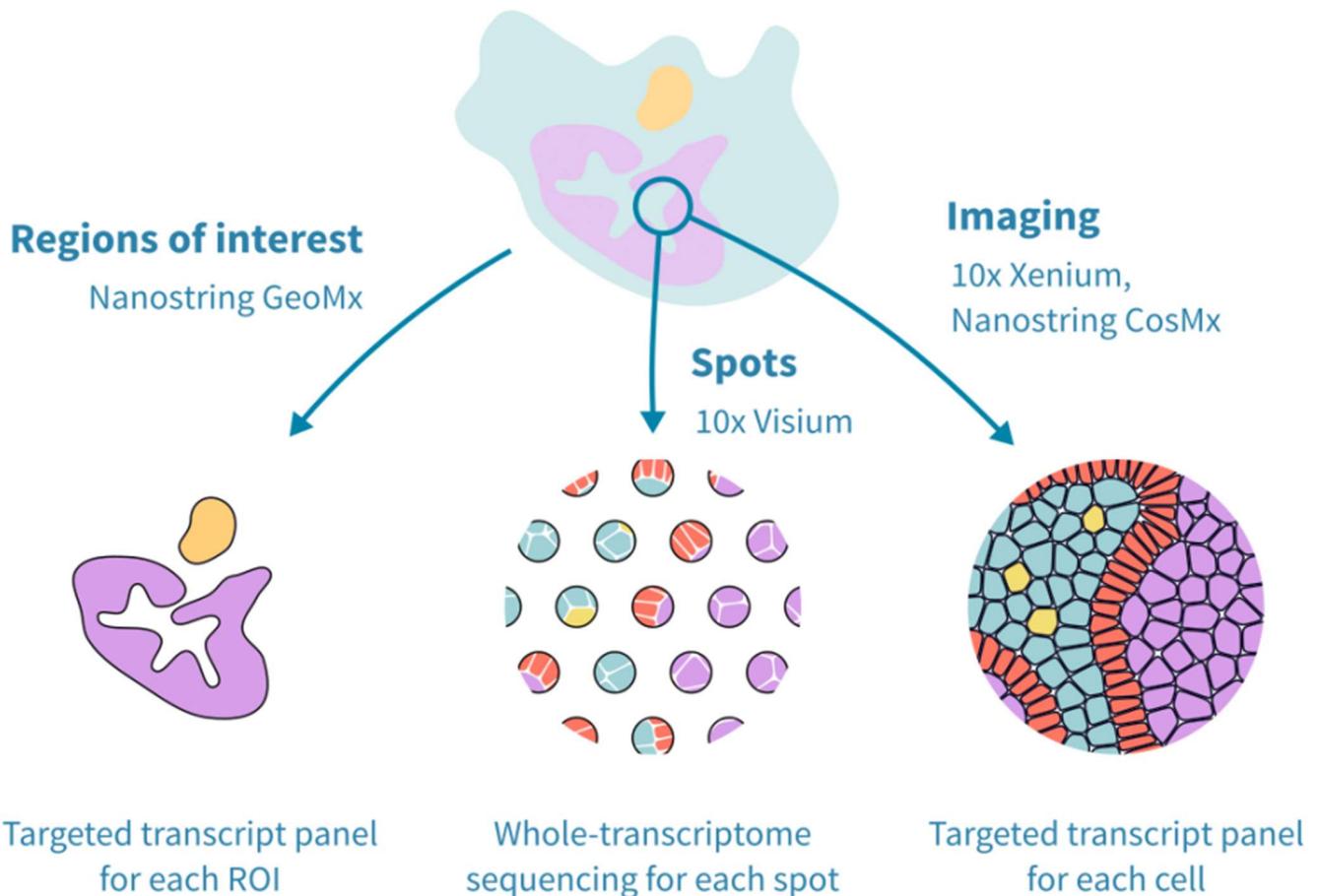


## Visium HD Spatial Gene Expression, 단일 세포 수준의 공간 전사체 분석

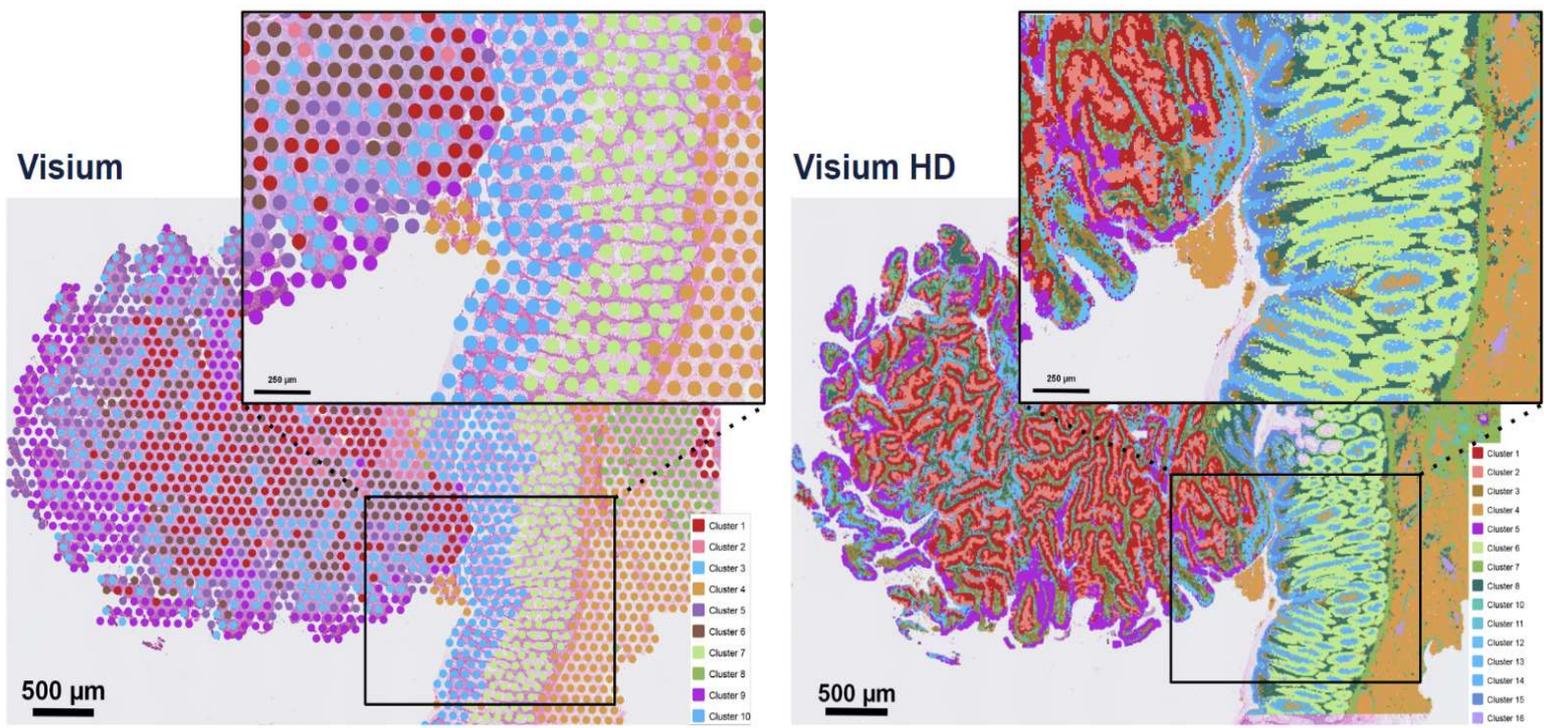
공간 전사체학(Spatial Transcriptomics)은 유전자 발현 패턴을 조직 내 공간적인 맥락에서 분석하는 기술로 생물학적 연구에서 그 중요성이 날로 커지고 있다. 이 기술은 기존의 single cell RNA-seq 과 같은 단일 세포 수준의 전사체 분석 한계를 극복하고 조직의 구조적 특성 안에서 세포 간 상호작용을 보다 정확하게 파악할 수 있게 한다. 이러한 기술을 통해 조직 병리학적 현상과 생물학적 매커니즘을 더 깊이 이해할 수 있다.

Spatial Transcriptomics, 공간 전사체 분석을 위한 기술은 다양하다. 그 중 가장 대중적인 기술은 10X Genomics 의 Visium 과 NanoString 의 GeoMx 플랫폼으로, 공간 분석의 해상도와 분자 표적 범위에 따라 그 방향성을 결정할 수 있다. 