



APPLICATION NOTE

倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2
超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R with NSPARCJulian Gurgo, Erika De Sensi, Alvaro H. Crevenna
European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Epigenetics & Neurobiology Unit, Rome, Italy

NSPARCサイクリックイメージングによる超解像空間マルチオミクス

イメージング技術は、空間生物学、特に空間トランスクリプトミクス分野の発展を大きく後押ししてきました。細胞の転写状態を空間情報とともに *in situ* で可視化することは、疾患の理解や新たな生物学的知見の獲得につながる強力なアプローチです。さらに、高解像度イメージングとRaw画像データへの直接アクセスを組み合わせることで、データ品質を向上させるとともに、サンプルに含まれる情報を最大限に活用できます。

本稿では、NikonのNSPARC超解像共焦点イメージング技術を用い、紫外（UV）から近赤外（NIR）までの広い波長域を活用した高度な多重化ワークフローにより、組織サンプル中の単一RNA転写産物を同定した事例を紹介します。本稿で紹介するイメージングワークフローは幅広い蛍光染色法に適用可能ですが、本実験ではマルチプレックス *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて、新鮮凍結マウス脳組織における16種類のアストロサイト特異的遺伝子を解析しました。また、ROIに基づく標的イメージング、マルチモーダル空間オミクスとの統合、およびRaw画像データへのアクセスを維持した解析により、転写産物をサブセラー分解能で三次元的に可視化できることを示しました。さらに、免疫蛍光染色法と組み合わせたマルチオミクス解析により、複雑な細胞形態を持つアストロサイトにおいても、転写産物を高精度に各細胞へ割り当てられることを実証しました。

本システムは、UVからNIRまでをカバーする3D超解像空間マルチオミクスプラットフォームです。広い波長帯域、高い多重化性能、および超解像イメージングを統合することで、複雑な生物学的サンプルを高精細かつ包括的に解析することを可能にします。

キーワード：NSPARC、超解像顕微鏡、UV-NIR、サイクリックイメージング、マルチオミクス、3D イメージング

イメージングに基づく空間トランスクリプトミクス解析

本稿で紹介する顕微鏡は、UVからNIRまでの広い波長域に対応し、ポイントスキャン共焦点イメージングとNSPARC超解像共焦点イメージングを1台で実現するマルチモーダルシステムです。この構成により、多様な蛍光イメージングアッセイを単一のワークフローで柔軟に実施できます。

撮像ではまず、低倍率対物レンズ（Plan Apo λ D 10X）を用いてマウス脳全体の概観画像を取得し、詳細解析を行う関心領域（ROI）を選択するための参照画像としました（図1a）。続いて、選択したROIを高倍率対物レンズ（Plan Apo λ D 20X）、レゾナントスキャナー、およびNSPARC SPADアレイ検出器を用いて撮像しました。この構成により、個々のRNA分子由来の蛍光スポットを検出するために必要な高感度を維持しながら、広範囲を効率的に取得できます。

RNA解析には、染色、撮像、脱色を繰り返すサイクリックイメージングワークフローを適用しました。計4サイクルの解析を実施し、各サイクルではUVチャンネルで核を撮像するとともに、4つの蛍光チャンネルを用いてRNA転写産物を検出しました。システムが備えるUVからNIRまでの広いスペクトル帯域を活用することで、高い多重化性能と優れたスペクトル分離を両立し、効率的な多項目遺伝子解析を実現しました。

図1に、画像取得後の解析ワークフローを示します。取得したタイル画像をスティッチングした後（図1b）、サイクル間の画像レジストレーション（図1c）、細胞セグメンテーションおよびスポット検出（図1d,e）を行いました。その後、検出された転写産物を個々の細胞に割り当てた細胞×遺伝子マトリクスを作成し、DAPI画像とともに可視化しました（図1f）。得られたデータは、下流のバイオインフォマティクス解析に活用できます。

