

## Introduction

これからの腫瘍免疫学における大きな進歩は、腫瘍微小環境 (TME) 内における様々なタイプの細胞の空間的配置を解読するハイパラメーターツールによってもたらされるであろう。Imaging Mass Cytometry™ (IMC™) は、腫瘍微小環境 (TME) における複雑な細胞間相互作用を研究するための実績あるツールである。IMC™はCyTOF®テクノロジーを利用し、以下のタンパク質を同時に評価することができ、スペクトルの重なりやバックグラウンドの自家蛍光の影響を受けずに、40種類以上のタンパク質マーカーを細胞内分解能で同時に評価できるため、TMEの組織と機能に関するこれまでにない知見が得られる。しかしながら、いくつかのタンパク質ターゲットは、市販の抗体がほとんどない、あるいは全くないため、IMCに含めることが困難である。さらに、タンパク質ターゲットの検出によって細胞のアイデンティティは容易に解読できるが、細胞のトランスクリプトームに関する知識は、細胞機能と活性化状態の理解を向上させる。ここでは、RNA検出のための高感度かつ特異的なRNAscope™テクノロジーと、同じ腫瘍サンプル中の主要なRNAおよびタンパク質マーカーを可視化するIMCの多重化機能を組み合わせた、堅牢で信頼性の高いワークフローを紹介する。RNAscope HiPlex v2アッセイとIMCによるタンパク質検出を組み合わせ、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 腫瘍組織マイクロアレイ (TMA) におけるRNAおよびタンパク質ターゲットの発現を評価した。

## Results

### RNAscope HiPlex Flex イメージング・マス・サイトメトリー用プロトコル

FFPE ヒト肺癌 TMA は、RNAscope HiPlex Assay v2 の手順 (3-Step Procedure Overview に記載) を用いて処理した。スライドをRNAscope HiPlex 12 Positive Control Probe-Hs (ACD、Cat.No.324311) で染色し、12個のハウスキーピング遺伝子を検出した。

Figure 1. Human lung squamous cell carcinoma

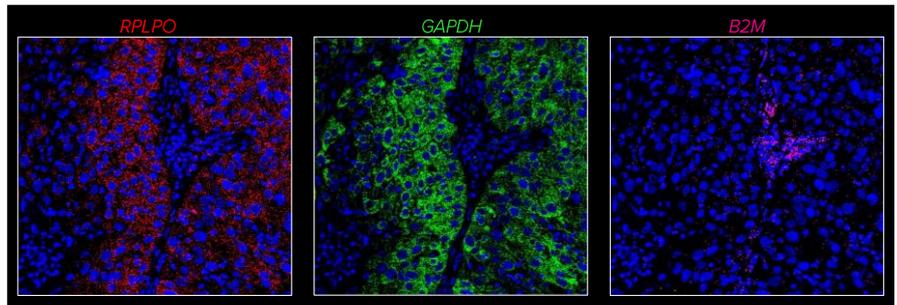
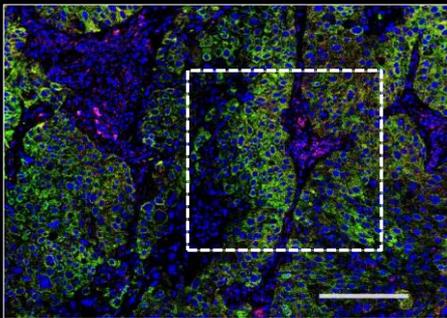
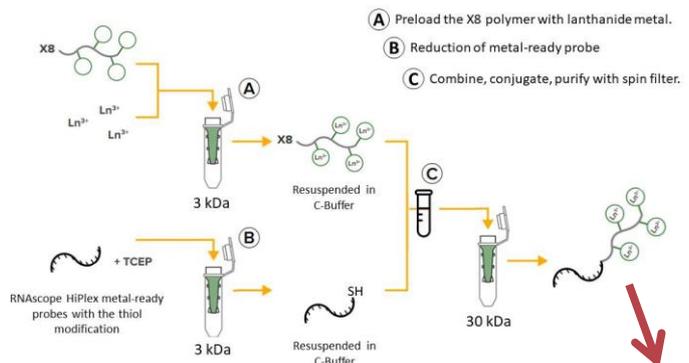


Figure 1 shows RNA staining of positive control RNA targets *RPLPO* (red), *GAPDH* (green), and *B2M* (pink). RNAscope metal-ready detection probes T11, T12, and T8 conjugated to lanthanides <sup>160</sup>Gd, <sup>172</sup>Yb, and <sup>174</sup>Yb, respectively, were used for detection of the RNA targets. Scale bar is 200 μm.

