

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5675638号
(P5675638)

(45) 発行日 平成27年2月25日 (2015. 2. 25)

(24) 登録日 平成27年1月9日 (2015. 1. 9)

(51) Int. Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N	33/53		P
GO 1 N 37/00	(2006. 01)	GO 1 N	37/00	1 O 2	
C 1 2 Q 1/68	(2006. 01)	GO 1 N	33/53		Q
C 1 2 N 15/09	(2006. 01)	C 1 2 Q	1/68		A
		C 1 2 N	15/09		A

請求項の数 20 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2011-539763 (P2011-539763)
 (86) (22) 出願日 平成21年12月4日 (2009. 12. 4)
 (65) 公表番号 特表2012-511155 (P2012-511155A)
 (43) 公表日 平成24年5月17日 (2012. 5. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/066876
 (87) 国際公開番号 W02010/065929
 (87) 国際公開日 平成22年6月10日 (2010. 6. 10)
 審査請求日 平成24年12月3日 (2012. 12. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/120, 033
 (32) 優先日 平成20年12月4日 (2008. 12. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(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 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー反応を診断するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、被験体における分泌型サイトカインプロファイルを決定する方法：
 少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板 (mold
 able slab) の上に堆積された、被験体由来の生きた末梢血単核球細胞の懸濁液を提供する
 工程であって、該マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルは、ナ
 ノリットル以下の体積中に単一細胞を含有する、工程；

該細胞の分泌型サイトカインにそれぞれが結合する少なくとも2種類の検出剤で前処理
 された基板と、該マイクロウェルアレイとを接触させる工程；

該基板上にある該分泌型サイトカインのレベルを測定する工程であって、該レベルは該
 単一細胞の分泌型サイトカインの量に対応する、工程；および

該単一細胞由来のそれぞれの分泌型サイトカインの分泌速度を決定し、それによって、
 分泌型サイトカインプロファイルを決定する、工程；

該分泌型サイトカインプロファイルにおける動的变化を測定する工程をさらに含む、方
 法。

【請求項2】

分泌型サイトカインが、Th₁、Th₂、Th₉、Th₁₇、またはThサイトカインである、請求項1
 記載の方法。

【請求項3】

基板が少なくとも3種類の検出剤で前処理された基板である、請求項1記載の方法。

10

20

【請求項 4】

基板が少なくとも4種類の検出剤で前処理された基板である、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

分泌型サイトカインが、IL-17、IL-10、IL-4、およびIFN- からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

分泌型サイトカインがTヘルパー2(Th₂)サイトカインである、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

分泌型サイトカインが、IL-4、IL-5、IL-13、およびIL-9を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

分泌型サイトカインが、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)またはTh₁サイトカインである、請求項1記載の方法。

10

【請求項 9】

分泌型サイトカインが、IFN、MIP-1、TNF、パーフォリン、およびIL-2を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

末梢血単核球細胞を成形可能な平板上に堆積させる前に刺激する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

疑いのあるアレルゲンまたは既知のアレルゲンで末梢血単核球細胞を刺激する、請求項10記載の方法。

20

【請求項 12】

単一細胞の表現型または系列を決定する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

CD4またはCD8が単一細胞の表面上に発現しているか否かを決定する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

アレルゲンが食品である、請求項11記載の方法。

【請求項 15】

食品が、乳、卵、ピーナッツ、ツリーナッツ(tree nut)、魚、ダイズ、コムギ、卵製品、豆果、海産物、または貝・甲殻類である、請求項14記載の方法。

30

【請求項 16】

アレルゲンが薬物である、請求項11記載の方法。

【請求項 17】

薬物が、アモキシシリン、ペニシリン、サルファ剤、バルピツレート、抗痙攣剤、インシュリン、またはヨウ素である、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

アレルゲンが、塵埃、花粉、ペットの鱗屑、ラテックス、塩素、または昆虫刺咬に関連する毒液である、請求項11記載の方法。

【請求項 19】

アレルゲンが、スズメバチ、ヒアリ(fire ant)、またはハチ刺されに由来する、請求項11記載の方法。

40

【請求項 20】

分泌型サイトカインが4つの異なるサイトカインまでの分泌型サイトカインである、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2008年12月4日に提出された米国特許出願第61/120,033号に係る優先権を主張

50

する。米国特許出願第61/120,033号はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦政府の支援による研究に関する声明

本発明は、一部、米国立衛生研究所により付与された助成金番号5U19AI050864-07の下で米国政府による資金提供を受けた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、疾患の免疫学的プロファイルを作成する目的で、単一細胞から、複数の種類のサイトカインおよび相関関係にある表面発現した免疫表現型バイオマーカーを検出するための方法を提供する。

10

【背景技術】

【0004】

発明の背景

個々の細胞は外見が同じであっても、特定の遺伝子の発現、重要な代謝産物もしくはイオンの濃度、または所定の刺激に対する応答のパターンにばらつきがあるなど非常に多くの特徴の点で異なることがよく知られている。生細胞では、デオキシリボ核酸(DNA)および重要な調節分子を含む多くの成分のコピー数が非常に少ない。遺伝子発現の生化学的プロセスに特有の確率的現象(内的ノイズ)および他の細胞成分の変動(外的ノイズ)のいずれもが、細胞間のばらつき全体に実質的に寄与している。細胞型、変異、および変動は全て体内の細胞の多様性に寄与している。

20

【0005】

しかしながら、ほとんどの臨床アッセイまたは細胞をベースとするアッセイは、血清または細胞培地を用いて細胞をまとめて分析する。これらのアッセイは、多くの場合、全細胞集団にわたる情報を平均し、生物システムの状態を評価するのに重要な詳細な情報、例えば、1)2種類以上の遺伝子が、同じ細胞において同時発現しているのか、またはその細胞の異なる亜集団において同時発現しているのか；2)全体で測定された発現のわずかな増加が、全細胞にわたる均一でわずかな増加に起因するのか、または細胞のサブセットにおける大幅な増加に起因するのかという情報を提供しない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【非特許文献1】 LOVE J C, A MICROENGRAVING METHOD FOR RAPID SELECTION OF SINGLE CELLS PRODUCING ANTIGEN-SPECIFIC ANTIBODIES, NATURE BIOTECHNOLOGY, 米国, NATURE PUBLISHING GROUP, 2006年6月1日, V24 N6, P703-707

【非特許文献2】 BRADSHAW E M, CONCURRENT DETECTION OF SECRETED PRODUCTS FROM HUMAN LYMPHOCYTES BY MICROENGRAVING: 以下備考, CLINICAL IMMUNOLOGY, 米国, ACADEMIC PRESS, 2008年10月1日, V129 N1, P10-18, CYTOKINES AND ANTIGEN-REACTIVE ANTIBODIES

【発明の概要】

【0006】

ナノスケールアッセイシステムまたはサブナノスケールアッセイシステムにおいて、本発明の方法は、個々の生細胞から同時に放出された、複数の種類(例えば、2種類、4種類、5種類、6種類、8種類、10種類、20種類)の分泌産物、例えば、サイトカインについての頻度および分泌速度の分布を定量的に測定する。前記方法は、1つのアッセイシステムにおいて、「誰」(調べられた細胞の表現型または系列)、「何」(分泌産物の正体、例えば、サイトカイン、抗体、ケモカイン、または増殖因子)、「どのくらいの頻度」(細胞集団におけるレスポンスの頻度)、および「どのくらいの量」(分泌の規模、例えば、それぞれの分泌産物の量のレベル)を含む、非常に多くの質問に対する回答を提供する。前記方法は、分泌細胞、例えば、T細胞またはB細胞などの免疫細胞のプロファイルを得るのに有用であるが、ホルモンまたは酵素を分泌する細胞などの他の分泌細胞にも有用である。単一の生細胞の分泌プロファイルを、(例えば、画像化または検査によって確かめられた)

40

50

その表現型または系列と突き合わせて、細胞の分泌プロファイルを得る。この分泌プロファイルから、疾患を診断するための、または治療介入に対する応答をモニタリングするための価値のある情報が得られる。

【0007】

例えば、本発明は、被験体における免疫学的疾患、例えば、感染症、自己免疫疾患、またはアレルギーを診断するための方法を提供する。ある態様では、個体における免疫学的応答、例えば、アレルギー応答のプロファイルを得るために、単一細胞(または数個の細胞)がアッセイされる。本発明の方法を用いて作成された、統合された定量(多次元)データセットは、異なる刺激に対する、異なるドナー由来の細胞の応答を区別するのに用いられる。本明細書に記載の方法はまた、ワクチン、治療用生物薬剤、進行中の感染、自己免疫疾患などの臨床モニタリングにも有用である。

10

【0008】

1つの局面において、本発明は、被験体における免疫プロファイル、例えば、分泌型サイトカインプロファイルを決定する方法を特徴とする。前記方法は、少なくとも1つのマイクロウェル(それぞれのマイクロウェルは $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ 未満、例えば、 $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$ である)をマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板(moldable slab)の上に堆積された、被験体由来の細胞(例えば、生細胞)の懸濁液を提供する工程を含み、マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルはナノリットル以下の体積中に単一細胞を有する。1つの局面において、細胞は全血細胞である。別の局面において、細胞は末梢血単核球(PBMC)である。マイクロウェルアレイは、細胞の分泌産物(例えば、サイトカイン)に結合する少なくとも1種類の検出剤(例えば、サイトカイン検出剤)で前処理された基板と接触される。1つの局面において、前記方法は、少なくとも2種類の検出剤、少なくとも3種類の検出剤、または少なくとも4種類の検出剤を利用する。基板上にある検出剤のレベルが測定され、このレベルは単一細胞の分泌産物の量に対応し、それによって、免疫プロファイルが検出される。任意で、検出剤はT細胞分泌産物パネルを検出する。別の局面において、検出剤はTヘルパー2(Th_2)分泌産物パネルを検出する。

20

【0009】

1つの局面において、それぞれの分泌産物について分泌速度が求められる。別の局面において、細胞の表現型が決定される。任意で、分泌産物は、系列を区別する、細胞上の表面発現マーカーと突き合わされる。

30

【0010】

個々の生細胞のプロファイルを決定する方法は、少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板の上に堆積された、被験体由来の細胞の懸濁液を提供する工程であって、マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルはナノリットル以下の体積中に単一細胞を含有する、工程；前記細胞の分泌産物に結合する少なくとも1種類の検出剤で前処理された基板と、マイクロウェルアレイとを接触させて、プリントされたマイクロアレイを得る工程；プリントされたアレイを画像化して、データセットを得る工程；データセットをフィルタリングして、単一細胞からなる前記アレイ上の位置を特定する工程；および位置を、単一細胞位置から検出された分泌産物のレベルと突き合わせ、それによって、個々の生細胞の前記免疫プロファイルを決定する工程を用いて行われる。任意で、前記方法は、単一細胞の表現型または系列を特定し、次いで、所定の位置における表現型または系列を分泌産物レベルと突き合わせる工程を含む。

40

【0011】

ある態様において、プロファイルは、全体的なT細胞プロファイル、 Th_1 プロファイル、 Th_2 プロファイル、 Th_9 プロファイル、 Th_{17} プロファイル、または別の分泌細胞プロファイルである。例えば、基板は、関心対象のサイトカインを検出するための適切な抗体ペアまたは複数の種類の抗体を含む。例示的で特異な抗体パネルは、Th応答の偏り(skewedness)ならびに特異的な Th_2 および Th_1 応答を示すサイトカインセットを検出する。例えば、全体的なT細胞パネルは、以下のサイトカインIL-4/IL-10/IL-17/IFN を検出する。調べられ

50

た細胞の分泌産物間での、サイトカインの1つまたは複数の増加は細胞のプロファイルを示す。Th2パネルは、IL-4/IL-5/IL-9の検出剤を含む。細胞傷害性Tリンパ球(CTL)またはTh1プロファイルを検出するパネルは、IFN- γ /MIP-1 β /TNF- α /パーフォリン/IL-2を検出する検出剤を含む。ここで、MIPおよび/またはパーフォリンはCTL表現型への偏りを示し、IL-2はTh1表現型への偏りを示す。IFN- γ /IL-10/IL-17/IL-22を検出する検出剤を含むパネルは、粘膜試料の評価に、例えば、(疾患/障害またはその素因を評価する手段として)胃腸管に由来する細胞の免疫プロファイルを決定するための粘膜試料の評価に有用である。抗体アイソタイプの検出は、アレルギー個体またはアレルギーを起こしやすい個体の評価に有用である。例えば、以下の抗体パネル(IgG1/IgA/IgE/IgG4およびIgG1/IgA/IgG3/IgM)を検出するために、検出剤パネルが開発された。IgEアイソタイプ抗体のレベルの増加の検出は、刺激アレルゲンに対するアレルギー反応を示す。

10

【0012】

代表的なThセットには、インターロイキン-17(IL-17)、IL-10、IL-4、インターフェロン- γ (IFN- γ)、IL-1b、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-21、IL-22、IL-23、マクロファージ炎症性タンパク質(MIP)1b、MIP1a、および/またはインターフェロン誘導性タンパク質(IP)-10を検出する薬剤が含まれる。代表的な(Th₂セット)は、IL-4、IL-5、IL-13、および/またはIL-9を検出する。別の局面において、細胞の表面発現マーカー(例えば、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD20、CD25、CD27、CD38、CD138、CD95、CD154、CD127)が画像化される。これらのマーカーは、それぞれの細胞のサイトカインプロファイルと突き合わされる。これは、本明細書に記載の方法と、以前に述べられた他の捕捉アッセイとの相違点である。

20

【0013】

または、もしくはさらに、前記方法は、抗体、例えば、IgE、IgG₁、IgG₄、IgGA、IgG₂、IgG₃、IgM、IgA1、および/またはIgA2を検出する検出剤を使用することができる。好ましいサイトカイン検出剤は、抗体、例えば、サイトカインに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。または、サイトカイン検出剤はアプタマーである。

【0014】

一般的に、サイトカイン産生細胞を有する任意の生物学的組織が用いられる。ある態様では、末梢血単核球(PBMC)が用いられる。所望であれば、細胞を成形可能な平板上に堆積させる前に刺激する。例えば、疑いのあるアレルゲンまたは既知のアレルゲンを用いて、細胞を刺激する。または、感染因子に由来するペプチド、タンパク質、または無傷の病原体を用いて、細胞を刺激する。

30

【0015】

ある態様において、アレルゲンは食品である。例えば、食品は、乳、卵、ピーナッツ、ツリーナッツ(tree nut)、魚、貝・甲殻類、ダイズ、コムギ、卵製品、豆果、または海産物である。ある態様において、アレルゲンは、薬物、例えば、アモキシシリン、ペニシリン、サルファ剤、バルビツレート、抗痙攣剤、インシュリン、またはヨウ素である。ある態様において、アレルゲンは、塵埃、花粉、ペットの鱗屑、ラテックス、もしくは塩素、または昆虫刺咬による、例えば、スズメバチ、ヒアリ(fire ant)による刺咬、もしくはハチ刺されに関連する毒液である。ある態様において、アレルゲンは、生物治療剤(biologic therapeutic)、例えば、G-CSF(フィルグラスチム)およびGM-CSF(サルグラモスチム)、EPO(エリスロポエチン)、RITUXAN(登録商標)(リツキシマブ)、HERCEPTIN(登録商標)(トラスツズマブ)、ヒト成長ホルモン、BETASERON(登録商標)(インターフェロン- γ -1b)、AVONE X(登録商標)、(インターフェロン- γ -1a)、またはENBREL(登録商標)(エタネルセプト)である。

40

【0016】

別の局面において、本発明は、被験体におけるアレルゲンに対する感受性を評価する方法を特徴とする。前記方法は、少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板の上に堆積された、被験体由来の細胞の懸濁液を提供する工程であって、マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルは単一細胞を有

