

(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2006-34294
(P2006-34294A)

(43) 公開日 平成18年2月9日(2006.2.9)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	4 B 0 6 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 O 5 4 H 0 4 5
A 61 P 37/02 (2006.01)	A 61 P 37/02	

審査請求 有 請求項の数 43 O L (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-223497 (P2005-223497)	(71) 出願人	592104782 ザ・トラスティーズ・オブ・コランビア・ ユニバーシティー・イン・ザ・シティー・ オブ・ニューヨーク THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100- 27、ニューヨーク、ウエスト・ワンハン ドレッドシックスティーンス・ストリート ・アンド・ブロードウェイ (番地無し)
(22) 出願日	平成17年8月1日 (2005.8.1)		
(62) 分割の表示	特願2003-118461 (P2003-118461) の分割		
原出願日	平成4年11月16日 (1992.11.16)		
(31) 優先権主張番号	792,728	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(32) 優先日	平成3年11月15日 (1991.11.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】モノクローナル抗体5c8が特異的に結合するタンパク質

(57) 【要約】

【課題】ATCC受付番号HB10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体に関する技術を提供する。

【解決手段】ATCC受付番号HB10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質に結合することが可能なモノクローナル抗体を提供する。この発明はまたATCC受付番号HB10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識される単離タンパク質を提供する。この発明は、さらに、ATCC受付番号HB10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質をコードする単離核酸分子を提供する。この発明はまたB細胞に接触依存性ヘルパー機能を本質的に付与し得るD1.1と呼ばれるATCC受付番号CRL10915のヒトCD4+T細胞白血病細胞を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

活性化された T 細胞の表面上に位置する、抗原 5c8 に特異的に結合して複合体を形成するモノクローナル抗体であって、該抗原 5c8 が ATCC 受付番号 HB10916 を有するハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c8 が特異的に結合する抗原であるモノクローナル抗体。

【請求項 2】

該活性化された T 細胞が T 細胞ヘルパー機能を有する CD4+T 細胞である請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

該モノクローナル抗体が複合体の形成によって B 細胞の T 細胞活性化を阻害する請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

該 B 細胞が休止 B 細胞である請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

該 B 細胞が感作 B 細胞である請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

該モノクローナル抗体が、ATCC 受付番号 HB10916 を有するハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c8 が特異的に結合するエピトープに特異的に結合する請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

該モノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

該モノクローナル抗体がヒトモノクローナル抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

該モノクローナル抗体がキメラモノクローナル抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

該モノクローナル抗体がヒト化モノクローナル抗体である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 11】

該モノクローナル抗体が治療剤に結合している請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 12】

該治療剤が放射性同位体、毒素、トキソイド又は化学療法剤である請求項 11 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 13】

該モノクローナル抗体が検出可能なマーカーで標識された請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 14】

該検出可能なマーカーが放射性同位体、酵素、色素、又はビオチンである請求項 13 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 15】

該モノクローナル抗体が画像形成剤と結合している請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項 16】

該画像形成剤が放射性同位体である請求項 15 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を包含する、動物におけるB細胞の活性化を抑制するための薬学的組成物。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物におけるB細胞活性化抑制用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 20】

該B細胞が休止B細胞である請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

該B細胞が感作B細胞である請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、自己免疫疾患に罹患した動物における自己免疫応答抑制用組成物の製造に使用する方法。

【請求項 23】

該自己免疫疾患が慢性関節リュウマチ、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、真性糖尿病又は薬物誘発自己免疫疾患である請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

該薬物誘発自己免疫疾患が薬物誘発ループスである請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物における体液性免疫応答抑制用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物における免疫応答抑制用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、移植臓器を受けた動物における臓器拒絶抑制用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 28】

移植臓器が腎臓、心臓又は肝臓である請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物におけるアレルギー応答抑制用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 30】

該アレルギー応答が枯草熱又はペニシリンアレルギーである請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物におけるT細胞腫瘍細胞の増殖抑制用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物のT細胞のHTLV-Iウイルス感染抑制用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 33】

請求項 15 又は 16 に記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物におけるT細胞腫瘍細胞の像形成用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 34】

請求項 13 又は 14 に記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体を、動物におけるT細胞腫瘍細胞の存在の検出用薬学的組成物の製造に使用する方法。

【請求項 35】

ATCC受付番号HB10916を有するハイブリドーマによって產生されるモノクロ-

10

20

30

40

50

ナル抗体 5 c 8 が特異的に結合するタンパク質を発現する T 細胞腫瘍細胞を血液試料が宿しているかどうかを決定するインピトロ方法であって、該方法が、

(a) 血液試料を、該モノクローナル抗体と該血液試料中の可溶性タンパク質との複合体の形成を許容する条件下で、請求項 13 又は 14 に記載のモノクローナル抗体及び薬学的に許容される担体と接触させ、

(b) 形成したモノクローナル担体 / タンパク質複合体の存在を検出して、この複合体の存在で血液試料中の T 細胞腫瘍細胞の存在を指示させることを包含する方法。

【請求項 3 6】

該 T 細胞腫瘍が T 細胞白血病である請求項 3 1、3 3、3 4 又は 3 5 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 3 7】

前記 T 細胞腫瘍が T 細胞リンパ腫である請求項 3 1、3 3、3 4 又は 3 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

動物が哺乳類である請求項 1 9 乃至 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 9】

哺乳類がヒトである請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

A T C C 受付番号 H B 1 0 9 1 6 を有するハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体 5 c 8 をコードする単離核酸分子。 20

【請求項 4 1】

A T C C 受付番号 H B 1 0 9 1 6 を有するハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体 5 c 8 から誘導されるポリペプチドをコードする単離核酸分子。

【請求項 4 2】

該ポリペプチドが軽鎖タンパク質又は重鎖タンパク質である請求項 4 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 4 3】

該核酸分子が D N A 分子である請求項 4 1、4 2 又は 4 3 のいずれかに記載の単離核酸分子。 30

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

[発明の属する技術分野]

【0 0 0 2】

ここで開示される発明は、国立衛生研究所からの助成金第 P01-AI-26886、R0-1-AI-1496 9、R0-1-CA-55713、及び免疫学養成助成金 (Immunology Training Grant) AI-07132 による研究でなされたものである。従って、合衆国政府は、この発明に一定の権利を有する。

【従来の技術】

【0 0 0 3】

[本発明の背景]

この出願の全体を通じて、種々の報告が、括弧内の著者の名字及びこれに続く報告年によって参照されている。これらの報告に対する全参考文献は、明細書の最後、即ち請求の範囲のすぐ前にある。本出願で開示され、クレームされた本発明の期日における当分野の状態をより完全に説明するために、これらの報告の開示内容は、参考文献によって本出願中に含まれる。

【0 0 0 4】

[背景技術]

「T 細胞ヘルパー機能」といわれる接触依存性プロセスにおいて、C D 4⁺ T リンパ球は、B 細胞を活性化及び分化させ、これによって抗体分子の特異性、分泌及びアイソタイ

30

40

50

エンコード機能を調節することにより体液性免疫応答を認識している (Mitcheら, 1968; Michison, 1971; Whiteら, 1978; Reinherzら, 1979; Janewayら, 1988; O'Brienら, 1988; Rahemtullaら, 1991; 及び Grusbyら, 1991)。T細胞ヘルパー機能の接触依存性要素を媒介するT細胞表面分子はまだ完全にはわかっていない (Noelleら, 1991)。

【0005】

T細胞がB細胞を補助し、分化させるプロセスは、2つの異なったフェーズ、即ち誘導フェーズ及びエフェクターフェーズに分けられる (Vitettaら, 1989; Noelleら, 1990)。誘導フェーズにおいて、増殖していないT細胞は、抗原感作されたB細胞に接触し、この結合は、クローン型のT細胞レセプター (TCR) - CD4複合体をB細胞上のIa / Ag複合体と相互作用させる (Janewayら, 1988; Kaizら, 1973; Zinkernagel, 1976; Sprent, 1978a; Sprent, 1978b; Jonesら, 1981; Juliusら, 1982; Chestnutら, 1981; Rogozinskiら, 1984)。Ia / AgのTCR / CD4認識は、安定なT-B連結相互作用対 (cognate pairs) の形成並びに両方向のT及びB細胞活性化で起こる (Sandersら, 1986; Snowら, 1983; Krusemeierら, 1988; Noelleら, 1989; Bartlettら, 1989; Kupferら, 1987)。エフェクターフェーズにおいて、活性化されたT細胞は、リンフォカインを分泌することによって (Noelleら, 1983; Thompsonら, 1985)、及び接触依存性の刺激によって (Noelleら, 1989; Clementら, 1984; Crowら, 1986; Brianら, 1988; Hirohataら, 1988; Joverら, 1989; Whalenら, 1988; Pollokら, 1991; Bartlettら, 1990) B細胞を分化させる。これらは両方とも、T細胞が小さな増殖していないB細胞を最終的に Ig分泌細胞に分化させるのに必要である (Clementら, 1984; Martinezら, 1981; Anderssonら, 1980)。

T細胞が補助する誘導フェーズはAg - 依存性及びMHC - 制限性であるが (Janewayら, 1988; Katzら, 1973; Zinkernagle, 1978a; Sprent, 1978a; Jonesら, 1981; Juliusら, 1982; Chestnutら, 1981; Anderssonら, 1980) T細胞ヘルパー機能のエフェクターフェーズは、Ag - 独立性及びMHC - 非制限性であり得る (Clementら, 1984; Hirohataら, 1988; Whalenら, 1988; Anderssonら, 1980; DeFrancoら, 1984; Juliusら, 1988a; Juliusら, 1988b; Riedelら, 1988; Owens, 1988; Cambierら, 1988; Tohmaら, 1991; Lohoffら, 1977)。追加の対照的な性質は、T細胞が補助する誘導フェーズが、しばしばCD4分子を必要とし、抗-CD4 mAbによって阻害されることである (Rogozinskyら, 1984)。これに対して、ヘルパーエフェクター機能は、CD4分子を必要とせず (Friedmanら, 1986)、抗-CD4 mAbによって阻害されない (Brian, 1988; Hirohataら, 1988; Whalenら, 1988; Tohmaら, 1991)。非特異的なヘルパーエフェクター機能は、抗原特異的な連結相互作用対を伴ったT-B細胞相互作用の局剤化する性質によって、特異的なB細胞標的上に集められると信じられている (Bartlettら, 1989; Kupferら, 1987; Pooら, 1988)。

【0006】

B細胞分化の終末は、接触及びリンフォカインの両方で媒介されたT細胞からの刺激を必要とするが、B細胞分化の中間段階は、分泌されるファクターを欠いた状態で活性化されたT細胞表面によって誘導されうる (Crowら, 1986; Brianら, 1988; Sekitaら, 1988; Hodgkinら, 1990; Noelleら, 1991; Kubotaら, 1991)。B細胞に関するこれらの中間体効果には、表面CD23発現の誘導 (Crowら, Joverら, 1989; Crowら, 1989)、細胞分裂の進行に伴った酵素の誘導 (Pollokら, 1991) 及びリンフォカインに対する応答性の誘導 (Noelleら, 1989; Pollokら, 1991; Tphmaら, Hodgkinら, 1990; Noelleら, 1991; Kubotaら, 1991) が含まれる。B細胞を活性化させる活性化誘導T細胞表面分子は同定されていないが、機能性の研究は、これらの誘導及び生化学の幾つかの特徴を示している。第一に、T細胞は、B細胞を4~8時間刺激し、ついで活性化する能力を身につけている (Bartlettら, 1990; Tohmaら, 1991)。第二に、活性化されたT細胞の表面に関連づけられるB細胞刺激活性は、パラホルムアルデヒド固定細胞上 (Noelleら, 1989; Crowら, 1986; Pollokら, 1991; Tohmaら, 1991; Kubotaら, 1991)、及び精製された膜フラグメント上 (Hodgkinら, 1990; Martinezら, 1981) で保持される。第三に、B細胞刺激活性

は、プロテアーゼ処理に対して敏感である (Noelleら, 1989; Sekitaら, 1988; Hodgkinら, 1990)。第四に、これらの表面活性構造を取得し、次いでT細胞活性化を起こすプロセスは、シクロヘキサミドによって阻害される (Tohmaら, 1991; Hodgkinら, 1990)。これらの研究は、B細胞に接触依存性刺激を伝達する活性化誘導T細胞表面タンパク質の存在を強く示唆しているが、このような構造の分子の同一性は、まだ不明のままである。

【0007】

表面CD23分子を発現し、レクチンの存在下でB細胞の終末分化を補助するようにB細胞を活性化するというユニークで機能的な可能性を有するCD4⁻¹Jurkatサブクローニング(D1.1)の単離は、以前に報告されている (Yellinら, 1991)。Jurkat D1.1は、多数の関連のないドナーからのB細胞を活性化し、このD1.1の効果が、Ag独立性であり、MHC非制限性であることを示唆した。Jurkat D1.1で媒介されるB細胞の活性化のメカニズムは、細胞-細胞接触か、又は細胞がかなり近接することに依存することが見い出されている。これは、パラホルムアルデヒド固定D1.1細胞であるがファクターを分泌しないものが、B細胞CD23を誘導する能力を有しているためである。加えて、B細胞上のD1.1の効果は、抗-IL4抗体によって阻害されない。更に、B細胞上のD1.1の効果は、IL-4の効果から明瞭である。これは、D1.12ではなく、rIL-4からB細胞表面IgM(sIgM)の上方調節を誘導するからである (Yellinら, 1991; Shieldsら, 1989)。まとめて考えると、これらのデータは、Jurkat D1.1及び活性化されたCD4⁺T細胞が、T細胞によって補助される接触依存性要素をB細胞に与える表面構造を分担していることを示唆している。

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本出願において、ネズミIgG2a 2mAb(5c8)が生成され、これは、D1.1で媒介されたB細胞活性化を阻害し、及びD1.1の表面からの、新規な30キロダルトン(kD)の非スルフィド結合性タンパク質をイムノプレシピテーションさせる。通常のT細胞では、5c8抗原は、活性化されたCD4⁺T細胞上で、mRNA及びタンパク質合成に要求されるよりも幾分過渡的に発現される。機能性の研究では、mAb 5c8はB細胞の活性化及び終末分化を媒介するT細胞の能力を阻害する。まとめて考えると、これらのデータは、5c8Agが、B細胞分化のための接触依存性刺激を媒介する活性化誘導T細胞表面構造の重要な成分であることを示している。

【課題を解決するための手段】

【0009】

〔本発明の概要〕

本発明は、ハイブリドーマ(ATCCアクセス番号HB10916)から生産されるモノクローナル抗体5c8によって特異的に認識されるタンパク質に結合することができるモノクローナル抗体を提供する。本発明は、またハイブリドーマ(ATCCアクセス番号HB10916)によって生産されるモノクローナル抗体5c8も提供する。

【0010】

本発明は、D1.1(ATCCアクセス番号HBCRL10915)と称されるヒトCD4T細胞白血病細胞株であって、接触依存性ヘルパー機能を構造的にB細胞に与えるものを提供する。本発明はまた、活性化されたT表面から単離されたタンパク質も提供する。ここで、該タンパク質は、T細胞がB細胞を活性化するために必要なものである。本発明は、更に活性化されたT細胞表面から単離された安定なタンパク質を提供する。ここで、該タンパク質は、T細胞がB細胞を活性化するために必要なものである。

【0011】

本発明は、更にハイブリドーマ(ATCCアクセス番号HB10916)から生産されるモノクローナル抗体5c8によって特異的に認識されるタンパク質をエンコーディングする単離された核酸分子を提供する。このハイブリドーマについてのATCCアクセス番号HB10916及びD1.1についてのATCCアクセス番号HBCRL10915は、いずれも

ブダペスト条約に基づくATCCへの国際寄託の受託番号である。

【発明の実施の形態】

【0012】

〔図面の説明〕

図1.CD4⁻Jurkat D1.1の細胞表面の表現型。CD4⁻Jurkat D1.1とCD4⁺B2.7の蛍光ヒストグラム(FACS)分析の結果を示した。Y軸は細胞数を、X軸は相対蛍光強度を表す。使用したmAbは:OKT3(抗CD3)、OKT4(抗CD4)、W6/32(抗MHC I)である。“コントロール”は一次mAb非存在下でのバックグラウンド染色(強度)を示す。

【0013】

図2.Jurkat D1.1は休止Bリンパ球上でCE23の発現を誘導する。単独で、あるいはCD4⁻Jurkat(D1.1)、もしくはCD4⁺Jurkat(B2.7)と共に24時間培養した後の、粘性を失った高密度B細胞の2色FACS分析の結果を示す。分析には抗IgM-FITCもしくは抗CD20(Leu-16)-FITC(X軸上)と抗CD23-PE(Y軸上)(Becton-Dickinson)を用いた。各ヒストグラムの右上に示した数値は、両分子を発現するゲートされた(gated)全細胞の割合を表す。Jurkat D1.1で培養したB細胞ポピュレーションは、B2.7(16%のIgM⁺細胞と16%のCD20⁺細胞)で培養したB細胞と比較してIgM⁺細胞の66%、CD20⁺細胞の69%でCD23を発現した。本実験では、単色FACSは、CD3(OKT3)⁺2%、IgM⁺84%、CR2(HB-5)⁺84%およびCD(Leu-16)⁺87%となる小さな高密度B細胞のポピュレーションを示した。

【0014】

図3.D1.1に誘導されたCD23発現の投与応答。種々の割合のD1.1、B2.7細胞または細胞上清と共に24時間培養した後に、CD23を発現するIgM⁺細胞の割合を示す。実験の条件と2色FACS分析は、図2に示す通りである。凡例では、 2×10^5 細胞に添加されるJurkatsの比率を図示するように変化させたことを除いた。上清は、 1×10^5 D1.1もしくはB2.7細胞をIscove's改良Dulbecco培地/10%FCS 1mL中で培養し、48時間後に採取した。またその後B細胞へ添加する前に0.2m μ のフィルターを通した。IgM⁺細胞のCD23発現のバックグラウンドの値(B細胞のみ)は、12%であった。B細胞ポピュレーションは、本実験ではIgM⁺が65%であった。

【0015】

図4.この図は、PHA存在下でJurkat D1.1がB細胞の増殖を誘導することを示す。rIL-2(25U/mL)、rIL-4(25U/mL)、PHA(5ug/mL)またはコントロール培地の指示された組み合わせの存在下で、マイトイシン-C処理されたJurkat細胞と共に培養したB細胞の[³H]チミジンの取り込みを示す。エラーバーは、3回の培養の平均値の標準偏差を示す。

【0016】

図5.Jurkat D1.1は、Ig分泌細胞へのB細胞の分化を誘導する。A.PWM欠乏下で、B細胞に対して指示された割合のJurkat D1.1もしくはB2.7により誘導されるB細胞 10^5 個当りのブラーク形成コロニーの数。B.1A)と同様の実験から得られた上清中のIgG。E⁻細胞は、Eロセッタ(rosette)がなく、粘着性がない高密度のパーコールポピュレーションであり、それは優勢なB細胞である。E⁺細胞は、Eロセッタがポジティブで、マイトイシンC処理した休止T細胞である。Igの測定は定量サンドイッチELISA法により行った。エラーバーは標準曲線を基に計算された標準偏差を表す。

【0017】

図6.D1.1ではなくrIL-4がB細胞のsigM発現を増加させた。図3と同様の実験の結果得られた2色FACS分析を示す。示された抗IL-4の濃度は1.25 μ g/mLであり、rIL-4は50U/mLである。IgMのメジアンチャンネル蛍光(median channel fluorescence)は右のカラムで示す。

【0018】

図7.mAb 5c8のJurkat D1.1細胞への結合。CD4⁻Jurkat D1.1とCD4

10

20

30

40

50

[†]Jurkat B 2.7細胞の蛍光ヒストグラム分析(FACS)を示す。Y軸は細胞数を示し、X軸は相対蛍光強度を示す。用いたmAbは:OKT3(抗CD3)、OKT4(抗CD4)、OKT8(抗CD8)、W6/32(抗MHC I)およびmAb 5c8である。FITCはコントロールmAbとマッチしたアイソタイプのバックグラウンド染色(強度)を表す。