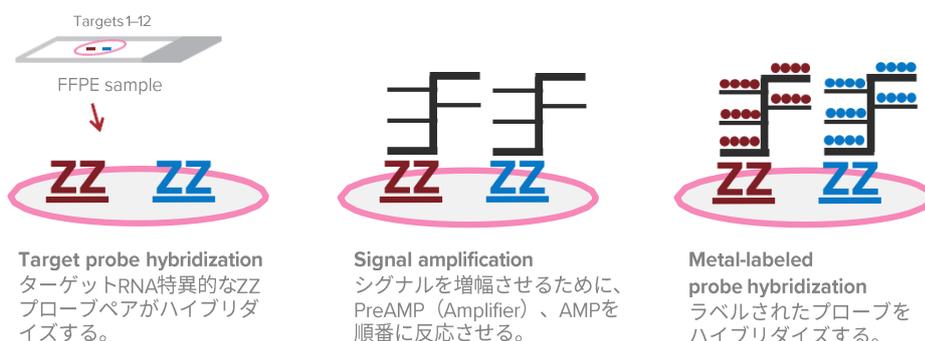
## 3ステップ手順の概要

### STEP 1- IMC用金属タグによる検出オリゴヌクレオチドの標識

RNAscope HiPlexメタルレディプローブは、チオール修飾を施したメタルタグとコンジュゲートする必要がある。ワークフローの概略図は、既存のMaxpar® Antibody Labeling User Guide (PRD002) を用いた、検出オリゴヌクレオチドの適応ステップを示す。金属標識X8ポリマーとTCEPで還元した金属標識プローブを、混合。最終的なコンジュゲーションプロダクトを30 kDaスピンフィルターで精製。

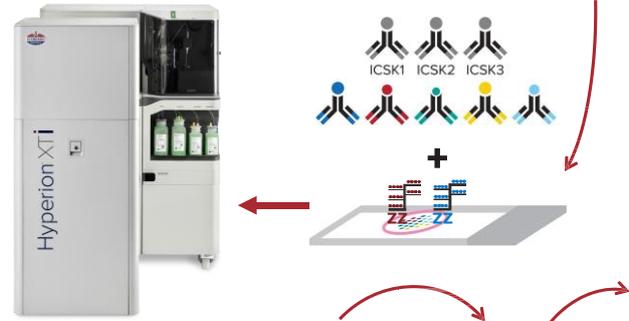


### STEP 2 – RNAscope HiPlex Flex Assay v2 を使用し、金属ラベルされた抗体のハイブリダイズ



### STEP 3 – 金属標識した抗体染色と測定

RNAscope HiPlex flexアッセイのワークフローに従った後、FFPE組織を金属標識抗体で4度で一晩染色することができる。ここでは Maxpar Human Immuno-Oncology IMCパネルキット (Standard BioTools™) を用いて、FFPE組織中の特異的タンパク質ターゲットを染色/検出した。その後、Hyperion XTi Imaging Systemを用いてIMCデータを取得した。



### ヒト肺癌組織マイクロアレイにおけるRNAとタンパク質の共検出



#### 共検出パネル: RNA targets (ACD)

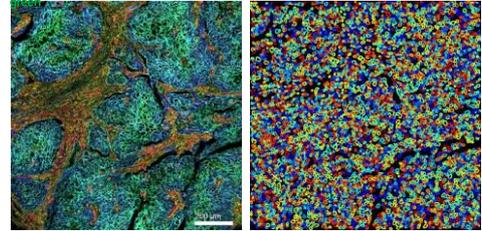
- RNAscope HiPlex 12 Positive Control Probes - Hs (ACD, Cat. No. 32431)



#### 使用した抗体パネルキット(Standard BioTools):

- Maxpar Human Immuno-Oncology IMC Panel Kit (Cat. No. 201508)
- 3つのサブパネルで構成:
  - ✓ Maxpar Human Tissue Architecture IMC Panel Kit (Cat. No. 201507)
  - ✓ Maxpar Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes IMC Panel Kit (Cat. No. 201506)
  - ✓ Maxpar Human Immune Activation Panel Kit (Cat. No. 201503)
- Maxpar IMC Cell Segmentation Kit (Cat. No. 201500)

Maxpar IMC Cell Segmentation Kit (ICSK1 – red, ICSK2 – blue, ICSK3 – green) + CellProfiler™ single-cell segmentation



