

(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2014-520555  
(P2014-520555A)

(43) 公表日 平成26年8月25日(2014.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G045
C12Q 1/48 (2006.01)	C12Q 1/48 Z	2G054
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z	4B063
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	
GO1N 33/68 (2006.01)	GO1N 33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-520354 (P2014-520354)  
 (86) (22) 出願日 平成24年7月13日(2012.7.13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年2月10日(2014.2.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/046623  
 (87) 国際公開番号 WO2013/010061  
 (87) 国際公開日 平成25年1月17日(2013.1.17)  
 (31) 優先権主張番号 61/508,057  
 (32) 優先日 平成23年7月14日(2011.7.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512175133  
 ナショナルヘルスリサーチインスティテューツ  
 National Health Research Institutes  
 台湾 350 ミアオリカウンティ、ツナン  
 タウン、キーアンロード、ナンバー  
 35  
 (74) 代理人 100093779  
 弁理士 服部 雅紀  
 (72) 発明者 タン ツェーフア  
 台湾 ミアオリカウンティ、ツナン  
 タウン、キーアンロード、ナンバー35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GLK 介在疾患の治療薬同定方法、および、GLK 介在疾患判定方法

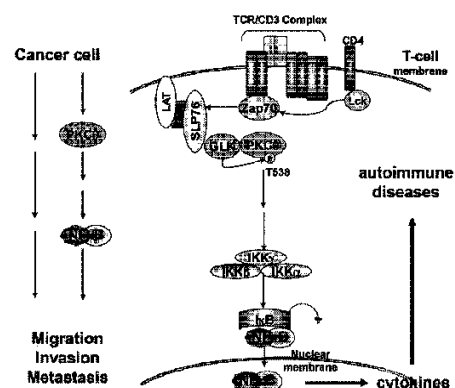
(57) 【要約】

本発明は、胚中心キナーゼ (GCK) 類似キナーゼ (GLK) 介在疾患を治療する治療薬を同定する方法を開示するものであり、試験化合物により GLK シグナル伝達の変調を検出する方法を開示する。また、本発明は、自己免疫性疾患または癌について、その存在または重症度を検出する方法を開示する。

【選択図】 図 6

FIG. 6

GLK is A Therapeutic Target for Autoimmune Diseases and Cancer



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

胚中心キナーゼ ( G C K ) 類似キナーゼ ( G L K ) 介在疾患を治療する治療薬を同定する方法であって、

前記方法は、試験化合物によって、前記 G L K が介在したシグナル伝達の変調を検出する検出ステップを含み、前記検出ステップは、

a ) 前記試験化合物の存在下で G L K 発現細胞を培養する細胞培養ステップであって、前記変調は、G L K 転写産物もしくは G L K タンパクの発現レベル、I L - 1 7 A の生産量、または、N F - B の活性を測定することにより検出される細胞培養ステップ、

b ) 前記試験化合物の存在下で、G L K タンパクを基質および A T P と反応させる反応ステップであって、前記変調は、A D P の生産量、A T P の消費量、または、リン酸化される前記基質の量を測定することにより検出される反応ステップ、

c ) 前記試験化合物の存在下で、G L K 発現癌細胞を培養する癌細胞培養ステップであって、前記変調が、前記癌細胞の転位、浸潤、または、創傷治癒を測定することにより検出される癌細胞培養ステップ、および、

d ) 前記試験化合物の存在下で G L K タンパクを基質タンパクと相互作用させる相互作用ステップであって、前記変調は、前記 G L K タンパクと前記基質タンパクとの相互作用を測定することにより検出される相互作用ステップ、  
のうちのいずれかと、

e ) 前記試験化合物の存在下の前記変調を対照と比較して、前記 G L K 介在疾患を治療する治療薬を同定する比較ステップと、

を含む治療薬同定方法。

## 【請求項 2】

前記 G L K 介在疾患は、自己免疫性疾患、炎症性疾患、癌、および癌転移からなる群より選択される請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 3】

前記基質は、P K C - タンパク、およびミエリン塩基性タンパク ( M B P ) からなる群より選択される請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 4】

前記試験化合物は、R N A i 分子、マイクロ R N A 、アンチセンス分子、および小有機分子とからなる群より選択される請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 5】

前記 G L K 発現細胞は、G L K 発現 T 細胞を含み、

前記 G L K 発現癌細胞は、G L K 発現肺癌細胞を含む請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 6】

前記癌は、G L K タンパク介在癌の型であり、哺乳類ラパマイシン標的タンパク ( m T O R ) から独立したものである請求項 2 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 7】

前記自己免疫性疾患は、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、成人発症型ステイル病、グレーブス病、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、神経脊髄炎、自己免疫性脳脊髄炎、および脱毛症からなる群より選択される請求項 2 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 8】

前記癌は、肺癌、食道癌、膠芽細胞腫、膵臓癌、乳癌、および肝癌からなる群より選択される請求項 2 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 9】

前記ステップ d ) において、前記 G L K タンパクと前記基質タンパクとの間の相互作用は、蛍光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) アッセイまたは増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法を用いて測定される請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

## 【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記ステップ d ) において、

前記基質タンパクは P K C - タンパクを含み、

前記 G L K タンパクおよび前記 P K C - タンパクは、互換性を持つ異なる蛍光プローブで標識されており、そのうち一方の蛍光プローブは、他方のプローブよりも高い蛍光波長を有しており、

前記変調の関連は、より高い蛍光発光波長の変化により検出される請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

【請求項 1 1】

胚中心キナーゼ ( G C K ) 類似キナーゼ ( G L K ) 介在疾患の存在または重症度を判定する方法であって、

a ) G L K 介在疾患または癌を有すると疑われる被験者から、T 細胞または癌細胞を含むサンプルを採取する採取ステップと、

b ) 前記 T 細胞または前記癌細胞中の G C K 類似キナーゼ ( G L K ) の発現レベルを測定する測定ステップと、

c ) 前記 G L K 介在疾患の存在または重症度を判定する判定ステップと、  
を含み、

前記被験者の前記 T 細胞または前記癌細胞中の前記 G L K の発現レベルが、対照の G L K の発現レベルと比較して増加していることは、前記被験者が、前記 G L K 介在疾患を発症もしくは保有するリスクを有している、または、癌の再発もしくは転移のリスクを有していることを示している G L K 介在疾患判定方法。

【請求項 1 2】

前記 G L K の発現レベルの増加は、哺乳類ラパマイシン標的タンパク ( m T O R ) から独立したものである請求項 1 1 に記載の G L K 介在疾患判定方法。

【請求項 1 3】

前記測定ステップは、G L K タンパクの発現レベルを測定するステップを含む請求項 1 1 に記載の G L K 介在疾患判定方法。

【請求項 1 4】

前記測定ステップは、免疫プロット分析、フローサイトメトリー分析、または免疫組織化学によって行われる請求項 1 3 に記載の G L K 介在疾患判定方法。

【請求項 1 5】

前記測定ステップは、G L K 転写産物の発現レベルを測定するステップを含む請求項 1 1 に記載の G L K 介在疾患判定方法。

【請求項 1 6】

測定された前記 G L K 転写産物の発現レベルをハウスキーピング遺伝子に対して補正し、前記 G L K 転写産物の補正された発現レベルを得るステップをさらに含む請求項 1 5 に記載の G L K 介在疾患判定方法。

【請求項 1 7】

前記 G L K 介在疾患は、自己免疫性疾患、炎症性疾患、癌、および癌転移からなる群より選択される請求項 1 1 に記載の G L K 介在疾患判定方法。

【請求項 1 8】

前記 G L K 発現細胞は、G L K 過剰発現細胞を含み、または、  
前記 G L K 発現癌細胞は、G L K 過剰発現癌細胞を含む、請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

【請求項 1 9】

前記 A T P は非放射性である請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

【請求項 2 0】

前記 G L K タンパクと前記基質タンパクとの相互作用は試験管内で生じるものである請求項 1 に記載の治療薬同定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【0001】

本発明は一般に、自己免疫および癌に関し、さらに詳細には、自己免疫変調およびPKC/NF- $\kappa$ Bシグナル伝達、並びに腫瘍転移に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

NF- $\kappa$ Bは、細胞生存、成長および増殖に貢献する遺伝子を調節する主要な転写因子である。T細胞レセプター(TCR: T cell receptor)結合は、感染に対する寄主防御ならびに炎症、癌および自己免疫の進行に寄与するNF- $\kappa$ B活性化を引き起こす。PKC- $\delta$ は、IKK-NF- $\kappa$ B活性化およびT細胞機能に重要な役割を果たす。TCR刺激におけるPKC- $\delta$ 活性化に、アダプタSLP-76が必要になる。しかしながら、SLP-76からPKC- $\delta$ へのシグナル伝達およびPKC- $\delta$ を活性化するダイレクトキナーゼについては、依然として不明な点がある。したがって、TCR誘発NF- $\kappa$ B活性化の最も重要な疑問点は、SLP-76とPKC- $\delta$ との間のかなめ線を同定することである。

10

## 【0003】

PKC- $\delta$ の活性化には、T538でのリン酸化が必要である。キナーゼPDK1はPKC- $\delta$ と相互作用するので、T538でのPKC- $\delta$ のリン酸化はPDK1欠損T細胞では不完全である。したがって、PDK1がT538でPKC- $\delta$ を直接リン酸化することが提唱されているが、PDK1が直接にPKC- $\delta$ をインビトロでリン酸化することが明らかに証明されたわけではない。さらに、PDK1がTCRシグナル伝達でなくCD28のみにより活性化されることが観測されており、PDK1がTCRシグナル伝達により誘発されるPKC- $\delta$ 活性化のためのダイレクトキナーゼであるという可能性はさらに除外される。したがって、T細胞の活性化中に直接にPKC- $\delta$ を活性化するキナーゼは、依然としてその定義が難しい。

20

## 【0004】

GCK(Germinal Center Kinase)類似キナーゼ(GLK(GCK-like kinase); MAP4K3ともいう)は、MAPキナーゼキナーゼキナーゼキナーゼ(MAP4K)の構成メンバーであり、Ste20類似セリン/トレオニンキナーゼのサブファミリーである。GLKは、保護されたN末端キナーゼドメインと、保護されたC末端シトロン相同ドメインと、中央の数個のプロリンリッチなモチーフとを含んでいる。Jnkリン酸化は、ストレス刺激に応じ、MEKK1およびMKK4/SEK1を介してGLKによって誘発される。また、GLKは、アミノ酸処理後、上皮細胞系列中のmTOR下流エフェクターS6K1および4E-BP1の活性化を介して、細胞発育を調節する。しかしながら、GLKの調節機構および生理的役割については、未知な部分が多い。

30

## 【0005】

したがって、GLKの調節と関連した前述の欠損および機能不全、特にTCRシグナル伝達プロセス中のGLKの生理的役割と関連した前述の欠損および機能不全を扱うためには、従来技術には未着手の課題が存在する。

## 【発明の概要】

40

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明の一態様は、胚中心キナーゼ(GCK)類似キナーゼ(GLK)が介在した疾患を治療するための治療薬を同定する方法に関する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

前記方法は、GLKが介在したシグナル伝達の変調を、試験化合物により検出する検出ステップを含み、この検出ステップは、以下のステップ、a)試験化合物の存在下でGLK発現細胞を培養するステップであって、前記変調は、GLK転写産物またはGLKタンパクの発現レベル、生産されるIL-17A(interlukin-17A)の量また

50

はNF- $\kappa$ Bの活性を測定することにより検出される、前記細胞培養ステップ、またはb)試験化合物の存在下で、GLKタンパクをこれらの基質とATPの存在で反応させる反応ステップであって、前記変調は、生産されるADPの量、消費されるATPの量および/またはリン酸化される基質の量を測定することにより検出される、前記反応ステップ、またはc)試験化合物の存在下でGLK発現癌細胞を培養する癌細胞培養ステップであって、前記変調が、前記癌細胞の転位/浸潤/創傷治癒を測定することにより検出される、前記癌細胞培養ステップ、またはd)試験化合物の存在下でGLKタンパクをこれらの基質タンパクと相互作用させる相互作用ステップであって、前記変調は、GLKタンパクと基質タンパクとの間の相互作用を測定することにより検出される、前記相互作用ステップ、および、e)試験化合物の存在下で前記変調を対照と比較して、GLK介在疾患を治癒する治療薬を同定する、比較ステップを含む。

10

## 【0008】

本発明の別の態様は、胚中心キナーゼ(GCK)類似キナーゼ(GLK)介在疾患の存在および/または重症度を検出する方法に関する。GLK介在疾患の存在および/または重症度の検出は、癌の予後を判定するステップを含んでもよい。前記方法は、以下のステップ、a)GLK介在疾患または癌を有すると疑われる被験者から、T細胞または癌細胞を備えるサンプルを採取する採取ステップと、b)T細胞または癌細胞中のGCK類似キナーゼ(GLK)の発現レベルを測定する測定ステップと、c)GLK介在疾患の存在および/または重症度を判定する判定ステップを含み、T細胞または癌細胞中のGLK発現レベルの、対照中のGLKの発現レベルと比較した増加分は、被験者が、GLK介在疾患を進展または保有するリスクを有している、または癌の再発および/または転移のリスクを有していることを示している、前記判定ステップと、を含む。前記判定ステップは、癌の予後を判定するステップを含んでもよい。

20

## 【0009】

上記およびその他の態様は、以下の図面を参照して説明する好適な実施形態の以下の説明から明らかになるが、本開示の趣旨および新しいコンセプトの範囲から逸脱することなく変更および修正を行ってもよい。

## 【0010】

添付の図面は、本発明の1つ以上の実施形態を例示し、詳細な説明と共に、本発明の原理を説明する役目を果たすものである。実施形態においては全図面を通し、可能な限り、同じ参照符号を同じまたは類似の要素を指示するために用いるものとする。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】図1は、T538でGLKがPKC- $\delta$ に直接に相互作用し、リン酸化する様子を示す図である。(a)は、GLK-siRNAまたはGLKをコードしたプラスミドを導入されたジャーカットT細胞中における、NF- $\kappa$ Bレポーターに対するルシフェラーゼ活性アッセイを示す。エラーバーは、3組のサンプルの標準偏差(s.d.)である。(b)は、CD3刺激作用後のマウスプライマリーT細胞の溶解物中の内因性GLKのPKC- $\delta$ との共同免疫沈降(IP)を示す。NSは標準的な血清のこと。IBは免疫プロットのこと。(c)は、精製Flag-GLKおよびGST-PKC- $\delta$ タンパクに対するインビトロ結合アッセイを示す。pptは沈降のことである。(d)は、導入後のHEK293T細胞から分離されたFlag-GLKおよびMyc-PKC- $\delta$ を(基質として)用いて行ったインビトロ・キナーゼ・アッセイにおけるGLK発現およびGLK誘発PKC- $\delta$ リン酸化の免疫プロット分析を示す。ジャーカット細胞の溶解物中のPKC- $\delta$ の免疫プロット分析は、コントロールバンド(右の2本のレーン)として示される。(e)は、精製Flag-GLKおよびGST-PKC- $\delta$ タンパクを用いた、インビトロ・キナーゼ・アッセイにおけるGLK発現およびGLK誘発PKC- $\delta$ リン酸化の免疫プロット分析を示す。データは、3つの別々の実験を表している。

40

【図2】図2は、SLP-76がGLKの直接の上流側調節因子であることを示す図である。(a)は、CD3刺激作用後のマウスプライマリーT細胞の溶解物中内因性GLKの

50

S L P - 7 6 または P K C - との共同免疫沈降を示す。( b ) は、精製 F l a g - G L K および F l a g - S L P - 7 6 タンパクに対するインビトロ結合アッセイを示す。( c , d ) は、空ベクターまたは G L K をコードしたプラスミドを導入され、S L P - 7 6 s h R N A ( d ) の有無にかかわらず、その後、抗 C D 3 抗体で処理または未処理の J 1 4 細胞 ( c ) またはジャーカット T 細胞 ( d ) の溶解物中の F l a g - G L K のインビトロ・キナーゼ・アッセイを示す。( e ) は、空ベクター、S L P - 7 6 をコードしたプラスミド、または、G L K もしくは H P K 1 をコードしたプラスミドを導入された H E K 2 9 3 T 細胞の溶解物中における、S L P - 7 6 S 3 7 6 のリン酸化の免疫プロット分析を示す。矢印は、S L P - 7 6 S 3 7 6 のリン酸化を示す。データは、3 つの別々の実験を表している。

10

【図 3】図 3 は、G L K 欠損プライマリー T 細胞は、P K C - - I K K 活性化および T 細胞増殖が不完全であることを示す図である。( a , b ) は、C D 3 刺激作用の後 ( a ) 、または C D 3 と C D 2 8 刺激作用の後 ( b ) 、精製 T 細胞の溶解物中における G L K 、 p - P K C - 、 P K C - 、 I K K 、 p - E r k 、 E r k 、 p - P D K 1 、 P D K 1 および チューブリンの免疫プロット分析を示す。( c ) は、抗 C D 3 抗体の後にイオノマイシン ( I o n o ) で刺激した精製マウス T 細胞中のカルシウム指示薬 F l u o - 4 のフローサイトメトリーを示す。( d , e ) は、野生型マウスまたは G L K 欠損マウスから分離した C D 3 + T 細胞を、抗 C D 3 抗体または P M A と、イオノマイシンとを加えて 7 2 時間処理した、[ <sup>3</sup> H ] チミジン移入アッセイ ( d ) および C F S E プロファイル ( e ) を示す。F l o w J o ソフトウェアにより解析した増殖指数 ( 平均 + / - 標準誤差 ) を示す。( f ) は、空ベクター ( p C M V - G F P ) または G F P - G L K を導入された野生型および G L K - 欠損の T 細胞中における [ <sup>3</sup> H ] チミジン移入アッセイを示す。W T は野生型を指し、G L K - K O は G L K - 欠損マウスを指す。データは、3 つの別々の実験を表している ( エラーバー ( d , f ) 、標準誤差 ) 。

20

【図 4】図 4 は、インビボの G L K - 欠損マウス中で T 細胞に依存する免疫応答が損なわれていることを示す図である。( a , b ) は、K L H ( k e y h o l e l i m p e t h e m o c y a n i n ) - 免疫性付与マウスから分離し、インビトロで 3 日間、K L H により再刺激した K L H - 再刺激リンパ節細胞の培養液上清中における C F S E 希釈アッセイ ( a ) 、ならびに、I F N - 、I L - 2 および I L - 4 の E L I S A アッセイ ( b ) を示す。F l o w J o ソフトウェアにより解析した増殖指数 ( 平均 ) を示す。( c , d ) は、第 1 の免疫化の 1 4 日後 ( c ) または第 2 の免疫化の 7 日後 ( d ) のマウスの血清中におけるニトロフェノール特異抗体 ( N P 特異的 A b ) 生産の E L I S A アッセイを示す。n = 6 である。( e ) は、G L K 欠損マウス中および B 6 バックグラウンドの F 5 の野性型同腹子における E A E 誘起 ( 約 9 7 % ) を示す。マウスの臨床のスコア ( 1 - 5 ) を示す。n = 7。( f ) は、1 4 日目の M O G 免疫マウスの脳および脊髄から採取した浸透型 T<sub>H</sub> 1 7 細胞 ( C D 4 5 依存性 ) のフローサイトメトリーを示す。( g ) は、M O G 免疫マウスの血清中における I L - 1 7 レベルの E L I S A アッセイを示す。n = 6 である。( h ) は、インビトロで識別した T<sub>H</sub> 1 7 細胞における I L - 1 7 生産 C D 4 T 細胞のフローサイトメトリーを示す。( i ) は、T<sub>reg</sub> 細胞と抗 C D 3 コーティングビーズとを 3 : 1 ( 左 ) または 9 : 1 ( 右 ) の割合で培養した T 細胞に対応する C F S E 希釈物として提供された、野生型または G L K 欠損 T<sub>reg</sub> 細胞による ( 細胞質色素 C F S E で標識化された ) C D 3 + T 細胞の抑制を示す。データは、3 つ ( パネル b 、 e 、 f 、 h ) または 2 つ ( パネル a 、 c 、 d 、 g 、 i ) の別々の実験からの平均 + / - 標準誤差で示される。\* P 値 < 0 . 0 5 。 \*\* P 値 < 0 . 0 0 1 。

30

40

【図 5】図 5 は、G L K 発現および P K C - - T 5 3 8 リン酸化が、S L E 患者からの T 細胞中に誘発されることを示す図である。( a ) は、4 9 人の S L E 患者および 3 5 の健常対照者 ( H C : h e a l t h y c o n t r o l ) の P B L からの G L K 発現 ( G L K + ) リンパ球のフローサイトメトリー分析を示す。S L E 患者 ( S L E D A I ( S L E d i s e a s e a c t i v i t y i n d e x ) = 2 0 ) からの結果を、代表として示す。( b ) は、全ての S L E 患者からの G L K 発現 T 細胞のパーセンテージと、S L E

50

D A Iとの間における正の相関および大きな回帰を示す（ピアソン相関係数： $r = 0.773$ ；単回帰： $Y = -0.886 + 0.3901X$ 、回帰相関係数：調整 $R^2 = 0.597$ 、 $P$ 値 =  $1.08 \times 10^{-17}$ ）。（c）は、高いGLK<sup>+</sup>パーセンテージ（21%）のSLE患者からのGLK<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージと、SLEDAIとの間の高い相関および大きな回帰を示す（ $n = 16$ ；ピアソン相関係数： $r = 0.807$ ；単回帰： $Y = 5.2085 + 0.2757X$ 、回帰相関係数：調整 $R^2 = 0.626$ 、 $P$ 値 =  $0.000159$ ）。（d）は、ランダムに選んだ5人のSLE患者および5人の健常対照者から採取したPBLの溶解物中におけるGLK、p-PKC、p-IKKおよびチュープリンの免疫プロット分析を示す。各々の患者のSLEDAIをパネル下方に示す。チュープリンに対する補正のための相対的な倍率の変更を、パネルの最下部に示す。（e）は、

10

代表的なSLE患者および健常対照者のPBLから採取した、リン酸-PKC またはリン酸-IKKが陽性の（CD3依存性）細胞のフローサイトメトリーを示す（パネルa参照）。データは、少なくとも3つの別々の実験を表している（d, e）。  
【図6】図6は、TCRシグナル伝達中にGLKに誘発されるPKC / NF- $\kappa$ B活性化を表す図である。TCR結合の後、活性化LckがTCR錯体に補充されて、CD3の免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）をリン酸化し、Zap70の補充および活性化が実現される。Zap70活性化は、近接SLP-76シグナリング錯体の構築を誘発する。SLP-76は、直接にGLKと相互作用し、GLKキナーゼの活性化に必要である。活性化GLKは、T538で直接に相互作用しPKCをリン酸化することにより、PKC膜トランスロケーションおよびキナーゼ活性化が実現される。次いで、

20

活性化PKCが、IKK/NF- $\kappa$ Bシグナル伝達カスケードの活性化を誘発する。癌細胞では、GLKは、PKC/NF- $\kappa$ Bシグナル伝達を通して転位/浸潤/転移を誘発し、あるいはPKCから独立したシグナル伝達を誘発する。  
【図7】図7は、GLKがTCR刺激作用によりT細胞中のNF- $\kappa$ B活性化を誘発することを示す図である。（a）は、ベクター、または、GLKもしくはGLK（KD）変異を発現しているジャーカットT細胞を抗CD3抗体で15分処理した溶解物中におけるGLK、p-IKK、IKK、p-Erk、Erk、p-mTOR、mTORおよびチュープリンの免疫プロット分析を示す。（b）の左側は、TNF-（Tumor Necrosis Factor）刺激の後に、空ベクターまたはGLK siRNAが導入されたジャーカット細胞のNF- $\kappa$ Bリポーターアッセイを示す。右側は、抗CD3刺激の後、空ベクター、GLKをコードしたプラスミドまたはGLK siRNAを導入されたジャーカットT細胞の溶解物中におけるGLKおよびチュープリンの免疫プロット分析を示す。（c）は、抗CD3抗体で刺激されたFlag-GLK発現J-TAg T細胞から分離されたGLKのインビトロ・キナーゼ・アッセイを示す。矢印はGLK自動リン酸化を指す。IPは免疫沈降を指す。IBは免疫プロットを指す。（d）は、30分間のCD3刺激後、GLK、GLK（KD）変異をコードしたプラスミドが導入されたJ-TAg T細胞の溶解物中における、GLK、p-PKC、PKC、およびチュープリンの免疫プロット分析を示す。（e）は、空ベクター、GLK、GLK、若しくはPKC siRNAを単独でコードしたプラスミド、または、PKC siRNAを加えたGLKをコードしたプラスミドが導入されたジャーカットT細胞のNF- $\kappa$ Bリ

30

40

ポーターアッセイを示す。抗CD3抗体の有無にかかわらず、これら細胞を2時間刺激した。データは、3つの別々の実験を表している。\*  $P$ 値 < 0.05。\*\*  $P$ 値 < 0.001。パネル（b）および（e）のエラーバーは、三組のサンプルの標準偏差（s.d.）で与えられる。データは、少なくとも3つの別々の実験を表している。  
【図8】図8は、GLKがPKCと相互作用することを示す図である。（a）は、HEK293T細胞に対して、空ベクターまたはGLKをコードしたプラスミドを導入し、さらにPKCをコードしたプラスミドを共に導入したもの、または導入していないものである、HEK293T細胞の溶解物中におけるGLKおよびPKCの共同免疫沈降（IP）、ならびに、免疫プロット（IB）分析を示す。（b, c）のうち、パネル上方は、5  $\mu$ g/mlの抗CD3抗体で刺激された、Flag-GLK発現J-TAg（b

50

) または E L 4 ( c ) T 細胞の溶解物中における、 F l a g - G L K および内因性 P K C - の共同免疫沈降を示す。パネル下方は、プレ免疫沈降サンプル中における G L K、 p - P K C - 、 P K C - およびチューブリンの免疫プロット分析を示す。データは、少なくとも 3 つの別々の実験を表している。

【図 9】図 9 は、 G L K と S L P - 7 6 との間の相互作用が、チロシンリン酸化を介して行われることを示す図である。( a ) は、空ベクターまたは S L P - 7 6 をコードしたプラスミドと共に、 G L K をコードしたプラスミドが導入された H E K 2 9 3 T 細胞の溶解物中における G L K および S L P - 7 6 の共同免疫沈降 ( I P ) および免疫プロット ( I B ) 分析を示す。( b ) は、抗 C D 3 抗体で刺激された、 F l a g - S L P - 7 6 過剰発現 J - T A g T 細胞の溶解物中における、 S L P - 7 6 および G L K の共同免疫沈降を示す。( c ) は、 F l a g - G L K を導入された J - T A g T 細胞中における、抗 C D 3 に誘発された S L P - 7 6 / G L K / P K C - 相互作用の共同免疫沈降を示す。( d ) は、 S L P - 7 6 をコードしたプラスミドと共に、空ベクターまたは G L K をコードしたプラスミドを導入された H E K 2 9 3 T 細胞の溶解物中における、 G L K および S L P - 7 6 の共同免疫沈降を示す。細胞は、チロシンホスファターゼ阻害剤パーバナジン酸もしくはセリン/スレニオンホスファターゼ阻害剤オカダ酸と共に、または抜きで、前処理されている。データは、少なくとも 3 つの別々の実験を表している。

【図 10】図 10 は、 V a v 1 が T C R - 誘発 G L K 活性化に必要なことを示す図である。抗 C D 3 抗体の存在下または不存在下で 30 分刺激した V a v 1 s h R N A ノックダウンジャーカット T 細胞 ( s h V a v 1 a - c ) から分離された F l a g - G L K のインビトロ・キナーゼ・アッセイを示す。基質として M B P ( m y e l i n b a s i c p r o t e i n ) を用いている。データは、少なくとも 3 つの別々の実験を表している。

【図 11】図 11 は、 G L K 欠損マウスでは T 細胞進行が標準的であることを示す図である。( a ) は、遺伝子 - トラップベクターの構造を示す。 - g e o は、 - ガラクトシダーゼおよびネオマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子による融合を示す。 S A は、スプライス受容体を示す。数の記入されたボックスは、 G L K の配列情報を示す。点線矢印は、 P C R 用プライマーを示す。( b ) は、マウステイルからのゲノム DNA 中の G L K 野生型および変異対立遺伝子の P C R 分析を示す。 P C R 産物の中で、高いバンド ( 1 4 0 0 b p ) のものは、野生型 ( W T ) の対立遺伝子を示し、低いバンド ( 1 0 0 0 b p ) は、 G L K 変異対立遺伝子を示す。( c ) は野生型および G L K - 欠損 ( G L K - K O ) マウスの胸腺、( d ) は脾臓、( e ) はリンパ節からの、 T リンパ球のフローサイトメトリー分析を示す。データは、平均 + / - 標準誤差を提示している。( f ) は、抗 C D 3 - ビオチンおよびストレプトアビジンで刺激したマウス T 細胞の溶解物中における、 G L K、 p - P L C 1、 p - L c k、 L c k およびチューブリンの免疫プロット分析を示す。( g ) は、精製 T 細胞中における T 細胞増殖の C F S E 希釈アッセイを示す。また、 F l o w J o ソフトウェアによって分析された増殖指数 ( 平均 + / - 標準誤差 ) も示す。データは、少なくとも 3 つの別々の実験を表している ( b - g ) 。

【図 12】図 12 は、 T<sub>H</sub>1 および T<sub>H</sub>2 の分化は、 G L K 欠損によって損なわれることを示す図である。 I F N - 生成 C D 4<sup>+</sup> T 細胞、 I L - 4 生成 C D 4<sup>+</sup> T 細胞および F o x p 3 - 陽性 C D 4<sup>+</sup> T 細胞のフローサイトメトリーを示す。データは、平均 + / - 標準誤差で示される。データは、少なくとも 3 つの別々の実験を表している。

【図 13】図 13 は、血清 I L - 17 のレベルが S L E 患者で増加することを示す図である。( a ) は、 S L E 患者およびペアを組まれた健常対照者のプロファイルを示す。データは、平均 + / - 標準偏差で示される。( b ) は、 S L E 患者および健常対照者 ( H C ) の血清中の I L - 17、 T N F - 、および I L - 6 ( i n t e r l e u k i n - 6 ) の E L I S A アッセイを示す。

【図 14】図 14 は、 G L K - 欠損マウス中の C I A ( C o l l a g e n - i n d u c e d a r t h r i t i s ) の誘起がそこなわれたことを示す図である。( A ) は、 G L K 欠損型マウスと野生型 ( W T ) マウスとの間で疾患進行を比較する平均臨床のスコア + /

10

20

30

40

50

- 標準誤差を示す。動物の記録は、コラーゲン免疫化の後、週に1度行われた。n = 5である。(B)は、第2の免疫化の7日後に得た後部関節を示す。(C)は、免疫化の7日後のGLK-欠損マウスおよびWTマウスからの血清のIL-1 (interleukin-1)レベルを判定するためのELISAアッセイを示す。(DおよびE)は、第2の免疫化の7日後のマウスからの血清のIL-6レベル(D)およびIL-17Aレベル(E)をELISAアッセイにより判定した結果を示す。\* p < 0.05。\* \* p < 0.01。

【図15】図15は、RA (rheumatoid arthritis) 患者からの末梢血T細胞中のGLKタンパクおよびmRNAレベルが増加することを示す図である。(A)は、ランダムにサンプルした5人のRA患者および2人の健常対照者(HC)から採取した精製末梢血T細胞中のGLKおよびリン酸化PKC- (p-PKC-)の免疫ブロッティング分析を示す。GAPDHに対して補正されたGLKの相対的な倍率変更は、パネルの下部に示される。(B)は、11人のRA患者と5人のHCとの間のGLK発現レベルの比較を示す。データは、GAPDHに対して補正されたGLKの相対的な倍率変更として示される。p = 0.047である。(C)は、12人のRA患者および13人のHCの精製末梢血T細胞中における、GLKメッセンジャーRNA (mRNA)のレベルを示す。データは、ペプチジルプロリルイソメラーゼ (PP1A) mRNA転写物に対するGLKの割合として表される。エラーバーは、平均(標準誤差)の標準誤差を示す。p = 0.0029である。

【図16】図16は、滑液からのT細胞およびRA患者の滑膜組織中におけるGLKの過剰発現を示す図である。(A)は、代表的なRA患者およびOA患者から採取した滑液白血球中におけるGLKおよびp-PKC-の免疫ブロッティング分析を示す。(B)は、代表的なRA患者およびOA患者の滑液中におけるGLKポジティブなCD3依存性T細胞のフローサイトメトリー分析を示す。(C)は、2人のRA患者および2人のOA患者の滑膜組織中の抗GLK(青色)および抗CD3(茶色の)に対する免疫組織化学染色を示す。矢印は、GLK発現T細胞を表す。

【図17】図17は、RA患者の滑液および末梢血からのT細胞中のGLK、PKC- およびCD3の共通局在性を示す図である。(A)は、TCS SP5(ライカ)共焦点システムによる、RA患者およびOA患者の滑液T細胞中のGLK、PKC- およびCD3の共焦点顕微鏡検査を示す。(B)は、TCS SP5(ライカ)共焦点システムによる、RA患者およびHCの末梢血T細胞中のGLK、PKC- およびCD3の共焦点顕微鏡検査を示す。

【図18】図18は、RA患者の末梢血T細胞中における炎症サイトカインレベルの増加およびGLK、p-PKC- およびp-IKKの共存を示す図である。RA患者および健常対照者における(A)TNF-、(B)IL-6、および(C)TGF-の血清レベルを、ELISAアッセイにより判定した。(D)は、代表的なRA患者および健常対照者(HC)の末梢血白血球から採取したGLK/p-PKC-/p-IKK陽性細胞のフローサイトメトリー分析を示す。CD3陽性T細胞は、ゲート設定された後、フローサイトメトリーで分析された。(E)は、CD3にゲートされたT細胞中のGLK発現を30人のRA患者と24人のHCとの間の比較を示す。エラーバーは、平均95%の信頼区間を示す。\* p < 0.05。\* \* p < 0.01。

【図19】図19は、RA疾患活動性とGLK発現T細胞頻度との相関を示す図である。(A)~(D)は、以下の間の正の相関および大きな回帰を示す。(A)圧痛関節数(TJC: tender joint count)とGLK発現T細胞の頻度との間(ピアソンの相関係数: r = 0.500; 単純な直線的な回帰: Y = 0.274X - 0.402 (p = 0.005))。(B)赤血球沈降速度(ESR: erythrocyte sedimentation rate)とGLK発現T細胞の頻度との間(ピアソンの相関係数: r = 0.400; 単純な直線的な回帰: Y = 1.113X + 9.602 (p = 0.003))。(C)C反応性タンパク質(CRP: C-reactive protein)とGLK発現T細胞の頻度との間(ピアソンの相関係数: r = 0.330; 単純な直