【0019】

図8.mAb 5c8は、Bリンパ球によりCD23の発現を誘導するJurkat D 1.1を阻害する。培地のみ、B2.7もしくはD1.1 Jurkat クローンを加えた培地を24時間培養し、粘性を失った高密度B細胞の2色FACS分析を示す。そしてここでは、抗IgM-FITC(X軸)または抗CD23-PE(Y軸)を用いた。FACSトレーシング(tracing)の右上の数値は、CD23を発現するIgM⁺細胞の割合を表す。mAb W6/32は1μg/ml存在し、mAb 5c8はハイブリドーマの上清を200倍希釈したものである。ネズミのIgG2a mAb W6/32は、クラスI MHC分子上の同一構造決定基(monomorphic determinant)を認識する。

【0020】

図9.mAb 5c8とコントロールmAbにより免疫沈降した表面蛋白のSDS/PAGE分析。2-MEの存在下(還元基、R)または非存在下(非還元基、NR)において12.5%のポリアクリルアミドにて分離された、表面をヨウ素処理したJurkat D 1.1、Jurkat B 2.7細胞の細胞溶解物由来のmAb 5c8またはコントロールのmAbとの免疫沈降物のオートラジオグラムを示す。示されたmAbは、抗CD28(KOLT-4)と抗MHCクラスI(W6/32)である。分子量マーカーは、ラベル処理前のスタンダードの移動度を表す。NMS:正常マウス血清。

【0021】

図10.T細胞の活性化と活性化されたT細胞の抗原5c8の発現における代謝的阻害因子の影響。示されているようにmAb 5c8もしくは抗CD69を用い、休止状態または活性化状態のT細胞のFACSヒストグラムを表す。T細胞の活性は、アクチノマイシンD(10μM)もしくはシクロヘキサミド(100μM)存在下に5時間放置後、PMA(10ng/ml)、PHA(10μg/ml)により測定した。

【0022】

図11.単離されたCD4⁺、CD8⁺T細胞サブセット上での5c8の発現のカインティクス。直前に精製調製したT細胞サブセットをPHA(10μg/ml)、PMA(10ng/ml)で活性化した後の、CD4⁺細胞(a, b, c)またはCD8⁺細胞(d, e, f)の示された時間毎蛍光ヒストグラムを示す。実線:5c8の結合;破線:IgG2aコントロール;点線:抗CD69。

【0023】

図12.D1.1は、B細胞上での表面CD23の発現を誘導し、RAMOS 266でも幾つか発現を誘導する。それはmAb 5c8(抗T-BAM)またはmAb G28-5(抗CD40)により阻害される。図示されるようにJurkatクローンD1.1もしくはB2.7との培養後の、B細胞(左のカラム)もしくはRAMOS 266(右のカラム)のY軸上の抗CD23PEとX軸上の抗IgM-FITCの2色のFACSヒストグラムを示す。右上の数値は、B細胞を含む実験における表面CD23を発現するIgM⁺B細胞の割合、またはRAMOS 266実験におけるRAMOS 266上でのCD23のメジアン蛍光強度(測定)を示す。

【0024】

図13.扁桃のB細胞に対するD1.1の影響。2色FACS分析によるCD23を発現するIgM⁺B細胞の割合を表す。ここではD1.1またはB2.7細胞は、mAb 5c8(IgG2a抗T-BAM)、W6/32(IgG2a抗クラスI MHC)、抗LFA1a(IgG1)およびB-B20(IgG1抗CD40)存在下で、18時間、扁桃B細胞と培養した後に用いた。

【0025】

図14.D1.1-B細胞活性化におけるT-BAMとCD40の役割。Jurkatクローン

D 1 . 1 もしくは B 2.7 と共に、あるいは図示されるリンホカインの存在下で18時間培養した後の、表面 C D 23を発現する I g M⁺ B 細胞の割合（左側 Y 軸、縞模様バー）と R A M O S 266 の C D 23メジアン蛍光強度（右側 Y 軸、網目模様バー）を示す2色 F A C S の棒グラフを示す。（a.）r I L 4 と r I K -2は10ユニット / m L、抗 I L -4と抗 G M - C S F (“ C S F ”）は10 μg / m L 存在する。（b.）示された m A b は飽和濃度まで培養開始時に添加された。

【 0 0 2 6 】

図 15 . 末梢性 B 細胞の D 1 . 1 活性化に対する抗 C D 40m A b の影響。図示された m A b の存在下で18時間、D 1 . 1 細胞と培養した I g M⁺ B 細胞の2色 F A C S 分析の結果を示す。

10

【 0 0 2 7 】

図 16 . B 細胞 C D 23発現に対する抗 C D 40の C D 32⁺ L 細胞へ及ぼす影響。図示された m A b もしくはコントロール培地存在下で、I - A⁺ L 細胞（L 細胞）もしくは F c R g II⁺ L 細胞（C D 32⁺ L 細胞）の単層と共に18時間培養を行なった後の、（a.）末梢性 B 細胞または R A M O S 266 、および（b.）扁桃と脾臓の B 細胞の2色 F A C S 分析の結果を示す。（a.）では左側の Y 軸は C D 23を発現する I g M⁺ B 細胞の割合を示し、右側の Y 軸は R A M O S 上での C D 23の M F I を示す（図 1 で凡例に示されてる）。（b.）では“コントロール”とは扁桃を用いた実験の抗 L F A I a および脾臓を用いた実験の抗 C R 2 (T H B -5) を意味する。

【 0 0 2 8 】

図 17 . ヒト正常リンパ球組織での T - B A M 発現。T - B A M 発現は、（A.、B.）正常な扁桃（A. × 25、B. × 40）と（c.）正常なリンパ節（× 25）並びに正常な脾臓（D. × 25；E. × 63）の凍結した組織断片で評価した。ここでは m A b 5c 8 と改変 A B C 技術（材料と方法参照）を用いた。T - B A M 陽性は、膜の染色として現われる。

20

【 0 0 2 9 】

図 18 . T - B 分子の相互作用モデル。

【 0 0 3 0 】

図 19 . 慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおける C D 4⁺ T リンパ球上での T - B A M の発現。活性型、細胞性の慢性関節リューマチの患者に由来する滑膜パンヌスでの1つのリンパ小節における免疫化学的な染色区分を示す。（a,b）抗 C D 3 ジアミノベンジジン（D A B ）染色（a.ローパワー、b.ハイパワー）。（c）抗 C D 4 (ブルーフシン、A P A P 染色) と抗 T - B A M (m A b 5c 8 、褐色、D A B) による二重染色。（d）抗 C D 8 (ブルーフシン、A P A P 染色) および抗 T - B A M (m A b 5c 8 、褐色、D A B) 。これらの標本は全て、慢性関節リューマチの滑膜の炎症に関わる C D 4⁺ T 細胞上で T - B A M が発現すること示す。

30

【 0 0 3 1 】

図 20 A . 浸潤性乾癬損傷の T リンパ球での T - B A M の発現。乾癬損傷由来皮膚生検標本の免疫化学的な染色（a.ローパワー）、（b.ハイパワー）-皮膚での T 細胞の浸潤を示す。T - B A M 発現は、m A b 5c 8 とジアミノベンジジン（D A B ）（褐色）により検出された。

40

【 0 0 3 2 】

図 21 . 非ホジキンリンパ腫細胞での T - B A M の発現。T - B A M⁺ T 細胞（褐色、D A B ）を示す非ホジキンリンパ腫を保持する患者2人のリンパ節に由来する免疫化学的な標本を示す（a.630× および b.400× ）。

【 0 0 3 3 】

〔発明の詳細な説明〕

この発明は、A T C C 受付番号 H B 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c 8 によって特異的に認識されるタンパク質と結合可能なモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 3 4 】

50

この発明は、活性化T細胞の表面に位置するタンパク質を特異的に認識し、かつこのタンパク質と複合体を形成し、それによりB細胞のT細胞活性化を阻害するモノクローナル抗体を提供する。活性化T細胞は、通常、動物のリンパ節の胚中心にのみ見出される。しかしながら、活性化T細胞は、T細胞腫瘍、例えば、T細胞白血病およびリンパ腫に罹患した動物の末梢血または慢性間接リウマチおよび乾癬のような疾患の浸潤組織に見出される。

【0035】

ここに記載され、請求されるモノクローナル抗体は、リンパ節の胚中心においてB細胞と相互作用するT細胞に結合し、健常個体の他のT細胞には結合しない。T細胞表面上のタンパク質を特異的に認識し、かつこのタンパク質と結合して、それによりB細胞の活性化を阻害することが当業者に知られているモノクローナル抗体、例えば、抗CD28モノクローナル抗体および抗LFA-1モノクローナル抗体は、活性化T細胞を区別しない。

10

【0036】

この発明の目的のためには、“活性化T細胞”は、休止B細胞にT細胞ヘルパー機能を付与し得るT細胞である。この発明の目的のためには、“リンパ節の胚中心”は、T細胞がB細胞にT細胞ヘルパー機能を付与するリンパ節の領域である。

【0037】

この発明に目的のためには、“モノクローナル抗体”は、ハイブリドーマ細胞によって產生される抗体である。モノクローナル抗体合成ハイブリドーマ細胞の作製方法は当業者に公知であり、例えば、抗体産生Bリンパ球と不死化Bリンパ球細胞株との融合による。

20

【0038】

この発明の一態様においては、B細胞は休止B細胞である。この発明の他の態様においては、B細胞は感作B細胞である。この発明の目的のためには、“休止”B細胞は、非活性化B細胞、すなわち抗体分子を合成しない未文化B細胞である。この発明の目的のためには、“感作”B細胞は、抗原と接触し、それにより部分的に活性化してはいるが、いまだ抗体分子を合成しないB細胞である。

【0039】

この発明の一態様においては、モノクローナル抗体はネズミモノクローナル抗体である。この発明の他の態様においては、モノクローナル抗体はキメラモノクローナル抗体である。この発明のさらに別の態様においては、モノクローナル抗体はヒト化モノクローナル抗体である。しかしながら、この発明の好ましい態様においては、モノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体である。

30

【0040】

この発明の目的のためには、“キメラ”モノクローナル抗体は、異なる動物からの定常領域フラグメント(Fc)を有するネズミモノクローナル抗体である。この発明の好ましい態様においては、キメラモノクローナル抗体はヒトFcおよびネズミFabを有する。この発明の目的のためには、“ヒト化”モノクローナル抗体は、軽鎖および重鎖両者のネズミ相補性決定領域(CDR)を除いて全てのネズミタンパク質配列がヒトタンパク質配列に置き換えられているネズミモノクローナル抗体である。

40

【0041】

この発明の一態様においては、モノクローナル抗体は、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるエピトープに向けられている。この発明のさらに別の態様においては、モノクローナル抗体はモノクローナル抗体5c8である。

【0042】

この発明は、さらに、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質に結合することができるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞を提供する。この発明の目的のためには、“ハイブリドーマ細胞”は、不死化細胞と抗体産生細胞とを融合し、それによりモノクローナル抗体を產生する細胞を形成することにより作製された細胞である。一態様に

50

においては、ハイブリドーマ細胞は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定に基づき、1991年11月14日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.S. に寄託されたATCC受付番号HB 10916に一致した。

【 0 0 4 3 】

この発明の1つにおいて、モノクローナル抗体は検出可能なマーカー、例えば放射性同位体、酵素、染料またはビオチンで標識されている。この発明の他の態様においては、モノクローナル抗体は治療剤、例えば放射性同位体、トキシン、トキソイドまたは化学療法剤に結合している。この発明のさらに別の態様においては、モノクローナル抗体は画像形成剤(imaging agent)、例えば放射性同位体に結合している。

10

【 0 0 4 4 】

この発明は、このモノクローナル抗体と薬剤学的に許容し得る担体を含有する医薬組成物を提供する。この発明の目的のためには、“薬剤学的に許容し得る担体”は標準的な医薬担体のいかなるものをも意味する。適切な担体の例はこの分野において公知であり、標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、ポリソルブ(Polysorb)80を含有するリン酸緩衝生理食塩水、水、油／水エマルジョンのようなエマルジョン、および種々のタイプの湿潤剤を含み得るが、これに限定されるものではない。

【 0 0 4 5 】

典型的には、このような担体は賦形剤、例えばスターク、ミルク、砂糖、特定のタイプのクレイ、ゼラチン、ステアリン酸もしくはそれらの塩、ステアリン酸マグネシウムもしくはカルシウム、タルク、植物性脂肪もしくは油、ゴム、グリコールまたは他の公知の賦形剤を含有する。このような担体はフレーバーおよび着色添加物または他の成分を含有してもよい。このような担体を含有する組成物は、よく知られた通常の方法により処方される。

20

【 0 0 4 6 】

このような担体はこの分野において公知であり、標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、油／水エマルジョンのようなエマルジョン、および種々のタイプ湿潤剤のいかなるものをも含み得るが、これらに限定されるものではない。他の担体には、無菌溶液、錠剤、コート錠、およびカプセルが含まれ得る。

30

【 0 0 4 7 】

ここに記述され、請求されるモノクローナル抗体は、このモノクローナル抗体が結合するタンパク質の単離に有用である。このモノクローナル抗体はまた、新規かつ有用な；動物における免疫応答の阻害方法；自己免疫疾患のような免疫不全またはライム病、梅毒、結核およびHIV感染のような自己免疫発現を伴う感染症により特徴付けられる疾患における免疫応答の緩和方法；動物における腫瘍もしくは新生物の像形成方法；動物における腫瘍もしくは新生物の存在を検出する方法；動物が腫瘍細胞を宿しているかどうかを決定する方法であって、T細胞ガンに罹患した動物におけるT細胞腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む方法；および動物T細胞のウイルス感染を阻害する方法においても有益である。

30

【 0 0 4 8 】

この発明は、このモノクローナル抗体の軽鎖タンパク質をコードする単離核酸分子を提供する。この発明の一態様においては、この核酸分子はDNA分子である。好ましくは、このDNA分子はcDNA分子である。

40

【 0 0 4 9 】

この出願を通して、特定のヌクレオチドに対する言及は核酸のコード鎖上に存在するヌクレオチドに対するものである。この明細書を通して、特定のヌクレオチドを示すために、以下の標準的な略語が用いられる：

C = シトシン A = アデニン

T = チミジン G = グアノシン

この発明のDNA分子は、1以上のアミノ酸残基の同一性および位置が天然の形態とは

50

異なり（タンパク質について特定される全ての残基よりも少ない残基を有する欠損アナログ、特定される残基の1以上が他の残基によって置換されている置換アナログおよび1以上のアミノ酸残基がポリペプチドの末端もしくは中間部に追加されている付加アナログ）、かつ天然型の性質の幾つかもしくは全てを共有する、抗原性ポリペプチドのポリペプチド・アナログ、断片または誘導体をも含む。これらには、選択された非哺乳動物ホストによる発現に好ましいコドンの組み込み；制限エンドヌクレアーゼ酵素による開裂のための部位の提供；および容易に発現するベクターの構築を容易にする、さらなる先頭、末端もしくは中間DNA配列を提供することが含まれる。

【0050】

ここに記述され、請求される核酸は、以下に記載する新規ウイルスもしくは環状プラスミドベクターの產生に有用である。この核酸分子はまた、遺伝子治療の新規かつ有用な方法、すなわち動物から単離した細胞を核酸分子で安定に形質転換し、次いで安定に形質転換した細胞を動物に再投与することによる方法に有益でもある。細胞を単離する方法には、動物から細胞を抜き取るいかなる標準法もが含まれる。適切な単離細胞には骨髄細胞が含まれるが、これに限定されるものではない。細胞の再投与方法には、動物に細胞を再投与するいかなる標準法もが含まれる。

【0051】

この発明は、RNA転写のプロモーターに作動可能に連結する、モノクローナル抗体の軽鎖タンパク質をコードする核酸分子を含む遺伝子運搬ベクター、例えばプラスミドもしくはウイルスベクターを提供する。この発明はまた、RNA転写のプロモーターに作動可能に連結する、モノクローナル抗体の重鎖タンパク質をコードする核酸分子を含む遺伝子運搬ベクター、例えばプラスミドもしくはウイルスベクターをも提供する。

【0052】

ここに記載され、請求される遺伝子運搬ベクターは、安定に形質転換された真核ホスト細胞の產生に有用であり、それ故にそのようなホスト細胞をタンパク質產生に適した条件下で増殖させる新規かつ有用な方法において有益な生成物としての価値を有する。

【0053】

この発明は、ここに記載され、請求される遺伝子運搬ベクターを適切なホスト細胞中に有するホストベクター系を提供する。この発明の一態様においては、適切なホスト細胞は、安定に形質転換された真核細胞、例えば安定に形質転換された酵母もしくは哺乳動物細胞である。この発明の好ましい態様においては、安定に形質転換された真核細胞は、安定に形質転換された哺乳動物細胞である。

【0054】

ここに記載され、請求されるホストベクター系は、このホストベクター系をモノクローナル抗体の產生に適した条件下で増殖させることを包含する、モノクローナル抗体の新規かつ有用な合成方法に有益である。

【0055】

この発明は、B細胞に接触依存性ヘルパー機能を本質的に付与することが可能な、D1.1と呼ばれるATCC受付番号CRL 10915のCD4+ヒトT細胞白血病細胞株を提供する。このD1.1細胞は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定に基づき、1991年11月14日にアメリカン・タイプ・カルチャーラークション(ATCC)、12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.S.に寄託された。この発明の一態様においては、このB細胞は休止B細胞である。この発明の他の態様においては、このB細胞は感作B細胞である。

【0056】

ここに記載され、請求される細胞株は、ATCC受付番号 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c8により特異的に認識される単離タンパク質の源として有益である。この単離タンパク質は、それ自身をコードするヌクレオチド配列に関する事項を提供する情報にとって有益である。この核酸配列は、ここに記載され、請求される可溶性活性化T細胞表面タンパク質の新規かつ有用な產生方法に有益である。この細

10

20

30

40

50

胞株はまた、タンパク質抗原に対して動物を免疫する新規かつ有用な方法、および医薬化合物をB細胞のT細胞活性化を阻害するそれらの能力についてスクリーニングする新規かつ有用な方法に有益である。

【0057】

この発明は、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識される単離タンパク質を提供する。

【0058】

この発明はさらに、ATCC受付番号10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識される単離タンパク質を提供する。ここで、この単離タンパク質は、活性化T細胞の表面からのものであり、B細胞最終分化のT細胞誘発に必要なものである。この出願において、“最終分化(terminal differentiation)”はその細胞の特定のIg分泌が明らかにされていることを意味し、この用語は当業者には公知である。
10

【0059】

この発明の一態様においては、B細胞は休止B細胞である。この発明の他の態様においては、B細胞は感作B細胞である。

【0060】

この発明はまた、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識され、N末端に配列Xaa-Ile-Glu-Xaa-Tyr-Asn-Gln-Xaa-Ser-Pro-(配列番号11)を有する単離タンパク質を提供する。この出願においては、“Xaa”はいかなるアミノ酸残基でもよい。
20

【0061】

この発明は、T細胞表面タンパク質をコードする単離核酸分子を提供する。この発明の一態様においては、核酸分子はDNA分子である。好ましくは、このDNA分子はcDNA分子である。この核酸分子は、以下に記載の新規ウイルスまたは環状プラスミドベクターを生成するための生成物として有益である。この核酸分子はまた、遺伝子治療の新規かつ有用な方法、すなわち、動物から単離した細胞をこの核酸分子で安定に形質転換し、次いで安定に形質転換した細胞を動物に再投与することによる方法に有益である。細胞の単離方法には、動物から細胞を取り出すいかなる標準法もが含まれる。適切な単離細胞には骨髄細胞が含まれるが、これに限定されるものではない。細胞の再投与方法には、動物に細胞を再投与するいかなる標準法もが含まれる。
30

