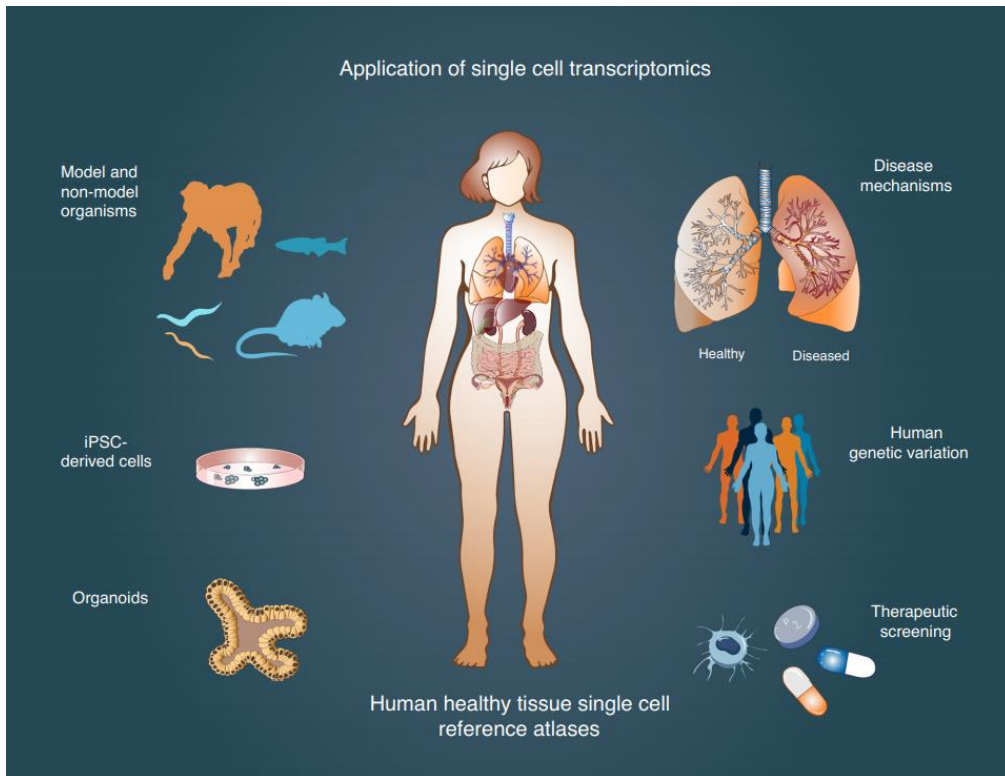
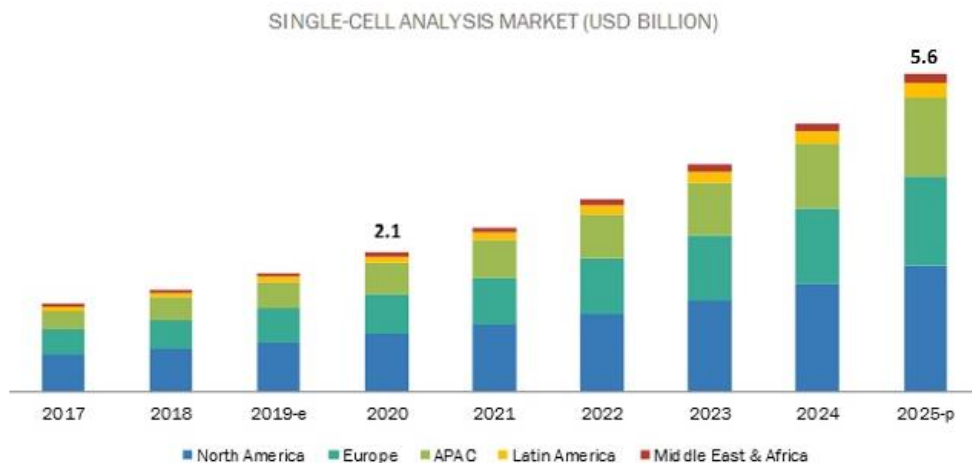


