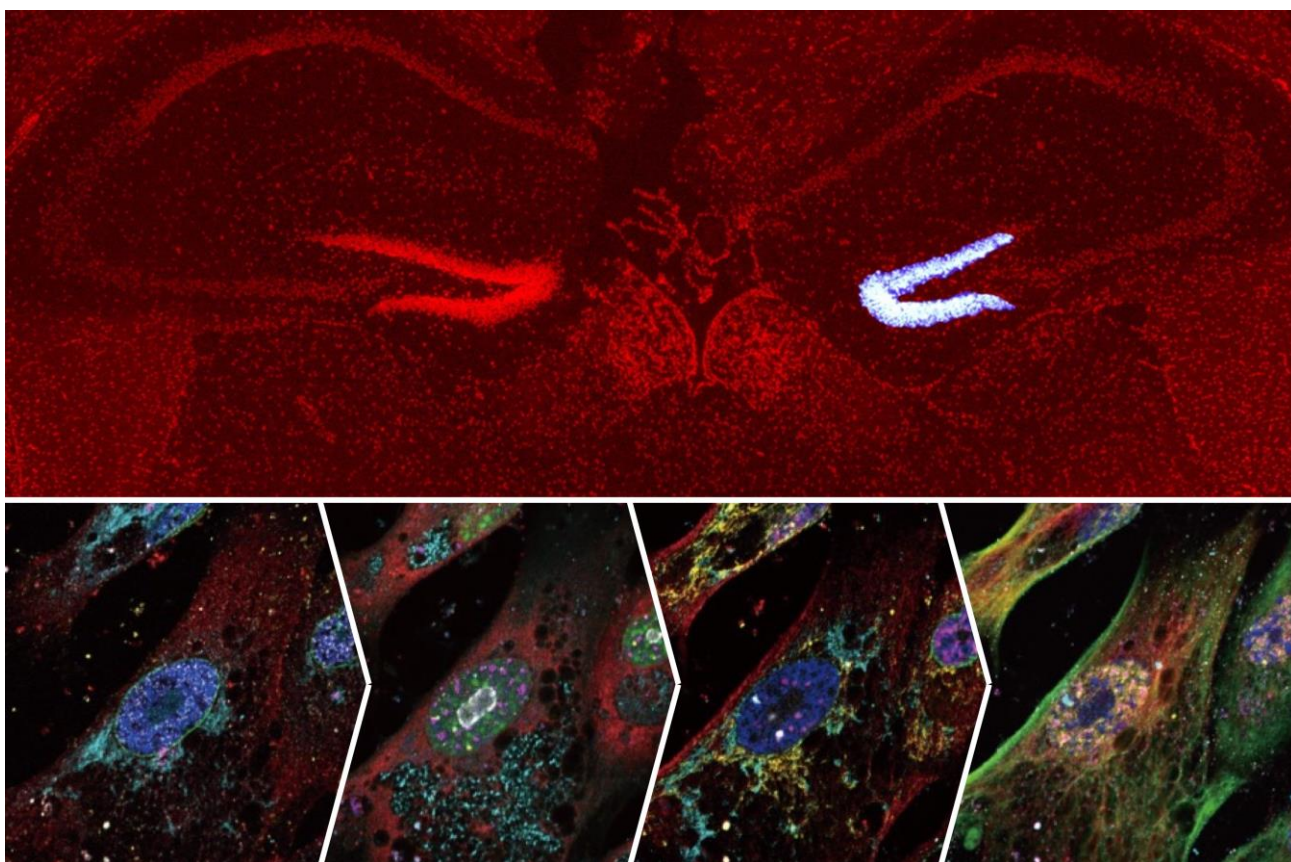


空間オミクス解析に関する技術講習

要旨集



コーディネーター：

沖 真弥 熊本大学 生命資源研究・支援センター 機能ゲノミクス分野 教授

富松 航佑 九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野 助教

日 時：2024年6月27日(木)

技術講習：13:00～14:30

実技講習：14:40～16:40

会 場：千里ライフサイエンスセンタービル5F 山村雄一記念ライフホール

主 催：公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団

表紙の図：

PIC RNA-seq (マウス海馬の歯状回に UV 照射)

【熊本大学 生命資源研究・支援センター 沖 真弥 先生 提供】

seqIS (老化した IMR90 細胞を 7 擬似色で 4 回免染)

