(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7384789号
(P7384789)

(45)発行日　令和5年11月21日(2023.11.21)

(24)登録日　令和5年11月13日(2023.11.13)

(51)国際特許分類		FI		
G01N 1/30 (2006.01)		G01N	1/30	
G01N 33/48 (2006.01)		G01N	33/48	P
G01N 33/53 (2006.01)		G01N	33/53	Y

請求項の数　20　（全72頁）

(21)出願番号	特願2020-518127(P2020-518127)
(86)(22)出願日	平成30年5月18日(2018.5.18)
(65)公表番号	特表2020-522721(P2020-522721A)
(43)公表日	令和2年7月30日(2020.7.30)
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/063098
(87)国際公開番号	WO2018/224289
(87)国際公開日	平成30年12月13日(2018.12.13)
審査請求日	令和3年5月14日(2021.5.14)
(31)優先権主張番号	1709089.5
(32)優先日	平成29年6月7日(2017.6.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)

(73)特許権者　522450118
ディープ・ピクション・ゲーエムベーハー
ドイツ連邦共和国・８１３７７・ミュンヘン・ケーダーバッハ―シュトラーセ・２９
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　アリ・エルテュルク
ドイツ・８０６３７・ミュンヘン・ヒューブナーシュトラーセ・９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　大型組織の標識、透明化及びイメージングのための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

蛍光顕微鏡用の動物組織を調製する方法であって、前記方法が、以下の工程:

c)固定動物組織における標的分子を、前記標的分子に結合することが可能な蛍光色素含有標識剤を含む標識溶液で標識して、前記蛍光色素含有標識剤で標識された固定動物組織を取得する工程であって、前記標識剤が、100kDa以下の分子量を有し、

前記固定動物組織が、工程c)における前記標的分子の前記標識の前に透過処理溶液で処理され、前記透過処理溶液及び前記標識溶液が、異なる溶液であるか、

又は、前記固定動物組織が、工程c)における前記標的分子の前記標識の間に透過処理溶液で処理され、前記透過処理溶液及び前記標識溶液が、同一の溶液である、工程、並びに

d)前記蛍光色素含有標識剤で標識された前記固定動物組織を、有機溶媒を含む透明化溶液で透明化して、蛍光顕微鏡用の前記動物組織を取得する工程

を含み、

前記透過処理溶液が、界面活性剤を含み、メチル-β-シクロデキストリン及び/又はtrans-1-アセチル-4-ヒドロキシ-L-プロリンをさらに含み、

前記動物組織が、マウス全体である、方法。

【請求項２】

前記方法が、工程c)の前に、以下の工程：

a)脱灰用溶液で固定動物組織を脱灰する工程、及び/又は

b)ヘム除去用溶液で前記固定動物組織を脱色する工程

をさらに含む、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
前記方法が、工程b)を含み、工程b)が、前記固定動物組織に、前記ヘム除去用溶液を灌流させることにより実施され、前記ヘム除去用溶液が、ヘムキレート溶液であり、前記ヘム除去用溶液が、ヘムの除去に適するアミノアルコールを含む、請求項2に記載の方法。
【請求項４】
前記ヘム除去用溶液が、界面活性剤を含み、前記界面活性剤が、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、双性イオン性界面活性剤、カオトロピック界面活性剤、又はこれらの組合せである、請求項3に記載の方法。
【請求項５】
前記アミノアルコールが、N,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン、N-ブチルジエタノールアミン、N-メチルジエタノールアミン、4-(2-ヒドロキシエチル)モルホリン、N-エチルジエタノールアミン、2-(ジイソプロピルアミノ)エタノール、4-メチルモルホリンN-オキシド又は1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジンである、請求項3又は4に記載の方法。
【請求項６】
前記蛍光色素含有標識剤が、前記蛍光色素と複合体形成した単一ドメイン抗体であり、前記単一ドメイン抗体が、前記標的分子に結合することが可能である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記有機溶媒を含む前記透明化溶液が、1.500～1.600の屈折率を有する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記有機溶媒を含む前記透明化溶液が、1.520～1.580の屈折率を有する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記有機溶媒が、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、ジベンジルエーテル、エチル3-フェニル-2-プロペノエート、アリル3-フェニルアクリレート、PEG (Mn=200-1000)、PEGDA (Mn=200-1000)、PEGMA (Mn=200-1000)、1-フェニルナフタレン及び/又はジフェニルエーテルを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記動物組織が、がん転移を含み、工程c)において前記標識剤で標識される前記標的分子が、前記がんの細胞に存在するタンパク質、脂質、DNA若しくはRNAである構造である；及び/又は
前記動物が、バイオ医薬で処理されており、前記動物組織が、前記バイオ医薬を含み、前記バイオ医薬が、工程c)において前記標識剤で標識される前記標的分子であるか、若しくは前記バイオ医薬が、in vitroでさらなる蛍光色素で標識されているか、若しくは前記バイオ医薬が、蛍光それ自体である、
請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
請求項1～10のいずれか一項に記載の蛍光顕微鏡用の動物組織を調製する方法により調製された動物組織であって、前記動物組織が、前記蛍光色素含有標識剤で標識される前記標的分子を含む、動物組織。
【請求項１２】
前記動物組織において、前記標的分子が、前記蛍光色素含有標識剤で標識され、すべての標的分子が、光シート蛍光顕微鏡により解析する場合、前記動物組織におけるその位置と無関係に単一セル解像度で検出可能である、請求項11に記載の動物組織。
【請求項１３】
請求項11又は12に記載の動物組織の解析方法であって、前記解析方法が、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法を含み、i)前記組織を蛍光顕微鏡により解析して、前記動物

組織における前記蛍光色素の蛍光を検出する工程を更に含む、方法。
【請求項１４】
転移の検出方法であって、前記方法が、請求項13に記載の動物組織の解析方法を含み、前記動物組織が、がん転移を含み、前記標識剤で標識される前記標的分子が、前記がんの細胞に存在する構造である、方法。
【請求項１５】
前記転移の検出方法が、前記動物組織全体にわたって単一セル解像度で前記動物組織における転移を検出するための方法である、請求項14に記載の転移の検出方法。
【請求項１６】
バイオ医薬の体内分布の解析方法であって、前記方法が、請求項13に記載の動物組織の解析方法を含み、前記動物が、請求項10に規定されたように前記バイオ医薬で処理されており、前記動物組織が、前記バイオ医薬を含み、前記バイオ医薬が、前記標識剤で標識される前記標的分子である、方法。
【請求項１７】
(i)前記バイオ医薬が、治療タンパク質である；
(ii)前記バイオ医薬が、治療抗体である；又は
(iii)前記バイオ医薬が、ナノ粒子である、
請求項16に記載の方法。
【請求項１８】
ナノ粒子の体内分布の解析方法であって、前記方法が、請求項13に記載の動物組織の解析方法を含み、前記動物が、前記ナノ粒子で処理されており、前記動物組織が、前記ナノ粒子を含み、前記ナノ粒子が、前記標識剤で標識される前記標的分子であり、及び/又は蛍光色素複合体形成ナノ粒子若しくは蛍光それ自体であるナノ粒子から選択される、方法。
【請求項１９】
前記ナノ粒子が、薬物を担持するか又は薬物である、請求項18に記載の方法。
【請求項２０】
試験方法であって、前記方法が、請求項13に記載の動物組織の解析方法を含み、前記方法が、
(i)神経変性の試験方法であり、前記動物組織が、ニューロンを含有する；
(ii)神経炎症の試験方法であり、前記動物組織が、ニューロンを含有する；又は
(iii)髄膜リンパ管の試験方法である、
方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、バイオ医薬の体内分布を解析するため、及びナノ粒子の体内分布を解析するための、蛍光顕微鏡用の動物組織の調製方法、この方法により取得可能な動物組織、この動物組織の解析方法、及び転移の検出方法に関する。動物組織の本発明による調製方法は、全身標識、透明化及びイメージング方法を包含する。本発明の方法は、例えば、ブタ及びヒトの脳を含む哺乳動物組織における単一細胞、単一細胞レベルでの腫瘍転移、並びにマウス全体における単一細胞レベルでのバイオ医薬の分布(例えば、インタクトなマウスのような動物全体におけるがん標的治療抗体の分布)をそれらが可視化することができるという点において有利である。
【背景技術】
【０００２】
原発腫瘍から遠位の部位で発生する転移によりがん患者が死に至ることが多いため、腫瘍の浸潤及び転移の細胞学的な詳細を理解することは、がん研究において重要である。転移は、種々の器官に影響する複雑な過程であり(Lambertら、2017年; Massague及びObenauf、2016年)、これが、全身規模での単一転移の包括的な追跡及び可視化が今日に至るまで主要な課題に留まっている理由である。現在利用可能な方法は、(例えば、前選択さ

れた器官における、組織切片又は表面上検出可能な転移結節の検査により)転移量の偏った不完全な像をもたらすか又は空間解像度が非常に不十分であり、3次元情報はわずかで、体の深部での透過が制限される(例えば、バイオルミネセンスに基づくイメージング)(de Jongら、2014年)。

【０００３】

哺乳動物組織は、天然で不透明であり、数百マイクロメートルよりも深部の任意の組織において高解像度でのイメージングを妨げる(Tuchin及びTuchin、2007年)。最近開発された組織透明化方法は、マウス脳全体におけるニューロン投射(Renierら、2016年; Yeら、2016年)及び腸における炎症過程(Gabanyiら、2016年)等のインタクトな器官を研究する道を開いてきた(Belleら、2014年; Chungら、2013年; Erturkら、2012年; Erturkら、2011年; Hamaら、2011年; Keら、2013年; Murrayら、2015年; Renierら、2014年; Susakiら、2014年; Yangら、2014年)。少数の研究では、ヒト胚(Belleら、2017年)及び成体マウス全身でさえも透明化している(Panら、2016年; Tainakaら、2014年; Yangら、2014年)。特に、ultimate DISCO(uDISCO)透明化方法は、本発明者によりこれまでに開発されたものであり、組織を元のサイズの3分の1に収縮させることにより、齧歯動物の全身の透明化とイメージングの両方を可能とする(Panら、2016年)。これは、成体マウス全身の3Dイメージング及び再構築を、光シート顕微鏡を使用して初めて可能とした。

【０００４】

しかし、今まで、完全なマウスの体における標的分子(例えば、がん細胞に存在するタンパク質)を、マウスを事前に切断することなく単一セル解像度で可視化することを可能とする方法は、未だ利用可能ではない。例えば、Yangら、2014年及びTainakaら、2014年の既知の方法では、彼らがマウスの全身透明化を達成したと主張している。しかし、このような方法では、蛍光顕微鏡によって全身を実際には解析せず、体の切断した部分を解析したのみであった。したがって、このような先行公表文献において、完全にインタクトな成体マウスを単一セル解像度で撮像した実証/証拠は存在していない。

【０００５】

加えて、今まで、ブタ脳の大きさの組織を透明にする技術は存在しない。これは全体的手法を使用する哺乳動物脳における疾患及び治療選択肢の研究に重要であり、これにより不偏性な様式で病状が全体的に示されるであろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【文献】Lambertら、2017年
【文献】Massague及びObenauf、2016年
【文献】de Jongら、2014年
【文献】Tuchin及びTuchin、2007年
【文献】Belleら、2014年
【文献】Chungら、2013年
【文献】Erturkら、2012年
【文献】Erturkら、2011年
【文献】Hamaら、2011年
【文献】Keら、2013年
【文献】Murrayら、2015年
【文献】Renierら、2014年
【文献】Susakiら、2014年
【文献】Yangら、2014年
【文献】Renierら、2016年
【文献】Yeら、2016年
【文献】Gabanyiら、2016年

【文献】Belleら、2017年
【文献】Panら、2016年
【文献】Tainakaら、2014年
【文献】Tuchin、2016年
【文献】Zipfelら、2003年
【文献】Battkeら、2011年
【文献】Gondiら、2013年
【文献】Hongら、2017年
【文献】Holliger及びHudson、2005年
【文献】Vickら、2015年
【文献】Yonedaら、2001年
【文献】Hamaら、2015年
【文献】Muyldermans、2013年
【文献】Gageら、2012年
【文献】Ghanavatiら、2014年
【文献】lornsら、2012年
【文献】Condeelis及びWeissleder、2010年
【文献】Massoud及びGambhir、2003年
【文献】Massoud及びGambhir、2007年
【文献】Ntziachristos、2010年
【文献】Pichlerら、2008年
【文献】Timpsonら、2011年
【文献】Pandey及びMahadevan、2014年
【文献】Weltiら、2013年
【文献】Butlerら、2010年
【文献】Erturkら、2016年
【文献】Wilsonら、2010年
【文献】Janewayら、1997年
【文献】Ransohoff及びEngelhardt、2012年
【文献】Louveauら、2015年
【文献】Calvoら、2011年

【発明の概要】

【０００７】

このように、動物全体及び大型の哺乳動物脳を含む組織の調製及び解析のための方法の向上が求められている。

【０００８】

本発明者は、光学的に透明な組織のイメージングは、マウスを含めて、例えば、蛍光標識したがん細胞及び/又は治療抗体をセル解像度でインタクトな体において検出する、強力な前臨床手法として有用であり得ると考える。

【０００９】

典型的には、がん細胞のin vitro又はin vivoでの蛍光標識は、可視スペクトルで発光する、GFP、YFP及びmCherryのような蛍光タンパク質の内在性の発現により達成される。しかし、体の多くの組織はまた、この領域内の高い自家蛍光を示し(Tuchin、2016年; Zipfelら、2003年)、これは、センチメートル厚のインタクトなマウスの体を通じた単一がん細胞の信頼性のある検出を妨げ得る。本発明の好ましい実施形態によれば、特に遠赤色領域内で発光ピークを有する蛍光染料でタグ付けした抗体を使用する、がん細胞のような細胞の標識は、単一細胞の信頼性のある検出について高いシグナル対バックグラウンド比をもたらすことにより、このような自家蛍光シグナルを克服するのに有利である。

【００１０】

この目標に向けて、本発明者は、蛍光顕微鏡用の動物組織の調製方法を開発した。好ま

しくは、この方法では、ナノ抗体のような抗体断片に基づく全身標識(例えば、免疫標識)技術を使用して、内在性に発現する一般的な蛍光タンパク質(例えば、EGFP、mCherry)、又は好ましくは遠赤色スペクトルの、Alexa及びAtto染料のような蛍光色素を有する内在性細胞タンパク質を特異的に標識する。次いで、本発明者は、全身DISCO透明化方法(その全体をすべての目的において参照により組み込む、Panら、2016年を参照)のような有機溶媒に基づく透明化方法を本発明の方法に組み入れた。本発明の方法は、インタクトなシースルーマウスにおいて、自家蛍光が高い組織においても、がん細胞のような細胞の可視化をこれらが可能とする点において有利である。

【００１１】

本発明による新規のこのパイプラインは、LuCiD(全身標識、u/3Disco透明化、イメージング、データ可視化)と名付けられた。本発明の方法は、例えば、腫瘍転移及びがん細胞標的抗体の体内分布を、例えば、マウスにおいて判定するために使用することができる。本発明者は、例えば、ヒト乳癌細胞を移植し、モノクローナル治療抗体6A10を炭酸脱水酵素XII(CA12)に対して直接注入したマウスを使用することにより(この抗体についての参考のために、その全体をすべての目的において参照により組み込む、Battkeら、2011年;及びGondiら、2013年を参照)、この知見を例証した。本発明の方法は、他のイメージング手法に対する種々の重要な利点を提供し、これには、自然転移を検出し、腫瘍薬物と標的との相互作用を単一細胞レベルでインタクトなマウスにおいて監視し、透明化した組織の再水和を経て定義された腫瘍微小環境の表現型を更に決定した後、抗体を標識することが可能であることを含むが、これらに限定されない。

【００１２】

がん転移及び腫瘍標的治療薬の体内分布を単一細胞レベルで不偏性に検出することは、前臨床研究において長年にわたる課題となっている。

【００１３】

ここで、本発明者は、有機溶媒に基づく全身透明化方法を使用し、例えば、マウス全身のような組織におけるセル解像度での、微小転移及び抗腫瘍治療抗体分布の解析に使用し得る方法を開発した。本発明の方法は、動物組織の解析前に動物組織を切断することなく、動物組織(例えば、マウス全体等)において単一セル解像度で標的分子を標識及び検出可能とするため、不偏性である。有利なことには、事前に切断することなく、本発明に従って調製及び単一セル解像度で解析可能な動物組織は、これまでに既知の方法によるものよりも大型である。したがって、組織の切断により(及び後続する、この動物組織の種々の切断部分の個別解析により)生じるバイアスは、本発明の方法により最小化される。例えば、選択された器官、又はこのような器官の部分のみの解析により生じるバイアスは、本発明の方法により最小化することができる。非限定的な実施形態では、本発明による方法により使用する有機溶媒は、動物組織をより小型のサイズに収縮させ、蛍光顕微鏡に動物組織をより接近し易くして顕微鏡対物を所与の最大作動距離に有するようにするため、本発明の有利な効果に寄与する。

【００１４】

本発明の方法はまた、皮膚を含む組織、例えば、皮膚を含む成体マウス全体の透明化を可能とする点において、これまでの方法と比較して有利である。

【００１５】

本発明の方法はまた、一般的に使用される落射蛍光顕微鏡を用いたイメージングであっても、バイオルミネセンスメージングにより可視化し得るものよりも更に詳細な検出がインタクトなシースルーマウスにおいて可能となるため、高度に特殊な器具を必要とすることなく、多様な研究室において容易に適用可能である点において有利である。

【００１６】

本発明の方法はまた、例えば、マウス全身における細胞レベルでの腫瘍微小転移の調査に必要とされる時間及びコストを減少させることができる。加えて、研究者らが、選択された組織/器官ではなくマウス全身を容易に評価可能であり、方法が高感度である(全身の単一細胞を同定及び定量可能である)ため、研究に使用するマウスの数をも本発明の方法に

より顕著に減らすことができる。

【００１７】

このように、ここに示す本発明の方法は、新規療法の臨床への橋渡しを従来の方法よりも更により効率的に発展させることができる。

【００１８】

その上、組織を脆弱とするCUBIC及びPACT法のような既知の組織透明化方法とは異なり、蛍光顕微鏡用の動物組織の本発明による調製方法は、動物組織を強固とする。このように、有利なことには、本発明の方法により取得可能な動物組織は、種々の部分への切断及び蛍光顕微鏡による切断後の部分のさらなる解析に適する。本発明によれば、事前に切断することなく本発明に従って調製及び単一セル解像度で解析可能な動物組織が、これまでに既知の方法によるものよりも大型であるため、本発明の方法により取得可能な動物組織の切断を必要としないことが多いことが理解され得る。しかし、切断が望ましい場合も、本発明により取得可能な動物組織は、有利に使用することができる。これは、本発明の方法により同定されている微小転移、及び単離後のその微小環境の特性を更に決定するのに特に有用であり得る。

【００１９】

ナノボディを使用する全身免疫染色のような組織標識

内在性蛍光タンパク質のような内在性タンパク質の厚い生体組織におけるイメージングでは、青緑色スペクトルの自家蛍光、並びに長尺(lengthy)なイメージング及び保存における退色を含む、主要な課題を提示する。本発明の例示的実施形態では、成体マウス全体における単一腫瘍細胞の検出のための最も質の高いシグナルを達成するために、内在性蛍光タンパク質、例えば、がん細胞における内在性蛍光タンパク質を、安定な遠赤色蛍光色素、例えば、Atto又はAlexa染料で標識(例えば、免疫標識)することは、有利である。この手法は、これが、シグナル対バックグラウンド比を20倍まで増加させ、組織において、特にセンチメートル厚のマウスの体においても、単一細胞の可視化を可能とする点において有利である。本発明によれば、近赤外蛍光色素のような、更により長い波長のスペクトルの蛍光色素の使用は、画質を更に増加させ、マウス全身における細胞内構造/分子の研究を潜在的に可能とするのに向いている可能性があることが理解され得る(適する蛍光色素の例としては、その全体をすべての目的において参照により組み込む、Hongら、2017年を参照)。

【００２０】

本発明の方法では、100kDa以下の分子量を有する、蛍光色素含有標識剤(例えば、蛍光色素と複合体形成した抗体断片)による標識を使用する。このような標識剤の例として、現在、限られた数の市販のナノボディが存在するが、ナノブースター(nano-booster)(ChromoTek社)は、本発明の方法に使用可能であり、幅広く選択可能な21種の多様な蛍光タンパク質、例えばEGFP、YFP、Venus、mCherry及びmRFPを染色することができる。或いは、本発明の方法ではまた、他のナノボディ又は従来の抗体(例えばscFv)の小断片を使用し得る(このような標識剤の例としては、例えば、その全体をすべての目的において参照により組み込む、Holliger及びHudson、2005年を参照)。或いは、新規のナノボディを本発明の方法のために生成して、全身に影響する病状を研究することができる。例えば、標識剤(例えば、ナノボディ)は、炎症又は感染マーカーとして使用することができ、全身に影響する、多発性硬化症若しくは関節リウマチのような炎症性疾患、又は感染症についてのマウス全体における不偏性読み出し情報の収集に役立ち得る。更に、本発明の実施例では、本発明のLuCiD法により撮像した動物由来の組織を、後続して再水和し、標準プロトコルを使用して従来の抗体で染色することができ、これにより腫瘍/転移及びその微小環境の完全な表現型特性の決定が可能となることを実証する。

【００２１】

本発明による微小転移の検出

例えば、齧歯動物の全身における、セル解像度での腫瘍微小転移の不偏性ハイスループットマッピングは、腫瘍細胞の播種の生物学的な背景を明らかとするのに有用なツールと

なり得る。例示的実施形態では、本発明は、マウス全身における腫瘍微小転移の体積測定イメージングに使用し得るLuCiD法を包含する。単一面レーザー走査光シート顕微鏡の使用は、例えば、シースルーマウスにおいてがん細胞を検出するための、本発明による解析方法の最も好ましい実施形態であるが、標準的蛍光顕微鏡を利用したとしてもまた、新たな見識を提供することができる。例えば、本発明者は、直径20μmほどの小型の微小転移を落射蛍光顕微鏡を使用して検出した。加えて、落射蛍光イメージングは、透明化したマウスの体の直接のスキャンを数分以内に実施して、目的の領域を決定した後、光シート顕微鏡による大量のデータセットを収集するのに役立つ。後続の光シート顕微鏡イメージングでは、落射蛍光データに基づいて目的の器官/領域のみに焦点を合わせることができる。この手法は、行われる研究を顕著に迅速化し、解析するデータ量を減少させ得る。以下に示す本発明の説明的実施例では、光シート顕微鏡イメージングは、単一のマウスの体についてのデータは約4TBであったのに対して、肺のような単一器官についてのデータは約100GB生成した。このような説明的実施例では、本発明者は、Vision4Dソフトウェア(Arivis社)を使用して、超顕微法により収集した3Dイメージングスタックを結合した。これは、完全なマウスからセル解像度で取得したTBサイズのデータの結合及び領域分割が可能である。顕微鏡画像の解析のための他の既知のコンピュータプログラムはまた、本発明に従って使用することができる。

【００２２】

本発明者は、有利なことに、本発明の方法が、マウス全身におけるがん転移の細胞レベルでの検出及びマッピングに適し、単一の播種性がん細胞の正確な位置の同定を可能とすることをここに実証した。重要なことには、本発明者はまた、本発明の方法が、従来の抗体、例えばRNAseqによる遺伝子発現プロファイリング、及びプロテオミクス(質量分析)による、同定した転移組織の再検出を可能とすることを示した。

【００２３】

このように、本発明によれば、蛍光顕微鏡用の動物組織の本発明の調製方法は、タンパク質(機能性エピトープ)及びDNA/RNAを保つ点において有利である。

【００２４】

したがって、本発明の方法は、遠位の器官において同定された、微小転移及び単一腫瘍細胞の特性決定及び分子スクリーニングを更に可能とすることができる。本発明によれば、腫瘍細胞、例えば、がん幹細胞、又は腫瘍微小環境由来の炎症細胞及び細胞外基質成分、例えば、がん関連線維芽細胞、T細胞及びマクロファージ等の特定のサブタイプの分子マーカーの使用は、組織、例えば、齧歯動物全身の転移における的確な時空間分布の決定に役立ち得る。

【００２５】

バイオ医薬の体内分布の本発明による解析

バイオ医薬(例えば、抗体医薬)の体内分布の正確な判定は、腫瘍治療のような治療に対するその特異性及び有用性の評価に重要であるが、このような情報をインタクトな生体において細胞レベルでもたらすことができる方法は、存在していない。ここで、本発明者は、本発明の方法(例示的実施形態において「LuCiD」法とも呼ばれる)を、単一腫瘍細胞の分布だけでなく抗体に基づく治療薬をも研究するために使用することができる新たなツールとして提示する。本発明の説明的実施例は、本発明の方法が、特に、肺、腎臓、脳及び肝臓を含む種々の器官における転移について、抗体標的腫瘍細胞の同定を可能とすることができることを実証する。例えば、本発明者は、驚くべきことに、肺における多くの微小転移が、抗CA12治療抗体6A10により標的化されたが、肺及び肝臓にわたって分布する、いくつかの微小転移は、抗体により標的化されていなかったことを観察した。最終的には、本発明の解析方法はまた、バイオ医薬(例えば、治療抗体)の非標的組織(がん治療抗体の場合は非癌組織等)への結合を検出して、潜在的なオフターゲット作用を指摘するためにも使用することができる点において有利である。これは、マウス全身においての以下に示す非限定的実施例において例証されており、器官における定量化を示す。

【００２６】

ナノ粒子の体内分布の本発明による解析

ナノ粒子の体内分布の例示的解析方法では、ナノ粒子(DNAオリガミ又はカーボンナノチューブ)は、PEGのようなポリマーと複合体形成させて、循環時間及び安定性を増大させている。これらはまた、抗体、ペプチド、アプタマーのような標的部分によりタグ付けされ得る。例えば、CpGペプチドを使用して、免疫細胞に対してそれを標的とすることができる。最終的には、それらはまた、蛍光色素(例えば、Alexa又はAtto色素)と複合体形成させて、本発明の方法に従って使用することができる。複合体形成したナノ粒子は、PBS中200nM～2μMの濃度に溶解することができる。次いで、この溶液100～200μLをマウスにi.v.又はi.p.のいずれかで注射する。その後、マウスを早くて3時間(又はそれよりも長く)灌流する。ナノ粒子の体内分布を本発明の方法により判定する。

【００２７】

このように、本発明は、有利な標識及び解析パイプラインを提供する。このパイプラインは、例えば、マウス全身における単一セル解像度での腫瘍微小転移及び抗体に基づく療法の可視化及び解析を可能とする。本発明の方法は、時間及びコスト効率が良いため、種々の生物医学的問題、例えば、生体全身に影響する、種々の病状又は発生過程に関する生物医学的問題を調査するために使用することができる。

【００２８】

したがって、本発明は、次の好ましい実施形態を包含する。

【００２９】

1．次の工程:

a)脱灰用溶液で固定動物組織を任意選択で脱灰する工程と、

b)ヘム除去用溶液で固定動物組織を任意選択で脱色する工程と、

c)固定動物組織における標的分子を、100kDa以下の分子量を有する、この標的分子に結合することが可能な蛍光色素含有標識剤を含む標識溶液で標識して、この蛍光色素含有標識剤で標識した固定動物組織を取得する工程であって、

工程c)における標的分子のこの標識の前に固定動物組織を透過処理溶液で処理し、透過処理溶液及び標識溶液が、異なる溶液であるか、

又は、工程c)における標的分子のこの標識において固定動物組織を透過処理溶液で処理し、透過処理溶液及び標識溶液が、同一の溶液である、工程と、

d)この蛍光色素含有標識剤で標識した固定動物組織を、有機溶媒を含む透明化溶液で透明化して、蛍光顕微鏡用のこの動物組織を取得する工程と

を含む、蛍光顕微鏡用の動物組織の調製方法。

2．工程a)を含む、項目1に記載の方法。

3．工程a)において、脱灰用溶液が、EDTA及び$NaHCO_3$を含む溶液、ギ酸を含む溶液、HNO_3を含む溶液、又はHClを含む溶液から選択される、項目1又は2に記載の方法。

4．この固定動物組織が、4wt%のパラホルムアルデヒド及び任意選択でヘパリンを含む固定溶液によって固定することにより取得可能である、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

5．工程b)を含む、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

6．工程b)が、固定動物組織を、このヘム除去用溶液で灌流することにより実施される、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

7．このヘム除去用溶液が、ヘムキレート溶液である、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

8．工程b)において、このヘム除去用溶液が、ヘムの除去に適するアミノアルコール及び任意選択で界面活性剤(detergent)を含む、項目1～7のいずれか一項に記載の方法。

9．このヘム除去用溶液が、界面活性剤を含み、この界面活性剤が、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、双性イオン性(zwitterionic)界面活性剤、カオトロピック界面活性剤又はこれらの組合せである、項目8に記載の方法。

