

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特開2023-1092
(P2023-1092A)

(43)公開日 令和5年1月4日(2023.1.4)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)			
C 1 2 Q	1/6874(2018.01)	C 1 2 Q	1/6874	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6806(2018.01)	C 1 2 Q	1/6806	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 Q	1/6816(2018.01)	C 1 2 Q	1/6816	Z	
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z	
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z	
審査請求	未請求	請求項の数	13	O L	外国語出願 (全10頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-98035(P2022-98035)	(71)出願人	520094891		
(22)出願日	令和4年6月17日(2022.6.17)		ミルテニー バイオテック ベー.フェー . ウント コー. カー・ゲー		
(31)優先権主張番号	21180189		Miltenyi Biotec B.V . & Co. KG		
(32)優先日	令和3年6月18日(2021.6.18)		ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラ トバッハ フリードリヒ-エーパート- シュトラーセ 68		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach, Germany		
		(74)代理人	100114890		
			弁理士 アインゼル・フェリックス=ラ インハルト		
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】基板上でギャップを有するパドロックを使用して組織から遺伝子を空間配列決定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】組織の細胞内レベルで遺伝子の配列情報および空間情報を取得するための方法を提供する。

【解決手段】少なくとも 1 つの m - R N A 鎖を含む試料中の標的配列の空間位置および配列情報を取得するための方法であって、 a . 少なくとも 1 つの m - R N A 鎖に結合可能な複数のスペーサー単位と少なくとも 1 つの参照マーカーとを有する表面を提供する工程、 b . 表面に少なくとも 1 つの m - R N A 鎖を含む試料を提供する工程、 c . 参照マーカーを基準として試料の空間情報を取得するために、表面の第 1 の画像を撮影する工程、 d . 表面から試料を除去する工程、 e . パドロック型構造を形成し、これをライギーションして一本鎖の環状錆型を生成する工程、 f . ローリングサークル增幅により、口口ニーを形成する工程、 g . 口口ニーの配列情報を取得する工程、および h . 試料の空間情報と口口ニーの配列情報を関連付ける工程を含む、方法とする。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 1 つの m - R N A 鎖を含む試料中の標的配列の空間位置および配列情報を取得するための方法であって、

a . 少なくとも 1 つの m - R N A 鎖に結合可能な複数のスペーサー単位と少なくとも 1 つの参照マーカーとを有する表面を提供する工程

b . 前記表面に少なくとも 1 つの m - R N A 鎖を含む試料を供給する工程であって、前記試料の少なくとも 1 つの m - R N A 鎖が少なくとも 1 つのスペーサー単位に結合して少なくとも 1 つの一本鎖オリゴマーを生成する工程

c . 前記参照マーカーを基準として前記試料の空間情報を取得するために、前記表面の第 1 の画像を撮影する工程 10

d . 表面から試料を除去する工程

e . 5' 末端および 3' 末端を有する 50 ~ 1000 個の核酸を含む少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを前記一本鎖オリゴマーの相補的部分とハイブリダイズさせることによりパドロック型構造を形成し、これをライゲーションして一本鎖の環状錠型を生成する工程

f . ローリングサークル増幅が可能なポリメラーゼによって、前記一本鎖の環状錠型を複数の D N A コンカテマーに増幅することにより、ロロニーを形成する工程

g . 前記ロロニーの配列情報を取得する工程

h . 前記試料の空間情報と前記ロロニーの配列情報を関連付ける工程 20
を含む、方法。

【請求項 2】

前記スペーサー単位が、抗体、抗体の F a b 断片、一本鎖 F v (s c F v) 断片、二価一本鎖抗体もしくはダイアボディ、またはアブタマーからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記スペーサー単位が、少なくとも 5 つのチミン (p o l y - T) 単一分子を含むオリゴヌクレオチドからなる群から選択され、前記少なくとも 1 つのスペーサー単位への前記一本鎖オリゴマー結合が、c - D N A 鎖に逆転写され、前記 m R N A 鎖は変性によって除去されることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを前記少なくとも 1 つの一本鎖オリゴマーの相補的部分とハイブリダイズさせ、前記オリゴヌクレオチドの 5' 末端と 3' 末端との間にギャップを有するパドロック単位を作成し、前記パドロック単位の前記ギャップを標的配列と相補的な核酸で埋め、それらをライゲーションして前記一本鎖の環状錠型を生成することを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを前記少なくとも 1 つの一本鎖オリゴマーの相補的部分とハイブリダイズさせ、前記オリゴヌクレオチドの 5' 末端と 3' 末端とをライゲーションして前記一本鎖の環状錠型を生成し、前記少なくとも 1 つの一本鎖オリゴマーの前記相補的部分が標的配列を規定することを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の方法。 40

