

(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2019-518226
(P2019-518226A)

(43) 公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2019-514696 (P2019-514696)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成29年3月17日 (2017. 3. 17)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成30年11月22日 (2018. 11. 22)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/KR2017/002870</p> <p>(87) 国際公開番号 WO2017/204446</p> <p>(87) 国際公開日 平成29年11月30日 (2017. 11. 30)</p> <p>(31) 優先権主張番号 10-2016-0063735</p> <p>(32) 優先日 平成28年5月24日 (2016. 5. 24)</p> <p>(33) 優先権主張国 韓国 (KR)</p> <p>(31) 優先権主張番号 10-2017-0033207</p> <p>(32) 優先日 平成29年3月16日 (2017. 3. 16)</p> <p>(33) 優先権主張国 韓国 (KR)</p>	<p>(71) 出願人 518416067 ユニバーシティ オブ ウルサン ファン デーション フォー インダストリー コ オペレーション 大韓民国 4 4 6 1 0 ウルサン, ナム グ, テハクロー, 9 3</p> <p>(71) 出願人 518416274 ジ アサン ファンデーション 大韓民国 0 5 5 0 5 ソウル, ソンパ グ, オリピックロー 4 3-ギル, 8 8</p> <p>(74) 代理人 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所</p>
--	---

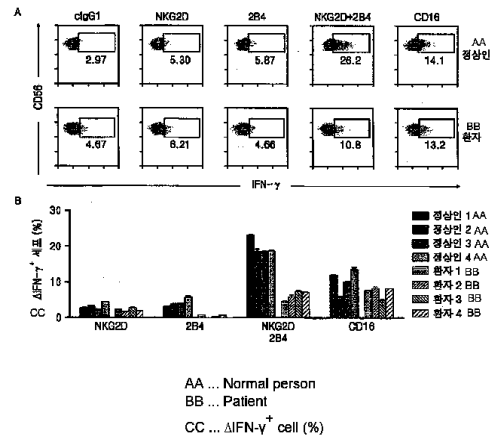
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 受容体シナジー活性を利用したNK細胞の活性度検査方法、及びそれを利用したNK細胞の活性度が関連する疾患の診断方法

(57) 【要約】

試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を特異的に刺激する段階と、NK細胞のシナジー活性化程度を測定する段階と、正常NK細胞対比で、NK細胞のシナジー活性化程度を比較する段階と、を含むNK細胞の活性度検査方法、及びNK細胞の活性度検査用組成物に係わるものであり、また本発明は、該組成物を含むNK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断用キットに係わるものである。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を特異的に刺激する段階と、前記2個以上の因子の刺激により誘発された、前記NK細胞のシナジー活性化程度を測定する段階と、

正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化程度を比較する段階と、を含むNK細胞の活性度検査方法。

【請求項 2】

前記方法は、前記試料のうち必要とするNK細胞を分離する段階をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載のNK細胞の活性度検査方法。

10

【請求項 3】

前記因子は、細胞表面または細胞内に存在することを特徴とする請求項1に記載のNK細胞の活性度検査方法。

【請求項 4】

前記因子は、NKGD2、2B4(CD244)、DNAM-1(CD226)、CD2、CD16、NKp30、NKp44、NKp46及びNKp80のうちから選択されたことを特徴とする請求項3に記載のNK細胞の活性度検査方法。

【請求項 5】

前記刺激は、前記因子に同時にまたは順次になされることを特徴とする請求項1に記載のNK細胞の活性度検査方法。

20

【請求項 6】

前記刺激は、前記因子のそれぞれまたはすべてに特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する化合物、及び可逆的または非可逆的な作用因子から選択される1以上によることを特徴とする請求項1に記載のNK細胞の活性度検査方法。

【請求項 7】

前記因子に特異的な活性を誘発する標的細胞は、NK細胞上において区別される2以上の因子に対する抗体、その断片、及びそれらの組み合わせのうちから選択された1以上のものでコーティングされたものであることを特徴とする請求項6に記載のNK細胞の活性度検査方法。

30

【請求項 8】

前記活性化程度を測定する段階は、前記因子の下位因子のリン酸化または発現程度、脱顆粒化活性、細胞毒性活性及びNK細胞刺激によって分泌されたサイトカインの測定のうちから選択された1以上を含むことを特徴とする請求項1に記載のNK細胞の活性度検査方法。

【請求項 9】

前記サイトカインは、IFN-、TNF-、TNF-、MIP-1、MIP-1、PANTES、IL-8及びIL-10のうちから選択されたことを特徴とする請求項8に記載のNK細胞の活性度検査方法。

【請求項 10】

前記方法は、NK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断についての情報を提供するためのものであることを特徴とする請求項1に記載のNK細胞の活性度検査方法。

40

【請求項 11】

前記NK細胞のシナジー活性と係わる疾患は、過敏性免疫疾患、自家免疫疾患、免疫不全疾患、免疫拒絶反応、組織球症、癌、二型糖尿病、寄生虫感染疾患及びウイルス感染疾患のうちから選択されたことを特徴とする請求項10に記載のNK細胞の活性度検査方法。

【請求項 12】

NK細胞のシナジー活性を起こす刺激物質として、前記NK細胞上において区別される2以上の因子のそれぞれまたはすべてに特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘

50

発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する化合物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上を含むNK細胞の活性度検査用組成物。

【請求項13】

前記因子は、NKG2D、2B4(CD244)、DNAM-1(CD226)、CD2、CD16、Nkp30、Nkp44、Nkp46及びNkp80のうちから選択されたことを特徴とする請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在を検出する物質として、前記因子の下位因子のリン酸化または発現程度、脱顆粒化活性、細胞毒性活性及びNK細胞刺激によって分泌されたサイトカインの測定のうちから選択された1以上を検出するための抗体またはその断片をさらに含むことを特徴とする請求項12に記載の組成物。

10

【請求項15】

前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在を検出する物質は、パーフォリン、グランザイム、CD107a、CD107b、IFN-、MIP-1、MIP-1、TNF-、TNF-、PANTES、IL-8及びIL-10のうちから選択された1以上に対する抗体、その断片、またはそれらの組み合わせのうちから選択された1以上であることを特徴とする請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を刺激し、前記NK細胞のシナジー活性を起こす刺激物質として、2個以上の因子のそれぞれまたはすべてに特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する化合物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上と、

20

正常NK細胞対比で、前記NK細胞の活性化の存在または不在を検出する物質と、を含むNK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断用キット。

【請求項17】

前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在を検出する物質は、パーフォリン、グランザイム、CD107a、CD107b、IFN-、MIP-1、MIP-1、TNF-、TNF-、PANTES、IL-8及びIL-10のうちから選択された1以上に対する抗体、その断片、またはそれらの組み合わせのうちから選択された1以上または蛍光染料であることを特徴とする請求項16に記載の診断用キット。

30

【請求項18】

前記因子に特異的な活性を誘発する標的細胞は、NK細胞上において区別される2以上の因子に対する抗体、その断片、及びそれらの組み合わせのうちから選択された1以上のものでコーティングされたことを特徴とする請求項16に記載の診断用キット。

【請求項19】

NK細胞のシナジー活性と係わる疾患は、過敏性免疫疾患、自家免疫疾患、免疫不全疾患、免疫拒絶反応、組織球症、癌、二型糖尿病、寄生虫感染疾患及びウイルス感染疾患のうちから選択されたことを特徴とする請求項16に記載の診断用キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、NK細胞の受容体シナジー活性を利用したNK細胞の活性度を検査する方法、及びそれを利用したNK細胞の活性と係わる疾患を診断する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

NK細胞(natural killer cell)は、先天的免疫系及び後天的(adaptive)免疫系に重要な細胞毒性リンパ球の種類である。該NK細胞は、ウイルス感染された細胞や癌細胞に反応するが、典型的に、細胞表面のMHC(major histocompatibility complex)の異常現象を感知する。そのようなNK細胞は、パーフォリン(perforin)を分泌し、感染

50

細胞や癌細胞の細胞膜に孔を開け、そこにグランザイム (granzyme) を出し、その細胞を死滅させる細胞毒性を有する。B細胞腫患者及び多くの癌患者の場合、NK細胞の数や、抗癌活性に欠陥が発見されており、NK細胞の機能異常は、そのような癌の発生と密接な関連を有していると知られている (Annu. Rev. Immunol. 2013; 31: 227-258)。

【0003】

該NK細胞の活性には、多様な活性化及び阻害性の受容体が関与 (engage) する。支配的であると見なされる受容体のうちには、免疫受容体チロシン基盤活性モチーフ (ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 関連信号伝達分子 (例えば、FcR 鎖またはTCR 鎖) と係わるNKp46、及び信号伝達分子DAP10と係わる受容体NKG2D (EMBO J. 2004; 23: 255-9, Annu. Rev. Immunol. 2005; 23: 225-74) に係わるものなどがある。共同刺激性と見なされる受容体としては、2B4 (CD244) のような信号伝達リンパ球活性分子 (SLAM: signaling lymphocytic activation molecule) ファミリーの構成員だけでなく、DNAM-1 (CD226)、CD2及びNKp80 (KLRF1遺伝子産物) のような多様な受容体を含む。

