

(19)日本国特許庁（J P）

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003－516747

(P2003－516747A)

(43)公表日 平成15年5月20日(2003.5.20)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 11/04		C 1 2 N 11/04	2 G 0 4 5
B 0 1 J 19/00		B 0 1 J 19/00	Z 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 11/08		C 1 2 N 11/08	4 B 0 3 3
11/12		11/12	4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 71数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001－544993(P2001－544993)

(86)(22)出願日 平成12年12月15日(2000.12.15)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月14日(2002.6.14)

(86)国際出願番号 PCT/US00/34010

(87)国際公開番号 W001/043869

(87)国際公開日 平成13年6月21日(2001.6.21)

(31)優先権主張番号 09/466,011

(32)優先日 平成11年12月17日(1999.12.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 バイオモザイク システムズ インコーポ
レイティド
アメリカ合衆国,カリフォルニア 94080,サ
ウス サンフランシスコ,イースト グラン
ド アベニュー 270

(72)発明者 リ, ロンガオ
アメリカ合衆国,カリフォルニア 94002,ベル
モント,コンティネンタルズ ウェイ 1
001 #309

(72)発明者 マザー, ジェニー ピー.
アメリカ合衆国,カリフォルニア 94030,ミ
ルプレー,ラ プレンダ ドライブ 269

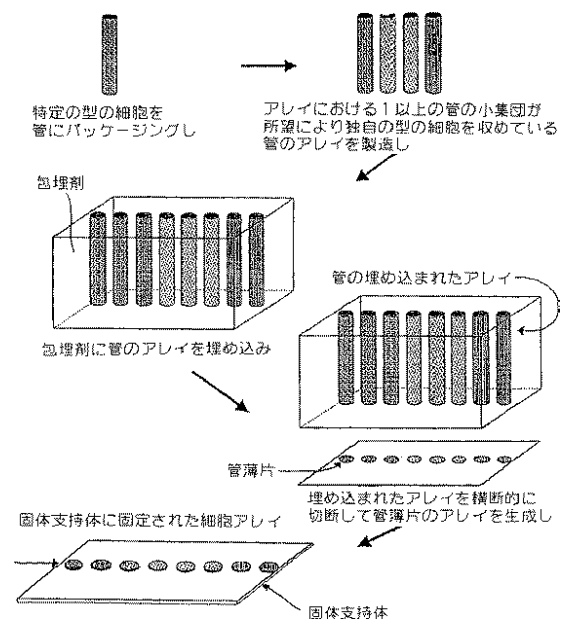
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞アレイとその使用

(57)【要約】

本発明は、細胞群を内部に固定化して収めた複数個の管を含む細胞アレイを提供する。該アレイは細胞ベースの比較解析を行ううえで特に有用である。該アレイはまた、多数の被検者に由来する多数の細胞型において標的ポリヌクレオチドの同時検出を支援する。本発明のアレイはさらに、シグナル伝達経路のモジュレーター候補の高スループットスクリーニングを可能にする。本発明はさらに、細胞ベースの比較解析を行うためのキット、コンピュータ実行方法及びシステムを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の工程を含む細胞アレイの調製法:

- (a)それぞれ1以上の内腔を備え、該内腔内に細胞群を収めた一連の管からなる管アレイを準備すること;
- (b)該管アレイを横断的に切断して、複数個の管横断薄片を得ること; 及び
- (c)該複数個の管薄片を固相支持体上に固定すること。

【請求項2】 固相支持体上に固定化された各管横断薄片が上面を露出させている請求項1の方法。

【請求項3】 各管横断薄片の長さが約0.01 μm ～約5mmの範囲である請求項1の方法。

【請求項4】 細胞群が内腔内に固定化されている請求項1の方法。

【請求項5】 1以上の内腔を備え、かつ該内腔に細胞群を収めかつ固定化している最大長さ約0.01 μm ～約5mmの範囲の管。

【請求項6】 内腔の横断面積が約0.01 mm^2 ～約5 cm^2 である請求項5の管。

【請求項7】 細胞群がマトリックス中に埋め込まれている請求項5の管。

【請求項8】 細胞群が実質的に均一である請求項5の管。

【請求項9】 細胞が真核又は原核細胞である請求項5の管。

【請求項10】 細胞が胚又は成体細胞である請求項5の管。

【請求項11】 細胞が外胚葉、内胚葉又は中胚葉起源である請求項5の管

。

【請求項12】 細胞が初代培養細胞又は確立された細胞系の細胞である請求項5の管。

【請求項13】 細胞が野生型、遺伝子組換え又は化学処理細胞である請求項5の管。

【請求項14】 管がプラスチックポリマー、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、半導体材料及び金属からなる群より選択される1以上の物質を素材とする請求項5の管。

【請求項15】 アレイの各管が特定の型の細胞群を該内腔内に収めかつ固定化している、請求項5の管を複数個含む細胞アレイ。

【請求項16】 アレイの各管が固相支持体上に固定化されている請求項15の細胞アレイ。

【請求項17】 複数個のうちの少なくとも小集団が2以上の管を含み、該小集団の各管が独自の型の細胞を収める請求項16の細胞アレイ。

【請求項18】 小集団内の管群が多数の内腔を備え、小集団内の管の各内腔が小集団の管群の他の内腔に収められた他の諸々の細胞群とは異なる独自の細胞群を収める請求項17の細胞アレイ。

【請求項19】 小集団内の管群が多数の内腔を備え、小集団内の管の各内腔が同じ管の他の内腔に収められた他の諸々の細胞群とは異なる独自の細胞群を収める請求項17の細胞アレイ。

【請求項20】 細胞群がマトリックス中に埋め込まれている請求項16の管。

【請求項21】 アレイ内の少なくとも1個の管が複数の内腔を備える請求項16の細胞アレイ。

【請求項22】 アレイの各管の素材がプラスチックポリマー、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、半導体材料、金属、又はそれらの任意の組合せである請求項16の細胞アレイ。

【請求項23】 各管が同型の細胞を10個以上収める請求項16の細胞アレイ。

【請求項24】 各管が同型の細胞を100個以上収める請求項16の細胞アレイ。

【請求項25】 アレイ内の1以上の管が対照細胞を収める請求項16の細胞アレイ。

【請求項26】 固相支持体の素材がプラスチックポリマー、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、半導体材料、金属、又はそれらの任意の組合せである請求項16の細胞アレイ。

【請求項27】 小集団内の異なる管に収める細胞が遺伝子型特性、由来種、発生段階、発生起源、由来組織、化学処理、細胞周期の時点及び病状からなる群より選択される1以上の特性を異にする請求項17の細胞アレイ。

【請求項28】 小集団内の異なる管に収める細胞がヒト、マウス、ラット、ミバエ、蠕虫、酵母菌及び細菌からなる群より選択される由来種を異にする請求項27の細胞アレイ。

【請求項29】 小集団内の異なる管に収める細胞が内胚葉、中胚葉及び外胚葉起源から選択される発生起源を異にする請求項27の細胞アレイ。

【請求項30】 小集団内の異なる管に収める細胞が、血液、筋肉、神経、脳、心臓、肺臓、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、毛髪、皮膚、骨、乳房、子宮、膀胱、脊髄、及び種々の体液から選択される、由来組織を異にする請求項27の細胞アレイ。

【請求項31】 細胞アレイが胚細胞アレイ、成体細胞アレイ、初代培養細胞アレイ、細胞系アレイ、組織アレイ、哺乳類細胞アレイ、雑多アレイ、個人細胞アレイ、遺伝子組換え細胞アレイ、化学処理細胞アレイ又は疾病細胞アレイである請求項17の細胞アレイ。

【請求項32】 細胞アレイががん細胞アレイである請求項17の細胞アレイ。

【請求項33】 管の少なくとも小集団が横断薄片の上面を露出させており、またアレイの細胞中に含まれるポリヌクレオチドが所望により変性処理されている請求項17の細胞アレイ。

【請求項34】 次の工程を含む、タンパク質性プローブと多数の細胞型における標的タンパク質とが関与する特異的タンパク質－タンパク質相互作用の存在を同時に検出する方法：

- (a) 請求項33の細胞アレイを準備すること；
- (b) 安定なプローブ－標的複合体を生成するに足る条件の下で、該管アレイに、標的タンパク質に対して特異的なタンパク質性プローブを接触させること；及び
- (c) 各管における安定なプローブ－標的複合体の形成を検出し、もって多数の細胞型における特異的タンパク質－タンパク質複合体の存在を検出すること。

【請求項35】 タンパク質性プローブが抗体、細胞表面受容体、受容体リガンド、免疫リポソーム、免疫毒素、サイトゾルタンパク質、分泌タンパク質、核内タンパク質、及びそれらの機能性モチーフからなる群より選択される請求項

34の方法。

【請求項36】 標的タンパク質が膜タンパク質、サイトゾルタンパク質、分泌タンパク質、核内タンパク質、又はシャペロンタンパク質である請求項34の方法。

【請求項37】 膜タンパク質が細胞表面抗原である請求項36の方法。

【請求項38】 標的タンパク質が管アレイに収めた1以上の細胞型において差別的に発現する請求項34の方法。

【請求項39】 プローブが酵素、放射性部分及び発光部分からなる群より選択される検出可能標識と結合している請求項34の方法。

【請求項40】 次の工程を含む、抗体の細胞型結合選択性を検定する方法：

- (a) 請求項33の細胞アレイを準備すること；
- (b) 該アレイを、抗体－抗原複合体の形成に有利な条件の下で、抗体と接触させること；及び
- (c) 該アレイ内の各管における、該抗体の細胞結合選択性を表わす免疫染色パターンを示す抗体－抗原複合体の形成を検出すること。

【請求項41】 次の工程を含む、2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的タンパク質の差別的発現を検出する方法：

- (a) 第1被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第1細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な抗体で染色すること；
- (b) 第1被検者の多数の細胞型における該標的の差別的発現を表わす第1免疫染色パターンを示す染色を第1アレイの各管から検出すること；
- (c) 第2被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第2細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な抗体で染色すること；
- (d) 第2被検者の多数の細胞型における該標的の差別的発現を表わす第2免疫染色パターンを示す染色を第2アレイの各管から検出すること；及び
- (e) 両免疫染色パターンを比較し、もって両被検者の多数の細胞型における標的タンパク質の差別的発現を検出すること。

【請求項42】 第1及び第2細胞アレイが同じアレイである請求項41の方法

。

【請求項43】 第1及び第2細胞アレイが異なるアレイである請求項41の方法。

【請求項44】 次の工程を含む、2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差別的発現を検出する方法：

- (a) 第1被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第1細胞アレイを該標的ポリヌクレオチドに対応するヌクレオチドプローブと、安定なプローブ-標的複合体を形成するに足る条件の下でハイブリダイズさせること；
- (b) 第1被検者の多数の細胞型における該ポリヌクレオチドの差別的発現を表わすハイブリダイゼーションパターンを示すプローブ-標的複合体の形成を第1アレイの各管から検出すること；
- (c) 第2被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第2細胞アレイを該標的ポリヌクレオチドに対応するヌクレオチドプローブと、安定なプローブ-標的複合体を形成するに足る条件の下でハイブリダイズさせること；
- (d) 第2被検者の多数の細胞型における該ポリヌクレオチドの差別的発現を表わすハイブリダイゼーションパターンを示すプローブ-標識複合体の形成を第2アレイの各管から検出すること；及び
- (e) 両ハイブリダイゼーションパターンを比較し、もって両被検者の多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差別的発現を検出すること。

【請求項45】 第1及び第2細胞アレイが同じアレイである請求項44の方法。

【請求項46】 第1及び第2細胞アレイが異なるアレイである請求項44の方法。

【請求項47】 ヌクレオチドプローブが酵素、放射性部分及び発光部分からなる群より選択される検出可能標識と結合している請求項44の方法。

【請求項48】 ヌクレオチドプローブがDNA又はRNAである請求項44の方法。

【請求項49】 次の工程を含む、多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差別的発現を検出する方法：

- (a) 請求項33のアレイを準備すること；
- (b) 安定なプローブ標的複合体を生成するに足る条件の下で、該アレイに、標的ポリヌクレオチドに対応するヌクレオチドプローブを接触させること；及び
- (c) 該アレイの各管における、多数の細胞型における該ポリヌクレオチドの差異的発現を表わすハイブリダイゼーションパターンを示す安定なプローブ標的複合体の形成を検出すること。

【請求項50】 ヌクレオチドプローブが酵素、放射性部分及び発光部分からなる群より選択される検出可能標識と結合している請求項49の方法。

【請求項51】 標的ポリヌクレオチドがDNA又はRNAである請求項44の方法。

【請求項52】 次の工程を含む、シグナル伝達経路のモジュレーターを同定する方法：

- (a) 管の少なくとも小集団が検出可能なシグナル伝達情報を生成する1以上のレポーター分子を発現する細胞を収める、請求項33の細胞アレイを準備すること；
- (b) 該アレイを候補モジュレーターと接触させること；及び
- (c) シグナル伝達情報の変化の有無を検定し、もってシグナル伝達経路のモジュレーターを同定すること。

【請求項53】 多数の細胞型における標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの存在を同時に検出するための、適切にパッケージした請求項33の細胞アレイを含むキット。

【請求項54】 2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの、細胞アレイ上のハイブリダイゼーションパターンの差異によって示される差異的発現を検出するためのコンピュータ利用システムであって、次の工程を含むシステム：

- (a) 参照ハイブリダイゼーションパターンと試験ハイブリダイゼーションパターンとを含むデータ保存装置であって、該参照ハイブリダイゼーションパターンは該標的ポリヌクレオチドに対応する標識ヌクレオチドプローブを、参照被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイとハイブリダイズすることによって生成され、該試験ハイブリダイゼーションパターンは該標的ポ

リヌクレオチドに対応する標識ヌクレオチドプローブを、試験被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイとハイブリダイズすることによって生成されることを特徴とするデータ保存装置；

(b) 工程(a)のデータ保存装置の試験ハイブリダイゼーションパターンを参照ハイブリダイゼーションパターンと比較して、両ハイブリダイゼーションパターンの差異を検出するための探索装置；及び

(c) 工程(b)の両ハイブリダイゼーションパターンの差異を獲得するための検索装置。

【請求項55】 2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的タンパク質の差異的発現を、細胞管アレイ上の免疫染色パターンの差異に基づいて検出するためのコンピュータ利用システムであって、次の工程を含むシステム：

(a) 参照免疫染色パターンと試験免疫染色パターンとを含むデータ保存装置であって、該参照免疫染色パターンは参照被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な標識抗体で染色することによって生成され、該試験免疫染色パターンは試験被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な標識抗体で染色することによって生成されることを特徴とするデータ保存装置；

(b) 工程(a)のデータ保存装置の試験免疫染色パターンを参照免疫染色パターンと比較して、両免疫染色パターンの差異を検出するための探索装置；及び

(c) 工程(b)の両免疫染色パターンの差異を獲得するための検索装置。

【請求項56】 多数の細胞型における標的タンパク質の差異的発現を、免疫染色パターンの差異に基づいて検出するためのコンピュータ実行方法であって、次の工程を含む方法：

(a) 多数の細胞型における標的タンパク質の発現パターンを表わす免疫染色パターンを含むデータベースを準備すること、その場合、各免疫染色パターンは請求項33の細胞アレイを該標的に対して特異的な標識抗体で染色する工程により、様々な染色強度レベルの検出可能な抗体－標的複合体を形成させることにより生成すること；

- (b)2以上の免疫染色パターンを比較用に受け取ること；
- (c)選択された免疫染色パターンの差異を検出すること；及び
- (d)該検出の結果を表示すること。

【請求項57】 多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差異的発現を、ハイブリダイゼーションパターンの差異に基づいて検出するためのコンピュータ実行方法であって、次の工程を含む方法：

- (a)多数の細胞型におけるポリヌクレオチドの発現パターンを表わすハイブリダイゼーションパターンを含むデータベースを準備すること、その場合、各ハイブリダイゼーションパターンは請求項33の細胞アレイを該ポリヌクレオチドに対して特異的な標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズする工程により、様々なハイブリダイゼーション強度レベルの検出可能な標的-プローブ複合体を形成させることにより生成すること；
- (b)2以上のハイブリダイゼーションパターンを比較用に受け取ること；
- (c)選択されたハイブリダイゼーションパターンの差異を検出すること；及び
- (d)該検出の結果を表示すること。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

関連出願

本願は、1999年12月17日に出願された米国出願第09/466,011号の優先権を主張する。同出願は参照指示によりその全体が本書に組み込まれる。

【0002】

技術分野

本発明は細胞生物学の分野に関する。特に、本発明は多数の細胞型を含む細胞アレイの生成に関する。その種のアレイは同一型及び同一継代の細胞を含む多数の試験ユニットの生成に使用することができる。本発明に具体化される組成物と方法は、示差遺伝子発現パターン及びタンパク質-タンパク質相互作用パターンの速やかな同定並びにシグナル伝達経路モジュレーター候補物質の高スループットスクリーニングに特に有用である。

