

단일 세포 전사체 분석과 공간 전사체학 분석의 필요성: Brain 의 complexity 해독하기

뇌는 가장 복잡한 조직 유형중 하나이며 독특한 기능적 연결성을 나타내는 매우 다양한 세포유형으로 구성되어 있다. 단일 세포 전사체 분석 기술은 조직에서 분리된 개별 세포의 전사체의 발현을 분석함으로써 뇌의 다양한 세포 유형을 효과적으로 분석할 수 있다. 그러나 단일 세포 전사체 분석 방법은 조직을 세포 상태로 해리해야 하기 때문에 조직 내 세포간 상호관계가 손실되며 공간적 맥락이 부족하여 세포 유형의 다양한 구성이 개별 뇌 영역에서 어떻게 특정 기능을 생성하는지, 각 개별 세포가 어떻게 연결되어 기능 단위를 형성하는지에 대한 포괄적인 이해가 불가능하다.[1] 반면, 공간 전사체 분석 방법은 조직을 세포 상태로 해리하지 않기 때문에 공간 정보를 유지하면서 조직 내 수천개의 세포에서 유전자의 발현을 분석할 수 있다. 이 기술노트에서는 단일 세포 및 공간전사체 분석이 뇌 연구에 어떻게 활용되고 있으며, 각 기술의 한계와 향후 방향에 대해서 기술하고자 한다.

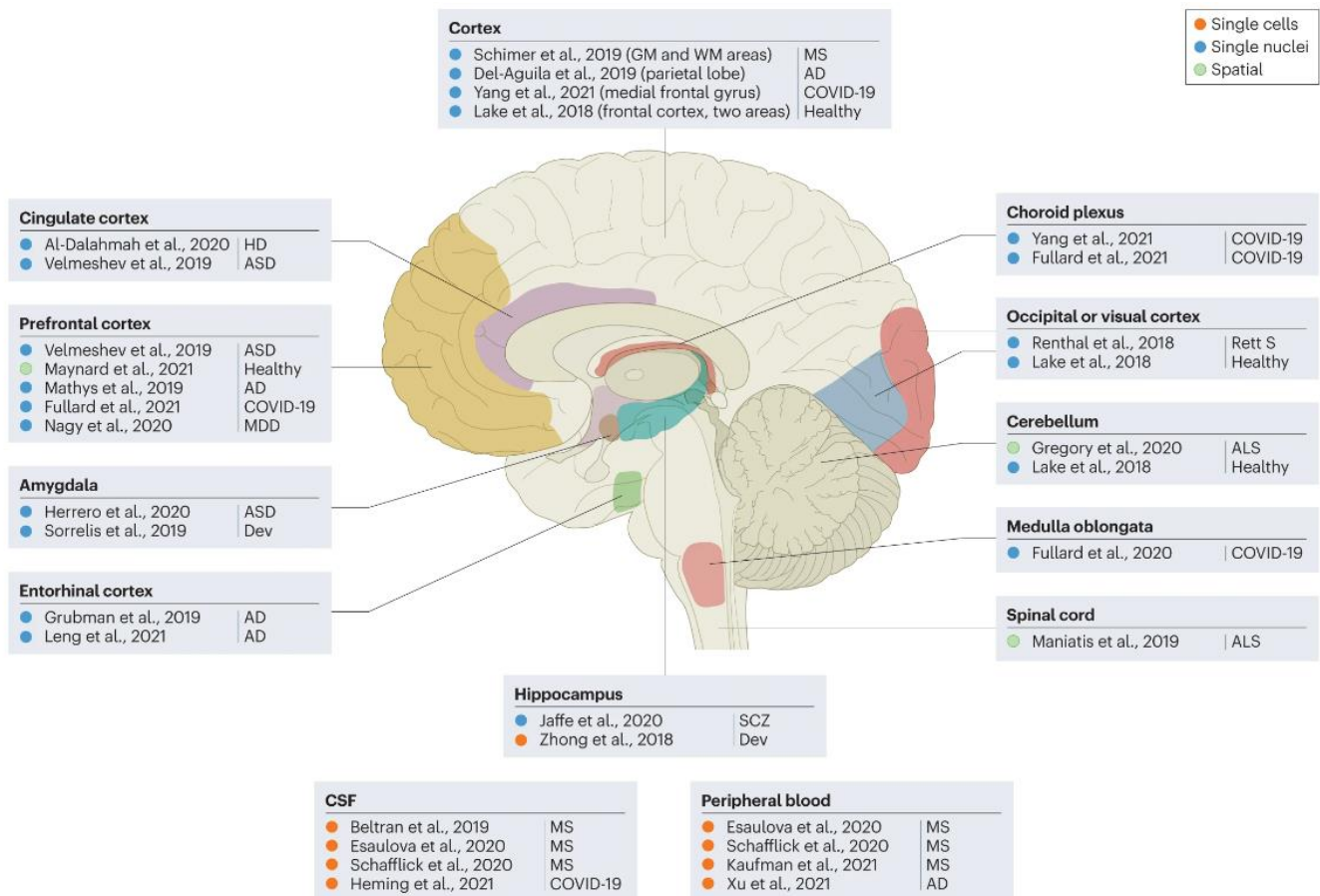


그림 1. Single-cell RNA-sequencing, single-nuclei RNA-sequencing and spatial transcriptomics studies reveal cellular and molecular heterogeneity in human neurological disorders [2]