10

【0004】

ITAM関連分子は、NK細胞のさまざまに異なる性化受容体による信号伝達に寄与するが、自然細胞毒性受容体 (NCR: natural cytotoxicity receptor) のうちNKp46及びNKp30は、FcR 及び/またはTCR と係わり、一方、NKp44は、信号アダプター (adaptor) DAP12と関連する (EMBO J. 2004; 23: 255-9)。

20

【0005】

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH: hemophagocytic lymphohistiocytosis) は、単球 (monocyte) または大食細胞 (macrophage) の増殖を示す疾患であり、調節されない血球貪食現象と炎症性サイトカイン (cytokine) の過分泌現象とを示す。ここで、特に、免疫不全性X関連リンパ増殖症候群1 (XLP1: immunodeficiency X-linked lymphoproliferative disease 1) は、HLHのような症状を示す疾患であり、エプスタイン・パール・ウイルス (EBV: Epstein-Barr virus) に感染されて発病したり、先天的XLP1の場合、SAP蛋白質を作るSH2D1Aの突然変異が、XLP1の遺伝的基盤を形成したりする。 (Annu. Rev. Immunol. 2007; 25: 337-79, Annu. Rev. Immunol. 2011; 29: 665-705)。

30

【0006】

2B4は、細胞質的末端 (tail) に、ITSMモチーフを含んでおり、小型アダプターSAP及びSAP関連チロシンキナーゼFynの募集を介した活性化信号を伝達する (J. Exp. Med. 202, 181-192 (2005), Immunity 36, 974-985 (2012))。2B4の信号伝達は、Vav1、p38 MAPK、Erk及びPLC-g2の活性化を導き出す (Nat. Immunol. 9, 495-502 (2008))。注目する点は、機能的なSAP発現が不足した先天的XLP1患者から得たNK細胞において、2B4が活性されず、代わりに、抑制的信号を伝達することができるということである (Annu. Rev. Immunol. 25, 337-379 (2007))。そのようなNK細胞欠陥は、エプスタイン・パール・ウイルス (EBV) 感染されたB細胞の殺害欠陥、IFN-g生産欠陥、電撃性単核症 (fulminant mononucleosis) 及びB細胞腫のような臨床的なXLP1の徴候に寄与すると考えられる。

40

【0007】

一方、癌患者のNK細胞において、抗癌受容体であるNKG2D (J. Immunol. 175, 5541-5550 (2005), Cancer Res. 69, 7775-7783 (2009); J. Immunol. 189, 1360-1371 (2012))、DNAM-1 (Immunol. Cell Biol. 90, 109-115 (2012)) を介したNK細胞活性化に欠陥が観察された。また、B型肝炎ウイルス感染患者のNK細胞においても、NKG2D、2B4の発現と機能が低減していると知られている (PloS Pathog. 8, e1002594 (2012))。

【0008】

従って、HLHだけではなく、癌及びウイルス感染疾患においても、NK細胞活性も、検査を介して、前記疾患を診断しようとするが、NK細胞活性度を測定する既存の技術は

50

、放射性同位元素または蛍光標識探針 (probe) を利用したものであり、費用面や時間面において、臨床的適用に不適であり、NK細胞の活性度を簡便であって迅速でありながらも、有意的に測定することができる方法が、多様な免疫関連疾患の早期診断及び予後判断に重要であると認識されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

一様相は、試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を特異的に刺激する段階と、前記2個以上の因子に対する刺激に誘発された、前記NK細胞のシナジー活性化程度を測定する段階と、正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化程度を比較する段階と、を含むNK細胞の活性度検査方法を提供する。

10

【0010】

他の様相は、NK細胞の相乗化された活性(シナジー活性)を起こす刺激物質として、前記NK細胞上において区別される2以上の因子に、それぞれまたは同時に、特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する組成物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上を含むNK細胞の活性度検査用組成物を提供する。

【0011】

さらに他の様相は、試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を刺激し、前記NK細胞の相乗化された活性(シナジー活性)を起こす刺激物質として、2個以上の因子に、それぞれまたは同時に、特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する組成物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上；及び正常NK細胞対比で、前記NK細胞の活性化の存在または不在を検出する物質を含むNK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断用キットを提供する。

20

【発明の効果】

【0012】

一様相による試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を特異的に刺激する段階と、前記NK細胞のシナジー活性化程度を測定する段階と、正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化程度を比較する段階と、を含むNK細胞の活性度検査方法を利用し、既存に知られた技術より簡便であって迅速でありながらも、有意性あるように、NK細胞の活性度を検査することができ、NK細胞の活性と係わる疾患を容易に早期診断して予後判断することができる。

30

【0013】

他の様相によるNK細胞の相乗化された活性(シナジー活性)を起こす刺激物質として、前記NK細胞上において区別される2以上の因子に、それぞれまたは同時に、特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する組成物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上を含むNK細胞の活性度検査用組成物を利用し、NK細胞の活性と係わる疾患の早期診断、予後判断などのための方法を容易に遂行することができ、キットを容易に製造または利用することができる。

40

【0014】

さらに他の様相による試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を刺激し、前記NK細胞の相乗化された活性(シナジー活性)を起こす刺激物質として、2個以上の因子に、それぞれまたは同時に、特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する組成物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上；及び正常NK細胞対比で、前記NK細胞の活性化の存在または不在を検出する物質を含むNK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断用キットを利用し、既存に知られた技術より簡便であって迅速でありながらも、有意性あるように、NK細胞の活性と係わる疾患を早期診断または予後判断することができる。

50

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】区別される因子NKGD及び/または2B4を特異的に刺激した場合、NF-Bp65サブユニットのリン酸化程度に係わる流動細胞計測分析結果を示すグラフである。

【図2】区別される因子NKGD及び/または2B4を特異的に刺激した場合、IFN-またはTNF-を発現させる細胞の頻度に対する流動細胞計測分析結果を示すグラフである。

【図3】特定受容体を、単一刺激または共同刺激した場合、NK細胞の相乗化された活性(シナジー活性)を細胞毒性として確認したグラフである。

【図4】健常人またはXLP1患者の供与者から獲得したNK細胞を、区別される因子NKGD及び/または2B4で刺激した場合、NK細胞活性化と係わる因子の発現程度を示す図面である。

【図5】(A)健常人またはXLP1患者の供与者から獲得したNK細胞を、区別される因子NKGD及び/または2B4で刺激した場合、IFN-発現程度を、流動細胞計測機によって分析した図面であり、(B)NK細胞に刺激を加えていない場合(IFN-+細胞)対比で、刺激を加えた場合(IFN-+NK細胞)、IFN-を発現するNK細胞増加百分率を示すグラフである。

【図6】共同活性化に対するXLP1NK細胞の欠陥的細胞毒性脱顆粒化を示すものであり、(A)健常人またはXLP1供与者から獲得したNK細胞を、区別される因子NKGD及び/または2B4で刺激した場合、CD107aの発現程度を、流動細胞計測機によって分析した図面であり、(B)NK細胞に刺激を加えていない場合(CD107a+細胞)対比で、刺激を加えた場合(CD107a+NK細胞)、CD107a+NK細胞の増加百分率を示す。

【図7】多様な血球細胞において、NKGD/2B4組み合わせの刺激による活性程度に係わる流動細胞計測分析結果を示す図面である。

【図8】NK細胞において、NKGD/2B4組み合わせの刺激による活性程度に係わる流動細胞計測分析結果を示す図面である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

一様相は、試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を特異的に刺激する段階と、前記2個以上の因子に対する刺激に誘発された、前記NK細胞のシナジー活性化程度を測定する段階と、正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化程度を比較する段階と、を含むNK細胞の活性度検査方法を提供する。

【0017】

前記試料は、個体、例えば、ヒトを含んだ哺乳類などに由来した生物学的試料でもある。また、前記生物学的試料は、個体から分離されたものでもあり、血液、全血、血清、血漿、リンパ、小便、大便、組織、細胞、器官、骨髄、唾液、喀痰、脳脊髄液、またはそれらの組み合わせでもある。また、前記生物学的試料は、PBM C、精製されたNK細胞、または一次性休止期の細胞(primary resting cell)(すなわち、血液から直ちに分離したもの)を含むものでもある。一具体例において、前記試料は、血液である。

【0018】

前記用語「区別」は、細胞での位置、構造及び機能などにおいて、同等ではない全ての場合を含む。具体的には、刺激後、細胞内において誘発する信号伝達過程を異ならせるか、細胞上の位置または因子それ自体が構造的に異なり、刺激手段または方法を異ならせなければならぬか、あるいは単一刺激された場合、細胞内での役割が異なるか、効果的に有効に活性を起こすのに不足しているということの意味する。

