

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-518437
(P2024-518437A)

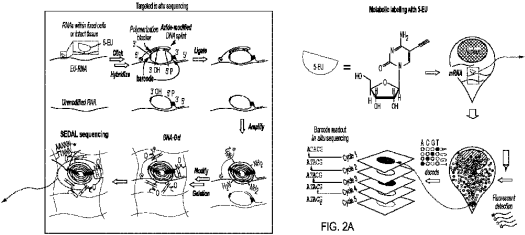
(43)公表日 令和6年5月1日(2024.5.1)

(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 2 9
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z	
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z	
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全110頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-568525(P2023-568525)				
(86)(22)出願日	令和4年5月6日(2022.5.6)				
(85)翻訳文提出日	令和6年1月5日(2024.1.5)				
(86)国際出願番号	PCT/US2022/028012				
(87)国際公開番号	WO2022/236011				
(87)国際公開日	令和4年11月10日(2022.11.10)				
(31)優先権主張番号	63/314,873				
(32)優先日	令和4年2月28日(2022.2.28)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/185,511				
(32)優先日	令和3年5月7日(2021.5.7)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA				
		最終頁に続く		(71)出願人	515025398
				(71)出願人	ザ ブロード インスティテュート, イン コーポレーテッド THE BROAD INSTITUTE , INC. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2142、ケンブリッジ、メイン スト リート 415、ルーム 7003 415 Main Street, Roo m 7003, Cambridge, M assachusetts 02142 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】 細胞以下の分解能での時空間分解トランスクリプトミクス

(57)【要約】

本開示は、対象におけるin vivoでの時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法を含む、時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法を提供する。本開示はまた、時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割をプロファイリングする方法、疾患または障害の発症または進行における時空間的遺伝子発現の役割を研究する方法、時空間的遺伝子発現を調節可能な薬剤をスクリーニングする方法、対象における疾患または障害を診断する方法、および対象における疾患または障害を処置する方法も提供する。本明細書に記載の方法において有用なオリゴヌクレオチドプローブもまた、本開示により提供される。本開示はまた、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドプローブを含むキットも提供する。時空間的遺伝子発現をプロファイリングするためのシステムも、本開示により提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための、以下を含む方法:

a) 細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b) 代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c) 代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

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

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

f) 1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

h) 第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること。

【請求項 2】

ステップ(a)~(h)を異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返して、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ(a)~(h)が、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

時空間的遺伝子発現が、複数の細胞において同時にプロファイリングされる、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

時空間的遺伝子発現が、10個を超える細胞、20個を超える細胞、50個を超える細胞、100個を超える細胞、200個を超える細胞、300個を超える細胞、400個を超える細胞、500個を超える細胞、または1000個を超える細胞において、同時にプロファイリングされる、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

細胞が、複数の細胞型を含む、請求項4または5に記載の方法。

【請求項 7】

細胞型が、幹細胞、前駆細胞、神経細胞、星状細胞、樹状細胞、内皮細胞、ミクログリ

10

20

30

40

50

ア、オリゴデンドロサイト、筋細胞、心筋細胞、間葉細胞、上皮細胞、免疫細胞、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 6 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞が、透過化処理された細胞である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

細胞が、無傷の組織内に存在する、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

組織が、上皮組織、結合組織、筋肉組織、または神経組織である、請求項 9 に記載の方法。 10

【請求項 11】

組織が、ステップ (a) のインキュベーション中およびステップ (b) の接触の前に、*in vivo* にある、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

組織が、ステップ (a) のインキュベーション後およびステップ (b) の接触の前に採取される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

組織が、非ヒト実験動物中にある、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

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 13 に記載の方法。 20

【請求項 15】

代謝標識核酸が、5-エチニルウリジン標識された核酸である、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

時空間的遺伝子発現が、最大 100 個、最大 200 個、最大 500 個、最大 1000 個、最大 2000 個、最大 3000 個、または 3000 個を超える目的の代謝標識核酸について、同時にプロファイリングされる、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

時空間的遺伝子発現が、最大 1000 個の目的の代謝標識核酸について同時にプロファイリングされる、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 18】

目的の代謝標識核酸が、新生 RNA、メッセンジャー RNA (mRNA)、トランスファー RNA (tRNA)、またはリボソーム RNA (rRNA) である、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

目的の代謝標識核酸が、新生 RNA 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】

目的の代謝標識核酸が、mRNA である、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 21】

ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分が、反応性生体直交性官能基である、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分が、アジド、アルキン、ニトロソ、アルケン、テトラジン、またはテトラゾールを含む、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分が、アル 50

キンを含む、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体が、5-エチニルウリジン、3'-アジド-3'-デオキシチミジン、C8-アルキン-デオキシウリジン、(2'S)-2'-デオキシ-2'-フルオロ-5-エチニルウリジン、または5-エチニル-2'-デオキシシチジンである、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分が、反応性生体直交性官能基である、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 26】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブの反応性化学物質部分が、アジド、アルキン、ニトロン、アルケン、テトラジン、またはテトラゾールを含む、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分が、アジドを含む、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

ヌクレオシド類似体の化学物質部分と、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分との反応が、クリックケミストリー反応を含む、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 29】

クリックケミストリー反応が、銅(I)触媒によるアジド-アルキン環化付加(CuAAC)反応である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブがさらに、重合ブロッカーを含む、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

重合ブロッカーが、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブの3'末端にある、請求項 30 に記載の方法。

30

【請求項 32】

重合ブロッカーが、逆位核酸残基を含む、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

重合ブロッカーが、逆位チミン残基である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブが、ポリAリンカー配列を含む、請求項 1～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

ポリAリンカー配列が、約2～100、約10～90、約20～80、約30～70、または約40～60ヌクレオチド長である、請求項 34 に記載の方法。

40

【請求項 36】

ポリAリンカー配列が、約50ヌクレオチド長である、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブが、構造:

5'-[反応性化学物質部分]-[ポリAリンカー配列]-[第3のオリゴヌクレオチド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inkerを含む、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 38】

任意のヌクレオチドリンカーの各例が、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長である、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約3～20、約4～19、約5～18、約6～17、約7～16、約8～15、約9～14、約10～13、または約11～12ヌクレオチド長である、請求項37または38に記載の方法。

【請求項 40】

第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約3、約4、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、または約20ヌクレオチド長である、請求項37～39のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 41】

目的の代謝標識核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約10～30、約11～29、約12～28、約13～27、約14～26、約15～25、約16～24、約17～23、約18～22、または約19～21ヌクレオチド長である、請求項1～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

目的の代謝標識核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、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、約30、または30を超えるヌクレオチド長である、請求項1～41のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 43】

第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列が、約1～10ヌクレオチド長である、請求項1～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列が、約5～10ヌクレオチド長である、請求項1～43のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 45】

第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列が、約5ヌクレオチド長である、請求項1～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

第2のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：
5'-[目的の代謝標識核酸に相補的な部分]-[バーコード配列]-3'
を含み、ここで-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む、請求項1～45のいずれか一項記載の方法。

【請求項 47】

任意のヌクレオチドリンカーの各例が、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長である、請求項46に記載の方法。

40

【請求項 48】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列が、約1～10ヌクレオチド長である、請求項1～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列が、約5～10ヌクレオチド長である、請求項1～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列が、約5ヌクレオチド長である、請求項1～49のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 5 1】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列が、約 1 ～ 1 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列が、約 5 ～ 1 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列が、約 5 ヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 3 ～ 2 0、約 4 ～ 1 9、約 5 ～ 1 8、約 6 ～ 1 7、約 7 ～ 1 6、約 8 ～ 1 5、約 9 ～ 1 4、約 1 0 ～ 1 3、または約 1 1 ～ 1 2 ヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、または約 2 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

目的の代謝標識核酸に相補的な第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 1 0 ～ 3 0、約 1 1 ～ 2 9、約 1 2 ～ 2 8、約 1 3 ～ 2 7、約 1 4 ～ 2 6、約 1 5 ～ 2 5、約 1 6 ～ 2 4、約 1 7 ～ 2 3、約 1 8 ～ 2 2、または約 1 9 ～ 2 1 ヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

目的の代謝標識核酸に相補的な第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、約 3 0、または 3 0 を超えるヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの 5'末端と 3'末端との間で分割されている、請求項 1 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5'-[第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第 1 の部分]-[第 1 のバーコード配列]-[目的の代謝標識核酸に相補的な部分]-[第 2 のバーコード配列]-[第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第 2 の部分]-3'

を含み、ここで-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む、請求項 1 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

任意のヌクレオチドリinkerの各例が、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 ヌクレオチド長である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

第 4 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、請求項 1 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

ローリングサークル増幅を行うステップがさらに、アミン修飾ヌクレオチドを提供する

10

20

30

40

50

ことを含み、ここでアミン修飾ヌクレオチドが、1以上の連結アンブリコンに組み込まれている、請求項1～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項63】

1以上の連結アンブリコンをポリマーマトリックスに埋め込むステップが、1以上の連結アンブリコンのアミン修飾ヌクレオチドをメタクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させること、および、1以上の連結アンブリコンとポリマーマトリックスを共重合させることを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

ポリマーマトリックスが、ヒドロゲルである、請求項1～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項65】

ヒドロゲルが、ポリビニルアルコールヒドロゲル、ポリエチレングリコールヒドロゲル、ポリアクリル酸ナトリウムヒドロゲル、アクリル酸ポリマーヒドロゲル、またはポリアクリルアミドヒドロゲルである、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列が、目的の代謝標識核酸を識別するために使用される遺伝子特異的配列である、請求項1～65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンブリコンを第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させるステップが、目的の代謝標識核酸を識別するために実施される、請求項1～66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

目的の代謝標識核酸を識別することが、SEDAL配列決定を実施することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

SEDAL配列が、2回、3回、4回、5回、または5回を超えて実施される、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

画像化するステップが、蛍光画像化を含む、請求項1～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項71】

画像化するステップが、共焦点顕微鏡検査または落射蛍光顕微鏡検査を含む、請求項1～70のいずれか一項に記載の方法。

【請求項72】

細胞内の追加の分子をプロファイリングするステップをさらに含む、請求項1～71のいずれか一項に記載の方法。

【請求項73】

追加の分子が、RNA、DNA、タンパク質、炭水化物、小分子、代謝産物、および/または脂質である、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

プロファイリングされた細胞の細胞型を決定することを、細胞の時空間的遺伝子発現プロファイルを、様々な細胞型の時空間的遺伝子発現プロファイルを含む参照データと比較することにより行うこと、をさらに含む、請求項1～73のいずれか一項に記載の方法。

【請求項75】

細胞の1以上の遺伝子を過剰発現またはノックアウトして、1以上の遺伝子が目的の代謝標識核酸の時空間的発現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1～74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項76】

細胞での時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割をプロファイリングするための

10

20

30

40

50

、以下を含む方法:

a) 転写後修飾に關与する遺伝子のノックダウンを含む細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b) 代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c) 代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

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

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

f) 1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

h) 第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、
ここで、野生型細胞における発現と比較した目的の代謝標識核酸の発現の変化は、転写後修飾が、目的の代謝標識核酸の時空間的発現の調節に關与していることを示す。

【請求項77】

ステップ(a)~(h)を異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返して、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることをさらに含む、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

転写後修飾が、7-メチルグアノシン、 N^6 -メチルアデノシン(m^6A)、ポリ(A)テール、イントロンスプライシング、またはヒストンmRNAプロセッシングである、請求項76または77に記載の方法。

【請求項79】

転写後修飾が、アデノシンのメチル化を含む、請求項76~78のいずれか一項に記載の方法。

【請求項80】

転写後修飾が、 m^6A である、請求項76~79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項81】

転写後修飾に關与する遺伝子が、YTHドメインファミリー(YTHDF)1、YTHDF2、YTHDF3、YTHドメイン含有(YTHDC)1、YTHDC2、メチルトランスフェラーゼ様(METTL)3、およびMETTL14からなる群から選択される、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割が、最大100個、最大200個、最大500個、最大1000個、最大2000個、最大3000個、または3000個を超える目的の代謝標識核酸について、同時にプロファイリングされる、請求項76~81のい

10

20

30

40

50

ずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割が、最大 1 0 0 0 個の目的の代謝標識核酸について同時にプロファイリングされる、請求項 7 6 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

細胞が、ステップ (a) のインキュベーション中およびステップ (b) の接触の前に、in vivo の組織内にある、請求項 7 6 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

組織が、ステップ (a) のインキュベーション後およびステップ (b) の接触の前に採取される、請求項 8 4 に記載の方法。 10

【請求項 8 6】

組織が、非ヒト実験動物中にある、請求項 8 4 または 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

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 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

疾患または障害の発症または進行における時空間的遺伝子発現の役割を研究するための、以下を含む方法：

a) 疾患組織からの細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み； 20

b) 代謝標識核酸を、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第 1 のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み；

c) 代謝標識核酸を、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 3 のオリゴヌクレオチドプローブを含む 1 対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで：

i) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み；および

ii) 第 3 のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第 1 のバーコード配列、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第 2 のバーコード配列を含み、ここで、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 のバーコード配列は、第 2 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であり； 30

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

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

f) 1 以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと； 40

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた 1 以上の連結アンプリコンを、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 のバーコード配列に相補的な配列を含む第 4 のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

h) 第 4 のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた 1 以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、ここで、非疾患細胞または非疾患組織からの細胞における発現と比較した、目的の代謝標識核酸の発現の変化は、目的の代謝標識核酸の時空間的発現の変化が、疾患または障害の発症または進行に参与し得ることを示す。

【請求項 8 9】

ステップ (a) ~ (h) を異なる時間 t_2 で少なくとも 1 回繰り返して、目的の標識核酸の 50

時空間的発現をプロファイリングすることをさらに含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

疾患または障害が、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である、請求項 88 または 89 に記載の方法。

【請求項 91】

疾患組織が、対象から採取される、請求項 88 ~ 90 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

対象が、非ヒト実験動物である、請求項 91 に記載の方法。

10

【請求項 93】

対象が、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 91 または 92 に記載の方法。

【請求項 94】

対象が、ヒトである、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 95】

疾患組織が、ステップ(a)のインキュベーション中およびステップ(b)の接触の前に、*in vivo*にある、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 96】

疾患組織が、ステップ(a)のインキュベーション後およびステップ(b)の接触の前に採取される、請求項 95 に記載の方法。

20

【請求項 97】

疾患組織が、非ヒト実験動物中にある、請求項 95 または 96 に記載の方法。

【請求項 98】

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 97 に記載の方法。

【請求項 99】

時空間的遺伝子発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための、以下を含む方法:

a)細胞を、1以上の候補薬剤およびヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

30

b)代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

40

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

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

f)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴ

50

ヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

h) 第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、
ここで、1以上の候補薬剤の不在下での発現と比較した、1以上の候補薬剤の存在下での目的の代謝標識核酸の発現の変化は、1以上の候補薬剤が、時空間的遺伝子発現を調節することを示す。

【請求項100】

ステップ(a)~(h)を異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返して、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることをさらに含む、請求項99に記載の方法。

10

【請求項101】

1以上の候補薬剤が、候補薬剤のライブラリを含む、請求項99または100に記載の方法。

【請求項102】

候補薬剤のライブラリが、数百の候補薬剤を含む、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

候補薬剤のライブラリが、数千の候補薬剤を含む、請求項101に記載の方法。

【請求項104】

1以上の候補薬剤が、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、および炭水化物からなる群から選択される、請求項99~103のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項105】

1以上の候補薬剤が、1以上の既知の薬物、または1以上のFDA承認薬物を含む、請求項99~104のいずれか一項に記載の方法。

【請求項106】

小分子が、抗がん治療剤である、請求項104に記載の方法。

【請求項107】

タンパク質が、抗体もしくはその断片、受容体、またはサイトカインである、請求項104に記載の方法。

【請求項108】

核酸が、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、dsRNA、短ヘアピンRNA(shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である、請求項104に記載の方法。

30

【請求項109】

目的の代謝標識核酸の時空間的遺伝子発現の調節が、疾患もしくは障害の症状を軽減、緩和もしくは除去すること、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、請求項99~108のいずれか一項に記載の方法。

【請求項110】

疾患または障害が、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である、請求項109に記載の方法。

40

【請求項111】

対象における疾患または障害を診断するための、以下を含む方法:

a) 対象から採取した試料からの細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b) 代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c) 代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオ

50

チドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

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

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

f) 1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

h) 第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、

ここで、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における発現と比較した、目的の代謝標識核酸の発現の変化は、対象が、疾患または障害を有することを示す。

【請求項112】

非疾患細胞における目的の代謝標識核酸の時空間的発現が、対照実験として同時にプロファイリングされる、請求項111に記載の方法。

【請求項113】

非疾患細胞における目的の代謝標識核酸の時空間的発現プロファイルが、参照データを含む、請求項111に記載の方法。

【請求項114】

ステップ(a)~(h)を異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返して、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることをさらに含む、請求項111~113のいずれか一項に記載の方法。

【請求項115】

疾患または障害が、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である、請求項111~114のいずれか一項に記載の方法。

【請求項116】

対象が、ヒトである、請求項111~115のいずれか一項に記載の方法。

【請求項117】

試料が、組織試料を含む、請求項111~116のいずれか一項に記載の方法。

【請求項118】

試料が、生検である、請求項111~117のいずれか一項に記載の方法。

【請求項119】

生検が、骨、骨髄、乳房、胃腸管、肺、肝臓、脾臓、前立腺、脳、神経、腎臓、子宮内膜、子宮頸部、リンパ節、筋肉、または皮膚の生検を含む、請求項118に記載の方法。

【請求項120】

生検が、腫瘍生検を含む、請求項118または119に記載の方法。

【請求項121】

対象における疾患または障害を処置するための、以下を含む方法:

a) 対象から採取した試料からの細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1

10

20

30

40

50

の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b)代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

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

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

f)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

h)第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること;および

i)非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における発現と比較して、時空間的遺伝子発現の変化が観察された場合、対象に、疾患または障害の処置を施すこと。

【請求項122】

非疾患細胞における目的の代謝標識核酸の時空間的発現が、対照実験として同時にプロファイリングされる、請求項121に記載の方法。

【請求項123】

非疾患細胞における目的の代謝標識核酸の時空間的発現プロファイルが、参照データを含む、請求項121に記載の方法。

【請求項124】

ステップ(a)~(h)を異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返して、処置を施す前に、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることをさらに含む、請求項121~123のいずれか一項に記載の方法。

【請求項125】

処置が、治療剤、外科手術、または放射線治療を施すことを含む、請求項121~124のいずれか一項に記載の方法。

【請求項126】

治療剤が、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、または炭水化物である、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

治療剤が、既知の薬剤またはFDA承認薬物である、請求項125または126に記載の方法。

【請求項128】

小分子が、抗がん治療剤である、請求項126に記載の方法。

【請求項129】

タンパク質が、抗体もしくはその断片、または抗体バリエーションである、請求項126に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 130】

核酸が、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、dsRNA、shRNA、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 126 に記載の方法。

【請求項 131】

疾患または障害が、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である、請求項 121～130のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 132】

対象が、ヒトである、請求項 121～131のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 133】

第1のオリゴヌクレオチドプローブ、第2のオリゴヌクレオチドプローブ、および第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブであって、ここで、

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、反応性化学物質部分を含み;

ii) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

iii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、

ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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である、

前記複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 134】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの反応性化学物質部分が、反応性生体直交性官能基である、請求項 133に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 135】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの反応性化学物質部分が、アジド、アルキン、ニトリン、アルケン、テトラジン、またはテトラゾールを含む、請求項 133または134に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 136】

第1のオリゴヌクレオチドプローブの反応性化学物質部分が、アジドを含む、請求項 133～135のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 137】

第1のオリゴヌクレオチドプローブがさらに、重合ブロッカーを含む、請求項 133～136のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 138】

重合ブロッカーが、第1のオリゴヌクレオチドプローブの3'末端にある、請求項 137に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 139】

重合ブロッカーが、逆位核酸残基を含む、請求項 137または138に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 140】

重合ブロッカーが、逆位チミン残基である、請求項 139に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 141】

第1のオリゴヌクレオチドプローブがさらに、ポリAリンカー配列を含む、請求項 133～140のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 142】

10

20

30

40

50

ポリ A リンカー配列が、約 2 ～ 1 0 0、約 1 0 ～ 9 0、約 2 0 ～ 8 0、約 3 0 ～ 7 0、または約 4 0 ～ 6 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 4 1 に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 4 3】

ポリ A リンカー配列が、約 5 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 4 1 または 1 4 2 に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 4 4】

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5' - [反応性化学物質部分] - [ポリ A リンカー配列] - [第 3 のオリゴヌクレオチド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、請求項 1 4 1 ～ 1 4 3 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 4 5】

任意のヌクレオチドリンカーの各例が、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 4 4 に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 4 6】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 3 ～ 2 0、約 4 ～ 1 9、約 5 ～ 1 8、約 6 ～ 1 7、約 7 ～ 1 6、約 8 ～ 1 5、約 9 ～ 1 4、約 1 0 ～ 1 3、または約 1 1 ～ 1 2 ヌクレオチド長である、請求項 1 4 4 または 1 4 5 に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 4 7】

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、または約 2 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 4 4 ～ 1 4 6 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 4 8】

目的の代謝標識核酸に相補的な第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 1 0 ～ 3 0、約 1 1 ～ 2 9、約 1 2 ～ 2 8、約 1 3 ～ 2 7、約 1 4 ～ 2 6、約 1 5 ～ 2 5、約 1 6 ～ 2 4、約 1 7 ～ 2 3、約 1 8 ～ 2 2、または約 1 9 ～ 2 1 ヌクレオチド長である、請求項 1 3 3 ～ 1 4 7 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 4 9】

目的の代謝標識核酸に相補的な第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、約 3 0、または 3 0 ヌクレオチドを超える長さである、請求項 1 3 3 ～ 1 4 8 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 5 0】

第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列が、約 1 ～ 1 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 3 3 ～ 1 4 9 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 5 1】

第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列が、約 5 ～ 1 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 3 3 ～ 1 5 0 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 5 2】

第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列が、約 5 ヌクレオチド長である、請求項 1 3 3 ～ 1 5 1 のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 1 5 3】

第 2 のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5'-[目的の核酸に相補的な部分]-[バーコード配列]-3'

を含み、ここで]-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む、請求項133～152のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項154】

任意のヌクレオチドリンカーの各例が、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長である、請求項153に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項155】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列が、約1～10ヌクレオチド長である、請求項153または154のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

10

【請求項156】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列が、約5～10ヌクレオチド長である、請求項133～155のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項157】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列が、約5ヌクレオチド長である、請求項133～156のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項158】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列が、約1～10ヌクレオチド長である、請求項133～157のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

20

【請求項159】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列が、約5～10ヌクレオチド長である、請求項133～158のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項160】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列が、約5ヌクレオチド長である、請求項133～159のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

30

【請求項161】

第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約3～20、約4～19、約5～18、約6～17、約7～16、約8～15、約9～14、約10～13、または約11～12ヌクレオチド長である、請求項133～160のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項162】

第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約3、約4、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、または約20ヌクレオチド長である、請求項133～161のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

40

【請求項163】

目的の代謝標識核酸に相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、約10～30、約11～29、約12～28、約13～27、約14～26、約15～25、約16～24、約17～23、約18～22、または約19～21ヌクレオチド長である、請求項133～162のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項164】

目的の代謝標識核酸に相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、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、約30、

50

または30を超えるヌクレオチド長である、請求項133～163のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項165】

第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分が、第3のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端との間で分割されている、請求項133～164のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項166】

第3のオリゴヌクレオチドプローブが、構造：

5'-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1の部分]-[第1のバーコード配列]-[目的の核酸に相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第2の部分]-3'

を含み、ここで-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む、請求項133～165のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項167】

任意のヌクレオチドリンカーの各例が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長である、請求項166に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項168】

第4のオリゴヌクレオチドプローブをさらに含む、請求項133～167のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項169】

第4のオリゴヌクレオチドプローブが、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む、請求項168に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項170】

第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列が、目的の核酸を識別するために使用される遺伝子特異的配列である、請求項133～169のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項171】

第4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、請求項169または170に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項172】

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

【請求項173】

第1のバーコード配列が、追加のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列に相補的である、請求項172に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項174】

第1のバーコード配列が、5～10ヌクレオチド長である、請求項172または173に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項175】

第1のバーコード配列が、5ヌクレオチド長である、請求項172～174のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項176】

第2のバーコード配列が、5～10ヌクレオチド長である、請求項172～175のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項177】

第2のバーコード配列が、5ヌクレオチド長である、請求項172～176のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項178】

追加のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分が、オリゴヌクレオチドプローブの

10

20

30

40

50

5'末端と3'末端との間で分割されている、請求項172～177のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項179】

構造:

5'-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1の部分]-[第1のバーコード配列]-[目的の核酸に相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第2の部分]-3'

を含み、ここで-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む、請求項172～178のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項180】

任意のヌクレオチドリinkerの各例が、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長である、請求項179に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項181】

請求項133～171のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、キット。

【請求項182】

キットが、請求項121～159のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、目的の、別々の代謝標識核酸の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするために使用される、請求項181に記載のキット。

【請求項183】

キットが、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、または1000を超える複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項181または182に記載のキット。

【請求項184】

請求項172～180のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブを含む、キット。

【請求項185】

キットが、請求項160～168のいずれか一項に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで各オリゴヌクレオチドプローブが、別々の目的の核酸に相補的な部分を含む、請求項184に記載のキット。

【請求項186】

キットが、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、または1000を超える複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項184または185に記載のキット。

【請求項187】

細胞をさらに含む、請求項181～186のいずれか一項に記載のキット。

【請求項188】

1以上の酵素をさらに含む、請求項181～187のいずれか一項に記載のキット。

【請求項189】

1以上の酵素が、リガーゼを含む、請求項188に記載のキット。

【請求項190】

1以上の酵素が、ポリメラーゼを含む、請求項188または189に記載のキット。

【請求項191】

アミン修飾ヌクレオチドをさらに含む、請求項181～190のいずれか一項に記載のキット。

【請求項192】

10

20

30

40

50

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 181～191のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 193】

細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための、以下を含むシステム：

- a) 細胞；
- b) ヌクレオシド類似体のプール、ここでヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み；
- c) 第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各オリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み；および
- d) 第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む、1対以上のオリゴヌクレオチドプローブ、ここで：
 - i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の核酸に相補的な部分を含み；および
 - ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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である。

10

【請求項 194】

顕微鏡をさらに含む、請求項 193に記載のシステム。

20

【請求項 195】

コンピュータをさらに含む、請求項 193または194に記載のシステム。

【請求項 196】

CPUをさらに含む、請求項 193～195のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 197】

コンピュータメモリおよび/またはストレージをさらに含む、請求項 193～196のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 198】

カメラをさらに含む、請求項 193～197のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項 199】

対象における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための、以下を含む方法：

- a) ヌクレオシド類似体のプールを、 t_1 の時間、対象にin vivoで投与して、対象の1以上の細胞によって合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み；
- b) 組織試料を、対象から採取すること；
- c) 採取された組織試料中の代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み；
- d) 代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで：
 - i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み；および
 - ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列と相補的であり；
- e) 第3のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端をライゲートして、環状オ

40

50

リゴヌクレオチドを生成すること；

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

g) 1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

h) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

i) 第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること。

10

【請求項200】

採取された組織が、上皮組織、結合組織、筋肉組織、または神経組織である、請求項199に記載の方法。

【請求項201】

採取された組織が、心臓組織である、請求項199または200に記載の方法。

【請求項202】

対象が、非ヒト実験動物である、請求項199～201のいずれか一項に記載の方法。

【請求項203】

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202に記載の方法。

20

【請求項204】

ヌクレオシド類似体が、対象に注射によって投与される、請求項199～203のいずれか一項に記載の方法。

【請求項205】

注射が、後眼窩投与を含む、請求項204に記載の方法。

【請求項206】

組織試料を対象から採取することが、組織生検を行うことを含む、請求項199～205のいずれか一項に記載の方法。

【請求項207】

組織試料を対象から採取することが、対象から1以上の臓器全体を採取することを含む、請求項199～205のいずれか一項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は35 U.S.C. § 119(e)の下で、2021年5月7日に出願された米国仮出願U.S.S.N. 63/185,511、および2022年2月28日に出願された米国仮出願U.S.S.N. 63/314,873の優先権を主張する；これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

40

【0002】

発明の背景

遺伝子発現の調節された流れは生命の最も基本的なプロセスを形成し、多くの疾患および障害の発症および進行に影響を与える。これらの高度に制御されたプロセスには、転写、RNAプロセッシング、翻訳、ならびにメッセンジャーRNA(mRNA)およびタンパク質の分解が含まれる。空間トランスクリプトミクスの方法の開発は、遺伝情報を空間的文脈で保持することにより、単一細胞配列決定技術への急速なパラダイムシフトを生じさせ、細胞組織化と組織構造の直接的可視化を可能にする。しかし、空間トランスクリプトミクスの現在の方法は、mRNAをトランスクリプトームの静的な画像として検出するのみであり、その高度に動的な性質は不明瞭である。さらに、現在のほとんどの方法は汎細胞レベ

50

ルに焦点を当てており、異種の細胞型を決定して、それらを組織にマッピングし直すが、細胞内環境での豊富な情報は無視している。したがって、空間トランスクリプトミクスを時間次元と結び付ける方法が、時間経過に伴う空間的文脈での遺伝子発現を研究し、時空間的(spatiotemporal)遺伝子発現および細胞発生、さらには様々な疾患および障害の発症および進行との関連を理解するために、必要とされている。

【発明の概要】

【0003】

発明の概要

本開示は、1つの細胞または複数の細胞(例えば、組織内に存在する細胞を含む)における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法を記載する。一側面において、本明細書で「TEMPOmap」(時間的に分解された(temporally resolved(または時間分解)in situ配列決定およびマッピング)と呼ぶ方法が説明される。TEMPOmap法は、新生に転写されたRNAを細胞以下の分解能で分解し、時間分解能を空間トランスクリプトームワークフローに組み込むことにより、遺伝子発現の動力学(すなわち、トランスクリプトーム)を追跡するために使用可能である。この方法は、細胞以下のレベルで画像ベースの単一細胞の説明を提供し、細胞内活動、例えばエピトランスクリプトームプロセッシング、mRNAトラフィッキング、局所的翻訳、RNA翻訳の動態パラメータなどの研究に使用することができる。TEMPOmapはまた、無傷の組織を研究し、遺伝子発現の変化に関連する様々な疾患および障害の発症および進行の原因を理解および特定するためにも使用できる。ここに記載された方法は、RNA、タンパク質、およびそれらの相互作用の理解を容易にし、ゲノム情報が時間的および空間的にどのように処理されるかを可視化する、貴重なツールを提供する。これらの方法のいずれも、本明細書でさらに説明するようにin vivoで実施可能である。

【0004】

したがって一側面において、本開示は、細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための、以下のステップを含む方法を提供する:

a)細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b)代謝標識核酸(metabolically labeled nucleic acids)を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

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

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

f)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレ

オチドロープと接触させること;および

h) 第4のオリゴヌクレオチドロープを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンブリコンの位置を決定すること。

【0005】

いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)はさらに1回以上実施される。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)は、ステップ(a)のインキュベーションにおいて、異なる時間 t_2 を使用して少なくとも1回繰り返される。ある態様において、ステップ(a)~(h)は、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される。

10

【0006】

いくつかの態様において、本明細書に開示される任意の方法は、疾患または障害の診断および/または処置に有用である。いくつかの態様において、本明細書に開示される任意の方法は、RNA翻訳の動態パラメータを研究するのに有用である。いくつかの態様において、本明細書に開示される任意の方法は、転写後RNA修飾を研究するのに有用である。いくつかの態様において、本明細書に開示される任意の方法は、時空間的遺伝子発現を細胞周期および細胞複製の様々な段階で研究するのに有用である。

【0007】

別の側面において、本開示は、時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割をプロファイリングするための方法を提供する。いくつかの態様において、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、1以上の目的の核酸(例:1以上のRNA転写産物)の転写後修飾に関与する遺伝子のノックダウンを含む細胞において、実施され得る。次いで、ノックダウン細胞における目的の様々な核酸の時空間的発現を、野生型細胞における同じ目的の核酸の時空間的発現と比較することができる。野生型細胞における発現と比較した目的核酸の発現の任意の変化は、転写後修飾が、目的核酸の時空間的発現の調節に関与していることを示し得る。

20

【0008】

別の側面において、本開示は、疾患または障害の発症または進行における、時空間的遺伝子発現の役割を研究するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、疾患組織(例:対象から採取された疾患組織)からの細胞において実施され得る。次いで、疾患組織からの細胞における様々な目的核酸の時空間的発現を、非疾患組織からの細胞における同じ目的核酸の時空間的発現と比較することができる。非疾患細胞における発現と比較した目的核酸の発現の任意の変化は、目的核酸の時空間的発現が、疾患または障害の発症または進行に関与し得ることを示し得る。

30

【0009】

別の側面において、本開示は、目的の核酸または目的の複数の核酸の時空間的遺伝子発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、1以上の候補薬剤の存在下で、細胞(例:正常細胞または疾患細胞)内で実施され得る。次いで、細胞における様々な目的核酸の時空間的発現を、1以上の候補薬剤に曝露されなかった細胞における、同じ目的核酸の時空間的発現と比較することができる。候補薬剤(単数または複数)に曝露されなかった細胞における発現と比較した、目的核酸(単数または複数)の発現の任意の変化は、目的核酸(単数または複数)の時空間的発現が、候補薬剤(単数または複数)によって調節されていることを示し得る。

40

【0010】

別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害を診断するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、対象(例:疾患もしくは障害を有すると考えられる、または疾患もしくは障害を有す

50

るリスクがある対象)から採取した試料からの細胞において実施することができる。次いで、細胞における様々な目的核酸の時空間的発現を、非疾患組織試料からの細胞における同じ目的核酸の時空間的発現と比較することができる。非疾患細胞における発現と比較した、目的核酸の発現の任意の変化は、対象が、疾患または障害を有することを示し得る。

【0011】

別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害を処置するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、対象(例:疾患もしくは障害を有すると考えられる、または疾患もしくは障害を有するリスクがある対象)から採取した試料からの細胞において実施することができる。次いで、細胞における様々な目的核酸の時空間的発現を、非疾患組織試料からの細胞における同じ目的核酸の時空間的発現と比較することができる。次いで、非疾患細胞における発現と比較して目的核酸の発現に何らかの変化が観察された場合には、疾患または障害の処置を対象に施すことができる。

【0012】

別の側面において、本開示は、*in vivo*で対象における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための、以下のステップを含む方法を提供する:

a)ヌクレオシド類似体のプールを、 t_1 の時間、対象に*in vivo*で投与して、対象の1以上の細胞によって合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b)組織試料を、対象から採取すること;

c)採取された組織試料中の代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

d)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで;

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列と相補的であり;

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

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

g)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

h)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

i)第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること。

【0013】

別の側面において、本開示は、第1のオリゴヌクレオチドプローブ、第2のオリゴヌクレオチドプローブ、および第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで、

i)第1のオリゴヌクレオチドプローブは、反応性化学物質部分を含み;

ii)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の核酸に相補的な

10

20

30

40

50

部分を含み;および

iii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、

ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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である。

【0014】

いくつかの態様において、本開示は、構造: 5'-[反応性化学物質部分]-[ポリAリンカー配列]-[第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分]-[重合ブロッカー]-3'、を含むオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む。いくつかの態様において、本開示は、構造: 5'-[目的の核酸に相補的な部分]-[バーコード配列]-3'、を含むオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む。いくつかの態様において、本開示は、構造: 5'-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1の部分]-[第1のバーコード配列]-[目的の核酸に相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第2の部分]-3'、を含むオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む。

10

【0015】

別の側面において、本開示は、本明細書に記載の1以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む、キットを提供する。

20

【0016】

別の側面において、本開示は、細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするためのシステムを提供する。いくつかの態様において、システムは以下を含む: a) 細胞; b) ヌクレオシド類似体のプール、ここでヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分(例: クリックケミストリーハンドルなどの生体直交性官能基)を含み; c) 第1のオリゴヌクレオチドプローブ、ここで第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み; および d) 第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブ、ここで:

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

30

ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、

ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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である。

【0017】

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

40

【図面の簡単な説明】

【0018】

図面の簡単な記載

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

【0019】

【図1】 図1は、細胞および組織における遺伝子調節機構を細胞以下の分解能で精査するための、時間分解in situ配列決定およびマッピング(TEMPOMap)法の概略図を提供す

50

る。TEMPOmapは、時間分解能と空間トランスクリプトミクスを統合して、RNAの4Dマップを作成する。この方法は、調整可能な期間にわたって3D空間でのRNAの軌道をマッピングし、様々な生物学的および生理学的プロセスにおける遺伝子調節のより深い理解を可能にする。

【0020】

【図2A-1】図2A～2Eは、TEMPOmapの原理および、時空間的に分解された(spatiotemporally resolved(または時空間分解))トランスクリプトミクスのための新生RNA標識化学の使用を示す。図2Aは、TEMPOmapの概要を示す概略図を提供する。5-エチニルウリジン(5-EU)標識細胞を調製した後、カスタムの3パートプローブは細胞のmRNAに抱合またはハイブリダイズされ、各パドロック配列のcDNAアンプリコンへの酵素的複製がもたらされる。アンプリコンは、機能化されたアクリル基を介してin situでヒドロゲルメッシュに固定され、DNA-ゲルハイブリッドを生成する(波線)。各アンプリコンの5塩基のバーコードは、5ラウンドのSEDAL配列決定によって読み出される。したがって、多重化されたRNAの定量化は、新生細胞内位置における遺伝子発現を明らかにする。

10

【図2A-2】図2Aは、TEMPOmapの概要を示す概略図を提供する。5-エチニルウリジン(5-EU)標識細胞を調製した後、カスタムの3パートプローブは細胞のmRNAに抱合またはハイブリダイズされ、各パドロック配列のcDNAアンプリコンへの酵素的複製がもたらされる。アンプリコンは、機能化されたアクリル基を介してin situでヒドロゲルメッシュに固定され、DNA-ゲルハイブリッドを生成する(波線)。各アンプリコンの5塩基のバーコードは、5ラウンドのSEDAL配列決定によって読み出される。したがって、多重化されたRNAの定量化は、新生細胞内位置における遺伝子発現を明らかにする。

20

【図2B】図2Bは、異なる時点を統合することによる、RNAの時空間的軌道の再構築を示す。

【図2C】図2Cは、3パートDNAプローブ設計の概略図を提供する。DNAスプリントプローブは、非標的化の様式で標識RNAに抱合され、パドロックを環状化するには、スプリントプローブとパドロックプローブの対形成が必要である。プライマープローブとパドロックプローブの2番目の対形成により、標的特異的シグナルが増幅される。

