

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6456969号
(P6456969)

(45) 発行日 平成31年1月23日(2019.1.23)

(24) 登録日 平成30年12月28日(2018.12.28)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N	1/28 (2006.01)	GO 1 N	1/28 J
GO 1 N	1/30 (2006.01)	GO 1 N	1/30
GO 1 N	33/53 (2006.01)	GO 1 N	33/53 Y
GO 1 N	33/48 (2006.01)	GO 1 N	33/48 P
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	GO 1 N	1/28 F

請求項の数 49 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-553349 (P2016-553349)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月20日 (2015. 2. 20)
 (65) 公表番号 特表2017-511883 (P2017-511883A)
 (43) 公表日 平成29年4月27日 (2017. 4. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/016788
 (87) 国際公開番号 W02015/127183
 (87) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)
 審査請求日 平成28年11月4日 (2016. 11. 4)
 (31) 優先権主張番号 61/943, 045
 (32) 優先日 平成26年2月21日 (2014. 2. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 596060697
 マサチューセッツ インスティテュート
 オブ テクノロジー
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア
 ヴェニュー・77
 (74) 代理人 100095832
 弁理士 細田 芳徳
 (72) 発明者 チェン, フェイ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 141 ケンブリッジ, ナンバー301,
 モンシニョール オブライエン ハイウェイ
 169

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膨張顕微鏡法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

顕微鏡法のための目的の試料を拡大するための方法であって、該方法は、
 目的の試料を膨潤性(swellable)材料に埋め込む工程、ここで、該試料を膨潤性材料に
 埋め込む工程が、該試料に、膨潤性材料の前駆体を含む組成物を浸透化させること、およ
 びインサイチュで膨潤性材料を形成することを含む、
 該試料を、膨潤前に膨潤性材料に固定する工程、ならびに
 該材料を膨潤させることにより該試料を拡大する工程
 を含み、該試料を膨潤させる前に、該試料を、機械的、物理的、化学的、生化学的または
 酵素的な消化に供する、方法。

【請求項2】

該試料が標識される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

該試料が、免疫蛍光染色、免疫組織化学的染色または免疫細胞化学的染色により標識さ
 れる、請求項2記載の方法。

【請求項4】

該組成物が、1つ以上の水溶性モノマー前駆体を含む水溶液である、請求項1記載の方
 法。

【請求項5】

該溶液が、アクリレート、アクリルアミドおよびN,N-メチレンビスアクリルアミドを含

む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

該膨潤性材料がポリアクリレートである、請求項 1 ~ 5 いずれか記載の方法。

【請求項 7】

該試料が、水を添加することにより全方向に等しく膨潤され、拡大された試料を生じる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

該試料に膨潤性材料の前駆体を浸透化させる前に、該試料を界面活性剤で処理する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

顕微鏡法のための目的の拡大された試料を調製するための方法であって、該方法は、目的の試料を多価電解質ヒドロゲルに埋め込む工程、ここで、該試料を多価電解質ヒドロゲルに埋め込む工程が、該試料に、多価電解質ヒドロゲルの前駆体を含む組成物を浸透化させること、およびインサイチュで多価電解質ヒドロゲルを形成することを含む、該試料を、膨潤前に多価電解質ヒドロゲルに固定する工程、ならびに該ヒドロゲルを膨潤させることにより該試料を拡大する工程を含み、該試料を膨潤させる前に、該試料を、機械的、物理的、化学的、生化学的または酵素的な消化に供する、方法。

10

【請求項 10】

該試料が標識される、請求項 9 記載の方法。

20

【請求項 11】

該試料が、免疫蛍光染色、免疫組織化学的染色または免疫細胞化学的染色により標識される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

該多価電解質ヒドロゲルの前駆体が、アクリレート、アクリルアミドおよびN,N-メチレンビスアクリルアミドを含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 13】

多価電解質ヒドロゲルがポリアクリレートである、請求項 9 ~ 12 いずれか記載の方法。

【請求項 14】

該試料に多価電解質ヒドロゲルの前駆体を浸透化させる前に、該試料を界面活性剤で処理する、請求項 9 記載の方法。

30

【請求項 15】

該試料が、水を添加することにより全方向に等しく膨潤され、拡大された試料を生じる、請求項 9 記載の方法。

【請求項 16】

該拡大された試料を顕微鏡下で見分することにより試料の高解像度画像を作製する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 15 いずれか記載の方法。

【請求項 17】

顕微鏡下で該拡大された試料を検分することにより該拡大された試料を光学的画像化する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 15 いずれか記載の方法。

40

【請求項 18】

(a)細胞または組織の試料と、結合部分およびアンカーを含むタグを接触させる工程、ここで、該結合部分は、該試料の生体分子成分に結合する；
 (b)該試料に、膨潤性材料の前駆体を含む組成物を浸透化させる工程；
 (c)重合を開始してインサイチュで膨潤性材料を形成する工程、ここで、該アンカーは、該膨潤性材料に共有結合して、試料 - 膨潤性材料複合体を形成する；ならびに
 (d)水性の溶媒または液体を添加して、試料 - 膨潤性材料複合体を膨潤させ、それにより該複合体を物理的に拡大させ、全方向に等しく拡大された試料を生じる工程を含む、細胞または組織の試料を全方向に等しく拡大するための方法。

50

【請求項 19】

該試料が標識される、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

該試料が、免疫蛍光染色、免疫組織化学的染色または免疫細胞化学的染色により標識される、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

該液体が水である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 22】

浸透化工程を行う前に、該試料を界面活性剤で処理する、請求項 18 記載の方法。

【請求項 23】

工程(d)の前に、該試料 - 膨潤性材料複合体を、機械的、物理的、化学的、生化学的または酵素的な消化に供する、請求項 18 記載の方法。

10

【請求項 24】

該膨潤性材料の前駆体を含む組成物が、1つ以上の水溶性モノマー前駆体を含む水溶液である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 25】

該溶液が、アクリル酸ナトリウム、アクリルアミドおよびN,N-メチレンビスアクリルアミドを含む、請求項 18 ~ 24 いずれか記載の方法。

【請求項 26】

該膨潤性材料がポリアクリレートである、請求項 18 ~ 24 いずれか記載の方法。

20

【請求項 27】

(a)細胞または組織の試料と、結合部分およびアンカーを含むタグを接触させる工程、ここで、該結合部分は、該試料の生体分子成分に結合する；
 (b)該試料に、ヒドロゲルの前駆体を含む組成物を浸透化させる工程；
 (c)重合を開始してインサイチュでヒドロゲルを形成する工程、ここで、該アンカーは、該ヒドロゲルに共有結合して、試料 - ヒドロゲル複合体を形成する；ならびに
 (d)水性の溶媒または液体を添加して、試料 - ヒドロゲル複合体を膨潤させ、それにより該複合体を物理的に拡大させ、全方向に等しく拡大された試料を生じる工程を含む、細胞または組織の試料を全方向に等しく拡大するための方法。