【0019】

前記用語「因子」は、NK細胞のシナジー活性化を起こす全ての分子的要素を意味する。具体的には、前記因子は、細胞内外の受容体、チャネル(channel)、並びに特異的な

10

20

30

40

50

リガンドと結合することができる細胞内外のアダプター (adaptor)、蛋白質、糖蛋白質、ペプチド及びモチーフを含んでもよい。

【 0 0 2 0 】

一具体例において、前記因子は、受容体でもある。前記用語「受容体」は、特定物質と結合し、NK細胞の活性を変化させる全ての分子を言う。前記特定物質は、化学的組成物、体内由来または人工的な特定蛋白質、ペプチド、コレステロール、糖蛋白質を含み、他の免疫細胞またはNK細胞自体によるサイトカインまたはケモキン、または標的細胞またはNK細胞自体の特定受容体または膜蛋白質を含んでもよい。

【 0 0 2 1 】

一具体例において、前記因子は、細胞表面または細胞内に存在するものでもある。従って、例えば、前記因子が受容体である場合、NK細胞の細胞表面に位置し、特定物質と結合し、細胞内で信号伝達し、NK細胞の活性を起こす場合だけではなく、細胞膜を通過し、細胞膜内面または細胞質に存在する受容体であり、外部特定刺激物質と結合し、信号伝達作用を起こすことができる全ての受容体を含む。

【 0 0 2 2 】

前記用語「刺激」は、因子に作用し、NK細胞内外の特定信号伝達を起こすものを意味する。前記刺激を起こす方法は、前記因子の1以上に対して特異的な抗体、その断片、またはペプチド、特異的に誘導または抑制する組成物、及び可逆的または非可逆的な作用因子 (agonist) または拮抗剤 (antagonist) を利用することもでき、NK細胞を刺激することができる多様な標的細胞 (例えば、K 5 6 2、7 2 1、2 2 1、または特定受容体刺激抗体によってコーティングされた P 8 1 5) を含む培養物と培養することを含んでもよい。

【 0 0 2 3 】

前記用語「シナジー」は、単一因子それぞれの効果は、NK細胞活性を効果的に有効に活性化させるのに不足するが、区別される各因子が同時または順次に共同刺激された場合、単一因子それぞれ刺激されたもの対比で、顕著に変化を誘発するか、あるいはNK細胞活性を効果的に有効に活性化させることができることを意味する。従って、NK細胞の「シナジー活性」または「シナジー活性化」は、NK細胞上において区別される2以上の因子をそれぞれ、及びそれらの組み合わせに対して特異的に刺激し、前記各因子、及びそれらの組み合わせに対する刺激による前記NK細胞の活性を測定し、前記各因子の刺激によるNK細胞活性程度対比 (望ましくは、前記各因子のうちさらに多く活性化されたNK細胞活性程度対比) で、前記各因子の組み合わせの刺激によるNK細胞活性程度が1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上である場合、シナジー活性が誘発されたと決定することができる。望ましくは、2倍以上である場合、シナジー活性が誘発されたと決定することができる。前記シナジー活性化程度は、本明細書に記載されているように、流動細胞計測分析、免疫ブロッティング (immunoblotting) などを利用し、下位因子のリン酸化または発現程度、脱顆粒化 (degranulation) 活性、細胞毒性 (cytotoxicity) 活性及びNK細胞刺激によって分泌されたサイトカインを測定したものを基準に数値化させることができるが、それに制限されるものではない。

【 0 0 2 4 】

本発明のNK細胞の活性度を検査する方法において、正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化を比較する段階は、具体的には、正常なNK細胞を対照群として、実験群と同等な条件で、区別される2以上の因子をそれぞれまたは特定組み合わせで刺激したとき、正常なNK細胞で示される相乗化された活性化現象が、実験群で顕著に高いか、示されないか、あるいはその程度が顕著に低い場合、非正常であると判断することを含む。また、単一因子を刺激した場合に比べ、共同刺激した場合、比較が容易であり、人為的にシナジー活性化を誘発し、そのデータを比較することによって判断することを含む。前記段階により、非正常なNK細胞と係わる疾患の病理学的徴候、ウイルス感染、癌細胞の存在、及び特定癌を判断し、前記疾病に対して予後予測することができる。前記「正常NK細胞」は、疾病を有さない個体が有するか、あるいはそのような個体に由来したNK

10

20

30

40

50

細胞を言い、前記疾病を有さない個体は、少なくともNK細胞活性に影響を及ぼすと知られた身体的、遺伝的または外来的な条件を有さない。

【0025】

一具体例において、前記方法は、前記試料のうち、必要とするNK細胞を分離する段階をさらに含んでもよい。必要によっては、他の血球またはリンパ球と共に存在する中で、刺激後、前記段階がなされ、リンパ球としてNK細胞のみを含む試料にするために、前記段階がなされた後、前記刺激する段階がなされもする。分離されNK細胞の精製度、及びその試料の構成は、実験に必要なほどに多様でもある。該NK細胞は、必要によっては、試料で精製されたそのままを使用することができ、実験に適する条件または細胞量を確保するために、増殖させた後で使用することができる。

10

【0026】

しかし、特定因子の組み合わせの場合、NK細胞に特異的であるので(実施例6)、本発明の方法において、前記NK細胞に特異的な因子の組み合わせを利用する場合、前記NK細胞を分離する段階は、必須でもない。

【0027】

一具体例において、前記刺激は、前記因子に同時にまたは順次に行われもする。具体的には、前記因子に構造的に結合するか、あるいは前記因子を改造(modify)して刺激することができる。前記改造は、例えばリン酸化、ユビキチン化、スルホニル化、メチレーション(methylation)、パリレーション(parylation)または糖化(glycosylation)のような翻訳後の改造(post-translation modification)、または切断を含んでもよい。

20

【0028】

一具体例において、前記因子は、ITAM含有信号伝達分子(例えば、CD16、NKp46、NKp30またはNKp44など)、NKG2D、2B4(CD244)、DNAM-1(CD226)、CD2及びNKp80のうちから選択されたものでもある。Bryceson Yら(Blood 2006; 107: 159-166)及びKim HSら(Immunity 2010; 32: 175-186)によれば、NK細胞シナジー活性化は、前記羅列された因子の多様な組み合わせによって可能であり、前記因子の組み合わせの例としては、2B4及びDNAM-1、DNAM-1及びNKG2D、2B4及びNKG2D、または2B4、DNAM-1及びNKG2Dがあるが、それらに制限されるものではない。

【0029】

一具体例において、前記刺激する段階において、前記刺激は、前記2個以上の因子に、それぞれまたは同時に、特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に誘導または抑制する化合物、及び可逆的または非可逆的な作用因子または拮抗剤のうちから選択された1以上によっても誘発される。前記因子に特異的な抗体またはその断片は、イソ型を含み、区別される2以上の因子に同時に結合することもできる。具体的には、前記区別される2以上の因子に同時結合する例として、CD244/2B4またはCD226/DNAM-1でコーティングされたP815がある。前記作用因子または拮抗剤は、対象因子に対して構造的に特異的な性質を有する化合物でもあり、三次構造的に特異性を有するポリペプチドでもある。

30

【0030】

一具体例において、前記因子に特異的な活性を誘発する標的細胞は、NK細胞上において区別される2以上の因子に対する抗体、断片及びそれらの組み合わせのうちから選択された1以上のものでコーティングされたものでもある。前記NK細胞上において区別される2以上の因子は、前述の通りである。該抗体は、前記因子のイソ型に対する抗体でもあり、該断片は、抗体の断片として活性を起こすに十分な前記抗体の特定部分のみを含んでもよい。該コーティングは、下記実施例で敘述するように、標的細胞とのプリインキュベーション(preincubation)でも行われ、または架橋(cross-linking)技法を利用し、前記抗体、断片またはその組み合わせでコーティングすることができる。

40

【0031】

一具体例において、前記活性化程度を測定する段階は、前記NK細胞上において区別さ

50

れる2以上の因子の下位因子のリン酸化または発現程度、脱顆粒化活性、細胞毒性活性及びNK細胞刺激によって分泌されたサイトカインの測定のうちから選択された1以上を含むものでもある。用語「下位因子」は、前記NK細胞上の因子が刺激される場合、影響を受けて発現が増大するか、あるいはリン酸化される細胞内蛋白質、または変化されるポリペプチドなどを意味するものであり、特に、リン酸化反応に係わる場合、前記下位因子は、基質 (substrate) と同一意味でも使用される。

【0032】

前記下位因子の発現程度は、例えば、刺激されたNK細胞を溶解させた後、NK細胞活性化に關与する細胞内蛋白質のうち一つであるErkまたはpY174-Vav1に特異的な抗体を利用する従来周知の免疫ブロット (immunoblot) 方式を利用して測定することができる。

10

【0033】

前記脱顆粒化活性は、例えば、パーフォリン分泌 (perforin) またはグランザイム (granzyme) 分泌により、標的細胞の溶解を誘導することを意味し、それを、FACSを利用して分析することができる。具体的には、該試料で分離したPBM C、あるいは純粋分離したNK細胞を刺激した後、脱顆粒化と比例するCD107a発現をフルオロクロム接合された抗体を利用して測定する方法を利用することができる。