【請求項 6】

前記スペーサー単位が基板上にランダムに分布していることを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が前記表面に供給された後に浸透処理されることを特徴とする、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

工程 (d) において、前記試料が酵素的または化学的に表面から除去されることを特徴 50

とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

前記オリゴヌクレオチドが、ローリングサークル増幅が可能な前記ポリメラーゼに対して少なくとも 1 つのプライマー配列を含むことを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

前記オリゴヌクレオチドが、プライマーオリゴヌクレオチドのライゲーションによるローリングサークル増幅が可能な前記ポリメラーゼに対して少なくとも 1 つのプライマー配列を備えることを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

前記試料の空間位置と前記配列決定されたロロニーの空間位置とを前記参照マーカーの位置を基準として重ね合わせることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記試料を前記表面に供給した後、前記試料を染色して、前記参照マーカーを基準とした空間位置を取得することを特徴とする、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

配列決定情報を sequencing by synthesis 法によって取得することを特徴とする、請求項 1 から 12 までのいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

本発明は、組織の細胞内レベルで遺伝子の配列情報および空間情報を取得するための方法に関する。

【0002】

空間情報を保持した後、それらの遺伝子の潜在的な変異について配列決定することにより、組織の細胞内レベルで全発現遺伝子を検出することは困難であった。特に細胞内分解能に到達することは困難である。本出願に記載する方法は、数十ナノメートルに至る理論的分解能を可能にし、組織の空間情報を発現遺伝子の配列情報とを関連付けることを可能にする。

【0003】

このような技術は、Spatial Transcriptomics社および10X genomics社によって開発された。この技術では、アレイ上に事前スポットティングされた空間識別子で組織 RNA 分子をタグ付けしているため、空間情報を保持される。その後、得られたライプラリを、例えば Illumina の標準的なインビトロ NGS 配列決定手法により配列決定する。スポットティングプロセスにより、配列決定プロセスの実施前にアレイ上の空間識別子の位置が既知である。空間識別子の配列決定後、対象となる関連する RNA 配列を組織の位置に割り当てることができる。この手法はアレイ上のスポットの形状サイズに依存し、現行で多細胞レベルのみであるため、技術の分解能が主たる限界の 1 つである。Spatial Transcriptomics は、複数の取得済み特許を有するが、分子はバーコードで標識され、基板外で配列決定される。また、収集するバーコード化分子すべてのライプラリ調製を行う必要がある。本明細書に提示する方法は、基板から分子を除去するのではなく、基板上で配列を直接決定する。参考文献は、米国特許出願公開第 2015 / 0344942 号明細書 “METHODS AND PRODUCT FOR OPTIMISING LOCALISED OR SPATIAL DETECTION OF GENE EXPRESSION IN A TISSUE”、および国際公開第 2016 / 162309 号 “SPATIALLY DISTINGUISHED, MULTIPLEX NUCLEIC ACID ANALYSIS OF BIOLOGICAL SPECIMENS” である。

【0004】

遺伝子情報と空間情報を組み合わせる別の手法は、国際公開第 2012 / 14022

10

20

30

40

50

4号、Fredrik Salmen et al., in: *Nature protocols* 2018, “Barcode solid-phase RNA capture for Spatial Transcriptomics profiling in mammalian tissue”、およびSanja Vickovic et al., “High-density spatial transcriptomics arrays for *in situ* tissue profiling”, *Nature methods*, September 9 2019に開示されている。

【0005】

概要

記載される方法は、現在、市販されている他の競合ソリューションと比較して簡素化されたワークフローを用いて、空間識別子を必要とせずに、300～500 nmの高空間分解能で組織のmRNAを検出するために使用される。

