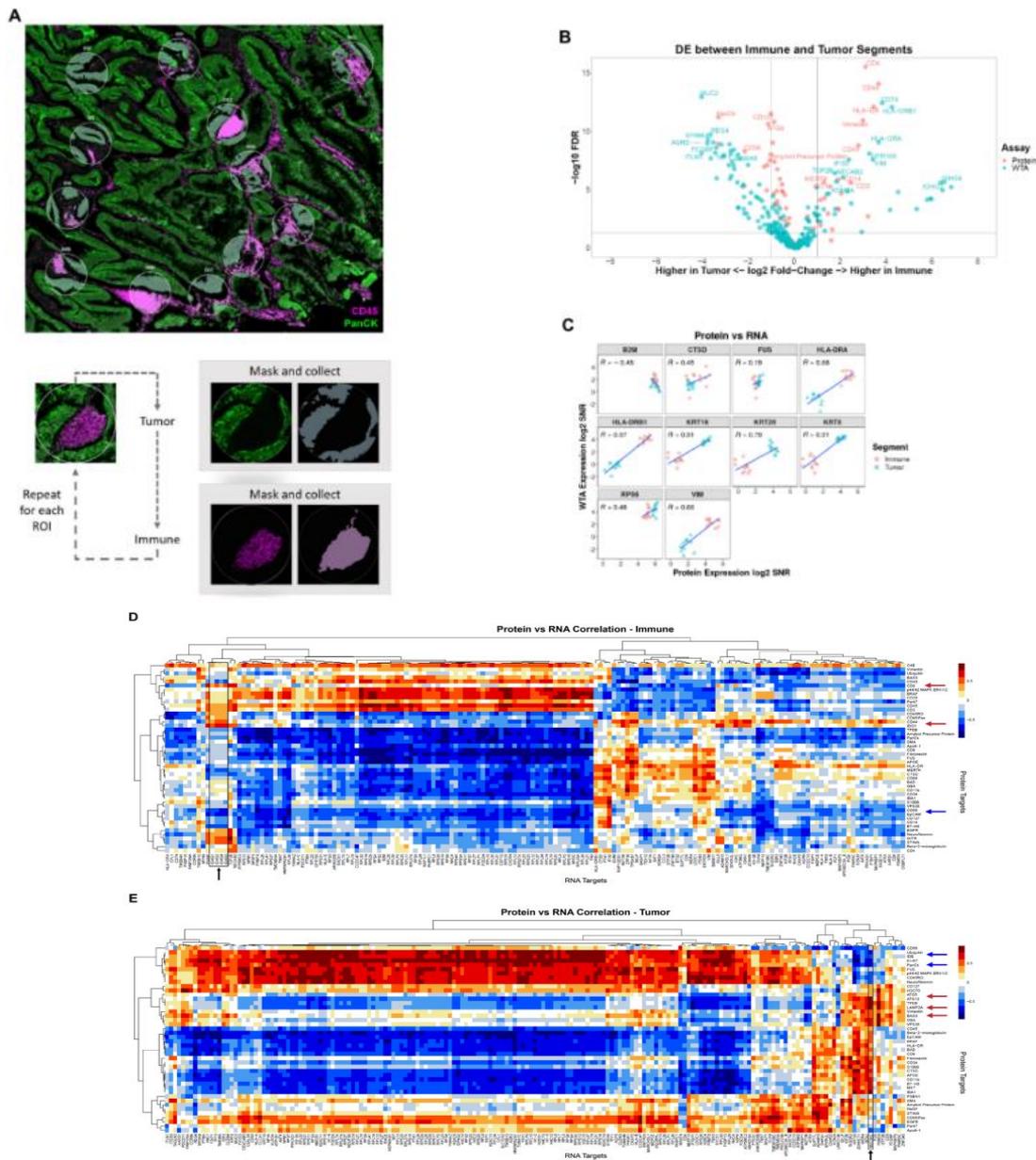


図 7: セグメンテーションによる高度 ROI 設定。CRC 検体について、直径 300 μm の円形 ROI を免疫領域および腫瘍領域にセグメント化し、タンパク質および RNA のマルチプレックス特性解析を実施しました。タンパク質および RNA カウントは SNR に変換し、SNR が 3 以上のタンパク質ターゲットおよび SNR が 4 以上の WTA RNA ターゲットを解析対象としました。(A) プロテオゲノミクスアッセイでプロファイリングした大腸癌検体。FFPE 切片を 15 の GeoMx[®] Protein Module (147-plex)、GeoMx[®] Hu WTA、抗 PanCK 抗体 (腫瘍、緑色) および抗 CD45 抗体 (免疫、赤紫色) で染色しました。腫瘍および免疫セグメントはそれぞれ PanCK および CD45 免疫蛍光染色により作製しました。(B) タンパク質発現量と RNA 発現量を併記した火山プロット。背景を上回るタンパク質および RNA ターゲットについて、全ての免疫セグメントと全ての腫瘍セグメントと比較しました。差次的発現遺伝子のサブセットは、それらの分析対象物にマッチする色で表示しています。(C) マッチするタンパク質ターゲットと RNA ターゲットの一致度。SNR が 3 以上のタンパク質ターゲットと SNR が 4 以上の対応する RNA ターゲットについて、対散布図を作成し、各分析対象物間の一致度を視覚化しました。各図に Pearson R 算出値を示しています。免疫セグメント (D) および腫瘍セグメント (E) における、背景を上回るプロテオゲノミクス RNA ターゲットとタンパク質ターゲットとの一致度。免疫および腫瘍セグメントの双方について、検出された全 RNA ターゲット (SNR 4 以上) と検出された各タンパク質ターゲット (SNR 3 以上) の Pearson R を算出しました。

