

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-529290
(P2024-529290A)

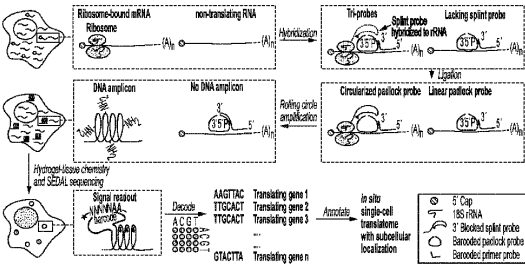
(43)公表日 令和6年8月6日(2024.8.6)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/00	C	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z	4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	C 0 7 K	16/40		4 C 0 8 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全109頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2024-500034(P2024-500034)		(71)出願人 515025398			
(86)(22)出願日 令和4年6月28日(2022.6.28)		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3月4日(2024.3.4)		コーポレーテッド			
(86)国際出願番号 PCT/US2022/035271		THE BROAD INSTITUTE			
(87)国際公開番号 WO2023/278409		, INC.			
(87)国際公開日 令和5年1月5日(2023.1.5)		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 63/216,315		2142、ケンブリッジ、メイン スト			
(32)優先日 令和3年6月29日(2021.6.29)		リート 415、ルーム 7003			
(33)優先権主張国・地域又は機関		415 Main Street, Roo			
		m 7003, Cambridge, M			
		assachusetts 02142			
(81)指定国・地域		United States of Am			
		erica			
		(71)出願人 596060697			
		マサチューセッツ インスティテュート			
		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 RNAの翻訳状態の単一細胞プロファイリング

(57)【要約】

本開示は、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングする、方法およびシステムを提供する。また、インタクトな組織内の細胞を包含する細胞において翻訳されているRNAのプロファイルに基づいて、対象における疾患または障害を診断する方法も本開示によって提供される。1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な候補作用物質をスクリーニングまたは試験する方法はまた、本開示によって提供される。本開示はまた、疾患または障害の処置を必要とする、対象における疾患または障害を処置する方法を提供する。本明細書において記載の方法を行うために有用であり得る、オリゴヌクレオチド部分を含むプローブのペアおよびプローブのセットはまた、本開示によって記載されている。追加的に、本開示は、本明細書において記載のプローブのいずれかを含むキットを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするための方法であって、方法は:

a)細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii)第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること;

b)第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d)1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e)ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定することを含む、方法。

【請求項 2】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

抗体が二次抗体である、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

細胞を、リボソームを認識し、かつ第2のプローブの二次抗体によって結合されることができる一次抗体と接触させることをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

一次抗体が、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体または抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、リボソーム内のrRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが、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、3

10

20

30

40

50

0、または30を超えるヌクレオチド長である、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが約25ヌクレオチド長である、請求項7～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

第2のプローブが重合ブロッカーをさらに含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

重合ブロッカーが第2のプローブの3'端に位置する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

重合ブロッカーが反転核酸残基を含む、請求項11または12に記載の方法。

【請求項14】

反転核酸残基が反転チミン残基である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

オリゴヌクレオチドバーコード配列が、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1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

オリゴヌクレオチドバーコード配列が、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1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

第1および第3のオリゴヌクレオチドプローブが、着目したRNAの異なる部分に相補的である、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

第1のプローブが、構造：

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[第1のバーコード配列]-[第3のプローブの部分に相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-3'

を含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、第1のプローブの5'端および3'端の間で分割されている、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、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1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、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1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分が、10～30、11～29、12～28、13～27、14～26、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21ヌクレオチド長である、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチド長である、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

第2のプローブが、構造：

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である、請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

リボソームを認識する第2のプローブの部分、および第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、ポリAヌクレオチドリンカーによって接合されている、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

ポリAヌクレオチドリンカーが、20～80、30～70、または40～60ヌクレオチド長である、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

ポリAヌクレオチドリンカーが約50ヌクレオチド長である、請求項29または30に記載の方法。

【請求項 32】

第3のプローブが、構造：

5'-[着目したRNA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1～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分が、10～30、11～29、12～28、13～27、14～26、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21ヌクレオチド長である、請求項1～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチド長である、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分が、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1～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分が、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1～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

翻訳されているRNAが、多数の細胞において同時にプロファイルされる、請求項1～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

翻訳されているRNAが、100を超える細胞、200を超える細胞、300を超える細胞、400を超える細胞、500を超える細胞、1000を超える細胞、10,000を超える細胞、20,000を超える細胞、30,000を超える細胞、40,000を超える細胞、または50,000を超える細胞において同時にプロファイルされる、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

細胞が、複数の細胞型を含む、請求項37または38に記載の方法。

【請求項 40】

細胞型が、幹細胞、前駆細胞、神経細胞、アストロサイト、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、間葉系細胞、上皮細胞、免疫細胞、肝細胞、平滑筋細胞および骨格筋細胞、造血細胞、リンパ球、単球、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、およびニューロンからなる群から選択される、請求項39に記載の方法。

10

【請求項 41】

細胞が、インタクトな組織内に存在する、請求項1～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

インタクトな組織が、固定化された組織サンプルである、請求項41に記載の方法。

【請求項 43】

組織が脳組織である、請求項41または42に記載の方法。

【請求項 44】

20

1を超える、2を超える、3を超える、4を超える、5を超える、10を超える、20を超える、30を超える、40を超える、50を超える、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、3000RNA、4000を超えるRNA、または5000を超えるRNAの翻訳が同時にプロファイルされる、請求項1～43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

第1のプローブの第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列が、着目したRNAを同定するために使用される遺伝子特異的配列である、請求項1～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

30

配列決定のステップが、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による配列決定(SEDAL)を行うことを含む、請求項1～45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

SEDALが、2回、3回、4回、5回、または5回を超えて行われる、請求項46に記載の方法。

【請求項 48】

ポリマーマトリックスがヒドロゲルである、請求項1～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

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、ナトリウムポリアクリレートヒドロゲル、アクリレートヒドロゲル、またはポリアクリルアミドヒドロゲルである、請求項48に記載の方法。

【請求項 50】

ローリングサークル増幅を行うステップが、アミン修飾ヌクレオチドを提供することをさらに含み、アミン修飾ヌクレオチドが、1以上のコンカテネートされたアンプリコンに組み込まれる、請求項1～49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

1以上のコンカテネートされた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以上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以上のコンカテネートされたアンプリコン

50

および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50に記載の方法。

【請求項52】

細胞内の追加の分子をプロファイリングすることをさらに含む、請求項1～51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

追加の分子が、非翻訳中のRNA、他の細胞内位置のRNA、タンパク質、脂質、または小分子である、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

1以上の細胞のRNA翻訳プロファイルを、様々な細胞型の細胞のRNA翻訳プロファイルを含む参照データと比較することによって、プロファイルされた細胞の細胞型、またはプロファイルされた多数の細胞の細胞型を決定することをさらに含む、請求項1～53のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項55】

1以上の細胞のRNA翻訳プロファイルを、様々な細胞状態の細胞のRNA翻訳プロファイルを含む参照データと比較することによって、プロファイルされた細胞の細胞状態、またはプロファイルされた多数の細胞の細胞状態を決定することをさらに含む、請求項1～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

細胞において1以上の遺伝子を過剰発現またはノックアウトして、1以上の遺伝子が着目したRNAの翻訳を調節することに関与しているかどうかを決定することをさらに含む、請求項1～55のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項57】

方法が、細胞内構造、細胞形態、および/または組織構成の空間情報を乱さない、請求項1～56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするための方法であって、方法は:

a)細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること;

b)第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

40

d)1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e)ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定することを含む、方法。

【請求項59】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質を含む、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくは

50

フラグメントを含む、請求項58または59に記載の方法。

【請求項61】

抗体が二次抗体である、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

細胞を、リボソームを認識し、かつ第2のプローブの二次抗体によって認識される一次抗体と接触させることをさらに含む、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

一次抗体が、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体または抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、リボソーム内のリボソームRNA(rRNA)の部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項58に記載の方法。

【請求項65】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが、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、または30を超えるヌクレオチド長である、請求項64または65に記載の方法。

【請求項67】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが約25ヌクレオチド長である、請求項64～66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、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58～67のいずれか一項に記載の方法。

【請求項69】

第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、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58～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項70】

第1のプローブが、構造：

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[バーコード配列]-3'

を含む、請求項58～69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

第2のプローブが、構造：

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含む、請求項58～70のいずれか一項に記載の方法。

【請求項72】

第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、着目したRNAを同定するために使用される遺伝子特異的配列である、請求項58～71のいずれか一項に記載の方法。

【請求項73】

対象における疾患または障害を診断するための方法であって、方法は：

a)対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；かつ

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補

10

20

30

40

50

的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること；

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること；

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと；ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定し、着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定して、細胞において翻訳されているRNAをプロファイルすること

を含み、

ここで、1以上の非疾患細胞と比べた、細胞のRNA翻訳プロファイルの差異は、対象が疾患または障害を有することを指し示す、方法。

【請求項 7 4】

対象における疾患または障害を診断するための方法であって、方法は：

a) 対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み；かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること；

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること；

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと；ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること

を含み、

ここで、1以上の非疾患細胞と比べた、細胞のRNA翻訳プロファイルの差異は、対象が疾患または障害を有することを指し示す、方法。

【請求項 7 5】

1以上の非疾患細胞において翻訳されているRNAが、対照実験として、対象から取り出された細胞と共にプロファイルされる、請求項73または74に記載の方法。

【請求項 7 6】

1以上の非疾患細胞において翻訳されているRNAのプロファイルが参照データを含む、請求項73または74に記載の方法。

【請求項 7 7】

10

20

30

40

50

疾患または障害が、遺伝性疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝臓疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液疾患、神経疾患、精神疾患、胃腸(GI)管疾患、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73～76のいずれか一項に記載の方法。

【請求項78】

細胞が組織に存在する、請求項73～77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項79】

組織が、上皮組織、結合組織、筋組織、または神経組織である、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

組織が脳組織である、請求項78または79に記載の方法。

【請求項81】

組織が、対象から取り出された組織サンプルである、請求項78～80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項82】

対象が非ヒト実験動物である、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

非ヒト実験動物が、マウス、ラット、イヌ、ブタ、または非ヒト霊長類である、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

対象がヒトである、請求項81に記載の方法。

【請求項85】

1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングする方法であって、方法は:

a) 候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること;

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定し、着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定して、細胞において翻訳されているRNAをプロファイルすること

を含み、

ここで、候補作用物質の非存在下と比べた、候補作用物質の存在下で翻訳されているRNAのプロファイルの差異は、候補作用物質が1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることを指し示す、方法。

【請求項86】

1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングするた

10

20

30

40

50

めの方法であって、方法は:

a) 候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること;

b) 第1のプローブの5'端および3'端を一緒にライゲーションして、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行い、第3のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞においてリボソームに結合した着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること

を含み、

ここで、候補作用物質の非存在下と比べた、候補作用物質の存在下で翻訳されているRNAのプロファイルの差異は、候補作用物質が1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることを指し示す、方法。

【請求項87】

候補作用物質が、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85または86に記載の方法。

【請求項88】

候補作用物質が、公知の薬物またはFDA承認薬物である、請求項85～87のいずれか一項に記載の方法。

【請求項89】

タンパク質が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントである、請求項87または88に記載の方法。

【請求項90】

核酸が、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA(dsRNA)、ショートヘアピン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87または88に記載の方法。

【請求項91】

RNA翻訳をモジュレートすることが、疾患または障害の症候を低減、緩和、または排除することに関連する、請求項85～90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

疾患または障害が、遺伝性疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝臓疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液疾患、神経疾患、精神疾患、胃腸(GI)管疾患、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

10

20

30

40

50

は心血管疾患である、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

対象における疾患または障害を処置するための方法であって、方法は：

a) 対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること；

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること；

d) 1以上のコンカテネートされた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コンカテネートされたアンプリコンを配列決定し、リボソームに結合した着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定して、細胞において翻訳されているRNAをプロファイルすること；ならびに

f) 1以上の非疾患細胞と比べて、細胞において翻訳されているRNAのプロファイルに差異が観察される場合、疾患または障害の処置を対象に投与することを含む、方法。

【請求項94】

対象における疾患または障害を処置するための方法であって、方法は：

a) 対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み；かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること；

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること；

d) 1以上のコンカテネートされた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コンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞においてリボソームに結合した着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること；ならびに

f) 1以上の非疾患細胞と比べて、細胞において翻訳されているRNAのプロファイルに差異が観察される場合、疾患または障害の処置を対象に投与すること

10

20

30

40

50

を含む、方法。

【請求項 95】

1以上の非疾患細胞における1以上のRNAの翻訳が、対照実験として、同時にプロファイルされる、請求項93または94に記載の方法。

【請求項 96】

1以上の非疾患細胞における1以上のRNAの翻訳のプロファイルが参照データを含む、請求項93または94に記載の方法。

【請求項 97】

処置が、治療作用物質、手術、または放射線療法を投与することを含む、請求項93～96のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

治療作用物質が、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93～97のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 99】

治療作用物質が、公知の薬物またはFDA承認薬物である、請求項93～98のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

タンパク質が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントである、請求項98または99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)、ショートヘアピン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または99に記載の方法。

【請求項 102】

疾患または障害が、遺伝性疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝臓疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液疾患、神経疾患、精神疾患、胃腸(GI)管疾患、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93～101のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 103】

第1のプローブおよび第2のプローブを含むプローブのペアであって、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

かつ

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

プローブのペア。

【請求項 104】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質を含む、請求項103に記載のプローブのペア。

【請求項 105】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントを含む、請求項103または104に記載のプローブのペア。

【請求項 106】

抗体が二次抗体である、請求項105に記載のプローブのペア。

【請求項 107】

二次抗体が、リボソームを認識し、かつそれに結合する一次抗体に結合する、請求項106に記載のプローブのペア。

【請求項 108】

一次抗体が、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体または抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である、請求項107に記載のプローブのペア。

10

20

30

40

50

【請求項 109】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、リボソーム内のrRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項103に記載のプローブのペア。

【請求項 110】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項109に記載のプローブのペア。

【請求項 111】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが、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、または30を超えるヌクレオチド長である、請求項109または110に記載のプローブのペア。

10

【請求項 112】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが約25ヌクレオチド長である、請求項109～111のいずれか一項に記載のプローブのペア。

【請求項 113】

第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、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103～112のいずれか一項に記載のプローブのペア。

【請求項 114】

第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、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103～113のいずれか一項に記載のプローブのペア。

20

【請求項 115】

第1のプローブが、構造：

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[バーコード配列]-3'

を含む、請求項103～114のいずれか一項に記載のプローブのペア。

【請求項 116】

第2のプローブが、構造：

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含む、請求項103～115のいずれか一項に記載のプローブのペア。

30

【請求項 117】

第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含むプローブのセットであって、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み；かつ

40

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

プローブのセット。

【請求項 118】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質を含む、請求項117に記載のプローブのセット。

【請求項 119】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくは

50

フラグメントを含む、請求項117または118に記載のプローブのセット。

【請求項120】

抗体が二次抗体である、請求項119に記載のプローブのセット。

【請求項121】

二次抗体が、リボソームを認識し、かつそれに結合する一次抗体に結合する、請求項120に記載のプローブのセット。

【請求項122】

一次抗体が、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体または抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である、請求項121に記載のプローブのセット。

【請求項123】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、リボソーム内のrRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項117に記載のプローブのセット。

【請求項124】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項123に記載のプローブのセット。

【請求項125】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが、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、または30を超えるヌクレオチド長である、請求項123または124に記載のプローブのセット。

【請求項126】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが約25ヌクレオチド長である、請求項123～125のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項127】

第2のプローブが重合ブロッカーをさらに含む、請求項117～126のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項128】

重合ブロッカーが第2のプローブの3'端に位置する、請求項127に記載のプローブのセット。

【請求項129】

重合ブロッカーが反転核酸残基を含む、請求項127または128に記載のプローブのセット。

【請求項130】

反転核酸残基が反転チミン残基である、請求項129に記載のプローブのセット。

【請求項131】

オリゴヌクレオチドバーコード配列が、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117～130のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項132】

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117～131のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項133】

第1および第3のオリゴヌクレオチドプローブが、着目したRNAの異なる部分に相補的である、請求項117～132のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項134】

第1のプローブが、構造：

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[第1のバーコード配列]-[第3のプローブの部分に相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-3'

を含む、請求項117～133のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項135】

10

20

30

40

50

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である、請求項117～134のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項136】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である、請求項117～135のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項137】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、第1のプローブの5'端および3'端の間で分割されている、請求項117～136のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項138】

第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、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117～137のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項139】

第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、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117～138のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項140】

着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分が、10～30、11～29、12～28、13～27、14～26、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21ヌクレオチド長である、請求項117～139のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項141】

着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチド長である、請求項117～140のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項142】

第2のプローブが、構造：

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含む、請求項117～141のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項143】

第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である、請求項117～142のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項144】

第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である、請求項117～143のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項145】

リボソームを認識する第2のプローブの部分、および第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、ポリAヌクレオチドリンカーによって接合されている、請求項117～144のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項146】

ポリAヌクレオチドリンカーが、20～80、30～70、または40～60ヌクレオチド長である、請求項145に記載のプローブのセット。

【請求項147】

ポリAヌクレオチドリンカーが約50ヌクレオチド長である、請求項145または146に記載のプローブのセット。

【請求項148】

10

20

30

40

50

第3のプローブが、構造:

5'-[着目したRNA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117~147のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項149】

着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分が、10~30、11~29、12~28、13~27、14~26、15~25、16~24、17~23、18~22、または19~21ヌクレオチド長である、請求項117~148のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項150】

着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチド長である、請求項117~149のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項151】

第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分が、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117~150のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項152】

第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分が、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117~151のいずれか一項に記載のプローブのセット。

【請求項153】

請求項103~116のいずれか一項に記載のプローブの多数のペアまたは請求項117~152のいずれか一項に記載のプローブの多数のセットを含む複数のプローブであって、プローブの各ペアまたはプローブのセットは、着目した異なるRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、複数のプローブ。

【請求項154】

請求項103~116のいずれか一項に記載のプローブのペアまたは請求項117~152のいずれか一項に記載のプローブのセットを含む、キット。

【請求項155】

請求項154に記載のキットであって、キットは、請求項103~116のいずれか一項に記載のプローブの多数のペアまたは請求項117~152のいずれか一項に記載のプローブの多数のセットを含み、かつプローブの各ペアまたはプローブの各セットは、着目した異なるRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、キット。

【請求項156】

細胞をさらに含む、請求項154または155に記載のキット。

【請求項157】

1以上の酵素をさらに含む、請求項154~156のいずれか一項に記載のキット。

【請求項158】

1以上の酵素がリガーゼを含む、請求項157に記載のキット。

【請求項159】

1以上の酵素がポリメラーゼを含む、請求項157または158に記載のキット。

【請求項160】

アミン修飾ヌクレオチドをさらに含む、請求項154~159のいずれか一項に記載のキット。

【請求項161】

ポリマーマトリックスを調製するための試薬およびモノマーをさらに含む、請求項154~160のいずれか一項に記載のキット。

【請求項162】

細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするためのシステムであって、

a) 細胞;

10

20

30

40

50

b) 第1のプローブおよび第2のプローブを含むプローブの1以上のペアであって、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

第1のプローブおよび第2のプローブを含むプローブの1以上のペア；

c) 顕微鏡；ならびに

d) コンピュータ

を含む、システム。

10

【請求項163】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質を含む、請求項162に記載のシステム。

【請求項164】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントを含む、請求項162または163に記載のシステム。

【請求項165】

抗体が二次抗体である、請求項164に記載のシステム。

【請求項166】

二次抗体が、リボソームを認識し、かつそれに結合する一次抗体に結合する、請求項165に記載のシステム。

20

【請求項167】

一次抗体が、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体または抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である、請求項166に記載のシステム。

【請求項168】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、リボソーム内のrRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項162に記載のシステム。

【請求項169】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項168に記載のシステム。

30

【請求項170】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが、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、または30を超えるヌクレオチド長である、請求項168または169に記載のシステム。

【請求項171】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが約25ヌクレオチド長である、請求項168～170のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項172】

第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、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162～171のいずれか一項に記載のシステム。

40

【請求項173】

第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、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162～172のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項174】

第1のプローブが、構造：

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[バーコード配列]-3'

を含む、請求項162～173のいずれか一項に記載のシステム。

50

【請求項 175】

第2のプローブが、構造：

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含む、請求項162～174のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 176】

細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするためのシステムであって、

a)細胞；

b)第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含むプローブの1以上のセットであって、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み；かつ

iii)第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含むプローブの1以上のセット；

c)顕微鏡；ならびに

d)コンピュータ

を含む、システム。

【請求項 177】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質を含む、請求項176に記載のシステム。

【請求項 178】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントを含む、請求項176または177に記載のシステム。

【請求項 179】

抗体が二次抗体である、請求項178に記載のシステム。

【請求項 180】

二次抗体が、リボソームを認識し、かつそれに結合する一次抗体に結合する、請求項179に記載のシステム。

【請求項 181】

一次抗体が、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体または抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である、請求項180に記載のシステム。

【請求項 182】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、リボソーム内のrRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項176に記載のシステム。

【請求項 183】

リボソームを認識する第2のプローブの部分が、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む、請求項182に記載のシステム。

【請求項 184】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが、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、または30を超えるヌクレオチド長である、請求項182または183に記載のシステム。

【請求項 185】

rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドが約25ヌクレオチド長である、請求項17

10

20

30

40

50

6～184のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項186】

第2のプローブが重合ブロッカーをさらに含む、請求項176～185のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項187】

重合ブロッカーが第2のプローブの3'端に位置する、請求項186に記載のシステム。

【請求項188】

重合ブロッカーが反転核酸残基を含む、請求項186または187に記載のシステム。

【請求項189】

反転核酸残基が反転チミン残基である、請求項188に記載のシステム。

10

【請求項190】

オリゴヌクレオチドバーコード配列が、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176～189のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項191】

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176～190のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項192】

第1および第3のオリゴヌクレオチドプローブが、着目したRNAの異なる部分に相補的である、請求項176～191のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項193】

20

第1のプローブが、構造：

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[第1のバーコード配列]-[第3のプローブの部分に相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-3'

を含む、請求項176～192のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項194】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である、請求項176～193のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項195】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である、請求項176～194のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項196】

第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、第1のプローブの5'端および3'端の間で分割されている、請求項176～195のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項197】

第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、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176～196のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項198】

40

第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分が、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176～197のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項199】

着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分が、10～30、11～29、12～28、13～27、14～26、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21ヌクレオチド長である、請求項176～198のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項200】

着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレ

50

オチド長である、請求項176～199のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項201】

第2のプローブが、構造：

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含む、請求項176～200のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項202】

第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である、請求項176～201のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項203】

第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である、請求項176～202のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項204】

リボソームを認識する第2のプローブの部分、および第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分が、ポリAヌクレオチドリンカーによって接合されている、請求項176～203のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項205】

ポリAヌクレオチドリンカーが、20～80、30～70、または40～60ヌクレオチド長である、請求項204に記載のシステム。

【請求項206】

ポリAヌクレオチドリンカーが約50ヌクレオチド長である、請求項204または205に記載のシステム。

【請求項207】

第3のプローブが、構造：

5'-[着目したRNA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176～206のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項208】

着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分が、10～30、11～29、12～28、13～27、14～26、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21ヌクレオチド長である、請求項176～207のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項209】

着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチド長である、請求項176～208のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項210】

第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分が、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176～209のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項211】

第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分が、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176～210のいずれか一項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる、2021年6月29日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/216,315号に対する、35U.S.C. § 119(e)に基づく優先権を主張す

10

20

30

40

50

る。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

単一細胞における転写プロファイルは、同じ細胞からのプロテオミクスプロファイルと常に相関するわけではない。このことは、まだ特徴付けられていないいくつかを包含する、タンパク質の産生および分解を調節するための様々な機序が転写後レベルで存在することを示唆する。したがって、mRNAレベルは、タンパク質の産生を推定するための不完全なプロキシであり、細胞の状態を定義する際に偏る可能性がある。単一細胞のプロテオームを直接定量化するための追加の方法は、細胞型および環境に対する細胞型特異的な応答を解釈するための、より機能的に関連する基盤を提供することができる。細胞におけるタンパク質の産生の正確な決定は、たくさんの生理学的状態の研究、または様々な疾患の処置、ならびに薬物開発においても有用であるだろう。したがって、単一細胞におけるタンパク質の産生を正確に定量化するための、追加のより良好なシステムが必要とされている。

10

【発明の概要】

【0003】

発明の概要

*in situ*リボソームプロファイリング(すなわち、能動的に翻訳されている着目したRNAのプロファイリング)のための方法、組成物、キット、およびシステムが本明細書において記載されている。そのようなシステムは、能動的に翻訳されるmRNAを定量化/プロファイリングすることによって、細胞のトランスクリプトームおよびプロテオームの間のギャップを埋めるために不可欠な技術を表す。単一細胞のプロテオームの推定として、*in situ*でRNAの翻訳状態の特異的かつハイスループットな特徴付けを達成するために、近接ライゲーションに基づく戦略が本明細書において記載されている。本システムは、リボソームが結合したmRNA分子にアニーリングした対応するプローブの配列を認識する、オリゴヌクレオチドプローブにコンジュゲートしたリボソームを認識する作用物質を利用する(図1)。簡潔には、本システムは、着目したmRNA内の標的配列を同定するために、ユニークな分子状バーコードを含むプローブまたはプローブのセットを利用する。その後、リボソームは、リボソームの部分に相補的なプライマーのオリゴヌクレオチド配列部分によって、またはDNAプライマーにコンジュゲートした二次抗体が結合したリボソーム特異的一次抗体によって結合される。リボソームの部分に相補的なオリゴヌクレオチド配列、または二次抗体にコンジュゲートした(および、このようにして、リボソームに結合した)DNAプライマーは、プローブにライゲーションされる。プローブをプライマーとして使用して、着目したmRNAはローリングサークル増幅によって増幅されて、測定可能な配列シグナルを生産する。追加的に、抗体は、空間情報を提供するために、抗体染色を介して検出可能である。リボソームを標識し、かつ着目したmRNAを位置付けることによって、能動的に翻訳されるmRNAの精密な空間情報は、健康および疾患の両方における翻訳の時空間パターンを理解するための重要な読出しである、高度に選択的なRNA-リボソーム共局在化の手段によって抽出されることできる。リボソームおよびmRNAの間の相互作用はプローブ付けされて、着目したmRNAの翻訳を決定することができる。

20

30

40

【0004】

このようにして、一態様では、本開示は、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングする方法を提供する(例えば、図1、図3、および図6を参照)。本明細書において開示の方法では、細胞は、本明細書においてさらに記載され、かつリボソームによって能動的に翻訳されているRNAを増幅(例を挙げれば、ローリングサークル増幅によって)するために使用され得る、1以上のプローブのペアまたはプローブのセットと接触させられ得、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成する。次いで、1以上のコンカテネートされたアンプリコンはポリマーマトリックスに埋め込まれ、配列決定されて(例を挙げれば、本明細書においてさらに記載されているようなSEAL配列決定(動的アニ

50

ーリングおよびライゲーションによるエラー低減(Error-reduction by Dynamic Annealing and Ligation)による配列決定によって)、転写産物のアイデンティティおよびポリマーマトリックス内のそれらの位置を決定し得る。着目した転写産物の位置を使用して、細胞において翻訳されているRNAはプロファイルされ得、時空間情報が得られて、翻訳位置およびタイミングが健康および疾患における細胞機能にどのように影響するかについての当該分野の理解を向上する。方法は、例えば、疾患および健常な組織サンプルからの細胞(または多数の細胞)におけるRNA翻訳を比較するため;または、例えば、作用物質で処理された細胞および未処理細胞におけるRNA翻訳を比較するために有用であり得る。

【0005】

重要なことに、本明細書において記載の方法は、翻訳中のmRNA分子をプロファイリングするための2種のプローブまたは3種のプローブを包含し得る。各方法は翻訳中のmRNA分子をプロファイリングするために有用であるが、3プローブ法はより良好なシグナル対ノイズ比を生成することが実証されている。

【0006】

いくつかの実施形態では、本開示は、以下のステップ:

a)細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること;

b)第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d)1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e)ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定することを含む、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするための2プローブ法を提供する。

【0007】

いくつかの実施形態では、本開示は、以下のステップ:

a)細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii)第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること;

b) 第1のプロープの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプロープをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと; ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること

を含む、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするための3プロープ法を提供する。

10

【0008】

本明細書において記載の方法、組成物、およびシステムは、組織(例を挙げれば、発達中の組織、正常組織、疾患組織)におけるRNA翻訳を研究するため、様々な疾患を診断および処置するため、リサーチ目的のため、および薬物発見のために有用であり得る。このようにして、一態様では、本開示は、対象における疾患または障害(例を挙げれば、がん)を診断する方法を提供する。例えば、本明細書において記載の翻訳されているRNAをプロファイリングする方法は、対象(例を挙げれば、疾患もしくは障害を有すると考えられるか、または疾患もしくは障害を有するリスクがある対象、あるいは健常であるか、または健常であると考えられる対象)から取り出された細胞または多数の細胞に対して行われ得る。次いで、細胞における着目した様々なRNAの発現は、非疾患細胞または非疾患組織サンプルからの細胞(例を挙げれば、健常な個体からの細胞、または健常な個体の集団からの多数の細胞)における着目した同じRNAの発現と比較されることができる。1以上の非疾患細胞と比べた、細胞のRNA翻訳プロファイル(着目した単一RNAまたは多数のRNAのもの、例を挙げれば、特異的な疾患シグネチャを包含する)の差異はいずれも、対象が疾患または障害を有することを指し示し得る。1以上の非疾患細胞(例を挙げれば、正常細胞)におけるRNA翻訳は、対照実験としての疾患細胞における発現と共にプロファイルされ得る。1以上の非疾患細胞(例を挙げれば、正常細胞)におけるRNA翻訳はまた、前もってプロファイルされ得、疾患細胞における発現は、非疾患細胞に対するこの参照データと比較され得る。

20

30

【0009】

別の態様では、本開示は、着目した1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングする方法を提供する。例えば、本明細書において記載の翻訳されているRNAをプロファイリングする方法は、1以上の候補作用物質の存在下で細胞において行われ得る。次いで、細胞(例を挙げれば、正常細胞または疾患細胞)において翻訳されている着目した様々なRNAの発現は、1以上の候補作用物質に曝露されなかった細胞における着目した同じRNAの発現と比較されることができる。候補作用物質(複数可)に曝露されなかった細胞における翻訳と比べた、RNA翻訳プロファイルの何らかの差異は、着目した1以上のRNAの翻訳(または潜在的に転写)が候補作用物質(複数可)によってモジュレートされることを指し示し得る。いくつかの実施形態では、疾患の処置に関連することが知られている特定の(例を挙げれば、翻訳されている着目した多数のRNAの)シグネチャが使用されて、所望の様式で翻訳をモジュレートし、このようにして疾患を処置することが可能な他の作用物質を同定し得る。本明細書において記載の方法はまた、例えば、1以上の細胞が候補作用物質または公知の薬物で処理される場合に特異的なRNA翻訳シグネチャを探すことによって、ある特有の副作用を有する薬物を同定するために使用され得る。本明細書において記載の方法はまた、細胞の翻訳およびタンパク質の産生の基本的な生物学を研究するために有用であり得る、リサーチ試薬または化学プロープを同定するために使用され得る。

40

【0010】

別の態様では、本開示は、対象における疾患または障害(例を挙げれば、がん)を処置す

50

る方法を提供する。例えば、本明細書において記載の翻訳されているRNAをプロファイリングする方法は、対象(例を挙げれば、疾患もしくは障害を有すると考えられるか、または疾患もしくは障害を有するリスクがある対象)から取り出されたサンプルからの細胞において行われ得る。次いで、細胞において翻訳されている1以上のRNAのプロファイルは、非疾患組織サンプルからの細胞における着目した同じRNAの翻訳状態と比較されることができる。次いで、非疾患細胞と比べてRNA翻訳プロファイルに何らかの差異が観察される場合、疾患または障害の処置が対象に投与され得る。1以上の非疾患細胞におけるRNA翻訳は、対照実験としての疾患細胞におけるRNA翻訳と共にプロファイルされ得る。1以上の非疾患細胞(例を挙げれば、正常細胞)におけるRNA翻訳はまた、前もってプロファイルされ得、疾患細胞における翻訳は、非疾患細胞に対するこの参照データと比較され得る。

10

【0011】

一態様では、本開示は、第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)および第2のプローブ(本明細書において「プライマー」プローブとも称される)を含むプローブのペアを提供し、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む。

20

【0012】

別の態様では、本開示は、第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)、第2のプローブ(本明細書において「スプリントプローブ」または「ブロックされたプローブ」とも称される)、および第3のプローブ(本明細書において「プライマープローブ」とも称される)を含むオリゴヌクレオチドプローブのセットを提供し、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

30

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である。

【0013】

別の態様では、本開示は、キット(例を挙げれば、本明細書において開示のプローブのペアまたはセットのいずれかを含むキット)を提供する。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書において記載されているように、プローブの多数のペアまたはセットを含み、それらの各々は、翻訳されている着目した特有のRNAを同定するために使用されることができる。本明細書において記載のキットはまた、細胞、リガーゼおよび/またはポリメラーゼなどの酵素、アミン修飾ヌクレオチド、一次抗体、二次抗体、緩衝液、試薬(染料、染色剤等を包含する)、およびポリマーマトリックス(例を挙げれば、ポリアクリルアミドマトリックス)を作製するためのモノマーを包含するがこれらに限定されない、本明細書において記載の方法を行うのに有用なあらゆる他の試薬またはコンポーネントを包含し得る。

40

【0014】

別の態様では、本開示は、細胞におけるRNA翻訳をプロファイリングするシステムを提供する。いくつかの実施形態では、そのようなシステムは、以下を含む:

a) 細胞;

50

b) 第1のプローブおよび第2のプローブを含むプローブの1以上のペアであって、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

第1のプローブおよび第2のプローブを含むプローブの1以上のペア；

c) 顕微鏡；ならびに

d) コンピュータ。

いくつかの実施形態では、そのようなシステムは、以下を含む：

a) 細胞；

b) 第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含むプローブの1以上のセットであって、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、第1プローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み；かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含むプローブの1以上のセット；

c) 顕微鏡；ならびに

d) コンピュータ。

【0015】

本明細書において記載のプローブ(すなわち、プローブのペアまたはプローブのセット)のいずれも、本開示によって企図されているシステムで使用され得る。

【0016】

前述の概念、および後述する追加の概念は、本開示がこの点で限定されないため、あらゆる適切な組合せで配置され得ることが了解されるべきである。さらに、本開示の他の利点および新規な特徴は、添付の図と併せて考慮すると、様々な非限定的な実施形態の以下の詳細な説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

以下の図面は、本明細書のパートを形成し、かつ本明細書において提示されている特有の実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1以上を参照することによって、よりよく理解されることができる、本開示のある特有の態様をさらに実証するために包含されている。

【0018】

【図1】 図1は、in situでRNA翻訳を特徴付け/プロファイリングする方法の概略図である。DNAがコンジュゲートした二次抗体が使用されて、近接して同じRNAに係属するパドロックプローブを認識し、それらの増幅を可能にする。各パドロックプローブは、RNA部位のアイデンティティをコードするユニークなバーコードを含有する。バーコード情報はローリングサークル増幅によって増幅され、SEDAL in situ配列決定によってデコードされる。

【0019】

【図2A-2B】 図2A-図2Dは、in situでのRNA翻訳の単一細胞プロファイリングの

10

20

30

40

50

画像である。図2Aは、図2B(一次抗体なし)、図2C(コンジュゲートしたDNAなしの二次抗体)、および図2D(二次抗体なし)の陰性対照と比較した、能動的に転写されたベータ-アクチン(ACTB)RNAの検出を示す。