10

【0006】

したがって、本発明の目的は、少なくとも1つのm-RNA鎖を含む試料中の標的配列の空間位置および配列情報を取得するための方法であって、

a. 少なくとも1つのm-RNA鎖に結合可能な複数のスペーサー単位と少なくとも1つの参照マーカーとを有する表面を提供する工程

b. 表面に少なくとも1つのm-RNA鎖を含む試料を供給する工程であって、試料の少なくとも1つのm-RNA鎖が少なくとも1つのスペーサー単位に結合して少なくとも1つの一本鎖オリゴマーを生成する工程

c. 参照マーカーを基準として試料の空間情報を取得するために、表面の第1の画像を撮影する工程

20

d. 表面から試料を除去する工程

e. 5'末端および3'末端を有する50～1000個の核酸を含む少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを一本鎖オリゴマーの相補的部分とハイブリダイズさせることによりパドロック型構造を形成し、これをライゲーションして一本鎖の環状錠型を生成する工程

f. ローリングサークル増幅が可能なポリメラーゼによって、一本鎖の環状錠型を複数のDNAコンカテマーに増幅することにより、ロロニーを形成する工程

g. ロロニーの配列情報を取得する工程

h. 試料の空間情報とロロニーの配列情報を関連付ける工程
を含む、方法である。

30

【0007】

図1に示されている本発明の第1の実施形態において、スペーサー単位は、少なくとも5つ、好ましくは5～50のチミン単一分子（「poly-T」と称する）を含むオリゴヌクレオチドからなる群から選択され、少なくとも1つのスペーサー単位への一本鎖オリゴマー結合は、c-DNA鎖に逆転写され、mRNA鎖は変性によって除去される。

40

【0008】

図3に示されている本発明の第2の実施形態において、スペーサー単位は、抗体、抗体のFab断片、一本鎖Fv(scFv)断片、二価一本鎖抗体もしくはダイアボディ、またはアブタマーからなる群から選択される。好ましくは、組換えヒト抗体(eIF4E)またはモノクローナル抗体(抗7-メチルグアノシン(m7G)mAb)を使用して、5'末端側のmRNAのキャップ末端を標的にする。

40

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の第1の実施形態の一般的なワークフローを示す図である。

【図2】本発明の表面でのスペーサー単位、参照マーカー、および組織の空間配置を示す図である。

【図3】本発明の第2の実施形態の一般的なワークフローを示す図である。

【0010】

詳細な説明

本発明の方法は、以下に詳細に説明する複数の工程で実施される。

【0011】

50

工程(a)

最初に、固体で平坦な二次元基板に、官能化表面、例えば活性化されたカルボキシレート基またはスクシンイミジルエステルを付与する。この活性化表面に、スペーサ基を結合する。 pol y - T 基の変形例では、アミン修飾オリゴヌクレオチドによって、別の変形例では、アミノ基を付与された抗体を使用して、これを行うことができる。固体基板はまた、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの独立した参照マークを含む。

【 0 0 1 2 】

その後、緩衝液で $m\text{-RNA}$ 分子を表面にロードする。 $m\text{-RNA}$ 分子は官能化表面と相互作用し、表面の全領域にランダムに空間分布することになる。 $m\text{-RNA}$ 分子の空間密度または表面密度は、ロードする濃度によって制御することができる。

10

【 0 0 1 3 】

スペーサ単位、したがってさらには $m\text{-RNA}$ 分子は、基板上にランダムに分布していることが好ましい。分布密度は、濃度、温度、 pH 、および表面官能化によって制御することができる。好ましくは、試料は、表面に供給された後に浸透処理される。

【 0 0 1 4 】

工程(b)

組織試料を、すべての單一分子が配置された固体基板と接触させる。次に、5 ~ 50 塩基長の pol y T テールを、組織内の発現する $m\text{RNA}$ とハイブリダイズする。

20

【 0 0 1 5 】

工程(c)

任意選択で、例えば、DAP-I またはヘマトキシリソまたはエオシンで組織を染色し、視覚化することができる。また、参照マークの画像も撮影し、X-Y 位置を記録する。個々の單一分子それぞれの各配列を記録し、参照マークを基準とした空間位置を X-Y 距離として保存する。

【 0 0 1 6 】

試料を表面に供給した後、試料を染色して、参照マーカーを基準とした空間位置を取得することができる。任意選択で、試料の形態を決定できるように試料を染色する。

【 0 0 1 7 】

工程(d)

次に、酵素的または化学的に、例えばプロテイナーゼ K を用いて、組織を基板から除去する。その後、 $m\text{RNA}$ を有する單一分子をさらに cDNA に逆転写することができる。

