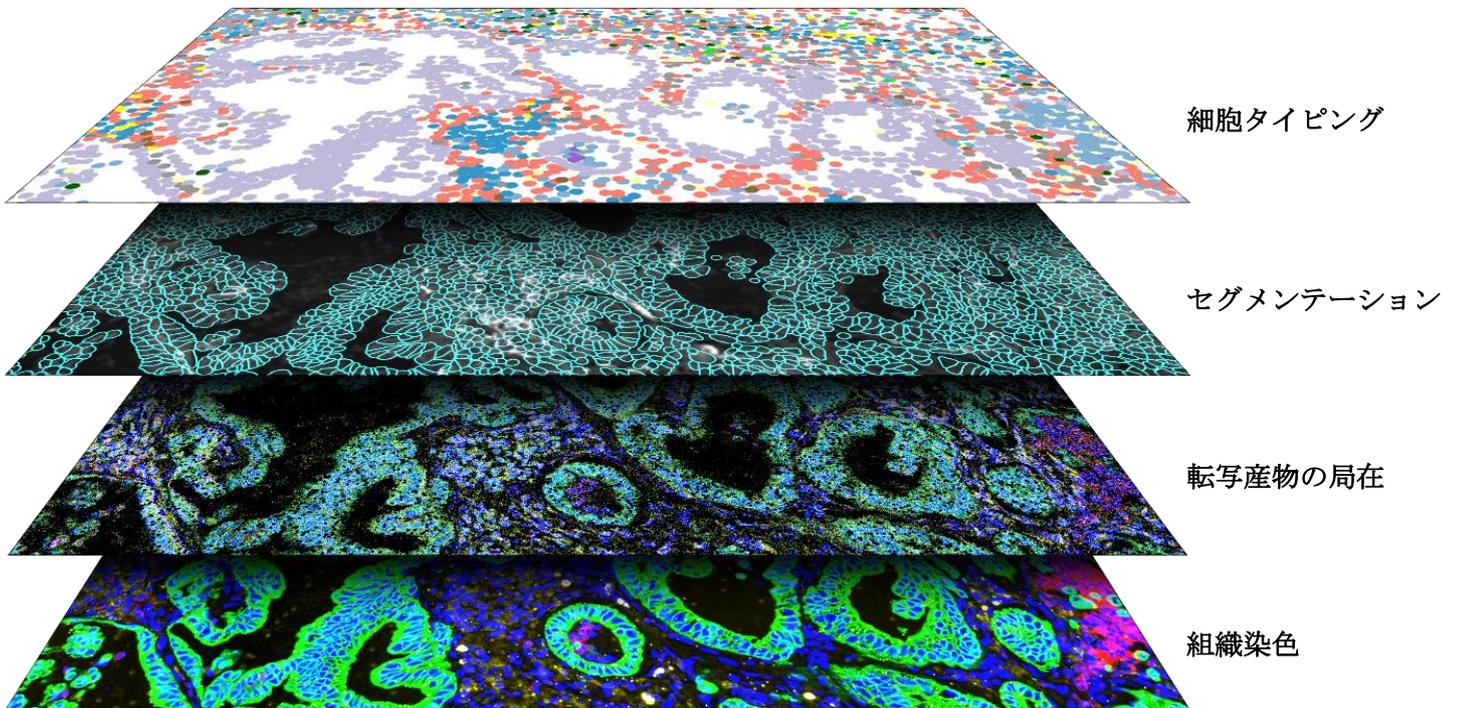


# CosMx™

## 空間モレキュラーイメージャー

### Grant Support Document

インタクトな組織をサブセラーレベルの解像度で分析できる、単一細胞ハイブレックスアッセイにより、細胞表現型や細胞間相互作用をより深く理解することが可能です



## 申請書に記載すべき情報

### プラットフォームの概要

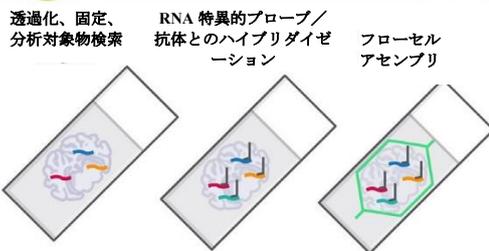
CosMx™空間モレキュラーイメージャー (SMI) は、空間生物学的研究のための高分解能、ハイプレックス、マルチオミックスアッセイです。

CosMx™ SMI は、ハイプレックスプロファイリング能力 (最大 1,000 種類の対象物を分析可能)、超高分解能イメージング技術 (X 軸及び Y 軸上の分析対象物分解能: 100 nm 未満)、ハイスループット (1 検体当たり最大で細胞 100 万個、4 検体/回) を組み合わせた高感度 *in situ* 技術 (NanoString 社特許技術) を土台とするプラットフォームです。顕微鏡スライド上のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) / 新鮮凍結 (FF) 組織切片を用いて、分析対象のタンパク質や遺伝子発現を可視化・定量化することが可能です。