【図2C-2D】図2A-図2Dは、in situでのRNA翻訳の単一細胞プロファイリングの画像である。図2Aは、図2B(一次抗体なし)、図2C(コンジュゲートしたDNAなしの二次抗体)、および図2D(二次抗体なし)の陰性対照と比較した、能動的に転写されたベータ-アクチン(ACTB)RNAの検出を示す。

【0020】

【図3】図3は、リボソーム抗体および3パートDNAプローブを使用したin situリボソームプロファイリング法の概略図である。DNAがコンジュゲートした二次抗体が使用されて、近接して同じRNAに係属するパドロックプローブを認識し、ライゲーションを可能にする。各パドロックプローブは、RNA部位のアイデンティティをコードするユニークなバーコードを含有する。バーコード配列はローリングサークル増幅によって増幅されて、最適に測定可能なシグナルを生産する。方法は、細胞内小器官(例を挙げれば、小胞体およびミトコンドリア)を標識するための免疫蛍光染色に適合する。

10

【0021】

【図4A-4B】図4A-図4Cは、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体を使用したりリボソームタンパク質抗体に基づくin situリボソームプロファイリングの画像である。図4Aは、ACTBについてのin situリボソームプロファイリングシグナルを示す。図4Bは、抗RPS3抗体の代わりにIgGを使用した陰性対照のリボソームプロファイリングシグナルを示す。図4Cは、非コードRNA転移関連肺腺癌転写産物1(MALAT1)についてのin situリボソームプロファイリングシグナルを示す。

20

【図4C】図4A-図4Cは、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体を使用したりリボソームタンパク質抗体に基づくin situリボソームプロファイリングの画像である。図4Aは、ACTBについてのin situリボソームプロファイリングシグナルを示す。図4Bは、抗RPS3抗体の代わりにIgGを使用した陰性対照のリボソームプロファイリングシグナルを示す。図4Cは、非コードRNA転移関連肺腺癌転写産物1(MALAT1)についてのin situリボソームプロファイリングシグナルを示す。

【0022】

【図5A-5B】図5A-図5Cは、抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体を使用したりリボソームタンパク質抗体に基づくin situリボソームプロファイリングの画像である。図5Aは、ACTBについてのin situリボソームプロファイリングシグナルを示す。図5Bは、抗RPL4抗体の代わりにIgGを使用した陰性対照のリボソームプロファイリングシグナルを示す。

30

【図5C】図5A-図5Cは、抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体を使用したりリボソームタンパク質抗体に基づくin situリボソームプロファイリングの画像である。図5Cは、非コードRNA MALAT1についてのin situリボソームプロファイリングシグナルを示す。

【0023】

【図6】図6は、rRNAおよびmRNAにハイブリダイズする3パートDNAプローブを使用したin situリボソームプロファイリング法の概略図である。rRNAハイブリダイゼーションプローブが使用されて、近接して同じRNAに係属するパドロックプローブを認識し、ライゲーションを可能にする。各パドロックプローブは、RNA部位のアイデンティティをコードするユニークなバーコードを含有する。バーコード情報はローリングサークル増幅によって増幅され、SEDAL in situ配列決定によってデコードされる。方法は、細胞内小器官(例を挙げれば、小胞体およびミトコンドリア)を標識するための免疫蛍光染色に適合する。

40

【0024】

【図7A-7B】図7A-図7Cは、rRNAがハイブリダイズしたプローブに基づくin situリボソームプロファイリング法の画像である。図7Aは、ACTBについてのin situリボ

50

ソームプロファイリングシグナルを示す。図7Bは、リボソーム内のrRNAにハイブリダイズする部分を含まないプローブを使用した陰性対照のリボソームプロファイリングシグナルを示す。

【図7C】図7A-図7Cは、rRNAがハイブリダイズしたプローブに基づくin situリボソームプロファイリング法の画像である。図7Cは、非コードRNA MALAT1についてのin situリボソームプロファイリングシグナルを示す。

【0025】

【図8】図8は、本明細書において記載のRNAプロファイリング法に有用な例示的プローブの詳細な設計を示す。

【0026】

【図9A】図9A-図9Jは、細胞以下の分解能でのmRNA翻訳のin situプロファイリングのためのRIBOmapを示す。図9Aは、RIBOmapの概略図を提供する。サンプル(細胞株または組織サンプル)が調製された後、バーコードが付いたパドロックプローブおよびプライマーのペアが標的化された細胞内RNAにハイブリダイズされ、スプリントプローブが18S rRNAを介してリボソームにハイブリダイズされる。スプリントプローブは、パドロックプローブを環状化するために、近接ライゲーションの鋳型として使用される。スプリントプローブは、ローリングサークル増幅RCA中にその伸長をブロックするために、3'反転dT修飾物を用いて設計される。次いで、インタクトなパドロックプローブは増幅されることができて、in situでアミン修飾DNAアンプリコンを作出する。次に、これらのDNAアンプリコンは、in situマッピングのために、組織-ヒドロゲル化学を介してヒドロゲルに共重合される。次いで、cDNAアンプリコンの遺伝子特異的識別子配列(標識された「バーコード」)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(SEDAL)による環状in situ配列決定によって読み出されることができる。

【図9B-9C】図9A-図9Jは、細胞以下の分解能でのmRNA翻訳のin situプロファイリングのためのRIBOmapを示す。図9Bは、トリプローブ戦略の例を示す。(左)トリプローブサンプルの蛍光画像は、HeLa細胞におけるACTB mRNAのRIBOmapシグナルを示す。(中央)プライマーまたはスプリントプローブなしの陰性対照サンプルの蛍光画像は、最小のDNAアンプリコンシグナルを示す。(右)rRNAハイブリダイゼーションセグメントなしのスプリントプローブを使用した対照サンプルの蛍光画像は、DNAアンプリコンシグナルを示さない。スケールバー、10 μ m。図9Cは、図9Bにおいて、DAPIシグナルに対して正規化されたDNAアンプリコンシグナル強度の定量化を示す。エラーバー、標準偏差。1条件あたりn=3画像。スチューデントのt検定、**P<0.01。

【図9D-9E】図9A-図9Jは、細胞以下の分解能でのmRNA翻訳のin situプロファイリングのためのRIBOmapを示す。図9Dは、mRNA(ACTB)および非コードRNA(MALAT1およびvtRNA1-1)を標的化することによって、RIBOmapシグナルの検証の概略的表現を提供する。図9Eは、STARmapによるRNAの検出結果およびRIBOmapによるRNAの翻訳の検出結果を示す蛍光画像を提供する。スケールバー、10 μ m。

【図9F-9G】図9A-図9Jは、細胞以下の分解能でのmRNA翻訳のin situプロファイリングのためのRIBOmapを示す。図9Fは、図9Eに示されるDAPIシグナルに対して正規化されたDNAアンプリコンシグナル強度の定量化を示す。エラーバー、標準偏差。1条件あたりn=3画像。スチューデントのt検定、****P<0.0001。図9Gは、ハリングトニンによる翻訳調節の概略図を提供する。

【図9H-9I】図9A-図9Jは、細胞以下の分解能でのmRNA翻訳のin situプロファイリングのためのRIBOmapを示す。図9Hは、ACTB mRNAの異なる部位を標的化する3ペアのSNAILプローブを示す。プローブペア1は開始コドンの近くである一方、プローブペア2およびプローブペア3は、それぞれCDS領域において開始コドンの115ntおよび405nt下流にある。図9Iは、ハリングトニン処理前後のHeLa細胞におけるACTB mRNAの異なる領域を標的化した3セットのプローブのRIBOmapシグナルを示す蛍光画像を提供する。スケールバー、10 μ m。

【図9J】図9A-図9Jは、細胞以下の分解能でのmRNA翻訳のin situプロファイリン

10

20

30

40

50

グのためのRIBOmapを示す。図9Jは、図9Iに示されるDAPIシグナルに対して正規化されたRIBOmapシグナル強度の定量化を示す。エラーバー、標準偏差。1条件あたりn=3画像。スチューデントのt検定、**P<0.01。

【0027】

【図10A】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Aは、局在化したmRNA翻訳を測定するためのHeLa/FUCCI細胞におけるRIBOmap検出の概略図を提供する。RIBOmapはリボソームが結合したmRNAシグナルを読み出し、STARmapは標的化されたRNAを検出する。細胞小器官染色は手順において組み合わせられて、核、ERおよび細胞形態を可視化した。

10

【図10B-10C】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Bは、HeLa細胞におけるFUCCI蛍光シグナル、cDNAアンプリコン、および細胞小器官染色シグナルの同時マッピングを示す代表的な画像を提供する。左、RIBOmap(上)およびSTARmap(下)についての細胞のFUCCI蛍光イメージング結果。蛍光シグナルは、HeLa細胞の細胞周期段階を指し示す。中央、代表的な細胞のズームインビューを伴う981個の遺伝子についての第1の配列決定サイクルの最大強度投影(MAX)、および6配列決定サイクルにわたる代表的な細胞の単一フレームビューを示す代表的な画像。右:代表的な細胞の細胞小器官染色シグナルのズームインビュー。ERのコンカナバリリンA(ConA)のAlexa Fluor 594コンジュゲート染色、細胞形態のフラミンゴ蛍光染色、および核のDAPI染色は、提供される凡例により示される。図10Cは、STARmap(左上)およびRIBOmap(右上)測定用の41個の細胞周期マーカー遺伝子の単一細胞発現プロファイルを使用して決定された細胞周期段階クラスターの拡散マップ埋込みを、単量体Kusabira-Orange 2(mKO2)-hCDT1および単量体Azami-Green(mAG)-hGEN FUCCI細胞周期マーカー(STARmap、左下;RIBOmap、右下)の対応する単一細胞タンパク質蛍光プロファイルと共に示す。

20

【図10D】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Dは、981個の測定された遺伝子にわたる細胞間変動のペアワイズピアソンの相関係数を示す単一細胞トランスラトーム共変動マトリックスを示し、それらの平均発現レベルと一緒に示されている。5つの強く関連する遺伝子のモジュールが、マトリックス中の灰色のボックスによって指し示され、それらの2つ(モジュール3および5)は、右側に拡大されている。翻訳複合体に関与し、かつ細胞周期マーカーとして同定された遺伝子は、拡大されたマトリックスに注釈付けられている。

30

【図10E】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Eは、RIBOmapの結果(左)およびSTARmapの結果(右)において、2個の遺伝子のリードが同じ細胞の半径3umの球内に共存する傾向がある程度を記載する、ペアワイズ共局在化p値のマトリックスを示し、これらの遺伝子の発現レベルと一緒に示されている。STARmapマトリックスは、RIBOmapマトリックスと同じ順序の遺伝子を使用する。5つの強く関連する遺伝子のモジュールが、マトリックス中の灰色のボックスによって指し示されている。

40

【図10F】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Fは、5つの遺伝子モジュールの各々における最も有意に濃縮されたGOターム(最大3)を可視化する棒プロットを示す。

【図10G】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Gは、遺伝子モジュール3および遺伝子モジュール4の拡大されたマトリックスを示す。

【図10H-10J】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Hは、ER画像に重ねられた、モジュール3およびモジュール4遺伝子のRIBOmapシグナルの空間分布を示す。画像は、遺伝子ドットおよびERシグナルのMAXである。図10Iは、モジュール3遺伝子、モジュ

50

ール4遺伝子、および検出されたすべての遺伝子のER局在化パーセンテージの定量化を示す。ウィルコクソンの符号順位検定、**** $P < 0.0001$ 。図10Jは、空間パラメータ距離比(DR)の計算を示すダイアグラムを提供する。

【図10K】図10A-図10Kは、RIBOmapがヒトHeLa細胞において981個の遺伝子の細胞内翻訳を同時に測定することを示す。図10Kは、 m^6A 遺伝子および非 m^6A 遺伝子について、リボソームが結合したRNAのDR値およびRNAのDR値のバイオリンプロットを提供する。ウィルコクソンの符号順位検定、**** $P < 0.0001$ 。

【0028】

【図11A】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Aは、RIBOmap用の標的化されたマウス冠状片側脳領域(ボックスでマークされている)のダイアグラムを提供する。

10

【図11B】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Bは、マウス冠状片側脳スライスにおいて、RIBOmapによる5,413個の遺伝子の局在化した翻訳の測定を示す代表的な画像を提供する。(左)5,413個の遺伝子の第1の配列決定ラウンドの最大強度投影、5つすべてのチャンネルを同時に示す。四角、ズームイン領域。(中央)第1の配列決定ラウンドのMAXビューを示す、3つの細胞のズームインビュー。(右)9配列決定ラウンドにわたる単一のzフレームにおけるアンプリコンの空間的配置を示す、3つの細胞のズームインビュー。

【図11C】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Cは、対応する遺伝子の発現パターンを示す、Allen Brain ISH画像と比較した3個の細胞型マーカー遺伝子のRIBOmap画像を提供する。

20

【図11D】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Dは、マウス冠状片側脳から回収された62,753個の細胞の翻訳プロファイルの一樣多様体の近似および投影(Uniform Manifold Approximation and Projection)(UMAP)プロットの可視化を示す。Leidenクラスタリングを使用して、57個の細胞型が同定された。

【図11E】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Eは、代表的な空間細胞型アトラスを提供する。(左)画像化された冠状マウス脳スライスの異なる脳領域を強調する概略図。(中央)図11Dと同じコードを使用した、画像化された冠状片側脳領域における代表的な空間細胞型アトラス。スケールバー、500 μm 。(右)異なる細胞型および間隙を示す、海馬およびCA1領域のズームイン切片。スケールバー、200 μm 。

30

【図11F-11G】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Fは、海馬ニューロンの細胞体および突起を示す、海馬スライスのスキームを提供する。図11Gは、細胞体リードならびに神経およびグリア突起リードを示す、CA1領域の切片を示す。スケールバー、50 μm 。

【図11H-11I】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Hは、5,413個の遺伝子のRIBOmap測定における個々の遺伝子の突起リードパーセンテージを示し、遺伝子は、それらの突起リードパーセンテージに基づいたランク順である。9個の例の遺伝子が挿入図に標識された。図11Iは、突起で濃縮された翻訳遺伝子について、上位10個の有意に濃縮されたGOタームを示す。

40

【図11J-11K】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11Jは、細胞体で濃縮された翻訳遺伝子について、上位10個の有意に濃縮されたGOタームを示す。図11K-図11Lは、細胞体リードおよび突起リードを示す、海馬領域における例の突起で濃縮された翻訳遺伝子(図11K)および細胞体で濃縮された翻訳遺伝子(図11L)の空間翻訳マップを示す

50

す。

【図11L】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11K-図11Lは、細胞体リードおよび突起リードを示す、海馬領域における例の突起で濃縮された翻訳遺伝子(図11K)および細胞体で濃縮された翻訳遺伝子(図11L)の空間翻訳マップを示す。

【図11M-11N】図11A-図11Nは、マウス脳における5,413個の遺伝子の空間分解された単一細胞トランスラトームプロファイリングを示す。図11M-図11Nは、細胞体リードおよび突起リードを示す、海馬領域における突起で濃縮された翻訳遺伝子(M)および細胞体で濃縮された翻訳遺伝子(N)のグリア細胞マーカー遺伝子の例の空間翻訳マップを示す。

【0029】

【図12A-12C】図12A-図12Fは、抗体に基づくRIBOmap戦略の例を示す。図12Aは、スプリントプローブがコンジュゲートしたプロテインA/G調製のための合成スキームを提供する。図12Bは、HeLa細胞におけるACTB mRNAの抗リボソームタンパク質S3(RPS3)抗体に基づくRIBOmapシグナルを示す。RPS3抗体は、リボソームの小ユニットのRPS3タンパク質に結合し、プロテインA/Gがコンジュゲートしたスプリントプローブを翻訳中のmRNAに連れていく。次いで、翻訳中のmRNAに対して標的化されたパドロックプローブは、ライゲーションおよび増幅されて、in situでアミン修飾DNAアンプリコンを作出することができる。図12Cは、HeLa細胞におけるACTB mRNAの抗リボソームタンパク質L4(RPL4)抗体に基づくRIBOmapシグナルを示す。

【図12D-12E】図12A-図12Fは、抗体に基づくRIBOmap戦略の例を示す。図12Dは、HeLa細胞におけるACTB mRNAの、IgG対照の抗体に基づくRIBOmapシグナルを示す。図12Eは、図12B-図12Dにおいて、DAPIに対して正規化された抗体支援のRIBOmapシグナル強度の定量化を示す。エラーバー、標準偏差。1条件あたりn=3画像。スチューデントのt検定、**P<0.01、***P<0.001。

【図12F】図12A-図12Fは、抗体に基づくRIBOmap戦略の例を示す。図12Fは、rRNAプローブに基づくRIBOmap戦略および抗体に基づくRIBOmap戦略のシグナル対ノイズ比の定量比較を示す。エラーバー、標準偏差。1条件あたりn=3画像。スチューデントのt検定、**P<0.01。

【0030】

【図13A】図13A~13Bは、細胞周期関連バリエーションのトランスクリプトームおよびトランスラトーム詳細分析を示す。図13Aは、細胞周期段階クラスター埋込みでの細胞周期マーカー遺伝子の発現を示す。

【図13B】図13A~13Bは、細胞周期関連バリエーションのトランスクリプトームおよびトランスラトーム詳細分析を示す。図13Bは、細胞周期段階クラスター埋込みでの細胞周期マーカー遺伝子の翻訳を示す。

【0031】

【図14A-14B】図14A-図14Fは、単一細胞トランスラトームの共変動分析を示す。図14Aは、単一細胞トランスラトーム共変動マトリックスにおいて同定された5つのモジュールの各々における上位3個の有意に濃縮されたGOタームを示す。図14B-図14Dは、単一細胞トランスラトーム共変動マトリックスにおいて同定された拡大モジュール1(図14B)、モジュール2(図14C)、およびモジュール4(図14D)を示す。

【図14C-14D】図14A-図14Fは、単一細胞トランスラトームの共変動分析を示す。図14B-図14Dは、単一細胞トランスラトーム共変動マトリックスにおいて同定された拡大モジュール1(図14B)、モジュール2(図14C)、およびモジュール4(図14D)を示す。

【図14E-14F】図14A-図14Fは、単一細胞トランスラトームの共変動分析を示す。図14Eは、遺伝子モジュール3(G2Mマーカー遺伝子)および遺伝子モジュール5(G1Sマーカー遺伝子)の間の相関を示すズームインビューを提供する。図14Fは、細胞周期マーカー遺伝子モジュールおよび翻訳機構遺伝子モジュールの間の相関を示すズームイン

10

20

30

40

50

ビューを提供する。

【0032】

【図15A】図15A－図15Fは、共局在化した遺伝子モジュールのタンパク質-タンパク質相互作用分析および空間分布を示す。図15Aは、モジュール3(左)およびモジュール4(右)における遺伝子のStringタンパク質ネットワーク分析を示す。

【図15B】図15A－図15Fは、共局在化した遺伝子モジュールのタンパク質-タンパク質相互作用分析および空間分布を示す。図15Bは、リボソームが結合したRNAの細胞内共局在化マトリックスにおける拡大されたモジュール1(左)、モジュール2(右上)、およびモジュール5(右下)を示す。

【図15C】図15A－図15Fは、共局在化した遺伝子モジュールのタンパク質-タンパク質相互作用分析および空間分布を示す。図15Cは、モジュール1(上)、モジュール2(中央)、およびモジュール5(下)における遺伝子のStringタンパク質ネットワーク分析を示す。

10

【図15D－15E】図15A－図15Fは、共局在化した遺伝子モジュールのタンパク質-タンパク質相互作用分析および空間分布を示す。図15Dは、ER画像に重ねられた、モジュール1、モジュール2、およびモジュール5遺伝子のRIBOmapシグナルの空間分布を示す。図15Eは、モジュール1遺伝子、モジュール2遺伝子、モジュール5遺伝子、および検出されたすべての遺伝子のER局在化パーセンテージの定量化を示す。ウィルコクソンの符号順位検定、*** $P < 0.0001$ 。

【図15F】図15A－図15Fは、共局在化した遺伝子モジュールのタンパク質-タンパク質相互作用分析および空間分布を示す。図15Fは、共変動分析の階層的クラスタリングマトリックスの共局在化ペアワイズ相関p値を示す。

20

【0033】

【図16A】図16A－図16Cは、in situハイブリダイゼーションおよび免疫蛍光を用いたRIBOmap測定の相互検証を示す。図16Aは、対応する遺伝子の発現パターンを示す、Allen Brain ISH画像と比較した6個の例の細胞マーカー遺伝子のRIBOmap画像を提供する。

【図16B】図16A－図16Cは、in situハイブリダイゼーションおよび免疫蛍光を用いたRIBOmap測定の相互検証を示す。図16B－図16Cは、Sst(図16B)およびNefl(図16C)の、RIBOmapから得られた翻訳プロファイル、Allen Brain Atlasからのin situハイブリダイゼーション(ISH)データ、およびHPA Brain Atlasからの抗体に基づく免疫蛍光(IF)プロファイリングを示す。

30

【図16C】図16A－図16Cは、in situハイブリダイゼーションおよび免疫蛍光を用いたRIBOmap測定の相互検証を示す。図16B－図16Cは、Sst(図16B)およびNefl(図16C)の、RIBOmapから得られた翻訳プロファイル、Allen Brain Atlasからのin situハイブリダイゼーション(ISH)データ、およびHPA Brain Atlasからの抗体に基づく免疫蛍光(IF)プロファイリングを示す。

【0034】

【図17A】図17A－図17Bは、RIBOmapのマウス脳データの品質管理および細胞型マーカーの発現レベルを示す。図17Aは、RIBOmapのマウス脳データセットの対数変換後の各細胞における転写産物および遺伝子の数を示すヒストグラムを提供する。縦線は、絶対偏差の中央値(MAD)によって推定されたフィルタリング閾値を表す。

40

【図17B】図17A－図17Bは、RIBOmapのマウス脳データの品質管理および細胞型マーカーの発現レベルを示す。図17Bは、RIBOmapのデータセットにおけるマウス脳の主要な細胞型についてのカノニカルマーカーの発現レベルを示すUMAPを提供する。

【0035】

【図18A】図18A－図18Dは、単一細胞翻訳プロファイリングに基づく細胞型クラスタリングを示す。図18Aは、レベル1～3の細胞クラスタリングを示す、細胞型の階層的分類法を示す。

【図18B－18C】図18A－図18Dは、単一細胞翻訳プロファイリングに基づく細胞

50

型クラスタリングを示す。図18Bは、細胞を神経細胞およびグリア細胞に分類するためのレベル1クラスタリングの一樣多様体の近似および投影(UMAP)プロットの可視化を提供する。図18Cは、細胞を興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞、ミクログリア、および血管細胞に分類するためのレベル2クラスタリングのUMAPプロットの可視化を提供する。

【図18D】図18A-図18Dは、単一細胞翻訳プロファイリングに基づく細胞型クラスタリングを示す。図18Dは、レベル2クラスタリングで同定された細胞型とアラインメントした代表的なマーカーの遺伝子発現ヒートマップを提供する。各遺伝子の発現は、各細胞のすべての遺伝子にわたってzスコア付けされる。

【0036】

【図19A】図19A-図19Cは、興奮性ニューロンの遺伝子発現および空間マップを提供する。図19Aは、興奮性ニューロンサブタイプとアラインメントした代表的なマーカーの遺伝子発現ヒートマップを提供する。各遺伝子の発現は、各細胞のすべての遺伝子にわたってzスコア付けされる。

【図19B】図19A-図19Cは、興奮性ニューロンの遺伝子発現および空間マップを提供する。図19Bは、21個の興奮性ニューロンサブタイプのUMAPプロットの可視化を示す。

【図19C】図19A-図19Cは、興奮性ニューロンの遺伝子発現および空間マップを提供する。図19Cは、皮質および海馬領域における空間細胞マップを示すズームインビューを伴う、画像化された冠状片側脳領域における興奮性ニューロンサブタイプの空間細胞マップを提供する。

【0037】

【図20A】図20A-図20Cは、抑制性ニューロンの遺伝子発現および空間マップを提供する。図20Aは、抑制性ニューロンサブタイプとアラインメントした代表的なマーカーの遺伝子発現ヒートマップを提供する。各遺伝子の発現は、各細胞のすべての遺伝子にわたってzスコア付けされる。

【図20B】図20A-図20Cは、抑制性ニューロンの遺伝子発現および空間マップを提供する。図20Bは、18個の抑制性ニューロンサブタイプのUMAPプロットの可視化を示す。

【図20C】図20A-図20Cは、抑制性ニューロンの遺伝子発現および空間マップを提供する。図20Cは、皮質および線条体領域における空間細胞マップを示すズームインビューを伴う、画像化された冠状片側脳領域における抑制性ニューロンサブタイプの空間細胞マップを示す。

【0038】

【図21A】図21A-図21Cは、グリア細胞の遺伝子発現および空間マップを提供する。図21Aは、グリア細胞サブタイプとアラインメントした代表的なマーカーの遺伝子発現ヒートマップを提供する。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21B】図21A-図21Cは、グリア細胞の遺伝子発現および空間マップを提供する。図21Bは、18個のグリア細胞サブタイプのUMAPプロットの可視化を示す。

【図21C】図21A-図21Cは、グリア細胞の遺伝子発現および空間マップを提供する。図21Cは、皮質および海馬領域における空間細胞マップを示すズームインビューを伴う、画像化された冠状片側脳領域におけるグリア細胞サブタイプの空間細胞マップを提供する。

【0039】

【図22A】図22A-図22Dは、突起で濃縮された翻訳遺伝子の例の空間マップを提供する。図22A-図22Bは、海馬領域における、突起で濃縮された翻訳遺伝子(図22A)および細胞体で濃縮された翻訳遺伝子(図22B)の追加の例の翻訳空間マップを示す。細胞体リードおよび突起リードが示されている。

【図22B】図22A-図22Dは、突起で濃縮された翻訳遺伝子の例の空間マップを提供

10

20

30

40

50

する。図22A-図22Bは、海馬領域における、突起で濃縮された翻訳遺伝子(図22A)および細胞体で濃縮された翻訳遺伝子(図22B)の追加の例の翻訳空間マップを示す。細胞体リードおよび突起リードが示されている。

【図22C】図22A-図22Dは、突起で濃縮された翻訳遺伝子の例の空間マップを提供する。図22C-図22Dは、海馬領域における、突起で濃縮された翻訳遺伝子(図22C)および細胞体で濃縮された翻訳遺伝子(図22D)の追加のグリア細胞マーカー遺伝子の例の翻訳空間マップを提供する。細胞体リードおよび突起リードが示されている。

【図22C】図22A-図22Dは、突起で濃縮された翻訳遺伝子の例の空間マップを提供する。図22C-図22Dは、海馬領域における、突起で濃縮された翻訳遺伝子(図22C)および細胞体で濃縮された翻訳遺伝子(図22D)の追加のグリア細胞マーカー遺伝子の例の翻訳空間マップを提供する。細胞体リードおよび突起リードが示されている。

10

【0040】

定義

別様に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術および科学用語は、この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、この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)。本明細書において使用される場合、以下の用語は、別様に指定されない限り、それらに帰する意味を有する。

20

【0041】

「投与する(administer)」、「投与すること(administering)」、または「投与(administration)」という用語は、処置もしくは治療用作用物質、または処置もしくは治療用作用物質の組成物を対象内または対象上にはめ込む、吸収する、摂取する、注射する、吸入する、または別様に導入することを指す。

【0042】

本明細書において使用される「アンプリコン」という用語は、増幅反応(すなわち、遺伝的フラグメントまたは標的配列の1以上のコピーの生成)または複製反応の産物である核酸(例を挙げれば、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、人工的に形成されることができる。「コンカテネートされたアンプリコン」という用語は、一緒に接合されて単一の核酸分子を形成する、多数のアンプリコンを指す。コンカテネートされたアンプリコンは、例えば、環状オリゴヌクレオチドが増幅されて、コンカテネートされた多数のアンプリコンを含む単一核酸分子としてオリゴヌクレオチドの多数の線状コピーを生成する、ローリングサークル増幅(RCA)によって形成されることができる。

30

【0043】

「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、それぞれ2個の大きい重鎖および2個の小さい軽鎖を有する基本構造ユニットで作製される。いくつかの異なるタイプの抗体重鎖、およびいくつかの異なる種類の抗体が存在し、それらはそれらがどの重鎖を保有するかに基づいて、異なるアイソタイプと一緒にグループ化される。5つの異なる抗体アイソタイプ(IgG、IgA、IgE、IgD、およびIgMが哺乳動物において知られており、これらは異なる役割を果たし、遭遇する異物の異なる各タイプに対して適切な免疫応答を導くのを助ける。本明細書において使用される「抗体」という用語はまた、抗体フラグメントおよびナノボディ、ならびに抗体のバリエーションならびに抗体フラグメントおよびナノボディのバリエーションを網羅する。いくつかの実施形態では、抗体は、疾患または障害(例を挙げれば、対象から取り出された細胞において翻訳されているRNAのプロファイルの変化に関連するもの)の処置と

40

50

して投与される。いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書において記載されているように、オリゴヌクレオチドプローブにコンジュゲートされている。ある特定の実施形態では、抗体はリボソームに結合する(例を挙げれば、抗体は、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体または抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である)。

【0044】

「がん」(本明細書において記載の方法を使用して、研究され、特徴付けされ、診断され、および/または処置され得るがんを包含する)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、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。例を挙げれば、Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensyl ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990を参照されたい。がんは増殖性疾患の一例である。例示的ながんは、聴神経腫; 腺癌; 副腎がん; 肛門がん; 血管肉腫(例を挙げれば、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、血管肉腫); 虫垂がん; 良性単クローン性ガンマグロブリン血症; 胆管がん(例を挙げれば、胆管癌); 膀胱がん; 乳房がん(例を挙げれば、乳房の腺癌、乳房の乳頭癌、乳がん、乳房の髄様癌); 脳のがん(例を挙げれば、髄膜腫、グリア芽腫、神経膠腫(例を挙げれば、星状細胞腫、乏突起膠腫)、髄芽腫); 気管支がん; カルチノイド腫瘍; 子宮頸がん(例を挙げれば、子宮頸部腺癌); 絨毛癌; 脊索腫; 頭蓋咽頭腫; 結腸直腸がん(例を挙げれば、結腸がん、直腸がん、結腸直腸腺癌); 結合組織がん; 上皮癌; 上皮腫; 内皮肉腫(例を挙げれば、カボジ肉腫、多発性特発性出血性肉腫); 子宮内膜がん(例を挙げれば、子宮がん、子宮肉腫); 食道がん(例を挙げれば、食道の腺癌、バレット腺癌); ユーイング肉腫; 眼がん(例を挙げれば、眼内黒色腫、網膜芽腫); よく知られている過好酸球増加症; 胆嚢がん; 胃がん(例を挙げれば、胃腺癌); 消化管間質腫瘍(GIST); 生殖細胞がん; 頭頸部がん(例を挙げれば、頭頸部扁平上皮癌、口腔がん(例を挙げれば、口腔扁平上皮癌)、喉のがん(例を挙げれば、喉頭がん(laryngeal cancer、pharyngeal cancer)、上咽頭がん、中咽頭がん)); 造血性がん(例を挙げれば、急性リンパ性白血病(ALL)(例を挙げれば、B細胞ALL、T細胞ALL)、急性骨髄性白血病(AML)(例を挙げれば、B細胞AML、T細胞AML)、慢性骨髄性白血病(CML)(例を挙げれば、B細胞CML、T細胞CML)および慢性リンパ性白血病(CLL)(例を挙げれば、B細胞CLL、T細胞CLL)などの白血病); ホジキンリンパ腫(HL)(例を挙げれば、B細胞HL、T細胞HL)および非ホジキンリンパ腫(NHL)(例を挙げれば、びまん性大細胞型リンパ腫(DLCL)などのB細胞NHL)(例を挙げれば、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/小リンパ性リンパ腫(CLL/SLL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、辺縁帯B細胞リンパ腫(例を挙げれば、粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾辺縁帯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、Waldenstrom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)リンパ腫などのリンパ腫; および前駆Tリンパ芽球性リンパ腫/白血病などのT細胞NHL、末梢性T細胞リンパ腫(PTCL)(例を挙げれば、皮膚性T細胞リンパ腫(CTCL)(例を挙げれば、菌状息肉症、セザリー症候群)、血管免疫芽細胞性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、皮下脂肪織炎様T細胞リンパ腫、および未分化大細胞型リンパ腫); 上記の1以上の白血病/リンパ腫の混合; および多発性骨髄腫(MM)、重鎖病(例を挙げれば、アルファ鎖病、ガンマ鎖病、ミュー鎖病); 血管芽細胞腫; 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(例を挙げれば、腎芽腫、別名、ウィリムス腫瘍、腎細胞癌); 肝臓がん(例を挙げれば、肝細胞がん(HCC)、悪性肝細胞腫); 肺がん(例を挙げれば、気管支原性癌、小細胞肺がん(SCLC)、非小細胞肺がん(NSCLC)、肺の腺癌); 平滑筋肉腫(LMS); 肥満細胞症(例を挙げれば、全身性肥満細胞症); 筋肉のがん; 骨髄異形成症候群(MDS); 中皮腫; 骨髄増殖性疾患(MPD)(例を挙げれば、真性赤血球増加症(PV)、本態性血小板増加症(ET)、原発性骨髄線維症(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)); 神経芽腫; 神経線維腫(例を挙げれば、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(例を挙げれば、膵消化管神経内分泌

10

20

30

40

50

腫瘍(GEP-NET)、カルチノイド腫瘍);骨肉腫(例を挙げれば、骨がん);卵巣がん(例を挙げれば、嚢胞腺癌、卵巣胎児性癌、卵巣腺癌);乳頭腺癌;膵臓がん(例を挙げれば、膵臓腺癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)、膵島腫瘍);陰茎がん(例を挙げれば、陰茎および陰嚢のパジェット病);松果体腫;原始神経外胚葉性腫瘍(PNT);形質細胞腫;腫瘍随伴症候群;上皮内新生物;前立腺がん(例を挙げれば、前立腺腺癌);直腸がん;横紋筋肉腫;唾液腺がん;皮膚がん(例を挙げれば、扁平上皮癌(SCC)、角化棘細胞腫(KA)、黒色腫、基底細胞癌(BCC));小腸(small bowel)がん(例を挙げれば、虫垂がん);軟部肉腫(例を挙げれば、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(small intestine)がん;汗腺癌;滑膜腫;精巣がん(例を挙げれば、セミノーマ、精巣胎児性癌);甲状腺がん(例を挙げれば、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;および外陰部がん(例を挙げれば、外陰部のパジェット病)を包含するが、これらに限定されない。

10

【0045】

「細胞」は、本明細書において使用される場合、細胞の集団中に(例を挙げれば、組織、サンプル、生検、器官、またはオルガノイド中に)存在し得る。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、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ための細胞は、生物、生物に由来する単一細胞型、または細胞型の混合物内に存在することができる。天然に存在する細胞および細胞集団、遺伝的に操作された細胞株、トランスジェニック動物由来の細胞、対象からの細胞等が包含される。実質的にあらゆる細胞型およびサイズが、本明細書において記載の方法およびシステムにおいて順応されることができる。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物細胞(例を挙げれば、天然に存在する組織などの複雑な細胞集団)である。いくつかの実施形態では、細胞はヒト由来である。ある特定の実施形態では、細胞は、生検などの医療手順を通して対象(例を挙げれば、ヒト)から回収される。代替的に、細胞は培養された集団(例を挙げれば、複雑な集団に由来する培養物、または細胞が多数の系統に分化した単一の細胞型に由来する培養物)であり得る。細胞はまた、組織サンプル中にin situで提供され得る。

