

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特開2023-4952
(P2023-4952A)

(43)公開日 令和5年1月17日(2023.1.17)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6816(2018.01)	C 1 2 Q 1/6816	Z Z N A
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L 外国語出願 (全18頁)

(21)出願番号 特願2022-101003(P2022-101003)	(71)出願人 520094891
(22)出願日 令和4年6月23日(2022.6.23)	ミルテニー バイオテック ベー・フェー
(31)優先権主張番号 21181309	・ ウント コー・カー・ゲー
(32)優先日 令和3年6月24日(2021.6.24)	Miltenyi Biotec B.V
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)	・ & Co. KG
	ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラー
	トバッハ フリードリヒ・エーバート・
	シュトラッセ 68
	Friedrich-Ebert-St
	rasse 68, 51429 Ber
	gisch Gladbach, Ger
	many
	(74)代理人 100114890
	弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラ
	インハルト
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 M I C タグによる空間配列決定

(57)【要約】 (修正有)

【課題】組織の領域または組織内の個々の細胞におけるmRNAの分布を決定する方法を提供する。

【解決手段】サンプル中のRNAまたはcDNA鎖の少なくとも一部の空間位置および配列情報を得るための方法であって、a.ブリッジオリゴヌクレオチドに部分的にハイブリダイズされ、オリゴヌクレオチドに結合可能なギャップ領域が形成される、第1の検出プローブオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程と、b.サンプル中のRNAまたはcDNA鎖の空間情報を決定するバーコードオリゴヌクレオチドで、ギャップ領域を部分的に充填する工程と、c.第2の検出プローブオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせて、環状テンプレートを形成する工程と、d.環状テンプレートを、複数のコンカテマーを含むロロニー内でローリングサークル増幅可能なポリメラーゼにより増幅する工程と、e.ロロニーのヌクレオチド配列を決定する工程とを含む、方法である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル中の RNA または cDNA 鎖 ((0 0 6)) の少なくとも一部の空間位置および配列情報を得るための方法であって、

a . 5 ~ 1 0 0 個のヌクレオチドを含むブリッジオリゴヌクレオチド (2 0 5) に部分的にハイブリダイズされ、オリゴヌクレオチドに結合可能なギャップ領域 (2 0 6) が形成される、5 0 ~ 1 0 0 0 個のヌクレオチドを含む第 1 の検出プローブオリゴヌクレオチド (2 0 4) を、その 3 ' および / または 5 ' 末端で、少なくとも 1 つの前記 RNA または cDNA 鎖の相補的部分にハイブリダイズさせる工程と、

b . 4 ~ 2 0 個のヌクレオチドを含み、前記サンプル中の前記 RNA または cDNA 鎖 10 の前記空間情報を決定する、1 ~ 1 6 個のバーコードオリゴヌクレオチドで、前記ギャップ領域 (2 0 6) を部分的に充填する工程と、

c . 5 0 ~ 1 0 0 0 個のヌクレオチドを含む第 2 の検出プローブオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') を、その 3 ' および / または 5 ' 末端で、同じまたは cDNA 鎖の前記相補的部分に部分的にハイブリダイズさせかつそれぞれ他端で前記ブリッジオリゴヌクレオチド (2 0 5) に部分的にハイブリダイズさせて、環状テンプレートを形成する工程と、

d . 前記環状テンプレートを、複数のコンカテマーを含むロロニー内でローリングサークル増幅可能なポリメラーゼにより増幅する工程と、

e . 前記ロロニーのヌクレオチド配列を決定する工程と

を含む、方法。

20

【請求項 2】

サンプル中の RNA または cDNA 鎖 ((0 0 6)) の少なくとも一部の空間位置および配列情報を得るための方法であって、

f . それぞれ 5 0 ~ 1 0 0 0 個のヌクレオチドを含む第 1 のオリゴヌクレオチド (2 0 4) および第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') を含み、これらが 5 ~ 1 0 0 個のヌクレオチドを含む部分的にハイブリダイズされたブリッジオリゴヌクレオチド (2 0 5) により連結され、前記第 1 のオリゴヌクレオチド (2 0 4) と前記第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') との間にブリッジギャップ領域 (2 0 6) が形成される、検出プローブオリゴヌクレオチドの 3 ' および 5 ' 末端を、前記少なくとも 1 つの RNA または cDNA 鎖 30 の前記相補的部分にハイブリダイズさせる工程と、

g . 4 ~ 2 0 個のヌクレオチドを含み、前記サンプル中の前記 RNA または cDNA の前記空間情報を決定する、1 ~ 1 6 個のバーコードオリゴヌクレオチドで、前記ブリッジギャップ領域 (2 0 6) を充填して、環状テンプレートを形成する工程と、

h . 前記環状テンプレートを、複数のコンカテマーを含むロロニー内でローリングサークル増幅可能なポリメラーゼにより増幅する工程と、

i . 前記ロロニーの前記ヌクレオチド配列を決定する工程と

を含む、方法。

30

【請求項 3】

前記検出プローブオリゴヌクレオチドが、それぞれ 5 0 ~ 1 0 0 0 個のヌクレオチドを含む第 1 の検出プローブオリゴヌクレオチド (2 0 4) および第 2 の検出プローブオリゴ 40 ヌクレオチド (2 0 4) を、それぞれの 3 ' および 5 ' 末端で、前記少なくとも 1 つの RNA または cDNA 鎖の相補的部分にハイブリダイズさせ、続いて、前記第 1 (2 0 4) と第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') とを、前記ブリッジオリゴヌクレオチド (2 0 5) に部分的にハイブリダイズさせて連結させることにより、前記少なくとも 1 つの RNA または cDNA 鎖にハイブリダイズされることを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記検出プローブオリゴヌクレオチドが、

第 1 のオリゴヌクレオチド (2 0 4) を第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') にライゲーションし、ついで、得られたオリゴヌクレオチドを前記少なくとも 1 つの RNA または cDNA 鎖の前記相補的部分にハイブリダイズさせ、続いて、前記得られたオリゴヌ 50

クレオチドの未結合末端を前記ブリッジオリゴヌクレオチド（２０５）に部分的にハイブリダイズさせて連結させる

ことにより、前記少なくとも１つのRNAまたはcDNA鎖にハイブリダイズされることを特徴とする、請求項２記載の方法。

【請求項５】

前記検出プローブオリゴヌクレオチドが前記少なくとも１つのRNAまたはcDNA鎖の前記相補的部分にハイブリダイズされ、これにより、前記検出プローブオリゴヌクレオチドの前記第１のオリゴヌクレオチド（２０４）と前記第２のオリゴヌクレオチド（２０４'）との間に１～１５０個のヌクレオチドのギャップ（２０７'）が形成されることを特徴とする、請求項１から４までのいずれか１項記載の方法。