10．この界面活性剤が、イオン性界面活性剤であり、ドデシル硫酸ナトリウム又はデオキシコレートである、項目9に記載の方法。

11. この界面活性剤が、非イオン性界面活性剤であり、4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェニル-ポリエチレングリコール、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール、ポリエチレングリコールtert-オクチルフェニルエーテル又はポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートである、項目9に記載の方法。
12. この界面活性剤が、双性イオン性界面活性剤であり、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート水和物である、項目9に記載の方法。
13. この界面活性剤が、カオトロピック界面活性剤であり、尿素である、項目9に記載の方法。
14. このアミノアルコールが、N,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン、N-ブチルジエタノールアミン、N-メチルジエタノールアミン、4-(2-ヒドロキシエチル)モルホリン、N-エチルジエタノールアミン、2-(ジイソプロピルアミノ)エタノール、4-メチルモルホリンN-オキシド又は1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジンである、項目8～13のいずれか一項に記載の方法。
15. このアミノアルコールが、N,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミンである、項目8～14のいずれか一項に記載の方法。
16. ヘム除去用溶液が、1:2又は1:3希釈の次の試薬、好ましくは0.1MのPBS中、0.1MのPBS中25wt%の尿素、25wt%のN,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン、15wt%のトリトンX-100である、項目15に記載の方法。
17. 工程b)において、このヘム除去用溶液が、ヘムを酸化するための酸化試薬を含む、項目1～16のいずれか一項に記載の方法。
18. ヘムを酸化するための酸化試薬が、過酸化ベンジル、3-クロロペルオキシ安息香酸又はモノペルオキシフタル酸マグネシウム六水和物である、項目17に記載の方法。
19. ヘムを酸化するための酸化試薬が、過酸化ベンジルである、項目17に記載の方法。
20. 蛍光色素含有標識剤が、60kDa以下の分子量を有する、項目1～19のいずれか一項に記載の方法。
21. 蛍光色素含有標識剤が、50kDa以下の分子量を有する、項目1～20のいずれか一項に記載の方法。
22. 蛍光色素含有標識剤が、40kDa以下の分子量を有する、項目1～21のいずれか一項に記載の方法。
23. 蛍光色素含有標識剤が、30kDa以下の分子量を有する、項目1～22のいずれか一項に記載の方法。
24. 蛍光色素含有標識剤が、20kDa以下の分子量を有する、項目1～23のいずれか一項に記載の方法。
25. この蛍光色素が、赤外又は赤色蛍光を発することが可能である、項目1～24のいずれか一項に記載の方法。
26. この蛍光色素が、近赤外又は遠赤色蛍光を発することが可能である、項目1～25のいずれか一項に記載の方法。
27. この蛍光色素の最大発光が、480nmよりも大きい波長で生じる、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。
28. この蛍光色素の最大発光が、500nmよりも大きい波長で生じる、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。
29. この蛍光色素の最大発光が、550nmよりも大きい波長で生じる、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。
30. この蛍光色素の最大発光が、590nmよりも大きい波長で生じる、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。
31. この蛍光色素の最大発光が、600nmよりも大きい波長で生じる、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。
32. この蛍光色素の最大発光が、640nmよりも大きい波長で生じる、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。
33. この蛍光色素の最大発光が、700nmよりも大きい波長で生じる、項目1～26のいずれ

か一項に記載の方法。
34. この蛍光色素の最大発光が、640nm～700nmの波長範囲で生じる、項目1～26のいずれか一項に記載の方法。
35. この蛍光色素の最大発光が、1000nmよりも小さい又は900nmよりも小さい波長で生じる、項目1～33のいずれか一項に記載の方法。
36. この蛍光色素の最大発光が、800nmよりも小さい波長で生じる、項目1～33のいずれか一項に記載の方法。
37. 蛍光色素含有標識剤が、この蛍光色素と複合体形成した抗体断片であり、この抗体断片が、この標的分子に結合することが可能である、項目1～36のいずれか一項に記載の方法。
38. 蛍光色素含有標識剤が、この蛍光色素と複合体形成したナノボディであり、このナノボディが、この標的分子に結合することが可能である、項目1～37のいずれか一項に記載の方法。
39. 工程c)が、固定動物組織を、蛍光色素含有標識剤を含むこの標識溶液で灌流することにより実施される、項目1～38のいずれか一項に記載の方法。
40. 蛍光色素含有標識剤が、蛍光染料であり、この蛍光染料が、この標的分子に結合することが可能である、項目1～39のいずれか一項に記載の方法。
41. 蛍光色素含有標識剤が、蛍光染料であり、この蛍光染料が、ニッスル、ヨウ化プロピジウム、メトキシ-x04、酢酸クレシルバイオレット、ピロニンY、チアジンレッド、レクチン、DiI、Atto染料、及びTo-pro3である、項目1～40のいずれか一項に記載の方法。
42. この有機溶媒が、この動物の組織の屈折率から5%以下で偏向する屈折率を有する、項目1～41のいずれか一項に記載の方法。
43. 有機溶媒を含むこの透明化溶液が、この動物の組織の屈折率から2%以下で偏向する屈折率を有する、項目1～42のいずれか一項に記載の方法。
44. 有機溶媒を含むこの透明化溶液が、1.500～1.600の屈折率を有する、項目1～43のいずれか一項に記載の方法。
45. 有機溶媒を含むこの透明化溶液が、1.520～1.580の屈折率を有する、項目1～44のいずれか一項に記載の方法。
46. この有機溶媒が、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、ジベンジルエーテル、エチル3-フェニル-2-プロペノエート、アリル3-フェニルアクリレート、PEG (Mn=200-1000)、PEGDA (Mn=200-1000)、PEGMA (Mn=200-1000)、1-フェニルナフタレン及び/又はジフェニルエーテルを含む、項目1～45のいずれか一項に記載の方法。
47. 有機溶媒を含むこの透明化溶液が、抗酸化剤を更に含む、項目1～46のいずれか一項に記載の方法。
48. 有機溶媒を含むこの透明化溶液が、4:8:3から10:20:3までの体積比のベンジルアルコール、安息香酸ベンジル及びジフェニルエーテル、並びにこの抗酸化剤からなる、項目1～47のいずれか一項に記載の方法。
49. この抗酸化剤が、DL-アルファ-トコフェロールである、項目47又は48に記載の方法。
50. この抗酸化剤が、この透明化溶液中に0.4vol%の量で存在する、項目47又は48又は49のいずれか一項に記載の方法。
51. 工程d)が、この蛍光色素含有標識剤で標識した固定動物組織を、有機溶媒を含むこの透明化溶液で灌流することにより実施される、項目1～50のいずれか一項に記載の方法。
52. この蛍光色素含有標識剤で標識した固定動物組織を、有機溶媒を含むこの透明化溶液で少なくとも6時間灌流する、項目51に記載の方法。
53. 工程d)が、この透明化溶液による灌流の前に、0vol%～100vol%のさらなる有機溶媒を含む脱水溶液の勾配を上昇させた灌流を更に含む、項目51又は52に記載の方法。
54. 0vol%～100vol%のこのさらなる有機溶媒を含む脱水溶液のこの勾配を上昇させたこの灌流の後に、別の有機溶媒を含む脱脂溶液により灌流する、項目53に記載の方法。
55. このさらなる有機溶媒が、tert-ブタノール、テトラヒドロフラン(THF)、メタノール、エタノール又は1,4-ジオキサンであり、この勾配を上昇させたこの灌流が、このさらな

る有機溶媒の融解温度を超える温度で実施される、項目54に記載の方法。
56. この別の有機溶媒が、ジクロロメタン(dichoromethane)、クロロホルム、メタノール、ヘキサン、ブタノール、酢酸エチル、tert-ブチルメチルエーテルであり、この別の有機溶媒によるこの灌流が、この別の有機溶媒の融解温度を超える温度で実施される、項目54又は55に記載の方法。
57. この標識溶液及びこの透過処理溶液及びこの透明化溶液が、加圧することにより、好ましくはポンプで加圧することにより能動的に送達される、項目1～56のいずれか一項に記載の方法。
58. 標識溶液による標的分子のこの標識及び透過処理溶液によるこの処理が、80mmHgよりも高い、好ましくは150mmHgよりも高い圧力で灌流することにより実施される、項目1～57のいずれか一項に記載の方法。
59. 標識溶液による標的分子のこの標識及び透過処理溶液によるこの処理が、220～240mmHgの圧力、好ましくは230mmHgの圧力で灌流することにより実施される、項目1～58のいずれか一項に記載の方法。
60. 固定及び脱色した動物組織が、工程c)における標的分子のこの標識前に透過処理溶液により処理され、透過処理溶液及び標識溶液が、異なる溶液である、項目1～59のいずれか一項に記載の方法。
61. この透過処理溶液が、項目54又は55に規定する脱水溶液である、項目60に記載の方法。
62. この透過処理溶液が、項目54又は56に規定する脱脂溶液である、項目60に記載の方法。
63. この透過処理溶液が、酢酸を含む、項目60に記載の方法。
64. この透過処理溶液が、塩酸グアニジン及び/又は酢酸ナトリウムを含む、項目60に記載の方法。
65. 固定動物組織が、工程c)における標的分子のこの標識において透過処理溶液で処理され、透過処理溶液及び標識溶液が、同一の溶液である、項目1～59のいずれか一項に記載の方法。
66. 工程b)が、80mmHgよりも高い、好ましくは150mmHgよりも高い圧力で、このヘム除去用溶液により固定動物組織を灌流することにより実施される、項目1～65のいずれか一項に記載の方法。
67. 工程b)が、220～240mmHgの圧力、好ましくは230mmHgの圧力で、このヘム除去用溶液により固定動物組織を灌流することにより実施される、項目1～66のいずれか一項に記載の方法。
68. 工程d)における灌流が、80mmHgよりも高い、好ましくは150mmHgよりも高い圧力で実施される、項目51～67のいずれか一項に記載の方法。
69. 工程d)における灌流が、220～240mmHgの圧力、好ましくは230mmHgの圧力で実施される、項目51～67のいずれか一項に記載の方法。
70. この動物組織が、哺乳動物由来である、項目1～69のいずれか一項に記載の方法。
71. この動物組織が、非ヒト哺乳動物又はヒト由来である、項目1～70のいずれか一項に記載の方法。
72. この動物組織が、齧歯動物由来である、項目1～71のいずれか一項に記載の方法。
73. この動物組織が、マウス由来である、項目1～72のいずれか一項に記載の方法。
74. この動物組織が、マウス全体である、項目1～73のいずれか一項に記載の方法。
75. この動物組織が、ブタ脳である、項目1～71のいずれか一項に記載の方法。
76. この動物組織が、器官全体又はその一部である、項目1～58のいずれか一項に記載の方法。
77. 工程c)においてこの標識剤で標識するこの標的分子が、この固定動物組織の細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質、脂質、DNA又はRNA、より好ましくはこの固定動物組織の細胞に存在するタンパク質である、項目1～76のいずれか一項に記載の方法。
78. この動物組織が、がんを含み、工程c)においてこの標識剤で標識するこの標的分子が

、このがんの細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質、脂質、DNA又はRNA、より好ましくはこのがんの細胞に存在するタンパク質である、項目1～77のいずれか一項に記載の方法。
79. この動物組織が、がん転移を含み、工程c)においてこの標識剤で標識するこの標的分子が、このがんの細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質、脂質、DNA又はRNA、より好ましくはこのがんの細胞に存在するタンパク質である、項目1～78のいずれか一項に記載の方法。
80. この動物が、バイオ医薬で処理されており、この動物組織が、このバイオ医薬を含み、このバイオ医薬が、工程c)においてこの標識剤で標識されるこの標的分子であるか、又はこのバイオ医薬が、in vitroでさらなる蛍光色素で標識されているか、又はこのバイオ医薬が、蛍光それ自体である、項目1～79のいずれか一項に記載の方法。
81. バイオ医薬が、低分子である、項目80に記載の方法。
82. バイオ医薬が、治療タンパク質である、項目80に記載の方法。
83. バイオ医薬が、治療抗体である、項目80に記載の方法。
84. ヒト又は動物の体の手術又は療法による治療方法でもなく、ヒト又は動物の体に対して実施する診断方法でもない、項目1～83のいずれか一項に記載の方法。
85. ex vivoでの方法である、項目1～84のいずれか一項に記載の方法。
86. 工程d)において取得する蛍光顕微鏡用の動物組織が、工程b)において使用する固定動物組織よりも体積が小さい、項目1～85のいずれか一項に記載の方法。
87. 工程d)において取得する蛍光顕微鏡用の動物組織が、工程b)において使用する固定動物組織よりも体積が40%～75%小さい、項目86に記載の方法。
88. この蛍光色素含有標識剤で標識されるこの標的分子を含む、蛍光顕微鏡用の動物組織を調製するための項目1～87のいずれか一項に記載の方法により取得可能な動物組織。
89. 齧歯動物全体、好ましくはマウス全体である、項目88に記載の動物組織。
90. 器官全体又はその一部である、項目88に記載の動物組織。
91. 哺乳動物器官全体である、項目90に記載の動物組織。
92. 2×2×2cmのサイズの組織塊である、項目88に記載の動物組織。
93. この動物組織において、この標的分子が、この蛍光色素含有標識剤で標識され、すべての標的分子が、光シート蛍光顕微鏡により解析する場合、動物組織におけるその位置に無関係に単一セル解像度で検出可能である、項目88～92のいずれか一項に記載の動物組織。
94. i) この組織を蛍光顕微鏡により解析して、この動物組織におけるこの蛍光色素の蛍光を検出する工程を含む、項目88～93のいずれか一項に記載の動物組織の解析方法。
95. ii) この蛍光色素の検出した蛍光を可視化して、この動物組織の画像、好ましくは3次元画像を取得する工程を更に含む、項目94に記載の解析方法。
96. この画像が、この動物組織全体にわたって単一セル解像度を有する画像である、項目95に記載の解析方法。
97. この動物組織が、20cm以下の厚さ、好ましくは10cm以下の厚さ、より好ましくは5cm以下の厚さである、項目94～96のいずれか一項に記載の解析方法。
98. この動物組織が、2cm以下の厚さであり、好ましくは1.5～2cmの厚さである、項目94～97のいずれか一項に記載の解析方法。
99. 工程i)の前に、項目1～87のいずれか一項に記載の方法を更に含む、項目94～98のいずれか一項に記載の解析方法。
100. この蛍光顕微鏡が、光シート蛍光顕微鏡、落射蛍光顕微鏡、多光子顕微鏡及び共焦点蛍光顕微鏡からなる群から選択される、項目94～99のいずれか一項に記載の解析方法。
101. この蛍光顕微鏡が、光シート蛍光顕微鏡である、項目94～100のいずれか一項に記載の解析方法。
102. 工程i)の後に、iii) 目的の組織領域を切断する工程、iv) 切断した目的の組織領域を再水和する工程、及びv) 切断した目的の組織領域を更に解析する工程を更に含む、項目94～101のいずれか一項に記載の解析方法。

103. 工程v)において、切断した目的の組織領域を、抗体に基づく免疫染色により、又は遺伝子プロファイリング、好ましくはRNAseqによる遺伝子プロファイリングにより、又はプロテオミクス、好ましくは質量分析によるプロテオミクスにより更に解析する、項目102に記載の解析方法。
104. 切断した目的の組織領域が、転移、好ましくは腫瘍細胞200個未満のサイズを有する転移、より好ましくは腫瘍細胞100個未満のサイズを有する転移、更により好ましくは腫瘍細胞75個未満のサイズを有する転移、更により好ましくは腫瘍細胞50個未満のサイズを有する転移、及び更により好ましくは腫瘍細胞25個未満のサイズを有する転移を含む、項目102又は103に記載の解析方法。
105. 項目94～104のいずれか一項に記載の、動物組織の解析方法を含む、転移の検出方法。
106. この動物組織全体にわたって単一セル解像度でこの動物組織における転移を検出するための方法である、項目105に記載の、転移の検出方法。
107. この動物組織が、がん転移を含み、この標識剤により標識するこの標的分子が、このがんの細胞に存在する構造、好ましくはタンパク質である、項目105又は106に記載の、転移の検出方法。
108. 項目94～104のいずれか一項に記載の、動物組織の解析方法を含み、この動物が、項目80に規定されたようにバイオ医薬で処理されており、この動物組織が、このバイオ医薬を含み、このバイオ医薬が、この標識剤で標識されるこの標的分子である、バイオ医薬の体内分布の解析方法。
109. バイオ医薬が、治療タンパク質である、項目108に記載の方法。
110. バイオ医薬が、治療抗体である、項目108に記載の方法。
111. バイオ医薬が、ナノ粒子である、項目108に記載の方法。
112. 項目94～104のいずれか一項に記載の、動物組織の解析方法を含み、この動物が、ナノ粒子で処理されており、この動物組織が、このナノ粒子を含み、このナノ粒子が、この標識剤で標識されるこの標的分子である、及び/又は蛍光色素複合体形成ナノ粒子若しくは蛍光それ自体であるナノ粒子から選択される、ナノ粒子の体内分布の解析方法。
113. ナノ粒子が、薬物を担持するか又は薬物である、項目112に記載の、ナノ粒子の体内分布の解析方法。
114.項目94～104のいずれか一項に記載の、動物組織の解析方法を含み、この動物組織が、ニューロンを含む、神経変性の試験方法。
115. この動物組織におけるニューロンが、好ましくは蛍光タンパク質を発現することにより、蛍光標識されている、項目114に記載の、神経変性の試験方法。
116. 神経変性の試験が、神経軸索の小疱形成の解析を含む、項目114又は115に記載の、神経変性の試験方法。
117. 項目94～104のいずれか一項に記載の、動物組織の解析方法を含み、この動物組織が、ニューロンを含む、神経炎症の試験方法。
118. この動物組織における免疫細胞が、好ましくは蛍光タンパク質を発現することにより、蛍光標識されている、項目117に記載の、神経炎症の試験方法。
119. 蛍光標識した免疫細胞のシグナル強度及び/又は細胞数を解析することにより免疫細胞の活性化を試験することを含む、項目117又は118に記載の、神経炎症の試験方法。
120. 項目94～104のいずれか一項に記載の、動物組織の解析方法を含み、この動物組織が、好ましくはインタクトなマウスの頭部を含む、髄膜リンパ管の試験方法。
121. この髄膜リンパ管が、好ましくはマーカータンパク質により、又はオボアルブミンのようなトレーサーにより蛍光標識される、項目120に記載の、髄膜リンパ管の試験方法。
122. この髄膜リンパ管が、この標的分子を含む、項目120又は121に記載の、髄膜リンパ管の試験方法。
【図面の簡単な説明】
【００３０】

【図１ａ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1a)は、成体マウスの体に対するLuCiDパイプラインの工程である。目的のがん細胞を含む特定領域を切断、再水和し、更に抗体標識により特性を決定し得る。
【図１ｂ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1b)は、種々のイメージング波長での光の組織透過の実証であり、緑色(励起470nm)(左)、赤色(励起561nm)(中央)、及び遠赤色チャネル(励起640)(右)で光シート顕微鏡を使用して撮像した、透明化マウスの同一の肝臓領域(いかなる標識もしない)である。
【図１ｃ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1c)は、(図1b)において破線により示す領域の最大強度に対して正規化した蛍光シグナル強度プロファイルである。
【図１ｄ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1d)は、透明化した非標識マウスの肺におけるmCherryを発現する腫瘍転移の代表的な光シート画像である。
【図１ｅ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1e)は、Atto594と複合体形成した抗mCherryナノボディでブーストした転移である。
【図１ｆ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1f)は、Atto647Nと複合体形成した抗mCherryナノボディでブーストした転移である。
【図１ｇ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1g)は、パネルの破線に沿ったシグナル強度プロファイルのプロットである(各チャネルから1マウスあたりn=3転移)。
【図１ｈ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1h)は、(図1g)のデータのバックグラウンドに対して正規化した蛍光シグナル強度プロファイルである。
【図１ｉ】深部組織蛍光イメージングのための、LuCiDパイプライン及びナノレベルでブーストする利点を示す図である。(図1i)は、LuCiD後のシースルーマウスにおける遠赤色スペクトルでの脳の腫瘍転移の深部組織イメージング例である。腫瘍微小転移(矢頭)は、脳組織の数ミリメートルの深度まで見ることができる。
【図２ａ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2a)は、LuCiD処理前の高腫瘍量マウスの正常バイオルミネセンス画像である。
【図２ｂ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2b)は、LuCiD処理前の高腫瘍量マウスの高露光バイオルミネセンス画像である。
【図２ｃ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2c～図2h)において、LuCiD処理後の同一マウスの落射蛍光画像は、転移(破線の四角形)のさらなる詳細をバイオルミネセンスと比較して示す。
【図２ｄ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2c～図2h)において、LuCiD処理後の同一マウスの落射蛍光画像は、転移(破線の四角形)のさらなる詳細をバイオルミネセンスと比較して示し、加えて(図2d)では、バイオルミネセンスにおいて可視の主要な転移をバルクシグナルとして示す。
【図２ｅ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2c～図2h)において、LuCiD処理後の同一マウスの落射蛍光画像は、転移(破線の四角形)のさらなる詳細をバイオルミネセンスと比較して示し、加えて(図2e)では、バイオルミネセンスにおいて見ることができる主要な転移をバルクシグナルとして示す。
【図２ｆ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2c～図2h)において、LuCiD処理後の同一マウスの落射蛍光画像は、転移(破線の四角形)のさらなる詳細をバイオルミネセンスと比較して示し、(図2f)では、肺において容易に検出され得る小型の微小転移を含む(矢頭)。

【図２ｇ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2c～図2h)において、LuCiD処理後の同一マウスの落射蛍光画像は、転移(破線の四角形)のさらなる詳細をバイオルミネセンスと比較して示し、加えて(図2g)では、原発腫瘍を示す。
【図２ｈ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2c～図2h)において、LuCiD処理後の同一マウスの落射蛍光画像は、転移(破線の四角形)のさらなる詳細をバイオルミネセンスと比較して示し、(図2h)では、脚部において容易に検出され得る小型の微小転移を含む。
【図２ｉ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2i)は、(図2a～図2c)に示す破線の四角形の領域に対応する光シートイメージングデータから取得した3D領域分割の正面像である。簡略化のために、ごくわずかな器官:心臓及び肺を領域分割し、腫瘍を黒色で示す。
【図２ｊ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2j)は、(図2a～図2c)に示す破線の四角形の領域に対応する光シートイメージングデータから取得した3D領域分割の側面像である。簡略化のために、ごくわずかな器官:心臓及び肺を領域分割し、腫瘍を黒色で示す。
【図２ｋ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2k)は、(図2j)に示す矢状面から腫瘍を示す光シート顕微鏡の元データ(500μm投影)である。
【図２ｌ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2l)は、(図2j)に示す矢状面から腫瘍を示す光シート顕微鏡の元データ(500μm投影)である。
【図２ｍ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2m)は、(図2j)に示す矢状面から腫瘍を示す光シート顕微鏡の元データ(500μm投影)である。
【図２ｎ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2n)は、(図2j)に示す矢状面から腫瘍を示す光シート顕微鏡の元データ(500μm投影)である。
【図２ｏ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2o)は、LuCiDにより検出された単一腫瘍細胞(囲み領域)を示す高解像度光シート顕微鏡画像(単一面)である。図7～図9をまた参照されたい。
【図２ｐ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2p)は、LuCiDにより検出された核(ヨウ化プロピジウム(PI)で標識)を示す高解像度光シート顕微鏡画像(単一面)である。図7～図9をまた参照されたい。
【図２ｑ】高腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化を示す図である。(図2q)は、LuCiDにより検出された単一腫瘍細胞(図2oの囲み領域)及び核(図2pにおいてヨウ化プロピジウム(PI)で標識)を示す高解像度光シート顕微鏡画像(単一面)である。図7～図9をまた参照されたい。
【図３ａ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3a)は、LuCiD前の低腫瘍量マウスの正常露光バイオルミネセンス画像である。腋窩リンパ節(A.L.N)における原発腫瘍及び転移を(図3a)において矢でマークする。
【図３ｂ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3b)は、LuCiD前の低腫瘍量マウスの高露光バイオルミネセンス画像である。
【図３ｃ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3c)は、バイオルミネセンスと比較した腫瘍転移のさらなる詳細を示すLuCiD処理マウスの落射蛍光画像である。
【図３ｄ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3d)は、バイオルミネセンスと比較した腫瘍転移のさらなる詳細を示すLuCiD処理マウスの落射蛍光画像である。

【図３ｅ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3e)は、バイオルミネセンスと比較した腫瘍転移のさらなる詳細を示すLuCiD処理マウスの落射蛍光画像であり、バイオルミネセンスにより検出不可能な、20mmよりも更に小型のいくつかの肺の微小転移(矢頭)を含む。
【図３ｆ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3f)は、バイオルミネセンスと比較した腫瘍転移のさらなる詳細を示すLuCiD処理マウスの落射蛍光画像である。
【図３ｇ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3g)は、光シート顕微鏡イメージング後のマウス全体の3D再構築の側面像である。マウスの体におけるすべての腫瘍/転移を領域分割する(いくつかを矢でマークする)。
【図３ｈ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3h)は、光シート顕微鏡イメージング後のマウス全体の3D再構築の腹部像である。マウスの体におけるすべての腫瘍/転移を領域分割する(いくつかを矢でマークする)。
【図３ｉ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3i)は、マウス全体におけるすべての転移のそのサイズ(細胞数)及び量に基づく定量化を示す。
【図３ｊ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3j)は、マウス全身における腫瘍転移の2D分布図である。斑点のサイズは、腫瘍転移の体積を表す。マークした領域の相対深度を右側に示す。
【図３ｋ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3k)は、腫瘍細胞(白色の点)自家蛍光バックグラウンドを示す、肺において検出された腫瘍転移の3D領域分割である。
【図３ｌ】低腫瘍量のインタクトなマウスの全身における転移の可視化及び定量化を示す図である。(図3l)は、(図3k)に示す肺における、すべての転移の3D散布図であり、そのサイズ及び位置を表す。
【図４ａ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4a)は、LuCiD前にAlexa568と複合体形成した治療抗体6A10を注射した低腫瘍量マウスの正常露光バイオルミネセンス画像である。ルシフェラーゼシグナルを有する腫瘍のみ(治療抗体ではなく)を見ることができることに留意されたい。
【図４ｂ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4b)は、LuCiD前にAlexa568と複合体形成した治療抗体6A10を注射した低腫瘍量マウスの高露光バイオルミネセンス画像である。ルシフェラーゼシグナルを有する腫瘍のみ(治療抗体ではなく)を見ることができることに留意されたい。
【図４ｃ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4c～図4g)において、LuCiD処理マウスの落射蛍光画像は、腫瘍転移及び抗体6A10分布の両方の詳細を示す。微小転移のほとんどが、抗体により標的とされたように見えるが(図4eの矢)、抗体により標的とされていないように見えるいくつかの微小転移が存在する(図4fの矢)。
【図４ｄ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4c～図4g)において、LuCiD処理マウスの落射蛍光画像は、腫瘍転移及び抗体6A10分布の両方の詳細を示す。
【図４ｅ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4c～図4g)において、LuCiD処理マウスの落射蛍光画像は、腫瘍転移及び抗体6A10分布の両方の詳細を示す。微小転移のほとんどが、抗体により標的とされたように見えるが(図4eの矢)、抗体により標的とされていないように見えるいくつかの微小転移が存在する(図4fの矢)。
【図４ｆ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4c～図4g)において、LuCiD処理マウスの落射蛍光画像は、腫瘍転移及び抗体6A10分布の両

方の詳細を示す。微小転移のほとんどが、抗体により標的とされたように見えるが(図4eの矢)、抗体により標的とされていないように見えるいくつかの微小転移が存在する(図4fの矢)。
【図４ｇ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4c～図4g)において、LuCiD処理マウスの落射蛍光画像は、腫瘍転移及び抗体6A10分布の両方の詳細を示す。
【図４ｈ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4h)は、光シート顕微鏡イメージング後のマウス全体の3D再構築の腹部像である。マウスの体におけるすべての腫瘍を領域分割し、抗体でオーバーレイする(白色シグナルとして統合されたものを示す)。
【図４ｉ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4i)は、光シート顕微鏡イメージング後のマウス全体の3D再構築の側面像である。マウスの体におけるすべての腫瘍を領域分割し、抗体でオーバーレイする(白色シグナルとして統合されたものを示す)。
【図４ｊ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4j)は、(図4h)の囲み領域の高拡大率像であり、腫瘍微小転移のさらなる詳細を示す。
【図４ｋ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4k～図4m)は、(図4j)の囲み領域の抗体標的化の詳細であり、(図4k)は、腫瘍チャネルである。図10及び図11をまた参照されたい。
【図４ｌ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4k～図4m)は、(図4j)の囲み領域の抗体標的化の詳細であり、(図4l)は、抗体チャネルである。図10及び図11をまた参照されたい。
【図４ｍ】インタクトなマウス全身の転移及び治療抗体の可視化を示す図である。(図4k～図4m)は、(図4j)の囲み領域の抗体標的化の詳細であり、(図4m)は、統合である。図10及び図11をまた参照されたい。
【図５ａ】転移を有する個々の器官の高解像度光シートイメージングを示す図である。(図5a)は、肺、肝臓、腎臓及び脳の3D可視化である。領域分割した腫瘍を(黒色)で矢頭により示し、治療抗体(Alexa568と複合体形成した)により標的とされた腫瘍を矢(白色)により示す。
【図５ｂ】転移を有する個々の器官の高解像度光シートイメージングを示す図である。適切な器官における単一転移の高解像度光シート顕微鏡の元画像であり、肺、腎臓及び脳における腫瘍細胞及び治療抗体(白色)のオーバーラップを示す。
【図５ｃ】転移を有する個々の器官の高解像度光シートイメージングを示す図である。(図5c)は、2D分布図である。
【図５ｄ】転移を有する個々の器官の高解像度光シートイメージングを示す図である。(図5d)は、種々の器官における標的化治療抗体に対する非標的化転移の定量化である。値は、平均±s.e.m.であり、n=3マウスである。
【図５ｅ】転移を有する個々の器官の高解像度光シートイメージングを示す図である。(図5e)は、器官における抗体分布:腫瘍に結合する治療抗体に対する非腫瘍宿主マウス組織の定量化である。値は、平均±s.e.m.であり、n=3マウスである。
【図６ａ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6a、図6b)では、マウス胴体を通した光シート顕微鏡スキャンにより、バイオルミネセンスで見ることができなかった小型の腫瘍集団が示された(破線の四角形)。
【図６ｂ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6a、図6b)では、マウス胴体を通した光シート顕微鏡スキャンにより、バイオルミネセンスで見ることができなかった小型の腫瘍集団が示された(破線の四角形)。