20

【0046】

本開示の方法での使用が企図されている細胞型は、幹および前駆細胞(例を挙げれば、胚性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経堤細胞等)、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞および骨格筋細胞、間葉系細胞、上皮細胞、造血細胞、T細胞などのリンパ球(例を挙げれば、Th1 T細胞、Th2 T細胞、Th0 T細胞、細胞傷害性T細胞)およびB細胞(例を挙げれば、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、ならびに特定の器官(例を挙げれば、胸腺、内分泌腺、膵臓、脳、ニューロン、グリア、アストロサイト、デンドロサイト、およびそれらの遺伝的に修飾された細胞)に關与する細胞を包含するが、これらに限定されない。細胞はまた、異なるタイプの形質転換細胞または新生物細胞(例を挙げれば、異なる細胞起源の癌、異なる細胞型のリンパ腫等)またはいずれかの種類のがん性細胞(例を挙げれば、本明細書において開示のがんのいずれかからのもの)であり得る。異なる起源(例を挙げれば、外胚葉、中胚葉、および内胚葉)の細胞はまた、本開示の方法での使用が企図されている。いくつかの実施形態では、細胞は、ミクログリア、アストロサイト、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。いくつかの実施形態では、多数の細胞型の細胞は、同じサンプル内に存在する。

30

40

【0047】

「相補的」という用語は、本明細書において、互いに水素結合する塩基を含む2個のオリゴヌクレオチド配列(例を挙げれば、DNAまたはRNA)を指すために使用される。2個のオリゴヌクレオチド配列間の相補性の程度は、完全な相補性から相補性なしまで変動することができる。例えば、2個のオリゴヌクレオチド配列は、互いに部分的にのみ相補的であり得る(例を挙げれば、本明細書において記載のプロープにおいて、プロープの部分のみが、別のプロープまたは着目したRNAに相補的である)。2個のオリゴヌクレオチド配列は、例を挙げれば、互いに70%以上相補的、互いに75%以上相補的、互いに80%

50

以上相補的、互いに85%以上相補的、互いに90%以上相補的、互いに95%以上相補的、互いに96%以上相補的、互いに97%以上相補的、互いに98%以上相補的、互いに99%以上相補的、または互いに100%相補的であり得る。

【0048】

「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」という用語は、DNAおよびRNA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以上のヌクレオチドのあらゆる鎖を意味する。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、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等を改善するために、塩基モイエティ、糖モイエティ、またはリン酸骨格で修飾されることができる。

10

【0049】

「タンパク質」、「ペプチド」、または「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって一緒に連結されたアミノ酸残基のポリマーを含む。用語は、あらゆるサイズ、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アミノ酸長である。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体を指し得る。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、当技術分野で知られている非天然アミノ酸(すなわち、天然には生じないが、ポリペプチド鎖に組み込まれることができる化合物)および/またはアミノ酸類似体が代替的に用いられ得る。また、タンパク質における1以上のアミノ酸は、例えば、炭水化物基、ヒドロキシル基、ホスファート基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、コンジュゲーションもしくは官能化のためのリンカー、または他の修飾などの化学的実体の付加によって修飾され得る。タンパク質はまた、単一分子であり得るか、または複数分子の複合体であり得る。タンパク質は、天然に存在するタンパク質のフラグメントまたはペプチドであり得る。タンパク質は、天然に存在する、組換え、合成、またはこれらのあらゆる組合せであり得る。タンパク質はまた、疾患または障害の処置として投与される治療用タンパク質であり得る(例を挙げれば、対象から取り出された細胞において翻訳されているRNAのプロファイルの変化に関連するもの)。ある特定の実施形態では、タンパク質は抗体である。

20

【0050】

「転写産物」または「RNA転写産物」は、DNA配列のRNAポリメラーゼが触媒する転写の結果生じる産物である。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称されるか、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配列であり得、成熟RNAと称される。「メッセンジャーRNA(mRNA)」は、イントロンがなく、細胞によってポリペプチドに翻訳されることができるRNAを指す。「cRNA」は、組換えcDNA鋳型から転写された相補的なRNAを指す。「cDNA」は、mRNA鋳型に相補的であり、かつmRNA鋳型に由来するDNAを指す。

30

【0051】

「サンプル」または「生物学的サンプル」という用語は、組織サンプル(組織切片、外科的生検、および組織の針生検など);細胞サンプル(例を挙げれば、細胞学的スメア(Papまたは血液スメアなど)または顕微解剖によって得られる細胞のサンプル);または細胞画分、フラグメント、もしくは細胞小器官(細胞を溶解し、そのコンポーネントを遠心分離または別様により分離することによって得られるなど)を包含するあらゆるサンプルを指す。生物学的サンプルの他の例は、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(例を挙げれば、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(頬側スワブなど)、または第1の生物学的サンプルに由来する生体分子を含有するあらゆる材料を包含するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、生物学的サンプルは、対象から取り出された外科的生検、例えば、本明細書において記載の組織のいずれかの生検である。ある特定の実施形態では、生物学的サンプルは腫瘍生検(例を挙げれば、がんと診断されたか、がんを有すると疑われるか

40

50

、またはがんを有すると考えられる対象からの)である。いくつかの実施形態では、腫瘍生検は、直接の研究のために原発腫瘍細胞および組織を捕捉する。いくつかの実施形態では、液体生検は、血液または他の体液(CNS液、リンパ等)から従来の方法(例を挙げれば、FACS、親和性捕捉等)を介して捕捉および/または選別された腫瘍細胞で使用されることができる。いくつかの実施形態では、サンプルは脳組織である。いくつかの実施形態では、組織は心臓(cardiac)組織である。いくつかの実施形態では、組織は筋肉組織である。

【0052】

「小分子」という用語は、天然に存在するか人工的に創出された(例を挙げれば、化学合成を介して)かにかかわらず、比較的低い分子量を有する分子を指す。典型的には、小分子は有機化合物(例を挙げれば、それは炭素を含有する)である。小分子は、多数の炭素-炭素結合、立体中心、および他の官能基(例を挙げれば、アミン、ヒドロキシル、カルボニル、および複素環等)を含有し得る。ある特定の実施形態では、小分子の分子量は、約1,000g/mol以下、約900g/mol以下、約800g/mol以下、約700g/mol以下、約600g/mol以下、約500g/mol以下、約400g/mol以下、約300g/mol以下、約200g/mol以下、または約100g/mol以下である。ある特定の実施形態では、小分子の分子量は、少なくとも約100g/mol、少なくとも約200g/mol、少なくとも約300g/mol、少なくとも約400g/mol、少なくとも約500g/mol、少なくとも約600g/mol、少なくとも約700g/mol、少なくとも約800g/mol、少なくとも約900g/mol、または少なくとも約1,000g/molである。上記範囲の組合せ(例を挙げれば、少なくとも約200g/molかつ約500g/mol以下)もまた可能である。ある特定の実施形態では、小分子は、薬物(例を挙げれば、米国食品医薬品局によって承認された分子)などの治療上活性な作用物質である。小分子はまた、1以上の金属原子および/または金属イオンと錯体形成され得る。好ましい小分子は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおいて生物学的効果を生成するという点で生物学的に活性である。ある特定の実施形態では、小分子は薬物である。好ましくは、必ずしもそうとは限らないが、薬物は、適切な政府機関または規制機関によってヒトまたは動物における使用のために既に安全かつ有効であるとみなされているものである。

【0053】

投与が企図されている「対象」は、ヒト(すなわち、あらゆる年齢群の男女、例を挙げれば、小児対象(例を挙げれば、乳児、小児、または青年)または成人対象(例を挙げれば、若年成人、中年成人、または高齢者))または非ヒト動物を指す。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は哺乳動物(例を挙げれば、霊長類(例を挙げれば、カニクイザルまたはアカゲザル)またはマウス)である。「ペイシエント」という用語は、疾患の処置を必要とする対象を指す。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、ペイシエントはヒトである。ヒトは、いずれかの発達段階の男または女であり得る。疾患または障害の処置を「必要とする」対象またはペイシエントは、限定されないが、疾患または障害の何らかのリスク因子または症候を呈するものを包含する。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト実験動物(例を挙げれば、マウス、ラット、イヌ、または非ヒト霊長類)である。

【0054】

処置または治療用作用物質の「治療有効量」は、症状の処置において治療上の利益を提供するか、または症状に関連する1以上の症候を遅延もしくは最小化するために十分な量である。治療有効量の処置または治療用作用物質は、単独でまたは他の治療と組み合わせ、症状の処置において治療上の利益を提供する治療の量を意味する。「治療有効量」という用語は、治療全体を改善し、症候、徴候、または症状の原因を低減または回避し、および/または別の治療用作用物質の治療有効性を増強する量を網羅することができる。

【0055】

本明細書において使用される場合、「組織」は、同じ起源からの細胞およびそれらの細胞外マトリックスのグループである。一緒にすると、細胞は特有の機能を実行する。多数

の組織型の会合は、一緒になって器官を形成する。細胞は、異なる細胞型であり得る。いくつかの実施形態では、組織は上皮組織である。上皮組織は、器官表面(例を挙げれば、皮膚、気道、軟性器官、生殖管の表面、および消化管の内側)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、排出、および吸収にも関与する。上皮組織の例は、単層扁平上皮、重層扁平上皮、単層立方上皮、移行上皮、偽重層上皮、円柱上皮、および腺上皮を包含するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、組織は結合組織である。結合組織は、非生体物質(例を挙げれば、細胞外マトリックス)によって分離された細胞からなる線維性組織である。結合組織は、器官に形状を提供し、器官を適所に保持する。結合組織は、線維性結合組織、骨格結合組織、および流動性結合組織を包含する。結合組織の例は、血液、骨、腱、靱帯、脂肪、および疎性結合組織を包含するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、組織は筋組織である。筋組織は、筋細胞から形成される活動性収縮組織である。筋肉組織は、力を生成し、運動を引き起こすように機能する。筋肉組織は、平滑筋(例を挙げれば、器官の内側に見出されるような)、骨格筋(例を挙げれば、典型的には骨に付着したような)、および心筋(例を挙げれば、心臓に見出されるような、生物全体に血液を送り出すために収縮する)を包含する。いくつかの実施形態では、組織は神経組織である。神経組織は、中枢神経系および末梢神経系を含む細胞を包含する。神経組織は、脳、脊髄、脳神経、および脊髄神経(例を挙げれば、運動ニューロン)を形成する。ある特定の実施形態では、組織は脳組織である。ある特定の実施形態では、組織は胎盤組織である。いくつかの実施形態では、組織は心臓組織である。

10

20

【0056】

「トランスラトーム」という用語は、特定の細胞または生物における、すべてのオープンリーディングフレーム(すなわち、開始および停止コドンの間に入るDNA配列)を指す。いくつかの実施形態では、本明細書において提供の方法、プローブ、およびキットは、トランスラトームを研究および/またはプロファイリングするために有用である。

【0057】

「処置」、「処置する」、および「処置すること」という用語は、本明細書において記載の疾患(例を挙げれば、がん)の発症を逆転させる、軽減する、遅延させる、または進行を阻害することを指す。いくつかの実施形態では、処置は、疾患の1以上の徴候または症候が発症した後または観察された後(例を挙げれば、予防的に(本明細書にさらに記載され得るように)、または疾患の疑いもしくはリスクを受けて)に投与され得る。他の実施形態では、処置は、疾患の徴候または症候の非存在下で投与され得る。例えば、処置は、症候の発症前に(例を挙げれば、対象または対象の家族メンバーにおける症候歴に照らして)感受性対象に投与され得る。処置はまた、例えば、再発を遅延または予防するために、症候が消散した後も継続され得る。いくつかの実施形態では、本明細書において開示の方法を使用し、健常な細胞または組織と比較して、細胞または組織において発現されているRNAのプロファイルの変化を観察した後に、処置は投与され得る。

30

【発明を実施するための形態】

【0058】

ある特定の実施形態の詳細な記載

本明細書において記載の態様は、特有の実施形態、システム、組成物、方法、またはコンフィギュレーションに限定されず、そのため、当然のことながら変動することができる。本明細書において使用される専門用語は、特有の態様のみを記載する目的のものであり、本明細書において具体的に定義されない限り、限定することが意図されるものではない。

40

【0059】

本開示は、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングする、方法、組成物、およびシステムを提供する。本開示はまた、インタクトな組織内の細胞を包含する細胞において翻訳されているRNAのプロファイルに基づいて、対象の疾患または障害を診断する方法を提供する。1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な候補作用物質

50

をスクリーニングまたは試験する方法はまた、本開示によって提供される。本開示はまた、疾患または障害の処置を必要とする、対象における疾患または障害を処置する方法を提供する。本明細書において記載の方法を行うために有用であり得る、オリゴヌクレオチドプローブのペアおよびセット、ならびに本明細書において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はまた、本開示によって記載されている。

【0060】

細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングする方法

一態様では、本開示は、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングする方法を提供する。本明細書において開示の方法では、細胞は、本明細書においてさらに記載され、かつリボソームによって能動的に翻訳されているRNAを増幅するために使用され得る、1以上のプローブのペアまたはプローブのセットと接触させられ得、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成する。次いで、1以上のコンカテネートされたアンプリコンはポリマーマトリックスに埋め込まれ、配列決定されて、転写産物のアイデンティティおよびポリマーマトリックス内のそれらの位置を決定し得る(例を挙げれば、本明細書においてさらに記載されているようなSEDAL配列決定によって)。着目した転写産物の位置を使用して、細胞において翻訳されているRNAはプロファイルされ得る。本明細書において提供の方法は、サンプルにおける細胞内構造、細胞形態、および/または組織構成の空間情報を乱すことなく、サンプルにおけるRNA翻訳をプロファイルする能力を包含するがこれらに限定されない、以前に開示された方法およびシステムを超えるいくつかの利点を有する。

【0061】

いくつかの実施形態では、本開示は、以下のステップ:

a) 細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること;

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること

を含む、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするための方法を提供する。

【0062】

本明細書において開示の方法は、第1のプローブおよび第2のプローブを含む、プローブのペアの使用を企図している。第2のプローブ(本明細書において「プライマープローブ」とも称される)は、リボソーム(すなわち、着目したRNAに結合し、かつ着目したRNAを能動的に翻訳しているリボソーム)を認識する部分を含む。リボソームを認識するプローブの部分は、タンパク質、ペプチド、核酸、または小分子であり得る。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質である。ある特定の実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、抗体(例を挙げれば、二次抗体)、または抗体バリ

アントもしくはフラグメントを含む。リボソームを認識する第2のプローブの部分が二次抗体である場合、方法は、任意に、細胞を、リボソームを認識し、かつ第2のプローブの二次抗体によって認識される一次抗体と接触させることをさらに含み得る。一次抗体は、リボソームのいずれかの部分、例えば、リボソームのいずれかのタンパク質、核酸(例を挙げれば、rRNA)、またはそれらの組合せを認識し得る。いくつかの実施形態では、一次抗体は、抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体(例を挙げれば、抗RPS3モノクローナル抗体)である。いくつかの実施形態では、抗体は、抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体(例を挙げれば、抗RPL4ポリクローナル抗体)である。抗体の代わりに、本開示はまた、本明細書において記載のプローブのリボソームを認識することが可能なあらゆる作用物質の使用を企図している。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、リボソーム内のリボソームRNA(rRNA)の部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、40S小リボソームサブユニットの部分(例を挙げれば、18S rRNAを包含する)または60S大リボソームサブユニットの部分(例を挙げれば、5S rRNA、28S rRNA、および5.8S rRNAを包含する)に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドは、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、または30を超えるヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドは、約25ヌクレオチド長である。

10

20

【0063】

リボソームを認識する部分に加えて、第2のプローブはまた、第1のプローブの部分に相補的な部分を含む。いくつかの実施形態では、第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である。本開示は、第2のプローブの部分のあらゆる配置を企図している。いくつかの実施形態では、本明細書において記載の方法で使用される第2のプローブは、構造:

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'または

5'-[第1のプローブに相補的な部分]-[リボソームを認識する部分]-3'

30

を含み;

ここで、]-[は、任意のリンカー(例を挙げれば、ヌクレオチドリリンカー)を含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第2のオリゴヌクレオチドプローブの2つの部分間の直接的な連結(すなわち、ホスホジエステル結合)を表す。

【0064】

本明細書において記載の方法で使用される第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)は、特有のヌクレオチドの配列からなるオリゴヌクレオチドバーコード配列を包含する。いくつかの実施形態では、第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、約3~約20、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。いくつかの実施形態では、第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。本明細書において記載のオリゴヌクレオチドプローブのバーコードは、翻訳されている着目したRNAを同定するために使用される遺伝子特異的配列を含み得る(すなわち、各バーコード配列は、特有の遺伝子または転写産物に関連している)。本明細書において記載されているものと類似のプローブに対するバーコードの使用は、例えば、2019年10月17日に公開された国際特許出願公開WO 2019/199579、およびWang et al., Science 2018, 361, 380にさらに記載されており、これら両方は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0065】

第1のプローブはまた、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および着

50

目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分は、約5、約6、約7、約8、約9、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。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、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もしくはそれを超えるヌクレオチド長である。第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分のあらゆる順序での配置が、本開示によって企図されている。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、構造：

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[バーコード配列]-3'または

5'-[着目したRNAに相補的な部分]-[第2のプローブに相補的な部分]-[バーコード配列]-3'または

5'-[バーコード配列]-[着目したRNAに相補的な部分]-[第2のプローブに相補的な部分]-3'または

5'-[バーコード配列]-[第2のプローブに相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-3'または

5'-[着目したRNAに相補的な部分]-[バーコード配列]-[第2のプローブに相補的な部分]-3'または

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[バーコード配列]-[着目したRNAに相補的な部分]-3'

を含み、

ここで、]-[は、任意のリンカー(例を挙げれば、ヌクレオチドリリンカー)を含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第1のプローブの2つの部分間の直接的な連結(すなわち、ホスホジエステル結合)を表す。

【0066】

いくつかの実施形態では、本開示は、以下のステップ：

a)細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み；

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み；かつ

iii)第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること；

b)第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること；

d)1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと；ならびに

e)ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること

を含む、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするための方法を提供

する。

【0067】

本明細書において開示の方法は、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含む、プローブのセットの使用を企図している。第3のプローブ(本明細書において「プライマープローブ」とも称される)の追加は、第3のプローブが使用されない方法の実施形態と比較して、特異性の向上および/または標的外増幅の減少をもたらす得る。

【0068】

本明細書において記載されているように、第2のプローブ(本明細書において「スプリントプローブ」または「ブロックされたプローブ」とも称される)は、リボソーム(すなわち、着目したRNAに結合し、かつ着目したRNAを能動的に翻訳しているリボソーム)を認識する部分を含む。いくつかの実施形態では、第2のプローブは重合ブロッカーをさらに含む。重合ブロッカーの追加は、第2のプローブがステップ(c)の増幅においてプライマーとして使用されることを防ぎ、第3のプローブが増幅中にプライマーとして使用されることを確実にする。第2のプローブの重合ブロッカーは、本明細書において記載の方法のステップ(c)の増幅において、プライマーとしての第2のプローブの使用を防ぐことが可能な何らかのモイエティであることができる。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、第2のプローブの3'端にある。重合ブロッカーは、例えば、ポリメラーゼが第2のプローブを重合のためのプライマーとして使用することを防ぐ何らかの化学的モイエティであることができる。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、ブロックされた3'ヒドロキシル基を含む(例を挙げれば、3'ヒドロキシル基に酸素保護基を含む)核酸残基である。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、3'ヒドロキシル基の代わりに水素を含む。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、3'ヒドロキシル基の代わりに、追加のヌクレオチドが付加されることを防ぐ何らかの化学的モイエティを含む。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは反転核酸残基を含む。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、反転アデノシン、チミン、シトシン、グアノシン、またはウリジン残基である。ある特定の実施形態では、重合ブロッカーは、反転チミン残基である。

【0069】

リボソームを認識する部分に加えて、第2のプローブはまた、第1のプローブの部分に相補的な部分を含む。いくつかの実施形態では、第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分は、4~20、5~19、6~18、7~17、8~16、9~15、10~14、または11~13ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分および第1のプローブに相補的な第2のプローブの部分は、ポリAヌクレオチドリンカーによって接合されている。いくつかの実施形態では、ポリAヌクレオチドリンカーは、20~80、30~70、または40~60ヌクレオチド長(例を挙げれば、約50ヌクレオチド長)である。

【0070】

本開示は、第2のプローブの部分のあらゆる配置を企図している。いくつかの実施形態では、本明細書において記載の方法で使用される第2のプローブは、構造:

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'または

5'-[第1のプローブに相補的な部分]-[リボソームを認識する部分]-3'

を含み;

ここで、]-[は、任意のリンカー(例を挙げれば、ヌクレオチドリンカー)を含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第2のオリゴヌクレオチドプローブの2つの部分間の直接的な連結を表す。

いくつかの実施形態では、第2のプローブは、構造:

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-[重合ブロッカー]-3'を含み、

ここで、]-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む。

【0071】

本明細書において記載の方法で使用される第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)は、特有のヌクレオチドの配列からなる、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を包含する。いくつかの実施形態では、第1のプローブの第1および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列は、同じヌクレオチド配列を含む。第1のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列の存在は、本明細書において記載の方法において、着目したRNAの検出の特異性を向上し得る(すなわち、第2のバーコード配列を含まない第1のオリゴヌクレオチドプローブを使用して方法が行われた場合と比較して)。第1のオリゴヌクレオチドプローブの追加のオリゴヌクレオチドバーコード配列の使用はまた、本明細書において記載の方法において、着目したRNAの非特異的増幅を減少させる役割を果たし得る。このことは、本明細書において記載の方法で使用される第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的であり、第3のプローブをプライマーとして使用する増幅が起きることができる前に、求められる特異性の追加の層を付加することにより達成される。いくつかの実施形態では、第3のプローブに相補的な第1のプローブの部分は、5~15、6~14、7~13、8~12、または9~11ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第3のプローブに相補的な第1のプローブの部分は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。

10

【0072】

20

第1のプローブはまた、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および着目したRNAに相補的な部分を含む。いくつかの実施形態では、第2のプローブに相補的な第1のプローブの部分は、4~20、5~19、6~18、7~17、8~16、9~15、10~14、または11~13ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第2のプローブに相補的な第1のプローブの部分は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、第2のプローブに相補的な第1のプローブのオリゴヌクレオチド部分は、第1のプローブの5'端および3'端の間で分割されている。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分は、10~30、11~29、12~28、13~27、14~26、15~25、16~24、17~23、18~22、または19~21ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分は、約5、約6、約7、約8、約9、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。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、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もしくはそれを超えるヌクレオチド長である。

30

【0073】

いくつかの実施形態では、第1のプローブは、構造:

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[第1のバーコード配列]-[第3のプローブの部分に相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-3'

40

を含み、

ここで、]-[は、任意のリンカー(例を挙げれば、ヌクレオチドリリンカー)を含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第1のプローブの2つの部分間の直接的な連結(すなわち、ホスホジエステル結合)を表す。

【0074】

本明細書において開示の方法で使用される第3のプローブ(本明細書において「プライマー」プローブとも称される)は、特有のヌクレオチドの配列からなるバーコード配列を包含する。いくつかの実施形態では、第3のプローブのバーコード配列は、約3~約20、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

50

である。いくつかの実施形態では、第3のプローブのバーコード配列は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、第3のプローブのバーコード配列は、10ヌクレオチド長である。

【0075】

第3のプローブはまた、着目したRNAに相補的な部分、および第1のプローブの部分に相補的な部分を含む。いくつかの実施形態では、第1および第3のプローブは、着目したRNAの異なる部分に相補的であり、かつそれに結合する。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分は、10~30、11~29、12~28、13~27、14~26、15~25、16~24、17~23、18~22、または19~21ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分は、約5、約6、約7、約8、約9、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。いくつかの実施形態では、第3のプローブは、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もしくはそれを超えるヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第1のプローブに相補的な第3のプローブの部分は、5~15、6~14、7~13、8~12、または9~11ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第1のプローブに相補的な第3のプローブの部分は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。

【0076】

いくつかの実施形態では、第3のプローブは、構造：

5'-[着目したRNA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(例を挙げれば、ヌクレオチドリリンカー)を含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第3のプローブの2つの部分間の直接的な連結を表す。第3のプローブの部分のあらゆる配置が、本開示によって企図されている。

【0077】

本明細書において開示の方法におけるあらゆるタイプの細胞の使用が、本開示によって企図されている(例を挙げれば、本明細書において記載の細胞型のいずれか)。いくつかの実施形態では、標的細胞は哺乳動物細胞である。ある特定の実施形態では、細胞はヒト細胞である。本開示はまた、多数の細胞に対して同時に(例を挙げれば、同時に、100を超える細胞、200を超える細胞、300を超える細胞、400を超える細胞、500を超える細胞、1000を超える細胞、10,000を超える細胞、20,000を超える細胞、30,000を超える細胞、40,000を超える細胞、または50,000を超える細胞)、本明細書において記載の方法を行うことを企図している。いくつかの実施形態では、方法は、同じ細胞型の多数の細胞に対して行われる。いくつかの実施形態では、方法は、異なる細胞型の細胞を含む多数の細胞に対して行われる。本明細書において開示の方法を使用して、翻訳されているRNAがプロファイルされ得る細胞型は、幹細胞、前駆細胞、神経細胞、アストロサイト、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、間葉系細胞、上皮細胞、免疫細胞、肝細胞、平滑筋細胞および骨格筋細胞、造血細胞、リンパ球、単球、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、およびニューロンを包含するが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、1以上の細胞は、インタクトな(例を挙げれば、本明細書において記載の組織型のいずれかの)組織内に存在する。ある特定の実施形態では、インタクトな組織は、固定化された組織サンプルである。いくつかの実施形態では、インタクトな組織は、多数の細胞型を含む。ある特定の実施形態では、組織は、心臓(cardiac)組織、リンパ節組織、肝臓組織、筋肉組織、骨組織、眼(eye)組織、または耳組織である。ある特定の実施形態では、組織は脳組織である。

【0078】

本明細書において記載の方法において遺伝子発現がプロファイルされる着目したRNAは、細胞のゲノムDNAから発現された転写産物であり得る。いくつかの実施形態では、着目したRNAはmRNAである。本明細書において記載の方法は、ある時に細胞において翻訳されている1種のRNA、または着目した多数のRNAを同時にプロファイルするために使用され得る。いくつかの実施形態では、細胞または多数の細胞におけるRNA翻訳は、1を超える、2を超える、3を超える、4を超える、5を超える、10を超える、20を超える、30を超える、40を超える、50を超える、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RNA、4000を超えるRNA、または5000を超えるRNAに対して同時にプロファイルされる。

【0079】

ポリマーマトリックスは、ローリングサークル増幅後、細胞において翻訳されている着目したRNAの配列決定およびイメージングを容易にするために、本明細書において記載の方法で使用される。様々なポリマーマトリックスの使用が本開示によって企図され、1以上のコンカテネートされたアンプリコンが埋め込まれることができるあらゆるポリマーマトリックスが、本明細書において記載の方法での使用に適している。いくつかの実施形態では、ポリマーマトリックスはヒドロゲル(すなわち、親水性である架橋されたポリマーのネットワーク)である。いくつかの実施形態では、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、ナトリウムポリアクリラートヒドロゲル、アクリラート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。ある特定の実施形態では、ヒドロゲルはポリアクリルアミドヒドロゲルである。そのようなヒドロゲルは、例えば、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サンプルをインキュベートし、緩衝液を除去し、重合混合物(例を挙げれば、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)中でサンプルをインキュベートすることによって調製され得る。

【0080】

いくつかの実施形態では、ローリングサークル増幅を行い、環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成するステップは、反応性化学基で修飾されたヌクレオチド(例を挙げれば、5-(3-アミノアリル)-dUTPなどのアミン修飾ヌクレオチド)を提供することをさらに含む。いくつかの実施形態では、反応性化学基で修飾されたヌクレオチドは、増幅反応で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%をなす。例えば、ローリングサークル増幅を行い、環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成するステップは、5-(3-アミノアリル)-dUTPなどのアミン修飾ヌクレオチドを提供することをさらに含み得る。増幅プロセス中、アミン修飾ヌクレオチドは、1以上のコンカテネートされたアンプリコンが生成されるときに、それらに組み込まれる。結果として得られたアンプリコンは第一級アミンで官能化され、これは別の適合性化学モイエティ(例を挙げれば、N-ヒドロキシスクシンイミド)とさらに反応されて、コンカテネートされた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を容易にすることができる。いくつかの実施形態では、1以上のコンカテネートされた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は、1以上のコンカテネートされた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以上のコンカテネートされたアンプリコンおよびポリマーマトリックスを共重合させることを含む。

【0081】

本明細書において開示の方法はまた、ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定するステップを包含する。いくつかの実施形態では、配列決定のステップは、「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による配列決定」(SEDAL配列決定)を行うことを含む。いくつかの実施形態では、SEDALは、特定のサンプルに対して2回、3回、4回、5回、または5回を超えて行われる。SEDAL配列決定は、X.et al., Three-dimensional intact-tissue sequencing of single

10

20

30

40

50

-cell transcriptional states. Science 2018, 361, 380、および2019年10月17日に公開された国際特許出願公開WO 2019/199579にさらに記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。手短には、検出可能な標識(すなわち、例えばイメージングによって、追加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されることが出来る何らかの標識)を含むオリゴヌクレオチドプローブが、細胞に提供される。ある特定の実施形態では、検出可能な標識は、蛍光(例を挙げれば、フルオロフォア)である。追加のオリゴヌクレオチドプローブは、第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的であり、このようにして着目したRNAのアイデンティティに連結され、細胞内での着目したRNAの位置を同定するために使用されることが出来る。

10

【0082】

本明細書において記載の方法(例を挙げれば、SEDAL配列決定で使用される場合)で使用する追加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いずれかの適切なイメージング技法を使用して読み出され得る。例えば、追加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実施形態では、フルオロフォアは、着目したRNAを同定するためのイメージングを使用して読み出され得る。上で考察されたように、追加のオリゴヌクレオチドプローブは、着目した特有のRNAを検出するために使用される、第1のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列に相補的な配列を含む。フルオロフォアを含む追加のオリゴヌクレオチドプローブの位置をイメージングすることによって、サンプル内の着目した特有のRNAの位置は決定されることが出来る。いくつかの実施形態では、イメージングのステップは、蛍光イメージングを含む。ある特定の実施形態では、イメージングのステップは、共焦点顕微鏡法を含む。ある特定の実施形態では、イメージングのステップは、落射蛍光顕微鏡法を含む。ある特定の実施形態では、2ラウンドのイメージングが行われる。ある特定の実施形態では、3ラウンドのイメージングが行われる。ある特定の実施形態では、4ラウンドのイメージングが行われる。ある特定の実施形態では、5ラウンド以上のイメージングが行われる。

20

【0083】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載のRNA翻訳をプロファイリングする方法は、細胞内で追加の分子をプロファイリングする方法と組み合わせられ得る。例えば、非翻訳中のRNAの発現は、リボソームを認識する部分を含まないプローブを使用して、RNA翻訳と共にプロファイルされ得る。能動的に翻訳されていない他の細胞内位置のRNAも、RNA翻訳と共にプロファイルされ得る。タンパク質発現のプロファイリング(例を挙げれば、従来のプロテオミクス法の使用)はまた、本明細書において記載の方法、ならびにトランスクリプトーム、脂質、および/または小分子のプロファイリングと組み合わせられ得る。いくつかの実施形態では、本明細書において提供の方法のいずれかは、細胞において1以上の遺伝子を過剰発現またはノックアウトして、1以上の遺伝子が着目したRNAの翻訳を調節することに関与しているかどうかを決定するステップをさらに含む。

30

【0084】

本明細書において記載の方法のいずれかはまた、1以上の細胞の細胞型および/または細胞状態を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書において提供の方法のいずれかは、1以上の細胞のRNA翻訳プロファイルを、様々な細胞型の細胞のRNA翻訳プロファイルを含む参照データと比較することによって、プロファイルされた細胞の細胞型、またはプロファイルされた多数の細胞の細胞型を決定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書において提供の方法のいずれかは、1以上の細胞のRNA翻訳プロファイルを、様々な細胞状態の細胞のRNA翻訳プロファイルを含む参照データと比較することによって、プロファイルされた細胞の細胞状態、またはプロファイルされた多数の細胞の細胞状態を決定するステップをさらに含む。

40

【0085】

対象における疾患または障害を診断する方法

別の態様では、本開示は、対象における疾患または障害を診断する方法を提供する。例

50

例えば、本明細書において記載の翻訳されているRNAをプロファイリングする方法は、対象(例を挙げれば、疾患もしくは障害を有すると考えられるか、または疾患もしくは障害を有するリスクがある対象、あるいは健常であるか、または健常であると考えられる対象)から取り出された細胞または多数の細胞に対して行われ得る。次いで、細胞における着目した様々なRNAの発現は、非疾患細胞または非疾患組織サンプルからの細胞(例を挙げれば、健常な個体からの細胞、または健常な個体の集団からの多数の細胞)における着目した同じRNAの発現と比較されることができ得る。1以上の非疾患細胞と比べた、細胞のRNA翻訳プロファイル(着目した単一RNAまたは多数のRNAのもの、例を挙げれば、特異的な疾患シグネチャを包含する)の差異はいずれも、対象が疾患または障害を有することを指し示し得る。1以上の非疾患細胞におけるRNA翻訳は、対照実験としての疾患細胞における発現と共にプロファイルされ得る。1以上の非疾患細胞におけるRNA翻訳はまた、前もってプロファイルされ得、疾患細胞における発現は、非疾患細胞に対するこの参照データと比較され得る。

10

【0086】

いくつかの実施形態では、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:

a)対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

20

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること;

b)第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d)1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

30

e)ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定し、着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定して、細胞において翻訳されているRNAをプロファイルすること

を含み、

ここで、1以上の非疾患細胞と比べた、細胞のRNA翻訳プロファイルの差異は、対象が疾患または障害を有することを指し示す。

【0087】

いくつかの実施形態では、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:

40

a)対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i)第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii)第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプロ

50

ープの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

対象から取り出された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること；

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること；

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと；ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞における着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定することを含み、

ここで、1以上の非疾患細胞と比べた、細胞のRNA翻訳プロファイルの差異は、対象が疾患または障害を有することを指し示す。

【0088】

いくつかの実施形態では、1以上の非疾患細胞において翻訳されているRNAは、本明細書において開示の方法を使用して、対照実験として、対象から取り出された細胞と共に同時にプロファイルされる。いくつかの実施形態では、疾患細胞における発現と比較される、1以上の非疾患細胞において翻訳されているRNAのプロファイルは、方法が1以上の非疾患細胞に対して前もって行われたときからの参照データを含む。

【0089】

あらゆる疾患または障害の診断が、本明細書において記載の方法によって企図されている。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、遺伝性疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝臓疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液疾患、神経疾患、精神疾患、胃腸(GI)管疾患、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。ある特定の実施形態では、疾患はがんである。

【0090】

いくつかの実施形態では、細胞は組織(例を挙げれば、上皮組織、結合組織、筋組織、または神経組織)に存在する。いくつかの実施形態では、組織は対象からの組織サンプルである。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト実験動物(例を挙げれば、マウス、ラット、イヌ、ブタ、または非ヒト霊長類)である。いくつかの実施形態では、対象は家畜である。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、組織サンプルは、固定化された組織サンプルを含む。ある特定の実施形態では、組織サンプルは、生検(例を挙げれば、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、または皮膚生検)である。ある特定の実施形態では、生検は腫瘍生検である。ある特定の実施形態では、組織は脳組織である。ある特定の実施形態では、組織は中枢神経系由来である。

【0091】

1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングする方法別の態様では、本開示は、着目した1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングする方法を提供する。例えば、本明細書において記載の翻訳されているRNAをプロファイリングする方法は、1以上の候補作用物質の存在下で細胞において行われ得る。次いで、細胞(例を挙げれば、正常細胞または疾患細胞)において翻訳されている着目した様々なRNAの発現は、1以上の候補作用物質に曝露されなかった細胞における着目した同じRNAの発現と比較されることができる。候補作用物質(複数可)に曝露されなかった細胞における翻訳と比べた、RNA翻訳プロファイルの何らかの差異は、着目した1以上のRNAの翻訳が候補作用物質(複数可)によってモジュレートされること

