

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-27653

(P2005-27653A)

(43) 公開日 平成17年2月3日(2005. 2. 3)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|-----------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 | 2 G O 4 5 |
| A 6 1 K 31/7088 | A 6 1 K 31/7088 | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 K 35/12 | A 6 1 K 35/12 | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 39/00 | 4 B O 6 5 |
| A 6 1 K 39/00 | A 6 1 K 45/00 | 4 C O 8 4 |

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 54 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2003-406232 (P2003-406232) | (71) 出願人 | 503403928 |
| (22) 出願日 | 平成15年12月4日 (2003. 12. 4) | | オチョア, アウグスト・シー |
| (62) 分割の表示 | 特願平5-517612の分割 | | アメリカ合衆国、2 1 7 0 2 メリーランド、フレデリック、アレクサンドラ・コート 1 0 2、アパートメント 1 8 0 |
| 原出願日 | 平成5年4月6日 (1993. 4. 6) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 07/863, 262 | (71) 出願人 | 503445401 |
| (32) 優先日 | 平成4年4月6日 (1992. 4. 6) | | ミゾグチ, ヒロモト |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国、2 1 7 0 2 メリーランド、フレデリック、ウィロウデイル・ドライヴ 1 4 9、アパートメント 4 4 |
| (31) 優先権主張番号 | 07/987, 966 | (71) 出願人 | 503403939 |
| (32) 優先日 | 平成4年12月11日 (1992. 12. 11) | | オシェア, ジョン・ジェイ |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国、メリーランド、シルヴァー・スプリング、ダブリン・ドライヴ 1 7 2 1 |
| (31) 優先権主張番号 | 08/031, 434 | | |
| (32) 優先日 | 平成5年3月15日 (1993. 3. 15) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 08/034, 832 | | |
| (32) 優先日 | 平成5年3月17日 (1993. 3. 17) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 進行性免疫抑制症患者の評価と治療

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】腫瘍を持つ哺乳動物から得る血清には溶解性の免疫抑制因子が存在していて、TCRサブユニットタンパク質のレベルや、Tリンパ球シグナル変換経路が変化することに関係している。この変化を利用して、少なくとも一種の選択されたTCRサブユニットタンパク質またはTリンパ球変換経路のタンパク質のレベル、あるいはNF-kB / rel系のパターンを測定して、免疫抑制がない生体のレベルおよびパターンと比較することによる免疫抑制の重篤度判定法が生まれている。

【効果】この方法は、免疫療法が施術できる程度まで患者のTリンパ球が活性化できることを確認したり、免疫抑制を起こす薬剤またはこれを逆転する薬剤を決定するのに有用である。免疫抑制因子を単離してタンパク質の発現レベルと組み合わせると、例えば臓器移植の場合に免疫反応を抑制するのに有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の性質を有する溶解性免疫抑制因子。

a) 哺乳動物の生物標本におけるTCRサブユニットタンパク質のレベルを、免疫抑制されていない哺乳動物の同様の生物標本のサブセットのレベルと比較して、低下させることができる。

b) 哺乳動物の生物標本におけるTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質のレベルを、免疫抑制されていない哺乳動物の同様の生物標本のタンパク質のレベルと比較して、低下させることができる。

c) 免疫抑制された哺乳動物から得られる血清中に存在する。

10

【請求項 2】

腫瘍細胞培養物の上澄み液中に存在するものとしてさらに定義される請求項 1 に記載の因子。

【請求項 3】

上記腫瘍細胞培養物がリンパ種のMCA-38またはMBL-2である請求項 2 に記載の因子。

【請求項 4】

上記免疫抑制哺乳動物が約26日以上存在しているMCA-38系の腫瘍を有する請求項 3 に記載の因子。

【請求項 5】

上記TCRサブセットタンパク質が、CD3 である請求項 1 に記載の因子。

20

【請求項 6】

上記TCRサブセットタンパク質が、CD3 である請求項 1 に記載の因子。

【請求項 7】

上記Tリンパ球シグナル変換経路タンパク質が、Src系のチロシンキナーゼである請求項 1 に記載の因子。

【請求項 8】

上記Src系のチロシンキナーゼが、Fynまたはlckである請求項 7 に記載の因子。

【請求項 9】

シグナル変換経路タンパク質が、PLC またはGAPである請求項 1 に記載の因子。

【請求項 10】

30

哺乳動物の細胞サンプルの免疫抑制のレベルを測定する方法であって、

a) TCRサブセットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現のレベルを測定するステップと、

b) 前記タンパク質の発現レベルと同一種の哺乳動物の免疫抑制されていない個体を特徴づける前記タンパク質の発現レベルとを比較するステップと、
を含む方法。

【請求項 11】

上記サンプルがリンパ球調製物である請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

発現のレベルの測定結果が、タンパク質を発現するTリンパ球の数を測定対象となったTリンパ球の総数で割った発現率である請求項10に記載の方法。

40

【請求項 13】

上記リンパ球調製物が、脾臓組織、末梢血液、腫瘍組織、リンパ節組織、脳脊髄液、胸膜滲出液、および腹水を含む組織から調製されるものである請求項11に記載の方法。

【請求項 14】

上記TCRサブユニットタンパク質が、CD3 を含む請求項10に記載の方法。

【請求項 15】

上記シグナル変換経路タンパク質が、src系のチロシンキナーゼを含む請求項10に記載の方法。

【請求項 16】

50

上記チロシンキナーゼが、Fynまたは1ckである請求項15に記載の方法。

【請求項17】

上記シグナル変換経路タンパク質が、PLC またはGAPである請求項10に記載の方法。

【請求項18】

免疫療法に適する程度に活性化できるTリンパ球を持った患者の確認方法であって、

a) TCRサブセットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現のレベルを測定するステップと、

b) 上記タンパク質の発現レベルと免疫抑制されていないヒトに特有の上記タンパク質の発現レベルとを比較するステップと、

c) 免疫抑制されていないヒトの治療に有効なしきい値以上の上記タンパク質の発現レベルを有する患者を選択するステップと、
を含む方法。 10

【請求項19】

上記発現レベルの測定結果が、タンパク質を発現するTリンパ球の数を測定対象となったTリンパ球の総数で割った発現率である請求項18に記載の方法。

【請求項20】

上記発現レベルが、リンパ球調製物から単離した総タンパク質のマイクログラム当りの上記タンパク質の量として定義される請求項18に記載の方法。

【請求項21】

上記リンパ球が、脾臓組織、末梢血液、腫瘍組織、リンパ節組織、脳脊髄液、胸膜滲出液、および腹水を含む組織から得られるものである請求項18に記載の方法。 20

【請求項22】

上記TCRサブユニットタンパク質が、CD3 タンパク質を含む請求項18に記載の方法。

【請求項23】

上記シグナル変換経路タンパク質が、src系のチロシンキナーゼである請求項18に記載の方法。

【請求項24】

上記チロシンキナーゼが、Fynまたは1ckである請求項23に記載の方法。

【請求項25】

上記シグナル変換経路タンパク質が、PLC またはGAPである請求項18に記載の方法。 30

【請求項26】

刺激したTリンパ球により治療する、免疫療法に反応する疾患を有する患者の治療方法であって、患者を請求項18に記載の方法により選択することを特徴とする治療方法。

【請求項27】

上記疾患が癌である請求項26に記載の方法。

【請求項28】

上記癌が黒色腫である請求項27に記載の方法。

【請求項29】

哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を起こす薬剤の決定方法であって、

a) TCRサブユニットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現レベルが同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体の特徴となっているレベルと同等である哺乳動物Tリンパ球調製物を得るステップと、 40

b) 上記リンパ球調製物を、免疫抑制すると考えられる薬剤の存在下で培養するステップと、

c) 上記タンパク質の発現のレベルを測定するステップと、

d) 上記薬剤の存在下で培養しなかったTリンパ球調製物中の上記タンパク質の発現のレベルよりも顕著に低いレベルへの低下を引き起こす薬剤を決定するステップと、
を含む方法。

【請求項30】

哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を逆転する薬剤の決定方法であって、 50

a) TCRサブユニットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現レベルが、同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体のレベルよりも低い免疫抑制された哺乳動物から、Tリンパ球調製物を得るステップと、

b) 上記リンパ球調製物を免疫抑制を逆転すると考えられる薬剤の存在下で培養するステップと、

c) 上記タンパク質の発現のレベルを測定するステップと、

d) 上記タンパク質の発現レベルを顕著に上昇させる薬剤を決定するステップと、を含む方法。

【請求項 3 1】

上記薬剤が *in vivo* で存在する請求項30に記載の方法。

10

【請求項 3 2】

溶解性免疫抑制因子を阻害する薬剤のスクリーニング方法であって、

a) 請求項 1 に記載の因子を含む系に薬剤を加えることと、

b) 上記系の免疫抑制を、

i) TCRサブユニットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現レベルを測定し、

ii) タンパク質発現の上記レベルと、同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体の特徴である上記タンパク質の発現と比較することと、

c) 上記系が免疫抑制の逆転を示すかを判定することと、

を含む方法。

20

【請求項 3 3】

免疫抑制の治療方法であって、請求項30に記載の決定済み薬剤を製薬的に許容できる希釈剤に配合したものの治療有効量を投与することよりなる方法。

【請求項 3 4】

上記哺乳動物がヒトである請求項33に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 に記載の免疫抑制因子またはそのエピトープ部分に対する抗体。

【請求項 3 6】

請求項 1 に記載の因子を阻害する薬剤。

【請求項 3 7】

抗CD3とIL-2を含む請求項36に記載の薬剤。

30

【請求項 3 8】

請求項 1 に記載の因子の発現に対するアンチセンス構成物。

【請求項 3 9】

請求項 1 に記載の因子をコード化する遺伝子。

【請求項 4 0】

請求項 1 に記載の因子からなるワクチン。

【請求項 4 1】

免疫抑制モニター用キットであって、TCRサブユニットタンパク質またはシグナル変換経路のタンパク質に対する抗体と、抗体-抗原複合体の形成検出手段とを、各々別個の容器に収容してなるキット。

40

【請求項 4 2】

請求項 1 に記載の溶解性因子で処理した哺乳動物の細胞。

【請求項 4 3】

製薬的に許容し得る担体に担持させて請求項 1 に記載の因子を有効量を哺乳動物に投与して、自己免疫を誘発するためまたは臓器移植を容易にするために必要な免疫抑制を引き起こす哺乳動物の治療方法。

【請求項 4 4】

請求項32に記載の方法により製造した薬剤に製薬的に許容し得る希釈剤を配合し、治療有効量を投与することを含む免疫抑制された哺乳動物の治療法。

50

【請求項 4 5】

哺乳動物の免疫抑制のレベルを測定する方法であって、 a) 哺乳動物の細胞サンプルから核抽出物を作り、NF-kB / rel系の転写因子のレベルを測定するステップと、 b) 上記パターンを、同一種の哺乳動物の免疫抑制されていない個体から採取した同様の細胞サンプルを特徴づけるパターンと比較し、免疫抑制されていない個体のパターンと顕著な差異があれば、これを哺乳動物の顕著な程度の免疫抑制を示すものとするステップと、を含む方法。

【請求項 4 6】

哺乳動物の細胞サンプルがリンパ球調製物である請求項45に記載の方法。

【請求項 4 7】

c-rel , p65 , p50 , p48 , およびp44の存在または不存在によりパターンを測定する請求項45に記載の方法。

10

【請求項 4 8】

上記リンパ球調製物が、脾臓組織、末梢血液、腫瘍組織、リンパ節組織、脳脊髄液、胸膜滲出液、および腹水を含む組織から調製されるものである請求項46に記載の方法。

【請求項 4 9】

免疫療法に適する程度まで活性化できるTリンパ球を持つ患者の決定方法であって、

a) 患者のTリンパ球から得た核抽出物中のNF- B / rel系の転写因子のパターンを測定するステップと、

b) 上記パターンを、免疫抑制されていない個体を特徴づけるパターンと比較するステップと、

c) 免疫抑制されていないヒトの治療に有効なしきい値以上の上記タンパク質の発現レベルを有する患者を選択するステップと、
を含む方法。

20

【請求項 5 0】

上記リンパ球が、脾臓組織、末梢血液、腫瘍組織、リンパ節組織、脳脊髄液、胸膜滲出液、および腹水を含む組織から誘導されるものである請求項49に記載の方法。

【請求項 5 1】

刺激したTリンパ球により治療する、免疫療法に反応する疾患を持つ患者の治療方法であって、請求項49に記載の方法により患者を選択する方法。

30

【請求項 5 2】

上記疾患が癌である請求項51に記載の方法。

【請求項 5 3】

53. 上記癌が黒色腫である請求項52に記載の方法。

【請求項 5 4】

哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を起こす薬剤の決定方法であって、

a) 標本から作った核抽出物のNF- B / relのパターンが同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体の特徴を備えている哺乳動物Tリンパ球調製物を得るステップと、

b) 上記リンパ球調製物を免疫抑制すると考えられる薬剤の存在下で培養するステップと、

c) 培養した標本から得た核抽出物中のNF- B / rel系の転写因子のパターンを測定するステップと、

d) 薬剤の存在下で培養しなかった標本中のパターンと比較して、パターンに顕著な変化を起こす薬剤を決定するステップと、
を含む方法。

40

【請求項 5 5】

哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を逆転する薬剤の決定方法であって、

a) 標本から作った核抽出物のNF- B / rel系の転写因子のパターンが、同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体の同様の標本を特徴づけるパターンとは顕著に異なる免疫抑制がない哺乳動物のTリンパ球調製物を用意するステップと、

50

b) 上記リンパ球調製物を免疫抑制を逆転すると考えられる薬剤の存在下で培養するステップと、

c) 培養物から核抽出物を作りNF- B / relの転写因子のパターンを測定するステップと、

d) パターンを顕著に変化させて、同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体の同様の標本を特徴づけるパターンとはあまり大きな差異がないようにする薬剤を決定するステップと、

を含む方法。

【請求項56】

上記薬剤がin vivoに存在する請求項55に記載の方法。

10

【請求項57】

製薬的に許容し得る希釈剤中の請求項55に記載の薬剤の治療有効量を投与することよりなる免疫抑制された哺乳動物の治療方法。

【請求項58】

上記哺乳動物がヒトである請求項57に記載の方法。

【請求項59】

免疫抑制モニター用キットにおいて、NF- B / rel系転写因子に対する抗体と、抗体-抗原複合体の形成検出手段とをそれぞれの容器に収容してなるキット。

【請求項60】

免疫抑制または腫瘍を持つ哺乳動物の生体内においてNF- B転写因子系のp50の分解により形成される実質的に純粋なポリペプチド。

20

【請求項61】

p44とp48とからなる群より選ばれる請求項60に記載のポリペプチド。

【請求項62】

免疫抑制を持つ哺乳動物から採取するTリンパ球の核抽出物中のp50には存在するが、p50に置き変わるタンパク質には存在しないアミノ酸配列に対する抗体。

【請求項63】

上記抗体が請求項62による抗体である請求項60に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本願は、1992年4月6日付け米国特許出願第07/863,262号、および、1992年12月11日付け米国特許出願第07/987,966号の一部継続出願である。

【背景技術】

【0002】

本発明は、腫瘍を持つ哺乳動物の細胞が産生する可溶性免疫抑制因子と、この因子をコード化する遺伝子とに関する。この因子の作用を阻止または逆転させる薬剤のスクリーニング方法が特定される。また、本発明を利用して、免疫抑制剤や対抗剤を認識することができる。この因子は、免疫抑制を誘発するのに用いることができる。さらに、本発明は進行性免疫抑制症を併発する疾患患者の評価、選別および治療に関する。免疫療法に反応する疾患の患者、特に癌患者について、免疫抑制に冒されたタンパク質類の発現度を基準にして、病期判定と評価がなされる。病期判定と評価の結果から免疫療法の成否を予見することができる。

40

【0003】

患者に進行性免疫抑制症を合併することを特徴とする疾患は多い。免疫反応障害をもつ悪性腫瘍患者の症例は、数多く記録されている。癌患者や腫瘍を持つマウスについて、遅延型過敏性の減少、細胞溶解機能の低下や、リンパ球の繁殖反応など、実に様々な免疫機能異常が報告されている。S. Broder et al., N. Engl. J. Med., 299: 1281 (1978); E. M. Hersh et al., N. Engl. J. Med., 273: 1006 (1965); North and Burnauker (1984)。

50

【0004】

この他にも免疫反応異常の発生を特徴とする多くの疾患がある。例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）、敗血症、らい病、シトメガロウイルス感染症などの患者に進行性免疫抑制症が観察されている。免疫反応の調節が衰えるメカニズムはまだ解明されていない。

【0005】

免疫反応は複雑な現象である。すべての免疫反応には細胞が介在しているが、その発現にはTリンパ球（T細胞）が重要である。ヘルパーT細胞が免疫反応の進行の管理調節を行う。細胞毒性T細胞（キラーT細胞）は、感染標的細胞を溶解することにより細胞内寄生体やウイルスに対する免疫反応において重要な役割を果たすエフェクター細胞である。また、細胞毒性T細胞は、免疫監視メカニズムによって、癌の発症から体をまもる役割も担っているとされている。サプレッサーT細胞は、ヘルパーT細胞の誘導および/または作用を妨害する。一般に、T細胞は遊離抗原を認識しないが、他の細胞の表面上では抗原を認識することができる。ここで云う他の細胞とは抗原の提供に特異性を持っている細胞であるかもしれないし、あるいは体内でウイルスに感染してしまった細胞毒性T細胞の標的細胞であるかもしれない。

10

【0006】

普通、細胞毒性T細胞や、サプレッサーT細胞は、すべての有核細胞に発現されているクラスIの主要組織適合遺伝子複合体（MHC）成生物と関連して抗原を認識する。ヘルパーT細胞や、生体内で抗原に反応して増加するほとんどのT細胞は、クラスIIのMHC成生物と関連して抗原を認識する。クラスII成生物は、ほとんどの場合、抗原提示細胞や、いくつかのリンパ球において発現する。モノクローナル抗体により定義される細胞膜糖タンパク質を基準にしてT細胞をさらに二つの主要細区分に分類することができる。普通、62 KDの糖タンパク質を発現するCD4⁺サブセットはクラスII抗原範囲内の抗原を認識し、CD8⁺サブセットは76Kdの糖タンパク質を発現し、クラスIのMHC範囲内だけの抗原を認識する。

20

【0007】

CD4⁺サブセットは、さらに、機能が異なる2つのグループに分けることができる。一つのグループは、T細胞とB細胞の免疫反応に正の影響を与える。もう一つのグループは、CD8⁺細胞におけるサプレッサー/細胞毒性機能を誘発する。

【0008】

最も確実なT細胞標識は、T細胞抗原レセプター（TCR）である。TCR-2はジスルフィドと結合しているポリペプチド2種（ α と β ）からなるヘテロダイマーである。TCR-1の構造はTCR-2に似ているが、TCR-2はCD3複合体からなるポリペプチド複合体と結び付いている。すべてのT細胞の表面に見いだされるTCRは、異なる3つのサブグループのタンパク質に分類することができる相異なる少なくとも6個のサブユニットからなる。R. D. Klausner et al., *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6: 403 (1990)。

30

【0009】

Tiサブユニットは、抗原結合の原因となるもので、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖および δ 鎖を含んでいる。レセプター複合体内の α ヘテロダイマーや β ヘテロダイマーは、リガンド結合の原因となる。 γ ヘテロダイマーは、最も成熟したT細胞に見いだされ、 δ ヘテロダイマーはおもに上皮のT細胞に見いだされる。TCRを形成するもう一つのタンパク質サブグループは、相異なるが密接な関係を持つ少なくとも4個のサブユニットからなるCD3鎖である。これらのサブユニットとしては、 ϵ 、 ζ 、 η および θ が挙げられる。F. Konings et al., *Eur. J. Immunology*, 20: 299 (1990); R. S. Blumberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7220 (1990)。レセプターのタイプが多様化しているのは、TCR複合体の鎖を複数のサブユニットに分離した結果である。不完全なアセンブリーの複合体は劣悪化し、完全なアセンブリーのエフェクターのみが表面発現する。R. D. Klausner, *New Biol.*, 1: 3 (1989)。

40

【0010】

TCRサブユニットタンパク質の関与に加えて、さらにT細胞の認識イベントにより、シグナル変換（signal transduction）が行われ、細胞の反応を管理する適切な生化学シグナ

50

ルが発生する。TCRがシグナルを変換して、多重生化学カスケードを発生させることができることは、免疫細胞活性化の中核的イベントである。しかし、このシグナル変換の経路 (signal transduction path-way) は、まだほとんど分かっていない。TCRのうち、一以上のチロシン (Tyr) キナーゼがT細胞の活性化に重要な役割を持っている可能性が高い。R. D. Klausner et al., *Cell*, 64: 875 (1991)。CD3あるいはヘテロダイマーの何れかに対するモノクローナル抗体または抗原によってTCRが刺激されると、少なくとも二つのシグナル変換経路が活性化する。

【0011】

TCRが刺激されるとチロシンキナーゼが活性化する。L. E. Samelson et al., *Cell*, 46: 1083 (1986); M. D. Patel et al., *J. Biol. Chem.*, 262: 5831 (1987); E. D. Hsi et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 10836 (1989)。TCRが刺激を受けると、数秒以内に数個のタンパク質がチロシン残基によってリン酸化される。C. H. June et al., *J. Immunol.*, 144: 1591 (1990)。TCR鎖の何れも固有のキナーゼ活性を有していない。ただ、チロシンキナーゼのSrc系のFynと呼ぶ物質がCD3複合体と共に共同沈降する。L. E. Samelson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4358 (1990)。チロシンキナーゼ類のSrc系のT細胞に特異性のあるメンバーLckは、CD4あるいはCD8いずれかの分子の細胞質領域と、共有結合ではないが、密に結合する。CD4とCD8の細胞外領域は、それぞれMHCクラスIとクラスIIの分子に結合する。提示細胞上でTCRが抗原-MHC複合体に結合すると、このTCRは、適切なMHC分子と独立して結合出来るCD4あるいはCD8のいずれかの分子に近づくと思われている。また、TCRは、ホスファチジルイノシトールに特異性を持つホスホリパーゼを活性化して、ホスファチジルイノシトール-4, 5-ビス-ホスフェイトを加水分解する。A. Weiss et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4169 (1984); J. B. Imboden et al., *J. Exp. Med.*, 161: 446 (1985)。これにより二つの第二のメッセンジャーが遊離する。すなわち、1) 一過性のCa²⁺可動化を実現するイントロシトール-1, 4, 5-トリス-ホスフェイト、および、2) プロテインキナーゼの強力な活性化物質であるジアシルグリセロールである。C. B. Berridge et al., *Nature*, 341: 197 (1989)。