10

20

30

40

50

線的な回帰： $Y = 0.059X - 0.271$ 、 $p = 0.015$ ）。(D) DAS28 (28-joint disease activity score) と全ての RA 患者からの GLK 発現 T 細胞の頻度との間 (ピアソンの相関係数： $r = 0.606$ ；単純な直線的な回帰： $Y = 0.065X + 3.575$ 、 $p = 0.005$ )。 (E) は、DAS28 と 30 人の患者のうちの 26 人からの GLK 発現 T 細胞の頻度との間の相関および大きな回帰を示す (ピアソンの相関係数： $r = 0.713$ ；単純な直線的な回帰： $Y = 0.061X + 3.6158$ 、 $p = 0.0000639$ )。

【図 20】図 20 は、成人発症型ステイル病 (AOSD: Adult-Onset Still's Disease) をもつ患者および健常対照者 (HC) からの T 細胞中の GLK 発現レベルを示す図である。(A) は、1 人の AOSD 患者の末梢血から得られた、CD3<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞の細胞内 GLK 生産のフローサイトメトリー輪郭プロットの代表的な例を示し、(B) は、1 人の健常対照者から得られた、それらの代表的な例を示す。(C) は、24 人の対象の AOSD 患者および 12 人の HC から得られた、循環 GLK 発現 CD3<sup>+</sup>T 細胞 (C) の頻度を示す。(D) は、GLK 転写産物の相対的発現レベルを AOSD 患者と HC との間で比較して示す。(E) は、AOSD 患者および HC からの末梢血 T 細胞の溶解物中における、GLK 発現の免疫プロット分析を示す。(F) は、GLK タンパクの相対的発現レベルを AOSD 患者と HC (F) との間で比較して示す。横棒は、中央値を示す。\* P 値は、マン-ホイットニー-U 試験によって判定された。

【図 21】図 21 は、成人発症型ステイル病 (AOSD) をもつ対象患者および健常対照者 (HC) からの IL-1 (A)、IL-6 (B)、IL-17A (C) および TNF- (D) を含む炎症性サイトカインの血清レベルを比較して示す図である。横棒は、中央値を示す。\* P-値は、マン-ホイットニー-U 試験によって判定された。

【図 22】図 22 は、循環 GLK 発現 T 細胞の頻度と、成人発症型ステイル病をもつ 24 人の患者から採取した以下の (A) ~ (H) との間の相関を示す。(A) 疾患活動性スコア；(B) 血清フェリチンレベルを含む活動性パラメータ；(C) C 反応性タンパク質 (CRP) レベル；(D) 可溶性のインターロイキン 2 レセプターレベル；ならびに (E) IL-1、(F) IL-6、(G) TNF-、および (H) IL-17A を含むサイトカインの血清レベル。相関係数 ( ) および p 値は、非母数のスピアマンの順位相関試験によって得られた。

【図 23】図 23 は、循環 GLK 発現 T 細胞、GLK タンパクの発現レベル、および転写産物のレベルの変化、ならびに、有効な治療後の 12 人の AOSD 患者における可溶性インターロイキン 2 レセプター (sIL-2R: soluble interleukin-2 receptor) の血清レベルの変化を示す図である。データは、平均 + / - 標準誤差で示される。\*  $p < 0.005$ 、ウイルコクソンの符号順位検定によって処理前に対して判定される。

【図 24】図 24 は、自己免疫性疾患を有する患者からの T 細胞中の GLK 過剰発現を示す図である。強直性脊椎炎 (AS: ankylosing spondylitis)、シェーグレン症候群 (SS: Sjogren's syndrome)、脱毛症、成人発症型ステイル病 (AOSD: adult onset Still's disease) および神経脊髄炎 (NMO: neuromyelitis optica) の患者から採取した精製 T 細胞の溶解物中の GLK および GAPDH の免疫プロット分析を示す。HC は、健常対照者を指す。

【図 25】図 25 は、グレーブス病の患者からの T 細胞中の GLK 過剰発現を示す図である。(a) は、グレーブス病 (Gd: Grave's disease) 患者および健常対照者 (HC) からの精製 T 細胞の溶解物中の GLK および GAPDH の免疫プロット分析を示す。(b) は、HC (n = 3) と Gd (n = 7) との間の相対的 GLK 発現を現す定量 PCR 法を示す。

【図 26】図 26 は、グレーブス病患者において GLK ポジティブな T 細胞の増加するパーセンテージを示す図である。グレーブス病 (Gd) および健常対照者 (HC) による被

10

20

30

40

50

験者の末梢血からの G L K 発現 T リンパ球のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 27】図 27 は、大部分の G L K - 過剰発現 T 細胞は、I L - 17 生成細胞であることを示す図である。(a) は、S L E 患者および健常対照者の血清 I L - 17 レベルを判定するための E L I S A アッセイを示す。(b) は、代表的な S L E 患者 ( S L E D A I = 12 ) の末梢血からの G L K / I L - 17 - ダブル陽性 T 細胞 ( C D 3 依存性 ) のフローサイトメトリー分析を示す。(c) は、H C および S L E 患者からの T 細胞 ( C D 3 依存性 ) 中、または、T 細胞部分集合 ( 各個に依存性 ) 中の G L K / I L - 17 - ダブル陽性細胞のパーセンテージを示す。(d) は、ダブルネガティブ T 細胞、C D 4 陽性 T 細胞、または C D 8 陽性 T 細胞にゲートをかけた後、S L E 患者の P B L からの G L K / I L - 17 - ダブル陽性細胞をフローサイトメトリーによって分析した結果を示す。異なる部分集合中の G L K / I L - 17 - ダブル陽性細胞のパーセンテージが示されている。

【図 28】図 28 は、L c k - G L K トランスジェニック ( T g ) マウスは、自発的に自己免疫性疾患を進行させることを示す図である。(a) は、L c k - G L K T g マウスのフェノタイプを示す。大部分の L c k - G L K T g マウスは、弱い尾部および後肢を示している。高い G L K 発現を有する L c k - G L K T g マウスは、13 週齢で死亡した。L c k - G L K T g マウスは、白内障および盲目を引き起こした。(b) および (c) は、L c k - G L K T g マウスの血清自己抗体を E L I S A アッセイにより検出した結果を示す。抗核抗体は、S L E を示す。リウマチ因子は、R A を示す。

【図 29】図 29 は、L c k - G L K トランスジェニック ( T g ) マウスが I L - 17 A レベルの増加を示すことを示す図である。(a) は、マウス ( 5 週齢 ) の血清サイトカインを E L I S A アッセイ ( n = 8 ) により測定した結果を示す。(b) は、プール L c k - G L K T g マウスからの周辺 T 細胞中における G L K および I L - 17 A の m R N A レベルを、リアルタイム P C R ( n = 6 ) を用いるタクマンプローブにより判定した結果を示す。

【図 30】図 30 は、非小細胞肺臓癌腫中の G L K 過剰発現を示す図である。それぞれ、肺癌の患者からの肺臓組織中の G L K、p - I K K、p - m T O R の免疫プロットティング分析を示す。n = 20 である。T : 腫瘍部分。N : 正規の部分。

【図 31】図 31 は、食道癌中の G L K 過剰発現を示す図である。それぞれ、患者からの食道癌腫サンプル中の G L K の免疫プロットティング分析を示す。n = 31 である。T : 腫瘍部分。N : 正常部分。

【図 32】図 32 は、膵臓の導管腺癌中の G L K 過剰発現を示す図である。正常な膵臓および膵臓の導管腺癌 ( P D A : P a n c r e a t i c D u c t a l A d e n o c a r c i n o m a ) に対する G L K 染色を行っている。(A) は正常な膵臓、(B) はグレード 1 P D A、(C) はグレード 2 P D A、および (D) はグレード 3 P D A を代表する画像であり、パラフィン包埋された組織から得られる。当初の倍率 : 20 倍。

【図 33】図 33 は、肝細胞癌中の G L K 過剰発現を示す図である。正常肝および肝細胞癌への G L K 染色を行っている。(A) は正常肝、(B) はグレード 1 の肝細胞癌、(C) はグレード 3 の肝細胞癌を表す画像であり、(D) は (C) の拡大画像である。当初の倍率 : 20 倍。

【図 34】図 34 は、乳癌中の G L K 過剰発現を示す図である。正常胸部および乳癌に対する G L K 染色を行っている。(A) は正常な胸、(B) はグレード 2 のステージ T 2 N 0 M 0 乳癌、(C) はグレード 2 のステージ T 2 N 1 M 0 乳癌を表す画像である。当初の倍率 : 20 倍。

【図 35】図 35 は、膠芽細胞腫中の G L K 過剰発現を示す図である。正常な脳組織中、ヒト膠芽細胞腫 ( グレード I I ~ I V ) 中、および、2 つの脳腫瘍細胞株 ( U - 87 M G および T 98 G ) 中の G L K タンパク発現の免疫プロットティング分析を行っている。

【図 36】図 36 は、非小細胞肺癌患者の G L K タンパク発現が高いと、再発が早いことが予想されることを示す図である。非小細胞肺癌 ( N S C L C : n o n - s m a l l - c e l l l u n g c a r c i n o m a ) 患者の中において、G L K タンパクレベルが高い ( G L K - 高 ) と、再発も早くなるという相関が得られた。

10

20

30

40

50

【図37】図37は、GLK過剰発現が、自発的な浸潤を増加させることを明らかにする図である。H1299細胞は、24時間で、ベクター（パネル上側）、GLK（パネル中央）またはshRNA-GLK（パネル下側）を過渡的に導入された。導入の後、これらの細胞は、トランスウェルアッセイによって試験された。10% - 10%の血清は、自発的な浸潤を示す。0% - 10%の血清は、血清 - 誘発性の浸潤を示す。

【図38】図38は、GLKの過剰発現が細胞転位（創傷治癒）を促進することを示す図である。H1299細胞が、示されたプラスミドを導入され、コンフルエントするまで培養される。p200ピペット先端で細胞単層を直線でこそいで「創傷」を生成し、細胞増殖培養液で細胞を洗浄することにより創傷のデブリを除去した。図に記載した培養時間の後、位相差顕微鏡の画像を得た。

【図39】図39は、BL21大腸菌（His-GLK-KD）から、または、Sf9昆虫細胞（GST-GLK）中のかん状ウイルスから分離されたGLKキナーゼドメイン（GLK-KD:GLK kinase domain）組み換え型タンパクについて、ATP-GLO（商標）キナーゼキット（a）、ADP-GLO（商標）キナーゼキット（b）、または放射性キナーゼアッセイ（c）を用いてインビトロでキナーゼアッセイを行った結果を示す図である。

【図40】図40は、GLKとPKC- との間の相互作用を示す図である。（a）は過渡的に導入されたHEK293T細胞中のCFP-GLKとYFP-PKC- との間で直接相互作用のFRET（Fluorescence Resonance Energy Transfer）分析を示す。（b）は増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ法（ALPHA: amplified luminescent proximity homogeneous assay）により測定された、過渡トランスフェクションHEK293T細胞の溶解物中におけるFlag-GLKとMyc-PKC- との間の相互作用のシグナルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

[定義]

一般に、本明細書中で使用される用語は、本発明の文脈において、また、各々の用語が使われる特定の文脈において、従来技術における通常の意味を持つものである。本発明を記載するために用いる特定の用語は、明細書において検討され、本発明の説明に関わる実務家に付加的な手引きを提供するものである。便宜上、特定の用語を強調することもあり、たとえば、イタリックおよび/または引用符を使うこともある。強調する場合でも、それが強調されるにせよされないにせよ、同じ文脈において係る用語の範囲および意味の上で影響が無く、用語の範囲および意味は同じである。同じ事項を、異なる複数の方法で記載することもあることが理解されよう。従って、ここで検討されるあらゆる用語の1つ以上につき、代替的な用語や同義語が用いられてもよく、あるいは、用語がここで詳細に述べられまたは検討されたか否かにより、特殊な意味がこめられてもよい。特定の用語に対しての同義語が、提供される。1つ以上の同義語の詳説は、別の同義語の使用を排除しない。ここで検討されるあらゆる用語の用例を含む本明細書全体での用例の使用は、例示目的のみであり、本発明またはここで例示した全ての用語の範囲および意味を限定するものではない。同様に、本発明は本明細書中の所与の各種実施形態に限定されるものではない。

【0013】

特に言及しない限り、ここに使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有するものである。矛盾が生じる場合、定義を含む本明細書を照合するものとする。

【0014】

ここで用いられる例では、「ほぼ」、「およそ」、または「約」の語は、一般に、所与の値または範囲の20パーセント以内を指し、好ましくは10パーセント以内を指し、さらに好ましくは5パーセント以内を指すものとする。ここで与えられる数量は、近似値で

あり、「ほぼ」、「およそ」、または「約」の語は、明確に述べられていない場合にも推論できることを意味するものである。

【0015】

文脈によっては、用語「対照」は、健康で正常なサンプルまたは細胞を意味する場合もあり、また、試験化合物がない場合に成し遂げられる試験を参照する場合もある。患者被験者のT細胞から得られる測定結果は、健康で正常な被験者のT細胞から得た対照の測定結果と比較される。患者の癌細胞から得られる測定結果は、同じ患者または健康な正常な被験者の、非腫瘍組織サンプルからの非癌正常細胞から得られる対照の測定結果と比較される。

【0016】

用語「GLKシグナル伝達」は、GLKの介在したシグナル伝達、すなわちGLK - PKC - IKK - NF - B - IL17Aシグナル伝達を意味するものである。

【0017】

FLAG - タグまたはFLAGオクタペプチドは、ポリペチド・タンパク・タグであり、組換えDNA技術を用いるタンパクに加えてもよい。FLAG - タグは、抗体による認識を必要とする多くの異なるアッセイに使われてもよい。FLAG - タグのペプチドシーケンスは、N - DYKDDDDK - Cである。mycタグは、c - myc遺伝子産物に由来するポリペチド・タンパク・タグであり、組換えDNA技術を用いるタンパクに加えてもよい。myc - タグのペプチドシーケンスは、N - EQKLISEEDL - Cである。

【0018】

GLKタンパクおよびPKC - タンパクが、一方の蛍光プローブから別の蛍光プローブへの蛍光エネルギーの移動を可能にするような、それぞれ異なるエネルギーを有し、かつ、互換性を持つ蛍光プローブによって標識される場合、GLKがPKC - タンパクに結合する際（すなわち物理的に関連する際）に蛍光エネルギー移動が生じる。第1の蛍光プローブの励起波長は低く、第2の蛍光プローブの励起波長は高い。第1の蛍光プローブの発光波長は、より高い励起波長と重なるので、第2の蛍光プローブを励起し、より高い波長での発光を引き起こす。試験化合物が、PKC - に結合するGLKを妨げる場合には、蛍光プローブのエネルギー伝達は生じず、より高い波長での蛍光発光は生じない。

【0019】

ここで用いられる略記号のフルネームは、次の通りである。回帰性リウマチ（PMRA：palindromic rheumatism）；ホルボール - 12 - ミリステート - 13 - アセテート（PMA：phorbol - 12 - myristate - 13 - acetate）；末梢血白血球（PBL：peripheral blood leukocyte）；胚中心キナーゼ（GCK）類似キナーゼ（GLK：Germinal Center Kinase（GCK） - Like Kinase）。

【0020】

本発明は、TCRシグナル伝達カスケードにおけるGLKの役割を発見したことに関する。GLKは、SLP - 76からPKC - へのシグナル伝達をリンクするキナーゼを表すことが見いだされた。

【0021】

ヒト胚中心キナーゼに関連したプロテインキナーゼ（GLK）のアミノ酸配列は、配列番号1であり、そのヌクレオチド配列は、配列番号2である。ラット分裂促進因子 - 活性化プロテインキナーゼキナーゼキナーゼ3（Map4k3：mitogen - activated protein kinase kinase kinase 3）のアミノ酸配列は、配列番号3であり、そのヌクレオチド配列は、配列番号4である。プロテインキナーゼC、シータ（ヒト）のアミノ酸配列は、配列番号5であり、そのヌクレオチド配列は配列番号6である。マウスプロテインキナーゼC、シータのアミノ酸配列は、配列番号7であり、そのヌクレオチド配列は配列番号8である。

【0022】

[化合物をスクリーニングする方法]

10

20

30

40

50

(タンパクベースのアッセイ：放射性/非放射性インビトロ・キナーゼ・アッセイ)

放射性インビトロ・キナーゼ・アッセイ：組み換え型GLKタンパクを、 $10\ \mu\text{Ci}$ の $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 、 $4\ \mu\text{g}$ のミエリン塩基性タンパク(MPB: myelin basic protein)、および $35\ \mu\text{l}$ のキナーゼ緩衝液中 $500\ \mu\text{M}$ のコールドATPと共に、室温で40分培養した。 $12\%$  SDS-pageによってサンプルを分離し、放射標識されたリン酸塩の基質への移入を、タイフーン級スキャナーによって定量した。

【0023】

非放射性インビトロ・キナーゼ・アッセイ：非放射性インビトロ・キナーゼ・アッセイは、ウェル96個、全体積 $100\ \mu\text{l}$ の白色プロキシプレート(パーキンエルマー社、米国マサチューセッツ州ボストン)を用いて実施された。GLKキナーゼ反応の後に生成するADPのレベルを判定するため、組み換え型GLKタンパク( $2\ \mu\text{g}$ ; 大腸菌またはかん状ウイルス感染Sf9昆虫細胞から分離された)を、キナーゼ緩衝液 $25\ \mu\text{l}$ 中のMPB $10\ \mu\text{g}$ およびATP $2\ \mu\text{M}$ と共に40分間室温で培養した。これにADP-Glo(商標)試薬( $25\ \mu\text{l}$ ; プロメガ社)を加えた。40分の培養後、キナーゼ検出試薬( $50\ \mu\text{l}$ )を加え、さらに30分間培養した。エンビジョン・マルチラベル・リーダー(パーキンエルマー・ライフ・サイエンス社)によって、輝度を測定した。GLKキナーゼ反応の後に消費されるATPのレベルを判定するため、組み換え型GLKタンパク( $0.2\sim 1\ \mu\text{g}$ )を、キナーゼ緩衝液 $25\ \mu\text{l}$ 中のMPB $10\ \mu\text{g}$ およびATP $2\ \mu\text{M}$ と共に、40分室温で培養した。これにADP-Glo(商標)試薬( $25\ \mu\text{l}$ ; プロメガ社)を加え、さらに10分培養した。エンビジョン・マルチラベル・リーダー(パーキンエルマー・ライフ・サイエンス社)によって、輝度を測定した。

10

20

【0024】

細胞ベースのアッセイ：IL-17A ELISAまたはNF- $\kappa$ B活性リポーターアッセイにより判定される安定GLKトランスフェクション細胞を用いた薬剤スクリーニングである。

【0025】

安定GLKトランスフェクション細胞の作製：ネオン移入システム(インビトロジェン社)を用いて、ジャーカット細胞にGLKプラスミドおよびp-NF- $\kappa$ B-Luc-ハイグロマイシンプラスミドを導入した。安定GLKトランスフェクション細胞を選択するため、GLKトランスフェクション細胞を、RPMI-1640を含有するネオマイシン中で少なくとも2週間培養した。

30

【0026】

IL-17A酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)：安定GLKトランスフェクションジャーカット細胞(96ウェルディッシュのウェル毎に106個)を、RPMI培地( $200\ \mu\text{l}$ )中で72時間培養した。上澄み中のIL-17Aのレベルを、ヒトIL-17A ELISA(ペプロテック)を用いて判定した。

【0027】

ルシフェラーゼリポーターアッセイのNF- $\kappa$ B活性：106個の安定GLKトランスフェクションジャーカット細胞を、 $60\ \mu\text{l}$ の細胞溶解/ルシフェラーゼ緩衝(プロメガ社)を加えた $60\ \mu\text{l}$ のRPMI培地中で、再懸濁した。データは、標準偏差の、エラーバーと共に、ホタルルシフェラーゼ活性の平均を示している。

40

【0028】

トランスウェル移動および浸潤アッセイ：トランスウェル移動アッセイでは、非コーティング・トップチャンバ(24ウェルのインサート; 細孔径 $8\ \mu\text{m}$ ; コーニングコスター社)に配置され、16時間培養された $1\times 10^5$ 個の細胞を用いた。浸潤アッセイでは、マトリゲルコーティングしたトップチャンバ(BDバイオサイエンス社)上に配置され、24~48時間培養された $1\times 10^5$ 個の細胞を用いた。トランスウェルの上側に残留した非浸潤細胞を綿スワブでこそぎ落とした。インサートフィルターの下側の細胞を、4%のパラホルムアルデヒドによって10分で高速に固定した後、1%クリスタルバイオレットで20分染色した。光学顕微鏡下でインサートフィルター下側の細胞の数を計数した。

50

その結果を、10個のフィールド毎の移動細胞または浸潤細胞の数として表した。

【0029】

創傷治癒アッセイ（細胞転位）：ヒト肺癌H1299細胞に、ベクター（導入遺伝子のない空状態）、pCIneo-GLK（GLK導入遺伝子を有するプラスミド）またはshRNA-GLK（GLK導入遺伝子のshRNAを有するプラスミド）を導入した。これらの細胞単層はコンフルエントされた。p200ピペットの先端を用いて2本の平行な掠り傷を形成した。位相差顕微鏡を用いて、この傷を観測した。創傷の交点の側面に位置する両側の領域で、0～24時間の過程に定期的な間隔で撮像を行った。

【0030】

タンパク-タンパク相互作用アッセイ：蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）アッセイおよび増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ（ALPHA；パーキンエルマー社）である。

10

【0031】

蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）アッセイ：CFP-GLKおよびYFP-PKC-プラスミドをHEK293T細胞に導入し、24時間後の蛍光強度を、エンスパイア2300マルチラベルリーダー（パーキンエルマー社）を用いて判定した。CFPを432nmで励起し、得られた485nmで発光する蛍光強度を測定した。YFPを485nmで励起し、得られた540nmで発光する蛍光強度を測定した。FRETシグナルを432nmで励起し、得られた540nmで発光する蛍光強度を測定した。

【0032】

増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ（ALPHA）：アルファスクリーン・結合アッセイを、全体積20μlで、ウェル384個の白色プロキシプレート（パーキンエルマー社、米国マサチューセッツ州ボストン）内で行った。アルファスクリーンFlag検出キットは、パーキンエルマー・ライフ・サイエンス社から入手可能である。アルファスクリーン・ドナービーズはFlagとして供給され、アクセプタービーズは抗Myc抗体に結合される。精製Flag-GLKとmyc-PKC、またはFlag-SLP-76とmyc-GLKとを、ウェル384個のプレート（5μl/ウェル）中で混合した。HEK293T形質転換体を用いる場合には、ウェル毎に0.2μgの溶解物を加えた。アクセプタービーズ（5μl/ウェル）を加えて30分培養した。その後、ドナービーズ（5μl/ウェル）を加え、3時間培養した。ALPHAシグナルを、エンビジョン・マルチラベル・リーダー（パーキンエルマー・ライフ・サイエンス社）によって判定した。ドナービーズおよびアクセプタービーズの最終濃度は、20μg/mlであった。全ての希釈物はHEPES緩衝液中で生産した（10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% Tween-20、0.5mM DTT）。

20

30

【0033】

GLK過剰発現は、癌および転移と関連し、このGLKの介在した癌および転移は、哺乳類ラパマイシン標的（mTOR）とは関係がないことが見出された。本発明は、癌予防バイオマーカーおよびGLK介在疾患治療の標的として有用な、GLK-PKC-IKK-NF- $\kappa$ B-IL-17シグナル伝達経路の発見に関する。

【0034】

1つの態様では、本発明は、胚中心キナーゼ（GCK）類似キナーゼ（GLK）介在疾患を治療する治療薬を同定する方法に関する。上記方法は、試験化合物によってGLKの介在したシグナル伝達の変調を検出するステップを備え、係るステップは、以下のa)～d)のいずれかと、e)とを有する。

40

a) 試験化合物の存在下でGLK発現細胞を培養するステップであって、前記変調は、GLK転写産物もしくはGLKタンパクの発現レベル、生産されるIL-17Aの量またはNF- $\kappa$ Bの活性を測定することにより検出される細胞培養ステップ。

b) 試験化合物の存在下で、GLKタンパクをこれらの基質とATPの存在で反応させる反応ステップであって、前記変調は、生産されるADPの量、消費されるATPの量および/またはリン酸化される基質の量を測定することにより検出される反応ステップ。

50

c) 試験化合物の存在下で G L K 発現癌細胞を培養する癌細胞培養ステップであって、前記変調が、前記癌細胞の転位 / 浸潤 / 創傷治癒を測定することにより検出される癌細胞培養ステップ。

d) 試験化合物の存在下で G L K タンパクをこれらの基質タンパクと相互作用させる相互作用ステップであって、前記変調は、G L K タンパクと基質タンパクとの間の相互作用を測定することにより検出される相互作用ステップ。

e) 試験化合物の存在下で前記変調を対照と比較して、G L K 介在疾患を処理する治療薬を同定する、比較ステップ。

【0035】

G L K タンパクと基質タンパク ( P K C - タンパク等 ) との間の相互作用は、蛍光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) アッセイまたは増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイを用いて測定してもよい。

【0036】

上記ステップ d ) では、基質は P K C - タンパクを含んでもよく、G L K タンパクおよび P K C - タンパクが、互換性を持つ異なる蛍光プローブで標識される。そのうち一方の蛍光プローブは、蛍光励起し、他方の蛍光プローブよりも高い発光波長を備える。前記変調との関連性は、より高い蛍光発光波長における変化により検出される。

【0037】

A T P は、非放射性でもよいし、ラジオアイソトープで標識されてもよい。G L K タンパクと基質との相互作用は、細胞内に、または試験管中にインビトロで、生じることもできる。G L K 介在疾患は、自己免疫性疾患と、炎症性疾患と、癌と、癌転移とからなる群より選択されてもよい。基質は、P K C - タンパクと、ミエリン塩基性タンパク ( M B P ) とからなる群より選択されてもよい。試験化合物は、R N A i 分子と、m i c r o R N A と、アンチセンス分子と、小有機分子とからなる群より選択されてもよい。G L K 発現細胞は、G L K 発現 T 細胞を含んでもよく、および / または G L K 発現癌細胞は、G L K 発現肺癌細胞を含んでもよい。G L K 発現細胞は、G L K - 過剰発現 T 細胞等の G L K - 過剰発現細胞を含んでもよく、および / または、G L K 発現癌細胞は、G L K - 過剰発現肺癌細胞等の G L K - 過剰発現癌細胞を含んでもよい。

【0038】

自己免疫性疾患は、全身性エリテマトーデスと、慢性関節リウマチと、成人発症型ステイル病と、グレーブス病と、シェーグレン症候群と、強直性脊椎炎と、神経脊髄炎と、自己免疫性脳脊髄炎と、脱毛症とからなる群より選択されてもよい。癌は、肺癌と、食道癌と、膠芽細胞腫と、膵臓癌と、乳癌と、肝癌とからなる群より選択されてもよい。本発明の一実施形態では、癌は、一種の G L K タンパク介在癌であり、哺乳類ラバマイシン標的 ( m T O R ) タンパクから独立したものである ( または無関係である ) 。

【0039】

別の態様では、本発明は、胚中心キナーゼ ( G C K ) 類似キナーゼ ( G L K ) 介在疾患の存在および / または重症度を検出する方法に関する。G L K 介在疾患の存在および / または重症度を検出するステップは、肺癌等の癌の予後を判定するステップを備えてもよい。前記方法は、以下のステップ、a) G L K 介在疾患または癌を有すると疑われる被験者から、T細胞または癌細胞を備えるサンプルを採取する採取ステップと、b) T細胞または癌細胞中の G C K 類似キナーゼ ( G L K ) の発現レベルを測定する測定ステップと、c) G L K 介在疾患の存在および / または重症度を判定する判定ステップとを含み、対照中の G L K の発現レベルと比較したときにおける T細胞または癌細胞中の G L K 発現レベルの増加分は、被験者が G L K 介在疾患を発症または保有するリスクを有している、または癌の再発および / または転移のリスクを有していることを示している。前記判定ステップは、癌の予後を判定するステップを備えていてもよい。

【0040】

前記測定ステップは、T細胞中の G L K タンパクの発現レベルを測定するステップを含んでいてもよく、免疫プロット分析、フローサイトメトリー分析、および / または

10

20

30

40

50

免疫組織化学によって行われる。あるいは、測定ステップは、G L K 転写産物の発現レベルを測定するステップを含んでいてもよく、このステップはさらに、測定された G L K 転写産物の発現レベルをハウスキーピング遺伝子に対して補正して、G L K 転写産物の補正された発現レベルを得ることを含んでいてもよい。

本発明の一実施形態では、癌細胞中の G L K の発現レベルの増加は、哺乳類ラバマイシン標的 ( m T O R ) タンパクとは無関係である。

【実施例】

【 0 0 4 1 】

本発明の範囲を限定する意図なしで、本発明の実施形態に従った例示的な機器、装置、方法およびそれらの関連した結果が下記に与えられる。読者の便宜のため、タイトルまたはサブタイトルを実施例で使っているが、これは本発明の範囲を決して限定するものではないことが注記される。さらに、特定の理論がここに提案され開示されるが、それが正しいか誤りかに関係なく、本発明が行われる限り、あらゆる特定の理論または作用の方式にかかわらず、本発明の範囲は限定されない。

10

【 0 0 4 2 】

I . G L K は、T 細胞中の P K C - を活性化することにより自己免疫および N F - B シグナル伝達を制御する。

【 0 0 4 3 】

[ 方法および材料 ]

( G L K 欠損マウス )

G L K ノックアウト ( クローン R R O 2 7 0 ) による 1 2 9 マウス胎生期stem細胞クローンを E U C O M M から購入し、これを、台湾のゲノム医学国家研究計画におけるトランスジェニック・マウス・モデル・コアにおいて、C 5 7 B L / 6 の尾胞に注入して、キメラマウスを生成した。全ての動物実験は、国立衛生研究所で I A C U C に承認されたプロトコルに従って遂行された。

20

【 0 0 4 4 】

( 患者および健常対照者 )

米国リウマチ学会基準に基づき、全身性エリテマトーデス ( S L E : s y s t e m i c l u p u s e r y t h e m a t o s u s ) と診断される 4 9 人の患者につき、研究を行った。全ての患者は、台中退役軍人総合病院 ( T V G H : T a i c h u n g V e t e r a n s G e n e r a l H o s p i t a l ) のアレルギー・免疫学・リウマチ学部門に付託された。35人の健康な個人が、対照者として登録された。この研究は、T V G H の治験審査委員会に承認され、書面にした告知に基づく同意を全ての個人から得た。

30

【 0 0 4 5 】

( 抗体、プラスミドおよび精製タンパク )

抗マウス C D 3 ( 1 4 5 - 2 C 1 1 ) および抗ヒト C D 3 ( O K T 3 ) が、プロテイン A - セファロースクロマトグラフィーによりマウス腹水から精製された。G L K、H P K 1、p - E r k ( T 2 0 2 / Y 2 0 4 )、E r k、p - S L P - 7 6 ( S 3 7 6 ) および S L P - 7 6 に対する抗体が、個々のペプチドでウサギに免疫性を与えることによって生成された。抗 p - P K C - ( T 5 3 8 ) 抗体および抗 p - P K C - ( S 6 9 5 ) 抗体は、アップステートバイオテクノロジージャ社から入手した。抗 P K C - ( C - 1 9 ) 抗体、抗 p - P K C - ( S 6 7 6 ) 抗体、抗 V a v 1 ( D - 7 ) 抗体、抗 V a v 2 ( E - 1 2 ) 抗体および抗 V a v 3 ( K - 1 9 ) 抗体は、サンタ・クルーズ・バイオテクノロジージャ社から入手した。抗 F l a g ( M 2 ) 抗体、抗 M y c 抗体、抗 H A 抗体および抗チューブリン抗体は、S I G M A 社から入手した。抗 p - I K K ( S 1 8 1 ) 抗体、抗 p - P D K 1 ( S 2 1 4 ) 抗体、抗 I K K 抗体および抗 P D K 1 抗体は、セルシグナリング社から入手した。細胞内染色用の抗 p - P K C - ( T 5 3 8 ) ( 1 9 / P K C ) 抗体は、B D ファ - ミンゲン社から入手した。抗 p - m T O R 抗体および抗 m T O R 抗体は、アブカム社から入手した。

40

【 0 0 4 6 】

50

GLK、GLKキナーゼデッド(KD: kinase-dead)変異およびFlag-SLP-76に対する発現プラスミドは、前述の通りである。MycタグPKC-、HAタグGLKおよびGFPタグGLKは、個々の相補DNAを、pCMV6-AC-Myc、pCMV6-AC-HA、およびpCMV6-AC-GFP(オリジンテクノロジージャ)にそれぞれサブクローニングすることにより構築された。shRNAプラスミドは、国立RNAiコア設備によって作られた。NF-Bリポータープラスミド(pNF-B-Luc)および標準化されたプラスミド(pRL-Tk)をプロメガ社から購入した。

#### 【0047】

インビトロでの結合アッセイのため、Flag-GLKトランスフェクションHEK293T細胞およびFlag-SLP-76トランスフェクションHEK293T細胞から、精製GLKおよびSLP-76をそれぞれ分離し、その後、Flagペプチド溶出を行った。Sf9昆虫細胞中のかん状ウイルスから発現される精製組み換え型GST-PKC-を、シグナルケム社より購入した。

10

#### 【0048】

(過渡的導入およびT細胞活性化)

過渡的導入アッセイのため、ネオン移入システム(インビトロジェン社)を使って細胞を導入した。個々の細胞系または一次細胞の具体的な設定は、以下の通りである: ジャーカットT細胞およびJ14細胞系では、1420V、継続時間30ミリ秒、1パルス; EL4細胞では、1080V、継続時間50ミリ秒、1パルス; プライマリーT細胞では、2000V、継続時間20ミリ秒、2パルス。T細胞活性化を誘発するため、J-TAgおよびEL4細胞を、抗CD3抗体5 $\mu$ g/mlを用いて、示した時間、37で刺激した。プライマリーT細胞活性化を誘発するため、 $3 \times 10^6$ 個の精製T細胞を、抗CD3-ビオチン(500A2; eバイオサイエンス社)3 $\mu$ g/mlおよびストレプトアビジン(シグマ社)3 $\mu$ g/mlを用いて刺激した。

20

#### 【0049】

(インビトロ・キナーゼ・アッセイ)