30

【 0 0 1 8 】

次の工程として、二本鎖 DNA 分子が一本鎖オリゴヌクレオチドを形成するように、單一分子の結合した固体基板を変性させる。

【 0 0 1 9 】

任意選択で、試料の空間位置と配列決定されたローリングの空間位置とを参照マーカーの位置を基準として重ね合わせる。

【 0 0 2 0 】

工程(e)

ギャップを有する、種々の遺伝子を標的とするパドロックプローブを付加する。パドロックプローブは、遺伝子が発現していれば、別の $m\text{RNA}$ に結合することになる。その後、ギャップも逆転写され、ギャップの埋まったパドロックがライゲーションされて環状鑄型になる。次に、パドロックに対してローリングサークル增幅を実施する。

40

【 0 0 2 1 】

変形例では、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを少なくとも 1 つの一本鎖オリゴマーの相補的部分とハイブリダイズさせることにより、オリゴヌクレオチドの 5' 末端と 3' 末端との間にギャップを有するパドロック単位を作成し、パドロック単位のギャップを標的配列と相補的な核酸で埋め、それらをライゲーションして一本鎖の環状鑄型を生成することにより、本発明の方法を実施する。

【 0 0 2 2 】

50

別の変形例では、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを少なくとも 1 つの一本鎖オリゴマーの相補的部分とハイブリダイズさせ、オリゴヌクレオチドの 5' 末端と 3' 末端とをライゲーションして一本鎖の環状錆型を生成することにより、本発明の方法を実施する。この場合、少なくとも 1 つの一本鎖オリゴマーの相補的部分が標的配列を規定する。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、オリゴヌクレオチドは、ローリングサークル増幅が可能なポリメラーゼに対して少なくとも 1 つのプライマー配列を含む。代わりに、このオリゴヌクレオチドが、プライマー-オリゴヌクレオチドのライゲーションによるローリングサークル増幅が可能なポリメラーゼに対して少なくとも 1 つのプライマー配列を備えていてもよい。

【 0 0 2 4 】

別の変形例では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 つの異なるプライマー配列を備えているかまたは含み、これを使用すると、連続して配列決定ができ、互いに隣接する複数の口口ニーが蛍光する場合の光学的クラウディングを回避する効果がある。

【 0 0 2 5 】

基板上の各口口ニーの位置は、1 つ以上の第 2 の画像を撮影することにより組織の元の位置と相關させることができる。図 2 (A) は、組織および参照マーカーとともに第 1 の画像を撮影する方法を示している。図 2 (B) は、配列決定時に口口ニーおよび参照マーカーとともに第 2 の画像を撮影する方法を示している。

【 0 0 2 6 】

工程 (f) 20

最後に、シーケンシングプライマーを付加した後、ギャップの埋まったパドロックを配列決定し、各塩基を決定する。後に基板上の各口口ニーの位置を組織の元の位置と相關させることができる。これは、組織上の遺伝子の位置を決定でき、遺伝子に変異があるか否かを配列決定によって確認できることを意味する。

【 0 0 2 7 】

工程 (g)

好ましくは、配列決定情報は、sequencing by synthesis 法によって取得する。sequencing by synthesis は、続いて蛍光標識ヌクレオチドを口口ニーとハイブリダイズさせることにより実施する。この場合、ハイブリダイズした蛍光標識ヌクレオチドが検出可能な蛍光シグナルを提供する。

【 0 0 2 8 】

図 1 に示す、poly T テールを用いる変形例に基づく例示的なワークフロー：

- ・長鎖 poly T テールからなる同一のオリゴヌクレオチド（スペーサ単位）を官能化固体表面（例えば、標準カバーガラス 25 × 75 × 1 mm）にロードする（図 1、A）
- ・単一分子 poly T が、官能化表面にランダムに固定される。表面の上面図を図 2 に示す
- ・表面の単一分子の密度は濃度によって制御される
- ・単一分子は、互いに約 50 ~ 500 nm の最小距離を有し得る
- ・組織試料を、すべての単一分子が配置された固体基板と接触させる。次に、30 ~ 50 塩基長の poly T テールを、組織内の発現する mRNA とハイブリダイズする。（図 1、B）
- ・組織を染色（DAPI / ヘマトキシリン、エオシン）し、視覚化する。固体基板はまた、2 つの独立した参照マークを含む。また、参照マークの画像も撮影し、X - Y 位置を記録する。個々の単一分子それぞれの各配列を記録し、参照マークを基準とした空間位置を X - Y 距離として保存する。
- ・任意選択工程は、異なる蛍光色素結合抗体で周期的染色を実施して顕微鏡データを取得し、組織試料をさらに特性決定し、組織に発現するいくつかの異なるタンパク質を特定するものである。これにより、組織に関してより多くの考察が得られ、後にタンパク質情報を遺伝子発現および変異体の結果と比較することができる。
- ・次に、組織を基板から除去する。その後、mRNA を有する単一分子を cDNA に逆転

