

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-522284  
(P2015-522284A)

(43) 公表日 平成27年8月6日(2015. 8. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/483 (2006.01)	G O 1 N 33/483 C	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/58 (2006.01)	G O 1 N 33/58 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2015-520420 (P2015-520420)  
 (86) (22) 出願日 平成25年6月26日 (2013. 6. 26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月16日 (2015. 2. 16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/047774  
 (87) 国際公開番号 W02014/004609  
 (87) 国際公開日 平成26年1月3日 (2014. 1. 3)  
 (31) 優先権主張番号 61/665, 231  
 (32) 優先日 平成24年6月27日 (2012. 6. 27)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/784, 802  
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510144959  
 ラトガース, ザ ステート ユニバーシテ  
 ィ オブ ニュー ジャージー  
 アメリカ合衆国, 08903 ニュージャ  
 ージー州, ニュー ブランズウィック, サマ  
 セット ストリート, オールド クイーン  
 ズ  
 (74) 代理人 110000671  
 八田国際特許業務法人  
 (72) 発明者 ブッシュキン, ユーリ  
 アメリカ合衆国, 10520 ニューヨー  
 ク州, ニューヨーク, クロトン-オン-ハ  
 ドソン, ウォッチ ヒル ロード 44

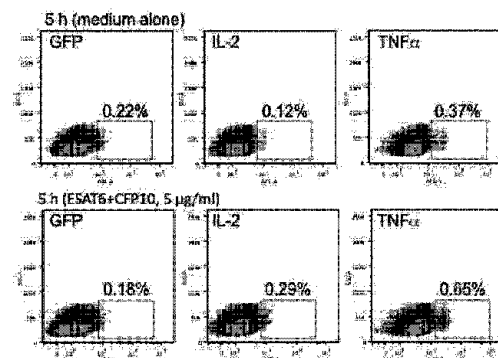
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フローサイトメトリーを用いたRNA測定によるT細胞活性化のための迅速アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、個々の細胞内で発現された少なくとも1つのRNA分子のコピーを迅速に検出するための方法およびその使用に関する。

FIG. 3



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) リガンドまたは刺激分子が結合すると遺伝子発現につながるシグナルカスケードを開始することができる特異的受容体を発現する細胞の集団を含むサンプルを提供し、

(b) 特異的受容体に結合し、および遺伝子発現を開始する少なくとも1つの化合物を用いて前記細胞をインキュベートすることにより、直ちにまたは培養後に、*ex vivo* で前記細胞内での遺伝子発現を誘導し、

(c) 前記細胞を固定および透過処理し、

(d) 蛍光標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブセットを用いて前記細胞によって発現された少なくとも1つのRNA分子のコピーを標識し、および非結合プローブを洗い流し、

(e) 蛍光強度ゲーティングにより分類された1つ以上の蛍光測定値である発現現象を有する細胞をフローサイトメトリー (FC) により検出すること

を含む個々の細胞内で発現した少なくとも1つのRNA分子のコピーを検出するための方法。

## 【請求項 2】

誘導するステップが、前記細胞集団中に存在する抗原提示細胞 (APC) により、または人工 APC (aAPC) により、T細胞受容体 (TCR) シグナル伝達および下流の遺伝子発現を刺激することを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

APC または aAPC 誘導による刺激が、30分から6時間の間である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

誘導するステップが、少なくとも1つのモノクローナル抗体 (mAb) を用いて共刺激することを含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

誘導するステップが、前記 aAPC に結合された少なくとも1つのモノクローナル抗体 (mAb) を用いて共刺激することを含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記化合物が微生物由来である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記化合物がペプチドまたはペプチドの混合物を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

MHC クラス I または MHC クラス II 分子と結合するペプチドまたはペプチドの混合物が前記 APC または aAPC に加えられる、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記ペプチドまたはペプチド混合物が 1 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の間の濃度で存在する、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記少なくとも1つのRNA分子がサイトカイン遺伝子によってコードされた、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記遺伝子が IL-2、TNF、または IFN をコードする、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記刺激分子が結核菌 (*M. tuberculosis*) 由来の免疫原性ペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記プローブセットが同じ蛍光部分でそれぞれ単独で標識された 20 ~ 60 のプローブを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

前記細胞集団がヒト P B M C から得られた T 細胞であり、前記少なくとも 1 つの R N A 分子がサイトカイン遺伝子によってコードされ、前記細胞集団中の細胞が T C R と相互作用する 1 つ以上のペプチド負荷 M H C 分子を伴う a A P C により誘導され、および前記プローブセットが同じ蛍光部分でそれぞれ単独で標識された 20 ~ 60 のプローブを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

発現現象を有する前記検出された細胞が発現現象を有しない細胞から分離される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記分離される細胞が 1 つの細胞のみを含む、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記分離される細胞が 1 つを超える細胞を含む、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記分離が蛍光活性化細胞の分取により実施される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 19】

遺伝子発現が前記分離される細胞内で測定される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 20】

遺伝子発現測定が R T - P C R または前記細胞内の R N A のトランスクリプトーム解析により実現される、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

誘導する前記ステップが微生物産物または合成化合物を用いて T o l l 様受容体シグナル伝達および下流の遺伝子発現を刺激するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記微生物産物が脂質、グリカン、糖脂質、硫脂質、糖タンパク質、タンパク質、ペプチド、または核酸である、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

刺激が 30 分から 6 時間の間である、請求項 21 または 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

刺激が 6 時間から 24 時間の間である、請求項 2、21 または 22 に記載の方法。

## 【請求項 25】

刺激が 24 時間から 72 時間の間である、請求項 2、21 または 22 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記刺激物が 1 ~ 100 n g / m l の間の濃度で存在する、請求項 21 または 22 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記刺激物が 100 ~ 1000 n g / m l の間の濃度で存在する、請求項 21 または 22 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記刺激物が 1 ~ 20 μ g / m l の間の濃度で存在する、請求項 21 または 22 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記化合物がサイトカインである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記サイトカインが I F N 、 I L - 2 、 I L - 15 、および T N F からなる群から選択されるものである、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記サイトカインが、I F N 、 I L - 2 、 I L - 15 、または T N F 以外のサイトカインである、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 32】

10

20

30

40

50

1つを超える化合物または刺激物が提供される、請求項1または21に記載の方法。

【請求項33】

異なる刺激が異なる時間に提供される、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記核酸がRNAまたはDNAである、請求項22に記載の方法。

【請求項35】

(a) リガンドまたは刺激分子が結合すると遺伝子発現につながるシグナルカスケードを開始することができる特異的受容体を発現する細胞の集団を含むサンプルを提供し、

(b) 前記細胞を固定および透過処理し、

(c) 蛍光標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブセットを用いて前記細胞によって発現された少なくとも1つのRNA分子のコピーを標識し、および非結合プローブを洗い流し、

(d) 蛍光強度ゲーティングにより分類された1つ以上の蛍光測定値である発現現象を有する細胞をフローサイトメトリーにより検出すること

を含む個々の細胞内で発現した少なくとも1つのRNA分子のコピーを検出するための方法。

【請求項36】

前記受容体がToll様受容体、NOD受容体およびNOD様受容体、Gタンパク質共役型受容体、ポリペプチドホルモン受容体、サイトカイン受容体、B細胞受容体、ならびにT細胞受容体からなる群から選択される、請求項1または35に記載の方法。

【請求項37】

前記Gタンパク質共役型受容体がケモカイン受容体である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記集団がPBMC、T細胞、リンパ球、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞(Tヘルパー1またはTh1細胞)、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞(Tヘルパー2またはTh2細胞)、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、Th17、Treg細胞、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、樹状細胞、各種身体臓器の内皮および上皮を含む細胞、ならびに神経系の細胞からなる群から選択される細胞を含む、請求項1または35に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2012年6月27日に出願された米国特許仮出願第61/665,231号、および2013年3月14日に出願された米国特許仮出願第61/784,802号に対する優先権を主張する。本出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

(政府の権利)

本明細書に開示されている本発明は、少なくとも部分的に、アメリカ国立衛生研究所からの助成金AI045761号、AI106036号、MH079197号、およびHL106788号による政府の援助によってなされたものであった。米国政府は、本発明にある一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、個々の細胞内の遺伝子発現を迅速に検出する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

多くの病状はT細胞媒介免疫応答を誘発する。これらには癌、自己免疫、移植、および、例えば結核(TB)を含む感染症が含まれる。これらすべての状態において、T細胞の活性化は、共通点としてT細胞受容体(TCR)と特異的な抗原(Ag)との相互作用が関与するが、この相互作用の機能的結果は多様である。どのT細胞内においても、TCR

10

20

30

40

50

シグナル伝達カスケードは、A gの物理的な性質、A gの提示、TCRのレパートリー、およびA g誘導活性化の強度に応じて、異なる組の遺伝子の発現を刺激しうる。細胞の活性化、増殖、および分化過程での誘導されたこれらの遺伝子発現パターンの違いは、最終的にクローン的に増殖したエフェクター細胞の間での機能的不均一性に寄与しうる。細胞間多様性の追加要素はT細胞のホメオスタシスにおいて起きる。A gが除かれるとき、増殖した大部分のエフェクター細胞はアポトーシスによって死ぬが、ごく一部の細胞は長寿命のメモリー細胞として生き残る。A gに再び曝露して起きる応答は、上に列挙した要因に支配され、さらに前分化過程に影響される。その結果、遭遇した各A gについて、免疫応答は同じA g特異性を共有する機能的に特異なT細胞のサブセット（例えばエフェクター細胞対セントラルメモリー細胞対エフェクターメモリー細胞）を発生させる。免疫病理学的症状の自然経過においてはいつでも、これらの異なるサブセットの相対的な提示は多様であり；これらが疾患過程を決定または反映しうる。慢性ウイルス感染およびTBの研究で例証されているように、T細胞サブセットは*in vivo*でのA gおよび病原体負荷と関連し、これらの重要なサブセットの定量分析は診断法および防御免疫測定に有望である。治療の成果は特定の免疫病理症状の進展に関連するため、T細胞サブセットの明確な変化は治療中にも見られるはずである。（自然または治療媒介での）進展状態のこのようなサインは、アンサンブル測定では見逃され、単一のT細胞レベルでしか検出できない。個々のT細胞の特性は、A g刺激に対するこれらの応答によってしか完全には明らかにできない。

10

20

30

40

50

#### 【0005】

現在、血液ベースの臨床イムノアッセイでは一般的に非感染性および感染性の病態の存在は認識することができるが、病態の進行は明らかにできないことがある。対照的に、末梢血中のA g特異的な免疫細胞の単細胞機能解析によって、感染および疾患の進展に関連する複合的に交差する免疫病理状態は解明されるはずである。このような解析は、予後診断能力を進展させ、効果的な介入を促進するのに役に立つであろう。説得力のある例が、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染によって提供されている。現在の方法では、TBは患者が患者の接触者に既に感染を伝播させた後で診断される。無症候性感染自体の診断については未だ医療行為が保証されない。（感染性となる前に）安定した潜伏感染 (LTBI) と初期の活性疾患とを識別できる能力が大いに必要とされている。既存の免疫診断アッセイはこのニーズに応えることができないが、これは感染状態間で異なることが知られているA g特異的な機能性T細胞サブセットを区別するよう適合されていないためである。さらに、これらのアッセイではマイコバクテリア性A gの段階特異的な発現を反映しうる応答を評価することができない。

#### 【0006】

結核感染の顕著な特徴は、大勢の人々がこの病原菌に無症候性に感染したことである（20億人）。易感染性がない状態では、潜在的に感染した人の90～95%は活性のあるTBを発症しない。しかし、保菌者のサイズから、結核感染は依然として年間で9.4百万の活性TBの新たな症例を引き起こし、1.7百万人が死亡する原因となっている。活性疾患に進行する際、症候性および感染性になる前に感染した人を特定して治療することができれば、感染の伝播は大幅に減少するであろう。桿菌数が非常に少ないため、初期の活性疾患の間に結核菌または桿菌の産物を検出することは非常に難しい。標準的な活性TBの微生物学的診断は、既に呼吸器の分泌物に結核菌を有することで感染性である人を検出する。

#### 【0007】

アンサンブル測定に基づく方法は、単に細胞媒介免疫応答の複雑さを明らかにするよう適合されておらず、病期および進展に関連するまれなまたは過渡的な細胞状態を明らかにすることができない。単一T細胞解析にとって最も一般的なイムノアッセイフォーマットは、酵素結合免疫スポットアッセイ (ELISPOT) 法および定量的フローサイトメトリー (FC) 解析である。市販のELISPOT試験 (Oxford Immunotech (英国) 製) では、末梢血単核球 (PBMC) が、血液サンプルからまず単離され、

洗浄および計数される。次いで、所定の数（250, 000など）のPBM Cおよび結核特異的Agがインターフェロンガンマ（IFN）抗体をプレコートしたプレートウェルに添加され、一晚（16～20時間）インキュベートされる。活性化T細胞から放出されるIFNはウェル内で捕捉される。次いで、発色酵素が結合した二次抗体（Ab）と共にインキュベーションされ、その後ウェルは洗浄され、発色基質が加えられる。T細胞によってIFNが分泌された箇所に、サイトカイン放出細胞の周囲に色のついた環状という特徴的な外観を有するスポットが生じる。最後に、肉眼またはプレートリーダーを用いてスポットが計数される。ELIS P O Tは高感度である（その検出限界はPBM Cにおいて $10/10^6$ である）。しかし、いくつかの理由により、機能性T細胞サブセットの間で所望の識別ができない。第1に、一般的に複数の標的を同時に検出するのに適していない。第2に、フォーマットが解析する細胞数に制限がある（例えば、前述の市販のT-S P O T・TB試験では250, 000細胞/ウェル）。従来のFCは多重パラメータ機能を有している。全血またはPBM C中の細胞は、特異的Ag（例えば結核特異的ペプチドまたはタンパク質）、およびプレフェルジンまたはモネンシンのような細胞外分泌阻害剤を用いて6時間以上インキュベーションすることにより刺激される。次いで、透過処理したT細胞は、フルオロフォア標識抗サイトカインAb（例えばFITC結合抗IFN）を用いて染色され、FCにより解析される。Abによるタンパク質染色は、特に細胞内タンパク質の場合において、従来のFCの汎用性を低下させる。さらに、アッセイは内在性抗原提示細胞（APC）によるT細胞の長時間の刺激を必要とするプロトコルにより制限され、これにより所要時間が長くなり、臨床的有用性が低下する。

10

20

#### 【0008】

個々の細胞のサイトカイン解析のための既存の方法は、少量の末梢血サンプル中に存在する低頻度のT細胞集団を迅速に識別する能力に欠ける。市販のELIS P O T試験では、TBとLTBIが区別できない。さらに、（活性TBの微生物学的証拠がない）無症候の個人における陽性結果は、再活性化のリスクにとって情報価値がない。したがって、結核感染の存在を正確に反映する一方で、陽性結果は治療介入の指標と見なされない。このため、特に低資源・高負担で人口の大部分が感染している国々（南アフリカの地域では最大80%）においては、試験の認容性が低下する。さらに、米国のような低負担・高資源な国々においてさえも、再活性化リスクの指標なしで推奨される場合は、LTBI治療の副作用によりその治療が拒否されることがしばしばある。明らかに、現在の免疫診断の限界は、世界中で極めて大きな公衆衛生上の影響を及ぼしている。

30

#### 【0009】

したがって、個々の細胞内の遺伝子発現を迅速に検出する方法に関して、満たされていないニーズがある。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

本発明は、個々の細胞内の各種RNA分子を検出するための新規の迅速な方法に関する。

#### 【課題を解決するための手段】

40

#### 【0011】

したがって、本発明の1つの側面では、個々の細胞内で発現された少なくとも1つのRNA分子のコピーを検出するための方法が提供される。方法は、（a）リガンドまたは刺激分子が結合すると遺伝子発現につながるシグナルカスケードを開始することができる特異的受容体を発現する細胞の集団（例えば少なくとも100または少なくとも10,000細胞）を含むサンプルを提供するステップと；（b）特異的受容体に結合するか、またはシグナル伝達を開始して遺伝子発現を開始する、少なくとも1つの化合物、例えば、（結核菌などの）微生物由来のペプチドまたはペプチド混合物を用いて細胞をインキュベートすることにより、直ちにまたは培養後にex vivoで細胞内での遺伝子発現を誘導するステップと；（c）細胞を固定および透過処理するステップと；（d）蛍光標識した

50

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブセットを用いて、細胞によって発現した少なくとも1つのRNA分子のコピーを標識し、かつ非結合プローブを洗い流すステップと；および(e)蛍光強度ゲーティングにより分類された1つ以上の蛍光測定値である発現現象を有する細胞をフローサイトメトリー(F C)により検出するステップを含む。

**【0012】**

上述の方法は、個々の細胞内の各種RNA分子を検出するために用いることができる。特に、本方法はIL-2、TNF、またはIFNなどのサイトカイン遺伝子によってコードされたRNA分子を検出するために用いることができる。

**【0013】**

本方法において、誘導ステップは、細胞集団中に存在する抗原提示細胞(APC)または人工APC(aAPC)によるT細胞受容体(TCR)シグナル伝達および下流の遺伝子発現の刺激を含むことができる。誘導は、30分から6時間の間で実施することができる。いずれの場合でも、誘導ステップは、少なくとも1つのモノクローナル抗体(mAb)を用いて共刺激するステップも含むことができる。モノクローナル抗体は、aAPCまたはAPCに結合または付加させることができる。

**【0014】**

本方法の1つの実施形態では、細胞集団はヒトPBMCから得られたT細胞の集団でもよい。その場合、少なくとも1つのRNA分子はサイトカイン遺伝子によってコードされたものにすることができる。また、細胞集団中の細胞は、TCRと相互作用する1つ以上のペプチド負荷MHC分子を伴うAPCまたはaAPCにより誘導することができる。

**【0015】**

本方法において、化合物または刺激分子は、結核菌由来の免疫原性ペプチドなど、微生物由来でもよい。1つの例では、化合物はMHCクラスIまたはMHCクラスII分子と結合するようなペプチドまたはペプチド混合物を含むことができる。これらのペプチドまたはペプチド混合物は、様々な濃度(例えば1~20µg/mlの間)で前述のAPCまたはaAPCに加えることができる。

**【0016】**

上記の方法において、誘導ステップは、刺激物を用いたこのような受容体を含む細胞内でのToll様受容体シグナル伝達および下流の遺伝子発現の刺激を含むことができ、この刺激物の例にはサイトカイン、微生物産物、または合成化合物が含まれる。微生物産物の例には、脂質、グリカン、糖脂質、硫脂質、糖タンパク質、タンパク質、ペプチド、または核酸(例えばRNAもしくはDNA)が含まれる。刺激は、30分から72時間の間(例えば30分から6時間、6時間から24時間、24時間から72時間)で実施することができる。刺激物は、1~20µg/mlの間(例えば1~100ng/mlまたは100~1000ng/ml)の濃度で存在することができる。化合物または刺激物は、IFN、IL-2、IL-15、TNFなどのサイトカイン、またはIFN、IL-2、IL-15またはTNF以外のサイトカインでもよい。本方法において、1つを超える化合物または刺激物は、同時にまたは別々に提供することができる。

**【0017】**

本方法のステップ(d)において、プローブセットは同じ蛍光成分でそれぞれ単独で標識された20~60のプローブを含むことができる。

**【0018】**

別の実施形態では、発現現象を有する検出された細胞は、発現現象を有しない細胞から(例えば蛍光活性化細胞分取により)分離することができる。分離された細胞は、1つの細胞のみ、または1つを超える細胞(例えば10、100、1000、10,000または100,000細胞)を含むことができる。次いで、遺伝子発現は、分離された細胞内で、例えばRT-PCRまたは細胞内のRNAのトランスクリプトーム解析により、測定することができる。

**【0019】**

本発明の1つ以上の実施形態の詳細が、以下の説明に記載されている。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】実施例2に記載のFC読み取り値の蛍光強度に対する前方散乱チャンネルA (FSC-A) のグラフである。

【図2】実施例7に記載のサンプルのFC検出から得られた1セットの4つの頻度プロットである。

【図3】実施例8に記載のサンプルのFC検出から得られた1セットの6つの頻度プロットである。

【図4】実施例9に記載のサンプルのFC検出から得られた1セットの3つの頻度プロットである。

【図5】実施例10に記載のサンプルのFC検出から得られた1セットの12の頻度プロットである。

【図6A】実施例11に記載のmRNAプローブセットを用いてプローブ検査したサンプルのFC検出から得られた1セットの28の頻度プロットである。

【図6B】実施例11に記載のmAbを用いてプローブ検査したサンプルのFC検出から得られた1セットの16の頻度プロットである。

【図7A】実施例12に記載の、サイトカイン陽性およびサイトカイン陰性の集団として細胞を区別するための追加ゲーティング前(左枠)および後(右枠)の、緑色蛍光タンパク質用プローブを用いてプローブ検査したサンプルのFC検出から得られた1セットの2つの頻度プロットである。

【図7B】実施例12に記載の、サイトカイン陽性およびサイトカイン陰性の集団として細胞を区別するための追加ゲーティング前(左枠)および後(右枠)の、4つのmRNAプローブセットを用いて同時にプローブ検査したサンプルのFC検出から得られた1セットの2つの頻度プロットである。

【図8A】実施例12に記載の分取した(+/-)細胞集団中の2つの遺伝子の増幅の閾値サイクルを示す表である。

【図8B】実施例12に記載の増幅により得られた増幅産物の電気泳動ゲルを示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、タンパク質をコードするRNA転写物(例えばメッセンジャーRNA(mRNA)およびプレmRNA)ならびにタンパク質をコードしないRNA転写物を含む1つ以上の遺伝子の発現を測定および評価するための方法を開示する。

【0022】

本明細書に開示されているように、本方法は様々な誘導にตอบสนองして遺伝子発現が変化する細胞内のRNA転写物を評価するために用いることができる。誘導は、自然発生でもよく、またはTCRを含む(ただしこれに限定されない)細胞受容体の任意の既知リガンドによって刺激されてもよく、また原則的に、任意の受容体またはリガンド(例えばToll受容体様またはケモカインの受容体およびこれらのリガンド)またはシグナル伝達カスケードを開始する化合物が関与してもよく、特定の遺伝子(例えばIL-2、TNF、またはIFNなどの少なくとも1つのサイトカイン遺伝子)の転写合成および発現をもたらしてもよい。