【図2D】図2Dは、シグナル増幅には3つのプローブすべての存在が必要であることを示す。mRNA_IはACTBを表し、mRNA_IIはGAPDHを表す。4つの画像はすべて、ACTB(明るい灰色)mRNAとHeLa細胞核(濃い灰色)を示す。EU処理細胞を未処理細胞と比較すると、信号対雑音比は30となる。

30

【図2E】図2Eは、パルスチェイス実験の設計(左)および実験からの一連の蛍光画像(右)を示し、異なる時間で1時間のEU処理後に洗浄した場合の、ACTB mRNAの移行(translocation)を示す。

【0021】

【図3】図3は、TEMPOmapの3パートプローブの概略図を提供する。スプリントプローブは、ポリAセグメントとスプリントパドロックアニーリング配列(スプリントプローブのボックス内で強調表示されているヌクレオチド)に分割される。スプリントプローブは逆位Tで終了して(プローブの3'末端で標識されているように)、増幅の開始を防ぐ。パドロックプローブは以下を含有する:スプリントプローブ上の領域に相補的なスプリントパドロックアニーリング配列(パドロックプローブのボックス内で強調表示されている、スプリントプローブに相補的なヌクレオチド)とジャンクション、同じバーコードの2つの領域(「バーコード配列」と表示)、mRNAを標的とする20ntハイブリダイゼーション領域(パドロックプローブのボックス内で強調表示されている、mRNAに相補的なヌクレオチド)、およびプライマーパドロックアニーリング配列(パドロックプローブのボックス内で強調表示されている、プライマープローブに相補的なヌクレオチド)。プライマープローブは以下を含有する:パドロックプローブの隣のmRNAの領域を標的とする20ntハイブリダイゼーション領域(プライマープローブのボックス内で強調表示されている、mRNAに相補的なヌクレオチド)および、パドロックプローブ上の領域に相補的な

40

50

プライマーパドロックアニーリング配列(プライマー上のボックス内で強調表示されている、パドロックに相補的なヌクレオチド)。

【0022】

【図4A】図4A～4Bは、siRNAトランスフェクションによる、7つのN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)ライター(writer)またはリーダー(reader)のノックダウンのSTARmap解析を示す。図4Aは、野生型細胞と比較して各細胞が1つのsiRNAでノックダウンされた場合の、遺伝子発現のクラスター化されたヒートマップを提供する。

【図4B】図4Bは、細胞当たりの読取り数(左)および遺伝子数(右)のヒストグラムを示す。

【0023】

【図5】図5は、データ処理パイプラインを示す。この処理パイプラインはもともとSTARmap用に設計されたものであり、生の画像化データから読取りを抽出する典型的な計算ワークフローを示す。

【0024】

【図6A】図6A～6Bは、1時間未満および細胞以下の分解能での、時間分解STARmapの概略図を提供する。図6Aは、STARmapの原理を示す。細胞または組織の固定後、細胞内で細胞内mRNAにハイブリダイズするDNAプローブは、cDNAアンプリコンとして酵素的に複製される。DNAプローブの各対は、遺伝子の身元(identity)をコードするバーコード(プローブ上に標識されている)を含有し、in situ配列決定を通して蛍光色として読み出される。

【図6B】図6Bは、時間分解STARmapを示す。転写、核外輸送(nuclear export)、分解速度は、トランスクリプトームスケールで測定される。エチニルウリジン(EU)は、短いパルスで新たに転写されたRNAを標識するために使用され、試料は、様々なケースの持続時間の後に固定される。標識されたRNAは、クリックケミストリーを介し、重合性部分を用いてin situ修飾され、次にアクリルアミドと共重合してヒドロゲルネットワーク(波線)内に埋め込まれ、その後、非標識RNAが除去される。細胞内のRNAの時空間的軌道は、複数の時点でのSTARmapの結果を統合することにより再構築される。

【0025】

【図7】図7は、TEMPomap法のワークフローを示す追加の概略図を提供する。機能化されたcDNAアンプリコンはポリアクリルアミドマトリックスに共有結合されて、組織の除去と生体分子の処理を可能にする。

【0026】

【図8A】図8A～8Bは、パルスチェイス実験におけるhACTBの標的化を示す。図8Aは、5-EU標識ヒトHeLa細胞の生の蛍光画像を提供する。HeLa細胞を2時間標識し(パルス)、その後5-EUなしで様々な時間培養した後(チェイス:0、2、4、または6時間)、固定およびin situ配列決定定量化を行った。新生に転写されたhACTB RNAの空間的局在は明るい灰色で示され、細胞核の空間的局在は濃い灰色で示される。

【図8B】図8Bは、異なる条件下でのhACTB RNA対細胞核(DAPI染色)の蛍光強度の比率の定量化を示す。

【0027】

【図9A】図9A～9Bは、HeLa細胞における4つのm⁶A関連RNAの時間経過中の標的化を示す。図9Aは、5-EU標識ヒトHeLa細胞の生の蛍光画像を提供する。HeLa細胞を12時間標識し、標識後直ちに固定し、その後in situ配列決定を行った。4つのチャネルはそれぞれ、4つのヒトRNAの局在を示す。陰性対照における細胞は、5-EU標識なしで培養した。

【図9B】図9Bは、1時間標識HeLa細胞と、続いて、固定前の5-EUなしでの様々な時間の細胞培養(チェイス:0～6時間)の、生の蛍光画像を提供する。各チャネルは、1種類のRNAの空間情報を表す。凡例を図9Aに示す。

【0028】

【図10A】図10A～10Dは、TEMPomapの概略図および検証を示す。図10Aは

10

20

30

40

50

、TEMPOmapワークフローの概要を提供する:複数時点でのin situの新生RNA配列決定とそれに続く時空間的RNA解析。

【図10B】図10Bは、TEMPOmap実験ワークフローの概略図を提供し、TEMPOmapアンプリコンライブラリの調製およびin situ SEDAL配列決定の手順を示す。

【図10C】図10Cは、3パートDNAプローブ設計の原理を示す。アンプリコンの生成には、スプリントプローブ、環状パドロックプローブ、およびプライマープローブの存在が必要である。

【図10D】図10D(左)は、図10Cの陰性対照実験の概略図および代表的な蛍光細胞画像を提供し、シグナル増幅のための3パートプローブの要件を示している。mRNA_IはACTBを表し、mRNA_IIはGAPDHを表す。4つの画像はすべて、HeLa細胞内のACTB(明るい灰色)mRNAを示す(DAPIは濃い灰色)。右:細胞画像の定量化であり、細胞当たりの平均アンプリコン読取りを示す(各条件で、約300個の細胞を含む5枚の画像を測定した)。**** $p < 1e-04$ 。スケールバー:10 μm 。

10

【0029】

【図11A-B】図11A~11Eは、単一細胞および細胞内トランスクリプトームの時空間的分割を示す。図11Aは、TEMPOmapパルスチェイス実験の設計を示す。図11Bは、STARmapプローブ標的化遺伝子発現によって正規化された各パルスチェイス時点の、細胞当たりの読取り(アンプリコン)数を示す。

【図11C】図11Cは、処理中のTEMPOmapの3D蛍光画像を、各時点における周期1の代表的な単一細胞の拡大図で示す。Zスタック範囲:10 μm 。

20

【図11D】図11Dは、1つの代表的な細胞の細胞内領域の割当て(核、中央、および末梢)(下)、および各時点における全細胞の各細胞内領域における読取りの割合を要約する箱ひげ図(上)を示す。**** $P < 0.001$ ($n = 1000 \sim 2000$)。

【図11E】図11Eは、TEMPOmap単一細胞(上の行)または核細胞質(中の行)のRNA測定値であって、Potential of Heat-diffusion for Affinity-based Trajectory Embedding(PHATE)(親和性ベースの軌道埋め込みのための熱拡散のポテンシャル)によって可視化され、パルスチェイス時点(I、III)または細胞周期マーカー遺伝子発現(II、IV)によって色分けされたものを示す。RNA分解ベクトル場によって推測される黒い矢印は、主にチェイスタイム進行の遷移方向を示す。PHATE座標上で分離されたG2/M期細胞の代表的な生画像を、下の行に示す。スケールバー:15 μm 。

30

【0030】

【図12A-B】図12A~12Gは、細胞周期にわたるRNA細胞内動力学的定量的推定を示す。図12Aは、RNA動態パラメータを推定するための動的モデルを示す。各遺伝子について、RNA合成(α)および全細胞分解定数(β)を、単一細胞RNA濃度を使用して推定した。核外輸送定数(λ)、核分解定数(β_n)、および細胞質(β_c)は、細胞内RNA濃度を使用して推定した。図12Bは、細胞質移行(γ)をDRベースの解析を用いて推定するための、動的モデルを示す。

【図12C】図12Cは、RNAライフサイクルの数学的モデルおよび推定に用いる動態の仮定を示す(右下)。図12Cはまた、QCに合格したすべての遺伝子の6つのパラメータのヒストグラム、およびパラメータとR値とのペアワイズ相関分析(ピアソン相関)を示す散布図と線形フィッティング曲線(左下)も示す。相関関係を示したパラメータの対は、アスタリスクで強調表示される($R > 0.1$)。ドットの強度は局所的な密度を示す。

40

【図12D-E】図12Dは、細胞周期の3つの期(G1、G1/S、G2/M)からの単一細胞を使用して推定された6つのパラメータのペアワイズ相関行列を示すヒートマップを提供する。提供される凡例による陰影は、ピアソン相関の値を示す。四角で囲まれた領域は、細胞周期にわたる各パラメータの相関関係を示す。図12Eは、細胞周期にわたる18の推定パラメータすべてを使用した遺伝子クラスタリングを示す、UMAP表現(左)およびヒートマップ(右)を提供する。ヒートマップに提供される凡例に従った陰影は、パラメータごとに正規化されたZスコアの値を表す。

【図12F-G】図12Fは、DAVIDを用いた図12Eの各クラスターにおける遺伝子

50

の経路エンリッチメント(enrichment)解析を示す。図 1 2 G は、パルスチェイス時点にわたる代表的な細胞の 4 つの動態クラスターの可視化を提供する。スケールバー: 1 0 μm 。

【0031】

【図 1 3 A - B】図 1 3 A ~ 1 3 G は、遺伝子機能および転写後の特徴による差次的 RNA 動力学(differential RNA dynamics)を示す。図 1 3 A は、すべての時点を組み合わせた場合の、単一細胞 RNA の共変動によるすべての遺伝子のペアワイズ相関を示すヒートマップを提供し、陰影はピアソン相関の値を示す。図 1 2 E から 4 つの動態クラスターは右側に陰影付けされており、各遺伝子が属するクラスターを示す。グループ 1 と 2 は、相関性の高い遺伝子モジュールとして強調表示される。図 1 3 B は、グループ 1 (上) およびグループ 2 (下) の拡大図を示し、個々の時点にわたる各遺伝子モジュールの RNA 共変動の相関関係を示す。個々の時点の完全なヒートマップは図 1 9 A に示す。

10

【図 1 3 C - D】図 1 3 C は、グループ 1 および 2 における遺伝子の経路エンリッチメント解析の結果を示す。図 1 3 D は、グループ 1 および 2 における RNA 合成 (α 、左) および全細胞分解定数 (β 、右) の分布を示す、箱ひげ図を提供する。

【図 1 3 E】図 1 3 E は、DNA 結合遺伝子、RNA 結合遺伝子、および細胞間結合 (cell-cell junction) 関連遺伝子について推定された 6 つのパラメータの分布を示す、箱ひげ図を提供する。

【図 1 3 F】図 1 3 F は、細胞周期にわたる DNA 結合、RNA 結合、および細胞間結合関連遺伝子のパラメータ相関行列を示す、ヒートマップを提供する。陰影はピアソン相関の値を示す。四角で囲まれた領域は、細胞周期にわたる各パラメータの相関関係を示す。

20

【図 1 3 G】図 1 3 G は、 $m^6\text{A}$ および非 $m^6\text{A}$ RNA について推定された 6 つのパラメータを比較する箱ひげ図を示す。** $p < 0.05$ 、*** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.001$ 。y 軸の範囲は、図 1 3 E および図 1 3 G の 25 ~ 75 % 四分位の値に対して選択した。

【0032】

【図 1 4 A - B】図 1 4 A ~ 1 4 E は、TEMPMap 実験計画および最適化を示す。図 1 4 A は、アジド修飾スプリントと EU 標識された新生転写産物を抱合するための、CuAAC 媒介性クリックケミストリーの使用を示す。図 1 4 B は、TEMPMap の 2 プローブ設計と 3 プローブ設計の比較を示す。左、プローブ設計の概略図。中央、センス標的化およびアンチセンス標的化のパドロックおよびプライマーで処理した細胞の、代表的な蛍光画像。右、細胞画像の蛍光の定量化 (各測定について $n = 150 \sim 200$)。

30

【図 1 4 C】図 1 4 C は、TEMPMap の 3 プローブシステムの DNA 配列を示す。

【図 1 4 D】図 1 4 D は、概念実証パルスチェイス実験 (上) と、それに続く生の細胞画像 (下) であり、1 時間の EU 処理後に異なる時間でチェイスした場合の ACTB mRNA の移行を示す。細胞核 (濃い灰色)、アンプリコン (薄い灰色)。スケールバー: 1 0 μm 。

【図 1 4 E】図 1 4 E は、実験ワークフローにおける、TEMPMap による新生 RNA および STARmap による全 RNA の同時マッピングおよび配列決定を示す。TEMPMap を標的としたアンプリコンの読取りは、STARmap を標的とした RNA の読取りに対して正規化した。

40

【0033】

【図 1 5 A】図 1 5 A ~ 1 5 D は、TEMPMap のデータ処理および解析を示す。図 1 5 A は、TEMPMap のデータ解析パイプラインを示す。

【図 1 5 B - C】図 1 5 B は、細胞内区画における読取り割り当ての概略図を提供する。図 1 5 C は、細胞当たりの検出された読取り (DNA アンプリコン) (左) および細胞当たりの遺伝子 (右) を示すヒストグラムを提供する。

【図 1 5 D】図 1 5 D は、細胞質における、距離比 (DR) に基づく細胞内セグメンテーションの概略図を提供する。各アンプリコンの 2 つの値を 3 D で計算した。d₁、核膜までの最短距離。d₂、細胞膜までの最短距離。「中間」は、DR = 0 ~ 10 の間で定義される領域である。「周辺」は DR > 10 として定義される。

50

【0034】

【図16A】図16A～16Dは、RNAの細胞内解析および細胞周期の期(phase)の識別を示す。図16Aは、6時間のチェイス時点での991個の遺伝子のアンプリコン読取りの、核対細胞質比を示す。遺伝子は、比率に従って上から下にランク付けした。

【図16B-C】図16Bは、TEMPOmap標識RNA発現を介して測定された細胞周期遺伝子マーカーによる、細胞周期の識別(G1、G1/S、G2/M)を示す。細胞はPCAによって可視化し、細胞周期の期ごとに陰影付けした(左上)。すべての細胞周期遺伝子マーカー(左下)と4つの代表的なマーカー(右)の生のカウントの変動を、擬時間解析によって予測した。図16Cは、有意差を示さない、scEU-seqデータセットを使用した1時間標識読取りおよび総読取りによる、細胞周期識別の比較を提供する。各ボックス内の数字は細胞

10

の数を示す。
【図16D】図16Dは、核細胞質マトリックスのPHATE埋め込みに基づく、細胞クラスタリングの結果を提供する。クラスター1には、生の画像の目視検査によるM期の細胞が組み込まれている。

【0035】

【図17A-B】図17A～17Hは、RNA動態パラメータの推定を示す。図17Aは、細胞体積(ボクセル単位)と単一細胞読取りとの間の相関関係を示し、細胞体積による転写産物数への影響を示している。図17Bは、核および細胞質における1つのRNA種の異なる濃度を示す、概略図を提供する。

【図17C】図17Cは、RNA動態パラメータ(α 、 β 、 β_n 、 λ 、 β_c)を推定するための数学的モデルと、計算およびフィッティング手順の詳細なワークフローを示す。注： $X(t)$ =単一細胞RNA濃度； $N(t)$ =核RNA濃度； $C(t)$ =細胞質RNA濃度； p (核処理定数) $=\beta_n + \lambda$ 。明確にするために、 $\beta_n = \beta_n$ 、 $\beta_c = \beta_c$ とする。

20

【図17D-E】図17Dは、 $R^2 \sim 1$ (左)および $R^2 \sim 0.5$ (右)を有する遺伝子の、時点にわたる $X(t)$ の自然対数の変化を示す。推定の β と p は、品質管理として $R^2 > 0.5$ の閾値でフィルタリングした。図17Eは、0～6時間のチェイス時点にわたる991個の遺伝子すべてについての、単一細胞平均DR値の分布を示す。

【図17F】図17Fは、すべての遺伝子の推定の γ (細胞質移行)値のヒストグラムを提供する。破線は、 $\gamma > 0$ と $\gamma < 0$ の遺伝子を分けており、観察された移行の反対方向を示す。

30

【図17G】図17Gは、左側において、 $\gamma < 0$ ($R^2 > 0.5$)の12個の遺伝子が、細胞外エキソソームおよび膜貫通タンパク質において強くエンリッチされていることを示す(9/12)。図17Gは、中央において、代表的な遺伝子の経時的DR値を示す。

【図17H】図17Hは、 $\gamma < 0$ の遺伝子の、RNA移行の観察された内向き方向を示す概略図を提供する。

【0036】

【図18A-B】図18A～18Kは、細胞周期段階にわたるRNA動態パラメータを示す。図18A～18Fは、図12Dにおけるペアワイズ相関の例を提供し、G1とG2/Mとの間の関係の散布図を示す。相関係数は、左から右へ： α ($R=0.99$)、 β ($R=0.77$)、 β_n ($R=0.70$)、 λ ($R=0.65$)、 β_c ($R=0.36$)、 γ ($R=0.07$)。Rはピアソン相関の値を示す。

40

【図18C-D】図18A～18Fは、図12Dにおけるペアワイズ相関の例を提供し、G1とG2/Mとの間の関係の散布図を示す。相関係数は、左から右へ： α ($R=0.99$)、 β ($R=0.77$)、 β_n ($R=0.70$)、 λ ($R=0.65$)、 β_c ($R=0.36$)、 γ ($R=0.07$)。Rはピアソン相関の値を示す。

【図18E-F】図18A～18Fは、図12Dにおけるペアワイズ相関の例を提供し、G1とG2/Mとの間の関係の散布図を示す。相関係数は、左から右へ： α ($R=0.99$)、 β ($R=0.77$)、 β_n ($R=0.70$)、 λ ($R=0.65$)、 β_c ($R=0.36$)、 γ ($R=0.07$)。Rはピアソン相関の値を示す。

【図18G-H】図18G～18Hは、RNA合成(α)および分解(β)が、単一細胞RNA

50

発現(図18G)および各細胞周期の期(G1、G1/S、G2/M)の公開されたscEU-seqデータセット(図18H)から推定されたことを示す。

【図18I】図18Iは、各細胞周期の状態に推定された各6つのパラメータ(左から右へ: α 、 β 、 βn 、 λ 、 βc 、 γ)の分布を示す、密度プロットを提供する。最初の5つのパラメータはRNA濃度から推定され、 γ はDR値から推定されたが、3つの状態にわたる全体的変化は示されなかった。

【図18J-K】図18Jは、G2期およびM期の細胞の βn 、 λ 、 βc の分布を示すバイオリンプロットを提供する。M期は図16Dで識別された;G2期はG2/M細胞の残りであった。図18Kは、各動態クラスターにおける経時的なRNA読取りの細胞内分布を示す、箱ひげ図を提供する。

10

【0037】

【図19A】図19A~19Hは、遺伝子機能および転写後修飾状態における、RNA動態の変動を示す。図19Aは、0時間、2時間、4時間、および6時間(左から右)のチェイス時点でのTEMPoMap測定遺伝子発現における、単一細胞変動からのペアワイズ相関係数の行列を示すヒートマップを提供する。各行列に沿った遺伝子の順序は同じであり、4つの時点を組み合わせた行列の階層的クラスタリングツリーにより決定された(図13A)。各行列のサイドバーは、図12Eからの遺伝子クラスターの陰影の注釈を示す。

【図19B-D】図19Bは、遺伝子オントロジーによって解析された991個の遺伝子の、主要な分子機能を説明する円グラフを提供する。図19Cは、遺伝子プールにおけるm⁶A-RNAメチル化を説明する円グラフを提供する。図19Dは、遺伝子プールにおけるYTHDC1との関係を説明する円グラフを提供する。

20

【図19E】図19Eは、3つの細胞周期の期にわたるm⁶Aおよび非m⁶A RNAについて推定された6つのパラメータを比較する、箱ひげ図を提供する。 $**p < 0.05$ 、 $***p < 0.01$ 。Y軸の範囲は、25~75%四分位の値に対して選択した。

【図19F】図19Fは、対照細胞およびsiYTHDC1細胞における、他の6つのSTARmap標的遺伝子(METTL3/14、YTHDC2、YTHDF1-3)の発現により正規化された、YTHDC1の発現を示す。

【図19G】図19Gは、0~6時間のチェイス時点におけるYTHDC1のノックダウン後の、核対細胞質発現比のlog₂倍数変化の累積分布を示す(左から右へ)。

【図19H-1】図19Hは、YTHDC1のノックダウン後の6つのパラメータにおける、log₂倍率変化の累積分布を示す。

30

【図19H-2】図19Hは、YTHDC1のノックダウン後の6つのパラメータにおける、log₂倍率変化の累積分布を示す。

【0038】

【図20A】図20A~20Bは、in vivoのTEMPoMapの原理を示す。代謝標識された生きた動物の時空間分解トランスクリプトミクスのための、組織切片における新生RNA標識化学が示される。図20Aは、in vivoのTEMPoMapワークフローを示す。EUを注射したマウス(1mgのEU)およびPBSを注射した対照からの組織を採取し、投与後2時間固定した。組織を切片化し、TEMPoMapワークフローによって化学的に処理して、DNAアンプリコンライブラリを調製した。次いでDNAアンプリコンを、一連の蛍光画像化によってin situで配列決定した。

40

【図20B】図20B(左):EU注射の心臓切片は、PBS注射の対照と比較して、アンプリコンのシグナルの強いエンリッチメントを示し、in vivoのTEMPoMapの高い信号対雑音比を実証する。図20B(右):心臓切片の代表的蛍光画像であって、マウス心臓における2時間のEU標識ウィンドウにおける4つの遺伝子(Myh6、Flt1、Dach1、Lamc1)の新生転写シグナルおよび、PBS注射マウスの心臓における最小のバックグラウンドシグナルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

定義

50

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

【0040】

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

【0041】

本明細書で使用される「アンプリコン」という用語は、増幅反応(すなわち、遺伝子断片または標的配列の1以上のコピーの生成)または複製反応の産物である、核酸(例: DNAまたはRNA)を指す。アンプリコンは、例えば、PCRまたは他の重合反応を使用して、人工的に形成することができる。「連結アンプリコン(concatenated amplicons)」という用語は、一緒に結合されて単一の核酸分子を形成する、複数のアンプリコンを指す。連結アンプリコンは、例えば、ローリングサークル増幅(RCA)によって形成することができ、この場合、環状オリゴヌクレオチドが増幅されて、オリゴヌクレオチドの複数の直鎖状コピーが、連結された複数アンプリコンを含む単一の核酸分子として生成される。

【0042】

「血管新生」という用語は、新しい血管が既存の血管から形成される生理学的プロセスを指す。血管新生は、中胚葉細胞前駆体からの内皮細胞のde novo形成である脈管形成とは異なる。発生中の胚における最初の血管は脈管形成により形成され、その後血管新生が、正常または異常な発生中のほとんどの血管成長の原因となる。血管新生は、成長および発生だけでなく、創傷治癒および肉芽組織の形成においても重要なプロセスである。しかし血管新生は、腫瘍が良性状態から悪性状態に移行する際の基本的なステップでもあり、がんの処置における血管新生阻害剤の使用につながる。血管新生は、成長因子(例: VEGF)などの血管新生タンパク質によって化学的に刺激され得る。「病的血管新生」とは、疾患に至る、および/または疾患に関連する異常な(例えば過剰または不十分な)血管新生を指す。

【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、2本の大きな重鎖と2本の小さな軽鎖をそれぞれが有する基本構造単位で作られている。抗体重鎖にはいくつかの異なる種類があり、また、抗体にはいくつかの異なる種類があり、それらがどの重鎖を持っているかに基づき異なるアイソタイプにグループ化される。哺乳動物では5つの異なる抗体アイソタイプ(IgG、IgA、IgE、IgD、およびIgM)が知られており、これらは異なる役割を果たし、遭遇する異なる種類の異物それぞれに対して、適切な免疫応答を導くのに役立つ。本明細書で使用される「抗体」という用語はまた、抗体断片およびナノボディ、ならびに抗体のバリエーションも包含する。「抗体バリエーション」という用語は、抗体断片を包含するために使用されることもある。いくつかの態様において、抗体または抗体バリエーションは、疾患または障害(例: 対象から採取された細胞における時空間的遺伝子発現プロファイルの変化に関連するもの)の処置として投与される。

【0044】

「抗がん剤」は、生物療法抗がん剤および化学療法剤を包含する。例示的な生物療法抗がん剤には、限定はされないが以下が含まれる: インターフェロン、サイトカイン(例: 腫

10

20

30

40

50

瘍壊死因子、インターフェロン α 、インターフェロン γ)、ワクチン、造血成長因子、モノクローナル血清療法、免疫刺激薬および/または免疫調節剤(例:IL-1、2、4、6、または12)、免疫細胞成長因子(例:GM-CSF)および抗体(例:HERCEPTIN(トラスツズマブ)、T-DM1、AVASTIN(ベバシズマブ)、ERBITUX(セツキシマブ)、VECTIBIX(パニツムマブ)、RITUXAN(リツキシマブ)、BEXXAR(トシツモマブ))。例示的な化学療法剤には、限定はされないが以下が含まれる:抗エストロゲン剤(例:タモキシフェン、ラロキシフェン、およびメゲストロール)、LHRHアゴニスト(例:ゴスクリンおよびリュープロリド)、抗アンドロゲン薬(例:フルタミドおよびビカルタミド)、光線力学療法(例:ベルトポルフイン(BPD-MA)、フタロシアニン、光増感剤Pc4、およびデメトキシヒポクレリンA(2BA-2-DMHA))、ナイトロジェンマスタード(例:シクロホスファミド、イホスファミド、トロホスファミド、クロラムブシル、エストラムスチン、およびメルファラン)、ニトロソ尿素(例:カルムスチン(BCNU)およびロムスチン(CCNU))、スルホン酸アルキル(例:ブスルファンおよびトレオスルファン)、トリアゼン(例:ダカルバジン、テモゾロミド)、白金含有化合物(例:シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン)、ビンカルカロイド(例:ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシン、およびビノレルビン)、タキソイド(例:パクリタキセルまたはパクリタキセル等価物、例えばナノ粒子アルブミン結合パクリタキセル(ABRAXANE)、ドコサヘキサエン酸結合パクリタキセル(DHA-パクリタキセル、タキソプレキシ)、ポリグルタミン酸塩結合パクリタキセル(PG-パクリタキセル、パクリタキセルポリグルメックス、CT-2103、XYOTAX)、腫瘍活性化プロドラッグ(TAP)ANG1005(パクリタキセルの3分子に結合したAngiopep-2)、パクリタキセル-EC-1(erbB2認識ペプチドEC-1に結合したパクリタキセル)、およびグルコース抱合パクリタキセル、例えば2'-パクリタキセルメチル2'-グルコピラノシルスクシナート;ドセタキセル、タキソール)、エピポドフィリン(例:エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、トポテカン、9-アミノカンプトテシン、カンプトイリノテカン、イリノテカン、クリスナトール、マイトマイシンC)、代謝拮抗剤、DHFR阻害剤(例:メトトレキサート、ジクロロメトトレキサート、トリメトトレキサート、エダトレキサート)、IMPデヒドロゲナーゼ阻害剤(例:ミコフェノール酸、チアゾフリン、リバビリン、およびEICAR)、リボヌクオチドレダクターゼ阻害剤(例:ヒドロキシ尿素およびデフェロキサミン)、ウラシル類似体(例:5-フルオロウラシル(5-FU)、フロクスウリジン、ドキシフルリジン、ラチトレキセド、テガフルウラシル、カペシタビン)、シトシン類似体(例:シタラビン(araC)、シトシンアラビノシド、およびフルダラビン)、プリン類似体(例:メルカプトプリンおよびチオグアニン)、ビタミンD3類似体(例:EB 1089、CB 1093、およびKH 1060)、イソプレニル化阻害剤(例:ロバスタチン)、ドーパミン作動性神経毒(例:1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン)、細胞周期阻害剤(例:スタウロスポリン)、アクチノマイシン(例:アクチノマイシンD、ダクチノマイシン)、ブレオマイシン(例:ブレオマイシンA2、ブレオマイシンB2、ペプロマイシン)、アントラサイクリン(例:ダウノルビシン、ドキシソルビシン、ペグ化リボソームドキシソルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ピラルビシン、ゾルビシン、ミトキサントロン)、MDR阻害剤(例:ベラパミル)、Ca²⁺ ATPase阻害剤(例:タプシガルジン)、イマチニブ、サリドマイド、レナリドマイド、チロシンキナーゼ阻害剤(例:アキシチニブ(AG013736)、ボスチニブ(SKI-606)、セジラニブ(RECENTIN(商標)、AZD2171)、ダサチニブ(SPRYCEL(登録商標)、BMS-354825)、エルロチニブ(TARCEVA(登録商標))、ゲフィチニブ(IRESSA(登録商標))、イマチニブ(Gleevec(登録商標)、CGP57148B、STI-571)、ラパチニブ(TYKERB(登録商標)、TYVERB(登録商標))、レスタウルチニブ(CEP-701)、ネラチニブ(HKI-272)、ニロチニブ(TASIGNA(登録商標))、セマキサニブ(セマキシニブ、SU5416)、スニチニブ(SUTENT(登録商標)、SU11248)、トセラニブ(PALLADIA(登録商標))、バンデタニブ(ZACTIMA(登録商標)、ZD6474)、バタラニブ(PTK787、PTK/ZK)、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標))、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))、リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))、セツキシマブ(ERBITUX(登録商標))、パニツムマブ(VECTIBIX(登録商標))、ラニビズマブ(Lucentis(登録商標))、ニロチニブ(TASIGNA(登録商標))、ソラフェ

10

20

30

40

50

ニブ(NEXAVAR(登録商標))、エベロリムス(AFINITOR(登録商標))、アレムツズマブ(CAMPATH(登録商標))、ゲムツズマブオゾガマイシン(MYLOTARG(登録商標))、テムシロリムス(TORISEL(登録商標))、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、ドビチニブ乳酸塩(TKI258、CHIR-258)、BIBW2992(TOVOK(商標))、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF1120(VARGATEF(登録商標))、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、チボザニブ(AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647、および/またはXL228)、プロテアソーム阻害剤(例:ボルテゾミブ(VELCADE))、mTOR阻害剤(例:ラパマイシン、テムシロリムス(CCI-779)、エベロリムス(RAD-001)、リダフォロリムス、AP23573(Ariad)、AZD8055(AstraZeneca)、BEZ235(Novartis)、BGT226(Norvartis)、XL765(Sanofi Aventis)、PF-4691502(Pfizer)、GDC0980(Genentech)、SF1126(Semafoe)、およびOSI-027(OSI))、オブリメルセン、ゲムシタピン、カルミノマイシン、ロイコボリン、ペメトレキセド、シクロホスファミド、ダカルバジン、プロカルビジン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、カンパテシン、ブリカマイシン、アスパラギナーゼ、アミノプテリン、メトプテリン、ボルフィロマイシン、メルファラン、ロイロシジン、ロイロシン、クロランブシル、トラベクテジン、プロカルバジン、ディスコデルモリド、カルミノマイシン、アミノプテリン、およびヘキサメチルメラミン。

10

【0045】

「自己免疫疾患」とは、体内に通常に存在する物質および組織に対する、対象の体の不適切な免疫応答から生じる疾患を指す。言い換えれば、免疫システムが体の一部を病原体と誤認し、自分自身の細胞を攻撃する。これは特定の臓器に限定される場合もあり(例:自己免疫性甲状腺炎)、または異なる場所の特定の組織が関与する場合もある(例:肺と腎臓の両方の基底膜に影響を与え得るグッドパスチャー病)。自己免疫疾患の処置は、典型的には、例えば免疫応答を低下させる薬物療法を用いる、免疫抑制である。例示的な自己免疫疾患には、限定はされないが以下が含まれる:糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、壊死性血管炎、リンパ節炎、結節性動脈周囲炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、潰瘍性大腸炎、全身性硬化症、皮膚筋炎/多発性筋炎、抗リン脂質抗体症候群、強皮症、尋常性天疱瘡、ANCA関連血管炎(例:ウェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎)、ぶどう膜炎、シェーグレン症候群、クローン病、ライター症候群、強直性脊椎炎、ライム病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、および心筋症。

20

30

【0046】

本明細書で使用される「生体直交性官能基」という用語は、生体系内の天然の生化学的プロセスのいずれにも干渉することなく、生体系の内部(例:細胞内部)の化学反応に使用することができる官能基を指す。生体直交性官能基には、例えば、クリックケミストリーハンドルが含まれる。本明細書で使用される「クリックケミストリーハンドル」という用語は、クリックケミストリー反応に参加することができる反応物または反応基を指す。例示的なクリックケミストリーハンドルは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開20130266512に示されている。例えばシクロオクチンなどの歪みアルキンは、歪み促進型環化付加に参加できるため、クリックケミストリーハンドルである。一般にクリックケミストリー反応には、互いに反応できるクリックケミストリーハンドルを含む少なくとも2つの分子が必要である。互いに反応するかかるクリックケミストリーハンドル対は、本明細書ではパートナークリックケミストリーハンドルと呼ばれることがある。例えば、アジドは、アルキンとのパートナークリックケミストリーハンドルである。例示的なクリックケミストリーハンドルには、限定はされないが、アルケン、ジエン、テトラジン、トランスシクロオクテン、アルキン、アジド、ニトロソ、およびテトラゾールが含まれる。2つの分子がクリックケミストリーによって抱合されるためには、分子のクリックケミストリーハンドルが相互に反応性でなければならない;例えば、一方のクリックケミストリーハンドルの反応性部分が、第2のクリックケミストリーハンドルの反応性部分と反応

40

50

することができて、少なくとも1つの共有結合を形成する必要がある。クリックケミストリーハンドルのかかる反応性対は、当業者によく知られている。

【0047】

「がん」という用語は、制御不能に増殖し正常な身体組織に浸潤して破壊する能力を有する異常細胞の発生を特徴とする、疾患のクラスを指す。例えば、Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensyl ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990を参照されたい。がんの例としては、限定はされないが、以下が含まれる：聴神経腫；腺癌；副腎がん；肛門がん；血管肉腫（例：リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、血管肉腫）；虫垂がん；良性モノクローナルガンマグロブリン症；胆道がん（例：胆管がん）；膀胱がん；乳がん（例：乳房の腺癌、乳房の乳頭癌、乳がん、乳房の髄様癌）；脳がん（例：髄膜腫、膠芽腫、神経膠腫（例：星状細胞腫、希突起神経膠腫）、髄芽腫）；気管支がん；カルチノイド腫瘍；子宮頸がん（例：子宮頸部腺癌）；絨毛癌；脊索腫；頭蓋咽頭腫；結腸直腸がん（例：結腸がん、直腸がん、結腸直腸腺癌）；結合組織がん；上皮癌；上皮腫；内皮肉腫（例：カポジ肉腫、多発性特発性出血肉腫）；子宮内膜がん（例：子宮がん、子宮肉腫）；食道がん（例：食道の腺癌、パレット腺癌）；ユーイング肉腫；眼がん（例：眼球内黒色腫、網膜芽腫）；家族性好酸球増加症；胆嚢がん；胃がん（例：胃腺癌）；消化管間質腫瘍（GIST）；胚細胞がん；頭頸部がん（例：頭頸部扁平上皮細胞癌、口腔がん（例：口腔扁平上皮細胞癌）、咽頭がん（例：喉頭がん、咽頭がん、上咽頭がん、中咽頭がん））；造血系がん（例：急性リンパ性白血病（ALL）などの白血病（例：B細胞ALL、T細胞ALL）、急性骨髄性白血病（AML）（例：B細胞AML、T細胞AML）、慢性骨髄性白血病（CML）（例：B細胞CML、T細胞CML）、および慢性リンパ性白血病（CLL）（例：B細胞CLL、T細胞CLL））；リンパ腫、例えばホジキンリンパ腫（HL）（例：B細胞HL、T細胞HL）および非ホジキンリンパ腫（NHL）（例：B細胞NHL、例えばびまん性大細胞型リンパ腫（DLCL）（例：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫）、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ性白血病/小リンパ球性リンパ腫（CLL/SLL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、辺縁帯B細胞リンパ腫（例：粘膜内リンパ組織（MALT）リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫）、原発性縦隔B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫（すなわち、ワルデンストレーママクログロブリン血症）、有毛細胞白血病（HCL）、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆体Bリンパ芽球性リンパ腫および原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫；およびT細胞NHL、例えば前駆体Tリンパ芽球性リンパ腫/白血病、末梢T細胞リンパ腫（PTCL）（例：皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）（例：菌状息肉症、セザリール症候群）、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、節外性ナチュラルキラーT細胞リンパ腫、腸疾患型T細胞リンパ腫、皮下脂肪炎様T細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫）；上記などの1つ以上の白血病/リンパ腫の混合物；および多発性骨髄腫（MM）、重鎖疾患（例：α鎖疾患、γ鎖疾患、μ鎖疾患）；血管芽腫；下咽頭がん；炎症性筋線維芽細胞性腫瘍；免疫細胞性アミロイドーシス；腎臓がん（例：腎芽細胞腫、別名ウィルムス腫瘍、腎細胞癌）；肝臓がん（例：肝細胞がん（HCC）、悪性肝がん）；肺がん（例えば、気管支原性癌、小細胞肺がん（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：全身性肥満細胞症）；筋肉がん；骨髓異形成症候群（MDS）；中皮腫；骨髓増殖性障害（MPD）（例：真性赤血球増加症（PV）、本態性血小板増加症（ET）、不明原性骨髓化生（AMM）、別名骨髓線維症（MF）、慢性特発性骨髓線維症、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性好中球性白血病（CNL）、好酸球増加症候群（HES））；神経芽細胞腫；神経線維腫（例：神経線維腫症（NF）1型または2型、神経鞘腫症）；神経内分泌がん（例：胃腸膵神経内分泌腫瘍（GEP-NET）、カルチノイド腫瘍）；骨肉腫（例：骨がん）；卵巣がん（例：嚢胞腺癌、卵巣胎児性癌、卵巣腺癌）；乳頭腺癌；膵臓がん（例：膵臓腺癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）、膵島細胞腫瘍）；陰茎がん（例：陰茎および陰嚢のパジェット病）；松果腫；原始神経外胚葉腫瘍（PNT）；形質細胞腫；傍腫瘍性神経症候群；上皮内腫瘍；前立腺がん（例：前立腺腺癌）；直腸がん；横紋筋肉腫；唾液腺がん；皮膚がん（例：扁平上皮細胞癌（SCC）、ケラトアカントーマ（KA）、黒色腫、基底細胞癌（BCC））；小腸がん（例：虫垂がん）；軟部肉腫（例：悪性線維性組織球腫（MFH）、脂肪肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）、軟骨肉腫、線維肉腫、筋肉腫）；皮脂腺癌；小腸がん；汗腺がん；滑膜腫；精巣がん（例：精上皮腫、精巣胎児性がん）；甲状腺がん（例：甲状腺の乳頭癌、甲状腺乳頭癌（PTC）、甲状腺髄様