이번 기술노트에서는 10X Genomics 의 Visium 플랫폼에 대해 소개하고, 특히 Visium HD (High Definition) 기술에 대해서 자세하게 다룰 예정이다. NanoString 의 GeoMx 플랫폼에 대한 자세한 내용은 2024 년 3 월 발행된 기술노트를 참고 바란다. [1]



[2] Spatial transcriptomic technologies

Visium 플랫폼은 일정 크기로 나뉜 spot 을 기반으로 하며, 각 spot 은 대략 수십개의 세포를 포함한다. 이 공간의 전사체를 시퀀싱, 조직 내 각 spot 의 유전자 발현 패턴을 측정하고 미세 구조 이미지와 결합하여 시각화할 수 있다. 최근 출시된 Visium HD 는 이 spot 의 크기를 2 $\mu$ m 정사각형으로 빈틈없이 연속적으로 배열하여 Visium 과 다르게 spot 사이의 공백 없이 단일 세포 수준의 공간 해상도를 제공한다. 또한 Visium HD 는 Fresh frozen 조직 샘플 뿐만 아니라 FFPE, Fixed frozen 과 같은 고정된 조직 샘플에서도 활용이 가능하며 기존의 임상 샘플 기반 연구에 폭넓게 적용할 수 있으며 이를 통해 질병 연구, 치료제 개발 등의 의학 분야에서 요구하는 정밀한 분석이 가능하다.



