(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6881801号
(P6881801)

(45)発行日　令和3年6月2日(2021.6.2)　(24)登録日　令和3年5月10日(2021.5.10)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04	ZNA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	
C12N 5/12	(2006.01)	C12N	5/12	
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	

請求項の数 28　(全 30 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-527119(P2020-527119)
(86)(22)出願日　令和2年2月17日(2020.2.17)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/006069
(87)国際公開番号　WO2020/171020
(87)国際公開日　令和2年8月27日(2020.8.27)
審査請求日　令和2年6月5日(2020.6.5)
(31)優先権主張番号　特願2019-26766(P2019-26766)
(32)優先日　平成31年2月18日(2019.2.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

早期審査対象出願

(73)特許権者　507420835
株式会社エヌビィー健康研究所
北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目２
(74)代理人　100100480
弁理士　藤田　隆
(74)代理人　100135839
弁理士　大南　匡史
(72)発明者　芦田　仁己
北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目２
株式会社エヌビィー健康研究所内
(72)発明者　漆畑　祐司
北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目２
株式会社エヌビィー健康研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞の選抜方法、核酸の製造方法、組換え細胞の製造方法、目的物質の製造方法、医薬組成物の製造方法、及び試薬

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
所望の細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する目的細胞を、第二細胞の集団から選抜する細胞の選抜方法であって、
前記細胞膜タンパク質は、複数回膜貫通型タンパク質であり、
下記工程：
ａ）互いに連通することなく独立した複数のマイクロウェルを有する基板を提供する工程、
ｂ）前記細胞膜タンパク質を細胞表面に発現する１個の第一細胞を、各々の前記マイクロウェルに導入し、前記マイクロウェルに接着させる工程、
ｃ）工程ｂ）に続いて、各々の前記マイクロウェルに、前記集団から単離された１個の第二細胞を導入し、前記マイクロウェル内で前記第一細胞と前記第二細胞を接触可能な状態で共存させる工程、
ｄ）工程ｃ）に続いて、前記目的物質が結合した第一細胞を含むマイクロウェルを特定する工程、
ｅ）工程ｄ）で特定されたマイクロウェルから、前記目的細胞として前記第二細胞を回収する工程、
を包含し、
前記工程ｃ）は、
マイクロウェル内で共存させた前記第一細胞と前記第二細胞を所定時間インキュベート

すること、及び
インキュベートが終了した後、各々のマイクロウェルを洗浄して上清を除去すること、
をさらに包含する、細胞の選抜方法。
【請求項２】
前記工程ｄ）は、前記目的物質が前記第一細胞に結合したことを可視化する可視化工程を包含する、請求項１に記載の細胞の選抜方法。
【請求項３】
前記可視化工程は、前記マイクロウェルに、前記目的物質に対して特異的に結合する標識物質を添加することを含む、請求項２に記載の細胞の選抜方法。
【請求項４】
前記標識物質が前記目的物質に対する標識抗体である、請求項３に記載の細胞の選抜方法。
【請求項５】
前記標識物質における標識が蛍光標識である、請求項３又は４に記載の細胞の選抜方法。
【請求項６】
前記標識物質は、第一蛍光物質で標識された抗体であり、
前記工程ｂ）は、前記マイクロウェルに接着している前記第一細胞を第二蛍光物質で標識する第一細胞標識工程を含み、
第一蛍光物質が発する蛍光の蛍光波長は、第二蛍光物質が発する蛍光の蛍光波長と異なる、請求項５に記載の細胞の選抜方法。
【請求項７】
前記可視化工程は、前記目的物質が前記第一細胞に結合した際に起きる、前記細胞膜タンパク質の活性化に伴う細胞内情報伝達物質の変動を可視化することを含む、請求項２に記載の細胞の選抜方法。
【請求項８】
前記第一細胞が、前記細胞膜タンパク質を発現するベクターを導入した細胞である、請求項１～７のいずれかに記載の細胞の選抜方法。
【請求項９】
前記第一細胞が、前記細胞膜タンパク質を発現する腫瘍細胞である、請求項１～７のいずれかに記載の細胞の選抜方法。
【請求項１０】
前記第一細胞が、前記細胞膜タンパク質を発現する非腫瘍細胞である、請求項１～７のいずれかに記載の細胞の選抜方法。
【請求項１１】
前記目的物質が抗体である、請求項１～１０のいずれかに記載の細胞の選抜方法。
【請求項１２】
前記第二細胞が、前記細胞膜タンパク質又はそれをコードする核酸で免疫した非ヒト動物由来の骨髄、脾臓、リンパ組織、又は血液細胞由来である、請求項１１に記載の細胞の選抜方法。
【請求項１３】
前記第二細胞が不死化された細胞である、請求項１２に記載の細胞の選抜方法。
【請求項１４】
前記第二細胞がハイブリドーマである、請求項１３に記載の細胞の選抜方法。
【請求項１５】
前記第二細胞が、ヒトのリンパ組織又は血液由来である、請求項１１に記載の細胞の選抜方法。
【請求項１６】
前記第二細胞が、エプスタイン・バール・ウイルス感染により不死化された細胞である、請求項１５に記載の細胞の選抜方法。

【請求項１７】
前記第二細胞が、外来性の抗体遺伝子を有し、当該抗体を発現する組換え細胞である、請求項１１に記載の細胞の選抜方法。
【請求項１８】
前記抗体が、完全抗体、機能的抗体断片、一本鎖抗体、又は多重特異性抗体である、請求項１７に記載の細胞の選抜方法。
【請求項１９】
前記抗体が、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である、請求項１７又は１８に記載の細胞の選抜方法。
【請求項２０】
前記抗体が、ネコ化抗体又はイヌ化抗体である、請求項１７又は１８に記載の細胞の選抜方法。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれかに記載の方法によって第二細胞の集団より選抜された目的細胞から、前記目的物質をコードする核酸を取得する、核酸の製造方法。
【請求項２２】
前記目的物質が抗体である、請求項２１に記載の核酸の製造方法。
【請求項２３】
請求項２１又は２２に記載の方法によって製造された核酸を宿主細胞に導入し、前記目的物質を発現する組換え細胞を取得する、組換え細胞の製造方法。
【請求項２４】
請求項２３に記載の方法によって製造された組換え細胞を培養し、その培養物から前記目的物質を取得する、目的物質の製造方法。
【請求項２５】
請求項１～２０のいずれかに記載の方法によって第二細胞の集団より選抜された目的細胞を培養し、その培養物から前記目的物質を取得する、目的物質の製造方法。
【請求項２６】
前記目的物質が抗体である、請求項２４又は２５に記載の目的物質の製造方法。
【請求項２７】
請求項２１又は２２に記載の方法によって製造された核酸に、薬学的に許容される担体又は添加物を組み合わせて、前記核酸を有効成分として含有する医薬組成物を取得する、医薬組成物の製造方法。
【請求項２８】
請求項２４～２６のいずれかに記載の方法によって製造された目的物質に、薬学的に許容される担体又は添加物を組み合わせて、前記目的物質を有効成分として含有する医薬組成物を取得する、医薬組成物の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞の選抜方法、核酸の製造方法、組換え細胞の製造方法、目的物質の製造方法、医薬組成物の製造方法、及び試薬に関する。
【背景技術】
【０００２】
Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）、トランスポーター、イオンチャンネル、サイトカイン受容体等の細胞膜タンパク質は、様々な疾患に関わることが知られており、診断薬や医療用医薬品の標的分子として注目されている。細胞膜タンパク質は、細胞外の物質、例えば、低分子化合物、ペプチド、タンパク質等からなるリガンドと結合することで、その機能が活性化あるいは阻害されることにより、細胞機能や薬理機能を発現する。
【０００３】
加えて、近年では、細胞膜タンパク質に結合する特異抗体や抗体様分子（抗体断片、一

本鎖抗体、二重特異性抗体，又は薬剤結合抗体など）が注目され、診断薬や医療用医薬品としての開発が進んでいる。

【０００４】

細胞膜タンパク質の中でも、特に複数回膜貫通型タンパク質（例えば、ＧＰＣＲ、トランスポーター、イオンチャンネル等）に対する特異的結合物質（例えば、タンパク質リガンド、ペプチドリガンド、特異抗体等）が、医薬品として開発中である。しかし、医薬品として実用化されているものは限定的である。

【０００５】

複数回膜貫通型タンパク質は、可溶性タンパク質（例えば、サイトカイン、ホルモン、酵素、核内受容体）と比べて疎水性構造を多く含むため、単離精製することが格段に難しい。加えて、自然界に存在する構造を維持し、かつ複数回膜貫通型タンパク質の機能を維持できることが証明されている精製例は、限定的である。一般的に、複数回膜貫通型タンパク質は、細胞の脂質２重膜中に存在する状態で、その機能性を発揮する。

【０００６】

細胞膜タンパク質に対する特異的結合物質を探索する技術としては、例えば、細胞膜タンパク質の一部であって、細胞外に露出した可溶性ドメイン又は部分ペプチドを大量に製造および精製したものを用いる方法がある。例えば、精製された前記可溶性ドメイン又は部分ペプチドを９６ウェルプレートに固相化し、候補となる特異的結合物質との結合をＥＬＩＳＡ法などで評価することが挙げられる。しかしながら、このような方法で選抜された物質が、生体内に存在する標的細胞膜タンパク質に特異的かつ高い親和性を兼ね備えて結合するかは、保証されるものではない。したがって、診断薬や医療用医薬品の開発を目的として、細胞膜タンパク質に対する有用な特異的結合物質を探索する場合には、生体内での細胞膜タンパク質の立体構造を模すために、標的細胞膜タンパク質が生細胞の細胞膜上で発現されている哺乳動物細胞を用いることがより有効である。

【０００７】

一方、ペプチドリガンド、タンパク質リガンド、特異抗体といった物質は、ヒトあるいは非ヒト動物由来の細胞や、遺伝子組み換え技術を応用した組換え細胞を培養することで、培養上清中に分泌させることができる。ここで、標的細胞膜タンパク質に特異的に結合する未知の物質を発見する場合には、異なる物質を生産する数千～数万種類の産生細胞集団（例えば、抗体生産ハイブリドーマライブラリー）を調査対象とする必要がある。しかし近年、新規物質を探索するために調べるべき産生細胞数がますます増加する傾向があり、数万～数千万種類の細胞の調査が必要なこともある。そのため、産生細胞の培養や維持にかかるコスト、探索にかかる時間、等において、従来技術は大きな課題を有している。

【０００８】

所望の細胞膜タンパク質に対する特異的抗体を探索する従来技術としては、ハイブリドーマ培養とフローサイトメーターを組み合わせた手法がある。例えば、数千種類に及ぶハイブリドーマの培養上清を調製し、標的細胞膜タンパク質を細胞表面に発現するＣＨＯ細胞と接触させ、フローサイトメーターを用いて結合性を評価する。そして、陽性と判定されたハイブリドーマを回収し、限界希釈法にてさらに培養を行う。そして、フローサイトメーターを用いた結合性評価を繰り返し、２か月程度かけて、所望の特異的抗体を産生する細胞を同定することができる（例えば、特許文献１）。

【０００９】

しかし、非ヒト動物にＧＰＣＲ等の細胞膜タンパク質を抗原として免疫した場合、親和性と特異性の両方が高い抗体の出現頻度は極めて低いことが知られている。そのような出現頻度が低い特異抗体を産生する目的細胞を選抜するには、ハイブリドーマ法では数十万～数百万種類の産生細胞を培養し評価する必要がある。そのため、ハイブリドーマ培養とフローサイトメーターを利用した従来の方法は、能力の限界に近づいていると考えられる。

【００１０】

別の技術として、シングル細胞解析技術を応用した、特異的抗体産生細胞の同定法が開

発されつつある（非特許文献１）。例えば、疎水性のマイクロドロップレット中に１個の抗体産生細胞と抗原タンパク質を封じ込める。そして、抗体産生細胞から分泌される抗体と抗原タンパク質の結合の有無を可視化し、マイクロ流路を持つ分析機器中で特異的抗体を産生する陽性細胞を含むマイクロドロップレットを分離することができる。

非特許文献２には、マイクロドロップレットとマイクロ流路を応用した、特異的抗体産生細胞を同定する方法の原理が記載されている。

しかしながら、この方法では、マイクロドロップレット中で抗体と抗原タンパク質の結合の有無を可視化する過程において、洗浄工程を加えることができない。そのため、細胞膜表面上に発現する量が極めて少ない細胞膜タンパク質を標的とする場合には、バックグラウンドの蛍光シグナルに比べ、抗体と抗原タンパク質の結合による蛍光シグナルが弱いため、前記結合の有無を確認することが困難であるといった欠点が報告されている（非特許文献１）。