抗Flagアガロースビーズを用いて、刺激されないまたは抗CD3刺激を行ったジャーカットT細胞またはJ-14細胞の溶解物(80 $\mu$ g)から、Flag-GLKを免疫沈降した。抗Flag免疫沈降物を、細胞溶解緩衝液により3回洗浄した後、さらにキナーゼ緩衝液により1回洗浄し、または、Flag-GLKの精製用のFlagペプチド溶出液にさらした。抗Flag-GLKビーズまたは精製Flag-GLKを、キナーゼ緩衝液35 $\mu$ l中[ $^{-32}$ P]ATP10 $\mu$ Ciの存在下または不存在下で、コールドATP500 $\mu$ M、ミエリン塩基性タンパク4 $\mu$ gと共に、40分室温で培養した。サンプルを、SDS-PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)により分離した。免疫ブロット分析によって、基質のリン酸化を検出した。または、放射標識されたリン酸塩の基質への導入により検出した。これをタイフーン級スカナー(GE)によって定量した。

30

#### 【0050】

(フローサイトメトリー分析)

PMAとイオノマイシンで細胞を2時間刺激し、ゴルジストップ(登録商標)でさらに2時間処理した。細胞を採取し、コールドPBSで洗浄し、その後、示された抗体で、氷上で30分染色した。臨床のサンプル分析のため、別の刺激なしでPBLを直ちにゴルジストップで処理し、その後、室温で、抗表面マーカで染色した。細胞内染色のため、PBLを、サイトフィクス/サイトパーム緩衝液(BDバイオサイエンス)200 $\mu$ l中で2時間透過処理し、パームウォッシュ緩衝液で洗浄し、その後、抗体(1:50希釈物)中で2時間培養した。以下の抗体を染色に用いた: 抗mCD3-APC(145-2C11)抗体、抗mCD3-FITC(145-2C11)抗体、抗Foxp3-PE(150D)抗体、抗IFN-FITC(XMG1.2)抗体、抗IL-4-PE(11B11)抗体および抗IL1-17A-PE(TC11-18H10.1)抗体を、バイオレジェンド社から購入した。抗mCD4-パシフィックブルー(RM4-5)抗体、抗hCD

40

50

3 - P E C y 7 ( S K 7 ) 抗体、および、抗 h C D 1 9 - P E ( S J 2 5 C 1 ) 抗体を、B D ファーミング社から購入した。F A C S C a n t o I I フローサイトメーター ( B D バイオサイエンス ) を用いてデータを収集し、F l o w J o ソフトウェアを用いて分析を行った。

#### 【 0 0 5 1 】

( インビボ T 細胞介在の免疫応答および E A E の誘起 )

各々の実験に使われるマウスは、6 ~ 1 0 週齢の性が一致する同腹子であった。免疫性を与えられたマウスからの抗原特異的な ( K L H ) 抗体、T H <sup>1</sup> および T H <sup>2</sup> サイトカインの生産は、前記の通り測定された。E A E の誘起は、前記のよう行われた。

#### 【 0 0 5 2 】

( インビトロ T 細胞分化アッセイ )

C D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>-</sup> 細胞を、マウスのリンパ節から精製した。細胞 ( 2 . 5 × 1 0 <sup>5</sup> ) を、抗 C D 3 ( 2 μ g / m l ) 抗体および抗 C D 2 8 ( 3 μ g / m l ) 抗体と共に、コーティングした 4 8 個のウェルのプレート内の 5 0 0 μ l 培地中で培養した。T r e g 分化のため、細胞を、1 0 n g / m l の I L - 2、1 0 n g / m l の T G F - 抗体、2 . 5 μ g / m l の抗 I L 4 抗体、および 2 . 5 μ g / m l の抗 I F N - 抗体を含む培地で培養した。T H 1 7 分化のため、細胞を、2 0 n g / m l の I L - 6、5 n g / m l の T G F - 、5 0 n g / m l の I L - 2 3、5 μ g / m l の抗 I L 4 抗体および 5 μ g / m l の抗 I F N - 抗体を含む培地で培養した。T H 1 分化のため、細胞を、5 n g / m l の I L - 1 2 および 1 μ g / m l の抗 I L 4 抗体を含む培地中で培養した。T H 2 分化のため、細胞を、1 0 n g / m l の I L - 4 および 1 μ g / m l の抗 I F N - 抗体を含む培地中で培養した。

#### 【 0 0 5 3 】

( インビトロ抑制アッセイ )

マウス C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を、マウスの脾臓およびリンパ節からネガティブに選択した。精製の第 2 ラウンドでは、マウス C D 2 5 に対して磁力結合型抗体を用いて、C D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>+</sup> T ( T r e g ) 細胞を、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞から分離した。T r e g 細胞を、C D 3 <sup>+</sup> T 細胞 ( 終末濃度は 2 × 1 0 <sup>5</sup> 個の細胞 / 5 0 0 μ l ) に加え、その後、抗 C D 3 抗体で 7 2 時間刺激した。

#### 【 0 0 5 4 】

( 統計的方法 )

P 値を、スチューデントの t 検定によって判定した。臨床サンプルに由来するデータの分析のため、ピアソン相関 ( r ) を最初に使用した。臨床サンプルのフロー・サイトメトリー・データに対する単回帰を用いて、G L K 発現 T 細胞のパーセンテージと S L E 患者の S L E D A I との間に統計学的に高い相関が示された。

#### 【 0 0 5 5 】

[ 結果 ]

・ G L K は、直接に P K C - をリン酸化して活性化する。

我々は、ジャーカット T 細胞中の G L K 過剰発現または G L K s i R N A ノックダウンに続いて抗 C D 3 刺激を行うことにより、T C R シグナル伝達における G L K の役割を研究した ( 図 1 a および図 6 )。ジャーカット T 細胞における抗 C D 3 - 誘発 N F - B 活性および I K K リン酸化 ( E r k または m T O R 活性はない ) は、G L K s i R N A または G L K のキナーゼデッド ( K D ) 変異によって抑制され、また、G L K 過剰発現により促進された ( 図 1 a および図 7 a , b )。さらに、G L K キナーゼ活性は、1 分で T C R シグナル伝達によって誘発され、3 0 分でピークに達した ( 図 7 c )。これらの発見は、G L K が T C R - 誘発 N F - B 活性化に関与することを示唆するものである。S L P - 7 6 が E r k および I K K 経路の両方を調節するため、S L P - 7 6 は、G L K の標的ではないと考えられていた。したがって、我々は、P K C - の活性化に対する G L K の効果の試験を行い、T C R シグナル伝達において、I K K - N F - B の上流側および S L P - 7 6 の下流側で重要な調節因子であることを試験した。P K C - リン酸化は、

10

20

30

40

50

GLKによって調節されるため、我々は、PKC- $\delta$  をターゲットとすることにより、GLKがIKK-NF- $\kappa$ B経路を活性化したかどうかの試験を行った(図7d)。PKC- $\delta$  siRNAノックダウンは、抗CD3刺激によるGLK-誘発NF- $\kappa$ Bの活性化を無効化するので、GLKがPKC- $\delta$  を標的とすることでNF- $\kappa$ B活性化を誘発することが示された(図7e)。

#### 【0056】

T細胞シグナル伝達中に、GLKが直接にPKC- $\delta$  をリン酸化・活性化できるか否かを調べるため、共同免疫沈降アッセイを用いてTCRシグナル伝達中にGLKがPKC- $\delta$  と相互作用したか否かを、我々は調べた。CD3刺激は、プライマリーT細胞中で、内因性GLKとPKC- $\delta$  との間の相互作用を誘発し、GLK-PKC相互作用は、PKC- $\delta$  活性化を伴発した(図1b)。HEK293T、ジャーカットおよびEL4細胞系を用いた時も、同様の結果が観測された(図8a~c)。精製GLKタンパクおよびPKC- $\delta$  タンパクの結合アッセイを用いて、GLKとPKC- $\delta$  との間の直接の相互作用が、インビトロでさらに実証された(図1c)。GLKによってPKC- $\delta$  リン酸化の部位を判定するため、我々は、PKC- $\delta$  の3つ主要なリン酸化部位であるT538、S676およびS695でPKC- $\delta$  リン酸化の試験を行った。T538リン酸化は、PKC- $\delta$  キナーゼ活性化およびそれ以降のNF- $\kappa$ B活性化に最も重要なものである。免疫沈降Flag-GLKおよびMyc-PKC- $\delta$  を用いたインビトロ・キナーゼ・アッセイでは、GLKは、T538でPKC- $\delta$  をリン酸化したが、S676またはS695ではリン酸化しなかった(図1d)。

10

20

#### 【0057】

精製GLKタンパクおよびPKC- $\delta$  タンパクを用いたインビトロ・キナーゼ・アッセイでは、PKC- $\delta$  -T538は、GLKによって直接にリン酸化された(図1e)。これらを一緒に解釈すれば、我々の結果は、GLKは直接にPKC- $\delta$  と相互作用し、TCRシグナル伝達中はT538でPKC- $\delta$  をリン酸化することを示した。

#### 【0058】

・SLP-76は、GLKの直接の上流側調節因子である  
SLP-76は、T細胞中の重要な骨格タンパク質であり、TCR-誘発PKC- $\delta$  -IKKの活性化に必要である。我々は、SLP-76がTCRシグナル伝達中のGLKの直接の上流側調節因子であったかどうかを問うた。CD3刺激は、プライマリーT細胞中の内因性GLKとSLP-76との間の相互作用を誘発した(図2a)。SLP-76-GLK相互作用は、GLK-PKC相互作用およびPKC- $\delta$  活性化に先行した。同様の結果が、ジャーカットおよびHEK293T細胞を用いて観測された(図9a~c)。さらに、SLP-76とGLKとの間の相互作用は、チロシンリン酸化を通して介在された(図9d)。精製GLKおよびSLP-76を使ったインビトロでの結合アッセイでは、これらの2つのタンパクの間の直接の相互作用が実証された(図2b)。次に、SLP-76がGLKの活性化に必要か否かにつき、我々は調べた。CD3刺激によって誘発したGLKキナーゼ活性は、SLP-76-欠損J14細胞(図2c)およびSLP-76 shRNAトランスフェクションジャーカット細胞(図2d)では無効化されていた。過去の報告によれば、Vav1がSLP-76と関連しPKC- $\delta$  転位に関連することが示されており、Vav1がPKC- $\delta$  活性化を制御することが示唆される。したがって、Vav1がGLK活性化を調節したか否かを、我々は調べた。しかしながら、TCR誘発GLKキナーゼ活性化は、Vav1 shRNAノックダウンによっては、影響を受けなかった(図9)。これらのデータは、TCRシグナル伝達中、GLKキナーゼ活性化の調節におけるVav1の関与を排除するものだった。また、別のMAP4K、すなわち、HPK1についても、SLP-76によって活性化し、次いで、SLP-76-S376リン酸化を誘発することにより、このSLP-76活性化を負に調整したため、SLP-76の負のフィードバック調節にGLKが役割を果たしているか否かにつき、我々は検討を行った。SLP-76-S376リン酸化は、HPK1のみにより誘発され、GLKには誘発されなかった(図2e) 事実は、GLKはSLP-76を負に調整するためのフィ

30

40

50

ードバックに関与しないことを示唆するものである。これらの発見は、TCRシグナル伝達中、SLP-76は直接に相互作用しGLKを活性化することを示すものである。

【0059】

・GLKは、インビボにT細胞介在の免疫応答を制御する

インビボにおけるGLKの役割を研究するため、我々は、GLK欠損マウスを生成した(図11a, b)。T細胞は、GLK欠損マウス中、正常に発育した(図11c-e)。プライマリーT細胞中において、TCRシグナル伝達のGLK欠損の効果を研究した。我々の過去の観測(図1)と合致した点としては、CD3(図3a)またはCD3-CD28共同刺激(図3b)では、GLK欠損T細胞中、PKC-およびIKKのリン酸化が無効化されていたことが挙げられる。これとは対照的に、ErkおよびPDK1活性化は、GLK欠損(図3b)に影響を受けなかった。

10

【0060】

また、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達に加えて、Lck、LATおよびPLC-1のリン酸化は影響を受けなかった(図11fおよび図8c)。NF- $\kappa$ Bシグナル伝達がT細胞増殖を調節することから、我々は、<sup>3</sup>Hチミジン取込みおよびCFSEダイ希釈アッセイを用いて、T細胞増殖へのGLKの効果を研究した。GLK欠損が大いに阻害するT細胞増殖は、CD3刺激により誘発された増殖であり、PMAとイオノマイシン刺激によって誘発された増殖ではない(図3d, e、図11g)。PMAおよびイオノマイシンが近接TCRシグナル伝達をバイパスするので、この結果は、GLK活性がTCR近接シグナリング錯体によって誘発されることを示唆している。さらに、GLK欠損T細胞の細胞増殖の低下は、異所的に発現されたGLKによって救われた(図3f)。これらのデータは、GLKが、T細胞増殖にとって重要であることを実証するものである。

20

【0061】

我々は次に、GLKがインビボにT細胞介在の免疫応答で重要な役割を果たすかどうかを調査した。我々は、ミョウバンをアジュバントとして用い、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、T細胞依存抗原で、野生型およびGLK-欠損マウスに免疫性を与えた。KLH免疫性が付与されたGLK欠損マウスからのT細胞の増殖性は、KLH再刺激の後、低下した(図4a)。さらに、GLK欠損マウスからのKLH再刺激後の脾臓のT細胞におけるインターフェロン- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン2(IL-2)およびIL-4を含むサイトカインのレベルは、非常に低減し(図4b)、これは、インビボのT細胞活性化が損なわれたことを示唆する。また、GLK欠損マウスにおいて、最初の免疫化および第2の免疫化後の血清中での抗原特異抗体の生成は、非常に低減された(図4c, d)。これらの結果は、GLKは、免疫応答および抗体産生の機能を搭載する必要があることを示している。

30

【0062】

・GLK欠損マウスは、自己免疫に耐性を示す。

実験的な自己免疫性脳脊髄炎(EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis)は主に、IL-17-生成CD4<sup>+</sup>Tリンパ球(T<sub>H</sub>17)が介在する。PKC- $\delta$ 欠損により、EAEおよびT<sub>H</sub>17応答が改善された。GLKがPKC- $\delta$ を活性化したため、我々は次に、実験的な自己免疫性脳脊髄炎モデルを使うことにより、T<sub>H</sub>17が介在した自己免疫性疾患におけるGLKの役割を研究した。GLK欠損マウスは、症状をほとんど示さなかったが、その野性型腹子は、激しい実験的自己免疫性脳脊髄炎を増長させた(図4e)。免疫性を与えられて14日目のマウスの脳および脊髄の中の、浸潤性リンパ球中におけるT<sub>H</sub>17細胞のパーセンテージは、GLK欠損マウスでは、非常に低かった(図4f)。さらに、血清中のIL-17の滴定量は、GLK欠損マウスでは、非常に低かった(図4g)。GLK欠損マウスにおけるT<sub>H</sub>17応答の欠陥がT細胞固有の効果であるか否かを調べるため、我々は、GLK欠損未感作T細胞のインビトロT<sub>H</sub>17分化能を測定した。一貫して、T<sub>H</sub>1およびT<sub>H</sub>2細胞に加えてT<sub>H</sub>17細胞のインビトロ分化は、GLK欠損によって低減された(図4hおよび図12)。インビトロTreg分化は、GLK欠損によって影響を受けなかった(図

40

50

12) が、GLK欠損Treg細胞は、インビトロでより高い活性抑圧を示した(図4i)。これらの結果は、インビボのGLK欠損は、TH17が介在した自己免疫性疾患の進展からマウスを保護することを示す。欠損TCRシグナル伝達およびTH17分化は、GLK欠損T細胞中に増加したTreg機能と共に、GLK欠損マウス耐性に対して、重要な役割を果たすことができる。

【0063】

・ヒトSLE中におけるGLK誘発PKC- の活性化

ヒト自己免疫性疾患全身性エリテマトーデス(SLE)において、TH17の介在した炎症は重要な役割を果たしている。GLK欠損マウスにおいて、自己免疫誘起およびTH17応答が低減し、GLKがPKC- - IKK経路を活性化しているため、我々は、GLK-PKC- - IKK-IL-17カスケードがヒトSLEに關与するか否かを研究した。我々は、SLE患者49人および35人の対になる健常対照者から分離された末梢血白血球(PBL)中におけるGLK発現およびPKC- - IKK活性化を検討した(図13a)。フローサイトメトリー分析によれば、SLE患者の新たに分離されたPBLからの、B細胞でなく、GLK発現T細胞の、パーセンテージが大きく増加したことが示された(図5a)。GLK発現T細胞のパーセンテージは、SLE疾患活動性度指数(SLEDAI)と相関した(図5b;ピアソン相関係数:  $r = 0.773$ )。特に、GLK表現(GLK+)T細胞が高パーセンテージ(21%)のSLE患者の3分の1(16/49)は、GLKが通常範囲の患者と比較して( $r = 0.451$ ;表1)、より高い相関を示した( $r = 0.807$ 、図5c、表1)。また、SLE患者のGLKタンパク発現の量は増加した(図5d)。これらの結果は、GLK過剰発現が、30%の患者のSLE発病に關与したことを示唆するものである。表1は、SLEDAIとSLE患者の別々の部分集合から得たGLK+T細胞のパーセンテージとの間の相関の比較を示す。

【表1】

SLEおよびGLK+T細胞をもつ人の部分集合	SLEDAI (平均)	ピアソン相関係数 (r)
合計	9.6	0.773
≥21%	16.4	0.807
<21%	6.9	0.451

SLEおよび低GLK+T細胞をもつ人(<21%)に対し、調整された回帰相関係数は、 $r^2 = 0.177$ 、 $P$ 値 = 0.008503。

【0064】

我々は次に、SLE患者からのT細胞におけるGLK過剰発現が、PKC- - IKK活性化を誘発したか否かにつき調べた。リン酸-PKC- またはリン酸-IKK陽性T細胞のパーセンテージは増加し、およびSLE患者からのT細胞中、GLK発現と共に染色した(図5e)。同様に、免疫プロット分析は、SLE患者におけるPKC- - IKK活性化の誘起を示した(図5d)。これらのデータは、GLKが、SLE患者からのT細胞において、PKC- を活性化することを示唆するものである。TNFでなくIL-6でもなく、IL-17の力価が、SLE患者の血清中に増加した(図8b)。これらの結果は、T細胞中のGLK過剰発現が、狼瘡患者の自己免疫発病を促進することを示唆するものである。したがって、GLKは、T細胞中のPKC- の直接活性化による自己免疫性疾患の重要な正調節因子である。

【0065】

[検討]

我々の研究の重要な発見は、GLKが、TCRシグナル伝達中にT538でPKC- を直接にリン酸化するキナーゼとして、認定されたことである。活性化ループ内の残留物

T538におけるPKC- $\delta$ リン酸化は、T細胞中のNF- $\kappa$ B活性化にとって必須である。GLK誘発PKC- $\delta$ -IKKリン酸化は、PDK1活性化およびCD28の相互刺激に関係無く、これは、GLK機能がPDK1活性化とは無関係であることを示唆する。これらのデータは、GLKが、TCRシグナル伝達中にPKC- $\delta$ のすぐ上流側のキナーゼとして機能することを明示するものである。

#### 【0066】

インビトロT細胞分化アッセイの結果は、GLKは、Tヘルパー細胞の分化に対して、固有のポジティブな役割を果たすことをさらに示している。GLKがTヘルパー細胞分化を調節するメカニズムは、依然として解っていない。しかしながら、TH1、TH2およびTH17のインビトロ分化は全て、GLK欠損によって低減し、これは、GLKが、別のTヘルパー分化経路に対して別のサイトカインシグナル伝達経路を調節する代わりに、通常メカニズム（例えば、TCRシグナル伝達またはIL-2生成を増加）によりTヘルパー細胞分化を調節してもよいことを示唆するものである。

10

#### 【0067】

GLKのインビボの役割についての我々の研究は、GLKが、最適のT細胞免疫応答および抗体産生に必要であることを実証するものである。GLK欠損マウスへの最初の免疫化および第2の免疫化の後に生じた、抗原特異抗体生成の低減に加えて、IL-2、IFN- $\gamma$ （TH1サイトカイン）およびIL-4（TH2サイトカイン）等のT細胞分泌サイトカインの減少は、PKC- $\delta$ 欠損T細胞に対して報告される欠損と同様である。また、EAE誘起に対するGLK欠損マウスの耐性およびTH17応答の低下は、PKC- $\delta$ 欠損マウスの表現型に合致している。胸腺の天然Tregの数は、GLK欠損マウスでは影響を受けなかった。しかしながら、PKC- $\delta$ -NF- $\kappa$ Bシグナル伝達が損なわれたことが原因で、PKC- $\delta$ 欠損マウス、CARMA1欠損マウス、BCL10欠損マウス、またはIKK2突然変異マウスのTreg数は低減する。PKC- $\delta$ は、例えばCD28、CD4、CD8、LFA-1の刺激または小胞体（ER：endoplasmic reticulum）応力シグナル伝達等、様々なシグナル伝達経路によって、活性化が可能である。Treg発達中に、PKC- $\delta$ -NF- $\kappa$ Bシグナル伝達がどのように活性化されるかは、依然として不明である。我々のデータによれば、GLKが、別の既知のリン酸化部位（例えばS676およびS695）でなく、T538残留物をリン酸化することにより、PKC- $\delta$ を活性化することが示される。おそらく、GLKは、キナーゼを活性化する唯一のPKC- $\delta$ ではない。したがって、PKC- $\delta$ -CARMA1-BCL10-IKK2の活性化は、Treg中の別のキナーゼによっても可能であるであろうと考えられ、GLK欠損マウス中のTregの数を正常な値にすることができる。Tregの数は、GLK欠損マウスでは影響を受けなかったが、Treg活性は、GLK欠損によって増加した。PKC- $\delta$ は、Tregが介在した抑制に対して負の役割を有する。これらをまとめれば、TH1、TH2、TH17およびTreg細胞を調節することに対してのGLKの役割は、PKC- $\delta$ の役割と実質的に合致し、これは、GLKはおそらくTCRシグナル伝達に対してのPKC- $\delta$ の唯一のアクティベーターであるという仮説を支持するものである。

20

30

#### 【0068】

また、この研究では、SLE患者の末梢血T細胞中でGLK発現が誘発され、これは疾患重症度と正に相関したことを、我々は報告するものである。また、SLE患者から分離されるGLK過剰発現によるT細胞は、PKC- $\delta$ -IKK活性化の上昇を示し、これは、GLK-PKC- $\delta$ -IKK経路の活性化は、SLE発症を制御することを示唆するものである。これは、SLE患者のT細胞中のGLK過剰発現およびPKC- $\delta$ -IKK過剰反応を最初に例証するものである。SLE患者中の血清IL-17の上昇は、過去の報告にも合致している。血清IL-17とSLEDAIとの間の相関と比較すると（ピアソン相関係数： $r = 0.41$ ）、GLKとSLEDAI（ $r = 0.773$ ）との間の相関は、非常に高く、また顕著である。これらをまとめれば、我々の発見は、GLKが、自己免疫発病学で重要な役割を果たし、SLEの進行についての新しい診断バイオマーカーとしての

40

50

役目を果たすことができることを示し、さらに、GLKおよびその下流PKC - IKKシグナル伝達の抑制が、新しい治療の戦略をSLEに対して提供することができることを示している。

【0069】

II. 慢性関節リウマチの新しいバイオマーカーとしてのT細胞中のGLK過剰発現

我々の過去の研究では、GLKが、T細胞中のプロテインキナーゼC - (PKC - ) - NF - Bキナーゼの阻害剤(IKK) - NF - Bのシグナル伝達経路を活性化することにより、自己免疫を制御することを実証した(Chuangほか(2011)、「The kinase GLK controls autoimmunity and NF - B signaling by activating the kinase PKC - in T cells」*Nat Immunol*, 12(11): 1113 - 1118, この文献の全体が、参照事項として本願に包含される)。全身性エリテマトーデス(SLE)患者からのT細胞は、疾患重症度によく相関するGLK過剰発現を示すが、RA中のGLKの役割は解っていない。

10

【0070】

コラーゲン誘発関節炎(CIA)は、破壊性炎症性の関節滑膜炎類似RAを発達させる、広く研究された動物モデルである。PKC - 欠損マウスは、応答の低下をCIA[14]に示す。IKK - 抑制は、関節炎動物モデル中の骨および軟骨の破壊に有効な処理である。PKC - およびIKKが炎症性関節炎に重要な役割を果たすため、我々は、コラーゲン免疫性付与マウスおよびヒトRA患者からの臨床のサンプルを用いて、RA発病に対する上流側キナーゼGLKの役割可能性を調べた。

20

【0071】

[材料および方法]

(参加者)

米国リウマチ学会で1987年に修正されたRAの基準を満たす30人の患者を登録した。24人の健康な志願者が、健常対照者の役目を果たした。8人の骨関節炎(OA: osteoarthritis)および8人のRA患者からの滑膜組織および滑液を得た。この研究プロトコルは、台中退役軍人総合病院の臨床調査倫理委員会で承認されたものである。

30

【0072】

(疾患活動性)

赤血球沈降速度(ESR)、C反応性タンパク質(CRP)、および28関節疾患活動性スコア(DAS28)の血清レベルを、RA疾患活動性を評価するために使用した。

【0073】

(GLK欠損マウス)

台湾ゲノム医学国立研究プログラムのトランスジェニック・マウス・モデル・コアにおいて、欧州条件変異マウス作成プログラムからのGLK欠損(RR0270)を有する129マウス胎生期stem細胞クローンを、マウスラインCB57L/6から尾胞に注入して、キメラマウスを発生させた。GLK欠損マウスを、C57BL/6バックグラウンドで、9世代にわたって戻し交配した。全ての動物実験は、台湾国立衛生研究所の動物実験委員会によって承認されたプロトコルで行われた。

40

【0074】

(関節炎の誘起およびスコアリング)

従来説明されているように、ワイドタイプ(WT)またはGLK欠損マウスに、コラーゲン誘発関節炎(CIA)を誘発させた(Campbellほか(2000)「Collagen-induced arthritis in C57BL/6(H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis」*Eur J Immunol*. 30(6): 1568 - 1575)。12週齢(0日)のマウスに対し、ニワトリ型IIニワトリコラーゲン/フロインド完全アジュバント乳化物(MDバイオ

50

サイエンス社、スイス国チューリッヒ)を含む合計100 $\mu$ lのエマルジョンを、尾部のベースに皮内注射した。同様の注射を、21日に腹膜内に繰り返した。次いで、以下の臨床のスコアを使い、WTまたはGLK欠損マウス中の疾患の臨床結果を示した：1 = 指の腫れ、2 = 紅斑、3 = 足/踝の腫れ 4 = 機能損失。

【0075】

(血清サイトカインの定量)

WTまたはGLK欠損マウスおよびRA患者のTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-17Aの血清レベルを、製造業者(eバイオサイエンス社、サンディエゴ、カリフォルニア、米国)のインストラクションに従い、ELISAを使って測定した。

【0076】

(試薬と抗体)

GLK抗体は、個々のペプチドでウサギに免疫性を与えることによって生成されている。ウェスタンブロッティングには、抗p-PKC- $\alpha$  (T538)抗体(アップステートバイオテクノロジー社、レークプラシッド、ニューヨーク、米国)を用いた。細胞内染色には、抗PKC- $\alpha$ 抗体(サンタ・クルーズ・バイオテクノロジー社、サンタクルーズ、カリフォルニア、米国)を用いた。フローサイトメトリー分析には、抗hCD3-PECy7(SK7; BDファーマーミンゲン社、サンディエゴ、カリフォルニア、米国)抗体、抗p-PKC- $\alpha$  T538(19/PKC; BDファーマーミンゲン社、サンディエゴ、カリフォルニア、米国)抗体、および抗p-IKK(2681S)(サンタ・クルーズ・バイオテクノロジー社、サンタクルーズ、カリフォルニア、米国)抗体を用いた。GLK mRNA検出には、タックマンプローブおよびプライマーセット(アプライドバイオシステム社、フォスター、カリフォルニア、米国)を用いた。

【0077】

(ウェスタンブロット解析およびフローサイトメトリー分析)

免疫ブロッティング分析に対し、滑液白血球および精製末梢血T細胞のサンプリングを、過去の文献に基づいて行った(Chuangほか(2011)「The kinase GLK controls autoimmunity and NF- $\kappa$ B signaling by activating the kinase PKC- $\alpha$  in T cells」. Nat Immunol. 12(11): 1113-1118、この文献の全体が、参照事項として本願に包含される)。また、前述のように、末梢血および滑液のフローサイトメトリー分析を行った。

【0078】

(免疫組織化学)

RA患者およびOA患者の滑膜について、GLKの免疫染色を行った。パラフィンで包埋した組織を10分間沸騰し、2分間水で洗浄した。次いで、切片を、予め水素ペルオキシダーゼブロック(サーモサイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ、米国)で1時間培養し、その後、抗CD3抗体(サンタ・クルーズ・バイオテクノロジー社、サンタクルーズ、カリフォルニア、米国)および抗GLK抗体と共に、4 $^{\circ}$ Cで1晩培養した。LVBblue/LVRed(マルチビジョンポリマー検知システム、サーモサイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ、米国)を用いて染色を行った。

【0079】

(統計的分析)

社会科学用統計学パッケージ(SPSS: Statistical Package for the Social Sciences)バージョン13.0ソフトウェア(SPSS社、シカゴ、イリノイ、米国)を、統計的分析に用いた。連続する変数の比較には、スチューデントのt検定を用いた。変数間の相関を判定するためにはピアソンの相関を用いた。RA患者のGLK発現T細胞とDAS28の頻度との間の相関を調べるため、単回帰を用いた。

【0080】

[結果]

10

20

30

40

50

・ G L K 欠損マウスにおけるコラーゲン誘発関節炎の発育低下

G L K 欠損マウスでは、T 細胞介在の免疫応答が低下することを、我々は以前に実証した (Chuang ほか、Nat Immunol. 2011; 12 (11): 1113 - 1118、この文献の全体が、参照事項として本願に包含される)。炎症性関節炎への G L K の寄与を調べるため、我々は、C I A モデルを使い、野生型 (W T) マウスおよび G L K 欠損マウスの自己免疫応答の誘起を研究した。W T マウスは、重い C I A を進行させた一方、G L K 欠損マウスは、症状を急激に低減させた (図 14 A、B)。炎症性サイトカインは、C I A 進行中に誘発される。コラーゲン - 免疫付与 G L K 欠損マウスの I L - 1、I L - 6 および I L - 17 A の血清レベルは、W T マウスと比較して著しく低減したことを、我々は見いだした (図 15 C - E)。G L K が炎症性の関節炎に必要であることが、これらの結果から示唆される。

10

【0081】

・ R A 患者の人口統計学的データおよび臨床の特徴

R A 患者からの T 細胞中で、G L K レベルが上昇したか否かを調べるため、R A 患者 30 人 (女性 66.7% (平均年齢: 50.3+/-15.7 歳) および健常対照者 24 人 (女性 62.5% (平均年齢: 33.4+/-8.3 歳) を登録した (表 2)。表 2 は、慢性関節リウマチ (R A) 患者および健常対照者 (H C) の人口統計学的データ、臨床の発現および検査所見を示す。

【0082】

・ R A 患者からの精製末梢血 T 細胞中における G L K 発現の上昇

ウェスタンブロッティングによれば、R A 患者からの精製末梢血 T 細胞中で、G L K のタンパク質レベルが上昇している (図 15 A)。R A 患者からの精製 T 細胞中の G L K 発現レベルは、健常対照者の G L K 発現レベルに比べて、著しく高かった (1.3+/-0.8 対 0.4+/-0.4、p = 0.047、図 15 B)。さらに、R A 患者において、精製末梢血 T 細胞中の G L K m R N A レベルは、健常対照者と比較して非常に高かった (12.3+/-18.5 対 1.0+/-1.2、p = 0.029、図 15 C)。G L K が P K C - を活性化するため、G L K 誘発 P K C - 活性化が R A に関与しているか否かにつき、我々は研究した。また、P K C - 活性化は、R A 患者からの末梢 T 細胞内で増加した (図 15 A)。

20

【表 2】

30

	RA (n = 30)	HC (n = 24)
研究登録時点での年齢 (年)	50.3 ± 15.7*	33.4 ± 8.3
性別 (女性 (%))	20 (66.7)	15 (62.5)
疾患継続時間 (年)	6.7 ± 9.8	NA
RF (IU/ml)	64.8 ± 63.1	NA
抗 CCP 抗体 (ユニット)	133.4 ± 86.5	NA
DAS 28	4.8 ± 1.0	NA
ESR (mm/時間)	35.9 ± 24.4**	14.0 ± 2.3
CRP (mg/dl)	1.00 ± 1.72*	0.09 ± 0.02
プレドニソロン一日量 (mg)	5.9 ± 2.8	NA
メトトレキサート (%)	23 (76.6)	NA
ヒドロキシクロロキン (%)	11 (36.6)	NA
スルファサラジン (%)	4 (13.3)	NA
抗 TNF-α 治療 (%)	19 (63.3)	NA

40

# 値は、患者の平均 + / - 標準偏差または人数 (%)。

スチューデントの t 検定によって判定される H C 対 R A 患者の \* p < 0.05、\*\* p

50

< 0 . 0 0 1 .