【請求項 28】

該試料が標識される、請求項 27 記載の方法。

30

【請求項 29】

該試料が、免疫蛍光染色、免疫組織化学的染色または免疫細胞化学的染色により標識される、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

該液体が水である、請求項 27 記載の方法。

【請求項 31】

浸透化工程を行う前に、該試料を界面活性剤で処理する、請求項 27 記載の方法。

【請求項 32】

工程(d)の前に、該試料 - ヒドロゲル複合体を、機械的、物理的、化学的、生化学的または酵素的な消化に供する、請求項 27 記載の方法。

40

【請求項 33】

該ヒドロゲルが多価電解質ヒドロゲルである、請求項 27 ~ 32 いずれか記載の方法。

【請求項 34】

該ヒドロゲルの前駆体を含む組成物が、少なくとも1つの多価電解質モノマーおよび共有結合架橋剤を含む、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

該ヒドロゲルの前駆体が、アクリル酸ナトリウム、アクリルアミドおよびN,N-メチレンビスアクリルアミドを含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

50

該多価電解質ヒドロゲルがポリアクリレートである、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 7】

該拡大された試料を顕微鏡下で見分することにより試料の高解像度画像を作製する工程をさらに含む、請求項 1 8 ~ 3 6 いずれか記載の方法。

【請求項 3 8】

顕微鏡下で該拡大された試料を検分することにより該拡大された試料を光学的画像化する工程をさらに含む、請求項 1 8 ~ 3 6 いずれか記載の方法。

【請求項 3 9】

(a)細胞または組織の試料と、結合部分およびアンカーを含むタグを接触させる工程、ここで、該結合部分は、該試料の生体分子成分に結合する；

(b)該試料に、膨潤性材料の前駆体を含む組成物を浸透化させる工程；

(c)重合を開始してインサイチュで膨潤性材料を形成する工程、ここで、該アンカーは、該膨潤性材料に共有結合して、試料 - 膨潤性材料複合体を形成する；ならびに

(d)水性の溶媒または液体を添加して、試料 - 膨潤性材料複合体を膨潤させ、それにより該複合体を物理的に拡大させ、全方向に等しく拡大された試料を生じる工程を含む方法により作製される、全方向に等しく拡大された細胞または組織の試料。

【請求項 4 0】

該試料が標識される、請求項 3 9 記載の試料。

【請求項 4 1】

該試料が、免疫蛍光染色、免疫組織化学的染色または免疫細胞化学的染色により標識される、請求項 4 0 記載の試料。

【請求項 4 2】

該液体が水である、請求項 3 9 記載の試料。

【請求項 4 3】

浸透化工程を行う前に、該試料を界面活性剤で処理する、請求項 3 9 記載の試料。

【請求項 4 4】

工程(d)の前に、該試料 - 膨潤性材料複合体を、機械的、物理的、化学的、生化学的または酵素的な消化に供する、請求項 3 9 記載の試料。

【請求項 4 5】

該膨潤性材料がヒドロゲルである、請求項 3 9 ~ 4 4 いずれか記載の試料。

【請求項 4 6】

該ヒドロゲルが多価電解質ヒドロゲルである、請求項 4 5 記載の試料。

【請求項 4 7】

該膨潤性材料の前駆体を含む組成物が、少なくとも1つの多価電解質モノマーおよび共有結合架橋剤を含む、請求項 4 5 記載の試料。

【請求項 4 8】

該ヒドロゲルの前駆体が、アクリル酸ナトリウム、アクリルアミドおよびN,N-メチレンビスアクリルアミドを含む、請求項 4 7 記載の試料。

【請求項 4 9】

該多価電解質ヒドロゲルがポリアクリレートである、請求項 4 6 記載の試料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、その内容が、その全体において参照により本明細書に援用される2014年2月21日に出願された米国仮特許出願番号61/943,045の利益を主張する。

【0002】

連邦政府により支援された研究または開発に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所により認められた助成金番号1DP1NS087724の下、米国政府の

10

20

30

40

50

支援によりなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

技術の分野

本発明は、顕微鏡法、特に生物学的標本の光学的画像化に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

顕微鏡法は、固定された細胞および組織中の小さな構造の画像を光学的に拡大することにより、価値のある生物学的情報を提供している。しかしながら、かかる画像化技術の解像度は、発光源の波長の約半分に限定される。スペクトルの可視領域において、これは1ミクロンの1/4~1/3のオーダーである(250~330nm)。不幸にも、従来の光学的顕微鏡法ではこの長さの尺度未満の非侵襲性の観察が利用できない非常に多くの範囲の生物学的構造/系がある。

10

【0005】

100nm以下の長さの尺度で構造を明らかにする光学技術の開発を目的とする多くの活動があった。例えば、超解像顕微鏡法の開発は、250nmから20nmまでのより良い解像度での試料の視覚化を可能にした。しかしながら、これらの技術は、特殊で要求の厳しい画像化条件、特に設計された蛍光タンパク質、または高価な新規の機械および該機械を使用するためのさらなる技術的訓練を必要とし、組織切片または腫瘍などの厚い構造に困難性を有する。

20

【0006】

したがって、現在の回析の限界がある顕微鏡を用いて作業が可能であり、組織切片または腫瘍などのより大きな試料をナノスケールの正確さで光学的に拡大し得るより高い解像度の顕微鏡法の必要性がある。

【発明の概要】

【0007】

概要

本発明は、生物学的標本自体を物理的に膨張することに基づく、古典的な顕微鏡法回析限界よりも良好な解像度での生物学的標本の光学的画像化のための方法である。この方法において、培養された細胞、固定された組織、または原則として、生物学的材料を含む他の型の目的の試料に、組成物または化学カクテルを注入し、該組成物または化学カクテルで試料材料を包埋し、次いで該組成物を、好ましくはナノスケールの正確さで三次元において全方向に等しく膨張させ得る。

30

【0008】

この考えの態様において、該組成物は、例えば低塩水中で巨視的に膨潤し得る多価電解質ヒドロゲル(またはその成分)を含む。該組成物は、膨張前にヒドロゲルに(例えば化学的に)固定され得るタグまたは他の目的の特徴(例えば、抗体染色により生物学的試料に送達された蛍光色素分子)を含み得る。固定後、標本を酵素消化(または他の消化)に供して、生物学的分子の基礎をなす網目状組織を破壊し、完全でかつゲルに固定された目的のタグ(例えば、蛍光色素分子)を放出させる。この方法において、ゲル-生体分子ハイブリッド物質の機械的特性は、空間的により均一になり、最小の人為構造による全方向への等しい膨張を可能にする。

40

【0009】

生物学的標本が包埋される膨潤した材料は、任意の光学顕微鏡で画像化され、古典的な回析限界未満の効果的な特徴の画像化を可能にし得る。結果として生じる標本は透明であり得るので、大きな体積、広い視野、高速3D走査が可能な注文の(custom)顕微鏡は、膨張された試料に関しても使用し得る。