結論

本ホワイトペーパーでは、1枚の組織切片スライドから RNA およびタンパク質ターゲットを同時検出するハイプレックス空間プロテオゲノミクスワークフローの開発について報告いたしました。また、複数の細胞株や組織への使用事例を紹介し、このワークフローを活用して同一検体内での RNA およびタンパク質の変化を正確に測定する方法も考察しました。このワークフローにより、GeoMx® DSP の適用範囲が拡大し、複数の分析対象物を調べる際に貴重な検体の使用量を最小限に抑えることができます。今後さらに GeoMx® DSP を用いたプロテオゲノミクスの適用範囲を拡大するため、新鮮凍結 (FF) 検体や手作業での前処理、マウス特異的な試薬を用いたときの本ワークフローの性能についても評価する予定です。GeoMx® DSP を用いた同一スライド空間プロテオゲノミクス解析の **詳細** については、www.nanostring.com/spatial-proteogenomics をご覧ください。

謝辞

知見と助言を提供してくださった NanoString Technologies 社 Bridget Kulasekara、Karen Nguyen、Daniel R. Zollinger、Michelle Kriner、Michael Rhodes、Margaret Hoang 各氏、編集作業にご協力いただいた Aric Rininger 氏、NGS を支援してくださった NanoString 社 Corey Williams 氏に感謝申し上げます。