【0012】

TCR鎖の細胞質領域によって、レセプターの刺激をシグナル変換経路に充分につなぐことができる。B. A. Irving et al., *Cell*, 64: 891 (1991)。CD8の細胞外領域および膜内外領域と鎖の細胞質領域とをキメラタンパク質によってつなぐと、キメラタンパク質はCD3、およびの不存在下で適切なシグナル変換経路を活性化させた。したがって、の役割は明かにTCRを細胞内シグナル変換メカニズムにつなぐことにある。シグナル変換に関連するもう一組のタンパク質として、NF- κ B/rel転写活性化因子がある。NF- κ B転写活性化物質は、複タンパク質複合体 (multiprotein complex) である。NF- κ B/rel転写活性化因子は、生体内で細胞がサイトカイン類、二重鎖RNA、T細胞マイトジェン類、DNA破壊物質類、タンパク質合成インヒビター類、寄生体類、ウイルス類やウイルストランス活性化物質類など極めて多種の物質に暴露されたときに、直ちに防衛シグナル発現タンパク質の合成を誘導することに専門化されているように見える。NF- κ Bを活性化する物質は、細胞や生体にシグナルを送るか、あるいは脅威を与えると言う共通の特徴を備えている。

【0013】

NF- κ Bは急速に形質発現を活性化するのに特に適している。その理由は、(i) 新しくタンパク質を合成する必要がない、(ii) 簡単な解離反応で活性化を開始する、(iii) NF- κ Bは細胞質-核シグナルに有効に参加している、そして、(iv) 強力なトランス活性化物質であることである。NF- κ Bは、T細胞成長因子であるインターロキン2とその高親和性レセプターの成分の誘導可能な発現に関与しており、NF- κ Bが成長調節因子であることを示唆している。事実、T細胞の繁殖状態とNF- κ Bの活性状態との間にはかなりの相関関係がある。

【0014】

三つのタンパク質サブユニット、即ち、I κ Bとp50とp65が、NF- κ Bの生物機能を管理し

10

20

30

40

50

ている。IκBは、NF-κBのDNA結合を抑制し、刺激されていない細胞の細胞質において誘導可能な形でNF-κBを保持する35~43kDaのサブユニットである。細胞が刺激されると、p65およびp50との不活性複合体から、IκBが解離する。遊離したp50-p65複合体ヘテロダイマーは、核に移行して遺伝子をトランス活性化する。T細胞系と骨髄腫 (myeloma) 細胞系のハイブリッドにおける、IL-2レセプター 遺伝子の構造的発現 (constitutive expression) は、ヘテロダイマーの存在にのみ依存する。p65だけがIκBを結合するようである。細胞内で、IκB、p65、またはその両方のうちどれかを修飾することにより、IκBを遊離させることができた。

【0015】

Relタンパク質は、転写活性化物質であると考えられ、またp50とヘテロダイマーを形成することができ、さらに、κBモチーフを認識する配列特異性のDNA結合タンパク質である。IκBは、たがいに相同性を持ち、細胞内で類似する役割を果たしているタンパク質群の一物質である。p50とp65とは両方とも、relタンパク質および背 (dorsal) タンパク質と相同である。IκB群とrel群は、細胞質または核のシグナルに関与することで知られている互いに関連するタンパク質からなっている。

【0016】

転写活性化物質NF-κBと、この物質とrelタンパク質の関係についての資料は、Baeuerle, P. A. (1991) "The inducible transcription activator NF-κB regulation by distinct protein subunits", *Biophysica Acta* 1072: 63-80を参照されたい。

【0017】

治療の一形態としての化学療法は、癌の全てのタイプには効果をもつことはできなかった。これに代わる形態の治療としての免疫療法の臨床実験において、最も興味の対象となったのは免疫反応の仲介因子の同定と単離であった。例えば、インターロイキン2 (IL-2) やヘルパーT細胞が産生するリンフォカインなどの生物反応仲介因子は、生体内でも、また生体外でもIL-2レセプターを保持するT細胞の成長を刺激する。さらに、ナチュラルキラー (NK) 細胞の抗腫瘍機能を活性化 (増進) する (Lotze et al. 1981)。また、NK細胞は、鎖を発現する。IL-2を含有する上澄み液中で静止リンパ球を3ないし4日間インキュベートすると、健康細胞を損なわないで、新鮮な腫瘍細胞の溶解を仲介することができるリンパ球が生成する。この溶菌細胞はリンフォカイン活性化キラー (LAK) 細胞と名付けられている。I. Yron et al., *J. Immunol.*, 125: 238 (1980); M. T. Lotze et al., *Cancer Res.*, 41: 4420 (1981); およびS. A. Rosenberg et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 75: 595 (1985)。

【0018】

Tリンパ球を活性化してT活性化キラー細胞 (T-AK) を生成する方法は、白血球泳動 (leukophoresis) または末梢血液からリンパ球を採取し、モノクローナル抗体 (MAb) により抗CD3などのT細胞表面レセプター (可溶または固相結合) に対してこの細胞を刺激することよりなる。T細胞はIL-2などのサイトカイン類一種以上を添加して刺激することができるし、また添加しなくとも刺激することができる。別法として、先ずT細胞を精製してから、MAbにより表面レセプターに対して刺激することもできる。T-AK細胞の実験結果では、CD8⁺細胞のため培養基中にMHCに制限されない細胞溶解作用が認められることが立証されている。P. M. Anderson et al., *J. Immunol.*, 142: 1383 (1989); C. M. Loeffler et al., *Cancer Res.*, 51: 2127 (1991)。Tリンパ球を改良して免疫反応性をもたせることができる能力、および、新鮮な自己由来、同系 (syngeneic)、または同種異系のナチュラルキラー (NK) 細胞耐性腫瘍細胞は溶解するが正常な細胞は溶解しない能力をIL-2が持っていることから、自己由来養子免疫療法 (autologous adoptive immunotherapy) などの細胞移行療法が開発されることとなった。

【0019】

代表的な養子免疫療法としては、免疫活性細胞を個体に投与して癌の縮小あるいは管理などの有益な免疫効果を与えようとするものが挙げられる。免疫活性細胞の代表的な採取方法は、自己由来療法の場合は患者本人から、同種異系療法の場合は患者以外の人から静脈

穿刺法、あるいは白血球泳動法で採取する。このようにして採取したリンパ球を培養して数を増やし、抗腫瘍作用を活性化してから、注入により患者に戻してやる。現在のところ養子免疫療法では、試験管内で細胞数を増加させた後に、注入により患者に戻すことに大きな努力が払われている。

【0020】

健康な実験動物から癌性腫瘍を持つ動物に免疫活性細胞を移行する実験を行ったが、養子免疫療法は一部の腫瘍モデルで高い奏効率で抗腫瘍効果を認めた。ネズミを用いる動物実験において、IL-2とLAKとを併用したところ各種の悪性腫瘍の治療に効果が認められた。また、IL-2で治療後LAK細胞を移行すると生体内で繁殖する。確認されている転移癌を持つ患者を選別して行った臨床実験では、LAKとIL-2との併用、あるいはIL-2の単独投与で疾患の回帰の仲介に効果があることが立証されている。S. A. Rosenberg, " Immunotherapy of Patients with Advanced Cancer Using Interleukin-2 Alone or in Combination With Lymphokine Activated Killer Cells, " in Important Advances in Oncology 1988: J. B. Lippincott Co., 217, (1988)。

10

【0021】

しかしながら、療法に多数の細胞が必要であること、細胞を培養してLAK活性を発現するためには大量の培養基と多大の時間を必要とすること、所望の治療効果のためには十分なLAK活性を長時間維持しなければならないこと、さらには治療による副作用のため、養子免疫療法は限られた成功しか収めることができなかった。養子免疫療法の効率増進のため、試験管内培養方法が改良されてきた。抗原レセプター複合体CD3 (抗CD3 MAb) に対してIL-2および/またはモノクローナル抗体中で細胞を培養すると、多数のT細胞の繁殖が誘導されて抗腫瘍活性が増殖することが分かった。P. M. Anderson et al., J. Immunol., 27: 82 (1988); P. M. Anderson et al., J. Immunol., 142: 1383 (1989); およびA. C. Ochoa et al., Cancer Res., 49: 963 (1989)。

20

【0022】

腎臓線癌のネズミRENCAモデルにおいて、IL-2活性化キラー細胞と化学療法を併用してある程度の腫瘍の縮小効果を挙げたが、この効果はサイトカインが仲介したことが疑われた。Wiltrot, Progress in Neuro Endocrin Immunology, 4: 154 (1991)。

【0023】

生体内で抗腫瘍メカニズムを活性化しようとして、限られた成功を収めた。高い投与量のIL-2を服用した小数の患者に治療効果があったが、著しい毒性が認められた。抗腫瘍CD3モノクローナル抗体単独をマウスに直接注入すると、非特異性の抗腫瘍機能が抑制される。D. W. Hoskin et al., Cancer Immunol Immunother., 29: 226 (1989)。ネズミモデルで肯定的な成績を得たので、人に抗CD3の直接注入を行った。OKT3と名付けられている抗CD3 MAbを投与された患者は、生体内で若干のT細胞の活性化を経験したが、この静注OKT3の毒性は、免疫効果を示し始める前の低用量で最高耐薬量 (MTD) に達してしまった。W. Urba et al., Cancer Res., March 1991。この毒性の大部分は遊離OKT3に原因があると信じられている。

30

【0024】

単独投与形態の治療が適切でないので、相乗作用を検索した。フラボン酢酸 (Flavone acetic acid: FAA) は、サイトカイン誘導の合成薬剤で、IL-2との併用でネズミのRENCA腫瘍を縮小する相乗効果が認められている。したがって、サイトカイン誘導物質であるフラボノイドをIL-2と併用することによる抗腫瘍効果に期待することができる。FAAは生物反応モデファイアー (BRM) で、全身的にナチュラルキラー (NK) 細胞の作用を増強し、IL-2との相乗効果によって進行したRENCAの治療に効果があることが証明されている。Wiltrot et al., J. Immunol., 140: 3261 (1988); U. S. Patent No. 5, 096,707およびNo. 5,061,488。FAAによって誘導されたサイトカイン類 (TNF、 γ -IFN、および β -IFN) は、治療上、rIL-2との相乗効果に関与しているとされてきた。CD8⁺-Tリンパ球は、この相乗効果を仲介する上で重要である。FAAは試験管内でサイトカイン遺伝子を誘発する。このモデルでは、RENCA腫瘍の進行中に免疫抑制性T細胞が誘導されている。Gregarian et a

40

50

l., *Cancer Immunol. Immunother* 31: 325, 31: 335 (1990)。

【0025】

各種の *in vitro* 試験によると、腫瘍を持つ宿主のTリンパ球は免疫機能が低下している。R. Lafreniere et al., *J. Surg. Oncol.*, 43: 8 (1990); R. J. North et al., *J. Exp. Med.*, 159: 1295 (1984); M. Sarzotti et al., *Int. J. Cancer*, 39: 118 (1987)。末梢血液リンパ球の免疫感度が低下する前に、腫瘍に浸潤しているTリンパ球が自系または同種異系のいずれの腫瘍細胞に対しても乏しい細胞毒性しか示していないことが観察されている。E. F. Klein et al., 1980, In: *Contemporary Topics in Immunology*, I. P. Witz and M. G. Hanna, Jr., eds. Plenum Press, N. Y., p 79-107; B. M. Vose et al., *J. Cancer*, 44: 846 (1981)。

10

【0026】

腫瘍を持つ宿主由来のT細胞免疫感度が低下している分子的な根拠は、明白ではない。サプレッサーリンパ球が発生するのでT細胞の免疫感度が低下すると提案されたことがあった。S. B. Mizel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2205 (1980); C. C. Ting et al., *Int. J. Cancer*, 24: 644 (1979)。感度が高いT細胞クローンの欠失が原因であると言われたこともあった。S. Webb et al., *Cell*, 63: 1249 (1990)。さらに、T細胞のアネルギーが誘導される結果として、T細胞の免疫感度が低下すると提案されたこともあった。M. K. Jenkins et al., *J. Exp. Med.*, 165: 302 (1987)。さらにまた、抗原提示の変更によって免疫反応に大きな変化が起こり、その結果CD4⁺ヘルパーTリンパ球の反応が適正でなくなることも示唆された。上記の諸説に加えてその後、サイトカイン遺伝子によりトランスフェクトされた腫瘍細胞は、抗腫瘍保護反応を誘導し、その結果免疫学上の記憶反応となることが観察されるようになった。E. R. Fearon et al., *Cell*, 60: 397 (1990)。

20

【0027】

in vivo 腫瘍モデルにおいて、名称をMCA-38としたネズミ結腸癌を皮下に埋没したところ、移植片が進行的に成長し (>26日)、CD8⁺Tリンパ球の溶解機能とmRNAの腫瘍壊死因子 (TNF-)、グランザイムB (granzyme B) に対する発現とが互いに結び付きながら低下し、移行した養子細胞の *in vivo* 抗腫瘍効果を仲介する能力も失われてしまった。(Loeffler et al., 1992, *J. Immunol.*, 149: 949)。しかしながら、CD4⁺の繁殖、リンフォカイン産生、およびリンフォカインレセプターの調節のグレードアップについては、健康ネズミと腫瘍を持つネズミとの間に差はなかった。サプレッサー機能を有する細胞は検出されなかったし、また腫瘍を持つネズミとMCA-38腫瘍細胞から採取したリンパ球の何れからも形質転換成長因子 (TGF-B) の産生が検出されなかった。

30

【0028】

リンフォカイン類の注入および/または養子免疫療法によって免疫異常患者の免疫反応を増大させようとする試みは、不安定で限られたものではあるが一応の成功を収めた。このタイプの治療は、方法を改良する必要がある。免疫抑制症患者の免疫系を効果的なタイミングで増強することができるように、免疫抑制の進行を測定する効果的な方法が必要である。また、患者の免疫抑制の程度を見積って、治療に対する患者の反応を正確に予想する方法が必要である。こうすると、系統立った患者の療法を開発することができる。さらにまた、臨床医が患者のTリンパ球は活性化できるものであるか、そうだとすれば、自系の養子免疫療法が効果的であるのかを決定する方法が必要である。

40

【0029】

また、疾患の進行中にTリンパ球の免疫抑制状態を回避あるいは逆転して、患者にT細胞免疫反応を発生させたり、増強する方法の必要がある。免疫抑制剤および免疫抑制を逆転したり、阻害する薬剤のスクリーニング方法の必要がある。

【0030】

腫瘍の存在、特に癌の発生を初期段階で検出し、治療効果を増進する方法の必要がある。疾患の病期を判定する改良法があれば、容易に最適のタイプの治療を選択することができる。また、臨床実験開始前、さらに開始後も臨床実験の補助手段として治療タイプの効

50

果をチェックする必要がある。

【0031】

本発明は、免疫抑制および例えば癌といった一般に免疫抑制を特徴とする疾患の検出、モニターリング、及び逆転の技術における制限を解消しようとするものである。

【0032】

発明の概要

本発明は、部分的には、TCRサブユニットに関連する各種タンパク質類の発現の水準や、Tリンパ球シグナル変換経路 (signal transduction pathway)、NF- κ B/relを変化させることができる可溶性免疫抑制因子の同定に関する。発現のパターンには、存在の減少 (reduced presence)、切断 (truncation) などのタンパク質構造の改変を含み、細胞または一以上の無細胞系中にタンパク質が存在すること、不存在であることを含むものとする。

10

【0033】

「因子」とは、免疫抑制を持つ哺乳動物由来の血清中に存在し、TCR関連タンパク質類の発現を変えることができる組成物である。因子は腫瘍細胞培養物の一部の上澄み液中に存在する。「因子」なる語には、上記の血清または上澄み液から単離または精製したために、本明細書で説明する免疫を抑制する性質とTCRタンパク質を改変する性質を持っているサブコンポーネント (subcomponent) を含めるものとする。タンパク質発現のパターンは、TCRレセプター、Tリンパ球シグナル変換経路、およびNF- κ B/relを弱体化している一種以上のタンパク質類において改変される。

20

【0034】

免疫が抑制されていない哺乳動物や、免疫が抑制されていない哺乳動物の細胞培養物、あるいは免疫が抑制されていない哺乳動物の特徴であるタンパク質水準を特徴としている細胞の培養物から由来する細胞培養物におけるタンパク質の特徴的なレベルと比較して、TCRレセプターを含む特定のタンパク質や、シグナル変換経路の特定のタンパク質の発現レベルは、免疫抑制哺乳動物において、低下しているのが普通である。しかしながら、本発明の一態様であるこれらのタンパク質の発現は、相互に関連している複雑な免疫システムの一部である。このシステムのタンパク質一個が混乱しても、他のタンパク質のレベルに色々な態様で影響し、つまり、やがて特定の時点でこのレベルを上昇させたり、低下させたりすることがある。

30

【0035】

重要なのは、免疫システムの少なくとも一つのタンパク質レベルがこのシステムの作用を混乱させる程度まで低下すると、システムが抑制される、つまり健康な哺乳動物が特徴とする免疫機能を達成するのに必要な作用ができなくなってしまう。抑制の程度はいろいろあるが、普通、抑制が著しくなるにつれて、より重篤な臨床上的の問題に結び付いて行く。さらに、免疫抑制が進行して行くにつれて、ますます多くのタンパク質レベルが変化して行く。本発明においては、免疫抑制進行の指標として、一個の特定タンパク質が相対応じて減少する反面、複数のタンパク質は免疫が抑制されていない状態から脱却する。普通、一部のタンパク質レベルが上昇して、一部のタンパク質レベルが低下する。例えば、CD3 が減少し、FC が増加する。

40

【0036】

本発明において免疫抑制因子の存在下で増加するタンパク質の例として、TCRのサブユニットが挙げられる。これらのタンパク質にはCD3 とCD3 がある。

【0037】

CD3 レベルが低下するにつれて上昇するタンパク質、発現が逆の相関関係にあるものの例としては、IgEレセプターに関連したタンパク質であるFc が挙げられる。本発明の方法によるFc タンパク質のコントロールによって、増加したFc をスクリーニングしたり、この増加を抑制する薬剤の選択に有用であり、したがって、アレルギー反応をコントロールできるようになりうる。

【0038】

50

免疫抑制因子の存在下で減少するタンパク質のもう一つの例として、シグナル変換経路タンパク質が挙げられる。このタンパク質には、Src系酵素などのチロシンキナーゼ、特にFynとIckならびにPLC およびGAPタンパク質がある。

【0039】

NK- B/re1系のTCRサブユニットタンパク質、シグナル変換経路タンパク質、あるいはタンパク質転写因子のパターンは、腫瘍、すなわち免疫抑制状態と結びついた疾患の存在下で変化する。これに関連するパターンとしては、腫瘍がなく免疫が抑制されていない状態の哺乳動物に見いだされる異なるタンパク質成分の存在、不存在、および免疫が抑制されておらず、腫瘍もない状態の特性とは異なる、分子量などの特性によって特徴づけられた各種関連化合物の存在、不存在が挙げられる。NF- B/re1因子と分子量などの特性の存在、不存在は、当業者に知られている方法により測定する。これらの方法には、ウェスタン法、ゲルシフト分析およびUV架橋分析 (UV-crosslinking analysis) がある検定に、例えば脾臓から採取したリンパ球製剤を使用する場合には、短時間培養することが好ましい。本発明の可溶性免疫抑制因子は、腫瘍を持つ哺乳動物の血清に存在することを、もう一つの特性とする。

10

【0040】

腫瘍細胞を培養した上澄み液が、正常リンパ球のin vitro細胞毒性作用を抑制することが証明されている。この培養物の例としてはMCA-38とMBL-2をあげることができる。したがって、この因子が腫瘍保持源から誘導される哺乳動物細胞製剤から単離精製されたものでありうる。この因子は、腫瘍発生後一定期間を置いてから採取することが可能である。腫瘍発生後の期間が長ければ長いほど、因子採取の可能性が高い。腫瘍は一以上発生している場合もある。どのくらいの期間を置けば因子採取が可能となるかについては、哺乳動物のタイプ、腫瘍のタイプ、および悪性腫瘍の状態に関連する要因によって異なる。例えば、本明細書で説明する腫瘍系の場合、発生後少なくとも26日で、可溶性因子をマウスから採取することが可能である。

20

【0041】

可溶性因子は、哺乳動物の血清を含む生物標本からも採取することができる。さらに、細胞、例えばMCA-38系、あるいはMBL-2系の細胞を培養した上澄み液からも採取することができる。これらの細胞系は本明細書で説明する用途について、入手可能である。

【0042】

哺乳動物の免疫抑制のレベルを測定する一般的な方法は、TCRサブユニットタンパク質、またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質を少なくとも一種選択して、これから哺乳動物リンパ球製剤を精製し、この製剤の発現のレベルを測定し、同一の種類の哺乳動物の健康な、即ち免疫が抑制されていない個体のタンパク質を選択し、これに特徴的な発現のレベルと試験サンプルの発現のレベルとを比較する各ステップからなる。本発明の実施に好適なTCRサブユニットタンパク質は、CD3 とCD3 である。また、本発明の実施に好適なシグナル変換経路のタンパク質は、Src系のチロシンキナーゼp56^{Ick}およびp59^{Fyn}とPLC およびGAPのタンパク質を含む。

30

【0043】

正常状態から悪性状態までの進行と直接に結び付くタンパク質発現のレベルの変化の例としては、CD3 が減少し、CD3 鎖を完全に欠失するT細胞抗原レセプター (TCR) が挙げられる。後者の鎖はFc 鎖に変えられる。

40

【0044】

正常状態から悪性状態までの進行と結び付くリンパ球シグナル変換経路のタンパク質発現のレベルの変化の例としては、チロシンキナーゼ発現の減少を含めるものとする。代表的な一態様においては、p56^{Ick}、p59^{Fyn}、PLC およびGAPは、正常レベルと比較して減少する。どの個体においても、一以上のタンパク質レベルが変化することがある。悪性が進行するにつれて、一般に、より多くのタンパク質レベルが変わって行くようになる。疾患が異なると、変化の出現順序も変わる。

【0045】

50

この例で見いだされる変化は、腫瘍を持たない実験動物またはヒトと比較して、腫瘍を持つマウス、およびヒトの両方に観察される。一般に、相関関係を持つ反応、即ち、パターンが悪性状態の進行と結び付いているものであるが、正常なTCR複合タンパク質発現レベルの変化が少なくとも一つ観察される。

【0046】

免疫抑制状態、即ち腫瘍を持っている状態に関する検定方法として、NF- B/rel系の転写因子のパターンがある。この例で対象とするタンパク質類は、c-rel、p65、およびp50である。ある異常な条件下では、これら三つタンパク質の全てが存在しない。他の条件下では、一つか、二つだけが存在しない。さらに他の異常条件下では、新しい形態のタンパク質が正常状態の形態にとってかわる。哺乳動物の一種から採取した比較ができる細胞サンプルとの間で比較することが好ましい。p50は、腫瘍を持たない哺乳動物のTリンパ球製剤の核成分であるが、例えば、マウスのRENCA腫瘍の存在下では、このp50は姿を消してしまい、(ウエスタン法による測定で、分子量おのおの48及び44KDと見積られているタンパク質)p48とp44とにとって代わられる。新しい形態のタンパク質は、単に大型の形態のものをN末端で切断しただけで、置き換えられる分子量の大きな形態と互いに類縁関係にあるように見える。

10

【0047】

免疫抑制によって影響された発現のレベルとタンパク質のパターンによって、癌患者の病期判定と評価を行う。病期判定と評価の結果から免疫療法の成否を予想する。TCRサブユニットのタンパク質レベル、シグナル変換経路、およびNF- B/relタンパク質類によって、この目的に必要な情報が提供される。また、療法に対する細胞のin vitro反応によって、治療効果、あるいは細胞の免疫強度、あるいはこの両者の相関関係を予想することができる。