【0062】

この発明はまた、活性化T細胞表面タンパク質をコードする単離核酸分子を含む遺伝子運搬ベクター、例えばプラスミドまたはウイルスベクターを提供する。

【0063】

ここに記載され、請求される遺伝子運搬ベクターは、安定に形質転換された真核ホスト細胞を產生し、それ故にそのホスト細胞をタンパク質の產生に適した条件下で増殖させる新規かつ有用な方法に有益な生成物として価値がある。

【0064】

この発明は、さらに、適切なホスト細胞中に遺伝子運搬ベクターを含むホストベクター系を提供する。この発明の一態様においては、この適切なホスト細胞は、細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞である。
40

【0065】

このホストベクター系は、このホストベクター系をタンパク質の产生に適した条件下で増殖させることによる活性化T細胞表面タンパク質の大規模合成に有用な生成物として有益である。したがって、活性化T細胞表面タンパク質の产生方法もまた提供される。この発明は、さらに、この方法により產生されたタンパク質を提供する。

【0066】

この発明は、B細胞のT細胞活性化に必要な、活性化T細胞の表面から単離された可溶性タンパク質を提供する。この発明の一態様においては、このB細胞は休止B細胞である
50

。この発明の他の態様においては、B細胞は感作B細胞である。

【0067】

この発明の目的のためには、“可溶性タンパク質”は、細胞膜および他の細胞成分を含有しないタンパク質である。好ましくは、この可溶性タンパク質は、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質である。この発明の一態様においては、この可溶性タンパク質は検出可能なマーカー、例えば、放射性同位体、酵素、染料またはビオチンで標識されている。この可溶性タンパク質は、新規かつ有用な医薬組成物を作製するための生成物として有益である。

【0068】

したがって、この可溶性タンパク質および薬剤学的に許容し得る担体を含有する医薬組成物もまた提供される。“薬剤学的に許容し得る担体”は標準的な薬剤学的に許容し得る担体のいかなるものをも意味する。例として、リン酸緩衝生理食塩水、生理食塩水、水および油／水エマルジョンのようなエマルジョンを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0069】

この発明は、この可溶性タンパク質をコードする単離核酸分子を提供する。この発明の一態様においては、核酸分枝はDNA分子である。好ましくは、このDNA分子はcDNA分子である。

【0070】

ここに記載され、請求される核酸配列は、以下に記載される新規ウイルスおよび環状プラスミドベクターの產生に有用である。この核酸分子はまた、遺伝子治療の新規かつ有用な方法、すなわち、動物から単離した細胞をこの核酸分子で安定に形質転換し、次いで安定に形質転換された細胞を動物に再投与することによる方法に有益である。細胞を単離する方法には、動物から細胞を取り出す標準法のいかなるものも含まれる。適切な単離細胞には骨髄細胞が含まれるが、これに限定されるものではない。細胞の再投与方法には、動物に細胞を再投与する標準法のいかなるものも含まれる。

【0071】

この発明はまた、RNA転写プロモーターに作動可能に連結した単離核酸分子を有する遺伝子運搬ベクター、例えばプラスミドベクターまたはウイルスベクターをも提供する。ここに記載され、請求される遺伝子運搬ベクターは、安定に形質転換された真核ホスト細胞を生成し、それ故にそのようなホスト細胞をタンパク質產生に適した条件下で増殖させる新規かつ有用な方法に有益な生成物として価値がある。

【0072】

この発明は、さらに、適切なホスト細胞中にこの遺伝子運搬ベクターを有するホストベクター系を提供する。この発明の一態様においては、適切なホスト細胞は安定に形質転換された真核細胞、例えば、安定に形質転換された真核酵母もしくは哺乳動物細胞である。好ましくは、安定に形質転換された細胞は、哺乳動物細胞である。

【0073】

このホストベクター系は、このホストベクター系をタンパク質の產生に適した条件下で増殖させ、產生されたタンパク質を回収することによる、可溶性活性T細胞表面タンパク質の大規模合成に有用な生成物として有益である。したがって、この可溶性タンパク質の產生方法もまた提供される。この発明は、さらに、この方法により產生された可溶性タンパク質を提供する。

【0074】

この発明は、活性T細胞表面タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体および薬剤学的に許容し得る担体を含有する医薬組成物の有効阻害量を動物に投与することを具備する、動物においてB細胞活性化を阻害する方法を提供する。この発明の目的のためには、医薬組成物の“有効阻害量”は、活性T細胞表面上のタンパク質に結合し、それによりB細胞のT細胞活性化を阻害するに有効な医薬組成物の量である。この有効阻害量は、

10

20

30

40

50

この分野において公知の実験を用いて、当業者が容易に決定することができる。そのような実験的アプローチの1つはタイトレーションによるものである。この発明の一態様においては、B細胞は休止B細胞である。この発明の他の態様においては、B細胞は感作B細胞である。

【0075】

“有効阻害量”を決定する方法は当業者には公知であり、関連する動物のタイプおよび動物の体重（これらに限られるものではないが）を含む因子に依存するであろう。この発明の一態様においては、動物は哺乳動物、例えばマウスまたはヒトである。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0076】

この発明の目的のためには、“投与”は当業者に公知の医薬組成物の標準投与方法のいかなるものとも意味する。例として、静脈内、腹腔内または筋肉内投与を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0077】

B細胞活性化を阻害する方法は、動物の免疫応答を阻害する新規かつ有用な方法に有益である。この発明の一態様においては、動物は哺乳動物、例えば、マウスまたはヒトである。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0078】

この発明の一態様においては、動物の免疫応答の阻害は、動物による移植臓器、例えば、心臓、腎臓または肝臓の拒絶を阻害する方法として有益である。

【0079】

この発明の他の態様においては、動物の免疫応答の阻害は、突発性自己免疫疾患に罹患している動物における自己免疫応答を阻害する方法として有益である。突発性自己免疫疾患の例には、乾癬、慢性関節リューマチ、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、グレーブス病、突発性血小板減少紫斑病、溶血性貧血、IgE増加症候群(hyper IgE syndrome)、真性糖尿病および薬物誘発自己免疫疾患、例えば薬物誘発ループスが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0080】

他の態様においては、この発明は、感染症の自己免疫発現に罹患しているヒトにおける自己免疫応答を阻害する方法を提供する。自己免疫発現は、ライター症候群、脊椎関節炎(spondyloarthritis)、ライム病、HIV感染、梅毒または結核に由来することがある。

【0081】

この発明のさらに別の態様においては、動物における免疫応答の阻害は、動物におけるアレルギー応答、例えば、枯草熱またはペニシリンに対するアレルギーを阻害する方法として有益である。

【0082】

この発明は、ATCC受付番号10916のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質を発現する腫瘍細胞または新生物細胞の像を形成する方法であって、(i)抗体が像形成剤と結合している、モノクローナル抗体5c8の医薬組成物の有効量を、モノクローナル抗体とタンパク質との複合体の形成を許容する条件下で患者に投与し、かつ(ii)形成されるモノクローナル抗体/タンパク質複合体の像を形成し、それにより患者における腫瘍細胞または新生物細胞の像を形成することを具備する方法を提供する。

【0083】

このような腫瘍細胞または新生物細胞は、T細胞腫瘍、例えば、T細胞白血病またはリンパ腫由来であってもよい。好ましくは、患者はヒト患者である。

【0084】

“投与”は、当業者に公知の医薬組成物投与の標準法のいかなるものとも意味する。例として、筋肉内または腹腔内投与を挙げができるが、これらに限定されるものでは

10

20

30

40

50

ない。モノクローナル抗体／タンパク質複合体の形成を検出する方法、例えばX線フィルムの露光による方法は、当業者には公知である。

【0085】

医薬組成物の“有効像形成量”は、複合体の像を形成し得るように、モノクローナル抗体と細胞表面タンパク質との複合体を形成するに有効な量である。“有効像形成量”を決定する方法は当業者に公知であり、関係する動物のタイプ、動物の大きさおよび用いられる像形成剤を含む（これらに限られるものではない）要素に依存する。そして、正確な有効像形成量は、当業者に公知の、タイタレーションのような実際の実験により決定することができる。この発明の一態様においては、像形成剤は放射性同位体である。

【0086】

この発明は、動物において、ATCC受付番号 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c8 により特異的に認識されるタンパク質を発現する腫瘍細胞または新生物細胞の存在を検出する方法であって、検出し得るマーカーに結合したモノクローナル抗体を含有する医薬組成物の、腫瘍細胞または新生物細胞の表面上のタンパク質に結合するに有効な量を、モノクローナル抗体とタンパク質との複合体の形成を許容する条件下で動物に投与し；未結合の像形成剤を動物から除去し；および形成されるモノクローナル抗体／タンパク質複合体の存在を検出することを具備する方法を提供する。複合体の存在は、動物における腫瘍細胞または新生物細胞の存在を示す。この腫瘍細胞は、T細胞白血病またはリンパ腫由来であってもよい。好ましい態様においては、この腫瘍は非ホジキンリンパ腫である。この発明の一態様においては、動物は哺乳動物、例えば、マウスまたはヒトである。好ましくは、動物はヒトである。

【0087】

“投与”は、当業者に公知の、医薬組成物のあらゆる標準投与方法を意味する。例として、静脈内、筋肉内または腹腔内投与を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。例えばX線フィルムの露光または顕微鏡下での試験により、モノクローナル抗体／タンパク質複合体の形成を検出する方法は当業者に公知である。

【0088】

医薬組成物の“有効量”は、動物において腫瘍細胞または新生物細胞の存在を検出するに有効な医薬組成物の量である。“有効量”を決定する方法は当業者に公知であり、関連する動物のタイプ、接触する血液試料のサイズおよび用いる検出可能なマーカーを含む（これらに限られるものではない）多くの要素に依存する。この発明の一態様において、検出可能なマーカーは、放射性同位体、酵素、染料またはビオチンである。

【0089】

この発明は、ATCC受付番号 10916のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c8 により特異的に認識されるタンパク質を発現する腫瘍細胞または新生物細胞を動物が有しているかどうかを決定する方法であって、動物から血液試料を単離し；この試料を、可溶性タンパク質に結合するに有効な量の、検出可能なマーカーで標識されたモノクローナル抗体を含有する医薬組成物と、モノクローナル抗体とタンパク質との複合体の形成を許容する条件下で接触させ；および形成されるモノクローナル抗体／タンパク質複合体の存在を検出する（このような複合体の存在は、患者における腫瘍細胞または新生物細胞の存在を示す）ことを具備する方法を提供する。

【0090】

一態様において、腫瘍細胞はT細胞腫瘍、例えば、T細胞白血病またはリンパ腫に由来する。好ましい態様において、T細胞リンパ腫は非ホジキンリンパ腫である。

【0091】

この発明によって提供される方法は、腫瘍細胞それ自身の存在が検出され得る前に、動物の血液中のT細胞腫瘍細胞の存在を検出する新規かつ有用な方法として有益である。この発明によって提供される方法はまた、抗T細胞腫瘍剤を用いる動物の治療の有効性を決定する新規かつ有用な方法、すなわち、動物の血液中の可溶性タンパク質のレベル（そのようなレベルは治療の有効性を示す）を決定することによる方法として有益である。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

T細胞腫瘍に罹患している患者の血液がT細胞腫瘍細胞表面から脱落した可溶性タンパク質、例えばtac抗原、を含むことは当業者には公知である。したがって、動物の血液中における可溶性T細胞表面タンパク質の存在は、動物におけるT細胞腫瘍の存在を示している。

【 0 0 9 3 】

この発明の目的のためには、“可溶性タンパク質”は、細胞膜および他の細胞成分を含有しないタンパク質である。この発明の好ましい態様においては、可溶性タンパク質は、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質である。10

【 0 0 9 4 】

動物からの血液の“単離”は、血液を抜き取り、この血液を、抗凝集剤、例えばヘパリン、EDTAまたはクエン酸塩を入れた容器に直ちに収容する、一般的に許容し得るあらゆる方法を意味する。モノクローナル抗体／タンパク質複合体の検出方法は当業者には公知である。例としてX線フィルムの露光およびELISAを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 9 5 】

医薬組成物の“有効量”は、動物の血液中において可溶性タンパク質の存在を検出するに有効な医薬組成物の量である。“有効量”を決定する方法は当業者には公知であり、関連する動物のタイプ、接触する血液試料のサイズおよび用いられる検出可能なマーカーを含む（これらに限られるものではない）多くの要素に依存する。20

【 0 0 9 6 】

この発明の一態様においては、動物は哺乳動物、例えばマウスまたはヒトである。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 9 7 】

この発明は、腫瘍または新生物、例えば、T細胞白血病またはリンパ腫に罹患している動物において、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質を発現する腫瘍細胞または新生物細胞の増殖を阻害する方法であって、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質を発現する腫瘍細胞または新生物細胞の増殖を阻害するに有効な量の、治療剤と結合した、もしくは結合していないモノクローナル抗体を含有する医薬組成物を患者に投与することを具備する方法を提供する。この発明の一態様においては、動物は哺乳動物、例えばマウスまたはヒトである。好ましくは、哺乳動物はヒトである。30

【 0 0 9 8 】

“投与”は、医薬組成物を投与する、当業者に公知のあらゆる標準法を意味する。例として、筋肉内または腹腔内投与を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 9 9 】

医薬組成物の“有効量”は、ATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識されるタンパク質を発現する腫瘍細胞または新生物細胞の増殖を阻害するに有効な医薬組成物の量である。“有効量”を決定する方法は当業者には公知であり、関連する動物のタイプ、動物の大きさおよび用いられる治療剤を含む（これらに限られるものでない）要素に依存する。この発明の一態様においては、治療剤は放射性同位体、毒素、トキソイドまたは化学療法剤である。40

【 0 1 0 0 】

この発明は、HTLV-Iウイルスによる動物T細胞のウイルス感染を阻害する方法であって、HTLV-IウイルスによるT細胞の感染を阻害するに有効な量の、活性T細胞表面のタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を含有する医薬組成物を動物に投与することを具備する方法を提供する。この発明の一態様においては、動物は哺乳動物50

、例えば、マウスまたはヒトである。好ましくは哺乳動物はヒトである。

【0101】

H T L V I ウィルスが結合する細胞性タンパク質が C D 4 タンパクであることは当業者には公知である。このように、H T L V I ウィルスは、C D 8⁺ ではなく C D 4⁺ T 細胞に優先的に感染する。この発明は、モノクローナル抗体 5c8 が結合し、また C D 4⁺ T 細胞に特異的なタンパク質を提供する。

【0102】

この発明は、医薬化合物、例えば、シクロスボリン、シクロホスファミドまたはアゾチオプリンを、その T 細胞ヘルパー機能を阻害する能力についてスクリーニングする方法であって：動物から血液試料を単離し；この試料を、そこに含まれる B 細胞の活性化を許容する条件下で培養し；試料を、B 細胞を活性化するに有効な量の D 1 . 1 細胞株または A T C C 受付番号 H B 10916 のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c8 により特異的に認識される単離タンパク質を発現する細胞と接触させ；医薬化合物が T 細胞活性化を阻害することが可能であるならば、B 細胞の最終分化の T 細胞誘発を阻害するに有効な量の医薬化合物と試料を接触させ；および医薬化合物の存在下において、T 細胞株が B 細胞を活性化するかどうかを決定することを具備する方法を提供する。

【0103】

この発明の一態様においては、B 細胞は休止 B 細胞である。この発明の他の態様においては、B 細胞は感作 B 細胞である。

【0104】

この発明の一態様においては、血液は哺乳動物、例えば、マウスまたはヒトから単離される。

【0105】

動物からの血液の“単離”は、血液を抜き取り、この血液を、抗凝集剤、例えば、ヘパリン、E D T A またはクエン酸塩を入れた容器に直ちに収容する、一般に許容可能なあらゆる方法を意味する。“B 細胞の活性化を許容する条件下”での B 細胞の培養には、リンホカイン類の存在下での B 細胞の培養が含まれる。D 1 . 1 細胞株“の有効活性化量”は、培養物中におけるこの細胞の、培養物中の B 細胞を活性化するに有効な濃度である。“有効活性化量”を決定する方法は、当業者に公知である。

【0106】

タンパク質抗原に対して動物を免疫する方法であって：動物から休止 B リンパ球を含有する血液試料を単離し；この試料から休止 B 細胞を回収し；この休止 B 細胞を、B 細胞を刺激して分化させる量の細胞株 D 1 . 1 または A T C C 受付番号 H B 10916 のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体 5c8 により特異的に認識される単離タンパク質を発現する細胞と共に、B 細胞の分化を許容する条件下で共培養 (coculturing) し；この分化 B 細胞を、分化 B 細胞にタンパク質抗原を認識する抗体を產生させるに有効な量のタンパク質抗原と接触させ；およびこの抗体產生 B リンパ球を、血液試料を単離した動物に投与することを具備する方法。

【0107】

この発明の目的のためには、“休止 B 細胞”は、未分化の非抗体合成 B 細胞または記憶 B 細胞のいずれかである。

【0108】

動物からの血液の“分離”は、血液を抜き取り、この血液を、抗凝集剤、例えば、ヘパリン、E D T A またはクエン酸塩を入れた容器に直ちに収容する、一般に許容可能なあらゆる方法を意味する。“B 細胞の活性化を許容する条件下”での B 細胞の培養には、リンホカイン類の存在下での B 細胞の培養が含まれる。B リンパ球を動物に投与する方法には、細胞を動物に投与する、一般に許容可能なあらゆる方法が含まれる。

【0109】

D 1 . 1 細胞株または可溶性活性 T 細胞表面タンパク質の“有効量”は、細胞株または可溶性タンパク質の、B 細胞の分化を誘発するに有効な量である。“有効量”を決定する

10

20

30

40

50

方法は当業者には公知である。

【0110】

タンパク質抗原の“有効分化量”は、抗原の、分化B細胞に抗原を特異的に認識する抗体を産生させるに有効な量である。

【0111】

この発明の一態様においては、動物は哺乳動物、例えば、マウスまたはヒトである。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0112】

この発明の一態様においては、抗原はウイルス性タンパク質抗原、例えば、B型肝炎ウイルスタンパク質抗原、ヒトT細胞白血病ウイルスタンパク質抗原またはヒト免疫不全症ウイルスタンパク質抗原である。この発明の他の態様においては、抗原は自己抗原または腫瘍抗原である。当業者に公知のRo、La、RNPおよびリューマチ様因子(IgG)は、そのような自己抗原の例である。

【0113】

この発明は、さらに、抗体産生細胞のイソタイプの切替えを誘発する方法であって、(i)抗体産生細胞を、B細胞の分化を許容する条件下で、イソタイプの切替えを誘発するに有効な量の細胞株D1.1またはATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識される単離タンパク質を発現する細胞と接触させ；および(ii)抗体産生細胞のイソタイプを検出することを具備する方法を提供する。一態様においては、抗体産生細胞はハイブリドーマ細胞である。他の態様においては、抗体産生細胞はEBV形質転換細胞株である。

【0114】

この発明はまた、抗体産生細胞によって産生される抗体の親和性を増大する方法であって、抗体産生細胞を、細胞の接触を許容する条件下で、有効量の細胞株D1.1あるいはATCC受付番号HB 10916のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体5c8により特異的に認識される単離タンパク質を発現する細胞と接触させ；および抗体産生細胞によって産生される抗体の結合親和性を決定することを具備する方法を提供する。

【0115】

この発明は、低ガンマグロブリン血症に罹患した患者を治療する方法であって、低ガンマグロブリン血症について患者を治療するに有効な量の可溶性活性T細胞表面タンパク質を患者に投与することを具備する方法を提供する。“有効量”を決定する方法は当業者に公知である。タイトレーションによる方法は、そのような方法の一例である。

【0116】

この発明は、以下の実験の詳細を参考することによりさらに理解されるであろう。しかしながら、詳細に述べられる特定の実験は単に説明に過ぎず、ここに記載され、その後に続く請求の範囲によって定義されるこの発明を限定することを意味するものではないことは、当業者には容易に理解されるであろう。

【0117】

実験の第1シリーズ

材料および方法

5C8モノクローナル抗体の產生および特徴 5匹のBalb/cマウスは、生理食塩水中で 2×10^6 のD1.1細胞で静脈内免疫感作し、次ぎに腹腔内で約2週間間隔での5回のブーストがなされた。これらのマウスの血清は、B2.7細胞に対してジャーカットD1.1に優先的に結合する抗体が存在するかどうかについてテストするために、FACSによって滴定された。最も差異のある滴定を示した一匹のマウスは、融合する三日前に、静脈下、 2×10^6 のD1.1細胞のブーストを受けた。該マウス由来の脾臓細胞は、前記記載(Kirchevsky et al., 1988)のように、 7×10^7 のマウスSP2/0骨髄融合パートナー細胞と融合させた。融合産生物を8-mmの360 ウエルに播種する前に、細胞混合物は、15% FCSを含むDulbecco's Modified Eagle's 培地(DMEM)中で一晩培養された。220 ウエルに出現したコロニーおよびすべてについて、D1.1およびB2.

