(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002年7月4日 (04.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/052032 A1

(51) 国際特許分類7: C12Q 1/02, C12N 15/09, 5/10, G01N 33/15, 33/48, 33/50, 33/566, 33/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11301

(22) 国際出願日: 2001年12月21日 (21.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-391234
2000年12月22日 (22.12.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都 北区浮間 5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 周郷 泉 (SUGO,Izumi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 吉田 賢二 (YOSHIDA,Kenji) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外(ISHIDA,Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF MEASURING CELL DEATH OF TARGET CELLS

(54) 発明の名称: 標的細胞の細胞死の測定方法

(57) Abstract: A method of measuring the cell death of target cells characterized in that target cells containing a gene encoding a membrane protein capable of inducing cell death and a gene encoding a marker protein are incubated and then the marker protein leaked outside the cells due to cell death is measured.

(57) 要約:

標的細胞の細胞死を測定する方法において、細胞死を誘起し得る膜タンパク質をコードする遺伝子及びマーカータンパク質をコードする遺伝子を含有する標的細胞をインキュベートし、細胞死により細胞外に漏出するマーカー蛋白質を測定することを特徴とする方法。

WO 02/052032 A1

明 細 書

標的細胞の細胞死の測定方法

発明の分野

本発明は標的細胞の細胞死の新規な測定方法に関する。

背景技術

抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）のような膜蛋白質に起因する反応により誘起される細胞死を測定する方法としては、^{51}Crを取り込ませた細胞を標的細胞として用い、細胞傷害により細胞外に漏出する^{51}Cr量を測定する方法がある。しかし、一般に、ラジオアイソトープ(RI)を使用する方法では、実験施設がRI管理区域内に制限され、^{51}Crの年間使用量の制限、実験者のRI従事者登録など汚染防止、実験従事者保護の立場から厳重な管理下での実施が要求される。

RIの取り扱いを含まない細胞死の検出方法としては、特開平10-215868号公報の実施例において、細胞死により細胞外に漏出するβガラクトシダーゼを測定することにより細胞傷害性Ｔ細胞の主要組織適合性複合体(MHC)に依存する細胞傷害活性を検出している。

しかし、細胞傷害性Ｔ細胞の細胞傷害活性（CTL活性）は標的細胞のMHCに拘束された抗原量がわずかな場合でも測定が可能であるのに対し（Christinck E.R. et al., Nature 352(1991), 67-70）、ADCC活性は標的細胞に膜蛋白質として発現している抗原の量に依存し、抗原量が少ない場合はADCC活性を測定することはできない（Ohtomo T. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 258(1999), 583-591）。すなわち、ADCC活性を含む細胞

の膜蛋白質に起因する反応により誘起される細胞死を測定するためには、標的細胞が膜蛋白質を安定に発現していることが必要である。

発明の開示

本発明は、膜蛋白質に起因する反応により細胞死を誘起するのに充分な量の膜蛋白質を発現しているとともに、非ＲＩマーカーを発現している標的細胞を用い、細胞死により細胞外に漏出するマーカーを検出することにより概標的細胞の細胞死を測定する方法を提供することを目的とする。

上記の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、細胞死を誘起し得る膜蛋白質をコードする遺伝子及びマーカー蛋白質をコードする遺伝子の両者を安定して発現することができる形質転換された細胞を構築することに成功し、本発明を完成した。

従って本発明は、標的細胞の細胞死を測定する方法において、細胞死を誘起し得る膜蛋白質をコードする遺伝子及びマーカー蛋白質をコードする遺伝子を含有する標的細胞をインキュベートし、細胞死により細胞外に漏出するマーカー蛋白質を測定することを特徴とする方法を提供する。

前記細胞死を誘起し得る膜蛋白質は、抗体又はリガンドの結合により細胞に細胞死を誘起するものであればよく、例えばHM1.24抗原(BST-2)蛋白質又はFas抗原蛋白質である。前記インキュベーションは、好ましくは前記細胞死を誘起し得る膜蛋白質に対する抗体又はリガンドの存在下で行われる。前記インキュベーションは、好ましくはエフェクター細胞の存在下で行われる。

前記標的細胞は、好ましくは膜蛋白質の安定発現系が得られる細胞である。前記標的細胞は、好ましくはCHO細胞である。前記マー

カーは、好ましくは酵素である。前記マーカーは、好ましくはβガラクトシダーゼである。

本発明はまた、標的細胞の細胞死を誘起又は抑制する物質のスクリーニング方法において、細胞死を誘起し得る膜蛋白質をコードする遺伝子及びマーカー蛋白質をコードする遺伝子を含有する標的細胞を、被検物質と共にインキュベートし、細胞死により細胞外に漏出するマーカー蛋白質を測定することを特徴とする方法を提供する。

前記細胞死を誘起し得る膜蛋白質は、抗体又はリガンドの結合により細胞に細胞死を誘起するものであればよく、例えばHM1.24抗原(BST-2)蛋白質又はFas抗原蛋白質である。前記インキュベーションは、好ましくは前記細胞死を誘起し得る膜蛋白質に対する抗体又はリガンドの存在下で行われる。前記インキュベーションは、好ましくはエフェクター細胞の存在下で行われる。

前記標的細胞は、好ましくは膜蛋白質の安定発現系が得られる細胞である。前記標的細胞は、好ましくはCHO細胞である。前記マーカーは、好ましくは酵素である。前記マーカーは、好ましくはβガラクトシダーゼである。

本発明はまた、標的細胞の細胞死の測定又は標的細胞の細胞死を誘起もしくは抑制する物質のスクリーニング方法に使用するための標的細胞であって、細胞死を誘起し得る膜蛋白質をコードする遺伝子及びマーカー蛋白質をコードする遺伝子を含有し、該膜蛋白質に起因する反応により誘起される細胞死により前記マーカー蛋白質を漏出する細胞を提供する。

前記細胞死を誘起し得る膜蛋白質は、抗体又はリガンドの結合により細胞に細胞死を誘起するものであればよく、例えばＨＭ1.24抗原(BST-2)蛋白質又はFas抗原蛋白質である。

好ましくは、前記膜蛋白質に対する抗体又はリガンドの存在下でのインキュベーションにより前記マーカー蛋白質が漏出する。

好ましくは、エフェクター細胞の存在下でのインキュベーションにより前記マーカー蛋白質を漏出する。

前記標的細胞は、好ましくは膜蛋白質の安定発現系が得られる細胞である。前記標的細胞は、好ましくはCHO細胞である。前記マーカーは、好ましくは酵素である。前記マーカーは、好ましくはβガラクトシダーゼである。

図面の簡単な説明

図１はpβ-gal-IRES2-EGFP-Fの導入によりβガラクトシダーゼが発現する細胞に、HM抗原の発現していることを示すグラフである。

図２は、pβ-gal-IRES2-EGFP-Fの導入によりβガラクトシダーゼを発現する細胞をGalacton-star mammalian kitに従い 細胞溶解した場合と、細胞溶解を行わなかった場合の培地中のβガラクトシダーゼの活性を示すグラフであり、βガラクトシダーゼが発現していることを示している。

図３は、図２の場合と同じ細胞において、緑色蛍光蛋白質(EGFP-F)が発現していることを示すグラフである。図２と図３の比較において、βガラクトシダーゼの発現量と、EGFP-Fの発現量との間に順位相関があることが示される。