【0023】

ある実施形態において、誘導は、特異的受容体を結合してそれにより遺伝子発現を開始する1つまたは複数の化合物(例えばMHC IまたはMHC II分子に結合したペプチドまたはペプチド混合物)による刺激である。1つまたは複数の化合物は微生物由来でもよく、例えば結核菌由来の免疫原性ペプチドである刺激分子でもよい。遺伝子発現の誘導、例えばT細胞受容体シグナル伝達および下流の遺伝子発現の刺激は、調査する細胞集団中

10

20

30

40

50

に存在するAPCによってもよい。あるいは、刺激は人工APC(aAPC)によってもよい。MHCクラスI分子またはクラスII分子に結合するペプチドまたはペプチドの混合物は、TCRと相互作用するペプチド負荷MHC分子を産生するために、好ましくは1~20 $\mu$ g/mlの範囲の濃度でAPCまたはaAPCに加えられてもよい。本発明の方法の特定の実施形態は、APCまたはaAPCに加えて、少なくとも1つのモノクローナル抗体を用いる共刺激を含む。aAPCを用いるとき、mAbはaAPCに結合されてもよい。

#### 【0024】

本発明の方法により、細胞集団の構成における変化ならびに感染性または非感染性疾患の進展および付随する病態進行の間に起こる機能の測定を、迅速かつ高感度で実施することができる。これらの測定により、造血および非造血起源の新生および/または悪性細胞、ならびに自己免疫疾患に關与する細胞の特性を特徴付けることができる。

10

#### 【0025】

本方法は、疾患状態を処置する治療における応答の監視においても用いることができる。感染症については、抗生物質療法に応答する免疫制御は、病原菌(例えば結核菌)の根絶における進展と、機能性T細胞サブセットの抗原ペプチドに対する応答などの刺激に対する細胞応答の変化とを相関させることによって、確認することができる。

#### 【0026】

本発明の方法は概して、リガンド/刺激分子結合によりシグナル伝達カスケードを開始させることができる特異的受容体を発現する実質的にすべての細胞、哺乳類(ヒトを含むがこれに限定されない)および下等真核生物に適用できる。これらの方法は、細菌の集団および多細胞生物に適用することができる。特定の好ましい実施形態は、ヒト細胞を含むがこれに限定されない動物細胞に対して本発明の方法を適用するものである。適切な源は、まれな現象の検出および/または統計解析のために十分な細胞数を提供する。ある実施形態において、その数はわずか1000細胞またはさらに100細胞である。多くの実施形態において、例えば細胞がT細胞である場合、少なくとも10,000細胞を提供する源が好ましい。より好ましくは、本源は少なくとも100,000細胞または少なくとも100万細胞を提供する。適切な源には、血液サンプルおよび組織サンプル、例えば生検サンプルが含まれる。組織サンプルは個々の細胞に分離されなければならない、すなわち脱凝集した組織が処理のために必要である。

20

30

#### 【0027】

前述のように、本発明の方法には、5日を超えず好ましくはさらに短い、例えば4、3、2、もしくは1日、または16、12、10、8、6、もしくは4時間の迅速な誘導が含まれる。好ましい誘導時間は30分から8時間、好ましくは30分から6時間、より好ましくは30分から4時間、さらにより好ましくは30分から2時間である。

#### 【0028】

本発明の方法には、イオン流束によって誘導される活性化および機能的影響(イオノフォアおよび/もしくはマイトジェンによって引き起こされ、またはケモカイン受容体、ポリペプチドホルモン受容体、サイトカイン受容体、B細胞受容体、もしくはTCRを含む、Toll様受容体、NOD受容体、NOD様受容体、ならびにGタンパク質共役型受容体を含むパターン認識受容体を含むがこれに限定されない細胞表面または細胞内受容体を通じたシグナル伝達によって引き起こされるが、これらに限定されない)に基づいて、免疫および非免疫細胞内の1つ以上の遺伝子の発現を迅速に測定するステップが含まれる。本発明に記載の方法は、多様な感染性および非感染性の病態に対する医療を進歩させると考えられる。好ましい実施形態は、単離されたPBMC、T細胞内、または(単離されたPBMCではなく)全血サンプル中のいずれか、およびさらに以下に示す他のタイプの細胞内の個々のリンパ球内の1つ以上のサイトカインについて、mRNAおよびpre-mRNAの両方を含むRNAの発現を検出するステップを含む。本発明に記載の方法は、例えばIL-2、IFN、およびTNFを産生するCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞(Tヘルパー1またはTh1細胞); IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、およびIL-13を

40

50

産生するCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞（Tヘルパー2またはTh2細胞）；（IL-2、IFN、TNF、MIP-1 および他のケモカイン）を産生するCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、ならびに他の特殊なT細胞サブセット（Th17およびTreg細胞を含むがこれらに限定されない）、または他のリンパ球サブセット（NK細胞、NKT細胞を含むがこれらに限定されない）、マクロファージおよび樹状細胞の亜集団、各種身体臓器の内皮および上皮を含む細胞、または神経系の細胞（ニューロンおよびグリアを含むがこれらに限定されない）、ならびにサイトカイン、ケモカイン、およびこれらの細胞によって産生される機能分子（例えば表2を参照）のプレmRNAおよびmRNAの解析に適用される。

#### 【0029】

本発明に記載の特定の方法は、*ex vivo*での細胞の刺激または特異的な分子相互作用の誘導を含み、活性マーカーの発現および細胞機能の調節をもたらす。刺激は、直ちに実施されても、または培地内で培養した後の細胞に対して実施されてもよい。刺激は、自然刺激でもよく、すなわち培養物中で単に細胞をインキュベートしてもよい。好ましくは、刺激は、特異的受容体/リガンドをトリガーしてシグナル伝達カスケードを誘導する1つ以上の化合物と共に培地中で細胞をインキュベートすることにより促進されてもよい。これらの化合物は、合成でもまたは微生物（細菌、ウイルス、および菌類を含むがこれらに限定されない）由来でもよく、例えばリボ多糖、リボアラビノマンナン、ペプチドグリカン、細菌起源のミコール酸、またはエプスタイン・バーウイルスもしくはサイトメガロウイルスを含むがこれらに限定されないウイルス起源のタンパク質（例えばそれぞれタンパク質ebvIL-10、cmvIL-10およびUL146）、あるいは真菌（例えばクリプトコッカス関連およびコウジカビ関連）のガラクトキシロマンナンおよびガラクトマンナンならびに可溶性の抗原；ポリペプチドホルモン、例えば血小板由来の増殖因子またはVEGF；サイトカイン；ならびに抗原ペプチドを含む抗原でもよい。刺激の好ましい方法は、人工抗原提示細胞（aAPC；下記参照）を用いる。

#### 【0030】

本発明に記載の方法は、1つのバイオマーカーサイン、好ましくは複数のバイオマーカーサイン、すなわち無傷細胞内で*in situ*でmRNAまたはプレmRNAを特に含む1つ以上のRNAを有する、特に活性化された細胞を含む個々の細胞の検出をさらに含む。

#### 【0031】

本発明に記載の好ましい方法は、固定および透過処理された細胞で、蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブのセットを利用して非結合プローブを洗い流し、mRNAまたはプレmRNA分子を含む発現RNA分子を標識することによって、個々の細胞（例えば活性化T細胞）内での誘導された遺伝子発現（例えばサイトカイン、最も好ましくは複数のサイトカイン）を検出するステップを含む。各RNA標的に対して複数の蛍光標識を提供する複数の核酸ハイブリダイゼーションプローブを用いることによって、単分子感度が得られる。これらのプローブは、同族のmRNAまたはプレmRNAにハイブリダイズされたときに、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）によって蛍光を発するために標識された特定のフルオロフォアまたはプローブを用いて多重的に標識された少数のプローブでもよい。本発明の好ましい方法は、単一の蛍光色素でそれぞれ標識され、標的配列に同時に結合する、より多くの、例えば10~100、より好ましくは20~60、さらにより好ましくは30~50、例えば約50の、より短いオリゴヌクレオチドプローブを利用する。多数の標識を各RNA分子に付けると、細胞は、FC法によって検出することができるバックグラウンドを上回る十分な蛍光を発するようになる。

#### 【0032】

さらに、本発明に記載の方法は、1つまたは複数の標的RNAを発現する個々の細胞のFCによる検出および解析を含む。本発明の特定の方法は、所望の細胞内でAPCまたはaAPC刺激により誘導されたサイトカイン遺伝子のRNA発現産物を含む細胞を検出するために、定量的FCを使用するステップを含む。

#### 【0033】

10

20

30

40

50

FCは、細胞の単一ファイルを作成する流体力学的絞り込みのための流体システムを含む。次いで、単細胞は1つまたは複数の波長での蛍光発光を調べることができる。FCは、臨床病理の実験室においては当たり前の手法である。例えば、FCによるイムノフェノタイピングは、各種血液系腫瘍の診断および進行度診断において重要なツールである。極めて重要なFCステップは、1つ以上の蛍光部分（例えばフルオロフォア）を用いて細胞を標識するステップ、標識された細胞をフローサイトメーターに導入するステップ、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーなどの励起光源を各細胞に照射するステップ、および用いられている各蛍光部分に特異的な発光波長を区別するフィルターおよびミラーを用いて発せられた蛍光を検出するステップであり、それによって、励起および発光に基づき、各細胞に結合した各蛍光部分の存在、および好ましくは量を明らかにするデータを取得する。

10

#### 【0034】

本明細書に開示されているように、複数の単独標識蛍光ハイブリダイゼーションプローブの利用によりRNAを発現する細胞を検出するために、FCは用いることができる。最も好ましい実施形態は、内在性APCまたはより好ましくはaAPCのいずれかによる結核菌Agの提示によって刺激された、単離されたPBMCのT細胞分画中におけるサイトカイン遺伝子から発現したRNA（mRNAまたはプレmRNA）の検出である。複数のサイトカインに対するRNAは、各RNA種に特異的で、検出される各RNA種を異なる蛍光部分（例えば異なるフルオロフォア）で標識したプローブを使用することにより検出することができる。

20

#### 【0035】

本発明の方法において、FCは（わずか10,000細胞から100万細胞を超える）細胞の集団に対して実施される。データは1つ以上の現象について取得される。現象は1つの細胞に対する1セットの測定値である。各現象のデータは、ユーザー定義ウィンドウ（例えば、強度レベルXと強度レベルYの間のフルオロフォアAに対するシグナル、またはフルオロフォアAに対するシグナル）に分類される。FC読み取り値の分類はゲーティングと呼ばれるプロセスであり、したがって、現象は、通常、ある一定の閾値を上回るように、またはある特定の許容限界値で制限されて、ゲーティングまたは選別される。次いで、結果は、ある一定のウィンドウ内の細胞の絶対数として、または好ましくは1つ以上のウィンドウ内の細胞の割合、すなわち頻度として表すことができる。例えば、疾患状態の解析において、結果は、10%の細胞がmRNA AおよびmRNA Bについて陽性で、7%の細胞がmRNA BおよびmRNA Cについて陽性で、2%の細胞がmRNA A、mRNA BおよびmRNA Cの3つすべてについて陽性であってもよい。10,000細胞が解析される場合、最低の可能な陽性結果は、ある一定の現象が10,000細胞のなかで1回発生したというものである。一方、100万細胞が解析される場合、最低の可能な陽性結果は、ある一定の現象が100万細胞のなかで1回発生したというものである。

30

#### 【0036】

FCの結果の解析は、分散分析（ANOVA）を含んでもよいが、これは分散を分析するための統計モデルの集合であり、一般に、全分散を真の偶然誤差による成分と平均値間の差による成分とに分けることによって、グループの平均値または変数の間で有意差を試験する。

40

#### 【0037】

本発明は、前述の方法を実施するための試薬キットについても開示する。本発明に記載のキットは、少なくとも1つの刺激化合物、例えば、試験される疾患状態に特徴的な応答として1つ以上のサイトカインの発現を刺激するタンパク質またはペプチド、またはこのようなペプチドを負荷し後述のように共刺激分子を保有するaAPC、およびmRNAもしくはプレmRNA中に存在する単一の配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズする1つ以上のセットのオリゴヌクレオチドプローブ（好ましくはここで各セットはそれぞれ16~20塩基のオリゴヌクレオチドを20~60含み、各オリゴヌクレオチドは単一のフル

50

オロフォアで標識されている)を含む。前記キットは、mRNA特異的プローブ以外に、細胞タンパク質または関心のある標的に結合しているフルオロフォアでタグ付けされた化学プローブを認識するフルオロフォア結合Ab、解析される細胞の固定および透過処理のための試薬、包含されたプローブと細胞とのハイブリダイゼーションのための試薬、および過剰なハイブリダイズされていないプローブまたは他の非結合標識プローブを除去するための洗浄液などのハイブリダイゼーション後の処理のための試薬をさらに含んでもよい。

#### 【0038】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、細胞集団中に存在するAPCまたは合成ピーズ(本明細書においてaAPCと呼ぶ)によるTCRシグナル伝達および下流の遺伝子発現の刺激を含む。合成ピーズは、機械的な担体、すなわちタンパク質(MHCおよび/または共刺激受容体およびリガンド)が化学結合、静電結合、または他の任意のタイプの結合によって結合できるプラットフォームとしての役目を果たす。したがって、例えば、aAPCの機械的な担体、すなわちプラットフォームとしての役目を果たすために、必要に応じて化学修飾または誘導体化を施したまたは施していない任意のプラスチック表面を用いることができる。

10

#### 【0039】

APCは、MHC分子と結合し(またはMHC分子によって内因的に処理および提示され)、次いでTCRを刺激することができるよう、添加したペプチド(またはタンパク質)と相互作用(または反応)する。aAPCはMHC分子に結合した添加ペプチドと相互作用し、これによりこれらのペプチド負荷aAPCはTCRを刺激することができる。したがって、aAPCは、CD28および/またはCD49dなどのT細胞上で発現された共刺激受容体と相互作用する1つ以上の抗体または他のタイプのリガンド存在下又は非存在下で、TCRと相互作用するペプチド負荷MHC分子の1つ以上のクラスを保有する。特定の好ましい実施形態において、刺激性ペプチドは、結核菌由来の免疫原である。TCRを刺激するステップは、適切なペプチドを負荷し、また、いくつかの実施形態においては、シグナル伝達を増強する共刺激受容体上の標的に結合する抗体、ペプチド、各種炭水化物含有および脂質含有分子などの共刺激タンパク質または機能的等価物を負荷するMHCクラスIまたはクラスII分子を含むTCR発現細胞の、APCまたはaAPCを用いたインキュベーションを含み、T細胞の活性化を引き起こす。

20

30

#### 【0040】

機能的に異なるT細胞サブセットは、現在の検出限界に近い頻度で(一般に0.01~0.1%)しばしば発現する。したがって、それらの検出には、まれなT細胞サブセットでも直接検出できるように、または特定の分析方法の検出限界を上回る数まで増殖するように、強力なTCR刺激および高感度の検出方法が必要である。本発明の方法は、細胞集団中に存在するAPCによる、あるいはaAPC((i)適切なペプチドを負荷したMHCクラスIまたはクラスII分子、および、特定の好ましい実施形態においては(ii)別のシグナルを提供する共刺激タンパク質(抗CD28および/または抗CD49dモノクローナル抗体)(Oelke et al., 2003, Nature Medicine 9(5): 619-24)]を含む合成ピーズベースのプラットフォーム)による効果的なTCR刺激を誘導するステップを含む。実質的に任意のMHC対立遺伝子をピーズプラットフォームに付着でき、および任意の共刺激シグナルは、自然発生するまたは化学的に定義されるいずれかのピーズ付着特異的モノクローナル抗体(mAb)または共受容体リガンドとして提供することができる。優れた刺激特性に加えて、aAPCは非常に安定している:最終的な細胞サイズのaAPCは、結合した合成ペプチドの有無にかかわらず、凍結乾燥形態で保存安定性に優れ、容易に運ぶことができる。

40

#### 【0041】

本発明の方法において、刺激のための手順は一般に、被験者から所望の細胞を得るステップ、培地内で細胞をインキュベートするステップ、および30分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、またはさらに長い期

50

間（例えば1、2、3、4または5日）などの様々な時間で、培養された細胞を刺激するために化合物を加えるステップを含む。細胞は、固形組織の生検により、または気管支肺胞洗浄など、関心のある部位からの液体中の細胞の吸引により得ることができ、あるいは細胞の源は末梢血でもよい。所望の細胞は、これらの細胞を溶解し、溶解した細胞の残分（remnant）から無処置の所望の細胞を分離することによって、または特定の細胞の特性に基づいて不必要な細胞から所望の細胞を分離することによって、不必要な細胞から分離した後に培養してもよい。例えば、血液由来のP B M Cは、培地内でのインキュベート前に、赤血球（R B C）の溶解後、または細胞密度に基づくフィコールによる遠沈による回収およびフィコールの除去の後のいずれかで培養してもよい。刺激は、検出される応答を生じるのに十分な量の上述の刺激化合物（細菌、真菌、またはウイルスの産物、あるいは宿主タンパク質またはペプチドなど）を加え、応答を生じるのに十分な時間だけインキュベートすることにより実現することができる。応答は、培養され、刺激された細胞による、プレmRNAまたはmRNAの合成でもよい。応答は、与えられた刺激物に対する所望の細胞の応答に特徴的なサインとして解釈されてもよい。

10

#### 【0042】

結核感染のサインを得るために、例えば、H L A - A \* 0 2 0 1 ベースの a A P C は、R v 1 8 8 6 c、R v 3 8 7 4 および R v 3 8 7 5 などの既知の A g 由来のヒト H L A - A - 0 2 0 1 M H C クラス I タンパク質に結合することが知られている H L A - A \* 0 2 0 1 エピトープ（ペプチド）を負荷することができ、また、A 2 ベースの A g 負荷 a A P C は、C D 8 + T エフェクターを検出するために、標準的な培養条件下、1 : 1 の比率で P B M C と混合することができる。H L A - D R B 1 \* 0 4 ベースの a A P C も同様に負荷して、C D 4 + T エフェクターの検出のために用いることができる。

20

#### 【0043】

1つ以上の特異的なRNAのコピーを含む細胞を検出するために、各RNAについて、1セットの複数の蛍光標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを利用することができる。オリゴヌクレオチドプローブは、DNA、RNA、またはDNAとRNAの混合物でもよい。これらは、非天然ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、および非天然ヌクレオチド間結合を含んでもよい。各プローブは、複数の蛍光部分、例えばフルオロフォア、量子ドット、または他の蛍光部分の複数のコピーで標識されてもよい。例えば、国際公開第1997/014816号には、標的あたり5つのプローブを利用した、一段階の *i n s i t u* ハイブリダイゼーションによる  $\alpha$ -アクチンおよび  $\beta$ -アクチン mRNA の検出が記載されており、プローブは、10ヌクレオチドおきに1つのフルオロフォア（フルオレセインまたはCy3）、すなわちプローブあたり5つのフルオロフォアで標識した約50ヌクレオチド長の一本鎖DNAである。本発明の好ましい方法は、単一の蛍光色素を用いてそれぞれ標識され、標的配列に同時に結合する、より多くの、例えば10~100、より好ましくは20~60、さらにより好ましくは30~50、例えば約50の、より短いオリゴヌクレオチドプローブを利用する。多数の標識を各RNA分子に付けると、細胞は、FC法によって検出することができるバックグラウンドを上回る十分な蛍光を発するようになる。ほとんどの実施形態において、各プローブセットは単一の蛍光部分を有するようになり、また、各蛍光部分は、検出可能な程度に他の存在する蛍光部分と区別可能になる。しかし、各細胞が第1のRNAまたは第2のRNAを発現するか否かを検出しようとする場合、両方のプローブセットを同じ蛍光部分で標識することができる。

30

40

#### 【0044】

バックグラウンド蛍光は、FCを利用する本発明の方法に対し、細胞内の輝点として個々のRNAを顕微鏡により可視化する顕微鏡的 *s m F I S H* 法とは異なる問題を引き起こす。本発明の方法では、バックグラウンド低減技術を用いてもよい。このような技術の1つは、標的RNA上に隣接して整列するプローブ間でFRETを利用するものである。例えば、第1プローブおよび第2プローブの3'末端に（知られている適切なFRET距離内で）隣接する第1プローブの5'末端と隣接して整列する第2プローブを考えると、第

50

1プローブの5'末端にFRETドナーを、また、第2プローブの3'末端にFRETアクセプターを加えてもよい。この組み合わせでは、細胞はドナーフルオロフォア（例えばフルオレセイン）の吸収波長で励起されるが、シグナルはアクセプターフルオロフォア（例えばTexas Red）の発光波長で検出される。Texas Redフルオロフォアは直接励起されないため、ハイブリダイズされていないプローブ、または誤ってハイブリダイズされたプローブは、蛍光を発しない。別の技術は、Resonanceプローブを用いたプロービングにおいて実施されるように、二本鎖DNA色素とプローブセットのフルオロフォアとの間でFRETを利用するものである。この場合、SYBR GREENなどのdsDNA色素が含まれ（SYBR GREENはフルオレセインと非常に似た吸収波長および発光波長を有する）、また、プローブセットはSYBR GREENからの発光を受けるフルオロフォア（例えばTMR）で標識される。この組み合わせでは、SYBR GREENの吸収波長で細胞を励起することができるが、フルオロフォアの発光波長で発光を検出する。フルオロフォアは直接励起されないため、ハイブリダイズされていないプローブは蛍光を発しない。

#### 【0045】

RNAのすべての領域は、プローブの標的として役目を果たすことができるが、このようなプローブの選定においては、いくつかの要素が考慮されるべきである。好ましくは、標的領域は細胞内でゲノムの他の領域から発現されるべきでなく、またより好ましくは、標的領域はゲノム中の他の場所に存在すべきでない。これは、所望の標的の配列を、検討されている生物の発現遺伝子および全ゲノム配列を一覧にしているデータベースと照合することによって確実にすることができる。潜在的にバックグラウンドを発生させる配列のこの「フィルトレーション (filtration)」は、「repeat masker」などの公開されているコンピュータープログラムを用いて実施することができる。プローブは、標的と直接隣接する領域から選択することができ、または隣接するプローブ間にいくらかのスペースがあってもよい。プローブの長さはハイブリダイゼーションの厳密性に応じて変化してもよい。

