

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7025340号
(P7025340)

(45)発行日 令和4年2月24日(2022.2.24)

(24)登録日 令和4年2月15日(2022.2.15)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q	1/6841(2018.01)	C 1 2 Q	1/6841	Z Z N A
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68	
C 1 2 Q	1/682(2018.01)	C 1 2 Q	1/682	Z

請求項の数 23 (全33頁)

(21)出願番号	特願2018-545154(P2018-545154)	(73)特許権者	515158308 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8 , スタンフォード, メイン クワッド ピー . オー . ボックス 2 0 3 8 6 , オフィス オブ ザ セネラル カウンセル ビルディング 1 7 0 , サード フロア
(86)(22)出願日	平成29年2月24日(2017.2.24)	(74)代理人	100114557 弁理士 河野 英仁
(65)公表番号	特表2019-511917(P2019-511917 A)	(74)代理人	100078868 弁理士 河野 登夫
(43)公表日	令和1年5月9日(2019.5.9)	(72)発明者	サムジーク, ニコライ
(86)国際出願番号	PCT/US2017/019443		
(87)国際公開番号	WO2017/147483		
(87)国際公開日	平成29年8月31日(2017.8.31)		
審査請求日	令和2年2月21日(2020.2.21)		
(31)優先権主張番号	62/300,596		
(32)優先日	平成28年2月26日(2016.2.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 2プローブ近接ライゲーションシステムを用いた多重化単一分子RNA可視化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単一細胞中の標的核酸の存在量を測定する方法であって、
特異的ハイブリダイゼーションを許容する条件下、固定化及び透過処理された細胞を、少なくとも1対の変性SNAI Lオリゴヌクレオチドプライマーと接触させること、前記少なくとも1対の変性SNAI Lオリゴヌクレオチドプライマーは、スプリントプライマーオリゴヌクレオチド(SPO)及びパドロックオリゴヌクレオチド(PO)を含み、SPO及びPOはそれぞれ、前記標的核酸上の直接の隣接配列と相補的である第一相補領域(それぞれ、CR1及びCR1')を含み、かつ、SPO及びPOはそれぞれ、さらに、CR1またはCR1'と隣接する位置にある第二相補領域(CR2及びCR2')を含み、PO上のCR2'は、ハイブリダイゼーション後、POの5'末端及び3'末端が先頭と末尾とを突き合わせる様式で互いに直接隣接して配置されるようになるように、前記POの5'末端及び3'末端が、SPOのCR2とハイブリダイズするようなスプリット領域であり、前記細胞を洗い、未結合プライマーを洗い落とすこと、前記細胞をリガゼと接触させること、前記POは、CR2'内の5'末端及び3'末端での結合により閉鎖環を形成し、前記POをテンプレートとして、及び前記SPOをポリメラーゼ用プライマーとして用いて、ローリングサークル増幅を行うこと、特異的ハイブリダイゼーションを許容する条件下、前記細胞を、増幅産物と結合するオリゴヌクレオチド検出プローブと接触させること、ならびに、

結合した検出プローブのレベルを検出して前記標的核酸の存在量を求めることを含む、方法。

【請求項 2】

前記標的核酸はRNAであり、前記RNAは、2つの合成オリゴヌクレオチド、即ちスプリントプライマーオリゴヌクレオチド(SPO)及びパドロックオリゴヌクレオチド(PO)からなる複合体を組み立てるための足場として機能する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞は、細胞集団中に存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞集団は、複数の細胞型を含む、請求項3に記載の方法。

10

【請求項 5】

異なる標的核酸に対して特異性を有する複数のSNAILオリゴヌクレオチドプライマーが使用される、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも5種類の異なる標的核酸が検出される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸は、RNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記RNAは、mRNAである、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記標的核酸は、DNAである、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記細胞は、1種または複数の非核酸マーカの発現について同時にプロファイリングされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記1種または複数の非核酸マーカは、タンパク質マーカである、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記検出プローブは、フルオロフォア、同位体、または質量タグの1種または複数で標識されている、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 13】

検出は、フローサイトメトリー、配列決定、プローブ結合及び電気化学的検出、pH変化、DNAタグと結合した酵素により誘導される触媒反応、量子もつれ、ラマン分光法、テラヘルツ波技術、または走査型電子顕微鏡により行われる、請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

前記フローサイトメトリーは、マスサイトメトリーまたは蛍光励起フローサイトメトリーである、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

検出は、顕微鏡観察、走査型質量分析、または他の撮像技法により行われる、請求項1から14のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 16】

検出は、nano-SIMSにより行われる、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

SNAILオリゴヌクレオチドの1つまたは複数の配列は、多重化分析で使用するための前記標的核酸の同定用バーコード情報を提供する、請求項1に記載の方法。

【請求項 18】

前記POは、閉鎖環として提供され、前記細胞をリガーゼと接触させる工程は、省略される、請求項1に記載の方法。

【請求項 19】

50

反応におけるプローブのT_mは、溶液中のライゲーションを最小限に抑えるように選択される、請求項1から18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記検出プローブは、検出後に除去される、請求項1から19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記検出プローブは、異なる時点での異なるローリングサークル産物を差示的に検出する、請求項1から19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

複数のSNAILオリゴヌクレオチドプライマー対が同時に、RNA種にわたって、タイル状に並べられ、プライマーは、任意選択で、組み込まれたコードを含む、請求項1から21のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項23】

請求項1から22のいずれか1項に記載の方法で使用される少なくとも1対の変性SNAILオリゴヌクレオチドプライマーと、

請求項1から22のいずれか1項に記載の方法で使用されるオリゴヌクレオチド検出プローブと

を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

20

【0001】

遺伝子発現調節機構の研究は、その調節不全が如何にして疾患状態を招き得るかを理解するために必要である。メッセンジャーRNA(mRNA)の空間分布は、細胞レベル及び組織レベルの両方で厳密に調節されている。mRNAの存在量及び空間分布の両方を解析することは、従来の顕微鏡で同時に検出可能なフルオロフォアの数により、または労力、時間、及び費用がかかる方法により、制約されることが多い。単一細胞中の特定mRNA分子の検出は、通常、cDNAの生成、例えば、FISSEQ技法を含み、すなわちcDNAでのパドロックプロープライゲーション、続いてローリングサークル増幅を行うが、このため感度が逆転写酵素の効率の低さに制約される。

【0002】

30

あるいは、単一分子RNA検出に、複数のショート蛍光標識化ヌクレオチドプローブと標的mRNAとの直接のハイブリダイゼーション、例えば、単分子RNA-FISHを利用することができる。こうした方法は、複数のプローブを合成しなければならない、及びそのようなプローブは概してオープンリーディングフレームを標的とする必要がある、という欠点を有する。

【0003】

さらに最近になって、本発明者らは、近接性に基づくRNA検出技法PLAYRを発表したが、この技法は、CYTOF上での単一細胞RNA検出を可能にした。しかしながら、PLAYRは、2段階ハイブリダイゼーションを必要とし、プローブ設計プロセスを複雑にする中間ハイブリダイゼーション特異的配列を特徴とする複雑な4プローブシステムを含むという問題がある。さらに、各遺伝子は、異なる中間ハイブリダイゼーション配列を必要とし、各新規配列は、ライゲーションの効率及びクロストークがないことを確実にするために別々に試験されなければならない、このことが、高度に多重化された実験の設計を時間及び労力を要する作業にしている。

40

【0004】

マイクロアレイ技術を使用した遺伝子発現のハイスループット測定すなわちハイスループット配列解読は、遺伝子ネットワークが、正常細胞及び組織でどのように協調して機能するか、ならびにそれらが疾患でどのように機能不全になるかを我々が理解することに多いに貢献する。そのような測定は、遺伝子の発現パターンに基づいてその遺伝子の機能を推測すること、どの遺伝子の発現が疾患で変更されるかを検出すること、及び疾患増悪を予

50

測する発現シグネチャーを同定することを可能にする。しかしながら、トランスクリプトームのバルク測定は、試料中の平均遺伝子発現の情報しか与えない。すなわち、異なる遺伝子発現シグネチャーを持つ複数の細胞型を含む複合試料では、最も存在量が多いシグネチャーが捕捉されるにすぎず、最も重要なものが捕捉されとは限らない。したがって、ほとんどの生体システム、特に組織及び腫瘍における単一細胞遺伝子発現の多様性から、関心対象の個別細胞における遺伝子発現プログラムを特性決定することを目的とした技法の必要性が生じる。

【 0 0 0 5 】

単一細胞測定の重要性に対する認識が高まりつつあることは、マスサイトメトリー及びマイクロ流体に基づくアプローチを含む膨大な数の単一細胞分析プラットフォームがここ数年で市販されて成功していることに現れている。フローサイトメトリーは、抗体を用いて、単一細胞中のタンパク質を検出する優れたプラットフォームを提供するものの、核酸検出用のこれに匹敵する手立てが存在しない。単一細胞中の mRNA を検出及び定量するマイクロ流体技術は、非常に費用がかかり、その処理量は、フローサイトメトリーを用いてタンパク質で達成可能であるものよりも数桁低い。

10

【 0 0 0 6 】

バルク解析の限界を乗り越えるため、単一細胞で遺伝子発現を測定する技術が複数開発されてきた。そのような方法の1つでは、最大で20のショートオリゴヌクレオチドプローブ対が、標的RNAと隣接位置でハイブリダイズする。続いて、これらの結合事象を、分岐DNA技術を用いて増幅させるが、このとき、続くハイブリダイゼーション工程でオリゴヌクレオチドのセットを加えることにより、分岐DNA分子を生じさせる。そうすると、そのような分岐DNA構造の存在を、蛍光プローブを用いるフローサイトメトリーにより検出及び定量することができる。この技術は、数百万もの単一細胞中にわずかに数コピーしかないRNAを検出することを可能にするが、現在のところ、少数の測定された転写物の同時検出に限られる。そのうえさらに、そのプロトコルは、時間も労力も要し、しかも使用される緩衝液は、フローサイトメトリーで一般的に使用されるいくつかのフルオロフォアと適合性がなく、マスサイトメトリーでは全く使用できない。

20

【 0 0 0 7 】

別の方法(Larsson et al. (2010) Nature Methods)は、パドロックプローブ、すなわち標的RNA分子とのハイブリダイゼーションに際して標的依存性ライゲーションにより環状DNA分子へと変換することができる直鎖プローブを使用する。生じる環化一本鎖DNAプローブは、その後、ローリングサークル増幅(RCA)と呼ばれるプロセスで、酵素phi29ポリメラーゼを用いて増幅させることができる。このプロセスは、原型DNA環の相補的縦列反復を数百含有する一本鎖DNA分子を生成させる。このRCA産物は、産物中の検出配列とハイブリダイズする蛍光標識化検出プローブの添加を通じて、可視化することができる。この技術は、転写物の多重検出を可能にするが、特異的プライマーを用いた標的mRNAの逆転写及びパドロックプローブのハイブリダイゼーション前の元の転写物のRNAアーゼH消化を必要とする。したがって、この技術は、アッセイにさらなる変動性を導入し、さらにプローブ及びプライマー両方の設計及び最適化を必要とする。

30

40

【 0 0 0 8 】

単一細胞mRNA測定用に市販されている別の手立ては、マイクロ流体装置を用いた単一細胞の物理的分離、それに続くライブラリー調製、及び配列解析に基づく。これは、現在のところ、唯一のゲノム規模の手立てであるが、非常に限定された処理量(1回につき96個の細胞)のため、血液試料または腫瘍など複数の細胞集団を含む試料の分析には適していない。さらに、この技術は、他のアプローチよりも費用がかかり、しかも同一細胞中のタンパク質及びmRNAの同時検出ができない。

【 0 0 0 9 】

単一細胞中の複数転写物について情報を提供することができる方法、特にタンパク質分析と組み合わせて役立てることができる方法が必要とされている。そのような方法は、生体

50

ネットワークが、正常及び疾患状態の細胞及び組織でどのように協調して機能するかを解析する助けとなり得る。本発明は、この需要を満たす。

【0010】

刊行物

Larsson et al. In situ detection and genotyping of individual mRNA molecules. Nat. Methods 7, 395-397 (2010). Player et al. Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization. J. Histochem. Cytochem. 49, 603-612 (2001). Porichis, F. et al. High-throughput detection of miRNAs and gene-specific mRNA at the single-cell level by flow cytometry. Nature Communications 5, 5641 (2014). Bendall, S. C. et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science 332, 687-696 (2011). Wolf-Yadlin, A. et al. Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration. Mol Syst Biol 2, 54 (2006). Angelo, M. et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. Nat Med 20, 436-442 (2014). Fredriksson, S. et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. Nat Biotechnol 20, 473-477 (2002). Soderberg, O. et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat. Methods 3, 995-1000 (2006).

10

20

30

【0011】

国際特許公開公報WO2012/160083; WO2001/061037; WO2013/173774.