Single-cell technology

NGS 기반의 한 단일세포 전사체 분석 기술은 2009 년에 처음 발표되었으며, 이는 현미경을 이용하여 마우스 난모 세포를 수동으로 분리하여 mRNA 의 발현을 분석한 것이었다.. 이후 RNA 검출을 위한 UMI, 세포 바코드, 세포 포획, 실험 워크플로우의 최적화, 분석 방법 등 단일세포 전사체 분석을 위한 다양한 기술이 개선되고 발전해 왔다. 이러한 발전은 2015 년에 scRNA-Seq (Drop-Seq)방법이 도입되면서 가속화되었으며, 이 기술은 snRNA-Seq 에도 적용될 수 있다. snRNA-Seq 은 scRNA-seq 적용이 어려운 시료에 대해 대안을 제공하며, 세포 다양성 분석에 유용하다. 두 기술은 각각의 장단점이 있기 때문에 연구 목적에 따라 적절한 선택이 필요하다. 특히,snRNA-Seq 의 가장 큰 장점은 냉동 보존 조직이나 뉴런과 같이 온전한 상태로 세포를 분리하기 어려운 시료에도 쉽게 적용할 수 있다는 점이다. 반면에 snRNA-Seq 은 핵 내의 pre-mRNA 만 분석할 수 있기 때문에 세포질 내 전사체는 분석하지 못하는 한계가 있다. 그 외의 장단점은 표 1 에서 확인할 수 있다.

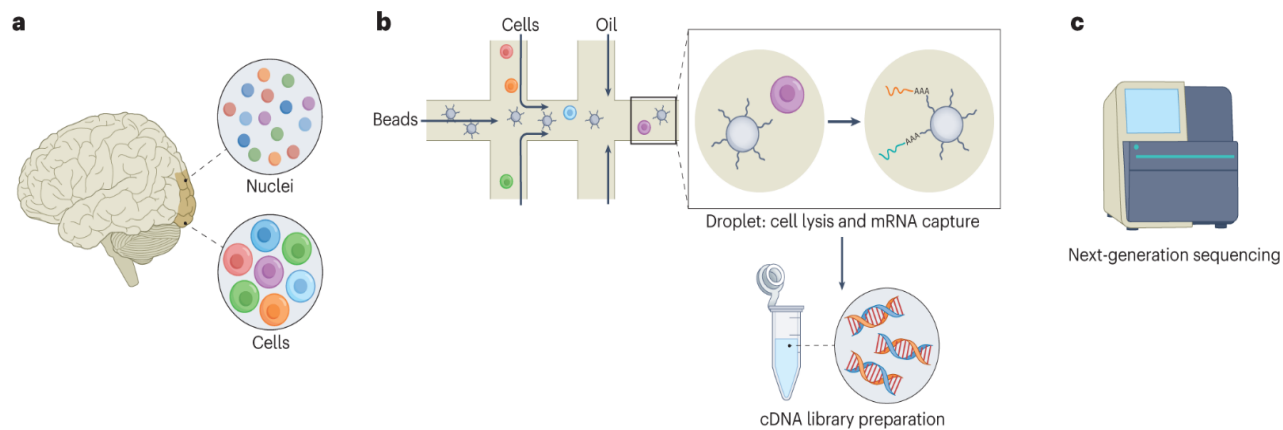


그림 2. Experimental pipeline of a droplet-based single-cell RNA sequencing in a nutshell. [2]

	Single cell RNA-Seq	Single nucleus RNA-Seq
Pros	• Captures cytoplasmic and nuclear transcripts • Enhanced capture of immune cells for disease studies • Large number of datasets have been generated	• Can be used on archived samples (fixed or frozen) • Improved capture of hard to dissociate or fragile cells
Cons	• Tissue needs to be fresh • Dissociation induces stress response which can impact data interpretation • Biases toward cells that survive dissociation process	• Depletion of immune cells • Capture of mostly unspliced pre-mRNA

표 1. Comparing information from scRNAseq vs snRNAseq [3]

Single-cell technology in neuroscience

단일세포 전사체 분석 기술의 발달로 뇌 연구는 빠르게 발전하였으며, 다양한 분석이 가능해졌다. 예를 들어, 새로운 세포(novel cell) 유형이나 아형(subtype) 식별을 하거나, 희귀 세포의 population 을 이해하는 연구가 가능하다. 또한 뇌의 진화에 대한 인사이트를 제공하거나, 외부 자극에 따른 세포 상태 변화의 특성을 분석하는 등 다양한 연구에 활용될 수 있다. 분석방법의 발전으로 인해 조직 혹은 기관 내 세포 상태에 대한 스냅샷을 제공할 뿐만 아니라, 세포의 다이내믹 프로세스에 대한 특성화도 가능해졌다(그림 3).