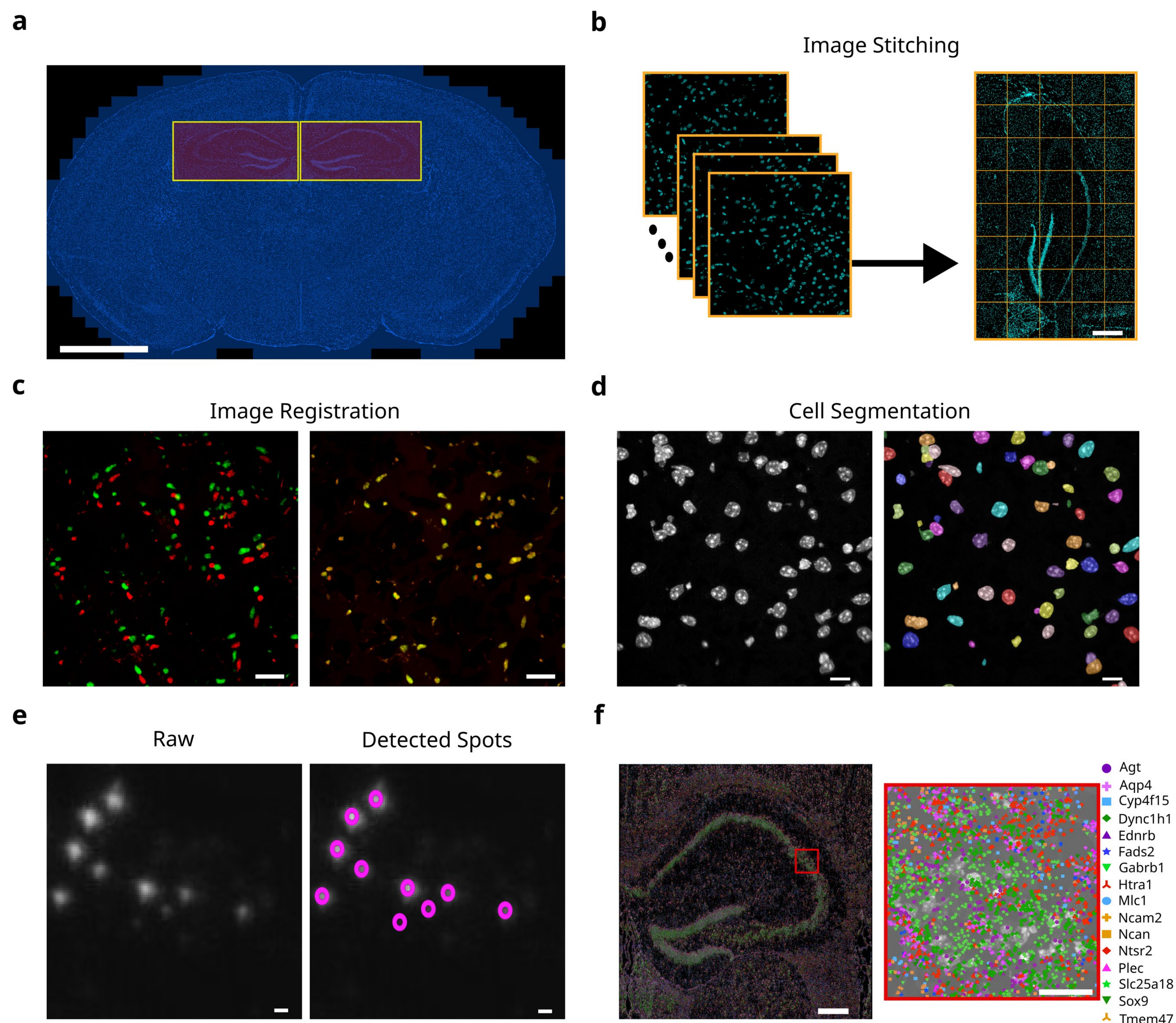


図1：NSPARC空間トランスクリプトミクスデータの画像処理。
(a) 落射蛍光イメージングで取得したサンプル全体像と 関心領域（ROI）。スケールバー：2 mm。(b) タイル画像をスティッチングし、その後の処理に用いるデータセットを生成。スケールバー：500 μm。(c) 異なるイメージングラウンドのスティッチング画像をレジストレーションし、ラウンド間の位置ずれを補正。スケールバー：50 μm。(d) Cellpose による核セグメンテーション。スケールバー：50 μm。(e) ディープラーニングベース手法による代表領域のスポット検出。