【九州大学 生体防御医学研究所 富松 航佑 先生 提供】

プログラム

技術講習 13:00～14:30

13:00～13:45 座長：富松 航佑

- 講習 1** PIC: 局所領域に対する高深度 RNA-seq 技術 2
熊本大学 生命資源研究・支援センター 機能ゲノミクス分野 教授 沖 真弥

13:45～14:30 座長：沖 真弥

- 講習 2** seqIS: 細胞状態を高解像で捉える連続免染技術 4
九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野 助教 富松 航佑

14:30～14:40 休憩

実技講習 14:40～16:40

14:40～15:00 座長：富松 航佑

- 講習 1** PIC のトリセツ: 共同研究として実施する 7
熊本大学 生命資源研究・支援センター 機能ゲノミクス分野 教授 沖 真弥

15:00～15:20 座長：沖 真弥

- 講習 2** 脳オルガノイドの PIC RNA-seq 8
名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学分野 臨床研究医 / University of California, San Diego Rady Children's Institute for Genomic Medicine 中村 勇治

15:20～15:40 座長：沖 真弥

- 講習 3** 小型魚類モデルを用いた細胞老化・個体老化研究に PIC を利用する 10
大阪大学 微生物病研究所 環境応答研究部門 教授 石谷 太

15:40～15:55 座長：沖 真弥

- 講習 4** seqIS のトリセツ: DIY で実施する 12
九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野 助教 富松 航佑

15:55～16:00 休憩

16:00～16:30 進行役：沖 真弥、富松 航佑

パネルディスカッション

16:30～16:40

- 最後に** 熊本大学 生命資源研究・支援センター 機能ゲノミクス分野 教授 沖 真弥

* 会終了後、ロビーにて交流会(名刺交換会)を開催します。

※講演の時間は質疑応答を含みます。ご注意ください。

技術講習 1. PIC: 局所領域に対する高深度 RNA-seq 技術

熊本大学 生命資源研究・支援センター 機能ゲノミクス分野 教授
沖 真弥

学歴・職歴

2007年 大阪大学大学院医学研究科博士後期課程修了
2007年 九州大学大学院医学研究院 助教
2019年 同 講師
2020年 京都大学医学研究科創薬医学講座 特定准教授
2024年 熊本大学生命資源研究支援センター 教授

学 位 博士 (医学)

所属学会 日本分子生物学会、日本発生生物学会、日本バイオインフォマティクス学会

専門分野 空間オミクス、発生生物学、バイオインフォマティクス

主な著書 (原著論文)

PIC に関する論文

Honda, M., Kimura, R., Harada, A., Maehara, K., Tanaka, K., Ohkawa, Y., **Oki, S.** Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections. *STAR Protoc.* 3(2), 101346, 2022.

Honda, M., **Oki, S.**, Kimura, R., Harada, A., Maehara, K., Tanaka, K., Meno, C., Ohkawa, Y. High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nat Commun.* 12(1), 4416, 2021.

ChIP-Atlas に関する論文

Zou, Z., Ohta, T., **Oki, S.** ChIP-Atlas 3.0: a data-mining suite to explore chromosome architecture together with large-scale regulome data. *Nucleic Acids Res.* gkae358, 2024.

Zou, Z., Ohta, T., Miura, F., **Oki, S.** ChIP-Atlas 2021 update: a data-mining suite for exploring epigenomic landscapes by fully integrating ChIP-seq, ATAC-seq and Bisulfite-seq data. *Nucleic Acids Res.* 50(W1), W175-W182, 2022.

要 旨

多細胞生物は多様な組織や細胞タイプから構成され、それらは空間的に整然と配置される。その細胞タイプの性質は遺伝子発現によって規定されるため、多細胞システムの理解には位置情報と紐づけた解析が必要である。空間オミクス解析技術は RNA やタンパク質の網羅的な分布を位置情報と紐づけて解析するための技術であり、近年、世界中で数々の手法が開発され商用化されている。本講習会の前半部「技術講習」では、国産技術として開発された PIC 法（本項）と seqIS 法（次項）の開発者が登壇し、その原理や他の技術との比較について紹介する。後半部の「実技講習」では、実践のためのトリセツやコツなどを開発者が紹介するほか、ユーザによる現場トークを披露していただく。