Spatial Transcriptomes 분석 기술의 발전과 응용



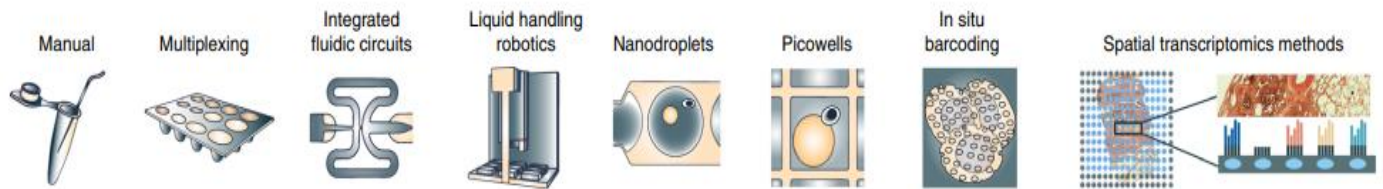
NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18158-5>

세포는 생물학의 기본이 되는 단위로, Single-cell Sequencing은 기존의 조직단위가 아닌 세포단위에서 유전체 연구를 수행하는 기술이다. 같은 조직 유래 세포라도 크기, 단백질과 RNA 발현 양상이 크게 다를 수 있기 때문에 세포별 이질성을 확인하는 것이다. Single-cell Sequencing은 미생물 유전체 식별, 줄기세포 계대배양시 single-cell 유지 관련 연구, 유전체 염색체 역할 규명, 종양 이질성 이해 등 다양한 분야에서 각광받고 있다. 특히 종양 조직의 경우 암이 진행되는 동안 암세포들이 진화할 수 있어 single-cell 분석을 통해 세포별 특이성을 분석, 치료에 적용할 수 있다. 2016년 10월 세포 수준에서 인체를 mapping한다는 'Human Cell Atlas (HCA) Project'가 시작되면서 Single-cell Sequencing 기술은 빠르게 발전하고 있으며[1], 세포 기반 연구에 대한 정부 지원의 증가와 암 연구에 대한 single-cell 분석의 폭넓은 적용으로 single-cell 시장은 크게 성장하고 있다[2].



<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/single-cell-analysis-market-171955254.html>

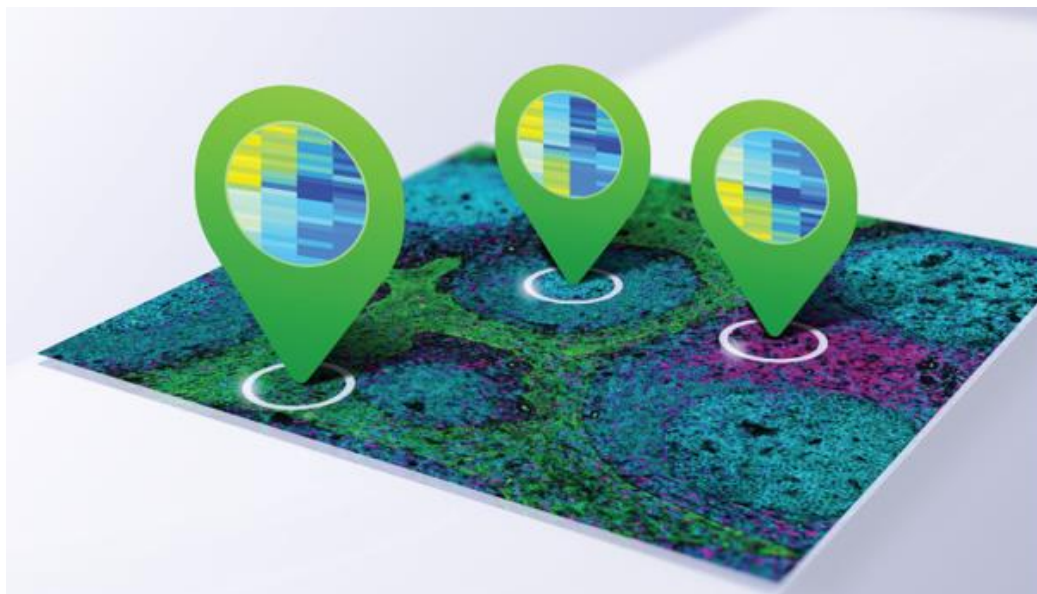
< Development of single-cell transcriptomics technologies >



NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18158-5>

초기의 manual 방법에서는 일부 세포에 대해서만 single-cell transcriptomic 분석이 가능했지만, Integrated fluidic circuits과 Liquid handling robotics의 도입으로 cell수는 수천개까지 가능하게 되었고 Nonodroplets과 Picowells 기술로 다수의 세포를 동시에 프로파일링 하게 되었다[3]. 이러한 기술을 통해 세포들의 이질성 (heterogeneity)을 유지하면서 각 세포군 내에서 발생하는 유전 정보를 축적할 수 있었다. 이러한 정보들은 세포 분화에 있어서 새로운 동적인 변화 기저와 암과 같은 복잡한 질병에 결정적인 영향을 미칠 수 있는 새로운 세포 군을 발견하는데 중요한 역할을 하였지만, 세포를 보다 잘 이해하기 위한 노력은 실제에 가까운 세포 환경을 재현함으로써 지속되고 있다. 세포는 3차원 공간에 존재하며 그 공간 내에서 상호작용하고 있기 때문에 spatial transcriptome 분석을 통해 세포 종류 및 위치를 이해하기 위한 방법들이 개발되었다[4,5,6]. *In situ* barcoding 도입은 조직 부분 내에서 성층학적 위치의 유전체 정보를 통합하는 spatial method의 최신 발달로 수십만 개의 cell에서 동시에 수만개의 전사체의 발현 양상을 확인할 수 있게 되었다.

< Spatial transcriptomics Technologies >

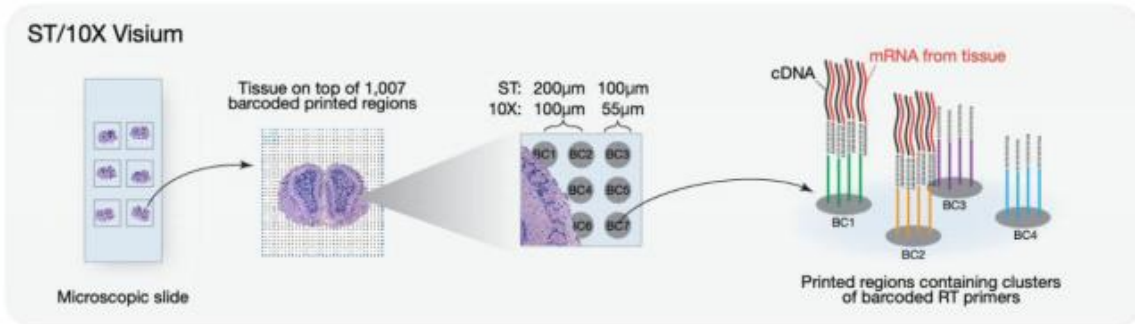


<https://www.nanostring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-dsp-overview/>

최신의 spatial 기술은 *in situ* capturing 방식으로, 이미 알고 있는 tissue의 특정 영역을 분리한 후 sequencing 이나 hybridization을 통해 RNA 분자를 *in situ*로 시각화 하는 방법이다. 이 방식은 직접적인 시각화의 한계를 피하고 완전한 전사체 분석을 가능하게 한다. 그러나 이러한 방법은 RNA capture 효율과 얼마만큼의 고해상도로 측정이 가능한지가 주요 쟁점이 되고 있다. 국내에서 가장 많이 활용되고 있는 *in situ* capturing 기술의 개요는 아래와 같다[7].