図４は、膜蛋白質HMを発現する細胞にpβ-gal-IRES2-EGFP-Fを導入した細胞を、抗HM抗体とエファクター細胞の存在下にインキュベートした場合に、抗HM抗体の濃度に依存して細胞傷害すなわちβガラクトシダーゼの細胞外への漏出が生ずることを示すグラフである。

図５は、図４の実験系で、細胞を界面活性剤で溶解したときに、

溶解された細胞が100個以上有れば、マーカー蛋白質が検出されること、及び細胞が溶解されなければマーカー蛋白質が細胞外に漏出されないことを示すグラフである。

図６は、図４の実験系で、市販のPBMCをIL-2刺激することにより、抗体依存的な細胞障害活性と抗体非依存的な細胞障害活性が観察できることを示すグラフである。

発明の実施の形態

細胞死を誘起し得る膜蛋白質としては、抗体又はリガンドの結合により細胞に細胞死を誘起するものであればよく、例えばHM1.24抗原(BST-2)蛋白質、Fas抗原蛋白質、IAP、erbB2等が挙げられる。

HM1.24抗原蛋白質は、徳島大学　小阪等によって作製された抗HM1.24抗体(Goto T. et al., Blood 84(1994), 1922-1930)の認識する抗原である。抗HM1.24抗体は、ヒトミエローマ細胞株KPC-32を免疫原として用い得られたマウスモノクローナル抗体であり、骨髄腫細胞表面に高発現するHM1.24抗原を認識し、エフェクター細胞存在下でADCC活性を誘導し、抗腫瘍作用を示すことが明らかにされてきた(Ozaki S. et al., Blood 90(1997), 3179-3186)。

この抗体が認識するHM1.24抗原蛋白質は、分子量29-33kDaの膜蛋白質であり、その遺伝子クローニングの結果、骨髄腫又は関節リュウマチ患者由来のストローマ細胞に高発現するBST-2(Ishikawa J. et al., Genomics 26(1995), 527-534)と同一の分子であることが明らかとなった(Ohtomo T. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 258(1999), 583-591)。

Fas抗原蛋白質／CD95は、細胞膜に存在するTNF－受容体ファミリーに属する蛋白質であり細胞内にDeath Domainを有しており（Yonehara S. et al., J.Exp.Med. 169(1989)1747-1756）、Fasリガンド

(Cheng J. et al., Science 263(1994)1759) やアゴニスト作用を持つ抗Fas抗体(Cifone M.G. et al., J.Exp.Med. 180(1994)1547)によりアポトーシスを誘導する蛋白質として知られている。

本発明の標的細胞は、細胞死を誘起することができる蛋白質、例えば上記のHM1.24抗原(BST-2)蛋白質、Fas抗原蛋白質等により細胞死、例えばアポトーシスを起こして死亡する細胞であればよいが、好ましくは動物細胞、例えばCHO細胞、293細胞、L細胞、NIH/3T3細胞、等を使用することができる。

本発明のマーカー蛋白質は、前記の細胞死を誘起することができる蛋白質と同時に前記標的細胞中で発現され得、細胞死の際に細胞外に漏出し、且つそれ自体が検出可能なマーカー機能を有するか、又は検出可能なマーカーにより標識され得るものであればよい。このようなマーカー蛋白質としては、酵素、例えばβガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等；発光基質として例えば、ルシフェリン、CSPD（TROPIX社）、Galacton-star（TROPIX社）等を用いることができる。

βガラクトシダーゼの検出は、例えば次のようにして行うことができる。βガラクトシダーゼ活性を高感度で検出・定量する方法として、発光基質を用いた方法が知られている。即ち、βガラクトシダーゼ1μU（＝約1pg＝約10^5分子）-100mUを発光基質液、例えばGalacton-starと反応させることにより、βガラクトシダーゼ量に応じた発光量が得られる。この化学発光は、ARVO-sx5（WALLAC社）等の光学機器を用いて測定することができる。

本発明において、細胞死を生じさせるには、細胞死を誘起させることができる膜蛋白質がHM1.24抗原(BST-2)蛋白質である場合、この蛋白質及びマーカー蛋白質を発現させることができる標的細胞を、該HM1.24抗原(BST-2)蛋白質に対する抗体及びエフェクター細胞

の存在下にインキュベートすればよい。また、細胞死を誘起させることができる膜蛋白質がFas抗原蛋白質である場合、この蛋白質及びマーカー蛋白質を同時に発現させることができる標的細胞を、Fas抗原蛋白質のリガンドの存在下にインキュベートすればよい。

エフェクター細胞としては末梢血単核細胞(PBMC)、NK細胞、サイトカイン刺激した単球細胞等が使用され、例えばPBMCは次のようにして調製される。

健常人の末梢血より比重遠心法で分離した単核細胞を用いる場合、健常人の末梢血に等量のPBSを加え、Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia)に積層し、500gで30分間遠心し分離することができる。単核球相を分取し、10%FBS (GIBCO社)を含むRPMI1640 (GIBCO社)で３回洗浄後、同培養液で細胞数を調製すればよい。

細胞死を誘起することができる蛋白質に対する抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、抗体断片等を使用することができ、これらは常法に従って入手、又は調製することができる。HM1.24抗原に対する抗体、特にモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体などはすでに記載されており、例えば抗HM1.24抗体 (Goto T. et al., Blood 84(1994), 1922-1930) 、キメラ及びヒト型化抗HM1.24抗体 (WO98/14580) 等が挙げられ、上記の抗HM1.24抗体は、上記の文献に記載の方法により得ることができた。

ヒトFas抗原蛋白質のリガンドとしては、細胞死を誘導できる抗ヒトFasモノクローナル抗体CH-11 ((株) 医学生物学研究所、No.SY-001) 等が入手可能である。

本発明の標的細胞の培養は、例えば動物細胞を培養するための常法に従って、培養することができる。培養器の表面に付着した細胞は、例えば、トリプシン処理など常法に従って剥がし、細胞懸濁液

を得ることができる。

本発明の細胞死の測定は、例えば上記のごとく培養し、懸濁した細胞を10^3個／ml以上の濃度に、例えばα-MEM培地中に調製し、前記膜蛋白質に対する抗体又はリガンドを添加してインキュベートし、さらにエフェクター細胞／標的細胞比として8/1～100/1の濃度となるようにエフェクター細胞を加えてインキュベートすることにより行う。あるいは、前記抗体又はリガンド及びエファクター細胞の共存下でインキュベーションを行うこともできる。インキュベーションの時間は４時間～24時間であり、温度は例えば37℃である。このインキュベーションにより細胞死が生じ、その結果マーカー蛋白質が細胞から培地中に漏出する。従って、培養上清を採取し、その中に存在するマーカー蛋白質を、前記のようにして測定することにより、細胞死の程度を測定することができる。

本発明の細胞死の測定は、前記膜蛋白質に対するリガンドのスクリーニング（すなわち、ある被検物質がリガンドであるか否かの決定）、又は膜蛋白質に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング（すなわち、ある被検物質が、アンタゴニスト又はアゴニストであるか否かの決定）のために特に有用である。このスクリーニングにおいては、上記の細胞死の測定方法において、標的細胞と、それに対する抗体もしくはリガンド及び／又はエフェクター細胞とのインキュベーションを、被検物質の存在下で行えばよい。

