

(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2004-77122

(P2004-77122A)

(43) 公開日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	Z
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z
GO 1 N 33/574	GO 1 N 33/574	Z

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-180802 (P2002-180802)	(71) 出願人	300040380
(22) 出願日	平成14年6月21日 (2002. 6. 21)		株式会社オリエントキャンサーセラピー
(31) 優先権主張番号	特願2002-177811 (P2002-177811)		東京都三鷹市大沢 1 - 1 - 2 1
(32) 優先日	平成14年6月18日 (2002. 6. 18)	(74) 代理人	100088904
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 庄司 隆
		(72) 発明者	八木田 旭邦
			東京都三鷹市大沢 1 丁目 1 番 2 1 号
		Fターム(参考)	4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QQ96 QR48 QR77 QS33

(54) 【発明の名称】 癌マーカーの測定方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、CD4 + CD25 - T細胞及び/又はCD4 + CD25 + T細胞を測定し、各測定結果の検定の意味するところを分析し、新免疫療法の完成を課題とする。

【課題の解決手段】本発明は、

” CD4 + CD25 + T細胞を測定しそれが活性化キラーT細胞に抑制的に働いていることと判定する癌の検査手段、CD4 + CD25 - T細胞を測定しそれがCTL活性化に働いていることと判定する癌の検査手段、CD4 + CD25 - T細胞 / CD4 + CD25 + T細胞の比を測定する癌治療の有効性の判定手段、前記載の情報を自然法則を利用した媒体に担持した商業用媒体、前記載の商業用媒体を利用した商業方法 ” からなる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CD4 + CD25 + T細胞を測定し、それが活性化キラーT細胞に抑制的に働いていることと判定する癌の検査手段。

【請求項 2】

CD4 + CD25 - T細胞を測定し、それがCTL活性化に働いていることと判定する癌の検査手段。

【請求項 3】

CD4 + CD25 - T細胞 / CD4 + CD25 + T細胞の比を測定する癌治療の有効性の判定手段。

10

【請求項 4】

ガンの免疫治療剤のスクリーニング方法であって、CD4 + CD25 - T細胞 / CD4 + CD25 + T細胞の比を検定し、CD4 + CD25 - T細胞の優位をもって有効と判定するガンの免疫治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 の何れか一に記載の情報を自然法則を利用した媒体に担持した商業用媒体。

【請求項 6】

請求項 5 の商業用媒体を利用した商業方法。
からなる。

【発明の詳細な説明】

20

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、CD4 + CD25 - T細胞及び / 又はCD4 + CD25 + T細胞を測定し、その免疫療法の有効性を判断するための新規な手段の提供に関する。

【0002】

【従来の技術】

ガン (malignant neoplasms) (cancer) の予防または治療のために有用な物質の選別には、従来、ガン細胞へのその直接的作用が重要視されていた。免疫賦活剤がガン治療に有用であることは認められていたが、免疫賦活剤として得られた化合物はいずれもその抗ガン効果が微弱であり、免疫療法単独または化学療法との併用治療によってもガンの十分な治療効果は達成されていない。

30

【0003】

本発明者の医学博士、八木田は、先にガン治療における画期的な手法として、インターロイキン12 (IL - 12) を生体内で誘発する物質の有用性に着目し、キノコ菌系体加工物とその機能を有することを発見し、新免疫療法 (Novel Immunotherapy for cancer) (NITC) ともいふべきガン治療法を確立した。従来IL - 12 は、抗ガン効果があるものの生体内にIL - 12 自体を直接投与した場合には副作用を生じるために患者が治療に耐えられないという事実があり、それ自体を抗ガン剤として使用できなかった。しかし、八木田が報告したキノコ菌系体加工物を含む製剤は、ガンの治療において著しい治癒・延命効果を達成した。つまり八木田は、IL - 12 を生体内で誘発できる有効量のキノコ菌系体加工物を投与することにより、ガンの治療目的を達成した (特開平10 - 139670号公報) 。

40

【0004】

IL - 12 は、TNF IFN IL - 12 CTL活性というルートでキラーT細胞の活性化効果と増強効果をもつ。つまりIL - 12 の産生増強は、キラーT細胞の活性化と増強により抗ガン効果が期待される。