R F : リウマチ因子 ( r h e u m a t o i d f a c t o r ) ; C C P : 環状シトルリン化ペプチド ( c y c l i c c i t r u l l i n a t e d p e p t i d e ) ; D A S 2 8 : 2 8 関節疾患活動性スコア ; E S R : 赤血球沈降速度 ; C R P : C 反応性タンパク質 ; T N F -  $\alpha$  : 腫瘍壊死因子 -  $\alpha$  ( t u m o r n e c r o s i s f a c t o r -  $\alpha$  ) ; N A : 適用なし。

【 0 0 8 3 】

・ R A 滑液および滑膜組織からの T 細胞中における G L K 発現の増加

次に、我々は、G L K が、ヒト R A 患者の滑液の微小環境からの T 細胞中で発現されたか否かにつき、研究を行った。ウェスタンブロッティングによれば、R A 患者からの滑液白血球中において、G L K 発現および P K C -  $\delta$  活性化が増加した ( 図 1 6 A ) 。フローサイトメトリー分析によれば、R A 患者からの滑液中の G L K 発現 C D 3 <sup>+</sup> T 細胞の頻度は、O A 患者のそれと比べて非常に高かった ( 図 1 6 B ) 。R A 患者および O A 患者の滑膜組織に対して、抗 G L K ( ブルー ) および抗 C D 3 ( 茶色 ) 免疫組織化学染色を行った。図 1 6 C に例示されるように、G L K 発現 T 細胞は、R A 患者からの滑膜組織中で増加したが、O A 患者からの滑膜組織では、わずかにしか検出されなかった。

10

【 0 0 8 4 】

・ 滑液および末梢血からの T 細胞中における G L K 、 P K C -  $\delta$  および C D 3 の共局在性  
共焦点顕微鏡検査の結果、R A 患者の滑液 ( 図 1 7 A ) および末梢血 ( 図 1 7 B ) の両方からの T 細胞中で、P K C -  $\delta$  および C D 3 と共に、G L K が相互局所化されていることが示された。これにより、G L K は T 細胞膜上で活性 P K C -  $\delta$  と相互作用することが示唆された。

20

【 0 0 8 5 】

・ R A 疾患活動性による G L K 発現 T 細胞頻度の相関

R A 患者の血清 T N F -  $\alpha$  ( 2 7 . 6 + / - 4 2 . 4 対 5 . 4 + / - 1 3 . 9 p g / m l 、 p = 0 . 0 1 9 ) および I L - 1 7 A ( 1 4 . 2 + / - 1 2 . 1 対 7 . 5 + / - 4 . 4 p g / m l 、 p = 0 . 0 1 5 ) のレベルは、健常対照者のレベルより高かったが、T G F -  $\beta$  ( 6 . 5 + / - 5 . 1 4 対 5 . 2 + / - 7 . 6 p g / m l 、 p = 0 . 5 ) はそうではなかった ( 図 1 8 A - C ) 。フローサイトメトリーの分析によれば、R A 患者の末梢血 T 細胞では、G L K 発現、リン酸 - P K C -  $\delta$  陽性、およびリン酸 - I K K 陽性細胞の頻度が、より大きかった ( 図 1 8 D ) 。R A 患者の G L K 発現末梢血 T 細胞の頻度は、健常対照者に比べて非常に高かった ( 1 8 . 4 + / - 7 . 6 対 1 0 . 5 + / - 5 . 0 、 p < 0 . 0 0 1 、 図 1 8 E ) 。さらに、R A 患者では、G L K 発現 T 細胞は、リン酸化 P K C -  $\delta$  および I K K を発現した。これらのデータによれば、G L K - P K C -  $\delta$  - I K K カスケードは、ヒト R A の発病に関与していることが示唆される。

30

【 0 0 8 6 】

R A 患者において、G L K 発現 T 細胞の頻度は、以下のものと相関していた：圧痛関節数 ( r = 0 . 5 0 0 、 p = 0 . 0 0 5 、 図 1 9 A ) ; 赤血球沈降速度 ( E S R ; r = 0 . 4 0 0 、 p = 0 . 0 0 3 、 図 1 9 B ) ; C 反応性タンパク質 ( C R P ; r = 0 . 3 3 0 、 p = 0 . 0 1 5 、 図 1 9 C ) ; 又は、2 8 - 関節疾患活動性スコア ( D A S 2 8 ; r = 0 . 6 0 6 、 p = 0 . 0 0 0 5 、 図 1 9 D ) ( 表 3 ) 。単回帰において高い剰余 ( モジュラス > 1 ) を示した 4 つの外れ値を除去した後、残りの R A 患者の 8 6 パーセント ( 3 0 のうちの 2 6 ) は、G L K 発現 T 細胞頻度と D A S 2 8 との間でより高い相関を示した ( r = 0 . 7 1 2 、 p = 0 . 0 0 0 0 6 3 9 、 図 1 9 E ) 。これらの結果によれば、G L K シグナル伝達は、R A の発病に重要な役割を果たすことが示唆される。表 3 は、登録された被験者の R A 疾患活動性と G L K 発現 T 細胞頻度との間のピアソン相関を示す。

40

【表 3】

	ピアソンの相関係数 (r)	p 値
T J C	0. 5 0 0	0. 0 0 5
S J C	0. 1 3 2	0. 4 8 8
E S R	0. 4 0 0	0. 0 0 3
C R P	0. 3 3 0	0. 0 1 5
D A S 2 8	0. 6 0 6	0. 0 0 0 5

10

R A : 慢性関節リウマチ ; G L K : G C K - 類似キナーゼ ; T J C : 圧痛関節数 ; S J C : 腫脹関節数 ; D A S 2 8 : 2 8 関節疾患活動性スコア ; E S R : 赤血球沈降速度 ; C R P : C 反応性タンパク質。

## 【 0 0 8 7 】

この研究では、R A 患者からの末梢血の T 細胞および滑膜組織中に G L K が過剰発現していることを、我々は見いだした。G L K 欠損は、マウスの C I A の進行を遅らせた。さらに、G L K 発現 T 細胞の頻度は、R A 疾患重症度と非常に相関しており、G L K が R A の発病に寄与していることが示された。この結果は、G L K は新しい診断バイオマーカであり、治療計画に対する潜在的な標的であるということを示唆している。

20

## 【 0 0 8 8 】

ここ何年かの間、p 3 8 M A P K は、R A における T h 1 / T h 1 7 介在慢性炎症の誘起および維持に重要であると考えられていたが、p 3 8 M A P K の抑制は、初期試験では顕著な成果を提供していない。G L K は、広く様々な人体組織の中に発現されるセリン/トレオニンキナーゼであり、また、M A P K シグナル伝達の上流側キナーゼである。我々の最近の研究では、G L K が、P K C -  $\delta$  を直接にリン酸化し活性化することにより、I K K - N F -  $\kappa$  B 経路を誘発することが実証されている。E A E および C I A モデルを用いた我々の研究および過去の報告では、G L K 欠損マウスと P K C -  $\delta$  欠損マウスの両方ともに、T h 1 / T h 1 7 が介在した自己免疫応答が低く示されており、これは、G L K シグナル伝達が自己免疫を制御することを示唆するものである。R A 患者の末梢血および滑液からの T 細胞中で、G L K は P K C -  $\delta$  と共に相互局在化した。さらに、G L K 発現 T 細胞の大部分は、P K C -  $\delta$  / I K K 活性化された細胞であった。我々の知るところ、本研究は、T 細胞中における G L K 過剰発現および P K C -  $\delta$  / I K K 過反応が、R A 患者用の新しいバイオマーカになるという、最初の報告である。さらに、G L K 陽性 T 細胞の頻度は、R A 疾患活動性と正に相関し、これは、G L K - P K C -  $\delta$  - I K K 経路が、R A の発病学の中に重要な役割を果たしていることを示すものである。

30

## 【 0 0 8 9 】

N F -  $\kappa$  B 経路のアップレギュレーションは、マトリックス分解酵素の合成に重要であり、これは、R A における骨侵食を引き起こすが、I K K の抑制が骨および軟骨を破壊から保護する。また、抗 C D 3 - 誘発 N F -  $\kappa$  B の活性化は、G L K 過剰発現によって増強され、T 細胞系中の G L K s i R N A によって抑制される。これは、G L K を抑制することで、R A における炎症を軽減することができることを示唆するものである。R A 患者に関して、T 細胞 ( T r e g ) 機能の低下が報告されている一方、P K C -  $\delta$  の抑制が、R A 患者から欠損 T r e g 活動性を回復させることも報告されている。G L K 欠損マウスは、T r e g 介在の抑制機能が増大されることを示している。したがって、G L K - P K C -  $\delta$  経路は、T r e g 機能をネガティブに調節する。これらをまとめれば、R A 患者中の G L K を対立させることで、T 細胞介在の免疫応答を低減でき、また、T r e g 介在抑制機能を増大させることができるので、G L K が R A に対して有望な治療の標的であることが示唆される。

40

50

## 【0090】

この研究には、いくつかの制約がある。第1に、その設計は横断的であり、GLK発現に関して、薬理治療の影響を評価することを困難なものにしている。過去の報告によれば、グルココルチコイドがPKC-シグナル伝達を抑制すること、および、TNF-阻害剤がNF-B調節遺伝子形質発現を低減することが示された。RA患者のT細胞中のGLK、PKC-、IKKまたはNF-Bの発現は、免疫抑制因子により低減されるが、GLKレベルは、まだ非常に高く、少なくとも86%のRA患者に疾患活動性で相関した。第2に、骨破壊および軟骨損傷の発病学におけるGLKの役割は、さらに定義が難しい。それにもかかわらず、我々の結果は、RA患者に対して、GLKと関節炎症との間の関連を実証するものである。

10

## 【0091】

我々の結果によれば、GLKがRAの発病に重要な役割を果たし、疾患重症度の潜在的な診断バイオマーカーであることが示される。さらに、GLKおよびその下流PKC-IKKシグナル伝達の抑制は、新しい治療の戦略をRAに対して提供することができる。

## 【0092】

III. 胚中心キナーゼ(GCK)類似キナーゼ(GLK/MAP4K3)の発現は、成人発症型ステイル病で増加し、活動性マーカーとしての機能を果たすことができる

## 【0093】

GLKの発現の強さは、全身性エリテマトーデス(SLE)の患者の疾患重症度に対応していることが示された。我々は、成人発症型ステイル病(AOSD)の発病におけるGLKの役割を調べたが、これは、同様の臨床のいくつかの特性をSLEと共有する。

20

## 【0094】

## [方法]

## (被験者)

Yamaguchi基準を満たす対象の未治療のAOSDをもつ24人の継続的患者(女性15人および男性9人、平均年齢 $\pm$ SD、 $33.3 \pm 9.9$ 年)を登録した。感染症、悪性腫瘍または別のリウマチ性疾患をもつ患者は排除した。各々のAOSD患者の疾患活動性スコア(範囲0~12)を、Pouchotほかによって記載される基準に従って評価した。循環GLK発現T細胞およびTh17関連サイトカインのレベルを初期定量した後、全てのAOSD患者に対して、コルチコステロイドおよび非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)を受容させた。使用された疾患修正抗リウマチ薬(DMARD: Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drug)は、メトトレキサート(20人の患者)、ヒドロキシクロロキン(18人の患者)、スルファサラジン(8人の患者)およびアザチオプリン(3人の患者)であった。リウマチ性疾患を有しない12人の年齢が整合する健康な志願者(8人の女性および4人の男性、平均年齢 $32.4 \pm 8.2$ 年)が、正常対照者の役目を果たした。エンドトキシフィーなヘパリン化減圧チューブ(KABI-ET; クロモジェニックス社、アントワープ、ベルギー)を用いて末梢血を採取し、試料採集と培養との間の合間でサイトカインが生成されることを回避した。台中退役軍人総合病院の臨床研究倫理委員会は、この研究を承認し(No. C10130)、ヘルシンキ宣言によって全ての参加者から書面による同意を得た。

30

40

## 【0095】

## (フローサイトメトリー分析を用いた循環GLK発現T細胞の計量)

最近の研究に記載される技術に基づき、フローサイトメトリー分析を用いて、循環GLK発現T細胞を定量した。ウサギに個々のペプチドで免疫性を与えることによって、GLK抗体を生成した。簡潔には、末梢血単核細胞(PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell)を採取し、コールドPBSで洗浄し、氷上で30分間、示された抗体で染色した。次いで、PBMCを、他の刺激なしで、ゴルジストップ( $10 \mu\text{g/ml}$ のプレフェルジンA、シグマ社、ドイツ)で処理し、その後、抗CD3-アロフィコシアニン[APC]-Cy7(BDファーマーミンゲン社)、抗CD4-

50

パシフィックブルー (BDファーマンゲン社)、および抗CD8 - ペリジニン・クロロフィル・タンパク (PerCP: Peridinin Chlorophyll Protein) シアニン5.5 (Cy5.5: cyanin 5.5) (BDファーマンゲン社) を用いて、室温で染色した。細胞内染色のために、PBMCを、サイトフィクス/サイトパーム緩衝液 (BDバイオサイエンス) 200  $\mu$ l の中で2時間透過処理し、パームウォッシュ緩衝液で洗浄した。ペレットを、100  $\mu$ l の試薬2、サポニン (ベックマンコールター社、米国) を用いて、室温暗所で5分間培養した。サンプルを、0.1%のBSA - PBSで二度洗浄し、PE接合GLK特異mAb (eバイオサイエンス社、米国) で30分室温暗所において培養した。GLK染色には、室温暗所で、アイソタイプコントロールIgG1 - PE (eバイオサイエンス社、米国) を用いた。染色後、細胞を洗浄し、その後直ちに、フローサイトメトリー (ベックマンコールター社、米国) を使って分析した。前方性およびサイズ散乱性に基いてリンパ球をゲートし、少なくとも10,000個のCD3<sup>+</sup>細胞を分析した。データは、FACSCantoIIフローサイトメーター (BDバイオサイエンス) を使って収集し、FlowJoソフトウェアによって分析した。

10

## 【0096】

(GLK発現ウェスタンブロッティング)

免疫ブロッティング分析のため、我々の最近の研究論文に記載されているように、精製T細胞のサンプリングを行った。GLKについて、実験の各セットからの細胞抽出物と等量を混合した反応液を、泳動バッファー (25 mM トリス、192 mM グリシン、0.1% SDS) 中で、6~8% SDS - PAGEで分画した。30分、90Vでゲルを泳動し、その後、青色素の前端が底に到達するまで130Vをかけた。トランスブロットSDセミドライ電気泳動的トランスファーセル (パイオラド社、米国) を用いて、ゲルを21Vで1時間、転写バッファー (50 mM トリス、384 mM グリシン、20% メタノール) 中の二フッ化ポリビニリデン膜 (PVDF: Polyvinylidene Difluoride) に転写した。

20

## 【0097】

TBST (150 mM NaCl、20 mM トリス - HCl (pH 7.4)、0.1%のTween-20) 中で、5%のBSAを用いて、膜を1時間室温でブロックした後、抗GLK (1:1000) で、4で1晩プローブ処理した。抗GLKは、適切なペプチドおよび抗 - チューブリン (1:1000、T4026、シグマ社、米国) を用いてウサギに免疫性を与えることにより生成されたものである。膜をTBSTで約3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ接合された第2の抗体 (1:6000) と共に、1時間室温で培養した。抗体反応した膜を、TBSTで3回洗浄し、増強イモビロン・ウェスタン・ケミルミネッセントHRPサブストレート (WBKLS0500、ミリポア社、米国) を用いて処理を行い、新型メガカム810サイエンスグレードCCDカメラ (UVP、LLC、CA、米国) で撮影した。 - チューブリンに対してGLKタンパクの相対的な発現レベルを補正し、対照と相対的な値を示した。

30

## 【0098】

(GLK発現に対する定量PCR (qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction))

フィコール - パック (商標) プラス (GEヘルスケアバイオサイエンス社、スウェーデン) を用いて、密度勾配遠心分離により、静脈の血液から分PBMCを直接的に分離した。グアニジンイソチオシアネート方法によって、PBMCから全細胞RNAを得て、260nmの分光度測定により定量した。標準的な手順に従い、200Uのモロニーマウス白血病ウイルス・リバーシ・トランスクリプターゼ (ファーマンタス、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社、米国) を用いて、RNAアリコート2.5  $\mu$ gを逆転写した。タクマンPCRコア試薬キット (アプライドバイオシステムズ社、米国) に供給されているqPCRアッセイによって、GLK mRNA発現レベルを判定した。GLKおよび内部コントロールグリセリンアルデヒド - 3 - リン酸塩デヒドロゲナーゼ (GAPDH

40

50

: Glyceraldehydes - 3 - Phosphate Dehydrogenase) に特異的なプライマーを、アプライドバイオシステムズ社 (フォスター市、CA、米国) から入手した。解離曲線プロットによってPCR産物の純度を評価した。GLKのmRNAレベルを補正するために、各々のサンプルで並行して、ハウスキーピング遺伝子GAPDHの転写産物レベルを判定した。GLKの相対的な発現レベルを、比較閾値サイクル (Ct) 法で計算し、 $2^{-Ct}$  によって評価した ( $Ct = \text{患者}(Ct_{GLKgene} - Ct_{GAPDH}) - \text{対照者平均}(Ct_{GLKgene} - Ct_{GAPDH})$ )。

#### 【0099】

(可溶性のIL-2レセプター (sIL-2R) およびTh17関連サイトカインの血清レベルの定量)

E L I S A キット (セルフリー; エンドジェン社、MA、米国) を使って、血清sIL-2Rレベルを判定した。製造業者 (e バイオサイエンス社、サンディエゴ、CA、米国) のマニュアルに従い、酵素結合抗体免疫吸着アッセイを用いて、A O S D 患者および健常対照者におけるIL-1、IL-6、IL-17A およびTNF- $\alpha$  の血清レベルを測定した。

#### 【0100】

[統計学的分析]

結果は、平均 + / - 標準偏差または中央値 (四分位数間領域) で示される。循環GLK発現T細胞の頻度、GLK転写産物およびタンパクの発現レベル、ならびに、Th17関連サイトカインの血清レベルについて、それぞれの群間比較を行うために、非母数のクラスカル・ワリス検定を使用した。この検定が顕著な差を示した時は、マンホイットニーU検定を使用して、正確なp値を判定した。非母数のスピアマンの順位相関試験を使って、相関係数を計算した。有効な治療の後のA O S D 患者のフォローアップ中、循環GLK発現T細胞のレベルとGLKの発現レベルとを比較するため、ウイルコクソンの符号順位検定を用いた。その比較のためにウイルコクソンの符号順位検定を用いた。0.05未満の確率のときは、顕著であるとみなされた。

#### 【0101】

[結果]

(A O S D 患者の臨床の特性)

表4に示されるように、対象の未治療のA O S D を有する全ての24人の患者は、日常的にスパイク熱 (39) を発症していた。別の通常の発現は、感知しにくい発疹 (83.3%、20人)、咽頭炎 (70.8%、17人) および関節炎 (62.5%、15人) を含んでいた。リンパ節腫脹および肝脾腫大症は、それぞれ10人 (41.7%) および6人 (25.0%) の患者で見られた。この研究の登録者の年齢や、A O S D 患者と健常対照者との間の女性の割合には、顕著な差はなかった。表4は、成人発症型ステイル病 (A O S D) および健常対照者 (H C) で患者の人口統計学的データおよび臨床の特性を示す。

10

20

30

【表 4】

特性	AOSD (n = 24)	HC (n = 12)	
研究登録者の年齢 (年)	33.3 ± 9.9	32.4 ± 8.2	
女性の割合	15 (62.5%)	8 (66.7%)	
発熱 (≥ 38℃)	24 (100%)	NA	
感知しにくい発疹	20 (83.3%)	NA	10
咽頭炎	17 (70.8%)	NA	
関節炎	15 (62.5%)	NA	
リンパ節腫脹	10 (41.7%)	NA	
肝臓機能不全	10 (41.7%)	NA	
肝脾腫大症	6 (25.0%)	NA	
臨床の活動性スコア	5.83 ± 1.34	NA	
CRPレベル (U/L)	3.3 ± 0.4	NA	20
フェリチンレベル (μg/L)	692.9 ± 103.6	NA	
sIL-2Rレベル (pg/ml)	563.5 ± 87.5	NA	

データは、平均 + / - SD または数 (パーセンテージ) で表される ; NA : 適用なし。  
肝臓機能不全は、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT: Alanine Aminotransferase) レベル 40 IU/L であると定義される。CRP: C反応性タンパク質。sIL-2R: 可溶性のインターロイキン2レセプター。

## 【0102】

(AOSD患者中の循環GLK発現T細胞の頻度増加)

対象のAOSDを有する患者1人および健常対照者1人の、末梢血CD3<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞におけるGLK発現のフローサイトメトリー輪郭プロットの代表的な例が、それぞれ、図20Aおよび20Bに示される。対象のAOSDの患者 (中央値 = 31.85%、四分位 [IQ] 範囲 21.21% ~ 48.84%) に観測された循環GLK発現CD3<sup>+</sup>T細胞平均頻度は、健常対照者 (中央値 = 8.93%、IQ範囲 6.81% ~ 2.08%; p < 0.001、図20C) に比べて大変高かった。

## 【0103】

(AOSD患者のGLK転写産物およびタンパクの発現増加)

図20Dに示すように、健常対照者 (中央値 = 0.92、IQ範囲 0.63 ~ 1.37; p < 0.001) に比べて、対象のAOSD患者 (中央値 = 2.35、IQ範囲 1.66 ~ 3.88) には、GLK転写産物の相対的な発現における何倍もの増加が観測された。同様に、対象のAOSD患者について、ウェスタンブロッティング (図20E) によって判定される精製T細胞の溶解物中のGLKの発現が増加した。対象のAOSD患者におけるGLKタンパクの相対的な発現レベル (中央値 = 1.74、IQ範囲 1.47 ~ 2.95) は、対照者における発現レベル (中央値 = 0.66、IQ範囲 0.54 ~ 0.94; p < 0.001、図20F) に比べて著しく高かった。

## 【0104】

(AOSD患者におけるTh17関連サイトカインの血清レベルの上昇)

図21に示すように、対象のAOSD患者は、血清IL-6 (中央値 = 474.81、IQ範囲 156.42 ~ 987.55)、IL-17A (中央値 = 306.80、IQ範囲

30

40

50

囲 152.17 ~ 503.70)、および TNF- (中央値 = 51.85、I Q 範囲 23.63 ~ 65.93) について、非常に高い中央値レベルを有し、これは、健常対照者 (IL-6 は中央値 = 85.78、I Q 範囲 31.13 ~ 189.98、 $p < 0.001$ ; IL-17A は中央値 = 70.90、I Q 範囲 51.42 ~ 124.53、 $p < 0.001$ ; TNF- は中央値 = 24.66、I Q 範囲 10.50 ~ 37.76、 $p < 0.01$ ) と比較して顕著であった。しかしながら、血清 IL-1 レベルについては、AOSD 患者と HC との間で顕著な差はなかった。

【0105】

(AOSD 患者のサイトカインに加えて GLK 発現と疾患活動性との間の相関)

【表 5】

10

	循環 GLK 発現 T 細胞 (%)	GLK タンパクの相対的な発現レベル	GLK 転写産物の相対的な発現レベル
臨床の活動性スコア	0.599**	0.435*	0.452*
CRP (mg/dL)	0.455*	0.315	0.364
フェリチン ( $\mu$ g/L)	0.508*	0.296	0.318
sIL-2R (pg/ml)	0.865***	0.569**	0.803***
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	0.281	0.152	-0.063
IL-6 (pg/ml)	0.822***	0.423*	0.547**
IL-17A (pg/ml)	0.787***	0.699***	0.740***
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0.295	0.177	0.310

20

AOSD: 成人発症型ステイル病; CRP: C 反応性タンパク質; sIL-2R: 可溶性のインターロイキン 2 レセプター; IL-1: インターロイキン-1; IL-6: インターロイキン-6; IL-17A: インターロイキン-17A; TNF-: 腫瘍壊死因子-。

30

\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.005$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  は、非母数のスピアマンの順位相関試験によって得られた。

【0106】

表 5 に示すように、循環 GLK 発現 CD3<sup>+</sup>T 細胞の頻度は、臨床の活動性スコア、CRP レベル、フェリチンレベルおよび sIL-2R の血清レベルを含む疾患活動性と正に相関し、これは、AOSD 患者の T 細胞活性化を反映したものである。同様に、GLK タンパクおよび転写産物の相対的な発現レベルは、AOSD 患者の臨床の活動性スコアおよび sIL-2R レベルに対して正に相関した。Th17 関連サイトカインの中では、GLK 発現レベルは、IL-6 および IL-17A の血清レベルと正に相関した。しかしながら、GLK 発現と我々の AOSD 患者の臨床発現との間に顕著な相関はなかった (データ図示せず)。表 5 は、循環 GLK 発現 T 細胞の頻度が、GLK タンパクの相対的な発現レベル、GLK 転写産物および疾患活動性パラメータおよび AOSD をもつ 24 人の患者の Th17 関連サイトカインとの間で相関を有することを示す。

40

【0107】

(有効な治療後の AOSD 患者における GLK 発現レベルの変化)

12 人の AOSD 患者は、活性段階および寛解傾向段階の検査に利用可能であった。図 22 に示すように、有効な治療後の AOSD 患者において、循環 GLK 発現 T 細胞のレベルおよび GLK タンパクの相対的な発現レベルに加えて転写産物が、著しく低減され (平均 + / - 標準誤差、それぞれ、45.77 + / - 5.58 対 20.11 + / - 2.53; 3.01 + / - 0.49 対 0.93 + / - 0.17; 3.45 + / - 0.56 対 1.21

50

+ / - 0 . 3 8、全てで  $p < 0 . 0 0 5$  )、臨床の寛解傾向および s I L - 2 R の血清レベルの減少 ( 7 4 7 . 8 + / - 1 3 1 . 8 p g / m l 対 2 2 9 . 1 + / - 3 8 . 5 p g / m l、 $p < 0 . 0 0 5$  ) と、平行している。

#### 【 0 1 0 8 】

本研究は、健常対照者に比べて、対象の A O S D 患者で G L K 過剰発現が生じていることを実証する最初の調査である。細胞内シグナリング分子のフローサイトメトリー分析が出現したことにより、不均質細胞群中で単一の細胞を研究する機会が一気に増えた。本研究では、C D 4 および C D 8 部分集合を含む C D 3<sup>+</sup>T 細胞が、対象の A O S D をもつ患者における G L K 発現の増大を実証する。また、我々の結果では、A O S D 患者において、循環 G L K 発現 T 細胞が非常に高い頻度で発生し、これは、臨床の活動性スコアや血清フェリチンレベルを含む疾患活動性と相関していることが示された。さらに、A O S D 患者では、疾患寛解傾向に伴い平行に G L K 生成も減少することが見いだされた。A O S D 患者に関係しているこれらのデータは、S L E 患者の活性度指数と相関する循環 G L K 発現 T 細胞の高いレベルが示されている我々の最近の研究の結果と同様であり、これは、G L K 過剰発現は A O S D 発病に重要な役割を果たしており、したがって A O S D の潜在的な活動性マーカーになり得ることを示唆するものである。しかしながら、ここに記載した発見を確認するためには、大規模な予測研究を行う必要がある。

10

#### 【 0 1 0 9 】

A O S D 患者中のタンパクおよび転写産物レベルで G L K 発現を証明するため、対象の未治療の A O S D を有する我々の患者からの末梢血リンパ球に対して、G L K 発現ウェスタンブロットティングおよび q P C R を実施した。A O S D 患者において、G L K タンパク質および転写産物の相対的な発現レベルは、H C に比べて非常に高かったことを、我々は実証した。さらに、我々の研究において、循環 G L K 発現 T 細胞の頻度と、G L K タンパク質の発現レベルとの間の正の相関は、過去の研究の発見に合致しており、このことは、細胞内フローサイトメトリーとウェスタンブロットティングとは共に、M A P K シグナル伝達状態を測定する同様のアッセイであることを示している。さらに、転写産物と同様に G L K タンパク質の発現レベルは、我々の A O S D 患者における臨床の活動性スコアと著しく相関した。これらのデータは、A O S D 患者の T 細胞において G L K 過剰発現の第一の直接的かつ確固とした証明を提供する。

20

#### 【 0 1 1 0 】

証明の累積により、T h 1 7 細胞は、A O S D および S L E の両方の発病に対して重要な役割を果たすことが示される。I L - 6 は、I L - 1 と相乗作用し、T h 1 7 細胞の分化および発生を促進する。T h 1 7 細胞は、多面的なサイトカイン、I L - 1 7 を分泌することができ、これは、炎症誘発性のサイトカインおよびケモカインの発現を誘発することによって組織炎症に寄与する。我々の最近の研究では、G L K 欠損マウスは、E A E の進展に耐性を示し、T h 1 7 応答を低減させたことが示された。インビトロ T 細胞分化アッセイからの結果は、G L K が、T h 1 7 細胞分化にポジティブな役割を果たすことを示している。本研究での結果は、T h 1 7 関連サイトカイン、I L - 6 および I L - 1 7 A の血清レベルが向上することを示し、これは、A O S D 患者からの T 細胞の中に G L K の発現レベルと相関した。我々のデータも、過去の発見を支持し、M A P K 経路は、T h 1 7 細胞機能の調節に重要な役割を果たし、かつ、I L - 1 7 生成は、M A P K に依存する機構が介在することを示している。さらに、M A P K の抑制により、V o g t - K o y a n a g i - H a r a d a 症候群における I L - 1 7 生成を抑制することができ、かつ、T h 1 7 介在自己免疫性疾患、E A E を低減できる。これらの観測によれば、G L K 過剰発現あるいは M A P K シグナル伝達が、T h 1 7 関連サイトカインの生成に寄与できることが示唆される。しかしながら、G L K アップレギュレーションは、A O S D の発病の最初の現象よりむしろ炎症の随伴現象を代表する可能性が、まだ存在する。

30

40

#### 【 0 1 1 1 】

我々は、A O S D 患者に対する長期的なフォローアップを行い、循環 G L K 発現 T 細胞のレベルだけでなく、G L K タンパク質および転写産物の発現レベルも著しく減少するこ

50

とを示し、これは、臨床の寛解傾向と平行的であり、また、有効な治療後の炎症性のパラメータの減少とも平行的である(図23)。我々の結果は、さらに上流側のMAPKシグナル伝達経路の阻害剤、例えばMAP2K(MKK3またはMKK6)およびMAP3K(形質転換成長因子活性化キナーゼ1、TAK1)が、リウマチ性疾患に対する有望な治療の方法を与えることができるという仮説を支持するものである。上流側MAPキナーゼとしてのGLKはまた、下流側MAPKまたは数個のp38アイソフォームを広く抑制することにより、潜在的な治療の戦略を目標とできる。さらに、抑制すると大きな毒作用を示すp38MAPK等の下流側分子に比べて、上流側シグナル伝達分子は、良い標的とすることができる。

#### 【0112】

AOSDのIL-1レベルが上昇し、IL-1レセプターアンタゴニスト(アナキンラ)が炎症性疾患の治療に大きな助けとなるということを報告した研究があるが、我々の結果によれば、AOSD患者と健康体との間には、IL-1レベルの顕著な差を示さなかった。

#### 【0113】

我々の結果は、Th17関連サイトカインのレベルを増加させることによるGLK過剰発現が、AOSDの発症メカニズムに関与できることを、明らかにした。我々のデータは、GLK過剰発現と炎症性疾患のリストとの間に関連があるということを示す証拠に加えられる。また、我々の結果において、GLK発現レベルは、AOSDの疾患活動性と正に相関し、これは、GLKが、新しい活動性バイオマーカーおよび潜在的な治療の標的として用いる事ができることを示している。

#### 【0114】

##### IV. GLK診断バイオマーカー

SLE患者の他に、7人の付加的な自己免疫性疾患からの患者サンプルでは、末梢血T細胞のGLK発現が、劇的に増加したことが示された(表6、図24~26)。上記で開示されるように、GLK発現は、RAおよびAOSDの疾患重症度と相関した。GLK過剰発現T細胞が、RA患者からの滑膜組織中で検出された。

#### 【0115】

我々のデータによれば、GLK過剰発現末梢血T細胞が、SLE患者中の全てのIL-17生成細胞であったことが示された(図27)。自己免疫発病におけるGLKの制御作用を研究するため、我々はさらに、Lck-GLKと呼ばれるT細胞特異GLKトランスジェニック(Tg)マウスを生み出した。Lck-GLK Tgマウスは、多数の自己免疫性疾患を自発的に発達させ、血清IL-17およびSLE/慢性関節リウマチ自己抗体が増加していた(図28および29)。Lck-GLK Tgマウスは、慢性関節リウマチおよび多発性硬化症のフェノタイプを表した。T細胞中のIL-17転写は、トランスジェニックGLKによって誘発された(図29)。Lck-GLK Tgマウスのこれらの結果によれば、GLK-PKC-IKK-IL-17軸の活性化が、自己免疫性疾患に貢献することが示唆される。

#### 【0116】

したがって、GLKは、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、成人発症型ステイル病、グレーブス病、シェーグレン症候群、神経脊髄炎、強直性脊椎炎および脱毛症を含む多数の自己免疫性疾患の診断バイオマーカーおよび治療の標的となる。

#### 【0117】

腫瘍形成に関与するNF- $\kappa$ B活性化をGLKが誘発することから、我々は、癌腫サンプル中のGLK発現を研究した。我々の最近のデータによれば、ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)、食道癌、膠芽細胞腫、膵管腺癌、乳癌および肝癌中のGLK発現が著しく増加したことが示された(図30~35)。mTORではなく、IKKの活性化が、NSCLCにおいて増大した(図30)。これらのデータによれば、GLKが、mTORから独立した経路を通じて、腫瘍形成に寄与することが示唆される。さらに、腫瘍部分におけるGLK過剰発現は、NSCLC患者では、早期の再発(すなわち末端の転移)とよく相関し

10

20

30

40

50

た ( P = 0 . 0 0 9 ; 図 3 6 ) 。 我々のデータによれば、 G L K 過剰発現が腫瘍形成および腫瘍転移を誘発したことが示された ( 図 3 7 ) 。 したがって、 G L K は、多様な癌、例えば肺癌、食道癌、膠芽細胞腫、膵臓癌、乳癌および肝癌に対する新しいバイオマーカおよび治療の標的である。

【 0 1 1 8 】

これらをまとめれば、我々のデータによれば、 G L K は、自己免疫炎症疾患および癌に対して、新しいバイオマーカおよび治療の標的であることが示された。細胞が G L K を過剰発現させる自己免疫炎症性の疾患 / 癌の患者に対する治療法として、将来開発される G L K 阻害剤を用いることができるであろう。

【 0 1 1 9 】

[ 結論 ]

1 . G L K は、多様な自己免疫性疾患の新しいバイオマーカである

S L E 、慢性関節リウマチおよび成人発症型スティル病患者の T 細胞中における G L K 過剰発現の他、シェーグレン症候群、神経脊髄炎、強直性脊椎炎および脱毛症の T 細胞の中にも、 G L K 過剰発現は見いだされた ( 図 2 4 ) 。 我々はまた、薬剤未感作なグレーブス病 ( G D ) 患者からの T 細胞、および、部分的な抗甲状腺治療を受けたが未だ甲状腺中毒の状態にある患者からの T 細胞中に、 G L K が過剰発現したことを見いだした。これは、フローサイトメトリー、免疫プロッティングおよび定量 P C R 法 ( q P C R ) によって判定された ( 図 2 5 および 2 6 ) 。 G L K タンパクレベルおよび m R N A レベルは、 G D 患者からの T 細胞中で上昇した ( 図 2 5 ) 。 我々の結果によれば、 G L K 過剰発現は、自己免疫性疾患の発病および重症度に寄与し、自己免疫性疾患の新しいバイオマーカであることが示唆される。表 6 は、 G L K の介在した自己免疫性疾患および癌を示す。