10

【請求項６】

前記ギャップ（２０７'）が前記少なくとも１つのRNAまたはcDNA鎖の隣接部分に相補的なヌクレオチドで充填され、これにより、第１の標的配列（２０７）が得られることを特徴とする、請求項５記載の方法。

【請求項７】

前記少なくとも１つのRNAまたはcDNAにハイブリダイズされた前記第１および／または第２のオリゴヌクレオチドの一部を使用して、第２の標的配列を得ることを特徴とする、請求項１から６までのいずれか１項記載の方法。

【請求項８】

前記サンプル中の前記環状テンプレートの前記空間情報が、前記第１および／または第２の標的配列に連結されることを特徴とする、請求項６または７記載の方法。

20

【請求項９】

前記ブリッジギャップ領域（２０６）が、ハイブリダイズ後に光で前記光開裂性保護基を除去して、同じかまたは異なる光開裂性保護基を含むバーコードオリゴヌクレオチドを前記ブリッジオリゴヌクレオチド（２０５）の相補的部分にハイブリダイズさせることにより、少なくとも部分的に充填されることを特徴とする、請求項１から８までのいずれか１項記載の方法。

【請求項１０】

前記環状テンプレートが、ローリングサークル増幅ポリメラーゼについてのプライミング部位として、バーコードオリゴヌクレオチドのうちの１つに相補的なプライマーオリゴヌクレオチドを提供する（ハイブリダイズさせる）ことにより選択的に増殖されることを特徴とする、請求項１から９までのいずれか１項記載の方法。

30

【請求項１１】

前記サンプルが、表面に固定され、透過処理されることを特徴とする、請求項１から１０までのいずれか１項記載の方法。

【請求項１２】

前記サンプルが組織として提供され、一本鎖環状テンプレートが、前記サンプルから分離され、ローリングサークル増幅により *ex situ* で複製されることを特徴とする、請求項１から１１までのいずれか１項記載の方法。

【請求項１３】

前記サンプルが組織として提供され、一本鎖環状テンプレートが、ローリングサークル増幅により前記組織上に複製されることを特徴とする、請求項１から１１までのいずれか１項記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、空間配列決定の技術に関する。その目的は、組織の領域または組織内の個々の細胞におけるmRNAの分布を決定することである。

【０００２】

空間配列決定は、細胞のmRNA含量をその組織状況との関係で直接配列決定すること

50

が可能な方法の総称である。これらの方法は、一方では、一種の高度に多重化された蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) アッセイにおける、細胞の mRNA 発現プロファイルの分析に役立ちうる。

【0003】

他方で、*in situ* 配列決定により、特異的な mRNA 結合プローブを使用して、mRNA 配列情報の読み出しも可能である場合がある。このプローブは、特定の mRNA または cDNA 配列の予め決められた部分のコピーを塞ぐことができる (“Gap-fill padlock probes”, Ke et al., Nature Methods 2013, doi:10.1038/nmeth.2563)。 *in situ* 配列決定法は全てシグナル増幅工程を必要とし、これは、ほとんどの場合、mRNA または cDNA 結合プローブの環化および後続のローリングサークル増幅 (RCA) により行われ、プローブ配列の複数のコピーを含む DNA 分子、いわゆるナノボール、ロロニーまたはローリングサークル増幅産物 (RCP) を生成する。これらは、nm または μ m スケールのサイズを有する大きな分子であるため、1つの細胞内で形成することができるロロニーの数は、この細胞のサイズにより厳密に制限される。

【0004】

さらに、細胞内のロロニーの密度が高すぎる場合、配列決定手法の光学的検出工程の単一の mRNA シグナルの識別が非常に損なわれる。このことは、技術の主な欠点であるため、これを回避すべく、種々の技術、例えば、より小さなロロニーの設計または組織-ヒドロゲル複合体の生成および除去が開発されている (Asp et al., BioEssays 2020, DOI: 10.1002/bies.201900221)。しかしながら、これらの方法は、*in situ* 配列決定の固有の空間的限界を依然として完全には回避できない。

【0005】

別のアプローチでは、*in situ* シグナル増幅を回避する。*in situ* 捕捉は、組織からの mRNA 分子の、バーコード化プライマーのスポットで被覆された表面への移動によるものであり、配列決定された mRNA が抽出された特定の組織領域への *ex situ* 獲得配列情報のバックトラッキングが可能となる。それにもかかわらず、この方法も、RNA 捕捉効率が制限されており、バーコード化捕捉スポットの比較的大きなサイズに起因して分解能が不十分である (単一細胞分析ができない) ため、制限されている (Asp et al., BioEssays 2020, DOI:10.1002/bies.201900221)。

【0006】

発明の概要

本発明は、光学的方法を使用して、遺伝子コードを配列に挿入する方法に関する。このコードを、コード化が実行された位置を探索するために使用することができる。本明細書における目的は、*in situ* で測定可能な mRNA 配列の数および発現動態に関する既存の *in situ* 配列決定法の限界をほとんど克服することである。光学的コード化は、1 μ m の範囲の分解能と、各細胞が典型的なサイズの組織切片においてそれ自体のコードを受容するのに十分なコードの可変性とを有することができる。

【0007】

さらに、特異的な mRNA 結合プローブの光学的コード化およびこれらのプローブ内に封入された mRNA 領域の逆転写媒介「コピー」を行うことができる。このため、この方法を、mRNA の分布をプロファイリング (単一の細胞の発現プロファイリング) するだけでなく、特定の mRNA 切片の配列情報を決定 (例えば、一塩基多型、SNP; 単一の細胞の配列決定) するためにも使用することができる。

【0008】

本明細書に開示する方法の基本方式は、細胞中に存在する mRNA へのパッドロックプローブの結合に基づいている。これらを、以下、MIC タグプローブ (Mismatch Cell Tagging (ミスマッチ細胞タグ) または Mismatch Code Tagging (ミスマッチコードタグ)) と称するものとする。

【0009】

提案された MIC タグワークフローを、図 1 に示す: サンプル調製、組織染色および画

10

20

30

40

50

像化（透過、蛍光）の後に、セグメント化またはクラスター分析および構造化照明のためのマスクの計算が続いて行われる。MICタグプローブは、細胞内の特定のmRNA分子に結合し、これにより、逆転写酵素媒介ギャップ充填（mRNA配列のMICタグプローブへのコピー）およびMICタグコードの周期的組み込み、MICタグプローブのローリングサークル増幅、MICタグコードの配列決定が可能となる。ギャップ充填により得られた配列およびMICタグコードは、画像に注釈付けされる。バイオインフォマティクス分析およびその結果と最初のサンプルソースとの関係により、ワークフローが完了する。