【図６ｃ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6c～図6f)は、(図6b)に示す領域の高拡大率光シート顕微鏡画像である。レクチン標識した血管を(図6c)に示す。
【図６ｄ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6c～図6f)は、(図6b)に示す領域の高拡大率光シート顕微鏡画像である。腫瘍を(図6d)に示す。
【図６ｅ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6c～図6f)は、(図6b)に示す領域の高拡大率光シート顕微鏡画像である。治療抗体6A10(透明化の2日前に注射)を(図6e)に示す。
【図６ｆ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6c～図6f)は、(図6b)に示す領域の高拡大率光シート顕微鏡画像である。(図6f)は、(図6c～図6e)に示す3つのチャネルの3D統合である。腫瘍のほとんどが、この高度に脈管形成された腫瘍微小環境において治療抗体により標的とされていることに留意されたい。
【図６ｇ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6g～図6j)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を腫瘍関連線維芽細胞(a平滑筋アクチン;aSMA)のマーカーを使用して実施した。
【図６ｈ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6g～図6j)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を腫瘍関連線維芽細胞(a平滑筋アクチン;aSMA)のマーカーを使用して実施した。
【図６ｉ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6g～図6j)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を腫瘍関連線維芽細胞(a平滑筋アクチン;aSMA)のマーカーを使用して実施した。
【図６ｊ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6g～図6j)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を腫瘍関連線維芽細胞(a平滑筋アクチン;aSMA)のマーカーを使用して実施した。
【図６ｋ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6k～図6n)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を血管内皮細胞(MECA-32)のマーカーを使用して実施した。
【図６ｌ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン

灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6k～図6n)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を血管内皮細胞(MECA-32)のマーカーを使用して実施した。

【図６ｍ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6k～図6n)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を血管内皮細胞(MECA-32)のマーカーを使用して実施した。

【図６ｎ】腫瘍脈管構造の可視化及び腫瘍微小環境の再検出を示す図である。血管腫瘍微小環境及び治療抗体分布の詳細を試験するために、低腫瘍量マウスの脈管構造をレクチン灌流により標識した。(図6g～図6n)は、LuCiDによる全身標識、透明化及び腫瘍細胞のイメージング後の肺転移組織の共焦点顕微鏡画像である。同定した転移性肺組織を再水和し、(図6k～図6n)では、腫瘍微小環境の免疫標識解析を血管内皮細胞(MECA-32)のマーカーを使用して実施した。

【図７ａ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。(図7a)は、腫瘍移植のための実験ワークフローの図解である。

【図７ｂ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。(図7b)は、LuCiDパイプライン後のマウス全身である。

【図７ｃ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。(図7c)は、肺における腫瘍の内在性mCherryシグナルの共焦点画像である。

【図７ｄ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。(図7d)は、肺における腫瘍の内在性mCherryシグナルの共焦点画像であり、Atto647Nと複合体形成した抗mCherryナノブースターで標識する。

【図７ｅ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。統合を図7eに示す。

【図７ｆ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。(図7f)は、Atto647Nと複合体形成した抗mCherryナノブースターで標識した動物の肺における転移の共焦点画像(矢頭)である。

【図７ｇ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。(図7g)は、ヨウ化プロピジウム(PI)で標識した動物の肺における転移の共焦点画像(矢頭)である。

【図７ｈ】腫瘍移植の実験計画、抗体標識の特異性及び腫瘍形態特性を示す図である。(図7f～図7h)は、Atto647Nと複合体形成した抗mCherryナノブースター(図7f、矢頭)及びヨウ化プロピジウム(PI)(図7g、矢頭)で標識した動物の肺における転移の共焦点画像である。2つのチャネルの統合を(図7h、矢頭)に示す。

【図８ａ】mCherry発現腫瘍マウスにおけるナノブースター染色特異性の確認を示す図である。(図8a)は、高腫瘍量(mCherry発現)動物とC57BL/6N対照動物との間の比較であり、これらはともに、Atto647Nと複合体形成した抗mCherryナノボディでブーストされ(白色)、C57BL/6N対照由来の器官において非特異的シグナルが存在しないことを示した。BL6対照由来の器官における指示する領域の光シート顕微鏡画像であり、特異的シグナルが存在しないことを示す。バックグラウンド(灰色)を強化して、高拡大率画像においてシグナルが存在しないことを実証していることに留意されたい。

【図８ｂ】mCherry発現腫瘍マウスにおけるナノブースター染色特異性の確認を示す図である。(図8b)は、肺組織における647でブーストした腫瘍微小転移の共焦点画像であり、これは、透明化した組織の再水和後に抗ホタルルシフェラーゼ抗体で免疫標識し、細胞核をヘキスト(Hoechst)で標識した。

【図９ａ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9a～図9d)において、正常露光によるバイオルミネセンス

イメージングが、低腫瘍量マウスにおけるすべての転移の検出に高感度ではないことが判明した。例えば、図9a、図9b及び図9c、図9dのマウスでは、正常露光によるバイオルミネセンス画像が非常に類似していた。このようなマウスにLuCiDを適用することにより、発明者は、立体蛍光顕微鏡を使用して、ある場合においては腫瘍転移を見出さなかったが(図9a、図9b)、腋窩リンパ節において大型転移(矢頭)を見出した(図9c、図9d、囲み領域1)。

【図９ｂ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9a～図9d)において、正常露光によるバイオルミネセンスイメージングが、低腫瘍量マウスにおけるすべての転移の検出に高感度ではないことが判明した。例えば、図9a、図9b及び図9c、図9dのマウスでは、正常露光によるバイオルミネセンス画像が非常に類似していた。このようなマウスにLuCiDを適用することにより、発明者は、立体蛍光顕微鏡を使用して、ある場合においては腫瘍転移を見出さなかったが(図9a、図9b)、腋窩リンパ節において大型転移(矢頭)を見出した(図9c、図9d、囲み領域1)。落射蛍光画像では、腫瘍(A647で標識)を白色で示す。

【図９ｃ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9a～図9d)において、正常露光によるバイオルミネセンスイメージングが、低腫瘍量マウスにおけるすべての転移の検出に高感度ではないことが判明した。例えば、図9a、図9b及び図9c、図9dのマウスでは、正常露光によるバイオルミネセンス画像が非常に類似していた。このようなマウスにLuCiDを適用することにより、発明者は、立体蛍光顕微鏡を使用して、ある場合においては腫瘍転移を見出さなかったが(図9a、図9b)、腋窩リンパ節において大型転移(矢頭)を見出した(図9c、図9d、囲み領域1)。原発腫瘍からのシグナルは、正常及び高露光バイオルミネセンス画像の両方において強力であるが(図9c、図9d、囲み領域3)、肺における転移(矢)は、見ることができない(図9c、図9d、囲み領域2)。

【図９ｄ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9a～図9d)において、正常露光によるバイオルミネセンスイメージングが、低腫瘍量マウスにおけるすべての転移の検出に高感度ではないことが判明した。例えば、図9a、図9b及び図9c、図9dのマウスでは、正常露光によるバイオルミネセンス画像が非常に類似していた。このようなマウスにLuCiDを適用することにより、発明者は、立体蛍光顕微鏡を使用して、ある場合においては腫瘍転移を見出さなかったが(図9a、図9b)、腋窩リンパ節において大型転移(矢頭)を見出した(図9c、図9d、囲み領域1)。原発腫瘍からのシグナルは、正常及び高露光バイオルミネセンス画像の両方において強力であるが(図9c、図9d、囲み領域3)、肺における転移(矢)は、見ることができない(図9c、図9d、囲み領域2)。落射蛍光画像では、腫瘍(A647で標識)を白色で示す。

【図９ｅ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9e、図9g)において、高腫瘍量マウスでは、バイオルミネセンスイメージングにより、転移分布のバルクヒートマップがもたらされる。

【図９ｆ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9f、図9h)では、バイオルミネセンスイメージングとは対照的に、LuCiDにより、立体蛍光顕微鏡によってであっても、マウス全身における単一転移が解像された。特に肺においては、直径が20μm未満の微小転移でさえも、インタクトなマウスにおいて解像可能であった。

【図９ｇ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9e、図9g)において、高腫瘍量マウスでは、バイオルミネセンスイメージングにより、転移分布のバルクヒートマップがもたらされる。

【図９ｈ】低及び高腫瘍量マウスにおけるバイオルミネセンス及び落射蛍光イメージングの間の比較を示す図である。(図9f、図9h)では、バイオルミネセンスイメージングとは対照的に、LuCiDにより、立体蛍光顕微鏡によってであっても、マウス全身における単一転移が解像された。特に肺においては、直径が20μm未満の微小転移でさえも、インタクトなマウスにおいて解像可能であった。

【図１０ａ】改良3DISCOプロトコル:脱色工程+免疫染色+3DISCO透明化の組合せを使用した腫瘍の内在性発現mCherryシグナルの消失を示す図である。(図10a)では、改良3DISCO透明化の前後に肺における腫瘍転移を蛍光立体顕微鏡により撮像し、内在性発現mCherryシグナルが除去されたことを示した。
【図１０ｂ】改良3DISCOプロトコル:脱色工程+免疫染色+3DISCO透明化の組合せを使用した腫瘍の内在性発現mCherryシグナルの消失を示す図である。(図10b)は、緑色(励起470nm)で撮像した、バックグラウンドを有する原発腫瘍(左)、赤色(励起561nm)で撮像したmCherryシグナル(中央)、及び遠赤色チャネル(励起640)で撮像した、ブーストしたシグナル(Atto647N)(右)の光シート顕微鏡画像である。
【図１０ｃ】改良3DISCOプロトコル:脱色工程+免疫染色+3DISCO透明化の組合せを使用した腫瘍の内在性発現mCherryシグナルの消失を示す図である。(図10c)は、パネルbの白線に沿ったシグナル強度プロファイルのプロットである(n=3マウス)。
【図１０ｄ】改良3DISCOプロトコル:脱色工程+免疫染色+3DISCO透明化の組合せを使用した腫瘍の内在性発現mCherryシグナルの消失を示す図である。(図10d)は、図10cのデータのバックグラウンドを正規化した蛍光シグナルプロファイルであり、改良3DISCO透明化後に内在性mCherryシグナルがバックグラウンドと同様のレベルまで枯渇したことを示す。
【図１１ａ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11a)は、Atto647と複合体形成した抗mCherryナノボディで標識した動物の肺における転移の共焦点画像である。
【図１１ｂ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11b)は、Alexa568と複合体形成した治療抗体6A10で処理した動物の肺における転移の共焦点画像である。
【図１１ｃ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11c)は、動物の肺における転移の共焦点画像である。転移の抗体6A10との共局在を示す(矢頭)。
【図１１ｄ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11d)は、Atto647と複合体形成した抗mCherryナノボディで標識した動物の腎臓における転移の共焦点画像である。
【図１１ｅ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11e)は、Alexa568と複合体形成した治療抗体6A10で処理した動物の腎臓における転移の共焦点画像である。
【図１１ｆ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11f)は、動物の腎臓における転移の共焦点画像である。転移の抗体6A10との共局在を示す(矢頭)。
【図１１ｇ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11g)は、Atto647と複合体形成した抗mCherryナノボディで標識した動物の肝臓における転移の共焦点画像である。
【図１１ｈ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11h)は、Alexa568と複合体形成した治療抗体6A10で処理した動物の肝臓における転移の共焦点画像である。
【図１１ｉ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11i)は、動物の肝臓における転移の共焦点画像である。転移の抗体6A10との共局在を示す(矢頭)。
【図１１ｊ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11j)は、動物の肺における単一がん細胞の共焦点画像である。ヘキスト核染色を(図11j)に示す。囲みは、高拡大率画像、すなわち破線の囲みにより示すそれぞれの領域である。
【図１１ｋ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11k)は、Atto594と複合体形成した抗mCherryナノボディで標識した

動物の肺における単一がん細胞の共焦点画像である。囲みは、高拡大率画像、すなわち破線の囲みにより示すそれぞれの領域である。

【図１１ｌ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11l)は、Alexa647と複合体形成した治療抗体6A10で処理した動物の肺における単一がん細胞の共焦点画像である。囲みは、高拡大率画像、すなわち破線の囲みにより示すそれぞれの領域である。

【図１１ｍ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11m)は、動物の肺における単一がん細胞の共焦点画像である。腫瘍の核染色との共局在を示す。囲みは、高拡大率画像、すなわち破線の囲みにより示すそれぞれの領域である。

【図１１ｎ】抗体6A10シグナルのナノボディシグナルとの共局在を共焦点顕微鏡により示す図である。(図11n)は、動物の肺における単一がん細胞の共焦点画像である。腫瘍の抗体6A10との共局在を示す。囲みは、高拡大率画像、すなわち破線の囲みにより示すそれぞれの領域である。

【図１２ａ】腫瘍切除モデルにおける肺転移の解析を示す図である。MDA-231細胞の乳腺脂肪体への移植から8週後に体積が1.5cm^3未満の原発腫瘍を切除し、5週後にマウスを灌流してLuCiDワークフローを導入した。(図12a)は、全身透明化前のヌードマウスの外観である。

【図１２ｂ】腫瘍切除モデルにおける肺転移の解析を示す図である。MDA-231細胞の乳腺脂肪体への移植から8週後に体積が1.5cm^3未満の原発腫瘍を切除し、5週後にマウスを灌流してLuCiDワークフローを導入した。(図12b)は、全身透明化後のヌードマウスの外観である。

【図１２ｃ】腫瘍切除モデルにおける肺転移の解析を示す図である。MDA-231細胞の乳腺脂肪体への移植から8週後に体積が1.5cm^3未満の原発腫瘍を切除し、5週後にマウスを灌流してLuCiDワークフローを導入した。(図12c)は、全身透明化後のヌードマウスの外観である。(図12c)では、透明化後に肺が完全に透明となることに注目されたい。

【図１２ｄ】腫瘍切除モデルにおける肺転移の解析を示す図である。MDA-231細胞の乳腺脂肪体への移植から8週後に体積が1.5cm^3未満の原発腫瘍を切除し、5週後にマウスを灌流してLuCiDワークフローを導入した。(図12d)は、全身透明化後のヌードマウスの外観である。(図12d)では、透明化後に皮膚が完全に透明となることに注目されたい。

【図１２ｅ】腫瘍切除モデルにおける肺転移の解析を示す図である。MDA-231細胞の乳腺脂肪体への移植から8週後に体積が1.5cm^3未満の原発腫瘍を切除し、5週後にマウスを灌流してLuCiDワークフローを導入した。(図12e)は、腫瘍を切除したマウスの肺における腫瘍転移の3D領域分割である。

【図１２ｆ】腫瘍切除モデルにおける肺転移の解析を示す図である。MDA-231細胞の乳腺脂肪体への移植から8週後に体積が1.5cm^3未満の原発腫瘍を切除し、5週後にマウスを灌流してLuCiDワークフローを導入した。(図12f)は、(図12e)に示す肺におけるすべての転移の定量化であり、そのサイズ分布を示す。

【図１３】成体マウスCNSにおける神経変性の試験にLuCiDを使用したことを示す図である。(図13a)では、GFP-Mマウス(TBI後2カ月)由来のCNS全体を透明化し、撮像した。錐体軸索路(pyramidal axonal track)の変性は、CNSにわたって明らかである(図13b～図13d)。異栄養性ニューロンの形態の詳細をすべての領域で見ることができることに留意されたい(図13b～図13d、矢頭)。(図13e)は、同齢対照GFP-Mマウス由来の非病変脊髄像である。インタクトな軸索が下行していることに留意されたい(囲み)。

【図１４】LuCiDによる全身抗GFPナノボディ標識後のCX3CR1-GFPマウス(TBI後4カ月)におけるミクログリア/マクロファージの活性化を示す図である。CNS全体(図14a)及び単一細胞(図14b～図14d)の拡大像では、免疫細胞の慢性的活性化が、錐体軸索路に沿って明らかである。細胞形態の詳細が、LuCiDによるナノブースト後に見ることができることに留意されたい(図14c、矢頭)。(図14e)は、同齢対照CX3CR1-GFPマウス由来の非病変脊髄像である。ミクログリアの均一な分布及び中央に蓄積がないことに留意されたい。

【図１５】インタクトなマウスの体における脳リンパ管の試験にLuCiDを使用したことを示す図である。(図15a～図15e)は、BL6マウスにおいて(図15a、図15b)又はVEGFR3-YFP遺伝子導入マウスにおいて(図15c～図15e)全身透明化及びイメージング並びに内皮細胞標識(レクチン-FITC)後、インタクトなマウスの頭部(頭蓋を含む)においてオボアルブミン(OV)-Alexa647により標識したリンパ管の血管周囲の分布である。VEGFR3シグナル(図15d)とオボアルブミントレーサー(図15e)が共局在し、ともに脳リンパ管をマークしていること(図15c～図15e)に留意されたい。CX3CR1-GFPマウスのインタクトな頭部における(図15f、矢頭)、及びCX3CR1-GFP+CCR2-RFP二重遺伝子導入マウスにおける(図15g、破線の中間の矢頭)髄膜血管の免疫細胞のイメージングである。RFP(破線の中間の矢頭)+マクロファージ/単球が脳から除去され(脳領域において矢頭でマークしたミクログリア、破線の右側)、この浸潤が損傷の際に追跡されることに留意されたい。M.V.は、髄膜血管である。

【図１６】マウスの血液及び脾臓を用いたアミノアルコールの脱色についてのスクリーニングを示す図である。11種の様々なアミノアルコールをPFA固定マウス血液と混合し、遠心分離した。(図16a)では、無色のペレットは、赤色ヘムが脱色されたことを示す。(図16b)では、8種の良好な候補の脱色作用を、マウス脾臓を用いて更に検査した。マウス脾臓は、すべて脱色された。0時間及び指示するアミノアルコールによる24時間のインキュベーション後の画像をそれぞれ示す。図に示すアミノアルコールは、次の通りであった: 1. クアドロール(Quadrol)、2. N-ブチルジエタノールアミン、3. N-メチルジエタノールアミン、4. N,N-ジメチルメチレンイミニウムクロリド、5. 1,3-ビス(ジメチルアミノ)-2-プロパノール、6. 4-(2-ヒドロキシエチル)モルホリン、7. N-tert-ブチルジエタノールアミン、8. N-エチルジエタノールアミン、9. 2-(ジイソプロピルアミノ)エタノール、10. 4-メチルモルホリンN-オキシド、及び11. 2-(ジブチルアミノ)エタノール。

【図１７】ブタ脳の透明化を示す図である。(図17a)は、切断した新鮮なブタ脳である。(図17b)は、2-(ジイソプロピルアミノ)エタノールによる24時間のインキュベーション後の脱色したブタ脳である。(図17c)は、透明化後のブタ脳の透明性を示す。

【図１８】ヒト脳の大型試料の透明化及び標識を示す図である。(図18a)は、3cm×3cm×1cmのサイズを有するヒト脳の透明化後の透明性を示す。(図18b)では、蛍光共焦点画像により、透明化ヒト脳におけるプラーク及び細胞を示す(矢はメトキシ-x04、星はヨウ化プロピジウム、矢頭はニッスルを示す)。

【発明を実施するための形態】

【００３１】

定義及び一般技術

以下、他に定義しない限り、本発明において使用する用語は、当業者に既知のその一般的意味に従って理解されるものとする。

【００３２】

本明細書において引用する、すべての公表文献、特許及び特許出願は、本明細書によって、その全体をすべての目的において参照により組み込む。本明細書において言及する、このような公表文献、特許及び特許出願は、その第1著者名及び公表年により特定する。このように特定する各参照については、公表文献の特定のソース(例えば、科学雑誌の名称及び巻等)を含む対応するそれぞれの参照は、「参照文献」と題する節において見出すことができる。

【００３３】

材料、方法、及び例は、説明にすぎず、他に明示しない限り、限定することを意図しない。

【００３４】

用語「蛍光色素」は、本明細書において使用する場合、特に限定されない。例えば、蛍光色素は、蛍光タンパク質又は合成有機化合物のような合成化合物であり得る。好ましくは、本発明に従って使用する蛍光色素は、赤色又は赤外領域、より好ましくは、遠赤色又は近赤外領域の蛍光を発することが可能である。本発明に従って使用する蛍光色素の好ま

しい最大発光波長は、本発明の好ましい実施形態に示すものである。遠赤色又は近赤外領域の蛍光を発することが可能であり、本発明に従って使用可能な蛍光色素の非限定的な例は、当技術分野において既知であり、例えば、Hongら(2017年)、Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. Nature Biomedical Engineering 1巻、0010号に概説されており、その全体をすべての目的において参照により組み込む。遠赤色又は近赤外領域の蛍光を発することが可能であり、本発明に従って使用可能な蛍光色素は、市販されており、好ましくは、例えば、ATTO Rho13、ATTO 594、ATTO 610、ATTO 620、ATTO Rho14、ATTO 633、ATTO 647、ATTO 647N、ATTO 655、ATTO Oxa12、ATTO 665、ATTO 680、ATTO 700、ATTO 725及びATTO 740のようなATTO染料、並びにAlexa Fluor(登録商標)568、Alexa Fluor(登録商標)594、Alexa Fluor(登録商標)610、Alexa Fluor(登録商標)633、Alexa Fluor(登録商標)635、Alexa Fluor(登録商標)647、Alexa Fluor(登録商標)660、Alexa Fluor(登録商標)680、Alexa Fluor(登録商標)700、Alexa Fluor(登録商標)750及びAlexa Fluor(登録商標)790のようなAlexa Fluor(登録商標)染料を含む。488nm、555nm及び568nmの最大発光を有する染料はまた、当技術分野において既知であり、また、本発明の方法において使用することができる。

【００３５】

本発明の方法において使用可能な動物組織は、特に限定されない。これらは、いかなる動物種由来であってもよい。本発明の好ましい実施形態では、動物組織は、非ヒト哺乳動物由来又はヒト由来の組織であり得る。好ましくは、非ヒト哺乳動物由来の動物組織は、齧歯動物由来、より好ましくは、マウス由来である。更により好ましくは、動物組織は、マウス全体である。本発明による好ましい実施形態では、動物組織は、器官全体又はその一部、好ましくは、ヒトの器官又はその一部であり得る。本発明の他のすべての実施形態による好ましい実施形態では、動物組織は、組換えにより発現する蛍光タンパク質(例えば、GFP、YFP及びmCherry)を含むことができ、これは、標的分子として使用することができる。例えば、本発明による好ましい実施形態では、動物組織を取得した動物は、このような組換え蛍光タンパク質を発現するがん細胞を移植した動物(例えば、マウス)であり得る。

【００３６】

本発明の調製方法の脱色工程では、固定動物組織を使用する。本発明による好ましい実施形態では、本発明の調製方法は、脱色工程から開始し、動物組織の固定を含まない。したがって、好ましい実施形態では、本発明のすべての方法は、好ましくは、ヒト又は動物の体の手術又は療法による治療方法でもなく、ヒト又は動物の体に対して実施する診断方法でもない方法であり得る。本発明の他のすべての実施形態による関連する好ましい実施形態では、本発明の方法は、ex vivoでの方法である。このように、本発明の方法は、好ましくは、生きた動物の外部で行うことができる。

【００３７】

本発明の方法に適する固定動物組織は、当業者により容易に特定することができる。例えば、PFA固定では、ミダゾラム、メデトミジン及びフェンタニルの組合せ(ＭＭＦ)(例えば、マウス体重の1mL/100g; i.p.)を使用してマウスを深く麻酔した後、ヘパリン処理した0.1MのPBSにより5～10分間室温で血液が洗い流されるまで心臓灌流することができる(10U/mLのヘパリン、Ratiopharm社; Leica Perfusion Oneシステムを使用して圧力100～125mmHg)。この手順の後に、例えば0.1MのPBS(pH7.4)(Morphisto社、11762.01000)中の例えば、4%のパラホルムアルデヒド(PFA)で10～20分間固定することができる。脈管構造染色が望ましい場合は、マウス(例えば、マウス全体)のような動物組織は、FITC複合体形成レクチン(EY Laboratories社、F-2101-5)0.5mgを含むPBS(ヘパリンなし)20mlで心臓灌流した後、PFAによる固定を進めることができる。或いは、PaXgene固定では、ミダゾラム、メデトミジン及びフェンタニルの組合せ(ＭＭＦ)(例えば、マウス体重の1mL/100g; i.p.)の組合せを使用してマウスを深く麻酔した後、ヘパリン処理した0.1MのPBSにより5～10分間室温で血液が洗い流されるまで心臓灌流することができる

(10U/mLのヘパリン、Ratiopharm社; Leica Perfusion Oneシステムを使用して圧力100～125mmHg)。この手順の後に、PaXgene固定溶液40～50mlの注射により固定することができる。PaXgeneで固定した動物の保存が、さらなる処理の前に必要とされる場合は、PaXgene安定溶液中に組織を維持する。脈管構造染色が望ましい場合は、マウス(例えば、マウス全体)のような動物組織は、FITC複合体形成レクチン(EY Laboratories社、F-2101-5)0.5mgを含むPBS(ヘパリンなし)20mlで心臓灌流した後、PFAによる固定を進めることができる。その後、皮膚を注意深く除去するか、動物がヌードである(毛皮がない)場合はインタクトのままにしておくことができ、体を4%のPFA中に1日、4℃で後固定し、0.1MのPBSに移すことができる。本発明の方法は、直ちに開始し得るか、又はマウス全身を、好ましくは、PBS中に4℃で最大4週間、若しくは0.05%のアジ化ナトリウム(Sigma社、71290)を含むPBS中に最大6カ月間保存することができる。

【００３８】

本明細書において使用する場合、「蛍光顕微鏡用の動物組織」のような用語は、それぞれの動物組織が、蛍光顕微鏡に適することを示すことを意味する。

【００３９】

同様に、溶液に関する用語「ヘム除去用」は、ヘムの除去に適する任意の溶液を指す。本発明によれば、ヘムの除去は、その機構が、ヘムを組織から除去する、及び/又はヘムを脱色する限りは、特定の機構に限定されない。例えば、ヘムの除去に適するアミノアルコール、例えば、N,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミンは、例えば、好ましい実施形態に示すように使用することができる。このようなアミノアルコールは、ヘモグロビンと競合してヘム結合し、このため、組織のヘモグロビンから、及び組織からヘムを除去するために使用することができる。或いは、過酸化ベンジルを使用することができる。

【００４０】

用語「蛍光色素含有標識剤」は、本発明に従って使用する場合、脱色した固定動物組織における標的分子を標識するのに適し、この標的分子に結合することが可能であり、100kDa以下の分子量を有する限りは、特に限定されない。好ましい実施形態では、蛍光色素含有標識剤は、この蛍光色素と複合体形成した抗体断片、より好ましくは、この蛍光色素と複合体形成したナノボディ(単一ドメイン抗体としても知られる)である。本発明に従って使用可能な単一ドメイン抗体以外の抗体断片はまた、当技術分野において既知であり、例えば、Fab、F(ab')、単一特異性Fab_2、二重特異性Fab_2、scFv、二重特異性ダイアボディ及び三重特異性トリアボディ、scFv-Fc、ミニボディ並びにhclgG分子を含む。

【００４１】

本明細書において使用する場合、用語「標的分子」は、組織における任意の標的分子を指す。生物医学的適用のような本発明の方法の所与の適用では、適切な標的分子が選択され得ることが理解される。このような標的分子は、例えば、動物の内在性分子(例えば、がんのような疾患のマーカータンパク質)又は組換え分子、例えば、組換えタンパク質であり得る。例えば、本発明による好ましい実施形態では、動物組織を取得した動物が、このような組換え蛍光タンパク質を発現するがん細胞を移植した動物(例えば、マウス)である場合、このような蛍光タンパク質は、標的分子であり得る。

【００４２】

用語「標的分子を標識する」は、本明細書において使用する場合、2つ以上の標的分子を本発明の方法により標識し得る可能性を含むことがまた理解される。このように、本発明による好ましい実施形態では、2つ以上の標的分子、例えば、2つ又は3つの標的分子を標識する。例えば、本発明による好ましい実施形態では、動物組織を取得した動物が、このような組換え蛍光タンパク質を発現するがん細胞を移植した動物(例えば、マウス)である場合、このような蛍光タンパク質は、第1の標的分子であり得、この動物に投与した抗がんバイオ医薬(例えば、がんに対する治療抗体)は、第2の標的分子であり得る。このように、本実施形態のような好ましい実施形態では、本発明による転移の検出方法及びバイオ医薬の体内分布の解析方法は、一緒に行うことができる。

【００４３】
本明細書において使用する場合、用語「の圧力での灌流」は、組織の入口で測定可能な圧力を指す。圧力は、当技術分野において既知の任意の方法により測定することができる。好ましくは、圧力は、マノメータにより、より好ましくは、Kkmoon Digital Manometer Pressure Gauge Manometer(HT-1891)により測定する。Kkmoon Digital Manometer Pressure Gauge Manometer(HT-1891)を使用する場合は、ヘッドが2つあるコネクタ(B.Braun社Discofix(登録商標)C Dreiwegehahn、16494C)をポンプ注入チャネルに挿入してマノメータに接続することができる。ポンプ注入チャネルは、心臓灌流針(Leica社、39471024)により設定することができ、圧力は、(読み出しが安定している場合)この方法で使用するポンプ注入速度で測定することができる。

【００４４】
「透過処理溶液」は、本明細書において言及する場合、動物組織の透過処理に適する溶液を意味する。このような溶液は、当技術分野において既知であり、当業者により容易に選択されることができ、例えば、トリトンX-100のような透過処理に適する界面活性剤を含む。好ましくは、本発明に従って使用する透過処理溶液は、生体膜からコレステロールを抽出するのに適する薬剤を更に含む。生体膜からコレステロールを抽出するのに適する、このような薬剤は、例えば、メチル-β-シクロデキストリンを含む。好ましくは、本発明に従って使用する透過処理溶液は、コラーゲン網を緩める薬剤、例えば、trans-1-アセチル-4-ヒドロキシ-L-プロリンを更に含む。透過処理溶液を本発明の方法の特定の工程において使用する場合、このことは、他の溶液、例えば、本方法の前工程において使用する溶液がまた、透過処理に寄与し、透過処理を向上させ得ることを除外しないことが理解される。例えば、ヘム除去用溶液は、透過処理に寄与する溶液であり得る。

【００４５】
本発明による組織体積の測定は、当技術分野において既知の適する任意の方法により行うことができる。好ましくは、このような体積は、組織による液体の押しのけ体積を、例えば、適するシリンダーにおいて測定することにより測定することができる。

