

特集 2 ブレインバンク / 死後脳研究

4. 空間的遺伝子発現解析を用いた精神・神経疾患研究の展望

久保 健一郎^{1,2)}

抄録：空間的遺伝子発現解析 (spatial transcriptomics) は、今年、つまり、2021 年に、Method of the Year に選ばれた解析技術である。単一細胞解析では、一細胞ごとに RNA シークエンスを行うのに対して、空間的遺伝子発現解析では、場所 (空間) の情報と結びつけながら、RNA シークエンスを行う。ヒトの脳は大きく発達するため、空間的にも複雑な形状をもっている。このため、精神・神経疾患の研究において死後脳の解析を行う際にも、空間的な位置情報を保ちながら、遺伝子発現解析を行うことが望ましい。現在のところ、その代表的な手法は、10x Genomics 社の Visium と、nanoString 社の GeoMX Digital Spatial Profiler (DSP) である。この両者を中心に、空間的遺伝子発現解析について概観する。

日本生物学的精神医学会誌 32 (4) : 196-199, 2021

Key words : spatial transcriptomics, postmortem brain, schizophrenia, Visium, GeoMX DSP

はじめに

近年、単一細胞解析技術の進展によって、組織全体での比較では明らかにならなかった遺伝子発現の変化が、細胞ごとでの比較によって捉えられるようになった。例えば、自閉スペクトラム症の死後脳を用いた単一細胞解析を用いて、大脳皮質の中でも、表層側の層、すなわち、第Ⅱ層と第Ⅲ層の神経細胞における、シナプス伝達、軸索ガイダンス、神経細胞移動などにかかわる遺伝子発現の変化が報告された⁸⁾。この場合、遺伝子発現の変化を示す細胞集団が、第Ⅱ層と第Ⅲ層の神経細胞であることは、層マーカーの発現により同定されているが、そのような同定に場所 (空間) の情報も併せて用いることができるのが、空間的遺伝子発現解析 (spatial transcriptomics) である。

1. 脚光をあびる空間的遺伝子発現解析

毎年 1 月に、Nature Method 誌が、注目度の高い技術を、その前年の、Method of the Year として選

ぶ。空間的遺伝子発現解析は、2021 年の 1 月に、Method of the Year 2020 に選ばれた³⁾。すなわち、Method of the Year に選ばれた、最新の技術、ということになる。ちなみに、2020 年は単一細胞の多次元オミックス解析 (single-cell multimodal omics)⁹⁾、2019 年は自由行動下にある動物のイメージング技術 (imaging in freely behaving animals)²⁾、2018 年はオルガノイド技術 (organoids) が Method of the Year に選ばれている¹⁾。単一細胞解析、すなわち、単一細胞シークエンス (single-cell sequencing) は、2014 年の Method of the Year に選ばれている⁵⁾。

通常の遺伝子発現解析は、採取した検体の組織全体をホモジェナイズ、すなわち、すり潰して、RNA シークエンス等を行う。一方、単一細胞解析では、これを組織全体でなく、一細胞ごとに RNA シークエンスを行う。その細胞がどこに由来する細胞なのかは、RNA シークエンスの結果、得られた遺伝子発現の情報をもとにクラスタリング、つまり、細胞をグループ化して、既知のマーカーとなる遺伝子発現をもとに同定される。それに対して、空間的遺伝子発現解析は、その同定に位置情報を用いることが

An overview of spatial transcriptomics for the study of neuropsychiatric disorders

1) 東京慈恵会医科大学解剖学講座 (〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8) Ken-ichiro Kubo : Department of Anatomy, The Jikei University School of Medicine. 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

2) 慶應義塾大学医学部解剖学 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35) Ken-ichiro Kubo : Department of Anatomy, Keio University School of Medicine. 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

【久保 健一郎 E-mail : ken16@jikei.ac.jp, kkubo@keio.jp】

できる。また、単一細胞解析を行う場合、ヒトの脳の解析で用いられるのは主に凍結脳組織であるため、細胞体ではなく、核を単離して、その核から RNA を抽出して解析する、単一核シーケンスが行われることが多い。核内の遺伝子発現は、おおむね細胞質の遺伝子発現を反映するものの、シナプスや樹状突起をはじめとする、細胞質の遺伝子発現の正確な情報は、単一核シーケンスを行う場合、失われる可能性がある。一方で、空間的遺伝子発現解析を行う場合は、細胞質の遺伝子発現情報が保たれると考えられる⁴⁾。

筆者らは、Method of the Year 2020 に選ばれる以前から、空間的遺伝子発現解析に注目し、この技術を用いて、精神・神経疾患の死後脳組織の解析を行いたいと考えている。精神・神経疾患の研究では、ヒトの死後脳組織を用いた解析を進める必要があると考えられるが、ヒトの脳は、前頭前皮質をはじめ、大きく発達しており、空間的にも複雑な形状をもっている。このため、その際に、細胞の空間的な位置情報も保ちながら、遺伝子発現解析を行うことが望ましい。現在のところ、空間的遺伝子発現解析の代表的な手法は 10x Genomics 社の Visium と、nanoString 社の GeoMX Digital Spatial Profiler (DSP) であるため、この両者を中心に、空間的遺伝子発現解析について概観する。