[3] A side-by-side comparison of Visium V2 data (left) and Visium HD data (right) in FFPE human colorectal cancer, demonstrating the enhanced discovery power of whole transcriptome spatial gene expression at single cell-scale resolution.

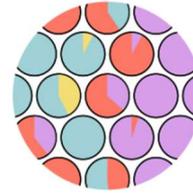
## Visium HD Spatial Transcriptomic Analysis Pre-view

Visium HD는 spot 기반의 공간 전사체 고해상도 분석 플랫폼으로 기존의 단일 세포 전사체 분석인 single cell RNA-seq 데이터와 유사한 방식의 유전자 발현 분석 패턴을 시각적으로 제공한다.

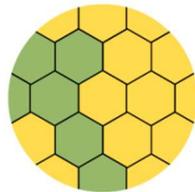
### Spatially variable genes



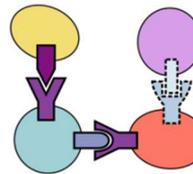
### Cell-type deconvolution



### Spatial domains



### Cell-cell communication



## [4] Spatial transcriptomic analyses

### 1. 공간 전사체 데이터 확보

조직 내 유전자 발현의 차이를 바탕으로 조직 특이적인 분자기능적 구조를 직접적으로 확인할 수 있다. 이를 통해 특징적인 유전자의 high/low regulation을 모든 조직에서 직관적으로 확인할 수 있다.

### 2. 세포 타입별 발현 패턴 확인

Visium HD는 단일 세포 수준의 해상도를 제공하지만 분석적인 시각화의 기준 등으로 인해 spot 안에 여러 개의 세포가 포함될 수 있다. 이러한 spot 안에 포함된 다양한 세포 타입별 발현 패턴을 정확하게 파악하기 위해서는 Cell Deconvolution 분석이 필요하다. 이는 기존의 single cell RNA-seq 데이터를 활용할 수 있으며, 각 spot에서의 각 세포 타입 비율을 예측하여 더욱 정밀한 분석이 가능하다.

### 3. 조직 영역별 시각화

세포 타입 비율에 따른 유전자 발현 패턴을 분석하고 이를 기반으로 조직 영역별 특성을 시각화할 수 있다. 이를 통해 시간에 따른 조직 내 발달 과정이나 병리학적 변화를 이해하는데 도움을 줄 수 있다.

### 4. 세포 간 상호작용

조직의 각 영역 안에서 인접한 세포들은 ligand-receptor 발현 수준과 함께 분석되어 세포 간 상호작용을 밝히는 데에 중요한 정보를 제공한다. 이러한 분석은 세포 간 신호전달 및 기능적 관계를 이해하는데 활용될 수 있다.

## CytAssist, Visium HD Spatial Technology

Visium HD 는 조직의 공간 전사체 분석 데이터를 확보하는 데 있어 H&E, IF staining 과 같은 분자 생물학적 이미징 기법을 활용하기에 매우 적합하다. 기존에 보관되어 있던 frozen, fixed frozen, FFPE 조직 섹션 슬라이드 또는 H&E, IF staining 이 끝난 일반 슬라이드에 Whole Transcriptome Probe 패널을 hybridization, ligation 수행한 이후, CytAssist 를 사용하면 준비한 일반 슬라이드에서 Visium HD 전용 슬라이드로 손쉽게 전사체 Probe 를 옮겨줄 수 있다. (그림 5)