10

20

30

40

50

7 細胞を識別して結合するかどうかを、 F A C S によってスクリーニングした。 5 c 8 と名付けられた m A b が D 1 . 1 細胞と結合し、 B 2 . 7 細胞には結合しないことがわかった。 5 c 8 クローンは、モノクローナル性が達成されるまで何回もサブクローンされた。 5 c 8 m A b は、エリサ法 (Hyclone, Logan, UT) で I g G 2 a であることがわかった。

【 0 1 1 8 】

モノクローナル抗体：下記の m A b s : OKT 11(抗-CD2), OKT 10(抗-38), OKT 8(anti-CD8), OKT 6(抗-CD1a), OKT 4(anti-CD4), OKT 3(抗-CD3), OKT 1(抗-CD5), 3A1(抗-CD7), tac(抗-CD25), T-HB5(抗-CD21, CR2), W6/32 (抗-MHC class I), AB2.06(抗-MHC class II), L243 (抗-MHC class II), 93F10(抗-MHC class II), TS1/22.1.13(抗-LFA-1a), TS1/18.1.2.11.4(抗-LFA-1), TS2/9.1.4.3 (抗-LFA-3), および 187.1(抗-human Ig(Fab)) は American Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手可能なハイブリドーマによって製造された。これらの m A b は、飽和濃度のハイブリドーマ上澄液で使用されるか、またはタンパク A カラム (Biorad, Rockville Center, NY) で腹腔液から精製されるかのいづれかであった。抗-ジャーカット TCR Clonotypic mAb (抗-v 8)mAb 16G8 および抗-T CR mAb のような他のパネルは、 Diversi-T, T cell Science (Cambridge, MA) から購入した。 mAb OKT4A は、 Ortho Pharmaceutical (Raritan, NJ) から購入し、 TCR -1 は Dr. Michael Brenner, ハーバード医学学校 (Boston, MA) からの贈呈された。 M241(anti-CD1c) は Dr. Cox Terhorst of ハーバード医科大学からの贈呈であった。 FITC 標識抗-CD23-PE mAb および無標識の抗-CD69 は、 Becton Dickinson (Mountainview, CA) より購入した。 FITC 標識抗 IgM は Tago (Burlingame, CA) より購入した。 Kolt-4 (抗-CD28) 、および抗-CD27 は Accurate Scientific (Westbury, NY) から購入した。

【 0 1 1 9 】

組換蛋白 r I L - 4 は Genzyme (Cambridge, MA) より購入した。 r I L - 2 は Hoffmann-La Roche (Nutley, N.J.) の贈呈であった。

【 0 1 2 0 】

細胞フルオログラフィー分析 約 10^5 細胞を、表示の m A b s の飽和濃度により、 45 分間 4 で、 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ の熱凝集したヒト I g G (International Enzyme, Fallbrook, CA) の存在下でインキュベートした。細胞は、洗浄されて未結合の m A b を除去した後、蛍光体 (Cappel, Cochranville, PA) と結合されたヤギ抗-マウス I g 二次抗体でインキュベーションされた。

【 0 1 2 1 】

二色分析のため、細胞を表示のように直接連結された F I T C または m A b に接合し、 45 分間 4 で、凝集ヒト I g G 存在下で、フィコエリスリン (PE) と反応させた。分析に先立ち、細胞を洗浄し、 P B S 中に再懸濁した。蛍光強度は、 consort-30 ソフトウェア (Becton-Dickinson, Mountainview, CA) 付き F A C S C A N 細胞フルオログラフィーで測定した。 B 細胞とジャーカットクローニとの共培養に関する実験では、弱い前方および側方の光分散によって異種細胞集団をゲーティングすることによって、ジャーカット細胞を B 細胞蛍光分析から除外した。 P M A および P H A 活性化細胞による実験においては、死細胞は、ヨウ化プロピリデイウムおよび電子 F A C S ゲーティングによる処理によって分析から除外された。

【 0 1 2 2 】

細胞系 下記の細胞系 : HPB-ALL, Jurkat, CEM, PEER, MOLT-IV, K562, Ramos, Raji, および U937 は、 American Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手できる。 B A は以前報告されている (Bank, et al., 1986) ように Epstein Barr ウイルスで形質転換された B 細胞系である。 H 9 は、 HIV Repository (Rockville, MD) から入手できる。 H L A の分類は、コロンビア大学 (One Lambda, Los Angeles, CA) の病理課 Dr. Elaine Reed によって行われた。ジャーカット D 1 . 1 および B 2 . 7 は、 Mycotech キット (GIBCO, Grand Island, NY) および D N A ハイブリディゼーション法 (Genprobe, La Jolla, CA) ではマイコプラズマに対して陰性であった。

【 0 1 2 3 】

10

20

30

40

50

細胞集団の単離 末梢血液リンパ球は、健康な志願者より取り出された新鮮な血液を、Ficoll-Hyphaque (Sigma, St. Louis, MO)またはLeukoprep (Becton-Dickson)で遠心分離することで得られた。T細胞は、ノイラミニダーゼ処理されたヒツジ赤血球によって実質的に選別された。CD⁺CD⁻およびCD⁻CD⁺細胞のサブセットが、それぞれ抗CD⁸または抗CD⁴mAb処理によって単離された後、以前(Rogozinski, et al., 1984)に記載されているように、補体の仲介によって溶菌された。B細胞は、ノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球によるロゼット形成を二回行った後、Ficoll-Hyphaque遠心分離ではペレット化されなかった細胞集団から得られた。

【0124】

B細胞は、更に密度遠心分離あるいは抗Igカラムでのポシティブ選別によって精製された。最初の方法では、消耗したマクロファージを固定させるため、E-細胞をポリスチレンフラスコ(37、5%CO₂)中で一晩培養した。これらの非T細胞および非マクロファージ細胞が不連続の30%/50%/100%のパーコール勾配中で、2300 rpm、12分の遠心分離で、高および低密度の分画に分画された。高密度細胞が50/100%の界面から、低密度細胞が30/50%の界面から得られた(Crow, et al., 1985)。高密度(静止)細胞は、主に60-80%CD²⁰⁺, 55-80%IgM⁺、および<5%CD³⁺および<5%CD²³⁺(バックグラウンド)であった。(表示されている)他の実験では、B細胞が、記載(Rogozinski et al., 1984; Friedman, et al., 1976)されているように、Sephadex G-200抗F(ab)₂Ig親和性クロマトグラフィで精製された。FACSで分析すると、sIg⁺細胞集団は、主に<5%CD³⁺、<10%CD²⁺、および>90%CD²⁰⁺であった。

【0125】

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 ジャーカットクローンは、ラクトペルオキシダーゼ法でヨウ素化し、1%のNP40, ヨードアセトアミドを含む25mMトリスで緩衝化されたPBSおよび10μmPMSF中に溶解された。細胞溶解物を、mAb187.1(抗ヒトF(ab)Ig)と約10μgの表示mAbで被覆された蛋白A-4Bセファロースビーズ(Pharmacia, Uppsula, Sweden)と反応させた。ビーズを洗浄して非特異的に結合した蛋白を除去後、沈殿した蛋白をSDS中で2-ME存在下または無存在下で、熱変性させた。変性蛋白および予め染色してある分子量マーカー(Biorad, Rockville Center, NY)を、12cmのゲル中で12%ポリアクリルアミドを通して電気泳動にかけ、乾燥ゲルを使用してX線フィルム(Kodak, Rochester, NY)を感光させた。

【0126】

マイトイシンCおよびパラフォルムアルデヒド処理 ジャーカット細胞(10⁷)を、50μg/mLのマイトイシン-C(Sigma, St. Louis, MO)で、60分37で処理した。マイトイシン処理されたジャーカット細胞を二回洗浄し、無マイトイシン培地に再懸濁してから、45-60分37で培養した。該細胞を更に二回洗浄してからB細胞培養中に添加した。固定化実験では、T細胞を新たに作成した0.5%のパラフォルムアルデヒドで5-10分処理し、0.2MのL-リジンで抑制し、5回洗浄しB細胞培養中に添加した。

【0127】

T細胞活性化 5c8Agの発現を研究する実験では、静止T細胞を、10μg/mLのホルボールミリストアセテート(PMA)(Sigma, St. Louis, MO)および10μg/mLのPHA(Sigma)の存在下または無存在下で培養した。5c8Ag発現の代謝要求を研究する実験では、T細胞が100μmシクロヘキサアミド(Sigma)または10μg/mLのアクチノマイシンD(Sigma)の存在下で活性化された。

【0128】

活性化したT細胞によって高密度のB細胞でのCD²³の発現の誘発を研究する実験では、10μg/mLのmAbをPBS中で1時間培養することで、mAb sOKT3またはOKT4を24ウェル培養プレートの表面に固定化した。対照のウェルは、mAbを含まないPBS中で培養した。未結合mAbを洗浄した後、10ng/mLのホルボールジ

ブチレート(PDB)(Sigma)の存在下、6時間で 2×10^6 細胞/ウェルでプレートが被覆された。細胞を激しいピペット操作で除去し、洗浄し、培養前に、細胞と 2×10^5 の高密度で、パーコールで単離された静止B細胞との割合を1:1にして、0.5%のパラフォルムアルデヒドで上記記載通りに固定化した。B細胞CD23の発現が上記記載のように2色FACSで測定された。

【0129】

B細胞活性化および分化 B細胞表面CD23の発現誘発を測定する実験では、 2×10^5 高密度細胞を、 $200 \mu L$ のIsocove's Modified Dulbecco培地(IMDM)10%FCS丸底マイクロタイヤーウエル(Nunc)中の表示数のジャーカット細胞またはT細胞に添加し、18-24時間たってCD23の発現について分析した。ミリポア(Bedford, MA)からの $45 \mu m$ 培養プレート挿入物によって 1×10^6 細胞から分離された 1×10^6 のB細胞の存在下または無存在下で、 1×10^6 ジャーカット細胞による二つのチェンバー実験が行なわれた。

【0130】

B細胞増殖は、平底マイクロタイヤーウエル(NUNC)中で、PHA($5 \mu g / mL$)の存在下または無存在下で、 10^5 B細胞と、マイトイシン-Cで処理した同数のE⁺細胞またはジャーカットクローンと共に培養することによって測定された。培養物は、60時間後に、 $1 \mu Ci (H^3)$ チミン(New England Nuclear, Boston, MA)でパルス標識され、16時間後にグラスファイバーフィルターペーパー(Cambridge Technology Watertown, MA)上で採取された。ベータシンチレーションcpmをベータ計測器(LKB Rackbeta counter、1209型)で測定した。

【0131】

ラーク形成体(PFC)は、イエルネ溶血ラーク分析の改変法で測定された(Rogozinski, et al., 1984)。つまり、 2.5×10^5 B細胞をマイトイシンC処理された様々な数のジャーカット細胞と共に培養するか、または未処理の新たに単離された自己に由来するT細胞と共に、6日間1:400の希釈率のPWM(Gibco, Grand Island, NY)の存在下あるいは無存在下で培養した。細胞を二回洗浄し、ハンクス平衡塩類溶液中に再懸濁した。適宜希釈から、培養された細胞懸濁液の $50 \mu L$ を、塩化第二クロムによってラビット抗ヒトIgで被覆されたSRBCの11%溶液 $10 \mu L$ 、希釈されたラビット抗ヒトIg $10 \mu L$ 、およびギアナビッグ補体 $10 \mu L$ と混合した。これらの混合物を二つ対になったガラス室に入れ、2時間37で培養した。ラークを解剖用顕微鏡を使用して計測し、ラーク形成コロニー(PFC) 10^6 B細胞として表示した。

【0132】

Igアイソトープ定量のためのエリサ法が、炭酸緩衝液、pH9.6中で、ポリスチレン96ウェル(immunion II, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA9)を、ヤギ抗ヒトIgA, IgG, またはIgM(Tago, Burlingame, CA)の希釈物で、18時間4で被覆することで行なわれた。そのプレートをPBS中0.05%トウイーンで洗浄し、1%のBSA-PBSで2時間のインキュベーションすることで非特異的部位を封鎖した。洗浄後、 $50 \mu L$ の細胞培養上澄液またはIgアイソトープ標準液(Rockland, Gilbertsville, PA)を該ウェルに添加し、2時間結合させた。次ぎに、結合したヒトIgを検出するために、アルカリリフォスファターゼ(Tag)と結合したヤギ抗ヒトIgを添加した。2時間後、ウェルを洗浄し、p-ニトロフェニルfosfateを添加した。Molecular Device s VMAX器(Palo Alto, CA)で405nmにおける吸光度を測定した。サンプルは3回分析した。エラーバーは曲線当てはめ法および内挿法(Delta-Soft, BioMetallics, Inc. Princeton, NJ)から計算された標準偏差を示す。

【0133】

T細胞の作用におけるCD4の役割

T細胞の作用におけるCD4の役割を研究するために、CD4⁺ジャーカットクローン(D1.1)をCD4⁻のサブ細胞集団自然発生させた培養液から単離し、FACS分析でのマイナスピークで確認した。CD4の表面発現が見られなかつことは、ジャーカッ

トD1.1細胞表面の表現型が、多くのmAb類の結合についてのCD4⁺クローン、すなわちジャーカットB2.7（図1、および表1）と同様であった事が、比較的特異的であった。CD4の異なる発現は、これらのサブクローン間での定量的差異に過ぎないけれども、研究された他の分子構造はのうち幾つかは、定量的に異なるレベルで発現された。例えばジャーカットD1.1は、ジャーカットB2.7よりもCD2およびMHCクラス（HLA）の分子を多く発現した。しかしながら、ジャーカットD1.1はジャーカットB2.7よりもCD28分子、およびTCR- / (V8) / CD3複合体の発現が少なかつた（図1、および表1）。これらのclonotypic抗-TCR mAbとの反応性が共通しているのに加えて、ジャーカットD1.1およびB2.7はHLAと同一（A3, 34, 2, 16）であり、無関連T細胞白血病系、HPB-ALL（A9）とははっきり相違していた。これらのデータをまとめると、ジャーカットD1.1はジャーカットのCD4⁻サブクローンであり、CD4分子がないことは表面表現型における比較的特異的な変化であることが実証された。10

【表1】

表 1

ジャーカットクローンD 1.1 およびB 2.7 の細胞表面表現型

CD No.	分子	mAb	平均蛍光強度 ^a		10
			D1.1	B2.7	
	TCRα/β	BMA-031	10	40	
	TCRγβ8	16G8	30	70	
	TCR-γβ5	W112	0	0	
	MHC-クラス I	W6/32	190	70	
	MHC-クラス II	2.06	0	0	
CD1a	T6	OKT5	10	10	
CD1c		M241	10	10	
CD2	T11	OKT11	100	10	
CD3	TCR 積合体	OKT3	30	80	
CD4	T4	OKT4	0	130	20
CD5	T1	OKT1	20	90	
CD7		3A1	200	190	
CD8	T8	OKT8	0	0	
CD11a	LFA-1α	TS1/ 22.1.13			
		My2	40	100	
CD14		3G8	0	0	
CD16	FcεRII	TS1/ 18.1.2.11.4	20	20	
CD18	LFA-1β	tac taq-1	30	80	
CD21	CR2	HB-5	0	0	
CD23	FcγRII	leu20	0	0	30
CD25	tac. IL-2Rα	tac	0	0	
CD26	DPPIV	taq-1	0	0	
CD28	9.3. gp44	KOLT-4	30	70	
CD29		4B4	140	110	
CD38	T10	OKT10	40	30	
CDw32	FcγRII	32.2	0	0	
CD45RA	T200. LCA	2H4	30	40	
CD45RO	T200. LCA	UCHL1	10	20	
CDw49	VLA-1	1B.3	0	0	
CD58	LFA-III	TS2/9.1.4.3	40	60	
CD64	FcγRI	IV 3	0	0	40

【0 1 3 4】

^a 数字は、FACS 平均で測定した蛍光強度（任意単位）を示す。バックグラウンドはマイナスされ、数字は約 10 単位で四捨五入されている。

【0135】

作用性研究では、 $CD4^+(B2.7)$ および ($D1.1$) ジャーカット細胞が静止 B 細胞を誘発して $CD23$ を発現させる能力、B 細胞活性化のマーカーを比較した (Crow, et al., 1986; Jover, et al., 1989; Crow, et al., 1989)。驚いたことに、B 細胞と、 $CD4^+$ ジャーカット細胞 ($B2.7$) ではなく $CD4^-$ ジャーカット ($D1.1$) と共に培養すると、 $CD23$ の発現が、60% を越える B 細胞で誘導された。(図 2)。ジャーカット $D1.1$ による B 細胞表面の $CD23$ 発現の誘導は、 $D1.1$ と B 細胞との比率が 1 : 1 では、20 - 24 時間で最大となつた(図 3)。反対に、 $B2.7$ ジャーカットサブクローニは、高比率の B 細胞、または長期間共培養(最高 48 時間、表示せず)した B 細胞を活性化しなかつた(図 3)。更に、ジャーカット $D1.1$ は他の T 細胞 ($H9$, $H9$ -ALL, MOLT-IV, CEM) および非 T 細胞 ($U937$) 白血病系(表示せず)と比較すると、該能力に特異性をもつていた。ジャーカット $D1.1$ は、IgM(図 2)、 $CD20$ (図 2) またはクラス I MHC 等の他の B 細胞表面分子の量が影響を受けないので、B 細胞の $CD23$ の発現を選択的に誘発した。B 細胞活性化におけるジャーカット $D1.1$ の効果は、25 以上の関連性のない提供者由来の B 細胞に一定に観察された。これは、該影響が Ag にも MHC にも制限されない事を示唆する。

10

【0136】

B 細胞 $CD23$ は、Ig の分泌細胞に至る最終 B 細胞分化において、初期、および、もしかすると中間の段階で発現される。活性化された T 細胞表面に与えられる刺激とは別の刺激が、実質的な B 細胞の増殖および分化を行うには必要である。B 細胞増殖または分化を測定するには、数日の培養が必要であるので、ジャーカットクローニの増殖を、マイトシン C による前処理で阻害した。マイトシン C は、B 細胞を活性化する能力を奪うことはない(表 2)。

20

【表 2】

表 2
マイトマイシンCおよびIL-4に対する抗体の、
ジャーカットD1.1細胞に誘発されるB細胞CD23発現への効果

B細胞	C	rIL-4	rIL-2	D1.1	B2.7	<u>ジャーカットクローニ</u>	
						D1.1/M	B2.7/M
プラス	14	64	17	81	16	57	14
抗 IL-4 ND	28	ND	84	ND	64	ND	
抗 IL-2	ND	60	ND	86	ND	60	ND