#### 【0046】

下に示す通り、実施例1では、単細胞内での遺伝子発現の特徴的なサインの区別における誘導およびプロービングが実証されている。

#### 【0047】

さらに具体的には、アッセイを実施して、照射された結核菌で刺激された分化THP-1細胞を試験した。細胞を、24時間刺激した後、4%パラホルムアルデヒドで20分間インキュベーションして固定し、次いで2つのmRNA標的についてプローブでハイブリダイズした。1つはTNFであり、活性化T細胞およびマクロファージの解析に重要な標的である。もう1つはACSL1（脂質代謝遺伝子、GenBank受託番号：BC050073.1）であり、同様に刺激物によって誘導されることが予想される。TNFに特異的なプローブセット（Ensembl配列ID：ENST00000376122）は、それぞれ約20ヌクレオチド長で、かつテトラメチルローダミンフルオロフォアで末端標識した48のプローブを含んでいた。ACSL1に特異的なプローブセットは、それぞれ約20ヌクレオチド長で、かつ光学的に区別可能なフルオロフォア、すなわちAl

#### 【0048】

実施例1については、発現RNA産物は、Raj et al., 2010, Methods in Enzymology 472: 365-386およびRaj et al., 2008 Nature Methods 5: 877-879に記載の既知の顕微鏡技術、すなわちsmFISHを用いて検出した。この技術は、個々のRNA分子にセットされたプローブのハイブリダイゼーションの目印としての蛍光点の検出を含む。実施例1において、両方のmRNAに対応する点を検出した。TNFおよびACSL1の画像は、細胞の同じセットの各チャネルの合成三次元積層 (merged 3-D stack) であった。解釈には、参考文献に記載されているように、mRNAの個々の分子に対応する回折限界

10

20

30

40

50

スポットを明らかにするコンピュータプログラムを用いた画像処理、細胞のDIC画像へのその回折限界スポットの重ね合わせ、およびmRNA分子の数の細胞毎の計数値の取得が含まれていた。細胞間で各遺伝子の転写物の数に大きなばらつきが観察されたが、これは、哺乳類細胞においてmRNA合成が非常に確率的であるという以前の観察と一致する。結果（連続して解析した50の細胞で計数された点の合計に基づく刺激および無刺激の細胞におけるTNFの平均の点の数）では、単細胞の測定がアンサンブル測定よりもはるかに情報価値があることが示された。

#### 【0049】

本発明の方法のためのFCデータ取得は、従来のFC技術により実施することができる。光は、前方散乱チャンネル(FSC)および側方散乱チャンネル(SSC)の両方において検出することができる。データは、密度プロットおよび等高線図のいずれか、またはその両方で提示することができる。不必要な粒子(例えば細片)による結果を排除しながら関心のある細胞を可視化するために、FCゲーティングが用いられる。ゲートおよびウィンドウ、または領域は、陽性の現象がウィンドウ内に現れるように、従来の方法で決定される。真陽性の現象を偽陽性の現象から識別するためのゲーティングを支援するために、陰性対照、すなわち細胞が発現することのできないもののプロービングの使用が役に立つ。原則的に、これはタンパク質のためのFCに類似しており、ここではアイソタイプ陰性対照および/または未染色細胞が利用される。

10

#### 【0050】

FC検出は、サンプル中の陽性の現象の数、例えば、10,000細胞中に1つの陽性の現象(1/10,000)、100,000細胞中に3つの陽性の現象(3/100,000)、または100万細胞中に2つの陽性の現象(2/10<sup>6</sup>)を明らかにする。現象の頻度によって、生物学的な状態、例えば疾患状態に関する結論が導かれてもよい。あるいは、組み合わせによって結論が導かれてもよい(例えばサンプル中の10%の細胞が第1のサイトカイン(サイトカインA)について陽性であり、また、第2のサイトカイン(サイトカインB)について陽性である)。別の例として、疾患状態は以下の組み合わせによって特徴付けることができる:10%以上の細胞がサイトカインAおよびBについて陽性;7%以上の細胞がサイトカインBおよび第3のサイトカイン(サイトカインC)について陽性;2%以上の細胞が3つのサイトカインすべてについて陽性。

20

#### 【0051】

本明細書に開示されているように、FCが本発明の方法のための読み取り値として有用であることが実証された。後述の実施例2における実験は、個々の細胞内のRNA標的にハイブリダイズされたプローブセットによって生成されたシグナルをFCによって検出することができるかを試験するために計画された。その例では、レンチウイルスコンストラクトから発現させる細胞培養液内のHIV GAG mRNAを検出するステップを説明している。さらに具体的には、293T細胞を、組換えレンチウイルスコンストラクトと一緒に発現させる3つのプラスミドを用いてトランスフェクトし、またGAG mRNAに特異的なプローブを用いてハイブリダイズした。FCの結果は図1に示しており、トランスフェクトされていない細胞から得られた蛍光強度と前方散乱チャンネルA(FSC-A)のグラフが左側、レンチウイルスパッケージングシステムからの3つのプラスミドを用いてトランスフェクトした細胞から得られたグラフが右側である。細胞の両方のセットについて、GAG mRNAに対するプローブセットを用いてハイブリダイズした。トランスフェクトした細胞の集団は、外れ値のトランスフェクトされていない細胞(すなわち、設定閾値を上回るもの)からのシグナルに見られる強度より1~2桁高い強度のシグナルを生じた。対照として、smFISHの結果の画像ベースの解析は、約25%の細胞がコンストラクトを発現していることを示した。同じ集団に対するFC解析により、同じ割合の細胞が蛍光性であることが明らかになった。これらの結果は、mRNA発現がFCによって容易に検出されることを実証するものである。さらに、データは、低頻度の強く刺激された(強い蛍光性の)T細胞を非刺激集団内の外れ値から区別する指針を与えるものである。受信者動作特性(ROC)分析によって、最適な閾値を定義することができる。R

30

40

50

OC分析は、試験開発の当業者に周知である。例えば、Zweig et al., 1993, *Clinical Chemistry* 39(8):561-577およびPepe, 2003, *The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction*. New York, NY: Oxfordを参照されたい。

#### 【0052】

T細胞活性化の転写サインの検出において難題は2つあり、細胞の小さなサブセットのみが誘導されること、およびこの誘導された細胞はmRNAのコピーを細胞あたりわずかに数個のみ発現することである。実施例7で説明する実験において、本発明者らは、低頻度の応答の高感度検出と、いくつかのmRNA標的の同時検出の両方を本発明の方法により実証することができた。刺激、固定された細胞のプロベイング、およびFCを含むアッセイにより、IL-2/TNF およびIFN $\gamma$ /TNF サイトカインペアをそれぞれ頻度3.35%および6.37%で発現させる細胞が検出される一方で、IL-2/IFN $\gamma$  ペアを頻度3.46%で発現させる細胞を検出することができた(図2、右枠)。単一のサイトカインおよび二重のサイトカイン集団、例えば、IFN $\gamma$  (4.76~5.40%)とIL-2/IFN $\gamma$  (3.46%)の比較は、すべてのIFN $\gamma$  産生株がIL-2を産生できたわけではないことを示唆した。一方、大部分のIFN $\gamma$  産生株(5.40%)は、IFN $\gamma$ /TNF 産生集団のサイズ(6.37%)により示唆される通り、TNFも発現したようである。この結果は、TCRトリガリングおよびレクチン媒介刺激(抗CD3 mAbおよびフィトヘマグルチニン)の併用により非特異的に活性化されたT細胞の集団に予想される。したがって、本発明に記載のアッセイにより、既知のT細胞生物学と一致する結果が得られた。

10

20

#### 【0053】

実施例8に示す通り、本発明による方法をex vivoで刺激された結核菌特異的な細胞の検出に適用した。PBMCを、ESAT6由来およびCFP10由来ペプチドの混合物(T-SPOT.TB、Oxford Immunotec、英国)を5 $\mu$ g/mlで用いて5時間インキュベートした。図3に示す通り、Ag特異的なT細胞内でサイトカインmRNAを発現させる細胞は、この刺激の後、2倍にまで増加した。したがって、抗CD28 mAbによってもたらされる共刺激がない状態でも、アッセイはこのLTBIドナー中に存在する低頻度の循環している結核菌特異的なT細胞を検出した。この結果は、本発明によるアッセイの有用性を実証するものである。

30

#### 【0054】

実施例9では、実施例8と比較してシグナルを増大させた本発明に記載の方法を説明している。mAbによるTCRのCD28共受容体の会合を利用して、Ag特異的なT細胞に優位な刺激を与えた。実施例8に示す通り、PBMCを、ESAT6由来およびCFP10由来ペプチドの混合物(T-SPOT.TB、Oxford Immunotec、英国)を5 $\mu$ g/mlで用いて5時間インキュベートしたが、今回は、抗CD28 mAb 53D10存在下または非存在下で行った。固定および洗浄した細胞を、緑色蛍光タンパク質(GFP、陰性対照)またはIFN $\gamma$  に特異的なCy5標識DNAプローブを用いてインキュベートし、次いでFCにより解析した。サイトカイン産生株の頻度を図4に示す。2倍を超えるIFN $\gamma$  mRNAの発現の増加が、抗CD28 mAbの存在下、LTBIドナーのAg特異的なT細胞内で起きた。対照GFPおよびHIV-1 GAGプローブを用いた非特異的なハイブリダイゼーションは、CD28共刺激によって影響されなかった。実施例9は、シグナルを増幅するための、すなわち同族のAgが特異的に会合したTCRに共刺激シグナルを与えることによる特異な方策を示している。さらに、抗CD28 mAbによって媒介された共刺激は対照プローブ(GFPおよびHIV-1 GAG)の非特異的な結合に影響を与えなかったため、共刺激は特異的なシグナルの強度を増大させてバックグラウンドノイズを上回るようにするために用いることができる。

40

#### 【0055】

いくつかの方策は、本発明によるアッセイの最適化に特に役立つ。これらは、以下を含

50

む。

【0056】

i) シグナル検出の動態 各RNA標的(例えばサイトカインIL-2、IFN、およびTNFのmRNA)に関するmRNA分析物の発現の動態は、1つまたは複数の適切な誘導因子(例えば実施例8に記載のAgの混合物(例えば5 $\mu$ g/mlで存在するESAT6由来およびCFP10由来ペプチド(T-SPO.TB、Oxford Immunotec、英国))を用いて刺激された、与えられた源(例えばLTBI+およびLTBI-ドナーの血液サンプルから得られるフィコール分離PBMC)の細胞を用いて決定される。次いで、各サイトカインの発現は、Ag刺激PBMC中で様々な時間(例えば30分、2、4、8、12および16時間)で別々に試験される。特にサイトカインに

10

【0057】

ii) 用量反応 Ag刺激に対する用量反応は、最適なシグナル検出の時点でESAT6とCFP10のペプチド混合物の濃度を変える(1~20 $\mu$ g/ml)ことによって(例えば3つのサイトカインそれぞれについて)同様に求めることができる。さらに、任意のドナーからのPBMCの非特異的な刺激(抗CD3+PHA)は、様々な濃度を別々に

20

【0058】

iii) シグナル対ノイズ増幅 より非常に強力なフルオロフォアを備えたプローブセットを設計することができる。この目標もいくつかの改善の方策によって実現されるであろう。さらに、プローブ標識法は先に説明の通り変更することができる。ハイブリダイゼーションの厳密性は、シグナル/ノイズ比を向上させるために経験的に最適化することが

30

【0059】

シグナルを増幅するための特異な方策は、実施例9に関連して説明した通り、同族のAgが特異的に会合したTCRに共刺激シグナルを与えることによる。共刺激のための条件は、上で概説した通り、本明細書に記述されるアッセイによって、動態および用量反応に対して最適化して、複数のRNA(例えば、3つのサイトカイン)の頑強な検出を実現することができる。

【0060】

iv) 閾値の決定 特定のアッセイにおいて臨床的に許容される閾値は商業的アッセイ開発の最終時点で決定できるが、RNA検出のための閾値の初期評価は最適化されたアッセイの標準化に役立つことができる。研究段階において、ドナーから得られ、かつex vivoで刺激されたAg特異的なT細胞内でのRNA検出(サイトカインの発現)の閾値を評価することができる。Ag特異的な応答は、無刺激のPBMCからのシグナルを、最適な時間およびAg用量でAg刺激PBMCを用いて得られた値から差し引くことによって計算することができる。各サイトカイン読み取り値について、ROC(受信者動作特性)曲線は、様々な切点(ドナーの平均に標準偏差の2倍を加えた値を含む)において感度と特異性の間の妥協点を示すと推定され、また、最適な閾値はAg特異的な応答を特定するために選択される。

40

【0061】

v) 血液量および処理時間の低減 現在、平均で0.8mlの血液に相当する2 $\times$ 10

50

<sup>6</sup> 細胞 / パラメータ (例えば各サイトカイン) が解析される。P B M C 調製におけるフィコール分離の代わりに、全血の赤血球溶解を導入することによって、また、遠心分離の代わりに真空駆動遠沈 (vacuum-driven sedimentation) (96 ウェルフォーマット) などの血液処理の改変をさらに加えることによって、サンプル量を少なくし、またアッセイ時間を短縮することができる。予備実験では、シグナルを大幅に損失することなくハイブリダイゼーションの時間を2時間にまで短縮できることが示されている。

#### 【0062】

アッセイ開発は従来の方法により進めることができる。例えば、3つのドナーグループ (活性T B、L T B I、および非感染の対照) 由来のP B M Cは、実施例4に記載の通り、E S A T 6 およびC F P 1 0 ペプチドを負荷したH L A - A 2 ベースおよびH L A - D R 4 ベースのa A P Cを用いて刺激することができる。各アッセイは、解析に4色のF Cを用いて、表1に示す遺伝子を含むがこれらに限定されないグループから選ばれる刺激 (発現特性に基づいて一緒に試験される) に対する応答の4マーカーのパネルを試験することができる。これにより、すべての標的を各ドナーについて評価することが可能になる。初期の試験において選定されたマーカーは、各グループにおいて同様のレベルで発現される遺伝子をまとめるよう選ばれた組み合わせで再試験することができる。統計解析は、実施例4に記載されている通り実施することができる。所望であれば、従来のA P C刺激によって誘導される標的の発現を測定して、単細胞内の複数の分析物に対する検出感度を改善できるa A P Cの能力を確認することもできる。さらに、アッセイは蛍光顕微鏡により試験することもできる。統計解析は、実施例5に記載されている通り実施することができる。

10

20

#### 【0063】

実施例10に記載されている実験では、T細胞内におけるサイトカインm R N A発現の検出に用いられる「F I S H - f l o w」と呼ばれる同じ手法が、初代マクロファージを含むがこれに限定されない他のタイプの細胞においてうまく利用することができることが実証されている。さらに、この実験では、異なる時間に単一の遺伝子の発現を監視することによって、初代マクロファージ内において異なる刺激に対する応答を区別することができることが実証されている。

#### 【0064】

図5に示す結果は、G F P陰性対照によって評価されるバックグラウンド発現が、一定のままであったが無視できることを示している (ゲーティングされた細胞の約0.1~0.2%)。リポ多糖 (L P S) およびI F N またはN - パルミトイル - S - [ 2 , 3 - ビス (パルミトイルオキシ) - プロピル ] - ( R ) - システイニル - (リシル) 3 - リシン (P a m <sub>3</sub> C S K <sub>4</sub>) の混合物を用いた処置は、これらの培養されたマクロファージ内で、陽性であるすべての細胞の6~42%のレベルまでT N F 転写物の発現を容易に誘導した。T N F 転写物の頑強な発現が、活性化マクロファージ内で予想され、またI F N m R N Aの中程度 (2%未満) の発現とは対照的であった。I F N m R N Aの発現は、刺激の選択および/または刺激の長さによって影響されなかったため、実際の発現プロファイルではなく、これらの細胞における異常に高いバックグラウンドを反映する可能性がある。L P SおよびI F N によって誘導されるT N F m R N A発現の動態は、P a m <sub>3</sub> C S K <sub>4</sub>によって誘導されるものとは異なるように見受けられ、前者の刺激は、持続的で長いm R N Aレベルの上昇につながる。一方、P a m <sub>3</sub> C S K <sub>4</sub>による同じm R N Aの刺激は、持続性ははるかに及ばないものであった。

30

40

#### 【0065】

実施例11では、記載したm R N Aに特異的なF I S Hプローブを用いて (図6A)、またはそれらのタンパク質産物を認識するm A bを用いて (図6B) 得られたフローサイトメトリーの結果を比較して、T細胞活性化のマーカーであるサイトカイン、ケモカイン、およびケモカイン受容体に関する遺伝子発現の経時的なプロファイルの識別を、刺激されたヒトT細胞内で実証している。F I S H - F l o w (図6A) によるサイトカイン産生株の頻度は、非刺激の細胞内でのI L - 2、I F N、T N F、C C L 3、C C R 7

50

および c F o s mRNA の発現が、ゲーティングされる細胞の 1 % 未満で発生しており、無視できる ( 対照 G F P、I L - 2、I F N、および C C R 7 ) か、または非常に小さい ( T N F、C C L 3、および c F o s ) かのいずれかであることを示した。予想外なことに、誘導されたこれらの mRNA の発現は、刺激の 2 時間後にピークに達し、次いで 1 日から 3 日の時点を通じて低下するようである。このことは、同じ細胞を ( 1 μ g / m l のプレフェルジン A の存在下で ) 用いて従来 of m A b 免疫染色法およびフローサイトメトリーにより得られるパラレルデータとは対照的である。ここで、非刺激の細胞は、陰性対照のアイソタイプマッチ ( I s o ) m A b と比べて、I L - 2、I F N、および T N F などの少なくとも一部のマーカーに対して検出された基礎レベル ( 1 ~ 3 % ) のタンパク質発現を明確に示している。さらに、すべての標的は、2 時間で誘導され、試験される 3 日間は高い状態で保持される。したがって、特異な経時的プロファイルはサイトカインに結合する m A b を用いて検出されなかった。実施例 11 では、従来 of m A b 染色法およびフローサイトメトリーに対して、F I S H - F l o w を用いて優れたプロファイル識別をもたらす動態の違いが実証されており、F I S H - F l o w が活性化検出感度の大幅な向上を提供することを示唆している。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 6 6 】

任意の細胞タイプの機能性サイン ( すなわち、特殊な生物学的機能を遂行できる能力 ) を完全に定義するためには、活性化細胞と非活性化 ( 非応答 ) 細胞におけるすべての他の mRNA の発現を知ることが重要であることがある。実施例 12 において報告される検討では、F I S H - F l o w により刺激に応答して 1 つまたは複数の標的を発現する細胞の標識が可能になること、およびこのような応答物はその遺伝子発現プロファイルを調べる目的で細胞集団全体から単離できることが実証されている。

#### 【 0 0 6 7 】

刺激されたヒト T 細胞は、G F P に特異的な R N A に相補的な C y 5 標識 D N A プローブと共にインキュベートして対照として F C により解析するか、または I L - 2、I F N、T N F、および C C L 3 mRNA に対して反応性を有し C y 5 単独で標識されている F I S H プローブセットの混合物 ( 表 3 ) と共にインキュベートした。G F P プローブを用いて得られた結果を図 7 A に示す。プローブ混合物を用いて得られた結果を図 7 B に示す。リンパ球集団のゲーティング ( 各図の左枠 ) の後、保守的な追加ゲーティングを適用して、解析したリンパ球を I F N 発現細胞 ( I F N + ) と非発現細胞 ( I F N - ) とを区別する 2 つの異なる集団 ( 各図の右枠 ) に分けた。G F P プローブされた細胞 ( 図 7 A ) のゲーティング設定により 2 つの集団が定義され、解析したリンパ球すべてのうち、0 . 1 % が I F N + 集団中、7 1 . 2 % が I F N - 集団中であった。I L - 2 : I F N : T N F : C C L 3 プローブされた細胞 ( 図 7 B ) では、同じゲーティングを用いて、1 0 . 2 % が I F N +、3 3 . 7 % が I F N - であった。後者の F I S H プローブされた細胞 ( 図 7 B ) は、単離した活性化および非応答細胞に対して遺伝子発現解析を実施するために、蛍光標識細胞分取 ( F A C S ) により陽性および陰性の集団に分けた。分取した細胞集団を解析して、特異的な F I S H プローブに対するそれらの反応性と一致する特異な遺伝子発現プロファイルを示した。I F N と「ハウスキーピング」G A P D H ( 対照 ) の 2 つの遺伝子によってコードされた mRNA の発現を選び、本発明のこの態様の実施形態を例証した。分取した細胞集団について、2 つの遺伝子のうちの 1 つに特異的なプライマーを用いて R T - P C R を行った。増幅産物の定量的な測定は、増幅反応混合物中に S Y B R G R E E N 色素を含有させることによって行った。図 8 A に示す結果は、I F N 特異的なプライマーが、I L - 2、I F N、T N F、および C C L 3 に対するプローブを用いて識別された I F N + 細胞内で、これらのプローブで最小限に標識された I F N - 細胞内よりも、より多数の標的を検出することを実証するものである。活性化状態によって変化しない対照 G A P D H シグナルの増幅は、活性化および非応答細胞内の双方において同様であると予想される。活性化細胞内で G A P D H 特異的プライマーに見られるわずかに低減した増幅は、この分取した集団が著しく小さいために、産生できた mRNA がより少なかったことを反映している。

## 【0068】

これらの結果（サイズ分析により確認、図8B）は、遺伝子発現が、細胞の分集団の分取および取得のための当業者に周知の方法、ならびにRT-PCRまたはトランスクリプトーム解析などの遺伝子発現測定のための方法を適用することによって、本発明のFISH-Flowプラットフォームを用いて識別された細胞の所望の亜集団においてさらに解析されてもよいことを実証するものである。識別および調査することができる亜集団は、1つの細胞、または1つを超える細胞（10、100、1000、10,000、100,000、またはさらに多い細胞を含むがこれらに限定されない）を含んでもよい。

## 【実施例】

## 【0069】

（実施例1）誘導およびプローブセットの実証

この実施例は、RNA（この場合、mRNA）を産生する細胞の人工刺激の使用、および発現RNAにハイブリダイズする単独標識蛍光プローブのセットの使用を実証するものである。