【0034】

前記細胞毒性活性は、例えば、ユウロピウム蛍光染料で標識されたNK細胞を活性化させることができる標的細胞を含む培養物と培養した後、標的細胞溶解を介して排出された蛍光染料の量を、マイクロプレートリーダー (microplate reader) を利用して測定することができる。

20

【0035】

一具体例において、前記サイトカインは、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PANTES、IL-8及びIL-10のうちから選択されるものでもある。前述のようなNK細胞の免疫活性因子発現分析は、FACS、細胞内サイトカイン染色またはELISAなどを利用しても行われる。具体的には、フルオロクロム接合された特定抗体を利用してNK細胞表面を染色した後、細胞を透過性化 (permeabilization) させ、フルオロクロム接合された他の特定免疫活性因子 (例えば、IFN- γ) 抗体で、前記サイトカインなどを染色し、NK細胞内の免疫活性因子の発現を測定する方法を利用することができる。

30

【0036】

本発明の実施例によれば、サイトカイン分泌量または細胞毒性脱顆粒化程度において、患者に比べ、健常人は、2つの因子のうちさらに高く出たことを基準に、シナジー活性化を誘発した場合、2倍以上の差を示し、NK細胞のシナジー活性化を誘発した後で比較したときも、シナジー活性化されたサイトカイン分泌量または細胞毒性脱顆粒化程度の差において、2倍以上の差を示した。

【0037】

従って、一具体例において、前記正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化程度を比較する段階は、前記下位因子のリン酸化または発現程度、脱顆粒化活性、細胞毒性活性及びNK細胞刺激によって分泌されたサイトカイン分泌量程度の差が2倍以上、具体的には、2つの因子のうちさらに高く出たものを基準に、2倍以上である場合、前記試料において、NK細胞の活性が正常であると判断することができる。他の具体例において、前記NK細胞のシナジー活性化されたサイトカイン分泌量または細胞毒性脱顆粒化程度の差が2倍以下、具体的には、正常NK細胞のシナジー活性化されたサイトカイン分泌量または細胞毒性脱顆粒化程度を基準に、2倍以下である場合、前記試料において、NK細胞の活性が非正常であると判断することができる。

40

【0038】

本発明のNK細胞の活性度検査方法は、NK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断に係わる情報を提供するのにも利用される。

50

【0039】

本発明者らは、HLH患者及び膵臓癌患者において、NK細胞の活性化は、誘発されることはされるが、健常人は、シナジー活性化程度が大きい一方、前記患者は、シナジー活性で失敗するか、あるいはその程度が顕著に低いということを見い出した。特に、シナジー活性化を誘発させて比較する場合、単にNK細胞活性化を誘発させて比較することより、シナジー活性化を誘発させて比較することの方が、HLHまたは膵臓癌を診断するのに有意性を高め、さらに容易であって正確であるということ。従って、本発明のNK細胞の活性化検査方法は、非正常的なNK細胞シナジー活性を示す試料を区別し、HLH及び膵臓癌を含んだNK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断に係わる情報を提供するの

10

【0040】

一具体例において、前記NK細胞のシナジー活性と係わる疾患は、非正常的なNK細胞のシナジー活性化を示すものであり、例えば、過敏性免疫疾患、自家免疫疾患、免疫拒絶反応、免疫不全疾患、組織球症、癌、二型糖尿病、寄生虫感染疾患及びウイルス疾患でもある。前記過敏性免疫疾患は、喘息及び蓄膿症のうちから選択された1以上のものであるか、前記自家免疫疾患は、ループス、多発性硬化症(multiple sclerosis)、一型糖尿病及びリュウマチ関節炎のうちから選択された1以上のものであるか、あるいは前記組織球症は、HLH、XLP1及びXLP2のうちから選択されたいずれか1以上のものでもある。血球貪食性リンパ組織球症(HLH)は、第2群ランゲルハンス細胞組織球症、赤血球貪食性リンパ組織球増殖症(家族性、散発性)、感染関連性血球貪食症侯群、ウイルス関連性血球貪食症侯群、巨大リンパ節病を伴った組織球症、または網状組織球症の意味を含んでもよい。前記「癌」は、腫瘍、血液癌または固形癌を含む意味であり、個体のNK細胞のシナジー活性を損傷させたり、特定条件において、標的細胞としてNK細胞のシナジー活性を起こさせたりしないものを含む。一具体例において、前記癌は、肺癌、肝癌、食道癌、胃癌、大腸癌、小腸癌、膵臓癌、黒色腫、乳癌、口腔癌、脳腫瘍、甲状腺癌、副甲状腺癌、腎臓癌、子宮頸部癌、肉腫、前立腺癌、尿道癌、膀胱癌、睾丸癌、血液癌、リンパ腫、皮膚癌、乾癬及び線維腺症からなる群のうちから選択されたものでもある。一具体例において、前記癌は、膵臓癌またはB細胞腫(B cell lymphoma)でもある。一具体例において、前記ウイルス疾患は、B型肝炎でもある。一具体例において、前記免疫不全疾患は、ディ・ジョージ症候群(DiGeorge syndrome)またはチェディアック・ヒガシ症候群(Chediak-Higashi syndrome)でもある。

20

30

【0041】

前記NK細胞の活性と係わる疾患に係わる情報は、正常NK細胞対比で、実験群NK細胞のシナジー活性化が検出されない場合、非正常的なNK細胞と判断することができ、または、特定受容体に対してシナジー活性を喪失したNK細胞が、標的細胞に対して非正常的にシナジー活性を起こしたり起こさなかつたりする場合、前記標的細胞が、特定疾病と関連があると判断することができる。前記特定疾病の判断をさらに容易に行うために、前記標的細胞は、NK細胞上において区別される2以上の因子に係わる抗体、断片、及びそれらの組み合わせのうちから選択された1以上のものでコーティングする段階をさらに含んでもよい。

40

【0042】

他の様相は、NK細胞の相乗化された活性(シナジー活性)を起こす刺激物質として、前記NK細胞上において区別される2以上の因子に、それぞれまたは同時に、特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する化合物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上を含むNK細胞の活性化検査用組成物を提供する。

【0043】

一具体例において、前記NK細胞上の因子は、NKGD2D、2B4(CD244)、DNAM-1(CD226)、CD2、CD16、NKp30、NKp44、NKp46及びNKp80のうちから選択されたものでもある。

50

【0044】

一具体例において、正常NK細胞対比で、前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在を検出するために、前記組成物は、前記因子の下位因子のリン酸化または発現程度、脱顆粒化活性、細胞毒性活性及びNK細胞刺激によって分泌されたサイトカインの測定のうちから選択された1以上を検出するための抗体またはその断片をさらに含んでもよい。

【0045】

一具体例において、前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在を検出する物質は、パーフォリン、グランザイム、CD107a、CD107b、IFN- γ 、MIP-1 β 、MIP-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、PANTES、IL-8及びIL-10のうちから選択された1以上に対する抗体、断片、またはそれらの組み合わせのうちから選択された1以上のものでもある。

10

【0046】

一具体例において、前記NK細胞の活性度検査用組成物は、前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在の検出結果を視覚的に表示するための物質として、染料(dye)、蛍光染料、二次抗体、または生物学的または分子的な探針をさらに含んでもよい。

【0047】

前記組成物で言及された用語または要素において請求されたNK細胞の活性度検査方法に係わる説明で言及されたようなことは、請求されたNK細胞の活性度検査方法で言及されたところと理解される。

【0048】

さらに他の様相は、試料内のNK細胞上において区別される2以上の因子を刺激し、前記NK細胞の相乗化された活性(シナジー活性)を起こす刺激物質として、2個以上の因子に、それぞれまたは同時に、特異的な抗体またはその断片、特異的な活性を誘発する標的細胞またはポリペプチド、特異的に活性を誘導する化合物、及び可逆的または非可逆的な作用因子のうちから選択された1以上；及び正常NK細胞対比で、前記NK細胞の活性化の存在または不在を検出する物質を含むNK細胞のシナジー活性と係わる疾患の診断用キットを提供する。

20

【0049】

一具体例において、前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在を検出する物質は、パーフォリン、グランザイム、CD107a、CD107b、IFN- γ 、MIP-1 β 、MIP-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、PANTES、IL-8及びIL-10のうちから選択された1以上に対する抗体、断片、またはそれらの組み合わせのうちから選択された1以上であるか、あるいは蛍光染料でもある。前記抗体、断片、またはそれらの組み合わせは、蛍光プローブで標識されたり標識されなかったりするものでもある。前記蛍光染料または蛍光プローブは、検出しようとする対象、前記対象の組み合わせまたは個数、所望波長、検出器などの条件によって多様であり、例えば、ペリデジニクロロフィル(PerCP:peridinin chlorophyll)、フィコエリスリン(PE:phycoerythrin)、蛍光イソチオシアネート(FITC:fluorescein isothiocyanate)またはユウロピウムでもあるが、それらに制限されるものではない。本発明の実施例によれば、IFN- γ 及びTNF- α に、蛍光プローブであるFITCで標識することにより、二次的処理なしに、流動細胞計測機で、前記IFN- γ 及びTNF- α を直接検出することができる。また、本発明の実施例によれば、蛍光染料で染色した標的細胞(例えば、P815)に対するNK細胞の活性化により、前記標的細胞が溶解されて排出される蛍光染料を測定することにより、NK細胞のシナジー活性化程度を測定することができる。従って、前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在を検出する物質で蛍光染料を使用することは、細胞毒性を測定するのに、特に有利である。