被検物質を加えた系（試験系）での細胞死、すなわちマーカー蛋白質の漏出量と、被検物質を加えない系（対照）での細胞死、すなわちマーカー蛋白質の漏出量とを比較することにより、被検物質がリガンドであるか否か、あるいはアゴニストもしくはアンタゴニストであるか否かを知ることができる。

すなわち、対照系に比べて試験系でのマーカー蛋白質の漏出が多

い場合は、被検物質はリガンド又はアゴニストと判定され、その逆の場合はアンタゴニストと判定される。

実施例

次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例１．　HM1.24抗原(BST-2)を発現する細胞CHO#30の作製

細胞死を誘導する膜蛋白質であるHM1.24抗原蛋白質を発現するCHO#30細胞を次のようにして作製した(Ohtomo T. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 258(1999), 583-591)。即ち、DHFRを欠損したCHO細胞株に、HM1.24抗原をコードする発現ベクターp3.19（上記文献）を導入し、500μg/mlのG418で選択し、さらに限界希釈法によりCHO#30細胞株を得た。

実施例２．　マーカー遺伝子を含む発現ベクターの構築

サイトメガロウイルスプロモーターの制御下にβガラクトシダーゼ遺伝子を含んで成るプラスミド(pCMV/β-gal)(PEバイオシステムズより入手No.AV20C)をBamHIにより消化し、βガラクトシダーゼ遺伝子を含むDNA断片を得た。pIRES2-EGFP-F（クロンテック社）を消化し、これに前記のβガラクトシダーゼ遺伝子を含むＤＮＡ断片を組み込んで、IRES2により連結されたβガラクトシダーゼと緑色蛍光蛋白質(EGFP-F)とをコードする遺伝子をCMVプロモーターの制御下に含んで成るプラスミドpβ-gal-IRES2-EGFP-Fを構築した。このプラスミドにはさらに、形質転換細胞の薬剤選択が可能なようにSV40プロモーターの制御下にネオマイシン耐性遺伝子が含まれている。

このプラスミドを大腸菌DH5α（東洋紡）を用いて増やし、回収したプラスミドをQiagen Maxiカラム（Qiagen社）により精製し、SacI消化により約2.2kbpのDNA断片が生ずること、及び連結部位の塩

基配列の確認により構造を確認した。その結果、pβ-gal-IRES2-EGFP-Fを得た。

実施例３． CHO#30細胞へのpβ-gal-IRES2-EGFP-Fの導入及びクローニング

（１）形質転換

CHO#30細胞を1×10^{5} 細胞を12ウエルプレートにプレートし、血清を含むα-MEM培地（核酸含有：Gibco社）中で一晩培養した後、血清を含まないOPTI-MEM(Gibco社)0.5mLあたり（１）３マイクロＬのリポフェクタミン(Lipofectamin)/0.25μgのpIRES2-EGFP-F(Mocとして）、（２）3μLのリポフェクタミン／0.25μgのpβ-gal-IRES2-EGFP-F(D0.25/L3)、（３）3μLのリポフェクタミン／0.5μgのpβ-gal-IRES2-EGFP-F(D0.5/L3)、又は（４）5μLのリポフェクタミン／0.25μgのpβ-gal-IRES2-EGFP-F(D0.25/L5)を培地を除き洗浄した前記細胞に添加し４時間培養した後、血清を含むα-MEM（核酸含有：Gibco社）を1.5mL追加し培養を行い、遺伝子導入を行った。

（２）マーカー遺伝子の発現の確認

導入遺伝子のマーカーとしての緑色蛍光プロテイン(GFP)の発現を調べるため、上記の培養細胞をトリプシン－EDTAによりウエルから剥がし、リン酸緩衝液(PBS)により洗浄し、PBSに懸濁した。次にEPICS-ELITE(BECKMAN COULTER社)を用いて、GFPの発現により強く蛍光を発する細胞を分取した。回収した細胞は、10％ウシ胎児血清(FCS)を含むα-MEM（核酸添加）培地で洗浄し、６ウエルプレート中、10％ＦＣＳ及び0.5mg／mLのジェネテシン（G418:Gibco社）を含有するα-MEM（核酸添加）培地中で培養・保存した。

この結果、遺伝子導入後２日目にフローサイトメーターによりGFPの一過性発現を解析した場合、pIRES2-EGFP-Fを導入したCHO#30細胞(Moc)において約40％のGFP陽性細胞が観察され、pβ-gal-IRES2-

EGFP-Fを導入した細胞において約10%のGFP陽性細胞が観察され、遺伝子導入時の条件(D0.25/L3、D0.05/L3、又はD0.25/L5)により殆んど差がなかった。また、GFPの発現（EGFP-Fとして）は蛍光顕微鏡においても観察された。

他方、pβ-gal-IRES2-EGFP-Fを導入した細胞におけるβガラクトシダーゼの発現量を測定した。すなわち、培養したCHO#30細胞をトリプシンーEDTAで剥がし、1x10^{4} 細胞／100μL／ウエルとなるように丸底96ウエルプレートにまいた。プレートの各ウエルに細胞溶解液（Galacton-starアッセイキット）を100μLまたは培地(10%FCS α-MEM)100μLを加え４時間CO_2 インキュベーターの中においてインキュベートした。反応液を20μLずつ96well white plateにとり、Galacton-starを含む反応緩衝液を100μL加えた。室温で、１時間反応させた後、発光量をALVO-sx5で測定した。

その結果、培地中で前記インキュベートした際に自然漏出したβガラクトシダーゼ活性が4109.5RLU（相対発光ユニット）であるのに対して、細胞溶解液中でインキュベートした際の最大漏出量は25280.5RULであった。

しかし、遺伝子導入後６日目にフローサイトメーターでEGFP-Fの発現を解析するとMOC細胞、及びpβ-gal-IRES2-EGFP-F導入細胞では、どちらもGFP陽性細胞は約１％しか残っていなかった。そこで、遺伝子導入後３週間程度培養したD0.5L3の細胞からGFP陽性細胞をセルソーターにより回収した。その結果、約10万個の細胞から約300個のGFP陽性細胞が回収され（回収率約0.3%）、回収された細胞を２週間培養し増やした結果、GFP陽性率は約30%になった。

（３）限界希釈法によるβガラクトシダーゼ陽性細胞の単クローン化

前記セルソーターにより回収された、GFP陽性細胞が濃縮された

細胞群を10％FCS及び0.5mg／mLのジェネテシンを含有するα-MEM（核酸添加）中で培養し、トリプシン－EDTAにより剥がし、PBSにより洗浄した後、細胞数を測定し、1細胞／mLとなるように、10％FCS及び0.5mg／mLのジェネテシンを含有するα-MEM（核酸添加）培地に懸濁した。この細胞懸濁液を96ウエルプレートの各ウエルに100μLづつ分配し、各ウエル中の生育してきた細胞を活性測定用及び植え継ぎ用の2つに分けて90ウエルプレートで培養し、活性測定用培養物を用いてβガラクトシダーゼ活性を測定した。