【００４６】
「透明化溶液」は、本明細書において言及する場合、動物組織の透明化に適する溶液を意味する。このような溶液は、これらが有機溶媒を含む限りは、特に限定されない。このような有機溶媒は、例えば、その電磁吸収/発光スペクトル(特に、それが可視、赤色及び近赤外領域の蛍光発光を欠くこと)に基づいて、本発明の方法と適合するように当業者により容易に選択されうることが理解される。好ましくは、有機溶媒を含む透明化溶液は、好ましい実施形態に反映されるように、その動物の組織(例えば、骨)に類似の屈折率を有する。このような透明化溶液は、組織の透明化に特に有利である。本発明のこのような透明化溶液に使用可能な好ましい有機溶媒の例は、例えば、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル及びジフェニルエーテルを含む溶媒、ケイ皮酸エチルを含む溶媒、並びにケイ皮酸アリルを含む溶媒である。

【００４７】
屈折率を測定するための方法は、当技術分野において公知である。本明細書において言及する屈折率の値は、室温(すなわち25℃)及び標準大気圧(すなわち760mmHg)で測定した値である。

【００４８】
「さらなる有機溶媒」は、本発明に関して言及する場合、特に限定されない。このような溶媒は、これらが、脱水に適するように当業者により選択され得ることが理解される。このような溶媒の例は、THF、ジクロロメタン及び1,4-ジオキサンである。例えば、本発明によれば、さらなる有機溶媒の勾配を0vol%～100vol%で上昇させる好ましい灌流は、勾配0vol%～100vol%のTHFによる灌流であり得、その後、ジクロロメタンでインキュベーションする。或いは、本発明によるすべての実施形態では、ジクロロメタンは、1,4-ジオキサンに置き換えることができる。

【００４９】

本発明の他のすべての実施形態によるさらなる改良は、脱灰工程の追加により達成することができる。このような工程は、骨の透明化を更に向上させ得る。脱灰化学物質は、既知であり、例えば、EDTAを含む、好ましくは、$NaHCO_3$を更に含む溶液を包含する。このような脱灰工程は、脱灰工程の前、又は脱灰工程を実施しない場合は、標識工程の前に実施する。

【００５０】

用語「細胞に存在する」は、本明細書において構造に関して使用する場合、その細胞に存在する構造を指す。この用語は、構造が細胞内に存在しなければならないことを意味しないだけではなく、構造がその細胞の表面上に存在する可能性をも含む。

【００５１】

用語「治療抗体」は、本明細書において使用する場合、当技術分野において既知の任意の治療抗体及び治療抗体断片を指す。更に、この用語は、治療抗体及び治療抗体断片それ自体に限定されないだけでなく、抗体薬物複合体のような複合体をも含む。

【００５２】

本明細書において言及する場合、用語「低分子」は、当技術分野において既知の意味を有する。典型的には、本発明に従って使用する低分子は、900ダルトン未満の分子量を有する。

【００５３】

本発明によれば、用語「含む」がそれぞれ発生する場合、用語「からなる」と任意選択で置き換えてもよい。

【００５４】

本発明は、以下の非限定的実施例により説明する。

【実施例】

【００５５】

他に述べない限り、以下の方法を実施例において使用する。

【００５６】

マウス、異種移植実験及び治療抗体の注射

雌のNSG(NOD/SCID/IL2受容体ガンマ鎖ノックアウト)マウスをジャクソン研究所(Jackson Laboratory)から取得し、ミュンヘン・ヘルムホルツセンター(Helmholtz Center Munich)の動物施設において飼育した。すべての動物実験は、オーバーバイエルン行政府(Government of Upper Bavaria)(Regierung von Oberbayern、ミュンヘン、独国)の倫理審査委員会(Ethical Review Board)の認可後、ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン(Ludwig Maximilian University of Munich)及びミュンヘン・ヘルムホルツセンターの施設ガイドラインに従って行った。すべてのデータは、ARRIVE基準に従って報告した。mCherryを発現するレンチウイルスにより形質導入し、ホタルルシフェラーゼを強化したMDA-MB-231乳がん細胞(Vickら、2015年)を計数し、100μmのフィルターを通して濾過し、RPMI1640培地中に再懸濁した。1マウスあたり細胞2×10^6個を用量50μlで左の第4乳腺脂肪体内に経皮的に注射した。記載のように(Gondiら、2013年)IVIS Lumina II Imaging System(Caliper Life Sciences社)を使用して全身のバイオルミネセンス測定(光子/秒)により腫瘍の増殖を監視した。簡潔には、マウスをイソフルランで麻酔し、イメージングチェンバーに固定し、ルシフェリン注射(150mg/kg; i.p.)の15分後に撮像した。バイオルミネセンスシグナルをLiving Imageソフトウェア4.2(Caliper社)を使用して定量化した。腫瘍細胞注射から9週後、発光測定により低、中又は高転移シグナルのいずれかを示すマウス(図9)を、ヒト炭酸脱水酵素(CA)XII特異的抗体(6A10)の注射(Battkeら、2011年)、脈管構造染色、内在性mCherry蛍光のブースト、免疫標識及び透明化を含む種々の実験手順に以下に記載のように割り当てた。灌流の48時間前に、マウスの尾静脈にAlexa-568又はAlexa-647と複合体形成した6A10抗体20μgを注射した。

【００５７】

切除モデル

NMRI nu/nuマウスをジャンビエ研究所(Janvier)から取得し、施設ガイドラインに従

って動物実験を行い、独国ダルムシュタット(Darmstadt)地方議会の獣医学局により認可された。腫瘍細胞の注射前には、動物を0.9%のNaCl溶液0.2ml中100mg/kgのケタミン及び10mg/kgのキシラジンで麻酔した。乳腺脂肪体移植では、麻酔したマウスを仰向けにして無菌条件下に置いた。右下腹部の皮膚を小さく(約1cm長)切開して乳腺脂肪体を露出させた。次いで、1動物あたりMDA-231-Br細胞4×10^6個を含む腫瘍細胞懸濁液50μlの注射を乳腺脂肪体に投与し(Yonedaら、2001年)、ミシェルクリップ(Michel clip)を適用して創傷を閉じた。腫瘍体積を推定するために、ノギスにより測定し、体積は、次の式: $Vt=(a\times b^2)/2$に従って計算し、式中、aは、腫瘍長(最長測定値)を示し、bは、aに対して垂直に測定する腫瘍幅を示す。実験の終了時(腫瘍体積が$2cm^3$に達した場合、又は停止を必要とする他の症状、例えば、悪液質、潰瘍形成等が観察された場合のいずれか)には、動物を深麻酔により　　殺し、4%のPFAで灌流した。腫瘍切除による実験では、動物を上記のように麻酔し、無菌条件下で、腫瘍から約2～3mm離れた箇所から皮膚を切開した。腫瘍をより露出させるために、それを覆う皮膚を穏やかに開創した。次いで、腫瘍に供給する主要な動脈を確認し、焼灼ユニットを使用して熱凝固により閉じた。腫瘍の完全除去を達成するために、周囲の乳腺脂肪体を腫瘍から少なくとも2mm離れた箇所で切断した。腫瘍切除において観察された、いかなる少量の出血も熱凝固により止血した。その後、ミシェルクリップを適用して皮膚創傷を閉じた。術後期には、動物に鎮痛剤(リマダイル(Rimadyl))を術後1週間投与し、次の数週間観察した。実験の終了時には、動物を深麻酔により殺し、4%のPFAで灌流した。

【００５８】

灌流及び組織の処理

ミダゾラム、メデトミジン及びフェンタニルの組合せ(MMF)(マウス体重の1mL/100g; i.p.)を使用してマウスを深く麻酔した後、ヘパリン処理した0.1MのPBSにより5～10分間室温で血液が洗い流されるまで心臓灌流し(10U/mLのヘパリン、Ratiopharm社; Leica Perfusion Oneシステムを使用して圧力100～125mmHg)、マウスを死に至らせた後、0.1MのPBS(pH7.4)(Morphisto社、11762.01000)中4%のパラホルムアルデヒド(PFA)で10～20分間固定した。脈管構造染色では、FITC複合体形成レクチン(EY Laboratories社、F-2101-5)0.5mgを含むPBS(ヘパリンなし)20mlでマウスを心臓灌流した後、PFAによる固定を進めた。NGSマウスでは、皮膚を注意深く除去し、体を4%のPFA中に1日、4℃で後固定し、0.1MのPBSに移した。NMRI nu/nuマウスは、皮膚を除去せずに同一の方法で後固定した。LuCiDパイプラインを直ちに開始するか、又はマウス全身をPBS中に4℃で最大4週間、若しくは0.05%のアジ化ナトリウム(Sigma社、71290)を含むPBS中に最大6カ月間保存した。

【００５９】

uDISCO全身透明化

マウスの全身を透明化するためのuDISCOプロトコルは、参考文献(Panら、2016年)において詳細に既に記載されていた。簡潔には、蠕動ポンプ(ISMATEC社、REGLO Digital MS-4/8 ISM 834;レファレンスチューブ、SC0266)を含む経心腔循環システムを設置した。ポンプからの2つのチャネルを設定して、心臓を経由して脈管構造内を循環させた。すなわち、第1のチャネルでは、透明化溶液をマウス体内にポンプ注入し、第2のチャネルでは、マウス体内から出る溶液を収集し、溶液を元のボトルに戻して再循環させた。溶液を心臓内に注入する、第1のチャネルの流出チューブでは、シリンジの先端(Braun社、9166017Vの1mlシリンジから切断)を使用して、灌流針(Leica社、39471024)をチューブに接続した。一方、透明化溶液を再循環させる、第2のチャネルの流入チューブは、マウスの体を含むガラスチェンバーに固定した。循環する溶液の量は、透明化ガラスチェンバーの容量に依存した。例えば、ガラスチェンバーの最大容量が400mlである場合、300mlの量の溶液を循環に使用した。

【００６０】

すべての透明化工程は、ドラフトにおいて実施した。はじめに、マウスの体をガラスチェンバーに置き、PFA灌流に使用した同一の穴から灌流針を心臓内に挿入した。次いで、

チェンバーをアルミ箔で覆った後、経心腔循環を230mmHgの圧力で開始した(ISMATEC社のポンプで60rpm)。マウスの体は、次の勾配のtert-ブタノール:30Vol%、50Vol%、70Vol%、90Vol%(蒸留水中)、100Vol%で2回を6時間、最後に、4部のBABB(ベンジルアルコール+安息香酸ベンジル1:2、Sigma社、24122及びW213802)、1部のジフェニルエーテル(DPE)(Alfa Aesar社、A15791)及び0.4%VolのビタミンE(DL-アルファ-トコフェロール、Alfa Aesar社、A17039)を含む屈折率適合溶液BABB-D4で少なくとも6時間、体の透明性を達成するまで灌流した。tert-ブタノールの融点が23～26℃であるため、35～40℃に設定した加熱マットを100%のtert-ブタノールによる循環2ラウンドに使用して、溶液の凝固を防いだ。

【００６１】

脱色及び全身免疫染色

次のナノボディ及び染料を全身免疫染色に使用した: Atto647N複合体形成抗RFP/mCherryナノブースター(Chromotek社、rba647n-100)、Atto594複合体形成抗RFP/mCherryナノブースター(Chromotek社、rba594-100)、ヘキスト33342(Thermo Fisher Scientific社、21492H)、ヨウ化プロピジウム(PI、Sigma社、P4864)及びFITC複合体形成レクチン(EY Laboratories社、F-2101-5)。

【００６２】

PFA灌流後に残留する血液及びヘムを除去するために、動物を脱色溶液による灌流のラウンドに供した後、免疫染色した。脱色溶液は、CUBIC試薬1を0.1MのPBS中に1:3の希釈で作製した(Susakiら、2014年)。CUBIC試薬1は、0.1MのPBS中に25wt%の尿素(Roth社、3941.3)、25wt%のN,N,N',N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン(Sigma社、122262)、15%のトリトンX-100(AppliChem社、A4975,1000)を混合して調製した。染料凝集物の試料中の凝集を効率的に防ぎ、ポンプ注入の高圧を約230mmHgに維持する0.20μmのシリンジフィルター(Sartorius社16532)をチューブに接続したことを除いて、uDISCOで使用する蠕動ポンプを含む同一の経心腔循環システムを、脱色及び免疫染色工程においてマウスを灌流するために設置した。後固定及びPBSによる洗浄の後、マウスを0.1MのPBSにより一晩室温で灌流し、次いで、新鮮な溶液を12時間毎に交換しながら、動物を脱色溶液により2日間室温で灌流した。その後、動物を0.1MのPBS中に1.5%のヤギ血清(Gibco社、16210072)、0.5%のトリトンX-100、0.5mMのメチル-ベータ-シクロデキストリン(Sigma社、332615)、0.2%のtrans-1-アセチル-4-ヒドロキシ-L-プロリン(Sigma社、441562)、0.05%のアジ化ナトリウム(Sigma社、71290)、ナノブースター(原液濃度0.5～1mg/ml)25μL、レクチン-FITCを1mg、10μg/mLのヘキスト及び/又はヨウ化プロピジウム(原液濃度1mg/mL)350μLを含む免疫染色溶液300mLにより2日間室温で灌流した。次いで、マウスを洗浄溶液(0.1MのPBS中1.5%のヤギ血清、0.5%のトリトンX-100、0.05%のアジ化ナトリウム)により12時間を2回室温で、最後に0.1MのPBSにより12時間を2回室温で灌流した。

【００６３】

3DISCO全身透明化

3DISCOを使用する全身の受動的透明化では、マウスを室温の脱水下でインキュベートし、ガラスチェンバー内の透明化溶液を穏やかに循環させてドラフト内の振盪揺動装置(IKA社、2D digital)の上部に維持し、これにより組織を十分に透明化した。脱水では、蒸留水中の次の勾配のテトラヒドロフランTHF(Sigma社、186562)300ml: 50Vol%のTHF、70Vol%のTHF、80Vol%のTHF、100Vol%のTHF及び再び100Vol%のTHFでマウスの体をインキュベートし(各工程6～12時間)、次いで、マウスを1時間ジクロロメタン(Sigma社、270997)で、最後にBABBでインキュベートした。すべてのインキュベーション工程において、ガラスチェンバーは、パラフィルムで密封し、アルミ箔で覆った。

【００６４】

LuCiD後の透明化した転移組織の再水和及び免疫染色

次の抗体を組織の再水和に使用した:抗ホタルルシフェラーゼ(希釈1:2000、Abcam社、ab21176)、抗汎内皮細胞(Panendothelial Cell)抗原MECA-32 (希釈1:25、BD Bio

sciences社、550563)、抗α平滑筋アクチン(αSMA)(希釈1:500、SIGMA社C6198)、AlexaFluor 568ヤギ抗ラットIgG(H+L)(希釈1:400、Life Technologies社、A11077)、AlexaFluor 647ヤギ抗ウサギIgG(H+L)(希釈1:400、Life Technologies社、A21245)、AlexaFluorPlus 555ヤギ抗ウサギIgG(H+L)(希釈1:400、A32732)、AlexaFluor 488ヤギ抗ウサギIgG(H+L)(希釈1:400、Life Technologies社、A11034)。

【００６５】

LuCiD処理マウスの肺において転移を同定した後、肺組織を切断し、uDISCO透明化に使用する、次のような逆勾配のtert-ブタノールを適用することにより再水和した(穏やかに振盪しながら37℃で各6時間):100Vol%で2回、90Vol%、70Vol%、50Vol%、30Vol%及び0.1MのPBSで2回を室温で。再水和した試料を0.2%のゼラチン、0.5%のトリトンX-100、0.05%のアジ化ナトリウム及び5%の正常ヤギ血清を含む0.1MのPBSで1日、37℃でインキュベートした(Belleら、2014年)。次いで、同一の溶液に希釈した1次抗体とともに1mmの切片を一晩37℃でインキュベートし、PBSで2回洗浄し、2次抗体とともに4時間、37℃でインキュベートした。

【００６６】

落射蛍光立体顕微鏡によるイメージング

透明化したマウス全身を元の透明化チェンバーに固定し、Zeiss AxioZoom EMS3/SyCoP3蛍光立体顕微鏡により1×の長作動距離空気対物レンズ(Plan Z 1×、0.25NA、作動距離(WD)=56mm)を使用して撮像した。拡大率は、7×に設定し、結像領域は、マウスの体全体を対象とするように手動で選択した。画像は、GFP、RFP及びCy5フィルターを用いて取得し、ファイルをRGBイメージとしてエクスポートし、これはAdobe Photoshop CS6を使用して、更に結合した。高拡大率による拡大画像では、同一の顕微鏡により最大112×でスキャンした。

【００６７】

光シート顕微鏡イメージング

単一面照射(光シート)画像スタックを、4μmの軸分解能を備えるUltramicroscope II(LaVision BioTec社)を使用して取得した。腫瘍及び抗体シグナルの低拡大率での全身スクリーニングでは、Olympus社MVX10ズームボディに接続するOlympus社の1×の空気対物レンズを使用した。これは、0.63×～最大6.3×の範囲の縮小及び拡大をもたらす。1×の対物レンズを使用して、2×2.5cmの視野を撮像し、マウスの体の幅全体を対象とした。マウスの体の縦方向のy軸に沿ってオーバーラップが60%のタイルスキャンを腹側及び背側面から最大13mmの深度で取得し、10μmのz-stepを使用して体の全体積を対象とした。露光時間は150分、レーザー出力は3～4mW(70%～95%の出力レベル)とし、光シート幅は最大に維持した。全視野における試料のタイルイメージング後、薄い歯科用電動ブレード(0.2mm)(Dremel社、8200)を使用してスキャンした領域を切断し、更にイメージングした。全身の低倍率でのイメージング後、個々の器官(肺、肝臓、腎臓、脳、脾臓、腸及び骨を含む)を切断し、1×に維持したOlympus社の回転ズームボディユニット(U-TVCAC)に接続する高拡大率対物レンズ(Olympus社4×/0.28NA [WD=10mm]及びZeiss社20×/0.1NA [WD 4=mm])を使用して個別に撮像した。オーバーラップ20%による高拡大率でのタイルスキャン(4×4)を取得し、光シート幅を削減して、同一のNAを維持する視野において最大照射を得た。

【００６８】

共焦点顕微鏡イメージング

透明化した試料、例えば、切断した組織、器官片又は器官全体を35mmのガラス底のペトリ皿(MatTek社、P35G-0-14-C)上に置き、次いで、試料を1滴又は2滴の屈折率適合溶液、例えば、BABB又はBABB-D14で覆った。このマウントチェンバーは、密封する必要はない。倒立レーザー走査共焦点顕微鏡システム(Zeiss社、LSM 880)により40×の油浸レンズ(Zeiss社、EC Plan-Neofluar 40×/1.30 Oil DIC M27)及び25×の水浸長作動距離対物レンズ(Leica社、NA 0.95、WD=2.5mm)を使用して試料を撮像した。後者のレンズは、特別仕様のマウントスレッド上に取り付けた。z-stepサイズは、1～2.50μmで

あった。
【００６９】
マウス全身スキャンの再構築
落射蛍光(マウス全身の2D合成画像):
収集した落射蛍光画像をAdobe Photoshopのphotomerge機能(File＼automate＼photomerge)を使用して半自動的に結合した。種々のチャネルを別々に結合し、Adobe Photoshopで統合して合成画像を作成した。
【００７０】
光シート顕微鏡(マウス全身の3D合成):
ImSpector(LaVision BioTec GmbH社)を使用した光シート顕微鏡スタックを、16ビットのグレースケールTIFF画像として各チャネルについて個別に取得した。スタックをはじめにアラインし、Vision4D(Arivis AG社)により、一緒に結合させた。さらなる画像処理を、主にFiji(ImageJ2)で行った:はじめに、自家蛍光チャネル(励起488で撮像)では、マウスの体の大まかなアウトラインを均等化した。器官は、目的の領域(ROI)を定義することにより手動で領域分割した。Amira(FEI Visualization Sciences Group社)、Imaris(Bitplane AG社)、Vision4Dを用いて、体積測定及び最大強度のプロジェクションカラーマッピングの両方においてデータの可視化を行った。
【００７１】
定量化
蛍光及び正規化蛍光シグナルプロファイルのプロット:
最大ピークにわたってプロットする蛍光シグナルプロファイルの計算を使用して、遠赤色チャネルにおける散乱、自家蛍光及び光の吸収が少ないため、赤色を超えた遠赤色チャネルと特に緑色チャネルとの深部組織光学イメージングをより良く比較した。3つの異なるチャネル(励起470nm、561nm及び647nm)において肝臓試料の同一のz-stackを光シート顕微鏡により取得した後、種々のチャネルから取得した同一のz-planeをFijiソフトウェアで開いた。種々のチャネルにおいて器官の一方から他方の側にわたって同一の直線を描き、線により定義されたシグナル強度プロファイルを測定した。次いで、プロットのすべての値は、プロファイルの最大ピークに対する割合として正規化し、これらを代表的折れ線グラフに示した(図1D)。
【００７２】
イメージングチャネルを遠赤色又は近赤外に動作させた場合の、バックグラウンドの減少及びバックグラウンド比(SBR)に対するシグナルの向上を比較するために、mCherryを発現する肺転移は、励起545/561nmで撮像し、Atto594と複合体形成した抗mCherryナノボディで標識した肺転移は、励起590nmで撮像し、Atto647Nと複合体形成した抗mCherryナノボディで標識した肺転移は、励起640nmで撮像した(各イメージング法あたり3匹の動物からなる各実験群あたりn=9腫瘍)。はじめに、このようなすべての転移の蛍光シグナルプロファイルプロットを計算した。すなわち、腫瘍z-plane画像を光シート顕微鏡により取得し、Fijiで開き、バックグラウンドと見なす腫瘍周囲の組織領域をも含む腫瘍にわたって約300～350ピクセルの直線を描いた。シグナルプロファイルを定義した直線から測定し、それぞれの実験群毎の代表的動物から取得したプロットのすべての値を代表的折れ線グラフに示した(図1G)。最後に、グラフ図1Hで表す正規化したプロットは、上記のように取得した肺転移のプロットを周囲のバックグラウンドそれぞれの平均シグナル強度に対して正規化することにより計算した。
【００７３】
図10C～図10Dにおいてシグナル対バックグラウンド比(SBR)を比較するために、Atto647Nと複合体形成した抗mCherryナノボディで試料を標識し、原発腫瘍を励起470nm、561nm及び640nmでそれぞれ撮像した。蛍光シグナル強度プロファイル及びバックグラウンド正規化プロファイルを各チャネルについて上記と同一の戦略によりプロットした。
【００７４】
腫瘍サイズ及び治療抗体の結合:

腫瘍のサイズ及び数を大量のデータセットにおいて定量するために、本発明者は、カスタムメイドのpythonスクリプトを開発した。これは、データを小さい3Dキューブ(チャンク)に分割し、それらを別々に処理する。次いで、別々の各チャンクを、Fijiを使用して定量した。データサイズと処理速度との非線形関係(データサイズが増加すると処理速度が大幅に減少する)のため、データセットが小さいほど処理速度がより早くなり、その上、種々のデータパッケージは、複数のプロセッサにわたって分散され、全体的処理を更に加速させるように同時に管理され得る。並列プロセッサの出力は、pythonスクリプトを使用して統合した。多くの中でも、最終結果は、腫瘍の体積、表面、半径、及び座標の測定を含んだ。各腫瘍の細胞数を定量するために、単離したいくつかの単一細胞のサイズ(約1700μm^3)を測定し、体積測定補間に基づいて転移の総数を推定した。推定の精度は、微小転移例内の核(PI又はヘキストにより標識)の数により確認した。腫瘍の柱状グラフは、Python(Matplotlib)により作成した。これは同一数のがん細胞による転移頻度を示す。治療抗体の体内分布を解析するために、はじめに、領域分割した腫瘍チャネルをマスクとして抗体チャネルに適用し、特異的シグナルを領域分割した。これにより本発明者らは、治療抗体により標的とされた微小転移と標的とされなかった微小転移の割合を迅速に決定することが可能となった。腫瘍を標的化していなかった抗体を決定するために、抗体チャネルのみに出現するが、腫瘍チャネルには出現しないシグナルを領域分割した。

【００７５】

実施例1:成体マウスの全身免疫標識

本発明者は、成体マウス全身において一般に使用する蛍光タンパク質を発現するがん細胞を標識するための免疫染色法を開発することを目指した。本発明者は、ナノボディは、そのサイズが小型であるため(従来の抗体の約150kDaと比較して12～15kDa)、成体マウス全身の完全な免疫標識を達成するのに最適であり得ると判断した(Muyldermans、2013年; Yangら、2014年)。明るいAtto染料と複合体形成したナノボディ(ナノブースターと呼ぶ)を全身に送達するために、本発明者は、トリトンX-100、メチル-β-シクロデキストリン(生体膜からコレステロールを抽出するため)、及びtrans-1-アセチル-4-ヒドロキシ-L-プロリン(コラーゲン網を緩めるため)を含む透過処理溶液を開発した(Hamaら、2015年)。本発明者は、この透過処理溶液をマウスの全身に高圧蠕動ポンプ(80～150mmHgの標準的マウス心臓灌流と比較して230mmHg)により循環させた(Gageら、2012年; Ghanavatiら、2014年)。これは、ナノブースターを組織深部に心血管系を介して送達することを促進した。肝臓のような血液が高濃度の器官におけるバックグラウンドを更に減少させるために、全身免疫標識工程の前にマウス全身をアミノアルコールで処理した(Tainakaら、2014年)。マウスを透明化した後、インタクトな体を標準的落射蛍光及び光シート顕微鏡により撮像した。収集した画像を結合して、インタクトなシースルーマウスにおける目的の細胞を不偏性に可視化した(図1A)。

【００７６】

本発明者は、生体組織を通過する光が、遠赤色のようなスペクトルでそれほど散乱せず(Hongら、2017年)、表面で遮断されることなく肝臓のような大型器官の内部コアに達し得るため、遠赤色染料と複合体形成したナノボディを使用して、がん細胞に由来するシグナルをブーストすることを選択した(図1B、図1C)。LuCiDを腫瘍転移において利用するために、ヒト乳癌細胞(mCherry及びホタルルシフェラーゼを発現するMDA-MB-231細胞)をNOD scidガンマ(NSG)雌マウスの乳腺脂肪体に移植し、6～10週を超えて腫瘍を増殖及び転移させた(図7A)(Gondiら、2013年; lornsら、2012年)。次いで、LuCiDプロトコルの適用前に標準的PFA固定法を使用して動物を経心腔灌流した。はじめに、腫瘍細胞における内在性mCherryシグナルを、Atto-594又はAtto-647N染料と複合体形成した抗mCherryナノボディでブーストした後、透明なマウスにおける蛍光シグナルを判定した。本発明者は、ナノブースターが、腫瘍細胞を特異的に標識し、シグナル対バックグラウンド比を、内在性mCherryシグナルと比較して最大20倍まで強化することを見出した(図1D～図1H及び図7B～図7G)。シグナル強度の顕著な強化及び遠赤色領域でのイメージングの利点のため、光がほとんど散乱せずに深部組織に透過し、腫瘍微小転移は、脳の中央部のよ

うな深部組織領域においても容易に検出された(図1I、矢頭)。LuCiD全身免疫標識の特異性を更に確認するために、次の対照実験を実施した。1)対照マウスは、腫瘍移植せずに染色し、これによりmCherryを発現せず、解析した器官のいずれにおいても標識は見出されなかった(図8A)。2)原発腫瘍由来の透明な組織及び肺転移を再水和し、特定の抗ルシフェラーゼ抗体を使用して再び染色し、これにより内在性mCherry蛍光が、ナノブースターとルシフェラーゼシグナルの両方と共局在したことが確認された(図7B～図7D及び図8B)。

【００７７】

実施例2:シースルーマウスにおける単一細胞レベルでのがん転移の検出

がん転移についての多くの前臨床試験では、磁気共鳴イメージング(MRI)、コンピュータ断層撮影(CT)、ポジトロン放射断層撮影(PET)、単一光子放射コンピュータ断層撮影(SPECT)、又は超音波及びバイオルミネセンスイメージングのような方法を使用して、原発部位及び遠位の体の領域において、がん細胞の増殖を観察するマウスモデルを利用する(Condeelis及びWeissleder、2010年; Massoud及びGambhir、2003年、2007年; Ntziachristos、2010年; Pichlerら、2008年; Timpsonら、2011年)。このような方法は、原発腫瘍及び大型転移のサイズについての重要な長期的情報をもたらすが、50μm(細胞約75個)よりも大型の構造を典型的に解像する可能性があり、そのためより少数の細胞からなるより小型の微小転移を検出する解像度を有しない。より小さいサイズの腫瘍細胞集団の検出は、休眠がん細胞又は初発転移結節を表す可能性があり、重要な意味を持つため、本発明者は、LuCiDを使用してマウス全身においてがん転移を試験した。従来のイメージング方法とLuCiDを比較するために、LuCiDの前に、ヒト乳癌細胞を移植したマウスのバイオルミネセンス画像を取得して、検出可能な腫瘍転移のレベルを決定した。低又は高腫瘍量のマウスを次のようにバイオルミネセンスイメージングに基づいて解析した。転移を有しない(図9A)又は単一の体の領域のみに限定された転移を有するマウスは、低腫瘍量カテゴリーに入り(図9C)、一方、2箇所以上の体の領域に転移を有するマウスは、高腫瘍量カテゴリーに入った(図2A、図2B及び図9E、図9G)。類似モデルのMDA-MB-231細胞の乳腺脂肪体への注射を使用する、これまでの知見と一致して、本発明者は、腋窩リンパ節における早期の大型転移をバイオルミネセンスにより常に検出した(図9)(lornsら、2012年)。バイオルミネセンス判定の後、次のようにLuCiDを適用した。マウス全身をPFA固定、脱色し、Atto-647Nと複合体形成した抗mCherryナノブースターを使用して免疫標識し、DISCOの全身的手法を使用して透明化した(Panら、2016年)。はじめに、高腫瘍量マウスの透明なマウスの体全体を標準的落射蛍光立体顕微鏡を使用して可視化した(図2C～図2H)。予想通りに、原発腫瘍(図2G)と腋窩リンパ節における主要な転移(図2E)の両方を容易に見ることが可能であり、これはまた、バルクシグナルとして実際のサイズ及び形状についての情報を欠いてはいるが、バイオルミネセンスイメージングによっても検出された(図2A、図2B)。対照的に、LuCiDはまた、肺におけるいくつかの微小転移の可視化を従来の落射蛍光イメージングにより可能とし、これは、バイオルミネセンスでは見ることができなかった(図2Fの赤色矢頭と図2A、図2Bの紫色四角形でマークした領域とを比較)。このように、落射蛍光イメージングは、数分以内で完了することができ、バイオルミネセンスイメージングと比較して、さらなる詳細及び感度を既に提供している(図9)。