【発明の概要】

【0012】

単一細胞レベルでmRNA種を分析するための組成物及び方法が提供される。本発明の方法は、SNAIL-RCAと称する場合があるが、これは、スプリントヌクレオチド補助分子内ライゲーション及び続くローリングサークル増幅(Splint Nucleotide Assisted Intramolecular Ligation followed by Rolling Circle Amplification)の略である。本発明の方法では、関心対象の細胞中に存在するmRNAは、本明細書中、スプリントプライマーオリゴヌクレオチド(SPO)及びパドロックオリゴヌクレオチド(PO)と称する2つのオリゴヌクレオチドを含む複合体の組立用足場として機能する。実施形態によっては、増幅反応混合物は、各標的配列用の2つのプローブを含む、それらからなる、または本質的にそれらからなるものであり、本方法は、所定の標的配列用の追加プローブの不在下で行うことができる。

40

【0013】

SPO及びPOはそれぞれ、標的mRNA上の隣接配列と相補的である第一相補領域(それぞれ、CR1及びCR1')を含む。

【0014】

50

SPO及びPOはそれぞれ、さらに、CR1またはCR1'と隣接する位置にある第二相補領域(CR2及びCR2')を含む。CR2'は、PO上に存在し、スプリット領域であって、POの5'末端及び3'末端が、先頭と末尾とを突き合わせる様式でCR2とハイブリダイズすることで、ハイブリダイゼーション後、POの5'末端及び3'末端は互いに直接隣接して配置されるようになる。模式図を図1に示す。POは、さらに、スパーサー領域を含む場合があり、スパーサー領域は、環状型の分子では、CR1'とCR2'との間にある。直鎖型のPOでは、5'末端は、CR2の両末端のアニーリングの際、オリゴヌクレオチドが任意の適切なDNAリガーゼ酵素、例えばT4 DNAリガーゼを用いてライゲーションにより環化できるように、ホスホリル化されている。

【0015】

代替実施形態において、POは、閉環分子であり、ライゲーション工程は省略される。

【0016】

環化の際、PO配列は、任意の鎖置換ポリメラーゼ、例えばバクテリオファージ 29ポリメラーゼを用いて、ローリングサークル増幅により増幅させることができる。増幅は環状分子を必要とし、そのためには、SPO及びPOが同一mRNA分子の隣接領域と直接ハイブリダイズすること、ならびにリガーゼがPOの5'末端と3'末端との連結に成功することを必要とする。増幅反応が起こるために両方のプローブが隣接位置でハイブリダイズすることを必要とすることにより高レベルの特異性が生じ、その結果、優れた特異性、低いバックグラウンド、及び高い信号対雑音比がもたらされる。

【0017】

RCA産物は、様々な方法で検出可能であり、そのような方法として、配列特異的検出オリゴヌクレオチド(DO)、または検出プローブと称するものとのハイブリダイゼーションが挙げられるが、これに限定されない。実施形態によっては、DOは、検出可能な標識、例えばフルオロフォア、ランタニド、ピオチン、放射性核種などと結合しており、標識は、高額顕微鏡観察、SIMSイオンビーム撮像などにより検出可能な場合がある。実施形態によっては、DOは未標識であり、DOの存在は、DOにより刺激された重合反応で検出することができ、重合反応は、検出可能な標識を含む1つまたは複数のdNTPを含む場合がある。そのような重合産物は、さらに、異なる産物の順次検出のため、標識の付加、標識の検出、及び標識の除去という工程を含む場合がある。検出プライマーは、標的遺伝子に特異的なRCA増幅産物のある領域、例えばCR1'配列に対して特異的であることも、PO上の標的特異的領域外、例えばスパーサー領域に結合する汎用検出プローブであることも可能である。

【0018】

本発明の方法は、必要なプローブ数が少ないことで利点をもたらし、これにより分析費用を削減し、高度な多重化を可能にする。本発明の方法は、単一細胞中の特定核酸を経済的に検出することを可能にし、さらに、複数の核酸、例えば少なくとも1つから、最大で5、最大で10、最大で15、最大で20、最大で30、最大で40、またはそれより多くの転写物を、最大で約50、100、250、500、最大750、最大1000、またはそれより多くの細胞/秒の速度で、同時分析できるように、フローサイトメトリーまたはマスサイトメトリーと組み合わせて、多数の細胞を同時分析することができる。SNAILの利点として、タンパク質、細胞内リン酸化部位、及び他の細胞抗原の従来抗体染色と適合性があることから、単一細胞中の複数の核酸及びタンパク質を同時分析する能力が挙げられる。これにより、追加の細胞パラメーターと合わせて複数の核酸分子の同時検出が可能になる。SNAILは、様々な異なるプラットフォームと組み合わせることができ、そのようなプラットフォームとして、FACS、マスサイトメトリー、顕微鏡観察、走査型質量分析(nano-SIMSが挙げられるが、これに限定されない)などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

実施形態によっては、単一細胞中の標的核酸の存在量を測定する方法が提供され、本方法は、特異的ハイブリダイゼーションを許容する条件下、固定化及び透過処理された細胞を

10

20

30

40

50

、少なくとも1対のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させること、各オリゴヌクレオチド対は、上記のとおりのでSPOプローブ及びPOプローブを含む、細胞を洗い、未結合プライマーを洗い落とすこと、ライゲーション反応を行うこと、この反応では、POプローブは、スプリント(SPO)と適切にハイブリダイズし、結合により環を形成する、結合された骨格/挿入環を、ローリングサークル増幅により増幅させること、細胞を洗い、ポリメラーゼを洗い落とすこと、検出プライマーを増幅環とハイブリダイズさせること、細胞を洗い、未結合検出プライマーを洗い落とすこと、ならびに、結合した検出プライマーのレベルを定量して標的核酸の存在量を求めることを含む。多くの実施形態において、複数の標的核酸が、同時に分析される。

【0020】

本発明の実施形態によっては、SNAILは、同時に測定される他の細胞パラメーターにより規定されるとおりに特定細胞集団のゲーティングを行うサイトメトリーと組み合わせ、例えば、関心対象のサブ集団を規定する抗体染色及びマスサイトメトリーまたはFACSと組み合わせ使用される。そのような実施形態では、複雑な細胞集団、例えば、免疫細胞、前駆細胞もしくは幹細胞、癌細胞などを含む可能性がある生検または血液試料を、分析することができる。例えば、複雑な細胞集団内の規定された細胞型中の1種または複数の標的核酸の存在量を測定する方法が提供され、この場合、検出プローブの定量は、細胞マーカーの検出と組み合わせられ、そのような細胞マーカーとして、関心対象の細胞型を規定する役割を果たすタンパク質マーカーが挙げられるが、これに限定されない。

【0021】

他の実施形態において、本発明の方法は、単一細胞中のmRNA転写物の特定スプライスバリエーションの多重検出及び定量に使用される。

【0022】

さらに別の実施形態において、本発明の方法は、核酸分子及びタンパク質-タンパク質相互作用の同時検出及び定量のため、近接ライゲーションアッセイ(PLA)と組み合わせられる。

【0023】

内在性細胞DNAを先行して変性させる(熱、酵素手段、または任意の他の適切な手順による)ことで、本技術は、特定DNA配列を検出する(単一細胞の遺伝子型を判定する)ように改変される。この適応では、本技術は、遺伝子コピー数変異の定量ならびにゲノム転位/融合事象の検出を可能にする。例えば、融合事象の検出では、第一の遺伝子が第二の遺伝子と融合している場合、SPO配列を持つプライマーが遺伝子1を標的とするように、及びPOプローブが遺伝子2を標的とするように、SNAIL法を適応させることができる。個々のプローブは増幅産物をもたらさないで、シグナルは、融合転写物が存在する場合に限り得られる。複数の個別プライマーを、遺伝子1及び遺伝子2、例えば2、3、4、5、6、またはそれより多くのそれぞれ用に設計することができる。

【0024】

実施形態によっては、SNAILオリゴヌクレオチドプローブは、プローブが溶液中で「ライゲーション」できる可能性を最小限に抑えるため、部分的には、個々の結合プローブ、または対になるプローブのT_mに基づいて選択される。近接による「局所的濃度」の上昇に依存することにより、より少ない数のプローブが、ライゲーション点周囲で対形成することを可能にする。

【0025】

実施形態によっては、検出プローブは、検出後に除去される、または差示的に使用されて異なる時点での異なるローリングサークル産物を視覚化する。

【0026】

実施形態によっては、隣接領域ではない、例えばRNA分子の末端にある領域でのプローブによる結合事象が検出されるが、これは空間的3D変化が領域を近づけることによるものである。

【0027】

10

20

30

40

50

実施形態によっては、複数のSNAILオリゴヌクレオチドプローブ対が、標的配列にわたって同時にタイル状に並べられる。そのような実施形態のいくつかにおいて、タイル状オリゴヌクレオチドは、どれが読み取られるのかを判定するためにコードされる。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1A】SNAIL-RCAプロトコルの工程であるハイブリダイゼーション、ライゲーション、ローリングサークル増幅、増幅産物検出を示す図である。

【図1B】SNAIL-RCAプロトコルの工程であるハイブリダイゼーション、ライゲーション、ローリングサークル増幅、増幅産物検出を示す図である。

【図2】NALM-6及びジャーカット細胞中のHLADRの発現のSNAIL-RCA検出を示す図である。

10

【図3】OVCA R-4細胞中の24個の遺伝子の発現のプロファイリングを、検出プローブの反復リアーニングにより視覚化した図である。

【図4A】602個のOVCA R-4細胞にわたり定量された遺伝子の同時発現を示す図である。

【図4B】OVCA R細胞の単一細胞力指向描画を示す図であり、エッジは、24個の遺伝子のパネルにわたりコンピューター計算された相関する単一細胞発現プロファイルを表す。カラーコードは、クラスター化及び個々の遺伝子の発現により特定された細胞の表現型集団を表す。

【発明を実施するための形態】

20

【0029】

本発明をさらに説明する前に、当然のことながら、本発明は、記載される特定の実施形態に限定されず、したがって、当然のことながら変化する場合がある。同じく当然のことながら、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることになるので、本明細書中で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図しない。

【0030】

値の範囲が提供される場合、当然のことながら、文脈でそうではないと明記されない限り、その範囲の上限と下限との間に介在する各値が、下限値の単位の10分の1まで、及び任意の他の記述される範囲中のその記述されるまたは介在する値が、本発明に包含される。これらのより狭い範囲の上限値及び下限値は、それぞれ独立して、そのより狭い範囲に含まれる場合があり、同じく本発明に包含されるが、記述される範囲のいずれの限度値にしてもその値自身を含まない場合がある。記載される範囲が上限及び下限の一方または両方を含める場合、これらに含まれる上限及び下限の一方または両方を含まない範囲もまた、本発明に含まれる。

30

【0031】

本明細書中で記載される方法は、記載される事象を、記載される順序で行うことに加えて、論理的に可能である任意の順序で行うことができる。

【0032】

特に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本発明を実施するためにまたは試行するために、本明細書中で記載されるものと同様または等価な任意の方法及び材料もまた使用可能であるものの、好適な方法及び材料をこれから記載する。

40

【0033】

本明細書中で言及される全ての刊行物は、方法及び/または材料を、それに関連して言及される刊行物と合わせて開示及び説明することで、参照として本明細書中に援用される。

【0034】

なお、本明細書中及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈でそうではないと明白に示されない限り、複数についての言

50

及も含める。さらにまた、特許請求の範囲は、どのような任意選択の要素も排除するように作成することができる。そのため、本文書は、特許請求の範囲の要素の記述に関連して「solely」、「only」などの排他的用語の使用、または「否定的」限定の使用のための先行詞として機能することを意図する。

【0035】

本明細書に記載される公報は、それらの開示が本出願の出願日前であったことを提示するにすぎない。それらのどれも、本発明が先行発明を理由にそうした公報に先行する資格がないことの承認とみなされることはない。さらに、提示される公開日は、実際の公開日とは異なる可能性があり、実際の公開日は、個別に確認される必要がある。

【0036】

定義

標的核酸。本明細書中で使用される場合、標的核酸とは、単一細胞中に存在する任意のポリヌクレオチド核酸分子（例えば、DNA分子、RNA分子、修飾核酸など）である。実施形態によっては、標的核酸は、コードRNA（例えば、mRNA）である。実施形態によっては、標的核酸は、非コードRNA（例えば、tRNA、rRNA、マイクロRNA（miRNA）、成熟miRNA、未成熟miRNAなど）である。実施形態によっては、標的核酸は、細胞の文脈において、RNA分子（例えば、mRNA、pre-mRNAなど）のスプライスバリエーションである。したがって、適切な標的核酸は、スプライシングされていないRNA（例えば、pre-mRNA、mRNA）、部分スプライシングされたRNA、または完全スプライシングされたRNAなどであることも可能である。

【0037】

関心対象の標的核酸は、可变的に発現する場合がある、すなわち細胞集団内で存在量が変化し、本発明の方法は、個別の細胞中の核酸の発現レベルのプロファイリング及び比較を可能にし、可能になるものとしてRNA転写物が挙げられるがこれに限定されない。

【0038】

標的核酸は、DNA分子、例えば、変性ゲノム、ウイルス、プラスミドなども可能である。例えば、本方法は、例えば癌細胞集団中のコピー数変異体を検出するために使用することができ、この場合、標的核酸は、集団の細胞のゲノム中に異なる量で存在し、また、ウイルス感染細胞に使用してウイルス量及び動態を測定することができる。