10

20

30

40

50

がん);尿道がん;膣がん;外陰がん(例:外陰部のパジェット病)。

【0048】

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

10

【0049】

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

20

【0050】

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

30

【0051】

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

40

【0052】

用語「遺伝的疾患」は、対象のゲノムにおける1以上の異常によって引き起こされる疾患、例えば、対象の出生時から存在する疾患を指す。遺伝的疾患は遺伝性であり、両親の遺伝子から受け継がれ得る。遺伝的疾患はまた、対象のDNAおよび/またはRNAの変異または変化によって引き起こされ得る。このような場合、遺伝的疾患は、生殖系列で発生した場合に遺伝性となる。例示的な遺伝的疾患としては、限定はされないが以下を含む:アールスコッグ・スコット症候群、アーセ症候群、軟骨無形成症、先端形成不全症、中毒、副腎白質ジストロフィー、白皮症、アブレファロン・巨口症症候群、アラジール症候群、アルカプトン尿症、 α -1アンチトリプシン欠乏症、アルポート症候群、アルツハイマー

50

病、喘息、自己免疫性多腺性症候群、アンドロゲン非感受性症候群、アンジェルマン症候群、運動失調、毛細血管拡張性運動失調、アテローム性動脈硬化症、注意欠陥多動性障害(ADHD)、自閉症、はげ頭症、バッテン病、ベックウィズ・ヴィーデマン症候群、ベスト病、双極性障害、短指症、乳がん、パーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病、シャルコー・マリー・トゥース病、クローン病、口唇裂、コケイン症候群、コフィン・ローリー症候群、結腸がん、先天性副腎過形成、コルネリア・デ・ランゲ症候群、コストロ症候群、カウデン症候群、前鼻異形成(Craniofrontonasal Dysplasia)、クリグラー・ナジャー症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、嚢胞性線維症、難聴、うつ病、糖尿病、捻曲性骨異形成症、ディジョージ(Digeorge)症候群、ダウン症候群、失読症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、Dubowitz症候群、外胚葉形成不全症、Ellis-van Creveld症候群、エーラス・ダンロス(Ehlers-Danlos)、表皮水疱症、てんかん、本態性振戦、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、フリードライヒ運動失調症、ゴーシェ病、緑内障、グルコースガラクトース吸収不良、グルタル酸尿症、脳回転状萎縮、ゴールドバーグ・シュプリンツェン症候群(口蓋帆・心臓・顔症候群)、ゴーリン症候群、ヘイリー・ヘイリー病、半身肥大、ヘモクロマトーシス、血友病、遺伝性運動感覚神経障害(HMSN)、遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん(HNPCC)、ハンチントン病、高IgMを伴う免疫不全、若年性糖尿病、クラインフェルター症候群、カブキ症候群、リー病、QT延長症候群、肺がん、悪性黒色腫、躁うつ病、マルファン症候群、メンケス症候群、流産、ムコ多糖症、多発性内分泌腫瘍、多発性硬化症、筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、筋強直性ジストロフィー、神経線維腫症、ニーマン・ピック病、ヌーナン症候群、肥満、卵巣がん、膵臓がん、パーキンソン病、発作性夜間ヘモグロビン尿症、ペンドレッド症候群、球脊髄性筋萎縮症、フェニルケトン尿症(PKU)、多発性嚢胞腎、プラダーウィリ症候群、原発性胆汁性肝硬変、前立腺がん、REAR症候群、リフサム病、網膜色素変性症、網膜芽腫、レット症候群、サンフィリップ症候群、統合失調症、重度複合免疫不全症、鎌状赤血球貧血、二分脊椎、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳萎縮症、成人突然死症候群、タンジール病、テイ・サックス病、橈骨欠損を伴う血小板減少症候群、タウンズブロックス症候群、結節性硬化症、ターナー症候群、アッシャー症候群、フォンヒッペル・リンドウ症候群、ワールデンブルグ症候群、ウィーバー症候群、ウェルナー症候群、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、色素性乾皮症、およびツェルウェガー症候群。

10

20

30

40

50

【0053】

「血液病」には、造血細胞または造血組織に影響を与える疾患が含まれる。血液病には、異常な血液学的含量および/または機能に関連する疾患が含まれる。血液病の例には、以下が含まれる:骨髄照射またはがんの化学療法処置に起因する疾患、悪性貧血、出血性貧血、溶血性貧血、再生不良性貧血、鎌状赤血球貧血、鉄芽球性貧血、慢性感染症例えばマラリア、トリパノソーマ症、HTV、肝炎ウイルスまたはその他のウイルス等に関連する貧血、骨髄欠損による骨髄性貧血、貧血による腎不全、貧血症、赤血球増加症、伝染性単核球症(EVI)、急性非リンパ性白血病(ANLL)、急性骨髄性白血病(AML)、急性前骨髄球性白血病(APL)、急性骨髄単球性白血病(AMMoL)、真性赤血球増加症、リンパ腫、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、網膜芽腫、血友病、血栓症のリスク増加に関連する障害、ヘルペス、サラセミア、抗体媒介障害例えば輸血反応および赤芽球症、赤血球への機械的外傷例えば微小血管障害性溶血性貧血、血栓性血小板減少性紫斑病、および播種性血管内凝固症候群等、マラリア原虫などの寄生虫による感染、鉛中毒などによる化学傷害、および脾機能亢進症。

【0054】

「炎症性疾患」および「炎症状態」という用語は本明細書では互換的に使用され、炎症によって引き起こされる、炎症からもたらされる、または炎症を引き起こす疾患または状態を指す。炎症性疾患および状態には、痛み(疼痛、有害物質の生成および神経の刺激による)、発熱(熱(calor)、血管拡張による)、赤み(発赤、血管拡張および血流の増加による)、腫脹(腫瘍、体液の過剰な流入または制限された流出による)、および/または機能喪失(機能喪失(funcio laesa)、部分的または完全、一時的または永続的)の兆候を特徴

とする、疾患、障害または状態が含まれる。炎症には様々な形があり、限定はされないが以下が含まれる:急性、癒着性、萎縮性、カタル性、慢性、肝硬変、びまん性、播種性、滲出性、線維性、線維化性、局所性、肉芽腫性、過形成性、肥大性、間質性、転移性、壊死性、閉塞性、実質性、可塑性、増殖性(productive)、増殖性(proliferous)、偽膜性、化膿性(purulent)、硬化性、漿液線維索性、漿液性、単純性、特異性、亜急性、化膿性(suppurative)、毒性、外傷性、および/または潰瘍性。「炎症性疾患」という用語はまた、マクロファージ、顆粒球、および/またはTリンパ球による過剰な反応を引き起こして異常な組織損傷および/または細胞死をもたらす、調節不全の炎症反応を指す場合もある。炎症性疾患は、急性または慢性の炎症状態のいずれかであり、感染性または非感染性の原因によって生じ得る。炎症性疾患には、限定することなく以下が含まれる:アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、自己免疫障害、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、リウマチ性多発筋痛症(PMR)、通風性関節炎、変形性関節炎、腱炎、滑液包炎、乾癬、嚢胞性線維症、骨関節炎、リウマチ性関節炎、炎症性関節炎、シェーグレン症候群、巨細胞性動脈炎、進行性全身性硬化症(強皮症)、強直性脊椎炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、天疱瘡、類天疱瘡、糖尿病(例:I型)、重症筋無力症、橋本甲状腺炎、グレーブス病、グッドパスチャー病、混合性結合組織疾患、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、悪性貧血、炎症性皮膚病、通常型間質性肺炎(UIP)、石綿肺、珪肺症、気管支拡張症、ベリリウム中毒、滑石肺、塵肺、サルコイドーシス、剥離性間質性肺炎、リンパ球性間質性肺炎、巨細胞性間質性肺炎、細胞性間質性肺炎、外因性アレルギー性肺炎、ウェゲナー肉芽腫症および関連する血管炎(側頭動脈炎および結節性多発動脈炎)、炎症性皮膚疾患、肝炎、遅延型過敏反応(例:毒ツタ皮膚炎)、肺炎、気道炎症、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、脳炎、即時型過敏反応、喘息、花粉症、アレルギー、急性アナフィラキシー、リウマチ熱、糸球体腎炎、腎盂腎炎、蜂窩織炎、膀胱炎、慢性胆嚢炎、虚血(虚血性傷害)、再灌流傷害、同種移植片拒絶反応、宿主対移植片拒絶反応、虫垂炎、動脈炎、眼瞼炎、細気管支炎、気管支炎、子宮頸管炎、胆管炎、絨毛膜羊膜炎、結膜炎、涙腺炎、皮膚筋炎、心内膜炎、子宮内膜炎、腸炎、小腸結腸炎、上顎炎、精巣上体炎、筋膜炎、結合組織炎、胃炎、胃腸炎、歯肉炎、回腸炎、虹彩炎、咽頭炎、脊髄炎、心筋炎、腎炎、臍炎、卵巣炎、精巣炎、骨炎、耳炎、腭炎、耳下腺炎、心膜炎、咽頭炎、胸膜炎、静脈炎、肺炎、直腸炎、前立腺炎、鼻炎、卵管炎、副鼻腔炎、口内炎、滑膜炎、精巣炎、扁桃炎、尿道炎、膀胱炎、ぶどう膜炎、膣炎、血管炎、外陰炎、外陰膣炎、脈管炎、慢性気管支炎、骨髄炎、視神経炎、側頭動脈炎、横行性脊髄炎、壊死性筋膜炎、および壊死性小腸結腸炎。眼の炎症性疾患には手術後の炎症が含まれるが、これに限定されない。

10

20

30

40

50

【0055】

追加の例示的な炎症状態としては、限定はされないが以下に関連する炎症が含まれる:座瘡、貧血症(例えば、再生不良性貧血、溶血性自己免疫性貧血)、喘息、動脈炎(例:多発性動脈炎、側頭動脈炎、結節性動脈周囲炎、高安動脈炎)、関節炎(例:結晶性関節炎、骨関節炎、乾癬性関節炎、痛風性関節炎、反応性関節炎、リウマチ性関節炎、ライター関節炎)、強直性脊椎炎、アミロース症、筋萎縮性側索硬化症、自己免疫疾患、アレルギーまたはアレルギー反応、アテローム性動脈硬化症、気管支炎、滑液包炎、慢性前立腺炎、結膜炎、シャーガス病、慢性閉塞性肺疾患、皮膚筋炎、憩室炎、糖尿病(例:I型糖尿病、II型糖尿病)、皮膚状態(例:乾癬、湿疹、熱傷、皮膚炎、そう痒症)、子宮内膜症、ギラン・バレー症候群、感染症、虚血性心疾患、川崎病、糸球体腎炎、歯肉炎、過敏症、頭痛(例:片頭痛、緊張性頭痛)、腸閉塞(例:術後腸閉塞、敗血症時の腸閉塞)、特発性血小板減少性紫斑病、間質性膀胱炎(膀胱痛症候群)、胃腸障害(例:消化性潰瘍、限局性腸炎、憩室炎、胃腸出血、好酸球性胃腸障害(例:好酸球性食道炎、好酸球性胃炎、好酸球性胃腸炎、好酸球性大腸炎)、胃炎、下痢、胃食道年齢逆流症(GORD、またはその同義語GERD)、炎症性腸疾患(例:クローン病、潰瘍性大腸炎、膠原性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、便流偏向性大腸炎、ベーチェット症候群、不確定大腸炎)および炎症性腸症候群(IBS)、狼瘡、多発性硬化症、限局性強皮症、重症筋無力症、心筋虚血、ネフローゼ症候群、尋常性天疱瘡、悪性貧血、消化性潰瘍、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、脳障

害に伴う神経炎症(例:パーキンソン病、ハンチントン病、およびアルツハイマー病)、前立腺炎、頭蓋放射線傷害に伴う慢性炎症、骨盤内炎症性疾患、再灌流傷害、限局性腸炎、リウマチ熱、全身性エリテマトーデス、強皮症、硬皮症(scleroderma)、サルコイドーシス、脊椎関節症、シェーグレン症候群、甲状腺炎、移植拒絶反応、腱炎、外傷または傷害(例:凍傷、化学的刺激物、毒素、瘢痕化、熱傷、身体的損傷)、血管炎、白斑およびウェゲナー肉芽腫症。ある態様において、炎症性障害は、関節炎(例:リウマチ性関節炎)、炎症性腸疾患、炎症性腸症候群、喘息、乾癬、子宮内膜症、間質性膀胱炎および前立腺炎から選択される。ある態様において、炎症状態は、急性炎症状態(例:感染に起因する炎症)である。ある態様において、炎症状態は、慢性炎症状態(例:喘息、関節炎、および炎症性腸疾患に起因する状態)である。

10

【0056】

「肝疾患(liver disease)」または「肝疾患(hepatic disease)」という用語は、肝臓への損傷または肝臓の疾患を指す。肝疾患の非限定的な例としては、以下が含まれる:肝内胆汁うっ滞(例:アラジール症候群、胆汁性肝硬変)、脂肪肝(例:アルコール性脂肪肝、ライ症候群)、肝静脈血栓症、肝レンズ核変性症(すなわち、ウィルソン病)、肝腫大、肝膿瘍(例:アメーバ性肝膿瘍)、肝硬変(例:アルコール性肝硬変、胆汁性肝硬変、実験的肝硬変)、アルコール性肝疾患(例:脂肪肝、肝炎、肝硬変)、寄生虫性肝疾患(例:肝エキノコックス症、肝蛭症、アメーバ性肝膿瘍)、黄疸(例:溶血性黄疸、肝細胞性黄疸、胆汁うっ滞黄疸)、胆汁うっ滞、門脈圧亢進症、肝肥大、腹水、肝炎(例:アルコール性肝炎、動物肝炎、慢性肝炎(例:自己免疫性肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、薬剤性慢性肝炎)、中毒性肝炎、ウイルス性ヒト肝炎(例:A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎)、肉芽腫性肝炎、続発性胆汁性肝硬変、肝性脳症、静脈瘤、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、肝細胞腺腫、血管腫、胆石、肝不全(例:肝性脳症、急性肝不全)、血管筋脂肪腫、石灰化を生じた肝転移、嚢胞状肝転移、線維層板型の肝細胞癌(fibrolamellar hepatocarcinoma)、肝腺腫、肝臓がん、肝嚢胞(例:単純嚢胞、多発性嚢胞性肝疾患、肝嚢胞腺腫、総胆管嚢胞)、間葉腫瘍(例:間葉性過誤腫、乳児血管内皮腫、血管腫、肝紫斑病、脂肪腫、炎症性偽腫瘍)、上皮腫瘍(例:胆管過誤腫、胆管腺腫)、限局性結節性過形成、結節性再生過形成、肝芽腫、肝細胞癌、胆管癌、嚢胞腺癌、血管腫瘍、血管肉腫、カボジ肉腫、血管内皮腫、胎児性肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、癌肉腫、奇形腫、カルチノイド、扁平上皮がん、原発性リンパ腫、肝紫斑病、肝骨髄性ポルフィリン症(erythrohepatic porphyria)、肝性ポルフィリン症(例:急性間欠性ポルフィリン症、晩発性皮膚ポルフィリン症)、およびツェルウェガー症候群。

20

30

【0057】

「肺疾患(lung disease)」または「肺疾患(pulmonary disease)」という用語は、肺の疾患を指す。肺疾患の例には、限定はされないが以下が含まれる:気管支拡張症、気管支炎、気管支肺異形成症、間質性肺疾患、業務性肺疾患、肺気腫、嚢胞性線維症、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、重症急性呼吸器症候群(SARS)、喘息(例:間欠性喘息、軽度持続性喘息、中度持続性喘息、重度持続性喘息)、慢性気管支炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺気腫、間質性肺疾患、サルコイドーシス、石綿症、アスペルギルス腫、アスペルギルス症、肺炎(例:大葉性肺炎、多葉性肺炎、気管支肺炎、間質性肺炎)、肺線維症、肺結核、リウマチ性肺疾患、肺塞栓症、および肺がん(例:非小細胞肺癌(例:腺癌、扁平上皮肺癌、大細胞肺癌)、小細胞肺癌)。

40

【0058】

「神経疾患」という用語は、神経系の任意の疾患であって、中枢神経系(脳、脳幹および小脳)、末梢神経系(脳神経を含む)、および自律神経系(その一部は中枢神経系と末梢神経系の両方に存在する)が関与する疾患を含むものを指す。神経変性疾患とは、神経細胞の喪失を特徴とする神経疾患の一種を指し、これには、限定はされないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、タウオパチー(前頭側頭型認知症を含む)、およびハンチントン病などを含む。神経疾患の例には、限定はされないが、頭痛、昏迷および昏睡、認知症、発作、睡眠障害、外傷、感染症、新生物、神経眼科、運動障害、脱髄

50

疾患、脊髄障害、ならびに末梢神経、筋肉および神経筋接合部の障害が含まれる。依存症および精神疾患には、限定することなく、双極性障害および統合失調症が含まれ、これらはまた神経疾患の定義にも含まれる。神経疾患のさらなる例は、以下を含む：後天性てんかん性失語症；急性播種性脳脊髄炎；副腎白質ジストロフィー；脳梁欠損症；失認症；アイカルディ症候群；アレクサンダー病；アルパース病；交互性片麻痺；アルツハイマー病；筋萎縮性側索硬化症；無脳症；エンジェルマン症候群；血管腫症；酸素欠乏症；失語症；失行症；くも膜嚢胞；くも膜炎；アーノルド・キアリ奇形；動静脈奇形；アスペルガー症候群；毛細血管拡張性運動失調症；注意欠陥多動性障害；自閉症；自律神経失調症；背部疼痛；パテン病；ベーチェット病；ベル麻痺；良性本態性眼瞼けいれん；良性限局性筋萎縮症；良性頭蓋内圧亢進症；ピンスワンガー病；眼瞼けいれん；ブロッホ・スルツバーガー症候群；腕神経叢損傷；脳膿瘍；脳損傷；脳腫瘍（多形神経膠芽腫を含む）；脊椎腫瘍；ブラウン・セカール症候群；カナバン病；手根管症候群（CTS）；灼熱痛；中枢性疼痛症候群；橋中心髄鞘崩壊症；頭蓋障害；脳動脈瘤；脳動脈硬化症；脳萎縮；大脳巨人症；脳性麻痺；シャルコー・マリー・トゥース病；化学療法誘発性の神経障害および神経障害性疼痛；キアリの奇形；舞蹈病；慢性炎症性脱髄性多発神経障害（CIPD）；慢性疼痛；慢性局所疼痛症候群；コフィン・ローリー症候群；持続的植物状態を含む昏睡；先天性顔面麻痺；大脳皮質基底核変性症；頭蓋動脈炎；頭蓋骨縫合早期癒合症；クロイツフェルト・ヤコブ病；累積的な外傷性障害；クッシング症候群；サイトメガリック封入体病（CIBD）；サイトメガロウイルス感染症；dancing eyes-dancing feet症候群；ダンディ・ウォーカー症候群；ドーソン病；ド・モルシエ症候群；デジェリーヌ・克蘭プケ麻痺；認知症；皮膚筋炎；糖尿病性神経障害；びまん性硬化症；自律神経失調症；書字障害；失読症；ジストニア；初期の乳児てんかん性脳症；エンプティセラ症候群；脳炎；脳ヘルニア；脳三叉神経血管腫症；てんかん；エルブ麻痺；本態性振戦；ファブリー病；ファール症候群；失神；家族性痙攣性麻痺；熱性けいれん；フィッシャー症候群；フリードライヒ運動失調症；前頭側頭型認知症およびその他の「タウオパチー」；ゴーシェ病；ゲルストマン症候群；巨細胞性動脈炎；巨細胞封入体病；球状細胞白質ジストロフィー；ギラン・バレー症候群；HTLV-1関連脊髄症；ハラーフォルデン・スパッツ病；頭部外傷；頭痛；片側顔面けいれん；遺伝性痙攣性対麻痺；遺伝性多発神経炎性失調症；耳帯状疱疹；帯状疱疹；平山症候群；HIV関連認知症および神経障害（エイズの神経症状も参照）；全前脳胞症；ハンチントン病およびその他のポリグルタミン反復疾患；水脳症；水頭症；コルチゾール過剰症；低酸素症；免疫介在性脳脊髄炎；封入体筋炎；色素失調症；乳児フィタン酸蓄積症；乳児レフサム病；乳児けいれん；炎症性ミオパチー；頭蓋内嚢胞；頭蓋内圧亢進症；ジュベール症候群；カーズ・セイヤー症候群；ケネディ病；キンズボーン症候群；クリッペル・フェイル症候群；クラッペ病；クーゲルベルク・ヴェランダー病；クーラー病；ラフォラ病；ランバート・イートン筋無力症候群；ランダウ・クレフナー症候群；髄外側（ワレンバーグ）症候群；学習障害；リー病；レノックス・ガストー症候群；レシュ・ナイハン症候群；白質ジストロフィー；レビー小体型認知症；滑脳症；閉じ込め症候群；ルー・ゲーリッグ病（別名、運動ニューロン疾患または筋萎縮性側索硬化症）；腰椎椎間板疾患；ライム病-神経学的後遺症；マシャド・ジョセフ病；大脳症；巨脳症；メルカーソン・ローゼンタール症候群；メニエール病；髄膜炎；メンケス病；異染性白質ジストロフィー；小頭症；片頭痛；ミラー・フィッシャー症候群；ミニストローク；ミトコンドリアミオパチー；メビウス症候群；単量体性筋萎縮症；運動ニューロン疾患；もやもや病；ムコ多糖症；多発梗塞性認知症；多巣性運動神経障害；多発性硬化症およびその他の脱髄性疾患；起立性低血圧を伴う多系統萎縮症；筋ジストロフィー；重症筋無力症；脊髄破碎性びまん性硬化症；乳児のミオクロニー脳症；ミオクロヌス；ミオパシー；先天性ミオトニー；ナルコレプシー；神経線維腫症；神経遮断薬悪性症候群；エイズによる神経学的症状；狼瘡の神経学的後遺症；神経ミオトニー；ニューロンセロイドリポフスチン症；神経細胞移動障害；ニーマン・ピック病；オサリバン・マクロード症候群；後頭神経痛；潜在的脊髄形成不全シーケンス（occult spinal dysraphism sequence）；太田原症候群；オリブ橋小脳萎縮症；オブソクローヌス・ミオクロヌス；視神経炎；起立性低血圧；使いすぎ症候群；感覚異常；パーキンソン病；先天性異常筋強直症；腫瘍随伴疾患；発作；パリー・ロンバーグ症候群；ペリゼウス・メルツバッハー病；周期的な麻痺；末梢神経障害；痛みを伴う神経障害および神経障害性疼痛；持続的植物状態；広汎性発達障害；光くし

10

20

30

40

50

やみ反射;フィタン酸蓄積症;ピック病;神経圧迫;下垂体腫瘍;多発性筋炎;孔脳症;ポリオ後症候群;帯状疱疹後神経痛(PHN);感染後脳脊髄炎;起立性低血圧;プラダーウィリ症候群;原発性側索硬化症;プリオン病;進行性片側顔面萎縮;進行性多巣性白質脳症;進行性硬化性ポリジストロフィー;進行性核上性麻痺;偽腫瘍脳;ラムゼイ・ハント症候群(I型およびII型);ラスムッセン脳炎;反射性交感神経性ジストロフィー症候群;レフサム病;反復運動障害;反復性ストレス損傷;むずむず脚症候群;レトロウイルス関連脊髄症;レット症候群;ライ症候群;舞踏病(Saint Vitus Dance);サンドホフ病;シルダー病;統合脳症;中隔視神経異形成症;揺さぶられ症候群;帯状疱疹;シャイ・ドレーガー症候群;シェーグレン症候群;睡眠時無呼吸;ソト症候群;痙縮;二分脊椎;脊髄損傷;脊髄腫瘍;脊髄性筋萎縮症;スティッフパーソン症候群;脳卒中;スタージ・ウェーバー症候群;亜急性硬化性全脳炎;くも膜下出血;皮質下動脈硬化性脳症;シデナム舞踏病;失神;脊髄空洞症;遅発性ジスキネジア;テイ・サックス病;側頭動脈炎;緊留性脊髄症候群;トムセン病;胸郭出口症候群;チック;トッドの麻痺;トウレット症候群;一過性脳虚血発作;伝染性海綿状脳症;横断性脊髄炎;外傷性脳損傷;振戦;三叉神経痛;熱帯性の痙性対不全麻痺;結節性硬化症;血管性認知症(多発梗塞性認知症);側頭動脈炎を含む血管炎;フォン・ヒッペル・リンダウ病(VHL);ワレンバーク症候群;ヴェルドニヒ・ホフマン病;ウェスト症候群;むち打ち症;ウィリアムズ症候群;ウィルソン病;およびゼルウィガー症候群。

【0059】

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

【0060】

「増殖性疾患」とは、細胞の増殖による異常な成長または拡大によって生じる疾患を指す(Walker, Cambridge Dictionary of Biology; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1990)。増殖性疾患は以下に関連し得る:1)通常は静止状態の細胞の病的増殖;2)細胞の、正常な位置からの病的移動(例:腫瘍性細胞の転移);3)マトリックスメタロプロテイナーゼ(例:コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、エラスターゼ)などのタンパク質分解酵素の病的発現;または4)増殖性網膜症および腫瘍転移におけるような、病的血管新生。例示的な増殖性疾患には、がん(すなわち、「悪性新生物」)、良性新生物、血管新生、炎症性疾患、および自己免疫疾患が含まれる。

【0061】

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

パラメータなどを改善することができる。いくつかの態様において、核酸は、代謝標識核酸である。「代謝標識核酸」とは、本明細書では、5-エチニルウリジンなどの1以上の非天然ヌクレオシド類似体を、転写の間にそのオリゴヌクレオチド鎖に組み込んだ核酸を指す。

【0062】

本明細書で使用される用語「転写後修飾」とは、転写後のRNA(例:RNA一次転写産物)の化学的修飾または変化を指す。転写後修飾は真核細胞(例:ヒト細胞)では一般的であり、成熟した機能的RNA分子の生成、および/またはRNA分子が核から、様々な機能を実施する細胞内の様々な位置に移行するために、多くの場合に重要である。転写後修飾は、mRNA転写産物を、細胞がタンパク質に翻訳可能な成熟mRNAに変換する際にも、重要な役割を果たす。転写後修飾には、限定はされないが、RNA転写産物の5'プロセッシング(例えば、7-メチルグアノシンによるmRNAの5'キャッピング)、RNA転写産物の3'プロセッシング(例えば、RNA転写産物の3'末端の切断またはポリアデニル化)、イントロンスプライシング(すなわち、プレmRNAからの非コード領域(イントロン)の除去)、およびヒストンmRNAプロセッシングに關与する修飾が含まれる。具体的な転写後修飾には、限定はされないが、7-メチルグアノシン(m^7G)、 N^6 -メチルアデノシン(m^6A)、ポリ(A)テール、イントロンスプライシング、およびヒストンmRNAプロセッシングが含まれる。

10

【0063】

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

20

30

【0064】

「RNA転写産物」は、RNAポリメラーゼ触媒によるDNA配列の転写から生じる産物である。RNA転写産物がDNA配列の相補的コピーである場合、それは一次転写産物と呼ばれるか、または一次転写産物の転写後プロセッシングに由来するRNA配列であり、成熟RNAと呼ばれる。「メッセンジャーRNA(mRNA)」とは、イントロンを持たず、細胞によってポリペプチドに翻訳され得るRNAを指す。「cRNA」とは、組換えcDNA鋳型から転写された相補的RNAを指す。「cDNA」とは、mRNA鋳型に相補的であり、mRNA鋳型に由来するDNAを指す。「新生RNA」とは、細胞によって活発に転写されているRNA、および細胞によって最近転写されたがまだいかなる種類の転写後修飾も受けていないRNAを指す。

40

【0065】

用語「試料」または「生物学的試料」とは、組織試料(例えば組織切片、外科的生検、および組織の針生検など);細胞試料(例:細胞学的塗抹標本(Papまたは血液塗抹標本など)または顕微解剖によって得られた細胞の試料);または、細胞画分、断片またはオルガネラ(例えば、細胞を溶解し、遠心分離などによりその成分を分離することによって得られるものなど)を含む任意の試料を指す。生物学的試料の他の例としては、血液、血清、尿、精液、糞便、脳脊髄液、間質液、粘液、涙、汗、膿、生検組織(例えば、外科的生検または針生検によって得られる)、乳頭吸引物、乳、膿液、唾液、スワブ(口腔スワブなど)、または第1の生体試料に由来する生体分子を含有する任意の材料が挙げられる。いくつか

50

の態様において、生物学的試料は、対象から採取された外科的生検、例えば、本明細書に記載の任意の組織の生検である。ある態様において、生物学的試料は、腫瘍生検である(例えば、がんと診断された、がんを有すると疑われる、またはがんを有すると考えられる対象からの)。

【0066】

投与が企図される「対象」とは、ヒト(すなわち、任意の年齢層の男性または女性、例えば、小児対象(例:幼児、小児、または青年)または成人対象(例:若年成人、中年成人、または高齢成人))、または非ヒト動物を指す。いくつかの態様において、非ヒト動物は哺乳動物(例:霊長類(例:カニクイザルまたはアカゲザル)またはマウス)である。「患者」という用語は、疾患の処置を必要とする対象を指す。いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、患者はヒトである。ヒトは、発達の任意の段階の男性または女性であり得る。疾患または障害の処置を「必要としている」対象または患者には、疾患または障害の何らかの危険因子または症状を示すものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、対象は非ヒト実験動物(例:マウス、ラット、イヌ、またはブタ)である。

10

【0067】

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

20

【0068】

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

30

40

【0069】

用語「処置」、「処置する」、および「処置すること」とは、本明細書に記載の疾患を逆転させる、軽減する、発症を遅延させる、または進行を阻害することを指す。いくつかの態様において、処置は、疾患の1以上の徴候または症状が発生または観察された後(例えば、予防的に(本明細書でさらに説明され得るように)、または疾患の疑いまたはリスクに基づいて)施されてもよい。他の態様において、処置は、疾患の兆候または症状がない場合に施してもよい。例えば、処置は、症状の発症前に感受性のある対象に施してもよい

50

(例えば、対象または対象の家族の症状の病歴を考慮して)。処置はまた、症状が解消した後も、例えば再発を遅らせまたは予防するために、継続してよい。いくつかの態様において、処置は、本明細書に開示される方法を使用し、細胞または組織における1以上の目的の核酸の時空間的遺伝子発現の変化を、健康な細胞または組織と比較して観察した後に、施してもよい。

【0070】

用語「腫瘍」および「新生物」は、本明細書で使用される場合、異常な組織塊であって、その塊の増殖が正常組織の増殖を上回り、それと調和していないものを指す。腫瘍は、以下の特徴に応じて「良性」または「悪性」である:細胞分化の程度(形態および機能を含む)、増殖速度、局所浸潤、および転移。「良性新生物」は、一般に良好に分化し、悪性新生物よりも成長が遅いのが特徴で、発生部位に局在したままである。さらに良性新生物は、離れた部位に浸潤(infiltrate)、浸潤(invade)、または転移する能力を有さない。例示的な良性新生物としては、限定はされないが、脂肪腫、軟骨腫、腺腫、アクロコルドン、老人性血管腫、脂漏性角化症、黒子、および脂腺過形成が挙げられる。いくつかの場合において、特定の「良性」腫瘍が後に悪性新生物を引き起こす可能性があり、これは、腫瘍の新生物細胞の部分集団における追加の遺伝子変化に起因する可能性があり、これらの腫瘍は「前悪性新生物」と呼ばれる。例示的な前悪性新生物は、奇形腫である。対照的に、「悪性新生物」は一般に低分化(退形成)であり、進行性の浸潤、浸潤、および周囲組織の破壊を伴う、特徴的な急速な増殖を有する。さらに、悪性新生物は一般に、離れた部位に転移する能力を有する。用語「転移」、「転移性」、または「転移する」とは、原発腫瘍または元の腫瘍から別の臓器または組織への、がん細胞の拡散または移動を指し、典型的には、二次(転移)腫瘍が位置する臓器または組織の組織型ではなく、原発腫瘍または元の腫瘍の組織型の「二次腫瘍」または「二次細胞塊」が存在することによって識別可能である。例えば、骨に移動した前立腺がんは転移性前立腺がんと言われ、これには骨組織内で増殖するがん性前立腺がん細胞が含まれる。

【0071】

特定の態様の詳細な説明

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

【0072】

本開示は、対象におけるin vivoでの時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法を含む、時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法を提供する。本開示はまた、時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割をプロファイリングする方法、疾患または障害の発症または進行における時空間的遺伝子発現の役割を研究する方法、遺伝子発現を調節可能な薬剤を識別する方法、対象における疾患または障害を診断する方法、および対象における疾患または障害を処置する方法も提供する。本明細書に記載の方法およびシステムにおいて有用なオリゴヌクレオチドプローブもまた、本開示によって提供される。本開示は、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドプローブを含むキットも提供する。時空間的遺伝子発現をプロファイリングするためのシステムもまた、本開示によって提供される。

【0073】

時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法

一側面において、本開示は、細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法を提供する(例えば、図1を参照)。本明細書に開示される方法において、細胞は、ヌクレオシド類似体のプールの存在下でのインキュベーションを通じて代謝標識され得、ここで、各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分(例:任意の反応性生体直交性官能基、例えば本明細書でさらに説明するクリックケミストリーハンドルなど)を一定の時間(本明細書では「 t_1 」と呼ぶ)の間含む。次いで、代謝標識核酸を、反応性化学物質

部分(例:細胞の転写産物に組み込まれたヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応可能な、任意の生体直交性官能基)を含む第1のオリゴヌクレオチドプローブと、接触させることができる。ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と第1のオリゴヌクレオチドプローブは、互いに反応し、第1のオリゴヌクレオチドプローブを、細胞によって生成される代謝標識転写産物に結合させる。次いで、代謝標識核酸を、本明細書にさらに記載される1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させることができ、細胞によって生成される転写産物を増幅して、1以上の連結アンプリコンを生成するために使用することができる。次いで、1以上の連結アンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込み、配列決定して、転写産物の身元(例えば、本明細書でさらに説明するSEDAL配列決定(動的アニーリングおよびライゲーションによるエラー低減を伴う配列決定)を通じて)およびポリマーマトリックス内のそれらの位置を、決定することができる。転写産物の位置を使用して、個々の細胞、細胞内位置、およびオルガネラを識別することができる。次いで、この方法をさらに1回以上繰り返し、細胞とヌクレオシド類似体を異なる時間(すなわち、 t_2 、 t_3 、 t_4 など)インキュベートして、1以上の核酸の発現が経時的にどのように変化するかを決定することができる。

10

【0074】

いくつかの態様において、本開示は、細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための、以下のステップを含む方法を提供する:

a)細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

20

b)代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

30

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

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

f)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

40

h)第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること。

【0075】

いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)はさらに1回以上実施される。ステップ(a)~(h)を繰り返し、ステップ(a)で細胞とヌクレオシド類似体のプールを様々な時間一緒にインキュベートすると、目的の代謝標識核酸、または目的の複数の代謝標識核酸の発現が経時的に観察され、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることが可能になる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)は、異なる時間 t_2 で少なく

50

とも1回繰り返される。ある態様において、ステップ(a)~(h)は、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される。ステップ(a)~(h)を繰り返す回数に、制限はない。ステップ(a)において細胞とヌクレオシド類似体のプールと一緒にインキュベートする時間にも、制限はない。いくつかの態様において、ステップ(a)のインキュベーションは、数分程度の時間(例:約1分間、約2分間、約5分間、約10分間、約20分間、約30分間、約40分、約50分、または約60分)実施される。いくつかの態様において、ステップ(a)のインキュベーションは、数時間程度の時間(例:約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、または約24時間)実施される。ある態様において、ステップ(a)のインキュベーションは、24時間を超えて実施される。いくつかの態様において、ステップ(a)のインキュベーションは、数日程度の期間(例:約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、または7日より長く)実施される。

10

【0076】

本明細書に開示の方法における任意の種類の細胞の使用が、本開示によって企図される(例:本明細書の定義に記載される任意の細胞型)。いくつかの態様において、細胞は哺乳動物細胞である。ある態様において、細胞はヒト細胞である。いくつかの態様において、細胞はがん細胞である。本開示はまた、本明細書に記載の方法を、複数の細胞に対して同時に実施することも企図している。いくつかの態様において、時空間的遺伝子発現は、10個を超える細胞、20個を超える細胞、50個を超える細胞、100個を超える細胞、200個を超える細胞、300個を超える細胞、400個を超える細胞、500個を超える細胞、または1000個を超える細胞で、同時にプロファイリングされる。いくつかの態様において、本方法は、同じ細胞型の複数の細胞に対して実施される。いくつかの態様において、本方法は、異なる細胞型の細胞を含む複数の細胞(例:幹細胞、前駆細胞、神経細胞、星状細胞、樹状細胞、内皮細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、筋細胞、心筋細胞、間葉細胞、上皮細胞、免疫細胞、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、ニューロンなど)に対して実施される。ある態様において、細胞はHeLa細胞である。ある態様において、細胞(単数または複数)は、透過処理された細胞である(例えば細胞は、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させるステップの前に、透過処理される)。ある態様において、細胞(単数または複数)は、無傷の組織(例:本明細書に記載される組織型のいずれか、例えば上皮組織、結合組織、筋肉組織、および神経組織)内に存在する。いくつかの態様において、組織は、代謝標識核酸を第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させるステップの前に、*in vivo*にある(すなわち、組織は、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で細胞をインキュベーションするステップの間、*in vivo*にある)。いくつかの態様において、組織内の1以上の細胞は、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で*in vivo*でインキュベートされ、次に組織は、代謝標識核酸を第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させるステップの前に、採取される。組織の採取には、対象(例えば、非ヒト実験動物)から臓器全体を採取することが含まれる場合もあり、または、組織生検が含まれる場合もある。ある態様において、組織は、非ヒト実験動物(例:マウス、ラット、イヌ、ブタ、または非ヒト霊長類(例:サル、類人猿など))にある。いくつかの態様において、組織は植物組織である。