20

【0048】

本発明の一態様は、TCRレセプター、シグナル変換、またはNF- B/relタンパク質類の変化を検定することにより、患者が自系養子免疫療法 (autologous adaptive immunotherapy) を活性化できるTリンパ球を持っていることを確認する方法を提供することにある。この方法は、免疫抑制評価の対象患者から得たリンパ球調製物を用いて、TCRサブユニットタンパク質から選ばれる少なくとも一種またはTリンパ球シグナル変換経路内のあるタンパク質の発現レベル、あるいはNF- B/relタンパク質の少なくとも一種のパターンを測定することを含む。

30

【0049】

本発明によるタンパク質の発現レベルの定量法は、発現比率よりなる。但し、これに類似する方法は、本発明の一部とする。発現比率とは、計測したTリンパ球の総数に対する特定タンパク質を発現するTリンパ球の数の比率のことをいう。タンパク質発現のレベルを、健康な、即ち免疫が抑制されていないヒトの正常な特定タンパク質発現レベルと比較する。本発明のもう一つのタンパク質発現レベル定量法は、例えばTリンパ球の、生物標本から単離した総タンパク質量中に存在するタンパク質の量を数式で表示するものである。

【0050】

NF- B/rel系の転写因子のパターンについては、分子量成分の存在、不存在は、核抽出物中で測定する。この場合、少なくとも一つの成分の検定を行う。但し、異常状態が異なるとパターンも異なる特徴があるため、複数の成分を検定することが好ましい。

40

【0051】

さらに、リンパ球の刺激と相容できるタンパク質の最低濃度を、しきい値と定める。また、リンパ球の刺激と相容できるNF- B/relタンパク質のパターンをしきい値とする。相容性とは、リンパ球の注入を伴う療法において臨床改善に一般に必要とされる抗CD3などの薬剤が与えるレベルの刺激であると定義する。言い替えると、免疫反応に干渉しないタンパク質レベルおよび/またはパターンをしきい値のレベルとする。

【0052】

50

本発明の方法を免疫療法に反応する疾患患者の治療に適用することにより、リンパ球が刺激に反応して、免疫療法が成功するであろうと考えられる患者を選択することが可能となる。また、特定タンパク質の発現レベルとタンパク質のパターンがしきい値以上で、リンパ球の刺激に反応できる患者は、免疫療法に適合する。

【0053】

本発明の他の態様は、哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を起こす薬剤の選別方法に関する。この方法は、健康な、即ち免疫が抑制されていない同一の哺乳動物種の個体の特徴である発現レベルのTCRサブユニットタンパク質から選ばれる少なくとも一種、またはシグナル変換経路内のあるタンパク質および/またはNF- κ B/relタンパク質のパターンからなる哺乳動物のTリンパ球調製物を用意し、免疫抑制を起こすと考えられる薬剤の存在下でこのリンパ球調製物を培養し、選ばれたタンパク質の発現レベル、および/またはパターンを測定し、選ばれたタンパク質の発現レベルを顕著に低下させるか、あるいはパターンを変化させて正常とはことなるものにする薬剤を選別する各ステップよりなる。この場合正常とは免疫が抑制されていない状態であると測定されるしきい値レベルとする。最後の選別ステップは強力な免疫欲製剤を投与した後in vivoで実施する。例えば、器官移植に伴う免疫抑制誘導方法としては、本発明の溶解性免疫抑制因子を患者に投与する。

10

【0054】

同様にして、哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を逆転させる薬剤の確認方法は、次の各ステップからなっている。即ち、免疫が抑制されている哺乳動物から得た哺乳動物のTリンパ球調製物を用意し、ここで、少なくとも一つの選ばれたTCRサブユニットタンパク質またはシグナル変換経路のタンパク質が、免疫が抑制されていない、すなわち健康な同一哺乳動物種の個体の特徴であるしきい値以下の発現レベルとなっているか、あるいは、NF- κ B/relタンパク質の改変されたパターンを示しているか、あるいは、これら変化のいずれかが合併している。そして、免疫抑制を逆転すると疑われている薬剤の存在下でこのリンパ球調製物を培養する。さらに、選ばれたタンパク質の発現レベルを測定する。そして、選ばれたタンパク質の発現レベルを顕著に増加させる薬剤を選別するものである。この方法は、免疫抑制を逆転する可能性のある薬剤を投与した後、in vivoで実施する。

20

【0055】

本発明のTCRサブユニット、シグナル変換のタンパク質、またはNF- κ B/relタンパク質の変化を検出する方法を利用して、腫瘍を減少させたり、除去したりする治療方法を評価することができる。この評価のためには、治療開始前に腫瘍を持つ哺乳動物のタンパク質濃度を測定する。治療後、同じタンパク質について、レベルまたはパターン、あるいはその両方を測定し、治療前と比較して、変化の有無を判定する。一般には、変化の有無の判定には、統計的に意味があるデータが必要である。また、腫瘍を持たない哺乳動物のタンパク質レベルを比較しておいて、将来の治療効果比較に役立てても良い。

30

【0056】

一態様において、サイトカインを誘導するフラボノイドとIL-2の併用により、確立した腫瘍を持つ哺乳動物の治療を行う。チロシンのリン酸化パターンの変化を検討したところ、マウスの腫瘍では、この腫瘍の存在に関連してp56^{lck}、p59^{lyn}、PLC- γ 1とCD3複合体のゼータ鎖の濃度が低下していたものが治療後逆転し、また、腫瘍が縮小していた。腫瘍を持つマウスでは、NF- κ B/rel系のc-relとp65が存在せず、p50の代わりにp44とp48が出現していた。治療後、このパターンは、ほぼ正常状態に戻っていた。この結果は、フラボノイド、サイトカインおよびIL-2の併用により、正常な免疫機能に必要な成分、例えばシグナル変換経路が回復され、このためT細胞が効果的な抗腫瘍反応を展開できるようになったと解釈できる。

40

【0057】

腫瘍を持つ哺乳動物においてCD3 タンパク質の発現レベルが一旦低下した後、発現の回復を誘導する薬剤の例として含まれるのは、イオノマイシン (ionomycin)、または、イオノマイシンと次のいずれかの併用である。すなわち、フォーボルミリスティックアセテート (phorbol myristic acetate)、IL-2、PMAとIL-2、抗CD3とIL-2、そしてモノクロ

50

ナル抗体、抗CD3のうちのいずれかである。

【0058】

次に、本発明による免疫抑制因子を抑制する薬剤のスクリーニングを下記のようにして実施する。先ず、ある系にこの薬剤を添加した後、免疫抑制の程度を測定し、添加前の免疫抑制の程度と比較する。この態様の一つは、次のステップからなっている。

【0059】

1. この薬剤に対するモノクロナール抗体を形成し、この薬剤を含有する調製物にこの抗体を添加すると複合体が形成されるようにする。これによって、薬剤の作用を抑制すると共に、当業者に周知の方法によりこの抗原-抗体複合体を標識して、複合体の形成が検出できるようにする。このことから、薬剤が製剤中に存在することが推論できる。

10

【0060】

2. 第一の細胞系にこの免疫抑制因子を含有させておき、試験すべき薬剤を添加する。

【0061】

3. 第二の細胞系にもこの免疫抑制因子を含有させておき、薬剤と薬剤に対する抗体と一緒に添加する。

【0062】

4. 本発明による検定方法を用いて、例えばTCRサブユニットおよびシグナル変換経路のタンパク質発現レベル、および/または、NF- κ B/relタンパク質のパターンを測定して、免疫抑制の程度を測定する。

【0063】

5. 第一の細胞系の免疫抑制の程度と、第二の細胞系のそれとを比較して、モノクロナール抗体を含有する系が免疫抑制を逆転させたか、否かを判定する。タンパク質レベルにより、および/または、第二の細胞系のパターンが第一の細胞系のレベルより上位にあることにより、逆転したことが分かる。このレベルまたはパターンは、免疫が抑制されていない同様の細胞系の特徴となっているレベルまたはパターンと一致することが好ましい。同様の細胞系とは、同一の哺乳動物種から誘導される系で、同一のタイプの細胞からなり、その他の類似した免疫特性を有するものを含む。

20

【0064】

さらに、本発明は、免疫抑制を阻害する、すなわち悪性状態またはその他の免疫抑制を誘発する異常状態により発生する免疫抑制を防止あるいは逆転するものとして、本発明の方法により決定された薬剤に関する。化学的療法を原因とする免疫抑制も、上記の免疫抑制の定義に含まれるものである。

30

【0065】

さらにまた、免疫抑制因子に対する抗体も本発明の一部である。この抗体は当業者に周知のポリクロナールおよびモノクロナール抗体の製法により、本発明の免疫抑制因子を単離し、この免疫抑制因子から単離精製したエピトープを用いて製造する。

【0066】

免疫抑制因子は、腫瘍を持つ哺乳動物の血清、腫瘍または腫瘍を持つ哺乳動物の細胞、または免疫が抑制されていない系に対して用いると免疫抑制を発生させる他の生物源から、単離精製する。本発明の一態様では、この因子は、溶解性の、タンパク質様の化合物である。単離精製した因子を使用して、免疫抑制因子をコード化している遺伝子のクローンを作り、ヌクレオチドのコード化配列を決定する。

40

【0067】

当業者に周知の方法により、本発明の免疫抑制因子をコード化するからクローンが作られる。この因子、または少なくとも免疫抑制に必要なセグメントは、因子またはエピトープセグメントに対するモノクロナール抗体を用いるか、あるいは標準生化学精製法によって精製することができる。精製因子にはアミノ酸配列を決定し、縮退 (degenerate) オリゴヌクレオチドを形成してヌクレオチド配列ライブラリーをスクリーンするのに使用する。

【0068】

50

本発明の免疫抑制因子の発現に対抗するアンチセンス構成物は、この因子の作用を抑制するのに有用である。哺乳動物にアンチセンス構成物を投与して、免疫抑制状態に進行するのを抑止することができる。アンチセンス構築物は、一般に細胞内へとトランスフェクトさせて、その細胞を哺乳動物に投与する。

【0069】

また、当業者に周知の方法により、溶解性因子の遺伝子を哺乳動物の細胞にトランスフェクトさせることができる。

【0070】

本発明の一態様は、本発明の溶解性免疫抑制因子の少なくとも免疫的に活性である部分から製造するワクチンに関する。このワクチンは当業者に周知の方法により製造する。

10

【0071】

さらに、本発明は、免疫抑制のレベルを測定するキットを提供する。このキットは、TCRサブユニット、シグナル変換経路、およびNF- κ B/rel系の一群からのタンパク質に対する抗体を含む。別々の容器に、本発明の各々のタンパク質に対する一個以上の抗体を入れる。さらに、キット中には抗原-抗体複合体の形成を検出する手段があり、この形成検出により特定のタンパク質が存在することを推論できるようになっている。配列は、正常状態と異常状態とでは異なる配列に対して特異性を有する抗体は、劣化タンパク質の検出に有用である。

【0072】

また、本発明は、免疫抑制・腫瘍進行逆転用治療剤の効果判定キットを提供する。これはリンパ球調製物を数種、一種づつそれぞれの容器に入れて、キットにしたものである。第一の調製物は、レベルとパターンについて対照として用いるものである。第一調製物は、一般的には、治療対象と同一の哺乳動物種であって、免疫障害がなく、腫瘍もない哺乳動物の脾臓から採取したリンパ球の調製物である。第二の調製物は、免疫抑制されたか、腫瘍を有する哺乳動物には由来するが、同様な細胞および哺乳動物から得た細胞調製物である。一般に、細胞は、キットの到着時から使用時まで液体窒素で凍結しておかなければならない。調製物が核抽出物であるか、あるいは、キット中に溶解手段を入れてあるので、核を使ってNF- κ B/relのパターンを分析することができる。治療薬の効果判定は、その治療薬を第二の調製物に添加し、ある適当な時間を置いて、当業者に周知の方法により、タンパク質のレベルとパターンを比較して行う。適当な時間とは、細胞のタイプ、細胞検

20

30

【0073】

哺乳動物の細胞を免疫抑制因子を阻害する薬剤で処理したもの、そして、哺乳動物の細胞を免疫抑制因子で処理したものは、疾患の性質、治療条件に応じて免疫抑制作用を上昇させたり、低下させたりすることができ、治療上有用である。処理された細胞は、養子免疫療法に用いることができる。

【0074】

本発明の方法により免疫抑制を逆転させることができると判定された薬剤の治療有効量を、製薬的に許容できる希釈剤に入れて投与し、免疫抑制された哺乳動物を治療する。治療有効量は、特定疾患、特定条件毎に経験的に定める。治療対象の哺乳動物にはヒトも含む。本発明の他の目的、特性、および長所は、以下に述べる詳細な説明により明らかとなる。ここで用いる用語を、次のように定義する。

40

【0075】

Tリンパ球またはT細胞は、T細胞抗原レセプターを持つすべてのリンパ球サブセットを含めるものとする。これらのサブセットには、次のリンパ球がある。CD3⁺CD4⁺(⁺)、CD3⁺CD8⁺(⁺)、CD3⁺CD4⁻CD8⁺(⁺)、CD3⁺CD56⁺である。

【0076】

免疫療法とは、細胞養子免疫療法を含む養子免疫療法を含むものとする。細胞養子免疫療法は、個体に免疫的に活性(免疫上有効な)を有する細胞を投与して、癌組織または疾患組織の減少あるいはコントロールなどの、有益な免疫的效果を挙げようとするものであ

50

る。

【0077】

本発明で言う、免疫治療活性または免疫反応または免疫的に活性または免疫的に有効といった表現には、白血球の抗腫瘍作用、抗感染細胞作用、疾患治療作用、キラー作用を含めるものとする。

【0078】

培養とは、成長に必要なすべての栄養剤からなる組織培養基(TCM)にT細胞を置く工程をいう。刺激とは、一以上のサイトカイン、またはその代わりに一以上のT細胞抗表面レセプター抗体、あるいはこれに一以上のサイトカインを併用したものを配合して、TCMによりT細胞を培養することをいう。この工程は、細胞や組織の培養に適するものであれば、如何なる容器、如何なる装置を用いてもよい。さらに、この工程は、異なる段階を幾つか用いる培養および継代培養からなってもよいが、刺激をする段階は、典型的には、一つのみにとどめることが好ましい。

10

【0079】

シグナル変換経路は、リガンドまたは抗体が何れかのT細胞表面レセプターに結合することにより、発現が誘導、リンク、あるいは調節されるすべてのタンパク質を含むものとする。これらのタンパク質としては、Jun、Fos、Myc、GAP、Raf1、c-rel、NF B、Plc、タンパク質G、イノシトールホスフェート、タンパク質キナーゼC、Map1キナーゼ、CD45ホスファターゼ、およびLck、Fyn、YesとLynを含むSrc系が挙げられる。

【0080】

抗体は、特異的にT細胞の適当なエピトープに結合して刺激を与えるすべてのタンパク質またはタンパク質類縁物質を含むものとする。抗体はまた、TCRサブユニットタンパク質、Fc、またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質と特異的に結合するすべてのタンパク質またはタンパク質類縁物質を含むものとする。さらにまた、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、またはそれらのフラグメントを始めとする従来の方法により形成する抗体、ならびに遺伝子工学、または合成による化合物、例えば機能的には抗体と同等の結合特異性を有する結合領域を含有している単鎖抗体もこれに含める。

20

【0081】

サイトカインは、多くの細胞内シグナルに関与して、外部からの各種刺激に対する総合的な反応を行うタンパク質である。サイトカイン類は、細胞表面の高い親和力を持つ特定のレセプターと相互作用を行う強力な媒介物質である。また、サイトカイン類は、免疫反応に関係があるすべてのタイプの細胞の機能に影響し、さらにリンパ球新生や、造血にも関与し、多くの疾患の病態生理に関係があることが証明されている。リンホカイン類は、本発明の好ましいサイトカイン類である。

30

【0082】

NF B転写活性化因子は、遺伝子転写を活性化する複タンパク質複合体である。三つのタンパク質サブユニット、IKB、p50とp65が、NF Bの生理機能をコントロールしている。Relタンパク質は、転写活性化因子であり、p50とヘテロダイマーを形成することができ、さらにKBモチーフを認識することができる、配列特異性のDNA結合タンパク質である。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0083】

腫瘍を持つマウス(tumor-bearing mouce:TBM)、特に長期間腫瘍を持つマウスのTリンパ球は、TCR関連タンパク質の性質が変化しているのが認められる。癌患者にも同様の変化が認められる。このことは、TCRサブユニットとシグナル変換経路のタンパク質、およびNF B/rel系の作用が阻害されているために、腫瘍が増殖することを示唆している。反対に、これらのタンパク質の変化を逆転させる、例えばこれらのタンパク質の発現が欠失あるいは低下しているのを逆転させて、正常レベルの存在に戻してやると抗腫瘍治療が成功することになる。

【0084】

これらの観察に基づいて、哺乳動物の免疫抑制検定法を開発した。この検定法は、TCR

50

サブユニットのタンパク質、シグナル変換経路のタンパク質、およびNF- κ B / relの変化を対象としている。これらの検定法には、臨床面で多くの用途がある。

【0085】

本発明のTCR関連タンパク質に対する効果およびこの効果が進行性免疫抑制と関係があることを基準にして、腫瘍を持つ哺乳動物に存在している溶解性免疫抑制因子を決定した。

【0086】

本発明の方法は、治療の評価、さらには免疫系の機能不全を特徴とする多種の疾患の治療方法に適している。これら疾患のうちに、進行性免疫抑制を伴う疾患、さらに「自己」が異種として認識されて、自己免疫反応が確立されてしまう疾患も数えることができる。

10

【0087】

進行性免疫抑制を合併する疾患には、多くの異なる組織の癌、例えば白血病、ホジキン病、肺癌、結腸癌、グリオーム、腎臓細胞腫などがある。また、進行性免疫抑制は多種の感染症、例えば、らい病、結核、リーシュマニアなどの細胞内感染症、敗血症や、HIV、サイトメガロウイルス、エプスタイン-バーウイルスなどのウイルスを病因とする細胞外感染症、住血吸虫症、マラリアなどの寄生虫感染症などにも観察される。

【0088】

自己免疫を伴う疾患としては、狼瘡、自己免疫甲状腺炎、硬皮症、リウマチ様関節炎などのリウマチ様疾患が挙げられる。

【0089】

器官移植には免疫抑制を誘導することが必要である。本発明の溶解性因子は、この状態にするのに有用である。また、免疫抑制剤の評価に本発明の検定法を用いることができる。

20

【0090】

本発明の検定法によって免疫抑制剤が免疫抑制を逆転させることを確認してから治療法を決定する。治療は、癌あるいは免疫系障害を伴う他の疾患を持つ哺乳動物に免疫刺激薬を直接投与して行っても良いし、また養子免疫療法を使っても良い。

【0091】

効果のある免疫療法剤をリポゾームでデリバリー（送達）する。効果がある免疫療法剤は、TCRサブユニットとシグナル変換経路のタンパク質のレベルを腫瘍出現前のレベル、あるいは疾患の発症前のレベルにまで回復させる。効果がある免疫療法剤は、NF- κ B / rel系の転写因子を発病前の状態に回復する。

30

【0092】

腫瘍を持つマウスのTリンパ球（TBM）の特性

1. 治療効果の低下

26日より長い間腫瘍を持っているネズミ宿主（以下、この宿主を後期腫瘍を持つマウスまたは後期TBMと称す。）から養子移植したTリンパ球の治療効果は顕著に低下した。これは、健康マウスや、21日未満の間腫瘍を持っているマウス（初期腫瘍を持つマウスまたは初期TBMという。）と区別できる低下であった。

【0093】

後期TBMのTリンパ球の機能のin vitro分析を行ったところ、抗CD3とIL-2には正常と思われる増殖反応を示し、CD4⁺からはリンホカインが正常に形成されていることを認めた。しかしながら、CD8⁺細胞の細胞毒性機能が著しく低下していることが観察された。この細胞毒性低下は、細胞が介在して抑制されたものではなかった。TNF やグランザイムBなどの溶解性分子をコード化する遺伝子の発現が顕著に減少していたのである。

40

【0094】

後期TBMのTリンパ球からCD3 およびCD3 鎖を検出することはできなかった。鎖は、鎖系的一种であるFc 鎖の発現に置き換えられていた。TBMのリンパ球では、さらにLckとFynタンパク質が顕著に減少しているのが認められた。これと平行して、Ca²⁺を動員する能力が低下し、チロシンリン酸化のパターンも変化していた。

50

【0095】

腫瘍を持つマウスのCD8⁺Tリンパ球により、溶解および治療機能が低下し (Loeffler et al., 1992)、シグナル発生分子の発現と機能の変化が劣化した。CD3 鎖は、TCRの重要なシグナル変換成分であるばかりでなく (Romeo and Seed, Cell 64, 1037, 1991)、T細胞ハイブリドームにおけるTCR-CD3複合体の組立発現および膜発現を制限するサブユニットでもある (Weissman et al., Science 239: 1018, 1988)。TCR-鎖またはCD3-鎖を欠失した細胞では溶解機能が低下する。Schmitt, Verhuisi et al., Nature 325: 628 (1987)。腫瘍を持つマウスのT細胞にCD3 あるいはCD3 が不存在であることの影響は明らかではない。

【0096】

CD3⁺、NK1.1⁺、CD16⁺、CD4⁻およびCD8⁻としての特徴を持ち、鎖の代わりにFc 鎖を発現する大型粒子のTリンパ球 (large granular T-lymphocytes: LGLs) の細区分については、既に説明がなされている (Koyasu, J. Exp. Med. 175: 203, 1992)。これらのリンパ球は、発現型から見ると、腫瘍を持つマウスのものとは異なっている。しかしながら、これらのLGLsは、溶解機能を持っている。したがって、標的細胞の溶解は、CD3 鎖の存在に依存するものではない。さらに、細胞毒性T細胞系中で発現したFc によって形成されるキメラ分子も、独自の溶解機能を持っている。このことから、特に二つの鎖の相同性の程度からみて、Fc と とは、溶解メカニズムに結合する場合、相互に交換できることが示唆される (Romeo et al., Cell 68: , 899 (1992))。

【0097】

2. 腫瘍を持つ哺乳動物のPLC とGAPの発現低下

ウェスタン法により、PLC- に対する抗体 (Upstate Biotechnologies Inc., Lake Placid, N. Y., 1: 5000で希釈) と抗GAP (同社, 1: 2000で希釈) を用いて行った実験データでは、腫瘍を持つマウスでは両抗体ともに発現が低下したことを示している。さらに、これらのシグナル変換媒介物質を癌患者において試験したところ、PLC- は低下したが、GAPは必ずしも低下することはない。