【0039】

標的的特異的オリゴヌクレオチドプライマー対。本発明の方法において、標的的特異的オリゴヌクレオチドプライマーの1つまたは複数の対を、標的核酸を含む細胞と接触させる。各オリゴヌクレオチド対は、2つのオリゴヌクレオチドを含み、本明細書中、それぞれスプリットプライマーオリゴヌクレオチド（SPO）及びパドロックオリゴヌクレオチド（PO）と称する。SPO及びPOはそれぞれ、標的mRNA上の隣接配列と相補的である第一相補領域（それぞれ、CR1及びCR1'）を含む。SPO及びPOはそれぞれ、さらに、CR1またはCR1'と隣接する位置にある第二相補領域（CR2及びCR2'）を含む。CR2'は、PO上に存在し、スプリット領域であって、POの5'末端及び3'末端が、先頭と末尾とを突き合わせる様式でCR2とハイブリダイズすることで、ハイブリダイゼーション後、POの5'末端及び3'末端は互いに直接隣接して配置されるようになる。模式図を図1に示す。POは、さらに、スペーサー領域を含む場合があり、スペーサー領域は、環状型の分子では、CR1'とCR2'との間にある。スペーサー配列は、バーコード情報などを提供するように選択することができる。直鎖型のPOでは、5'末端は、CR2の両末端のアニールングの際、オリゴヌクレオチドが任意の適切なDNAリガーゼ酵素、例えばT4 DNAリガーゼを用いてライゲーションにより環化できるように、ホスホリル化されている。

【0040】

複数のオリゴヌクレオチド対を反応に使用することができ、1つまたは複数の対は、各標的核酸と特異的に結合する。感度を改善し変動性を低下させる目的で、例えば、1つの標的核酸に対して2つのプライマー対を用いることができる。同じく関心対象であることは

10

20

30

40

50

、細胞中の複数の異なる標的核酸を検出すること、例えば、最大2、最大3、最大4、最大5、最大6、最大7、最大8、最大9、最大10、最大12、最大15、最大18、最大20、最大25、最大30、最大40、またはそれより多くの異なる標的核酸を検出することである。プライマーは、典型的には、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、及び最高約99、最高約95、最高約90の温度で加熱することにより、典型的には、使用前は変性状態にある。

【0041】

標的結合部位は、標的核酸の一領域に結合する。対においては、各標的部位は異なっており、その対は、標的核酸の相補的隣接部位であり、例えば、通常は他方の部位から10nt以下の距離、9、8、7、6、5、4、3、2、または1nt以下の距離であり、間に距離がない部位の場合もある。標的部位は、典型的には、同一方向の標的核酸の同一鎖上に存在する。標的部位は、細胞中に存在する他の核酸に対して、独自の結合部位を提供するようにも選択される。各標的部位は、概して長さ約18~25nt、例えば約18~23nt、約18~21ntなどである。オリゴヌクレオチドプローブの対は、その同族標的部位に結合するために対の各プローブが同様な融点を有するように選択され、例えば、 T_m は、約50、約52、約55から最高約70、最高約72、最高約70、最高約65、最高約62までの場合があり、約58~約62の場合がある。標的部位のGC含有量は、一般に、約20%以下、約30%以下、約40%以下、約50%以下、約60%以下、約70%以下であるように選択される。

【0042】

リガーゼ。「リガーゼ」という用語は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドを結合させて1つにするため、または単一ポリヌクレオチドの末端どうしを結合させるために一般的に使用される酵素を示す。リガーゼとして、ATP依存性二本鎖ポリヌクレオチドリガーゼ、NAD⁺依存性二本鎖DNAまたはRNAリガーゼ、及び一本鎖ポリヌクレオチドリガーゼ、例えば、EC6.5.1.1(ATP依存性リガーゼ)、EC6.5.1.2(NAD⁺依存性リガーゼ)、EC6.5.1.3(RNAリガーゼ)に記載される任意のリガーゼが挙げられる。リガーゼの具体例として、E. coli DNAリガーゼ及びTaq DNAリガーゼなどの細菌リガーゼ、熱安定DNAリガーゼであるAmpligase(登録商標)(Epicentre(登録商標)Technologies Corp.、Illumina(登録商標)の一部、Madison, Wis.)、ならびにT3 DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼ、及びT7 DNAリガーゼなどのファージリガーゼ、ならびにそれらの変異体が挙げられる。

【0043】

ローリングサークル増幅。一本鎖環状ポリヌクレオチドテンプレートは、POのライゲーションにより形成され、この環状ポリヌクレオチドは、SPOプローブと相補的な領域を含む。適切なdNTP前駆体及び他の補因子の存在下でDNAポリメラーゼを加えると、テンプレートから複数のコピーが複製されることにより、SPOプローブが伸長される。この増幅産物は、検出プローブと結合させることにより容易に検出可能である。

【0044】

ローリングサークル増幅に関する技法は、当該分野で既知である(例えば、Baner et al, Nucleic Acids Research, 26:5073-5078, 1998; Lizardi et al, Nature Genetics 19:226, 1998; Schweitzer et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97:10113-119, 2000; Faruqi et al, BMC Genomics 2:4, 2000; Nallur et al, Nucl. Acids Res. 29:el 18, 2001; Dean et al. Genome Res. 11:1095-1099, 2001; Schweitzer et al, Nature Biotech. 20:359-365, 2002; 米国特許第6,054,274号、同第6,291,187号、同第6,323,009号、同第6,344,329号、及び同第6,368,801号を参照)。実

10

20

30

40

50

実施形態によっては、ポリメラーゼは、phi29 DNAポリメラーゼである。

【0045】

検出プローブ(DO)。細胞中の増幅されたSNAILパドロック配列の存在及び定量は、オリゴヌクレオチドプローブが増幅産物と結合する条件下、細胞をオリゴヌクレオチドプローブと接触させることにより求めることができる。プローブは、測定及び定量が可能な検出可能標識を含む。代替手段として、WO2015/200139に記載の方法を使用することができ、WO2015/200139は本明細書中に参照として特に援用される。

【0046】

標識化核酸プローブとは、任意の標識部分で標識化された核酸である。実施形態によっては、核酸検出剤は、増幅産物と特異的に結合する単一標識化分子(すなわち、標識化核酸プローブ)である。実施形態によっては、核酸検出剤は、複数の分子を含み、それらのうちの1種が、増幅産物と特異的に結合する。そのような実施形態では、標識化核酸プローブが存在する場合、標識化核酸プローブは、標的核酸とは特異的に結合せず、その代わりに核酸検出剤のその他の分子の1種と特異的に結合する。ハイブリダイゼーションプローブは、特異的結合をもたらすために都合がよい任意の長さが可能であり、例えば、プローブは、長さが約16~約50ntであることが可能であり、より一般的には、長さが約18nt~約30ntである。

【0047】

核酸プローブ用の「標識」または「標識部分」とは、シグナル検出を提供する任意の部分であり、これは、アッセイの特定の性質に応じて広く様々に変わる可能性がある。関心対象の標識部分として、直接及び間接的に検出可能な標識の両方が挙げられる。本明細書中で記載される方法での使用に適した標識として、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的、または他の手段により間接的または直接に検出可能である任意の部分が挙げられる。例えば、適切な標識として、抗原標識(例えば、ジゴキシゲニン(DIG)、フルオレセイン、ジニトロフェノール(DNP)など)、標識化ストレプトアビジン複合体で染色するためのビオチン、蛍光色素(例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、ALEXA FLUOR(登録商標)標識などのフルオロフォア標識など)、放射標識(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P)、酵素(例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、その他ELISAで一般的に使用されるもの)、蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質など)、金属をキレート化する合成重合体、比色分析標識などが挙げられる。抗原標識は、任意のヌクレオチドの核酸(例えば、A、U、G、C)に組み込むことができる。

【0048】

蛍光標識は、光検出器(例えば、フローサイトメーターに含まれているもの)を用いて発光を検出することにより検出することができる。酵素標識は、典型的には、酵素に基質を提供し、基質での酵素作用により生成した反応産物を検出することにより検出され、比色分析標識は、着色標識を可視化するだけで検出することが可能であり、抗原標識は、抗原標識と特異的に結合する抗体(またはその結合断片)を提供することにより検出することができる。抗原標識と特異的に結合する抗体は、直接に検出可能でも間接的に検出可能でもよい。例えば、抗体は、シグナル(例えば、蛍光)を提供する標識部分(例えば、フルオロフォア)と結合させることが可能であり、抗体は、適切な基質(例えば、蛍光チラミド、FastRedなど)が提供された場合に検出可能な産物(例えば、蛍光産物)を生成する酵素(例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)と結合させることが可能である、などである。

【0049】

金属標識(例えば、Sm¹⁵²、Tb¹⁵⁹、Er¹⁷⁰、Nd¹⁴⁶、Nd¹⁴²など)は、任意の従来方法を用いて検出することができ(例えば、標識の量が測定可能であり)、そのような方法として、例えば、マスサイトメトリーによるnano-SIMSが挙げられ

10

20

30

40

50

る(例えば、米国特許第7,479,630号;Wang et al. (2012) Cytometry A. 2012 Jul;81(7):567-75; Bandura et al., Anal Chem. 2009 Aug 15;81(16):6813-22;及びOrnatsky et al., J Immunol Methods. 2010 Sep 30;361(1-2):1-20を参照)。上記のとおり、マスサイトメトリーは、リアルタイム定量分析技法であり、この方法によれば、細胞または粒子は、個別に質量分析器(例えば、誘導結合プラズマ質量分析器(ICP-MS))に導入され、単一細胞により生成したイオン雲(または複数のイオン雲)が、質量分析(例えば、飛行時間型質量分析)により分析される(例えば、複数回)。マスサイトメトリーは、検出試薬(例えば、抗体及び/または核酸検出剤)に標識部分として付加された元素(例えば、金属)または安定同位体を利用することができる。

10

【0050】

他の実施形態において、検出は、配列読み取り、プローブ結合及び電気化学的検出、pH変化、DNAタグと結合した酵素により誘導された触媒作用の検出、量子もつれによる検出、ラマン分光法による検出、テラヘルツ波技術による検出、SEM(走査型電子顕微鏡)による検出を含む場合がある。

【0051】

核酸、類似体、及び模倣物。本発明の方法で使用される要素であるオリゴヌクレオチドプライマー、プローブなどの定義において、当然ながら、そのようなプローブ、プライマーなどは、天然及び合成または修飾ポリヌクレオチドを包含し、特にプローブ、プライマーなどが、それ自身は本方法の実行中の酵素修飾の基質ではない場合、例えば標的特異的オリゴヌクレオチドプライマー、及び検出プローブの場合に、そうである。

20

【0052】

修飾核酸は、核酸に、新たな特長または特長の向上(例えば、安定性の改善)をもたらすために、1つまたは複数の修飾、例えば、塩基修飾、骨格修飾などを有する。ヌクレオシドは、塩基部分が複素環塩基である塩基糖化合物が可能である。複素環塩基として、プリン及びピリミジンが挙げられる。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共役結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシル部分と結合することができる。オリゴヌクレオチド形成の際、リン酸基は、隣接ヌクレオシドと互いに共役結合して、直鎖重合化合物を形成する。場合によっては、この直鎖重合化合物のそれぞれの末端が、さらに結合して、環状化合物を形成する可能性がある。また、直鎖化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有する場合があります。したがって完全または部分的二本鎖化合物を生成するような様式で折りたたまれる場合がある。オリゴヌクレオチド内では、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成すると示すことができる。RNA及びDNAの結合または骨格は、3' 5'ホスホジエステル結合が可能である。

30

【0053】

修飾を有する適切な核酸の例として、骨格が修飾された、または非天然ヌクレオシド内結合を持つ核酸が挙げられる。骨格が修飾された核酸として、骨格にリン原子を保持するもの及び骨格にリン原子を保持しないものが挙げられる。骨格中にリン原子を含有する適切な修飾オリゴヌクレオチド骨格として、例えば、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキル=ホスホナート(3'-アルキレン=ホスホナート、5'-アルキレン=ホスホナート、及びキラルホスホナートなど)、ホスフィナート、ホスホロアミダート(3'-アミノホスホロアミダート及びアミノアルキルホスホロアミダートなど)、ホスホロジアミダート、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスファート及びボラノホスファートで、通常の3'-5'結合を有するもの、それらの2'-5'結合類似体、ならびに逆極性を有し、1つまたは複数のヌクレオチド内結合が3' 3'、5' 5'、または2' 2'結合であるものが挙げられる。逆極性を有する適切なオリゴヌクレオチドとして、最も3'側にあるヌクレ

40

50

オチド内結合での単独の 3' - 3' 結合、すなわち単独の逆位ヌクレオシド残基が挙げられ、これは塩基性の場合がある（核酸塩基が失われている、またはその代わりにヒドロキシル基を有する）。様々な塩（例えば、カリウムまたはナトリウムなど）、混合塩、及び遊離酸形も、含まれる。

【0054】

実施形態によっては、対象核酸は、1つまたは複数のホスホロチオアート及び/またはヘテロ原子ヌクレオシド内結合を有し、特に、 $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ （メチレン（メチルイミノ）またはMMI骨格として知られる）、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、及び $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ （この場合、天然ホスホジエステルヌクレオチド内結合は、 $-O-P(=O)(OH)-O-CH_2-$ として表される）を有する。MMI型ヌクレオシド内結合は、上記で参照した米国特許第5,489,677号に開示されている。適切なアミドヌクレオシド内結合は、米国特許第5,602,240号に開示されている。

10

【0055】

同じく適切であるのは、例えば、米国特許第5,034,506号に記載されているとおりのモルホリノ骨格構造を有する核酸である。例えば、実施形態によっては、対象核酸は、リボース環の代わりに六員のモルホリノ環を含む。こうした実施形態のあるものは、ホスホロジアミダートまたは他の非ホスホジエステルヌクレオシド内結合が、ホスホジエステル結合と置き換わっている。