【0010】

この技術は、脳をマッピングすること、ならびに新規の診断、個人化医薬、組織病理学および他の医学的能力などの、新しい種類の科学研究を可能にする。

50

【図面の簡単な説明】

【0011】

本発明の他の局面、利点および新規の特徴は、添付の図面に関して考慮すると、以下の発明の詳細な説明からより明確になる。

【図1】本発明の方法の例示的な態様における工程を示すフローチャート。

【図2】標準顕微鏡法(図2A)および本発明の方法による膨張顕微鏡法(expansion microscopy)(図2B)を使用した例。

【図3】標準顕微鏡法(図3A)および本発明の方法による膨張顕微鏡法(図3B)を使用したさらなる例。

【図4】本発明の膨張顕微鏡法(ExM)を示す。図4Aは、架橋剤(点)およびポリマー鎖(線)を示す潰れた多価電解質網目状組織(i)、ならびにH₂O透析後の膨張した網目状組織(ii)の模式図である。図4Bは、固定されたマウス脳薄片の写真である。図4Cは、側方照明下の試料(図4B)のExM後の写真である。図4Dは、生体分子の部位でゲルに固定され得る標識の模式図である。図4Eは、微小管(緑色)およびポリマー網目状組織(橙色)の模式図である。図4Fは、一次抗体(灰色)を介して微小管(紫色)に結合したオリゴ保有(oligo-bearing)二次抗体(灰色)にハイブリダイズして、メタクリロイル基(橙色の点)を介してゲル(橙色の線)に組み込まれた図4Dの標識を示し、これはタンパク質分解(点線)後に残る。図4Bおよび4Cのスケールバーは5mmである。模式図は一定の縮尺ではない。

【図5-1】図5A~5Oは、膨張顕微鏡法がナノスケール等方で物理的に拡大することを示す。従来の顕微鏡法(青色スケールバー)により得られた画像対膨張後(橙色スケールバー)に得られた画像を比較した。図5Aは、HEK293細胞中の微小管の共焦点画像を示す。図5Bは、試料図5Aの膨張後共焦点画像を示す。図5Cは、培養した細胞のExM前対ExM後の共焦点画像の二乗平均(RMS)長さ測定値誤差を示す(青色の線、平均;影の領域、標準偏差;n=4試料)。図5Dは、微小管の超解像構造化照明顕微鏡法(SR-SIM)画像である。図5Eは、図5Dの試料の膨張後共焦点画像を示す。

【図5-2】図5Fおよび5Gは、図5Dおよび図5Eそれぞれの四角で囲われた領域の拡大された図を示す。図5Hは、図5Fおよび図5G中の青色および橙色の点線に沿って得られた微小管密度のプロフィールを示す。図5Iは、ExM対SR-SIM画像のRMS長さ測定誤差を示す(青色の線、平均;影の領域、標準偏差;n=4試料)。図5Jは、ガウス適合(黒色点線)による代表的な微小管の横断プロフィール(青色の線)を示す。図5Kは、HEK293細胞中のクラスリン被覆ピット(CCP)のSR-SIM画像である。図5Lは、図5Kの試料の膨張後共焦点画像である。

【図5-3】図5Mおよび5Nは、図5Kおよび図5Lそれぞれの四角で囲われた領域中の単一CCPの拡大図である。図5Oは、ExM対SR-SIMにより測定したCCPの半径の散乱プロットである(3試料からn=50 CCP)。緑色の線、y=xの線;影の緑色の領域、y=xの線についてのデジタル化誤差の1/2ピクセル幅。前対後ExM画像についてのスケールバー:図5A 20 μm、図5B 20 μm(膨張後の物理的サイズ81.6 μm);図5D 2 μm、図5E 2 μm(9.1 μm);図5F 500nm、図5G 500nm(2.27 μm);図5K 2 μm、図5L 2 μm(8.82 μm);図5M 100nm、図5N 100nm(441nm)。

【図6-1】図6A~6Jは、哺乳動物脳組織のExM画像化を示す。図6Aは、蛍光(白色)を示すThy1-YFPマウス脳薄片の広視野画像である。図6Bは、試料図6Aの膨張後広視野画像である。図6Cは、脳薄片の前対後-ExM画像についての二乗平均(RMS)長さ測定誤差である(青色の線、平均;影の領域、標準偏差;n=4試料)。図6Dおよび6Eは、抗GFP(緑色)に加えて前シナプス(抗Bassoon、青色)および後シナプス(抗Homer1、赤色)マーカーで染色した図6Aおよび6Bのそれぞれにおける四角で囲まれた領域の共焦点蛍光画像を示す。前、図6D対後、図6E膨張。

【図6-2】図6Fおよび6Gは、図6Dおよび図6E中の四角で囲まれた領域の詳細を提供する。図6Hは、図6Gで強調された代表的な単一のシナプスを示し、図6Iは、白色の四角の長軸に沿った、図6Hの試料のBassoon(青色)およびHomer1(赤色)についての染色強度を示す。黒い点線、ガウス適合。a.u.、任意の単位(arbitrary unit)。図6Jは、Bassoon-Homer1分離を示す(4個の皮質薄片からn=277シナプス)。前対後ExM画像についてのスケールバ

10

20

30

40

50

ー：図6A 500 μm 、図6B 500 μm (膨張後の物理的サイズ2.01mm)；図6D 5 μm 、図6E 5 μm (20.1 μm)；図6F 2.5 μm 、図6G 2.5 μm (10.0 μm)および図6H 250nm (1.00 μm)。

【図7 - 1】図7A~7Dは、マウス脳組織の測定可能な(scalable)3D超解像顕微鏡法を示す。図7Aは、ニューロンを示す海馬の一部(緑色で示されるThy1-YFPを発現)およびシナプス(抗Bassoon(青色)および抗Homer1(赤色)でマークされる)のボリュームレンダリング(volume rendering)である。

【図7 - 2】図7Bは、CA1網状分子層(stratum lacunosum moleculare)(slm)中の樹状突起のボリュームレンダリングである。図7Cは、CA1 slm中の樹状突起分岐のボリュームレンダリングである。図7Dは、歯状回の門の苔状線維膿胞を示す。パネル(i~iii)、選択されたz薄片。スケールバー：図7A それぞれの寸法で100 μm ；図7B 52.7 μm (x)、42.5 μm (y)および35.2 μm (z)；図7C 13.5 μm (x)、7.3 μm (y)および2.8 μm (z)；図7D(i~iii) 1 μm 。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

本発明は、顕微鏡法のための拡大された目的の試料、および目的の試料を拡大するための方法、標本中で膨潤性(swelling)ポリマー網目状組織を合成することによる古典的顕微鏡法回析限界よりも良好な解像度での目的の試料の光学的画像化に関し、標本は、物理的に膨張され、物理的な拡大がもたらされ得る。本発明はまた、目的の試料を拡大するための本明細書に記載される組成物の使用を含む。

【0013】

一局面において、本発明は、顕微鏡法のための目的の膨張可能な(expandable)試料を提供する。目的の膨張可能な試料は、膨潤性材料中に埋め込まれた目的の試料を含む。特定の態様において、目的の試料は標識される。

