

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-522350
(P2024-522350A)

(43)公表日 令和6年6月18日(2024.6.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6841(2018.01)	C 1 2 Q	1/6841		2 G 0 4 5
C 1 2 Q	1/6853(2018.01)	C 1 2 Q	1/6853	Z	4 B 0 2 9
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	4 B 0 6 3
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全116頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-573328(P2023-573328)		(71)出願人	515025398	
(86)(22)出願日	令和4年5月27日(2022.5.27)			ザ ブロード インスティテュート, イン	
(85)翻訳文提出日	令和6年1月29日(2024.1.29)			コーポレーテッド	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/031275			THE BROAD INSTITUTE	
(87)国際公開番号	WO2022/251586			, INC.	
(87)国際公開日	令和4年12月1日(2022.12.1)			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0	
(31)優先権主張番号	63/194,536			2142、ケンブリッジ、メイン スト	
(32)優先日	令和3年5月28日(2021.5.28)			リート 415、ルーム 7003	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			415 Main Street, Roo	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(71)出願人	596060697	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			マサチューセッツ インスティテュート	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			最終頁に続く	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR				
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,				
	最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 転写状態およびタンパク質組織像の共マッピング

(57)【要約】

本開示は、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングする（すなわち、同じ細胞内で遺伝子およびタンパク質発現を同時にマッピングする）ための、方法およびシステムを提供する。本開示はまた、対象における疾患または障害（例：アルツハイマー病などの神経障害）を診断するための方法を提供する。遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能な候補薬剤をスクリーニングする方法も、本開示によって提供される。本開示はまた、アルツハイマー病などの疾患または障害を、それを必要とする対象において処置するための方法も提供する。本明細書に記載の方法を実施するのに有用であり得る複数のオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブのいずれかを含むキットも、本開示によって記載される。さらに、本開示は、少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別するための方法、装置、および非一時的なコンピュータ可読記憶媒体を提供する。

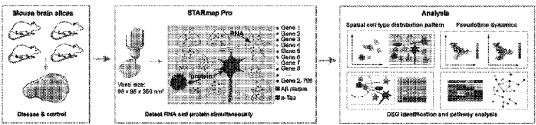


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための、以下を含む方法：

- a) 細胞を、1 対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで
 - i) 第 1 のオリゴヌクレオチドプローブは、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第 1 のバーコード配列、および第 2 のバーコード配列を含み；および
 - i i) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列に相補的であり；
 - b) 第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの 5' 末端と 3' 末端を一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；
 - c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1 つ以上の連結アンプリコンを生成すること；
 - d) 細胞を、1 つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；
 - e) 1 つ以上の連結アンプリコンと 1 つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；
 - f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた 1 つ以上の連結アンプリコンを、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 のバーコード配列に相補的な配列を含む第 3 のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および
 - g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた 1 つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた 1 つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること。

【請求項 2】

遺伝子およびタンパク質発現が、複数の細胞においてプロファイリングされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

細胞が、複数の細胞型を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞型が、幹細胞、前駆細胞、神経細胞、星状細胞、樹状細胞、内皮細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、筋細胞、心筋細胞、間葉細胞、上皮細胞、免疫細胞、および肝細胞からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

細胞が、透過化処理された細胞である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

細胞が、無傷の組織内に存在する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

無傷の組織が、固定組織試料である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

目的の核酸が DNA である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

目的の核酸が RNA である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

RNA が mRNA である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

100を超える、200を超える、500を超える、1000を超える、2000を超える、または3000を超える目的の核酸の遺伝子発現がマッピングされる、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

最大100万個の目的の核酸の遺伝子発現がマッピングされる、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、5～15、6～14、7～13、8～12、または9～11ヌクレオチド長である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、10ヌクレオチド長である、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブが、目的の核酸の異なる部分に結合する、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 7】

第1のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：
5' - [第2のプローブに相補的な部分] - [目的の核酸に相補的な部分] - [第1のバーコード配列] - [第2のバーコード配列] - 3'、
を含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

第2のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：
5' - [目的の核酸に相補的な部分] - [第1のプローブに相補的な部分] - [バーコード配列] - 3'、
を含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 9】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列が、目的の核酸の検出の特異性を高める、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列が、非特異的増幅を低減する、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

第3のオリゴヌクレオチドプローブが、検出可能な標識を含む、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 2】

検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項21に記載の方法。

【請求項 2 3】

1つ以上の検出剤が、それぞれが検出可能な標識を含む抗体である、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

1つ以上の検出剤を二次検出剤と接触させることをさらに含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

1つ以上の検出剤が、小分子を含む、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

50

- 【請求項 26】
小分子が X-34 である、請求項 25 に記載の方法。
- 【請求項 27】
二次検出剤が、二次抗体である、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 28】
二次抗体が、検出可能な標識を含む、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 29】
検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 28 に記載の方法。
- 【請求項 30】
1 つ以上の検出剤が、それぞれがオリゴヌクレオチド配列に抱合し、かつそれぞれが目的のタンパク質に結合する抗体である、請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法。 10
- 【請求項 31】
目的のタンパク質に結合する 1 つ以上の抗体のそれぞれを、検出可能な標識に抱合したオリゴヌクレオチドと接触させることをさらに含み、ここで、検出可能な標識に抱合したオリゴヌクレオチドが、1 つ以上の抗体に抱合したオリゴヌクレオチド配列に相補的である、請求項 30 に記載の方法。
- 【請求項 32】
検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 31 に記載の方法。
- 【請求項 33】
画像化するステップが、蛍光画像化を含む、請求項 1 ～ 32 のいずれか一項に記載の方法。 20
- 【請求項 34】
画像化するステップが、共焦点顕微鏡検査または落射蛍光顕微鏡検査を含む、請求項 1 ～ 33 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 35】
ポリマーマトリックスに埋め込まれた 1 つ以上の検出剤のそれぞれを、二次検出剤と接触させるステップが、ローリングサークル増幅を実施して環状オリゴヌクレオチドを増幅するステップの後に実施される、請求項 24 ～ 34 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 36】
細胞を、1 つ以上の検出剤と接触させるステップが、埋め込みのステップの前に実施される、請求項 1 ～ 35 のいずれか一項に記載の方法。 30
- 【請求項 37】
目的の核酸および目的のタンパク質の位置が、画像化の同じラウンドで決定される、請求項 1 ～ 36 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 38】
目的の核酸および目的のタンパク質の位置が、画像化の別個のラウンドで決定される、請求項 1 ～ 36 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 39】
ポリマーマトリックスが、ヒドロゲルである、請求項 1 ～ 38 のいずれか一項に記載の方法。 40
- 【請求項 40】
ヒドロゲルが、ポリビニルアルコールヒドロゲル、ポリエチレングリコールヒドロゲル、ポリアクリル酸ナトリウムヒドロゲル、アクリル酸ポリマーヒドロゲル、またはポリアクリルアミドヒドロゲルである、請求項 1 ～ 39 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 41】
ローリングサークル増幅を行うステップがさらに、アミン修飾ヌクレオチドを提供するステップを含み、ここでアミン修飾ヌクレオチドが、1 つ以上の連結アンプリコンに組み込まれている、請求項 1 ～ 40 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 42】
1 つ以上の連結アンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むステップが、1 つ以上 50

のアンプリコンのアミン修飾ヌクレオチドを、アクリル酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと反応させること、および、1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスを共重合させることを含む、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列が、目的の核酸を識別するために使用される遺伝子特異的配列である、請求項 1～42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

方法が、細胞以下の分解能で実施される、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

方法が、200 nm、150 nm、100 nm、50 nm、40 nm、30 nm、20 nm、または10 nmの、細胞以下の分解能で実施される、請求項 1～44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

方法が、200 nmの、細胞以下の分解能で実施される、請求項 1～45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

細胞における遺伝子発現をマッピングするための、以下を含む方法：

a) 細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端を一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；

c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；

d) 1つ以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを画像化して、細胞内の目的の核酸の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること。

【請求項 48】

細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための、以下を含む方法：

a) 細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、および第1の

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分を含み；

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端と一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；

c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；

d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；

e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること。

【請求項49】

対象における疾患または障害を診断するための、以下を含む方法：

a) 対象から採取した細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端と一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；

c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；

d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；

e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること；

ここで、1つ以上の非疾患細胞における発現と比較した、目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現の変化は、対象が疾患または障害を有することを示す。

【請求項50】

1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現が、対照的実験として同時にプロファイリングされる、請求項49に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

1 つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現が、参照データを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

疾患または障害が、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸（GI）管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系（CNS）障害、または心血管疾患である、請求項 4 9～5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

疾患または障害が、アルツハイマー病である、請求項 4 9～5 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 4】

細胞が、組織内に存在する、請求項 4 9～5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

組織が、対象からの組織試料である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

対象が、非ヒト実験動物である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

対象がヒトである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

組織が、固定組織試料である、請求項 5 4～5 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

組織が脳組織である、請求項 5 4～5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

遺伝子およびタンパク質発現が、複数の細胞においてプロファイリングされる、請求項 5 4～5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

細胞が、複数の細胞型を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

細胞型が、幹細胞、前駆細胞、神経細胞、星状細胞、樹状細胞、内皮細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、筋細胞、心筋細胞、間葉細胞、上皮細胞、免疫細胞、および肝細胞からなる群から選択される、請求項 6 1 に記載の方法。

30

【請求項 6 3】

目的のタンパク質が、アミロイドベータ（A β ）ペプチドを含む、請求項 4 9～6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

A β ペプチドが、A β プラークの形態で細胞内に存在する、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

目的のタンパク質が、タウタンパク質を含む、請求項 4 9～6 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6 6】

タウタンパク質が、封入体（p-Tau）の形態で細胞内に存在する、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

目的の核酸が、Vsnl1、Snap25、Dnm1、Slc6a1、Aldoc、Bsg、Ctss、Plp1、Cst7、Ctsb、Apoe、Trem2、C1qa、P2ry12、Gfap、Vim、Aqp4、Clu、Plp1、Mbp、C4b、Ccnb2、Gpm6a、Ddit3、Dapk1、Myo5a、Tspan7、およびRhocからなる群から選択される、請求項 4 9～6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

A β ペプチドが、小分子を使用して検出される、請求項 6 3～6 7 のいずれか一項に記

50

載の方法。

【請求項 6 9】

小分子が X-34 である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

タウタンパク質が、p-Tau 一次抗体を使用して検出される、請求項 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

p-Tau 一次抗体を、二次抗体を用いて検出することをさらに含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

二次抗体が、検出可能な標識に抱合される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

目的の核酸の発現の変化を用いて、プラークに近接した細胞型を識別し、ここで、特定の細胞型がプラークに近接して識別された場合、対象はアルツハイマー病を有するかまたは有する疑いがある、請求項 4 6 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

プラークが、A β プラークである、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

プラークに近接した疾患関連ミクログリア細胞型の識別が、対象がアルツハイマー病を有するかまたは有するリスクがあることを示す、請求項 7 4 または 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

プラークに近接した疾患関連星状細胞の細胞型の識別が、対象がアルツハイマー病を有するかまたは有するリスクがあることを示す、請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

プラークに近接したオリゴデンドロサイト前駆細胞型の識別が、対象がアルツハイマー病を有するかまたは有するリスクがあることを示す、請求項 7 4 ~ 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

疾患または障害が、がんである、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 8 0】

目的の核酸が DNA である、請求項 4 9 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

目的の核酸が RNA である、請求項 4 9 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

RNA が mRNA である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

100 を超える、200 を超える、500 を超える、1000 を超える、2000 を超える、または 3000 を超える目的の核酸の遺伝子発現がマッピングされる、請求項 4 9 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

最大 100 万個の目的の核酸の遺伝子発現がマッピングされる、請求項 4 9 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

オリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、5 ~ 15、6 ~ 14、7 ~ 13、8 ~ 12、または 9 ~ 11 ヌクレオチド長である、請求項 4 9 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である、請求項49～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項87】

オリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、10ヌクレオチド長である、請求項49～86のいずれか一項に記載の方法。

【請求項88】

第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブが、目的の核酸の異なる部分に結合する、請求項49～87のいずれか一項に記載の方法。

【請求項89】

第1のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5' - [第2のプローブに相補的な部分] - [目的の核酸に相補的な部分] - [第1のバーコード配列] - [第2のバーコード配列] - 3'、
を含む、請求項49～88のいずれか一項に記載の方法。

【請求項90】

第2のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5' - [目的の核酸に相補的な部分] - [第1のプローブに相補的な部分] - [バーコード配列] - 3'、
を含む、請求項49～89のいずれか一項に記載の方法。

【請求項91】

第2のバーコード配列が、目的の核酸の検出の特異性を高める、請求項49～90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

第2のバーコード配列が、非特異的増幅を低減する、請求項49～91のいずれか一項に記載の方法。

【請求項93】

第3のオリゴヌクレオチドプローブが、検出可能な標識を含む、請求項49～92のいずれか一項に記載の方法。

【請求項94】

検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

画像化するステップが、蛍光画像化を含む、請求項49～94のいずれか一項に記載の方法。

【請求項96】

画像化するステップが、共焦点顕微鏡検査または落射蛍光顕微鏡検査を含む、請求項49～95のいずれか一項に記載の方法。

【請求項97】

遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための、以下を含む方法：

a) 候補薬剤で処置されているかまたは処置された細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

i i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端を一緒にライゲートして、環

10

20

30

40

50

状オリゴヌクレオチドを生成すること；

c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；

d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；

e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること；

ここで、候補薬剤の不在下での発現と比較した、候補薬剤の存在下での目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現の変化は、候補薬剤が遺伝子および／またはタンパク質発現を調節することを示す。

【請求項98】

候補薬剤が、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、または炭水化物である、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

小分子が、抗がん治療剤である、請求項98に記載の方法。

【請求項100】

タンパク質が抗体である、請求項98に記載の方法。

【請求項101】

核酸が、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA(dsRNA)、短ヘアピンRNA(shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である、請求項98に記載の方法。

【請求項102】

遺伝子および／またはタンパク質発現の候補薬剤による調節が、疾患または障害の症状の軽減、緩和、または除去に関連する、請求項97～101のいずれか一項に記載の方法。

【請求項103】

疾患または障害が、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、または心血管疾患である、請求項102に記載の方法。

【請求項104】

疾患または障害が、アルツハイマー病である、請求項102または103に記載の方法。

【請求項105】

疾患または障害が、がんである、請求項102または103に記載の方法。

【請求項106】

対象における疾患または障害を処置するための、以下を含む方法：

a) 対象から採取した細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配

10

20

30

40

50

列を含み；および

- i i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；
- b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端と一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；
- c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；
- d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；
- e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；
- f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および
- g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること；および
- h) 1つ以上の非疾患細胞における発現と比較して、目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現の変化が観察された場合、対象に疾患または障害の処置を施すこと。

10

20

30

40

50

【請求項107】

1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現が、対照的実験として同時にプロファイリングされる、請求項106に記載の方法。

【請求項108】

1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現が、参照データを含む、請求項106に記載の方法。

【請求項109】

処置が、治療剤、手術、または放射線治療を施すことを含む、請求項106～108のいずれか一項に記載の方法。

【請求項110】

治療剤が、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、または炭水化物である、請求項109に記載の方法。

【請求項111】

小分子が、抗がん治療剤である、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

タンパク質が抗体である、請求項110に記載の方法。

【請求項113】

核酸が、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA(dsRNA)、短ヘアピンRNA(shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である、請求項110に記載の方法。

【請求項114】

疾患または障害が、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、または心血管疾患である、請求項106～113のいずれか一項に記載の方法。

【請求項115】

疾患または障害が、アルツハイマー病である、請求項106～114のいずれか一項に

記載の方法。

【請求項 1 1 6】

疾患または障害が、がんである、請求項 1 0 6 ～ 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブであって、ここで、

i) 第 1 のオリゴヌクレオチドプローブは、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第 1 のバーコード配列、および第 2 のバーコード配列を含み；および

i i) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、

ここで、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列に相補的である、

前記複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 1 8】

第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、5 ～ 1 5、6 ～ 1 4、7 ～ 1 3、8 ～ 1 2、または 9 ～ 1 1 ヌクレオチド長である、請求項 1 1 7 に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 1 9】

第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、または 1 5 ヌクレオチド長である、請求項 1 1 7 または 1 1 8 に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 2 0】

第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列が、1 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 1 7 ～ 1 1 9 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 2 1】

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5' - [第 2 のプローブに相補的な部分] - [目的の核酸に相補的な部分] - [第 1 のバーコード配列] - [第 2 のバーコード配列] - 3'、

を含む、請求項 1 1 7 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 2 2】

第 2 のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5' - [目的の核酸に相補的な部分] - [第 1 のプローブに相補的な部分] - [バーコード配列] - 3'、

を含む、請求項 1 1 7 ～ 1 2 1 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 2 3】

第 2 のバーコード配列が、目的の核酸の検出の特異性を高める、請求項 1 1 7 ～ 1 2 2 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 2 4】

第 2 のバーコード配列が、非特異的増幅を低減する、請求項 1 1 7 ～ 1 2 3 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 2 5】

請求項 1 1 7 ～ 1 2 4 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、キット。

【請求項 1 2 6】

キットがさらに、1 つ以上の抗体を含み、ここで各抗体が目的のタンパク質に結合する、請求項 1 2 5 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 7】

抗体が、抗 p-Tau 抗体を含む、請求項 1 2 5 または 1 2 6 に記載のキット。

【請求項 1 2 8】

小分子検出剤をさらに含む、請求項 1 2 5 ～ 1 2 7 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 2 9】

小分子検出剤が X-34 である、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 3 0】

キットがさらに、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項 1 2 5 ～ 1 2 9 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 3 1】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブが、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 のバーコード配列に相補的な配列を含む、請求項 1 3 0 に記載のキット。

【請求項 1 3 2】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブが、検出可能な標識を含む、請求項 1 3 0 または 1 3 1 に記載のキット。

【請求項 1 3 3】

検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 1 3 2 に記載のキット。

【請求項 1 3 4】

少なくとも 1 つの画像内の細胞型の空間的変動を識別する、以下を含む方法：

少なくとも 1 つの画像内の複数の細胞のそれぞれについて、少なくとも 1 つの画像内の細胞の空間的位置を受け取ること；

少なくとも 1 つの画像内の複数のタンパク質のそれぞれについて、画像内のタンパク質の空間的位置を受け取ること；

複数のタンパク質の第 1 のタンパク質について、第 1 のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第 1 の細胞型の細胞の数を決定すること、ここで、距離は、複数の細胞の少なくともいくつかの空間的位置と、複数のタンパク質の少なくともいくつかの空間的位置に基づいて決定され；

第 1 の細胞型の細胞の数に基づいて、少なくとも 1 つの画像内の第 1 の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；および

少なくとも 1 つの画像内の第 1 の細胞型の細胞の空間的変動の表示を、出力すること。

【請求項 1 3 5】

少なくとも 1 つの画像内の第 1 の細胞型の細胞の空間的変動を識別することが、以下：

第 1 のタンパク質までの距離が閾値距離未満である複数の細胞のうちの細胞について、第 1 の細胞型に関連する細胞の第 1 のパーセンテージを決定すること；

少なくとも 1 つの画像内の複数の細胞のうちの、第 1 の細胞型に関連する細胞の第 2 のパーセンテージを決定すること；

第 1 のパーセンテージを第 2 のパーセンテージと比較して、比較結果を取得すること；および

比較結果を使用して、少なくとも 1 つの画像内の第 1 の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；

を含む、請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

比較結果が、第 1 のパーセンテージが第 2 のパーセンテージよりも大きいことを示し；および

少なくとも 1 つの画像内の第 1 の細胞型の細胞の空間的変動を、比較結果を使用して識別することが、第 1 の細胞型の細胞のエンリッチメントが、第 1 のタンパク質までの距離が閾値距離未満である領域内に存在することの識別を含む、

請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

少なくとも 1 つの画像を、カメラを用いて取得することをさらに含む、請求項 1 3 4 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 138】

少なくとも1つの画像が複数の画像を含み、およびここで、少なくとも1つの画像をカメラを用いて取得することが、以下：

複数の画像の第1の画像を取得すること、第1の画像は、複数の細胞の空間的位置を決定するために使用され；および

複数の画像の第2の画像を取得すること、第2の画像は、複数のタンパク質の空間的位置を決定するために使用される；

を含む、請求項137に記載の方法。

【請求項 139】

さらに以下：

第1の画像からの複数の細胞の空間的位置を、第2の画像からの複数のタンパク質の空間的位置と空間的に整列させること；および

空間的に整列された空間的位置に基づいて、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定すること；

を含む、請求項138に記載の方法。

【請求項 140】

少なくとも1つの画像が、以下：

複数の細胞の空間的位置を決定するために使用される、第1の画像；および

複数のタンパク質の空間的位置を決定するために使用される、第2の画像；

を含む複数の画像を含む、請求項134に記載の方法。

【請求項 141】

第1の画像と第2の画像が、空間的に整列されており；および

第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数が、空間的に整列された画像に基づいて決定される、

請求項138に記載の方法。

【請求項 142】

第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定することが、細胞の重心から第1のタンパク質の端までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定することを含む、請求項134に記載の方法。

【請求項 143】

第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定することが、第1の細胞型に関連する各細胞について、以下：

第1の細胞型の細胞から、複数のタンパク質のうちの最も近いタンパク質までの、最短距離を決定すること；および

最短距離を閾値距離と比較すること；

を含む、請求項134に記載の方法。

【請求項 144】

第1の細胞型の細胞から、第1の細胞型に関連する各細胞の最も近いタンパク質までの、最短距離に基づいて、第1の細胞型の細胞から最も近いタンパク質までの平均最短距離を決定することをさらに含む、請求項143に記載の方法。

【請求項 145】

複数の細胞のそれぞれに対して、以下：

細胞の遺伝情報を受け取ること；および

細胞の遺伝情報に基づいて、複数の細胞型のうちの1つの細胞型を、細胞と関連付けること、ここで、複数の細胞型は第1の細胞型を含む；

をさらに含む、請求項134に記載の方法。

【請求項 146】

装置であって、以下：

少なくとも1つのコンピュータプロセッサ；および

10

20

30

40

50

少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されると少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別する方法を実施する複数の命令をコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体；

を含み、ここで前記方法が、以下：

少なくとも1つの画像内の複数の細胞のそれぞれについて、少なくとも1つの画像内の細胞の空間的位置を受け取ること；

少なくとも1つの画像内の複数のタンパク質のそれぞれについて、画像内のタンパク質の空間的位置を受け取ること；

複数のタンパク質の第1のタンパク質について、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定すること、ここで、距離は、複数の細胞の少なくともいくつかの空間的位置と、複数のタンパク質の少なくともいくつかの空間的位置に基づいて決定され；

第1の細胞型の細胞の数に基づいて、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；および

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動の表示を、出力すること；

を含む、前記装置。

【請求項147】

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別することが、以下：第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である複数の細胞のうちの細胞について、第1の細胞型に関連する細胞の第1のパーセンテージを決定すること；

少なくとも1つの画像内の複数の細胞のうちの、第1の細胞型に関連する細胞の第2のパーセンテージを決定すること；

第1のパーセンテージを第2のパーセンテージと比較して、比較結果を取得すること；および

比較結果を使用して、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；

を含む、請求項146に記載の装置。

【請求項148】

比較結果が、第1のパーセンテージが第2のパーセンテージよりも大きいことを示し；および

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を、比較結果を使用して識別することが、第1の細胞型の細胞のエンリッチメントが、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である領域内に存在することの識別を含む、

請求項147に記載の装置。

【請求項149】

方法がさらに、少なくとも1つの画像をカメラを用いて取得することを含む、請求項146に記載の装置。

【請求項150】

少なくとも1つの画像が複数の画像を含み、およびここで、少なくとも1つの画像をカメラを用いて取得することが、以下：

複数の画像の第1の画像を取得すること、第1の画像は、複数の細胞の空間的位置を決定するために使用され；および

複数の画像の第2の画像を取得すること、第2の画像は、複数のタンパク質の空間的位置を決定するために使用される；

を含む、請求項149に記載の装置。

【請求項151】

方法がさらに、以下：

第1の画像からの複数の細胞の空間的位置を、第2の画像からの複数のタンパク質の空間的位置と空間的に整列させること；および

空間的に整列された空間的位置に基づいて、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満

10

20

30

40

50

である第 1 の細胞型の細胞の数を決定すること；
を含む、請求項 1 5 0 に記載の装置。

【請求項 1 5 2】

少なくとも 1 つの画像が、以下：
複数の細胞の空間的位置を決定するために使用される、第 1 の画像；および
複数のタンパク質の空間的位置を決定するために使用される、第 2 の画像；
を含む複数の画像を含む、請求項 1 4 6 に記載の装置。

【請求項 1 5 3】

第 1 の画像と第 2 の画像が、空間的に整列されており；および
第 1 のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第 1 の細胞型の細胞の数が、空間的に
整列された画像に基づいて決定される、
請求項 1 5 0 に記載の装置。 10

【請求項 1 5 4】

第 1 のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第 1 の細胞型の細胞の数を決定する
ことが、細胞の重心から第 1 のタンパク質の端までの距離が閾値距離未満である第 1 の細胞
型の細胞の数を決定することを含む、請求項 1 4 6 に記載の装置。

【請求項 1 5 5】

第 1 のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第 1 の細胞型の細胞の数を決定する
ことが、第 1 の細胞型に関連する各細胞について、以下：
第 1 の細胞型の細胞から、複数のタンパク質のうちの最も近いタンパク質までの、最短距
離を決定すること；および
最短距離を閾値距離と比較すること；
を含む、請求項 1 4 6 に記載の装置。 20

【請求項 1 5 6】

方法がさらに、第 1 の細胞型の細胞から、第 1 の細胞型に関連する各細胞の最も近いタ
ンパク質までの、最短距離に基づいて、第 1 の細胞型の細胞から最も近いタンパク質まで
の平均最短距離を決定することを含む、請求項 1 5 5 に記載の装置。

【請求項 1 5 7】

方法がさらに、複数の細胞のそれぞれに対して、以下：
細胞の遺伝情報を受け取ること；および
細胞の遺伝情報に基づいて、複数の細胞型のうちの 1 つの細胞型を、細胞と関連付けるこ
と、ここで、複数の細胞型は第 1 の細胞型を含む；
を含む、請求項 1 4 6 に記載の装置。 30

【請求項 1 5 8】

少なくとも 1 つのコンピュータプロセッサによって実行されると少なくとも 1 つの画像
内の細胞型の空間的変動を識別する方法を実施する複数の命令をコードされた、少なくと
も 1 つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体であって、ここで前記方法が、以下：
少なくとも 1 つの画像内の複数の細胞のそれぞれについて、少なくとも 1 つの画像内の細胞
の空間的位置を受け取ること；
少なくとも 1 つの画像内の複数のタンパク質のそれぞれについて、画像内のタンパク質の
空間的位置を受け取ること；
複数のタンパク質の第 1 のタンパク質について、第 1 のタンパク質までの距離が閾値距離
未満である第 1 の細胞型の細胞の数を決定すること、ここで、距離は、複数の細胞の少な
くともいくつかの空間的位置と、複数のタンパク質の少なくともいくつかの空間的位置に
基づいて決定され；
第 1 の細胞型の細胞の数に基づいて、少なくとも 1 つの画像内の第 1 の細胞型の細胞の空
間的変動を識別すること；および
少なくとも 1 つの画像内の第 1 の細胞型の細胞の空間的変動の表示を、出力すること；
を含む、前記少なくとも 1 つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。 40

【請求項 1 5 9】

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別することが、以下：
第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である複数の細胞のうちの細胞について、第1の細胞型に関連する細胞の第1のパーセンテージを決定すること；
少なくとも1つの画像内の複数の細胞のうち、第1の細胞型に関連する細胞の第2のパーセンテージを決定すること；
第1のパーセンテージを第2のパーセンテージと比較して、比較結果を取得すること；および

比較結果を使用して、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；

を含む、請求項158に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

10

【請求項160】

比較結果が、第1のパーセンテージが第2のパーセンテージよりも大きいことを示し；および

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を、比較結果を使用して識別することが、第1の細胞型の細胞のエンリッチメントが、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である領域内に存在することの識別を含む、

請求項159に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項161】

方法がさらに、少なくとも1つの画像をカメラを用いて取得することを含む、請求項158に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

20

【請求項162】

少なくとも1つの画像が複数の画像を含み、およびここで、少なくとも1つの画像をカメラを用いて取得することが、以下：

複数の画像の第1の画像を取得すること、第1の画像は、複数の細胞の空間的位置を決定するために使用され；および

複数の画像の第2の画像を取得すること、第2の画像は、複数のタンパク質の空間的位置を決定するために使用される；

を含む、請求項161に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項163】

方法がさらに、以下：

30

第1の画像からの複数の細胞の空間的位置を、第2の画像からの複数のタンパク質の空間的位置と空間的に整列させること；および

空間的に整列された空間的位置に基づいて、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定すること；

を含む、請求項162に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項164】

少なくとも1つの画像が、以下：

複数の細胞の空間的位置を決定するために使用される、第1の画像；および

複数のタンパク質の空間的位置を決定するために使用される、第2の画像；

を含む複数の画像を含む、請求項158に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

40

【請求項165】

第1の画像と第2の画像が、空間的に整列されており；および

第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数が、空間的に整列された画像に基づいて決定される、

請求項162に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項166】

第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定することが、細胞の重心から第1のタンパク質の端までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定することを含む、請求項158に記載の少なくとも1つの非一時的

50

なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 167】

第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定することが、第1の細胞型に関連する各細胞について、以下：

第1の細胞型の細胞から、複数のタンパク質のうちの最も近いタンパク質までの、最短距離を決定すること；および

最短距離を閾値距離と比較すること；

を含む、請求項 158 に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 168】

方法がさらに、第1の細胞型に関連する細胞から、第1の細胞型の各細胞に最も近いタンパク質までの、最短距離に基づいて、第1の細胞型の細胞から最も近いタンパク質までの平均最短距離を決定することを含む、請求項 167 に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 169】

方法がさらに、複数の細胞のそれぞれに対して、以下：

細胞の遺伝情報を受け取ること；および

細胞の遺伝情報に基づいて、複数の細胞型のうちの1つの細胞型を、細胞と関連付けること、ここで、複数の細胞型は第1の細胞型を含む；

を含む、請求項 158 に記載の少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 170】

以下を含む、システム：

a) 細胞；および

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブと第2のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブ、ここで：

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的である。

【請求項 171】

顕微鏡をさらに含む、請求項 170 に記載のシステム。

【請求項 172】

顕微鏡が共焦点顕微鏡である、請求項 171 に記載のシステム。

【請求項 173】

コンピュータをさらに含む、請求項 170 ～ 172 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 174】

1つ以上の追加の細胞をさらに含む、請求項 170 ～ 173 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 175】

細胞が、組織試料の一部である、請求項 174 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は35 U.S.C. § 119(e)の下で、2021年5月28日に出願された米国仮出願U.S.S.N. 63/194,536の優先権を主張する；これは参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

アルツハイマー病（AD）は進行性の神経変性疾患であり、高齢者における最も一般的な認知症の形態である（Masters et al., 2015）。アミロイドβ（Aβ）プラークおよび神経原線維変化（過剰リン酸化タウ沈着）の、特に新皮質および海馬における広範な沈着は、ADの神経病理学的特徴である（Braak and Braak, 1991; Hardy and Selkoe, 2002; Masters et al., 2015）。さらに、ADの病理は、グリオシス（ミクログリアおよび星状細胞の反応性変化）および白質異常も特徴とする（Beach et al., 1989; Henstridge et al., 2019; Butt et al., 2019）。AD研究における重要な疑問は、形態学的特徴が神経変性を引き起こす細胞遺伝子パスウェイとどのように相関するのかということである。ゲノムワイド関連解析（GWAS）はADリスクに関連する遺伝子を明らかにし、AD病理のメカニズムの解明に貢献しており、ADリスク遺伝子の大部分がミクログリアで高度に発現していることが示されている（Pimenova et al., 2018; Cauwenbergh et al., 2016）。ADマウスモデルおよび他の神経変性モデルからの複数のバルクおよびscRNA-seq研究により、DAM（疾患関連ミクログリア）と呼ばれる独特の転写状態を持つミクログリアの集団が発見された（Bohlen et al., 2019; Hansen et al., 2018）。DAMに加えて、AD病理に関連する星状細胞集団も特徴付けられている。確立された解析方法は、ADの分子および細胞の複雑さを明らかにするには不利である：バルク組織解析では脳内の細胞集団の不均一性が隠蔽され、標準的画像化方法では少数の遺伝子とタンパク質しか可視化できず、限られた細胞型しか識別することができない。単一細胞RNA配列決定（scRNA-seq）の、AD脳組織への最近の適用により、主要な脳の細胞型における遺伝子発現の、実質的な不均一変化が明らかになった（Grubman et al., 2019; Keren-Shou et al., 2017; Mathys et al., 2019）。しかし、scRNA-seq研究では単一細胞の分解能は得られるが、空間パターンを保存することはできない。また、あらゆる細胞型の単一細胞調製物を、脳から偏りのない方法で単離することも容易ではない。アミロイドプラーク、タウ凝集、細胞死、およびシナプス喪失に対する多様な細胞反応の範囲と不均一性を真に理解し、上記の局所的な病変と細胞反応の間の空間的関係を調査するには、根本的に異なる技術プラットフォームが必要である。したがって、空間的に分解された単一細胞トランスクリプトミクスと組織の組織像を統合する方法は、AD研究において非常に望まれており、他の多くの応用にも役立つであろう。

【0003】

多くの既存の空間的に分解されたトランスクリプトーム技術（例：空間トランスクリプトミクス、STARmapなど）は、同じ組織切片でのタンパク質検出との互換性がない（Stahl et al., 2016; Stuart and Satija, 2019; Wang et al., 2018）。プラーク誘導性遺伝子（PIG）は、隣接する脳切片の蛍光染色による空間トランスクリプトミクス（Stahl et al., 2016; Stuart and Satija, 2019; Wang et al., 2018）を使用して明らかにされている。しかし、分解能には限界があり、細胞分解能で検証された遺伝子のセットはごくわずかである。さらに、各切片の相対的な厚さのため、隣接切片戦略は精度が低く、同じ細胞内の遺伝子発現に対するタウのもつれの影響を調査するために使用することはできない。したがって、同じ組織試料で遺伝子発現とタンパク質組織像をマッピングするための新しい方法が必要であり、かかる方法はアルツハイマー病の研究および処置に役立つであろう。

【発明の開示】

【0004】

発明の概要

本開示は、同じ細胞内での遺伝子およびタンパク質発現をプロファイリングするための方法を記載する。特に、本明細書で「STARmap Pro」と呼ぶ方法／システムの開発が、本開示に記載される。STARmap Proは、高分解能空間トランスクリプトミクスを、同じ組織切片内の特定のタンパク質の局在化と同時に実施することを可能にする。この方法／システムは、例えば、ADの病態生理学について、包括的な分子アトラスを用いて、

細胞以下の分解能で複数の細胞型にわたって理解するのに有用である（図1A）。この方法／システムは、がんなどの、遺伝子および／またはタンパク質発現の変化を伴う任意の疾患の研究、診断、または処置に、および組織発生の研究にも、有用である。STARmap Proはまた、あらゆる疾患に関連する遺伝子およびタンパク質発現を特徴づけ、正常組織の発生を研究し、または組織に対する薬剤の効果を研究するためにも使用し得る（組織に対して特定の効果を有する薬剤のスクリーニングを含む）。例えば、本開示は、hPrese nilin 2（PS2）、hAPP、およびhTAUの変異型を発現し、かつ加齢関連の脳のアミロ イド沈着、タウオパチー、神経膠症、および認知障害を示す、アミロイドプラークおよび タウオパチーの両方を有する、ADの確立されたマウスモデル（TauPS2APPトリプルト ランスジェニックマウス）の使用について記載する。（Grueninger et al., 2010 ; L ee et al., 2021）。以前のバルクおよび単一細胞RNA-seq参照および多様なAD関連 データベースから抽出された2, 766個の遺伝子の標的リストをマッピングすることにより、8月齢および13月齢のTauPS2APPマウスの空間細胞アトラスが、細胞外Aβ プラークおよび細胞内リン酸化タウ蓄積との関連で、細胞以下の分解能で作成された。単一細胞分解トランスクリプトーム解析により、TauPS2APPモデルの皮質および海馬領域における様々な細胞型にわたる疾患関連遺伝子パスウェイが、対照（control）試料と比較して識別された。多様な細胞型および状態の、様々な疾患段階における空間マップを合成することにより、AD疾患進行の包括的な時空間モデルが確立され、本明細書に記載される。

10

20

30

40

50

【0005】

一側面において、本開示は、遺伝子およびタンパク質発現（1つまたは複数の遺伝子およびタンパク質の）を、同じ細胞内で（すなわち、単一細胞分解能で、例えば、図1Aおよび1Bを参照）マッピングするための方法およびシステムを提供する。遺伝子およびタンパク質発現はまた、複数の細胞、例えば組織試料中に存在する複数の細胞において、一度にマッピングすることもできる。本明細書に開示される方法において、細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させて目的の核酸を増幅し、および1つ以上の連結アンプリコンを生成することができる。次いで細胞を、1つ以上の検出剤（例えば、抗体、または抗体断片もしくはバリエーション）と接触させることができ、ここで各検出剤は目的のタンパク質に結合する。次いで、1つ以上の連結アンプリコンおよび1つ以上の検出剤をポリマーマトリックスに埋め込むことができ、1つ以上のアンプリコンを配列決定して、転写産物の身元（identity）およびポリマーマトリックス内でのそれらの位置を決定することができる。ポリマーマトリックス内の1つ以上の目的のタンパク質に結合した検出剤の位置もまた、画像化（例えば、共焦点顕微鏡検査による）によって決定することができ、細胞内の目的の転写産物およびタンパク質の位置を、同じ試料（例：同じ細胞）内に同時にマッピングすることが可能になる。目的の転写産物およびタンパク質の位置を使用すると、個々の細胞、細胞内位置、およびオルガネラを、特定の遺伝子とタンパク質の位置および発現パターンに基づいて識別することができる。この方法は、例えば、病気の組織試料および健康な組織試料からの細胞（または複数の細胞）を比較するのに有用であり得る。この方法はまた、創薬（例：特定の効果を持つ候補薬剤のスクリーニング）、薬物の副作用の研究、および疾患（例：アルツハイマー病およびがん）の診断および処置にも役立ち得る。

【0006】

いくつかの態様において、本開示は、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための方法を提供し、この方法は、以下のステップを含む：

a) 細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブ（本明細書では「パドロック」プローブとも呼ぶ）および第2のオリゴヌクレオチドプローブ（本明細書では「プライマー」プローブとも呼ぶ）を含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配

列を含み；および

- i i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；
- b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端と一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；
- c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；
- d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；
- e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；
- f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および
- g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること。

10

20

【0007】

本明細書に記載の方法およびシステムは、組織（例：発生中の組織）における遺伝子およびタンパク質発現の研究、様々な疾患の診断および処置、ならびに創薬に有用であり得る。したがって、別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害（例：アルツハイマー病）を診断するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の遺伝子およびタンパク質発現をプロファイリングするための方法は、対象（例：疾患または障害を有すると考えられる対象またはそのリスクがある対象、または健康な対象、または健康だと思われる対象）から採取した試料からの細胞において、実施することができる。次に、細胞内の目的の様々な核酸およびタンパク質の発現を、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞（例：健康な個人からの細胞、または健康な個人の集団からの複数の細胞）における、目的の、同じ核酸およびタンパク質の発現と比較することができる。非疾患細胞における発現と比較した目的の核酸の発現の任意の変化は、対象が疾患または障害を有することを示し得る。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現は、対照実験として、疾患細胞における発現と並行してプロファイリングされ得る。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現は、以前にもプロファイリングされている可能性があり、疾患細胞における発現を、非疾患細胞に関するこの参照データと比較することができる。

30

【0008】

別の側面において、本開示は、目的の核酸もしくはタンパク質、または目的の複数の核酸および／もしくはタンパク質の、遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための方法は、細胞内で、1つ以上の候補薬剤の存在下で実施することができる。次いで、細胞（例：正常細胞または疾患細胞）における目的の様々な核酸および／またはタンパク質の発現を、1つ以上の候補薬剤に暴露されていない細胞における、目的の、同じ核酸および／またはタンパク質の発現と比較することができる。候補薬剤（単数または複数）に曝露されなかった細胞における発現と比較した、目的の核酸（単数または複数）および／またはタンパク質（単数または複数）の発現の任意の変化は、目的の核酸（単数または複数）および／またはタンパク質の発現が、候補薬剤（単数または複数）により調節されていることを示し得る。

40

50

【0009】

別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害（例：アルツハイマー病）を処置するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の遺伝子発現およびタンパク質発現をプロファイリングするための方法は、対象（例：疾患または障害を有すると考えられる、または有するリスクがある対象）から採取した試料からの細胞（または複数の細胞、例えば組織を作るもの）において実施し得る。次いで、細胞における目的の様々な核酸および／またはタンパク質の発現を、非疾患組織試料からの細胞における目的の、同じ核酸および／またはタンパク質の発現と比較することができる。次いで、非疾患細胞における発現と比べて目的の核酸および／またはタンパク質の発現に何らかの変化が観察された場合、疾患または障害の処置を、対象に施すことができる。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現は、対照実験として疾患細胞における発現と並行してプロファイリングされ得る。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現は、以前にもプロファイリングされている可能性があり、疾患細胞（または疾患細胞であると疑われる試験細胞）における発現を、非疾患細胞に関するこの参照データと比較することができる。

10

【0010】

別の側面において、本開示は、第1のオリゴヌクレオチドプローブ（本明細書では「パドロック」プローブとも呼ぶ）および第2のオリゴヌクレオチドプローブ（本明細書では「プライマー」プローブとも呼ぶ）を含む、複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで：

20

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的である。

【0011】

別の側面において、本開示は、キット（例：本明細書に開示される複数のオリゴヌクレオチドプローブのいずれかを含むキット）を提供する。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブのライブラリを含み、その各々は、目的の特定の核酸を識別するために使用することができる。いくつかの態様において、キットはさらに、目的の様々なタンパク質を検出するための検出剤、または検出剤のライブラリを含む。本明細書に記載のキットはまた、本明細書に記載の方法を実施するのに有用な任意の他の試薬または成分も含み得て、これには、限定はされないが、細胞、リガーゼ、ポリメラーゼ、アミン修飾ヌクレオチド、一次抗体、二次抗体、緩衝液、および／またはポリマーマトリックス（例えば、ポリアクリルアミドマトリックス）を作るための試薬が含まれる。