【0010】

MICタグプローブをmRNAに提供することが、本発明の本質的な部分であり、2つの一般的な変形例により達成することができる。

10

【0011】

本発明の第1の目的は、サンプル中のRNAまたはcDNA鎖（006）の少なくとも一部の空間位置および配列情報を得るための方法であって、

a. 5～100個のヌクレオチドを含むブリッジオリゴヌクレオチド（205）に部分的にハイブリダイズされ、オリゴヌクレオチドに結合可能なギャップ領域（206）が形成される、50～1000個のヌクレオチドを含む第1の検出プローブオリゴヌクレオチド（204）を、その3'および/または5'末端で、少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の相補的部分にハイブリダイズさせる工程と、

b. 4～20個のヌクレオチドを含み、サンプル中のRNAまたはcDNA鎖の空間情報を決定する、1～16個のバーコードオリゴヌクレオチドで、ギャップ領域（206）を部分的に充填する工程と、

20

c. 50～1000個のヌクレオチドを含む第2の検出プローブオリゴヌクレオチド（204'）を、その3'および/または5'末端で、同じまたはcDNA鎖の相補的部分に部分的にハイブリダイズさせかつそれぞれ他端でブリッジオリゴヌクレオチド（205）に部分的にハイブリダイズさせて、環状テンプレートを形成する工程と、

d. 環状テンプレートを、複数のコンカテマーを含むロロニー内でローリングサークル増幅可能なポリメラーゼにより増幅する工程と、

e. ロロニーのヌクレオチド配列を決定する工程とを含む、方法である。

【0012】

30

MICタグプローブは、部分的に相補的に結合した「ブリッジ」（図2におけるブリッジオリゴヌクレオチド（205））により連結された、前述の特異的なmRNA結合部位のうちの1つをそれぞれ含む2つのプローブ（204, 204'）からなることができる。このブリッジプライマーの配列は、全てのMICタグプローブについて同じである場合がある。プローブ上のその結合領域に対するブリッジオリゴヌクレオチド（205）の親和性および結合効率を、ロックド核酸（LNA）またはペプチド核酸（PNA）をブリッジオリゴマー配列に組み込むことにより向上させることができる。

【0013】

本発明の第2の目的は、サンプル中のRNAまたはcDNA鎖（006）の少なくとも一部の空間位置および配列情報を得るための方法であって、

40

f. それぞれ50～1000個のヌクレオチドを含む第1のオリゴヌクレオチド（204）および第2のオリゴヌクレオチド（204'）を含み、これらが5～100個のヌクレオチドを含む部分的にハイブリダイズされたブリッジオリゴヌクレオチド（205）により連結され、第1のオリゴヌクレオチド（204）と第2のオリゴヌクレオチド（204'）との間にブリッジギャップ領域（206）が形成される、検出プローブオリゴヌクレオチドの3'および5'末端を、少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の相補的部分にハイブリダイズさせる工程と、

g. 4～20個のヌクレオチドを含み、サンプル中のRNAまたはcDNAの空間情報を決定する、1～16個のバーコードオリゴヌクレオチドで、ブリッジギャップ領域（206）を充填して、環状テンプレートを形成する工程と、

50

h. 環状テンプレートを、複数のコンカテマーを含むロロニー内でローリングサークル増幅可能なポリメラーゼにより増幅する工程と、

i. ロロニーのヌクレオチド配列を決定する工程とを含む、方法である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】MICタグワークフローを示す図である。サンプル調製、組織染色および画像化。

【図2】パッドロック形成およびMICタグプローブのギャップ充填の変形例を示す図である。

10

【図3】MICタグコード化を示す図である。

【図4】ギャップ充填、コード化およびブリッジプライマー除去後のMICタグプローブを示す図である。

【図5】MICタグロロニーの配列決定を示す図である。

【図6】MICタグコードのための加速された配列決定手法を示す図である。

【図7】MICタグプローブの並列コード化変形例を示す図である。

【図8】固有分子識別子(UMI)のMICタグプローブ配列への組み込みを示す図である。

【図9】プライマー制御MICタグコード化を示す図である。

【0015】

20

発明を実施するための形態

以下において、検出プローブオリゴヌクレオチドは、「MICタグプローブ」と称され、ブリッジオリゴヌクレオチド(205)は、複数の「MICタグディジット」またはより短く「ディジット」を含有し、ギャップ領域(206)は、「MICタグスニップス」またはより短く「スニップス」と称されるバーコードオリゴヌクレオチドで充填される。

【0016】

検出プローブオリゴヌクレオチドを生成するための変形例を、図2A～図2Dに示す。

【0017】

図2Aに、パッドロックを示す。検出プローブオリゴヌクレオチド(204)は、少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖(005)の相補的部分(006)に結合する結合領域(203)を有する。検出プローブオリゴヌクレオチドは、部分的にハイブリダイズされ、オリゴヌクレオチドに結合可能なギャップ領域(206)を形成するブリッジオリゴヌクレオチド(205)を備える。

30

【0018】

図2Bに、パッドロックの一般的な概念および形状を示す。第1(204)および第2(204')の検出プローブオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖(005)の相補的部分(006)および(006')に結合する結合領域(203)および(203')を有する。最終的な検出プローブオリゴヌクレオチドは、第1(204)および第2(204')の検出プローブオリゴヌクレオチドを、ブリッジオリゴヌクレオチド(205)に部分的にハイブリダイズさせることにより生成される。ここで、オリゴヌクレオチドに結合可能なギャップ領域(206)が形成される。

40

【0019】

図2Bに示されている実施形態の第1の変形例では、検出プローブオリゴヌクレオチドは、それぞれ50～1000個のヌクレオチドを含む第1の検出プローブオリゴヌクレオチド(204)および第2の検出プローブオリゴヌクレオチド(204')を、それぞれの3'および5'末端で、少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の相補的部分にハイブリダイズさせ、続いて、第1(204)と第2のオリゴヌクレオチド(204')とを、ブリッジオリゴヌクレオチド(205)に部分的にハイブリダイズさせて連結させることにより、少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖にハイブリダイズされる。

【0020】

50

図 2 B に示されている実施形態の第 2 の変形例では、検出プローブオリゴヌクレオチドは、第 1 のオリゴヌクレオチド (2 0 4) を第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') (部分 2 0 3 および 2 0 3 ') にライゲーションし、ついで、得られたオリゴヌクレオチドを少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎖の相補的部分にハイブリダイズさせ、続いて、得られたオリゴヌクレオチドの非結合末端をブリッジオリゴヌクレオチド (2 0 5) に部分的にハイブリダイズさせて連結することにより、少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎖にハイブリダイズされる。