10

20

30

40

50

写する。（図 1、C）

・次の工程として、二本鎖 D N A 分子が一本鎖オリゴヌクレオチドを形成するように、単一分子の結合した固体基板を変性させる。（図 1、D）

・種々の遺伝子を標的とする、ギャップを有するパドロックプローブを付加する。パドロックプローブは、遺伝子が発現していれば、別の m R N A に結合することになる。（図 1、E）

・その後、ギャップも逆転写され、ギャップの埋まったパドロックがライゲーションされて環状鉄型になる。次に、パドロックに対してローリングサークル増幅を実施する。（図 1、E）

・最後に、シーケンシングプライマーを付加した後、ギャップの埋まったパドロックを配列決定し、各塩基を決定する。後に基板上の各ローニーの位置を組織の元の位置と相関させることができる。これは、組織上の遺伝子の位置を決定でき、遺伝子に変異があるか否かを配列決定によって確認できることを意味する。（図 1、F）

【0029】

図 3 に示す、m R N A のキャップ末端を捕捉する抗体を用いる変形例に基づく例示的なワークフロー：

・同一の抗体またはアプタマーを官能化固体表面（例えば、標準カバーガラス 25 × 75 × 1 mm）にロードする（図 3、A）

・抗体またはアプタマーが、官能化表面にランダムに固定される。表面の上面図を図 2 に示す

・表面の抗体またはアプタマーの密度は濃度によって制御される

・抗体またはアプタマーは、互いに約 50 ~ 500 nm の最小距離を有し得る

・組織試料を、すべての抗体またはアプタマーが配置された固体基板と接触させ、浸透処理後、固体表面に連結した抗体またはアプタマーによって 7 - メチル G が認識される

・組織を染色（D A P I / ヘマトキシリンまたはエオシン）し、視覚化する。固体基板はまた、2 つの独立した参照マークを含む。また、参照マークの画像も撮影し、X - Y 位置を記録する。個々の単一分子それぞれの各配列を記録し、参照マークを基準とした空間位置を X - Y 距離として保存する。

・任意選択工程は、異なる蛍光色素結合抗体で周期的染色を実施して顕微鏡データを取得し、組織試料をさらに特性決定し、組織に発現するいくつかの異なるタンパク質を特定するものである。これにより、組織に関してより多くの考察が得られ、後にタンパク質情報を遺伝子発現および変異体の結果と比較することができる。

・次に、組織を基板から除去する。（図 3、B）

・種々の遺伝子を標的とする、ギャップを有するパドロックプローブを付加する。パドロックプローブは、遺伝子が発現していれば、別の m R N A に結合することになる。（図 3、C）

・その後、ギャップも逆転写され、ギャップの埋まったパドロックがライゲーションされて環状鉄型になる。次に、パドロックに対してローリングサークル増幅を実施する。（図 3、D）

・最後に、シーケンシングプライマーを付加した後、ギャップの埋まったパドロックを配列決定し、各塩基を決定する。後に基板上の各ローニーの位置を組織の元の位置と相関させることができる。これは、組織上の遺伝子の位置を決定でき、遺伝子に変異があるか否かを配列決定によって確認できることを意味する。（図 3、E）

