

(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2009-524023

(P2009-524023A)

(43) 公表日 平成21年6月25日(2009.6.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C 0 8 4
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 Z	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-550549 (P2008-550549)
 (86) (22) 出願日 平成19年1月13日 (2007.1.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年9月16日 (2008.9.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/060533
 (87) 国際公開番号 W02007/120947
 (87) 国際公開日 平成19年10月25日 (2007.10.25)
 (31) 優先権主張番号 60/759,195
 (32) 優先日 平成18年1月13日 (2006.1.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

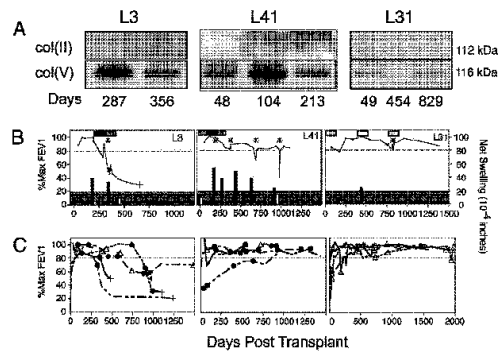
(71) 出願人 301046787
 インディアナ・ユニバーシティ・リサーチ
 ・アンド・テクノロジー・コーポレーショ
 ン
 アメリカ合衆国、インディアナ州 462
 02、インディアナポリス、ウェスト テ
 ンス ストリート 351
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺中に観察される結合組織に対する自己免疫反応が関与する、肺疾患の治療のための分子

(57) 【要約】

多様な態様は、肺のような臓器に観察されるコラーゲンのような結合組織に対する自己免疫応答を含む医学状態を診断する及び治療するための方法を含む。一つの方法において、特発性肺線維症 (IPF) のような肺疾患及び障害が、例えば、V型を含む多様な型のコラーゲンに対する自己免疫応答の証拠について、患者から得られた体液又は組織サンプルを分析することにより診断される。V型コラーゲンに対する自己免疫応答の証拠について一つの型のアッセイは、患者から体液又は組織サンプルを得ること、該サンプルの少なくとも一部と抗V型コラーゲンに対する抗原を接触させること、及び該サンプル中の抗V型コラーゲンの存在を示す変化についてサンプル及び抗原の混合物をモニターすることを含んでなる。別の態様は、V型コラーゲンを含む多様なコラーゲンのエピトープの療法的有効量を投与することにより、IPFのような肺疾患を治療することを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺疾患を評価するための方法であって、

患者からサンプルを得ること；及び

前記患者の少なくとも一つの肺中に存在する少なくとも一つの型のコラーゲンに対する自己免疫の証拠について前記サンプルをアッセイすること；

の工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 2】

前記コラーゲンが、V型コラーゲン、V型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープ及びV型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性断片から成る群より選択される、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記肺疾患が、特発性肺線維症、成人呼吸窮迫症候群、急性呼吸不全症候群、二次膠原病性脈管疾患及び線維性肺疾患のいずれかの形態から成る群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記疾患が閉塞性細気管支炎である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記アッセイする工程が、

V型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分を提供すること；及び 20

前記サンプルの少なくとも一部と前記V型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分とを接触させること；

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アッセイする工程がさらに、前記抗原性成分が前記V型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分に対する少なくとも一つの抗体と相互作用した場合に生成されるシグナルをモニターすることを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

肺疾患を治療する方法であって、

肺中に存在する少なくとも一つの型のコラーゲンに対する自己免疫を有する患者を同定すること； 30

該自己免疫応答を抑制する少なくとも一つの化合物を提供すること；及び

前記患者に前記化合物の療法的有効量を投与すること；

の工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 8】

前記コラーゲンが、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン及びVI型コラーゲンから成る群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記コラーゲンがV型コラーゲンである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】 40

前記疾患が特発性肺線維症、成人呼吸窮迫症候群、急性呼吸促迫症候群、二次膠原病性脈管疾患、線維性肺疾患のいずれかの形態から成る群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記化合物がシクロスポリン、免疫システム調節分子及び免疫システムの成分に対する抗体から成る群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記化合物が、V型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分である、請求項 7 に記載の方法

【請求項 13】 50

前記化合物が、肺内点滴注入により患者に投与される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 14】

前記化合物が経口摂取により患者に投与される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 15】

移植された臓器組織を拒絶することについて、増加したリスクがある患者を同定する方法であって、

患者からサンプルを得ること；及び

肺中に存在する少なくとも一つの型のコラーゲンに対する自己免疫の証拠について前記サンプルをアッセイすること；

の工程を含んでなる、前記方法。

10

【請求項 16】

前記サンプルが、血液、血清、間質性肺液、痰、粘液、組織などから成る群より選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記コラーゲンが、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、III 型コラーゲン、IV 型コラーゲン及び V 型コラーゲンから成る群より選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記コラーゲンが V 型コラーゲンである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

閉塞性細気管支炎 (BOS) を発生する、増加したリスクがある患者を同定する方法であって、

20

患者から血液のサンプルを得ること；及び

肺に観察されるコラーゲンの少なくとも一つの型に対する自己免疫反応の証拠について前記血液のサンプルをアッセイすること；

の工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 20】

前記コラーゲンが、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、III 型コラーゲン、IV 型コラーゲン及び V 型コラーゲンから成る群より選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記コラーゲンが V 型コラーゲンである、請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記試験が抗体に基づいたアッセイであり、前記アッセイが、

前記サンプルの少なくとも一部と、コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分に対する抗体に対する抗原とを接触させ；

前記抗原を、前記抗原に対する少なくとも一つの抗体に結合させること、ここで前記抗体は前記サンプル中に存在している；

前記サンプル中の前記抗体の、前記抗原への結合を示す少なくとも一つのシグナルをモニターすること；

の工程を含んでなる、請求項 19 に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記抗原が、V 型コラーゲン、V 型コラーゲンの抗原性成分及び V 型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分の抗原性類似体；から成る群より選択される、請求項 19 に記載の方法

【請求項 24】

肺疾患を評価するためのキットであって、

V 型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分；及び

前記少なくとも一つの抗原性成分が少なくとも一つの抗 V 型抗体に結合した場合にシグナルを発生する少なくとも一つの部分；

を含んでなるキット。

【請求項 25】

50

前記キットがさらに表面を含み、前記表面は前記少なくとも一つの抗原性成分を結合するために適している、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

前記表面が、フィルター、ビーズ、プレート、膜、チップ、スライドなどから成る群より選択される物体の一部である、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

前記キットがさらに、レポーター分子、レポーター原子、キット中の抗原に結合された抗体に対する抗体、緩衝液、安定化剤、抗菌剤及びアジュバントから成るリストから選択される化合物の少なくとも一つを含む、請求項 24 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

特許請求の優先権

本出願は、その全体が本明細書に援用される、2006年1月13日に提出された米国仮特許出願番号60/759,195の優先権を主張する。

【0002】

政府資金提供の記載

米国政府は、米国保健研究所(NIH)からの連邦補助金番号HL60797に従って本発明に特定の権利を所有することができる。

【0003】

20

技術分野

多様な態様は一般に、肺疾患のための試験及び治療に関し、いくつかの側面はV型コラーゲンのような、肺結合組織に対する自己免疫応答の証拠を同定することを含んでおり、さらに他の側面は、コラーゲン及びコラーゲン様分子の治療的に有効量を患者に投与することをにより患者の免疫応答を変調し、例えばV型コラーゲンに対して患者を耐性化することを含んでいる。

【0004】

背景技術

自己免疫応答を含む病態学は周知である。所与のヒト又は動物自身の免疫システムにより組織に生じた傷害が関与する状態には、例えば、1型(若年性)糖尿病、関節リウマチ、多発性硬化症、及び例えば、乾癬を含むいくつかの炎症状態が含まれる。典型的には、動物自身の免疫システムの一部は、動物自身の組織の抗原への攻撃を開始する。前記の自己免疫疾患により例示されるごとく、その結果は、糖尿病のような管理可能ではあるが慢性の状態の生成から、多発性硬化症でしばしば起こるような完全な身体障害及び早死までの範囲の破局的なものでありうる。

30

【0005】

自己免疫応答に具体的に關係する多様な疾患に加え、他の疾患も誤った免疫応答が関与する。従って、患者自身の免疫応答が疾患の進行に果たしうる役割(もしあれば)について決定するため、多様な疾患の病因を試験することに強い関心がある。

【0006】

40

患者自身の免疫システムによる不可欠な組織に対する攻撃を含む別の病態は、臓器又は組織移植後の同種移植片拒絶である。心臓、腎臓、肝臓及び肺を含む種々の臓器の移植は、しばしば移植された組織を攻撃する移植レシピエントの免疫システムを生じる。同種移植片拒絶を最小化するために、臓器ドナー及びレシピエントを適合させることに大きな注意が払われる。それでも、一卵性双生児間を除けば、完全な適合を行うことは事実上不可能である。その後の同種免疫応答を管理するため、ほとんどの移植レシピエントは、そうしないと移植された臓器及び/又は組織を破壊するであろう自己免疫応答を制御するため、生存期間を通して免疫抑制化合物で処置される。

【0007】

同種移植片拒絶は、お互いに決して完全適合ではない個体間の肺移植において特に問題

50

である。肺移植の分野において、肺移植では他のほとんどの固形臓器の移植よりもより頻繁に拒絶が起こると広く信じられている。実際、肺同種移植片レシピエントにおける死亡の第一位の原因は、閉塞性細気管支炎 (bronchiolitis obliterans) (BO) として知られている慢性拒絶である (Trulock, 1997; Westra et al., 1990)。慢性拒絶の病因はあまりよく理解されていない; しかしながら、慢性拒絶を発生するリスクは、反復した急性拒絶病状発生と関連していると信じられている。

【0008】

閉塞性細気管支炎 (BO) は、肺の長期間受容及び同種移植片レシピエントの生存に主要な障害である慢性拒絶の一形態であり、肺移植後5年生存者の少なくとも60%が罹患している。BOの組織病理学は、炎症性及び損傷性応答が、最終共通経路、小気道閉塞に付随する病変の発生に導くことを示唆している。どこにでも存在するドナーHLA抗原が急性拒絶応答の標的及び刺激であると信じられている。しかしながら、より新しい治療薬は急性拒絶の発生を減少させたにもかかわらず、BOの発生は変化せず、組織特異的抗原への薬剤耐性宿主応答が慢性拒絶プロセスに関与しうるを示唆している。

【0009】

臓器拒絶は、多くの場合において、宿主Tリンパ球による同種(ドナー)主要組織適合性複合体(MHC)分子の認識により開始され、上方調節された細胞性及び体液性免疫を導くと考えられている。多様な治療には、移植された臓器への免疫応答の重症度を軽減するために免疫抑制剤を投与することが含まれる。残念ながら、多くの場合において、これらの療法は連続する拒絶病状発生を防止することに失敗し、それ故、免疫寛容として知られている同種移植片のあいまいな受容を誘導する最終目標は分かりにくいままである。

【0010】

同種MHC分子は、拒絶間の免疫応答の刺激及び標的である。それ故、MHC抗原と相同的であることができるMHC由来ペプチド又は合成ペプチドは、同種移植片に対する免疫学的寛容性を誘導することを試みている研究の焦点となってきた(Krensky and Clayberger, 1997; Oluwole et al., 1993)。加えて、ごく最近の研究報告はMHC分子に由来する非多形合成ペプチドによる、インビトロでの複数の同種MHC分子に対する寛容の誘導を報告している(Murphy et al., 1999)。しかしながら、これらのいずれもが、同種移植片拒絶、特に、肺同種移植片拒絶の問題を解決したようには思われない。

【0011】

ドナーMHC分子の多形領域の認識は通常、同種免疫応答についての刺激であり、ドナーMHCに由来するペプチドにより誘導された免疫学的寛容は、ドナーMHC分子のアレルに特異的でありうる。従って、個体間で高度に保存されている、及び複数のMHCアレルにわたって免疫学的寛容も誘導するタンパク質/ペプチドの同定は、同種移植片拒絶に苦しんでいる又は発生するリスクがある患者を治療するための効果的な療法を開発することにおいて非常に重要でありうる。しかしながら、肺同種移植片に対する免疫学的寛容の誘導についてのこうしたタンパク質/ペプチドの使用は十分に評価されていない。さらに、こうした寛容に有用であるタンパク質/ペプチドはごく少数しか同定されていない。

【0012】

さらに、ドナー特異的輸血、ドナー由来APCの胸腺注入、又は移植に先だつたドナーMHC分子に由来するペプチドでの全身免疫化(Krensky and Clayberger, 1997)のような固形臓器同種移植片に対する寛容を誘導するための異なった技術の存在にもかかわらず、これらの技術のいずれもが有効であるには、十分な時間(即ち、数週間から数ヶ月)を寛容誘導が発生するのに当てるため、移植に先立った数週間前には特異的ドナーMHC分子が既知でなければならない。しかしながら、典型的なシナリオにおいては、可能性のあるドナーの同定と移植手術の間には数時間のみしかなく、ほとんどの場合、ほとんどの移植片レシピエントに寛容を誘導する十分な時間はない。

【0013】

臓器移植の必要性にそれ自身必然的に伴う、自己免疫疾患をすでに患っている移植片レシピエントは、移植された臓器の破局的な拒絶に対して高められたリスクにさらされる可

10

20

30

40

50

能性がある。従って、いずれの根底にある自己免疫に基づいた病態も、移植前ではないにしても確実に移植後には、同定する及び多分治療する必要がある。診断する及び治療するのが困難であり、そしてその根底にある原因が未知であり、さらにそれらを診断する及び治療する取り組みを複雑にしている、特発性肺線維症（IPF）のような多様な肺疾患及び障害もある。

【0014】

よって明らかに、IPFのような自己免疫疾患を同定する及びこうした疾患を治療する又は少なくとも管理するために使用することが可能である方法に対する要求がある。本要求は、一つの主要な治療、肺移植がそれ自身存在している病原性自己免疫応答によりひどく危険にさらされている場合に特に深刻である。多様な側面及び態様は、多様な及び特異的な型のコラーゲンのような肺の成分に対する望まれない自己免疫応答により引き起こされる、又は悪化する疾患を診断すること及び治療することに関している。

10

【0015】

概要

一つの態様は、ヒト又は動物患者においてIPFのような肺疾患又は障害を評価する方法である。一つの態様は、患者から体液又は組織のサンプルを得ること、及び該サンプルを分析して、患者の免疫システムのいずれかの成分が、患者身体の臓器中に見出される結合組織のいずれかの要素に対する免疫応答を開始したかどうかを決定する工程を含んでなる。典型的な結合組織成分は、いずれかの型のコラーゲン及び/又はコラーゲンの抗原性成分を含むことができる。自己免疫応答を惹起することができる多様なコラーゲンには、例えば、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲン及びVI型コラーゲンが含まれる。これらの患者の肺疾患又は状態を評価するための試験は、患者から体液又は組織のサンプルを得ること、サンプルの少なくとも一部とV型コラーゲンの少なくとも一つの抗原性成分（エピトープ）を接触させること、及びサンプル中の少なくとも一つの抗V型コラーゲン抗体の存在を示すいずれかのシグナルについての試験をモニターすること、の工程を含んでなることができる。こうした試験は、試験を行うために必須又は有益であることができるいずれかの型の、追加の成分の存在を含むことができる。こうした成分には、限定されるわけではないが、抗V型抗体に結合する二次抗体、レポーター分子又は原子、抗原性成分を結合するための表面、緩衝剤、安定剤、抗菌剤などが含まれる。

20

30

【0016】

一つの側面は：肺からの体液若しくは組織又は肺と接触していた体液を得ること、サンプルの少なくとも一部とV型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープ又は抗V型コラーゲン抗体と優先的に結合するいずれかの他の分子を接触させること、及び抗V型抗体とサンプル中のV型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープの結合に付随する変化を検出すること、の工程を含んでなるアッセイである。このアッセイ及びそれらの変法は、IPFなどのような肺疾患、又はV型コラーゲンの少なくとも一部への自己免疫応答を含むいずれか他のタイプの肺疾患又は障害をアッセイするために使用し得る。

【0017】

別の態様は、患者が肺の成分に対する自己免疫を有しているかどうかを決定する方法である。典型的な自己免疫応答は、体液性又は細胞性免疫のいずれか又は両方を含んでもよい。こうした応答には、例えば、遅延型過敏性応答が含まれる。自己免疫特性を有する肺疾患には、限定されるわけではないが、特発性肺線維症（Idiopathic Pulmonary Fibrosis）、急性呼吸促迫症候群（Acute Respiratory Distress）、成人呼吸促迫症候群（Adult Respiratory Distress Syndrome）、二次膠原病性脈管疾患（secondary collagen vascular disease）、他の線維性肺疾患（fibrotic lung disease）などが含まれる。

40

【0018】

一つの態様は、自己免疫特性を有する肺疾患又は状態を発生する増加したリスクを有する特異的患者又は患者の群を同定するため、患者をスクリーニングすることを含む。こうした疾患又は状態には、限定されるわけではないが、特発性肺線維症（IPF）、急性呼

50

吸促迫症候群、成人呼吸窮迫症候群、二次膠原病性脈管疾患、他の線維性肺疾患など、あるいは少なくとも一部はV型コラーゲンのような肺結合組織への自己免疫反応による他の状態が含まれる。これらの患者をスクリーンするための試験は、患者から体液又は組織のサンプルを得ること、サンプルの少なくとも一部とV型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープを接触させること、及びサンプル中の少なくとも一つ抗V型コラーゲン抗体の存在を示すいずれかのシグナルについてサンプル及び抗原の混合物をモニターすること、の工程を含んでもよい。

【0019】

さらに別の態様は、患者の肺疾患の進行をモニターすること、又はこうした肺の疾患又は障害を患っている患者を治療するために使用した種々の治療計画をモニターすることを含む。これらの患者をモニターする試験は、患者から体液又は組織のサンプルを得ること、サンプルの少なくとも一部とV型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープを接触させること、及びサンプル中の少なくとも一つ抗V型コラーゲン抗体の存在をの指標となるいずれかのシグナルについての試験をモニターすること、の工程を含んでもよい。

10

【0020】

一つの態様は、IPFのような疾患のための診断試験を含み、いくつかの態様において、本試験は、患者から体液又は組織のサンプルを得ること、サンプルの少なくとも一部とV型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープを接触させること、及びサンプル中の少なくとも一つ抗V型コラーゲン抗体の存在を示すいずれかのシグナルについて混合物をモニターすること、の工程を含んでもよい。

20

【0021】

さらに別の態様は、BOSを発生する増加したリスクを有する候補者、例えば、V型コラーゲンのような、肺中に観察されるコラーゲンへの自己免疫応答について試験陽性の患者を同定するために、肺移植候補者を評価することを含む。これらの候補者を評価する方法は、候補者から体液又は組織のサンプルを得ること、サンプルの少なくとも一部とV型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープを接触させること、及びサンプル中の抗V型抗体が抗原に結合した証拠について抗原及びサンプル混合物をモニターすること、の工程を含んでもよい。これらの候補者を評価するための試験は、抗原を固体表面に結合させること、サンプルと抗原を接触させること、抗原がサンプル中に存在する抗原に対する抗体に結合するための時間を見越すこと、及び過剰の抗体及び/又はサンプルを除去するために結合した抗原-抗体複合体を洗浄すること、の工程を含んでもよい。追加の工程は、抗原抗体複合体にレポーター部分を結合させること、及び抗原に結合した抗体の存在の指標となるシグナルの何らかの変化をについてシステムをモニターすることを含んでもよい。いくつかの態様において、試験における抗原は、V型コラーゲンの少なくとも一つのエピトープである。

30

【0022】

別の態様は、V型コラーゲンのような肺中の結合組織に対する自己免疫応答が関与する肺疾患を同定するための方法を試験することを含む。いくつかの試験する方法は、所与の患者から体液又は組織のサンプルを得ること、及びV型コラーゲンに対する自己免疫応答の証拠についてサンプルの少なくとも一部をアッセイすること、の工程を含んでもよい。一つの態様において、V型コラーゲン又はそれらのエピトープ抗原性類似体に対する遅延型過敏性応答の証拠についてサンプルが分析される。さらに別の態様において、V型コラーゲンに対する抗体又はそれらのエピトープ又は抗原性類似体の存在についてサンプルが分析される。

40

【0023】

さらに別の態様は、閉塞性細気管支炎 (bronchiolitis obliterans syndrome) (BOS) を発生する高められたリスクを有する患者を同定する、及び/又は該症候群の進行又は該症候群を治療するために使用された治療の有効性をモニターする方法である。これらの方法は一般に、患者から血清、血液、間質肺液、痰、粘液又は組織のサンプルを得ること、肺の結合組織の成分に対する自己免疫反応の証拠

50

についてサンプルをアッセイすること、の工程を含む。一つの態様において、患者は肺移植の候補者又はレシピエントであり、該サンプルはV型コラーゲンに対する宿主免疫応答の証拠についてアッセイされる。一つの態様において、該サンプルはV型コラーゲンに対する細胞性免疫についてアッセイされる。さらに別の態様において、該サンプルはV型コラーゲンに対する体液性免疫についてアッセイされる。

【0024】

別の態様は、体液又は組織のサンプルを、V型コラーゲンのエピトープ又はそれらの類似体、一部又は成分に対する免疫の証拠をアッセイすることを含んでなる。

【0025】

さらに別の態様は、V型コラーゲン又はそれらの抗原性部分又は断片に対する自己免疫応答のため、移植された組織を拒絶することについて高められたリスクにある予定肺移植レシピエントを同定する方法である。

【0026】

さらに別の態様は、V型コラーゲン又はそれらのエピトープ又は抗原性断片に対する自己免疫応答による移植された組織を拒絶する継続するリスクを評価するため、肺組織移植受け取りをモニターする方法である。

【0027】

さらに別の態様は、患者の臓器中に見出されるV型コラーゲンのような結合組織に対する自己免疫応答が関与する疾患又は障害を有する患者、あるいは疾患又は障害を発生するリスクのある患者を治療するための方法である。一つの態様において、該方法は、免疫抑制化合物、あるいはV型コラーゲンのような抗原の存在に対して患者を寛容化する化合物を提供すること、及び所与の患者に該化合物の治療的有効量を投与すること、の工程を含んでなる。こうした化合物には、限定されるわけではないが、多様なコラーゲン又はコラーゲンの一部、例えば、V型コラーゲン又はそれらのエピトープ又は抗原性類似体 (antigenic analogues) が含まれる。自己免疫応答を誘導することができる典型的結合組織成分には、限定されるわけではないが、いずれかの型のコラーゲン及び/又はコラーゲンの抗原性成分 (エピトープ) が含まれる。自己免疫応答を惹起することができる多様なコラーゲンには、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲン、VI型コラーゲン及びそれらの多様な抗原性成分が含まれる。

【0028】

さらに別の態様は、患者の肺組織中の又は移植された肺の組織中の、コラーゲン又はコラーゲンの抗原性成分に対する患者の自己免疫応答を抑制するためにコラーゲン又はコラーゲンの抗原性成分を提供することによる、特発性肺線維症、成人呼吸窮迫症候群及び他の線維性肺障害、急性呼吸促迫症候群、閉塞性細気管支炎 (BOS) などのような肺疾患又は障害の進行を治療する又は防止する方法である。こうした療法は、患者の免疫システムをより良好にコラーゲンを寛容するように条件付け、及びコラーゲンに対する患者の自己免疫応答を少なくとも部分的に抑制すると決定された期間にわたって、患者にコラーゲン又はコラーゲンの成分又はそれらの類似体の安全で及び有効な用量を投与することを含んでもよい。一つの態様において、該コラーゲンはV型コラーゲン又はそれらの抗原性断片又は類似体である。

【0029】

さらに別の態様は、コラーゲン又はコラーゲンの抗原性部分に対するT細胞活性及び遅延型過敏性応答を含んでもよい、自己免疫応答により引き起こされる又は悪化される肺疾患の形態を治療することを含んでなる。一つの態様において、患者に投与されるコラーゲンは、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲン、VI型コラーゲン及びそれらの多様な抗原性成分から成る群より選択される。これらの化合物は、限定されるわけではないが、肺内滴下注入、経口、吸入、皮下注射、点滴、直接注入などを含む多様な手段により投与することができる。

【0030】

10

20

30

40

50

さらに別の態様は、移植された臓器及び組織を拒絶する増加したリスクを有する患者を同定する方法である。典型的には、この方法は、患者から血液、血清、体液、痰又は組織のサンプルを採取すること、及び、患者の免疫システムのいずれかの成分が、患者身体の臓器中にある結合組織のいずれかの要素に対する免疫応答を開始したかどうかを決定するためにサンプルを分析すること、の工程を含んでなる。典型的な臓器には、限定されるわけではないが、肺、心臓、肝臓、腎臓、膵臓及び眼の構成要素が含まれる。典型的な結合組織成分には、いずれかの型のコラーゲン及び/又はコラーゲンの抗原性成分が含まれる。自己免疫応答を惹起することができる多様なコラーゲンには、I型コラーゲン、II型コラーゲン、III型コラーゲン、IV型コラーゲン、V型コラーゲン、VI型コラーゲンが含まれる。

10

【0031】

さらに別の態様は、所与の患者に自己免疫に基づいた肺病態を発生するリスクがあるかどうかを決定するための試験を実施するための、又はこうした状態とすでに診断された患者の健康をモニターするためのキットである。一つの態様において、該キットは、コラーゲンに対する細胞性及び/又は体液性自己免疫の証拠を検出するために適した、少なくとも一つのコラーゲンの抗原性成分、例えば、V型コラーゲン又はエピトープ、断片又はそれらの類似体を含む。一つの態様において、該キットはさらに、V型コラーゲンに対する自己免疫応答の指標である少なくとも一つの分子の存在下、シグナルの変化を示す少なくとも一つの原子か又は分子のレポーター部分を含む。さらに別の態様において、該キットはさらに、試験の半減期、感度及び/又は信頼性を増加させるように働く、少なくとも一つの緩衝液、安定剤、保存剤、抗菌化合物、補助剤などを含む。一つの態様において、キットはさらにフロイントアジュバント又は成分又はそれらの類似体を含む。

20

【0032】

発明の詳細な説明

本発明の原理の理解を進める目的で、ここでそれらの好ましい態様が参照され、及びそれを記述するために特別の専門用語が使用されるであろう。とは言っても、本発明に関連する当業者には普通に生じるであろうような、企図されている本発明の原理のこうした改変、修飾及びさらなる応用には、本発明の範囲の限定は意図されないことが理解されるであろう。

【0033】

多数の説明及び実験が説明として提供されるが、限定ではない。記述、比較、説明又は実施例により提供されていようとなかろうと、本発明がどのように働くかの理論は限定と考えるべきではない。

30

【0034】

本明細書で開示された及び暗示された組成物及び方法論は、ヒト及び他のより下等動物（例えば、愛玩動物、動物園又は家畜動物）両方への応用に有用である。従って、以下の実施例及び議論はガイダンス及び説明のつもりで示されており、限定ではない。