【 0 0 2 1 】

図 2 A に示された変形例では、検出プローブオリゴヌクレオチドならびに / または少なくとも 1 つの R N A もしくは c D N A にハイブリダイズされた第 1 および / もしくは第 2 のオリゴヌクレオチドの一部が、第 2 の標的配列を得るために使用される。 10

【 0 0 2 2 】

図 2 A に示されている実施形態とは異なり、図 2 B に示されている実施形態は、m R N A (0 0 5) にハイブリダイズされると、第 1 のオリゴヌクレオチド (2 0 4) と第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') との間にギャップ (2 0 7 ') を備える。

【 0 0 2 3 】

この変形例は図 2 C に示されており、ここで、検出プローブオリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎖の相補的部分にハイブリダイズされ、これにより、検出プローブオリゴヌクレオチドの第 1 のオリゴヌクレオチド (2 0 4) と第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') との間に 1 ~ 1 5 0 個のヌクレオチドのギャップ (2 0 7 ') が形成される。 20

【 0 0 2 4 】

ついで、ギャップ (2 0 7 ') を、少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎖の隣接部分に相補的なヌクレオチドで逆転写酵素 (2 0 8) により充填して、第 1 の標的配列 (2 0 7) を得ることができる。ついで、第 1 のオリゴヌクレオチド (2 0 4) および第 2 のオリゴヌクレオチド (2 0 4 ') の最終ライゲーションを、D N A リガーゼ (2 0 9) により行う。

【 0 0 2 5 】

図 2 D に、その第 1 の目的に係る本発明の方法を示す。本明細書において、第 1 の検出プローブオリゴヌクレオチド (2 0 4) は、その 3 ' および / または 5 ' 末端 (2 0 3) で、少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎖 (0 0 5) の相補的部分 ((0 0 6)) にハイブリダイズされる。第 1 の検出プローブオリゴヌクレオチド (2 0 4) を、ブリッジオリゴヌクレオチド (2 0 5) と共に予め提供し、m R N A 鎖 (0 0 5) にハイブリダイズさせることができる。 30

【 0 0 2 6 】

代替的には、第 1 の検出プローブオリゴヌクレオチド (2 0 4) が、最初に、少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎖 (0 0 5) の相補的部分 ((0 0 6)) にハイブリダイズされ、ついで、ブリッジオリゴヌクレオチド (2 0 5) に部分的にハイブリダイズされる。

【 0 0 2 7 】

両方の場合において、オリゴヌクレオチドに結合可能なギャップ領域 (2 0 6) が形成される。 40

【 0 0 2 8 】

すなわち、図 2 (A) は、1 つの m R N A 結合部位を有する M I C タグプローブを示し、図 2 (B) は、2 つの直接に隣接する m R N A 領域にハイブリダイズされた 2 つの m R N A 結合部位を有する M I C タグプローブを示し、図 2 (C) は、M I C タグプローブギャップの充填を示す。M I C タグプローブが、特異的な m R N A 種の 2 つの直接に隣接しない m R N A 領域に結合した後、ギャップ充填のための c D N A 合成が、逆転写酵素により行われる。D N A リガーゼにより、鎖が連結される。

【 0 0 2 9 】

この種の一本鎖DNAプローブは、mRNAの2つの隣接領域または近接するが直接に隣接しない2つの領域とハイブリダイズする2つの特異的なmRNA結合領域を含有する。ついで、プローブ結合が近接するが直接に隣接しない2つの領域で生じた際に生成されたギャップを、逆転写酵素により、封入されたmRNAに相補的な配列で「充填」（「ギャップ充填」）することができる。

【0030】

続いて、プローブは、後続のローリングサークル増幅を可能にするDNAリガーゼ（図2における209）により環化される。

【0031】

下記のプロセス工程において、ギャップ領域（206）は段階的に充填され、相補的配列（MICタグスニップス）の断片を、各工程において、相補的MICタグディジットに挿入し、これを光で固定する。例えば、合成プロセスによる配列決定に使用される環状化学とは対照的に、一実施形態では、単一のデオキシヌクレオチドが挿入されず、小さなオリゴヌクレオチド（MICタグスニップス）が挿入される。

【0032】

したがって、ブリッジギャップ領域（206）を、ハイブリダイズ後に光で光開裂性保護基を除去して、同じかまたは異なる光開裂性保護基を含むバーコードオリゴヌクレオチドをブリッジオリゴヌクレオチド（205）の相補的部分にハイブリダイズさせることにより、少なくとも部分的に充填することができる。

【0033】

ミスマッチング

MICタグスニップス（バーコードオリゴヌクレオチド）は、その長さに応じて、対応するMICタグディジットと1つ以上のミスマッチを有することができるが、ブリッジオリゴヌクレオチドの（ほぼ）相補的部分に依然として特異的に結合するのに十分な配列長を有するべきである。

【0034】

「ミスマッチ」という用語は、少なくとも1つの非相補的ヌクレオチドを有するバーコードオリゴヌクレオチドを指す。

【0035】

MICタグスニップスは、好ましい比率のMICタグスニップス：ミスマッチ＝10：1bpを有する1つまたは2つのミスマッチを含有することができる。ミスマッチバージョンに加えて、MICタグスニップスは、別の変形例として機能するマッチングコードも含有することができる。

【0036】

その関連するMICタグディジットとの特異的ハイブリダイゼーションを確実にするために、スニップスは、他のディジットを結合することができないように設計される必要がある。スニップスにおけるミスマッチの代替として、ブリッジプライマーも、スニップスミスマッチに相補的な位置にユニバーサル塩基を含有するように設計することができる。

【0037】

これらのMICタグスニップスのアニーリングは周期的プロセス内で行われ、このアニーリングは、各周期において、空間的に構造化された別の光パターンで組織サンプルを処理することにより、組織サンプルの構造化照明によってトリガされる。「構造化照明」および「空間的に構造化された光パターン」は、サンプルの一部または選択された領域のみを照明することを指す。例えば、図1に、画像化100に供される組織ドナー001から得られた（場合により、染色された）組織切片002を示す。この画像化100により、セグメント化またはクラスター分析、すなわち、本発明の方法によりさらに調査されるべきサンプルの部分の選択が可能となる。このようなセグメント化／クラスタリング／選択により、構造化照明および／または空間的に構造化された光パターンのためのマスクの計算が可能となる。