30

40

【0050】

一具体例において、前記NK細胞上の因子に特異的な活性を誘発する標的細胞は、NK細胞上において区別される2以上の因子に対する抗体、断片、及びそれらの組み合わせのうちから選択された1以上のものでコーティングされたものでもある。

50

【 0 0 5 1 】

一具体例において、前記NK細胞の活性化検査用キットは、前記NK細胞のシナジー活性化の存在または不在の検出結果を視覚的に表示するための物質として、染料、蛍光染料、二次抗体、または生物学的または分子的な探針をさらに含んでもよい。

【 0 0 5 2 】

一具体例において、前記NK細胞のシナジー活性と係わる疾患は、過敏性免疫疾患、自家免疫疾患、免疫拒絶反応、組織球症、癌、二型糖尿病、寄生虫感染疾患及びウイルス感染疾患のうちから選択されたものでもある。

【 0 0 5 3 】

前記キットで言及された用語または要素において請求されたNK細胞の活性化検査方法、またはNK細胞の活性化検査用組成物に係わる説明で言及されたようなことは、前記請求された方法または組成物で言及されたところと理解される。

【 0 0 5 4 】

以下、本発明について、実施例によってさらに詳細に説明する。しかし、それら実施例は、本発明について例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲は、それら実施例によって制限されるものではない。

【 実施例 】

【 0 0 5 5 】

実施例 1 . 区別される因子であるNKG2D及び2B4の共同活性化による正常NK細胞での相乗化された活性化の存在または不在の確認

【 0 0 5 6 】

1 - 1 . NK細胞の獲得

峨山メディカルセンター、UCL Institute of Child Health及びフィラデルフィア小児病院の機関審議委員会によって承認されたプロトコル下の告知に則り、健康な供与者、及びXLP1供与者からヒト血液試料を、研究を目的として採取した。密度勾配遠心分離機（リンパ球分離培地（LSM：lymphocyte separation medium）（MP Biomedicals）を利用）により、末梢血液単核細胞（PBMCs：peripheral blood mononuclear cells）を血液試料から分離し、その過程を進める間、低温保存（cryopreserved）した。ヒトNK細胞を、従来知られているように（Sci. Signal. 5, ra49 (2012)）、NK細胞分離キット（StemCell Technologies）を利用し、陰性選択（negative selection）により、PBMCから精製した。それら細胞は、流動細胞計測法によって評価されたところにより、97ないし99%のCD3 - CD56+であった。ヒトNK細胞株であるNKL（M. Robertsonの寄贈）を10% FBS、1mMピルビン酸ナトリウム、及び200U/ml組み換えIL-2（rIL-2）で補充されたRPMI1640で培養した。NKL細胞を、rIL-2なしに、24時間、5% FBS及び0.5mMピルビン酸ナトリウムで補充されたRPMI1640で休止させた。

【 0 0 5 7 】

1 - 2 . NKG2D及び2B4の共同活性化によるNK細胞の相乗化された活性の指標としてのNF - B p65サブユニットのリン酸化

NK - Bは、先天的及び後天的な免疫反応において、調節子として重要な転写因子であり、NK - Bサブユニットp65 Ser536残基のリン酸化がなされる場合、NK細胞の活性が上昇する（Front Immunol. 2014; 5: 662）。従って、NK細胞の活性化因子でもって、一次休止期のNK細胞内のNF - B p65サブユニットのリン酸化を測定した。

【 0 0 5 8 】

NK細胞の活性化を起こす特定因子を刺激するために、下記の受容体架橋を実施した。

【 0 0 5 9 】

精製されたヒト一次NK細胞またはNKL細胞を、30分間、氷において、NK受容体（いずれも10µg/mlにおいて）に対して、NKG2D及び/または2B4に特異的であるmAbまたはイソ型対照群mAb（cIgG1）とブリンキュベーションした。

10

20

30

40

50

培地で洗浄した後、NK細胞を、37℃で、塩素抗マウスF(ab')₂二次Abで受容体架橋することによって刺激した。細胞をDPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで、37℃で10分間固定させた。その後、固定された細胞を、90%メタノールで30分間、氷で透過性化させ(permeabilize)、0.5%BSAで、室温で10分間ブロッキングした。該細胞を、Alexa Fluor 488接合された抗pS536 p65 Ab(93H1)またはイソ型対照群兔IgG(DA1E)(Cell Signaling)で染色した後、p65リン酸化について、流動細胞計測分析機を利用して分析した。

【0060】

その結果、図1から分かるように、反応する細胞の比率が、一次性NK細胞のNKGD及び2B4に結合された刺激によって相乗化されるように上昇する一方、受容体単独に係わる反応は、共同活性化された場合より顕著に小さいということが分かった。

【0061】

1-3. NKGD及び2B4の共同活性化によるNK細胞の相乗化された活性の指標としての免疫活性因子測定

NK細胞が活性化される場合、免疫活性因子(または、サイトカイン)であるIFN- γ またはTNF- α などを分泌する。従って、区別される特定因子の共同活性化により、サイトカインの分泌量が相乗化されるように増加するか否かということをもテストした。

【0062】

前述のように、NK細胞を採取し、NKGD及び/または2B4に特異的なmAbまたはイソ型対照群mAbにプリインキュベーションしたP815細胞(American Type Culture Collection)でPBMCを刺激した。その後、6時間インキュベーションし、細胞表面マーカーをCD3及びCD56で染色した。NK細胞によるサイトカイン生産を、CD3-CD56+NK細胞におけるIFN- γ またはTNF- α の細胞内発現を、流動細胞計測機でもって測定した。具体的には、PBMC、または一次休止期のNK細胞を、同一数の指定された標識細胞で、1時間37℃で刺激した。その後、ブレフェルジンA(brefeldin A)(Golgi Plug, BD Bioscience)を添加し、総6時間に対するさらなる5時間のインキュベーションを行った。その後、細胞を、4℃暗室で、30分間抗CD56-PE及び/または抗CD3-PerCP-mAbsで表面マーカーを染色した。FACS緩衝液で、2回細胞を洗浄した後、それらをBD Cytotfix/Cytoperm溶液(BD Bioscience)で、20分間暗室4℃でインキュベーションした。4℃暗室で、30分間、抗IFN- γ -FITCまたは抗TNF- α -FITC mAbで細胞内染色した前後、細胞をBD Perm/Wash緩衝液(BD Bioscience)で2回洗浄した。その後、細胞を、NK細胞に対してゲーティングし、流動細胞計測機によって分析した。

【0063】

その結果、図2から分かるように、NKGD及び2B4の共同関与(coengagement)は、免疫活性因子であるIFN- γ またはTNF- α を発現するNK細胞の比率において、相乗化された上昇を誘発するということが分かった。

【0064】

それらをいずれも総合すれば、そのような結果は、NKGD及び2B4それぞれの単一な刺激では、NF- κ B活性化をNK細胞活性に有効に刺激するのにおいて、十分ではなく、NKGD及び2B4の共同活性化を加えた場合、NF- κ B活性化に対する臨界点(threshold)を克服し、NK細胞による相乗化されたサイトカイン生成を誘発するということを示す。

【0065】

各グラフは、3回以上の独立した実験によって作製された。結果は、平均 \pm SDとして示されている。統計的分析は、GraphPad Prism softwareを利用し、両側スチューデントt-検定(two-tailed student's t-test)によって行われた。

【0066】

実施例2. 区別される因子の共同活性化によるNK細胞の相乗化された活性の指標としての細胞毒性測定

10

20

30

40

50

前記NKG2D及び2B4の共同活性化により、免疫活性因子であるIFN- またはTNF- を発現するNK細胞の比率で相乗化された上昇が誘発されるということを観察したように、相乗化された活性（シナジー活性）を測定する一方法として、細胞毒性においても、相乗化された上昇が誘発されるか否かということ进行测试した。

【0067】

P815細胞を、CD56、CD16及びNKG2D並びに/または2B4、DNAM-1及び/または2B4に特異的なmAbまたはイソ型対照群mAbでプリインキュベーションし、前記NK細胞特定受容体刺激抗体でコーティングされたP815を、ユウロピウム蛍光染料で標識した。その後、前述のように、一次性休止期NK細胞を、前記P815細胞で共に培養することによって刺激した。その後、遠心分離を介して培養液を回収し、細胞毒性の指標である標的細胞溶解（lysis）を介して排出された蛍光染料量を測定した。前記培養液内の蛍光程度は、マイクロプレートリーダーを介して分析した。