## 【0070】

この実施例では、smFISHの技術を用いて、プローブに結合したmRNAの個々の分子に対応する点を可視化した。Raj et al., 2010, Methods in Enzymology 472:365-386およびRaj et al., 2008, Nature Methods 5:877-879を参照されたい。プローブのハイブリダイゼーション条件および細胞の洗浄条件は、これらの参考文献に記載されている。手順は、1つの重要な方法において異なっている。洗浄ステップにおける細胞の損失を避けるため、0.5%ウシ胎児血清を洗浄溶液に含有させた。1セットの核酸プローブ（この場合、DNAプローブ）を、活性化T細胞およびマクロファージの解析のために重要な標的であるTNF mRNAのために選定し、さらに、照射された結核菌で刺激された分化THP-1細胞を試験した。さらに含まれていたのは、異なる色のフルオロフォアで標識され、かつACSL1 mRNA（脂質代謝遺伝子）に結合するよう設計された第2のセットのDNAプローブであった。後者の遺伝子も、刺激物によって誘導されることが予想された。ヒトTNF に特異的なプローブセットは、それぞれ約20ヌクレオチド長で、かつテトラメチルローダミンフルオロフォアで末端標識した48のプローブを含んでいた。ヒトACSL1遺伝子に特異的なプローブセットは、それぞれ約20ヌクレオチド長で、かつ光学的に区別可能なフルオロフォア、すなわちAlexaFluor 594で標識された48のプローブを含んでいた。プローブの配列は、本説明の最後に記載した配列一覧に記載されている（表3）。各セットに一覧にしたプローブは、標的mRNAの検出に適しているが、Raj et al., 2010, Methods in Enzymology 472:365-386およびRaj et al., 2008, Nature Methods 5:877-879に記載されている、標的RNAの異なる領域から選択される代替のプローブも用いることができる。前述の通り、前記細胞内の両方のmRNAに対応する点を検出した。TNF RNA分子の数は、誘導なしで細胞あたり0.24から、刺激後に平均で細胞あたり1.4に増加した。

## 【0071】

（実施例2）遺伝子を発現する細胞を検出するためのFCの使用

この実験では、アッセイを実施して、レンチウイルスコンストラクトを発現させる細胞培養液内のHIV GAG mRNAを検出した。

## 【0072】

簡潔には、293T細胞を、組換えレンチウイルスコンストラクトと一緒に発現させる3つのプラスミドを用いてトランスフェクトし、また、HIV mRNAのGAG領域に特異的なプローブを用いてハイブリダイズした（GenBank受託番号：AY835771.1）。プローブの配列は、本明細書の最後に記載する（表3）。プローブをハイブリダイズして、Raj et al., 2010, Methods in Enzymology 472:365-386およびRaj et al., 2008, Natur

10

20

30

40

50

e Methods 5 : 877 - 879 (これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載の手順にしたがって細胞を洗浄した。再び、洗浄ステップにおける細胞の損失を避けるため、0.5%ウシ胎児血清を洗浄溶液に含有させた。次いで、FCを実施して、コンストラクトを発現させる細胞を検出した。ゲートは、トランスフェクトされていない細胞の蛍光に基づいて確立した。トランスフェクトした細胞のうち、約25%の細胞が、ゲートにより設定されたレベルよりも強度が高いシグナルによって示されるコンストラクトを発現した。FCの結果は、蛍光強度(「a.u.」)と前方散乱(「FSC-A」)の2つのグラフを示した図1に示している。左側のグラフ(レンチウイルス-)は、トランスフェクトされていない細胞を示している。右側のグラフ(レンチウイルス+)は、レンチウイルスパッケージングシステムからの3つのプラスミドを用いてトランスフェクトした細胞を示している。

10

#### 【0073】

(実施例3) M-TB由来ペプチドにより刺激されたサイトカイン遺伝子発現の検出  
PBM Cは、非感染性の無症候性潜伏感染(LTBI)ドナーおよび活性のあるTBドナーから得られる。T細胞は、免疫優性マイコバクテリア性AgのRv3875(ESAT6)およびRv3874(CFP10)由来のT-SPOT.TB IFN 放出アッセイ(IGRA)(Oxford Immunotec、マサチューセッツ州マールボロ)内で用いられるペプチド混合物を、製造元の指示にしたがって添加することによって活性化される。様々な時間(4~120時間)で、刺激された細胞は固定および透過処理され、次いで、以下で説明する1つ以上のプローブセットを用いてハイブリダイズされる。標的を発現する細胞の頻度を求めるために、細胞は、プローブを標識するために用いられるフルオロフォアの間で区別する利用可能なフィルターセットを個々におよび組み合わせて用いて、FCにより解析される。

20

#### 【0074】

TNF に対するプローブセットは、実施例1において指定したプローブセットである。2つの付加的なプローブセットが、1つはIL-2のために、1つはIFN のために調製され、それぞれ50のプローブを有する(Ensembl配列IDは、それぞれENST00000226730およびENST00000229135)。3つのセットすべてのプローブは、直鎖状(ランダムコイル)のオリゴヌクレオチド(15~25ヌクレオチド長)で、単一のフルオロフォアで標識されている。3つのセットに用いられる3つのフルオロフォアは、光学的に区別可能である。これら3つのサイトカイン遺伝子は、T細胞サブタイプを区別するT細胞の活性化および増殖のための既知のマーカーである。標的転写物は十分に長く、それぞれ少なくとも50のプローブの使用が可能になる。

30

#### 【0075】

ごく一部(0.01%)の細胞内でマーカーの発現をFCにより検出するため、 $1 \times 10^6$ の現象の結果が収集される。ドナーグループ間の差における統計学的有意性を判定するため、非応答性細胞を応答性細胞から分ける閾値はROC分析によって求められ(例えばZweig et al., 1993, Clinical Chemistry 39(8):561-577およびPepe, 2003, The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. New York, NY: Oxfordを参照)、陽性細胞の頻度が判定される。混合モデルANOVAを用いてデータを解析することができる。データは解析に先立ち変換される(例えば対数変換)。ANOVAの仮説を扱うのに単純な変換では不十分な場合は、統計学的手法のノンパラメトリックアナログが適用される。

40

#### 【0076】

3つのマーカーすべてに関する発現の検出可能な頻度が活性化細胞内で明らかになっている。マーカーの異なる組み合わせを発現する細胞の頻度は疾患のサインである。

#### 【0077】

(実施例4) 結核菌特異的エフェクターT細胞向けアッセイ

50

この実施例では、結核菌特異的なエフェクターT細胞を検出するためのアッセイについて説明する。

【0078】

a. CD8 + Tエフェクターの検出 TB患者は、対立遺伝子特異的なmAb BB7.2および0222を用いて免疫染色されたPBMCのFC検出により、またはPCR確認によりHLA分類される。HLA-A\*0201ベースのaAPCは、Rv1886c、Rv3874、およびRv3875由来の個々の既知のHLA-A\*0201エピトープ(ペプチド)を負荷している。

【0079】

これらのペプチドは、結核菌の免疫優性Ag由来である。PBMCは、HLA-A2に分類されたTB患者から単離され、また、A2ベースのAg負荷aAPCを1:1の比率で用い、標準的な培養条件下で刺激される。あるいは、単離されたPBMCは、内在性APCによるT細胞刺激のために、添加されたペプチドと共にインキュベートされる。4~120時間の様々な時間で、細胞は固定および透過処理され、IL-2、IFN、およびTNFについて特異的プローブと共にインキュベートされる。陰性対照には、上記のAg負荷aAPCで刺激された健康で非感染の(IGRA陰性)ドナーからのPBMC、ならびに無関係なメラノーマ特異的Mart1ペプチド(26~35エピトープ)および分化Ag gp100ペプチド(44~59エピトープ)を負荷したaAPCで刺激された陽性ドナーからのPBMCが含まれる。陽性対照には抗CD3 mAb + PHAで非特異的に刺激されたPBMCが含まれる。

10

20

【0080】

b. CD4 + Tエフェクターの検出 まず、HLA-A\*0201ベースのaAPCを構築するための上述の手法を用いて、HLA-DRB1\*04ベースのaAPCが作成される。この手法の主要な態様は、生合成の間にクラスIIaおよびbのポリペプチドの対形成を必要とする、HLA-DR4分子の可溶性の発現である。MHCクラスII分子の可溶性類似体のサブユニット対形成を容易にするために、IgG分子が分子足場として用いられるが、これは二価であり、多種多様なタンパク質ドメインに適応するように容易に改変することができる。改変したa鎖およびb鎖は、デュアルプロモーターのパキユロウイルス発現ベクター内でクローン化される。このベクターに感染した細胞は、約0.5~2.0mg/mlの可溶性HLA-DR4-Ig様物質を分泌する。一般的なクローニングベクターpZigを用いて可溶性MHCクラスIIのHLA-DR4-Ig複合体を構築するため、DR4タンパク質の鎖および鎖のクラスII細胞外ドメインをコードするDNAは、エンドヌクレアーゼ制限部位を用いてIgの重鎖および軽鎖をコードするDNAに連結される。また、キメラは、改変したpAcUW51ベクターに順次連結される。分泌されるタンパク質の収量、純度および完全性は、HLA-DR4特異的なmAb 0222HA(One Lambda)を用いた生化学的解析(SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法)により確認される。精製された可溶性HLA-DR4-Igタンパク質および抗CD28 mAb(1:1の比率)は、磁気ビーズ(M-450 Epoxy Dynabeads、Dyna1 Invitrogen)に結合される。

30

40

【0081】

Rv1886c、Rv3874、およびRv3875由来で、かつHLA-DRB1\*04対立遺伝子によって制限される既知のペプチド(表1)は、HLA-DR4ベースのaAPC上に負荷され、非感染、LTBIおよび活性TBのドナー由来のPBMCを刺激するために用いられる。あるいは、単離されたPBMCは、内在性APCによるT細胞刺激のために、加えられたペプチドを用いてインキュベートされる。4~72時間の様々な時間の刺激の後、細胞は、IL-2、IFN、およびTNF mRNAについてプローブ検査を行い、FCにより解析される。陰性および陽性対照は、CD8 + T細胞について上記で説明した通りである。

【0082】

【表 1】

表1 HLA-A*0201拘束性およびHLA-DRB1*04拘束性エпитープ		
M. tb タンパク質	HLA-A2エピトープ(配列ID番号)	HLA-DR4エピトープ(配列ID番号)
Rv1886c	FIYAGSLSAL (1) KLVANNTRL (2) GLAGGAATA (3)	PVEYLQYPSPSMGRD (4) LPVEYLQVPSPSMGR* (5) PQQFIYAGSLSALLD* (6)
Rv1986	ALGISLTV* (7) FLACFTLIAA* (8) FLIGYGLLA* (9)	AGRLRGLFTNPGSWR (10) VGFLACFTLIAAIGA* (11) LDTVVLLGALANEHS* (12)
Rv2220	GLLHHAPSL (13) SLWKDGAPL (14)	-***
Rv2659c	RKAAGRPLDLRV* (15) KLLDNHILA* (16) FVLMAAWLA* (17)	PDPYQAFVLMMAAWLA* (18) TMRAHSYSLRAIMQ* (19) RAHYRKLLDNHILAT* (20)
Rv2780	VLMGGVPGVE (21) LLDSGTTSI (22)	-***
Rv3407	ARVEAGEELGV* (23) ALIESGVLIPA* (24) RLVARLIPV* (25)	AIGIRELRQHASYL* (26) RLVARLIPVQAAERS* (27) KRTLSDVLNEMRDEQ* (28)
Rv3874	SGDLKTQIDQV* (29) IRQAGVQYSR** (30)	IRQAGVQYSR** (30) EISTNIRQA (31)
Rv3875	AMASTEGNV (32) LLDEGKQSL (33)	FAGIEAAASAIQGNV (34) SAIQGNVTSIHSLLD* (35)
*Immune Epitope Database And Analysis Resourceのウェブサイト(immuneepitope.org)から入手可能なソフトウェアを用いて予測。 **このエピトープは二重に(dually)クラスI/II拘束性。 ***不要。クラスIベースのaAPCと共に用いたのみ。		

10

20

## 【0083】

実施例3に記載されている統計解析の方法がこれらの結果に適用される。この実施例における複数の刺激アプローチも、比較のために混合モデルANOVAを必要とする。

30

## 【0084】

前述の試験では、対立遺伝子特異的なHLAクラスI拘束性またはクラスII拘束性ペプチドを用いた刺激に基づいて、TB患者の血液中のCD4+およびCD8+エフェクターT細胞の両方を検出することができる。Rv1886c、Rv3874、およびRv3875のAgを認識し、かつ少なくとも単一のサイトカイン、IFNまたはTNFを産生することができる活性化エフェクターT細胞は、容易に検出可能である。2つのサイトカイン(IL-2+IFN+およびIL-2+TNF+)の同時産生は、活性TB患者の血液中においてエフェクターの大部分を占める最終分化したT細胞内では頻度が低い。

40

## 【0085】

(実施例5) 感染段階特異的Agによって誘発される単一のT細胞サイトカインプロファイル

活性TB、LTBI、および非感染のドナーからのPBMCは、Rv1886c(活性のあるTB段階)ならびにRv1986、Rv2659c、およびRv3407(LTBI段階)由来のペプチド混合物を負荷したHLA-A2ベースおよびHLA-DR4ベースのaAPCを用いて、様々な時間(4~120時間)で刺激される。あるいは、単離されたPBMCは、内在性APCによるT細胞刺激のために加えられたペプチドを用いてインキュベートされる。読み取り値は、3つのセットの約50の単独標識蛍光プローブおよび発現細胞の数のFC検出を用いた、IL-2、IFN、およびTNFの発現である。疾患状態を区別する可能性のあるAg候補を識別するために、一元配置ANOVAを用

50

い、カットオフ値として大きな p 値 ( p = 0 . 2 5 ) を用いた。選択した A g を用い、多重または累積ロジスティック回帰などのロジスティック回帰の一般化を利用して、ドナーグループを区別する応答のモデルを構築する。

【 0 0 8 6 】

R v 1 8 8 6 c を用いた刺激は、特徴的な感染段階に関連する T 細胞サイトカインプロファイルをもたらす： T B 患者では単一、二重、および三重の産生株、 L T B I 患者では大部分が I L - 2 産生株である。

【 0 0 8 7 】

( 実施例 6 ) 単一の T 細胞内における感染段階に関連する機能性エフェクターおよびメモリーサインの識別

T C R 活性化によって誘導可能な機能性マーカーは、主たる機能性 T 細胞サブセットを正確に記述できるように、本発明の方法によって測定することができる。このアッセイのために、 T C R の会合後、 4 ~ 6 時間以内に誘導可能な候補マーカー、および / または成熟段階および既知の T 細胞サブセットの機能を反映する遺伝子を選定した。エフェクター、エフェクターメモリー、およびセントラルメモリー T 細胞内で発現する活性化および機能性マーカーの得られるパネル ( 表 2 ) は、これらの考慮すべき事項を満たす。表 2 のデータは、 Mak T W , Saunders M E , editors . New York : Elsevier ; 2 0 0 6 . p . 3 7 3 - 4 0 1 の Zinkernagel R M . T cell activation、および Mak T W , Saunders M E , editors . New York : Elsevier ; 2 0 0 6 . p . 4 0 3 - 4 3 2 の Doherty P . T cell differentiation and effector function、ならびにこれらの参考文献からまとめたものであった。

【 0 0 8 8 】

【 表 2 】

表2 T細胞サインを定義する重要なマーカー\*

マーカー	サブセット	機能
CD27	ナイーブ、エフェクター	増殖、メモリー応答
CD40L	エフェクター	APC活性化、一次応答
CD44high	エフェクター、メモリー	メモリー応答
CD69high	エフェクター、メモリー	活性化、Th17応答
CD107a	CD8+エフェクター、メモリー	CTL脱顆粒
CD137	エフェクター	CTL増殖、IFN $\gamma$ 産生
IL-2	エフェクター、メモリー	増殖、Th1応答
IFN $\gamma$	エフェクター、メモリー	Th1応答
TNF $\alpha$	エフェクター、メモリー	Th1応答
MIP-1 $\alpha$	エフェクター、メモリー	Th1応答
IL-2Ra	エフェクター、メモリー	増殖
CCR1	エフェクター	ホーミング
CCR5	エフェクター	ホーミング、活性化メモリー
CCR7	セントラルメモリー	ホーミング、活性化セントラルメモリー
CXCR4	エフェクター	ホーミング、遊走
CXCR5	CD4+メモリー	ホーミング、遊走、メモリー
LPAM-1	エフェクター、メモリー	ホーミング、CTL分化、メモリー
VLA-4	エフェクター、メモリー	輸送、接着、メモリー
Bcl-2	メモリー	抗アポトーシス、細胞生存
Bcl-xL	CD8+メモリー	抗アポトーシス、細胞生存
パーフォリン	CD8+エフェクター	細胞毒性
グランザイムB	CD8+エフェクター	細胞毒性

【 0 0 8 9 】

T C R を介した刺激および C D 2 8 を介した共刺激を与えるための ( 実施例 3 または 4 に記載の ) ペプチドを負荷した a A P C の使用、あるいは、内在性 A P C による刺激のための ( 実施例 3 または 4 に記載の ) ペプチドを組み合わせた抗 C D 2 8 m A b の使用は、重要なケモカインおよびサイトカイン ( M I P - 1 、 I F N 、 および T N F を含むがこれらに限定されない ) ならびに他の共刺激分子 ( C D 4 0 L 、 C D 1 3 7 を含むが

これらに限定されない)の発現を迅速に増加させ、それがさらに応答性を高める。ポジティブフィードバックは、検出に用いられる時間枠内で応答を増大させ、また多重パラメータの解析におけるFCの結果の感度を高める。選択したマーカーの組み合わせは、ドナーグループの末梢血中での個々のエフェクター細胞およびメモリー細胞の再現性のある識別および特徴付け、ならびにそれらの定量分析が可能になるように選ばれる。これらのマーカーは、T細胞機能性サインとして役目を果たす。識別されるサインが臨床の場で汎用される機器を用いた解析に適するように、4色のFCが用いられる。

#### 【0090】

高いドナー再現性が、ESAT6とCFP10のペプチドの市販の混合物、およびHLA-A2ベースまたはHLA-DR4ベースのaAPCで刺激されたPBMCを用いて得られたデータで明らかになっている。このペプチド混合物を用いて得られたデータは、内在性APCに基づく従来のIGRAを用いた場合に非常に正確である。aAPCによってもたらされる頑強な刺激は、標準的なサイトカイン標的に関して上述の通り、複数の標的の誘導にも適用される。複数のマーカーを発現させる細胞も、従来のAPC刺激の場合よりも高い頻度で検出される。この実施例の方法により、感染(この場合、TB感染)の様々な段階で存在する特異なT細胞のサインとして役目を果たすマーカーセットの識別が可能になる。

10

#### 【0091】

(実施例7) 刺激したPBMC中の2つのサイトカインmRNAの同時検出

この実施例は、蛍光細胞の非常に小さな集団の検出が可能であることを示している。簡潔には、CFSE標識PBMCをMITOTRACKER(Invitrogen)標識PBMC中に連続的に希釈した。アッセイは0.0013%の頻度の前者を検出でき、十分な感度を実証するものであることが判明した。

20

#### 【0092】

IL-2、IFN、およびTNF mRNAの検出を実証するために、抗CD3 mAbおよびこれらの細胞内で様々なサイトカインの発現を誘導することが知られているPHAを用いて、TCRを介してPBMCを非特異的に刺激した。刺激後、細胞を固定して、IL-2とIFN、IL-2とTNF、さらにIFNとTNFに対するプローブセットのペアの組み合わせを用いてプローブ検査した。各ペアのプローブセットの1つをCy5フルオロフォアで標識し、もう1つはTMRフルオロフォアで標識した。具体的には、PBMCを抗CD3 mAb OKT3およびPHA(いずれも1mg/ml)で5日間刺激し、次いで4%パラホルムアルデヒドおよび70%エタノールを用いて固定した。固定および洗浄した細胞を、IL-2およびIFNに特異的なCy5標識またはTMR標識RNAプローブを用いてインキュベートすることにより標識し、再び洗浄して、2色のFC(LSRII, Becton Dickinson)により解析した。結果を図2に示す。図2の4つのプロットは、左から右へ、未染色/偽ハイブリダイズ対照; 単一のサイトカイン、IFN-Cy5標識細胞; 単一のサイトカイン、IFN-TMR標識細胞; および二重のサイトカイン(IL-2、Cy5標識およびIFN、TMR標識)標識細胞である。ゲーティングは、1つまたは2つのサイトカインを発現させる細胞集団およびそれらの頻度を示している。

30

40

#### 【0093】

(実施例8) ex vivoで刺激された結核菌特異的な細胞内におけるサイトカインmRNAの検出

この実施例において、ex vivoで刺激された結核菌特異的な細胞を検出するために本発明に記載の方法を適用した。循環している結核菌特異的な細胞は、通常、潜伏TB感染(LTBI)の個人に低頻度で存在する。LTBIドナーからの血液を得て、結核菌Ag ESAT6およびCFP10(T-SPOT.TB試験で一般に用いられる)由来のペプチドの混合物を用いて5時間刺激した。PBMCを、培地のみで、または5μg/mlのESAT6由来およびCFP10由来ペプチドの混合物(T-SPOT.TB、Oxford Immunotec、英国)と共に5時間インキュベートした。固定および

50

洗浄した細胞を、陰性対照としてGFPに特異的な、またはIL-2およびTNF に特異的なRNAと相補的なCy5標識DNAプローブを用いてインキュベートし、次いでFCにより解析した。サイトカイン産生株の頻度を図3に示す。ここで、上段の3つのプロットは、培地のみでインキュベートしたPBMCの頻度、下段の3つのプロットは、Ag混合物を含む培地でインキュベートしたPBMCの頻度である。

#### 【0094】

(実施例9)LTBドナーの共刺激されたPBMCにおけるIFN 検出

PBMCを、ESAT6由来およびCFP10由来ペプチドの混合物(T-SPOT, TB, Oxford Immunotec、英国)を5 $\mu$ g/mlで用い、抗CD28 mAb 53D10存在下または非存在下で5時間インキュベートした。固定および洗浄した細胞を、GFP mRNA(GFP、陰性対照)(GFP配列はpTRED2EGFP(Invitrogen)を指す)、またはIFN mRNAに特異的なCy5標識DNAプローブを用いてインキュベートし、次いでFCにより解析した。サイトカイン産生株の頻度を図4に示す。対照GFPの非特異的な染色は、CD28共刺激によって影響されなかった。

#### 【0095】

(実施例10)活性化マクロファージにおけるサイトカイン誘導

この実施例は、非T細胞、この場合はプラスチックへの密着により末梢血から得て標準的な条件(10%ウシ胎児血清および抗生物質を補充したRPMI 1640培地)下で2週間培養したヒトマクロファージの人工刺激の使用を説明するものである。