2. Visium

空間的遺伝子発現解析という言葉は、Ståhl と Salmén が 2016 年に Science⁸⁾ に発表した論文の中で最初に用いられた⁸⁾。ここで発表された方法が 2018 年に商業化されたのが、10x Genomics 社の Visium である。

Visium のためのガラススライドの表面には、mRNA を結合するための、オリゴ dT プライマーを含む、プローブが配置されている。そのようなガラススライドとプローブの上に、まず、新鮮凍結した組織から作成した凍結切片を貼り付ける。そののち、組織をパーミアライズ (permialize) して組織から mRNA を遊離させ、その mRNA をオリゴ dT プライマーで捉える。そのうえで、逆転写反応を行うと、mRNA から、オリゴ dT プライマーの続きとして、cDNA が合成される。オリゴ dT プライマーには、場所情報を識別するためのバーコード (spatial barcode) が配列として結合している。このため、cDNA を回収して、バーコードの配列とともにシーケンスすることで、どのような配列の mRNA が、

スライド上のどこに分布していたのかを知ることができる。

当初の報告では、6.2 mm × 6.6 mm の大きさに、100µm の直径の spot が、200µm 間隔で並んでいるスライド上で、空間的遺伝子発現解析が行われた⁷⁾。現在、商業ベースで利用できる Visium では、6.5 mm × 6.5 mm の大きさに、55µm の直径の spot が 5,000 個、100µm 間隔で並んでいるスライドが用いられている。そして、より単一細胞解析に近い解析が行えるように、より小さい、5µm の間隔で並んだ直径 4µm の spot での解析が開発中らしい (Visium HD, という名称が予定されている)。2022 年には、そのようなバージョンアップがなされるとのことである。55µm の直径の spot で解析を行う現在の手法でも、1 つの spot に入る神経細胞の平均の数は 3 個程度とされるため⁴⁾、5µm での spot での解析によって、単一細胞よりもさらに細かい領域ごとの解析が可能になると期待される。

また、当初の報告で、マウスの嗅球の組織を用いた解析の例が報告されたように、Visium の開発中も、神経科学の領域での使用が想定されていたと思われる。しかし、現在、Visium を用いた解析は、全身の臓器で行われており、発生学や免疫学、腫瘍学の領域でも盛んである³⁾。特に、腫瘍学の分野では、同じ腫瘍組織の中でも、場所によって遺伝子発現が驚くほど多様であることが、Visium を用いた解析で示されつつある。Visium による解析により、切片上の組織をみながら、悪性度が高い部位と、低い部位の遺伝子発現の比較などが可能となっており、空間的遺伝子発現解析が大きな注目を浴びている。

3. GeoMX DSP

上記の Visium が、専用スライドに、新鮮凍結した組織から作成した凍結切片を貼り付けて解析するのに対して、nanoString 社が販売する GeoMX DSP では、通常のスライドに貼り付けた、パラフィン切片からも解析を行うことができる (ただし、新鮮凍結した組織の切片でも可能である。逆に、現在、新鮮凍結した組織の切片を用いている Visium も、パラフィン切片での解析を始めるという情報があり、いずれの技術も刻々とアップデートされている)。Visium が組織上の場所を網羅的に解析するのに対して、GeoMX DSP では、抗体等で染色を行ったのち、解析する領域 (region of interest: ROI) を選び、その領域内で解析を行う。もともとは、蛍光標識さ

れた複数の抗体等を用いた、定量的な発現解析が販売されていた。その場合、紫外線で分離できる barcode のついた抗体等を ROI に反応させたのち、紫外線で barcode を分離して回収し、定量的な測定が行われる。

最近、抗体を用いて細胞を蛍光染色した後、任意の ROI を選んで、染色された細胞に発現している mRNA を網羅的に解析する、Whole Transcriptome Analysis (WTA) が商業化され、日本国内でも、代理店を通して利用することができるようになった。1つの切片から 12 から 24 個程度、最小で 32 μ m、最大で 600 μ m の ROI を選び、それぞれの ROI から、22,000 個程度の mRNA を捉えることができる、とされている。

後述のように、筆者らも GeoMX DSP を用いた WTA を開始している。切片を送ると、あらかじめ選定した抗体で染色した高解像度の画像が送られてきて、nanoString 社の専門家や技術者と Zoom 会議をしながら、任意の ROI を選ぶ。筆者は、実際に解析を行う以前は、ROI が小さければ小さいほど、特異的に細胞を選ぶことができ、より良いのではないかと考えていた。しかし、細胞数が少なすぎると、そこから回収できる RNA が少なすぎて、シグナルとして検出されないらしい。このため、目安として、神経細胞の場合は、標的となる細胞が少なくとも 50 個程度は入る ROI を選ぶ必要がある。免疫系の細胞の場合は、細胞体が小さいので、200 個程度の細胞が入る ROI を選ぶ、とのことである。解析する細胞は抗体染色によって抽出されるので、当然のことながら、特異的な抗体で染色を行う必要がある。