20

【0056】

骨格中にリン原子を含まない適切な修飾ポリヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド内結合、混合ヘテロ原子及びアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド内結合、あるいは1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド内結合により形成される骨格を有する。そうしたものとして、モルホリノ結合（部分的に、ヌクレオシドの糖部分から形成される）、シロキサノ骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、リボアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファマート骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホナート及びスルホンアミド骨格、アミド骨格を有するもの、ならびにN、O、S、及び CH_2 要素部分を混合して有する他のものが挙げられる。

30

【0057】

同じく含まれるのは、核酸模倣物である。「模倣物」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、フラノース環のみ、またはフラノース環及びヌクレオチド内結合の両方が、非フラノース基で置き換えられているポリヌクレオチドを包含し、フラノース環のみの置換は、糖代替物であるとも称する。複素環塩基部分または修飾複素環塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーション用に維持される。そのような核酸の1種で、優れたハイブリダイゼーション性質を有することが示されているポリヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNAでは、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置き換えられている。ヌクレオチドは、保持されており、骨格のアミド部分のアザ窒素原子と直接または間接的に結合している。

40

【0058】

優れたハイブリダイゼーション性質を有するポリヌクレオチド模倣物の1種は、ペプチド核酸（PNA）である。PNA化合物の骨格は、2つ以上のアミノエチルグリシン単位が連結したものであり、これがPNAにアミド含有骨格を与える。複素環塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子と直接または間接的に結合している。PNA化合物の調製を記載する代表的な米国特許として、米国特許第5,539,082号；同第5,714,331号；及び同第5,719,262号が挙げられるが、これらに限定されない。

【0059】

適切なポリヌクレオチド模倣物の別のクラスは、モルホリノ環に結合した複素環塩基を有

50

するモルホリノ単位が連結したもの（モルホリノ核酸）に基づく。モルホリノ核酸においてモルホリノ単量体を連結することができる結合基は、多数報告されている。連結基の1つのクラスは、非イオン性オリゴマー化合物を与えるように選択されてきている。非イオン性モルホリノ系オリゴマー化合物は、細胞タンパク質との望ましくない相互作用を起こしにくいようである。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、細胞タンパク質との望ましくない相互作用物を形成しにくい、オリゴヌクレオチドの非イオン性模倣物である（Dwa ine A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510）。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、米国特許第5,034,506号に開示されている。モルホリノクラスのポリヌクレオチドに含まれる様々な化合物が、調製されてきており、それらは、単量体サブ

10

【0060】

ポリヌクレオチド模倣物の別の適切なクラスは、シクロヘキセニル核酸（CeNA）と称される。DNA/RNA分子に通常存在するフラノース環が、シクロヘキセニル環に置き換えられている。古典的なホスホルアミダイト化学反応に従って、CeNA DMT保護されたホスホルアミダイト単量体が調製されてきており、オリゴマー化合物の合成に使用されてきている。完全修飾されたCeNAオリゴマー化合物及び特定位置にCeNA修飾を有するオリゴヌクレオチドが、調製及び研究されてきている（Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 8595-8602を参照）。CeNA単量体をDNA鎖に組み込むことで、DNA/RNAハイブリッドの安定性が向上する。CeNAオリゴアデニラートは、天然の複合体と同様な安定性を持つ、RNA及びDNA補体との複合体を形成した。CeNA構造の天然核酸構造への組み込みは、構造順応を進めることがNMR及び円二色性により示された。

20

【0061】

修飾核酸として同じく適切であるのは、ロック型核酸（LNA）及び/またはLNA類似体である。LNAでは、2'-ヒドロキシル基は、糖環の4'炭素原子に結合され、それにより2'-C, 4'-C-オキシメチレン結合を形成し、それにより、二環式糖部分を形成する。結合は、2'酸素原子と4'炭素原子を架橋するメチレン（-C₂H-）、基が可能であり、式中、nは、1または2である（Singh et al., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456）。LNA及びLNA類似体は、相補的DNA及びRNAとの非常に高い二重らせん熱安定性（T_m=+3~+10）、3'-エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、及び良好な溶解性を示す。LNAを含有する強力な及び無毒のオリゴヌクレオチドが、記載されている（Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 5633-5638）。

30

【0062】

LNA単量体アデニン、シトシン、グアニン、5-メチル-シトシン、チミン、及びウラシルの合成及び調製は、それらのオリゴマー化、ならびに核酸認識性質と合わせて、記載されている（Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630）。LNA及びそれらの調製は、WO98/39352及びWO99/14226にも記載されており、WO98/39352及びWO99/14226は両方とも、その全体が参照として本明細書により援用される。LNA類似体の例は、米国特許第7,399,845号及び同第7,569,686号に記載されており、米国特許第7,399,845号及び同第7,569,686号は両方とも、その全体が参照として本明細書により援用される。

40

【0063】

核酸は、1つまたは複数の置換糖部分も含むことができる。適切なポリヌクレオチドは、OH、F、O-、S-またはN-アルキル、O-、S-またはN-アルケニル、O-、S-またはN-アルキニル、もしくはO-アルキル-O-アルキルから選択される糖置換基を含む。これらの置換基中、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換または無置

50

換の $C_1 - C_{10}$ アルキルまたは $C_2 - C_{10}$ アルケニル及びアルキニルが可能である。同じく適切であるのは、 $O((CH_2)_nO)_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、及び $O(CH_2)_nON((CH_2)_nCH_3)_2$ であり、式中、 n 及び m は、1 ~ 約 10 である。他の適切なポリヌクレオチドは、 $C_1 - C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、 O -アルカリールまたは O -アラルキル、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 $SOCH_3$ 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、及び同様な性質を持つ他の置換基から選択される糖置換基を含む。適切な修飾として、2'-メトキシエトキシ(2'- O - $C_2H_5OCH_3$ 、これは2'- O -(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られる)(Martinet al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)すなわち、アルコキシアルコキシ基を挙げることができる。適切な修飾として、本明細書中に以下の実施例で記載されるとおり、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基(2'-DMAOEとしても知られる)、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'- O -ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとも称する)、すなわち、2'- O - $C_2H_5OCH_2-N(CH_3)_2$ を挙げることができる。

10

【0064】

20

他の適切な糖置換基として、メトキシ(- OCH_3)、アミノプロポキシ(- $OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、アリル(- $CH_2-CH=CH_2$)、 O -アリル(- $OCH_2-CH=CH_2$)、及びフルオロ(F)が挙げられる。2'-糖置換基は、アラビノ(上側)位置にあることも、リボ(下側)位置にあることも可能である。適切な2'-アラビノ修飾は、2'- F である。同様な修飾は、オリゴマー化合物の他の位置、特に3'末端ヌクレオチドまたは2'-5'結合オリゴヌクレオチドの糖の3'位、及び5'末端ヌクレオチドの5'位で行うことも可能である。オリゴマー化合物は、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣物を有することも可能である。

【0065】

核酸は、核酸塩基(「塩基」とも称する)修飾または置換も含むことができる。本明細書中で使用される場合、「未修飾」または「天然」核酸塩基には、プリン塩基であるアデニン(A)及びグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)、及びウラシル(U)が含まれる。修飾核酸塩基には、他の合成及び天然の核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル(- $C=C-CH_3$)ウラシル及びシトシンならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン、及びチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル、及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンなどが含まれる。修飾核酸塩基には、三環式ピリミジン、例えば、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾオキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、置換フェノキサジンシチジン(例えば9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド(5,4-(b)(1,4)ベンゾオキサジン-2(3H)-オン)などのG-クランプ、カルバゾールシチジン(

30

40

50

2H - ピリミド (4 , 5 - b) インドール - 2 - オン)、ならびにピリドインドールシチジン (H - ピリド (3 ' , 2 ' : 4 , 5) ピロロ (2 , 3 - d) ピリミジン - 2 - オン) も含まれる。

【 0 0 6 6 】

複素環塩基部分として、プリンまたはピリミジン塩基が、他の複素環、例えば、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン、及び2 - ピリドンに置き換えられたものも挙げることができる。さらなる核酸塩基として、米国特許第 3 , 6 8 7 , 8 0 8 号に開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 8 5 8 - 8 5 9 , Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されるもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されるもの、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289 - 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993に開示されるものが含まれる。これらの核酸塩基があるものは、オリゴマー化合物の結合親和性を高めるために有用である。そのようなものとして、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびに2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル、及び5 - プロピニルシトシンをはじめとするN - 2、N - 6、及びO - 6置換プリンが挙げられる。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重らせん安定性を0.6 ~ 1.2 上昇させることが示されており (Sanghvi et al., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276 - 278)、これらは、例えば、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせる場合に、適切な塩基置換である。

【 0 0 6 7 】

定量及び検出可能な標識。検出プローブ上に存在する、または分析される細胞を規定するために使用される細胞マーカーの分析と組み合わせた方法において存在する、のいずれにしる、検出可能な標識の存在を定量するために様々な方法を利用することができる。検出プローブ、または存在する他の特異的結合パートナーの量を測定する場合、好都合な方法は、検出可能な部分で標識することであり、そのような部分は、金属、蛍光性、発光性、放射性、酵素的活性などであるものが可能である。

【 0 0 6 8 】

蛍光部分は、事実上どのような生体分子、構造、または細胞型でも標識するために容易に入手可能である。免疫蛍光部分は、特定タンパク質だけでなく、特定構造、切断産物、またはリン酸化などの部位修飾との結合向けであることが可能である。個々のペプチド及びタンパク質は、例えばそれらを細胞内で緑色蛍光タンパク質キメラとして発現させることにより、自己蛍光であるように操作することが可能である (総説については、Jones et al. (1999) Trends Biotechnol. 17 (12) : 477 - 81 を参照) 。

【 0 0 6 9 】

マスサイトメトリーは、フローサイトメトリーの変法の1つであり、この方法では、プローブを、蛍光色素ではなく重金属イオンタグで標識する。読み取りは、飛行時間型質量分析による。この方法は、チャンネル間に明らかなスピルオーバーを起こすことなく、単一試料中に、より多くの特異性を組み合わせることを可能にする。例えば、Bendall et al. (2011) Science 332 (6030) : 687 - 696 を参照、これは本明細書中に特に参照として援用される。走査型質量分析 (nano - SIMS を含むが、これに限定されない) は、金属標識を検出する代替方法である。

【 0 0 7 0 】

複数の蛍光または金属標識を同一試料上で使用することができ、それらは、個別に定量検

10

20

30

40

50

出すことができ、同時多重分析を可能にする。蛍光の独特な性質を利用する定量技法が多数開発されてきており、そのような方法として、直接蛍光測定、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)、蛍光偏光または異方性 (FP)、時間分解型蛍光 (TRF)、蛍光寿命測定 (FLM)、蛍光相関分光法 (FCS)、及び蛍光退色回復 (FPR) が挙げられる (Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Seventh Edition, Molecular Probes, Eugene Oreg.)。

【0071】

フローサイトメトリーまたはマスサイトメトリーは、細胞表面タンパク質の存在またはそれらの構造修飾もしくは翻訳後修飾など、透過処理が抗体 (またはプローブ) の接触を可能にする場合の細胞内または分泌されたタンパク質などのパラメーターを定量するために使用することができる。インプット細胞の型が同定されておりパラメーターが定量的撮像ならびに蛍光及び共焦点顕微鏡観察により読み取られる場合、単一細胞複数パラメーター及び複数細胞複数パラメーター多重アッセイの両方が、当該分野で使用される。Confocal Microscopy Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology Vol. 122.) Paddock, Ed., Humana Press, 1998を参照。

10

【0072】

細胞。本発明のアッセイで使用する細胞は、生体でも、生体由来の単一細胞型でも可能であり、複数の細胞型の混合物でも可能である。含まれるのは、天然起源の細胞及び細胞集団、遺伝子操作された細胞株、遺伝子組換え動物由来の細胞などである。事実上あらゆる細胞型及び大きさを受け入れることができる。適切な細胞として、細菌細胞、真菌細胞、植物細胞、及び動物細胞が挙げられる。本発明の1つの実施形態において、細胞は、哺乳類細胞、例えば天然起源の組織、例えば、血液、肝臓、膵臓、神経組織、骨髄、皮膚などの複雑な細胞集団である。組織によっては、破壊して単分散懸濁液にする場合がある。あるいは、細胞は、培養集団、例えば複雑集団由来の培養物、単一細胞型由来の培養物で細胞が複数の系統に分化したもの、またはそのような培養物で細胞が刺激に対して差示的に反応するものなどが可能である。

20

【0073】

本発明で使用を見出す細胞型として、幹細胞及び前駆細胞、例えば胚幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経堤細胞など、内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、平滑筋及び骨格筋細胞、間葉系細胞、上皮細胞、造血細胞、例えば、Th1T細胞、Th2T細胞、Th0T細胞、細胞障害性T細胞などのT細胞を含むリンパ球など、B細胞、プレB細胞など、単球、樹状細胞、好中球、ならびにマクロファージ、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞など、脂肪細胞、特定臓器、例えば、胸腺、内分泌腺、膵臓、脳などに関与する細胞、例えばニューロン、グリア、星状細胞、樹状細胞など、ならびにそれらを遺伝子修飾した細胞が挙げられる。造血細胞は、炎症プロセス、自己免疫疾患などに関連する可能性があり、内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞などは、循環器疾患に関連する可能性があり、ほぼすべての型の細胞は、腫瘍、例えば肉腫、細胞腫、及びリンパ腫など、肝細胞による肝疾患、腎臓細胞による腎臓疾患などに関連する可能性がある。