【0014】

第2の局面において、本発明は、顕微鏡法のために目的の試料を拡大するための方法を提供する。該方法は、まず目的の試料を膨潤性材料に包埋し、次いで該材料を膨潤させる工程を含む。特定の態様において、目的の試料は標識される。

【0015】

第3の局面において、本発明は、顕微鏡法のために目的の拡大可能な試料を調製するための方法を提供する。一態様において、該方法は、目的の試料を膨潤性材料に包埋する工程を含む。特定の態様において、目的の試料は標識される。

【0016】

別の局面において、本発明は、目的の試料を拡大する工程および拡大された試料を顕微鏡下で見分する工程を含む、試料の高解像画像を作製するための顕微鏡法の方法を提供する。一態様において、目的の試料を拡大する工程は、目的の試料を膨潤性材料に埋め込むこと、次いで該材料を膨潤させることを含む。特定の態様において、目的の試料は標識される。

【0017】

さらなる局面において、本発明は、試料自体を物理的に膨張させることに基づいて、古典的顕微鏡法回析限界よりも良好な解像度による、目的の試料の光学的画像化のための方法を提供する。一態様において、該方法は、膨潤性材料中に目的の試料を埋め込むこと、次いで該材料を膨潤させることを含む。特定の態様において、目的の試料は標識される。

【0018】

本明細書で使用する場合、「目的の試料」は一般的に、限定されないが、細胞、細胞のアレイ、腫瘍、組織、細胞単離物、生化学的集合または顕微鏡分析に適した分子の分布などの生物学的、化学的または生化学的試料をいう。

【0019】

好ましい態様において、目的の試料は、標識され得るかまたはタグ化され得る。典型的に、標識またはタグは、試料またはその成分に化学的に結合(例えば、共有結合、水素結合またはイオン結合)する。抗体または他の標的的特異的結合体により達成され得るよう

10

20

30

40

50

、タグは、特定の標的(例えば、バイオマーカーまたは分子のクラス)について選択的であり得る。好ましくは、タグは、典型的な色素または蛍光分子であるような可視の成分を含む。目的の試料と標識またはタグを接触させることにより、「標識された目的の試料」が生じる。蛍光標識された目的の試料は、例えば、限定されないが顕微鏡分析を補助するための免疫蛍光、免疫組織化学または免疫細胞化学的な染色などの技術により標識される目的の試料である。したがって、標識またはタグは、好ましくは目的の試料またはその標識化される成分に化学的に結合する。好ましい態様において、標識またはタグ、例えば抗体および/または蛍光色素はさらに、該試料を、組成物、ヒドロゲルもしくは他の膨潤性材料に、結合もしくは架橋させる物理的、生物学的もしくは化学的なアンカーまたは部分を含む。標識された試料はさらに、1つより多くの標識を含み得る。例えば、それぞれの標識は、特定のまたは識別可能な蛍光特性、例えば識別可能な励起および発光波長を有し得る。さらに、それぞれの標識は、試料または試料の成分中の特異的かつ識別可能な標的について選択性である異なる標的に特異的なバインダーを有し得る。

10

【0020】

本明細書で使用する場合、「膨潤性(swellable)材料」は一般的に、水または他の溶媒などの液体と接触させた場合に膨張する材料をいう。好ましくは、該膨潤性材料は、3次元的に均等に膨張する。追加的にまたは代替的に、該材料は、膨張時に光が試料を通過し得るように透明である。一態様において、膨潤性材料は、膨潤性ポリマーまたはヒドロゲルである。一態様において、膨潤性材料は、その前駆体からインサイチュで形成される。例えば、重合性エチレン不飽和基を含む水溶性基からなる群より選択されるモノマーなどの1つ以上の重合性材料、モノマーまたはオリゴマーが使用され得る。モノマーまたはオリゴマーは、そのジビニル性架橋剤(例えば、N,N-アルキレンビスアクリルアミド)を含む、1つ以上の置換または非置換のメタクリレート、アクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、ビニルアルコール、ビニルアミン、アリルアミン、アリルアルコールを含み得る。前駆体はまた、重合開始剤および架橋剤を含み得る。好ましい態様において、膨潤性ポリマーは、ポリアクリレートおよびそのコポリマーまたは架橋コポリマーである。代替的にまたは追加的に、膨潤性材料は、水溶性オリゴマーまたはポリマーを化学的に架橋することによりインサイチュで形成され得る。したがって、本発明は、膨潤性材料の前駆体(水溶性前駆体など)を試料に添加して、該前駆体をインサイチュで膨潤性にすることを構想する。

20

30

【0021】

一態様において、膨潤性材料中に試料を埋め込む工程は、好ましくは膨潤性材料の前駆体を添加することにより、試料に膨潤性材料を透過させること(かん流すること(perfusing)、注入すること、浸すこと、添加することまたは他の混合することなど)を含む。代替的にまたは追加的に、該試料を膨潤材料中に埋め込む工程は、試料中に1つ以上のモノマーまたは他の前駆体を透過させること、およびモノマーもしくは前駆体を重合および/または架橋して、膨潤性材料もしくはポリマーを形成することを含む。この様式で、目的の試料は膨潤性材料に埋め込まれる。

【0022】

したがって、本発明の好ましい態様において、目的の試料または標識化試料は、水膨潤性材料の水溶性前駆体を含み、前駆体と反応してインサイチュで水膨潤性材料を形成する組成物に透過される。

40

【0023】

特定の態様において、目的の試料または標識化試料は、任意に、1つ以上の膨潤性材料前駆体と接触される前に界面活性剤で処理され得る。界面活性剤の使用により、試料の湿潤性が向上され得るか、または試料が破壊されて1つ以上の膨潤性モノマー前駆体が試料を透過することが可能になり得る。

【0024】

好ましい態様において、該試料は、1つ以上のモノマー、または反応して膨潤性ポリマーを形成する1つ以上のモノマーもしくは前駆体を含む溶液が透過する。例えば、目的の

50

試料をポリアクリル酸ナトリウムに埋め込む場合、モノマーアクリル酸ナトリウムおよびアクリルアミドならびに架橋剤N,N-メチレンビスアクリルアミドを含む溶液が試料中にかん流される。試料または標識化試料が浸透されると、該溶液は活性化されてポリアクリル酸ナトリウムを形成する。好ましい態様において、モノマーを含む溶液は水性である。該溶液は、好ましくは、約50%以上飽和(本明細書において、浸透の条件下で沈殿を生じるものと同じ割合で水性溶媒中に存在する固体のパーセンテージとして定義される)など、高濃度である。好ましくは、該溶液は、約75%以上飽和、より好ましくは90%以上飽和など、高濃度である。