20

30

40

【0077】

いくつかの態様において、本明細書に記載の任意の方法は、*in vivo*で実施することができる。したがっていくつかの態様において、本開示は、対象における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための、以下のステップを含む方法を提供する:

50

a)ヌクレオシド類似体のプールを、 t_1 の時間、対象にin vivoで投与して、対象の1以上の細胞によって合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b)組織試料を、対象から採取すること;

c)採取された組織試料中の代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

d)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで;

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列と相補的であり;

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

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

g)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

h)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

i)第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること。

【0078】

いくつかの態様において、採取された組織は、上皮組織、結合組織、筋肉組織、または神経組織である。ある態様において、採取された組織は心臓組織である。いくつかの態様において、対象は非ヒト実験動物(例:マウス、ラット、イヌ、ブタ、または非ヒト霊長類)である。ヌクレオシド類似体は、任意の適切な手段、例えば注射によって、対象に投与され得る。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、後眼窩投与(retro-orbital administration)によって投与される。いくつかの態様において、対象から組織試料を採取することは、組織生検を行うことを含む。いくつかの態様において、対象から組織試料を採取することは、対象から1以上の臓器全体を採取することを含む。

【0079】

本明細書に記載の方法における標識細胞(すなわち、代謝標識された細胞)の使用もまた、本開示によって企図される。いくつかの態様において、細胞は、ヌクレオシド類似体で標識されている。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、アデノシン、グアノシン、チミジン、シチジン、ウリジン、および/またはイノシンの類似体である。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、3'-アジド-3'-デオキシチミジン、C8-アルキン-デオキシウリジン、(2'S)-2'-デオキシ-2'-フルオロ-5-エチニルウリジン、または5-エチニル-2'-デオキシシチジンである。ある態様において、代謝標識核酸は、5-エチニルウリジン標識された核酸である。いくつかの態様において、本明細書に記載の方法を使用して、複数の細胞が同時にプロファイリングされる。

【0080】

本明細書に記載の方法は、一度に1つの目的の代謝標識核酸について、または同時に複数の目的の代謝標識核酸について、時空間的遺伝子発現をプロファイリングするために使

10

20

30

40

50

用され得る。いくつかの態様において、時空間的遺伝子発現は、最大100個、最大200個、最大500個、最大1000個、最大2000個、最大3000個、または3000個を超える目的の代謝標識核酸について、同時にプロファイリングされる。ある態様において、時空間的遺伝子発現は、最大1000個の目的の代謝標識核酸について、同時にプロファイリングされる。目的の代謝標識核酸は、細胞のゲノムDNAから発現された転写産物であり得る。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸は、新生RNA、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、またはリボソームRNA(rRNA)である。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸は、新生RNA(すなわち、細胞によって新たに産生されているRNA、または細胞によって新たに産生されたが、いかなる種類の転写後修飾もまだ受けていないRNA)である。ある態様において、目的の代謝標識核酸は、mRNAである。

10

【0081】

様々な反応性化学物質部分を有するヌクレオシド類似体が、本明細書に記載の方法での使用のために企図される。ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分は、任意の反応性生体直交性官能基(例:本明細書に記載の任意のクリックケミストリーハンドル)であり得る。当業者であれば、本明細書に開示されるもの以外の他の生体直交性官能基が、本明細書に開示される方法での使用に適していること、および本明細書に記載の生体直交性官能基が、当技術分野で知られている他の任意のもので置換され得ることを、容易に理解するであろう。例えば、米国特許公開20130266512およびThirumurugan, P. et al. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical-Biology Applications. Chem. Rev. 2013, 113(7), 4905-4979に記載のものを参照されたい。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分は、アジド、アルキン、ニトロ、アルケン、テトラジン、またはテトラゾールを含む。ある態様において、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分はアルキンを含む。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、3'-アジド-3'-デオキシチミジン、C8-アルキン-デオキシウリジン、(2'S)-2'-デオキシ-2'-フルオロ-5-エチニルウリジン、または5-エチニル-2'-デオキシシチジンである。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は5-エチニルウリジンである。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、オリゴヌクレオチドプローブの5'末端にある。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体は、オリゴヌクレオチドプローブの3'末端にある。

20

30

【0082】

本明細書に記載の方法は、反応性化学物質部分を含む第1のオリゴヌクレオチドプローブ(本明細書では「スプリントプローブ」とも呼ばれる)の使用を企図する。第1のオリゴヌクレオチドプローブの反応性化学物質部分は、細胞と接触すると第1のオリゴヌクレオチドプローブが細胞内に存在する代謝標識転写産物と抱合するような様式で、細胞を代謝標識するために使用されるヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と、反応性でなければならない。第1のオリゴヌクレオチドプローブの反応性化学物質部分は、本明細書に記載されるかまたは当技術分野で知られている、任意の生体直交性官能基であってもよい。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分は、アジド、アルキン、ニトロ、アルケン、テトラジン、またはテトラゾールを含む。ある態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分はアジドを含む。いくつかの態様において、ヌクレオシド類似体の化学物質部分と第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分の反応は、クリックケミストリー反応(例:銅(I)触媒によるアジド-アルキン環化付加(CuAAC)反応)を含む。

40

【0083】

第1のオリゴヌクレオチドプローブはまた、様々な他の構成要素も含んでよい。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブはさらに、重合ブロッカーを含む。重合ブロッカーは、本明細書に記載の方法のステップ(e)の増幅におけるプライマーとしての第1のオリゴヌクレオチドプローブの使用を妨げることができる、任意の部分であり得る。いくつかの態様において、重合ブロッカーは、第1のオリゴヌクレオチドプローブ

50

ブの3'末端にある。重合ブロッカーは、例えば、ポリメラーゼが第1のオリゴヌクレオチド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妨げる、任意の化学物質部分であることができる。いくつかの態様において、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(例えば、3'ヒドロキシル基上に酸素保護基を含む)核酸残基である。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、重合ブロッカーは、3'ヒドロキシル基の代わりに任意の化学物質部分を含み、これはさらなるヌクレオチドの付加を防ぐ。いくつかの態様において、重合ブロッカーは、逆位核酸残基を含む。いくつかの態様において、重合ブロッカーは、逆位アデノシン、チミン、シトシン、グアノシン、またはウリジン残基である。ある態様において、重合ブロッカーは、逆位チミン残基である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブはさらに、ポリアデノシン(ポリA)リンカー配列を含む。いくつかの態様において、ポリAリンカー配列は、約2~約100、約10~約90、約30~約70、または約40~約60ヌクレオチド長である。ある態様において、ポリAリンカー配列は、約50ヌクレオチド長である。

10

20

30

40

50

【0084】

いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブは、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、または約75ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3~20、約4~19、約5~18、約6~17、約7~16、約8~15、約9~14、約10~13、または約11~12ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3、約4、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、または約20ヌクレオチド長である。ある態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約12ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造：
5'-[反応性化学物質部分]-[ポリAリンカー配列]-[第3のオリゴヌクレオチド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。任意のヌクレオチドリンカーの各例は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、]-[は、任意の非ヌクレオチドリンカー(例：化学的リンカーまたはペプチドベースのリンカー)を含む。

【0085】

本明細書に開示される方法はまた、一対のオリゴヌクレオチドプローブとして提供される第2および第3のオリゴヌクレオチドプローブの使用も含む。第2のオリゴヌクレオチドプローブ(本明細書では「プライマー」プローブとも呼ぶ)は、ヌクレオチドの特定の配列で構成されるバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、約1~約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、約5~約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、バーコード配列は、約10ヌクレオチド長を超える、約15ヌクレオチド長を超える、または約20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は5ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10~30、約11~29、約12~28、約13~27、約14~26、約15~25、約16~24、約17~23、約18~22、または約19~21ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または約30ヌクレオチド長である。ある態様において、目的の核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、20ヌ

クレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40ヌクレオチド長である。ある態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは32ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造:

5'-[目的の代謝標識核酸に相補的な部分]-[バーコード配列]-3'

を含み、ここで]-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む。任意のヌクレオチドリinkerの各例は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、]-[は、任意の非ヌクレオチドリinker(例: 化学的リinkerまたはペプチドベースのリinker)を含む。

10

【0086】

本明細書に記載の方法で使用される第3のオリゴヌクレオチドプローブ(本明細書では「パドロック」プローブとも呼ぶ)は、それぞれがヌクレオチドの特定の配列で構成される第1のバーコード配列および第2のバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約1~約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約5~約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、バーコード配列は、約10ヌクレオチド長を超える、約15ヌクレオチド長を超える、または約20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約5ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約1~約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約5~約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、バーコード配列は、約10ヌクレオチド長を超える、約15ヌクレオチド長を超える、または約20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約5ヌクレオチド長である。第3のオリゴヌクレオチドプローブはまた、第1のオリゴヌクレオチドプローブと相補的な部分も含む。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3~20、約4~19、約5~18、約6~17、約7~16、約8~15、約9~14、約10~13、または約11~12ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3、約4、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、または約20ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、第3のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端との間で分割される。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10~30、約11~29、約12~28、約13~27、約14~26、約15~25、約16~24、約17~23、約18~22、または約19~21ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、または30ヌクレオチドを超える長さである。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造:

20

30

40

5'-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1の部分]-[第1のバーコード配列]-[目的の代謝標識核酸に相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第2の部分]-3'

を含み、ここで]-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む。任意のヌクレオチドリinkerの各例は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド

50

長であってもよい。いくつかの態様において、]-[は、任意の非ヌクレオチドリンカー(例:化学的リンカーまたはペプチドベースのリンカー)を含む。

【0087】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブのバーコードは、目的の代謝標識核酸を識別するために使用される遺伝子特異的配列を含む。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプローブにおけるバーコードの使用は、例えば、2019年10月17日に公開された国際特許出願公開WO2019/199579、およびWang et al., Science 2018, 361, 380にさらに記載されており、これらの両方は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0088】

いくつかの態様において、ライゲーションのステップは、第3のオリゴヌクレオチドプローブが不在の場合には実施できない。いくつかの態様において、ローリングサークル増幅を行って環状オリゴヌクレオチドを増幅して、1以上の連結アンプリコンを生成するステップはさらに、反応性化学基で修飾されたヌクレオチドを提供するステップを含む。いくつかの態様において、ローリングサークル増幅を行って環状オリゴヌクレオチドを増幅して1以上の連結アンプリコンを生成するステップはさらに、アミン修飾ヌクレオチドを提供するステップを含む。増幅プロセス中、アミン修飾ヌクレオチドは、生成される1以上の連結アンプリコンに組み込まれる。得られたアンプリコンは第一級アミンで機能化され、これをさらに別の適合性のある化学物質部分(例:N-ヒドロキシスクシンイミド)と反応させて、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。いくつかの態様において、1以上の連結アンプリコンをポリマーマトリックスに埋め込むステップは、1以上の連結アンプリコンのアミン修飾ヌクレオチドをメタクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させること、および、1以上の連結アンプリコンとポリマーマトリックスを共重合することを含む。

【0089】

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以上の連結アンプリコンを埋め込むことができる任意のポリマーマトリックスが、本明細書に記載の方法での使用に適している。いくつかの態様において、ポリマーマトリックスはヒドロゲル(すなわち、親水性である架橋ポリマーのネットワーク)である。いくつかの態様において、ヒドロゲルは、ポリビニルアルコールヒドロゲル、ポリエチレングリコールヒドロゲル、ポリアクリル酸ナトリウムヒドロゲル、アクリル酸ポリマーヒドロゲル、またはポリアクリルアミドヒドロゲルである。ある態様において、ヒドロゲルは、ポリアクリルアミドヒドロゲルである。

【0090】

本明細書に開示される方法には、第4のオリゴヌクレオチドプローブの使用も含まれる。いくつかの態様において、第4のオリゴヌクレオチドプローブはフルオロフォアを含む。本明細書に記載されるように、第4のオリゴヌクレオチドプローブは、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、目的の代謝標識核酸を識別するために使用される、遺伝子特異的配列である。いくつかの態様において、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させるステップは、目的の代謝標識核酸を識別するために実施される。目的の代謝標識核酸を識別するためのこの方法は、動的アニーリングおよびライゲーションによるエラー低減を伴う配列決定(SEDAL配列決定)として知られており、Wang, X. et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. Science 2018, 36, eaat5691および国際特許出願公開WO 2019/199579に記載されており、それぞれは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、SEDAL配列決定は、1以上の目的の代謝標識核酸を識別するために、2、3、4、5、または5回を超えて実施される。

【0091】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の方法で使用される(例えば、SEDAL配列決定で使用されるような)第4のオリゴヌクレオチドプローブは、当技術分野で知られている任意の適切な画像化技法を使用して読み出すことができる。例えば、第4のオリゴヌクレオチドプローブがフルオロフォアを含む態様では、フルオロフォアを、画像化を使用して読み出して、目的の代謝標識核酸を識別することができる。いくつかの態様において、画像化ステップは、蛍光画像化を含む。ある態様において、画像化ステップは共焦点顕微鏡検査を含む。ある態様において、画像化ステップは落射蛍光顕微鏡検査を含む。

【0092】

様々な態様において、本明細書に記載の方法は、目的の核酸以外の追加の分子をプロファイリングするための、さらなるステップを含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の方法はさらに、細胞内の追加の分子をプロファイリングすることを含む。かかる追加の分子には、限定することなく、RNA、DNA、タンパク質、炭水化物、小分子、代謝産物、および/または脂質が含まれ得る。

10

【0093】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法はさらに、細胞の時空間的遺伝子発現プロファイルを、様々な細胞型の時空間的遺伝子発現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、プロファイリングされた細胞の細胞型を決定することを含む。

【0094】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法はさらに、細胞内の1以上の遺伝子を過剰発現またはノックアウトして、1以上の遺伝子が目的の代謝標識核酸の時空間的発現に参与しているかどうかを決定することを含む。

20

【0095】

時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割をプロファイリングするための方法

別の側面において、本開示は、時空間的遺伝子発現における、転写後修飾(例: 7-メチルグアノシン、 N^6 -メチルアデノシン(m^6A)、ポリ(A)テール、イントロンスプライシング、またはヒストンmRNAプロセッシング)の役割をプロファイリングするための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、1以上の目的の代謝標識核酸(例: 1以上の代謝標識RNA転写産物)の転写後修飾に参与する遺伝子のノックダウンを含む細胞において、実施され得る。次に、ノックダウン細胞における目的の様々な代謝標識核酸の時空間的発現を、野生型細胞における目的の同じ代謝標識核酸の時空間的発現と、比較することができる。野生型細胞における発現と比較した目的の代謝標識核酸の発現の任意の変化は、転写後修飾が、目的の代謝標識核酸の時空間的発現の調節に参与することを示し得る。

30

【0096】

いくつかの態様において、細胞での時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割をプロファイリングするための方法は、以下のステップを含む:

a) 転写後修飾に参与する遺伝子のノックダウンを含む細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

40

b) 代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c) 代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオ

50

リゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

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

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

f) 1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること; および

h) 第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、

ここで、野生型細胞における発現と比較した、目的の代謝標識核酸の発現の変化は、転写後修飾が、目的の代謝標識核酸の時空間的発現の調節に関与していることを示す。

【0097】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法を使用して、複数の細胞が同時に解析される。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)はさらに1回以上実施される。ステップ(a)~(h)を繰り返し、ステップ(a)で細胞とヌクレオシド類似体のプールを様々な時間一緒にインキュベートすると、目的の代謝標識核酸、または目的の複数の代謝標識核酸の発現が経時的に観察され、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることが可能になる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)は、異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返される。ある態様において、ステップ(a)~(h)は、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される。

【0098】

様々な転写後修飾のプロファイリングは、本明細書に開示される方法を使用して実施され得る。特定の遺伝子または遺伝子のセットが既知であるかまたは導入に関与すると考えられるところの、任意の転写後修飾は、本開示の方法を使用してプロファイリングされ得る。いくつかの態様において、翻訳後修飾は、転写産物の5'プロセッシング(例: 5'キャップの導入)を含む。いくつかの態様において、転写後修飾は、転写産物の3'プロセッシング(例: 転写産物のポリアデニル化または転写産物の3'末端の切断)を含む。いくつかの態様において、転写後修飾は、7-メチルグアノシン、 N^6 -メチルアデノシン(m^6A)、ポリ(A)テール、イントロンスプライシング、またはヒストンmRNAプロセッシングである。いくつかの態様において、転写後修飾はアデノシンのメチル化を含む。ある態様において、転写後修飾は m^6A である。

【0099】

核酸の転写後修飾に関与する様々な遺伝子を、本明細書に記載の方法を使用してノックダウンし、研究することができる。いくつかの態様において、転写後修飾に関与する遺伝子は、YTHドメインファミリー(YTHDF)1、YTHDF2、YTHDF3、YTHドメイン含有(YTHDC)1、YTHDC2、メチルトランスフェラーゼ様(METTL)3、およびMETTL14からなる群から選択される。本明細書に開示される方法は、一度に1つの目的の代謝標識核酸の時空間的遺伝子発現、または一度に複数の目的の代謝標識核酸の時空間的遺伝子発現に対する、転写後修飾に関与する遺伝子の役割を研究するために、使用され得る。いくつかの態様において、時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割は、最大100個、最大200個、最大500個、最大1000個、最大2000個、最大3000個、または3000個を超える目的の代謝標識核酸について、同時にプロファイリングされる。ある態様において、時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割は、最大1000個の目的

10

20

30

40

50

の代謝標識核酸について、同時にプロファイリングされる。

【0100】

いくつかの態様において、細胞は、代謝標識核酸を第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させるステップの前に、*in vivo*の組織内にある(すなわち、組織は、細胞をヌクレオシド類似体のプールの存在下でインキュベートするステップの間、*in vivo*にある)。いくつかの態様において、組織内の1以上の細胞は、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で、対象において*in vivo*でインキュベートされ、その後組織は、代謝標識核酸を第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させるステップの前に、対象から採取される。組織の採取には、対象(例:非ヒト実験動物)から臓器全体を採取することが含まれる場合もあり、または組織生検が含まれる場合もある。ある態様において、組織は、非ヒト実験動物(例:マウス、ラット、イヌ、ブタ、または類人猿もしくはサルなどの非ヒト霊長類)内にある。

10

【0101】

疾患または障害の発症または進行における時空間的遺伝子発現の役割を研究するための方法

別の側面において、本開示は、疾患または障害の発症または進行における時空間的遺伝子発現の役割を研究するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、疾患組織(例:対象から採取された疾患組織)からの細胞において実施され得る。次いで、疾患組織からの細胞における目的の様々な代謝標識核酸の時空間的発現を、非疾患組織からの細胞における目的の同一の代謝標識核酸の時空間的発現と比較することができる。非疾患細胞における発現と比較した目的の代謝標識核酸の発現の任意の変化は、目的の代謝標識核酸の時空間的発現が、疾患または障害の発症または進行に関与し得ることを示し得る。

20

【0102】

いくつかの態様において、疾患または障害の発症または進行における時空間的遺伝子発現の役割を研究するための方法は、以下のステップを含む:

a) 疾患組織からの細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b) 代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

30

c) 代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i) 第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

40

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

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

f) 1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g) ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

50

h) 第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、
ここで、非疾患細胞または非疾患組織からの細胞における発現と比較した、目的の代謝標識核酸の発現の変化は、目的の代謝標識核酸の時空間的発現の変化が、疾患または障害の発症または進行に関与し得ることを示す。

【0103】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法を使用して、複数の細胞が同時にプロファイリングされる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)はさらに1回以上実施される。ステップ(a)~(h)を繰り返し、ステップ(a)で細胞とヌクレオシド類似体のプールを様々な時間一緒にインキュベートすると、目的の代謝標識核酸、または目的の複数の代謝標識核酸の発現が経時的に観察され、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることが可能になる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)は、異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返される。ある態様において、ステップ(a)~(h)は、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される。

【0104】

遺伝子発現の変化に関連し得る任意の疾患または障害における、1以上の目的の核酸の役割は、本明細書に記載の方法を用いて研究することができ、本明細書に記載の方法は、いかなる特定の疾患および障害の研究にも限定されない。いくつかの態様において、疾患または障害は、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である。

【0105】

本明細書に記載の方法における様々な組織試料の使用も、本開示によって企図される。本明細書に記載の方法を実施する場合、任意の組織試料(例:定義に列挙された任意の種類の組織の試料)を使用することができる。いくつかの態様において、疾患組織は、対象から採取された組織試料である。いくつかの態様において、対象は非ヒト実験動物である。ある態様において、対象は、マウス、ラット、イヌ、またはブタである。いくつかの態様において、対象はヒトである(例:研究対象の疾患または障害と診断された患者、これを有すると考えられる患者、または有するリスクがある患者)。いくつかの態様において、疾患組織は、代謝標識核酸を第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させるステップの前に、*in vivo*にある(すなわち、組織は、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で細胞をインキュベートするステップの間、*in vivo*にある)。いくつかの態様において、疾患組織中の1以上の細胞は、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で、対象において*in vivo*でインキュベートされ、次いで疾患組織は、代謝標識核酸を第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させるステップの前に、採取される。組織の採取には、対象(例:非ヒト実験動物)から臓器全体を採取することが含まれる場合もあり、組織生検が含まれる場合もある。ある態様において、疾患組織は、非ヒト実験動物(例:マウス、ラット、イヌ、ブタ、または類人猿もしくはサルなどの非ヒト霊長類)中にある。

【0106】

時空間的遺伝子発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための方法

別の側面において、本開示は、目的の代謝標識核酸または目的の複数の代謝標識核酸の時空間的遺伝子発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、1つ以上の候補薬剤の存在下で、細胞内で実施され得る。次いで、細胞(例:正常細胞または疾患細胞)における目的の様々な代謝標識核酸の時空間的発現を、1つ以上の候補薬剤に曝露されていない細胞における、目的の同一の代謝標識核酸の時空間的発現と比較することが

できる。候補薬剤(単数または複数)に曝露されなかった細胞における発現と比較した、目的の代謝標識核酸(単数または複数)の発現の任意の変化は、目的の代謝標識核酸(単数または複数)の時空間的発現が、候補薬剤(単数または複数)によって調節されることを示し得る。

【0107】

いくつかの態様において、時空間的遺伝子発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするための方法は、以下のステップを含む:

a)細胞を、1以上の候補薬剤およびヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

10

b)代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

20

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

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

f)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

30

h)第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、ここで、1以上の候補薬剤の不在下での発現と比較した、1以上の候補薬剤の存在下での目的の代謝標識核酸の発現の変化は、1以上の候補薬剤が、時空間的遺伝子発現を調節することを示す。

【0108】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法を使用して、複数の細胞が同時にプロファイリングされる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)はさらに1回以上実施される。ステップ(a)~(h)を繰り返し、ステップ(a)で細胞とヌクレオシド類似体のプールを様々な時間一緒にインキュベートすると、目的の代謝標識核酸、または目的の複数の代謝標識核酸の発現が経時的に観察され、目的の標識核酸の時空間的発現をプロファイリングすることが可能になる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)は、異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返される。ある態様において、ステップ(a)~(h)は、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される。

40

【0109】

いくつかの態様において、1以上の候補薬剤は、候補薬剤のライブラリとして(例えば

50

、小分子または他の候補治療剤のスクリーニングコレクションから)提供され得る。いくつかの態様において、候補薬剤のライブラリは、数百の候補薬剤を含む(例:約100の候補薬剤、約200の候補薬剤、約300の候補薬剤、約400の候補薬剤、約500の候補薬剤、約600の候補薬剤、約700の候補薬剤、約800の候補薬剤、または約900の候補薬剤)。いくつかの態様において、スクリーニングライブラリは、数千の候補薬剤を含む(例:約1000の候補薬剤、約2000の候補薬剤、約3000の候補薬剤、約5000の候補薬剤、約10,000の候補薬剤、約20,000の候補薬剤、約30,000の候補薬剤、約40,000の候補薬剤、約50,000の候補薬剤、約60,000の候補薬剤、約70,000の候補薬剤、約80,000の候補薬剤、約90,000の候補薬剤、約100,000の候補薬剤、または100,000を超える候補薬剤)。いくつかの態様において、細胞当たり1つの候補薬剤がスクリーニングされる。ある態様において、一度に1つのみの候補薬剤が、本明細書に記載の方法を使用してスクリーニングされる。

10

【0110】

いくつかの態様において、1以上の候補薬剤は、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、および炭水化物からなる群から選択される。ある態様において、候補薬剤(例:小分子)は、抗がん治療剤である。いくつかの態様において、候補薬剤(例:小分子)は、既知の薬物を含む。いくつかの態様において、候補薬剤(例:小分子)は、FDA承認薬物を含む。いくつかの態様において、小分子は化合物のライブラリを含む。ある態様において、タンパク質は抗体である。ある態様において、タンパク質は抗体断片である。ある態様において、タンパク質は抗体バリエーションである。ある態様において、タンパク質は受容体である。ある態様において、タンパク質はサイトカインである。ある態様において、核酸は、mRNA、アンチセンスRNA、miRNA、siRNA、RNAアプタマー、dsRNA、短ヘアピンRNA(shRNA)、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。任意の候補薬剤を、本明細書に記載の方法を使用してスクリーニングすることができる。特に、時空間的遺伝子発現を調節可能であると考えられる任意の候補薬剤を、本明細書に記載の方法を使用してスクリーニングすることができる。いくつかの態様において、1以上の候補薬剤による、目的の代謝標識核酸または目的の複数の代謝標識核酸の時空間的遺伝子発現の調節は、疾患または障害の症状を軽減、緩和、もしくは除去すること、または、疾患または障害の発症または進行を防ぐことに関連する。いくつかの態様において、候補薬剤によって調節される疾患または障害は、遺伝的疾患、増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、肝疾患、脾臓疾患、肺疾患、血液病、神経疾患、胃腸(GI)管疾患、泌尿生殖器疾患、感染症、筋骨格疾患、内分泌疾患、代謝障害、免疫障害、中枢神経系(CNS)障害、神経障害、眼科疾患、または心血管疾患である。

20

30

【0111】

対象における疾患または障害を診断するための方法

別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害を診断するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、対象(例:疾患もしくは障害を有すると考えられる対象、またはそのリスクがある対象、または、健康であるか、健康であると考えられている対象)から採取した試料からの細胞において、実施することができる。次いで、細胞における目的の様々な代謝標識核酸の時空間的発現を、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞(例:健康な個人からの細胞、または健康な個人の集団からの複数の細胞)における、目的の同じ代謝標識核酸の時空間的発現と比較することができる。非疾患細胞における発現と比較した、目的の代謝標識核酸の発現における任意の変化は、対象が疾患または障害を有することを示し得る。

40

【0112】

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

a) 対象から採取した試料からの細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌ

50

クレオシド類似体のプールは、反応性化学物質部分を含み；

b)代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み；

c)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで：

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み；および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり；

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

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

f)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと；

g)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること；および

h)第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること、

ここで、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における発現と比較した、目的の代謝標識核酸の発現の変化は、対象が、疾患または障害を有することを示す。

【0113】

いくつかの態様において、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における目的の代謝標識核酸の時空間的発現を、対照実験として同時にプロファイリングすることができる。いくつかの態様において、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における目的の代謝標識核酸の時空間的発現プロファイルは、参照データを含む。

【0114】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法を使用して、複数の細胞が同時にプロファイリングされる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)はさらに1回以上実施される。ステップ(a)~(h)を繰り返し、ステップ(a)で細胞とヌクレオシド類似体のプールを様々な時間一緒にインキュベートすると、目的の代謝標識核酸、または目的の複数の代謝標識核酸の発現が経時的に観察され、目的の核酸の時空間的発現をプロファイリングすることが可能になる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)は、異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返される。ある態様において、ステップ(a)~(h)は、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される。

【0115】

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

10

20

30

40

50

【0116】

いくつかの態様において、対象は、非ヒト実験動物(例:マウス、ラット、イヌ、ブタ、または類人猿もしくはサルなどの非ヒト霊長類)である。いくつかの態様において、対象は家畜である。いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、試料は組織試料を含む。ある態様において、組織試料は生検である(例:骨、骨髄、乳房、胃腸管、肺、肝臓、脾臓、前立腺、脳、神経、腎臓、子宮内膜、子宮頸部、リンパ節、筋肉、または皮膚の生検)。ある態様において、生検は腫瘍生検である。

対象における疾患または障害を処置するための方法

【0117】

別の側面において、本開示は、対象における疾患または障害を処置するための方法を提供する。例えば、本明細書に記載の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするための方法は、対象(例えば、疾患もしくは障害を有すると考えられる、または疾患もしくは障害を有するリスクがある対象)から採取した試料からの細胞において実施することができる。次いで、細胞における目的の様々な代謝標識核酸の時空間的発現を、非疾患組織試料からの細胞における目的の同じ代謝標識核酸の時空間的発現と比較することができる。次いで、非疾患細胞における発現と比べて、目的の代謝標識核酸の発現に何らかの変化が観察された場合、疾患または障害に対する処置を対象に施すことができる。

【0118】

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

a)対象から採取した試料からの細胞を、ヌクレオシド類似体のプールの存在下で t_1 の時間インキュベートして、細胞により合成された核酸を代謝標識すること、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;

b)代謝標識核酸を、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団と接触させること、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌクレオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;

c)代謝標識核酸を、第2のオリゴヌクレオチドプローブおよび第3のオリゴヌクレオチドプローブを含む1対以上のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること、ここで:

i)第2のオリゴヌクレオチドプローブは、バーコード配列および目的の代謝標識核酸に相補的な部分を含み;および

ii)第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の代謝標識核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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であり;

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

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

f)1以上の連結アンプリコンを、ポリマーマトリックスに埋め込むこと;

g)ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンを、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む第4のオリゴヌクレオチドプローブと接触させること;および

h)第4のオリゴヌクレオチドプローブを画像化して、ポリマーマトリックスに埋め込まれた1以上の連結アンプリコンの位置を決定すること;および

i)非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における発現と比較して、時空間的遺伝子発現の変化が観察された場合、対象に、疾患または障害に対する処置を施すこと。

【0119】

いくつかの態様において、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における目的の

10

20

30

40

50

代謝標識核酸の時空間的発現を、対照実験として同時にプロファイリングすることができる。いくつかの態様において、非疾患細胞または非疾患組織試料からの細胞における目的の代謝標識核酸の時空間的発現プロファイルは、参照データを含む。

【0120】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法を使用して、複数の細胞が同時に解析される。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)はさらに1回以上実施される。ステップ(a)~(h)を繰り返し、ステップ(a)で細胞とヌクレオシド類似体のプールを様々な時間一緒にインキュベートすると、目的の代謝標識核酸、または目的の複数の代謝標識核酸の発現が経時的に観察され、目的の核酸の時空間的発現をプロファイリングすることが可能になる。いくつかの態様において、ステップ(a)~(h)は、異なる時間 t_2 で少なくとも1回繰り返される。ある態様において、ステップ(a)~(h)は、第3の時間 t_3 の間任意で繰り返され、第4の時間 t_4 の間任意で繰り返され、第5の時間 t_5 の間任意で繰り返され、第6の時間 t_6 の間任意で繰り返され、第7の時間 t_7 の間任意で繰り返され、第8の時間 t_8 の間任意で繰り返され、第9の時間 t_9 の間任意で繰り返され、および第10の時間 t_{10} の間任意で繰り返される。

【0121】

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

【0122】

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

【0123】

いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、試料は生物学的試料を含む。いくつかの態様において、試料は組織試料を含む。ある態様において、組織試料は生検である(例えば、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、または皮膚の生検)。ある態様において、生検は腫瘍生検である。ある態様において、生検は固形腫瘍生検である。

オリゴヌクレオチドプローブ

【0124】

本開示は、本明細書に記載の方法およびシステムで使用するための、オリゴヌクレオチドプローブも提供する。一側面において、本開示は、第1のオリゴヌクレオチドプローブ(本明細書では「スプリント」プローブとも呼ぶ)、第2のオリゴヌクレオチドプローブ(本明細書では「プライマー」プローブとも呼ぶ)、および第3のオリゴヌクレオチドプロ

ープ(本明細書では「パドロック」プローブとも呼ぶ)を含む、複数(すなわち、セット)のオリゴヌクレオチドプローブを提供し、ここで:

i) 第1のオリゴヌクレオチドプローブは、反応性化学物質部分を含み;

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

iii) 第3のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含み、

ここで、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、第2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である。

10

【0125】

本明細書に記載のすべてのオリゴヌクレオチドプローブは、任意で、様々なヌクレオチド長のスペーサーまたはリンカーを、列挙された構成要素のそれぞれの間に有してもよく、またはオリゴヌクレオチドプローブの構成要素は、互いに直接結合されてもよい。第1のオリゴヌクレオチドプローブの反応性化学物質部分は、本明細書に記載されているかまたは当技術分野で知られている、任意の生体直交性官能基であってもよい。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分は、アジド、アルキン、ニトロン、アルケン、テトラジン、またはテトラゾールを含む。ある態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブの化学物質部分は、アジドを含む。第1のオリゴヌクレオチドプローブはまた、他の様々な構成要素も含んでよい。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブはさらに、本明細書に記載の重合ブロッカーを含む。いくつかの態様において、重合ブロッカーは、第1のオリゴヌクレオチドプローブの3'末端にある。重合ブロッカーは、例えば、ポリメラーゼが重合のためのプライマーとして第1のオリゴヌクレオチドプローブを使用することを妨げる、任意の化学物質部分であり得る。いくつかの態様において、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(例えば、3'ヒドロキシル基上に酸素保護基を含む)核酸残基である。いくつかの態様において、重合ブロッカーは、逆位核酸残基を含む。いくつかの態様において、重合ブロッカーは、逆位アデノシン、チミン、シトシン、グアノシン、またはウリジン残基である。ある態様において、重合ブロッカーは、逆位チミン残基である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブはさらに、ポリアデノシン(ポリA)リンカー配列を含む。いくつかの態様において、ポリAリンカー配列は、約2~約100、約10~約90、約30~約70、または約40~約60ヌクレオチド長である。ある態様において、ポリAリンカー配列は約50ヌクレオチド長である。

20

30

【0126】

いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブは、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、または約75ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3~20、約4~19、約5~18、約6~17、約7~16、約8~15、約9~14、約10~13、または約11~12ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3、約4、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、または約20ヌクレオチド長である。ある態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約12ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造:

40

5'-[反応性化学物質部分]-[ポリAリンカー配列]-[第3のオリゴヌクレオチド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。任意のヌクレオチドリンカーの各例は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、]-[は、任意の非ヌクレオチドリンカー(例

50

:化学的リンカーまたはペプチドベースのリンカー)を含む。

【0127】

本明細書に開示される複数のオリゴヌクレオチドプローブはまた、第2および第3のオリゴヌクレオチドプローブも含む。第2のオリゴヌクレオチドプローブは、特定のヌクレオチド配列からなるバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、約1～約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、約5～約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、バーコード配列は、約10ヌクレオチド長を超える、約15ヌクレオチド長を超える、または約20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブのバーコード配列は、5ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10～30、約11～29、約12～28、約13～27、約14～26、約15～25、約16～24、約17～23、約18～22、または約19～21ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、または約30ヌクレオチド長である。ある態様において、目的の核酸に相補的な第2のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、20ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40ヌクレオチド長である。ある態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは、32ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第2のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造:

5'-[目的の核酸に相補的な部分]-[バーコード配列]-3'

を含み、ここで]-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む。任意のヌクレオチドリンカーの各例は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、]-[は、任意の非ヌクレオチドリンカー(例:化学的リンカーまたはペプチドベースのリンカー)を含む。

【0128】

本明細書に記載の方法で使用される第3のオリゴヌクレオチドプローブは、それぞれがヌクレオチドの特定の配列で構成される、第1のバーコード配列および第2のバーコード配列を含む。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約1～約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約5～約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、バーコード配列は、約10ヌクレオチド長を超える、約15ヌクレオチド長を超える、または約20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約5ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約1～約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約5～約10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、バーコード配列は、約10ヌクレオチド長を超える、約15ヌクレオチド長を超える、または約20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約5ヌクレオチド長である。第3のオリゴヌクレオチドプローブはまた、第1のオリゴヌクレオチドプローブと相補的な部分を含む。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、第3のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端との間で分割される。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3～20、約4～19、約5～18、約6～17、約7～16、約8～15、約9～14、約10～13、また

は約 11～12ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約3、約4、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、または約20ヌクレオチド長である。ある態様において、第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、12ヌクレオチド長である(例えば、プローブの5'末端に6ヌクレオチドおよびプローブの3'末端に6ヌクレオチド)。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10～30、約11～29、約12～28、約13～27、約14～26、約15～25、約16～24、約17～23、約18～22、または約19～21ヌクレオチドである。いくつかの態様において、目的の代謝標識核酸に相補的な第3のオリゴヌクレオチドプローブの部分は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、または30ヌクレオチドを超える長さである。いくつかの態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブは、以下の構造:

5'-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1の部分]-[第1のバーコード配列]-[目的の核酸に相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第2の部分]-3'

を含み、ここで]-[は、任意のヌクレオチドリinkerを含む。任意のヌクレオチドリinkerの各例は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、]-[は、任意の非ヌクレオチドリinker(例:化学的リinkerまたはペプチドベースのリinker)を含む。

【0129】

いくつかの態様において、複数のオリゴヌクレオチドプローブはさらに、第4のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの態様において、第4のオリゴヌクレオチドプローブは、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列に相補的な配列を含む(すなわち、相補的配列は、本明細書で定義される第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列と同じ長さである)。ある態様において、第3のオリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、目的の核酸(例:新生RNAまたはmRNAなどのRNA)を識別するために使用される、遺伝子特異的配列である。いくつかの態様において、第4のオリゴヌクレオチドプローブは、フルオロフォアを含む。いくつかの態様において、フルオロフォアは、第4のオリゴヌクレオチドプローブの5'末端に付着される。いくつかの態様において、フルオロフォアは、第4のオリゴヌクレオチドプローブの3'末端に付着される。

【0130】

別の側面において、本開示は、目的の核酸に相補的な部分、第1のバーコード配列、追加のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第2のバーコード配列を含む、オリゴヌクレオチドプローブを提供する。いくつかの態様において、第1のバーコード配列は、追加のオリゴヌクレオチドプローブ上のバーコード配列に相補的である。いくつかの態様において、本明細書に記載のプローブの様々な構成要素の長さは、本明細書に記載の第3のオリゴヌクレオチドプローブのものと同じである。

【0131】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、約1～10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドプローブの第1のバーコード配列は、5～10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、バーコード配列は、約10ヌクレオチド長を超える、約15ヌクレオチド長を超える、または約20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第1のバーコード配列は、5ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、約1～10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドプローブの第2のバーコード配列は、5～10ヌクレオチド長である。いくつ

かの態様において、バーコード配列は、約 10ヌクレオチド長を超える、約 15ヌクレオチド長を超える、または約 20ヌクレオチド長を超える。ある態様において、第2のバーコード配列は、5ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、追加のオリゴヌクレオチドプローブに相補的なオリゴヌクレオチドプローブの部分は、オリゴヌクレオチドプローブの5'末端と3'末端との間で分割される。ある態様において、オリゴヌクレオチドプローブは以下の構造:

5'-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第1の部分]-[第1のバーコード配列]-[目的の核酸に相補的な部分]-[第2のバーコード配列]-[第1のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な第2の部分]-3'

を含み、ここで]-[は、任意のヌクレオチドリンカーを含む。任意のヌクレオチドリンカーの各例は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、]-[は、任意の非ヌクレオチドリンカー(例:化学的リンカーまたはペプチドベースのリンカー)を含む。

キット

【0132】

キットもまた本開示に包含される。一側面において、提供されるキットは、本明細書に記載の1以上のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。いくつかの態様において、キットはさらに、容器(例:バイアル、アンプル、ボトル、および/またはディスペンサーパッケージ、または他の適切な容器)を含み得る。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載の複数(すなわち、セット)のオリゴヌクレオチドプローブまたは単一のオリゴヌクレオチドプローブのいずれかを含む。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載の複数の複数オリゴヌクレオチドプローブまたは複数の単一オリゴヌクレオチドプローブを含み、ここで複数オリゴヌクレオチドプローブまたは単一オリゴヌクレオチドプローブのそれぞれは、目的の、別々の代謝標識核酸の時空間的遺伝子発現をプロファイリングするために使用される。いくつかの態様において、キットは、1つを超える、2つを超える、3つを超える、4つを超える、5つを超える、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、または1000を超える、本明細書に開示された複数のオリゴヌクレオチドプローブまたは単一のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの態様において、キットはさらに、本明細書に開示される方法を実施するための、他の試薬を含む(例えば、細胞;ヌクレオシド類似体のプール、ここでヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、本明細書にさらに記載されるように反応性化学物質部分を含み;リガーゼ;ポリメラーゼ;アミン修飾ヌクレオチド;および/またはポリマーマトリックス(例:ポリアクリルアミドマトリックス)を作成するための試薬類)。いくつかの態様において、キットは、細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするために有用である。いくつかの態様において、キットは、時空間的遺伝子発現における転写後修飾の役割をプロファイリングするために有用である。いくつかの態様において、キットは、疾患または障害の発症または進行における時空間的遺伝子発現の役割を研究するために有用である。いくつかの態様において、キットは、時空間的遺伝子発現を調節可能な薬剤をスクリーニングするために有用である。いくつかの態様において、キットは、対象における疾患または障害を診断するために有用である。いくつかの態様において、キットは、対象における疾患または障害を処置するために有用である。ある態様において、本明細書に記載のキットはさらに、キットの使用説明書を含む。

【0133】

時空間的遺伝子発現プロファイリングのシステム

本開示はまた、細胞における時空間的遺伝子発現をプロファイリングするためのシステムを提供する。いくつかの態様において、システムは以下を含む:a)細胞;b)ヌクレオシド類似体のプール、ここで、ヌクレオシド類似体のプール中の各ヌクレオシド類似体は、反応性化学物質部分を含み;c)第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団、ここで、第1のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ヌク

レオシド類似体の反応性化学物質部分と反応する化学物質部分を含み;および d) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 3 のオリゴヌクレオチドプローブを含む、1 対以上のオリゴヌクレオチドプローブ、ここで:

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

ii) 第 3 のオリゴヌクレオチドプローブは、目的の核酸に相補的な部分、第 1 のバーコード配列、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの集団中の第 1 のオリゴヌクレオチドプローブに相補的な部分、および第 2 のバーコード配列を含み、ここで、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 のバーコード配列は、第 2 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である。

10

【0134】

いくつかの態様において、システムはさらに、顕微鏡(例:共焦点顕微鏡)を含む。いくつかの態様において、システムはさらに、コンピュータを含む。いくつかの態様において、システムはさらに CPU を含む。いくつかの態様において、システムはさらに、コンピュータ記憶装置および/またはメモリを含む。いくつかの態様において、システムはさらに、カメラを含む。いくつかの態様において、システムは、顕微鏡検査を実施するためのおよび/または画像解析のためのソフトウェアを含む。いくつかの態様において、システムはさらにリガーゼを含む。いくつかの態様において、システムはさらにポリメラーゼを含む。いくつかの態様において、システムはさらにアミン修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、システムはさらに、ポリマーマトリックス(例:ポリアクリルアミドマトリックス)を作成するための試薬を含む。本開示のシステムにおける細胞は、本明細書に開示される細胞型のいずれであってもよい。いくつかの態様において、システムは複数の細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は異なる細胞型のものである。ある態様において、細胞は組織内に存在する。いくつかの態様において、組織は、対象によって、または対象から、提供された組織試料である。ある態様において、対象はヒトである。

20

【0135】

例

例 1: 時空間分解トランスクリプトミクスのための新生 RNA 標識化学

細胞がどのように活動を調節し、その空間的文脈において環境刺激に反応するかを理解することの重要性は、ますます認識されている。実際、生体組織は空間的に閉じ込められた膨大な数の細胞で構成されており、それらの細胞が協調的に作用して特定の機能を発揮し、活動を制御している。生物または組織内の細胞の位置は、細胞の分化と活動に影響を与え、同様に、異種細胞の景観(landscape)は組織の特殊な発達および生理学的状態に寄与する。

30

【0136】

組織および多細胞生物での細胞組織化の研究における急速な進歩は、トランスクリプトーム配列決定技術または RNA-seq の開発から始まり、これは、プールされた細胞における mRNA の包括的な検出および定量化を可能にした。単一細胞 RNA 配列決定(scRNA-seq)により、個々の細胞のトランスクリプトームの評価が容易になり、細胞型間の生物学的差異の推測を可能にした。最近では、空間的に分解されたトランスクリプトーム法がさらに一歩進んで、単一細胞のトランスクリプトームを、細胞内の空間的文脈を保持しつつ、調べている。STARmap などの画像ベースの方法は、組織、オルガノイド、および臓器を解析するための重要な要素である逐次的画像化によって細胞の 3 次元位置を検出することで、利点を実証する。Human Cell Atlas および Brain Initiative Cell Census Network などの大規模なコンソーシアムは、空間トランスクリプトームを最大限に活用することで、生命、健康、および疾患を理解するための基礎としての、ヒト組織の多様な細胞型の包括的な参照「マップ」を作成中である。

40

【0137】

組織がどのようにして、機能化された細胞型により構造化されるかに加えて、細胞内の生体分子の空間的組織化も同様に、それ以上ではないにしても、細胞機能および組織生理

50

学を理解する上で極めて重要である。タンパク質の空間的分離は、区画化された細胞環境を作り出し、細胞の効果的かつ秩序ある機能に貢献する。相互作用の忠実性と熱力学的効率を確保するために、タンパク質のかかる不均一な組織化にはmRNAの空間制御および局所的タンパク質翻訳も必要である。動物細胞におけるmRNAの細胞内局在の既知の例には、線維芽細胞、ニューロン、オリゴデンドロサイト、筋細胞、および心筋細胞で観察されるものが含まれており、細胞生物学におけるRNAの非対称分布という繰り返し発生するテーマを示唆する。さらに、非対称なmRNA分布とオンサイトでのタンパク質合成の強力な証拠により、転写と翻訳の分離が可能となり、mRNAの位置の細胞機能に対する重要な役割を実証する。タンパク質合成は必要なだけ何回も実施されることが多いため、局在化に加えて、時間に依存した方法でのmRNAプロセシングの微調整が普及している。顕著な例としては、ニューロンおよび胚発生におけるmRNAの輸送およびトラフィッキングが含まれる。したがって、組織内の全体的な細胞組織化だけでなく、各細胞型内の特定の区画化された活動を研究することも不可欠である。その結果、mRNA、RNAとタンパク質の相互作用、およびタンパク質合成の細胞内レベルでの時空間制御を理解することは、細胞が互いにどのように異なるかを明らかにするために重要である。

10

20

30

40

50

【0138】

それにも関わらず、ほとんどの空間トランスクリプトーム戦略は依然として汎細胞レベルで検査を行い、単一細胞を追跡および識別するが、細胞内環境におけるmRNAの空間情報は調べていない。細胞内レベルをより深く調査しようとする試みであっても、この分野の現在の最先端技術は、細胞の定常状態におけるmRNA局在のスナップショットを提供するのみであり、転写と転写産物代謝回転(turnover)との間の高度に調節されたバランスは不明瞭である。mRNAの細胞内位置の動力学は、細胞生物学の基本的な理解から健康な状態と疾患の状態の区別に至るまで広範囲に影響を与えるため、mRNAの移行を単一細胞内で出生から死亡まで追跡する、時間分解された空間的配列決定方法が、定義された期間にわたり遺伝子発現を正確にプロファイリングするために緊急に必要とされている。

【0139】

RNA動力学を捕捉するための1つの有望なアプローチは、代謝標識によるものである。ヌクレオチド類似体を使用したトランスクリプトームの代謝配列決定により、新生に転写されたRNAの選択的標識が可能となる。4-チオウリジン(4SU)、5-ブロモウリジン(5BrU)、5-エチニルウリジン(5-EU)、およびアデノシン類似体を使用すると、様々なケミカルハンドルを標識RNAに組み込むことが可能となり、これはさらにエンリッチされ非標識転写産物から様々な手段を通じて単離することができる。これらのアプローチにより、遺伝子発現の時間的変化のモニタリングと、新生転写産物の動態パラメータの特性評価が可能になった。具体的には、5-EU標識RNAはクリックケミストリーによって捕捉および分類することができ、これは、細胞の化学的処理において生体直交性と高い信号対雑音比を達成する、大きな可能性を実証する。

【0140】

代謝標識を空間トランスクリプトミクスに組み込むことにより、TEMPOmap(temporally resolved insitu sequencing and mapping、時間分解insitu配列決定およびマッピング)が開発された。TEMPOmapは、単一細胞の新生トランスクリプトミクスを時間次元で分解する、新しい方法である。したがって、1つの細胞または複数の細胞内のRNAの「4Dマップ」を作成することができる(図1)。この方法は、ヒドロゲル組織化学、DNAバーコーディング、および2塩基配列決定スキーム(SEDAL配列決定)に基づく。この方法は、代謝標識、DNA-RNA近接ライゲーション、および3パートのDNAプローブ設計を含み、高効率かつ低バックグラウンドで新生転写産物の選択的捕捉を可能にする。TEMPOmapは、トランスクリプトーム全体のスケールでRNAに関する空間的、時間的、および単一分子の情報を提供できるため、新生転写産物の細胞内局在を可視化することができる。他の空間トランスクリプトーム方法と同様に、TEMPOmapを使用して、単一細胞の不均一性を識別し、それらを構造化組織にマッピングすることができる。し

たがってこの方法は、mRNAのゲノムスケールの合成および分解速度の解明と、調整可能な期間にわたるこれらの転写産物の空間的移行制約の同時観察を可能にすることにより、単一細胞の状態および細胞内機能の、より詳細な記述を提供する。

【0141】

TEMPOmapの最初の実証は、HeLa細胞における新生転写産物を解明し、観察された標的トランスクリプトームの動力学を、一般的なエピトランスクリプトーム修飾であるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)と結び付けることによってなされた。TEMPOmapはまた、ニューロンがmRNA輸送と分散型タンパク質合成を必要とする精巧な構造を持っているため、神経科学の生化学的基礎を研究することも可能にする。この方法を使用して、ニューロンが環境刺激に応答してどのように適応および変化するかを、RNAの局在化、RNAとタンパク質の相互作用、および局所的翻訳の観点から決定する。TEMPOmapは多用途のプラットフォームであり、遺伝子発現が多くの異なる細胞および組織型においてどのように動的に処理されるかを理解し、転写後調節の広範な影響を判断するために、使用することができる。

【0142】

TEMPOmap法の設計および原理。新生RNAの選択的かつ効率的な捕捉を実証するために、HeLa細胞をヌクレオシド類似体5-EUに曝露して、ケミカルハンドルを標識転写産物上に作成した(図2A)。次に、アジド修飾DNAオリゴ、またはDNA「スプリント」を設計し、透過化処理した細胞と共にインキュベートし、銅(I)触媒によるアジド-アルキン環化付加(CuAAC)を介して標識mRNAに共有結合させた。この生体直交性のDNA-RNA抱合により、新生に転写されたRNAの選択的修飾を確実にし、アルキン官能基を欠いた転写産物が検出されなくなる。次に、mRNAのエキソン領域を標的とする、プライマーとパドロックの対のライブラリを設計した。プライマーとパドロックが標的mRNAにハイブリダイズすると、スプリントが同じmRNA上に近接している場合にのみ、5'リン酸化されたパドロックが環状になってRNAに連結された。さらに、ほとんどの蛍光in situハイブリダイゼーション(smFISH)実験における自己蛍光および散乱を克服するために、in situ酵素反応を実施して、パドロック配列を鋳型として増幅した。このため、単一プローブの非特異的ハイブリダイゼーションを、同じ遺伝子を標的とするプライマーとパドロックの対を利用することでさらに低減し、プライマーとパドロックが同じRNAに独立してハイブリダイズする場合にのみ、ローリングサイクル増幅(RCA)が可能になるようにし、cDNAナノボール(アンプリコン)の形成をもたらした。したがって、この3パートDNAプローブ設計(スプリント、プライマー、およびパドロック)を使用して、時間および配列制御された転写産物の増幅が、2段階の閾値戦略を介して達成された(図2c)。

【0143】

RCAの間、アミン修飾ヌクレオチドを増幅反応に加えて、アンプリコンをアミン基で機能化した。次にアクリルアミド官能基を、メタクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MA-NHS)により、アミンアンプリコンに化学的に追加した。内因性転写産物の物理的位置を保存するために、アクリルアミド修飾アンプリコンを重合中にヒドロゲルモノマーで架橋することにより、DNAヒドロゲルハイブリッドを作成し、アンプリコンをヒドロゲルネットワークに固定した。このハイブリッドは、化学的に抱合されたアンプリコンを保持しつつ未増幅のRNAとDNAプローブの除去を可能にする、分子足場を構築する。さらに、試料の安定性も大幅に向上され、その後の高分解能画像化が可能になった。最後に、各パドロックでは、固有のバーコードがパドロックの両面にコードされ、片面はそれぞれのプライマーによる直交配列認識に使用され、もう一方の面はSEDAL配列決定による逐次塩基読出しおよび解読に使用されて、単一細胞トランスクリプトームの高度に多重化された検出が達成された。

【0144】

この方法を、パルスチェイス実験と組み合わせた。約1000個の遺伝子をコードするRNAを異なるチェイス期間後に捕捉し、異なる時点でそれらの位置を統合することによ

って、時空間的軌道の再構築のためにトレースした(図2B)。この方法により、代謝標識転写産物がエンリッチされ(図2D)、かつ調整可能な時間経過にわたる遺伝子発現の変化が確実に検出された(図2E)ことが実証された。厳密な2段階の閾値処理原理が適用されることを考慮すると、このアプローチにより、高い信号対雑音比でほぼゲノム規模のトランスクリプトーム読出しが達成されることが、さらに実証された。

【0145】

3パートDNAプローブ設計。TEMPOMapで使用される3パートDNAプローブの配列設計を、図3に示す。3パートプローブは、DNAスプリントプローブ、プライマープローブ、およびパドロックプローブで構成される。スプリントは、2つの領域:ポリAリンカーとスプリントパドロックアニーリング領域に分割される。ポリAリンカーは50個のアデノシンヌクレオチドを含有し、これによりスプリントに、近くのパドロックに到達するのに十分な長さが提供される。スプリントパドロックアニーリング配列は、スプリントとパドロックのハイブリダイゼーションを可能にし、ライゲーションステップでシール可能な「ニック」を有する二本鎖DNA領域が作成される。5'リン酸化パドロックは、スプリントパドロックアニーリング領域、同じバーコードの2つの領域、プライマーパドロックアニーリング領域、目的のmRNAを標的とする20ntハイブリダイゼーション配列、およびいくつかの短いリンカーで構成される。ライゲーションすると、パドロックが環状になり、in situ酵素増幅のためのDNA鋳型になる。プライマーは、一致するパドロックのバーコードに逆相補的な遺伝子固有の領域、同じくパドロックに相補的な4塩基配列、およびmRNAを標的とする20ntハイブリダイゼーション配列を含有する。プライマーおよびパドロック上の2つの20ntハイブリダイゼーション領域は、mRNA上で互いに1~2塩基隣り合って存在する。プライマーとパドロックが結合すると、プライマーは増幅開始剤として機能し、パドロックの配列が増幅されてcDNAアンプリコンが生成される。

【0146】

標識プローブ標的化遺伝子のエンリッチメントを検証するために、陰性対照条件を、ヒトβアクチンmRNA(ACTB)のみを標的とする試験条件と比較した。図2Dに示すように、5-EUで15時間パルスし、TEMPOMap設計に従って処理したHeLa細胞は、量子化アンプリコンシグナルの高い蛍光強度を示し、そのほとんどは細胞周辺に位置していた。このRNA局在の明確な傾向は、細胞骨格の一部としてのβアクチンタンパク質の内因性の機能と位置を反映しており、ヒトACTB遺伝子の局所的翻訳も証明された。対照的に、5-EU標識、スプリント、またはプライマーとパドロックの一致するペアを持たない対照は、シグナルを示さないか、またはほとんど示さなかった。標識されていないシグナルに対する5-EU標識されたシグナルの信号対雑音比は、標識された新生転写産物の顕著なエンリッチメントを実証した。

【0147】

HeLa細胞の末梢におけるACTB mRNAの発見に基づいて、この方法を、異なるパルスおよびチェイス時間の経過を与えた場合のmRNA核外輸送および移行の動力学を捕捉する能力について試験した。したがって、HeLa細胞において、新たに合成されたRNAを5-EUで1時間パルス標識し、細胞を様々な時間洗浄した(図1D、左)。次にTEMPOMapを適用して、様々な長さの洗浄時間にわたるACTB転写産物の移行を検出した。画像は、核から細胞質への核外輸送の軌道の明らかな傾向を示した(図1D、右)。したがってこの方法は、実際に新生転写産物を捕捉およびエンリッチメントし、これらのRNAの移行および動力学を検出可能であると結論付けられた。

【0148】

例2:RNA m⁶Aメチル化のプロファイリング

高等真核生物のmRNAは、重要な転写後調節により遺伝子発現中に広範囲に修飾される。これらの多様に修飾されたヌクレオチドの中で、N⁶-メチルアデノシン(m⁶A)は、真核生物の転写産物上の最も一般的な内部マークである。m⁶Aの機能および特徴は徐々に解明されている。m⁶A部位モチーフを認識するm⁶A「リーダー(readers)」のグルー

ブなどのRNA結合タンパク質が発見されており、RNA調節の分子機構について貴重な洞察を提供している。

【0149】

m⁶Aリーダーの1つのクラスには、YTHドメインファミリー1~3(YTHDF1-3)およびYTHドメイン含有1~2(YTHDC1~2)が含まれる。それらの共通の進展(evolutionary)関係および類似するRNA基質にも関わらず、これらの各タンパク質の生物学的機能は独特である。例えば、YTHDF2は、標的RNAを細胞のRNA崩壊(decay)部位に引き寄せることで、その標的RNAの安定性を調節する;YTHDF1は、翻訳因子を動員することでmRNAの翻訳を促進する;YTHDF3はYTHDF1-2と連携して機能し、RNAの分解と翻訳の両方を促進することが示唆されている。対照的に、YTHDC1は、スプライシング因子および核外輸送アダプタータンパク質と相互作用することによって、核外輸送およびmRNAスプライシングを促進するが、YTHDC2は、精子形成中に重要な役割を果たす。これらのm⁶Aリーダーは機能を協調的に発揮して、多層調節を達成し、m⁶A修飾転写産物の表現型の結果を微調整する。

10

【0150】

m⁶A修飾mRNAの調節と細胞内のそれらの空間的位置との間の関係は、系統的に検討されていない。RNAの機能はその細胞局在化とトラフィックに強く関連しているため、TEMPOmap法によりエピトランスクリプトーム調節の分子機構についてさらに詳しい洞察が得られるかどうかを検討した。このために、1000個のm⁶Aプロセッシング関連遺伝子のリストが厳選され、そこから標的化プライマーおよびパドロックプローブが設計されて、それらの時空間動力学をTEMPOmapを使用して検出およびプロファイリングした。このアプローチは、時空間におけるRNA m⁶Aメチル化プロセッシングの画像ベースの説明を提供し、この転写後修飾を調節する複雑なネットワークが明らかになった。

20

【0151】

1000個の遺伝子のリストには、m⁶A存在量が極めて高いまたは低いRNA、およびYTHDF1-3およびYTHDC1-2によって確実に認識されるRNAをコードする遺伝子が含まれていた。このリストにはまた、m⁶Aのプロセッシング(付加、認識、除去など)に関連する遺伝子も含まれている。さらに、RNAの局在の解析を支援するための、細胞内位置マーカーとして機能する遺伝子が含まれており、異なる時間経過での細胞の可視化を支援するための、細胞周期で活性な遺伝子も含まれている。野生型HeLa細胞における上記の遺伝子の研究に加え、YTHDF1-3、YTHFC1-2、およびm⁶AライターMETTL14およびMETTL3を標的とする短鎖干渉RNA(siRNA)で細胞を処理することにより、7つの遺伝子が独立してノックダウンされた;これはRNAにメチル化をインストールする。次に、これら1000個の遺伝子のin situでの発現を対照およびノックダウン試料と比較し、転写および転写後のin situプロファイリングの変化を捕捉した。METTL14/3、YTHDF1-3、およびYTHDC1-2の独立した役割によって確認されたことから、mRNAの輸送およびトラフィックは、遺伝子ノックダウンによって多かれ少なかれ影響を受けるはずであると想定された。

30

【0152】

これらのsiRNAによる遺伝子ノックダウンの効率を検証するため、siRNA標的遺伝子の発現(または発現の欠如)を検出するためにSTARmapを使用して最初の試験を実施し、この試験を未処理の野生型細胞と比較した。培養細胞の各ウェルを、最初に1種類のsiRNAで処理し、細胞が2日間増殖した後、すべての細胞を1つのウェルにまとめてプールし、一晚増殖させた。次に、STARmapプロトコルを適用して、単一細胞における7つの遺伝子の発現を、2ラウンドのin situ配列決定を使用して検出した。HeLa細胞の8つの異なるクラスターが、遺伝子発現の解析後に発見され、7つのクラスターはYTHDF1-3、YTHDC1-2、およびMETTL14/3ノックダウン細胞を表し、1つのクラスターはsiRNAトランスフェクションなしであった(図4)。この方法は、siRNAの同じ群で処理した場合に、1000個の遺伝子の遺伝子発現をプロファイリングするように拡張することができる。

40

50

【0153】

siRNAトランスフェクションの成功が確認された後、7つの遺伝子(および対照siRNAトランスフェクション)のノックダウン実験をHeLa細胞で繰り返した。トランスフェクションの6時間後、8つの細胞集団と一緒にプールし、6つの群に均等に分割した。次に、1つの群を200 μ Mの5-EUで約15時間、固定前に標識した。翌日、残りの5群の非標識細胞を、200 μ Mの5-EUと共にそれぞれ1時間インキュベートし、新鮮な培地(200 μ Mの5-EUを含む)と、それぞれ0、1、2、4、および6時間交換した。続いて、TEMPOmapを実施し、実験は1000個の遺伝子を検出できるようにスケールした。SEDAL配列決定の生画像を収集した。

【0154】

異なる長さのパルスチェイスで処理した6つの細胞群から生画像を収集した後、画像を最初に計算ワークフロー(図5)を使用して前処理して、読取りを抽出し、検出された遺伝子を定量化した。次に、データ内の多層情報を解析した。TEMPOmapは、時空間的に分解された多重化in situ RNA検出を可能にする、最初の実験方法である。

【0155】

データ解析は2つの層に分けられる:攪乱されていない細胞のみにおけるRNAの解析と、遺伝子ノックダウンを伴う細胞におけるRNAの変化の解析。最初の層では、RNA移行と半減期の変化を、様々な時点でのRNA読取りの位置および定量化を比較することによって調べる。パルスチェイスデータも、細胞の定常状態にあるRNAを表す15時間の標識データと比較する。次に遺伝子のエンリッチメントを、ある時点での特定の細胞内領域において調べ、および/または異なる細胞内領域へのRNAの移動性/不動性を調べる。遺伝子の興味深い共局在化または共移行を使用して、データを解析することもできる。同様に、RNAの半減期または分解速度を計算し、半減期と位置の間の特有の関連性をさらに調べることができる。同様に、特定の細胞内領域への移行が半減期の長短に関係しているのか、あるいは移行速度自体が半減期に関係しているのかを判断することも可能である。続いて、同様の活動または挙動を共有するRNAの特定の群にGO termがエンリッチされているかどうか、またはRNAの異なる「クラスター」が異なる生化学的役割を持っているかどうかを解析し、そこから m^6A プロセッシング経路のより詳細な機構研究が、RNA局在の観点から実施される。

【0156】

第2層において、第1層の攪乱されていない細胞の解析を遺伝子ノックダウン細胞の解析と組み合わせて、 m^6A ライターおよびリーダーのいずれかがRNA細胞内トラフィッキング、局在化、および/または安定性に関与しているかどうかを調べる。YTHDF1が標的mRNAのリボソーム占有を促進し、YTHDF2がRNAの安定性に影響を与えることは十分に検証されており、観察されたこれらの因果関係は、未だ発見されていないRNAの空間局在化およびトランス局在化によって部分的に説明できる可能性が高い。特定の遺伝子のノックダウンによって誘導される変化を探すことに加えて、 m^6A プロセッシング経路に沿った任意の遺伝子の抑制が、空間トランスクリプトームプロファイルの普遍的な変化を引き起こす可能性もある。

【0157】

この例は、 m^6A 代謝に関連する最大1000個の遺伝子のmRNAレベル、半減期、および移行の解析を実証する。この方法は、転写後の修飾を超えて、生体分子の空間的文脈および細胞の形態的文脈によって影響を受けるあらゆる生物学的現象の研究に使用することができる。

【0158】

例3:ニューロンおよび3Dの無傷の組織におけるRNAの可視化

TEMPOmapはまた、神経科学における重要な問題を解決するために適用することもできる。ニューロンの軸索と樹状突起は細胞体から最大数十ミリメートル離れた空間に広がっているため、これらの領域のプロテオームが刺激を感知し、遅延なく反応することは、非常に注目に値する。TEMPOmapを使用して、ニューロンのmRNA輸送と遠位のRNA-

10

20

30

40

50

タンパク質の相互作用を可視化することができる。TEMPOmapは培養ニューロンに適用でき、TEMPOmapのワークフローは無傷の組織を処置するために最適化することができる。TEMPOmapは、細胞の10層に相当する100ミクロンの厚さの組織を、均一に検出することを可能にした。TEMPOmapは、マウスを外部刺激で処置する際に、マウス脳スライスに使用することができる。

【0159】

ニューロンにおけるTEMPOmapの能力を実証するために、現在の実験ワークフローを固定ニューロン培養に適用することができ、初期試験を、ACTB mRNAのみを検出するために実施することができる。ニューロンはKClで刺激でき、パルスチェイス実験を、KCl刺激後に行うことができる。ニューロン刺激後に最も高度に発現された、活動が調節された遺伝子を標的とするTEMPOmapプローブを使用して、これらの遺伝子の動力学の捕捉を試験する。ゲノムワイドなCRISPRスクリーニングをニューロンで実施でき、mRNAトラフィッキング、RNA-タンパク質相互作用、および局所翻訳に関連するmRNAを標的とする、約1000個の遺伝子プローブを設計して、RNAの遠隔移行および翻訳機構のメカニズムの画像ベースの研究を系統的に提供することができる。さらに、シナプスにおけるエピトランスクリプトームプロセッシングも調べることができる。TEMPOmapの使用は、mRNAプロセッシングと、シナプス形成および経験依存性の可塑性などのニューロン活動との関係について、より多くの洞察を提供することができる。

【0160】

代替的に、RNA動力学も組織生理学にとって重要であるため、TEMPOmapの実験ワークフローを最適化して、3D in situ配列決定の可能性を実現することができる。したがって、空間トランスクリプトミクスの利点を活用して、この方法は、細胞を新しい動的観点から区別および類別し、細胞の組織へのマッピングを可能にする。ワークフロー内の個々の化学的および酵素的ステップを変更して、3D可視化への互換性を持たせることができる。

【0161】

例4:細胞以下の分解能での時空間分解トランスクリプトミクス

遺伝子発現は、RNAライフサイクルの複数のステップ、すなわち転写、プロセッシング、核外輸送、翻訳、および分解において動的に調節される。多細胞生物内の機能的に多様な細胞型における遺伝子調節機構を理解するには、細胞型特異的なRNAの局在化および動態(kinetics)の測定が必要である。単一細胞RNA配列決定(scRNA-seq)技術は、単一細胞レベルでのトランスクリプトーム測定を可能にし、トランスクリプトームプロファイルによって細胞型を再定義した。空間トランスクリプトーム法の最近の開発により、細胞転写産物を同時に計数し、組織構造の文脈における空間的に分解された分子細胞タイピングのために、in situでその空間情報を追跡することがさらに可能となった^{1~11}。並行して、単一細胞の代謝標識実験により、新生トランスクリプトームを既存のRNAから分離することが、RNA代謝プログラムおよび、外部刺激に応答した即時の調節変化を特定するために必要であることが明らかになった¹²。

【0162】

しかし、RNAの空間的局在化とRNA生合成、核外輸送、および分解の動態をトランスクリプトームスケールで同時に測定するための統合された方法は、依然として存在せず、発生、環境、代謝、および病的信号によって引き起こされる動的な調節スキームを理解する能力が制限されている。

【0163】

かかる技術的ギャップを埋めるために、時空間分解トランスクリプトーム法が開発された。以前に、空間分解転写産物アンプリコンの読出しマッピングのための方法(STARmap、図6A)¹が開発され、ここでは、化学的に機能化されたcDNAアンプリコンがポリアクリルアミドマトリックスに共有結合されて、厳密な組織除去および生体分子プロセッシングを可能にした。この例では、STARmapへの時間次元の追加について説明した。mRNAは、化学的に修飾された重合性ヌクレオシドで代謝標識され、修飾された転写産物はポリ

マーマトリックスに直接結合される。

【0164】

現在のSTARmapプロトコルは、アクリレート修飾DNAアンプリコンをポリアクリルアミドヒドロゲルマトリックスに共有結合させるが、これはmRNA保持の能力が限られていることが実証される架橋方法である。この例において、代謝標識RNAは、ヒドロゲルに直接結合された。この方法は、架橋効率を高めるための解決策を提供し、標識されたRNAを優先的に結合することにより、これは、経時的な試料解析のためのパルスチェイス実験^{1,2}と互換性がある(図6B、t-STARmap)。mRNAは最初に5-EUで代謝標識され、標識された転写産物は、クリックケミストリーを含む2段階の合成を介して、ポリアクリルアミドヒドロゲルと架橋される。この合成スキームは、生体直交性標識戦略で一般的に見られる高収率の反応で構成されており、修飾RNAが、リンカー末端のアクリレート基を介してアクリルアミドゲルに結合するのを支援する。アクリレート基は、ポリアクリルアミドマトリックスのフリーラジカル重合に関与し、重合中にRNAをポリアクリルアミドヒドロゲル上にロックするためのリンクとして機能する。化学反応は、効率的なRNA-ヒドロゲルの架橋を提供するので、さらに指定されたRNA分子をSTARmapによって可視化することができる。

10

【0165】

次いで、パルスおよびチェイス実験(図2B)を、哺乳動物細胞培養物および動物モデルを用いて実施する。次にデータを解析して、細胞内での個々のRNAの時空間的軌道をさらにコンピュータ的に再構築する。t-STARmap法は、刺激(細胞周期、神経活動、ウイルス感染など)に応答した細胞の状態変化および機能器官における細胞型特異的遺伝子調節プログラムなどの、重要な生物学的問題を研究するために、使用することができる。

20

【0166】

例5:時空間分解トランスクリプトミクスのための新生RNA標識化学のさらなる使用

この例は、単一細胞における遺伝活性および代謝活性を検出および定量化するためのシステムを提供し、かつ、組織および臓器における細胞型、細胞状態、および細胞間相互作用の組成および変化を理解するためのプラットフォームを構築する、新規の画像ベースのin situ RNA配列決定方法について説明する。この技術は、単一細胞RNA配列決定に空間および時間分解能を提供することで、目的の細胞活動のハイスループットかつマルチモーダルな「オミクス(omics)」情報を提供する。

30

【0167】

in situ RNAハイブリダイゼーションおよび配列決定の方法が発明および開発され、単一細胞における遺伝子発現のゲノム規模のプロファイリングを明らかにし、かつ疾患を理解する能力を大幅に加速するためのツールを提供する。しかし、一定の期間枠にわたる遺伝子発現をプロファイリングするために、単一細胞におけるRNAの合成、輸送、および代謝回転を測定および予測する緊急の必要性が依然として存在する。ここで説明する方法論は、RNAに関する空間的、時間的、および単一分子の情報をハイスループットの様式で提供するという性質により、独特である。DNA転写産物の近接ライゲーションは、代謝標識、DNAバーコーディング、SEDAL逐次的配列決定¹などの、様々な既存のバイオテクノロジーツールと組み合わせられる。

40

【0168】

空間分解転写産物アンプリコンの読出しマッピング(STARmap)¹が開発されており、これは遺伝子発現の空間マッピングのための確実なin situトランスクリプトームツールである。この例では、単一細胞のトランスクリプトームを可視化するだけでなく、時間枠内のトランスクリプトームの変化も追跡する代替方法について説明する。この戦略(図7)は、mRNAを化学的に修飾されたヌクレオシドである5-エチニル-ウリジン(5-EU)で代謝標識し、標識されたmRNAを銅(I)触媒によるアジド-アルキン環化付加(CuAAC)を介してアジド修飾DNAプライマーと連結することにより、達成される。次いで、このRNAプライマー架橋イベントは、mRNAにハイブリダイズするパドロックプローブによって認識され、ローリングサイクル増幅によって増幅される。その後、増幅されたシグナルは

50

ヒドロゲル足場内に保持される。遺伝子固有の識別子は、各パッドロックプローブにコード化されており、mRNAの身元はSEDAL配列決定により、可視化および解読される。

【0169】

このアプローチは、ほぼゲノム規模でのトランスクリプトームのエンリッチメントおよび代謝標識転写産物の選択的保持を達成し、特定の時間経過にわたる遺伝子発現の変化を確実に検出できるであろう。HeLa細胞におけるヒト β -アクチン遺伝子(hACTB)の標的化を図8に示す;これは、5-EU非標識転写産物と比較して、保持された転写産物の顕著なエンリッチメントおよび、転写産物を様々な時間枠にわたって検出する能力を実証する。

【0170】

RNA動力学を、RNAのプロセッシング、翻訳、および分解に影響を与えることが示された豊富なエピトランスクリプトームマークであるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)の有無においても、定量化した。このRNA修飾の影響は、4つの代表的なRNAの動力学を検出することによって研究され、そのうちの2つはm⁶Aを含むが、他の2つはm⁶Aを含まない(図9)。画像では4色で表される4つの遺伝子が、同時に検出されることが実証された。RNA分解の画像ベースの測定は、第2世代配列決定を使用して以前に測定されたRNA半減期と合理的に相関しており、画像は4つすべてのRNAについて、RNA移行の傾向を明確に示す。

【0171】

例6:時空間分解単一細胞トランスクリプトミクスはRNAライフサイクルのキネティックスカルプティング(kinetic sculpting)を明らかにする

細胞トランスクリプトームの時空間的調節は、タンパク質発現を細胞機能の最終的実行へと指示するために重要である。RNAの合成、崩壊、核外輸送、および移行などの複雑な細胞内動力学は、既存のトランスクリプトミクス法の限界により不明瞭である。時間分解in situ配列決定およびマッピング(TEMPOmap)のための方法が、本明細書に記載される。この方法は、単一細胞での時間および空間にわたる細胞内遺伝子発現を明らかにする高度に多重化された3次元in situマッピング技法を表す。TEMPOmapを使用して、数千の遺伝子の重要な動態パラメータが、ヒト細胞のRNAライフサイクル全体を通して決定され、遺伝子機能、細胞内組織化、および細胞周期進行の文脈における遺伝子発現の多段階動態形成が明らかにされた。これらの時空間分解トランスクリプトミクス測定は、調節戦略がいかんして、キネティックスカルプティングを通じて時間および空間における正確な遺伝子発現を可能にするかについての理解を深める。

【0172】

緒言

細胞状態および機能は、遺伝子発現の時空間的に不均一な調節によって形成される。単一細胞で分解されたトランスクリプトーム全体の情報を時間および空間において系統的にプロファイリングする能力は、細胞および組織における転写および転写後の遺伝子調節機構を理解するために重要である。空間分解トランスクリプトミクス法により、組織形態の文脈における、異種細胞型からの遺伝子発現の統合プロファイリングが可能となった¹³~¹⁹。しかし、これらの空間トランスクリプトミクスのアプローチは、細胞および組織の静的なスナップショットのみを提供し、遺伝子発現の動的な流れは不明瞭である²⁰。対照的に、RNA代謝標識のアプローチは、新生単一細胞トランスクリプトームのプロファイリングを可能にしたが、空間的情報は不足する²¹~²⁵。さらに、生細胞の画像化は細胞内のRNAの軌道を直接追跡できるが、多重転写産物を同時に可視化することは依然として困難である²⁶。したがって、新生mRNAを誕生から死亡まで細胞以下および単一細胞の分解能でin situで追跡する、遺伝子発現をプロファイリングする時間分解かつ高度に多重化された空間マッピング法が、緊急に必要とされている。

【0173】

ここで、時間および空間におけるRNAライフサイクルのシステム全体の単一細胞解析を提供するために、細胞以下の分解能で経時的に新生トランスクリプトミクスの時空間的進展(evolution)を追跡する方法であるTEMPOmap(時間分解in situ配列決定および

マッピング)が開発された(図10A)。TEMPOmapは、時間ゲートされた新生トランスクリプトームの代謝標識および選択的増幅を、最新の三次元(3D)in situ RNA配列決定と統合させることを、200nmの分解能でヒドロゲル-細胞足場内に実現する¹³。正確に制御されたパルスチェイス標識実験を設計することにより、転写速度、細胞内領域での崩壊、核外輸送、および細胞質移行を含む、RNAライフサイクル中の数千の遺伝子の動態パラメータの完全なコレクションが、初めて同時にトレースされた。これらの時空間パラメータに照らして、様々な遺伝子のmRNAが、RNAライフサイクルの様々な段階で、および様々な細胞周期の期にわたって動態学的に分類され、最終的には分子および細胞の機能に役立つことが発見された。