30

40

【0074】

細胞は、様々な型の癌化または腫瘍性細胞、例えば異なる細胞起源の細胞種、異なる細胞型のリンパ腫などである場合もある。アメリカ培養細胞系統保存機関 (Manassas, VA) は、150を超える異なる種由来の4,000を超える細胞株、700のヒト癌細胞株を含む950超の癌細胞株を収集しており、利用可能にしている。国立癌研究所は、ヒト腫瘍細胞株の巨大パネルから、臨床的、生化学的、及び分子的データを蓄積しており、それらは、ATCCまたはNCIから利用可能である (Phelps et al. (1996) Journal of Cellular Biochemistry Supplement 24:32-91)。含まれるのは、個々の細胞株から自発的に派生した、または所望の成長もしくは反応特性に関して選択された異なる細胞株であり、ま

50

た、同様な腫瘍型であるが異なる患者または部位に由来する複数の細胞株を含む場合がある。

【0075】

細胞は、非付着細胞、例えば、単球、T細胞、B細胞を含む血液細胞、腫瘍細胞などの場合も、付着細胞、例えば上皮細胞、内皮細胞、神経細胞などの場合もある。付着細胞をプロファイリングする目的で、それらが持つプローブ分子を認識しプローブ分子と結合する能力を維持する様式で、それらが付着している基質及び他の細胞から解離させる場合がある。

【0076】

そのような細胞は、個体から、例えば、吸引、灌流、洗浄、外科切除などを用いて、様々な組織、例えば、血液、骨髄、固形組織（例えば、固形腫瘍）、腹水などから、当該分野で既知の様々な技法により、得ることができる。細胞は、固定されたまたは固定されていない、新鮮なまたは凍結された、全試料または脱凝集試料から得ることができる。組織の脱凝集は、既知の技法を用いて機械的または酵素的いずれかにより起こすことができる。

10

【0077】

試料の成分を予め分離するための様々な方法及び装置が存在する。そうした方法として、フィルター、遠心、クロマトグラフ、及び他の周知の流体分離法、カラム、遠心、フィルター、望ましくない細胞の死滅による分離、蛍光標示式細胞分取器を用いた分離、細胞を物理的支持体に固定されたリガンドと直接または間接的に結合させることによる分離（パニング技法など）、カラム免疫吸着による分離、及び、磁気免疫ビーズを用いた分離を用いた大規模分離が挙げられる。

20

【0078】

固定化及び透過処理。本発明の態様は、細胞試料を「固定する」ことを含む。「固定する」または「固定化」という用語は、本明細書中で使用される場合、生物学的材料（例えば、組織、細胞、器官、分子など）を減衰及び/または分解しないように保存するプロセスである。固定化は、任意の好都合なプロトコルを用いて達成することができる。固定化は、細胞試料を、固定試薬（すなわち、少なくとも1種の固定液を含有する試薬）と接触させることを含むことができる。細胞試料は、広範囲の長さの時間で固定試薬と接触させることができ、その時間は、温度、試料の性質、及び固定液（複数可）に依存する可能性がある。例えば、細胞試料は、固定試薬と、24時間以下、18時間以下、12時間以下、8時間以下、6時間以下、4時間以下、2時間以下、60分以下、45分以下、30分以下、25分以下、20分以下、15分以下、10分以下、5分以下、または2分以下で接触させることが可能である。

30

【0079】

細胞試料は、5分～24時間（例えば、10分～20時間、10分～18時間、10分～12時間、10分～8時間、10分～6時間、10分～4時間、10分～2時間、15分～20時間、15分～18時間、15分～12時間、15分～8時間、15分～6時間、15分～4時間、15分～2時間、15分～1.5時間、15分～1時間、10分～30分、15分～30分、30分～2時間、45分～1.5時間、または55分～70分）の範囲の時間の長さで、固定試薬と接触させることができる。

40

【0080】

細胞試料は、プロトコル及び使用する試薬に応じて、様々な温度で固定試薬と接触させることができる。例えば、場合によっては、細胞試料は、-22～55の範囲の温度で固定試薬と接触させることができ、関心対象の具体的な範囲として、50～54、40～44、35～39、28～32、20～26、0～6、及び-18～-22が挙げられるが、それらに限定されない。場合によっては、細胞試料は、-20、4、室温（22～25）、30、37、42、または52の温度で固定試薬と接触させることができる。

【0081】

任意の好都合な固定試薬を使用することができる。一般的な固定試薬として、架橋固定液

50

、沈殿固定液、酸化固定液、水銀剤などが挙げられる。架橋固定液は、2つ以上の分子を共役結合により化学的に連結するものであり、広範囲の架橋試薬を使用することができる。適切な架橋固定液の例として、アルデヒド（例えば、ホルムアルデヒド、「パラホルムアルデヒド」及び「ホルマリン」とも一般的に称されるグルタルアルデヒドなど）、イミドエステル、NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）エステルなどが挙げられるが、これらに限定されない。適切な沈殿固定液の例として、アルコール（例えば、メタノール、エタノールなど）、アセトン、酢酸などが挙げられるが、これらに限定されない。実施形態によっては、固定液は、ホルムアルデヒド（すなわち、パラホルムアルデヒドまたはホルマリン）である。固定試薬中のホルムアルデヒドの適切な最終濃度は、10分間で約1.6%をはじめとして0.1~10%、1~8%、1~4%、1~2%、3~5%、または3.5~4.5%である。実施形態によっては、細胞試料は、最終濃度4%のホルムアルデヒド中（より濃い原液、例えば、38%、37%、36%、20%、18%、16%、14%、10%、8%、6%などから希釈して）で固定される。実施形態によっては、細胞試料は、最終濃度10%のホルムアルデヒド中で固定される。実施形態によっては、細胞試料は、最終濃度1%のホルムアルデヒド中で固定される。実施形態によっては、固定液は、グルタルアルデヒドである。固定試薬中のグルタルアルデヒドの適切な濃度は、0.1~1%である。

10

【0082】

固定試薬は、1種より多い固定液を任意の組み合わせで含有することができる。例えば、実施形態によっては、細胞試料は、ホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドの両方を含有する固定試薬と接触させられる。

20

【0083】

透過処理。本発明の態様は、細胞試料を「透過処理する」ことを含む。「透過処理」または「透過処理する」という用語は、本明細書中で使用される場合、細胞試料の細胞（細胞膜など）に、核酸プローブ、抗体、化学物質などの実験試薬が浸透できるようにするプロセスを示す。透過処理のための任意の好都合な方法及び/または試薬を使用することができる。適切な透過処理試薬として、界面活性剤（例えば、サポニン、Triton X-100、Tween-20など）、有機固定液（例えば、アセトン、メタノール、エタノールなど）、酵素などが挙げられる。界面活性剤は、ある範囲の濃度で使用することができる。例えば、0.001%~1%界面活性剤、0.05%~0.5%界面活性剤、または0.1%~0.3%界面活性剤が、透過処理のために使用可能である（例えば、0.1%サポニン、0.2% tween-20、0.1~0.3% triton X-100など）。実施形態によっては、氷上で少なくとも10分間のメタノール処理を用いて透過処理する。

30

【0084】

実施形態によっては、同一溶液を、固定試薬及び透過処理試薬として使用することができる。例えば、実施形態によっては、固定試薬は、0.1%~10%ホルムアルデヒド及び0.001%~1%サポニンを含有する。実施形態によっては、固定試薬は、1%ホルムアルデヒド及び0.3%サポニンを含有する。

【0085】

細胞試料は、広範囲にわたる長さの時間で透過処理試薬と接触させることができ、その長さは、温度、試料の性質、及び透過処理試薬（複数可）に依存する可能性がある。例えば、細胞試料は、24時間以上（以下に記載される貯蔵を参照）、24時間以下、18時間以下、12時間以下、8時間以下、6時間以下、4時間以下、2時間以下、60分以下、45分以下、30分以下、25分以下、20分以下、15分以下、10分以下、5分以下、または2分以下で、透過処理試薬と接触させることができる。細胞試料は、使用するプロトコル及び試薬に依存して、様々な温度で透過処理試薬と接触させることができる。例えば、場合によっては、細胞試料は、-82~55の範囲の温度で透過処理試薬と接触させることができ、関心対象の具体的な範囲として、50~54、40~44、35~39、28~32、20~26、0~6、-18~-22、及び-78~

40

50

- 8 2 が挙げられるが、それらに限定されない。場合によっては、細胞試料は、- 8 0、- 2 0、4、室温(22~25)、30、37、42、または52の温度で透過処理試薬と接触させることができる。

【0086】

実施形態によっては、細胞試料は、酵素透過処理試薬と接触させる。酵素透過処理試薬は、アッセイ試薬が細胞試料に浸透することを阻害する細胞外基質または表面タンパク質を部分的に分解することにより、細胞試料を透過処理する。酵素透過処理試薬との接触は、固定後及び標的検出前の任意の時点で行うことができる。場合によっては、酵素透過処理試薬は、市販の酵素であるプロテイナーゼKである。そのような場合、細胞試料は、固定後試薬(以下に記載)と接触させる前に、プロテイナーゼKと接触させる。プロテイナーゼK処理(すなわち、プロテイナーゼKとの接触、一般に「プロテイナーゼK消化」とも称する)は、ある範囲の長さの時間、ある範囲の温度で、調査中の細胞型または組織型それぞれについて実験的に求められたある範囲の酵素濃度で行うことができる。例えば、細胞試料は、30分以下、25分以下、20分以下、15分以下、10分以下、5分以下、または2分以下で、プロテイナーゼKと接触させることができる。細胞試料は、1ug/ml以下、2ug/ml以下、4ug/ml以下、8ug/ml以下、10ug/ml以下、20ug/ml以下、30ug/ml以下、50ug/ml以下、または100ug/ml以下のプロテイナーゼKと接触させることができる。細胞試料は、2~55の範囲の温度でプロテイナーゼKと接触させることができ、関心対象の具体的な範囲として、50~54、40~44、35~39、28~32、20~26、及び0~6が挙げられるが、それらに限定されない。場合によっては、細胞試料は、4、室温(22~25)、30、37、42、または52の温度でプロテイナーゼKと接触させることができる。実施形態によっては、細胞試料は、酵素透過処理試薬と接触させない。実施形態によっては、細胞試料は、プロテイナーゼKと接触させない。

【0087】

細胞試料を少なくとも固定試薬及び透過処理試薬と接触させることにより、固定化/透過処理された細胞試料が生成する。

【0088】

ヌクレアーゼ阻害。本発明の態様は、ハイブリダイゼーション工程中、特に標的特異的オリゴヌクレオチド対と細胞中に存在するRNA分子との結合中に、細胞試料をヌクレアーゼ阻害剤と接触させることを含む。本明細書中で使用される場合、「ヌクレアーゼ阻害剤」とは、細胞試料の細胞内の核酸の完全性が保存されるように、細胞試料内のヌクレアーゼ活性を阻害するために使用することができる任意の分子である。言い換えると、ヌクレアーゼ活性による細胞試料の細胞内の核酸の分解は、細胞試料をヌクレアーゼ阻害剤と接触させることにより阻害される。

【0089】

実施形態によっては、ヌクレアーゼ阻害剤は、RNAアーゼ阻害剤である(すなわち、阻害剤は、RNAアーゼ活性を阻害する)。適切な市販のヌクレアーゼ阻害剤の例として、タンパク質及び非タンパク質系阻害剤、例えばバナジリボヌクレオシド錯体、オリゴ(ピニルスルホン酸)(OVS)、2.5%、アウリントリカルボン酸(ATA)、ピロ炭酸ジエチル(DEPC)、Life Technologies製のRNAsecure(登録商標)試薬など)、ならびにタンパク質系阻害剤(例えば、EMD Millipore製リボヌクレアーゼ阻害剤、RNaseOUT(登録商標)組換えリボヌクレアーゼ阻害剤、SUPERaseIn(登録商標)、ANTI-RNase、及びLife Technologies製RNAアーゼ阻害剤、Roche製RNAアーゼ阻害剤及びProtector RNAアーゼ阻害剤、Promega製RNAsinなど)がある。ヌクレアーゼ阻害剤は、それぞれの販売元が推奨するとおりの濃度範囲で使用することができる。

【0090】

マーカー検出試薬。本発明の態様は、標的核酸だけでなくマーカーについても同時に細胞のプロファイリングを行う目的で、試料中の細胞を検出試薬と接触させることを含む場合

10

20

30

40

50

がある。そのような方法は、複雑な集団、例えば免疫細胞集団、神経細胞集団、複雑な生検細胞集団などの集団中の細胞の表現型を検出するために、特に有用である。「マーカー検出試薬」という用語は、本明細書中で使用される場合、標的マーカー（例えば、細胞試料の細胞の標的タンパク質）に特異的に結合し、標的タンパク質の定性的及び/または定量的検出を促進する任意の試薬を示す。「特異的結合」、「特異的に結合する」などという用語は、溶液または反応混合物中のある分子に対して他の分子または部分よりも優先的に結合することを示す。実施形態によっては、検出試薬とその標的タンパク質とが互いに特異的に結合する場合の検出試薬とそれが特異的に結合する標的タンパク質との間の親和性は、 10^{-6} M以下、例えば 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下を含み、例えば、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M以下、 10^{-11} M以下、 10^{-12} M以下、 10^{-13} M以下、 10^{-14} M以下、 10^{-15} M以下を含むという K_d （解離定数）を特徴とする。「親和性」は、結合の強さを示し、結合親和性が高くなることは、 K_d が低くなることと相関する。