【００１１】

また、マイクロドロップレット中での細胞の生存維持、特に、不死化していない骨髄組織、脾臓、リンパ組織、血液細胞由来のＢリンパ球や形質細胞、の生存維持は非常に困難であり、細胞種ごとに厳密な制御が必要である。

加えて、一般的には、陽性細胞を含むマイクロドロップレット中には複数の陰性抗体産生細胞も含まれる。そのため、モノクローナル抗体を樹立するためには、複数回、スクリーニング操作を実施する必要がある。

さらに、抗体と標的細胞膜タンパク質の結合の有無を可視化するための方法は、標的細胞膜タンパク質ごとに最適化する必要があり、汎用的に実用化されるためには改良の余地が残されている。

【００１２】

特許文献２には、スライドグラス上で、標的細胞膜タンパク質を発現する細胞集団と、候補の細胞集団とを接触させ、候補の細胞集団から標的細胞膜タンパク質に対する抗体を産生する細胞を同定する技術が記載されている。しかし、この方法も、前記した洗浄工程を行うことができないため、細胞膜表面上に発現する量が極めて少ない細胞膜タンパク質を標的とする場合には、抗体と細胞膜タンパク質との結合の有無を確認することが困難である。

【００１３】

特許文献３には、精製された可溶性サイトカイン受容体タンパク質をコートしたマイクロウェルに抗体産生細胞の候補を導入し、細胞が分泌した抗体と可溶性サイトカイン受容体タンパク質との結合性をもって所望の抗体産生細胞を選抜する技術が開示されている。しかし前述したように、単離精製された受容体タンパク質が、生体内で機能を発揮する構造を維持しているとは限らない。さらに、精製困難な複数回膜貫通型タンパク質にこの方法を適用することは、極めて困難である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１４】

【特許文献１】国際公開第２０１２／０４３６３４号

【特許文献２】国際公開第２００４／０５１２６８号

【特許文献３】特許第４１４８３６７号公報

【非特許文献】

【００１５】

【非特許文献１】Fitzgerald V, Leonard P., "Single cell screening approaches for antibody discovery", Methods, 116:34-42, 2017

【非特許文献２】Shembekar et al., "Single-Cell Droplet Microfluidic Screening for Antibodies Specifically Binding to Target Cells", Cell Reports 22, 2206-2215, February 20, 2018

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】
【００１６】
上記のように、細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する細胞を、より迅速かつ効率的に選抜する技術は、未だ完成しているとは言い難い。さらに、評価する細胞の母集団数の増加に対応すべく、細胞培養操作を出来るだけ軽減する必要がある。そこで本発明は、細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する細胞を、より迅速かつ効率的に選抜する技術、並びに、当該技術で選抜された細胞を用いて、抗体等の目的物質を製造する技術を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１７】
本発明者らは、直径２０～３０μｍのマイクロウェル内で、標的細胞膜タンパク質を発現する細胞と、細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する目的細胞の候補を共存させることにより、非常に短時間で目的細胞を選抜できることを見出した。
【００１８】
本発明の１つの様相は、所望の細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する目的細胞を、第二細胞の集団から選抜する細胞の選抜方法であって、下記工程：
ａ）複数のマイクロウェルを有する基板を提供する工程、
ｂ）前記細胞膜タンパク質を細胞表面に発現する第一細胞を、各々の前記マイクロウェルに接着させる工程、
ｃ）工程ｂ）に続いて、各々の前記マイクロウェルに、前記集団から単離された１又は２個の第二細胞を導入し、前記マイクロウェル内で前記第一細胞と前記第二細胞を共存させる工程、
ｄ）工程ｃ）に続いて、前記目的物質が結合した第一細胞を含むマイクロウェルを特定する工程、
ｅ）工程ｄ）で特定されたマイクロウェルから、前記目的細胞として前記第二細胞を回収する工程、
を包含する、細胞の選抜方法である。
【００１９】
好ましくは、前記工程ｄ）は、前記目的物質が前記第一細胞に結合したことを可視化する可視化工程を包含する。
【００２０】
好ましくは、前記可視化工程は、前記マイクロウェルに、前記目的物質に対して特異的に結合する標識物質を添加することを含む。
【００２１】
好ましくは、前記標識物質が前記目的物質に対する標識抗体である。
【００２２】
好ましくは、前記標識物質における標識が蛍光標識である。
【００２３】
好ましくは、前記標識物質は、第一蛍光物質で標識された抗体であり、前記工程ｂ）は、前記マイクロウェルに接着している前記第一細胞を第二蛍光物質で標識する第一細胞標識工程を含み、第一蛍光物質が発する蛍光の蛍光波長は、第二蛍光物質が発する蛍光の蛍光波長と異なる。
【００２４】
好ましくは、前記可視化工程は、前記目的物質が前記第一細胞に結合した際に起きる、前記細胞膜タンパク質の活性化に伴う細胞内情報伝達物質の変動を可視化することを含む。
【００２５】
好ましくは、前記細胞膜タンパク質が複数回膜貫通型タンパク質である。
【００２６】
好ましくは、前記第一細胞が、前記細胞膜タンパク質を発現するベクターを導入した細

胞である。
【００２７】
好ましくは、前記第一細胞が、前記細胞膜タンパク質を発現する腫瘍細胞である。
【００２８】
好ましくは、前記第一細胞が、前記細胞膜タンパク質を発現する非腫瘍細胞である。
【００２９】
好ましくは、前記目的物質が抗体である。
【００３０】
好ましくは、前記第二細胞が、前記細胞膜タンパク質又はそれをコードする核酸で免疫した非ヒト動物由来の骨髄、脾臓、リンパ組織、又は血液細胞由来である。
【００３１】
好ましくは、前記第二細胞が不死化された細胞である。
【００３２】
好ましくは、前記第二細胞がハイブリドーマである。
【００３３】
好ましくは、前記第二細胞が、ヒトのリンパ組織又は血液由来である。
【００３４】
好ましくは、前記第二細胞が、エプスタイン・バール・ウイルス感染により不死化された細胞である。
【００３５】
好ましくは、前記第二細胞が、外来性の抗体遺伝子を有し、当該抗体を発現する組換え細胞である。
【００３６】
好ましくは、前記抗体が、完全抗体、機能的抗体断片、一本鎖抗体、又は多重特異性抗体である。
【００３７】
好ましくは、前記抗体が、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である。
【００３８】
好ましくは、前記抗体が、ネコ化抗体又はイヌ化抗体である。
【００３９】
本発明の他の様相は、上記の方法によって第二細胞の集団より選抜された目的細胞から、前記目的物質をコードする核酸を取得する、核酸の製造方法である。
【００４０】
好ましくは、前記目的物質が抗体である。
【００４１】
本発明の他の様相は、上記の方法によって製造された核酸を宿主細胞に導入し、前記目的物質を発現する組換え細胞を取得する、組換え細胞の製造方法である。
【００４２】
本発明の他の様相は、上記の方法によって製造された組換え細胞を培養し、その培養物から前記目的物質を取得する、目的物質の製造方法である。
【００４３】
本発明の他の様相は、上記の方法によって第二細胞の集団より選抜された目的細胞を培養し、その培養物から前記目的物質を取得する、目的物質の製造方法である。
【００４４】
好ましくは、前記目的物質が抗体である。
【００４５】
本発明の他の様相は、上記の方法によって製造された核酸に、薬学的に許容される担体又は添加物を組み合わせて、前記核酸を有効成分として含有する医薬組成物を取得する、医薬組成物の製造方法である。
【００４６】

本発明の他の様相は、上記方法によって製造された目的物質に、薬学的に許容される担体又は添加物を組み合わせて、前記目的物質を有効成分として含有する医薬組成物を取得する、医薬組成物の製造方法である。

【００４７】

本発明の他の様相は、上記方法によって製造された目的物質を含む、前記所望の細胞膜タンパク質を検出するための試薬である。

【発明の効果】

【００４８】

本発明によれば、細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する細胞を、より迅速かつ効率的に選抜することができる。さらに、細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質、例えば抗体を、容易に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【００４９】

【図１】本発明の一態様に係る細胞の選抜方法の概要を表す説明図であり、（ａ）～（ｅ）は各ステップを表す。

【図２】実施例４における陽性マイクロウェルの画像の一例を表す写真であり、（ａ）は透過光、（ｂ）はCytoRed由来の蛍光、（ｃ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光を観察した結果である。

【図３】実施例４における陰性マイクロウェルの画像の一例を表す写真であり、（ａ）は透過光、（ｂ）はCytoRed由来の蛍光、（ｃ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光を観察した結果である。

【図４】実施例５における陽性マイクロウェルから回収したハイブリドーマ由来の遺伝子組み換え抗体をフローサイトメトリーに供した結果を表す図である。

【図５】実施例５における陰性マイクロウェルから回収したハイブリドーマ由来の遺伝子組み換え抗体をフローサイトメトリーに供した結果を表す図である。

【図６】実施例６における陽性マイクロウェルの画像の一例を表す写真であり、（ａ）は透過光、（ｂ）はCytoRed由来の蛍光、（ｃ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光を観察した結果である。

【図７】実施例６における陰性マイクロウェルの画像の一例を表す写真であり、（ａ）は透過光、（ｂ）はCytoRed由来の蛍光、（ｃ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光を観察した結果である。

【図８】実施例７における陽性マイクロウェルから回収したリンパ球由来の遺伝子組み換え抗体をフローサイトメトリーに供した結果を表す図である。

【図９】実施例７における陰性マイクロウェルから回収したリンパ球由来の遺伝子組み換え抗体をフローサイトメトリーに供した結果を表す図である。

【図１０】実施例９におけるマイクロウェルの画像の一例を表す写真であり、（ａ）は透過光、（ｂ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光、（ｃ）はDyLight 650由来の蛍光を観察した結果である。

【発明を実施するための形態】

【００５０】

本発明の細胞の選抜方法は、所望の細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する目的細胞を、第二細胞の集団から選抜するものである。以下、前記目的細胞を、陽性細胞と称することがある。また前記所望の細胞膜タンパク質を「標的細胞膜タンパク質」と称することがある。また前記目的物質を、「細胞膜タンパク質に対する特異的結合物質」、または単に「特異的結合物質」と称することがある。また本発明において、「細胞を選抜する」という文言は「細胞を同定する」と言い換えることができる。

【００５１】

図１に、本発明の一態様に係る細胞の選抜方法の概略を示す。（ａ）は複数のマイクロウェル２を有する基板１を表す。（ｂ）はマイクロウェル２に第一細胞３を接着させた状態を表す。（ｃ）はマイクロウェル２内で第一細胞３と第二細胞５を共存させた状態を表

す。（ｄ）は第二細胞５が分泌した目的物質６が、第一細胞３の表面に結合した状態を表す。（ｅ）は第一細胞３の表面の目的物質６に、標識物質７が結合した状態を表す。

【００５２】

＜基板とマイクロウェル＞

本発明では、複数のマイクロウェルを有する基板を用いる。マイクロウェルとは、哺乳動物細胞や鳥類細胞が１～３個程度入る微小サイズのウェル（窪み、凹部）を指す。マイクロウェルは有底の微小な穴であり、例えばその開口部の内径は１０μｍ～５０μｍ程度、深さは開口部の内径と同程度である。

【００５３】

マイクロウェルの形状は、典型的には円筒形である。その他、四角柱、六角柱等の多角柱のような複数の平面で構成される筒状や、逆円錐形や逆角錐形等のすり鉢状であってもよい。また、これらの形状を２つ以上組み合わせて連結させた形状でもよい。逆円錐形や逆角錐形の場合は、錐の底面部分がマイクロウェルの開口部となり、頂点の一部が切り取られたような形状（すなわち、円錐台状や角錐台状）とすることができる。

マイクロウェルが円筒形の場合、その開口部の直径（内径）は、マイクロウェルに格納する細胞の種類や数を考慮して適宜決定することができる。第一細胞がＣＨＯ細胞、第二細胞が非ヒト動物由来のＢリンパ球又は形質細胞である場合は、直径が２０μｍ～４０μｍ程度であることが好ましい。また、マイクロウェルの深さは、開口部の直径と同程度であることが好ましい。

【００５４】

基板上の単位面積あたりのマイクロウェル数（密度）としては特に限定はなく、例えば、１回あたりに探索する第二細胞の総数と目的細胞の発現頻度を考慮して適宜決定することができる。例えば、１ｃｍ^{2}あたり２０，０００個～２００，０００個の範囲とすることができる。