スケールバー：1 μm。(f) ROIにマッピングしたデコード済み転写産物。スケールバー：左 500 μm、右 100 μm。

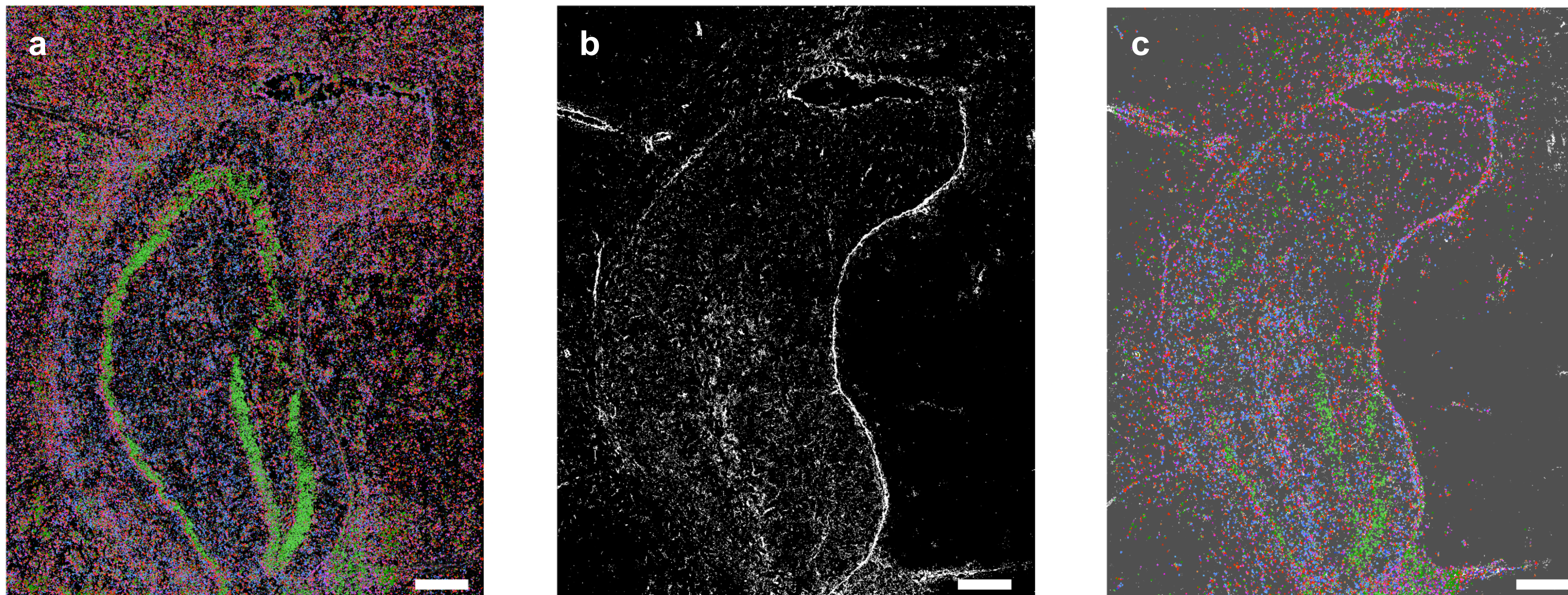


図2：免疫蛍光染色（IF）と空間トランスクリプトミクスを組み合わせたマルチオミクス。
(a) DAPI 画像に重ね合わせたデコード済み転写産物。スケールバー：500 μm。(b) GFAP 陽性細胞を示す免疫蛍光由来マスク。スケールバー：500 μm。(c) IF マスクに関連付けられたデコード済み転写産物のサブセット。同一組織切片内でタンパク質情報と転写産物情報を統合できることを示す。スケールバー：500 μm。