30

【0012】

本開示の別の側面は、少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別するための方法を提供する（すなわち、複数の試料間での特定の細胞型の相対的な空間分布の変動を調べること、例えば、健康な組織と疾患組織の比較）。いくつかの態様において、かかる方法は、以下のステップを含む：

40

少なくとも1つの画像内の複数の細胞のそれぞれについて、少なくとも1つの画像内の細胞の空間的位置を受け取ること；

少なくとも1つの画像内の複数のタンパク質のそれぞれについて、画像内のタンパク質の空間的位置を受け取ること；

複数のタンパク質の第1のタンパク質について、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定すること、ここで、距離は、複数の細胞の少なくともいくつかの空間的位置と、複数のタンパク質の少なくともいくつかの空間的位置に

50

基づいて決定され；

第1の細胞型の細胞の数に基づいて、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；および

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動の表示を、出力すること。かかる方法は、例えば、疾患に関連し得る目的のタンパク質から特定の距離内にある細胞型を識別するのに、有用である。例えば、本明細書でさらに説明するように、 $A\beta$ および／またはタウ封入体から一定の距離にある特定の細胞型の存在は、アルツハイマー病と関連する可能性がある。

【0013】

別の側面において、本開示は、装置であって、以下：少なくとも1つのコンピュータプロセッサ；および、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されると少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別する方法を実施する複数の命令をコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体、を含み、ここで前記方法が、以下：

少なくとも1つの画像内の複数の細胞のそれぞれについて、少なくとも1つの画像内の細胞の空間的位置を受け取ること；

少なくとも1つの画像内の複数のタンパク質のそれぞれについて、画像内のタンパク質の空間的位置を受け取ること；

複数のタンパク質の第1のタンパク質について、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定すること、ここで、距離は、複数の細胞の少なくともいくつかの空間的位置と、複数のタンパク質の少なくともいくつかの空間的位置に基づいて決定され；

第1の細胞型の細胞の数に基づいて、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；および

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動の表示を、出力すること；を含む、前記装置を提供する。

【0014】

別の側面において、本開示は、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されると少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別する方法を実施する複数の命令をコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体であって、ここで前記方法が、以下：

少なくとも1つの画像内の複数の細胞のそれぞれについて、少なくとも1つの画像内の細胞の空間的位置を受け取ること；

少なくとも1つの画像内の複数のタンパク質のそれぞれについて、画像内のタンパク質の空間的位置を受け取ること；

複数のタンパク質の第1のタンパク質について、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定すること、ここで、距離は、複数の細胞の少なくともいくつかの空間的位置と、複数のタンパク質の少なくともいくつかの空間的位置に基づいて決定され；

第1の細胞型の細胞の数に基づいて、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること；および

少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動の表示を、出力すること；を含む、前記少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体を提供する。

【0015】

前述の概念、および以下で説明する追加の概念は、任意の適切な組み合わせで構成することができることを理解されたい；なぜならば、本開示はこれらに限定されないからである。さらに、本開示の他の利点および新規な特色は、様々な非限定的態様の以下の詳細な説明から、添付の図面と併せて考慮した場合に、明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本開示の特定の態様をさらに実証するために含まれており、本開示は、これらの図面の1つ以上を、本明細書に提示される特定の態様の詳細な説明と組み合わせて参照することによって、よりよく理解することができる。

【0017】

【図1A-1F】図1A~1Fは、STARmap Proを使用した、アルツハイマー病における単一細胞の転写状態とアミロイドβおよびタウ病理との共マッピングを示す。細胞型、単一細胞の転写状態、および組織病理の、200nmの分解能での同時マッピングが表示される。図1Aは、STARmap Pro法の概要を示す；これは、同じ無傷の三次元（3D）組織内において数千のRNA種およびタンパク質疾患マーカーを細胞以下の分解能（200nm）で同時にマッピング可能な、統合的in situ法である。STARmap Proを、アミロイドβおよびタウ病理を有するTauPS2APPトランスジェニックマウス（アルツハイマー病(AD)病因のマウス疾患モデル）の特性評価に適用した。単一細胞の転写状態と組織病理（空間的細胞タイピング、擬時間軌道、差次的遺伝子発現、および遺伝子パスウェイ解析）との統合解析を使用して、アルツハイマー病の進行に伴う主要な細胞型、細胞状態、および遺伝子プログラムを明らかにした。図1Bは、STARmap Pro法の概略フローチャートを示す。脳組織を解剖して固定し、細胞内mRNAを一对のSNAIL（分子内ライゲーションによる核酸の特異的増幅）プローブによって認識し、酵素的ライゲーションおよびローリングサークル増幅によってアミン修飾cDNAアンプリコンをin situで合成した。タンパク質標的を一次抗体で標識した後、アミン修飾cDNAアンプリコン、タンパク質、および一次抗体を有する組織を、アクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(AA-NHS)で官能化してアクリルアミドと共重合させ、in situマッピングのために生体分子（例：アンプリコン、タンパク質、および抗体）の位置を固定する、ヒドロゲルと組織のハイブリッドを生成した。各cDNAアンプリコンは、遺伝子特異的識別子配列（図1Bの上部に標識されている）を含有し、これは、in situ SEDAL（動的アニーリングおよびライゲーションによるエラー低減を伴う配列決定（sequencing with error reduction by dynamic annealing and ligation））によって読み出され、その後、蛍光タンパク質染色（二次抗体および小分子色素X-34による）に供されて、タンパク質シグナルを可視化する。図1Cは、STARmap Proの拡張されたコーディング容量を示す。STARmap ProのSNAILプローブは、理論上100万（ 4^{10} ）のコーディング容量を持つ2つの5ntバーコード（「バーコードA」および「バーコードB」の標識）を含有する。図1Dは、13か月のTauPS2APPマウス脳における、細胞核、cDNAアンプリコン、およびタンパク質シグナルの画像化結果を提供する。拡大画像は、海馬のCA1領域にあるp-Tau陽性細胞を示す。細胞核のヨウ化プロピジウム（PI）染色、すべてのcDNAアンプリコンの蛍光DNAプローブ染色、アミロイドβプラークのX-34染色、およびp-Tauの免疫蛍光染色（AT8一次抗体、続いて蛍光ヤギ抗マウス二次抗体）が、提供された凡例に従って示されている。図1Eは、13月齢のTauPS2APPマウス脳スライスにおける、細胞核、cDNAアンプリコン、およびタンパク質シグナルの同時マッピングを示す代表的な画像化結果を提供する。生の共焦点蛍光画像の3D投影は、海馬のCA1領域のp-Tau陽性細胞を示す（左）。左パネルの破線領域の拡大図も提供され（中央）、これは、タンパク質とcDNAアンプリコンの両方を検出する組織病理画像化の、最後のサイクルを示す。細胞核のヨウ化プロピジウム（PI）染色、すべてのcDNAアンプリコンの蛍光DNAプローブ染色、アミロイドβプラークのX-34染色、およびp-Tauの免疫蛍光染色（AT8一次抗体、続いて蛍光ヤギ抗マウス二次抗体）が、提供された凡例に従って示される。中央のパネルの図の8サイクルのin situ RNA配列決定も示される（右）。それぞれが1ラウンドのin situ配列決定を表す蛍光チャンネルが示される。図1Fは、DNAタグ付き抗体を調製するための、例示的な合成スキームを示す。

【0018】

【図2A-2L】図2A~2Lは、TauPS2APPおよび対照(control)マウスの脳スライスにおける、最上位細胞型分類および空間解析を示す。図2Aは、4つの試料からの33,106個の細胞のトランスクリプトームプロファイルの非線形次元圧縮を可視化する

、Uniform Manifold Approximation (UMAP) プロットを提供する。ライデンアルゴリズムを使用して、トランスクリプトームプロファイルの低次元表示において良好に連結された細胞をクラスターとして識別した。13の細胞型が、各クラスターでエンリッチされている遺伝子マーカーによって定義された。個々の試料のUMAPで可視化されたように、破線の長方形で強調表示されたクラスター（星状細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、および歯状回）は、TauPS2APPと対照試料の間で細胞集団の差次的分布を示した。図2Bは、細胞型の階層的分類を示す。提供されるプロットは、次の両方が、細胞型分類プロセスの間に識別されたことを示す：13の最上位クラスター（皮質興奮性ニューロン（CTX-Ex、8,687細胞）、抑制性ニューロン（Inh、2,005細胞）、CA1興奮性ニューロン（CA1-Ex、2,754細胞）、CA2興奮性ニューロン（CA2-Ex、436細胞）、CA3興奮性ニューロン（CA3-Ex、1,878細胞）、歯状回（DG、4,377細胞）、星状細胞（Astro、2,884細胞）、内皮細胞（Endo、1,849細胞）、ミクログリア（Micro、1,723細胞）、オリゴデンドロサイト（オリゴ、4,966細胞）、オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC、549細胞）、平滑筋細胞（SMC、877細胞）、外側手綱核ニューロン（LHb、121細胞））、および24のサブレベルクラスター。目的の各最上位クラスターの遺伝子発現プロファイルが取得され、同じ方法でサブレベルクラスタリングに再度使用された。図2Cは、Aβおよびタウ病理を有するTauPS2APPの13か月試料の皮質および海馬領域の細胞アトラスを示す。最上位細胞型と病理的シグナルは、右上隅の凡例に示されているように陰影付けされており、Aβプラークとp-Tauタンパク質は、提供の凡例に示されるように、それぞれ黒と灰色で色付けされている。画像化断面は皮質と皮質下に手動で分離され、境界は黒い破線でマークされる。スケールバー、100 μm。拡大断面図：（I）は皮質領域の拡大断面図であり、Aβプラークが中央に黒く陰影付けされている；（II～III）は皮質下領域の拡大断面図であり、p-Tauタンパク質が細胞上に灰色に陰影付けされている；スケールバー、10 μm。図2Dは、Aβプラーク周囲の細胞型組成を解析するために使用される戦略を示す、概略プロットを提供する。各プラークのサイズを考慮して、異なる半径（10、20、30、40、および50 μm）の5つの同心円を生成し、細胞型組成を、各プラークの端からの異なる距離間隔で定量化した。細胞が2つの同心円の間の境界に存在する場合、それらは、反復カウントを防ぐために併合した。スケールバー、50 μm。図2Eは、TauPS2APPの13か月試料について、異なる距離間隔でのAβプラーク周囲の細胞型組成を示す。Aβプラーク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μm）における、各最上位細胞型のパーセンテージを示す積み上げ棒プロットが提供される。各領域には、全体の（平均された）細胞型組成が参照として含まれる。図2Fは、8か月および13か月のTauPS2APPおよび対照マウスの冠状脳切片から収集した72,165個の細胞のトランスクリプトームプロファイルの非線形次元圧縮を可視化するUniform Manifold Approximation (UMAP) プロットを提供する。ライデンアルゴリズムを使用して、トランスクリプトームプロファイルの低次元表示で良好に連結された細胞をクラスターとして識別した。13の主要な細胞型が、各クラスターでエンリッチされている遺伝子マーカーによって識別された。個々の試料のUMAPで可視化されたように、破線の長方形で強調表示されたクラスター（星状細胞、ミクログリア、稀突起膠細胞、および歯状回）は、UMAPにおいてTauPS2APPと対照試料の間で細胞型集団の差次的分布を示した。図2Gは、細胞型の階層的分類を示す。提供されるプロットは、次の両方が、細胞型分類プロセスの間に代表的な遺伝子マーカーに基づいて識別されたことを示す：13の最上位クラスター（皮質興奮性ニューロン（CTX-Ex、18,483細胞）、抑制性ニューロン（Inh、4,163細胞）、CA1興奮性ニューロン（CA1-Ex、3,225細胞）、CA2興奮性ニューロン（CA2-Ex、1,439細胞）、CA3興奮性ニューロン（CA3-Ex、3,225細胞）、歯状回（DG、9,562細胞）、星状細胞（Astro、6,789細胞）、内皮細胞（Endo、4,168細胞）、ミクログリア（Micro、3,732細胞）、オリゴデンドロサイト（Oligo、11,265細胞）、オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC、1,269細胞）、

10

20

30

40

50

平滑筋細胞 (SMC、2, 397細胞)、外側手綱核ニューロン (LHb、204細胞)、および27個のサブレベルクラスター。目的の各最上位クラスターの遺伝子発現プロファイルを、ライデンクラスタリングを再度使用して解析し、同じ方法でサブレベルクラスターを識別した。図2Hは、A β およびタウ病理を有するTauPS2APPの13か月試料の、皮質および海馬領域の代表的な空間細胞型アトラスを示す。最上位細胞型と病理的シグナルは、右上隅の凡例に示されているように陰影付けされており、A β プラークとp-Tauタンパク質は、提供の凡例に示されているように、それぞれ黒と灰色で色付けされている。画像化断面は皮質、脳梁(CC)、および海馬に手動で分離され、境界は黒い破線でマークされる。スケールバー、100 μ m。拡大断面図：(I)は皮質領域の拡大断面図であり、A β プラークが中央に黒く陰影付けられ、様々な型の細胞に囲まれている；(II)は海馬領域の拡大断面図であり、p-Tauタンパク質が細胞上に灰色に陰影付けされている；スケールバー、10 μ m。図2Iは、A β プラーク周囲の細胞型組成を解析するために使用される戦略を示す、概略プロットを提供する。各プラークのサイズを考慮して、5つの同心円状の境界(各プラークから10、20、30、40、および50 μ m離れた位置)を生成し、各プラークの端からの異なる距離間隔において細胞型組成を定量化した。2つのストライプ間の境界に細胞が存在する場合、それらは、反復カウントを防ぐために併合した。スケールバー、50 μ m。図2Jは、TauPS2APPの13か月試料について、異なる距離間隔におけるA β プラーク周囲の細胞型組成の、代表的な空間分布を示す。A β プラーク周囲の各距離間隔(0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μ m)における、各最上位細胞型の密度(mm²あたりの細胞数)を示す積み上げ棒プロットが提供される。各領域には、各主要細胞型の細胞密度が、比較の参考として含まれる。図2Kは、p-Tauシグナル定量化に使用される方法を示す概略図を提供する。組織切片を、20 μ m $\times$ 20 μ mのグリッドに分割した。陰影は、各正方形のp-Tauの積分強度を表し、p-Tauの異なる細胞型との共局在の程度を解析するための指標として使用した。図2Lは、13か月のTauPS2APP試料における20 μ m $\times$ 20 μ mグリッドに基づく細胞型組成解析を、p-Tau密度によってランク付けして示す。グリッド線で分割されたブロックは、タウ陽性ピクセルのパーセンテージによってランク付けされ、3つのビンにグループ化された：0% (ゼロp-Tau)、1~50% (低p-Tau)、51~100% (高p-Tau)。高p-Tauグループをさらにプラーク陽性グループと陰性グループに分けて、プラークおよびタウオパチーの細胞型分布に対する影響を詳しく解析した。積み上げ棒プロットは、主要な細胞型ごとのブロックあたりの細胞の平均数を示す。

10

20

30

40

50

【0019】

【図3A-3S】図3A~3Sは、タウ+プラーク病理下でのミクログリア集団の、独特のトランスクリプトーム応答および空間的組成を実証する。TauPS2APPおよび対照試料におけるミクログリアの、時空間遺伝子発現解析が示される。図3Aは、ミクログリア細胞集団のUMAPをサブクラスターアノテーションと共に提供する。プロットは、図2Aから識別された1723個のミクログリア細胞のトランスクリプトームプロファイルの低次元表示を示す。3つのサブレベルクラスター(Micro1 (n=779)、Micro2 (n=415)、およびMicro3 (n=529))がライデンアルゴリズムによって識別された。Micro3クラスターは、以前の報告および疾患試料での著しいエンリッチメントに従って、その遺伝子マーカーにより疾患関連ミクログリア(DAM)集団としてアノテーションされた。各試料(対照8か月、TauPS2APP8か月、対照13か月、TauPS2APP13か月)についてのサブレベル細胞クラスターのUMAPプロットも含まれていた。図3Bは、異なるサブクラスターにわたる代表的マーカーの発現レベルを示す(行ごとのZスコア)。図3Cは、ミクログリア細胞集団のUMAPを擬時間軌道と共に提供する。Monocle 3によって生成されたミクログリア細胞のトランスクリプトームプロファイルの、低次元表示を示すプロットが提供される。カラーマップは、擬時間の値を表す。対応する軌道が構築され、低次元の埋め込み上にプロットされて、細胞集団の生物学的進行を示す。各試料のプロットも含まれる。軌道開始アンカーは、手動で選択された(8か月の対

照試料に基づいて)。図3Dは、ミクログリア細胞集団の擬時間埋め込みを、サブクラスターアノテーションと共に示す。擬時間計算で使用する低次元の埋め込みを示すプロットが、ミクログリアのサブクラスターのアノテーションと共に提供される。図3Eは、擬時間分布を示す。ミクログリアの3つの亜集団の擬時間の分布および、4つの試料におけるミクログリアの擬時間の分布が示される。マン・ホイットニー・ウィルコクソン検定、 $ns: p > 0.05$ 、 $*p \leq 0.05$ 、 $**p \leq 0.01$ 、 $***p \leq 0.001$ 、 $****p \leq 0.0001$ 。図3Fは、対照の13か月試料のミクログリア集団の空間マップを提供する。スケールバー、 $100 \mu m$ 。図3Gは、TauPS2APPの13か月試料のミクログリア集団の空間マップを提供する。スケールバー、 $100 \mu m$ 。2つの拡大セクション（I、II）を右上隅に示す。スケールバー、 $10 \mu m$ 。図3Hは、プラーク周囲の領域ごとの細胞密度および細胞型組成を示す。各試料の皮質および皮質下領域の両方における、各ミクログリアサブクラスターの密度（ mm^2 あたりの数）を示す積み上げ棒グラフが提供される（上）。棒グラフの陰影は、図3Fの細胞型の凡例に対応する。プロットは、8か月と13か月の両方のTauPS2APP試料での、DAMの著しいエンリッチメントを示す。A β プラーク周囲の各距離間隔（ $0 \sim 10$ 、 $10 \sim 20$ 、 $20 \sim 30$ 、 $30 \sim 40$ 、 $40 \sim 50 \mu m$ ）における、各ミクログリアサブクラスターのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフも提供される（下）。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図3Iは、差次的に発現された遺伝子（DEG）の、遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）の結果を示す。統計的に有意な（名目p値 < 0.01 ）エンリッチメントスコアの符号により陰影付けされている。termは、termサイズ $20 \sim 1000$ でフィルタリングされる。図3Jは、ADと対照の比較からのミクログリア集団のDEGの、検証されたサブセットを示すマトリックスプロットを提供する。2766個の遺伝子データセットおよび64個の遺伝子検証結果で有意に変化した上位のDEG（p値でランク付け）の、行ごとにスケールされた発現値を示すプロットが提供される。図3Kは、ミクログリア細胞集団のサブクラスターリングを示す。プロットは、図2Aから識別された3732個のミクログリア細胞の、トランスクリプトームプロファイルの低次元表示を示す（上）。3つのサブレベルクラスター（Micro1（ $n = 1924$ ）、Micro2（ $n = 784$ ）、およびMicro3（ $n = 1024$ ））が、ライデンアルゴリズムによって識別された。Micro3クラスターは、以前の報告および疾患試料での著しいエンリッチメントに従って、その遺伝子マーカーにより疾患関連ミクログリア（DAM）集団としてアノテーションされた。各試料のミクログリア細胞集団のサブレベル細胞クラスターの拡散マップの可視化（対照8か月、TauPS2APP8か月、対照13か月、TauPS2APP13か月、各条件下で $n = 2$ ）も含まれていた。図3Lは、細胞集団の異なるサブクラスター間の代表的な遺伝子マーカーの発現レベルを示す。各ミクログリア亜集団の代表的なマーカーの平均遺伝子発現（陰影）と、それらを発現する細胞のパーセンテージ（ドットサイズ）の両方を示す、ドットプロットが提供される。遺伝子発現値は、各列に対して正規化された。図3Mは、ミクログリア細胞集団の拡散マップを、擬時間軌道と共に提供する。プロットは、Monocle 3によって生成されたミクログリア細胞のトランスクリプトームプロファイルの低次元表示を示す（上）。カラーマップは、擬時間値を表す。対応する軌道が構築され、低次元の埋め込み上にプロットされて、細胞集団の生物学的進行が示される。各試料のプロットも含まれる。軌道開始アンカーは手動で選択された（8か月の対照試料に基づいて）。異なる試料からの細胞は、拡散マップ埋め込み内に別々に強調表示される（下）。図3Nは、ミクログリア細胞集団の擬時間埋め込みをサブクラスターのアノテーションと共に示す。擬時間計算で使用する低次元埋め込みを示すプロットが、図3Kで識別されたミクログリアのサブクラスターアノテーションおよび図3Mで識別された軌道と共に提供される。図3Oは、対照の13か月試料のミクログリア集団の空間マップを提供する。スケールバー、 $100 \mu m$ 。図3Pは、TauPS2APPの13か月試料のミクログリア集団の空間マップを提供する。スケールバー、 $100 \mu m$ 。2つの拡大セクション（I、II）が黒いボックス内に強調表示される。スケールバー、 $10 \mu m$ 。黒の破線は、皮質、脳梁（cc）、および海馬の間の境界をマークする。図3Qは、プラーク周囲の領域ごとの細胞密

10

20

30

40

50

度と細胞型の組成を示す。2つの時点における対照およびTauPS2APPマウスの皮質および海馬領域の両方における、各ミクログリアサブクラスターの密度 (mm^2 あたりの数) を示す箱ひげ図が提供される (上)。棒グラフの陰影は、図3Pの細胞型の凡例に対応する。プロットは、8か月および13か月でのTauPS2APP試料の両方の脳領域における、DAMの著しいエンリッチメントを示す。13か月でのA β プラーク周囲の各距離間隔 (0~10、10~20、20~30、30~40、40~50 μm) における、各ミクログリアサブクラスターのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフも提供される (下)。各領域には、各エリアの各垂集団の全体の細胞密度が、比較の基準として含まれた。図3Rは、ミクログリアサブタイプの4つの代表的な遺伝子マーカーの発現を示す、拡散マップを提供する。陰影は、各細胞の遺伝子の $\log_{10}$ (平均遺伝子発現値) を示す。図3Sは、プラークからの複数の距離間隔 (0~10、10~20、20~30、30~40、40+ μm) にわたるミクログリアの空間DEGのZスコアを示す、マトリックスプロットを提供する。

10

【0020】

【図4A~4T】図4A~4Tは、タウ+プラーク病理の下での疾患関連集団および星状細胞の空間的組成を示す。TauPS2APPおよび対照試料における星状細胞の時空間遺伝子発現解析が示される。図4Aは、星状細胞集団のUMAPをサブクラスターのアノテーションと共に提供する。図2Aから識別された2884個の星状細胞のトランスクリプトームプロファイルの、低次元表示を示すプロットが提供される。3つのサブレベルクラスター (Astro1 ($n=1068$)、Astro2 ($n=1271$)、およびAstro3 ($n=545$)) が、ライデンアルゴリズムによって識別された。Astro3クラスターは、以前の報告と疾患試料での著しいエンリッチメントに従って、その遺伝子マーカーにより疾患関連星状細胞 (DAA) としてアノテーションされた。各試料 (対照8か月、TauPS2APP8か月、対照13か月、TauPS2APP13か月) についてのサブレベル細胞クラスターのUMAPプロットも含まれていた。図4Bは、異なるサブクラスターにわたる代表的なマーカーの発現レベルを示す。行ごとのZスコアによる陰影付け。図4Cは、星状細胞集団のUMAPを擬時間軌道と共に提供する。Monocle 3によって生成された星状細胞のトランスクリプトームプロファイルの低次元表示を示すプロットが提供される。カラーマップは擬時間値を表す。対応する軌道が構築されて、低次元の埋め込み上にプロットされ、集団の生物学的進行が示された。各試料のプロットも含まれる。図4Dは、星状細胞の細胞集団の擬時間埋め込みを、サブクラスターのアノテーションと共に示す。擬時間計算で使用する低次元埋め込みを示すプロットを、星状細胞のサブクラスターのアノテーションと共に提供する。図4Eは、擬時間分布を示す。星状細胞の3つの垂集団の擬時間の分布と、4つの試料における星状細胞の擬時間の分布が示される。マン・ホイットニー・ウィルコクソン検定、 $ns: p > 0.05$ 、 $* p \leq 0.05$ 、 $** p \leq 0.01$ 、 $*** p \leq 0.001$ 、 $**** p \leq 0.0001$ 。図4Fは、対照13か月試料の星状細胞集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。図4Gは、TauPS2APPの13か月試料の星状細胞集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション (I、II) を右上隅に示す。スケールバー、10 μm 。図4Hは、プラーク周囲の領域ごとの細胞密度および細胞型組成を示す。各試料の皮質および皮質下領域の両方における、各星状細胞サブクラスターの密度 (mm^2 あたりの数) を示す積み上げ棒グラフが提供される (上)。棒グラフの陰影は、図4Fの細胞型の凡例に対応する。プロットは、特に13か月において皮質のDAAが著しくエンリッチされていることを示す。A β プラーク周囲の各距離間隔 (0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm) における、各星状細胞サブクラスターのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフも提供される (下)。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図4Iは、擬時間埋め込みに関するDEGを示す。擬時間埋め込み上で4つの上方制御された疾患遺伝子の発現を示すUMAPが示されており、生のカウントの陰影付きスケールは $\log_{10}$ スケールにより調整した。図4Jは、差次的に発現された遺伝子 (DEG) のGSEA結果を示す。termは、termサイズ (20~1000) と名目p値 (< 0.01) によって

20

30

40

50

フィルタリングされる。図 4 K は、AD と対照の比較から得られた星状細胞集団の DEG の検証済みサブセットを示すマトリックスプロットを提供する。2766 個の遺伝子データセットおよび 64 個の遺伝子の検証結果において有意に変化した上位の (p 値によってランク付けされた) DEG の、行ごとにスケールされた発現値を示すプロットが提供される。図 4 L は、星状細胞集団のサブクラスターを示す。図 2 A から識別された 6, 789 個の星状細胞のトランスクリプトームプロファイルの、拡大拡散マップの可視化を示すプロットが提供される (上)。星状細胞の 3 つのサブレベルクラスター (Astro1 (n = 2, 547)、Astro2 (n = 3, 278)、および Astro3 (n = 964)) が、ライデンアルゴリズムによって識別された。Astro3 クラスターは、以前の報告および疾患試料での著しいエンリッチメントに従って、その遺伝子マーカーにより疾患関連星状細胞 (DAA) としてアノテーションされた。各試料の星状細胞のサブレベル細胞クラスターの拡散マップ埋め込み (対照 8 か月、TauPS2APP 8 か月、対照 13 か月、TauPS2APP 13 か月、各条件下で n = 2) も含まれていた。図 4 M は、異なるサブクラスターにわたる代表的なマーカーの発現レベルを示す。各星状細胞亜集団の代表的なマーカーの平均遺伝子発現 (陰影) と、それらを発現する細胞のパーセンテージ (ドットサイズ) の両方を示すドットプロットが提供される。遺伝子発現値は各列に対して正規化された。図 4 N は、星状細胞集団の拡散マップを擬時間軌道と共に提供する。Monocle 3 によって生成された星状細胞のトランスクリプトームプロファイルの拡散マップの可視化が提供される (上)。カラーマップは擬時間値を表す。対応する軌道が構築され、低次元の埋め込み上にプロットされて、集団の生物学的進行が示された。各試料のプロットも含まれる。軌道開始アンカーは、Astro1 集団に基づき手動で選択された。黒の矢印は、疾患関連遺伝子発現の変化に関連する軌道上の分岐点を強調表示する。異なる試料からの細胞は、拡散マップ埋め込み内に別々に強調表示された (下)。図 4 O は、図 4 L で識別された異なる種類の星状細胞を示す拡散マップを、図 4 N で識別される軌道と共に提供する。星状細胞の細胞集団の擬時間埋め込みが、サブクラスターのアノテーションと共に示される。擬時間計算で使用する低次元埋め込みを示すプロットが、星状細胞のサブクラスターのアノテーションと共に提供される。図 4 P は、TauPS2APP 13 か月試料の星状細胞集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。図 4 Q は、TauPS2APP 13 か月試料の星状細胞集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2 つの拡大セクション (I、II) が示される。スケールバー、10 μm 。黒の破線は、皮質、脳梁 (cc)、および海馬の間の境界をマークする。図 4 R は、プラーク周囲の領域ごとの細胞密度および細胞型組成を示す。各試料 (対照および TauPS2APP マウス) の皮質および海馬領域の両方における、各星状細胞サブクラスターの密度 (mm^2 あたりの数) を示す箱ひげ図が 2 つの時点で提供される (上)。棒グラフの陰影は、図 4 Q の細胞型の凡例に対応する。プロットは、特に 13 か月で皮質の TauPS2APP 13 の著しいエンリッチメントを示す。13 か月での A β プラーク周囲の各距離間隔 (0 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 40、および 40 ~ 50 μm) における、星状細胞サブクラスターの密度 (mm^2 あたりの数) を示す積み上げ棒グラフも提供される (下)。各領域では、各エリアの各亜集団の細胞密度が、比較の基準として含まれた。図 4 S は、擬時間埋め込みに関する DEG を示す。擬時間埋め込み上の星状細胞亜集団の 4 つの代表的な遺伝子マーカーの発現を示す拡散マップが示されており、生のカウントの陰影付きスケールは、 $\log_{10}$ 変換により調整された。図 4 T は、プラークからの複数の距離間隔 (0 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 30、30 ~ 40、40 + μm) にわたる星状細胞の空間 DEG の Z スコアを示す、マトリックスプロットを提供する。

【0021】

【図 5 A - 5 V】図 5 A ~ 5 V は、タウ+プラーク病理下での、オリゴデンドロサイトおよび前駆細胞のサブレベルクラスターリングおよび組成を示す。TauPS2APP および対照試料における、オリゴデンドロサイトおよび前駆細胞の時空間遺伝子発現解析が示される。図 5 A は、オリゴデンドロサイトおよび前駆細胞 (OPC) 集団の UMAP を、サブクラスターのアノテーションと共に提供する。図 2 A から識別された 4966 個のオリゴデン

10

20

30

40

50

ドロサイトおよび549個のOPCのトランスクリプトームプロファイルの低次元表示を示すUMAPプロットが提供される。3つのサブレベルクラスター（Oligo1（ $n=4,295$ ）、Oligo2（ $n=181$ ）、Oligo3（ $n=490$ ））およびOPC（ $n=549$ ）が、ライデンアルゴリズムによって識別された。Oligo3クラスターは、疾患エンリッチされた（disease-enriched）オリゴデンドロサイトとしてアノテーションされた。各試料（対照8か月、TauPS2APP8か月、対照13か月、TauPS2APP13か月）についてのサブレベル細胞クラスターのUMAPプロットも含まれていた。図5Bは、オリゴデンドロサイトの異なるサブクラスターにわたる代表的なマーカーの発現レベルを示す（行ごとのZスコア）。図5Cは、オリゴデンドロサイト関連細胞集団のUMAPを擬時間軌道と共に提供する。Monocle 3によって生成されたオリゴデンドロサイトおよびOPCのトランスクリプトームプロファイルの低次元表示を示すプロットが提供される。カラーマップは擬時間値を表す。対応する軌道が構築され、低次元の埋め込み上にプロットされて、集団の生物学的進行が示された。各試料のプロットも含まれる。図5Dは、オリゴデンドロサイト関連細胞集団の擬時間埋め込みを、サブクラスターのアノテーションと共に示す。擬時間計算で使用する低次元埋め込みを示すプロットが、オリゴデンドロサイトおよび前駆細胞のサブクラスターアノテーションと共に提供される。図5Eは、オリゴデンドロサイトおよびオリゴデンドロサイト前駆細胞の3つの亜集団の擬時間の分布、ならびに4つの試料におけるそれらの細胞の擬時間の分布を示す。マン・ホイットニー・ウィルコクソン検定、 $ns: p > 0.05$ 、 $* p \leq 0.05$ 、 $** p \leq 0.01$ 、 $*** p \leq 0.001$ 、 $**** p \leq 0.0001$ ）。図5Fは、対照13か月試料のオリゴデンドロサイト関連集団の空間マップを提供する。スケールバー、 $100 \mu m$ 。図5Gは、TauPS2APP13か月試料のオリゴデンドロサイト関連集団の空間マップを提供する。スケールバー、 $100 \mu m$ 。2つの拡大セクション（I、II）を右上隅に提供する。スケールバー、 $10 \mu m$ 。図5Hは、プラーク周囲の領域ごとの細胞密度および細胞型組成を示す。各試料の皮質および皮質下領域の両方における各オリゴデンドロサイトサブクラスターおよびOPCの密度（ mm^2 あたりの数）を示す、積み上げ棒グラフが提供される。棒グラフの陰影は、図5Fの細胞型の凡例に対応する。A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm ）における、各オリゴデンドロサイトサブクラスターとOPCのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフも提供される（下）。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図5Iは、差次的に発現された遺伝子（DEG）の遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）の結果を示す。termは、termサイズ20~1000および名目p値<0.01によってフィルタリングされる。図5Jは、マーカー遺伝子を発現する細胞の擬時間埋め込みを示す。代表的なマーカーを発現する細胞の擬時間分布を示すUMAPが提供される。図5Kは、ADと対照の比較からのオリゴデンドロサイト関連集団のDEGの検証されたサブセットを示す、マトリックスプロットを提供する。2766個の遺伝子データセットおよび64個の遺伝子の検証結果において、有意に変化した上位DEG（p値によるランク）の行ごとにスケールされた発現値を示すプロットが提供される。図5Lは、オリゴデンドロサイトおよび前駆細胞（OPC）集団のサブクラスターを示す。図2Aから識別された11,265個のオリゴデンドロサイトおよび1,269個のOPCの拡大拡散マップの可視化が提供される（上）。ライデンクラスタリングによって識別されたオリゴデンドロサイトの3つのサブクラスター：Oligo1（ $n=9,594$ ）、Oligo2（ $n=910$ ）、Oligo3（ $n=761$ ）、およびOPC（ $n=1,269$ ）を示す。各試料（対照8か月、TauPS2APP8か月、対照13か月、TauPS2APP13か月）のオリゴデンドロサイトおよびOPCのサブクラスターの拡散マップ埋め込みも提供される（下）。図5Mは、オリゴデンドロサイトおよびOPCの異なるサブクラスターにわたる、代表的なマーカーの発現レベルを示す。各亜集団の代表的なマーカーの平均遺伝子発現（陰影）と、それらを発現する細胞のパーセンテージ（ドットサイズ）の両方を示す、ドットプロットが提供される。遺伝子発現値は各列に対して正規化された。図5Nは、オリゴデンドロサイト関連細胞集団の拡散マップ擬時間軌道の可視化を示す。Monocle 3によって生成されたオリゴデ

10

20

30

40

50

ンドロサイトとOPCの擬時間軌道の拡散マップの可視化が提供される（上）。カラーマップは擬時間値を表す。対応する擬時間軌道が、拡散マップ埋め込み上にプロットされた。軌道開始アンカーは、OPC集団に基づき手動で選択された。黒の矢印は、疾患関連遺伝子発現の変化に関連する軌道上の分岐点を強調表示する。異なる試料からの細胞は、拡散マップ埋め込み内に別々に強調表示された（下）。図5 Oは、図5 Lで識別された異なる種類のオリゴデンドロサイトおよびOPCを示す拡散マップを、軌道と共に提供する。図5 Pは、対照13か月試料のオリゴデンドロサイト関連集団の空間細胞マップを提供する。スケールバー、100 μm 。図5 Qは、TauPS2APP13か月試料のオリゴデンドロサイト関連集団の空間細胞マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション（I、II）が提供され、黒いボックス内に強調表示された拡大領域が示される。スケールバー、10 μm 。黒の破線は、皮質、脳梁（cc）、海馬、および白板（alveus）の間の境界をマークする。図5 Rは、2つの時点における対照マウスおよびTauPS2APPマウスの皮質、脳梁、および海馬領域における、各オリゴデンドロサイトサブタイプおよびOPCの密度（ mm^2 当たりの数）を示す箱ひげ図を提供する。プロットは、脳梁（cc）および海馬領域における、Oligo2の著しいエンリッチメントを示す。図5 Sは、13か月でのA β プラーク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、40～50 μm ）における、各オリゴデンドロサイトサブクラスターとOPCの密度（ mm^2 当たりの数）を示す積み上げ棒グラフを提供する。各エリアの各亜集団の全体の細胞密度が、比較の基準として含まれた（all）。図5 Tは、p-Tau病理に関連したオリゴデンドロサイト系統の細胞型組成解析を示す。13か月でのTauPS2APP試料の組織領域を20 μm × 20 μm のグリッドに分割し、p-Tau密度によってランク付けした。グリッド線で分割されたブロックは、p-Tau陽性ピクセルのパーセンテージによってランク付けされ、ゼロ（0%）、低（1%～50%）、高（50%～100%）の3つのピンにグループ化された。高p-Tauのピンは、A β プラークの有無に基づいてさらに2つのグループに分類される。各オリゴデンドロサイト関連サブタイプのブロックあたりの細胞の平均数を示す積み上げ棒グラフが提供される。図5 Uは、海馬白板領域におけるオリゴデンドロサイトおよびOPCの細胞密度およびサブタイプ組成を示す。図5 Vは、プラークからの複数の距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、40+ μm ）にわたる、オリゴデンドロサイトの空間DEGのzスコアを示すマトリックスプロットを提供する。

10

20

30

40

50

【0022】

【図6 A～6 U】図6 A～6 Uは、TauPS2APPおよび対照試料における、ニューロンの差次的遺伝子発現解析および空間情報を示す。図6 Aは、興奮性ニューロン集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。TauPS2APPの13か月試料（総細胞数：CTX-Ex1：2, 292、CTX-Ex2：2, 766、CTX-Ex3：1, 184、CTX-Ex4：2, 445、CA1：2, 754、CA2：436、CA3：1, 878、DG：4, 377）および、下部にCA1領域の1倍拡大セクション。スケールバー、10 μm 。p-Tauタンパク質シグナルは、細胞上に灰色に色付けされている。図6 Bは、抑制性ニューロン集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。TauPS2APPのCnr1：421、Lamp5：191、Pvalb：864、Sst：529。13か月試料および、CA1領域の1倍拡大セクションを下に示す。スケールバー、10 μm 。p-Tauタンパク質のシグナルは、細胞上に灰色に色付けされている。図6 Cは、プラーク周囲の興奮性ニューロン組成を示す。ADの13か月試料の皮質および皮質下領域からのA β プラーク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μm ）における、興奮性ニューロン集団の各サブクラスターのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフが提供される。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図6 Dは、プラーク周囲の抑制性ニューロン組成を示す。ADの13か月試料の皮質および皮質下領域からのA β プラーク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μm ）における、抑制性ニューロン集団の各サブクラスターのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフが提供される。各領域には、全体の細胞型組成が参照と

して含まれる。図 6 E は、p-Tau 陽性ニューロンの細胞型組成を示す。現在の閾値下の各 AD 試料におけるタウ陽性興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンの組成を示す、積み上げ棒グラフが提供される。図 6 F は、プラーク周囲の p-Tau シグナルの定量化を示す。p-Tau+ピクセル（強度>閾値）を、TauPS2APP 13 か月試料の皮質および皮質下領域からの A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および 40~50 μ m）において定量化した。値はリング面積により正規化した。図 6 G は、歯状回（DG）細胞集団の UMAP を、擬時間軌道と共に提供する。Monocle 3 によって生成された各試料の歯状回領域内の細胞集団のトランスクリプトームプロファイルの低次元表示を示すプロットが提供される。カラーマップは擬時間値を表す。対応する軌道が構築され、低次元の埋め込み上にプロットされて、集団の生物学的進行が示された。各試料のプロットも含まれる。図 6 H は、DG 集団について擬時間によって陰影付けされた空間細胞マップを提供する。スケールバー、100 μ m。図 6 I は、擬時間埋め込み上の DEG を示す。擬時間埋め込み上の DG ニューロンの DEG 解析から、4 つの大きく変化した遺伝子の発現を示す UMAP が提供される。生のカウントの陰影スケールは、log₁₀ スケールにより調整した。図 6 J は、AD と対照の比較からの興奮性ニューロン集団および抑制性ニューロン集団の DEG の検証されたサブセットを示す、マトリックスプロットを提供する。2,766 個の遺伝子データセットおよび 64 個の遺伝子の検証結果において、有意に変化した上位 DEG（p 値によってランク付け）の行ごとにスケールリングされた発現値を示すプロットが提供される。図 6 K は、皮質興奮性ニューロン細胞集団のサブクラスターリングを示す。ライデンクラスターリングによって識別された皮質興奮性ニューロン細胞の 4 つのサブクラスターを示す UMAP の可視化：CTX-Ex1（n=4,972）、CTX-Ex2（n=6,049）、CTX-Ex3（n=4,158）、および CTX-Ex4（n=3,304）。図 6 L は、皮質興奮性ニューロン細胞の異なるサブクラスター間の代表的な遺伝子マーカーの発現レベルを示す。各亜集団の代表的なマーカーの平均遺伝子発現（陰影）と、それらを発現する細胞のパーセンテージ（ドットサイズ）の両方を示す、ドットプロットが提供される。遺伝子発現値は、各列に対して正規化された。図 6 M は、抑制性ニューロン細胞集団のサブクラスターリングを示す。ライデンクラスターリングによって識別された抑制性細胞の 6 つのサブクラスターを示す UMAP の可視化：Cnr1（n=512）、Lamp5（n=573）、Pvalb（n=1,392）、Pvalb-Nog（n=410）、Sst（n=959）、および Vip（n=317）。図 6 N は、抑制性ニューロン細胞の異なるサブクラスター間の代表的な遺伝子マーカーの発現レベルを示す。各亜集団の代表的マーカーの平均遺伝子発現（陰影）および、それらを発現する細胞のパーセンテージ（ドットサイズ）の両方を示す、ドットプロットが提供される。遺伝子発現値は、各列に対して正規化された。図 6 O は、TauPS2APP の 13 か月試料における興奮性ニューロン集団の A β プラークおよび p-Tau の空間マップを提供する（上）。スケールバー、100 μ m。TauPS2APP の 13 か月試料の総細胞数：CTX-Ex1：2,292、CTX-Ex2：2,766、CTX-Ex3：1,184、CTX-Ex4：2,445、CA1：2,754、CA2：436、CA3：1,878、DG：4,377 および、黒いボックス内に示された CA1 領域のセクションの高倍率図が下部に示される。スケールバー、10 μ m。p-Tau タンパク質シグナルは、細胞上に灰色に色付けされている。図 6 P は、TauPS2APP の 13 か月試料における抑制性ニューロン集団の A β プラークおよび p-Tau の空間マップを提供する（上）。スケールバー、100 μ m。TauPS2APP の Cnr1：421、Lamp5：191、Pvalb：864、Sst：529。13 か月の試料と、黒いボックス内に示された CA1 領域のセクションの高倍率図が下に示される。スケールバー、10 μ m。p-Tau タンパク質シグナルは、細胞上に灰色に色付けされている。図 6 Q は、プラーク周囲の興奮性ニューロン組成を示す。AD の TauPS2APP の 13 か月試料の皮質および皮質下領域からの A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および 40~50 μ m）における、様々な脳領域からの抑制性ニューロン集団の各サブクラスターの密度（mm² あたりの数）を示す、積み上げ棒グラフが提供される。各領域では、各細胞型亜集団の全体の細胞密度が、参照比較基準として含まれた。図 6 R は、