なお、βガラクトシダーゼの測定は、培養細胞をウエルからトリプシンEDTAで剥がし、培地を加え100μLとし、Galacton-screanを100μLずつ加え室温で1時間反応させた後発光量をALVO-sx5で測定した。その結果、βガラクトシダーゼ高発現株として、CHO#30-20,CHO#30-21,CHO#30-40の3株が得られた。

（4）βガラクトシダーゼ高発現株のHM抗原発現量。

pβ-gal-IRES2-EGFP-Fの遺伝子導入により、CHO#30の性質がβガラクトシダーゼとEGFP-Fの発現以外で変化する可能性がある。そこでCHO#30細胞株のHM抗原の発現が失われていないかを確認した。すなわち、前記において選択したβガラクトシダーゼ安定発現細胞株の細胞をトリプシン－EDTAで剥がした後、PBSで洗浄した。フルオレセインで標識したIgG(FITC-IgG)またはフルオレセインで標識した抗－HM抗体(FITC-AHM)4μgとともに4℃で1時間反応させPBSで洗浄した後、EPICS-XL-MCLでフルオレセイン(FITC)を指標として解析した。その結果、CHO#30-20,CHO#30-21及びCHO#30-40細胞株においてHM1.24抗原の発現が確認された（図1）。

（5）βガラクトシダーゼ安定発現株のβガラクトシダーゼ活性とEGFP-F発現量

βガラクトシダーゼ高発現株として得られた、3株のβガラクト

シダーゼ発現量とEGFP-F発現量を比較した。その結果、βガラクトシダーゼ発現量とEGFP-F発現量はCHO#30-20>CHO#30-40>CHO#30-21の様になり、βガラクトシダーゼ発現量とEGFP-F発現量には順位相関が見られた（図２及び図３）。

なお、図２に示すβガラクトシダーゼの発現量は、１ x 10^3 細胞につき、前記（２）に記載したのと同様にして測定した細胞であり、図３に示すEGFP-Fの発現量はEPICS-XL-MCLを用いて波長525nmの蛍光を検出することにより測定したものである。

（６）βガラクトシダーゼ高発現CHO#30株の発現安定性

CHO#30-20株を長期培養した際のβガラクトシダーゼ発現量を比較した。その結果CHO#30-20株を単クローン化した後の継代培養は、約２ヶ月間にわたって安定してβガラクトシダーゼを発現した（平均16432.2RLU/1x10^3 cells、%CV13.4）。

実施例４．ＰＢＭＣを用いたADCC活性測定法

エフェクター細胞として健常人の末梢血より比重遠心法で分離した単核球を用いた。すなわち、健常人の末梢血に等量のPBSを加え、Ficoll-PaquePLUS(Pharmacia)に積層し、500gで30分間遠心した。単核球相を分取し、10%FCSを含むRPMI1640で３回洗浄後、10%FCSを含むα-MEMで細胞数が5x10^6 ／mLになるように調製した。

トリプシン－EDTAで剥がし、10%FCSを含むα-MEMで懸濁した2x10^5 細胞／mLのβガラクトシダーゼ安定発現CHO#30細胞株50μLと、様々な濃度の抗HM1.24抗体50μLを96ウエルＵ底プレートに加え、４℃で15分間反応させた。ついでエフェクター細胞100μLを加え、37℃で４時間培養した。培養後、20μLの培養上清を採取し、βガラクトシダーゼ活性を測定した。最大遊離酵素量はGalactone-starアッセイキットの細胞溶解緩衝液により遊離される酵素量とした。

細胞傷害活性は、

$$\text{細胞傷害活性（％）（％}\beta\text{－ガラクトシダーゼ）} = \frac{A - C}{B - C} \times 100$$

として計算した。ここでＡは抗体存在下において遊離されたβガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)、Ｂは細胞溶解緩衝液により遊離されたβガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)、Ｃは抗体を含まず培養液のみで遊離されたβガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)を示す。

結果を図４に示す。いずれのβガラクトシダーゼ安定発現細胞株においても、抗HM1.24抗体濃度依存的にβガラクトシダーゼが放出され、抗体濃度依存的に細胞死が生ずることが確認された。

実施例５．βガラクトシダーゼ高発現株の溶解に基づく活性の出現

βガラクトシダーゼ高発現CHO#30株を100，625，1000，1250，2500，10000，および20000／ 100μＬ／ wellの密度に8 wellsずつ播き込み、その内の4 wellsにβガラクトシダーゼ検出キット(PE Biosystems, Cat. No. BM300S)附属のlysis solution、残り4 wellsにＰＢＳを100μＬ／ wellずつ添加し、37℃、5%CO2存在下で1.5時間培養した。ついで、その上清20μＬをあらかじめ分注したβガラクトシダーゼ活性検出キットの基質100μＬ／ wellに加え、室温で1時間培養し、ALVO-sx5で化学発光を測定した。その結果、lysis solutionを添加したものについては、播き込んだ細胞数に依存してβガラクトシダーゼ活性が検出された。一方、ＰＢＳを添加したものでは活性は検出されなかった（図５）。

実施例６．IL-2刺激した市販ヒト抹消血単核球画分の細胞傷害活性に対するＥ／Ｔ比の影響

βガラクトシダーゼ高発現CHO#30株を5000／ 50μＬ／ wellの密度に播き、ついで抗HM1.24抗体（終濃度1または0 μｇ／ｍＬ）を含むα－ＭＥＭ培地（核酸添加）を50μＬ／ well加え、更にあらか

じめ150 unit/ mLのIL-2で18時間培養した市販のヒト抹消血単核球画分（BioWhittaker社、Cat. No. CC-2702）を0、 6250、12500、25000 または50000 cells／ 100μＬ／ well（エフェクター／ターゲット比：0, 12.5, 25, 50, 100）ずつ添加し、37℃、5%CO2存在下で４時間培養した。ついで、その上清20μＬをあらかじめ分注したβガラクトシダーゼ活性検出キットの基質100μＬ／ wellに加え、室温で１時間培養し、ALVO-sx5で化学発光を測定した。その結果を図６に示す。抗HM1.24抗体を添加しない場合にもエフェクター／ターゲット比（Ｅ／Ｔ比）に依存してβガラクトシダーゼ活性の増加が見られ、抗HM1.24抗体を添加した場合には更に２倍近い増加が観察された。両者の差がADCC活性に相当する。

請　求　の　範　囲

１．標的細胞の細胞死を測定する方法において、細胞死を誘起し得る膜蛋白質をコードする遺伝子及びマーカー蛋白質をコードする遺伝子を含有する標的細胞をインキュベートし、細胞死により細胞外に漏出するマーカー蛋白質を測定することを特徴とする方法。

２．前記インキュベーションを、前記細胞死を誘起し得る膜蛋白質に対する抗体又はリガンドの存在下で行う、請求項１に記載の方法。

３．前記インキュベーションをエフェクター細胞の存在下で行う、請求項１又は２に記載の方法。

４．前記標的細胞が、膜蛋白質の安定発現系が得られる細胞である請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