【0035】

本明細書で使用される用語「評価すること」は、例えば、句「～について患者を評価すること」で使用される場合、限定されるわけではないが、所与の疾患、障害又は状態などに相関することが示されているいずれかの識別できるパラメータについて診断する、スクリーニングする、評価する、モニターすることなどを含む。本明細書で使用される用語「評価すること」は、限定されるわけではないが、以下の活動の少なくとも一つを含む：特異的又は一般的医学状態を有しているかどうか決定するために患者を診断すること；疾患の進行又は治療計画の有効性を追跡するため、既知の又は疑われる医学状態を有する患者をモニターすること；所与の医学状態を発生するであろう可能性を見積もるために患者をスクリーニングすること；所与の患者が所与の疾患又は医学状態を有する又は発生するリスクがある確率を評価すること；疾患、症候群又は状態を発生する傾向又は感受性の存在を検出すること；及び所与の医学状態、疾患、障害などを発生すること及び/又は回復することについての長期又短期予後を予測すること。

40

50

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される用語「医学状態」とは、症候群、疾患、状態などを含む。

【 0 0 3 7 】

ラット肺移植モデルでの研究は、特異的抗抗 V 型コラーゲン自己免疫応答が原因で肺が拒絶されることを示した。追加の議論については：その全体が本明細書において援用される David S. Wilkes により 2 0 0 3 年 9 月 1 3 日に出願された米国特許出願番号 10/243,797 に基づく米国特許出願公開番号 2003/0078208A、及び Davic C. Mares et. al., による "Type V Collagen Modulates Alloantigen-Induced Pathology and Immunology in the Lung," Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, Vol. 23, pp. 62-70, 2000、を参照されたい。V 型コラーゲン [c o l (V)] は肺に存在するマイナーなコラーゲンであり (Madri and Furthmayr, 1980)、細気管支周囲結合組織 (Madri and Furthmayr, 1979)、肺胞間質 (Konomi et al, 1984) 及び毛細血管基底膜 (Madri and Furthmayr, 1979) に位置する。I (V) の - 1 鎖は X I 型コラーゲン 2 鎖 [2 (X I)] とほとんど 7 6 % 共同的であり (Cremer et al., 1994)、及び 2 (X I) の遺伝子はマウス及びヒトの M H C クラス I I 座位に位置しており (Hanson et al., 1989)、及び M H C クラス I I とアミノ酸配列を共有している (Wilson et al., 1995)。M H C 由来ペプチドは、肺以外の同種移植片において寛容を誘導するために利用されてきた。本発明者は、c o l (V) における M H C 「様」配列の存在可能性のため、肺同種移植片における免疫応答を変調するために c o l (V) を選択した。

10

【 0 0 3 8 】

20

ここで (以下に示されている) 実施例 1 の結果を参照すると、コラーゲンに対して増加した自己免疫応答を有する肺移植患者は、移植拒絶についてより高いリスクであるようである。これら及びその他の観察に従い、一つの態様は、肺移植を待っている又は受けた患者のコラーゲンに対する細胞性か又は体液性自己免疫応答を測定することによる、肺移植拒絶の進行を予測する及び / 又は追跡する方法である。一つの態様において、追跡された肺移植拒絶のバイオマーカーは、V 型コラーゲン及び / 又は V 型コラーゲンのエピトープである。

【 0 0 3 9 】

ミオシン及び熱ショックタンパク質のような自己抗原は、心臓及び皮膚同種移植片拒絶の間、免疫応答の標的になり得ることが、医学文献に報告されている (Fedoseyeva, et al., 1999; Duquesnoy, et al., 1999; Birk, 1999)。げっ歯類における肺同種移植片拒絶が、組織弾力性及び伸展性に必須であり、肺及び皮膚に観察されるマイナーコラーゲン (Schwarze, et al., 2000) である V 型コラーゲンに対する T 細胞応答に関連していることも報告されている (Mares, et al., 2000)。c o l (V) の断片が肺移植後に気管支肺胞洗浄 (B A L) 液内に放出され、c o l (V) 特異的 T 細胞の養子移入が移植された肺同系移植片中で「拒絶様」病態を誘導する (Haque, et al., 2002)。肺移植に先だってラットに c o l (V) を摂取させることにより誘導された経口寛容は、急性拒絶及び B O の発生を抑制した (a b r o g a t e d) (Yasufuku et al., 2001; Yasufuku et al., 2002)。

30

【 0 0 4 0 】

40

一つの形式的可能性は、肺移植片を受けた患者は c o l (V) に対する細胞性及び / 又は体液性免疫を発生する可能性があり、及びこの自己免疫応答が B O を発生するリスクを増加させるというものである。(以下に示されている) 実施例 2 の結果のいくつかは、肺移植後の c o l (V) 免疫反応性の発生と一致しており、閉塞性細気管支炎症候群 (B O S) の主要なリスクファクターを代表している。

【 0 0 4 1 】

B O の組織病理学は、炎症及び傷害への応答が最終共通経路、移植片不全を導く病変の発生を結果として生じることを示唆している。肺移植環境の外部でこの症候群がまれなことは、自己免疫機構がこのプロセスに中心的役割を果たしていることを示している。しかしながら、急性拒絶及び M H C 不適合が必ずしも B O S につながるわけではないという事

50

実は、他の免疫因子が重要である可能性も示唆している。(以下に示されている)実施例2の結果は、肺移植が自己抗原、V型コラーゲンに対する新自己免疫の発生を誘導しうることを示唆している(Estienne, et al., 2002)。実際、この研究で観察された肺移植後のc o l (V) 自己免疫により与えられた相対的リスクは、以前にB O Sの移植後リスクとして同定された、急性拒絶病状発生のような因子よりもおよそ8 ~ 10倍大きかった(Sharpies, et al., 2002)。

【0042】

肺移植片レシピエントの末梢血中のc o l (V) D T H反応性の原因であるT細胞の予備的分析は、c o l (V)特異的C D 8 + Tエフェクター細胞の役割は排除できないけれども、大部分はC D 4 +であることを示している(Burlingham, W., Rodriguez, D. and Jankowska-Gan, E., 未発表)。ラットモデルにおいて、拒絶肺移植片からのインビトロ培養により誘導されたc o l (V)特異的M H CクラスI I制限C D 4 + T細胞クローンは、左肺同系移植片において肺拒絶病態を仲介することが可能であり、いくらかの病態は未処理の右肺にも広がっていた(Haque, et al., 2002)。同一のクローンを正常ラット内へ注入した場合、未処理肺への損傷は観察されず、これらの結果は、同系移植片法に伴っている虚血及び再灌流障害が免疫病態を開始するために必要とされたことを示唆している。拒絶同種移植片から単離されたT細胞のすべてのクローンが病原性であるわけではなく、いくつかは保護的であるようであり(D. Wilkes, 未発表)、c o l (V)又は他の組織抗原に特異的なC D 4 + T調節細胞は自己免疫病態を制限することにおいて役割を果たすことができることを示唆している。実際、患者L3におけるB O S発生後の移植片損失への急速な進行、及び抗c o l (V)自己免疫を有する幾人かの患者における機能の安定化(図I B、左パネル及び1 C、中央パネル)は、ヒト(VanBuskirk, et al, 1998: Burlingham, et al., 2000, Cai, et al., 2004)及び非ヒト霊長類(Torrealba, et al., 2004)での腎臓移植で以前に記載されている現象である、ドナー抗原への調節されたD T H応答の喪失又は獲得と関連していた(W. Burlingham and E. Jankowska-Gan, 未発表)。

【0043】

H L A D R不適合は臓器移植の早期急性拒絶の周知のリスクファクターである(Ayoub, et al., 1982)。このことは、なぜD R不適合がB O Sに関連しているのかを部分的に説明できる(van den Berg, et al., 2001)。ドナー及び自己抗原に向けられる免疫調節の状態を確立することにより、H L A D R適合が肺移植に有益な役割を果たしている可能性が高い(Rodriguez, et al., 2004)。

【0044】

I V型コラーゲンに対するB細胞自己免疫とグッドパスチャー症候群間のよく確立されたつながりがあり(Hudson et al., 2003)、それはトランスビポD T Hアッセイを使用したT細胞レベルで本研究において確認された(図3 B)。T細胞仲介傷害による腎臓からのコラーゲンI Vの放出は、システムを局所B細胞免疫に、及びこの疾患のラットモデルにおける抗系球体基底膜I g G沈着に傾かせる。同様に、アロ反応性との関係において、虚血損傷肺移植片からのc o l (V)の放出は、c o l (V)特異的エフェクターT細胞を活性化し、局所c o l (V)特異的B細胞応答及び上皮マトリックスにおけるC ' - 固定I g Gの沈着を促進する。

【0045】

本明細書に報告されている実施例2の一つの結果は、I P Fを有する患者中に、先在するc o l (V)特異的自己免疫が存在するという発見である。肺移植後(R E F)のこれらの患者の予後不良の理由と同様に、I P Fの病因は謎のままである。抗c o l (V)特異的T細胞が、この肺疾患の根底にある線維性プロセス、又はI P Fのための肺移植における早期不良転帰に寄与かどうかまだ決定されていないが、これらのデータは明瞭にこれらの現象間の関連と一致している。

【0046】

実施例2の予期されなかった結果は、移植に先立ってc o l (V)に対する自己寛容を

10

20

30

40

50

回復する又は強化することにより、I P Fを有する又は発生するリスクがあると診断された患者を治療することを示唆している。一つの態様は、間質的な肺内への経口療法により (Yasufuku et al, 2001 ; Yasufuku, et al, 2002)、あるいは、限定されるわけではないが、V型コラーゲン及び抗原性成分及びそれらの変異体を含むコラーゲンに対する患者の寛容を増加させるように設計された、服用量計画での他の減感作戦略により、c o l (v)を投与することによって、I P Fを治療する方法である。

【 0 0 4 7 】

さらに別の態様は、自己免疫応答を含む疾患を診断する又はモニターするための抗体に基づいたアッセイである。

【 0 0 4 8 】

コラーゲンに対する抗体の存在を検出することは、いくつかの態様に従って、E L I S A法によるような多数のイムノアッセイ法のいずれかを使用して達成することができる。標準イムノアッセイ教科書を参照することにより見ることができるよう、広範囲のイムノアッセイ技術が利用可能であり、これらには、限定されるわけではないが、シングルサイト及び2 - サイト、又は非競合型の「サンドイッチ」アッセイ、ならびに慣用的競合結合アッセイが含まれる。

【 0 0 4 9 】

サンドイッチアッセイは中でも最も有用で及び通常使用される、抗体に基づいたアッセイ法であり、多様な態様を実施するために使用することができる。サンドイッチアッセイ技術の多数の変法が存在し、すべてが多様な態様に包含されることが意図される。簡単には、サンプル中の抗体を検出するための典型的なアッセイにおいては、非標識抗原を固体表面に固定化し、そして試験されるべきサンプルを結合された抗原分子と接触させる。適したインキュベーション期間後 (即ち、抗体 - 抗原複合体の形成を可能にする十分な時間)、検出可能なシグナルを生成することができるレポーター分子で標識した抗ヒトI g Gのような第二抗体を次ぎに加え、抗体 - 抗原 - 標識抗体の形成に十分な時間放置する。未反応材料を洗い流し、そしてサンプル中の検出すべき抗体の存在を、レポーター分子により生成されたシグナルの観察により決定する。結果は、例えば、可視シグナルの単純な観察により、定性的であってもよく、あるいは、問題とするサンプルにより発生されたシグナルを検出されるべき抗体を既知の量含有する対照サンプルと比較することにより、定量的であってもよい。このアッセイの変法には、サンプル及び標識抗体の両方が同時に結合された抗原に加えられる、同時アッセイが含まれる。これらの技術は公知であり、当業者には容易に明らかになるであろういずれかのマイナー変法が含まれる。

【 0 0 5 0 】

典型的なサンドイッチアッセイにおいて、抗原は固定化されており、例えば、固体表面に共有結合でか又は受動的に結合されている。いくつかの態様において、固体表面は、典型的には、ガラス又はポリマーであり、最も通常に使用されるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニル又はポリプロピレンである。固体支持体はチューブ、ビーズ、ディスク又はマイクロプレートの形態、又はイムノアッセイの実施に適したいずれかの他の表面であってもよい。多様な結合プロセスが当該技術分野において周知であり、一般に所与の表面への抗原の架橋、共有結合又は物理吸着から成っている。固定化抗原は次ぎに、試験サンプルの添加に備えて洗浄される。試験されるべきサンプルのアリコート次ぎに固定化抗原と接触させ、十分な期間 (例えば、2 ~ 40分)、及びサンプル中に存在する、コラーゲンに対するいずれの抗体の結合も可能にするために適した条件下 (例えば、25)でインキュベートする。接触時間の実際の長さ、緩衝液条件、温度などは容易に調節可能なパラメータであり、所与の試験について典型的には容易に決定される。インキュベーション期間に続いて、いずれかの結合された抗体を含んでいる固定化抗原を洗浄及び乾燥し、結合された抗体に特異的な第二抗体 (例えば、抗ヒトI g G)とインキュベートする。第二抗体はレポーター分子に連結されており、それを抗体 - 固定化抗原複合体への第二抗体の結合を示すために使用する。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

用語「部分 (moiety)」とは、本明細書で使用される場合、分子、原子、化学官能基などを含む。

【0052】

本明細書で使用される用語「レポーター分子」には、それらの化学的性質により、抗原結合抗体の検出を可能にする分析的に同定可能なシグナルを提供する分子が含まれる。検出は定性的であっても、あるいは定量的であってもよい。この型のアッセイにおいて最も普通に使用される分子には、酵素、フルオロフォア又は放射性核種含有分子（即ち、放射性同位元素）、化学発光分子などが含まれる。酵素イムノアッセイ (EIA) の場合において、酵素は第二抗体に、一般にはグルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸によりコンジュゲートされている。しかしながら、容易に認識されるであろうように、広範囲の異なったコンジュゲーション技術が存在し、それらは容易に当該技術分野で利用可能であり、及び特定のアッセイ及び試験に至適の又はほぼ至適の条件は、最少の実験法のみで到達し得る。これらの型のアッセイにおいて普通に使用されるレポーター酵素には、限定されるわけではないが、中でも西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ及びアルカリホスファターゼが含まれる。特定の酵素で使用されるべき基質は、レポーター分子又は原子の存在に関連する所与のシグナルの検出可能な変化の産生（対応する酵素による加水分解で）に対して一般に選択される。上記の発色基質というよりむしろ蛍光生成物を生成する蛍光発生基質を用いることも可能である。ほとんどの場合、酵素-標識抗体は第一の抗体-抗原複合体に加えられ、結合させ、次ぎに過剰の試薬を洗い流す。適切な基質を含有する溶液を抗体-抗原-標識抗体の複合体へ加える。基質は第二抗体に連結された酵素と反応し、検出可能な視覚シグナルを産生し、それは通常分光光度計を使用してさらに定量することができ、サンプル中に存在した抗体の量の指標を与える。用語「レポーター分子」はガラス又はラテックスビーズのような細胞凝集又は凝集の障害を使用することにも拡張される。加えて、レポーターは、その存在が、例えば、シンチレーション計数によって検出される放射性基又は原子でもあり得る。

10

20

【0053】

もしくは、フルオレセイン及びローダミンのような蛍光化合物を抗体へ、それらの結合能を有意に変化させることなく化学的に結合させてもよい。特定の波長の光による照明で活性化した場合、蛍光色素標識抗体は光エネルギーを吸収し、分子の励起性の状態を誘導し、続いて特徴的な色の光を放出し、いくつかの態様において、放射されたシグナルは光学顕微鏡で視覚的に検出可能であり、他の態様において、シグナルは可視スペクトルの外側であることもできる。EIAのように、蛍光標識抗体は一次抗体-抗原複合体に結合させることが可能である。非結合試薬を洗い出した後、残っている三次複合体を次ぎに適切な波長の光に暴露し、観察される蛍光は目的の抗体の存在を示す。免疫蛍光法及びEIA技術は両方とも当該技術分野でよく確立されており、本明細書に開示した多様な態様の使用に容易に適応可能である。加えて、放射性同位元素、化学発光、蛍光色素、又は生物発光分子などのような他のレポーター分子も用いることができる。

30

【0054】

いくつかの態様を実施するため、純粋な又は部分的に純粋なコラーゲン又はそれらのエピトープ又は抗原性部分を得る必要がある。これらの材料、例えば、V型コラーゲン又はそれらの抗原部分は、限定されるわけではないが、2~3例を挙げると動物源、ヒト死体又は組換え手段を含む、多様な手段により容易に得ることができる。追加の方法にはV型コラーゲンのようなコラーゲンの部分的消化が含まれる。

40

【0055】

一つの側面は、V型コラーゲンのような肺結合組織に対する自己免疫応答の証拠を同定することにより、特発性肺線維症のような疾患を診断することを含んでなる。結合組織の証拠は、V型コラーゲン及びそのエピトープを含むことができる。実施例3で明瞭に示したように、IPFを有する、又はIPF又はBO又はBOSを発生することが高められている患者を同定する及び/又は追跡するために使用し得る一つのアプローチは、患者の体液中の抗V型コラーゲン抗体のレベルを測定することである。

50

【 0 0 5 6 】

別の側面は、V型コラーゲン及びV型コラーゲンの多様な抗原性成分及び/又はそれらの類似体のような化合物の安全で及び療法的に有効量を投与することにより、肺組織中に観察されるコラーゲンの自己免疫拒絶に関連する、医学状態を有すると診断された、又は医学状態を有すると考えられる、又は医学状態を発生する高められたリスクにあると考えられる、患者を治療することを含む。これらの化合物は、経口摂取、肺内滴下注入、吸入、注射などを含む、当該技術分野では公知のいずれかの手段により投与し得る。療法化合物の有効量及び治療の持続は、各患者に依存するであろうが、療法効果、例えば、V型コラーゲン又はそれらのいくつかの断片のようなコラーゲンに対する患者の自己免疫応答の少なくとも部分的な抑制を誘導するために容易に較正し得る。

10

【 0 0 5 7 】

免疫システムに関連する疾患又は医学状態を治療するためにMCHエピトープを使用する療法的意義の追加の議論は、例えば、2005年6月28日にSachsにより公布された米国特許第6,911,220号、及び2003年4月24日に公開された米国特許公開番号2003/0078208 A1 (Wilkes) (両方ともその全体が本明細書において援用される)に見ることができる。

【 0 0 5 8 】

一つの態様において、自己免疫応答を含む又は自己免疫応答により引き起こされる肺疾患又は障害を有する、又は患っていると考えられた患者は、例えば、シクロスポリンを含む免疫抑制剤で治療することが可能であった。免疫システムに対するいくつかのその効果を含む、シクロスポリンのさらなる一般的議論については、2005年6月25日にDavalian, et al.により公布された米国特許第6,410,696号及び1999年11月23日にWangにより公布された5,990,274号(両方ともその全体が本明細書において援用される)を読者は参照されたい。

20

【 実施例 】

【 0 0 5 9 】

実施例 1

移植後肺患者はV型コラーゲンが特異的な自己免疫を発生していたかどうかを決定するため、8人の肺移植片レシピエント及び5人の腎臓移植片レシピエント(グッドパスチャー症候群を有する、IV型コラーゲン(c o l)自己免疫)からの白血球、及び3つの異なったコラーゲンを使用する遅延型過敏性(DTH)アッセイを行った。図3、パネルAに示したように、肺移植片レシピエントからのT細胞はc o l (V)に応答したが、c o l (I V)又はc o l (I I)には応答せず、一方、グッドパスチャー症候群を有する患者からのT細胞はc o l (V)又はc o l (I I)には応答せずに、c o l (I V)に対して有意により高いDTH応答を有していた。この鍵となる発見は、肺移植片レシピエントが抗V型コラーゲン自己免疫を有していることを示している。

30

【 0 0 6 0 】

我々は次に、抗V型コラーゲン自己免疫応答が、肺移植を待っているいずれの患者にも観察することができ、それ故特定の患者が低下した肺機能及び拒絶を生じ易くできる先在条件を反映しているかどうかを決定した。肺移植を待っている多様な末期肺疾患を有する23人の患者における抗c o l (V) D T H 応答の解析は、一つの特定の群が抗V型コラーゲン自己免疫応答を有していることを示した。図5に示したように、特発性肺線維症(IPF)の患者が抗c o l (V) D T H 応答を示し、それはいずれか他の疾患を有する患者で観察されたよりも2倍高かった。この鍵となる発見は、IPFがV型コラーゲンに対する自己免疫応答により起こされ得ることを示している。

40

【 0 0 6 1 】

この発見をさらに支持するため、いくつかの異なる原因により肺移植を待っている患者を、c o l (V)か又はc o l (I I)に対するかれらの自己免疫応答について試験した。図3、パネルBに示したように、IPF患者からのT細胞のみがV型コラーゲンに特異的である自己免疫応答を示した。University of Wisconsin で移植したIPFを有する

50

患者は有意に低い1年移植片生着 ($p = 0.05$) (図3パネルC) を有したことを示したのは興味深く、それは先在するV型コラーゲンへの自己免疫応答がより速い肺機能の喪失及び死を生じ得ることを示唆する。図3及び5に示された結果は、IPFはV型コラーゲンへの自己免疫応答により起こされ得ること、これらの患者はこの自己免疫応答のためより速い速度で肺を拒絶するであろうこと、及びこれがV型コラーゲンによる経口免疫寛容療法に应答するであろう追加の患者の群を表していることを示している。

【0062】

IPF患者で観察されたような、V型コラーゲンに対する先在する自己免疫応答が肺破壊を生じるであろうという考えを裏付けるため、我々は、我々のラット移植モデルを使用した。WKYラットを何もなしで(図6a)、ニワトリ卵リゾチーム(HEL)(図6b)か又はV型コラーゲン(図6c)で免疫し、同系移植肺を移植した。観察されるように、何もなしで又はHELで免疫したラットは正常肺病理を示した。対照的に、V型コラーゲンに対して活性免疫応答を有するラットは30日以内にそれらの同系移植片肺を破壊した。これらのデータはさらにV型コラーゲンへの自己免疫応答と一致しており、V型コラーゲンに対する自己免疫応答を示さない肺移植片レシピエントで予期されるよりも、移植された肺及び肺組織の拒絶のより高いリスクを示している。

10

【0063】

実施例2

閉塞性細気管支炎(BOS)は、肺移植後の移植片機能損失の主要原因である。肺細胞外マトリックス中のマイナーコラーゲン、V型コラーゲン(col(V))はラット肺同種移植片拒絶の病変形成に結びつけられてきた。ヒト肺移植後のcol(V)に対する自己免疫がBOSの素因となるという仮説を試験するため、我々は末梢血中の遅延型過敏性(DTH)応答及び気管支肺胞洗浄(BAL)中の抗体応答を試験した。

20

【0064】

1988年から2003年6月まで、University of Wisconsin で実施されたすべての肺移植($n = 229$)を、BOSの素因となるリスクファクターについて遡及的に分析した。56人のこれらのレシピエント、10人の正常対照及び25人の移植を待っている患者における、col(V)又はcol(II)に対するDTH又は抗体を測定した。

【0065】

すべての対象は、University of Wisconsin 及びIndiana University School of Medicine で、IRB認可インフォームド・コンセント手順を使用することにより同意した。1988年から2003年3月まで、University of Wisconsin Hospital and Clinics で一次肺移植を受けた229人の内、3人は技術的失敗のため分析から除外した。

30

【0066】

すべての患者は、移植後0.5、1、3、6、9及び12ヶ月、及び臨床的に指示された場合はその後もプロトコール気管支肺胞洗浄(BAL)及び経気管支生検(TBB)を受けた。TBB組織はサイトメガロウイルス(CMV)封入及び細胞浸潤についてスクリーニングした。col(V)研究患者($n = 56$)には、2000年に開始された移植後DTH研究プロトコールに登録された29人が含まれており、BALが保存されていた23人の患者が遡及的にcol(V)に対する抗体を試験し、4人の患者は移植後3~6年から始まったDTHについてのみ試験した。さもなければ、およそ6、12及び18ヶ月目及びその後は毎年、DTHアッセイのために血液サンプルを採取した。非喫煙成人血液ドナー及び気管支鏡検査を受けているボランティア及びBAL液の収集物が、陰性対照として働いた。グッドパスチャー症候群のための腎臓移植後の5人の患者もDTH試験における対照血液ドナーとして採用された。

40

【0067】

BOSレベルI(一次研究エンドポイント)は、少なくとも移植90日後、最大移植後値の $< 80\%$ へのFEV1の持続的低下により診断された(9)。

【0068】

IgGは、商業的に調製されたProtein Gセファロースカラム(Pharmacia, Piscataway

50

、NJ)を製造元のプロトコールに従って通過させることにより、患者及び対照のBAL液から親和性精製された。すべての溶出フラクションは使用するまで - 80 で凍結した。

【0069】

c o l (V) に対する抗体は、検出にヒツジ抗ヒト I g G アイソタイプ特異的抗体を使用したことを除いて、以前に記載されているウェスタンブロット技術を使用して分析した。ウシ c o l (I I) 及び c o l (V) (Collaborative Biomedical Products- Becton Dickinson, Bedford MA) 又はヒト胎盤から抽出した (1 0) c o l (V) を標的抗原として使用した。

【0070】

C B - 1 7 S C 1 D マウスは Harlan Sprague Dawley, Inc (Indianapolis, IN) から購入するか、又は近くで繁殖させた。全ての動物は N I H ガイドラインに沿って飼育し及び処置した。

【0071】

トランスビポ D T H アッセイは、以前に記載されているように (i i) 、 S O 1 D マウスの足蹠内にヒト P B M C 及び抗原を同時導入することにより実施した。ヒト c o l (V) 、 c o l (1 V) (Fluka, Inc., Buchs, Switzerland) 又はウシ c o l (I I) (5 μ g / 注入 ; Southern Biotech, Birmingham, AL) が試験抗原であった。足蹠厚はダイヤル厚さ計を使用し、注射前及び 2 4 時間後に測定した。緩衝液を伴った P B M C 単独によるバックグラウンド膨潤を差し引いて、抗原特異的応答を決定した。バックグラウンドを > 2 5 × 1 0 ⁻⁴ インチを超える膨潤応答を陽性と考えた (1 2) 。

【0072】

B O S フリー生存率は Kaplan 及び Meier の方法を使用して見積り、そして log-rank test を使用して群間を比較した。陰性 c o l (V) D T H 又は A b 応答の基準は厳格であった - たえ全ての他の時点で陰性であっても、ウェスタンブロットでのわずかに陽性の抗 c o l (V) バンド又は最小陽性 D T H 応答 (2 5 × 1 0 ⁻⁴ インチ) を有する患者は陽性と考えた。C o x の比例ハザードモデルを、疑わしいリスクファクター間の関連を評価するために使用し、そのいくつかは時間 - 変動、及び B O S フリー生存であった。P 値 < 0 . 0 5 は有意であると考えた。全ての分析は S A S 統計ソフトウェアリリース 6 . 1 2 、 SAS Institute Inc. (Cary, NC) を使用して実行した。移植前 c o l (V) D T H 応答はクラスカル・ワリス検定を使用し、I P F 患者サブグループ及び他のグループ間で比較した。