【0025】

好ましい態様において、試料(例えば、標識された試料)は、膨張前に膨潤性材料に固定されるかまたは架橋される。好ましくは、これはタグまたは標識を、重合もしくは膨潤性材料のインサイチュでの形成の間またはその後などで、膨潤性材料と化学的に架橋することにより達成され得る。一態様において、標識化された試料が膨潤性材料に固定された後、該試料は任意に、内因性生物学的分子(または試料が生物学的材料以外の場合は目的の試料の物理的構造)の破壊に供されて、タグまたは蛍光色素分子が完全なまま保たれ、膨潤性材料に固定される。この場合、試料-膨潤性材料複合体の機械的特性は、空間的により均一になり、最小人工物を伴う全方向への等しい膨張が可能になる。

10

【0026】

本明細書で使用する場合、目的の試料の「内因性生物学的分子の破壊」は一般的に、試料が膨張に耐えられないような、試料の機械的、物理的、化学的、生化学的、好ましくは酵素消化、破壊(disruption)もしくは破壊(break up)をいう。一態様において、プロテアーゼ酵素を使用して、試料-膨潤材料複合体を均質化する。破壊が、膨潤性材料の構造に影響を及ぼさないが、試料の構造を破壊することが好ましい。したがって、試料破壊は実質的に、膨潤性材料に対して不活性であるべきである。消化の程度は、試料の機械的構造の完全性を傷つけるのに十分であり得るか、または試料-膨潤材料複合体が実質的に試料を有さない程度にまで完遂され得る。

20

【0027】

次いで、試料-膨潤材料複合体は全方向に等しく膨張される。好ましくは、後に膨潤性材料に吸収される溶媒または液体を、該複合体に添加して、膨潤を引き起こす。膨潤性材料が水膨潤性である場合、水溶液を使用し得る。

30

【0028】

一態様において、水の添加により、埋め込まれた試料が三次元において、元の大きさの4x~5x(例えば4.5x)以上に膨張することが可能になる。したがって、試料は、体積が100倍以上増加し得る。これは、ポリマーが試料中に埋め込まれるために、ポリマーが、膨潤(増大)した際に組織も同様に膨張するためである。したがって、組織試料自体が大きくなる。驚くべきことに、該材料が全方向に等しく膨潤するので、固定されたタグはそれらの相対的な空間的關係を維持する。

【0029】

目的の試料が埋めこまれた膨潤した材料は、古典的な回析限界未満の特徴の効果的な画像化を可能にする任意の光学顕微鏡で画像化され得る。結果として生じる標本は好ましくは透明であるので、大きな体積、広い視野、3D走査が可能で別注の顕微鏡も、膨張された試料に関して使用し得る。

40

【実施例】

【0030】

実施例

図1は、本発明の方法の例示的な態様における工程を示すフローチャートである。

【0031】

固定可能(Anchor-able)色素系：DNA配列は、5'アミノ修飾(Integrated DNA Technologies)で順序づけられ、市販のキット(Solulink, Antibody-Oligonucleotide All-in-One Conjugation Kit)を使用して二次抗体(Jackson ImmunoResearch)にコンジュゲートされた。三

50

次DNA/色素染色分子について、相補的オリゴヌクレオチドは、3'アミン修飾および5'アクリライト(Acrydite)修飾(Integrated DNA Technologies)で順序づけられ、製造業者の指示に従いNHS-エステル化学で修飾された色素(Life Technologies and Sigma Aldrich)にコンジュゲートされる。コンジュゲートされたDNA分子は、逆相HPLCにより精製され、凍結乾燥され、ddH₂Oに再懸濁された。

【0032】

培養された細胞調製物および染色：そうではないと記されなければ、全ての溶液は1x PBSで作製し、インキュベーションは室温で行う。HEK293-FT細胞を、3%ホルムアルデヒド/0.1%グルタルアルデヒド(Electron Microscopy Sciences)中、10分間固定し、次いで100mMグリシン中、10分間クエンチし、0.1% NaBH₄で7分間還元した。細胞を、室温で15分間 0.2% Tritonで浸透化させ、5%正常口バ血清で1時間ブロッキングした。標本を、ブロッキングバッファ中10 μg/mLの濃度の一次抗体と1~4時間インキュベートし、次いでPBSで3回、それぞれ5分間洗浄した。標本を、DNAハイブリダイゼーションバッファ(2xSSCバッファ、10%硫酸デキストラン、1mg/mL酵母tRNA、5%正常口バ血清)中、約10 μg/mLの濃度のDNA標識二次抗体と1~4時間インキュベートし、次いで一次抗体と同様にPBS中で洗浄した。標本を、ハイブリダイゼーションバッファ中、0.5ng/μLの濃度で色素標識DNA三次抗体(tertiaries)と一晩インキュベートし、次いで2x SSC中で3回洗浄した。

10

【0033】

組織調製および染色：Thy1-YFP-発現マウスをイソフルランで麻酔して、氷冷4%パラホルムアルデヒドで経心臓かん流した。脳を切り出し、4%パラホルムアルデヒド中に4で1日間静置し、次いで30%スクロース中100mMグリシンに一日間沈めた。組織を、ドライアイスで冷やした-40のイソペンタンで凍結し、M-1包埋マトリックス(Thermo Scientific)中に包埋し、クリオトームで薄片にした。薄片を浸透化して、0.1% Tritonおよび2%正常口バ血清を有する1x PBS(薄片ブロックバッファ)中で少なくとも6時間ブロッキングした。薄片ブロッキングバッファ中、薄片を、10 μg/mLの濃度の一次抗体と6~12時間インキュベートして、次いで、薄片ブロッキングバッファ中、各洗浄について30分間で4回洗浄した。ハイブリダイゼーションバッファ中、薄片を、約10 μg/mLの濃度のDNA標識二次抗体と、6~12時間インキュベートし、次いで、一次抗体と同様に薄片ブロッキングバッファ中で洗浄した。標本を、ハイブリダイゼーションバッファ中、1ng/μLの濃度の色素標識DNA三次抗体と6~12時間インキュベートし、次いで一次抗体と同様に薄片ブロッキングバッファ中で洗浄した。

20

30

【0034】

ヒドロゲル包埋：モノマー溶液(1x PBS、2M NaCl、8.625%(w/w)アクリル酸ナトリウム、2.5%(w/w)アクリルアミド、0.15%(w/w) N,N'-メチレンビスアクリルアミドを毎週新たに混合する。包埋の前に、モノマー溶液を4に冷却し、早熟のゲル化を防止した。過硫酸アンモニウム(APS)開始剤およびテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)促進剤の濃縮ストック(10%w/v)を、それぞれ0.2%(w/w)までモノマー溶液に添加した。染色された細胞または組織薄片を、モノマー溶液 + APS/TEMEDと、4で2分(培養細胞)または10分(薄片)インキュベートし、次いで37 オープンに1時間移した。

【0035】

消化および膨張：プロテイナーゼK (New England Biolabs)を、消化バッファ(50mM Tris pH8、1mM EDTA、0.5% Triton-X100、1M NaCl、0.8MグアニジンHCl)中200 μg/mLに希釈して、少なくとも10倍量過剰の体積でゲルに直接適用した。ゲルは、Culturewell Chambered Coverglass (Invitrogen)中で形成され得、酵素と包埋された組織の接近を向上するために消化バッファを添加する前にチャンバーの壁を取り除く。次いでゲルを6時間より長く消化バッファ中でインキュベートして、全てのタンパク質の完全な消化を確実にする。次いで、消化されたゲルを、過剰容量の二重脱イオン化水または蒸留水中に数時間置いて膨張させ、ゲルが平衡に達することを確実にした。膨張されたゲルは、標準的な光学顕微鏡で画像化され得るが、高い集光および検出器感度は、結合した色素分子の容積測定希釈(volumetric dilution)のために有用である。