10

20

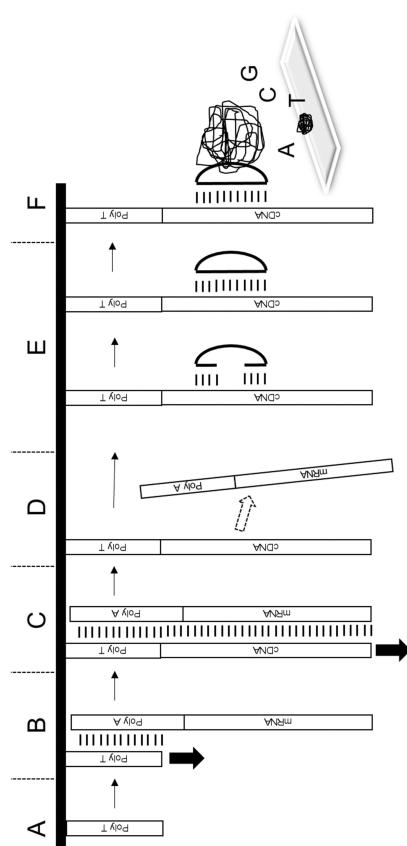
30

40

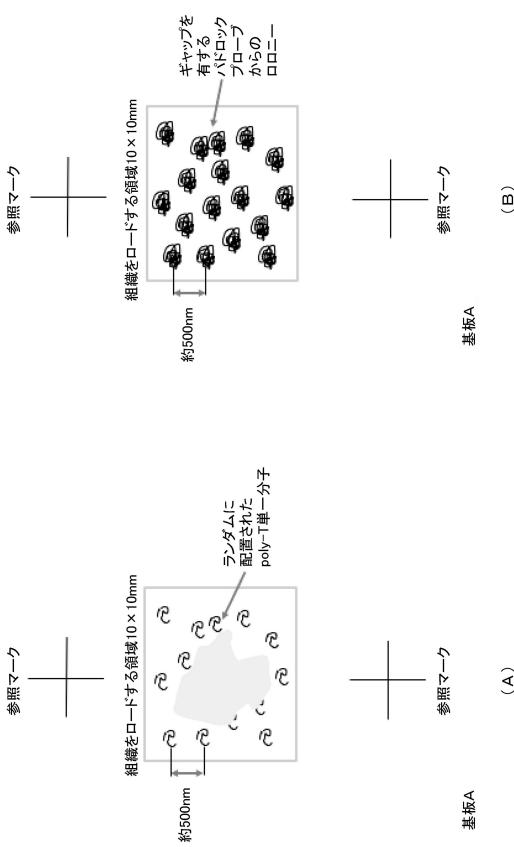
50

【図面】

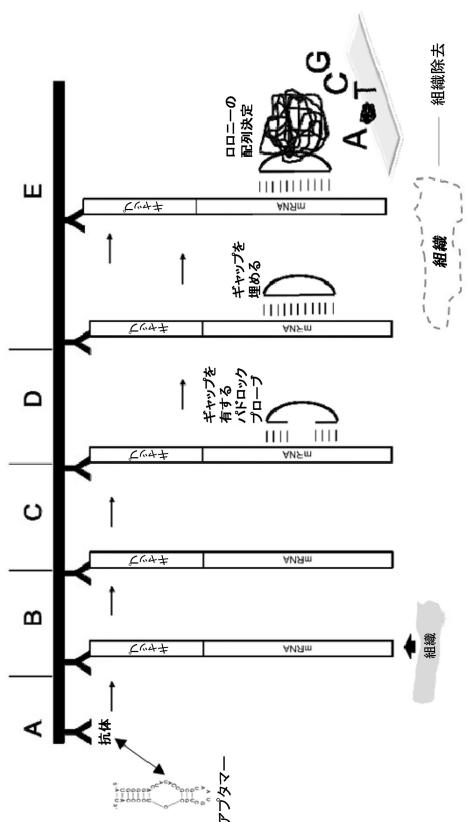
【図1】



【図2】



【図3】



【外國語明細書】

2023001092000004.pdf

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)
C 07K 16/00 (2006.01)	C 07K 16/00	
C 12N 15/115 (2010.01)	C 12N 15/115	Z
C 12N 15/12 (2006.01)	C 12N 15/12	
C 07K 17/00 (2006.01)	C 07K 17/00	
C 12N 15/29 (2006.01)	C 12N 15/29	

(74)代理人 100098501
弁理士 森田 拓
(74)代理人 100116403
弁理士 前川 純一
(74)代理人 100134315
弁理士 永島 秀郎
(74)代理人 100162880
弁理士 上島 類

(72)発明者 ハンスイユーリ マイアー
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ - エーバート - シュトラーセ 68
ケア・オブ ミルテニー バイオテック ベー.フェー. ウント コー. カー・ゲー
(72)発明者 ロバート ピナード
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ - エーバート - シュトラーセ 68
ケア・オブ ミルテニー バイオテック ベー.フェー. ウント コー. カー・ゲー

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA20 QQ02 QQ04 QQ07 QQ53 QR32 QR48 QR62
QS10 QS24 QS34 QS36 QS39
4H045 BA10 BA60 CA40 DA76 EA50 FA74