10

20

30

40

50

ブランク周囲の抑制性ニューロン組成を示す。ADのTauPS2APPの13か月試料の皮質および皮質下領域からのA β ブランク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μ m）における、様々な脳領域からの抑制性ニューロン集団の各サブクラスターの密度（mm²あたりの数）を示す、積み上げ棒グラフが提供される。各領域では、各細胞型亜集団の全体の細胞密度が、参照比較基準として含まれた。図6Sは、対照マウスおよびTauPS2APPマウスにおける各皮質興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンサブタイプの密度（mm²あたりの数）を示す、棒グラフを提供する。図6Tは、A β ブランク周囲のp-Tauシグナルの定量化を示す。p-Tau+ピクセル（強度>閾値）は、TauPS2APPの13か月試料の皮質および皮質下領域からのA β ブランク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μ m）において定量化した。値はリング面積により正規化した。Y軸の値は、各脳領域の合計p-Tauシグナルによって正規化した。図6Uは、p-Tau陽性ニューロンの細胞型組成を示す。積み上げ棒グラフは、各細胞の面積に対するタウ陽性ピクセルの比率によって定義される、2つの時点における現在の閾値下での各AD試料（対照およびTauPS2APP）におけるp-Tau陽性興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンの組成を示す。

10

20

30

40

50

【0023】

【図7A～7M】図7A～7Mは、疾患関連細胞型の統合パスウェイおよび空間解析を示す。図7Aは、ADの13か月試料において目的の各細胞型のDEGでエンリッチされている有意な（名目p値<0.05）生物学的プロセス関連termを示す、GSEAヒートマップを提供する。termは、termサイズ（20～1000）によってフィルタリングされる。タイルの陰影は、正規化されたエンリッチメントスコアを表す。図7Bは、25 μ mリングの外側の細胞と比較した、25 μ mリング内の細胞からのADの13か月試料のブランク近傍領域において、上方制御された遺伝子（LogFC>0.1）を示す、マトリックスプロットを提供する（行ごとのZスコアによる陰影付け）。図7Cは、ADの13か月試料中のブランク誘導遺伝子（PIG）の、ADの8か月試料中のPIGおよび18か月のAppNL-G-Fマウスにおける以前に報告されたPIGとの重複を強調する、ベン図を提供する。図7Dは、ADの8か月試料（左）および13か月試料（右）におけるA β ブランク周囲の、疾患関連ミクログリア（DAM）、疾患関連星状細胞（DAA）、オリゴデンドロサイト、OPC、およびニューロン細胞の集団の空間ヒストグラムを提供する。ヒストグラムでは、各ブランクの端からの2D最大投影において、10 μ mピン内の細胞を計数した。図7Eは、8か月のADマウス（左）および13か月のマウスの脳におけるA β ブランク周囲のDAM、DAA、オリゴデンドロサイト、OPC、ミクログリア（DAMを除く）、星状細胞（DAAを除く）、およびニューロン細胞の集団の概略図を提供する。概略図内の細胞の数は、各リング内の各細胞型の計算された平均細胞数の近似値である。図7F～7Gは、TauPS2APPの8か月試料（図7F）およびTauPS2APPの13か月試料（図7G）での、A β ブランク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、>40 μ m）における、遺伝子クラスタリング結果を示すマトリックスプロットを提供する。行ごとのZスコアによる陰影付け。図7H～7Iは、TauPS2APPの8か月試料（図7H）およびTauPS2APPの13か月試料（図7I）でのA β ブランク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、>40 μ m）における、ブランク誘導遺伝子（0～40の間隔でのエンリッチメント、調整されたp値<0.01）を示すマトリックスプロットを提供する。行ごとのZスコアによって色分け。図7Jは、TauPS2APPの8か月および13か月試料におけるSDEGと、TauPS2APPにおけるSDEGおよび18か月のAppNL-G-Fマウスにおける以前に報告されたPIGとの重複を強調する、ベン図を示す。図7Kは、TauPS2APPの8か月および13か月の試料、および以前に報告されたPIGにおける、SDEGの著しくエンリッチされたGO termを示す。図7Lは、ADのTauPS2APPの8か月試料（左）および13か月試料（右）におけるA β ブランク周囲の、Micro3疾患関連ミクログリア（DAM）、Astro3疾患関連星状細胞（DAA）、Oligo2/3オリゴデンドロサイト、OPC、および神経細胞集団の、空間ヒストグラムを提供する。ヒストグラムでは、各ブランクの端からの2D最大投影において、

10 μm ビン内の細胞を計数した。図7Mは、8か月のADマウス（左）と13か月のマウスの脳の海馬白板のA β プラークおよびオリゴデンドロサイトサブタイプ周辺の様々な細胞型（例：DAM、DAA、オリゴデンドロサイト、OPC、ミクログリア（DAMを除く）、星状細胞（DAAを除く）、およびニューロン細胞集団）の概略図を提供する。概略図内の細胞の数は、各リング内の各細胞型の細胞数のおよその比率である。

【0024】

【図8A-8E】図8A~8Eは、STARmap Pro法の開発を示す。図8AはSTARmap Proの手順を示し、ここでp-Tau一次抗体染色は、mRNAのin situハイブリダイゼーションおよび増幅後に実施された。画像化結果は、cDNAアンプリコンとタンパク質の両方からの強いシグナルを示した。図8Bは、p-Tau一次抗体染色を、mRNAのin situハイブリダイゼーションおよび増幅の前に行う代替手順を示す。画像化結果は、cDNAアンプリコンからののはるかに弱いシグナルを示し、RNA分解が、抗体のインキュベーションおよび洗浄ステップ中に起こっていることが示唆された。図8Cは、以前のSTARmap法と比較して、STARmap Proの強化された特異性を説明する概略図を提供する。元のSTARmap法設計では、すべての遺伝子のDNAプローブがライゲーション接合部で同一のDNA配列を共有しているため、パドロックプローブは、近くにプライマープローブがある場合でも、環状化されて非特異的に増幅される可能性がある。これにより、以前のSTARmap法を使用すると、誤った信号が発生する可能性がある。STARmap Proでは追加の5 n tのバーコードがライゲーション部位に配置され、非特異的結合プローブのライゲーションを防ぐことができるため、特異性が向上する。図8Dおよび8Eは、ライゲーション部位付近にバーコード不一致がある場合（図8D）およびない場合（図8E）の、SNAILプローブを使用したSTARmap Proの画像化結果を示す。細胞核のDAPI染色とすべてのcDNAアンプリコンの蛍光DNAプローブ染色が、提供された凡例に従って示される。

【0025】

【図9A-9G】図9A~9Gは、すべての試料の最上位細胞型分類結果を示す。図9Aは、2,766個の遺伝子データセットの各最上位細胞型と整列された代表的遺伝子マーカーの、積み重ねバイオリンプロットを提供する。図9Bは、2,766個および64個の遺伝子データセットの各最上位細胞型と整列された代表的マーカーの、遺伝子発現ヒートマップを提供する。64個の遺伝子データは、最上位クラスタリング結果をうまく再現した。各遺伝子の発現は、各細胞内のすべての遺伝子にわたってZスコア付けされる。図9Cは、検証データセットの4つの試料からの36,625細胞のトランスクリプトームプロファイルの非線形次元圧縮を可視化するUniform Manifold Approximation (UMAP) プロットを提供する。以下を示すプロットが提供される：13の最上位クラスタ（皮質興奮性ニューロン (CTX-Ex、8,640細胞)、抑制性ニューロン (In、2,858細胞)、CA1興奮性ニューロン (CA1-Ex、2,967細胞)、CA2興奮性ニューロン (CA2-Ex、331細胞)、CA3興奮性ニューロン (CA3-Ex、1751細胞)、歯状回 (DG、4,560細胞)、星状細胞 (Astro、3,423細胞)、内皮細胞 (Endo、1,661細胞)、ミクログリア (Micro、2,183細胞) 細胞)、オリゴデンドロサイト (Oligo、5,268細胞)、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC、711細胞)、平滑筋細胞 (SMC、1,146細胞)、および混合未同定細胞 (Mix、1126細胞)。図9Dおよび9Eは、2,766遺伝子データセット（図9D）および64遺伝子データセット（図9E）における4つの試料の皮質および海馬領域における、最上位細胞型の空間アトラスを示す。スケールバー、100 μm 。図9Fおよび9Gは、8か月試料と13か月試料両方の2,766遺伝子データセット（F）および64遺伝子検証データセット（G）における、異なる距離間隔でのA β プラーク周囲の細胞型組成を示す。A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm ）における各最上位細胞型のパーセンテージを示す、積み上げ棒プロットが提供される。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。

【0026】

【図10A-10E】図10A~10Eは、ミクログリア集団の追加の遺伝子発現および

空間情報を示す。図10Aは、8か月の対照試料およびTauPS2APP試料における、ミクログリアサブタイプの空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション（I、II）を右側に示す。スケールバー、10 μm 。図10Bは、8か月試料でのTauPS2APP試料の異なる距離間隔における、A β プラーク周囲の細胞型組成を示す。A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm ）における、各ミクログリア亜集団のパーセンテージを示す積み上げ棒プロットが提供される。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図10Cは、擬時間によって色付けされたミクログリアの空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション（I、II）を右側に示す。スケールバー、10 μm 。図10Dは、プラークに対するミクログリアの擬時間値を示す。A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm ）における、ミクログリアの擬時間の分布を示す箱ひげ図が提供される。全ミクログリアの分布が、参照として含まれた。ボックスの陰影は、擬時間の中央値を表す。図10Eは、ミクログリアの差次的発現についてのボルケーノプロットを提供する。プロットは、8か月および13か月の試料でのADおよび対照試料にわたるミクログリアの遺伝子発現を示す（y軸： $-\log$ 調整後のp値、x軸：平均対数倍率変化）。差次的に発現される遺伝子（調整されたp値<0.05、logFCの絶対値>0.1）は、正の倍率変化値（上方制御）または負の倍率変化値（下方制御）を有する。

10

【0027】

【図11A~11E】図11A~11Eは、星状細胞集団についての追加の遺伝子発現および空間情報を示す。図11Aは、8か月試料での対照試料およびTauPS2APP試料の星状細胞サブタイプの空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション（I、II）を右側に示す。スケールバー、10 μm 。図11Bは、TauPS2APPの8か月試料についての、異なる距離間隔でのA β プラーク周囲の細胞型組成を示す。A β プラークの周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm ）における、各星状細胞亜集団のパーセンテージを示す積み上げ棒プロットが提供される。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図11Cは、星状細胞の細胞集団について擬時間によって陰影付けされた、星状細胞の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション（I、II）を右側に示す。スケールバー、10 μm 。図11Dは、プラークに関する擬時間値を示す。A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm ）における、星状細胞の擬時間の分布を示す箱ひげ図が提供される。全星状細胞の分布が参照として含まれた。図11Eは、星状細胞における差次的遺伝子発現を示す、ボルケーノプロットを提供する。ADおよび対照の8か月および13か月の試料にわたる、星状細胞の遺伝子発現を示すプロットが提供される（y軸： $-\log$ 調整後のp値、x軸：平均対数倍率変化）。差次的に発現される遺伝子（調整されたp値<0.05、logFCの絶対値>0.1）は、正の倍率変化値（上方制御）または負の倍率変化値（下方制御）を有する。

20

30

【0028】

【図12A~12F】図12A~12Fは、オリゴデンドロサイトおよびOPC細胞集団の追加の遺伝子発現および空間情報を示す。図12Aは、対照およびTauPS2APPの8か月試料両方のオリゴデンドロサイトおよびOPC集団について、細胞分解空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション（I、II）を右側に示す。スケールバー、10 μm 。図12Bは、TauPS2APPの8か月試料について、異なる距離間隔でのA β プラーク周囲の細胞型組成を示す。A β プラーク周囲の各距離間隔（0~10、10~20、20~30、30~40、および40~50 μm ）における、各オリゴデンドロサイト亜集団およびOPCのパーセンテージを示す積み上げ棒プロットが提供される。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図12Cは、オリゴデンドロサイト関連細胞集団について擬時間で陰影付けした空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。2つの拡大セクション（I、II）を右側に示す。スケールバー、

40

50

10 μm 。図12Dは、プラークに関する擬時間を示す。A β プラーク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μm ）における、オリゴデンドロサイトの擬時間の分布を示す箱ひげ図が提供される。全オリゴデンドロサイトの分布が参照として含まれた。図12Eは、プラークに関する擬時間を示す。A β プラークの周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μm ）における、OPCの擬時間の分布を示す箱ひげ図が提供される。全OPCの分布が参照として含まれた。図12Eは、オリゴデンドロサイトで差次的発現を示すボルケーノプロットを提供する。ADおよび対照の8か月および13か月試料にわたる、オリゴデンドロサイトの遺伝子発現を示すプロットが提供される（y軸： $-\log$ 調整後のp値、x軸：平均対数倍率変化）。差次的に発現される遺伝子（調整されたp値 < 0.05 、 $\log\text{FC}$ の絶対値 > 0.1 ）は、正の倍率変化値（上方制御）または負の倍率変化値（下方制御）を有する。

10

【0029】

【図13A～13G】図13A～13Gは、ニューロンの集団について追加の遺伝子発現および空間情報を示す。図13Aは、4つの試料の興奮性ニューロン集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。図13Bは、4つの試料の抑制性ニューロン集団の空間マップを提供する。スケールバー、100 μm 。図13Cは、興奮性ニューロンのプラーク周囲の、領域ごとの細胞密度および細胞型組成を示す。各試料の皮質および皮質下領域両方における、各興奮性ニューロンサブクラスターの密度（ mm^2 あたりの数）を示す積み上げ棒グラフが提供される（上）。棒グラフの陰影は、図13Aの細胞型の凡例に対応する。A β プラーク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μm ）における、各興奮性ニューロンサブクラスターのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフも提供される（下）。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図13Dは、抑制性ニューロンのプラーク周囲の、領域ごとの細胞密度および細胞型組成を示す。各試料の皮質および皮質下領域両方における、各抑制性ニューロンサブクラスターの密度（ mm^2 あたりの数）を示す積み上げ棒グラフが提供される（上）。棒グラフの陰影は、図13Bの細胞型の凡例に対応する。A β プラーク周囲の各距離間隔（0～10、10～20、20～30、30～40、および40～50 μm ）における、各抑制性ニューロンサブクラスターのパーセンテージを示す積み上げ棒グラフも提供される（下）。各領域には、全体の細胞型組成が参照として含まれた。図13E～13Gは、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、およびタウ病理を有するCA1細胞からのDEGの、SynGOを使用したシナプス遺伝子オントロジーtermのエンリッチメントを示す。サンバーストプロットの陰影は、1%FDRでのエンリッチメント $-\log_{10} Q$ 値を表す。

20

30

【0030】

【図14A～14E】図14A～14Eは、ADマウス脳のパスウェイおよび空間解析を示す。図14Aは、ADの8か月試料において目的の各細胞型の上方制御された遺伝子がエンリッチされた生物学的プロセス関連termを示す、遺伝子オントロジーヒートマップを提供する。termは、termサイズ20～1000でフィルタリングされる。タイルの陰影は、エンリッチメント $-\log_{10}(\text{FDR})$ 値を表す。図14Bは、神経細胞（興奮性、抑制性ニューロン）および非神経細胞（ミクログリア、星状細胞、およびオリゴデンドロサイト）において差次的に発現される遺伝子（ $|\text{abs}(\log\text{FC})| > 0.1$ 、ウィルコックス検定p値 < 0.05 ）から、EnrichmentMapアプリとAutoAnnotateアプリを備えたCytoscapeを用いて生成された、機能エンリッチメントマップを提供する。各円はGO termを表し、各細胞クラスターからのDEGの共通および異なる寄与を説明するために、細胞型ごとに陰影付けされている。楕円は、AutoAnnotateアプリによってクラスタリングされたGO termの集まり（constellations）を示す。図14C（左）は、ADの13か月試料における関連細胞型とA β プラークとの間の平均最近傍距離を示すヒートマップを提供する。平均最近傍距離は次のように計算される：1）すべての細胞とプラークについて、互いのオブジェクトまでのユークリッド距離を計算し、各細胞型またはプラーク

40

50

に最も近い細胞を見つけて、その距離を保存する。2) 目的のすべての比較（すなわち、Micro対ブランク）について、その距離分布の平均を計算する。図14C（右）は、図14C（左）と同じ距離を示すが、ただし、シャッフルされた（ランダム化された）細胞型標識を使用している。図14D（左）は、ADの8か月試料における関連する細胞型とAβブランクとの間の平均最近傍距離を示すヒートマップを提供する。計算は図14Cで用いられたものと同様である。図14D（右）は、14D（左）と同じ距離を示すが、ただし、シャッフルされた（ランダム化された）細胞型標識を使用している。図14Eは、25μmリングの外側の細胞と比較して、25μmリング内の細胞からのADの8か月試料のブランク近傍領域において上方制御された遺伝子を示す、マトリックスプロットを提供する。

10

【0031】

【図15】図15は、少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別することに関連する方法の、一態様のフロー図である。

【0032】

【図16】図16は、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別することに関連する方法の、一態様のフロー図である。

【0033】

【図17】図17は、少なくとも1つの画像をカメラを使用して取り込むことに関連する方法の、一態様のフロー図である。

【0034】

【図18】図18は、複数の画像から空間的位置を空間的に整列させる、一態様のフロー図である。

20

【0035】

【図19】図19は、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である細胞型の細胞の数を決定することに関する方法の、一態様のフロー図である。

【0036】

【図20】図20は、細胞の細胞型を決定することに関連する方法の、一態様のフロー図である。

【0037】

【図21】図21は、様々な機能または方法が実装され得るコンピュータシステムのブロック図である。定義

30

【0038】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。以下の参考文献は、当業者に、本発明で使用される多くの用語の一般的な定義を提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994) ; The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988) ; The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991) ; および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用される場合、以下の用語は、別段の指定がない限り、それらに帰属される意味を有する。

40

【0039】

用語「投与する」、「投与すること」、および「投与」は、処置もしくは治療剤、または処置もしくは治療剤の組成物を、対象の内部または上に移植する、吸収する、摂取する、注射する、吸入する、またはその他で導入することを指す。

【0040】

本明細書で使用される「アンプリコン」という用語は、増幅反応（すなわち、遺伝子断片または標的配列の1つ以上のコピーの生成）または複製反応の産物である、核酸（例：DNAまたはRNA）を指す。アンプリコンは、例えば、PCRまたは他の重合反応を使用して、人工的に形成することができる。「連結アンプリコン（concatenated amplicon

50

s) 」という用語は、一緒に結合されて単一の核酸分子を形成する、複数のアンプリコンを指す。連結アンプリコンは、例えば、ローリングサークル増幅（RCA）によって形成することができ、この場合、環状オリゴヌクレオチドが増幅されて、オリゴヌクレオチドの複数の直鎖状コピーが、連結された複数アンプリコンを含む単一の核酸分子として生成される。

【0041】

「抗体」とは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖タンパク質を指す。抗体および免疫グロブリンという用語は、互換的に使用される。いくつかの例外を除いて、哺乳動物の抗体は典型的には、2本の大きな重鎖と2本の小さな軽鎖をそれぞれが有する基本構造単位で作られている。抗体重鎖にはいくつかの異なる種類があり、また、抗体にはいくつかの異なる種類があり、それらがどの重鎖を持っているかに基づき異なるアイソタイプにグループ化される。哺乳動物では5つの異なる抗体アイソタイプ（IgG、IgA、IgE、IgD、およびIgM）が知られており、これらは異なる役割を果たし、遭遇する異なる種類の異物それぞれに対して、適切な免疫応答を導くのに役立つ。いくつかの態様において、本明細書で使用される抗体は、目的のタンパク質（例：細胞内で発現される任意の目的のタンパク質）に結合する。本明細書で使用される「抗体」という用語はまた、抗体断片およびナノボディ、ならびに抗体のバリエーションおよび抗体断片、およびナノボディのバリエーションも包含する。

【0042】

「がん」という用語は、制御不能に増殖し正常な身体組織に浸潤して破壊する能力を有する、異常細胞の発生を特徴とする疾患のクラスを指す。例えば、Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensyl ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990を参照されたい。がんの例としては、限定はされないが、以下が含まれる：聴神経腫；腺癌；副腎がん；肛門がん；血管肉腫（例：リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、血管肉腫）；虫垂がん；良性モノクローナルガンマグロブリン症；胆道がん（例：胆管がん）；膀胱がん；乳がん（例：乳房の腺癌、乳房の乳頭癌、乳がん、乳房の髄様癌）；脳がん（例：髄膜腫、膠芽腫、神経膠腫（例：星状細胞腫、希突起神経膠腫）、髄芽腫）；気管支がん；カルチノイド腫瘍；子宮頸がん（例：子宮頸部腺癌）；絨毛癌；脊索腫；頭蓋咽頭腫；結腸直腸がん（例：結腸がん、直腸がん、結腸直腸腺癌）；結合組織がん；上皮癌；上衣腫；内皮肉腫（例：カポジ肉腫、多発性特発性出血肉腫）；子宮内膜がん（例：子宮がん、子宮肉腫）；食道がん（例：食道の腺癌、バレット腺癌）；ユーイング肉腫；眼がん（例：眼球内黒色腫、網膜芽腫）；家族性好酸球増加症；胆嚢がん；胃がん（例：胃腺癌）；消化管間質腫瘍（GIST）；胚細胞がん；頭頸部がん（例：頭頸部扁平上皮細胞癌、口腔がん（例：口腔扁平上皮細胞癌）、咽頭がん（例：喉頭がん、咽頭がん、上咽頭がん、中咽頭がん））；造血系がん（例：急性リンパ性白血病（ALL）などの白血病（例：B細胞ALL、T細胞ALL）、急性骨髄性白血病（AML）（例：B細胞AML、T細胞AML）、慢性骨髄性白血病 白血病（CML）（例：B細胞CML、T細胞CML）、および慢性リンパ性白血病（CLL）（例：B細胞CLL、T細胞CLL））；リンパ腫、例えばホジキンリンパ腫（HL）（例：B細胞HL、T細胞HL）および非ホジキンリンパ腫（NHL）（例：B細胞NHL、例えばびまん性大細胞型リンパ腫（DLCL）（例：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫）、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ性白血病／小リンパ球性リンパ腫（CLL/SLL）、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、辺縁帯B細胞リンパ腫（例：粘膜内リンパ組織（MALT）リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫）、原発性縦隔B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫（すなわち、ワルデンストレームマクログロブリン血症）、有毛細胞白血病（HCL）、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆体Bリンパ芽球性リンパ腫および原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫；およびT細胞NHL、例えば前駆体Tリンパ芽球性リンパ腫／白血病、末梢T細胞リンパ腫（PTCL）（例：皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）（例：菌状息肉症、セザリー症候群）、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、節外性ナチュラルキラーT細胞リンパ腫、腸疾患型T細胞リンパ腫、皮下脂肪炎様T細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫）；上記などの1つ以上

の白血病／リンパ腫の混合物；および多発性骨髄腫（MM）、重鎖疾患（例：α鎖疾患、γ鎖疾患、μ鎖疾患）；血管芽腫；下咽頭がん；炎症性筋線維芽細胞性腫瘍；免疫細胞性アミロイドーシス；腎臓がん（例：腎芽細胞腫、別名ウィルムス腫瘍、腎細胞癌）；肝臓がん（例：肝細胞がん（HCC）、悪性肝がん）；肺がん（例えば、気管支原性癌、小細胞肺癌（SCLC）、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺の腺癌）；平滑筋肉腫（LMS）；肥満細胞症（例：全身性肥満細胞症）；筋肉がん；骨髄異形成症候群（MDS）；中皮腫；骨髄増殖性障害（MPD）（例：真性赤血球増加症（PV）、本態性血小板増加症（ET）、不明原性骨髄化生（AMM）、別名骨髄線維症（MF）、慢性特発性骨髄線維症、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性好中球性白血病（CNL）、好酸球増加症候群（HES））；神経芽細胞腫；神経線維腫（例：神経線維腫症（NF）1型または2型、神経鞘腫症）；神経内分泌がん（例：胃腸膵神経内分泌腫瘍（GEP-NET）、カルチノイド腫瘍）；骨肉腫（例：骨がん）；卵巣がん（例：嚢胞腺癌、卵巣胎児性癌、卵巣腺癌）；乳頭腺癌；膵臓がん（例：膵臓腺癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）、膵島細胞腫瘍）；陰茎がん（例：陰茎および陰嚢のパジェット病）；松果腫；原始神経外胚葉腫瘍（PNT）；形質細胞腫；傍腫瘍性神経症候群；上皮内腫瘍；前立腺がん（例：前立腺腺癌）；直腸がん；横紋筋肉腫；唾液腺がん；皮膚がん（例：扁平上皮細胞癌（SCC）、ケラトアカントーマ（KA）、黒色腫、基底細胞癌（BCC））；小腸がん（例：虫垂がん）；軟部肉腫（例：悪性線維性組織球腫（MFH）、脂肪肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）、軟骨肉腫、線維肉腫、筋肉腫）；皮脂腺癌；小腸がん；汗腺がん；滑膜腫；精巣がん（例：精上皮腫、精巣胎児性がん）；甲状腺がん（例：甲状腺の乳頭癌、甲状腺乳頭癌（PTC）、甲状腺髄様がん）；尿道がん；膣がん；外陰がん（例：外陰部のパジェット病）。

10

20

【0043】

本明細書で使用される「細胞」は、細胞の集団（例：組織、試料、生検、臓器、またはオルガノイド中）に存在し得る。いくつかの態様において、細胞集団は複数の異なる細胞型から構成される。本開示の方法で使用する細胞は、生物内、生物に由来する単一の細胞型内、または細胞型の混合物内に存在することができる。これに含まれるのは、天然に存在する細胞および細胞集団、遺伝子操作された細胞株、トランスジェニック動物由来の細胞などである。実質的に任意の細胞型およびサイズが、本明細書に記載の方法およびシステムに適応され得る。適切な細胞には、細菌細胞、真菌細胞、植物細胞、および動物細胞が含まれる。いくつかの態様において、細胞は哺乳動物細胞（例：天然に存在する組織などの複雑な細胞集団）である。いくつかの態様において、細胞はヒト由来である。ある態様において、細胞は、生検などの医療処置を通じて対象（例：ヒト）から収集される。代替的に、細胞は、培養された集団（例：複雑な集団に由来する培養物、または、細胞が複数の系統に分化している単一細胞型に由来する培養物）であってもよい。細胞はまた、*in situ*で細胞組織においても提供され得る。

30

【0044】

本開示の方法での使用が企図される細胞型には、限定はされないが、以下が含まれる：幹細胞および前駆細胞（例：胚性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経堤細胞など）、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞および骨格筋細胞、間葉細胞、上皮細胞、造血細胞、T細胞（例：Th1 T細胞、Th2 T細胞、Th0 T細胞、細胞傷害性T細胞）などのリンパ球、およびB細胞（例：プレB細胞）、単球、樹状細胞、好中球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、脂肪細胞、免疫細胞、ニューロン、肝細胞、および特定の臓器に関与する細胞（例：胸腺、内分泌腺、膵臓、脳、ニューロン、グリア、星状細胞、樹状細胞、およびそれらの遺伝子改変細胞）。細胞はまた、異なる種類の形質転換細胞または新生物細胞（例：異なる細胞起源の癌、異なる細胞型のリンパ腫など）、または任意の種類のがん性細胞（例えば、本明細書に開示されるがんのいずれかに由来するもの）であってもよい。異なる起源（例：外胚葉、中胚葉、および内胚葉）の細胞も、本開示の方法での使用が企図される。いくつかの態様において、細胞は、ミクログリア、星状細胞、オリゴデンドロサイト、興奮性ニューロン、または抑制性ニューロンである。いくつかの態様において、複数の細胞型の細胞が同じ試料内に存在する。

40

50

【0045】

本明細書で使用される場合、用語「検出剤」とは、目的のタンパク質またはペプチドの存在または位置を検出するために使用することができる、任意の薬剤を指す。いくつかの態様において、本明細書に開示される方法は、1つ以上の細胞を1つ以上の検出剤と接触させるステップを含む。本明細書に開示される方法で使用される各検出剤は、目的のタンパク質またはペプチドに結合する。本明細書に記載の方法で使用することができる検出剤には、タンパク質、ペプチド、核酸、および小分子が含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、検出剤は、目的のタンパク質に結合する抗体である。ある態様において、検出剤は、抗体断片、抗体バリエーション、およびナノボディを含む。ある態様において、検出剤はアプタマーを含む。ある態様において、検出剤は、受容体またはその断片を含む。いくつかの態様において、検出剤は、小分子色素（例：小分子X-34）を含む。

10

【0046】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子」は、タンパク質を発現する核酸断片であって、コード配列の前（5'非コード配列）および後（3'非コード配列）の調節配列を含むものを指す。「天然遺伝子」とは、それ自身の調節配列を有して自然界に見出される遺伝子を指す。

【0047】

本明細書で使用される場合、「遺伝子発現」とは、遺伝子からの情報が遺伝子産物の合成に使用されるプロセスを指す。遺伝子産物には、タンパク質およびRNA転写産物（例：メッセンジャーRNA、トランスファーRNA、または核内低分子RNA）が含まれる。遺伝子発現には、転写および翻訳が含まれる。転写は、DNAのセグメントが、RNAポリメラーゼによってRNAに転写されるプロセスである。翻訳は、RNAが、リボソームによってペプチドまたはタンパク質に翻訳されるプロセスである。本明細書で使用される用語「遺伝情報」とは、1つ以上の遺伝子および／または1つ以上のRNA転写産物（例：任意の数の遺伝子および／またはRNA転写産物）を指す。

20

【0048】

「神経変性疾患」とは神経細胞の喪失を特徴とする神経疾患の種類であり、限定はされないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、タウオパチー（前頭側頭型認知症を含む）、およびハンチントン病を含む。いくつかの態様において、神経変性疾患はアルツハイマー病である。アルツハイマー病の原因はほとんど解明されていないが、多くの場合、遺伝的基礎を含むと考えられている。この疾患は、大脳皮質のニューロンおよびシナプスの喪失を特徴とし、その結果、影響を受けた領域が萎縮する。生化学的には、アルツハイマー病は、脳内の異常に折りたたまれたアミロイドβタンパク質とτタンパク質のプラーク蓄積によって引き起こされる、タンパク質のミスフォールディング疾患として特徴付けられる。アルツハイマー病の症状には、限定はされないが、最近の出来事を思い出すことの困難、言語の問題、見当識障害、気分の変動、モチベーションの低下、自己無視（セルフネグレクト）、問題行動などが含まれる。最終的には身体機能が徐々に失われ、アルツハイマー病はいずれは死に至る。処置は現在、疾患によって引き起こされる認知問題の処置（例：アセチルコリンエステラーゼ阻害剤またはNMDA受容体拮抗薬による）、心理社会的介入（例：行動指向または認知指向のアプローチ）、および一般的な介護を目的としている。現在、病気の進行を完全に止め、または逆転させる処置法は存在しない。

30

40

【0049】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」、および「オリゴヌクレオチド」は、DNAおよびRNA中の一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも呼ばれる）を指し、2つ以上のヌクレオチドの任意の鎖を意味する。ポリヌクレオチドは、キメラ混合物またはその誘導体もしくは修飾バージョン、および一本鎖または二本鎖であることができる。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で修飾され得て、例えば、分子の安定性、そのハイブリダイゼーションパラメータなどを改善することができる。

50

【0050】

「タンパク質」、「ペプチド」、または「ポリペプチド」は、ペプチド結合により互いに連結されたアミノ酸残基のポリマーを含む。この用語は、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドを指す。典型的には、タンパク質は少なくとも3アミノ酸の長さである。タンパク質は、個々のタンパク質またはタンパク質の集合を指し得る。本発明のタンパク質は、好ましくは天然アミノ酸のみを含有するが、しかし、当技術分野で知られている非天然アミノ酸（すなわち、天然には存在しないが、ポリペプチド鎖に組み込むことができる化合物）および／またはアミノ酸類似体を、代替的に使用することもできる。また、タンパク質中の1つ以上のアミノ酸は、例えば、炭水化物基、ヒドロキシル基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、抱合または官能基化のためのリンカーなどの化学物質、またはその他の修飾を加えることによって、修飾されてもよい。タンパク質は、単一分子であっても、多分子複合体であってもよい。タンパク質は、天然に存在するタンパク質またはペプチドの断片であってもよい。タンパク質は、天然、組換え、合成、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。

10

【0051】

本明細書で使用する「擬時間」とは、細胞における遺伝子の差次的発現をモデル化する方法を指し、これはさらにVan den Berge, K. et al. Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data. Nature Communications 2020, 11, 1-13に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

【0052】

「転写産物」または「RNA転写産物」は、RNAポリメラーゼ触媒によるDNA配列の転写から生じる産物である。RNA転写産物がDNA配列の相補的コピーである場合、それは一次転写産物と呼ばれるか、または一次転写産物の転写後プロセッシングに由来するRNA配列であり、成熟RNAと呼ばれる。「メッセンジャーRNA (mRNA)」とは、イントロンを持たず、細胞によってポリペプチドに翻訳され得るRNAを指す。「cRNA」とは、組換えcDNA鑄型から転写された相補的RNAを指す。「cDNA」とは、mRNA鑄型に相補的であり、mRNA鑄型に由来するDNAを指す。

20

【0053】

用語「試料」または「生物学的試料」とは、組織試料（例えば組織切片、外科的生検、および組織の針生検など）；細胞試料（例：細胞学的塗抹標本（Papまたは血液塗抹標本など）または顕微解剖によって得られた細胞の試料）；または、細胞画分、断片またはオルガネラ（例えば細胞を溶解し、遠心分離などによりその成分を分離することによって得られるものなど）を含む任意の試料を指す。生物学的試料の他の例としては、限定はされないが、血液、血清、尿、精液、糞便、脳脊髄液、間質液、粘液、涙、汗、膿、生検組織（例えば、外科的生検または針生検によって得られる）、乳頭吸引物、乳、膿液、唾液、スワブ（口腔スワブなど）、または第1の生体試料に由来する生体分子を含有する任意の材料が挙げられる。いくつかの態様において、生物学的試料は、対象から採取された外科的生検、例えば、本明細書に記載の任意の組織の生検である。ある態様において、生物学的試料は、腫瘍生検である（例えば、がんと診断された、がんを有すると疑われる、またはがんを有すると考えられる対象からの）。いくつかの態様において、試料は脳組織である。いくつかの態様において、組織は心臓組織である。いくつかの態様において、組織は筋肉組織である。

30

40

【0054】

投与が企図される「対象」とは、ヒト（すなわち、任意の年齢層の男性または女性、例えば、小児対象（例：幼児、小児、または青年）または成人対象（例：若年成人、中年成人、または高齢成人））、または非ヒト動物を指す。いくつかの態様において、非ヒト動物は哺乳動物（例：霊長類（例：カニクイザルまたはアカゲザル）またはマウス）である。「患者」という用語は、疾患の処置を必要とする対象を指す。いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、患者はヒトである。ヒトは、発達の任意の段階の男性または女性であり得る。疾患または障害の処置を「必要としている」対象ま

50

たは患者には、疾患または障害（例：アルツハイマー病）の何らかの危険因子または症状を示すものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、対象は非ヒト実験動物（例：マウス）である。

【0055】

処置または治療剤の「治療有効量」とは、状態の処置において治療上の利益を提供するか、または状態に関連する1つ以上の症状を遅らせるかもしくは最小限に抑えるのに十分な量である。処置または治療剤の治療有効量は、単独で、または他の治療と組み合わせて、状態の処置において治療効果をもたらす、治療の量を意味する。「治療有効量」という用語は、全体的な治療を改善し、症状、徴候または状態の原因を軽減または回避し、および／または別の治療剤の治療効果を増強する量を包含し得る。

10

【0056】

本明細書で使用される場合、「組織」とは、同じ起源からの細胞およびその細胞外マトリックスの群である。一緒に、細胞は特定の機能を実行する。複数の組織型が結合して、一緒に臓器を形成する。細胞は異なる細胞型であってもよい。いくつかの態様において、組織は上皮組織である。上皮組織は、臓器の表面（例：皮膚の表面、気道、軟器官、生殖管、および消化管の内層）を覆う細胞によって形成される。上皮組織は保護機能を果たし、分泌、排泄、および吸収にも関与する。上皮組織の例には、限定されないが、単純扁平上皮、重層扁平上皮、単純立方上皮、移行上皮、偽重層上皮、円柱上皮、および腺上皮が含まれる。いくつかの態様において、組織は結合組織である。結合組織は、非生物物質（例：細胞外基質）によって分離された細胞で構成される、線維組織である。結合組織は臓器に形状を与え、臓器を所定の位置に保持する。結合組織には、線維性結合組織、骨格性結合組織、および流体性結合組織が含まれる。結合組織の例には、血液、骨、腱、靱帯、脂肪、および乳輪組織が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、組織は筋肉組織である。筋肉組織は、筋肉細胞から形成される活動的な収縮組織である。筋肉組織は、力を生成して運動を引き起こすように機能する。筋肉組織には、平滑筋（例：臓器の内層に見られるもの）、骨格筋（例：典型的には骨に付着しているもの）、および心筋（例：心臓に見られるものであり、収縮して生物全体に血液を送り出す）が含まれる。いくつかの態様において、組織は神経組織である。神経組織には、中枢神経系と末梢神経系を含む細胞が含まれる。神経組織は、脳、脊髄、脳神経、および脊髄神経（例：運動ニューロン）を形成する。ある態様において、組織は脳組織である。ある態様において、組織は胎盤組織である。いくつかの態様において、組織は心臓組織である。

20

30

【0057】

用語「処置」、「処置する」、および「処置すること」とは、本明細書に記載の疾患（例：アルツハイマー病）を逆転させる、軽減する、発症を遅延させる、または進行を阻害することを指す。いくつかの態様において、処置は、疾患の1つ以上の徴候または症状が発生または観察された後（例えば、予防的に（本明細書でさらに説明され得るように）、または疾患の疑いまたはリスクに基づいて）施されてもよい。他の態様において、処置は、疾患の兆候または症状がない場合に施してもよい。例えば、処置は、症状の発症前に感受性のある対象に施してもよい（例えば、対象または対象の家族の症状の病歴を考慮して）。処置はまた、症状が解消した後も、例えば再発を遅らせまたは予防するために、継続してよい。いくつかの態様において、処置は、本明細書に開示される方法を使用し、細胞または組織における1つ以上の目的の核酸および／またはタンパク質の、遺伝子および／またはタンパク質発現の変化を、健康な細胞または組織と比較して観察した後に施してもよい。

40

【0058】

用語「腫瘍」および「新生物」は、本明細書で使用される場合、異常な組織塊であって、その塊の増殖が正常組織の増殖を上回り、それと調和していないものを指す。腫瘍は、以下の特徴に応じて「良性」または「悪性」である：細胞分化の程度（形態および機能を含む）、増殖速度、局所浸潤、および転移。「良性新生物」は、一般に良好に分化し、悪性新生物よりも成長が遅いのが特徴で、発生部位に局在したままである。さらに良性新生

50

物は、離れた部位に浸潤 (infiltrate)、浸潤 (invade)、または転移する能力を有さない。例示的な良性新生物としては、限定はされないが、脂肪腫、軟骨腫、腺腫、アクリコルドン、老人性血管腫、脂漏性角化症、黒子、および脂腺過形成が挙げられる。いくつかの場合において、特定の「良性」腫瘍が後に悪性新生物を引き起こす可能性があり、これは、腫瘍の新生物細胞の亜集団における追加の遺伝子変化に起因する可能性があり、これらの腫瘍は「前悪性新生物」と呼ばれる。例示的な前悪性新生物は、奇形腫である。対照的に、「悪性新生物」は一般に低分化 (退形成) であり、進行性の浸潤、浸潤、および周囲組織の破壊を伴う、特徴的な急速な増殖を有する。さらに、悪性新生物は一般に、離れた部位に転移する能力を有する。用語「転移」、「転移性」、または「転移する」とは、原発腫瘍または元の腫瘍から別の臓器または組織への、がん細胞の拡散または移動を指し、典型的には、二次 (転移) 腫瘍が位置する臓器または組織の組織型ではなく、原発腫瘍または元の腫瘍の組織型の「二次腫瘍」または「二次細胞塊」が存在することによって識別可能である。例えば、骨に移動した前立腺がんは転移性前立腺がんと言われ、これには骨組織内で増殖するがん性前立腺がん細胞が含まれる。

10

特定の態様の詳細な説明

【0059】

本明細書に記載の側面は、特定の態様、システム、組成物、方法、または構成に限定されず、したがって当然ながら変更することができる。本明細書で使用される用語は、特定の側面を説明することのみを目的としており、本明細書で特に定義されない限り、限定することを意図してはいない。