#### 【0096】

簡潔には、活性化は、リポ多糖(LPS)(100ng/ml)およびIFN (20ng/ml)またはN-パルミトイル-S-[2,3-ビス(パルミトイルオキシ)-プロピル]- (R)-システイニル-(リシル)3-リシン(Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>)(100ng/ml)の混合物を4時間または1日間用いて実施した。刺激された初代マクロファージを0.2~0.3%EDTA含有PBS中でプラスチックから取り除き、実施例7に記載されている通り、固定および透過処理し、次いでIFN およびTNF mRNAに特異的なFISHプローブ(表3)を用いてインキュベートし、フローサイトメトリーにより解析した。実施例8に記載の通り、固定および洗浄した細胞を、GFPに特異的なRNAと相補的なCy5標識DNAプローブ(表3)を用いてインキュベートし、陰性対照としてFCにより解析した。上述(例えば実施例2に記載)のFISH-flow解析によりプローブを用いて検出された細胞の頻度を図5に示しており、図中、上段はGFPプローブを用いた結果、中段はIFN プローブ、下段はTNF プローブの結果である。各段の1列目はLPSおよびIFN を4時間用いた刺激、2列目はLPSおよびIFN を1日間用いた刺激、3列目はPam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>を4時間用いた刺激、4列目はPam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>を1日間用いた刺激である。

#### 【0097】

(実施例11)活性化T細胞内におけるサイトカインおよび活性化マーカーの発現動態

この実施例では、フィコール勾配により末梢血から得たヒトT細胞の、PMA(25ng/ml)およびイオノマイシン(350ng/ml)を用いた刺激に応答した、T細胞活性化のマーカーであるサイトカイン、ケモカイン、およびケモカイン受容体に関する遺伝子発現の経時的なプロファイルの識別を実証している。さらに具体的には、様々な時間(2時間、1日、3日)の刺激後、細胞を実施例7に記載されている通り固定および透過処理し、次いで、記載したmRNAに特異的なFISHプローブ(表3)またはそれらのタンパク質産物を認識するmAbを用いてインキュベートし、続いてフローサイトメトリー解析を行った。上述(例えば、実施例2に記載)のFISH-flow解析によりプローブを用いて検出された細胞の頻度を図6Aに示しており、図中、上段は刺激なしの結果、それに続く段はそれぞれ、2時間、1日間、3日間の刺激後の結果である。各段の1列目はGFPプローブ使用;2列目はIL-2プローブ使用;3列目はIFN プローブ使用;4列目はTNF プローブ使用;5列目はCCL3プローブ使用;6列目はCCR7

プローブ使用；最後の列はc F o s プローブ使用の結果である。上段はG F P プローブ、中段はI F N プローブ、下段はT N F プローブの結果である。F Cによりm A bを用いて検出された細胞の頻度を図6 Bに示しており、図中、上段は刺激なしの結果、それに続く段はそれぞれ、2時間、1日間、3日間の刺激後の結果である。各段の1列目は、陰性対照のアイソタイプマッチ ( I s o ) m A b使用；2列目はI L - 2を認識するm A b使用；3列目はI F N を認識するm A b使用；4列目はT N F を認識するm A b使用の結果である。

#### 【0098】

(実施例12) サイトカイン発現および非発現集団への活性化F I S HプローブされたT細胞の分離および解析

この実施例では、上記のF I S H - F l o wにより刺激にตอบสนองして1つまたは複数の標的を発現する細胞の標識が可能になること、およびこのような応答物はその遺伝子発現プロファイルを調べる目的で細胞集団全体から分離できることが実証されている。

#### 【0099】

パートI：集団への分離

フィコール勾配により末梢血から得られ、かつP M A ( 2 5 n g / m l ) およびイオノマイシン ( 3 5 0 n g / m l ) を用いて全体的に2時間刺激したヒトT細胞は、G F Pに特異的なR N Aに相補的なC y 5標識D N Aプローブを用いてインキュベートして、対照としてF Cにより解析するか、または、I L - 2、I F N、T N F、およびC C L 3 m R N Aに対して反応性を有しC y 5単独で標識されている、いくつかのF I S Hプローブセットの混合物(表3)を用いてインキュベートした。上述の、例えば実施例2に記載のF I S H - F l o w解析によりプローブを用いて検出された細胞の頻度を図7 Aおよび図7 Bに示している。G F Pプローブを用いて得られた結果を図7 Aに示す。プローブ混合物を用いて得られた結果を図7 Bに示す。F S CおよびS S Cに基づくリンパ球集団のゲーティング(各図の左枠)の後、保守的な追加ゲーティングを適用して、解析したリンパ球を2つの特異な集団(各図の右枠) - サイトカイン陽性(I F N + と表す)および陰性(I F N - と表す)に分けた。G F Pプローブされた細胞(図7 A)のゲーティング設定により2つの集団が定義され、解析したリンパ球すべてのうち、0.1%がI F N +、71.2%がI F N -であった。I L - 2 : I F N : T N F : C C L 3 プローブされた(図7 B)集団では、同じゲーティングを用いて、10.2%がI F N +、33.7%がI F N -であった。後者のF I S Hプローブされた細胞(図7 B)は、以下で説明する単離したサイトカイン発現および非発現細胞に対して遺伝子発現解析を実施するために、F A C Sにより陽性および陰性の集団に分けた。この手法は、I F N + およびI F N - 分集団に区別および分取された、I F N 特異的なF I S Hプローブのみで標識された刺激されたT細胞に対しても成功するものであった。

#### 【0100】

パートII：F I S Hプローブされ、活性化および非応答T細胞集団に分取されたT細胞のサイトカイン遺伝子発現解析

調製およびパートIに記載の別々の集団に分取した活性化および非応答T細胞を解析し、特異的なF I S Hプローブに対するそれらの反応性と一致する特異な遺伝子発現プロファイルを示した。I F N と「ハウスキーピング」G A P D H (対照)の2つの遺伝子によってコードされたm R N Aの発現を選び、この目標の実現可能性を例証した。標準的な方法により分取した細胞集団から単離したR N Aについて、Q I A G E N O n e S t e p R T - P C R K i tを用いて、供給業者によって記述されたプロトコルに従い、また、2つの遺伝子のうちの1つに特異的なプライマーを用いてR T - P C R (逆転写と、それに続く、得られるc D N Aのポリメラーゼ連鎖反応による増幅)を行った。増幅反応のプライマー配列は、以下の通りであった。

#### 【0101】

I F N フォワードプライマー：5' G A G C A T C C A A A A G A G T G T G G A G (配列ID番号：36)

10

20

30

40

50

IFN $\gamma$  リバースプライマー：5' TTCATGTATTGCTTTGCGTTGG  
(配列ID番号：37)

GAPDH フォワードプライマー：5' CCAATATGATTCCACCCATG  
GC (配列ID番号：38)

GAPDH リバースプライマー：5' TCCTGGAAGATGGTGATGGGAT  
T (配列ID番号：39)

RTインキュベーションおよび94、15分間の初期変性に続いて、サーマルサイクリングステップは、94で0.5分、55で0.5分、72で1分であった。40サイクル実施した。増幅産物は、SYBR GREEN色素により検出した。増幅反応の閾値サイクルを図8Aに示す。増幅結果を検証し、人工産物の可能性を排除するために、確認された増幅産物のサイズを、IFN $\gamma$  特異的およびGAPDH特異的プライマーを用いてゲル電気泳動により確認した。結果を図8Bに示す。

10

【0102】

【表3-1】

### プローブ配列

配列ID 番号		配列ID 番号	
	IFN $\gamma$ プローブ		
40	atcagaacaatgtgctgcac	64	tctaatagctgatcttcaga
41	ccaaaggacttaactgatct	65	tcttgtatcaagctgatcag
42	gccaaagaagttgaaatcag	66	tcatcgtttccgagagaatt
43	gagctgaaaagccaagatat	67	caagagaacccaaaacgatg
44	tatgggtcctggcagtaaca	68	aaggttttctgcttctttta
45	gacctgcattaaaatatttc	69	ccattatccgctacatctga
46	caaatgcctaagaaaagag	70	cactctcctctttccaattc
47	tggtctctgcattatTTTTCT	71	gtttgaagtaaaaggagaca
48	gctctgggtcactctTTAAAGT	72	atgggtctccacactctTTTG
49	cttgacattcatgtcttct	73	ctcgtttctTTTTGTTGCTA
50	ttagtcagctTTTCGAAGTC	74	gacattcaagtcagttaccg
51	gttcatgtattgctttgcgt	75	agttcagccatcacttggat
52	ttcgcttccctgTTTTAGCT	76	cgaacagcatctgactcct
53	attactgggatgctcttcga	77	caaatattgcaggcaggaca
54	ccccatataaataatgttaa	78	cttatttgattgatgagtct
55	cattacacaaaagttgctat	79	gacagtcacaggatatagga
56	cagaaaacaaaggattaagt	80	cacatagccttgccctaatta
57	ccctgagataaaagccttgta	81	ttaggttggtgctgctagttg
58	aaacacacaacccatgggat	82	gttcattgtatcatcaagtg
59	ctggatagtatcacttact	83	catattttcaaacgggcagt
60	aagcactggctcagattgca	84	agttctgtctgacatgccat
61	tcagggtcacctgacacatt	85	ctcctgagatgctatgTTTT

20

30

40

【0103】

【表 3 - 2】

62	ttggaagcaccaggcatgaa	86	cagtcacagttgtcaacaat
63	tgagttactttccatttggg	87	gtgaacttacactttattca
	IL-2プローブ		
88	tagcccacacttaggtgata	112	gtgaaatccctctttgttac
89	agactgactgaatggatgta	113	ggaatttctttaaaccccca
90	ttcctcttctgatgactctt	114	gaaaaaacattaccttcatt
91	tttcaaagactttacctgtc	115	tgttttacatattacacata
92	aatattatgggggtgtcaaa	116	ttatactgttaattctggaa
93	ctcttgaacaagagatgcaa	117	attaaagagagtgatagggga
94	ttgaggttactgtgagtagt	118	tcctgtacattgtggcagga
95	caatgcaagacaggagtgtc	119	tgacaagtgcaagacttagt
96	ttgaagtaggtgcactgttt	120	gctgtgttttctttgtagaa
97	gcagtaaagtctccagttgt	121	tcaaaatcatctgtaaatcc
98	tcttgaattattaattcca	122	gcatcctggtgagtttggga
99	gcatgtaaaacttaaatgtg	123	tcagttctgtggccttcttg
100	cttctagacactgaagatgt	124	cctccagaggtttgagttct
101	tttgagctaaatttagact	125	gtcttaagtgaagtttttg
102	tattgctgattaagtccctg	126	gttccagaactattacgttg
103	atgttgtttcagatcccttt	127	catcagcatattcacacatg
104	attctacaatggttgctgtc	128	aggtaatccatctgttcaga
105	gttgagatgatgctttgaca	129	gcacttaattatcaagtcag
106	ctgatatgttttaagtggga	130	atatttaataaataagaagg
107	caacaataaataataaaattt	131	ataggtagcaaaccatacat
108	agattaagaataatagttac	132	agatccatattttatagtttt
109	gggcttacaaaaagaatcat	133	gaaaccatttttagagcccct
110	aatattttgggataaataag	134	ctatatttaacattcaacat
111	actaaccaatctacatagat	135	tcaaatttattaaatagttt
	TNF $\alpha$ プローブ		
136	tcctctgctgtccttgctga	160	agttgcttctctccctetta
137	tctgaggggtgttttcaggg	161	atgtgagaggaagagaacct
138	tgctcttccaggggagaga	162	gatcatgctttcagtgtca
139	aagaggctgaggaacaagca	163	aaagtgcagcaggcagaaga
140	tgattagagagaggtccctg	164	agaagatgatctgactgcct
141	tgggctacaggcttgcact	165	agcttgaggggttgctacaa
142	tggttatctctcagctccac	166	tgaggtagcaggccctctgat
143	ttgaagaggacctgggagta	167	ttgaccttggctctgtagga
144	gctcttgatggcagagagga	168	agatagatgggctcatacca
145	acccttctccagctggaaga	169	attgatctcagcgtgagtc
146	tcggcaaagtcgagatagtc	170	atgatcccaaagtagacctg
147	tttgggaaggttgatgttc	171	taataaagggttggggcag

10

20

30

40

【 0 1 0 4 】

【表 3 - 3】

148	agaggttgaggggtgtctgaa	172	cccaattctctttttgagcc
149	ttctaagcttgggttccgac	173	gtgggtgtcttgttgcttaa
150	attcctgaatcccaggtttc	174	tagtggttgcccagcacttca
151	tggaggccccagtttgaatt	175	aaagctgtaggccccagtga
152	tctccagattccagatgtca	176	attctggccagaaccaaagg
153	taggtgaggtccttctcaagt	177	ctaaggtccacttgtgtcaa
154	aaacatctggagagaggaag	178	tccgtgtctcaaggaagtct
155	ataaatagagggagctggct	179	ccggtctcccaaataaatac
156	acattgggtccccaggata	180	aaaacatgtctgagccaagg
157	ttgttcagctccgttttcac	181	atcaaaagaaggcacagagg
158	ggtcaccaaatacagcattgt	182	aggctcagcaatgagtgaca
159	attacagacacaactcccct	183	ttctcgccactgaatagtag
	ACSLプローブ		
184	tgcaatgtgatgcctttgac	208	gaaggccattgtcgatagaa
185	ttcgcttcattgttggagt	209	tgaaatagttccgcagctct
186	tagaggtcatctatctgcca	210	aaactaaaccttgatagtgg
187	ccatttcctctgagctttct	211	gagaagagattgtggaactg
188	aacaacatgaaggccatcag	212	ccctacacttgctgtattca
189	aagtcaaacacgaacgcttc	213	tatgagaagaaccccgaatg
190	gtgttctctttcctctagca	214	aacatgaggtgactgtaagg
191	ggctcattttggaaagtgtg	215	gcacatttatagtatcccct
192	ctgaggaagtctcaaataac	216	gaaacagggagacagaagat
193	caaagtcctaacccttgat	217	gtagcagacatctcagagat
194	agacagctgcagaatttgca	218	gcactgtactctttagagca
195	aaagggaaacacttccctcta	219	gccaggacagttgttcttat
196	tgggtccgcttgtgagattct	220	ggacagtagcagggatttaa
197	ttctgtgaatgcctgtgaga	221	cgtaacccttacgaatcaga
198	gactggagaagaacatgagt	222	atgctccaacagaaaccaca
199	atggttctgagttggatctg	223	atttgccagaggctccttat
200	aatccacgcgttctgatgag	224	agagcattctgcatgaaag
201	aaccctgaaaaaggatgga	225	cactatagaatctaaggcag
202	ctgatccaggttaactctttc	226	acagttattcaggcgtcaca
203	gtgagtgggttcagtgaagat	227	ggcaagttaatcccaacatg
204	gaaatgcttgctgagagtt	228	gtactcaagtataactccc
205	ccaggaaatgaactttccag	229	caaatgtggcaaagactcac
206	ccccaaaacagctgctttaa	230	gccctgttgtgcttgtatat
207	gttaggctaccaagtagtgt	231	caaaacccaaggtgacaaa
	CCL3プローブ		
232	ctgctgcccgtgtcctt	252	agaaaggactgaccact
233	ctcgagtgtcagcagag	253	gagcaggtgacggaatg

10

20

30

40

【 0 1 0 5 】

【表 3 - 4】

234	agtggagacctgcatga	254	gaggacagcaagggcag
235	gagagccatggtgcaga	255	tgcagagaactggttgc
236	cgtgtcagcagcaagtg	256	gtagctgaagcagcagg
237	gtggaatctgccgggag	257	agtcagctatgaaatc
238	ggctgctcgtctcaaag	258	caccgggcttggagcac
239	gcttggtaggaagatg	259	cacagacctgccggctt
240	caactcctcactggggtc	260	cgctgacatatttctgg
241	ctcaggcactcagctcc	261	ctcgaagcttctggacc
242	ccaccgaggtcgtctggg	262	tcaggctcctgctcctc
243	acacgcatgttcccaag	263	aagaggtagctgtggag
244	gcaacaaccagtcata	264	ccacagtgtggctgttt
245	tttaagttaagaagagt	265	agtataaataaattaa
246	aaattacaaaaactaaa	266	acacactgtgaaatcga
247	cagagcaaacatcaca	267	aggggacaggggaactc
248	gttgtcaccagacgcgg	268	gctgatgacagccactc
249	gccatgactgcctacac	269	tcagtctggtggctttg
250	gcatccgatacacattt	270	tcacagccctgaacaaa
251	attatttccccaggccg	271	accttttaaaagagcat
	CCR7プローブ		
272	cggtaaaaccacacagga	296	caggctccatgacgctctc
273	cagcacgcttttcatagg	297	aatgacaaggagagccac
274	ttgacacaggcatacctg	298	tgtaatcgtccgtgacct
275	ccactgtggtgtgtctc	299	aagactcgaacaaagtgt
276	cgcacgtccttcttgag	300	ggaggaaccaggctttaa
277	acaaatgatggagtacat	301	attgccagtaggcccac
278	ataggtcaacacgaccag	302	tggtcttgagcctcttga
279	ttgagcaggtaggtatcg	303	tgtaggcccagaagggaa
280	cgaagaccaggacttgg	304	tgagcttgcaaaagtgga
281	gctcatctttagatggc	305	taggagcatgccactgaa
282	gtcaatgctgatgcaaag	306	ctggacgatggccacgta
283	ggacagcttctgatgag	307	gcactgtggctagtatcc
284	tacaggagctctgggatg	308	ctgctcctctggaggctca
285	agagcatcgatcgcttg	309	ctccacatgctctgtgat
286	ccacctggatggtgataa	310	cagaaagccgatcaccat
287	gaagctcatggccagcag	311	gcggatgatgacaaggta
288	ctcaaagttgcgtgcctg	312	atcaccttgatggccttg
289	atgaagaccacgaccaca	313	attgtagggcagctggaa
290	cgctctgggcccaggaccac	314	gctactggtgatgttgaa
291	ttgcttactgagctcaca	315	gacgtcgtaggcagatggt
292	gacgcaggccaggctgta	316	gaaagggttgacgcagca
293	gacgccgatgaaggcgta	317	gaagagatcgttgcggaa

10

20

30

40

【 0 1 0 6 】

【表 3 - 5】

294	gccaggtccttgaagag	318	gagctgctcctggctgag
295	gatgtgccgacaggaaga	319	ctccacactcatggagga
	cFosプローブ		
320	tctgcaaagcagacttctca	344	tctgcaaagcagacttctca
321	ttcagcaggttggaatctc	345	actctagtttttcttctcc
322	tcggtgagctgccaggatga	346	aggatcatcagggatcttgca
323	agacatctcttctgggaagc	347	agtcagatcaagggaagcca
324	tgaaggcctcctcagactcc	348	agggtcattgaggagaggca
325	acaggttccactgagggtt	349	tccatgctgctgatgctctt
326	atcaaagggtcggcttca	350	tgatgctgggaacaggaagt
327	tcagagccactgggctgga	351	tcagagccactgggctgga
328	tgctgcatagaaggaccag	352	actgtgcagaggctcccagt
329	tctgtggccatgggccccat	353	tacaggtgaccaccggagtg
330	tgtaagcagtgcagctggga	354	taggtgaagacgaaggaaga
331	acagctggggaaggagtcag	355	tcattgctgctgctgccctt
332	agctgagcgagtcagaggaa	356	agtggtcacttggtgggtgccg
333	tgtaatgcaccagctcgggc	357	gaagatgtgtttctcctctc
334	gtctacaggaaccctctagg	358	acagataaggctcctccttag
335	acagcctgggtgtgtttcacg	359	ctttcaagtccttgaggccc
336	cttgagtccacacatggatg	360	atctccggaagaggtaagga
337	cactccatgcgttttgctac	361	gtgtcactgggaacaataca
338	ctaactaccagctctctgaa	362	aggcctggctcaacatgcta
339	agagaaaagagacacagacc	363	tatgagaagactaaggaga
340	ccaatagattagttaatgc	364	ccaggttaattccaataatg
341	caatttgaaaatatccagca	365	gttaaaatcagctgcactag
342	ccaggaacacagtagttatt	366	ctaatacagaacacactattg
343	cttagtataatattggatc	367	ccagaaaataaagtcgtatc
	GFPプローブ		
368	tcgcccttgetcaccat	392	accccggtgaacagctc
369	tcgaccaggatgggcac	393	ttacgtcgccgtccagc
370	gctgaacttggtggcgt	394	tcgccctcgccggacac
371	cgtaggtggcatgccc	395	cttcagggtcagcttgc
372	ccggtggtgcagatgaa	396	agggcacgggcagcttg
373	agggtggtcacgagggt	397	actgcacgccgtaggtc
374	tcgggtagcggctgaa	398	cggtgcttcatgtgg
375	ggcggacttgaagaagt	399	acgtagccttcgggcat
376	agatggtgcgctcctgg	400	gccgtcgtccttgaaga
377	gcgcggtcctttagtt	401	cctcgaacttcacctcg
378	gttcaccagggtgtcgc	402	cccttcagctcgatgcg
379	cctccttgaagtcgatg	403	cccaggatggtgccgt