５．前記標的細胞が、CHO細胞である請求項４に記載の方法。

６．前記マーカーが、酵素である請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

７．前記マーカーが、βガラクトシダーゼである請求項６に記載の方法。

８．標的細胞の細胞死を誘起又は抑制する物質のスクリーニング方法において、細胞死を誘起し得る膜蛋白質をコードする遺伝子及びマーカー蛋白質をコードする遺伝子を含有する標的細胞を、被検物質と共にインキュベートし、細胞死により細胞外に漏出するマーカー蛋白質を測定することを特徴とする方法。

９．前記インキュベーションを、前記細胞死を誘起し得る膜蛋白質に対する抗体又はリガンドの存在下で行う、請求項８に記載の方法。

１０．前記インキュベーションをエフェクター細胞の存在下で行

う、請求項８又は９に記載の方法。

１１．前記標的細胞が、膜蛋白質の安定発現系が得られる細胞である請求項８～１０のいずれか１項に記載の方法。

１２．前記標的細胞が、CHO細胞である請求項１１に記載の方法。

１３．前記マーカーが、酵素である請求項８～１２のいずれか１項に記載の方法。

１４．前記マーカーが、βガラクトシダーゼである請求項１３に記載の方法。

１５．標的細胞の細胞死の測定又は標的細胞の細胞死を誘起もしくは抑制する物質のスクリーニング方法に使用するための標的細胞であって、細胞死を誘起し得る膜蛋白質をコードする遺伝子及びマーカー蛋白質をコードする遺伝子を含有し、該膜蛋白質に起因する反応により誘起される細胞死により前記マーカー蛋白質を漏出する細胞。

１６．前記蛋白質に対する抗体又はリガンドの存在下のインキュベーションにより前記マーカー蛋白質を漏出する、請求項１５に記載の細胞。

１７．エフェクター細胞の存在下でのインキュベーションにより前記マーカー蛋白質を漏出する請求項１５又は１６に記載の細胞。

１８．前記標的細胞が、膜蛋白質の安定発現系が得られる細胞である請求項１５～１７のいずれかに記載の細胞。

１９．前記標的細胞が、CHO細胞である請求項１８に記載の細胞。

２０．前記マーカーが、酵素である請求項１５～１９のいずれか１項に記載の細胞。

２１．前記マーカーが、βガラクトシダーゼである請求項２０に

記載の細胞。

Fig.1

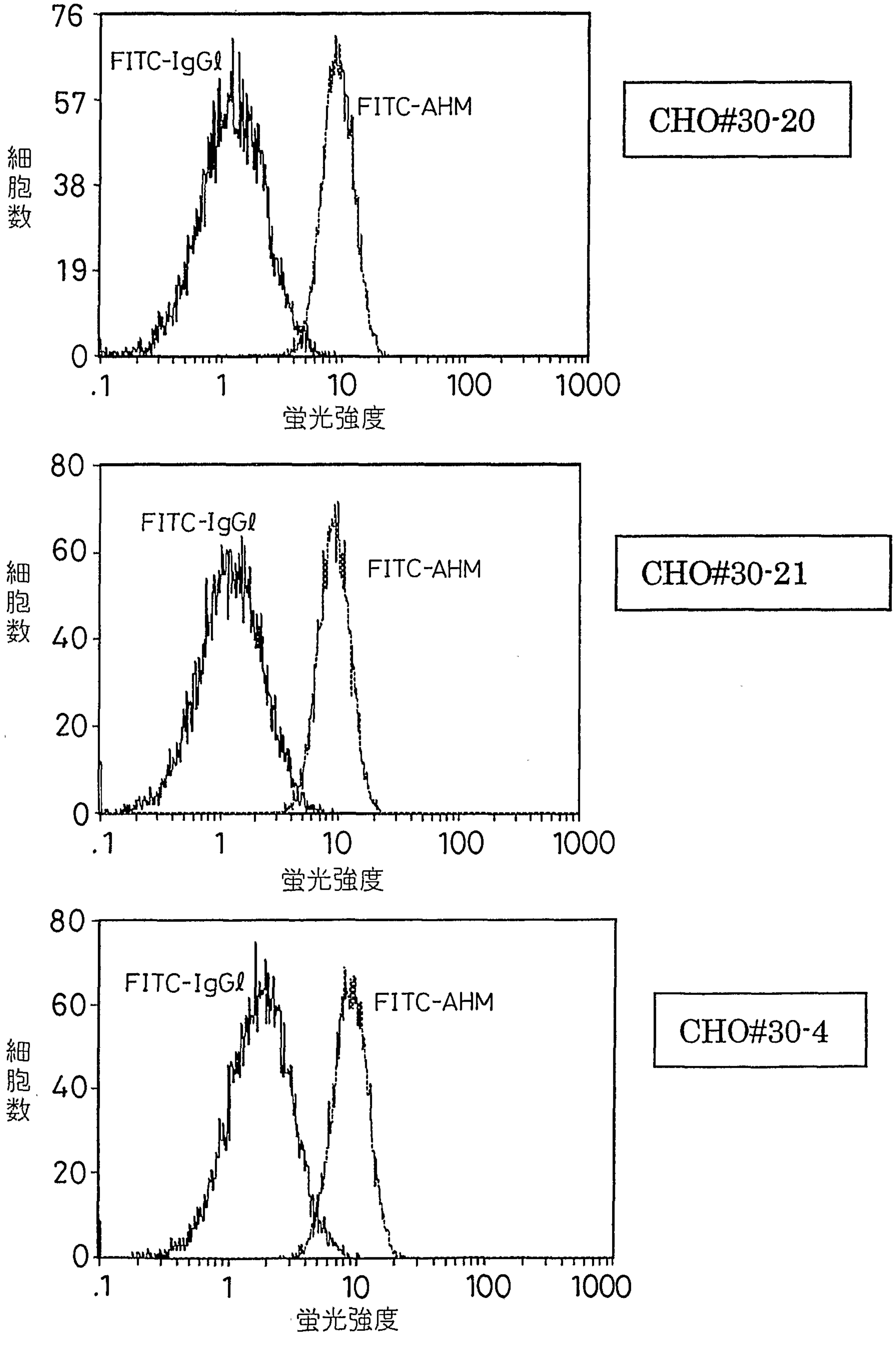

76
57
38
19
0
細胞数
FITC-IgGℓ
FITC-AHM
CHO#30-20
.1
1
10
100
1000
蛍光強度
80
60
40
20
0
細胞数
FITC-IgGℓ
FITC-AHM
CHO#30-21
.1
1
10
100
1000
蛍光強度
80
60
40
20
0
細胞数
FITC-IgGℓ
FITC-AHM
CHO#30-4
.1
1
10
100
1000
蛍光強度