10

20

30

40

50

を指し示し得る。いくつかの実施形態では、疾患の処置に関連することが知られている特定の(例を挙げれば、翻訳されている着目した多数のRNAの)シグネチャは、所望の様式で翻訳をモジュレートすることが可能な候補作用物質を同定するために使用され得る。本明細書において記載の方法はまた、例えば、1以上の細胞が候補作用物質または公知の薬物で処理される場合に特異的なRNA翻訳シグネチャを探すことによって、ある特有の副作用を有する薬物を同定するために使用され得る。

【0092】

いくつかの実施形態では、本開示は、1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングするための方法を提供し、方法は以下のステップ:

a) 候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること;

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定し、着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定して、細胞において翻訳されているRNAをプロファイルすること

を含み、

ここで、候補作用物質の非存在下と比べた、候補作用物質の存在下で翻訳されているRNAのプロファイルの差異は、候補作用物質が1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることを指し示す。

【0093】

いくつかの実施形態では、本開示は、1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングするための方法を提供し、方法は、以下のステップ:

a) 候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のセッ

トと接触させること;

b) 第1のプロープの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプロープをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと; ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞においてリボソームに結合した着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること

を含み、

ここで、候補作用物質の非存在下と比べた、候補作用物質の存在下で翻訳されているRNAのプロファイルの差異は、候補作用物質が1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることを指し示す。

【0094】

いくつかの実施形態では、候補作用物質は、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。いくつかの実施形態では、候補作用物質は、公知の薬物またはFDA承認薬物を含む。ある特定の実施形態では、タンパク質は抗体である。ある特定の実施形態では、タンパク質は抗体フラグメントまたは抗体バリエーションである。ある特定の実施形態では、タンパク質は受容体である。ある特定の実施形態では、タンパク質はサイトカインである。ある特定の実施形態では、核酸は、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA(dsRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。あらゆる候補作用物質が、本明細書において記載の方法を使用して、スクリーニングされ得る。特に、1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることが可能と考えられるあらゆる候補作用物質は、本明細書において記載の方法を使用してスクリーニングされ得る。いくつかの実施形態では、候補作用物質による着目した1以上のRNAの翻訳のモジュレーションは、疾患もしくは障害の症候を低減、緩和、もしくは排除すること、または疾患もしくは障害の発症もしくは進行を予防することに関連する。いくつかの実施形態では、候補作用物質によってモジュレートされる疾患または障害は、遺伝性疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝臓疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液疾患、神経疾患、精神疾患、胃腸(GI)管疾患、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。ある特定の実施形態では、候補作用物質によってモジュレートされる疾患または障害は、がんである。

【0095】

対象における疾患または障害を処置する方法

別の態様では、本開示は、対象における疾患または障害を処置する方法を提供する。例えば、本明細書において記載の翻訳されているRNAをプロファイリングする方法は、対象(例を挙げれば、疾患もしくは障害を有すると考えられるか、または疾患もしくは障害を有するリスクがある対象)から取り出されたサンプルからの細胞において行われ得る。次いで、細胞において翻訳されている1以上のRNAのプロファイルは、非疾患組織サンプルからの細胞における着目した同じRNAの翻訳状態と比較されることができる。次いで、非疾患細胞と比べてRNA翻訳プロファイルに何らかの差異が観察される場合、疾患または障害の処置が対象に投与され得る。1以上の非疾患細胞におけるRNA翻訳は、対照実験としての疾患細胞におけるRNA翻訳と共にプロファイルされ得る。1以上の非疾患細胞におけるRNA翻訳はまた、前もってプロファイルされ得、疾患細胞における翻訳は、非疾患細胞に対するこの参照データと比較され得る。

【0096】

いくつかの実施形態では、本開示は、以下のステップを含む、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し、方法は、以下のステップ:

a) 候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させることであって、プローブの各ペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のペアと接触させること;

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第2のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定し、着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定して、細胞において翻訳されているRNAをプロファイルすること

を含み、

ここで、候補作用物質の非存在下と比べた、候補作用物質の存在下で翻訳されているRNAのプロファイルの差異は、候補作用物質が1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることを指し示す。

【0097】

いくつかの実施形態では、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し、方法は、以下のステップ:

a) 候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させることであって、プローブの各セットは、第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含み、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

候補作用物質で処理されているか、または処理された細胞を、プローブの1以上のセットと接触させること;

b) 第1のプローブの5'端および3'端と一緒にライゲーションして、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行い、第3のプローブをプライマーとして使用して環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上のコンカテネートされたアンプリコンを生成すること;

d) 1以上のコンカテネートされたアンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むこと;ならびに

10

20

30

40

50

e) ポリマーマトリックスに埋め込まれたコンカテネートされたアンプリコンを配列決定して、細胞においてリボソームに結合した着目した各RNAのアイデンティティおよび位置を決定すること

を含み、

ここで、候補作用物質の非存在下と比べた、候補作用物質の存在下で翻訳されているRNAのプロファイルの差異は、候補作用物質が1以上のRNAの翻訳をモジュレートすることを指し示す。

【0098】

いくつかの実施形態では、1以上の非疾患細胞におけるRNA翻訳は、本明細書において開示の方法を使用して、対照実験として、同時にプロファイルされる。いくつかの実施形態では、疾患細胞における翻訳と比較される、1以上の非疾患細胞におけるRNA翻訳データは、方法が前もって非疾患細胞に対して行われた時点からの参照データを含む。

【0099】

疾患または障害に対するあらゆる適切な処置が対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、処置は、治療用作用物質を投与することを含む。いくつかの実施形態では、処置は手術を含む。いくつかの実施形態では、処置はイメージングを含む。いくつかの実施形態では、処置は、さらなる診断方法を行うことを含む。いくつかの実施形態では、処置は放射線療法を含む。いくつかの実施形態では、治療用作用物質は、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。いくつかの実施形態では、治療用作用物質は、公知の薬物および/またはFDA承認薬物である。ある特定の実施形態では、タンパク質は抗体である。ある特定の実施形態では、タンパク質は抗体フラグメントまたは抗体バリエーションである。ある特定の実施形態では、タンパク質は、受容体、またはそのフラグメントもしくはバリエーションである。ある特定の実施形態では、タンパク質はサイトカインである。ある特定の実施形態では、核酸は、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、二本鎖RNA(dsRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。

【0100】

あらゆる疾患または障害の処置が、本明細書において記載の方法によって企図されている。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、遺伝性疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝臓疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液疾患、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、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(ophthalmic)疾患、または心血管疾患である。ある特定の実施形態では、疾患はがんである。

【0101】

いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、サンプルは生物学的サンプルを含む。いくつかの実施形態では、サンプルは組織サンプルを含む。ある特定の実施形態では、組織サンプルは、生検(例を挙げれば、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、または皮膚生検)である。ある特定の実施形態では、生検は腫瘍生検である。ある特定の実施形態では、生検は固形腫瘍の生検である。いくつかの実施形態では、組織サンプルは脳組織サンプルである。ある特定の実施形態では、組織サンプルは中枢神経系の組織サンプルである。

【0102】

プローブ

本開示はまた、本明細書において記載の方法およびシステムで使用するためのプローブのペアおよびセットを提供する。一態様では、本開示は、第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)および第2のプローブ(本明細書において「プライマー」プローブとも称される)を含むプローブのペアを提供し、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み

;かつ

ii)第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む。

【0103】

本明細書において記載のプローブのすべては、列挙されたコンポーネントの各々の間に様々なヌクレオチド長のスパーサーまたはリンカーを任意に有し得るか、またはオリゴヌクレオチドプローブのコンポーネントは、互いに直接(すなわち、ホスホジエステル結合によって)接合され得る。本明細書において記載のプローブのすべては、標準ヌクレオチドを含み得るか、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いずれかの修飾ヌクレオチドで置換され得る。

【0104】

本明細書において記載のプローブのペアは、第1のプローブおよび第2のプローブを含む。第2のプローブは、リボソーム(すなわち、着目したRNAに結合し、かつ着目したRNAを能動的に翻訳しているリボソーム)を認識する部分を含む。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、抗体、または抗体バリエーションもしくはフラグメントに結合する作用物質である。ある特定の実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、抗体(例を挙げれば、二次抗体)、または抗体バリエーションもしくはフラグメントを含む。リボソームを認識する第2のプローブの部分が二次抗体である場合、二次抗体は、リボソームを認識する一次抗体に結合し得る。いくつかの実施形態では、一次抗体は抗40Sリボソームタンパク質S3(RPS3)抗体である。いくつかの実施形態では、一次抗体は抗60Sリボソームタンパク質L4(RPL4)抗体である。抗体の代わりに、本開示はまた、本明細書において記載のプローブのリボソームを認識することが可能なあらゆる作用物質の使用を企図している。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、リボソーム内のリボソームRNA(rRNA)の部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、40S小リボソームサブユニットの部分(例を挙げれば、18S rRNAを包含する)または60S大リボソームサブユニットの部分(例を挙げれば、5S rRNA、28S rRNA、および5.8S rRNAを包含する)に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分は、18S rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドは、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、または30を超えるヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、rRNAの部分に相補的なオリゴヌクレオチドは、約25ヌクレオチド長である。

【0105】

本明細書において記載のプローブのペアの第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)は、特有のヌクレオチドの配列からなるオリゴヌクレオチドバーコード配列を包含する。いくつかの実施形態では、第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、約3~約20、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。いくつかの実施形態では、第1のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。本明細書において記載のオリゴヌクレオチドプローブのバーコードは、着目したRNA(すなわち、リボソームによって翻訳されているRNA)を同定するために使用される遺伝子特異的配列を含み得る。

【0106】

第1のプローブはまた、第2のプローブに相補的な部分、および着目したRNAに相補的な部分を含む。第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分のあらゆる順序での配置が、本開示によって企図されている。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、構造:

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[バーコード配列]-3'

10

20

30

40

50

を含み、

ここで、]-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第1のプローブの2つの部分間の直接的な連結(すなわち、ホスホジエステル結合)を表す。

【0107】

リボソームを認識する部分に加えて、第2のプローブはまた、第1のプローブの部分に相補的な部分を含む。本開示は、第2のプローブの部分のあらゆる配置を企図している。いくつかの実施形態では、本明細書において記載のプローブのペアの第2のプローブは、構造:

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含み、

ここで、]-[は、任意のリンカー(例を挙げれば、ヌクレオチドリンカー)を含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第2のオリゴヌクレオチドプローブの2つの部分間の直接的な連結を表す。

【0108】

別の態様では、本開示は、第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)、第2のプローブ(本明細書において「スプリントプローブ」または「ブロックされたプローブ」とも称される)、および第3のプローブ(本明細書において「プライマープローブ」とも称される)を含むオリゴヌクレオチドプローブのセットを提供し、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である。

【0109】

本明細書において記載のプローブのペアとの比較において、本開示によって企図されているプローブのセットは、第3のプローブを含む。第3のプローブの追加は、第3のプローブが使用されない実施形態と比較して、特異性の向上および/または標的外増幅の減少をもたらし得る。本明細書において記載されているように、第2のプローブは、リボソーム(すなわち、着目したRNAに結合し、かつ着目したRNAを能動的に翻訳しているリボソーム)を認識する部分を含む。いくつかの実施形態では、第2のプローブは重合ブロッカーをさらに含む。重合ブロッカーの追加は、第2のプローブがステップ(c)の増幅においてプライマーとして使用されることを防ぎ、第3のプローブが増幅中にプライマーとして使用されることを確実にする。第2のプローブの重合ブロッカーは、本明細書において記載の方法のステップ(c)の増幅において、プライマーとしての第2のプローブの使用を防ぐことが可能な何らかのモイエティであることができる。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、第2のプローブの3'端にある。重合ブロッカーは、例えば、ポリメラーゼが第2のプローブを重合のためのプライマーとして使用することを防ぐ何らかの化学的モイエティであることができる。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、ブロックされた3'ヒドロキシル基を含む(例を挙げれば、3'ヒドロキシル基に酸素保護基を含む)核酸残基である。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、3'ヒドロキシル基の代わりに水素を含む。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、3'ヒドロキシル基の代わりに、追加のヌクレオチドが付加されることを防ぐ何らかの化学的モイエティを含む。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは反転核酸残基を含む。いくつかの実施形態では、重合ブロッカーは、反転アデノシン、チミン、シトシン、グアノシン、またはウリジ

10

20

30

40

50

ン残基である。ある特定の実施形態では、重合ブロッカーは、反転チミン残基である。

【0110】

リボソームを認識する部分に加えて、第2のプローブはまた、第1のプローブの部分に相補的な部分を含む。いくつかの実施形態では、第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分は、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第1のプローブの部分に相補的な第2のプローブの部分は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、リボソームを認識する第2のプローブの部分および第1のプローブに相補的な第2のプローブの部分は、ポリAヌクレオチドリンカーによって接合されている。いくつかの実施形態では、ポリAヌクレオチドリンカーは、20～80、30～70、または40～60ヌクレオチド長(例を挙げれば、約50ヌクレオチド長)である。

10

【0111】

本開示は、第2のプローブの部分のあらゆる配置を企図している。いくつかの実施形態では、第2のプローブは、構造：

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-3'

を含み、

ここで、]-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第2のオリゴヌクレオチドプローブの2つの部分間の直接的な連結を表す。

いくつかの実施形態では、第2のプローブは、構造：

20

5'-[リボソームを認識する部分]-[第1のプローブに相補的な部分]-[重合ブロッカー]-3'を含み、

ここで、]-[は、任意のリンカー(例を挙げれば、ヌクレオチドリンカー)を含む。

【0112】

本明細書において記載のプローブのセットの第1のプローブ(本明細書において「パドロック」プローブとも称される)は、特有のヌクレオチドの配列からなる、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を包含する。いくつかの実施形態では、第1のプローブの第1および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列は、同じヌクレオチド配列を含む。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、本明細書において記載の方法において、着目したRNAの検出の特異性を向上し得る(すなわち、第2のバーコード配列を含まない第1のプローブを使用して方法が行われた場合と比較して)。第1のオリゴヌクレオチドプローブの追加のオリゴヌクレオチドバーコード配列の使用はまた、リボソームによって翻訳されている着目したRNAの非特異的増幅を減少させる役割を果たし得る。このことは、第3のプローブのオリゴヌクレオチドバーコード配列が、第1のプローブの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的であり、第3のプローブをプライマーとして使用する増幅が起きることができるよう前に、求められる特異性の追加の層を付加することにより達成される。いくつかの実施形態では、第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分は、5～15、6～14、7～13、8～12、または9～11ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第3のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。

30

40

【0113】

第1のプローブはまた、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および着目したRNAに相補的な部分を含む。いくつかの実施形態では、第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分は、4～20、5～19、6～18、7～17、8～16、9～15、10～14、または11～13ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第2のプローブの部分に相補的な第1のプローブの部分は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、第2のプローブに相補的な第1のプローブのオリゴヌクレオチド部分は、第1のプローブの5'端および3'端の間で分割されている。いくつかの実施形態では、着目したRN

50

Aに相補的な第1のプローブの部分は、10～30、11～29、12～28、13～27、14～26、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第1のプローブの部分は、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。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、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。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、構造:

5'-[第2のプローブに相補的な部分]-[第1のバーコード配列]-[第3のプローブの部分に相補的な部分]-[着目したRNAに相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-3' 10

を含み、

ここで、]-[は、任意のリンカー(例を挙げれば、ヌクレオチドリリンカー)を含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第1のプローブの2つの部分間の直接的な連結(すなわち、ホスホジエステル結合)を表す。

【0114】

本明細書において開示のプローブのセットの第3のプローブ(本明細書において「プライマー」プローブとも称される)は、特有のヌクレオチドの配列からなるバーコード配列を包含する。いくつかの実施形態では、第3のプローブのバーコード配列は、約3～約20、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。いくつかの実施形態では、第3のプローブのバーコード配列は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、第3の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

【0115】

第3のプローブはまた、着目したRNAに相補的な部分、および第1のプローブの部分に相補的な部分を含む。いくつかの実施形態では、第1および第3のプローブは、着目したRNAの異なる部分に相補的であり、かつそれに結合する。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分は、10～30、11～29、12～28、13～27、14～26、15～25、16～24、17～23、18～22、または19～21ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、着目したRNAに相補的な第3のプローブの部分は、約5、約6、約7、約8、約9、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。いくつかの実施形態では、第3のプローブは、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。いくつかの実施形態では、第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分は、5～15、6～14、7～13、8～12、または9～11ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第1のプローブの部分に相補的な第3のプローブの部分は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。 30

【0116】

いくつかの実施形態では、第3のプローブは、構造:

5'-[着目したRNA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' 40

を含み、

ここで、]-[は、任意のヌクレオチドリリンカーを含む。いくつかの実施形態では、]-[は、第3のプローブの2つの部分間の直接的な連結を表す。第3のプローブの部分のあらゆる配置が、本開示によって企図されている。

【0117】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書において記載されているように、プローブの多数のペアを含む複数のプローブを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、 50

本明細書において記載されているように、プローブの多数のセットを含む複数のプローブを提供する。ある特定の実施形態では、複数のプローブにおけるプローブの各ペアまたはセットは、着目した異なるRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む。

【0118】

キット

本開示によってキットも提供される。一態様では、提供されるキットは、本明細書において記載されているように、1以上のプローブを含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書において記載のプローブのペア、またはプローブの多数のペアのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書において記載のプローブのセット、またはプローブの多数のセットのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、キットは、容器(例を挙げれば、バイアル、アンプル、ボトル、および/もしくはディスペンサーパッケージ、または他の適切な容器)をさらに含み得る。キットはまた、対照実験を行うための細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書において開示の方法を行うための他の試薬(例を挙げれば、リガーゼまたはポリメラーゼなどの酵素、本明細書において記載されているような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(例を挙げれば、ポリアクリルアミドマトリックス)を作製するための試薬およびモノマー))をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、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ために有用である。いくつかの実施形態では、キットは、対象における疾患を診断するために有用である。いくつかの実施形態では、キットは、RNA翻訳をモジュレートすることが可能な作用物質をスクリーニングするために有用である。いくつかの実施形態では、キットは、対象における疾患または障害を診断するために有用である。いくつかの実施形態では、キットは、対象における疾患または障害を処置するために有用である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載のキットは、キットを使用するための説明書をさらに包含する。

【0119】

システム

一態様では、本開示は、細胞において翻訳されているRNAをプロファイリングするシステムを提供する。いくつかの実施形態では、そのようなシステムは、以下を含む:

a) 細胞;

b) 第1のプローブおよび第2のプローブを含むプローブの1以上のペアであって、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;かつ

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、および第1のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含む、

第1のプローブおよび第2のプローブを含むプローブの1以上のペア;

c) 顕微鏡;ならびに

d) コンピュータ。

いくつかの実施形態では、そのようなシステムは、以下を含む:

a) 細胞;

b) 第1のプローブ、第2のプローブ、および第3のプローブを含むプローブの1以上のセットであって、

i) 第1のプローブは、第2のプローブに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列、第3のプローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、および第2のオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み;

ii) 第2のプローブは、リボソームを認識する部分、第1プローブの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分を含み;かつ

iii) 第3のプローブは、着目したRNAに相補的なオリゴヌクレオチド部分、第1のプロ

ープの部分に相補的なオリゴヌクレオチド部分、およびオリゴヌクレオチドバーコード配列を含み、第3のプロープのオリゴヌクレオチドバーコード配列は、第1のプロープの第1のオリゴヌクレオチドバーコード配列に相補的である、

第1のプロープ、第2のプロープ、および第3のプロープを含むプロープの1以上のセット;

c)顕微鏡;ならびに

d)コンピュータ。

【0120】

本明細書において記載のプロープ(すなわち、プロープのペアまたはプロープのセット)のいずれも、本開示によって企図されているシステムで使用され得る。いくつかの実施形態では、顕微鏡は共焦点顕微鏡である。いくつかの実施形態では、システムはCPUをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムは、コンピュータストレージおよび/もしくはメモリ、またはストレージデバイスをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムはカメラをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムはCCDをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムは、顕微鏡法を行うためおよび/または画像分析のためのソフトウェアをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムはリガーゼをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムはポリメラーゼをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムはアミン修飾ヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、システムは、ポリマーマトリックス(例を挙げれば、ポリアクリルアミドマトリックス)を製作す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、本明細書において開示の細胞型のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、システムは多数の細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は異なる細胞型のものである。ある特定の実施形態では、細胞は組織に存在する。いくつかの実施形態では、組織は、対象によって提供されるか、または対象由来の組織サンプルである。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。

10

20

【0121】

例

例1:in situでのRNAの翻訳状態の単一細胞プロファイリング

in situリボソームプロファイリングが使用されて、ベータ-アクチン(ACTB)mRNAの能動的な翻訳を可視化した(図2A~図2D)。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたリボソーム抗体は、リボソームの結合を増幅可能なプライマーに転換し、これは蛍光法によって簡単に増幅および検出されることができる。パドロックプロープのプールは、標的化された配列のセグメントをユニークなバーコードに転換するように設計された。次いで、バーコードを読み出し、mRNAのアイデンティティおよびそのmRNA上のリボソームの数を解読するために、コンビナトリアルおよび逐次的なSEDAL配列決定ラウンドが行われた。

30

【0122】

in situリボソームプロファイリングの検出特異性をさらに改善するために、3パートプロープ戦略が開発され、利用された(図3)。抗リボソーム抗体がコンジュゲートしたDNAプロープは3'端でブロックされ、このようにしてパドロックプロープのライゲーションにのみ使用されることができる。次いで、インタクトなパドロックプロープは増幅され、隣接部位にハイブリダイズするプライマープロープを使用して、DNAアンプリコンを作出することができる。このようにして、リボソームが結合したRNAのみがcDNAアンプリコンを作出する一方、リボソームが結合していないmRNAはライゲーションおよび増幅されることができない。各遺伝子のアイデンティティは、パドロックおよびプライマープロープにコードされ、SEDAL in situ配列決定によって読み出される。細胞内局在情報を得るために、細胞小器官染色がin situリボソームプロファイリング手順に組み込まれた(図3)。全体として、この改善された戦略を使用して、細胞内局在情報を伴うin situでの高い特異性の単一細胞の翻訳状態が得られることができる。

40

【0123】

50

真核生物のリボソームは、小40Sサブユニットおよび大60Sサブユニットからなり、これらは一緒に合計でおよそ80個の構造的に別個のタンパク質を含有する。小サブユニットタンパク質RPS3(リボソームタンパク質S3)および大サブユニットタンパク質RPL4(リボソームタンパク質L4)の両方を標的化する抗体が利用されて、3プローブin situリボソームプロファイリング法を試験した。抗RPS3抗体および抗RPL4抗体の両方が、この方法で働くことが示された(図4A~図4Cおよび図5A~図5C)。抗RPS3抗体または抗RPL4抗体(図4Aおよび図5A)を使用して、ACTBについて強いin situリボソームプロファイリングシグナルが観察された一方、抗体として免疫グロブリンG(IgG)を使用した陰性対照サンプルは弱いシグナルを示した(図4Bおよび図5B)。非コード転移関連肺腺癌転写産物1(MALAT1)RNAも試験され、抗RPS3抗体または抗RPL4抗体のいずれかを使用したMALAT1ではほとんどシグナルは観察されず(図4Cおよび図5C)、このアプローチは翻訳中のmRNAを特異的に検出し、非コードRNAを検出しないという仮説を支持した。

10

20

30

40

50

【0124】

ここに記載されている抗体に基づくin situリボソームプロファイリング法は、リボソームが結合したmRNAを正確に検出することができる;しかしながら、手順は抗リボソーム抗体の特異性に依拠しており、抗体-DNAコンジュゲーションの余分なステップを求める。リボソームはリボソームRNA(rRNA)およびリボソームタンパク質からなるので、パドロックプローブのライゲーションのために、rRNAがハイブリダイズしたプローブを利用する手順が開発されて、抗体結合ステップを回避した(図6)。手順は、本明細書において記載の3プローブ戦略を利用し、また、本明細書において記載の2プローブ戦略とも適合する。抗体に基づくアプローチと同様に、rRNAがハイブリダイズしたプローブは3'端でブロックされ、ローリングサークル増幅のためのプライマーとして使用されることができない。18S rRNAにハイブリダイズするプローブが使用されて、in situリボソームプロファイリング法を試験した。この手順は、前述のアプローチと比較して、最良のシグナル対ノイズのコントラストを与えることが見出された(図7A~図7C)。ACTBについて強いin situリボソームプロファイリングシグナルが細胞膜の近くで観察され(図7A)、これはACTB RNAの局在化した翻訳と一致している。rRNAのハイブリダイゼーション部分のないプローブを利用するか、または非コードMALAT1遺伝子を標的化した陰性対照サンプルは、両方とも最小のシグナルを示した(図9Bおよび図9C)。

【0125】

例2:細胞以下の分解能で空間分解された単一細胞トランスラトミクス

mRNA翻訳の精密な空間制御は、細胞生理学の転写後および翻訳遺伝子調節の必須なパートである。しかしながら、単一細胞におけるトランスクリプトームスケールで、局在化したmRNA翻訳を体系的に研究することは主要な課題のままである。このようにして、RIBOmapの開発が本明細書において記載されている。RIBOmapは、インタクトな細胞および組織において細胞以下の分解能で同時に数千個の遺伝子のmRNA翻訳を検出するための三次元(3D)in situプロファイリング法である。RIBOmapを使用して、981個の遺伝子がヒトHeLa細胞においてマッピングされ、細胞周期依存的および細胞内局在化した翻訳を明らかにした。さらに、成体マウス脳組織における5,413個の遺伝子の単一細胞空間トランスラトームが、62,753個の細胞の空間細胞アトラスを用いて創出された。神経およびグリア細胞における局所翻訳も検出された。一緒にすると、RIBOmapは、最初の空間分解された単一細胞トランスラトミクス技術を提示し、細胞内アーキテクチャ、細胞状態、および組織解剖学の文脈における局在化したタンパク質合成の理解を促進する。全体として、RIBOmapは、インタクトな細胞および組織において同時に数千個の遺伝子について、3DでのmRNA翻訳の単一細胞in situプロファイリングを可能にする。

【0126】

細胞タンパク質は、細胞機能を遂行し、細胞型および状態を形作るための遺伝子発現の最終産物であり、単一細胞および空間分解能でゲノム全体の翻訳パターンを測定することは、不均一な細胞型および状態における翻訳調節の理解を変換することができる最も重要なゴールである。大規模な単一細胞または空間分解プロテオームのプロファイリングは困

難なままである一方(1)、単一細胞において対応するタンパク質の存在量を推測するために、mRNAレベルを使用することが一般的な慣行であった。しかしながら、遺伝子発現は転写および翻訳レベルの両方で調節されており、多くの研究は、mRNAおよびタンパク質レベルの間の相関が低いと結論付けている(2~5)。その上、多くの遺伝子は、特有の細胞内の場所で局在化した翻訳を受ける(6)。したがって、タンパク質合成のスケラブルな単一細胞および空間分解プロファイリングのための方法が、翻訳制御の包括的な理解のために必要とされている。

【0127】

既存のバルクおよび単一細胞リボソームプロファイリング法は、トランスクリプトームでのタンパク質翻訳の分析を可能にした(7~12)。しかしながら、これらの方法は、細胞内構造、細胞形態、または組織構成の空間情報を保存することができず、空間におけるタンパク質合成をチャート化する能力を限定している。対照的に、mRNA翻訳をそれらの物理的座標で追跡することができるイメージングに基づく方法(13~19)は、一度に1個の遺伝子に限定される。したがって、細胞以下の分解能で単一細胞において高度に多重化した空間リボソームプロファイリングを達成することは困難なままである。このギャップを埋めるために、細胞以下の分解能でタンパク質および遺伝子発現を高度に多重化してチャート化するための、新しい3D in situマッピング法(RIBOmap)が、本明細書において記載されている。981個の遺伝子のタンパク質合成が、RIBOmapを用いてインタクトな細胞においてプロファイルされ、局所翻訳の細胞内パターン形成を分析するための計算機パイプラインが開発された。RIBOmapはまた、細胞以下の分解能でインタクトなマウス脳組織における5,413個の遺伝子をプロファイルするために適用され、細胞型および組織領域にわたるタンパク質合成の空間パターンを明らかにした。

【0128】

RIBOmapは、リボソームが結合したmRNAを選択的に検出および増幅し、続いてヒドロゲル-組織埋込みおよび高度に多重化したin situ配列決定読出しを行う、トリプロブのユニークな設計を使用する標的化配列決定戦略に基づいて築き上げられた(20)。特に、RIBOmapトリプロブセットは、(1)リボソームRNA(rRNA)にハイブリダイズし、近くのパドロックプロブを環状化するためのスプリントとして作用するスプリントDNAプロブ(下記を参照);(2)着目した特有のmRNA種を標的化し、遺伝子にユニークな識別子をコードするパドロックプロブ;(3)同じmRNAのパドロックプロブの隣接部位を標的化し、ローリングサークル増幅(RCA)によって環状化されたパドロックプロブの増幅を可能にし、DNAナノボール(アンプリコン)を生成するプライマーとして作用するプライマーを包含する。重要なことに、プライマー-パドロックプロブの遺伝子特異的なハイブリダイゼーションペアは、単一プロブの非特異的ハイブリダイゼーションから生じる偽陽性シグナルを除外する(20)(図9A)。一緒にすると、RNAのシグナルは、3プロブのすべてが近接して存在する場合にのみDNAアンプリコンに増幅される(図9Bおよび図9C)。その後、DNAアンプリコンは、組織-ヒドロゲルコンジュゲーション化学を使用して、ポリアクリルアミドヒドロゲルマトリックスにin situで埋め込まれる(20)。次いで、DNAアンプリコンの遺伝子にユニークなバーコードは、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によるin situ配列決定によってデコードされる(SEDAL、図9A)(20)。

【0129】

リボソームタンパク質を標的化する一次抗体(これは、その後、トリプロブ増幅のためのスプリントがコンジュゲートしたプロテインA/Gによって検出される)を利用して、RIBOmapワークフローの代替戦略も設計された(図12A)。具体的には、この戦略は、抗RPS3(小40Sサブユニットリボソームタンパク質3)抗体および抗RPL4(大80Sサブユニットリボソームタンパク質4)抗体を使用して評価された(図12B~図12E)。抗体に基づく戦略のシグナル対ノイズ比(SNR)は、13.6~16.7の範囲であった。rRNA標的化戦略のSNRは 93 ± 17 であった(図12F)。

【0130】

次に、リボソームが結合したmRNAに対するRIBOmapトリプローブ増幅の特異性が評価された。最初に、非翻訳中の長い非コードRNA(核局在化MALAT1 RNAおよび細胞質局在化vtRNA1-1 RNA)を陰性対照として使用して、検出特異性が試験された。RIBOmapおよび以前に報告されたSTARmap(20)イメージングが、HeLa細胞におけるACTBおよび陰性対照RNAについて行われて、リボソームが結合したRNA、および全RNAをそれぞれ検出した(図9D)。RIBOmapはACTB mRNAのみを検出した一方、STARmapはmRNAおよび非コードRNAの両方を検出したことが見出された(図9Eおよび図9F)。次に、リボソーム負荷部位の検出におけるRIBOmapのサブ転写産物特異性が検証された。ここでは、翻訳を開始中のリボソームを開始コドンでトラップし、伸長中のリボソームを転写産物から追い出すことができる、翻訳阻害剤であるハリングトニンが使用された(図9G)。3つのトリプローブセットは、開始コドンから異なる距離(-16、115、および405nt)でサブ転写産物領域を標的化するように設計された(図1H)。5分のハリングトニン処理(2 μ g/mlの最終濃度)後、開始コドンの115または405nt下流を標的化するプローブによって検出された場合、ACTB mRNAは、RIBOmapのシグナル強度の有意な減少(それぞれ、 $p=7.5 \times 10^{-5}$ 、 4.7×10^{-5} 、スチューデントのt検定)を示した一方、開始コドンから-16ntを標的化するプローブによって作出されたシグナルは、わずかな減少を示した(図9Iおよび図9J)。まとめると、RIBOmapは、リボソームが結合したmRNAを特異的に検出することができることが実証された。

10

20

30

40

50

【0131】

RIBOmapのSNRおよび特異性をベンチマーキングした後、HeLa細胞において高度に多重化した981個の遺伝子のRIBOmap実験を行うことによって、単一細胞における細胞周期依存性および局在化したmRNA翻訳が細胞以下の分解能でプロファイルされた(図10A)。981個の遺伝子は、細胞周期遺伝子マーカー、多様な細胞内パターンを有する遺伝子、および変動するRNA安定性の遺伝子から構成されるキュレートされたリストを表す(21~24)。細胞周期段階および細胞内小器官の情報をさらに組み込むマルチモーダルRIBOmap実験が設計された:(1)各細胞の細胞周期フェーズは蛍光のユビキチン化に基づく細胞周期インジケータ(FUCCI)によって捕捉された(25、26);(2)リボソームが結合したmRNA(981個の遺伝子)は、FUCCIイメージング後にin situで配列決定された(20);(3)最後に、核、小胞体、および細胞形状が染色され、画像化された(図2B)。3つのイメージングモダリティはすべて、核(DAPI)染色の共有されたチャンネルによって登録された。空間トランスラトーム対空間トランスクリプトームを比較するために、HeLa FUCCI細胞の同じバッチに対してSTARmapを使用して(同一のRNAハイブリダイゼーション配列を用いて)、同じ981個の遺伝子のペアリングされた全RNAマッピングが実施された(図10A)。品質管理フィルタリング後、合計で、1,813個の細胞がRIBOmapによって配列決定(平均で細胞あたり1,500個のリボソームが結合したRNAリード)され、1,757個の細胞がSTARmapによって配列決定(平均で細胞あたり2,349個のRNAリード)された。

【0132】

最初に、RIBOmapが細胞周期依存性mRNA翻訳を詳細分析できるかどうか評価された。この目標のために、RIBOmapによって作出された単一細胞トランスラトームプロファイルおよびSTARmapによって作出された単一細胞トランスクリプトームプロファイルが、単一細胞軌跡分析に供された(21)。RIBOmapおよびSTARmapサンプルの両方において、公知の細胞周期遺伝子マーカー(21)の単一細胞プロファイルが使用されて、単一細胞を擬時間値を用いて拡散マップに埋め込み、細胞周期の進行を描写した(図10Cおよび図13Aおよび図13B)。両方のデータセットについて、RNAで定義されたG1、S、およびG2/M細胞周期フェーズは、予想される細胞周期依存性パターンのFUCCIタンパク質の蛍光と一致し(図10C)、細胞状態の検出におけるRIBOmapの能力を実証した。

【0133】

細胞周期の進行の描写におけるRIBOmapの精度を確認した後、共調節される遺伝子モジュールが共変動分析によって同定された。単一細胞トランスラトーム発現に基づいて、すべての遺伝子ペアのペアワイズ相関が計算され、階層的クラスタリングが使用されて、

単一細胞にわたって高い相関係数を有する遺伝子を同定した。とりわけ、実質的なモジュール内相関および別個の機能的経路の濃縮を有する5つの遺伝子モジュールが見出された(モジュール1~5、図10Dおよび図14A~図14D)。特に、モジュール3および5の遺伝子は、それぞれG2/MおよびG1/S細胞周期マーカー遺伝子で濃縮された(図10E)。これらの2つの遺伝子モジュールはまた、負の相関がある(図14E)。この結果は、これらの細胞周期マーカー遺伝子が、それらの遺伝子機能の同期した遂行のために、細胞周期の進行中に共調節されるという以前の知見を支持する単一細胞レベルの証拠を提供した(27)。その上、モジュール2は、リボソームタンパク質(RPS3、RPS28、およびRPL37)および翻訳因子(EEF2、EIF3B、およびETF1)などのタンパク質翻訳機構をコードする遺伝子を含む(図14C)。これらの遺伝子は、モジュール5(G1/Sマーカー遺伝子)と正の相関を示し、モジュール3(G2/Mマーカー遺伝子)と負の相関を示す(図14F)。このことは、細胞内小器官の物理的な拡大および複製のためのタンパク質産生を供給するために、G1/Sフェーズにおいてタンパク質翻訳機構がより能動的に産生されるという結論をもたらす。