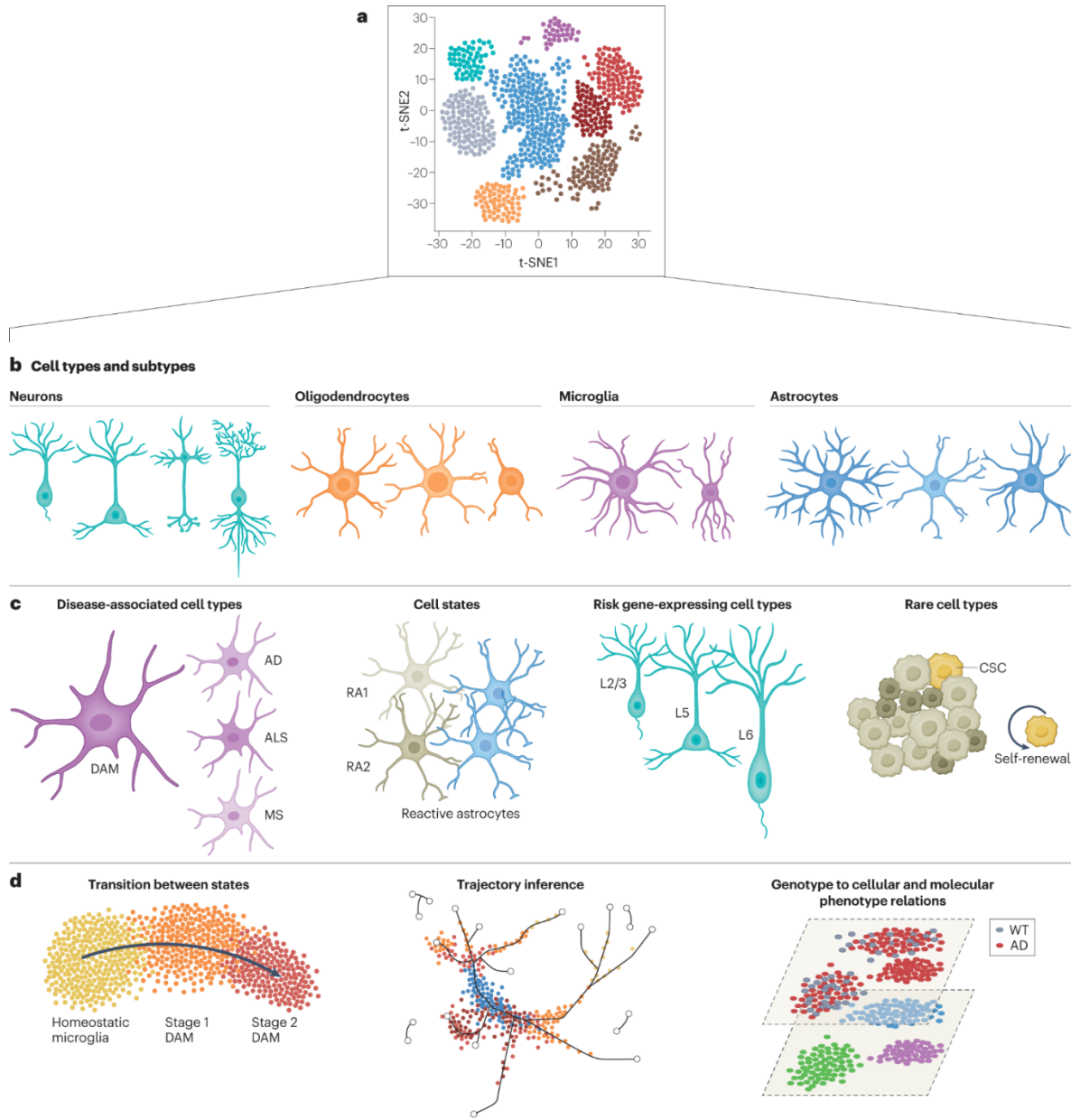


그림 3. High-dimensional single-cell RNA sequencing data can be visualized by using dimensionality reduction algorithms to reveal cell clusters [2]

단일세포 전사체 분석은 다양한 영역의 조직 분야에서 수많은 정보들을 얻을 수 있게 했는데, 예외적으로 뇌는 신경세포의 미엘린(myelin)이 분석에 영향을 끼치기도 한다. 미엘린은 신경 축삭(neuronal axons)에 존재하는 단백질로 신경 세포 전반에 전기 자극을 전달하는 역할을 한다. 미엘린은 발달 과정에서 양이 증가하며, 성인의 뇌는 배아의 뇌보다 더 많은 미엘린을 포함하고 있다.

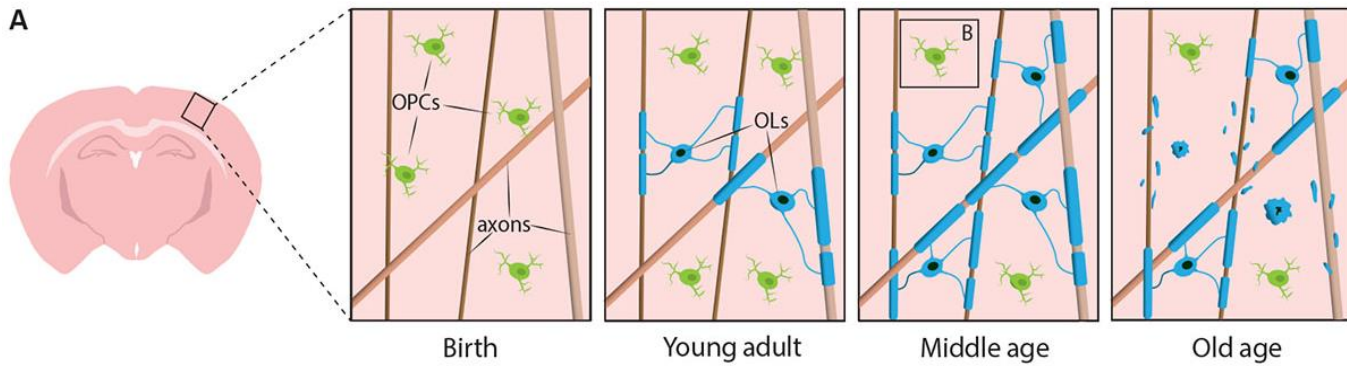


그림 4. Oligodendrocyte and myelin dynamics in the mammalian cortex throughout life [4]

미엘린에는 astrocyte 나 oligodendrocyte 와 같은 비신경세포에서 발현되는 유전자들이 포함될 수 있기 때문에 각 세포의 유전자 발현 양상이나 특성을 정확히 이해하는 데 방해가 될 수 있으며, scRNA-seq 을 진행하기 위한 Cell QC 진행 시, trypan blue 에 염색되어 Cell viability 측정에 큰 장애물이 되기도 한다. 그렇기 때문에 뇌를 이용한 단일세포 전사체 분석을 효과적으로 진행하기 위해서는 미엘린 제거가 필요하다. 아래의 표에서는 뇌에서 미엘린을 제거하는 방법에 대한 프로토콜을 확인할 수 있다.