10

20

30

40

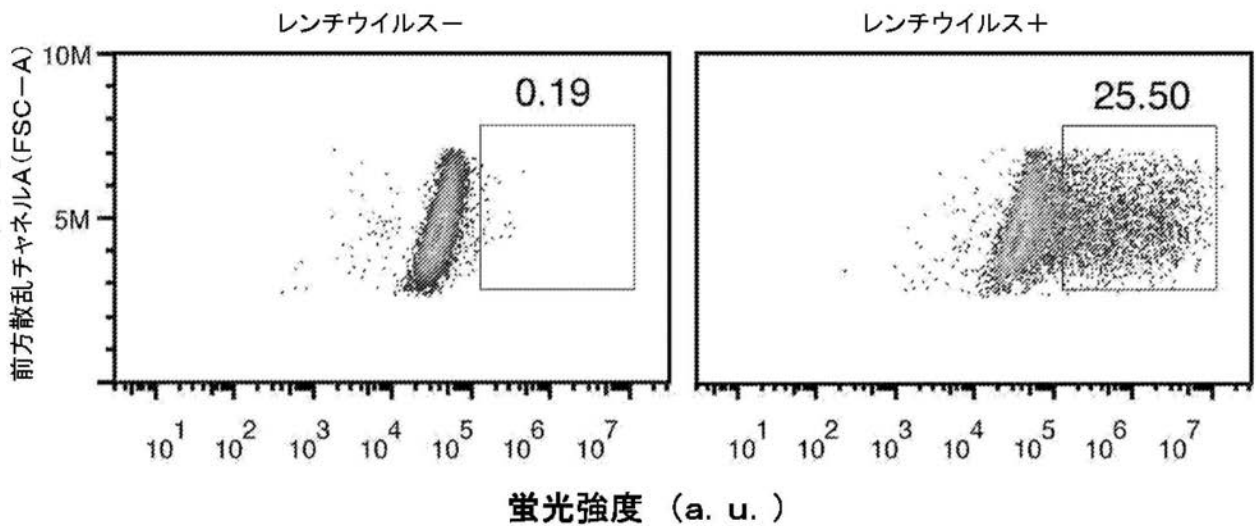
【0107】

前述の実施例および好ましい実施形態の説明は、特許請求の範囲により定義される本発明を限定するものではなく、例示するものであると見なされるべきである。容易に理解されるように、特許請求の範囲に記載の本発明から逸脱することなく、上に記載の特徴の多

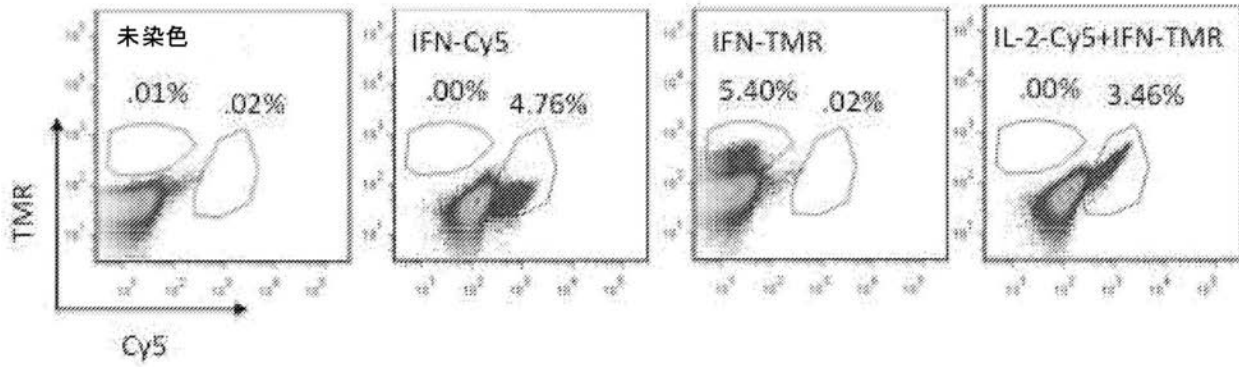
50

数の変形形態および組み合わせを利用することができる。このような変形形態は、本発明の範囲からの逸脱とは見なされず、このような変形形態はすべて、以下の特許請求の範囲内に含まれるものである。本明細書において引用したすべての参考文献は、その全体が本明細書に組み込まれる。

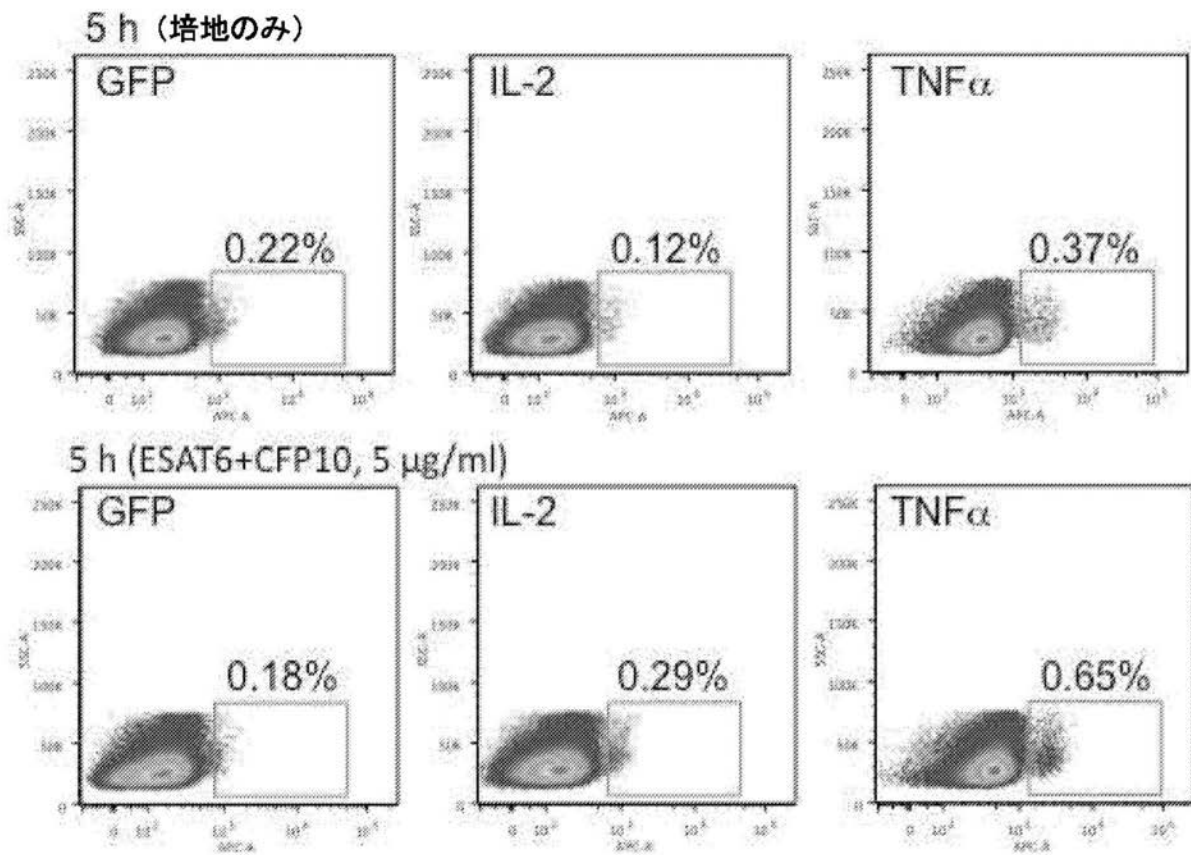
【 図 1 】



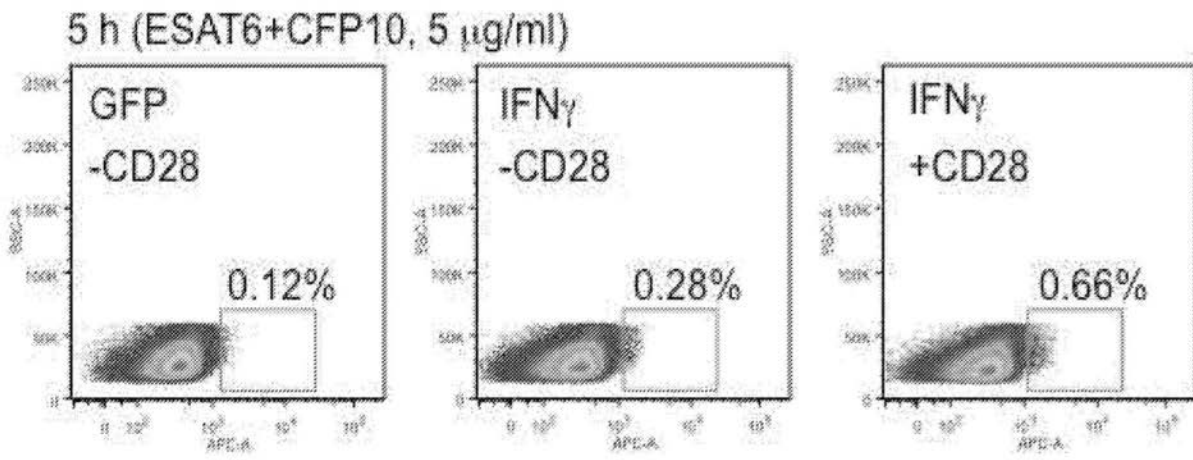
【 図 2 】



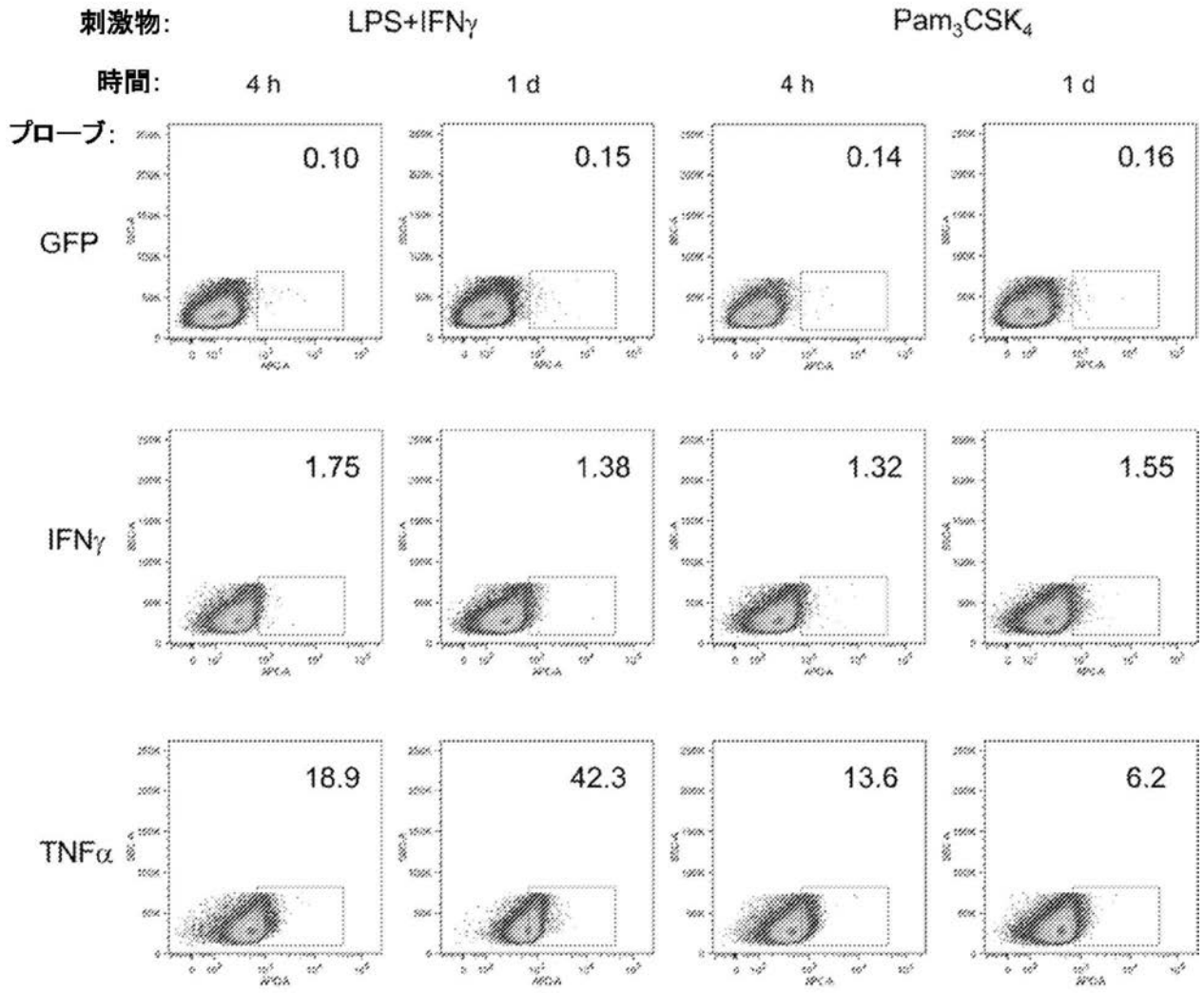
【 図 3 】



【 図 4 】

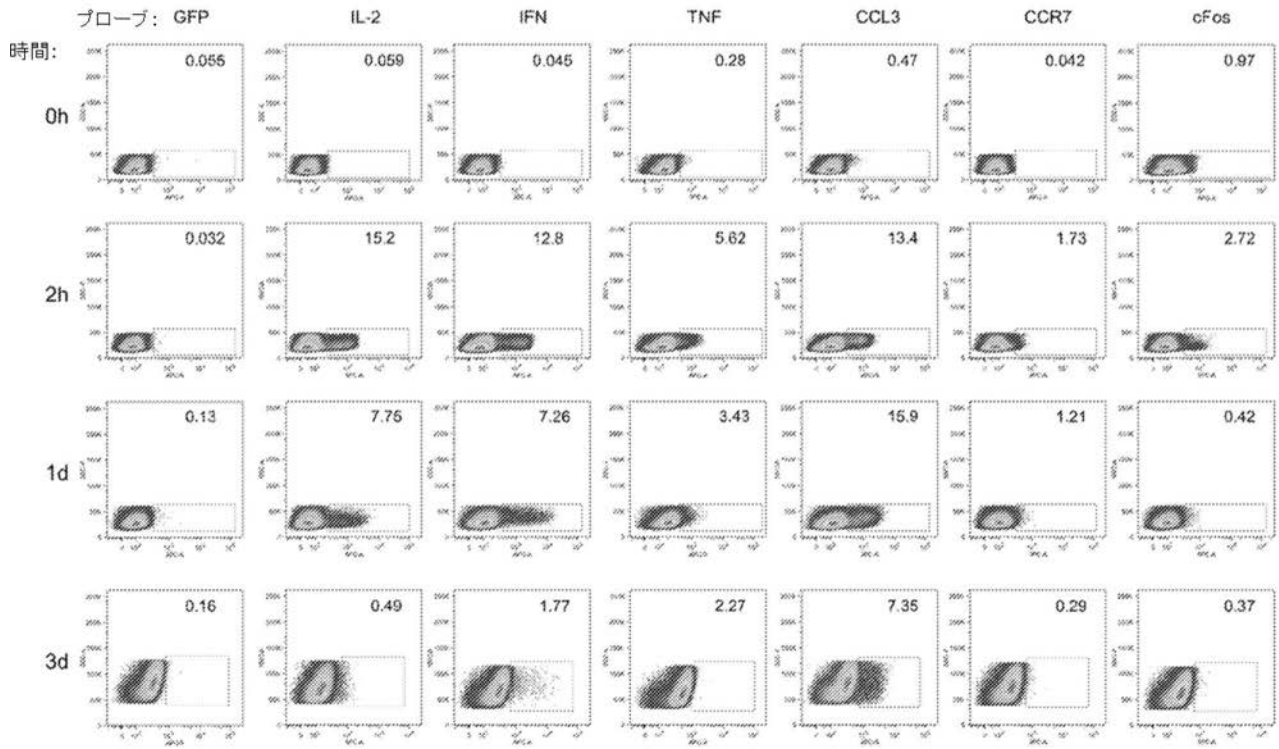


【図5】

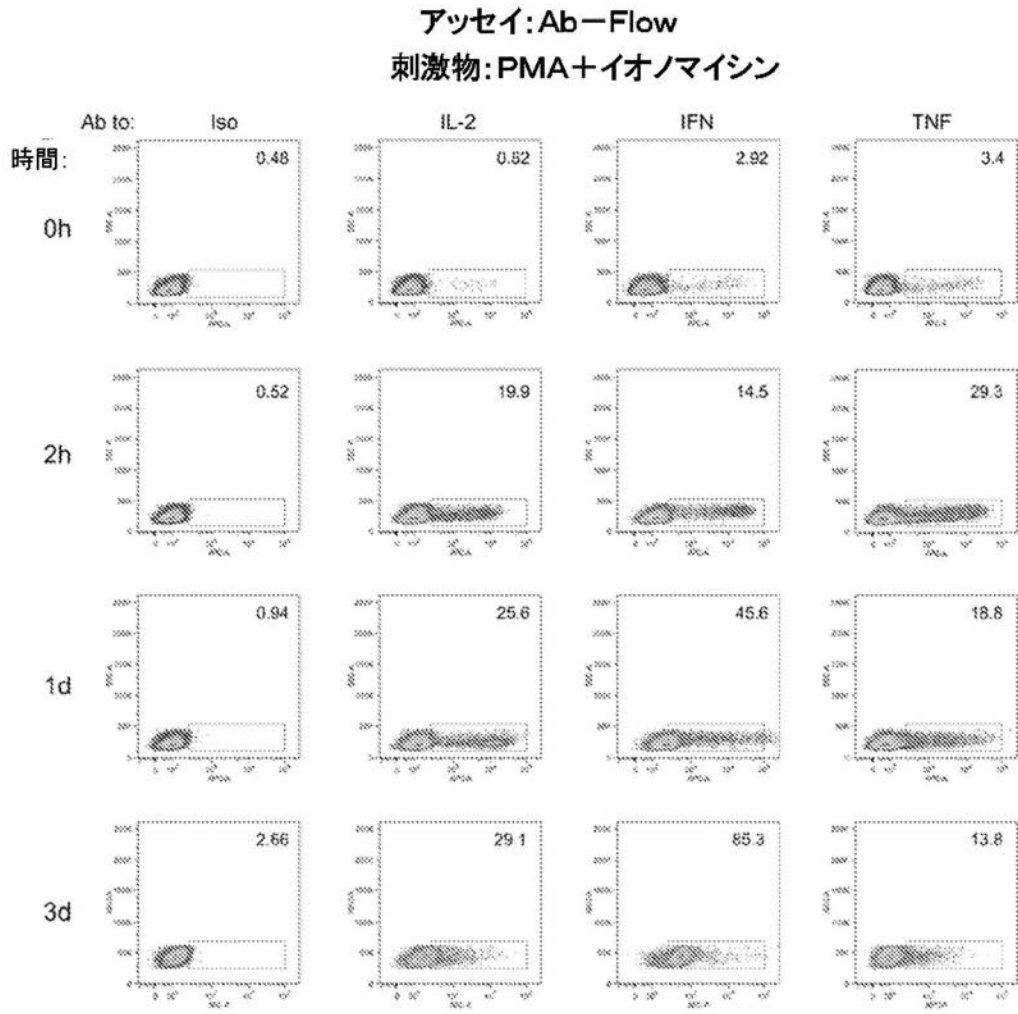


【図 6 A】

アッセイ: FISH-Flow  
刺激物: PMA+イオノマイシン

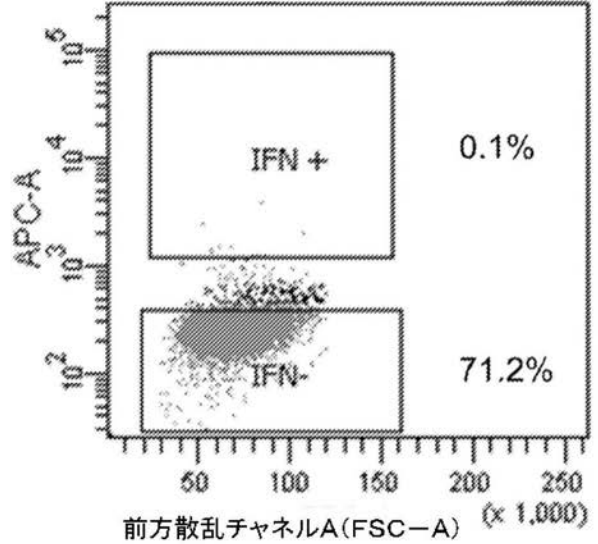
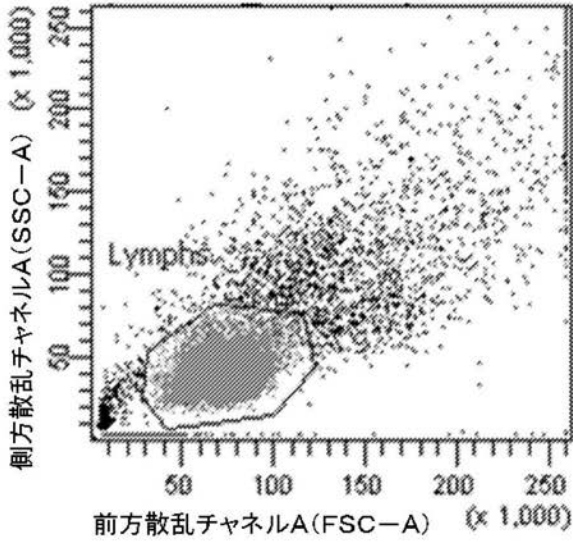


【図6B】



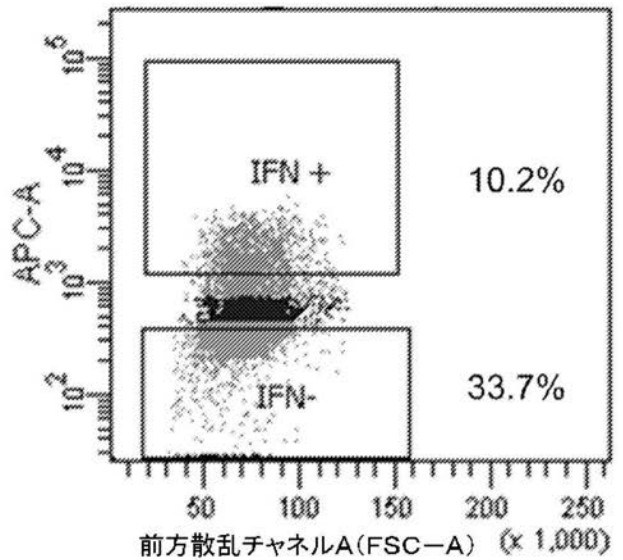
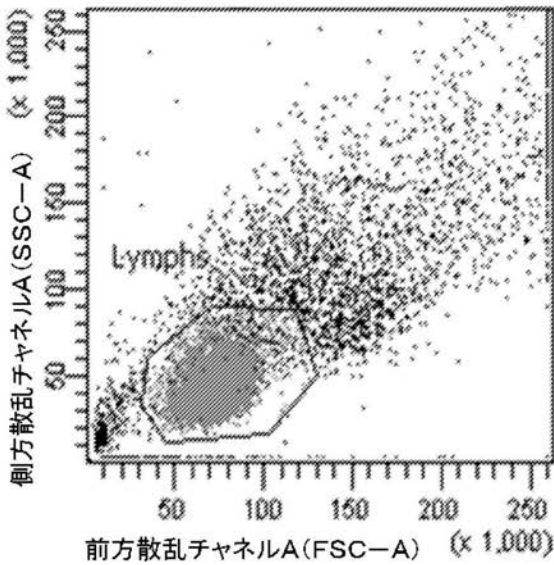
【 図 7 A 】