【0038】

10

20

30

40

50

本発明の方法における更なる下流では、構造化照明および／または空間的に構造化された光パターンのために得られた情報が、M I C タグコード生成のための光処理（１０２）の間に利用される。これにより、パッドロックプローブ２０１の環化が可能となり、最終的に、R C A 後に、口口ニー２０２の形成が可能となる。構造化照明の助けを借りて、サンプル２０２の選択された領域／細胞のみが、口口ニーの次世代配列決定（１００）および配列分析（１０１）に供される。

【００３９】

M I C タグスニップスの結合動力学は、光開裂性基が除去されない場合、例えば温度を上昇させることによりスニップスを分離し洗い流すことができるように調節される。露光が行われた場合、ブリッジオリゴヌクレオチド内のその対応するM I C タグディジットとハイブリダイズされたM I C タグスニップスが、プローブ内に固定される。光開裂性基がパターン化照明により分離され、この部位でのリガーゼ反応が可能となるためである。最後に、M I C タグスニップスの個々の組み合わせにより、組織切片内または細胞内でさえ、M I C タグプローブの位置をコード化するM I C タグコードが決定される。

【００４０】

M I C タグコード化のプロセスを、図３に示す：４つの特異的ギャップ充填オリゴのうちの１つが、結合し、ギャップ充填されたM I C タグプローブに加えられる。このオリゴは、塩基ミスマッチを全く有さないか、１つまたは２つの塩基ミスマッチを有するかのいずれかである。このスキームにより、１６種類のミスマッチプローブを、各M I C タグディジットについて設計することができる。これらのミスマッチプローブは、４つのM I C タグディジット結合領域（I ~ IV）のうちの１つに結合する。単一細胞を照明することにより、光開裂が誘引され、D N A リガーゼによるM I C タグスニップスの組み込みが可能となる。

【００４１】

標的鎖の逆転写酵素によるギャップ充填が既に行われたM I C タグプローブから出発して、M I C タグスニップスは、幾つかのスニップスからなるコードが書き込まれるまで、周期的なプロセスで構築される。図３に示された例では、スニップスの変動性は１６であり、これを、２つのミスマッチおよびブリッジ内の４つの結合領域（M I C タグディジット）により達成することができる。したがって、６５５３６種類の値を有することができるコードを書き込むには、 4×16 サイクルが必要となる。

【００４２】

コード化が完了した後、全てのM I C タグプローブ、すなわち環状テンプレートが、組織サンプルから単離される、すなわち除去される。ブリッジオリゴヌクレオチドを、例えば熱誘引二本鎖融解により、環状テンプレートから分離することができる。代替的な変形例において、ブリッジオリゴヌクレオチドは、ローリングサークル増幅を誘引するためのプライマー配列を備え、このため、環状テンプレート／M I C タグプローブ上に残存することができる。

【００４３】

図４に、M I C タグスニップス（２１７）を担持する単離されたM I C タグプローブを示す。M I C タグスニップス（２１７）は、そのm R N A 鎖を起源とする組織構造、細胞または細胞内領域からの情報を提供する。加えて、M I C タグプローブのm R N A 結合部位（（００６）、（００６'））間のギャップ充填（２０７）によるc D N A 合成により、標的とするm R N A の最終的な突然変異またはS N P（一塩基多型）に関する情報が含まれる（図４、２０７）。

【００４４】

原則として、この方法は、同時に検査されるm R N A の種類の数に関して限定されるものではなく、個々のm R N A 発現レベルに関して限定されるものではない。その結果、ハウスキーピング遺伝子としての高レベルの発現者がそのプロセスを損なうことはないであろう。同時に個々に検査される細胞数は、選択されたコード長により制限される。この制限は、シーケンサの能力およびスループットのみである。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

配列決定

本発明の方法における1つの工程は、口ロニーのヌクレオチドの配列を決定することに向けられる、すなわち、MICタグプローブ上にコード化された情報が配列決定により読み出される。配列決定のための1つの方法は、sequencing by synthesis法(SBS)であってよい。読み出しシグナルを増加させるために、MICタグプローブ配列の増幅を行うことができる。クローン増幅のための1つの方法は、単離されたMICタグプローブのローリングサークル増幅(RCA)であってよい。この増幅は、口ロニーに対する配列決定プロセスを開始する前に行われる。

【 0 0 4 6 】

10

図5に、MICタグ口ロニーの配列決定を示す。2つの配列決定プライマーにより、ギャップ充填cDNA配列(218, 218')およびMICタグコード(219, 219')の連続配列決定が導かれる。

【 0 0 4 7 】

本発明の変形例では、MICタグコードの配列を、標的遺伝子の配列(ギャップ充填配列)とは別個に読み取ることができる。これを、配列決定手法を2つの異なる配列決定プライマーによる2つのランに分割することにより実現することができる。

【 0 0 4 8 】

MICタグコード配列決定の加速

MICタグスニップスの配列決定を、ミスマッチ領域の前後のマッチングコードが4つの塩基のうちの3つ(例えば、G、T、C)の配列のみからなる場合、加速させることができる。下記の配列において、Mは、塩基G、A、Cのうちの1つについてのプレースホルダであり、Xは、ミスマッチングコードについてのプレースホルダである。

20

【 0 0 4 9 】

MMMMMTXXMMMM(MICタグスニップス、M={G, A, C}およびX={A, G, T, C})

【 0 0 5 0 】

合成による配列決定に適用される環状化学物の文脈において、組み込まれたヌクレオチドは、通常、塩基特異的フルオロフォアおよびターミネーター(本明細書において、A^{*}、G^{*}、C^{*}、T^{*}で示される)で修飾され、これにより、その位置が読み取られるまで、更なるポリメラーゼ媒介鎖伸長がブロックされる。上記で与えられた変形例におけるMICタグスニップスを読み取る場合、色素およびターミネーターを含まないヌクレオチドT、G、CとA^{*}との混合物を適用することができる。ついで、これらは、Tが生じるまで組み込まれ、常にミスマッチに先行し、A^{*}を組み込むことにより更なる伸長が妨げられる。

30

【 0 0 5 1 】

ついで、配列のミスマッチ部分を、ターミネーターおよび蛍光色素で修飾されたヌクレオチドの混合物を使用することにより検出することができる。ついで、T、G、C、A^{*}混合物を再度添加し、鎖伸長を、次のMICタグスニップスにおける次のミスマッチ位置の前にある次のTまで進行させる。

40

【 0 0 5 2 】

これにより、本質的に、MICタグコード中のミスマッチ位置を配列決定するために必要なサイクル数を減少させることができる。この戦略を使用して、周期的組み込みのデフェージングが回避され、補正される。読み取られるべき第1のMICタグスニップス配列を、配列決定プライマーがミスマッチ配列の直前に結合し、このため、T、G、C、A^{*}による最初のパディングの必要性を排除するようにも設計することができる。