【0073】

ここで表 1 (図 7) を参照すると、ここに要約されているのは、University of WI, Madison での 2 2 6 人の肺移植片レシピエントにおける個体統計及び B O S のの発生率である。B O S は 8 6 人の患者 (3 8 %) で発生した。両側肺移植 (n = 9 3) と比較して片側 (n = 1 3 3) でより多かった。平均経過観察期間は 3 . 7 年であった。全体の比率の構成及び c o l (V) 研究サブセットの構成は B O S の発生率、平均経過観察期間、及び各疾患カテゴリーにおける患者の比率に関して類似していた。

【0074】

我々は以前に I g G 2 産生が、肺同種移植片拒絶の病状発生の間に B A L 液で選択的に増加したことを報告した (1 0) 。図 1 A に図解したように、肺移植片患者 L 3 (B O S レベル I I I - 移植片機能損失) 及び L 4 1 (B O S なし) の B A L から単離された I g G 抗体は、ウェスタンブロットにおいて c o l (V) に強く結合したが、c o l (I I) には結合しなかった。ウシ及びヒト c o l (V) の両方とも B A L I g G により等しく認識されるたことは (データは示されていない) 、標的エピトープが種を超えて保存されていることを示している。患者 L 3 及び L 4 1 とは対照的に、B O S を発生していない L 3 1 の B A L サンプル中では、c o l (V) への結合は弱い又は観察されなかった (図 1 A) ; 陰性結果は正常ボランティアの B A L から単離された I g G でも観察された (n = 1 0 ; データは示されていない) 。

【0075】

10

20

30

40

50

次に、我々は、末梢における（トランスビボ D T H 試験を使用して）及び局所的に（B A L 抗体分析により）、B O S の発生と抗 c o l (V) 自己免疫との関係を試験した。同一の 3 人の患者の臨床経過を図 1 B に示した。患者 L 3 は、試験された移植後の最も早い時期に（180 日）、強い及び特異的な抗 c o l (V) D T H 反応性を有しており、F E V - 1 は未だ最高レベルであった。強い c o l (V) 抗体応答は B O S の発生直前にも検出され（黒色矩形）、その時 F E V - 1 の値は最大の 80 % 付近で停滞していた。D T H 及び c o l (V) に対する抗体応答の両方が B O S の発生の間に検出されたが、450 日目の B O S 末期（グレード I I I）では D T H 反応性は失われた。

【0076】

患者 L 4 1 は、c o l (V) に対する強い早期応答を有するが、同種移植片機能の持続的低下がない患者の例である。抗 c o l (V) 抗体（2+）が 48 ~ 213 日目で検出され、及び 188 ~ 460 日目に得られた全ての P B M C サンプルは c o l (V) に対して D T H 陽性であった。500 日目から抗 c o l (V) D T H 応答は変動し、そして一般に減少した。980 日目の急性拒絶病状発生後、B O S - 1 についてのカットオフの直ぐ上の、最大 F E V 1 のおよそ 82 % で安定化した。

10

【0077】

患者 L 3 1 は 49 日目に c o l (V) に対する弱い抗体応答及び 400 日目に最小陽性抗 c o l (V) D T H 応答を有したが、強い自己免疫反応性を発生することはなかった。該患者は優れた移植片機能を > 5 年維持し、そしてつい最近の P B M C サンプル（1600 日目）は抗 c o l (V) D T H 応答について陰性のままである。

20

【0078】

c o l (V) 応答及び同種移植片機能のこれら三つのパターンは、56 人の患者の研究サブグループで見られたものを代表している。図 1 C は、各カテゴリーにおける 4 人の追加患者の移植後時間経過を示している。各々の線は単一の患者についての % 最大 F E V 1 を表しており、及び各々の赤色記号は c o l (V) について陽性試験を表している（B A L 中の抗体か又は D T H アッセイにおいて > 25 の正味足蹠膨潤）。緑色記号は陰性抗 c o l (V) 結果を示している。

【0079】

第一のカテゴリー中の 4 人全ての患者（抗 c o l (V) +、B O S +）は、L 3 患者と同様に、移植片機能の喪失に先立って陽性 D T H 又は抗体試験を示した。第三のカテゴリーの患者（抗 c o l (V) -、B O S -）は、c o l (V) に対する応答をほとんど示さず、そしてすべて 3 ~ 6 年の経過観察で B O S フリーを続けた。中間のカテゴリーの患者は、抗 c o l (V) 応答についての繰り返した陽性試験にもかかわらず、移植後 1 ~ 3 年優れた移植片機能を何とか維持していたので、最も興味深い。

30

【0080】

B O S か又は移植片機能損失又はエンドポイントとしての B O S 単独に関連するリスクファクターの遡及的分析の結果は表 2（図 8）に示されている。全患者集団中で、B O S の有意により高い（ $p < 0.05$ ）リスクの素因となる移植前因子には、ドナーとの 2 D R 不適合を有している（ $R R = 1.64$ vs . 0 又は 1 D R 不適合）、及び慢性閉塞性肺疾患、C O P D（ $R R = 1.7$ ）又は「他の」（ $R R = 1.9$ ）の疾患カテゴリーを有しているものが含まれる。B O S 又は移植片機能損失のより低い発生率の素因となる移植前因子には、嚢胞性線維症（C F）の本来の疾患又は両側肺移植を受けている（この疾患カテゴリーの主な治療）が含まれる（両方とも $R R = 0.35$ ）。B O S についての移植後リスクファクターも評価した。予期されたように、急性拒絶病状発生の発生率は、B O S の 1.4 ~ 1.5 倍より高いリスクと関連し、それは極めて有意であった。しかしながら、C M V + ドナー肺の C M V - レシipient への移植、又は移植後期間におけるバイオプシ証明 C M V は B O S と有意に関連しなかった。

40

【0081】

図 8 を再び参照すると、表 2 は、C o x 比例ハザード肺移植モデルを使用し、c o l (V) への応答について分析された 56 の肺移植片レシipient における乏しい機能（B O

50

S I又は移植片機能損失)又はBOS I発生の分析を要約している。この患者の下位集団において、急性拒絶は再び乏しい機能についてのリスクであった。乏しい移植片機能についての最も高いRR(12.3)は、BOS発生前に近い時点でc o l (V)に対して陽性DTHを有する患者で観察された。対照c o l (I I)に対するDTH応答はBOSの発生前に相関を示さず(RR=1.0)、c o l (V)に対するDTH応答はBOSリスクの特異的マーカーであることを示している。2は、c o l (V)に対するDTH応答とBOSの発生の関係を、如実に示している。移植後370日目(上のパネル)及び760日目(下のパネル)に良好な肺機能(>80%最大FEV1)を有する患者を、抗体及び/又はDTH分析に基づいてc o l (V) + 対c o l (V) - 応答者に分割し、カプランマイヤー分析を、エンドポイントとしてBOS Iまでの時間で実施した。各時点で先立って抗c o l (V)反応性を有する患者の半分以上が次の2年以内にBOSを発生し、一方、c o l (V)に対して陰性応答を有する患者は主にBOSフリーであった。

【0082】

BAL中の抗c o l (V)抗体のレベルは、何らかの原因によりBOSの発生又は移植片機能損失(RR=2.3)、及びBOS単独のリスク(RR=2.08)と有意に関連した。二つの指標、DTH又はc o l (V)に対する抗体が合わさった場合、BOS又は移植片機能損失に対するRRは12.7であり、BOSを発生した全ての患者がいくつかの前の時点で陽性DTHか又はc o l (V)に対する抗体応答を有していたので、BOSについては計算することができなかつた、表2(図8)。

【0083】

肺移植後患者で見られた抗c o l (V)応答が、特定の患者に乏しい機能を生じやすくすることができる、前々から存在している状態の単なる反映しているかどうかを決定するため(COPDを有する患者はより高い移植前抗c o l (V)応答を有し、一方、CFを有する患者はより低い応答を有する)、肺移植を待っている、多様な末期肺疾患を有する23人の患者における抗c o l (V)DTH応答を分析した。図3、パネルAに示したように、ほとんど末期の肺疾患を有する患者は抗c o l (V)DTH応答を有しておらず、既知の肺疾患を有していない正常対象で見られたことと著しく異なっている。例外はIPFを有する患者である。これらの患者における抗c o l (V)DTH応答はいずれか他の疾患を有する患者で見られるもののおよそ2倍であった。興味深いことに、University of Wisconsinで移植したIPFの患者は、有意に低い1年移植片生存率(p=0.05、データは示されていない)、しかし同様の5年生存率及びBOS発生の比率を有していた(表1)。

【0084】

肺移植後患者におけるコラーゲンに対する自己免疫の発生がV型コラーゲンに特異的であったかどうかを決定するため、8人の肺移植レシピエント及びグッドパスチャー症候群(IV型コラーゲン自己免疫)を有する5人の腎臓移植レシピエントに対し、c o l (I I)、c o l (I V)及びc o l (V)を使用してDTHアッセイを実施した。図3、パネルBに示したように、肺移植レシピエントはc o l (V)に反応したがc o l (I V)又はc o l (I I)には反応せず、一方、グッドパスチャー症候群を有する患者はc o l (V)又はc o l (I I)への反応なしに、c o l (I V)に対し有意に高いDTH応答を有していた。

【0085】

実施例3

V型コラーゲンに対する体液性又は抗体仲介免疫応答の検出のためのビーズアッセイ。このアッセイは、V型コラーゲン自己免疫応答を有する患者からの血清及び/又は肺洗浄液中に存在することができるV型コラーゲンに対する抗体を検出するであろう。V型コラーゲン-被覆ビーズならびに他の必要な試薬がこのアッセイのために提供される。末端利用者は、血清及び/又は肺洗浄液、及びアッセイを実行するためのPBSのような通常の試薬(又はこれらの試薬はキット中に組み入れることが可能である)を提供することができる。簡単には、典型的なアッセイは以下のようである：

10

20

30

40

50

1) ストレプトアビジン被覆ビーズ (5 μm 、結合能 10 ~ 20 $\mu\text{g} / 1 \times 10^7$ ビーズ (Polyscience, Warrington, PA)) を滅菌 PBS で 2 回洗浄した。ビーズ (1 \times 10⁷) を 40 μg のヒト V 型コラーゲンを含んだ 100 μl の PBS に懸濁し、4 で 60 分インキュベートした。

【0086】

2) ヒトコラーゲン V 抗体に対する 20 μm のウサギ抗体 (ビオテン) (Abeam, Cambridge, MA) を使用し、上記 1 と同一手順で陽性対照を発生させた。

【0087】

3) 各アッセイについて、1 \times 10⁶ コンジュゲートビーズを PBS 中で 2 回洗浄し、50 μl の血清又は肺洗浄液を加えた 100 μl の PBS 中でインキュベートした。室温で 30 分インキュベート後、ビーズを 10% FCS 含有 PBS で 3 回洗浄した。

【0088】

4) ビーズを 100 μl の滅菌 PBS + 10% FBS に懸濁し、室温で約 30 分、二次抗体とインキュベートした。典型的には、R-PE にコンジュゲートされた 5 μl の抗ヒト IgG 抗体を使用した (Sigma, Saint Louis)。ビーズを 10% FCS 含有 PBS 中で 3 回洗浄し、300 μl の PBS / FCS 溶液に懸濁し、フローサイトメーターを使用して分析した。このアッセイの例の結果は図 9 に要約されている。

【0089】

陽性対照については、既知の量の抗コラーゲン-V 抗血清をビーズアッセイに加えた。図 9 の右側のパネルが図示しているように、抗コラーゲン V 抗体の量の増加は、平均蛍光チャンネルの右への著しいシフトを生じる。それ故、この方法は患者の血清中に存在する異なった量の抗体を検出し得る。さらに図 9 を参照すると、左のパネルは健康なヒト対象から得られた血清サンプルと比較された 4 人の患者の血清からの抗コラーゲン V 抗体の検出を図示している。トレースにより図示されているように、患者 # 457 からのサンプルは右への最も大きなシフトを示し、この患者が抗コラーゲン V 抗体の最も高いレベルを有していることを示唆している。患者 # 458 及び 420 は小さなシフトを示し、患者 # 457 よりも低いレベルの抗体を示し、一方、患者 519 は、このアッセイで反応する何らの抗体も有していないようである。

【0090】

図 9 に要約した結果により示されているように、患者 457 は右への最も大きなシフトを示し、この特定の患者が抗 col (V) 抗体の最も高いレベルを有することを示唆している。対照的に、患者 # 458 及び # 420 から集められたサンプルは蛍光ピークに小さなシフトを示し；一方、患者 # 595 はこの特定のサンプル中にいずれの抗体も少しも有していないようである。これらのデータは特発性肺疾患 (IPD) 又は他の自己免疫に基づいた肺障害又は疾患を検出する、及び / 又は肺移植を受けている所与の患者が移植された臓器を拒絶するであろう可能性を評価する方法を説明している。肺疾患を診断する、又は BOS を発生する所与の患者の可能性を評価する方法は、一般には、患者から体液 (例えば、血清又は間質液) 又は組織を集めること、および V 型コラーゲンに対する抗体の存在についてサンプルを分析することを含む。

【0091】

実施例 4

試験動物における経口免疫寛容の誘導、コラーゲン又はコラーゲンの抗原性成分に対するヒト又は動物患者の自己免疫応答を変調するためのモデル。利用された病原体フリー、MHC (RT1) 不適合雄ラットは : Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.) 又は Taconic (Germantown, N.Y.) から購入され、施設のガイドラインに従って Indiana University School of Medicine (Indianapolis, Ind.) の Laboratory Animal Resource Center に収容した、移植の時点で 250 ~ 300 g の Fischer 344 (F344、RT1^{l v l})、Brown Norway (BN、RT1ⁿ) 及び Wistar Kyoto (WKY、RT1^l) ラットであった。

【0092】

10

20

30

40

50

簡単には、V型コラーゲンは以下のように調製した。精製したヒトV型コラーゲン [c o l (V)] を 0 . 0 0 5 M 酢酸 (0 . 5 m g / m l) に希釈し、アッセイに使用されるまで4 で貯蔵した。c o l (V) の量は、サンプル中のヒドロキシプロリン含量の決定により評価した (Woessner, 1961) 。

【 0 0 9 3 】

この特定の試験において、V型コラーゲンをW K Y雄ラットに経口で投与した。動物 (1 8 0 ~ 2 0 0 g) には、以前に記載されているように (Stark and Ostrow, 1990)、0 . 5 m l の生理食塩水に溶解した 1 0 μ g か又は 5 0 μ g の c o l (V)、c o l (I I) 又は c o l (X I) 溶液を、1 6 ゲージボールポイントステンレススチール動物摂取針 (Braintree Scientific, Braintree, Mass.) を利用する胃経管栄養により摂取させた。対照として、同様の動物に希釈剤のみを摂取させた。8回又は4回摂取に対し、動物は一日おきに摂取させた。最後の摂取7日後、これらのラットは同所性移植により F 3 4 4 肺同種移植片を受けた。W K Yレシピエント内へ移植されたW K Y肺移植片 (同種移植片) を対照として使用した。

10

【 0 0 9 4 】

遅延型過敏性 (D T H) 応答は、Sayegh et al, 1992; Yoshino et al, 1995; 及び Yamagami et al, 1999、に記載されている方法を改変して決定した。手短に言えば、肺移植2週間後、対照又はc o l (V) 摂取W K Yラットは、2 6 ゲージ注射針を使用する皮下 (s . c .) 注射により、右耳介内に、 10^7 照射 (3 0 0 0 ラド) ドナー由来 F 3 4 4 又は第三者 (B N) 脾細胞の 3 0 μ l P B S 溶液を受けた。左耳介は等容積の希釈剤を受け、対照部位として働いた。無処置又は同種移植片レシピエントW K Yラットの別々の群が、1 5 μ g の c o l (V) を 3 0 μ l 容量で右耳介内に、希釈剤を左耳介内に注射されて試験された。無処置W K Yラットは陰性対照として使用した。耳の厚さは、注射直前及び2 4 時間後に盲検様式で、マイクロメーターカリパー (Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, 111.) で測定した。抗原特異的D T H 応答は以下の式に従って計算した：特異的耳介膨潤 = (右耳厚さ@ 2 4 時間 - 右耳厚さ@ 0 時間) - (左耳厚さ@ 2 4 時間 - 左耳厚さ@ 0 時間) × 10^{-3} m m (Yamagami et al., 1999)。全てのデータは三回の測定の平均として報告されている。

20

【 0 0 9 5 】

左肺同種移植片 (W K Y W K Y) 又は 同種移植 (F 3 4 4 W K Y) の同所性移植は (Marck et al., 1983 and Prop et al., 1985) により最初に記載されている手順を利用し、既に報告されているように (Sekine et al., 1997) 実施した。発明者の以前の報告 (Sekine et al., 1997) と同様に、全ての移植群において生存率は 9 0 % を上回った。実験期間の間、いずれの時点でも非免疫抑制療法は与えなかった。

30

【 0 0 9 6 】

移植肺は、移植後1日、6日及び13日目に連続胸部X線検査によりモニターした。画像的变化は以下のように段階付けした：グレード1、正常；グレード2、軽度浸潤；グレード3、中程度浸潤；及びグレード4、重篤な浸潤又は完全不透明化。

【 0 0 9 7 】

5 移植群を研究した：W K Yラットからの肺をW K Yレシピエントに (W K Y W K Y、対照同系移植片)；F 3 4 4 肺を希釈剤摂取W K Yレシピエントに移植 (F 3 4 4 W K Y、対照同種移植片)；F 3 4 4 肺をc o l (V) 摂取W K Yレシピエントに移植 (F 3 4 4 c o l (V) 摂取W K Y、c o l (V) 摂取同種移植片)；F 3 4 4 肺をc o l (I I) 摂取W K Yレシピエントに移植 (F 3 4 4 c o l (I I) 摂取W K Y、c o l (I I) 摂取同種移植片)；並びにF 3 4 4 肺をc o l (X I) 摂取W K Yレシピエントに移植 (F 3 4 4 c o l (X I) 摂取W K Y、c o l (X I) 摂取同種移植片)。予備的実験は、無摂取W K Yラット内に移植された同種移植片と比較して、同種移植病態の発生、気管支肺胞洗浄 (B A L) 示差的 (differential) 細胞計数又はD T H 応答に何の影響も与えなかった。

40

【 0 0 9 8 】

50

BAL液は、移植1週及び2週後のケタミン麻酔肺移植片レシピエントから集めた。簡単に言えば、自然の及び移植した肺のBALは、縫合により安全にされた16ゲージカテーターで、右及び左主気管支の選択的カニューレ挿入により実施した。体側気管支がクランプされている期間中、3mlの滅菌PBS(37℃)を各主気管支内に点滴注入し、吸引した。遠心分離検体から得られた無細胞BAL上清は、使用されるまで-70℃で貯蔵した。BAL液示差的細胞計数は、光学顕微鏡を利用してサイトスピン上の高倍率視野当たり300細胞を計数し、サンプル中のマクロファージ、リンパ球及び多形核(PMN)細胞の量を決定することにより行った。

【0099】

肺における病態の存在を検出するため、各群から移植肺を採取し、4%グルタルアルデヒドの気管内点滴注入により固定し、切片とし、ヘマトキシリン及びエオシンで染色し、光学顕微鏡下で検査し、及び、移植群の予備知識無しに盲検の様式で、Lung Rejection Study Group (Yousem et al, 1996)により確立された組織学的基準に従って段階付けした。

【0100】

BAL液中のPMN及びリンパ球数の統計的分析は、最初にANOVAにより実行し、群間で差が存在するかどうかを決定した。もし差が観察されたら、Student-Newman-Keuls検定を利用する事後解析を実行して、どの群が異なっているのかを決定した。P値<0.05が有意であると決定された。対照同種移植におけるDTH及び異なった抗原が暴露された無処置WKYラットは正常に分布していないことが観察されたので、相互作用を有するrank-sum二方向ANOVAを利用し、群間の差を決定した。P値<0.05が有意であると決定された。対照同種移植片及びcol(V)摂取同種移植片間の、ドナー同種抗原に対するDTH応答の相違はマンホイットニーU検定を利用して決定した。P値<0.05が有意であると決定された。気道及び脈管病理学的スコア間の相違は、最初にクラスカル・ワリス検定を利用して、続いてマンホイットニーU検定を利用する事後解析により決定した。P値<0.03が有意であると決定された。

【0101】

本発明者らは、col(V)が、マウスにおける肺同種抗原に対する局所免疫応答の標的であることを以前に示した。次ぎに、彼らは肺同種移植片拒絶の間、col(V)が抗原として認識されることを示した。DTH応答は、肺以外の臓器移植の多様なげっ歯類モデルにおいて、拒絶の程度と相関すると報告されてきた(VanBuskirk et al, 1998; Lowry et al, 1985; Joo et al, 1995)。細胞性免疫応答のインビボ試験として、同種抗原への全身DTH応答を実行した。F344肺同種移植片を受けて2週間後のWKYラットにおける、及び無処置非移植WKYラットにおけるF344脾細胞、col(V)及びBN脾細胞(第三者)に対するDTH応答を試験した。図10は、F344同種移植片を受けたWKYラットは、F344脾細胞に対する有意なDTH応答[F344脾細胞か又はcol(V)で試験された無処置WKYラットと比較してp<0.0001]を有していたことを図示している。F344同種移植片を受けたWKYラットは、col(V)に対する有意なDTH応答[F344脾細胞か又はcol(V)で試験された無処置WKYラットと比較してp<0.0001]を有していたことを図示している;図11。統計学的に、F344脾細胞及びcol(V)に対する対照同種移植片のDTH応答間には差はなかった(p>0.05)。データは、F344同種移植片を受けたWKYラットは第三者同種抗原(BN脾細胞、RT1ⁿ)へのDTH応答は有しておらず、F344同種移植片に対する免疫応答は同種特異的であることを示している。加えて、これらのデータは、肺同種移植片拒絶の間に抗原として認識されているcol(V)と一致している。

【0102】

以前の報告は、肺以外の同種移植片の拒絶の間に免疫応答の標的である抗原の経口投与はドナー臓器に対する寛容を誘導することを示している(Ishido et al., 1999)。移植に先だって肺移植片レシピエントへのcol(V)の経口投与がドナー肺に対する免疫学的寛容性を誘導するかどうかを決定するため、WKYレシピエントに、上記のごとく移植

に先だって *c o l (V)* を摂取させた。予備的実験では、1日おきに $10 \mu\text{g}$ の *c o l (V)* を8回摂取させ ($80 \mu\text{g}$ の総用量)、続いて最後の摂取から7日後の左同所性肺移植は、このモデルにおける *B A L* 細胞計数及び拒絶病態に最も大きな効果を有していた。それ故、この摂取計画を、すべての以下の研究で利用した。*C o l (V)* 摂取レシピエントの左肺移植を行い、上記のように実験期間の完了時に採取した。

【0103】

図12は、移植2週間後の対照 *W K Y* 同系移植片 (*i s o g r a f t*) レシピエント、対照 *W K Y* 同種移植片 (*a l l o g r a f t*) レシピエント及び *c o l (V)* 摂取 *W K Y* 同種移植片レシピエント及び正常 *W K Y* ラットからの *B A L* 液中の示差的細胞計数を図示している。同系移植片肺と比較して正常肺における *B A L* 示差的細胞計数で差はなかった。(Yagyu et al, 1990)と同様に、正常又は同系移植片肺と比較して、対照同種移植片 *B A L* においては *P M N* 及びリンパ球が有意に増加した (*P M N* について $p < 0.039$ 、及びリンパ球について $p < 0.00001$)。対照的に、移植に先立って *c o l (V)* を摂取させることは、対照同種移植片と比較して *B A L* 中の *P M N* 及びリンパ球に有意な減少を生じた (*P M N* について $p < 0.023$ 、及びリンパ球について $p < 0.00001$)。急性同種移植片拒絶は通常、同種移植片 *B A L* 液中の総細胞数の増加に関係する (Hirt et al., 1999)。しかしながら、移植2週間後では、対照 *W K Y* 同種移植片肺は重度の拒絶を通常受けており、移植片の破壊により、*B A L* 総細胞数を決定するための十分な *B A L* は確実に実施することが不可能である。対照的に、*c o l (V)* 摂取同種移植片レシピエントはより軽度の拒絶を示し、それはより容易な *B A L* を可能にし、より高い細胞計数を生じる。これらの理由のため、群間の総細胞数の比較は行われなかった。まとめると、*c o l (V)* による経口免疫は、急性拒絶間の同種移植片 *B A L* 液におけるより少ない *P M N* 及びリンパ球と関連することをこれらのデータは示している。

10

20

【0104】

c o l (V) 摂取が同種抗原に対する *D T H* 応答を減少させるかどうかを決定するため、対照 *W K Y* 同種移植片レシピエント及び *c o l (V)* 摂取同種 *W K Y* 移植片レシピエントは、右耳介に全同種抗原性 (*F 3 4 4*) 脾細胞を及び左耳介に *P B S* を暴露した。*D T H* 応答は24時間後測定し、特異的耳介膨潤を決定した。図10に示したように、無処置の対照同種 *W K Y* 移植片レシピエントは重度の急性拒絶を受け、ドナー抗原暴露後に強い *D T H* 応答を有した。対照的に、より軽度の同種移植片拒絶を有していた *c o l (V)* 摂取 *W K Y* 移植片レシピエントは、ドナー抗原に対する *D T H* 応答の有意な減少も有した。

30

【0105】

c o l (V) により誘導された同種抗原に対する損なわれた免疫応答は、広範囲の免疫低応答性であり (Faria and Weiner 1999)、寛容ではない。それ故、*c o l (V)* 摂取 *W K Y* ラットが他の抗原に応答できるかどうかを決定するため、これらのラットは気管内 ($200 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 1 \text{mg} / \text{kg}$) か又は静脈内に ($1 \sim 5 \text{mg} / \text{kg}$) リポ多糖 (*L P S*) (Sigma, St. Louis, MO.) を受け、それらの用量は注射又は注入24~48時間後、肺及び全身的に重度の炎症反応を誘発することが知られている用量であった (Delclaux et al. 1999)。ラットは *c o l (V)* の最後の摂取から1週間後に暴露された。誘発された疾患は肺炎及びグラム陰性菌により起こされる敗血症に類似していた。正常 *W K Y* ラットと同様に、*c o l (V)* 摂取 *W K Y* ラット内の肺内への *L P S* の点滴注入又は *I . V .* は重度の病気 (波打つ毛皮及び虚脱) 及びレシピエント肺の炎症を誘発した。これらのデータは、移植に先立った *c o l (V)* の摂取は、ドナー抗原への広範囲の免疫低応答性ではなく、寛容性を誘導することにより同種移植片拒絶を防止したことを示している。