本講では、我々が開発した光単離化学（Photo-Isolation Chemistry, PIC）について紹介する。これは局所領域のトランスクリプトーム情報を光照射によって高解像度かつ高深度に抽出できる技術である。その手順として、まず組織切片を準備し、そのまま逆転写反応をおこなう。次に免疫染色などで関心領域（ROI）を可視化し、ROI に UV を照射する。そののち組織切片のレーザーを回収して RNA-seq を行うと、UV 照射された ROI だけの遺伝子発現情報が抽出できる。その原理の根本は、逆転写反応後における cDNA の化学的な性質を UV 照射で変化させ、増幅反応を可能にすることである。PIC は ROI の情報しか抽出できないため、空間バーコードを用いた空間トランスクリプトーム技術に比べて空間網羅性に劣る。しかし UV 照射によって ROI を定義するため、サブミクロンレベルの解像度で ROI を識別できる。さらに最高で単一細胞から約 8,000 種類もの遺伝子を検出できるため、検出深度に優れた技術といえる。

本講ではさまざまな空間オミクス解析技術について概説したのち、我々が開発した PIC の原理や他の技術との比較について述べる。さらにこれまでに百件近く実施した共同研究の実施例を紹介し、得られた知見などについて概説する。

参考文献（オキラボ HP からダウンロードできます。 <https://oki-lab.jp/resource/>）

Honda, M., et al., Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections. *STAR Protoc.* 3(2), 101346, 2022.

Honda, M., et al., High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nat Commun.* 12(1), 4416, 2021.

本田瑞季, 沖 真弥. Photo-Isolation Chemistry : 光照射による高解像度かつ高感度なトランスクリプトーム技術. *実験医学.* 39(14), 2021.

技術講習 2. seqIS: 細胞状態を高解像で捉える連続免染技術

九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野 助教
富松 航佑

学歴・職歴

2010年 九州大学システム生命科学府システム生命科学科 修了
2011年 鳥取大学生命機能研究支援センター 研究員
2013年 ケンブリッジ大学英国がん研究所 研究員
2018年 滋賀医科大学医学部 特任助教
2020年 九州大学生体防御医学研究所 特任助教
2021年 九州大学生体防御医学研究所 助教

学 位 博士（システム生命科学）

所属学会 日本エピジェネティクス研究会、日本分子生物学会
International Cell Senescence Association (ICSA)

専門分野 細胞老化、空間オミクス

主な著書（原著論文）

細胞老化に関する論文

Tomimatsu K, Bihary D, Olan I, Parry AJ, Schoenfelder S, Chan ASL, Slater G StC, Ito Y, Rugg-Gunn PJ, Kirschner K, Bermejo-Rodriguez C, Seko T, Kugoh H, Shiraishi K, Sayama K, Kimura H, Fraser P, Narita M, Samarajiwa SA, Narita M. Locus-specific induction of gene expression from heterochromatin loci during cellular senescence. *Nature Aging* 2:31-45, 2022.

空間オミクスに関する論文

Tomimatsu K, Fujii T, Bise R, Hosoda K, Taniguchi Y, Ochiai H, Ohishi H, Ando K, Minami R, Tanaka K, Tachibana T, Mori S, Harada A, Maehara K, Nagasaki M, Uchida S, Kimura H, Narita M, Ohkawa Y. Precise immunofluorescence canceling for highly multiplexed imaging to capture specific cell states. *Nature Communications* 15:3657, 2024.

要 旨

細胞状態は、外因性因子によるシグナル伝達の活性化を介した転写の変化によりもたらされる。これまで 1 細胞オミクス解析技術の進歩により、細胞の状態変化はスナップショットデータを並び替えて擬似時間を構築することで推定されてきた。その一方で、細胞間のシグナル伝達から状態変化までを包括的に理解するアプローチは確立されておらず、未だ擬似時間データから状態変化の原因推定が困難である。我々はこの問題解決を目指し、1 細胞レベルで活性化シグナル伝達を含むタンパク質の空間解析と、遺伝子発現の空間解析を同時に行う空間マルチオミクスの技術開発を進めている。