50

する、工程を含む。好ましくは、細胞は試験アレルゲンと接触したことがある。マイクロウェルアレイは、アレルゲンに対する感受性を示す少なくとも1種類の検出剤で前処理された基板と接触される。その後、検出剤は検出され、例えば、検出剤のレベルが測定される。検出剤のレベルは、分泌産物、例えば、サイトカインまたは抗体のレベルと関連し、それによって、アレルゲンの感受性が評価される。1つの例では、検出剤はサイトカインを特定し、例えば、Th1サイトカインであるIFN のレベルと比較した、Th2サイトカイン、例えば、IL-4のレベルの増加は、被験体がアレルゲンに対するアレルギーを有するか、またはアレルゲンに対するアレルギーを発症するリスクを有することを示す。別の例において、検出剤は抗体アイソタイプを検出する。IgGなどの他のアイソタイプ(特に、IgG₄、IgM、またはIgA)と比較したIgEアイソタイプの増加は、刺激アレルゲンに対するアレルギー反応、ならびに細胞が得られた被験体のアレルギーまたはその素因を示す。

10

【0017】

別の局面において、本発明は、自己免疫疾患または感染症を示す被験体におけるサイトカインプロファイルを決定する方法を特徴とする。第1に、少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板の上に堆積された、被験体由来の細胞の懸濁液が提供される。1つの局面において、マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルは単一細胞を有する。次に、マイクロウェルアレイと基板を接触させる。1つの局面において、基板は少なくとも1種類のサイトカイン検出剤で前処理される。最後に、サイトカイン検出剤は検出され、自己免疫疾患または感染症を示すサイトカインプロファイルが定められる。自己免疫疾患または感染症を示す例示的なサイトカインプロファイルは、IFN またはIL-2の正常レベルと比較したIFN またはIL-2のレベルの増加を含む。

20

【0018】

例示的な自己免疫疾患には、関節炎(関節リウマチを含む)、多発性硬化症、免疫介在性糖尿病または1型糖尿病、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス、乾癬、硬皮症、および自己免疫性甲状腺疾患が含まれる。感染症の例には、例えば、アフリカトリパノソーマ症、コレラ、クリプトスポリジウム症、デング熱、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、HIV/AIDS、インフルエンザ、マラリア、日本脳炎、マラリア、麻疹、髄膜炎、オンコセルカ症(「河川盲目症」)、肺炎、ロタウイルス、住血吸虫症、細菌性赤痢、連鎖球菌性咽頭炎(strep throat)、結核、腸チフス、および黄熱病が含まれる。

30

【0019】

別の局面において、基板；基板を収容するように構成された成形可能な平板であって、成形可能な平板と基板との間に流体密着シールを設けるように構成された成形可能な平板；ならびに適合した支持体および基板を用いて、会合し得る種を特定するための説明書を含む、キットが組み立てられる。キットは、好ましくは、複数のマイクロウェルを有し、基板を収容し、成形可能な平板と基板との間に流体密着シールを設けるように構成されている。キットは、好ましくは、成形可能な平板および基板を用いて、会合し得る種を特定するための説明書を含む。

【0020】

本明細書で使用する「会合する」という用語は、相互作用、例えば、結合、吸着、イオン引力、または他のいくつかのタイプの、2つの種間の相互作用をいう。ある例では、会合する種は、好ましくは、少なくとも約 $10^9 M^{-1}$ 以上の会合定数で互いに結合する。このような会合定数で互いに結合する種があると、会合する種と会合しない種とを容易に区別することができる。

40

【0021】

ある特定の例によれば、本明細書に記載の方法およびキットにおいて、成形可能な平板が用いられる。本明細書で使用する「成形可能な平板」は、基板と接触している時に、少なくとも1寸法において曲がる、動く、または変形することができる器具をいう。例えば、ある特定の構造では、成形可能な平板は、基板と接触している時に、成形可能な平板と基板との間に実質的に流体密着シールを形成して、成形可能な平板の中にある流体が漏れ

50

る、または漏出するのを阻止または防止するような材料、例えば、エラストマー材料を含んでもよい。

【0022】

成形可能な平板は、ソフトリソグラフィおよびレプリカモールドイングによって製造され、毒性のない気体透過性の生体適合材料からなる。成形可能な平板もしくは基板またはその両方は、ガラス、プラスチック、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ(ジメチルシロキサン)、ニトロセルロース、ポリ(フッ化ビニリデン)、および金属からなる群より選択される1種類または複数の種類の材料を含む。金属は、金、パラジウム、白金、銀、鋼、もしくは合金、またはその混合物の1つまたは複数である。ある態様において、基板は、ガラススライド、プラスチックスライド、またはビーズであり、成形可能な平板はマイクロウェルアレイを含む。成形可能な平板は加圧されて基板に押しつけられて、基板と密着しているが可逆的なシールを形成する。マイクロウェルアレイは一区画のウェルを含み、ウェルの直径は約50 μm 、深さは約50 μm であり、ウェルの間隔は約50 μm であるか、またはウェルの直径は約100 μm 、深さは約100 μm であり、ウェルの間隔は約100 μm である。ウェルは、約1ナノリットル以下の流体を保持するようなサイズである。成形可能な平板を生成するための例示的な方法は、米国特許第6,180,239号および米国特許第6,776,094号にさらに詳述されている。これらのそれぞれの全開示は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

10

【0023】

成形可能な平板の中にあるウェルまたはチャンバーの正確な数は異なってもよい。ある例では、成形可能な平板は、1つの種をスクリーニングすることができる1個の大きなマイクロウェルを備える。例えば、成形可能な平板は、スクリーニングしようとする1種類の細胞、触媒、または他の選択された種を含む。成形可能な平板がアレイとして構成されている構造では、個々のマイクロウェルの数は、約1、4、8、24、48、96、384、1024、2048、5096以上、またはこれらの例示的な値の間にある任意の値でもよい。

20

【0024】

エンレーピング用プレートは複数のウェルを備え、それぞれのウェルは直径が100マイクロメートル未満であり、1個の細胞を含む。好ましくは、細胞の数は5個より少ない。エンレーピング用プレートは、気体透過性の適合した組成物である。プレートの弾性率(ヤング率)は、200~2000キロパスカル(kPa)の範囲である。プレートの組成物は、好ましくは、ポリ(ジメチルシロキサン)である。プレートのウェルは少なくとも1個の細胞を含む。この細胞は、免疫細胞、抗体産生細胞、ハイブリドーマ細胞、T細胞、または血液もしくは組織に由来する他の細胞である。細胞の機能または分泌プロファイルは未知である。任意で、細胞は組換え分泌型ポリペプチドを産生する。

30

【0025】

別の局面において、本発明は、成形可能な平板と基板との間で流体密着シールを設けるように、基板と、本明細書に記載のサイトカイン検出剤の1つまたは複数とを接触させるマイクロウェルアレイを形成する少なくとも1つのマイクロウェルを備える成形可能な平板を備える試験器具を提供する。この器具は、1つの種、一般的には、細胞を、マイクロウェルアレイの少なくとも1つのウェルの中に入れる。成形可能な平板のマイクロウェルは、約1ナノリットル以下の流体体積を保持するようなサイズおよび配置である。

40

【0026】

特に定義のない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様のまたは等価な方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、適切な方法および材料を以下で説明する。本明細書で述べた全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全てが参照として組み入れられる。矛盾する場合、定義を含む本明細書によって統制される。さらに、材料、方法、および実施例は例示にしかすぎず、限定するとは意図されない。

【0027】

50

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0028】

本開示の有益性を考慮すれば、図面に示した例が必ずしも縮尺通りに描かれているとは限らないことが当業者により認識される。本明細書において開示された例示的な局面および例をより良く理解するために、特定の特徴または成分を拡大、縮小、または変形することができる。さらに、図面の中の陰影付け、パターン、ダッシュ記号などの使用は、特に文脈から明らかでない限り、特定の材料または方向を示唆または意味するとは意図されない。

[本発明1001]

以下の工程を含む、被験体における免疫プロファイルを決定する方法：

少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板(moldable slab)の上に堆積された、被験体由来の細胞の懸濁液を提供する工程であって、該マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルは、ナノリットル以下の体積中に単一細胞を含有する、工程；

該細胞の分泌産物に結合する少なくとも1種類の検出剤で前処理された基板と、マイクロウェルアレイとを接触させる工程；および

該基板上にある該検出剤のレベルを測定する工程であって、該レベルは該単一細胞の分泌産物の量に対応し、それによって、免疫プロファイルを決定する、工程。

[本発明1002]

プロファイルが、Th₁プロファイル、Th₂プロファイル、Th₉プロファイル、Th₁₇プロファイル、Thプロファイル、または抗体アイソタイプレベルである、本発明1001の方法。

[本発明1003]

第2の検出剤をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1004]

第3の検出剤をさらに含む、本発明1003の方法。

[本発明1005]

第4の検出剤をさらに含む、本発明1004の方法。

[本発明1006]

検出剤がT細胞分泌産物パネルを検出する、本発明1001の方法。

[本発明1007]

検出剤が、IL-17、IL-10、IL-4、およびIFN- からなる群より選択される複数の種類のサイトカインを検出する、本発明1001の方法。

[本発明1008]

検出剤がTヘルパー2(Th₂)分泌産物パネルを検出する、本発明1001の方法。

[本発明1009]

検出剤が、IL-4、IL-5、IL-13、およびIL-9からなる群より選択される複数の種類のサイトカインを検出する、本発明1001の方法。

[本発明1010]

検出剤が、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)細胞またはTh₁の分泌産物パネルを検出する、本発明1001の方法。

[本発明1011]

検出剤が、IFN、MIP-1、TNF、パーフォリン、およびIL-2からなる群より選択される複数の種類のCTLまたはTh₁パネル産物を検出する、本発明1001の方法。

[本発明1012]

検出剤が、IgE、IgG₁、IgG₄、およびIgAからなる群より選択される抗体アイソタイプを検出する、本発明1001の方法。

[本発明1013]

検出剤が、IgG₃、IgG₁、IgM、およびIgAからなる群より選択される抗体アイソタイプを検出する、本発明1001の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1014]細胞が、被験体由来の全血細胞である、本発明1001の方法。[本発明1015]細胞が末梢血単核球(PBMC)である、本発明1001の方法。[本発明1016]細胞を成形可能な平板上に堆積させる前に刺激する、本発明1001の方法。[本発明1017]疑いのあるアレルゲンまたは既知のアレルゲンで細胞を刺激する、本発明1001の方法。[本発明1018]細胞からの分泌産物の分泌速度を決定する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

10

[本発明1019]細胞の表現型を決定する工程をさらに含む、本発明1001の方法。[本発明1020]CD4またはCD8が細胞表面上に発現している、本発明1001の方法。[本発明1021]以下の工程を含む、個々の生細胞のプロファイルを決定する方法：少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板の上に堆積された、被験体由来の細胞の懸濁液を提供する工程であって、該マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルは、ナノリットル以下の体積中に単一細胞を含有する、工程；

20

該細胞の分泌産物に結合する少なくとも1種類の検出剤で前処理された基板と、マイクロウェルアレイとを接触させて、プリントされたマイクロアレイを得る工程；該プリントされたアレイを画像化して、データセットを得る工程；該データセットをフィルタリングして、単一細胞からなる該アレイ上の位置を特定する工程；および該位置を、該単一細胞の位置から検出された分泌産物のレベルと突き合わせる工程であって、それによって、個々の生細胞の免疫プロファイルを決定する、工程。[本発明1022]単一細胞の表現型または系列を特定する工程をさらに含む、本発明1021の方法。[本発明1023]表現型または系列を、分泌産物レベルと突き合わせる工程をさらに含む、本発明1022の方法。

30

[本発明1024]以下の工程を含む、被験体におけるアレルゲンに対する感受性を評価する方法：少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板の上に堆積された、被験体由来の細胞の懸濁液を提供する工程であって、該マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルは単一細胞を有し、該細胞は試験アレルゲンと接触したことがある、工程；該アレルゲンに対する感受性を示す少なくとも1種類の検出剤で前処理された基板と、マイクロウェルアレイとを接触させる工程；および

40

該検出剤のレベルを測定する工程であって、それによって、アレルゲンの感受性を評価する、工程。[本発明1025]検出剤が抗体アイソタイプを特定する、本発明1024の方法。[本発明1026]他の抗体アイソタイプと比較したIgEアイソタイプのレベルの増加が、被験体がアレルゲンに対するアレルギーを有するか、または該アレルゲンに対するアレルギーを発症するリスクを有することを示す、本発明1024の方法。[本発明1027]IgG₄アイソタイプのレベルと比較したIgEアイソタイプのレベルの増加が、被験体がア

50

レルゲンに対するアレルギーを有するか、または該アレルギーに対するアレルギーを発症するリスクを有することを示す、本発明1024の方法。

[本発明1028]

検出剤がサイトカインを特定する、本発明1024の方法。

[本発明1029]

Th1サイトカインのレベルと比較したTh2サイトカインのレベルの増加が、被験体がアレルギーに対するアレルギーを有するか、または該アレルギーに対するアレルギーを発症するリスクを有することを示す、本発明1028の方法。

[本発明1030]

Th2サイトカインがIL-4を含む、本発明1029の方法。

10

[本発明1031]

Th1サイトカインがIFN を含む、本発明1029の方法。

[本発明1032]

アレルギーが食品である、本発明1024の方法。

[本発明1033]

食品が、乳、卵、ピーナッツ、ツリーナッツ(tree nut)、魚、貝・甲殻類、ダイズ、またはコムギ、卵製品、豆果、海産物、または貝・甲殻類である、本発明1032の方法。

[本発明1034]

アレルギーが薬物である、本発明1024の方法。

[本発明1035]

薬物が、アモキシシリン、ペニシリン、サルファ剤、バルビツレート、抗痙攣剤、インシュリン、またはヨウ素である、本発明1034の方法。

20

[本発明1036]

アレルギーが、塵埃、花粉、ペットの鱗屑、ラテックス、もしくは塩素、または昆虫刺咬に関連する毒液である、本発明1024の方法。

[本発明1037]

昆虫刺咬が、スズメバチ、ヒアリ(fire ant)、またはハチ刺されによるものである、本発明1024の方法。

[本発明1038]

以下の工程を含む、自己免疫疾患または感染症を示す被験体におけるサイトカインプロファイルを決定する方法：

30

少なくとも1つのマイクロウェルをマイクロウェルアレイに備える成形可能な平板の上に堆積された、被験体由来の細胞の懸濁液を提供する工程であって、該マイクロウェルアレイにおける少なくとも1つのマイクロウェルは単一細胞を有する、工程；

少なくとも1種類のサイトカイン検出剤で前処理された基板と、マイクロウェルアレイとを接触させる工程；および

該サイトカイン検出剤を検出する工程；および

サイトカインプロファイルを形成する工程；および

自己免疫疾患または感染症を示すサイトカインプロファイルを定める工程。

[本発明1039]

40

自己免疫疾患または感染症を示すサイトカインプロファイルが、IFN またはIL-2の正常レベルと比較したIFN またはIL-2のレベルの増加を含む、本発明1038の方法。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】 マイクロエンレービング(microengraving)のための手順の模式図である。(1) ソフトリソグラフィーによって製造されたマイクロウェルのアレイ上に、細胞懸濁液を堆積させる。(2) ウェルの中へと細胞を沈澱させ、次いで、吸引によって余分な培地を取り除く。(3) アレイを、捕捉抗体で前処理された固体支持体と接触させ、軽く加圧し、1~2時間インキュベートする。(4) 固体支持体からマイクロウェルを取り出し、培地に戻す。検出抗体によってガラススライドを発色させる。

50

【図2】マイクロエンレーピングおよびELISpotによって測定された、サイトカイン分泌細胞の頻度を実証する一連の棒グラフである。

【図3】マイクロエンレーピングによって作製されたCD4+T細胞についての四重サイトカインプロファイルを示す一連の顕微鏡写真である。

【図4】マイクロエンレーピングによって作製されたCD4+T細胞についての四重Th2サイトカインプロファイルを示す一連の顕微鏡写真である。

【図5】(a)抗CD3/抗CD28、(b)フィットヘマグルチニン、および(c)ポークウィードマイトジェンで刺激されたヒトPBMCについての四重サイトカインアッセイを実証する一連の棒グラフである。データは、24時間の刺激後、48時間の刺激後、および72時間の刺激後にマイクロエンレーピングによって検出されたスポットの数を示す。

10

【図6 A】図6は、単一細胞からのサイトカイン分泌の定量を実証する一連のグラフを示す。(A)マイクロエンレーピング中の、単一細胞を含む1個のマイクロウェルの構造の模式図。