【 0 0 5 3 】

本発明のこの変形例を、図6に示す。この場合、例えば2つの連続するミスマッチが、MICタグスニップスに存在する。図6に、MICタグコードのための加速配列決定手法を示す。特異的配列決定プライマーにより誘導されて、ターミネーター(T^{*}、C^{*}、G

50

、A）で蛍光標識されたヌクレオチドが、3サイクルで添加されて、合成アプローチによる配列決定におけるミスマッチ検出が可能となる。次の工程では、非標識および非終結ヌクレオチド（T、C、G）およびターミネーター（A*）で蛍光標識されたAが添加され、鎖がDNAポリメラーゼにより充填される。A*の結合により、この工程が停止する。次のミスマッチ位置に到達したことを示すためである。再度、ターミネーター（T*、C*、G*、A*）で蛍光標識されたヌクレオチドが、3サイクルで添加されて、合成アプローチによる配列決定におけるミスマッチ検出が可能となる。このアプローチは、MICタグコード全体が配列決定され、ミスマッチ領域を除いて、その配列内にチミジンを含まない特別に設計されたMICタグスニップスが必要となるまで繰り返される。

【0054】

10

この変形例では、例として、下記の配列が利用される。

【0055】

配列番号1：配列決定プライマー221の3'末端：5'-...TGATCATG-3'（10ヌクレオチド未満、配列表なし）

配列番号2：第1のMICタグスニップス（ミスマッチヌクレオチド224を有する）：3'-GCTAGTACTCGAGCC-5'

配列番号3：第2のMICタグスニップス（ミスマッチヌクレオチド224'を有する）：3'-GCAACGGCCCTAGCCCTG-5'

配列番号4：第3のMICタグスニップスの3'末端：3'-CGCAAGGCT...-5'

20

配列番号5：（標識ヌクレオチド222を使用する）合成手法による配列決定において生成された相補的配列の5'末端：5'-...TGATCATGAGCTCGGCGTTGCCGGAATCGGTCGCGTTTCCGA...-3'

【0056】

種々のMICタグコード

MICタグコードを、種々のMICタグスニップスの組み合わせにより生成することができる。本明細書において、スニップスの変動性Nは、異なるスニップスの数を表す。好ましくは、異なるスニップスの数は、 $N = 2, 4$ または16である。MICタグディジットの数M（結合領域の数）は、1~32の範囲にありうる。ついで、MICタグコードの総変動性は、 NM である。コードの書き込みに必要なサイクル数は、 $N \times M$ である。

30

【0057】

コード生成の加速

MICタグディジット（結合部位）それぞれに（ $N - 1$ ）種類のMICタグスニップスを組み込んだ後、最後の種類のMICタグスニップスを、光を適用することなく組み込むことができる。最初の $N - 1$ ステップ内で既に照明された領域の相補的実体に関連するためである。これを、光開裂性基を有さないスニップスを提供することにより利用することができる。ついで、この非光開裂性スニップスを、次のMICタグディジットのための第1の（光開裂性）MICタグスニップスと共に提供することができる。これを1回のサイクルとしてカウントすると、必要なサイクルが $N \times M - M + 1 = (N - 1) \times M + 1$ に減少する。最後のサイクルにおいて、光を適用することなく、MICタグコードが完了するであろう。この方法は、 $N = 2$ の場合に特に有用であり、この場合、 $N \times M - M + 1 = M + 1$ となる。

40

【0058】

下記の表に、本発明の方法の変形例の例およびMICタグコード化に必要なサイクル数に対するその効果を示す。

【0059】

【表 1】

#MIC タグ スニップス N	#MIC タグ ディジット M	MIC タグコード の変動性 N^M	コード生成 $N \times M$ に必要な サイクル数 (加速: $(N-1) \times M + 1$)
2	8	256	16 (9)
2	16	65565	32 (17)
4	8	65565	32 (25)
16	4	65565	64 (61)

10

【0060】

エラー処理

M I C タグコードが書き込まれると、M I C タグスニップスが組み込まれたときに、エラーが発生する場合がある。M I C タグスニップスのうちの1つが挿入されない場合、プローブは環化されず、R C A を起こすことができず、続いての配列決定情報が生成されないであろう。

【0061】

20

誤ったM I C タグスニップスが挿入された場合、コードは正しい細胞を示さないであろう。この制限は、先のセクションで概説されたコード生成の加速が適用されない場合にのみ有効である。

【0062】

すなわち、M I C タグスニップスが挿入されない場合、パッドロックは形成されず、期間内に配列決定に供されないであろう。その限りにおいて、本発明の方法は、組み込みエラー処理を有する。

【0063】

加えて、他の誤り訂正方法を含ませることも意味がある場合がある。例えば、2つ目の同一コードを異なる位置でブリッジに同時に挿入することができ、その結果、コードを内部的に検証することができる。また、コード長を長くし、冗長化による誤り訂正を付加することも可能である。

30

【0064】

この変形例において、ブリッジオリゴヌクレオチドは、同じM I C タグスニップスについて少なくとも2つの同一の結合領域を含有し、これらは、特異的結合反応を確実にするために同時にアクセス可能である。この場合も、1つのM I C タグスニップスが正しく挿入されなければ、各パッドロックが形成されず、配列決定に供されないであろう。

【0065】

この点に関して、図7に、並列に同一に記載された2つの同一領域を有するM I C タグプローブを示す。この場合、両方のコードが同一である箇所にそれらの配列のみを割り当てることが可能である。これにより、特に、異なるサンプル領域間で非常に異なるm R N A 発現プロファイルを有するサンプルにおいて、そのコントラストが不正確なコードにより平準化されることが防止される。

40

【0066】

遺伝コードの読み出しには、読み出しエラーの問題がある。これらのエラーは、M I C タグコードおよびm R N A 配列において生じうる。したがって、R C A により産生された鎖を酵素的に切断し、配列決定のために再度R C A により各鎖から複数の鎖を生成することが有用でありうる。ついで、エラー訂正をM I C タグコードとm R N A 配列との両方に行うことができるように、M I C タグプローブ中に固有分子識別子 (U M I) を含ませることが有用である。この変形例は、固有分子識別子 (U M I) 226 をM I C タグプロー