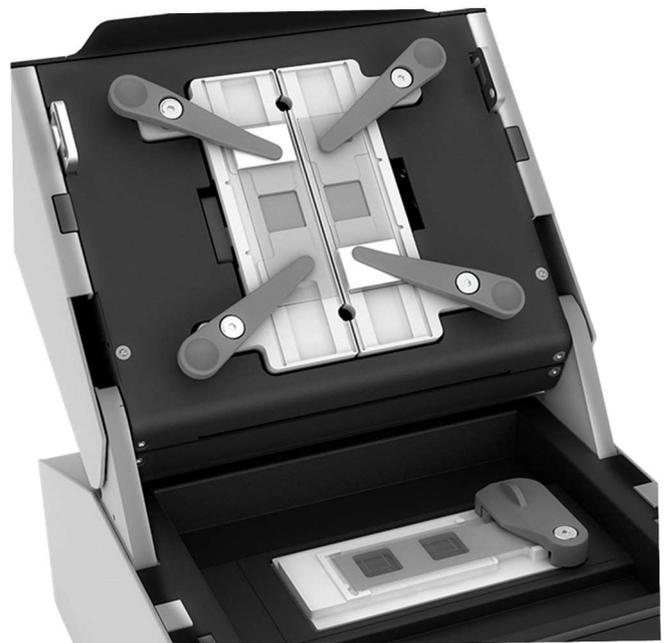


[5] Diagram of probe transfer from FFPE tissue sections on glass slides onto a Visium HD slide, facilitated within the CytAssist instrument. Tissue slides and Visium HD slides are loaded into the Visium CytAssist instrument, where they are brought into proximity with one another. Gene expression probes are released from the tissue, enabling capture by the spatially barcoded oligonucleotides present in a hydrogel on the Visium slide surface.

### Visium CytAssist

위에서 언급한 Visium CytAssist 는 연구자가 준비한 일반 슬라이드 위에 있는 전사체 Probe 를 Visium 전용 슬라이드로 이동시켜주는 장비다. Visium 플랫폼을 이용하기 위한 전용 슬라이드에 연구자가 직접 섹션을 올릴 필요성이 없어지며, 일반 슬라이드에서의 H&E, IF staining 과 같은 조직학적 기술을 활용하여 원하는 조직 위치를 사전에 선별하고 이동시킬 수 있어 편리성과 신뢰성을 높일 수 있다.

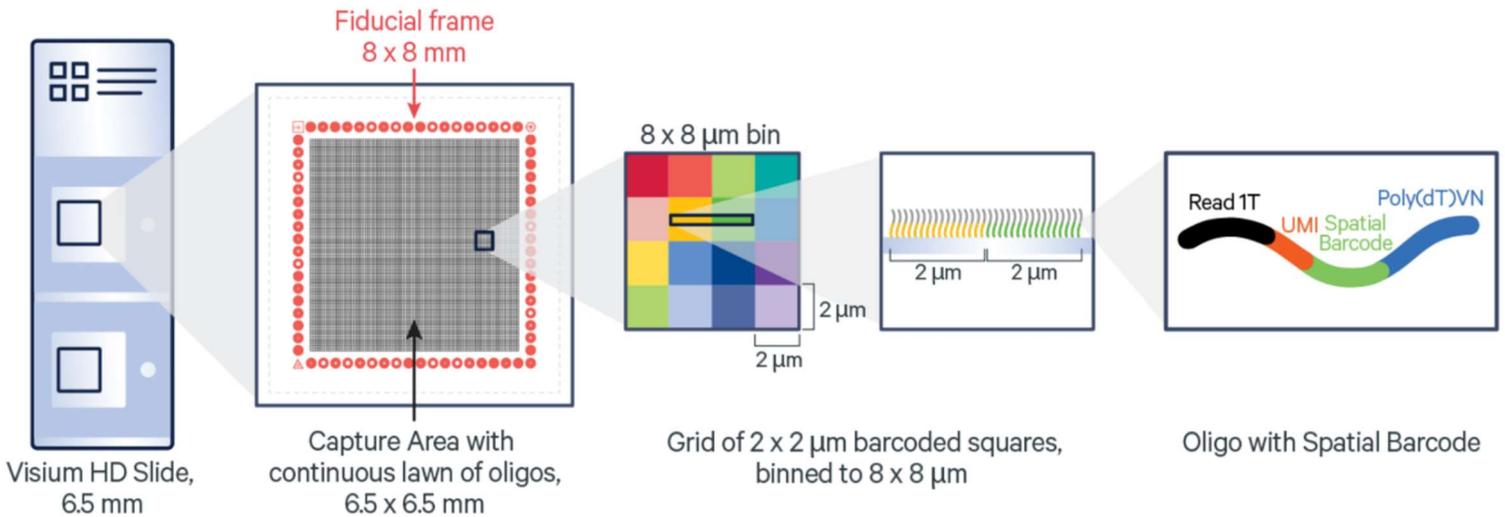
결론적으로, Visium CytAssist 는 Visium 플랫폼 전용 슬라이드에 Probe 를 전달하는 목적으로 사용되며 조직 부착, 탈파라핀화, 염색, 이미징 (H&E, IF) 과정은 일반 슬라이드에서 수행되고, Probe 수집, library 제작은 Visium 플랫폼 프로세스에 따라 진행된다.