40

50

【 0 0 3 6 】

画像化：SIM画像化は、Deltavision OMX SIM顕微鏡上で行った。染色された細胞は、光脱色(photobleaching)の抑制および反射指標適合のためにSlowFade Goldアンチフェード試薬(Invitrogen)を有するCulturewell Chambered Coverglass中で画像化した。

【 0 0 3 7 】

膨張後画像化は、Perkin ElmerスピニングディスクコンフォーカルまたはZeissレーザー走査コンフォーカル(LSM 710)で行った。簡潔に、膨張したゲルをガラス底6ウェルプレート(In Vitro Scientific)に配置し、低融点アガロースで定位置に保持した。LSM 710上1エアリー単位(Airy unit)およびナイキストサンプリングにより画像を得た。

【 0 0 3 8 】

図2A~Bは例を示す。図2A：40x、1.3NAでの標準的な共焦点画像。図2B：20x、0.8 NAでの膨張後。スケールバー：5 μ m。試料の物理的膨張により部分的に拡大が達成されていることに注意。

【 0 0 3 9 】

図3A~Bは例を示す。図3A：構造化照明顕微鏡法(Deltavision OMX)、膨張前の微小管、100x 1.40NA。図3B：膨張後の、スピニングディスクコンフォーカル、100x、1.40NAでの4.5x画像化。光の回折限界よりも小さい特徴がコンフォーカル上で画像化され得ることに注意。

【 0 0 4 0 】

膨張顕微鏡法(ExM)。以下の記載および対応する図面中の色に関する任意の参照は、Chen et al., Science (January 2015), Expansion Microscopy, v347(6221), pp. 543-548に見出され得、これは参照により本明細書に援用される。しかしながら、色の使用は、図面および図面中の質感がはっきりしている場合の例示的な目的のためである。

【 0 0 4 1 】

超吸収物質を作製するために使用されるモノマーであるアクリル酸ナトリウムを、共モノマーアクリルアミドおよび架橋剤N'-メチレンビスアクリルアミドと共に、化学的に固定され、浸透化された脳組織中に注入した(図4B)。過硫酸アンモニウム(APS)開始剤およびテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)促進剤とのフリーラジカル重合を誘発した後、組織-ポリマー複合体をプロテアーゼで処理し、その機械的特徴を均質化した。タンパク質分解後、肉眼解剖学のレベルでゆがむことなく、水中での透析により4.5倍の直線の膨張をもたらした(図4C)。消化は薄片のあらゆる場所で均一であった。膨張された標本は、主に水で構成されるので透明であった。したがって、生物学的試料のあらゆる場所にポリマーを埋め込んだ場合に高分子電解質ゲル膨張は可能である。

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載されるタンパク質分解処理およびその後の組織膨張と適合する蛍光標識を、ポリマー網目状組織に直接取り込ませた。可視化のための、フリーラジカル重合に関与し得るメタクリロイル基を含む該標識は、三官能基化学フルオロフォアであり、親和性タグに結合した相補的配列(例えば二次抗体)にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドである(図4EおよびF)。したがって、蛍光タグは、目的の生体分子に標的化されるが、高収率でポリマー網目状組織に共有結合的に固定されたままである。

【 0 0 4 3 】

本発明の膨張顕微鏡法(ExM)を使用して蛍光画像化を行い、三官能基標識で標識され、固定されたHEK293細胞中の微小管を検査し、ExMプロセス前 対ExMプロセス後にコンフォーカルレーザー走査顕微鏡により画像化した。ExM後画像(図5B)は、視覚的に区別がつかない画像を生じる同様の变形を介して、ExM前画像(図5A)に対して記録された。ExMの等方性を定量するために、非剛体レジストレーション(non-rigid registration)プロセスを介して画像間の变形ベクトル場を計算した。このベクトル場から、ExM後の特徴測定の二乗平均誤差を定量した。長さの誤差は小さかった(画像化システム広がり点関数サイズ(imaging system point spread function size)よりも大きい誤差について、距離の<1%)(図5C、n=4試料)。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

ExM前の従来の超解像画像を、ExM後のコンフォーカル画像と比較した。微小管およびクラスリン被覆ピットを含む超解像顕微鏡の性能を特徴づけるために従来から使用される特徴を標識し、ExM前の超解像構造化照明顕微鏡(SR-SIM)およびExM後のスピニングディスク共焦点により画像化した。定性的に(図5DおよびE)、画像は同様であり、定量的に(図5I)、測定誤差は、再度1%のオーダーであり、SR-SIM顕微鏡の点広がり関数サイズ内で良好であった(n=4試料)。微小管網目状組織は、SR-SIM(図5F)よりもExM(図5G)においてより鮮明に分解された。ExMにより、SR-SIMでは区別できなかった個々の微小管が分解された(図5H)。ExMで画像化された微小管は、 $82.4 \pm 6.01\text{nm}$ (平均 ± 標準偏差、3試料からn=24微小管)の半値全幅(FWHM)を示した(図5J)。

10

【 0 0 4 5 】

クラスリン被覆ピットも良好に分解された(図5KおよびL)。ExMは、SR-SIMよりも良好なピットの中心ヌル(central null)を分解した(図5MおよびN)。ExMおよびSR-SIMで測定したクラスリン被覆ピット半径は、1.001の傾斜で高度に相関した(全最小二乗回帰(total least squares regression)、信頼区間、 $P < 0.05$ で0.013、3試料からn=50ピット)(図5O)。50ポイントのうち49は、単一傾斜線(unity slope line)の1/2ピクセルの距離内にあり、ExM対SR-SIM比較の変化は、測定のデジタル化誤差内にあったことが示唆される。

【 0 0 4 6 】

固定された脳の組織にExMを適用した。ニューロンのサブセット中のThy1プロモーター下で細胞質YFPを発現するThy1-YFP-Hマウス由来の脳の薄片を、抗GFP一次抗体(YFPにも結合する)を使用して、Alexa 488を有する三官能基標識により染色した。培養細胞における膨張因子と同様に、切片は約4倍まで膨張した。落射蛍光顕微鏡で得たExMの前後の画像を比較した。培養細胞に関して、類似性変形を介して、ExM後の画像(図6A)は、ExM前の画像(図6B)に対して記録された。記録された画像は緊密に適合したが、いくつかの特徴は、ExM後の軸上の膨張のために視野の深さの内または外に移動した。定性的に、ExM後の測定誤差(図6C、n=4皮質薄片)は2~4%であった。