20

【0060】

本開示は、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングする (すなわち、同じ細胞における遺伝子およびタンパク質発現を同時にマッピングする) ための、方法およびシステムを提供する。本開示はまた、対象における疾患または障害 (例: アルツハイマー病またはがん) を診断するための方法も提供する。遺伝子および / またはタンパク質発現を調節可能な候補薬剤をスクリーニングまたは試験する方法も、本開示によって提供される。本開示はまた、神経障害 (例: アルツハイマー病) などの疾患または障害を、それを必要とする対象において処置するための方法を提供する。本明細書に記載の方法を実施するのに有用であり得るオリゴヌクレオチドプローブの対、および本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブのいずれかを含むキットも、本開示によって記載される。さらに、本開示は、少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別するための方法、装置、システム、および非一時的なコンピュータ可読記憶媒体を提供する。

30

細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための方法

【0061】

一側面において、本開示は、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための方法を提供する (例えば、図1Aおよび1Bを参照)。本明細書に開示される方法において、細胞は、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触され得て、これは本明細書にさらに記載され、および転写産物を増幅するために使用され得て (例: ローリングサークル増幅によって)、1つ以上の連結アンプリコンを生成する。次いで、細胞を1つ以上の検出剤 (例: 抗体) と接触させることができ、ここで各検出剤は、細胞内の目的のタンパク質に結合する。次いで、1つ以上の連結アンプリコンおよび1つ以上の検出剤をポリマーマトリックスに埋め込むことができ、1つ以上のアンプリコンを配列決定して、転写産物の身元を決定し (例えば、本明細書にさらに記載される SEDAL 配列決定 (動的アニーリングおよびライゲーションによるエラー低減を伴う配列決定) を通して)、およびポリマーマトリックス内のそれらの位置を決定することができる。ポリマーマトリックス内の1つ以上の目的のタンパク質に結合した検出剤 (例: 抗体) の位置も、画像化 (例: 共焦点顕微鏡検査による) によって決定することができ、これにより、細胞内の目的の転写産物およびタンパク質の位置をマッピングすることが可能となる。目的の転写産物およびタンパク質の位置を使用して、個々の細胞、細胞内位置、およびオルガネラを識別することができる。この方法は、例えば、疾患および健康な組織試料からの細胞 (または

40

50

複数の細胞)を比較するのに有用であり得る。

【0062】

いくつかの態様において、本開示は、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための、以下のステップを含む方法を提供する：

- a) 細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで
 - i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および
 - i i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；
 - b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端を一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；
 - c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；
 - d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；
 - e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；
 - f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および
 - g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること。いくつかの態様において、目的の1つの核酸およびタンパク質の発現は、本明細書に記載の方法を使用してマッピングされる。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法のいずれかを使用して、同じ細胞（または複数の細胞、例えば組織サンプル中の）内の、複数の目的の核酸および目的のタンパク質の発現をマッピングすることができる。

【0063】

本明細書に開示される方法における任意の種類の細胞の使用が、本開示によって企図される（例：本明細書に記載される任意の細胞型）。いくつかの態様において、細胞は哺乳動物細胞である。ある態様において、細胞はヒト細胞である。いくつかの態様において、細胞は神経系からの細胞である。いくつかの態様において、細胞はがん細胞である。本開示はまた、本明細書に記載の方法を複数の細胞に対して同時に実施することも企図している。いくつかの態様において、方法は、同じ細胞型の複数の細胞に対して実施される。いくつかの態様において、方法は、異なる細胞型の細胞を含む複数の細胞に対して実施される。本明細書に開示される方法を使用して遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすることができる細胞型には、限定はされないが、幹細胞、前駆細胞、神経細胞、星状細胞、樹状細胞、内皮細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、筋細胞、心筋細胞、間葉細胞、上皮細胞、免疫細胞、および肝細胞が含まれる。ある態様において、細胞は、ミクログリア、星状細胞、オリゴデンドロサイト、興奮性ニューロン、および／または抑制性ニューロンである。ある態様において、細胞（単数または複数）は、透過化された細胞である（例えば、細胞は、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させるステップの前に透過化される）。ある態様において、細胞（単数または複数）は、無傷の組織（例：本

明細書に記載の組織型のいずれか)内に存在する。ある態様において、無傷の組織は、固定組織試料である。いくつかの態様において、無傷の組織は、複数の細胞型(例:ミクログリア、星状細胞、オリゴデンドロサイト、興奮性ニューロン、および/または抑制性ニューロン)を含む。ある態様において、組織は、心臓組織、リンパ節組織、肝臓組織、筋肉組織、骨組織、眼組織、または耳組織である。

【0064】

本明細書に記載の方法において遺伝子発現がプロファイリングされる、目的の核酸(単数または複数)は、細胞のゲノムDNAから発現された転写産物であり得る。いくつかの態様において、目的の核酸はDNAである。いくつかの態様において、目的の核酸はRNAである。ある態様において、目的の核酸はmRNAである。本明細書に記載の方法は、一度に1つの目的の核酸について、または同時に複数の目的の核酸について、細胞における遺伝子発現をプロファイリングするために使用され得る。いくつかの態様において、1つの細胞または複数の細胞における遺伝子発現が、100を超える、200を超える、500を超える、1000を超える、2000を超える、3000を超える、5000を超える、10,000を超える、15,000個を超える、20,000個を超える、25,000個を超える、または30,000個を超える目的の核酸について、同時にマッピングされる。ある態様において、1つの細胞または複数の細胞における遺伝子発現が、最大100万個の目的の核酸について同時にプロファイリングされる。

【0065】

本明細書に開示される方法はまた、一対のオリゴヌクレオチドプローブとして提供される第1のオリゴヌクレオチドプローブと第2のオリゴヌクレオチドプローブの使用も企図する。本明細書に記載の方法で使用される第1のオリゴヌクレオチドプローブ(本明細書では「パドロック」プローブとも呼ぶ)は、それぞれがヌクレオチドの特定の配列で構成される第1のバーコード配列と第2のバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約5~約15、約6~約14、約7~約13、約8~約12、または約9~約11ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。ある態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約5~約15、約6~約14、約7~約13、約8~約12、または約9~約11ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。ある態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、10ヌクレオチド長である。第2のバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブと第2のオリゴヌクレオチドプローブとの間に追加の相補性部位を提供し、以前のオリゴヌクレオチドプローブ設計に勝る利点を提供する。第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、本明細書に記載の方法における目的の核酸の検出の特異性を高めることができる(すなわち、方法を、第2のバーコードを含まない第1のオリゴヌクレオチドプローブを使用して実施した場合と比較して)。第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列もまた、本明細書に記載の方法において目的の核酸の非特異的増幅を減少させる役割を果たし得る。

【0066】

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブのバーコードは、目的の核酸を識別するために使用される遺伝子特異的配列を含み得る。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブにおけるバーコードの使用は、例えば、国際特許出願公開第WO2019/199579号、およびWang et al., Science 2018, 361, 380にさらに記載されており、両方ともその全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0067】

第1のオリゴヌクレオチドプローブはまた、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補

的な部分と、目的の核酸に相補的な部分とを含む。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端との間で分割される。いくつかの態様において、目的の核酸に相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または約30ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブは、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造：

10

5' - [第2のプローブに相補的な部分] - [目的の核酸に相補的な部分] - [第1のバーコード配列] - [第2のバーコード配列] - 3'、
を含み、ここで] - [は、任意のリンカー（例えば、任意のヌクレオチドリンカー）を含む。いくつかの態様において、] - [は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの2つの部分間の直接結合（すなわち、ホスホジエステル結合）を表す。

【0068】

本明細書に開示される方法で使用される第2のオリゴヌクレオチドプローブ（本明細書では「プライマー」プローブとも呼ぶ）は、ヌクレオチドの特定の配列で構成されるバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、約5～約15、約6～約14、約7～約13、約8～約12、または約9～約11ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。ある態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、10ヌクレオチド長である。

20

【0069】

第2のオリゴヌクレオチドプローブはまた、目的の核酸に相補的な部分と、第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分に相補的な部分とを含む。いくつかの態様において、第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸の異なる部分に相補的であり、これに結合する。いくつかの態様において、目的の核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または約30ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造：

30

5' - [目的の核酸に相補的な部分] - [第1のプローブに相補的な部分] - [バーコード配列] - 3'、
を含み、ここで] - [は、任意のヌクレオチドリンカーを含む。いくつかの態様において、] - [は、第2のオリゴヌクレオチドプローブの2つの部分間の直接結合を表す。

40

【0070】

本明細書に開示される方法はまた、第3のオリゴヌクレオチドプローブの使用も含む。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブは、検出可能な標識（すなわち、例えば画像化を通じて第3のオリゴヌクレオチドプローブの位置を可視化するために使用可能な、任意の標識）を含む。ある態様において、検出可能な標識は蛍光性である（例：フルオロフォア）。本明細書に記載されるように、第3のオリゴヌクレオチドプローブは、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、目的の核酸を識別するために使用される、遺伝子特異的配列である。いくつかの態様にお

50

いて、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させるステップは、目的の核酸を識別するために実施される。目的の核酸を識別するためのこの方法は、動的アニーリングおよびライゲーションによるエラー低減を伴う配列決定（SEDAL配列決定）として知られており、Wang, X. et al., Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. Science 2018, 36, eaat5691および国際特許出願公開第WO 2019/199579号にさらに説明されており、これらのそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる。

【0071】

本明細書に記載の方法で使用される（例えば、SEDAL配列決定で使用されるような）第3のオリゴヌクレオチドプローブは、当技術分野で知られている任意の適切な画像化技術を使用して読み出すことができる。例えば、第3のオリゴヌクレオチドプローブがフルオロフォアを含む態様において、フルオロフォアを画像化を使用して読み出して、目的の核酸を識別することができる。上述のように、第3のオリゴヌクレオチドプローブは、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含み、これは、目的の特定の核酸を検出するために使用される。フルオロフォアを含む第3のオリゴヌクレオチドプローブの位置を画像化することによって、試料内の目的の特定の核酸の位置を決定することができる。いくつかの態様において、画像化するステップは、蛍光画像化を含む。ある態様において、画像化ステップは共焦点顕微鏡検査を含む。ある態様において、画像化ステップは、落射蛍光顕微鏡検査を含む。いくつかの態様において、目的の核酸および目的のタンパク質の位置は、画像化の同じラウンドで決定される。いくつかの態様において、目的の核酸および目的のタンパク質の位置は、画像化の別のラウンドで決定される。ある態様において、2ラウンドの画像化が実施される。ある態様において、3ラウンドの画像化が実施される。ある態様において、4ラウンドの画像化が実施される。ある態様において、5ラウンド以上の画像化が実施される。

【0072】

いくつかの態様において、本明細書に開示される方法は、細胞を1つ以上の検出剤と接触させるステップを含み、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合する。いくつかの態様において、検出剤は、タンパク質、ペプチド、核酸、または小分子である。ある態様において、検出剤は抗体である。ある態様において、検出剤は、抗体断片、抗体バリエーション、またはナノボディである。ある態様において、検出剤はアプタマーである。ある態様において、検出剤は、受容体またはその断片である。目的のタンパク質に結合する任意の抗体の使用が、本開示によって企図される。本明細書に記載の方法で使用され得る抗体にはまた、抗体断片、ならびに全長抗体または抗体断片のバリエーションも含まれる。いくつかの態様において、1つ以上の検出剤は、それぞれが固有の検出可能な標識（例：フルオロフォア）を含む抗体である。いくつかの態様において、方法はさらに、1つ以上の抗体を二次検出剤と接触させることを含む。例えば、目的のタンパク質に結合する各抗体を、異なる二次検出剤と接触させることができる。いくつかの態様において、二次検出剤は、二次抗体（すなわち、目的のタンパク質に結合した抗体の1つに結合する抗体）である。ある態様において、二次抗体は、検出可能な標識を含む。いくつかの態様において、二次抗体の検出可能な標識は、フルオロフォアである。いくつかの態様において、1つ以上の検出剤は、それぞれが目的のタンパク質に結合する抗体であり、目的のタンパク質に結合する各抗体は、固有のオリゴヌクレオチド配列に抱合される。次いで、1つ以上の抗体を、1つ以上の抗体に抱合されたオリゴヌクレオチド配列に相補的な検出可能な標識（例：フルオロフォア）に抱合されたオリゴヌクレオチドと、接触させることができ、1つ以上の抗体の位置を可視化することが可能となる（例：共焦点顕微鏡検査または蛍光を検出するための他の手段による）。

【0073】

いくつかの態様において、目的のタンパク質に結合する検出剤は、小分子色素である。ある態様において、小分子色素はX-34である。例えば、X-34（ β シート構造について

の高蛍光マーカーとして一般に使用される、アミロイド特異的蛍光色素)を使用して、細胞内のA β プラークの存在を検出し、アルツハイマー病に関連する病理的变化を判定することができる。A β プラークの検出におけるX-34の使用は、当技術分野で周知であり、例えば、Styren, S. D. et al. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. J. Histochem. Cytochem. 2000, 48(9), 1223-1232に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤のそれぞれを二次検出剤と接触させるステップは、ローリングサークル増幅を実施して環状オリゴヌクレオチドを増幅するステップの後に、実施される。いくつかの態様において、細胞を1つ以上の検出剤と接触させるステップは、埋め込みのステップの前に実施される。

10

【0074】

本明細書で提供される方法は、細胞における遺伝子およびタンパク質発現を細胞以下の分解能でマッピングするために使用され得る。例えば、本明細書で提供される方法のいずれも、200 nm、150 nm、100 nm、50 nm、40 nm、30 nm、20 nm、または10 nmの細胞以下の分解能で実施され得る。ある態様において、本明細書で提供される方法のいずれも、200 nmの細胞以下の分解能で実施される。

【0075】

様々なポリマーマトリックスの使用が本開示で企図されており、1つ以上の連結アンブリコンおよび検出剤を埋め込むことができる任意のポリマーマトリックスが、本明細書に記載の方法での使用に適している。いくつかの態様において、ポリマーマトリックスは、ヒドロゲル(すなわち、親水性である架橋ポリマーのネットワーク)である。いくつかの態様において、ヒドロゲルは、ポリビニルアルコールヒドロゲル、ポリエチレングリコールヒドロゲル、ポリアクリル酸ナトリウムヒドロゲル、アクリル酸ポリマーヒドロゲル、またはポリアクリルアミドヒドロゲルである。ある態様において、ヒドロゲルは、ポリアクリルアミドヒドロゲルである。かかるヒドロゲルは、例えば、試料をアクリルアミドおよびビスアクリルアミドを含む緩衝液中でインキュベートし、緩衝液を除去し、および試料を重合混合物(これは例えば、過硫酸アンモニウムおよびテトラメチルエチレンジアミンを含む)中でインキュベートすることによって、調製され得る。

20

【0076】

いくつかの態様において、ローリングサークル増幅を実施して環状オリゴヌクレオチドを増幅し、1つ以上の連結アンブリコンを生成するステップはさらに、反応性化学基(例: 5-(3-アミノアリル)-dUTP)で修飾されたヌクレオチドを提供するステップを含む。いくつかの態様において、反応性化学基で修飾されたヌクレオチドは、増幅反応に使用されるヌクレオチドの約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、または約10%を構成する。例えば、ローリングサークル増幅を実施して環状オリゴヌクレオチドを増幅し、1つ以上の連結アンブリコンを生成するステップはさらに、アミン修飾ヌクレオチドを提供するステップを含んでもよい。増幅プロセス中、アミン修飾ヌクレオチドは、生成されるにつれて、1つ以上の連結アンブリコンに組み込まれる。得られたアンブリコンは第一級アミンで官能化され、これを別の適合性のある化学部分(例: N-ヒドロキシスクシンイミド)とさらに反応させることで、連結アンブリコンをポリマーマトリックスに埋め込むステップが容易になる。いくつかの態様において、1つ以上の連結アンブリコンをポリマーマトリックスに埋め込むステップは、1つ以上の連結アンブリコンのアミン修飾ヌクレオチドを、アクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと反応させ、1つ以上の連結アンブリコンとポリマーマトリックスを共重合させることを含む。

30

40

【0077】

ある態様において、本開示は、細胞における遺伝子発現をマッピングするための、以下のステップを含む方法を提供する:

a) 細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴ

50

ヌクレオチドプローブを含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端と一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；

c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；

d) 1つ以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを画像化して、細胞内の目的の核酸の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること。

【0078】

ある態様において、本開示は、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための、以下のステップを含む方法を提供する：

a) 細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、および第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分を含み；

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端と一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；

c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；

d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；

e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること。

対象の疾患または障害を診断するための方法

【0079】

別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害を診断するための方法を提

供する。例えば、本明細書に記載の遺伝子およびタンパク質発現をプロファイリングする方法は、対象（例：疾患もしくは障害を有すると考えられる、またはそのリスクがある対象、または健康であるか、もしくは健康であると考えられる対象）から採取した試料からの1つまたは複数の細胞において実施することができる。次に、細胞内の目的の様々な核酸およびタンパク質の発現を、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞（例：健康な個人からの細胞、または健康な個人の集団からの複数の細胞）における、目的の、同じ核酸およびタンパク質の発現と比較することができる。非疾患細胞における発現と比較した、目的の核酸および／または目的のタンパク質（または複数の目的の核酸および／または目的のタンパク質、例えば、特定の疾患シグネチャー）の発現の任意の変化は、対象が疾患または障害を有することを示す。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現は、対照実験として、疾患細胞における発現と並行してプロファイリングされ得る。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現はまた、以前にプロファイリングされている可能性があり、疾患細胞における発現を、非疾患細胞に関するこの参照データと比較することができる。

10

【0080】

いくつかの態様において、対象における疾患または障害を診断するための方法は、以下のステップを含む：

a) 対象から採取した細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで

20

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；

b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端を一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；

c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；

30

d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；

e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること；

40

ここで、1つ以上の非疾患細胞における発現と比較した、目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現の変化は、対象が疾患または障害を有することを示す。

【0081】

いくつかの態様において、1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現を、対照実験として、本明細書に開示される方法を使用して同時にプロファイリングする。いくつかの態様において、疾患細胞における発現と比較される、1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現データは、1つ以上の非疾患細胞に対して方法を以

50

前に実施した場合からの参照データを含む。

【0082】

任意の疾患または障害の診断が、本明細書に記載の方法によって企図される。いくつかの態様において、疾患または障害は、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸（GI）管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系（CNS）障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である。ある態様において、疾患または障害は神経変性疾患である。ある態様において、疾患または障害はアルツハイマー病である。ある態様において、疾患または障害はがんである。

【0083】

いくつかの態様において、細胞は組織内に存在する。いくつかの態様において、組織は、対象からの組織試料である。いくつかの態様において、対象は非ヒト実験動物（例：マウス）である。いくつかの態様において、対象は家畜である。いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、組織試料は、固定組織試料を含む。ある態様において、組織試料は、生検（例：骨、骨髄、乳房、胃腸管、肺、肝臓、脾臓、前立腺、脳、神経、腎臓、子宮内膜、子宮頸部、リンパ節、筋肉、または皮膚の生検）である。ある態様において、生検は腫瘍生検である。ある態様において、組織は脳組織である。ある態様において、組織は中枢神経系からである。

【0084】

本明細書に開示される、対象における疾患または障害を診断するための方法において、任意の種類の細胞の使用が、本開示によって企図される。いくつかの態様において、細胞は哺乳動物細胞である。ある態様において、細胞はヒト細胞である。いくつかの態様において、細胞はがん細胞である。本開示はまた、本明細書に記載の方法を複数の細胞に対して同時に実施することも企図する。いくつかの態様において、方法は、同じ細胞型の複数の細胞に対して実施される。いくつかの態様において、方法は、異なる細胞型の複数の細胞に対して実施される。本明細書に開示される方法を使用して遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすることができる細胞型には、限定はされないが、幹細胞、前駆細胞、神経細胞、星状細胞、樹状細胞、内皮細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、筋細胞、心筋細胞、間葉細胞、上皮細胞、免疫細胞、および肝細胞が含まれる。ある態様において、細胞は、ミクログリア、星状細胞、オリゴデンドロサイト、興奮性ニューロン、および／または抑制性ニューロンである。

【0085】

様々な、目的の核酸および目的のタンパク質を、本明細書に開示される方法を使用してプロファイリングすることができる。例えば、疾患または障害（例：アルツハイマー病）に関連することが知られているか、または関連すると考えられている任意の核酸またはタンパク質の発現が、本明細書に開示される方法を使用してマッピングされ、疾患または障害の診断に使用され得る。いくつかの態様において、目的の核酸は、Vsnl1、Snap25、Dnm1、Slc6a1、Aldoc、Bsg、Ctss、Plp1、Cst7、Ctsb、Apoe、Trem2、C1qa、P2ry12、Gfap、Vim、Aqp4、Clu、Plp1、Mbp、C4b、Ccnb2、Gpm6a、Ddit3、Dapk1、Myo5a、Tspan7、およびRhocからなる群から選択される。いくつかの態様において、目的のタンパク質は、アミロイドベータ（A β ）ペプチドを含む。ある態様において、A β ペプチドは、A β プラークの形態で存在する。いくつかの態様において、目的のタンパク質は、タウタンパク質を含む。ある態様において、タウタンパク質は、細胞内に封入体（p-Tau）の形態で存在する。A β プラークおよび／またはp-Tauの存在は、例えば、対象における神経変性疾患（例：アルツハイマー病）を診断するために使用され得る。

【0086】

1つ以上の目的のタンパク質を検出するための様々な検出剤の使用が、本開示によって企図される。いくつかの態様において、1つ以上の目的のタンパク質がA β ペプチドを含む場合、A β ペプチドは、小分子検出剤（例：小分子蛍光色素）を使用して検出される。

10

20

30

40

50

ある態様において、小分子検出剤はX-34であり、本明細書に記載されており、また例えばStyren, S. D. et al. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. J. Histochem. Cytochem. 2000, 48(9), 1223-1232に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、目的のタンパク質がタウタンパク質またはp-Tauを含む場合、タウタンパク質は、p-Tau一次抗体を使用して検出される。ある態様において、方法はさらに、p-Tau一次抗体を二次抗体を用いて検出することを含む。いくつかの態様において、二次抗体は、検出可能な標識（例：フルオロフォア）に抱合される。

【0087】

対象における疾患または障害を診断するための本明細書に開示される方法を使用して、目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現における変化を、1つ以上の非疾患細胞における発現と比較して検査することは、対象が疾患または障害を有することを示し得る。いくつかの態様において、目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現の変化を使用して、プラークに近接した細胞型を識別する。例えば、特定の細胞型がプラークに近接して識別された場合、対象はアルツハイマー病を有し得るか、または有する疑いがあり得る。いくつかの態様において、プラークはA β プラークである。ある態様において、プラークに近接した疾患関連ミクログリア細胞型（例えば、C1qa、Trem2、Cst7、Ctsb、および／またはApoeの高発現を含む）の識別は、対象がアルツハイマー病を有するか、または有するリスクがあることを示す。ある態様において、プラークに近接した疾患関連星状細胞の細胞型（例：Gfap、Vim、および／またはApoeの高発現を含む）の識別は、対象がアルツハイマー病を有するか、または有するリスクがあることを示す。ある態様において、プラークに近接したオリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞型（例：Cldn11、Klk6、Serpina3n、および／またはC4bの高発現を含む）の識別は、対象がアルツハイマー病を有するか、または有するリスクがあることを示す。プラークに近接する細胞には、プラークから約10 μ m以内、約20 μ m以内、約30 μ m以内、約40 μ m以内、または約50 μ m以内にある細胞が含まれ得る。

【0088】

本明細書に開示される方法はまた、目的の翻訳後修飾（例：リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、脂質化など）で修飾されたタンパク質をマッピングするために使用することもできる。かかる修飾タンパク質の位置を特定の細胞型と比較して研究することは、リン酸化などのタンパク質修飾が、がんの発生および進行中に重要な役割を果たすため、例えばがんの研究、診断、処置に有用なツールを提供する可能性がある。

遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能な薬剤のスクリーニング方法

【0089】

別の側面において、本開示は、目的の核酸もしくはタンパク質、または目的の複数の核酸および／もしくはタンパク質の、遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするための方法は、1つ以上の候補薬剤の存在下で、細胞内で実施することができる。次いで、細胞（例：正常細胞または疾患細胞）における目的の様々な核酸および／またはタンパク質の発現を、1つ以上の候補薬剤に暴露されていない細胞における、目的の同じ核酸および／またはタンパク質の発現と比較することができる。候補薬剤（単数または複数）に曝露されなかった細胞における発現と比較した、目的の核酸（単数または複数）および／またはタンパク質（単数または複数）の発現の任意の変化は、目的の核酸（単数または複数）および／またはタンパク質の発現が、候補薬剤（単数または複数）によって調節されることを示す。いくつかの態様において、疾患の処置に関連することが知られている特定のシグネチャー（例：核酸およびタンパク質の発現）を使用して、遺伝子および／またはタンパク質発現を所望の様式で調節することができる候補薬剤を、識別することができる。本明細書に記載の方法はまた、例えば、1つ以上の細

10

20

30

40

50

胞が候補薬剤または既知の薬物で処置される場合に、特定の核酸およびタンパク質の発現シグネチャーを探すことによって、特定の副作用を有する薬物を識別するために使用することもできる。

【0090】

いくつかの態様において、本開示は、遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための、以下のステップを含む方法を提供する：

- a) 候補薬剤で処置されているかまたは処置された細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで
 - i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および
 - ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；
 - b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端を一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；
 - c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；
 - d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；
 - e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；
 - f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および
 - g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること；
- ここで、候補薬剤の不在下での発現と比較した、候補薬剤の存在下での目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現の変化は、候補薬剤が遺伝子および／またはタンパク質発現を調節することを示す。

【0091】

いくつかの態様において、候補薬剤は、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、または炭水化物である。ある態様において、小分子は抗がん治療剤である。いくつかの態様において、小分子は既知の薬物を含む。いくつかの態様において、小分子はFDA承認薬物を含む。ある態様において、タンパク質は抗体である。ある態様において、タンパク質は、抗体断片または抗体バリエーションである。ある態様において、タンパク質は受容体である。ある態様において、タンパク質はサイトカインである。ある態様において、核酸は、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA (dsRNA)、短ヘアピンRNA (shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) である。任意の候補薬剤を、本明細書に記載の方法を使用してスクリーニングすることができる。特に、遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能と考えられる任意の候補薬剤を、本明細書に記載の方法を使用してスクリーニングすることができる。いくつかの態様において、候補薬剤による遺伝子および／またはタンパク質発現の調節は、疾患または障害の症状を軽減、緩和、または除去すること、または疾患もしくは障害の発症または進行を予防することに関連する。いくつかの態様において、候補薬剤によって調節される

疾患または障害は、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸（GI）管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系（CNS）障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である。ある態様において、疾患または障害はアルツハイマー病である。ある態様において、疾患または障害はがんである。

対象における疾患または障害を処置するための方法

【0092】

別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害を処置するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の遺伝子発現およびタンパク質発現をプロファイリングするための方法は、対象（例：疾患または障害を有すると考えられる、また有するリスクがある対象）から採取した試料からの細胞において実施することができる。次いで、細胞における目的の様々な核酸および／またはタンパク質の発現を、非疾患組織試料からの細胞における目的の同じ核酸および／またはタンパク質の発現と比較することができる。次いで、非疾患細胞における発現と比べて、目的の核酸および／またはタンパク質の発現に任意の変化が観察された場合、疾患または障害の処置を、対象に施すことができる。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現は、対照実験として、疾患細胞における発現と並行してプロファイリングされ得る。1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現は、以前にもプロファイリングされている可能性があり、疾患細胞における発現を、非疾患細胞に関するこの参照データと比較することができる。

【0093】

いくつかの態様において、本開示は、対象における疾患または障害を処置するための、以下のステップを含む方法を提供する：

- a) 対象から採取した細胞を、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの各対は、第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで
 - i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および
 - ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的であり；
- b) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端と一緒にライゲートして、環状オリゴヌクレオチドを生成すること；
- c) ローリングサークル増幅を実施して、環状オリゴヌクレオチドを、第2のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用いて増幅し、1つ以上の連結アンプリコンを生成すること；
- d) 細胞を、1つ以上の検出剤と接触させること、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合し；
- e) 1つ以上の連結アンプリコンと1つ以上の検出剤を、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；
- f) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンを、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含む第3のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および
- g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスに埋め込まれた1つ以上の検出剤を画像化して、細胞内の目的の核酸および目的のタンパク質の位置を決定すること、および任意で、遺伝子およびタンパク質発現をマッピングすること；および
- h) 1つ以上の非疾患細胞における発現と比較して、目的の核酸および／または目的のタンパク質の発現の変化が観察された場合、対象に疾患または障害の処置を施すこと。

【0094】

いくつかの態様において、1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現を、対照実験として、本明細書に開示される方法を使用して同時にプロファイリングする。いくつかの態様において、疾患細胞における発現と比較した、1つ以上の非疾患細胞における遺伝子およびタンパク質発現データは、方法が非疾患細胞に対して以前に実施されたときからの参照データを含む。

【0095】

疾患または障害に対する任意の適切な処置を、対象に施すことができる。いくつかの態様において、処置は、治療剤を投与することを含む。いくつかの態様において、処置は外科手術を含む。いくつかの態様において、処置は画像化を含む。いくつかの態様において、処置は、さらなる診断方法を実施することを含む。いくつかの態様において、処置は放射線治療を含む。いくつかの態様において、治療剤は、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、または炭水化物である。ある態様において、小分子は抗がん治療剤である。いくつかの態様において、小分子は既知の薬物である。いくつかの態様において、小分子はFDA承認薬物である。いくつかの態様において、小分子は、化合物のライブラリを含む。ある態様において、タンパク質は抗体である。ある態様において、タンパク質は抗体断片である。ある態様において、タンパク質は抗体バリエーションである。ある態様において、タンパク質は受容体である。ある態様において、タンパク質はサイトカインである。ある態様において、核酸は、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA (dsRNA)、短ヘアピンRNA (shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) である。ある態様において、核酸はDNAである。ある態様において、タンパク質は抗体である。ある態様において、タンパク質は、抗体断片または抗体バリエーションである。ある態様において、タンパク質は、受容体、またはその断片もしくはバリエーションである。ある態様において、タンパク質はサイトカインである。ある態様において、核酸は、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA (dsRNA)、短ヘアピンRNA (shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) である。

【0096】

任意の疾患または障害の処置が、本明細書に記載の方法によって企図される。いくつかの態様において、疾患または障害は、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸 (GI) 管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系 (CNS) 障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である。ある態様において、疾患または障害は神経変性疾患である。ある態様において、疾患または障害はアルツハイマー病である。ある態様において、疾患または障害はがんである。

【0097】

いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、試料は生物学的試料を含む。いくつかの態様において、試料は組織試料を含む。ある態様において、組織試料は生検である (例: 骨、骨髄、乳房、胃腸管、肺、肝臓、脾臓、前立腺、脳、神経、腎臓、子宮内膜、子宮頸部、リンパ節、筋肉、または皮膚の生検)。ある態様において、生検は腫瘍生検である。ある態様において、生検は固形腫瘍生検である。いくつかの態様において、組織試料は脳組織試料である。ある態様において、組織試料は中枢神経系組織試料である。

オリゴヌクレオチドプローブ

【0098】

本開示はまた、本明細書に記載の方法およびシステムで使用するための、オリゴヌクレオチドプローブを提供する。

【0099】

一側面において、本開示は、第1のオリゴヌクレオチドプローブ (本明細書では「パドロック」プローブとも呼ぶ) および第2のオリゴヌクレオチドプローブ (本明細書では「

プライマー」プローブとも呼ぶ)を含む、複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで：

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、

ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的である。

【0100】

本明細書に記載のすべてのオリゴヌクレオチドプローブは、任意で、様々なヌクレオチド長のスペーサーまたはリンカーを列挙された構成要素のそれぞれの間に有してもよく、またはオリゴヌクレオチドプローブの構成要素は、互いに直接結合されてもよい。本明細書に記載のすべてのオリゴヌクレオチドプローブは、標準ヌクレオチドを含んでもよく、または標準ヌクレオチドのいくつかは、当技術分野で知られている任意の修飾ヌクレオチドと置換されてもよい。

【0101】

本明細書に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブの第1のオリゴヌクレオチドプローブ（本明細書では「パドロック」プローブとも呼ぶ）は、それぞれがヌクレオチドの特定の配列で構成される、第1のバーコード配列および第2のバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約5～約15、約6～約14、約7～約13、約8～約12、または約9～約11ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。ある態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約5～約15、約6～約14、約7～約13、約8～約12、または約9～約11ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。ある態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、10ヌクレオチド長である。第2のバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブと第2のオリゴヌクレオチドプローブとの間に追加の相補性部位を提供し、以前のオリゴヌクレオチドプローブ設計に勝る利点を提供する。第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、目的核酸の検出の特異性を、複数のオリゴヌクレオチドプローブを使用して高めることができる（例えば、複数のオリゴヌクレオチドプローブを、本明細書で開示される任意の方法において使用して）。第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列はまた、目的の核酸の非特異的増幅を減少させる役割も果たし得る。

【0102】

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブのバーコードは、目的の核酸を識別するために使用される遺伝子特異的配列を含み得る。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブにおけるバーコードの使用は、例えば、国際特許出願公開第WO2019/199579号、およびWang et al., Science 2018, 361, 380にさらに記載されており、両方ともその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0103】

第1のオリゴヌクレオチドプローブはまた、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分と、目的の核酸に相補的な部分とを含む。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端との間で分割される。いくつかの態様において、目的の核酸に相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10、約

10

20

30

40

50

1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、または約 3 0ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブは、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、約 3 0、約 3 1、約 3 2、約 3 3、約 3 4、約 3 5、約 3 6、約 3 7、約 3 8、約 3 9、または約 4 0ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造：

5' - [第 2 のプローブに相補的な部分] - [目的の核酸に相補的な部分] - [第 1 のバーコード配列] - [第 2 のバーコード配列] - 3、' を含み、ここで] - [は、任意のリンカー（例えば、任意のヌクレオチドリンカー）を含む。いくつかの態様において、] - [は、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの 2 つの部分間の直接結合（すなわち、ホスホジエステル結合）を表す。

10

【0104】

本明細書に開示される複数のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のオリゴヌクレオチドプローブ（本明細書では「プライマー」プローブとも呼ぶ）は、ヌクレオチドの特定の配列で構成されるバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、約 5 ～約 1 5、約 6 ～約 1 4、約 7 ～約 1 3、約 8 ～約 1 2、または約 9 ～約 1 1ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、または 1 5ヌクレオチド長である。ある態様において、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、1 0ヌクレオチド長である。

20

【0105】

第 2 のオリゴヌクレオチドプローブはまた、目的の核酸に相補的な部分と、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの部分に相補的な部分とを含む。いくつかの態様において、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸の異なる部分に相補的であり、これに結合する。いくつかの態様において、目的の核酸に相補的な第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、または約 3 0ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、約 3 0、約 3 1、約 3 2、約 3 3、約 3 4、約 3 5、約 3 6、約 3 7、約 3 8、約 3 9、または約 4 0ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造：

30

5' - [目的の核酸に相補的な部分] - [第 1 のプローブに相補的な部分] - [バーコード配列] - 3、' を含み、ここで] - [は、任意のリンカー（例えば、任意のヌクレオチドリンカー）を含む。いくつかの態様において、] - [は、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの 2 つの部分間の直接結合（すなわち、ホスホジエステル結合）を表す。

【0106】

いくつかの態様において、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの態様において、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブは、検出可能な標識を含む。ある態様において、検出可能な標識はフルオロフォアである。本明細書に記載されるように、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブは、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列に相補的である。いくつかの態様において、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列は、目的の核酸を識別するために使用される遺伝子特異的配列である。いくつかの態様において、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸を識別するために使用される（例えば、SEDAL 配列決定を通じて）。

40

キット

【0107】

50

本開示により、キットもまた提供される。一側面において、提供されるキットは、本明細書に記載の1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。いくつかの態様において、キットはさらに、容器（例：バイアル、アンプル、ボトル、および／またはディスペンサーパッケージ、または他の適切な容器）を含み得る。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの態様において、キットはさらに、1つ以上の検出剤（例：ペプチド、抗体などのタンパク質、アプタマーなどの核酸、または蛍光色素などの小分子）を含み、ここで各検出剤は、目的のタンパク質に結合する。ある態様において、1つ以上の検出剤は、抗p-Tau抗体を含む。いくつかの態様において、キットはさらに、小分子検出剤（例：本明細書に記載のX-34）を含む。いくつかの態様において、キットはさらに、本明細書に記載の第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む。第3のオリゴヌクレオチドプローブは、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列に相補的な配列を含んでもよい。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブは、検出可能な標識（例：フルオロフォア）を含む。いくつかの態様において、キットは、2セット以上のオリゴヌクレオチドプローブからなるライブラリを含み、ここでオリゴヌクレオチドプローブの各セットは、目的の特定の核酸を識別するために使用される。いくつかの態様において、キットは、複数の目的のタンパク質を検出するための、検出剤のライブラリを含む。いくつかの態様において、キットはさらに、本明細書に開示される方法を実施するための他の試薬（例：細胞、リガーゼ、ポリメラーゼ、アミン修飾ヌクレオチド、一次抗体、二次抗体、緩衝液、および／またはポリマーマトリックス（例：ポリアクリルアミドマトリックス）を作るための試薬）を含んでもよい。いくつかの態様において、キットは、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をプロファイリングするのに有用である。いくつかの態様において、キットは、対象における疾患（例：アルツハイマー病）を診断するのに有用である。いくつかの態様において、キットは、遺伝子および／またはタンパク質発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするのに有用である。いくつかの態様において、キットは、対象における疾患または障害を診断するのに有用である。いくつかの態様において、キットは、対象における疾患または障害を処置するのに有用である。ある態様において、本明細書に記載のキットはさらに、キットの使用説明書を含む。

少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別するための方法、装置、および非一時的なコンピュータ可読記憶媒体

【0108】

様々な側面において、本開示は、1つ以上の画像内の細胞型の空間的変動を識別する（すなわち、複数の試料間における特定の細胞型の相対的な空間分布の変動を調べること、例えば、健康な組織と疾患組織の比較）ための方法を提供する。いくつかの態様において、1つ以上の画像は、本明細書に開示される方法のいずれかを使用して取得される。図15は、少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別することに関連する方法の、一態様のフロー図である。プロセスフロー1500は、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実施され得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されるとプロセスフロー1500を実施する複数の命令がコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体が存在し得る。プロセスフロー1500は、ステップ1502、ステップ1504、ステップ1506、ステップ1508、およびステップ1510を含む。ステップ1502において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、少なくとも1つの画像内の複数の細胞のそれぞれについて、少なくとも1つの画像内の細胞の空間的位置を受け取る。ステップ1504において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、少なくとも1つの画像内の複数のタンパク質のそれぞれについて、画像内のタンパク質の空間的位置を受け取る。ステップ1506において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、複数のタンパク質の第1のタンパク質について、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定し、ここで距離は、複数の細胞の空間的位置の少なくともいくつか、および複数のタンパク質の空間的位置の少なくともいくつかに基づいて決定される。ステップ1

508において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、第1の細胞型の細胞の数に基づいて、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別する。ステップ1510において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動の表示を出力する。

【0109】

図16は、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること（すなわち、複数の試料間における特定の細胞型の相対的な空間分布の変動を調べることに、例えば、健康な組織と疾患組織の比較）に関連する方法の、一態様のフロー図である。プロセスフロー1600は、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実施され得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されるとプロセスフロー1600を実施する複数の命令がコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体が存在し得る。プロセスフロー1600は、ステップ1602、ステップ1604、ステップ1606、およびステップ1608を含む。ステップ1602において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である複数の細胞のうちの細胞について、第1の細胞型に関連する細胞の第1のパーセンテージを決定する。ステップ1604において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、少なくとも1つの画像内の複数の細胞のうち、第1の細胞型に関連する細胞の第2のパーセンテージを決定する。ステップ1606において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、第1のパーセンテージを第2のパーセンテージと比較して、比較結果を得る。ステップ1608において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、比較結果を使用して、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別する。

10

20

【0110】

図17は、カメラを使用して少なくとも1つの画像を取り込むことに関連する方法の、一態様のフロー図である。プロセスフロー1700は、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実施され得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されるとプロセスフロー1700を実施する複数の命令がコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体が存在し得る。プロセスフロー1700は、ステップ1702およびステップ1704を含む。ステップ1702において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、複数の画像の第1の画像を取り込み、第1の画像は、複数の細胞の空間的位置を決定するために使用される。ステップ1704において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、複数の画像の第2の画像を取り込み、第2の画像は、複数のタンパク質の空間的位置を決定するために使用される。

30

【0111】

図18は、複数の画像からの空間的位置を空間的に整列させる一態様の、フロー図である。プロセスフロー1800は、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実施され得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されるとプロセスフロー1800を実施する複数の命令がコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体が存在し得る。プロセスフロー1800は、ステップ1802およびステップ1804を含む。ステップ1802において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、第1の画像からの複数の細胞の空間的位置を、第2の画像からの複数のタンパク質の空間的位置と空間的に整列させる。ステップ1804において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、空間的に整列された空間的位置に基づいて、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定する。

40

【0112】

図19は、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定することに関する方法の、一態様のフロー図である。プロセスフロー1900は、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実施され得る。いくつかの態様におい

50

て、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されるとプロセスフロー1900を実施する複数の命令がコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体が存在し得る。プロセスフロー1900は、ステップ1902およびステップ1904を含む。ステップ1902において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、第1の細胞型の細胞から、複数のタンパク質のうち最も近いタンパク質までの、最短距離を決定する。ステップ1904において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、最短距離を閾値距離と比較する。

【0113】

図20は、細胞を細胞型に関連付ける方法の、一態様のフロー図である。プロセスフロー2000は、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実施され得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサによって実行されるとプロセスフロー2000を実施する複数の命令がコードされた、少なくとも1つの非一時的なコンピュータ可読記憶媒体が存在し得る。プロセスフロー2000は、ステップ2002およびステップ2004を含む。ステップ2002において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、細胞の遺伝情報（例：遺伝子および／またはタンパク質発現に関する情報）を受け取る。ステップ2004において、少なくとも1つのコンピュータプロセッサは、細胞の遺伝情報に基づいて、細胞を複数の細胞型からの1つの細胞型と関連付け、ここで複数の細胞型は第1の細胞型を含む。