マルチモーダル空間オミクス

細胞の空間情報を保持したままRNA転写産物を画像ベースで検出することは、組織内の遺伝子発現状態を解析するための強力なアプローチです。しかし、個々の細胞への転写産物の割り当ては下流のバイオインフォマティクス解析に大きく依存しており、細胞セグメンテーションに起因するアーティファクトの影響を受けやすいという課題があります。

そこで本実験では、アストロサイトを正確に同定し、より信頼性の高い細胞セグメンテーションを実現するため、RNA解析に先立って標準的な免疫蛍光染色（IF）を組み込みました。サンプルは、アストロサイトマーカーであるGFAPに対する一次抗体、蛍光標識二次抗体、およびDAPIで染色しました。その後、サンプルを脱色し、標的RNAに対する遺伝子特異的プローブとハイブリダイズさせた後、染色、撮像、脱色を繰り返すサイクリックイメージングを実施しました。合計4サイクルの解析により、各サイクルで4遺伝子、計16遺伝子の発現を解析しました。

GFAPシグナルとRNAシグナルを統合して解析した結果、アストロサイト特異的遺伝子パネルの設計どおり、検出されたRNA分子の大部分がアストロサイト内に局在していることが確認されました（図2）。この結果は、免疫蛍光情報と空間トランスクリプトミクスデータを組み合わせることで、細胞種特異的な遺伝子発現を高い精度で捉えられることを示しています。

さらに、本システムの柔軟性を活かし、高倍率油浸対物レンズを用いて個々の細胞を詳細に観察しました。IF由来の細胞マスクを利用することで、転写産物を各細胞へより高い信頼性で割り当てることが可能になりました（図3a）。実際に、転写産物は細胞核から離れた位置に存在していても同一細胞に属する場合があります（図3a、矢印）、一方で細胞核近傍に位置していても別の細胞に由来する場合があります（図3a、矢じり）。このような転写産物の正確な帰属には、アストロサイト特有の複雑な細胞形態を反映したセグメンテーションが不可欠です。

以上の結果から、免疫蛍光情報を組み込んだマルチオミクス解析は、複雑な細胞形態を持つ細胞においても高精度な転写産物アサインメントを可能にし、空間トランスクリプトミクス解析の信頼性向上に有効であることが示されました。