【0098】

3. 腫瘍を持つマウス (TBM) のキナーゼ機能の低下

LckとFynのキナーゼ機能 (リン酸化能力) の試験を行ったところ、腫瘍を持つマウスにおいて二つながらキナーゼ機能が低下したことを認めた。

【0099】

癌患者のTリンパ球の特性とタンパク質発現のレベル

同様に、ヒト癌患者においては、健康な、即ち腫瘍を持たない対照と比較して、CD3 タンパク質の発現が検出できないか、顕著に低下していた。ヒト癌患者におけるCD3 タンパク質の発現の分析も、ウェスタン法によって行った。例えば、腎臓細胞腫患者二名、眼のメラノーマから肝臓に転移している患者一名、および健康な対照一名から末梢血液を採取し、先ずリンパ球を単離、さらにこれから同数の細胞と等量のタンパク質を単離した。健康な対照では、CD3 タンパク質の発現が検出された。対照的に、腎臓細胞腫患者一名、および眼のメラノーマから肝臓に転移している患者一名のサンプルからはCD3 の発現は検出されなかった。第二の腎臓細胞腫患者では、CD3 タンパク質の発現は、95% 低下していた。これらの患者各々の癌存続期間は、30日以上であった。

【0100】

癌が進行すると、Tリンパ球の免疫抑制につながって行く。養子免疫療法におけるT細胞の抗腫瘍効果の喪失は、CD8⁺の細胞毒性機能の顕著な低下およびタンパク質の発現の変化と相関関係がある。

【0101】

メラノーマ、腎臓細胞腫、急性リンパ性白血病、多発性骨髄腫患者のデータでは、抗抗血清387を用いて測定したところ、若干の患者でCD3 鎖の発現が著しく低下したことが認められている (データは、Dr. Alan Weissman, NCIより恵贈された)。さらに、Fyn (UBI)、Lck (UBI)、およびPLC- (UBI) の低下も認められている。

10

20

30

40

50

【0102】

免疫が抑制されたT細胞のタンパク質発現の変化としては、TCRサブユニットタンパク質であるCD3 α とCD3 β の発現が完全に欠失したか、顕著に低下したこと、Fc γ R α が出現したこと、シグナル変換経路のタンパク質、特にLck、Fyn、PLC- γ およびGAPの発現が低下したことが挙げられる。これらの変化と相関関係を持ちながら、Ca²⁺を動員する能力が失われ、チロシンリン酸化のパターンが変化するのである。

【0103】

30日より長期にわたって腫瘍を持っているヒト癌患者三名においても、CD3 α の発現が完全に欠失するか、顕著に低下したことが観察されている。CD3 α や、CD3 β などのTCRサブユニットタンパク質の発現が低下した、Tリンパ球にFc γ R α が発現した、Lckや、Fynなどのシグナル変換経路タンパク質の発現が低下した。これらと相関関係を持ちながら、T細胞の機能も同様に変化し、細胞毒性が失われ、刺激を受けるべき能力も失われた。通常はCD3 α をも発現するNK細胞が、CD3 α の発現が失われるのとともに、免疫反応性の低下を示すことがありそうである。

10

【0104】

メラノーマ患者では、NF- κ B/relタンパク質のパターンが非癌状態のパターンとは異なっており、c-relとc65とが核調製物から姿を消していた。この結果は、癌検出のためにNF- κ B/relパターンの分析の使用を裏付けるものである。動物モデルでは、このパターンの変化は、CD3 ζ の発現レベルよりも早く検出できるので、ヒト癌患者においてもこのパターンの分析によって、本発明のその他の検定法よりも早期検出が可能となりうる。臨床徴候前に検出すること、即ちスクリーニング検定法が考えられる。

20

【0105】

免疫抑制検定法

本発明の一態様は、免疫抑制のレベルを測定する検定法を提供することである。これらの検定法は、例えば養子免疫療法、あるいは器官移植について患者の適否を評価する上で有用である。検定は、Tリンパ球の免疫抑制のレベルを予告することで知られているタンパク質を選んで、このタンパク質の発現の変化を測定する。検定対象として選択するタンパク質としては、TCRサブユニットまたはシグナル変換経路のタンパク質一個、あるいは両タンパク質の組合せセットなどが挙げられる。こうして選んだCD3 α やCD3 β などのTCRサブユニットタンパク質の発現が低下したり、あるいは、Lck、Fyn、PLC- γ またはGAPなどのT細胞シグナル変換経路タンパク質の発現が低下したり、あるいは、T細胞またはT細胞サブセットでFc γ R α の発現が増加したりすることは、免疫が抑制されている状態を示すものである。Tリンパ球またはT細胞サブセットでのタンパク質の発現の変化は、効果的な養子免疫療法に必要とされるT細胞を刺激する能力の喪失に関連している。

30

【0106】

一般に、TCRタンパク質の発現と、免疫抑制との間には明確な関係がある。すなわち、タンパク質の発現が低下するにつれて、免疫療法に対する細胞の反応も低下する。悪性腫瘍の進行に対するヒトやその他の動物の反応は、ネズミの体内で観察されたのと同じ方向に反応する。

【0107】

また、TCRサブユニットタンパク質、シグナル変換経路タンパク質、あるいはNF- κ B/relタンパク質系の転写因子のパターンを分析して、免疫抑制検定を行う。パターンとしては、タンパク質少なくとも一個の存在の有無を挙げるができる。また、パターンが、ウェスタン法または同様の方法によって測定して、存在、不存在それぞれ0または1のベクトル量であることもある。この系の成分に対する抗体は、タンパク質の存在、不存在を測定するのに有用である。正常状態では存在していなければならないタンパク質が、異常状態では一以上の分子量が異なるものに置き代わっている場合がある。このような場合、置き代わったタンパク質中には存在していないタンパク質に対する抗体は、置換が既に行われてしまったか、否かを確かめるために使用することができ、このとき置換が行われてしまっていたら、複合体は形成されない。

40

50

【0108】

タンパク質発現のレベルの測定方法

TCRサブユニットタンパク質、Fc_γ、あるいはT細胞シグナル変換経路の発現レベルは、免疫抑制検定に用いるのに好適である。これには、タンパク質一種を単独使用しても良いし、一種以上を併用しても良い。従来の方法、よく知られている方法のうち、多くの方法がTリンパ球のタンパク質の発現レベルを評価するのに適している。患者から組織あるいは血液などの体液のサンプルを採取し、TCRサブユニットタンパク質、Fc_γ、またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現レベルを測定する。サンプルは、腫瘍組織、脾臓組織、リンパ系組織、末梢血液細胞、能脊髄液、胸膜滲出液、および腹水など各種の組織から採取する。

10

【0109】

組織サンプルや、細胞サンプルからタンパク質抽出物を作って、これを分析して直接タンパク質の発現レベルを測定する。これとは別に、T細胞、あるいはT細胞サブセットを精製した後、タンパク質の発現レベルを測定する方法もある。T細胞やT細胞サブセットの精製は、ロゼット形成といった従来からある技術のいずれかと、それに続くフィコール-ハイパック (Ficoll-Hypaque) 勾配遠心法、間接パンニング法、抗体/補体媒介細胞毒性法、免疫磁気精製法、流動細胞計測法その他同様の方法などによって行う。さらにCD3などの抗体を使って、TCRの免疫沈降 (immunoprecipitation) を行うことができる。TCRからなるサブユニットタンパク質は、当業者に周知の方法によるウェスタン法を用いて分析する。

20

【0110】

タンパク質発現のレベルは、免疫蛍光法、ELISA、ウェスタン法その他同様の技術など周知の方法を使って測定する。これら周知の方法でタンパク質を分析する場合、組織サンプル、体液サンプル、あるいはこれらのサンプルから採取したT細胞や、T細胞サブセットから抽出物を作成する。既知のラベルと共役させて、当業者に周知の方法により特定のタンパク質検出に特異性を持つ抗体を作ることができる。

【0111】

タンパク質発現検定法による器官移植の臨床分析

本発明の方法は、器官組織の移植のモニターリング、および促進に有用であると考えられる。現在のところ、移植に予定されている患者には、術前に各種の治療を実施して免疫寛容のレベルを上昇させようとする。これら治療のうちには、白血細胞や、全血を反復輸血することがある。

30

【0112】

本発明の溶解性免疫抑制因子を製薬的に許容できる賦形剤に配合して、患者に投与すれば、免疫抑制が誘導される。有効量は経験的に決定される。移植手術の準備段階で、特定TCRサブユニットタンパク質、Fc_γ、およびTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質をモニターし、患者の免疫抑制のレベルを測定、したがって移植が実施出来る程度まで患者の免疫系が抑制されたことを確認することができる。

【0113】

本発明の方法により患者の免疫抑制のレベルを測定し、その情報が提供されるので、免疫寛容を維持するための施術をタイミング良く行うことができる。本発明のスクリーニング法により免疫抑制を増進する薬剤が開発されている。この薬剤は、移植患者の術前準備と管理に有用性があると期待されている。

40

【0114】

免疫療法対象患者の選別

医師が治療戦略を決める場合、患者自身のTリンパ球のTCR関連タンパク質の発現を検定し、患者の免疫抑制のレベルを分析して、細胞を刺激して効果のある免疫療法を行うことができるか、成否を予測する。この予測は、患者自身の細胞を使用する療法、例えばサイトカイン療法や、自系養子療法の場合に有用である。さらに、患者自身のT細胞の免疫が抑制されている場合、本発明によりT細胞を分析されたT細胞を、同種異系または同系治療

50

プロトコルのために、選択することが考えられる。養子免疫療法が考慮されない場合であっても、免疫抑制のレベルを分析していれば、抗菌剤、免疫刺激剤などの投与時期の決定において医師の役に立つことが期待される。もう一つの用途として、自己免疫の場合または移植手術前、免疫抑制をモニターして置いて、投与しようとする抑制剤の至適濃度を決定すること、および移植のタイミングを決定することがある。

【0115】

特定タンパク質の発現のレベルあるいはパターンによって免疫療法、例えば自系養子免疫療法の患者を選別する。選別基準は、発現のレベルおよび/またはパターンがリンパ球の刺激に対する反応のしきい値以下であってはならないことである。リンパ球の刺激に対する反応のしきい値のレベルは、疾患と特定タンパク質の組合せ毎に経験的に誘導し、さらに正常な免疫反応を示すと考えられる個体とも関連させる。例えば、特定タンパク質と特定疾患のある組合せにおいて、自系免疫療法を効果あるものにするためには、健康な個体と実質的に同等なレベルでこの特定タンパク質が生成されなければならないとされる場合もあろう。あるいはまた、特定タンパク質と疾患の別の組合せにおいて、この特定タンパク質の比較的低いレベルでも、自系養子免疫療法が効果あるものとなることもあろう。

10

【0116】

さらに、ノザンハイブリッド形成法 (Northern hybridization) または in situ ハイブリッド形成法 (in situ hybridization) を含む各種方法によって、T細胞や、T細胞サブセット中の特定タンパク質をコード化している遺伝子を確認する方法もある。この遺伝子がTリンパ球でのみ発現することが分かっているならば、組織サンプルや、細胞サンプルからRNAを単離する。さらにまた、従来法を用いてこれらのサンプルからT細胞あるいはT細胞サブセットを作り、これを精製することによってRNAを得ることができる。RNAは、標識DNAまたはハイブリッド形成プローブとハイブリッドを形成し、特定タンパク質をコード化している mRNA を特異的に検出する。

20

【0117】

さらにまた、養子免疫療法の患者の選別は、その患者の発現率を基準にして行う。発現率 (E. R.) は、特定TCRサブユニットタンパク質、またはTリンパ球シグナル変換経路タンパク質を発現するT細胞の数を、計測したT細胞の全数で割ったものである。発現率は、例えば次の文献において説明されている方法により、二色または三色流動細胞計測計 (two-color or three-color flow cytometry) を用いて測定することができる。Current Protocols in Immunology, Vol. 1, J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober (eds.), Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, 5.1.1-5.4.15 (1991)、この文献は引用することにより本明細書の一部とする。

30

【0118】

膜の内側にあるTCRの成分、またはシグナル変換経路の成分については、細胞が標識まで透過できるようにしてある。例えば、患者から単離されたリンパ球は、各々異なる染料と共役している、二つの異なる抗体に暴露される。そのうち、一つの抗体は、特定のTCRサブユニットタンパク質あるいはTリンパ球シグナル変換経路タンパク質を発現する細胞を検出するために用いられるもので、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) などの染料と共役している。第二の抗体は、CD3などすべてのT細胞中のタンパク質と結合するもので、フィコエリトリンなどの第二の染料と共役している。特定TCRサブユニットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路タンパク質を発現するT細胞のフラグメントは、流動細胞計測計を使い、サンプルを分析して測定する。

40

【0119】

上記のように、タンパク質の発現のレベルあるいはパターンによって、自系養子免疫療法の患者を選別する。選別基準は、発現がリンパ球の刺激に対する反応のしきい値以下であってはならないことである。リンパ球の刺激に対する反応のしきい値のレベルは、疾患と特定タンパク質の組合せ毎に経験的に誘導する。

50

【0120】

例えば、特定タンパク質と疾患のある組合せにおいて、自系免疫療法を効果あるものにするためには、少なくとも50%のT細胞がこの特定タンパク質を発現 (E. R. =0.5) しなければならないとされる場合もある。あるいはまた、特定タンパク質と疾患の別の組合せにおいては、この特定タンパク質は少なくとも70%のT細胞によって発現 (E. R. =0.7) されなければ自系養子免疫療法が効果あるものとはならないこともある。特定タンパク質と疾患のさらに他の組合せでは、p65の存在が必要となる場合もある。

【0121】

化学療法と放射線療法の効果および 癌手術のモニタリング

化学療法、放射線療法、あるいは手術が効果があって、腫瘍の大部分を取り除くことができる場合には、免疫抑制されていたタンパク質は正常なレベルとパターンに戻る。このような改善を本発明の方法によってモニターする。 10

【0122】

従来の治療方法とプロトコルを使用して、本発明の方法を補完することが考えられる。非生物治療法、例えば化学療法を用いて、腫瘍の大きさ、患者の負荷が減少するにつれて、免疫抑制のレベルも低下する。さらに、本発明の方法により免疫抑制を逆転する薬剤を決定する。これらの治療を実施し、薬剤を投与した後で、自系養子免疫療法によって補完する。本発明の方法により患者の免疫抑制のレベルを測定、例えば特定のTCRサブユニットタンパク質、Tリンパ球のFc γ 、およびNF- κ B / rel系のタンパク質を測定して自系養子免疫療法の効果的なタイミングを予測する。 20

【0123】

自系養子免疫療法を補完するのに好適な方法としては、手術、放射線、あるいは化学療法剤や、一般医薬品による治療を挙げることができる。化学療法剤、一般医薬品の例としては、すべてのサイトカイン類、シクロホスファミド、アドリアマイシン、ステロイド類、フラボノイド類、およびIL-2、成長ホルモン類、シメチジン、クロロキン、アスピリン、イブプロフェン、インドメタシン、およびレバミゾールなどの腫瘍の大きさや、負荷を縮小する薬剤がある。

【0124】

Tリンパ球の免疫抑制を阻止する異なる幾つかの方策がある。組替え法でTリンパ球の免疫療法活性を回復する。また、免疫抑制されている細胞に特定タンパク質をコード化している遺伝子からなる発現ベクターを導入すると、免疫抑制細胞の特定TCRサブユニットタンパク質や、Tリンパ球シグナル変換経路タンパク質の発現レベル、あるいはNF- κ B / relが回復する。組替え加工された細胞で遺伝子が発現すると、リンパ球に正常レベルのタンパク質が回復する。これらの組替え加工されたリンパ球を刺激して、ここで説明する補完方法の何れかを併用する養子免疫療法を実施する。 30

【0125】

リポゾームデリバリーシステム

IL-2などの遊離サイトカイン類は、本発明の方法に好適であるが、サイトカインをリポゾーム中に組み入れてデリバリー (送達) システムとすることが好ましい。リポゾームはリン脂質賦形剤で、リポゾーム製造に用いた溶質とリン脂質の相互作用如何ではあるが、サイトカインその他の生活性化合物の指定量を収容することができる。リポゾーム埋封サイトカイン類の製造方法はアメリカ合衆国同時係属出願第07 / 382,778号において開示されている。この開示すべてを引用することにより本明細書の一部とする。 40

【0126】

リポゾームに好適な投与経路はいくつかあり、例として静脈注射、皮下注射、腹腔内投与、経口投与を挙げることができる。生活性成分の遊離剤形と比較して、リポゾームデリバリーには組織分布と結合特性が優れていると言う長所があり、治療指標は上昇し、毒性は低下する。

【0127】

IL-2リポゾームによるマウスの治療

(14日に渡って腫瘍を持つ)マウスにIL2-リポゾームを腹腔内投与(50,000U/マウス/1日×5日間)して、二つの実験を行った。マウスを腫瘍注入後32日目に殺して、脾臓リンパ球の発現を検討した。IL2-リポゾームを投与したマウスにおいて、鎖は正常レベルであったが、無処置のマウスでは、この鎖の発現は完全に欠失していた。したがって、IL2-リポゾームは、腫瘍に誘発されて欠失するのを防止している可能性がある。しかしながら、リポゾームがT細胞を非特異的に膨張させるため、膨張した集団によっての欠失が隠されている可能性も否定できない。

【0128】

刺激したT細胞の臨床使用

本発明の一態様では、刺激したT細胞を採取し、有機体の本体、好ましくはマウス、ヒトなどの哺乳動物中にこのT細胞を入れた後、IL-2を投与すると、免疫療法の作用、例えば細胞毒性作用や、リンホカインの生成が推進される。より好ましくは、この細胞を人体中に入れて免疫療法で治療する。この細胞は、S. A. Rosenbergのアメリカ合衆国特許第4,690,915号で開示されているものを含む従来から周知の方法と経路の何れを用いても、患者に投与することができる。上記の特許は引用することにより本明細書の一部とする。経路の例としては、静脈内、動脈内、腔内(intracavitary)の投与があり、胸膜腔内、腹腔内、鞘内、嚢内などの投与を含む。

10

【0129】

一般に、in vivoでIL-2の有効量を投与すると、細胞の増殖と抗腫瘍活性が昂進する。IL-2の投与期間は、好ましくは約7日間である。in vivoで細胞増殖と免疫療法活性を昂進させる有効量は、治療を受けている哺乳動物如何にかかっている。例えば、マウスの投与量は、IL-2 10,000~70,000単位/1日、好ましくはIL-2約50,000単位/1日であるが、ヒトの投与量は、約 1×10^6 ないし 6×10^6 国際単位/m²/1日である。

20

【0130】

前章で説明した通り、T細胞は、始めにIL-2の有無にかかわらず抗CD3 MAbで24時間以下刺激することが好ましい。所望の場合、IL-2と抗CD3 MAbとを初度培養に入れることを本発明の一部とする。ただし、このことは適当であり、同様の結果を得ることができるが、少なくともIL-2のため望ましくない費用がかかるので必ずしも好ましくはない。むしろ、細胞を抗CD3 MAbだけで刺激し、刺激した細胞を採取して、免疫抑制された哺乳動物に注入し、その後IL-2を哺乳動物に投与することが好ましい。

30

【0131】

インターロイキン2は、市場から入手できるT細胞成長因子である。ラットスプレノサイトス(rat splenocytes)の培養物、あるいはジャーカット細胞系(Jurkacell line)から誘導される天然産IL-2でも、また組替えIL-2(rIL-2)のどちらでも好適である。本発明においては、この他のサイトカインを用いて、サイトカイン-活性化細胞を生成することができるを信じられている。これには、天然サイトカイン、組替えで生成したサイトカインのどちらを用いても良い。これらのものの例としては、IL-1、IL-4、IL-6、IL-12、TNF、GM-CSFインターフェロンなどがある。使用方法としては、サイトカイン一種の単独使用、IL-2を含む他のサイトカインとの併用で、併用するサイトカインを培養基に添加したり、患者に投与するなどがある。rIL-2、フラボノイドと化学療法剤の併用は、少なくとも動物モデルにおいて腫瘍を縮小するのに有効である(Wiltrout et al., 1991)。この抗腫瘍反応にはT細胞を欠くことはできない。Current Protocols in Immunology, Vol. 1, J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober (eds.), Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, 2.4.1-2.10.3 (1991)。

40

【0132】

免疫回復剤の使用

本発明の方法を用いて決定した免疫回復剤は、免疫抑制を逆転することができるので、進行性免疫抑制を特徴とする疾患の治療に有用であると考えられる。これは、先ず哺乳動物のTリンパ球標本を用意する。ただし、この標本は、TCRサブユニットとシグナル変換経

50

路の特定タンパク質うち少なくとも一種の発現レベルまたはNF- κ B/relタンパク質のパターンが、健康な、免疫抑制がない同一の哺乳動物種個体と比較して正常値以下である。このリンパ球標本を試験対象薬剤、一般には免疫抑制を逆転すると思われる薬剤の存在下で培養する。その後特定タンパク質の発現レベルおよび/またはパターンを測定する。また、TCTサブユニットタンパク質、またはTリンパ球シグナル変換経路タンパク質の発現が正常値以下の患者にこの薬剤を投与し、治療後にこの患者からサンプルを採取して前記のタンパク質の発現レベルを測定する方法をとっても良い。

【0133】

このようにして得た薬剤は、TCRサブユニットあるいはTリンパ球シグナル変換経路の特定タンパク質の発現のレベルを顕著に増加させ、および/または、NF- κ B/rel系のタンパク質の存在を回復することができる。したがって、この薬剤は病気の動物あるいは人間の免疫抑制を逆転する方法となる。投与方法としては、任意にこの薬剤を単独投与するか、あるいはT細胞表面レセプター抗体および/またはサイトカインと併用投与して、リンパ球を刺激して患者の免疫抑制を逆転させる。また、患者からリンパ球を単離して*in vitro*で薬剤により処理し、養子免疫療法として患者に投与しても良い。例えば、リンパ球をフラボノイドの存在下で培養することもできる。このようにして得たリンパ球は、*in vitro*または*in vivo*で刺激する。この場合、リンパ球の単独使用でも良いし、T細胞表面レセプター抗体および/またはサイトカインと併用しても良い。

【0134】

患者によっては薬剤のある組合せには反応しないが、他の組合せには反応するので、この点を確認評価する。例えば、抗CD3に反応しない患者が、フラボノイドとIL-2を加えることにより反応するかも知れない。難治であった患者が、薬剤を追加することで救われることもある。

【0135】

組替え技術による免疫機能の回復

当業者に周知の方法を用いることによって、特定の遺伝子を担持するベクターを形成し、このベクターを免疫抑制されているT細胞に導入することができる。免疫機能を回復するため、免疫回復剤をコード化している遺伝子をベクターに含ませる。この遺伝子は本発明の免疫抑制因子に対するアンチセンス遺伝子にもなり得る。遺伝子はプロモーターに結合する。このプロモーターは一般に調節可能なプロモーターである。リン酸カルシウムトランスフェクション、あるいはエレクトロポレーション (electroporation) によるトランスフェクションなどの周知のトランスフェクションプロトコルを用いて、ベクターをTリンパ球内に導入する。この特定遺伝子は、周知のベクター、例えばレトロウイルスベクターを使って、T細胞内に導入されて、発現する。Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al. (eds.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 9.0.1-9.14.3 (1989)。

【0136】

CD3 鎖の再発現

下記の併用剤の何れかを含有する組織培養基 (RPMI1640⁺添加剤、ただしウシ胎児血清は加えていない) により、腫瘍を持つマウスから採取したリンパ球を48時間培養したところ、CD3 鎖が再発現した。