【0114】

本明細書で提供される本開示の態様のいずれかと関連して使用され得るコンピュータシステム2100の例示的な実装が、図21に示される。コンピュータシステム2100は、1つ以上のコンピュータプロセッサ2110と、非一時的なコンピュータ可読記憶媒体、例えばメモリ2120および1つ以上の不揮発性記憶媒体2130を含む1つ以上の製造品とを含むことができる。プロセッサ2110は、任意の適切な様式でのメモリ2120および不揮発性記憶装置2130へのデータの書き込みおよびそれらからのデータの読み取りを、制御することができる。プロセスフロー1500、1600、1700、1800、1900、2000に関連する方法などの、本明細書に記載の機能または方法のいずれかを実施すること、または例えば、少なくとも1つの画像内の細胞型の空間的変動を識別すること（すなわち、複数の試料間での特定の細胞型の相対的な空間分布の変動を調べること、例えば、健康な組織と疾患組織の比較）、少なくとも1つの画像内の第1の細胞型の細胞の空間的変動を識別すること、少なくとも1つの画像をカメラを用いて取り込むこと、複数の画像からの空間的位置を空間的に整列させること、第1のタンパク質までの距離が閾値距離未満である第1の細胞型の細胞の数を決定すること、または細胞を細胞型と関連付けることなどのために、プロセッサ2110は、1つ以上の非一時的なコンピュータ可読記憶媒体に記憶された1つ以上のコンピュータプロセッサ実行可能命令を実行することができる、該記憶媒体としては例えば、メモリ2120であって、これは、プロセッサ2110による実行用のプロセッサ実行可能命令を記憶する、非一時的なコンピュータ可読記憶媒体として機能し得る。

細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするシステム

【0115】

本開示はまた、細胞における遺伝子およびタンパク質発現をマッピングするためのシステムを提供する。いくつかの態様において、システムは、a)細胞；およびb)第1のオリゴヌクレオチドプローブと第2のオリゴヌクレオチドプローブとを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで：

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第2のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、および第2のバーコード配列を含み；および

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、およびバーコード配列を含み、ここで、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの第

10

20

30

40

50

2のバーコード配列に相補的である。

【0116】

いくつかの態様において、システムは、顕微鏡（例：共焦点顕微鏡）をさらに含む。いくつかの態様において、システムはコンピュータをさらに含む。いくつかの態様において、システムは、顕微鏡検査および／または画像解析を実施するためのソフトウェアをさらに含む（例えば、本明細書に記載の画像解析方法のいずれかを使用）。いくつかの態様において、システムはリガーゼをさらに含む。いくつかの態様において、システムはポリメラーゼをさらに含む。いくつかの態様において、システムはアミン修飾ヌクレオチドをさらに含む。いくつかの態様において、システムは、ポリマーマトリックス（例：ポリアクリルアミドマトリックス）を作るための試薬をさらに含む。本開示のシステムにおける細胞は、本明細書に開示される細胞型のいずれであってもよい。いくつかの態様において、システムは複数の細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は異なる細胞型のものである。ある態様において、細胞は組織内に存在する。いくつかの態様において、組織は、対象によって、または対象から提供された組織試料である。ある態様において、対象はヒトである。

【0117】

例

例1：STARmap Pro法の開発

アミロイドβプラークおよび神経原線維タウのもつれはアルツハイマー病（AD）の神経病理学的特徴であるが、ADの病態生理の根底にある分子事象および細胞機構は、空間および時間の次元で依然として十分に理解されていない。STARmap Pro法は、ADマウスモデルの脳組織における単一細胞の転写状態とタンパク質疾患マーカー（アミロイドβ凝集体およびタウ病理）を同時に検出するために開発され、適用された。擬時間軌道構築と細胞以下の分解能（200nm）での差次的遺伝子発現の共同解析により、AD病理における細胞型と状態の高分解能空間マップが構築された。疾患関連ミクログリア（DAM）細胞は、疾患進行の初期段階からアミロイドβプラークと直接接触する内殻を形成する一方、疾患関連星状細胞（DAA）およびオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）が、疾患の後期段階においてアミロイドβプラークを囲む外殻にエンリッチされていることが判明した。過剰リン酸化タウは、主に興奮性ニューロンおよび軸索突起に出現した。さらに、疾患に関連する遺伝子パスウェイが様々な細胞型にわたって正確に示され、検証されたことから、グリア細胞における炎症およびグリオーシスのプロセス、および成人海馬の神経新生における低下が示唆された。

【0118】

以前のSTARmap法は、組織学的染色（免疫染色または小分子染色）と互換性がなく、1024個の遺伝子の検出に限定されていた。かかる制限をSTARmap Proで克服するため、実験プロトコルをまず合理化して、ライブラリ調製およびin situ配列決定ステップに、抗体（AT8抗体、リン酸化タウを検出）および色素染色（X-34、Aβプラークを検出）を組み込んだ（図1B、図8Aおよび8B）。脳組織の細胞内mRNAは一对のDNAプローブ（プライマーおよびパドロック、図1C）によって検出され、cDNAアンプリコンとして酵素的に増幅された。タンパク質は一次抗体で標識され、その後、cDNAアンプリコンと一次抗体の両方が、ヒドロゲルマトリックスに埋め込まれる。各cDNAアンプリコンは遺伝子固有の識別子（バーコード）を含有し、これはin situ SEDAL配列決定（動的アニーリングおよびライゲーションによるエラー削減を伴う配列決定）（Wang et al., 2018）および、続いて蛍光タンパク質染色（二次抗体染色および小分子色素X-34染色）により読み出されて、タンパク質シグナルを可視化する。

【0119】

次いで、DNAプローブ中の遺伝子をコードするバーコードを、5ヌクレオチド（nt）から、20,000を超える遺伝子をコードするのに十分な10nt（10⁶コーディング容量）まで拡張した。さらに、追加の5ntバーコードをライゲーション部位近くに戦略的に設計して、ミスマッチのプライマーパドロック対の非特異的増幅を減少させ

ることにより、遺伝子検出の特異性を高める（図 8 C）。次にバーコード設計を、ライゲーション部位近くにミスマッチを組み込むことにより検証した。結果は検出不能シグナルを示し、STARmap Pro法が高い特異性を有することを示唆した（図 8 D および 8 E）。

【 0 1 2 0 】

アミロイド沈着および過剰リン酸化タウを含むAD関連病理が、細胞レベルで転写反応にどのように影響するかを調べるために、8 ラウンドのin situ配列決定を実施して27666個の遺伝子をマッピングし、1 ラウンドの配列決定後に画像化を実施して（図 1 D）、TauPS2APPマウスおよび対照マウスからの脳の薄い冠状切片における、A β プラークおよびリン酸化タウ（p-Tau）の位置を特定する。トランスジェニックTauPS2APPマウスは、ヒトアミロイド前駆体タンパク質（APPK670N/M671L）およびプレセニン2（N141I）の変異型を発現し、これは高レベルのA β ペプチドを産生して、過剰リン酸化されて凝集するヒトMAPTの変異型（P301L）を発現するのに加えて、プラーク形成を引き起こす。切片は、8 か月（タウおよびA β の病理が定着し、拡大している年齢）および13 か月（重度の病理と神経炎症活動の上昇を伴う、より進行した疾患段階）で解析した（Lee et al., 2021）。ADで最も感受性の高い領域の2つである皮質と海馬を、主に調査した。TauPS2APPの空間タンパク質シグナルは、以前の報告結果と一致して（Grueninger et al. 2010、Lee et al. Neuron 2021）、A β プラークシグナルが皮質と海馬領域の両方に分布し、p-Tau免疫反応性が主に海馬のCA1領域に分布していることを示し（図 1 D）、STARmap Proにおけるタンパク質検出の忠実性を示唆する。2匹のTauPS2APPマウスからの19,932細胞および2匹の対照マウス（非トランスジェニック同腹子）からの17,135細胞を、細胞以下の分解能でマッピングした（ボクセルサイズ95 nm $\times$ 95 nm $\times$ 346 nm、図 1 A）。3次元RNA読取りを2次元平面に投影し、単一細胞転写プロファイルの細胞セグメンテーションと品質管理フィルタリング（面積が1000ピクセルまたは9.025 μ m²を超え、細胞あたりRNA読取りが68を超える；STAR法も参照）の後、4つの試料すべてからプールされた残りの33,106個の細胞を、下流解析に供した。

例 2：階層的細胞分類および空間解析

【 0 1 2 1 】

STARmap Proデータから細胞型を識別するために、階層的クラスタリング戦略を採用した；この戦略では、最上位クラスタリングは、細胞をすべての試料で共有される共通の細胞型に分類するのに役立ち、サブレベルクラスタリングは、疾患に関連するサブタイプをさらに識別するのに役立つ。最上位クラスタリングの間、ライデンアルゴリズムを、すべてのトランスクリプトームプロファイルの低次元表示に対し、Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) と共に適用した（McInnes et al., 2018；Traag et al., 2019）。13の主要な細胞型が、以前に報告された遺伝子マーカーおよび組織形態に従って、明確なアノテーションで識別された（図 2 A、図 9 A）。例えば、興奮性ニューロンは、Vsnl1、Snap25、Dnm1などのイオンチャネルおよびシナプスシグナル伝達に関連する遺伝子の高い発現レベルによりアノテーションされた。抑制性ニューロンは、ガンマアミノ酪酸（GABA）トランスポーターSlc6a1のエンリッチメントによって分離された。他の非神経細胞型特異的マーカー、例えば星状細胞についてはAldoc、内皮細胞についてはBsg、ミクログリアについてはCtss、オリゴデンドロサイトについてはPlp1などを使用して、対応するクラスターにもアノテーションを付けた（図 9 A）。TauPS2APP試料のUMAPプロットは、対照試料と比較して、星状細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、および歯状回（DG）細胞の異なる分布を示し、疾患に関連する細胞サブタイプを示唆した（図 2 A）。したがって、各主要な細胞型内の不均一性が調査され、24のサブレベルクラスターが、トランスクリプトームシグネチャーに基づいて識別された（図 2 B）。

【 0 1 2 2 】

細胞以下の分解能で保存された空間情報の恩恵を受けて、空間細胞型アトラスを、4つの試料の皮質および海馬領域における組織病理学的特徴と共に生成した（図 2 C および 図

9 D)。異なる試料のすべての空間細胞アトラスは、皮質領域と海馬領域の類似する解剖学的構造を示し、最上位クラスタリング結果の堅牢性と信頼性を確認した。さらに、いくつかの主要な細胞型は、TauPS2APP試料においてAβプラーク付近で様々な空間分布を示し、p-Tauシグナルは13か月の海馬領域において明らかになった（図2C）。Aβプラークとの空間的関係における細胞型組成をさらに定量化するために、各細胞の重心からその最も近いプラークの端までの距離を測定した。次いで、細胞を、Aβプラークからの距離の関数として（5つの10μm同心円内で）計数し、主要な細胞型のアノテーションに基づいてグループ化した（図2D、2E、および9F）。13の主要な細胞型のうち、ミクログリア、星状細胞、およびオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）は、全体の細胞型組成と比較して、TauPS2APP試料のプラークの周囲でエンリッチされていた。ミクログリアは、10μmリング内で最も優勢な細胞型であった。OPCと星状細胞は、20～30μmの距離で中程度のエンリッチメントを示した。残りの細胞型は、10～20μmのリング内で比較的枯渇していた。

10

【0123】

最上位細胞クラスタリングおよび空間解析により、ミクログリア、星状細胞、OPC、オリゴデンドロサイトおよび神経細胞が、転写プロファイル、空間的位置、または両方の特徴において、変化を示すことが明らかになった。したがってこれらの細胞型を、疾患に関連する細胞サブタイプと遺伝子パスウェイを正確に特定するための、詳細なサブレベルクラスタリング解析のために選択した。ADは本質的に進行性の疾患であり、継続的な分子および細胞変動を伴う。しかしクラスタリング解析は異なる細胞型を識別するのみであり、細胞状態の継続的な遷移を記述することはできない。疾患の進行に伴う細胞状態の傾き（gradient）を捕捉し、異なるサブタイプ間の関係を決定するために、以下のセクションでは、細胞分化軌道（differentiation trajectory）の再構築に広く使用されている計算ツールであるMonocle擬時間解析（Cao et al., 2019）を、サブクラスター解析の補完として使用した。

20

例3：疾患関連ミクログリアは疾患発症初期からAβプラークと直接接触する

【0124】

ミクログリアがプラークのごく近傍でエンリッチされていることを確認した後（図2E）、ミクログリア集団内の不均一性を、トランスクリプトームプロファイルのサブクラスタリング解析によって調査した。3つの亜集団が識別され、それぞれMicro1（n=779）、Micro2（n=415）、およびMicro3（n=529）と名付けられた（図3A）。Micro1およびMicro2サブタイプは4つの試料すべてに存在したが、Micro3集団は、TauPS2APP試料において8か月から13か月で大きく拡大し、対照試料にはほとんど存在しなかった（図3A）。さらに、Micro3サブクラスターは、C1qa、Trem2、Cst7、Ctsb、およびApoeを高レベルで発現したが、これらは疾患関連ミクログリア（DAM）の既知のマーカーであり、神経変性に関連する（Friedman et al., 2018; Keren-Shou et al., 2017）（図3B）。疾患モデルとの強い関連性および既知のDAM遺伝子マーカーとの一致を考慮して、Micro3はDAMとしてアノテーションされた。

30

【0125】

次いで、細胞状態遷移の継続的な傾きを、擬時間軌道解析により、ミクログリアにおいてさらに再構築した。ミクログリア集団は、実際の疾患進行タイムラインと非常によく一致する線形の擬時間軌道を示した。対照試料中のミクログリアは軌道の開始点でエンリッチされたが、TauPS2APP試料中のミクログリアは連続パス（continuous path）に沿って8か月から13か月まで変化し続けた（図3C～3E）。Micro3サブクラスターは、軌道に沿って後期の擬時間点において提示されたが、Micro1およびMicro2の両方は、初期から中間の擬時間値まで軌道に沿って広がった（図3D～3E）。次に、3つのミクログリアサブクラスターの空間分布を解析した。以下が観察された：（i）3つのサブクラスターすべてがTauPS2APP試料の皮質領域と海馬領域の両方に存在した（図3F～3G）；（ii）Micro3は、ほぼ独占的にTauPS2APPマウスに存在したが、対照試料には存在しなかった（図3H、図10A）；（iii）Micro2は、TauPS2APP試料

40

50

および対照試料の両方において、皮質領域よりも海馬領域において高い密度を示した（図3H）。A β プラーク周囲の細胞型組成解析では、以下が観察された：（i）8か月時点で、プラーク周囲の10 μ mリング内の全細胞の64.5%がミクログリアであり、特にミクログリアの73.3%がMicro3であった（図10B）；（ii）13ヵ月において、その数はそれぞれ75.8%および81.5%に増加した（図3H、下）。さらに、Micro2は厳密には疾患特異的ではないが、他の（非ミクログリア）細胞型と比較してプラーク付近の10 μ mリング内で有意にエンリッチメントされており（図3Hおよび図10B）、これはMicro2が、A β プラークにも応答することを示唆している。ミクログリアの空間細胞アトラスを擬時間値でさらにプロットし、プラーク付近の擬時間分布を、細胞型解析で使ったのと同様の同心リング定量化を用いて計算した。結果は、プラーク付近（10 μ m以内）のミクログリア細胞が、プラークから遠く離れた細胞よりも高い擬時間値を有するという予想された観察を示し、ミクログリアがA β プラークに向かって移動するときのミクログリア活性化の時空間的軌道（spatiotemporal trajectory）を明らかにした（図10Cおよび10D）。

10

【0126】

AD病態に対するミクログリア応答の分子レベルでのより包括的な理解を得るために、次いで、TauPS2APPマウスと対照マウスにおけるミクログリアの遺伝子発現を比較した（図10E）。ADの試料で識別された上方制御されたDEGのほとんどは、細胞活性化（Cst7、Apoe、Cd9、およびClec7a）、炎症反応（すなわち、Trem2、Ccl6、およびCd68）、抗原プロセッシングの制御および提示（すなわち、CtssおよびH2-k1）などの、生物学的プロセスに参与するDAM遺伝子マーカーであった。一方、疾患試料中のミクログリアの下方制御された遺伝子は、解剖学的構造の形態形成（すなわち、Sparc、Numb、Cdc42）、エンドサイトーシス（Calm1およびBin1）、および輸送の正の制御（すなわち、P2ry12およびGlud1）の調節に関連していた。最も重要なDEGおよび細胞型マーカーのサブセットを選択し、それらの発現変動を、64遺伝子のデータセットにおいて追加のマウスセットを使用して検証した（図3I）。

20

例4：疾患関連星状細胞は、プラーク-DAM複合体付近に後期の段階で出現する

【0127】

星状細胞は、TauPS2APPと対照試料との間に有意な差を有する別の非神経細胞集団であった。星状細胞のサブレベルクラスタリング解析により、トランスクリプトーム的に異なる3つの亜集団、Astro1（n=1,068）、Astro2（n=1,271）、およびAstro3（n=545）が識別された（図4A）。3つのサブクラスターすべては、全試料で観察された；しかし、対照マウスにはAstro3細胞がほとんど存在せず、TauPS2APPマウスではAstro3集団は8か月から13か月で大きく拡大した（図4A）。以前の研究では、Gfapの特徴的な上方制御を有する疾患関連星状細胞（DAA）が識別されており、Astro3の遺伝子マーカーは、DAAの遺伝子マーカーと類似していた（Habibetal.,2020）（すなわち、Gfap、Vim、およびApoe、図4B）。したがって、Astro3クラスターは、そのトランスクリプトームプロファイルがDAAと類似しており、ADモデルと関連しているため、DAAとしてアノテーションされた。さらに、Astro1およびAstro2は、以前に報告された低Gfapおよび中間Gfap細胞集団に対応する（Habib et al., 2020）。

30

40

【0128】

Astro1~3サブタイプにわたる多くのマーカー遺伝子の見かけの直線的な傾きにもかかわらず、分岐パスが、星状細胞集団の擬時間軌道解析から観察された（図4C）。擬時間軌道に沿ってサブクラスターのアノテーションを可視化することにより、最長のパス（下のパス）がAstro1（開始点）とAstro2（終了点）からの傾きと一致し、疾患の進行との明らかな関連性がないことが識別された。対照的に、分岐点からの短い分岐（上のパス）は、非疾患状態（主にAstro2）からAstro3（DAA）への遷移を表した（図4D）。

【0129】

50

星状細胞の空間細胞マップはさらに、Astro1が皮質ニューロンおよび海馬ニューロン付近に位置する一方、Astro2が脳梁およびラクノス層分子でエンリッチされていることを示した（図4F～4Hおよび図11A）。組織の病理に関連する細胞型解析により、DAMが10 μm 以内のプラークと直接相互作用してDAMプラーク複合体を形成する一方、Astro3（DAA）は、皮質および海馬領域の両方において、プラークから比較的離れた場所（20～40 μm ）でエンリッチされることが明らかになった。皮質、脳梁、および海馬領域では、13か月のTauPS2APP試料において、プラーク周囲の20～40 μm 範囲の細胞のそれぞれ約3.1%、7.8%、または10.1%がDAAであった（図4H）。さらに、Astro2は、8か月時点でプラーク付近でもエンリッチされており、20～40 μm の範囲の全細胞の3～16%に寄与していた；しかしながら、Astro2の存在は13か月で2～7%に低下した（図4Hおよび11B）。プラーク付近における、Astro2からAstro3集団への8から13か月の観察された変化は、Astro2からAstro3への疾患関連トランスクリプトーム擬時間軌道と組み合わせると（図4D、上のパス）、Astro2からAstro3（DAA）への変換が、疾患進行に伴ってプラーク付近に存在し得ることを示唆する。

10

20

30

40

50

【0130】

TauPS2APPおよび対照試料の星状細胞におけるDEGのほとんどは、グリア細胞分化（すなわち、Gfap、Vim、Clu、およびStat3）および細胞外マトリックス（すなわち、CtsbおよびBcan）に関連していた（図11E）。擬時間埋め込み上で識別された上位DEGの遺伝子発現レベルを示すことによって、GfapおよびVimの発現プロファイルは、DAAとの最良の相関を示し、疾患関連分岐に沿った分子の傾きに類似していた（図4I、上のパス）。DEGからのエンリッチされたGO termには、ニューロン投射の発達の負の制御およびグリア細胞増殖の正の制御、ならびに中間フィラメント組織化が含まれ（図4J）、AD疾患モデルにおける全体的なグリオーシスプロセスを示唆している。再び、最も重要なDEGのサブセットおよび細胞型マーカーが選択され、それらの発現の変動が、64遺伝子検証データセットにおいても観察された（図4K）。

実施例5：オリゴデンドロサイトサブタイプおよび前駆細胞はプラークの中間付近でエンリッチされる

【0131】

次に、サブレベルクラスタリング解析をオリゴデンドロサイト系統細胞に対して実施し、4つのクラスターを識別した（図5Aおよび5B）：Oligo1（ $n=4$ ，295）、Oligo2（ $n=181$ ）、Oligo3（ $n=490$ ）、およびOPC（ $n=549$ ）。オリゴデンドロサイトの遺伝子マーカーPlp1は、すべてのクラスターにわたって比較的均一な発現を示したが、Klk6およびCldn11は、それぞれOligo2およびOligo3集団をマークした（図5B）。TauPS2APP疾患モデルおよび対照試料は、UMAP埋め込み上で4つの細胞集団すべての同様の分布を示した（図5A）。

【0132】

OPC細胞とオリゴデンドロサイト細胞の混合集団の擬時間軌道解析は、OPCから成熟オリゴデンドロサイトへの既知の分化パスを再現（recapitulate）した（図5C、下の軌道）。星状細胞と同様に、疾患関連の軌道は、OPCからオリゴデンドロサイトへの主パスの横で分岐した（図5C、上の分岐）。TauPS2APP試料からのオリゴデンドロサイトは、8か月のTauPS2APP試料および対照試料と比較して、疾患関連軌道分岐の周囲に非常にエンリッチされていた（図5C）。さらに、疾患関連軌道には、3つのOligo1～3サブタイプすべてが含まれていた（図5D）。全体として、13か月の疾患試料における細胞の擬時間分布は、13か月の対照試料および8か月時点の疾患試料の両方と比較して、有意に高い平均を有していた（図5E）。

【0133】

空間マップおよび細胞密度計算（図5F～5H、上、および図12A）から、TauPS2APPにおけるOligo2およびOligo3集団の細胞密度は、対照試料と比較して、13か月時点の疾患試料において100～200%高いことが観察された。したがってOligo2と

Oligo3は、疾患エンリッチされたオリゴデンドロサイトとしてアノテーションされた。A β プラーク付近の細胞型分布解析から、8か月および13か月の両方でTauPS2APPマウスのプラーク周囲の20~40 μ mのリング内にOPCがエンリッチされていることが判明した(図5Hおよび14B)。さらに、Oligo2とOligo3は、TauPSAPPマウスのプラークから20~40 μ mの距離、特に皮質下領域でもエンリッチされていた。

【0134】

TauPS2APPマウスと対照マウスの比較からのオリゴデンドロサイトにおけるDEG解析を通じて、13か月齢のTauPS2APPマウスにおいて強く上方制御された遺伝子群(すなわち、Cldn11、Klk6、Serpina3n、およびC4b)が識別および検証された。対照的に、8か月齢のTauPS2APPと対照マウスとの間のDEGの変化倍数は有意ではなく、いくつかのDEGは、後の実験検証において一貫性のない変化を示した(図5Kおよび14F)。GO term解析により、疾患進行中のサイトカイン産生、ニューロン死の調節、シナプス可塑性と髄鞘形成の調節における、オリゴデンドロサイトの重要な生物学的プロセスが示された。疾患関連擬時間軌道に沿ったさらなるDEG解析により、オリゴデンドロサイトにおけるKlk6、Cldn11、およびC4b遺伝子の疾患関連がさらに確認された(図5J)。

例6：A β プラークおよびタウもつれに対する神経細胞の応答

【0135】

非神経細胞における細胞変化に加えて、ニューロンにおけるトランスクリプトーム応答は、神経変性の機構を理解するために重要である。神経細胞集団のサブレベルクラスタリング解析が行われ、8つの興奮性ニューロンサブクラスターと4つの抑制性ニューロンサブクラスターが識別された。ニューロンの空間細胞マップ(図6A、6B、13A、および13B)で可視化されるように、皮質興奮性ニューロンの4つのサブタイプは、異なる皮質層(CTX-Ex1~4)に対応する。海馬領域の興奮性ニューロンのタイプは、主要なタイプ(DG、CA1、CA2、およびCA3)と同じであり、各主要なタイプ内で追加のサブクラスターは識別されなかった。抑制性ニューロンの4つのサブタイプのうち、PvalbおよびSstニューロンは皮質にエンリッチされていたが、Cnr1およびLamp5ニューロンは海馬で過剰に存在した。

【0136】

次に、ニューロン型組成物およびそれらのトランスクリプトームプロファイルを、A β プラークに関連して調査した。一般に、プラーク付近では非神経細胞(ミクログリア、星状細胞、OPC、オリゴデンドロサイト)が移動および拡大するため、すべての神経細胞のパーセンテージはプラーク付近では低く、それらのプラークまでの距離と正の相関があった。しかし海馬領域では、プラーク周囲の神経細胞集団はほとんどがDG細胞で構成されており、これはプラークの大部分がDGの近くに出現したという観察と一致している。最近の報告によると、ヒトのAD患者ではDGにおける成人海馬神経新生(AHN)活性が急激に低下することが示された。したがって、TauPS2APPマウスモデルにおけるA β プラークもまた、DGのAHNに影響を与えるかどうかを、擬時間軌道解析によって試験した。8か月では、プラークはDG付近にほとんどなかったため、TauPSAPPマウスと対照マウスにおけるDG細胞の擬時間分布は、区別できなかった。しかし、13か月で、DG付近のプラーク数の増加に伴い、擬時間軌道は、それぞれTauPS2APPおよび対照試料のDG集団に対応する2つの分岐に分岐した。DG領域のニューロンの分子応答は神経新生に関連しているため、さらに研究された。擬時間解析によると、13か月時点の試料は2つの異なるパスをたどった。13か月の疾患試料では、Dapk1などの遺伝子が上方制御されており、これは神経細胞死の調節にも関与していた(図6Iおよび6J)。

【0137】

タウもつれによって誘導される変化を調べるために、各細胞内のタウタンパク質強度の定量化を、各細胞の総ピクセル面積に対するタウ陽性ピクセル数の比を計算することによって行った。軸索内のタウもつれは誤って細胞に起因するとされる可能性があるため、閾値を使用して各試料内のタウ陽性ニューロンを選択した。この場合、8か月では試料中の

10

20

30

40

50

タウ陽性興奮性ニューロンの大部分がCTX-Ex2集団にあったが、13か月ではそれらのほとんどはCA1領域で見出された。抑制性ニューロンについては、ほとんどのタウ陽性細胞はPvalb集団からであったが、13か月では、それらのほとんどはSst集団からであった（図6E）。プラーク周囲のタウシグナルも定量化され、皮質領域では、タウシグナルがプラーク付近でエンリッチされるが、皮質下領域ではパターンが観察されないことが判明した（図6F）。

【0138】

最後に、Aβプラークおよびタウもつれの、ニューロンに対する複合効果を、すべてのサブタイプを興奮性および抑制性ニューロンの2つの大きなカテゴリにプールし、TauP S2APP試料と対照試料の間のニューロンのDEGを解析することによって調べた。全体として、興奮性および抑制性神経細胞集団から識別されたDEGは、非常に一貫性があった。GO term解析は、識別されたDEGが、細胞周期調節（Ccnb2）、神経分化（Gpm6a）、および神経死の調節（Ddit3）の生物学的プロセスにエンリッチされていることを示した（図6Gおよび6H）。

例7：AD病理における疾患関連細胞の統合的解析

【0139】

上述の解析は、個々の主要な細胞型内の疾患関連サブタイプおよびDEGを解析することに焦点を当ててきた。複数の細胞型からのAD遺伝子パスウェイの包括的な全体像を合成するために、遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）を、4つの主要な細胞型（ミクログリア、星状細胞、オリゴデンドロサイト、およびニューロン）からのDEGを使用して実施した。GO termエンリッチメントヒートマップ（図7Aおよび14A）に示されるように、13か月で、生物学的プロセスにおける非神経細胞の有意にエンリッチされたtermのほとんどは、疾患関連集団の出現を再現するグリア細胞分化およびグリア細胞発生であり、一方、ニューロンのそれは、シナプスのシグナル伝達、認知、およびシナプス可塑性の調節に関与する。そこで、標的細胞型でエンリッチされているすべてのアノテーションを収集し、それらの類似性に基づいてグループ化した。GOエンリッチメントマップが生成され、ADの主要な関係物の細胞型特異的アノテーションおよび共有アノテーションの両方が示された（図14B）。集団が病理部位と直接相互作用するため、免疫応答、炎症反応、およびリソソームに関連する細胞型特異的なtermが、ミクログリアでエンリッチされていた。細胞の運動性、形態発生、および分化に関連するtermは、複数の細胞型にわたって共有された。

【0140】

ADと対照試料との比較において識別されたDEGに加えて、空間的DEGもまた、プラークから遠く離れた細胞（25 μmを超える距離）と比較して、プラークに近い細胞（25 μm以内）を用いて計算した。プラーク付近の領域で特異的に上方制御される遺伝子は、プラーク誘導遺伝子（PIG）とみなされた。8か月において16のPIGが識別され、13か月においてAD試料中に29のPIGが識別された（図7Bおよび14G）。ADの8か月試料中の16のPIGすべてが、ADの13か月試料中のPIGに含まれていた（図7C）。プラークから10 μm以内にエンリッチされたPIGは、主にTrem2、Cst7、Ctsb、Apoe、およびCd9などのDAMマーカー遺伝子であることが判明した（図7Bおよび14G）。DAAマーカーであるVimは、ADの13か月試料中、プラークから20～30 μmの領域で上方制御された（図7B）。これは、DAAが、ADの13か月試料中、プラークから20～30 μmの領域でエンリッチされていたという以前の発見と一致する（図4H）。発見されたPIGは、18か月のAppNL-G-Fマウスで以前に報告されたPIGとも比較された。結果は、ADの13か月試料中のPIGの58.9%（29のうち17）およびADの8か月試料中のPIGの87.5%（16のうち14）が、報告されたPIGと重複することを示した（図7C）。高いオーバーラップ率は、空間的に保存されたRNAシグナルを検出するSTARmap Proの精度を含意した。

【0141】

各細胞型とAβプラークとの間の空間的関係をより包括的かつ定量的に理解するために

、ブランク、DAM、DAA、およびニューロンからそれらの最近傍隣接物までの平均ユークリッド距離を計算した（図14Cおよび14E）。シャッフルされた参照（図14Dおよび14F）と比較すると、DAMがアミロイドブランクに最も近い隣接物であることが判明した。ブランクの代わりに、DAAはDAMまでの距離が短く、DAAがDAM-ブランク複合体に接触していることが示唆された。この発見をさらに検証するために、細胞を次に、各ブランクから異なる距離間隔で定量化し、それらの細胞型の身元に基づいてグループ化した（図7D）。要約すると、DAMはブランクに最も近く、0~20 μm の領域でエンリッチされていた。DAAとOPCはブランクまでの距離の点で比較的類似しており、20~40 μm の領域に分布していた。オリゴデンドロサイトとニューロンは、外側領域でより高い密度を有していた（図7D）。この空間情報に基づいて、ADの8か月試料およびADの13か月試料におけるブランク周囲の細胞分布パターンの図を生成した（図7E）。どちらの段階においても、DAMはブランクと直接接触して内部コアを形成する。疾患の進行に伴い、より多くのDAAが出現し、2番目に近いブランク領域でエンリッチされていた。ブランク付近の領域におけるOPCのエンリッチメントは、TauPS2APPの13か月試料の図にも示された。これらの標的細胞型のマーカー遺伝子またはDEGも、図内で標識された。

10

考察

【0142】

STARmap Proは、同じ組織切片におけるRNAおよびタンパク質シグナルの、単一細胞分解能でのin situ検出のために開発された。STARmapに基づいて、その検出能力と特異性がさらに向上され、空間情報を維持しながらRNAとタンパク質を単一細胞分解能で同時にプロファイリングする新しい機能が提供されている。STARmap Proは、より包括的な方法で生物学的システムを研究し、かつマルチモーダルな空間遺伝子発現解析を可能にする機会を提供する。タンパク質は最も一般的な疾患の特徴であるため、ここで説明する方法は、病理学研究に広く使用される可能性がある。STARmap Proを使用して疾患の特徴付近の遺伝子発現変化を調査すると、疾患の病因の理解が進むであろう。オリジナルのSTARmapはRNAシグナルのみを検出し、タンパク質の存在量を正確に表したりタンパク質の修飾を検出したりすることはできない。対照的に、STARmap Proの免疫染色戦略は、様々なタンパク質の種類だけでなくタンパク質修飾も区別できるため、がん研究に有用なツールとなる；なぜならば、リン酸化などのタンパク質修飾は、がんの発生と進行において重要な役割を果たすからである。

20

30

【0143】

STARmap Proを適用して、ADマウスモデルにおけるRNAおよびAD病理タンパク質シグナルを検出した。空間的に確保された単一細胞RNAシグナルを使用して細胞型の空間マップを生成し、A β ブランクに関連する細胞分布パターンを明らかにした；その結果、ミクログリアがブランク付近の領域で著しくエンリッチされていることが判明した。次に、5つの標的細胞型（ミクログリア、星状細胞、オリゴデンドロサイト、興奮性ニューロン、および抑制性ニューロン）のサブクラスタリング解析を実施した。この結果は、DAMおよびDAAの出現、およびA β ブランク領域付近でのそれらのエンリッチメント挙動を識別する、包括的空間マップを提供する。これは以前の研究と一致しており、STARmap Proの検出精度がさらに確認された。ブランク周囲の細胞分布を解析すると、DAMがA β ブランク周囲の最も近い領域に分布し、次にDAAがDAM近くの外側領域に分布していることが見出された。これは、DAMの分布がA β ブランクによって直接影響を受け、その後DAAがDAMによって影響を受ける可能性があることを意味する。実際、以前の研究では、DAAマーカー遺伝子GfapおよびVimを高発現する反応性星状細胞が、活性化されたミクログリアによって誘導されることが明らかにされた。細胞型の分布パターンに関しては、OPCがブランク付近の領域でエンリッチされていることもわかった。ブランク近くのこれらのOPCは、ADの病理に関与するオリゴデンドロサイトに分化する可能性がある。

40

【0144】

50

5つの主要な細胞型における病理応答性の転写シグネチャーも提供された。ほとんどの遺伝子マーカーは細胞型特異的であり、特定の摂動に關与する可能性がある一方、いくつかのDEGは細胞型間で共有されることが判明した。例えば、Gfapはすべての主要な細胞型で上方制御された。これは、様々な細胞型のアルツハイマー病特異的なサブクラスターにおいても高いGfap発現を示した以前の単核研究と一致していた。ミクログリアと星状細胞も、CTSBなどのDEGを共有していた。パスウェイ解析により、異なる細胞型からのDEGが同様の生物学的プロセスに關与していることも示された。

方法

マウス

【0145】

全ての動物手順はGenentech Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって承認された動物管理ガイドラインに従い、動物実験はIACUCの方針およびNIHガイドラインに準拠して実施した。STARmap Proで使用するマウスには、ヒトタウのP301L変異体およびPS2_{N141I}およびAPP_{Swe} (PS2APP_{homo}; P301L_{hemi}) を発現するpR5-183系統、および非トランスジェニック対照が含まれる。

STARmap Pro用の組織収集および試料調製

【0146】

動物をイソフルランで麻酔し、すばやく断頭した。脳組織を取り出し、O.C.Tに置き、液体窒素中で凍結し、-80℃で保存した。マウス脳組織切片の場合、脳をクリオスタット (Leica CM1950) に移し、冠状切片の20μmスライスとして切断した。脳スライスを、1×PBS緩衝液中の4%PFAを用いて室温で15分間固定し、冷メタノールで透過処理し、-80℃で1時間放置した。

空間RNAおよびタンパク質シグナルを検出するSTARmap Pro

【0147】

試料を-80℃から取り出して室温で5分間、次いでPBSTR緩衝液 (0.1% Tween-20、PBS中0.1U/μLのSUPERase・InRNase阻害剤) で洗浄した。洗浄後、試料を、300μLの1×ハイブリダイゼーション緩衝液 (2×SSC、10%ホルムアミド、1% Tween-20、0.1mg/mLの酵母tRNA、20mMのRVC、0.1U/μLのSUPERase・InRNase阻害剤、およびオリゴあたり1nMでプールしたSNAILプローブ) と共に、40℃の加湿オープン内で振盪およびパラフィルムラッピングしつつ36時間インキュベートした。試料を、PBSTRで2回、および高塩洗浄緩衝液 (PBSTRに溶解した4×SSC) で1回、37℃で洗浄した。最後に、試料をPBSTRで1回、室温でリンスした。試料を次に、ライゲーション混合物 (0.5mg/mLのBSAおよび0.2U/μLのSUPERase・InRNase阻害剤を補充した1×T4 DNAリガーゼ緩衝液中の、T4 DNAリガーゼの1:10希釈) と共に室温で2時間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。ライゲーション後、試料をPBASR緩衝液で2回洗浄し、ローリングサークル増幅 (RCA) 混合物 (250μMのdNTP、20μMの5-(3-アミノアリル)-dUTP、0.5mg/mLのBSAおよび0.2U/μLのSUPERase・InRNase阻害剤を補充した1×Phi29緩衝液中の、Phi29 DNAポリメラーゼの1:10希釈) と共に、30℃で2時間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。試料を、PBST (PBS中0.1%のTween-20) で2回洗浄し、ブロッキング溶液 (PBST中5mg/mLのBSA) で室温で30分間ブロックした。試料を、p-Tau一次抗体 (ブロッキング溶液中の1:100希釈) と共に室温で2時間インキュベートした。試料をPBSTで5分間ずつ3回洗浄した。次いで、試料をPBST中の20mMアクリル酸NHSエステルで1時間処理し、次いでPBSTで1回リンスした。試料をモノマー緩衝液 (2×SSC中の4%アクリルアミド、0.2%ビスアクリルアミド) 中で室温で15分間インキュベートした。次に緩衝液を吸引し、35重合混合物 (モノマー緩衝液に溶解した0.2%過硫酸アンモニウム、0.2%テトラメチルエチレンジアミン) を試料の中心に添加し、Gel Slickでコーティングされたカバースリップで直ちに覆った。重合反応を室温で1時間実施し、その後、PBSTで5分間ずつ2回洗浄した。試料を脱リン酸化混合物 (0.5mg/mLのBSAを補充

10

20

30

40

50

した1×CutSmart緩衝液中のエピアルカリホスファターゼの1：100希釈)で37℃で1時間処理し、その後、PBSTで各5分間、3回洗浄した。

【0148】

In situ RNA配列決定のために、各サイクルは、試料をストリッピング緩衝液(水中60%ホルムアミドおよび0.1%のTriton-X-100)で室温で10分間2回処理することから開始され、その後、PBSTで3回、各5分ずつ洗浄した。試料を、配列決定混合物(0.5mg/mlのBSA、10μMの読み取りプローブおよび5μM蛍光オリゴを補充した1×T4 DNAリガーゼ緩衝液中の、T4 DNAリガーゼの1：25希釈)と共に室温で少なくとも3時間インキュベートした。試料を、洗浄および画像化緩衝液(2×SSC中10%ホルムアミド)によって各10分間3回洗浄し、その後画像化のために、洗浄および画像化緩衝液に浸漬した。画像は、Leica TCS SP8共焦点顕微鏡を使用して取得した。8サイクルの画像化を実施して、2766個の遺伝子を検出した。

10

【0149】

RNAシグナルのin situ配列決定後、試料を、X-34溶液(1×PBS中の10μMのX-34、40%エタノールおよび0.02MのNaOH)中、室温で10分間インキュベートした。次いで試料を1×PBSで3回洗浄し、80%EtOH中で1分間インキュベートし、次いでPBSで各1分間、3回洗浄した。次に、試料を二次抗体(ブロッキング溶液中1：80希釈)と共に室温で12時間インキュベートした。次に、試料をPBSTで5分間ずつ3回洗浄した。細胞分割の目的で、ヨウ化プロピジウム(PI)染色を製造業者の指示に従って実施した。別のラウンドの画像化を実施して、空間タンパク質シグナルを検出した。

20

薄切片STARmap Proデータ処理

【0150】

すべての画像処理ステップは、MATLAB R2019bおよびPython 3.6の関連オープンソースパッケージを用いて実装し、Wang et al., 2018に従って適用した。

【0151】

画像の前処理：多次元ヒストグラムマッチングを、各タイルに対しMATLAB関数「imhistmatchn」を用いて実施した。最初の配列決定ラウンドの最初のカラーチャネルの画像を基準として使用して、照度とコントラストレベルを均一にした。

【0152】

画像レジストレーション：画像レジストレーションは、Wang et al., 2018に従って適用した。グローバル画像レジストレーションは3次元高速フーリエ変換(FFT)を用いて行い、すべての変換オフセット(translational offset)での2つの画像ボリューム間の相互相関を計算した。最大相関係数の位置を識別し、画像ボリュームを変換してオフセットの補償のために使用した。

30

【0153】

スポットコーリング：レジストレーション後、個々のドットが、配列決定の第1ラウンドの各カラーチャネルで別々に識別された。直径約6ピクセルのドットは、3Dで極大値を見つけることにより識別された。各ドットの識別の後、4つのチャンネルすべてにわたるそのドットの支配的な色が、各ラウンドにおいて、ドットの位置を囲む5×5×3ボクセルボリューム内に決定された。

40

【0154】

バーコードフィルタリング：ドットは、最初に品質スコアに基づいてフィルタリングされた。品質スコアは、各配列決定ラウンドの各ドットが、色の混合ではなく1つの色からどの程度生じているかを定量化した。バーコードコードブックは、バーコードDNA配列の2塩基コーディング後の予想される色配列に基づいて、色空間に変換された。コードブック内の品質閾値および一致配列をパスしたドットカラー配列は保持され、バーコードが表す特定の遺伝子として識別された；他のドットはすべて拒否された。コードブック内の高品質のドットおよび関連する遺伝子の身元は、下流の解析のために保存された。