連続免疫染色法は、1 細胞解像度でシグナル伝達分子の活性化を検出し、細胞状態を同時に捉える 1 つの手法として開発が進められている。近年、抗体に 1 本鎖オリゴ DNA で標識し、それを相補的な 1 本鎖蛍光オリゴプローブで検出する Fluorescent in situ hybridization (FISH) ベースの方法が確立され、広く採用されるようになった(CODEX, Goltsev et al., 2018, Black et al., 2021)。この手法はオリゴ DNA 標識抗体のカクテルをサンプルと反応させた後、標識オリゴに相補的な蛍光オリゴを順次反応させることで連続染色を行う。しかしながらオリゴ DNA はしばしば核タンパク質と非特異的に相互作用するため、オリゴ DNA 標識抗体は、細胞表面抗原の検出や特異性の高い抗体の使用に限られていた。一方で 4i (Gut et al., 2018) や CycIF (Lin et al., 2015) など蛍光免疫染色した抗体の蛍光を消光または抗体自体を剥がすことで連続染色する手法は活性化したシグナル伝達分子の検出を可能にするが、染色した抗体やその蛍光を除去するための条件が過酷であり、細胞状態を解析するために十分な多重性を得る前に試料の完全性が失われる。そのため、細胞状態とシグナル伝達活性化の詳細を解析する手法は未だ達成されていない。

我々は、ジスルフィド結合を介して蛍光色素を標識した抗体(Precise Emission Canceling Antibody: PECAb)を開発した。PECAb は、活性化シグナルと核タンパク質を特異的に検出し、穏やかな消光条件で組織の状態を維持することにより最大 206 タンパク質を染色する高い多重性を達成した。さらに、取得されるデータを用いて擬似時間を構築することで、シグナル伝達に伴う細胞状態変化ダイナミクスが可視化された (Tomimatsu et al., 2024)。本技術は空間トランスクリプトーム手法 Seq-smFISH と組み合わせることでマルチモーダルな解析を可能とすることが示され、今後多様な細胞状態におけるシグナル伝達との因果関係の解明が期待される。本講ではこれら最近の知見について紹介したい。

参考文献

- Lin JR, et al., Highly multiplexed imaging of single cells using a high-throughput cyclic immunofluorescence method. *Nature Communications*, 8390, 2015.
- Goltsev Y, et al., Deep profiling of mouse splenic architecture with CODEX multiplexed imaging. *Cell*, 174:968-981, 2018.
- Gut G, et al., Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states. *Science*, 361:eaar7042, 2018.
- Black S, et al., CODEX multiplexed tissue imaging with DNA-conjugated antibodies. *Nature Protocols*, 16:3802-3835, 2021.
- Tomimatsu K, et al., Precise immunofluorescence canceling for highly multiplexed imaging to capture specific cell states. *Nature Communications* 15:3657, 2024.

..... MEMO

実技講習 1. PIC のトリセツ: 共同研究として実施する

熊本大学 生命資源研究・支援センター 機能ゲノミクス分野 教授
沖 真弥

* 講師については P2 参照

要 旨

我々が開発した光単離化学 (Photo-Isolation Chemistry, PIC) は、局所領域のトランスクリプトーム情報を光照射によって高解像度かつ高深度に抽出できる技術である。この実験は全て市販の試薬や機器を使って実施できるが、DIY でおこなうには多大な準備費用や労力を要する。そのため我々はアカデミアや企業からの依頼を受けて多くの受託解析をおこなってきた。本講ではその研究支援の流れについて以下のように概説する。

1) コンサルテーション

依頼者とともにオンラインで打ち合わせする。研究の背景、目的の組織や関心領域 (ROI) などを聞き取り、切片の作製方法や注意点、必要なレプリケート数などをお伝えする。実験にかかる受益者負担費用についても説明する。

2) 予備検討

組織切片 1~2 枚を送っていただき、RNA のクオリティーチェック (RIN 測定) を実施する。一定の基準をクリアすれば、1~2 枚の組織切片の ROI に光照射してシーケンスし、マップ率や検出される遺伝子数を確認する。

3) 本番実験

必要なレプリケートを含む全ての組織切片を送っていただき、逆転写反応や免疫染色を行う。次の光照射は依頼者に実施してもらうことが多いが、珍しい装置を触って照射するため、けっこう楽しいと評判である。その後、我々がライブラリ増幅、シーケンス、情報解析を行う。