【００７８】

次いで、単一面レーザー走査光シート顕微鏡を使用して、高解像度3D画像をインタクトなマウスから収集して(Panら、2016年)、高腫瘍量マウスの全身の微小転移を検出した。スキャンしたタイルを結合し、腫瘍を領域分割した。胸部領域では、一般的に、肺(図2I、図2Jの分割領域)及びリンパ節においてだけでなく、頸の付け根及び周囲組織においても種々の転移を見ることができた(図2I～図2N)。重要なことには、光シート顕微鏡によるスキャンにより、本発明者らは、インタクトなマウスの体において単一細胞レベルに至るまで微小転移を可視化することが可能となった(図2O～図2Q)。次いで、LuCiDを使用して、低腫瘍量マウスを撮像した。繰り返すが、落射蛍光イメージングでは、腫瘍転移のさらなる詳細(図3C～図3F)をバイオルミネセンスイメージング(図3A、図3B)と比較して既に示している。低腫瘍量マウスにおいて光シート顕微鏡を使用して、腋窩リンパ節における大

型微小転移を検出し、様々なサイズの数百の微小転移を全身、特に肺において検出した(図3G～図3J)。インタクトなマウスの肺を拡大して、本発明者は、転移を細胞レベルで撮像し、そのサイズ及び空間的位置について情報を抽出することができた(図3K、図3L)。例えば、図3I～図3Lに示す肺では、約1490個の微小転移を検出し、その62.2%は、バイオルミネセンスを含む標準方法によって撮像できなかった、細胞75個よりも小さかった。興味深いことには、微小転移は、そのサイズに関係なく、肺にわたってランダムに分布しており、複数の部位において独立してコロニー形成したことを示唆した。異なる腫瘍モデルにおけるLuCiDパイプラインの適用性を実証するために、原発乳腺脂肪体腫瘍を1.5cm^3未満の体積に達した後に切除し、更に約8週間マウスを観察した。この切除モデルは、臨床環境に更に酷似し、原発腫瘍の増殖により制限されず、転移を伝播及び増殖させるための追加の時間を提供する。実際、このモデルにおける転移の数が、切除しない動物と比較して4倍に増加した(図12、図3I)。興味深いことには、本発明者は、肺における88.5%の微小転移が、細胞75個よりも小さかったことを見出し(図12)、これは、新規の微小転移が、恐らく腫瘍細胞を循環させることにより、持続的に再播種したことを示唆している。このように、LuCiDは、インタクトなマウスの全身における腫瘍転移の細胞学的な詳細を明らかにする。

【００７９】

実施例3:LuCiDを使用した治療抗体の判定

鍵となる腫瘍細胞抗原を標的とするモノクローナル抗体は、過去20年間に出現したものの中でも最も有望な腫瘍療法である。多数の腫瘍標的モノクローナル抗体は、種々の固形及び血液の悪性腫瘍に対する標準治療の一部となり、より多くが、初期であれ後期であれ臨床開発の途上にある(Pandey及びMahadevan、2014年)。典型的には、治療抗体は、がん細胞により過剰発現する腫瘍関連抗原に対して生成する。このような抗体を注入すると、全身に分布して、がん細胞を標的とする。しかし、これまでのところ、セル解像度で全身において治療抗体の分布を判定する方法は、存在していない。ここで、本発明者は、LuCiDを利用して、ヒトCA12に対するモノクローナル治療抗体6A10の体内分布を判定した(Battkeら、2011年)。CA12は、種々の型のがんにおいて過剰発現し、その活性を抗体6A10により遮断すると、腫瘍の増殖が減少する(Gondiら、2013年)。Alexa-568(Atto-647Nでブーストされる腫瘍シグナルを有する)と複合体形成した、又はAtto-647N(Atto-594でブーストされる腫瘍シグナルを有する)と複合体形成した6A10を20μgでMDA-MB-231細胞の移植から9週後に静脈内に注射し、抗体注射から2日後にマウスを灌流してLuCiD解析を行った。Alexa-568の励起/発光スペクトルが、がん細胞の内在性mCherryシグナルとオーバーラップするため、本発明者は、改良した3DISCOプロトコル、すなわち脱色工程+免疫染色+3DISCO透明化の組合せを使用して、Alexa-568と複合体形成した6A10抗体を注射したマウスにおける内在性mCherryシグナルを完全に消光した(図10)(Panら、2016年)。繰り返すが、マウスのエンドポイントバイオルミネセンスイメージングは、低腫瘍量マウスの原発腫瘍及び腋窩リンパ節においてのみ検出可能なシグナルを示した(図4A、図4B)。LuCiDが、腫瘍細胞と治療抗体6A10の体内分布の両方の同時イメージングが可能であるかどうかを判定するために、本発明者は、はじめに、落射蛍光顕微鏡を使用し、原発腫瘍における抗体6A10(図4C、図4G)及び腋窩リンパ節における転移(図4C、図4D)の蓄積を観察した。肺に焦点を合わせると、抗体6A10により標的とした微小転移(図4E、白色の矢)及び抗体6A10により標的としなかったその他(図4F、矢)を見ることが可能であった。次いで、インタクトなシースルーマウスの全身における腫瘍転移及び複合体形成抗体6A10の高解像度光シート顕微鏡画像を取得して、標的とした腫瘍の完全分布を判定した(図4H～図4M)。本発明者は、腎臓及び脳では、すべての腫瘍微小転移が6A10により標的とされたが、肝臓及び肺では、75%及び81%がそれぞれ標的とされるに留まったことを見出した(図5A～図5D、図12)。加えて、腎臓において5%、肝臓において27%、並びに肺及び脳において約40%の抗体結合部位が、非特異的であった(非腫瘍担持宿主組織)(図5E)。全体的に見て、この解析は、本発明の方法が、インタクトなマウスの体における、治療抗体の体内分布並びに微小転移を追跡する強力なプラットフォームを提供すること

を実証する。

【００８０】

実施例4:腫瘍脈管構造の3D可視化及び腫瘍微小環境の表現型の決定

原発腫瘍及び転移はともに、酸素及び代謝物の供給について血管に依存する。加えて、腫瘍脈管構造は、腫瘍細胞を遠位部位へ播種するため、免疫細胞を腫瘍へ流入させるため、及び治療薬を送達するための導管を提供する(Weltiら、2013年)。その上、血管由来のアンジオクラインシグナルは、増殖、浸潤、自己複製又は治療耐性を含む腫瘍生物学の多様な態様を制御する、特殊な血管ニッチを形成することができる(Butlerら、2010年)。本発明者は、LuCiDを使用して、インタクトなマウスにおける、腫瘍細胞、治療抗体及び血管の同時可視化により転移性腫瘍脈管構造の特性を決定した。光シート顕微鏡による低腫瘍量マウスのマウス全身のイメージングにより、原発腫瘍及び主要な転移部位から遠位の微小転移を同定した(図6A、図6B)。次いで、本発明者は、高解像度光シート顕微鏡画像をインタクトなマウスから収集して、転移領域における血管構造を可視化した(図6C～図6F)。本発明者はまた、この血管密集領域において、治療抗体が腫瘍微小転移の大多数に達したことを見出した(図6D～図6F)。

【００８１】

全身で検出された小型の微小転移の特性を更に決定可能とするために、LuCiDパイプラインの後に定義された目的の領域について免疫標識を実施することが重要であり得る。この目的を達成するために、LuCiDにより撮像した転移性肺組織を、uDISCOプロトコルを逆転させることにより再水和した。その後、がん関連線維芽細胞マーカーであるアルファ平滑筋アクチン(αSMA)(図6G～図6J)及び血管内皮細胞マーカーであるMECA-32(図6K～図6N)を使用して、これらを免疫染色した。このような結果は、LuCiDでは、選択された組織のさらなる表現型の決定が抗体標識により可能となることを実証した。

【００８２】

実施例5:本発明の方法を使用して、マウスのCNS全体における神経変性の詳細を判定することができる。

マウスのCNS全体における慢性神経変性を試験するために、本発明者は、ニューロンのサブセットがGFPを発現するThy-1 GFP-Mマウス系統に対して外傷性脳損傷(TBI)を実施した。本発明者は、開放性頭蓋モデルと比較してヒト外傷例をより良く模倣するため、閉鎖性頭部(インタクトな頭蓋)TBIマウスモデルを使用した。マウスの体性感覚運動皮質に対して、TBIの制御式皮質衝撃(CCI)モデル(「Impact One」装置、Leica社)によりTBIを誘発した。これは、本発明者が最近述べたように(Erturkら、2016年)、高度に再現性の、軽度及び中等度TBIの誘発を可能とする。次のパラメータを使用した:ピストル速度6.5m/秒、衝撃持続時間350ミリ秒及び衝撃深度2.0mm。このTBIは、頭蓋を破砕し、2～3週以内にMRIにより見ることができる穴を誘発する。TBIから2カ月後、本発明者は、マウスを灌流し、LuCiDパイプラインを適用して、Atto647Nと複合体形成した抗GFPナノボディを使用してマウス全身においてGFPシグナルをブーストした。その後、マウスのインタクトな中枢神経系を、光シート顕微鏡を使用して撮像した。本発明者は、脳から脊髄まで下行する錐体運動軸索(pyramidal motor axon)の変性を発見した(図13)。軸索の変性は、非病変マウス由来の脊髄(図13E)と比較して囲み領域における断片化(小疱形成)により明らかであった(図13B～図13D)。類似の実験が、ブーストすることなく内在性GFPを可視化することにより行われ得るが(Panら、2016年)、GFPをブーストすると、1) 染料がより明るいため内在性GFPと比較してさらなる詳細がもたらされ、2) 長期的な高倍率スキャンにより収集され得る高解像度画像を詳細に示すGFPシグナルが安定化し(経時的退色がない)、及び3) A647Nでタグ付けした抗GFPナノボディを使用して遠赤色においてブーストすると、緑色(488nm)チャネルと比較して自家蛍光がより少ない遠赤色チャネルでの試料の撮像が促進されることに留意されたい。

【００８３】

実施例6:本発明の方法を使用して、マウスのCNS全体における慢性神経炎症の存在について解析することができる。

炎症は、損傷後の時間、関与する免疫細胞型、及び組織の位置に応じて複数の様相、修復と破壊の両方を有すると考えられている。標的とすべき炎症細胞型、及び経過(急性、慢性、又は両方)を知ることに加えて、一般的に、それらを標的とすべき的確な箇所をも知る必要がある。後者の課題は、ほとんど不明確のままである。

【００８４】

LuCiDを使用した本発明者らのデータは、脳においてだけでなく脊髄全体にわたっても神経炎症の発生を実証する(図14)。ここで、本発明者は、CX3CR1-GFPマウスに対して上記のように閉鎖性頭部TBIを誘発し(図13)、この場合、マクロファージ/ミクログリア及びいくつかの単球をGFPで標識する。TBIから4カ月後、動物に抗GFPナノボディ標識を使用して全身LuCiDを行い、GFPシグナルを強化した。運動軸索の下行に沿った免疫細胞の活性化は、運動路の縮退に関するシグナル強度及び細胞数の増大により見られるように明らかであることに留意されたい(図13)。免疫細胞の内在性タンパク質に対するナノボディを使用して免疫細胞を標識することができたこともまた言及するに値する。この所見では、TBIにより広範な慢性炎症応答が誘発されることを示唆し、この炎症応答は、損傷した脳領域だけでなく脊髄及び潜在的には末梢器官をも包囲すると考えられる。研究は、血液由来免疫細胞が浸潤すると、疾患進行が悪化することを示唆する(Wilsonら、2010年)。本発明者独自のデータは、損傷から数カ月後であったとしても、損傷したマウスの脳においてリンパ球が慢性的に存在することを示す(Erturkら、2016年)。このような長時間の後、これらリンパ球が、脳への(すなわち、そこで残存する)術をどのように見出すのかは、謎のままである。

【００８５】

実施例7:本発明の方法を使用して、透明なマウス全体における髄膜リンパ管を試験することができる。

体内の種々のリンパ器官に関連するリンパ系は、免疫応答に重要である(Janewayら、1997年)。これは、リンパ球及び他の白血球を全身に循環させる。最近まで、脳は、いかなるリンパ性の関連をも欠くと考えられていた(Ransohoff及びEngelhardt、2012年)。最近、マウスの頭蓋と脳との間の硬膜洞を覆う髄膜リンパ管が発見された(Louveauら、2015年)。このような髄膜血管は、免疫細胞を輸送し(Louveauら、2015年)、これは潜在的に、脳に侵入する傾向がある。しかし、脳のこのような髄膜リンパ管が、TBI(又は他の疾患)の病状にどのように寄与し得るかは、明確ではない。脳リンパ管は、頭蓋と脳との間に直接位置するため、標準的組織診断のために脳を回収する場合に破壊される。したがって、LuCiD技術を使用する場合のようなインタクトな頭部においてのみ、これらを試験することができる。種々の標識方法を使用して、本発明者は、LuCiDにより、インタクトなマウスの頭部において髄膜リンパ管をイメージングすることが可能となることを実証した(図14)。一般的に、1) オボアルブミン-Alexa647の大槽又は鼻腔内への注射(次いで、リンパ管に排出することにより、リンパ管を特異的に標識する)のようなトレーサー(図14A)、2) VEGFR3-YFPマウスのような遺伝子導入レポーターマウスの使用(Calvoら、2011年)(図14B～図14E)、及び3) Lyve-1のような特異的マーカーを使用したインタクトなマウスの頭部の抗体標識(Louveauら、2015年)により髄膜リンパ管を標識することができる。その後、一般的に、インタクトなマウスの頭部における目的の細胞/分子を撮像することができる。例えば、本発明者は、CX3CR1-EGFPマウス(図14F)及びCX3CR1-EGFP×CCR2-RFP二重遺伝子導入マウス(図14G)における免疫細胞集団を撮像することに成功した。

【００８６】

実施例8:マウス血液及び脾臓を用いた脱色用のアミノアルコールについてのスクリーニング

脱色用の追加の溶液を特定するために、はじめに、アミノアルコールが血液を直接脱色し得るかどうかを試験した。11種の様々なアミノアルコールをPFA固定マウスの血液と混合し、遠心分離した。無色のペレットは、赤色のヘムが脱色されたことを示す(図16、パネル(a))。したがって、マウスの脾臓を用いた8種の良好な候補の脱色作用を更に検査した。図16、パネル(b)に示すように、マウスの脾臓をすべて脱色した。0時間及び指示するアミノアルコールによる24時間のインキュベーション後の画像をそれぞれ示す。図に示すア

ミノアルコールは、次の通りであった:1．クアドロール、2．N-ブチルジエタノールアミン、3．N-メチルジエタノールアミン、4．N,N-ジメチルメチレンイミニウムクロリド、5．1,3-ビス(ジメチルアミノ)-2-プロパノール、6．4-(2-ヒドロキシエチル)モルホリン、7．N-tert-ブチルジエタノールアミン、8．N-エチルジエタノールアミン、9．2-(ジイソプロピルアミノ)エタノール、10．4-メチルモルホリンN-オキシド、及び11．2-(ジブチルアミノ)エタノール。

【００８７】

実施例9:ブタ脳の透明化並びにヒト脳の大型試料の透明化及び標識

本発明の方法をまた、ブタ及びヒトを含む大型動物の器官全体に適用した。

【００８８】

特に、本発明による方法をブタ脳の脱色及び透明化に使用した。図17(a)は、切断した新鮮なブタ脳を示し、図17(b)は、2-(ジイソプロピルアミノ)エタノールによる24時間のインキュベーション後の脱色したブタ脳を示す。最後に、図17(c)は、透明化後のブタ脳の透明性を示す。このような結果は、本発明の方法の脱色及び透明化工程が、ブタを含む大型動物に適用することができることを実証する。

【００８９】

次いで、本発明による方法をまた、ヒト脳の大型試料の透明化及び標識に使用した。特に、図18(a)は、3cm×3cm×1cmのサイズを有するヒト脳の透明化後の透明性を示す。図18(b)は、透明化したヒト脳におけるプラーク及び細胞を示す蛍光共焦点画像を示す。このような結果は、本発明の方法による透明化及び標識が、ヒト脳の大型試料に適用可能であり、このような透明化及び標識した試料が、蛍光顕微鏡により解析可能であることを実証する。本発明者はまた、ヒト脳全体を脱色及び透明化することが可能であることを実験により見出した。更に、蛍光イメージングが、本発明により調製したヒト脳全体のイメージングに適用可能であることが予想される。

【産業上の利用可能性】

【００９０】

本発明の方法及び産物は、産業的に適用可能であり、例えば、治療抗体のようなバイオ医薬の検査に使用することができる。

【００９１】

(参考文献)

参考文献

Battke, C., Kremmer, E., Mysliwietz, J., Gondi, G., Dumitru, C., Brandau, S., Lang, S., Vullo, D., Supuran, C., and Zeidler, R. (2011). Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII. Cancer Immunol Immunother *60*, 649-658.

Belle, M., Godefroy, D., Couly, G., Malone, S.A., Collier, F., Giacobini, P., and Chedotal, A. (2017). Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. Cell *169*, 161-173 e112.

Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., Bradke, F., and Chedotal, A. (2014). A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. Cell Rep *9*, 1191-1201.

Butler, J.M., Kobayashi, H., and Rafii, S. (2010). Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. Nat Rev Cancer *10*, 138-146.

Calvo, C.F., Fontaine, R.H., Soueid, J., Tammela, T., Makinen, T., Alfaro-Cervello, C., Bonnaud, F., Miguez, A., Benhaim, L., Xu, Y., et al. (2011). Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. Genes Dev 25, 831-844.

Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., *et al.* (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature *497*, 332-337.

Condeelis, J., and Weissleder, R. (2010). In vivo imaging in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a003848.

de Jong, M., Essers, J., and van Weerden, W.M. (2014). Imaging preclinical tumour models: improving translational power. Nat Rev Cancer *14*, 481-493.

Erturk, A., Mentz, S., Stout, E.E., Hedehus, M., Dominguez, S.L., Neumaier, L., Krammer, F., Llovera, G., Srinivasan, K., Hansen, D.V., et al. (2016). Interfering with the Chronic Immune Response Rescues Chronic Degeneration After Traumatic Brain Injury. J Neurosci 36, 9962-9975.

Erturk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. Nat Protoc *7*, 1983-1995.

Erturk, A., Mauch, C.P., Hellal, F., Forstner, F., Keck, T., Becker, K., Jahrling, N., Steffens, H., Richter, M., Hubener, M., *et al.* (2011). Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. Nat Med *18*, 166-171.

Gabanyi, I., Muller, P.A., Feighery, L., Oliveira, T.Y., Costa-Pinto, F.A., and Mucida, D. (2016). Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. Cell *164*, 378-391.

Gage, G.J., Kipke, D.R., and Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. J Vis Exp.

Ghanavati, S., Yu, L.X., Lerch, J.P., and Sled, J.G. (2014). A perfusion procedure for imaging of the mouse cerebral vasculature by X-ray micro-CT. J Neurosci Methods *221*, 70-77.

Gondi, G., Mysliwietz, J., Hulikova, A., Jen, J.P., Swietach, P., Kremmer, E., and Zeidler, R. (2013). Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII. Cancer Res *73*, 6494-6503.

Hama, H., Hioki, H., Namiki, K., Hoshida, T., Kurokawa, H., Ishidate, F., Kaneko, T., Akagi, T., Saito, T., Saido, T., *et al.* (2015). ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. Nat Neurosci *18*, 1518-1529.

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. Nat Neurosci *14*, 1481-1488.

Holliger, P., and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol *23*, 1126-1136.

Hong, G., Antaris, A.L., and Dai, H. (2017). Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. Nature Biomedical Engineering *1*, 0010.

Iorns, E., Drews-Elger, K., Ward, T.M., Dean, S., Clarke, J., Berry, D., El Ashry, D., and Lippman, M. (2012). A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis. PloS one *7*, e47995.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (1997). Immunobiology: the immune system in health and disease, Vol 1 (Current Biology).

Ke, M.T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nat Neurosci *16*, 1154-1161.

Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. Cell *168*, 670-691.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature 523, 337-341.

Massague, J., and Obenauf, A.C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature *529*, 298-306.

Massoud, T.F., and Gambhir, S.S. (2003). Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. Genes Dev *17*, 545-580.

Massoud, T.F., and Gambhir, S.S. (2007). Integrating noninvasive molecular imaging into molecular medicine: an evolving paradigm. Trends Mol Med *13*, 183-191.

Murray, E., Cho, J.H., Goodwin, D., Ku, T., Swaney, J., Kim, S.Y., Choi, H., Park, Y.G., Park, J.Y., Hubbert, A., *et al.* (2015). Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. Cell *163*, 1500-1514.

Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annu Rev Biochem *82*, 775-797.

Ntziachristos, V. (2010). Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. Nat Methods *7*, 603-614.

Pan, C., Cai, R., Quacquarelli, F.P., Ghasemigharagoz, A., Lourbopoulos, A., Matryba, P., Plesnila, N., Dichgans, M., Hellal, F., and Erturk, A. (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. Nat Methods.

Pandey, M., and Mahadevan, D. (2014). Monoclonal antibodies as therapeutics in human malignancies. Future Oncol *10*, 609-636.

Pichler, B.J., Wehrl, H.F., and Judenhofer, M.S. (2008). Latest advances in molecular imaging instrumentation. J Nucl Med *49 Suppl 2*, 5S-23S.

Ransohoff, R.M., and Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. Nat Rev Immunol 12, 623-635.

Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., *et al.* (2016). Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell *165*, 1789-1802.

Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. Cell *159*, 896-910.

Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., *et al.* (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. Cell *157*, 726-739.

Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. Cell *159*, 911-924.

Timpson, P., McGhee, E.J., and Anderson, K.I. (2011). Imaging molecular dynamics in vivo--from cell biology to animal models. J Cell Sci *124*, 2877-2890.

Tuchin, V.V. (2016). Editor's Introduction: Optical Methods for Biomedical Diagnosis.

Tuchin, V.V., and Tuchin, V. (2007). Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis, Vol 642 (SPIE press Bellingham).

Vick, B., Rothenberg, M., Sandhofer, N., Carlet, M., Finkenzeller, C., Krupka, C., Grunert, M., Trumpp, A., Corbacioglu, S., Ebinger, M., *et al.* (2015). An advanced preclinical mouse model for acute myeloid leukemia using patients' cells of various genetic subgroups and in vivo bioluminescence imaging. PloS one *10*, e0120925.

Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. J Clin Invest *123*, 3190-3200.

Wilson, E.H., Weninger, W., and Hunter, C.A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. J Clin Invest 120, 1368-1379.

Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., and Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. Cell *158*, 945-958.

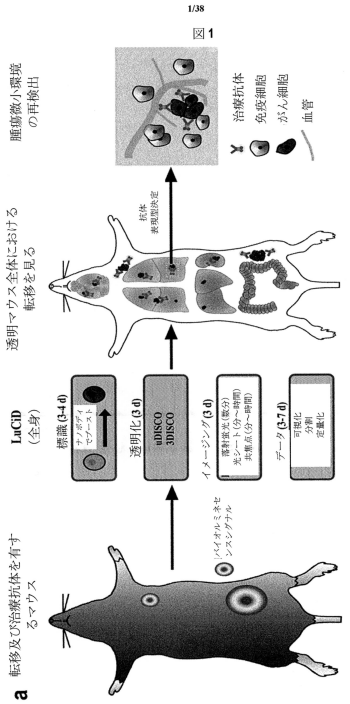
Ye, L., Allen, W.E., Thompson, K.R., Tian, Q., Hsueh, B., Ramakrishnan, C., Wang, A.C., Jennings, J.H., Adhikari, A., Halpern, C.H., *et al.* (2016). Wiring and Molecular Features of Prefrontal Ensembles Representing Distinct Experiences. Cell *165*, 1776-1788.

Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M. & Nishimura, R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. J Bone Miner Res 16, 1486-1495, doi:10.1359/jbmr.2001.16.8.1486 (2001).

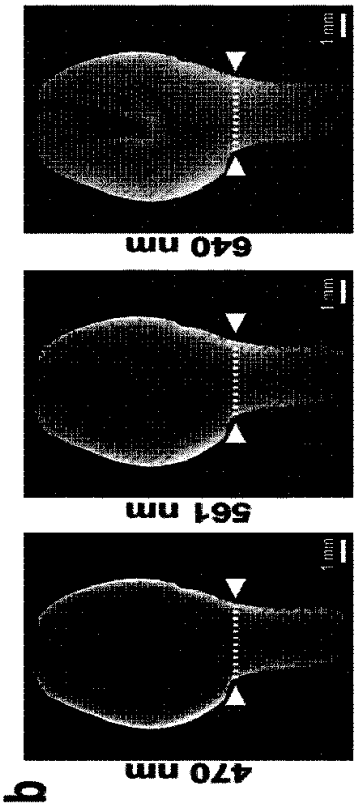
Zipfel, W.R., Williams, R.M., Christie, R., Nikitin, A.Y., Hyman, B.T., and Webb, W.W. (2003). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 7075-7080.