【0137】

- A. イノマイシン (1 μ g/ml)
(Calbiochem, La Jolla, CA)
- B. イノマイシン⁺ホーボルミリスティックアセテート
(10ng/ml) (Phorbol Miristic Acetate)
(Chemsyn Science Labs., Lenexa, Kansas)
- C. イノマイシン+IL2 (300U/ml)
- D. イノマイシン+PMA+IL2
- E. イノマイシン+抗CD3+IL2

10

20

30

40

50

F. 抗CD3モノクローナル抗体 (10mg/ml)

G. フラボノイド類+IL-2

H. 抗CD3+フラボノイド類

免疫抑制剤の使用

本発明の方法により決定された免疫抑制剤は、自己免疫性疾患の治療に有用であると考えられる。この点で特に興味のあるものは、T細胞の免疫抑制の原因である腫瘍から形成した溶解性因子である。これらの薬剤の決定方法は、次の通りである。まず、哺乳動物のリンパ球の標本を用意する。この標本では、少なくとも一種のTCRサブユニットの特定タンパク質またはシグナル変換経路のタンパク質が健康な同一の哺乳動物種個体と比較して正常である。また別に、NF- κ B/reIのパターンが変化したか、否かの検定を行う。このリンパ球標本を、免疫抑制を起こすと考えられる薬剤の存在下で培養し、前記タンパク質の発現のレベルおよび/またはパターンを測定する。あるいは、この薬剤を健康な個体に投与し、TCRサブユニットの特定タンパク質のうち少なくとも一種、またはリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現のレベルを測定する方法によっても良い。薬剤を単離した後、免疫抑制している上澄み液を分画して活性画分を探すことによりさらに精製し、定量分析法を適用して因子の特性を同定する。

10

【0138】

このようにして得た薬剤は、TCRサブユニットの特定タンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現のレベル、および/またはNF- κ B/reIのパターンを低下させることができる。したがって、これらの薬剤は、動物またはヒトにおいて免疫抑制を誘導する方法となる。これらの薬剤、すなわち本発明の溶解性免疫抑制因子は哺乳動物に投与する。あるいは、少なくとも溶解性因子の免疫抑制を起こす部位をコード化するヌクレオチド配列を、一般には服用動物の細胞にトランスフェクトした後、哺乳動物に投与しても良い。

20

【0139】

本発明の特異性があり、且つ最良の実施態様を次の実施例により説明する。これらの実施例は、如何なる方法においても本発明を限定するものと解釈してはならない。さらにまた、本発明の精神と範囲内に留まりながら多くの変化または変更が可能であることを理解すべきである。

【0140】

30

実施態様例

1. 哺乳動物の細胞サンプルにおける免疫抑制のレベルを測定方法であって、

a) 哺乳動物の細胞サンプルの核抽出液におけるNF- κ B/reI系の転写因子パターン、もしくは、哺乳動物の細胞サンプルにおけるTCRサブユニットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現レベルを測定するステップと、

b) 前記転写因子のパターンまたは前記タンパク質の発現レベルと、非免疫抑制の同種の哺乳動物の個体における転写因子のパターンまたはタンパク質発現レベルとを比較し、かかる非免疫抑制の個体の転写パターンから顕著な差違またはそのタンパク質発現レベルから顕著な減少があれば、それを哺乳動物における顕著な程度の免疫抑制を示すステップと

40

を含んでなることを特徴とする方法。

【0141】

2. 哺乳動物Tリンパ球の免疫抑制を引き起こす薬剤同定する方法であって、

a) サンプルの核抽出液にあるNF- κ B系の転写因子のパターンが非免疫抑制の個体のパターン特徴を有し、あるいは、TCRサブユニットタンパク質またはTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質の発現レベルが非免疫抑制の同種の哺乳動物の個体のレベル特徴と同等である、哺乳動物のTリンパ球の製剤を用意するステップと、

b) 前記リンパ球の製剤を免疫抑制させると考えられる薬剤の存在下でかかる製剤を培養するステップと、

c) 前記NF- κ B系の転写因子のパターンもしくは前記タンパク質の発現レベルを測定

50

するステップと、

d) 前記薬剤の存在において培養されていないTリンパ球製剤に比べると、そのNF- B系の因子の転写パターンに対し顕著な変化と、そのタンパク質の発現レベルより顕著な減少とを引き起こす薬剤を同定するステップとを含んでなることを特徴とする方法。

【0142】

3. 哺乳動物Tリンパ球の免疫抑制を逆転させる薬剤を同定する方法であって、

a) 免疫抑制の哺乳動物からそのTリンパ球製剤を用意するステップであって、そのNF-B系の因子の転写パターンが、非免疫抑制の同種の哺乳動物個体のパターンに比べて顕著な変化を有し、もしくは、そのTCRサブタンパク質またはシグナル変換経路のタンパク質の発現レベルが、非免疫抑制の同種の哺乳動物個体のレベルの比べて低いことを特徴とするステップと、

10

b) 免疫抑制を逆転できると思われる薬剤の存在下において、前記リンパ球の製剤を培養するステップと、

c) 培地中における前記NF- B系の因子の転写パターンまたは前記タンパク質の発現レベルを測定するステップと、

d) 非免疫抑制の同種の哺乳動物の個体の同様なサンプルパターン特徴に比べると顕著な差違を示さない、NF- B系の因子の転写パターンにおける顕著な変化、または前記タンパク質の発現レベルにおける顕著な増加を引き起こし薬剤を同定するステップとを含んでなることを特徴とする方法。

20

【0143】

4. (1) TCRサブタンパク質またはシグナル変換経路のタンパク質と、(2) NF- B系の転写因子とのいずれかに対する抗体を有する別々の容器(A)と抗体-抗原複合体の形成検出手段(B)とを含んでなる免疫抑制モニター用キット。

【0144】

5. 免疫抑制または腫瘍の持つ哺乳動物のin vivoにおいて、NF- B系の転写因子系のp50の分解により形成される実質的に純粋なポリペプチド。

【0145】

6. 免疫抑制を持つ哺乳動物から採取するTリンパ球の核抽出物中のp50には存在するが、p50に置き換わるタンパク質には存在しないアミノ酸配列に対する抗体。

30

【0146】

7. 前記哺乳動物細胞のサンプルが、リンパ球製剤であることを特徴とする実施態様例1の哺乳動物のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

【0147】

8. 発現のレベルが、発現率として測定され、カウンターされたTリンパ球の総数に対して前記タンパク質を発現するTリンパ球数の率として定義されることを特徴とする、実施態様例1の哺乳動物の細胞サンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

【0148】

9. 前記リンパ球の製剤が、脾臓組織、末梢血(peripheral blood)、腫瘍組織、リンパ腺組織、髄液、胸水と腹水を含む組織から調整されるものであることを特徴とする、実施態様例1の哺乳動物細胞のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

40

【0149】

10. 前記TCRサブタンパク質がCD3 を含んでなることを特徴とする、実施態様例1の哺乳動物細胞のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

【0150】

11. 前記シグナル変換経路タンパク質が、scr系のチロシンキナーゼを含んでなることを特徴とする、実施態様例1の哺乳動物細胞のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

【0151】

12. 前記チロシンキナーゼがFynまたはCckであることを特徴とする、実施態様例1の

50

哺乳動物細胞のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

【0152】

13. 前記シグナル変換経路タンパク質が、PLC またはGAPであることを特徴とする、実施態様例1の哺乳動物細胞のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

【0153】

14. c-rel、p65、p50、p48とp44の存非によって、パターンが測定されることを特徴とする、実施態様例1の哺乳動物細胞のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。

【0154】

15. リンパ球製剤から分離されたタンパク質全体のマイクログラム当たりの前記タンパク質の量として、前記発現レベルが定義されることを特徴とする、実施態様例1の哺乳動物細胞のサンプルにおける免疫抑制のレベルを測定する方法。 10

【0155】

16. 前記薬剤がin vivoに存在することを特徴とする、実施態様例2の哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を逆転する薬剤を同定する方法。

【0156】

17. p44とp48からなるグループから選択され、免疫抑制されたまたは腫瘍を持った哺乳動物のinvivoにおいて、NF- κ B系の転写因子の一員のp50の分解により形成される実質的に純粋なポリペプチド。

【0157】

18. 前記抗体が、免疫抑制を持つ哺乳動物から採取するTリンパ球の核抽出物中のp50には存在するが、p50に置き換わるタンパク質には存在しないアミノ酸配列に対する抗体であることを特徴とする、実施態様例4の免疫抑制モニター用キット。 20

【実施例1】

【0158】

長期腫瘍を持つマウスから単離したT細胞の抗腫瘍効果の欠失

長期TBMからT細胞を単離して、養子免疫療法に使用しても何らの抗腫瘍効果も検出することはできない(本発明に言う「長期」は「後期」と互換できるものとする)。C. M. Loeffler et al., Cancer Res., 51: 2127 (1991)で説明されているように、T活性化キラー(T-AK)細胞の世代は立証されている。この文献は引用することにより本明細書の一部とする。C57BL/6ネズミスプレノサイト(murine splenocytes)をフィコール-パック勾配遠心法(Ficoll-Paque Gradient)により処理して、リンパ球を単離した。HBSS(GIBCO, Grand Island, NY)で二回洗った後赤血球(RBC)を蒸留水で溶解し、残りの単核細胞数を計算した。その後、細胞をマウスT細胞急速アフィニティクロマトグラフィカラム(Biotex Laboratories Inc., Edmonton, Canada)に置いて、T細胞を濃縮した。細胞はHBSSで二回洗い、抗CD3 MAb(145-2C11)とIL-2(比活性 1.5×10^7 U/mg; Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ)で活性化した。T濃縮細胞は、濃度 1.5×10^6 細胞/mlのRosewell Park Memorial Institute(RPMI) 1640(GIBCO, Grand Island, NYから入手)からなるTCM、これにHEPES [N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)] 25mM、L-グルタミン 2mM、ウシ胎児血清 5%、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、非必須アミノ酸 10mM、ピルビン酸ナトリウム 100mM、および2-メルカプトエタノール 25 μ Mを添加してある培養フラスコで、インキュベートした。T-AK細胞を発生させるため、TCM 1mlにつき145-2C11 MAb 25 μ gを加えた。細胞は5%CO₂の気流下37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした後、採取して、HBSSで二回洗い、IL-2 30U/mlを含むHBSS中に再懸濁し、細胞数を計算して、マウスに注射した。 30 40

【0159】

リポゾームに包埋したIL-2(IL-2リポゾーム)と併用するT-AK細胞の治療効果の判定方法を、C. M. Loeffler et al., Cancer Res., 51: 2127 (1991)で説明されている通りに作成した。この文献を引用することにより本明細書の一部とする。

【0160】

MCA-38細胞約 3.0×10^5 個をHBSS 0.5mlに懸濁したものを、30ゲージの注射針を用いて生後6～8週のC57BL/6マウスの脾臓内に注射した。C57BL/6マウス少なくとも10匹により各群を構成した。3日後、健康マウス、初期TBM(14～21日間存続の皮下腫瘍)、後期TBM(30日間以上存続の皮下腫瘍)、それぞれに由来するT-AK 4.0×10^7 をマウスの静脈内に一回投与した。さらに、腫瘍接種後3～7日間、1日1回IL-2リポゾーム(1日当り50,000U)をマウスに腹腔内投与した。腫瘍接種後12日目に各群の肝臓転移数を評価した。マウスに麻酔を施し腸間膜静脈に15%墨汁(India ink solution) 2mlを注射した。肝臓を摘出してFekete液(70%エタノール300ml中にホルマリン30mlおよび氷酢酸15mlを配合)中に入れた。肝臓転移数を計算した後、スチューデント法により動物群間の差異の意味を評価した。

10

【0161】

図1のデータは、三つの異なる実験の代表的な成績を示している。未処置のマウスでは、11日目までに 236 ± 30 の肝臓転移が起こっていた。腫瘍を持たないマウス(「健康」)のT-AK細胞で処置したマウスでは、 99 ± 23 の肝臓転移があった反面、初期TBMから形成したT-AKではさらに大きく減少し、 48 ± 16 の転移であった。後期TBMからのT-AK細胞は、何らの治療効果を示すことが出来ず、転移数は 2229 ± 41 であった。T-AK細胞は、後期TBMから形成すると、治療効果が劇的に低下する。

【実施例2】

【0162】

長期TBM由来Tリンパ球のIn Vitro細胞毒性の著しい低下

20

長期TBM由来リンパ球のin vitro細胞毒性が、非悪性状態から著しく低下している。このため、T-AK細胞をエフェクターとする標準クロムリリースアッセイ(chromium release assay)を行った。このT-AK細胞を、先ず抗CD3で刺激した後、rIL-2 100Uと共に培養基中に保持した。検定は、培養第2日目、第4日目、第7日目に実施した。標的腫瘍(4×10^6 /ml)は、Na⁵¹CrO₄(1000μCi/ml; New England Nuclear Products, Boston, MA) 150μCiと共に37℃で60分間インキュベートした。標的腫瘍はTCMで二回洗い、培養基中に再懸濁し、細胞数を計算した。T-AKエフェクター細胞を二回洗い、U型底マイクロタイタープレート(Costar)中で三個づつアリコートを生じた後、二倍の連続希釈を行って、エフェクター:標的細胞の比率が24:1～3:1となるように連続して二倍に希釈した。ウェル1個につき標的細胞5,000個を加えた。自発リリースウェル(spontaneous release well)には、培養基中の標的細胞のみを入れた。最大リリースウェル(maximum release well)には、洗剤中の標的細胞を入れた。プレートは、5%CO₂の気流下で37℃で4時間インキュベートした。上澄み液を採取して、ガンマカウンター(LKB 1272)で放射能を測定した。比細胞毒性は、次の式によりパーセンテージを計算した。

30

【0163】

【数1】

$$\frac{\text{実験的平均cpm} - \text{自発平均cpm}}{\text{最大平均cpm} - \text{自発平均cpm}} = \% \text{細胞毒性}$$

40

【0164】

培養第2日目では、細胞毒性活性は初期TBM細胞が一貫して最も高く(図2)、腫瘍なし細胞(健康)、あるいは後期TBM細胞のそれは低かった。培養第4日目において、健康マウス由来細胞の溶解機能が顕著に増加したが、それでも初期TBMの溶解機能が最高であった(図3)。後期TBMリンパ球の溶解機能が最低であった。

【0165】

培養開始後7日で後期TBMリンパ球の溶解機能が、とにかく著しいと言える程度増加した(図3)。同系の標的細胞MBL2(リンパ腫)、および同種異系の標的細胞RENCA(腎臓細胞腫)に対しても溶解活性を示すのが観察された。細胞毒性の絶対レベルは標的によっ

50

て異なっていたが、初期TBM細胞が一貫して最も効果が高く、後期TBMの活性が常に最低であった。

【0166】

初期および後期TBM由来のCD8⁺-濃縮標本を作成し、これを用いて細胞毒性の検定を行った。濃縮T細胞標本は、キットのマニュアルに従って、T細胞カラム (Biotex Laboratory Inc., Edmonton, Canada) を経由して、単個細胞スプレノサイト (splenocyte) 懸濁液を通過させて作成した。CD8⁺細胞に対して濃縮するために、T濃縮細胞を抗L3T4 (500 μg/ml; Becton Dickinson, Mountain View, CA) 1 μg / 1.0 × 10⁶個と共に4 で30分間インキュベートした。細胞は、HBSSで二回洗った。FC-特異性ヤギ抗マウスIgGを塗布した磁気ビーズ (Advanced Magnetics Inc., Cambridge, MA) をPBSで二回洗い、PBSと共にインキュベートし、ビーズ：細胞比率を25：1として、4 で30分間T濃縮細胞と混合した後、磁気分離機 (Advanced Magnetics) で分離した。最後のステップは二回繰り返した。結合していない細胞を除き、HBSSで二回洗った。CD8⁺濃縮細胞には、汚染細胞であるCD4⁺が2%含まれていた。濃縮細胞標本の発現型を分析した結果ではCD8₊含量は95%以上であった。

10

【0167】

CD8₊濃縮細胞は、非分離のリンパ球と同様の溶解活性を示した (表1)。ごく小数の汚染細胞の効果との混同を避けるため、さらにCD8⁺細胞をFACSによって正の分別を行い、抗CD3⁺ IL-2と共に培養し、溶解機能を試験した。さらに、新鮮はスプレノサイト (splenocyte) 標本 (Thy1.2⁺細胞95%以上) のT濃縮細胞からFACSにより正の細胞選択 (positive cell selection) を行った。これにより得た細胞を、抗Lyt. 2 FITCおよび抗L3T4 (500 μg/ml; Becton Dickinson) 1 μg / 1.0 × 10⁶個と共に4 で30分間インキュベートした。これらの細胞をFACStar Plus流動細胞計測計 (Becton Dickinson) 上でFITC⁺ (CD8⁺細胞) とPE⁺ (CD4⁺細胞) とに分別した。

20

【0168】

初期TBMCD8⁺リンパ球の溶解活性は、やはり最高で、後期TBM細胞のそれは、最低であった (表1)。すべての実験において、エフェクター細胞が濃縮T細胞であっても、濃縮CD8⁺であっても、あるいはまた純粋なCD8⁺であっても、同様な成績であった。培養開始の7日後、後期TBMCD8⁺細胞の細胞毒性が増加したが、これはもともと抑制されていたCD8⁺の溶解機能が増加したためか、あるいは抑制されることがなかったCD8⁺の小さなサブセットが大きくなったためであると思われる。

30

【0169】

【表 1】

表 1
健康マウス、初期TBM、後期TBM^aの
T細胞の細胞毒性活性

| | 溶解性 U / 10 ⁷ 細胞 |
|---|----------------------------|
| T濃縮細胞 | |
| 健康マウス | 259 |
| 初期TBM | 319 |
| 後期TBM | 189 |
| CD8 ⁺ 細胞 (CD4 ⁺ 除去) | |
| 健康マウス | 254 |
| 初期TBM | 469 |
| 後期TBM | 162 |
| CD8 ⁺ 細胞 (正の分別) | |
| 健康マウス | 278 |
| 初期TBM | 1161 |
| 後期TBM | 125 |

a CD4⁺の除去または細胞の分別により形成したT濃縮、CD8⁺の細胞毒性の活性。細胞は抗CD3で活性化し、IL-2を100U/ml含むTCM中で培養した。

【実施例 3】

【0170】

健康マウス、初期TBMおよび後期TBMの新鮮なスプレノサイト (splenocyte) から形成したT濃縮細胞の発現型分析

後期TBM細胞の活性が異常であることと、T細胞のサブセットまたは分布が大きく変化していることとは関連性がない。溶解機能が異なるのはTリンパ球のサブセットのパーセントが互いに異なっているのが原因であるか、否かを確認するため、次の方法により発現型を分析した。マウス各群から採取した新鮮なスプレノサイトをT細胞に対して濃縮し、精製して汚染腫瘍細胞を取り除いた。Thy 1.2⁺含量が95%以上の細胞標本からデータを得た。後期TBMから常にL3T4⁺集団が減少していたが、顕著には減少していなかった(表2)。これらのマウスのCD4/CD8比は正常範囲内であった。同一マウス群から採取して、T細胞に対して濃縮しなかった新鮮スプレノサイトの発現型は、細胞のサブセット間で顕著な変化があることを示さなかった。したがって、T細胞のサブセットに大きな差異があることと、後期TBMの異常な活性とは関連性がない。

【0171】

【表2】

表 2

健康マウス、初期TBMおよび後期TBM^a
のT濃縮細胞の発現型分析

| | Thy1.2 | CD3 | Lyt.2 | L3T4 | Mac1 |
|-------|--------|-----|-------|------|------|
| 健康マウス | 98% | 86% | 37% | 54% | 2% |
| 初期TBM | 97% | 89% | 30% | 58% | 3% |
| 後期TBM | 95% | 86% | 34% | 48% | 3% |

10

a 健康および腫瘍マウス(TBM)のT濃縮細胞の発現型の分析。罹患期間が異なる腫瘍マウスの脾臓から単離したTリンパ球の流動細胞計測を行った。Tリンパ球は単離直後T細胞カラム(Collect, Biotex)で濃縮した。

20

【実施例4】

【0172】

健康マウス、初期TBMおよび後期TBMの活性化T濃縮細胞

の上澄み液中のリンパ球濃度に大きな差異が観察されなかったこと

30

CD4⁺ヘルパー細胞のサブセットの機能が充分でないことが後期TBMの免疫感度低下の主たる原因であるか、否かを判定するため、健康マウス、初期TBMおよび後期TBMの活性化T濃縮細胞の上澄み液中のリンパ球濃度を比較した。上澄み液のサンプルは、24時間目、48時間目および72時間目で採取した。IL-1はmouse Interest I-ELISA(Genzyme, Cambridge, MA)を用いて測定した。生物活性タンパク質はIL-1マウス胸腺リンパ球バイオアッセイを用いて確認した。IL-2濃度はIL-2エライザキット(Elisa Kit; Collaborative Research, Inc., Bedford, MA)により試験し、IL-2-依存性細胞系であるCTLL-2(ATCC)を用いるIL-2バイオアッセイによって確認した。IL-6濃度はネズミIL-6エライザキット(Endogen Inc., Boston, MA)で測定し、多発性骨髄腫細胞系T1165(Genetics Institute)を用いるネズミバイオアッセイで確認した。総ネズミインターフェロンはL929(ATCC)ウイルスバイオアッセイのより測定した。TNF-濃度は1929マウス繊維芽細胞細胞系(ATCC)によって測定した。

40

【0173】

三つの異なる実験において、初期および後期T-AK培養物で測定したリンパ球濃度に大きな差異はなかった。三つの内の二つの実験の培養開始48時間後のデータを表3に示す。これら二つの実験においても、溶解機能に顕著な差異が認められた。したがって、健康マウス、初期TBMおよび後期TBMの活性化T濃縮細胞の上澄み液中のリンパ球の生成は、定量的にも、定性的にも同様であった。

【0174】

【表 3】

表 3

健康マウス、初期TBMおよび後期TBM^a
の活性化T濃縮細胞の上澄み液中のリンホカイン濃度

| | IL-1 ^b | IL-2 ^c | IL-6 ^b | IFN ^c |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 実験#1 | | | | |
| 健康マウス | 24 | 3.0 | 850 | 20 |
| 初期TBM | 48 | 6.5 | 1000 | 60 |
| 後期TBM | 40 | 6.0 | 1250 | 40 |
| 実験#2 | | | | |
| 健康マウス | 0 | 4.5 | 1200 | 16 |
| 初期TBM | 90 | 7.5 | 1250 | 130 |
| 後期TBM | 75 | 9.0 | 1250 | 180 |

a 抗CD3で活性化した健康マウスとTBMのT濃縮細胞の上澄み液中のリンホカイン濃度。サンプルは、24時間目、48時間目および72時間目に採取した。このデータは48時間目のものである。

b pg/ml

c I.U./ml

【実施例 5】

【0175】

後期TBM由来のCD4⁺細胞が十分なヘルパー機能をもっていること

後期TBMのCD4⁺リンパ球はヘルパー細胞としては、健康動物由来のCD4⁺よりも活性である。後期TBM由来CD4細胞は、健康CD8⁺細胞の溶解機能を増進するのか、あるいは抑制するのかを試験するため混合実験を行った。精製したCD4⁺およびCD8⁺リンパ球を、サイズ4μmの細孔を有する膜で分離した24mmウェルと一緒に培養した。このサイズの細孔では溶解性成分が自由に交換できる。培養2日目に細胞毒性の検定を行った。健康動物のCD8⁺細胞の溶解活性は、後期TBM由来のCD4⁺細胞と共に培養した時には、CD4⁺細胞の存在下であった時の溶解活性(204L.U.)と比較して、増加している(655L.U.)のが認められた(表4)。さらに、後期TBM由来のCD4⁺細胞は初期TBMCD8⁺リンパ球の高い溶解機能(1075L.U.)を補助する上で、むしろ健康CD4⁺細胞(482L.U.)よりも優れていた。後期TBMでは、CD4⁺リンパ球はヘルパー細胞として健康動物由来のCD4⁺細胞よりも活性が高く、CD8⁺細胞の機能を抑制する原因とはなり得ない。