アッセイ:FISH-Flow/分取  
刺激物:PMA+イオノマイシン  
プローブ:GFP



【 図 7 B 】

アッセイ:FISH-Flow/分取  
刺激物:PMA+イオノマイシン  
プローブ:IFN $\gamma$ :IL-2:TNF $\alpha$ :CCL3



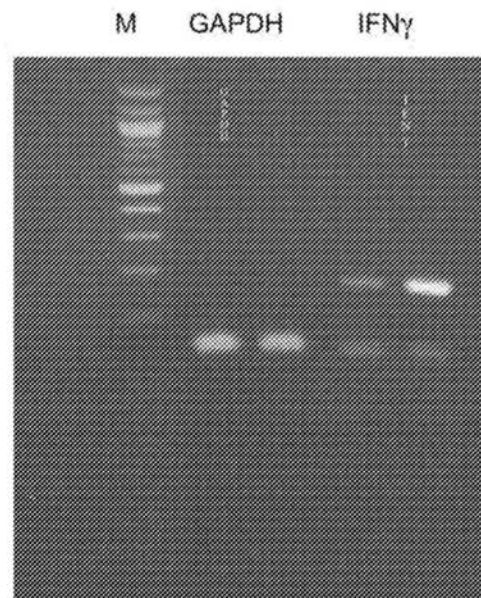
【図 8 A】

## アッセイ:FISH-Flow/分取後のT細胞に対するRT-PCR

FISH分取 集団	プライマー	閾値サイクル
IFN+	IFN $\gamma$	26.1
IFN-	IFN $\gamma$	28.3
IFN+	GAPDH	21.0
IFN-	GAPDH	20.5

【図 8 B】

## アッセイ:RT-PCR増幅産物サイズの検証



分取集団: IFN- IFN+ IFN- IFN+

## 【配列表】

2015522284000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年4月2日(2015.4.2)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

( a ) リガンドまたは刺激分子が結合すると遺伝子発現につながるシグナルカスケードを開始することができる特異的受容体を発現する細胞の集団を含むサンプルを提供し、

( b ) 特異的受容体に結合し、および遺伝子発現を開始する少なくとも 1 つの化合物を用いて前記細胞をインキュベートすることにより、直ちにまたは培養後に、*ex vivo* で前記細胞内での遺伝子発現を誘導し、

( c ) 前記細胞を固定および透過処理し、

( d ) 蛍光標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブセットを用いて前記細胞によって発現された少なくとも 1 つの RNA 分子のコピーを標識し、および非結合プローブを洗い流し、

( e ) 蛍光強度ゲーティングにより分類された 1 つ以上の蛍光測定値である発現現象を有する細胞をフローサイトメトリー ( F C ) により検出すること

を含む個々の細胞内で発現した少なくとも 1 つの RNA 分子のコピーを検出するための方法。

【請求項 2】

誘導するステップが、前記細胞集団中に存在する抗原提示細胞 ( A P C ) により、または人工 A P C ( a A P C ) により、T 細胞受容体 ( T C R ) シグナル伝達および下流の遺伝子発現を刺激することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

A P C または a A P C 誘導による刺激が、30 分から 6 時間、6 時間から 24 時間、および 24 時間から 72 時間を含む群から選択される時間である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

誘導するステップが、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体 ( m A b ) を用いて共刺激することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

誘導するステップが、前記 a A P C に結合された少なくとも 1 つのモノクローナル抗体 ( m A b ) を用いて共刺激することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記化合物が微生物由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記化合物がペプチドまたはペプチドの混合物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

M H C クラス I または M H C クラス I I 分子と結合するペプチドまたはペプチドの混合物が前記 A P C または a A P C に加えられる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ペプチドまたはペプチド混合物が 1 ~ 20  $\mu$  g / m l の間の濃度で存在する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの RNA 分子がサイトカイン遺伝子によってコードされた、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記遺伝子が I L - 2、T N F、または I F N をコードする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記刺激分子が結核菌 ( M . t u b e r c u l o s i s ) 由来の免疫原性ペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記プローブセットが同じ蛍光部分でそれぞれ単独で標識された20～60のプローブを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記細胞集団がヒトPBMCから得られたT細胞であり、前記少なくとも1つのRNA分子がサイトカイン遺伝子によってコードされ、前記細胞集団中の細胞がTCRと相互作用する1つ以上のペプチド負荷MHC分子を伴うaAPCにより誘導され、および前記プローブセットが同じ蛍光部分でそれぞれ単独で標識された20～60のプローブを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 15】

蛍光活性化細胞の分取により、発現現象を有する少なくとも1つの検出された細胞が発現現象を有しない細胞から分離される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 16】

遺伝子発現が前記分離される細胞内で測定される、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 17】

遺伝子発現測定がRT-PCRまたは前記細胞内のRNAのトランスクリプトーム解析により実現される、請求項16に記載の方法。

## 【請求項 18】

誘導する前記ステップが微生物産物または合成化合物を用いてToll様受容体シグナル伝達および下流の遺伝子発現を刺激するステップを含み、前記微生物産物が脂質、グリカン、糖脂質、硫脂質、糖タンパク質、タンパク質、ペプチド、または核酸であり、前記刺激分子が1～100ng/ml、100～1000ng/ml、または1～20μg/mlの濃度で存在する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 19】

刺激が30分から6時間、6時間から24時間、および24時間から72時間を含む群から選択される時間である、請求項18に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記化合物がサイトカインである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記サイトカインがIFN、IL-2、IL-15、およびTNF からなる群から選択されるものである、請求項20に記載の方法。

## 【請求項 22】

1つを超える化合物または刺激物が提供される、請求項1または18に記載の方法。

## 【請求項 23】

異なる刺激が異なる時間に提供される、請求項22に記載の方法。

## 【請求項 24】

(a) リガンドまたは刺激分子が結合すると遺伝子発現につながるシグナルカスケードを開始することができる特異的受容体を発現する細胞の集団を含むサンプルを提供し、

(b) 前記細胞を固定および透過処理し、

(c) 蛍光標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブセットを用いて前記細胞によって発現された少なくとも1つのRNA分子のコピーを標識し、および非結合プローブを洗い流し、

(d) 蛍光強度ゲーティングにより分類された1つ以上の蛍光測定値である発現現象を有する細胞をフローサイトメトリーにより検出すること

を含む個々の細胞内で発現した少なくとも1つのRNA分子のコピーを検出するための方法。

## 【請求項 25】

前記受容体がToll様受容体、NOD受容体およびNOD様受容体、Gタンパク質共役型受容体、ポリペプチドホルモン受容体、サイトカイン受容体、B細胞受容体、ならびにT細胞受容体からなる群から選択される、請求項1または24に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記集団が P B M C、T 細胞、リンパ球、C D 3 + C D 4 + T 細胞 ( T ヘルパー 1 または T h 1 細胞 )、C D 3 + C D 4 + T 細胞 ( T ヘルパー 2 または T h 2 細胞 )、C D 3 + C D 8 + T 細胞、T h 1 7、T r e g 細胞、N K 細胞、N K T 細胞、マクロファージ、樹状細胞、各種身体臓器の内皮および上皮を含む細胞、ならびに神経系の細胞からなる群から選択される細胞を含む、請求項 1 または 24 に記載の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

本明細書に開示されているように、F C が本発明の方法のための読み取り値として有用であることが実証された。後述の実施例 2 における実験は、個々の細胞内の R N A 標的にハイブリダイズされたプローブセットによって生成されたシグナルを F C によって検出することができるかを試験するために計画された。その例では、レンチウイルスコンストラクトから発現させる細胞培養液内の H I V G A G m R N A を検出するステップを説明している。さらに具体的には、293T細胞を、組換えレンチウイルスコンストラクトと一緒に発現させる3つのプラスミドを用いてトランスフェクトし、またGAG mRNAに特異的なプローブを用いてハイブリダイズした。F Cの結果は図1に示しており、トランスフェクトされていない細胞から得られた蛍光強度と前方散乱チャネルA ( F S C - A ) のグラフが上側、レンチウイルスパッケージングシステムからの3つのプラスミドを用いてトランスフェクトした細胞から得られたグラフが下側である。細胞の両方のセットについて、GAG mRNAに対するプローブセットを用いてハイブリダイズした。トランスフェクトした細胞の集団は、外れ値のトランスフェクトされていない細胞 ( すなわち、設定閾値を上回るもの ) からのシグナルに見られる強度より1~2桁高い強度のシグナルを生じた。対照として、s m F I S Hの結果の画像ベースの解析は、約25%の細胞がコンストラクトを発現していることを示した。同じ集団に対するF C解析により、同じ割合の細胞が蛍光性であることが明らかになった。これらの結果は、mRNA発現がF Cによって容易に検出されることを実証するものである。さらに、データは、低頻度の強く刺激された ( 強い蛍光性の ) T細胞を非刺激集団内の外れ値から区別する指針を与えるものである。受信者動作特性 ( R O C ) 分析によって、最適な閾値を定義することができる。R O C分析は、試験開発の当業者に周知である。例えば、Z w e i g e t a l . , 1993, C l i n i c a l C h e m i s t r y 39 ( 8 ) : 561 - 577およびP e p e , 2003, T h e s t a t i s t i c a l e v a l u a t i o n o f m e d i c a l t e s t s f o r c l a s s i f i c a t i o n a n d p r e d i c t i o n . N e w Y o r k , N Y : O x f o r dを参照されたい。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

T細胞活性化の転写サインの検出において難題は2つあり、細胞の小さなサブセットのみが誘導されること、およびこの誘導された細胞はmRNAのコピーを細胞あたりわずか数個のみ発現することである。実施例7で説明する実験において、本発明者らは、低頻度の応答の高感度検出と、いくつかのmRNA標的の同時検出の両方を本発明の方法により実証することができた。刺激、固定された細胞のプロービング、およびF Cを含むアッセイにより、I L - 2 / T N F およびI F N / T N F サイトカインペアをそれぞれ頻度3.35%および6.37%で発現させる細胞が検出される一方で、I L - 2 / I F N

ペアを頻度 3.46% で発現させる細胞を検出することができた(図2、右下枠)。単一のサイトカインおよび二重のサイトカイン集団、例えば、IFN (4.76~5.40%) と IL-2/IFN (3.46%) の比較は、すべての IFN 産生株が IL-2 を産生できたわけではないことを示唆した。一方、大部分の IFN 産生株(5.40%) は、IFN/TNF 産生集団のサイズ(6.37%) により示唆される通り、TNF も発現したようである。この結果は、TCRトリガリングおよびレクチン媒介刺激(抗CD3 mAb およびフィトヘマグルチニン)の併用により非特異的に活性化された T 細胞の集団に予想される。したがって、本発明に記載のアッセイにより、既知の T 細胞生物学と一致する結果が得られた。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

簡潔には、293 T 細胞を、組換えレンチウイルスコンストラクトと一緒に発現させる3つのプラスミドを用いてトランスフェクトし、また、HIV mRNA の GAG 領域に特異的なプローブを用いてハイブリダイズした(GenBank 受託番号: AY835771.1)。プローブの配列は、本明細書の最後に記載する(表3)。プローブをハイブリダイズして、Raj et al., 2010, Methods in Enzymology 472: 365-386 および Raj et al., 2008, Nature Methods 5: 877-879 (これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載の手順にしたがって細胞を洗浄した。再び、洗浄ステップにおける細胞の損失を避けるため、0.5% ウシ胎児血清を洗浄溶液に含有させた。次いで、FC を実施して、コンストラクトを発現させる細胞を検出した。ゲートは、トランスフェクトされていない細胞の蛍光に基づいて確立した。トランスフェクトした細胞のうち、約25%の細胞が、ゲートにより設定されたレベルよりも強度が高いシグナルによって示されるコンストラクトを発現した。FCの結果は、蛍光強度(「a.u.」)と前方散乱(「FSC-A」)の2つのグラフを示した図1に示している。上側のグラフ(レンチウイルス-)は、トランスフェクトされていない細胞を示している。下側のグラフ(レンチウイルス+)は、レンチウイルスパッケージングシステムからの3つのプラスミドを用いてトランスフェクトした細胞を示している。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

IL-2、IFN、および TNF mRNA の検出を実証するために、抗CD3 mAb およびこれらの細胞内で様々なサイトカインの発現を誘導することが知られている PHA を用いて、TCR を介して PBMC を非特異的に刺激した。刺激後、細胞を固定して、IL-2 と IFN、IL-2 と TNF、さらに IFN と TNF に対するプローブセットのペアの組み合わせを用いてプローブ検査した。各ペアのプローブセットの1つを Cy5 フルオロフォアで標識し、もう1つは TMR フルオロフォアで標識した。具体的には、PBMC を抗CD3 mAb OKT3 および PHA (いずれも 1 mg/ml) で5日間刺激し、次いで4%パラホルムアルデヒドおよび70%エタノールを用いて固定した。固定および洗浄した細胞を、IL-2 および IFN に特異的な Cy5 標識または TMR 標識 RNA プローブを用いてインキュベートすることにより標識し、再び洗浄して、2色の FC (LSRII, Becton Dickinson) により解析した。結果を図2に示す。図2の4つのプロットは、左上、右上、左下、右下の順に、未染色/偽八

イブリダイズ対照；単一のサイトカイン、I F N - C y 5 標識細胞；単一のサイトカイン、I F N - T M R 標識細胞；および二重のサイトカイン（I L - 2、C y 5 標識およびI F N 、T M R 標識）標識細胞である。ゲーティングは、1つまたは2つのサイトカインを発現させる細胞集団およびそれらの頻度を示している。

【手続補正6】

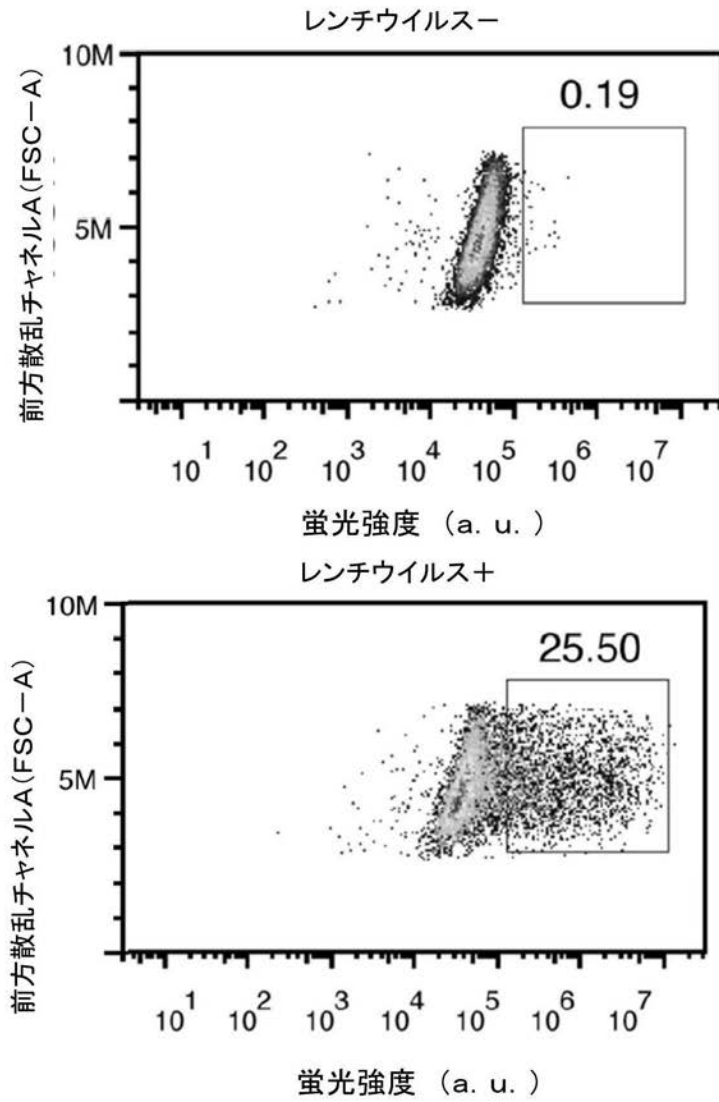
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