4) 納品・ディスカッション

シーケンスデータ (Fastq)、遺伝子カウントデータ、クラスタリング、DEG リストなどをオンラインで納品する。オンラインミーティングにて報告するとともに、依頼者の今後の研究にどのように活かせるかなどについてディスカッションする。

実技講習 2. 脳オルガノイドの PIC RNA-seq

名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学分野 臨床研究医／
University of California, Rady Children's Institute for Genomic Medicine

中村 勇治

学歴・職歴

2009年 名古屋市立大学医学部医学科 修了
2009年 豊橋市民病院 初期研修医
2011年 豊橋市民病院 小児科 医員
2015年 蒲郡市民病院 小児科 医員
2016年 名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学分野 臨床研究医
2017年 同 博士課程
2021年 同 博士課程 修了
2022年 同 臨床研究医
2023年 カリフォルニア大学サンディエゴ校 Postdoctoral Scholar

学 位 博士（生体情報・機能制御医学専攻）

受賞歴

2022年 第64回日本小児神経学会学術集会 Young Investigator Award

所属学会 日本小児科学会、日本小児神経学会、日本人類遺伝学会

専門分野 小児神経学

主な著書（原著論文）

Nakamura Y, Shimada IS, Maroofian R, Falabella M, Zaki M, Fujimoto M, Sato E, Takase H, Aoki S, Miyauchi A, Koshimizu E, Miyatake S, Arioka Y, Honda M, Higashi T, Miya F, Okubo Y, Ogawa I, Scardamaglia A, Miryounesi M, Alijanpour S, Ahmadabadi F, Herkenrath P, Dafsari H, Velmans C, Balwi M, Vitobello A, Denommé-Pichon A, Jeanne M, Civit A, Abdel-Hamid M, Naderi H, Darvish H, Bakhtiari S, Kruer M, Carroll C, Karimiani E, Khailany R, Abdulqadir T, Ozaslan M, Bauer P, Zifarelli G, Seifi T, Zamani M, Alam C, Alvi J, Sultan T, Efthymiou S, Pope S, Haginoya K, Matsunaga T, Osaka H, Matsumoto N, Ozaki N, Ohkawa Y, Oki S, Tsunoda T, Pitceathly R, Taketomi Y, Houlden H, Murakami M, Kato Y, Saitoh S. Biallelic null variants in PNPLA8 cause microcephaly through the reduced abundance of basal radial glia. *Brain* in press.

要 旨

ヒトは進化の過程で、高度な知能の基盤となる拡張した大脳皮質を獲得しました。大量の神経細胞を産生するにあたり basal radial glia (bRG) と呼ばれる高度な増殖能を持つ神経幹細胞が重要な役割を果たしますが、bRG の産生メカニズムは十分に解明されていません。我々は、脳回低形成型小頭症の患者の遺伝子解析により *PNPLA8* 遺伝子の機能喪失型変異が疾患の原因であることを発見しました。リン脂質代謝酵素である PNPLA8 がヒトの脳発生においてどのような役割を持つのかこれまで知られていませんでしたが、ヒト iPS 細胞から脳オルガノイドモデルを作製したところ、*PNPLA8* 遺伝子を欠損すると bRG と上層ニューロンの数が著明に減少することを発見しました。bRG は脳室帯と呼ばれる領域から産生されます。我々は *PNPLA8* 遺伝子の欠損によって脳室帯領域でどのような遺伝子発現変化が生じるのかを調べたいと考え、脳オルガノイドに対する PIC RNA-seq を行いました。本講では、脳オルガノイドの切片作製、ROI への光照射、納品されたデータの解析などについてご紹介したいと思います。

実技講習 3. 小型魚類モデルを用いた細胞老化・個体老化研究に PIC を利用する

大阪大学 微生物病研究所 環境応答研究部門 教授
石谷 太

学歴・職歴

2002年 名古屋大学大学院理学研究科博士課程生命理学専攻修了
2002年 名古屋大学大学院理学研究科 博士研究員
2006年 九州大学 生体防御医学研究所 独立助教授・准教授
2017年 群馬大学 生体調節研究所 教授
2019年 大阪大学 微生物病研究所 教授