1) Spatial Transcriptomics

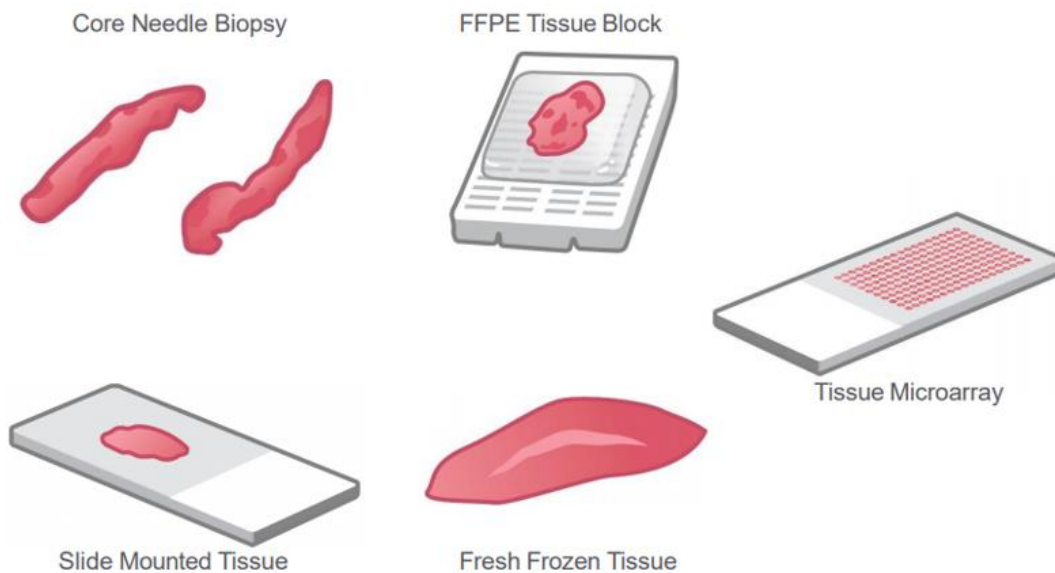
- *In situ* capturing을 사용한 첫 번째 기술은 2016년에 발표된 Spatial Transcriptomic 기술이었다[8]. 이 방법은 공간적으로 whole transcriptome에 대한 정보를 제공하지만, 100 μ m 직경의 바코드된 영역에 대한 분해능 (resolution)이 10~40 cells로 제한되었다. 2018년 말 Spatial Transcriptomic 기술은 10X Genomics에 의해 "10X Visium"이라는 이름으로 인수되어 추가로 개발되면서[9], 현재는 분해능이 개선되어 55 μ m 직경내 확인이 가능하게 되었지만 바코드된 영역의 간격이 single-cell 해상도가 아니라는 점이 아쉽다. 이 기술은 mRNA expression data만 제공하고 있다.