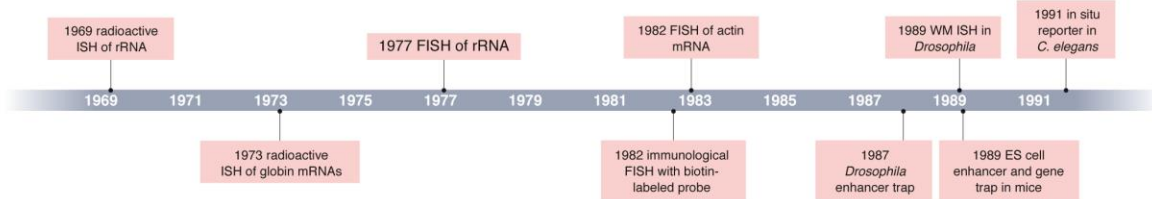
Method	Considerations	Publication/Protocol
Density gradient	Requires large sample input, as significant cell loss is expected	• Nguyen, H. X., Beck, K. D., & Anderson, A. J. (2011). • Nikodemova, M., & Watters, J. J. (2012). • Del-Aguila et al (2019).
Myelin removal kit	Requires large sample input	• Isolation of Nuclei for Single Cell RNA Sequencing & Tissues for Single Cell RNA Sequencing • Miltenyi Myelin Removal Beads
FACS	Useful when trying to enrich for specific cell types and cleanup at the same time Requires large sample input	• Pan, J., & Wan, J. (2020)

표 2. Myelin Removal method

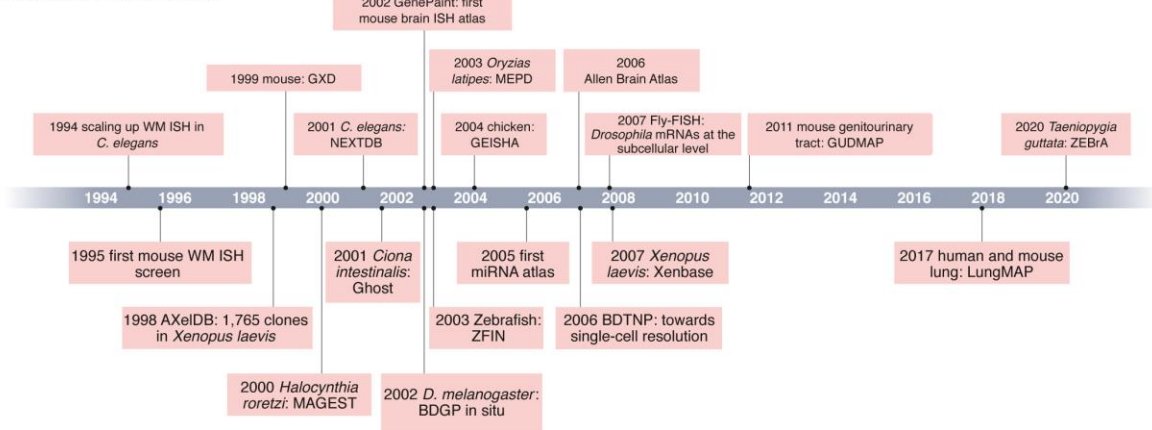
Spatial transcriptomics technology

공간 전사체 분석 기술은 조직 단면에서 유전자 발현을 직접적으로 시각화 할 수 있는 강력한 도구이다. 이 기술은 조직미세환경이 유전자 발현에 어떻게 관련되어 있는지, 혹은 어떤 영향을 미치는지 분석이 가능해졌다. 단일세포 전사체 분석은 조직을 세포단위로 해리하기 때문에 공간 정보를 상실하는 반면에 공간 전사체 분석은 공간 정보를 파괴하지 않고 조직내 세포의 위치가 유전자 발현에 미치는 영향을 파악하여, 복잡한 생물학적 퍼즐에서 누락된 공간 정보를 제공할 수 있다.

a Major events in evolution of prequel techniques



b Major prequel WM ISH atlases



c Major events in evolution of current-era techniques

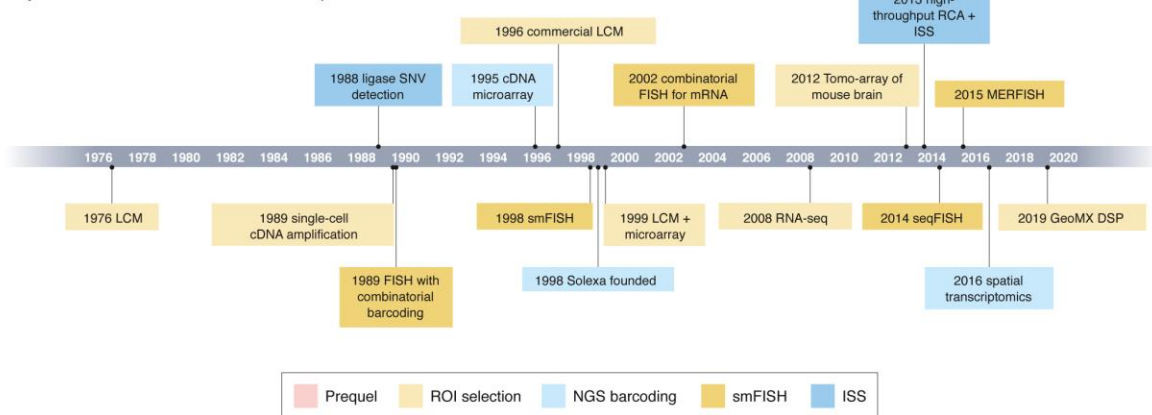


그림 5. Timelines of major events [5]