【 0 1 2 0 】

2 . G L K は、 T 細胞中の I L - 1 7 生成を誘発する

自己免疫の発病における G L K の制御作用を研究するため、我々はさらに、 T 細胞に特異的な促進因子 L c k を用いて、 T 細胞に特異的な G L K トランスジェニックの ( T g ) マウスを生成した。血清自己抗体および血清 I L - 1 7 の特異的な増加により、 L c k - G L K T g マウスは、自発的に多様な自己免疫性疾患を進展させた ( 図 2 7 ~ 2 9 ) 。 これらの発見は、 G L K - P K C - I K K - I L - 1 7 軸の活性化は、自己免疫性疾患に寄与することを示唆する。高レベルの G L K 遺伝子導入を発現する L c k - G L K - T g マウス ( 8 週齢 ) は、血清 I L - 1 7 A レベルの急激な誘起を示した。 I L - 1 7 A m R N A レベルは、トランスジェニック G L K によって上昇した ( 図 2 9 ) 。 これらの結果によれば、 G L K が T 細胞中の I L - 1 7 A 生成をプラスに調節するという、 S L E 患者の我々のデータをさらに裏付けることになる。

【表 6】

自己免疫性疾患	がん
慢性関節リウマチ ( R A )	食道がん
成人発症型スティル病 ( A O S D )	膠芽細胞腫
グレーブス病 ( G D )	膵管腺がん ( P D A )
シェーグレン症候群 ( S S )	乳がん
強直性脊椎炎 ( A S )	肝がん
神経脊髄炎 ( N M O )	
脱毛症	
自己免疫性脳脊髄炎	

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 1 】

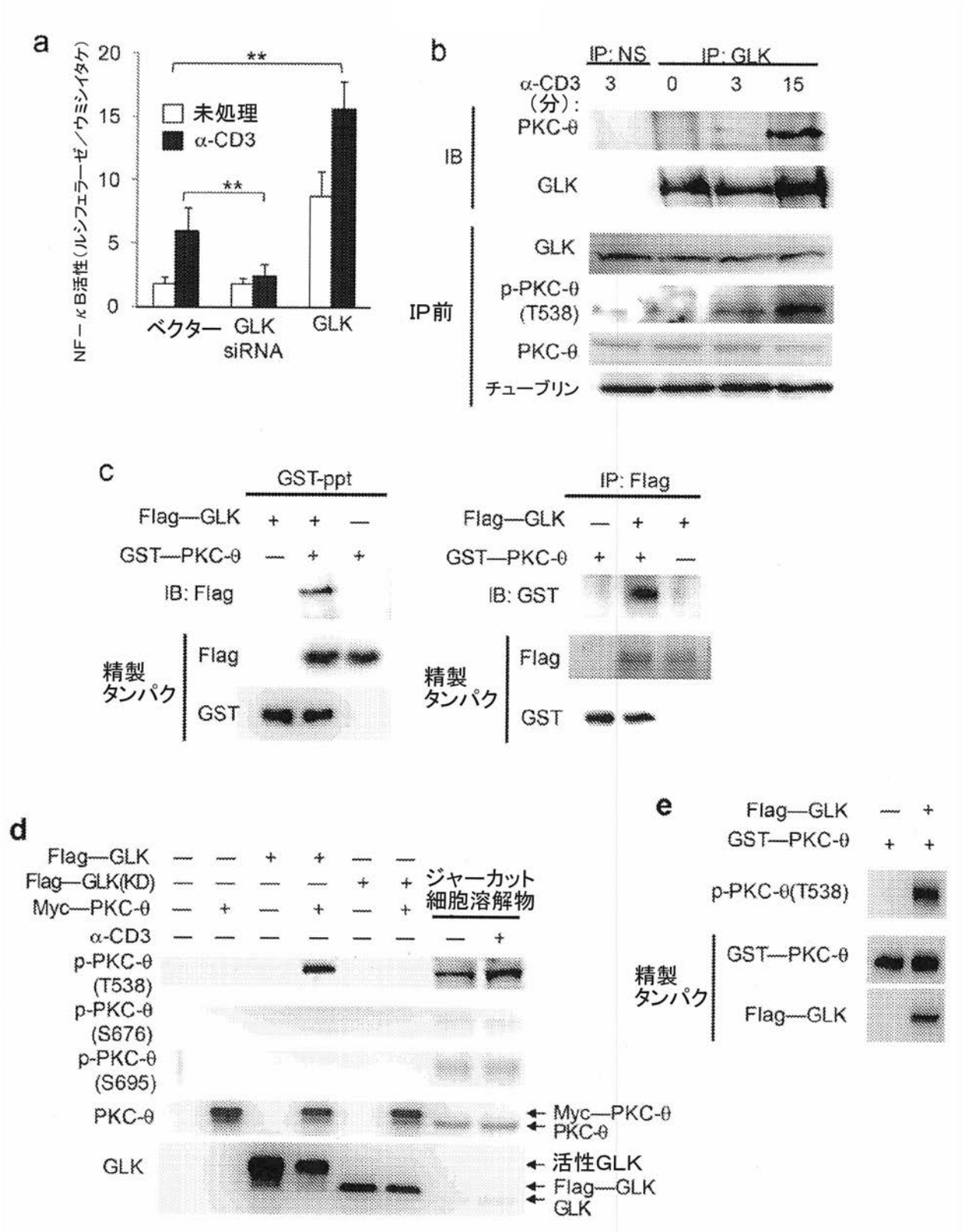
## 3 . 多様なタイプの癌における G L K 過剰発現

肺癌患者において正常な部分と比較して腫瘍部分中で、G L K タンパクレベルが上昇した（ 8 5 . 7 % ）。食道癌患者において正常な部分と比較して腫瘍部分中で、G L K タンパクレベルが上昇した（ 5 8 % ）。また、膠芽細胞腫、膵臓癌、乳癌および肝癌中においても、G L K が過剰発現した。

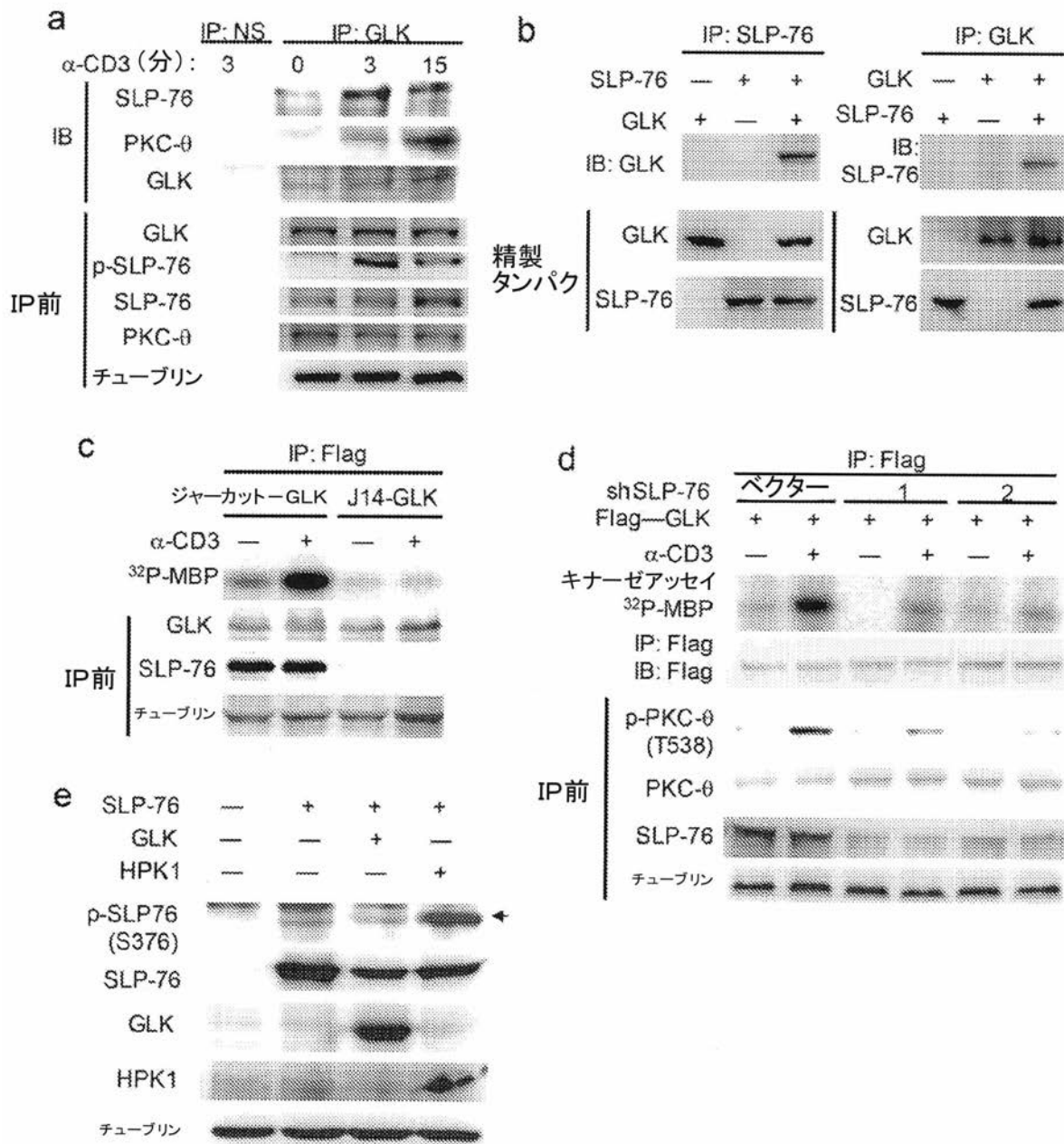
## 【 0 1 2 2 】

本発明の例示的な実施形態に関しての前述の説明は、例示および説明の目的にのみ提示されるものであり、本発明を網羅的とするものでもなければ、開示された形態に厳密に限定するものでもない。様々な変形および変更が、上記の教示を考慮した上で可能である。

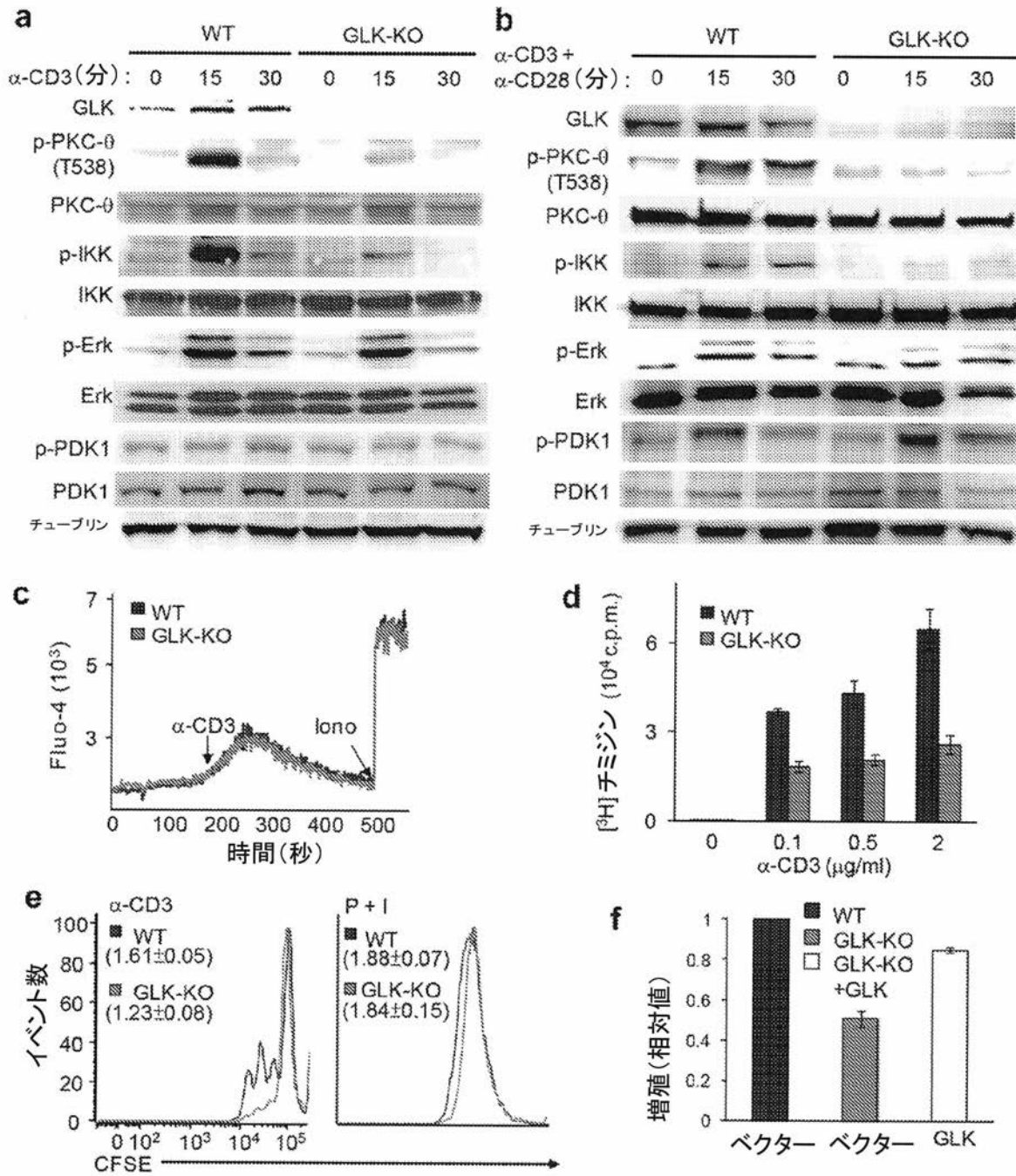
【 図 1 】



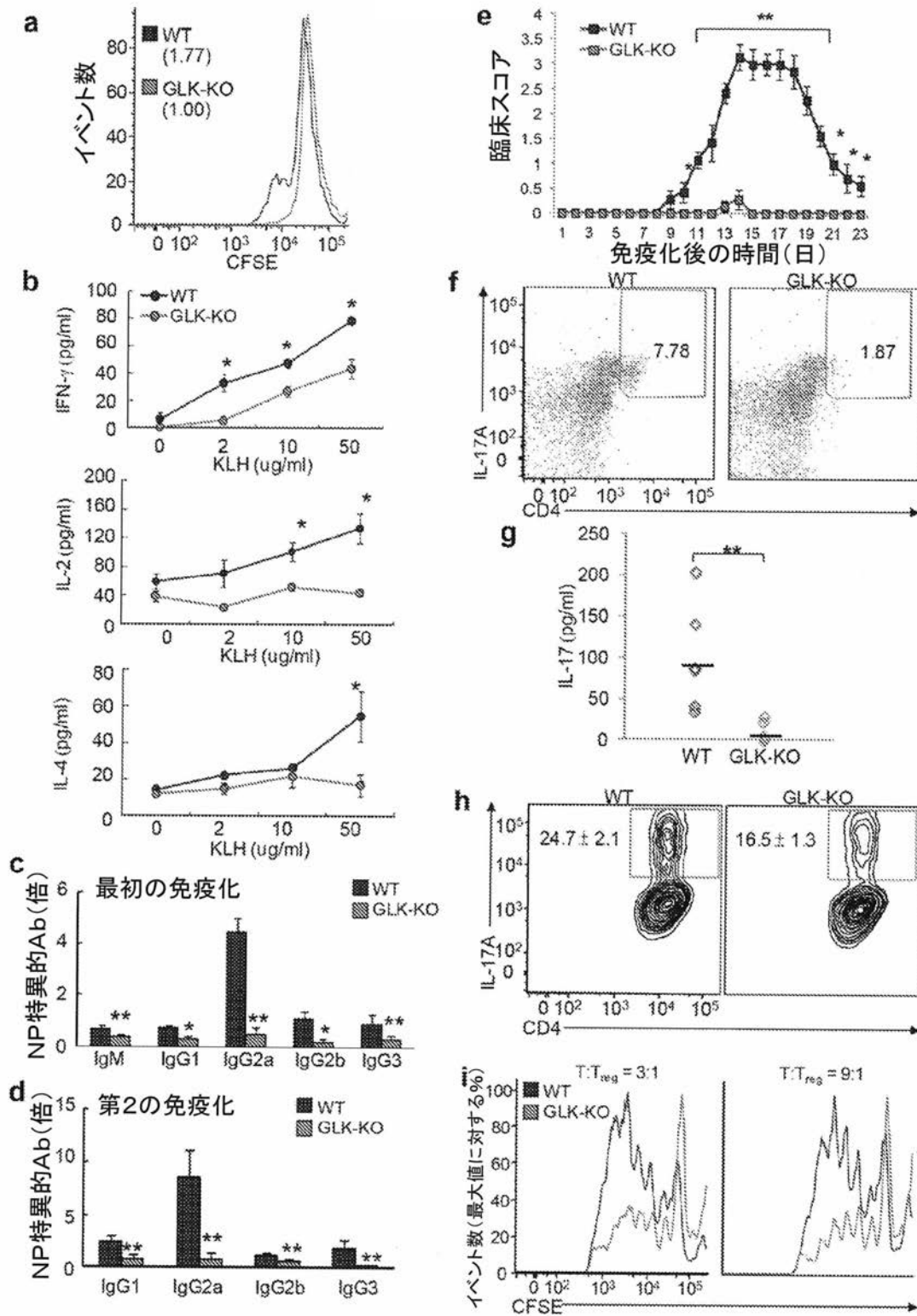
【 図 2 】



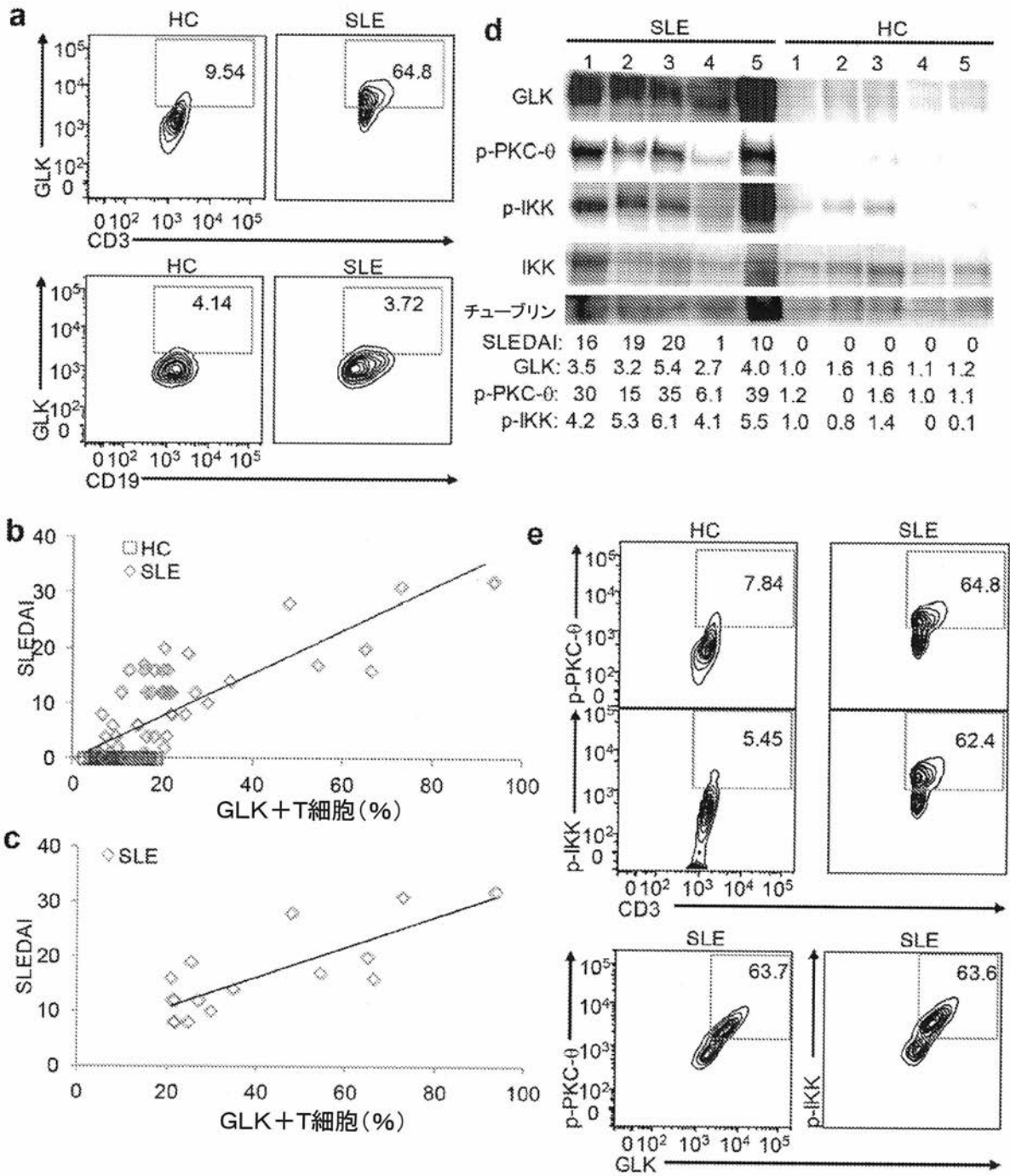
【図3】



【 図 4 】

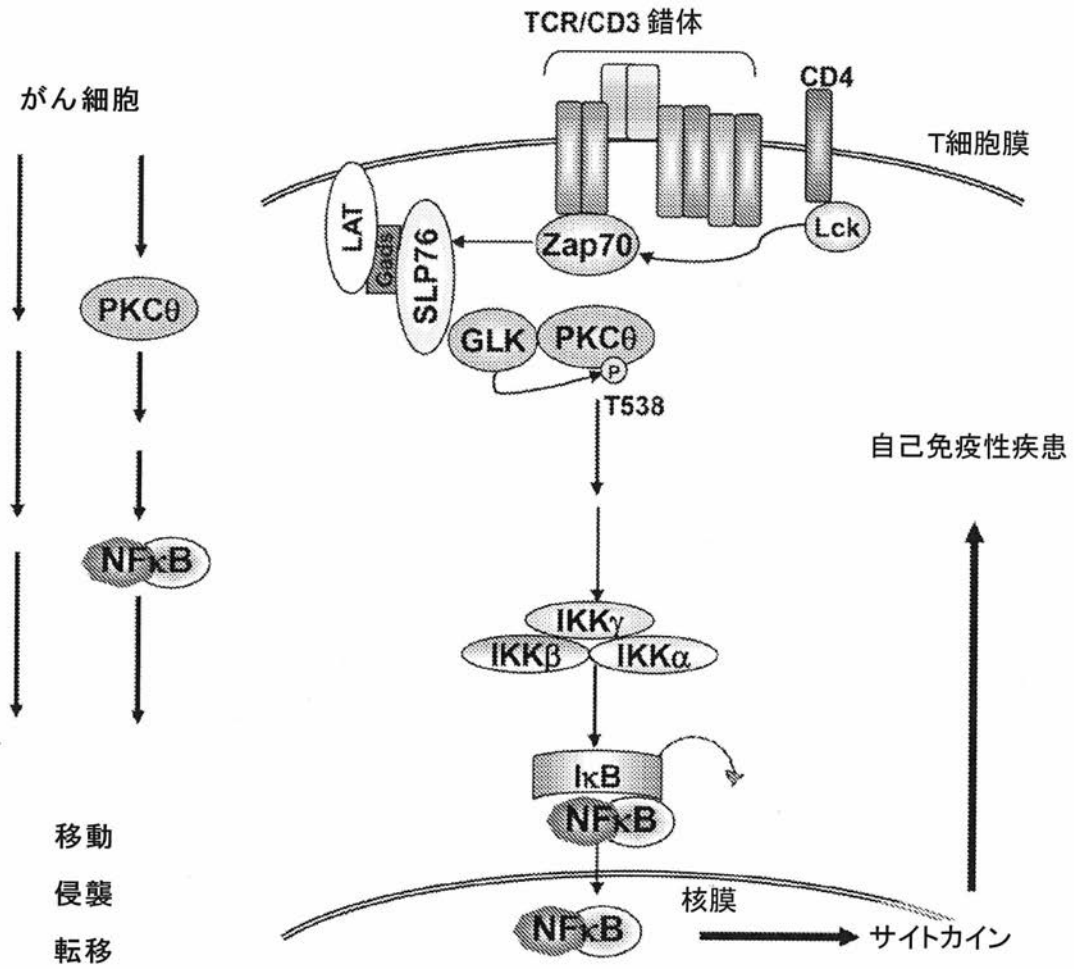


【 図 5 】

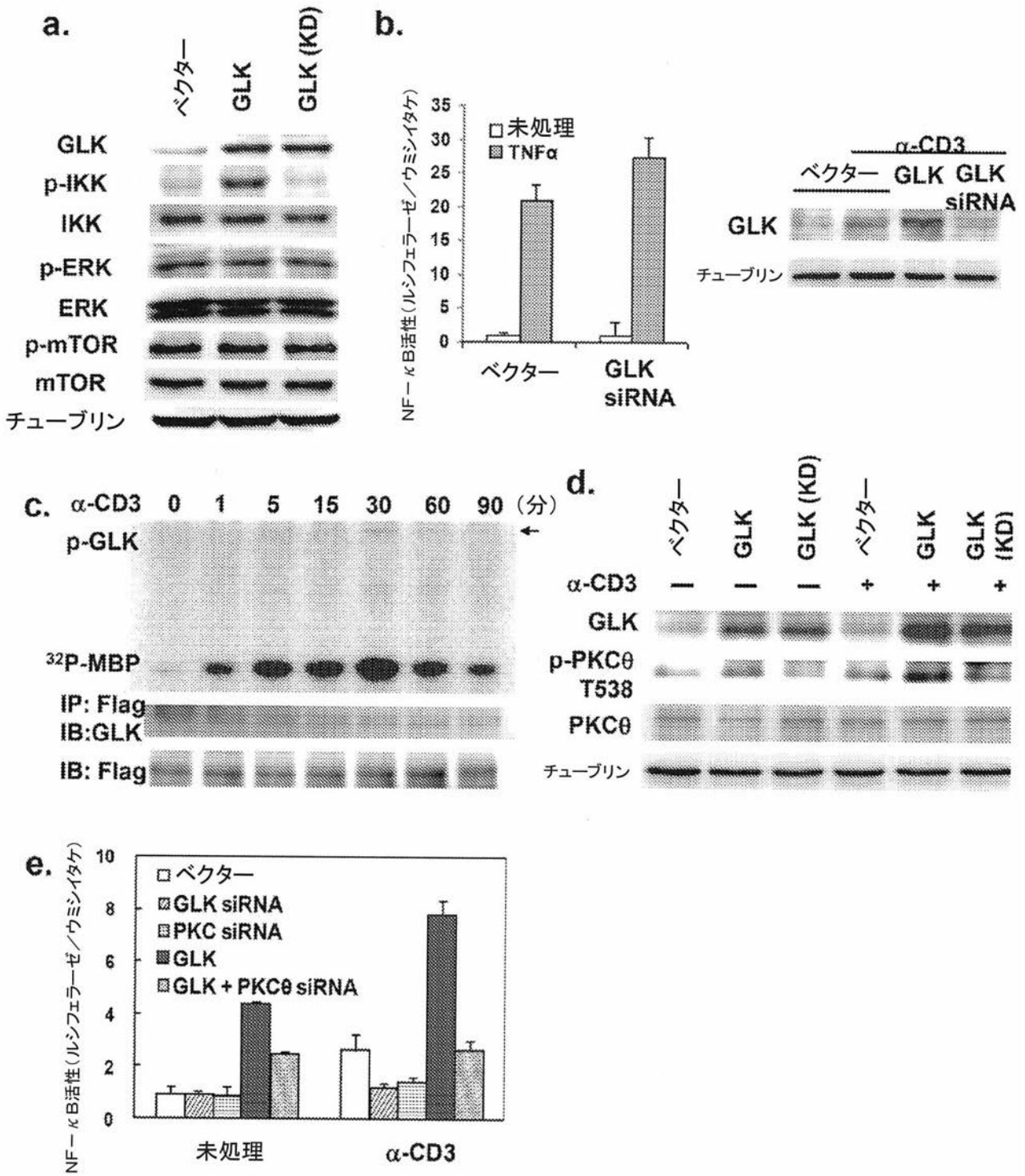


【 図 6 】

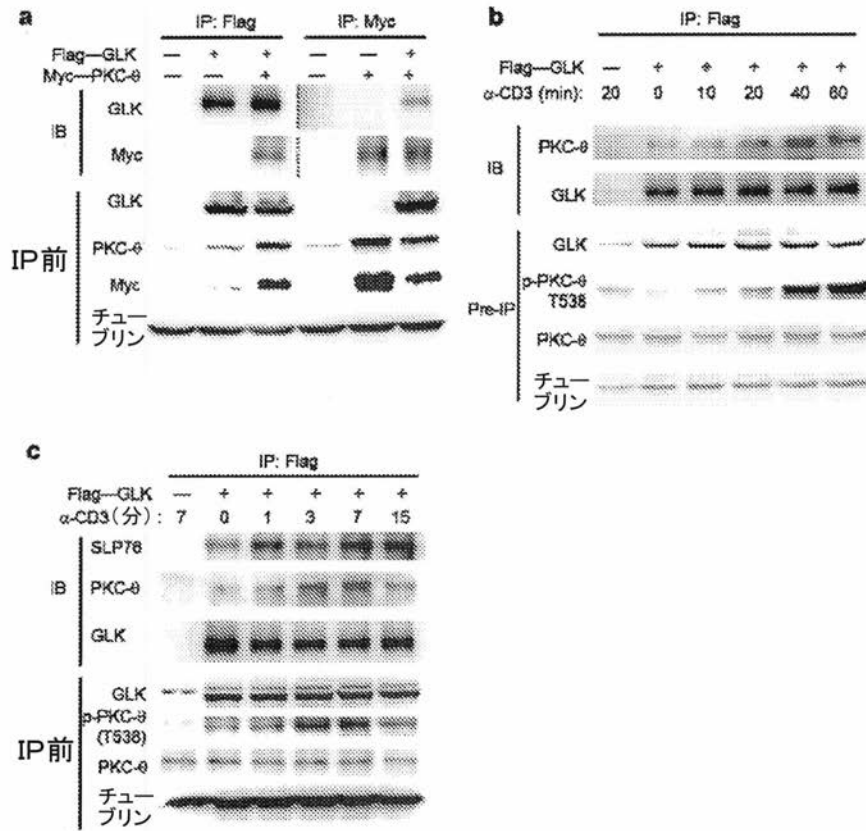
GLKは、自己免疫性疾患およびがんに対する治療標的である



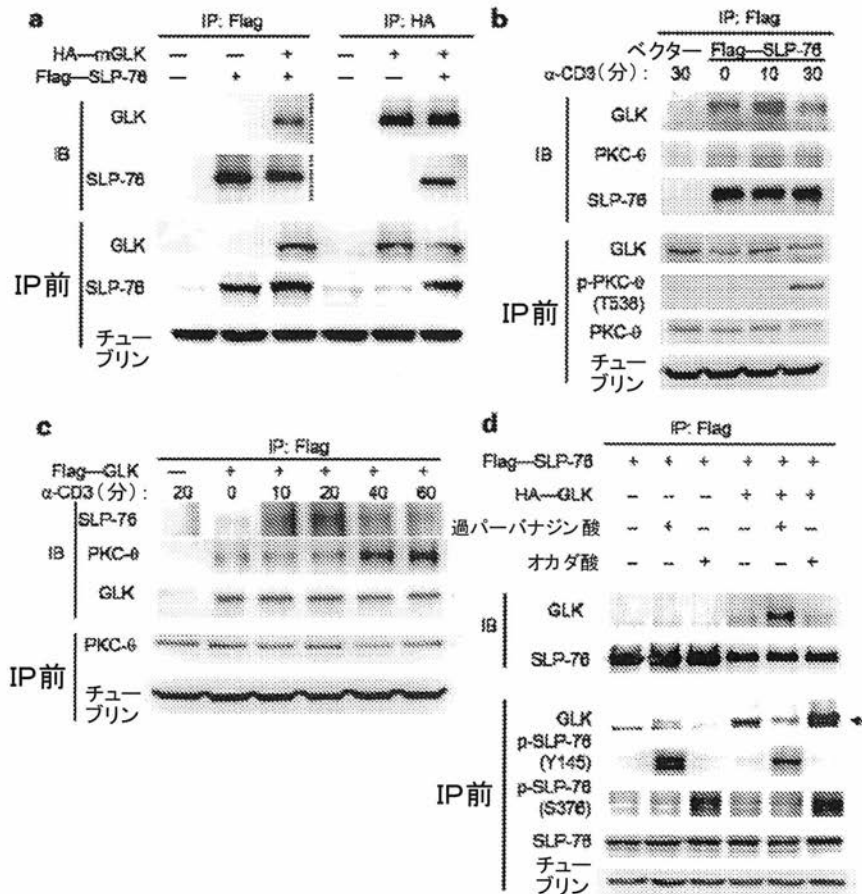
【 図 7 】



【 図 8 】



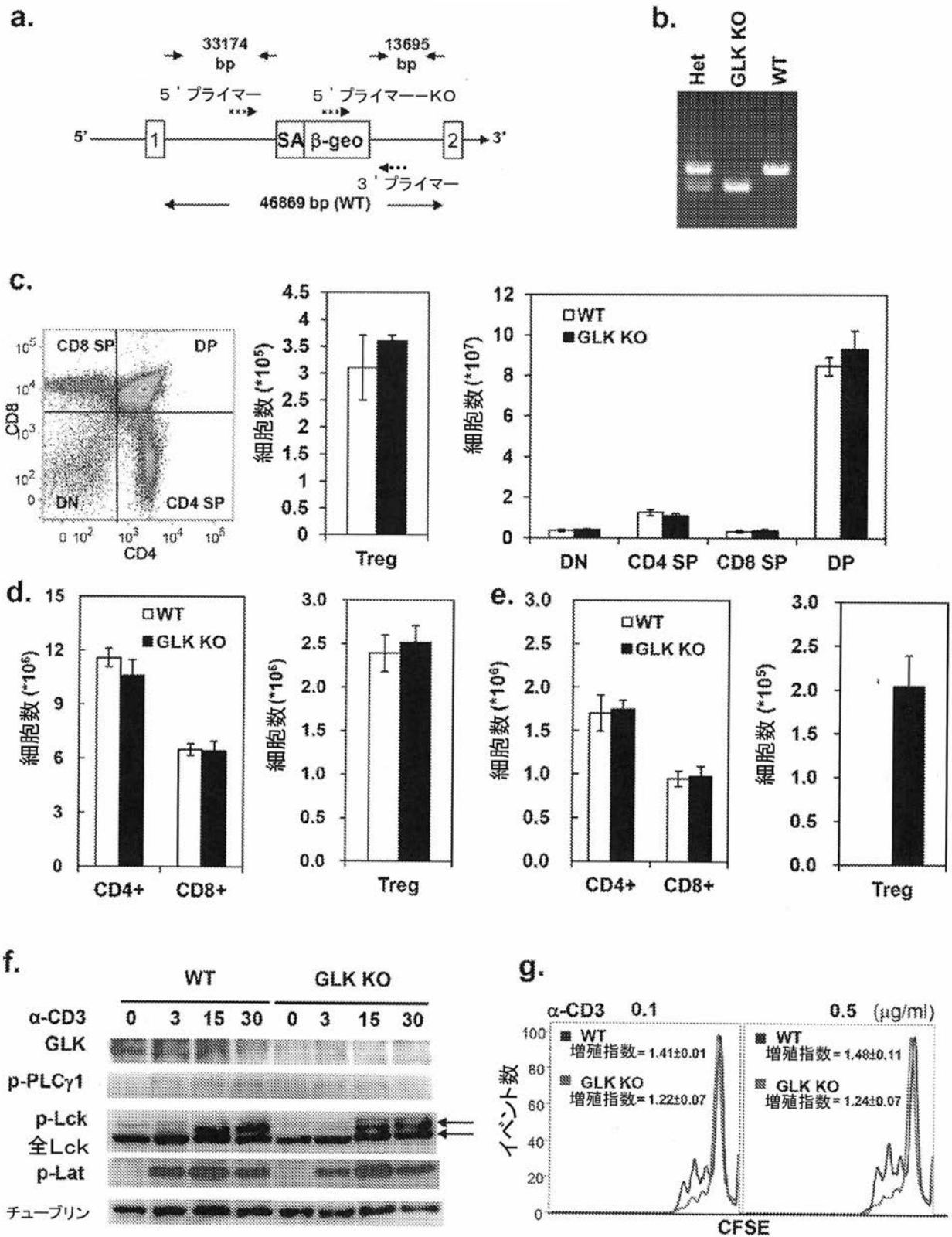
【 図 9 】



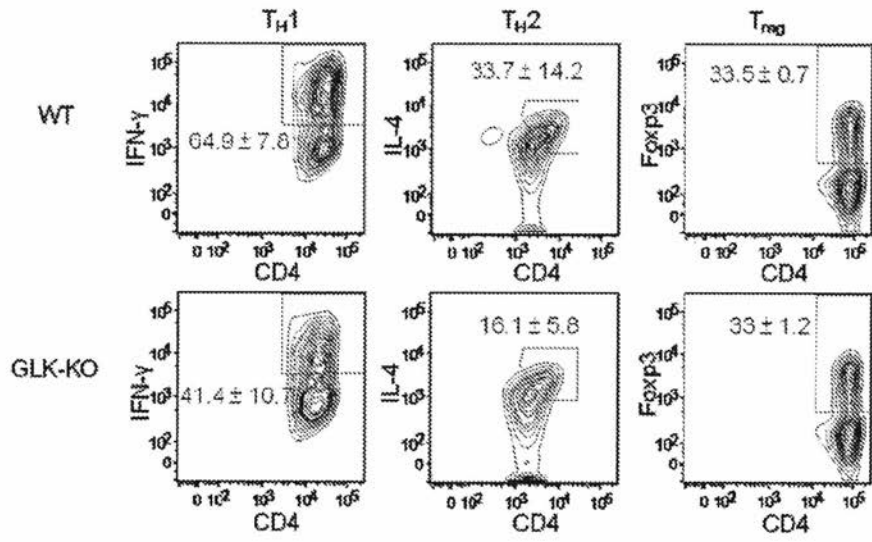
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

