

No.	質問	回答
1	空間トランスクリプトーム解析の「空間」は二次元のこと、一般的な用語の「空間」の「3次元」での解析は現段階では可能なのでしょうか？	可能です。今回は一つの組織切片の解析をお示しましたが、これを連続切片に拡張することで、xy軸だけではなく、z軸方向の空間情報も得ることができます。しかしながら、空間トランスクリプトーム解析の値段が高いことと、がんなどの臨床検体は非常に貴重であることを考えると、ヒトを対象とした解析では、なかなかハーダルは高いのかなと思います。
2	未知の細胞群や遺伝子欠損動物モデルなどで異常な細胞種が存在する場合はどのように対応しますか？	未知だけでも重要な細胞（例えば治療効果と相關しているなど）に関しては、unknownのままか、○○-like cellのような名前をつけて解析します。治療などの摂取後の細胞の遺伝子発現はかなりintactなものと比べて変化しているので、私も基本的に、○○-like cellみたいなやり方をしています。
3	発現遺伝子から推定した細胞の種類と、病理の先生が確認した結果は、どのくらい一致しますか？	病理の先生が確認するのは、がん細胞、正常上皮細胞、リンパ球、ミエロイド細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞といった解像度の細胞種になります。Xeniumなどの空間解析のモダリティでは、これらの細胞はほとんど一致した結果が得られている印象です。
4	酒井先生の講義中の資料では、5.細胞のクラスタリングで15個に分かれていますが、アノテーション前にどのような基準で分類されるのでしょうか。	ほとんどデフォルトの設定のままクラスタリングしておりますが、最初に存在を仮定した細胞が綺麗に分かれないので（例えはマクロファージと樹状細胞が分かれないので）、もっとクラスタリングの粒度を細かくしてみるということをしています。私は、この辺りかなりヒューリスティックな戦略をとっています。
5	(酒井先生への質問) 空間トランスクリプトーム解析未経験ですが、神経細胞のような形状が特殊なもの、心筋細胞など2核のものなど、組織によって特殊な解析は存在しますか？そもそもシングルセル解析でこれらの細胞が正しく取れるのか疑問なのですが、空間トランスクリプトームで結果が異なるなど知られていますか？	私は神経細胞などの解析経験がないのでわからないのですが、一細胞空間トランスクリプトームのプラットフォームの一つであるXenium 5Kでは、細胞セグメンテーション（一つ一つの細胞を分割する作業）に細胞膜のタンパク質の染色像を使用しているので、可能なのではないかと予想しています。2023年のXenium version1では細胞セグメンテーションに核の染色像を使用していたので、神経細胞のような細長い細胞を綺麗に解析することができなかつたです。
6	病院所属では病理医にお願いしやすいように思いますが、それ以外の場合、共同研究ベースのお願いになるのか、外注のような形になるのか、何かプラットフォームとかあるのでしょうか？	申し訳ないのですが、そのような（病理医と研究者を簡単につなぐ）プラットフォームは存じ上げておらず、無知で申し訳ありません。
7	一つのスポットに複数の細胞種がある場合、Visiumのデータから細胞種を推定することはむずかしいですか？例えば、Deconvolutionすることで、そのスポットに存在する細胞種を推定することはできますか？	Visiumのデータのみでは難しいですが、referenceとなるシングルセルRNAシークエンスの結果を利用すれば、deconvolution解析を行うことができます。referenceはVisiumの対象の組織と同一のものを利用することが一番望ましいですが、データベースから類似したデータをとってくることで代用することもできます。
8	(To Dr.vandenbon) Q1 : Is the Moran's I used in Slide No. 15 the global Moran's I ? Q2 : I would like to analyze the data using other spatial statistical methods with geospatial data analysis tools. How can I obtain information such as the coordinate data for Visium's spot IDs and the notation rules for the coordinates?	<p>Q1: I'm not sure if Moran's I is global. I'm just using a default one. I'm not so familiar with different kinds of Moran's I. As far as I understand, it looks at all the spots and checks for every gene. The next spots or the neighboring spots have similar values. In other words, they are correlated with each other. The spots with low values are not visible but there are many low value spots next to each other, and the values with high spots are also almost next to each other. This means it has a high autocorrelation. Using the whole slide could mean global Moran's I, but I'm not quite sure.</p> <p>Q2: If you get the raw data of Visium, one of the file teaches you location, a statue coordinates. It includes the X and the Y coordinates of every spot. In the hexagonal pattern data (As shown in the slide #9), the same file also includes the row and the column of every spot, you can also use it to see what's the location of every spot. In other words, you can see it in the raw data. And also, if you read your data into R, there is a way and a function to extract the location of every spot. So you can also get it through Seurat. But I don't remember the name of the function.</p>
9	PythonとRの選択は解析者の趣味に依存しますか？絶対は無いと思いますが、皆さん両刀使いですか？パイプラインに依存するなどで片方しか使わないのですか？	趣味だと思います。どちらでもほとんど同じことができます。ただし、両刀使いの場合は、Rとpython間でのデータのオブジェクト構造を変換しなくてはいけないので、かなり面倒です。私はほとんどpythonで完結する解析をしています。
10	空間トランスクリプトーム解析用のPCはどの程度のスペックが想定されますか？あるいはクラウド利用ですか？scRNASeqも公共データで多サンプルになると128GB RAM程度では厳しいですか？	Regarding the specs of the PC. Vizium data is not so big. The number of spots is typically 2,000 to 4,000. So compared to the single cell data, it's quite small, and I think I can analyze it on just a normal Laptop. Actually I can analyze it just on my normal desktop PC, which is not such a good PC. However, if you're trying to use a Zenium data, I think you will need at least 64 GB RAM. 128 GB RAM should be enough. But for the really huge samples, I have not tried to analyze on my PC. I'm running it on the server, which has 256 GB.
11	(To Dr.vandenbon) 11 Is the in-house data uploaded to DeeSpace DB the data that has completed QC and other processes in Seurat?	Most of the data shown on the website (Slide #74) is based on the quality process data. But here and the download data we added the Seurat object is processed, but also the raw one. So if you're interested in the raw data, you can also download it. If you're interested in already processed data, you can also download it. I think it should be easy to download and read and analyze them, using the Seurat package. If you have any problems, please contact me anytime. If there's some problem, I will try to fix it.