20

【 0 0 4 7 】

色の異なる三官能基標識およびオリゴヌクレオチドを合成して、多色ExMが可能になった。YFP(緑色)およびシナプス前後のスキャホールドタンパク質Bassoon(青色)およびHomer1(赤色)に対するExM標識を有するThy1-YFP-Hマウス皮質のExM前(図6D)対ExM後(図6E)の画像を得た。ExM前の画像において、BassoonおよびHomer1染色は、それぞれのシナプスで重複するスポットを形成するが(図6F)、ExM後の画像(Fig. 6G)は、明確に区別できるシナプス前後の標識を示す。ExMにより測定した際のBassoonとHomer1スキャホールドの間の距離を定量した。シナプス間隙に垂直な線に沿って得られたBassoonおよびHomer1の染色強度の分布(図6H、四角で囲まれた領域)は、ガウス分布に適合した(図6I)。Bassoon-Homer1の分離は $169 \pm 32.6\text{nm}$ であった(図6J、4皮質切片からn=277シナプス)。

30

【 0 0 4 8 】

高速回析限界顕微鏡上で走査された膨張試料が、測定可能な(scalable)超解像画像化を支持し得たかどうかを調べるために、 $500 \mu\text{m} \times 180 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ (免疫組織化学のための典型的な薄片厚さ)におよぶ成体Thy1-YFP-Hマウスの脳の体積を、3つの標識で画像化した(図7A; 抗GFP、緑色; 抗Homer1、赤色; 抗Bassoon、青色)。膨張係数で割ったコンフォーカルスピニングディスク顕微鏡(40x、1.15NA、水浸漬対物レンズを有する)の回析限界は、横方向に約70nmおよび軸に沿って約200nmの推定有効解像度を生じる。データセットの3D化画像を図7Aに示す。生のデータセットを拡大すると(zooming into)、ナノスケールの特徴が表れる(図7B~D)。CA1網状分子層(s1m)のサブセットのYFP発現ニューロンのボリュームレンダリングを行って、とげ状突起の形態を明らかにした(図7B)。CA1 s1mの樹状突起に焦点を当てて、後シナプスタンパク質Homer1が、前シナプス分子Bassoonと並列して(apposition)樹状突起棘の頭部に良好に局在することを観察した(図7C)。歯状回の門の苔状線維膿疱の検査により、反対の樹状突起のとげ状の突出物が該疱に陥入することが明らかになる(図7D)。したがって、ExMにより、神経回路の理解に関連のある長さの尺度を横

40

50

切るナノスケールの特徴のマルチスケール(multiscale)の画像化および視覚化が可能になる。

【0049】

好ましい態様が開示されるが、当業者は多くの他の手段を思いつき、多くの他の手段は全て、本発明の範囲内にある。上述の種々の態様のそれぞれは、多数の特徴を提供するために、他の記載される態様と組み合わされてもよい。さらに、上述の明細書は、本発明の装置および方法のいくつかの別々の態様を記載するが、本明細書に記載されているものは、本発明の原理の適用の例示に過ぎない。そのため、当業者による他の配置、方法、変更および置き換えも、本発明の範囲内にあるものとみなされ、以下の特許請求の範囲以外によって限定されるものではない。

【図1】

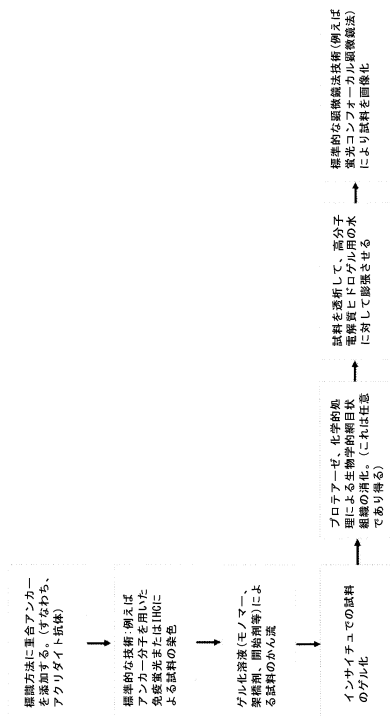


FIG. 1

【図2】

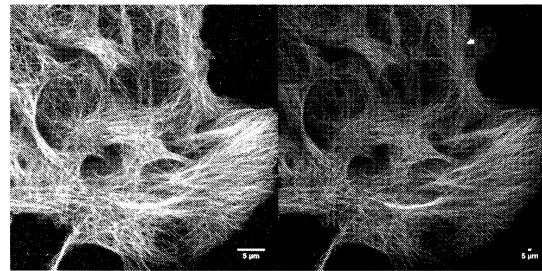


FIG. 2A

FIG. 2B

【図3】

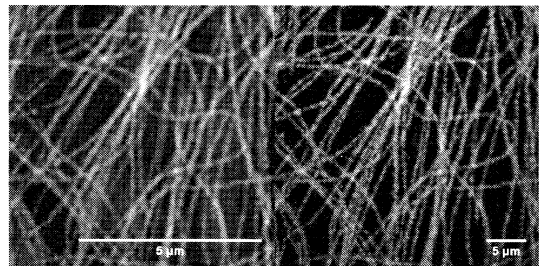
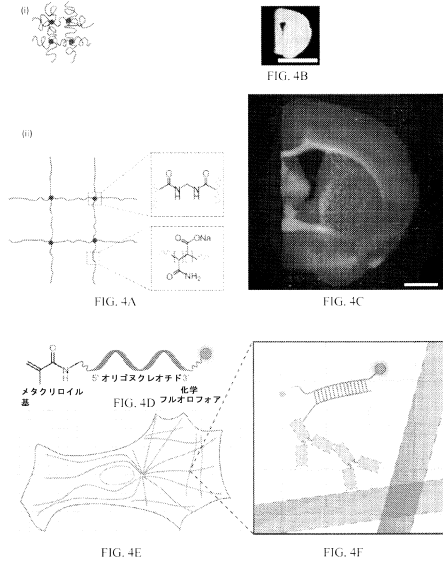