### CosMx™空間モレキュラーイメージャーの装置仕様

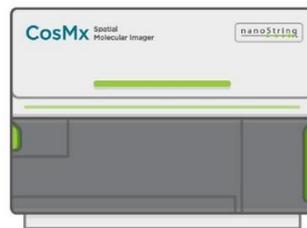
分解能	細胞下レベル分解能
スループット	最大でスライド16枚/週
多項目分析対象物	RNAおよびタンパク質
対応組織	FFPE組織、新鮮凍結組織、オルガノイド、培養細胞
マルチプレックス能力 (カスタマイズ可能)	<ul style="list-style-type: none"><li>最大1,000種類の対象物を分析できるRNAパネル</li><li>最大100種類の対象物を分析できるタンパク質パネル</li></ul>
柔軟なスキャン範囲	最大100 mm <sup>2</sup>
統合されたシステム	分析装置、バリデート済みのパネル・試薬、クラウドベースのデータストレージ・分析ソフトウェアを含む

### 1 検体の調製



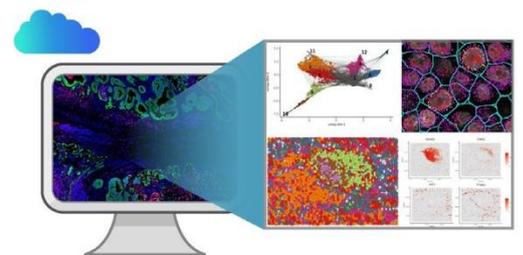
ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織 / 新鮮凍結 (FF) 組織に対応

### 2 総合的読み出し



検体に左右されない *in situ* ハイブリダイゼーション技術と読み出し

### 3 インタラクティブなデータ分析



インタラクティブなデータビューアーを備えたクラウドベースのスケラブルなデータ計算・ストレージ

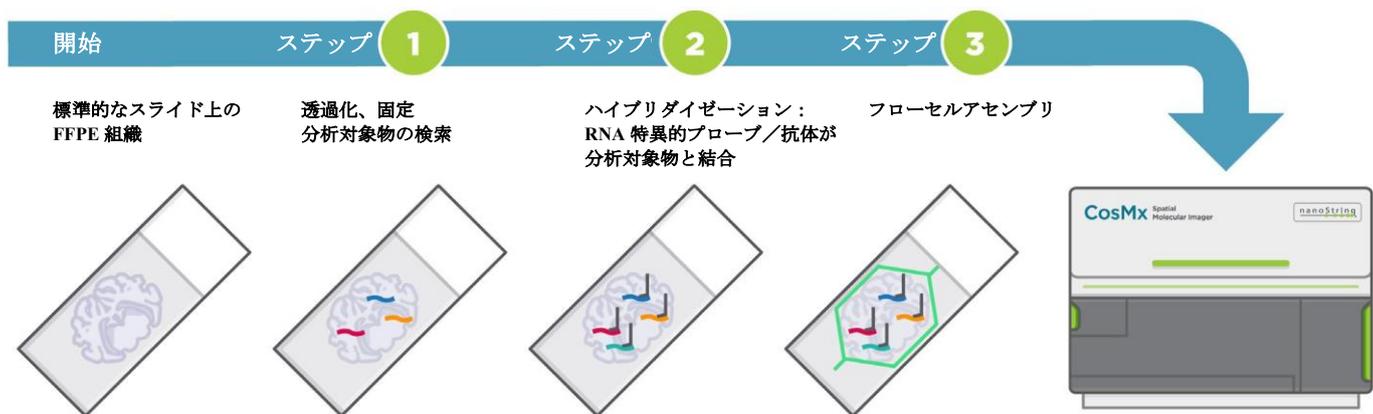
CosMx™ SMI は、バリデート済みの試薬・消耗品、化学処理・読み出し装置、クラウドベースのインタラクティブなデータ分析ソフトウェアから構成される統合的なシステムです。