30

【0137】

二色 FACS 分析によって、抗 $CD20$ (Leu-16) - FITC および抗 - $CD23$ PE で測定された $CD23$ を発現する $CD20$ (Leu-16)⁺ B 細胞のパーセンテージを示す。高密度のパーコールで分画された B 細胞 (2×10^5) は単独で培養されるか、または同数のジャーカット $B2.7$ または $D1.1$ 細胞と共に、表示されたように 20 時間培養された。表示のように、精製されたポリクローナルラビットの抗 IL-4 または抗 IL-2 Ig は、実験開始時に最終濃度 $1 \cdot 25 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるまで添加された。表示のように、rIL-2 または rIL-4 は、最終濃度 $25 \text{ U}/\text{mL}$ になるまで表示された培養液に添加された。分析された細胞は、前方および側方の光分散によって該分析からゲートされ、大きな $D1.1$ または $B2.7$ 細胞(もしあれば)が除かれた。C : 対照 ; $D1.1/M$: マイトシン C で処理された $D1.1$ 細胞 ; $B2.7/M$: マイトシン C で処理された $B2.7$; ND : 測定せず。

40

【0138】

マイトマイシン C 処理された $CD4^-$ ジャーカット $D1.1$ および $CD4^+$ ジャーカット $B2.7$ は、その B 細胞増殖または Ig 分泌細胞へ至る最終 B 細胞分化へ誘導する能力に

50

について調査された。T細胞依存B細胞マイトジエン(Doech, et al., 1980)の存在下、ジャーカットB2.7ではなく、ジャーカットD1.1に誘導されたB細胞の増殖は、DNA分析(図4)によって測定され、Ig分泌細胞の分化は、逆溶血プラーク分析(図5A)によって測定された。更に、分泌された抗体のアイソタイプは定量エリサ法で定性された。ジャーカットB2.7ではなく、ジャーカットD1.1は、培養上澄液中へIgGおよび少量ではあるがIgMの分泌を誘発した(図5BおよびC)。これらのデータは、まとめると、ジャーカットB2.7ではなく、ジャーカットD1.1がB細胞の分化およびIgMおよびIgGの分泌を援助する機能的能力を活性化T細胞と共有していることを示す。

【0139】

10

B細胞活性化の汎用要素の役割

D1.1上澄液はB細胞CD23の発現を誘発しなかった(図3)。静止B細胞を、B細胞存在下、無存在下で、D1.1細胞の培養培地を含むリンフォカインまたは培養液と、浸透膜によって分離されたチェンバーで培養する二室実験が行われた。ある実験では、B細胞(66% IgM)が0.45mμ膜の付いたチェンバー内で培養された。二色FACS分析によると、rIL-4(25U/mL)が、IgM⁺B細胞の28%でCD23の発現を誘発した。反対に、もう一つのチェンバーでは、D1.1細胞がCD23(バックグラウンド4.0%)に対してD1.1は4.7%)を発現するためのB細胞を活性化しなかった。更に、D1.1細胞とB細胞を一つのチェンバーで共培養したものは、もう一方のチェンバー中のCd23(4.9%)を発現するためのB細胞を活性化しなかった。しかしながら、B細胞と直接接觸を達成できれば、D1.1細胞は、B細胞によるCD23の発現を誘発することができた(B2.7細胞に対して76%体8.4%)。まとめると、これらのデータによって、B細胞におけるD1.1の効果を生じる汎用要素としての役割を裏づける事はできなかった。

【0140】

20

rIL-4は、CD23を発現するB細胞を活性化する事が知られていた(Rabin, et al., 1985)ので、この効果を果たす際のIL-4の潜在的役割を、B細胞でのCD23発現誘発の役割とは別に、更に調査した。rILはB細胞sIgM⁺の発現のアップレギュレーションをすることが知られていた(Shields, et al., 1989)。rIL-4は、CD23の発現およびsIgM⁺のアップレギュレーションを投与量に依存したかたちで誘発したけれども、D1.1細胞はCD23の発現を誘発したが、B細胞sIgMのアップレギュレーションはしなかった(図6)。B細胞の増殖におけるD1.1細胞の効果もまた、rIL-4(図4)効果とは異なっていた。rIL-4ではなくD1.1細胞は、PHA存在下でB細胞増殖を誘発した。おもしろいことに、rIL-4およびD1.1細胞は共同して、PHA無存在下ではB細胞増殖を誘発し、PHA存在下ではD1.1に誘発された増殖を増大させた。これらのデータは、まとめると、B細胞におけるD1.1細胞の効果が、IL-4によって誘発される効果とははっきりと異なる事を示唆している。しかしながら、B細胞に対するD1.1細胞の影響におけるIL-4の役割を直接調べるために、IL-4に対する中和抗体を使用した。rIL-4(図6)によって行われる抗CD23の誘発およびsIgMのアップレギュレーションの両方を阻害する抗IL-4抗体の濃度では、D1.1が介在するB細胞CD23発現は阻害されなかつた(表II)。これらのデータにより、IL-4単独ではD1.1のB細胞における効果が説明できない事が実証された。これらの結果を、まとめると、分泌要素ではなく、細胞-細胞接觸がB細胞活性化におけるD1.1の効果を説明することが示唆された。

30

【0141】

40

細胞-細胞接觸がB細胞におけるD1.1効果を生じるというアイデアを実証するために、ジャーカットD1.1および対照のB2.7細胞を1%のパラフォルムアルデヒドで固定化した。パラフォルムアルデヒド固定化は、ジャーカットD1.1のB細胞を活性化する能力を低下させたけれども、固定化されたD1.1細胞は、B細胞CD23の発現を誘発する能力を残していた。しかしながら固定化されたB2.7細胞は、CD23の発現

50

をバックグラウンドレベルから変えはしなかった。固定化された D 1 . 1 細胞 : B 細胞の割合が 5 : 1 の時、無固定化 D 1 . 1 細胞では 8 0 % であったのに比べて、6 3 % の B 細胞が誘発されて C D 2 3 を発現した。これらのデータは、まとめると、ジャーカット D 1 . 1 上の表面構造が、B 細胞の活性化を誘発するには十分であることを示唆している。

【 0 1 4 2 】

ヘルパー効クター作用を与える活性化された C D 4⁺ T 細胞の細胞表面蛋白の特徴

ヘルパー効クター作用を与える活性化された C D 4⁺ T 細胞の細胞表面蛋白の特徴付けを行うために、マウスを接触依存性ヘルパー効クター作用を有するジャーカット D 1 . 1 クローンで免疫感作した(Yellin et al., 1991)。モノクローナル抗体 (m A b) が産生され、D 1 . 1 クローンおよび非ヘルパージャーカットクローン B 2 . 7 に識別して結合するかどうかに対して、ハイブリドーマ上澄液をスクリーニングする。10

【 0 1 4 3 】

非ヘルパー B 2 . 7 細胞の表面ではなく、D 1 . 1 細胞表面に特異的に結合した 5 c 8 と名付けられたマウス I g G 2 a m A b が確認された(図 7)。m A b 5 c 8 は、他の様々な細胞系 : T 細胞白血病系、C E M , H 9 , M o l t - 4 , および P e e r ; B 細胞由来細胞系、B A , R a j i , または R a m o s ; 骨髄单球細胞系、U 9 3 7 ; または赤血球細胞系、K 5 6 2 とは結合しなかった(下記表 3 参照)。

【表3】

表 3
細胞集団および細胞系での5c8 Agの発現

細胞系	静止	活性化	
ジャーカットD1.1	+	+	
ジャーカットB2.7	-	-	
CEM	-	-	10
H9	-	ND	
Molt-4	--	-	
PEER	-	-	
BA	-	ND	
Raji	-	ND	
Ramos	-	ND	
U937	-	-	
K562	-	ND	20

細胞集団	静止	活性化	
T細胞	-	+	
B細胞	-	-	
単球	-	-	

30

【0144】

これらのデータは、表示細胞系または細胞集団に結合しているmAb 5c8のFACS分析から得られた。mAb 5c8の結合は、各々の細胞系または細胞集団に対する適切な陽性および陰性対照mAbsのFACS染色と比較して決定された。ND:測定されなかった。

40

【0145】

mAb 5c8がジャーカットクローンD1.1のヘルパー能力と作用的に関連のある分子と反応するかどうかを評価するために、mAb 5c8の効果を、B細胞でのD1.1に誘発されるCD23発現の分析で調査した。mAb 5c8はジャーカットD1.1誘発細胞活性化(図8)を阻害した可能性がある。反対に、アイソタイプの対照mAb、W6/32は、D1.1が介在するB細胞活性化を阻止しなかった。ここに提示したデータにより、5c8AgがD1.1細胞のヘルパーエフェクター作用に重要な役割を果たしていることが示唆される。

【0146】

mAb 5c8によって認識される抗原の生化学的特質

50

mAb 5c8によって認識される抗原を生化学的に特質化するために、免疫沈殿を、mAb 5c8または対照mAbsによっておこなわれる。対照mAbsは、表面ヨウ素化されたジャーカットD1.1細胞および対照、つまり表面mAb 5c8結合を欠く非ヘルパー・ジャーカットB2.7細胞の細胞溶融物上のクラスI MHC (W6/32)またはCD28 (kolt-4)抗原を認識する。mAb 5c8は、対照のB2.7溶融物からでなく、ヘルパー・クローニングD1.1の溶融物から、SDS/PAGE上の30kDaに移動する蛋白を免疫沈殿した(図9)。

【0147】

mAb 5c8によって免疫沈殿された蛋白種は、2-メルカプトエタノール(2-ME)による還元による影響は受けなかった。これは、30kDaのバンドが、ホモダイマーに連結した二硫化物でも、ヨウ素化が容易にできない他の蛋白に連結した二硫化物でもないことを示唆している。反対に、対照、抗-CD28 mAb、KOLT-4は、2-MEが存在しない場合は88kDaバンドを、2-MEが存在する場合は44kDaバンドを免疫沈殿した(図9)。これは公開のレポート(Martin, et al., 1986)およびこの構造が二硫化物が結合したホモダイマーであるという解釈と一致する。対照のmAb W6/32は、43と12kDa MWの蛋白の非硫化物が結合したヘテロダイマーを沈殿させた(図9)。これらのデータにより、mAb 5c8が、30kDa MWの非硫化物に結合した蛋白種を、D1.1細胞の表面から認識したことが示唆された。

【0148】

通常リンパ細胞による5c8 Ag発現の特徴

mAb 5c8または様々な対照mAbsの結合について、新たに単離されたTおよびBリンパ球、単球、および、PMAおよびPHAに刺激されたT細胞についてのFACSによって調査される。静止TまたはBリンパ球または単球は、5c8 Agを発現しなかった(上記表3、および図10参照)けれども、活性化されたT細胞のサブセットは、PMAおよびPHAで活性化された後5時間して、5c8 Agを発現した事がわかった(図10)。

【0149】

5c8 Agの発現のカイネチクスおよび細胞分布を特徴づけるために、mAb 5c8のT細胞への結合が、T細胞活性化後、様々な間隔をおいてFACSで調査された。T細胞活性化後、実質的に全てのT細胞に上に急速に誘導される事が知られている(Bjorndahl, et al., 1988)ので、32/38kDaの二硫化物結合ヘテロダイマーであるCD69分子を、対照として選択した。5c8が静止T細胞には無く、活性化後T細胞のサブセット上で発現されるけれども、対照的に、低レベルのCD69発現が静止T細胞上でみられ、高レベルのCD69の発現が全T細胞集団の活性化によって誘導された(図10)。mAb 5c8の結合が活性化後3時間(Bjorndahl, et al., 1988)に著じるしく、24時間(図11)を越えて持続したので、発現のカイネチクスにより、さらにCD69と5c8 Agは区別された。ここに示されたデータによって、CD69と5c8 Agが、それらの発現の細胞分布によっても、それらの活性化後のアップレギュレーションのカイネチクスによっても識別されることが提示された。

【0150】

mRNAまたは蛋白の合成が、5c8 Ag発現に必要とされるかどうかを決定するために、アクチノマイシンDまたはシクロヘキサミドの存在または非存在下で、T細胞をPMAおよびPHAで刺激し、5c8およびCD69の発現を比較した。5c8の発現は、アクチノマイシンDまたはシクロヘキサミドのいづれかの処理によって阻害された(図10)。反対に、CD69は、アクチノマイシンDまたはシクロヘキサミドのいづれかの存在下にもかかわらず、活性化によって、以前に報告されている(Bjorndahl, et al., 1988)ようにアップレギュレーションされた(図11)。これらのデータにより、T細胞活性化後に5c8の抗原の発現が、mRNAの転写および蛋白の新生(de novo)合成に依存している事が示唆された。

【0151】

10

20

30

40

50

活性化後に 5 c 8 A g を発現する T 細胞サブセットの特徴

活性化後 5 c 8 A g を発現する T 細胞サブセットの特徴付けを行うために、 C D 4⁺ C D 8⁻ または C D 4⁻ C D 8⁺ T 細胞集団を抗 C D 8 または抗 C D 4 m A b 处理によってそれぞれ単離し、その後、補体 depletion を行なった。 C D 4⁺ C D 8⁻ または C D 4⁻ C D 8⁺ 集団を、 P H A および P M A で活性化し、 F A C S による 5 c 8 A g または C D 6 9 の発現について調査した。 C D 8⁺ 細胞が活性化後、類似量の C D 6 9 を発現したという事実にもかかわらず（図 11）、活性化後、 5 c 8 の発現は、 C D 8⁺ ではなく C D 4⁺ 細胞上において排他的に誘発された。これらのデータをまとめると、 5 c 8 A g の発現が C D 4⁺ 細胞に限られる事が実証された。

【 0 1 5 2 】

10

通常 T 細胞の介在する T ヘルパー機能における 5 c 8 A g の役割の評価

通常 T 細胞の介在する T ヘルパー機能における 5 c 8 A g の役割の評価するために、表面 C D 2 3 分子と発現するための小量の静止 B 細胞を誘発する活性化 T 細胞の能力における m A b 5 c 8 の効果を調査した。ホルボールジブチレート（ P B D ）の存在下、抗 - C D 3 (O K T 3) または対照の抗 - C D 4 (O K T 4) m A b s で被覆された表面で、 T 細胞を培養しそしてパラフォルムアルデヒドで固定化した。これらの固定化された T 細胞の、溶解性 m A b 5 c 8 または O T K 4 の存在下での B 細胞活性化能力について調査した。 O T K 4 は、 T 細胞表面 C D 4 分子と反応するが、 T - B 細胞相互作用と阻害しない (Rogozinski, et al., 1984) から、 m A b O T K 4 は、これらの実験でアイソタイプと適合した対照として選択された。 O T K 4 ではなく m A b 5 c 8 は、活性化された T 細胞の B 細胞 C D 2 3 発現を誘導する能力を阻害した（下記表 4 参照）。

20

【 表 4 】

表 4

パラフォルムアルデヒドに固定化された活性化 T 細胞が介在する B 細胞表面 CD23 誘導における mAb 5c8 处理の効果

	培地	mAb 5c8	OKT4
無 T 細胞	6.8	ND	ND
ジャーカット D1. 1	93.8	9.8	96.1
PDB 活性化 T 細胞	29.8	ND	ND
PDB/OKT4 活性化 T 細胞	26	ND	ND
PDB/OKT3 活性化 T 細胞	52.7	30.4	56.1

30

【 0 1 5 3 】

40

表示したように、 B 細胞を単独で培養した後、または同数のジャーカット d 1 . 1 細胞存在下で培養した後、二色 F A C S 分析によって C D 2 3 を発現する I g M⁺ B 細胞のパーセンテージ、あるいは P B D 単独で刺激されたか、または固定化された抗 - C D 3 (O K T 3) または抗 - C D 4 (O K T 4) m A b のいづれかの存在下で刺激されたパラフォルムアルデヒドで固定化された T 細胞のパーセンテージを示す。 I g G 2 a m A b s 、 5 c 8 、および O K T 4 は、並行の用量 - 反応実験において、 9 0 % の C D 2 3 誘導を阻害した m A b 5 c 8 の濃度の二倍の 5 0 0 n g / m L であった。 N D : 測定せず。

【 0 1 5 4 】

50

次に、 m A b 5 c 8 および O K T 4 の、通常のヒト T 細胞によって起こされる最終 B 細胞分化を阻害する能力にたいする効果を比較した。これらの実験では、 C D 4⁺ T 細胞を P W M の存在下、自己由来の、カラム単離 B 細胞と共に培養し、 I g を分泌する B 細胞

ラーク形成コロニー（PFC）の数を逆溶血ラーク分析によって測定した。OKT4ではなく、mAb 5c8が、CD4⁺細胞起動PFC反応を阻害した（表5参照）。これらのデータをまとめると、5c8Agが活性化されたCD4⁺T細胞のヘルパーエフェクター機能の接触依存性面に関わっている事が実証される。

【表5】

表 5
抗体形成細胞の誘導におけるmAb 5C8処理の効果

T 細胞	B細胞	PWM	mAb	PFC			10
				実験1	実験2	実験3	
CD4 ⁺ T	B			120	240	600	
	B	PWM		240	600	4,800	
CD4 ⁺ T				240	120	180	
CD4 ⁺ T	B			2,580	780	ND	
CD4 ⁺ T		PWM		3,840	240	60	
CD4 ⁺ T	B	PWM		149,760	85,200	25,800	20
CD4 ⁺ T	B	PWM	5c8	58,000	4,680	9,000	
CD4 ⁺ T	B	PWM	OKT4	143,520	103,200	30,960	

30

【0155】

CD4⁺T細胞を、PWMの存在下または無存在下で、自己由来の、抗Igカラム単離B細胞との比率0.6:1で培養した、無関連のドナーについての3つの別個の実験の結果を示す。106B細胞につきラーク形成コロニー（PFC）の数を逆溶血ラーク分析によって測定した。OKT4が1μg/mLである実験1以外では、mAbs 5c8およびOKT4は、500ng/mLであった。ND：測定せず。

40

【0156】

考察

ジャーカットD1.1クローンは、関連のない種々の患者由来のB細胞に対して、表面CD23分子（B細胞活性化のマーカー）の発現を誘導し、またT依存性B細胞マイトジエンの存在下で増殖およびISCへの最終分化を誘導する点において、CD4⁺ジャーカット細胞ライン及び他の種々の白血病T細胞ラインとは機能的に異なっている。B細胞活性化に対するこのD1.1の作用は、親密な細胞接觸を必要とし、分泌された因子（または特にIL-4）によっては説明できなかった。

【0157】

ジャーカットD1.1が接触依存性B細胞の活性化および分化を誘導できるという事実

50

は、ジャーカットD 1 . 1が、補助(help)の接触依存性エフェクター相を媒介する活性化T細胞と共に通した、表面構造を有していることを示唆している。

【0158】

活性化されたT細胞と、Tヘルパー機能のエフェクター相を媒介するB細胞との間の分子的相互作用は複雑であり、殆ど理解されていない。Tヘルパー・エフェクター機能の機構を詳細に吟味するために、幾つかの研究によってB細胞分化の初期現象が測定された。第一に、細胞サイクル過程に関連したRNA、DNAおよび酵素のB細胞合成が、活性化された休止していないT細胞によって誘導される(O'Brien, et al., 1988; Grusby, et al., 1991; Noelle, et al., 1991; Noelle, et al., 1990; Zinkernagle, 1977; Sprent, 1978; Sprent, 1978; Jones, et al., 1981; Julius, et al., 1982; Chestnut et al., 1981)。第二に、B細胞表面CD23の誘導により測定されるB細胞の活性化が、活性化された休止していないT細胞によって誘導される(Zinkernagle, 1976)。第三に、B細胞の活性化および増殖が、パラホルムアルデヒドで固定された活性化T細胞によって誘導され得る(Zinkernagle, 1977; Julius, et al., 1982)。第四に、B細胞の増殖が、活性化された休止していないT細胞由来の膜プレパレーションによって誘導される(Noelle, et al., 1991; Katz, et al., 1973; Brian, 1988)。最後に、活性化T細胞または活性化T細胞膜がB細胞の活性化または増殖を誘導する能力は、プロテアーゼ処理によって喪失される(Katz, et al., 1973; Jones, et al., 1981)。総合すると、これら所見は、T細胞の活性化が、B細胞と相互作用する表面構造の誘導に付随し、B細胞の活性化および増殖のための接触依存性信号を提供するという思想に合致している。活性化T細胞と同様であるが、他の白血病細胞ラインとは異なり、ジャーカットD 1 . 1は、細胞/細胞の接触に依存するがリンホカイン、Ag特異性またはMHC制限には依存せずに、B細胞CD23の発現を誘導する能力を有している。B細胞表面CD23の発現の誘導は、T指令されたB細胞のIg分泌細胞への分化(固定された活性化T細胞の表面によって駆動され得る)の初期段階または中間段階で生じると思われる(Zinkernagle, 1976; Sprent, 1978)。B細胞CD23の発現の誘導に加えて、ジャーカットD 1 . 1は、PWMの存在下でのD 1 . 1に誘導された最終B細胞分化において、CD4⁺ジャーカットクローニとは機能的に異なる。これらの点において、ジャーカットD 1 . 1は活性化されたT細胞と共に通した、B細胞を刺激する後天的な表面特性を有していると思われる。

【0159】

ヘルパー機能を説明するジャーカットD 1 . 1の表面構造の性質は、今回の研究においては同定されなかった。T細胞上のCD28分子はB細胞リガンドを結合するから(Hirohata, et al.,)、特に興味深いのは、ヘルパーD 1 . 1およびB 2 . 7クローニ上のCD28の発現を比較することである。しかし、ジャーカットD 1 . 1およびB 2 . 7がCD28分子を発現したという事実によって、CD28だけではジャーカットD 1 . 1の独特的機能的性質を説明できないことが示された。更に、CD2、CD3、CD5、CE38、LFA-1a、LFA-1bおよびLFA-3に特異的なmAbを用いたmAb阻害研究においては、何れのmAbも、D 1 . 1に媒介されたB細胞の活性化を阻害するものとして同定され得なかった。ヘルパー効率を媒介するD 1 . 1の異なった細胞表面特性を同定するために、D 1 . 1と反応し、D 1 . 1のB細胞を補助する能力を阻害するmAbを創製する試みが開始された。

【0160】

ヘルパー機能を媒介する表面構造は同定されていないが、D 1 . 1系は、ヘルパー効率を媒介するCD4分子の役割を暗示している。CD4⁺であるものとして単離されたジャーカットサブクローニが、ヘルパー機能(通常はCD4分子を発現するT細胞のサブセットに付随する)を有していたことは奇妙なことである。幾つかの系統の研究によって、CD4分子はヘルパー効率を媒介するCD4分子において直接の役割を果たさないことが示唆されている(Mitchison, 1971; Gusby, et al., 1991; Noelle, et al., 1991; Vitetta, et al., 1989; Katz, et al., 1973; Zinkernagle, 1976)。TCRおよびCD4の両者がMHCクラスIIの分子(Ia)と相互作用するという事実(Whalen, et al.