【図面】

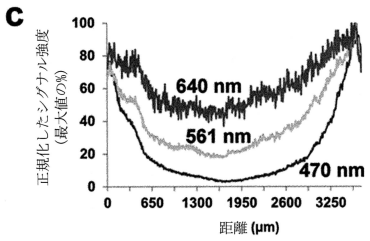
【図１ａ】



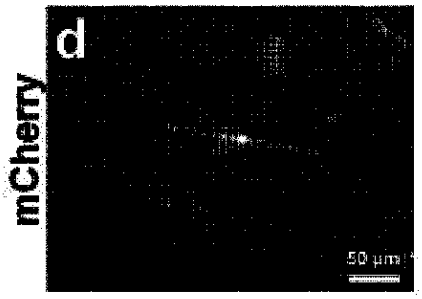
【図１ｂ】



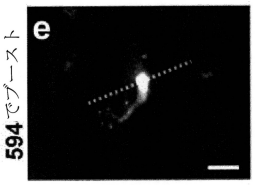
【図１ｃ】



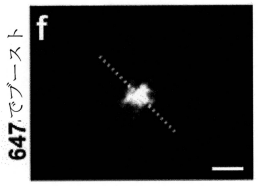
【図１ｄ】



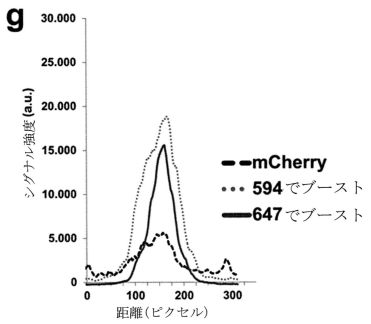
【図１ｅ】



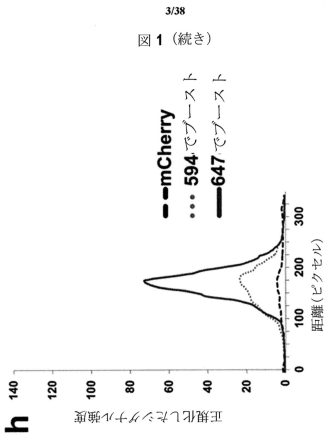
【図１ｆ】



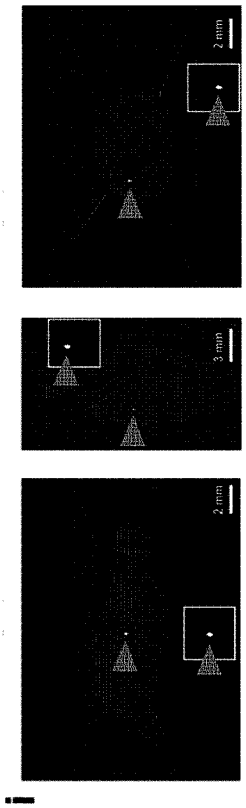
【図１ｇ】



【図１ｈ】



【図１ｉ】



i

【図２ａ】

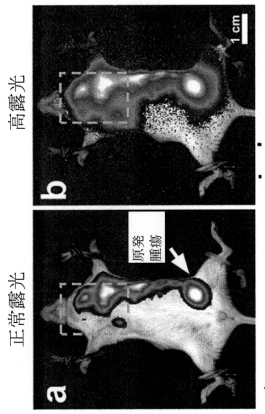


図２ａ

【図２ｂ】

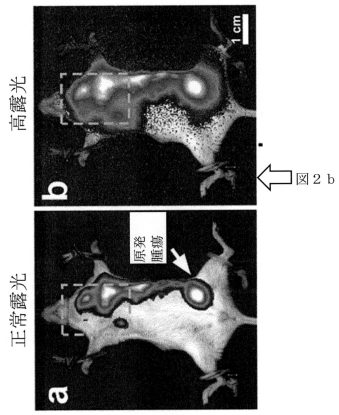


図２ｂ

【図２ｃ】

図２

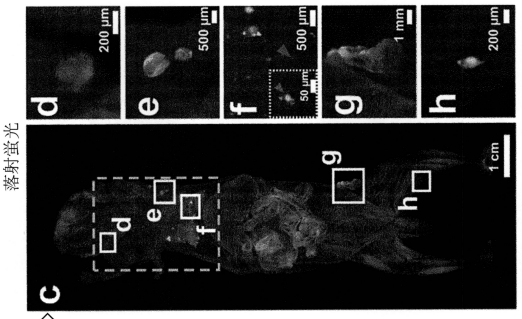
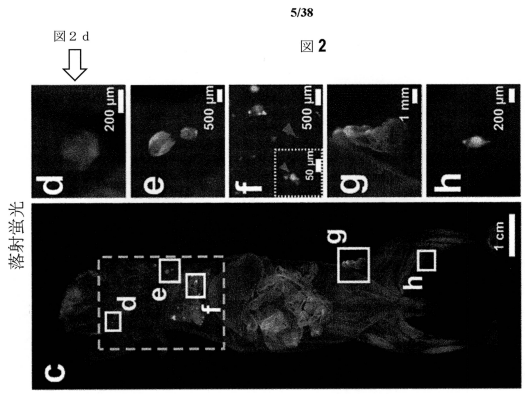
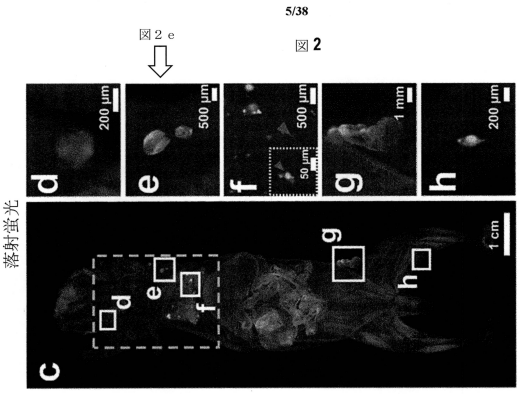