【0003】

発明の背景

もはや時間の問題となっている全ヒト・ゲノム配列解析の完了は遺伝子配列、ゲノム構造及び編成に関する大量の情報をもたらすであろう。多数のモデル生物のゲノム配列が解明されれば、これらのデータの生物学的重要性を探る研究への新たな道がさらに切り開かれよう。次の目標は、この膨大な遺伝子データを疾病の予測、診断及び治療に利用することである。特に、異種生物細胞間の、同種生物の異種細胞型間の、又は同一細胞の異種病理段階間の、差別的遺伝子発現パターンを識別可能にする方法が求められる。多種多様な外部刺激に応じた細胞生理学的な一時的変化の記録と関連付けのための追加的方法も求められる。この種の方法は「機能的ゲノム学」と呼ばれるが、その狙いは任意の時点における細胞の表現型とその遺伝子型との関係を解明することである。

【0004】

任意の細胞型の表現形質に寄与する遺伝子型特性の解明は今日までのところきわめて困難な作業となっている。特定の細胞型に固有の遺伝子又は遺伝子産物を同定するための在来アプローチは、単一又は少数の特定の遺伝子配列を対象に、

細胞型を1つずつ分析するものであり、総じて制約が大きい。これは主に、多数の細胞系又は培養細胞型の維持には大変な費用と人手を要するためである。最近開発された技術、たとえばマイクロパターン化アレイ (WO 97/45730) やマイクロ流体アレイは細胞ベースの比較分析を可能にする貴重な手段となるが、限界も著しい。これらの技術は、性質が実験ごとに一定であるという保証のない生きた細胞を使用するため、培養施設又は継代の異なる細胞に付随する固有のバラツキが必然的に実験に持ち込まれてしまう。細胞の遺伝子型、表現型どちらの性質も *in vitro* 培養では時間と共に変化する可能性があることは技術上周知の問題である。

【0005】

したがって、不統一性を最小限に抑えた細胞ベースの比較分析を行うための装置と方法が大いに求められている。理想の装置は、(a) 多数の細胞型の細胞活性を同時に調べることに及び (b) 多数の細胞型の同一バッチの細胞を多数回の実験で試験し、もって細胞条件のバラツキを最小限に抑えること可能にするであろうし、また最後に (c) 治療標的及び／又は治療剤の候補を選別する高スループットスクリーニングを費用効果的にサポートしなければならない。本発明はこれらの必要性を満たし、また関連の利点をもたらす。

【0006】

発明の要約

本発明の主要な側面は、多様な細胞型を含む小型化細胞アレイの多数のコピーの生成を可能にする技術の設計である。この細胞アレイ生産技術は多数の細胞型を必要のたびに培養するという手間と費用のかかる方法を簡便化する。この技術は多数回の生物学的検定法、又は異なる場所の異なる施設で行われる検定法が以前の検定で用いられたものと本質的に同じ性質をもつ細胞を対象に実施されることを可能にし、もってバッチ、継代培養、及び出所となる研究施設や預託機関の異なる細胞を扱う場合にしばしば直面する検定時の細胞条件のバラツキを最小限に抑える。

【0007】

そこで、本発明は次の工程を含む細胞アレイの調製法を提供する： (a) それぞ

れ1以上の内腔を備え、該内腔内に細胞群を収めた一連の管からなる管アレイを準備すること、(b)該管アレイを横断薄片に切断して、複数個の管横断薄片を得ること、及び(c)該複数個の管横断薄片を固相支持体上に固定すること。

【0008】

本発明はまた、最大長約0.01 μm ～約5mmの管を提供する。該管は1以上の内腔を備え、該内腔内に細胞群を収め固定化してある。同態様の一側面において、管の横断面積は約0.01 mm^2 ～5 cm^2 である。他の側面において、管はプラスチックポリマー、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、半導体材料及び金属からなる群より選択される1以上の物質を素材とする。さらに別の側面において、管はマトリックス中に埋め込まれた細胞群を収める。該マトリックスはメトセルロース、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン、寒天、Matrix-gel（登録商標）、0CTコンパウンド及びパラフィンからなる群より選択される1以上の物質を素材とする。

【0009】

同態様の別の側面において、管に収めた細胞群は実質的に均一である。細胞は生きた細胞でも死んだ細胞でも、真核細胞でも原核細胞でも、胚細胞でも成体細胞でも、外胚葉、内胚葉、中胚葉いずれに由来する細胞でもよい。管に詰める細胞は新たに単離した細胞でも、初代又は二次培養の培養細胞でも、安定細胞系の細胞でもよい。さらに、細胞は野生型でも、遺伝子組換え細胞でも、化学処理細胞でもよい。

【0010】

本発明はさらに、本発明に具体化される複数個の管を含む細胞アレイを提供する。同態様の一側面において、細胞アレイの各管は固相支持体上に固定化される。細胞管がその上に配列される固相支持体は軟質でも硬質でもよい。好ましくは、固相支持体の素材はプラスチックポリマー、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、半導体材料、金属、又はそれらの任意の組合せである。好ましい細胞アレイは横断切片の上表面を露出させた2個以上の管を含む。随意に、細胞管に収めたポリヌクレオチドは変性処理してある。

【0011】

別の側面において、細胞アレイ上の管の少なくとも小集団は独自の型の細胞を収める。小集団内の管群は多数の内腔を備え、小集団内の管の各内腔は該小集団内の管群の他の内腔に収められた他の諸々の細胞群とは異なる独自の細胞群を収める場合もあろう。あるいは、小集団内の管群は多数の内腔を備え、小集団内の管の各内腔は同じ管の他の内腔に収められた他の諸々の細胞群とは異なる独自の細胞群を収める場合もあろう。細胞アレイの各管は同じ型の細胞を10個以上、好ましくは同じ型の細胞を100個収めることになる。細胞アレイは随意に対照細胞管を含んでもよい。

【0012】

同態様の別の側面において、管の小集団内の管に収める細胞は遺伝子型特性、由来種、発生段階、発生起源、由来組織、細胞周期の時点、化学処理及び病状からなる群より選択される1以上の特性が異なる。由来種はヒト、マウス、ラット、ミバエ、蠕虫、酵母菌及び細菌からなる群より選択されるが、細胞の好ましい由来組織は血液、筋肉、神経、脳、心臓、肺臓、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、毛髪、皮膚、骨、乳房、子宮、膀胱、脊髄、又は種々の体液である。細胞アレイの小集団の管に収める細胞は胚及び成体段階を含めた発生段階、並びに内胚葉、中胚葉及び外胚葉起源などのような発生起源が異なる場合もある。したがって、本発明の細胞アレイは胚細胞アレイ、成体細胞アレイ、初代培養細胞アレイ、細胞系アレイ、組織アレイ、哺乳類細胞アレイ、雑多アレイ (Zoo array)、個人細胞アレイ、遺伝子組換え細胞アレイ、化学処理細胞アレイ及び病気細胞アレイを包含する。好ましい病気細胞アレイはがん細胞アレイである。

【0013】

本発明はまた、前記細胞アレイの使用法を提供する。一態様では、本発明はタンパク質性プローブと多数の細胞型における標的タンパク質とが関与する特異的タンパク質-タンパク質相互作用の存在を同時に検出する方法を提供する。該方法は次の工程を含む: (a) 主題の細胞アレイを準備すること、(b) 安定なプローブ-標的複合体を生成するに足る条件の下で、該管アレイに、標的タンパク質に対して特異的なタンパク質性プローブを接触させること、及び(c) 各管における

安定なプローブ標的複合体の形成を検出し、もって多数の細胞型における特異的タンパク質-タンパク質複合体の存在を検出すること。この検定法に使用できるタンパク質性プローブの例は、抗体、細胞表面受容体、分泌タンパク質、受容体リガンド、免疫リポソーム、免疫毒素、サイトゾルタンパク質、核内タンパク質、及びそれらの機能性モチーフなどである。検出されることになる標的タンパク質の例は、膜タンパク質、分泌タンパク質、サイトゾルタンパク質、核内タンパク質、及びシャペロンタンパク質などである。ある種の側面において、標的タンパク質は管アレイに収めた1以上の細胞型において差異的に発現する。

【0014】

別の態様において、本発明は細胞アレイを使用して抗体の細胞型結合選択性を検定する方法を提供する。

【0015】

さらに別の態様において、本発明は2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的タンパク質の差異的発現を検出する方法を提供する。該方法は次の工程を含む：(a) 第1被検者に由来する多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第1細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な抗体で染色すること、(b) 第1被検者に由来する多数の細胞型における該標的の差異的発現を表わす第1免疫染色パターンを示す染色を第1アレイの各管から検出すること、(c) 第2被検者に由来する多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第2細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な抗体で染色すること、(d) 第2被検者に由来する多数の細胞型における該標的の差異的発現を表わす第2免疫染色パターンを示す染色を第2アレイの各管から検出すること、及び(e) 両免疫染色パターンを比較し、もって両被検者に由来する多数の細胞型における標的タンパク質の差異的発現を検出すること。

【0016】

さらに別の態様において、本発明は多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差異的表現を検出する方法を提供する。

【0017】

さらに別の態様において、本発明は2以上の被検者に由来する多数の細胞型に

における標的ポリヌクレオチドの差別的表現を検出する方法を提供する。

【0018】

さらになお別の態様において、本発明はシグナル伝達経路のモジュレーターを同定する方法を提供する。該方法は次の工程を含む：(a)前述の要領で細胞アレイを準備するが、その場合に該アレイ上の管の少なくとも小集団に、検出可能なシグナル伝達情報を生成するような1以上のレポーター分子を発現する細胞を収めるようにすること、(b)該アレイを候補モジュレーターと接触させること、及び(c)シグナル伝達情報の変化の有無を検定し、もってシグナル伝達経路のモジュレーターを同定すること。

【0019】

さらに、本発明は多数の細胞型における標的ポリヌクレオチド又はタンパク質の差別的発現を検出するためのコンピュータ実行方法を包含する。本発明はまた、2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチド又はタンパク質の差別的発現を検出するためのコンピュータ利用システムを包含する。さらに、本発明は多数の細胞型における標的ポリヌクレオチド又はポリペプチドの存在を同時に検出するための主題細胞アレイを含むキットを提供する。

【0020】

発明の態様

本書は、出所を明記した引用により種々の出版物、特許及び公開特許明細書に言及している。これらの出版物、特許及び公開特許明細書の内容は、本発明に関わる最新技術をさらに十分に説明する意味で、参照指示により本書に組み込まれる。

【0021】

用語の意味

本発明の実施では、特に断らない限り、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミックス及び組換えDNAの公知技術を採用することになろう。たとえばSambrook、Fritsch及びManiatis「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL」2版(1989)；「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」[F.M. Ausubel 他編(1987)]；「シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Pre

ss, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH」[M.J. MacPharson, B.D. Hames及びG.R. Taylor編 (1995)]; Harlow及びLane編 (1988)「ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL」; 及び「ANIMAL CELL CULTURE」[R.I. Freshney編 (1987)]を参照。

【0022】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」は互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はその類縁物質のいかなるものを問わずヌクレオチド類の任意の長さの重合体をいう。ポリヌクレオチドは任意の立体構造をとってよいし、また既知、未知を問わず任意の機能を果たしてよい。ポリヌクレオチドを非限定的に例示すると次のとおりである: 遺伝子又は遺伝子断片のコード又は非コード領域、連鎖解析から確定される遺伝子座、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、枝分れポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、核酸プローブ、及びプライマー。ポリヌクレオチドはメチル化ヌクレオチドやヌクレオチド類縁物質などのような修飾ヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチド構造に対する修飾が存在する場合、それは重合体の形成前、後いずれの修飾でもよい。ヌクレオチド配列は非ヌクレオチド成分で中断されてもよい。ポリヌクレオチドは重合後に、たとえば標識成分との結合によるさらなる修飾を受けてもよい。

【0023】

「ヌクレオチドプローブ」は、それと対応する標識ポリヌクレオチドをハイブリダイゼーション反応で検出又は同定するために使用されるポリヌクレオチドをいう。

【0024】

「作動可能に連結された」又は「有効に連結された」は、そのように表現される成分がその所期の機能を果たせるような関係に並置されていることを意味する。たとえば、プロモーター配列がコード配列と作動可能に連結された状態にあるというのは、該プロモーター配列が該コード配列の転写を促進する場合である。

【0025】

「遺伝子」は、転写及び翻訳処理後の特定のタンパク質をコードすることがで

きるオープンリーディングフレームを1以上含むポリヌクレオチドをいう。

【0026】

「特異的発生起源の遺伝子」は、諸々の発生段階ではなく特定の発生段階で発現する遺伝子をいう。たとえば、遺伝子はその発現段階に応じて胚起源又は成体起源となろう。

【0027】

細胞は、それぞれ3種の胚葉すなわち外胚葉、内胚葉又は中胚葉に由来する場合には「外胚葉」起源、「内胚葉」起源又は「中胚葉」起源という。外胚葉は外側の胚葉であり、表皮と神経系の細胞を生み出す。内胚葉は内側の胚葉であり、消化管とその付随器官、たとえば膵臓や肝臓の内壁を生み出す。中胚葉は中間の胚葉であり、いくつかの器官(心臓、腎臓、生殖腺など)、結合組織(骨、筋肉、腱など)、及び血液細胞を生成する。

【0028】

「疾病関連の」遺伝子又はポリヌクレオチドは、病気に冒された組織に由来する細胞中で、病気に冒されていない対照の組織又は細胞と比較して異常なレベルで、又は異常な形で転写又は翻訳産物を産生する遺伝子又はポリヌクレオチドをいう。それは、発現レベルが異常に高くなる遺伝子の場合もあれば、発現レベルが異常に低くなる遺伝子の場合もあり、そうした発現レベルの変化は病気の発生や進行と相関する。疾病関連の遺伝子はまた、直接の病因となる又は病因遺伝子と連鎖不均衡の関係にある、突然変異又は遺伝的変異をもつ遺伝子をもいう。その転写又は翻訳産物は既知でも未知でもよいし、また正常レベルでも異常レベルでもよい。

【0029】

異なるポリヌクレオチドは、その一方が最終的に他方に由来する場合には、互いに「対応する」という。たとえば、同じ二本鎖配列を構成するセンス鎖はアンチセンス鎖と対応する。mRNA (遺伝子転写物ともいう)はその転写元の遺伝子と対応する。cDNAは、逆転写反応により又はRNA配列に基づくDNAの化学合成により生み出される際の起源となるRNAと対応する。cDNAは、該RNAをコードする遺伝子とも対応する。ポリヌクレオチドは、標的配列と最適にアラインメントされた状

態で相当の配列相同性を共有する連続配列部分を含む場合でさえも、標的ポリヌクレオチドに対応すると言われることがある。

【0030】

「発現」は本書では、ポリヌクレオチドがmRNAへと転写される過程及び／又は転写されたmRNA（転写物ともいう）がその後にペプチド、ポリペプチド又はタンパク質へと翻訳される過程をいう。転写物とコード化ポリペプチドは一括して「遺伝子産物」という。該ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合には、真核細胞中でのmRNAのスプライシングも発現に含まれよう。

【0031】

「差異的に発現した」は、被検者中のヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に対して適用するときは、対照で検出される発現と比較した場合の該配列の過剰発現又は過少発現をいう。過少発現は特定配列の発現の不存在を含むが、それは対照と比較した場合の試験被検者における検出可能発現の不存在によって裏付けられる。

【0032】

「差異的发現」又は「差異的表現」は遺伝子産物の存在度又は発現パターンの変質をいう。「発現パターン」の変質は組織分布の変化又は本発明のアレイ上に認められるハイブリダイゼーションパターンの変化によって示されよう。

【0033】

用語「ハイブリダイズする」はポリヌクレオチドに対して適用される場合には、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体をポリヌクレオチドが形成しうることを意味する。水素結合は、ワトソン・クリック型塩基対合、フーグステーン結合により、又は他の配列特異的な仕方で起ころう。該複合体は、二本鎖構造を形成する2本鎖、多鎖複合体を形成する3本鎖以上、自己ハイブリダイズする1本鎖、又はそれらの任意の組合せを含むであろう。ハイブリダイゼーション反応はもっと大きな過程、たとえばPCR反応の開始又はリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断の一工程であってもよい。

【0034】

ハイブリダイゼーションは種々の「ストリンジェンシー」条件下で行うことが

できる。関連条件は温度、イオン強度、インキュベーション時間、反応混合物中の追加的溶質、たとえば、ホルムアミドの存在及び洗浄方法などである。高ストリンジェンシー条件はより高い温度とより低いナトリウムイオン濃度などのような条件であり、そこでは安定なハイブリダイゼーション複合体を形成するためにハイブリダイゼーション要素間の相補性の下限をより高くすることが要求される。一般に、低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション反応は約40℃、10 x SSCで、又は当価イオン強度／温度の溶液中で行われる。中ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは一般に約50℃、6 x SSCで、また高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは一般に約60℃、1 x SSCでそれぞれ行われる。

【0035】

2本の一本鎖ポリヌクレオチド間でハイブリダイゼーションが逆行的に起こるとき、その反応は「アニーリング」といい、それらのポリヌクレオチドは「相補的」であるという。二本鎖ポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドに対して「相補的」又は「相同的」であると言えるのは、最初のポリヌクレオチドと二番目のポリヌクレオチドの一方の鎖との間でハイブリダイゼーションが起こりうる場合である。「相補性」又は「相同性」(あるポリヌクレオチドが他のポリヌクレオチドと相補的である度合い)は、一般的な塩基対合則に従って互いに水素結合することが見込まれる対向鎖中の塩基の比率で定量化することができる。

【0036】

「in situハイブリダイゼーション」は、形態学的に保存された染色体、細胞又は組織切片中で特定のポリヌクレオチド配列の検出を可能にする周知の技術である。in situハイブリダイゼーションと免疫化学を組み合わせると、DNA、mRNA及びタンパク質のレベルで顕微鏡的位相情報を遺伝子活性に関連付けることができる。