10

20

30

40

50

, 1988) は、Ia分子のライゲーションがヘルパー効果のモデルになり得ることを示唆している。加えて、B細胞上のIa分子のライゲーションがB細胞に信号を発するという所見は、このモデルによって更に支持される (Pollok, et al., 1991; Bartlett, et al., 1990; Martinez, et al., 1981)。ジャーカットD1.1はヘルパー機能を有するがCD4⁻ではないという事実は、CD4分子がヘルパー機能のエフェクター相には必要とされないことを強力に示唆する。これとは対称的に、ジャーカットのCD4⁻クローンが後天的なヘルパー機能を有することは、CD4分子がCD4⁻ジャーカット細胞のヘルパー効果を阻害し得ることを示唆する。ジャーカットD1.1がDC4分子を欠失していることと、その独特のヘルパー機能との間の関係を直接測定するために、異種プロモータによって駆動されるCD4+cDNA構築物の電気穿孔法によって、D1.1の安定なCD4⁺形質導入体が創製された。

10

【0161】

最近、ネズミ系において、活性化されているが休止していないTリンパ球から誘導された膜プレパレーションが、B細胞の増殖を誘導するが Ig 分泌を誘導しないことが示された (Noelle, et al., 1991; Katz, et al., 1973; Brian, 1988)。これら研究のD1.1系に対する関係は現在は明らかでないが、D1.1細胞から単離された膜が、B細胞に対してCD23の発現、増殖および最終分化を誘導するか否かを決定することは興味深いことである。何れにしても、ジャーカットD1.1は、接触依存性ヘルパー機能の媒介において重要な表面分子の同定および特徴付けを行なうために有用であるらしい。

20

【0162】

接触依存性ヘルパー機能をもった機能的に独特なジャーカット白血病ライン (D1.1) が、D1.1に誘導されたB細胞の活性化を阻害するネズミ抗体 (5c8と命名) を創製するために用いられた。抗体5c8は、D1.1表面の独特な蛋白種 (ジスルフィド結合されておらず、SDS/PAGE上では30kDaの分子量で移動する) を認識した。正常なリンパ球においては、5c8+Agの発現は活性化後のT細胞サブセットに限定されていた。T細胞上における5c8+Agの該活性化に誘導された発現は、mRNAの転写およびノボタンパク (novo protein) 合成を必要とした。該5c8+Agは活性化されたT細胞表面に一時的に発現されるが、この発現は6時間でピークに達し、24時間で消失する。正常T細胞表面での機能的研究において、mAb・5c8は、固定化された活性化T細胞のB細胞CD23の発現を誘導する能力を阻害した。加えて、mAb・5c8は、正常T細胞のB細胞分化を指令する能力を阻害した。総合すると、これらのデータは、5c8+Agが活性化CD4⁺T細胞 (Tヘルパー機能の接触依存性因子を媒介すること含まれる) に専ら発現される、活性化に誘導された新規な表面タンパクであることを示している。

30

【0163】

5c8+Agの組織分布、発現の速度論、誘導のための代謝要求性および生化学によって、5c8+Agは、T細胞活性化によって誘導される他の公知の表面タンパクから区別される。第一に、他の公知のT細胞活性化マーカーは全て、CD4⁺で且つCD8⁺のT細胞によって発現されるのに対して、5c8+Agは専らCD4⁺T細胞によって発現される。第二に、T細胞の活性化に続く5c8+Ag発現の速度論は、他のT細胞活性化分子とは異なっていた。5c8+Agは活性化後6時間で最大に発現され、24時間で消失するのに対し、CD25 (Doech, et al., 1980)、Ia (Rabin, et al., 1985) およびCD28の32kD形は、活性化後18時間以上誘導される。加えて、CD69は5c8+Agよりも迅速に発現され、また (5c8+Agとは異なって) 24時間以上持続する。第三に、5c8+Ag発現の誘導はmRNA転写およびタンパク合成に依存したが、CD69は依存しなかったので、5c8+Agは、その誘導の代謝要求性によってCD69から区別された。第四に、5c8+Agは30kDのジスルフィド結合されていない種であった。これに対して、初期活性化分子であるCD69は、28/32kDのジスルフィド結合されたヘテロダイマーである (Bjorndahl, et al., 1988)。総合すると、これらのデータは、5c8+Agが他の公知のT細胞活性化分子とは異なっていることを示唆している。

40

【0164】

50

また、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ は、その組織分布および生化学の幾つかの側面によって、T-B相互作用において役割を果たすことが知られている他のT細胞表面分子からも区別された。第一に、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ はT細胞活性化によって誘導されたが、休止細胞出は発現されなかつた。これに対して、B細胞表面リガンドと相互作用するCD4, CD2, CD5, CD28, LFA-1, ICAM-1, CD45RO及び6C2 (Doyle, et al., 1987; Van de Velde, 1991; Tohma, et al., 1991; Sanders, et al., 1991; Linsley, et al., 1990; Stamenkovic, et al., 1991; Rothlein, et al., 1986; Tanimoto et al., 1991)は、休止T細胞表面に発現する (Rothlein, et al., 1986; Tanimoto et al., 1991; Sanchez Madrid, et al., 1982; Smith, et al., 1986; Yamada et al., 1985)。第二に、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ は活性化Tリンパ球に特異的に発現され、B細胞、単球または細胞ラインのパネル(表1)には発現されないことによって、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ は、B細胞または一定の細胞ライン(例示せず)にも発現されるICAM-1, CD4, CD5, IFA-1, CD2および6C2分子から区別される。第三に、CD2, CD5, CD28, LFA-1, ICAM-1, CD45RO及び6C2は、CD4⁺T細胞と同様にCD8⁺にも発現される (Rothlein, et al., 1986; Tanimoto et al., 1991; Sanchez Madrid, et al., 1982; Smith, et al., 1986; Yamada et al., 1985)のに対して、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ の発現はCD4⁺T細胞に限定されていた。第四に、mAb・ $5\text{c}8$ で沈殿された30 kDタンパクは、これら他のタンパク (Rothlein, et al., 1986; Tanimoto et al., 1991; Sanchez Madrid, et al., 1982; Smith, et al., 1986; Yamada et al., 1985)の何れとも似ていなかつた)。最後に、mAb・ $5\text{c}8$ はジャーカットD1.1に媒介されるヘルパー効果を阻害する能力によって同定されたから、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ はこれら他の分子とは異なつていた。

【0165】

mAb・ $5\text{c}8$ はジャーカットD1.1および固定された活性化Tリンパ球の接触依存性ヘルパー作用を阻害するから、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ は、B細胞表面のリガンド(または「カウンターレセプター」と相互作用することによって、B細胞活性化機能を媒介すると思われる。この $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ のB細胞カウンターレセプターとの相互作用は、T-B対に追加の付着力を提供すること、B細胞原形質への刺激信号を変換することまたはこれら機構の組み合わせによって、ヘルパー機能を媒介し得る。正確な機構には関係なく、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ の一時的な発現は、非特異的なB細胞活性化を制限するための分子的な解決を提供し得る。抗原特異的な同起源のT-B対の局在化された環境における $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ の一時的発現は、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ の抗原/MHCに制限されない活性化機能を、適切なB細胞標的ヘチャネルし得る。 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ の発現および下方調節の速度論は、内皮細胞、活性化誘導されたリンパ球の細胞表面メディエータおよびリンパ球結合性ELAM-1 (Bevilacqua, et al., 1987)と共に通している。この類似性は、局在化された細胞間相互作用を生じさせるために一時的発現を利用する戦略が、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ 、ELAM-1、並びに可能性としては、直接接触によって他の細胞に強力な信号を伝達する未だ特徴付けられていない他の表面分子によって共有され得ることを示し得るかも知れない。

【0166】

CD4分子は、ヘルパー機能をもつたT細胞前駆体を包含するT細胞ポピュレーションを同定する (Reinherz, et al., 1979)。しかし、CD4⁺サブセットは機能的に不均一であり、またヘルパー細胞に加えて、細胞毒性のサプレッサー細胞を含んでいる (Krensky, et al., 1982; Thomas, et al., 1981)。 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ がヘルパー機能に含まれるという事実は、 $5\text{c}8\cdot\text{Ag}$ が、CD4発現よりも密接にヘルパー発現型と関連し得ることを示唆している。活性化CD4⁺細胞における $5\text{c}8$ 発現の不均一な分布は、CD4⁺T細胞の機能的サブセット類が、その $5\text{c}8$ 発現レベルによって区別される得るかもしれないことを示唆する。例えば、ヘルパー活性または細胞毒性に関連して、 $5\text{c}8\cdot\text{CD4}^+$ 細胞および $5\text{c}8^+\text{CD4}^+$ 細胞の機能的可能性を測定することは興味深いことであろう。

【0167】

T細胞ヘルパー効果を有するB細胞応答性 (Krusemeier, et al., 1988; Hod 50

gkin, et al., 1990; Noelle, et al., 1991; Kubota, et al., 1991)、アイソタイプスイッチングの調節 (Tesch, et al., 1984) 及び体細胞超突然変異 (Weigert, et al., 1970) をもたらす複雑なプロセスである。多くの細胞 / 細胞相互作用によって、並びに種々のリンホカインを分泌することによって、T 細胞が B 細胞と相互作用するという事実は、個々の信号または信号の一定の組み合わせによって、B 細胞分化の特定の側面が調節されるであろうことを示唆する。 $mAb \cdot 5c8$ が T 細胞ヘルパー機能の接触依存性の側面を阻害するという事実によって、 $CD4^+T$ 細胞が液性免疫反応を調節するプロセスを更に詳細に検討する手段が提供される。

【0168】

実験の第2シリーズ

10

ヒトリンパ臘胞内で T - B リンパ球の共働を媒介する分子的相互作用

T ヘルパー機能と称する過程では、 $CD4^+$ の T リンパ球は、体液での（抗体が媒介する）免疫反応を媒介する抗原特異的 B 細胞の分化を選択、誘発する (Mitchell, et al., 1968; Mitchison, 1971; White, et al., 1978; Reinhertz, et al., 1979; Janeway, et al., 1988; Rehemtulla, et al., 1991; Grusby, et al., 1991)。リンパ臘胞内では生理学的な T - B 反応が起こっているが、様々なインビトロ系において、T ヘルパーの信号の機構的解明が可能になっている。ヘルプの誘導相は抗体と MHC に限定されているが、エフェクター相は非特異的であり、リンホカインと接触依存性信号の両方に媒介されている (Martinez, et al., 1981; Anderson, et al., 1980; Clement, et al., 1984; Crow, et al., 1986; Brian, 1988; Hirohata, et al., 1988; Noelle, et al., 1989; Whalen, et al., 1988)。

【0169】

接触依存性信号の解明は、不活性な末梢 B 細胞を本質的に活性化する、機能的にユニークなジャーカット T 細胞白血病細胞系 D 1 . 1 のサブクローニングが最近同定されたことにより進歩した (Yellin, 1991)。D 1 . 1 クローンは、以前から、不活性な B 細胞を誘発して表面の CD 23 分子を発現させ、B 細胞を増殖させて、抗体産生細胞に分化させることができわかっている (Yellin, 1991)。D 1 . 1 の B 細胞活性化能力は細胞の表面に局在している。これはパラホルムアルデヒドで固定された D 1 . 1 が、B 細胞を活性化する能力を保持していたが、D 1 . 1 の上清は不活性だったからである (Yellin, 1991)。これらのデータを一緒に考慮すると、D 1 . 1 は、接触依存性のヘルパー機能を媒介する活性化された T 細胞と表面構造を共有していることを示している。

20

30

40

【0170】

実験の第1シリーズでは、D 1 . 1 と特異的に反応して D 1 . 1 による B 細胞の機能的活性化を阻害する mAb (Lederman, et al., 1992) について、ハイブリドーマをスクリーニングすることにより、このような一つの構造 ($5c8 \cdot Ag$ と称する) が同定された。 $mAb \cdot 5c8$ によって、活性化された $CD4^+T$ 細胞上に発現するが、 $CD8^+T$ 細胞、B 細胞、単球には発現しない 30 キロダルトンの新規な表面構造が同定された (Lederman, et al., 1992)。PHA、PMA で刺激した後の、細胞表面での $5c8$ 抗原の発現の速度論は比較的ユニークであり、最大の発現は 6 時間後に起こるが、その後は下方調節されて 24 時間後にはまったく発現しなくなる (Lederman, et al., 1992)。機能的アッセイにおいて、 $mAb \cdot 5c8$ は、正常な $CD4^+T$ 細胞の B 細胞を抗体産生細胞に分化させる能力を阻害する (Lederman, et al., 1992)。以上のことを総合すると、これらのデータは、 $5c8$ 抗原が、接触依存性ヘルパー機能を媒介する $CD4^+T$ 細胞の表面構造の一つの構成部分であることを示している。従って、この $5c8 \cdot Ag$ を「T 細胞 - B 細胞活性化分子 (T - BAM)」と命名する。

【0171】

T - BAM はインビトロで接触依存性ヘルパー機能を誘起する T 細胞分子の一つであるが、そのリガンド及び B 細胞上の「カウンターレセプター」、即ち、インビボのリンパ系組織内で接触依存性ヘルパー機能を媒介するのに他の T 細胞分子と B 細胞分子がどのような役割を果たしているかは殆どわかっていない。幾つかの興味深い B 細胞の表面分子が、

50

リンパ系組織内において接触依存性信号を受容する役割をしているだろうといわれている。C D 4 0 分子、C R 2 分子および接着分子がそれである。ヒトB細胞表面上のC D 4 0 分子は、リンパ節B細胞分化に関する興味深い信号機能を持っている (Clark, et al., 1986; Clark, et al., 1988; Ledbetter, et al., 1987; Ledbetter, et al., 1986)。何故なら、抗C D 4 0 (mAb G28-5(Clark, et al., 1986)) はプログラムされた胚中心B細胞の死(アポプトーシス) (Lim, et al., 1989) を阻害し、ヒトB細胞の増殖、分化および長期の成長を誘起することがわかっているからである (Banchereau, et al., 1991a; Banchereau, et al., 1991b)。C R 2 はB細胞の補助レセプターで、抗体による誘発の後にB細胞に細胞分裂誘起信号を送ることができ、またはE Bウイルスの細胞表面レセプターとしての役割を果たす (Nemerow, et al., 1985; Carter, 1988)。最後に、接着レセプターL F A 1、L F A 3 およびI C A M - 1 は、多くの細胞の相互作用の中の接着相互作用において役割を果たしていることが知られていて、これらの構造と反応するm A b は、T細胞依存性B細胞の過程を阻害する (Tohma, et al., 1991a; Tohma, et al., 1991b)。しかし、ヘルパー相互作用におけるこれら分子の正確な役割はまだはっきりしていない。

10

20

【0172】

この第2シリーズの実験では、これらの発見を3つの方向に拡大した。第一に、B細胞リンパ腫クローンR A M O S 2 6 6 (Seigel, et al., 1990) が、抗T-B A M (m A b · 5 c 8) に阻害される仕方で、D 1 . 1 細胞の接触に応答するものとして同定された。第二に、T-B A Mと共に接触依存性T-B活性化の媒介に関するB細胞の表面構造 (C D 4 0) が同定された。第三に、T-B A Mは、インビボでは主に、リンパ節の外套部と中心部 (T細胞とC D 4 0 を発現するB細胞との相互作用が起こる解剖学的部位) において、T細胞によって発現されることがわかった。

30

30

40

50

【0173】

材料と方法

細胞系：ジャーカット・クローンD 1 . 1 とB 2 . 7 については既述されている (Yellin, et al., 1991; Lederman, et al., 1992)。R A M O S 2 6 6 、4 C N · 3 F 1 0 (R A M O S 2 6 6) クローン (Siegel, et al. 1990) は、食品医薬品局 (F D A) のセンター・フォー・バイオロジックス・エバリュエーション・アンド・リサーチ (Bethesda, M D) の Jay P. Siegel博士の好意により寄贈された。ヒトF c R g I I (C D 3 2) を発現しているL細胞は、Schering-Plough(Dardilly Cedex, France)のJacques Banchereau博士から贈られた (24)。また、マウスI a を発現しているL細胞は、コロンビア大学のNed Braunstein博士から贈られた。

40

50

【0174】

モノクローナル抗体：m A b · 5 c 8 (I g G 2 a) については記述されている (Leberman, et al., 1992)。次のm A b は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (Rockville, M D) から入手可能なハイブリドーマから作製された；O K T 4 (抗C D 4) 、O K T 8 (抗C D 8) 、O K T 3 (抗C D 3) 、W 6 / 3 2 (抗M H C クラスI x) 、T H B - 5 (抗C R 2 (C D 2 1)) 、T S 1 / 2 2 . 1 . 1 3 (抗L F A 1 a (C D 1 1 a)) 、T S 1 / 1 8 . 1 . 2 . 1 1 . 4 (抗L F A 1 b (C D 1 8)) 、T S 2 / 9 . 1 . 4 . 3 (抗L F A 3 (C D 5 8))。これらのm A b は、ハイブリドーマの上清の飽和濃度もしくは腹水の希釀濃度で使用され、又はプロテインAカラム (Biorad, Rockville Center, N Y) 若しくはプロテインGカラム (Pharmacia, Upsala, Sweden) で腹水液から精製して使用された。抗L F A 3 (7 A 6) はバイオジーン社 (Cambridge, M A) のVicki Sato博士から贈られた。抗C D 2 3 - P E 、l e u 1 6 (C D 2 0) 、l e u M 5 (I g G 2 b · 抗C D 1 1 c) m A b は、ベクトン・ディクソン社 (Mountainview, C A) から購入した。m A b · G 2 8 - 5 (1 9) は、ワシントン大学 (シアトル, W A) のEdward A. Clark博士から贈られた。m A b · R R 1 / 1 . 1 . 1 (抗I C A M - 1 (C D 5 4)) は、テキサス大学サウスウェスタン・メディカル・センター (ダラス, T X) のPeter Lipsky博士から贈られた。抗C D 4 0 · m A b であるB - B 2 0 (I g G