50

ブ配列に組み込んだ状態で、図 8 に示されている。UMI を、ロロニーの酵素消化後に元の MIC タグプローブを特定するために使用することができる。

【0067】

代替的なコード化アプローチ

提案された MIC タグ手法に加えて、代替的な方法を、*in situ* で MIC タグプローブにコードを書き込むために使用することができる。これまでに記載した MIC タグ手法の 1 つの変形例を、図 9 に示す。本明細書において、リガーゼ媒介 MIC タグスニップスの組み込みを、予め組み込まれる必要がある追加のプライマーにより制御することができる。MIC タグスニップスとして、これらのプライマーは、特定の波長光を有する照明により除去される光不安定性基を有し、この光不安定性基により、DNA リガーゼによる鎖へのその後続の組み込みが可能となる。光不安定性基に場合により結合されたフルオロフォアの放出を検出することができ、内部対照として使用することができる。

10

【0068】

図 9 で言及された追加のプライマーの代わりに、光開裂性基を有する単一のヌクレオチドを使用することができる。プライマーおよびブリッジプローブの相補鎖とハイブリダイズし、DNA リガーゼによりプローブに組み込まれる MIC タグスニップスとは対照的に、ヌクレオチドは、DNA ポリメラーゼにより組み込まれる必要がある。

【0069】

図 9 に、プライマー制御された MIC タグコード化を伴う本発明の変形例を示す。本明細書において、光不安定性基で修飾されたプライマーは、第 1 の MIC タグディジットに隣接する一本鎖領域にハイブリダイズされる。光により、プライマーに結合された光不安定性基の開裂が誘引される。プライマーは、DNA リガーゼにより鎖に組み込まれ、ついで、第 1 のスニップスが添加され、第 1 のディジットとハイブリダイズする。この工程は、ディジット I 位置における全ての異なるスニップスが組み込まれるまで繰り返される。ここで、第 1 の工程は、ディジット II における異なる種類のスニップス II の組み込みを調製するために繰り返される。複数のサイクル後、MIC タグコードが完了し、MIC タグプローブが最終的にライゲーションされる。

20

【符号の説明】

【0070】

図面の用語集

30

生物、組織および組織内容物

001 組織ドナー

002 染色組織切片

003 細胞

004 細胞核

005 mRNA

006 mRNA 上の MIC タグプローブ結合部位

技術的手法

100 画像化

101 セグメント化またはクラスター分析、構造化照明のためのマスクの計算

40

102 MIC タグコード生成のための光処理

103 ロロニーの次世代配列決定

104 配列分析

105 周期的バーコード化

試薬および生成物

200 cDNA ギャップ充填および個々のコード化前の MIC タグプローブ

201 cDNA ギャップ充填および個々のコード化後の MIC タグプローブ

202 ロロニーまたはローリングサークル増幅産物 (RCP)

203 特異的な mRNA 結合部位

204 MIC タグプローブ骨格

50

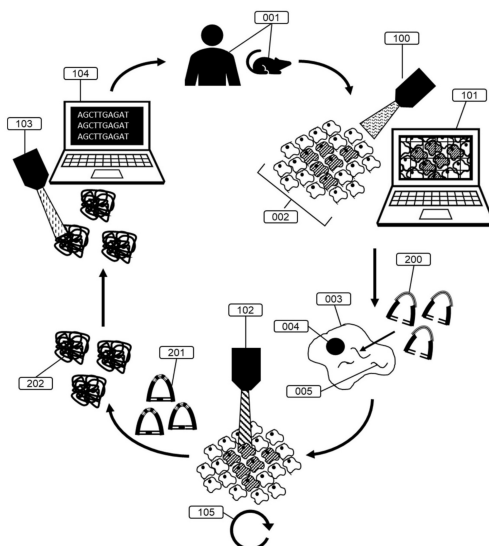
- 205 MICタグプローブ骨格末端にハイブリダイズしたブリッジオリゴヌクレオチド
 206 MICタグプローブ骨格にブリッジオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションにより形成されたギャップ
 207 cDNA（またはcDNAのギャップ、207'）
 208 逆転写酵素
 209 DNAリガーゼ
 210 ギャップ充填後のMICタグプローブ
 211 MICタグディジット（Ⅰ～Ⅳ）を有するブリッジプライマー
 212 光不安定性保護基を有するオリゴヌクレオチドまたはMICタグスニップス
 213 MICタグスニップスから光不安定性保護基を開裂させる集束光
 214 開裂型光不安定性保護基
 215 光不安定性保護基を含まないMICタグスニップス
 216 MICタグプローブに組み込まれたMICタグスニップス
 217 MICタグコード
 218 配列決定プライマー結合部位
 219 mRNA結合部位およびcDNAの配列決定手法
 220 MICタグコードの配列決定手法
 221 配列決定プライマー
 222 （光不安定性）保護基を有するヌクレオチド
 223 ヌクレオチド
 224 MICタグコード中の可変ヌクレオチド（「ミスマッチ」）
 225 DNAリガーゼ活性を支持するスプリントオリゴヌクレオチド
 226 固有分子識別子（UMI）
 227 制限部位
 228 制限酵素