【0174】

時空間分解トランスクリプトミクスのためのTEMPOmap

TEMPOmapは、細胞の5-エチニルウリジン(5-EU)による代謝標識で始まり^{25,27}、これは、標識されたmRNAに生体直交性ケミカルハンドルを追加する(図10B)。次に、3プローブセット(スプリント、パドロック、およびプライマー)を各遺伝子について設計して、代謝標識RNAに由来する相補的DNA(cDNA)アンプリコンを選択的に生成した(図10B~10Cおよび14B~14C):(1)スプリントプローブは、アジドおよびチェーンターミネーターで修飾されたDNAオリゴヌクレオチドであり、これは、銅(I)触媒によるアジド-アルキン環化付加を介して5-EU標識mRNAに共有結合し(CuAAC、図14A)、したがって非標識RNAを後続のcDNA増幅から排除する;(2)パドロックプローブは、20~25ヌクレオチド(nt)のcDNA配列と遺伝子バーコードを有するmRNA標的を認識し、これらは、スプリントプローブが近くにある場合に環状化され得る;(3)プライマープローブは、パドロックプローブの隣の隣接20~25ntを標的化し、これらはローリングサイクル増幅(RCA)を介して環状化されたパドロックをin situで増幅するためのプライマーとして機能し、標準蛍光in situハイブリダイゼーション(smFISH)における自己蛍光および散乱を克服するcDNAナノボール(アンプリコン)を形成する;(4)組み合わせ、3種類のプローブすべてが結合するmRNAのみが、標識されたmRNA集団の選択的検出のために、2段階の閾値戦略を介して標識と配列が制御された様式で増幅される(図10C~10D)。

【0175】

注目に値するのは、最初に設計された2プローブセットが、1つの遺伝子標的化パドロックプローブと1つの一般的なアジド修飾プローブを介して、スプリントとプライマーの二重の役割を果たすチェーンターミネーターなしで、5-EU標識RNAを認識することである(図14B)。しかし、2プローブ設計ではアンプリコンの強力なバックグラウンドシグナルが生じ(図14B)、これは、単一の遺伝子標的化パドロックプローブがより特異性の低い遺伝子検出を達成し、3プローブ設計におけるデュアルの遺伝子標的化プライマーおよびパドロックの対が、いくつかの状況においては理想的であり得ることを示唆する¹³。TEMPOmapプロトコルは、代謝標識転写産物を特異的にエンリッチさせ(図10D)、調整可能な時間経過にわたってβアクチンmRNA(ACTB)の細胞内局在の変化を確実に検出することが、観察された(図14D)。

【0176】

In situで生成されたcDNAアンプリコンライブラリは、その後、複数サイクルの蛍光画像化のためにヒドロゲルマトリックスに埋め込まれ、SEDAL(動的アニーリングおよびライゲーションによるエラー低減を伴う配列決定)を介して遺伝子コード化バーコードを解読し(図10Bおよび14C)¹³、数百から数千の遺伝子を同時に検出する。配列決定サイクルの完了後、アンプリコン読取りは次に登録され、解読され、細胞内および単一細胞分解解析のために、3Dセグメンテーションに供される(図11A)。

【0177】

単一細胞分解能での時間および空間におけるRNAライフサイクル

次にTEMPOmapを適用して、ヒトHeLa細胞における991個の遺伝子(981個のコードRNA、10個の非コードRNA)の焦点を絞ったリストのプロファイリングを行った

10

20

30

40

50

。STARmapプロブによる別の7つの遺伝子¹³もアンプリコン調製中に含まれ、これは、バッチ補正およびデータ正規化のための内部対照として、標識および非標識RNAの両方にハイブリダイズする(図14E)。次に、パルスチェイス実験^{15,28}を、1時間(hr)のパルス標識化と様々なチェイス時間(0、1、2、4、および6時間)、ならびに20時間のパルス標識化を有する1つの定常状態基準を使用して、実施した。(図11A)。全試料中のバーコードは、6ラウンドのin situ配列決定にわたって配列決定され、その後、最終ラウンドの細胞内区画染色(核および細胞質)により細胞体をセグメンテーションし、3Dで19,856個の細胞におけるアンプリコンの細胞内位置を割り当てた(図11B~図11C)。細胞質空間はさらに、距離比(DR)ベースの方法を使用して、中央領域(「中間」)と周縁部に分割された(図11D):各アンプリコンは、3Dにおいて核膜までの(dn)、および細胞膜(dc)までの最短距離によってそれぞれ測定され、DR値はdnとdn+dcの比として計算される。1時間のパルス標識後の、0時間~6時間のチェイス時間まで、細胞当たりの総RNA読取り値の減少、RNA分布の、核から細胞質への漸進的なシフト、および細胞質中央領域から周辺領域へのさらなる割り当てが観察された(図11B~11C)。注目すべきことに、核内に保持された読取りのかなりの部分(約40%)が、6時間のチェイス後でも依然として観察された。保持されたRNA分子を詳しく調べると、核対細胞質の読取り比が最も高いRNAには、長い非コードRNA(NEAT1、MALAT1)が含まれており、これは細胞画分からのRNAのディープ配列決定によって裏付けられていることが明らかになった(図15A)^{29,30}。注目すべきことに、核内に保持されたmRNA(KIF13A、LENG8、CCNL2、COL7A)も見出された。この観察は、mRNAの広範囲の核保持に関する以前の発見を裏付けるものであり、これは、細胞質遺伝子発現ノイズを緩衝する調節的役割として機能し得る^{31,32}。

10

20

【0178】

次に、1時間のパルス条件下のすべての細胞を、PHATEおよびDynamoを使用した単一細胞分解動的軌道解析のために、様々なチェイス時点(18,176細胞)でプールした(図11E、I)^{33,34}。結果は、チェイス時間の進行に沿った明確な軌道を示し、これは、時間的に分解された単一細胞の転写状態が容易に区別されて、遺伝子発現空間内で整理できることを示唆する。同じPHATE座標をRNA分解の動態ベクトルと重ね合わせると、RNAライフサイクルの進行に沿った単一細胞の軌道がさらに再現された^{34~36}。次に、パルスチェイスタイムラインによって定義されるRNAのライフサイクルが、細胞周期の進行とどのように一致するのかが問われた。このために、細胞を、マーカー遺伝子の新生発現に基づき、細胞周期スコアリングを使用して、3つの細胞周期の期(G1、G1/S、およびG2/M)に分類した(図16B~16C)³⁷。興味深いことに、細胞周期進行方向は、パルスチェイス時点の進行と直交している(図11E、II)。この観察は、TEMPOmapが、細胞周期に加えてRNAのライフサイクルに関する独立した時間的情報を提供できることを示唆する。

30

【0179】

TEMPOmapデータセットからの細胞内動力学を、次にさらに調査した。この目的のために、細胞ごとの核細胞質遺伝子行列を、軌道解析のために単一細胞核発現を細胞質発現と連結することによって、生成した(図11E、下)。単一細胞の一方方向性軌道を標識化時点と共に回復することとは別に(図11E、III)、G2/M細胞のごく一部が狭い軌道を形成し、別個の空間に投影されることが判明し、このグループのG2/M細胞における核細胞質RNAの分布が、残りのG2/M細胞とは大きく異なることを示唆する。これらの空間的に異なる細胞は、独自のRNA核細胞質分布を持つ有糸分裂を行っている細胞であると考えられた³⁸。実際、この軌道上の細胞は有糸分裂の異なる期にあり、その間、RNAは、G2細胞のものと比較して、クロマチン領域からほとんど排除されていた(図11E、V)。さらに、この独特の軌道の均一な方向は、有糸分裂の時間的進行とよく一致しており(図11E、V、5~8)、時間的な有糸分裂の遷移が細胞内RNA局在パターンによって推測できることを示している。その結果、時間ゲートされた核細胞質分布を共同利用することにより、この方法はG2細胞とM細胞を分離するだけでなく、有糸分裂の軌道も追跡し、

40

50

単一細胞の転写産物発現に加えて細胞周期進行のより高い時間分解能を提供する;ここでは、G2/M中RNAコピー数に変化はほとんどないが、有糸分裂の間は染色体からのRNAの劇的な除去があることが示されている³⁹。

【0180】

細胞周期にわたる細胞内RNA動態の定量化

RNAライフサイクル中の個々の動的ステップをさらに定量化するために、モデルを開発して、各遺伝子の6つの主要な動態定数、すなわち合成(α)、全細胞分解(β)、核分解(β_n)、核外輸送(λ)、細胞質分解(β_c)(図12A)、および細胞質移行(γ)(図12B)を推定した。物理的な細胞体積の、細胞内RNA読取りに対する潜在的な偏りを最小化するために、全細胞、核、および細胞質における各RNA種の濃度(読取り/ボクセル)に基づいて定数を推定した(図17A~17B)。モデルでは、 α および β が平均の全細胞RNA濃度を使用して最初に推定され、次に β_n 、 β_c 、および λ が平均の核および細胞質RNA濃度を併用することによって推定された(図17C)。モデルは、 $\alpha^{28,40}$ については0次速度(zero-order kinetics)を仮定し、 $\beta^{28,40}$ 、 β_n 、 β_c^{32} 、および $\lambda^{32,41}$ については品質管理のためのフィッティング閾値処理を伴う1次速度(first-order kinetics)を仮定した(991個の遺伝子のうち911個の遺伝子が $R^2 \geq 0.5$ である)(図17C)。並行して、各遺伝子のDR値を異なる時間にわたって計算し、すべての遺伝子について一定の移行速度を仮定して γ を当てはめた(図12B)。

10

【0181】

注目すべきことに、RNAの核外輸送は、以前のRNA速度に基づくモデル⁴⁰では一定であると考えられていたが、今回の結果は、一次仮定の下で λ^{41} は異なるRNA種間で実質的に変化し、これが核細胞質転写産物の存在量の恒常性を調節する可能性があることを示唆した。さらに、初めて、多数の遺伝子のRNAの細胞質移行を、1時間の分解能で系統的に同時に研究することができた。大部分の遺伝子は $\gamma > 0$ を有しており(図17E~17F)、核膜から細胞質膜への移行方向を示唆する。しかしながら、 $\gamma < 0$ ($R^2 > 0.5$)である遺伝子の小サブセットは、エキソソームおよび膜タンパク質に著しくエンリッチされており(図17G)、これは、サイトソルから小胞体への再配置イベント、または非ERアンカー型RNAの、ER関連RNAより速い分解速度の可能性を示している。異なるRNA分子の細胞質移行を指示する動態機構を調査するには、さらなる研究を行う必要がある(図17H)。

20

30

【0182】

次に、これらの動態パラメータ間の関係を、911個の遺伝子からなる行列を用いてこれらのペアワイズ相関をプロットすることにより調査した(図12C)。遺伝子セットは3つの分解定数間で正の相関を示し(β 対 β_n 、 β_n 対 β_c 、および β_n 対 β_c 、それぞれ $R = 0.86$ 、 0.39 、および 0.14)、最も高い相関は β と β_n ($R = 0.86$)であった。この観察は、RNAの安定性が主に固有の特色(配列、モチーフなど)によって形成されるが、異なる遺伝子は、核対細胞質ゾルRNA分解の異なる配分を有することを示唆した。さらに、分解と核外輸送との間に有意な相関関係が観察され(λ 対 β 、 β_n 、 β_c でそれぞれ $R = 0.45$ 、 0.36 、 0.14)、RNA崩壊と核外輸送との間に潜在的な動態カップリングがあることが示唆された。前述の相関関係にも関わらず、動態パラメータの他のペア間の相関は弱く($R < 0.1$)、これは、異なる細胞内領域での合成、輸送、崩壊、および移行の個々のステップが、RNAのライフサイクル中に異なる動態調節を受けることを実証した。

40

【0183】

次に、RNA動力学が細胞周期の期によって異なるかどうか我问われた。この目的のために、6つのパラメータの第2のペアワイズ相関分析を、異なる細胞周期の期で実施した(808個の遺伝子が品質管理に合格した;図12D)。興味深いことに、RNAライフサイクルの時空間的順序に従って、細胞周期の期において相関関係が低減する傾向が示されたことが観察された:RNA生成の初期段階では、3つの状態での α は高度に相関していた($R \sim 1$ 、図18A);核内での転写後プロセッシング中、 β_n と λ は両方とも中程度の相関を

50

有する($R \sim 0.7$ および 0.6 、図 18C~18D);最後に、RNAライフサイクルの終わり近くで、細胞質定数 β および γ は、はるかに弱い相関を有する($R \sim 0.3$ および 0.1 、図 18E~18F)。この観察により、RNAの様々な段階における動態ソーティングは、細胞周期の進行に応じて徐々に方向転換し、RNAはその時空間的調節に沿って、普遍的な調節の方向から様々な細胞状態での独立した調節へとシフトされることが明らかになった。したがって、細胞周期依存性のRNAの動態的景観(kinetic landscape)のプロファイリングから、細胞のライフサイクルの調節とRNAのライフサイクルの調節の間に関連性があることが実証された。

【0184】

以前の研究において、RNA合成速度が、G2/M期の方がG1よりも高いことが報告されたことは⁴²、注目に値する。 α と β の計算を、TEMPOMapデータおよび公開されているscEU-seqデータからの細胞当たりのRNAコピー数を使用して繰り返すと²⁵、一貫した結果が観察された:RNA合成速度がG2/Mにおいて約15%高いのに対し、細胞周期全体の分解速度は2つのデータセット間で異なる傾向を示しており、これは潜在的に細胞株が異なるためである(図18G~18H)。しかし、 α および β を、RNA濃度(α については単位核体積当たりのRNAコピー数、 β については単位細胞体積当たりのRNAコピー数)を使用して推定すると、様々な細胞周期段階での α および β の値の分布に、大きな変化は観察されなかった(図18I)。 α および β を、細胞当たりのRNAコピー数およびRNA濃度から推定して対比すると、以前の研究、すなわち、転写速度が染色体の利用可能な部位に比例し、かつ遺伝子発現の恒常性が細胞サイズによって調節されることを示したものと一致している⁴³。さらに、単一細胞の核細胞質PHATE包埋からG2期およびM期の細胞をサブセット化する場合(図16D)、有意に高い λ がM期に見出され、これは、有糸分裂中の染色体からのRNA除去の観察をさらに裏付ける(図18J、図11E、V)。

【0185】

動態定数と潜在的共調節機構(例:共有RNAモチーフおよびRNA結合タンパク質)との間の相関関係を考慮して、次に、異なる遺伝子がRNAライフサイクルおよび細胞周期の文脈で共有の動態パターンを進化させた可能性があるかどうか我问われた。18のパラメータ(3つの細胞周期段階にわたる6つの動態定数)を使用したクラスタリング解析により、4グループの異なる動態的景観が明らかになった(図12E)。クラスターを詳しく調べると、以下が示される:合成が遅く(α が低く)、安定性が高く(β が低く)、核外輸送が遅い(λ)遺伝子は、ヘリカーゼ活性およびその他のATP結合機能においてエンリッチされていた(クラスター0); α が低く、 β と λ が中程度の遺伝子(クラスター1)は、転写において強くエンリッチされていた;不安定で急速に核外輸送されるRNA(高い β および λ)を有する遺伝子(クラスター2)は、ユビキチン化および膜タンパク質に関連するtermでエンリッチされていた;より速い合成(高い α)、より高い安定性(低い β)、およびより速い核外輸送(高い λ)を有する遺伝子(クラスター3)は、mRNAスプライシングおよびミトコンドリア機能などの構成的細胞プロセスにおいてエンリッチされていた(図12F)。さらに、これらの遺伝子グループの空間パターンを比較した(図12G)。クラスター0と3の遺伝子は細胞質でより優勢であるように見えるのに対し、クラスター1と2は時間の経過と共に核内でより多く保持されることが観察された。3つの細胞内領域における4つのクラスターのRNA読取りは、この観察をさらに裏付け、動態学的に分類された遺伝子が異なる時空間分布をもたらし得ることを示した(図18H)。

【0186】

遺伝子機能による差次的RNA動態ソーティング

RNA動態によって定義される遺伝子クラスターからのGO termの差次的エンリッチメントを考慮して(図12F)、RNAライフサイクルの動態の特色が、どのように遺伝子機能に役立つかをさらに調査した。潜在的に共調節されるRNAは、前述のパルスチェイスHeLa細胞試料からの991個の遺伝子のペアワイズ単一細胞共変動分析を通して、最初に識別された(1時間のパルス、0~6時間のチェイス、図13A)。ヒートマップ上のすべての時点にわたり、行列での共同遺伝子ソーティングを使用して、有意な遺伝子間相関を

10

20

30

40

50

有する遺伝子の2つのグループが識別され、その相関係数は0時間から6時間のチェイスまで増加し続け(図13B、図19A)、これは、RNAのプロセッシングと崩壊による、遺伝子の共調節パターンのキネティクスカルプティングの可能性を示す。注目すべきことに、グループ1および2の遺伝子では両方とも細胞周期関連機能がエンリッチされている(図13C、右下、グループ1について $p < 0.05$;グループ2について $p < 1e-04$)、それらはRNAの動態において大きく異なる:グループ1は、より速いRNAプロセッシングを伴う動態クラスター2および3の遺伝子で構成されており、その遺伝子の共変動パターンは、合成後0~2時間で直ちに明らかであった;対照的に、グループ2では、共変動パターンが合成後2時間から6時間まで徐々に出現した、より遅いRNAプロセッシングを伴う動態クラスター0および1からの遺伝子がエンリッチされている(図12E、図13Bおよび13D)。この観察は、転写ステップと転写後のステップで異なる動的な特色を持つRNAが、協調して細胞周期の進行を共同で形成していることを示唆する。

10

【0187】

次に、RNAの動態的景観を、異なるカテゴリーの分子機能にわたって系統的に比較した。991遺伝子のリスト(図19B)の上位3つの機能カテゴリーは、DNA結合(97遺伝子)、RNA結合(28遺伝子)、および細胞間結合(25遺伝子)である。3つの遺伝子カテゴリーにわたる6つの動態パラメータを比較すると、DNA結合遺伝子は、RNA結合遺伝子および細胞間結合の分子機能を有する遺伝子よりも、著しく速いRNA崩壊を有することが判明した(図13E、 $p = 4.6e-03$ および 0.036)。細胞周期段階にわたる3つの機能カテゴリーからの動態パラメータのさらなる遺伝子相関分析により、RNA動態の異なる共調節パターンが明らかになる(図13F)。具体的には、RNAライフサイクルの上流から下流にかけて、DNA結合タンパク質として機能する遺伝子は、核RNAが分解されるまで高い相関を示した(β_n 、 $R \sim 0.8$);RNA結合機能の遺伝子は、細胞質RNA分解まで動態学的に相関しており(β_c 、 $R \sim 0.6$)、一方、細胞間結合の遺伝子は、細胞質移行において拡大された高い相関を示し(γ 、 $R \sim 0.5$)、これは、それらの遺伝子がDNA結合タンパク質と比較して、細胞質RNAの崩壊と局在における追加の共調節機能を持っていることを示す。これらの観察はさらに、RNAがその分子機能を果たすために動態学的に分類されるという概念を裏付ける。

20

【0188】

最後に、RNA動態を、重要な役割を果たすRNAの重要な転写後化学修飾であるN6-メチルアデノシン修飾(m^6A)の文脈において調査した^{44,45}。 m^6A はRNA崩壊を促進することが知られているが、しかし、 m^6A -RNAの動態調節の全体の景観は系統的に扱われていない。この目的のために、 m^6A 修飾を伴うRNAと修飾を伴わないRNA(m^6A -RNAまたは非 m^6A -RNA、図19C)をコードする遺伝子を分離した。以前の報告と一致して、 m^6A -RNAは安定性が低かった(より高い β 、図13G)⁴⁶。さらに、同じ傾向が、 m^6A と非 m^6A の β_n と β_c をそれぞれ比較した場合にも観察され、 m^6A メチル化の調節が、核と細胞質の両方のRNA崩壊により達成され、これは細胞周期の期全体にわたって一貫していることを示唆する(図19E)。対照的に、 λ の有意な差は、2つのグループ間で観察されなかった。以前の研究では、YTHDC1によって媒介されるmRNA核外輸送における、 m^6A の調節的役割が提案されている⁴⁷。したがって、YTHDC1の細胞的役割を確認するために、HeLa細胞を対照siRNAおよびYTHDC1 mRNAに対するsiRNAで処理し、対照細胞とノックダウン細胞を、機能的に関連する他の6つの遺伝子の発現に対して正規化された単一細胞YTHDC1読取りに基づいて分離した(METTL3/14、YTHDF1-3、YTHDC2、図19F)。以前の研究と一致して、YTHDC1標的化遺伝子の核対細胞質比は、非標的遺伝子よりも経時的に一貫して高く、YTHDC1ノックダウン時のRNAの核蓄積を示唆した(図19D、19G)。さらにこれらの結果は、YTHDC1ノックダウンによって誘導される核から細胞質へのかかる変化が、RNA核外輸送の変動速度に起因することを確認した(図19H)。この研究は、TEMPoMapを遺伝的摂動(例:RNAi)と組み合わせて、RNA結合タンパク質の機能を前例のない分解能で描写できることを例示する。

30

40

【0189】

50

考察

TEMPOmapは、単一細胞における時間および空間分解トランスクリプトミクスを同時にプロファイリングする新規なin situトランスクリプトームプラットフォームを構築し、これまでに達成されたことのない細胞以下の分解能でのマルチモーダル単一細胞トランスクリプトーム技術である。ここで説明する研究は、TEMPOmapを使用して、細胞とRNAの調節の調整可能な時間経過にわたる包括的な説明を提供し、生命の複雑な機構に対して細胞周期とRNAサイクルがどのように構成されるのかを支配する法則を解明する。RNAの動態パターンと遺伝子機能との強い相関関係が観察され、RNAライフサイクルのかかる機能指向型調節は、正確かつ経済的な方法で時空間的遺伝子発現を制御するために、生存とエネルギーの制約の下で進化した可能性がある⁴⁸。TEMPOmapはまた、ハイスループットの単一細胞機能ゲノミクス(例:CRISPRスクリーニング⁴⁹)と組み合わせて、RNAライフサイクルの動態的景観に影響を与える重要な分子の因子を決定することもできる。さらに、代謝標識条件を最適化することで^{27,50,51}、かかる方法論をex vivoまたはin vivoの組織試料に適用して、組織生物学における動的なイベントを系統的にプロファイリングすることができる。

【0190】

方法

化学物質および酵素。名称(供給者、カタログ番号)によりリストされている化学物質および酵素:Gel Slick Solution(Lonza、50640)。Plus One Bind-Silane(GE Healthcare、17-1330-01)。ポリ-D-リジン溶液、50 μ g/mL(ThermoFisher、A3890401)。超純蒸留水(Invitrogen、10977-015)。ガラス底24ウェルプレート(Greiner Bio-One、662892、およびMatTek、P24G-1.5-13-F)。#2マイクロカバーガラス、直径12mm(Electron Microscope Sciences、72226-01)。16%PFA、EMグレード(Electron Microscope Sciences、15710-S)。HPLC用メタノール(Sigma-Aldrich、34860-1L-R)。PBS、7.4(Gibco、1xの場合は10010-023、10xの場合は70011-044)。Tween-20、10%溶液(Calbiochem、655206)。Triton-X-100、10%溶液(Sigma-Aldrich、93443)。OminiPurホルムアミド(Calbiochem、75-12-7)。20 $\times$ SSC緩衝液(Sigma-Aldrich、S6639)。リボヌクレオシドバナジル複合体(New England Biolabs、S1402S)。酵母tRNA(Invitrogen、AM7119)。SUPERase $\cdot$ In(Invitrogen、AM2696)。5-エチニルウリジン(5-EU)(Invitrogen、E10345)。1.5 $\times$ クリックバッファー(Lumiprobe、61150)。L-アスコルビン酸(Sigma-Aldrich、A5960)。T4 DNAリガーゼ、5 Weiss U/ μ L(Thermo Scientific、EL0011)。Phi29 DNAポリメラーゼ(Thermo Scientific、EP0094)。10mMのdNTPミックス(Invitrogen、100004893)。BSA、分子生物学グレード(New England Biolabs、B9000S)。5-(3-アミノアリル)-dUTP(Invitrogen、AM8439)。BSPEG9(Thermo Scientific、21582)。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)。OminiPur SDS、20%(Calbiochem、7991)。Antarcticaホスファターゼ(New England Biolabs、M0289S)。DAPI(分子プローブ、D1306)。フラミンゴ蛍光タンパク質ゲル染色(Bio-Rad、1610491)。DMEM(ThermoFisher、11995)。FBS(HyClone、SH3007103)。リポフェクタミンRNAiMAX(Invitrogen、13778075)。アジド酪酸NHSエステル(Lumiprobe、63720)。Bio-Spin(登録商標)P-6カラム、SSC緩衝液(Bio-Rad、7326002)。

【0191】

TEMPOmap 3 プローブの設計および構築。TEMPOmap 3 プローブは、3つの別個のDNAオリゴヌクレオチドプローブのセット:スプリント、プライマー、およびパドロックを含有するように設計した。DNAスプリントは、40 μ Mの5'アミノ修飾スプリントオ

リゴ(Integrated DNA Technologies(IDT)製)を、25 mMのアジド酪酸NHSエステル(アジド-NHS)と共に0.1 MのNaHCO₃中室温で一晩インキュベートすることにより調製した。生成物をエタノール沈殿によって精製し、Bio-Spin(登録商標)P-6カラム(SSC緩衝液)に通した。

【0192】

代表的な配列グラフを図14Cに示す。プローブは次のように設計した:(1)5'アジド修飾スプリントを2つの領域に分割する:12 ntのスプリントパドロックアニーリング配列に接続された50 アデノシンヌクレオチドを含有するリンカー。酵素による増幅から保護するために、スプリントは、3'末端の逆位dTおよび、オリゴの3'末端の最後の3つのヌクレオチド上にホスホロチオエート結合を含有する。スプリントパドロックアニーリング配列により、同じRNA上でスプリントとパドロックのハイブリダイゼーションが可能になり、ライゲーションステップでシール可能な「ニック」を有する二本鎖DNA領域が作成される。(2)5'リン酸化パドロックは、相補的なスプリントパドロックアニーリング配列、同じ5 nt バーコードの2つの領域、10 ntのプライマーパドロックアニーリング配列、特異的RNA結合のための19~25 ntの標的領域、およびいくつかの短いリンカーで構成される。(3)プライマーは、別の19~25 ntの標的領域、2 ntのミスマッチ塩基、5 ntのリンカー、および一致するパドロックのバーコードに逆相補的な5 ntの遺伝子固有の配列を含有する。プライマーとパドロックの各セットの2つの標的領域は、同じmRNA種上で互いに1~2塩基隣り合って存在する。

【0193】

プライマーおよびパドロック上の標的領域選択の詳細な手順は、前述のように適用した¹³。簡単に言うと、最も短いアイソフォームおよび、非コードRNAを除くコード領域のみを考慮した。Picky2.2を使用して、長さ範囲40~46 ntの各プローブ対上の標的配列を設計し、6つの配列を各遺伝子に対して選択した。選択した領域の相補的DNA(cDNA)配列を、0~2 ntで区切られた20~25 ntの半分ずつに分割し、これには融解温度が最も一致するものが含有されていた。プローブをプールし、注文し、およびIDTにより製造された。SEDAL配列決定で使用する読み取りプローブと解読プローブは、Wang et al., 2018に従って設計および注文した。

【0194】

TEMPOmap2 プローブの設計および構築。TEMPOmap2 プローブ(スプリントおよびパドロック)を構築する場合、スプリントプローブの設計は3プローブのセクションで説明したものと同じであった。各パドロックプローブは、3プローブ設計に記載のようにして選択された40 ntの標的領域を含有し、各遺伝子に対して5つの配列を選択した。

【0195】

HeLa細胞培養およびsiRNAノックダウン。この研究で使用したヒトHeLa細胞株は、ATCC(CCL-2)から購入し、10%FBSを補充したDMEM(Gibco、11995)培地で増殖させた。細胞を、前処理した24ウェルのガラス底プレートにプレーティングし(次のセクションで説明する処理)、siRNAノックダウン前に5%CO₂、37℃で増殖させた。QiagenのAllstars陰性対照siRNA(SI03650318)を、ノックダウン実験の対照siRNAとして使用した。YTHDC1 siRNAはQiagenに注文した(SI04225851)。トランスフェクションは、siRNA用のLipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)を使用して、製造業者のプロトコルに従って実施した。

【0196】

siControl対siYTHDC1(KD)細胞を比較する下流解析については、in situ配列決定およびTEMPOmapデータセット処理(以下を参照)の後、まず、対照細胞とKD細胞を、STARmapプローブによって標的化された他の6つの機能的に関連する遺伝子の平均RNA発現に対して正規化された単一細胞YTHDC1読取りに基づいて分離した(METTL3/14、YTHDF1-3、YTHDC2、図14E)。次に細胞を、上位25%の正規化YTHDC1読取りを対照細胞(n~5000)として、および下位25%をKD細胞(n~5000)として使用した。

10

20

30

40

50

【0197】

TEMPOmap実験手順。24ウェルのガラス底プレートを、1%のメタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン(Bind-Silane)およびポリ-D-リジン溶液で、細胞をプレATINGする前に順次処理した。次いで、細胞をコーティングされたプレート上にプレATINGし、37℃、5%CO₂の湿潤培養インキュベーター内の増殖培地(10%FBS含有のDMEM)中で維持した。パルスチェイス実験は、200μの5-EUを用いて実施し、細胞培地で指定された時間洗浄した。代謝標識および洗浄の後、細胞を1.6%のPFAでPBS中10分間固定し、あらかじめ冷却した(-20℃)メタノールで、-80℃で30分間透過処理した。次に試料を-80℃から取り出し、室温まで平衡化し、10mMのTris、pH7.5および0.1mg/mLの酵母tRNAを補充したPBSTR(PBS中、0.1%のTween-20、0.1U/μLのSUPERase・In)を含有する緩衝液で10分間クエンチした。

10

【0198】

新生にエチニル化されたRNAを機能化するために、5'アジド修飾DNAスプリント(5μM)を1×Lumiprobeクリックケミストリー緩衝液に添加した。CuAACは、アスコルビン酸塩(800μM)を添加することによって開始した。反応混合物を37℃で1時間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。次に、試料をPBSTRで37℃で10分間、2回洗浄した。

【0199】

TEMPOmapプライマーおよびパドロックプローブ(991個の遺伝子を標的とする)のライブラリおよびSTARmap SNAILプローブのセット(METTL3/14、YTHDF1-3を標的とする)を別々にプールし、IDTに注文した。4つのプローブプールはすべてRNaseフリーの超純水に溶解し、保存のためにオリゴ当たり100nMになるようにした。次いで、プローブ混合物を90℃で5分間加熱し、氷上で冷却した。続いて試料を、オリゴ当たり2nMのTEMPOmapプローブとオリゴ当たり10nMのSTARmapプローブを添加した1×ハイブリダイゼーション緩衝液(2×SSC、10%ホルムアミド、1%のTween-20、20mMのRVC、0.1mg/mLの酵母tRNA、0.2U/μLのSUPERase・In)中、40℃の加湿オープン内で14~16時間穏やかに振盪しながらインキュベートした。次に、試料をPBSTRで2回、高塩緩衝液(PBSTR中の4×SSC)で1回、各回37℃で20分間洗浄し、洗浄後にPBSTRでもう1回すすいだ。次に、試料を室温でT4 DNAライゲーション混合物(1:20希釈のT4 DNAリガーゼ、1×BSA、および0.2U/μLのSUPERase・In)と共に、穏やかに振盪しながら2時間インキュベートした後、PBSTRで2回洗浄した。続いて、試料をRCA混合物(Phi29 DNAポリメラーゼの1:20希釈、250μMのdNTP、20μMの5-(3-アミノアシル)-dUTP、0.2U/μLのSUPERase・In、1×BSA)と共に30℃で穏やかに振盪しながら2時間インキュベートし、次にPBST(0.1%のTween-20を含むPBS)で2回洗浄した。次に、試料を室温で0.1MのNaHCO₃中の25mMメチルアクリル酸NHSエステル(MA-NHS)で2時間処理した後、PBSTで1回洗浄した。

20

30

【0200】

ゲルをキャストするために、試料をまず、0.2%のTEMEDを補充したモノマー緩衝液(4%アクリルアミド、0.2%ビスアクリルアミド、2×SSC)と共に室温で15分間インキュベートした。緩衝液を除去し、30μLの重合混合物(0.2%硫酸アンモニウム、モノマー緩衝液に溶解した0.2%のTEMED)を試料の中心にゆっくりと加え、これを直ちに、Gel Slickでコーティングされたカバースリップで覆った。サンドイッチ状の重合混合物をN₂中で1時間インキュベートし、続いてPBSTで2回洗浄した。次いで、ゲル化した試料を脱リン酸化混合物(1:100倍希釈のAntarcticホスファターゼ、1×BSA)で室温で一晩処理し、続いてPBSTで2回洗浄した。

40

【0201】

TEMPOmap試料の画像化およびin situ配列決定。TEMPOmap画像化およびin situ配列決定は、Wang et al.(2018)の記載に修正を加えて実施した。簡単に言うと、6

50

ラウンドの4色共焦点画像化を、998の遺伝子測定に対して実施し、さらに、DAPI染色された核の検出、フラミンゴ染色された細胞形態、およびコンカナバリンAによる小胞体(ER)領域を含む最後の1ラウンドを、製造業者の指示に記載のように実施した。画像化の各ラウンドは、試料を配列決定混合物(1:25希釈のT4 DNAリガーゼ、1×BSA、10 μMの読み取りプローブおよび5 μMの蛍光解読オリゴ)と共に室温で3時間インキュベートすることで開始し、画像化前に、洗浄/画像化緩衝液(2×SSC、10%ホルムアミド)で各5分間ずつ3回すすいだ。画像取得後、試料をストリッピング緩衝液(60%ホルムアミド、0.1%のTritonX-100)で10分間2回処理し、その後PBSTで3回洗浄した。6ラウンドの画像化の後、DAPI染色細胞核、フラミンゴ蛍光ゲル染色細胞質、およびコンカナバリンA染色ERを画像化した。画像は、405ダイオード、白色光レーザー、および40倍の油浸対物レンズ(NA1.3)を備えたLeica SP8共焦点顕微鏡法を使用して取得した。各ラウンドについて、画像の取得は、488 nm、546 nm、594 nm、および647 nmの照明、30の焦点面で行った。画像化のボクセルサイズは200 nm×200 nm×350 nmであった。

10

【0202】

画像処理およびアンプリコンの解読。画像処理は、Wang et al. (2018)の記載に修正を加えて実施した。まず、画像デコンボリューションをHuygens Essential v20.10.1p2を用いて適用した。次に、デコンボリューションされた画像をMin-Max戦略により正規化し、ヒストグラム均等化によってさらに調整し、ここでは最初の配列決定ラウンドの画像を参照として使用した。さらに、カスタマイズされたトップハットフィルタリングを適用して、蛍光シグナルを強化した。各cDNAアンプリコンのバーコードをより適切に識別するために、グローバルレジストレーションと非剛体レジストレーションの両方を、前処理された画像に対して実施した。グローバル画像レジストレーションは、すべての翻訳オフセットにおける2つの画像ボリューム間の相互相関を計算するために、3次元高速フーリエ変換(FFT)を使用して実施した。最大相関係数の位置を識別し、これを用いて画像ボリュームを変換して、オフセットを補償した。非剛体レジストレーションは、MATLAB 2020bの「imregdemons」関数により実現した。レジストレーション後、個々のアンプリコンを、配列決定の最初のラウンドの各カラーチャンネルにおいて識別した。この実験では、アンプリコンドットの識別を、MATLAB関数「imregionalmax」を使用して3Dで極大値を見つけることにより行った。重心の強度が閾値未満のドットは削除した。アンプリコンサイズの推定に基づき、各ラウンドの4つのチャンネルすべてにわたる各ドットの支配的な色を、ドットの重心を囲む5×5×3のボクセルボリュームにより決定した。各チャンネルのボクセルボリュームの統合強度を、色の決定に使用した。この場合、各ラウンドの各ドットは、4つの要素を持つL2正規化ベクトルを有した。各ドットの色は、ベクトル内の最高値を持つ対応するチャンネルにより決定した。ベクトル内に複数の最大値を持つドットは破棄した。次に、ドットを最初に品質スコア(すべての配列決定ラウンドにわたる $-\log(\text{支配的なチャンネルのカラーベクトル値})$ の平均)に基づいてフィルタリングした。品質スコアは、各配列決定ラウンドの各ドットが、色の混合ではなく1つの色からどの程度生じているかを定量化した。バーコードのコードブックは、予想される色配列に基づき、バーコードDNA配列の2塩基コーディングに従って、色空間に変換した。

20

30

40

【0203】

単一細胞および細胞内領域の画像のセグメンテーション。画像のセグメンテーションは、CellProfiler v4.1.3および、MATLABのその他のカスタマイズされたスクリプトを使用して実施した。2D参照セグメンテーションマスクを、DAPI染色画像と、アンプリコンチャンネルとフラミンゴ蛍光ゲル染色画像を組み合わせた複合画像の両方に対して、カスタマイズされたパイプラインにより生成した。

【0204】

50

3Dセグメンテーションの場合、異なる細胞区画を標的とする画像は、最初に中央値フィルタによって処理し、Otsuの方法によって二値化した。100ピクセル未満のすべての連結された構成要素(オブジェクト)を、バイナリ画像から削除した。次に画像を、半径3のディスク構造要素を使用して拡張した。最後に、各細胞領域を標的とする3Dセグメンテーションマスクを、バイナリ画像と前のステップの2D参照細胞セグメンテーションの間の、要素ごとの乗算プロセスにより生成した。核領域を3D細胞セグメンテーションマスクから削除して、細胞質のセグメンテーションを作成した。

【0205】

次いで、3Dで各セグメンテーション細胞領域と重複するフィルタリングされたアンプリコンを、特定の細胞内領域に割り当て(図15B)、各細胞区画における細胞ごとの遺伝子発現行列を計算した。

10

【0206】

距離比(DR)計算によるRNA細胞内分布の解析。細胞質内の読取りの相対的位置を定量化するために、距離比(DR)を細胞質読取りごとに計算した。細胞内のRNA読取りのDR値は、核のセグメンテーションによって規定される核までの読取りの最短距離(d_1)として定義され、細胞セグメンテーションによって規定される、この距離と細胞膜までの最短距離(d_2)との合計により正規化された(図15D)。最短距離は、Scipyが提供するユークリッド距離変換関数を使用して計算した。カットオフDR値10を使用して、TEMPOmapデータセットの各時点にわたる細胞内分布RNA読取りを詳細に調べるために、細胞質領域を「中間」と「周辺」にさらにセグメンテーションした。

20

【0207】

RNA細胞質移行(γ)の動的モデリング。RNA細胞質移行パラメータ γ は、異なるパルスチェイス時点にわたる各遺伝子の平均DR値(詳細は上記)の線形回帰を用いて推定した(図16B)。各遺伝子について、対応するすべての細胞のすべての読取りのDR値を平均して、特定の時点での細胞質局在を表す平均DR値を求めた。線形回帰は、各遺伝子のすべての時点にわたって、PythonにおけるScipyの「linregress」関数を用いて実施した。