10

【0068】

その結果、図3から分かるように、CD16が例外的に単一の強い細胞毒性を誘発したが、NKG2D+2B4及びDNAM-1+2B4に刺激された場合は、それぞれ刺激された場合に比べ、相乗化された細胞毒性を誘導するということが分かった。例外的な場合もあるが、それは、特定受容体刺激（例えば、前述のように、特定受容体刺激抗体の利用）として排除することができるので、区別される2つの因子を特異的に刺激し、シナジー活性測定を実現するだけでなく、単一の刺激する場合に比べ、同時刺激して誘発されたシナジー活性がNK活性度を比較するのに顕著な差を有し、区別しやすいということを確認した。

20

【0069】

実施例3．健常人及びXLP1患者のNKG2D及び2B4の共同活性化による特定因子発現の相乗化された差を利用したNK細胞活性度比較

区別される因子NKG2D及び因子2B4を特異的に共同活性化させ、NK細胞の相乗化された活性（シナジー活性）を誘発することができることを確認した。従って、そのような相乗化された活性の存在または不在を利用し、HLH疾患であるXLP1患者を診断することができるか否かということを確認するために、特定因子発現の相乗化された差を見ることができるウエスタンブロット（western blot）を行った。

【0070】

30

3-1．XLP1患者のNK細胞獲得

前述のように、XLP1の患者からNK細胞を供与された。そこには、先天的XLP1の対象として、遺伝性SH2D1A遺伝子突然変異患者を含んでいる。患者NK細胞の供給限界のために、XLP1患者のNK細胞を、NF- κ B活性化、及び効果子（effector）機能に対する分子的信号伝達を研究するために、前述のように増殖させた。健常人である供与者のNK細胞も増殖させ、休止期を経た後、NKG2D及び2B4で刺激し、効果子機能及び信号伝達での相乗化された上昇を再生産させた。

【0071】

XLP1患者のNK細胞が、疾患の指標になるか否か、ウエスタンブロットを行った。従来の公知（Nat. Rev. Immunol. 6, 56-66 (2006)）によれば、SAPは、2B4を含み、免疫刺激による活性化信号を送信するのに要求される受容体アダプター蛋白質であるが、XLP1患者の場合、NK細胞内SAP発現量が枯渇しているか、あるいは低減していると知られている。健常人またはXLP1患者の供与者から増殖された一次性NK細胞の総溶解物を、SAP及びアクチンに対してウエスタンブロットし、その発現量を調べた結果、実験された4人のXLP1患者のうち、3人の患者が、SAP発現の完全な損失を誘発するSH2D1A遺伝子に、マクロ欠損（macrodeletion）を有しており、1人の患者は、SAP発現が低減しているが、完全に消失していないミスセンス（missense）突然変異を有していることを確認した。

40

【0072】

3-2．Erk、及びリン酸化されたp65の相乗化された発現程度の比較

50

正常NK細胞と、XLP1患者のNK細胞において、活性度差をウエスタンブロットを利用して比較した。具体的には、健常人またはXLP1患者の供与者から増殖させた後の一次性休止期NK細胞を、指定された受容体に対して特異的なmAbまたはイソ型対照群mAb(cIgG1)と共にプリインキュベーションした。2分間(p-Akt及びp-Erk1/2)及び5分間(pS536-p65及びpS276-p65)、受容体を架橋した後、溶解物を、指定されたリン酸化で免疫ブロットした。その結果、図4から分かるように、NKG2D及び2B4がそれぞれ刺激された場合、NK細胞の活性指標であるNF- γ 活性化によるp65のリン酸化が観察されることはされるが、その程度が、NKG2D及び2B4の共同活性化によるシナジーリン酸化に比べて顕著に区別されるものではない。一方、NKG2D及び2B4の共同活性化によるp65のセリン536及びセリン276のシナジーリン酸化は、XLP1NK細胞において顕著に低減するというところを確認することができる。それは、共同活性化によって誘導されたErkの相乗化されたリン酸化において、また同様に示され、XLP1NK細胞において、頂上に比べて顕著に低減しているということが分かる。従って、XLP1診断において、それぞれの区別される因子を刺激し、NK細胞の活性度を測定するより、共同活性化させた場合、その差が顕著に観察されるので、NK細胞の区別される因子を共同活性化させることによって誘発される相乗化された活性度を基準に、XLP1を診断することが有利であると分かる。

10

【0073】

実施例4. 健常人及びXLP1患者のNKG2D及び2B4の共同活性化によるIFN- γ 発現量での相乗化された差を利用したNK細胞活性比較

20

XLP1診断に区別される2つの因子の刺激による相乗化された活性(シナジー活性)を比較することがさらに有利であるか否かということ調べるために、免疫活性因子のうち一つであるIFN- γ の発現量を比較する試験を行った。具体的には、健常人またはXLP1患者の供与者から増殖させた後の一次性休止期NK細胞を、指定された受容体に特異的なmAbとプリインキュベーションしたP815細胞と混合した。6時間インキュベーションした後、CD56に対するフルオロクロム接合されたmAbで染色し、IFN- γ で細胞内染色した後、前記叙述されたように、流動細胞計測機によって分析した。

【0074】

その結果、図5から分かるように、CD16刺激は、XLP1でのNK細胞活性化において意義を有さないにしても、NKG2D及び2B4の結合された刺激によってIFN- γ を発現するNK細胞の比率が、XLP1NK細胞において顕著に低下するということが分かった。その差は、図5Bでのように、指定された受容体で刺激した後、刺激がない細胞(IFN- γ +細胞)対比で、IFN- γ +NK細胞対比で指定された受容体で刺激した後、それぞれの健常人またはXLP1患者の供与者からのIFN- γ +NK細胞の上昇百分率で測定した。NKG2D及び2B4をそれぞれ単一に刺激したことに比べ、NKG2D及び2B4の共同結合された刺激による相乗化された活性度がさらに顕著であり、明らかに差があるということが分かる。それはまた、単一な刺激後に比較することに比べ、相乗化された活性化を起こした後で比較することがさらに有為であるように判断することができるという証拠を提示する。

30

【0075】

要約すれば、前記結果は、健常人及びXLP1患者のNK細胞での遺伝的及び分子的な差が共同活性化刺激に対する結果と一致するということを証明しながら、XLP1の診断に、前記実験に適用された因子の動態を判断することが十分な根拠を有するということを示し、診断において、単一因子を刺激することに比べ、相乗化された活性化を誘発することができる2以上の因子を刺激することにより、それによる相乗化された活性度を比較することがさらに有意にXLP1を診断することができる方法になる可能性があるということを示す。それだけではなく、そこで示される特定因子(Erk)でのみ示される相乗化されたリン酸化、特定受容体組み合わせ(NKG2D及び2B4)による相乗化された活性化結果は、特定受容体の特異的な共同活性化を介して、少なくともXLP1、及び関連臨床予後予測を診断するのに適するということを示す。

40

50

【0076】

各グラフは、3回以上の独立した実験によって作製された。結果は、平均±SDとして示されている。統計的分析は、GraphPad Prism softwareを利用し、両側スチューデントt-検定によって行われた。

【0077】

実施例5．健常人及びXLP1患者のNKGD2及び2B4の共同活性化による脱顆粒化での相乗化された差を利用したNK細胞活性比較

NK細胞の活性指標のうち一つの脱顆粒化と比例するNK細胞表面でのCD107aの発現程度を測定することにより、区別される2つの因子の刺激によって発生する相乗化された効果の差において、XLP1を診断することができるか否かということ調べた。

10

【0078】

NK細胞の脱顆粒化は、細胞表面のCD107a発現及びグランザイムB放出(BioLegend)によって評価した。要約すれば、前述のように、健常人及びXLP1患者の一次性休止期NK細胞を増殖させた後、フルオロクロム接合された抗CD107a mAb存在下で、指定された受容体に対して、特異的なmAbとプリインキュベーションしたP815と混合した。その後、2時間インキュベーションし、細胞を流動細胞計測機を利用して分析した。具体的には、30×gで、3分間スピンドウンし、37℃で2時間インキュベーションし、さらにスピンドウンした。細胞ペレット(pellet)を、FACS緩衝液(2%FBSを含むPBS)に再懸濁し、抗CD56-PEで、4℃で30分間暗室で染色した。リンパ球を、前方散乱(forward scatter)/側傍散乱(side scatter)でゲーティングし、NK細胞におけるCD107a発現を、流動細胞計測機及びFlowJo softwareでもって分析した。