10

20

30

40

50

【0134】

データセットの高い空間分解能を活用して、RIBOmapが翻訳の細胞内パターンを検出できるかどうかを調べた。細胞内空間に共局在化する(空間的近接を呈する)傾向を示す翻訳中の遺伝子を同定するために、RIBOmap中の各RNAについて最近傍プロファイルが作出され、遺伝子共局在化の有意性が、ランダム化対照に対して比較することによって評価された。遺伝子共局在化マトリックスのその後の階層的クラスタリングにより、高度に相関した細胞内空間構成および別個の機能的濃縮を有する5つの遺伝子モジュールが同定された(モジュール1~5、図10E~図10Gおよび図15A~図15C)。それらの中で、モジュール2、4、および5は、膜タンパク質および分泌経路で機能的に濃縮され(図10Fおよび図10Gおよび図15Aおよび図15B)、ER染色で物理的に共局在化されており(図10Hおよび図10Iおよび図14Dおよび図14E)、これらがERで翻訳された遺伝子であることを示唆している。一方、モジュール1および3の遺伝子は、それぞれ有糸分裂紡錘体の大きなタンパク質複合体(例を挙げれば、CDK1、NUSAP1、KIF23、SPAG5、TACC3、FAM83D)および翻訳機構(例を挙げれば、RPS3、RPS28、RPL36A、EEF2、DHX9)に濃縮される(図10Fおよび図10Gおよび図15Aおよび図15C)。そのような観察は、タンパク質複合体のサブユニットが効率的なアセンブリのために空間的に近接して生成され得ることを指し示す。最後に、共調節された遺伝子が翻訳のために共局在化される傾向があるかどうかを調べた。この目標のために、細胞内共局在分析からの共局在化p値が、単一細胞共変動遺伝子マトリックスにプロットされた。高い単一細胞共変動相関を有する5つの遺伝子モジュールはまた、強い細胞内共局在化を示すことが見出された(図16F)。これらの結果は、機能的に関連する遺伝子群が、細胞内の共局在化した翻訳によって共調節されることができるという結論をもたらす。

【0135】

次に、重大な転写後RNA修飾(28)であるN⁶-メチルアデノシン修飾(m⁶A)を有するRNAが、別個の空間翻訳パターンを有するかどうか決定された。この目標のために、各遺伝子の翻訳分布が、核膜および細胞質膜の間の各アンプリコンの相対ポジションを推定する距離比(DR)メトリックで定量化された(図10J)。とりわけ、m⁶A遺伝子のDR値は、非m⁶A遺伝子のDR値よりも有意に低いことが観察され(図10K)、m⁶A遺伝子は核膜の近くで物理的に翻訳されていることを指し示した。この差異は、サイトゾルにおけるm⁶A修飾RNAのより短い寿命、および、このようにして、より短い輸送時間によって説明されることができることと仮定された(23)。一緒にすると、細胞以下のレベルでの空間トランスラトミックスの統合的分析に対するRIBOmapの能力が実証され、RNAプロセッシングおよび翻訳に関する将来の研究のために、前例のないアプローチを提供した。

【0136】

組織サンプルの分析におけるRIBOmapの空間プロファイリング力をさらに実証するために、このアプローチはマウス脳スライスに適用されて、in situ単一細胞トランスラト

ームプロファイルを明らかにした。ここでは、以前に公開されたマウス細胞アトラスの単一細胞配列決定研究からキュレートされた5,413個の遺伝子の標的化遺伝子リスト(29~35)が、マッピングされた。9ラウンドのin situ配列決定により、多数の脳領域を含有するマウス左半球(27.6mm²、62,753個の細胞)の10μm厚の冠状切片が、90nm×90nm×300nmのボクセルサイズで画像化された(図1A)。予想されたように、タンパク質翻訳が起こるサイトゾルでの高密度シグナルとは対照的に、最小のRIBOmapシグナルが核で観察された(図11B)。

【0137】

最初に、周知の細胞型マーカー遺伝子(例を挙げれば、Slc17a7、Gad2、およびPcp4)の空間翻訳パターンを、Allen Brainデータベース(36)からの対応する遺伝子のin situハイブリダイゼーション(ISH)画像と比較することによって、組織RIBOmapデータがベンチマークされたところ、比較は一致した空間パターンを示した(図11Cおよび図16A)。顕著には、特有の遺伝子のRIBOmapリードは、海馬におけるCA3のSstおよびCA1のNeflなど、特有の脳領域におけるRNAシグナル(ISH)よりもタンパク質シグナルとより良好に相関したことが観察された(図16Bおよび図16C)。この結果は、リボソームプロファイリングの結果がRNA-seqデータよりもタンパク質の存在量と良好に相関したという以前の報告と一致している(7、11、12)。次に、62,753個の細胞のすべてが脳細胞型同定に供された(図17)。ここでは、階層的クラスタリング戦略が採用された(20、31);レベル1のクラスタリングは、細胞を神経細胞およびグリア細胞に分類した(図18Aおよび図18B)。レベル2のクラスタリングは、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞、ミクログリア、および血管細胞を同定した(図18A、図18C、および図18D);レベル3のクラスタリングは、57個の別個のサブタイプを同定した(図11Dおよび図19~図21)。細胞タイピングの結果に基づいて、画像化された片側脳領域から空間細胞マップが作出された(図11E)。これらのトランスラトーム的に定義された細胞型の空間分布は、大方予想されるとおりである。例えば、皮質は層特異的興奮性ニューロン(層2/3:Cplx2⁺、層4/5:Dkk3⁺、層6:Nr4a2⁺、層6:Pcp4⁺)で、脳梁はオリゴデンドロサイト(Mbp⁺、Mal⁺、Cnp⁺、Plp1⁺)で、線条体は中型有棘ニューロン(Tac1⁺、Adora2a⁺、Ppp1r1b⁺、Penk⁺、Rasd2⁺)で、視床は興奮性ニューロン(Prkcd⁺、Synpo2⁺)で、および視床下部はペプチド作動性ニューロン(Hap1⁺、Tac1⁺、Dlk⁺)で濃縮される。CA1-3の錐体層およびDGの顆粒層のそれぞれにおいて、領域特異的興奮性ニューロンも観察された。このようにして、単一細胞トランスラトームに基づいて多様な脳細胞型を同定するというRIBOmapの潜在能力が、空間組織アトラスを作出するための代替戦略として実証された。

【0138】

細胞内局在化したmRNA翻訳は、神経細胞(37~39)およびグリア細胞機能(40~42)の両方にとって不可欠である。とりわけ、RIBOmapの細胞以下の分解能は、神経およびグリア細胞の細胞体および突起における局在化した翻訳の調査を可能にした。この目標のために、RIBOmapリードは細胞体リード(すなわち、ClusterMap(43)によって同定された細胞ボディ領域の内側)および突起リード(すなわち、残りのリード)に分けられた(図11Fおよび図11G)。次に、最も高い突起対細胞体の比を有する上位10%の遺伝子は突起で濃縮された翻訳遺伝子として定義され、最も低い突起対細胞体の比を有する上位10%の遺伝子は細胞体で濃縮された翻訳遺伝子として定義された(図11H)。遺伝子オンロジー(GO)分析は、突起で濃縮された翻訳遺伝子が翻訳、シナプス、および後シナプス肥厚に関連することを示した(図11I)。対照的に、細胞体で濃縮された翻訳遺伝子は、原形質膜、細胞外マトリックス、および小胞体に関連する(図11J)。この結果は、膜および分泌タンパク質が細胞体領域のERで翻訳されると予想されるので、組織サンプルの細胞内局在化した翻訳を検出する際のRIBOmapの能力をさらに検証した。とりわけ、後シナプス肥厚タンパク質(例を挙げれば、Shank1、Dlg4、およびGrik5)、翻訳機構タンパク質(例を挙げれば、Eef2、Eef1a、Rpl3、およびRps5)、モータータンパク質(例を挙げれば、Kif5aおよびKif1a)、ならびにカルシウムセンサおよびシグナル伝達タンパク質(

例を挙げれば、*Calm1*および*Camk2n1*)などの、突起で濃縮された翻訳シグナルの並外れて高い存在量が、海馬神経毛において、観察された(図11Kおよび図22A)。比較として、膜貫通前駆体タンパク質をコードし、アルツハイマー病に関連する*App*、および小胞体に関連することが知られている*Rtn4*などの、細胞体で濃縮された翻訳遺伝子が、海馬神経毛において、まばらなRIBOmapシグナルを示した(図11Lおよび図22B)。ニューロンにおいて翻訳されるこれらの例示的な遺伝子の他に、グリア細胞マーカー遺伝子の局在化した翻訳も観察された(図11Mおよび図11Nおよび図22Cおよび図22D)。オリゴデンドロサイトの場合、マーカー遺伝子*Mbp*および*Plekha1*は、突起で濃縮された翻訳遺伝子として同定された一方、*Mal*および*Cnp*は、細胞体で濃縮された翻訳遺伝子であった(図11Mおよび図11Nおよび図22Cおよび図22D)。アストロサイトは多くの突起を有し、それらのマーカー遺伝子は、*Gfap*、*Ttyh1*、*Apoe*、および*Clu*のように、突起で濃縮された翻訳カテゴリーにおいて濃縮された(図11Mおよび図22C)。血管細胞の場合、それらのマーカー遺伝子は、*Ptgds*、*Itih2a*、および*Bsg*のように、細胞体で濃縮された翻訳遺伝子群において濃縮されている(図22C)。全体として、RIBOmapは、マウス脳組織において、神経およびグリア細胞の両方の突起における局在化した翻訳を研究するための強力なツールであることが実証された。

10

【0139】

新規な空間オミックス法であるRIBOmapの開発により、空間mRNA翻訳は単一細胞および細胞以下のレベルでマッピングされることができる。RIBOmapが、細胞周期中の981個の遺伝子の翻訳を精査し、ヒト細胞における翻訳中のRNAの別個の細胞内分布パターンを明らかにすることによって、mRNA調節およびタンパク質合成のより包括的な理解に向けた重大なステップを可能にすることが、本明細書において実証された。これを解説するために、本開示は、高い3D空間分解能でインタクトな組織サンプルにおける*in situ*でのトランスラトーム状態の空間プロファイリングを実証し、マウス脳組織におけるトランスラトームで定義された空間細胞マップを作出する。その上、Ribo-STAMPおよびTRAP法と比較して、RIBOmapは遺伝子マニピュレーションに依拠しない。

20

【0140】

材料および方法

細胞培養

ヒトHeLa細胞(CCL-2)はATCCから得られ、10%FBSを補充したDMEM中、37℃および5%CO₂で培養された。2μg/mlの最終濃度まで薬物を添加し、37℃で5分間インキュベートすることによって、ハリングトニン処理は行われた。

30

【0141】

HeLa FUCCI細胞は、以前に記載されたように(26)、レンチウイルス粒子を使用して作出された。簡潔には、HEK 293T細胞は、pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro(Addgeneから得られる、#86849)およびパッケージングプラスミド(psPAX2およびVSVG)でトランスフェクトされた。トランスフェクションの48時間後に、ウイルスを含有する培養培地から上清は回収された。上清は0.45μmのPESフィルタを通して濾過され、ウイルス上清が使用されて、HeLa細胞を形質導入した。ピューロマイシン選択に続いて、安定な細胞株は成長された。

40

【0142】

マウス

すべての動物手順は、動物プロトコル#0255-08-19の下でBroad Institute of MITおよびHarvardのInstitutional Animal Care and Use Committee(IACUC)によって承認された動物ケアガイドラインに従った。動物実験は、IACUCポリシーおよびNIHガイドラインに準拠して実施された。この研究におけるRIBOmapのために使用されたC57BL/6(雄、16週齢)マウスは、The Jackson Laboratory(JAX)から購入される。

【0143】

化学物質および酵素

50

化学物質および酵素は、名称(ベンダー、カタログ番号)として列挙される:DMEM(Gibco、11995)、ハリングトニン(Abcam、ab141941)。リポフェクタミンMessenger MAXトランスフェクション試薬(Thermo Scientific、LMRNA003)。Tissue-Tek O.C.T.化合物(SAKURA、4583)。ガラス底24ウェルプレート(Cellvis、P24-1.5H-N)。ガラス底12ウェルおよび24ウェルプレート(MatTek、P12G-1.5-14-F)。3-(トリメトキシシリル)プロピルメタクリレート(Sigma、M6514)。ポリ-D-リジン(Sigma-Aldrich、A-003-M)。16%PFA(Electron Microscope Sciences、15710-S)。メタノール(Sigma-Aldrich、34860-1L-R)。PBS(Gibco、10010-023)。Tween-20、10%溶液(Calbiochem、655206)。酵母tRNA(Thermo Scientific、AM7119)。SUPERase・In RNase阻害剤(Thermo Scientific、AM2696)。20×SSC(Sigma-Aldrich、S6639)。ホルムアミド(Calbiochem、655206)。リボヌクレオシドバナジル複合体(New England Biolabs、S1402S)。T4 DNAリガーゼ、5 Weiss U/μL(Thermo Scientific、EL0012)。Phi29 DNAポリメラーゼ(Thermo Scientific、EP0094)。10mM dNTPミックス(Thermo Scientific、18427089)。UltraPure BSA(Thermo Scientific、AM2618)。5-(3-アミノアリル)-dUTP(Thermo Scientific、AM8439)。メタクリル酸NHSエステル、98%(Sigma-Aldrich、730300)。DMSO、無水(Molecular Probes、D12345)。アクリルアミド溶液、40%(Bio-Rad、161-0140)。ビス溶液、2%(Bio-Rad、161-0142)。過硫酸アンモニウム(Sigma-Aldrich、A3678)。N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(Sigma-Aldrich、T9281)。OminPur SDS、20%(Calbiochem、7991)。プロテイナーゼK溶液、RNAグレード(Thermo Scientific、25530049)。南極ホスファターゼ(New England Biolabs、M0289L)。DAPI(Molecular Probes、D1306)。10%Triton X-100(Sigma-Aldrich、93443)。コンカナバリンA、Alexa Fluor 594コンジュゲート(Thermo Scientific、C11253)。フラミンゴ蛍光タンパク質ゲル染色(Bio-Rad、1610490)。DL-ジチオスレイトール(Sigma-Aldrich、D9779)。0.5ml 30-kDa Amicon Ultra Filters(Millipore、UFC503024)。リボソームタンパク質L4ポリクローナル抗体(Thermo Scientific、11302-1-AP)。RPS3モノクローナル抗体(Thermo Scientific、66046-1-IG)。Micro Bio-Spin(商標)P-6ゲルカラム、トリス緩衝液(Bio-Rad、7326221)。Pierce(商標)SM(PEG)₂、No-Weigh(商標)フォーマット(Thermo Scientific、A35397)。Zeba(商標)スピン脱塩カラム、7K MWCO、0.5mL(Thermo Scientific、89882)。

10

20

30

【0144】

RIBOmapおよびSTARmapプローブの設計

スプリントプローブおよびSNAILプローブを含有するトリプローブ戦略を使用して、RIBOmapは行われた。スプリントプローブは、3つのパート:18SリボソームRNA(rRNA)にハイブリダイズされる5'端の25nt配列、中央の50ntデオキシアデノシン(dA)配列、および3'端の12ntのスプリント-パドロックアニーリング配列からなった。18S rRNAにハイブリダイズされる25nt配列の設計は、以前に記載されたように適用された(44)。プローブは、比較的構造化されておらず、化学修飾に利用可能である、18S rRNAの領域に対して標的化される。合計で5種のユニークなプローブが設計された。スプリントプローブの3'端は、3'反転dT修飾によってブロックされ、RCA増幅のためのプライマーとして使用されることができない。スプリントプローブは、Integrated DNA Technologies(IDT)によって合成された。

40

【0145】

SNAILプローブの設計は、以前に記載されたように適用された(20)。手短には、Picky 2.2が使用されて、40~46ntに設定された長さを有する各SNAILプローブペアのハイブリダイゼーション配列を設計し、次いで、結果として得られた配列は半分の20~25ntに分割され、かつ0~2ntで分離され、2つの半分間の融解温度(T_m)を最もよくマッチさせた。HeLa細胞の981個の遺伝子実験のために、5または6ペアのSNAILプローブが各遺伝子に対して設計された。マウス脳の5,433個の遺伝子実験のために、4ペアのSNAI

50

Lプローブが各遺伝子に対して設計された。SNAILプローブが合成され、IDTによってプールされた。

【0146】

細胞培養のためのRIBOmapおよびSTARmapのサンプル調製

HeLa FUCCI細胞は24ウェルプレートで培養され、サンプル回収前にPBSで洗浄され、PBS緩衝液中、300 μ lの1.6% PFAで室温にて15分間固定化された。固定後、細胞は450 μ lの冷メタノールで透過処理され、-20℃で1時間インキュベートされた。次いで、HeLa FUCCI細胞サンプルは、-20℃から室温に5分間取り出され、次いで、200 μ lのクエンチング溶液(PBS中、1mg/mlの酵母tRNA、0.1U/ μ lのSUPERase In RNase阻害剤、100mMのグリシン、0.1% Tween-20)によって室温で10分間クエンチされた。クエンチング後、サンプルは、200 μ l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、20mMのリボヌクレオシドバナジル複合体、0.1mg/mlの酵母tRNA、0.5% SUPERase In、0.1% Tween-20、オリゴあたり1nMでプールされたSNAILプローブおよびプローブあたり1 μ MでのRIBOmapサンプル用のスプリントプローブ)と、パラフィルムラッピングおよび振盪を伴いながら12時間、加湿オープン中、40℃でインキュベートされた。サンプルは、300 μ lのPBSTR(PBS中、0.1U/ μ lのSUPERase・In RNase阻害剤、0.1% Tween-20)によって2回、および300 μ lの高塩洗浄緩衝液(PBSTRに溶解した4×SSC)によって1回、37℃で各洗浄につき20分間洗浄された。最後に、サンプルは、300 μ lのPBSTRで室温にて1回すすがれた。

10

【0147】

次いで、サンプルは、200 μ lのライゲーション混合物(1×T4 DNAリガーゼ緩衝液中、0.25U/ μ lのT4 DNAリガーゼ、0.5mg/mlのBSA、および0.4U/ μ lのSUPERase・In RNase阻害剤)と、穏やかに振盪しながら室温にて2時間インキュベートされた。ライゲーション反応後、サンプルは、300 μ lのPBSTRで2回洗浄され、次いで、200 μ lのローリングサークル増幅(RCA)混合物(1×Phi29緩衝液中、0.5U/ μ lのPhi29 DNAポリメラーゼ、250 μ MのdNTP、20 μ Mの5-(3-アミノアリル)-dUTP、0.5mg/mlのBSAおよび0.4U/ μ lのSUPERase・In RNase阻害剤)と、穏やかに振盪しながら4℃で30分間および30℃で2時間インキュベートされた。その後、サンプルはPBST(PBS中、0.1% Tween-20)で2回洗浄された。次いで、イメージングが行われて、RIBOmapサンプルおよびSTARmapサンプルのFUCCI蛍光シグナルを同時に記録した。その後、サンプルは、200 μ lの修飾混合物(100mMの重炭酸ナトリウム緩衝液中、25mMのメチルアクリル酸NHSエステル)で室温にて1時間処理され、次いでPBSTによって1回すすがれた。サンプルは、150 μ lのモノマー緩衝液(2×SSC中、4%アクリルアミド、0.2%ビスアクリルアミド)と、室温にて15分間インキュベートされた。次いで、緩衝液は吸引され、25 μ Lの重合混合物(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)がサンプルの中心に添加され、直ちにGel Slickコーティングされたカバースリップで覆われた。重合反応はN₂ボックス中、室温にて1時間行われ、次いでPBSTによって各々5分間で2回洗浄される。

20

30

【0148】

次いで、組織-ゲルハイブリッドは、200 μ lのプロテイナーゼK混合物(0.2mg/mlのプロテイナーゼK、1% SDS、100mMのNaCl、および50mMのトリス)で37℃で1時間消化され、次いでPBSTによって各々5分間で3回洗浄された。その後、サンプルは、200 μ lの脱リン酸化混合物(1×南極ホスファターゼ緩衝液中、0.25U/ μ Lの南極ホスファターゼ、0.5mg/mLのBSA)で37℃で1時間処理され、PBSTによって各々5分間で3回洗浄された。

40

【0149】

SEDAL配列決定のために、各配列決定サイクルは、サンプルを200 μ lのストリッピング緩衝液(H₂O中、60%ホルムアミド、0.1% Triton X-100)で室温にて各々10分間で2回処理することから開始し、続いてPBSTで各々5分間で3回洗浄した。次いで、サンプルは、200 μ lの配列決定混合物(1×T4 DNAリガーゼ緩衝液中、0.1875U/ μ lのT4 D

50

NAリガーゼ、0.5mg/mlのBSA、10 μ Mのリーディングプローブ、および5 μ Mの蛍光オリゴ)と、室温にて少なくとも3時間インキュベートされた。サンプルは、300 μ lの洗浄およびイメージング緩衝液(2 $\times$ SSC緩衝液中、10%ホルムアミド)によって各々10分間で3回洗浄され、次いで、イメージングのために、洗浄およびイメージング緩衝液に浸漬された。画像は、40倍の油浸対物レンズ(NA 1.3)および94.64nm $\times$ 94.64nm $\times$ 350nmのボクセルサイズを有するLeica TCS SP8共焦点顕微鏡法を使用して取得された。DAPIシグナルは、配列決定の第1のラウンドで画像化された。6サイクルのイメージングが行われて、981個の遺伝子を検出した。

【0150】

SEDAL配列決定後、サンプルは、200 μ lのストリッピング緩衝液で室温にて各々10分間で3回処理された。次いで、サンプルは、PBSTで各々5分間で3回洗浄され、200 μ lのER染色混合物(100mMの重炭酸ナトリウム緩衝液に希釈された0.05mg/mlのコンカナバリンA)とインキュベートされ、次いでPBSTによって各々5分間で2回洗浄された。その後、サンプルは、200 μ lのフラミンゴ染色混合物(洗浄およびイメージング緩衝液中、1 $\times$ フラミンゴ蛍光ゲル染色)と室温にて一晩インキュベートされ、次いで300 μ lのPBSTで3回洗浄された。

【0151】

マウス組織のためのRIBOmapのサンプル調製

この研究で使用されたマウスはイソフルランで麻酔され、次いで迅速に断頭された。マウス脳組織は回収され、Tissue-Tek O.C.T.化合物中に置かれた。次いで、O.C.T.中の脳組織は液体窒素中で凍結され、-80 $^{\circ}$ Cに保たれた。マウス脳組織の切片化のために、脳組織は、クライオスタット(Leica CM1950)に移され、-20 $^{\circ}$ Cで20 μ mの冠状切片に切断された。スライスに移され、3-(トリメトキシシリル)プロピルメタクリレートおよびポリ-D-リジンによって前処理されたガラス底12ウェルプレートに取り付けられた。脳スライスは、PBS中の4%PFAで室温にて15分間固定され、次いで、冷メタノールで透過処理され、-80 $^{\circ}$ Cで1時間置かれた。マウス脳組織の実験手順は、脳組織が12ウェルプレートで調製された時に、すべての反応体積が2倍にされたことを除いて、HeLa細胞の場合とほぼ同じである。蛍光タンパク質のイメージング手順は行われず、細胞小器官染色の手順は関与されなかった。画像は、63倍の油浸対物レンズ(NA 1.3)および90.14nm $\times$ 90.14nm $\times$ 300nmのボクセルサイズを有するLeica TCS SP8共焦点顕微鏡法を使用して取得された。DAPIシグナルは、配列決定の第1のラウンドで画像化され、9サイクルのイメージングが行われて、5,413個の遺伝子を検出した。

【0152】

細胞培養物のための抗体に基づくRIBOmap戦略

スプリントプローブがコンジュゲートしたプロテインA/Gが、最初に調製された。手短には、5'-チオール修飾スプリントプローブ(IDT)は、DL-ジチオスレイトール(DTT)によって室温にて2時間活性化され、Micro Bio-Spin(商標)P-6ゲルカラムによって精製されて、過剰なDTTを除去した。プロテインA/Gは、PEG化されたSMCC架橋剤[SM(PEG)₂]と4 $^{\circ}$ Cで2時間反応され、次いで、Zeba脱塩カラムによって精製されて、過剰な架橋剤を除去した。活性化されたスプリントプローブは、プロテインA/G(約1:11のプロテインA/G対スプリントプローブのモル比)と4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートされた。最終のコンジュゲートされたプロテインA/Gは、0.5mlの30-kDa Amicon Ultra Filterを使用することによって5回洗浄されて、未反応のDNAオリゴヌクレオチドを除去した。

【0153】

固定化ステップは、rRNAプローブに基づくRIBOmap戦略の場合と同じである。ハイブリダイゼーションステップのために、スプリントプローブではなくSNAILプローブのみが添加された。このステップのための他の試薬は、rRNAプローブに基づくRIBOmap戦略の場合と同じである。ハイブリダイゼーション後、リボソームタンパク質(RPS3またはRPL4)抗体インキュベーションが行われた。細胞サンプルは、ブロッキング溶液(PBSTR中、5mg/mlのBSA)で室温にて30分間ブロックされ、次いで、ブロッキング溶液

中の1:100希釈した一次抗体(RPS3またはRPL4、対照サンプルのIgG)で4℃で1時間染色された。サンプルは、PBSTRで室温にて各々5分間で3回洗浄された。次いで、サンプルは、スプリントプローブがコンジュゲートしたプロテインA/Gと室温にて1時間インキュベートされ、PBSTRで室温にて各々5分間で3回洗浄された。ライゲーションステップおよびRCAステップは、rRNAプローブに基づくRIBOmap戦略の場合と同じである。次いで、サンプルは、PBST中の、DNAアンプリコンに相補的な50nMの蛍光オリゴおよびDAPIとインキュベートされた。DNAアンプリコンシグナルは、イメージングによって検出された。

【0154】

RIBOmapおよびSTARmapイメージングの前処理。

画像デコンボリューションは、Huygens Essential version 21.04(Scientific Volume Imaging、The Netherlands、svi.nl)を用い、CMLEアルゴリズムを使用して、SNR:10および10の反復で達成された。以前の報告により、同様の画像登録、スポットコーリング、および微調整を伴うバーコードフィルタリングが適用された(20)。

【0155】

RIBOmap/STARmap細胞培養サンプルのデータ処理

3D細胞セグメンテーション:画像セグメンテーションは、CellProfiler v4.1.3によって作出された2D参照セグメンテーションを組み合わせた戦略で達成され、3D染色画像は、カスタマイズしたMATLABスクリプトで処理された。最初に、アンプリコンチャンネルおよびフラミンゴ蛍光ゲル染色画像を組み合わせた重ね合わせ画像が創出されて、細胞の境界を表した。3D DAPI染色画像および重ね合わせ画像の両方の最大投影は、CellProfiler v4.1.3で創出したカスタマイズされたパイプラインに入力された。メディアンフィルタが使用されて、画像上の高周波ノイズを除去し、IdentifyPrimaryObjects関数を使用して、細胞核を検出した。次いで、同定された核に基づいて、フィルタリングされた2D重ね合わせ画像にIdentifySecondaryObjects機能を適用することによって、細胞の境界は輪郭付けられた。アウトプット中の核および細胞セグメンテーションマスクの両方は、3Dセグメンテーションを創出するための以下の手順において、参照セグメンテーションとして使用された。

【0156】

3Dセグメンテーションのために、異なる細胞区画(核のDAPI染色、細胞の境界の重ね合わせ画像、およびERのコンカナバリンA染色)を標的化する画像は、最初にメディアンフィルタによって処理され、手動でキュレートした閾値で二値化された。200未満のボクセルを有するすべての接続されたコンポーネント(オブジェクト)は、バイナリ画像から除去された。次いで、10に等しい半径を有するディスク構造エレメントを用いて画像は拡張された。次いで、各細胞領域を標的化する3Dセグメンテーションマスクが、バイナリ画像および以前のステップからの2D参照細胞セグメンテーションの間のエレメントごとの乗算プロセスによって作出された。核領域は3D細胞セグメンテーションマスクから除去されて、細胞質セグメンテーションを創出した。最終的に、3Dにおいて標識された各領域とオーバーラップするフィルタリングされたアンプリコンを定量化することによって、各細胞区画における細胞ごとの遺伝子発現マトリックスが創出された。

【0157】

FUCCI細胞株のタンパク質シグナルの定量化:mAGおよびmKO2蛍光画像の両方が、以前の報告による画像登録を介して配列決定画像とアラインメントされた。各タンパク質のシグナルレベルは、3D核セグメンテーションマスクとオーバーラップするボクセルの積分強度として定量化された。

【0158】

単一細胞の品質管理:高品質のライブラリーを確実にするために、RIBOmapおよびSTARmap法の両方によって測定された単一細胞プロファイルは、それぞれ以下のメトリックおよび閾値に基づいてフィルタリングされた。最初に、所望の範囲($0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ ボクセル)外の3Dセグメンテーションによって定義された物理的体積を有する細胞は

除外された。次いで、細胞あたりの転写産物の数についてのサンプル特異的閾値が使用されて、各データセットにおける外れ値を除去した(RIBOmap下限(LB):300、上限(UB):3500、STARmap LB:500、UB:6000)。追加的に、転写産物の密度は、転写産物の数および各細胞の物理的体積の間の比として定義され、これが閾値メトリック(LB:0.00055)として使用されて細胞をさらに除外した。遺伝子は、それらを発現した細胞のパーセンテージ(LB:10%)および細胞におけるそれらの最大カウント(RIBOmap LB:2;STARmap LB:4)に基づいてフィルタリングされた。RIBOmapおよびSTARmapのフィルタリング基準の差異は、各技法に対する異なる予想から生じた。フィルタリング後、897個の遺伝子の、RIBOmapデータセットについては1,813個の細胞、およびSTARmapについては1,757個の細胞が、その後の分析に入った。

10

【0159】

共変動分析:共変動する遺伝子モジュールを同定するために、発現マトリックスは、最初に、細胞あたりで同じ総数の転写産物に対して正規化され、次いで、各遺伝子ペアにわたるピアソン相関係数が計算されて細胞間変動の類似性を測定した。ward linkageを用いた階層的クラスタリングは、n_clusterを10に設定して、RIBOmapに対して行われた。

【0160】

共局在化分析:共局在化リードクラスターを明らかにするために、並べ替え分析が行われた。細胞内の1つのリードが与えられた場合に、隣接リード(半径3 μ m以内)の遺伝子アイデンティティが記録された。すべての細胞をスクリーニングすることによって、観察されたカウントとして同定された各隣接遺伝子ペアのカウントが得られた。次に、RNAリードの遺伝子標識をそれらの細胞内位置を乱すことなくランダムにシャッフルするために、1000回の並べ替え試験が行われた。各並べ替えラウンドに対して、各隣接遺伝子ペアのカウントが、並べ替え分布を作出するために回収された。その後、観察されたカウントを並べ替え分布と比較することによって、各遺伝子ペアの片側p値が推測された。ペアワイズp値がさらに使用されて、ヒートマップを構築した(図10E)。RIBOmapサンプルのヒートマップにおける行および列は、階層的クラスタリングによって順序付けられた。STARmapサンプルのヒートマップは、空間分布の差異を用いて遺伝子モジュールを検出するために、RIBOmapと同じ順序を使用した。遺伝子モジュール間の小胞体(ER)局在化レベルを定量的に比較するために、単一細胞レベルで標的遺伝子モジュール内の遺伝子についてERに局在化したリードのパーセンテージが計算された。すべての遺伝子に対して同じパーセンテージが、比較ベースラインとして使用された。ウィルコクソンの符号順位検定は、統計的有意性を試験するために行われた。

20

30

【0161】

細胞周期および擬時間:細胞周期の進行を表す擬時間軌跡を構築するために、細胞周期フェーズ(G1、G1S、G2M)が、サイクルマーカー遺伝子に限定された細胞の発現プロファイルを使用して(Scanpyのscore_genes_cell_cycle関数)、最初に同定された。次に、STARmap細胞は、同じ遺伝子のセットの発現によって構築された拡散マップに埋め込まれた。この拡散マップを極座標系に転換した後、細胞周期の開始を表す「ルート」細胞が同定され、極座標上の「ルート」細胞に対する角度により擬時間値が各細胞に割り当てられた。同じ軌跡上のRIBOmap細胞に対して擬時間値を割り当てるために、2つのデータセットからの細胞は、mAGおよびmKO2の蛍光強度によって定義される同じ埋込みに登録された。各RIBOmap細胞の擬時間値は、STARmapにおけるその最近傍(k=3)の平均値として定義された。

40

【0162】

DR計算:細胞質内のRNAリードの局在化を定量的に分析するために、各細胞質リードに対して距離比(DR)が計算された。リードのDR値は、核セグメンテーションによって決定されるリードの核境界までの最短距離(d_1)が、この距離、および細胞セグメンテーションによって決定されるリードの細胞膜までの最短距離(d_2)の和によって正規化されたものとして定義された。Scipyのユークリッド距離変換関数(distance_transformed

50

it)が使用されて、3Dセグメンテーションによって定義された各リードおよび標的表面の間の最短距離を計算した。

【0163】

RIBOmap脳組織サンプルのデータ処理

ClusterMapを用いた細胞セグメンテーション:RNAアンブリコンに基づくセグメンテーション法(ClusterMap(43))が使用されて、単一細胞のシグナルの定量化を達成した。バックグラウンドシグナルの却下、DAPIシグナルのサンプリング、および密度に基づくセグメンテーションに關与する基本的な処理パイプラインが、各視野(FOV)に適用された。具体的には、RNAシグナルの10%が局所的に低密度のシグナルとして同定され、単一細胞レベルの定量化では除外された。セグメンテーション精度をさらに改善するために、追加のシグナルスポットが、パラメータdapi_grid_intervalを5に等しく設定して、カップリングされたDAPI染色画像からサンプリングされた。3Dにおけるセグメンテーション中に、パラメータcell_num_thresholdは、DAPI染色と比較した定性試験に基づいて0.02に設定された。5つ未満の転写産物を有するか、またはカップリングされたDAPI染色とオーバーラップしないとアルゴリズムに同定された細胞は除外された。すべてのFOVのClusterMapシグナルの割当てはマージされて、細胞-遺伝子マトリックスを創出した。

10

【0164】

品質管理および前処理:単一細胞レベルでのシグナル定量化後、細胞あたりの転写産物および遺伝子の数が使用されて、低品質の細胞を除外した。詳細には、絶対偏差の中央値(MAD)が使用されて、以下の式によって示されるように、細胞フィルタリングあたりのリードの閾値を推定した:

20

下限=中央値(細胞あたりのリード)-4*MAD

上限=中央値(細胞あたりのリード)+4*MAD

【0165】

以下などの他の標準的なフィルタリング戦略も適用された:

1.細胞がフィルタリングを通過するためには、最低10個の発現された遺伝子が求められる;および

2.遺伝子がフィルタリングを通過するためには、最低10個の発現された細胞が求められる。

30

【0166】

フィルタリング後、62,753個の細胞および5,413個の遺伝子のトランスクリプトームプロファイルが得られた。高品質の遺伝子ライブラリーを確実にするために、最大カウントが3未満の遺伝子が細胞にわたってさらに除外され、細胞型分類などの下流分析で使用される3,995個の遺伝子を結果としてもたらした。次いで、トランスクリプトームプロファイルは、pp.normalize_total関数(Scanpy v1.8.2)によって、細胞あたりの転写産物の数の中央値により正規化された。次いで、対数変換は、pp.log1p関数を用いて、データに対して行われた。最後に、データマトリックスが、pp.scale関数によって単位分散にスケールされ、次元削減および教師なしクラスタリングなどの下流分析で使用された。

40

【0167】

細胞型の分類:階層的クラスタリング戦略が適用されて、RIBOmapのマウス脳データセットに対して3レベルの細胞型注釈付けを作出した。最初に、3,995個の非常に存在量の多い遺伝子に制限されたスケールしたマトリックスが使用されて、主成分分析(PCA)を行った。関数tl.pcaが使用されて上位30個の主成分を計算し、それらのすべてが使用されて、k最近傍(k-NN)グラフを構築した。ここでは、細胞が、それらのトランスクリプトームプロファイルの類似性に基づいて、高次元空間においてそれらの隣接物と接続された。次いで、Leidenコミュニティ検出アルゴリズムが、kNNグラフに適用されて、細胞クラスターを検出した。脳における一般的な細胞型のカノニカルマーカー(すなわち、Slc17a7、Gad1、Gad2、Plp1、Slc1a3等)の発現プロファイルに基づいて、各クラ

50

スターは、それらの第1のレベルの注釈付けとして、ニューロンまたはグリア細胞のいずれかに分類された。

【0168】

より詳細な注釈付けを割り当てるために、以前に記載された同じ分析が、第1のレベルの注釈付けの下で、集団(ニューロン、グリア)の各々に適用された。エルボー法が使用されて、PCA後の有意な主成分を同定した。各主成分の分散比をプロット(pl.pca_variance_ratio関数)することにより、最も高い値を有する上位10個および15個の主成分が選定されて、それぞれニューロンおよびグリア細胞について以下の分析を実施した。ニューロンについては、それらは、Slc17a7、Gad1、およびGad2のそれらの発現プロファイルに基づいて、興奮性および抑制性ニューロンにさらに分けられた。グリア細胞については、主要なグリア細胞のいくつかについて多数のサブタイプ(すなわち、アストロサイトについては、アストロ1、アストロ2、およびアストロ3)が同定された。この場合、2つのレベルの注釈付けが、各クラスターに付与された;第2のレベルの注釈付けは、その主要なグリア細胞型(すなわち、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、血管細胞等)を指し示し、第3のレベルの注釈付け(ユニークな識別子)は、主要な集団内のサブタイプを表した。

10

【0169】

神経細胞のサブタイプを同定するために、同じ教師なしクラスタリングが、興奮性および抑制性ニューロン集団の両方に個別に適用された。具体的には、15個および10個の主成分が使用されて、それぞれ興奮性および抑制性ニューロンのkNNグラフを構築した。神経細胞のクラスターの大部分は、脳切片におけるそれらの空間的表現(すなわち、L2/3、L4、CA、DG、TH等などの解剖学的領域)に基づいて注釈付けられ、抑制性ニューロンクラスターのいくつかは、異なる神経ペプチドをコードするそれらの遺伝子マーカー(すなわち、SstおよびNpy)に基づいて注釈付けられた。

20

【0170】

領域で濃縮された翻訳遺伝子の同定:単一細胞の定量化においてClusterMapによって除外されたRNAアンプリコンは、細胞の細胞体領域外のRNAとして処理された。細胞体および突起領域の両方における各遺伝子のRNAカウントが計算され、各遺伝子の全RNA数に基づくパーセンテージに対して正規化された。各領域において最も高いRNAパーセンテージを有する上位10%の遺伝子は、領域で濃縮された翻訳遺伝子として注釈付けられ、それらのRNAの空間分布は脳切片上で可視化された。

30

【0171】

遺伝子オントロジー(GO)濃縮分析

DAVIDデータベース(david.ncifcrf.gov)(45、46)が、GO濃縮分析のために使用された。BenjaminiおよびHochbergの偽発見率(FDR)が、多数の超幾何検定においてp値を調整するために行われた。生物学的プロセス(BP)および細胞成分(CC)(FDR<0.05)からの結果が、濃縮されたGOタームとして選択された。上位3個の最も有意に濃縮されたGOタームは、共変動分析および遺伝子共局在化調査のために使用された一方、上位10個の濃縮されたタームは、細胞体で濃縮された翻訳遺伝子および突起で濃縮された翻訳遺伝子において抽出された。

40

【0172】

参考文献

1. J. A. Alfaro, P. Bohlander, M. Dai, M. Filius, C. J. Howard, X. F. van Kooten, S. O hayon, A. Pomorski, S. Schmid, A. Aksimentiev, E. V. Anslyn, G. Bedran, C. Cao, M. Chinappi, E. Coyaoud, C. Dekker, G. Dittmar, N. Drachman, R. Eelkema, D. Goodlett, S. Hentz, U. Kalathiya, N. L. Kelleher, R. T. Kelly, Z. Kelman, S. H. Kim, B. Kuster, D. Rodriguez-Larrea, S. Lindsay, G. Maglia, E. M. Marcotte, J. P. Marino, C. Masselon, M. Mayer, P. Samaras, K. Sarthak, L. Sepiashvili, D. Stein, M. Wanunu, M. Wilhelm, P. Yin, A. Meller, C. Joo, The emerging landscape of single-molecule protein sequencing technologies. Nat. Methods. 18, 604-617 (2021).