(酒井先生への質問)

- 12 ST解析のプラットフォームではRNA-seqと比較してリード数や検出遺伝子が少ないと聞いたのですが、例えばナイーブT細胞、活性化T細胞、疲弊T細胞のように、ある細胞のサブセットをST解析では同定できるのでしょうか、ST解析データだけでは難しい場合、他のデータも統合して細胞のヘテロジェネイティを解析できる手法があれば教えていただきたいです。

確かに検出感度は低いですが、エフェクターCD8 T細胞（グランザイムやパーフォリン遺伝子発現）や疲弊T細胞（PD-1やLAG3発現）くらいであれば、クラスタリングの粒度を細かくして同定できるという感覚です。また、これらの細胞の組織中の局在を観察することで、エフェクターCD8 T細胞ががんに近接し攻撃しているかどうか、などの表現型からその細胞種であることを検証することができます。

STデータを他の解析モダリティで同定したリファレンスの細胞種にマッピングする手法は、Seuratなどのツールで実装されていますので手軽に利用することができます（https://satijalab.org/seurat/articles/multimodal_reference_mapping）。リファレンスには、できるだけT解析の対象と類似した臓器・組織由来の細胞を利用することが望ましいです（理想的にはST解析の対象と同一組織由来のデータが良いです）。この辺りは今後データベースの発展により充実してきそうです。

区別できる場合もあります。

データの品質にも依存しますが、上皮細胞、T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、内皮細胞、線維芽細胞、etc...くらいのメジャー細胞までは、全体のデータのクラスタリングから区別できます。さらにサブセットを区別するためには、上記のメジャー細胞を分割したサブクラスターを生成し、それぞれに対して再度クラスタリングを実行することが有効です。