20

【0079】

その結果、図6Aから分かるように、CD16を刺激した場合には、相乗化された活性度の一側面である脱顆粒化において、正常NK細胞と顕著な差が観察されなかったが、NKGD2及び2B4の結合された刺激によっては、顕著な差が示される脱顆粒化が誘導されるということを観察することができる。ここでまた、前記免疫活性因子であるIFN-γを測定した場合と同様に、NKGD2及び2B4をそれぞれ単一に刺激して比較するより、共同活性化による相乗化された活性度を誘発した後、その顕著な差の存在または不在を判断することが、診断方法としてさらに有意に意義を有するということが分かる。それは、刺激がない細胞であるCD107a+細胞対比で、CD107a+NK細胞の百分率を示す図6Bグラフでさらに明らかに確認することができる。

30

【0080】

実施例6．NKGD2及び2B4の共同活性化によるNK細胞活性の特異性評価

NKGD2/2B4組み合わせを利用したシナジー測定が、他の細胞においても、NK細胞にだけ特異的であるか否かということを確認するために、NK細胞の活性指標のうち一つである脱顆粒化と比例するNK細胞表面におけるCD107aの発現程度を測定した。

【0081】

具体的には、健常人の単核球(PBMC)を、フルオロクロム接合された抗CD107a mAb存在下で、指定された受容体に対して特異的なリガンド(NKGD2に対してULBP1、及び2B4に対してCD48)を発現するP815細胞と混合した。その後、実施例5でのように、各細胞ペレットを得て再懸濁し、抗CD3-PerCP、抗CD56-PEで、4℃で30分間、暗室で染色した。リンパ球を、前方散乱/側傍散乱でゲーティングし、NK細胞(CD3-CD56+)、NKT細胞(CD3+CD56+)、T細胞(CD3+CD56-)、残り細胞(CD3-CD56-)のCD107a発現を、流動細胞計測機及びFlowJo softwareでもって分析した。

40

【0082】

その結果、図7から分かるように、NKGD2及び2B4を、それぞれ単一に刺激した場合には、NK細胞を含んだ他の細胞いずれにおいても、脱顆粒化が観察されなかったが

50

、NK G2D及び2B4の結合された刺激によっては、NK細胞特異的に顕著な差を示す脱顆粒化が誘導されるということを観察することができた。従って、NK G2D及び2B4をそれぞれ単一に刺激して比較するより、共同活性化による相乗化された活性度を誘発すれば、NK細胞に特異的に活性化を誘導し、診断方法として、さらに有意に意義を有するということが分かる。

【0083】

実施例7．癌患者におけるNK G2D及び2B4の共同活性化によるNK細胞シナジー活性比較

NK G2D / 2B4 組み合わせを利用したシナジー測定が、癌診断に適用可能であるか否かということ調べるため、膵臓癌患者試料を利用し、NK細胞の活性指標のうち一つである脱顆粒化と比例するNK細胞表面でのCD107aの発現程度を測定した。

10

【0084】

具体的には、健常人及び膵臓癌患者の単核球(PBMC)を、フルオロクロム接合された抗CD107a mAb存在下で、指定された受容体に対して特異的なリガンド(NK G2Dに対してULBP1、及び2B4に対してCD48)を発現するP815細胞と混合した。比較群として、NK細胞活性度測定に活用される血液癌細胞株であるK562を使用した。その後、実施例5のように、各細胞ペレットを得て再懸濁し、抗CD3-PerCP、抗CD56-PEで、4で30分間、暗室で染色した。リンパ球を、前方散乱/側傍散乱によってゲーティングし、NK細胞(CD3-CD56+)におけるCD107a発現を、流動細胞計測機及びFlowJo softwareでもって分析した。

20

【0085】

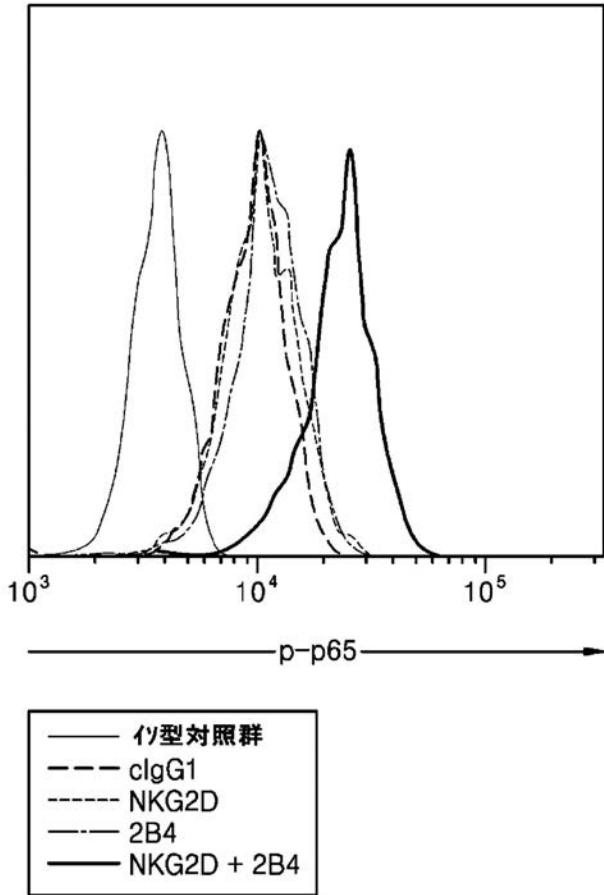
その結果、図8から分かるように、NK G2D及び2B4の結合された刺激によっては、健常人と膵臓癌患者とで顕著な差が示されるNK細胞の脱顆粒化が誘導されるということを観察することができ、従って、NK G2D / 2B4 組み合わせを利用したシナジー測定が、癌診断に適用可能であるということが分かる。

【0086】

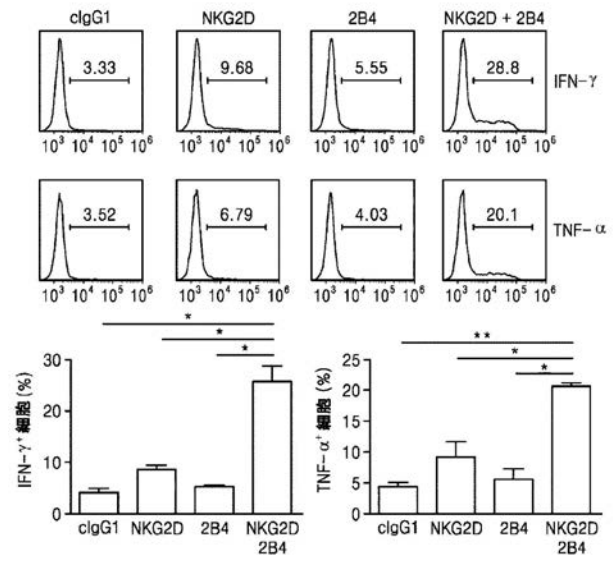
特異的なことは、比較群であるK562でNK細胞を刺激した場合には、NK G2D及び2B4を特異的に刺激した場合と異なり、健常人と膵臓癌患者とにおいて、NK細胞の脱顆粒化誘導に特に差がないということが分かった。従って、NK G2D及び2B4の結合された刺激のように、NK細胞上に特異的な因子の刺激によるシナジー活性化は、K562を使用するより、NK細胞活性度診断方法としてさらに有意に意義を有するということが分かる。

30

【 图 1 】

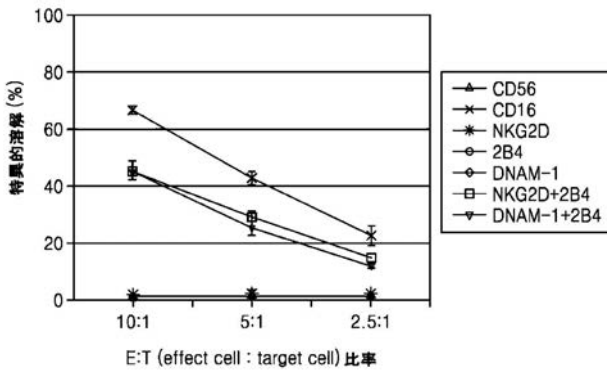


【 图 2 】

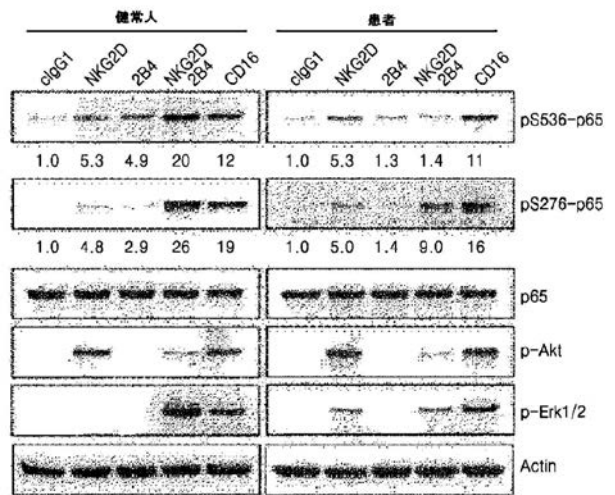


【 图 3 】

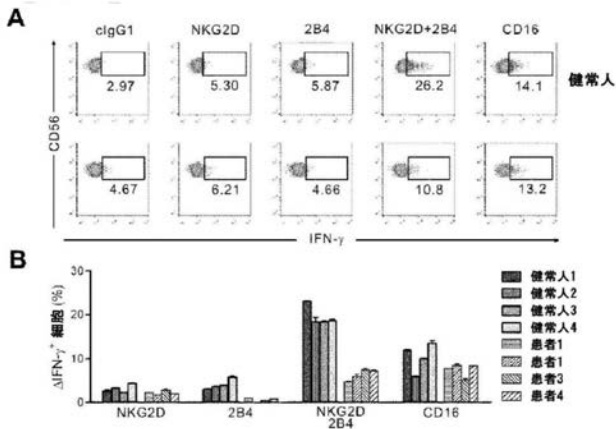
休止期NK逆抗体依存的细胞特性
(reverse antibody-dependent cellular cytotoxicity: rADCC)-P815