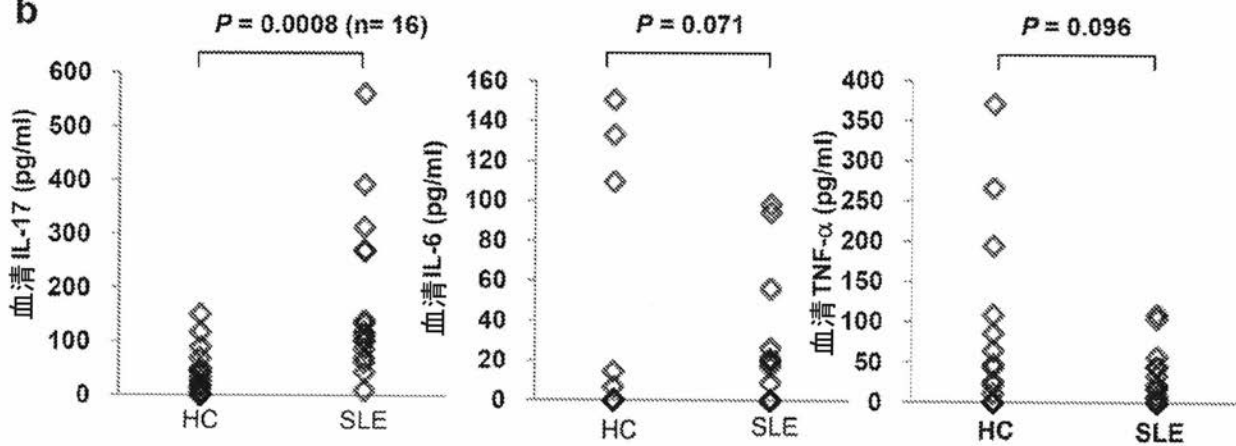


【 図 1 3 】

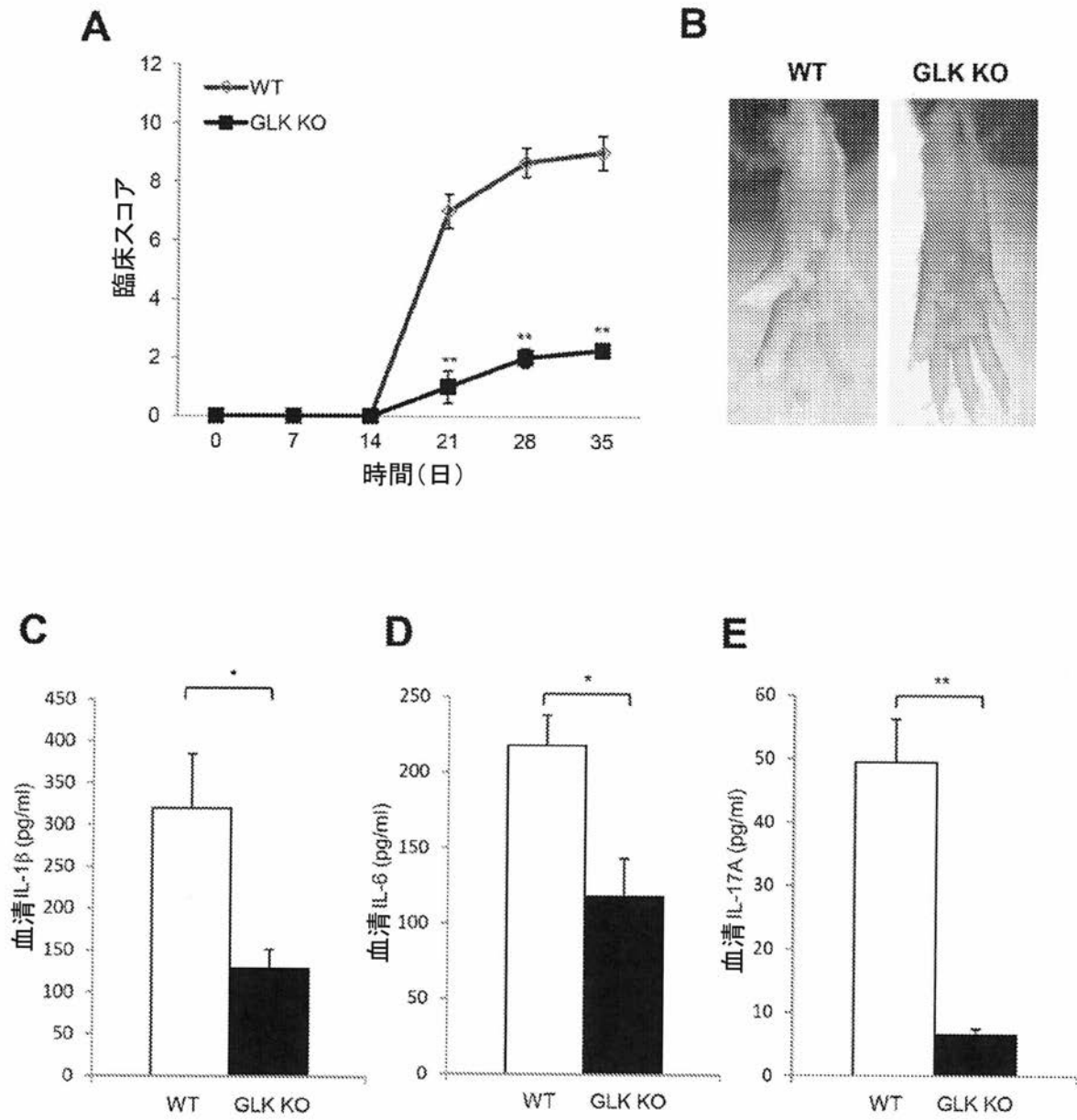
a

	SLE (n=49)	対照 (n=35)
研究登録時点での年齢(年)	38.6 ± 15.7	33.6 ± 8.1
性別(女性(%))	39 (79.6)	25 (71.4)
疾患継続時間(年)	6.4 ± 7.1	NA
SLEDAI	9.6 ± 7.6	NA
腎炎(%)	30 (61.2)	NA
発熱(%)	6 (12.2)	NA
関節炎(%)	14 (28.6)	NA
頬部紅斑(%)	16 (32.7)	NA
漿膜炎(%)	8 (16.3)	NA
神経障害(%)	10 (20.4)	NA
WBC (/mm <sup>3</sup> )	6681 ± 2873	NA
HgB (g/dl)	12.0 ± 2.2	NA
血小板(1000/mm <sup>3</sup> )	238 ± 107	NA
クレアチニン(mg/dl)	1.2 ± 1.0	NA
抗ds-DNA抗体 (WHO単位/ml)	225.7 ± 183.8	NA
C3 (mg/dl)	75.0 ± 31.8	NA
C4 (mg/dl)	16.6 ± 11.5	NA