【0005】

八木田は、IL - 12 の産生増強の系とは別にNK T細胞の活性化が抗ガン効果に有用であることを報告している。谷口等は、NK T細胞が有するV₂₄V₁₁という特異的なT細胞抗原受容体 (TCR) が認識する特異的な糖脂質抗原を発見し、この抗原が、

50

ガラクトシルセラミドであることを報告している。更に、ガラクトシルセラミドを投与した担ガンマウスでは、NK T細胞が活性化され、ガンの消失はみられないものの転移が抑制されることを証明した。

NK T細胞には、もう一つの受容体としてNK細胞抗原受容体(NKR-P1; ナチュラルキラー受容体P1)があることは報告されている(特集 NK T細胞の基礎と臨床: 最新医学55巻4号2000年818~823ページ)。NKR-P1もNK T細胞の活性化に関与し、この活性化が抗ガン効果がより優位であることを八木田は見出している。

【0006】

NK細胞についても生体の抗ガン作用に係わるという報告がなされているが、これまでNK細胞の活性と臨床的な抗ガン効果とが相関せず、IL-12の産生誘発量とNK細胞の活性とが完全な逆相関を示すことが八木田により証明されており、ヒトにおける抗ガン作用についてのNK細胞の関与は疑問視されていた。

10

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、CD4+CD25-T細胞及び/又はCD4+CD25+T細胞を測定し、各測定結果の検定の意味するところを分析し、新免疫療法の完成を課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

【0009】

すなわち本発明は、

20

1. CD4+CD25+T細胞を測定し、それが活性化キラーT細胞に抑制的に働いていることと判定する癌の検査手段。

2. CD4+CD25-T細胞を測定し、それがCTL活性化に働いていることと判定する癌の検査手段。

3. CD4+CD25-T細胞 / CD4+CD25+T細胞の比を測定する癌治療の有効性の判定手段。

4. ガンの免疫治療剤のスクリーニング方法であって、CD4+CD25-T細胞 / CD4+CD25+T細胞の比を検定し、CD4+CD25-T細胞の優位をもって有効と判定するガンの免疫治療剤のスクリーニング方法。

5. 前項1~3の何れか一に記載の情報を自然法則を利用した媒体に担持した商業用媒体

30

からなる。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳しく説明するが、本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されていない限り、本発明の属する技術分野において通常の知識を有する者により普通に理解される意味を持つ。

【0011】

本発明者の医学博士八木田のガン新免疫療法とは4つの異なる作用機序を組み合わせることからなる治療手段である。

40

第一の作用機序は、血管新生阻害物質(ベターシャーク)を投与してガンへの血流を障害してガン縮小をはかる方法である。これは血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を測定することでその効果は判定が可能である。血管新生阻害作用はVEGF値のマイナス値(-VEGF)で評価できる。このVEGF値の代わりにFGF、HGFなどのその他の血管増殖因子を用いることも血管新生阻害能を評価することが可能である。またVEGFの代わりに血管新生阻害因子の正数値でもその評価が可能である(例えばエンドスタチン値)。

【0012】

他の一つの作用機序は、1, 3グルカン構造を担持する化合物を投与してTh1サイトカイン(TNF、IFN、IL-12)を誘導してCTLを活性化する方法である。

50

CTL活性はCD8(+)パーフォリン産生能力で判定が可能であるが、このCD8(+)パーフォリン値には細胞障害性T細胞(CTL)と免疫抑制性T細胞(STC; Suppressor T cell)とがあり、前者はガン細胞を障害し、後者はガンの増殖に作用する。したがってその絶対値では評価はできない。しかし前者はIFNが10 IU/ml以上もしくはIL-12値が7.8 pg/ml以上であればCTLであり、IFNとIL-12が低値であればSTCと判定される。そこでCTL活性は、IFN産生能力(IFN値)もしくはIL-12産生能力(IL-12値)で評価が可能である。