<https://doi.org/10.1002/bies.201900221>

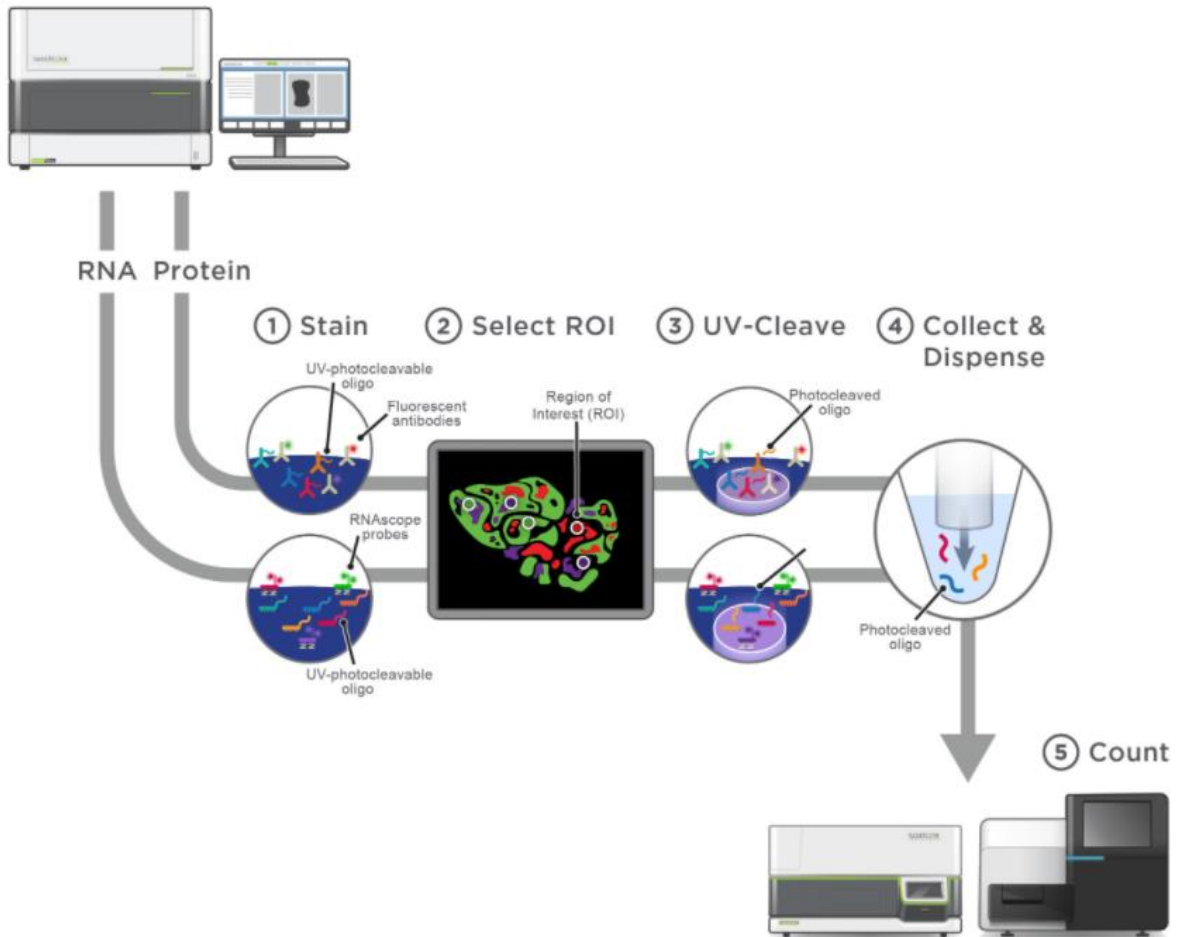
2) GeoMx Digital Spatial Profiler

- 2019년 3월 미국의 진단기술개발 전문기업인 NanoString사는 GeoMx Digital Spatial Profiling 기기를 발표했다[10]. GeoMx DSP는 기존의 동결조직(Fresh frozen tissue)뿐만 아니라 FFPE 샘플에 대해서도 실험이 가능하며, 유전체뿐만 아니라 단백질을 프로파일링 할 수 있다는 차별성을 가지고 있다.



<https://www.nanostring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-dsp-overview/>

- 조직 내에서 10-600 μ m의 다양한 사이즈의 ROI (Regions of interest)를 선정할 수 있고, 이 영역에 UV 광선을 노출시키면 RNA target probe (mRNA assay) 또는 항체 (protein assay)에 결합되어 있는 barcode tag가 분리되어 모이면서 정보를 얻을 수 있게 된다. 얻어진 barcode tag를 정량화 할 수 있는 방법과 관련하여 NGS를 이용한 정량화가 입증되면서 무제한의 multiplex이 가능해졌다[11].



https://www.nanostring.com/wp-content/uploads/2020/12/FL_MK0481_DSP_GrantPackage_May2020.pdf

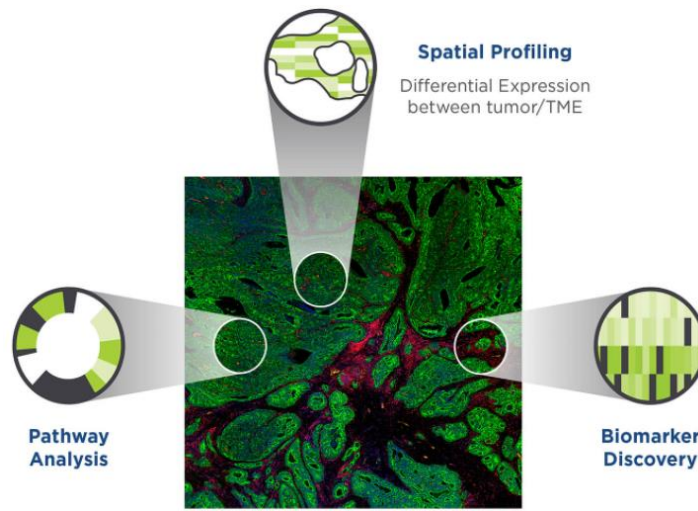
- ROI는 최대 750x625 μ m에서 최소 10x10 μ m까지 다양하게 ROI 영역을 설정할 수 있으며, 모양과 크기 또한 아래의 5가지 방식으로 조정할 수 있다.

Geometric	Segmentation	Cell-Type Specific	Contour	Gridded
CD3 PanCK DNA	PanCK DNA			
What is the heterogeneity of expression in different regions of my tissue?	What is the expression profile of distinct biological compartments (e.g., Tumor-TME)?	What is the expression profile of a specific cell population in my tissue?	How does the immune environment change on either side of an infiltrate boundary?	What novel targets are uncovered with deep mapping of a specific tissue region?

https://www.nanostring.com/wp-content/uploads/2020/12/FL_MK0481_DSP_GrantPackage_May2020.pdf