최근의 공간 전사체 분석은 주로 많은 수의 유전자에 대한 공간적 맥락 또는 전체 전사체의 유전자 발현을 정량화 하는 것을 의미한다. 그러나 지금의 공간 전사체 분석 방법은 약 55 여년전 조직 단면에서 개별 유전자를 직접 시각화 하는 ISH 방법이 개발되면서 시작되었으며, smFISH(single-molecule fluorescent in situ hybridization)의 개발로 처리량은 점차 증가했다. 2016 년에 10X genomics 사에서 개발한 Visium 제품을 시작으로 다양한 제품이 상용화되어 획기적으로 발전했으며, 2020 년에 Nature Method 에 올해의 기술로 선정되었다.

Spatial Transcriptomics 중 상용화 된 기술을 몇 가지 소개하고자 한다. 첫번째 방법은 조직에서 관심 영역(Region of Interest, ROI)을 선택한 후, 해당 영역을 레이저로 미세 절단(microdissection)하여 bulk RNA-Seq 혹은 scRNA-Seq 방법으로 분석하는 것이다. 이와 유사한 방법으로는 Nanostring 의 GeoMX DSP 기술이 있다. 표적 유전자 probe 를 hybridization 시킨 뒤 관심영역(ROI)를 선택하여 UV 조사하여 probe 에 부착되어 있는 바코드를 절단한 후, NGS 방법을 통해 분석한다. 이를 통해 Human 기준 18,000 개 유전자를 정량화 할 수 있다.

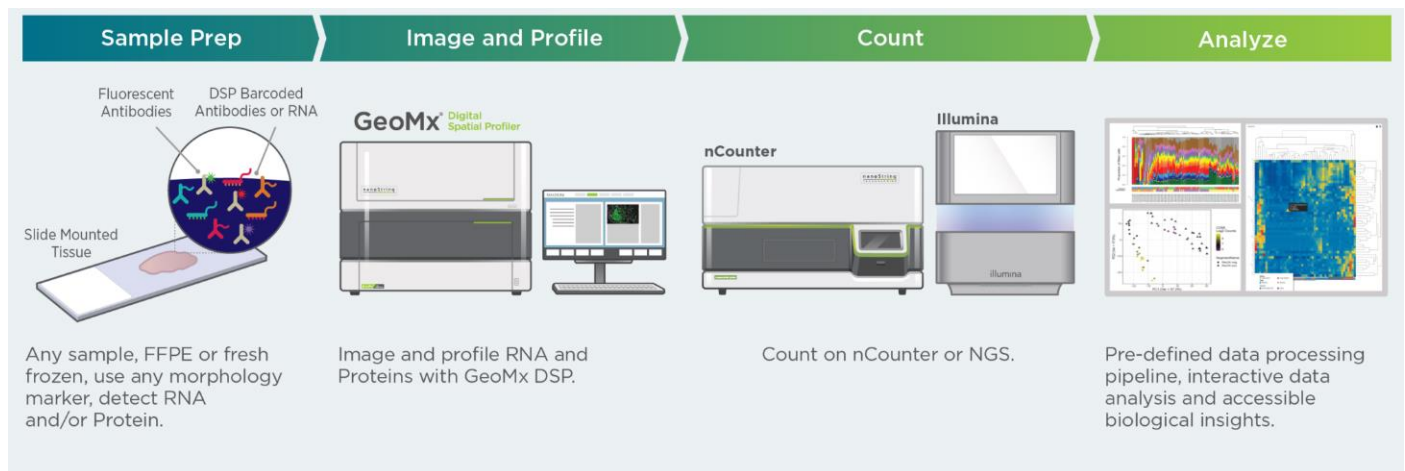


그림 6. GeoMx DSP Workflow.[6]

두번째는 spatial barcoding 을 NGS 로 분석하는 방법이다. 이 방법을 활용한 대표적인 상용화된 기술은 10X genomics 사의 Visium 이다. Visium v2 는 6.5 mm x6.5 mm 정사각형내 원형 spot 에 있는 전체 유전자의 발현량을 spatial barcoding 으로 확인 할 수 있는 기술이다. 초기 Visium v2 는 Spot 의 지름이 55 um 로 하나의 spot 에 수십개의 세포를 포함하여 분석 하는 단점이 있었으나, 최근 출시된 Visium HD 는 조직내 빈 공간 없이 single cell 수준으로 전체 유전자를 분석할 수 있게 되었다.

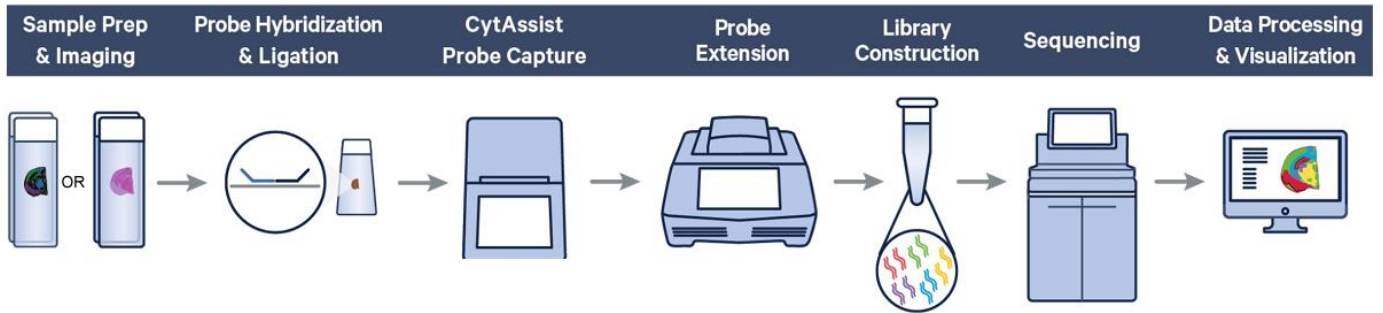


그림 7. Visium HD Spatial Gene Expression assay workflow[7]