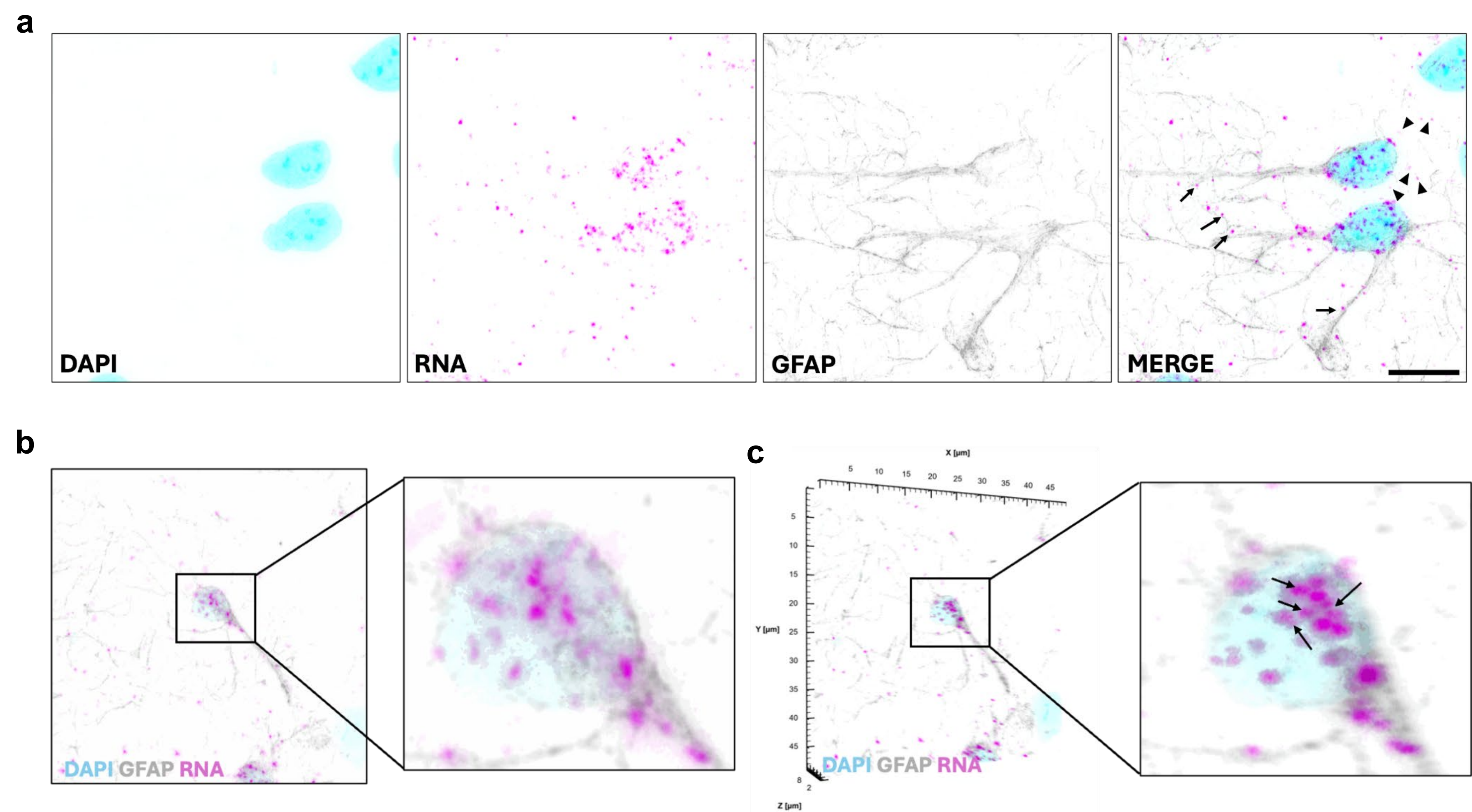


図3：NSPARCによるマルチモーダルおよび3D空間トランスクリプトミクス。

(a) アストロサイトの画像。シアン：核（DAPI）、マゼンタ：RNA転写産物（Alexa Fluor 647）、グレー：GFAP（Alexa Fluor 568）。矢印は核から離れたGFAP陽性アストロサイト突起内に位置する転写産物を示し、矢頭は核近傍にあるがその細胞に関連しない転写産物を示す。スケールバー：10 μm 。(b)アストロサイトのMaximum Intensity Projection画像、(c) 3D画像。3Dレンダリングにより、z軸方向の分離のため投影像では重なって見える個々の転写産物（矢印）を分解して可視化できる。画像はAX NSPARC検出器とPLAN APO λ D 60X Oil対物レンズ（レゾナントスキャナー、2048×2048ピクセル、6×ズーム）で取得。