### histoCAT™ analysis and cell identification:

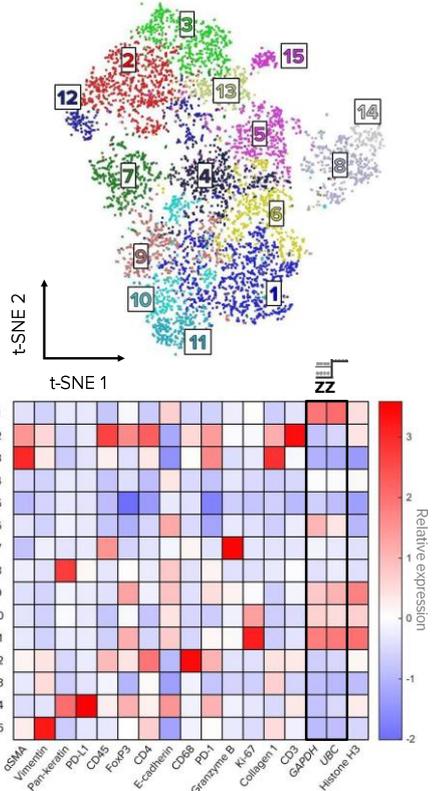


Figure 3. Transcriptionally active cells with high expression of GAPDH and UBC were found to be proliferating cancerous cells (Ki-67 and E-cadherin staining, respectively), identified in clusters 10 and 11. Other cell types were identified, such as activated T regulator cells (CD45, FoxP3, CD4) as seen in cluster 2 and PDL-1+ cancer cells (pan-keratin, PD-L1, E-cadherin) as seen in cluster 14.

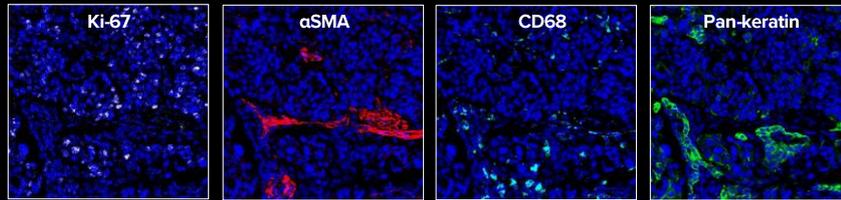
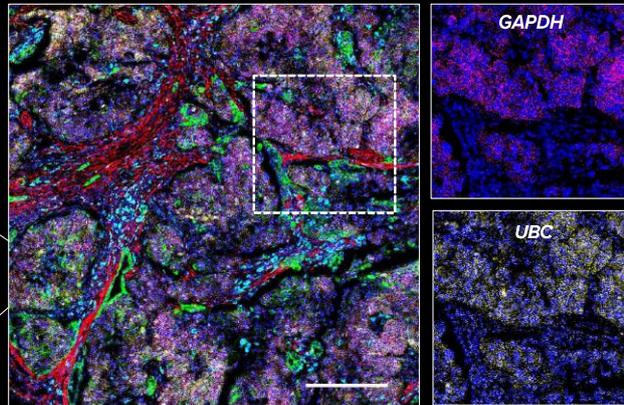
Figure 2. Human lung adenocarcinoma co-detection of RNA and protein in a single FFPE sample. Scale bar is 200 μm.



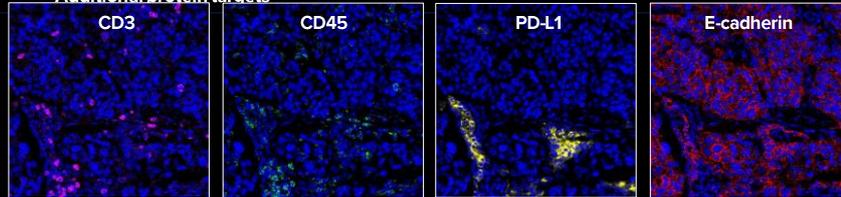
GAPDH  
UBC



αSMA  
Pan-keratin  
CD68  
Histone H3  
Ki-67



#### Additional protein targets



## Conclusion

- ここでは、同じFFPE腫瘍サンプル内のRNAとタンパク質の標的を共検出するための簡単な3ステップの手順を提供する。
- 我々の手順により、研究者は40以上のマーカーを可視化することができ、そのうち12はRNA検出に用いることができる。
- IMCとのRNA共検出を用いて、転写活性の高い増殖がん細胞を同定することができた。
- PD-L1に富むがん細胞、活性化T-reg細胞、活性化マクロファージも同定した。

## RNAとタンパク質の共検出の応用

- 一般的なFFPE組織サンプル中の細胞のマルチオミクス表現型解析により、生物学的洞察を得ることができる。
- 市販の抗体が利用できないことから、研究者はIMCにおいて以前はアクセスできなかったターゲットを同定できるようになった。例えば、メラノーマにおけるケモカインマイルスの研究<sup>2</sup>。
- 細胞のトランスクリプトームの同定は、細胞機能と活性化状態の理解を向上させる。例えば、乳癌間質におけるケモカイン発現細胞周辺のT細胞量の研究<sup>3</sup>。

### References

1. Wang, F. et al. "RNAscope: a novel *in situ* RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." *The Journal of Molecular Diagnostics* 14 (2012): 22–29.
2. Hoch, T. et al. "Multiplexed Imaging Mass Cytometry of the chemokine milieu in melanoma characterizes features of the response to immunotherapy." *Science Immunology* 7 (2022): eabk1692
3. Schulz, D. et al. "Simultaneous multiplexed imaging of mRNA and proteins with subcellular resolution in breast cancer tissue samples by mass cytometry." *Cell Systems* 6 (2018): 25–36.