40

【0106】

まとめると、これらのデータは、*c o l (V)* は広範囲の免疫低応答性ではなく、経口寛容性の誘導により肺同種移植片拒絶を下方調節するが、*c o l (I I)* 又は *c o l (X I)* はしない、ことを示している。さらに、*c o l (V)* により誘導された経口免疫寛容性は、ドナー同種抗原に対する *D T H* 応答を下方調節する。

【0107】

50

同種移植片 B A L 液中の減少した P M N 及びリンパ球数は、急性肺同種移植片拒絶間のそれほどひどくない X 線検査及び組織学的病変と関連する。肺浸潤の進行する速度を決定するため、移植レシピエントを移植後 1、6 及び 13 日目に連続胸部 X 線検査によりモニターし、上記のように段階付けした。対照同系移植片 (i s o g r a f t) は、全てのモニターした時点でいかなる肺浸潤も有していなかった (図 1 2 A)。対照同種移植片において、連続 X 線は移植 6 日目に左肺に浸潤の漸進的な発生を明らかにし、それは 2 週目の終わりまでに重篤な浸潤及び完全な不透明化を生じた (図 1 2 B)。しかしながら、c o l (V) 摂取同種移植片においては、浸潤の発生は対照と比較してより遅かった。X 線は 6 日目では正常であり、移植 2 週間後に軽い浸潤のみが存在した (図 1 2 C)。

【 0 1 0 8 】

ここで図 1 3 を参照すると、上段のパネルは、移植 2 週間後に採取した、自然の及び同系移植片 W K Y 肺、並びに対照同種移植及び c o l (V) 摂取同種移植ラットからの自然の及び同種移植肺の肉眼的解剖学を示している。図 1 3 A は W K Y ラットレシピエントの同系移植片 (左 - L) 及び自然肺 (右 - R) は外観が正常であることを示している。対照的に、対照同種移植片群の左同種移植肺は自然肺と比較して暗褐色の色、萎縮及び堅いコンシステンシーであった (図 1 3 B)。炎症及び拒絶の結果、対照同種移植片においては体腔壁及び臓側胸膜の融合が通常観察された。c o l (V) 摂取同種移植片レシピエントの移植された左肺 (図 1 3 C) は自然の (正常) 又は同系移植片肺 (図 1 3 A) の外観を有しており、胸膜癒着はなかった。

【 0 1 0 9 】

同種移植片 B A L 液におけるより少ない P M N 及びリンパ球、胸部 X 線での同種移植片におけるあまりひどくない浸潤、及び保存された肉眼的解剖学は、移植に先立って c o l (V) を摂取させることは、拒絶病態の発生を下方調節することを示唆している。図 1 4 の下段のパネルは、移植 2 週間後の対照同系移植片、対照同種移植片及び c o l (V) 摂取同種移植片の代表的な組織学を示している。以前の報告 (Prop et al, 1985) と同様に、対照同系移植片肺は、拒絶の徴候がない正常組織学を有していた (図 1 4 D)。対照同種移植片は、重度の急性拒絶と一致する広範な血管周囲、気管支周囲及び肺胞単核細胞浸潤を明らかにした (図 1 4 E)。対照的に、c o l (V) 摂取同種移植片肺においては、軽度から中程度の血管周囲及び気管支周囲のみしか検出されなかった (図 1 4 F)。

【 0 1 1 0 】

図 1 5 中の表 3 は標準判定基準を使用する移植 2 週間後での拒絶病態の段階付けを示している。急性血管拒絶は血管周囲単核細胞浸潤の存在及び程度に従って、A 0 - A 4 に段階付けされ、及び急性気道拒絶は気道炎症の程度及び強度に従って B 0 - B 4 に段階付けされた (Yousem et al. 1996)。全ての同系移植片対照肺は肺の正常構造が明らかにされた (A 0 ± 0、B 0 ± 0)。対照 W K Y 同種移植片は重度の血管及び気道拒絶を有していた (それぞれ A 3 . 8 ± 0 . 2、B 4 ± 0)。対照的に、c o l (V) 摂取 W K Y 同種移植片は軽度から中程度の血管及び気道拒絶 (それぞれ A 2 . 8 ± 0 . 2、B 2 . 6 ± 0 . 2) を示した。C o I (I I) 及び c o l (X I) 摂取同種移植片は、無処置の同種移植片と同様の拒絶病態を有していた (図 1 5)。これらのデータは、c o l (V) 摂取 W K Y 同種移植片は、他の同種移植片よりも軽度の拒絶病態を有していた (A スコアについては p < 0 . 0 2 8 及び B スコアについては p < 0 . 0 0 9)。

【 0 1 1 1 】

これらのデータは、c o l (V) を摂取させることが、肺同種移植片拒絶を下方調節することを示しており、経口的に寛容化された肺移植片レシピエントは、ドナー同種抗原で再暴露後に減少した D T H 応答を有すべきであることを示している。c o l (V) 摂取が同種抗原に対する免疫応答を減少させるかどうかを決定するため、対照同種移植片レシピエント及び c o l (V) 摂取同種移植片レシピエントは、右耳介に全同種 F 3 4 4 脾細胞及び左耳介に P B S を暴露した。D T H 応答は 2 4 時間後測定し、特異的耳介膨潤を決定した。図 1 4 に示したように、無処置の対照同種移植片レシピエントは重度の急性拒絶を受け、ドナー抗原暴露後に強い D T H 応答を有した (図 1 0 に示された対照同種移植片と

10

20

30

40

50

同一のデータ)。対照的に、c o l (V) 摂取同種移植片レシピエントはドナー抗原に対する有意に軽減されたD T H 応答を有していた(対照同種移植片と比較して $p < 0.02$)。これらのデータは、移植に先立ってc o l (V) を摂取することは、ドナー抗原に対する寛容性を誘導することにより同種移植片拒絶を防止したことを示している。

【0112】

重度の拒絶反応(グレード4)の発病の時間である移植2週間後、同種移植片肺は示差的細胞計数の決定及び血清を採取するためB A L を受けた。自然の及び移植肺を一括して採取し、固定し、切片とし、染色し、及び標準判定基準(Yousem et al. 1996)を使用して拒絶病態について段階付けした。拒絶病態の全ての説明及び段階付けは肺病理学者であるOscar W. Cummings, M.D.により実施され、以前に報告されているように(Wilkes et al. 1998)、彼は処置群については知らされていない。図14は、移植2週間後に採取された同系移植片W K Y 肺、及び対照W K Y 同種移植片及びc o l (V) 摂取W K Y 同種移植片レシピエントからの自然の及び同種移植片肺の肉眼的解剖学を示している。対照W K Y 同種移植片動物において、図14Bは移植された(左)肺は自然の肺と比較して色が暗褐色で萎縮していた。対照的に、c o l (V) 摂取W K Y 同種移植片レシピエントの移植された左肺(図14C)は、自然の(正常)又は同系移植片肺(図14A)の外観を有していた。c o l (I I) 又はc o l (X I) を摂取させたW K Y ラット中の同種移植片肺の全体の外観は無処置同種移植片肺と類似していた。予期されるように、同系移植片肺は正常のようにみえた(図14A)。

【0113】

図14は、移植2週間後の対照W K Y 同系移植片、対照W K Y 同種移植片、及びc o l (V) 摂取W K Y 同種移植片の組織学も図示している。W K Y 同系移植片肺は正常な組織学を有していた(図14D)。対照W K Y 同種移植片は、重度の急性拒絶と一致する広範な血管周囲、気管支周囲及び肺胞単核細胞浸潤を明らかにした(図14E)。対照的に、c o l (V) 摂取W K Y 同種移植片肺においては、軽度から中程度の血管周囲及び気管支周囲のみしか検出されなかった(図14F)。C o I (I I) 及びc o l (X I) を摂取させたW K Y ラットの同種移植片肺は、無処置の同種移植片と同様の病態を有していた(図15を参照されたい)。

【0114】

経口寛容が、肺以外の臓器におけるアロ反応性の下方調節に有益である(Ishido et al., 1999)と示されていたけれども、肺移植における経口寛容は、2002年9月13日に出願されたWilkesによる米国特許出願番号10/243,797で最初に報告された。肺移植のラットモデルを利用し、本発明のデータは、肺移植に先立った肺同種移植片レシピエントへのc o l (V) の経口投与が拒絶反応を下方調節することを示している。対照同種移植片レシピエントと比較されたc o l (V) 摂取の免疫学的、放射線学的及び組織学的分析は、c o l (V) を摂取させることが、同種移植片B A L 液中の減少したP M N 及びリンパ球数、胸部X線での同種移植片におけるあまりひどくない浸潤、及び同種移植片の肉眼的解剖学での保存、及び拒絶病態の減少と相関していることを示した。最後に、経口的に寛容化された同種移植片レシピエントは、ドナー同種抗原に対するD T H 応答を減少させた。

【0115】

以前に、マウスにおいてはc o l (V) が同種抗原に対する局所免疫応答の標的であることが示されている。V型コラーゲンは肺に存在するマイナーな型のコラーゲンであり、細気管支周囲結合組織、肺胞間質及び毛細血管基底膜に位置する。これらの組織は本発明者のマウスモデルにおいて同種抗原に应答する病理学的病変の部位であることが示されており(Wilkes et al., 1999)、ヒト肺同種移植片レシピエントにおける拒絶活性の部位である(Trulock, 1997)。

【0116】

抗原の経口投与は末梢性T細胞寛容を誘導する有効な方法である。この現象はしばしば経口寛容と称され：脳脊髄炎、ぶどう膜炎、糖尿病、重症筋無力症及び関節炎を含む動物

10

20

30

40

50

における自己免疫疾患の多様なモデルでよく研究されている。しかしながら、寛容を誘導する機構は完全には理解されていない。クローンアネルギー、クローン除去を含む寛容誘導についての全ての既知の機構、IL-4、IL-10又はTGF- β 仲介能動抑制による調節が経口寛容に役割を有することができる (Faria and Weiner, 1999)。一般に、抗原のより高い用量がアネルギー又はクローン除去を誘導すると報告されており (Chen et al., 1995; Whitacre et al., 1991)、一方、低用量はサイトカイン調節及び能動抑制を誘導する (Faria and Weiner, 1999; Chen et al., 1994)。心臓移植の動物モデルにおいて、同種間脾細胞の経口投与は、TH1活性化をバイパスすること、及びIL-4のようなTh-2由来阻害性サイトカインの選択的刺激誘導により寛容誘導に有効であることが示されている (Ishido et al., 1999)。

10

【0117】

近交系、病原体フリー、MHC (RT1) 不適合雄F344 (RT1^{l v l}) 及びWKY (RT1^l) ラット (250~300g) を移植手術に利用した。すべてのラットはHarlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.) から購入した。左肺同種移植片の同所性移植は既に報告されたように実行し (Sekine et al. 1997)、Marck及び共同研究者 (1983) により記述された手順を利用した。ラットはいずれの免疫抑制も受けなかった。拒絶病態は移植後の種々の時点で段階付けした。F344-WKY移植モデルは、移植後第一週の終わりまでに軽度急性拒絶 (グレード1)、第二週の終わりまでに中程度から重度の拒絶 (グレード2-3) 及び第三週の終わりまでに重度-グレード4拒絶の発生が付随した (Matsumura et al. 1995)。加えて、F344-WKYモデルは、再現性よく閉塞性細気管支炎 (BO) を発生する、ただ一つの肺移植の動物モデルである (Hirt et al. 1999)。それ故、このモデルは、急性及び慢性拒絶の病因を研究する独特の機会を提供する。

20

【0118】

経口寛容の誘導における相違を観察するため、異なった摂取計画を試験した。データはより高いcol (V) の用量 (50 μ g) と比較して、より低い用量 (10 μ g) の多数回の摂取は、拒絶病状発生がより抑制的であった。それ故、本明細書で使用した経口寛容のモデルにおいて、Th2サイトカイン (IL-4、IL-10) による調節、又はTGF- β により仲介される活性化された抑制も、寛容誘導において重要な役割を果たしているように思われる。

30

【0119】

移植寛容の誘導は移植研究の主たるゴールになってきており、長年にわたって異なった技術が移植寛容を誘導するために利用されてきた。ドナー特異的輸血 (Zheng et al., 1999)、骨髓移植 (Huang et al., 2000)、同種細胞の胸腺注入 (Garrovillo et al., 1999) 又はドナーMHC由来ペプチドによる全身免疫 (Sayegh and Krensky, 1996) は多様な動物モデルにおいて移植寛容を誘導することが示されている。しかしながら、これらの技術は、寛容誘導に利用されるドナー細胞が移植に先立って寛容を誘導する十分な時間内には利用できないであろうという事実のため、潜在肺移植片レシピエントでは限定的な実用性しか有していないであろう。低用量経口寛容の実験自己免疫モデルにおいて、経口寛容化後の調節細胞は、抗原特異的様式で引き金が引かれるが、抗原非特異的様式で抑制する。それ故、標的自己抗原それ自身を同定する必要はないであろうが、抑制性サイトカインを分泌する調節細胞を誘導することが可能なタンパク質が十分に経口的に投与されるであろう (Faria and Weiner, 1999)。本明細書で使用した肺移植における経口寛容のモデルは、経口的に投与された、ドナー特異的ではないcol (V) はアロ反応性を抑制し、及び移植寛容を誘導することができる。発明者は、移植に先立ったcol (V) による移植片レシピエントの経口治療が、肺移植における拒絶を防止するための、及びV型コラーゲン及び/又はそれらの抗原性成分に対する自己免疫反応により引き起こされることが知られている又は考えられている疾患を治療するための療法を提供するであろうことを想定する。図及びそこに引用されている参照文献を含む、実施例4から10に報告された結果の追加の議論については、その全体が本明細書において援用される、Wilkesにより2002年9月13日に出版された米国特許出願10/243,792 (現在米国特許公開番号2003/00

40

50

78208 AI) を参照されたい。

【 0 1 2 0 】

実施例 5

同種移植片拒絶の防止、及びコラーゲン及びコラーゲン様分子に対して動物を寛容化するために有用な追加の MHC 「様」 ペプチド及びコラーゲンの評価

病原体フリー、MHC (RT1) 不適合雄ラットを本研究で利用した: Wistar Kyoto (WKY、RT1^l)、Fischer 344 (F344、RT1^{l v l}) 及び Brown Norway (BN、RT1ⁿ) ラット (移植の時点で 250 ~ 300 g)。全てのラットは Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.) から購入し、施設のガイドラインに従って University School of Medicine の Laboratory Animal Resource Center Indiana (Indianapolis, Ind.) に収容した。

10

【 0 1 2 1 】

実験で使用するための II 型コラーゲン [col (II)] は、以前に報告されているように (Maves et al. 2000) イヌ軟骨から単離されたか、又は Collaborative Biomedical Products, Bedford, Mass から購入した。両調製物は 0.005 M 酢酸で可溶化し、透析すると 0.5 mg/ml の最終濃度を得た。

【 0 1 2 2 】

ウシ胎児軟骨からのウシ XI 型コラーゲン [col (XI)] (Morris and Bachinger 1987) は Biogenesis, Sandown, N.H. から購入し、0.005 M 酢酸 (0.5 mg/ml) で希釈し、使用されるまで 4 で貯蔵した。

20

【 0 1 2 3 】

ヒト胎盤から抽出し、示差 NaCl 沈殿 (Mares et al. 2000) により精製されたヒト V 型コラーゲン [col (V)] は、Dr. Jerome Seyer (VA Hospital, Hampton, Va.) から贈与された。手短に言えば、胎盤組織を細かく切り、洗浄し、0.5 M NaCl を含有する 0.5 M 酢酸に懸濁し、そして 4 でペプシンにより消化した。上清を遠心した検体から吸引し、ペレットを集め、そして抽出過程を反復した。2つの消化物からの上清を合わせ、そして 0.5 M 酢酸からの示差 NaCl 沈殿 (Maves et al. 2000) により、上清から col (V) を精製した。使用するまで、無傷の col (V) は 0.005 M 酢酸 (0.5 mg/ml) に希釈した。コラーゲンの量は、既に報告されているように (Mares et al. 2000)、サンプル中のヒドロキシプロリン含量の決定により評価した。

30

【 0 1 2 4 】

上記のように調製したコラーゲンは WKY ラットに経口で投与した。ラットには、0.5 ml の生理食塩水に溶解した 10 µg の col (II)、col (V) 又は col (XI) 溶液を、16 ゲージボールポイントステンレススチール動物摂取針 (Braintree Scientific, Braintree, Mass.) を利用する胃経管栄養により摂取させた。対照動物には希釈剤のみを摂取させた。8回摂取に対し、動物は一日おきに摂取させた。最後の摂取7日後、これらのラットは肺同種移植片のレシピエントとして利用した (以下に記載)。

【 0 1 2 5 】

左肺同系移植片 (WKY WKY) 又は同種移植片 (F344 WKY) の同所性移植は、以前に記載されている手順 (Prop et al. 1985) を利用し、以前に報告されているように実施した (Sekine et al. 1997)。手短に言えば、ドナーラット (F344 又は WKY) をケタミン (40 mg/kg) 及びキシラジン (5 mg/kg) の i.m. 注射で麻酔した後、胸部を剃髪し、胸骨切開術を行い、心臓及び肺を一括して除去した。左肺を次ぎに切除し、ヘパリン処置したラクトリンゲル液を肺動脈中に注入した。ドナー肺を生理食塩水で飽和した滅菌ガーゼでラップし、移植するまで無菌ビーカー中の氷上 (4) に置いた。

40

【 0 1 2 6 】

レシピエントラットをアトロピン (0.05 mg/kg) の s.c. 注射、続いての 2% ハロタンの吸入で麻酔した。気道に 14 - ゲージテフロンカテーテルでカニューレ挿入し、ラットは 100% 酸素を利用するげっ歯類ベンチレーター (Analytical Specialties

50

Co., St. Louis, Mo.) を使用して機械的に換気し、麻酔維持のため 1.5 ~ 2% イソフルレンを吸入させた。左 4 肋間腔の開胸術を行ったら、左肺血管及び気管支に止血剤を置き、左肺を切除した。プラスチックカフ及び 7 - 0 絹縫合糸 (Kono, Chiba, Japan) により、ドナー肺の肺血管をレシピエントに吻合した。ドナー及びレシピエント気管支を、8 - 0 Prolene 縫合糸 (Ethicon, Sommerville, N. J.) を利用してお互いに縫合した。気管支の吻合終了後直ちに止血剤を除去し、換気を回復させた。3 - 0 絹縫合糸 (Ethicon) を利用して 16 ゲージ胸腔チューブ上で左開胸切開を閉じた後、麻酔維持を中断し、動物を回復させた。自発呼吸が再開したら、カニユーレを気道から除去し、胸腔チューブをはずした。ドナー肺の虚血時間はおよそ 1 時間であり、及びドナー肺を摘出する及び移植するための総手術時間はおよそ 2 時間であった。すべての移植手順は無菌状態の中、手術用顕微鏡 (Micro Tech, Colorado Springs, CO.) 下で K. Y. により実施された。F 344 WKY 移植モデルには、第 1 週目の終わりまでの軽度の急性拒絶、及び第二週目の終わりまでの中程度から重度の急性拒絶の発生が付随している (Matsumura et al. 1995)。全ての移植群において生存率は 90% を上回った。実験期間の間、いずれの時点でも非免疫抑制療法は与えなかった。

10

【0127】

移植肺は、移植後 1 日、6 日及び 13 日目に連続胸部 X 線検査によりモニターした。画像的变化は以下のように段階付けした：グレード 1、正常；グレード 2、軽度浸潤；グレード 3、中程度浸潤；及びグレード 4、重篤な浸潤又は完全不透明化。

【0128】

5 移植群を研究した：WKY レシピエント内に移植された WKY ラットラットからの肺 [対照同系移植片]；希釈剤摂取 WKY レシピエント内に移植された F 344 肺 [対照同種移植片]；col (V) 摂取 WKY レシピエント内に移植された F 344 肺 [col (V) 摂取同種移植片]；col (II) 摂取 WKY レシピエント内に移植された F 344 肺 [col (II) 摂取同種移植片]；及び col (XI) 摂取 WKY レシピエント内に移植された F 344 肺 [col (XI) 摂取同種移植片]。

20

【0129】

気管支肺胞洗浄 (BAL) 液は、以前に報告されているように (Sekine et al. 1997)、移植 2 週間後のケタミン麻酔下の肺移植レシピエントから集めた。手短に言えば、自然の及び移植した肺の BAL は、縫合により安全にされた 16 ゲージカテーテルで、右及び左主気管支の選択的カニユーレ挿入により実施した。体側気管支がクランプされている間にサンプルを集め、3 ml の滅菌 PBS (37) を各主気管支内に点滴注入し、吸引した。遠心分離検体から得られた無細胞 BAL 上清は、使用されるまで -70 で貯蔵した。BAL 液示差的細胞計数は、光学顕微鏡を利用してサイトスピン上の高倍率視野当たり 300 細胞を計数し、サンプル中のマクロファージ、リンパ球及び多形核 (PMN) 細胞の量を決定することにより行った。

30

【0130】

遅延型過敏性 (DTH) 応答は、(Yamagami et al, 1999) に記載されている方法を改変して決定した。手短に言えば、肺移植 2 週間後、対照又は col (V) 摂取 WKY ラットは、26 ゲージ注射針を使用する s.c. 注射により、右耳介内に、 10^7 照射 (3000 ラド) ドナー由来 F 344 又は第三者 (BN) 脾細胞の $30 \mu\text{l}$ PBS 溶液を受けた。左耳介は等容積の希釈剤を受け、対照部位として働いた。無処置又は同種移植片レシピエント WKY ラットの別々の群が、 $15 \mu\text{g}$ の col (II)、col (V) 又は col (XI) を $30 \mu\text{l}$ 容量で右耳介内に、希釈剤を左耳介内に注射されて試験された。耳の厚さは、注射直前及び 24 時間後に盲検様式で、マイクロメーターカリパー (Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, 111.) で測定した。抗原特異的 DTH 応答は以下の式に従って計算した：特異的耳介膨潤 = (右耳厚さ @ 24 時間 - 右耳厚さ @ 0 時間) - (左耳厚さ @ 24 時間 - 左耳厚さ @ 0 時間) $\times 10^{-3}$ mm (Yamagami et al., 1999)。全てのデータは三回の測定の平均として報告されている。

40

【0131】

50

別の実験において、無処置及びc o l (V) 摂取W K Yラットを、100 μ lのアジュバントの懸濁液 (Titermax, CytRx Corp., Norcross, Ga.) に溶解した100 μ gの低エンドトキシン ウシ血清アルブミン (B S A) (Sigma, St. Louis) で刺激した。各ラットは尾の基部への懸濁液のs . c . で刺激した。7日後、右耳介内へ2%熱凝集B S A 溶液及び左耳介内へ希釈剤を接種した (Henningsen et al. 1984)。非刺激ラットがこれらの研究の対照であった。耳厚を注射直前及び24時間後に測定し、特異的耳膨潤を上記のように計算した。

【0132】

D T H 部位でのT G F - の中和は、(Bickerstaff et al. 2000) により記載されている手順を改変して実施した。手短に言えば、肺移植2週間後、c o l (V) 摂取W K Yラットは、5 μ gのポリクローナルニワトリ抗ラットT G F - A b又は5 μ gのポリクローナルヤギ抗ラットI L - 4又はI L - 10 A b (すべてR&D Systems, Minneapolis, Minn.) と混合された10⁷照射 (3000ラド) ドナー由来F 3 4 4脾細胞の30 μ l P B S 溶液を、26ゲージ注射針を使用したs . c . 注射で右耳介内に受けた。左耳介は等容積の希釈剤を受け、対照部位として働いた。陰性対照のため、c o l (V) 摂取同種移植片の別の群が、5 μ gの対照ニワトリ免疫グロブリン又は対照ヤギ免疫グロブリン (R&D Systems, Minneapolis, Minn.) と混合された10⁷照射 (3000ラド) ドナー由来F 3 4 4脾細胞を右耳介内に、及び希釈剤を左耳介内に受けた。特異的耳膨潤は上記のように計算した。対照免疫グロブリンはD T H 応答に何の影響も与えなかった。

10

【0133】

急性肺損傷のモデルとして、リポ多糖 (L P S) (Sigma, St. Louis, MO) の肺胞又は静脈内点滴注入を、(O'Leary wheat t al. 1997) により記載されている手順を改変して実施した。手短に言えば、最後の給餌一週間後、正常W K Yラット又はc o l (V) 摂取W K Yラットをアトロピン (0.05 mg / kg) のs . c . 注射、続いての2%ハロタンの吸入で麻酔した。気道に14 - ゲージテフロンカテーテルでカニューレ挿入し、ラットは100%酸素を利用するげっ歯類ベンチレーター (Analytical Specialties Co., St. Louis, Mo.) を使用して機械的に換気し、麻酔維持のため1.5 ~ 2%イソフルレンを吸入させた。自発呼吸の消失後、L P S (1 mg / mlで1 mg / kg) を気道内に点滴注入し、10分間機械的に換気した。麻酔維持を中断し、動物を蘇生させた。自発呼吸が再開したら、カニューレを気道から除去した。別の実験において、ラットはL P S (1 mg / mlで4 mg / kg) を尾静脈内に静脈内注射された。暴露24時間後、B A L を実施し、肺を病理学の評価のために摘出した。

20

30

【0134】

実験群の血清中T G F - レベルは、製造元のプロトコールに従ったT G F - ₁ 免疫アッセイシステム (Promega, Madison, Wis.) を利用するE L I S A により定量した。血清中I L - 4及びI L - 10レベルは、製造元のプロトコールに従ったCytoscreen 免疫アッセイキット (BioSource International, Camarillo, Calif.) を利用するE L I S A により定量した。T G F - 、I L - 4及びI L - 10アッセイの感度はそれぞれ32、2及び5 p g / mlであった。

【0135】

病理学は、各群からの自然及び移植肺を試験することにより評価した。肺サンプルを摘出し、固定し、切片化し、染色し、及び標準的判断基準 (Yousem et al. 1996) を使用し、以前に報告されているように (Sekine et al. 1997) 移植群の予備知識なしの盲検の様式で、病理学者 (O. W. C.) により段階付けされた。

40

【0136】

B A L 液中のP M N及びリンパ球数の統計的分析は、最初にA N O V A により実行し、群間で差が存在するかどうかを決定した。もし差が観察されたら、Student-Newman-Keuls 検定を利用する事後解析を実行して、どの群が異なっているのかを決定した。P値 < 0.05が有意であると決定された。対照同種移植におけるD T H 及び異なった抗原が暴露された無処置W K Yラットは正常に分布していないことが観察されたので、相互作用

50

を有する rank-sum 二方向 ANOVA を利用し、群間の差違を決定した。P 値 < 0.05 が有意であると決定された。対照同種移植片及び c o l (V) 摂取同種移植片間の、ドナー同種抗原に対する D T H 応答の相違はマンホイットニー U 検定を利用して決定した。P 値 < 0.05 が有意であると決定された。気道及び脈管病理学的スコア間の相違は、最初にクラスカル・ワリス検定を利用して、続いてマンホイットニー U 検定を利用する事後解析により決定した。P 値 < 0.03 が有意であると決定された。サイトカインの解析のためには、複数の比較のためのスチューデント t 検定を利用した。P 値 < 0.05 が有意であると決定された。