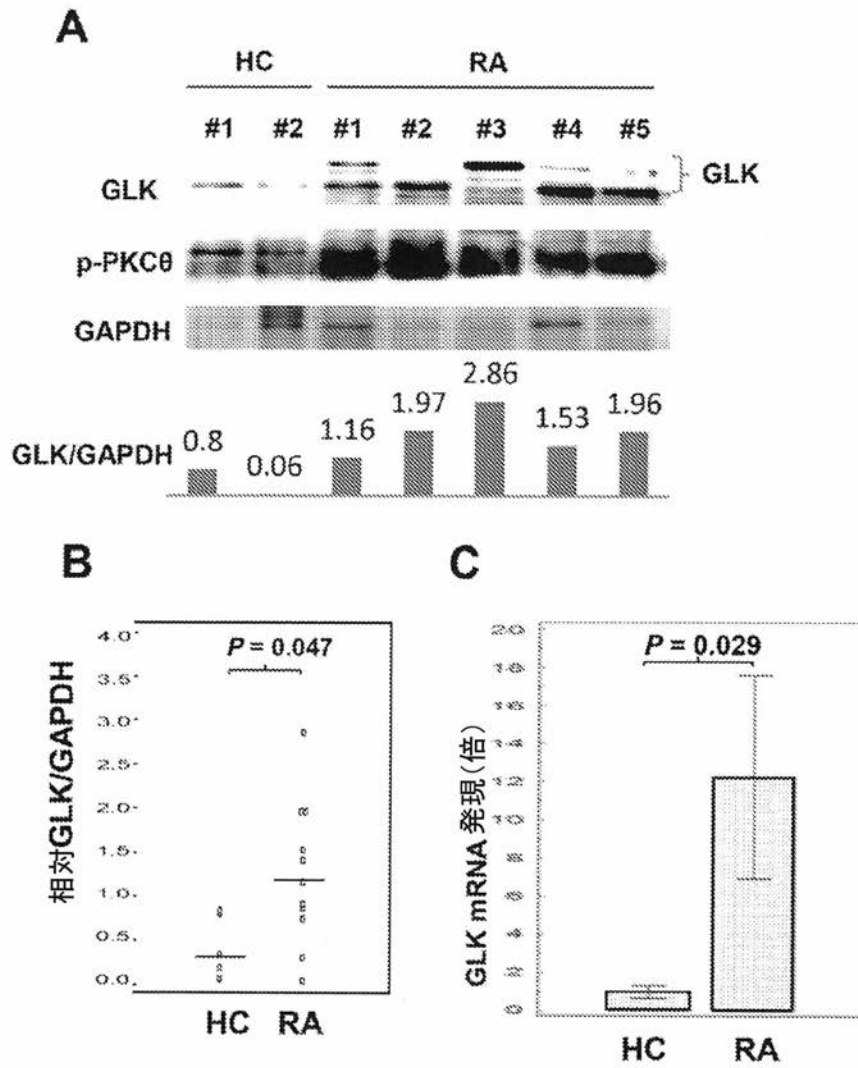
b



【 図 1 4 】

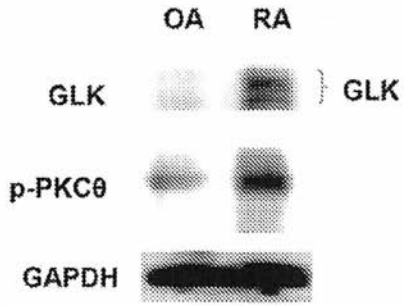


【 図 1 5 】

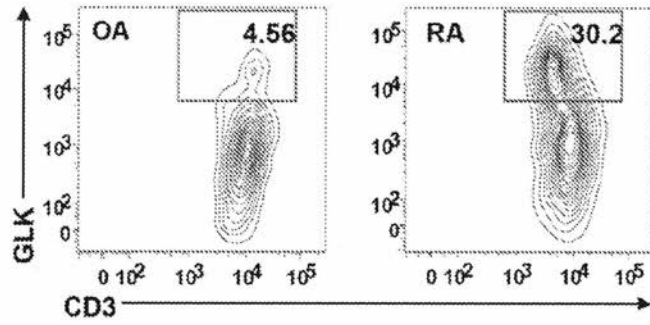


【 図 1 6 】

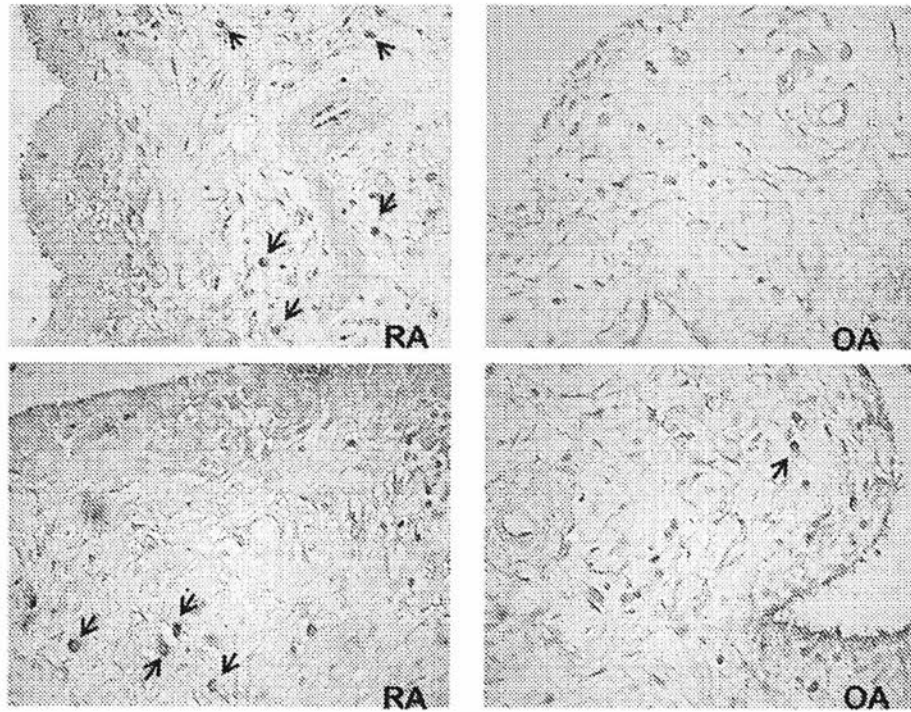
**A**



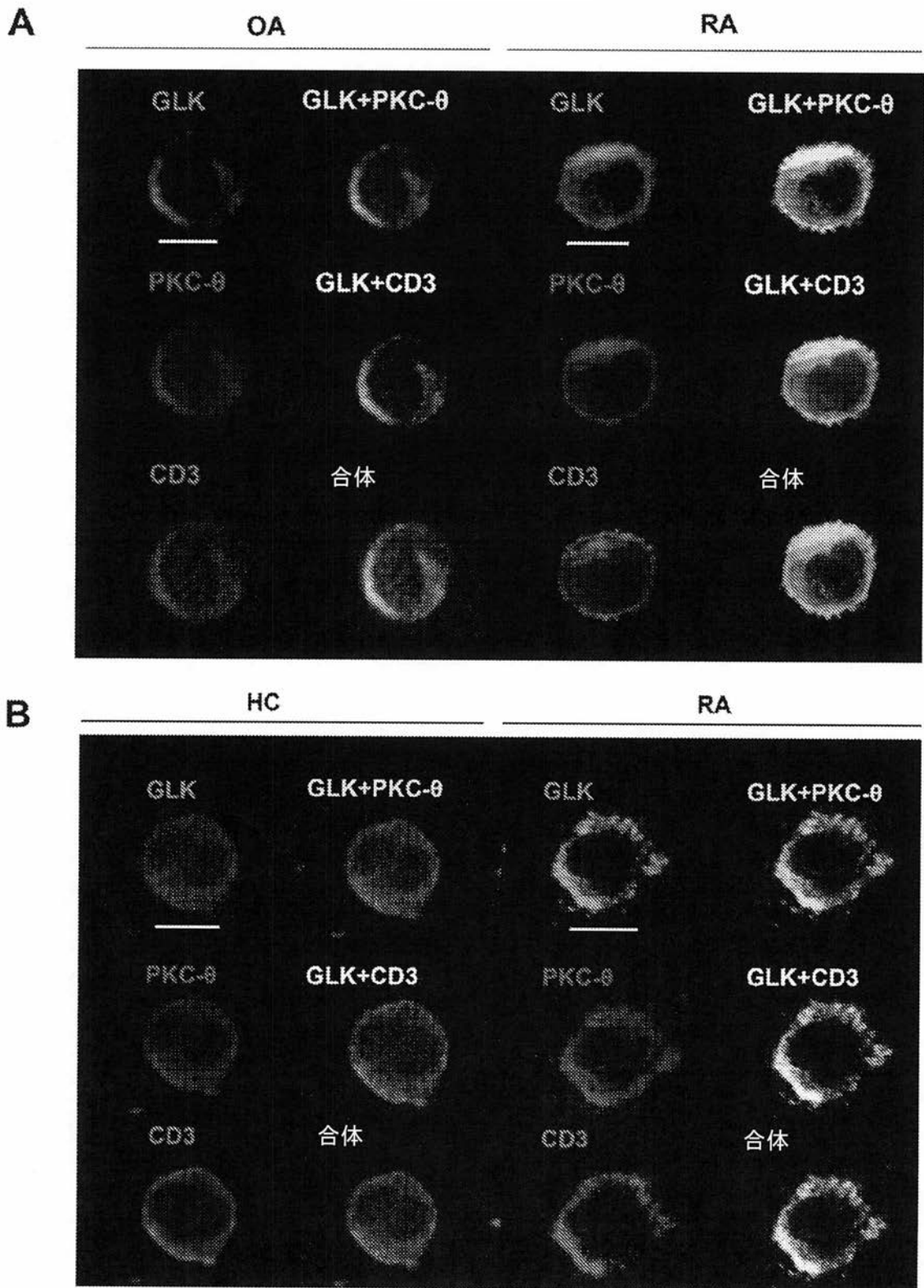
**B**



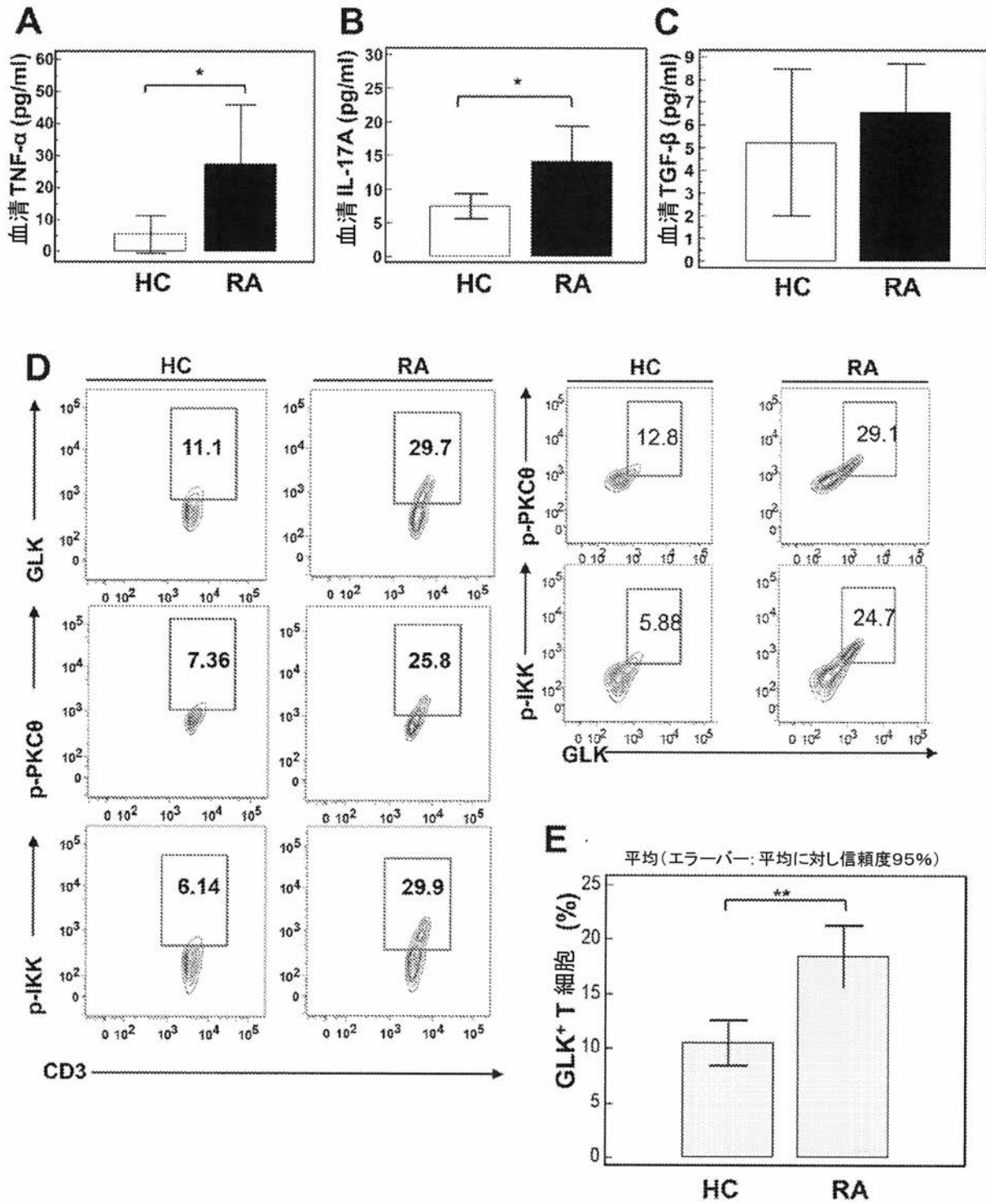
**C**



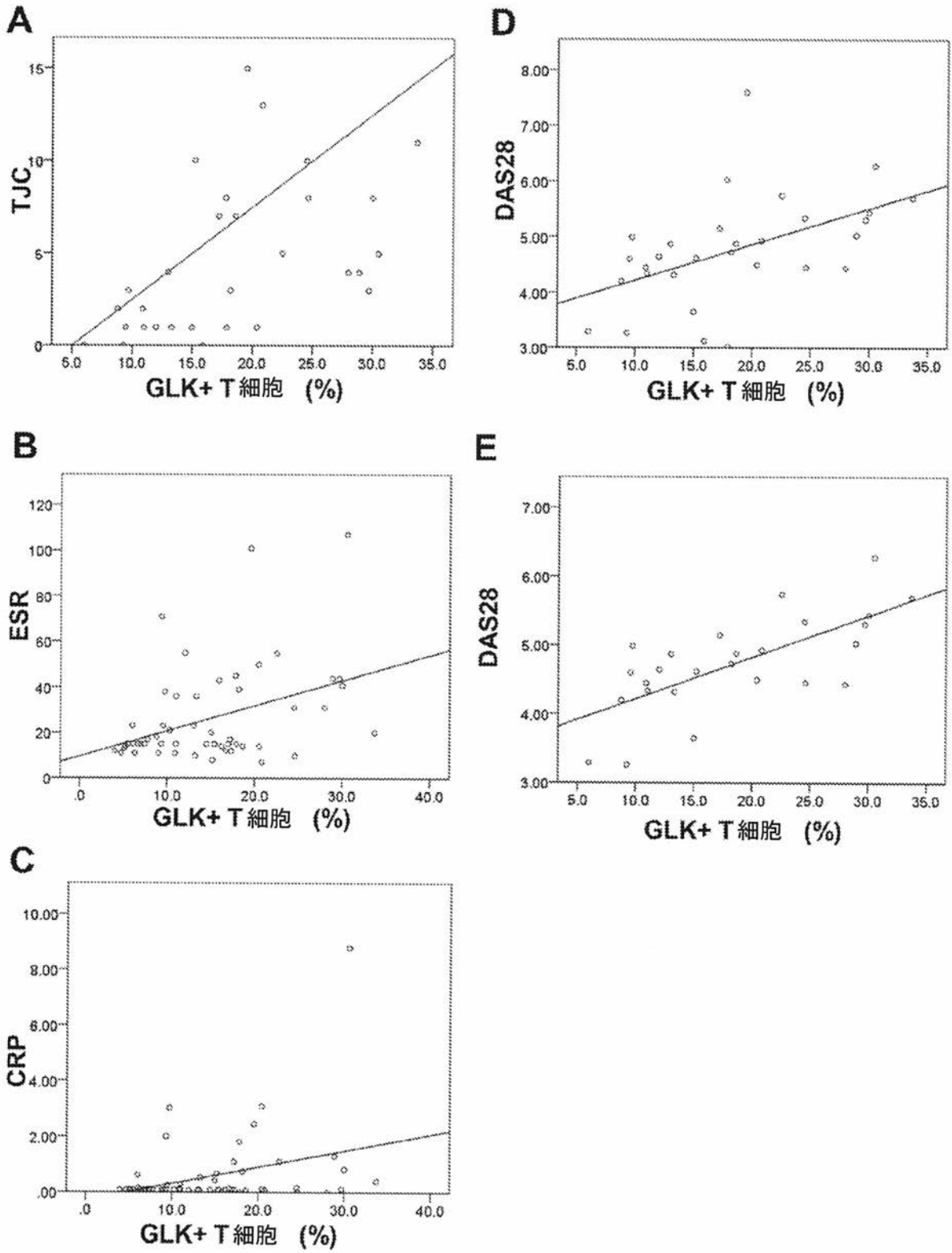
【図 17】



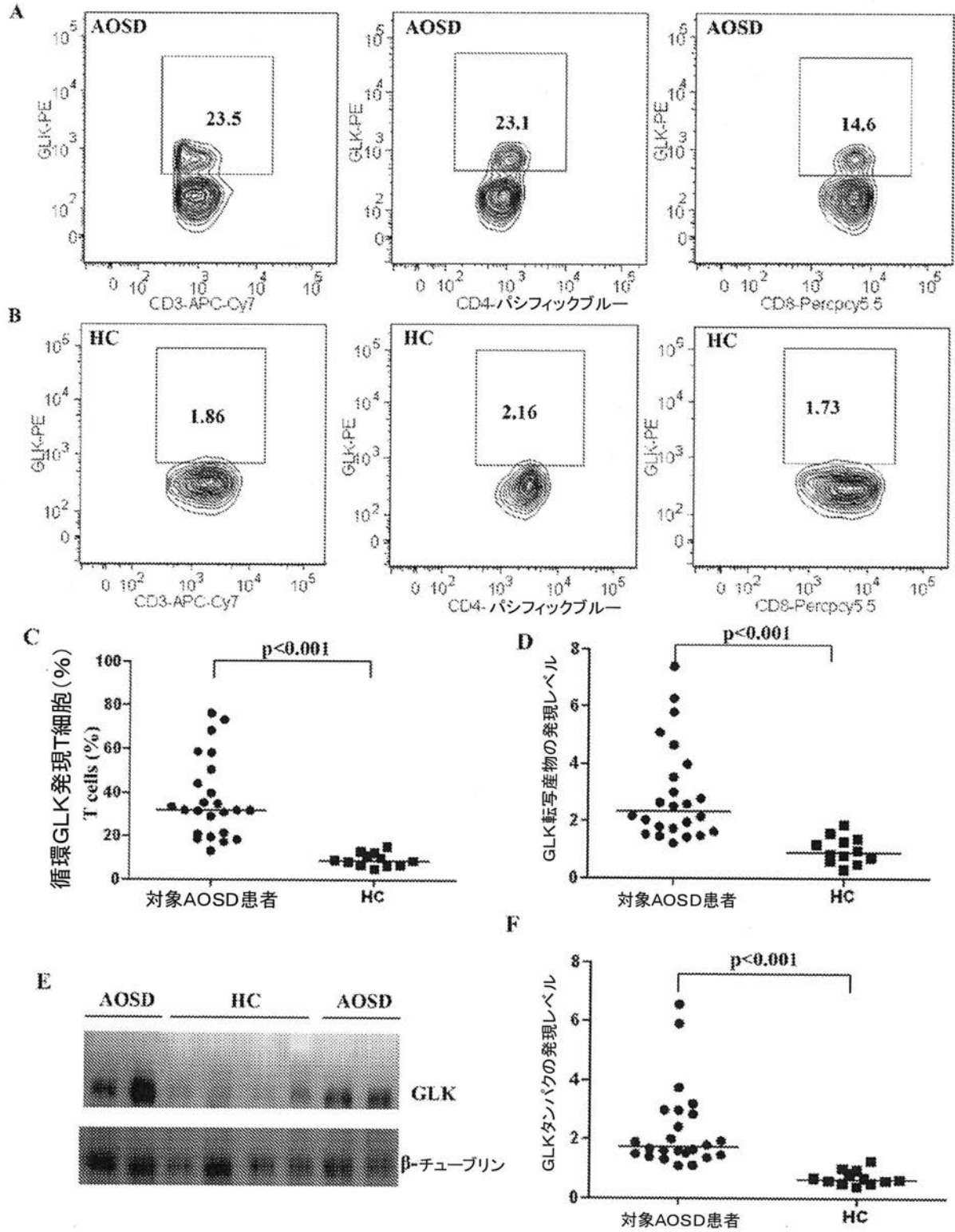
【 図 1 8 】



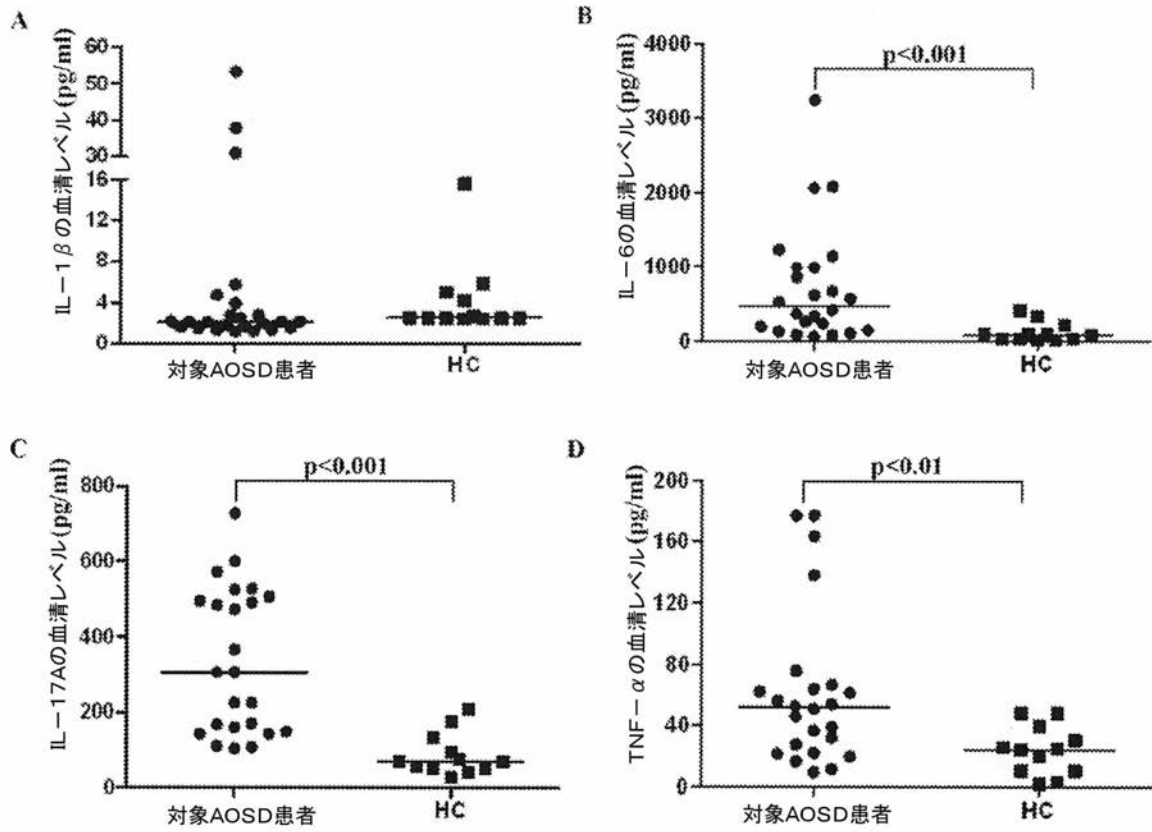
【 図 19 】



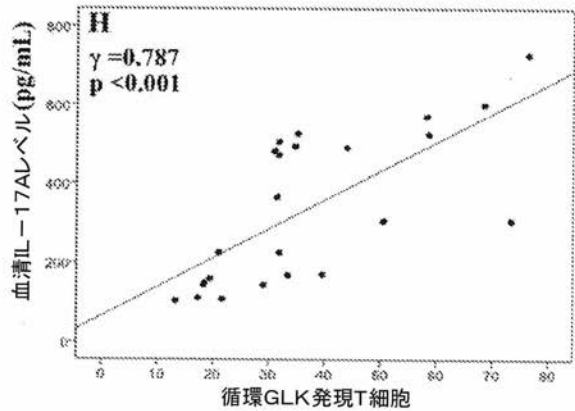
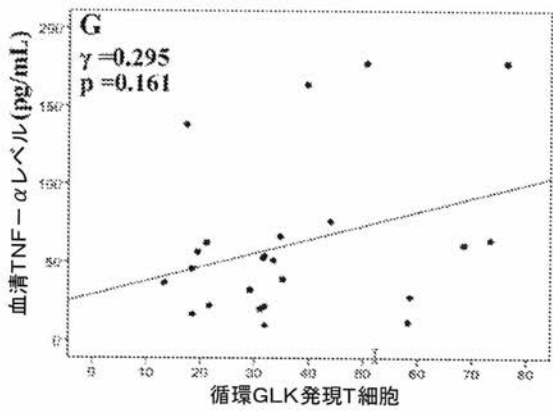
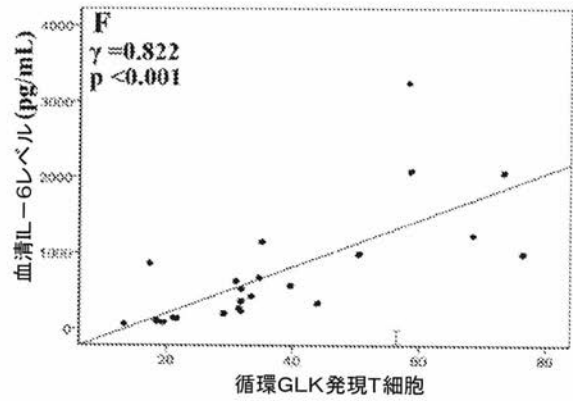
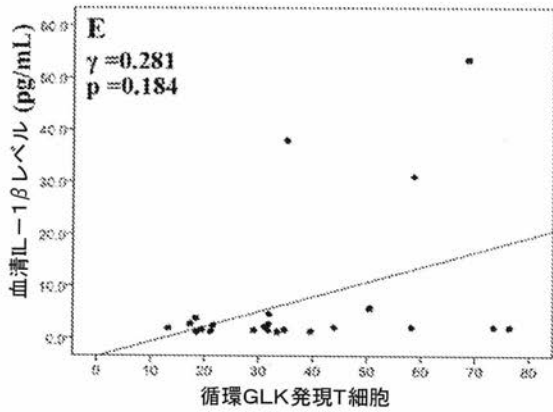
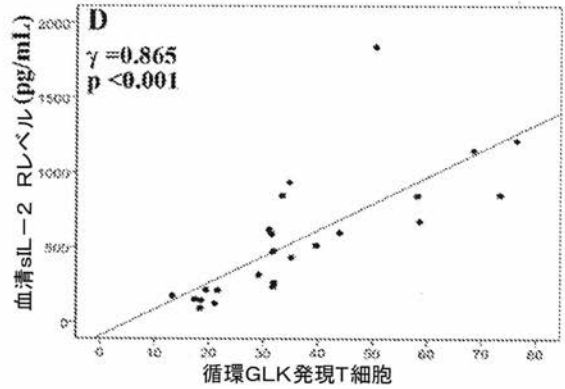
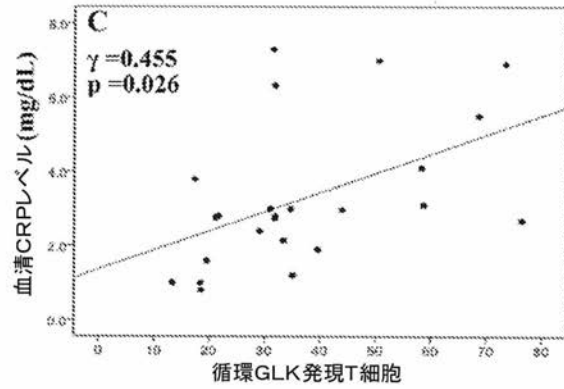
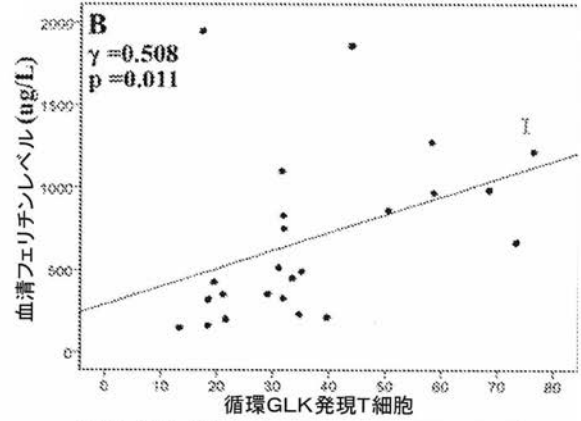
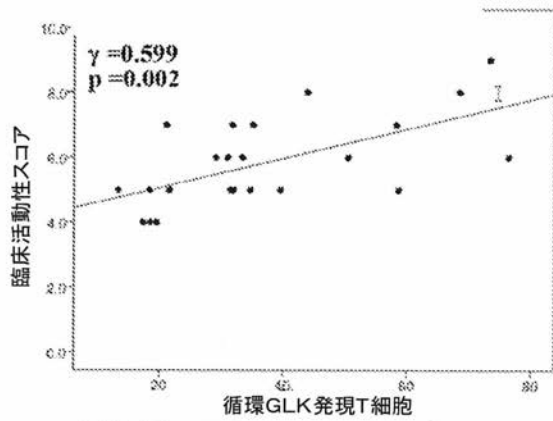
【 図 2 0 】



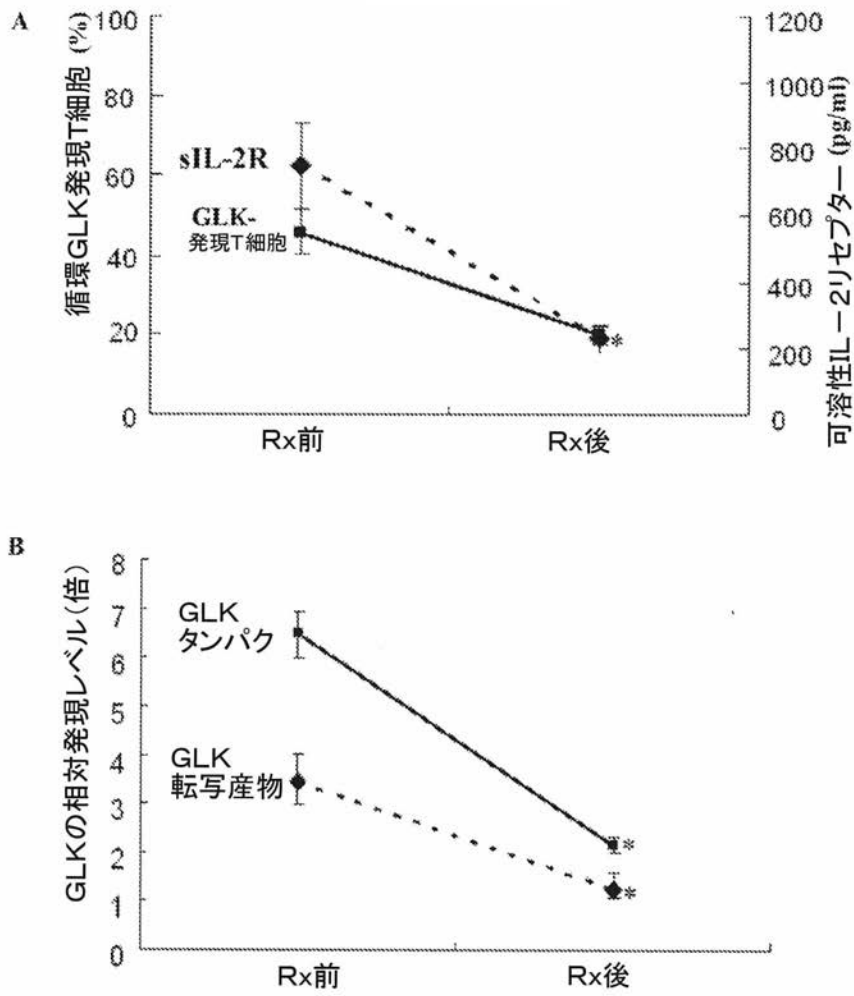
【 図 2 1 】



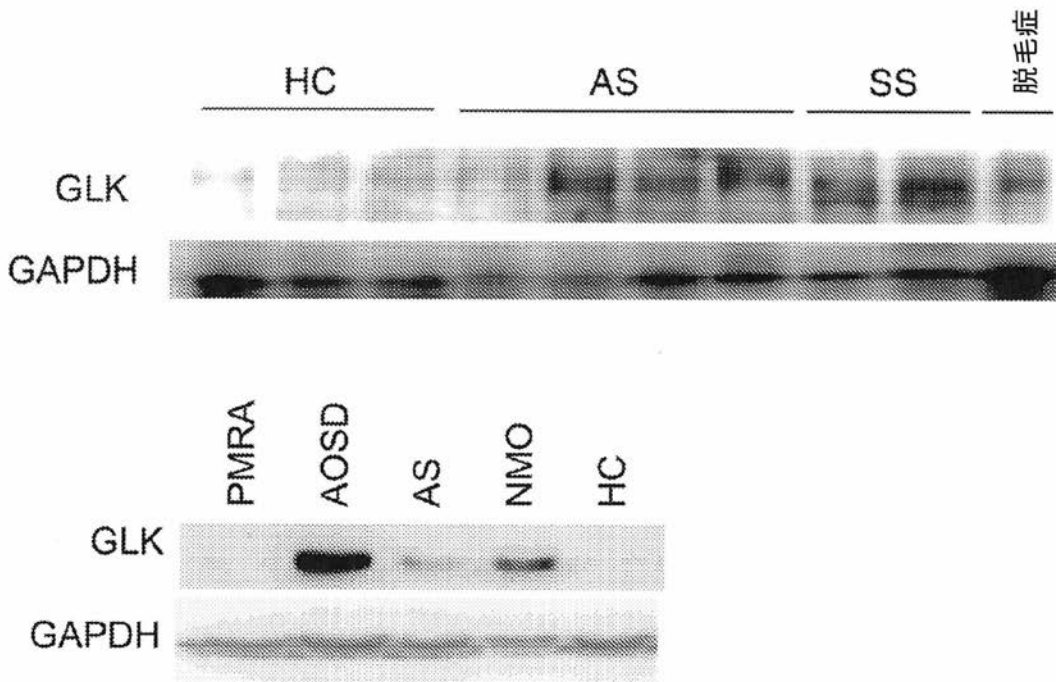
【 図 2 2 】



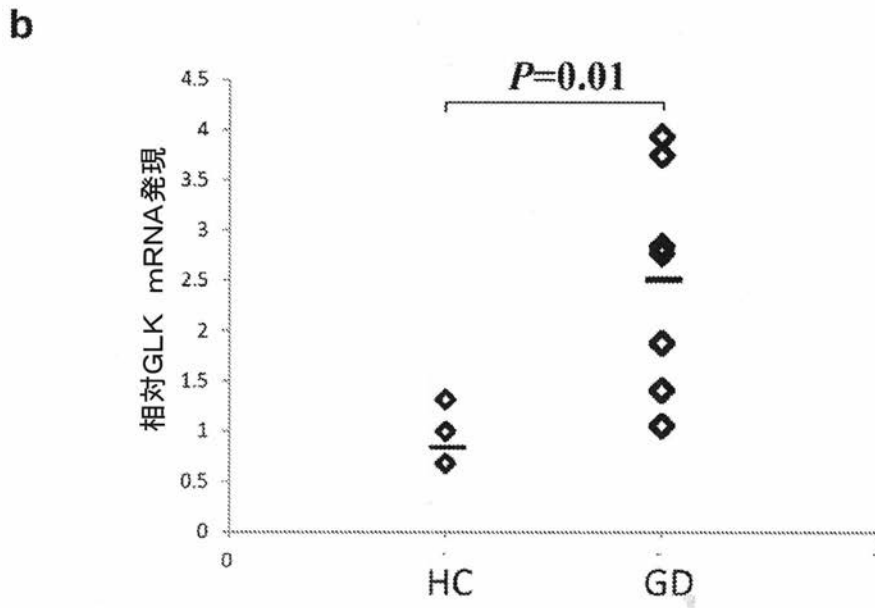
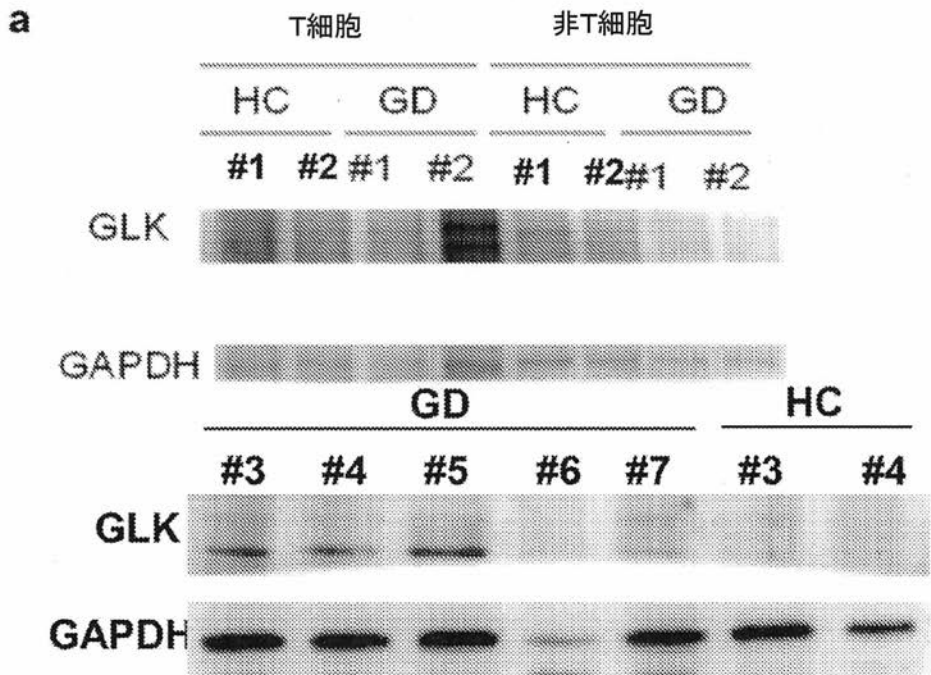
【 図 2 3 】