## 技術概要とワークフロー

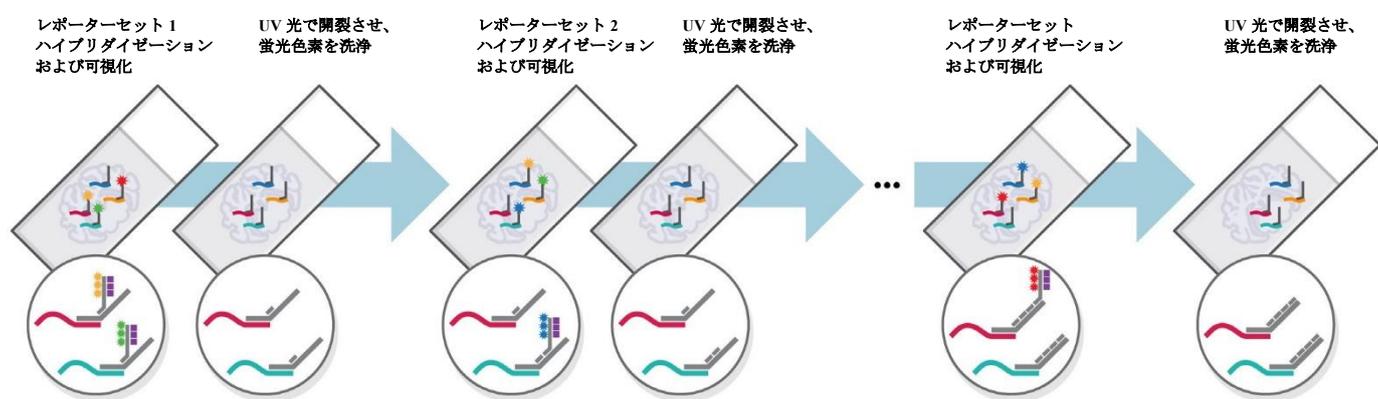
CosMx™ SMI プラットフォームは、高度な循環 *in situ* ハイブリダイゼーション技術、超高分解能の画像読み出し装置、インタラクティブなデータ分析・可視化ソフトウェアを備えた総合的なシステムです。CosMx™ SMI では、検体調製、SMI 装置による自動読み出し、付属のソフトウェアを用いたインタラクティブなデータ分析の 3 ステップで検体から結果を取得することが可能です。標準的な *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法による検体調製では、病理検査室で一般的に作製される組織切片スライドを、組織拡張やクリーニングを行うことなくそのまま使用することができ、cDNA 合成や増幅の必要はありません。各細胞における分析対象の RNA / タンパク質は、独自のバーコードシステムで標識した特異的プローブまたは抗体とのハイブリダイゼーションにより識別した後、SMI 装置を用いて蛍光標識レポータープローブ画像を繰り返し取得することによりバーコードを読み出します。各 RNA は細胞内で単一のスポットとして表示され、この可視化

されたスポットの数を計測することによりデジタル定量化します。得られたデータが保存されるクラウドストレージでは、分析・可視化ツールを利用できるとともに、カスタム分析ワークフローを組み込むことも可能です。

CosMx™ SMI は、標準的なバイオバンク FFPE 組織検体で 100 種類以上のタンパク質について単一細胞レベルおよび細胞下レベルの検出を同時に実行できる初のプラットフォームです。CosMx™ タンパク質技術の鍵となるのは、cyclic exchange (循環交換) 法ではなく、抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを用いた 64 ビットコード化法です。循環コード化された 4 色の組織生画像を解読することにより、細胞 (細胞下) レベルのタンパク質の局在を検出し、発現量を定量化します。CosMx™ のオリゴヌクレオチド標識抗体については、厳しい QC 検査、部位特異的な 60-bp コード化オリゴヌクレオチド標識技術、サイズ排除法による精製を行うことにより、非結合抗体や遊離オリゴヌクレオチドを含まない純粋な抗体-オリゴヌクレオチド可視化試薬を取得しています。



シンプルかつ効率的な検体調製ワークフロー



検体に左右されないハイブリダイゼーション技術により、高感度のハイブックスアッセイを実現

### CosMx™ SMI のワークフロー

1. 厚さ 5  $\mu\text{m}$  のホルマリン固定パラフィン包埋または新鮮凍結組織切片を固定し、透過化します。
2. RNA 分析対象物プローブをハイブリダイゼーションさせます。
3. 洗浄後、オリゴヌクレオチド標識抗体とともに培養し、形態マーカー染色を行います。
4. 洗浄後、フローセルを組み立て、SMI 装置に取り付け、形態マーカーを可視化します。
5. ハイブックス RNA/タンパク質分析を行う組織範囲 (最大 100  $\text{mm}^2$ ) を選択します。
6. 自動で蛍光レポータープローブセットを循環させ、特定の RNA プローブまたはタンパク質抗体上の固有バーコードを読み出します。