- 1 J. W. Hickey et al., Spatial mapping of protein composition and tissue organization: a primer for multiplexed antibody-based imaging. *Nature Methods*, (2021).
- 2 D. P. Nusinow et al., Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell* **180**, 387-402 (2020).
- 3 D.-K. Li, W. Wang, Characteristics and clinical trial results of agonistic anti-CD40 antibodies in the treatment of malignancies. *Oncology Letters* **20**, 176 (2020).
- 4 L. Ramiro et al., Integrative Multi-omics Analysis to Characterize Human Brain Ischemia. *Mol Neurobiol.* **58**, 4107-4121 (2021).
- 5 Y. Hasin, M. Seldin, A. Lusic, Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* **18**, (2017).
- 6 I. Subramanian, S. Verma, S. Kumar, A. Jere, K. Anamika, Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinformatics and biology insights* **14**, (2020).
- 7 Method of the Year 2019: Single-cell multimodal omics. *Nature Methods* **17**, 1-1 (2020).
- 8 J. Kochan, M. Wawro, A. Kasza, Simultaneous detection of mRNA and protein in single cells using immunofluorescence-combined singlemolecule RNA FISH. *Biotechniques* **59**, 209-212 (2015).
- 9 D. Schulz et al., Simultaneous Multiplexed Imaging of mRNA and Proteins with Subcellular Resolution in Breast Cancer Tissue Samples by Mass Cytometry. *Cell Syst* **6**, 531 (2018).
- 10 J. Kochan, M. Wawro, A. Kasza, Simultaneous detection of mRNA and protein in single cells using immunofluorescence-combined singlemolecule RNA FISH. *Biotechniques* **59**, 209-212, 214, 216 passim (2015).
- 11 A. Dikshit, H. Zong, C. Anderson, B. Zhang, X.-J. Ma, in *In Situ Hybridization Protocols*, B. S. Nielsen, J. Jones, Eds. (Springer US, New York, NY, 2020), pp. 301-312.
- 12 T. M. Grabinski, A. Kneynsberg, F. P. Manfredsson, N. M. Kanaan, A method for combining RNAscope in situ hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures. *PLoS One* **10**, (2015).
- 13 J. N. Ko et al., Multistaining Optimization for Epstein-Barr Virus Encoded RNA In Situ Hybridization and Immunohistochemistry of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Using an Automated Immunostainer. *J Pathol Transl Med.* **53**, 317-326 (2019).
- 14 S. Ikeda, Novel and simple method of double-detection using fluorescence in situ hybridization and fluorescence immunostaining of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Oncol Lett* **15**, 1084- 1088 (2018).
- 15 S. Chan et al., A method for manual and automated multiplex RNAscope in situ hybridization and immunocytochemistry on cytospin samples. *PLOS ONE* **13**, e0207619 (2018).
- 16 L. K. Officer, K. E. Andreou, A. V. Teodósio, Z. He, J. P. Le Quesne, in *In Situ Hybridization Protocols*, B. S. Nielsen, J. Jones, Eds. (Springer US, New York, NY, 2020), pp. 245-256.
- 17 M. Millar, in *In Situ Hybridization Protocols*, B. S. Nielsen, J. Jones, Eds. (Springer US, New York, NY, 2020), pp. 277-298.
- 18 C. R. Merritt et al., Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue. *Nature Biotechnology* **38**, 586-599 (2020).
- 19 D. R. Zollinger, S. E. Lingle, K. Sorg, J. M. Beechem, C. R. Merritt, GeoMx™ RNA Assay: High Multiplex, Digital, Spatial Analysis of RNA in FFPE Tissue. *Methods Mol Biol* **2148**, 331-345 (2020).
- 20 S. Gupta, J. Zugazagoitia, S. Martinez-Morilla, K. Fuhrman, D. L. Rimm, Digital quantitative assessment of PD-L1 using digital spatial profiling. *Lab Investigation* **100**, 1331-1317 (2020).
- 21 S. M. Zimmerman et al., Spatially resolved whole transcriptome profiling in human and mouse tissue using Digital Spatial Profiling. *bioRxiv*, 2021.2009.2029.462442 (2021).
- 22 Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **57**, 289-300 (1995).
- 23 L. Caruccio, K. Byrne, J. Procter, D. Stroncek, A novel method using formamide for the elution of antibodies from erythrocytes. *Vox Sanguinis* **83**, 63-69 (2002).
- 24 M. Ghandi et al., Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* **569**, 503-508 (2019).
- 25 E. Mourgeon, J. Xu, A. K. Tanswell, M. Liu, M. Post, Mechanical strain-induced posttranscriptional regulation of fibronectin production in fetal lung cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **277**, L142-L149 (1999).
- 26 G. Lee, R. Hynes, M. Kirschner, Temporal and spatial regulation of fibronectin in early *Xenopus* development. *Cell* **36**, 729-740 (1984).
- 27 N. Wang et al., Tumor Microenvironment Profiles Reveal Distinct Therapy-Oriented Proteogenomic Characteristics in Colorectal Cancer. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**, (2021).
- 28 F. Mair et al., A Targeted Multi-omic Analysis Approach Measures Protein Expression and Low-Abundance Transcripts on the Single-Cell Level. *Cell Reports* **31**, 107499 (2020).
- 29 G.-L. Gan et al., The Diverse Roles of the Mucin Gene Cluster Located on Chromosome 11p15.5 in Colorectal Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, (2020).
- 30 K. K. Patel et al., Autophagy proteins control goblet cell function by potentiating reactive oxygen species production. *The EMBO journal* **32**, 3130-3144 (2013).

詳しい情報は、nanosttring.com をご覧ください。

NanoString Technologies, Inc.

530 Fairview Avenue North T (888) 358-6266 nanosttring.com
 Seattle, Washington 98109 F (206) 378-6288 info@nanosttring.com

Sales Contacts

United States us.sales@nanosttring.com Asia Pacific & Japan apac.sales@nanosttring.com
 EMEA: europe.sales@nanosttring.com Other Regions info@nanosttring.com

FOR RESEARCH USE ONLY. Not for use in diagnostic procedures.

© 2021 NanoString Technologies, Inc. All rights reserved. NanoString, NanoString Technologies, nCounter, nSolver, IO360, 3D Flow, Vantage 3D, and 3D Biology are registered trademarks of NanoString Technologies, Inc., in the United States and/or other countries.