【0137】

細胞性免疫応答のインビボ試験である、ドナー抗原に対する D T H 応答は、肺以外の臓器移植の多様なげっ歯類モデルにおいて、拒絶の程度と相関すると報告されてきた (Van Buskirk et al, 1998; Lowry et al, 1985)。本発明者らは、c o l (V) が、マウスにおける肺同種抗原に対する局所免疫応答の標的であることを以前に示した (Mares et al, 2000)。それ故、c o l (V) が肺同種移植片拒絶の間に抗原として認識されるかどうかを決定するため、無処置ラット及び肺同種移植片レシピエントにおいて、全身性 D T H が同種抗原に反応することが決定された。肺同種移植片レシピエントが c o l (V) に対する D T H 応答を発生するかどうかも決定された。F 3 4 4 (ドナー) 脾細胞及び c o l (V) に対する D T H 応答は、F 3 4 4 肺同種移植片を受けて 2 週間後 (重度の急性拒絶が発生し始める時点 (Matsumura et al, 1995)) の W K Y ラット及び無処置、非移植 W K Y ラットにおいて試験した。同種抗原及び c o l (V) に対する D T H 応答の特異性を決定するため、c o l (I I)、c o l (X I) 及び第三者抗原、B N 脾細胞に対する D T H 応答を決定した。関節軟骨の主要成分である C o I (I I) は肺には存在せず、及び c o l (V) とは相同的ではない (Smith et al, 1985)。対照的に、c o l (X I) は c o l (V) と同種性を有するが (Morris and Bachinger 1987)、c o l (I I) と同様に、関節軟骨に観察され、及び肺には存在しない。これらの理由のため、c o l (I I) 及び c o l (X I) は c o l (V) の対照として働く。

【0138】

D T H 応答の尺度として特異的耳膨潤を利用し、図 10 は、対照同種移植片レシピエントが移植 2 週間後に F 3 4 4 脾細胞及び c o l (V) に対する有意な D T H 応答を発生したことを示している [F 3 4 4 脾細胞又は c o l (V) を暴露した無処置 W K Y ラットと比較して $^{\dagger} P < 0.0001$ 、及び c o l (V) 又は F 3 4 4 脾細胞を暴露した無処置 W K Y ラットと比較して $^{\dagger} P < 0.0001$] (図 10)。対照的に、対照同種移植片は第三者 (B N) 抗原、c o l (I I) 又は c o l (X I) に対する D T H 応答を有していなかった (図 8)。無処置 W K Y ラットは c o l (I I) 又は c o l (X I) に対する D T H 応答を有していなかった。これらのデータは、D T H 応答が同種移植片拒絶間の免疫活性化を示し、それはドナーに特異的ではあるが第三者同種抗原には特異的ではないことを示している他の研究 (VanBuskirk et al, 1998) を裏付けている。加えて、c o l (V) が肺同種抗原に対する免疫応答の標的である (しかし c o l (I I) 又は c o l (X I) は標的ではない) という本発明者のマウスでの結果 (Mares et al, 2000) を裏付けている。

【0139】

以前の報告は、肺以外の同種移植片の拒絶の間に免疫応答の標的である抗原の経口投与は、ドナー臓器に対する寛容性を誘導することを示した (Ishido et al, 1999)。移植に先立っての、肺同種移植片レシピエントへのコラーゲンの経口投与がドナー肺に対する免疫学的寛容性を誘導するかどうかを決定するため、上記のように移植に先立って W K Y レシピエントに c o l (I I)、c o l (V) 又は c o l (X I) を摂取させ、続いて連続胸部 X 線、同種移植片 B A L 示差的細胞計数、病理学的段階付け及びドナー抗原に対する D T H 応答を評価した。

【0140】

図 12 は、重度の急性拒絶が発生し始める時点 (Matsumura et al, 1995) である移植

10

20

30

40

50

2週間後の実験群、及び正常W K Yラットにおける、B A L液中の示差的細胞計数を示している。同系移植片肺と比較した正常においては、B A L示差的細胞計数に差違はなかった。以前の報告 (Prop et al. 1985; Yagyu et al. 1990) と同様に、正常又は同系移植片肺と比較して、対照同種移植片B A LにおいてはP M N及びリンパ球が有意に増加した (正常又は同系移植片肺と比較してリンパ球について * $p < 0.00001$ 、及びP M Nについて † $p < 0.038$) (図12)。対照的に、移植に先立ってc o l (V) を摂取させることは、対照同種移植片と比較してB A L中のP M N及びリンパ球に有意な減少を生じた (対照同種移植片と比較してリンパ球について ‡ $p < 0.0001$ 、及びP M Nについて § $p < 0.023$) (図12)。

【0141】

急性同種移植片拒絶は通常、同種移植片B A L液中の総細胞数の増加に関係する (Matsumura et al. 1995)。しかしながら、移植2週間後では、対照W K Y同種移植片肺は重度の拒絶を通常受けており、移植片の破壊により、B A L総細胞数を決定するための十分なB A Lは確実に実施することが不可能である。対照的に、c o l (V) 摂取同種移植片レシピエントはより軽度の拒絶を示し、それはより容易なB A Lを可能にし、より高い細胞計数を生じる。これらの理由のため、群間の総細胞数の比較は行われなかった。まとめると、c o l (V) による経口免疫は、急性拒絶間の同種移植片B A L液におけるより少ないP M N及びリンパ球と関連することをこれらのデータは示している。

【0142】

急性肺同種移植片拒絶において、同種移植片B A L液中の減少したP M N及びリンパ球数は、それほどひどくないX線検査及び組織学的病変と通常関連する。肺浸潤の進行する速度を決定するため、移植レシピエントを移植後1、6及び13日目に連続胸部X線検査によりモニターし、上記のように段階付けした。図13に示したように、対照同系移植片は、全てのモニターした時点でいかなる肺浸潤も有していなかった (グレード1) (図13A)。対照同種移植片において、連続X線は移植6日目に左肺に軽度の浸潤 (グレード2) の漸進的な発生を明らかにし (データは示されていない)、それは2週目の終わりまでに重篤な浸潤及び完全な不透明化 (グレード4) を生じた (図13B)。しかしながら、c o l (V) 摂取同種移植片においては、浸潤の発生は対照と比較してより遅かった。X線は6日目では正常 (グレード1) であり、移植2週間後に軽い浸潤 (グレード2) のみが存在した (図13C)。

【0143】

図14の上段のパネルは、移植2週間後に摘出した、自然の及び同種移植片W K Y肺、及び対照同種移植及びc o l (V) 摂取同種移植ラットからの自然の及び同種移植肺の肉眼的解剖学を示している。同系移植片 (左 - L) 及び自然肺 (右 - R) は外観が正常であった (図14A)。対照同種移植片レシピエント中の移植肺は、自然肺と比較して暗褐色の色、萎縮していた (図14B)。対照的に、c o l (V) 摂取同種移植片レシピエントの移植された左肺 (図14C) は自然の (正常) 又は同系移植片肺 (図14A) の外観を有していた。

【0144】

同種移植片B A L液におけるより少ないP M N及びリンパ球、胸部X線での同種移植片におけるあまりひどくない浸潤、及び保存された肉眼的解剖学は、移植に先立ってc o l (V) を摂取させることは、拒絶病態の発生を下方調節することを示唆している。図14の下段のパネルは、移植2週間後の対照同系移植片、対照同種移植片及びc o l (V) 摂取同種移植片の代表的な組織学を示している。全ての対照同系移植片肺は、拒絶の徴候がない正常組織学を有していた (図14D)。対照同種移植片は、重度の急性拒絶と一致する広範な血管周囲、気管支周囲及び肺胞単核細胞浸潤を明らかにした (図14E)。対照的に、c o l (V) 摂取同種移植片肺においては、軽度から中程度の血管周囲及び気管支周囲のみしか検出されなかった (図14F)。

【0145】

図15のデータは移植2週間後での拒絶病態の段階付けを示している。急性拒絶は血管

10

20

30

40

50

周囲単核細胞浸潤の存在及び程度に従って、A0 - A4に段階付けされ、及び気道炎症の程度及び強度に従ってB0 - B4に段階付けた (Yousem et al. 1996)。全ての同系移植片対照肺は肺の正常構造が明らかにされた (A0 ± 0、B0 ± 0)。対照同種移植片は重度の血管及び気道拒絶を有していた (それぞれA3.8 ± 0.2、B4 ± 0)。対照的に、c o l (V) 摂取同種移植片は軽度から中程度の血管及び気道拒絶 (それぞれA2.8 ± 0.2、B2.6 ± 0.2) (対照同種移植片と比較してAスコアについては * p < 0.028及びBスコアについては † p < 0.009) (図15、表3)を示した。実験は、c o I (I I) 及び c o l (X I) の摂取が対照同種移植片と比較して同種移植片病態の発生に効果がないことを示している (図15、表3)。これらのデータは、c o l (V) を摂取させることは急性拒絶病態を下方調節することを示している。

10

【0146】

c o l (V) を摂取させることが、肺同種移植片拒絶を下方調節することを示しているデータは、経口的に寛容化された肺移植片レシピエントが、ドナー同種抗原に対する減少したDTH応答を有すべきであることを示している。c o l (V) 摂取が同種抗原に対する免疫応答を減少させるかどうかを決定するため、対照同種移植片レシピエント及びc o l (V) 摂取同種移植片レシピエントは、右耳介に全同種F344脾細胞及び左耳介にPBSを暴露し、DTH応答を決定した。図16に示したように、及び図10で前に示したように、無処置の対照同種移植片レシピエントは、ドナー抗原暴露後に強いDTH応答を有した。対照的に、対照同種移植片レシピエントと比較してc o l (V) 摂取同種移植片レシピエントにおいては、ドナー抗原に対するDTH応答は有意に軽減されていた (対照同種移植片と比較して * p < 0.02) (図16)。

20

【0147】

c o l (V) により誘導された同種抗原に対する損なわれた免疫応答は、広範囲の免疫低応答性であり (Faria and Weiner 1999)、免疫寛容ではない。それ故、c o l (V) 摂取WKYラットが他の抗原に应答できるかどうかを決定するため、これらのラットは気管内 (1mg/kg) か又は静脈内に (4mg/kg) LPSを受け、それらの用量は暴露24時間後に、肺及び全身的に重度の炎症反応を誘発することが知られている用量であった (O'Leary et al. 1997)。誘発された疾患は肺炎及びグラム陰性菌により起こされる敗血症に類似していた。正常WKYラットと同様に、c o l (V) 摂取WKYラット内の肺内へのLPSの点滴注入又はi.v.注射はBAL示差的細胞計数及び病態に観察されるような重度の病気 (波打つ毛皮及び虚脱) 及びPMN及びリンパ球の大量の流入を誘発した (データは示されていない)。

30

【0148】

c o l (V) 摂取により誘導された損なわれた免疫応答が抗原特異的であったかどうかをさらに調べるため、c o l (V) を摂取させることが非相関微量抗原、BSA、ラットにおけるTリンパ球依存性抗原 (Henningsen et al. 1984) に対するDTH応答に影響するかどうかを決定した。無処置及びc o l (V) 摂取WKYラットを、100µlのアジュバントに溶解した100µgのBSAで刺激し、7日後、右耳介内へ2%熱凝集BSA溶液及び左耳介内へ希釈剤を接種した。非刺激ラットがこれらの研究の対照であった。図24に示したように、非刺激ラットの耳介内へのBSAの注射は有意な耳膨潤を誘発しなかった。対照的に、無摂取刺激WKYラット内にBSAを注射すると、有意な耳膨潤を誘発した (無刺激無処置WKYラットと比較して * p < 0.018) (図19)。しかしながら、c o l (V) 摂取はBSAに対するDTH応答に影響しなかった (刺激WKYラットと比較して † p > 0.05) (図24)。まとめると、これらのデータは、肺同種移植片拒絶のc o l (V) 誘導抑制は、広範な免疫低応答性ではなく免疫寛容により仲介されることを示している。

40

【0149】

経口寛容において、免疫応答を抑制する原因となるサイトカインとして、TGF-、IL-4及びIL-10の全身的産生がしばしば引用される (Faria and Weiner 1999)。それ故、次ぎに、c o l (V) により誘導された経口寛容が肺同種移植片拒絶間のTG

50

F - 、 I L - 4 及び I L - 1 0 の上方調節された産生と関係しているかどうかを決定した。市販の E L I S A を利用し、実験群の血清中の T G F - 、 I L - 4 及び I L - 1 0 を定量した。図 1 7 は、移植 2 週間後の正常 W K Y ラット、対照同種移植片及び c o l (V) 摂取同種移植片における血清 T G F - レベルを示す。予期されるように、低レベルの T G F - が正常 W K Y ラットの血清中に存在した (Ying and Sanders 1998)。対照同種移植片においては T G F - のわずかな増加があった。対照的に、c o l (V) 摂取同種移植片の血清中では、T G F - レベルは著しく上方調節されていた (対照同種移植片レシピエントと比較して * p < 0 . 0 5) (図 1 7) 。 I L - 4 又は I L - 1 0 は、同一ラットの血清中では検出不能であった (データは示されていない) 。

【 0 1 5 0 】

I L - 4 又は I L - 1 0 は血清中に検出されなかったけれども、このことは、ドナー同種抗原に対して下方制御された細胞性免疫応答における、それらの全身的活性を除外するものではない。T G F - 、 I L - 4 及び I L - 1 0 が同種抗原に対する免疫応答の抑制に役割を有しているかどうかを決定するため、ドナー抗原に対する D T H アッセイにおいて、これらのサイトカインの中和抗体を利用した。(Bickerstaff et al. 2000) により報告されている手順の変更を利用し、肺移植 2 週間後、c o l (V) 摂取 W K Y ラットは、5 μ g のポリクローナル抗 T G F - A b 又は 5 μ g のポリクローナル抗 I L - 4 又は I L - 1 0 A b と混合された 1 0 ⁷ 照射 (3 0 0 0 ラド) ドナー由来 F 3 4 4 脾細胞の P B S 溶液を、右耳介内に受けた。左耳介は等容積の希釈剤プラス脾細胞を受け、対照部位として働いた。陰性対照のため、c o l (V) 摂取同種移植片の別の群が、脾細胞とともに対照免疫グロブリンを右耳介内に、及び希釈剤プラス脾細胞を左耳介内に受けた。図 1 8 に示したように、及び図 1 0 で前に示したように、未処置対照同種移植片レシピエントはドナー抗原の暴露後に強い D T H 応答を有したが、それは c o l (V) 摂取同種移植片レシピエントでは有意に減少していた。しかしながら、c o l (V) 摂取同種移植片は、抗 T G F - 抗体がドナー脾細胞と混合され、耳の耳介内に注射された場合、有意に D T H 応答を回復した [対照免疫グロブリンと混合した抗原を暴露された c o l (V) 摂取同種移植片と比較して * p < 0 . 0 3] (図 1 8) 。対照的に、ドナー脾細胞と I L - 4 又は I L - 1 0 の中和抗体を混合することは D T H 応答を回復することにあまり有効ではなかった [対照免疫グロブリンと混合した抗原を暴露された c o l (V) 摂取同種移植片と比較して † † p > 0 . 0 5] (図 1 8) 。対照同種移植片と比較した、抗 T G F - 、抗 I L - 4 及び抗 I L - 1 0 抗体による c o l (V) 摂取同種移植片の D T H 応答の回復は、それぞれ 7 5 . 7 % 、 2 4 . 3 % 及び 3 9 . 9 % であった (図 1 8) 。

【 0 1 5 1 】

実施例 6

急性肺同種移植片拒絶の発生への経口寛容についての c o l (V) の効果は用量依存的である。F 3 4 4 (R T 1 ^{1 v 1}) 及び W K Y (R T 1 ¹) 雄ラット (2 0 0 ~ 2 5 0 g) は Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.) から購入した。すべての左肺同種移植片 (F 3 4 4) 又は同系移植片 (W K Y) は、以前に記載されているように (Sekine et al. 1997) 、 W K Y レシピエント内に、正所的に移植した。

【 0 1 5 2 】

ここで図 2 5 、表 4 を参照すると、この実施例で集められたデータの要約が含まれている。V 型コラーゲンは、正常出産のヒト胎盤か又は肺癌切除時に得られた正常肺組織検体から単離された。コラーゲン生化学に広範な専門知識を有する Gerald N. Smith Jr., Ph. D. がこれらの研究のために精製 V 型コラーゲンを提供した。

【 0 1 5 3 】

W K Y ラットは、予備的データ及び投稿原稿に報告されているように、胃経管栄養法を使用し、移植手術に先立ってコラーゲンで免疫した。全てのラットは、表に記載されているように、4 又は 8 日間、1 日おきに摂取させた。予備的データと同様に、1 週間の摂取後回復期間の後、F 3 4 4 ラット (同種移植) 又は W K Y ラット (同系移植片) の左肺を W K Y レシピエント内に正所的に移植した。この実験のラットは免疫抑制剤を受けていな

10

20

30

40

50

い。各コラーゲン型に対する各摂取群には20匹のラットが含まれている。ここで図25、表4を参照すると、本明細書で報告された実施例で使用された実験群の説明が含まれている。

【0154】

重度の拒絶反応が発生する時点である (Matsumura et al. 1995)、移植2週間の終わりに先立った24時間前、10レシピエントラットのドナー抗原に対するDTH応答について試験し、続いて胸部臓器を摘出した。BALを自然の及び移植片肺に対し、それぞれ右及び左主気管支にカニューレを選択的に挿入することにより実施し、37℃で5mlのPBSを点滴注入した (Sekine et al. 1997)。無細胞BALは遠心分離した検体から得られ、上清を-80℃で貯蔵した。血液は大静脈及び心穿刺により集め、検体を遠心分離して血清を分離し、-80℃で貯蔵した。

10

【0155】

遅延型過敏性 (DTH) 応答研究は、予備データ及び原稿 (Yasufuku et al. 投稿中) に報告されているように、2週間の術後期間の完了に先立つ24時間前、WKYラットの右耳内への照射ドナー (F344) 脾細胞の注射により実施した。データは「特異的耳膨潤」として報告された。予備的研究は、最大DTH応答が耳注射24時間後に起こることを示している他の報告 (Yamagami et al. 1999) を確認し、それ故、すべてのDTH測定は耳注射24時間後に実施されるであろう。予備的研究は、DTH試験は全身的細胞性又は体液性応答に影響を及ぼさないことを確認した。コラーゲン摂取WKYラットと比較した同系移植片及び同種移植片対照レシピエントにおけるドナー抗原に対するDTH応答を比較することにより、異なった用量のcol (V) がドナー抗原に対するDTH応答に示差的効果を有するかどうかを決定し得る。

20

【0156】

安楽死後、胸郭臓器を一括して除去し、組織学的に研究した。手短に言うと、胸郭臓器からのサンプルを4%グルタルアルデヒドの気管内点滴注入により固定し、パラフィンに包埋し、5~7µmの切片とし、および光学顕微鏡による組織学的研究のためヘマトキシリン及びエオシン (H & E) で染色した。組織学的病変はヒト肺同種移植片拒絶についての標準組織学的基準 (Yousem et al. 1996) により、盲検の様式 (Wilkes et al. 1995) で段階付けした。急性拒絶は、血管周囲及び細気管支周囲単核細胞浸潤の変化する強度により特徴付けた (Yousem et al. 1996)。群間の細胞浸潤の相違が、急性拒絶の認められた基準内で説明されるよりも適していることができるので、Sigma Scan ソフトウェア (Jandel Scientific, Chicago, Ill) を利用し、デジタル化H & E染色組織切片 (細胞/µm²) 上に存在する、血管周囲及び細気管支周囲単核細胞を計数することにより浸潤が定量化されるであろう。デジタル化法は現在我々の実験室で使用されている。

30

【0157】

細胞傷害性Tリンパ球は肺同種移植片拒絶の病態発生に鍵となる役割を有しており (Trulock 1997)、損なわれた細胞傷害活性は、経口寛容が疾患活性を防止する鍵となる機構であることが示されている (Faria and Weiner 1999; Mayer 2000; Garside and Mowat 1997)。col (V) 寛容化肺移植片レシピエントにおける減少した拒絶活性が損なわれた抗ドナー細胞傷害活性と関連するかどうかを決定するため、末梢リンパ節細胞を正常F344 (ドナー) ラットから単離し、⁵¹Cr (New England Nuclear, Boston, Mass.) を負荷し、完全培地中、96ウエル平底プレート (標的細胞、5x10³/ウエル) においた。エフェクター細胞 (各群中のレシピエントWKYラットからの脾臓Tリンパ球) を種々の比で標的と37℃で4時間インキュベートした (1:1、5:1、10:1及び100:1のE/T比)。純粋な脾臓T細胞 (>95%純度) は、抗CD3磁気ビーズ (Dyna Corp, Lake Success, N.Y.) を利用して単離し、及びフローサイトメトリーにより確認した。細胞傷害性は、負荷標的細胞のみからの放出と比較された、各E/T比のエフェクター細胞により誘発された特異的⁵¹Cr放出により決定された。

40

【0158】

他の研究者は、ラット及びヒトにおける肺同種移植片拒絶が肺胞、血管及び細気管支組

50

織に存在する細胞のアポトーシスと関連していること、及びそのアポトーシスが同種移植片受容の間にまれに検出されることを確認している (Blankenberg, et al. 2000)。同種抗原に対する局所的免疫応答が、マウスの血管内皮及び細気管支上皮内でのアポトーシスの誘導を含んでいることも以前に示されている。加えて、ドナー抗原に対するアネルギーを誘導する c o l (V) での免疫化は、このモデルにおいて同種抗原誘導アポトーシスを防止する。肺同種移植片におけるアポトーシスを防止する、c o l (V) 誘導経口寛容の能力を決定するため、T d T 仲介 dUTP Nick End Labeling (TUNEL) アッセイキット (In Situ Cell Death Detection Kit, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) を利用して、移植 2 週間後の肺同種移植片組織切片におけるアポトーシスを検出した。血管周囲及び細気管支周囲組織中のアポトーシスを起こした細胞の量は、Sigma Scan ソフトウェア (Jandel Scientific, Chicago, Ill) を利用し、デジタル化エオシン対比染色組織切片 (細胞 / μm^2) 上で定量した。

10

【 0 1 5 9 】

c o l (V) により誘導された免疫抑制のすべての可能性のあるメディエーター、I L - 4、I L - 1 0、T G F - β 、C T G F 及び一酸化窒素の産生、ならびに移植後合成の時間経過を決定するため、拒絶病態を防止することに最も有効である c o l (V) の用量を、ラットの別の群を摂取するために使用した。簡単に言えば、同種移植片対照ラット及び c o l (V) 摂取同種移植片レシピエントを移植後 2 日、4 日、6 日、8 日、1 0 日、1 2 日及び 1 4 日目に屠殺し、製造元のプロトコルによる E L I S A により (R&D Systems, Minneapolis, Minn.)、I L - 4、I L - 1 0、T G F - β の血清レベルを定量した (n = 5 各時点で 5 ラット)。R N a s e プロテクションアッセイ (PharMingen, San Diego, Calif.) を利用して、末梢リンパ節及び脾細胞におけるこれらサイトカインの m R N A を検出した。対照は、正常 W K Y ラットからの血清、リンパ節及び脾細胞である。

20

【 0 1 6 0 】

対照同種移植片、c o l (V) 摂取同種移植片及び正常ラットの血清中の C T G F レベルは、C T F G の構造及び機能における第一人者である Dr. George Martin, Ph.D., Scientific Director of Fibrogen, San Francisco, Calif. により、E L I S A を用いて決定された。Dr. Martin により提供されたプローブを利用し、末梢リンパ節及び脾臓中の C T G F についての m R N A を検出するため、ノーザンブロッティングを使用した。タンパク質及び m R N A 発現は、I L - 4、I L - 1 0 及び T G F - β について記述された同一の時点でアッセイした。

30

【 0 1 6 1 】

血清中の一酸化窒素レベルは、対照同種移植片及び c o l (V) 摂取同種移植片において上記の種々の時点で、及び上記の移植後の種々の時点で、ならびに正常 W K Y ラットで検出した。安定な代謝亜硝酸塩及び硝酸塩の産生は、血清の分光光度分析を利用する Greiss 反応により決定した (Kallio et al. 1997)。

【 0 1 6 2 】

実施例 7

慢性肺同種移植片拒絶 (閉塞性細気管支炎) の発生における経口寛容についての C o l (V) 用量の効果。病原体フリー、M H C (R T 1) 不適合雄ラットを本研究に利用した : Fischer 344 (F 3 4 4、R T 1 ^{1 v 1})、Brown Norway (B N、R T 1 ⁿ) 及び Wistar Kyoto (W K Y、R T 1 ¹) ラット (移植の時点で 2 5 0 - 3 0 0 g)。全てのラットは Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.) から購入し、施設のガイドラインに従って University School of Medicine の Laboratory Animal Resource Center Indiana (Indianapolis, Ind.) に収容した。

40

【 0 1 6 3 】

I I 型コラーゲン [c o l (I I)] は、以前に報告されているようにイヌ軟骨から単離した。精製ヒト V 型コラーゲン [c o l (V)] 及び X I 型コラーゲン [c o l (X I)] は Dr. Jerome Seyer (VA Hospital, Hampton, Va.) から贈与された。コラーゲンは 0 . 0 0 5 M 酢酸 (0 . 5 m g / m l) で希釈し、使用されるまで 4 週で貯蔵した。

50

【 0 1 6 4 】

W K Yラットは、0.5 mlの生理食塩水に溶解した10 μgのc o l (V) 溶液を、16ゲージボールポイントステンレススチール動物摂取針 (Braintree Scientific, Braintree, Mass.) を利用する胃経管栄養により摂取させた。対照動物には希釈剤のみを摂取させた。8回摂取に対し、動物は一日おきに摂取させた。最後の摂取7日後、これらのラットは肺同種移植片のレシピエントとして利用した。

【 0 1 6 5 】

左肺同系移植片 (W K Y W K Y) 又は同種移植片 (F 3 4 4 W K Y) の同所性移植は最初に (Marck et al. 1983, 及び Prop et al. 1985) により記述手順を利用し、既に報告されているように実施した。F 3 4 4 W K Y移植モデルは、第二週の終わりまでに重度の拒絶発生が付随した。加えて、このモデルは、再現性よく閉塞性細気管支炎 (B O) を発生する、ただ一つの肺移植の動物モデルである。全ての移植群において生存率は90%を上回った。実験期間の間、いずれの時点でも非免疫抑制療法は与えなかった。

10

【 0 1 6 6 】

3つの移植群を研究した：W K Yラットからの肺をW K Yレシピエントに移植 [対照同系移植片] ; F 3 4 4肺を希釈剤摂取W K Yレシピエントに移植 [対照同種移植片] ; 及びF 3 4 4肺をc o l (V) 摂取W K Yレシピエントに移植 [c o l (V) 摂取同種移植片] 。レシピエント移植2週及び10週後に屠殺した。