【0013】

第三及び第四の作用機序である1,3グルカン構造を担持する化合物の投与によって活性化されるeffector細胞はNK細胞とNKT細胞である。このNKとNKT細胞とはNKR-P1(NK細胞受容体CD161(+))を共有しており、前者はCD3(-)CD161(+))の表面マーカーでNK細胞数は測定可能であり、その活性化はCD3(-)CD161(+))パーフォリン産生能力で判定が可能である。一方後者のNKT細胞はCD3(+))CD161(+))でその細胞数は測定が可能となり、そのパーフォリン産生能力でNKT細胞の活性化は測定可能である。

10

【0014】

本発明は、臨床における結果と、NK細胞の活性化能、NKT細胞の活性化能、血管新生阻害能、IL-12の誘導産生能、及びIFNの誘導産生能の相関性に加えて、CD4+CD25-T細胞及び/又はCD4+CD25+T細胞の動態を検討することにより行われた。本発明者は、新免疫療法(NITC)として、ガン患者に1,3グルカン構造を担持する化合物、1,3グルカン構造を担持する化合物と血管新生阻害作用物質(サメ軟骨)を併用し、IL-12、IFN他の各種サイトカイン、CD4+CD25-T細胞、CD4+CD25+T細胞を測定した。その結果、CD4+CD25-T細胞及びCD4+CD25+T細胞を測定し、その比を検定し、マーカーとすることはガンの検査手段として意義があることを見出した。

20

【0015】

CD25はインターロイキン2(IL-2)受容体鎖である。最近、ヘルパーT細胞Th(CD4)のなかにCD25(+)とCD25(-)細胞とがあることが分かっている。CD4+CD25+T細胞が自己免疫疾患の発病に重要な役割を演じていることが知られている。しかし、癌免疫療法でどのような作用を示しているかは不明である。

30

【0016】

今回、新免疫療法を施行している65例において、この細胞がどのように関与しているかを検討し、CD4+CD25-T細胞はCTL活性化と関係があり、癌免疫療法の効果と密接な関係を有すること、CD4+CD25-T細胞/CD4+CD25+T細胞比は、CD4+CD25-T細胞の優位が癌免疫療法の効果と密接な関係を有することを見出した。

【0017】

この意義を見出したことによりCD4+CD25-T細胞、CD4+CD25+T細胞、及びCD4+CD25-T細胞/CD4+CD25+T細胞比の測定は、有用なCTL活性化剤のスクリーニング方法に適用可能であり、このスクリーニング方法を利用すればCTL活性化能を担持する新規1,3グルカンの特定が可能であることも見出した。

40

【0018】

以上のような情報は、自然法則を利用した媒体に担持すれば有用な商業用媒体となり、またその商業用媒体は有用な商業方法を提供する。

【0019】

本発明においてCTL活性化剤(IL-12産生誘導剤、INF産生誘導剤)は、本発明の測定法による結果を指標として、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維持できる処方にて用いられる。すなわち、指標をもとに、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維持できる投与量、ならびに投与期間を選択して用いられる。具体的に

50

は、その投与量は、CTL活性化剤（IL-12産生誘導剤、INF産生誘導剤）である-1,3グルカン構造を持つ化合物は1g~10g/日程度、好ましくは3g~6g/日程度である。また、投与期間は一般的には10日間~24ヶ月間、投与頻度は1~3回/日で、好ましくは連日投与である。当該CTL活性化剤（IL-12産生誘導剤、INF産生誘導剤）は、好適には経口摂取される。無論、投与量を減少させ、これらを非経口に耐え得る品質に調製することで、非経口摂取（静脈内または筋肉内投与などを含む）も可能である。

【0020】

測定は、ガン患者の血液を用いて、血中細胞について細胞表面抗原であるCD4、CD25について陽性・陰性で区別し、各細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いたTwo Color検査により常法通り測定した。 10

【0021】

（サイトカインを測定するための試料の調製）

まず、血液より単核球画分を分離調製する。ヘパリン加末梢血をリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline）（PBS）で2倍に希釈して混和した後、Ficoll-Conray液（比重1.077）上に重層し、400Gで20分間遠沈後、単核球画分を採取する。洗浄後、10%牛胎児血清（FBS）を加えたRPMI-1640培地を加え、細胞数を 1×10^6 個となるように調製する。得られた細胞浮遊液200 μ lにフィトヘマグルチニン（Phytohemagglutinin）（DIFCO社製）を20 μ g/mlの濃度となるように加え、96穴マイクロプレートにて5%CO₂存在下、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、該培養した細胞溶液中のサイトカインを測定する試料とする。 20