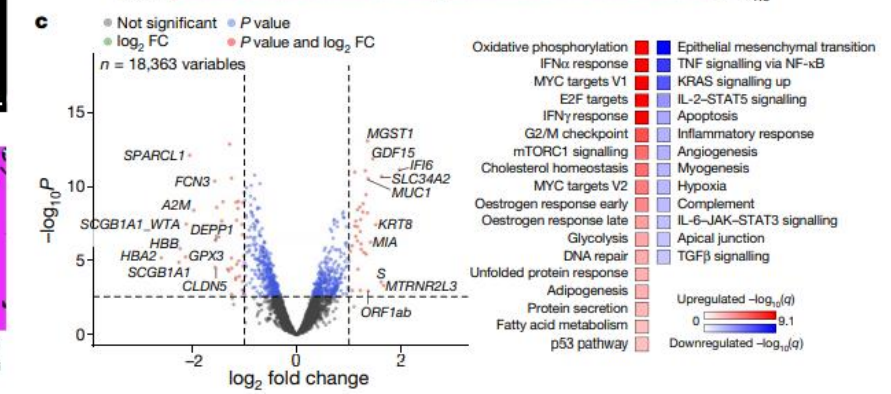
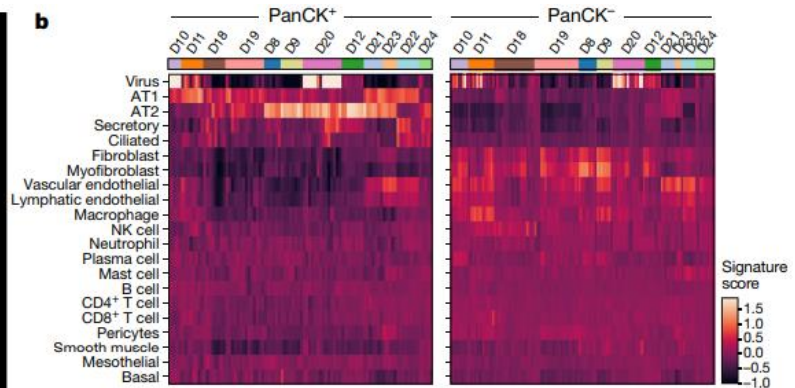
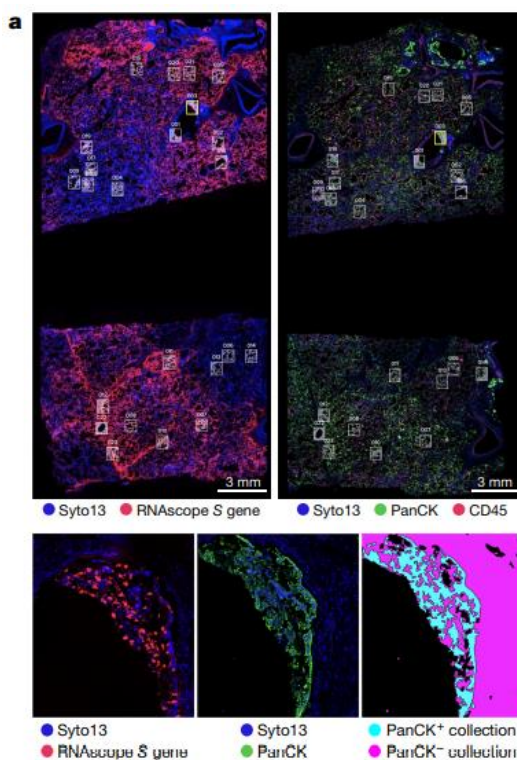
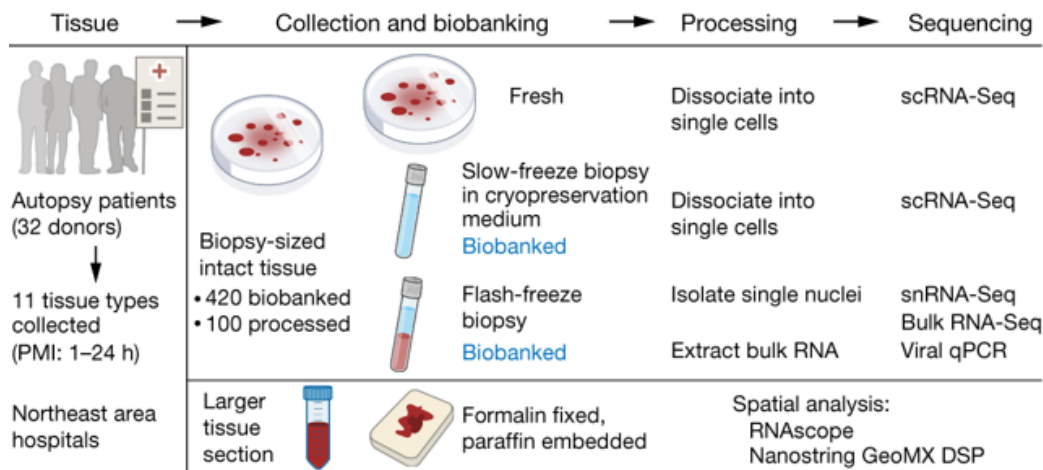
< Application of GeoMx Digital Spatial Profiler >