【００５５】

基板上におけるマイクロウェル間の距離（ピッチ）としては特に限定はなく、隣接するマイクロウェルに影響を与えない範囲で適宜設定することができる。例えば、マイクロウェルが円筒型の場合、隣接するマイクロウェルの開口部中心間の距離は、開口部直径の１．５～３倍程度であることが好ましい。

【００５６】

基板の材質としては特に限定はないが、後述する可視化工程を行う場合は、自家蛍光を有しない透明の材質であることが好ましい。

【００５７】

複数のマイクロウェルを有する基板は市場から入手可能である。例えば、直径１０μｍ、２０μｍ、又は３０μｍの複数のマイクロウェルを有する基板（マイクロウェルチャンバー）がアズワン社から市販されている。

【００５８】

＜標的細胞膜タンパク質＞

本発明における標的細胞膜タンパク質としては特に限定はなく、複数回膜貫通型タンパク質に代表される全ての細胞膜タンパク質が対象となりうる。例えば、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）、イオンチャンネル、トランスポーター、ＣＤ抗原、細胞接着分子、癌抗原、ウイルス抗原などが対象となりうる。また細胞膜タンパク質の由来動物種に特に限定はない。また本発明では、精製法が確立していない、大量精製が困難、天然に存在する構造を維持した形での単離精製が困難、等の事情を有する細胞膜タンパク質であって、その一部が脂質２重膜層から細胞外に露出しているタンパク質、が対象となりうる。

【００５９】

＜第一細胞＞

本発明では、所望の細胞膜タンパク質を細胞表面に発現する第一細胞を、マイクロウェルに接着させて使用する。

第一細胞としては、所望の細胞膜タンパク質が細胞表面に発現するものであれば、特に

限定はない。一つの実施形態として、標的細胞膜タンパク質を発現するベクターを導入した組換え細胞が挙げられる。例えば、完全長の標的細胞膜タンパク質の遺伝子を、適当な発現ベクター（例えば、ｐｃＤＮＡ、ｐＥＦ/ＦＲＴ/Ｖ５－ＤＥＳＴ等）に挿入する。そして、このベクターをＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞などの細胞に導入し、標的細胞膜タンパク質を細胞膜上に一過的又は安定的に発現する組換え細胞を取得する。この組換え細胞を第一細胞として用いることができる。この場合、標的細胞膜タンパク質の細胞膜上での発現量が、発現ベクターを有さない細胞と比較して、５倍以上に増強されていることが好ましい。

【００６０】

他の実施形態として、標的細胞膜タンパク質が正常細胞に比べて過剰に発現している腫瘍細胞を、第一細胞として用いることができる。腫瘍細胞としては、例えば、手術摘出臓器から単一細胞化したものを用いることができる。その他、腫瘍細胞は、ＡＴＣＣや細胞販売会社から入手することができる。

【００６１】

他の実施形態として、標的細胞膜タンパク質が発現している正常組織、例えば非ヒト又はヒト組織、に由来する各種の細胞（非腫瘍細胞）を、第一細胞として用いることができる。例えば、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、免疫細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、リンパ球細胞、皮膚細胞、などを第一細胞として用いることができる。また、血液細胞を公知の方法でｉＰＳ化した後、特定の組織細胞に分化させたものを第一細胞として用いてもよい。

【００６２】

＜目的物質＞

本発明では、所望の細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を生産する目的細胞を、第二細胞の集団から選抜する。前記目的物質（特異的結合物質）には、特定の細胞膜タンパク質に選択的に結合する、構造が既知又は未知のポリペプチド、環状ペプチド、タンパク質が含まれる。より具体的には、ペプチドホルモン、サイトカイン、抗体、人工ポリペプチド、人工環状ペプチド、等からなる特異的結合物質が含まれる。

【００６３】

＜第二細胞＞

本発明では、マイクロウェル内で第一細胞と第二細胞を共存させる。以下、第二細胞について具体的に説明する。

【００６４】

まず、目的物質（特異的結合物質）が抗体以外である場合、換言すれば、第二細胞が抗体産生細胞以外である実施形態について説明する。

第二細胞としては、所望の目的物質を生産することが予想される細胞であれば、特に限定はない。例えば、非ヒト又はヒト組織由来の各種の細胞、例えば血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、免疫細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、リンパ球細胞、皮膚細胞などを、第二細胞として用いることができる。例えば、非ヒト動物の組織を分離し、コラーゲナーゼ処理等の後、３０～１００μｍのメッシュでろ過し、単一細胞化したものを、第二細胞として用いることができる。例えば、ヒトの血液や手術摘出臓器から単一細胞化したものを、第二細胞として用いることができる。さらに、腫瘍細胞を第二細胞として用いることができる。腫瘍細胞は、例えば、手術摘出臓器から単一細胞化したものを用いることができる。その他、腫瘍細胞は、ＡＴＣＣや細胞販売会社から入手することができる。

【００６５】

組換え細胞を第二細胞として用いることができる。例えば、目的物質をコードする遺伝子を含むｃＤＮＡライブラリーを、ｐｃＤＮＡ、ｐＥＦ/ＦＲＴ/Ｖ５－ＤＥＳＴ、Mammalian PowerExpress System、などの発現ベクターに組み込む。そして、このベクターを一過的に、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＮＳＯ細胞などの細胞に導入し、組換え細胞を得る。この組換え細胞を、第二細胞として用いることができる。さらに、前

記組換え細胞において、ベクターに保持されている薬剤耐性遺伝子を用いて生存した、恒常的に遺伝子発現する組換え細胞を、第二細胞として用いることができる。また、アデノウイルス、レンチウイルス等に由来するウイルスベクターにｃＤＮＡライブラリーを組み込み、これをＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞等に感染させたものを第二細胞として用いることができる。

組換え細胞を第二細胞として用いる場合は、組換え細胞には１種類の目的物質をコードする遺伝子が導入されていることが好ましい。

【００６６】

次に、目的物質（特異的結合物質）が抗体である場合、換言すれば、第二細胞が抗体産生細胞である実施形態について説明する。

【００６７】

本発明において「抗体」という文言は、「免疫グロブリン」と置き換えることができる。本発明における抗体には、その機能的断片が含まれる。ここで「抗体の機能的断片」とは、抗体（すなわち免疫グロブリン）の部分断片であって、抗原に対する作用を少なくとも１つ保持するものを指す。前記部分断片の例としては、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ、Ｆｖ、ジスルフィド結合Ｆｖ、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ、ＶＨ－ＶＬ）、ＶＨ、及びこれらの重合体、並びに、これらと重鎖ＣＨ３領域との融合体等が挙げられる。さらに本発明における抗体は、多重特異性抗体であってもよい。その例としては、二重特異性抗体の一種であるダイアボディ（Diabody）（例えば、国際公開第９３／１１１６１号）が挙げられる。本発明における抗体のクラス（アイソタイプ）は特に限定されない。例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ等、いずれのクラスであってもよい。さらに、抗体のサブクラスについても特に限定はない。例えば、ＩｇＧであれば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４等のいずれのサブクラスであってもよい。さらに抗体は、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体のいずれの抗体であってもよい。

【００６８】

ヒトのリンパ組織や血液に由来するＢ細胞や形質細胞等の抗体産生細胞を、第二細胞として用いることができる。例えば、健常人、がんに罹患した患者、既知あるいは未知の感染症に罹患した患者、自己免疫疾患に罹患した患者、ワクチンを接種した者、等から採取したＢ細胞や形質細胞を、第二細胞として用いることができる。

【００６９】

なお、より効率よく標的細胞膜タンパク質に対する抗体産生細胞を同定するために、細胞濃縮を行ってもよい。例えば、標的細胞膜タンパク質で免疫した非ヒト動物由来の骨髄、脾臓、リンパ組織、又は血液細胞から得た活性化Ｂ細胞又は形質細胞を濃縮し、これを第二細胞の集団として用いることができる。例えば、ヒトのリンパ組織や血液由来細胞から得た活性化Ｂ細胞又は形質細胞を濃縮し、これを第二細胞の集団として用いることができる。活性化Ｂ細胞又は形質細胞の濃縮は、例えば、細胞表面のＣＤ抗原を指標として行うことができる。例えば、特定のＣＤ抗原に対する抗体磁気ビーズを用いることができる。ＣＤ抗原の例としては、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ３４、ＣＤ４０、ＣＤ４３、ＣＤ４５Ｒ、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ５６、ＣＤ６１、ＣＤ７９ａ、ＣＤ９０．２、ＣＤ１３８、ＣＤ２３５ａ、が挙げられる。濃縮の程度としては、例えば、約１０，０００，０００個のリンパ組織由来のリンパ球細胞集団から、活性化Ｂ細胞又は形質細胞を５０倍以上に濃縮することが挙げられる。

【００７０】

非ヒト動物を標的細胞膜タンパク質で免疫する方法については、Hutchings CJ, Koglin M, Olson WC, Marshall FH, "Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors", Nat Rev Drug Discov. 16(9), 2017. に示されているように様々な方法がある。例えば、細胞表面に露出している部分ペプチドや部分タンパク質を合成し、これを抗原として免疫する方法が挙げられる。また、細胞から標的細胞膜タンパク質を界面活性剤で可溶化して精製し、これを抗原として免疫する方法が挙げられる

。また、標的細胞膜タンパク質を高発現した細胞自体を直接免疫する方法が挙げられる。また、人工２重膜やウイルス様ナノ粒子上に標的細胞膜タンパク質を提示したものを抗原として免疫する方法が挙げられる。さらに、タンパク質発現ベクターに標的細胞膜タンパク質をコードするｃＤＮＡ配列を挿入したベクターを免疫する方法（ＤＮＡ免疫）が挙げられる。このうち、ＤＮＡ免疫が、より特異的で高親和性の抗体を取得できる可能性があるので好ましい。

【００７１】

ハイブリドーマ等の不死化した細胞を第二細胞として用いることができる。例えば、標的細胞膜タンパク質で免疫した非ヒト動物から免疫細胞を採取し、これをミエローマと細胞融合することによってハイブリドーマを得る。このハイブリドーマを、第二細胞として用いることができる。細胞融合、ハイブリドーマの選抜、クローニングについては、公知の方法を使用することができる。例えば、細胞融合はポリエチレングリコールを用いる方法や、免疫細胞とミエローマの混合液に電圧をかける方法により行うことができる。また、ハイブリドーマの選抜は、ＨＡＴ選択培地を用いた培養により行うことができる。

【００７２】

ハイブリドーマ法以外の方法でも細胞を不死化することができる。例えば、ヒトのリンパ組織や血液に由来するＢ細胞の場合は、エプスタイン・バール・ウイルス（Epstein-Barr virus）感染で不死化した細胞も、第二細胞として用いることができる。

【００７３】

抗体遺伝子が導入された組換え細胞を第二細胞として用いることができる。例えば、免疫動物のリンパ組織や血液細胞に由来するＢ細胞や形質細胞からｃＤＮＡライブラリーを作製する。このｃＤＮＡライブラリーから、抗体あるいは抗体断片の遺伝子を選択的に増幅する。完全抗体、機能的抗体断片、一本鎖抗体、又は多重特異性抗体などの様々な形態の抗体分子を発現できるように、増幅した遺伝子を改変し、抗体遺伝子ライブラリーを作製する。この遺伝子ライブラリーを、ｐｃＤＮＡ、ｐＥＦ/ＦＲＴ/Ｖ５－ＤＥＳＴ、Mammalian PowerExpress System、などのベクターに組み込む。そして、このベクターを一過的に、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＮＳＯ細胞などの細胞に導入し、組換え細胞を得る。この組換え細胞を、第二細胞として用いることができる。さらに、前記組換え細胞において、ベクターに保持されている薬剤耐性遺伝子を用いて生存した、恒常的に遺伝子発現する組換え細胞を、第二細胞として用いることができる。

【００７４】

第二細胞の由来となる動物種としては特に限定はないが、哺乳動物細胞又は鳥類細胞が好ましく用いられる。哺乳動物としてはマウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ラクダ、アルパカ等を挙げることができる。また、鳥類の例としては、ニワトリ、アヒル又は七面鳥を挙げることができる。

【００７５】

＜第一細胞の接着＞

本発明では、上記した第一細胞をマイクロウェルに接着させる。これにより、第一細胞が、その細胞機能を損なうことなくマイクロウェル内に格納及び固定化される。マイクロウェルに接着させる第一細胞の数は、第二細胞を受け入れるスペースを確保できるものであれば限定されないが、好ましくは１～２個である。

【００７６】

＜第一細胞と第二細胞の共存＞

本発明では、第一細胞が接着したマイクロウェルに１又は２個の第二細胞を導入し、第一細胞と第二細胞を共存させる。これにより、第二細胞が生産した（分泌した）目的物質が、第一細胞の表面に接触する。マイクロウェルには１個の第二細胞を導入することが好ましい。