【0022】

（IL-12の測定）

IL-12量の測定は自体公知の臨床、生化学的検査を利用できるが、R&D SYSTEMS社やMBL社より入手することのできる酵素免疫測定法（ELISA）による測定キットが使用される。ここではR&D SYSTEMS社の測定キットを用いた。実際には96穴マイクロプレートの各穴に測定用希釈液Assay Diluent RD1Fを50 μ l、標準液（standard）または実施例1で調製した試料を200 μ lずつ分注した後、室温にて静置して2時間反応させた。その後、西洋わさびパーオキシダーゼ（horse radish peroxidase）（HRP）標識抗IL-12抗体を200 μ lずつ分注し2時間室温で静置した。各穴の反応液を除去し3回洗浄後、発色基質溶液を200 μ lずつ分注し、20分間室温静置後、酵素反応停止溶液を50 μ lずつ分注した。550nmを対照として450nmにおける各穴の吸光度をEmax（和光純薬株式会社製）にて測定した。IL-12量は、pg/mlとして表される。ここでIL-12産生誘発能とは、末梢血単核球画分が刺激により産生するIL-12量を、7.8pg/ml以上に増強せしめる機能、またはある物質を投与する前のIL-12産生量より増強せしめる機能を意味する。 30

【0023】

（IFNの測定）

IFNの測定は、BioSource Europe S.社のIFN EASIAキットを用いて、酵素免疫測定法（EIA法）で測定した。実際には96穴マイクロプレートの各穴に標準液（standard）または上記調製した試料を2倍希釈したものを50 μ lずつ分注し、HRP標識抗IFN-抗体を50 μ lずつ分注し更に振盪しながら2時間室温で反応させた。各穴の反応液を除去し3回洗浄後、発色基質溶液を200 μ lずつ分注し、振盪しながら15分間室温で反応させ、酵素反応停止溶液を50 μ lずつ分注した。630nmを対照として450nmおよび490nmにおける各穴の吸光度をEmax（和光純薬株式会社製）にて測定した。IFN量は、IU/mlとして表される。 40

【0024】

(パーフォリン産生細胞の測定)

末梢血中のリンパ球について、細胞表面抗原であるCD8が陽性でかつパーフォリンが陽性の細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いたThree Color検査により常法通り測定する。具体的には、採取した血液に固定液を加えて細胞を固定し、膜透過液を添加後抗パーフォリン抗体(Pharmingen社製)を添加して反応させ、さらにPRE-Cy5標識二次抗体(DAKO社製)を添加して反応させ、ついで抗CD8抗体を添加して反応させ、その後フローサイトメトリーで測定する。

【実施例】

以下に、実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明は本実施例に限定されるものではない。

10

【0025】

【実施例1】

患者には、IL-X(東西医薬)、さめ軟骨(セイシン企業)、及び1,3構造をもつ糖類が、各推奨処方により投与された。処置患者群についてIL-12の誘導産生能、IFN誘導産生能、及びCD4+CD25-T細胞、CD4+CD25+T細胞、パーフォリン産生細胞の寄与の関係を分析した。

【0026】

CD4+CD25+T細胞とCD8+パーフォリン産生細胞(CD8+PER+)との相関を検討したのが図1である。

全症例(65例)、CR(治癒)(n=17)、PR(部分治癒)(n=14)、LNC(長期間癌増殖無)(n=8)、SNC(短期間癌増殖無)(n=7)、PD(無効)(n=14)、初診(n=5)のいずれにおいても逆相関を示した。

20

この事実はCD4+CD25+T細胞が活性化キラーT細胞に抑制的に働いていることを示している。

【0027】

CD4+CD25+T細胞とIL-12との相関を検討し、図2に示した。IL-12とCD4+CD25+T細胞との相関は、全体では緩い正の相関を示している。またCR(n=17例)、PR(n=14例)、LNC(n=8例)ではそれぞれ正の相関を示す傾向が認められた。一方SNC(n=7例)、PD(n=14例)では逆相関の傾向が認められた。