図２ｃ

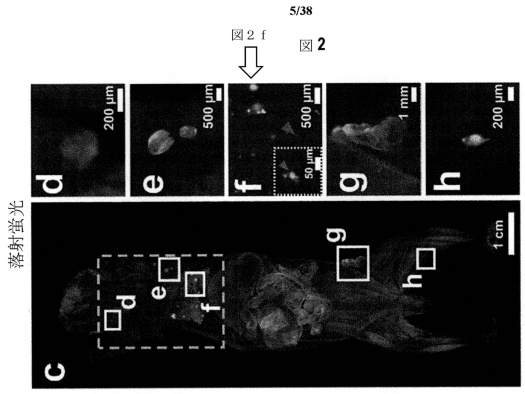
【図２ｄ】



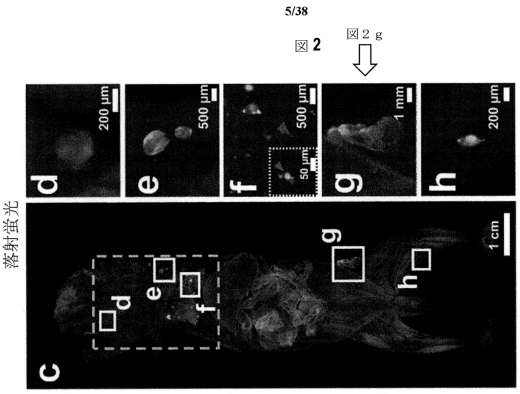
【図２ｅ】



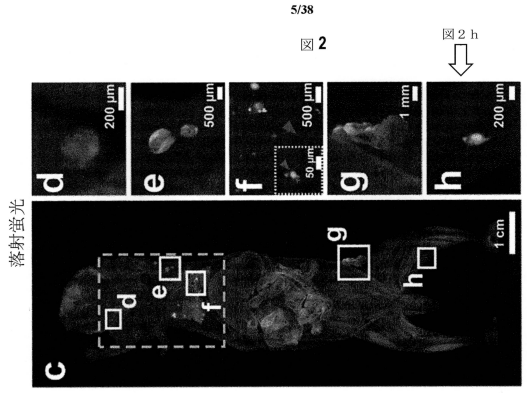
【図２ｆ】



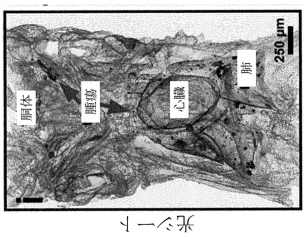
【図２ｇ】



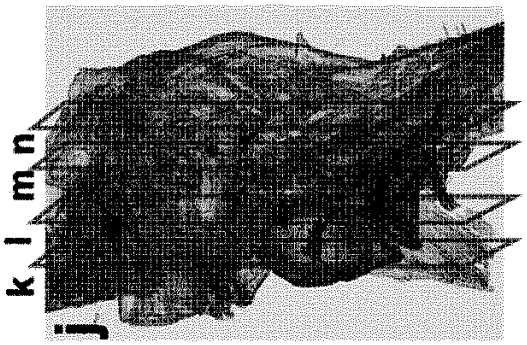
【図２ｈ】



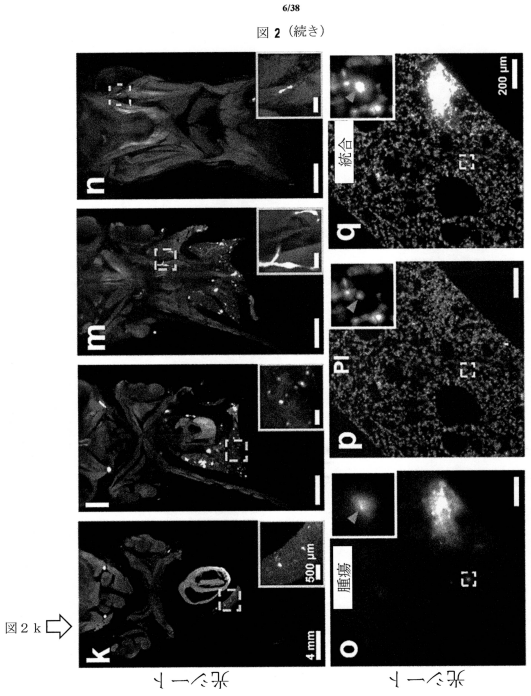
【図２ｉ】



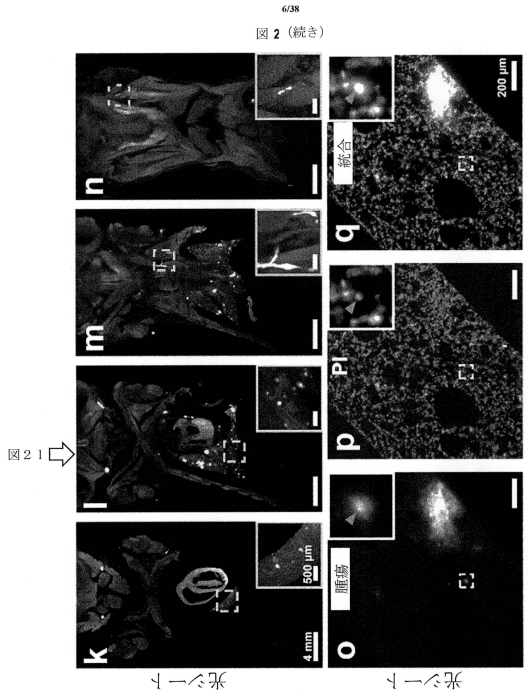
【図２ｊ】



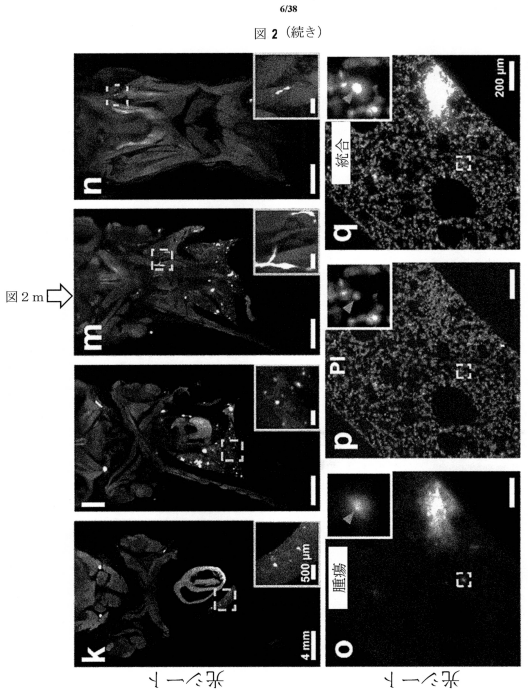
【図２ｋ】



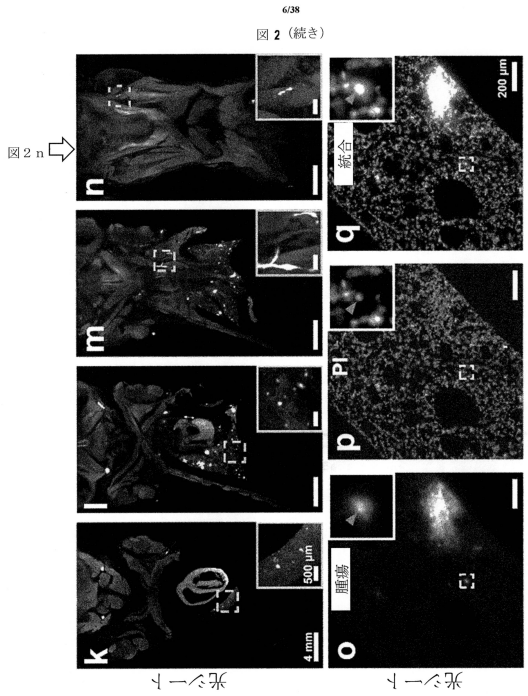
【図２ｌ】



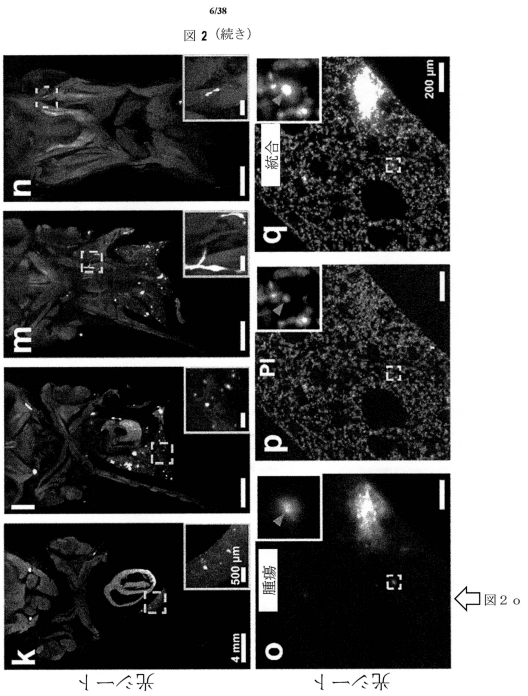
【図２ｍ】



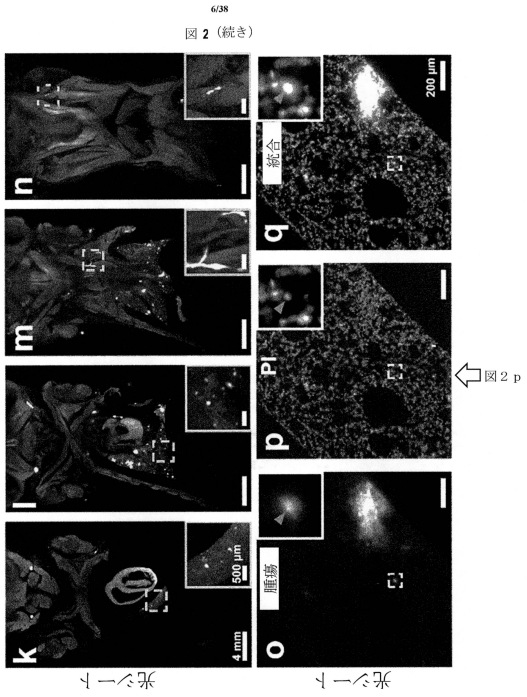
【図２ｎ】



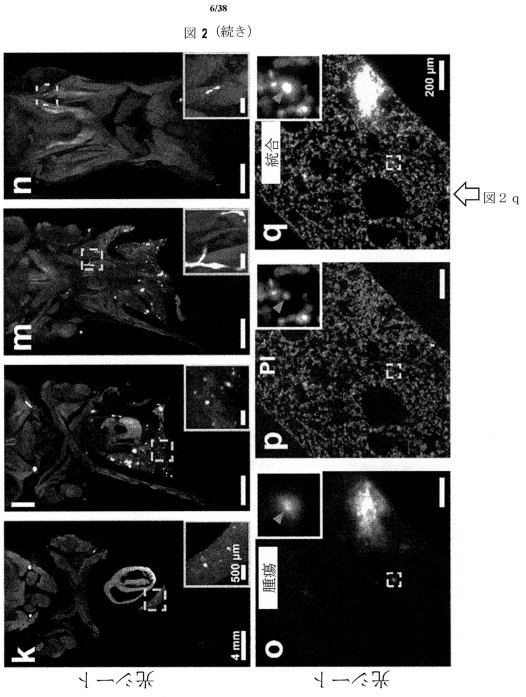
【図２ｏ】



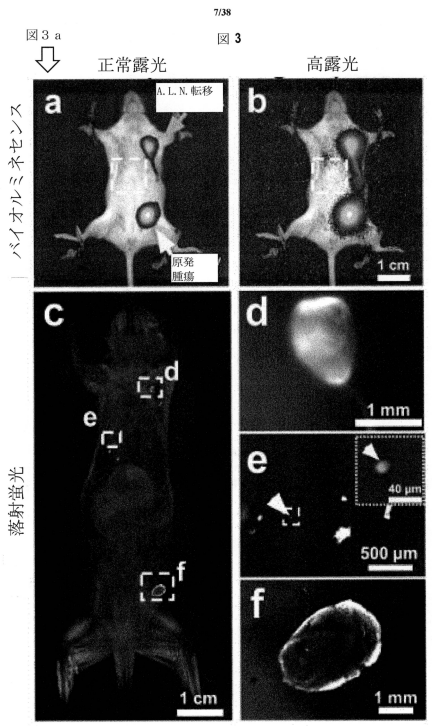
【図２ｐ】



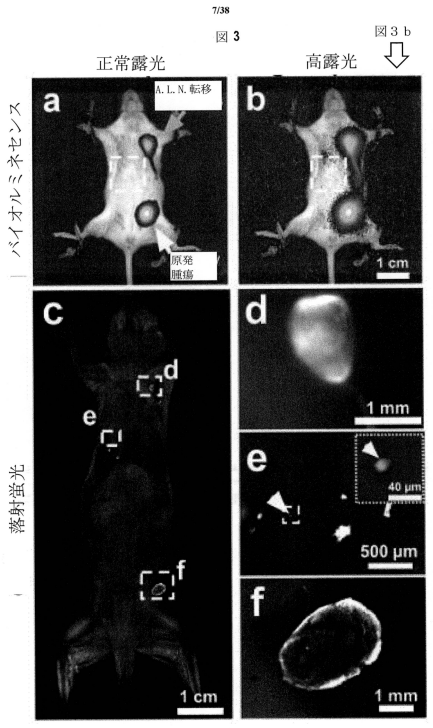
【図２ｑ】



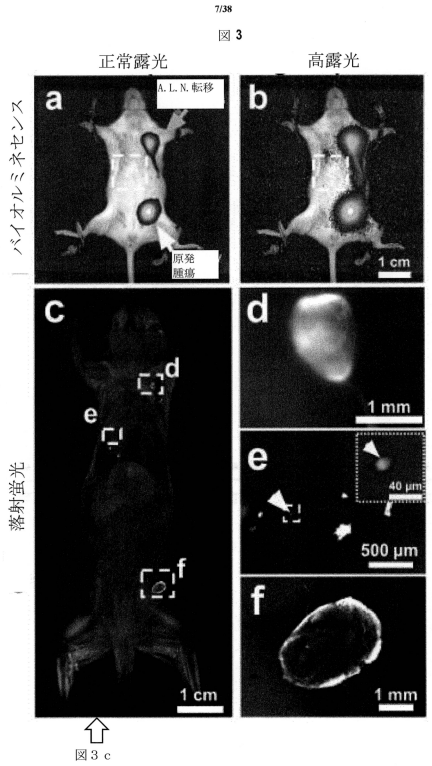
【図３ａ】



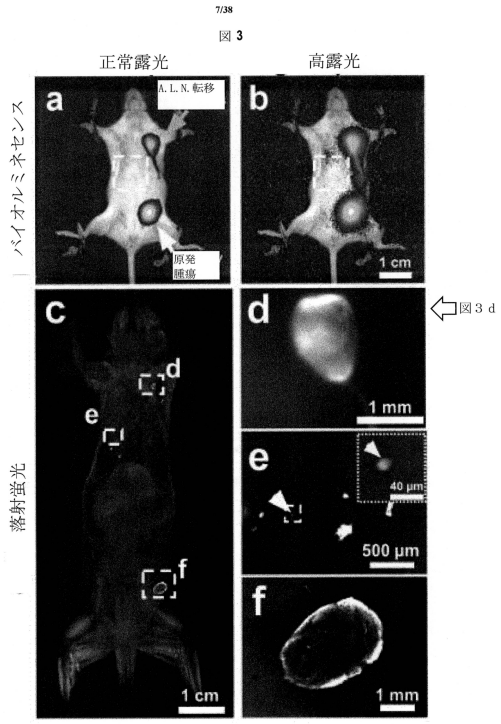
【図３ｂ】



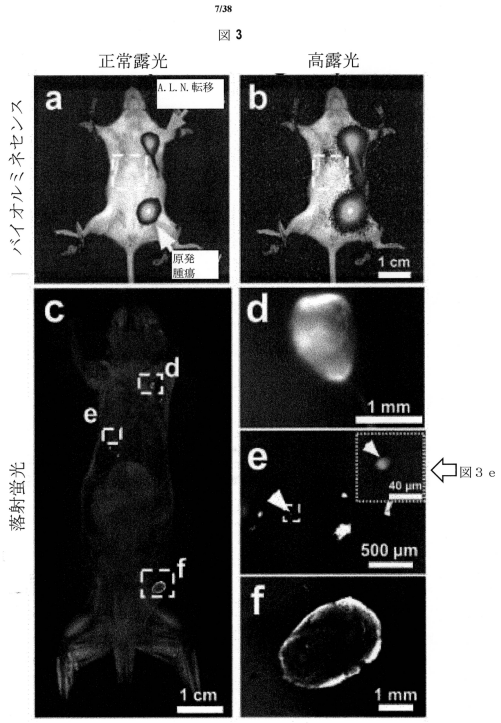
【図３ｃ】



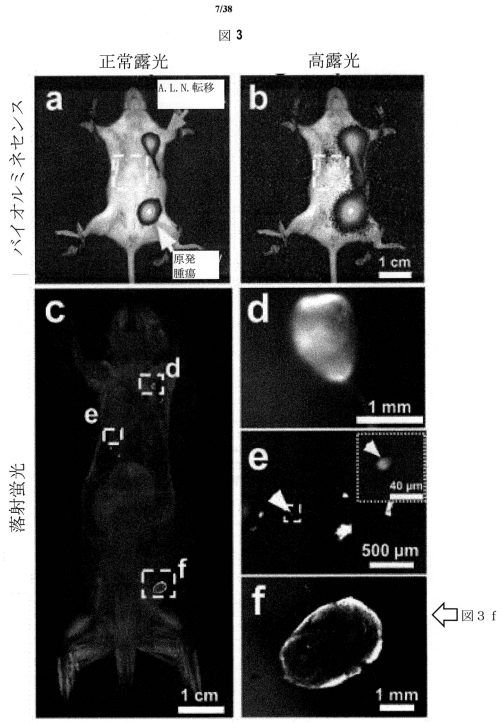
【図３ｄ】



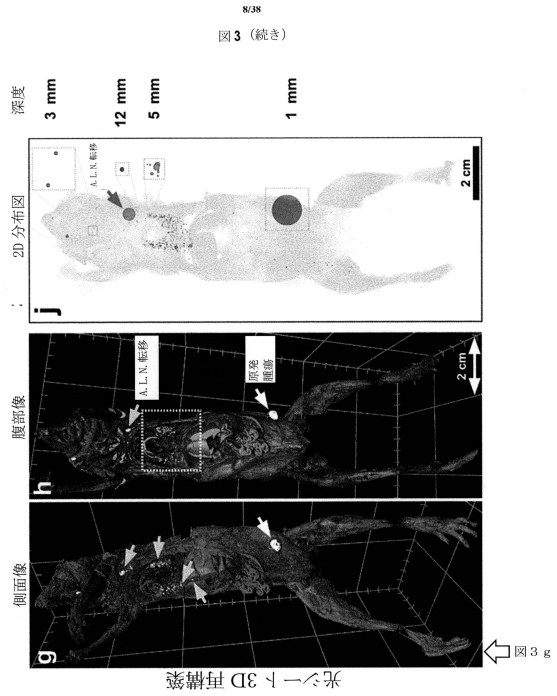
【図３ｅ】



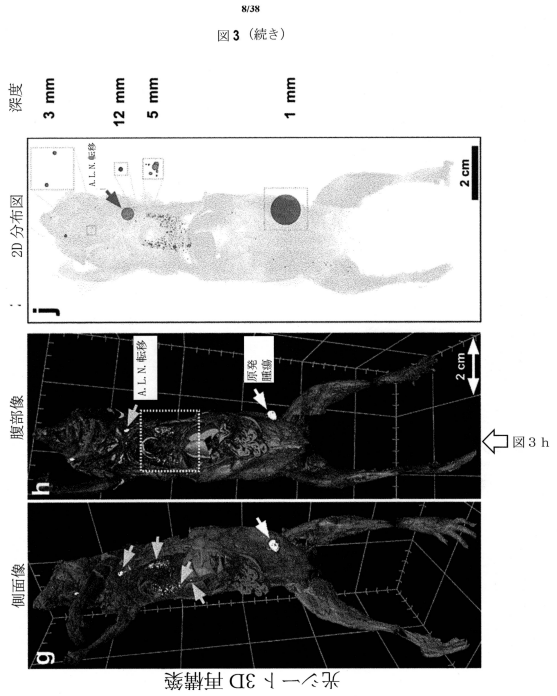
【図３ｆ】



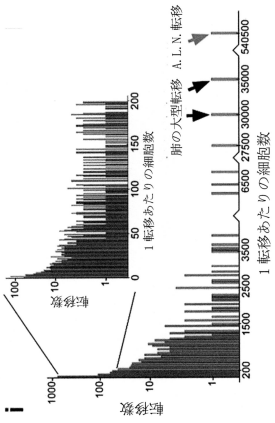
【図３ｇ】



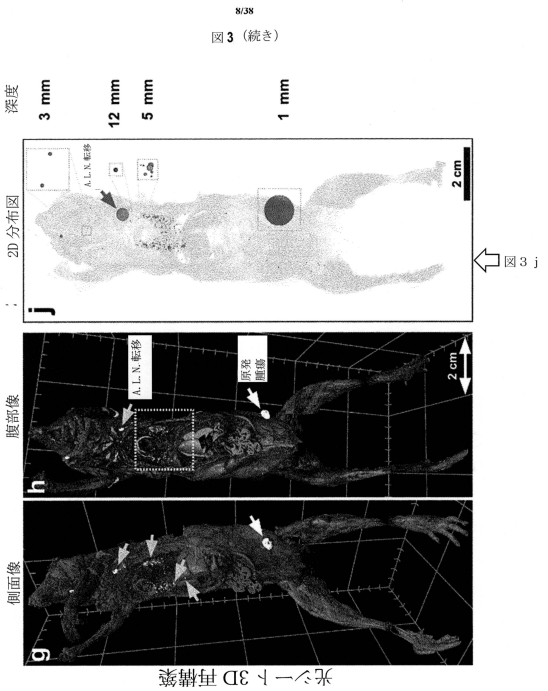
【図３ｈ】



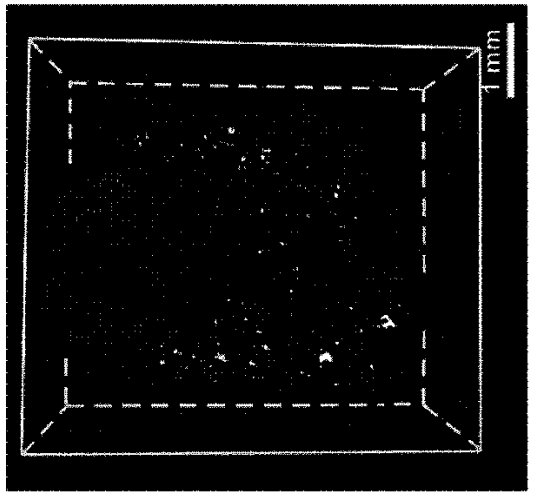
【図３ｉ】



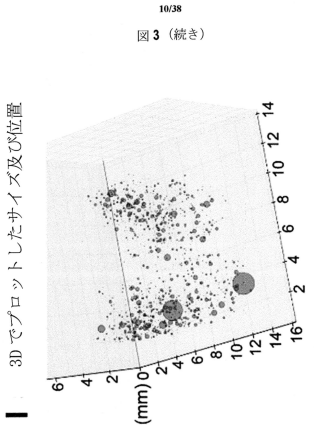
【図３ｊ】



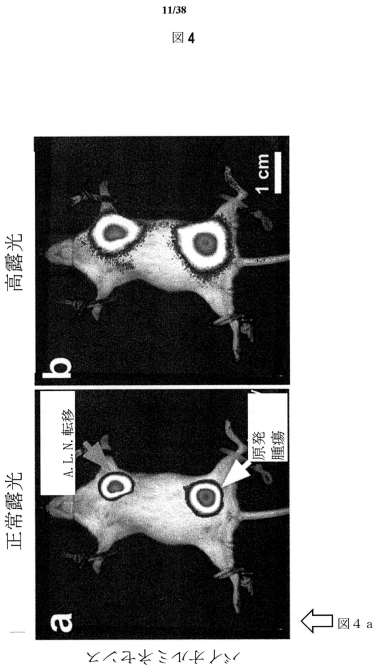
【図３ｋ】



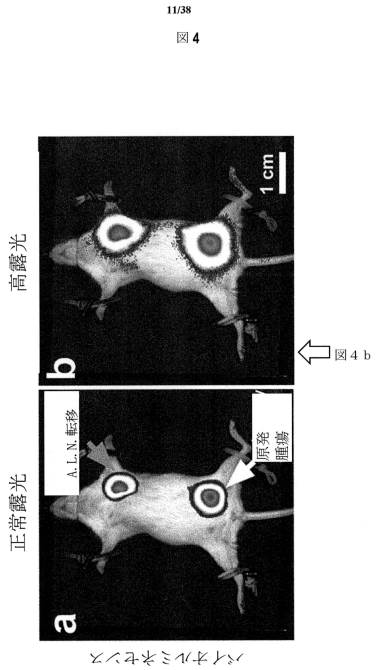
【図３ｌ】



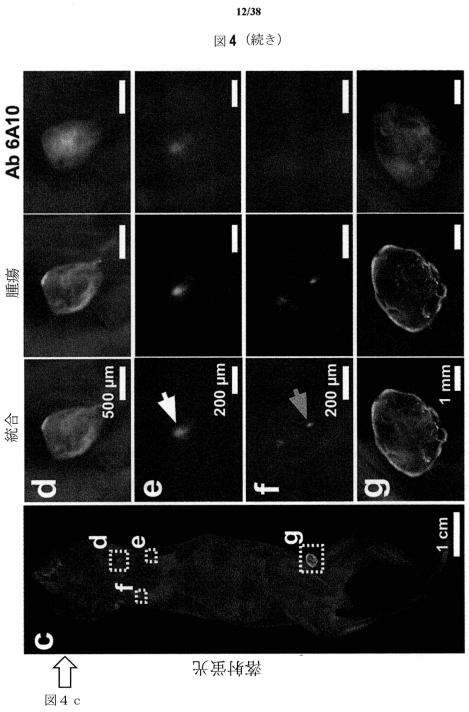
【図４ａ】



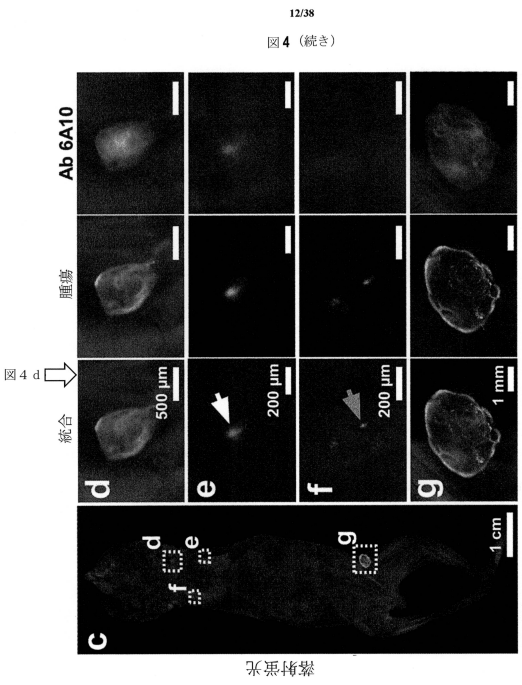
【図４ｂ】



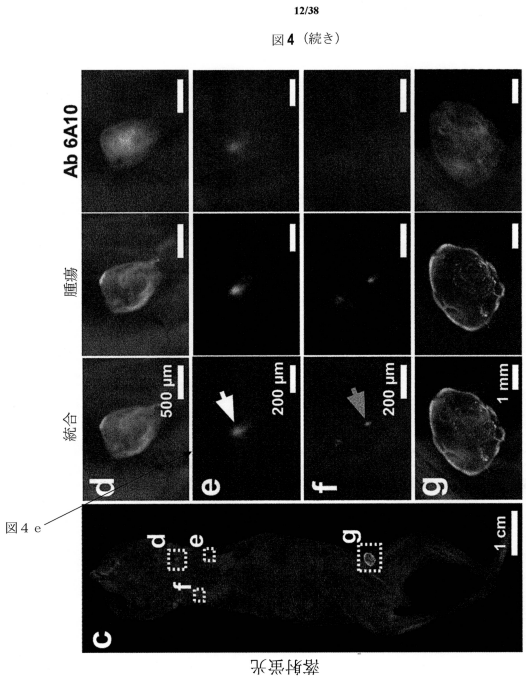
【図４ｃ】



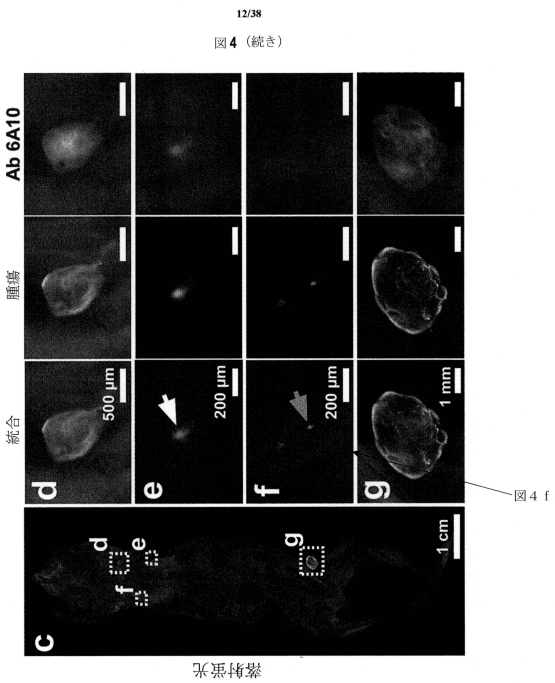
【図４ｄ】



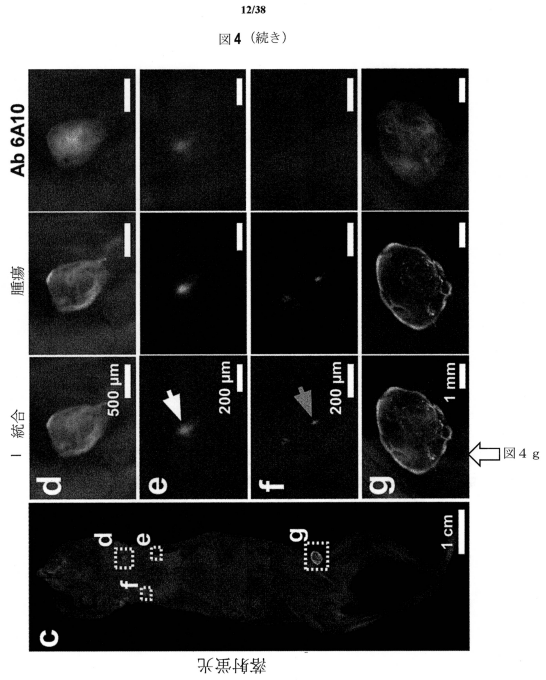
【図４ｅ】



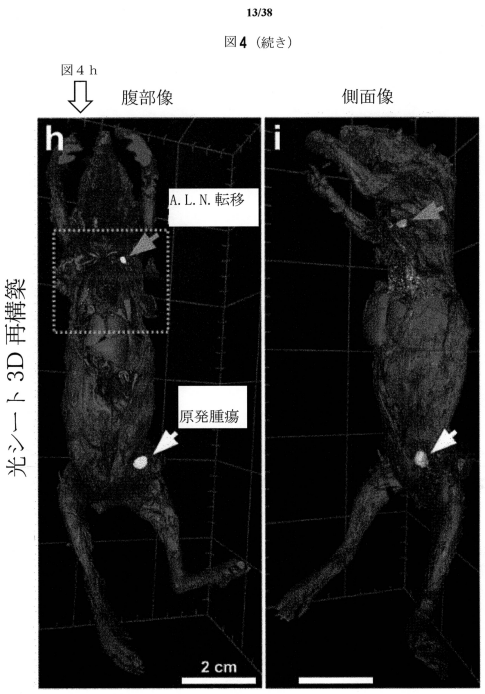
【図４ｆ】



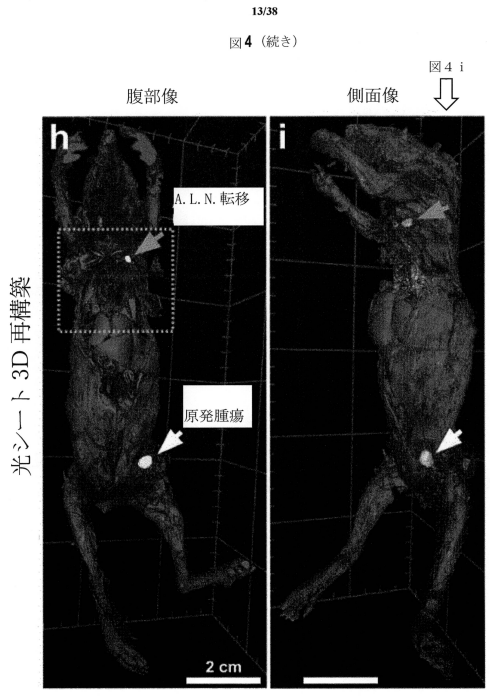
【図４ｇ】



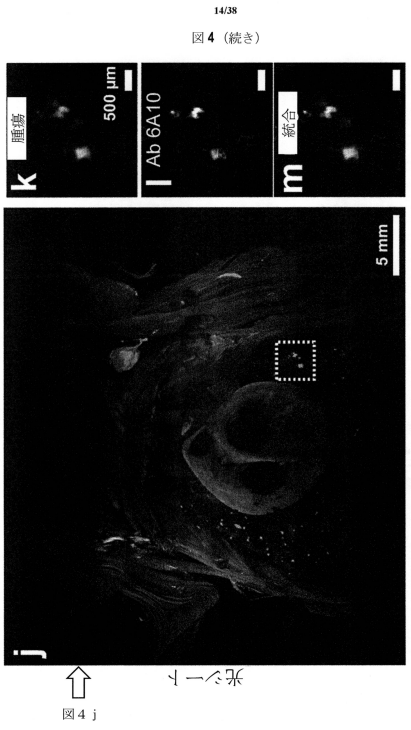
【図４ｈ】



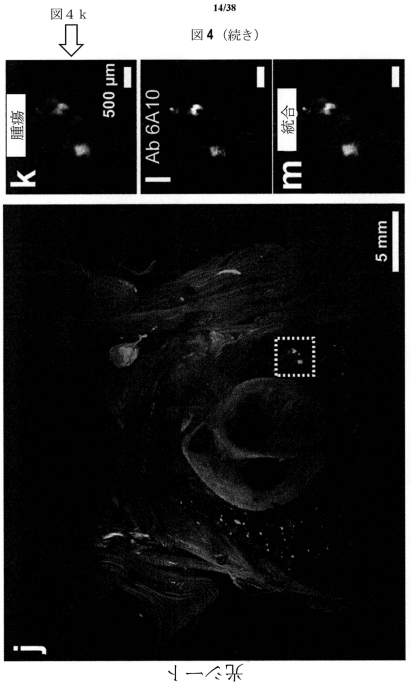
【図４ｉ】



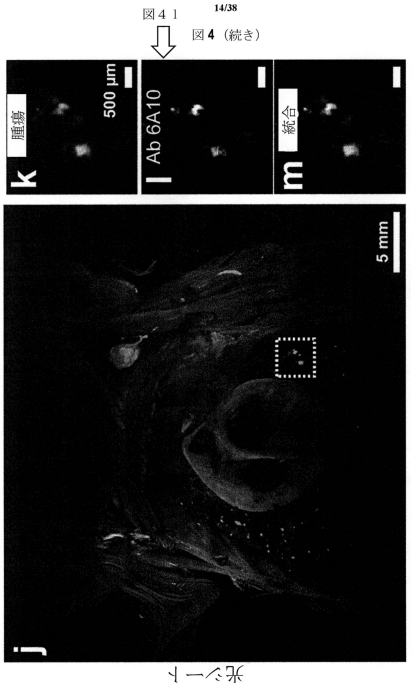
【図４ｊ】



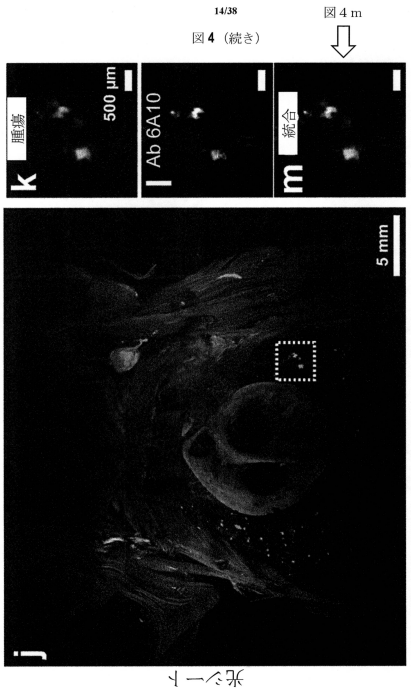
【図４ｋ】



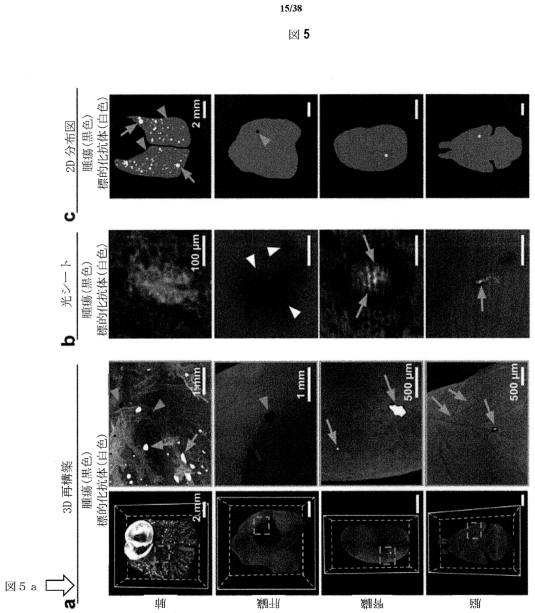
【図４ｌ】



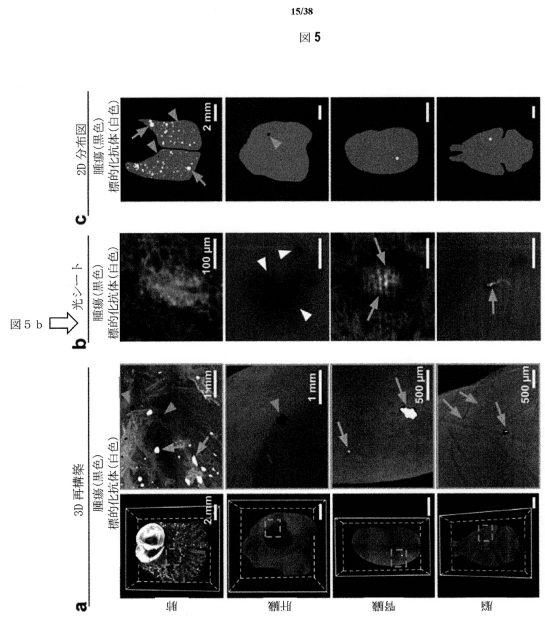
【図４ｍ】



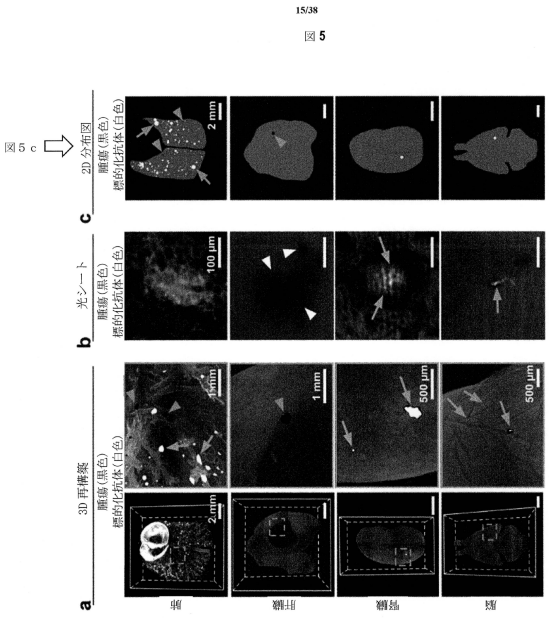
【図５ａ】



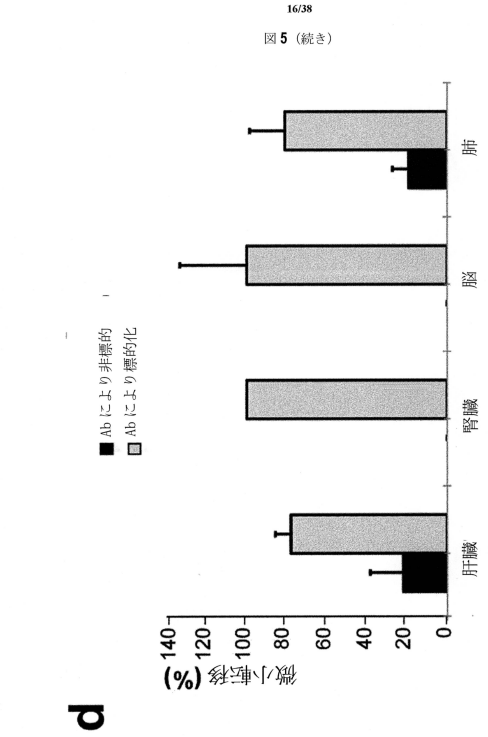
【図５ｂ】



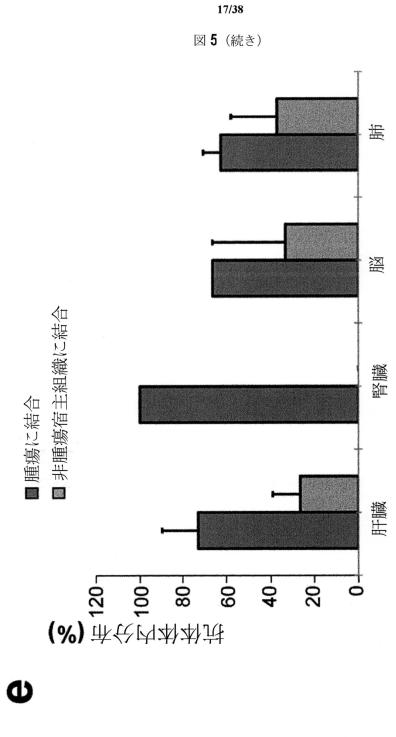
【図５ｃ】



【図５ｄ】



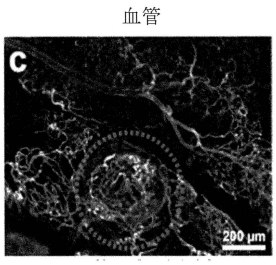
【図５ｅ】



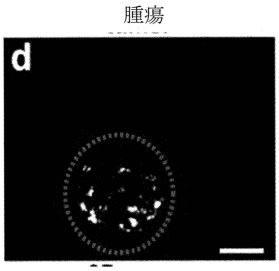
【図６ａ－６ｂ】



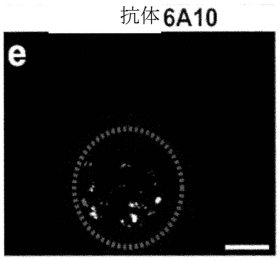
【図６ｃ】



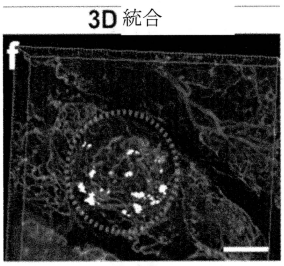
【図６ｄ】



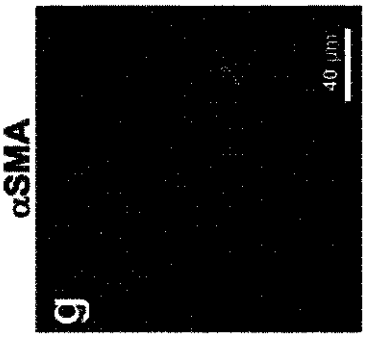
【図６ｅ】



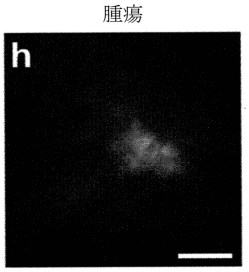
【図６ｆ】



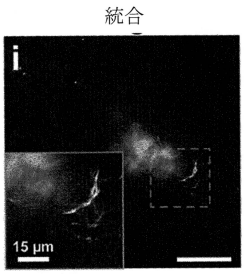
【図６ｇ】



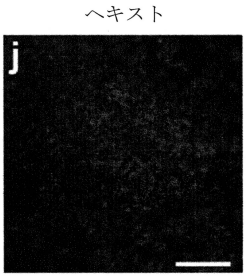
【図６ｈ】



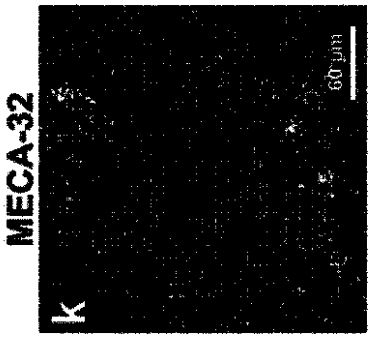
【図６ｉ】



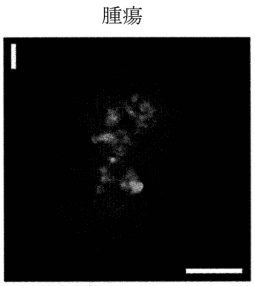
【図６ｊ】



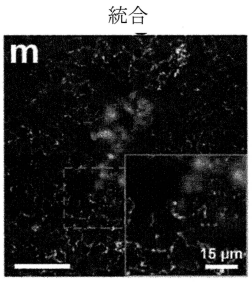
【図６ｋ】



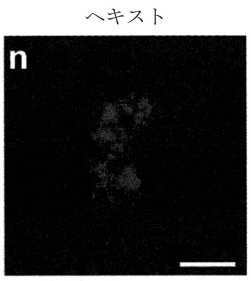
【図６ｌ】



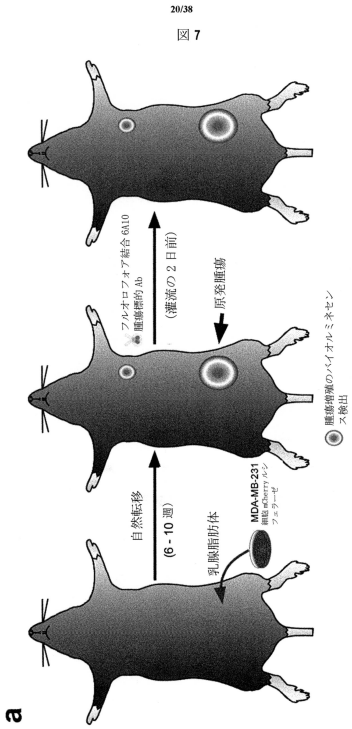
【図６ｍ】



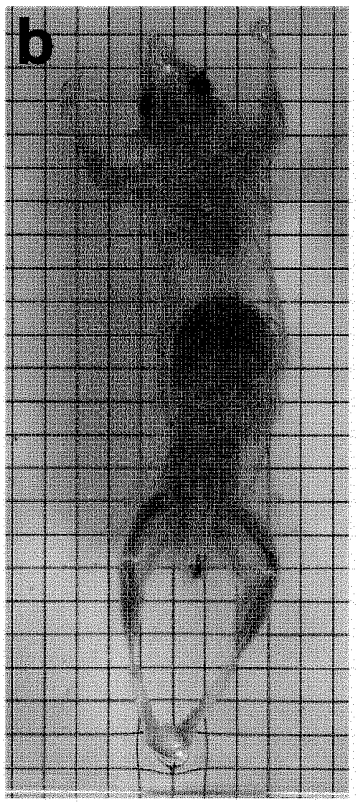
【図６ｎ】



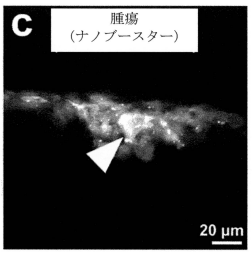
【図７ａ】



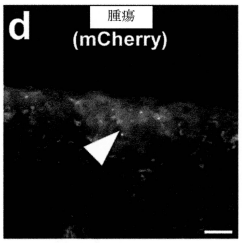
【図７ｂ】



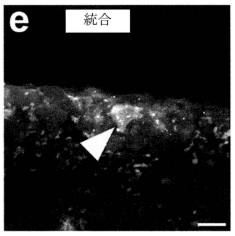
【図７ｃ】



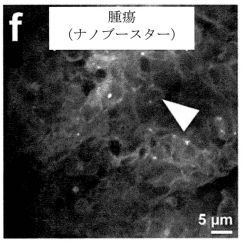
【図７ｄ】



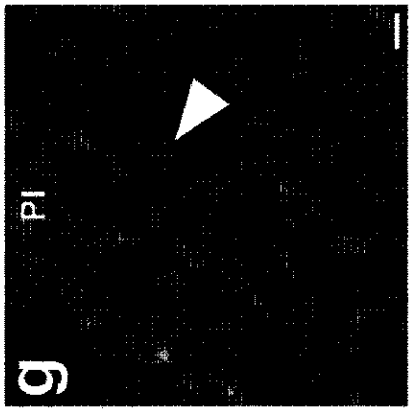
【図７ｅ】



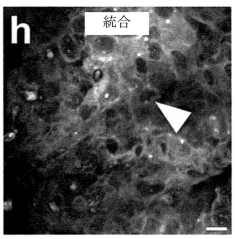
【図７ｆ】



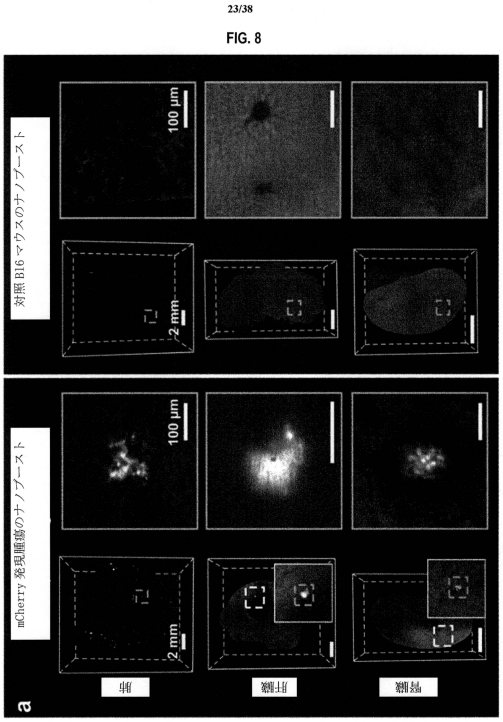
【図７ｇ】



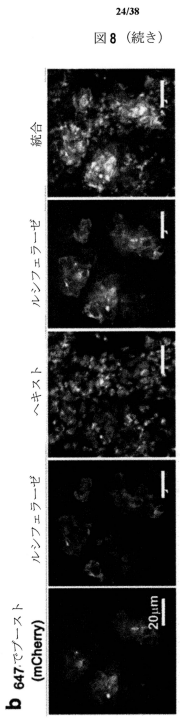
【図７ｈ】



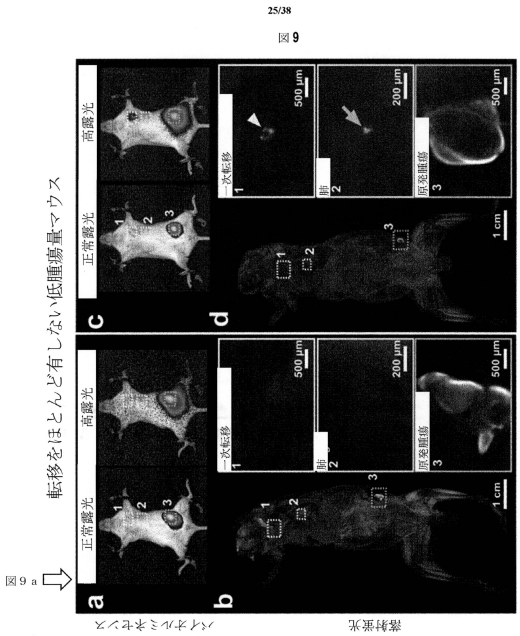
【図８ａ】



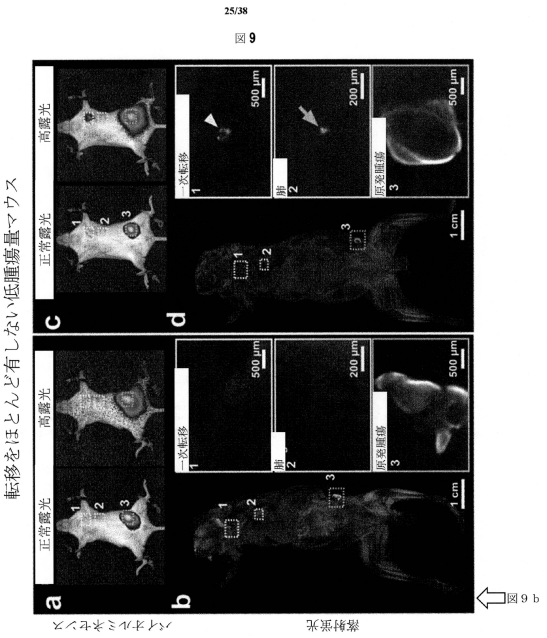
【図８ｂ】



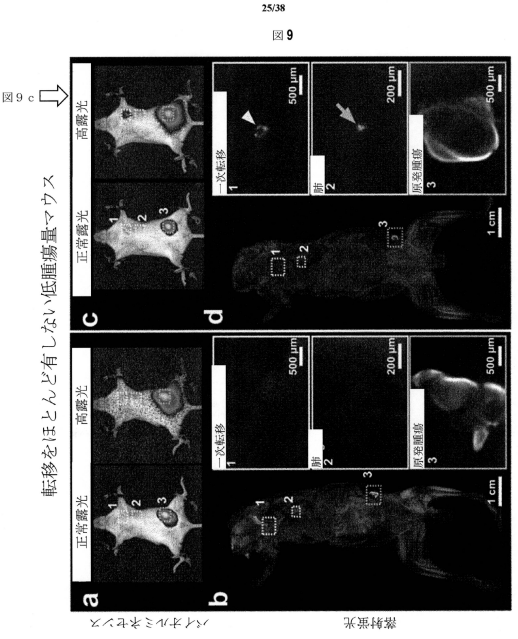
【図９ａ】