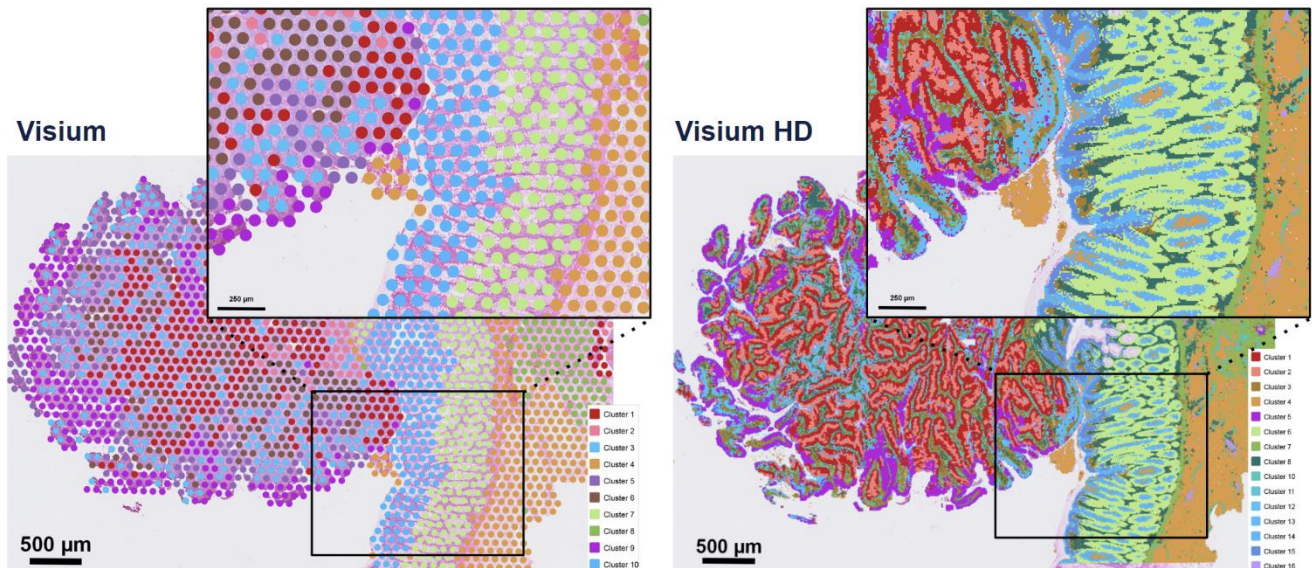


그림 8. A side-by-side comparison of Visium v2 data (left) and Visium HD data (right) in FFPE human colorectal cancer, demonstrating the enhanced discovery power of whole transcriptome spatial gene expression at single cell-scale resolution.[8]

마지막으로 소개할 방법은 In situ sequencing (ISS)이다. ISS 방법은 단일 세포 내에서 표적 유전자의 발현을 probe 형식으로 확인할 수 있다. 형광 Probe 를 hybridization 후, 증폭 및 이미지, 제거과정을 연속적으로 수행하여 NGS 없이도 단일세포 해상도에서 수천개의 유전자 발현을 검출할 수 있는 기술이다. 이 방법을 활용한 상용화된 기술로는 10x genomics 의 Xenium 과 Nanostring 사의 CoxMx SMI 가 있다.

Spatial transcriptomics technology in neuroscience

신경과학 분야에서 공간 전사체 분석 기술은 다양한 뇌 영역의 세포 지도를 생성하는데 활용되며, 신경회로 연구, 외부 자극에 대한 분자 및 세포 반응 조사, 정상 뇌와 질환 뇌의 차이를 특성화 하는데 사용된다. 더 나아가 점점 더 복잡한 생물학적 질문을 탐구하는데 에도 이 기술이 적용되고 있. 예를 들어, 신경회로는 같은 영역 또는 뇌의 다른 영역에 위치한 별개의 세포들 사이에서 어떻게 구성되어 있는지, 각 세포 유형이 다양한 외부자극에 어떻게 반응하는지, 그리고 정상 뇌와 질환 뇌의 공간을 구성하는 세포 간에는 어떤 차이가 있는지 등을 연구하는 다양한 신경생물학 맥락에서 공간 전사체 분석기술이 활용되고 있다.