【図6 B】図6は、単一細胞からのサイトカイン分泌の定量を実証する一連のグラフを示す。(B)細胞が10分子/sの一定速度で分泌している時に、マイクロエンレーピング中の、培地中()およびガラス表面上()に蓄積した分析物の計算された量のプロット。

【図6 C】図6は、単一細胞からのサイトカイン分泌の定量を実証する一連のグラフを示す。(C、D)LPSにより3時間、6時間、または12時間、刺激した後のヒトPBMCによるIL-6産生。(C)それぞれの刺激後の、マイクロエンレーピングによって測定されたIL-6分泌速度の分布のヒストグラム。(C)で示されている値nは、それぞれの曲線の下での規準化された細胞総数である。

20

【図6 D】図6は、単一細胞からのサイトカイン分泌の定量を実証する一連のグラフを示す。(C、D)LPSにより3時間、6時間、または12時間、刺激した後のヒトPBMCによるIL-6産生。(D)定量PCRにより測定されたIL-6 mRNAレベル。

【図6 E】図6は、単一細胞からのサイトカイン分泌の定量を実証する一連のグラフを示す。(E)LPS、PHA、およびPWMにより刺激された後の、2人のドナーからマイクロエンレーピングによって測定されたIL-6分泌速度の分布のヒストグラム。(E)で示されている値nは、それぞれの曲線の下での規準化された細胞総数である。

【図7】マイクロエンレーピングを用いた、単一分析物測定値の実験的分析を実証する一対のグラフである。(A)個々のヒトPBMCにより分泌されたIL-6の測定。細胞を、LPS(10 μ g/mL)およびPWM(5 μ g/mL)により48時間、刺激した。インキュベーション時間の関数としての、捕捉されたIL-6の相対蛍光強度の箱ひげ図。それぞれの箱の中に含まれる事象の最小数は35であった。中央値の線形回帰によって実線をフィットさせた。統計値は、両側スチューデントt検定によって求めた。(B)マウスハイブリドーマ細胞HYB 099-01(抗オポアルブミン、Statens Serum Institute)からの抗体の分泌の測定。2種類のヤギ抗マウスIgG(Zymed and Southern Biotech、それぞれ50 μ g/mL)の混合物によって、分泌IgGを捕捉し、オポアルブミン-Alexa 555(Invitrogen、2 μ g/mL)によって検出した。マイクロウェル中の生細胞の数は、マイクロエンレーピング後にカルセインバイオレットAM(Invitrogen)染色によって求めた。シグナルの中央値は、3種類の異なるインキュベーション時間(15分、30分、および45分)について、それぞれのウェルにおいて示された細胞数の関数としてプロットした。線形回帰によって実線をフィットさせた。

30

40

【図8】捕捉抗体の分泌速度および親和性(K_D)の関数としての捕捉された分析物の計算された数を示す折れ線グラフである。実線は、時間の関数としての分泌された分析物の総数を表す。 ρ_0 は、ガラス上の結合部位の推定密度である。これらの計算から、低親和性捕捉抗体($K_D=10$ nM)は分泌速度を約2分の1に過小評価し得ることが示唆される。

【図9】細胞からの分泌速度を計算するのに用いられた標準的な参照スライドの顕微鏡写真(A)および試料検量線(B)である。一連の希釈した蛍光標識検出抗体を、示された濃度でガラス上にスポットし(1 μ L/スポット)、各スポットの平均蛍光強度をプロットして検量線(実線)を作成した。

【図10 A】図10は、単一細胞からのサイトカインの四重分析を実証する顕微鏡写真およ

50

び一連のチャートである。ヒトPBMCを、PMA/イオノマイシンにより6時間、刺激した。(A)マイクロウェル内の個々の細胞の代表的な画像と、対応するサイトカインマイクロアレイからの顕微鏡写真(横列に並べた)と突き合わせた。第1の縦列は、マイクロウェル(位相差)および細胞(カルセインAM)の合成顕微鏡写真を示す。残りの4つの縦列は、4種類それぞれのサイトカイン(IL-17、青色; IFN γ 、緑; IL-2、黄色; TNF α 、赤色)についての、プリントされたマイクロアレイ上の一致する位置から抽出された顕微鏡写真である。画像外にあるオレンジ色の囲みは、それぞれの横列におけるポジティブスポット(MFI>バックグラウンド+3 σ)を示す。

【図10B】図10は、単一細胞からのサイトカインの四重分析を実証する顕微鏡写真および一連のチャートである。ヒトPBMCを、PMA/イオノマイシンにより6時間、刺激した。(B)産生されたサイトカインの組み合わせに従ってまとめられた、それぞれのサイトカインについての分泌速度のヒストグラム。色は(A)での割り当てと一致する。それぞれのヒストグラムの中にある、挿入された四角の横列は、プロット内に表された細胞が産生したサイトカインの組み合わせを示す。それぞれのヒストグラムの中にある値nは、100,000個の細胞あたりの、サイトカイン産生細胞の規準化された総数である。3回の独立した実験からのデータを用いて、ヒストグラムを構築した。

【図11】多重検出における低頻度の機能細胞の代表的な画像を示す顕微鏡写真である。第1の縦列は、マイクロウェル(位相差)および細胞(カルセインAM)の合成顕微鏡写真を示す。残りの4つの縦列は、4種類それぞれのサイトカイン(IL-17、青色; IFN γ 、緑; IL-2、黄色; TNF α 、赤色)について、プリントされたマイクロアレイ上の一致する位置から抽出された顕微鏡写真である。画像外にあるオレンジ色の囲みは、それぞれの横列におけるポジティブスポット(MFI>バックグラウンド+3SD)を示す。

【図12】(A)IFN γ または(B)IL-2を産生するCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞について測定された分泌速度を示す一対のヒストグラムである。nは、マイクロエンゲレービング後の、示された表面マーカーを有する細胞の未加工の数値である(IFN γ についてはp=0.055、IL-2についてはp=0.94)。

【図13A】図13は、同時分泌型サイトカインの相関関係を実証する一連のグラフである。(A)IFN γ /IL-2、IFN γ /TNF α 、およびIL-2/TNF α 二重産生株(producer)からのサイトカインペアについての分泌速度の二次元スキャッタープロット。それぞれの軸の色は、その次元におけるサイトカインのタイプを示す(IFN γ 、緑; IL-2、黄色; TNF α 、赤色)。それぞれのドットは1個の細胞を示し、x値およびy値は、サイトカインペアの分泌速度である。rは相関係数である。pは相関がない確率である。

【図13B】図13は、同時分泌型サイトカインの相関関係を実証する一連のグラフである。(B)IFN γ /IL-2/TNF α 三重産生株についてのそれぞれのサイトカインペアの二次元プロット。

【図13C】図13は、同時分泌型サイトカインの相関関係を実証する一連のグラフである。(C)CD4⁺(青色)およびCD8⁺(赤色)のIFN γ /IL-2(上パネル)およびIFN γ /TNF α (下パネル)T細胞についての速度のスキャッタープロット。数nは、プロットにおけるスポットの総数である。

【図14】ローリングサークル増幅機構の図である。検出抗体はオリゴヌクレオチドと結合体化している。DNAサークルがオリゴヌクレオチド中の相補配列にハイブリダイズし、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅される。最終的に、増幅されたDNA配列は、蛍光標識オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによってインサイチューで標識される。

【図15】ローリングサークル増幅(RCA)を用いた複数の種類のサイトカインを検出するデザインの図である。それぞれの種類の検出抗体が固有のオリゴヌクレオチド配列と連結されている。プライマーに対する相補配列を有する4種類の環状DNAを用いて、プライマーを増幅する。4種類のレポーター配列が、異なるフルオロフォアにより標識され、長いDNA鎖にハイブリダイズする。

【図16】複数の種類のサイトカインを検出するためのRCAに基づく連続標識のデザイン

10

20

30

40

50

を示した図である。前記で示したRCAプロセスの後に、対応する配列を検出するために、蛍光標識を有する第1のレポーター配列セットがシステムに添加される。スキャンの後に、スライドは、二本鎖DNAを特異的に切断する酵素で処理されるか、レポーター配列とフルオロフォアとの間のリンカーを切断する化学試薬で処理される。このプロセスの後に、第1のサイトカインセットに対して増幅された配列は不活性化される。次いで、別のサイトカインセットを検出するために、フルオロフォアを有する第2のレポーター配列セットがシステムに適用される。検出プロセス全体を数回、繰り返すことができる。

【図17-1】現行のアレルギー検査に関する問題を示した一連の図である。

【図17-2】現行のアレルギー検査に関する問題を示した一連の図である。

【図18】本明細書に記載のマイクロエンブリング法の実施を実証した一連の図およびグラフである。

【図19】アレルギー応答のプロファイリングを示した一連の図である。

【図20】マイクロアレイデータの分析を図示する模式図である。

【図21】細胞型、分泌の規模、およびレスポンスの頻度に基づいた免疫プロファイルの計算を実証するフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は、多重サイトカイン捕捉の方法を提供する。本発明はまた、データの次元を高めるために、サイトカインを、系列を区別する細胞上の表面発現マーカーと突き合わせる工程、および分泌速度を定量する工程も提供する。接触領域は、ディファレンシャルラベリング(differential labeling)によって特定される。

【0031】

具体的には、本発明は、ポリクローナルマイトジェン/アレルゲン(例えば、ポークウィードマイトジェン(PWM)およびフィットヘマグルチニン(PHA))ならびにTCR特異的活性化(例えば、抗CD3/CD28)の後の応答細胞の頻度を測定する。集められたデータから分泌速度が定量される。このさらなるデータによって、応答の頻度および規模(分布)の評価が可能になる。このさらなる次元は、サイトカイン応答の分解能の改善に重要である。下記で説明するように、具体例は、PWM、PHAなどによる刺激後の、2種類のドナーに由来するPBMCからのIL-6(初期炎症応答マーカー)分泌の測定を伴う。下記で説明するように、応答細胞の頻度は変化するが、応答の規模とは一致しない。統計検定から、分布は固有であることが分かる。この多次元データは、疾患(例えば、アレルギー、感染、自己免疫など)の免疫モニタリングの質を改善する。これらの測定は、細胞1個あたり複数の種類のサイトカイン(少なくとも4種類)について行われる。

【0032】

下記のように、表面発現した表現型マーカー(例えば、CD4およびCD8)は個々の測定値と突き合わされることで、データの分解能がさらに精巧になり、イメージングサイトメトリー(imaging cytometry)およびサイトカイン放出の突き合わせにより固有のサブセットが特定される。単一細胞について、様々なサイトカインの分泌速度が相関関係にある。本明細書に記載の方法は定量(多次元)データセットの統合を可能にし、このデータから、これらの測定値は、異なる刺激に対する、異なるドナーに由来する細胞の応答を区別するのに用いられることが分かる。本発明の用途には、アレルギー検査、ワクチン、治療用生物薬剤、進行中の感染、自己免疫疾患などの臨床モニタリングが含まれる。

【0033】

本発明は、アレルギー反応を特徴とするサイトカインのレベルを調べることによって、1種類または複数の種類のアレルゲンに対する個体の感受性を試験するための方法および組成物を提供する。アレルギーは免疫系過敏の一種であり、アレルゲンとして知られる環境物質と接触することで引き起こされる。アレルギーは世界的な流行病である。アレルギー免疫応答は、アレルゲンに対する感作および特異的免疫応答の発生を必要とする。アレルゲンに対する感作中に、アレルゲン特異的CD4⁺T_{h2}細胞が活性化されると、T_{h2}サイトカ

10

20

30

40

50

イン(例えば、IL-4およびIL-13)が産生される。 T_{H2} サイトカインは、B細胞におけるIgEへのクラススイッチの誘導、粘液産生、および T_{H2} 細胞に対する内皮細胞活性化、および組織への好酸球遊走を担っている。IgEは、マスト細胞および好塩基球の表面上に発現したIgE高親和性受容体(Fc RI)に結合することによって、マスト細胞および好塩基球を感作させる。アレルゲンによってIgE-Fc RI複合体が架橋結合すると、マスト細胞および好塩基球は脱顆粒し、血管作用性アミン(主に、ヒスタミン)、脂質メディエーター(プロスタグランジンおよびシステイニルロイコトリエン)、サイトカイン、ならびにケモカインを放出する。これらは全てアレルギー反応の即時相を特徴付ける。感作相の後に、標的器官において、アレルゲン投与に対するアレルギー性炎症およびアレルギー反応が観察され、アレルギー性の鼻結膜炎、湿疹、喘息、または全身アナフィラキシーの発症につながる(Lar

10

【0034】

インターロイキン-4(IL-4)、IL-5、IL-9、およびIL-13などの T_{H2} 型サイトカインは、慢性アレルギー性炎症に関連する広範囲の事象に影響を及ぼす。IL-4およびIL-13はIgEおよび血管細胞接着分子1の産生を刺激するのに対して、IL-5およびIL-9は好酸球の発生に関与し、IL-4およびIL-9はマスト細胞の発生を促進する。IL-9およびIL-13は気道過敏の促進を助けるのに対して、IL-4、IL-9、およびIL-13は粘液の過剰産生も促進する(Kay, AB 2001 N Engl J Med, 344:109-113; Kay, AB 2001 N Engl J Med, 344:30-37)。アレルギー性疾患のために重要な意味を有する、 $CD4^+$ T細胞の別の中心的なサブセットとして、調節性T細胞(T_{Reg} 細胞)が発見されている。マウスモデルにおける研究は T_{Reg} 細胞がアレルギー応答の抑制に強く関与していることを示しており、 T_{Reg} 細胞はまたヒトでは抑制性サイトカインであるIL-10およびトランスフォーミング成長因子- β (TGF- β)を介して T_{H2} 細胞応答も制御し、アトピーは T_{H2} 細胞と T_{Reg} 細胞との不均衡に起因するという証拠が現れつつある(Bacchetta, et al., 2007 J Allergy Clin Immunol, 120:227-235; quiz 236-27; Larche, M. 2007 Chest, 132:1007-1014)。調節性T細胞は、IgEの抑制およびIgG₄の誘導によってアレルギー性疾患の抑制に寄与し得るが、IgAの産生は、TLR7およびTLR9を介したB細胞活性化によって増強される(Meiler, F 2008 Allergy, 63:1455-1463)。 T_{H1} 細胞(IFN- γ を産生する)と T_{H2} 細胞との不均衡はアレルギー療法において重要な役割を果たしている。特異的免疫療法は、 T_{H2} 細胞によって産生されるサイトカインのダウンレギュレーション、 T_{H1} 細胞によって産生されるサイトカインのアップレギュレーション、および調節性T細胞の誘導に関連している。次に、これらの変化によってアレルギー性炎症が阻害され、IgEの産生を制御するサイトカイン(インターフェロンおよびインターロイキン-12)が増加し、「遮断」抗体(IgG)が産生され、アレルゲン特異的応答低下に関与するサイトカイン(IL-10およびTGF- β)が放出される(Kay, AB 2001 N Engl J Med, 344:109-113)。新たに特定された別のタイプの $CD4^+$ T細胞は T_{H17} 細胞と呼ばれ、これは好中球炎症に関連する(Stockinger, B 2007 Immunol Cell Biol, 85:83-84)。IL-17Aは、好中球流入に関連する喘息気道において過剰発現され、ヒト気道平滑筋細胞による好中球化学誘引物質IL-8(CXCL8)の産生を誘導する(Holgate, ST and Polosa, R 2008 Nat Rev Immunol, 8:218-230)。健常個体およびアレルギー個体は、3種類全ての T_{H1} 、 T_{H2} 、および T_{Reg} アレルゲン特異的サブセットを異なる比率で示す(Akdis, M et al., 2004 J Exp Med, 199:1567-1575)。従って、優勢なサブセットの変化および T_{H1} 細胞と T_{H2} 細胞と T_{Reg} 細胞との平衡がアレルギーの発症または回復につながり得る。

20

30

40

【0035】

マイクロアレイおよび平板は、PCT/US2006/036282(WO/2007/035633として公開)およびUSSN61/057,371に記載の方法を含む当該技術分野において公知の方法を用いて構築することができる。これらの両出願の内容は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。本明細書で使用する「成形可能な平板」は、基板と接触している時に、少なくとも1寸法において曲がる、動く、または変形することができる器具をいう。例えば、ある特定の構造では、成形可能な平板は、基板と接触している時に、成形可能な平板と基板との間に実