1) は、バイオソース・インターナショナル社 (Camarillo, CA) から購入した。mAb・32.2 (抗FcRgII (CD32)) は、Medarex、West Lebanon、NH から購入した。FITCでラベルした抗IgMは、Tago社 (Burlingame, CA) から購入した。イソタイプに適合した関連のないコントロールmAb・UPC-10 (IgG2a) とMOPC141 (IgG2b) は、シグマ社 (セントルイス, MO) から購入した。抗IL-4と抗GM-CSFは、Genzyme社 (ケンブリッジ, MA) から購入した。

【0175】

細胞蛍光グラフィック分析；略 10^5 の細胞を、飽和濃度の指示されたmAbと共に、80mg/mLの熱凝集ヒトIgG (インターナショナル・エンザイム社, Falbrook, CA) の存在下において、4で45分間培養した。蛍光物質と結合したFab₂ ヤギ抗マウス免疫グロブリン二次抗体 (Cappel, Cochranville, PA) と共にインキュベートする前に、結合しなかったmAbを除去するために細胞を洗浄した。2色分析のために、指示した直接結合FITCまたはフィコエリトリン (PE) 結合mAbと細胞とを、4で45分間、凝集したヒトIgG存在下で反応させた。分析に先だって細胞を洗浄し、PBSに再懸濁した。蛍光強度は、FACSCAN細胞蛍光グラフ (ベクトン・ディッキンソン社、Mountainview, CA) で測定した。B細胞とジャーカットクローンとの共培養を伴う実験において、ジャーカット細胞は、前方および側方の低い光散乱をもつ細胞の異なったポピュレーション上にゲートを設けることによって、B細胞の蛍光分析から除去された。

【0176】

リンホカイン：rIL-4はRobert Coffman博士から贈られ、DNA XとrIL-2はホフマン・ラ・ロッシュ社から得た。

【0177】

細胞群の単離：抹消血液リンパ球は、健康なボランティアから採った新鮮な血液から、ficolli-hypaque (シグマ社、セントルイス, MO) 上の遠心分離によって得た。脾臓B細胞も同様に、臓器提供者の新鮮なバイオプシー標本 (コロンビア大学外科のMark Barr博士から提供された) から得た。扁桃腺B細胞は、扁桃削除術後の新鮮な手術標本 (コロンビア大学ENT課のJoseph Hadad博士から提供された) から得た。リンパ系組織B細胞は、細かく碎いた組織標本をメタルスクリーンを通して、続いてficolli-hypaque遠心分離することによって得た。

【0178】

T細胞は、ノイラミニダーゼ処理したヒツジ赤血球とで陽性が選択された。B細胞は、ノイラミニダーゼ処理したヒツジ赤血球で2回ローゼッティング (rosetting) した後に、ficolli-hypaqueで沈殿しなかった細胞群から得た。

【0179】

B細胞は密度遠心法によってさらに精製された。E-細胞は一晩ポリスチレンフラスコのなかで培養され (37、5%CO₂)、接着によってマクロファージが除去された。これらの非T細胞、非マクロファージは、2300rpmでの12分間の遠心分離により、30%/50%/100%パーコール (percoll) 非連続勾配中の、高密度フラクションおよび低密度フラクションに分別された。高密度細胞は50%と100%の界面から得られ、低密度細胞は30%と50%の界面から得られた (Crow, et al., 1985)。抹消血液からの高密度 (休止) 細胞は、典型的には60-90%がCD20⁺であり、55-90%がIgM⁺、CD3⁺が5%未満、CD23⁺が5%未満 (バックグラウンド) であった。扁桃腺と脾臓からの高密度B細胞は、95%以上がCD20⁺であった。

【0180】

L細胞の培養実験：ヒトFcRgII (CD32) またはマウスIaを表示しているL細胞が、12ウェルプレート (Costar, Cambridge, MA) 内のDMEM・10%FCS中において、集密になるまで増殖された。この単層を培地で一回洗浄し、 2×10^6 のB細胞を含む1mLのIMDM・10%FCSをこの単層に加え、対でコントロール培地、あるいは2mgのG28-5・mAb、B-B20・mAb若しくはコントロールmAbを加え

10

20

30

40

50

た。18時間の培養後、温かに搅拌しながらピペットでB細胞を回収し、一度洗浄して、上記のようにしてFACSでCD23の発現を分析した。

【0181】

B細胞の活性化と分化のアッセイ：B細胞表面のCD23発現の誘起を測定する実験では、 $1 - 2 \times 10^5$ の高密度B細胞か又はRAMOS・266細胞が、200mL IMDM・10% FCS中の同数のジャーカット細胞（丸底マイクロタイヤーウェル（Nunc）内）に添加され、18-24時間後にCD23の発現が分析された。

【0182】

ヒト組織標本：バイオプシー標本を通常の診断過程か検死で集め、すぐ研究室に運んだ。それぞれの組織標本の代表的な一部を、最適切断温度（OCT compound, Miles, Elkhart, ID）でイソペンタンとドライアイス混合物の中の丸いコルクのディスク上で急速冷凍し、-70で種々の期間保存した。夫々の標本の代表部分をホルマリン緩衝液、B5またはブーアン液中で常法により固定し、パラフィンに埋め込み、ヘマトキシリソニン（H&E）染色された切片を調製した。

【0183】

多数の良性の組織検体の代表的な一部は、任意の患者から日常の治療の間に集められ、免疫組織化学的にmAb・5c8の結合が検査された。これら検体には以下のものが含まれる：食道2、胃2、小腸3、結腸6、胰臓2、肝臓3、腎臓3、子宮3、卵巣2、精巣2、前立腺1、肺4、心臓2、皮膚3、胸2、脳2、扁桃腺14、胸腺7、リンパ節4、脾臓10、虫垂5。

【0184】

免疫組織化学的染色：一連の4ミクロンの冷凍切片が、低温保存した組織ブロックから切り出され、以前に詳細に記述されたようにして（Inghirami, et al., 1990）、固定、染色された。概略を説明すれば次の通りである。切片を、適切に滴定されたmAbと共に、またF(ab')₂ヤギ抗マウスIgG(Fcガンマ特異的、1:200, Organon Teknika, Malvern, PA)及びアルカリ性ホスファターゼ・抗アルカリホスファターゼ複合体(APAAP, Dako, Santa Barbara, CA)と共に連続的に培養した。次いで、基質としてNew Fuschin及びB-ナフトール-A S-ビホスフェートで現像した。或いは、一次mAb又はイソタイプ適合性の非関連mAbの何れかと共に切片をインキュベートし、3回洗浄し、ビオチニル化されたウマ・抗マウスIgG(Vector, San Diego, CA)と共にインキュベートした。バーオキシダーゼを結合したアビジン・ビオチン複合体を適用し、ジアミノベンチジン(DAB)で現像し、場合によっては塩化ニッケルで増幅した。クライオスタット組織切片に対し、先に既述されたようにして（Inghirami, et al., 1991）、二色免疫組織化学的染色もまた実施された。簡単に説明すると、先ず、ABC技術（Vecto）を用いて、切片を一つのmAb(mAb・5c8、又はイソタイプ適合性の非関連mAb(UPC-10, IgG2a)で染色し、DABで現像した。次いで、切片をmAb(Leu M5, CD11c)か、又はイソタイプ適合性の非関連mAbと共にインキュベートし、3回洗浄し、APAAP複合体と共にインキュベートした後、前述したようにして現像した。

【0185】

結果

D1.1による誘発に反応するBリンパ腫細胞系の同定：

我々は以前、5c8・Ag(T-BAM)が、活性化したCD4+T細胞の表面上のタンパクであり、接触依存性ヘルパー機能に関与していることを示した（Lederman, et al., 1992）。この過程をより詳細に調べるために、T-BAMや他の分子の役割の分子分析を可能とする、均質なクローニングされたリンパ腫細胞系の同定を研究した。この目的のために、我々はT-BAM発現リンパ腫細胞系D1.1を利用して、CD23の上方調節によりD1.1接触に反応するB細胞リンパ腫を同定した。候補細胞系はRAMOS・266クローニングであり、これはCD23をあまり発現しないが、IL-4に誘起されると多く発現する（Siegel, et al., 1990）。

【0186】

10

20

30

40

50

RAMOS・266が、D1.1細胞に媒介された接觸に反応するかどうかを知るために、RAMOS・266細胞をD1.1細胞と共にインキュベートして、RAMOS・266の細胞表面に発現したCD23を2色FACS分析によって測定した(図12)。これらの実験において、陽性コントロールとして末梢B細胞をD1.1と共にインキュベートしたが、これは、B細胞がD1.1接觸に反応して表面のCD23を増加することが知られているからである(図12)。陰性コントロールとして、RAMOS・266又は末梢B細胞を、T-BAMを発現せずB細胞を活性化しないジャーカットのB2.7クローニと共にインキュベート(Lederman, et al., 1992)。予想どおり、18時間のインキュベーション後に、ジャーカットD1.1は末梢B細胞に表面CD23分子の発現を誘起したが、ジャーカットB2.7は誘起しなかった(図12)。重要なことに、末梢B細胞に対するこの効果と同じように、D1.1細胞はRAMOS・266に対して、18時間の共培養の後にCD23の発現を誘起したが、B2.7は誘起しなかった(図12)。RAMOS・266と末梢B細胞との明白な反応の違いは、RAMOS・266は全てのポピュレーションがCD23を均質なピークに上方調節したが、末梢B細胞は典型的に、明瞭に反応した細胞ポピュレーション(80%がCD23を発現した)と、全く反応しなかった細胞ポピュレーション(20%がCD23を発現しなかった)とにわかれたことである。この相違のために、RAMOS・266の反応を、CD23発現の単一のピークをもった中間の蛍光強度(MFI)として定量し、また末梢B細胞の反応を、反応細胞の比率として定量することが必要となった(図12)。異なる量のD1.1細胞を一定量のRAMOS・266またはB細胞に加えた分量反応実験(dose response experiments)によって、これらの方法が正しいことがわかる。何故なら、D1.1細胞の数が減少すると、RAMOS・266のMFIも減少し(示していない)、CD23+B細胞の割合も減少するからである(Yellin, et al., 1991)。これらのデータは、RAMOS・266が末梢B細胞の反応と同じ様に、D1.1との共培養に反応することを示している。

10

20

30

40

50

【0187】

RAMOSに対するD1.1の効果がT-BAM依存性であるかを調べるために、D1.1に媒介性された活性化に対する抗T-BAM・mAb・5c8の効果を研究した。これらの実験では、mAb・5c8またはイソタイプのコントロールmAbを、D1.1が入っているRAMOS・266または末梢B細胞の培養倍に加えた(図12)。末梢B細胞のD1.1による活性化を阻害するmAb・5c8の公知の効果と同様に、mAb・5c8は、RAMOS・266のD1.1による活性化を阻害する(図12)。対照的に、イソタイプのコントロールmAbは、D1.1の効果を阻害しなかった。以上を総合すると、これらのデータは、Bリンパ腫細胞系(RAMOS・266)が、D1.1で活性化された後にCD23を発現する細胞機構を有しており、またD1.1とRAMOS・266との相互作用がmAb・5c8によって阻害されることを示している。これらのデータは更に、D1.1とRAMOS・266との相互作用が、同質のリンパ腫細胞系における接觸依存性T-B信号をさらに詳しく調べるための有力なモデル系になり得ることを示している。

【0188】

この研究における我々の最終的な興味は、リンパ系B細胞の分化におけるT-BAMの役割を定義することであったので、次に、リンパ系器官から単離したB細胞に対するD1.1の効果を研究した。従って、前述したのと同じような実験において、mAb・5c8及びコントロール抗体の存在下および非存在下で、リンパ系器官から単離したB細胞をD1.1と共に培養した。末梢B細胞およびリンパ腫クローニ(RAMOS・266)に対するD1.1の効果と同様に、扁桃腺由来のB細胞(図13)も脾臓由来のB細胞(示していない)も、D1.1細胞によって活性化されてCD23分子を発現することが分かった。さらに、D1.1細胞のリンパ腫B細胞に対する効果は、mAb・5c8によって阻害されるが、コントロールmAbによっては阻害されない(図13)。これらのデータは、D1.1細胞とRAMOS・266の分子的相互作用が、リンパ系器官内のT細胞とB細胞の相互作用に類似していることを示している。

【0189】

B細胞に対するD1.1の増強効果は、分泌因子とは関係ないことが以前に示された。D1.1細胞がどのようにしてRAMOS・266を活性化するのかを調べるために、次の一連の実験では、リンホカインの放出（特にIL-4の役割）に関連した、RAMOSに対するD1.1の効果を研究した。これらの実験において、RAMOS・266はD1.1の上清液、D1.1細胞、rIL-2またはIL-4のいずれかと共に培養され、18時間後に表面CD23の発現のレベルをFACSで測定した。図14aに示したように、D1.1細胞またはIL-4は、RAMOS・266と末梢B細胞上にCD23を誘起した。対照的に、D1.1上清液またはrIL-2は効果がなかった（図14a）。更に、rIL-4の効果は抗IL-4によって阻害されたが、D1.1の効果は阻害されなかつた（図14a）。最後に、mAb・5c8は、rIL-4の効果を阻害しなかつた（図14a）。以上を総合すると、これらのデータによって、D1.1のRAMOS・266に対する効果はリンホカインの放出と関係ないことが示唆され、D1.1は活性IL-4を分泌しないという以前の見解が確認された（図14a）。

【0190】

T-BAMの誘発に関するB細胞の表面分子の同定：

接触依存性T-B相互作用に役割を果しているB細胞表面分子を同定するために、D1.1-RAMOS・266系を活用した。我々は、特徴のあるB細胞表面分子のうちで、CD40、CR2および接着受容体が接触依存性信号に役割を果たしている候補物質であると考えた。その理由は、これらがB細胞活性化（特に接触依存性相互作用）において役割を果していることが知られているからである（Banchereau, et al., 1991a；Nemerow, et al., 1985；Carter, et al., 1988；Tohma, et al., 1991a；Tohma, et al., 1991b；Emilie, et al., 1988；Sen, et al., 1992）。それゆえ、我々は、D1.1に媒介されたRAMOS・266および末梢B細胞の活性化に対する、これらのB細胞分子に向けられたmAbの効果について研究した。これらの実験において、D1.1細胞は、B細胞表面分子と反応するmAbの存在下において、RAMOS・266または末梢B細胞と共に培養され、18時間後にRAMOS・266またはB細胞のCD23の発現を測定した。これらの実験における陽性コントロースとして、mAb・5c8が用いられた（図12）。重要なことに、抗CD40・mAbであるG28-5（Clark, et al., 1986）は、D1.1に媒介されるRAMOS・266またはB細胞の活性化を阻害した（図12、14b）が、CR2、LFA-1、LFA-3およびICAM-1に対するmAbはほとんど効果がなかつた（図12、14b）。G28-5（IgG1）に加えて、抗CD40・mAbであるB-B20（IgG1）もまた、D1.1効果を阻害した（図15）。これらの実験では、B細胞およびRAMOS・266の両方の表面と反応する抗LFA1a・mAbであるTS1/22（IgG1）を、イソタイプ適合性の陰性コントロールとして使用した（図14b, 15）。同様の実験において、我々は、抗CD40がリンパ系器官から単離したB細胞に対するD1.1の効果を阻害することを発見した（図13）。以上を総合すると、これらのデータは、D1.1に媒介されるB細胞CD23の上方調節を阻害するという点において、抗CD40・mAbが調査した抗B細胞抗体のうちで特にユニークであることを示している。

【0191】

抗CD40・mAbは、rIL-4に誘起されたB細胞のCD23発現を増大することが知られている（Clark, et al. 1989）ので、抗CD40・mAbがCD23の発現を阻害するというのは幾分驚きである。従って、この結果を再び検討することによって、G28-5がD1.1に誘起されるCD23の発現を阻害する効果をもつとのとは対照的に、G28-5は、rIL-4に誘起されるB細胞およびRAMOS・266の指示クローニングの両方に対して、CD23の上方調節を強化することが分かった（図14a）。以上のデータを総合すると、抗CD40・mAbはB細胞に対するD1.1の効果を阻害するが、これらのmAbのB細胞に対する効果は、活性化の全般的な阻害ではないことが示される。何故なら、抗CD40はrIL-4効果を増大するからである。

10

20

30

40

50

【0192】

抗CD40が如何にして接触介助相互作用を阻害し、他のB細胞活性化信号を増大するかは、現在のところ分かっていない。一つの可能性は、D1.1がCD40と相互作用する表面分子を発現することである。我々は、D1.1の表面分子がCD40と相互作用してB細胞を刺激するならば、多量体の立体配置(multimeric configuration)の抗CD40抗体はD1.1の効果に似ているだろうし、またB細胞のCD23を上方調節するだろうと推測した。従って、FcgrIIを発現しているL細胞の存在下において、RAMOS・266とB細胞CD23に対するG28-5の効果を研究した。なお、FcgrII発現L細胞は、末梢B細胞の増殖を誘起する立体配置になっている(Banchereau, et al., 1991a)。従って我々は、B細胞を、G28-5、B-B20またはコントロールmAbの存在下において、FcgrII発現L細胞またはコントロールL細胞と共に培養し、18時間後にB細胞のCD23発現を調べた。多価の抗CD40は、扁桃腺および脾臓のB細胞(図16b)と同様に、末梢B細胞およびRAMOS(図16a)のCD23発現を誘起したが、単価のものは誘起しなかった。以上を総合すると、これらのデータは、多量体の抗CD40・mAbがB細胞を活性化してCD23を発現することを示している。また、D1.1系における抗CD40・mAbの阻害効果は、単価の抗CD40・mAbが、D1.1の表面の架橋リガンドとCD40分子との相互作用を阻害した結果であろうことを示唆する。

10

【0193】

T-B相互作用に含まれるリンパ系組織の領域における、T-BAMの発現：

20

CD4+T細胞は、卵胞や胚中心と呼ばれるリンパ系組織内において、一時的に抗原が誘起された構造でヘルパー機能を媒介するので、リンパ瘻胞内でT細胞上にT-BAMが発現しているかを調べるために、T-BAMの組織分布が免疫組織化学によって研究された。正常なヒト組織から調製された凍結組織切片をアセトンで固定し、mAb・5c8および種々のコントロールmAbを用いて免疫組織化学的に染色した。T-BAMの発現は、リンパ組織内の比較的小さい単核細胞に限定されており(図16)、筋肉、脳、腎臓、腸、卵巣、子宮、睾丸、皮膚、肺、または肝臓を含む他の組織には見られなかった(材料と方法の項を参照のこと)。

30

【0194】

リンパ系組織におけるT-BAMをもった細胞の正確な位置を知るために、扁桃腺、リンパ節、GI関連リンパ系組織、脾臓および胸腺を分析した。T-BAM発現細胞は、全ての末梢リンパ組織の二次瘻胞の外套ゾーンと胚中心明領域に優先的に局在化しており、その局在パターンはこれらの部位におけるCD4+Tリンパ球の分布と非常に類似している(図17)。扁桃腺においては、mAb・5c8及び抗CD4または抗CD8の何れかを用いた2色免疫組織化学分析によって、T-BAM発現がCD3+CD4+Tリンパ球に限られおり、CD8+T細胞には見られないことが示された(図示せず)。更に、二重染色によって、二次瘻胞内のCD4+Tリンパ球の大部分(50%以上)はT-BAMを発現していることが示唆された。