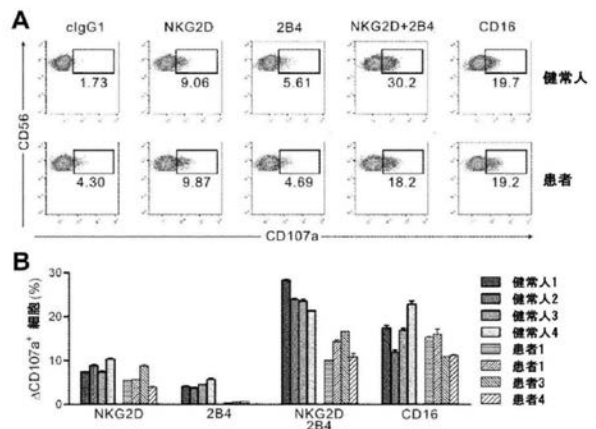
【 图 4 】



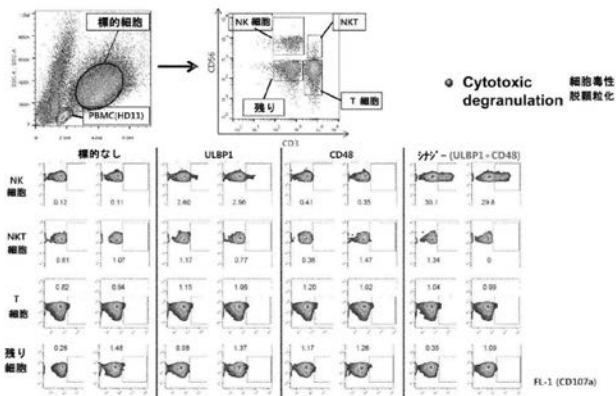
【 図 5 】



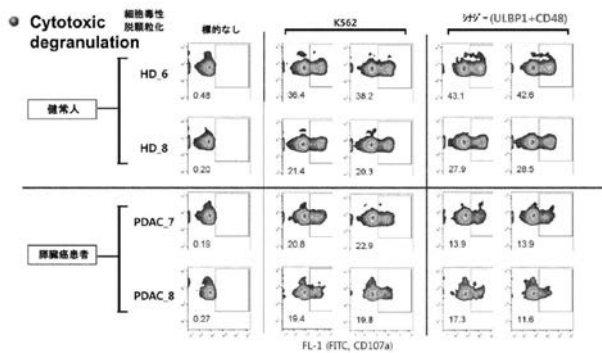
【 図 6 】




【 図 7 】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2017/002870
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/68; C12Q 1/02; G01N 21/64; G01N 33/574 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: NK cell, synergy vitalization, NK.G2D, 2B4, cytokine, cancer		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM et al., "Synergistic Signals for Natural Cytotoxicity Are Required to Overcome Inhibition by c-Cbl Ubiquitin Ligase", <i>Immunity</i> , Vol. 32, pages 175-186 (2010) See abstract; pages 176, 182-184; figures 1-2.	1-19
X	KWON et al., "Signaling for Synergistic Activation of Natural Killer Cell", <i>Immune Network</i> , Vol. 12, No. 6, pages 240-246 (2012) See abstract; pages 240-243.	1-19
X	LONG et al., "Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition", <i>Annual Review of Immunology</i> , Vol. 31, pages 227-258 (2013) See abstract; page 235; figure 2.	1-19
A	KR 10-2013-0032410 A (ATGEN CO., LTD.) 01 April 2013 See the entire document.	1-19
A	US 2012-0258476 A1 (SHEIKH et al.) 11 October 2012 See the entire document.	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 <p style="text-align: center;">23 JUNE 2017 (23.06.2017)</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">26 JUNE 2017 (26.06.2017)</p>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members


International application No.

PCT/KR2017/002870

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0032410 A	01/04/2013	CA 2826053 A1	23/08/2012
		CN 103370622 A	23/10/2013
		EP 2676139 A2	25/12/2013
		JP 2014-510517 A	01/05/2014
		KR 10-1438573 B1	12/09/2014
		KR 10-2012-0093002 A	22/08/2012
		US 2014-0017713 A1	16/01/2014
		WO 2012-110878 A2	23/08/2012
		WO 2012-110878 A3	31/01/2013
		US 2012-0258476 A1	11/10/2012
CA 2682661 C	14/03/2017		
EP 2139498 A2	06/01/2010		
EP 2139498 B1	18/03/2015		
US 2009-0162389 A1	25/06/2009		
US 8153120 B2	10/04/2012		
US 8540982 B2	24/09/2013		
WO 2008-118369 A2	02/10/2008		
WO 2008-118369 A3	11/12/2008		

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/002870

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68; C12Q 1/02; G01N 21/64; G01N 33/574		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: NK 세포, 시너지 활성화, NKG2D, 2B4, 시토킨, 암		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM 등, 'Synergistic signals for natural cytotoxicity are required to overcome inhibition by c-Cbl ubiquitin ligase' Immunity, Vol.32, pages 175-186 (2010) 요약; 페이지 176, 182-184; 도 1-2 참조.	1-19
X	KWON 등, 'Signaling for synergistic activation of natural killer cell' Immune Network, Vol.12, No.6, pages 240-246 (2012) 요약; 페이지 240-243 참조.	1-19
X	LONG 등, 'Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition' Annual Review of Immunology, Vol.31, pages 227-258 (2013) 요약; 페이지 235; 도 2 참조.	1-19
A	KR 10-2013-0032410 A ((주)에이티젠) 2013.04.01 전체 문헌 참조.	1-19
A	US 2012-0258476 A1 (SHEIKH 등) 2012.10.11 전체 문헌 참조.	1-19
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 06월 23일 (23.06.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 06월 26일 (26.06.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371	

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/002870

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0032410 A	2013/04/01	CA 2826053 A1 CN 103370622 A EP 2676139 A2 JP 2014-510517 A KR 10-1438573 B1 KR 10-2012-0093002 A US 2014-0017713 A1 WO 2012-110878 A2 WO 2012-110878 A3	2012/08/23 2013/10/23 2013/12/25 2014/05/01 2014/09/12 2012/08/22 2014/01/16 2012/08/23 2013/01/31
US 2012-0258476 A1	2012/10/11	CA 2682661 A1 CA 2682661 C EP 2139498 A2 EP 2139498 B1 US 2009-0162389 A1 US 8153120 B2 US 8540982 B2 WO 2008-118369 A2 WO 2008-118369 A3	2008/10/02 2017/03/14 2010/01/06 2015/03/18 2009/06/25 2012/04/10 2013/09/24 2008/10/02 2008/12/11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(72)発明者 キム, フン シク

大韓民国 05118 ソウル, クァンジン - グ, クァンナル - 口 56 - ギル, 32, 201 - 501

(72)発明者 ミョン, スン チェ

大韓民国 06215 ソウル, カンナム - グ, ヨクサム - 口, 309, 103 - 601

(72)発明者 キム, ソン チョル

大韓民国 05507 ソウル, ソンパ - グ, オリンピック - 口, 435, 221 - 2002

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36

专利名称(译)	使用受体协同活性测试NK细胞活性的方法，以及使用它测定与NK细胞活性相关的疾病的诊断方法		
公开(公告)号	JP2019518226A	公开(公告)日	2019-06-27
申请号	JP2019514696	申请日	2017-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人峨山社会福祉财团		
申请(专利权)人(译)	邱阿旻基金会		
发明人	キム,フン シク ミヨン,スン チェ キム,ソン チョル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36		
优先权	1020160063735 2016-05-24 KR 1020170033207 2017-03-16 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

特异性刺激样品中NK细胞的两个或多个不同因子的步骤，测量NK细胞协同激活程度以及与正常NK细胞相比的NK细胞协同激活程度的步骤 本发明涉及一种与包含所述组合物的NK细胞的活性进行比较的步骤，以及用于测试NK细胞活性的组合物，所述疾病涉及与包含所述组合物的NK细胞的协同活性相关的疾病。 它涉及诊断试剂盒。 [选择图]图5