学 位 博士（理学）

受賞歴

2009年 文部科学大臣表彰 若手研究者賞受賞
2014年 日本生化学会 柿内三郎記念奨励研究賞受賞

所属学会 国際ゼブラフィッシュ学会 IZFS（アジア代表理事）、日本細胞生物学会（理事、編集委員）、日本生化学会（代議員）、日本分子生物学会（編集委員）、日本発生生物学会（編集委員）、日本神経科学学会、日本癌学会、炎症再生医学会、International Cell Senescence Association (ICSA)

専門分野 モデル生物を用いた生体防御研究、疾患・老化生物学、細胞生物学

主な著書（原著論文） 演者の責任著者論文の一部を記載

Abe et al., Sex-dependent regulation of vertebrate somatic growth and aging by germ cells. *Science Adv.* 2024 in press
Zou et al., Determining zebrafish dorsal organizer size by a negative feedback loop between canonical/non-canonical Wnts and Tlr4/NFκB". *Nature Commun.* 2023; 14 (1): 7194
Haraoka et al., Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis. *Nature Commun.* 2022; 13(1):1417.
Akieda et al., Cell competition corrects noisy Wnt morphogen gradients to achieve robust patterning in the zebrafish embryo. *Nature Commun.* 2019; 10:4710
Ishitani et al., Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nature Cell Biol.* 2010; 12:278-85

要 旨

沖らが開発した光単離化学 (Photo-Isolation Chemistry, PIC) は、組織中の任意の細胞のトランスクリプトーム情報を空間情報を保持したまま高深度に抽出できる技術である。我々は、PIC が「生体組織内で起こる局所細胞の時間変容や細胞間コミュニケーション」のメカニズム解析に極めて有効であると考えており、3年前よりこの技術を我々の実験系 (小型魚類モデル系) に取り込むことを試みてきた。本講習会では、現在進めている PIC の活用例を2つご紹介したい。

- ① 細胞間コミュニケーションを介した細胞老化機構の解析：我々は最近、イメージングに優れたモデル脊椎動物を用いた解析により、生体組織に生じた前がん細胞に対して隣接正常細胞が細胞老化を促すことで前がん細胞からのがん発生を抑制することを見出している (Haraoka et al., *Nature Commun* 2022) が、この隣接細胞による細胞老化誘導機構は不明であった。そこで我々は PIC を用いて「隣接細胞において前がん細胞の出現に応答して発現変動する遺伝子群」の網羅的解析を行った。この解析により、細胞老化誘導機構の新たなメカニズムがわかりつつある (投稿準備中)。
- ② 皮膚幹細胞老化解析：我々は、超速老化魚キリフィッシュを使った新たな老化研究系を立ち上げている。この魚は人と類似した老化表現型を示すのみならず、ヒトでは数十年かかる老化プロセスをたった2、3ヶ月で観察できる (Abe et al., *Science Adv* 2024)。我々は in vivo の幹細胞老化のメカニズムを知るために、若齢と老齢のキリフィッシュの皮膚幹細胞の PIC 解析を進めており、これにより新たな幹細胞老化機構がわかりつつある (投稿準備中)。