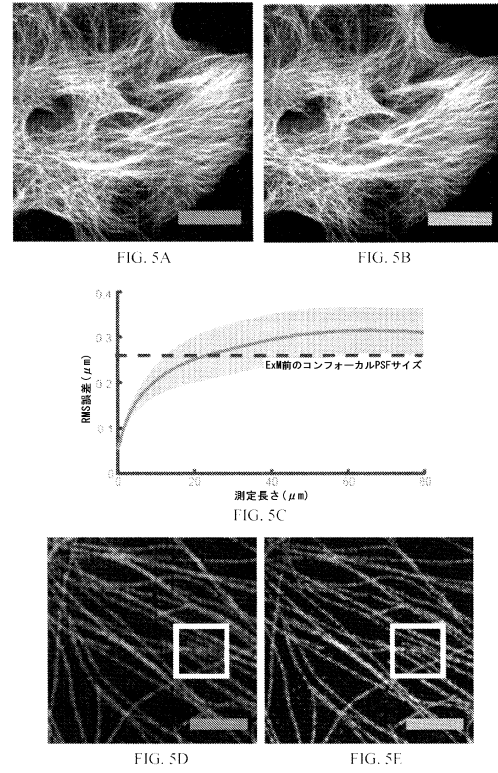
FIG. 3A

FIG. 3B

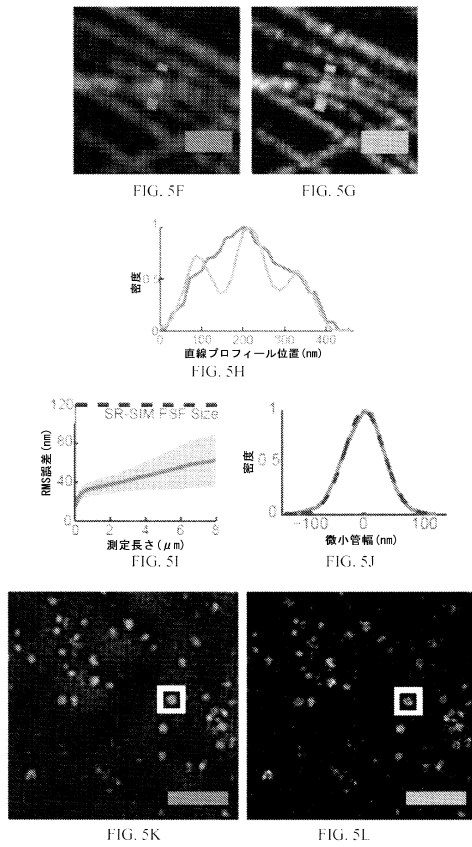
【 図 4 】



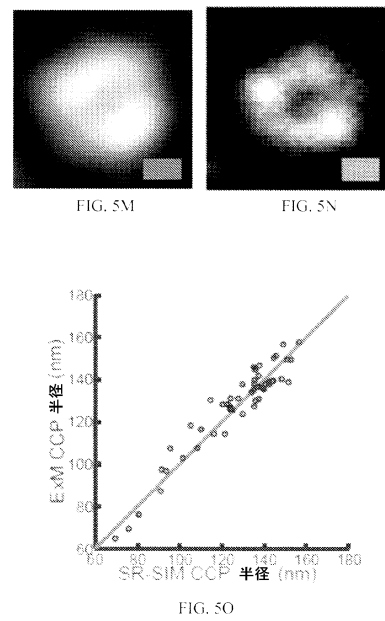
【 図 5 - 1 】



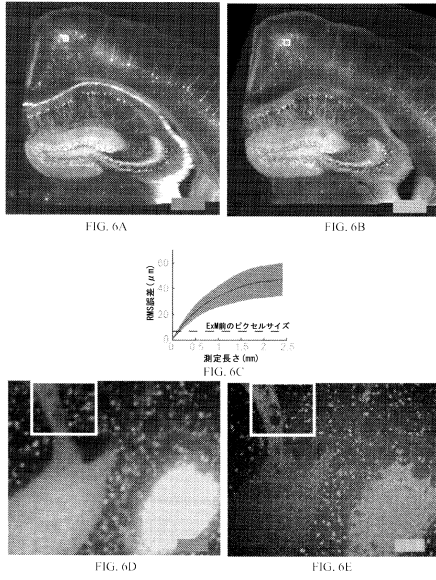
【 図 5 - 2 】



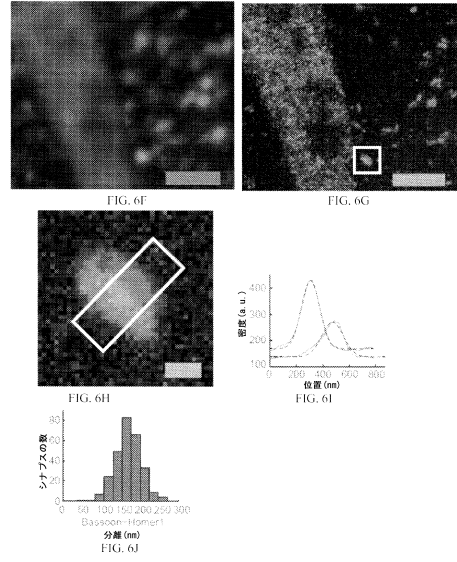
【 図 5 - 3 】



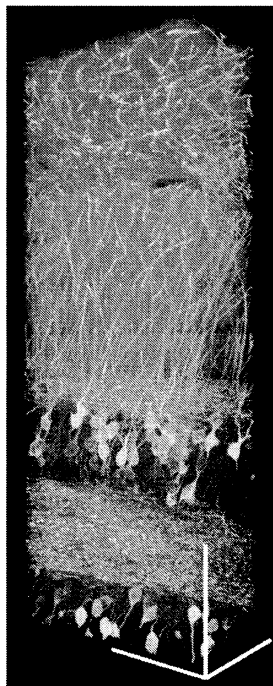
【 図 6 - 1 】



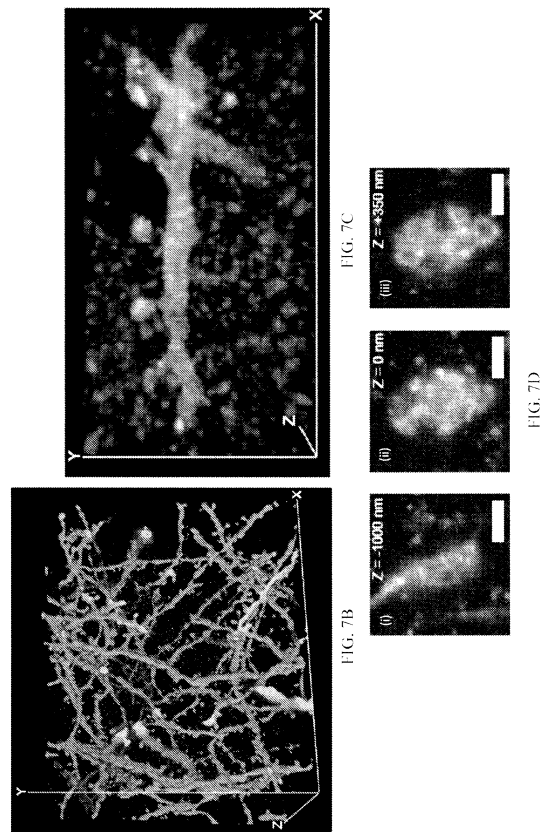
【 図 6 - 2 】



【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/04

(72)発明者 ティルバーグ, ポール, ワレン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 ケンブリッジ, ナンバー 2 1 イー, ウォズワース
ストリート 6 0

(72)発明者 ボイデン, エドワード, スチュアート
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 7 チェスナット ヒル, クリアウォーター ロード
5 7

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開 2 0 1 4 - 0 0 5 2 3 1 (J P , A)
特開 2 0 0 4 - 0 8 5 2 1 9 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 2 5 3 9 2 (W O , A 1)
米国特許第 0 6 1 0 7 0 8 1 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 3 0
G 0 1 N 3 3 / 4 8