【0208】

単一細胞および細胞内分解遺伝子発現行列に基づく、PHATEを介した細胞クラスタリングの可視化。単一細胞のクラスタリングは、細胞ごとの遺伝子発現行列で実施し、細胞の合計読取り数が同じになるように正規化した。細胞内分解クラスタリングは、水平に連結された核および細胞質発現行列上で実施し、両方とも細胞ごとの遺伝子発現行列と同じ次元であり、上記と同じ方法で正規化した。どちらの行列でも、PHATE(Potential of Heat-diffusion for Affinity-based Trajectory Embedding)を、クラスタリングおよび可視化方法として使用し、これは、データの局所構造とグローバル構造の両方を保存することが示されている。PHATEの近隣パラメータ30が両方の解析で使用された。

30

【0209】

RNA分解動態ベクトルの可視化およびdynamoによるトランスクリプトームベクトル場のアニメーション。PHATE座標上の点に重ねられた矢印(図11E、IおよびIII)は、単一細胞における総RNA分解動態を考慮してトランスクリプトーム動力学をモデル化することにより構築した。ベクトル可視化の総RNA分解速度は、-分解速度*新生RNAにより推定した。

40

【0210】

トランスクリプトームベクトル場アニメーションは、上記と同じRNA分解動態からdynamoを使用して構築した³⁵。

【0211】

細胞周期の期の分類および検証。単一細胞の3つの細胞周期の期(G1、G1/S、G2/M)は、scanpyの細胞周期スコアリング関数「score_genes_cell_cycle」によるTEMPOmap新生RNA発現を使用して分類した。1時間標識された新生トランスクリプトームが、細胞周期の期を正確に割り当てることができるかどうかを検証するために、細胞周期ス

50

コアリング解析を、以前に公開されたscEU-seqデータセットからの1時間パルスと総転写産物(22時間パルスと0時間チェイス)を用いて繰り返し、割り当てられた細胞周期結果の相関分析を実施した(図16C)。

【0212】

動的モデリングならびにRNA合成(α)、分解(β 、 β_n 、 β_c)および核外輸送(λ)定数のフィッティング

RNA濃度の計算。単一細胞の核および細胞質にある991個の各遺伝子のRNAコピー数を取得した後、読取りをまず6つの対照遺伝子(すなわち、STARmapプローブの標的となる遺伝子:METTL3、METTL14、YTHDC2、YTHDF1-3)の平均読取りに対して、異なるチェイス時点にわたって正規化した;これらは各遺伝子の全RNAが標的となっているため、異なるパルスチェイス条件下で均一な発現を示すと考えられた。次いで、割り当てられた各領域における正規化されたRNAコピー数(図15B)を、単位細胞体積(ボクセル)、単位核体積(ボクセル)、および単位細胞質体積(ボクセル)で割って、単一細胞($X(t)$)、核($N(t)$)、および細胞質($C(t)$)におけるRNA濃度をそれぞれ計算した。RNA濃度の単位は読取り/ボクセルであり、次のセクションでは[RNA]と表示される。

10

【0213】

モデリング。 α を転写定数($[RNA]/h$)、 β を全細胞分解定数($1/h$)、 β_n を核分解定数($1/h$)、 λ を核外輸送定数($1/h$)、および β_c を細胞質分解定数($1/h$)とする。1時間パルスにおける $X(t)$ は、次の1次動的方程式で記述される:

$$dX(t)/dt = \alpha - \beta * X(t) \quad (1)$$

20

および、後続のチェイス時点の間の $X(t)$ の時間進展(time evolution)は、次のように記述される:

$$dX(t)/dt = -\beta * X(t) \quad (2)$$

ここで、1時間のパルス後に合成される新しいRNAはないと仮定する。式(1)および(2)を使用して、全細胞RNA濃度からの時間に依存する α および β を、各遺伝子について推定し、ここで α および β は、パルスおよびチェイス期間中ほぼ一定であると仮定した。

【0214】

次に、残りの動的パラメータ(β_n 、 λ 、および β_c)を推定するために、次のように仮定した:RNAは転写後、核内で分解されるか細胞質に核外輸送されるかのいずれかであり、これは、数学的に1つのパラメータ p (核処理定数)に組み込むことができる。したがって、 $N(t)$ の時間進展は次のように記述される。

30

$$dN(t)/dt = -p * N(t) \quad (3)$$

一方、

$$p = \beta_n + \lambda \quad (4)$$

ここで以下を仮定した:(1)すべての細胞RNAは核から細胞質へ一方向に移動するため、 λ の値はすべて正である;(2) β_n 、 λ 、および β_c は時間に依存して一定である。式(3)を使用して、各遺伝子について p を推定した。次に、全細胞分解速度は核分解と細胞質分解の合計に等しいと仮定した。したがって、次の式が得られる:

$$X(t) * \beta = N(t) * \beta_n + C(t) * \beta_c \quad (5)$$

(4)に基づいて、

40

$$X(t) * \beta = N(t) * (p - \lambda) + C(t) * \beta_c \quad (6)$$

【0215】

このようにして、細胞質分解(β_c)および核外輸送(λ)を推定した。各遺伝子の p を推定し、次に核分解(β_n)を計算した。1時間パルス-1時間チェイス条件でのデータは、おそらくは洗浄後の細胞内の残留EUのため、線形モデルの外れ値であることが判明したことに留意すべきである。したがって、細胞は1時間のチェイスからは除去し、0、2、4、6時間のチェイスからの細胞のみをモデル化に使用した。

【0216】

フィッティングおよび閾値処理。推定された β と p については、モデルのデータへのフィッティングを R^2 を使用して評価した。したがってモデルは、(1):推定されたすべて

50

のパラメータが正の値を示す遺伝子に限定され、それによって、少なくとも1つの負の値のパラメータを持つすべての遺伝子が削除される;および、(2):式(2)および(3)を β と p の推定のためにそれぞれ対応するデータにあてはめる場合、 $R^2 \geq 0.5$ の遺伝子に限定される。したがって、時間の経過に伴うRNA濃度の、一定の分解(β)係数と核処理(p)係数が仮定された。すべての細胞周期の期を組み合わせした場合、5個のパラメータすべてについて、フィッティング閾値を超えた915個の遺伝子が得られ、細胞を異なる期に分離した場合には、15個のパラメータすべてについて、808個の遺伝子(3期にわたり5つのパラメータ)が得られた。

【0217】

動態パラメータの推定の検証。これらのモデルを検証するために、合成(α)と全細胞分解(β)の計算を、TEMPoMapデータセットおよび公開されているscEU-seqデータセット(1時間パルス、0、2、4、6時間のチェイス)の細胞当たりのRNAコピー数を使用して繰り返し、549個の重複遺伝子を得た。次いで、これらの2つのデータセットからの結果を、次元削減および遺伝子クラスタリングによって比較し、遺伝子クラスターの推定率の変動から導出されたZスコアを、ヒートマップにより可視化した(図18H~18J)。遺伝子のクラスタリングおよび可視化の方法の詳細については、次のセクションで説明する。

【0218】

動態パラメータの相関およびクラスタリング解析。推定された動態パラメータのペアワイズ相関係数を記述する行列は、細胞周期を組み合わせた6つのパラメータ(915個の遺伝子からなる)と細胞周期分解した18個のパラメータ(808個の遺伝子からなる)の両方について、 R を用いて構築し、これらは、散布図行列(図12C)およびヒートマップ(図12D)によってそれぞれ可視化した。細胞周期分解した18個のパラメータの相関関係のいくつかの重要な例も、散布図として図218A~18Fに可視化した。

【0219】

次に、808個の遺伝子の細胞周期分解した18個の動態パラメータに対して、次元削減をUMAPを用いて実施し、その後、Seurat v4に埋め込まれたLouvainによる遺伝子クラスタリングをUMAPに基づいて行い、ここで4つの遺伝子クラスターが識別された。動態パラメータの範囲は、異なる細胞周期の期における同じパラメータの分散よりも大きく変化することが注目された。したがって、4つのクラスター間の動態的差異をより良く可視化するために、Zスコアを、3つの細胞周期の期の間のすべての遺伝子について計算された各動態パラメータに対して算出し、そのZスコアをヒートマップとして図12Eにプロットした。

【0220】

UMAP解析により識別された4つのクラスターのそれぞれについて、遺伝子オントロジー(GO)を、背景としてのTEMPoMapの991遺伝子のリストに対してUMAP解析により識別された4つのクラスター各々における遺伝子について、DAVID(david.ncifcrf.gov/content.jsp?file=quote.htm)を用いて実施した。統計的に有意な(p 値が0.05に近い、またはそれ未満である)すべてのGO termを図12Fに示す。

【0221】

代表的な細胞における4つのクラスターの可視化は、カスタマイズされたスクリプトをPythonで用いて実施した。

【0222】

単一細胞の新生RNA発現の経時的共変動分析。単一細胞RNA発現の経時的な共変動分析(図13A、図19A)のために、各遺伝子対間の発現レベルの相関関係を記述する行列を、0、2、4、および6時間のチェイスからのすべての細胞を使用して最初に構築した。次いで階層的クラスタリングを実施して、遺伝子を、 R を使用して、これらの時間結合細胞におけるそれらの相関係数に基づいて組織化した。行列は、クラスタリング結果によって再配列し、ヒートマップにより可視化した(図13A、左)。次いで、個々の時点における発現レベルの相関係数を記述するヒートマップの作成を、すべての行列における遺伝

10

20

30

40

50

子の同じグループ化と順序を保持しつつ行った(図19A)。4つの時点にわたるヒートマップを比較すると、2つの小さな遺伝子クラスターが識別され(図13Aでは1および2として注釈付けられている)、これは、すべての時点を組み合わせた場合に相関する発現を示すが、個々の時点に沿っては変化も示す(図19A)。GO解析は、2つのクラスターのそれぞれの遺伝子について、上記のバックグラウンド遺伝子リストに対してDAVIDを用いて実施した。

【0223】

TEMPOmap遺伝子リストにおける m^6A およびYTHDC1標的の識別。 m^6A 関連遺伝子標識については、信頼性の高い m^6A 修飾転写産物をコードする遺伝子が、以前に報告されたPAR-CLIPおよび免疫沈降(IP)データにより識別された。簡単に言うと、 m^6A -RNAは、(1)非断片化 m^6A RIP-seqにおいて少なくとも1倍のエンリッチメントを有し、かつ(2)PAR-CLIPの各複製に結合した転写産物、として定義された。同様に、非 m^6A -RNAは、(1)非断片化 m^6A RIP-seqの0°未満のエンリッチメントを有し、かつ(2)PAR-CLIPのいずれの複製にもピークがない転写産物、として定義された。これらの基準を使用して、 m^6A -RNAをコードする573個の遺伝子と、非 m^6A -RNAをコードする111個の遺伝子が、TEMPOmap遺伝子リストから識別された。

【0224】

YTHDC1標的関連遺伝子標識については、信頼性の高い標的をコードする遺伝子が、以前に報告されたYTHDC1 PAR-CLIPおよびIPデータにより識別された。簡単に言うと、YTHDC1標的は、(1)YTHDC1-IP測定において少なくとも1倍のエンリッチメントを有し、かつ(2)IP測定においてp値が有意であり、および(3)PAR-CLIPの各複製で結合した転写産物、として定義された。次に、非標的を、(1)非断片化 m^6A RIP-seqの0°未満のエンリッチメントを有し、かつ(2)PAR-CLIPのいずれの複製にもピークがない転写産物、として定義された。これらの基準を使用して、標的転写産物をコードする158個の遺伝子と、非標的をコードする160個の遺伝子が識別された。

【0225】

例7:In vivo TEMPOMap

次に、動物全体の組織(例:心臓組織)における時空間トランスクリプトミクスを解明するために、TEMPOmapをin vivoで試験した。この目的を達成するために、1mgのEUをマウスに後眼窩投与により注射し、2時間後に臓器を採取した。PBSを投与したマウスを対照として使用した。臓器(例:心臓)を20 μ mの組織に凍結切片化し、TEMPOmapワークフローを使用して化学的に処理した(図20A)。TEMPOmapの、心臓組織切片におけるin vivoでの適用可能性が示されている。心臓で高度に発現される4つの遺伝子(Myh6、Flt1、Dach1、およびLamc1)の標的化を図20Bに示す。結果は、PBSを投与した対照組織と比較して、新生に転写されたRNAシグナルの顕著なエンリッチメントを示し、したがって、TEMPOmapの、生きた動物の組織切片上の代謝標識RNAを検出および測定するための能力を実証する。したがってTEMPOmap法は、システム、組織、オルガノイド、および臓器における多重化された時空間トランスクリプトミクスを解析するために、in vivoにおいて適用可能である。

【0226】

参考文献

1. Wang, X. et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. Science 361, eaat5691 (2018).

【0227】

2. Codeluppi, S. et al. Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH. Nat. Methods 15, 932 (2018).

【0228】

3. Moffitt, J. R. et al. Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region. Science 362, eaau5324 (2018).

【0229】

10

20

30

40

50

4. Shah, S., Lubeck, E., Zhou, W. & Cai, L. In situ transcription profiling of single cells reveals spatial organization of cells in the mouse hippocampus. *Neuron* 92, 342 (2016).
[0 2 3 0]
5. Achim, K., Pettit, J., Saraiva, L. et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol* 33, 503 (2015).
[0 2 3 1]
6. Lee, J. et al. Highly Multiplexed Subcellular RNA Sequencing in Situ. *Science* 343, 1360 (2014).
[0 2 3 2]
7. Stahl, P. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 353, 78 (2016).
[0 2 3 3]
8. Zechel, S., Zajac, P., Lonnerberg, P. et al. Topographical transcriptome mapping of the mouse medial ganglionic eminence by spatially resolved RNA-seq. *Genome Biol* 15, 486 (2014).
[0 2 3 4]
9. Gao, S., Yan, L., Wang, R. et al. Tracing the temporal-spatial transcriptome landscapes of the human fetal digestive tract using single-cell RNA-sequencing. *Nat Cell Biol* 20, 721 (2018).
[0 2 3 5]
10. Chen, K. et al. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* 348, 6233 (2015).
[0 2 3 6]
11. Crosetto, N., Bienko, M. & van Oudenaarden, A. Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nat Rev Genet* 16, 57 (2015).
[0 2 3 7]
12. Battich, N. et al. Sequencing metabolically labeled transcripts in single cells reveals mRNA turnover strategies. *Science* 367, 1151 (2020).
[0 2 3 8]
13. Wang, X. et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* (80), 361 (2018).
[0 2 3 9]
14. Chen, K. H., Boettiger, A. N., Moffitt, J. R., Wang, S. & Zhuang, X. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* (80), 348, aaa6090-aaa6090 (2015).
[0 2 4 0]
15. Codeluppi, S. et al. Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH. *Nat. Methods* 15, 932-935 (2018).
[0 2 4 1]
16. Stahl, P. L. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* vol. 353, 78-82 (2016).
[0 2 4 2]
17. Lee, J. H. et al. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. *Science* (80). 343, 1360-1363 (2014).
[0 2 4 3]
18. Shah, S., Lubeck, E., Zhou, W. & Cai, L. In Situ Transcription Profiling of Single Cells Reveals Spatial Organization of Cells in the Mouse Hippocampus. *Neuron* 92, 342-357 (2016).

10

20

30

40

50

[0 2 4 4]

19. Stickels, R. R. et al. Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2. *Nat. Biotechnol.* 39, 313-319 (2021).

[0 2 4 5]

20. Buxbaum, A. R., Haimovich, G. & Singer, R. H. In the right place at the right time: Visualizing and understanding mRNA localization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 16 95-109 (2015).

[0 2 4 6]

21. Erhard, F. et al. scSLAM-seq reveals core features of transcription dynamics in single cells. *Nature* 571, 419-423 (2019).

[0 2 4 7]

22. Qiu, Q. et al. Massively parallel and time-resolved RNA sequencing in single cells with scNT-seq. *Nat. Methods* 17, 991-1001 (2020).

[0 2 4 8]

23. Cao, J., Zhou, W., Steemers, F., Trapnell, C. & Shendure, J. Sci-fate characterizes the dynamics of gene expression in single cells. *Nat. Biotechnol.* 38, 980-988 (2020).

[0 2 4 9]

24. Hendriks, G.-J. et al. NASC-seq monitors RNA synthesis in single cells. *Nat. Commun.* 10, 3138 (2019).

[0 2 5 0]

25. Battich, N. et al. Sequencing metabolically labeled transcripts in single cells reveals mRNA turnover strategies. *Science* (80). 367, 1151 (2020).

[0 2 5 1]

26. Braselmann, E., Rathbun, C., Richards, E. M., & Palmer, A. E. Illuminating RNA Biology: Tools for Imaging RNA in Live Mammalian Cells. *Cell Chem. Biol.* 27, 891-903 (2020).

[0 2 5 2]

27. Jao, C. Y. & Salic, A. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15779-15784 (2008).

[0 2 5 3]

28. Rabani, M. et al. Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 436-442 (2011).

[0 2 5 4]

29. Djebali, S. et al. Landscape of transcription in human cells. *Nat.* 2012 4897414 489, 101-108 (2012).

[0 2 5 5]

30. Bhatt, D. M. et al. Transcript Dynamics of Proinflammatory Genes Revealed by Sequence Analysis of Subcellular RNA Fractions. *Cell* 150, 279-290 (2012).

[0 2 5 6]

31. Battich, N., Stoeger, T., & Pelkmans, L. Control of Transcript Variability in Single Mammalian Cells. *Cell* 163, 1596-1610 (2015).

[0 2 5 7]

32. Bahar Halpern, K. et al. Nuclear Retention of mRNA in Mammalian Tissues. *Cell Rep.* 13, 2653-2662 (2015).

10

20

30

40

50

【0258】

33. Moon, K. R. et al. Visualizing structure and transitions in high-dimensional biological data. *Nat. Biotechnol.* 2019 37:12 37, 1482-1492 (2019).

【0259】

34. Qiu, X. et al. Mapping transcriptomic vector fields of single cells. *Cell* (2022) doi:10.1016/J.CELL.2021.12.045.

【0260】

35. La Manno, G. et al. RNA velocity of single cells. *Nature* 560, 494-498 (2018).

【0261】

36. Bergen, V., Lange, M., Peidli, S., Wolf, F. A. & Theis, F. J. Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling. *Nat. Biotechnol.* 38, 1408-1414 (2020).

【0262】

37. Tirosh, I. et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* (80), 352, 189-196 (2016).

【0263】

38. Sharp, J. A., Perea-Resa, C., Wang, W. & Blower, M. D. Cell division requires RNA eviction from condensing chromosomes. *J. Cell Biol.* 219 (2020).

【0264】

39. Tanenbaum, M. E., Stern-Ginossar, N., Weissman, J. S., & Vale, R. D. Regulation of mRNA translation during mitosis. *Elife* 4 (2015).

【0265】

40. Xia, C., Fan, J., Emanuel, G., Hao, J., & Zhuang, X. Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 19490-19499 (2019).

【0266】

41. Chen, T. & Steensel, B. van. Comprehensive analysis of nucleocytoplasmic dynamics of mRNA in *Drosophila* cells. *PLOS Genet.* 13, e1006929 (2017).

【0267】

42. Berry, S., Muller, M., & Pelkmans, L. Nuclear RNA concentration coordinates RNA production with cell size in human cells. *bioRxiv* 2021.05.17.444432 (2021) doi:10.1101/2021.05.17.444432.

【0268】

43. Padovan-Merhar, O. et al. Single Mammalian Cells Compensate for Differences in Cellular Volume and DNA Copy Number through Independent Global Transcriptional Mechanisms. *Mol. Cell* 58, 339-352 (2015).

【0269】

44. Shi, H., Wei, J. & He, C. Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers. *Mol. Cell* 74, 640-650 (2019).

【0270】

45. Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T. & He, C. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell* 169, 1187-1200 (2017).

【0271】

46. Wang, X. et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger

10

20

30

40

50

ger RNA stability. *Nature* 505, 117-120 (2014).

【0272】

47. Roundtree, I. A. et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs. *Elife* 6, (2017).

【0273】

48. Schwanhuysen, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342 (2011).

【0274】

49. Dixit, A. et al. Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell* 167, 1853-1866.e17 (2016).

【0275】

50. Akbalik, G. et al. Visualization of newly synthesized neuronal RNA in vitro and in vivo using click-chemistry. *RNA Biol.* 14, 20-28 (2017).

【0276】

51. Sant, L. J. van't, White, J. J., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeij, W. P. & Jaarsma, D. In vivo 5-ethynyluridine (EU) labelling detects reduced transcription in Purkinje cell degeneration mouse mutants, but can itself induce neurodegeneration. *Acta Neuropathol. Commun.* 2021 91 9, 1-20 (2021).

【0277】

参照による組み込み

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

【0278】

均等物および範囲

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

【0279】

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

10

20

30

40

50

まれる。さらに、別段の指示がない限り、または文脈および当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表わされる値は、文脈上明らかに別段の指示がない限り、本発明の様々な態様において記載された範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、範囲の下限の単位の10分の1までとることができる。

【0280】

本出願は、様々な発行された特許、公開された特許出願、雑誌記事、および他の出版物を参照し、そのすべてが参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれた参考文献のいずれかと本明細書との間に矛盾がある場合には、本明細書が優先するものとする。さらに、従来技術に該当する本発明の特定の態様は、1以上の態様から明示的に除外することができる。かかる態様は当業者には既知であるとみなされるため、それらは、除外が本明細書に明示的に記載されていなくても、除外することができる。本発明のいかなる特定の態様も、いかなる理由によってもいかなる態様からも、先行技術の存在に関連するか否かに関わらず、除外することができる。

【0281】

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

【図面】

【図1】

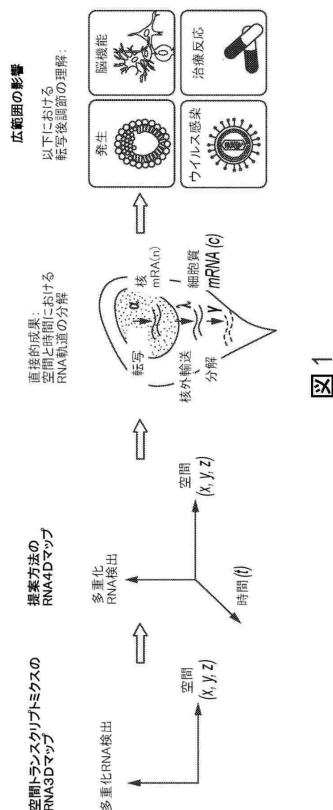


図1

【図2A-1】

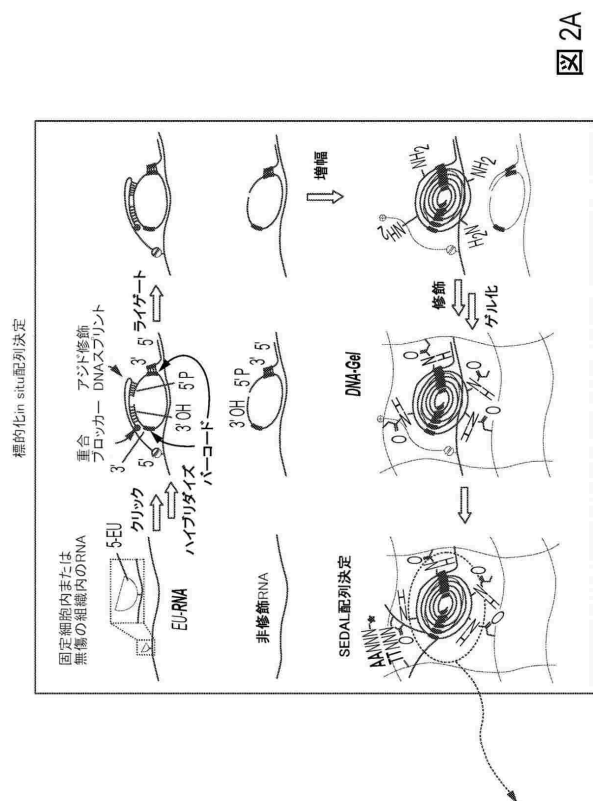


図2A

10

20

30

40

50

【図 2 E】

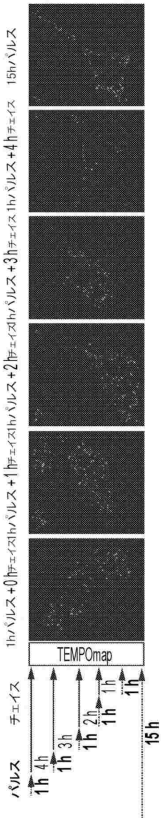


図 2E

【図 3】

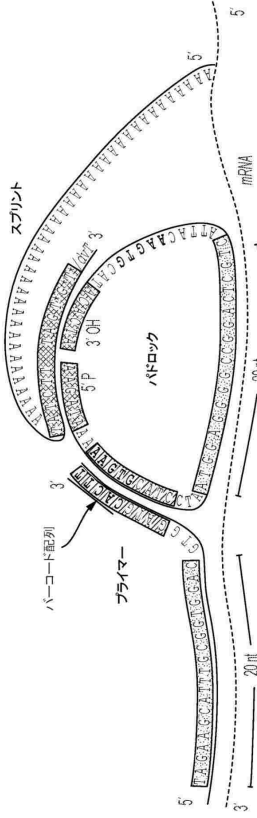


図 3

【図 4 A】

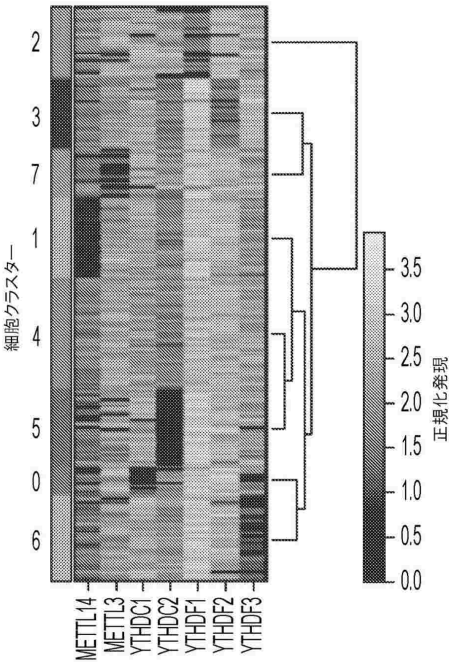


図 4A

【図 4 B】

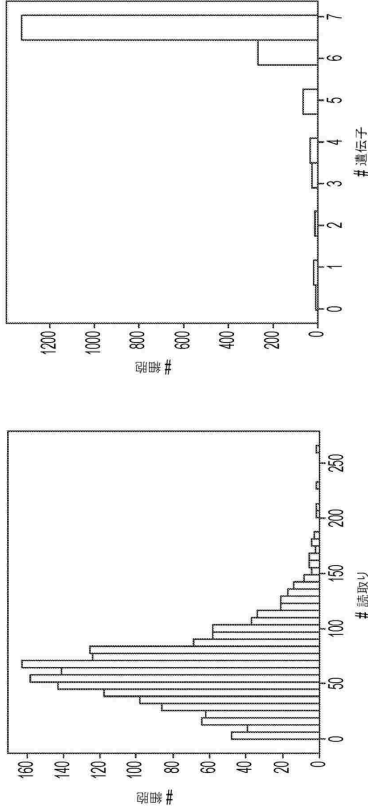


図 4B

10

20

30

40

50

【図 5】

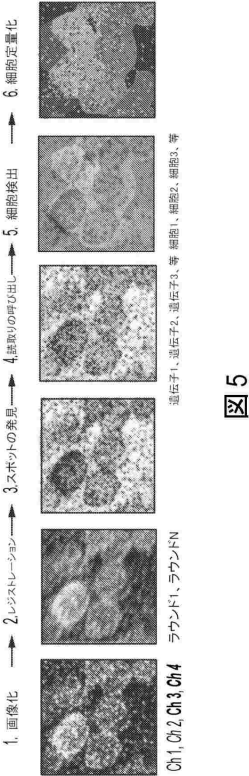


図 5

【図 6 A】

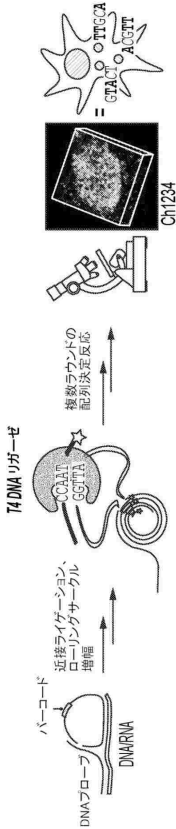


図 6A

【図 6 B】

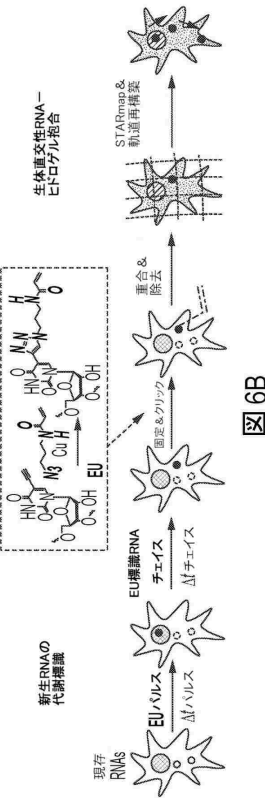


図 6B

【図 7】

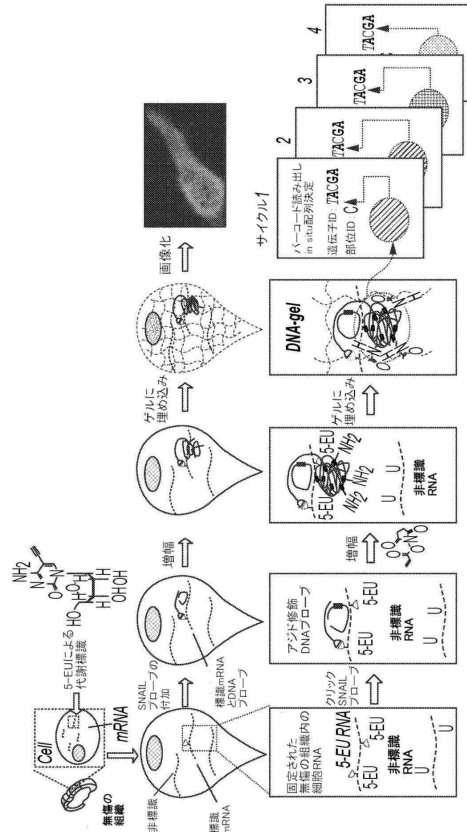
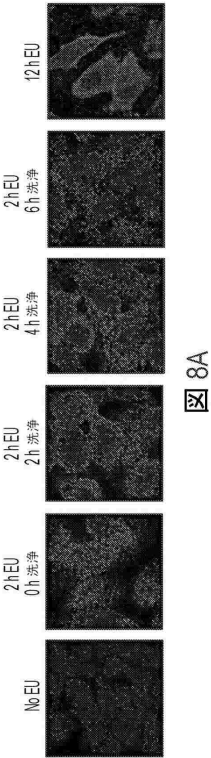
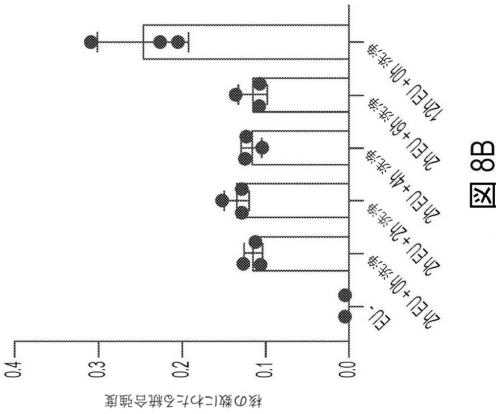