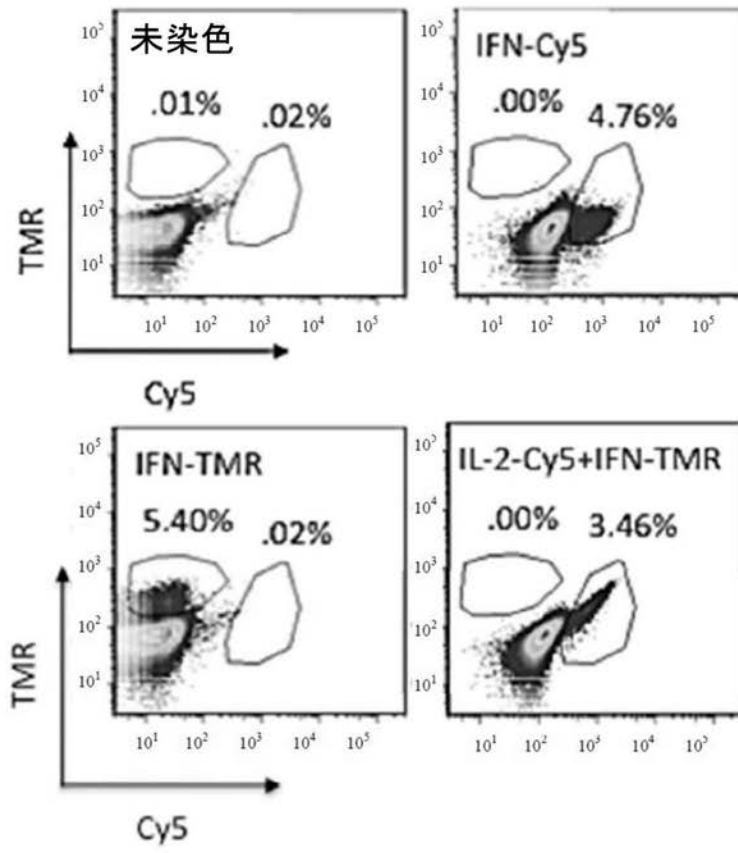
【補正方法】変更

【補正の内容】

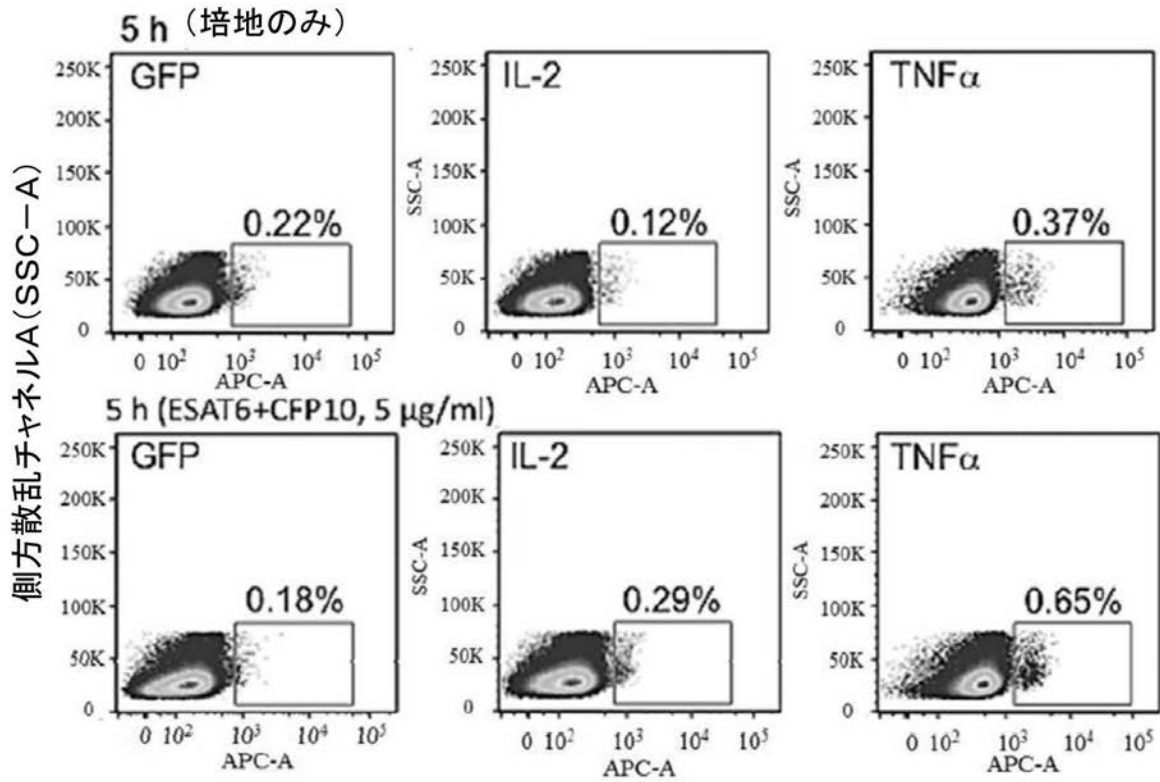
【 図 1 】



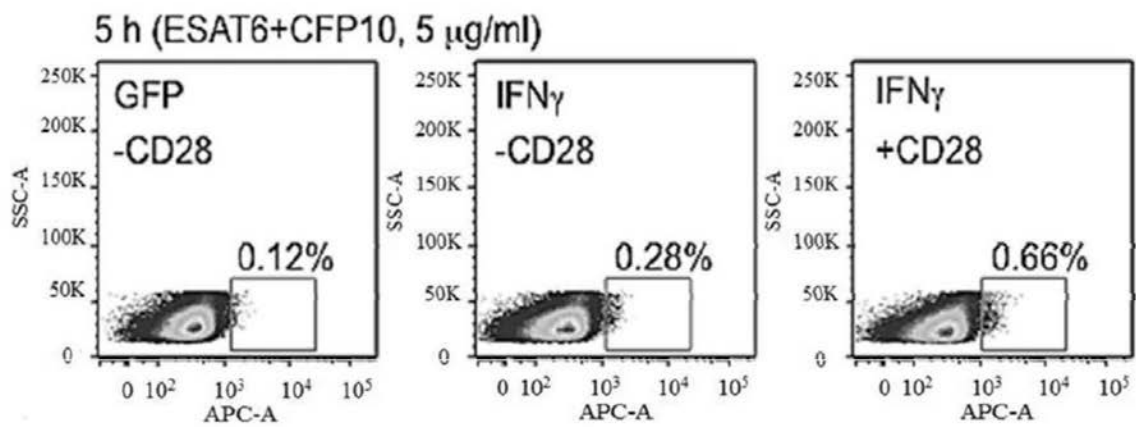
【 図 2 】



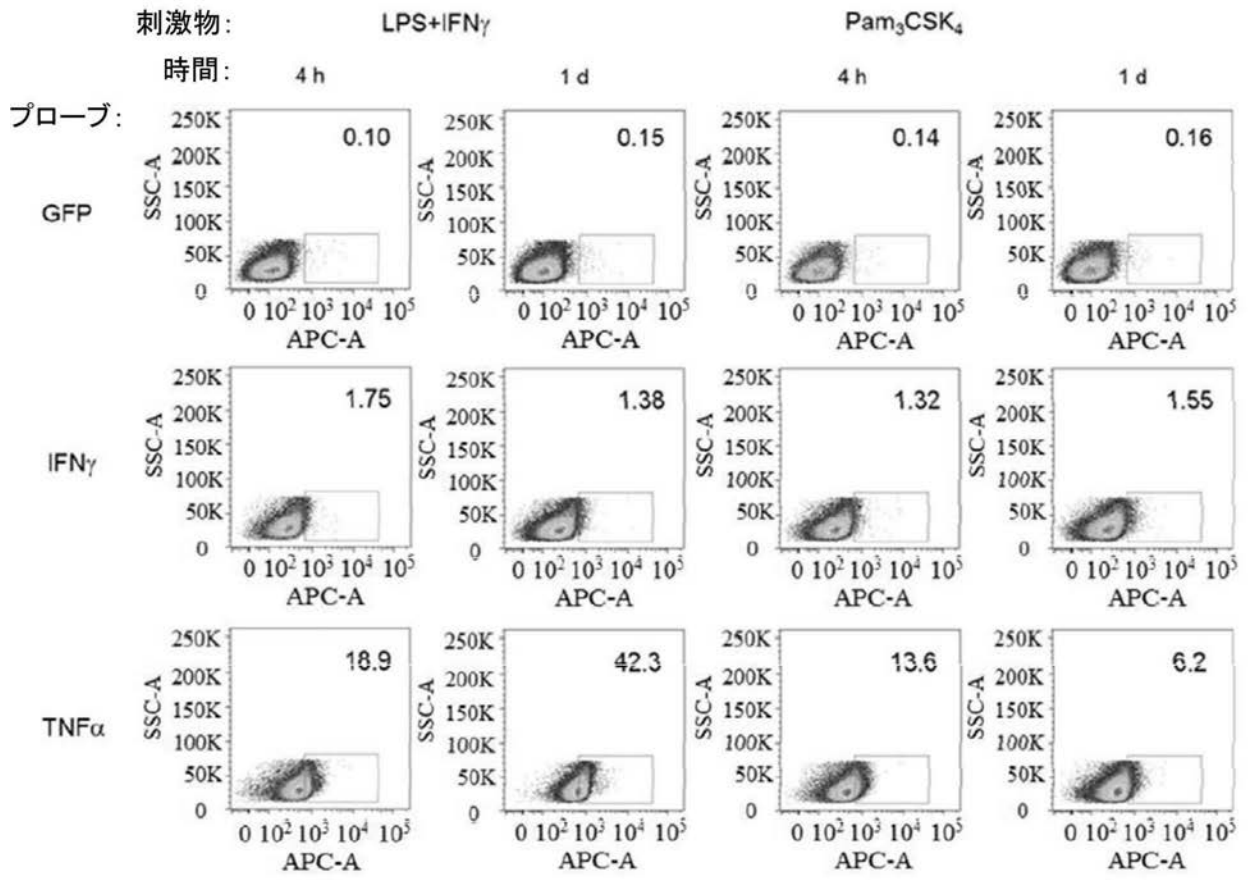
【 図 3 】



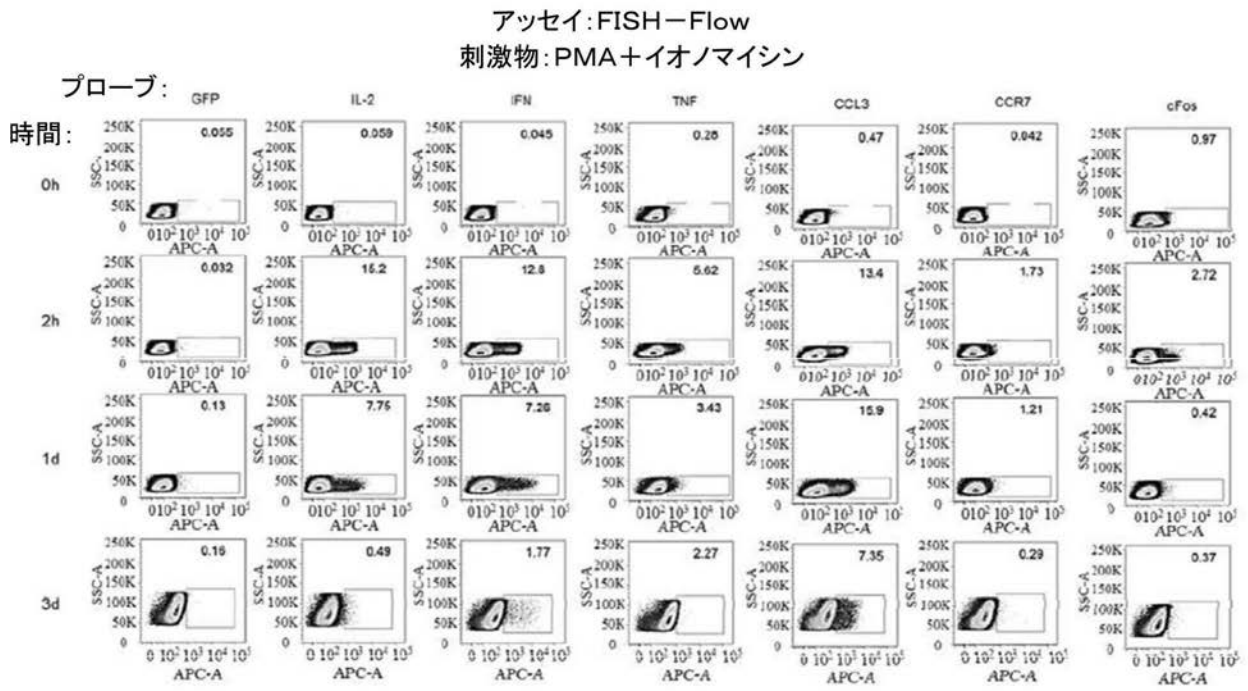
【 図 4 】



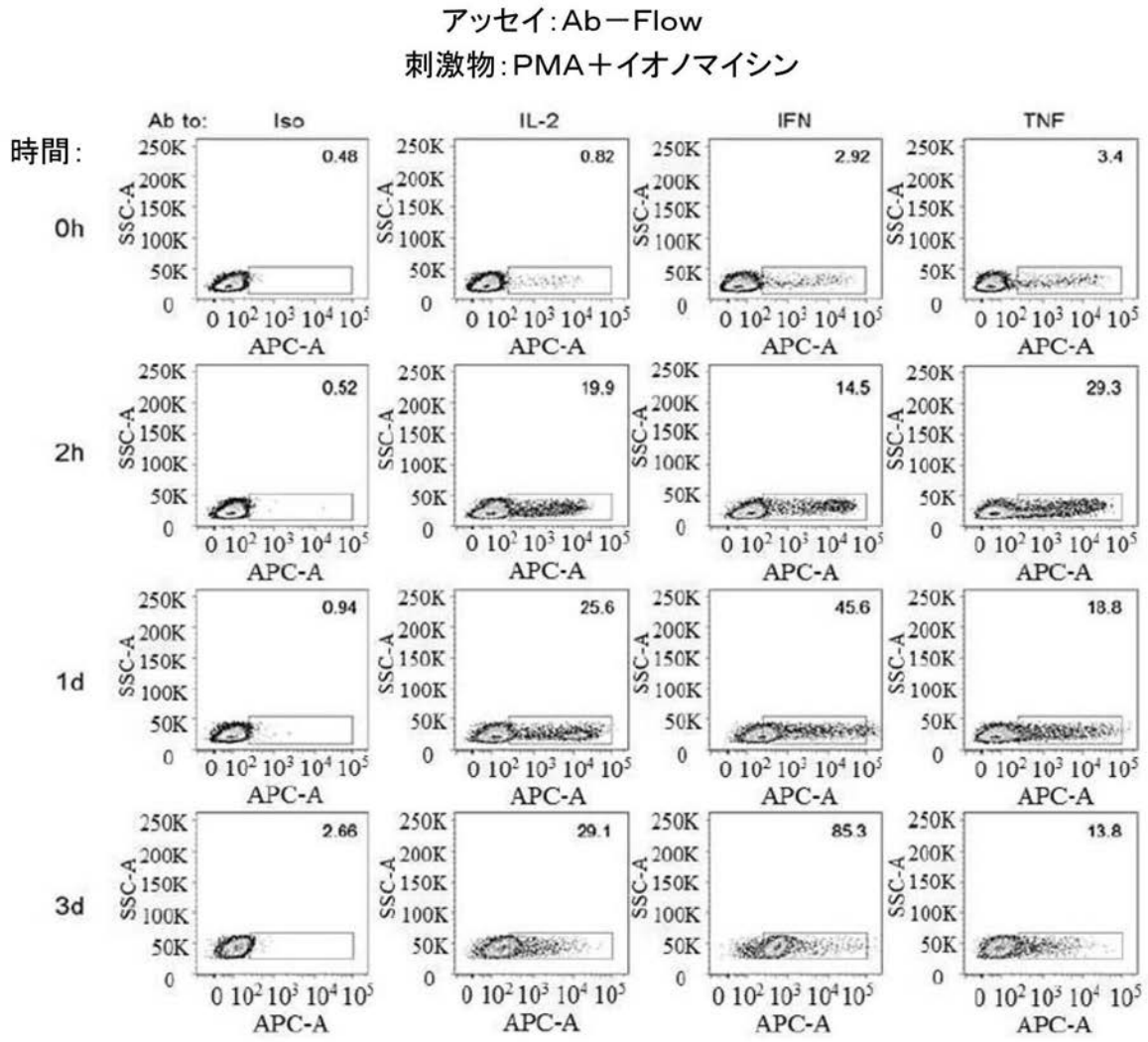
【 図 5 】



【図6A】

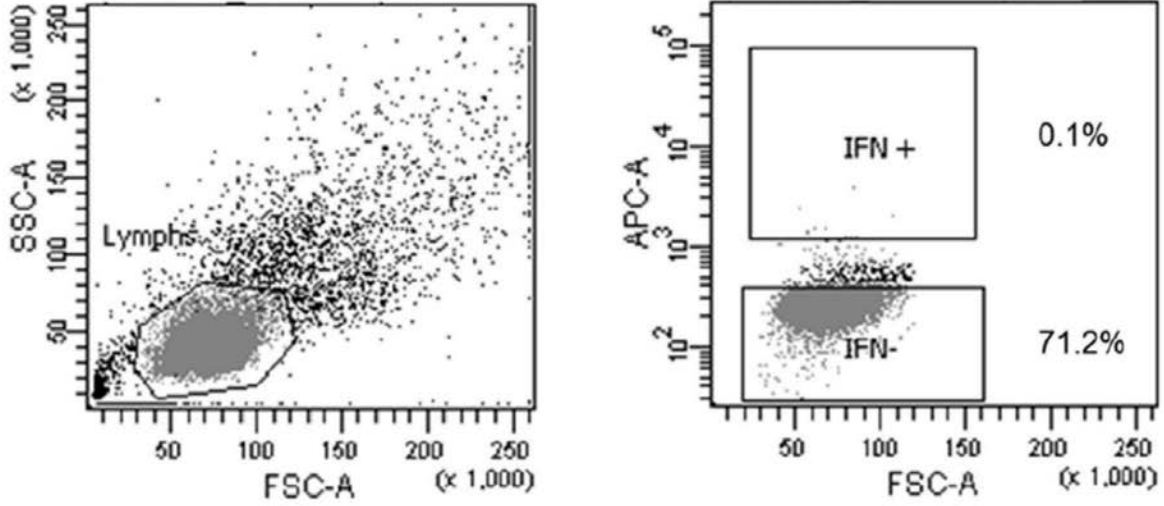


【図6B】



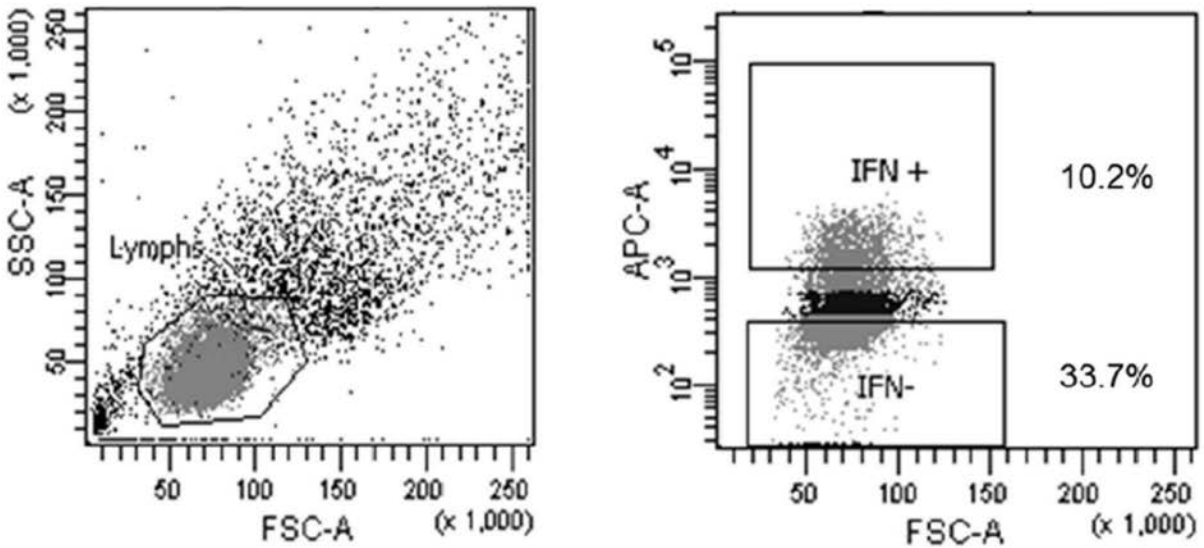
【 図 7 A 】

アッセイ:FISH-Flow/分取  
刺激物:PMA+イオノマイシン  
プローブ:GFP



【 図 7 B 】

アッセイ:FISH-Flow/分取  
刺激物:PMA+イオノマイシン  
プローブ:IFN $\gamma$ :IL-2:TNF $\alpha$ :CCL3



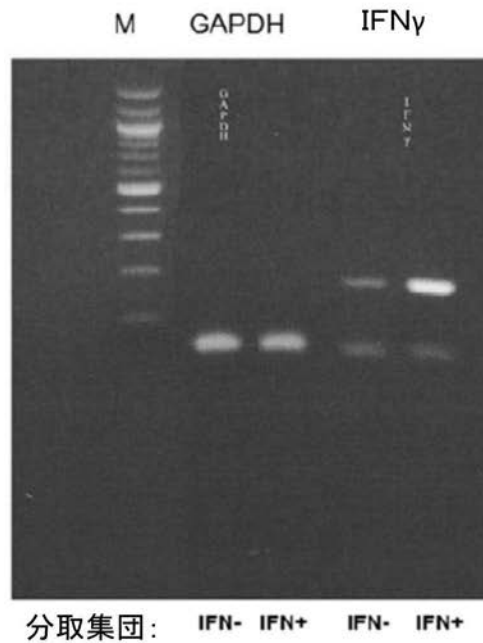
## 【 図 8 A 】

アッセイ:FISH-Flow/分取後のT細胞に対するRT-PCR

FISH分取集団	プライマー	閾値サイクル
IFN+	IFN $\gamma$	26.1
IFN-	IFN $\gamma$	28.3
IFN+	GAPDH	21.0
IFN-	GAPDH	20.5

## 【 図 8 B 】

アッセイ:RT-PCR増幅産物サイズの検証



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US13/47774
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68; C07H 21/04; G01N 33/00 (2013.01) USPC - 435/325, 7.24; 536/24.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12P 19/34; C12Q 1/68; C07H 21/04; C12N 15/85, 15/86, 15/11; G01N 33/00, 33/569; A61K 48/00 (2013.01) USPC: 435/325, 91.21, 4, 89, 41, 7.24, 6; 536/24.3, 23.1, 1.11; 424/93.1 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 practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; DialogPRO; PubMed; RNA; 'fluorescent probe,' 'FACS,' 'APC,' cytokine, chemokine, tuberculosis		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 7879609 B2 (MORIN, GB et al.) February 1, 2011; column 5, lines 32-50; column 4, lines 50-65; column 45, lines 58-67 to column 46, lines 1-8; column 49, lines 54-67 to column 50, lines 1-6; column 88, lines 45-56; column 88, lines 12-41; column 91, lines 15-59; column 92, lines 55-67 to column 93, lines 1-3; column 96, lines 8-31; column 157, lines 21-44	1, 13, 15-20, 35, 38/1, 38/35 — 2-12, 14, 21, 22, 23/21, 23/22, 24/2, 24/21, 24/22, 25/2, 25/21, 25/22, 26/21, 26/22, 27/21, 27/22, 28/21, 28/22, 29-31, 32/1, 32/21, 33/32/1, 33/32/21, 34, 36/1, 36/35, 37/36/1, 37/36/35
Y	WO 2005/118788 A2 (RILEY, JL et al.) December 15, 2005; abstract; page 7, lines 16-25; page 9, lines 6-12; page 12, lines 28-34; page 24, lines 25-30; page 25, lines 1-31; page 59, lines 12-18; figures 3, 12	2-5, 8-11, 14, 21, 22, 23/21, 23/22, 24/2, 24/21, 24/22, 25/2, 25/21, 25/22, 26/21, 26/22, 27/21, 27/22, 28/21, 28/22, 29-31, 32/1, 32/21, 33/32/1, 33/32/21, 34, 36/1, 36/35, 37/36/1, 37/36/35
Y	CASERTA, S et al. Synthetic CD4(sup)(+) T Cell-Targeted Antigen-Presenting Cells Elicit Protective Antitumor Responses. Cancer Research. 15 April 2008, Vol. 68, pp 3010-3018; page 3011, right column, fourth to fifth paragraph, Cytokine secretion assays and ELISA section. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5796.	3, 23/21, 23/22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 referring 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 19 November 2013 (19.11.2013)		Date of mailing of the international search report <b>13 DEC 2013</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/47774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 7514232 B2 (MAINO, VC et al.) April 7, 2009; abstract; column 3, lines 15-25; column 4, lines 29-42; Claims 12, 17, 18	6-9, 12, 27/21, 27/22, 28/21, 28/22
Y	BUTLER, MO et al. Ex Vivo Expansion of Human CD8(sup)(+) T Cells Using Autologous CD4 (sup)(+) T Cell Help. PLoS one. 12 January 2012, Vol. 7, No. e30229, pp 1-11; abstract; page 9, left column, third paragraph, T cell expansion section. DOI: 10.1371/journal.pone.0030229.	26/21, 26/22
Y	LORENZI, JC et al. Intranasal Vaccination With Messenger RNA As A New Approach In Gene Therapy: Use Against Tuberculosis. BMC Biotechnology. 20 October 2010, Vol. 10, pp 1-11; abstract; page 2, right column, third paragraph to page 3, right column, first paragraph; page 4, right column, first to second paragraph. DOI: 10.1186/1472-6750-10-77.	34

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 ジェナーロ, マリア ローラ  
アメリカ合衆国, 10023 ニューヨーク州, ニューヨーク, セントラル パーク ウェスト  
25

(72)発明者 ティアギ, サンジャイ  
アメリカ合衆国, 10038 ニューヨーク州, ニューヨーク, アpartment 2109, ジョ  
ン ストリート 99

(72)発明者 パイン, リチャード  
アメリカ合衆国, 10803 ニューヨーク州, ペルハム, アイデン アヴェニュー 102

Fターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA14 FB02 FB12

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ53 QR41 QR48 QR55 QS03 QS34 QX02

专利名称(译)	使用流式细胞术通过RNA测量快速测定T细胞活化		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015522284A</a>	公开(公告)日	2015-08-06
申请号	JP2015520420	申请日	2013-06-26
申请(专利权)人(译)	罗格斯新泽西州立大学		
[标]发明人	ブッシュキンユーリ ジェナーロマリアローラ ティアギサンジャイ パインリチャード		
发明人	ブッシュキン,ユーリ ジェナーロ,マリア ローラ ティアギ,サンジャイ パイン,リチャード		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6841 C12Q2565/626		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/483.C G01N33/53.M G01N33/58.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/FB02 2G045/FB12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS03 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	61/665231 2012-06-27 US 61/784802 2013-03-14 US		
其他公开文献	JP6464081B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及快速检测在单个细胞中表达的至少一种RNA分子的拷贝的方法及其用途。

(21) 出願番号	特願2015-520420 (P2015-520420)	(71) 出願人	510144959
(86) (22) 出願日	平成25年6月26日 (2013. 6. 26)		ラトガース, ザ ステート ユニバーシテ ィ オブ ニュー ジャージー
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月16日 (2015. 2. 16)		アメリカ合衆国, 08903 ニュージャ ージー州, ニュー プランズイック, サマ セット ストリート, オールド クイーン ズ
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/047774	(74) 代理人	110000671
(87) 国際公開番号	WO2014/004609		八田国際特許業務法人
(87) 国際公開日	平成26年1月3日 (2014. 1. 3)	(72) 発明者	ブッシュキン, ユーリ
(31) 優先権主張番号	61/665, 231		アメリカ合衆国, 10520 ニューヨー ク州, ニューヨーク, クロトン-オン-ハ ドソン, ウォッチ ヒル ロード 44
(32) 優先日	平成24年6月27日 (2012. 6. 27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/784, 802		
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		