【0176】

【表 4】

表 4

後期 TBM の CD4⁺ 細胞は CD8⁺ の溶解機能を抑制しない

| 細胞源 | | | 溶解活性 U 10 ⁷ 個の細胞 |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| 後期 TBM | 初期 TBM | 健康 マウス | |
| CD4 ⁺ CD8 ⁺ | -- | -- | 139 |
| -- | CD4 ⁺ CD8 ⁺ | -- | 1375 |
| -- | -- | CD4 ⁺ CD8 ⁺ | 204 |
| -- | CD4 ⁺ | CD8 ⁺ | 1058 |
| CD8 ⁺ | CD4 ⁺ | -- | 354 |
| CD4 ⁺ | -- | CD8 ⁺ | 655 |
| CD4 ⁺ | CD8 ⁺ | -- | 1075 |
| CD8 ⁺ | -- | CD4 ⁺ | 104 |
| -- | CD8 ⁺ | CD4 ⁺ | 482 |

a この混合実験は新しく単離した細胞のサブセットを抗 CD3 と IL-2 で刺激した後 24mm ウェルで混合して行ったものである。さらに、サブセットがサイズ 0.4 μm の細孔を有する膜で分離されるコースタートランスウェルプレート (Costar "Transwell" Plate) を用いて実験を行った。溶解機能は、培養開始 3 日後 MBL2 リンパ腫により試験した。

【実施例 6】

【0177】

後期 TBM 由来の CD8⁺ 細胞が、他の CD8⁺ 細胞を抑制しないこと

後期 TBM 由来の CD8⁺ 細胞には欠陥がある。後期 TBM 由来の CD8⁺ 細胞は、どの起源の CD4⁺ 細胞と共に培養しても溶解機能が劣っている。最も活性が高い初期 TBM の CD4⁺ 細胞と共に培養したときでさえも、後期 TBM 由来の CD8⁺ 細胞は、健康マウスまたは初期 TBM の CD8⁺ の総溶解機能の 1/3 ~ 1/4 でしかなかった。CD4⁺ と CD8⁺ とが細胞同士で接触できる標準 24mm

10

20

30

40

50

ウェルで培養する実験においても、結果は同様で、ここでもまた後期TBM由来のCD8⁺細胞は、健康マウスまたは初期TBMのCD8⁺の総溶解機能の1/3～1/4でしかなかった。初期および後期TBMのCD8⁺両方を用いる混合実験では、CD8⁺の溶解活性が他のCD8⁺サプレッサー細胞によって阻害されていることを示すものは何もなかった。後期TBM由来のCD8⁺細胞の細胞毒性はヘルパー機能が十分に存在する場合でも劣っており、CD8⁺細胞が腫瘍が媒介する免疫抑制の標的となっていることを窺わせる。

【実施例7】

【0178】

MCA-38細胞培養物の上澄み液による健康細胞の細胞毒性活性の抑制

後期TBM由来のリンパ球サブセット中で抑制作用がないことは、抑制シグナルが腫瘍そのものを起源としていることを示唆している。そこで、IL-2の濃度は一定とし、MCA-38細胞培養物の上澄み液の濃度を上げてゆく滴定試験を行った。リンパ球は、抗CD3で活性化し、IL-2 100U/mlと共に培養した。培養は濃度 1.5×10^6 細胞から始め、細胞数の計算と細胞毒性の検定は培養3日目に行った。MCA-38細胞の上澄み液を30%しか含まない培養基で培養したリンパ球の細胞活性は30～45%低下した(表5)。TGF- β は、腫瘍が媒介する免疫抑制に関与していた腫瘍関連サイトカインである。しかしながら、TGF- β に対する抗体は腫瘍上澄み液の抑制効果を低下させなかった。バイオアッセイを二回繰り返したが、腫瘍上澄み液にTGF- β の作用を検出することはできなかった。MBL-2リンパ腫の上澄み液も同様の抑制効果を媒介していた。したがって、腫瘍に抑制効果があるのはMCA-38モデル系に限らず、溶解性の腫瘍産物が後期TBMのCD8⁺の細胞毒性機能の発現を抑制するの

10

20

【0179】

【表 5】

表 5

腫瘍細胞上澄み液による健康リンパ球の
in vitro細胞毒性活性の抑制*

| | 溶解活性 U/10 ⁷ 細胞 | | |
|----------|---------------------------|------|------|
| | 実験 1 | 実験 2 | 実験 3 |
| 健康 | 138 | 93 | 118 |
| 上澄み液 10% | 126 | 116 | 126 |
| 上澄み液 20% | 99 | 89 | 66 |
| 上澄み液 30% | 83 | 48 | 21 |

a 培養中のMCA-38細胞上澄み液による健康リンパ球の細胞毒性活性の抑制。リンパ球は抗CD3で活性化し、IL-2 100U/mlと共に培養した。MCA-38腫瘍培養物の上澄み液を各種濃度で細胞培養物に滴定した。濃度 1.5×10^6 細胞/mlから培養を開始し、培養3日目で細胞数の計算と細胞毒性の検定を行った。

【実施例 8】

【0180】

細胞毒性タンパク質グランザイムBおよびTNF- α をコード化するRNAの発現後期TBM由来T-AKの溶解機能が低下するのは細胞毒性エフェクター分子の生成と関連するのか、否か検討することを目的として、健康マウス、初期および後期TBMの濃縮Tリンパ球を起源とする全細胞RNAを分析した。さらに、除去(depletion)によって得たCD4⁺とCD8⁺のサブセットを分析した。TNF- α 、グランザイムB、IL-2、IL-2R、IFN- γ およびIL-6をコード化するRNAの発現を測定した。18s RNAを用いてゲルに負荷するRNAの相対数量を測定した。負荷の際の差異を補償するため、18sの発現とTNF- α のグランザイムBとの間のデンシメトリー比率を計算した。

【0181】

IL-2、IL-2R、IFN- γ 、IL-6およびRNAの発現は、初期TBMリンパ球と後期TBMリンパ球との間で差異はなかった。しかしながら、グランザイムB mRNAのレベルは、培養36時間目において、初期TBMのCD8⁺細胞が後期TBMのCD8⁺細胞より10倍高かった。デンシメトリーの測定によると、後期TBMのCD8⁺細胞におけるグランザイムB mRNAのレベルは、培養36時間で健康CD8⁺細胞よりも著しく低かった。後期TBMのCD8⁺細胞におけるグランザイムBをコード化するmRNAの発現は、培養8日目になって初めて培養36時間の初期TBMのレベルにまで増加した。後期TBMで8日目になってグランザイムBを発現した細胞が小さなフラグメントで、検出可能となるまでに増殖するのに8日間を必要としたのか、あるいはこの日数があったためにCD8⁺が回復して再び細胞毒性機能を持てるようになったのかは不明である。

【0182】

10

20

30

40

50

培養36時間で測定したTNF- α mRNAの発現もまた、健康マウスあるいは後期TBMと比較して、初期TBMのTリンパ球において最高であった。後期TBMのTリンパ球におけるTNF- α mRNAの発現は、培養8日目になって初めて培養36時間の初期TBMのレベルにまで増加した。

【実施例9】

【0183】

後期TBMのTリンパ球におけるCD3 α とCD3 β の発現の著しい変化

対照フレオレセン標識IgG2A、抗マウスCD3 α (Pharmigen)または抗CD3 (145-2C11)で標識した後、蛍光強度によりTCR-CD3複合体を測定した。発現型分析結果では、精製された後期TBM由来T細胞は、CD3 $^+$ (97%)、Thy1.2 $^+$ (98%)、CD4 $^+$ (9%)およびNK1.1 $^+$ (<1%)であって、正常なCD4 (L3T4) / CD8 (Lyt2 $^+$) 比率を持つことが認められた。健康マウスのT細胞TCR-CD3複合体と後期TBMのそれとを比較すると、蛍光強度で見るとTCR-CD3複合体の発現は両者の間にはっきりとした差異はなかった。しかしながら、TCR発現型分析に使用した抗体は、TCR-CD3複合体にある鎖7本のうち1本づつにしか結合するに過ぎなかった。

【0184】

さらに、125ヨウ素による表面標識、抗CD3 (145-2C11)による免疫沈降 (immunoprecipitation) および二次元非還元性SDS-PAGE (2D non-reducing SDS-PAGE) による分割を使ってTCR-CD3複合体の分析を続けた。健康マウスと後期TBMそれぞれのTリンパ球約5 \times 10⁷個にラクトペロキシダーゼ-グルコースにより125ヨウ素で標識した。Current Protocols in Immunology, Vol. 1, J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Sheval and W. Strober (eds.), Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, 8.11.1-8.11.4 (1991)。標識後、TCR複合体を145-2C11 MAbで析出させ、タンパク質G-セファロースに吸収させて、二次元非還元性14% SDS-PAGEで分割した。この結果、後期TBM由来T細胞のTCR-CD3複合体が大きく変化していることが明かに認められた。すなわち、CD3 α サブセットが姿を消し、CD3 β は著しく減少していた。さらに、小さなタンパク質に対応する対角線の下に微かなスポットが現れていて、Fc γ がTCR-CD3複合体に結び付いたことを示唆している。E. Reinherz, J. Exp. Med., 175: 203 (1992)。

【0185】

さらにまた、健康マウスおよび後期TBMそれぞれのTリンパ球のTCR-CD3複合体について、表面発現を分析した。健康マウスのTリンパ球は、CD3 α Ti複合体、CD3 β 、CD3 γ およびCD3 δ 、それにCD3 ϵ ホモダイマーを発現した。しかしながら、後期TBMのTリンパ球はCD3 α またはCD3 β 鎖を発現しなかった。

【0186】

抗CD3 または抗Fc γ を用いるウェスタン法によってもこの観察が確認されている。すなわち、健康マウスと後期TBMそれぞれのT細胞約2 \times 10⁷個を溶菌バッファー (トリスpH7.4 1mM, NaCl150mM, 0.5%トリトン \times 100, オルトバナジン酸ナトリウム1mM, アプロプチニン (apoptinin) 10 μ g/ml, ロイペプチン10 μ g/ml, およびEDTA5mM) 中で可溶化した。ライゼートを遠心分離し、上澄み液をウサギ抗CD3 抗血清、対照として健康なウサギ血清、抗CD3 (145-2C11 MAb) または対照抗ヒトCD4 (OKT4) と共に免疫沈降 (immunoprecipitate) させた。免疫析出物をSDS-PAGEで分割し、抗ウサギ血清でブロッティングさせた。後期TBMのT細胞ではCD3 α 鎖を発現しないで、普通T細胞ではみられないFc γ を発現していた。したがって、後期TBMのT細胞のTCRは、通常Tリンパ球で見られるCD3 α 、CD3 β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ ではなく、CD3 ζ 、CD3 η 、Fc γ になってしまっていた。後期TBMのTリンパ球については、そのTCR-CD3構造の分析は行わなかった。

【0187】

後期TBMのTリンパ球のウェスタン法分析の結果では、この細胞において、CD3 α タンパク質の発現を検出することができなかった。健康マウスや、初期TBMから同一条件で単離したTリンパ球は正常レベルでCD3 α タンパク質を発現した。後期TBM由来Tリンパ球のTCRでは、重要なTCR成分が欠けている。後期TBM由来Tリンパ球でCD3 α タンパク質が発現しないことと、in vitroでは細胞毒性活性が、in vivoでは免疫資料活性ないこととは相関している。

【0188】

しかしながら、抗 と抗 を用いる免疫蛍光法の測定結果では、後期TBM由来Tリンパ球は正常レベルのTCRを発現している。抗Fc を用いるウェスタン法でも、系の一種がユニークな発現をしていることが明らかになった。後期TBM由来Tリンパ球の膜にFcが発現しているが、このために正常レベルのTCRがこの細胞に存在しているのかもしれない。

【実施例10】

【0189】

後期TBM由来リンパ球の異常なシグナル変換

後期TBM由来リンパ球では、変わった形でシグナル変換が行われている。このことは、後期TBM由来リンパ球が、健康マウスあるいは初期TBMのTリンパ球と比較して、Ca²⁺動員能力が著しく低下していることから明かである。カルシウムの流れは、Tリンパ球のものをカルシウム感受性蛍光分光法により測定し、カルシウム濃度は次の文献にしたがって推定した。Current Protocol in Immunology, Vol. 1, J.E. Coligan, A.E. Kruistbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevath and W. Strober (eds.), Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, 5.5.1-5.5.15 (1991)。この文献は引用することにより本明細書の一部とする。T細胞約1×10⁷個をインド1 (Indo1) に負荷し、抗CD3 MAb (145-2C11) 10ng/mlで刺激した。流れはカルシウムイオノホアで溶解した後で最大となった。蛍光分光はトリトン×100と溶解した時に最大となり、EGTAによりカルシウムがキレート化した時に最小となった。

10

20

【0190】

後期TBM由来リンパ球を抗CD3で刺激したところ、健康マウスあるいは初期TBMのTリンパ球と比較してCa²⁺動員能力が著しく低下していることを認めた。抗CD3とのインキュベーション時間を長くしても(400秒)、健康マウスまたは初期TBMのT細胞でみられるCa²⁺の流れのレベルに達することはできなかった。しかしながら、後期TBM由来リンパ球をカルシウムイオノファ (ionophore) で刺激したところ、同等の最大Ca²⁺の流れを確保することができ、細胞内でも十分な貯蔵が行われていることを示している。

【0191】

さらに、後期TBM由来リンパ球のチロシン残基のリン酸化のパターンも、健康マウスあるいは初期TBMの細胞の場合と著しく異なっていた。抗CD3 (145-2C11) 10ng/mlを含んでいる無血清培地でこの細胞約1×10⁷を2分間刺激した。オルトバナジン酸ナトリウム400μMとEDTA 1mMを含む氷冷のリン酸塩緩衝食塩水でこの細胞を二回洗った。細胞を溶菌緩衝液 (トリスpH7.4 25mM, NaCl150mM, 0.5%トリトン×100、オルトバナジン酸ナトリウム1mM、アプロプチニン (apoptinin) 10μg/ml、ロイペプチン10μg/ml、およびEDTA 5mM) で5分間溶菌した。溶菌液を遠心分離し、上澄み液を10.5%SDS-PAGEにより還元条件で分析した。タンパク質は電気泳動によりPVDFフィルター (Imobilon-P) に移行し、TBST緩衝液 (トリスpH7.4 20mM, NaCl135mM, 0.1%ツイーン20) 中で5%ゼラチンでブロックし、ホスホチロシンMAb (40ng/ml) と共にインキュベートした。洗った後、プロットをペロキシング剤と共役している抗マウスIg MAbと共にインキュベートし、ECLキット (Amersham) で処理して、x線フィルムに暴露した。

30

40

【0192】

後期TBM由来Tリンパ球のリン酸化チロシン残基の基礎パターンは、他の2群とは著しく異なっていた。三つの実験では、残基が一貫して分子量比40~52の範囲 (Mr=molecular weight ratio) で異なっているのが見受けられた。しかしながら、抗CD3で刺激するとチロシン残基のリン酸化が誘導されて、効果的にシグナル変換ができるようになった。

【0193】

健康マウスと腫瘍マウスのそれぞれから採取し、精製した脾臓T細胞の、蛍光強度 (レセプター数のインジケータである) あるいはTCR Bヘテロダイマー (図4A) またはCD3複合体 (図4B) を発現する細胞のパーセンテージは、互いに差異はなかった。流動細胞計測法では、腫瘍マウス由来の脾臓T細胞は、Thy 1.2 (98%) とCR B (98%) を発現し、CD4

50

ノCD8比率も正常であったことを示している。脾臓T細胞においてV 遺伝子の使用を検討した際には、T細胞レセプターレパートリーに支障を認めなかった。リガンドがTCRと結び付くとCa²⁺の動員が起こる。Weiss, (1990), J. Clin. Invest. 86, 1015。健康マウス由来のT細胞とは対照的に、腫瘍由来のものは、CD3に対する(抗CD3)モノクローナル抗体で刺激を受けると、カルシウム反応が鈍化する。この反応はインキュベーションを長くしても改善されない(400s)(図4A)。しかしながら、カルシウムイオノホファ(Indo-1)で刺激すると、健康マウス由来T細胞と腫瘍由来T細胞双方とも、同等で最高のCa²⁺の流れを達成することができた。したがって、腫瘍由来細胞は細胞内に十分なCa²⁺の貯蔵を持って、Indo-1に充分負荷することができた。精製されたCD4⁺とCD4⁺のT細胞サブセットを分析した結果では、サブセット各々定量的に同じ欠点を持っていることが認められた。これらのT細胞は、TCRの表面密度が正常であっても、必ずしもTCRを経由して与えられるシグナルに反応して、細胞内のCa²⁺貯蔵を放出するとは限らない。

10

【実施例11】

【0194】

後期TBM由来Tリンパ球ではLckとFynの発現は 検出不能であるか、
または低減している

TCRがシグナルに媒介すると、最も早くタンパク質チロシンのリン酸化が始まる。ついで、ホスファチジルイノシトールの加水分解、Ca²⁺の動員化、そしてこの後でサイトカインの分泌、サイトカインレセプターの発現などの機能にかんするステップが続く。(June et al., 1990 P.N.A.S. 87: 7722, J. Immunol. 144: 1591; Mmustelin et al., Science 1990, 247: 2584)。TCR-依存性のCa²⁺の流れに支障があったため、TCR-依存性のタンパク質チロシンリン酸化を調べた結果、これを変更することとした。腫瘍由来T細胞のタンパク質チロシンリン酸化の基礎パターンを、健康マウス由来のものと比較して次のように変更した。

20

【0195】

腫瘍マウス由来Tリンパ球のTCRが媒介するシグナルを測定した。(A) TCR-依存性Ca²⁺の動員を次のようにして測定した。T細胞(1×10⁷個)をIndo-1により負荷し、抗CD3(1μg/ml)で刺激した。最大Ca²⁺放出は、カルシウムイノマイシンで刺激した細胞中で測定した。最大蛍光強度は、トリトン×100で溶菌した細胞において測定し、最小蛍光強度は、EGTAによりCa²⁺がキレート化した後に測定した。遊離細胞内Ca²⁺、[Ca²⁺]_iの濃度は、Gryniewicz et al. Biol. Chem., 260: 3440 (1985)が開示した方法によって測定した。(B) タンパク質チロシンリン酸化は次のようにして測定した。健康マウス由来(N)または腫瘍マウス由来(T)の精製T細胞(10×10⁶個)を、精製抗CD3 10μg/mlを含む無血清培地中で2分間刺激するか、無処理の儘入れておいた。オルトバナジン酸ナトリウム400μMとEDTA1mMを含む氷冷のリン酸塩-緩衝食塩水で、細胞を二回洗って反応を止めた。T細胞は、溶菌した後、遠心分離して核を除いた。上澄み液中のタンパク質は、SDS-PAGEで分離して、イモビロンPフィルター(Immobilon P filters: Millipore)に移行、ホスホチロシンに対する抗体、MAB-4G10(40ng/ml)で免疫プロットした。(C) 健康マウスと腫瘍マウスそれぞれのTリンパ球におけるP56kkおよびp59fynの発現を次のようにして測定した。細胞溶菌液中のタンパク質をSDS-PAGE(14%ゲル)で分離、イモビロンPに移行して、LckおよびFynペプチド(UBI)に対する抗体で免疫プロットした。

30

40

【0196】

抗CD3の刺激によってタンパク質チロシンリン酸化が誘導されたが、リン酸化されたタンパク質のパターンは異常であった。これらのT細胞において基礎タンパク質チロシンリン酸化のパターンが異常であるのは、細胞タンパク質チロシンキナーゼの発現に変化があったためかも知れないし、あるいは基質が合成されているためかも知れない。したがって、Tリンパ球で発現した二つのSrc系タンパク質チロシンキナーゼであるp56kkとp59fynの発現を検討した(Varonova and Sefton, 1986, Nature 319: 682; Rudd et al., P.N.A.S. 1988, 85: 5190; Samuelson et al., 1990, P.N.A.S. 87: 4358)。

【0197】

50

全細胞抽出物のタンパク質を免疫ブロッティングしたところ、健康マウス由来と比較して、腫瘍マウス由来T細胞ではp56kkとp59fynとが減っているのが認められた。後期TBM由来Tリンパ球におけるリン酸化のパターンが変化しているのと平行して、この同じ細胞内でLckの発現も顕著に減少していた。前記と同様にして細胞溶菌液のサンプルを作成し、8%SDS-PAGEで処理の後、ウサギ抗Lckまたは抗Fyn血清によりブロッティングした。がなくなり、Lckが減少するために、シグナル変換のプロセスが変わり、このために溶菌メカニズムの活性化を阻害したり、遅延させたりする。Tリンパ球で、CD3 や、Lckの発現レベルが変化することは、養子免疫療法に必要な活性化ができる細胞を確認するマーカーとなる。

【0198】

10

腫瘍マウス由来T細胞では、TCRの構造が変化するばかりでなく、p56kkとp59fynも減少する。PTK阻害剤の研究で、TCRがシグナル変換に媒介するときこれらの酵素が果たすべき機能が明らかになっている (June et al., 1980 loc.cit.)。しかしながら、腫瘍マウス由来T細胞では、抗CD3、インターロイキン2 レセプターの調製、さらにはリンホカインの生成 (インターロイキン2、インターロイキン6、インターフェロン) に反応して正常に増殖が行われている。これから見ると、溶菌機能は、他のリンパ球機能に比べて、PTKの作用に対するより高い依存度を持っているのかも知れない。インターロイキン2は、TCR依存性のCa²⁺流がなくても正常に分泌する。

【0199】

各種腫瘍細胞系の上澄み液は、抗CD3に誘発された健康マウス由来細胞の細胞毒性を *in vitro* で抑制する。もっと正確に言うと、これらと全く同じ機能の異常、TCR構造の異常は、RENCA腎臓細胞腺癌を持つBALB/c系マウスにも起こっていることが観察されている。したがって、これらの所見は、MCA-38を持つマウスだけに当てはまるものではない。実験動物の内部で起こる腫瘍と宿主の相互作用が、これらの所見に関連している可能性が高い。また、悪液質または瀕死の状態ではないとき、MCA-38腫瘍マウスでも、RENCA腫瘍マウスでも、疾患の各段階でここに説明したような分子変化が起きているのである。