【0037】

「シグナル伝達」は、刺激又は抑制シグナルが細胞中に又は細胞内で伝達され細胞内応答を導き出す過程である。「シグナル伝達経路のモジュレーター」は同じ特定のシグナル伝達経路に位置付けられる1以上の細胞タンパク質の活性を調節する化合物をいう。モジュレーターはシグナル伝達分子の活性を増進又は抑制

する。

【0038】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は本書では互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸重合体をいう。重合体は線状重合体でも枝分れ重合体でもよいし、修飾アミノ酸を含んでもよいし、また非アミノ酸を介在させてもよい。これらの用語は、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は他の任意の操作たとえば標識成分の付加などのような修飾を受けたアミノ酸重合体をも包含する。「アミノ酸」は本書ではグリシンとD型、L型の両光学異性体を含めた天然アミノ酸及び／又は非天然又は合成アミノ酸、それにアミノ酸類縁物質及びペプチド模倣体をいう。

【0039】

「リガンド」は受容体のリガンド結合ドメインと結合しうる分子をいう。該分子は化学的に合成されることもあれば、天然に存在することもある。「リガンド」は受容体の生物活性を刺激することができる「アゴニスト」でも、受容体の生物活性を阻害する「アンタゴニスト」でもよい。

【0040】

「タンパク質性プローブ」は、標的タンパク質と特異的に結合して安定な標的-プローブ複合体を形成することにより、標的タンパク質を同定するポリペプチド含有分子をいう。代表的なタンパク質性プローブは、非限定的に例示すると、それぞれの細胞標的と特異的に相互作用する抗体、免疫リポソーム、及び免疫毒素である。

【0041】

「細胞表面受容体」又は「表面抗原」は細胞形質膜上に固定された分子をいう。それらはタンパク質、糖タンパク質、多糖類及び脂質の大ファミリーを構成し、形質膜の構造的成分としてだけでなく種々の生物学的機能を支配する調節要素としても機能する。

【0042】

「膜タンパク質」は本書では、形質膜と細胞内オルガネラ膜を含めた任意の細胞膜に結合する表在性及び内在性膜ポリペプチドを包含する。

【0043】

細胞タンパク質に適用される用語「サイトゾル(の)」、「核内(の)」及び「分泌(される)」は、該細胞タンパク質が局在する細胞外及び／又は亜細胞位置を指示する。ある種のタンパク質は、細胞のサイトゾルと核の間を行き来することができる「シャペロン」である。

【0044】

用語「OCTコンパウンド」は冷凍薄片の切断と取扱いを容易にする化合物をいう。組織化学分野の専門家に広く知られ使用されている包埋剤である。一般に、Lab-Tek Instruments Co.(Westmont, IL)製品などのような市販OCTコンパウンドには3つの使用温度帯、すなわち、 $-10^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}\sim-35^{\circ}\text{C}$ 、 $-35^{\circ}\text{C}\sim-50^{\circ}\text{C}$ に合わせた3タイプがある[詳しくは「Animal Tissue Techniques」G.L. Humason (1967), W.H. Freeman & Company, pp. 68-69を参照]。

【0045】

用語「機能性モチーフ」は本発明のタンパク質性プローブに適用される場合には、プローブのうち、該機能性モチーフの結合相手となる細胞標的を特異的に検出するに足る部分をいう。したがって、抗体の機能性モチーフは同等の標的結合特異性を示す抗体断片を包含する。同様に、免疫リポソームの機能性モチーフは標的結合特異性を維持する免疫リポソーム成分を包含する。

【0046】

「データベース」は若干の共通の特性を共有するデータの集合である。たとえば、ハイブリダイゼーション・データベースはヌクレオチドプローブを主題細胞アレイと接触させることによって生成されるハイブリダイゼーションパターンの集合である。同様に、免疫染色データベースは特定の抗体を主題細胞アレイと接触させることによって生成される免疫染色パターンを含む。

【0047】

「ルミネセンス」は温度の上昇を伴わない物質からの光の放出を指す慣用語である。一般に原子又は分子は「励起状態」から低エネルギー状態(通常、基底状態)に移るとき電磁エネルギー(たとえば光など)の光子を放出する。この過程はしばしば「放射性崩壊」という。いろいろな励起原因がある。励起原因が光子

ならば、このルミネセンス過程は「光ルミネセンス」という。励起原因が電子ならば「エレクトロルミネセンス」という。もっと正確に言えばエレクトロルミネセンスは電子の直接的な注入と除去による電子－正孔対の形成とそれに続く電子－正孔対の再結合による光子の放出に由来する。

【0048】

化学反応に由来するルミネセンスは通常、「ケミルミネセンス」という。生物によって生み出されるルミネセンスは通常、「生物ルミネセンス」という。光ルミネセンスがスピン許容遷移(たとえば一重項－一重項遷移、三重項－三重項遷移など)の結果であれば、その光ルミネセンス過程は通常、「蛍光」という。一般に蛍光発光は、そうしたスピン許容遷移を通じて急速に緩和する短寿命の励起状態であるため、励起原因が除去された後は持続しない。光ルミネセンスがスピン禁制遷移(たとえば一重項－三重項遷移など)の結果であれば、その光ルミネセンス過程は通常、「リン光」という。一般にリン光発光はそうしたスピン禁制遷移だけを通じて緩和する長寿命の励起状態であるため、励起原因が除去された後も長く持続する。「発光標識」は以上説明した性質のうち任意の1つをもつことになる。

【0049】

「抗原」は本書では、抗体又はその断片により、あるいはT細胞抗原受容体により、特異的に認識、結合される物質を意味する。抗原にはペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖類及び脂質、それらの部分及び組合せなどが含まれる。抗原は天然物質でも合成物質でもよい。また、細胞表面上に存在してもよいし、細胞内部に位置してもよい。

【0050】

「被検者」は本書では、発現された遺伝物質をもつ生物学的存在をいう。該生物学的存在は好ましくは脊椎動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはヒトであり、in vivoで得られた、又はin vitroで培養された生物学的存在の組織、細胞及びそれらの子孫も包含される。

【0051】

「対照」は比較目的の検定で使用される代替被検者又は試料である。「対照」

は「正」でも「負」でもよい。たとえば、着目しているある病気に冒された細胞又は組織中で差異的に発現した転写物又はポリペプチドの検出が検定の目的であれば、正の対照(そうした差異的発現と該疾病に特有の症候群を示す被検者又は被検者由来の試料)及び負の対照(該差異的発現と該疾病の臨床的な症候群を示さない被検者又は被検者由来の試料)を使用するのが一般に好ましい。

【0052】

「管」は本書では、本発明の細胞アレイの細胞パッケージング、保存及び調製に好適な、1以上の内腔を備えた容器をいう。この用語は多様なサイズ、形状及び容量の諸々の管状体、そうした管状体の横断薄片を包摂する。管はその製造材料と製造方法に関する限定を一切受けないものとする。管は管壁とほぼ平行な縦軸及び管の横断切片を薄切りにする際の横軸をもつ。縦軸は横軸と同じ長さでもよいし、又は横軸より長くても短くてもよい。管の横断切片もまた形状と長さ(「高さ」、「厚さ」ともいう)が多様であろう。管は両端又は一端が開放端でもよいし、閉鎖端でもよい。また、管の内腔は複数でもよい。

【0053】

細胞は管の1以上の内腔内に収納、「固定化」されて、細胞の移動度が管壁により、及び／又は好ましくはその中に細胞が埋め込まれる固定化マトリックスにより制限される。

【0054】

本発明の細胞アレイの構造

本発明の主要な側面は、多数の細胞型における標的ポリヌクレオチド又はタンパク質の同時検出を可能にする小型化細胞アレイの設計である。先行技術の非包埋型細胞アレイとは異なり、本発明の細胞アレイは多数の管を含み、各管は特定型の細胞群を収めた1以上の内腔を備える。一側面において、管は最大長さが約0.01 μm ～5mm、好ましくは約0.1 μm ～1mm、もっと好ましくは約1 μm ～0.1mmである。別の側面において、管は固相支持体上に固定化される。好ましい態様では、管アレイの小集団が2以上の管を含み、該小集団の各管は独自型の細胞を収める。別の好ましい態様では、該小集団の管が複数の内腔を備え、該小集団内の管の各内腔は該小集団全体の管の他の内腔に収められた他の諸々の細胞群とは異なる

独自の細胞群を収める。さらに別の好ましい態様では、該小集団の管が複数の内腔を備え、該小集団内の管の各内腔は同じ管の他の内腔に収められた他の諸々の細胞群とは異なる独自の細胞群を収める。

【0055】

上述の性質を1以上備える細胞アレイの設計にはいくつかのポイントがある。第1に、細胞を収める管は固相支持体の表面に安定に結合された状態にする。「安定に結合された」とは、所望の型の細胞を収める管薄片が、ハイブリダイゼーションや免疫染色を含むがそれだけに限らない後続の細胞ベースの解析に際し、その固相支持体に対する相対的な位置を維持することを意味する。

【0056】

細胞アレイ設計の第2のポイントは、同一アレイの多数のコピーをいつでも確実に生成しうるようにすることである。これは、まず細胞懸濁液を管に詰め、次いで管を横断的に薄切りにして同一バッチに由来する同一型の細胞を収めた管の横断薄片を作ることによって実現することができる。したがって、本発明の管は分割可能でなければならない。管は任意の好都合な形状、長さ、サイズに製造してよいが、一般にその横断面積の範囲は約 $0.1\text{mm}^2 \sim 5\text{cm}^2$ である。管の横断面形状は円、楕円、卵形、四角形、三角形、多角形でも、又は他の任意の、似たような曲線形状でもよい。各管薄片の横断面のサイズや形状もまた多様であろう。

【0057】

細胞アレイの設計のもう1つのポイントは、アレイの各管が実質的に均一な同一型の細胞群を含むことである。「実質的に均一な」細胞群とは、目的の細胞型が全細胞数の約75%超を占める細胞混合物をいう。この全細胞数に占める所望細胞の割合は好ましくは80%超、さらに好ましくは90%超、さらになお好ましくは95%超である。アレイ上の細胞の型は細胞アレイの所期目的次第である。たとえば、種々の生物におけるある遺伝子又は遺伝子産物の差異的発現を調べるのが目的であれば、アレイ上の各管は検定対象となる個別の生物を代表する細胞を含むことになる。

【0058】

検定生物から単離される任意の細胞はそれが初代培養又は細胞株としてin vit

ro培養されるものであれ、その生物の種々の組織から単離されるものであれ、ある共通の特性を共有し、したがって同一型とみなされるため、単一管内に固定化することができる。ある特定遺伝子又は遺伝子産物の組織分布パターンを調べるのが目的であれば、各管は検定対象となる単一組織に由来する細胞を含むことになる。細胞アレイの所期目的次第で、細胞は由来種、発生起源、由来組織、化学処理及び／又は細胞周期の時点などを含むがそれだけに限らない若干の共通の特性を共有すれば同一型とみなされよう。

【0059】

管内腔内の細胞は同一型でなければならないが、細胞アレイ中の管の少なくとも小集団が独自の管を含み、各独自の管が独自の細胞型を代表するようにしてもよい。

【0060】

「独自の」細胞型は本書では、着目の管の全体又は小集団によって代表される他のすべての細胞型とは別個の又は異なる細胞型である。たとえば、細胞アレイは多数の管を含み、各管が他の諸々の管に収められた細胞とは異なる独自の型の細胞を含むであろう。別の例では、細胞アレイは多数の内腔を供えた管を含み、各内腔が同一管の他の諸々の内腔に収められた細胞型とは異なる独自の型の細胞を収める。独自の型の細胞はつぎのうち1以上の特性によって区別することができる：遺伝子型、由来種、発生段階、発生起源、由来組織、細胞周期の時点、化学処理、及び病状。

【0061】

独自の型の細胞を収める管の割合は一般にアレイの他の管全体の約25%以上、好ましくは約50%以上、より好ましくは約75%以上、より好ましくは約80%以上、さらにもっと好ましくは約90%以上である。したがって本発明の細胞アレイは多様な独自の型のアレイを包含する。代表的なアレイ型は雑多アレイ、哺乳類細胞アレイ、ヒト・アレイ、組織アレイ、初代培養細胞アレイ、細胞系アレイ、胚細胞アレイ、成体細胞アレイ、異常細胞アレイ、遺伝子組換え細胞アレイ、化学処理細胞アレイなどである。これらの各例示アレイについて以下詳述する。

【0062】

本発明の「雑多アレイ (Zoo array)」は多数の細胞の独自の管を含み、各管は別個の生物に対応する。そうした生物の例は動植物界のメンバー、及びウィルス、細菌、原生動物、酵母菌などのような微生物である。「雑多アレイ」には単細胞生物、多細胞生物いずれの細胞を含めてもよい。好ましくは「雑多アレイ」はヒト細胞を含む。より好ましくはマウス、ラット、ミバエ、蠕虫、細菌、トウモロコシ、稲などを含むがそれだけに限らないモデル生物の細胞を含む。

【0063】

「哺乳類細胞アレイ」は複数個の独自の管を含み、各管は別個の哺乳類に由来する細胞を収める。哺乳類の非限定的な例は霊長類(チンパンジー、ヒトなど)、クジラ目(クジラ、イルカなど)、翼手類(コウモリなど)、奇蹄目(ウマ、サイなど)、げっ歯類(ラットなど)及びある種の食虫類動物(トガリネズミ、モグラ、ハリネズミなど)である。「ヒト・アレイ」はこの哺乳類細胞アレイの一変種であり、アレイの大多数の独自の管は多様な型のヒト細胞を収める。

【0064】

本発明に具体化される「組織アレイ」は複数個の独自の管を含み、各管は被検者に由来する特定の体組織を代表する細胞群を収める。体組織の例は血液、筋肉、神経、脳、心臓、肺臓、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、毛髪、皮膚、骨、乳房、子宮、膀胱、脊髄、及び各種体液などであるが、それだけに限らない。体液は非限定的に例示すると尿、血液、髄液、滑液、含アンモニア液、脳脊髄液(CSF)、精液、唾液などである。

【0065】

生物の異なる発生段階(胚又は成体)に対応した、特に外胚葉、内胚葉、中胚葉などを含む種々の発生起源に対応した細胞を収めた管を含む細胞アレイもまた本発明に具体化される。

【0066】

さらに、本発明が提供する細胞アレイには、新たに単離した細胞を収めた管からなる細胞アレイ、複数の初代培養に由来する細胞を収めた管からなる細胞アレイ(すなわち、初代培養細胞アレイ)、又は初代培養の拡大及び／又はクローニングで生成される継代培養に由来する細胞を収めた管からなる細胞アレイ(すなわ

ち細胞系アレイ)も含まれる。本発明のこの型の細胞アレイの調製には、培養で増殖しうる任意の細胞を使用することができる。今日培養で増殖させうる固有細胞型は非限定的に例示すると繊維芽細胞などのような結合組織単位、骨格組織(骨と軟骨)細胞、上皮組織(肝臓、肺臓、乳房、皮膚、膀胱及び腎臓などの)細胞、心筋及び平滑筋細胞、神経(グリアとニューロン)細胞、内分泌腺(副腎、下垂体、膵島)細胞、メラニン細胞及び多種類の造血細胞などである。特に重要なのは、病原遺伝子を差異的に発現(過剰発現又は過少発現)する型の細胞である。当業者には自明であるが、私的又は公的な保管機関から種々の細胞系を入手することができる。最大の保管機関は膨大な数の生物及び組織試料に由来する特性解明された細胞系の多様なコレクションを用意しているAmerican Type Culture Collection (<http://www.atcc.org>)である。

【0067】

本発明に具体化される細胞アレイのもう1つの種類は「個人細胞アレイ」であり、これは一家族に属する諸個人又は同家系内の種々の世代にまたがる諸個人に由来する細胞を収めた独自の管を含む。この型の細胞アレイは法医学及び親子鑑定に特に有用である。

【0068】

本発明の細胞アレイのさらにもう1つの型は、多数の独自の細胞管を含み、各管が特定の疾病又は特定の病期に関連する細胞型を代表するような細胞アレイ(すなわち疾病細胞アレイ)である。特定の疾病又は病期との関連は、細胞周期調節、細胞分化、アポトーシス、走化性、細胞運動及び細胞骨格再編成などのような1以上の生物学的過程における該細胞の異常な振る舞いによって確定されよう。疾病細胞は、着目の疾病を引き起こす病原(AIDSのHIVやB型肝炎のHBVなど)の存在によっても確認されよう。特定の細胞型の異常機能を伴う疾病には自己免疫疾患、がん、肥満症、高血圧症、糖尿病、神経及び／又は筋変性症、心疾患、内分泌障害、及びそれらの任意の組合せが含まれよう。

【0069】

本発明の細胞アレイの型としては他に「遺伝子組換え」又は「化学処理」細胞を収めた管を含むものがある。細胞が野生型細胞との比較で「遺伝子組換え」細

胞となるのは有糸分裂又は減数分裂によることなく遺伝的要素が該細胞中に外部から導入されたときである。該要素は該細胞にとって異種でもよいし、該細胞中にすでに存在している要素の追加コピー又は改良版でもよい。遺伝子組換えはたとえば、エレクトロポレーション、ウィルス感染、リン酸カルシウム法、又はポリヌクレオチド-リポソーム複合体との接触などのような技術上周知の方法により組換えプラスミド又は他のポリヌクレオチド送達手段を細胞に導入することによって実施されよう。遺伝子組換え細胞という場合、この用語は本源的組換え細胞とその子孫の両方を指す。好ましい組換え細胞はドラッグスクリーニング、細胞経路の解明、及び／又は抗体選別を行うためのレポーター遺伝子を含む細胞である。