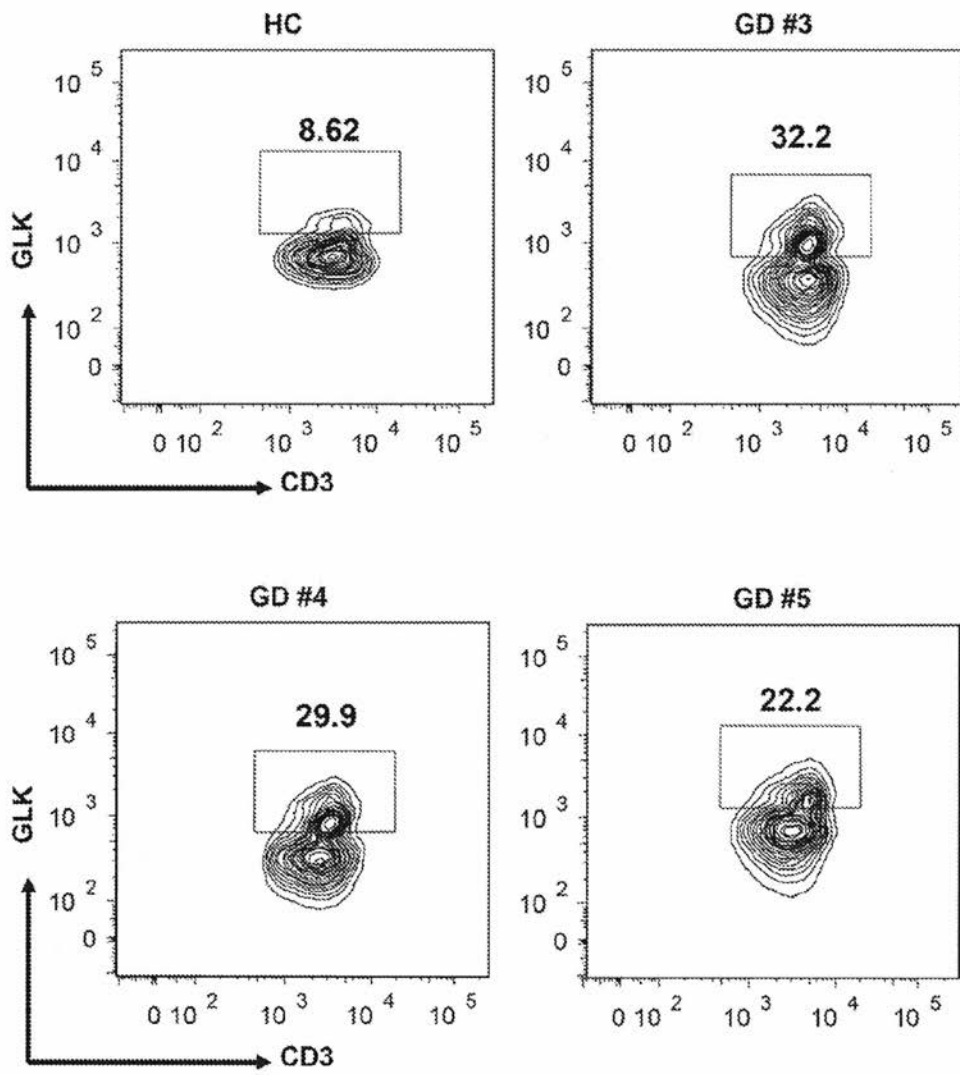
【 図 2 4 】



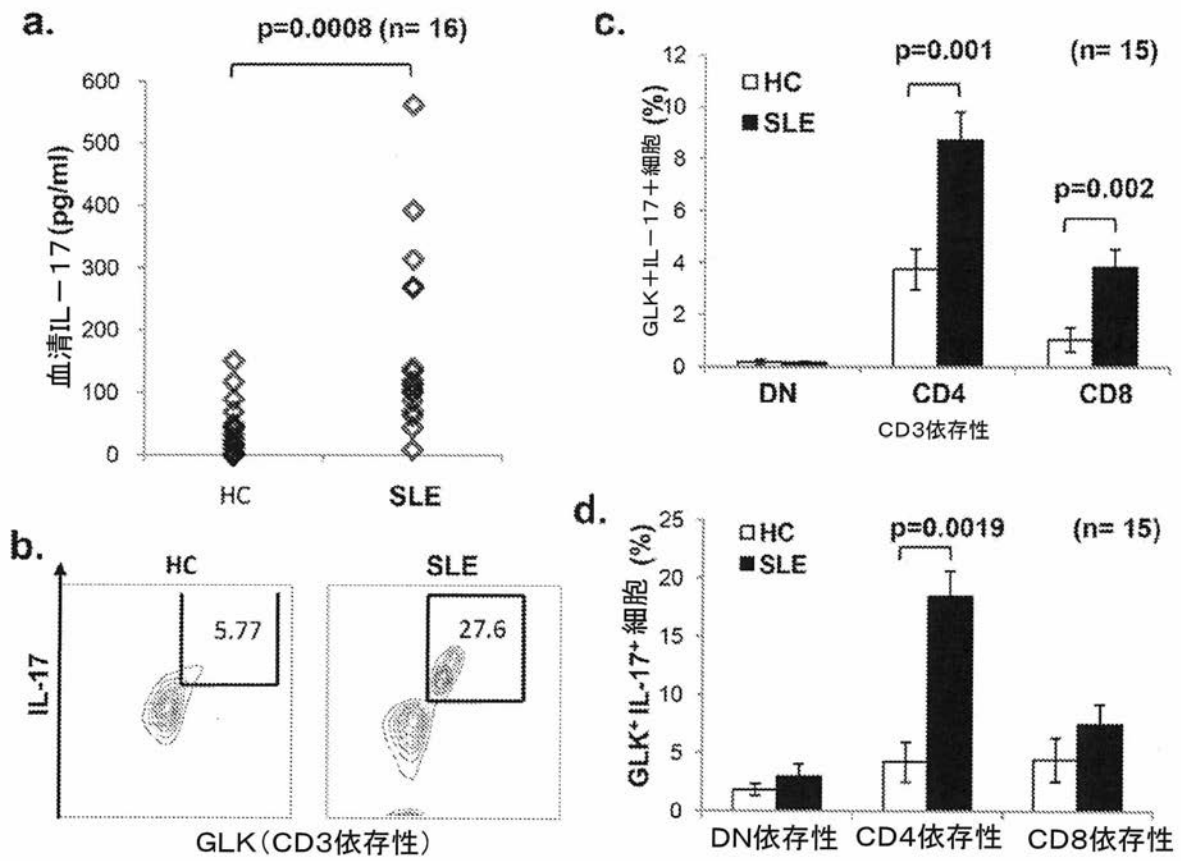
【 図 2 5 】



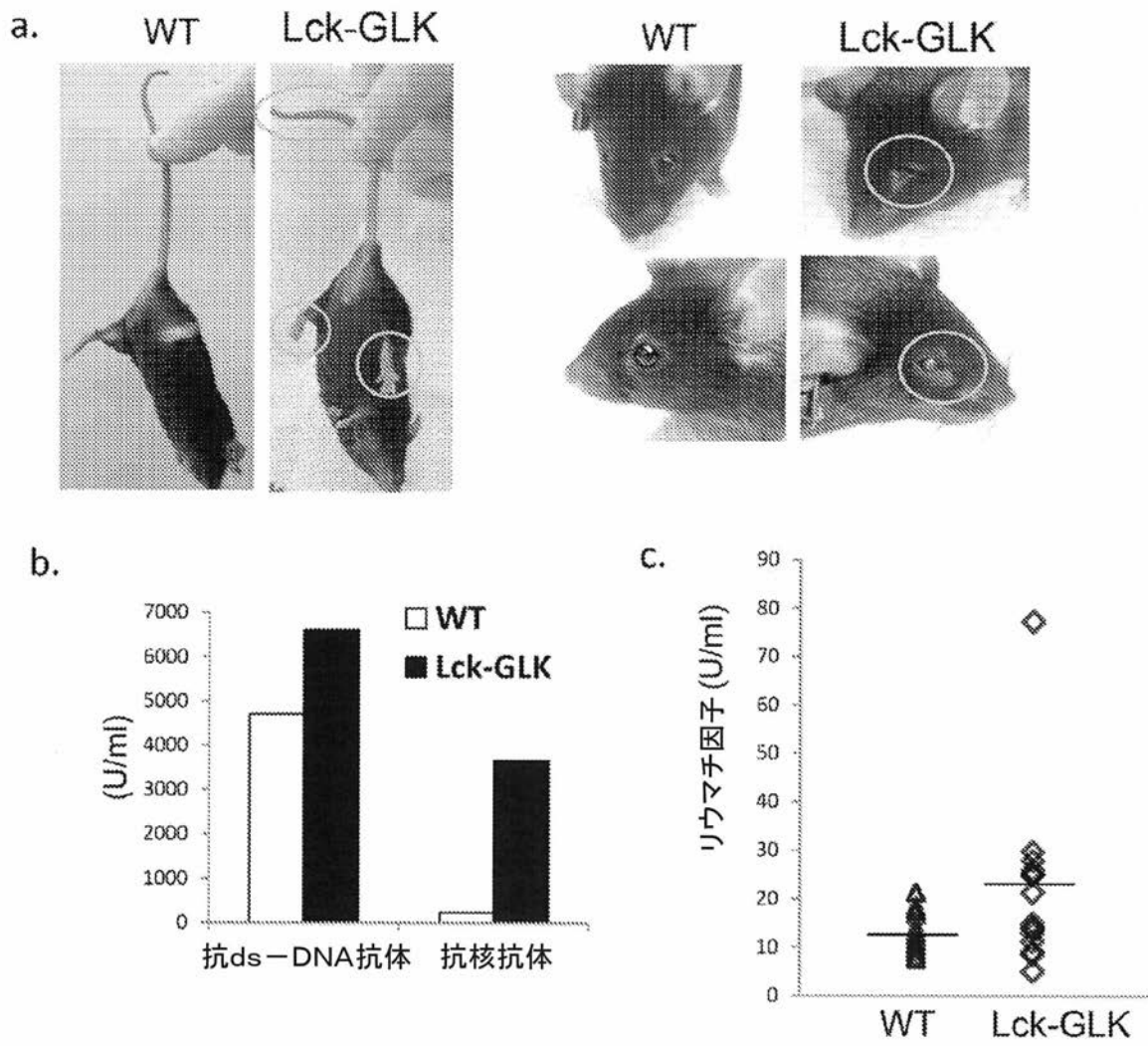
【 図 2 6 】



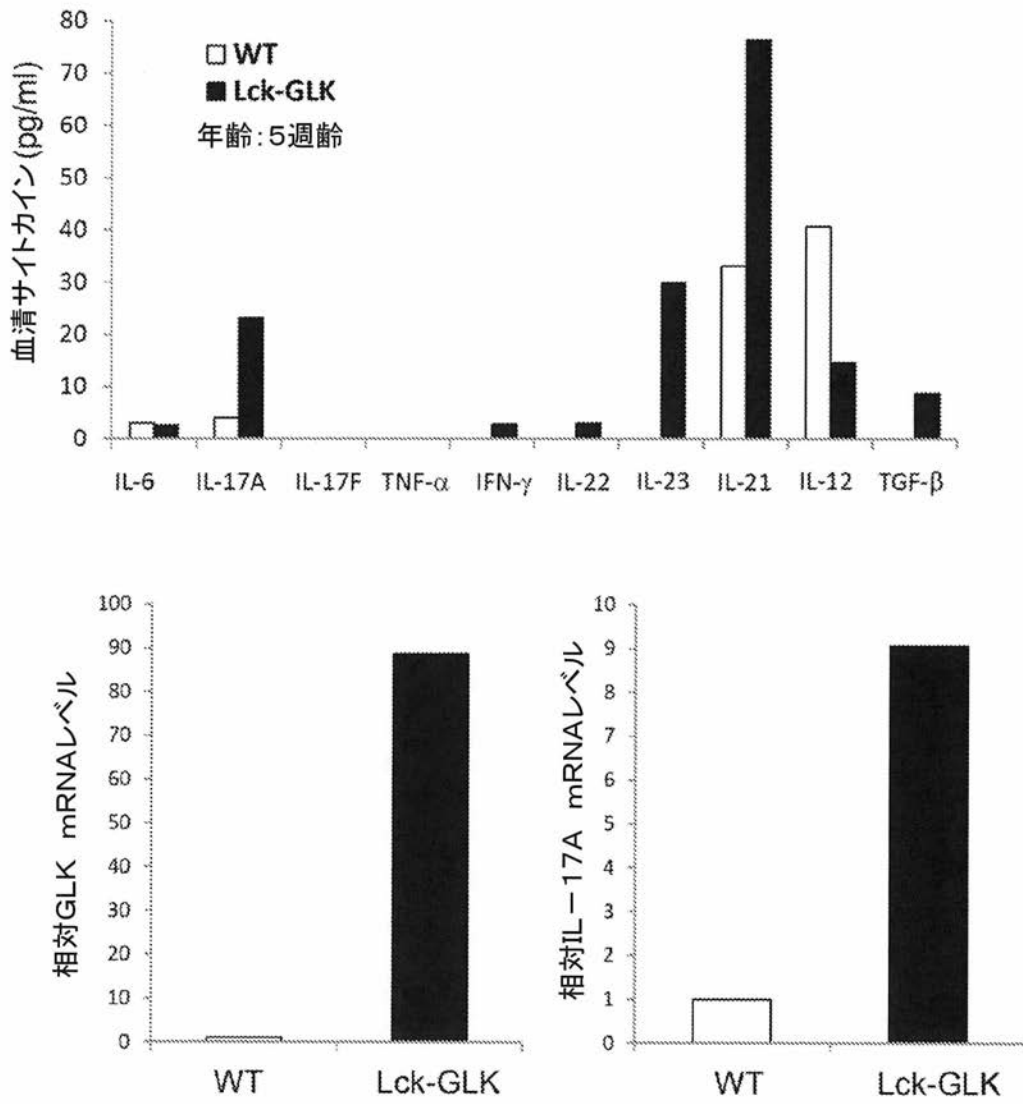
【 図 2 7 】



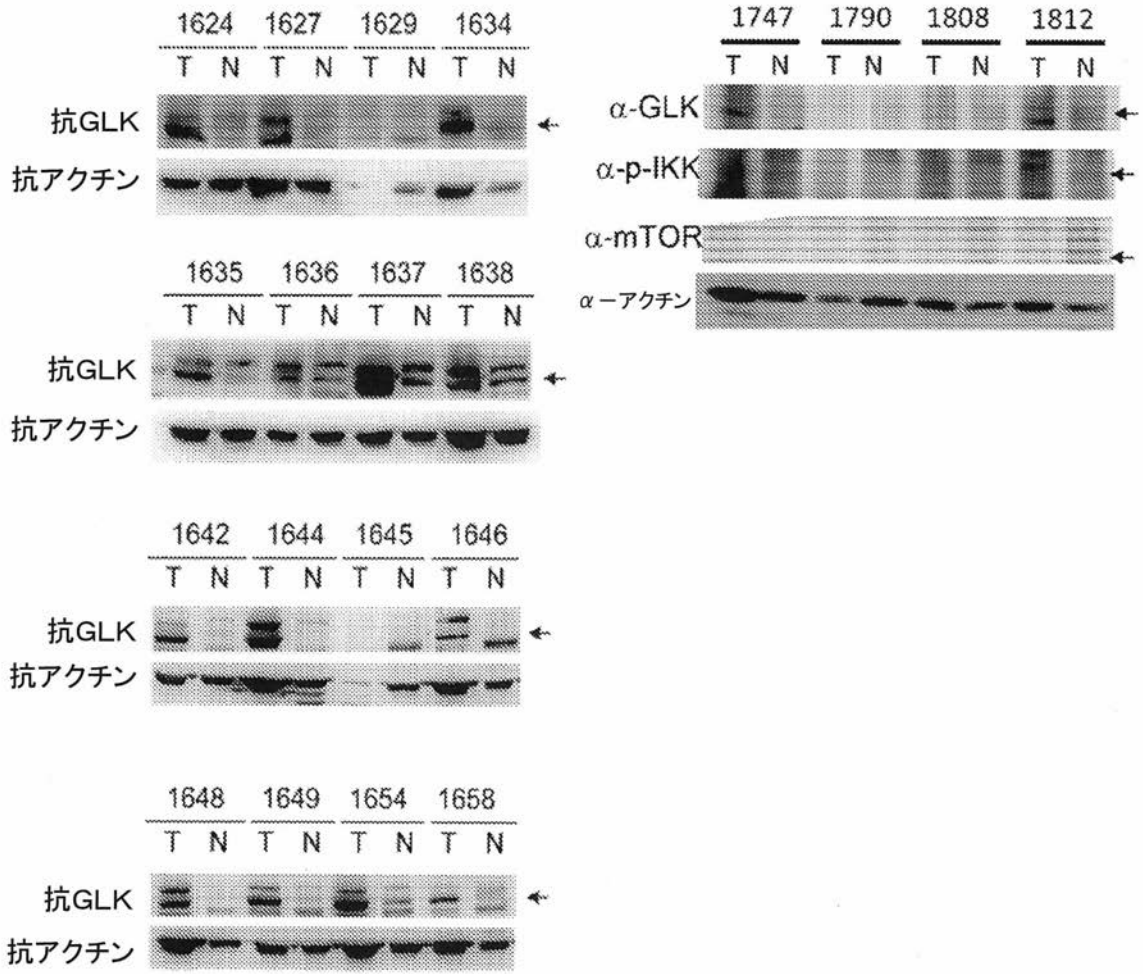
【 図 2 8 】



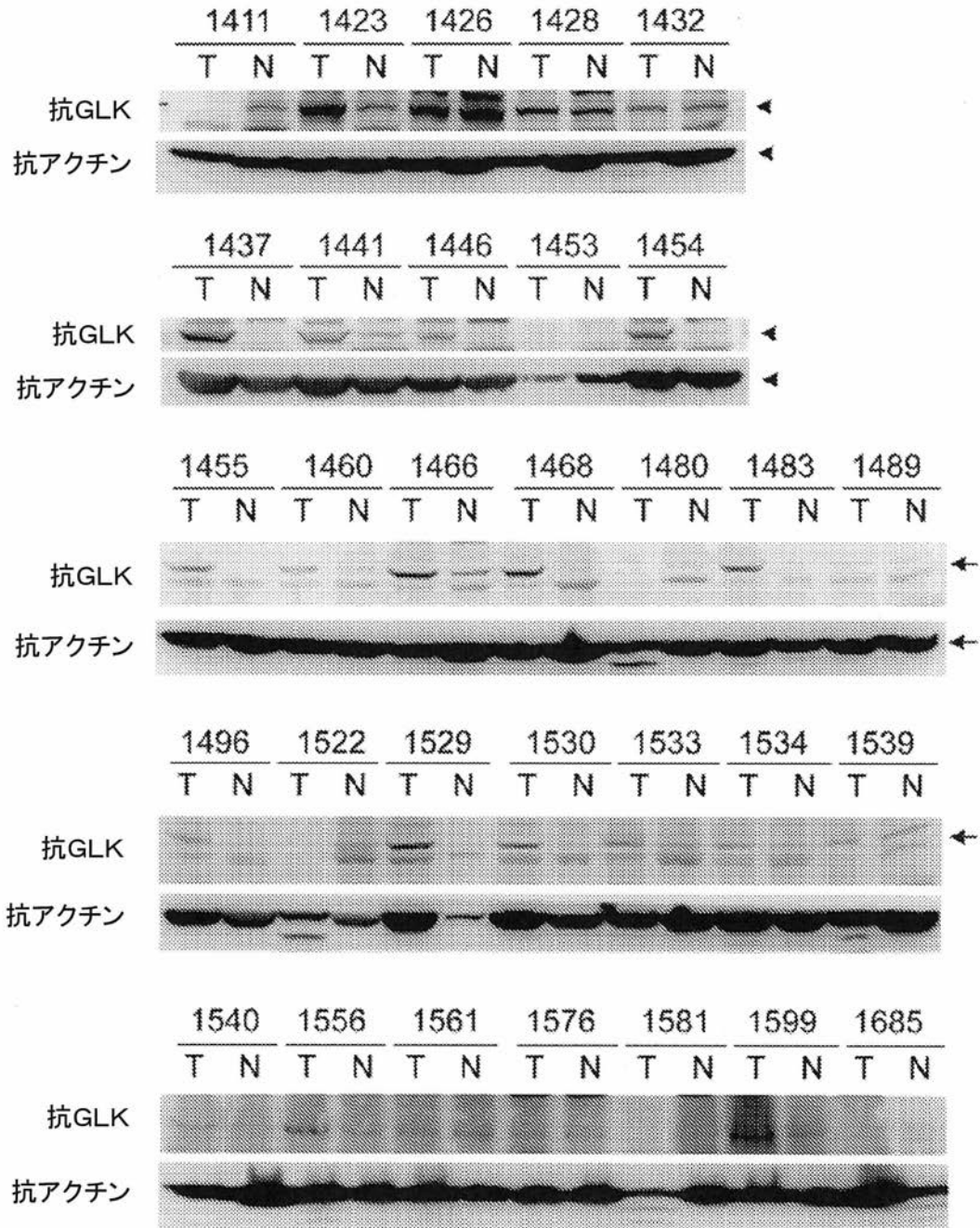
【 図 2 9 】



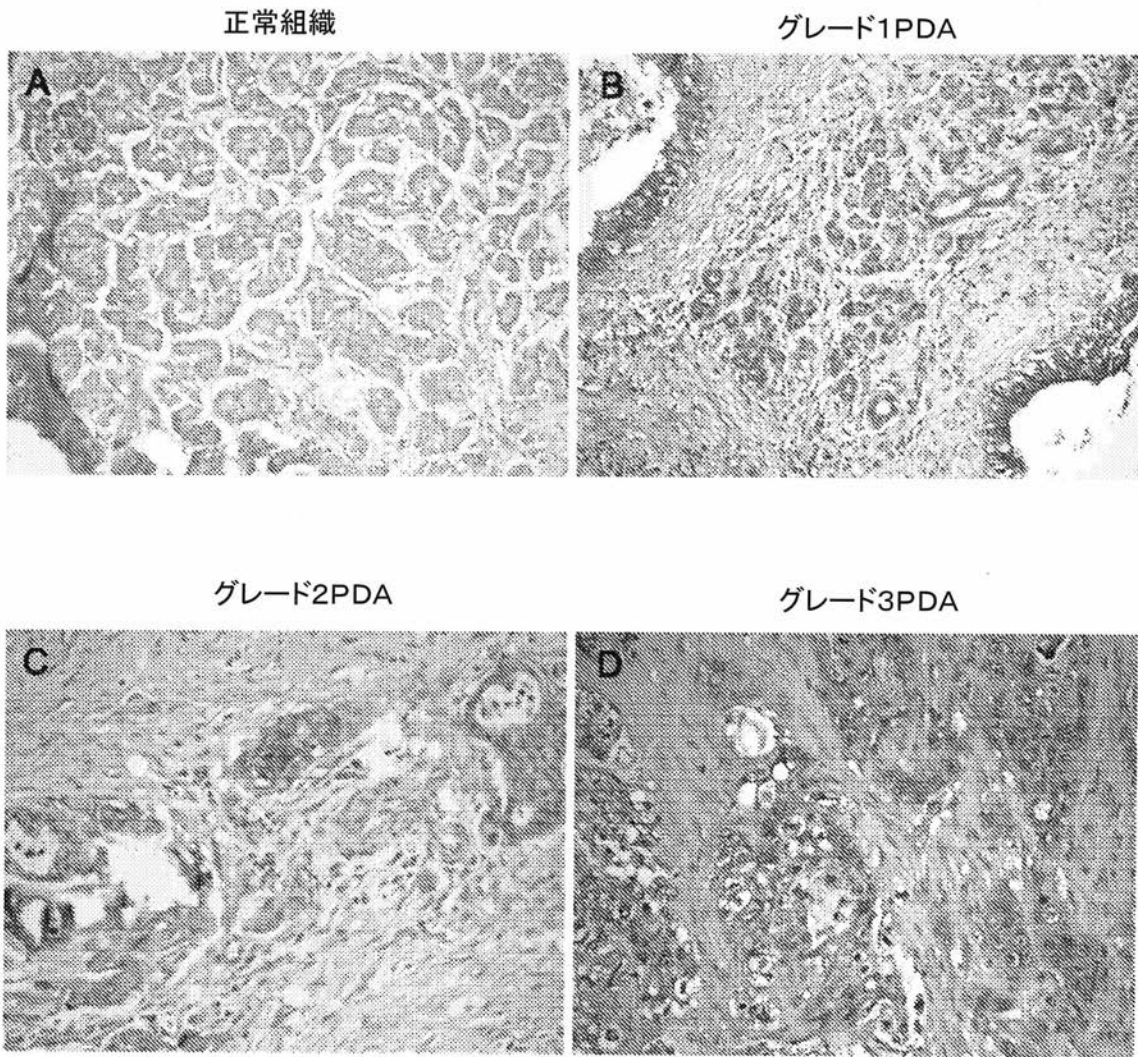
【 図 3 0 】



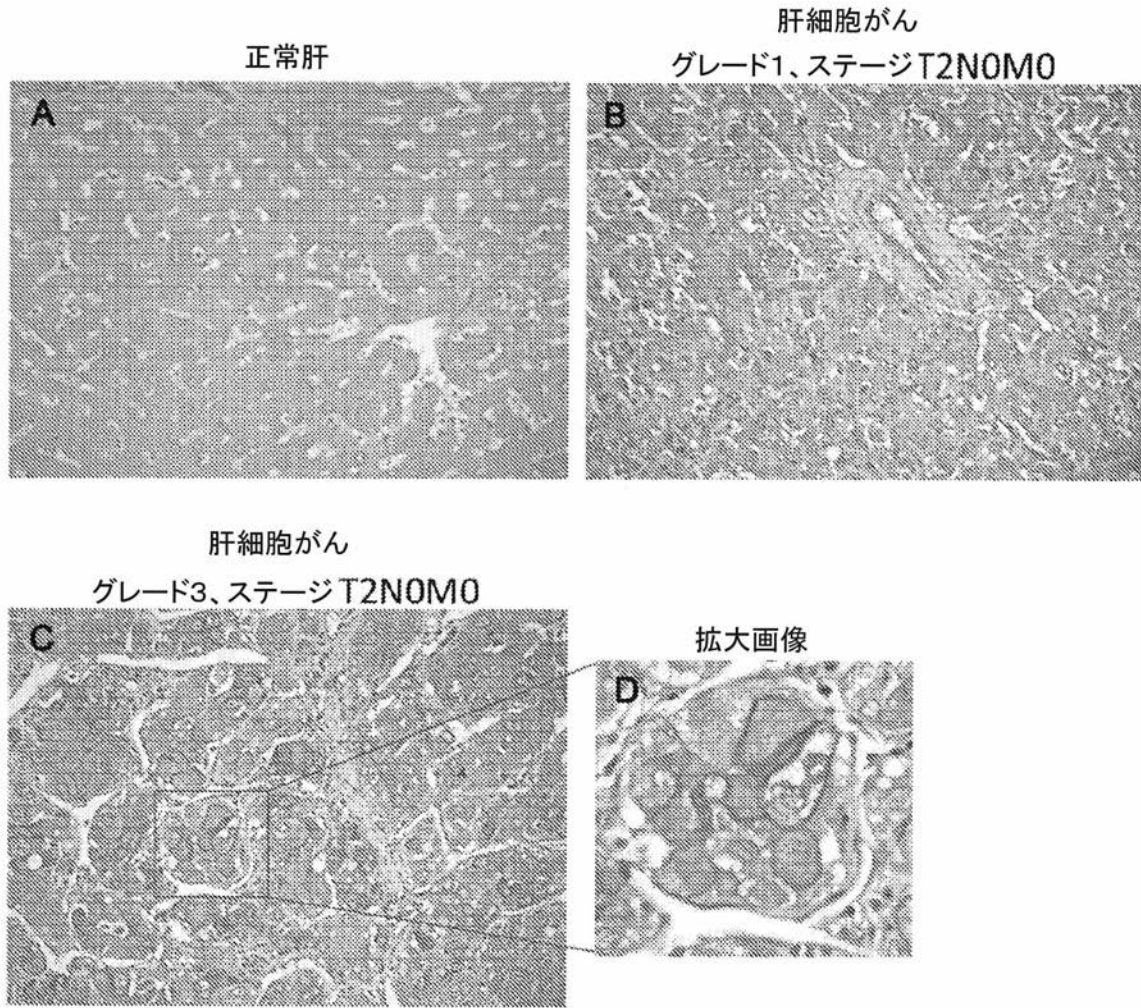
【 図 3 1 】



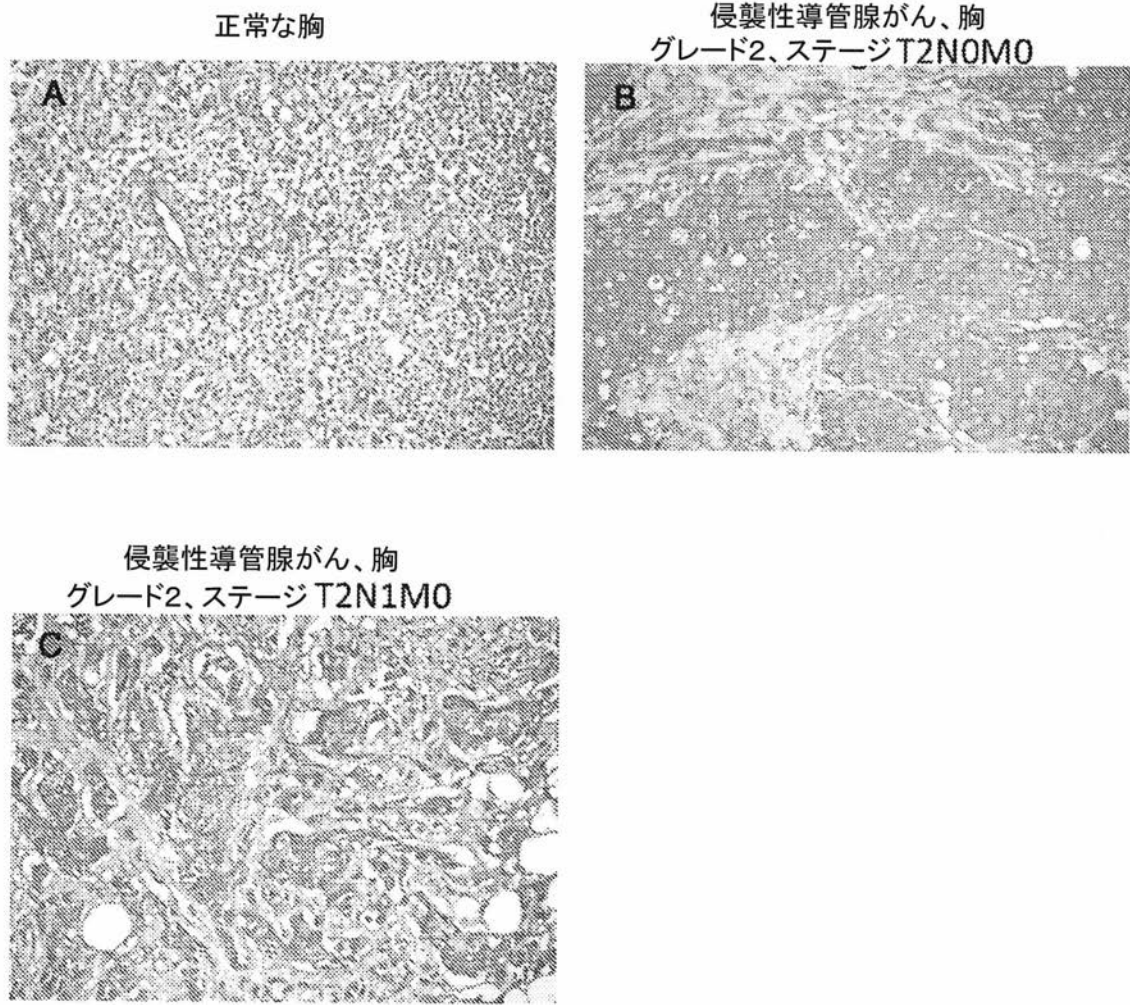
【 図 3 2 】



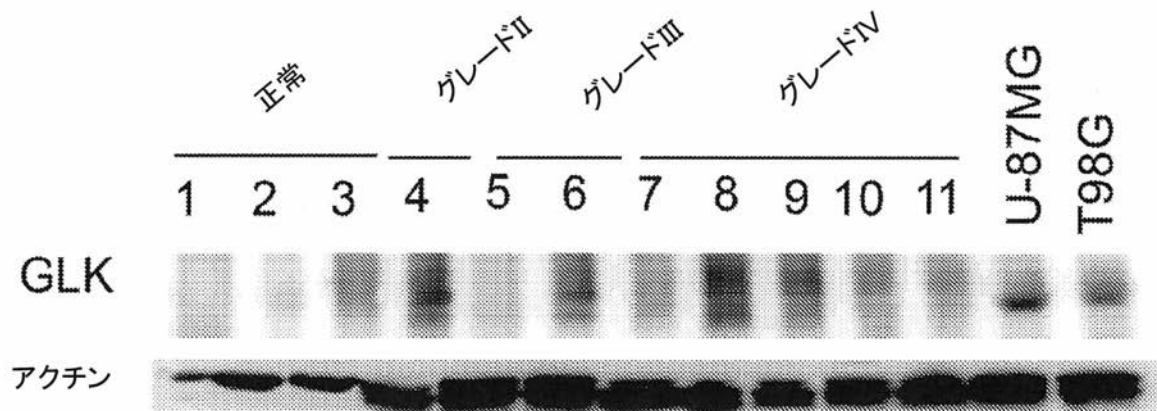
【図 3 3】



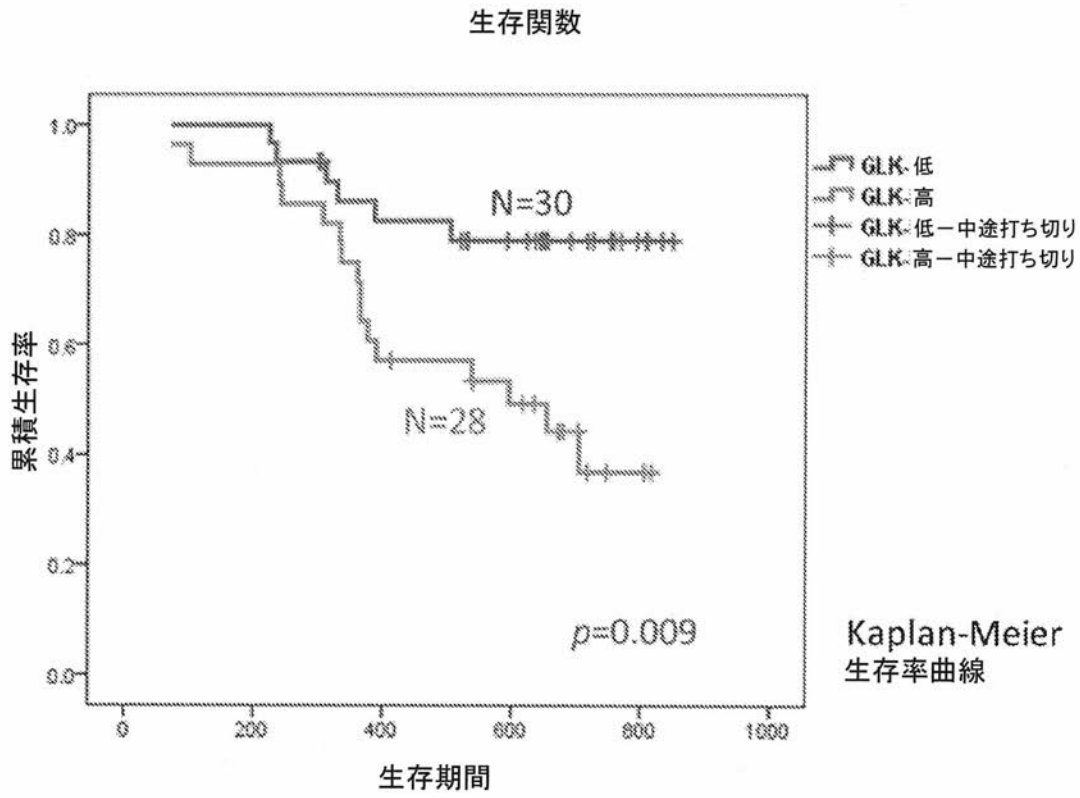
【図34】



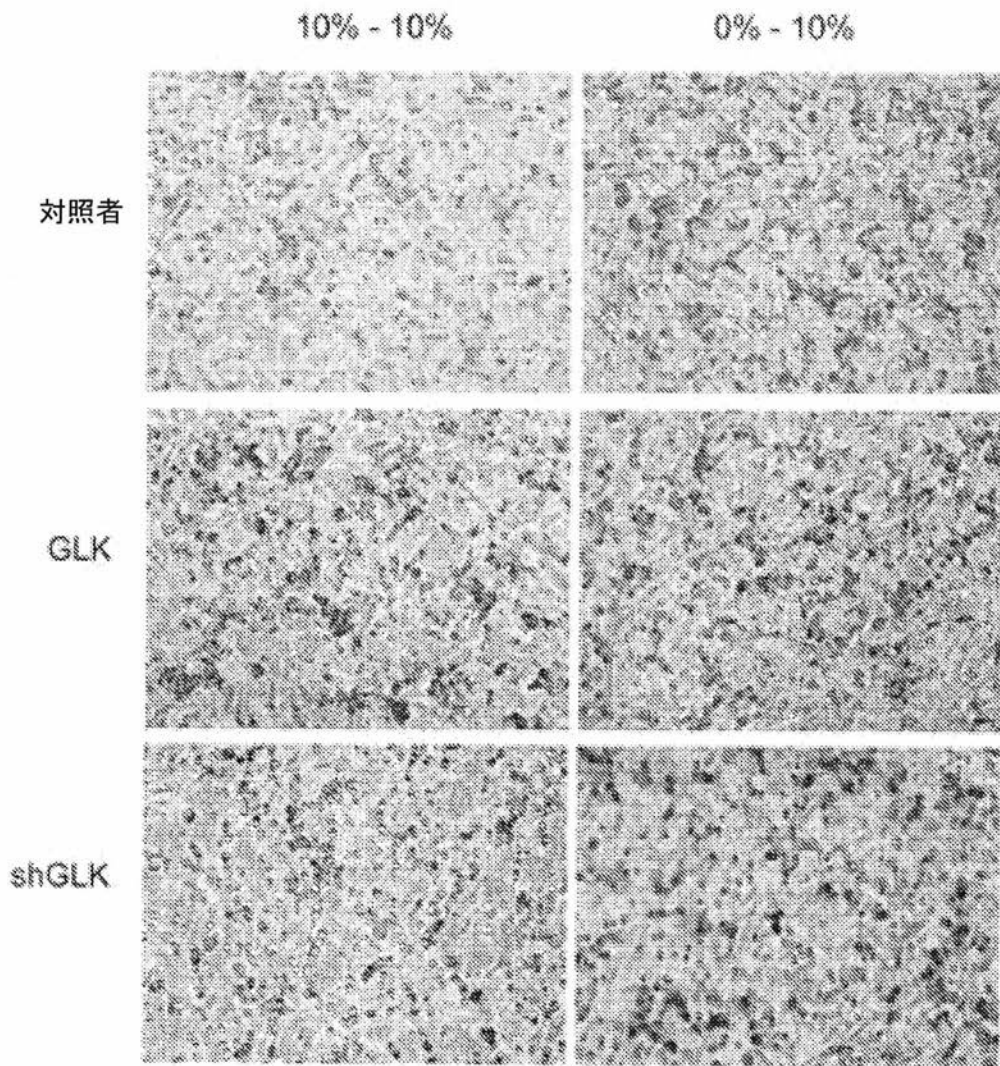
【図35】



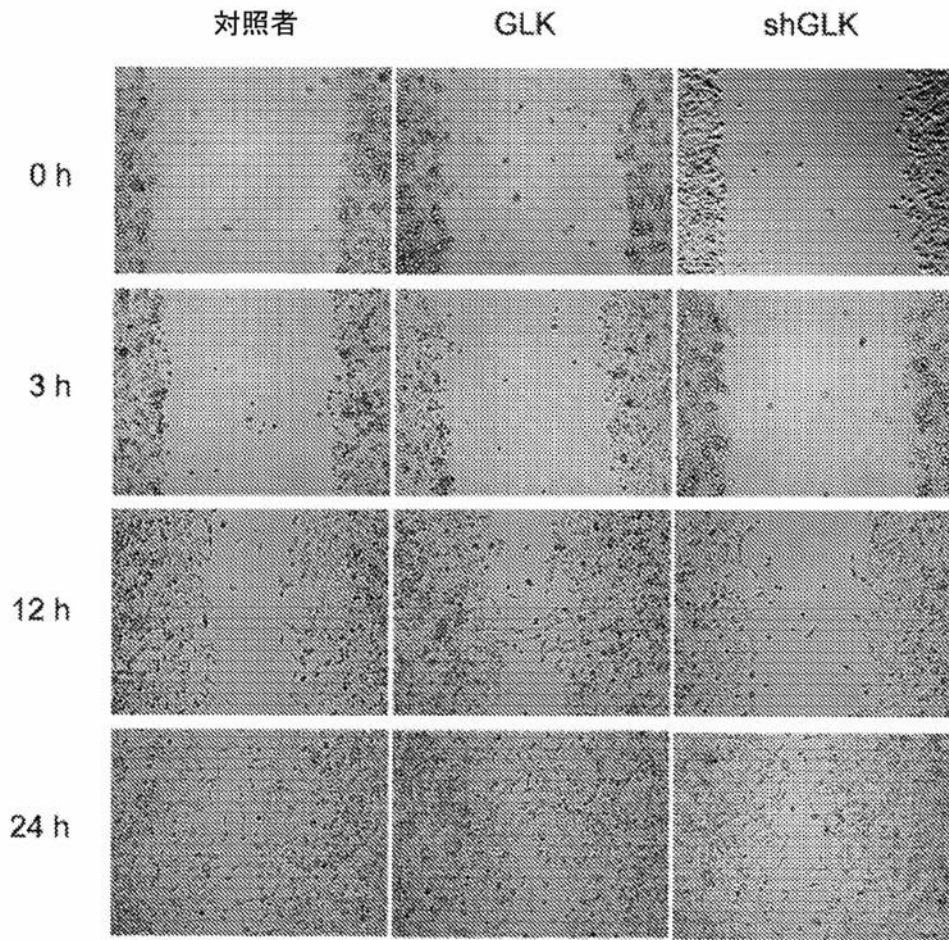
【 図 3 6 】



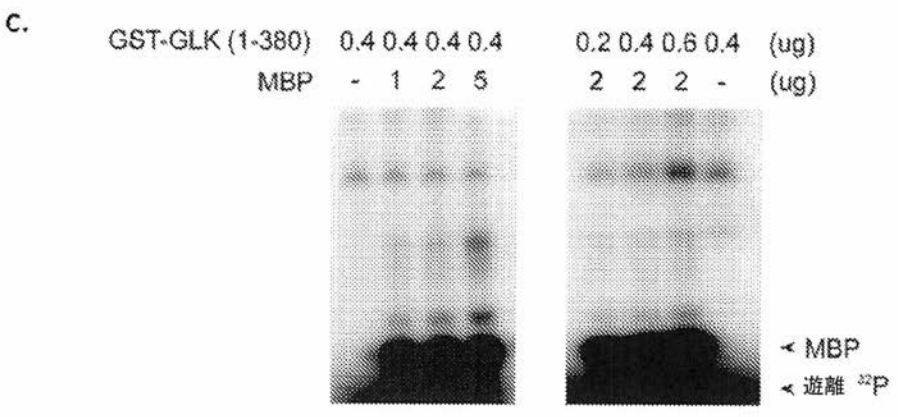
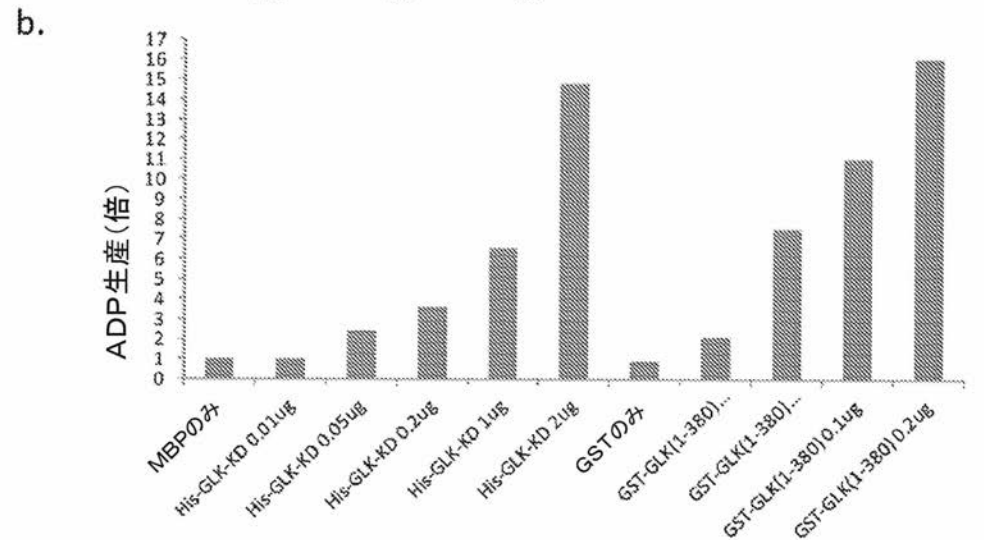
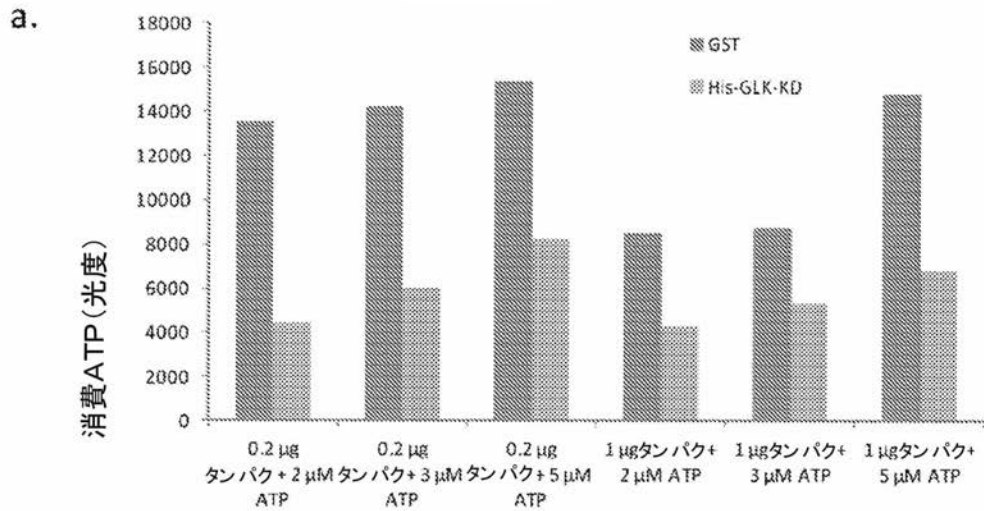
【 図 3 7 】



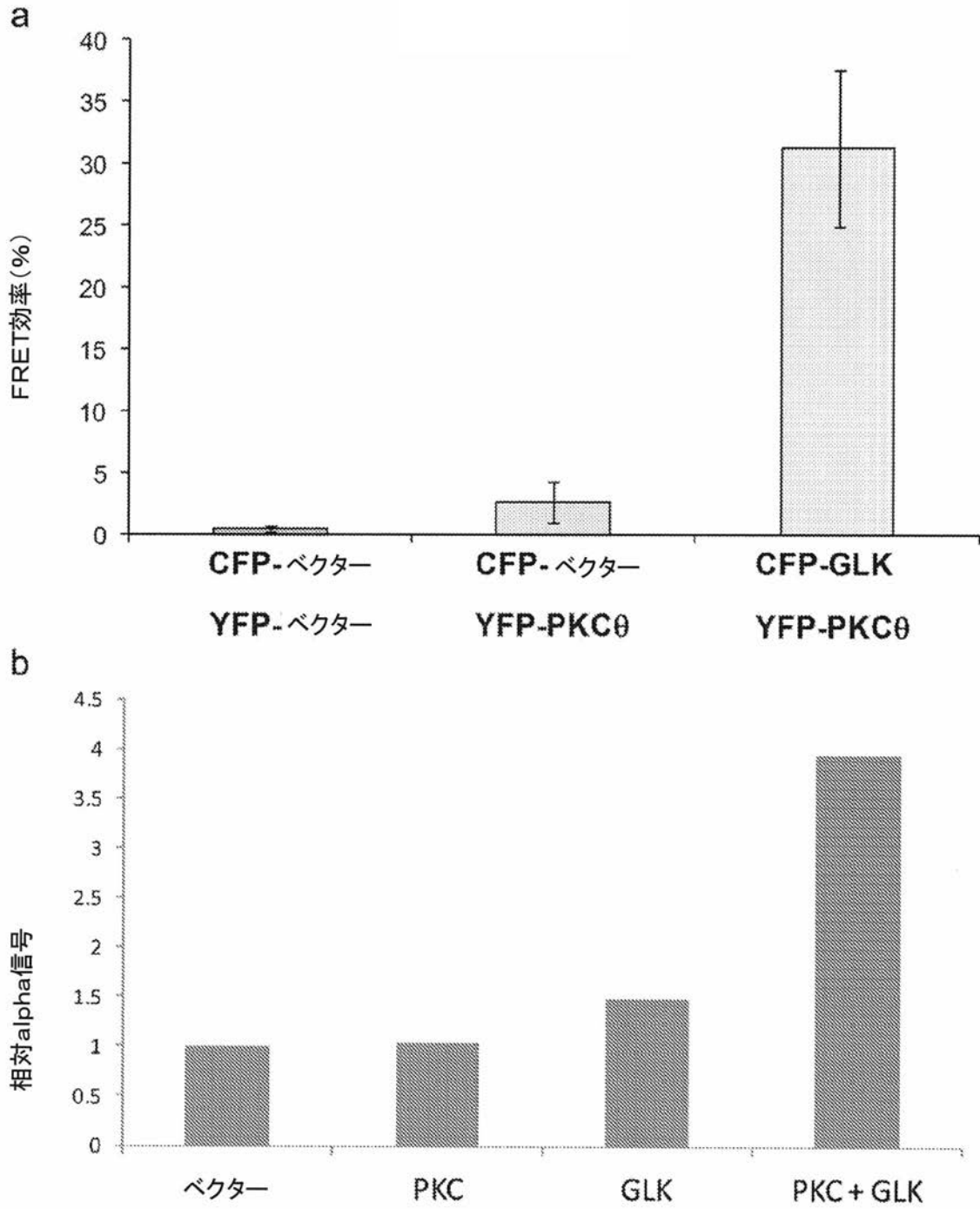
【 図 3 8 】



【 図 3 9 】



【 図 4 0 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/46623
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/02, C12Q 1/68 (2012.01) USPC - 435/29, 435/6.13, 435/6.14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/29, 435/6.13, 435/6.14		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6.1, 6.13, 6.14, 7.1, 29, 4 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (USPT, EPAB, JPAB, PGPB); Google Scholar Search terms: mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3 (MAP4K3, Germinal Center Kinase-Like Kinase (GLK), MEK3), cancer, inflammation, autoimmune disease, protein kinase C theta (PKC theta), mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	US 2009/0317392 A1 (NAKAMURA et al.) 24 December 2009 (24.12.2009). Especially para [0008], [0015], [0036], [0052], pg 56 table 3.	1, 2, 4, 5, 8, 11, 13-18 3, 7, 9, 19, 20 6, 10, 12
Y	US 2009/0099029 A1 (SAMUELS) 16 April 2009 (16.04.2009). Especially para [0015], [0017], [0154], [0158], [0326], pg 38 Table 5.	3, 9, 19, 20
Y	US 2009/0196912 A1 (EICKHOFF et al.) 6 August 2009 (06.08.2009). Especially	7
A	COOK et al., Nutrient-responsive mTOR signalling grows on Sterile ground. Blochem J, 1 April 2007, Vol 403, No 1, Pages E1-E3. Especially abstract.	6, 12
X,P	CHUANG et al., The kinase GLK controls autoimmunity and NF-kappaB signaling by activating the kinase PKC-theta in T cells. Nature Immunol, 9 October 2011, Vol 12, No 11, Pages 1113-1118. Especially pg 1113 col 1 para 1 and col 2 para 2, pg 1114 col 1 para 2.	1-20
A	PARK et al., The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells. Nature Immunol, February 2009, Vol 10 No 2, Pages 158-166. Especially pg 162 col 2 para 2.	10
X,P	DUSTIN, PKC-theta: Hitting the bull's eye. Nature Immunology, 19 October 2011, Vol 12, No 11, Pages 1031-1032. Entire document.	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 September 2012 (10.09.2012)		Date of mailing of the international search report <b>25 OCT 2012</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53		D
<b>G 0 1 N 33/483 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/483		C
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/15		Z
<b>G 0 1 N 33/542 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/542		A
<b>G 0 1 N 21/78 (2006.01)</b>		G 0 1 N 21/78		C

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

(72)発明者 チュワンーン ファイーチーア

台湾 ミアオリ カウンティ、ツナン タウン、キーアン ロード、ナンバー 3 5

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36 FB12 GC15

2G054 AA08 AB05 CA23 CE02 EA03 GA04

4B063 QA01 QA05 QA08 QA13 QA18 QQ08 QQ27 QQ42 QQ52 QQ79

QR07 QR32 QR35 QS16 QX01

专利名称(译)	鉴定GLK介导的疾病的 治疗剂的方法和判断GLK介导的疾病的 方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014520555A</a>	公开(公告)日	2014-08-25
申请号	JP2014520354	申请日	2012-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	财団法人国家卫生研究院		
申请(专利权)人(译)	国家卫生研究机构津市		
[标]发明人	タンツエーフア チュワンーンファイチャーア		
发明人	タン ツエーフア チュワンーン ファイチャーア		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/483 G01N33/15 G01N33/542 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/5041 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/136 G01N33/57484 G01N2333/91205		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.Z G01N33/50.Z G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/483.C G01N33/15.Z G01N33/542.A G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ27 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QS16 4B063/QX01		
优先权	61/508057 2011-07-14 US		
其他公开文献	JP6351503B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了鉴定用于治疗生发中心激酶 ( GCK ) - 类激酶 ( GLK ) 介导的疾病的 治疗剂的方法。公开了用于检测测试化合物对GLK信号传导的调节的方法。还公开了用于检测自身免疫疾病和/或癌症的存在和/或严重性的方法。

FIG. 6

GLK is A Therapeutic Target for Autoimmune Diseases and Cancer