【００７７】

マイクロウェル内で第一細胞と第二細胞を共存させた後、所定の条件でインキュベートすることが好ましい。インキュベートの条件は、例えば、第二細胞が生産する目的物質の

性質と第二細胞の生存時間を考慮して決定することができる。例えば、リン酸緩衝液、ＨＢＳＳ又は細胞培養液（例えばＲＰＭＩ培地、ＨＡＭ Ｆ－１２培地など）に必要に応じて牛血清、成長因子、特異的結合物質の産生を亢進させるサイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１３、ＩＬ－２１、ＴＮＦ，ＩＦＮγ、ＣＤ４０リガンドなど）を添加し、２５～３７℃で１５分～６時間インキュベートすることが好ましい。

【００７８】

＜陽性マイクロウェルの特定＞

マイクロウェル内で第一細胞と第二細胞を共存させ、必要に応じてインキュベートした後、目的物質が結合した第一細胞を含むマイクロウェル（陽性マイクロウェル）を特定する。換言すれば、各マイクロウェルにおける、第一細胞の表面に発現した標的細胞膜タンパク質と、第二細胞から分泌された物質との結合の有無を検出する。

【００７９】

第一細胞と目的物質との結合の有無を検出する方法としては、例えば、可視化による方法が好ましく用いられる。すなわち好ましい実施形態では、前記特異的結合物質が前記第一細胞に結合したことを可視化する可視化工程を包含する。

【００８０】

前記可視化の手法としては特に限定はない。１つの例として、第一細胞の表面を可視化する直接的手法が挙げられる。別の例として、前記目的物質が前記第一細胞に結合した際に起きる、前記細胞膜タンパク質の活性化に伴う細胞内情報伝達物質の変動を可視化する間接的手法が挙げられる。

【００８１】

前記直接的手法としては、目的物質に対して特異的に結合する標識物質を用いる方法が挙げられる。すなわち、マイクロウェル内で第二細胞と共存している第一細胞に対して、前記標識物質を接触させる。前記標識物質は、例えば標識抗体である。

具体的手順を例示すると、まず、上記したｃＤＮＡライブラリーを作製する際に、特異的結合物質にタグ（例えば、ＦＬＡＧ、Ｖ５）や抗体のＦｃ部分が付与されるように設計する。そして、このｃＤＮＡライブラリーをＣＨＯ細胞等に導入した組換え細胞を、第二細胞として用いる。タグが付与された目的物質に対しては、当該タグに対する標識抗体（例えば、標識抗ＦＬＡＧ抗体、標識抗Ｖ５抗体）を用いることができる。Ｆｃ部分が付与された目的物質に対しては、標識抗Ｆｃ抗体（例えば、標識抗ＩｇＧ抗体）を用いることができる。具体的操作としては、マイクロウェル内で第一細胞と第二細胞を共存させた後、必要に応じて所定の条件でインキュベートし、その後、標識物質を添加する。

【００８２】

前記標識としては、蛍光物質（蛍光複合体）、蛍光タンパク質、酵素、等による標識を採用することができる。

前記蛍光物質としては、Alexa Fluor（登録商標）、Aqua、Texas Red（登録商標）、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、Cascade Blue（登録商標）、フィコエリトリン、DyLight（登録商標）等が挙げられる。好ましくは、Alexa Fluor 488が用いられる。

蛍光タンパク質としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）が挙げられる。

前記酵素としては、アルカリフォスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、等が挙げられる。

【００８３】

標識物質（例えば、標識抗体）が発する強いシグナルを指標として、目的物質が結合した第一細胞を検出することができる。そして、標識の特性に合わせて、陽性シグナルを含むマイクロウェル（陽性マイクロウェル）を蛍光顕微鏡、発光顕微鏡、倒立顕微鏡又はこれらの顕微操作装置を包含した機器を用いて特定することができる。

【００８４】

一方、間接的手法は、例えば、特異的結合物質が細胞膜タンパク質の機能を促進する物質（例えば、内在性リガンドや、アゴニスト活性を保有すると考えられるポリペプチド、

環状ペプチド、抗体、タンパク質など）である場合に適用できる。具体的手順を例示すると、標的細胞膜タンパク質を発現している第一細胞に、標的細胞膜タンパク質の活性化に伴う細胞内情報伝達物質の変動を可視化できるレポーター遺伝子を予め導入しておく。そうすると、目的物質が標的細胞膜タンパク質に結合したとき、レポーター遺伝子の発現の変化を可視化できる。その結果、細胞膜タンパク質と目的物質との結合を間接的に可視化することができる。例えば、プロメガ社製のpGL4 Signaling Vectorシリーズと発光基質としてルシフェリンを使うことで、間接的に可視化することができる。そして、発光顕微鏡又は発光顕微鏡を包含した機器を用いて、陽性マイクロウェルを特定することができる。

【００８５】

間接的手法に適用できる他の例として、細胞内のｃＡＭＰの変動を可視化することが挙げられる。例えば、細胞内のｃＡＭＰ量の変動は、細胞膜タンパク質を活性化する物質を添加した際に見られるＣＲＥＢ（cAMP response element binding protein）の特異的リン酸化を、抗リン酸化抗体と蛍光標識された２次抗体とで検出することができる。また、さらに他の例として、細胞内のＣａの変動を可視化することが挙げられる。細胞内のＣａの変動は、細胞内蛍光Ｃａ指示薬の蛍光強度の変化をもって、間接的に可視化することができる。

【００８６】

標識物質を添加する前に、第一細胞を予め蛍光標識しておくことにより、陽性マイクロウェルをより簡便かつ迅速に特定することができる。例えば、前記標識物質として蛍光物質（第一蛍光物質）で標識された抗体を採用し、第一細胞を別の蛍光物質（第二蛍光物質）で標識する。ここで、第二蛍光物質として、第一蛍光物質が発する蛍光の蛍光波長と異なる蛍光を発するものを採用する。すなわち、第一蛍光物質が発する蛍光の蛍光波長は、第二蛍光物質が発する蛍光の蛍光波長と異なる。例えば、第二蛍光物質として、Calcein-AM、Fluorescein diacetate (FDA)、Carboxyfluorescein diacetate (CFDA)、CytoRed、Propidium iodide (PI)、Ethidium bromide (EB)、Acridine orange (AO)、DAPI、Hoechst 33342、又はHoechst 33258を用いる。一方、第一蛍光物質としてAlexa Fluor 488を用いる。これにより、標識抗体が結合した第一細胞と、標識抗体が結合していない第一細胞とを、発する蛍光の違いをもって容易に区別できる。そして、蛍光顕微鏡又は蛍光顕微鏡を包含した機器を用いて、陽性マイクロウェルを特定することができる。

【００８７】

抗体は通常、細胞外に分泌されるものであるが、細胞外に分泌されない膜型抗体が存在することが知られている。したがって、分泌されない膜型抗体が第二細胞の表面に存在することもあり得る。この場合、標識抗ＩｇＧ抗体を添加すると、第一細胞に結合した抗体のみならず、第二細胞上の膜型抗体にも結合してしまうおそれがある。しかし、上記した第一蛍光物質と第二蛍光物質を用いる実施形態によれば、第一細胞に結合した抗体のみを特異的に検出できる。

【００８８】

可視化工程において、標識物質を添加した後、余剰の標識物質を除去するために洗浄工程を行うことが好ましい。洗浄は、マイクロウェル内に第一細胞と第二細胞が保持される条件（第一細胞と第二細胞が流失しない条件）で行うものであれば特に限定はない。例えば、リン酸緩衝液、ＨＢＳＳ、又は細胞培養液で数回、マイクロウェルを穏やかに洗浄することが挙げられる。洗浄工程を含むことにより、標的細胞膜タンパク質の第一細胞の細胞膜上の発現量が極めて低い場合においても、目的物質が標的細胞膜タンパク質に結合したシグナルを高感度で検出することができる。

【００８９】

＜第二細胞の回収＞

陽性マイクロウェルを特定した後、目的細胞として第二細胞を回収する。マイクロウェルからの第二細胞の回収は、例えば、マイクロマニュピレーターを用いて行うことができる。例えば、直径が数μｍから５０μｍのキャピラリーを陽性マイクロウェルに挿入し、

第二細胞を生きたまま吸引し、回収することができる。マイクロマニュピレーターによる操作は、自動と手動とを問わない。例えば、セルピッキングシステム（アズワン社）やCellCelector (Automated Lab Solution社)を用いて回収することが出来る。

回収した第二細胞は、適切な細胞培養用の培地内、あるいはｍＲＮＡを分解させず素早く抽出するための細胞溶解液（Lysis緩衝液）内に回収することが好ましい。

【００９０】

なお、陽性マイクロウェルに２個の第二細胞が導入されていた場合は、例えば、細胞培養用の培地内に２個の第二細胞を回収後、両者を分離し、いずれか一方を目的細胞として採用すればよい。あるいは、Lysis緩衝液内に２個の第二細胞を回収後、２種類の目的物質をコードする核酸を以下に述べる方法で取得単離し、いずれか一方の核酸を目的核酸（目的遺伝子）として採用することができる。

【００９１】

＜核酸、組換え細胞、特異的結合物質の製造方法＞

本発明は、上記の方法によって第二細胞の集団より選抜された目的細胞から、目的物質をコードする核酸（遺伝子）を取得する核酸の製造方法を包含する。また本発明は、当該核酸を宿主細胞に導入し、目的物質を発現する組換え細胞を取得する組換え細胞の製造方法を包含する。さらに本発明は、当該組換え細胞を培養し、その培養物から目的物質を取得する目的物質の製造方法を包含する。好ましくは、前記目的物質は抗体である。

【００９２】

第二細胞から目的物質をコードする核酸を取得する方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、逆転写反応とＰＣＲ法を組み合わせてｃＤＮＡを合成する。そして当該ｃＤＮＡから、目的の核酸を単離することができる。

【００９３】

目的物質を発現する組換え細胞を取得する方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、単離した目的の核酸を適宜のベクターに組み込む。このベクターを大腸菌、酵母、哺乳動物細胞（例えばＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞又はＮＳＯ細胞）などの宿主細胞に導入し、目的の組換え細胞を取得することができる。

そして、当該組換え細胞を培養し、その培養物（例えば、培養上清）から目的物質を取得することができる。

【００９４】

目的物質が抗体である場合について、さらに説明する。第二細胞からの抗体遺伝子の単離は、例えば、国際公開第２００９／０９１０４８号、国際公開第２００９／１１０６０６号、及び国際公開第２０１１／０２７８０８号に記載の方法の組み合わせによって、又は、Nobuyuki Kurosawa, Megumi Yoshioka, Rika Fujimoto, Fuminori Yamagishi and Masaharu Isobe, "Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals", BMC Biology, 10:80, 2012に記載の方法（MAGrahd法）によって、行うことができる。

【００９５】

単離した抗体遺伝子に改変を加え、完全抗体、機能的抗体断片、一本鎖抗体、又は多重特異性抗体を発現する組換え細胞を構築することができる。同様に、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体を発現する組換え細胞を構築することができる。同様に、ネコ化抗体又はイヌ化抗体を発現する組換え細胞を構築することができる。

【００９６】

第二細胞自体が安定的に培養可能な場合には、第二細胞自体を培養して、その培養物から抗体等の目的物質を取得することもできる。すなわち本発明は、上記の方法で第二細胞の集団より選抜された目的細胞を培養し、その培養物から目的物質を取得する目的物質の製造方法を包含する。

【００９７】

培養物から抗体等の目的物質を精製する方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、アフィニティ、イオン交換、ゲルろ過等の各種クロマトグラフィーを採用す

ることができる。アフィニティクロマトグラフィーにおけるリガンドとしては、プロテインＡ、プロテインＧ、抗ＦＬＡＧ抗体、抗Ｖ５抗体、等が挙げられる。

【００９８】

＜医薬組成物の製造方法＞

本発明は、上記の方法によって製造された核酸に、薬学的に許容される担体又は添加物を組み合わせて、前記核酸を有効成分として含有する医薬組成物を取得する医薬組成物の製造方法を包含する。また本発明は、上記の方法によって製造された目的物質に、薬学的に許容される担体又は添加物を組み合わせて、前記目的物質を有効成分として含有する医薬組成物を取得する医薬組成物の製造方法を包含する。

【００９９】

本発明により製造された目的物質、例えば抗体は、医薬組成物（治療剤）の有効成分として有用である。前記医薬組成物は、本発明により製造された抗体等の目的物質と、薬学的に許容される担体や添加物とを含むことができる。好ましくは、前記医薬組成物は、標的細胞膜タンパク質特異的な細胞内情報伝達機構を遮断あるいは活性化するものである。