50

質的に流体密着シールを形成して、成形可能な平板の中にある流体が漏れる、または漏出するのを阻止または防止するような材料、例えば、エラストマー材料を含んでもよい。

【0036】

本明細書に記載の方法、器具、およびキットは、それぞれのマイクロウェルの中に1個または数個の細胞を保持するために、マイクロウェルまたはチャンバーの成形可能なアレイ(例えば、直径が100ミクロン未満、または直径が50~100ミクロン)を使用することができる。マイクロウェルが密封容器または試験器具になるように、アレイは基板と物理的に接触される。このシステムをインキュベーションすると、細胞は、抗体、サイトカイン、および他の分泌産物などの産物の産生が可能になり、次いで、産物は、基板上の、マイクロウェルと接触している領域において固定化される。このように、それぞれのマイクロウェルからの細胞産物のマイクロアレイが作製される。このシステムを、適切な時間、例えば、1分間、5分間、30分間、40分間、または50分間~数時間(1時間、3時間、6時間、12時間、例えば、24時間以下)インキュベーションした後に、固定化細胞産物が既知の種と会合するかどうか確かめるために、マイクロウェルアレイを基板から取り出し、基板、マイクロアレイ、またはマイクロエンレーピングの上にある固定化細胞産物を、既知の種を用いてスクリーニングすることができる。

10

【0037】

ソフトリソグラフィ法は、個々の細胞を含むマイクロウェル(それぞれ0.1~1nL)からなる高密度アレイをマイクロエンレーピングして、それぞれの細胞が分泌した分子からなる対応するアレイをプリントするのに用いられる。エンレーピング後に、細胞はマイクロウェルの中に培養状態で残っており、マイクロアレイは、タンパク質または抗体からなる市販のマイクロアレイと同様に、例えば、蛍光標識試薬およびレーザーベースの蛍光スキャナーを用いて調べられる。従って、この方法は、抗原特異的抗体の分泌などの望ましい特性を示す細胞を迅速に特定し、その後、クローン増殖のために個々のウェルから回収を行うことができる。

20

【0038】

一般的に、望ましいサイトカインを特異的に検出する任意の方法を、本発明の方法および組成物において使用することができる。一般的に、サイトカインの存在を検出するために、特異性が既知の抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル)からなるアレイが用いられる。

30

【0039】

ある態様において、試験されるサイトカインプロファイルは、 Th_1 または Th_2 プロファイルである。例えば、 Th セットを検出する検出剤の場合、サイトカインは、例えば、IL-17、IL-10、IL-4、および/またはIFN-でもよい。 Th_2 セットには、例えば、IL-4、IL-5、IL-13、および/またはIL-9が含まれる。第3のプロファイルは、IgE、IgG₁、IgG₄、および/またはIgGA抗体のレベルを評価する。試験することができる他のサイトカインには、例えば、IFN-、TNF-、IL-10、TGF-、GM-CSF(Th_1 細胞および Th_2 細胞の分化を媒介する)、ならびにIL-17Aが含まれる。必ずしもT細胞に由来するとは限らないが、スクリーニングされるサイトカインには、例えば、IL-2、IL-12、IL-18、IL-8、IL-15、IL-25(IL-17E)、IL-33、TGF-、IL-35、IL-1、IL-6、IL-23、IL-22、IL-19、IL-17F、胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)、グリコシル化阻害因子(GIF)、MARC(マスト細胞活性化関連ケモカイン)LTC4、およびPGD2が含まれる。試験される他のケモカインには、CCケモカイン(例えば、単球化学誘引物質タンパク質-1(MCP-1またはCCL2)およびRANTES(CCL5))、CXCケモカイン(例えば、IL-8)、Cケモカイン(例えば、XCL1(リンホタクチン-)およびXCL2(リンホタクチン-))、ならびにCX₃Cケモカイン(例えば、フラクタルカイン(またはCX₃CL1))が含まれる。

40

【0040】

一般的に、任意の既知のアレルゲンまたは疑いのあるアレルゲンを試験することができる。一般的な食物アレルギーおよび薬物アレルギーには、例えば、乳、卵、豆果(ピーナッツを含む)、ツリーナッツ(クルミ、カシューなど)、魚、貝・甲殻類、ダイズ、コムギ

50

、乳製品、卵製品、海産物、および貝・甲殻類が含まれる。薬物アレルギーには、例えば、アモキシシリン、ペニシリン、サルファ剤、バルビツレート、抗痙攣剤、インシュリン、およびヨウ素が含まれる。他の一般的なアレルギーには、例えば、塵埃、花粉、ペットの鱗屑、ラテックス、塩素、昆虫刺咬(スズメバチ、ヒアリ、およびハチ刺され)が含まれる。

【0041】

本明細書に記載の方法を用いた単一細胞分析は、疾患の生物学的プロセスおよび機構を理解するための固有の利点を備えている。顕微イメージングおよび化学的分離によって、大量サンプリング法では発見できない、単一細胞における固有の生物現象が解明されてきた(Sims, CE and Allbritton, NL 2007 Lab Chip, 7:423-440)。一例は、単一細胞を刺激した後に経時的にCa²⁺濃度が繰り返し増減する固有のパターンである(Woods, et al., 1986 Nature, 319:600-602)。この現象は、個々の細胞のタイミングおよび応答が異なるために細胞集団全体を研究する時には見えない。単一細胞の測定は、混合細胞の集団を研究するのにも価値がある。

10

【0042】

疾患状態の研究では、モデル生物または患者から直接採取された試料の分析は、正常細胞と罹患細胞の混合物のために複雑である。腫瘍生検材料の単一細胞研究から、腫瘍内の細胞の大半は正常である可能性があることが分かっている。しかしながら、異常細胞の中には、顕著な不均一性が存在する(Fink, et al., 2006 Exp Toxicol Pathol, 57: Suppl 2, 25-29; Bodey, B 2002 Expert Opin Biol Ther, 2:371-393)。従って、ほとんどの腫瘍の分子特性の決定は、プールした細胞の溶解産物の分析により極度に制限される。

20

【0043】

単一細胞検出

過去数十年間にわたって、個々の細胞の分子機構のハイスループット研究のために一連の技法が開発されてきた。ELISpot(酵素結合免疫スポット)は、単一細胞レベルでサイトカイン産生細胞を検出するための一般的な方法である(Czerkinsky, et al., 1983 J Immunol Methods, 65:109-121)。この技術では、細胞が負荷され、特異的抗体で機能化した膜上で増殖される。培養中に、それぞれの細胞によって産生されたサイトカインは、細胞の周囲にある抗体によって捕捉される。個々の細胞からの分泌産物は別の抗体により検出された後に、視覚化される。この方法は、分泌タンパク質の定性結果と、応答細胞の頻度の半定量結果の両方を提供する。この技法の欠点は、毎回、1種類または2種類の分泌タンパク質しか検出できず、それぞれの細胞から複数の分泌パターンは評価しないことである。また、実験後に特異的細胞が失われる。

30

【0044】

FACS(蛍光標示式細胞分取)はフローサイトメトリーの一種である。それぞれの細胞は、細胞表面マーカーまたは細胞内タンパク質に対する蛍光標識抗体で染色される。新たな検出法の開発により、それぞれの細胞から19までのパラメータ(17種類の蛍光色および2種類の物理的パラメータ)を同時に検出することができるが(Perfetto, et al., 2004 Nat Rev Immunol, 4:648-655)、日常的な使用は、典型的に6~8種類の色に限定される。FACSは、細胞集団を研究するために免疫学において用いられる最も一般的な技術である。FACSは、1秒間当たり数千個の細胞を分析することができる。しかしながら、検出後に単一細胞を収集および培養することが難しく、このために、1個の細胞を追跡する動力学研究は不可能である。典型的なFACS感度は~0.1%であり、標的細胞の十分な染色を必要とする。

40

【0045】

別の組のハイスループット法、例えば、CTC-チップ(Nagrath, et al., 2007 Nature, 450:1235-1239)、マイクロフィルター装置(Zheng, et al., 2007 J Chromatogr A 1162, 154-161)、またはマイクロポア(Talasz, et al., 2006 Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 1:1838-1841)は、血液から希少な循環性腫瘍細胞(CTC)を検出することを目的とする。いくつかは、検出システムの効率を改善する技法、例えば、レアイベントイメージングシステム(REIS)(Kraeft, et al., 2004 Clin Cancer Res, 10:3020-3028)および光ファイバー

50

アレイスキャニングテクノロジー (FAST) (Krivacic, et al., 2004 Proc Natl Acad Sci U SA, 101:10501-10504) である。これらの方法の利点は、希少な細胞を素早くスクリーニングおよび単離できることである。しかしながら、捕捉される細胞型およびさらなる分析には制限がある。

【 0 0 4 6 】

ラボオンチップ (LOC) は単一細胞検出のための別の形式である。多くのシステムがチャンネルおよび微小環境の微細加工に基づいている。異なるタイプの LOC には、フローサイトメトリー、細胞数の電気泳動分析、指示薬を用いた顕微分析、細胞少量リアクター (cell as small volume reactor)、細胞と微小環境との相互関係、および単一細胞 PCR (Sims, CE and Allbritton, NL 2007 Lab Chip, 7:423-440) が含まれる。

10

【 0 0 4 7 】

単一細胞研究用のマイクロエンレーピングおよびその利点

マイクロエンレーピングは、個々の細胞の迅速なハイスループットの多重スクリーニングのために最近開発された技法である。この技法は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするために用いられている (Love, et al., 2006 Nat Biotechnol, 24:703-707)。これはまた、1型糖尿病患者に由来する個々のヒト末梢血単核球の集団を、分泌型サイトカイン (IFN- および IL-6)、抗原特異的抗体、ならびに系列特異的表面マーカーについて多重に調べるように適合された (Bradshaw, et al., 2008 Clin Immunol, 129:10-18)。

【 0 0 4 8 】

20

この技術では、個々の細胞を単離するために、可撓性のある PDMS ポリマースタンプの中にマイクロウェルアレイを成形する (図1)。その後、関心対象のタンパク質に対する捕捉抗体で機能化したガラススライドに、ウェルアレイを適用する。ある特定のインキュベーション時間の後に、マイクロウェルスタンプからガラススライドを分離し、蛍光標識した検出抗体を用いて発色させる。細胞を含むスタンプは培養のために培地に戻されるか、細胞表面マーカーについて染色される。ウェルから関心対象の細胞を回収する。要約すると、この技法は、単一細胞レベルでタンパク質分泌を測定するようにサンドイッチ酵素結合免疫測定法 (ELISA) を適合させる。この技術はまた、ELISpot および FACS によって通常得られる情報を提供する他に、単一細胞を追跡する能力も有する。

【 0 0 4 9 】

30

免疫学的研究において用いられるマイクロエンレーピング

免疫系における細胞の多様性および細胞の多機能性のために、マイクロエンレーピング技術は、免疫系の単一細胞を研究するための有用な技法となっている。マイクロエンレーピングを用いると、末梢血単核球 (PBMC) から以下の情報が測定される: 1) 全集団における、それぞれの細胞型の頻度; 2) 全集団における、ある特定のサイトカインまたは抗体を分泌する細胞の頻度; 3) 単一細胞レベルでのサイトカインプロファイルおよびその動的変化; 4) 検出後の、生存能力のある関心対象のクローン; 5) 疾患における様々な種類の免疫細胞の機能ネットワーク。

【 0 0 5 0 】

前記の情報は、免疫学的研究、臨床診断、疾患発症のモニタリング、および治療の評価においてさらに使用することができる。

40

【 0 0 5 1 】

マイクロエンレーピングの改善

本発明は高い検出感度を提供する。大量細胞培養を用いる ELISA と比較したマイクロエンレーピングの利点の1つは、細胞が少量 (~0.1nI/細胞) でトラップされ、その結果、標的タンパク質の局所濃度が高くなることである。本明細書に記載の方法は、分泌型サイトカインの表面ベースの捕捉 (例えば、Millipore) の約10倍の感度がある。他方で、蛍光と検出抗体との直接標識は、シグナルが酵素触媒反応によって増幅される ELISA と比較して低い感度を示す。検出感度は、同じ抗体ペアを用いた ELISA の約10分の1から100分の1である。マイクロエンレーピングにおける分泌タンパク質の高い局所濃度および低いシグ

50

ナル増幅のために、全体の検出感度はELISAより劇的には高くない。

【0052】

本発明は、以下の非限定的な実施例においてさらに例示される。

【実施例】

【0053】

実施例1: サイトカイン検出のためのプロセスの最適化

ソフトリソグラフィーによって製造されたマイクロウェルアレイから分泌型サイトカインを検出するためのプロトコルを最適化した。様々なスライド、ブロッキング緩衝液、および捕捉抗体濃度を試験した。

【0054】

ポリリジンおよびエポキシドは、タンパク質マイクロアレイにおいて一般的に用いられる2種類のスライド用表面である。乳およびBSAは、ウエスタンブロットおよびマイクロアレイにおいて用いられる一般的な2種類のブロッキング緩衝液である。IL-4捕捉抗体の勾配をガラススライド表面(ポリLまたはエポキシ表面)の上に2 μ l/スポットでスポットした。室温で2時間インキュベートした後、スライドを、PBSに溶解した1%BSAまたは3%脱脂粉乳で30分間ブロックした。それぞれのスポットに標準IL-4(500pg/ml)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後、1 μ g/mlのDylight647結合体化IL-4検出抗体を検出試薬として適用した。対照(バックグラウンド)については、IL-4標準を添加しなかった。4つのパラメータを異なる組み合わせで用いて、捕捉抗体の勾配を試験した。乳でブロックし、10~25 μ g/ml捕捉抗体でコーティングしたポリLスライドから最良の結果が得られ、さらに、当初のプロトコル(エポキシスライド、BSAブロッキング、および200 μ g/ml捕捉抗体)より非常に良い結果が得られた。最適の混合物を以下の実験において使用した。

【0055】

GenePixスキャナーの4つのレーザーに基づく4色検出へのマイクロエンレーピングの展開を試験した。4種類のT細胞サイトカインIFN- γ 、IL-4、IL-10、およびIL-17を選択した。検出抗体を、IL-17-Dylight 488(青色)、IFN- γ -Dylight 549(緑)、IL-10-Alexa Fluor 594(黄色)、およびIL-4-Dylight649(赤色)の4種類の蛍光標識で別々に標識した。それぞれの抗体ペアの性能を試験するために、個々のサイトカイン標準は、個々の抗体ペアおよびサイトカイン標準を用いて行った。検量線は、これらの4種類のサイトカインの感度が200pg/mlであることを示す。この多重戦略は、4種類全ての捕捉抗体の混合物でガラスをコーティングし、検出抗体の混合物を用いて検出するものである。異なる抗体とサイトカインとの間の可能性のある交差反応を試験するために、それぞれの1種類のサイトカインについて、捕捉抗体および検出抗体の混合物を用いて検量線を作成した。この結果から、高濃度では、一部のサイトカインシグナルは互いに影響を受けることがあることが分かる。IL-10は、その濃度が16ng/mlを超えた時にIFN- γ チャンネルにおいて強力なシグナルを有する。IL-4およびIFN- γ は、IL-10チャンネルにおいて、いくらかのシグナルを有する。このデータに基づく、サイトカイン濃度が1~10ng/mlの範囲にあれば、これらの4色ははっきりと区別することができる。

【0056】

単一細胞からの複数の種類のサイトカイン検出

前記の方法が、細胞から分泌された複数の種類のサイトカインを検出する感度を有するかどうか試験するために、PBMCをPHAで24時間、刺激し、マイクロウェルに負荷した。一部のスポットの画像は、2時間のプリント後に観察された。スライド上には1色のスポットしか見られず、このことから、これらの4色が互いに良好に区別されることが分かる。また、二重陽性スポットおよび多数陽性スポットもあり、このことから、それぞれの細胞の機能プロファイルが異なることが実証される。

【0057】

マイクロエンレーピングおよびELISpotを比較するために、同じ細胞セットおよび同じ抗体クローンを用いて、両方法におけるサイトカイン分泌細胞の頻度を検出した(図2)