50

- [0 1 7 3]
 2. T. Maier, M. Guell, L. Serrano, Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583, 3966-3973 (2009).
- [0 1 7 4]
 3. R. de Sousa Abreu, L. O. Penalva, E. M. Marcotte, C. Vogel, Global signature of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* 5, 1512-1526 (2009).
- [0 1 7 5]
 4. C. Vogel, E. M. Marcotte, Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 13, 227-232 (2012).
- [0 1 7 6]
 5. B. Schwanhaussner, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, M. Selbach, Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 473, 337-342 (2011).
- [0 1 7 7]
 6. S. Das, M. Vera, V. Gandin, R. H. Singer, E. Tutucci, Intracellular mRNA transport and localized translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 483-504 (2021).
- [0 1 7 8]
 7. N. T. Ingolia, S. Ghaemmighami, J. R. S. Newman, J. S. Weissman, Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science.* 324, 218-223 (2009).
- [0 1 7 9]
 8. C. H. Jan, C. C. Williams, J. S. Weissman, Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* (2014), doi:10.1126/science.1257521.
- [0 1 8 0]
 9. C. C. Williams, C. H. Jan, J. S. Weissman, Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science.* 346, 748-751 (2014).
- [0 1 8 1]
 10. M. VanInsberghe, J. van den Berg, A. Andersson-Rolf, H. Clevers, A. van Oudenaarden, Single-cell Ribo-seq reveals cell cycle-dependent translational pausing. *Nature.* 597, 561-565 (2021).
- [0 1 8 2]
 11. N. T. Ingolia, Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome. *Cell.* 165, 22-33 (2016).
- [0 1 8 3]
 12. Y. Liu, A. Beyer, R. Aebersold, On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 165, 535-550 (2016).
- [0 1 8 4]
 13. J. M. Halstead, T. Lionnet, J. H. Wilbertz, F. Wippich, A. Ephrussi, R. H. Singer, J. A. Chao, Translation. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science.* 347, 1367-1671 (2015).
- [0 1 8 5]
 14. B. Wu, C. Eliscovich, Y. J. Yoon, R. H. Singer, Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science.* 352, 1430-1435 (2016).
- [0 1 8 6]
 15. T. Morisaki, K. Lyon, K. F. DeLuca, J. G. DeLuca, B. P. English, Z. Zhang, L. D. Lavis, J. B. Grimm, S. Viswanathan, L. L. Looger, T. Lionnet, T. J. Stasevich, Real-time

10

20

30

40

50

me quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science*. 352, 1425-1429 (2016).

[0 1 8 7]

16. X. Yan, T. A. Hoek, R. D. Vale, M. E. Tanenbaum, Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell*. 165, 976-989 (2016).

[0 1 8 8]

17. S. Boersma, D. Khuperkar, B. M. P. Verhagen, S. Sonneveld, J. B. Grimm, L. D. Lavis, M. E. Tanenbaum, Multi-Color Single-Molecule Imaging Uncovers Extensive Heterogeneity in mRNA Decoding. *Cell*. 178, 458-472.e19 (2019).

[0 1 8 9]

18. Z. B. Katz, B. P. English, T. Lionnet, Y. J. Yoon, N. Monnier, B. Ovrzyn, M. Bathe, R. H. Singer, Mapping translation 'hot-spots' in live cells by tracking single molecules of mRNA and ribosomes. *Elife*. 5, e10415 (2016).

[0 1 9 0]

19. S. T. Dieck, L. Kochen, C. Hanus, M. Heumuller, I. Bartnik, B. Nassim-Assir, K. Merk, T. Mosler, S. Garg, S. Bunse, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, Direct visualization of newly synthesized target proteins in situ. *Nature Methods*. 12 (2015), pp. 411-414.

[0 1 9 1]

20. X. Wang, W. E. Allen, M. A. Wright, E. L. Sylwestrak, N. Samusik, S. Vesuna, K. Evans, C. Liu, C. Ramakrishnan, J. Liu, G. P. Nolan, F. -A. Bava, K. Deisseroth, Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*. 361 (2018), doi:10.1126/science.aat5691.

[0 1 9 2]

21. I. Tirosh, B. Izar, S. M. Prakadan, M. H. Wadsworth 2nd, D. Treacy, J. J. Trombetta, A. Rotem, C. Rodman, C. Lian, G. Murphy, M. Fallahi-Sichani, K. Dutton-Regester, J. -R. Lin, O. Cohen, P. Shah, D. Lu, A. S. Genshaft, T. K. Hughes, C. G. K. Ziegler, S. W. Kazer, A. Gaillard, K. E. Kolb, A. -C. Villani, C. M. Johannessen, A. Y. Andreiev, E. M. Van Allen, M. Bertagnolli, P. K. Sorger, R. J. Sullivan, K. T. Flaherty, D. T. Frederick, J. Jane-Valbuena, C. H. Yoon, O. Rozenblatt-Rosen, A. K. Shalek, A. Regev, L. A. Garraway, Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 352, 189-196 (2016).

[0 1 9 3]

22. F. M. Fazal, S. Han, K. R. Parker, P. Kaewsapsak, J. Xu, A. N. Boettiger, H. Y. Chang, A. Y. Ting, Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq. *Cell*. 178, 473-490.e26 (2019).

[0 1 9 4]

23. X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, C. He, N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*. 505, 117-120 (2014).

[0 1 9 5]

24. H. Shi, X. Wang, Z. Lu, B. S. Zhao, H. Ma, P. J. Hsu, C. Liu, C. He, YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*. 27, 315-328 (2017).

[0 1 9 6]

25. A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, A. Miyawaki, Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*. 132, 487-498 (2008).

[0 1 9 7]

10

20

30

40

50

26. S.-B. Koh, P. Mascalchi, E. Rodriguez, Y. Lin, D. I. Jodrell, F. M. Richards, S. K. Lyons, Quantitative FastFUCI assay defines cell cycle dynamics at single-cell level. *Journal of Cell Science*. 130(2), 512-520 (2016) doi:10.1242/jcs.195164.

[0198]

27. D. Mahdessian, A. J. Cesnik, C. Gnann, F. Danielsson, L. Stenstrom, M. Arif, C. Zhang, T. Le, F. Johansson, R. Shutten, A. Backstrom, U. Axelsson, P. Thul, N. H. Cho, O. Carja, M. Uhlen, A. Mardinoglu, C. Stadler, C. Lindskog, B. Ayoglu, M. D. Leonetti, F. Ponten, D. P. Sullivan, E. Lundberg, Spatiotemporal dissection of the cell cycle with single-cell proteogenomics. *Nature*. 590, 649-654 (2021).

10

[0199]

28. B. S. Zhao, I. A. Roundtree, C. He, Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 31-42 (2017).

[0200]

29. A. Saunders, E. Z. Macosko, A. Wysoker, M. Goldman, F. M. Krienen, H. de Rivera, E. Bien, M. Baum, L. Bortolin, S. Wang, A. Goeva, J. Nemesh, N. Kamitaki, S. Brumbaugh, D. Kulp, S. A. McCarroll, Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell*. 174, 1015-1030.e16 (2018).

[0201]

30. Z. Yao, C. T. J. van Velthoven, T. N. Nguyen, J. Goldy, A. E. Sedenio-Cortes, F. Baftizadeh, D. Bertagnolli, T. Casper, M. Chiang, K. Crichton, S.-L. Ding, O. Fong, E. Garren, A. Glandon, N. W. Gouwens, J. Gray, L. T. Graybuck, M. J. Hawrylycz, D. Hirschstein, M. Kroll, K. Lathia, C. Lee, B. Levi, D. McMillen, S. Mok, T. Pham, Q. Ren, C. Rimorin, N. Shapovalova, J. Sulc, S. M. Sunkin, M. Tieu, A. Torkelson, H. Tung, K. Ward, N. Dee, K. A. Smith, B. Tasic, H. Zeng, A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell*. 184(12), 3222-3241 (2021), doi:10.1016/j.cell.2021.04.021.

20

[0202]

31. A. Zeisel, H. Hochgerner, P. Lonnerberg, A. Johnsson, F. Memic, J. van der Zwan, M. Haring, E. Braun, L. E. Borm, G. La Manno, S. Codeluppi, A. Furlan, K. Lee, N. Skene, K. D. Harris, J. Hjerling-Leffler, E. Arenas, P. Ernfors, U. Marklund, S. Linnarsson, Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell*. 174, 999-1014.e22 (2018).

30

[0203]

32. Tabula Muris Consortium, Overall coordination, Logistical coordination, Organ collection and processing, Library preparation and sequencing, Computational data analysis, Cell type annotation, Writing group, Supplemental text writing group, Principal investigators, Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature*. 562, 367-372 (2018).

40

[0204]

33. Tabula Muris Consortium, A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. *Nature*. 583, 590-595 (2020).

[0205]

34. X. Han, R. Wang, Y. Zhou, L. Fei, H. Sun, S. Lai, A. Saadatpour, Z. Zhou, H. Chen, F. Ye, D. Huang, Y. Xu, W. Huang, M. Jiang, X. Jiang, J. Mao, Y. Chen, C. Lu, J. Xie, Q. Fang, Y. Wang, R. Yue, T. Li, H. Huang, S. H. Orkin, G.-C. Yuan, M. Chen, G. Guo, Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell*. 173, 1307 (2018).

[0206]

35. J. Cao, M. Spielmann, X. Qiu, X. Huang, D. M. Ibrahim, A. J. Hill, F. Zhang, S. M

50

undlos, L. Christiansen, F. J. Steemers, C. Trapnell, J. Shendure, The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*. 566, 496-502 (2019).

[0 2 0 7]

36. E. S. Lein, M. J. Hawrylycz, N. Ao, M. Ayres, A. Bensinger, A. Bernard, A. F. Boe, M. S. Boguski, K. S. Brockway, E. J. Byrnes, L. Chen, L. Chen, T. - M. Chen, M. C. Chin, J. Chong, B. E. Crook, A. Czaplinska, C. N. Dang, S. Datta, N. R. Dee, A. L. Desaki, T. Desta, E. Diep, T. A. Dolbeare, M. J. Donelan, H. - W. Dong, J. G. Dougherty, B. J. Duncan, A. J. Ebbert, G. Eichele, L. K. Estin, C. Faber, B. A. Facer, R. Fields, S. R. Fischer, T. P. Fliss, C. Frensley, S. N. Gates, K. J. Glattfelder, K. R. Halverson, M. R. Hart, J. G. Hohmann, M. P. Howell, D. P. Jeung, R. A. Johnson, P. T. Karr, R. Kawal, J. M. Kidney, R. H. Knapik, C. L. Kuan, J. H. Lake, A. R. Laramée, K. D. Larsen, C. Lau, T. A. Lemon, A. J. Liang, Y. Liu, L. T. Luong, J. Michaels, J. J. Morgan, R. J. Morgan, M. T. Mortrud, N. F. Mosqueda, L. L. Ng, R. Ng, G. J. Orta, C. C. Overly, T. H. Pak, S. E. Parry, S. D. Pathak, O. C. Pearson, R. B. Puchalski, Z. L. Riley, H. R. Rockett, S. A. Rowland, J. J. Royall, M. J. Ruiz, N. R. Sarno, K. Schaffnit, N. V. Shapovalova, T. Sivisay, C. R. Slaughterbeck, S. C. Smith, K. A. Smith, B. I. Smith, A. J. Sodt, N. N. Stewart, K. - R. Stumpf, S. M. Sunkin, M. Sutram, A. Tam, C. D. Teemer, C. Thaller, C. L. Thompson, L. R. Varnam, A. Visel, R. M. Whitlock, P. E. Wohnoutka, C. K. Wolkey, V. Y. Wong, M. Wood, M. B. Yaylaoglu, R. C. Young, B. L. Youngstrom, X. F. Yuan, B. Zhang, T. A. Zwingman, A. R. Jones, Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 445, 168-176 (2007).

10

20

[0 2 0 8]

37. M. S. Fernandopulle, J. Lippincott-Schwartz, M. E. Ward, RNA transport and local translation in neurodevelopmental and neurodegenerative disease. *Nat. Neurosci.* 24, 622-632 (2021).

[0 2 0 9]

38. A. Biever, C. Glock, G. Tushev, E. Ciirdaeva, T. Dalmay, J. D. Langer, E. M. Schuman, Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes. *Science*. 367 (2020), doi:10.1126/science.aay4991.

30

[0 2 1 0]

39. C. Glock, A. Biever, G. Tushev, B. Nassim-Assir, A. Kao, I. Bartnik, S. Tom Dieck, E. M. Schuman, The translome of neuronal cell bodies, dendrites, and axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (2021), doi:10.1073/pnas.2113929118.

[0 2 1 1]

40. L. M. Meserve, V. V. Topkar, M. - M. Fu, mRNA Transport and Local Translation in Glia. *Trends Cell Biol.* 31, 419-423 (2021).

[0 2 1 2]

41. K. Sakers, A. M. Lake, R. Khazanchi, R. Ouwenga, M. J. Vasek, A. Dani, J. D. Dougherty, Astrocytes locally translate transcripts in their peripheral processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3830-E3838 (2017).

40

[0 2 1 3]

42. C. Muller, N. M. Bauer, I. Schafer, R. White, Making myelin basic protein-from mRNA transport to localized translation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 7 (2013) doi:10.3389/fncel.2013.00169.

[0 2 1 4]

43. Y. He, X. Tang, J. Huang, J. Ren, H. Zhou, K. Chen, A. Liu, H. Shi, Z. Lin, Q. Li, A. Aditham, J. Ounadjela, E. I. Grody, J. Shu, J. Liu, X. Wang, ClusterMap for multi-scale clustering analysis of spatial gene expression. *Nat. Commun.* 12, 590

50

9(2021).

【0215】

44.K.S.Burke,K.A.Antilla,D.A.Tirrell,A Fluorescence in Situ Hybridization Method To Quantify mRNA Translation by Visualizing Ribosome-mRNA Interactions in Single Cells.ACS Cent.Sci.3,425-433(2017).

【0216】

45.D.W.Huang,B.T.Sherman,R.A.Lempicki,Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.Nat.Protoc.4,44-57(2009).

【0217】

46.D.W.Huang,B.T.Sherman,R.A.Lempicki,Bioinformatics enrichment tools:paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.Nucleic Acids Res.37,1-13(2008).

【0218】

参照による組込み

本出願は、様々な発行済み特許、公開特許出願、科学雑誌論文、および他の公刊物を参照し、これらのすべては参照により本明細書に組み込まれる。発明の1以上の実施形態の詳細は、本明細書において表明される。発明の他の特徴、目的、および利点は、詳細の説明、図、例、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0219】

均等物および範囲

「a」、「an」、および「the」などの冠詞においては、反対のことが指し示されるか、または別様であることが文脈から明白でない限り、1または1より多いことを意味し得る。ある群の1以上のメンバーの間に「または(or)」を包含する実施形態または記載は、反対のことが指し示されるか、または別様であることが文脈から明白でない限り、その群のメンバーのうちの、1つか、1つより多いか、またはすべてが、所与の産物またはプロセスに存在するか、それに用いられるか、またはそれとは別様にそれと関係があるかを満たす。発明は、その群のうちの、正確に1つのメンバーが、所与の産物またはプロセスに存在するか、それに用いられるか、またはそれとは別様にそれと関係がある実施形態を包含する。発明は、その群のメンバーのうちの、1つより多いか、またはすべてが、所与の産物またはプロセスに存在するか、それに用いられるか、またはそれとは別様にそれと関係がある実施形態を包含する。

【0220】

さらに、本開示は、1以上の列挙された請求項からの1以上の限定、要素、節、および記述用語(descriptive terms)が別の請求項へ導入される、すべてのバリエーション、組合せ、および並べ替えを網羅する。例えば、別の請求項に従属するいずれの請求項も、同じ基本請求項に従属する他のいずれかの請求項中に見出される1以上の限定を包含するように修飾されることができる。要素が、例を挙げれば、マーカッシュ群フォーマットのリストとして提示されている場合、要素の各サブグループもまた開示され、いずれかの要素(複数可)はその群から除去されることができる。一般に、発明、または発明の態様が、特定の要素および/または特徴を含むとして称される場合、開示のある特定の実施形態または開示の態様は、そのような要素および/または特徴からなるか、または実質的にそれらからなるか理解されるべきである。簡潔さを目的として、それらの実施形態は、本明細書において、in haec verbaで具体的に表明されていない。「含むこと(comprising)」および「含有すること(containing)」という用語は、オープンであることが意図され、追加の要素またはステップの包含を容認することにもまた留意されたい。範囲が与えられる場合、エンドポイントは包含される。さらに、別様に指し示されるか、または別様であることが文脈および当業者の理解から明白でない限り、範囲として表現された値は、いずれか特有の値、または発明の異なる実施形態で述べられた範囲内の部分範囲を、文脈が明確に別様な指図をしない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで仮定することができる。

10

20

30

40

50

る。

【0221】

この出願は、様々な発行済み特許、公開特許出願、雑誌論文、および他の公刊物を参照し、これらのすべては参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれる参照のいずれかおよび本明細書の間には矛盾がある場合、本明細書がコントロール(control)するものとする。加えて、先行技術の範囲に入る本発明のいずれか特定の実施形態は、実施形態のいずれか1以上から明示的に除外され得る。そのような実施形態は当業者知られていると思われるので、それらは、除外が本明細書において明示的に表明されていない場合であっても、除外され得る。発明のいずれか特定の実施形態は、先行技術の存在に関するか否かにかかわらず、いずれかの実施形態から、いかなる理由でも除外されることができる。

10

【0222】

当業者は、本明細書において記載の特有の実施形態に対して多くの均等物を認識するか、またはせいぜいルーチンな実験を使用して確かめることができるであろう。本明細書において記載の本実施形態のスコップは、上の記載に限定されることは意図されず、むしろ添付の実施形態に表明されているとおりである。当業者は、以下の特許請求の範囲において定義されるとおり、本発明の趣旨またはスコップから逸脱せずに、この記載への様々な変化および修飾がなされ得ることを了解するであろう。

【図面】

【図1】

【図2A-2B】

20

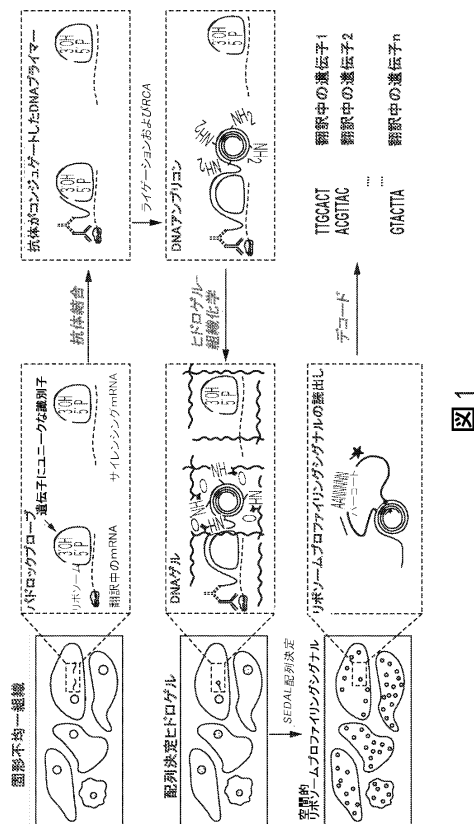


図1

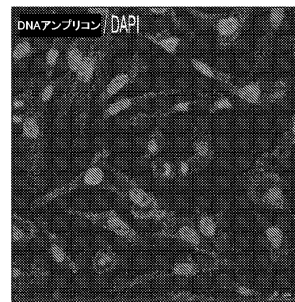


図2A

30

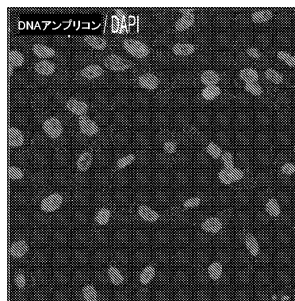


図2B

40

50

【図 2 C - 2 D】

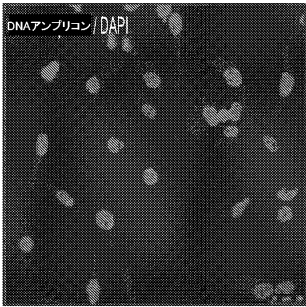


図 2C

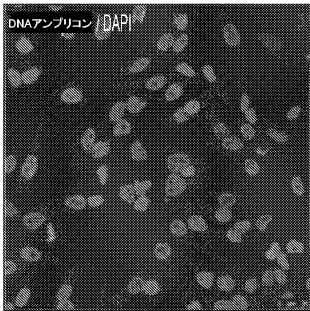


図 2D

【図 4 A - 4 B】

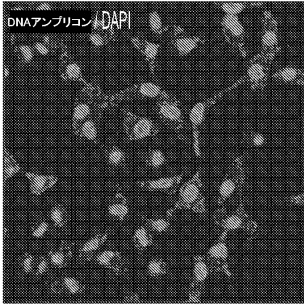


図 4A

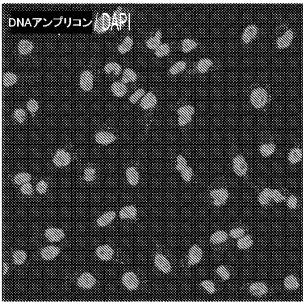


図 4B

【図 3】

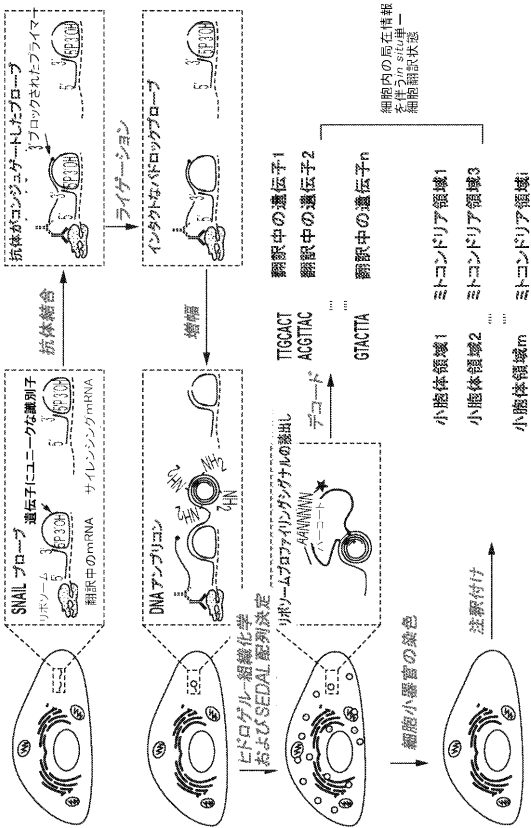


図 3

【図 4 C】

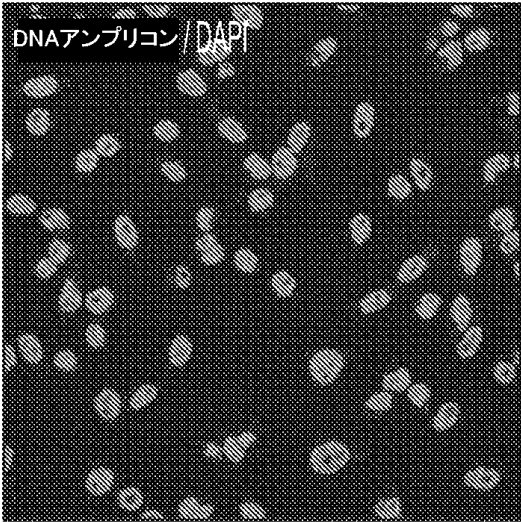


図 4C

10

20

30

40

50

【図 7 C】

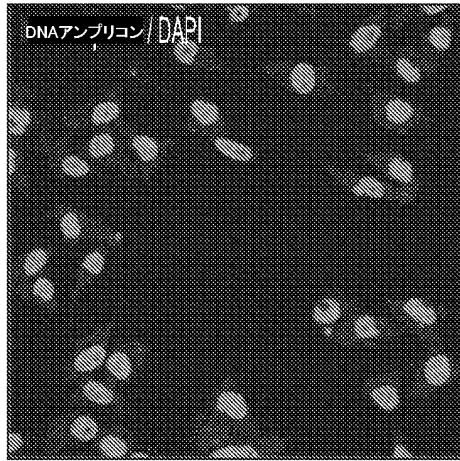
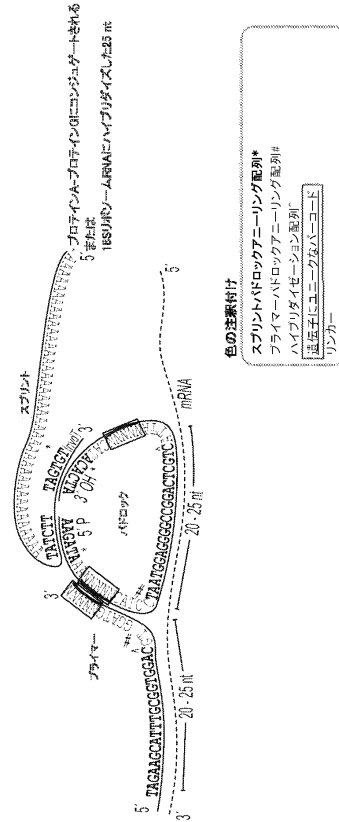