【０１００】

前記医薬組成物は、経口あるいは非経口的に、全身あるいは局部的に投与することができる。投与の形態としては、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の場合には、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより、全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢や症状により、適宜、投与方法を選択することができる。目的物質が抗体の場合、抗体の投与量としては、例えば、一回につき体重１ｋｇあたり０．０００１ｍｇから１０００ｍｇの範囲で選ぶことができる。あるいは、例えば、患者あたり抗体０．００１～１０００００ｍｇ／ｂｏｄｙの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、抗体の投与量は、これらの範囲に限定されるものではない。

【０１０１】

前記医薬組成物は、常法に従って製剤化することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）。前記担体あるいは添加物の例としては、界面活性剤（ＰＥＧ、Ｔｗｅｅｎ等）、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、キレート剤（ＥＤＴＡ等）、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油６０、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等が挙げられる。また、その他の低分子量のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリン等のタンパク質；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、リシン等のアミノ酸、を含んでいてもよい。

【０１０２】

前記医薬組成物を注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ＰＥＧ等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０）等と併用してもよい。また、必要に応じて、有効成分である抗体をマイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ［メチルメタクリル酸］等のマイクロカプセル）に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム（リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、ナノカプセル等）とすることもできる（"Remingto's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照）。

さらに、抗体に他の薬剤を直接融合させて治療効果を高める技術が知られており、前記

医薬組成物に適用し得る。
【０１０３】
また本発明で得られた核酸（遺伝子）、例えば抗体遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療薬とすることも考えられる。当該遺伝子治療薬（組換えベクター）の投与方法としては、Ｎａｋｅｄプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングして投与する方法、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ＨＶＪベクター等の各種ウイルスベクターに組み込んで投与する方法（Ａｄｏｌｐｈ『ウイルスゲノム法』，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｆｌｏｒｉｄ（１９９６）参照）、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆（国際公開第９３／１７７０６号等）して投与する方法、等が挙げられる。
すなわち、前記遺伝子治療薬は、生体内において有効成分たる抗体が発現され、その作用を発揮できる限り、いかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路により十分な量が投与される。非経口経路としては、静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入、又は筋肉内の経路を介した、注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）、添鼻薬等粘膜経路を介する方法、等が挙げられる。さらに、前記遺伝子治療薬は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法（米国特許第４，９４５，０５０号）、またはウイルス感染を利用して細胞に投与し、該細胞を動物に再導入することにより投与してもよい。
【０１０４】
＜細胞膜タンパク質検出用試薬＞
本発明は、上記の方法によって製造された目的物質を含む、所望の細胞膜タンパク質を検出するための試薬を包含する。例えば、本発明の方法によって製造された抗体（目的物質）を含む試薬を用いて、ヒト由来又は非ヒト哺乳動物由来の血液細胞に前記抗体を接触させる。さらに、蛍光物質又は色素からなる標識物質を、直接的又は間接的に接触させる。そして、フローサイトメトリー又はプレートリーダーによって、所望の細胞膜タンパク質の発現を検出することができる。また前記試薬を用いて、ヒト由来又は非ヒト哺乳動物由来の病理組織片に前記抗体を接触させて、所望の細胞膜タンパク質の発現を検出することができる。
【０１０５】
さらに、上記試薬を含む、細胞膜タンパク質検出用キットを構築することができる。例えば、上記試薬に標識物質等を組み合わせて、細胞膜タンパク質検出用キットを構築することができる。
【０１０６】
本発明は、上記の方法によって製造された目的物質を用いる、前記所望の細胞膜タンパク質を検出する方法、を包含する。本発明は、上記の方法によって製造された目的物質の、前記所望の細胞膜タンパク質の検出のための使用、を包含する。
【０１０７】
以下の実施例１～８では、主として、ヒトＧＰＣＲの１つであるアペリン受容体（以下、ＡＰＬＮＲと略記することがある）に対する特異的結合抗体を産生する細胞の選抜を行った。さらに、選抜された細胞から抗体遺伝子を単離し、抗体を発現する組換え細胞を構築した。さらに当該組換え細胞が発現する抗体の機能性評価を行った。
【実施例１】
【０１０８】
（１－１）ＡＰＬＮＲ発現ベクターの調製
ジーンバンクに登録されているヒトＡＰＬＮＲ遺伝子配列（NM_005161.4）をマウスのアミノ酸コドンに最適化した人工合成遺伝子（配列番号１）を作製した。この人工合成遺伝子を用い、国際公開第２０１２／０４３５３３号（日本国特許第５３１５４９５号）に記載の方法に準じて、ヒトＡＰＬＮＲ遺伝子とＧｒｏＥＬ遺伝子との融合遺伝子を含むベクターpCI-APLNR-GroELを構築した。

【０１０９】
（１－２）ＡＰＬＮＲ安定発現細胞（第一細胞）の調製
pEF5/FRT/V5-DESTベクター（インビトロジェン社）に上記人工合成遺伝子（配列番号１）を導入し、pEF-FRT-APLNRを構築した。pEF-FRT-APLNRから発現されるヒトＡＰＬＮＲは、Ｃ末端にＶ５と６×ＨＩＳタグが付加される。
【０１１０】
Ｆｌｐ-Ｉｎ-ＣＨＯ細胞（インビトロジェン社）を、１０％ウシ胎児血清、１００単位／ｍＬ ペニシリン、１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンを含むＨａｍ’ｓ Ｆ-１２培地（インビトロジェン社）にて培養した。この細胞に、リポフェクトアミン（Lipofectamin）２０００を用いて、pEF-FRT-APLNRとpOG44プラスミド（インビトロジェン社）を同時に導入した。導入の翌日から、５００μｇ／ｍＬハイグロマイシン（インビトロジェン社）含むＨａｍ’ｓ Ｆ-１２培地に培地を交換し、３日目ごとに培地を交換しながら２週間培養した。形成されたコロニーから、限界希釈法によりハイグロマイシン耐性細胞をクローニングした。
【０１１１】
フィコエリスリン（ＰＥ）標識抗マウスＩｇＧ抗体（ベックマン・コールター社）を２次抗体として使用し、得られたハイグロマイシン耐性細胞と抗アペリン抗体（Ｒ＆Ｄ社）又は抗Ｖ５タグ抗体（インビトロジェン社）との結合を、フローサイトメーターで解析した。その結果、得られたハイグロマイシン耐性細胞がＰＥ陽性を示し、ヒトＡＰＬＮＲを安定発現していることが確認された。以下、この細胞を、ヒトＡＰＬＮＲ安定発現ＣＨＯ細胞株（第一細胞）と記載する。
【実施例２】
【０１１２】
（２－１）ＤＮＡ免疫法による免疫動物の獲得
国際公開第２０１２／０４３５３３号（日本国特許第５３１５４９５号）に記載の方法に準じて、８週齢のマウスＩＣＲ（雌）に、ベクターpCI-APLNR-GroELを複数回に分けて注射した（ＤＮＡ免疫）。
【０１１３】
（２－２）脾臓からの抗体産生細胞を含む細胞集団（第二細胞）の調製
（２－１）でＤＮＡ免疫を行ったマウスから脾臓を摘出し、冷蔵ＨＢＳＳを入れた６ウェルプレートに回収した。付着している結合組織や脂肪組織を除去した後、新しいＨＢＳＳ内で脾臓をほぐしてリンパ球を遊離させた。細胞を回収し、１０ｍＬのＨＢＳＳで再懸濁した。セルストレーナーにて未破壊組織を分離後、２０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞を１ｍＬの溶血溶液に懸濁して３７℃で５分間インキュベートし、赤血球を除去した。１０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、リンパ球細胞を回収した。
EasySep Mouse Biotin Positive Selection Kit（STEMCELL TECHNOLOGIES社）を用いて、２．５×10^7個の上記リンパ球細胞から、所望の抗体産生細胞（目的細胞）の候補を含む約１．３×10^5個の細胞集団（第二細胞）を分離した。
【実施例３】
【０１１４】
（３－１）ハイブリドーマ細胞（第二細胞）の調製
細胞融合に使用するミエローマ細胞（SP2/0）は、細胞融合の５日前に起眠し、２日前に一度継代を行ってから使用した。
実施例２で取得した免疫済みマウスの凍結脾細胞を融解し、３７℃のＲＰＭＩ１６４０培地（１０％ＦＢＳ含有）で懸濁し、細胞数をカウントした。脾細胞とミエローマ細胞（SP2/0）を細胞数比１：１となるように混合した。なおミエローマ細胞は、細胞融合の５日前に起眠し、２日前に一度継代を行ってから使用した。細胞混合物を遠心分離した後、ＥＣＦバッファーで細胞を洗浄した。同様の洗浄をさらに２回行った。
【０１１５】

細胞融合装置ECFG21（ネッパジーン社）を用いて、脾細胞とミエローマ細胞の細胞融合を実施した。細胞融合後、細胞溶液の２倍量のＲＰＭＩ１６４０培地（ＦＢＳ含有、抗生物質不含）を加え、CO_2インキュベーター内で１時間静置した。遠心分離して細胞を回収し、ＨＡＴ培地（RPMI1640 with 10% FBS, 2-メルカプトメタノール(x500), HFCS(x100), HAT(x50)）で懸濁した。９６ウェルプレート、２４ウェルプレート及び１０ｃｍディッシュを用い、常法により、抗体産生ハイブリドーマ細胞のクローニングと培養を行った。

【実施例４】

【０１１６】

（４－１）マイクロウェルを用いた特異的抗体産生ハイブリドーマの選抜

マイクロウェルチャンバーASMC30-20P（アズワン社）を準備した。このマイクロウェルチャンバーは、約１．５ｃｍ×約２．４ｃｍのエリアの中に直径３０μｍのマイクロウェル８４，６４０個が等間隔で配置されている基板である。各マイクロウェルの深さは、マイクロウェルの直径と等しい。マイクロウェル間のピッチは、マイクロウェルの直径の２倍である。従来技術では、マイクロウェルに１個の細胞を格納して用いるのが一般的である。しかし本実施例では、マイクロチャンバーに第一細胞と第二細胞、すなわち２個以上の細胞を格納して実験を行った。以下、説明する。

【０１１７】

ヒトＡＰＬＮＲ安定発現ＣＨＯ細胞（第一細胞）をF-12培地（10% FBS, Penicillin/Streptomycin含有）で懸濁し、３×１０^{5}細胞／５００μＬの細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液を各マイクロウェルに充填した。マイクロチャンバーを３００ｒｐｍで２分間、２回遠心し、第一細胞が各マイクロウェルに１又は２個格納されるように調製した。マイクロチャンバーをF-12培地で洗浄した後、５００μＬのF-12培地を入れた。CO_2インキュベーターにて３７℃で１時間インキュベートし、マイクロウェルの底面に第一細胞を細胞としての機能性を維持したまま接着させた。F-12培地で１０ｎＭ濃度に調整したCytoRed溶液を加え、さらに３７℃で１時間インキュベートし、第一細胞を染色した。F-12培地で３回洗浄して余剰のCytoRedを除去した後、１ｍＬのF-12培地をマイクロチャンバー内に満たした。

【０１１８】

実施例３で調製したハイブリドーマ（第二細胞）の集団を培養し、３×１０^{5}細胞／５００μＬの細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液を各マイクロウェルに充填した。マイクロチャンバーを３００ｒｐｍで２分間、２回遠心し、第二細胞が各マイクロウェルに１又は２個格納されるように調製した。マイクロチャンバーを培地で洗浄した後、適量の培地を入れて３７℃で３０分間インキュベートし、ハイブリドーマから抗体を分泌させた。マイクロウェルを洗浄して上清を除去した後、ＲＰＭＩ１６４０（10% FBS含有）で５００倍希釈したAlexa Fluor 488標識抗マウスＩｇＧ抗体（２次抗体；標識物質）をアプライし、３７℃で３０分間インキュベートした。ＲＰＭＩ１６４０（フェノールレッド不含, 1% FBS含有）にて３回洗浄した後、ＲＰＭＩ１６４０を１ｍＬ入れた。セルピッキングシステム（アズワン社）にマイクロチャンバーをセットし、全てのマイクロウェルの透過光画像および２種類の蛍光画像の情報を取得した。CytoRedの蛍光検出は、励起波長５４３ｎｍ、蛍光波長５９３ｎｍの条件で行った。Alexa Fluor 488の蛍光検出は、励起波長４８２ｎｍ、蛍光波長５３６ｎｍの条件で行った