## Visium HD Capture Platform

Visium CytAssist 를 통해 전달된 Probe 는 Visium HD 슬라이드의 oligonucleotide 에 캡처된다. 캡처 영역은 6.5 X 6.5mm 이며, 8 X 8mm 프레임 안쪽에 포함된 조직의 정보를 분석한다. 이 캡처 영역은 빈틈없이 배열된 grid 형식의 사각형이 (2 X 2 $\mu$ m bin size) 수백만개로 이루어져 있으며 각 사각형(bin) 안에는 수많은 oligonucleotide 가 연속적으로 배열되어 있다. Oligonucleotide 는 ligation probe 를 캡처하기 위한 고유한 서열인 poly(dT)를 포함하여 각각의 bin 영역을 구분하기 위한 Spatial Barcode 와 bin 영역 내 각각의 probe 를 구분하기 위한 Unique Molecular Identifier (UMI)로 구성되어 있다. (그림 6)

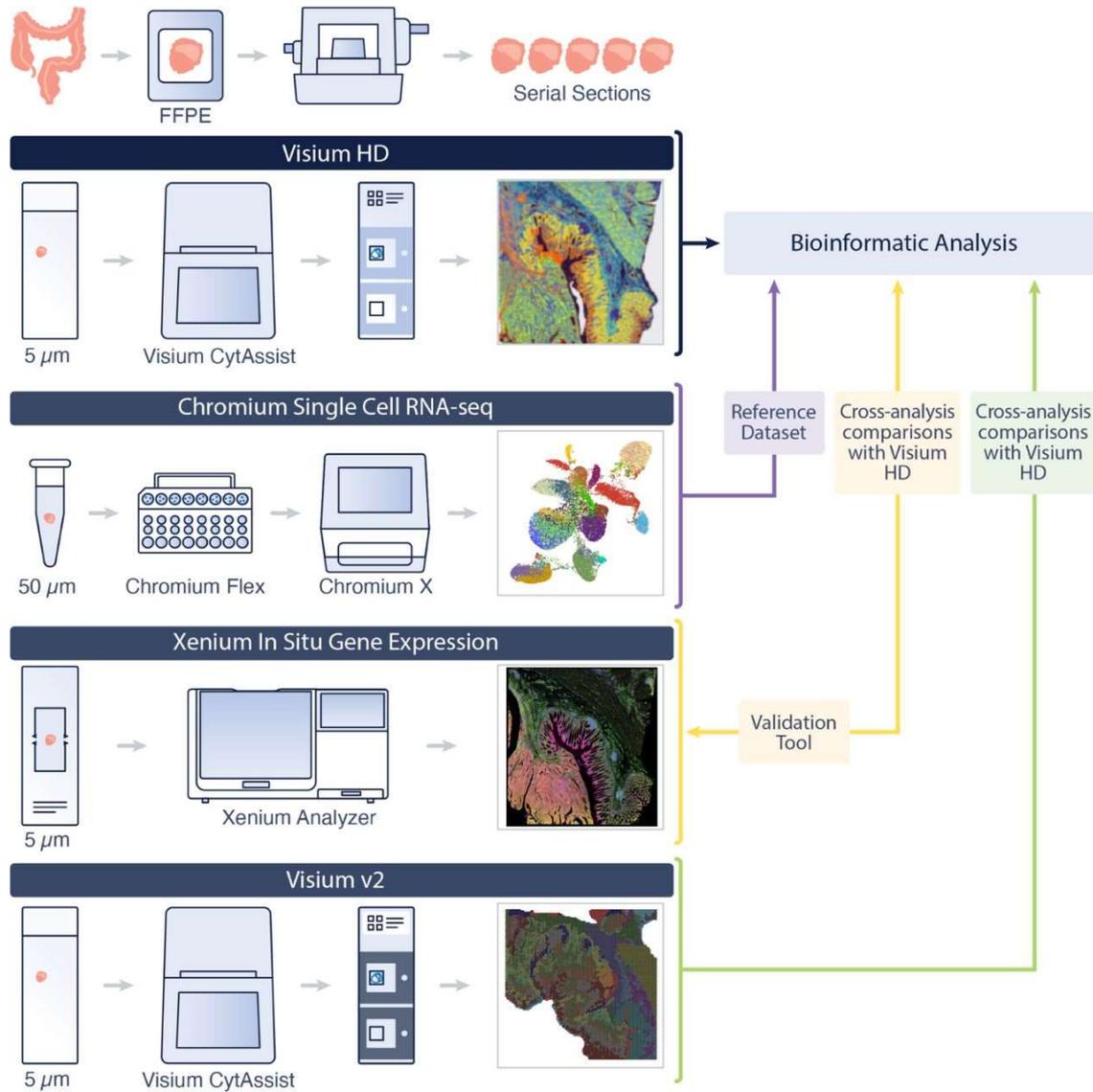
바코드 캡처까지 완료된 이후에는 Visium CytAssist 에서 슬라이드를 제거하고 수집된 Probe 로 library 를 제작, 이를 시퀀싱하여 분석한다. 바코드로 구분되어 있는 공간 전사체 데이터는 2 X 2 $\mu$ m bin size 로 제공되지만, 분석의 시각화 및 용이함을 위해 여러 개의 bin 영역을 합칠 수 있는데, 10X genomics 에서는 8 X 8 $\mu$ m (16 개의 bin) 크기로 분석할 것을 추천, 제안하고 있다. 이러한 해상도와 bin size 는 단일 세포 수준까지 충분히 조절이 가능하므로 주요 세포 유형 특성을 고려하거나 진행 세포 평균 크기에 (8~100 $\mu$ m) 따라 조직 형태를 연구자 주관적으로 유연하게 분석할 수 있다. 또한 이러한 공간 전사체 데이터는 기존 슬라이드의 staining (H&E, IF) 이미지와 오버레이가 가능하기 때문에 더욱 정확한 시각화를 통한 폭넓은 분석이 가능하다.