【0155】

50

2D細胞セグメンテーション：核は、配列決定の最終ラウンド後のステッチされたDAPIチャンネルの最大強度投影から、StarDist 2D機械学習モデル (Schmidt et al., 2018) によって自動的に識別された。次に細胞の位置が、セグメンテーションされたDAPI画像から抽出された。細胞体は、ステッチされたニッスル染色とマージされたアンブリコン画像のオーバーレイによって表された。最後に、マーカーベースの分水嶺変換を適用し、結合され閾値処理された細胞体マップと識別された核の位置に基づいて、閾値処理された細胞体をセグメンテーションした。次に、2Dでセグメンテーションされた各細胞領域に重なる点が、その細胞に割り当てられ、細胞ごとの遺伝子発現行列が計算される。

【0156】

細胞型分類：2レベルのクラスタリング戦略を適用して、データセット内の主要な細胞型とサブレベルの細胞型の両方を識別した。このセクションの処理ステップは、Scanpy v1.4.6 (Wolf et al., 2018) およびPython 3.6の他のカスタマイズされたスクリプトを使用して実装され、Wang et al., 2018に従って適用された。フィルタリング、正規化、およびスケーリングの後、主成分分析 (PCA) を適用して、細胞発現マトリックスの次元を削減した。説明された分散比に基づき、上位のPCを使用して観測値の近傍グラフを計算した。次に、ライデンアルゴリズムを使用して、良好に連結された細胞を、トランスクリプトームプロファイルの低次元表示においてクラスターとして識別した。細胞はUniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) を使用して表示され、その細胞型に応じて色分けされている。次に、各最上位クラスターの細胞をPCA分解を使用してサブクラスタリングし、その後ライデンクラスタリングによりサブレベルの細胞型を決定した。

空間解析

【0157】

ブランクのセグメンテーション：空間解析はブランクセグメンテーションから始まる。EBImageパッケージの「bwlabel」関数を使用すると、ブランクチャンネルのバイナリ画像からブランクをセグメンテーションすることができる。次に、各ブランクのサイズおよび中心が、「computeFeature.moment」関数と「computeFeature.shape」関数を使用して計算される。最後に、面積が400ピクセル (約36.7 μm^2) 未満のブランクがフィルターで除去される。

【0158】

ブランク周囲の細胞分布：細胞位置PCがデータ前処理ステップから得られるので、 n 細胞および m ブランクを有する試料を考慮すると、各細胞：

【数1】

$$i \in \{1, 2, \dots, n\}$$

について、その最も近いブランク距離は次のとおりである：

【数2】

$$ND_i = \min\{\|PC_i - PP_j\|_2, j \in \{1, 2, \dots, m\}\}$$

【0159】

次に細胞の数を、異なる範囲に入る全ての細胞型についてカウントする。範囲は0～10 μm (リング1) から40～50 μm (リング5) まで設定される。細胞総数の差を除去するために、リング内の各細胞型のパーセンテージを計算することにより、統計を正規化する。この解析のグラフによる説明を図2Dに示す。全体的統計のために、試料全体の各細胞型のパーセンテージを計算した。

【0160】

型間距離の計算： n 個の細胞および m 個のブランクを有する試料において、それらは、座標 P と型標識 (ブランク、DAA、DAMなど) を有するオブジェクトとして扱われる。

t 個の型の標識があり、各型のオブジェクトのセットが

【数 3】

$$S_1, S_2, \dots, S_t$$

であると仮定すると、i 型から j 型への型間距離は次のようになる：

【数 4】

$$D_{ij} = \frac{\sum_{k \in S_i} \min\{\|P_k - P_l\|_2\}}{\#S_i}, l \in S_j$$

10

【0161】

シャッフル対照的解析は同じアルゴリズムを使用して実施されるが、標識はランダムに割り当てられる（細胞／プラークの数は同じである）。

差次的発現およびパスウェイ解析

【0162】

差次的発現解析：DE解析を実施する前に、データセットを以下により正規化する：1）試料中の遺伝子数をその試料の＊細胞当たりの総数＊の中央値で割り、スケールファクター（すべての試料の＊細胞当たりの総数＊の中央値の平均値として定義される）を掛け；2）擬似カウント1を追加してlog2変換を実施する：

20

【数 5】

$$\text{スケールファクター} = \frac{\sum \text{中央値(細胞当たりの総数)}}{\text{試料数}}$$

【0163】

DE遺伝子は、Seuratの「FindMarkers」機能を使用して、細胞の2つの群間でウィルコクソンの順位和検定を実施することにより識別される。「疾患対対照的」などの比較では、2つの細胞群がTauPS2APP試料と対照試料から特定の種類の細胞を自然に抽出する。「プラークに近い細胞とプラークから遠い細胞」の比較に関しては、「プラークに近い細胞」は最も近いプラーク距離が25 μm未満の細胞であり、他のすべての細胞は「プラークから遠い細胞」として定義される。「CA1 Tau+対Tau-」の比較では、細胞体の面積に対するタウシグナル面積の率に従って、Tau+ CA1細胞がフィルタリングされる。その率の閾値は0.3に設定される。

30

【0164】

いくつかの低発現遺伝子をフィルタリングで除外するために、いずれかの細胞群において遺伝子の発現が検出される細胞の率の最小閾値を0.1に設定する。以下の閾値も生成された遺伝子リストに適用されて、有意でない遺伝子を除外した：対数倍率変化の絶対値>0.1、p値<0.05。

【0165】

DE結果を可視化するために、「EnhancedVolcano」パッケージを使用してボルケーノプロットプロットを生成した。logFC>0のDE遺伝子は赤色で表示され、その他の遺伝子は青色で表示される。LogFC閾値をパスできなかった有意な遺伝子（p値<0.05）は緑色で表示される。他のすべての有意でない遺伝子は灰色で表示される。極端に高い-log（P値）またはlogFCを持ついくつかの遺伝子には上限が設定されていることに、注意されたい。

40

遺伝子オントロジー（GO）エンリッチメント解析：

【0166】

ウェブサイトg:Profilerを使用して、各比較のDE遺伝子のGOエンリッチメント解析を実施した：疾患からの細胞と対照試料、またはタウ陽性と陰性、またはプラーク付近と

50

ブランクから離れた細胞（25 μm を閾値として使用）の間の、DE遺伝子のリストは、GO解析の入力である。統計ドメインの範囲は、アノテーション付き遺伝子に限定される。有意性の閾値はg:SCSを使用して決定し、ユーザーの閾値は0.05に設定した。エンリッチメント解析に供した機能カテゴリのサイズを制限するために、遺伝子数が20個未満または1000個を超えるGO termは除外した。結果は、汎用エンリッチメントマップ（GEM）形式でダウンロードして、さらなる機能エンリッチメント解析の入力として使用した。

【0167】

EnrichmentMap (v3.3.1) およびAutoAnnotate (v1.3.3) アプリを備えたCytoscape (v3.8.2) を使用して、5つの主要な細胞型のDEG (Ex/In/Astro/Micro/Oligo) からのGOエンリッチメント結果を統合および可視化した。g:Profilerで取得された統計的に有意なGO termおよびKEGG termのリストは、次のパラメーターを使用してCytoscapeにインポートした：ノード（GO/KEGG term）カットオフは、調整された p 値 <0.05 およびFDR q 値 <0.1 に設定した；エッジ（各ノードの遺伝子リスト間の類似性を表す）では、0.375の類似性閾値を使用した。各ノードは細胞型ごとに色分けされ、各細胞クラスターからのDEGの共通および異なる寄与を説明する。エンリッチメントマップには、AutoAnnotateを使用して自動的にアノテーションが付けられ、各クラスターの3単語の標識がWordCloudアプリを使用して作成される。

【0168】

SynGOエンリッチメントツールを使用して、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、およびタウ病理を有するCA1細胞からのDEGにおいてエンリッチされているシナプス機能を、さらに特徴付けた。脳発現遺伝子は、バックグラウンド遺伝子リストとして使用される。

参考文献

【0169】

1. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*. 82, 239-259.

【0170】

2. Busche, M.A., and Hyman, B.T. (2020). Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. 23, 1183-1193.

【0171】

3. Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D.M., Hill, A.J., Zhang, F., Mundlos, S., Christiansen, L., Steemers, F.J., et al. (2019). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*. 566, 496-502.

【0172】

4. Chen, W.-T., Lu, A., Craessaerts, K., Pavie, B., Sala Frigerio, C., Corthout, N., Qian, X., Lalakova, J., Kuhnemund, M., Voytyuk, I., et al. (2020). Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer's Disease. *Cell*. 182, 976-991.e19.

【0173】

5. Grubman, A., Chew, G., Ouyang, J.F., Sun, G., Choo, X.Y., McLean, C., Simmons, R.K., Buckberry, S., Vargas-Landin, D.B., Poppe, D., et al. (2019). A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nat. Neurosci.* 22, 2087-2097.

【0174】

6. Grueninger, F., Bohrmann, B., Czech, C., Ballard, T.M., Frey, J.R., Weidensteiner, C., von Kienlin, M., and Ozmen, L. (2010). Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by A β in TauPS2APP triple transgenic mice.

Neurobiol. Dis. 37, 294-306.

[0175]

7. Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., Green, G., Dionne, D., Nguyen, L., Marshall, J.L., et al. (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. Nat. Neurosci. 23, 701-706.

[0176]

8. Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 297, 353-356.

[0177]

9. Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., et al. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. Cell. 169, 1276-1290.e17.

[0178]

10. Lau, S.-F., Cao, H., Fu, A.K.Y., and Ip, N.Y. (2020). Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 117, 25800-25809.

[0179]

11. Lee, S.-H., Meilandt, W.J., Xie, L., Gandham, V.D., Ngu, H., Barck, K. H., Rezzonico, M.G., Imperio, J., Lalehzadeh, G., Huntley, M.A., et al. (2021). Trem2 restrains the enhancement of tau accumulation and neurodegeneration by β -amyloid pathology. Neuron. 109, 1283-1301.e6.

[0180]

12. Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., and Cummings, J.L. (2015). Alzheimer's disease. Nat Rev Dis Primers. 1, 15056.

[0181]

13. Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J.Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., et al. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. Nature. 570, 332-337.

[0182]

14. McInnes, L., Healy, J., Saul, N., and Grosberger, L. (2018). UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection. Journal of Open Source Software. 3, 861.

[0183]

15. Stahl, P.L., Salmen, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J.F., Magnusson, J., Giacomello, S., Asp, M., Westholm, J.O., Huss, M., et al. (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. Science. 353, 78-82.

[0184]

16. Stuart, T., and Satija, R. (2019). Integrative single-cell analysis. Nat. Rev. Genet. 20, 257-272.

[0185]

17. Traag, V.A., Waltman, L., and van Eck, N.J. (2019). From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. Sci. Rep. 9, 5233.

[0186]

18. Wang, X., Allen, W.E., Wright, M.A., Sylwestrak, E.L., Samusik, N., Vesuna, S., Evans, K., Liu, C., Ramakrishnan, C., Liu, J., et al. (2018). Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*. 361.

【0187】

19. Zhou, Y., Song, W.M., Andhey, P.S., Swain, A., Levy, T., Miller, K.R., Poliani, P.L., Cominelli, M., Grover, S., Gilfillan, S., et al. (2020). Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 26, 131-142.

10

参照による組み込み

【0188】

本出願は、様々な発行された特許、公開された特許出願、科学雑誌記事、および他の出版物を参照し、それらのすべては参照により本明細書に組み込まれる。本発明の1つ以上の態様の詳細が、本明細書に記載される。本発明の他の特色、目的、および利点は、詳細な説明、図面、実施例、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

均等物および範囲

【0189】

「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、逆の指示がない限り、または文脈から明らかでない限り、1つまたは1つより多くを意味し得る。グループの1つ以上のメンバー間に「または」を含む態様または説明は、逆の指示がない限り、または文脈から明らかでない限り、グループメンバーの1つ、1つより多く、またはすべてが、所与の製品またはプロセスに存在する、使用されている、またはその他で関連する場合に、満たされると見なされる。本発明は、グループの正確に1つのメンバーが、所与の製品またはプロセスに存在する、使用される、またはその他で関連する態様を含む。本発明は、グループメンバーの1つより多く、またはすべてが、所与の製品またはプロセスに存在するか、使用されるか、またはその他で関連する態様を含む。

20

【0190】

さらに、本開示は、列挙された請求項の1つ以上からの1つ以上の限定、要素、条項、および記述用語が別の請求項に導入される、すべてのバリエーション、組み合わせ、および置換を包含する。例えば、別の請求項に従属する任意の請求項は、同じ基本請求項に従属する他の請求項に見出される1つ以上の限定を含むように修正することができる。要素がリストとして提示される場合、例えばマークーシュグループ形式では、要素の各サブグループも開示され、任意の要素（単数または複数）をグループから削除することができる。一般に、本発明または本発明の側面が、特定の要素および／または特色を含むとされる場合、本開示のある態様または本開示の側面は、かかる要素および／または特色からなる、または本質的にそれらからなることを理解されたい。簡単にするために、これらの態様は、本明細書ではこの通りの言葉で具体的に説明されてはいない。「含む」および「含有する」という用語はオープンであることを意図しており、追加の要素またはステップを含めることを許容することにも留意されたい。範囲が指定されている場合は、エンドポイントも含まれる。さらに、別段の指示がない限り、または文脈および当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表わされる値は、文脈上明らかに別段の指示がない限り、本発明の様々な態様において記載された範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、範囲の下限の単位の10分の1までとることができる。

30

40

【0191】

本出願は、様々な発行された特許、公開された特許出願、雑誌記事、および他の出版物を参照し、そのすべてが参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれた参考文献のいずれかと本明細書との間に矛盾がある場合には、本明細書が優先するものとする。さらに、従来技術に該当する本発明の特定の態様は、1つ以上の態様から明示的に除外することができる。かかる態様は当業者には既知であるとみなされるため、それらは、除外が本明

50

細書に明示的に記載されていなくても、除外することができる。本発明のいかなる特定の態様も、いかなる理由によってもいかなる態様からも、先行技術の存在に関連するか否かに関わらず、除外することができる。

【0192】

当業者は、日常的な実験のみを使用して、本明細書に記載される特定の態様についての多くの均等物を認識するか、または確認することができるであろう。本明細書に記載される本態様の範囲は、上記の説明に限定されることを意図するものではなく、むしろ添付の態様に記載される通りである。当業者であれば、以下の特許請求の範囲で定義される本発明の精神または範囲から逸脱することなく、この記載に対する様々な変更および修正が可能であることを、理解するであろう。

【図面】

【図1A】

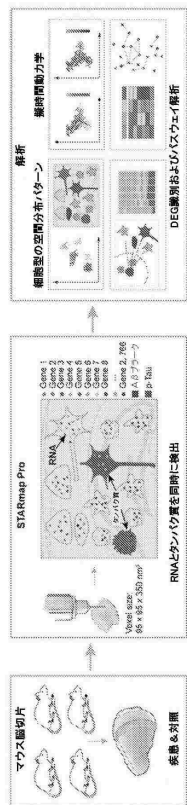


図1A

【図1B】

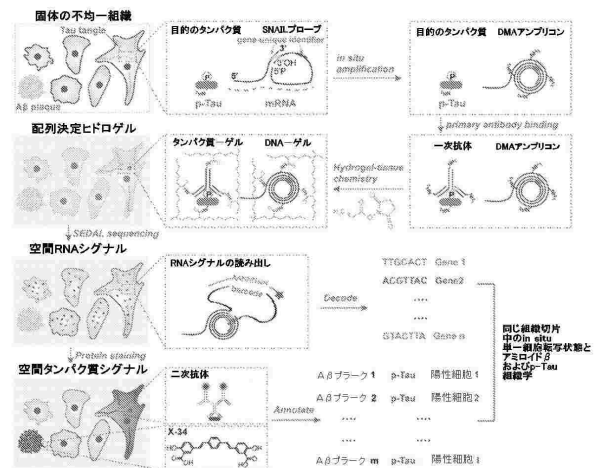


図1B

10

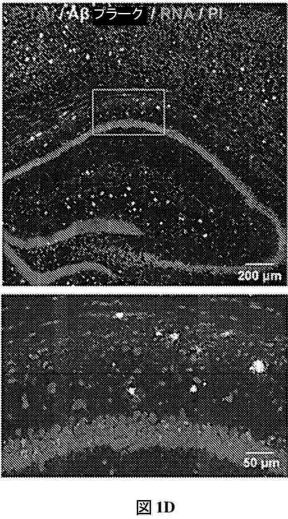
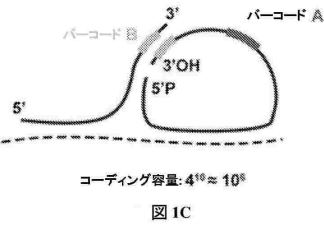
20

30

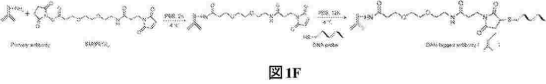
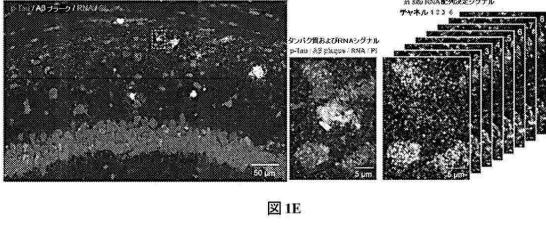
40

50

【図 1 C - D】



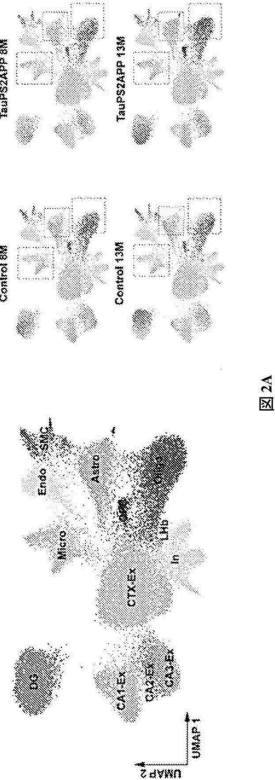
【図 1 E - F】



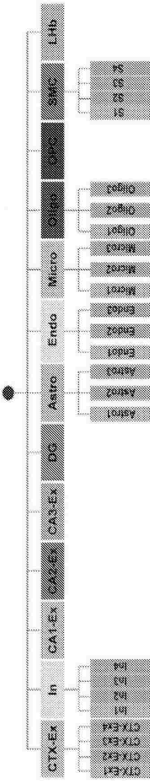
10

20

【図 2 A】



【図 2 B】



30

40

50

【図 2 C - D】

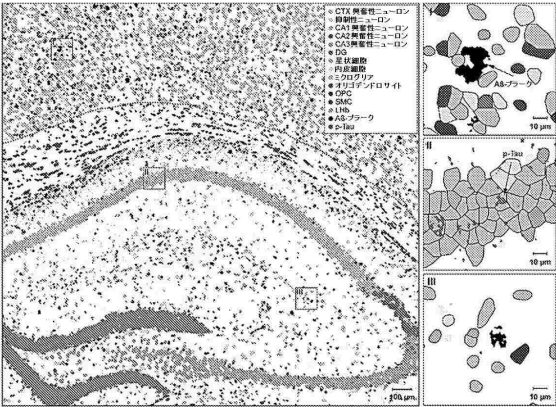


図 2C

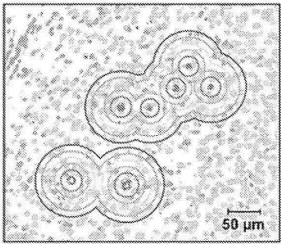


図 2D

【図 2 E】

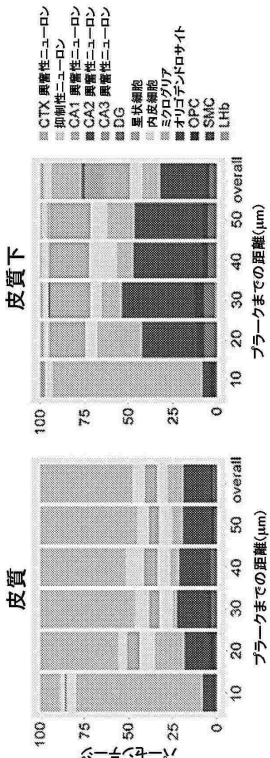


図 2E

【図 2 F】

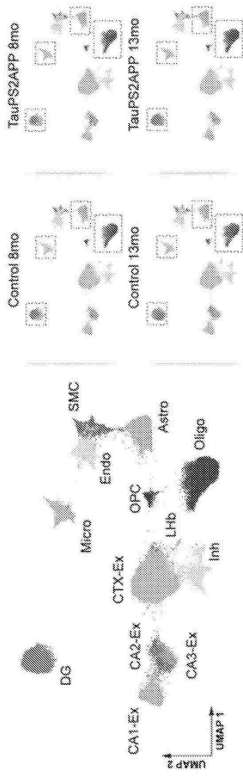


図 2F

【図 2 G】

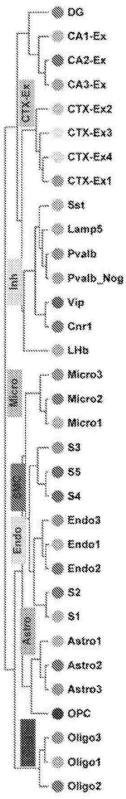


図 2G

10

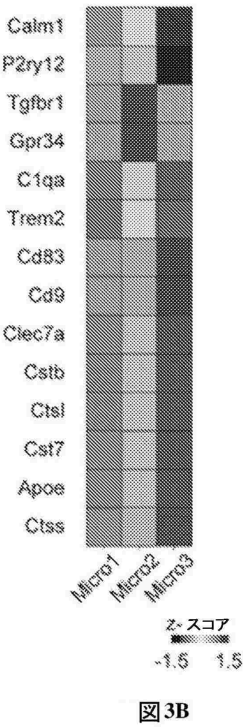
20

30

40

50

【 図 3 B 】



【 図 3 C 】

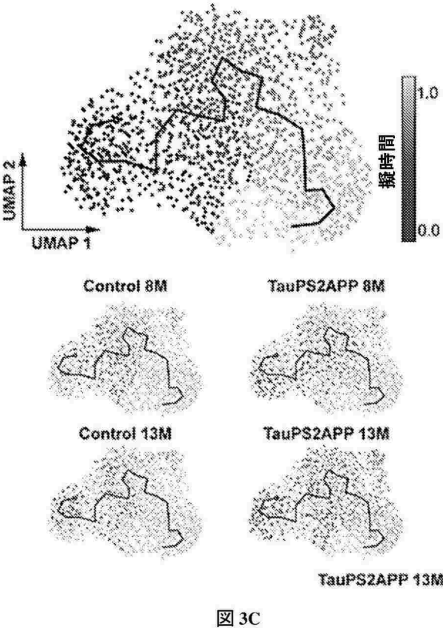
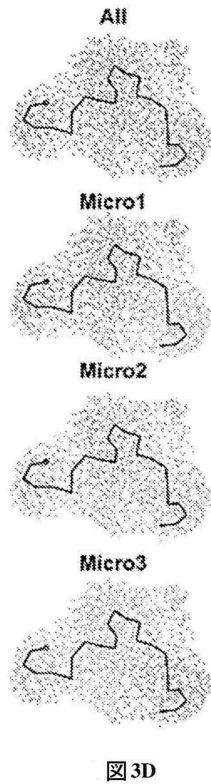