Fig.2

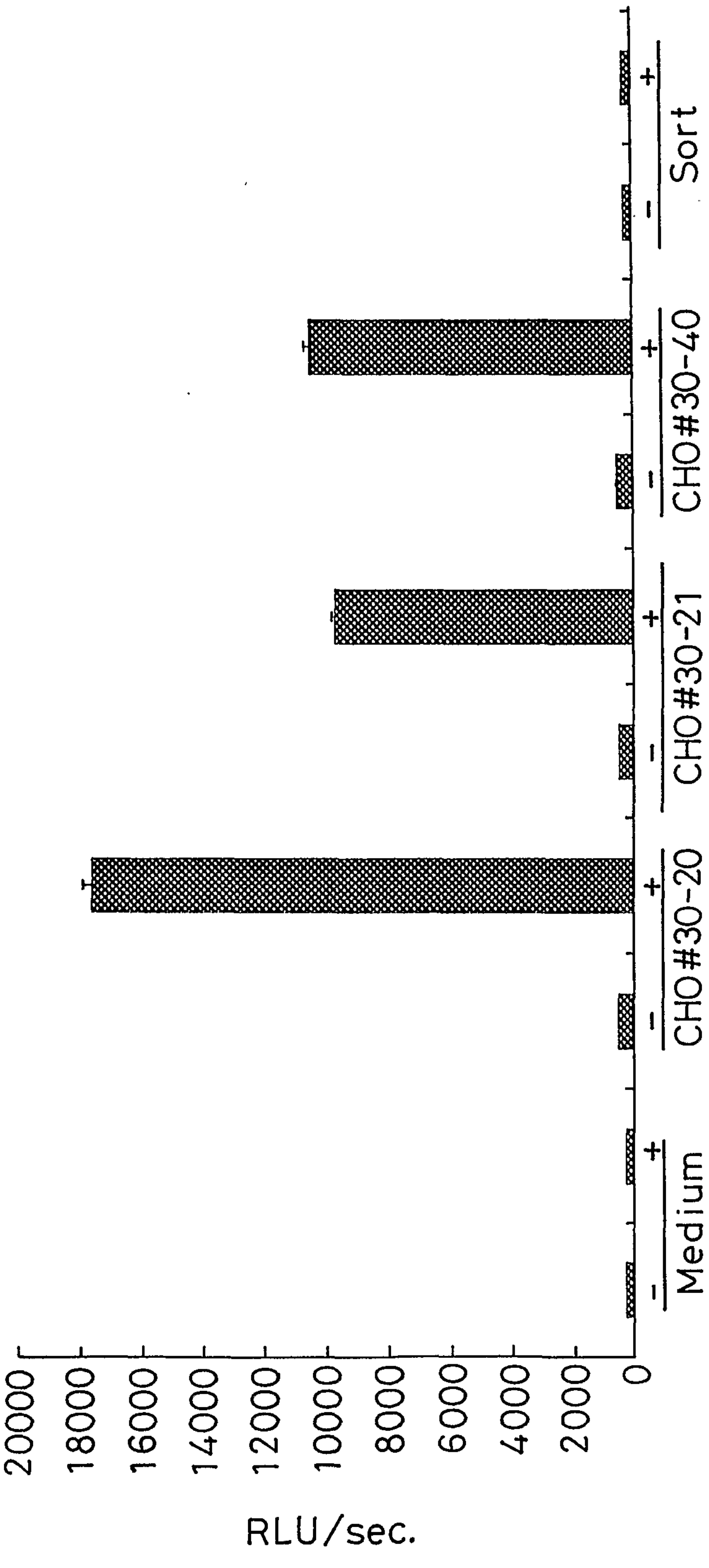

RLU/sec.
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
−
+
Medium
−
+
CHO#30-20
−
+
CHO#30-21
−
+
CHO#30-40
−
+
Sort

Fig.3

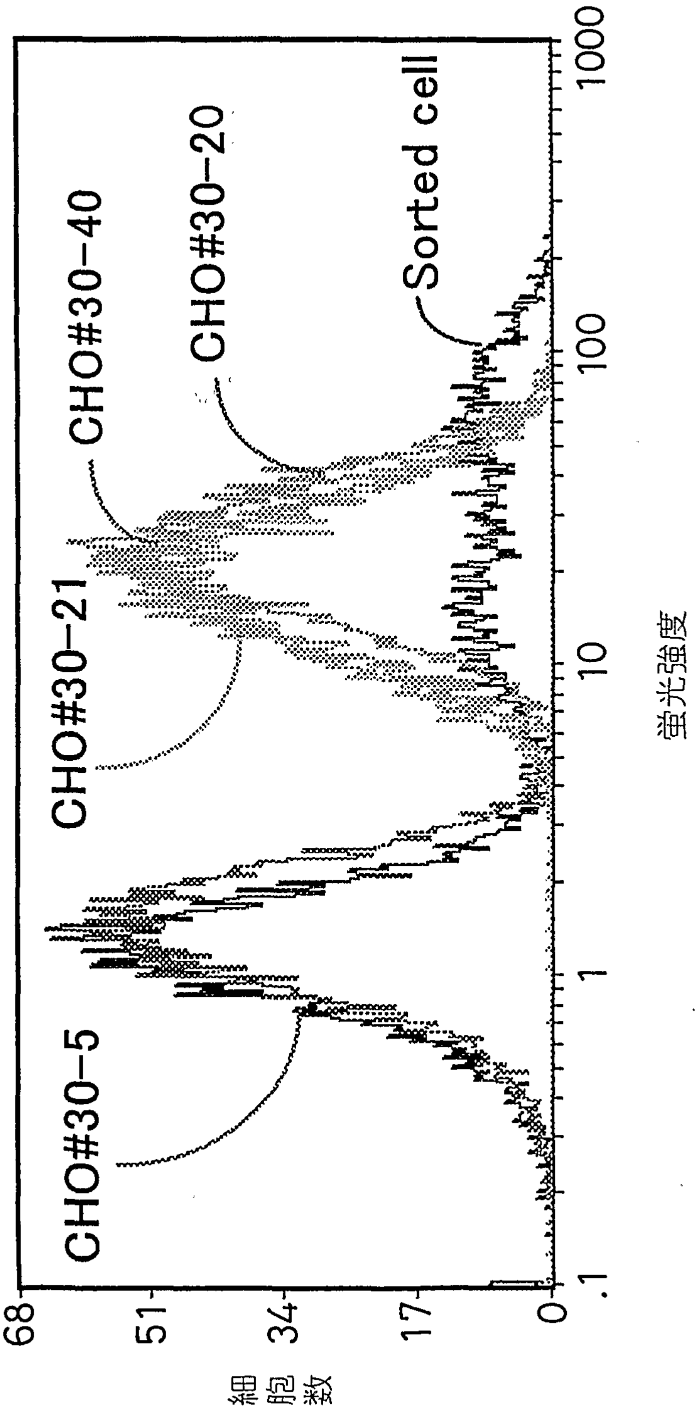

CHO#30-5
CHO#30-21
CHO#30-40
CHO#30-20
Sorted cell
68
51
34
17
0
.1
1
10
100
1000
細胞数
蛍光強度