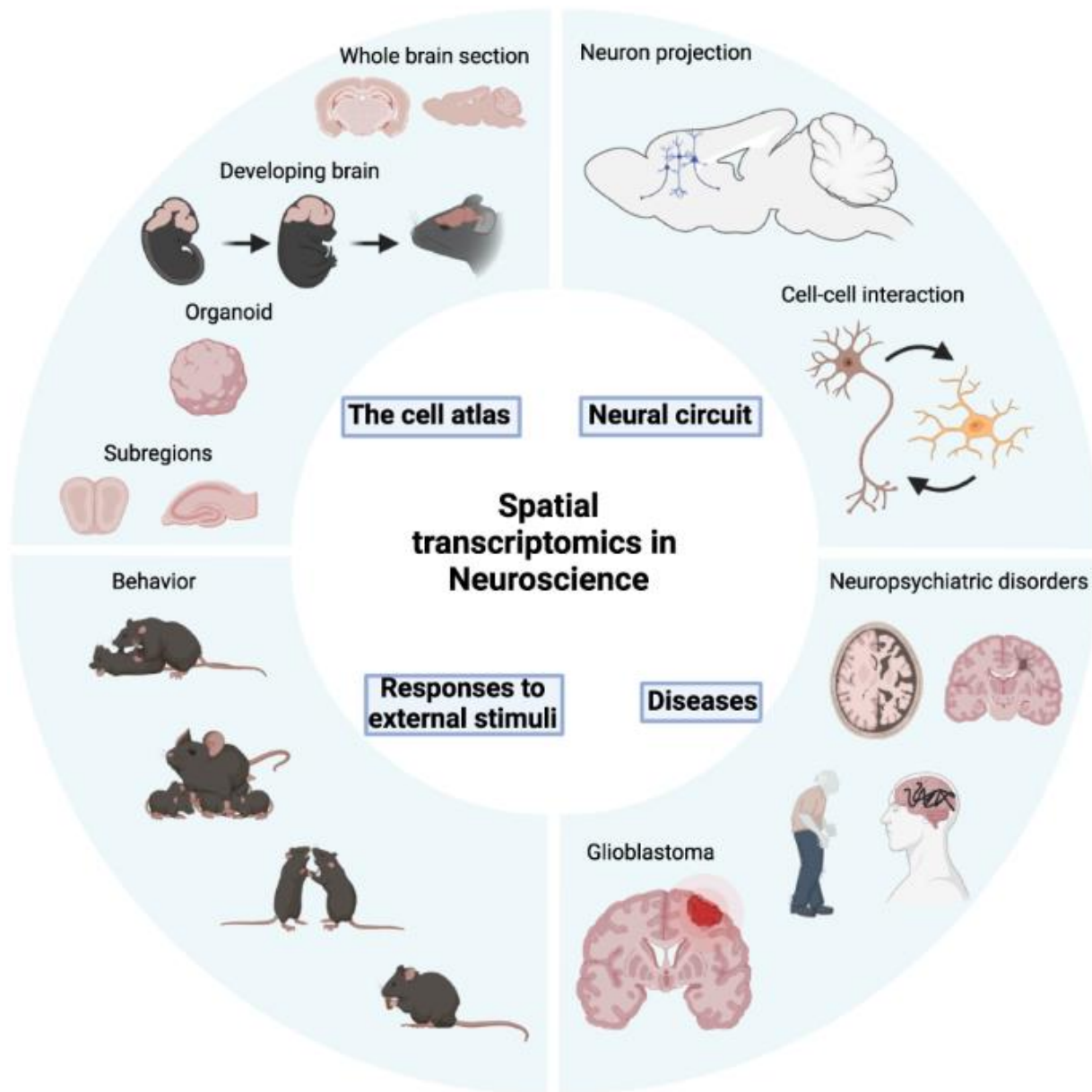


그림 9. The application of ST in neuroscience[1]

Ebiogen's 서비스

1. Single cell RNA-Seq

조직이나 세포 집단의 전사체 분석의 한계점을 극복하기 위해 단일세포의 전사체를 분석할 수 있는 Single cell RNA-Seq 서비스를 제공하고 있다. 특히 뇌에서 정확한 분석을 하기 위해서 Brain Tissue dissociation & Myelin removal 서비스 제공이 가능하다.

Service Info.

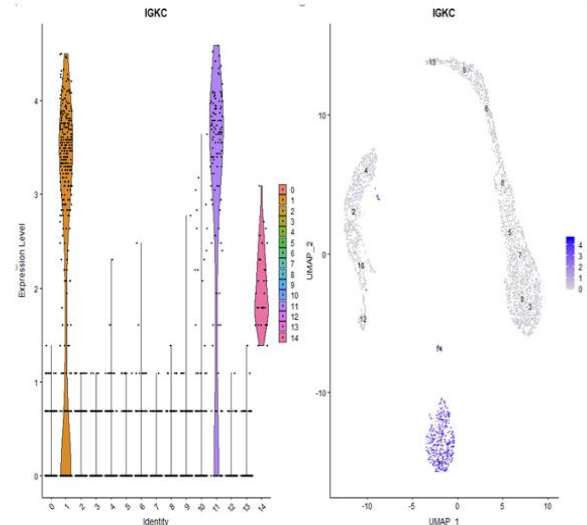
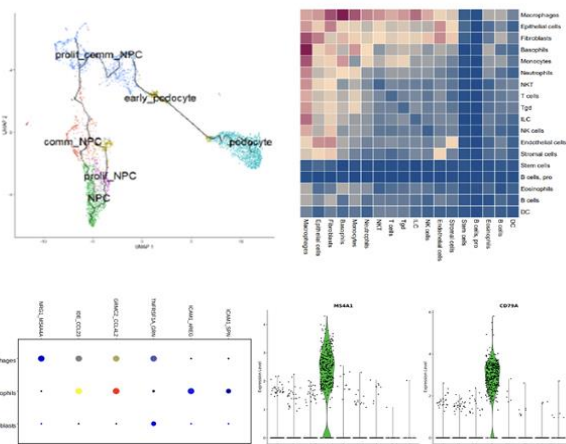
Sample requirement+	-Fresh Tissue 200 mg++ - Cell line : $\sim 1 \times 10^6$ cells in 14ml media(Cell viability >90%) - Primary cell or FACS sorted cell : 250,000 cells in 500 ul media(Viability >70%)
Library method	10X Genomics Next GEM technology
NGS run format	Nova-Seq 6000, PE100bp
Data yield+	$\sim 60,000$ reads(30,000 Paired Reads) per cell
Number of Target cell+	$\sim 5,000$ cells
Turnaround time	~ 4 weeks after Cell counting & QC
Sample type	Cell, Nuclei, Tissue