圖 7C

【圖 8】

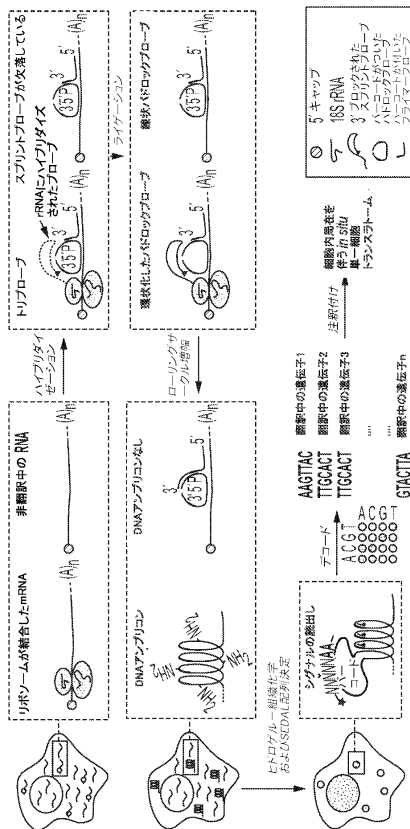




10

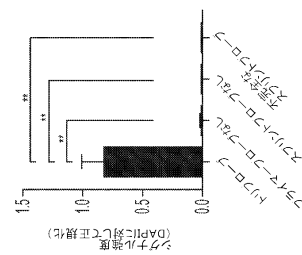
20

【図 9 A】



9A

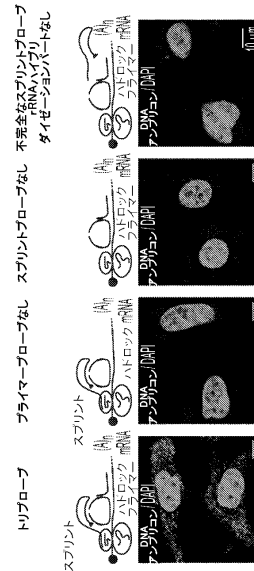
【図 9 B - 9 C】



96 図

30

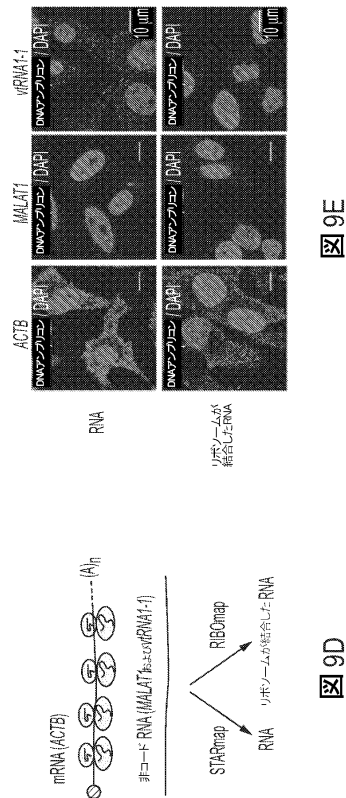
ローブ
なし


9B

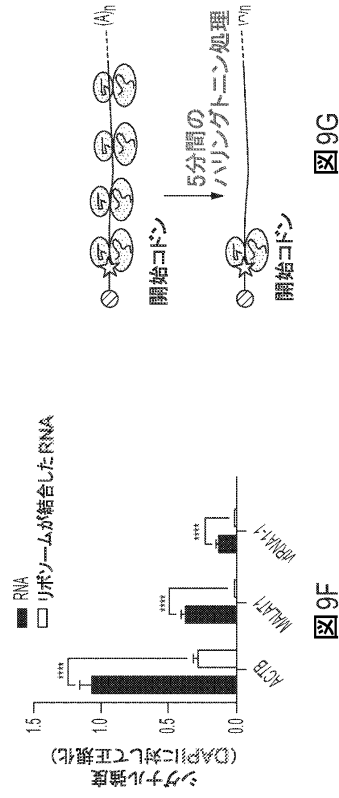
40

50

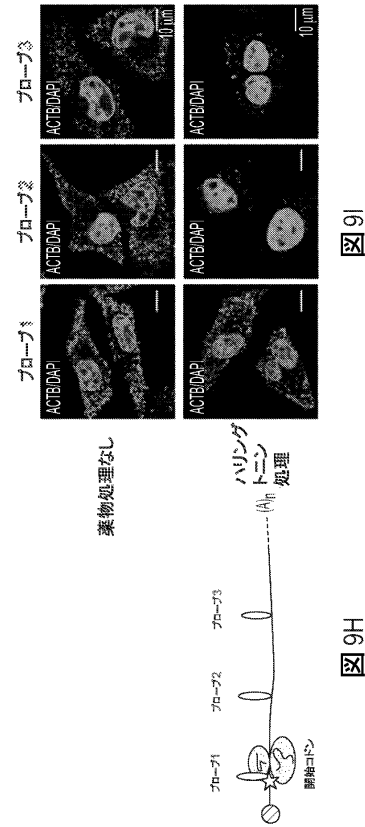
【図 9 D - 9 E】



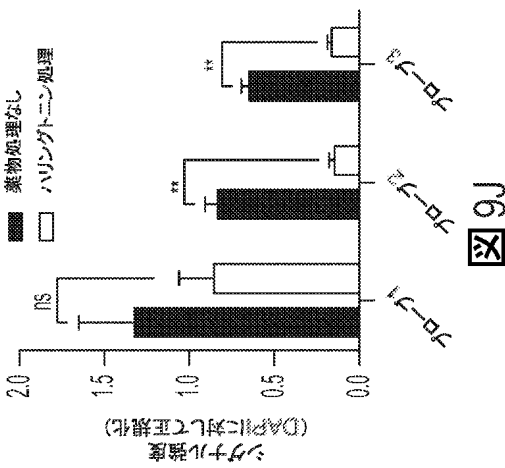
【図 9 F - 9 G】



【図 9 H - 9 I】



【図 9 J】



10

20

30

40

50

【図 10 F】

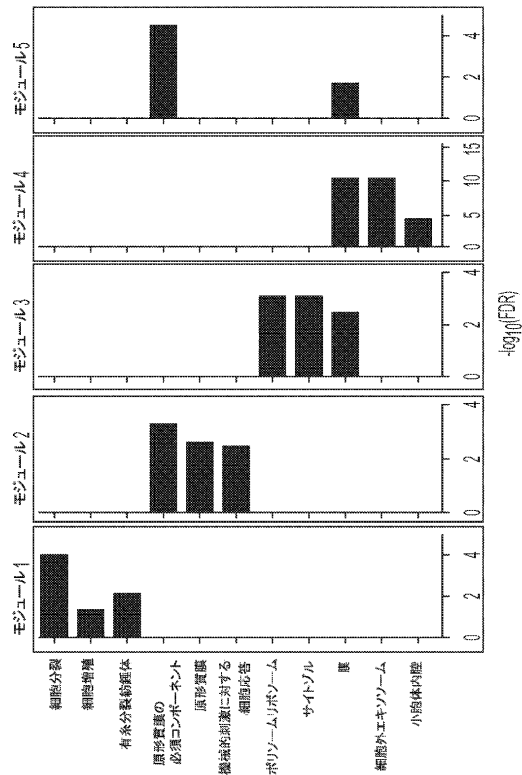


図 10F

【図 10 G】

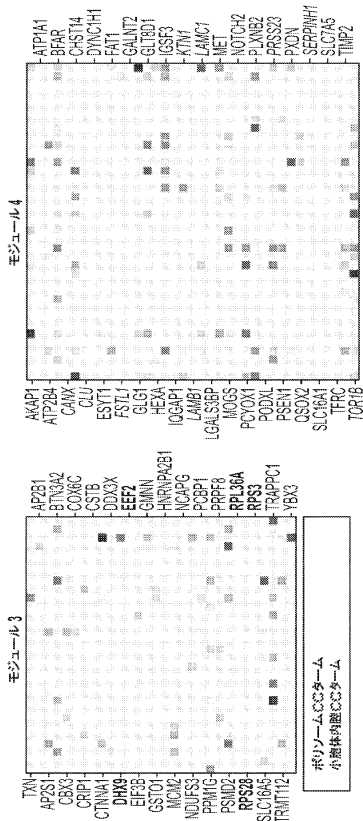


図 10G

【図 10 H - 10 J】

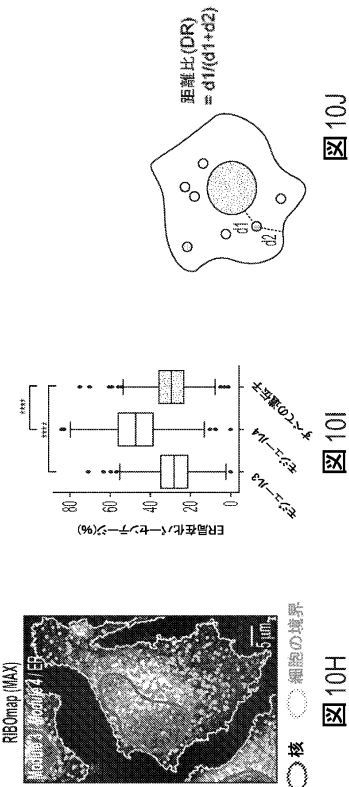


図 10I

図 10J

【図 10 K】

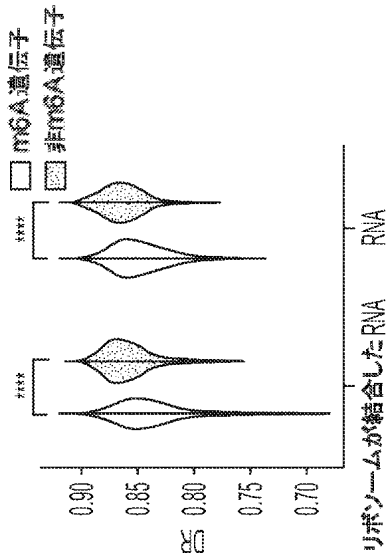


図 10K

10

20

30

40

50

【図 1 1 E】

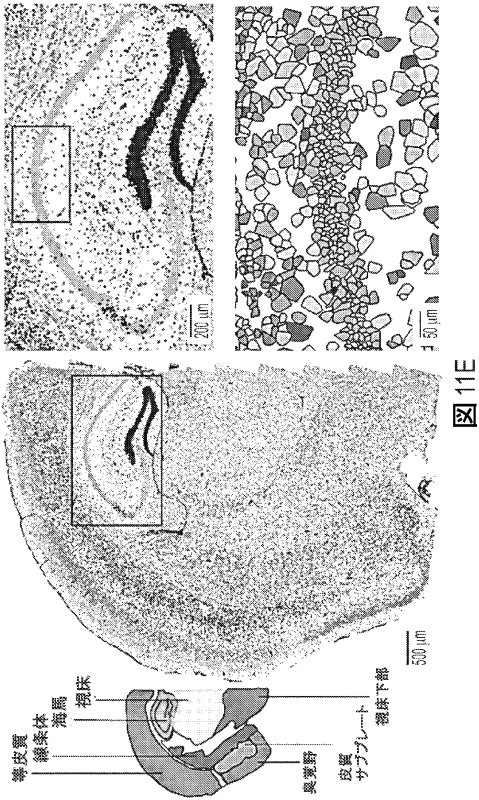


図 11E

【図 1 1 F - 1 1 G】

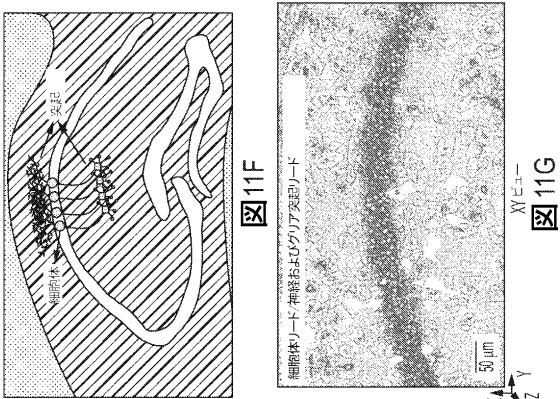
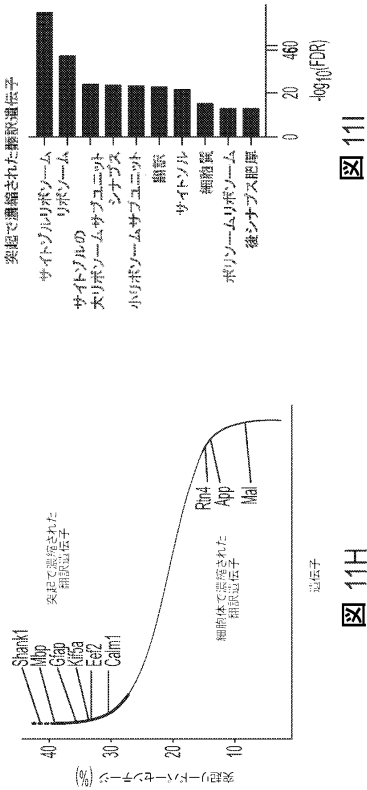


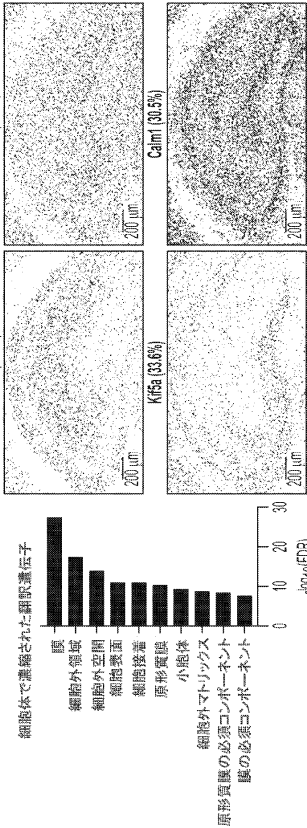
図 11F

図 11G

【図 1 1 H - 1 1 I】



【図 1 1 J - 1 1 K】



10

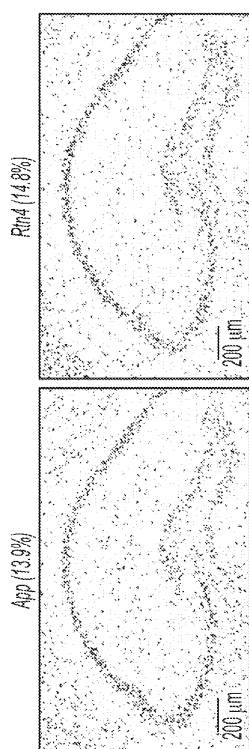
20

30

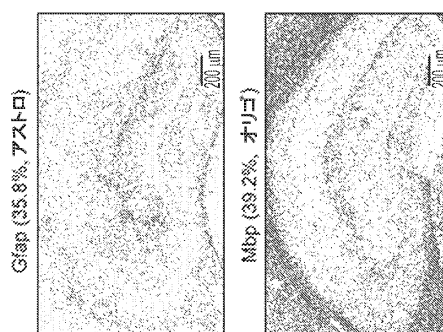
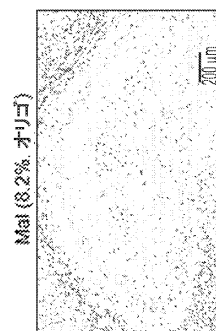
40

50

【図 1 1 L】



【図 1 1 M - 1 1 N】



【図 1 2 A - 1 2 C】

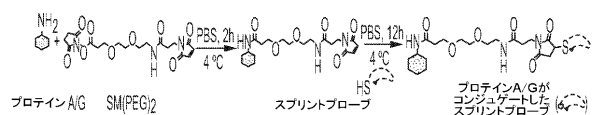


图 12A

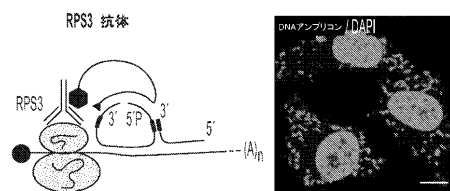


図 12B

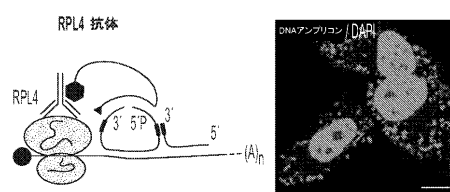


図 12C

【図 1 2 D - 1 2 E】

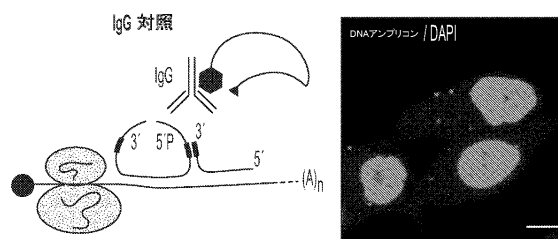


図 12D

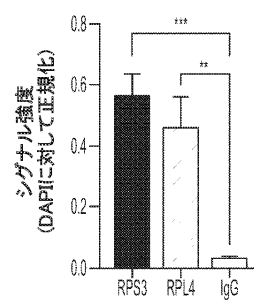


図 12E

【図 12 F】

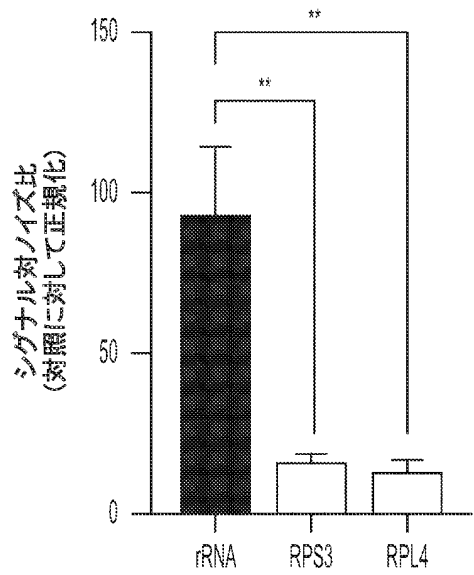


図 12F

【図 13 A】

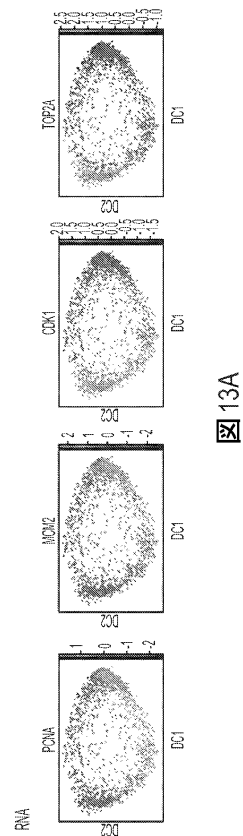


図 13A

【図 13 B】

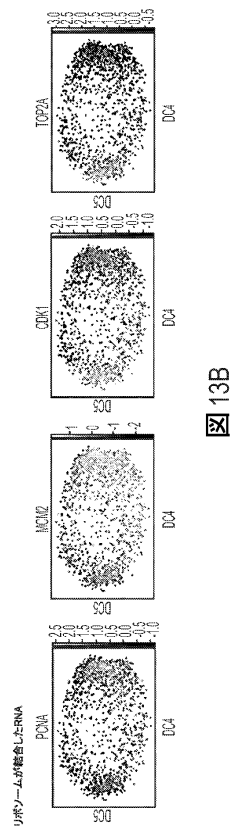


図 13B

【図 14 A - 14 B】

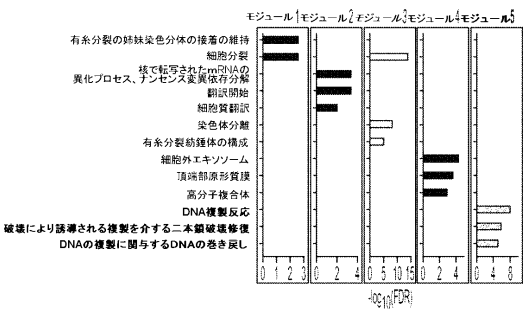


図 14A

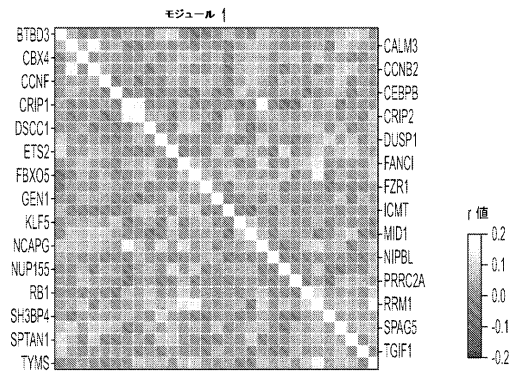


図 14B

10

20

30

40

50

【図 1 4 C - 1 4 D】

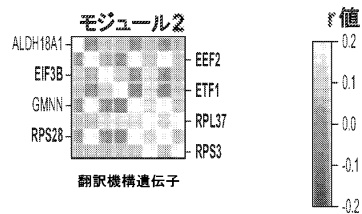


図 14C

【図 1 4 E - 1 4 F】

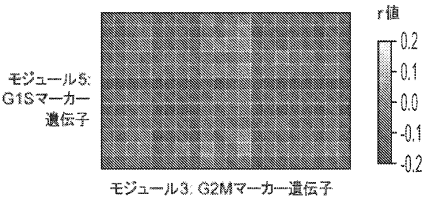


図 14E

10

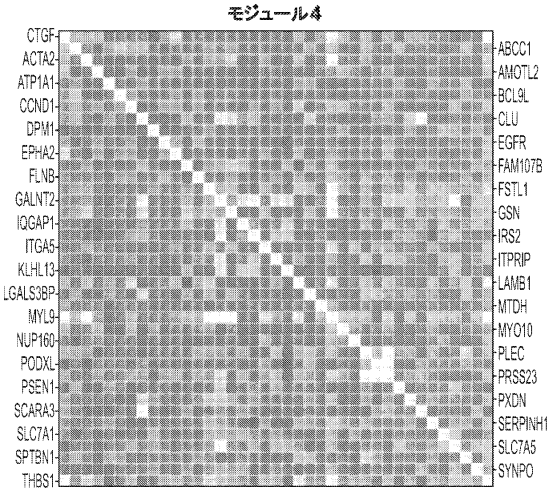


図 14D

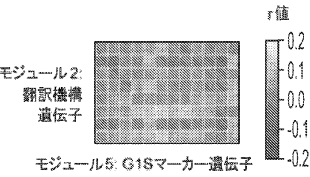
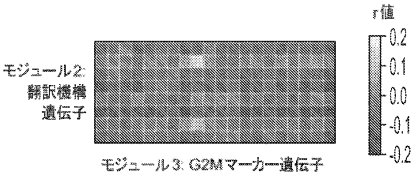


図 14F

20

【図 1 5 A - 1】

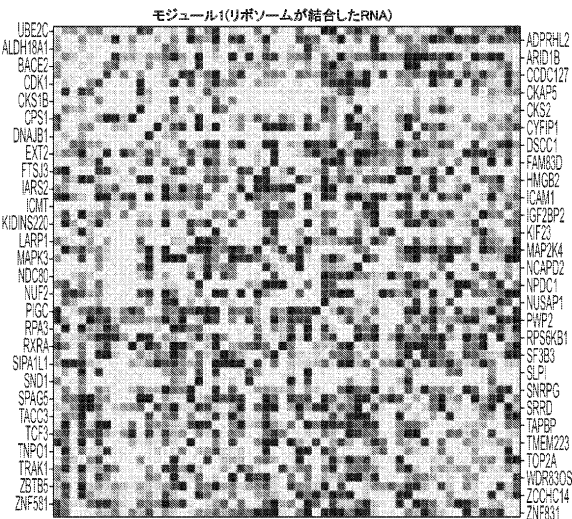


図 15A

【図 1 5 A - 2】

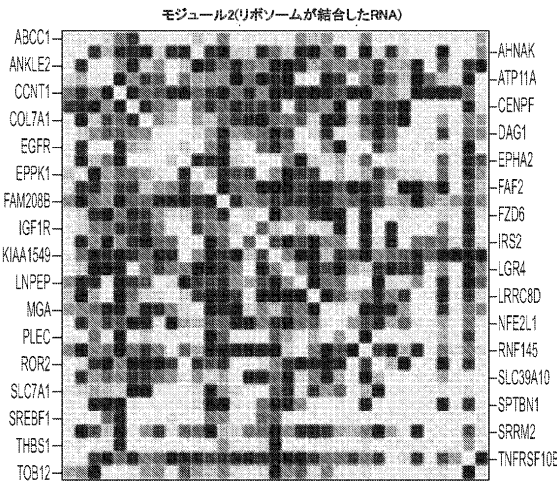


図 15A
(続き)

30

40

50

【図 15 C - 1】

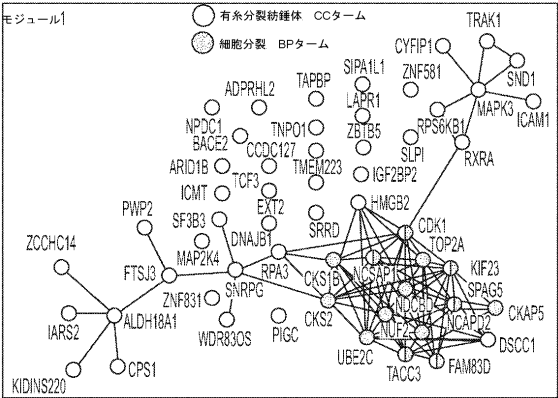


図 15C

【図 15 C - 2】

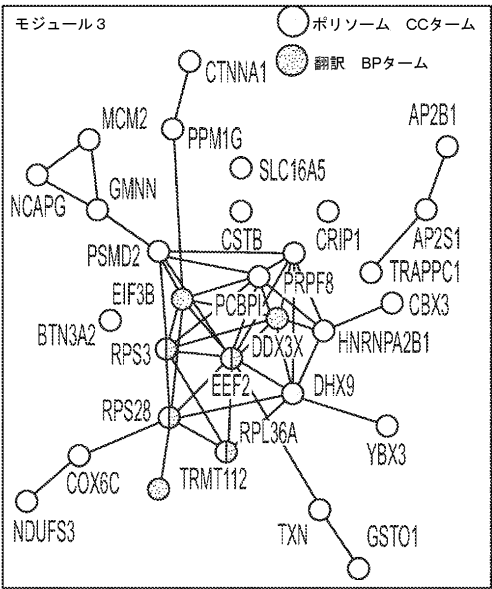


図 15C
(続き)

【図 15 D - 15 E】

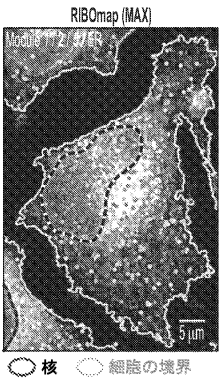


図 15D

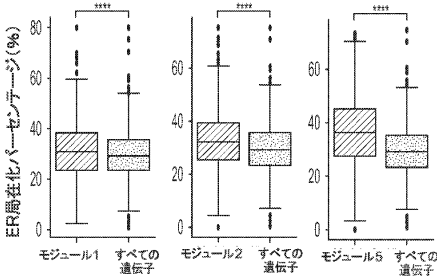


図 15E

【図 15 F】

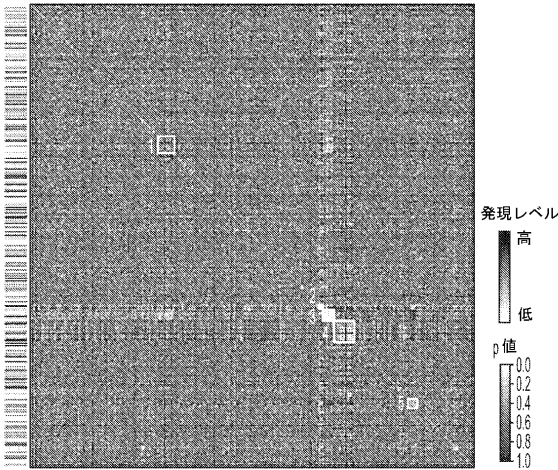
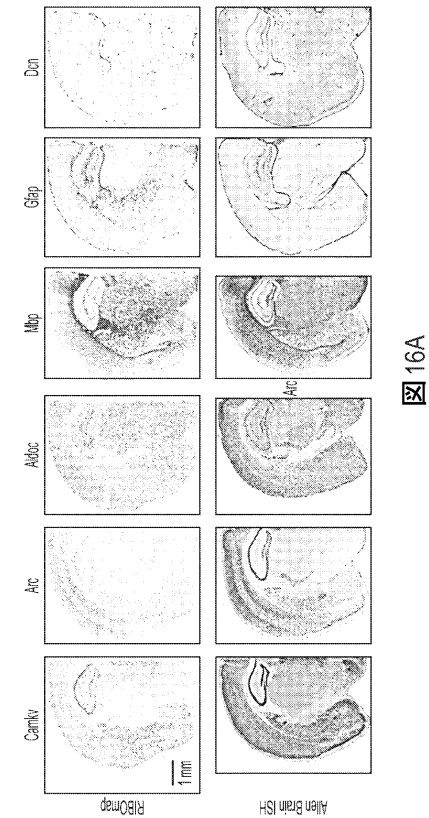
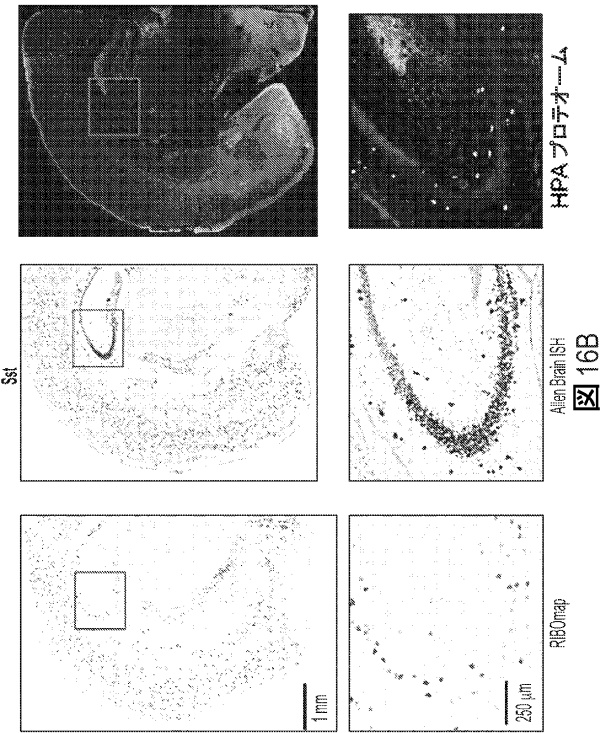


図 15F

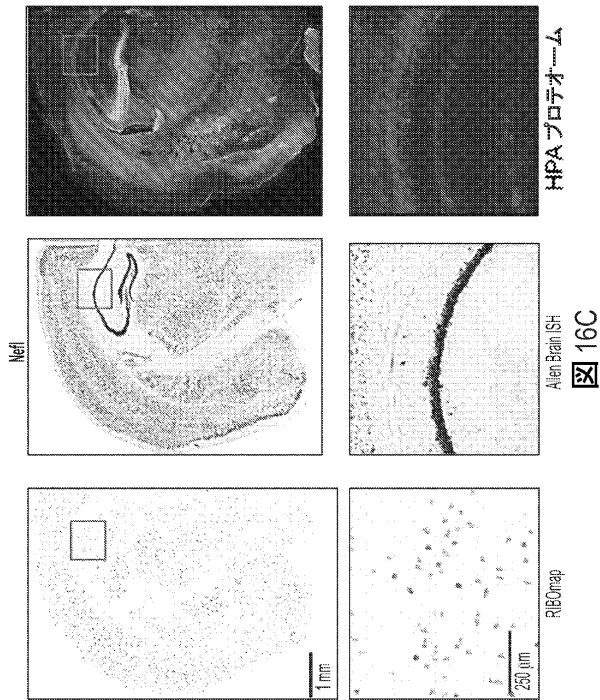
【図 16 A】



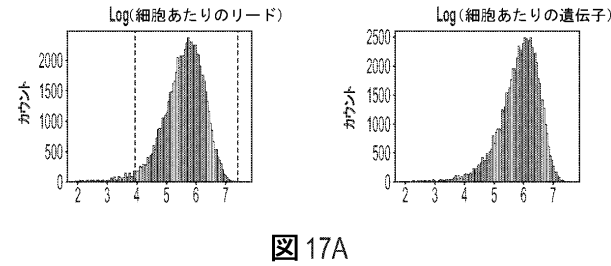
【図 16 B】



【図 16 C】



【図 17 A】



10

20

30

40

50

【図 17 B - 1】

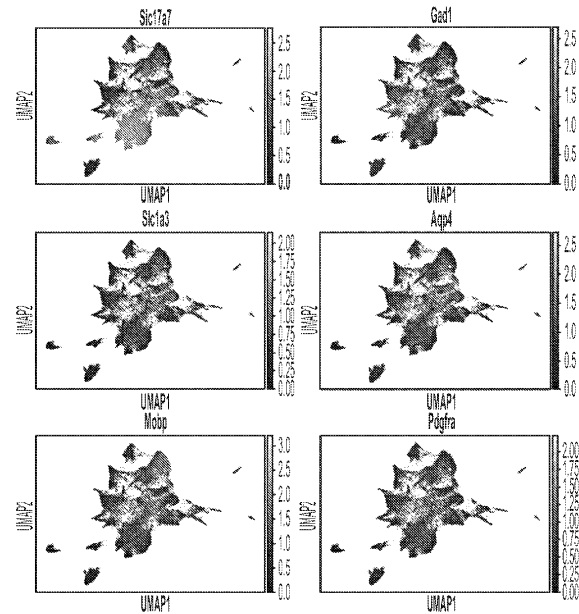


図 17B

【図 17 B - 2】

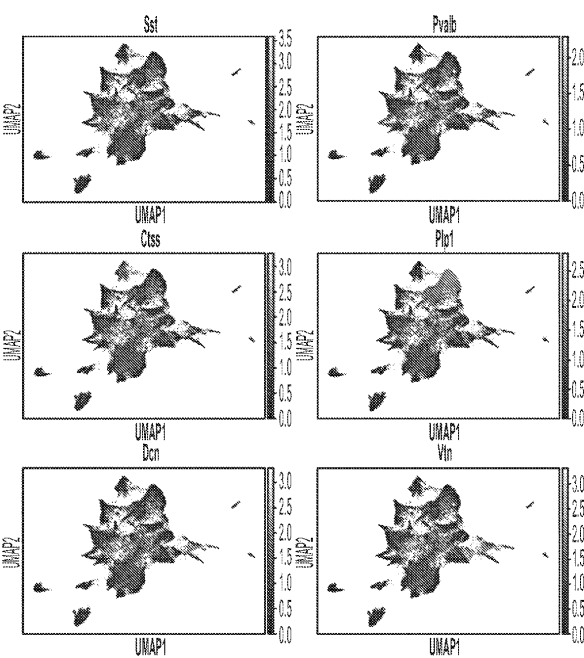


図 17B
(続き)

【図 18 A - 1】

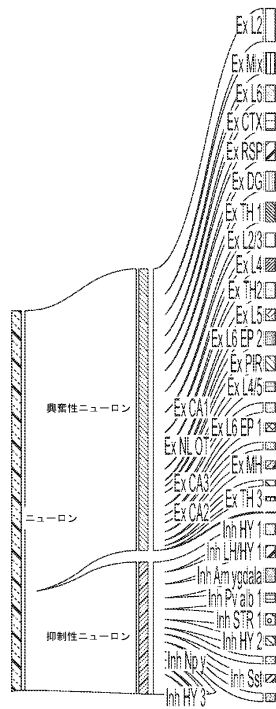


図 18A

【図 18 A - 2】

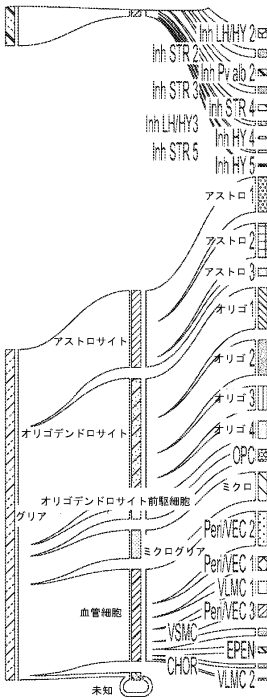


図 18A
(続き)