【0070】

化学処理細胞アレイは細胞の独自の管を含み、各管は個別の化学物質で、又は化学物質の特定の組合せで、処理してある。「化学物質」は本書では、有機又は無機の単純又は複合体分子、ペプチド、タンパク質(抗体など)、ポリヌクレオチド(アンチセンス・オリゴヌクレオチドなど)、リボザイム及びその誘導体などのような生物学的又は化学的化合物を非限定的に含むものとする。多様な化合物たとえばポリペプチドやポリヌクレオチドなどのような重合体、及び種々の骨格構造をベースにした合成有機化合物が合成可能であるが、これらもまた「化学物質」に含まれる。さらに、種々の天然源からもスクリーニング用化合物たとえば植物性又は動物性抽出物などが得られる。

【0071】

必要なら、本発明の細胞アレイは比較目的の対照を正、負の区別なく含む。適切な対照細胞の選択は、当初に選択される試料細胞及び／又は検査対象の遺伝子又は遺伝子産物の発現パターン次第である。ある種の対照細胞は細胞アレイの見当付けと位置決めのための位置マーカーとなる。管自体又は管内の細胞が検出可能マーカーを含んでもよい。該マーカーは発色染料、発光分子、放射性分子、又は密度又は不透明度マーカーでもよい。これらのマーカーを含む位置決め用対照は、細胞アレイの検定結果を読み取り、検出システムからのデータを保存するための、アレイの位置決め特に有用である。それらの対照はまた、自動検出シス

テムにアレイをセットするために、及び／又は検出システムを校正するための、又は1個の細胞アレイから得られたデータを他アレイへと正規化するための内部標準を与えるために、使用されよう。

【0072】

対照プローブもまた、ヌクレオチドプローブであれタンパク質性プローブであれ、次の3種類に区分されよう：(a)正規化対照、(b)発現レベル対照、及び(c)ミスマッチ対照。

【0073】

正規化対照は、in situハイブリダイゼーション又は免疫染色反応時に、特定反応のシグナルをアレイ間で、また同一アレイの異なる領域間で変動させかねないハイブリダイゼーション又は染色条件、標識強度、「読取り」効率又はその他因子の変動に関する対照としてのシグナルを生成する。好ましい態様では、アレイ内の他の諸々のプローブからのシグナル(蛍光強度など)の読みを対照プローブからのシグナル(蛍光強度など)で割ることによって、測定値を正規化する。一般に、正規化ヌクレオチド対照は、それぞれの標的ポリヌクレオチドに対して完全に相補的な配列を含む。ほぼどのようなプローブでも正規化対照として役立つ。しかし、ハイブリダイゼーション効率は塩基組成やプローブ長によって異なることがわかっている。好ましい正規化プローブはアレイ内に存在する他プローブの平均長を反映するように選択する。しかし、ある範囲の長さをカバーするように選択することもできる。正規化対照はまた、アレイ内の他プローブの塩基組成を反映するように選択することもできる。好適なタンパク質性プローブは、至る所で発現する細胞タンパク質に結合するプローブであろう。

【0074】

発現レベル対照は細胞アレイ内で構成的発現遺伝子又は遺伝子産物と特異的にハイブリダイズする又は結合するプローブである。発現レベル対照は、細胞の一般的な健康状態及び代謝活性に関して対照機能を果たすよう設計される。発現レベル対照の発現レベルの、標的ポリヌクレオチド又はそのタンパク質産物の発現レベルとの共分散を調べると、ある遺伝子の発現レベルの実測変化又は偏差が転写又は翻訳速度の変化に起因するのか、それとも細胞の健康状態の変異に起因す

るのが読み取れる。したがって、たとえばある細胞が健康を害しているか又は重要な代謝産物を欠いているとき、作動中の標的遺伝子と構成的発現遺伝子の両方の発現レベルが低下するものと見込まれる。逆もまた真である。したがって、発現レベル対照と標的遺伝子又は遺伝子産物の両方の発現レベルが共に低下するか又は共に上昇するように見受けられる場合には、その変化は問題の標的遺伝子又は遺伝子産物の差別的発現ではなく細胞全体としての代謝活性の変異に起因するといえよう。逆に、この標的遺伝子と発現レベル対照の発現レベルが共分散しない場合には、該標的遺伝子の発現レベルの偏差は細胞の代謝活性の全般的変異ではなく該遺伝子の調節の差異に起因する。

【0075】

任意の構成的発現遺伝子とその産物は発現レベル対照プローブの適当な候補となる。一般に、発現レベル対照プローブは構成的に発現する「ハウスキーピングタンパク質」をコードする配列をもつ。そうしたタンパク質には β -アクチン、トランスフェリン受容体、GAPDHなどがあるが、それだけに限らない。

【0076】

ミスマッチプローブは、該プローブの対象となる標的以外の、アレイ上の他の細胞によって提示されるポリヌクレオチドとの非特異的結合又はハイブリダイゼーションに関する対照となる。したがって、ミスマッチプローブはハイブリダイゼーションが特異的であるかどうかを示してくれる。たとえば、標的が存在する場合にはパーフェクトマッチプローブのほうがミスマッチプローブよりも一貫して明るはずである。一般に、ミスマッチプローブは1以上のミスマッチ塩基をもつ以外は、その対応する標的ポリヌクレオチドと同じである。ミスマッチの選択は、然るべきハイブリダイゼーション条件(たとえばストリンジェントな条件)下で試験プローブ又は対照プローブならその標的配列とハイブリダイズするもののミスマッチプローブのほうはハイブリダイズしない(又はハイブリダイズする頻度がずっと低い)と期待されるように行う。一般に(最適アラインメントの下での)20%以下の塩基対ミスマッチは許容しうる。

【0077】

主題細胞アレイの調製

本発明の細胞アレイは、複数個の固定化された細胞の管を生み出すような任意の手段によって調製することができる。細胞アレイ調製法の設計にはいくつかのポイントがある。第1に、大規模、高スループットの細胞ベース検定法に好適な細胞アレイを生産する方法でなければならない。第2に、同一バッチの、好ましくは別個の型の細胞を固定化したアレイの多数コピーの生産を可能にする方法でなければならない。したがって、主題細胞アレイの調製法は同一バッチの細胞の繰り返しの分析をサポートし、また一連の実験中に多数の型の新しいバッチの細胞がその都度要求される場合に不可避免的に持ち込まれるようなバラツキを防ぐ。主題の細胞マイクロアレイの好ましい調製法は次の工程を含む：(a)それぞれ1以上の内腔を備え、該内腔内に細胞群を収めた一連の管からなる管アレイを準備すること、(b)該管アレイを横断薄片に切断して、複数個の管横断薄片を得ること、及び(c)該複数個の管横断薄片を固相支持体上に固定すること。

【0078】

主題アレイを構成する管の選択：

主題の細胞アレイを構成する管は、細胞を好ましくはその内部に固定化して収めた1以上の内腔を備える。本発明には、多数の内腔を備え、そのうちのいくつか又はすべての内腔に同一型又は個別型の細胞を詰めた管もまた包含される。内腔は多様な構成をとってよい。たとえば、細胞容器内の内腔は直線状の壁で仕切って別個の隣接区画を形成するようにしてもよいし、また環状の壁で仕切って内側と外側の環状区画を形成するようにしてもよい。

【0079】

主題アレイの管はサイズ、形状、容量が様々であってもよいが、分割可能な材料を素材とし、管の横断薄片を調製しうるようにしなければならない。好ましくは、管の素材はまたin situハイブリダイゼーション又は免疫検定に際して低レベルの非特異的活性を示す。主題管の製造には多様な材料が適する。それには次のような多様なプラスチックポリマーが含まれる：ポリアミド(PA)、ポリイミド(PI)、ポリアクリロニトリル(PAN)、ポリブチレン(PB)、ポリブタジエン(PBD)、ポリカプロラクタム(PCL)、ポリエチレン(PE)、ポリクロロトリフルオロエチレン(PCTFE)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリジメチルシロキサン

(PDMS)、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリイソブチレン(PIB)、ポリスチレン(PS)、ポリオレフィン(PO)、高分子量ポリイソシアネート (PPI)、ポリ塩化ビニル(PVC)、ポリ塩化ビニリデン(PVDC)、ポリフッ化ビニル(PVF)、アクリロニトリル-アクリロイド-スチレン(AAS)、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン(ABS)、及びアクリロニトリル-クロリゼートエチレン-スチレン(ACS)、それにBiogenera Advanced Fiber Technology社(<http://www.biogenera.com/>)市販の他の好適なポリマー。マイクロ容器の製造に有用な他の材料としてナイロン、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、金属、及び半導体材料(シリコンやゲルマニウムなど)のような膜性材料がある。

【0080】

主題の細胞充填管は分割可能でなければならないが、管の薄片はサイズ、形状、厚さ及び容量が様々でもよい。好ましい管は横断面積が約 $0.01\text{mm}^2 \sim 5\text{cm}^2$ のマイクロチューブである。該横断面積は好ましくは約 $0.01\text{mm}^2 \sim 0.5\text{cm}^2$ であり、より好ましくは約 $0.1\text{mm}^2 \sim 5\text{mm}^2$ であり、さらにもっと好ましくは約 $0.1\text{mm}^2 \sim 0.5\text{mm}^2$ である。本発明の細胞アレイの調製には任意の長さのマイクロチューブを使用することができるが、それは均一な同心度と不変の直径をもつものが好ましい。

【0081】

細胞のパッケージング:

管アレイの調製は一般に、特定の型の細胞をアレイの個別管に充填する作業から進める。これにより、各管には特定の型の細胞群が封入される。細胞群の選択は細胞アレイの所期目的に大きく左右される。管に充填される細胞の量は一般に、所期の細胞ベース検定法に必要とされる断面積当たり細胞数に規定される。平均的な存在度の細胞タンパク質を免疫染色法で検出するには、各薄片は約 1×10^5 個/ $\text{cm}^2 \sim 5 \times 10^6$ 個/ cm^2 の細胞を収める。したがって、断面積が約 $0.3\text{mm}^2 \sim 3\text{mm}^2$ のマイクロチューブの場合、細胞充填密度は約 $10^6 \sim 10^9$ 個/ cm^3 、好ましくは約 $10^7 \sim 4 \times 10^8$ 個/ cm^3 、さらにもっと好ましくは約 $3 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 個/ cm^3 である。

【0082】

細胞を管中に固定化するには、密なペレットを形成するように細胞を詰めれば

よい。あるいは細胞を固定化マトリックスなどのような粘性物質と一緒に充填してもよい。種々のマトリックスが技術上使用可能であり寒天、Methocell（登録商標）、Matrix-gel（登録商標）、OCTコンパウンド、パラフィン、変性又は非変性コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、及びそれらの混合物はその一例である。当業者は細胞固定化用として好適な他のマトリックスについて知見をもつであろうし、あるいは過度の実験にまつまでもなくそうした物質を突き止めることができる。

【0083】

本発明の若干の態様では、細胞の生存能を維持するために固定化マトリックスを細胞培地の栄養物又は他成分で補うことができる。原核及び真核細胞の生存を左右する一般的なパラメーターは技術上周知である。in vitroで調節することができる生理化学的パラメーターはpH、CO₂、温度、容量オスモル濃度などである。細胞の栄養所要量は通常、最適環境を提供するために開発された標準培地配合物から供給される。栄養物はアミノ酸とその誘導体、炭水化物、糖、脂肪酸、複合脂質、核酸誘導体及びビタミンなど、いくつかの種類に分けられる。ほとんどの細胞は細胞の代謝を維持するための栄養物とは別に、次のうち1以上の群に由来する1以上のホルモンを個体維持又は増殖のために必要とする：ステロイド、プロスタグランジン、成長因子、下垂体ホルモン、及びペプチドホルモン[Sato, G.H.他「Growth of Cells in Hormonally Defined Media」, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982; Ham及びWallace (1979)「Meth. Enz.」58:44; Barnes及びSato (1980)「Anal. Biochem.」102:255; Mather, J.P.及びRoberts, P.E. (1998)「Introduction to Cell and Tissue Culture」, Plenum Press, New York]。

【0084】

栄養所要量、細胞の生存に最適の培地条件に関する大量の情報が得られる以上、当業者は前述の方法及び組成物のうち任意のものを単独で又は組み合わせて使用すれば所望の細胞型を収めた管アレイを容易に生み出すことができる。必要ならば、細胞充填管を後の使用に備えて低温(たとえば-80°C)で保存してもよい。一般に、「凍結解凍」時の細胞の損傷を防ぐために適正濃度のDMSO、グリセリン、

スクロースなどのような凍結保存剤を細胞に加える。

【0085】

管アレイの調製:

充填済みの管は薄切りして薄片にする前に、好都合なパターンにまとめて、一群の横断薄片の配置が格子、円、楕円、卵形又は他の類似の曲線形状を形成するようにする。一群の管は、それらの相対位置がアレイを正しい向きに置くのに役立つような形態にまとめることができる。管の総数は、細胞アレイとして展示しようとする独自の細胞型の数や主題アレイの具体的な用途に応じて決まる対照細胞型の数に応じて変化しよう。一般に、細胞アレイ上のパターンは約3以上の個別の細胞型を、通常は約10以上の個別の細胞型を、もっと通常は約20以上の個別の細胞型を含む。その場合、細胞型の数は100以上としてもよいが、通常は約5,000の個別の細胞型数を超えることはないし、もっと通常は約1,000の個別の細胞型数を超えることはない。多数の態様では、各独自細胞が2~4群1組として提示されるように、したがって細胞アレイ上に各個別の細胞型に対応する2~4個の管を存在させるようにするのが好ましい。アレイ上の個々の管はその相対位置、個別の色、又は独自の検出可能標識により識別、特定することができる。

【0086】

管アレイの薄片の調製は組織化学的な標準技術によって行うことができる。要するに、充填管アレイをまず「包埋剤」と称する物質の中に埋め込む。これは硬化すると、楽に薄切りができる引き締まった物質となる。慣用の包埋剤はパラフィン、ニトロセルロース、接着剤、(変性又は非変性)コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ガムシロップ、OCTコンパウンド、及び各種のプラスチックポリマー配合物であるが、それだけに限らない。包埋剤はアレイを構成する各管の周囲及び間で凝固させる。パラフィン包埋では一般に管アレイを脱水処理し過剰の水又は水分を除去してから包埋処理する。一般に、この脱水処理は増加する濃度の脱水剤、たとえば、アルコールなどに浸して行う。次いで、付着した脱水剤を包埋処理の直前に清浄剤で除去する。慣用の清浄剤はベンゼン、クロロホルム、トルエン、キシロール、ジオキサン、及び各種オイルの混合物である。

【0087】

包埋管アレイの薄切りは技術上周知の多様な切断器を用いて行うことができる。代表的な切断器は厚さ約1~100 μm の切片作成用の標準マイクロトーム、厚さ1 μm 未満の切片作成用ウルトラマイクロトーム及び凍結切片用のクライオスタットマイクロトームである。管薄片の厚さ(又は長さ)は大体、調べようとする細胞表現型に規定される。細胞表面抗原の差別的発現を識別するのが目的であれば、管薄片の最小厚さ(又は長さ)は一般に1細胞層分となる。細胞の平均厚さは種々の細胞型によって異なろう。哺乳類細胞なら一般に約4~20 μm の薄片に少なくとも1細胞層が包含されよう。細胞内構造を解析するのであれば、もっと薄い1~4 μm 程度の薄片が好ましい。当業者は組織学的解析のための多様な既定プロトコールに基づいて上述の切断パラメーター、脱水及び／又は包埋手順をごく普通に変更することができる[「Animal Tissue Techniques」G.L. Humason (1967), W. H. Freeman & Company、及び次の各サイトに掲載のプロトコールを参照<http://www.gac.edu/>; <http://www.ccc.nottingham.ac.uk/>; <http://www.hei.org/>]。

【0088】

管アレイの薄切りが完了したら、管薄片を固相支持体上に固定化するが、それには薄片と固相支持体表面との安定な結合をもたらす任意の好適な技術を用いる。好ましくは、固相支持体に固定化された各薄片は上面を露出した状態にする。安定な結合とは所望型の細胞を収めた管薄片が固相支持体に対するその相対位置を、ハイブリダイゼーションや免疫染色を含むがそれだけに限らない後続の細胞ベース解析に際しても維持することを意味する。したがって、管薄片は共有結合又は非共有結合によって固相支持体に直接付着させてもよいし、支持体上に機械的に(たとえば固定手段を用いて)付着させてもよい。非共有結合の例は非特異的吸着、静電(たとえばイオン、イオン対)結合、疎水性相互作用、水素結合相互作用、支持体表面に共有結合した特異的結合対の片方による特異的結合などである。共有結合は細胞又は管素材と支持体表面上の官能基との間での化学結合の形成を伴う。該官能基は天然に存在しても、リンカーとして導入してもよい。官能基は非限定的に例示するとヒドロキシル基、アミン基、チオール基、アミド基などである。共有結合による細胞固定化法の例はUV架橋又は他の光誘導性化学結合、及び機械誘導性結合などがあるが、それだけに限らない[たとえば米国特許第5,3