10

【0091】

実施形態によっては、タンパク質検出試薬は、標識または標識化結合メンバーを含む。「標識」または「標識部分」は、シグナル検出を提供する任意の部分であり、これは、アッセイの特定性質に応じて幅広く変わる可能性があり、そのような標識として、上記のオリゴヌクレオチド検出プローブとともに使用するために適した標識の任意のものが挙げられる。

【0092】

場合によっては、タンパク質検出試薬は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体もしくはその結合断片（すなわち、関心対象の標的、例えば、タンパク質標的に結合するために十分な抗体断片）である。抗体断片（すなわち、結合断片）は、例えば、単量体Fab断片、単量体Fab'断片、または二量体F(ab)'₂断片が可能である。同じく「抗体またはその結合断片」という用語の範囲に含まれるのは、抗体操作により製造された分子、例えば一本鎖抗体分子(scFv)、あるいは重鎖及び軽鎖の定常領域を置換してキメラ抗体を製造する、または定常領域及び可変領域のフレームワーク部分両方を置換してヒト化抗体を製造することによりモノクローナル抗体から製造された、ヒト化もしくはキメラ抗体である。

20

【0093】

関心対象のマーカーとして、細胞質の、細胞表面の、または分泌された生体分子が挙げられ、これらは、生体高分子、例えばポリペプチド、多糖類、ポリヌクレオチド、脂質などであることが多い。マーカーがタンパク質である場合、検出は、当該分野で既知のとおり、リン酸化、グリコシル化などの状態を含む場合がある。

30

【0094】

使用方法

本明細書で実証されるとおりの多重化アッセイは、時間及び労力、ならびに貴重な臨床材料を節約し、単一細胞レベルでのコピー数の増幅、RNA発現などの遺伝事象の分析を可能にする。より重要なことは、同一細胞内での複数の同時発生する分子事象を同時に評価する能力が、細胞内の相互作用の複雑なネットワークを解明する全く新しい機会を提供する可能性があることである。多重化分析は、細胞機能の理解をより深めるための、遺伝子相互作用間の均衡を測定及び定量化するために使用することができる。

40

【0095】

本発明の態様は、標的核酸（例えば、デオキシリボ核酸、リボ核酸）の存在について単一細胞レベルで、通常は複数の標的核酸について単一細胞レベルで細胞試料をアッセイする方法を含む。本分析は、集団内の細胞を規定する追加マーカー、例えばタンパク質マーカーの分析と組み合わせることができる。

【0096】

そのため、本発明の方法は、細胞試料の細胞中の標的核酸の量（すなわち、レベル）を評価する方法である。実施形態によっては、本発明の方法は、標的核酸が試料中に存在するか否かを評価する方法であり、標的核酸の検出は定性的である。実施形態によっては、本

50

発明の方法は、標的核酸が試料中に存在するか否かを評価する方法であり、標的核酸の検出は定量的である。本方法は、細胞試料の細胞中の標的核酸の量の定量的尺度を決定することを含むことができる。実施形態によっては、標的核酸の発現レベルを定量することは、発現の相対レベルを求める目的で、1つの核酸の発現レベルを別の核酸の発現レベルと比較することを含む。実施形態によっては、本発明の方法は、標的核酸が、細胞試料の細胞中に、予め定めた閾値より多く存在するか少なく存在するかを判定することを含む。そのため、検出されたシグナルが特定閾値（「予め定めた閾値」とも称する）より強い場合、関心対象の標的核酸の量は、細胞試料の細胞中に、予め定めた閾値より多く存在する。検出されたシグナルが予め定めた閾値より弱い場合、関心対象の標的核酸の量は、細胞試料の細胞中に、予め定めた閾値より少なく存在する。

10

【0097】

「細胞試料」という用語は、本明細書中で使用される場合、1つまたは複数の個別細胞を懸濁液中に任意の濃度で含有する任意の試料を意味する。例えば、細胞試料は、1ミリリットルあたり、 10^{11} 以下、 10^{10} 以下、 10^9 以下、 10^8 以下、 10^7 以下、 10^6 以下、 10^5 以下、 10^4 以下、 10^3 以下、500以下、100以下、10以下、または1つの細胞を含有することが可能である。試料は、含有する細胞の数が既知であることも未知であることも可能である。適切な細胞として、真核生物細胞（例えば、哺乳類細胞）及び/または原核細胞（例えば、細菌細胞または古細菌細胞）が挙げられる。

【0098】

本発明の方法を実施する際、細胞試料は、*in vitro*試料源（例えば、培養で増殖させた実験細胞の細胞懸濁液）から、または*in vivo*試料源（例えば、哺乳類対象、ヒト対象など）から得ることができる。実施形態によっては、細胞試料は、*in vitro*試料源から得られる。*In vitro*試料源として、原核生物（例えば、細菌、古細菌）細胞培養物、原核生物及び/または真核生物（例えば、哺乳類、原生生物、真菌など）細胞を含有する環境試料、真核生物細胞培養物（例えば、確立された細胞株の培養物、既知または購入細胞株の培養物、不死化細胞株の培養物、初代細胞の培養物、実験酵母菌の培養物など）、組織培養物などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0099】

実施形態によっては、試料は、*in vivo*試料源から得られ、試料として、組織（例えば、生検の細胞懸濁液、組織試料の細胞懸濁液など）及び/または体液（例えば、全血、分画した血液、血漿、血清、唾液、リンパ液、間質液など）から得られた試料を挙げることができる。場合によっては、対象由来の細胞、体液、または組織を、培養、貯蔵、または操作してから評価する。*In vivo*試料源として、生きた多細胞生物が挙げられ、この試料源は、非診断用または診断用細胞試料をもたらしすることができる。

30

【0100】

細胞試料は、様々な異なる種類の対象から得ることができる。実施形態によっては、試料は、哺乳綱に含まれる対象からのものであり、そのような対象として、例えば、食肉目（例えば、イヌ及びネコ）、齧歯目（例えば、マウス、モルモット、及びラット）、ウサギ目（例えばウサギ）、及び霊長目（例えば、ヒト、チンパンジー、及びサル）などが挙げられる。ある特定の実施形態において、動物または宿主、すなわち、対象（本明細書中、患者とも称する）は、ヒトである。

40

【0101】

本発明の態様は、細胞試料を「刺激作用剤」（本明細書中「刺激剤」とも称する）と接触させることを含む場合がある。刺激作用剤は、少なくとも1種の細胞活性に影響を及ぼす、または細胞の定常状態を変化させる（すなわち、存在量または活性を上昇または低下させる）任意の化合物を意味する。細胞試料と刺激作用剤との接触を用いて、作用剤に対する細胞反応を確認することができる。「有効量」の刺激作用剤は、刺激作用剤が、細胞の定常状態を変化させる（すなわち、存在量または活性を上昇または低下させる）少なくとも1種の細胞活性に影響を及ぼす量で存在することを意味する。刺激作用剤は、粉末としてまたは液状で提供することができる。そのため、刺激作用剤は、様々な化合物及び配合

50

物、例えば、細胞内シグナル誘導剤及び免疫調節剤を含むことができる。例として、小分子薬、ならびにペプチド、タンパク質、脂質、糖質などが挙げられる。特に関心が持たれるのは、ペプチドホルモン、ケモカイン、サイトカイン、例えばI型インターフェロン（例えば、IFN- α 、IFN- β ）、インターロイキン（例えば、インターロイキン-2（IL-2）、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21）、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）、ガンマインターフェロン（IFN- γ ）、トランスフォーミング成長因子 などの化合物である。

【0102】

標的核酸検出

本発明の方法は、標的核酸の存在をアッセイする方法である。そのため、本発明の方法は、（標的核酸が細胞試料の細胞に存在する場合）、標的核酸を検出し、標的核酸検出に反応してシグナルを生成させ、そして生成シグナルを検出する方法である。検出された標的核酸により生成するシグナルは、任意の検出可能なシグナル（例えば、蛍光シグナル、増幅された蛍光シグナル、化学発光シグナルなど）が可能である

10

【0103】

本発明の態様は、標的核酸を検出する方法（すなわち、標的核酸検出）を含む。実施形態によっては、細胞試料を核酸検出剤と接触させる。本明細書中で使用される場合、「核酸検出剤」という用語は、標的核酸に特異的に結合することができる任意の作用剤を意味する。例えば、適切な核酸検出剤として、標的核酸と少なくとも部分的に相補的であり、標的核酸の配列とハイブリダイズする核酸（または修飾核酸）が可能である。実施形態によっては、核酸検出剤は、プローブまたは1セットのプローブ（すなわち、プローブセット）を含み、それらはそれぞれが標的核酸の配列（すなわち、標的配列）に特異的に結合する（すなわち、ハイブリダイズする）。

20

【0104】

実施形態によっては、単一細胞中の標的核酸の存在量を求める方法が提供され、本方法は、特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件下、固定化及び透過処理された細胞をオリゴヌクレオチドSNAI Lプライマー対と接触させること、細胞を洗って、未結合プライマーを洗い落とすこと、ライゲーション反応を行うこと、この反応で、SNAI Lオリゴヌクレオチドは結合されて環を形成する、結合した環をローリングサークル増幅により増幅させること、検出プライマーを増幅した環とハイブリダイズさせること、及び、結合した検出プライマーのレベルを定量して、標的核酸の存在量を求めることを含む。

30

【0105】

本発明の実施形態によっては、SNAI Lは、同時に測定される他の細胞パラメーターにより規定されるとおりに特定細胞集団のゲーティングを行うサイトメトリーと組み合わせ、例えば、関心対象のサブ集団を規定するために抗体染色及びマスサイトメトリーまたはFACSと組み合わせ使用される。そのような実施形態では、複雑な細胞集団、例えば、免疫細胞、前駆細胞もしくは幹細胞、癌細胞などを含む可能性がある生検または血液試料を、分析することができる。例えば、複雑な細胞集団内の規定された細胞型中の1つまたは複数の標的核酸の存在量を測定する方法が提供され、この場合、検出プローブの定量は、細胞マーカーの検出と組み合わせられ、そのような細胞マーカーとして、関心対象の細胞型を規定する役割を果たすタンパク質マーカーが挙げられるが、これに限定されない。

40

【0106】

他の実施形態において、本発明の方法は、単一細胞中のmRNA転写物の特定スプライスバリエーションの多重化検出及び定量のために使用される。

【0107】

さらに別の実施形態において、本発明の方法は、核酸分子及びタンパク質タンパク質相互作用の同時検出及び定量のために、近接ライゲーションアッセイ（PLA）と組み合わせられる。

【0108】

内在細胞DNAを先行して変性させる（熱、酵素利用、または任意の他の適切な手段によ

50

る)ことで、本技術を、特定DNA配列の検出(単一細胞の遺伝子型判定)用に修飾する。この応用では、本技術は、遺伝子コピー数の変動の定量、ならびにゲノム転位/融合事象の検出を可能にする。

【0109】

シグナル検出及び定量は、本発明の方法からの蛍光、発光、光散乱、または比色分析シグナル(複数可能)アウトプットを測定することができる任意の装置(例えば、液体アッセイ装置)を用いて行うことができる。実施形態によっては、標的核酸の検出から生じるシグナルは、フローサイトメーターにより検出される。実施形態によっては、標的核酸の存在について細胞試料を評価するための液体アッセイ装置は、フローサイトメーター、例えば、マスサイトメーター、FACS、MACSなどである。そのため、場合によっては、細胞試料の細胞中に標的核酸が存在するか否かの評価は、細胞試料をフローサイトメトリーにより分析することを含む。フローサイトメトリーでは、細胞試料の細胞を、流体の流れに懸濁させ、その流れを、一度に1つの細胞で、少なくとも1つの光ビーム(例えば、単波長のレーザー光)に通過させる。1つまたは複数の蛍光検出器を含む複数の検出器が、散乱光ならびに細胞試料から放出された光(例えば、蛍光)を検出する。このようにして、フローサイトメーターは、光ビーム(複数可)を通過した個別の細胞それぞれの物理的及び化学的構造について情報を導き出すために使用可能なデータを獲得する。標的核酸の検出に対して特異的なシグナルがフローサイトメトリーにより細胞で検出された場合、標的核酸は、その細胞中に存在する。実施形態によっては、検出されたシグナルは、フローサイトメーターを用いて定量される。

10

20

【0110】

読み出しは、測定値と関連した平均(mean)、平均(average)、中央値、または分散、もしくは他の統計または数学的派生値の場合がある。読み出し情報は、対応する参照または対照との直接比較により、例えば標準ポリヌクレオチド試料、ハウスキーピング遺伝子発現などを参照することにより、さらに精密にすることができる。同一条件下で得られた絶対値は、生きた生体系に固有の変動性を表出している場合がある。

【0111】

ある特定の実施形態において、得られたデータを、単一の参照/対照プロファイルと比較することにより、アッセイした細胞の表現型に関する情報を得る。さらに他の実施形態において、得られたデータを、2種以上の異なる参照/対照プロファイルと比較することにより、アッセイした細胞の表現型に関するより詳細な情報を得る。例えば、得られたデータを、陽性及び陰性対照と比較することで、細胞が関心対象の表現型を有するか否かに関して確定情報を得ることができる。