実技講習 4. seqIS のトリセツ: DIY で実施する

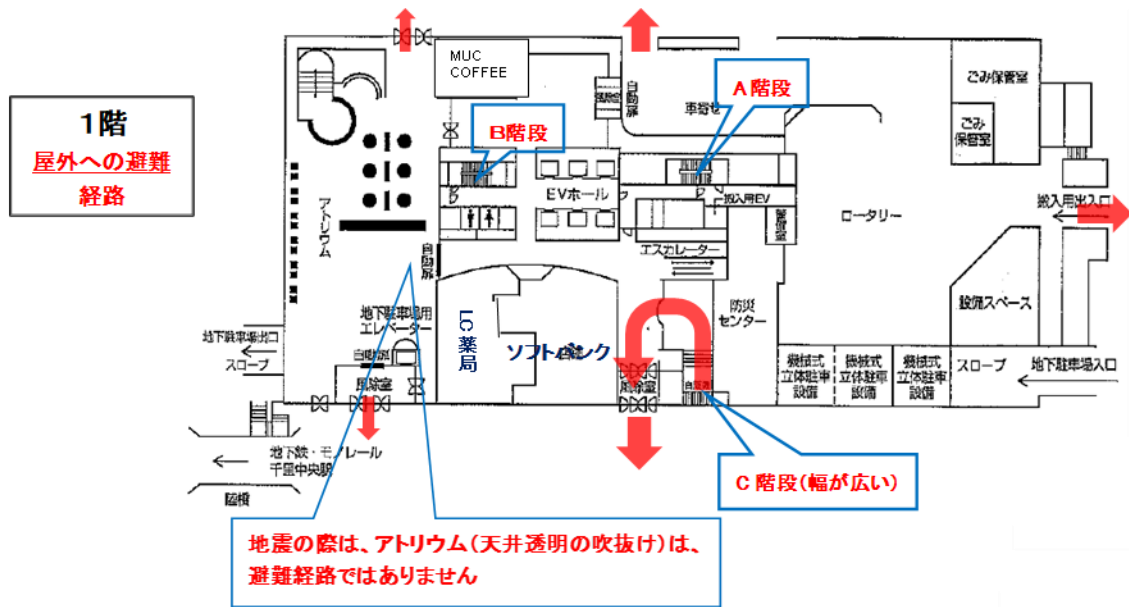
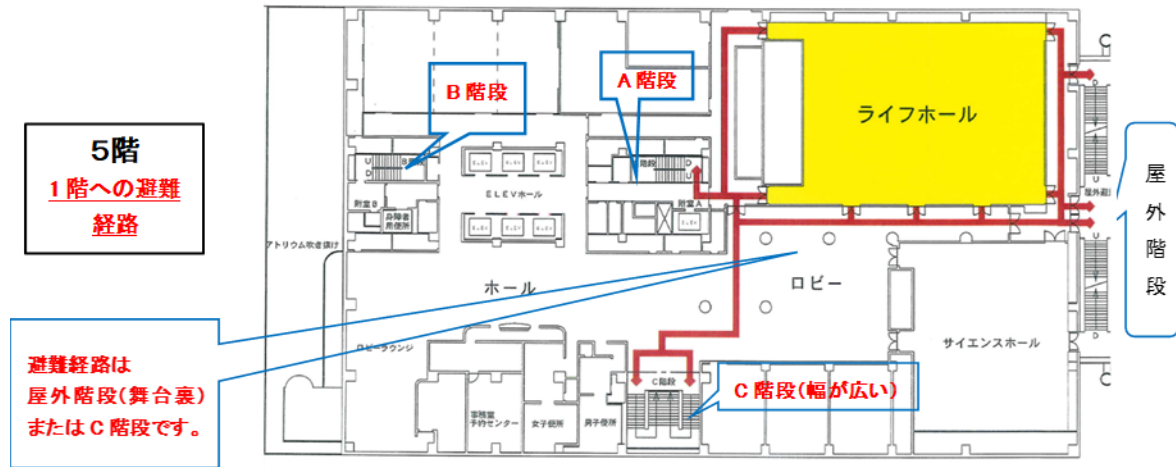
九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野 助教
富松 航佑

* 講師については P2 参照

要 旨

連続免疫染色(Sequential Immunostaining: SeqIS)は標的となるタンパク質に対して、特異的な抗体による染色と消光を繰り返すことで空間情報を維持したタンパク質の発現情報を網羅的に取得する。一方で、網羅的とまでは行かなくとも、これまで行われてきた3~4種類の免疫染色を10色に増やすだけでも取得される情報は従来の免疫染色と比べ劇的に増加する。そこで本講では SeqIS 技術を、まずは通常の免疫染色感覚で導入できるよう、PECAb (Precise Emission Canceling Antibody)の調製や実験の組み方について概説する。具体的には、PECAb にするための抗体選定のコツ、抗体とプローブの反応、必要となるマテリアルや時間と手間及び、抗体ラベルに失敗した時のリカバリープランなどを例を挙げて紹介する。

<<技術講習会開催時の防災対応について>>



- 地震・火災等の非常時には、当ビルの“防災センター（1階）”と協力し、状況を確認の上、万一、避難が必要な場合はご案内いたします。お席を離れず、落ち着いて係員の指示をお待ちください。
- 避難の際には、エレベーター/エスカレーターは使用せず、階段をご使用ください。
- 当ビルは、建築基準法の新耐震基準に対応しています。

公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団
〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2
千里ライフサイエンスセンタービル20階
TEL : 06-6873-2006 FAX : 06-6873-2002
E-mail : tech-2024@senri-life.or.jp
URL : <https://www.senri-life.or.jp/>