24,591号; Aplin他「Analyti. Biochem.」(1981) 113:144-148; Mrkich他「Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.」(1996) 25:55-78を参照]。好ましいのは、好適な封入剤を使用して切片を固相支持体に付着させる方法である[たとえば、「Animal Tissue Techniques」G.L. Humason (1967), W.H. Freeman & Company, pp. 132~134の説明を参照]。切片の封入に役立つ方法と組成物は技術上周知であり、詳細には立ち入らない。

【0089】

管アレイを付着させる固相支持体は1以上の表面を含むが、該表面は平滑でもよいし、また実質的に平板であれば凹凸などのような不規則部があってもよい。固相支持体は実質的に不透過性でも、反応物を通すに足るような多孔性でもよい。若干の態様では、固相支持体は細胞ベース検定法で検定を受けることになる反応物又は治療薬を供給するベースチャンバーと連結される。たとえば、マイクロ流体経路網(たとえば、WO 97/45730号を参照)を固相支持体と組み合わせれば、固相支持体上に固定化された各細胞管に反応物を送達することができる。

【0090】

主題の細胞アレイの支持体は多様な材料から製造されよう。一般に、支持体の製造材料はハイブリダイゼーション又は免疫分析に際して低レベルの非特異的結合を示す。好ましい固相支持体は次のうちの1種以上の材料から製造される：プラスチックポリマー、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、半導体材料、及び金属。材料は軟質でも硬質でもよい。軟質支持体は破損することなく曲げる、たたむ、ねじるなどの操作に耐えられる。硬質支持体は剛直又は非可撓性であり、また破損しやすい。したがって、主題アレイの硬質支持体はその上に固定される管に、アレイが使用されるような検定条件の下で、特に高スループット検定条件の下で、物理的支持及び構造を十分に与えることができる。軟質支持体の製造に好適な材料の例はニトロセルロース、ナイロン又はその誘導体などのような多様な膜材料、及びプラスチックポリマー(ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、及びそれらのブレンドなど)である。硬質支持体の製造に適した材料の例はガラス、シリコンやゲルマニウムなどのような半導体材料、白金や金などのような金属であるが、それだけに限らない

。可視光及び／又は紫外光を通す固相支持体を使用するのが好ましい場合も多いであろう。

【0091】

管アレイを載せる表面は、該表面の性質を変える働きをする1種以上の化合物層で変性させてもよい。そうした変性層は、それが存在するときは、一般に厚さの範囲が単分子の厚さ～約1mm、通常は単分子の厚さ～約0.1mm、もっと通常は単分子の厚さ～0.001mmであろう。固相支持体の表面を被覆する変性層は金属、金属酸化物などからなる無機物層、又は高分子又は有機低分子からなる有機物層などを含んでよい。高分子層の例はペプチド、タンパク質、多糖類、脂質、リン脂質、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリユリア、ポリアミド、ポリエチレンアミン、ポリ硫酸アリーレン、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセテートなどの層であり、高分子自体はヘテロ、ホモいずれの重合体でよいし、また官能部分と結合していても結合していなくてもよい。好ましい変性法は、ガラススライドを3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTS)などのようなアミノシランの層で被覆する方法である。

【0092】

主題の細胞アレイを載せる固相支持体はアレイの所期用途次第で、単純なものから複雑なものにまで至る多様な形を取ってよい。したがって、支持体は全体としてスライド又はプレートの形、たとえば四角形又は円板形でもよい。多くの態様では、支持体は横断面形状が四角形で、縦が約10mm～100cm、通常は約0.1cm～10cm、もっと通常は約1cm～5cm、横が約10mm～100cm、通常は約0.1cm～10cm、もっと通常は約1cm～5cm、厚さが約0.001mm～5cm、通常は約0.01mm～1cm、もっと通常は約0.1mm～2mmであろう。

【0093】

本発明の細胞アレイの使用

主題の細胞アレイは多数の細胞型における標的ポリヌクレオチド又はタンパク質の発現を同時に検出する効果的な手段を提供する。この発現検出法は疾病組織と正常組織の間での、異なる組織型及び細胞型の間での、発生段階を異にする又は細胞周期時点を異にする細胞の間で、及び多様な環境刺激又はリードドラッグ

にさらされる細胞の間での、最適遺伝子発現の検出と定量などを含む多種多様な場面で使用されよう。したがって、主題アレイはドラッグスクリーニング、疾病診断、系統分類、親子及び法医学鑑定などの分野で広範囲の有用性をもつ。

【0094】

多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの同時検出:

本発明は一態様において、多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差異的発現を検出する方法を提供する。該方法は次の工程を含む: (a) それぞれ1以上の内腔を備え、該内腔内に細胞群を収めた一連の管からなる本発明の固定化管アレイであって、該管アレイの1以上の管に収めた細胞のポリヌクレオチドが変性処理されている本発明の固定化管アレイを準備すること、(b)該標的ポリヌクレオチドに対応するヌクレオチドプローブを該アレイに、安定的なプローブ-標的複合体を形成するに足る条件の下で接触させること、及び(c)該アレイの各管を対象に、多数の細胞型における該ポリヌクレオチドの差異的発現を表わすハイブリダイゼーションパターンを示す安定的なプローブ-標的複合体の形成を検出すること。

【0095】

本発明は別の態様において、2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差異的発現を検出する方法を提供する。該方法は次の工程を含む: (a) 第1被検者に由来する多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第1細胞アレイを該標的ポリヌクレオチドに対応するヌクレオチドプローブと、安定なプローブ-標的複合体を形成するに足る条件の下でハイブリダイズさせること、(b)第1被検者に由来する多数の細胞型における該ポリヌクレオチドの差異的発現を表わす第1ハイブリダイゼーションパターンを示すプローブ-標的複合体の形成を第1アレイの各管から検出すること、(c) 第2被検者に由来する多数の細胞型を収めた複数個の管を含んでなる請求項33の第2細胞アレイを該標的ポリヌクレオチドに対応するヌクレオチドプローブと、安定なプローブ-標的複合体を形成するに足る条件の下でハイブリダイズさせること、(d)第2被検者に由来する多数の細胞型における該ポリヌクレオチドの差異的発現を表わす第2ハイブリダイゼーションパターンを示すプローブ-標識複合体の形成を

第2アレイの各管から検出すること、及び(e)両ハイブリダイゼーションパターンを比較し、もって両被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差異的発現を検出すること。

【0096】

試験細胞中で発現する標的ポリヌクレオチドに「対応する」ヌクレオチドプローブとは本書では、核酸であって、その全配列又はその連続断片が標的ポリヌクレオチドの配列に対する実質的な配列相同性を示すような核酸をいう。一般に、実質的に相同な配列は最適アラインメントの下で約80%以上のヌクレオチド塩基同一性を、好ましくは約90%の同一性を、より好ましくは約95%の同一性を示す。配列相同性の確認にはコンピュータプログラムを用いることができる。たとえば Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>を参照)、Fasta (Computing Group Package, Madison, Wisconsin, USA)、DNA Star、MegAlign及びGeneJockeyなどは相同性探索プログラムの例である。

【0097】

全細胞固定で特定の配列を検出するためのヌクレオチドプローブを設計するには、標的配列に対して特異的でかつ試験細胞の全ゲノムに独特のプローブを選択するのが好ましい。かかる独自のプローブは最適アラインメントの下で他の任意の内在遺伝子との実質的な配列相同性を欠くため、試験細胞中の他遺伝子とクロスハイブリダイズする確率が低い。第2に、好ましいヌクレオチドプローブは最小の二次構造及び内部配列相同性を示す。プローブ内の、たとえば逆方向反復配列などに起因する広範囲の相同性はセルフハイブリダイゼーションを促進して、標的配列に対するプローブの結合を妨げる。in situハイブリダイゼーションに使用するヌクレオチドプローブは一般に最小長さが約10ヌクレオチド、より好ましくは約50ヌクレオチド、さらに好ましくは約100ヌクレオチドである。プローブの最大長さは好ましくは約10,000ヌクレオチド、より好ましくは約5000ヌクレオチド、より好ましくは約1000ヌクレオチド、さらに好ましくは約500ヌクレオチドである。標的配列のin situ検出ではRNA、DNA両分子をプローブとして用いることができる。

【0098】

ヌクレオチドプローブの調製は化学合成、組換えクローニングたとえばPCR、又はそれらの任意の組合せで行うことができる。所望のヌクレオチド配列を生成するための化学合成法及び組換え法は技術上周知であり、詳細には立ち入らない。

【0099】

細胞アレイは一般にハイブリダイゼーションに先立って、次のような前処理を受ける：(a)細胞の形態学的保存(固定)、(b)標的配列のハイブリダイゼーション又は検出を妨げるおそれのある細胞内酵素の不活性化、(c)標的との可触性を増進するための脂質膜の透過性増強及び抽出(洗剤及び／又はプロテイナーゼ処理)、及び(d)特定プローブとのハイブリダイゼーションを実施するための標的ポリヌクレオチドの変性(二本鎖の場合)。以上列挙した各処理の手順は技術上周知であり(たとえば、「Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual」Boehringer Mannheim、2版を参照)、詳細には立ち入らない。

【0100】

多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの存在に関する検定では、ハイブリダイゼーション反応により、前述のアレイ上に固定化された細胞中に含まれる標的ポリヌクレオチドとプローブとの安定な複合体を形成させる。プローブ核酸としてアンチセンス鎖が使用される場合に、アレイ中に用意する標的ポリヌクレオチドが該アンチセンス核酸と相補的であるように選択されることは、当業者には自明であろう。逆に、ヌクレオチドプローブがセンス鎖である場合には、標的ポリヌクレオチドはセンス鎖配列と相補的であるように選択される。

【0101】

本発明の実施に好適なハイブリダイゼーション条件は、プローブと標的の間の認識相互作用が十分に特異的であると同時に十分に安定であるような条件である。前述のようにハイブリダイゼーション反応は種々の「ストリンジェンシー」条件下で行うことができる。関連条件は温度、イオン強度、インキュベーション時間、反応混合物中の追加的溶質、たとえば、ホルムアミドの存在及び洗浄方法などである。高ストリンジェンシー条件はより高い温度とより低いナトリウムイオン濃度などのような条件であり、そこでは安定的なハイブリダイゼーション複合

体を形成するためにハイブリダイゼーション要素間の相補性の下限をより高くすることが要求される。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを高める条件は技術上周知である[Sambrook他 (1989), 上掲; 「Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual」Boehringer Mannheim、2版を参照]。

【0102】

一般に、ハイブリダイゼーション特異性(ストリンジェンシー)とシグナル強度はトレードオフの関係にある。好ましい態様では、ハイブリダイズしたアレイを標的-プローブ複合体の検出前に洗浄してノイズ-シグナル比を高めるようにする。一般に、ハイブリダイズしたアレイを、ストリンジェンシーを順次高めた溶液で洗浄し、洗浄のたびにシグナルを読み取る。得られたデータ集合の解析から、それを超えるとハイブリダイゼーションパターンの目に見えた変化がもはや見られなくなり、かつ着目の特定ポリヌクレオチドプローブに対応する十分なシグナルをもたらすような洗浄ストリンジェンシーが明らかになる。洗浄ストリンジェンシーのパラメーターは一般にハイブリダイゼーションストリンジェンシーのそれと同じである。ハイブリダイゼーション時の遮断試薬(精子DNA、洗剤又は他の有機・無機化学物質)の添加といった他の処置もまた非特異的結合を抑制することができる。

【0103】

ヌクレオチドプローブに検出可能な標識を結合させると、ハイブリダイゼーション検定に際して形成されるプローブ-標的複合体の検出が容易になる。本発明への使用に適した検出可能な標識は分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的又は化学的な手段による検出が可能な任意の組成物である。適切な、多種多様な検出可能な標識が技術上周知であり、それには発光標識、放射性同位体標識、酵素性又は他のリガンドなどが含まれる。好ましい態様では、蛍光標識又は酵素タグ、たとえば、ジゴキシゲニン、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、アルカリ性ホスファターゼ又はペルオキシダーゼ、アビジン/ビオチン複合体などが使用されよう。

【0104】

標識は技術上周知の多数の手段のうち任意の手段によって組み込んでよい。一

側面では、ヌクレオチドプローブ調製の増幅工程で標識を同時に組み込む。したがって、たとえば標識プライマー又は標識ヌクレオチドを使用するPCRにより、標識増幅産物を得ることができる。別の側面において、前述のように標識ヌクレオチド(たとえばフルオロセイン標識UTP及び／又はCTP、ジゴキシゲニン標識UTP)又は標識プライマーを使用する転写反応で、転写産物の核酸に検出可能な標識を組み込む。

【0105】

あるいは、もともとの核酸試料(mRNA、polyA、mRNA、cDNAなど)に直接、又は増幅完了後に増幅産物に、標識を付加してもよい。核酸に標識を付加する手段は技術上周知であり、たとえばニックトランスレーション法又は末端標識法(たとえば、標識RNAの使用による)、核酸のキナーゼ処理とそれに続く核酸リンカーの付加(ライゲーション)により試料核酸を標識(蛍光団など)に結合させる方法が含まれる。

【0106】

ハイブリダイゼーションが起きた場所の特定及び／又はハイブリダイゼーション強度の定量に使用する検出法は一般に、前述のような標識の選択次第であろう。たとえば放射性標識なら写真フィルム又は(³²P標識の検出及び定量用)ホスホイメージャーを使用して検出することになる。蛍光マーカーなら発光検出用の光センサーを使用して検出定量することができる(装置例については米国特許第5,143,854号を参照)。酵素性標識は一般に、基質に酵素を与えて、基質に対する酵素の作用によって生成される反応生成物を測定することにより検出する。最後に、比色標識は単なる発色標識の視覚化により検出する。

【0107】

しかし、ハイブリダイゼーションシグナルの長さがハイブリダイゼーション効率、標的核酸上の標識の量及び試料中の特定標識核酸の量に応じて異なることは当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションデータの評価では、それを下回るシグナルはバックグラウンドとの識別が本質的に不可能とみなされるような強度の閾値を定めることになる。さらに、然るべき対照を準備すれば、ハイブリダイゼーション条件、細胞の健康状態、非特異的結合などの偏差に関する対照

が行えるもっと詳しい解析が可能になる。

【0108】

この検出法は、ハイブリダイゼーションが起きた管の位置を局限する。ハイブリダイズした領域の位置は検出可能量の標的ポリヌクレオチドが存在している特定の細胞型と相関する。検出法はまた、ハイブリダイズした各領域におけるハイブリダイゼーション強度レベルの定量的測定値を、したがって所与の配列の存在量又は発現レベルに関する直接的な測定値もたらす。アレイ上に存在するハイブリダイゼーション領域とそれぞれの強度を示すデータの集合は、被検者に由来する多数の細胞型における標的配列の発現プロフィールを表わす「発現パターン」を構成する。種々の被検者に由来する細胞をハイブリダイズすることによって生成されるハイブリダイゼーションパターンの不一致は、これらの被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差別的表現を示す。

【0109】

一側面において、比較用のハイブリダイゼーションパターンは同一アレイ上で生成することができる。その場合には、種々のパターンの区別は独自の型の検出可能な標識により、又はアレイの多数の切片を使用し、それぞれ異なるヌクレオチドプローブとインキュベートさせることにより行う。別の側面において、比較用のハイブリダイゼーションパターンは異なるアレイ上で生成されるが、その場合にはパターンの不一致が比較対象としての被検者に由来する特定の遺伝子の差別的発現を示す。

【0110】

多数の細胞型における標的タンパク質の同時検出:

本発明は別の態様において、タンパク質性プローブと多数の細胞型における標的タンパク質とが関与する特異的タンパク質-タンパク質相互作用の存在を同時に検出する方法を提供する。該方法は次の工程を含む: (a) 固相支持体上に固定化された管に多数の細胞型を収めてなる細胞アレイを準備すること、(b) 安定的なプローブ-標的複合体を生成するに足る条件の下で、該細胞アレイに標的タンパク質に対して特異的なタンパク質性プローブを接触させること、及び(c) 各管における安定なプローブ-標的複合体の形成を検出し、もって多数の細胞型にお

ける特異的タンパク質－タンパク質複合体の存在を検出すること。

【0111】

本態様の一側面において、タンパク質－タンパク質相互作用は標的タンパク質(すなわち抗原)と該標的に対して特異的な抗体との間で起こる。別の側面において、タンパク質－タンパク質相互作用は細胞表面受容体とその対応するリガンドとの間で起こる。さらに別の側面において、タンパク質－タンパク質相互作用は細胞表面受容体と免疫リポソーム又は免疫毒素が関与する。その他の側面において、タンパク質－タンパク質相互作用にはサイトゾルタンパク質、核内タンパク質、シャペロンタンパク質、又は他の細胞内膜構造に固定されたタンパク質が関与する。本発明の方法は、抗体、受容体リガンド、分泌タンパク質、細胞表面受容体、サイトゾルタンパク質、核内タンパク質、免疫リポソーム及び免疫毒素からなる群より選択されるタンパク質性プローブを使用して多数の着目細胞型における標的タンパク質の差異的発現を識別又は確認するうえで有用である。該検出法は問題のタンパク質－タンパク質相互作用の速度論的測定にも使用されよう。速度論的測定値は抗体結合親和性、リガンド結合親和性、免疫リポソーム又は免疫毒素取込み速度、タンパク質－タンパク質複合体の形成及び解離速度を包含するが、それだけに限らない。