。1個のスタンプにあるウェルの総数は約80,000個であり、ローディング効率は、通常、50%であった。この計算に基づいて、IFN- の頻度は、これらの2つの方法において同じ規模である。他の3種類のサイトカインとIFN- と比較すると、IL-4およびIL-17の相対頻度は同じオーダーであり、マイクロエンレーピングはELISpotより高い感度を示す。

【0058】

これらの2つの方法において、IL-10頻度は一致しない。考えられる説明は、マイクロエンレーピングにおいて用いられたIL-10抗体がELISpotに適していないということである。しかしながら、ELISpotは、それぞれの細胞から1つのパラメータしか検出できず、二重陽性細胞の頻度についての情報を得ることができない。ELISpotとびマイクロエンレーピングとの直接比較を表1に示した。

10

【0059】

(表1) マイクロエンレーピングとELISpotとの比較

	マイクロエンレーピング	ELISpot
細胞	~10 ⁵	~10 ⁵ /ウェル *Nサイトカイン
サンプリングウィンドウ	2 h	24 h
総時間	~7 h	少なくとも48h
分泌速度の定量測定	あり	限定的
細胞の回収	あり	なし
情報	多い	少ない

20

【0060】

表現型を維持している、マイクロエンレーピングから回収された細胞

初代細胞がプリント後でも生きていのかどうか、マイクロエンレーピングによって検出された機能プロファイルに再現性があるかどうか確かめるために、CD4⁺T細胞をマイクロウェルに負荷し、IFN- およびIL-17の分泌を測定した。IFN- 陽性、IL-17陽性、およびIFN- /IL17二重陽性の3種類のシグナルが検出された。プリント中に、ウェルの大部分は1~2個の細胞を含み、これらの一部は3個の細胞を含んだ。プリント後に、マイクロウェル内の細胞をさらに2日間培養した。細胞の大部分は分裂した。代表的な細胞の一部をウェルから取り出し、96ウェル内で培養した。細胞増殖させた後に、細胞内染色を行い、FACSを用いて表現型を検出した。

30

【0061】

IL-17およびIFN- を検出するために、CD4⁺T細胞をマイクロウェルに負荷した。シグナルのある細胞をウェルから取り出し、培養してクローンにした。細胞の一部は、マイクロエンレーピングにおいて検出されたものと同じ表現型を保持していた。二重陰性集団が観察された。これらの細胞は培養中にサイトカイン分泌能を失ってしまった可能性があるか、または、2個または3個の細胞が負荷された当初のウェル内で、このような細胞が存在していた可能性がある。これらの結果は、1)プロセス最適化によって、直接蛍光標識を用いた、1種類のサイトカインに対する検出感度が少なくとも200pg/mlであること；2)4種類のサイトカインがマイクロエンレーピングにおいて同時に検出されること；3)マイクロエンレーピングを用いて、サイトカイン分泌細胞の頻度が評価され、ELISpotと比較してさらに詳細な情報が得られること；4)2時間のプリント後に、細胞に生存能力があり、ウェルから細胞が回収されることを実証している。細胞の一部は元々の表現型を依然として保っている。

40

【0062】

50

実施例2: 多重サイトカイン捕捉

マイクロウェルアレイを作製するための、特注の射出成形用鋳型

前記のように、本発明の方法は、標準的なガラススライドに取り付けられたポリ(ジメチルシロキサン)の中に成形された薄い(1mm)ナノウェルアレイを作製するための射出成形プロセスを含む。この標準化された製造プロセスによって、アッセイおよびデータ収集の再現性が改善された。

【0063】

サイトカイン検出のための抗体検証

関心対象のサイトカインを検出するための適切な抗体ペアの検証を以下で説明する。以下で説明する簡単な無細胞アッセイは、候補抗体ペアを試験するのに用いられるマイクロエンレーピングプロセスを模倣する。この順応性のあるアッセイによって、Th応答の偏りならびに特異的なTh2応答およびTh1応答を示すサイトカインセットを検出するための4つの特異なパネル(IL-4/IL-10/IL-17/IFN γ ; IL-4/IL-5/IL-9; IFN γ /MIP-1/TNF α /パーフォリン; IFN γ /IL-10/IL-17/IL-22)が特定された。2つの抗体パネル(IgG1/IgA/IgE/IgG4; IgG1/IgA/IgG3/IgM)のための検出抗体が検証された。

【0064】

単一細胞からの四重サイトカイン検出

単一細胞からの2つのサイトカインセットの四重検出を以下で説明する。図3は、T細胞応答の偏り(IFN γ /IL-4/IL-10/IL-17)を示すアッセイ結果を示す。この実験では、抗CD3および抗CD28を用いてPBMCを刺激した。CD4+T細胞を負の選択によって分離し、蛍光表面マーカー(CD4-Alexa647)によって染色し、マイクロウェルアレイに負荷した。このアレイを、IL-4、IL-10、IL-17、およびIFN γ の捕捉抗体で機能化したガラススライドと接触させた。2時間のインキュベーション後に、アレイを取り出し、画像化した。スライドを染色し、Genepixマイクロアレイスキャナーによって画像化した。それぞれのウェルについて、画像を補正した。それぞれのウェルは50 μ m \times 50 μ m \times 50 μ mである。図4は、Th2応答(IL-4/IL-5/IL-13/IL-9)の幅を示すアッセイ結果を示す。この実験では、抗CD3および抗CD28を用いて、PBMCを刺激した。CD4+T細胞を負の選択によって分離し、マイクロウェルアレイに負荷した。このアレイを、IL-4、IL-5、IL-13、およびIL-9の捕捉抗体で機能化したガラススライドと接触させた。2時間のインキュベーション後に、アレイを取り出し、画像化した。スライドを染色し、Genepixマイクロアレイスキャナーによって画像化した。それぞれのウェルについて、画像を補正する。それぞれのウェルは50 μ m \times 50 μ m \times 50 μ mである。

【0065】

特に注目に値するのは、これらのアッセイにおいて、従来のELISpotによる検出が非常に難しいサイトカインであるIL-4が検出されたことである。これらの機能測定はまた、ナノウェル内にある細胞の自動画像収集とも一緒に行った。このようにして、個々の細胞の系列と、その分泌プロファイルとを突き合わせる。集められた1728xNチャンネルの画像を、特異的な表面発現マーカー(例えば、CD4、CD8)の発現レベルを示す関連したグレイスケール値を有する細胞リストに変換するために、特注の画像分析スクリプトを開発した。

【0066】

マイトジェンで刺激した細胞のサイトカインプロファイル

多重サイトカインアッセイを検証するために、健康ドナーに由来する末梢血単核球(PBMC)を、サイトカイン応答を誘導することが知られている一対のマイトジェン(ポークウィードおよびフィットヘマグルチニン、PHA)ならびにT細胞に対するポリクローナル刺激(抗CD3/CD8)により刺激した。特定の期間の刺激の後に、マイクロエンレーピングによって作製されたサイトカインマイクロアレイ上で検出されたスポットの数を評価した(図5)。これらのデータから、刺激薬および曝露時間の関数としての検出された応答間で特異な差があることが分かった。これらの活性化条件について従来のELISpotアッセイと比較してもデータが裏付けられた。

【0067】

実施例3: 単一細胞多次元サイトカインプロファイル

リンパ球によって放出されるサイトカインは、細胞機能および免疫応答の発展に及ぼす影響の尺度である。下記で説明するように、数値シミュレーションおよび実験検証を介して、単一細胞からの分泌を捕捉する技法であるマイクロエンレーピングは、個々の生細胞から同時に放出された4種類までのサイトカインの頻度および分泌速度の分布を定量的に測定する。これらの多次元測定は、単一パラメータ機能アッセイよりさらに詳細に、かつさらに高い感度で、刺激に曝露された細胞の応答の規模および強度を分解する。このアプローチを用いると、IFN の中央値分泌速度は、2種類または3種類のサイトカインを同時に産生するリンパ球において増加するが、他のサイトカイン(IL-2およびTNF)は同様の増加を示さないことが分かる。さらに、IFN およびIL-2の分泌速度は両サイトカインを産生する細胞において相関関係がないのに対して、IL-2およびTNF は正の相関関係を示す。

10

【0068】

特異な機能応答、例えば、1種類もしくは複数の種類のサイトカインの分泌または増殖能力によって、免疫応答の質と関連し得る固有のリンパ球サブセットが区別される(Pantaleo and Harari, 2006 Nat Rev Immunol, 6:417-423)。細胞サブセット間の不均一性の分解には、個々のリンパ球が示す機能の幅および質を多数測定する分析方法が必要である(Seder, et al., 2008 Nat Rev Immunol, 8:247-258)。

【0069】

既存の分析方法は、個々の細胞によって産生されるサイトカインの頻度、規模、および数を評価する。ELISpotは、サイトカイン産生細胞の頻度を求めるために分泌を直接測定するが、集団内の細胞間のわずかな差を定量するのは難しい。スポットの強度から分泌速度が分かるが(Henn, et al., 2009 J Immunol, 183:3177-3187)、感度が十分でないので、大部分のサイトカインを検出するためには12~48時間にわたるシグナルの統合が必要である(速度 \ll 100分子/s)。マルチパラメーターサイトメトリー用の細胞内染色(ICS)は、単一細胞が発現するサイトカインの数および規模を評価するための一般的な選択肢となってきた(Kannanganat, et al., 2007 J Virol, 81:8468-8476; Darrah, et al., 2007 Nat Med, 13:843-850)。平均蛍光強度(MFI)は、細胞内にトラップされたタンパク質の量の相対尺度を提供するが、これらの値は、独立した試料間では比較しにくい。さらに、ICSは、分泌が阻止された時点での細胞の産生能力を測定し、細胞が分泌し続けたサイトカインの量を正確に反映しない場合がある。フローサイトメトリーの2つの改良アプローチである「人工受容体」およびマイクロビーズ(Manz, et al., 1995 Proc Natl Acad Sci USA, 92:1921-1925; Powell and Weaver, 1990 Biotechnology (NY), 8:333-337)は、細胞の細胞外表面の付近にある分泌型サイトカインの捕捉を可能にする。しかしながら、これらの2つのプロセスにおける質量輸送の分析モデルから、低分泌細胞の場合、大量培地への放出サイトカインの拡散速度がこれらの測定の感度を制限し、細胞間の相互汚染を導入し得ることが分かっている(Frykman and Srienc, 1998 Biotechnol Bioeng, 59:214-226)。低温での高分子マトリックスの中への細胞のカプセル化も分泌を乱すことがある。

20

30

【0070】

サイトカインの蓄積またはアッセイ感度限界の克服には長い時間が必要なために、個々の初代細胞によるサイトカイン放出の動力学研究が制限されてきた。個々の生細胞から放出されたサイトカインの統合された定量測定を可能にする、新たな単一細胞分析法が本明細書で説明される。現行のアプローチを1~2桁、上回る感度で、単一細胞からの複数の種類のサイトカインの分泌速度を同時に割り当てるように、マイクロエンレーピング方法(Love, et al., 2006 Nat Biotechnol, 24:703-707)が改良されてきた。このデータは個体間の機能応答の差別化を強化し、多機能細胞におけるサイトカイン分泌の微細な動力学を明らかにする。

40

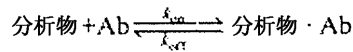
【0071】

モデリングおよび数値シミュレーション

マイクロウェル内の分析物の濃度を計算するために、下記の仮説を立てた：

50

ある特定の分析物について一定の分泌速度があり、その分析物は、機能化したガラス表面にしか特異的に結合しない。



【 0 0 7 2 】

マイクロウェル内の分析物の時間依存的拡散は、以下である：

$$\frac{\partial C}{\partial t} - D\nabla^2 C = 0$$

10

式中、Cは、培地中の分析物の濃度であり、Dは、分析物の拡散係数であり、tは、インキュベーション時間である。COMSOL Multiphysics 3.3(COMSOL AB, Stockholm, Sweden)を用いて、特異的捕捉Abを用いた分析物の分泌、拡散、および結合に関連する偏微分方程式を解いた。表2は、このシミュレーションにおいて用いられたシステムパラメータを列挙する。

【 0 0 7 3 】

(表2)シミュレーションにおいて用いられたパラメータの値

パラメータ	値	
ウェルサイズ	50 μm × 50 μm × 50 μm	20
細胞直径	10 μm	
拡散係数 (D)	10 ⁻¹⁰ m ² /s	
会合速度定数 (k_{on}^s)	10 ⁵ -10 ⁶ /M/s	
解離速度定数 (k_{off}^s)	10 ⁻³ -10 ⁻⁴ /s	
分泌速度 (κ)	1-100 /細胞/s	
全結合部位の密度 (θ_0)	10 ⁻⁸ -10 ⁻¹⁰ mol/m ²	30

【 0 0 7 4 】

PBMCの単離

施設の内部倫理審査委員会の承認を得て、健康対照から静脈血を採取して、緑の蓋の付いたリチウムヘパリンチューブ(Kendall)に入れた。Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)上での密度遠心分離を用いて、PBMCを分離した。PBMCを、10⁶/mLで、10%FBS、2mM L-グルタミン、10mM HEPES、100Uペニシリン、100mg/mLストレプトマイシン、0.1mM非必須アミノ酸、および1mMピルビン酸ナトリウムを添加したRPMI 1640培地(Mediatech)に懸濁した。

【 0 0 7 5 】

マイクロエンレーピングのための、細胞が負荷されたマイクロウェルの調製

実験は、以前に説明されたように、述べられたようにいくつかの変更を加えて行った(Love, et al., 2006 Nat Biotechnol, 24:703-707; Bradshaw, et al., 2008 Clin Immunol, 129:10-18)。簡単に述べると、マイクロウェルアレイは、シリコーンエラストマー(ポリジメチルシロキサン、PDMS; Dow Corning)を特注の鋳型に注入することによって製造し、80℃で1時間、硬化させた。アレイは、84,672個のマイクロウェル(それぞれ50×50×50 μm^3)を含んだ(Ogunniyi, et al., 2009 Nat Protoc, 4:767-782)。アレイを酸素プラズマ(Harrick PDC-32G)に30秒間、曝露した後に、細胞懸濁液(約2×10⁵/mL)をアレイの表面上に置き、細胞を、~1細胞/ウェルの密度で、重力によってウェルの中に沈澱させた。アレイ表面から余分な細胞を培地でリンスした後に、次いで、負荷された装置を、捕捉Abで

40

50

コーティングされたガラススライド上に置いた。それぞれのアッセイの具体的な詳細を下記で説明する。

【0076】

PBMCからのIL-6検出

公表されたプロトコールに従ってポリ-L-リジンスライドを調製し、捕捉Abを固定化するのに使用した。抗ヒトIL-6(40 µg/mL, MAB206, R&D)および抗ヒトIgG(10 µg/mL, 81-7100, Invitrogen)をホウ酸緩衝液で希釈し(Ogunniyi, et al., 2009 Nat Protoc, 4:767-782)、スライドに25 µLで1時間、適用し、PBSでリンスし、乾燥させた。IL-6分泌を刺激するために、LPS(10 µg/mL)、PHA(5 µg/mL)、およびPWM(5 µg/mL)を個々に丸底96ウェルプレートの中にあるPBMCに添加し、5%CO₂、37 °Cで望ましい時間インキュベートした。マイクロウェルアレイを負荷する前に、PBMCをカルセインバイオレットAM(Invitrogen)で染色した。次いで、生細胞の画像化(温度およびCO₂制御)のための装備がある自動倒立落射蛍光顕微鏡(Zeiss)によって、細胞が負荷されたアレイを画像化した。アレイを上向きにして、(特定の刺激を含む培地と共に)カバーガラスを付けて顕微鏡にのせた。次いで、ウェルアレイを、(ヒトIgによって全てのマイクロウェルの位置を標識するために)微量のヒト血清(1:40,000)を含む培地で穏やかにリンスし、直ぐに、捕捉Abを含むガラススライド上に適用した。組み合わされたアレイおよびガラススライドを軽く加圧して一緒に保持して、ハイブリダイゼーションチャンバーに入れ(Agilent Technologies, G2534A)、37 °Cでインキュベートした。経時的に行われた測定中に、それぞれの時点で、mRNA定量用に細胞の半分を集めた。プリント後、検出のために、Alexa Fluor488標識抗ヒトIL-6(R&D)およびAlexa Fluor 700標識抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch)を使用した。マイクロエンゲレーピング後に細胞を標識するために、10 µg/mlのCD3-Alexa Fluor488、CD11b-Alexa Fluor568、およびCD14-Alexa Fluor 660をウェルアレイに添加した。4 °Cで30分の後に、ウェルアレイをPBSで洗浄し、画像化した。(全てのAbは、示したようにAlexa Fluor-NHSエステル(Invitrogen)で標識した)。

【0077】

リアルタイムPCR

absolutely RNA microprepキット(Stratagene)を用いて、PBMCからのRNAを精製した。Taqmanキットと、供給されたランダムヘキサマー(Applied Biosystems)を用いて、cDNAを作った。IL-6プライマーおよびプローブはApplied Biosystemsから入手し、推奨された手順に従って使用した。

【0078】

サイトカインの多重検出

多重サイトカイン検出に用いられたAbペアは、IFN γ (MABTECH)、IL-17(eBioscience)、IL-2(R&D)、およびTNF α (BD)であった。捕捉のために、捕捉Ab(それぞれ10 µg/ml)の混合物をガラススライドに適用した。PBMCを、PMA(10ng/mL)およびイオノマイシン(1 µg/mL)によって6時間、刺激し、次いで、カルセインバイオレットAMで染色し、前記のようにマイクロウェル中で画像化した。ウェルアレイを無血清培地でリンスし、直ぐに、捕捉Abを有するガラススライド上に適用した。プリント後、検出のために、Ab-IL-17(Alexa Fluor 488)、IFN γ (Alexa Fluor 555)、IL-2(Alexa Fluor 594)、TNF α (Alexa Fluor 700)の混合物を使用した。マイクロエンゲレーピング後に細胞を標識するために、10 µg/mLのCD3(Alexa Fluor 488)、CD8(Alexa Fluor 568)、およびCD4(Alexa Fluor 660)をウェルアレイに添加した。4 °Cで30分の後に、ウェルアレイをPBSで洗浄し、画像化した。

【0079】

データ分析

操作中に、図20を見ると、分泌産物を分析するためのプロセス10は、示された段階を含む。しかしながら、プロセス10は例示に過ぎず、限定するものではない。プロセス10は、例えば、段階を加える、取り除く、または再編成することによって変更することができる。サイトカインのプリントされたマイクロアレイ14は、マイクロアレイスキャナー15(例えば、GenePix 4200AL, MDS)において画像化し、添付のソフトウェア(例えば、GenePix6.