NSPARC による超解像サブセルラー 3D トランスクリプトミクス

NSPARCの3D超解像イメージング性能を評価するため、選択したROIにおいて転写産物の三次元解析を行いました。サンプルには、抗GFAP抗体によりアストロサイトを標識し、すべての標的RNA分子を可視化した組織切片を用いました。DAPI、GFAP、およびRNAシグナルを含む3D画像スタックを取得することで、RNA転写産物の細胞内局在をサブセルラー分解能で三次元的に可視化しました（図3b）。拡大像では、関心領域内における転写産物の三次元的な分布を詳細に観察できます。NSPARC超解像イメージングにより、単一のXY断面内だけでなく、Z軸方向に近接するRNAスポットの分離能も向上しました（図3c、矢印）。この結果は、個々の細胞内における転写産物の空間配置をより正確に解析できることを示しています。

以上の結果から、NSPARCは転写産物をサブセルラー分解能で三次元的に可視化し、3Dサブセルトランスクリプトミクス解析を実現できる有効なプラットフォームであることが示されました。

結論

本実験で用いたプラットフォームは、ワイドフィールド（WF）、共焦点、およびNSPARC超解像イメージングを単一のワークフローに統合したマルチモーダルイメージングシステムです。広範囲の迅速なスクリーニングから高コントラストな光学セクションング、さらにはナノスケール構造の可視化まで、サンプルや研究目的に応じて最適なイメージングモダリティをシームレスに選択できます。

また、UVからNIRまでをカバーする広帯域スペクトルイメージングにより、利用可能な蛍光プローブや検出シグナルの幅が大きく広がり、複雑なマルチプレックス解析や多様な実験デザインに柔軟に対応できます。さらに、サイクリックイメージングと組み合わせることで、高い空間分解能と優れたスペクトル分離性能を維持しながら、ハイコンテンツかつ高スループットな解析を実現します。取得したRaw画像データは、主要なコミュニティ標準フォーマットで保存・エクスポートでき、MC Micro、SpatialData、Vitessce、TissUUmapsなどのオープンな解析・可視化プラットフォームとも円滑に連携可能です。

本稿で紹介したNSPARCは、UVからNIRまでをカバーする3D超解像空間マルチオミクス基盤として、高い空間分解能、多重化性能、およびデータ互換性を兼ね備えています。これにより、複雑な生物学的サンプルをこれまで以上に高精細かつ包括的に解析することが可能です。

イメージング条件

落射蛍光画像は、10倍対物レンズ（PLAN APO λ D）、励起光波長を400 nmに設定したOptical Configuration（OC）、露光時間5 msで取得しました。1 タイルあたりのスキャン領域は2048 × 2048 ピクセルです。組織全体をカバーするため、複数のタイルを撮像しました。NSPARC 画像は、20X（または60X）対物レンズ（それぞれPlan Apo λ Dドライまたは油浸）、レゾナントスキャナー、およびNSPARC SPAD アレイ検出器を用いて取得しました。ズームは3（60Xでは6）に設定しました。1 タイルあたりのスキャン領域は2048 × 2048 ピクセルです。励起光波長は405 nm、488 nm、561 nm、640 nm、730 nmを使用しました。取得前に、すべての波長でNSPARC コレクションレンズを自動アライメントしました。すべての画像は、Z-stack 7 μm 、ステップ1 μm で取得しました。照明強度は実験条件に基づいて設定しました。

謝辞

本研究は、EMBL Rome、Nikon Europe B.V.（Ezequiel Miron）、および株式会社ニコン（柴田美智太郎）による正式な共同研究の一環として実施されました。

製品情報

倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2、超解像共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R with NSPARC

ECLIPSE Ti2 倒立顕微鏡に AX/AX R 共焦点システムと NSPARC 超解像検出器を組み合わせることで、空間マルチオミクスに有用な強力なプラットフォームを構築できます。

広い視野により効率的な ROI 選択が可能となり、25 素子 NSPARC 検出器は、UV から NIR までの広いスペクトル範囲で個々の RNA 転写産物を検出し、3D 可視化するために必要な分解能と感度を提供します。



製品情報：