10

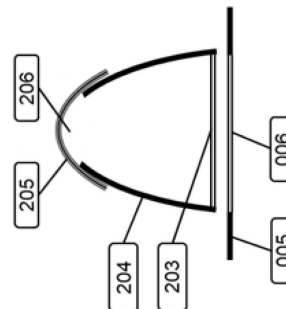
20

【図面】

【図1】



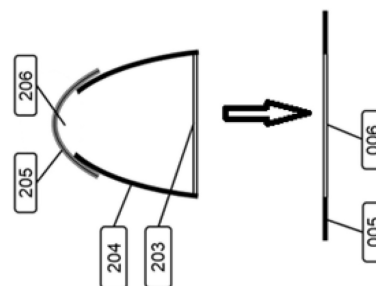
【図2-1】



30



40



A

図 2A

50

【 図 2 - 2 】

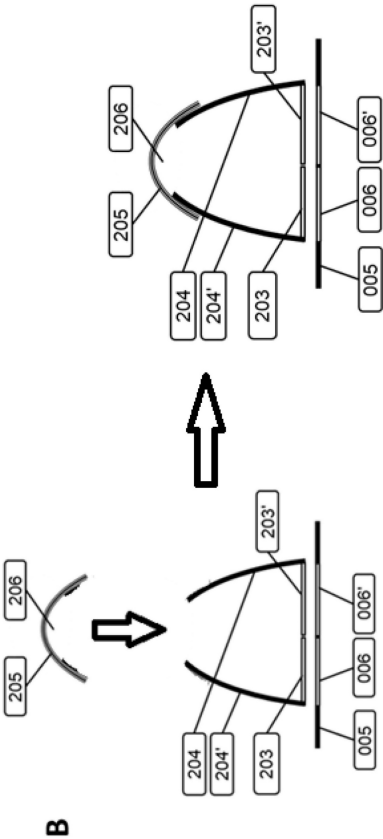


図 2 B

【 図 2 - 3 】

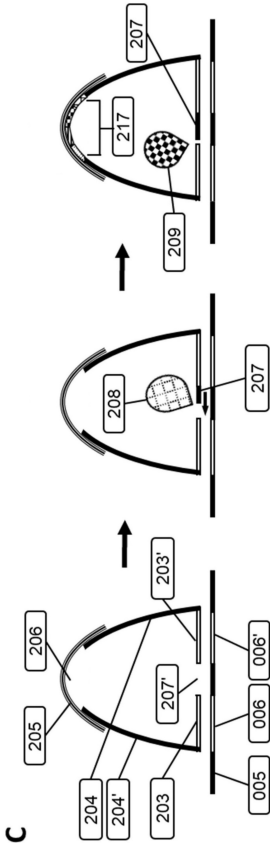


図 2 C

【 図 2 - 4 】

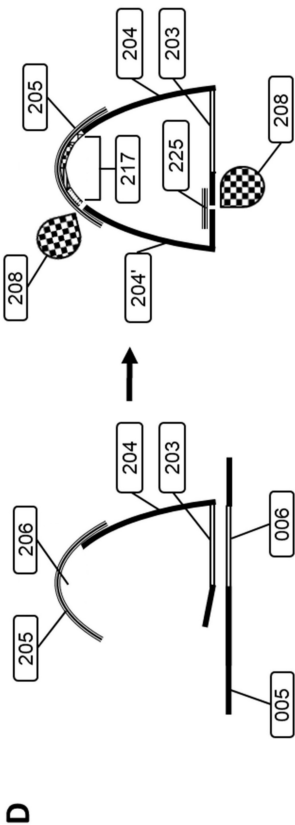
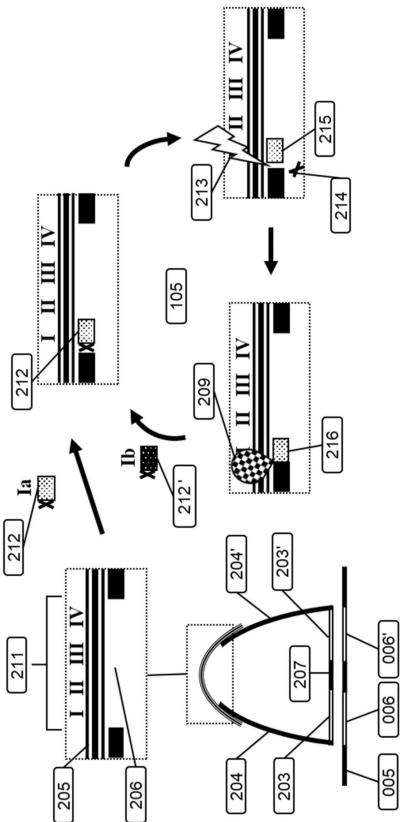


図 2 D

【 図 3 】



10

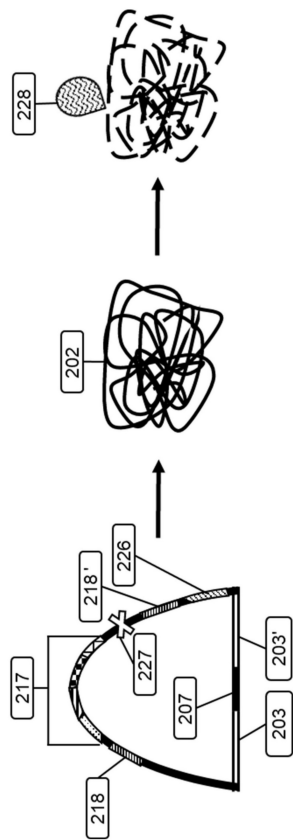
20

30

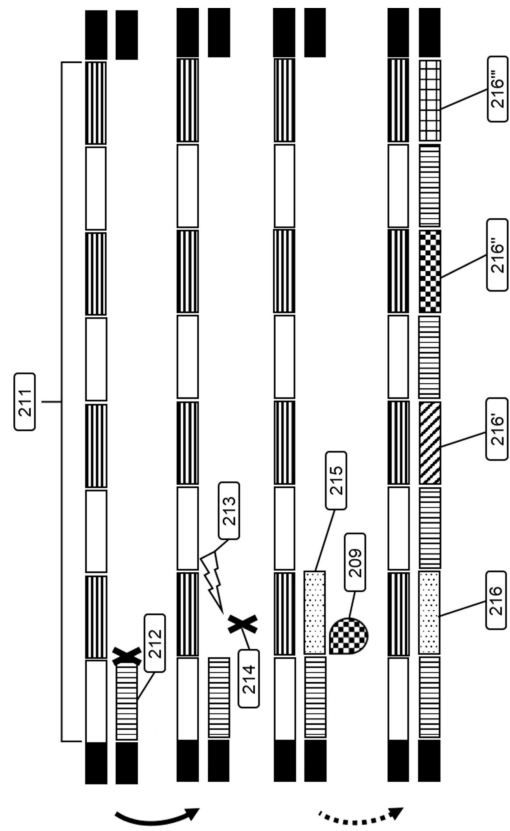
40

50

【 図 8 】



【 図 9 】



10

20

【 配列表 】

2023004952000001.app

【 外国語明細書 】

2023004952000014.pdf

30

40

50

フロントページの続き

(74)代理人 100098501
弁理士 森田 拓

(74)代理人 100116403
弁理士 前川 純一

(74)代理人 100134315
弁理士 永島 秀郎

(74)代理人 100162880
弁理士 上島 類

(72)発明者 ハインリヒ シュピーカー
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ - エーバート - シュトラーセ 6 8
ケア・オブ ミルテニー バイオテック ベー・フェー・ ウント コー・ カー・ゲー

(72)発明者 ザンドラ ハルプフェルト
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ - エーバート - シュトラーセ 6 8
ケア・オブ ミルテニー バイオテック ベー・フェー・ ウント コー・ カー・ゲー

(72)発明者 トーマス ロートマン
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ - エーバート - シュトラーセ 6 8
ケア・オブ ミルテニー バイオテック ベー・フェー・ ウント コー・ カー・ゲー

(72)発明者 アンドレアス ボズィオ
ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ - エーバート - シュトラーセ 6 8
ケア・オブ ミルテニー バイオテック ベー・フェー・ ウント コー・ カー・ゲー

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA20 QQ02 QQ42 QQ52 QR62 QS25 QS34 QS36
QS39