【０１１９】

図２（ａ）～（ｃ）は、第一細胞表面のＡＰＬＮＲに特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ、すなわち目的細胞が格納されたと判断される陽性のマイクロウェルの画像の一例である。一方、図３（ａ）～（ｃ）は、第一細胞表面のＡＰＬＮＲに特異的に結合しない抗体を産生するハイブリドーマ、すなわち目的外の細胞が格納されたと判断される陰性のマイクロウェルの画像の一例である。図２、３において、（ａ）は透過光、（ｂ）はCytoRed由来の蛍光、（ｃ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光を観察したものである。

【０１２０】

図２（ｃ）に示すように、目的細胞とＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞とが共存したマイクロウェルでは、CytoRedで標識されたＣＨＯ細胞と同じ位置にAlexa Fluor 488の蛍光が観察された。すなわち、目的細胞と共存したマイクロウェル内のＣＨＯ細胞は、Alexa Fluor 488とCytoRedで共染色された。これにより、ＣＨＯ細胞の表面にAlexa Fluor 488標識抗ＩｇＧ抗体が結合していることが確認された。

【０１２１】

一方、図３（ｃ）に示すように、目的外の細胞とＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞とが共存しマイクロウェルでは、Alexa Fluor 488の蛍光は、CytoRedで標識されたＣＨＯ細胞と同じ位置には観察されなかった。すなわち、ＣＨＯ細胞の表面にAlexa Fluor 488標識抗ＩｇＧ抗体が結合せず、ＣＨＯ細胞はAlexa Fluor 488とCytoRedで共染色されなかった。これにより、ＣＨＯ細胞の表面にAlexa Fluor 488標識抗ＩｇＧ抗体が結合していないことが確認された。

【０１２２】

最終的に、８４６４０個のマイクロウェルから、目的細胞を含む陽性マイクロウェルが１６個特定された。

【０１２３】

陽性マイクロウェルのうち、ハイブリドーマが１個のみ含まれるものを選別した。選別したマイクロウェルから、直径数μｍ～数十μｍのキャピラリーを用いてハイブリドーマを吸引し、細胞溶解液内に回収した。最終的に、少なくとも３種の独立したハイブリドーマが選抜された。

【０１２４】

本実施例の方法によれば、通常は６０日程度かかるハイブリドーマの選抜を、７日以内に完了することができた。

【実施例５】

【０１２５】

（５－１）選抜したハイブリドーマからの抗体遺伝子の単離

実施例４で選抜したハイブリドーマの１つから、MAGrahd法（Nobuyuki Kurosawa, Megumi Yoshioka, Rika Fujimoto, Fuminori Yamagishi and Masaharu Isobe, "Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals", BMC Biology, 10:80, 2012）にて抗体遺伝子を取得した。すなわち、実施例４で得た細胞溶解液５μＬとオリゴｄＴマグネット５μｇとを混合し、オリゴｄＴマグネット上に細胞由来のｍＲＮＡを捕捉した。MAGrahdリアクタートレーとネオジム磁石を使い、オリゴｄＴマグネットを洗浄溶液で洗浄後、逆転写反応によるｃＤＮＡ合成を行った。さらにマグネットを洗浄後、５’ターミナルトランスレーショナル反応を実施した。合成した上記ｃＤＮＡを用い、５’ｒａｃｅ ＰＣＲ法にて、抗体重鎖可変領域（ＶＨ領域）の遺伝子と、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ領域）の遺伝子を単離増幅した。

なお、増幅産物の特異性を高めるために、ＰＣＲは２回行った。１回目のＰＣＲでは、ＶＨ領域とＶＬ領域を共通して増幅させる第一フォワードプライマー（配列番号３）と、ＶＨ領域を特異的に増幅させる第一リバースプライマー（配列番号４）と、ＶＬ領域を特異的に増幅させる第二リバースプライマー（配列番号５）を混合して使用した。２回目のＰＣＲでは、１回目の増幅産物を鋳型とし、ＶＨ領域の増幅については、第二フォワードプライマー（配列番号６）と、ＶＨ領域を特異的に増幅させる第三リバースプライマー（配列番号７）、ＶＬ領域の増幅については第二フォワードプライマー（配列番号６）とＶＬ領域特異的に増幅させる第四リバースプライマー（配列番号８）をそれぞれプライマーとして使用した。

２回目のＰＣＲ後のサンプルについてアガロースゲル電気泳動を行ったところ、７５０ｂｐの位置にＶＨ領域、５５０ｂｐの位置にＶＬ領域に、それぞれ対応する増幅産物が確認できた。

【０１２６】

（５－２）抗体発現ユニットの構築

ＴＳ－ｊＰＣＲ法（Megumi Yoshioka, Nobuyuki Kurosawa and Masaharu Isobe, "Target-selective joint polymerase chain reaction: A robust and rapid method for high-throughput production of recombinant monoclonal antibodies from single cells", BMC Biotechnol. 2011 Jul 21;11:75）にて抗体発現ユニットを構築した。すなわち、（５－１）で増幅したＶＨ領域の遺伝子と、抗体重鎖定常領域の遺伝子と、遺伝子発現に必要なプロモーター領域とをＰＣＲを用いて融合し、完全長抗体重鎖を発現する抗体発現ユニットを構築した。同様に、（５－１）で増幅したＶＬ領域の遺伝子と、抗体軽鎖定常領域の遺伝子と、遺伝子発現に必要なプロモーター領域とをＰＣＲを用いて融合し、完全長抗体軽鎖を発現する抗体発現ユニットを構築した。これらの抗体発現ユニットを哺乳動物細胞に供導入することにより、所望の抗体（ＩｇＧ）を一過的に発現する組換え細胞を得ることができる。

【０１２７】

（５－３）哺乳動物細胞への抗体発現ユニット導入

上記文献（Nobuyuki Kurosawa et al., BMC Biology, 10:80, 2012）に記載の方法で、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に上記２種の抗体発現ユニットを共導入した。すなわち、コラーゲンコート９６ウェルプレートに、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を１．５×１０^{4}細胞／１００μＬ／ウェルとなるように播種した。リポフェクトアミン２０００を用いて、（５－２）で構築した２種の抗体発現ユニットをＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に共導入した。導入３日目に細胞上清を回収して、発現された抗体の結合性評価に用いた。

【０１２８】

比較例として、陰性マイクロウェルから回収された目的外のハイブリドーマを用いて（５－１）～（５－３）と同じ操作を行い、細胞上清を回収した。

【０１２９】

（５－４）フローサイトメトリーを用いたＡＰＬＮＲと抗体との結合性評価

ヒトＡＰＬＮＲ安定発現ＣＨＯ細胞株を、直径１０ｃｍのディッシュ内で培養した。細胞をＰＢＳで３回洗浄後、細胞剥離用バッファーを１ｍＬ加え、３７℃で１５分間インキュベートした。剥離された細胞をＦＡＣＳバッファーで懸濁し、１０００ｒｐｍで５分間遠心した後、細胞濃度が１×１０^{7}細胞／ｍＬとなるようにＦＡＣＳバッファーで再懸濁した。Fc Block（ベクトン・ディッキンソン社）を細胞懸濁液の１／５００量加え、４℃で３０分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、２×１０^{5}細胞／５０μＬとなるように細胞を懸濁した。９６ウェルプレート内で、この細胞懸濁液を（５－３）で回収した細胞上清と混合し、４℃で１時間インキュベートした。インキュベート後、１００μＬのＦＡＣＳバッファーで２回、細胞を洗浄した。蛍光標識抗ＩｇＧ抗体（２次抗体）の希釈液を各ウェルに５０μＬずつ加え、４℃で１時間インキュベートし、ＣＨＯ細胞表面に結合した抗体に２次抗体を結合させた。１００μＬのＦＡＣＳバッファーで細胞を２回洗浄した後、８０μＬのＦＡＣＳバッファーに懸濁し、フローサイトメトリー法にて細胞表面の蛍光強度を測定した。

【０１３０】

図４にフローサイトメトリーの結果を示す。すなわち、（５－３）で得られた組換え細胞が発現した抗体は、ヒトＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞に対する結合性を有していた。なお当該抗体は、ＡＰＬＮＲを発現していない野生型のＣＨＯ細胞に対する結合性は示さなかった。

一方、図５に示すように、陰性マイクロウェルから回収された目的外のハイブリドーマを用いた比較例では、組換え細胞が発現した抗体は、ヒトＡＰＬＮＲ安定発現ＣＨＯ細胞に対する結合性を有さなかった。

以上より、本実施例によって得られた抗体が、ヒトＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞に対する特異的結合性を有することが示された。

【実施例６】

【０１３１】

（６－１）マイクロウェルを用いた特異的抗体産生リンパ球細胞の選抜

実施例４の方法に準じて、実施例２で調製した不死化していないリンパ球細胞（第二細胞）の集団から、目的の抗体を産生する細胞を選抜した。以下、説明する。

【０１３２】

実施例４と同様にして、ヒトＡＰＬＮＲ安定発現ＣＨＯ細胞（第一細胞）をマイクロウェルの底面に接着させた。さらに、CytoRedで第一細胞を染色し、１ｍＬのF-12培地をマイクロチャンバー内に満たした。

【０１３３】

実施例２で調製したリンパ球（第二細胞）の集団をＲＰＭＩ１６４０で懸濁し、３×１０^{5}細胞／５００μＬの細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液を各マイクロウェルに充填した。マイクロチャンバーを３００ｒｐｍで２分間、２回遠心し、第二細胞が各マイクロウェルに１個又は２個格納されるように調製した。マイクロチャンバーをＲＰＭＩ１６４０で洗浄した後、１ｍＬのＲＰＭＩ１６４０を入れて３７℃で３０分間インキュベートし、リンパ球からの抗体産生を促した。マイクロウェルを洗浄して上清を除去した後、ＲＰＭＩ１６４０（10% FBS含有）で５００倍希釈したAlexa Fluor 488標識抗マウスＩｇＧ抗体（２次抗体；標識物質）をアプライし、３７℃で３０分間インキュベートした。ＲＰＭＩ１６４０（フェノールレッド不含，1% FBS含有）にて３回洗浄した後、ＲＰＭＩ１６４０を１ｍＬ入れた。セルピッキングシステム（アズワン社）にマイクロチャンバーをセットし、全てのマイクロウェルの透過光画像および２種類の蛍光画像の情報を取得した。

【０１３４】

図６（ａ）～（ｃ）は、第一細胞表面のＡＰＬＮＲに特異的に結合する抗体を産生するリンパ球、すなわち目的細胞が格納されたと判断される陽性のマイクロウェルの画像の一例である。一方、図７（ａ）～（ｃ）は、第一細胞表面のＡＰＬＮＲに特異的に結合しない抗体を産生するリンパ球、すなわち目的外の細胞が格納されたと判断される陰性のマイクロウェルの画像の一例である。図６、７において、（ａ）は透過光、（ｂ）はCytoRed由来の蛍光、（ｃ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光を観察したものである。

【０１３５】

図６（ｃ）に示すように、目的細胞とＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞とが共存したマイクロウェルでは、CytoRedで標識されたＣＨＯ細胞と同じ位置にAlexa Fluor 488の蛍光が観察された。すなわち、目的細胞と共存したマイクロウェル内のＣＨＯ細胞は、Alexa Fluor 488とCytoRedで共染色された。特に、目的細胞（リンパ球）に近い部分に強くAlexa Fluor 488の蛍光が観察された。これにより、ＣＨＯ細胞の表面にAlexa Fluor 488標識抗ＩｇＧ抗体が結合していることが確認された。

【０１３６】

一方、図７（ｃ）に示すように、目的外の細胞とＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞とが共存しマイクロウェルでは、Alexa Fluor 488の蛍光は、CytoRedで標識されたＣＨＯ細胞と同じ位置には観察されず、リンパ球の細胞膜表面から観察されたのみであった。すなわち、ＣＨＯ細胞の表面にAlexa Fluor 488標識抗ＩｇＧ抗体が結合せず、ＣＨＯ細胞はAlexa Fluor 488とCytoRedで共染色されなかった。これにより、ＣＨＯ細胞の表面にAlexa Fluor 488標識抗ＩｇＧ抗体が結合していないことが確認された。

【０１３７】

最終的に、８４６４０個のマイクロウェルから、目的細胞を含む陽性マイクロウェルが４０個特定された。

【０１３８】

陽性マイクロウェルのうち、リンパ球が１個のみ含まれるものを選別した。選別したマイクロウェルから、直径数μｍ～数十μｍのキャピラリーを用いてリンパ球を吸引し、細胞溶解液内に回収した。最終的に、フローサイトメトリーで目的物質に対する結合性が確認された、少なくとも１４種の独立した抗体産生リンパ球が選抜された。