[6] Diagram of Visium HD slide architecture. Visium HD slides contain two 6.5X6.5mm Capture Areas with a continuous lawn of oligonucleotides arrayed in millions of 2X2 $\mu$ m barcoded squares without gaps, achieving single cell-scale spatial resolution. The data is output at 2 $\mu$ m, as well as multiple bin sizes. The 8X8 $\mu$ m bin is the recommended starting point for visualization and analysis.

## Visium HD Spatial Gene Expression Articles

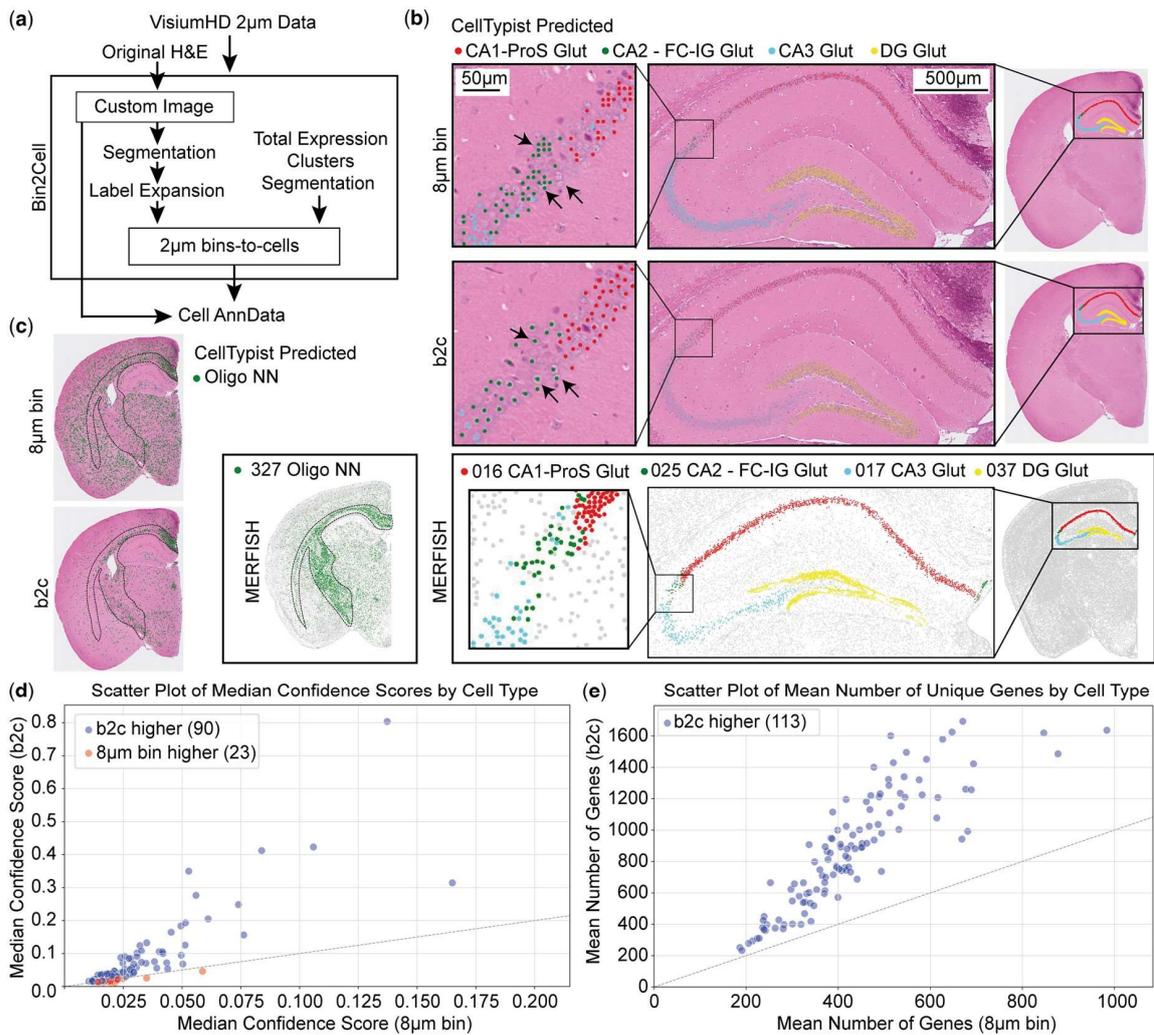
### About outline, with 10X Genomics platforms