10

20

30

40

50

1)を用いて分析することができる。顕微鏡から集められた透過光顕微鏡写真および落射蛍光顕微鏡写真を分析して16、各ウェル12に存在する細胞の数および系列を決定することができる18。細胞アレイおよびプリントされたマイクロアレイの両方について抽出されたデータを、アレイ内の各ウェルに割り当てられた固有の識別子を用いて(例えば、MS Excelにおいて)突き合わせるすることができる20。後の分析のために、データセットをフィルタリングして、(例えば、ExcelまたはMATLAB(Mathworks, Natick, MA)において)対応するマイクロアレイ14の上にある分泌タンパク質と突き合わされた単一細胞のみを含む、アレイ12における位置を含めることができる22。速度の分布は、コルモゴロフ スミルノフ(Kolmogorov-Smirnov)の二標本検定を用いて比較することができ、同時分泌の相関係数は、スピアマンの順位相関を用いて計算することができる24。

10

【0080】

操作中に、図21を見ると、臨床診断40を得る目的で免疫プロファイル38を作り出すためのプロセス30は、細胞型の決定32、分泌の規模の決定34およびレスポンスの頻度の決定36によって行われ、それぞれのデータセットを統合することによって、分析された細胞を入手したレシピエントの生理状態を示す免疫プロファイルが得られる。

【0081】

サイトカイン分泌速度を評価するための定量マイクロエンレーピング

マイクロエンレーピングは、最小限の攪乱で、ナノリットル以下の体積中に生細胞を一時的に閉じ込めるために、微細加工により作られたウェルからなるアレイを用いる。細胞から分泌されたタンパク質を捕捉するために、1つの体積内面がAbを支持する(図6A)。インキュベーション(~1から2時間)の後に、捕捉表面が取り出され、次いで、蛍光Abを適用することによって調べられる(Bradshaw, et al., 2008 Clin Immunol, 129:10-18)。マイクロエンレーピングによって分泌の定量測定が可能になる最適条件を決定するために、一連の微分方程式および数値シミュレーションを用いて、個々の体積に閉じ込められた単一細胞についての質量輸送をモデル化する。このシミュレーションによって、表面上に捕捉されたタンパク質の量と、体積中のタンパク質の量との時間的関係を説明する3つの体制が分かった(図6B)。中間の体制(~30分から>20時間)では、表面上に捕捉されたタンパク質の量は、細胞が分泌したタンパク質の総量に近い。

20

【0082】

細胞によって分析物が一定に放出されると仮定すると、このモデルから、捕捉される分析物の量は、時間またはウェル1個あたりの細胞数と共に直線的に増加するはずだということが示唆された。両予測とも、ヒトPBMCおよびマウスハイブリドーマ細胞を用いた実験によって検証された(図7)。これらの結果は、ある決まった時点で細胞に対して測定された、捕捉されたタンパク質のMFIのばらつきが、分泌されたタンパク質の量のばらつきを正確に反映し、従って、平均分泌速度のばらつきも正確に反映していることを意味している(図8)。ある特定の細胞についてMFIを速度に変換するために、既知量の蛍光検出Abを含む標準参照を用いて、MFIを、捕捉された分析物の有限量に変換した。この量をインキュベーション時間で割ることによって、単一細胞からの平均分泌速度が得られる(図9)。このモデルとこれらのデータを合わせると、マイクロエンレーピングによって、決められた期間にわたって分泌されたタンパク質の総量が効率的かつ定量的に評価されることを実証している。

30

40

【0083】

PBMCから放出されたIL-6の頻度および規模の定量

本発明者らの測定の感度を評価するために、LPSによる3回の刺激間隔(3時間、6時間、および12時間)の後に、ヒトPBMCから放出されたIL-6の頻度および分泌速度を測定した。測定された応答から、IL-6分泌細胞の頻度および細胞1個あたりの平均分泌速度は3~12時間(特に、3~6時間)まで単調に増加することが分かった(図6C)。しかしながら、IL-6をコードするmRNAの発現は6時間でピークに達した(図6D)。この観察から、転写のタイミングは必ずしもタンパク質分泌のタイミングと相関するとは限らない場合があることが確かめられた。IL-6分泌細胞のほとんどはCD11b⁺(44.8%)およびCD11b⁺CD14⁺(26.9%)であるの

50

に対して、小さな集団はCD3⁺(4.7%)であった。これらの細胞間の分泌速度の分布には有意差が無かった。このことから、これらは全て分泌能力が類似することが示唆される。

【0084】

次に、PBMCを異なる刺激に曝露した後の個体間の応答を区別するために、IL-6分泌速度の分布を調べた。測定値から、同じドナーに由来する細胞の応答は、異なる刺激後の頻度および規模(速度)の強いばらつきを示し、応答のこの組み合わせは個体に特有のものであることが分かった(図6E)。例えば、ドナー1および2はPHAで刺激された後に類似の応答細胞頻度を示したが、分泌速度の分布は全く異なっていた($p < 0.001$)。ドナー2については、2つの刺激条件(LPSおよびPHA)でしか類似の速度分布が得られなかった($p = 0.8622$)。これらの結果は、頻度および速度分布の測定による免疫応答性の区別が単一パラメータ測定(頻度)より頑強であり得ることを示唆している。

10

【0085】

単一細胞からの複数の種類のサイトカインの同時検出

マイクロエンゲレーピング用の分析モデルから、捕捉および検出に使用したそれぞれのAbペアに十分な特異性があると仮定して、同じ細胞から独立して複数の種類のサイトカインを検出できることが示唆された。IL-17、IFN γ 、IL-2、およびTNF α を同時に検出するために4種類の市販のAbペアを検証し、次いで、ヒトPBMCをPMA/イオノマイシンで刺激した後に、定量マイクロエンゲレーピングによって応答の幅を測定した。アレイ内の生細胞は、1種類、2種類、または3種類のサイトカインを含む広範囲の機能応答を示した(図10Aおよび図11)。サイトカイン組み合わせを分泌する細胞については(100,000個の細胞あたり最低48個)、それぞれのサイトカインの分泌速度を分析した(図10B)。IFN γ の放出が最も動的であったが(3.8~120分子/s)、他のサイトカインの速度は、典型的に、20分子/s未満であった。IFN γ およびIL-2+細胞はCD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方を含んだ。すなわち、それぞれの系列の頻度は異なったが、これらの分泌速度の分布は類似していた(図12)。予想通り、これらのデータから、CD4 T細胞およびCD8 T細胞の分泌能力には有意差が無いことが分かる。

20

【0086】

ICSによる多機能細胞の分析から、二重サイトカイン産生細胞および三重サイトカイン産生細胞は、分泌がブロックされた時には、細胞内で単一産生株より多量のサイトカインを発現することが分かった(Darrah, et al., 2007 Nat Med, 13:843-850)。この実験では、IFN γ 分泌速度の分布も単一産生株と二重/三重産生株との間で異なった(図10B)。細胞がIL-2またはIL-2/TNF α を同時分泌した時に、IFN γ の中央値分泌速度も2.2倍増加した。しかしながら、他のサイトカインについては、分泌速度の特異な差は無かった。複数の種類のサイトカインについて、二重産生株および三重産生株における分泌速度に相関関係があるかどうか確かめるために、このデータをさらに分析した(図13A、B)。二重産生株については、IFN γ 分泌速度とTNF α 分泌速度との間に正の相関関係があり、三重産生株については、IFN γ /TNF α 分泌速度とIL-2/TNF α 分泌速度との間に正の相関関係があった。対照的に、二重産生株または三重産生株について、IFN γ 分泌速度とIL-2分泌速度との間には相関関係が無かった。これらの結果は、サイトカインの同時発現に関する以前の研究と一致する。すなわち、IL-2遺伝子およびTNF α 遺伝子は共通の転写因子によって同時調節されるのに対して(Decker, EL 2003 Nucleic Acids Research, 31:911-921)、IFN γ およびIL-2は独立して調節される(Penix, et al., 1993 J Exp Med, 178:1483-1496)。IFN γ +/IL-2+CD4とCD8 T細胞との間では頻度の有意差も速度の相関関係も無いのに対して、IFN γ +/TNF α +CD8 T細胞の頻度はCD4 T細胞の約2倍である(図13C)。これらの結果から、マイクロエンゲレーピングは、ICSでははっきりしない、多機能細胞により示される分泌のわずかな動力学を明らかにすることが分かる。

30

40

【0087】

マイクロエンゲレーピングを用いて、個々の生存能力のあるリンパ球から放出されたサイトカインの多次元プロファイルを作成する定量方法が本明細書において説明される。このアプローチの技術的利点は、1) 試料全体にわたって比較される分泌機能の定量測定値が

50

得られること、および2)他の分泌ベースアッセイ(ELISpot、表面捕捉)と比較して、この方法の感度が質量輸送機構によって1桁、強化されること(表3)である(Frykman, et al., Biotechnol Bioeng, 59:214-226)。これらの特徴は、測定前および測定中の細胞への攪乱を最小限にする。さらに、分泌速度を、単一細胞から放出された個々のサイトカインに割り当てると、多機能性細胞の分析の次元が大きくなる。イメージングサイトメトリーとこれらの測定値を統合すると、細胞系列ならびに分泌型サイトカインの数および速度を含む単一細胞データの組み合わせが得られる。このようなデータは、特に、利用可能な細胞の数が、独立した従来法による分析に十分でない場合がある臨床試料(例えば、乳児、組織生検材料)を特徴付ける時の、ワクチン応答の評価および慢性疾患の病理の理解に重要な不均一な細胞サブセットの差別化を改善する。

10

【0088】

(表3)5種類のサイトカインについての実験検出限界

サイトカイン	フルオロフォア	検出限界 (分子/s)
IL-6	Alexa Fluor 488	0.52-0.67
IL-17	Alexa Fluor 488	0.48-0.63
IFN γ	Alexa Fluor 555	3.80-4.11
IL-2	Alexa Fluor 594	0.76-3.10
TNF α	Alexa Fluor 700	1.75-2.00

20

それぞれの検出抗体に対して用いられた特定のフルオロフォアについて検出限界を求めた。検出限界は、平均バックグラウンドを上回る標準偏差(SD)の3倍と定義した。これらの値は、人工受容体アッセイについて以前に計算された値の少なくとも10分の1より低く、ほとんどの場合、カプセル化アッセイの値より低い。

【0089】

実施例4: アレルギー検査へのマイクロエンゲレーピング技術の適用およびアレルギーに関するバックグラウンドの診断

30

異なる種類のTh細胞のサイトカイン分泌プロファイルならびに異なるIgサブタイプを分泌するB細胞の頻度を求める。この情報を用いてアレルギー感受性を診断し、アレルギー免疫療法中の免疫変化をモニタリングする。

【0090】

3種類の検出チップを開発する。これらには、IL-17(T_{h17})、IL-10(T_{Reg})、IL-4(T_{h2})、およびIFN-g(T_{h1})のThセットが含まれる。これらは、4種類のCD4⁺T細胞サブタイプの代表的なサイトカインである。Th2セット: アレルギーにおける4種類の重要な T_{h2} サイトカインである、IL-4、IL-5、IL-13、およびIL-9。Abセット: アレルギープロセスにおける4種類の免疫グロブリン分子サブタイプである、IgE、IgG₁、IgG₄、およびIgA。

【0091】

T_{h2} セットに適した抗体ペアを特定し、その検量線および交差反応を試験する。

40

【0092】

免疫グロブリン分泌を測定するために、ガラススライドをアレルギーで機能化して、アレルギー特異的抗体を捕捉する。検出抗体として、4種類の抗ヒトIgアイソタイプ抗体(抗ヒトIgE、抗ヒトIgG₁、抗ヒトIgG₄、および抗ヒトIgA)を使用する。ヒトIgE、IgG₁、IgG₄、およびIgA標準を用いて、市販の抗ヒトIgアイソタイプ抗体の特異性を試験する。

【0093】

この抗体チップは、4種類のIgアイソタイプを1回のアッセイで測定することを目的とする。しかしながら、アレルギーをガラス表面上に直接コーティングすると、アレルギーペプチドの免疫が失われるか、または弱まることがある。または、4種類のスライド上で、

50

各種類の抗ヒトIg抗体が捕捉抗体として用いられる。アレルゲンを蛍光標識し、検出試薬として使用する。

【0094】

ピーナツアレルギーモデルは、ピーナツ処理時の細胞反応を研究するのに用いられる。ピーナツアレルギーのある被験体およびピーナツアレルギーのない被験体から血液試料を入出する。それぞれの血液試料からPBMCを単離し、臨床診断において用いられたものと同じピーナツ抽出物で刺激する。Thチップ、Th2チップ、およびAbチップを用いて、PBMCの応答を調べる。最良のインビトロ刺激条件を決定するために、アレルゲン勾配と一緒に時間経過研究を行う。ピーナツアレルギーのある被験体のサイトカインプロファイルおよびアレルゲン特異的免疫グロブリンの頻度を統計解析し、ピーナツアレルギーのない被験体からのプロファイルと比較する。これらの2群間での有意差はアレルギーの診断指標とみなされる。アレルギー発症中の免疫系の変化を研究するために、および臨床試験の際のマイクロエンゲレーピングの潜在的な適用を探るために、任意で、異なる疾患段階での、または治療中でのサイトカインプロファイルおよびIg分泌が調べられる。

【0095】

本明細書において開発されたマイクロエンゲレーピング技術が発展することで、高効率の単一細胞多重分析、特に、免疫学的研究における高効率の単一細胞多重分析が可能になる。単一細胞のシグネチャー(signature)は免疫細胞ネットワークのさらなる理解に役立つ。疾患発症中の細胞挙動の変化を動的に追跡する。材料が低コストであること、標準プロセスがあること、およびこの技術の操作時間が短いことも臨床診断における好機を与える。アレルギー検査に加えて自己免疫疾患および感染症においても、この方法が発展したものを使用することができる。