### CosMx™ SMI 装置およびアッセイ

CosMx™ SMI は、単一細胞レベルの空間生物学的研究を支援するエンド・ツー・エンドの総合的ソリューションです。データ取得は CosMx™ SMI 装置で行い、取得したデータの保存・分析はすべて、各ユーザーのクラウドベースアカウントで行います。CosMx™ SMI による空間生物学的研究では、スライドのスキヤニング装置、視野 (FOV) 選択、分析対象の RNA/タンパク質を検出するためのオリゴヌクレオチドおよび抗体を用いたハイブリダイゼーション技術が必要です。SMI は、検出した分析対象の転写産物やタンパク質の空間的位置を X、Y、Z 座標で特定することにより、細胞下レベルの高分解能画像ベースのデータを読み出し、クラウドにエクスポートします。クラウド上では、データの処理や分析、可視化を行うことができ、円滑な共同作業が可能です。

光学系は、カスタム液浸光学系 (1.1 NA、倍率 22.77X) に基づく落射蛍光装置です。FOV サイズは 0.7 mm x 0.9 mm、照明はレーザーと LED を組み合わせた広角照明により、UV 光開裂 (385 nm) とともに、Alexa Fluor-488、Atto-532、Dyomics

Dy-605 および Alexa Fluor-647 の可視化が可能です。XY 軸ステージによりフローセルが分析対象の上部を移動し、Z 軸モーターは分析対象を移動させます。流体系は、カスタムインターフェースにより、シリンジポンプを用いてフローセルから試薬を吸引します。

## CosMx™ SMI のデータ分析

CosMx™ SMI には、クラウドベースのデータストレージ・分析ソフトウェアが付属しており、直感的なインターフェースにより、データの可視化・解釈を速やかに行うことが可能です。データ分析ツールとして、QC 正規化、次元削減、UMAP/tSNE 計算・可視化、(マーカー識別による) 細胞タイピング、空間クラスタリング (HMRF 特異的タイプ) を行う基本的なモジュールが備わっています。さらに、差次的発現、細胞隣接性、シグナル伝達経路分析、リガンド-受容体共発現、タンパク質データ分析のためのデータ分析モジュールを追加することもできます。外部ユーザーが設計したモジュールを組み込むことも可能です。

インタラクティブな総合的ビューアーでは、SMI データを様々な形で処理・可視化することにより、総合的な分析を行い、幅広い知見を得ることができます。

## CosMx™ SMI の消耗品

CosMx™ SMI に使用する以下のコンテンツを販売しています。

### RNA コンテンツ

1. Human Universal Cell Typing and Cell State : 950 種類の対象物を分析できるコアパネル、カスタム分析対象物 50 種類を追加することもできます。このハイブレックスパネルは、細胞タイピング、細胞状態・機能、細胞間相互作用、細胞シグナル伝達標的遺伝子、ホルモン活性に関する研究を対象としています。
2. Universal Add-on 50 : Universal Cell Typing and Cell State RNA パネルに加え、50 種類の対象物を分析できるパネル。
3. Mouse Neuroscience : マウス神経科学領域の対象物 1,000 種類を分析できるパネル。中枢神経系 (CNS) の基礎生物学的研究を対象とし、マウス脳の細胞タイプのプロファイリングが可能です。
4. Mouse Neuroscience Add-on 50 : Mouse Neuroscience RNA パネルに加え、50 種類の対象物を分析できるパネル。

5. Human Immuno-oncology : 100 種類の対象物を分析できるパネル。免疫系の基本的細胞タイプのプロファイリングが可能です。一般的な細胞マーカーに加え、単一細胞レベルでこれらの細胞タイプを見分けるための追加対象物も含まれています。

6. Human IO Add-on 10 : Human Immuno-oncology RNA パネルに加え、10 種類の対象物を分析できるパネル。

### タンパク質コンテンツ

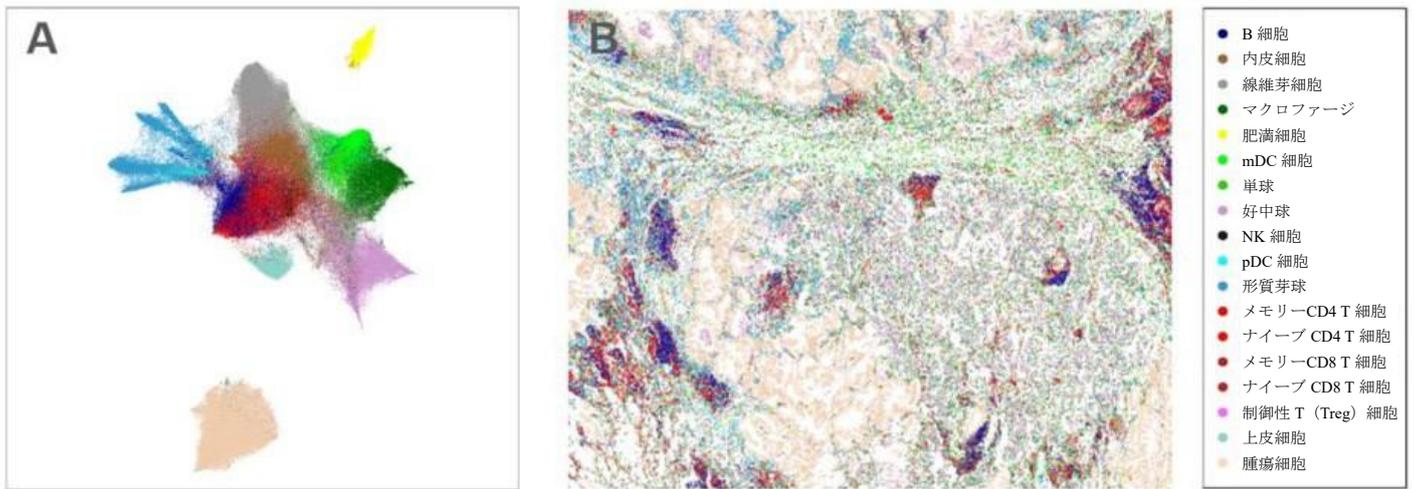
1. Human Immuno-oncology : 100 種類の対象物を分析できるパネルにより、癌の進行や免疫細胞の活性化状態-機能に重要な役割を果たす因子を検出可能です。