GeoMx Digital Spatial은 변화하는 연구의 요구 사항을 충족하도록 설계된 유연한 spatial solution으로, 표준 면역 형광 기술과 디지털 광학 바코드 기술을 결합하여 특정 위치에서 발현되는 유전체 및 세포의 특성과 세포 간의 상호작용을 이해할 수 있다. 이를 통해 정밀 진단 및 치료 표적 발굴이 가능하며 종양학, 면역학, 신경과학, 발달생물학 등의 응용 분야를 포함한 다양한 연구에 적용할 수 있다.



https://www.nanostring.com/wp-content/uploads/2020/12/FL_MK0481_DSP_GrantPackage_May2020.pdf

최근 사회적 이슈가 되고 있는 Covid-19와 관련하여 Covid-19에 감염된 폐와 그렇지 않은 폐의 FFPE 조직에서 GeoMx DSP를 이용하여 RNA 구성 및 발현 차이에 대한 연구한 사례가 있다[12].



<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03570-8>

이바이오젠에서는 이러한 연구 흐름에 맞춰 조직의 위치 정보와 RNA 혹은 단백질의 발현 정보를 파악할 수 있는 GeoMx DSP를 2021년 6월 도입하여 Spatial transcriptome profiling 서비스를 시작한다. 이를 통해 연구자들은 기존 장비와 다르게 동결조직 뿐만 아니라 FFPE에서 추출한 RNA 검체에서도 보고자 하는 세포 타입을 선정할 수 있으며, 관심있는 위치(ROI)를 지정하여 정확히 분석할 수 있다. 자사에서는 GeoMx DSP 서비스를 이용하여 조직병리학적인 연구 범위의 폭이 넓어질 것으로 기대하고 있으며, 현재 제공하고 있는 bulk RNA-Seq, Single-cell RNA-Seq, Proteomics analysis와 더불어 GeoMx DSP를 통해 연구자들의 연구 지원을 위해 폭넓은 서비스를 제공할 것이다.

Bulk RNA-Seq과 Single-cell RNA-Seq 서비스에 대한 비교 및 차이점에 대해서는 자사에서 3월에 발행한 Tech Note[13]를 참고하길 바라며, GeoMX DSP 서비스에 대해서는 아래 내용을 통해 확인할 수 있다.

< Spatial Gene Expression Sequencing service >

Service Name	Spatial Gene Expression Sequencing Service
Service Code	NR0910 (Human) / NR0920 (Mouse)
Sample type	Tissue (FFPE, Tissue microarray, Fresh frozen tissue 등 제한 없음)
Sample size	14.6 x 36.2 mm
Species	Human, Mouse
Gene⁺	Human ~18,000개 / Mouse ~23,000개
Data yield⁺	100~150M read/ROI
Publication	NanoString_GeoMx_Publication

+ Whole Transcriptome Atlas 기준

< 참고 문헌 >

1. http://www.biospectator.com/view/news_view.php?varAtclId=6724
2. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/single-cell-analysis-market-171955254.html>
3. Single cell transcriptomics comes of age. *Nat. Communications*. 11:4307 (2020)
4. Computational methods for single-cell omics across modalities. *Nat. Methods*. 17, 14–17 (2020).
5. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Method*. 6(6), 377-382 (2009)
6. 단일 세포(single cell) 분석을 이용한 다중 체학 (Multi-omics) 연구 동향.
<https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=3400>
7. Spatially Resolved Transcriptomes-Next Generation Tools for Tissue Exploration. *BioEssays*. 42, 1900221 (2020)
8. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. 353, 78 (2016)
9. <https://www.genomeweb.com/sequencing/10x-genomics-acquires-spatial-transcriptomics#.YMg4gqgzaUk>.
10. Presented at American Association of Cancer Research Conf., Atlanta, GA, March (2019)
11. High multiplex, digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue using genomic detection methods. *bioRxiv*. 559021 (2019)
12. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature*. 32k, 3, 618 (2021)
13. https://www.e-biogen.com/board_tech.php?act=view&aid=766&page=1