経験的には、Xeniumでは上皮細胞やT細胞はよく分かれます。マクロファージや線維芽細胞に関しては、さまざまサブセットが知られている割には、あまり綺麗に分かれないような感覚があります。

ST解析だけでは分かれない場合には、scRNA-seqで同定された細胞種をリファレンスにし、STデータをマッピングする手法が使えます。

(酒井先生への質問)

- 13 ST解析で似たような遺伝子発現を有する細胞中でもサブセットを区別できるのか、またそのような手法があるのか知りたいです。

(To Dr. Vandenbon)

- 14 Do you have a plan to implement SKNY tool on DeepSpaceDB for analyzing Xenium samples?

I think it would be nice to try. But, if I understand correctly, SKNY needs an input marker(s) to first define some region from which to calculate distances, and define niches. I am not sure how to add this to the database in practice. The user could give any gene as marker? In that case, distances should be calculated "live" in the database? That might be somewhat challenging.

今回のセミナーの例では30 μm 間隔で階層化していたので、細胞が直径10 μm だと仮定すると、それぞれの階層には、ラフな見積もりで、3細胞 \times 円周 \div 10 μm くらいが含まれるということになります。ご指摘の通り、細胞数は円周に依存して多くなるので、各階層間で遺伝子発現や細胞数を比較する場合は、その密度や比率を用いるのが最適だと考えています。

今回のセミナーのトラジェクトリ解析では、がん-間質境界領域でのバリア破壊をメインで紹介しました。他にもがん周辺で基質分解酵素MMPが過剰発現している結果を得ており、微小環境ががん浸潤の素地を整えているということを考察しております。

(酒井先生への質問)

- 15 階層化は興味深いですが、細胞数はそれぞれどの程度ですか？環境の変化のトラジェクトリ解析は、バリアが壊れてそこにいる細胞が変化した（免疫細胞が浸潤した）だけですか？

放射線治療前、中、後での相互作用の比較の結果、治療中でもっともPD-1-PD-L1の相互作用が活性化し、免疫のブレーキがかかっていたという結果をもとに、放射線治療中に当該の相互作用を阻害することで、細胞障害性CD8 T細胞のがん細胞への集積が強まり、グランザイムなどのエフェクター分子の発現が増強すると予想しています。

stLearnの系譜解析では、遺伝子発現と空間的隣接性とを両方加味した上でトラジェクトリを推定できる、という理解をしています。

空間情報を反映できるという点で非常に魅力的だと思う一方で、トラジェクトリに空間情報を反映させるための仮説設定が非常に重要であるという注意点があると考えています。

例えば、組織表層部の早期のがんから、組織深部へ悪性がんへと空間的に連続しながら悪性化が進むという仮説がある場合は、その仮説を反映させたトラジェクトリ構築のためにstLearnは非常に有用だと思います。

一方で、ナイーブT細胞からエフェクターT細胞への分化のように、本来はリンパ組織内での細胞間相互作用を経て進行するプロセスについては、リンパ組織が含まれない組織のSTデータのみから空間的連続性を前提として推定することには必ずしも最適とは言えない場合もあると考えています。

直径55 μm のスポットベースのVISIUMでも解像度は荒くなりますが、可能だと考えています。（VISIUM HDでは全く同じ解析ができます。）

SpatialKNIFEを用いた微小環境解析では、55 μm 間隔に階層化した解析ができます。stLearnの相互作用解析はグリッド化の工程を省略して同じ解析ができます。最後に紹介させていただいたトラジェクトリ解析に関しては、VISIUMは1細胞レベルの解析ではないので細胞分化トラジェクトリの推定が難しいですが、微小環境の変化というトラジェクトリを推定することには使えるのではないかと考えております。

※AJACSの趣旨と異なる質問は、回答および掲載を控えさせていただきました。