[7] Analysis of CRC and NAT samples using Visium HD

그림 7 번은 10X Genomics Visium HD Development Team 에서 발행한 리뷰에서 인용한 것으로, Visium HD 플랫폼을 이용하여 타 플랫폼과의 상호 관계를 통한 tumor microenvironment (TME) 분석에 초점을 맞추고 있다. 여기에서는 Colorectal cancer (CRC), Normal adjacent mucosal tissues (NAT) FFPE 조직을 사용한 Visium HD 플랫폼을 소개하면서 기존 Visium 플랫폼과 비교하여 향상된 해상도를 보여준다. 또한 single cell RNA seq 데이터를 활용하여 Macrophage, T cell subtype 을 분석했고 이를 통해 종양미세환경(TME)에 대한 시각화를 선보이기도 했다. 마지막으로 이렇게 분석한 Visium HD 데이터의 검증(validation)을 위해 Xenium 플랫폼을 활용했다. 이 리뷰는 Visium HD Spatial 플랫폼의 개요부터 시작하여 10X Genomics 에서 보유하고 있는 기술력을 바탕으로 한 종합적인 퍼포먼스 소개로, 기술적인 부분에 초점을 맞추어 참고하기에 유용하다.

## About more efficient analysis



[8] Bin2cell workflow and application to mouse brain Visium HD

그림 8 번은 Bioinformatics 학술지에서 인용한 것으로, 여기에서는 Mouse 뇌조직과 Human 대장암조직에서의 Visium HD 2µm<sup>2</sup> bin size 데이터를 재구성하여 기존의 8µm<sup>2</sup> bin size 데이터와 비교하였다. 첫째로 Mouse 뇌조직은 기존에 보고된 single cell atlas 를 기반으로 cell type 을 예측, 영역을 구분했다. 해마 영역의 구분은 2µm<sup>2</sup> 데이터와 8µm<sup>2</sup> 데이터에서 모두 동일하게 나타났으나, 세포 수준에서의 8µm<sup>2</sup> 데이터는 해마 영역에서 종종 빈 클러스터로 일부 세포를 포착하지 못했고, 회색질 영역에서는 오히려 세포를 과도하게 포착하는 경향을 보였다. 또한 전체적인 Median gene 개수와 Confidence score 도 2µm<sup>2</sup> 데이터보다 낮게 확인됐다. 다음으로 Human 대장암조직에서도 동일한 single cell atlas 를 활용하여 cell type 을 예측, 영역을 구분했다. Human 대장암조직은 유사한 세포 클러스터의 밀도가 높은 특징을 가지고 있어 8µm<sup>2</sup> 데이터에서도 비슷한 경향을 보여줬으나 해상도 측면에서는 당연히 2µm<sup>2</sup> bin size 데이터가 훨씬 좋은 성능을 보여주기 때문에 몇몇의 잘못된 예측이 발견하기도 했다. 결론적으로 이 연구는 기존의 8µm<sup>2</sup> 데이터와 비교했을 때, Data downstream 재구성을 통한 2µm<sup>2</sup> 데이터가 더욱 개선된 결과를 보여준다는 점을 확인했다. 하지만 앞서 Visium HD Capture Platform 에서 언급한 것처럼 개체 특성, 세포 크기 등을 고려한 연구자의 주관적인 판단이 중요할 것으로 보인다.