【0112】

相互作用反応は、プローブと標的の間での複合体の形成を可能にするような条件の下で、タンパク質性プローブを特に着目する細胞アレイと接触させることによって行う。複合体の形成は技術上周知の標準方法により直接的、又は間接的に検出することができる。直接検出法では、プローブに検出可能な標識を付加するが、未反応プローブを複合体から除去すれば、残存標識の量が複合体形成量を示すことになる。こうした方法では、ストリンジェントな洗浄条件の下でもプローブと付着した状態を保つような標識を選択するのが好ましい。しかしもっと重要なのは、標識が結合反応を妨げないことである。間接検出法では、親和性細胞化学によって検出することができるような化学的又は酵素的に導入された標識を含むプローブが必要となる。好ましい標識は一般に標的との結合又は形成される標的－プローブ複合体の安定性を妨げない。しかし、標識は通常、効果的な結合と

それによる検出可能なシグナルの生成のために、抗体と接触しうるように設計される。多種多様な標識が技術上周知である。本発明に使用することができる標識は非限定的に例示すると放射性同位体、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、及びケミルミネセンス化合物などである。

【0113】

結合反応で形成されるプローブ標的複合体の量は標準定量検定法で定量することができる。前述のように、プローブ標的複合体の形成は結合部位の残存標識量によって直接測定することができる。あるいは、標的タンパク質について標識付けした類縁物質との特異的プローブ上の結合部位をめぐる競合力を試験する。この競合検定法では、標識捕獲量は試験細胞群中に存在する標的タンパク質の量に反比例する。

【0114】

主題の細胞アレイを使用するin situ解析の重要な一応用例は、特に着目する標的タンパク質の組織及び／又は細胞内局在性の検定である。特定の型の組織及び細胞の凍結切片を1つずつ調べるという在来アプローチと違って、本発明の方法は多数の細胞型を収めた小型化アレイ上の標的細胞の同時検出を可能にするため、在来法の大幅な簡略化になる。

【0115】

標的タンパク質の差異的発現に関する組織アレイの検定では、選択された細胞と反応することが判明している対照プローブを含めるのが好ましい。標的タンパク質の細胞内局在を分析するには、技術上周知の標準的な細胞免疫染色法を用いることができる。細胞免疫染色法は細胞又は組織の凍結切片を対象に直接行ってもよいし、また細胞内構造を保存する固定剤で細胞を固定し、次いで細胞に透過性を付与してプローブが自由に入り込めるようにしてから行ってもよい。細胞表面抗原を調べるときは、この透過性付与工程を省くことができる。この細胞標品を標的に対して特異的な抗体などのようなプローブとインキュベートしてから、未結合抗体を洗浄除去し、結合抗体を直接検出する(一次抗体を標識する場合)か、又はもっと一般的には標識二次抗体を使用して間接的に視覚化する。標的ポリペプチドを細胞内の特定の亜細胞構造へと集中させる際には、そうした構造中に

差別的に存在する種々の抗原に対して特異的な1以上のマーカー抗体による同時染色を行うのが好ましい。

【0116】

一連のオルガネラ特異的抗体が技術上使用できる。非限定的に例示すると、細胞表面受容体Her2に対して反応性の原形質膜特異的抗体、小胞体(ER)残留タンパク質Bipに向けられるER特異的抗体、ゴルジ体特異的抗体 α -アダプチン、及び異なる細胞(たとえば上皮細胞とストロマ細胞)に由来するサイトケラチン又は異なる種内のサイトケラチンを識別するサイトケラチン特異的抗体などである。免疫特異的結合を検出、定量するには通常型又は共焦点型顕微鏡と結合したデジタル画像解析装置を使用することができる。

【0117】

特に興味深いのは、限定的な組織、細胞型又は亜細胞分布パターンを示す標的タンパク質である。このカテゴリー内では、疾病組織又は疾病細胞型において選択的に発現する細胞性標的が診断及び／又は治療面で大きな可能性を秘めている。近年、広範囲にわたる正常及びがん組織／細胞型のスクリーニングにより多数のがん細胞マーカータンパク質が同定されてきた。特性の解明が進んでいる乳がん細胞表面マーカーのHer2受容体は乳がん組織の小集団において正常組織に見られないような異常に高いレベルで発現することが判明している。乳がん細胞に選択的に結合するヒト化抗Her2抗体がすでに開発されHerceptin(登録商標)の名で市販されているが、これはHer2受容体を過剰発現する何万人もの乳がん患者の治療に、強力な効き目のある薬として使用されてきた。したがって、多種多様な細胞型を固定化した本発明の小型化細胞アレイは、望ましい細胞型結合選択性を示す抗体のスクリーニングに使用することができる。そこで本発明は主題の細胞アレイを使用して抗体の細胞型結合選択性を検定する方法を包含する。

【0118】

この標的タンパク質検出法は、タンパク質-タンパク質相互作用が起きた管の位置を局限する。相互作用が起きた管の位置は検出可能量の標的タンパク質が存在している特定の細胞型と相関する。この検出法はまた、各管内の相互作用レベル(たとえば免疫染色の強度)の定量的測定値を、したがって所与のタンパク質の

存在量又は発現レベルに関する直接的な測定値もたらす。アレイ上に存在する相互作用領域とそれぞれの強度を示すデータの集合は、被検者に由来する多数の細胞型における標的配列の発現プロフィールを表わす「免疫染色パターン」を構成する。種々の被検者に由来する免疫染色パターンの不一致は、これらの被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリペプチドの差別的表現を示す。

【0119】

一側面において、比較用の免疫染色パターンは、同一アレイの同一切片上の種々のタンパク質を同時に検出するための種々のプローブを用いて、又は同一アレイの多数の切片を用いて、それぞれ異なるプローブでインキュベートすることによって、同一アレイ上で生成することができる。その場合には、種々のパターンの区別は独自の型の検出可能な標識によって行う。別の側面において、比較用の免疫染色パターンは異なるアレイ上で生成されるが、その場合にはパターンの不一致が比較対象としての被検者に由来する特定標的タンパク質の差別的発現を示す。

【0120】

比較in situ解析(ハイブリダイゼーション、免疫検定又はそれらの組合せを含む)に用いるアレイは胚細胞アレイ、成体細胞アレイ、初代培養細胞アレイ、細胞系アレイ、組織アレイ、哺乳類細胞アレイ、雑多アレイ、遺伝子組換え細胞アレイ、化学処理細胞アレイ、又は異常細胞アレイなどであろう。こうした多様な細胞型アレイを対象に実施される比較分析は特定の発生起源の遺伝子及び遺伝子産物、たとえば、多細胞生物の胚又は成体で、外胚葉、内胚葉又は中胚葉形成期に発現する遺伝子及び遺伝子産物の同定を大いに楽にする。そうした分析はまた、特定組織の発生で重要な役目を果たすような、又は特定の疾病表現型に寄与するような、独自のクラスを形成する遺伝子及びポリペプチドの検出にも役立ちうる。さらに、これらの比較分析はシグナル伝達経路のモジュレーター候補となるような、診断及び／又は治療面に大きな可能性を秘めた化合物の効果的なスクリーニングを可能にする。

【0121】

シグナル伝達経路のモジュレーターの同定

細胞の活性は細胞内事象を刺激又は抑制する種々の外部刺激により調節される。刺激又は抑制シグナルが細胞中に又は細胞内で伝達されて細胞内応答が導き出される過程をシグナル伝達という。適正な細胞機能には適正なシグナル伝達が不可欠である。過去数十年にわたり、多数の細胞シグナル伝達分子の同定、クローニング及び特性解明が行われてきた。シグナル伝達タンパク質は非限定的に例示すると、細胞表面受容体、プロテインキナーゼ(チロシンキナーゼ、セリン／トレオニンキナーゼ又はヒスチジンキナーゼなど)、三量体Gタンパク質、サイトカイン、SH2-、SH3-、PH-、PDZ-、細胞死誘導-のドメインをもつタンパク質、それにHuman Genome Sciences Inc., Celera, the Institute for Genomic Research (TIGR)及びIncyte Pharmaceuticals, Inc.が公開している任意の遺伝子又はタンパク質ファミリーなどである。拡大する一方のシグナル伝達タンパク質ファミリーに依存するシグナル伝達事象のカスケードは多様な生物学的応答で中心的な役割を果たすことが解明、認識されてきた。たとえば細胞周期の調節、細胞分化、アポトーシス、走化性、細胞運動及び細胞骨格の再編成などである[Cantley他(1991)「Cell」64: 281-302; Liscovitch他(1994)「Cell」77:329-334]。シグナル伝達経路の様々な構成要素の欠陥が多様ながん、血管系及び神経系の疾患などを含む非常に多数の疾患の原因となることも認識されてきた。実際、シグナル伝達経路のモジュレーターはずっと以前から有力な診断及び／治療薬候補として認識されてきた。

【0122】

そこで、本発明はシグナル伝達経路のモジュレーターを同定するための方法を提供する。該方法は次の工程を含む：(a)検出可能なシグナル伝達情報を生成する1以上のレポーター分子を発現する細胞を少なくとも管の小集団に収めた主題の細胞アレイを準備すること、(b)該アレイを候補モジュレーターと接触させること、及び(c)シグナル伝達情報の変化の有無を検定し、もってシグナル伝達経路のモジュレーターを同定すること。

【0123】

レポーター分子の選択は調べようとするシグナル伝達経路次第である。たとえば細胞内pH条件の変動を伴うシグナル伝達カスケードを調べるのであれば、蛍光

pH染料などのようなpH感受性分子をレポーター分子として使用することができる。また、三量体 G_q タンパク質のシグナル伝達経路を調べるのであれば、カルシウム感受性蛍光プローブをレポーターとして使用することができる。シグナル伝達分野の専門家には自明であるが、三量体 G_q タンパク質は古典的なシグナル伝達経路に関与しており、そこでは G_q の活性化がホスホリパーゼCによるホスホイノシチドの加水分解を刺激して、特性解明が進んだ2種類の第2メッセンジャー、すなわちジアシルグリセロールとイノシトールリン酸を生成させる。後者はカルシウムの細胞内貯蔵部からの動員を刺激し、もって細胞内カルシウム濃度の一過性急上昇を招くが、それはカルシウム感受性プローブによる測定が可能な情報となる。

【0124】

レポーター分子のもう1つの例は、シグナル伝達経路の刺激又は抑制によって活性化することができる誘導性プロモーターと作動可能に連結されたレポーター遺伝子である。レポータータンパク質はまた、所与のシグナル伝達カスケードの刺激又は抑制に依存して発現する他タンパク質に連結することもできる。慣用のレポータータンパク質は比色又は蛍光検定法で簡単に検出することができる。そうしたレポータータンパク質は、非限定的に例示すると、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、及びそれらの誘導体である。当業者は特定のシグナル伝達情報の変化を検定するのに適した他レポーター分子について知りうるか、又は普通の実験によって確認しうるであろう。

【0125】

このスクリーニング法を実行するには、特定の細胞アレイをまず候補モジュレーターと接触させる。モジュレーターが裸のDNA又はRNA以外の組成物であれば、固相支持体上に固定された細胞管にモジュレーターを直接加えてよい。当業者には自明であろうが、加える量は「有効」量でなければならず、それは経験的に決定することができる。モジュレーターがポリヌクレオチドであれば、トランスフェクション又はエレクトロポレーションにより細胞中に直接導入してよい。あるいは、技術上周知の遺伝子送達手段又は他の方法を用いて細胞に挿入してもよい。

。

【0126】

本発明では、「モジュレーター」は生物学的又は化学的化合物、たとえば有機又は無機の単純又は複合体分子、ペプチド、タンパク質(抗体など)又はポリヌクレオチド(アンチセンス鎖など)を含むが、それだけに限らないものとする。ポリペプチドやポリヌクレオチドなどのような高分子、及び種々の骨格構造を土台にした合成有機化合物など多様な化合物を合成することができるが、これらも「モジュレーター」に含まれる。また、種々の天然源もスクリーニング用化合物たとえば植物性又は動物性抽出物などを供給することができる。必ずしも明記されるとは限らないが、モジュレーターは単独で、又は本発明のスクリーニングによって同定されるモジュレーターと同じ又は異なる生物活性をもつ他のモジュレーターと組み合わせて使用されるものとする。

【0127】

本発明によって体化されるあらゆる型の細胞アレイが候補モジュレーターのスクリーニングに使用できる。好ましい細胞アレイはレポーター分子を含有する細胞を収める。もっと好ましい細胞アレイはモジュレーターとの接触を可能にする透過性の固相支持体上に固定化された生きた細胞を収める。さらにもっと好ましくは、固相支持体は、試験する多数の細胞型に同一種類又は独自型の一連のモジュレーターを供給する一連のマイクロ流体経路に付着させる。そうした設定は、候補モジュレーターに呼応した細胞活性のリアルタイムでの記録と解析を可能にする。

【0128】

シグナル伝達情報の変化の検出及び／又は定量は一般に、以上のようにして選択されるレポーター分子次第であろう。酵素系のレポーター分子は一般に、該酵素に基質を供給し、基質に対する酵素の作用によって生成される反応生成物を、それが発する可視シグナルから測定する。発光レポーターなら、発光を検出することができる多様な光学系が使用可能である。そうした光学系は、非限定的に例示すると、低角レーザー走査照明と蛍光分子を選択的に励起するためのマスクとを利用するFLIPR(商標)(Molecular Devices, Inc.)、電荷結合光センサーを使

用して全細胞アレイを画像化するSAIC (Science Applications International Corporation)、及び蛍光レポーター分子の分布と活性を測定することができるArrayScan (商標) System (Cellomics, Inc.。米国出願第08/810983号とW0 98/38490号で開示されている)などである。

【0129】

本発明のコンピュータシステム

多数の細胞型における標的ポリペプチド又はタンパク質の差別的発現の決定はコンピュータを利用して行うことができる。そこで本発明は2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差別的発現を検出するための、次のようなコンピュータ利用システムを提供する。

【0130】

2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの、細胞アレイ上のハイブリダイゼーションパターンの差異によって示される差別的発現を検出するためのコンピュータ利用システムであって、次の工程を含むシステム：(a) 参照ハイブリダイゼーションパターンと試験ハイブリダイゼーションパターンとを含むデータ保存装置であって、該参照ハイブリダイゼーションパターンは該標的ポリヌクレオチドに対応する標識ヌクレオチドプローブを、参照被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイとハイブリダイズすることによって生成され、該試験ハイブリダイゼーションパターンは該標的ポリヌクレオチドに対応する標識ヌクレオチドプローブを、試験被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイとハイブリダイズすることによって生成されることを特徴とするデータ保存装置；(b) 工程(a)のデータ保存装置の試験ハイブリダイゼーションパターンを参照ハイブリダイゼーションパターンと比較して、両ハイブリダイゼーションパターンの差異を検出するための探索装置；及び(c)工程(b)の両ハイブリダイゼーションパターンの差異を獲得するための検索装置。

【0131】

本発明はまた、2以上の被検者に由来する多数の細胞型における標的タンパク質の差別的発現を、細胞管アレイ上の免疫染色パターンの差異に基づいて検出す

るためのコンピュータ利用システムを提供する。該システムは次の工程を含む：

(a) 参照免疫染色パターンと試験免疫染色パターンとを含むデータ保存装置であって、該参照免疫染色パターンは参照被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な標識抗体で染色することによって生成され、該試験免疫染色パターンは試験被検者の多数の細胞型を収めた複数個の管を含む請求項33の細胞アレイを該標的タンパク質に対して特異的な標識抗体で染色することによって生成されることを特徴とするデータ保存装置；(b) 工程(a)のデータ保存装置の試験免疫染色パターンを参照免疫染色パターンと比較して、両免疫染色パターンの差異を検出するための探索装置；及び(c)工程(b)の両免疫染色パターンの差異を獲得するための検索装置。

【0132】

一般にコンピュータ利用システムはハードウェアとソフトウェアの両方を含む。システムの一部としての「データ保存装置」は、主題アレイを使用して *in situ* ハイブリダイゼーション又は免疫染色によって生成される参照及び試験ハイブリダイゼーション又は免疫染色パターンを保存することができる記憶装置をいう。データ保存装置はまた、本発明のアレイ情報をその上に記録した製品にアクセスすることができるメモリアクセス装置を含んでもよい。用語「記録した」はコンピュータ読取り可能媒体上に情報を保存することをいう。当業者は、コンピュータ読取り可能媒体上に情報を保存するための既知の任意の方法をたやすく採り入れて、本発明のアレイを含む製品を生成することができよう。データ保存装置は、非限定的に例示すると、媒体格納装置、フロッピー(登録商標)ドライブ、スーパーフロッピー(登録商標)、テープドライブ、ジップドライブ、サイクレストサイジェットドライブ、ハードドライブ、追記型(R)CD-ROM、書換え可能(RW)CD-ROM、MDドライブ、光媒体及びパンチカード／テープなどである。

【0133】

コンピュータ利用システムの一部としての「探索装置」は、試験ハイブリダイゼーションパターンを参照ハイブリダイゼーションパターンと比較して両ハイブリダイゼーション又は免疫染色パターンの差異を検出するためにシステム上で実行される1以上のプログラムを含む。多様な既知アルゴリズムが公開されてお