30

【0028】

CD4+CD25+T細胞とIFNとの相関を図3に示した。IL-12と同様にIFNにおいてもCR、PRおよびLNCで正の相関を示す傾向が認められ、SNCとPD症例では逆相関の傾向を示している。この事実は有効例ではCD4+CD25+T細胞の免疫抑制に抵抗してTh1サイトカイン働いている可能性が示唆される。またSNCとPD症例においてTh1サイトカイン値が高い症例ではCD4+CD25+T細胞が抑制的に作用し、Th1サイトカイン値が低い症例ではCD4+CD25+T細胞が免疫抑制的に働いていることが示唆される。有効例ではTh1サイトカインがCD4+CD25+T細胞に打ち勝って免疫活性すなわちCD8+パーフォリン+T細胞が働いていると考えられる。

40

一方、無効例ではTh1サイトカイン値が低いもしくはCD4+CD25+T細胞のいずれかどちらかが免疫抑制的に働いていると考えられる。

【0029】

IL-10とCD4+CD25+T細胞との相関を図4に示した。全症例でIL-10とCD4+CD25+T細胞とは正の相関を示し、LNC(n=8)以外は全て正の相関を示した。この事実はNITC治療例ではIL-10とCD4+CD25+T細胞とはいずれも免疫抑制的に働いていることが示唆された。

【0030】

CD4+CD25+T細胞はTGFを産生して免疫抑制的に働いている可能性も考えられる。そこでこの細胞とCD4+CD25+TGF+T細胞との相関を検討すると正の

50

相関を示した。この事実はこのCD4 + CD25 + T細胞が強力な免疫抑制作用を持つTGF γ を産生して抑制的に働いている可能性も考えられる(図5)。

【0031】

CD4 + CD25 - T細胞はIL-2とIFN γ を産生してキラーT細胞(CD8 + T細胞)を活性化するものと考えられている。そこでIFN γ とCD4 + CD25 - T細胞との相関を検討したのが図6である。CD4 + CD25 - T細胞とIFN γ とは正の相関が認められた。

【0032】

次にCD4 + CD25 - T細胞のなかでIFN γ を産生する細胞(CD4 + CD25 - IFN γ +)とIFN γ との相関も正の相関を示した(図7)。

10

CD4 + CD25 - T細胞とCD4 + CD25 - IFN γ + T細胞との相関においても正の相関を示した。

【0033】

CD4 + CD25 + T細胞が30%以上を示す症例すなわちCD8 + 細胞に強力に抑制している症例について有効例と無効例とでその割合を比較した(図8)。

前者が20.5%であったのに対し、後者の無効例では47.6%と有意差が認められた($p < 0.05$)。すなわちCD4 + CD25 + T細胞がCD8 + パーフォリン産生細胞を抑制し、NITC治療症例で抑制的に働いていることが認められた。

【0034】

また、CD4 + CD25 - T細胞 / CD4 + CD25 + T細胞の比を有効例(CR + PR + LNC)の39例と無効例(SNC + PD)の21例と比較したが、有効例で高い値を示した($p < 0.01$)。この事実がCD4 + CD25 + T細胞の免疫抑制に働くカットオフ値は30%が適切と考えられた。

20

【発明の効果】

以上の結果によれば、CD4 + CD25 - T細胞、CD4 + CD25 + T細胞、CD4 + CD25 - T細胞 / CD4 + CD25 + T細胞比を検定することは、癌治療におけるマーカーとして有用であり、新規な意義を提供するものであり、ガン治療における画期的な成果を達成するものであることを確認した。

【0035】

【図面の簡単な説明】

30

【図1】CD8 + PER+とCD4 + CD25 + T細胞の相関を示す。

【図2】IL-12とCD4 + CD25 + T細胞の相関を示す。

【図3】IFN γ とCD4 + CD25 + T細胞の相関を示す。

【図4】IL-10とCD4 + CD25 + T細胞の相関を示す。

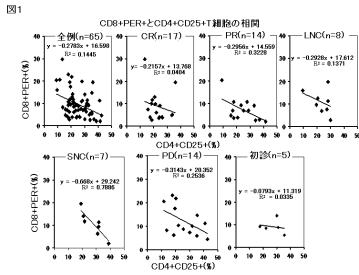
【図5】CD4 + CD25 + とCD4 + CD25 + TGF γ + の相関を示す。