【０１３９】

本実施例の方法によれば、従来の６０日程度かかるハイブリドーマ法を経ずに、直接リンパ組織より所望するリンパ球の選抜を、わずか１日で完了することができた。

【実施例７】
【０１４０】
（７－１）選抜したリンパ球からの抗体遺伝子の単離
実施例５と同様の操作を行い、実施例６で選抜したリンパ球の１つから抗体遺伝子を取得した。
【０１４１】
（７－２）抗体発現ユニットの構築
実施例５と同様の操作を行い、（７－１）で得られた抗体遺伝子から完全長抗体重鎖と完全長抗体軽鎖を発現する２種の抗体発現ユニットを構築した。
【０１４２】
（７－３）哺乳動物細胞への抗体発現ユニット導入
実施例５と同様の操作を行い、（７－２）で得られた抗体発現ユニットをＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に共導入した。導入４８時間後に細胞上清を回収して、発現された抗体の機能性評価に用いた。
【０１４３】
（７－４）フローサイトメトリーを用いたＡＰＬＮＲと抗体との結合性評価
実施例５と同様の操作を行い、（７－３）で得られた組換え細胞が発現する抗体の結合性評価を行った。
【０１４４】
図８にフローサイトメトリーの結果を示す。すなわち、（７－３）で得られた組換え細胞が発現した抗体は、ヒトＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞に対する結合性を有していた。なお当該抗体は、ＡＰＬＮＲを発現していない野生型のＣＨＯ細胞に対する結合性は示さなかった。
一方、図９に示すように、陰性マイクロウェルから回収された目的外のリンパ球を用いた比較例では、組換え細胞が発現した抗体は、ヒトＡＰＬＮＲ安定発現ＣＨＯ細胞に対する結合性を有さなかった。
【０１４５】
実施例６で選抜した他のリンパ球（１３種）についても同様の検討を行った。その結果、全ての抗体がヒトＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞に対する結合性を有していた。さらに、このうち１２種は、ＡＰＬＮＲを発現していない野生型のＣＨＯ細胞に対する結合性は示さなかった。
【０１４６】
以上より、本実施例によって得られた抗体が、ヒトＡＰＬＮＲ発現ＣＨＯ細胞に対する特異的結合性を有することが示された。
【実施例８】
【０１４７】
ＡＰＬＮＲ以外の標的細胞膜タンパク質についても本発明が有効であることを確認するために、ＡＰＬＮＲのリガンドとは別の生理活性脂質をリガンドとするＧＰＣＲについて、実施例１～５と同様の実験を行った。陽性細胞を含むと予想される２７個のマイクロウェルから回収した細胞を解析した。その結果、１８個のマイクロウェルで、標的細胞膜タンパク質を発現するＣＨＯ細胞に対して特異的な結合性を有する抗体を産生する陽性細胞が確認された。
【０１４８】
上記した実施例により、本発明によって、精製困難な細胞膜タンパク質に対して特異的に結合する目的物質を発現する細胞を、その不死化の如何に関わらず、より迅速かつ効率的に選抜できることが示された。さらに本発明によって、細胞膜タンパク質に対する特異的結合物質（例えば、抗体）を容易に製造できることが示された。
【実施例９】
【０１４９】
本実施例では、第一細胞表面の細胞膜タンパク質に目的物質が特異的に結合した際に起

きる、細胞膜タンパク質の活性化に伴う細胞内情報伝達物質の変動を可視化する間接的手法の一例を示す。細胞膜タンパク質としてヒトＧＬＰ－１（Glucagon-like peptide-1）受容体を用い、目的物質としてその特異的結合抗体を用いた。

【０１５０】

実施例１と類似の方法で作成した、ヒトＧＬＰ－１受容体安定発現ＣＨＯ細胞（第一細胞）をＦ－１２培地（10% FBS, Penicillin/Streptomycin含有）で懸濁し、３×１０^{5}細胞／５００μＬの細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液を各マイクロウェルに充填した。マイクロチャンバーを３００ｒｐｍで２分間、２回遠心し、第一細胞が各マイクロウェルに１又は２個格納されるように調製した。

【０１５１】

実施例２と同様の方法でラットに免疫した。実施例３と同様の方法でマウスミエローマと融合した抗体産生ハイブリドーマを作成し、培地から抗体を精製した。精製抗体をＦ－１２培地（Penicillin/Streptomycin含有）で５００ｎＭに希釈した溶液を作成した。この溶液４００μＬをマイクロウェルに添加した。一方、精製抗体を含まない溶液を、同様に、別のマイクロウェルに添加した。溶液の添加後、室温で３０分間静置し、第一細胞と抗体結合との反応を行った。

【０１５２】

その後、Ｆ－１２培地（Penicillin/Streptomycin含有）で５００ｐＭに調整したリガンド（ＧＬＰ－１）を４００μＬ添加（ＧＬＰ－１最終濃度２５０ｐＭ）し、３７℃で１時間インキュベートし、ヒトＧＬＰ－１受容体を活性化させた。マイクロウェルをＰＢＳで洗浄した後、４％パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（和光純薬工業株式会社）を６００μＬ添加して室温で１５分間静置し、第一細胞の固定化を行った。マイクロウェルをＰＢＳで再度洗浄した後、氷冷しておいた９０％メタノールを６００μＬ添加して氷上に１５分間静置し、第一細胞の細胞膜透過処理を行った。マイクロウェルをＰＢＳで洗浄した後、抗体希釈液（1 X PBS, 1% BSA, 0.3% Triton X-100）で１００倍希釈した、Ｓｅｒ１３３のリン酸化を認識するウサギ抗リン酸化－ＣＲＥＢ（クローン87G3）抗体（Cell Signaling TECHNOLOGY）を５００μＬ添加した。室温で１時間静置し、１次抗体反応を実施した。

【０１５３】

ウサギ抗リン酸化－ＣＲＥＢ抗体を検出する蛍光標識２次抗体としてAlexa Fluor 488標識抗ウサギＩｇＧ抗体と、ラット由来の抗体を検出する蛍光標識２次抗体としてDyLight 650標識抗ラットＩｇＧ抗体が、それぞれ２００倍希釈と５００倍希釈になるように抗体希釈液で調整した２次抗体溶液を５００μＬ調製した。１次抗体反応終了後、マイクロウェルをＰＢＳで洗浄し、調製した２次抗体溶液を５００μＬ添加した。室温で１時間静置し、それぞれの抗体の可視化を実施した。マイクロウェルをＰＢＳで洗浄した後、ＰＢＳを１ｍＬ入れた。セルピッキングシステムにマイクロチャンバーをセットし、透過光画像および２種類の蛍光画像の情報を取得した。Alexa Fluor 488の蛍光検出は、励起波長４８２ｎｍ、蛍光波長５３６ｎｍの条件で行った。DyLight 650の蛍光検出は、励起波長６２８ｎｍ、蛍光波長６９２ｎｍの条件で行った。

【０１５４】

代表例として、８個のマイクロウェル（Ｎｏ．１～Ｎｏ．８）の蛍光強度と、２個のマイクロウェル（Ｎｏ．１とＮｏ．５）の蛍光画像を基にして、結果と考察を以下に記載する。ここで、Alexa Fluor 488由来の蛍光は、リガンド（ＧＬＰ－１）添加による細胞内ｃＡＭＰの上昇を介したリン酸化ＣＲＥＢに由来している。すなわち、Alexa Fluor 488由来の蛍光は、細胞膜タンパク質（ＧＬＰ－１受容体）の活性化の有無を反映している。ＧＬＰ－１受容体が活性化されると、Alexa Fluor 488由来の蛍光強度が高くなる。一方、DyLight 650由来の蛍光は、第一細胞表面における抗体に由来している。すなわち、DyLight 650由来の蛍光は、添加した抗体の第一細胞表面への結合の有無を反映している。抗体が第一細胞表面に結合すると、DyLight 650由来の蛍光強度が高くなる。

【０１５５】

表１は、８個のマイクロウェルについて、Alexa Fluor 488由来の蛍光強度と、DyLight 650由来の蛍光強度をまとめたものである。図１０は、２個のマイクロウェル（Ｎｏ．１とＮｏ．５）の画像を表す写真であり、（ａ）は透過光、（ｂ）はAlexa Fluor 488由来の蛍光、（ｃ）はDyLight 650由来の蛍光を観察した結果である。

【０１５６】

【表１】

表1

ウェル番号	Alexa Fluor 488 強度	DyLight 650 強度
1	84.1	166.78
2	95.7	163.4
3	95.98	155.62
4	94.29	176.68
5	255	9.11
6	251.12	9.95
7	237.69	8.79
8	233.66	9.15

【０１５７】

図１０（ｂ）に示すように、Alexa Fluor 488由来の蛍光は、Ｎｏ．１のマイクロウェルの方が弱かった。また表１に示すように、Ｎｏ．１のAlexa Fluor 488由来の蛍光強度は、Ｎｏ．５の１／３程度であった（８４．１ 対 ２５５）。これは、Ｎｏ．１のマイクロウェルではＧＬＰ－１機能（ＧＬＰ－１受容体の活性化）が阻害され、一方、Ｎｏ．５のマイクロウェルではＧＬＰ－１機能が阻害されていないことを示している。

【０１５８】

図１０（ｃ）に示すように、DyLight 650由来の蛍光は、Ｎｏ．１のマイクロウェルの方が強かった。表１に示すように、Ｎｏ．１のDyLight 650由来の蛍光強度は、Ｎｏ．５の約１８倍であった（１６６．７８ 対 ９．１１）。これは、Ｎｏ．１のマイクロウェルでは、添加した抗体が第一細胞表面に強く結合していることを示している。またＮｏ．５のマイクロウェルでは、抗体が第一細胞表面に結合していないことを示している。

【０１５９】

また表１に示すように、Alexa Fluor 488由来の蛍光強度が強いマイクロウェルでは、DyLight 650の蛍光強度が低かった（Ｎｏ．５～Ｎｏ．８参照）。上記の結果より、リン酸化ＣＲＥＢ量に対応する蛍光強度の相対的低下は、ヒトＧＬＰ－１受容体活性化に起因する細胞内ｃＡＭＰの上昇が阻害されていることを示している。

【０１６０】

本実施例の方法により、第一細胞表面のヒトＧＬＰ－１受容体に特異的に結合して受容体の機能を阻害する抗体を含むマイクロウェルを同定することができる。また同様の原理で、受容体の機能を促進する抗体を含むマイクロウェルを同定することもできる。また、精製抗体の代わりに、ハイブリドーマ（例えば、実施例４）や抗体産生リンパ球細胞（例えば、実施例６）のような第二細胞をマイクロウェルに入れて、機能性抗体（目的物質）を生産する目的細胞を含むマイクロウェルを同定することができる。そして、同定されたマイクロウェルから、目的細胞を単一細胞として分離することができる。前記機能性抗体には、受容体の機能を阻害する抗体と、促進する抗体の両方が含まれる。