10

20

30

40

50

【図 18B - 18C】



図 18B



図 18C

【図 18D - 1】

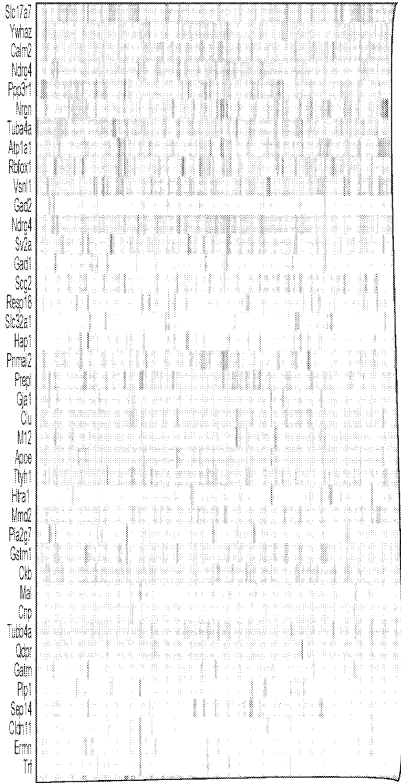


図 18D

【図 18D - 2】

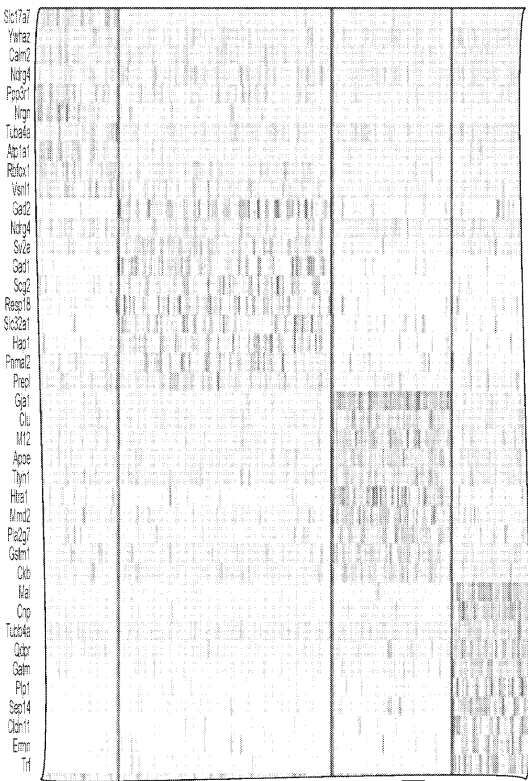


図 18D
続き

【図 18D - 3】

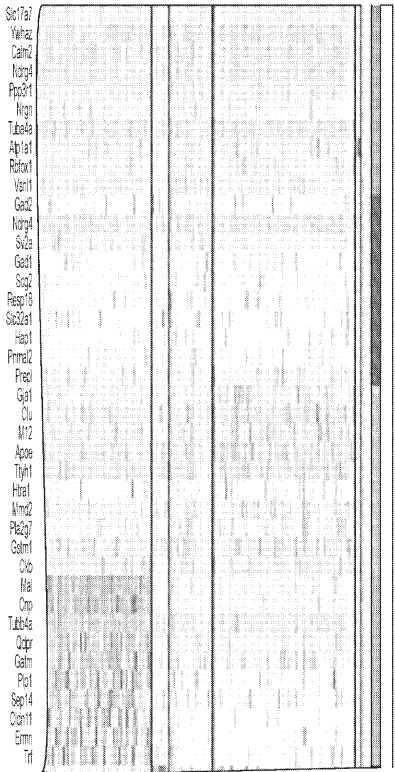


図 18D
続き

10

20

30

40

50

【図 19 A - 2】

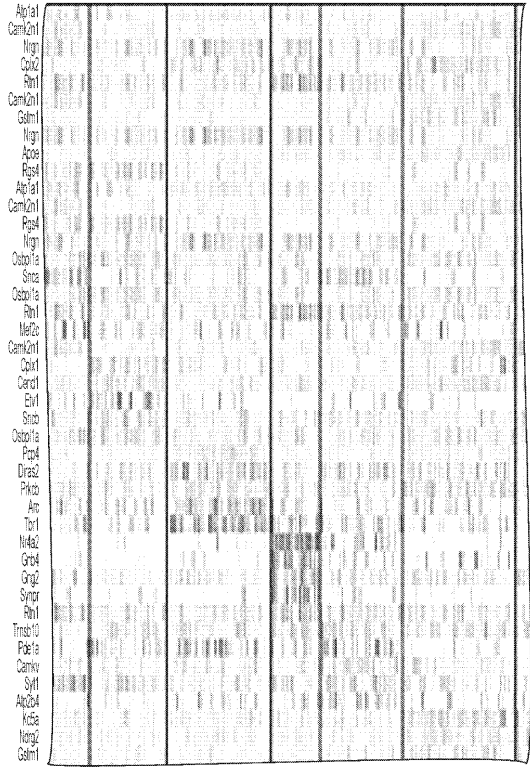


図 19A
続き

【図 19 A - 3】

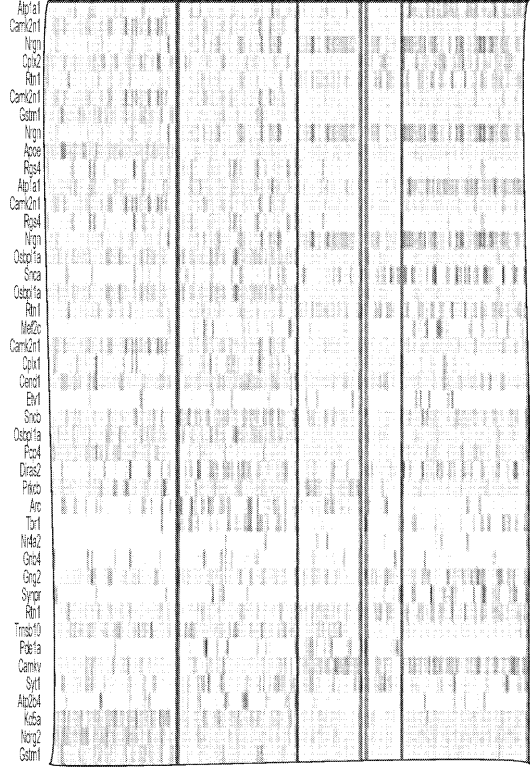


図 19A
続き

10

20

【図 19 A - 4】

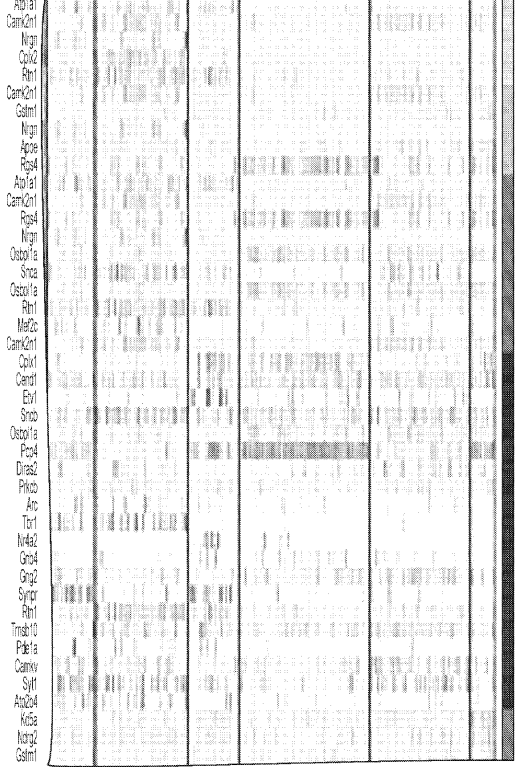


図 19A
続き

【図 19 A - 5】

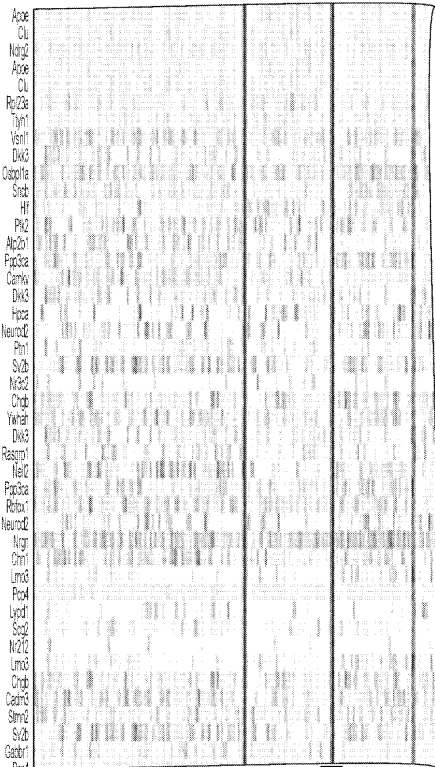


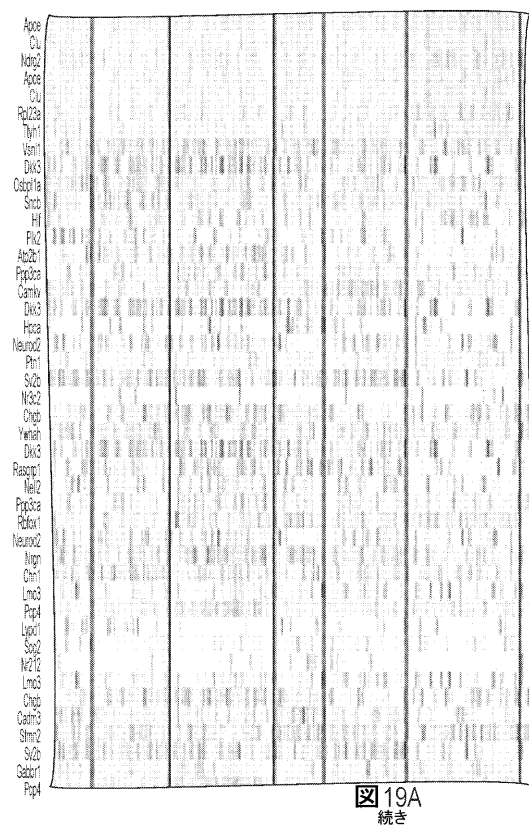
図 19A
続き

30

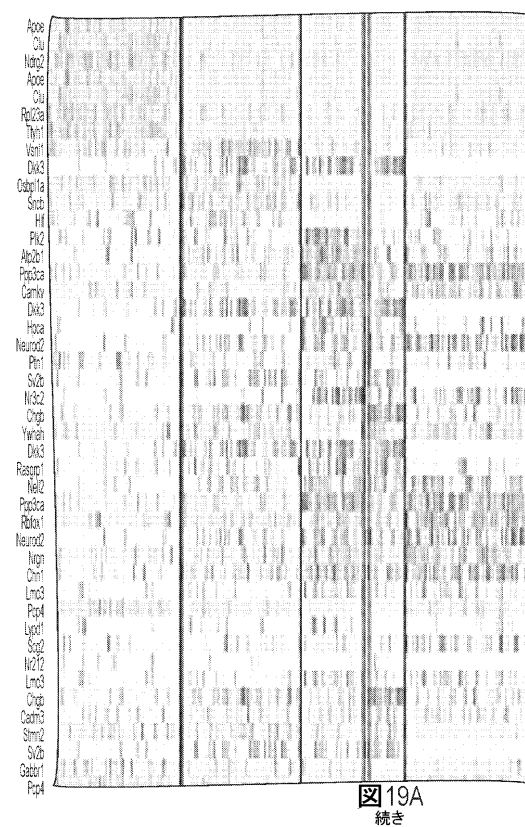
40

50

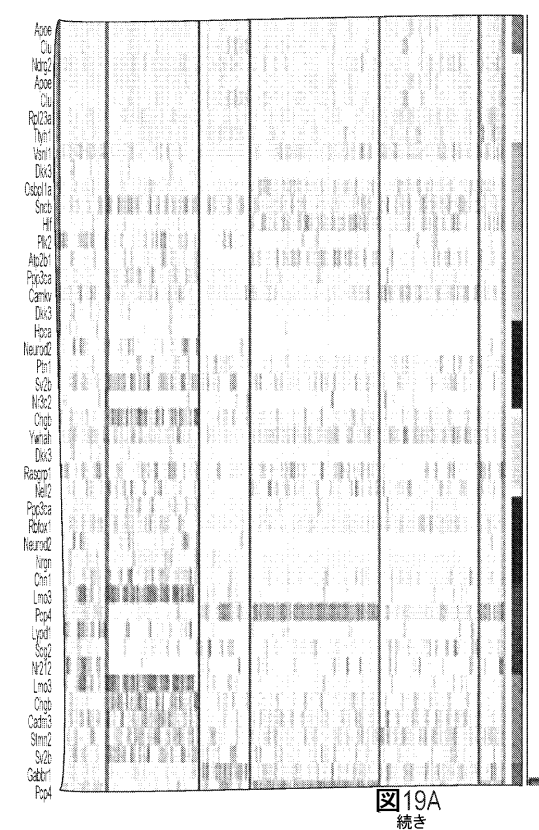
【圖 19 A - 6】



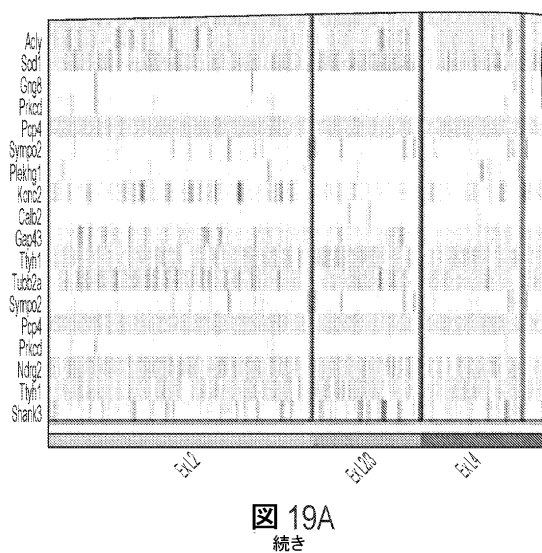
【圖 19 A - 7】



【圖 19 A - 8】



【図 19 A - 9】



【図 19 A - 1 0】

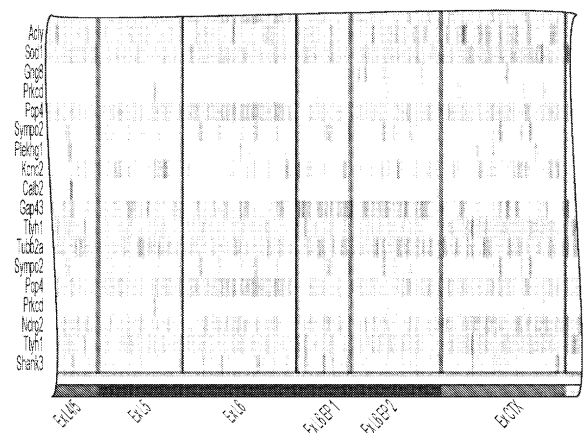


図 19A
続き

【図 19 A - 1 1】

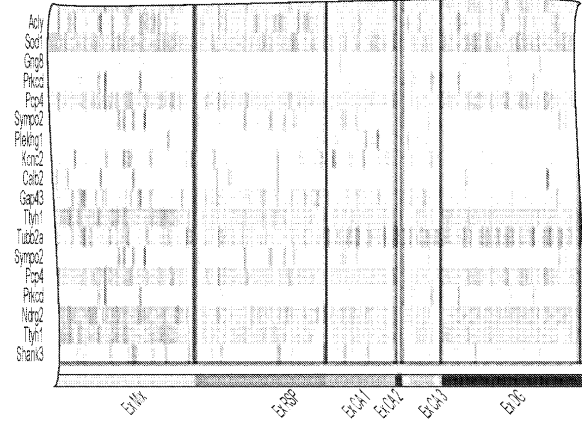


図 19A
続き

【図 19 A - 1 2】

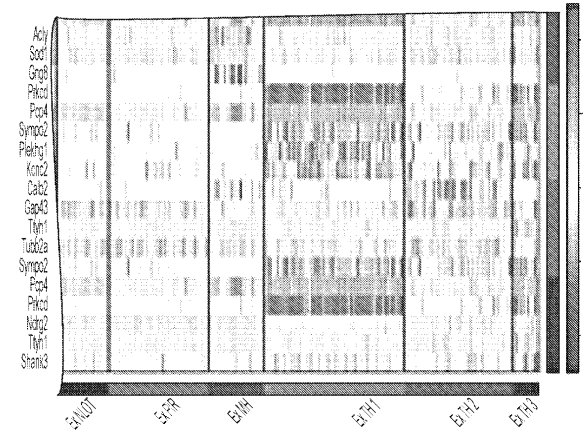


図 19A
続き

【図 19 B】

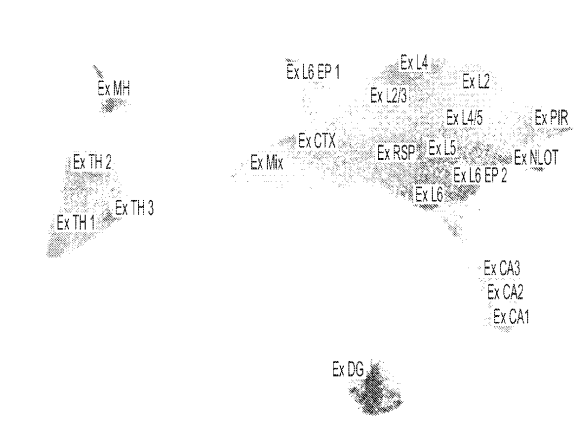


図 19B

10

20

30

40

50

【図 19 C】

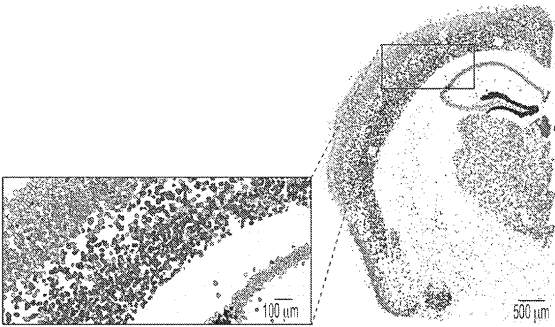


図 19C

【図 20 A - 1】

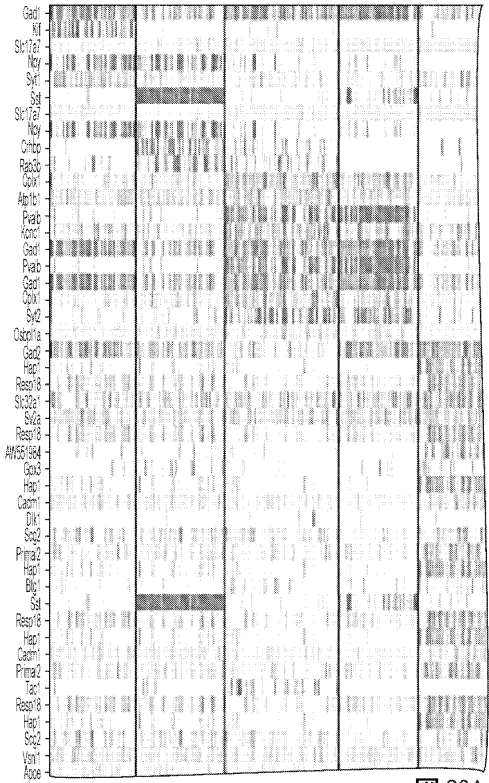


図 20A

【図 20 A - 2】

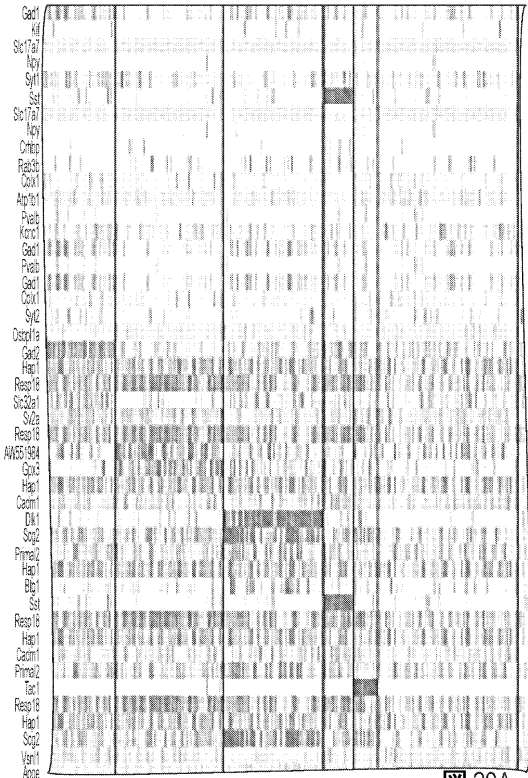


図 20A
続き

【図 20 A - 3】

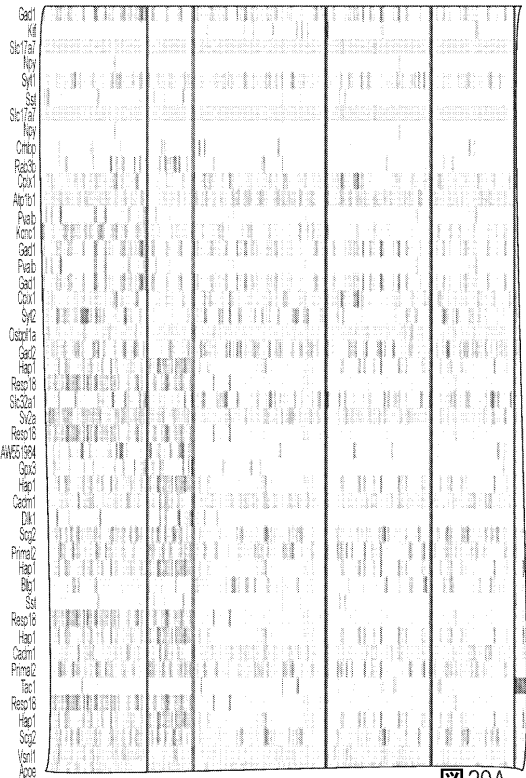


図 20A
続き

10

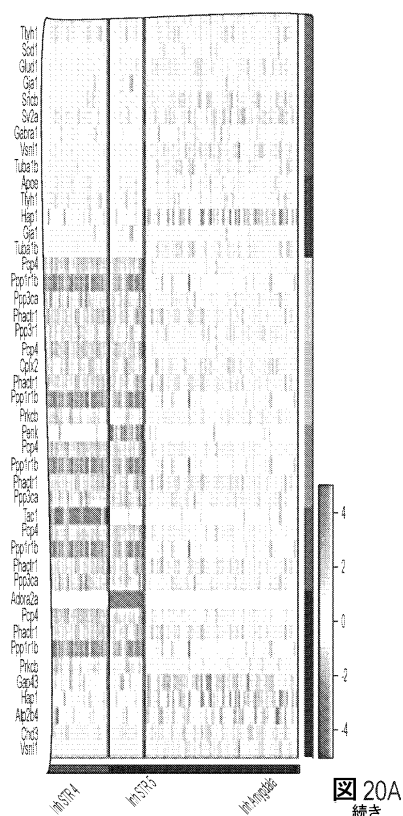
20

30

40

50

【図 20A-8】



【図 20 B】

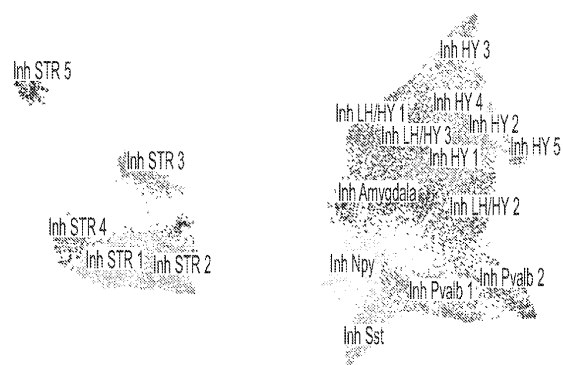


図 20B

10

20

【図 20 C】

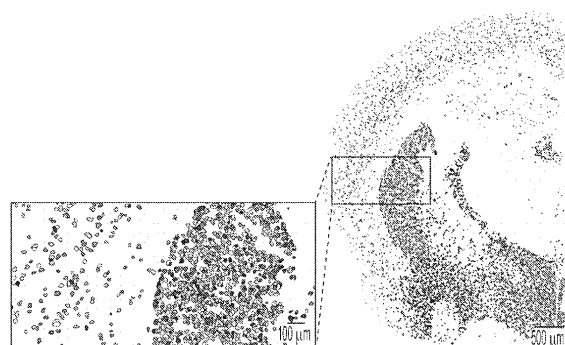


図 20C

【図 2 1 A - 1】

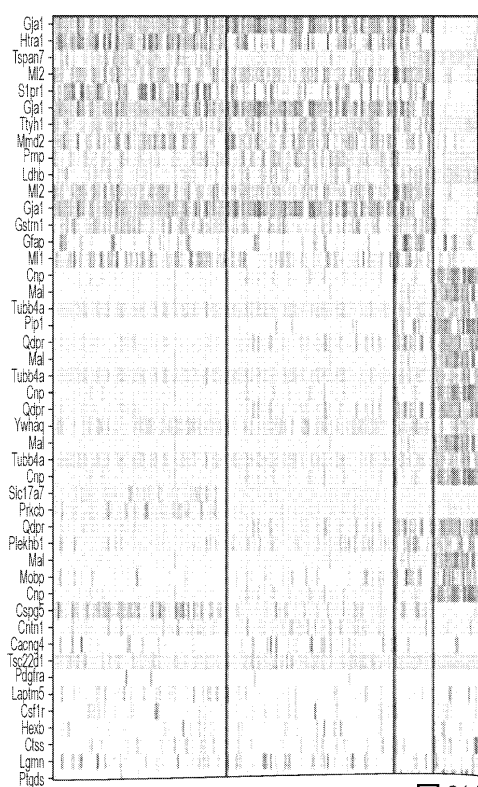
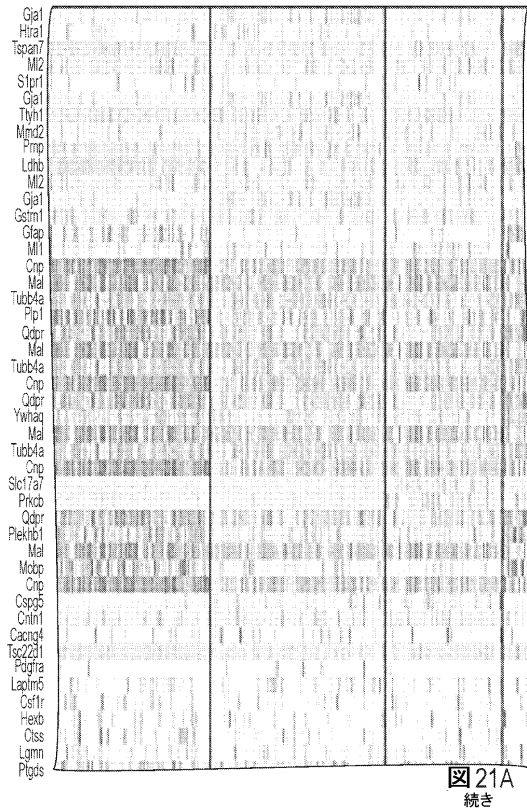


图 21A

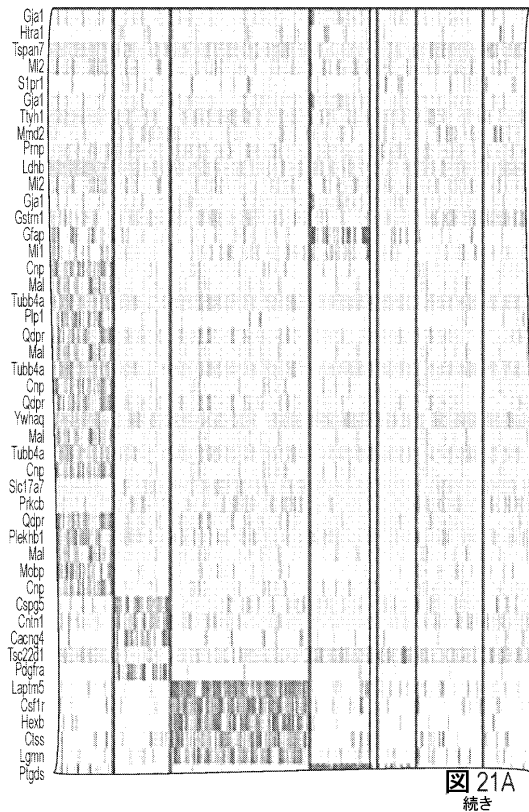
30

40

【図 21 A - 2】



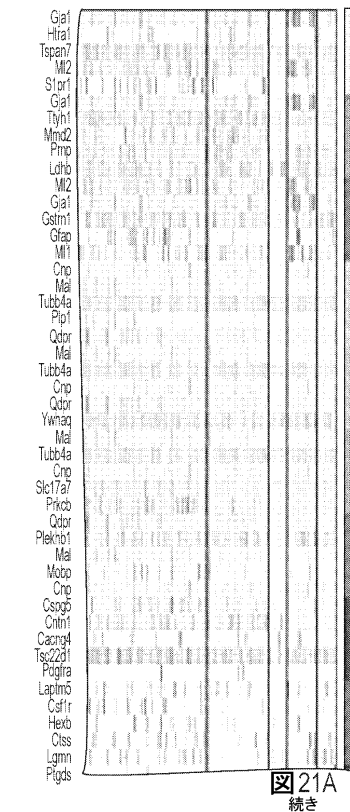
【図 21 A - 3】



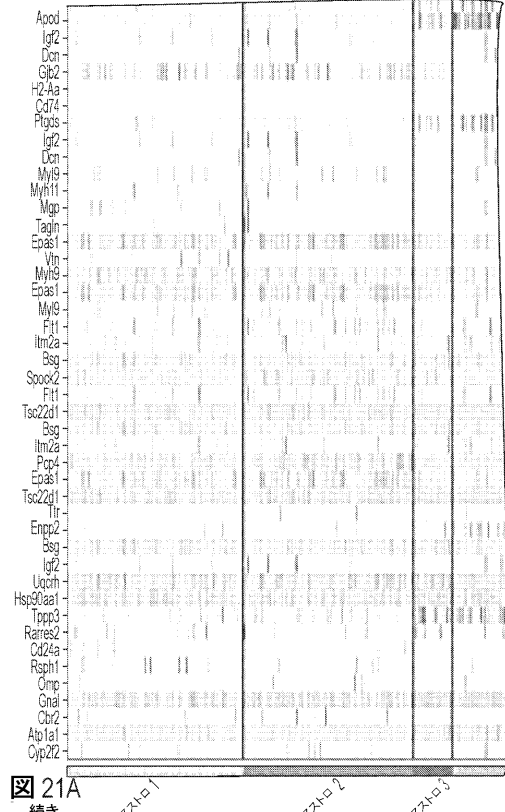
10

20

【図 21 A - 4】



【図 21 A - 5】

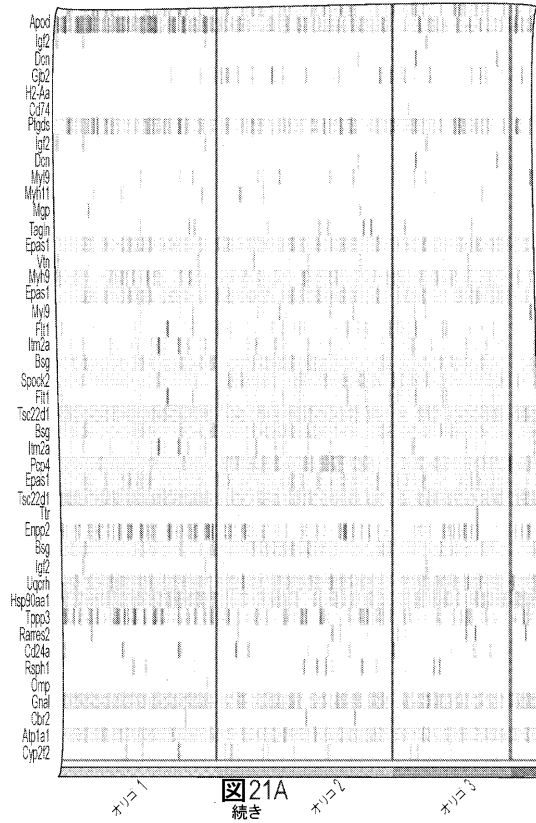


30

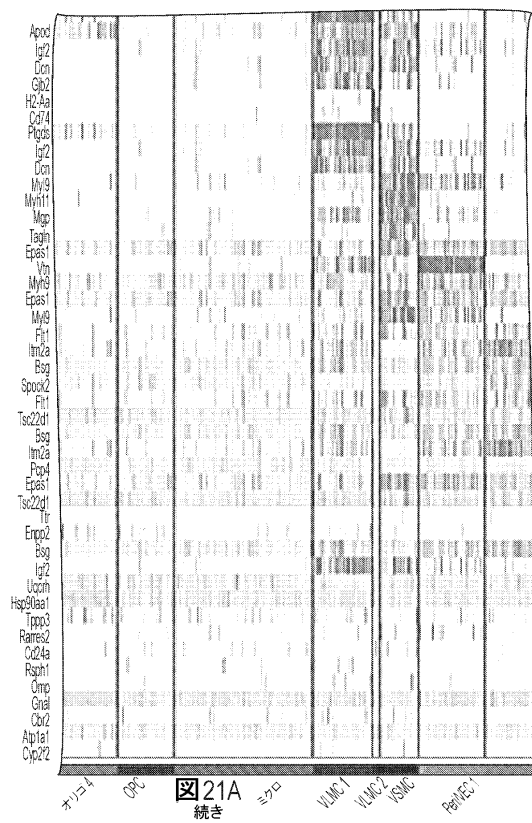
40

50

【図 2 1 A - 6】



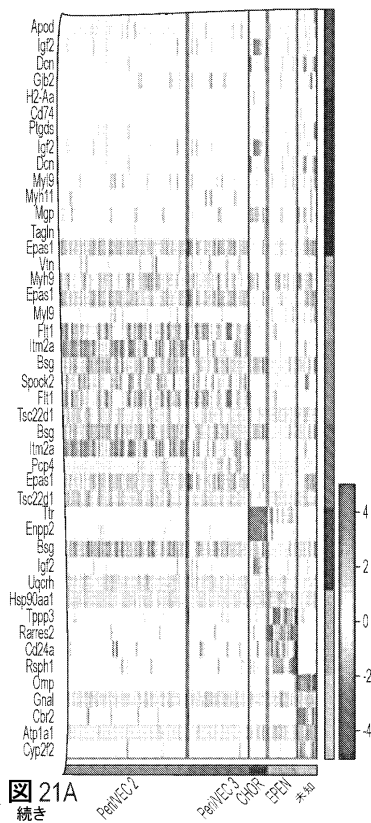
【図 2 1 A - 7】



10

20

【図 2 1 A - 8】



【図 2 1 B】

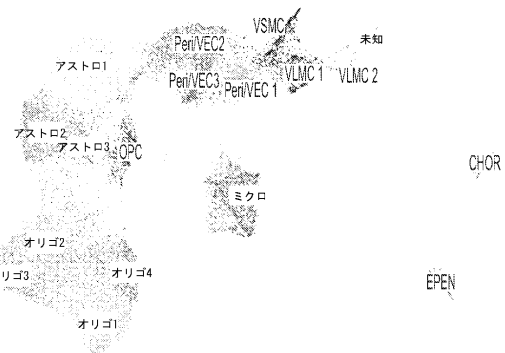


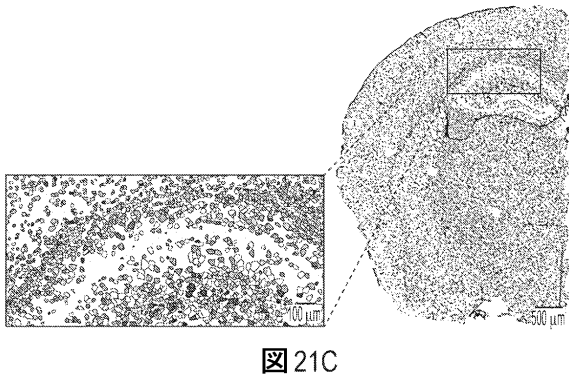
図 21B

30

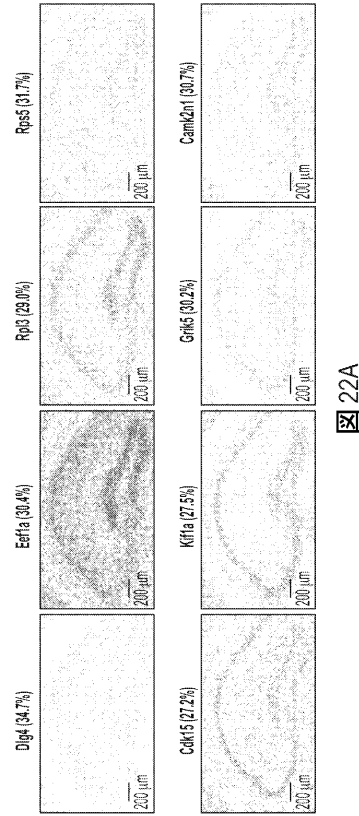
40

50

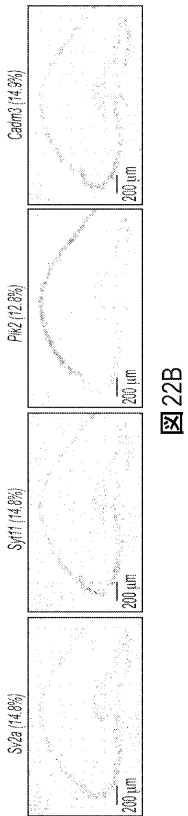
【図 21 C】



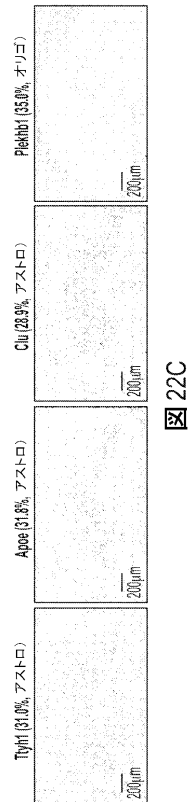
【図 22 A】



【図 22 B】



【図 22 C】



10

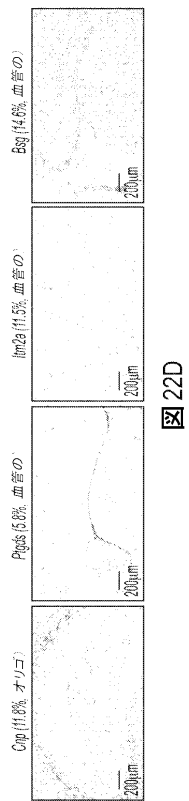
20

30

40

50

【図 22D】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/035271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6841 C12Q1/6804
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.
A	WO 2010/062775 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; WEISSMAN JONATHAN [US] ET AL.) 3 June 2010 (2010-06-03) figure 1A -----	1-211
A	WO 2019/199579 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 17 October 2019 (2019-10-17) cited in the application figure 1A ----- -/--	1-211

☒ 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

4 October 2022

Date of mailing of the international search report

11/10/2022

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/035271

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STRELL CARINA ET AL: "Placing RNA in context and space - methods for spatially resolved transcriptomics", THE FEBS JOURNAL, vol. 286, no. 8, 31 March 2018 (2018-03-31), pages 1468-1481, XP055872614, GB ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/febs.14435 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1111/febs.14435> example 3 -----	1-211

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/035271

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010062775 A2	A2	03-06-2010	AU 2009319907 A1	03-06-2010
			CA 2742298 A1	03-06-2010
			EP 2358913 A2	24-08-2011
			US 2010120625 A1	13-05-2010
			US 2013288905 A1	31-10-2013
			US 2016326519 A1	10-11-2016
			WO 2010062775 A2	03-06-2010

WO 2019199579 A1	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

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 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/18
A 6 1 P	13/02 (2006.01)	A 6 1 P	13/02
A 6 1 P	13/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/00
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 K	41/00 (2020.01)	A 6 1 K	41/00
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869

Z

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. M A T L A B

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
ー 7 7、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) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ52 QR32 QR40 QR55 QS24 QS32
QS36

4C084 AA11 AA13 NA05 NA14 ZA021 ZA022 ZA361 ZA362 ZA511 ZA512

ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZA941 ZA942 ZA961
ZA962 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
ZB321 ZB322 ZC021 ZC022 ZC211 ZC212

F ターム (参考)

12

4C086 AA01 AA02 EA16 NA05 NA14 ZA02 ZA36 ZA51 ZA59 ZA66
ZA75 ZA81 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB26 ZB27 ZB32 ZC02
ZC21
4H045 AA11 DA76 EA50