30

【0112】

実用性

本発明の方法、装置、組成物、及びキットは、多様な用途に利用を見出す。本発明の方法は、標的核酸の存在が不明である場合の細胞試料の細胞を評価する方法である。場合によっては、アッセイを行う前において、細胞試料の細胞が標的核酸を発現するか否かは不明である。他の場合では、アッセイを行う前において、細胞試料の細胞が、予め定めた閾値の量(または相対量)より多い(超える)量(または相対量、例えば、別の核酸と比較して、または正常細胞中の標的核酸の量と比較して)で標的核酸を発現するか否かは不明である。そのような場合、本方法は、関心対象の標的核酸が予め定めた閾値の量より多い(超える)または未満である量で存在するか否かが不明である細胞試料の細胞を評価する方法である。実施形態によっては、本発明の方法は、細胞試料の個別細胞(複数可)中の核酸の発現レベル(または相対発現レベル)を求めるために使用することができ、通常は、細胞中の複数核酸の多重分析である。任意選択で、タンパク質などの追加マーカーも分析される。

40

【0113】

本発明の方法は、試料中の特定細胞が異所性であるか非異所性であるかを同定するために使用することができる。例えば、いくつかのmRNAは、異所性細胞(例えば、癌性細胞

50

）中、特定レベルまたは相対レベルを超えて（すなわち、予め定められた閾値超で）発現することが知られている。すなわち、細胞試料の細胞の特定標的核酸（例えば、mRNA）に関してシグナルのレベル（または相対レベル）が（本発明方法を用いて検出した場合）、標的核酸のレベル（または相対レベル）を、異所性細胞に関連することが知られているレベル以上であると示す場合、細胞試料の細胞は、異所性であると判定される。反対に、いくつかのmRNA（及び/またはmiRNA）は、異所性細胞（例えば、癌性細胞）中、特定レベルまたは相対レベル未満で（すなわち、予め定められた閾値未満で）発現することが知られている。すなわち、細胞試料の細胞の特定標的核酸に関してシグナルのレベル（または相対レベル）が（本発明方法を用いて検出した場合）、標的核酸のレベル（または相対レベル）を、異所性細胞に関連することが知られているレベル以下であると示す場合、細胞試料の細胞は、異所性であると判定される。したがって、本発明の方法は、細胞試料中の異所性細胞の数及び/または頻度を検出及び計測するために使用することができる。同定された関心対象の細胞はどれでも、タンパク質または他のマーカーに関してさらなる情報をプロファイリングすることができる。

10

【0114】

場合によっては、特定標的核酸の発現が異所性細胞で変動するか否かは不明であり、本発明の方法は、標的核酸の発現が異所性細胞で変動するか否かを判定するために使用することができる。例えば、異所性細胞を含有しないことが既知の細胞試料を評価することができる、その結果を、異所性細胞を含有することが既知の（または疑われる）細胞試料の評価と比較することができる。

20

【0115】

場合によっては、異所性細胞は、異常状態（例えば、異常な代謝状態、刺激状態、シグナル伝達状態、疾患状態、例えば、細胞増殖性疾患、がんなど）にある細胞である。場合によっては、異所性細胞は、原核生物病原、真核生物病原、またはウイルス病原を含有する細胞である。場合によっては、異常病原含有細胞（すなわち、感染細胞）は、病原性mRNAまたは宿主細胞mRNAを、感染していない細胞より高いレベルで発現する。場合によっては、そのような細胞は、宿主細胞mRNAを、感染していない細胞より低いレベルで発現する。

【0116】

細胞試料をフローサイトメトリーで分析するためにフローサイトメーターを使用する実施形態において、細胞試料の細胞を標的核酸の存在について評価することは、迅速に達成することができ、細胞を選別することができ、多数の細胞を評価することができる。ゲーティングは、細胞試料の細胞の選択されたサブセット（例えば、特定範囲の形態に含まれる細胞、例えば、前方及び側方散乱特性、表面タンパク質を特定の組み合わせで発現する細胞、特定の表面タンパク質を特定レベルで発現する細胞など）を、標的核酸の発現の存在またはレベル（または相対レベル）に関して評価するために使用することができる。

30

【0117】

実施形態によっては、本方法は、異所性細胞が診断用細胞試料中に存在するか否かを判定する方法である。言い換えると、診断を下す（すなわち、疾患または健康状態を診断する）目的で、試料を、*in vivo* 試料源（すなわち、生きた多細胞生物、例えば、哺乳類）から得て、またはそれから派生させて、1つまたは複数の異所性細胞中の標的核酸の存在を判定する。したがって、本方法は、診断方法である。本方法が「診断方法」であるので、それらは、生きた生物、例えば哺乳類（例えば、ヒト）において、疾患（例えば、癌、循環腫瘍細胞（複数可）、微小残存病変（MRD）、細胞増殖性疾患状態、ウイルス感染、例えば、HIVなど）または健康状態（例えば、病原の存在）を診断する（すなわち、その有無を判定する）方法である。そのため、本開示のある特定の実施形態は、生きた対象が所定の疾患または健康状態（例えば、癌、循環腫瘍細胞（複数可）、微小残存病変（MRD）、細胞増殖性疾患状態、ウイルス感染、病原の存在など）を有するか否かを判定するために採用される方法である。「診断方法」は、少なくとも1つの標的核酸の発現のレベル（または相対レベル）に基づいて所定の疾患または健康状態の重篤度または状

40

50

態を判断する方法も含む。

【0118】

実施形態によっては、本方法は、異所性細胞が非診断用細胞試料中に存在するか否かを判定する方法である。非診断用細胞試料とは、生きた多細胞生物（例えば、哺乳類）をはじめとする任意の *in vitro* もしくは *in vivo* 試料源から得られたまたは派生した細胞試料であるが、診断を下すことを目的としないものである。言い換えると、試料は、標的核酸の存在を判定するために得られたものであるが、疾患または健康状態を診断することを目的としない。したがって、そのような方法は、非診断方法である。

【0119】

そのような分析の結果は、参照化合物、濃度曲線、対照などから得られた結果と比較することができる。結果の比較は、適切な演繹プロトコル、人為的証拠システム (*artificial evidence systems*)、統計比較などの使用により達成される。特定の実施形態において、上記の方法は、細胞の異種集団が複数の識別可能な標識化結合剤で標識されている多重アッセイに採用することができる。

10

【0120】

分析情報のデータベースを蓄積することができる。こうしたデータベースは、既知の細胞型からの結果、特定条件下で処理した細胞の分析による参照などを含むことができる。データ行列を作製することができ、データ行列の各点は、細胞からの読み出しに相当し、各細胞のデータは、複数標識からの読み出しを含むことができる。読み出しは、平均、中央値、または分散、もしくは測定に関連する他の統計的または数学的派生値の場合がある。出力された読み出し情報は、対応する参照読み出しと直接比較することにより、さらに精密にすることができる。同一条件下で各出力について得られた絶対値は、生きた生体系に固有の変動性を表出することになり、また、個々の細胞の変動性ならびに個体間に固有の変動性も反映している。

20

【0121】

キット

同じく本開示が提供するものは、上記のとおりの方法を実施するためのキットである。本発明のキットは、上記の方法を実施するための試薬を含有し、ある特定の実施形態においては、複数のプローブ及びプライマーを含有することができ、そのようなプローブ及びプライマーとして、例えば、少なくとも1対の標的特異的オリゴヌクレオチドプライマー、パドロックプローブ用の対応する挿入プライマー及び骨格プライマー、ならびに任意選択で検出可能な部分で標識された検出プローブが挙げられる。キットは、試験試料から得られた結果を比較することができる参照試料も含有することができる。

30

【0122】

上記の要素の他に、本発明のキットは、さらに、本明細書中で記載される方法を実施するためのキット構成要素の使い方説明書を含むことができる。本発明の方法を実施するための説明書は、一般に、適切な記録媒体に記録されている。例えば、説明書は、紙またはプラスチックなどの基材に印刷されている場合がある。そのため、説明書は、キットに、パッケージ挿入物として、キットまたはその構成要素の容器のラベルに（すなわち、包装または副次包装に付随して）存在する場合がある。他の実施形態において、説明書は、適切なコンピュータ読み取り可能記録媒体、例えばCD-ROM、ディスクなど存在する電子記録データファイルとして存在する。さらに他の実施形態において、実際の説明書は、キットに存在せず、リモートソースから、例えばインターネットを介して説明書を得るための手段が提供される。この実施形態の例は、説明書を閲覧することが可能な及び/またはそこから説明書をダウンロードすることが可能なウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様に、説明書を得るためのこの手段は、適切な基材に記録されている。上記の構成要素の他に、本発明のキットは、データ比較を実施するためのソフトウェアを含むことができる。

40

【0123】

当然のことながら、本発明は、特定の方法、プロトコル、細胞株、動物の種または属に限

50

定されず、そのため、記載された試薬は変化する場合がある。同じく当然のことながら、本明細書中で使用される用語は、特定の実施形態を記載することのみを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図しない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることになる。

【0124】

本明細書中で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈で明らかにそうではないと指示されないかぎり、複数についての言及も含む。本明細書中で使用される全ての技術用語及び科学用語は、そうではないと明白に示されないかぎり、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0125】

以下の実施例は、当業者に、本発明をいかにして実現及び使用するかの完全な開示及び説明を提供するために提示されるものであり、本発明としてみなされるものの範囲を限定することを意図しない。使用される数字（例えば、量、温度、濃度など）に関して正確を期するための努力がなされたものの、ある程度の実験誤差及び偏差が許容されるべきである。特に記載がないかぎり、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧は、大気圧であるか大気圧付近である。

【実施例】

【0126】

ここから、本発明をいくつかの実施例と関連してより詳細に記載するが、実施例は、本発明を限定するものとしてみなされることはない。

【0127】

実施例 1

単純化2プローブ近接ライゲーションシステムを用いた多重化単一分子RNA視覚化単一分子レベルで遺伝子転写活性を定量することは、細胞表現型多様性、分化過程、及び遺伝子調節ネットワークを研究する上で重要である。最新の単一細胞発現プロファイリング方法は、cDNA生成を必要とし、このため効率が制限されるとともに、配列バイアスが導入される。代替方法であるsmRNA-FISHは、長い転写物に限定される。本発明者らは、遺伝子の*in situ*増幅、検出、及び可視化を可能にする簡潔な2プローブ近接ライゲーションシステムを創出し、SNAIL-RCAと名付けた。RCA産物は、単一ヌクレオチド伸長物とカップリングした未標識検出プローブと、蛍光ヌクレオチド類似体とのハイブリダイゼーションを介して検出される。蛍光撮像及び自動画像分析は、発現レベルの正確な定量を可能にする。多重化は、リハイブリダイゼーションを通じて可能であり、リハイブリダイゼーションは、バーコード解析戦略(*parse barcoding strategy*)と組み合わせることで、数百または数千の遺伝子の同時検出を可能にする。本発明者らは、SNAILが、細胞培養物ならびに組織試料で単一細胞転写多様性を検出できること、発現が少ない転写物を検出するために十分な感度を持つことを示す。

【0128】

システム設計、HLADRNALM対ジャーカットでの高いシグナル特異性。本発明者らは、核酸、主にRNAの多重化検出のための単純化近接ライゲーション技法を設計した。この方法を、SNAIL-RCAと称するが、これは、スプリントヌクレオチド補助分子内ライゲーション及び続くローリングサークル増幅(*Splint Nucleotide Assisted Intramolecular Ligation followed by Rolling Circle Amplification*)の略称である。図1Aに示すとおり、RNAは、2つの合成オリゴヌクレオチドからなる複合体を組み立てるための足場として機能する。2つのオリゴヌクレオチドは、標的mRNA上の直接隣接する領域と相補的である一続きの部分を含む。上流の「スプリント」オリゴヌクレオチドは、下流の「パドロック」オリゴヌクレオチドの環化のための足場として機能するように設計された3'末端配列を含む。同時に、「パドロック」ヌクレオチドは、遺伝子特異的検出配列を含む。「パドロック」ヌクレオチドの5'末端及び3'末端は、先頭と

10

20

30

40

50

末尾とを突き合わせる様式でスプリントとアニーリングするように設計されており、T4 DNAリガーゼによる環化型のライゲーションを可能にする(図1A)。

【0129】

環化に続いて、鎖置換 29ポリメラーゼを加える。これは、「パドロック」及びそれに含有される遺伝子特異的検出配列のローリングサークル増幅(RCA)を引き起こす。(図1B)「スプリント」と「パドロック」との間の相補領域は、複合体形成、ライゲーション、及びそれに続くRCAが、特定足場RNAの存在下でのみ起こり得るように、短くかつ低い融点を有するように設計されている。事象のこの順序は、標的RNA検出の特異性を決定づける。検出は、特異的プライマーのハイブリダイゼーション(図1C)及び蛍光dNTPでの単一塩基伸長(図1D)を介して達成される。図1E~Fは、NALM細胞でのHLADRA mRNA検出の高度に特異的な検出を実証し(図1E)、同時に、T細胞系譜に由来しHLADR陰性であるジャーカット細胞は、シグナルの完全な不在を実証し、SNAIL-RCAシステムの特異性が確認される。

10

【0130】

SNAILは、単一ハイブリダイゼーション工程で形成される2つのオリゴヌクレオチドを用いた単純設計を特長とする。主な利点は、オリゴ設計手順の単純化である。RNA相補配列及び検出配列は、標的に応じて修飾されるものの、ライゲーション配列は、常に一定であるので、遺伝子の巨大プールに対するプローブセットを、完全自動化様式で設計することができる。