### 消耗品

1. 形態マーカーキット
  - ・ 神経科学用形態マーカーキット (マウス)
  - ・ 免疫腫瘍学用形態マーカーキット (ヒト)
  - ・ 核および細胞セグメンテーション用形態マーカーキット
2. FFPE および新鮮凍結 (FF) 組織検体調製キット
3. フローセルおよび可視化試薬 (トレイ)
4. バルク試薬 (緩衝剤)

### トレーニングとサポート

CosMx™ SMI をご購入いただくと、訓練を受けた NanoString 社フィールドエンジニアが現地で装置の据付と較正を行います。装置の適格性確認後、Product Application Scientist (PAS) が現地にて CosMx™ SMI プラットフォーム導入のための総合的なトレーニングを実施し、装置の日常的使用方法、実験計画、プロジェクトのコンサルテーション、データ分析について解説いたします。また、PAS は、ラボ研究者が実際の装置操作、CosMx™ プロトコールの実行方法を習得し、研究を最初から最後まで円滑に実施できるよう、実地訓練も行います。さらに、CosMx™ データ分析ソフトウェアを用いたデータ分析のトレーニングも実施し、データの処理、分析、解釈を円滑に実施できるよう支援いたします。トレーニング完了後、実験計画、装置、消耗品、ソフトウェアについてサポートが必要な場合は、NanoString CosMx™ Customer Experience Team にお問合せください。



NSCLC 組織の細胞タイプマップ。マップ上には、面積約 20 mm<sup>2</sup>の細胞切片における 135,707 個の細胞が表示されている。細胞タイプを色別に表示。 (A) UMAP 投影図 (B) 空間分解細胞タイプマップ

細胞ID	B2M	CE3E	GZMB	HLA-A	細胞ID	T細胞	B細胞	mDC	腫瘍細胞
1	0	0	1	0	1	25	50	5	15
2	4	2	0	0	2	25	2	0	10
3	2	0	0	5	3	1	0	1	130
4	1	0	0	1	4	3	0	1	150

遺伝子発現マトリックス (左パネル) と隣接細胞タイプマトリックス (右パネル) の比較

## 参考データ

このデータセットは、非小細胞肺癌 (NSCLC) の FFPE 組織を用いた 960 項目遺伝子発現アッセイの結果です。5 つの腫瘍から作製した 8 枚のスライドにおける細胞 800,000 個を分類し、異なる組織における単一細胞レベルの生物学的特性とその相互作用を調べました。細胞間コミュニケーションを可能にするリガンドと受容体を中心に、複数の組織タイプの細胞タイプデコンボリューションと細胞のシグナル伝達・細胞状態の重要な側面の双方に焦点を合わせています。