【 0 1 6 7 】

遅延型過敏性 (D T H) 応答は、(Sayegh et al. 1994及び Yamagami et al. 1999) に記載されている方法を改変して決定した。手短に言えば、肺移植10週間後、対照又はc o l (V) 摂取W K Yラットは、26ゲージ注射針を使用するs . c . 注射により、右耳介内に、 10^7 照射 (3000ラド) ドナー由来F 3 4 4又は第三者 (B N) 脾細胞の30 μlのP B S溶液を受けた。左耳介は等容積の希釈剤を受け、対照部位として働いた。無処置W K Yラットは陰性対照であった。無処置又は同種移植片レシピエントW K Yラットの別々の群が、15 μgのc o l (I I) 、c o l (V) 又はc o l (X I) を30 μl容量で右耳介内に、希釈剤を左耳介内に注射されて試験された。耳の厚さは、注射直前及び24時間後に盲検様式で、マイクロメーターカリパー (Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, 111.) で測定した。特異的耳膨潤は以下の式に従って計算した：特異的耳膨潤 = (右耳厚さ@ 24時間 - 右耳厚さ@ 0時間) - (左耳厚さ@ 24時間 - 左耳厚さ@ 0時間) × 10^{-3} mm。全てのデータは三回の測定の平均として報告されている。

20

30

【 0 1 6 8 】

D T H部位でのT G F - の中和は、(Bickerstaff et al. 2000) により記載されている手順を改変して実施した。手短に言えば、肺移植10週間後、c o l (V) 摂取W K Yラットは、5 μgのポリクローナルニワトリ抗ラットT G F - A b (R&D Systems, Minneapolis, Minn.) と混合された 10^7 照射 (3000ラド) ドナー由来F 3 4 4脾細胞の30 μlのP B S溶液を、右耳介内に受けた。左耳介は等容積の希釈剤を受け、対照部位として働いた。陰性対照のため、c o l (V) 摂取同種移植片の別の群が、5 μgの対照ニワトリ免疫グロブリン又は対照ヤギ免疫グロブリン (R&D Systems, Minneapolis, Minn.) と混合された 10^7 照射 (3000ラド) ドナー由来F 3 4 4脾細胞を右耳介内に、及び希釈剤を左耳介内に受けた。特異的耳膨潤は上記のように計算した。対照免疫グロブリンはD T H応答に何の影響も与えなかった。

40

【 0 1 6 9 】

混合白血球反応は以前に記述されている手順を改変することにより実施した。手短に言えば、抗原提示細胞源 (A P C) として使用されたF 3 4 4脾細胞 (刺激物質) をマイトマイシンC (Sigma, St. Louis, Mo.) で処理し、種々の比で、W K Yラットからのリンパ節T 1リンパ球 (応答物質) (3×10^5 / ウェル) と、96 - ウェル平底マイクロタイタープレート (Costar, Cambridge, Mass.) の200 μlの培地 (R P M I , 2 m M L - グルタミン、 5×10^{-5} M 2 - メルカプトエタノール、100 U / m l ペニシリン、100 μl / m l ストレプトマイシン、10% 熱不活性化ウシ胎児血清) 中で同時培

50

養した。37 (5% CO₂)での5日間のインキュベーションが完了する18時間前、各ウェルに1 μCi/mlの³H (Amersham Corp., Arlington Heights, 111.)を加えた。培養物を自動化セルハーベスター (Brandel, Gaithersburg, Md.)で収穫し、液体シンチレーションカウンター (Beckman, Arlington Heights, 111.)で分析した。細胞増殖は、3回の培養での[³H]チミジン取り込みの分当たりのカウントの平均として決定され、刺激指数として報告された。別の実験において、刺激物質として実験群のWKYラットからの脾細胞及び応答物質としてF344ラットからのリンパ節Tリンパ球を使用して同じアッセイを実施した。

【0170】

実験群の血清中のTGF-β₁レベルは、製造元のプロトコルにより、TGF-β₁免疫アッセイシステム (Promega, Madison, Wis.)を利用するELISAにより定量した。血清中のIL-4及びIL-10レベルは、製造元のプロトコルにより、Cytoscreenイムノアッセイキット (BioSource International, Camarillo, Calif.)を利用するELISAにより定量した。TGF-β₁、IL-4及びIL-10アッセイの感度は、それぞれ32、2及び5 pg/mlであった。

【0171】

病理学を評価するため、各群からの自然の及び移植された肺を摘出し、固定し、切片化し、染色し、及び既に報告されたように、移植群の予備知識がない盲検の様式で、病理学者 (O. W. C.)による標準的判断基準を使用して拒絶病態について段階付けした。

【0172】

対照同種移植におけるDTH及び異なった抗原が暴露された無処置WKYラットについてのデータは正常に分布していないことが観察されたので、相互作用を有するrank-sum二方向ANOVAを利用し、群間の差違を決定した。対照同種移植片及びc o l (V) 摂取同種移植片間の、ドナー同種抗原に対するDTH応答の相違はマンホイットニーU検定を利用して決定した。MLR及びサントカインの分析については、複数の比較のためのスチューデントt検定を利用した。P値<0.05が有意であると決定された。

【0173】

急性肺同種移植片拒絶は、ドナー抗原ならびにc o l (V) に対する免疫応答と関連することが示されている。しかしながら、最近の研究は、ドナー抗原に対する免疫応答が時間とともに減少できることを示唆した。ドナー抗原及びc o l (V) に対する免疫応答が肺移植後長期に存在するかどうかを決定するため、F344 (ドナー) 脾細胞及びc o l (V) に対するDTH応答を、F344肺移植片の移植10週後に、WKYラットにおいて試験した。図19は、対照同種移植片レシピエントが無処置WKYラットと比較して、ドナー抗原 (F344脾細胞) 及びc o l (V) に対する有意なDTH応答を有していることを示している (* p < 0.05)。有意に、10週目でのドナー抗原及びc o l (V) に対するDTH応答は、急性拒絶の間に (移植2週間後) 観察されたものと同じであった。C o I (I I) 又はc o l (X I) (対照) は、いずれの時点でも、肺同種移植片レシピエントにおいてDTH応答を誘導しなかった。

【0174】

ドナー由来抗原を使用する経口寛容誘導は、移植2週間後まではドナー抗原に対する細胞性免疫応答を抑制するのに有効であった。加えて、欠損抗原提示が、寛容が免疫応答を変調する別の機構であると報告されている。c o l (V) 摂取がドナー抗原に対する細胞性免疫応答を長期に下方調節するかどうかを次ぎに決定し、c o l (V) 誘導経口寛容が抗原提示に影響する効果を試験した。上記のように、非摂取及びc o l (V) が摂取されたWKYラットは、F344肺同種移植片を受けた。移植2週間 (急性拒絶の時間) 及び10週間 (BO発症の時間) 後、ラットを屠殺し、リンパ節リンパ球を単離し、ドナー抗原 (F344脾細胞) で刺激した。図19は、正常WKYラットからのリンパ節リンパ球又はF344肺同種移植片の移植後2週又は10週目のWKYラットから単離されたリンパ球が、ドナー抗原に対して匹敵する増殖応答を有していたことを示している。対照的に、正常又は対照同種移植片と比較し、c o l (V) 誘導経口寛容は、両方の時点でドナー

10

20

30

40

50

抗原に対する増殖応答の有意な減少を起こした ($* p < 0.05$)。加えて、c o l (V) 摂取肺同種移植片レシピエントからのリンパ球に対する増殖応答は、2週と比較して10週ではより低かった ($* p < 0.05$ 、図20)。

【0175】

我々は次に、c o l (V) 誘導経口寛容が抗原提示に影響するかどうかを決定した。手短に言えば、脾細胞(抗原提示細胞源)は正常W K Yラット又はF 3 4 4肺同種移植片の移植後2週又は10週目のW K Yラットから単離され、M L RにおいてF 3 4 4リンパ節リンパ球が増殖するのを誘導するそれらの能力を試験した。図19は、2週及び10週目にc o l (V) 摂取同種移植片レシピエントから単離された脾細胞が、正常W K Yラットから単離された脾細胞に匹敵する増殖を誘導したことを示している。

10

【0176】

ドナー抗原に対するD T H応答は、臓器移植の多様なげっ歯類モデルにおける拒絶活性と相関すると報告されている。それ故、10週目のc o l (V) 摂取肺同種移植片レシピエントにおけるドナー抗原に対する減少したD T H応答を示しているデータは、同種移植片における減少した拒絶病態を示唆している。図21は、移植10週後の、F 3 4 4肺同種移植片を受けたW K Yラット(対照同種移植片)、及びF 3 4 4肺同種移植片を受けたc o l (V) 摂取W K Yラットから摘出された肺同種移植片の肉眼的解剖学及び組織学を示している。対照同種移植片は暗褐色であり、萎縮し及び硬かった(図21A)。対照的に、c o l (V) 摂取W K Yラットからの同種移植片は、わずかに変色しているのみでほとんど正常外観を有していた(図21B)。移植10週後、全ての全対照同種移植片は広範囲の間質単核細胞浸潤、線維症及びB Oの病理学的病変である肉芽組織による小気道の閉塞を発生した($n = 5$ 、図21C)。対照的に、c o l (V) 摂取ラットから摘出された同種移植片は軽度急性拒絶の病態を記述する間質性炎症がなく、軽度の肺胞性浸潤を有するのみであった(グレードA 2、 $n = 5$ 、図21D)。

20

【0177】

I L - 4、I L - 10又はT G F - の全身的産生は、経口寛容誘導免疫抑制の機構としてよく報告されている。移植10週後の3つの実験群におけるT G F - の血清レベルは、図22に示されている。正常W K Yラットは血清中に低レベルのT G F - 、F 3 4 4肺同種移植片を受けたW K Yラットでは、わずかに、しかし有意ではなく増加したT G F - レベルを有していた(対照同種移植-図22)。しかしながら、肺移植に先だってc o l (V) を摂取させることは、有意に増加したT G F - の血清レベルを生じた(図25、 $* p < 0.05$)。肺移植なしでc o l (V) を摂取させることのみでは、血清T G F - レベルは増加しなかった(データは示されていない)。I L - 4又はI L - 10のいずれも、いかなる群の血清にも検出されなかった。

30

【0178】

同種抗原に対するリンパ球応答の下方調節、及びインビトロでの同種抗原の無傷の提示を示しているデータは、c o l (V) 誘導経口寛容が、インビボでのドナー抗原に対する抑制されたD T H応答にも関連しているに違いないことを示唆している。予期されるように、図23は、対照同種移植片レシピエントがドナー抗原に対する強いD T H応答を有していることを示している。しかしながら、移植に先だってc o l (V) を摂取させることは、ドナー抗原に対するD T H応答を有意に減少させた(図26、 $* p < 0.05$)。T G F - の増加した血清レベルがc o l (V) 誘導経口寛容に寄与しているかどうかを決定するため、以前に報告されているように、T G F - への中和抗体を使用してドナー抗原に対するD T H応答を繰り返した。図23は、T G F - を中和することは、ドナー抗原に対するD T H応答の有意な回復を生じた($* p < 0.05$ 、及びD T H応答の75%が対照同種移植片において観察された)。

40

【0179】

実施例8

図26を参照すると、表5は実施例8で使用された実験群、C o I (V) の鎖の臭化シアン消化物中に存在するペプチドが急性拒絶の発生を防止するかどうかの決定をリスト

50

している。手短に言えば、これらの実験群は以下のものである：同種移植片対照無傷 c o l (V) 摂取 2 (V) 。 V 型コラーゲンは、剖検で得られたヒト肺から単離された。肺組織を切り刻み、洗浄し及び 0 . 2 M N a C l を含有する 0 . 5 M 酢酸に懸濁させ、そしてペプシンにより消化し、遠心分離した検体から上清を吸引し、ペレットを集め、抽出手順を繰り返した。2つの消化物からの上清を合わせ、 - 7 0 で貯蔵した。V型コラーゲンは 0 . 5 M 酢酸からの示差 N a C l 沈殿により上清から精製した (Piez et al. 1963) 。 S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定されるおよそ 2 の 鎖比 1 (V) / 2 (V) を有する V 型調製物が得られるまで、酢酸での可溶化及び N a C l 沈殿のサイクルを繰り返す (Woodburye wheat t al. 1989) 。 2 (V) からの 1 (V) の分離は、D E A E - セルロースでのクロマトグラフィーにより達成される (Chiang et al 1980) 。 1 (V) 及び 2 (V) 鎖をカラムから溶出し、溶出物液中のヒドロキシプロリン含量の決定により定量する。

10

【 0 1 8 0 】

V 型コラーゲンの 鎖はさらに、コラーゲンのメチオニン残基を切断する臭化シアンによる消化により分画化する (Miller et al. 1971) 。消化が完了した後、サンプルを 5 0 倍に希釈し、凍結乾燥して臭化シアンを除去した。消化の程度はポリアクリルアミドゲルでスクリーニングした。個々のペプチドはイオン交換及び分子ふるいクロマトグラフィーの併用により単離した。

【 0 1 8 1 】

2 0 匹の W K Y ラットは胃経管栄養法により、無傷の c o l (V) 又は 1 (V) 又は 2 (V) からプールされたペプチドを受けた。本実施例における無傷の c o l (V) 又はペプチドの用量及び摂取計画は、実施例 5 で無傷の c o l (V) について決定されたものと同じである。移植 2 週間後、各群のラットを屠殺し、及び肺を回収した。

20

【 0 1 8 2 】

実施例 9

ここに示されたデータは、本発明の方法は、ヒト移植片レシピエントにおける急性又は慢性拒絶病状発生を防止する又は軽減するのに有効であろうこと、同一ではないにしても同様の療法は特発性肺疾患、又は肺に観察されるコラーゲンに対する自己免疫応答を含む、いずれか他のタイプの肺疾患又は肺障害のための有効な治療でもあるべきであることを示唆する。ヒト対象が移植を受けるためにリストに載せられた場合、該対象は本明細書に記載されたコラーゲン化合物のような同種免疫応答を抑制する分子の有効用量を受け始めるであろうことも意図される。治療を受けている患者は、経口投与により、好ましくは経口摂取か又はレシピエント内への肺内滴下注入により該化合物を受けるであろう。

30

【 0 1 8 3 】

用量は、当業者には公知である多数の因子により決定されるであろう。該対象が移植リストに載せられた時点から移植の時まで、月当たり少なくとも 3 用量を受けるであろう。ある場合には、月当たり少なくとも 3 用量を受けるために、用量が 4 日の間、隔日で投与されるであろう。他の場合、移植に先立って月当たり 5 回の総容量について、8 日の間、隔日で投与されるであろう。他の場合には、該対象は、移植リストに載せられた時点から移植の時まで、週に 1 回該化合物を受けるであろう。対象に依存して、該対象が移植リストに載せられた時点から移植の時まで、週当たり少なくとも 2 回、該化合物を投与することができる。

40

【 0 1 8 4 】

実施例 1 0

自己免疫応答を抑制する分子、好ましくはコラーゲン化合物による、移植を受けた、又はコラーゲン、例えば、V型コラーゲンに対する自己免疫を含む肺疾患又は障害を患っているヒト対象の治療は、該対象における急性又は慢性病態を防止する又は軽減するであろうことがさらに企図される。上記のように、該化合物の投与は、経口摂取による、又はレシピエント (患者) 内への肺内又は静脈内点滴注入によることを含む多様な手段で投与し得る。

50

【 0 1 8 5 】

再び、投与量は当業者には公知の多数の因子に基づいて当業者により決定されるであろう。ほとんどの場合、所与の患者は少なくとも2ヶ月の間、又は疾患又は障害の病状が改善されるまで、月当たり少なくとも3用量の化合物を受けるようである。これらの用量は、月当たり3用量について、上記のように、4日の間、隔日で1用量の形態を取ることができる。このやり方を当業者により決定される必要なだけ繰り返すことが可能である。もしくは、該対象は、移植後必要とされる月の間、月当たり総計で5用量について8日の間、隔日で1用量を受けることができる。他の側面において、該対象は、当業者により決定されるように、週毎の増加又は週で2倍の用量などを受けることができる。

【 0 1 8 6 】

本発明が図及び前記の説明において詳細に図示され及び記述されてきたが、このことは特質において例示的であり制限的ではないと考えるべきであり、好ましい態様のみが示され記述されてきたこと、及び本発明の精神内にくるすべての変更及び修飾は保護されるべきと望まれることを理解されている。その上、本発明が特定の実施例、理論的根拠、説明、及び例示を使用して例示されてきたが、これらの例示及び付随する議論は本発明を制限しているとして説明されているわけではない。この出願で参照されている、全ての特許、特許出願、及び教科書、科学書、出版物などへの参照は、その全体が本明細書において援用される。

【 0 1 8 7 】

参考文献

下記の参考文献は、それらが本明細書に示されているものへの例となる手順又は他の詳細な補完を提供する範囲において、特別に本明細書において援用される。

Ayoub G, Terasaki P. HLA-DR matching in multicenter, single-typing laboratory data. *Transplantation* 1982 May;33:515-7.

Bickerstaff2, Xia , Pelletier , and Orosz , "Mechanisms of Graft Acceptance: Evidence That Plasminogen Activator Controls Donor-Reactive Delayed-Type Hypersensitivity Responses in Cardiac Allograft Acceptor Mice." 2000.

Birk OS, Gur SL, Elias D, et al. The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5159-63.

Blankenberg, F., Robbins, R., Stoot, J., Vriens, P., Berry, G., Tait, J. and Strauss, H., "Radionuclide Imaging of Acute Lung Transplant Rejection With Annexin V " *Chest*, 2000; 117:834-840. Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, VanBuskirk AM, Orosz CG, Lee JH, Kusaka S. Loss of tolerance to a maternal kidney transplant is selective for HLA class II: Evidence from trans-vivo DTH and alloantibody analysis . *Human Immunology* 2000;61: 1395-402.

Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, et al. Minor H Antigen HA-I -specific Regulator and Effector CD8+ T Cells, and HA-I Microchimerism, in Allograft Tolerance. *J Exp Med* 2004;199: 1017-23.

Chen, Kuchroo, Inobe, Hafler, Weiner, "Regulatory T-cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis," *Science*, 265: 1237-1240 , 1994.

Chen, Inobe, Marks, Gonnella, Kuchroo, Weiner, "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance," *Nature*, 376: 177-180, 1995.

10

20

30

40

50

- Chiang, Mainardi, Seyer, "Type V(A-B) collagen induces platelet aggregation," *J. Lab. Clin. Med.*, 95:99-107, 1980.
- Cremer, Ye, Terato, Owens, Seyer, Kang, "Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat: characterization of cellular and humoral immune responses to native types XI, V, and II collagen and constituent α -chains," *J. Immunol.* 153:824-832, 1994.
- Fedoseyeva, Zhang, Orr, Levin, Buncke, Benichou, "De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process," *J. Immunol.* 162:6836-42, 1999. 10
- Delclaux, S., Rezaiguia-Delaux, C, Delacourt, C, Brun-Buission, C, Lafuma and Harf, A., "Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats." *Am J Physical Lung Cell Mol Physiol* 273: L104-L112, 1997; 1040-0605/97.
- Duquesnoy RJ, Liu K, Fu XF, Murase N, Ye Q, Demetris AJ. Evidence for heat shock protein immunity in a rat cardiac allograft model of chronic rejection. *Transplantation* 1999;67: 156-64. 20
- Estenne M, Maurer JR, Boehler A, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:297-310.
- Faria and Weiner, "Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications," *Adv. Immunol.* 73: 153-264, 1999.
- Garrovillo, Ali, Oluwole, "Indirect allorecognition in acquired thymic tolerance: induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by allopeptide-pulsed host dendritic cells," *Transplantation*, 68: 1827-1834, 1999. 30
- Garside and Mowat, "Mechanisms of oral tolerance." *Crit Rev Immunol*, 1997; 17(2): 119-37. Hanson, Gorman, Oui, Cheah, Solomon, Trowsdale, "The human α 2(XI) collagen gene(COLI 1A2) maps to the centromeric of the major histocompatibility complex on chromosome 6," *Genomics*, 5:925-931, 1989.
- Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, et al. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of Type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol* 2002 Aug 1; 169: 1542-9. 40
- Henningsen GM, Koller LD, Exon JH, Talcott PA, and Osborne CA, "A sensitive delayed-type hypersensitivity model in the rat for assessing in vivo cell-mediated immunity." *J Immunol Methods.* 1984 May 25; 70(2): 153-65.
- Hirt, You, Moller, Boeke, Starke, Spranger, Wottge, "Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: Implication of acute rejection and the time point of treatment," *J. Heart Lung Transplant*, 18:542-548, 1999. 50

Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and Type IV collagen. *N Engl J Med* 2003;348:2543-56.

Huang, Fuchimoto, Scheier-Dolberg, Murphy, Neville, Sachs, *J. Clin. Invest.*, 105 : 173-181, 2000.

Ishido, Matsuoka, Matsuno, Nakagawa, Tanaka, "Induction of donor-specific hyporesponsiveness and prolongation of cardiac allograft survival by jejunal administration of donor splenocytes," *Transplantation*, 68: 1377-1382, 1999.

10

Joo, Pepose, Stuart, "T-cell mediated responses in a murine model of orthotopic corneal transplantation," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36: 1530-1540, 1995.

Kallio*, E., Koskinen*, P., Aavik*, E., Vaali*, K., and Lemstrom*, K., "Role of Nitric Oxide in Experimental Obliterative Bronchiolitis (Chronic Rejection) in the Rat," *J. Clin. Invest.* Vol 100 No 12, December 1997, 2984-2994.

Konomi, Hayashi, Nakayasu, Arima, "Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin," *Am. J. Pathol.*, 116:417-426, 1984.

20

Krensky and Clayberger, "HLA-derived peptides as novel immunosuppressives," *Nephrol. Dial. Transplant*, 12:865-878, 1997.

Lowry, Marghesco, Blackburn, "Immune mechanisms in organ allograft rejection. VI. Delayed-type hypersensitivity and lymphotoxin in experimental renal allograft rejection," *Transplantation.*, 40: 183-188, 1985. Madri and Furthmayr, "Isolation and tissue localization of type AB2 collagen from normal lung parenchyma," *Am. J. Pathol.*, 94:323-332, 1979.

Madri and Furthmayr, "Collagen polymorphism in the lung," *Human Pathology*, 11 :353-366, 1980.

30

Marck, Prop, Widevuur, "Lung transplantation in the rat. III. Functional studies in iso- and allografts," *J. Surgical Res.*, 35: 149-158, 1983.

Mares DC, Heidler KM, Smith GN, et al. Type V Collagen Modulates Alloantigen-Induced Pathology and Immunology in the Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000 Jul 1; 23:62-70.

Matsumura, Marchevsky, Zuo, Kass, Matloff, Jordan, "Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation," *Transplantation.*, 59: 1509-1517, 1995.

40

Morris and Bachinger, "Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1. alpha., 2. alpha., 3. alpha.) retaining non-triple helical domains. *J. Biological Chem.*, 262: 11345-11350, 1987.

Murphy, Magee, Alexander, Waaga, Snoeck, Vella, Carpenter, Sayagh, "Inhibition of allorecognition by a human class II MHC-derived peptide through the induction of apoptosis," *J. Clin. Invest.*, 103:859-867, 1999.

50

O'Leary, Evans, Zuckerman, "IN Vivo Dexamethasone Effects on Neutrophil Effector Functions in a Rat Model of Acute Lung Injury," *Inflammation*, 21 :6, 1997.

Oluwole, Chowdhury, Jin, Hardy, "Induction of transplantation intolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogeneic soluble peptides," *Transplantation*, 56(6): 1523-1527, 1993.

Piez, K.A., Eigher, E.A. and Lewis, M.S. *Biochemistry*, 2, 58; 1996.

10

Prop, Nieuwenhuis, Wildevuur, "Lung allograft rejection in the rat. I. Accelerated rejection caused by graft lymphocytes," *Transplantation*, 40:25-30, 1985.

Rodriguez DS, Jankowska-Gan E, Haynes LD, et al. Immune regulation and graft survival in kidney transplant recipients are both enhanced by human leukocyte antigen matching. *Am J Transplant* 2004;4:537-43.

Sayagh, Watschinger, Carpenter, "Mechanisms of T cell recognition of alloantigen," *Transplantation*, 57:(9)1295-1302, 1994.

20

Sayegh, Khoury, Hancock, Weiner, Carpenter, "Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility complex allopeptides in the rat," *Proc. Natl. Acad. Sci*, 89: 7762-7766, 1992.

Sayegh and Krensky, "Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides," *Kidney Int. Suppl.* 53:S13-20, 1996.

Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of Type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *Am J Hum Genet* 2000;66: 1757-65.

30

Sekine, Nowen, Heidler, Van Rooijen, Brown, Cummings, Wilkes, "Role of passenger leukocytes in allograft rejection- Effect of depletion donor alveolar Macrophages on the local production of TNF-alpha, T helper 1/Helper 2 cytokines, IgG subclasses, and pathology in a rat model of lung transplantation," *J. Immunol*, 159: 4084-4093, 1997.

Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:271-81.

40

Smith Jr, Williams, Brandt, "Interaction of proteoglycans with pericellular (1 alpha, 2 alpha, 3 alpha) collagens of cartilage," *J. Biol. Chem.*, 260: 10761-10767, 1985.

Stark and Ostrow, Training Manual Series, Laboratory Animal Technician, American Association for Laboratory Animal Science, 181-182, 1990.

Trulock, "Lung transplantation," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155:789-818, 1997.

50

VanBuskirk, Wakely, Sirak, Orosz, "Patterns of allosensitization in allograft recipients: long-term allograft acceptance is associated with active alloantibody production in conjunction with active inhibition of alloreactive delayed-type hypersensitivity," *Transplantation*, 65: 1115-1123, 1998.

van den Berg JW, Hepkema BG, Geertsma A, et al. Long-term outcome of lung transplantation is predicted by the number of HLA-DR mismatches. *Transplantation* 2001; 71 :368-73.

10

Westra, Prop, Kuijpers, "A paradox in heart and lung rejection," *Transplantation*, 49:826-828, 1990 Whitacre, Gienapp, Orosz, Bitar, "Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy," *J. Immunol.*, 147:2155-2163, 1991.

Wilkes, Heidler, Bowen, Quinlan, Doyle, Cummings, Doerschuk, "Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology of acute lung allograft rejection, and deposition of IgG2a in recipient murine lungs," *J. Immunol*, 155:2775-2783, 1995.

20

Wilkes, Thompson, Cummings, Bragg, Heidler, "Instillation of allogeneic lung macrophages and dendritic cells cause differential effects on local IFN- γ production, lymphocytic bronchitis, and vasculitis in recipient murine lungs," *J. Leukoc. Biol.* 64:578-586, 1998.

Wilkes, Bowman, Cummings, Heidler, "Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology and immunology of lung allograft rejection in recipient murine lungs. Role of ICAM-1 on donor cells," *Transplantation*, 67(6):890-896, 1999.

Wilson, Ebringer, Ahmadi, Wrigglesworth, Tiwana, Fielder, Binder, Ettelaie, Cunningham, Joannou, Bansal, "Shared amino acid sequences between major histocompatibility complex class II glycoproteins, type XI collagen and *Proteus mirabilis* in rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, 54:216-220, 1995.