図 7

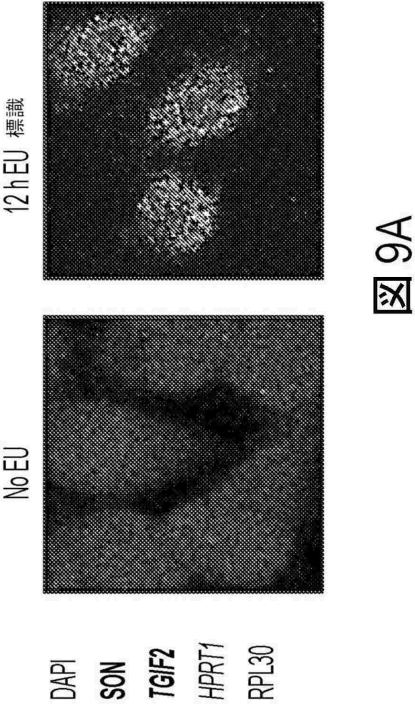
【図 8 A】



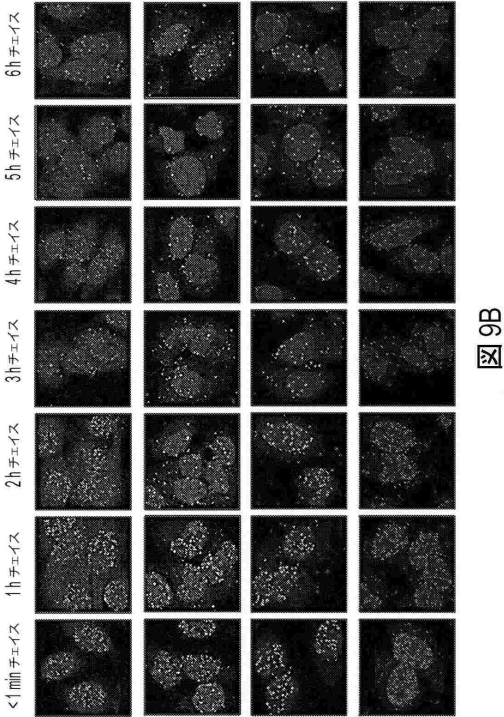
【図 8 B】



【図 9 A】



【図 9 B】



10

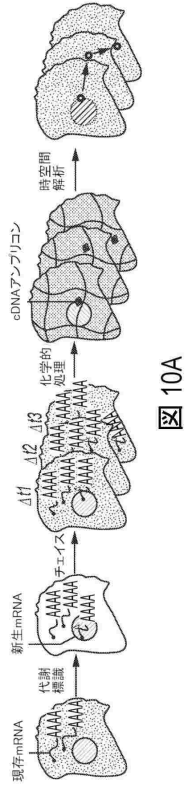
20

30

40

50

【図 10 A】



10A

【図 10 B】

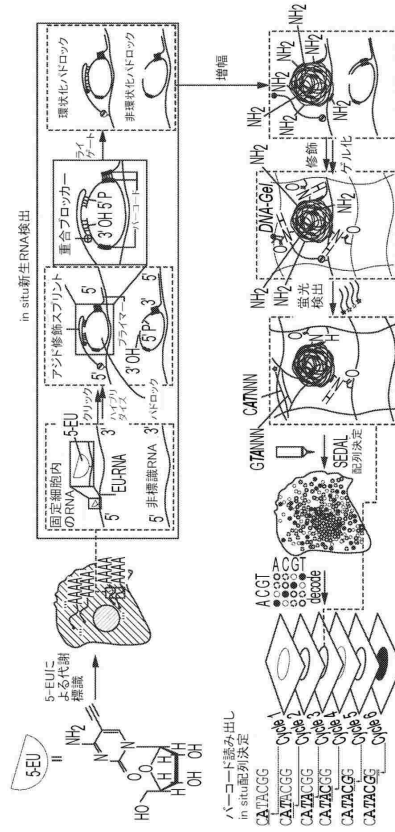


図 10B

10

20

【図 10 C】

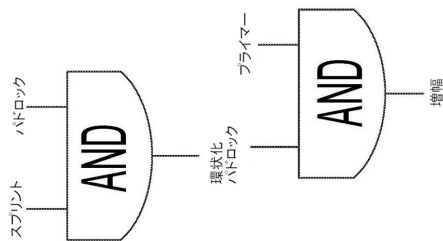


図 10C

【図 10 D】

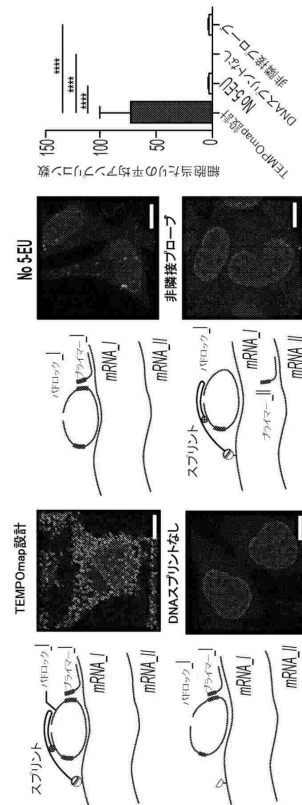


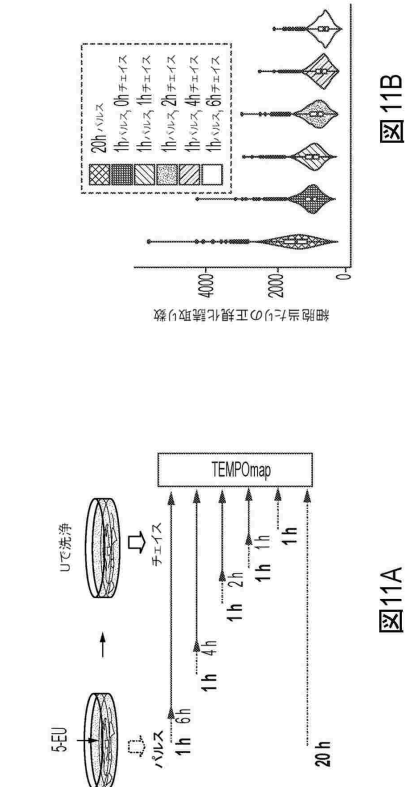
図 10D

30

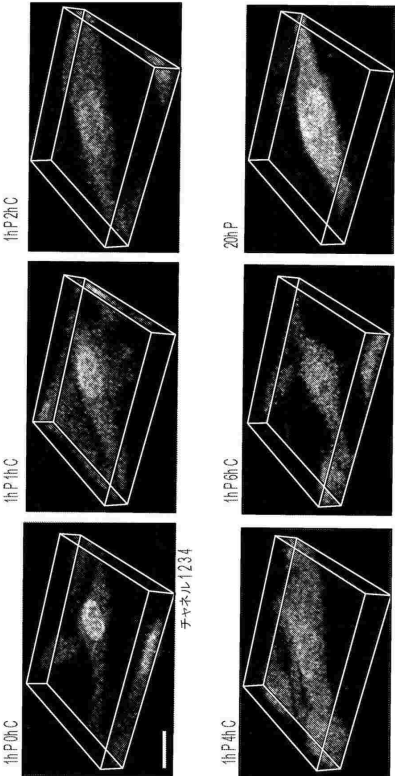
40

50

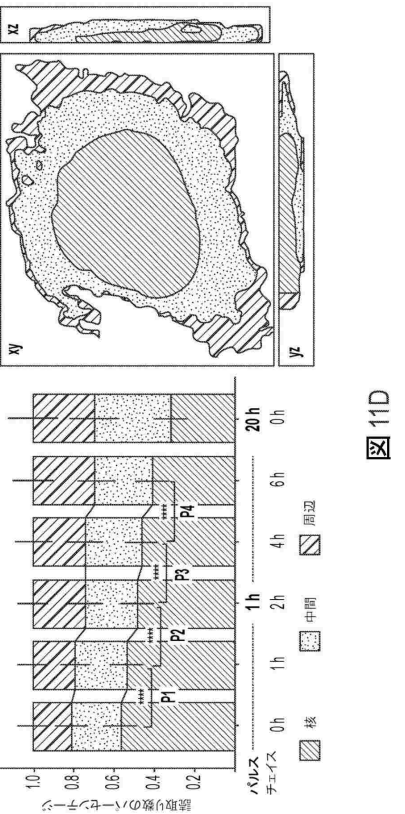
【図 1 1 A - B】



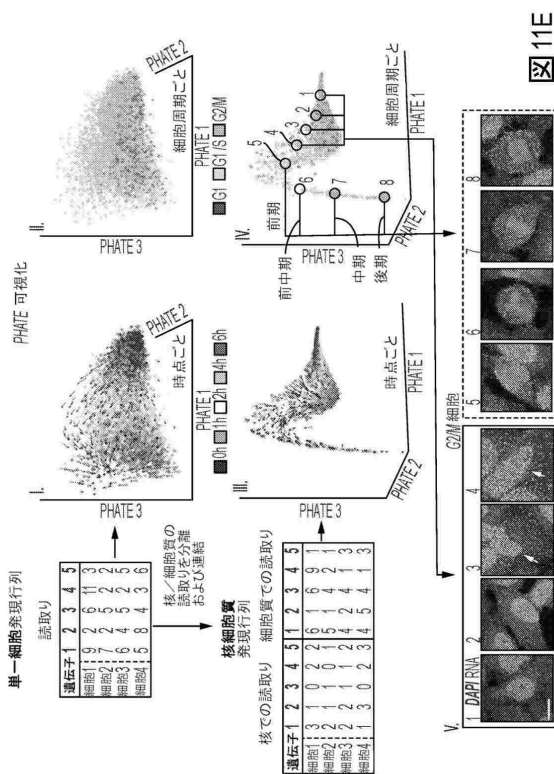
【図 1 1 C】



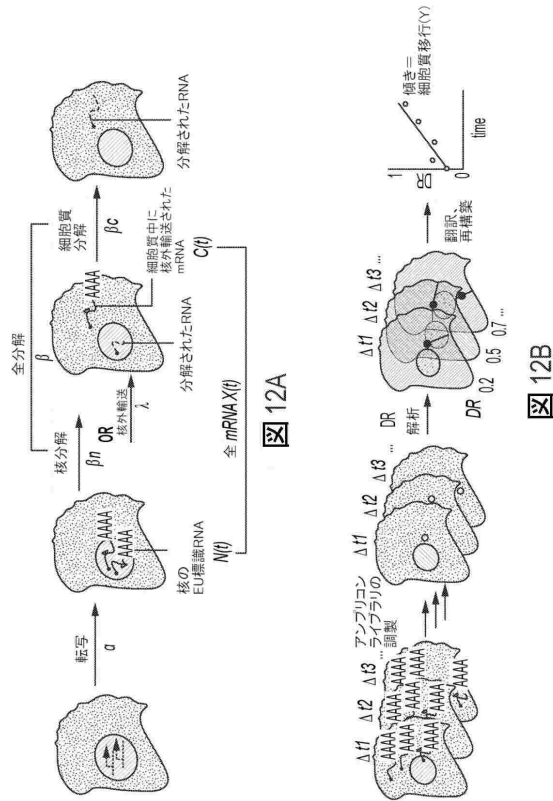
【図 1 1 D】



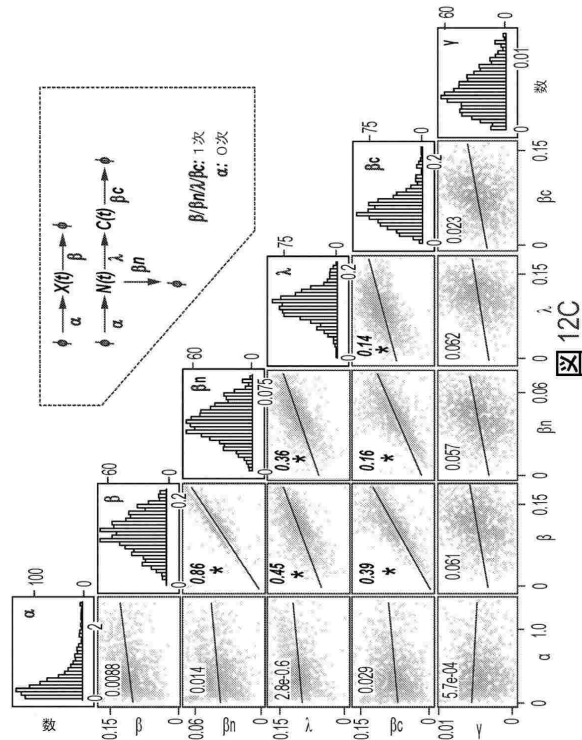
【図 1 1 E】



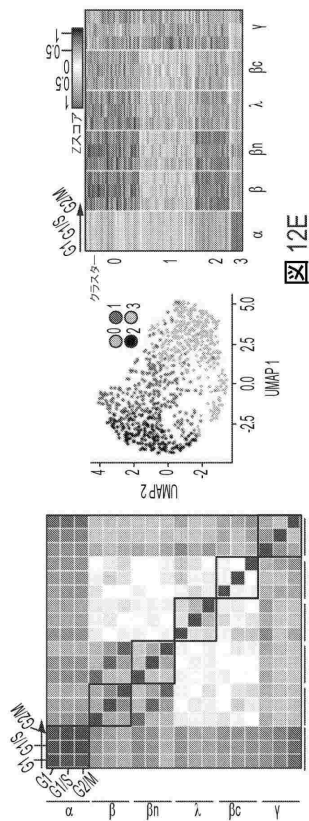
【図 1 2 A - B】



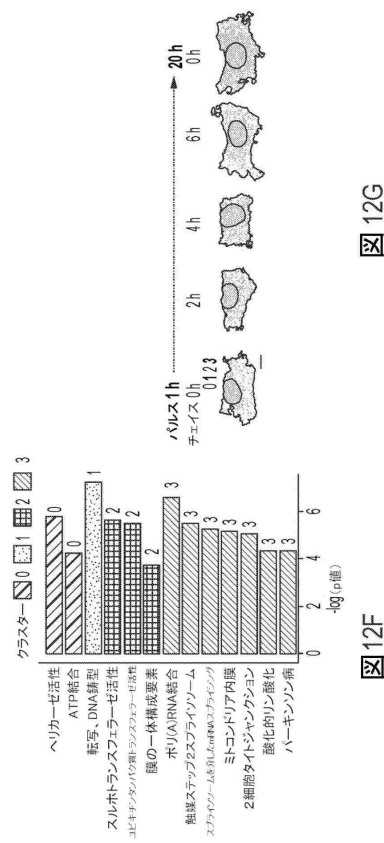
【図 1 2 C】



【図 1 2 D - E】



【図 1 2 F - G】



10

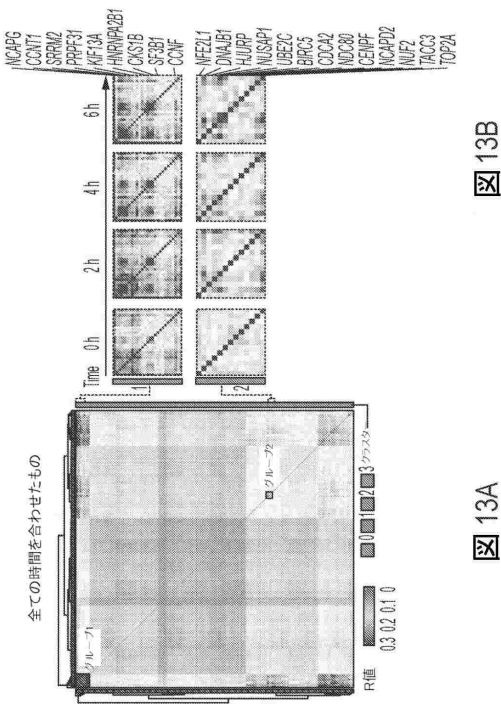
20

30

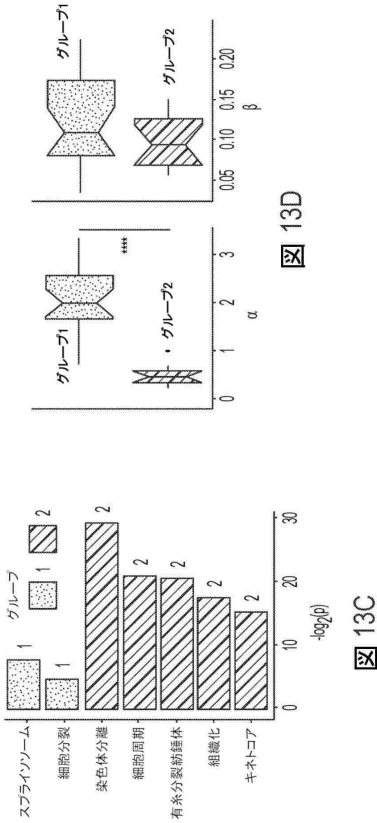
40

50

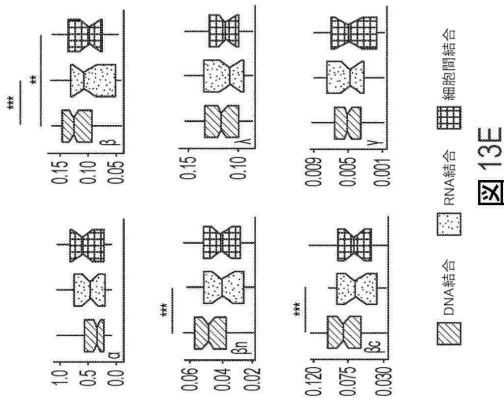
【図 13 A - B】



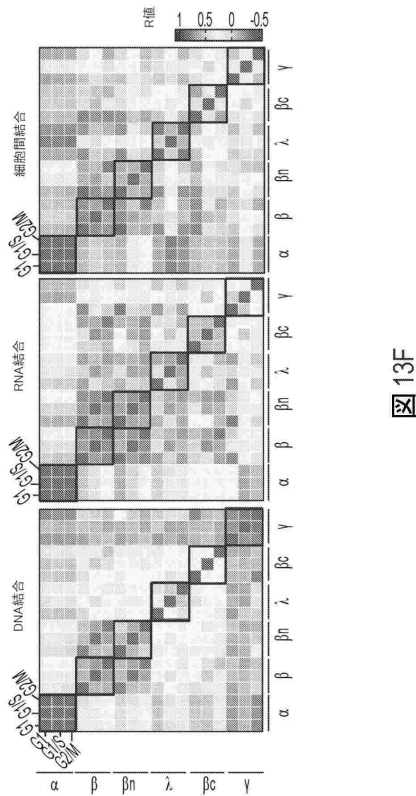
【図 13 C - D】



【図 13 E】



【図 13 F】



10

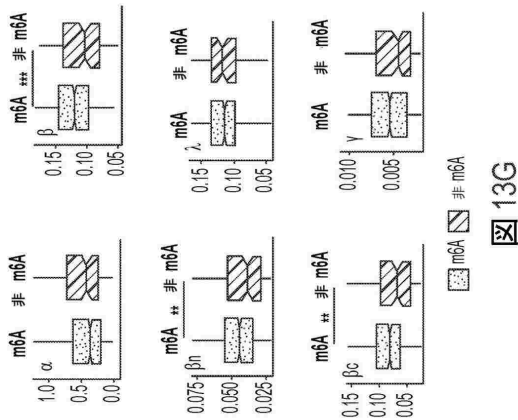
20

30

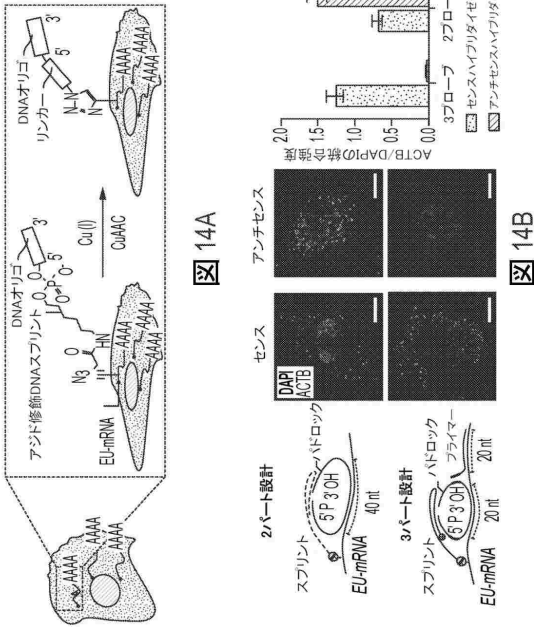
40

50

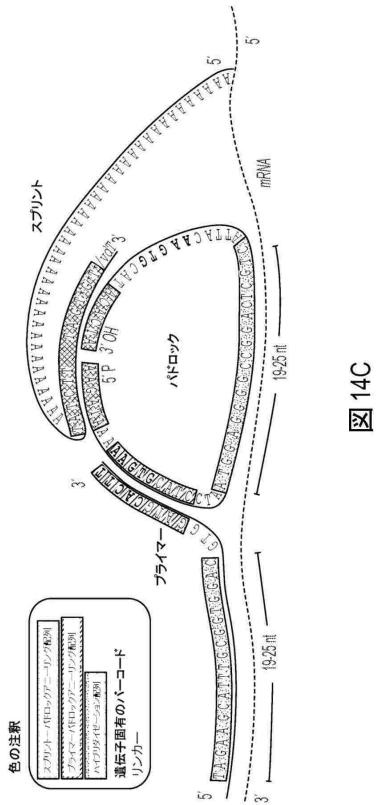
【図 1 3 G】



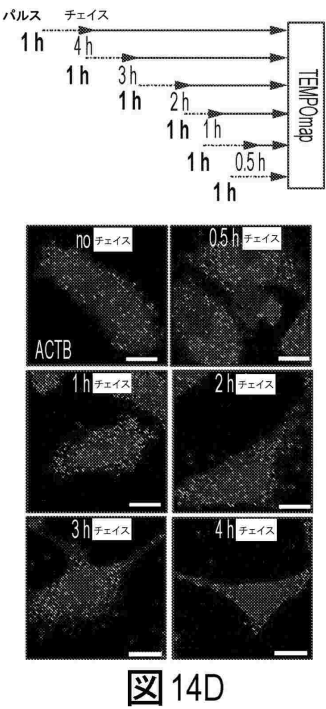
【図 1 4 A - B】



【図 1 4 C】



【図 1 4 D】



10

20

30

40

50

【図 16 A】

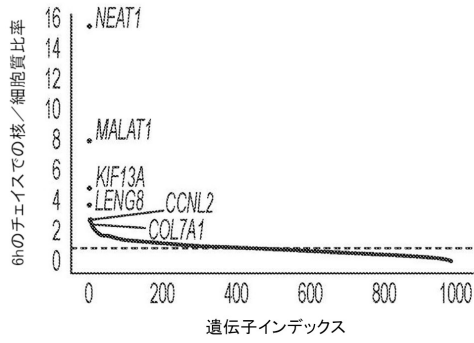


図 16A

【図 16 B - C】

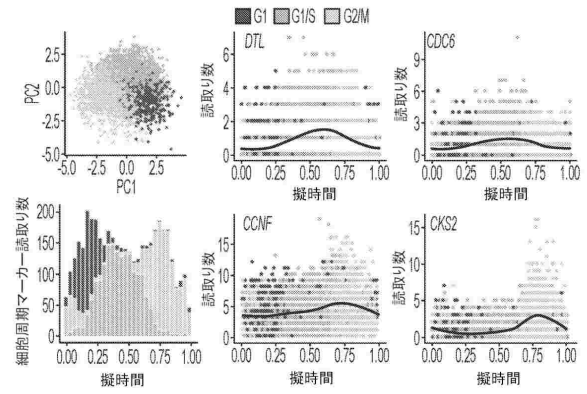


図 16B

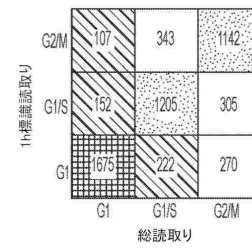


図 16C

【図 16 D】

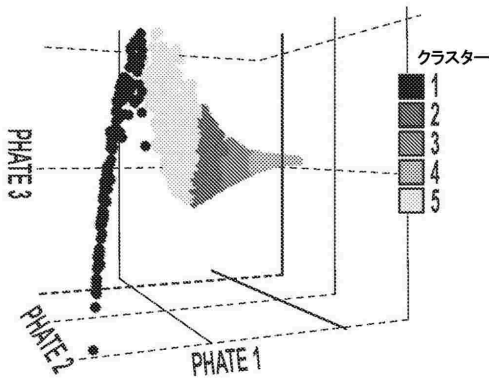


図 16D

【図 17 A - B】

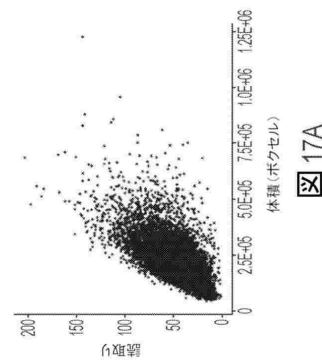


図 17A

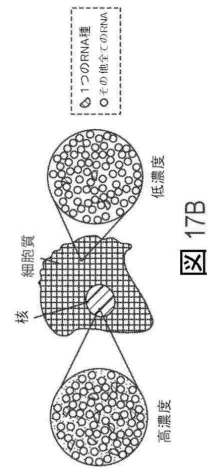


図 17B

10

20

30

40

50

【図 17 C】

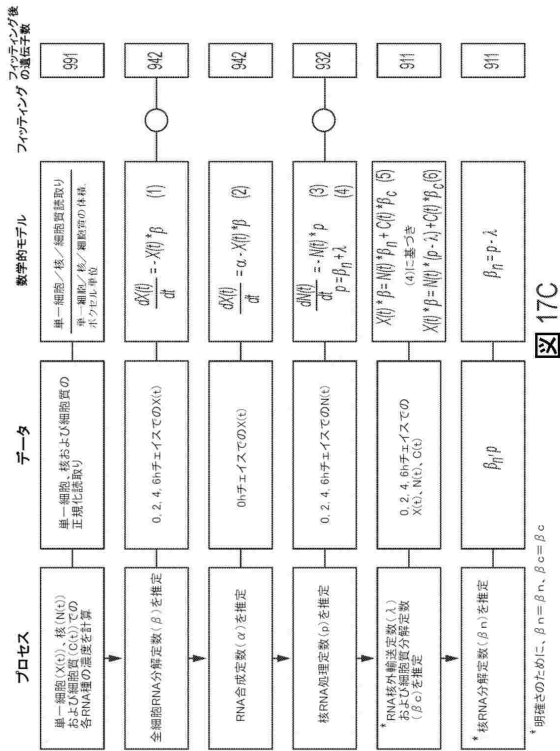


図 17C

【図 17 D - E】

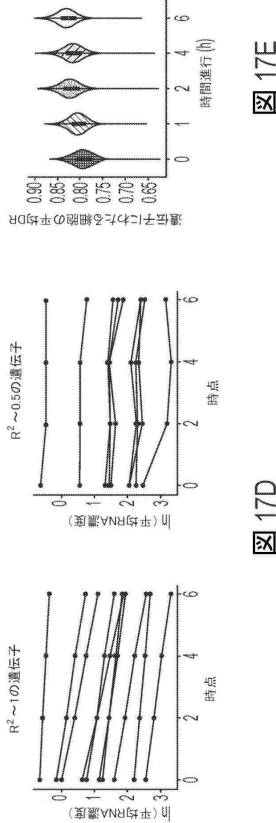


図 17E

図 17D

【図 17 F】

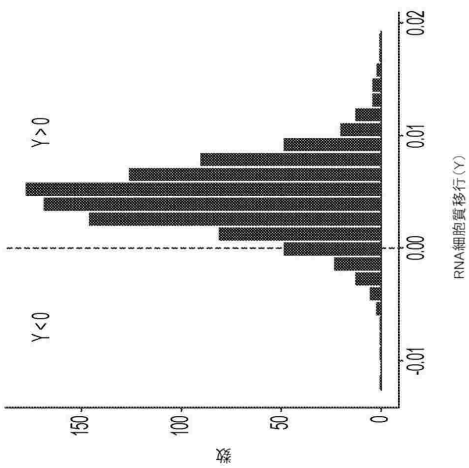


図 17F

【図 17 G】

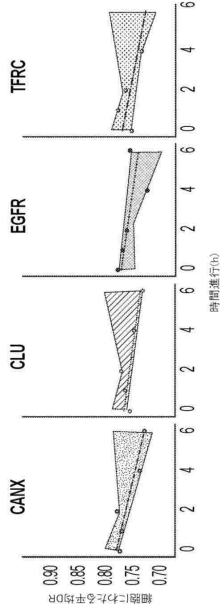


図 17G

Y < 0, R ² > 0.5 (12 遺伝子)	
注釈クラスター	P 値
細胞外エキソーム	3.4E-5
膜	9.4E-3

【図 17 H】

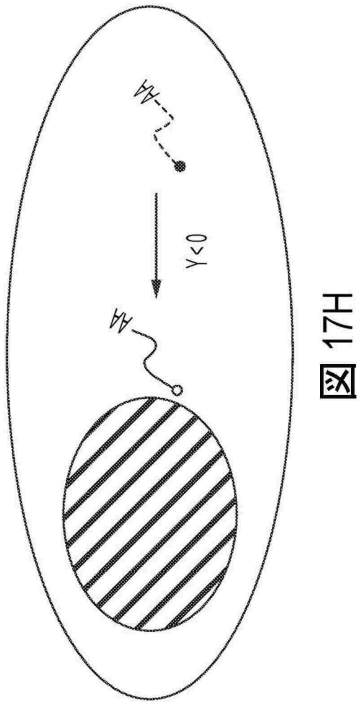


図 17H

【図 18 A - B】

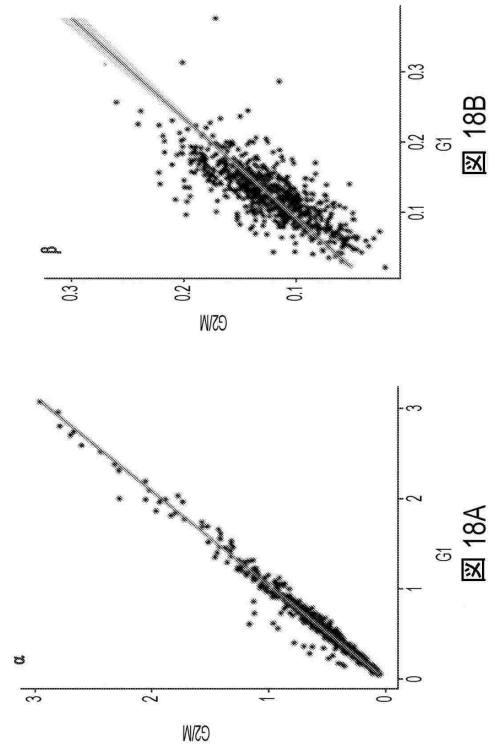


図 18B

図 18A

10

20

【図 18 C - D】

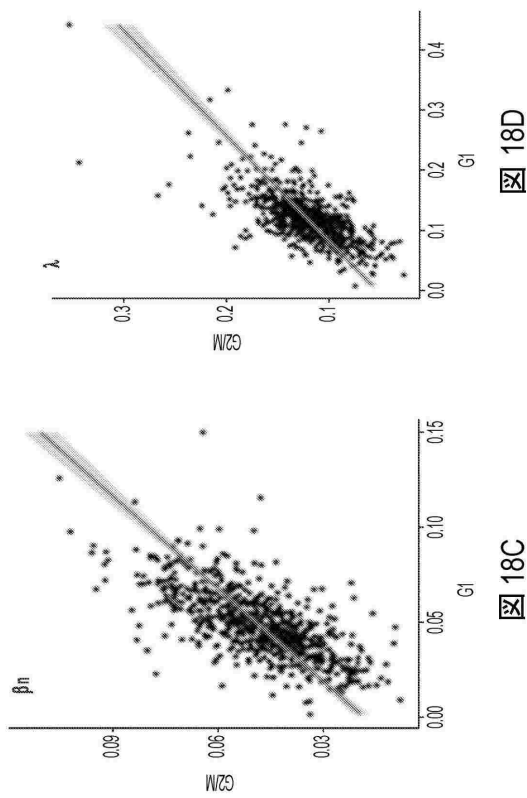


図 18D

図 18C

【図 18 E - F】

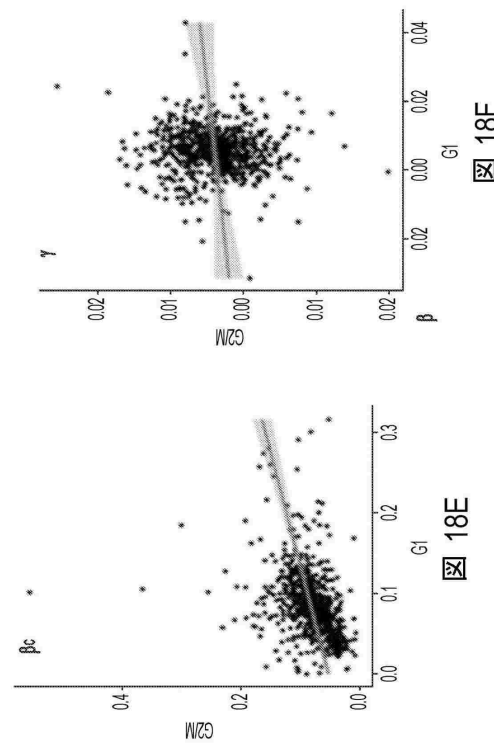


図 18F

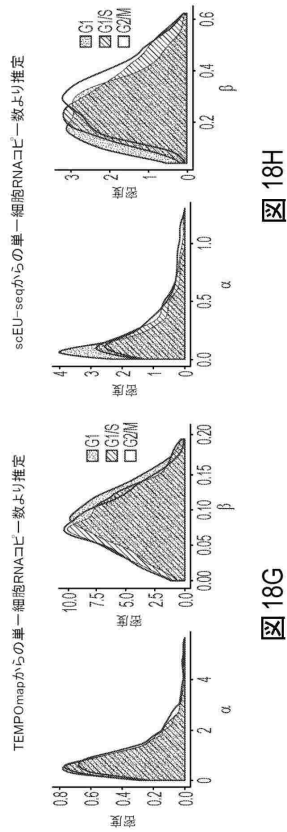
図 18E

30

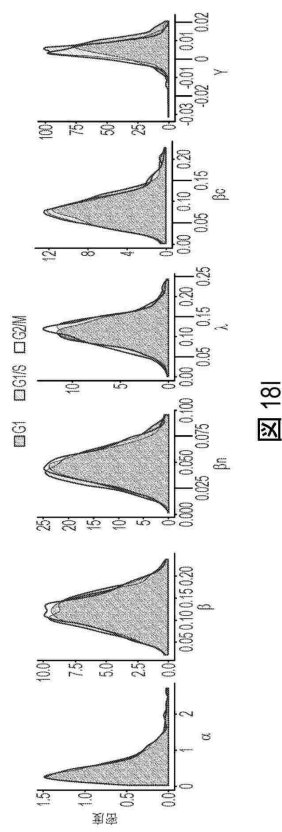
40

50

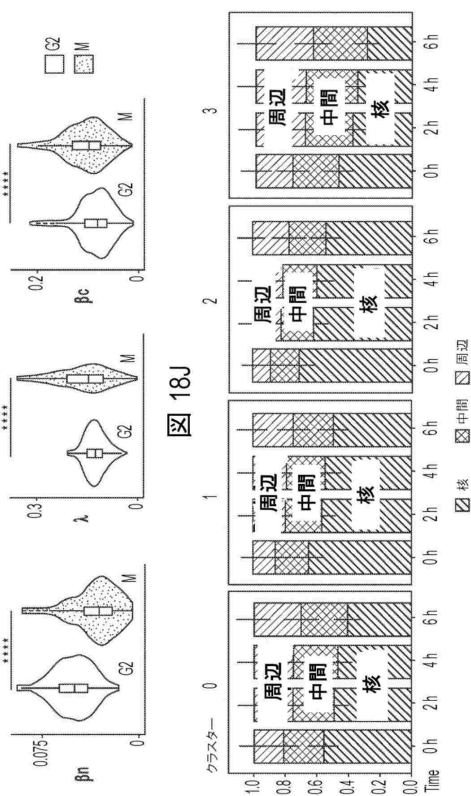
【図 18 G - H】



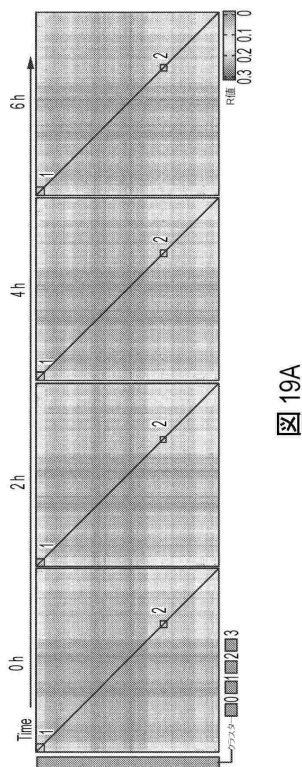
【図 18 I】



【図 18 J - K】



【図 19 A】



10

20

30

40

50

【図 19B - D】

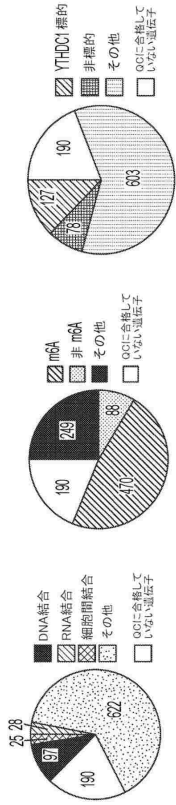


図 19D

図 19C

図 19B

【図 19F】

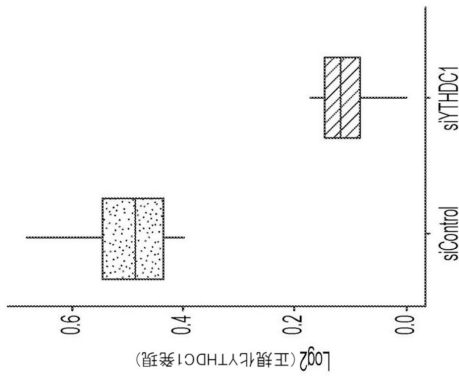


図 19F

【図 19E】

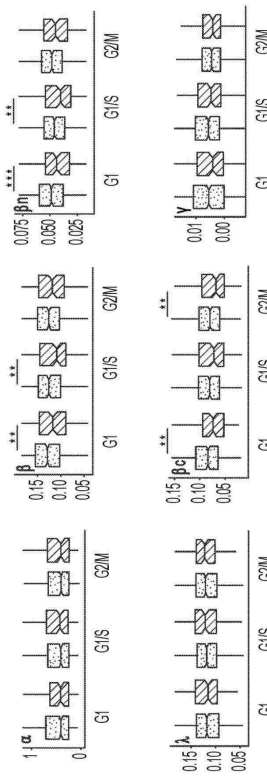


図 19E

【図 19G】

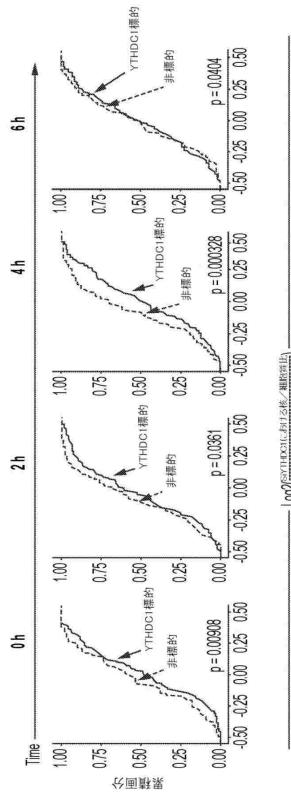


図 19G

10

20

30

40

50

【図19H-1】

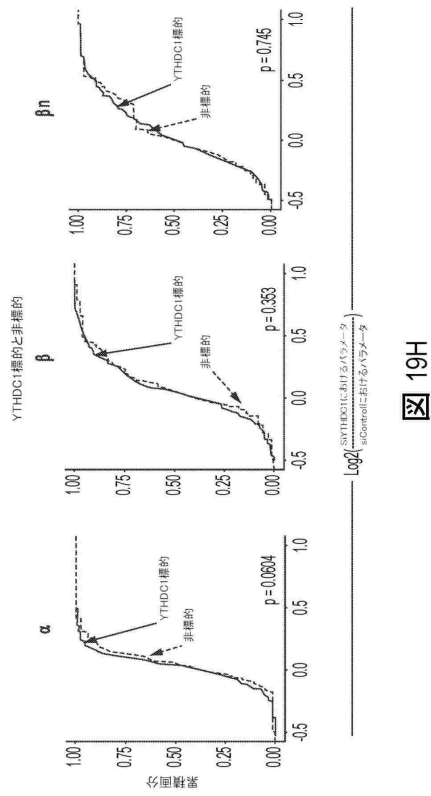


図19H

【図19H-2】

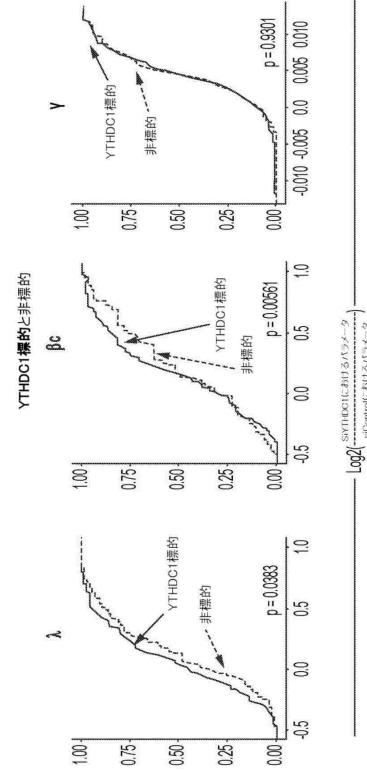


図19H
続き

【図20A】

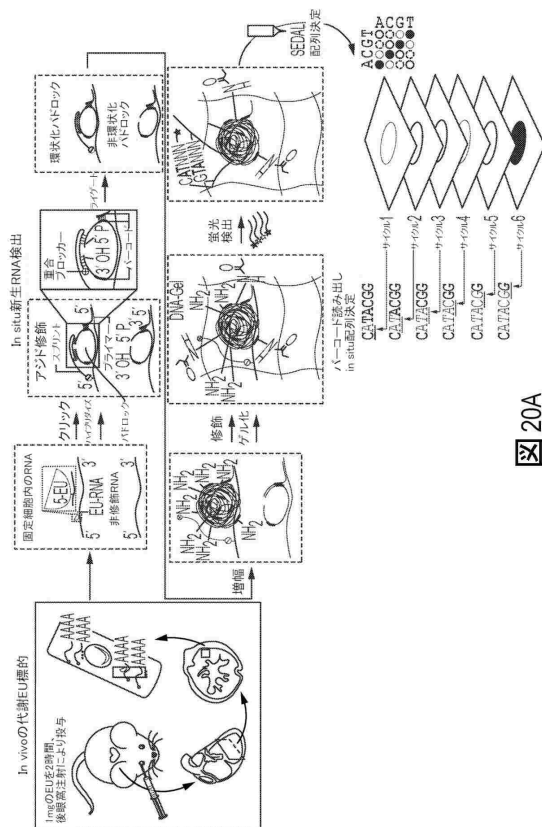


図20A

【図20B】

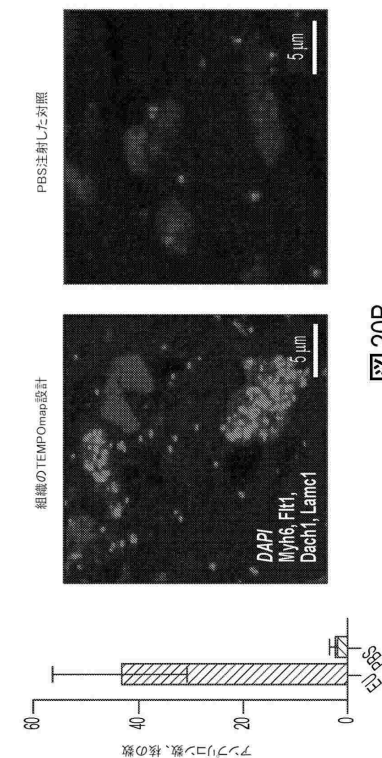


図20B

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/028012

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

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/199579 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 17 October 2019 (2019-10-17) cited in the application figures 1a-1e	1-57, 61-165, 168-207
X	XIAO WANG ET AL: "Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states", SCIENCE, vol. 361, no. 6400, 27 July 2018 (2018-07-27), page aaat5691, XP055585756, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aaat5691 cited in the application abstract; figure 1	1-57, 61-165, 168-207
	----- --/--	

☒ 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

8 August 2022

Date of mailing of the international search report

17/08/2022

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

Ulbrecht, Matthias

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/028012

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MICHAELA ASP ET AL: "Spatially Resolved Transcriptomes-Next Generation Tools for Tissue Exploration", BIOESSAYS, JOHN WILEY & SONS LTD, GB, vol. 42, no. 10, 4 May 2020 (2020-05-04), page n/a, XP071527643, ISSN: 0265-9247, DOI: 10.1002/BIES.201900221 the whole document -----	1-207

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/028012

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

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

F I

C 1 2 M 1/34

A

テーマコード (参考)

C 1 2 M 1/34

Z

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,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,JO,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,MZ,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,Z
A,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. M A T L A B

2. P Y T H O N

オブ テクノロジー

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

(74)代理人 110003971

弁理士法人葛和国际特許事務所

(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 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
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

(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

F ターム (参考) 4B029 AA07 AA23 BB16 BB20 FA12 FA15

4B063 QA05 QA13 QA18 QA19 QA20 QQ02 QQ28 QQ40 QQ52 QQ53

QR08 QR20 QR35 QR36 QS24 QS34 QS36 QX02