【図6】CD4 + CD25 - T細胞とIFN γ の相関を示す。

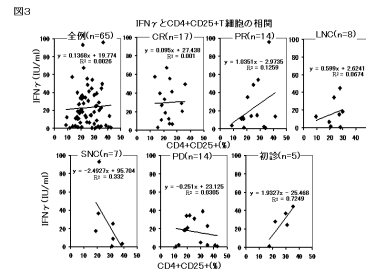
【図7】CD4 + CD25 - とCD4 + CD25 - IFN γ + の相関を示す。

【図8】CD4 + CD25 + T細胞が30%以上の症例を示す。

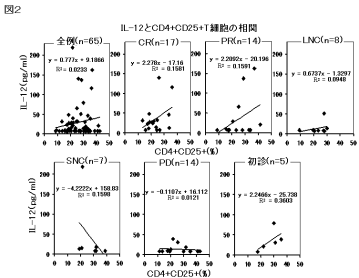
【 図 1 】



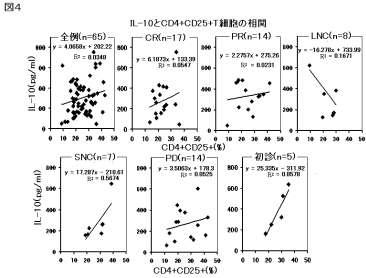
【 図 3 】



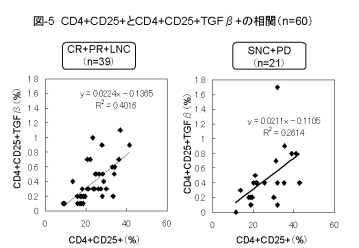
【 図 2 】



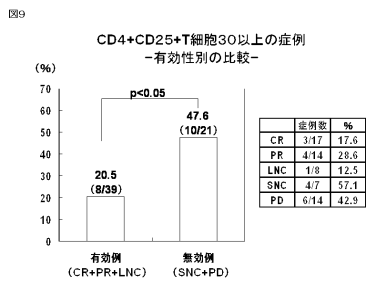
【 図 4 】



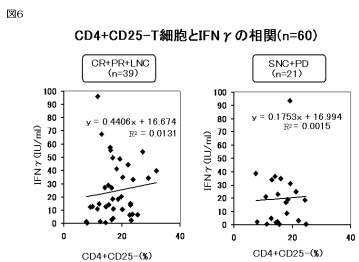
【 図 5 】



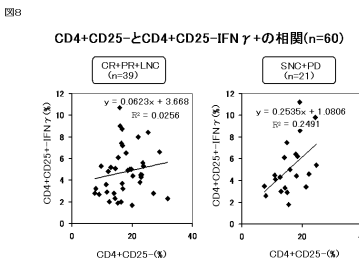
【 図 8 】



【 図 6 】



【 図 7 】



专利名称(译)	测量癌症标志物的方法		
公开(公告)号	JP2004077122A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2002180802	申请日	2002-06-21
申请(专利权)人(译)	有限公司东方癌症治疗		
[标]发明人	八木田旭邦		
发明人	八木田 旭邦		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/53.K C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/574.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 2G045/AA40 2G045/CA18 2G045/DA80		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	2002177811 2002-06-18 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过测量CD4 + CD25-T细胞和/或CD4 + CD25 + T细胞并分析每种测量结果的意义来完成新的免疫疗法。根据本发明，“对CD4 + CD25 + T细胞进行了测量，并判断其对活化的杀伤性T细胞起抑制作用。对癌症的一种测试方法，对CD4 + CD25-T细胞进行了测定，并对CTL活化起作用。癌症检测是指确定是否存在癌症，是指通过测量CD4 + CD25-T细胞/ CD4 + CD25 + T细胞的比例，并使用自然法将上述信息携带在培养基上，从而确定癌症治疗的有效性 商业媒体，“上述利用商业媒体的商业方法”。