30

Woessner Jr., "The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid," *Arch. Biochem. Biophys.* 93:440-447, 1961.

Yagyu, Steinhoff, Schfers, Dammenhayn, Haverich, Borst, "Comparison of mononuclear cell populations in bronchoalveolar lavage fluid in acute rejection after lung transplantation and *Mycoplasma* infection in rats," *J. Heart Transplant.*, 9:516-525, 1990.

40

Yamagami, Tsuru, Ohkawa, Endo, Isobe, "Suppression of allograft rejection with anti- α beta T cell receptor antibody in rat corneal transplantation," *Transplantation*, 67:600-604, 1999.

Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, et al. Oral tolerance induction by Type V collagen downregulates lung allograft rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 Jul;25:26-34.

50

Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, et al. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by Type V collagen-induced oral tolerance. *Transplantation* 2002;73:500-5.

Yoshino, Quattrocchi, Weiner, "Suppression of antigen-induced arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen," *Arthritis Rheum.* 38: 1092-1096, 1995.

Yousem, Berry, Cagle, Chamberlain, Husain, Hruban, Marchevsky, Ohori, Ritter, Stewart, Tazelaar, "Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung rejection study group," *J. Heart Lung Transplant*, 15: 1-15, 1996. 10

Zheng, Markees, Hancock, Li, Greine, Li, Mordes, Sayegh, Rossini, Strom, "CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment," *J. Immunol.*, 162:4983-4990, 1999.

【図面の簡単な説明】

【0188】

【図1】肺移植片レシピエントの臨床経過に関連した抗c o l (V) B及びT細胞自己反応性。 20

【0189】

パネルA . c o l (I I) 又はc o l (V) に対して試験された患者L 3、L 4 1、L 3 1からのB A Lサンプルから精製されたI g Gのウェスタンブロット分析。

【0190】

パネルB . 同じ3人の患者における抗c o l (V) 自己免疫及び移植片機能の時間経過。F E V 1 (実線、左軸) は各患者について最大 (L 3 について2 . 3、L 4 1 について2 . 4 及びL 3 1 について2 . 8) の1 0 0 % に調整された。B O S レベル1 は灰色の点線で表されている (最大F E V 1 の8 0 %) 。c o l (V) (黒いバー、右軸) 及びc o l (I I) (白いバー) に対するD T H は陰を付けた領域で表されている負のD T H 応答 (< 2 5 × 1 0 ⁻⁴ インチ) で示されている。ウェスタンブロットの結果 (パネルA から) はグラフの頂点近くの矩形により表されている。急性拒絶病状発生は * により表されている。 30

【0191】

パネルC . パネルB で見られたものと同様の反応性のパターンを有する、4人の追加の対象における臨床経過及び抗c o l (V) 反応性の合成。%最大F E V 1 (各線は個々の移植片レシピエントを表している)、c o l (V) に対する陽性A b 及び / 又はD T H (所与の対象F E V 1 線上の黒丸) 又はc o l (V) に対する陰性A b 及び / 又はD T H (F E V 1 線上の白三角)、ならびに対象の死 (+) が示されている。B O S 1 閾値 (8 0 % 最大F E V 1) は灰色の点線で表されている。 40

【図2】B O S I が存在しないことに関して抗c o l (V) 反応性を発生させることの効果を試験しているカプランマイヤー分析。移植後3 2 6 日 (パネルA) 又は移植後7 6 0 日 (パネルB) を通して良好な移植片機能を有する患者を、その時間に先立ち、c o l (V) へのそれらの応答に基づいて分割した。パネルA、陽性抗c o l (V) 応答を有するもの (点線) には抗体 / B A L 又はD T H / 末梢血陽性が含まれ ; パネルB、D T H 応答は前陽性抗c o l (V) 応答を有する患者を同定するために使用される唯一の判断基準である。両方のパネルにおいて、陰性の前抗c o l (V) 応答を有する患者は実線で示されている。c o l (V) 非反応性群及びc o l (V) 反応性群間の相違は有意であった (p = 0 . 0 1、パネルA ; p = 0 . 0 3、パネルB) 50

【図3】移植後肺患者におけるc o l (V) に対するD T H 応答は特異的であり、前移植には存在しない。

【0192】

パネルA . 移植後肺患者 (n = 8、いずれの疾患でも) 又はグッドパスチャー (Good pasture's) 症候群を有する腎臓患者 (G P S、 n = 5) を c o l (I I) (白いバー)、c o l (I V) (斜線を付けたバー) 又は c o l (V) (黒いバー) に対する D T H 応答について試験し、平均膨潤 \pm S . D . で表されている。種々のコラーゲンに対する肺移植片レシピエントの応答間の差違は有意であり (* p = 0 . 0 0 1)、G P S と腎臓移植片レシピエントの間の相違もそうであった。

【0193】

パネルB . 多様な肺疾患を有する非移植片レシピエントを c o l (I I) (白いバー)、又は c o l (V) (黒いバー) に対する D T H 応答について試験し、平均膨潤 \pm S . D . で表されている。I P F 及びいずれか他の疾患を有する患者においては、c o l (V) に対する応答の相違は有意であった (* p = 0 . 0 2)。

【0194】

パネルC . I P F 及びいずれか他の疾患の移植前診断を有する患者についての時間と移植片機能損失のカプランマイヤー分析。1年移植片生存率相違は有意であった (p = 0 . 0 5)。log rank 解析による総移植片生存率は、群間で有意に異ならなかった。

【図4】急性拒絶を受けた肺中の沈着を示している I g G の免疫化学の写真。経気管支生検 (T B B) の凍結切片又は正常肺組織はアセトン中で固定し、以前に記載されているように (Wilkes et al - Journal of Immunology 1995) I g G サブタイプ沈着のために染色した。パネルA、B、C 及びD は、移植後100日目に急性拒絶グレード2を受けた肺同種移植片から得られたT B B の I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 サブクラス免疫染色を示している。細気管支周囲結合組織中の I g G 2 沈着が気管支上皮 (矢印) に下にあることに注意されたい。対照的に、同一サンプル中には、I g G 1、I g G 3 又は I g G 4 沈着は検出されなかった。上皮下基質中の I g G 2 沈着は、正常肺中及び静止状態移植片状態を有する同種移植片中には存在しない (データは示されていない)。

【図5】肺移植を待っている患者におけるV型コラーゲンに対する遅延型過敏性応答。D T H 応答はT細胞活性化のマーカーであり、我々がラット肺移植モデルで報告したことを反している。I P F を有するが、他の形態の肺疾患ではない患者は、V型コラーゲンに対する有意により大きなD T H 応答を有する。このことは、これらの患者がこの自己抗原に対して活性化されたT細胞をすでに有していることを示している。

【図6】未処置のW K Y ラット (A)、既にニワトリ卵リゾチームで免疫されたW K Y ラット (B)、又は既にV型コラーゲンで免疫されたW K Y ラット (C) 内に移植された肺同系移植片の病態の効果を示している肺組織株の顕微鏡写真。データはc o l (V) (H E L ではない) からの前感作は、移植後30日目の肺の破壊を生じることを示している。いずれのラットも免疫抑制剤又は他の治療を受けていない。データはH E L 及びc o l (V) 群の各々について6匹のラット、未処置群ではS O ラット以上を代表している。

【図7】表1、患者層の要約。これらの条件は多様な手術後病態と関連した肺移植法を受けた患者で診断された。

【図8】表2、B O S と関連する多様な因子を追跡しているデータの要約。因子はB O S と関連する。

【図9A】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9B】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集め

10

20

30

40

50

られたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9C】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9D】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9E】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9F】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9G】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9H】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9I】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9J】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図9K】血清サンプル中の抗コラーゲンV抗体の異なったレベルを検出するために設計された、抗体ビーズに基づいたアッセイを使用して集められたデータのグラフ例示。右へのピークのシフトは抗コラーゲンV抗体の高いレベルを示す。左のパネルは患者から集められたデータを表し、右のパネルは多様なレベルの抗コラーゲンV抗体が血清に加えられた対照を表す。

【図10】移植2週間後の対照同種移植片レシピエントにおける、ドナー同種抗原、c o l (V)、及び第三者同種抗原に対するD T H 応答の減少。無処置W K Y ラットが対照であった。動物は 10^7 照射 (3 0 0 0 ラド) ドナー由来 F 3 4 4 脾細胞、第三者 (B N)

10

20

30

40

50

脾細胞又は $15\mu\text{g}$ の col(V) を右耳介内に、及び左耳介に等容積の希釈剤を受けた。耳の厚さは、注射直前及び24時間後に盲検様式で、マイクロメーターカリパー(Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, 111.)で測定した。特異的耳膨潤は方法に記載されているように計算した。データは、各群中4匹のラットの $\text{mm} \times 10^{-3}$ での特異的耳介膨潤の平均 \pm SEMで表されている[F344脾細胞又は col(V) を暴露された無処置WKYラットと比較して $* p < 0.0001$ 又は col(V) 又はF344脾細胞を暴露された無処置WKYラットと比較して $^{\dagger} p < 0.0001$]。

【図11】図11A、図11B及び図11C。 1.5×10^5 同種(C57BL/6)BAL細胞単独、 col(II) 、又は col(XI) (各 $50\mu\text{g}$)の週4回の点滴注入後、4週の間週1回、続いて週4回のC57BL/6 BAL細胞の点滴注入したBALB/cマウスの肺組織学。図11Aは、C57BL/6マウスからのBAL細胞の点滴注入を受けたBALB/cマウスの肺における細気管支周囲及び血管周囲単核細胞浸潤を示している。同様の病態病変が col(II) (図11B)又は col(XI) の週1回の点滴注入を受けたBALB/cマウスの肺において観察された。

【図12】正常WKY肺、対照同系移植片肺、対照同種移植片及び col(V) 摂取同種移植片におけるBAL液示差的細胞計数。移植2週間後、移植された肺にBALを行った。示差的細胞計数は光学顕微鏡を利用し、サイトスピン調製液での300細胞/視野を計数することにより決定した。Mac、マクロファージ; Lym、リンパ球; PMN、多形核細胞。データは4正常WKY肺、4対照同系移植片、5対照同種移植片及び5 col(V) 摂取同種移植片の平均 \pm SEMで表されている(正常又は同系移植片と比較して、PMNについて $* p < 0.038$ 及びリンパ球について $^{\dagger} p < 0.000001$ 、対照同種移植片と比較PMNして $^{\#} p < 0.023$ 及びリンパ球と比較して $^{\ddagger} p < 0.0001$)。

【図13】図13A、図13B及び図13C。移植2週間後の移植片レシピエントの連続胸部X線。左肺視野の短い白線(矢頭)は血管吻合使用されたカフを表している。対照同系移植片レシピエントは図13Aに正常胸部X線を示している。対照同種移植片レシピエントのX線は、重篤な浸潤及び完全な不透明化の同種移植片を明らかにし、重度の拒絶を図13Bに示している。 col(V) 摂取同種移植片レシピエントは、図13Cに移植2週間後の軽度の浸潤のみを示している。胸部X線は各群5ラットの代表である。

【図14】図14A、図14B、図14C、図14D、図14E及び図14F。上段パネル: 移植2週間後の(後面像)対照同系移植片肺、図14A、対照同種移植片肺、図14B及び col(V) 摂取同種移植片肺、図14Cの肉眼的解剖学。各パネルにおいて、左(L)肺は移植片肺であり、及び右(R)肺は自然肺である。対照同種移植片肺(パネルbの「L」)は、自然肺と比較し、暗褐色の色であり、萎縮し、及び堅いコンシステンシーであった。しかしながら、 col(V) 摂取同種移植片肺(パネルc中の「L」)は同系移植片肺(パネルa中「L」)の外観を有していた。対照同系移植片肺(図14A)は病態病変を示さず、正常WKY肺と同一であった。写真は各群中の5ラットを代表している。下段パネル: 移植2週間後の対照同系移植片、図14D、対照同種移植片、図14E、及び col(V) 摂取同種移植片、図14F、の組織学である。対照同系移植片は正常な気道及び血管構造を示す(図14D)。対照同種移植片は、重度の拒絶反応と一致する広範な血管周囲、気管支周囲及び肺胞単核細胞浸潤を示す(図14E)。対照的に、 col(V) 摂取同種移植片は軽度から中程度のみ血管周囲、気管支周囲及び肺胞単核細胞浸潤を示す(図14F)。顕微鏡写真は各群中の5匹のラットを代表している(100x倍率)。

【図15】表3。拒絶病態を段階付けしており、表は移植拒絶について対照から動物モデルまでのデータを含む表である。

【図16】 col(V) の経口投与によるドナー同種抗原に対するDTH応答の減少。移植2週間後の対照同種移植片レシピエント及び col(V) 摂取同種移植片レシピエントの右耳介内に 10^7 照射(3000ラド)ドナー由来F344脾細胞を、及び左耳介に等容積の希釈剤を暴露した。耳の厚さは、注射直前及び24時間後に盲検様式で、マイクロ

10

20

30

40

50

メーターカリパー (Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, 111.) で測定し、特異的耳膨潤を計算した。データは、各群中4匹のラットの $\text{mm} \times 10^{-3}$ での特異的耳介膨潤の平均 \pm SEM で表されている (対照同種移植片と比較して * $p < 0.02$)。

【図17】正常WKYラット、対照同種移植片レシピエント及びcol(V)摂取同種移植片レシピエントの血清中のTGF- β レベル。血清中のTGF- β のレベルはELISAにより決定された。データは、各群中4匹のラットの平均 \pm SEM で表されている (対照同種移植片と比較して * $p < 0.05$)。

【図18】TGF- β の中和は、col(V)摂取同種移植片レシピエントにおいてドナー同種抗原に対するDTH応答を回復する。肺移植2週間後、col(V)摂取WKYラットは、 $5 \mu\text{g}$ のポリクローナル抗TGF- β Ab又は $5 \mu\text{g}$ のポリクローナル抗IL-4又はIL-10 Abと混合された 10^7 照射(3000ラド)ドナー由来F344脾細胞のPBS溶液を、右耳介内に受けた。左耳介は等容積の希釈剤プラス脾細胞を受け、対照部位として働いた。陰性対照のため、col(V)摂取同種移植片の別の群が、脾細胞とともに対照免疫グロブリンを右耳介内に、及び希釈剤プラス脾細胞を左耳介内に受けた。耳の厚さは、注射直前及び24時間後に盲検様式で、マイクロメーターカリパーで測定し、以下に記載されるように特異的耳膨潤を計算した。SPI、脾細胞。データは、各群中4匹のラットの $\text{mm} \times 10^{-3}$ での特異的耳介膨潤の平均 \pm SEM で表されている [対照免疫グロブリンと混合した抗原を暴露したcol(V)摂取同種移植片と比較して * $p < 0.03$ 及びT; \dagger $p > 0.05$]。対照同種移植片と比較した、抗TGF- β 、抗IL-4及び抗IL-10によるcol(V)摂取同種移植片におけるdTH応答の回復は、それぞれ75.7%、24.3%及び39.9%であった。

【図19】移植10週間後の、対照同種移植片レシピエントにおける、ドナー同種抗原、col(II)、col(V)、col(XI)及び第三者同種抗原に対するDTH応答。動物は、 10^7 照射(3000ラド)ドナー由来F344脾細胞、第三者(BN)脾細胞又は $15 \mu\text{g}$ のcol(II)、col(V)又はcol(XI)を右耳介内に、希釈剤を左耳介に受けた。耳の厚さは、注射直前及び24時間後に盲検様式で、マイクロメーターカリパーで測定し、以下に記載されるように特異的耳膨潤を計算した。SPI、脾細胞。データは、各群中3匹のラットの $\text{mm} \times 10^{-3}$ での特異的耳介膨潤の平均 \pm SEM で表されている [F344脾細胞又はcol(V)を暴露した無処置WKYラットと比較して * $p < 0.05$]。

【図20】混合白血球反応。種々の比のマイトマイシン-C-処理F344脾細胞(刺激物質)と、col(V)を摂取させたWKYラット(正常)又はWKYラットからの 3×10^5 リンパ節リンパ球(応答物質)をインキュベートした。5日間のインキュベーションが完了する18時間前、細胞を ^3H でパルスラベルし、増殖をチミジン取り込みの計数/分(cpm)により決定した。刺激指数は、リンパ節リンパ球単独での増殖と比較した、種々の量の刺激物質により誘発されるリンパ節リンパ球の増殖の倍数に等しい。データは3回の実験を代表している。

【図21】図21A、図21B、図21C及び図21D。上段パネル：移植10週後の、対照同種移植片肺、図21A、及びcol(V)摂取同種移植片肺、図21B、の肉眼的解剖学。各パネル中、左(L)肺は移植片肺であり、及び右(R)は自然肺である。対照同種移植片肺は、自然肺と比較し、暗褐色の色であり、萎縮し、及び堅いコンシステンシーであった。しかしながら、col(V)摂取同種移植片肺はわずかに変色しているがほとんど正常外観を有していた。下段パネル：移植10週後の対照同種移植、図21C及びcol(V)摂取同種移植、図21D、の組織学。対照同種移植片は広範囲の間質単核細胞浸潤、線維症及びBOの病理学的病変である肉芽組織による小気道の閉塞を発生した。対照的に、col(V)摂取同種移植片は軽度急性拒絶の病態を記述する(グレードA2)間質性炎症がなく、軽度の肺胞性浸潤を有するのみであった。顕微鏡写真は各群中の5匹のラットを代表している。

【図22】移植10週後の、正常WKYラット、対照同種移植片レシピエント及びcol(V)摂取同種移植片レシピエントの血清中のTGF- β レベル。血清中のTGF- β の

10

20

30

40

50

レベルはELISAにより決定された。データは各群中の3匹のラットの平均±SEMを表している(対照同種移植片と比較して* p < 0.05)。

【図23】DTH応答におけるTGF-の中和。col(V)摂取WKYラットは、5μgのポリクローナルニワトリ抗TGF-Abと混合された10⁷照射(3000ラド)ドナー由来F344脾細胞を右耳介内に、希釈剤を左耳介に受けた。陰性対照として、col(V)摂取同種移植片の別の群が、5μgの対照ニワトリ免疫グロブリン又は対照ヤギ免疫グロブリンと混合された10⁷照射(3000ラド)ドナー由来F344脾細胞を右耳介内に、及び希釈剤を左耳介内に受けた。特異的耳膨潤は上記のように決定した。

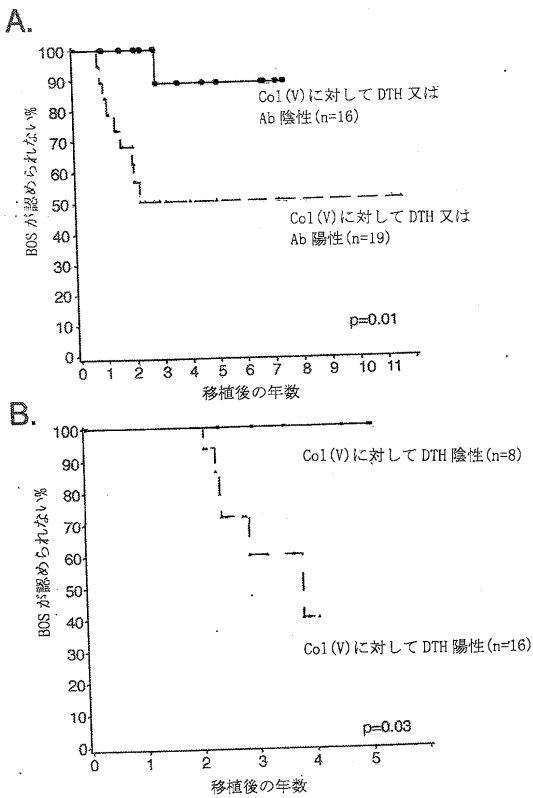
【図24】無処置及びcol(V)摂取WKYラットにおけるBSAに対するDTH応答。無処置及びcol(V)摂取WKYラットを、アジュバントに溶解した100μgのBSAのs.c.注射で刺激し、7日後、右耳介内へ2%熱凝集BSA溶液及び左耳介内へ希釈剤を暴露した。耳の厚さは、注射直前及び24時間後に盲検様式で、マイクロメーターカリパーで測定し、上記のように特異的耳膨潤を計算した。非刺激WKYラットが対照として働いた。データは、各群中4匹のラットのmm×10⁻³での特異的耳介膨潤の平均±SEMで表されている(非刺激無処置WKYラットと比較して* p < 0.018、及び刺激WKYラットと比較して† p ? 0.05)。

【図25】表4は実施例6で使用された実験群の一覧表である。

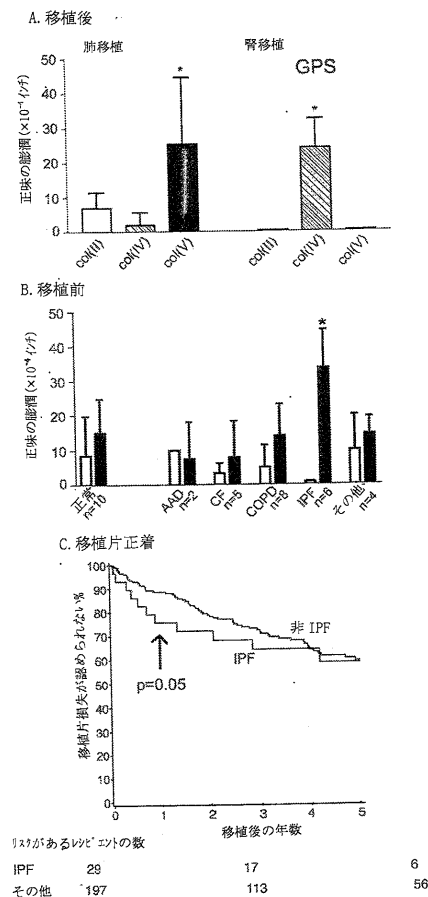
【図26】表5は実施例8に報告されている実験の結果の要旨である。

10

【図2】



【図3】



【 図 4 】

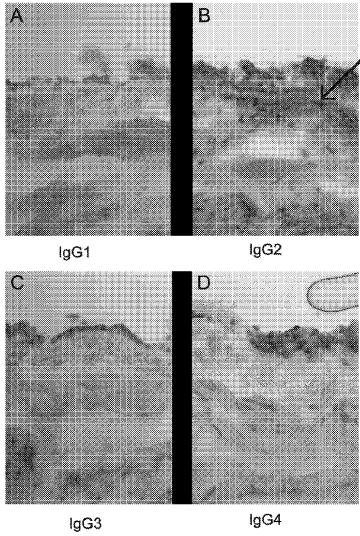
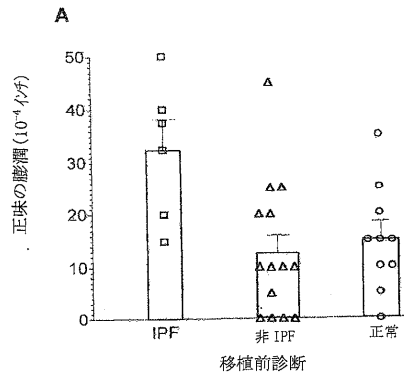


Fig. 4

【 図 5 】



【 図 6 】

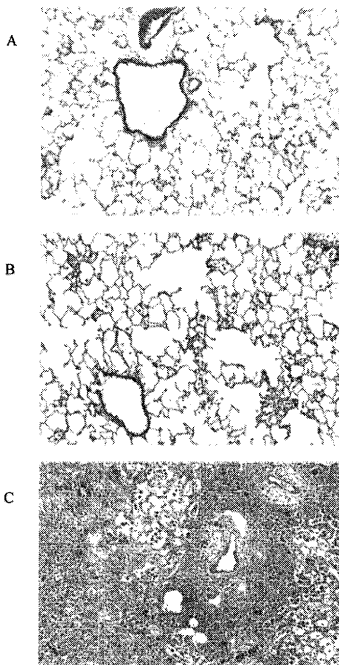


Fig. 6

【 図 7 】

	研究群	
	総数 n=226	Col(v)下位集団 n=56
両側肺移植*	93 (41%)	30 (54%)
移植前診断*		
AAD	36 (16%)	10 (18%)
CF	50 (22%)	18 (32%)
COPD	84 (37%)	14 (25%)
IPF	29 (13%)	8 (14%)
その他 ^b	27 (12%)	6 (11%)
BOSを有する患者*	86 (38%)	18 (32%)
BOSまでの平均時間 ^b	2.5 ± 1.9	2.2 ± 1.7
平均経過観察 ^c	3.7 ± 2.7	3.8 ± 2.4

表 1.患者層

*患者数(合計の%)

^bその他のカテゴリーには心房中隔欠損症、気管支拡張症、リンパ脈管筋腫症、特発性閉塞性細気管支炎、閉塞性細気管支炎、肺線維症、原発性肺高血圧及びサルコイドーシスを有する患者が含まれる。

^c年±標準偏差

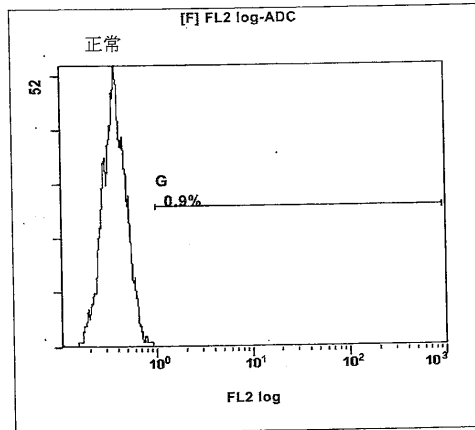
【 図 8 】

表2 BOSに関連する因子

Col (V) 研究群の分析	リスク比	信頼区間	p
col (V) に対する DTH か又は Ab ^a	∞^b	NA ^b	NA ^b
col (V) に対する DTH $\geq 25^\circ$	12.3	1.6-97.	0.02
col (V) に対する Ab $\geq 1^\circ$	2.08	1.1-4.0	0.02
拒絶病状発生数	1.58	1.1-2.3	0.02
全患者の分析			
拒絶病状発生数	1.40	1.2-1.7	< 0.001
原因となる疾患 ^c =CF	0.35	0.2-0.7	0.002
原因となる疾患 ^c =COPD	1.70	1.1-2.7	0.01
原因となる疾患 ^c =その他	1.90	1.1-3.4	0.02
両側移植	0.59	0.4-0.9	0.02
HLA 不適合 DR	1.62	1.0-2.6	0.03

^a患者が col (V) に対する陽性 DTH 又は Ab 応答を有したことがあるかどうかを示している時間依存性共変量。
^bcol (V) への応答を有していない BOS の患者はいないので、リスク比の最良の推定値は無限大であり、信頼区間はなく、及び p 値は定義されない。
^c陽性 (正味の膨潤 ≥ 2.5) DTH 応答を示している時間依存性共変量。
^dcol (V) に対する陽性 Ab 応答を示している時間依存性共変量。
^e各疾患カテゴリーにおける患者生存率を他のすべての疾患を有する患者の生存率と比較した。