20

【実施例12】

【0200】

TCAサブユニットの発現

健康マウス、腫瘍マウスそれぞれのT細胞を精製し、これをヨウ素化してTCR構造を検討した。TCR複合体のタンパク質は抗CD3で免疫沈降してから、二次元非還元-還元SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分離した (Samuelson et al., 1985 Cell, 43: 223)。

30

【0201】

腫瘍マウス由来Tリンパ球のTCRの構造を次のようにして測定した。Tリンパ球五千万個に、ラクトペロキシダーゼ-グルコースオキシダーゼ法によりNa¹²⁵Iの標識をつけた。その後、氷上の溶菌緩衝液 [トリス (pH7.4) 25mM; NaCl 300mM、0.5%トリトン x 100、オルトバナジン酸ナトリウム1mM、アプロプチニン10μg/ml、ロイペプチン10μg/ml、EDTA 5mM] 1ml中で5分間溶菌した。この細胞溶菌液では抗CD3がタンパク質G-セファロースに吸収されている。この細胞溶菌液の上澄み液からTCR複合体を免疫沈降させ、二次元非還元 (NR) -還元 (R) SDS-PAGE (15%ゲル) により分離した。こうして免疫沈降させたサブユニットを細胞系 (BW5147) で処理したところ、TCRがないという特異性が確認された。

40

【0202】

TCR とFc の発現を免疫ロット法により次のように分析した。健康マウス由来、腫瘍マウス由来それぞれのT細胞 (20 × 10⁶)、BW5147、および2B4.11を可溶化し、細胞溶菌液から上澄み液を採取した。CD3 に対するウサギ抗血清 (387) または健康ウサギ血清 (NRS) により、上澄み液からタンパク質を免疫沈降させた。TCRなし、BW5147胸腺腫からなる溶菌液を用いた。2B4.11ハイブリドーマはFc に対する正の対照として用いた。免疫沈降物中のタンパク質は、CD3 ペプチドに対するウサギ抗血清 (387) (NICHDのR. KI

50

ausner氏提供)とFc_γ に対する抗血清(NIAIDのJ.P. Kinet氏提供)によってプロットイングした。このプロットをマウスIgGに対するペロキシダーゼ共役抗体により、化学ルミネセンスに助けられながら展開した。

【0203】

腫瘍マウス由来Tリンパ球には、TCR β ヘテロダイマー(ジスルフィド結合が鎖間にあるため対角線の下を移動)とCD3 鎖(ジスルフィド結合が鎖内にあるため対角線の上を移動)とがお互いにほぼ等量で存在していた。

【0204】

これとは対照的に、腫瘍マウス由来T細胞のTCR-CD3複合体で、他の成分がはっきりと変化していた。先ず、CD3 鎖が無くなっており、CD3 鎖の量が減っていた。

10

【0205】

鎖を検出できなかったこと、およびTCRが細胞表面に発現していたことを一緒にして考えると、CD3 の安定している状態が量的に減ってきている、アセンブリーと輸送とが正常ではなかった、洗剤で可溶化されたレセプター複合体が不安定であることが原因ではないかとも思われる。CD3 タンパク質なんとか検出しようとして、脾臓T細胞の全細胞溶菌液からタンパク質を免疫プロットイングさせようとした。ここでも、健康マウス由来T細胞とは対照的に、腫瘍マウス由来T細胞にはCD3 鎖は存在しなかった。これは皮肉な結果で、CD3 鎖がないためにTCRは苦労して細胞表面まで運ばれた筈である。(Sussman et al., 1989)。しかしながら、TCRは、 α 系の他のものと結び付くことができる(Orloff et al., 1990)。Fc_γ 鎖は、 α 関連タンパク質で、Fcレセプターアセンブリーと輸送、さらにはシグナル変換の機能に役立つことができる。実験標識をつけている表面に鎖よりサイズが小さいタンパク質が存在していたが、このタンパク質はFc_γ とほぼ同じサイズであった。この鎖が腫瘍マウス由来T細胞に存在することは、Fc_γ に対する抗体(抗Fc_γ)を用いる免疫プロットイング法によって確認されている。

20

【0206】

このようにして、腫瘍マウス由来Tリンパ球はCD3 鎖が欠けている異常なTCR複合体を発現したが、大多数のT細胞にFc_γ 鎖を含有していた。異常のTCR複合体はCD4⁺とCD8⁺の両方に認められた。IckとCD3 鎖のmRNAのレベルは安定で、正常で、むしろ上昇している感じがあり、転写以降のレベルで欠陥が発生していることを示唆している。

【実施例13】

30

【0207】

フラボノイドとIL-2による腫瘍治療後TCRサブユニット およびTリンパ球シグナル変換経路のタンパク質分析

ある種の癌は治療にたいして依然として難治である。例えば、腎臓細胞癌(腺癌)は従来の化学療法剤に耐性である。腎臓細胞癌は多くの場合、診断を得たときには既に転移しているなど、悲惨な病気である。ほとんどの治療方法は腎臓細胞癌に効果がないが、生物反応モデファイアー(BRM)を用いてある種の抗腫瘍効果が認められてはいる。この生物反応モデファイアーは、薬剤(α -IFN、IL-2)毎に少なくとも従来の化学療法剤と同等の効果を上げているので、BRM/BRMやBRM/化学療法剤を含め併用療法によりより高い効果を上げようとして研究が行われている。治療法の効果的な組み合わせを作る上で齧歯動物モデルは有用である。治療薬、用量、投与計画を各種組み合わせた複雑な実験を速やかに、比較的安価に、しかも患者にリスクがなく実施することができる。齧歯動物モデルの一例として、RENCAシステム挙げることができる。これはBalb/c起源のRENCA腎臓腺癌を正常位に移植して、そこから転移させようとするものである。Murphy and Hrushesky, J. Natl. Cancer Inst., 50: 1013 (1990)。ほとんどのサイトカインは、単独使用の場合、効果がない。この腫瘍に対して最も効果のある治療方法は併用薬剤にIL-2がある場合である。特に、IL-2とIFNまたはフラボノイドを含むサイトカインとの併用が最も効果的である。腫瘍が縮小した実験動物では、T細胞は抗腫瘍反応に必須であったことが認められている。さらに、腫瘍のためにシグナル変換が変化していたが、治療によってこれが逆転した。T細胞のチロシンリン酸化のパターンが変わっていたが、ウェスタン法測定による

40

50

と、これが正常に戻っていた。腫瘍を注射した後僅か7週間（治療開始後3～4週間）で、lckとゼータ（zeta）が再び発現し始めた。TCRおよびCD3複合体は変化しなかった。

【実施例14】

【0208】

養子免疫療法患者の評価

腎臓癌を有する患者を選択し、末梢血液からリンパ球標本を作り、CD3 の発現を分析する。健康なヒトからもリンパ球を得、同様にして標本を作成し、分析する。末梢血液リンパ球は、静脈せん刺、またはリンホフレイセス（lymphopheresis）によって単離する。細胞はフィコール/ヒパック勾配遠心分離をして、単核細胞を得る。このようにして得た単核細胞の密度を測定し、患者、上記健康なヒトそれぞれ毎に同数の細胞からタンパク質を抽出する。

【0209】

同数の細胞を溶菌緩衝液（トリスpH7.4 25mM、NaCl150mM、0.5%トリトン×100、オルトバナジン酸ナトリウム1mM、アプロプチニン10μg/lm）ロイペプチン10μg/m）およびEDTA5mM）中に溶解する。溶菌液を遠心分離し、上澄み液をウサギ抗抗血清で免疫沈降させる。対照溶菌液は、通常のウサギ血清で免疫沈降させる。免疫沈降物はSDS-PAGEで再分割し、ナイロン膜（Imobilon-P）に移行し、抗ラビット血清でプロットする。対照と比較して、患者のタンパク質の発現が著しく減少している時には、免疫抑制であって、自分のTリンパ球を使って自系養子免疫療法を実施することできない。

【実施例15】

【0210】

癌患者のタンパク質発現の減少

ヒト癌患者12名のうち7名の末梢血液T細胞が、C3 鎖の発現が全くなくなっているか、減少していることが認められた。数名ではLckとPLC の発現が減少していた。したがって、ヒト腫瘍患者のT細胞シグナル変換分子に、構造上機能上の変化が認められた。

【実施例16】

【0211】

ワクチン

他の実施態様において、本発明の免疫抑制因子を製薬上許容し得る組成物として使用し、有効量を投与するとき免疫抑制に対して防御免疫で対抗することができる。

【0212】

主成分としてタンパク質を含有するワクチン製剤は当業者によく理解されている。通常、ワクチンは溶液、または懸濁液、さらには溶液、懸濁液、または液剤に好適であり、これらによって注射薬に形成する固体などの注射薬として製造される。乳剤でも良い。免疫原性を有する主成分に製薬上許容し得、且つ主成分と相容性がある賦形剤を配合することができる。好適な賦形剤としては、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびこれらのものの混合物などを挙げることができる。必要ある場合、ワクチンに、少量の補助剤、例えば湿潤剤、乳化剤、アジュバント、あるいはワクチンの効力を増進する増強剤等を配合することができる。

【0213】

従来、ワクチンは皮下あるいは筋肉内などに注射するように、非経口的に投与されてきた。さらに、処方によっては他の投与経路が好適である。このような剤形としては、座薬がある。場合によっては、経口薬を加えても良い。従来から、座薬にはポリアルキレングルコース、トリグリセライドなどからなるバインダーと担体が含まれている。座薬の主成分の含量は0.5%～10%の範囲、好ましくは1.2%である。経口薬は従来から使用されている製薬グレードのサッカリン、セルロース、炭酸マグネシウムなどからなる賦形剤が配合されていてもよい。経口薬の剤形は、溶液、懸濁液、錠剤、ピル、カプセル、などの剤形をとることができる。経口薬主成分に製薬上許容し得、且つ主成分と相容性がある賦形剤を配合することができる。好適な賦形剤としては

10

20

30

40

50

、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびこれらのものの混合物などを挙げることができる。必要ある場合、ワクチンに、少量の補助剤、例えば湿潤剤、乳化剤、アジュバント、あるいはワクチンの効力を増進する増強剤等を配合することができる。

【0214】

タンパク質様-粒子から中性剤または塩剤としてワクチンを製造することができる。これは酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基から製造）を含む製薬的に許容し得る塩であって、例えば塩酸、リン酸、などの無機酸、あるいは例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と共に形成される。遊離カルボキシル基と共に形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、またま水酸化鉄（ferric hydroxide）などの有機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されるもので良い。

10

【0215】

「単位用量」なる語は、所要の希釈剤、即ち担体または賦形剤と共に所定量の主成分を含有する、ヒトに好適なように物理的に分割されている単位を言う。

【0216】

ワクチンの投与は、製剤処方に適合する方法で、且つ治療するのに十分に有効であり、免疫原生である用量を投与する。投与量は、治療を受ける患者、抗体を産生する患者の免疫系の能力、および所望の防御の程度によって異なる。しかしながら、患者一人当たり主成分として1マイクログラムから数百マイクログラムの範囲が適当である。初回投与量とブースター量も一定ではないが、初回投与後一週間～二週間おいて次の注射あるいは次の治療を行うのが典型的である。

20

【実施例17】

【0217】

診断システム（キット）

生体サンプル中で本発明のタンパク質が存在するの検出したり、このサンプル中のタンパク質に対する抗体の存在を検出するのに有用な、好ましくはキットの診断システムである。内容は複数の容器の各々に次のものを含む。

(a) 抗原性を示す本発明のタンパク質。

(b) 本発明のタンパク質と抗体との間に免疫反応が存在していることをシグナルする標識した特異的な結合剤。

30

【0218】

「特異的な結合剤」とは、本発明のタンパク質などのリガンド、あるいは本発明のタンパク質と免疫反応する抗体と選択的に結合できる分子化合物である。

【0219】

特異的な結合剤の例としては、Fab' やF(ab')₂補体フラグメント、タンパク質Aなどの抗体、または抗体フラグメントなどを挙げることができる。

【0220】

本発明の説明に言う「標識（label）」なる語はあらゆる場合において、免疫反応物の存在を示す検出可能なシグナルの産生に直接または間接に関与する単一の原子または分子のことを言う。

40

【0221】

どのような標識手段（labeling means）も、特異的な結合剤に、結合させたり、または組み込んだり、あるいは別個に利用したりすることができる。前記の原子や分子は、単独で使われたり、あるいは追加試薬と一緒に使われたりする。前記の標識は、免疫化学ではよく知られているが、本発明の新規なタンパク質法および/または系で使用されている限り、本発明の一部とする。

【0222】

本発明のキットの代表的な使用方法は、エライザ（ELISA）法で使って血清やプラズマなどの生体サンプル中で多量の抗体が存在することを検出することにある。エライザは、

50

enzyme-linked immunosorbent assayと言いい、固相に結び付いた抗体、抗原を使い、酵素抗原、酵素-抗体共役によってサンプル中の抗原や抗体の量を検出定量する。エライザ法の説明はChapter 22 of BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4TH ed. 1982) by D. P. S. Ites et al., published by Lange Medical Publications of Los Angeles, California, and in U.S. Patent Nos. 3,654,090, No. 3,850,752 and No. 4,016,043にある。この文献各々は引用することにより本明細書の一部とする。

【0223】

このようにして、本発明の最良の実施態様において、抗原性を示すタンパク質が固体マトリックスに付着して固体支持部材となっている。タンパク質は水性培地から吸収されて固体マトリックスに付着する。水性培地からの吸収には数種の方法があり、さらに当業者に周知の他の方法もあるが、すべて使用可能である。これらの方法の内代表例としては、架橋結合しているデキストロースやセルロースのようなグルコースを含有しているマトリックス、あるいはラテックス粒子と共同作業をしている結合性グルタルアルデヒドと臭化シアンとが反応して、反応性カルボキシル官能価が作り出され、これとレセプターまたは抗原する方式である。グルタルアルデヒドについては、後で再び説明する。

10

【0224】

有用な固体は当業者に周知である。例としては、Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NY) がSEPHADEXなる商標で市販している架橋結合しているデキストラン、アガラーゼ (agarase)、Abbott Laboratories (North Chicago, IL) から得られる直径1ミクロン~5ミリのポリスチレンビーズ、塩化ポリビニール、ポリスチレン、架橋結合ポリアクリルアミド、シートや細片や棒などのナイロン系ウェブのニトロセルロース、ポリスチレンまたは塩化ポリビニール製のチューブやプレートやマイクロタイタープレートのウェルなどが挙げられる。

20

【0225】

最良の実施態様では、キットにはさらに別の容器があって、モルモット補体、抗イムノグロブリン、あるいは*S. aureus* cowan菌株、タンパク質Aなど検出すべき抗原や抗体と反応する補体からなる増幅試薬を提供している。これらの実施態様では、標識特異性を持つ結合剤は、増幅手段がタンパク質や抗体の方向へ移動すると特異的にこの増幅手段に結合する。

【0226】

本発明で説明している標識特異性をもつ結合剤や、上記の増幅試薬は、液体分散剤、乾燥どの高い粉末、例えば乾燥凍結品として供給し、これをようえきにする。指示手段が酵素である場合には、酵素の基質も別包装で供給する。マイクロタイタープレートなどの固体支持部材、一以上の緩衝液も追加包装としてこの診断検定システムの一部とすることが出来る。

30

【0227】

診断システムに関連させて説明した包装は、診断制度では慣習的に使用されているものである。したがって、このような包装ではガラス、プラスチック(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート)、ピン、バイアル、プラスチックトプラスチック膜、積層封筒などをいれてあるものである。

40

【実施例18】

【0228】

動物腫瘍モデルにおいてNF-kB / rel転写因子のパターンが
変化したが、治療によって逆転したこと

ヒト癌患者と腫瘍マウスについて免疫系障害が報告されている。免疫不全の原因では、T細胞の機能が重要な役割を果たしている。腫瘍哺乳動物のT細胞の状態を調査する目的を持って、Balb/cマウスの自然発生腎臓細胞癌 (spontaneously arising renal cell carcinoma: Renca) をモデルとして使用した。この腫瘍モデルには二つの重要な特徴がある。(1) Rencaが示す転移パターンがヒト腎臓細胞癌と似ている。Golubek et al. (1991) "Treatment of Established Renal Cancer by Tumor Cells and Engineered to Secre

50

te Interleukin-4”、さらに、(2)このネズミモデルにおいて、樹立Renca腫瘍をもつマウスに対して、実験化合物フラボン-8-酢酸 (FAA) と rIL-2 の併用により 80% の治癒率の成績をおさめたこと、そしてこのうちの三匹がその後の免疫テストに良好な反応を呈したことである。Wiltrot et al., (1988) "Flavone-8-Acetic Acid Augments Systemic Natural Cell Activity and Synergizes with IL-2 for Treatment of Murine Renal Cancer," (1988) J. Immunol. 140 (9) : 3261.

【0229】

ウェスタン法により、抗c-rel、抗p65、および抗p50抗血清を用いて健康マウス由来脾臓T細胞の核抽出物を調べたところ、三つのタンパク質すべてが正常のレベルであった。対照的に、腫瘍マウス由来脾臓T細胞の核抽出物では、c-relとp65が欠けていた。意外なことに、p50の代わりに二つの短縮型 (shorter form) のタンパク質 (P48とp44) が核に出現していた。この "48" と "44" はこの二つのタンパク質の大体の分子量を電気泳動により測定して48kDと44kDと見積つたものであった。

10

【0230】

c-rel、p65、およびp50の各々に対する抗血清の特異性は、それぞれのペプチドとの競合により明らかになった。p50の短縮型は、専ら核に存在していたが、正常サイズのタンパク質は細胞質に存在していた。p50のN-ターミナルペプチドに対して抗血清を作り、この抗血清を用いて同じ抽出物中でp50を分析したところ、p50の短縮型を検出しないで、正常なp50を検出することができた。これらの結果は、p50の短縮型は、p50のN末端の端を切ったものであることを示すと解釈される。さらに、スプライシングもp50の新型出現の原因であるかも知れない。ただし、先駆物質であるp105の短縮型が腫瘍サンプルの細胞質フラクションで観察されることはなかった。

20

【0231】

腫瘍マウス由来の脾臓T細胞において、核にc-relとp65が存在していないのに、p50の変型が出現したことが腫瘍の存在と関連があるのか、否かを判断するため、FAA/IL-2治療マウスから治療後各種時点で脾臓T細胞のサンプルを採取して、ウェスタン法で分析した。腫瘍マウスのFAAによる治療は7日目に開始した。IL-2は8~10日間毎日投与した。11日後、脾臓T細胞の核c-rel、p65およびp50が無処置腫瘍マウスと同様のパターンを示すようになった。対照的に、FAAとIL-2を投与されているグループの脾臓T細胞では、核のc-rel、p65およびp50の三つともほぼ正常レベルであった。おもしろいことに、p50の短縮型は治療群中ではもはや見られなくなった。腫瘍接種後4週目、即ち治療後3週目に、処置したグループについては、肉眼による観察あるいは顕微鏡による観察の何れによっても癌の徴候を見い出すことはできなかった。無処置の腫瘍マウス群では、通常約35日で死亡する。

30

【0232】

第7週までの生存を長期生存と定義して、その長期生存マウス群の脾臓T細胞の分析では、rel系マウスの核レベルは正常であった。

【0233】

健康動物と腫瘍動物の脾臓T細胞の核抽出物を用いて、電気泳動移動度検定 (EMSA) (Tan, T.H. et al., "Purification and characterization of multiple nuclear factors that bind to the TAX-inducible enhancer within the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat" (1989) Mol. Cell. Biol.) をおこなった。この検定では免疫グロブリン重鎖遺伝子のオリゴヌクレチドを使用した。腫瘍サンプルのDNA-タンパク質複合体のパターンが、腫瘍がないサンプルと比較して、異なっていた。健康パターンに較べて、早く移動する二つの複合体が観察された。特異性と非特異性のオリゴヌクレチドによる競合分析の結果、これらの複合体は何れもヌクレオチドプロープに特異性を持っていた。腫瘍発症後4週目で評価した群のサンプルで正常なパターンが再び見られたことから、これらのDNA-タンパク質複合体は腫瘍の状態と相関関係があった。

40

【0234】

腫瘍サンプル中のDNA-タンパク質複合体の特性を決定するため、UV-架橋 (UV-crosslinking)

50

king) (Kochel et al., "V-rel and C-rel-Protein Complexes Bind to the NF- κ B site In Vitro", *Oncogene* (1992) 7: 567-572) および架橋生成物の免疫沈降 (immunoprecipitation) (Rice et al., (1992) *Cell*, 71: 243-263) を行った。正常サンプルでは、p50とp65の組合せに対応する二つのタンパク質からなる移動速度の遅いDNA-タンパク質複合体がある、一方、p50に対応する一つのタンパク質からなる早く移動する複合体があること立証された。Sang-Mo Kang et al., "NF- κ B Subunit Regulation in Nontransformed CD4⁺T Lymphocytes" (1992) *Science* 256: 1452。腫瘍サンプルでは、上部のDNA-タンパク質複合体は、p50より短いタンパク質一個からなり、下部の複合体は、p50の短い誘導体二個に相当するタンパク質二個からなっていた。UV架橋生成物は、相異なる抗p50抗血清と共に免疫沈降した。正常サンプルを免疫沈降させたときには、移動の遅かった複合体は、二つの異なる抗p50抗血清と一つの抗p65抗血清を沈殿した。これらの結果から、上部の複合体はp50とp65からなっていたことを示している。移動が早かった複合体は、三つの異なるp50抗血清で沈殿させうることが分かったが、このことは下部の複合体はp50からなっていたことを示していた。

10

20

30

40

【0235】

腫瘍サンプルを分析したとき、移動速度の遅い複合体は、二つの異なる抗p50抗血清で沈殿したことが認められたが、N末端ペプチドに対してつくられた第三の抗血清は必要がなかった。また、沈殿した分子の分子量から判断すると。上部複合体はp48からなっていたと結論される。同様に、移動速度が早かった複合体は、上部複合体と同じ抗p50抗血清によって沈殿したが、N末端ペプチドに対してつくられた抗血清は必要がなかったことが認められる。この場合、抗ペプチド抗血清に対応し、p48とp44に対応する二つタンパク質がえられた。前免疫 (preimmune) 血清で免疫沈降を行った場合には、タンパク質バンドは得られなかった。

【0236】

試験方法

Tリンパ球の刺激

一実施態様においては、in vitroでTリンパ球表面レセプターに対する抗体と共に、Tリンパ球を短時間刺激した。刺激している間、任意に一以上のサイトカインを存在させても良い。刺激時間は、最長24時間以下、最短30分以上、通常12~18時間である。このようにして刺激した細胞をin vivo注射すると、高い治療効果がある。抗CD3によって刺激するとIL-2レセプターの発現が誘導される。抗CD3刺激細胞は肺に対する急性毒性が少なく、IL-2中で数日間培養した細胞より毒性が低い。同様に、抗CD3刺激細胞はIL-2の存在下では数を増やすことができるので、小数の抗CD3を注射しただけでも、in vivoでIL-2に暴露されると大きな数に増殖することができる。したがって、IL-2が存在するときには抗CD3刺激細胞の投与量をより少なくしても、十分な数の抗CD3刺激細胞を得ることができる。