図 3C

【 図 3 D 】



【 図 3 E 】

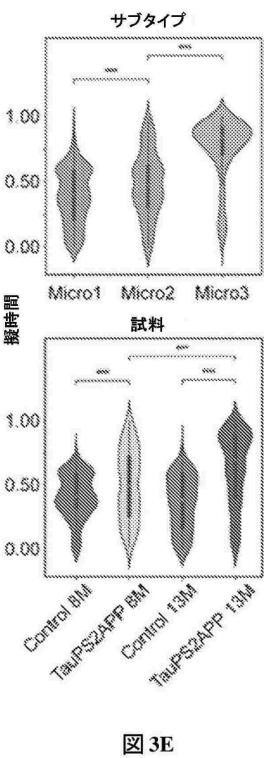


図 3E

10

20

30

40

50

【図 3 F】

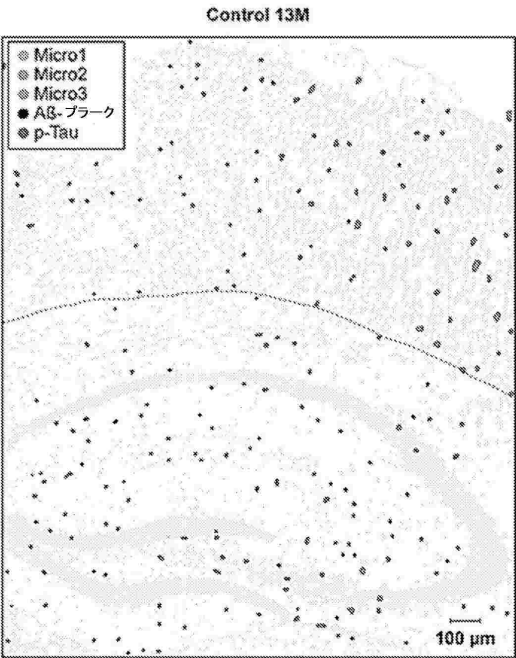


図 3F

【図 3 G】

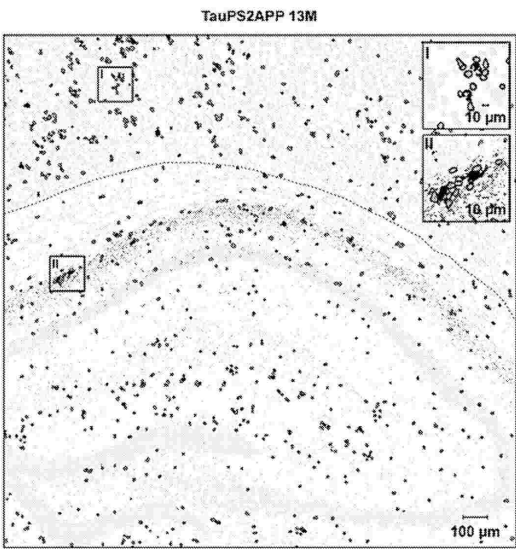


図 3G

【図 3 H】

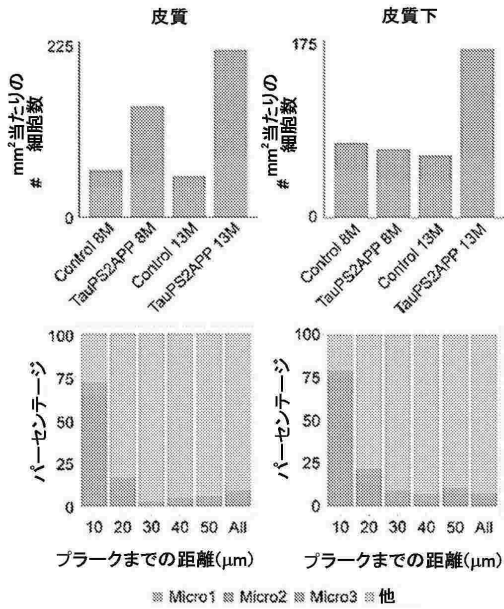


図 3H

【図 3 I】

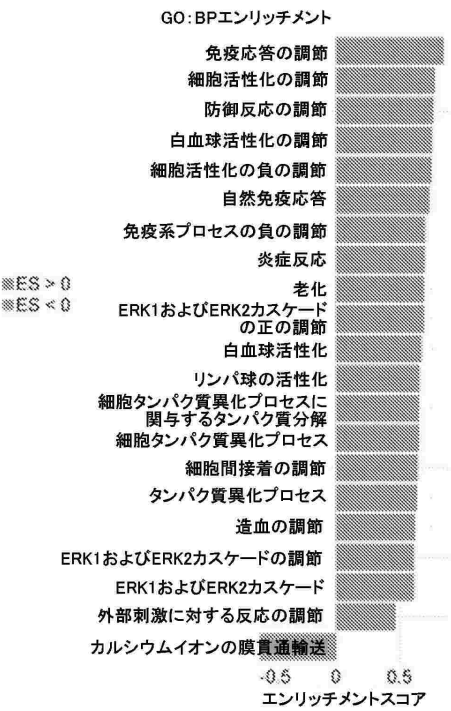


図 3I

10

20

30

40

50

【図 3 J】

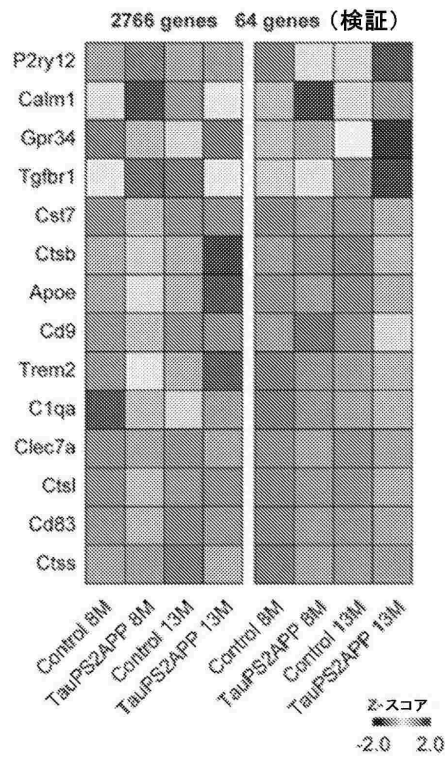


図 3J

【図 3 K】

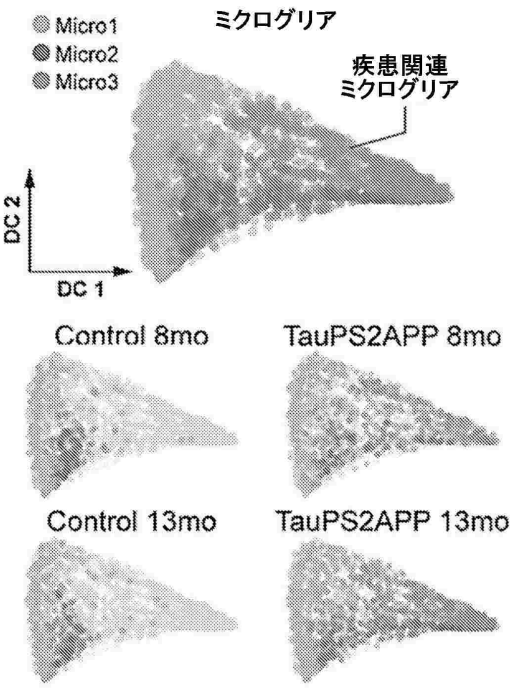


図 3K

【図 3 L】

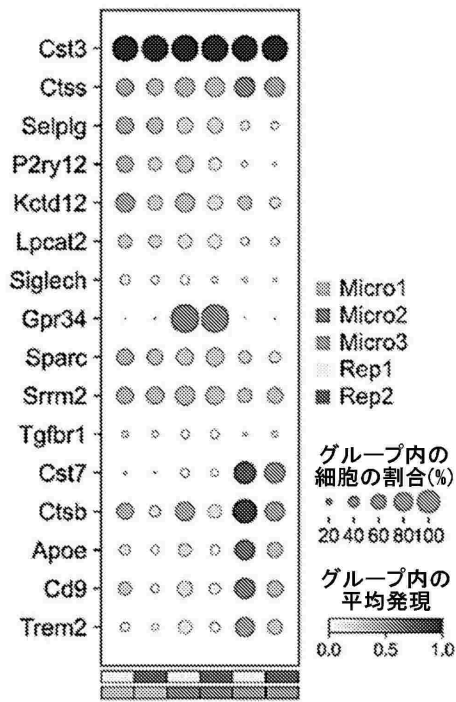


図 3L

【図 3 M】

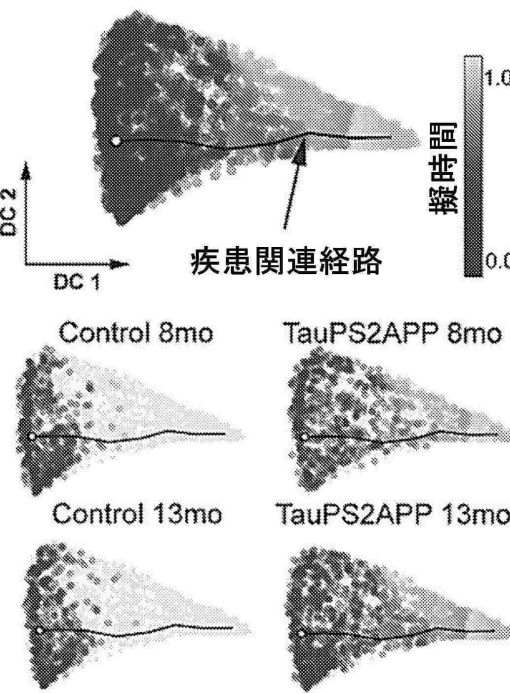


図 3M

10

20

30

40

50

【図 3 N】

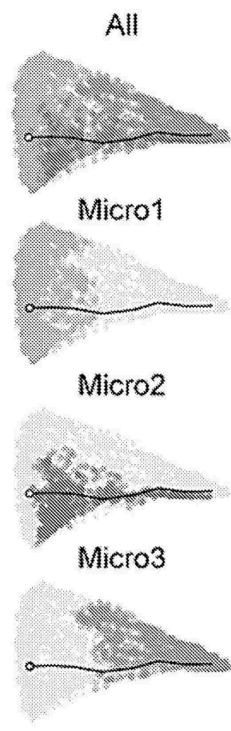


図 3N

【図 3 O】

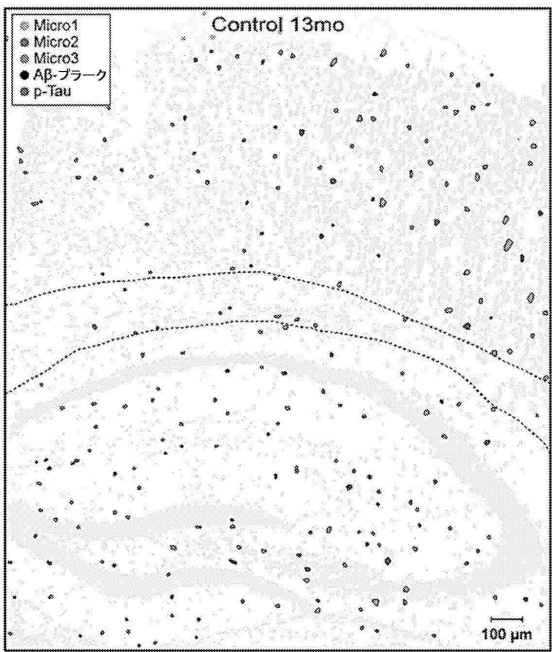


図 3O

【図 3 P】

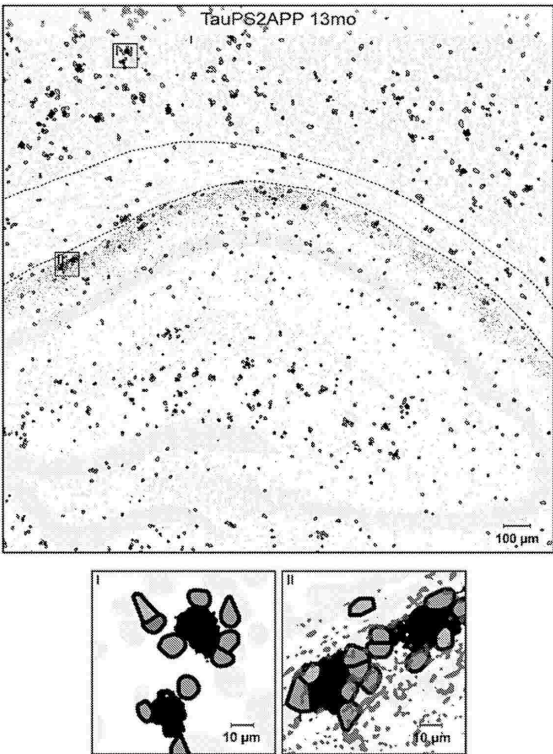


図 3P

【図 3 Q】

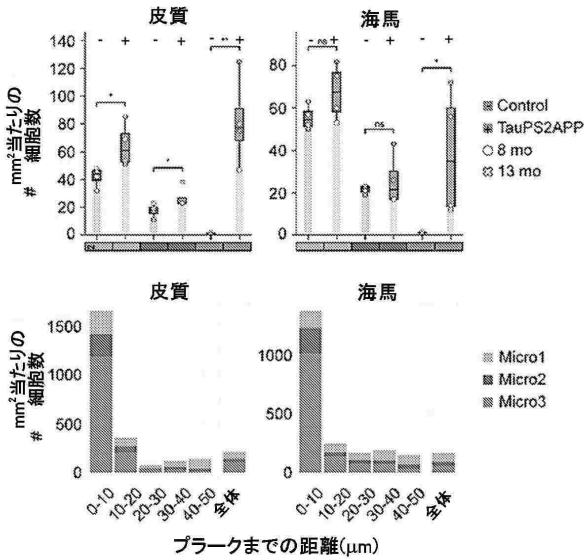


図 3Q

10

20

30

40

50

【 図 3 R 】

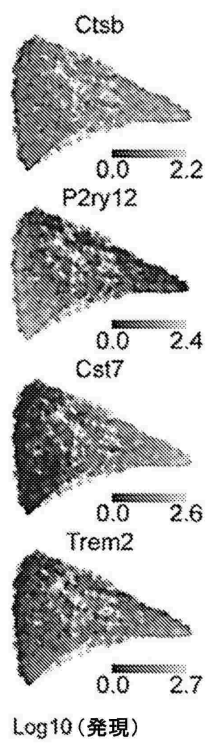


図 3R

【 図 3 S 】

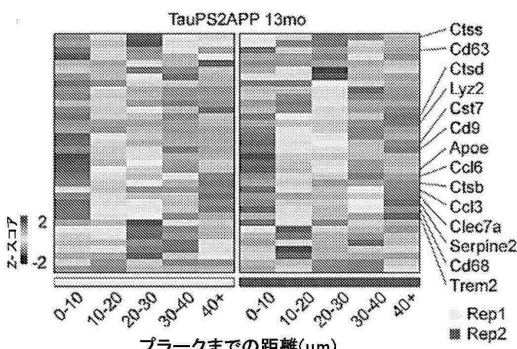


図 3S

【 図 4 A 】

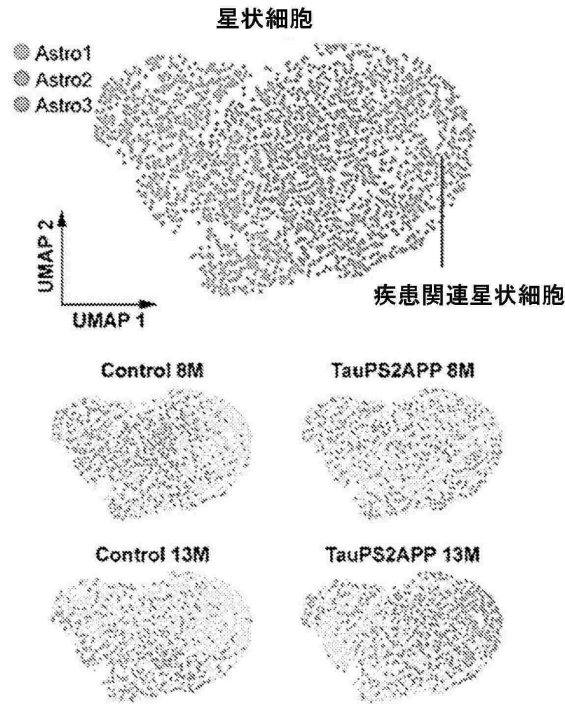


図 4A

【 図 4 B 】

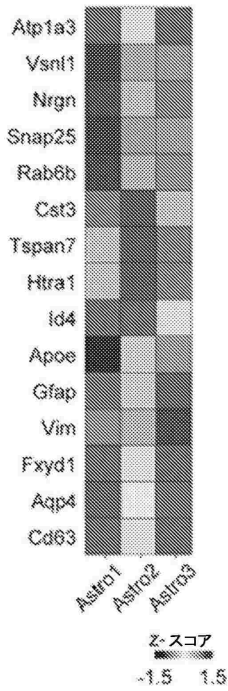


図 4B

10

20

30

40

50

【 図 4 C 】

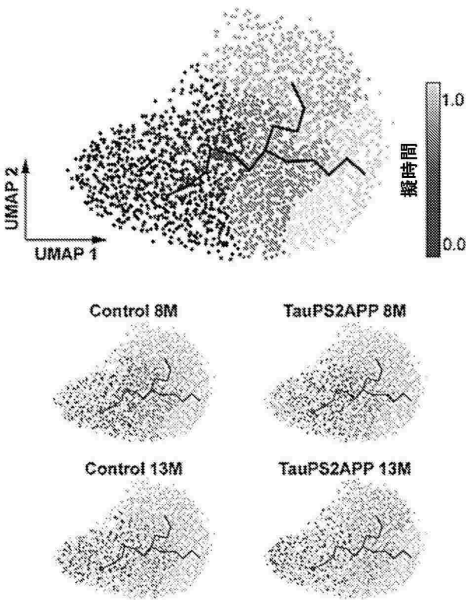


図4C

【 図 4 D 】

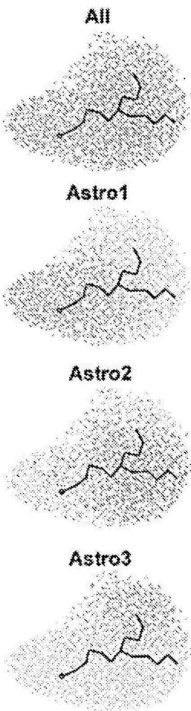


図4D

【 図 4 E 】

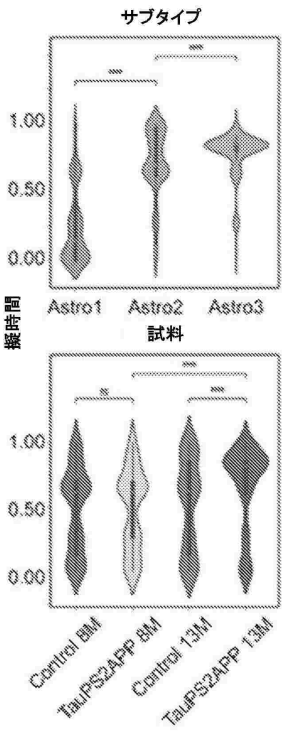


図 4E

【 図 4 F 】

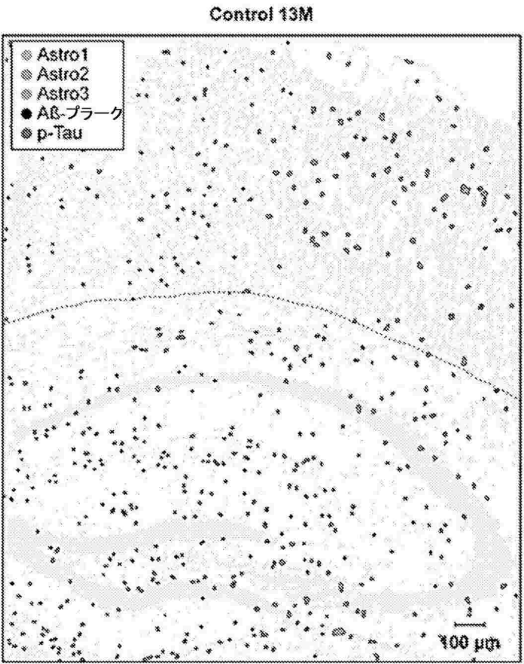


図 4F

10

20

30

40

50

【 図 4 G 】

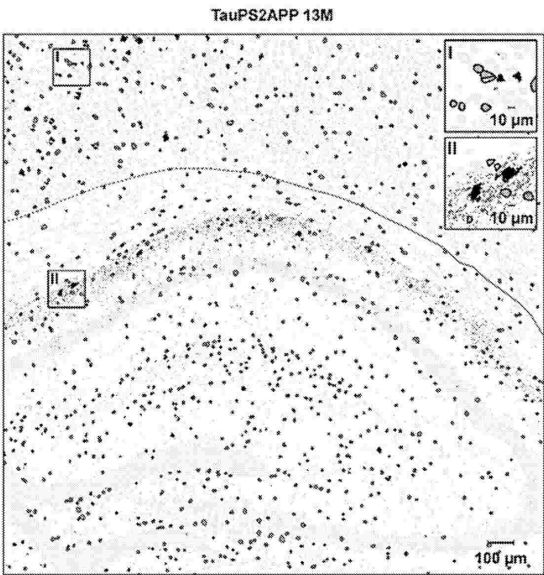


図 4G

【 図 4 H 】

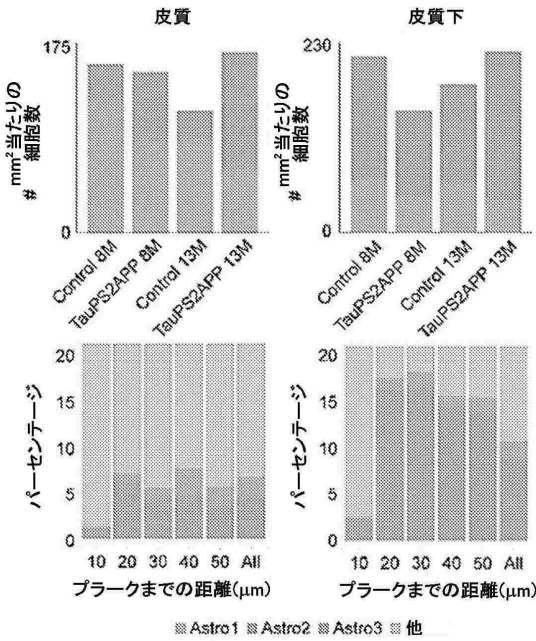


図 4H

【 図 4 I 】

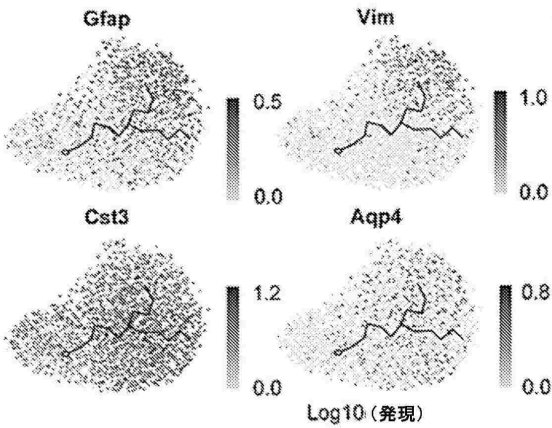


図 4I

【 図 4 J - K 】

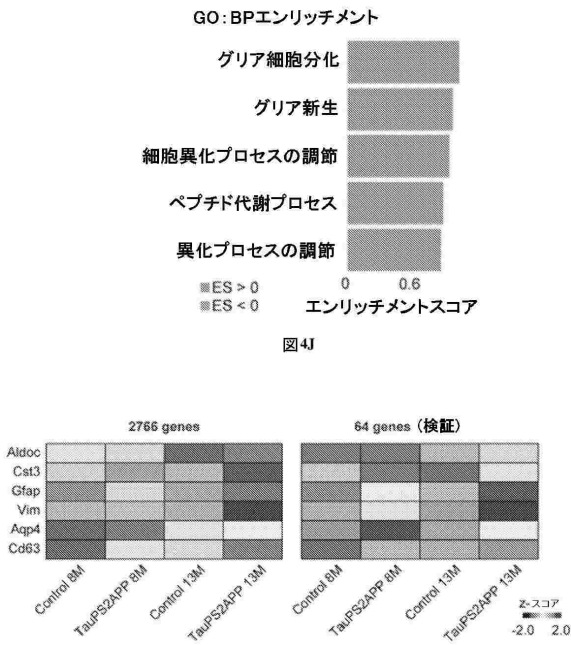


図 4K

【 図 4 L 】

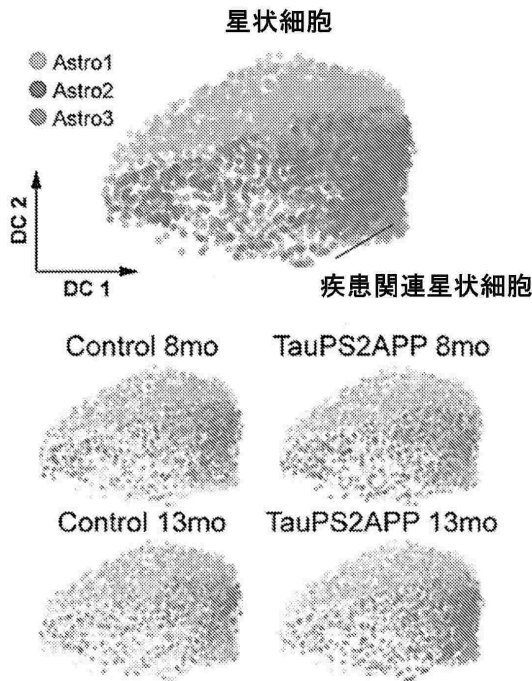


図 4L

【 図 4 M 】

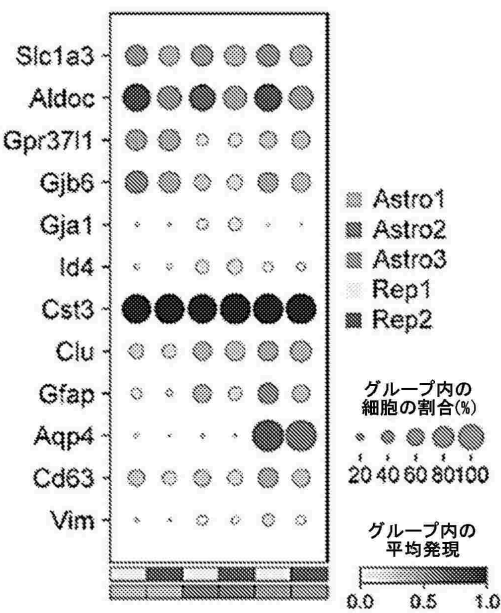


図 4M

【 図 4 N 】

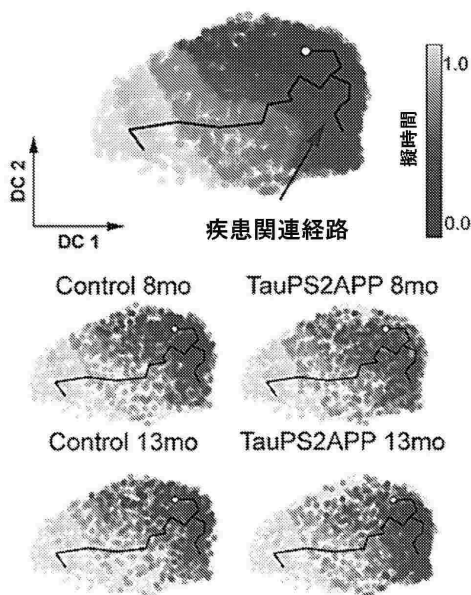


図 4N

【 図 4 O 】

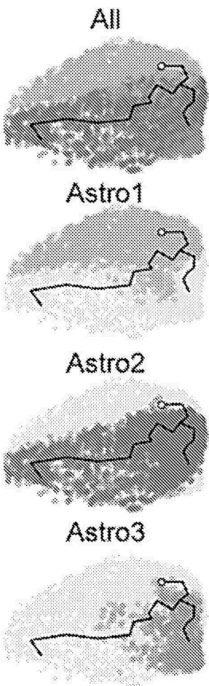


図 4O

【図 4 P】

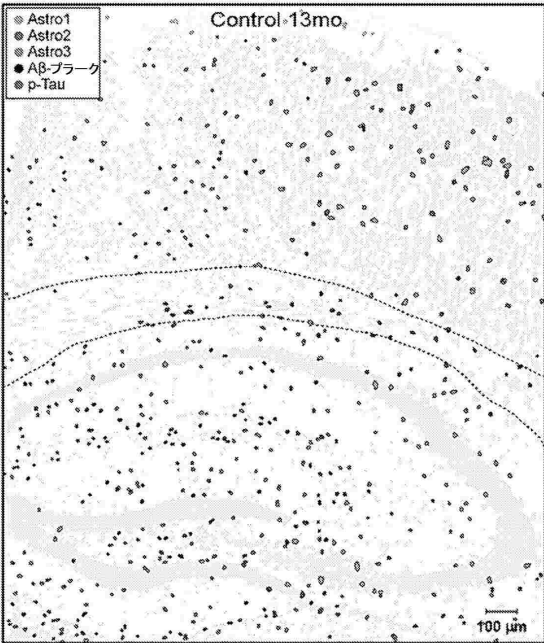


図 4P

【図 4 Q】

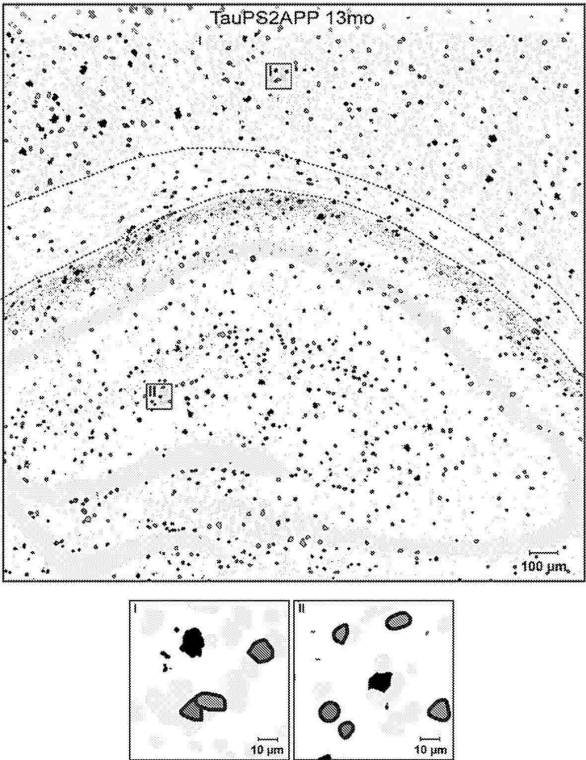


図 4Q

【図 4 R】

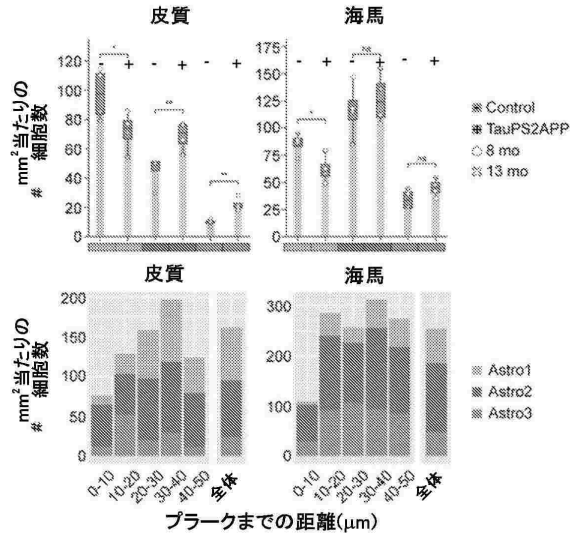


図 4R

【図 4 S】

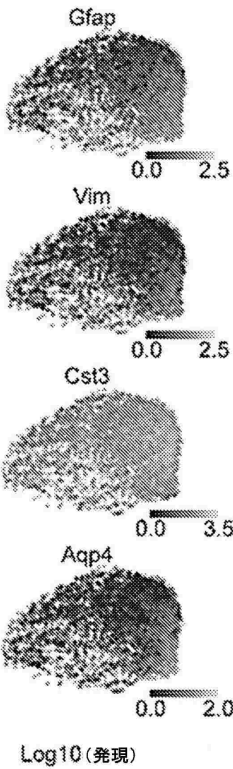


図 4S

10

20

30

40

50

【図 4 T】

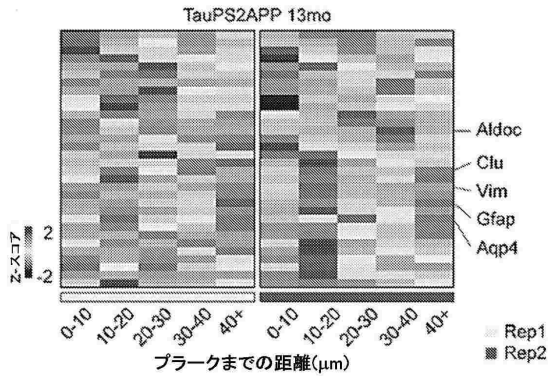


図 4T

【図 5 A】

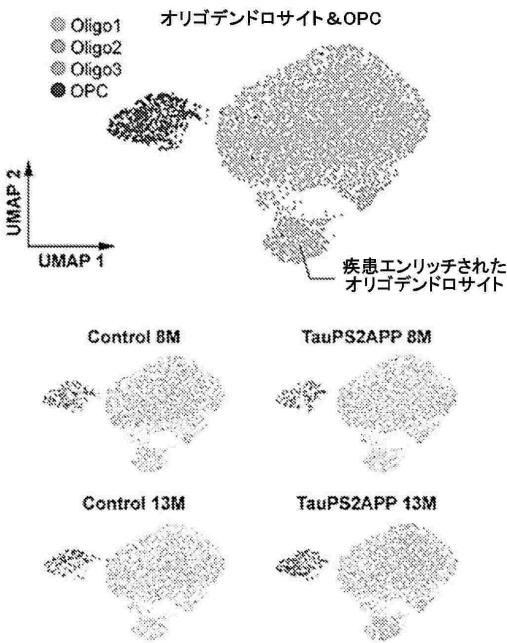


図 5A

【図 5 B】

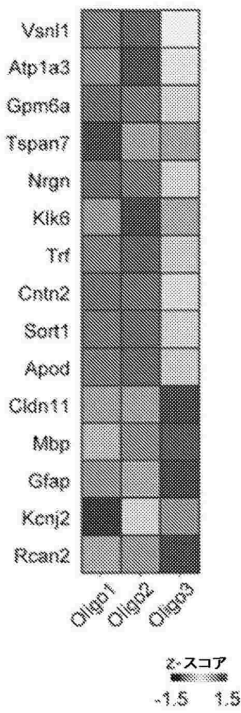


図 5B

【図 5 C】

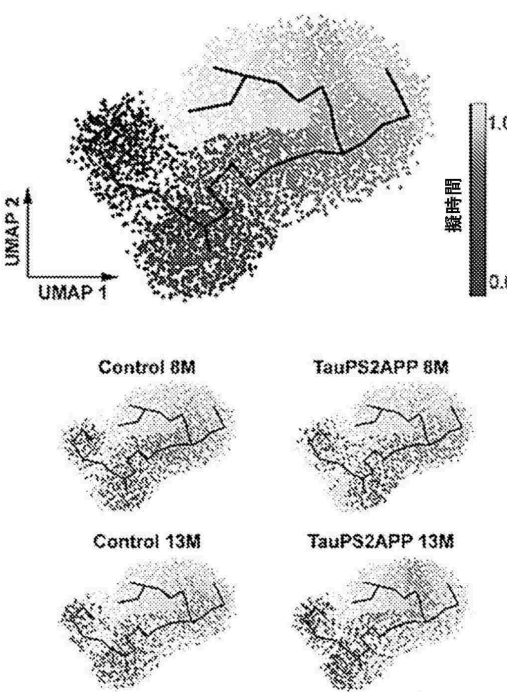


図 5C

10

20

30

40

50

【 図 5 D 】

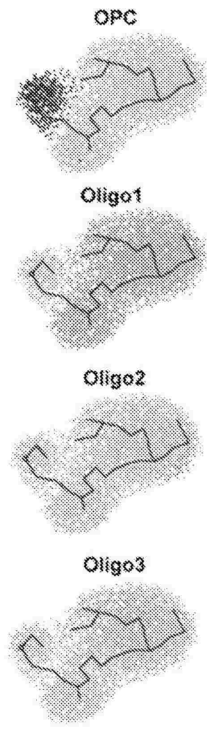


図 5D

【 図 5 E 】

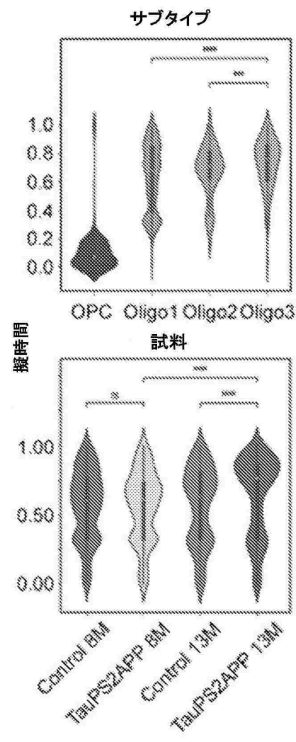


図 5E

【 図 5 F 】

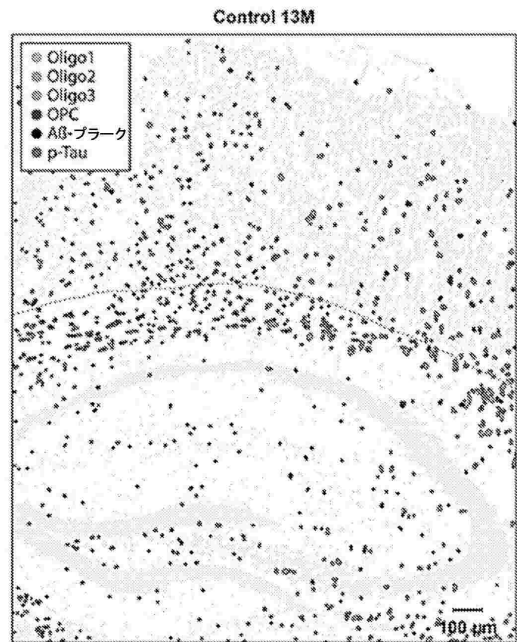


図 5F

【 図 5 G 】

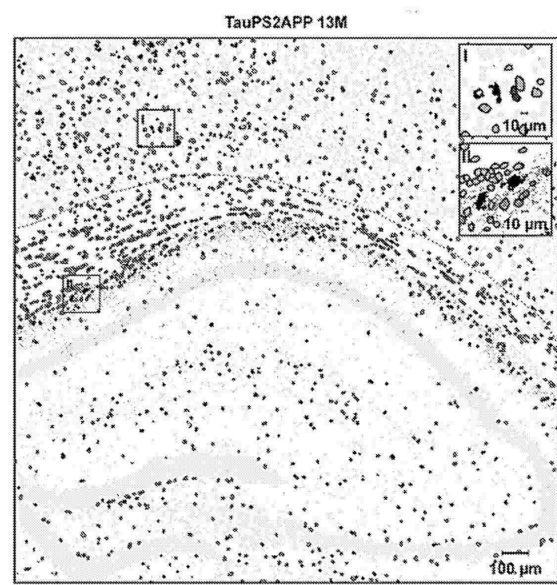


図 5G

10

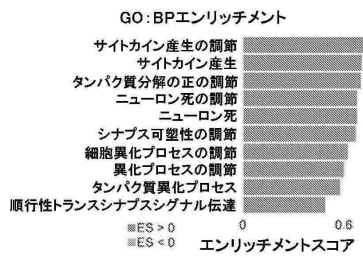
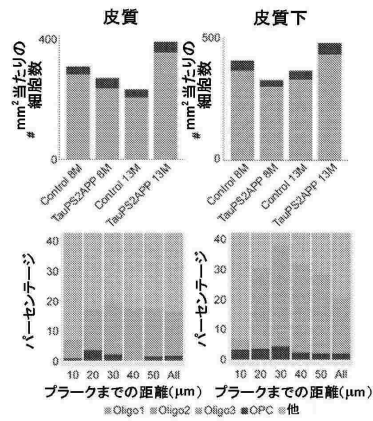
20

30

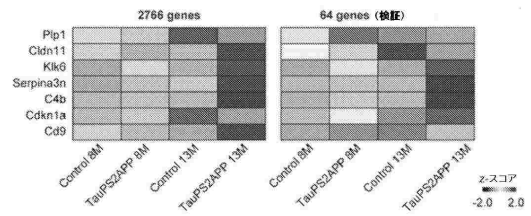
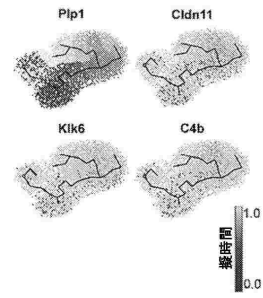
40

50

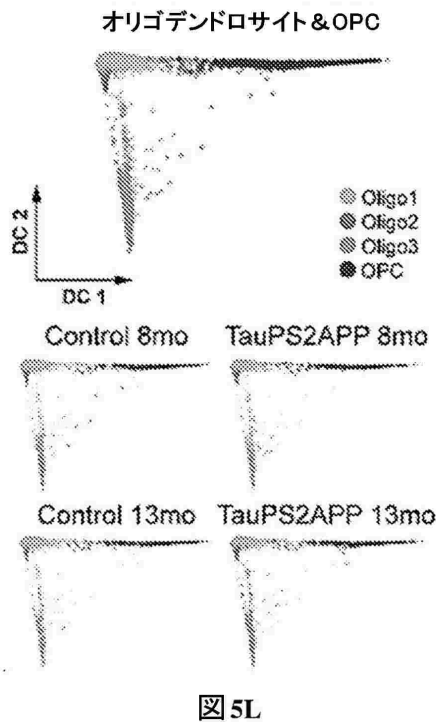
【図 5 H - I】



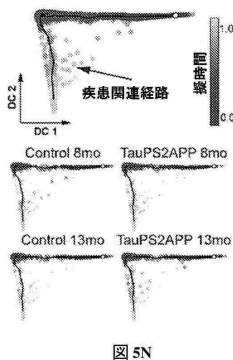
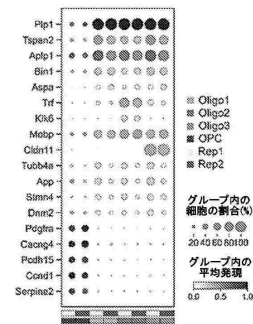
【図 5 J - K】