### 1. 細胞タイプピンと新たなクラスターの検出

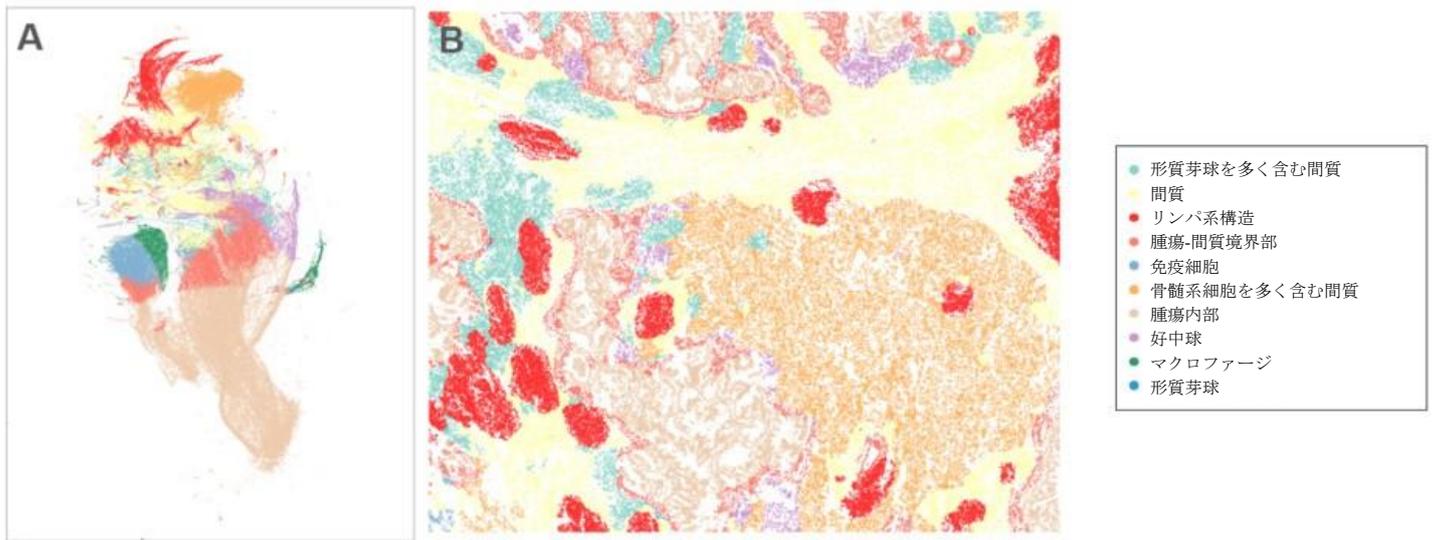
インタクトな NSCLC 組織の細胞を分類するために、参照プロファイルを用いて各細胞を既知の細胞タイプに割り当てるとともに、新たなクラスターを検出する期待値最大化アルゴリズムを実行しました。この例では、アルゴリズムにより、定義済みプロファイルに基づいて免疫細胞及び間質細胞を識別し、腫瘍細胞からなる新たなクラスターを検出しました。

### 2. 隣接細胞のクラスタリング

この空間情報から、「隣接」細胞を詳細に分析することも可能です。各細胞の直近の隣接細胞 200 個について、各細胞タイプの数をコード化することにより、「隣接細胞マトリックス」を定義することができます。また、解決したい様々な生物学的疑問に合わせて隣接細胞マトリックスを作成することもできます。例えば、「隣接」の定義の距離を増減したり、平均的遺伝子発現プロファイルや特定の細胞集団の平均的遺伝子発現プロファイルをコード化する隣接細胞マトリックスを作成したりすることができます。

### 3. 組織微小環境の表現型タイプピン

隣接細胞マトリックスを定義した後、従来の単一細胞分析を行いました。隣接細胞マトリックスの UMAP 投影図は、これらの腫瘍における多様な微小環境状態を示しています。例えば、ほぼ腫瘍細胞のみが存在する部位の周囲には、極めて低いレベルのマクロファージ・T細胞浸潤が認められる部分があります。一方、マクロファージ、好中球、形質芽球、骨髄系樹状細胞 (mDC) などの単一細胞タイプが占めている部分もあります。また、B細胞とT細胞、マクロファージとT細胞