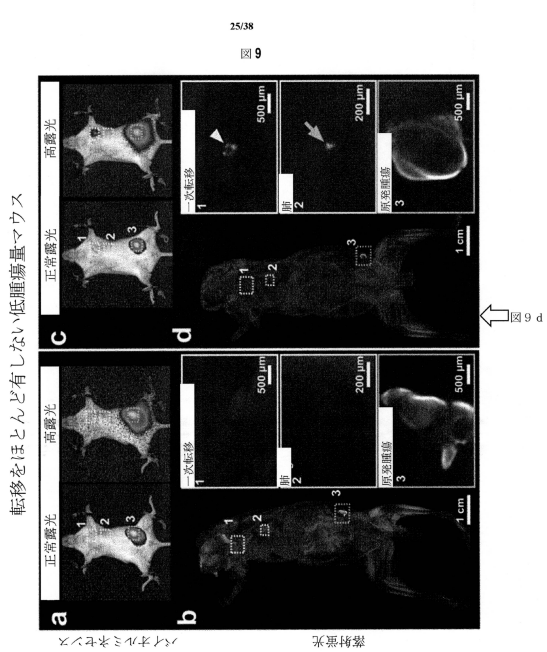
【図９ｂ】



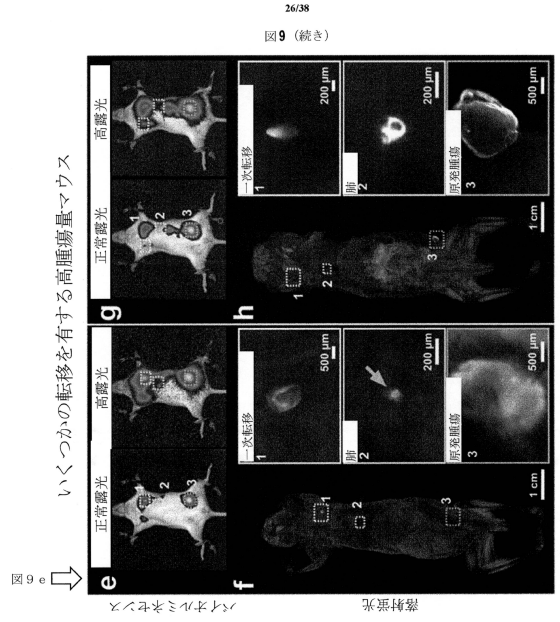
【図９ｃ】



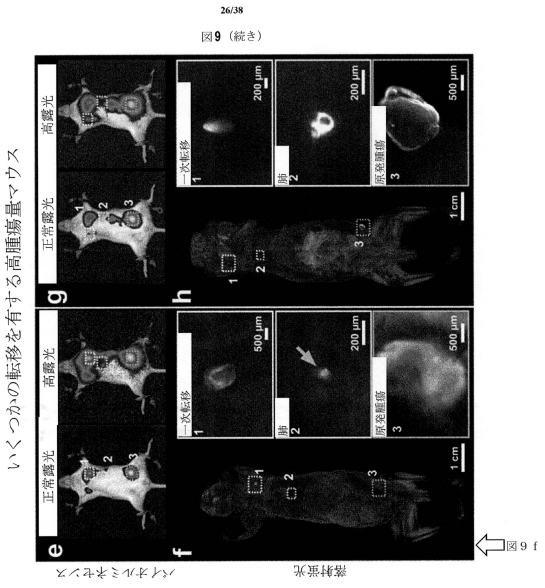
【図９ｄ】



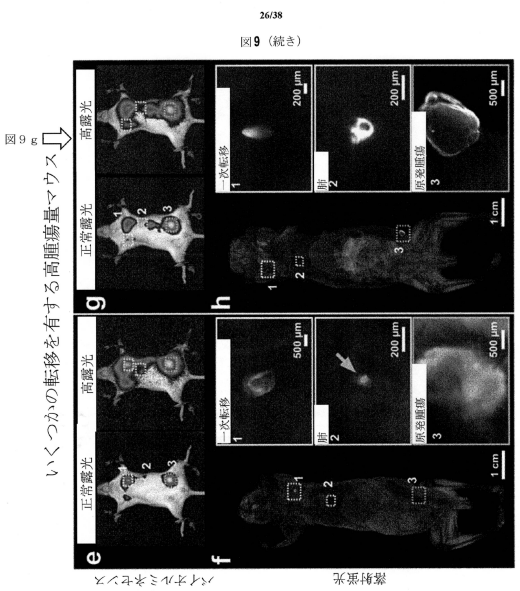
【図９ｅ】



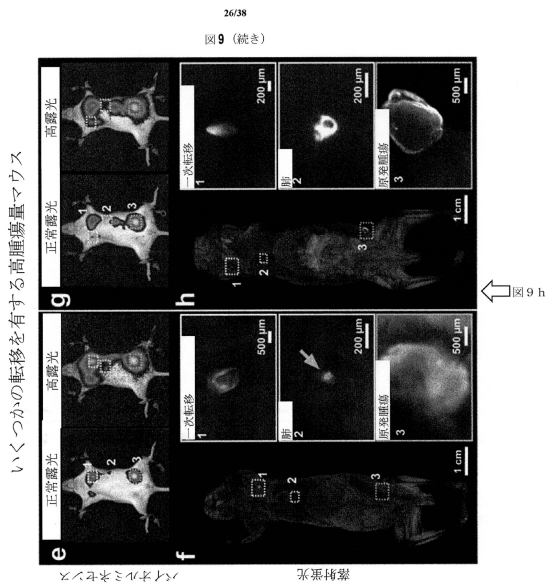
【図９ｆ】



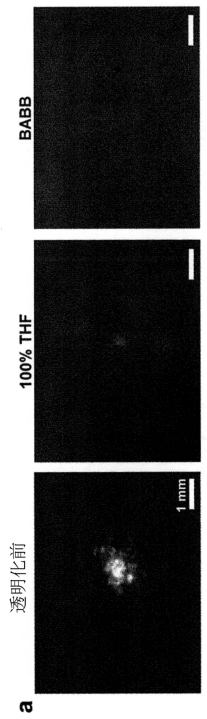
【図９ｇ】



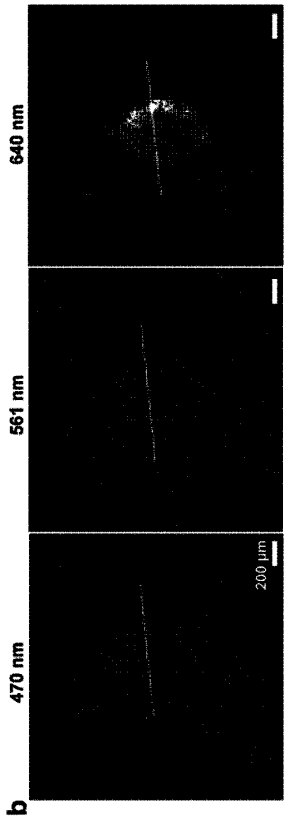
【図９ｈ】



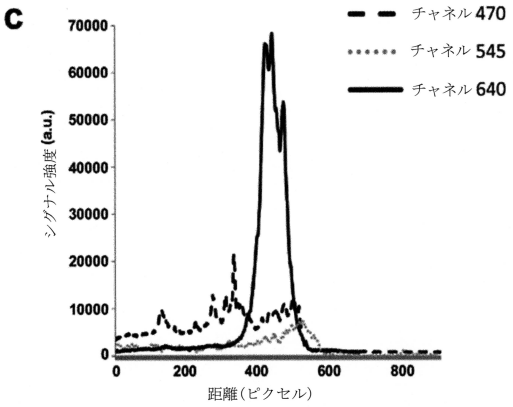
【図１０ａ】



【図１０ｂ】



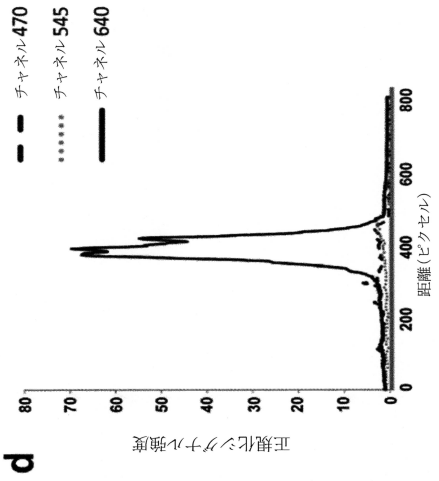
【図１０ｃ】



【図１０ｄ】

28/38

図10（続き）

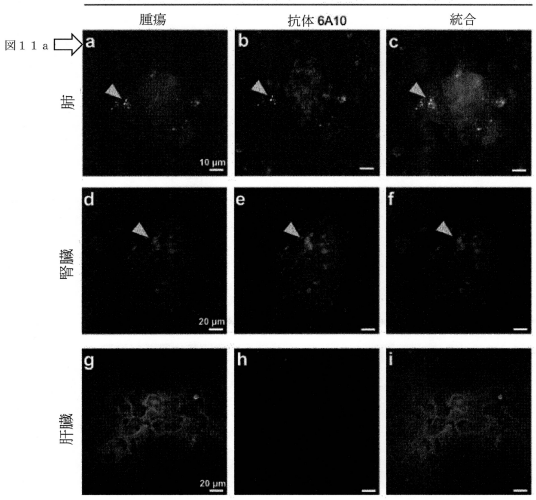


【図１１ａ】

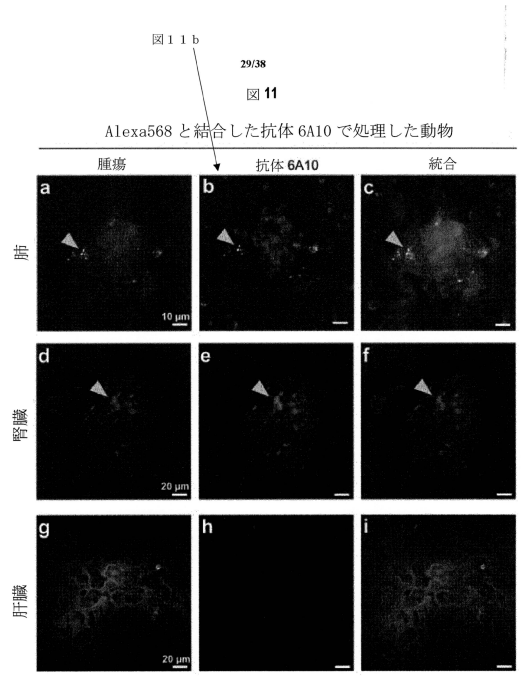
29/38

図11

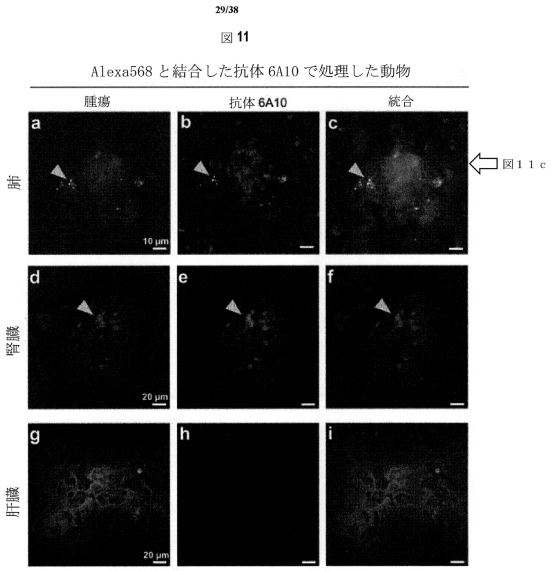
Alexa568 と結合した抗体 6A10 で処理した動物



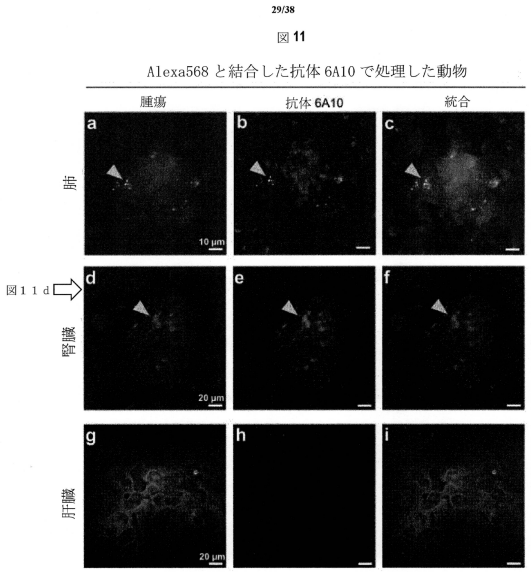
【図１１ｂ】



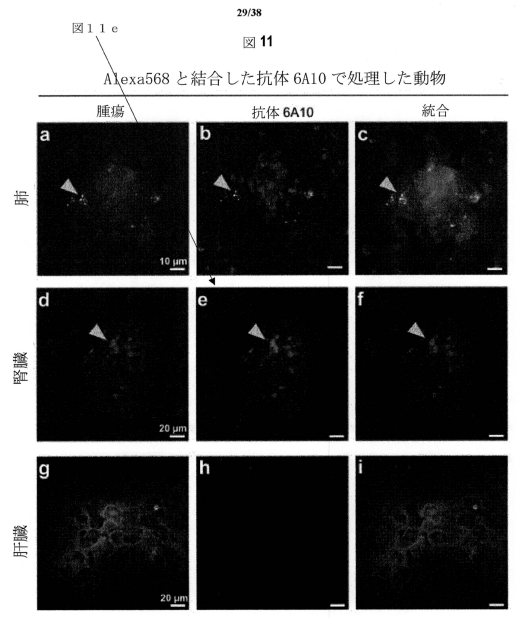
【図１１ｃ】



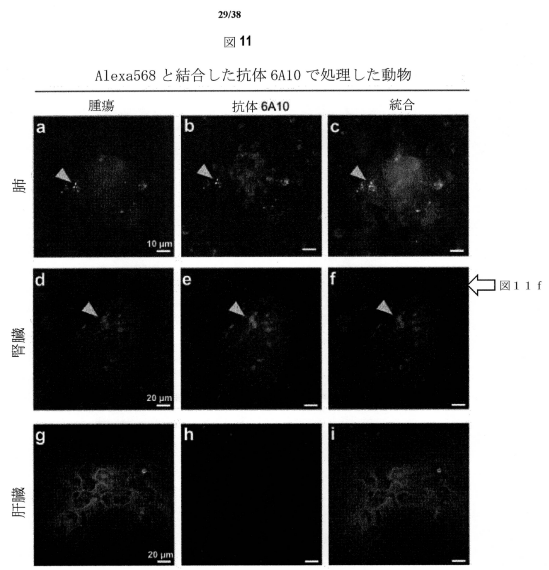
【図１１ｄ】



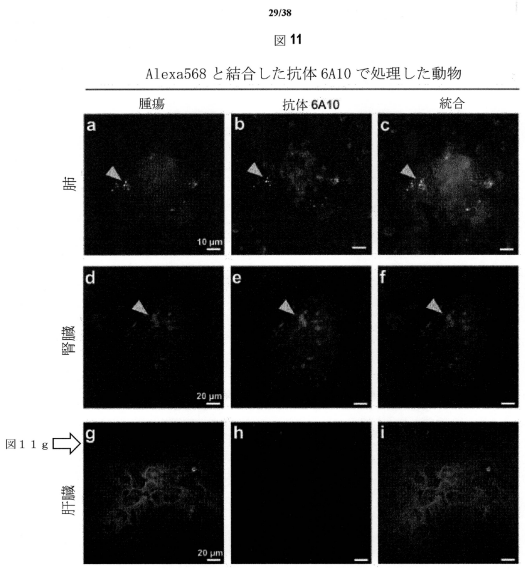
【図１１ｅ】



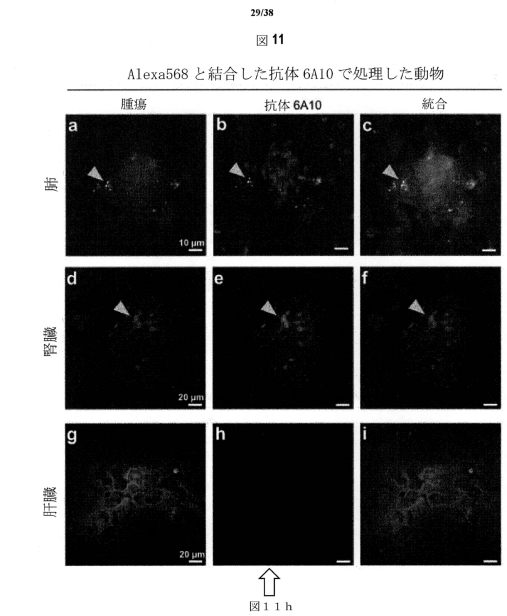
【図１１ｆ】



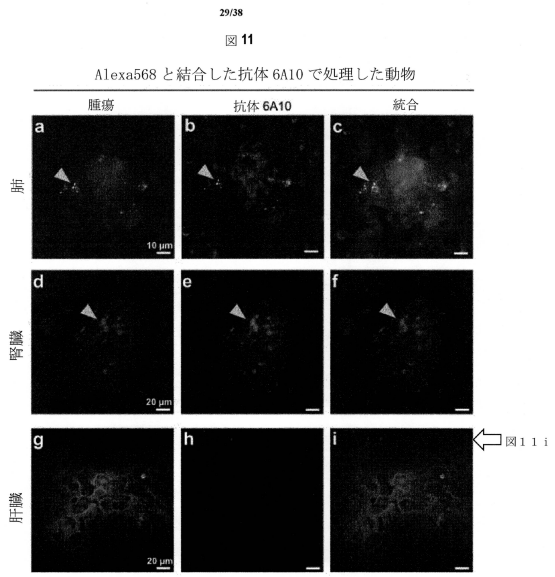
【図１１ｇ】



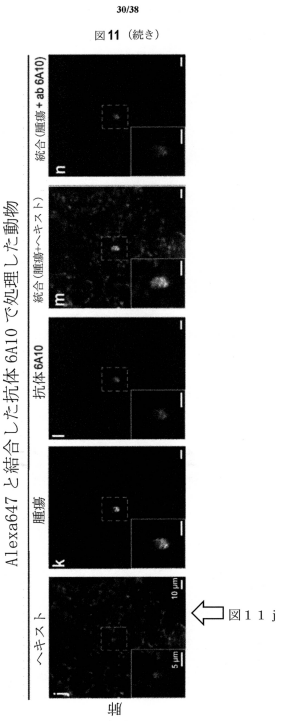
【図１１ｈ】



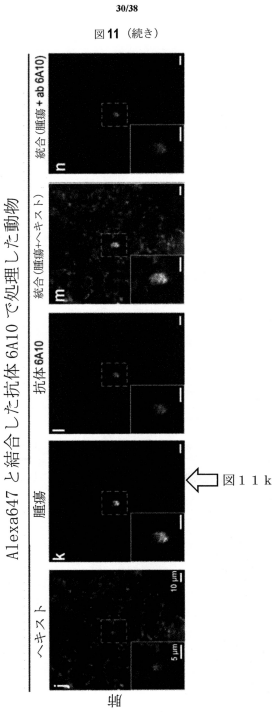
【図１１ｉ】



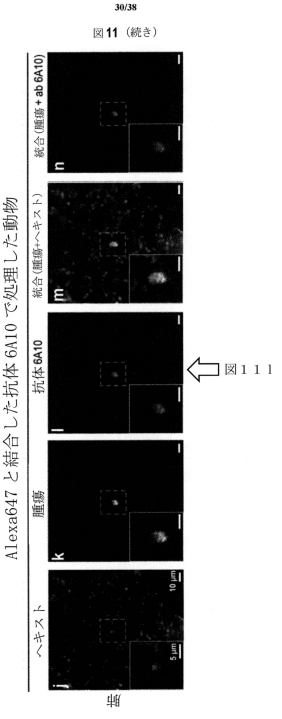
【図１１ｊ】



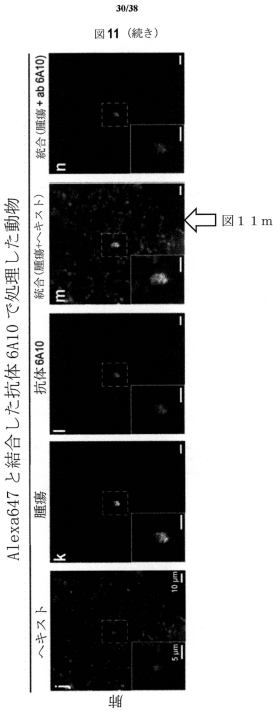
【図１１ｋ】



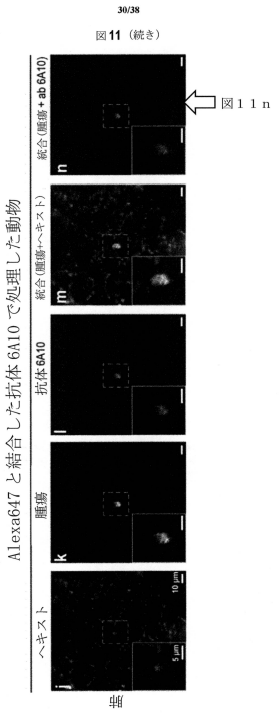
【図１１ｌ】



【図１１ｍ】



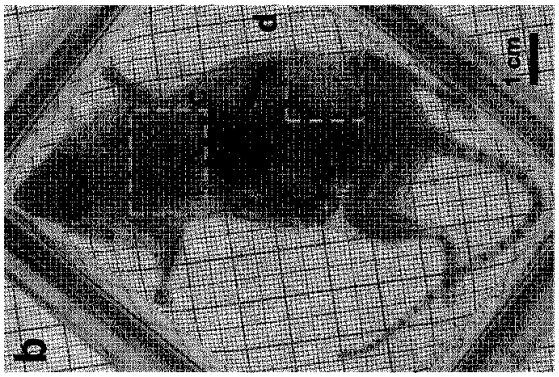
【図１１ｎ】



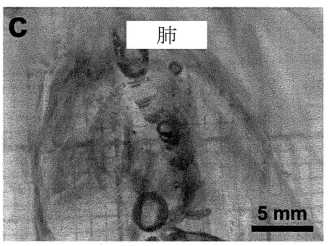
【図１２ａ】



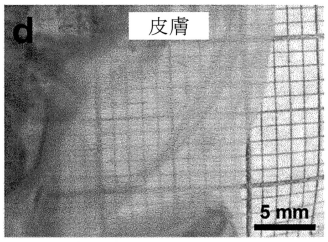
【図１２ｂ】



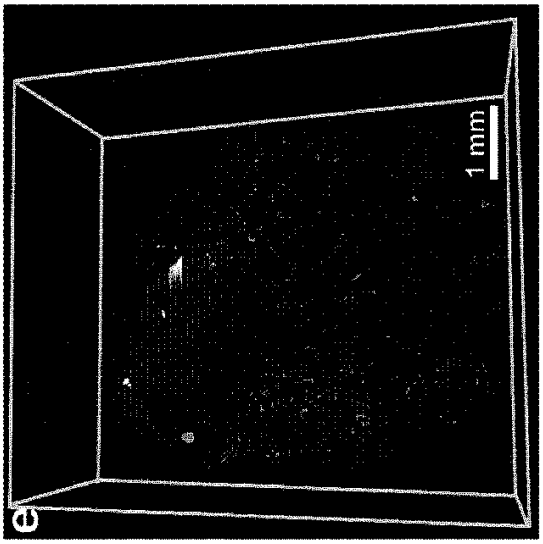
【図１２ｃ】



【図１２ｄ】



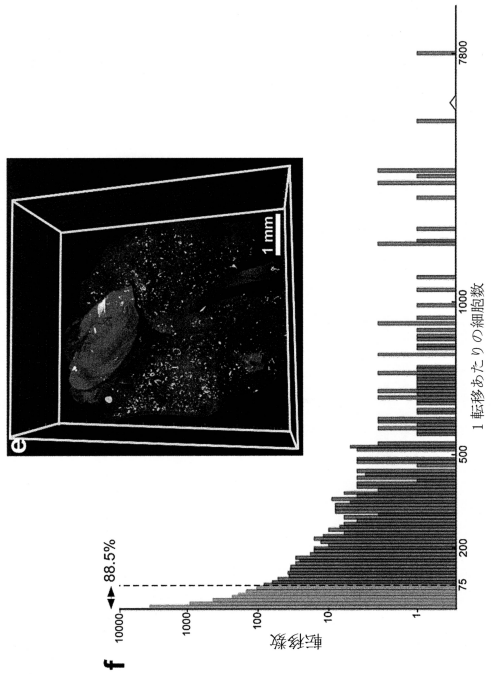
【図１２ｅ】



【図１２ｆ】

32/38

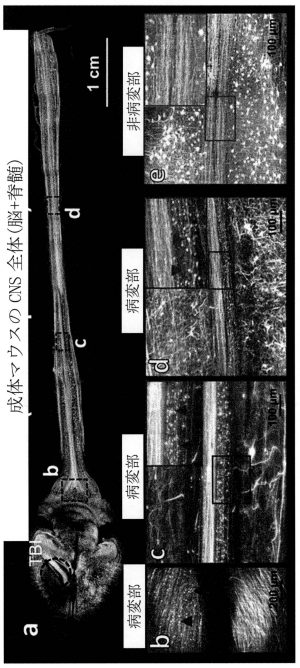
図12（続き）



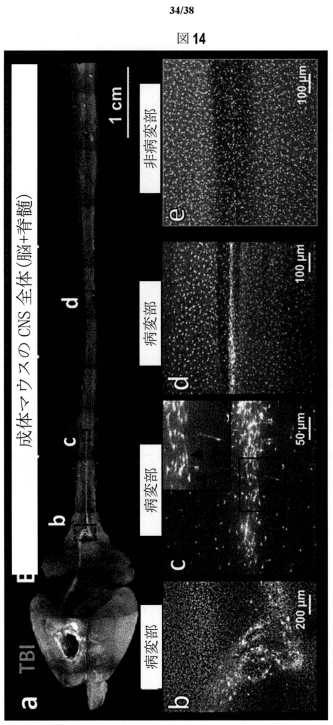
【図１３】

33/38

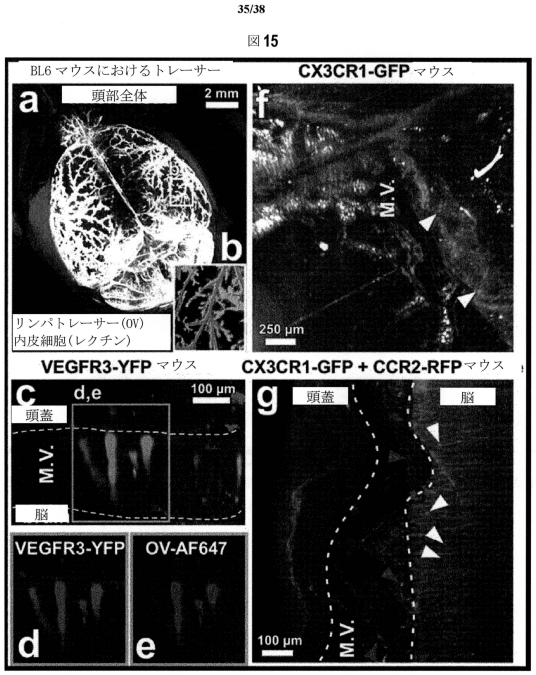
図13



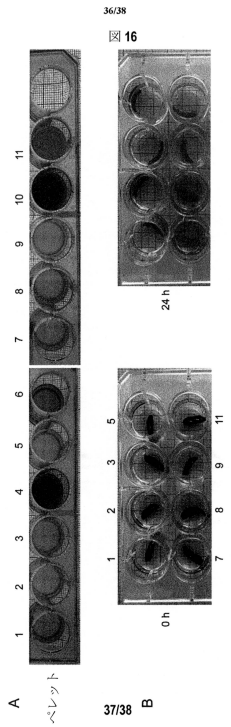
【図１４】



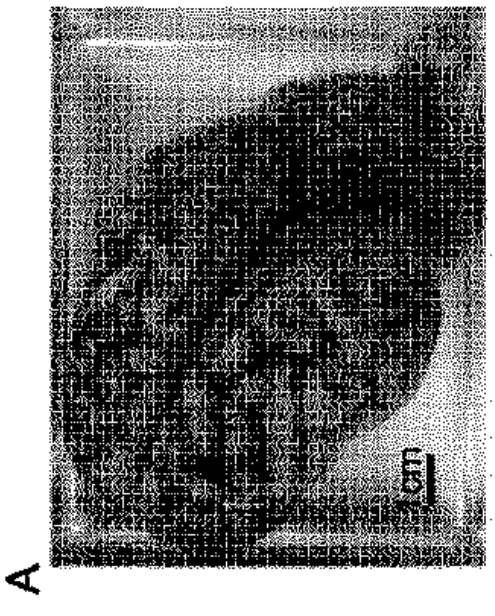
【図１５】



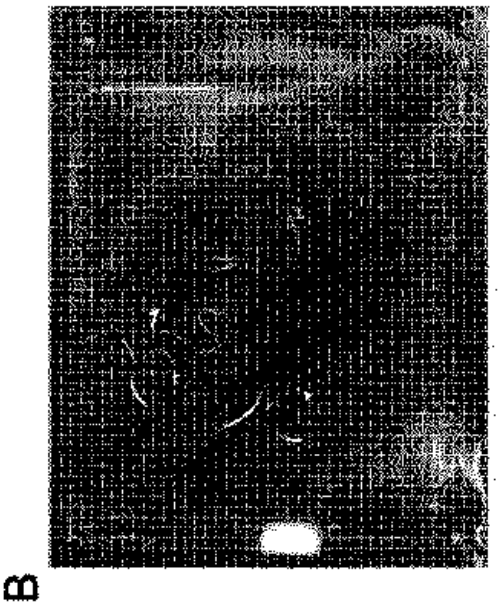
【図１６】



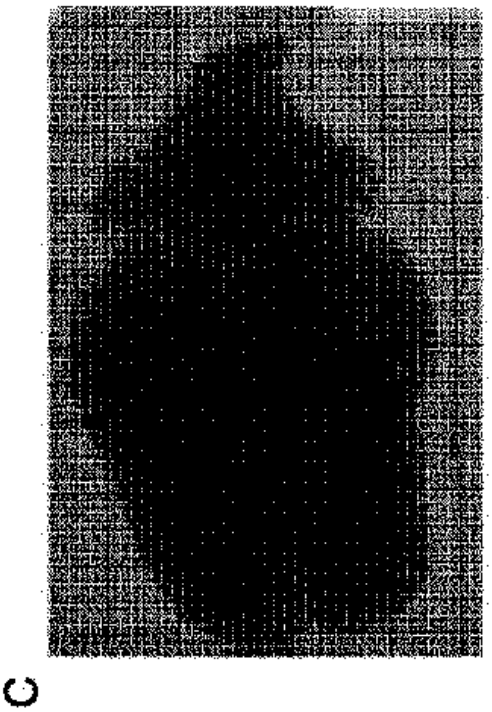
【図１７Ａ】



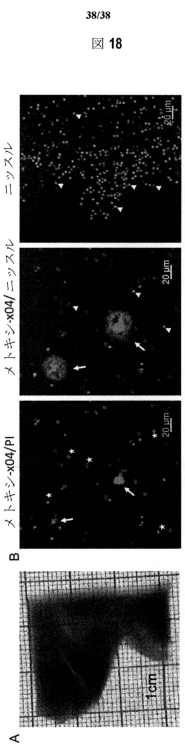
【図１７Ｂ】



【図１７Ｃ】



【図１８】



フロントページの続き

(72)発明者　カイ・ルイヤオ
アメリカ合衆国・９４３０１・カリフォルニア・パロアルト・エマーソン・ストリート・２５１・アパートメント・５
(72)発明者　チェンチェン・パン
ドイツ・８２１５２・プラネック／マルティンスリート・ロッホハマー－シュトラーセ・７・アパルトメント・２４５・シィンチ・チー様方
(72)発明者　シャン・ザオ
ドイツ・８２１５２・プラネック・ケーテ－コルヴィッツ－シュトラーセ・２
(72)発明者　アルナルド・パラ－ダマス
スペイン・０８０１２・バルセロナ・カレラ・デ・サン・ジュアキム・２８－３０
審査官　三木 隆

(56)参考文献
国際公開第２０１６／００４３６７（WO，Ａ１）
特表２０１６－５３８５６９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１６／１１７６１４（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１７／０１０８４１４（ＵＳ，Ａ１）
Pan Chenchen，Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO，Nature Methods，2016年08月22日，Vol.3 No.10，Page.859-867
Nicolas Renier，iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging，Cell，2014年11月06日，Vol.159，Page.896-910
Kazuki Tainaka，Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization，Cell，2014年11月06日，Vol.159，Page.911-924
マウスを丸ごと透明化し１細胞解像度で観察する新技術 〜血液色素成分を多く含む臓器なども脱色して全身を透明化〜，理化学研究所 科学技術振興機構（ＪＳＴ） 東京大学，2014年11月07日，https://www.jst.go.jp/pr/announce/20141107/index.html
Etsuo A. Susaki，Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis，Cell，2014年04月24日，Vol.157，Page.726-739
Klaus Becker，Chemical Clearing and Dehydration of GFP Expressing Mouse Brains，PLOS ONE，2012年03月30日，Vol.7 No.3，Page.e33916
Hiroshi Hama，ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging，NATURE NEUROSCIENCE，2015年09月14日，Vol.18，Page.1518-1529

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　１／３０
Ｇ０１Ｎ　３３／４８
Ｇ０１Ｎ　３３／５３
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）