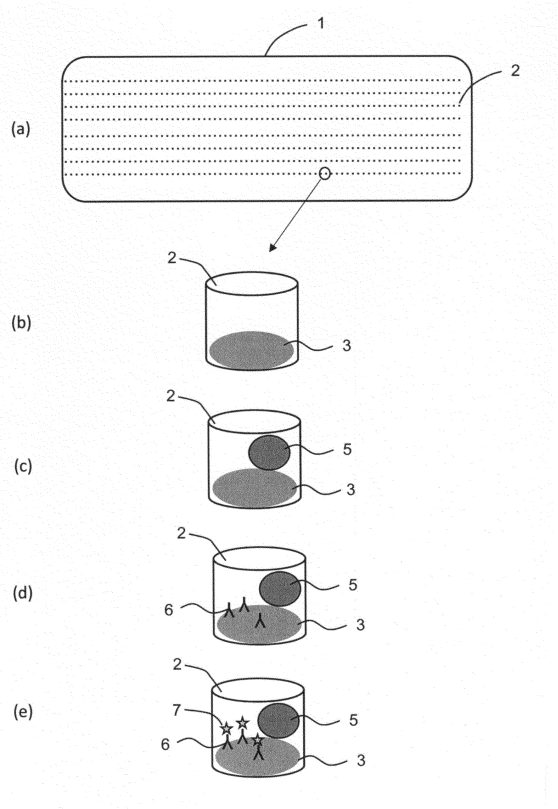
【符号の説明】

【０１６１】

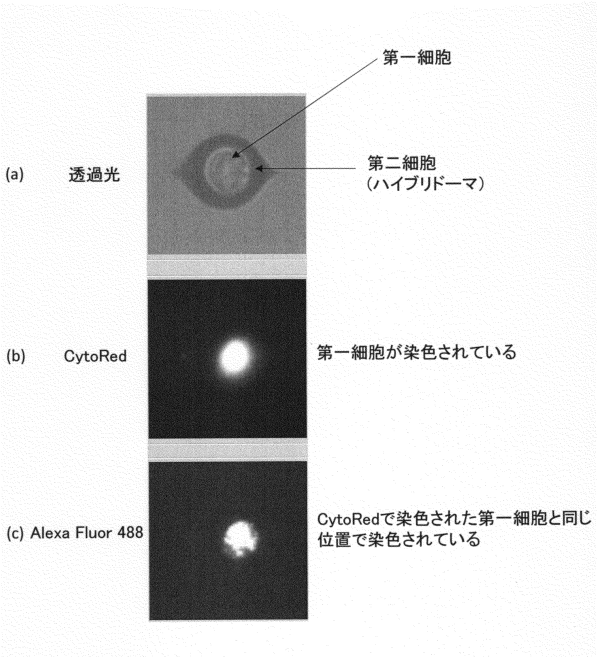
１　基板

2　マイクロウェル
3　第一細胞
5　第二細胞
6　目的物質
7　標識物質

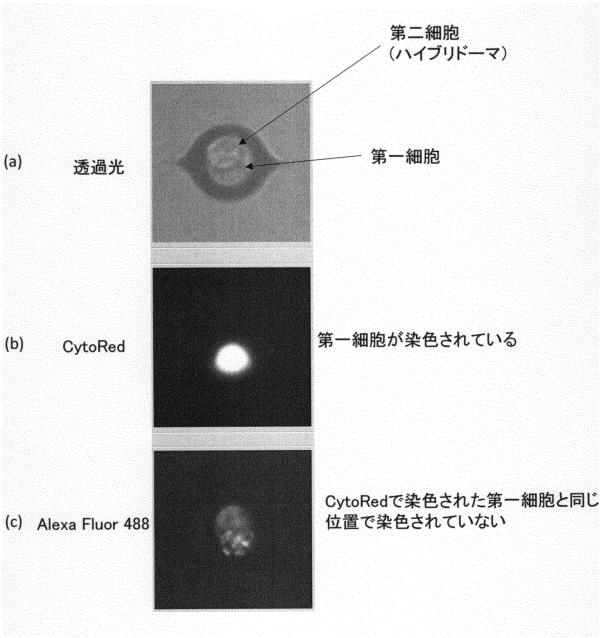
【図１】



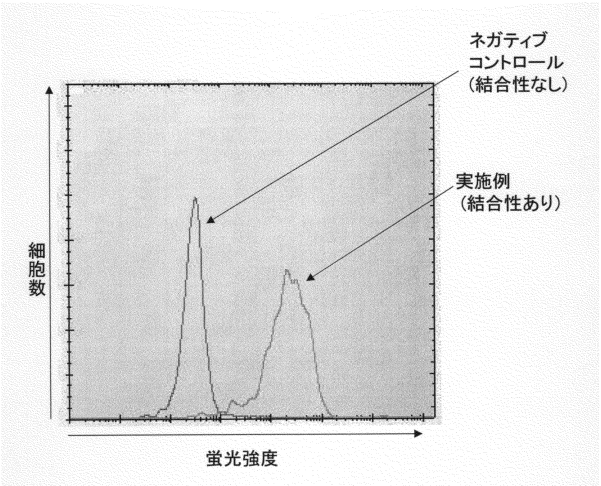
【図２】



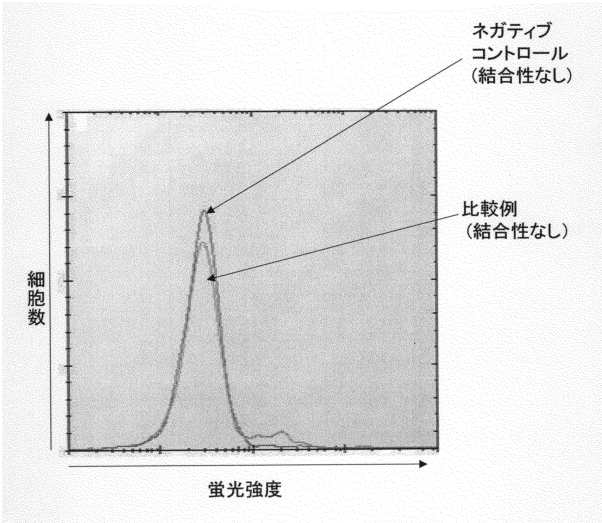
【図３】


第二細胞
（ハイブリドーマ）
(a)
透過光
第一細胞
(b)
CytoRed
第一細胞が染色されている
(c)
Alexa Fluor 488
CytoRedで染色された第一細胞と同じ
位置で染色されていない

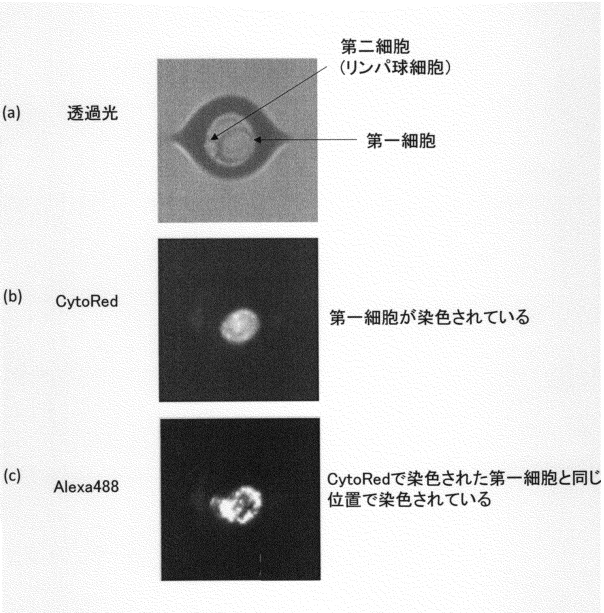
【図４】


ネガティブ
コントロール
（結合性なし）
実施例
（結合性あり）
細胞数
蛍光強度

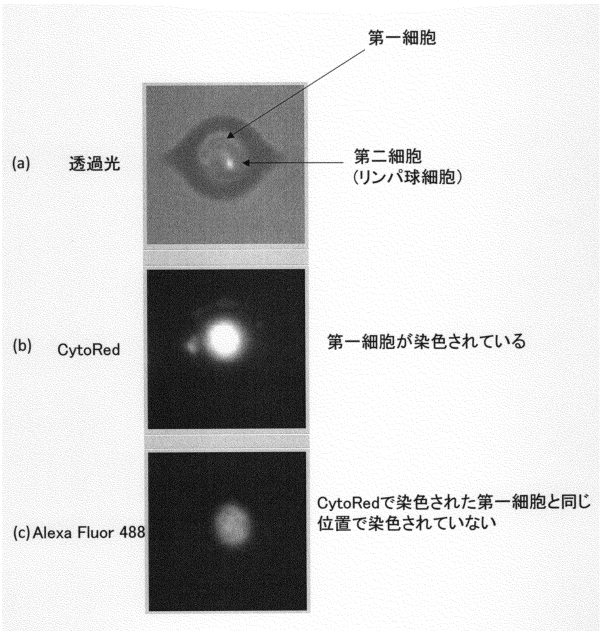
【図５】


ネガティブ
コントロール
（結合性なし）
比較例
（結合性なし）
細胞数
蛍光強度

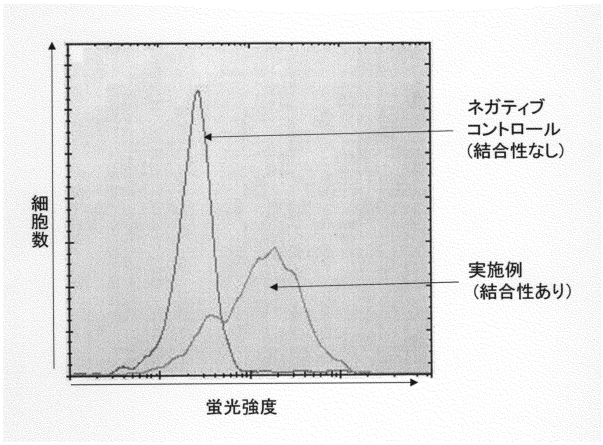
【図６】


第二細胞
（リンパ球細胞）
(a)
透過光
第一細胞
(b)
CytoRed
第一細胞が染色されている
(c)
Alexa488
CytoRedで染色された第一細胞と同じ
位置で染色されている

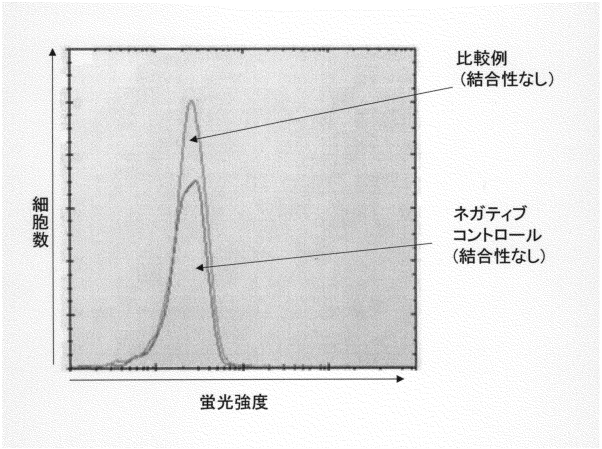
【図７】


第一細胞
(a) 透過光
第二細胞
（リンパ球細胞）
(b) CytoRed
第一細胞が染色されている
(c) Alexa Fluor 488
CytoRedで染色された第一細胞と同じ
位置で染色されていない

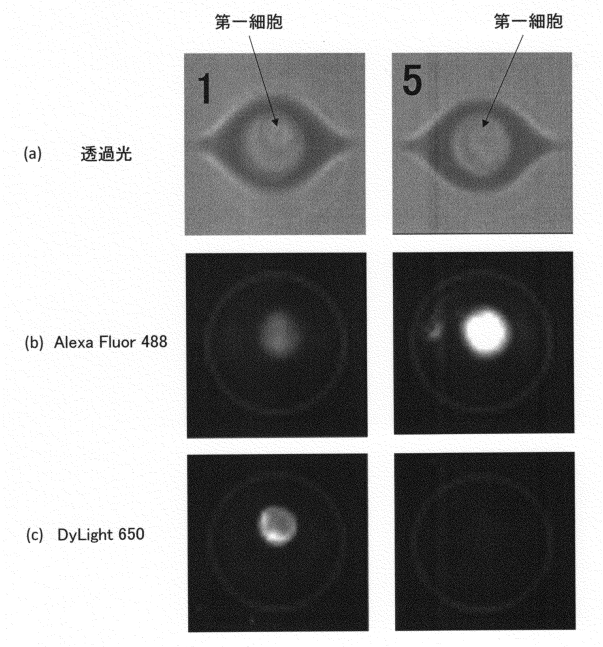
【図８】


細胞数
ネガティブ
コントロール
（結合性なし）
実施例
（結合性あり）
蛍光強度

【図９】


細胞数
比較例
（結合性なし）
ネガティブ
コントロール
（結合性なし）
蛍光強度

【図１０】


第一細胞
第一細胞
1
5
(a) 透過光
(b) Alexa Fluor 488
(c) DyLight 650

【配列表】
0006881801000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C07K	16/00	
C12P	*19/34*	*(2006.01)*	C12P	19/34	Z
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00	
A61K	*31/7088*	*(2006.01)*	A61K	31/7088	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	105
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N
G01N	*33/543*	*(2006.01)*	G01N	33/53	Y
			G01N	33/53	D
			G01N	33/543	575

(72)発明者 ▲高▼山 喜好
北海道札幌市北区北二十一条西十二丁目２ 株式会社エヌビィー健康研究所内

審査官 林 康子

(56)参考文献 国際公開第２０１７／０５７２３４（WO，Ａ１）
特開２００４－１７３６８１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００２／０３７０９９（WO，Ａ１）
特表２００３－５２２９４８（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００７／０１１１２０１（ＵＳ，Ａ１）
特開２０１０－２８１５９５（ＪＰ，Ａ）
特開２００９－０３４０４７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１４－１１０７８５（ＪＰ，Ａ）
特開２００５－２６１３３９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５１５５４８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５１１１５５（ＪＰ，Ａ）
生物工学会誌，2011，89(2)，pp.72-78

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ １／００
Ｃ１２Ｐ ２１／０２
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）