Fig.4

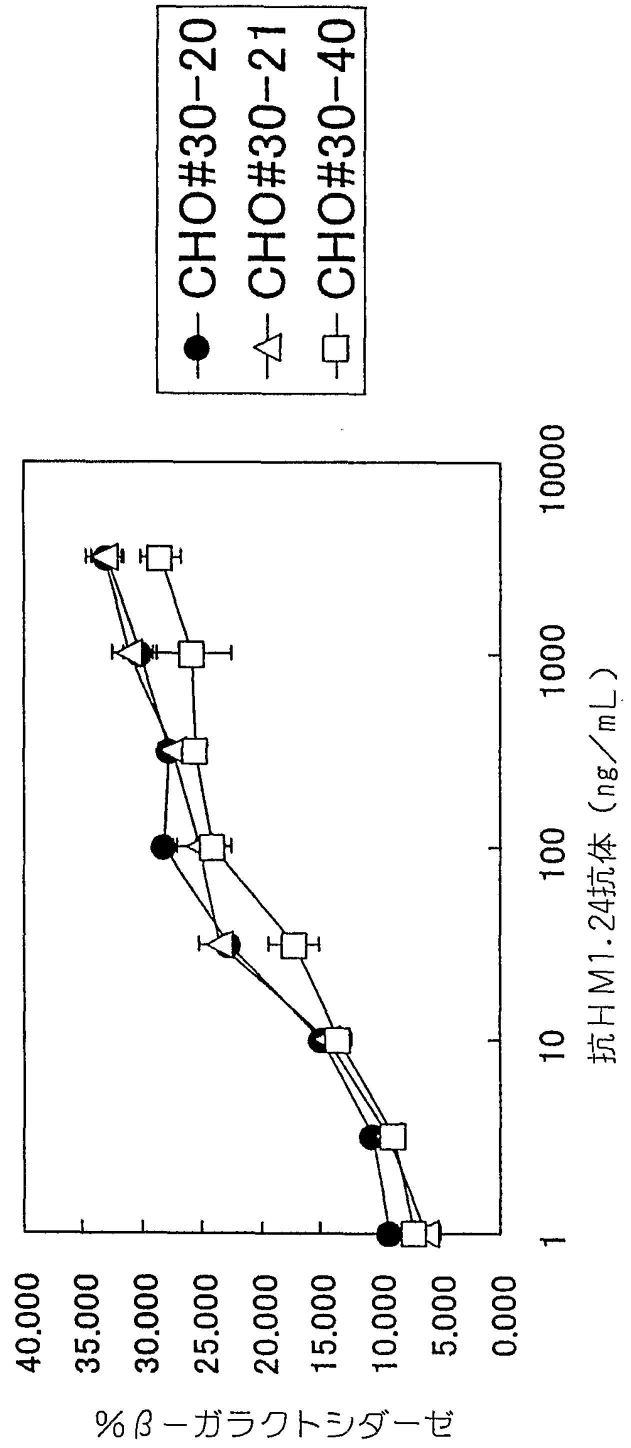
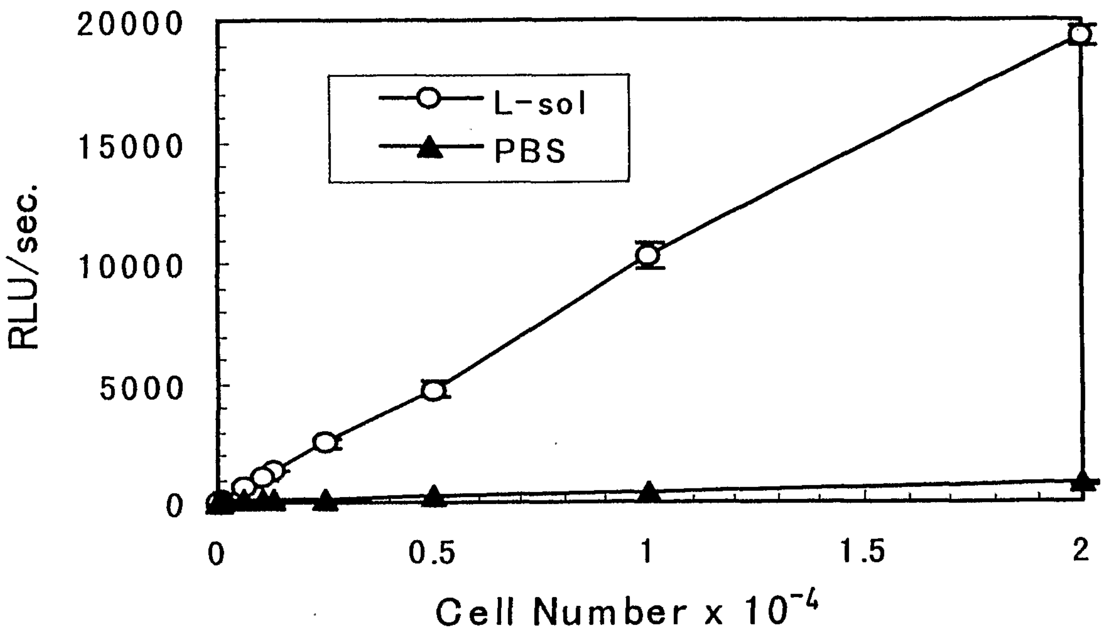

CHO#30-20
CHO#30-21
CHO#30-40
%β－ガラクトシダーゼ
40.000
35.000
30.000
25.000
20.000
15.000
10.000
5.000
0.000
1
10
100
1000
10000
抗HM1.24抗体（ng/mL）

Fig.5

(a)


20000
15000
10000
5000
0
RLU/sec.
L-sol
PBS
0
0.5
1
1.5
2
Cell Number x 10-4

(b)