【0096】

他の態様

サイトカイン検出感度の増大およびアッセイ1回あたりのサイトカイン数の拡大

アッセイの感度を増大させるために、ローリングサークル増幅(RCA)(Schweitzer, et al., 2002 Nat Biotechnol, 20:359-365)を用いて、アッセイ1回あたり複数の種類のサイトカインを検出する。RCAの利点は、抗体からの単一シグナルを増幅可能なDNA分子に変換することである(図14)。検出抗体を異なる蛍光色で標識する代わりに、検出抗体を異なるプライマーで標識する(図15)。環状DNAは、2つの部分を用いて構築される。1つの部分は保存配列であり、全ての環状DNAにおいて同一である。別の部分は、それぞれのサイトカインの検出抗体に結合している特異的プライマーに相補的である。

【0097】

検出抗体を適用した後に、環状DNAをシステムに添加し、ある特定のサイクルを介して増幅する。この場合、検出抗体に取り付けられたプライマーが伸長する。最後に、反応試薬を除去し、フルオロフォアの付いたレポーター配列を添加する。

【0098】

アッセイ1回あたりに検出されるサイトカイン数はまた、利用可能な蛍光色ならびに計器の中の励起レーザーおよびフィルターにも依存する。現在、GenePixスキャナーが用いられ、488nm、532nm、594nm、および635nmの4種類のレーザーを有する。標準的なフィルターを用いて、計器から4色が検出される。しかしながら、他のさらなるフィルターの組み合わせを用いると、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、またはQdotなどのフルオロフォアを用いて、他の2つまたは3つの色を追加することができる。

【0099】

しかしながら、異なる蛍光スペクトルの重複を少なくするために、蛍光色の余地は限定される。DNA配列は多様性が高いという利点があるので、サイトカイン数を拡大する連続標識戦略をRCAに基づいて設計した。図16に示したように、RCA反応後に、シグナルは、スキャン1回あたりに利用可能な色に応じてグループごとに検出される。例えば、異なる色の付いた4種類のレポーター配列を添加して、第1の4種類のサイトカインを検出する。スキャン後に、第1の蛍光分子セットをスライドから除去する。1つの方法は、二本鎖DNA部

分を切断し、検出された配列をこのシステムから除去する方法である。別の方法は、レポーターDNAとフルオロフォアとの間で切断可能なリンカーを利用する方法であり、そのために、検出後にフルオロフォアを切断することができる(Ju, et al., 2006 Proc Natl Acad Sci USA, 103:19635-19640)。システムにある蛍光分子を洗い流した後に、別のDNA配列セットにハイブリダイズするように、第2のレポーターセットをシステムに適用する。第1のフルオロフォアセットが取り除かれているので、第2のレポーター配列セットは同じ色で標識される。

【0100】

RCAは、マイクロエンレーピングシステムでは、最初に、単一サイトカイン検出時に行われる。Schweitzer et al.によって公表された環状DNAおよびプライマー配列が用いられる(Schweitzer et al., 2002 Nat Biotechnol, 20:359-365)。

サークル: 5'-CTC AGC TGT GTA ACA ACA TGA AGA TTG TAG GTC AGA ACT

CAC CTG TTA GAA ACT GTG AAG ATC GCT TAT TAT GTC CTA TC-3'

プライマー: 5'-CAC AGC TGA GGA TAG GAC AT-3'

レポーター: 5'-ATG TCC TAT CCT CAG CTG TG-3'

【0101】

増幅プロセスにおいて用いられる2種類の温度は45 および37 である。この増幅工程は統合され、プリント後の全ての工程が自動的に行われるように洗浄機によって行われる。最初に、プロセス(反応濃度および時間)を最適化し、検出感度を求めるために、1種類のサイトカインが用いられる。

【0102】

前記で開発されたサイトカインモデルを用いて、検出後にフルオロフォアを除去するために、2つの方法が用いられる。1)切断可能なリンカーを用いて、フルオロフォアとレポーターDNAを結合体化する。一選択肢は光切断可能な2-ニトロベンジルリンカーであり、10秒のレーザー照射(355nm)を用いて切断することができる(Seo, et al., 2005 Proc Natl Acad Sci USA, 102:5926-5931)。別の選択肢はアシル基リンカーであり、Pd触媒によって30秒で除去することができる(Ju, et al., 2006 Proc Natl Acad Sci USA, 103:19635-19640; Bi, et al., 2006 J Am Chem Soc, 128:2542-2543)。2)エンドヌクレアーゼを用いて二本鎖DNAを消化する。優先すべき事項は、レポーター結合DNA部分を切断する非配列特異的エンドヌクレアーゼを見つけることである。エンドヌクレアーゼが望ましく無い場合、または高価すぎる場合、配列特異的制限エンドヌクレアーゼが用いられる。この場合、プライマー、環状DNA、およびレポーターの設計において、切断部位が考慮される。フルオロフォア除去の効率は前記方法の全てにわたって評価され、最良の戦略が以下の工程において用いられる。

【0103】

複数の種類のサイトカイン検出のために環状DNAを設計し、連続標識を用いて複数の種類のサイトカイン検出に適用する。さらにプライマー、環状DNA、およびレポーターからなる3つのセットを、前記で示した第1の配列セットに基づいて設計する。大まかな戦略は、(図15に示したように)環状DNAの他の部分を変えずに、プライマー、レポーター、およびプライマーに相補的な環状DNAの一部の配列を変えることである。4種類のフルオロフォアをそれぞれ4種類のレポーターと結合体化する。4種類のプライマーを4種類の検出抗体と結合体化する。予備研究において用いられた同じフルオロフォアおよび抗体セットを、この工程において使用する。検出工程では、多サイトカイン検出の感度を測定するために、4種類のレポーターを同時に添加する。それぞれのレポーターを異なる時間で添加することによって連続標識を試験し、スキャンの後に除去する。この目的は、本発明者らのシステムにおいて使用することができる最大検出反復を測定することである。さらに、サイトカインの総数を、アッセイ1回あたり8または12まで拡大するために、さらに4種類または8種類のプライマーを設計する。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 4 】

ある態様において、前記工程は、標準的なプログラミング法を用いたコンピュータプログラムにおいて行われる。このようなプログラムはプログラム可能なコンピュータにおいて実行するように設計され、プログラム可能なコンピュータはそれぞれ、電子プロセッサ、データ保存システム(記憶素子および/または保存素子を含む)、少なくとも1つの入力装置、ならびに少なくとも1つの出力装置、例えば、ディスプレイまたはプリンタを含む。ある態様では、本明細書に記載の機能を果たすために、および出力情報を得るために(例えば、アレルギー状態を評価するために)、取得されたデータ(例えば、サイトカイン結合データ)にコードが適用され、出力情報は1つまたは複数の出力装置に適用される。このようなコンピュータプログラムはそれぞれ、高級手続き型プログラミング言語もしくはオブジェクト指向プログラミング言語またはアセンブリ言語もしくは機械語において行うことができる。さらに、言語は、コンパイラ型言語またはインタプリタ型言語でもよい。このようなコンピュータプログラムはそれぞれ、コンピュータにより読まれると、コンピュータ内のプロセッサが本明細書に記載の分析を行うことができる、コンピュータ可読保存媒体(例えば、CD ROMまたは磁気ディスク)に保存することができる。

10

【 0 1 0 5 】

操作中に、図21を見ると、免疫プロファイルの計算(38)および臨床診断(40)のためのプロセス30は、細胞型の決定(32)、分泌の規模の決定(34)、およびレスポンスの頻度の決定(36)を含む。

20

【 0 1 0 6 】

表4は、Th1、Th2、およびTh-17細胞型の表現型プロファイルを示す。

【 0 1 0 7 】

(表4) Th1、Th2、およびTh-17細胞型の表現型プロファイル

細胞型	Th1	Th2	Th-17
表面表現型:			
CD3	+	+	+
CD4	+	+	+
IFN-γR	+		
IL-12Rβ2	+IFN-γによりアップレギュレートされる	-	+
IL-23R	+		+IFN-γによりダウンレギュレートされる
Tim-3	+	-	?
サイトカインプロファイル:			
IFN-γ	+	-	-
IL-2	+	+/-	-
IL-4	-	+	-
IL-5	-	+	-
IL-6	-	+/-	+
IL-10	-	+(m)	-
IL-12	-	-	-
IL-13	-	+	-
IL-17A	-	-	+
IL-17F	-	-	+
IL-22	-	-	+
IL-25	-	+	-
IL-31	-	+	-
IL-33	-	+	-
TNF-α	+	-	+

30

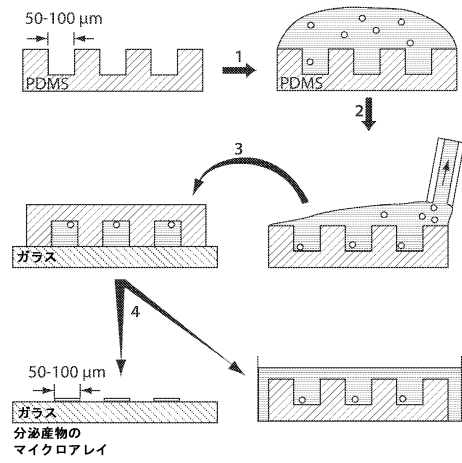
40

【 0 1 0 8 】

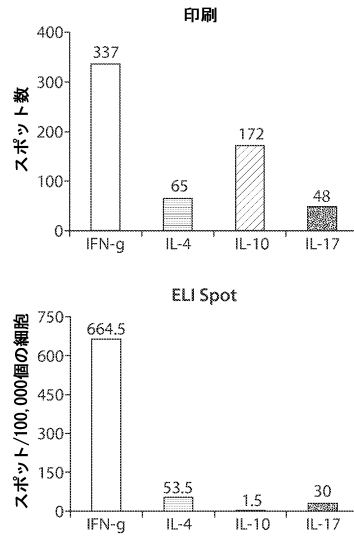
さらなる態様が特許請求の範囲内に存在する。

50

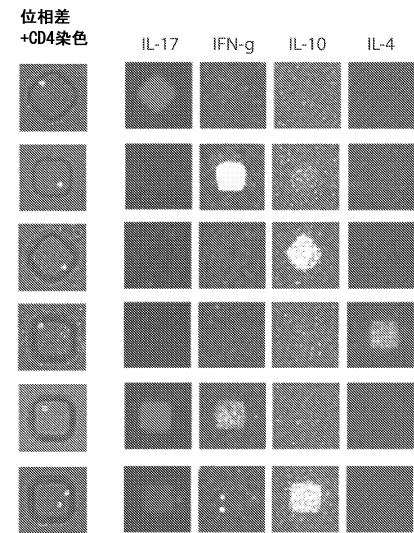
【図1】



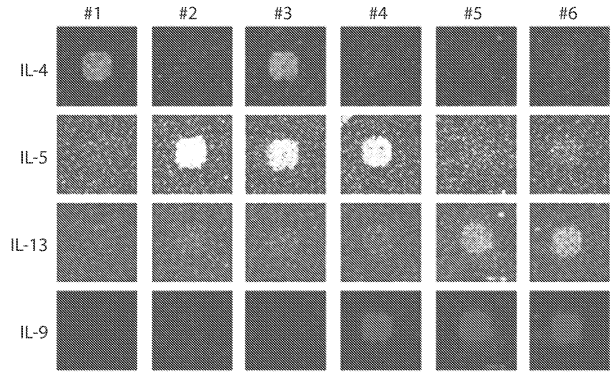
【図2】



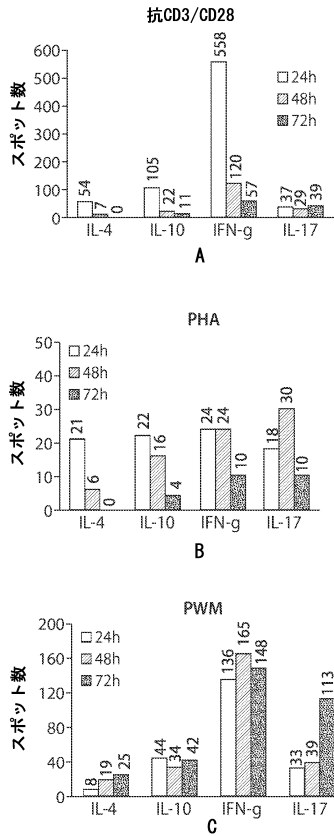
【図3】



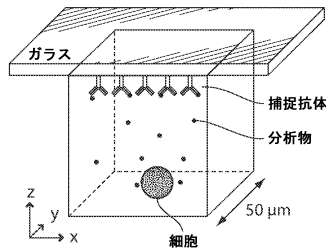
【図4】



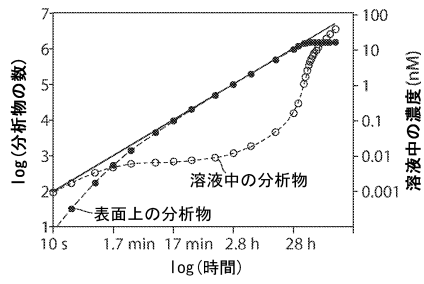
【図5】



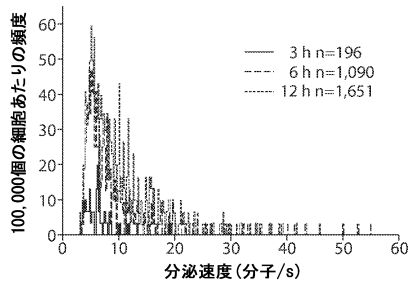
【図6A】



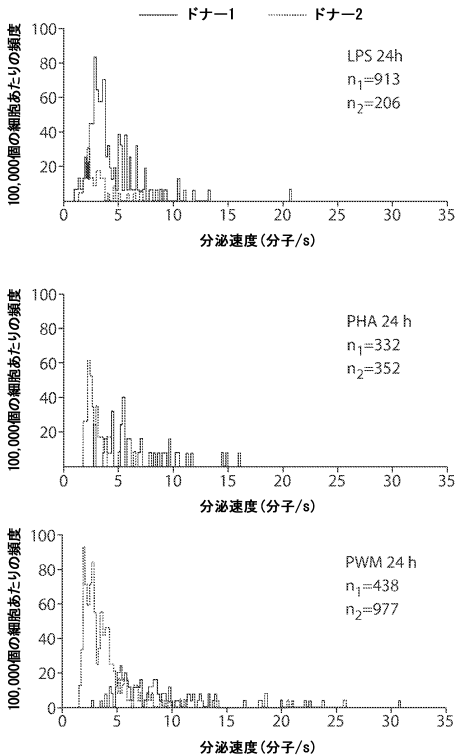
【図6B】



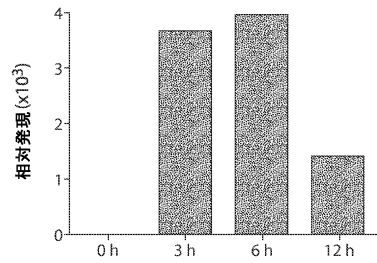
【図6C】



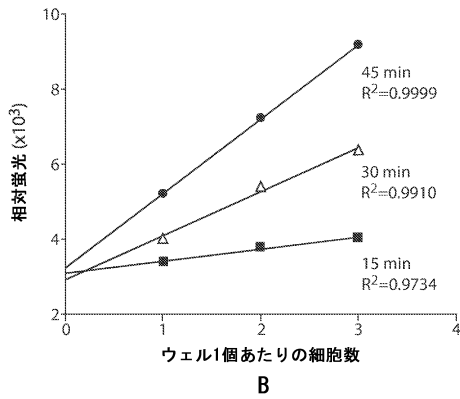
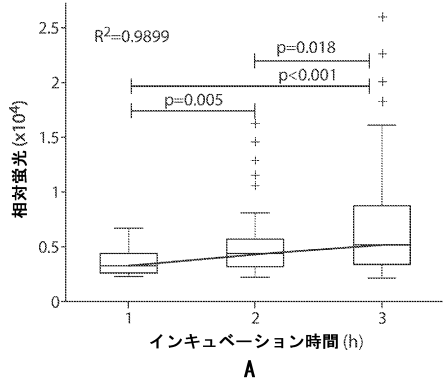
【図6E】