## E-biogen's Visium HD Spatial Gene Expression Serv.

### Slide Information

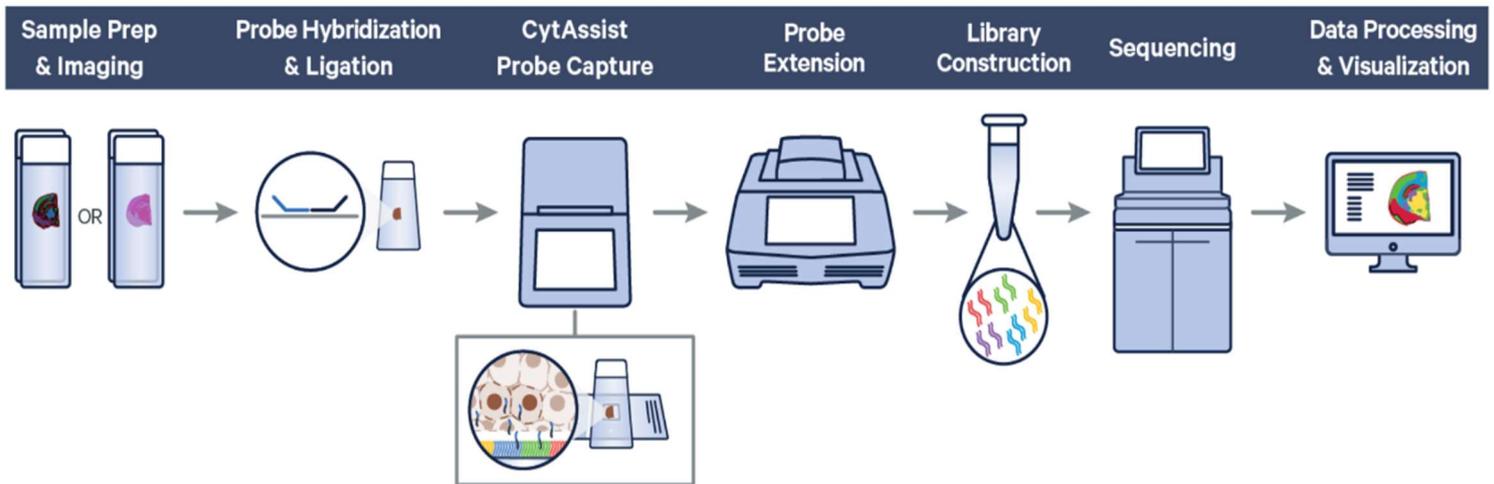
Sectioning 이후 규격에 맞는 슬라이드에 조직을 부착한다. 공기방울과 물기가 남아있지 않도록 건조하고 Section dry oven 또는 Thermal cycler 를 사용하여 incubation 한 뒤 제공한다. Visium HD CytAssist 플랫폼에 적합한 슬라이드 규격은 width 24.8 – 26.0mm, length 74.4 – 76.2mm 로, 모든 준비과정은 10X Genomics 가이드에 따른다.

조직 내 RNA 품질 확인을 위해 별도의 조직 섹션을 제공, total RNA 를 추출하여 품질을 평가한다. RNA 품질 평가 지표로는 DV200 을 사용하며, DV200 은 total RNA fragments 중 200 nucleotides 이상의 fragments 퍼센트를 나타낸다.

### Service Features

Visium HD Spatial Gene Expression Serv.는 조직 내 유전자 발현의 공간적인 패턴을 단일 세포 수준의 해상도로 분석하는 최신 기술로, 조직의 다양한 세포 간 상호작용과 미세환경을 정밀하게 파악할 수 있다. 이바이오젠은 10X Genomics 에서 제공하는 Space Ranger, Loupe Browser 분석 지원과 더불어 Seurat 분석, ExSCEA 등 자체 개발한 분석 툴을 제공하고 있다. [9]

<b>Species compatibility</b>	Human, Mouse
<b>Gene+</b>	Human ~18,000 gene, Mouse ~19,000 gene
<b>Tissue compatibility</b>	FFPE, Fresh Frozen, Fixed frozen
<b>Capture Area size</b>	6.5 mm X 6.5mm, 1 spot / slide 기준
<b>Assay</b>	Whole Transcriptome



< 참고 문헌 >

1. GeoMx, 유전자와 단백질의 Multiomics 분석을 한번에!, Technical Note, Mar. 2024, E-biogen
- 2,4. Spatial transcriptomic data analysis, Genevia Technologies
- 3,5,6. Your introduction to Visium HD: Spatial biology in high definition, Blog, 10X Genomics
7. Michelli F.Oliveira, et al. Characterization of immune cell populations in the tumor microenvironment of colorectal cancer using high definition spatilal profiling. bioRxiv (2024). doi:10.1101/2024.06.04.597233
8. Krzysztof Polański, et al. Bin2cell reconstructs cells from high resolution Visium HD data. Bioinformatics, Volume 40, Issue 9 (2024). doi:10.1093/bioinformatics/btae546
9. ExSCEA (Excel based Single Cell Expression Analysis). E-biogen. <https://www.e-biogen.com/product3.php>