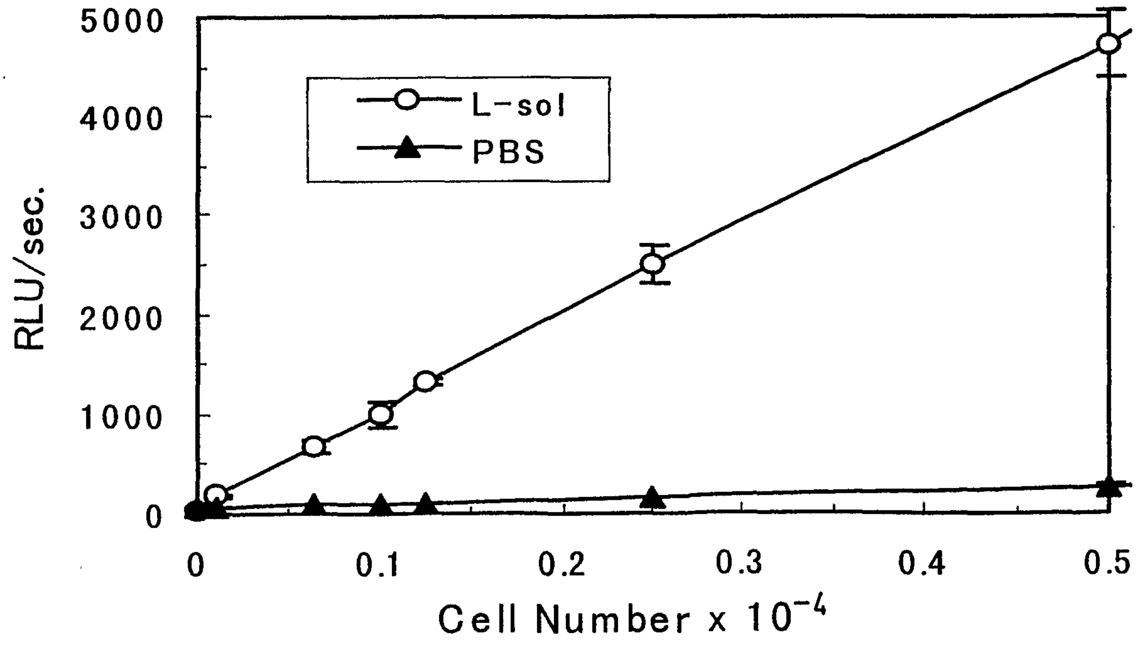
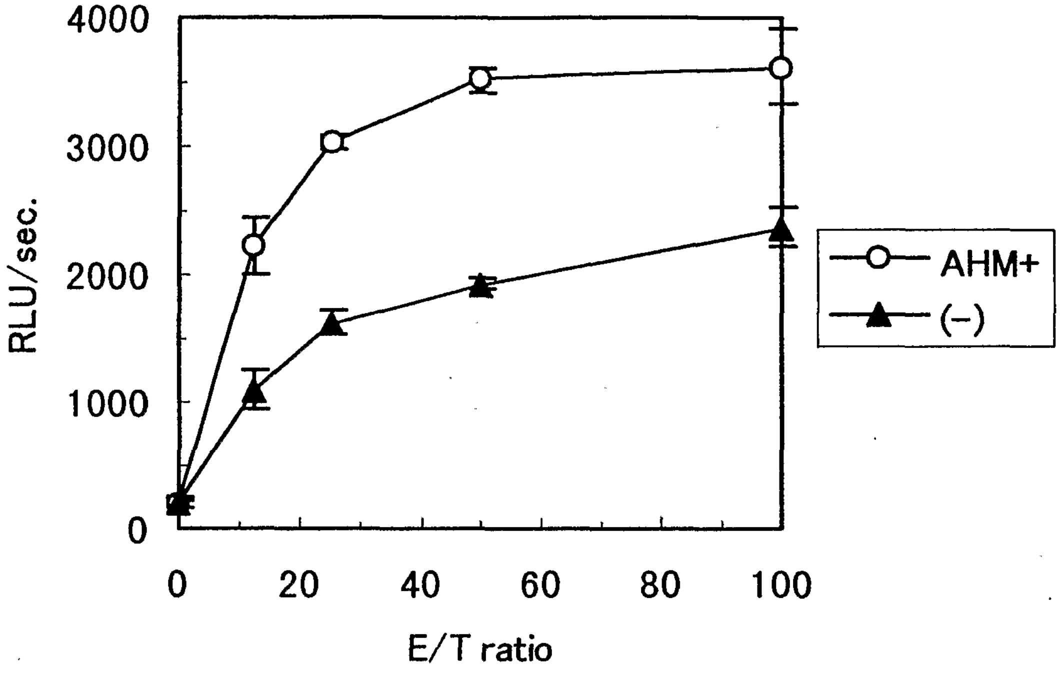
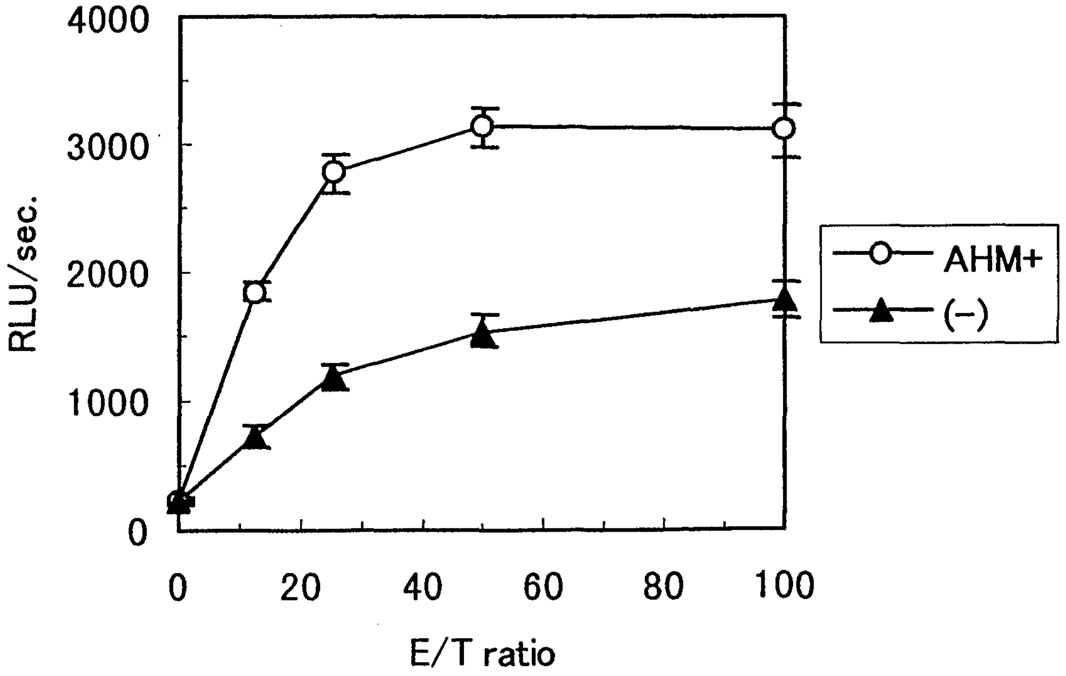

5000
4000
3000
2000
1000
0
RLU/sec.
L-sol
PBS
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Cell Number x 10-4

Fig.6

(a)


4000
3000
2000
1000
0
RLU/sec.
0
20
40
60
80
100
E/T ratio
AHM+
(-)

(b)


4000
3000
2000
1000
0
RLU/sec.
0
20
40
60
80
100
E/T ratio
AHM+
(-)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/11301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12Q1/02, C12N15/09, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/48, G01N33/50, G01N33/566, G01N33/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12Q1/02, C12N15/09, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/48, G01N33/50, G01N33/566, G01N33/68

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)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 844483, A1 (Pasteur Merieux Serums & Vaccins SA), 27 May, 1998 (27.05.98), & FR 2755977 A1 & CA 2219725 A & JP 10-215868 A	1-21
Y	BACHY, M. et al., Beta galactosidase release as an alternative to chromium release in cytotoxic T-cell assays. J.Immunol.Methods. 1999, Vol.230, No.1-2, pages 37 to 46	1-21
Y	OHTOMO, T. et al., Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. Biochem. Biophys.Res.Commun. 1999, Vol.258, No.3, pages 583 to 591	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document 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	Date of mailing of the international search report
04 April, 2002 (04.04.02)	16 April, 2002 (16.04.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／１１３０１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl^{7} C12Q 1/02,C12N 15/09,C12N 5/10,G01N 33/15,G01N 33/48,G01N 33/50,G01N 33/566,G01N 33/68

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl^{7} C12Q 1/02,C12N 15/09,C12N 5/10,G01N 33/15,G01N 33/48,G01N 33/50,G01N 33/566,G01N 33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI(DIALOG),BIOSIS(DIALOG),MEDLINE(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	EP 844483 A1 (PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS SA) 1998.05.27 & FR 2755977 A1 & CA 2219725 A & JP 10-215868 A	1-21
Y	BACHY,M. et al. Beta galactosidase release as an alternative to chromium release in cytotoxic T-cell assays. J.Immunol.Methods. 1999,Vol.230,No.1-2,p.37-46	1-21

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　０４．０４．０２

国際調査報告の発送日　16.04.02

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９２８１
高堀　栄二

電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	OHTOMO,T.et al. Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. Biochem.Biophys.Res.Commun. 1999,Vol.258,No.3,p.583-591	1-21