4. その他

現在はまだ、商業ベースでは利用できないものの、上記のほかにも、Slide-seq という技術が開発されている。この方法では、50 μ m、さらには、より小さい、10 μ m といったサイズのビーズに mRNA を移しとって、単一細胞解析に近い解析を行う⁶⁾。Slide-seq の技術も商業化が検討されているとのことであり、近い将来、空間的遺伝子発現解析のための、新たな選択肢として加わることが期待される。

5. 空間的遺伝子発現解析を用いた 死後脳研究の取り組み

筆者らの研究グループは、以前から空間的遺伝子

発現解析に注目していた。現在、筆者らは、精神疾患死後脳・DNA バンクを運営する福島県立医科大学、および、単一細胞解析等の最先端の解析を行う理化学研究所などと連携した研究グループとして、精神・神経疾患の死後脳を用いた単一細胞解析、そして空間的遺伝子発現解析を行おうとしている。理化学研究所生命医科学研究センターは、ヒトの全細胞(約 37 兆個)を単一細胞解析手法によって解析し、全世界でカタログ化する「ヒトセルアトラスプロジェクト」の中核機関の一つで、日本の拠点である。このため、このプロジェクトで得られた知見が、死後脳の解析においても活用されることが期待される。

また、筆者らの研究グループは、空間的遺伝子発現解析のうち、GeoMX DSP を開発した nanoString 社の募集する Spatial Biology Research Grant-Pacific に共同で応募して、2 サンプル分を、また、Global Neuroscience Grant に共同で応募して、4 サンプル分の解析を行う権利を得た。計 6 サンプルの解析を行う権利を有するため、それを利用した解析を開始している。もう一つの、10x Genomics 社が募集する 10x Genomics 2021 Neuroscience Challenge にも共同で応募し、最近、アジア太平洋地域の Winner として、単一細胞解析と Visium を組み合わせた解析を行う権利を得たことが通知された。

おわりに

筆者は、令和 3 年 4 月より東京慈恵医科大学解剖学講座に赴任した。今後、死後脳の単一細胞解析、そして、空間的遺伝子発現解析を実施して、精神・神経疾患の死後脳を用いた研究を、大きく発展させたいと考えている。これらの解析においては、大規模データを扱う必要があり、データサイエンスの素養をもった研究者が必要とされる。ライフサイエンスとデータサイエンスの両方の素養をもった、あるいは両方の素養を身につけたい、若い方に、ぜひ筆者らの研究に加わってほしい。

なお、本論文に関連して開示すべき利益相反はない。また本論文に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。

文 献

- 1) Arlotta P (2018) Organoids required! A new path to understanding human brain development and disease. *Nat Methods*, 15 : 27-29.
- 2) Calarco JA and Samuel ADT (2019) Imaging whole

- nervous systems : insights into behavior from worms to fish. *Nat Methods*, 16 : 14-15.
- 3) Marx V (2021) Method of the Year : spatially resolved transcriptomics. *Nat Methods*, 18 : 9-14.
 - 4) Maynard KR, Collado-Torres L, Weber LM, et al (2021) Transcriptome-scale spatial gene expression in the human dorsolateral prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, 24 : 425-436.
 - 5) Nawy T (2014) Single-cell sequencing. *Nat Methods*, 11 : 18.
 - 6) Rodrigues SG, Stickels RR, Goeva A, et al (2019) Slide-seq : A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science*, 363 : 1463-1467.
 - 7) Stahl PL, Salmen F, Vickovic S, et al (2016) Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, 353 : 78-82.
 - 8) Velmeshev D, Schirmer L, Jung D, et al (2019) Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science*, 364 : 685-689.
 - 9) Zhu C, Preissl S and Ren B (2020) Single-cell multimodal omics : the power of many. *Nat Methods*, 17 : 11-14.

■ ABSTRACT

An overview of spatial transcriptomics for the study of neuropsychiatric disorders

Ken-ichiro Kubo^{1,2)}

1) *Department of Anatomy, The Jikei University School of Medicine*

2) *Department of Anatomy, Keio University School of Medicine*

Spatial transcriptomics was selected as the “Method of the Year” by the journal *Nature Methods* this year. In single-cell analysis, RNA sequencing is performed for each individual cell, while in spatial transcriptomics, RNA sequencing is performed in conjunction with spatial information. Since the human brain is large and has a spatially complex shape, it is desirable to analyze gene expression profiles with spatial information when analyzing postmortem brains for the study of neuropsychiatric disorders. At present, Visium by 10x Genomics and GeoMX Digital Spatial Profiler (DSP) by nanoString are the representative methods. I will focus on these methods and give an overview of spatial transcriptomics.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 32 (4) : 196-199, 2021)