【 図 9 A 】



【 図 9 B 】

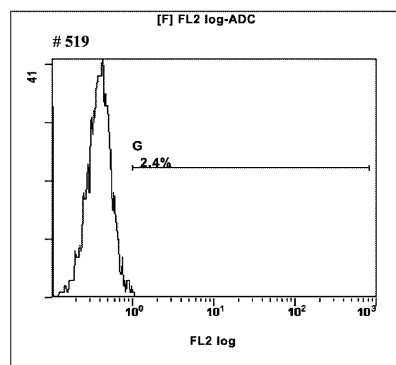


Fig. 9B

【 図 9 C 】

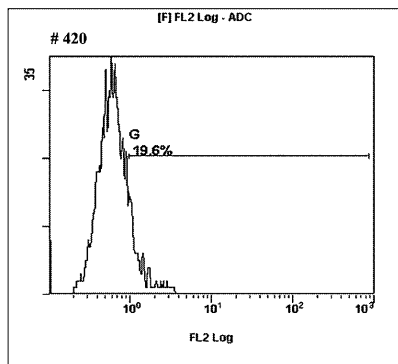


Fig. 9C

【 図 9 E 】

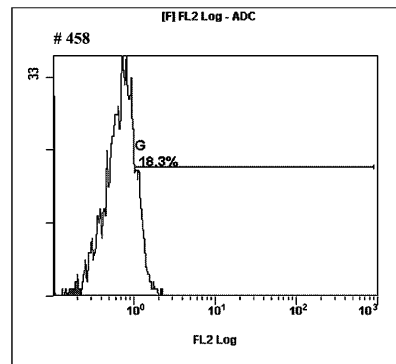


Fig. 9E

【 図 9 D 】

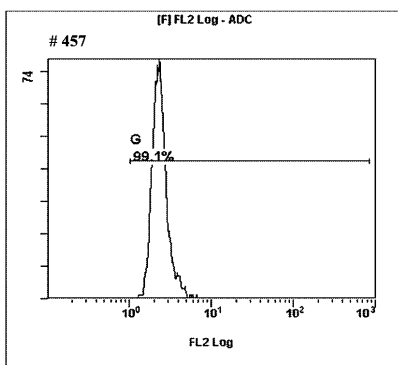


Fig. 9D

【 図 9 F 】

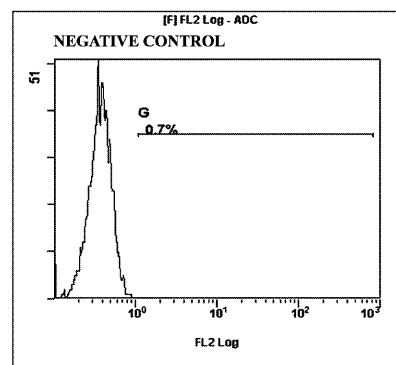


Fig. 9F

【 9 G 】

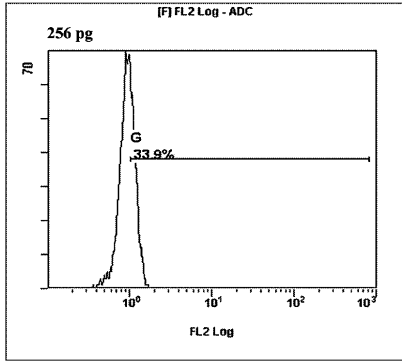


Fig. 9G

【 9 I 】

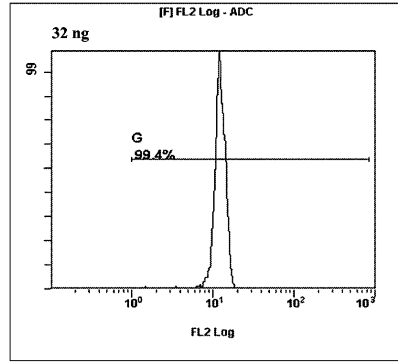


Fig. 9I

【 9 H 】

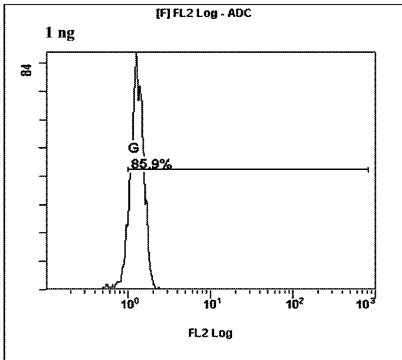


Fig. 9H

【 9 J 】

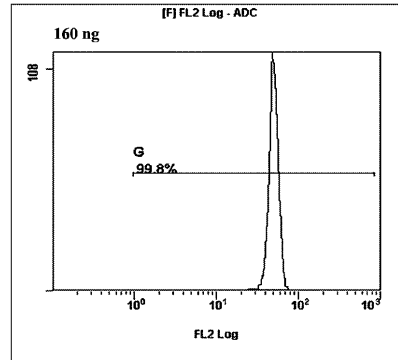


Fig. 9J

【 9 K 】

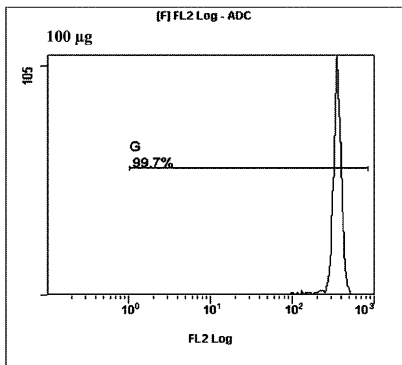
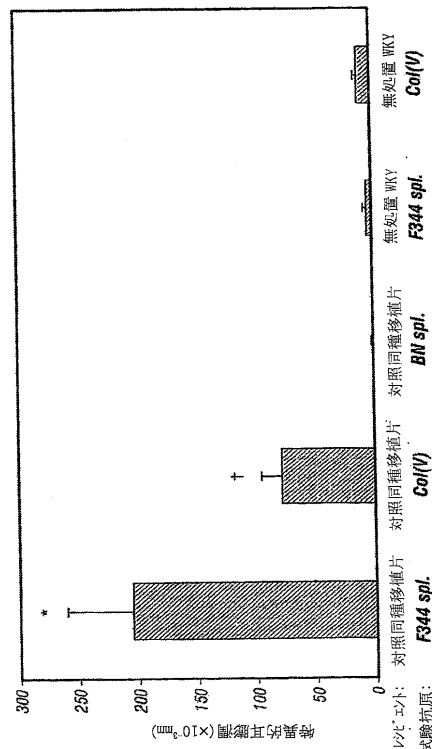


Fig. 9K

【 1 0 】



【 图 1 1 A 】

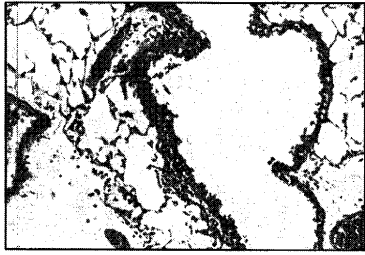


Fig. 11A

【 图 1 1 B 】

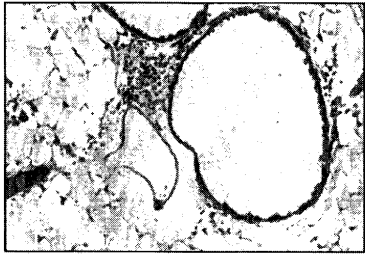
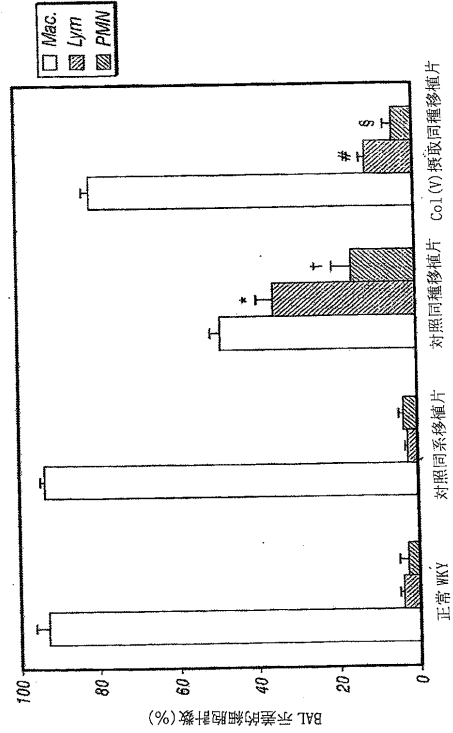


Fig. 11B

【 图 1 2 】



【 图 1 3 A 】

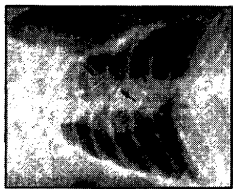


Fig. 13A

【 图 1 3 B 】



Fig. 13B

【 图 1 3 C 】



Fig. 13C

【 图 1 4 A 】

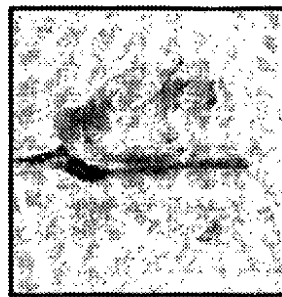


Fig. 14A

【 图 1 4 B 】

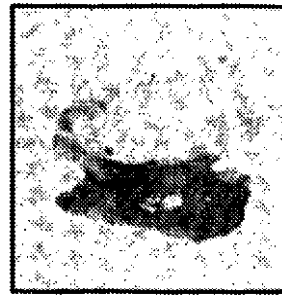


Fig. 14B

【 図 1 4 C 】

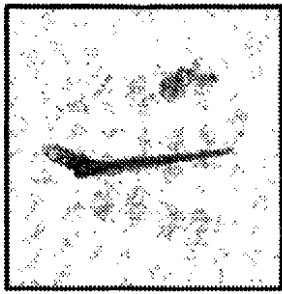


Fig. 14C

【 図 1 4 E 】

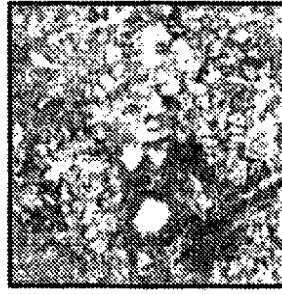


Fig. 14E

【 図 1 4 D 】

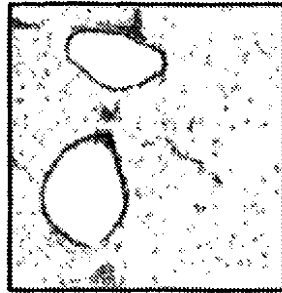


Fig. 14D

【 図 1 4 F 】

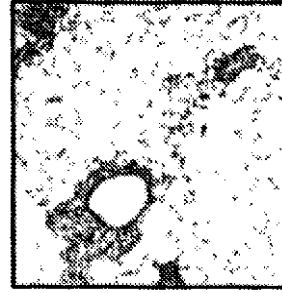


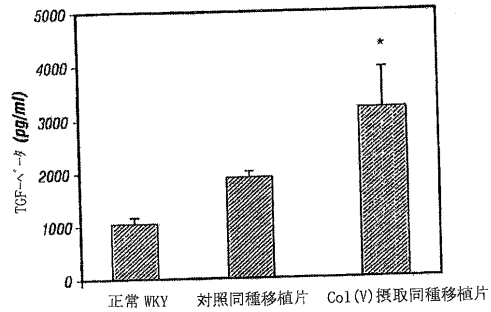
Fig. 14F

【 図 1 5 】

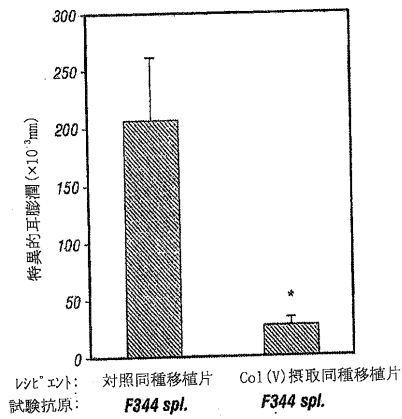
表 3
拒絶病態の段階付け

群	A (急性拒絶)	B (気道炎症)
対照 WKY 同系移植片	0 ± 0	0 ± 0
対照 WKY 同種移植片	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0
Col (II) 摂取 WKY 同種移植片	3.9 ± 0.3	4.0 ± 0
Col (XI) 摂取 WKY 同種移植片	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0
Col (V) 摂取 WKY 同種移植片	2.8 ± 0.2*	2.6 ± 0.2 ¹

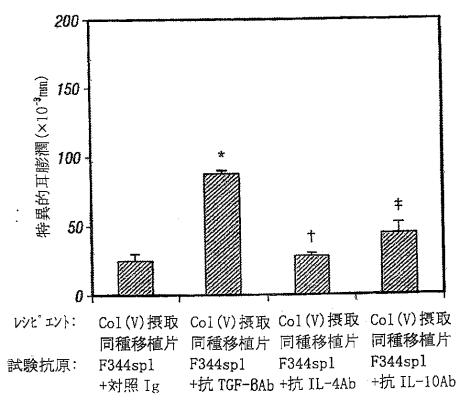
【 図 1 7 】



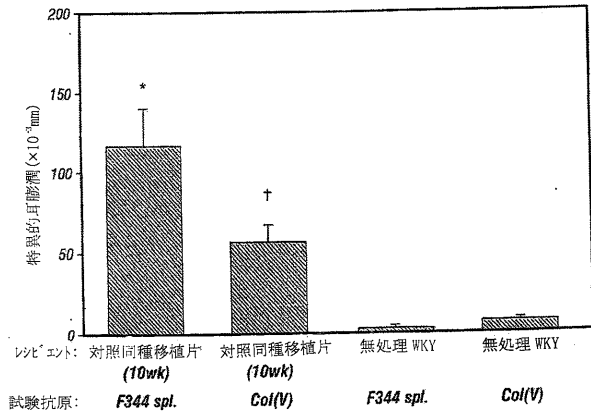
【 図 1 6 】



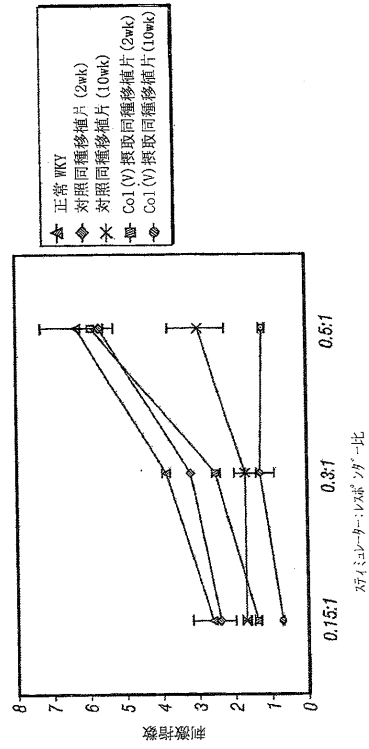
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 A 】



Fig. 21A

【 図 2 1 B 】



Fig. 21B

【 図 2 1 C 】



Fig. 21C

【 図 2 1 D 】

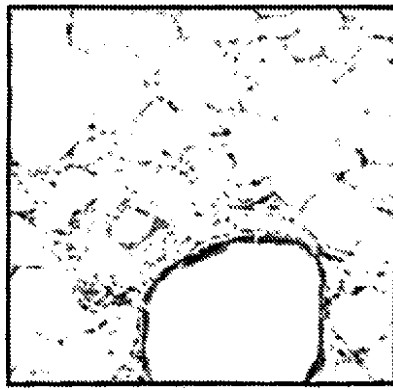
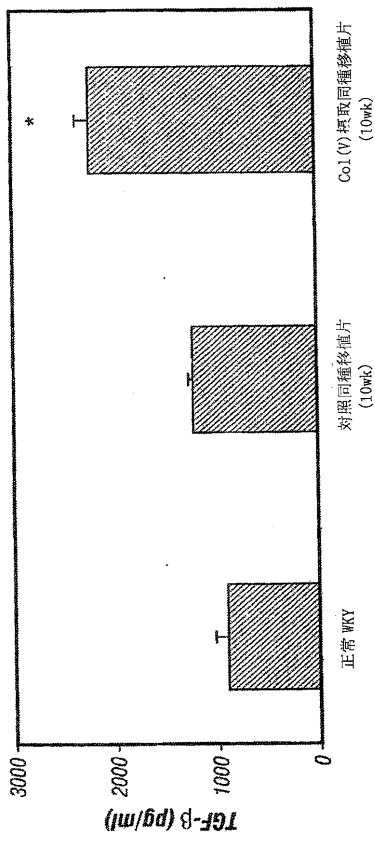
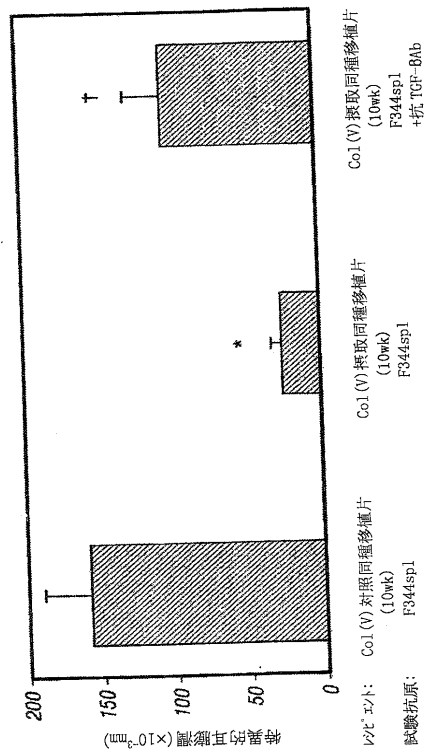


Fig. 21D

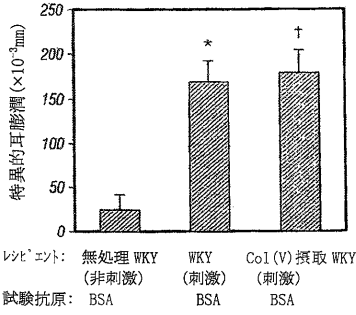
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

表 4

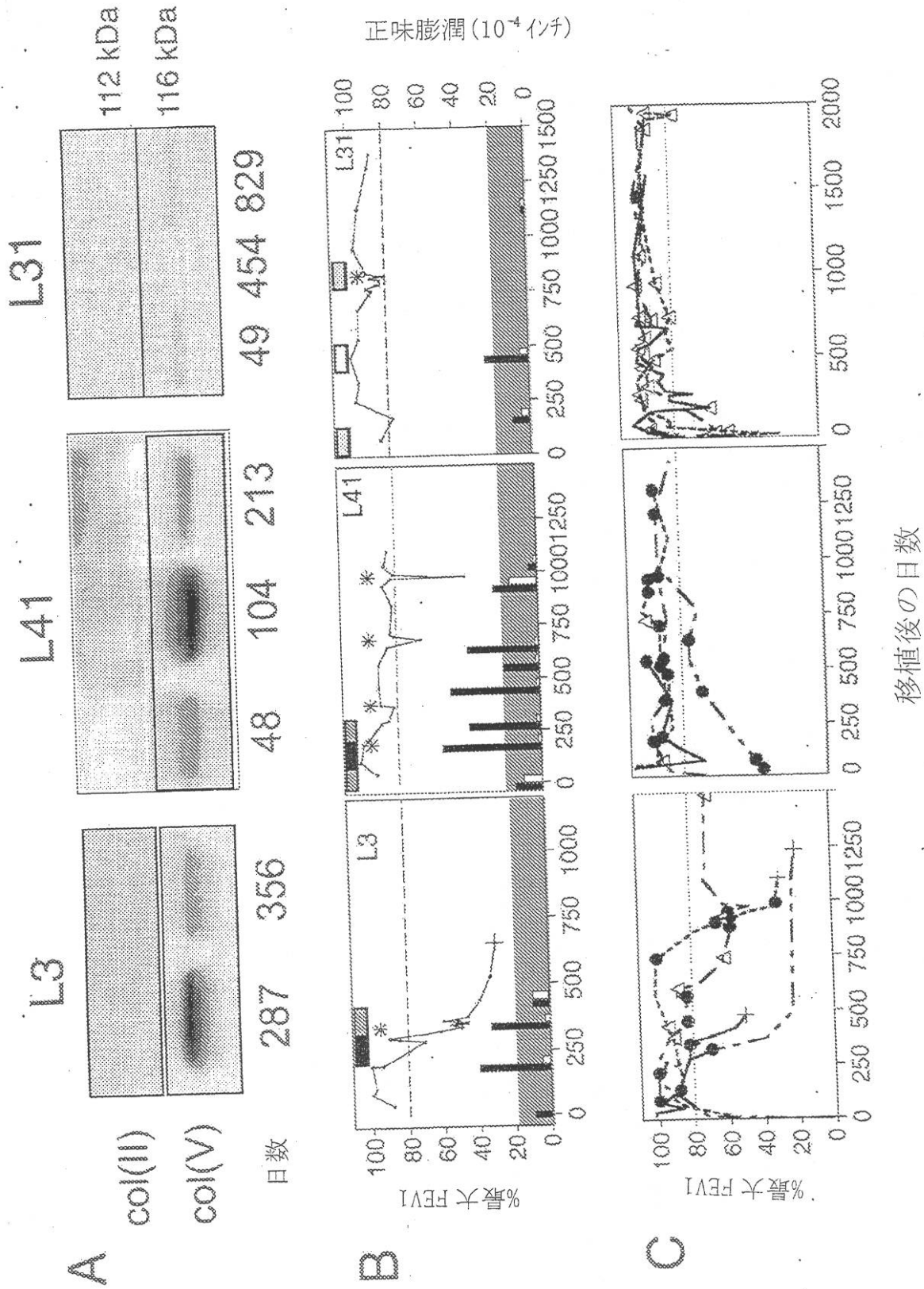
実験群:		
Col (V) 摂取同種移植片 (各用量及び同種移植片-サブグループについて n=20)	対照 (n=20)	同系移植片 (N=20)
ドナー: F344 ラット肺 (RT1 ¹¹⁴) レシビエント: WKY (RT1 ¹) ラット Col (V) 10 μ g, 20 μ g 又は 50 μ g を摂取 4 又は 8 日の間 1 日おき	ドナー: F344 ラット肺 (RT1 ¹¹⁴) レシビエント: WKY (RT1 ¹) ラット-無摂取	ドナー: WKY (RT1 ¹) ラット肺 レシビエント: WKY (RT1 ¹) ラット

【 図 2 6 】

表 5

Col (V) の α 鎖の臭化シアン消化物中に存在するペプチドが急性拒絶の発生を防止するかどうかの決定			
実験群			
同種移植片対照 (n=10)	無傷の Col (V) 摂取 (n=20)	1 (V) 摂取 (n=20)	2 (V)- 摂取 9N=20
ドナー: F344 ラット肺 (RT1 ¹¹⁴) レシビエント: WKY (RT1 ¹) ラット-無摂取	ドナー: F344 ラット肺 (RT1 ¹¹⁴) レシビエント: WKY (RT1 ¹) ラット-無傷の Col (V) を摂取	ドナー: F344 ラット肺 (RT1 ¹¹⁴) レシビエント: WKY (RT1 ¹) ラット-1 (V) ペプチドを摂取	ドナー: F344 ラット肺 (RT1 ¹¹⁴) レシビエント: WKY (RT1 ¹) ラット-2 (V) ペプチドを摂取

【図1】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/60533
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8): 435/7.1, 7.21;436/501, 518 USPC: G01N 33/00,33/566,33/567 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) U.S. : G01N 33/00, 33/566, 33/567 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Palm Inventor Name Search Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	Fernandez-Madrid et al. Autoimmunity to collagen in Human Lung Cancer, 01 January 1996 (01.01.1996), pages 121-126, see entire document.	1-3 and 5-6 4 and 19-27
Y	US 4,444,879 (Foster et al.) 24 April 1984 (24.04.1984), especially figure 6 and column 15.	24-27
Y	WILKES, David S. Autoimmune Responses to Grafted Lungs: Immune Responses to a Native Collagen-Type V Collagen., Vol 6, No.1, 2003, pages 42-49, Abstract Only, see entire abstract.	4 and 19-23
X	YASUFUKU et al. Prevention of Bronchiolitis Obliterans in Rat Lung Allografts by Type V Collagen-induced Oral Tolerance, 27 February 2002 (27.02.2002), Vol 73, No.4, pages 500-505, see entire document.	7-12 and 14-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 16 August 2007 (16.08.2007)		Date of mailing of the international search report 27 SEP 2007
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 Lisa V. Cook <i>Lisa V. Cook</i> Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/60533

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUMPETER et al. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology, Vol.286, pages L1129-1139, 2004.	7-18
A	TEODORO et al. Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. Pathology Research and Practice, Vol 200, 2004, pages 681-691, see entire document.	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/60533

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
East and West patent database
STN-biosis, caplus, embase, medline, japio

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 ウィルクス, ディヴィッド・エス

アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 2 7 8, インディアナポリス, ミル・ポンド・レーン 8 0 2
3

(72) 発明者 クレムツ, マイケル・ジェイ

アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 2 7 8, インディアナポリス, バージソン・コート 6 5 2 4

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA17 BA44 DA11 MA16 MA52 MA66 NA14 ZA592
ZB082

4C085 AA13 BB31 CC22 EE01 GG01 GG08

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009524023A5	公开(公告)日	2011-03-10
申请号	JP2008550549	申请日	2007-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	印第安纳UNIV RES TECH		
申请(专利权)人(译)	美国印第安纳大学的研究和技术公司		
[标]发明人	ウイルクスデイヴィッドエス クレムツマイケルジェイ		
发明人	ウイルクス,デイヴィッド・エス クレムツ,マイケル・ジェイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564 A61K45/00 A61P11/00 A61P37/06 A61K39/395 A61K38/00		
CPC分类号	A61P11/00 A61P37/06 G01N33/564 G01N33/6887 G01N2800/12		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/564.Z A61K45/00 A61P11/00 A61P37/06 A61K39/395.D A61K37/02		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DA11 4C084/MA16 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZB082 4C085/AA13 4C085/BB31 4C085/CC22 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/759195 2006-01-13 US		
其他公开文献	JP2009524023A JP5030973B2		

摘要(译)

各种实施方案包括用于诊断和治疗医学病症的方法，所述疾病涉及对结缔组织例如在器官例如肺中发现的胶原的自身免疫反应。在一种方法中，通过分析从患者获得的体液或组织样品中是否存在对各种类型的胶原蛋白（例如，V型）的自身免疫反应的证据，来诊断肺部疾病和疾病，例如特发性肺纤维化（IPF）。为证明对V型胶原蛋白有自身免疫反应的证据，包括以下步骤：从患者那里获得体液或组织样品，使样品的至少一部分与抗V型胶原蛋白的抗原接触，并监测样品和抗原的混合物指示样品中存在抗V型胶原蛋白的变化。另一个实施方案包括通过施用治疗有效剂量的各种胶原蛋白（包括V型胶原蛋白）的表位来治疗诸如IPF的肺部疾病。