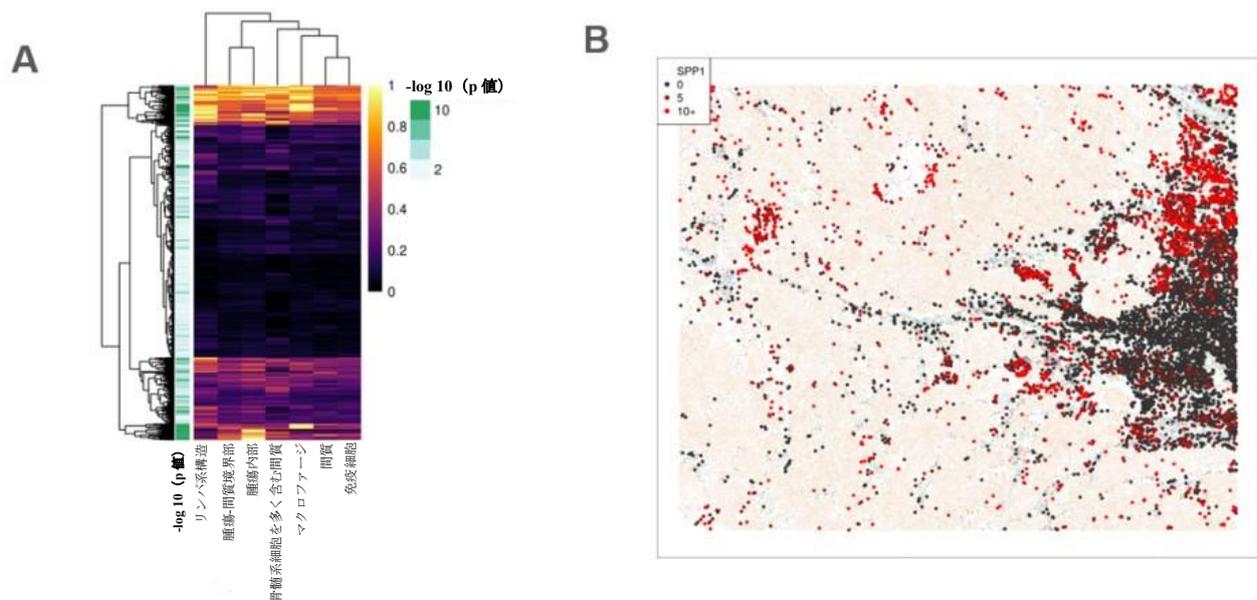


NSCLC 組織の構造マップ。隣接細胞クラスター（「ニッチ」）を色別に示す。(A) UMAP 投影図 (B) 空間分解隣接細胞クラスターマップ

胞＋形質細胞様樹状細胞 (pDC)、マクロファージと好中球＋散発的なリンパ球様細胞など、免疫細胞集団が混在している部分もあります。最後に、この隣接細胞マトリックスについてクラスタリングを行い、腫瘍微小環境を異なるニッチに分割しました。物理的空間においてニッチをプロットすることにより、これら腫瘍内の空間的構成と腫瘍間の違いを明確化することができました。

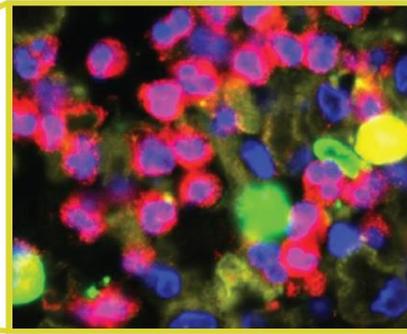
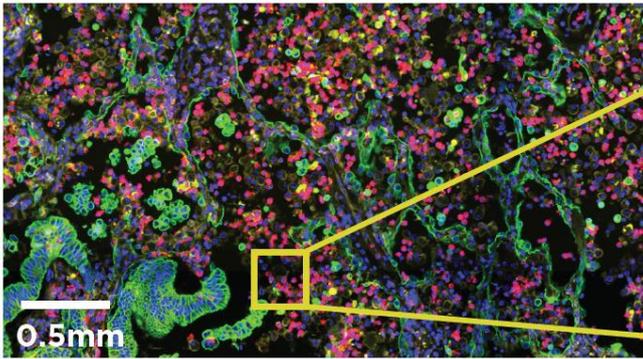
#### 4. 空間的位置に基づく各細胞タイプの差次的発現パターン

マクロファージの例に示すとおり、SMI データを用いて、空間的状况に基づき各細胞タイプの遺伝子発現パターンの変化を分析することも可能です。例えば、マクロファージは、免疫細胞が多い部分に比べ、腫瘍内部や腫瘍-間質境界部で SPP1 を多く発現しています。SPP1 の p 値は  $5 \cdot 10^{-61}$  であり、マクロファージの分極化に介在し、PD-L1 をアップレギュレートすることが報告されています (Zhang 2017)。



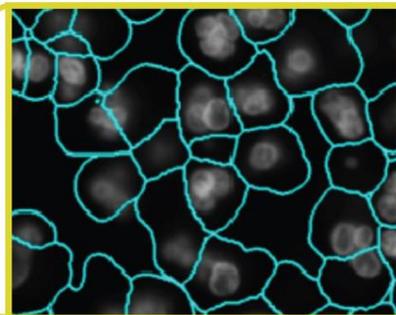
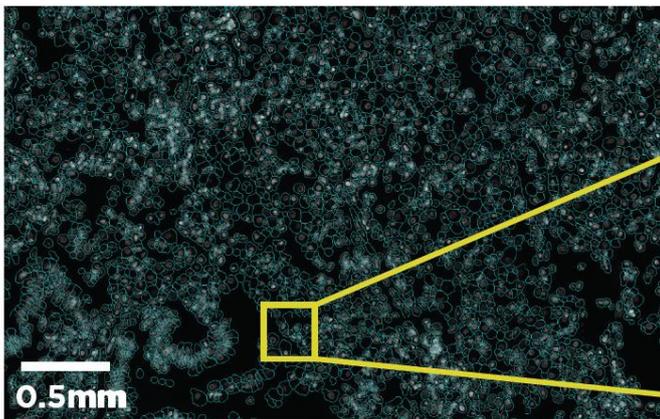
空間的状况に基づくマクロファージの遺伝子発現。(A) 全ニッチにおける遺伝子 960 個の発現のヒートマップ (B) SPP1 発現の空間マップ SPP1 発現量を色別に示す。