【0237】

また、一以上のリンパ球表面レセプターに対する抗体と共にin vitroでTリンパ球を刺激してもよい。任意に、刺激する間、一以上のサイトカインを存在させておいても良い。Tリンパ球のin vivo刺激を、一以上のリンパ球表面レセプターに対する抗体と共に、または、一以上のサイトカインを併用するか、あるいは抗体とサイトカインを組み合わせたものを併用して行うことができる。

【0238】

キナーゼ反応検定

常法により107個の細胞を溶解する。

抗Fyn Ab (6 μ l) または抗Lck Ab (3 μ l) と共に免疫沈降する。

EDTAを入れていない洗浄緩衝液で3回洗う。

ATPを入れていないキナーゼ緩衝液で3回洗う。

[³²P] ATP (3300Ci / mmol) (3 ~ 5 μ l) および 1 μ M ATP10 ~ 20 μ Ciを配合したキナーゼ緩衝液30 μ lを加える。

R / Tを10分間インキュベートする。

50

EDTA 20mMを含有する洗浄緩衝液で3回洗う。
 1.5倍のサンプル緩衝液を溶出する。
 8%のゲルで試験する。
 酢酸10%とメタノール50%で30分間ゲルを固定する。
 3%のグリセロールで置換えて20分間固定を続ける。
 ゲルドライヤーで1.5時間かけてゲルを乾燥する。
 ゲルをX線フィルムに暴露する。

【0239】

【表6】

キナーゼ緩衝液

| | |
|-------------------|-------|
| NaCl | 100mM |
| HEPES pH7.5 | 20mM |
| MnCl ₂ | 5mM |
| MgCl ₂ | 5mM |

10

ATP 1 μM
 [γ-³²P] ATP 3~5 μl

20

【0240】

抗体調製法

Tリンパ球表面レセプタータンパク質、または溶解性免疫抑制因子に対する抗体は、周知の常法を用いて作ることができる。例えば、Current Protocols in Immunology, Vol. 1, J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach and W. Strober (eds.), Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, 2.4.1-2.10.3 (1991), この文献は引用することにより本明細書の一部とする。モノクロナール抗体が調製されるが、これは因子に対するものである。抗体は免疫源としての腫瘍の標本の上澄み液を使って作る。製法は当業者に周知である。モノクロナール抗体はアフィニティクロマトグラフィを用いて因子を精製するとき有用である。(Marlow and Lane Antibodies Manual)。

30

【0241】

表面レセプターに対する抗体は単独で使用してもよいし、異なるT細胞表面レセプターに対する他の抗体と併用してもよい。いずれの場合でも、Tリンパ球を活性化することができる。好適な抗体としては、抗CD2、抗CD3、抗CD4、抗CD5、抗CD6、抗CD7、抗CD8、抗CD28、抗CD29、および抗CD45Rが挙げられる。好ましい抗体としては、抗CD3およびモノクロナール抗体(MAb)が挙げられる。抗CD3 MAbにはOKT3、WT32、Leu-4、SPV-T3Ck、RIV9、64.1および145-2C11などが含まれている。より好ましくは抗CD3 MAbが抗ネズミ MAb 145-2C11であることである。この抗体は、Leoら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, B4, 1374 (1978))によって同定されたもので、the American Type Culture Collection (ATCC)から入手することができる。マウス抗ヒトOKT3は、Johnson and Johnson社のOrtho Divisionから入手することができる。ヒトから誘導される各種の抗体は、in vivoで処理中にT細胞を活性化する際に有用である。抗CD3 MAbにより約24時間以下で処理されたTリンパ球は、総投与量約10ng/ml以下で処理するのが好ましい。

40

【0242】

50

溶解性免疫抑制因子の単離と精製

免疫抑制因子は、腫瘍細胞標本の上澄み液から連続ゲル濾過、アニオン・カチオン交換、およびFPLCによって精製される。これらの精製方法は、当業者にとって周知である。最終精製工程では、イオン交換によるHPLC、あるいは逆相クロマトグラフィが必要である。単離された因子のポリペプチドフラグメントの試験をして、どのフラグメントがまだ免疫抑制活性を保持しているかを確かめなくてはならない。その後アミノ酸配列から縮合オリゴヌクレオチドを形成して、Maniatis(1992)が開示した技術を使って因子のクローンを作る。(Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York)。

【図面の簡単な説明】

10

【0243】

【図1】図1は次の三群のマウスから採取したT-AK細胞で処理した実験結果を示している。(1)腫瘍を持たない(健康な)マウス、(2)<21日の腫瘍マウス(初期TBM)、(3)>30日の腫瘍マウス(後期TBM)。腫瘍接種後12日で肝臓に転移しているのが認められた。これら三群をスチューデント式テストで比較した。*は、 $P < 0.001$ 、対照群に対する処理群を示す。横棒はS.D.(標準偏差)である。(TBM:腫瘍を持ったマウス(tumor-bearing mouse))

【図2】図2は、(A)MCA-38(結腸癌)に対する健康、初期、および後期TBM T-AK細胞の細胞溶解作用、(B)MBL2(リンパ腫)に対する健康、初期および後期のTBM T-AK細胞の細胞溶解作用、および、(C)RENCA(腎臓細胞癌)腫瘍細胞系に対する健康、初期および後期のTBM T-AK細胞の細胞溶解作用を示している。濃縮T細胞を抗CD3で活性化し、組替えインターロイキン2(rIL-2)を100U/ml含有する組織培養基(TCM)で培養した。溶解機能は培養第二日目に試験した。

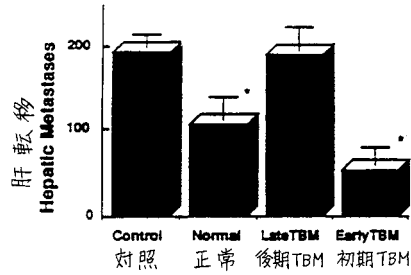
20

【図3】図3は、MBL2に対する健康、初期、および、後期TBM T-AK細胞の細胞溶解作用を示している。濃縮T細胞を抗CD3で活性化し、組替えrIL-2を100U/ml含有するTCMで培養した。培養第2、4および7日目において、4時間のクロム・リリース・アッセイ(chromium release assay)を行って溶解機能を試験した。

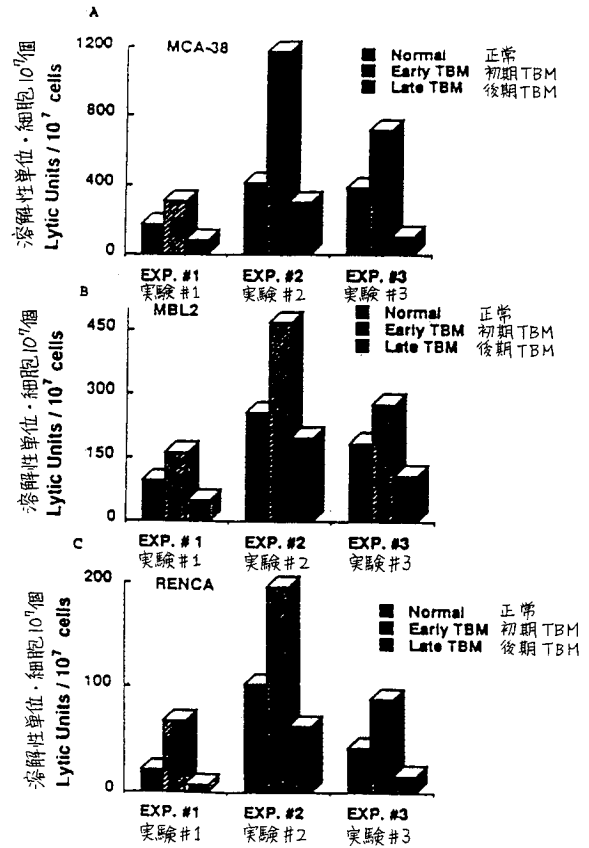
【図4】図4は、流動細胞計測法によって測定したTCR-CD3複合体の表面発現である。健康マウスおよび腫瘍マウス(点線および長点線)からT細胞を単離して、フルオレセインでラベルしたIgG2Aを対照として、(A)マウスTCR(クローンH57-597 Pharmingen)または(B)抗CD3(145-2C11)と共に培養した。健康マウス(影付部分)、腫瘍マウス(影のない部分)。

30

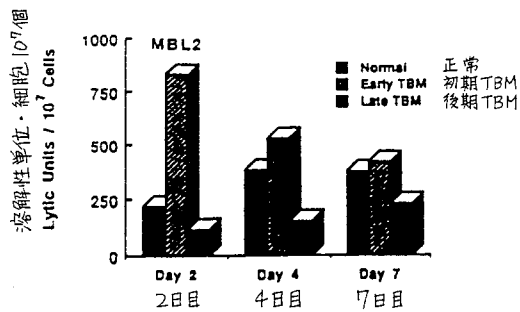
【 図 1 】



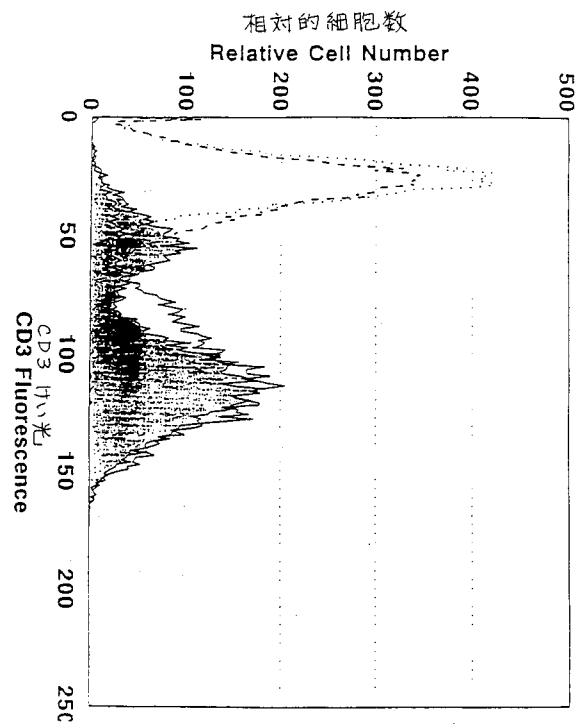
【 図 2 】



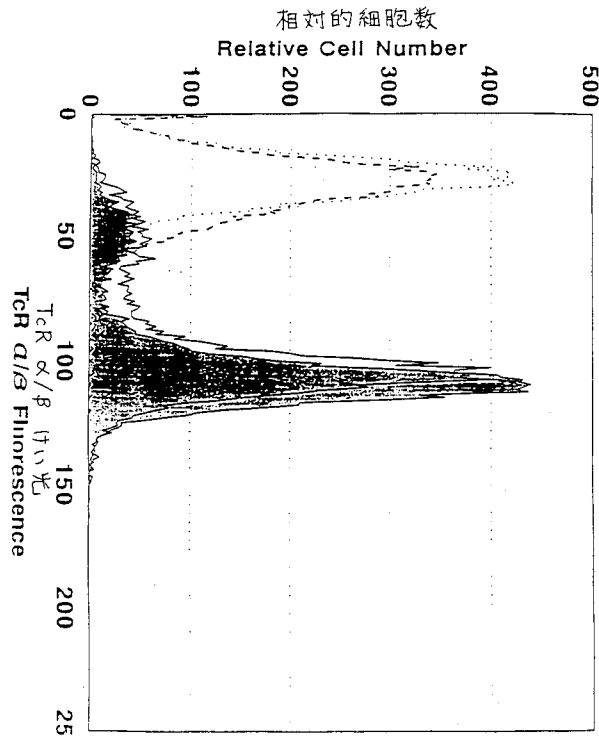
【 図 3 】



【 図 4 A 】



【図 4 B】



【手続補正書】

【提出日】平成16年1月5日(2004.1.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物のTリンパ球サンプルの免疫抑制のレベルを測定する方法であって、

a) CD3、CD3 およびタンパク質Fc から選択されるTCRサブユニットタンパク質の発現レベルを測定するステップと、

b) 前記タンパク質の発現レベルを、同一種の哺乳動物の免疫抑制されていない個体に特有な前記タンパク質の発現レベルと比較するステップと

を含む方法。

【請求項2】

前記発現レベルが、測定対象となったTリンパ球の総数に対する、前記タンパク質を発現するTリンパ球の数の割合として定義される発現率として測定される請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記Tリンパ球が、脾臓組織、末梢血液、腫瘍組織、リンパ節組織、脳脊髄液、胸膜滲出液または腹水に由来する請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

哺乳動物のTリンパ球の免疫抑制を起こす薬剤を同定する方法であって、

a) CD3 およびCD3 から選択されるTCRサブユニットタンパク質の発現レベ

ルが、同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体に特有なものである哺乳動物 T リンパ球調製物を供するステップと、

b) 上記リンパ球調製物を、免疫抑制すると考えられる薬剤の存在下で培養するステップと、

c) 上記選択されたタンパク質の発現のレベルを測定するステップと、

d) 上記薬剤の存在下で培養されていない T リンパ球調製物中における上記タンパク質の発現のレベルよりも低いレベルへの有意な低下を引き起こす薬剤を同定するステップとを含む方法。

【請求項 5】

哺乳動物の T リンパ球の免疫抑制を逆転させる薬剤を同定する方法であって、

a) 免疫抑制された哺乳動物であって、C D 3 および C D 3 から選択される T C R サブユニットタンパク質の発現レベルが、同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体のレベルよりも低い哺乳動物から、T リンパ球調製物を供するステップと、

b) 上記リンパ球調製物を、免疫抑制を逆転させると考えられる薬剤の存在下で培養するステップと、

c) 上記選択されたタンパク質の発現のレベルを測定するステップと、

d) 上記タンパク質の発現レベルを有意に上昇させる薬剤を同定するステップとを含む方法。

【請求項 6】

溶解性免疫抑制因子を阻害する薬剤をスクリーニングする方法であって、

a) 免疫抑制されている哺乳動物の生物試料における C D 3 および C D 3 から選択される T C R サブユニットタンパク質のレベルを、免疫抑制されていない哺乳動物の同様の生物試料における該サブユニットのレベルと比較して、低下させることができる溶解性免疫抑制因子を含む細胞系であって、M C A - 3 8 細胞株または M B L - 2 リンパ種に由来する上清である細胞系に、薬剤を加えるステップと、

b) 上記系の免疫抑制を、

i) C D 3 および C D 3 から選択される T C R サブユニットタンパク質の発現レベルを測定することと、

i i) 上記タンパク質発現のレベルを、同一種の哺乳動物の免疫抑制がない個体に特有である上記タンパク質の発現レベルと比較すること

により決定するステップと、

c) 上記系が免疫抑制の逆転を示すかを判定するステップとを含む方法。

【請求項 7】

前記細胞系が、M C A - 3 8 細胞株または M B L - 2 リンパ種に由来する上清であり、前記溶解性免疫抑制因子が、哺乳動物の生物試料における T リンパ球シグナル変換経路のタンパク質のレベルを、免疫抑制されていない哺乳動物の同様の生物試料における該タンパク質のレベルと比較して低下させることができる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

上記免疫抑制哺乳動物が、M C A - 3 8 株または M B L - 2 リンパ種である腫瘍を、2 6 日またはそれ以上有するマウスである請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法に使用するキットであって、C D 3、C D 3 および F c から選択される T C R サブユニットタンパク質に対する抗体と、抗体 - 抗原複合体の形成を検出する手段とを、各々別個の容器に含んでなるキット。

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 K 45/00 | A 6 1 K 48/00 | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 K 48/00 | A 6 1 P 5/14 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 P 5/14 | A 6 1 P 17/00 | 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 P 17/00 | A 6 1 P 29/00 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 P 29/00 | A 6 1 P 31/04 | |
| A 6 1 P 31/04 | A 6 1 P 31/08 | |
| A 6 1 P 31/08 | A 6 1 P 31/18 | |
| A 6 1 P 31/18 | A 6 1 P 31/20 | |
| A 6 1 P 31/20 | A 6 1 P 33/06 | |
| A 6 1 P 33/06 | A 6 1 P 33/12 | |
| A 6 1 P 33/12 | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 P 37/02 | |
| A 6 1 P 37/02 | A 6 1 P 37/04 | |
| A 6 1 P 37/04 | A 6 1 P 37/06 | |
| A 6 1 P 37/06 | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| A 6 1 P 43/00 | C 0 7 K 14/47 | |
| C 0 7 K 14/47 | C 0 7 K 16/18 | |
| C 0 7 K 16/18 | C 1 2 Q 1/02 | |
| C 1 2 N 5/10 | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q 1/02 | G 0 1 N 33/15 | Z |
| C 1 2 Q 1/68 | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/15 | G 0 1 N 33/53 | D |
| G 0 1 N 33/50 | C 1 2 N 5/00 | B |
| G 0 1 N 33/53 | A 6 1 K 37/02 | |

- (71)出願人 503403951
ロンゴ, ダン・エル
アメリカ合衆国、2 0 8 9 5 メリーランド、ケンジントン、パロル・レイン 9 6 1 0
- (71)出願人 503403962
ルーフラー, シンシア・エム
アメリカ合衆国、3 2 5 1 3 フロリダ、ペンサコラ、ノース・ナインス・アヴェニュー 5 1 5
1
- (71)出願人 503403973
ゴーシュ, パリトシュ
アメリカ合衆国、2 1 7 0 2 メリーランド、フレデリック、アシュフォード・コート 2 0 0
- (71)出願人 503404084
ヤング, ハワード・エイ
アメリカ合衆国、2 0 8 7 8 メリーランド、ケイザーズバーグ、ストーンブリッジ・ビュー・ド
ライヴ 1 4 5 2 0
- (74)代理人 100099623
弁理士 奥山 尚一
- (74)代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
- (74)代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
- (72)発明者 オチョア, アウグスト・シー
アメリカ合衆国、2 1 7 0 2 メリーランド、フレデリック、アレクサンドラ・コート 1 0 2、

- アパートメント 180
 (72)発明者 ミゾグチ、ヒロモト
 アメリカ合衆国、21702 メリーランド、フレデリック、ウィロウデイル・ドライブ 149
 、アパートメント 44
 (72)発明者 オシェア、ジョン・ジェイ
 アメリカ合衆国、メリーランド、シルヴァー・スプリング、ダブリン・ドライブ 1721
 (72)発明者 ロンゴ、ダン・エル
 アメリカ合衆国、20895 メリーランド、ケンジントン、バロル・レイン 9610
 (72)発明者 ルーフラー、シンシア・エム
 アメリカ合衆国、32513 フロリダ、ペンサコラ、ノース・ナインス・アヴェニュー 515
 1
 (72)発明者 ゴーシュ、バリトシュ
 アメリカ合衆国、21702 メリーランド、フレデリック、アシュフォード・コート 200
 (72)発明者 ヤング、ハワード・エイ
 アメリカ合衆国、20878 メリーランド、ゲイザーズバーグ、ストーンブリッジ・ビュー・ド
 ライヴ 14520

F ターム(参考) 2G045 BB20 CB01 CB02 DA36 FB05 FB08 FB12 GC15
 4B024 AA01 BA21 CA04 EA04 HA01
 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QR32 QR55 QS34
 4B065 AA91X AA99Y AB01 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA01 BA44 CA26 MA01 MA66
 NA14 ZA892 ZA962 ZB022 ZB052 ZB082 ZB092 ZB152 ZB262 ZB332
 ZB352 ZB372 ZC412
 4C085 AA03 BB11 CC03 DD62 EE01 GG02 GG06
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA89 ZA96
 ZB02 ZB05 ZB08 ZB09 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37 ZC06
 ZC41
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 DA03 DA32 MA66 NA14 ZA89 ZA96
 ZB02 ZB05 ZB08 ZB09 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37 ZC06 ZC41
 4H045 AA10 AA11 BA10 DA01 DA75 EA22 EA28 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2005027653A5 | 公开(公告)日 | 2005-05-26 |
| 申请号 | JP2003406232 | 申请日 | 2003-12-04 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 奥乔亚奥古斯托海 沟口希洛摩托 哦份额约翰·杰伊 Rongodan'eru 屋顶错误辛西娅中号 左岸巴黎什鲁斯伯里 杨孝华光芒 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 奥乔亚，奥古斯托海 沟口，广元市 奥谢，约翰·杰伊 隆戈，丹萨尔瓦多 Rufura，辛西娅M. 笨拙，Paritoshu 年轻，霍华德埃 | | |
| [标]发明人 | オチョアアウグストシー ミゾグチヒロモト オシエアジョンジェイ ロンゴダンエル ルーフラーシンシアエム ゴーシュパリトシュ ヤングハワードエイ | | |
| 发明人 | オチョア,アウグスト・シー ミゾグチ、ヒロモト オシエア,ジョン・ジェイ ロンゴ,ダン・エル ルーフラー,シンシア・エム ゴーシュ,パリトシュ ヤング,ハワード・エイ | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K31/70 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/16 A61K35/24 A61K35/26 A61K35/28 A61K35/30 A61K38/00 A61K38/20 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61K49/00 A61P5 /14 A61P17/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/06 A61P33/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K16 /18 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 | | |
| CPC分类号 | A61K38/2013 A61K39/00 A61P17/00 A61P29/00 C07K14/4702 C07K14/4703 C07K16/18 A61K2300 /00 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.A A61K31/7088 A61K35/12 A61K39/00.H A61K45/00 A61K48/00 A61P5/14 A61P17/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/06 A61P33/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.B A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045 /GC15 4B024/AA01 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/HA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B065/AA91X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084 | | |

/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA44 4C084/CA26 4C084/MA01 4C084/MA66 4C084/NA14
4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB022 4C084/ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB152
4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C084/ZC412 4C085/AA03 4C085/BB11
4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG06 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086
/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA89 4C086/ZA96
4C086/ZB02 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZB09 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086
/ZB35 4C086/ZB37 4C086/ZC06 4C086/ZC41 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB37
4C087/DA03 4C087/DA32 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB02 4C087
/ZB05 4C087/ZB08 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZB37 4C087/ZC06
4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045
/EA28 4H045/FA74

| | |
|-----|--|
| 优先权 | 07/863262 1992-04-06 US 07/987966 1992-12-11 US 08/031434 1993-03-15 US 08/034832 1993-03-17 US |
|-----|--|

| | |
|--------|---------------|
| 其他公开文献 | JP2005027653A |
|--------|---------------|

摘要(译)

可溶性免疫抑制因子存在于荷瘤哺乳动物的血清中，并参与TCR亚基蛋白水平和T淋巴细胞信号通路的变化。使用此更改，可测量T淋巴细胞转化途径中至少一种选定的TCR亚基蛋白或蛋白的水平，或NF-kB / rel系统的模式，以确定没有免疫抑制和抑制的生物体水平。已经创建了一种通过与模式进行比较来确定免疫抑制的严重性的方法。[效果]该方法可用于确认患者的T淋巴细胞可以被激活到可以进行免疫治疗的程度，并且可以用于确定引起免疫抑制的药物或逆转这种免疫的药物。免疫抑制因子的分离及其与蛋白质表达水平的结合可用于抑制免疫应答，例如在器官移植的情况下。[选择图]无