り、また本発明のコンピュータ利用システムにはパターン認識に有用な多様な市販ソフトウェアが使用できる。アレイ解析ソフトウェアの例はBiodiscovery、HP及び任意の画像解析用ソフトウェアなどである。現在使用されている探索装置には、ArrayScan（商標）(Cellomics, Inc.)に組み込まれたものなどがある。最後に、検索装置は探索装置によって検出されたハイブリダイゼーション又は免疫染色パターンの差異を検索するためにシステム上で実行されるプログラムを含む。検出されたパターン情報の表示に必要となるハードウェアも検索装置を構成する。データ保存、探索及び検索の各装置はPC、Mac、Apolloワークステーション(Cray)、SGIマシン、Sunマシン、UNIX(登録商標)又はLINUXワークステーション、BeOSシステム、ラップトップコンピュータ、パームトップコンピュータ、及びパームパイロットシステムなどとして集成されてもよい。

【0134】

本発明はさらに、多数の細胞型における標的タンパク質の差異的発現を、免疫染色パターンの差異に基づいて検出するためのコンピュータ実行方法を提供する。該コンピュータ実行方法は次の工程を含む：(a)多数の細胞型における標的タンパク質の発現パターンを表わす免疫染色パターンを含むデータベースを準備すること、その場合、各免疫染色パターンは請求項33の細胞アレイを該標的に対して特異的な標識抗体で染色する工程により、様々な染色強度レベルの検出可能な抗体-標的複合体を形成させることにより生成すること；(b)2以上の免疫染色パターンを比較用に受け取ること；(c)受け取った免疫染色パターンの差異を検出すること；及び(d)該検出の結果を表示すること。

【0135】

本発明はまた、多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの差異的発現を、ハイブリダイゼーションパターンの差異に基づいて検出するためのコンピュータ実行方法を提供する。該コンピュータ実行方法は次の工程を含む：(a)多数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの発現パターンを表わすハイブリダイゼーションパターンを含むデータベースを準備すること、その場合、各ハイブリダイゼーションパターンは請求項33の細胞アレイを該ポリヌクレオチドに対して特異的な標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズする工程により、様々なハイブリ

ダイゼーション強度レベルの検出可能な標的ープローブ複合体を形成させることにより生成すること；(b)2以上のハイブリダイゼーションパターンを比較用に受け取ること；(c)受け取ったハイブリダイゼーションパターンの差異を検出すること；及び(d)該検出の結果を表示すること。

【0136】

本発明の細胞アレイを含むキット

本発明はまた、本発明の細胞アレイを含むキットを包含する。本発明によって具体化されるキットは、細胞アレイ上に提示される多数の細胞型における標的ポリヌクレオチド又はタンパク質の発現の同時的検出及び／又は発現レベルの定量を可能にするものを含む。

【0137】

各キットは当然ながら、in situハイブリダイゼーション又は免疫染色法を可能にする試薬類；in situ解析を実施するための複数の細胞型に対応する多数の管薄片を固定化された細胞アレイ；標的ポリヌクレオチドの検出に有用なヌクレオチドプローブ；標的タンパク質の検出に使用可能なタンパク質性プローブ；ハイブリダイゼーション反応又はタンパク質ータンパク質結合検定に際して安定な標的ープローブ複合体の形成と検出を可能にする試薬類を含む。該キットはまた、標識プローブの生成に有用な試薬類を含む。随意に、キットに含まれるアレイは、試験被検者がそれに対して比較される対照の遺伝子及びタンパク質産物に対応するポリヌクレオチド又は抗体でプレハイブリダイズ又は染色してもよい。

【0138】

各試薬は在庫貯蔵に適するように、また後に検定の実施に際しての反応媒質への移し入れ又は添加に適するように、固形で、又は緩衝液に溶解／懸濁させた形で、供給することができる。通常は適当な個装とする。本発明のキットは随意に検定に有用な追加の構成要素を提供することができる。これらの随意の構成要素は非限定的に例示すれば、緩衝液、捕獲試薬、顕色試薬、標識、反応表面、検出手段、対照サンプル、使用説明書及び解釈情報などである。本発明のキットを使用する診断又は予後法は臨床研究室、実験室、開業医、又は民間個人による実行が可能である。

【0139】

以下の実施例では、本発明に基づくアレイ及び検定法の展開と使用に関するさらなる説明を行う。実施例は当業者への参考のために提供するものであり、何らかの限定を加えるものではない。

【0140】**実施例**

実施例1: 本発明の細胞アレイを使用する標的タンパク質の免疫染色法

主題の細胞アレイを用いて、標準的な細胞免疫染色法により2種類の細胞タンパク質標的すなわちサイトケラチンとビメンチンを検出した。サイトケラチンはヒト腫瘍上皮細胞でだけ発現する細胞骨格タンパク質であり、ビメンチンはやはり細胞骨格タンパク質であるが、主に非上皮細胞で発現する。検定に用いたアレイはガラススライドに固定化した細胞の多数の管を含む。各管はサル(COS)、ハムスター(CHO)、ヒト初代培養細胞系(Schwann細胞)、ヒト腫瘍細胞系のColo205、hCT1165、BT474、LNCap及びPC3からなる群より選択される固有型の細胞を収める。

【0141】

まず、アレイ上の細胞をエタノール(-20°C)で固定し、約30分間風乾した。代替固定剤はホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒドなどであるが、それだけに限らない。バックグラウンド染色シグナルを少なくするために、細胞をまず遮断液(たとえばPBS緩衝液に溶かした脱脂乳又は1~5% BSA)中で、次いで緩衝液(5% 血清と0.1% triton X-100を添加したPBS)中で、1時間、室温でインキュベートした。

【0142】

サイトケラチン又はビメンチンに対して特異的な一次抗体を適量、遮断液に加えて、約37°Cで2時間、又は4°Cで一晩かけてアレイ上の細胞に結合させた。未結合の一次抗体は細胞アレイを3回ほど洗浄して除去した。次いで細胞アレイを、酵素又は発光標識を結合させた二次抗体を含む遮断液に浸した。未結合の二次抗体をMilli-Q水で洗い流した。二次抗体の検出は二次抗体に結合させた標識の種類に依存するだろう。たとえば、ペルオキシダーゼ結合二次抗体を視覚化するの

であれば、酢酸ナトリウム緩衝液pH 5.0に溶かしたDAB/H₂O₂を含む酵素基質を使用することができる。アルカリ性ホスファターゼ結合二次抗体の特異的結合を検出するのであれば、Milli-Q水に溶かしたFastred/Texas Redを使用することができる。この酵素反応は適当な緩衝液を用いて未反応基質を洗い流せば終了させることができる。

【0143】

サイトケラチンの特異的染色は前記のヒト上皮腫瘍細胞系で検出されたが、CH0、COS及びSchwann細胞では検出されなかった。逆に、ビメンチンの特異的染色はCH0、COS及びSchwann細胞で検出されただけで、ヒト上皮腫瘍細胞系では検出されなかった(表1、図2B及び2C)。これらの結果は、主題アレイが標的タンパク質の差異的発現の検出に応用できることを立証する。

【0144】

【表1】

表1: 抗サイトケラチン及び抗ビメンチン抗体による主題細胞アレイの
免疫細胞化学的染色

	Colo 205	HCT 1165	BT 474	LN cap	PC3	COS	CHO	ヒト Schw ann
サイトケラチン	+	+	+	+	+	-	-	-
ビメンチン	-	-	-	-	-	+	+	+

「+」は選択された細胞中で標的タンパク質が検出されたことを、「-」は選択された細胞中で標的タンパク質が検出されなかったことを示す。

【0145】

実施例2: 凍結切片の作成

着目細胞を充填した管アレイをまず鋳型に入れた。次いで凍結切片の切断と処理を行うために鋳型にOCTコンパウンドを満たした。この鋳型をイソプロパノー

ル／ドライアイス浴に置き、管アレイ内に固定化された細胞を凍結した。管アレイは低温で(たとえば -80°C)で保存しておき、必要なときに薄片に切断した。

【0146】

凍結した管アレイの薄片への切断はクライオスタットマイクロトームを使用し、次の要領で行うことができる。凍結した管アレイをまずクライオスタット内に置き、約30分間平衡化した。次いで鋳型を取り出して、管アレイをOCTコンパウンドごとアラインニングチップ上に載せた。チップのアラインメントを済ませてから、管アレイを切断し所望の厚さ又は長さの管の薄片を得た。次いで薄片を、特定の固相支持体への固定化に備え解凍した。一般に、薄片はガラススライド又はカバースリップ上に付着させた。一般に、管薄片は固相支持体への安定的付着を実現するために室温で約15～20分間乾燥させた。得られた細胞アレイは後の使用に備えて再び低温(たとえば -70°C)で保存してもよい。

【0147】

実施例3: 凍結切片の免疫蛍光検定

管アレイの凍結切断で作成した細胞アレイは複数の凍結した未固定の細胞群を含む。未固定細胞の免疫蛍光検定法は技術的に十分確立されている。一般に、この方法は細胞アレイを湿潤チャンバー(たとえば150mmディッシュ)に入れることから始まる。次いで、アレイ上の細胞を、内在プロテイナーゼによる一次及び二次抗体の酵素的分解を防ぐためのプロテイナーゼ阻害剤を混ぜた遮断緩衝液中でインキュベートした。標準的な遮断緩衝液は、5%のBSA(ウシ血清アルブミン)または使用する二次抗体の種に由来する通常血清、1mMのPMSF、 $10\mu\text{g/ml}$ のアプロチニン、 $1\mu\text{g/ml}$ のロイペプチン、0.1%のTween 20をPBSに溶かしてある。適量の一次抗体とのインキュベーション後に、細胞をエチルアルコールにより -20°C で固定した。一次抗体との結合後に固定処理を行うことにより、固定剤による抗原結合部位の変化が避けられる。こうした方法はリガンド-受容体結合の検定にも応用することができる。次いで、実施例1で述べたように結合一次抗体を用いて視覚化することができよう。

【0148】

実施例4: in situハイブリダイゼーションへの細胞アレイの使用

細胞アレイ用の細胞を準備するために、個別細胞系について細胞培養を通常の細胞培養条件で組織培養フラスコ又はローラーボトルに維持した。細胞アレイ用の細胞を収穫するために、単層培養から培地を取り除き、細胞をPBSで1回洗い、次いでEDTA(0.02%)のPBS溶液により37°Cで10分間処理した。培養フラスコ又はローラーボトルを軽く叩いて培養器面から細胞を剥離させた。この細胞懸濁液を50 ml遠心管に移し、1000rpm、10分間の遠心で細胞を沈降させた。上清を捨て、細胞ペレットをOCTコンパウンド[Tissue-Tek(登録商標)]と約2:1の比で、氷上で混ぜてから、New Skin(登録商標) (Medtech, Jackson WY 83001) で予めコーティングしておいたポリエチレンチューブ中に注入した。New Skin(登録商標)はアルコール6.7%、丁子油、8-ヒドロキシキノリンを含む。

【0149】

細胞を充填したチューブはただちに、-80°Cドライアイスのフリーザーで冷やした金属表面にチューブを載せて冷凍した。New Skinのコーティングでは、チューブの一端に23G3/4針を介して注射器を取り付け、New Skinをチューブに注入した。次いでチューブに空気を通してNew Skinを完全に乾燥させた。充填済みチューブは使用時まで-80°Cで保存した。

【0150】

細胞アレイを集成するために、目的の細胞株ごとに細胞充填チューブから長さ約2cmの断片をドライアイス上で鋭利な刃物により切断した。これらの断片を互いに平行に整列させて、-25°Cのクライオスタットチャンバーによる急速冷凍でOCTコンパウンド中に埋め込んだ。2列を別々に作成してから、一まとめに整列させて1ブロックとした。次いで、このブロックを鋭利な刃物でトリミングし、切片に切断する準備を整えた。管アレイはPEチューブを含むブロックを切断するための最適温度である-18°Cで切片に切断した。切断温度はチューブの素材に応じて変えることができる。切断直前に手袋をした親指でブロック表面にちょっと触れることで、ブロック表面を少し温めることができる。この操作により管アレイ切片の保全性が改善された。厚さ16 μ mの切片を作成し、直前に10%の過酸化水素を含むエタノールで1時間処理し風乾させておいたガラススライド上にThaw Mount法で付着させた。切片は30分以上乾燥させてから、-20°Cのエタノールで固定

した。次いでアセトンで10分間処理し、風乾した。乾燥切片は使用時まで -80°C で保存することができる。

【0151】

オリゴヌクレオチドプローブとのin situハイブリダイゼーションには、次の材料を使用した。

【0152】

1. Alu配列: ビオチン-gtg aac ccg gga ggc gga gct tgc agt g
 2. DIGオリゴヌクレオチド3'末端標識キット(Roche Biochemicals Catalog#1362 372)によりddUTPジゴキシゲニンを標識した β -アクチンプローブカクテル(R&D Systems Catalog #BPR188)
 3. ビオチン標識 β -アクチンプローブカクテル(R&D Systems, Cat#BPR 188B)
- ハイブリダイゼーションを行うために、 -80°C のフリーザーからスライドを取り出し、ただちにPBS中に浸した。スライドをトリプシン/EDTA溶液(Gibco BRL Cat. No. 25300-054)により 4°C で約5分間処理して細胞に透過性を付与した。トリプシン処理の最適時間はスライドバッチごとに決めるのがよい。スライドを4%パラホルムアルデヒドPBS溶液により10分間、室温で後固定処理し、次いでPBSで2回すすいだ。スライドを0.1Mトリエタノールアミン緩衝液pH8ですすぎ、次いでトリエタノールアミン緩衝液pH8に新たに溶かした0.25%無水酢酸で処理した。スライドを4xSSCですすぎ、4xSSCで飽和させた湿潤チャンバーに入れた。各スライドに約300 μl のプレハイブリダイゼーション緩衝液を加え、Hybri-Slip (Sigma Cat. No. Z36591-2)を被せた。スライドを室温で2時間インキュベートした。使用したハイブリダイゼーション緩衝液は40%ホルムアルデヒド(Gibco BRL Cat. No. 15515-026)、1x Denhardt液(Sigma Cat. No. D2532)、4xSSC (Sigma Cat. No. S-6639)、10%硫酸デキストラン(Sigma Cat.No. D-8906)及び0.15mg/ml変性サケ精子DNAを含んでいた。

【0153】

次に、スライドからプレハイブリダイゼーション緩衝液を切り、15 μl のプローブミックスを加えた。プローブミックスはプレハイブリダイゼーション緩衝液にビオチニル化オリゴヌクレオチドを溶かして調製した。スライドにHybri-Slip

を被せた。

【0154】

たとえば、Alu配列とのDNAハイブリダイゼーションでは、スライドをヒートブロック上で95°Cへと1分間加熱して、室温の湿潤チャンバーへと戻した。RNAハイブリダイゼーション、たとえば、 β -アクチンmRNAでは、スライドを65°Cで10分間インキュベートし、次いで室温へと移した。室温での2時間のハイブリダイゼーション後にHybri-Slipを剥がし、スライドを1xSSCで5分間、2回すすいだ。

【0155】

ストレプトタビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(Sigma Cat. No. S-5512)又は抗DIGアルカリ性ホスファターゼ(Roche Biochemicals Ca. No. 1 093 274)を1xSSC及び1%BSAで(10 μ g/ml)調製した。約300 μ lを各スライドに加え、Hybri-Slipで覆い、Aluプローブの場合には37°Cで、 β -アクチンプローブの場合には30°Cで、それぞれ60分間インキュベートした。次いでスライドを1xSSCで5分間、3回すすいだ。

【0156】

ペルオキシダーゼ複合体を使用する場合には、スライドを0.1M酢酸ナトリウム pH 5.05と0.003%過酸化水素で調製したジアミノベンジジン溶液(0.5 mg/ml)中で、室温で20分間顕色させた。アルカリ性ホスファターゼ複合体を使用する場合には、スライドをSigma-fast錠剤(Sigma Cat. No. B5655)から調製したNTB/BCIP (ニトロブルーテトラゾリウム/5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート)基質中で、一晚、室温暗所で顕色させた。スライドを水で完全にすすぎ、70%、85%、95%及び100%のアルコールで順次脱水し、風乾した。次いでスライドをPermountで貼り付け、顕微鏡で調べ、また写真を撮影した。

【0157】

図3A～3Fに示すのは本書で開示した細胞アレイの使用によるin situ染色の写真である。図3Aはアレイ内の小領域の写真であり、3個のヒトがん細胞SKBR-3、SKOV-3及びColo-205細胞系がヒト特異的alu DNA反復配列に対して陽性染色となることを示している。図3BはパネルAのSKOV-3細胞におけるalu DNAハイブリダイゼーションの高倍率写真である。この写真では強い特異的核染色を見ることができ

る。図3Cは同じアレイ内のRL65ラット肺上皮細胞の写真であり、alu DNAに対して陰性染色となることを示している。図3D～Fは細胞アレイ中のSKOV-3細胞における β -アクチンmRNAのin situハイブリダイゼーションの写真である。図3Dは低倍率写真であり、in situハイブリダイゼーションで β -アクチンmRNAについて染色したアレイ上の全管SKOV-3細胞を示す。図3EはパネルDのある領域の高倍率写真であり、 β -アクチンmRNAの細胞質の局在を示している(若干例を矢印で指示)。図3Fはハイブリダイゼーション前にRNase Aで処理した負の対照スライドのバックグラウンド染色を示す。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1は本発明の細胞アレイの製法例を示す。