【0131】

組織調製及び切片化。組織をマウスから収穫し、O.C.T.化合物(Tissue-Tek)中で急速凍結させ、-80で貯蔵した。必要な場合は、組織をポリリシンコーティングしたスライドガラス上で5µmの切片にスライスし、最長1ヶ月まで-80で貯蔵した。

20

【0132】

SNAILプロトコル。切片を乾燥させ、室温で1分間平衡化し、直ちに室温で10分間、4%PFA含有PBSで固定した。次いで、組織を氷冷メタノールに入れて透過処理し、-80で10分間インキュベートした。次いで、メタノールを除去し、組織を、PBS、0.1%Tween(Sigma-Aldrich)、及び40U/mLのRNasin(PBST-R)に入れて室温で1分間再水和させた。SNAILプローブを用いたハイブリダイゼーションを、1xSSC(Affymetrix)、2.5%v/vのポリビニルスルホン酸、20mMのリボヌクレオシドバナジル錯体(New England Biolabs)、40U/mLのRNasin、1%Tween、及び100µg/mLのサケ精子DNA(Life Technologies)を含有するDEPC処理水(Life Technologies)を基材とする緩衝液中で行った。SNAILプローブを、DEPC処理水に、濃度100µMで再懸濁させた。プローブを5分間90に加熱し、次いで氷上で冷却し、ハイブリダイゼーション緩衝液中の組織に、最終濃度100nMで加えた。組織を、穏やかに振盪しながら40で一晩インキュベートし、続いてPBST-Rで3回洗った。次いで、組織を、PBS、4xSSC、40U/mLのRNasinを含有する緩衝液中、穏やかに振盪しながら40で20分間インキュベートした。PBST-Rで2回洗った後、組織を、T4 DNAリガーゼ(Thermo)とともに37で2時間インキュベートし、続いてphi29DNAポリメラーゼ(Thermo)とともに30で2時間インキュベートした。酵素は両方とも、製造元の説明書に従って、40U/mLのRNasinを加えて使用した。次いで、組織を、濃度10nMの検出オリゴヌクレオチドとともに、PBS、1xSSC、0.1%Tween、40U/mLのRNasin中、37で30分間インキュベートした。

30

40

【0133】

実施例2

細胞及び組織中の単一RNA分子の多重視覚化は、典型的には、mRNAと直接ハイブリダイズさせる複数の蛍光標識化プローブを使用するsmRNA-FISHに依存する。し

50

かしながら、先行アプローチは、典型的には、各 mRNA とハイブリダイズさせるために必要な 48 個の 20 nt プローブを使用し、巨大 mRNA へのアプローチを制限する可能性がある。また、ゲノムの巨大断片を提示する巨大ライブラリーを作製することは、法外に高価な可能性がある。bDNA 技術は、短 RNA、さらには miRNA さえも検出可能であるが、その多重化は、直交する bDNA 配列を見つけることが困難なために制限される。あるいは、cDNA を *in situ* で生成させ、次いでパドロックプローブとハイブリダイズさせ、パドロックプローブは RCA を介して連結及び増幅させることが可能であるが、効率の低さ及び逆転写の配列バイアスが、このアプローチのボトルネックとなる。

【0134】

本発明者らは、2つのプローブを使用し、アダプター配列を有する必要性を排除し、これによりライゲーション反応を2つから1つに削減またはなくす単純設計を構想し、SNA I L - R C A (スプリントヌクレオチド補助分子内ライゲーション及び続くローリングサークル増幅)と名付けた。上流プローブは、検出バーコード配列を含有する下流「パドロック」プローブの環化及びライゲーションのためのスプリントとして機能する(図1a)。各プローブ対は、標的RNAとのハイブリダイゼーションの際、環状構築物を形成し、これが、次いで鎖置換ポリメラーゼにより連結され増幅される(図1b)。相補領域の融点は、ハイブリダイゼーション(40)工程及びライゲーション(37)工程中、標的mRNA不在下で、2つのプローブが二量体を形成することを防ぐために十分な低さである(温度27)。このことは、B細胞白血病(NALM-6)及びT細胞白血病(Jurkat)細胞株でのHLADR及びCD3の検出により裏付けられたとおり、標的検出が高い特異性を意味し、実質的にバックグラウンドがゼロである(図2)。

【0135】

この単純設計は、多数の異なる mRNA に対して標的ハイブリダイゼーション配列のみが異なる同一相補/ライゲーション配列を用いることを可能にする。本発明者らは、同一検体に対して蛍光検出プローブを反復再アニーリングすることにより、多重化撮像を実施した。このアプローチを用いて、本発明者らは、OVCA R 4 細胞における24個の遺伝子の発現を検出した(図3)。本発明者らは、高度に発現する遺伝子(ACTB、GAPDH)ならびに発現が少ない遺伝子(CD24、E-カドヘリン)を同等に検出することができた。この撮像アプローチにより、本発明者らは、RNA 標的の細胞内局在を特性決定することができた。ほとんどのRNAは細胞質にのみ存在するものの、500万年を超えない過去の非コードRNAを起源とするヒト特異的タンパク質コード遺伝子であるPBOV1のmRNAは、核局在化を優先的に示すことが見出され、このことはコード及び非コードRNAとしての二重機能を示唆する。合同遺伝子発現の定量分析を行うため、602個の細胞を捉えた画像を分割し、単一細胞RNA発現のベクトルへと変換した。単一細胞にまたがる遺伝子同時発現の解析から、高い相関性での発現を示す増殖関連遺伝子の主要同時発現群が明らかとなった(図4A)。

【0136】

最後に、個々の細胞をクラスター化し、力指向描画で表示した。(方法については、Samusik et al. (2016) Nature Methods 6:493-496を参照)。クラスター1は、WFDC2発現細胞が豊富であり、クラスター2は、E-カドヘリン及びMUC16に関して陽性であり、クラスター3は、PBOV1を発現し、クラスター4及び5は、増殖性表現型を提示し、cMyc、CD13、及びKi-67を同時発現した。クラスター4は、E-カドヘリンに関して陽性であったが、クラスター5はE-カドヘリンに関して陰性であり、しかしcMycだけでなくMycNを発現した。この知見は、この細胞株のOVCA R 4 細胞に相当程度の表現型多様性があることを実証する。

【0137】

すなわち、SNA I L - R C A は、単一細胞での遺伝子発現レベルの、設定が容易で管理が効率的な定量的検出を可能にする。

【0138】

10

20

30

40

50

方法

細胞培養。OVCAR4細胞を、10%FBS(Thermo Fisher Scientific)、100U/mLのペニシリン/100µg/mLのストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific)を含むRPMI-1640培地(Thermo Fisher Scientific)で培養した。細胞を、無血清RPMI-1640培地中、1.6%ホルムアルデヒド溶液とともに室温で30分間インキュベートすることにより、60%集密度で固定した。その後、細胞を氷上に移し、氷冷したメタノール(Sigma Aldrich)で透過処理し、メタノール下-80で貯蔵した。
【0139】

SNAILプロトコル。自所で開発したSNAILデザイナーソフトウェアを用いてSNAILプローブ配列を設計した。1遺伝子あたり合計で4対のプローブを設計した。プローブは、IDTで合成して、100µMでIDTE緩衝液に入れて運搬及び貯蔵した。洗浄をはじめとするプロトコルの工程の大部分用のキャリア溶液は、PBS、0.1%Tween-20(Sigma-Aldrich)、及び4U/mLのRNasinであった。カバーガラスを、ホルムアルデヒド固定及びメタノール透過処理した細胞とともに、PBS、0.1%Tween(Sigma-Aldrich)及び4U/mL RNasin、ならびに20mMリボヌクレオシドバナジル錯体(New England Biolabs)で洗った。SNAILプローブを用いたハイブリダイゼーションを、1×生理食塩水クエン酸ナトリウム(SSC)(Affymetrix)、2.5%vol/volポリビニルスルホン酸、20mMのリボヌクレオシドバナジル錯体(New England Biolabs)、40U/mLのRNasin、1%Tween-20、及び100µg/mLのサケ精子DNA(Thermo Fisher Scientific)を含有するDEPC処理水(Thermo Fisher Scientific)を基材とする緩衝液中で行った。実験の全ての標的転写物用SNAILプローブを、混合し、90で5分間加熱した。次いで、プローブを、最終濃度200nMでハイブリダイゼーション緩衝液と混合し、細胞に加えた。細胞を40で1時間インキュベートし、3回洗った。次いで、細胞を、PBS、4×SSC、及び40U/mLのRNasinを含有する緩衝液中、40で20分間インキュベートした。2回洗った後、細胞を、Quickリガーゼ(New England Biolabs)とともに、37で1時間インキュベートし、次いでphi29DNAポリメラーゼ(Thermo Fisher Scientific)とともに、振盪下、30で2時間インキュベートした。増幅が長くなるほど(最長16時間)、一般に、シグナル強度が高くなる。酵素は両方とも、それらの製造元の説明書に従って使用した。

【0140】

撮像。細胞核をヘキスト34580(Thermo Fisher Scientific)で染色した。蛍光色素(ATTO-488、ATTO-595、ATTO-647)と結合した検出オリゴヌクレオチドでアニーリングすることにより、RCA産物を検出した。細胞を、アニーリングサイクルに供し、撮像し、特注の流体力学装置を用いて除去し、Keyence BZ-X710顕微鏡で撮像した。検出オリゴヌクレオチド、アニーリング緩衝液、及び除去緩衝液は、Akoya Biosciences Inc(San Francisco、USA)製であった。

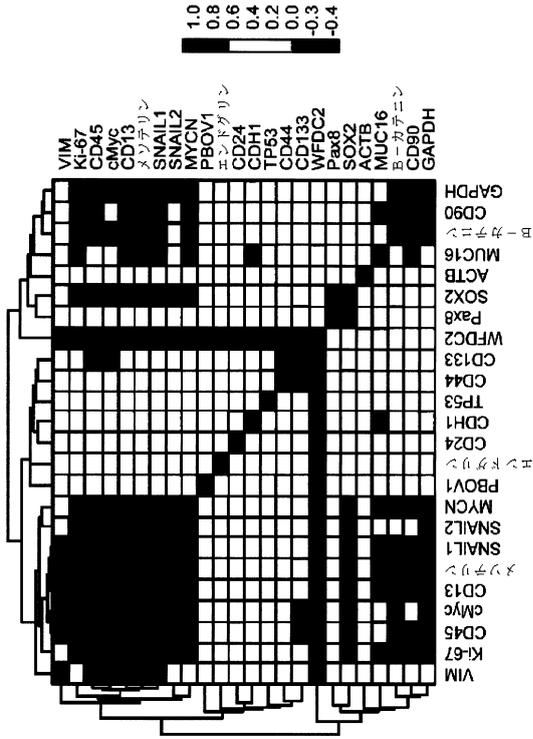
10

20

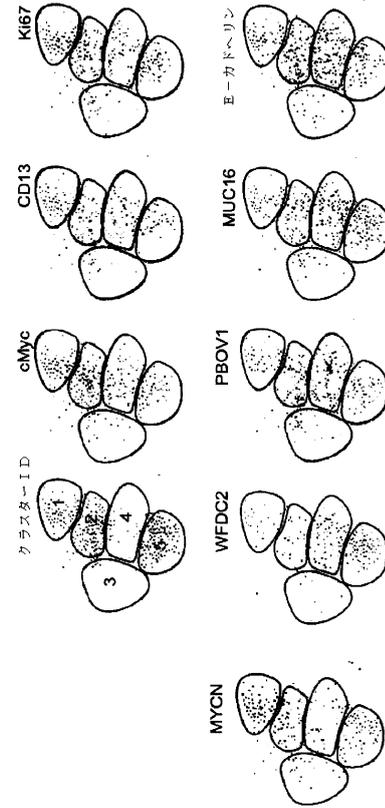
30

40

【 4 A 】



【 4 B 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- アメリカ合衆国 9 4 0 4 0 カリフォルニア州, マウンテン ビュー, モンロー ドライブ 2 4 0
 (72)発明者 バーヴァ, フェリスアレッシオ
 アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州, メンロー パーク, ロブレイ アベニュー 8 1 5
 , アプト 2
 (72)発明者 ゴルチェブ, ユーリー
 アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 5 1 2 4 カリフォルニア州, スタンフォード大学, バクスター ラ
 ボ, デプト. オブ マイクロバイオロジー アンド イミュノロジー, 3 2 2 0 シーシーアールエス
 (72)発明者 ノーラン, ゲイリー
 アメリカ合衆国 9 4 0 6 2 カリフォルニア州, レッドウッド シティ, ハーモーサ ロード 5
 審査官 野村 英雄
 (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 1 7 0 6 5 4 (U S , A 1)
 特表 2 0 1 4 - 5 0 6 4 7 2 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 5 / 2 0 0 1 3 9 (W O , A 1)
 MILLARD, P.J., et al. , "Detection of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious
 salmon anaemia virus by molecular padlock amplification." , JOURNAL OF FISH DISEASES
 , 2006年04月10日 , Vol.29, No.4 , pp.201-213 , doi: 10.1111/j.1365-2761.2006.00705.x
 Weibrecht I., et al. , "In situ detection of individual mRNA molecules and protein complexes
 or post-translational modifications using padlock probes combined with the in situ proximit
 y ligation assay." , NATURE PROTOCOLS , 2013年 , Vol.8, No.2 , pp.355-372
 (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 P u b M e d