+ 초기 세포수, 목표 세포수, 시퀀싱 read 수는 서비스 의뢰시 연구자와 상의하여 조정이 가능

++ Tissue dissociation 서비스 및 myelin removal 서비스를 원하실 경우 담당자와 상의하여 진행가능

Data analysis

이바이오젠에서는 자체 개발한 분석툴 ExSCEA(Excel based Single Cell Expression Analysis)와 WinSeurat(Windows based Seurat)을 제공함으로써 single cell RNA-seq 데이터를 보다 쉽고 직관적으로 다룰 수 있도록 지원하고 있으며, Cell QC report 를 포함한 10X genomics Cell Ranger data 와 Loupe browser 를 이용한 Gene expression data, UMAP, tSNE, Feature selection, Clustering heatmap, PCA, Cell type annotation, sub-cell type 예측분석 등의 다양한 분석을 지원하고 있다.



GeoMx DSP Service

GeoMx DSP 장비를 이용하여 조직 내에서 면역염색을 통해서 세포의 morphology 를 확인하고 원하는 영역, 세포 타입에 대한 단백질 또는 유전자의 발현값을 확인할 수 있는 서비스이다. Fresh Frozen, FFPE sample type 에 상관없이 Human 의 모든 조직에서 실험 가능한 장점을 가지고 있으며, Deconvolution, PCA, tSNE, UMAP 등 다양한 분석을 지원해드리고 있다.

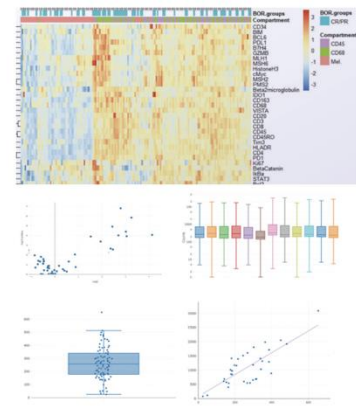
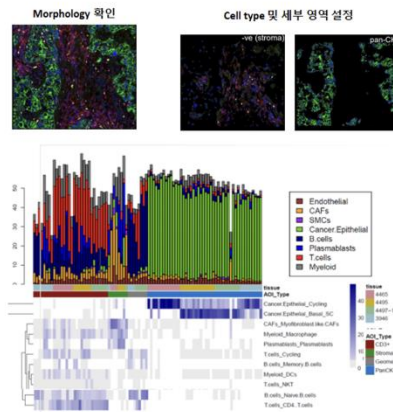
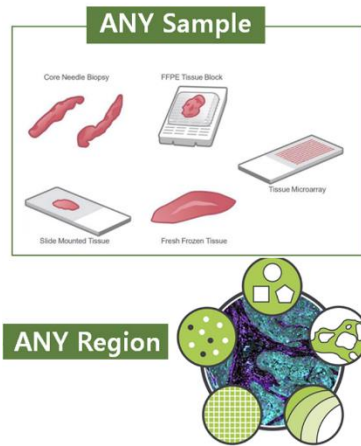
Service Info.

Service Name	GeoMx Spatial WTA* Service	GeoMx Spatial CTA* Service	GeoMx Spatial IPA* Service
Species	Human, Mouse	Human	Human
Number of Gene	Human ~18,000ea / Mouse ~22,000ea	~1,800ea	~570ea
Data yield	~100 reads/ μm^2	~30 reads/ μm^2	~200 reads/ μm^2
Sample type	Tissue (FFPE, Tissue microarray, Fresh frozen tissue, Core needle biopsy etc.,)		
Sample size	14.6 x 36.2 mm		
Turnaround time	~3 weeks after ROI selection		
Publication	NanoString GeoMx Publication		

*WTA (Whole Transcriptome Atlas) / *CTA (Cancer Transcriptome Atlas) / *IPA (Immuno-Oncology Proteome Atlas)

Data analysis

Gene expression 정보와 spatial information 을 결합한 분석을 지원한다. 또한 clusters, heatmaps, volcano plots, bar graphs, box plots, scatter plots 과 같은 다양한 visualization 이 가능하다.



Visium HD Service (출시예정)

Whole transcriptome spatial gene expression 과 single cell scale 해상도를 결합한 분석 방법으로 조직내에서의 고유한 생물학적 특성연구가 가능한 서비스이다. FFPE, Frozen tissue, fixed tissue 에서 적용 가능하다. 10x 에서 제공하는 기본 분석뿐만 아니라 다양한 분석을 지원할 예정이다.

<참고 문헌>

1. Jung, N. & Kim, T.-K. Spatial transcriptomics in neuroscience. *Exp. Mol. Med.* 55, 2105–2115 (2023).
2. Piwecka, M., Rajewsky, N. & Rybak-Wolf, A. Single-cell and spatial transcriptomics: deciphering brain complexity in health and disease. *Nat. Rev. Neurol.* 19, 346–362 (2023).
3. [Comparative Analysis of Single-cell and Single-nucleus RNA Sequencing](#)
4. Jill M Williamson & David A Lyons Myelin Dynamics Throughout Life: An Ever-Changing Landscape? *Front Cell Neurosci.* 2018 Nov 19:12:424.
5. Moses L, Pachter L. Museum of spatial transcriptomics. *Nat Methods.* 2022;19(5):534-546. doi:10.1038/s41592-022-01409-2
6. <https://nanosttring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-dsp-overview/>
7. [Visium HD: Spatially Resolved, Single Cell Scale Gene Expression Mapping of FFPE Tissue](#)
8. [Your introduction to Visium HD: Spatial biology in high definition](#), 10X genomics Blog