【図 5 L】



【図 5 M - N】



10

20

30

40

50

【図 5 O】

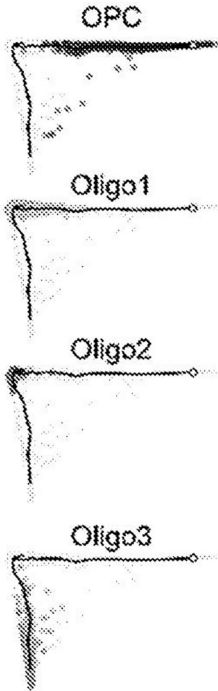


図 5O

【図 5 P】

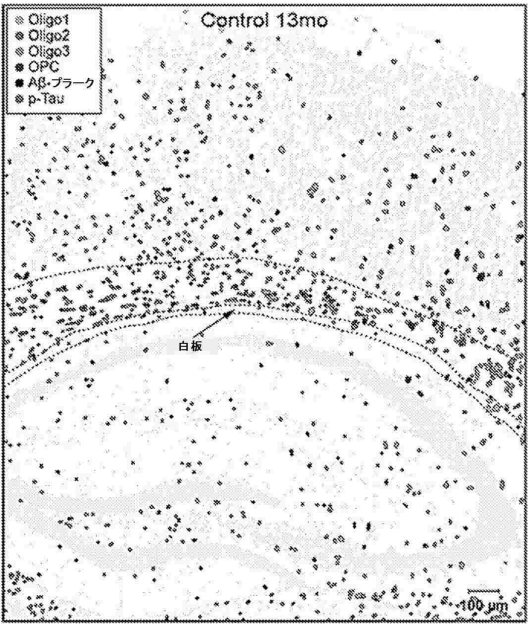


図 5P

【図 5 Q】

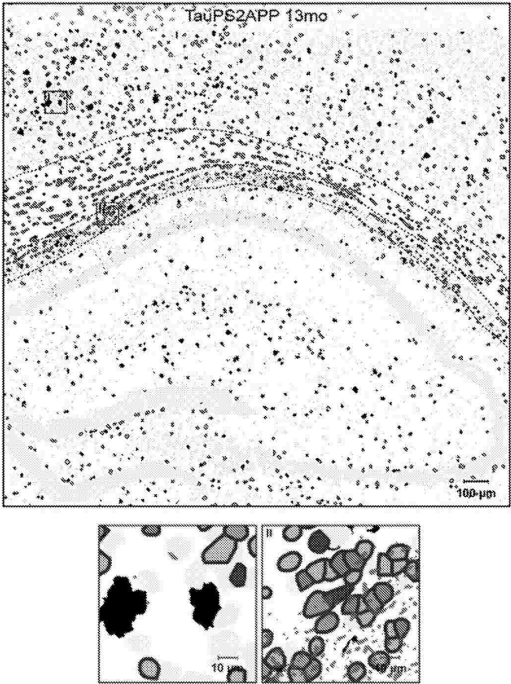


図 5Q

【図 5 R】

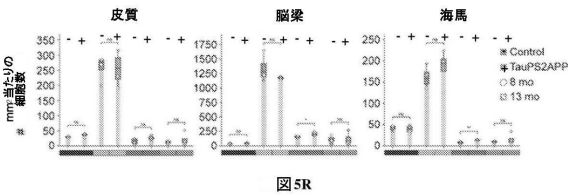


図 5R

10

20

30

40

50

【図 5 S - T】

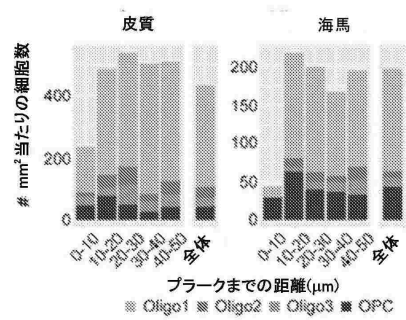


図 5S

【図 5 U - V】

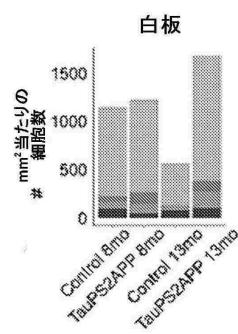


図 5U

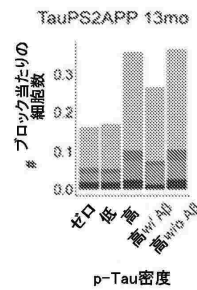


図 5T

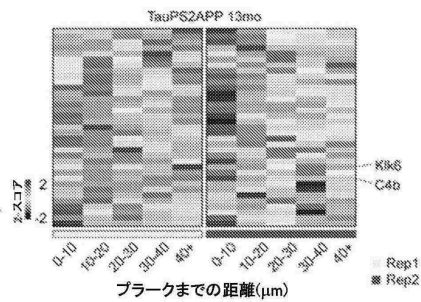


図 5V

【図 6 A】

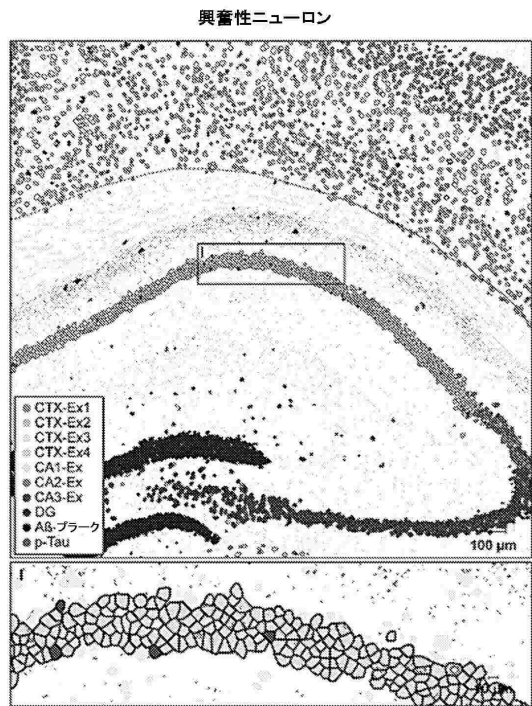


図 6A

【図 6 B】

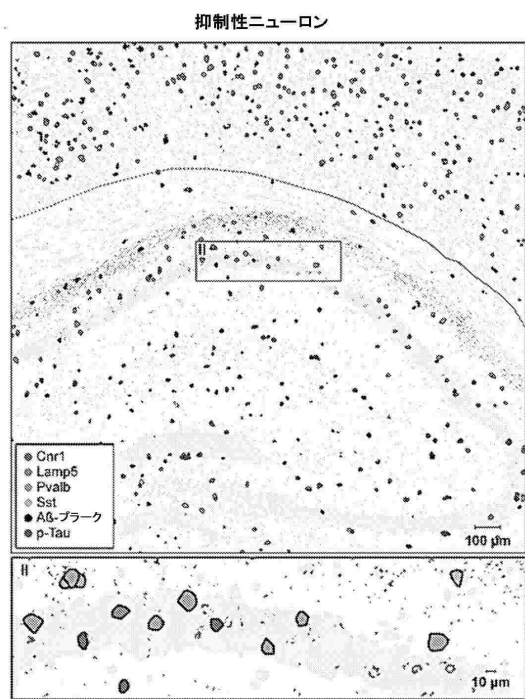


図 6B

10

20

30

40

50

【 図 6 C - D 】

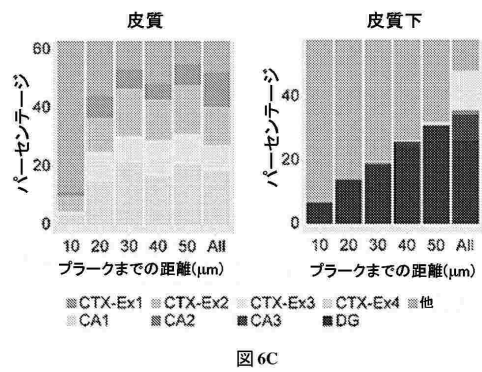


図 6C

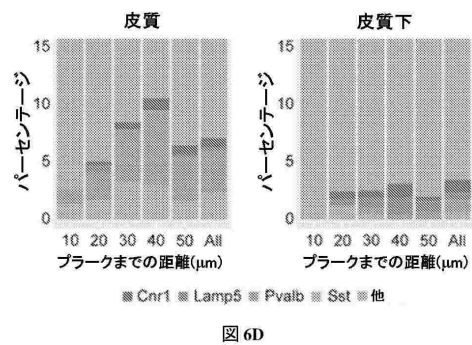


図 6D

【 図 6 E - F 】

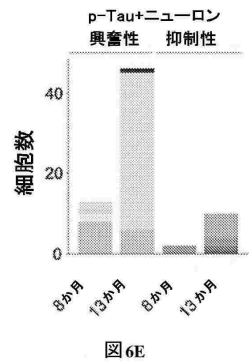


図 6E

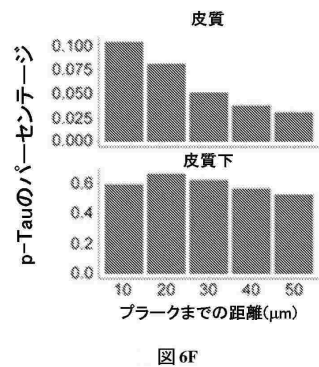


図 6F

【 図 6 G 】

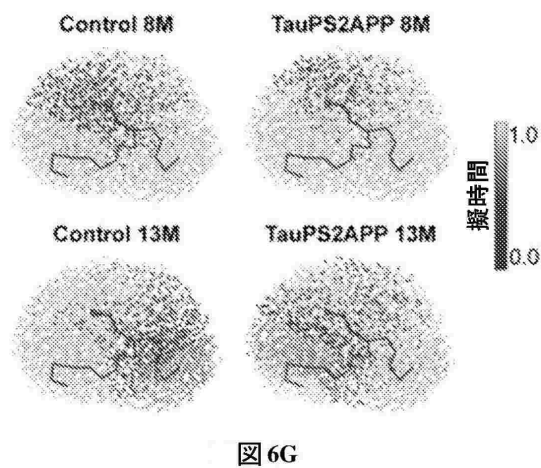


図 6G

【 図 6 H 】

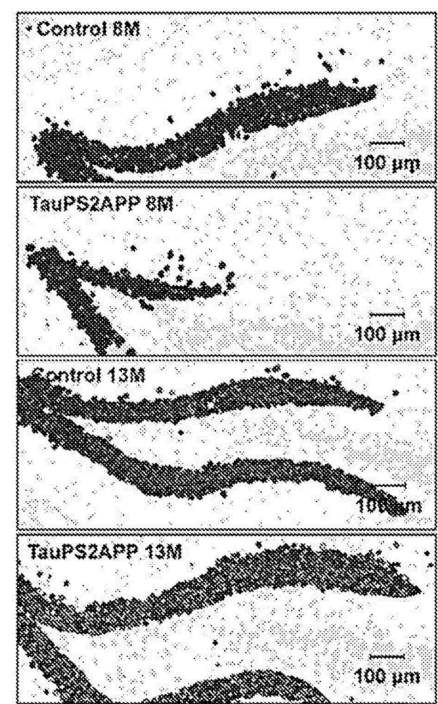


図 6H

【図 6 I - J】

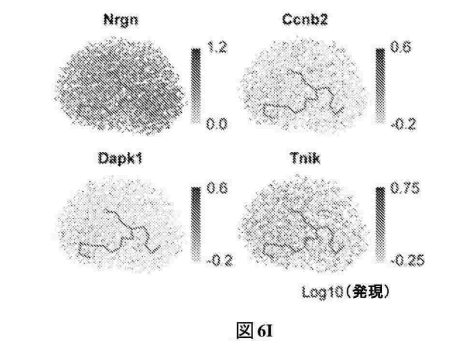


図 6I

【図 6 K - L】

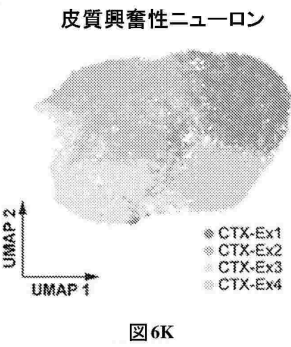


図 6K

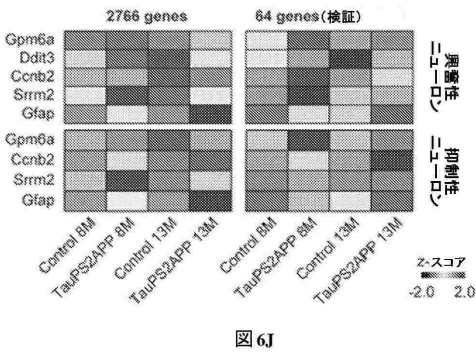


図 6J

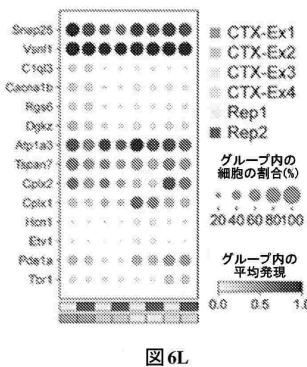


図 6L

【図 6 M - N】

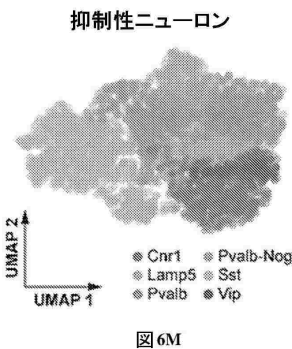


図 6M

【図 6 O】

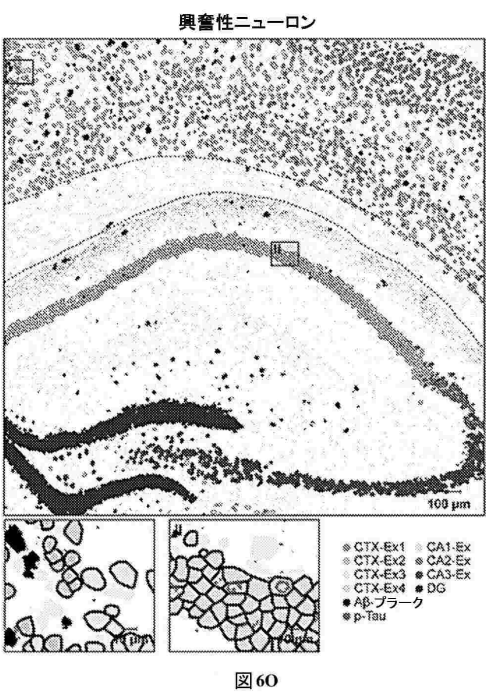


図 6O

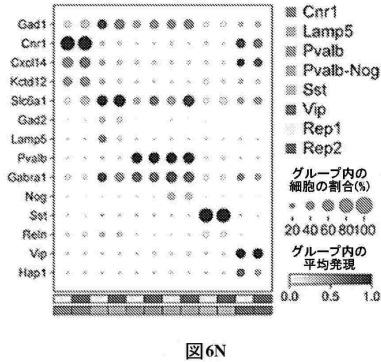


図 6N

10

20

30

40

50

【図 6 P】

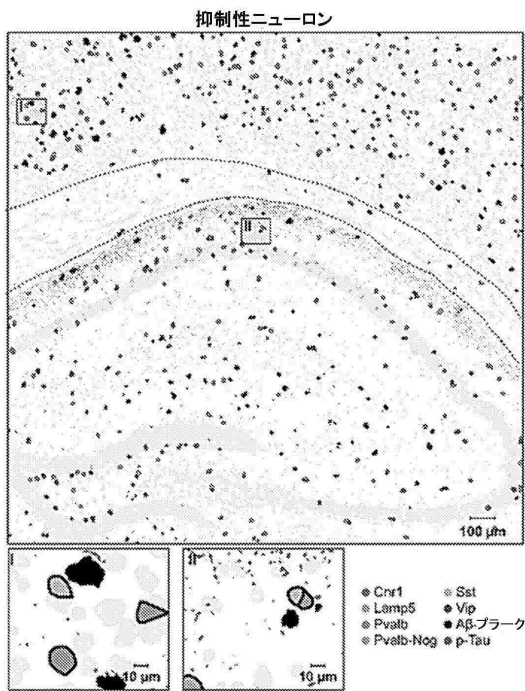


図 6P

【図 6 Q – R】

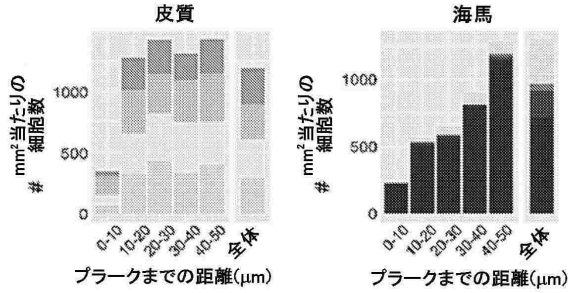


図 6Q

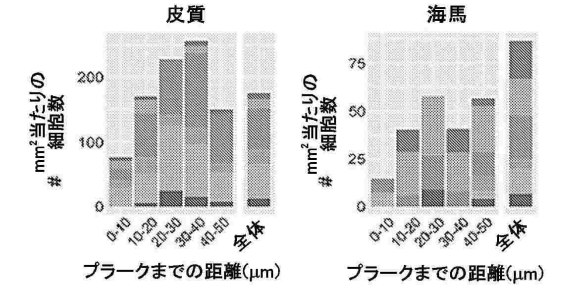


図 6R

【図 6 S】

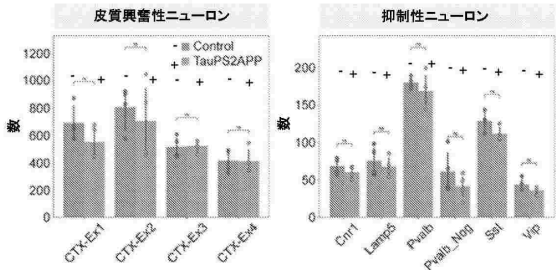


図 6S

【図 6 T – U】

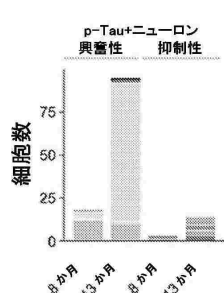


図 6T

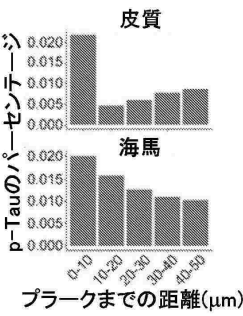


図 6U

10

20

30

40

50

【図 7 A】

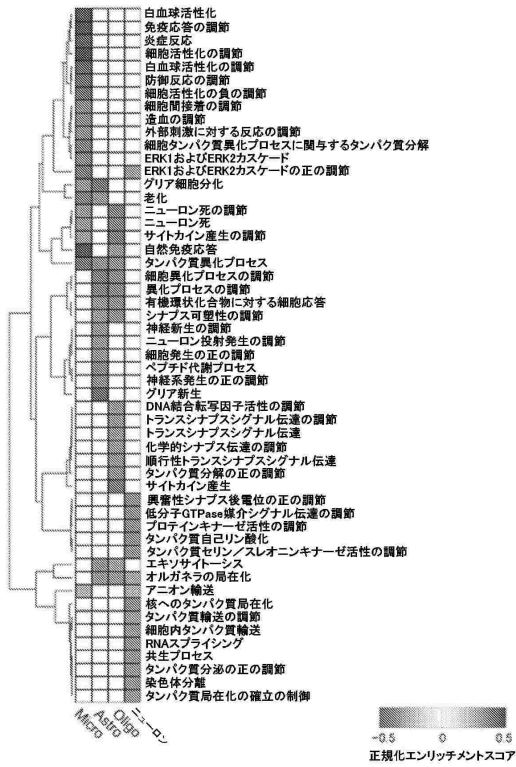


図 7A

【図 7 B】

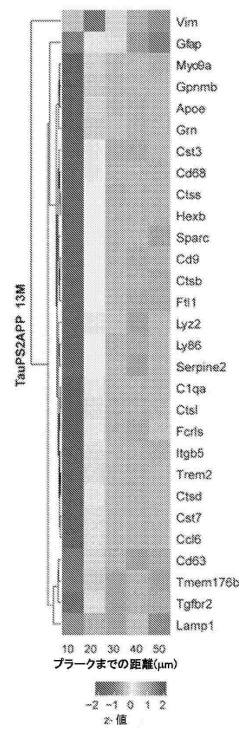


図 7B

【図 7 C】

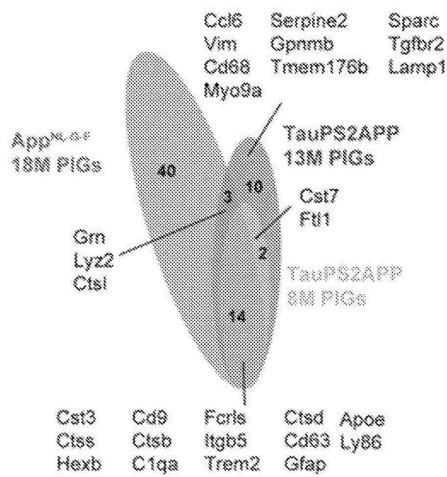


図 7C

【図 7 D】

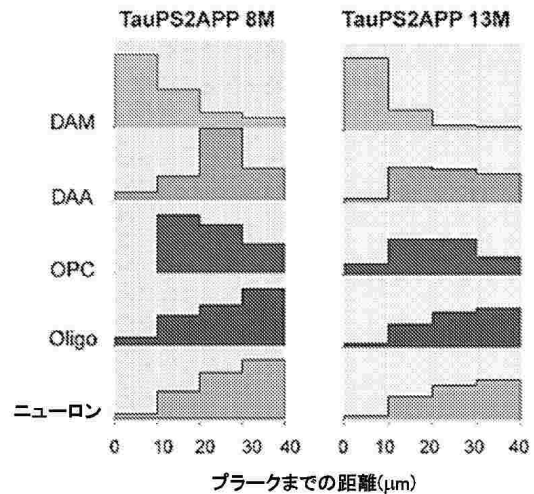


図 7D

10

20

30

40

50

【図 7 E】

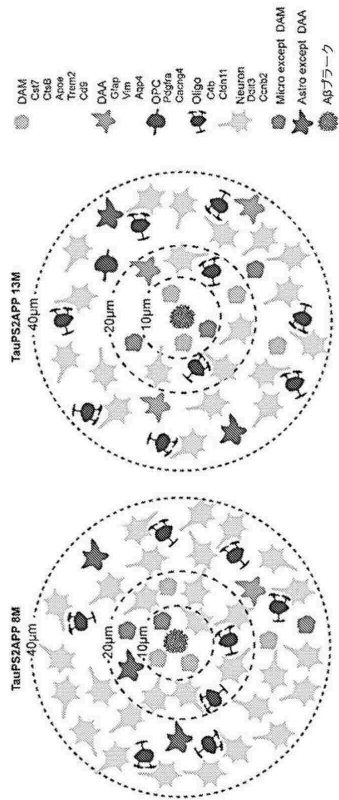


図 7E

【図 7 F - G】

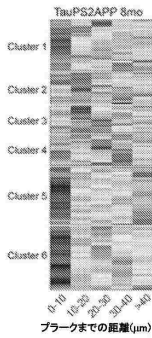


図 7F

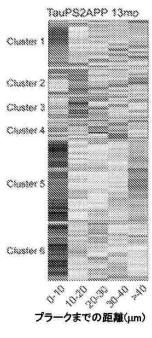


図 7G

【図 7 H】

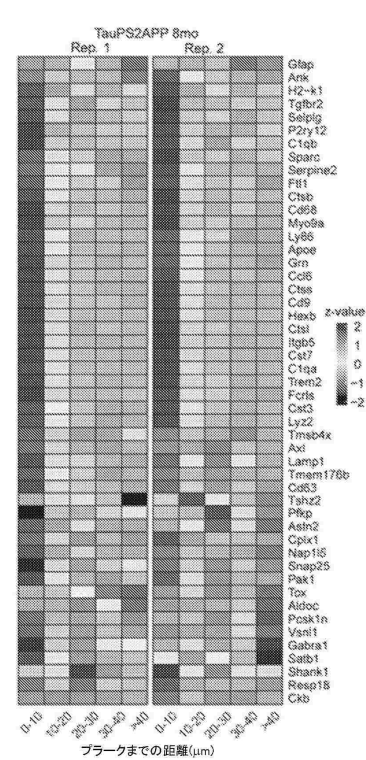


図 7H

【図 7 I】

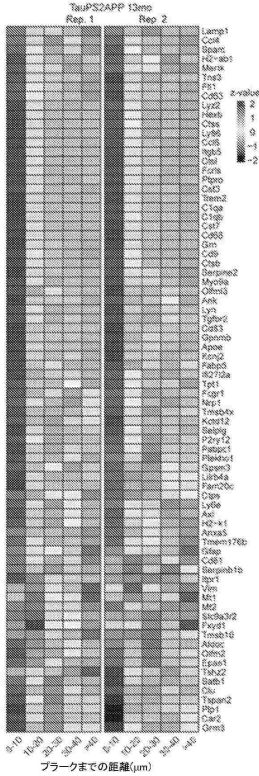


図 7I

10

20

30

40

50

【図 7 J】

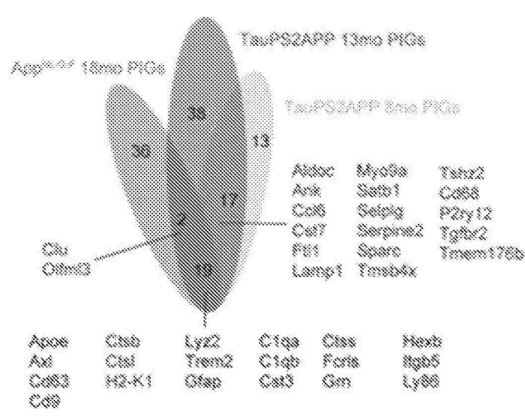


図 7J

【図 7 K】

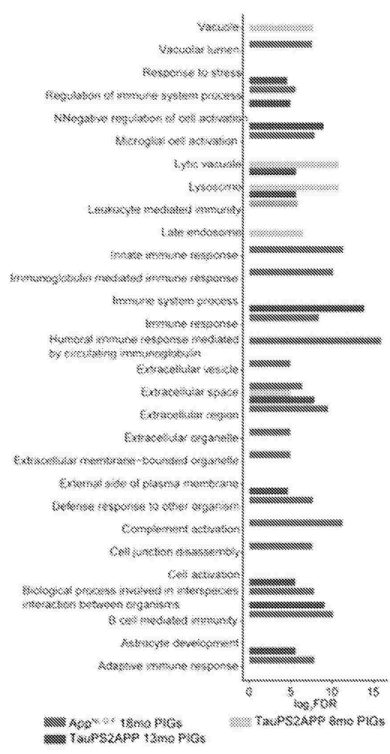


図 7K

【図 7 L】

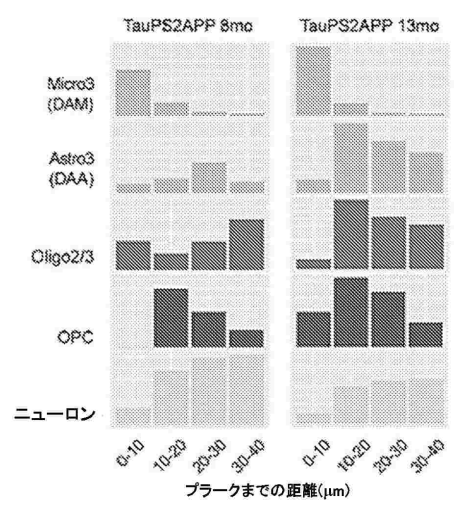


図 7L

【図 7 M】

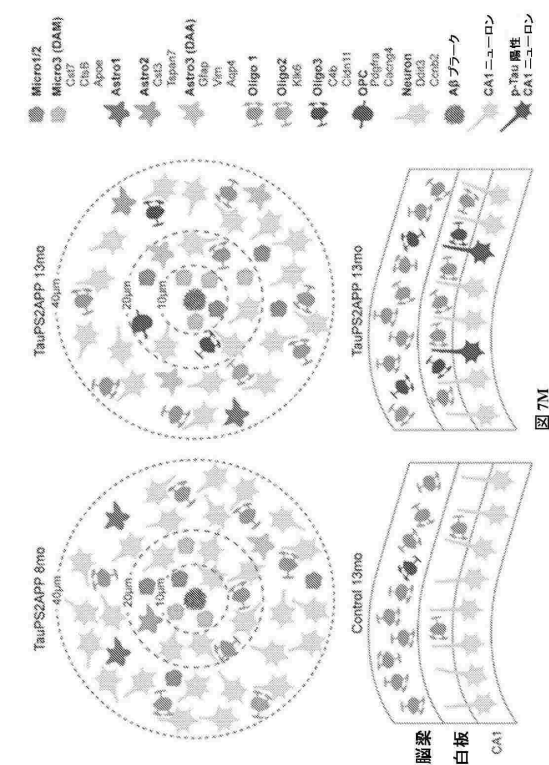


図 7M

10

20

30

40

50

【図 8 A - B】

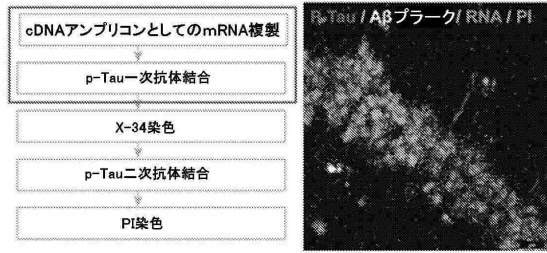


図 8A

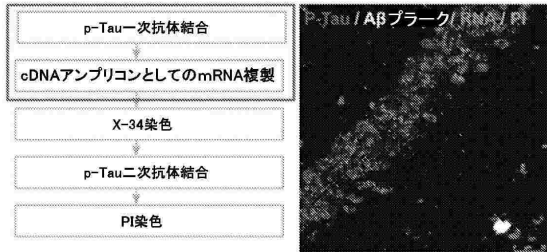


図 8B

【図 8 C】

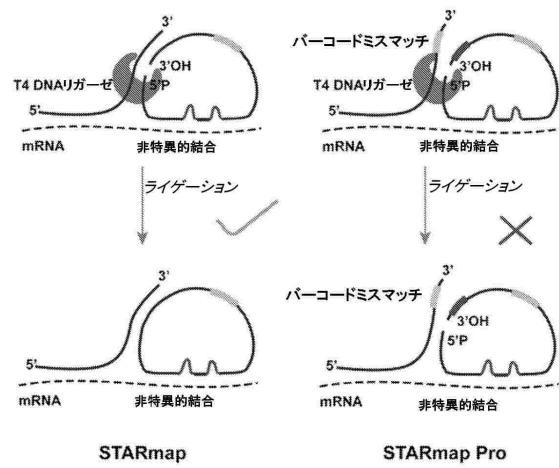


図 8C

【図 8 D - E】

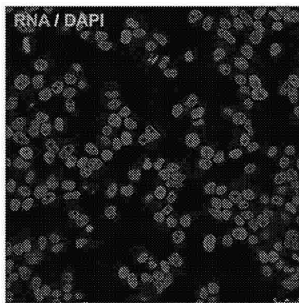


図 8D

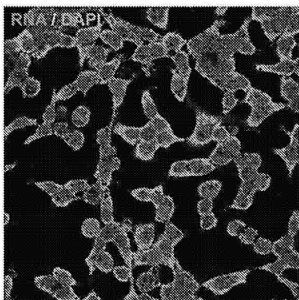


図 8E

【図 9 A】

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	--

【図 9 B - C】

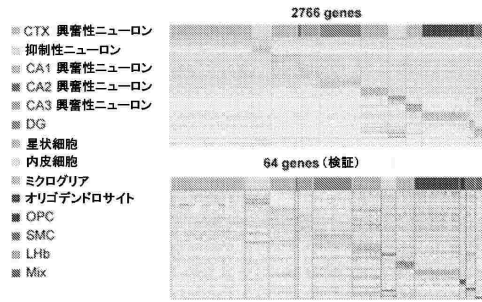


図 9B

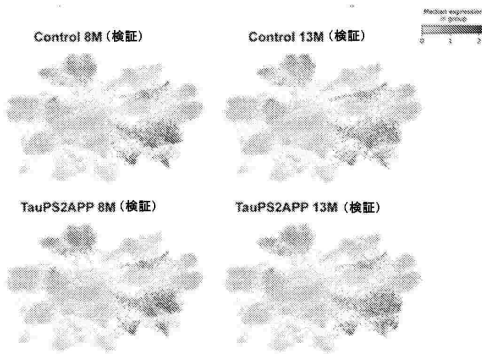


図 9C

【図 9 D】

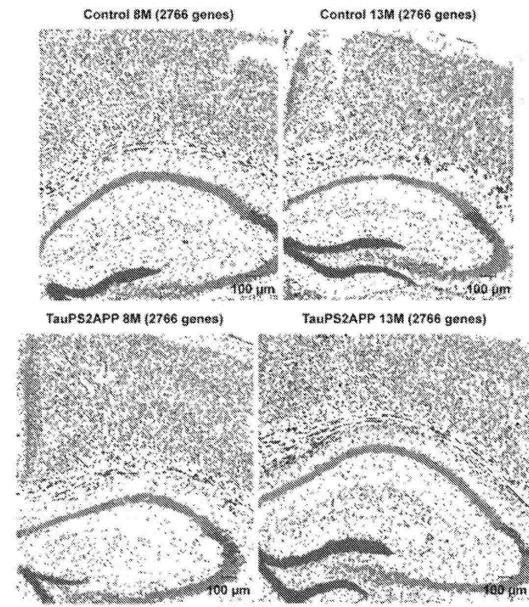


図 9D

10

20

【図 9 E】

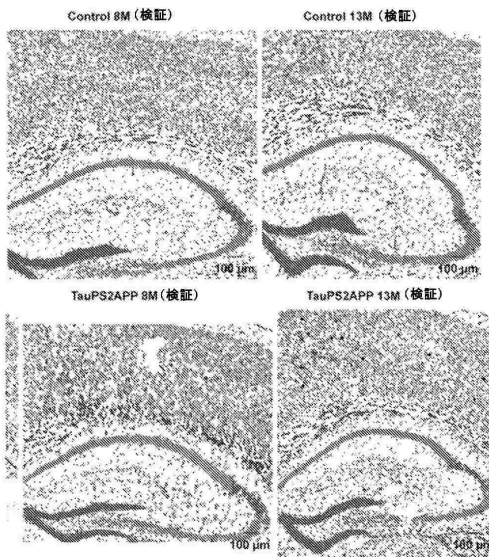


図 9E

【図 9 F - G】

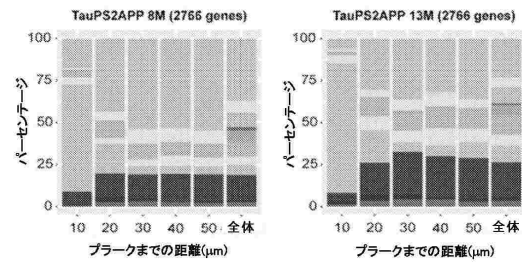


図 9F

30

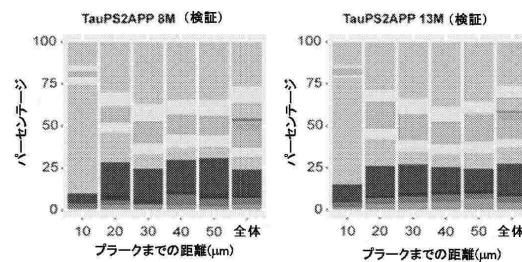


図 9G

40

50

【図 10 A】

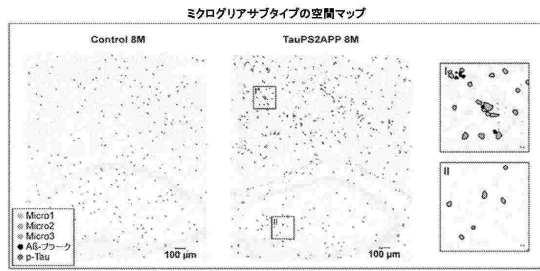


図 10A

【図 10 B】

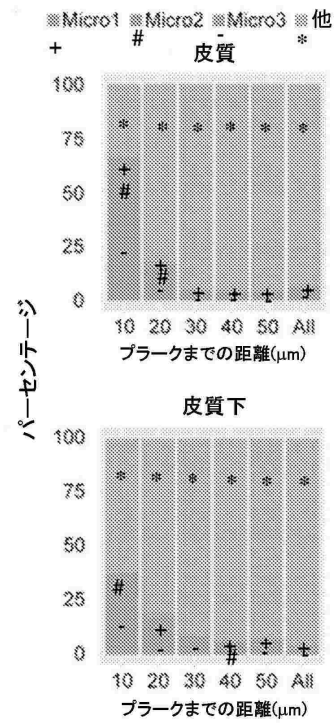


図 10B

【図 10 C】

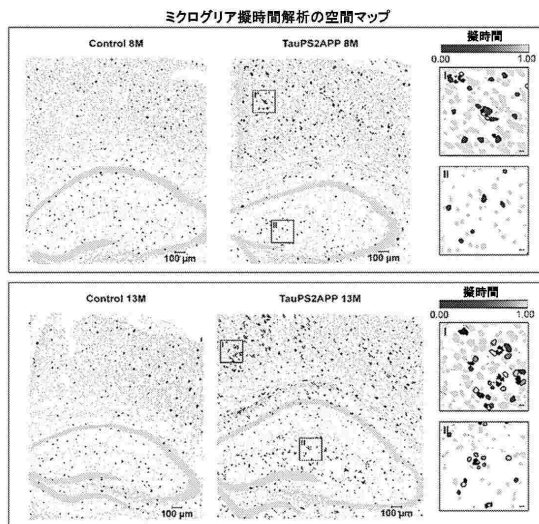


図 10C

【図 10 D】

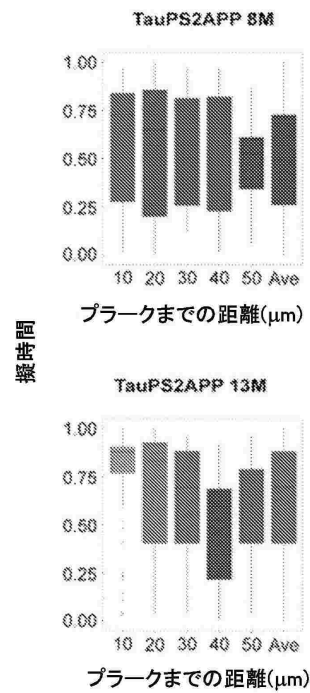


図 10D

10

20

30

40

50

【図 1 0 E】

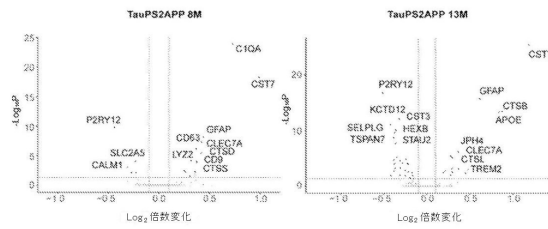


図 10E

【図 1 1 A - B】

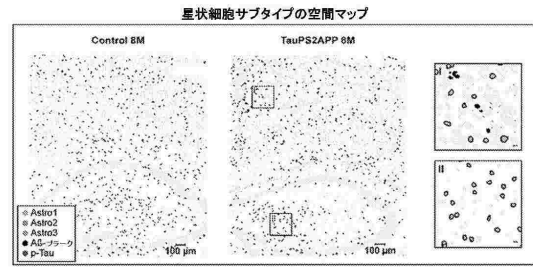


図 11A

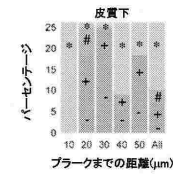
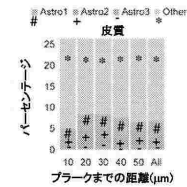


図 11B

【図 1 1 C】

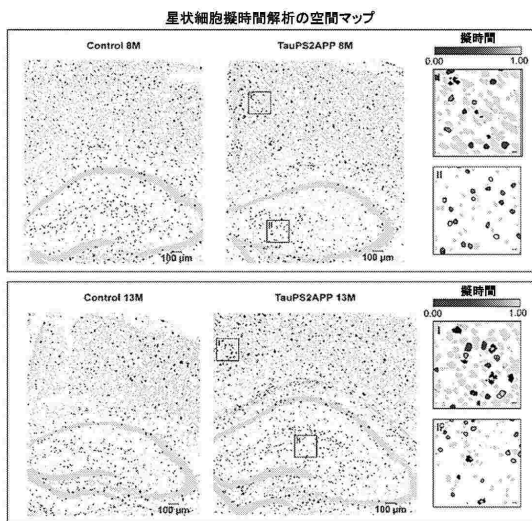


図 11C

【図 1 1 D】

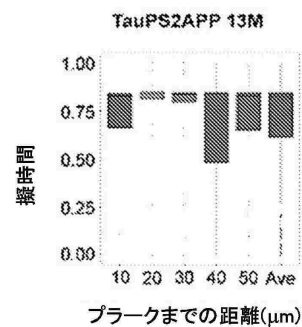
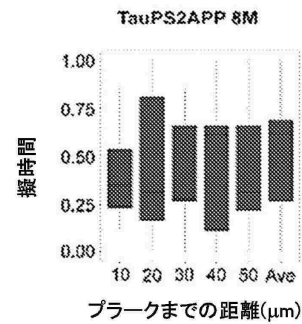


図 11D

10

20

30

40

50

【図 1 1 E】

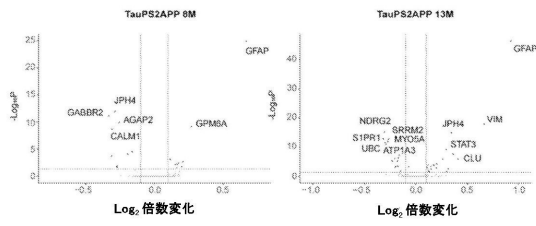


図 11E

【図 1 2 A】

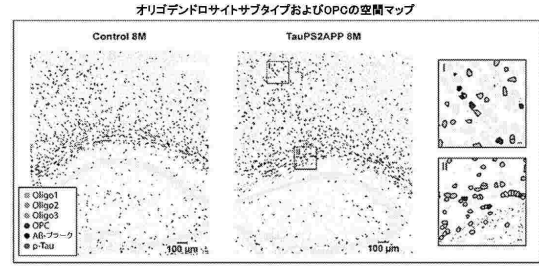


図 12A

10

【図 1 2 B】

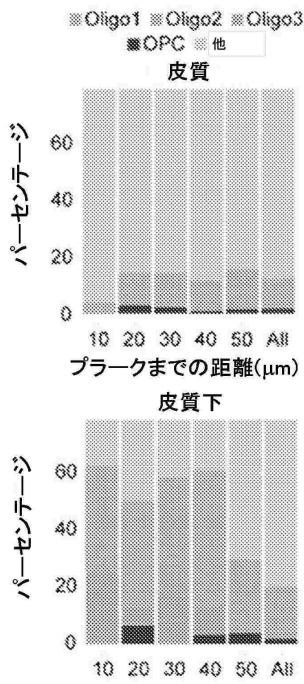


図 12B

【図 1 2 C】

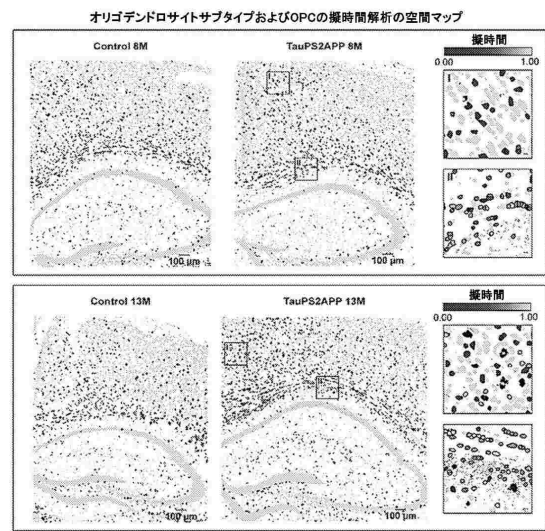


図 12C

20

30

40

50

【図 1 2 D】

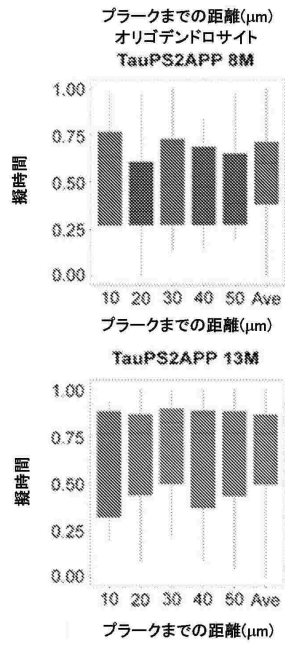


図 12D

【図 1 2 E】

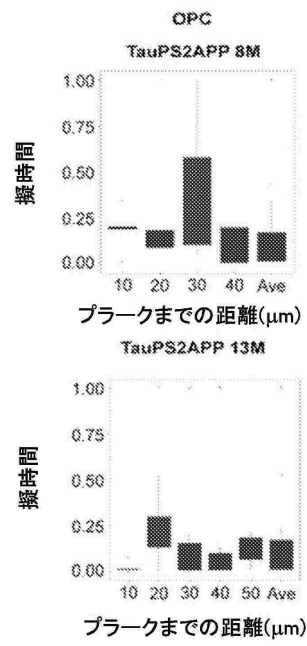
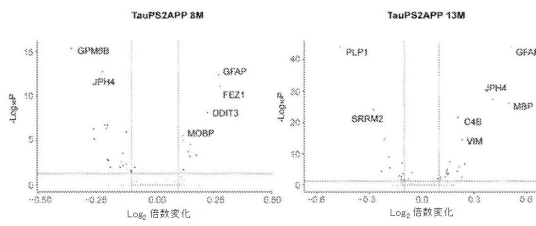
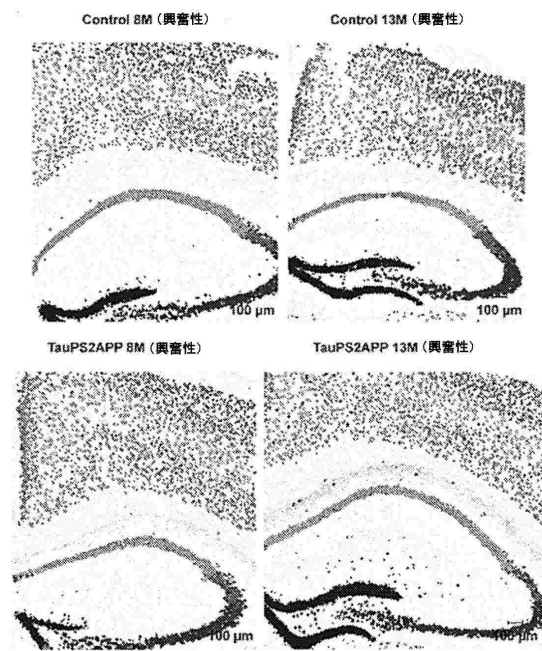


図 12E

【図 1 2 F】



【図 1 3 A】



10

20

30

40

50

【図 13 B】

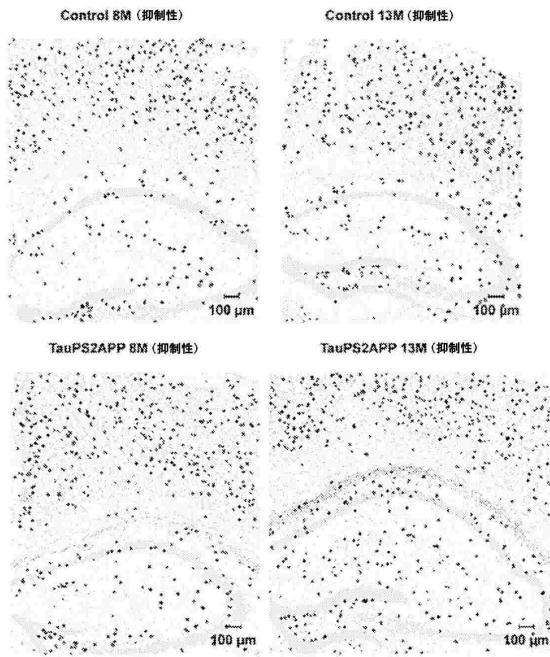


図 13B

【図 13 C】

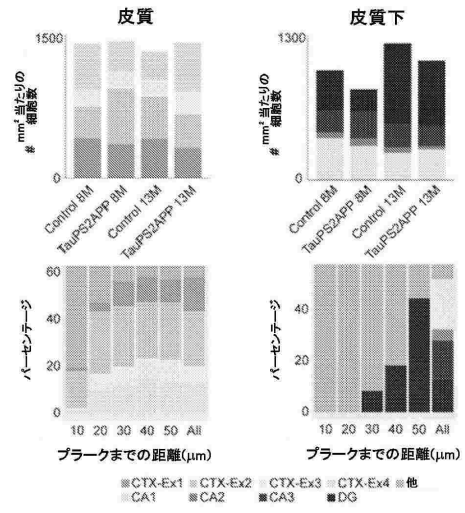


図 13C

【図 13 D】

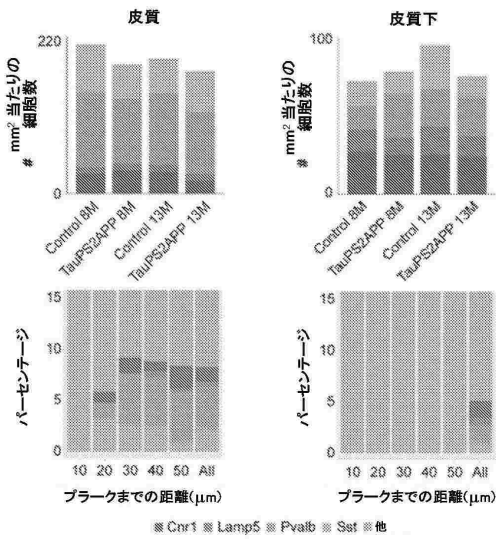


図 13D

【図 13 E】

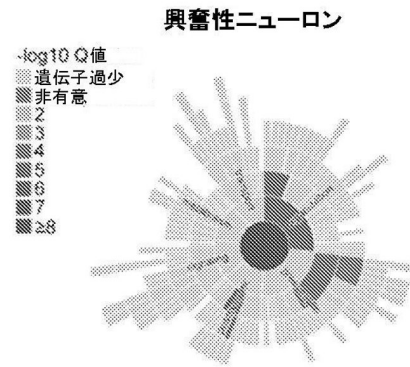


図 13E

10

20

30

40

50

【図 1 4 E】

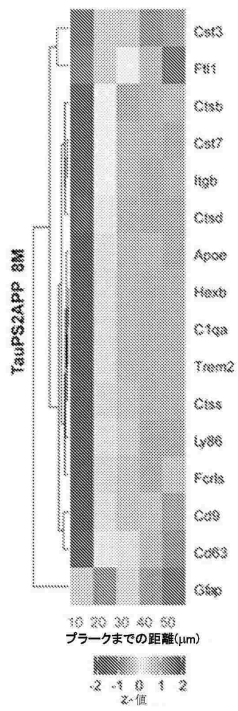


図 14E

【図 1 5】

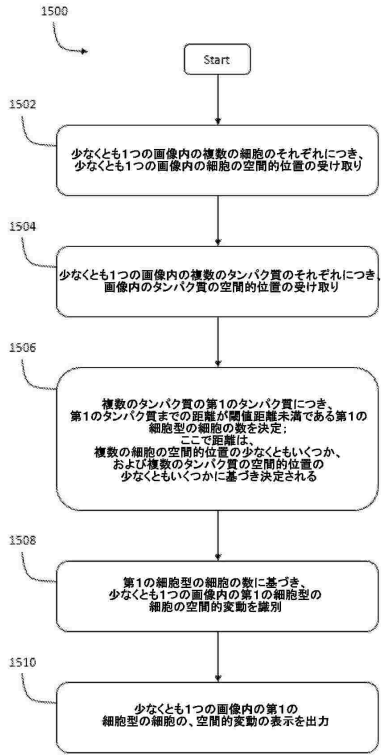


図 15

【図 1 6】

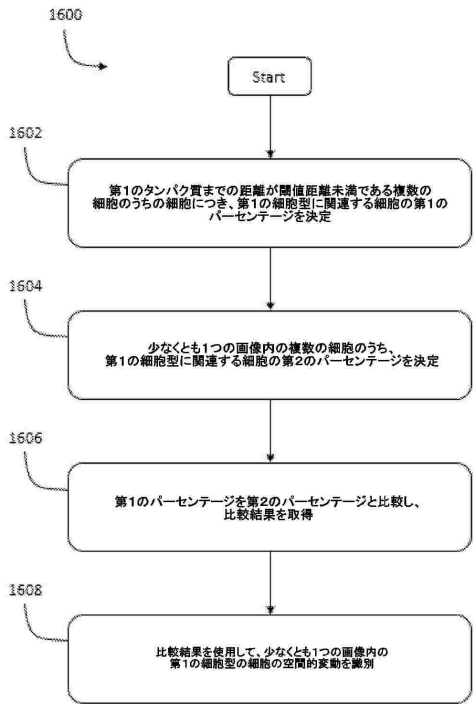


図 16

【図 1 7】

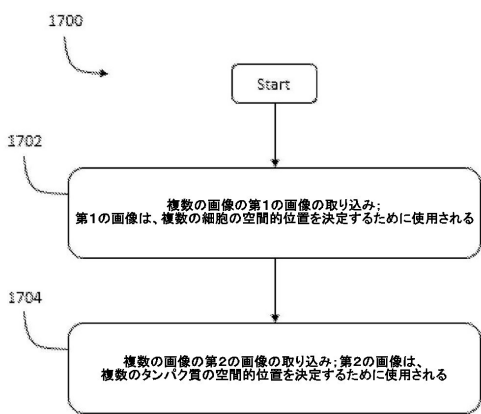


図 17

10

20

30

40

50

【図 18】

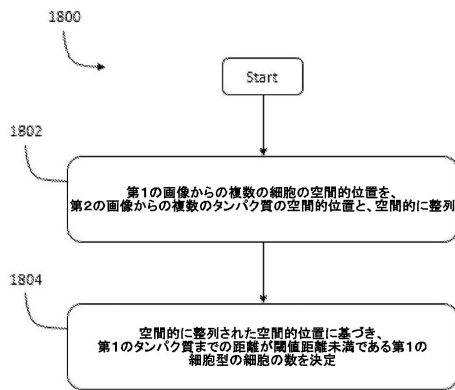


図 18

【図 19】

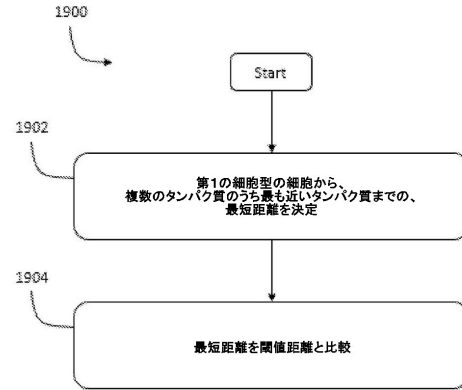


図 19

10

【図 20】

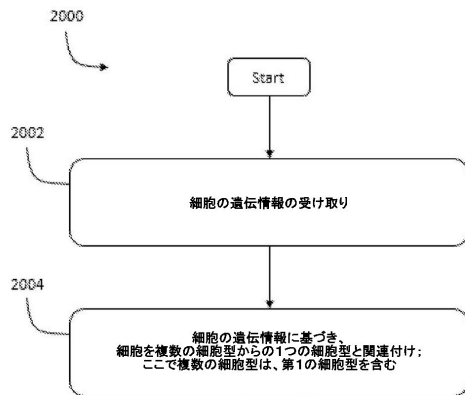


図 20

【図 21】

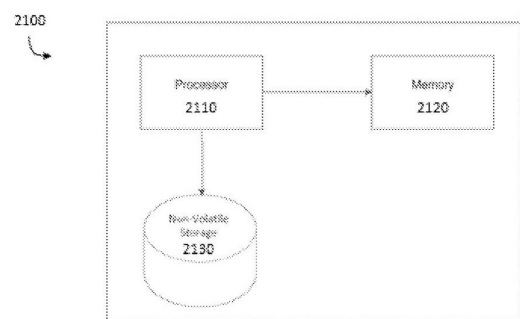


図 21

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/031275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6841
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/199579 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 17 October 2019 (2019-10-17) cited in the application	48
A	paragraphs [0107], [0130]; figure 2B; example 7	1-47, 49-133, 170-175
A	XIAO WANG ET AL: "Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states", SCIENCE, vol. 361, no. 6400, 27 July 2018 (2018-07-27), page eaat5691, XP055585756, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aat5691 figure 1	1-133, 170-175

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 August 2022

Date of mailing of the international search report

31/10/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aslund, Fredrik

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/031275**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims.; it is covered by claims Nos.:
1-133, 170-175

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2022 /031275

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-133, 170-175

Method and probes relating to a plurality of oligonucleotide probes comprising a first oligonucleotide probe and a second oligonucleotide probe, wherein i) the first oligonucleotide probe comprises a portion that is complementary to the second oligonucleotide probe, a portion that is complementary to a nucleic acid of interest, a first barcode sequence, and a second barcode sequence; and ii) the second oligonucleotide probe comprises a portion that is complementary to the nucleic acid of interest, a portion that is complementary to the first oligonucleotide probe, and a barcode sequence, wherein the barcode sequence of the second oligonucleotide probe is complementary to the second barcode sequence of the first oligonucleotide probe.

2. claims: 134-169

A method/apparatus or storage medium of identifying spatial variations of cell types in at least one image, comprising: receiving, for each of a plurality of cells in the at least one image, a spatial location of the cell in the at least one image; receiving, for each of a plurality of proteins in the at least one image, a spatial location of the protein in the image; for a first protein of the plurality of proteins, determining a number of cells of a first cell type having a distance to the first protein less than a threshold distance, wherein the distances are determined based on at least some of the spatial locations of the plurality of cells and at least some of the spatial locations of the plurality of proteins; based on the number of cells of the first cell type, identifying a spatial variation in cells of the first cell type in the at least one image; and outputting an indication of the spatial variation in cells of the first cell type in the at least one image.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/031275

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019199579	A1	17-10-2019	CA 3096621 A1	17-10-2019
			CN 112243463 A	19-01-2021
			EP 3775268 A1	17-02-2021
			JP 2021520795 A	26-08-2021
			KR 20200143420 A	23-12-2020
			US 2021164039 A1	03-06-2021
			WO 2019199579 A1	17-10-2019

US 2018208975	A1	26-07-2018	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	39/395	E	5 L 0 9 9
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 K	31/713		
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00		
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00		
A 6 1 P	13/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00		
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/00		
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 P	5/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00		
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	5/00		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00		
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
G 0 1 N	33/554 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
G 0 1 N	33/483 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M	
G 1 6 H	10/40 (2018.01)	G 0 1 N	33/53	Y	
		G 0 1 N	33/543	5 7 5	
		G 0 1 N	33/554		
		G 0 1 N	33/483	C	
		G 1 6 H	10/40		

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. T R I T O N
3. M A T L A B
4. P Y T H O N

オブ テクノロジー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ, マサチューセッツ・アヴェニュー・
7 7

(74)代理人 110003971

弁理士法人葛和国際特許事務所

(72)発明者 ワン, シャオ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
ケア オブ ザ ブロード インスティテュート, インコーポレーテッド

(72)発明者 ゼン, フー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
ケア オブ ザ ブロード インスティテュート, インコーポレーテッド

(72)発明者 レン, ジンイー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、マサチューセッツ アヴェニュー 77、ケア オブ マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー

F ターム (参考) 2G045 AA25 CB01 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB12 FB13
4B029 AA07 BB11 FA15
4B063 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR58 QR62 QS26
QS32 QS39 QX02
4C084 AA13 AA17 MA02 NA14 ZA011 ZA161 ZA361 ZA511 ZA591 ZA661
ZA751 ZA811 ZA941 ZA961 ZB111 ZB262 ZB321 ZC211
4C085 AA13
4C086 MA02 MA04 NA14 ZA01 ZA16 ZA36 ZA51 ZA59 ZA66 ZA75
ZA81 ZA94 ZA96 ZB08 ZB11 ZB26 ZB32 ZC21
5L099 AA04