【図 2 A】

図2Aは、至る所で広く発現するタンパク質ヘマトキシリンに対して反応性の抗ヘマトキシリン抗体で染色した細胞アレイの平面図(倍率10倍)である。アレイ上には独自型細胞の管が固定されている。第1列に示す細胞は左から右へ順にColo205 (ヒト上皮細胞系)、hCT1165、BT474及びLNCapである。第2列に示すのは左から順にPC3、COS、CHO及び初代培養ヒトSchwann細胞系である。第3列と第4列に示すのはそれぞれ、第1列と第2列に示したものの同型培養である。

【図 2 B】

図2Bは、細胞アレイ中の同じ細胞の管の抗ビメチン株(負の対照)の分裂状況である。

【図 2 C】

図2Cは単独の管のヒト前立腺がんLNCap上皮細胞の抗サイトケラチン株である。

【図 3 A】

図3A-Cは、ヒト特異的DNA反復配列であるalu配列に対応するオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズした細胞アレイの写真である。

図3Aはアレイ中の小領域の写真であり、3個の管のヒトがん細胞SKBR-3、SKOV-3及びColo-205細胞系がヒト特異的alu DNA反復配列に関して陽性染色となること

を示している。

【図3B】

図3BはパネルAのSKOV-3細胞におけるAlu DNAハイブリダイゼーションの高倍率写真である。

【図3C】

図3Cはalu DNAに関して陰性染色となった同じアレイ中のRL65ラット肺上皮細胞の写真である。

【図3D】

図3D-Fは細胞アレイ中のSKOV-3細胞における β -アクチンmRNAのin situハイブリダイゼーションを示す。

図3Dは、 β -アクチンmRNAに関してin situハイブリダイゼーションで染色された全管のSKOV-3細胞の低倍率写真である。

【図3E】

図3EはパネルDの一領域の高倍率写真であり、 β -アクチンmRNAの細胞質局在を示す(若干例を矢印で指示)。

【図3F】

図3Fは、ハイブリダイゼーション前にRNase Aで処理した負の対照スライドのバックグラウンド染色を示す。

【図1】

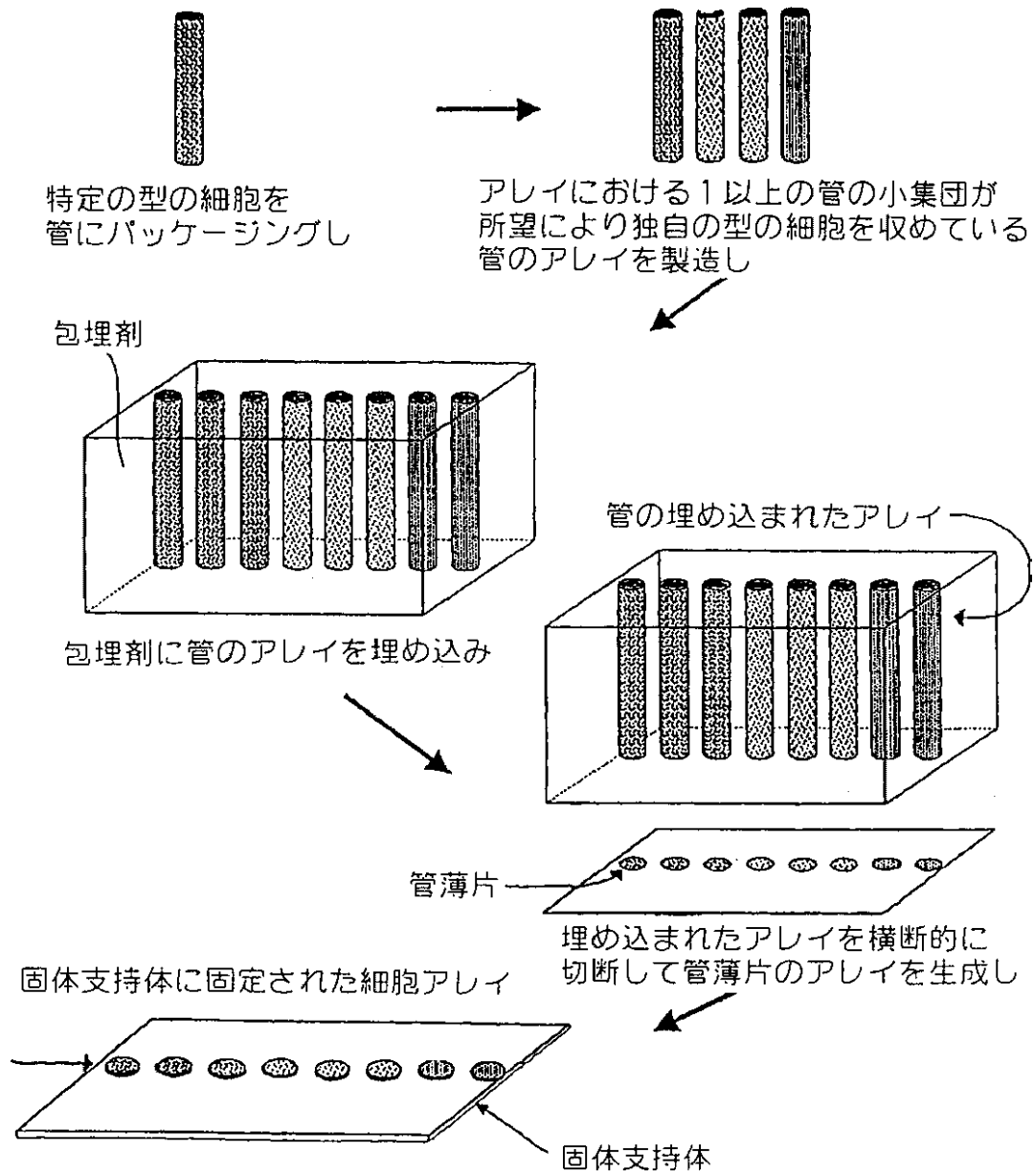
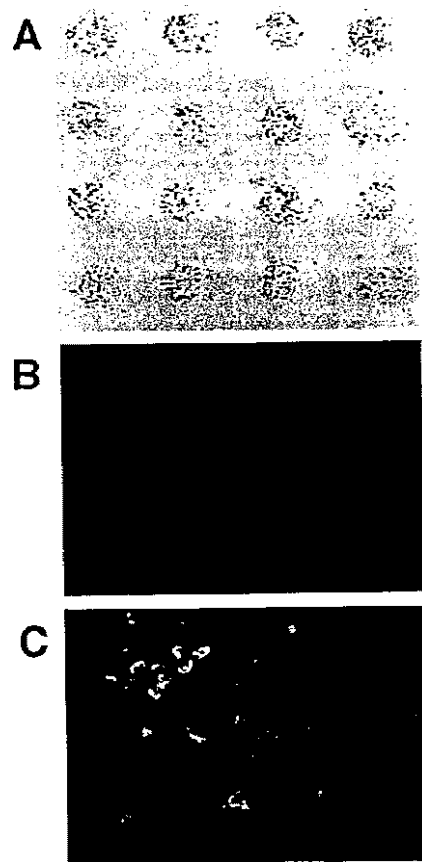


FIGURE 1

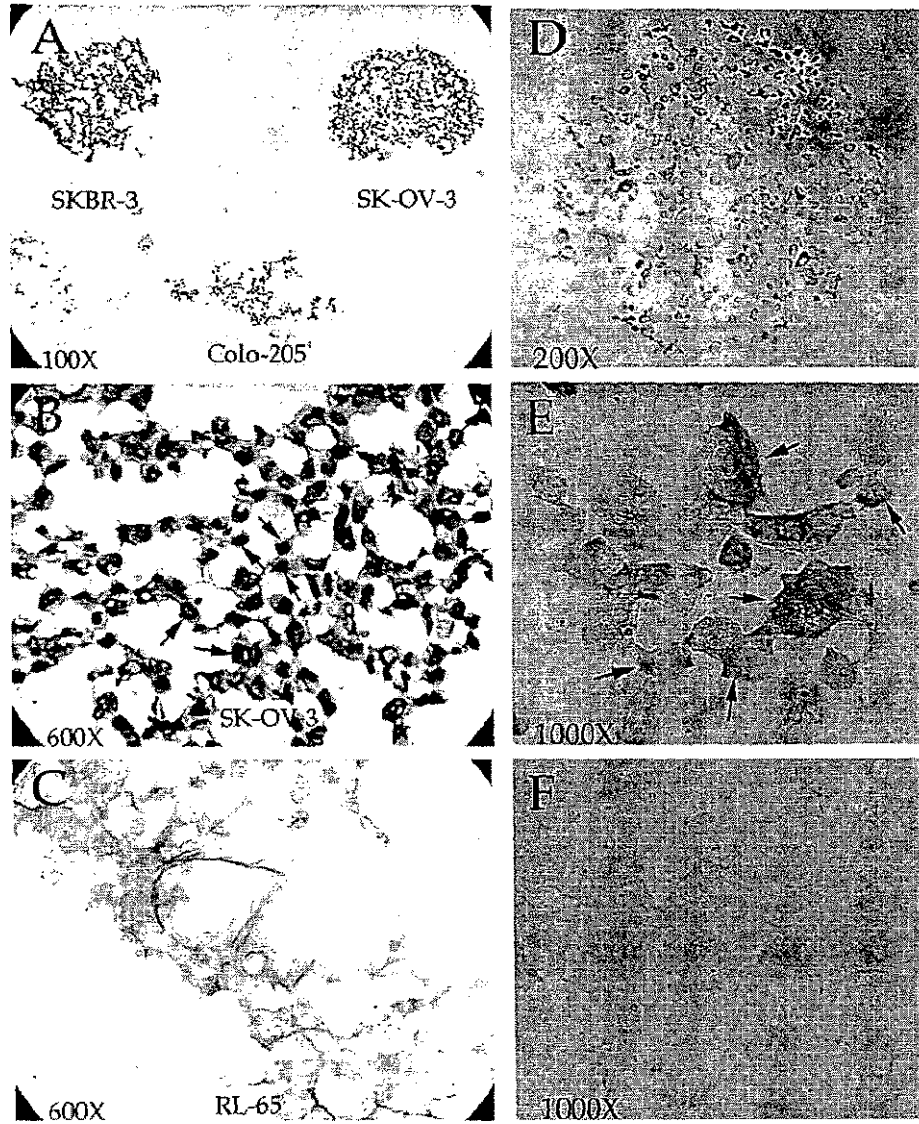
【図2】

Figure 2



【図3】

Figure 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PC JS 00/34010	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01J19/00 G01N33/543 G01N33/68 G01N33/50 G01N1/36	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01J G01N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, PAJ	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	WO 99 13313 A (GENOVATIONS, INC.) 18 March 1999 (1999-03-18) abstract page 2, line 29 -page 3, line 13 page 4, line 10 - line 14 page 4, line 20 page 5, line 10 - line 16 page 5, line 30 -page 6, line 4 page 6, line 14 - line 29 page 10, line 23 - line 28 page 10, line 30 -page 11, line 18 page 13, line 6 - line 10 claims; figures 12-14 --- -/--
	1-9, 14-17, 20, 22-24, 26,33,53
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 29 March 2001	Date of mailing of the international search report 16 07 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer STEVNSBORG, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PL/US 00/34010

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indicators, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 19711 A (LARRY S. MILLSTEIN) 22 April 1999 (1999-04-22) abstract page 6, line 8 -page 7, line 37 page 11, line 18 -page 12, line 5 page 13, line 23 -page 14, line 24 page 15, line 5 -page 18, line 4 page 19, line 18 - line 27 page 20, line 1 - line 15 page 21, line 1 - line 6 page 25, line 11 - line 23 page 41, line 9 - line 33 page 42, line 6 - line 14 claims; figures ---	1-33,53
A	WO 99 55460 A (CORNING INCORPORATED) 4 November 1999 (1999-11-04) abstract page 1, line 8 - line 10 page 15, line 13 - line 27 page 16, line 4 -page 17, line 3 page 24, line 29 -page 26, line 19 figures 8-10 ---	1,5,15, 53
E	WO 01 09607 A (LARGE SCALE PROTEOMICS, CORP.) 8 February 2001 (2001-02-08) the whole document -----	1-33,53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/34010

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-33,53 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-33,53 (in part)

insofar as they relate to a method of preparing a cell array in an array of tubes, a tube, a cell array comprising an array of tubes and a kit comprising the array.

2. Claims: 5,15-17,33-39 (in part)

insofar as they relate to the use of an array of cells in tubes in a method of simultaneously detecting the presence of a specific protein-protein interaction involving a proteinaceous probe and a target protein in multiple types of cells.

3. Claims: 5,15-17,33,40 (in part)

insofar as they relate to the use of an array of cells in tubes in a method of determining cell-type binding selectivity of an antibody.

4. Claims: 5,15-17,33,41-43,55,56 (in part)

insofar as they relate to the use of an array of cells in tubes in a method of detecting differential expression of a target protein in a multiplicity of cell types.

5. Claims: 5,15-17,33,44-48,49,51,54,57 (in part)

insofar as they relate to the use of an array of cells in tubes in a method of detecting differential expression of a target polynucleotide in a multiplicity of cell types.

6. Claims: 5,15-17,33,52 (in part)

insofar as they relate to the use of an array of cells in tubes in a method of identifying a modulator of a signal transduction pathway.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/34010

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9913313 A	18-03-1999	AU 733589 B	17-05-2001
		AU 7498598 A	29-03-1999
		CN 1269883 T	11-10-2000
		EP 1012564 A	28-06-2000
WO 9919711 A	22-04-1999	AU 9806298 A	03-05-1999
WO 9955460 A	04-11-1999	EP 0955084 A	10-11-1999
		AU 3552499 A	16-11-1999
		AU 3760499 A	16-11-1999
		EP 1075327 A	14-02-2001
		WO 9955461 A	04-11-1999
WO 0109607 A	08-02-2001	AU 6750200 A	19-02-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)		
C 1 2 N	15/09	C 1 2 Q	1/68	A	4 G 0 7 5
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/48	M	
G 0 1 N	33/48		33/53	D	
	33/53			M	
				Y	
			33/566		
	33/566		33/58	A	
	33/58			Z	
			37/00	1 0 2	
	37/00	1 0 2	C 1 2 N	15/00	A
(72)発明者	マザー, ジェニー ピー. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94030, ミルブレー, ラ プレンダ ドライブ 269				
F ターム(参考)	2G045 BB10 BB20 BB22 BB24 BB46 BB48 BB50 BB51 CB01 DA13 DA36 FA16 FA20 FB02 FB03 4B024 AA11 BA80 CA01 HA12 HA15 4B029 AA07 AA21 AA23 BB11 BB15 BB20 CC03 FA01 FA15 4B033 NA12 NA14 NA16 NB13 NB14 NB22 NB25 NB33 NB45 NC06 ND05 ND20 NE10 4B063 QA01 QA18 QA20 QQ08 QQ42 QQ79 QQ96 QR55 QR77 QR82 QS28 QS33 QS34 QX04 4G075 AA24 AA39 BD16 CA03 DA02 DA18 EA01 EB21 EE02 EE12 FB02 FB06 FB11 FB12 FC13				

专利名称(译)	单元阵列及其用途		
公开(公告)号	JP2003516747A	公开(公告)日	2003-05-20
申请号	JP2001544993	申请日	2000-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	马赛克生物系统公司雷开球德		
申请(专利权)人(译)	马赛克生物系统公司雷开球德		
[标]发明人	リロンガオ マザージェニーピー		
发明人	リ,ロンガオ マザー,ジェニー ピー.		
IPC分类号	G01N33/48 B01J19/00 C12M1/00 C12N5/02 C12N11/04 C12N11/08 C12N11/12 C12N15/09 C12Q1/68 C40B30/04 C40B60/14 G01N1/36 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C40B30/04 B01J19/0046 B01J2219/00317 B01J2219/0052 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00659 B01J2219/00673 B01J2219/00689 B01J2219/00702 B01J2219/0072 C40B60/14 G01N1/36 G01N33/6845		
FI分类号	C12N11/04 B01J19/00.Z C12M1/00.A C12N11/08 C12N11/12 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.Y G01N33/566 G01N33/58.A G01N33/58.Z G01N37/00.102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB46 2G045/BB48 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA20 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA01 4B029/FA15 4B033/NA12 4B033/NA14 4B033/NA16 4B033/NB13 4B033/NB14 4B033/NB22 4B033/NB25 4B033/NB33 4B033/NB45 4B033/NC06 4B033/ND05 4B033/ND20 4B033/NE10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX04 4G075/AA24 4G075/AA39 4G075/BD16 4G075/CA03 4G075/DA02 4G075/DA18 4G075/EA01 4G075/EB21 4G075/EE02 4G075/EE12 4G075/FB02 4G075/FB06 4G075/FB11 4G075/FB12 4G075/FC13		
优先权	09/466011 1999-12-17 US		
其他公开文献	JP4862146B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了包括多个管的细胞阵列，其中细胞组被固定并容纳在其中。该阵列对于执行基于细胞的比较分析特别有用。该阵列还支持同时检测来自多个受试者的多种细胞类型的靶多核苷酸。本发明的阵列还使得能够高通量筛选信号传导途径的候选调节剂。本发明进一步提供了用于进行基于细胞的比较分析的试剂盒，计算机实施的方法和系统。