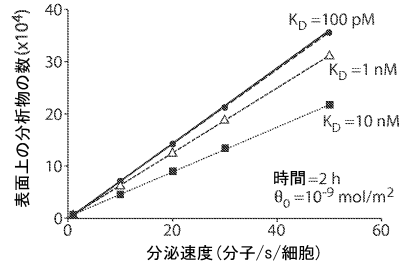
【図6D】



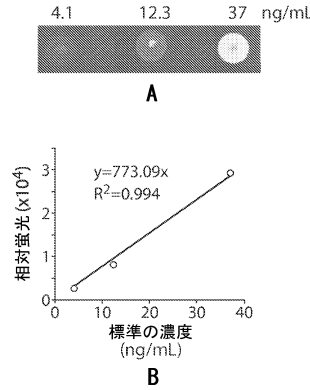
【図7】



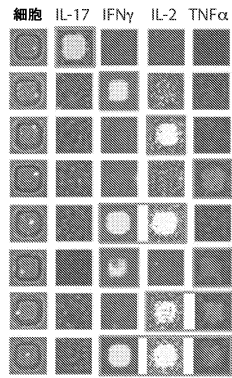
【図8】



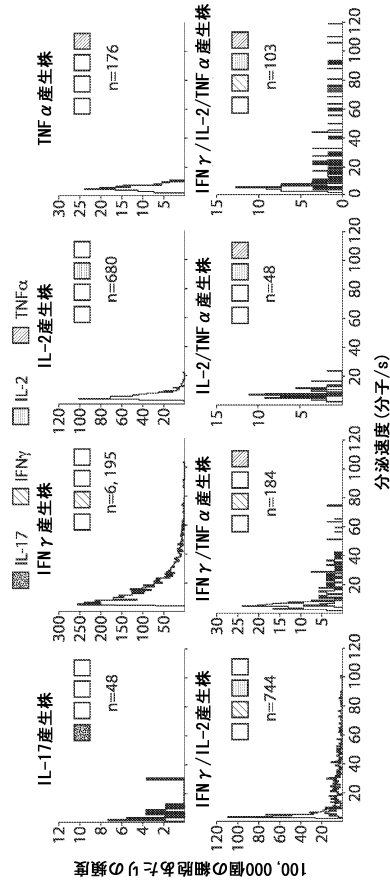
【図9】



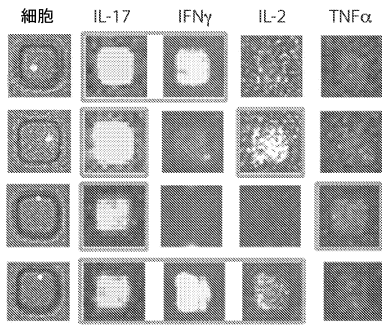
【図10A】



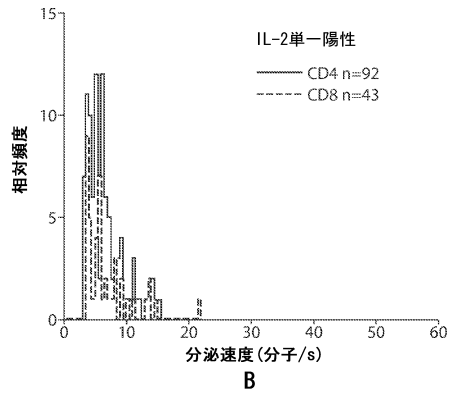
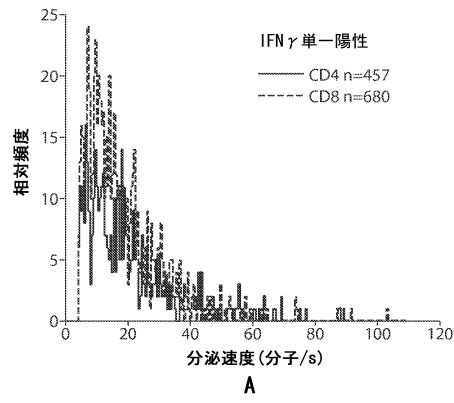
【図10B】



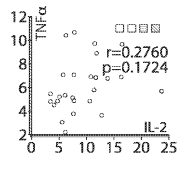
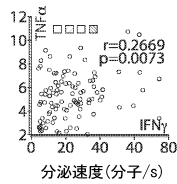
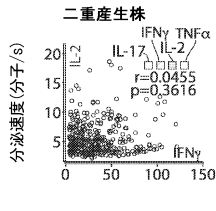
【 図 1 1 】



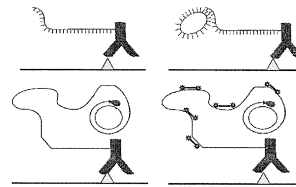
【 図 1 2 】



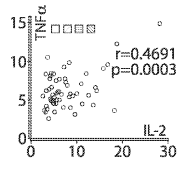
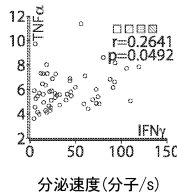
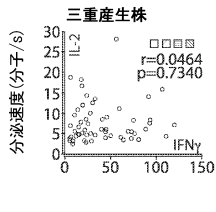
【 図 1 3 A 】



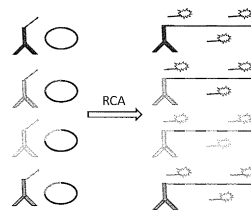
【 図 1 4 】



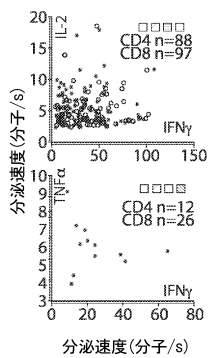
【 図 1 3 B 】



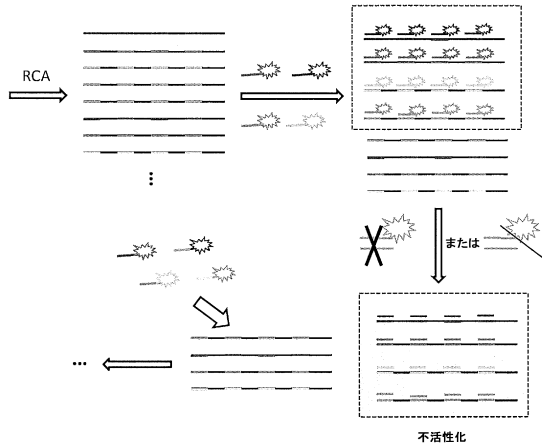
【 図 1 5 】



【 図 1 3 C 】

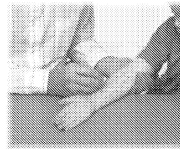


【図16】



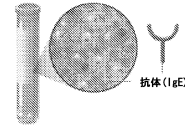
【図17-1】

問題
現行のアレルギー検査



経皮(皮膚プリック)検査

検査室においてあなたの血液を一度のアレルゲンと混合した時に生じるアレルギー抗体すなわちIgEのレベルを、血液検査により測定する。



IgEについての血清検査(RASTまたはELISA)

皮膚検査

- ・アレルゲンパネルを用いてピンプリックを複数行う
- ・短期免疫応答および長期免疫応答を測定する
- ・表在性炎症の定性評価
- ・乳児および小児については外傷経験
- ・多くの場合、小児の病歴における単一のデータ点

免疫吸着アッセイ

- ・低感度採血(GmL試料)
- ・IgE抗体の血清力価を測定する
- ・抗体の汎特異性(pan-specificity)および他の状態(HIV、皮膚病、寄生物)によるレベル上昇のために複雑である
- ・予測的でない = 単一パラメータ
- ・アレルギー歴と経時的に相関関係

食物投与

- ・様々な食品(一部は反応を誘導することが疑われる)を用いた二重盲検試験を患者に対して行う
- ・重篤な(アナフィラキシー)反応の病歴のある患者には用いることができない

工程1 アレルゲン 特異的IgE 工程2

工程3 標識抗 IgE 工程4

工程5

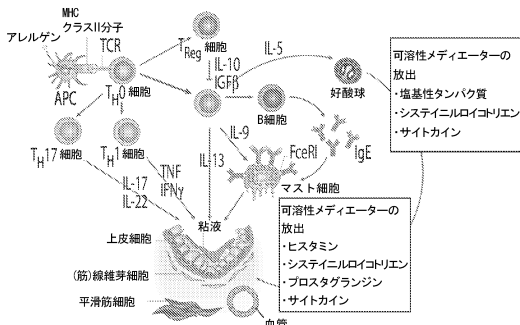
結合しなかった抗体を、界面活性剤を含有する緩衝液を用いて洗い流す。

結合した標識抗体の量は、ディスク上に存在するIgEの量と正比例する。

標識抗体と酵素基質との反応によって(EIA)、または放射活性をカウントすることによって(RAST)、特異的IgEを定量する。

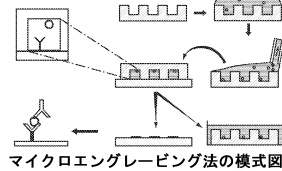
【図17-2】

アレルギーの免疫学的基礎



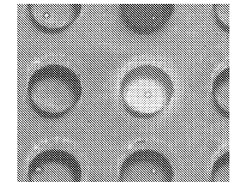
【図18】

実施
マイクロエンレーピング



仕組み

- ・培地に懸濁した細胞を、ポリ(ジメチルシロキサン)平板上に成形されたマイクロウェルの大きなアレイに堆積させ、~1細胞/ウェルの密度で、懸濁液からマイクロウェルの中に沈着させる。
- ・次いで、負荷されたマイクロウェルを逆さまにして、特異的捕捉試薬(例えば、抗サイトカイン)がコーティングされたガラススライドの上に置く。
- ・インキュベーション期間の後、マイクロウェルを取り出し、異なる捕捉試薬(例えば、抗IgGおよび抗IgE)がコーティングされた第2のガラススライドに適用する。
- ・得られたマイクロアレイを、検出用の蛍光標識試薬およびレーザーベースの蛍光スキャナーを用いて調べる。
- ・プリント後、ウェル内の細胞は、後で免疫蛍光により画像化するためにインサイチューで染色することができる。



Nature Biotechnology, 24, 703-707 (2006)
Clinical Immunology, 129, 10-18 (2008)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 17902-17907 (2008)
J. Immunol. Methods, in press (2008)

免疫学的プロファイル

単一細胞についての組み合わせアッセイ

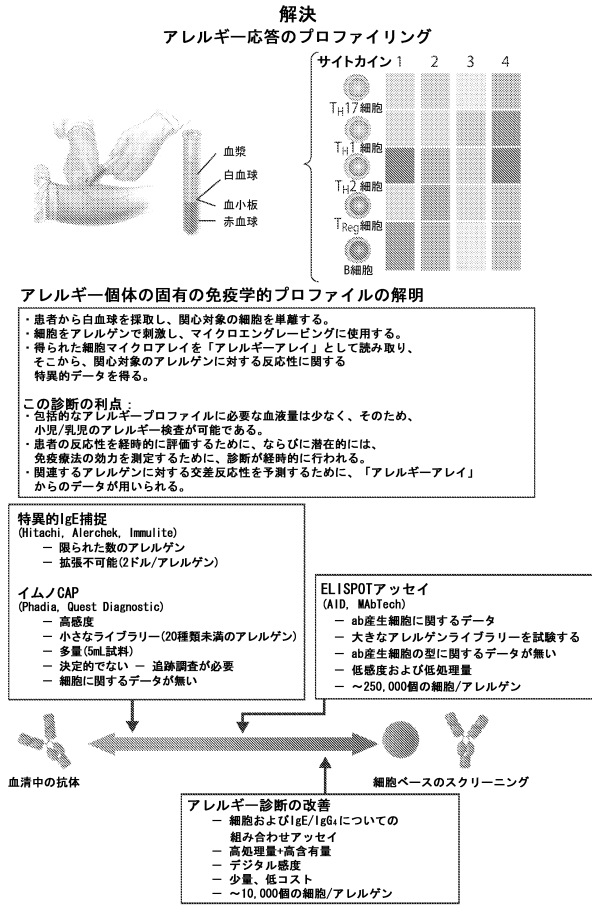
特定の細胞を抽出する

表面マーカー

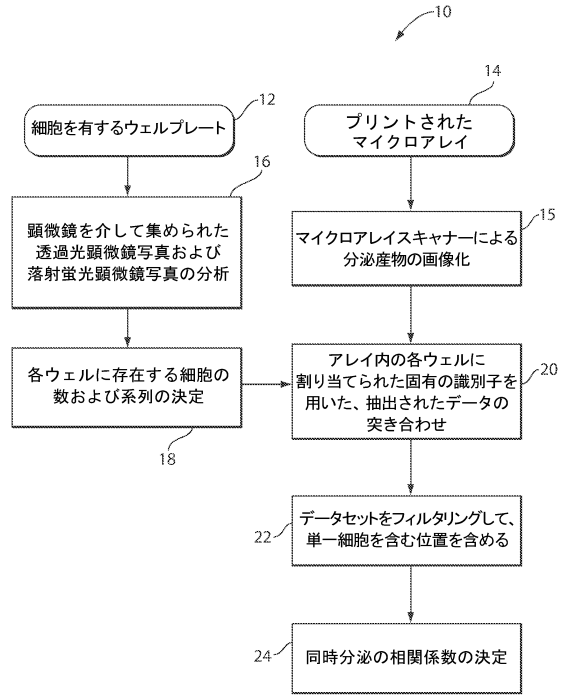
単一細胞の遺伝子分析

機能的応答

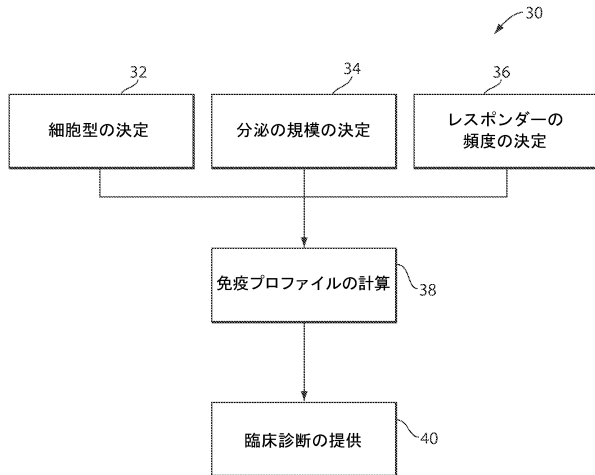
【図19】



【図20】



【図21】



【配列表】

0005675638000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ラブ ジェイ . クリストファー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル サマー ストリート 227 ユニット 2
- (72)発明者 ハン キン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ソーンダイク ストリート 134
- (72)発明者 トリプラネニ ビネイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレスノ イースト ウィンザー 910

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特表2004-528546(JP,A)
特表2009-520029(JP,A)
特開平08-259598(JP,A)
特表2003-531377(JP,A)
LOVE J C, A MICROENGRAVING METHOD FOR RAPID SELECTION OF SINGLE CELLS PRODUCING ANTIGEN-SPECIFIC ANTIBODIES, NATURE BIOTECHNOLOGY, 米国, NATURE PUBLISHING GROUP, 2006年
6月1日, V24 N6, P703-707
BRADSHAW E M, CLINICAL IMMUNOLOGY, 米国, 2008年10月1日, V129 N1, P10-18

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	诊断过敏反应的方法		
公开(公告)号	JP5675638B2	公开(公告)日	2015-02-25
申请号	JP2011539763	申请日	2009-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
当前申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
[标]发明人	ラブジェイクリストファー ハンキン トリプラネニビネイ		
发明人	ラブ ジェイ. クリストファー ハン キン トリプラネニ ビネイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N33/5047 G01N33/54366 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.P G01N37/00.102 G01N33/53.Q C12Q1/68.A C12N15/00.A		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/120033 2008-12-04 US		
其他公开文献	JP2012511155A5 JP2012511155A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种从单个细胞中检测多种细胞因子的方法，目的是产生疾病的免疫学特征。

(表1) マイクロエンレーピングとELISpotとの比較

	マイクロエンレーピング	ELISpot
細胞	~10 ⁵	~10 ⁵ /ウェル *Nサイトカイン
サンプリングウィンドウ	2 h	24 h
総時間	~7 h	少なくとも48h
分泌速度の定量測定	あり	限定的
細胞の回収	あり	なし
情報	多い	少ない