A



— CD3  
— DAPI  
— PanCK  
— 細胞膜マーカー

B



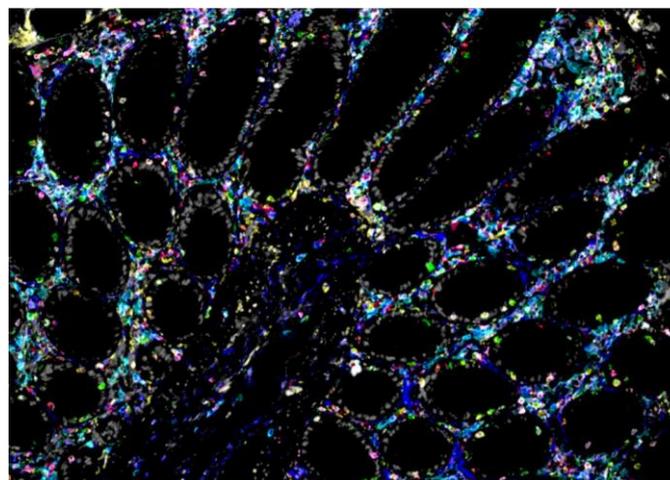
空間的状况に基づくマクロフェージの遺伝子発現。(A) 全ニッチにおける遺伝子 960 個の発現のヒートマップ。(B) SPP1 発現の空間マップ。SPP1 発現量を色別に示す。

## 5. タンパク質の可視化による正確な細胞セグメンテーション

転写産物を細胞位置に割り当てる正確な細胞セグメンテーションは、データの品質確保に不可欠ですが、3次元で境界を共有する細胞が密集しており、形態染色が不均一である組織切片では非常に困難です。CosMx™ SMI では、マルチモーダルな細胞セグメンテーションプロセスにより、細胞境界を正確に検出します。核および膜マーカー (DAPI、細胞膜マーカー/PanCK/CD3) イメージ、機械学習による細胞セグメンテーションアルゴリズム、転写産物に基づく高度なセグメンテーションを組み合わせ、形態学的にインタクタな組織における正確な単一細胞セグメンテーションを実現します。

## 6. 細胞下レベル分解能で 100 種類のタンパク質を同時に検出・定量化する

CosMx™ タンパク質アッセイ試薬は、多臓器 FFPE 組織マイクロアレイのほか、GITR、CD278、PD-L1、PD-1 などの重要な分析対象を過剰発現している細胞株を含む 45 種類のヒト FFPE 細胞株についてバリデートされています。原理の異なる複数のデータセット (Human Protein Atlas、ロープレックス IHC など) との比較により、本アッセイの感度と特異性の高さが確認されています。



— CD8  
— CD45  
— VIM  
— CD3  
— CD56  
— CD44  
— ヒストン

## 参考文献

1. Zhang, Y., Du W., Chen Z., Xiang C., Upregulation of PD-L1 by SPP1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma. *Experimental Cell Research*, 359, 449-457 (2017)

## オーダー情報

製品	説明	カタログ番号
CosMx™空間分子イメージャー	CosMx™空間分子イメージャー分析装置 (1年間のメーカー保証付き)	CMX-SMI-1Y

詳しい情報は、[nanosttring.com](https://nanosttring.com) をご覧ください。

### NanoString Technologies, Inc.

530 Fairview Avenue North  
Seattle, Washington 98109

T (888) 358-6266  
F (206) 378-6288

[nanosttring.com](https://nanosttring.com)  
[info@nanosttring.com](mailto:info@nanosttring.com)

### Sales Contacts

United States [us.sales@nanosttring.com](mailto:us.sales@nanosttring.com)  
EMEA: [europe.sales@nanosttring.com](mailto:europe.sales@nanosttring.com)

Asia Pacific & Japan [apac.sales@nanosttring.com](mailto:apac.sales@nanosttring.com)  
Other Regions [info@nanosttring.com](mailto:info@nanosttring.com)

本製品の使用目的は研究用で、診断には使用できません。

©2021 NanoString Technologies, Inc. All rights reserved. NanoString、NanoString Technologiesのロゴ、nCounter、nSolve、IO360、3D Flow、Vantage 3D、3D Biologyは、米国若しくはその他の国、またはその両方におけるNanoString Technologies Inc.の商標または登録商標です。