30

【0195】

インビトロのデータは、T-BAMおよびCD40の両方が接触依存性相互作用に関係していることを示しているので、我々は、T-BAMとCD40発現細胞とのインビトロでの関係を研究することに興味を持った。単色および二色免疫組織化学分析において抗CD40・mAbを用いることにより、B細胞と瘻胞樹状細胞がCD40を強く発現するとの公知の所見が確認された(Clark., et al., 1986; Hart, et al., 1988)(データは省略する)。T-BAM発現T細胞は多くのCD40+B細胞に囲まれているので、我々は、T-BAM発現T細胞と瘻胞樹状細胞との関係を測定することができなかつた(B細胞濃度が高いからである)。瘻胞胚中心内のT-BAM発現細胞と樹状細胞との関係を正確に決定するために、mAb・5c8および瘻胞樹状細胞を認識することが知られている抗CD11c・mAbを使って、二色免疫組織化学分析をおこなつた。この方法を使用することにより、T-BAM細胞は屡々、瘻胞樹状細胞および/またはその細胞質突起の近くに

40

50

存在するか、またはこれらに直接接していることが示された。これは多分、T-BAM発現T細胞はCD40+B細胞との相互作用に加えて、CD40を発現している濾胞樹状細胞と相互作用しているであろうことを示している（データは省略する）。

【0196】

T-BAM発現細胞が濾胞内において明瞭に局在していたことに加えて、比較的少ない（1%未満）T-BAM発現細胞が、末梢リンパ組織の濾胞間領域、脾臓のT細胞部位および正常な胸腺皮質においても同定され得た。胸腺においては、CD4発現細胞が多く存在するのに、T-BAM発現T細胞がほとんど無いことは興味深い。以上を総合すると、インビトロの機能的データ、並びにT-BAM保有細胞がT-B相互作用に関連した生理学的な解剖学的部位に局在することは、T-BAMがインビボでのT細胞補助において重要であるという考えを強く支持している。10

【0197】

考察

特異的な抗体反応をもたらすT細胞とB細胞との間の相互作用は、Tヘルパー機能のエフェクター相における重要な接触依存性相互作用を含んでいる。最近になって、CD4+T細胞に限定された表面活性化タンパク質、即ちT-BAMはB細胞への接触依存性ヘルパー信号の構成物であることが示された（Lederman, et al., 1992）。T-B接触依存性信号を媒介する分子的相互作用は、T-BAM発現細胞系（D1.1）およびT-BAMに媒介されるB細胞活性化を阻害する抗T-BAM・mAb（5c8）を用いることによって、更に研究された（Lederman, et al., 1992）。この第二シリーズの実験においては次のことが示された。即ち、1) 末梢血液からのB細胞に加えて、リンパ系のB細胞およびBリンパ腫クローニング（RAMOS・266）が、抗T-BAM（mAb・5c8）に阻害されるような態様で、D1.1細胞接触に対して反応すること；2) CD40は、T-BAMと共に、接触依存性T-B活性化の媒介に関係しているB細胞の表面構造であること；3) T-BAMは、主に、インビボのリンパ節の外套と細胞質の中心部分（これらはT細胞がCD40発現B細胞と相互作用する解剖学的な部位である）に多く存在するT細胞によって発現されることである。これらデータによって、T-BAMは、リンパ節B細胞の分化の過程でT細胞からB細胞に送られる関連信号であり得るとの考えを強く支持している。20

【0198】

更に、T-BAMリガンドを発現していると思われるRAMOS・266が入手可能であることは、接触依存性ヘルパー信号に役割を果たしている他のB細胞表面構造の抗体、並びにT依存性B細胞分化を媒介する分子メッセンジャーを生化学的に特徴づける抗体を、作製およびスクリーニングする際に有用であろう。30

【0199】

この研究においては、D1.1-RAMOS・266系を使用することにより、接触依存性の補助におけるB細胞表面分子の役割が分析された。我々は、抗CD40・mAbであるG28-5およびB-20が、何れも末梢血液とリンパ系器官から得られたRAMOS・266およびB細胞に対するD1.1細胞の効果を阻害することを観察した。対照的に、CR2、LFA1、LFA3、ICAM-1に対するmAbは、B細胞に対するD1.1の効果を阻害しなかった。これらのデータは、T-B細胞接触と同時に起こり且つこれと強く関連しているT細胞信号の受容における、CD40の正確な役割を示している。しかしながら、我々の系は、T-B相互作用における、LFA1及びICAM-1の正しい役割を示していない。mAb・抗ICAM-1（RR1/1.1.1.）は、D1.1が媒介するRAMOS・266またはB細胞の活性化を阻害しないが、このmAbは、活性T細胞を固定することによって部分的に接触依存性B細胞増殖を阻害することが知られている（Tohma, et al., 1991a）。我々が述べてきたT-BAM、並びにCD40依存性相互作用は、その後に引き続いて起こるLFA1-ICAM相互作用に依存した相互作用を誘起し得ると推測したい。何故なら、抗CD40が引き金となって、LFA1-ICAM-1の相互作用に依存したT-B接着が刺激されているからである（4050）。

Barett, et al., 1991)。

【0200】

D1.1の引き金に対する抗CD40・mAbの阻害効果は、それらがrIL-4に誘起されるCD23の発現を強める効果を有することとは対照的である。これらのデータは、抗CD40mAbによるD1.1効果の阻害が、B細胞の反応の一般的な阻害の結果ではないことを示している。加えて、抗CD40・mAbであるG28.5およびB-B20は、FcrgII+のL細胞の表面上にクロスリンクした形で存在しているときに、RAMOS・266並びに末梢およびリンパ節B細胞上のCD23発現を誘起した。以上を総合すると、これらの研究は、多価の抗CD40がD1.1細胞の効果と同じ効果を有し得ることを示しており、またCD40のリガンドはD1.1の表面構造であり得るとの考えと一致している。10

【0201】

D1.1系におけるmAb・5c8と抗CD40・mAbの阻害効果は、インビボのリンパ節の中で、T細胞が送るB細胞の接触依存性信号に、T-BAMとCD40の両方が、役割を果たしていることを示唆している。生理学的なT-B相互作用におけるT-BAMの役割を調べるために、インビボでのT-BAMの発現を免疫組織化学的に研究した。リンパ系組織の中で、T-BAM発現は、CD4+Tリンパ球に限られていた。これらのデータは、インビトロと同様にインビボでも、T-BAM発現がCD4+T細胞に限定されており、CD8+T細胞には発現しないことを示している。以上を総合すると、これらのデータは、CD4+T細胞ポピュレーション及びCD8+T細胞ポピュレーションが、CD4及びCD8の発現だけでなく、少なくとも一つの別の分子(T-BAM)の発現に関しても異なっている別個のT細胞系であることを示唆している。また、CD4+細胞のT-BAM発現がCD4+細胞に限定されていることは、ヘルパー機能がCD4+細胞に限定されることの分子根拠であることを示唆している。20

【0202】

T-BAMは、CD4+T細胞に限定されていることに加えて、インビボのリンパ系器官において、その発現がT細胞に限られている点で、今までにわかっているヒト表面T細胞活性化分子の中でも独特であると思われる。ラットにおいては、インビトロでの活性化の後に、OX-40という分子量50キロダルトンのタンパク質だけがCD4+T細胞によって発現されるが、報告された脾臓内でのOX-40の発現様式(Paterson, et al., 1987)は、我々が観察した外套と細胞中心部分でのT-BAMの発現とは異なっているよう思える。しかし、これらの分子の関係(もし存在するとすれば)を理解するには、両者の種において、これらの構造の関連した相同性を同定することが必要になるだろう。以上を総合すると、インビトロの機能的データおよび免疫組織化学的分析は、T-BAM発現CD4+T細胞が、リンパ節の胚中心で生じていることが分かっているヘルパー機能に関係していることを示唆している。30

【0203】

この研究によって提供された新しいデータは、T細胞がリンパ瘻胞B細胞分化の過程で果たしている役割を解明するための助けとなるだろう(Liu, et al., 1992; Nossal, 1992で再検討されている)。リンパ瘻胞において、抗原に刺激されたBリンパ球は、胚中心のセントロプラスティック(暗)ゾーン(centroblastic (dark)zone)内で急激な細胞増殖と体細胞分裂を起こす。その後、セントロプラスティックB細胞は、セントロサイティック(明)ゾーンに入る。ここで、B細胞は、その抗原レセプターの親和性に基づいて、生きるべきか死ぬべき(アポプトーシス)かをT細胞によって選択される。次いで、肯定的に選択されたB細胞はT細胞に指令されて、記憶B細胞か又は抗体産生プラズマ細胞に分化される。抗体産生プラズマ細胞は、ある場合には更に、機能的に異なる免疫グロブリンのイソタイプを作るために遺伝子を再配列される。従って、B細胞の分化を指示する信号は完全には分からないが、リンパ節でのB細胞の分化において、T細胞は少なくとも3つの異なる決定に関与すると思われる。その3つとは、生きるか死ぬか；記憶系かプラズマ細胞系；および抗体のイソタイプの選択である。セントロサイティックゾーン内のT細4050

胞がT-BAMを発現するとの観察は、一定のこれら決定に関して、B細胞の運命の決定においてT-BAMが役割を果たし得ることを示唆している。今後の研究は、リンパ節B細胞分化におけるこれらT細胞依存性の過程において、T-BAMが果たす具体的な役割に向けられるであろう。

【0204】

抗CD40mAbが、D1.1細胞とのT細胞接触に媒介された周到な相互作用を阻害するという結果によって、同様なCD40依存性の相互作用が、既に報告されているもつと複雑な生理学的反応に対する抗CD40の幾つかの効果の基礎であり得ることが示唆される。抗CD40(G28-5)は、培養された胚中心B細胞のプログラムされた細胞死(アポップトーシス)を強力に阻害する(Liu, et al., 1989)。更に、G28-5は、溶解性のrCD23及びIL-1 α によってインビトロで誘起される、形質芽球およびスイッチされた胚中心B細胞の生成を阻害する(Liu, et al., 1991)。これらCD40に依存した現象におけるT細胞接触の役割は、現在のところわかっていないが、ここに提示したデータは、CD40がT-B接触相互作用において特殊な役割を果たしており、またCD40リガンドを同定する手段およびCD40の信号機能をより正確に定義する手段を提供することを示している。

【0205】

これらの研究によって、T-Bの相互反応におけるT-BAMのT細胞に対する重要な役割、およびCD40のB細胞に対する重要な役割が同定されたから、これら分子の可能な関係について探求することが適切である。我々はこのデータを説明できる2つのモデルを提案する。T-BAMが直接CD40と反応するという仮定は、全てのデータを説明する最も簡単なモデルである(図7、モデル#1)。しかしながら、T-BAMとCD40との相互作用を示すはっきりした生化学的結合のデータがないので、T-BAMおよびCD40が異なるリガンドと相互作用するという、他の可能性に目を向けることが大切である(図7、モデル#2)。もし、T-BAMおよびCD40が異なるリガンドと相互作用するとしたら、上記の機能的データは、CD40-X相互作用およびT-BAM-Y相互作用の両方がB細胞CD23誘起のために必要であるが、これで十分ではないことを示唆する。

【0206】

T-BAMの“カウンターレセプター”(“X”)とCD40のカウンターレセプター(“Y”)とは夫々、B細胞とT細胞の表面分子であるらしいが(図7、モデル#2.a)が、我々のデータによれば、CD40はB細胞が分泌(自己分泌)する因子のレセプターである可能性を除外できない(図7、モデル2b)。CD40は、以前はサイトカインレセプターであると考えられたが、NGFレセプター(Stamenkovic, et al., 1989; Clark, 1990)との構造的同質性に基づけば、これがヘルパー機能に関与するT細胞表面タンパクのカウンターレセプターであるとの可能性は、FcRgII+のL細胞にクロスリンクした抗CD40·mAbと、D1.1細胞の表面を活性化する性質とがよく似ているという事実と合致する。

【0207】

B細胞に加えて、瀕胞樹状細胞がCD40を発現しており、我々は、瀕胞樹状細胞ときわめて接近し且つ恐らくこれと関係していると思われる、T-BAM発現T細胞を発見した。T細胞とCD40との相互作用は、T細胞の瀕胞樹状細胞との機能的な相互作用において重要かもしれない。なお、瀕胞樹状細胞はリンパ節での抗原のプロセッシングに役割を果たしていることが知られている(Gray, et al., 1988; Askonas, et al., 1972; Gray, et al., 1991)。更に、CD4+T細胞とCD40+瀕胞樹状細胞との相互作用は、AIDSにおける特別な病原性の重要性を有しているかもしれない。AIDSにおいて、瀕胞樹状細胞はHIVの貯蔵場所となっている(Spiegel, et al., 1992)。

【0208】

もし、モデル#2が正しくて、T-BAMがCD40以外のリガンドと相互作用するならば、T-BAMはCD40を発現しない細胞に対して信号を与える役割を果たしている

10

20

30

40

50

であろう。この点に関して、CD4+のT細胞は他のT細胞（CD4+及びCD8+）と相互作用し、細胞毒性の誘導（Bennick, et al., 1978; Ashman, et al., 1979; Kast, et al., 1986; Zinkernagle, et al., 1978; Leist, et al., 1989）、並びに抑制（Thomas, et al., 1980; Thomas, et al., 1982）を媒介する。更に、CD4+T細胞はマクロファージと相互作用して、活性化信号を媒介する（Zimecki, et al., 1988; Zimecki et al., 1989; Weer, et al., 1989; Wasik, et al., 1988; Fau, et al., 1990; Fau, et al., 1988）。将来の研究の重要なゴールは、T-BAMが他の細胞の活性化に関係しているか否か、或いは他の、おそらく関連のある分子がそういった役割を果たすか否かを決定することである。

【0209】

10

実験の第3シリーズモノクローナル抗体5c8の前臨床実験；T-BAMに対して向けられたネズミモノクローナル抗体

実験の全体の目的は、炎症および腫瘍疾患の診断と治療に於ける新規モノクローナル抗体（mAb）の有用性を評価することである。これらの実験の中心は、最近產生され特徴付けられた5c8と呼ばれるネズミmAbで、活性化されたヒトCD4+Tヘルパーリンパ球細胞上に存在する新規表面タンパク（T-BAM）を認識する。

【0210】

20

重要なことに、mAb 5c8はCD4+T細胞のエフェクター機能を阻止し、それはB細胞が特異的抗体を產生する先駆けとなる過程を含んでいる。健常人組織中では、T-BAMはリンパ組織中の胚中心と呼ばれる、一時的に抗原誘導される構造中に存在するCD4+T細胞上で独占的に発現される。しかしながら、種々の感染症疾患由来組織での予備実験により、T-BAMは疾患組織に浸潤しているCD4+Tリンパ球細胞によって発現されることが示されている。今まで、T-BAMを発現しているCD4+T細胞の浸潤は、リュウマチ様および変形性関節症に冒された関節組織中に、そして、乾せん、接触皮膚炎、および高IgE症候群に冒された皮膚中で観察された。T-BAMはインビトロでCD4+T細胞エフェクター機能の重要な役割を果たしていると思われるため、インビボでの感染部位でのT-BAM発現CD4+T細胞の存在は、T-BAMがこれらの疾患の免疫性の病理発生に参画しているかもしれないということを示唆している。抗T-BAM mAb 5c8を得たことにより、T-BAMを持つているCD4+T細胞、あるいはT-BAM分子それ自体がこれらの仮定で重要な役割を果たしているか否かということを尋ねる機会を与える。もしT-BAM+CD4+T細胞が特定の疾患で決定的な役割をすることが発見されるとすると、T-BAM+CD4+T細胞を溶解または中毒させるか、あるいは機能を阻止するためにmAb 5c8を使用して、攻撃的で、病原性のCD4+T細胞を特異的に標的とすることが可能かもしれない。さらに、T-BAM分子の変異発現は多くのリンパ腫瘍で観察されており、mAb 5c8がリンパ腫瘍の診断および治療に適用される可能性を示唆している。まとめると、これらの観察は炎症疾患およびリンパ腫瘍の診断および治療におけるmAb 5c8の有用性を示唆している。

30

【0211】

40

次に示す範囲が探究あるいは評価される：

1. 炎症、自己免疫、アレルギーおよび腫瘍疾患の患者からの冒された組織中のT-BAM発現、およびT-BAM発現は病気の範囲と関係しているか否かを決定すること。

【0212】

2. 炎症、自己免疫あるいはアレルギー疾患を持つ個体からの細胞を使用するインビトロ系でのリンパ機能に対するmAb 5c8の効果。

【0213】

3. 最終的にそのような動物で安全性試験と薬物動態実験とを実施するために、ヒト以外の靈長類（ルサスマカク－rhesusmacaques）からのTリンパ球機能に於けるmAb 5c8の効果。

【0214】

50

4. 炎症疾患および白血病 / リンパ腫の臨床評価での診断様式としての mAb の利用の可能性。

【0215】

理論的根拠 :

$CD4+T$ リンパ球細胞は炎症反応において中心的な役割を果たしている、なぜならば $CD4+T$ 細胞の活性化は体液性（抗体が関与した）免疫反応と細胞毒性（キラー） $CD8+T$ 細胞反応の両方の生成に対して必要とされるからである。この重要な役割にふさわしく、 $CD4+T$ 細胞は正常な免疫反応および幾つかの突発性炎症疾患に於ける炎症反応の間、組織に最も早く浸潤している細胞である。

【0216】

組織中で炎症反応を支配することに加えて、 $CD4+T$ 細胞は体液性の（抗体）関与した免疫反応の特異性およびエフェクター機能（アイソタイプ I S O T Y P E）の両方を支配する重要な役割（“ヘルパー機能”と呼ばれている）を果たしている。ヘルパー機能は $CD4+T$ 細胞によって媒介され、それはリンパ組織に移行し、胚中心と呼ばれる一時的な構造の種を播き、抗原特異的（コグネイト C O G N A T E）B 細胞が集まってくる。リュウマチ様関節炎および自己抗体産生によって特徴づけられた確定した他の自己免疫疾患（全身性の狼そう）において、 $CD4+T$ 細胞は自己抗体の産生に病原性の役割を果たしている。アレルギーでは、 $CD4+T$ 細胞は IgE 抗体の産生に重要な役割を果たしており、従ってアレルギー状態の維持に重要な役割を果たしている。

【0217】

$CD4+T$ 細胞は単一に分布した抗原レセプターを持っており、B 細胞およびマクロファージによって自己クラス I M H C 分子上で提示される外来性の消化された抗原を認識する。 $CD4+T$ 細胞クローニングは“活性化”と呼ばれる変換をする事によって、その様な認識に対応する特異的抗原 / M H C クラス II リガンドを認識し、それは幾つかの表面分子の新たな発現およびリンフォカインの分泌を含んでいる。

【0218】

最近開発された mAb 5c8 と呼ばれるモノクローナル抗体は、新規な 30 kDa の構造（5c8 Ag あるいは T - B A M と呼ばれる）が同定し、静止期ではなく活性化された $CD4+T$ 細胞上で独占的に発現されるが、しかし $CD8+T$ 細胞によっては発現されない（イエリン、ら、1991；リーダーマン、ら 1991）。重要なことに、T - B A M と相互作用する性質によって、 mAb 5c8 は抗体を産生する B 細胞を誘導する $CD4+T$ 細胞の能力を阻止することである（リーダーマン、ら、1992）。それゆえに、インビボで T - B A M はインビボでリンパ節のマントルおよびセントロシティックゾーンに優先的に存在する $CD4+T$ 細胞によって主に発現されて、その部位は生理的に T 細胞が B 細胞と相互作用する解剖学的部位である（リーダーマン、ら、1992b）。5c8

A g は $CD4+T$ 細胞上の表面構造の成分であり、B リンパ球の接触依存性活性化を仲介するという発見により、5c8 Ag を“T 細胞 - B 細胞活性化分子”（T - B A M）と改名することにした。T - B A M は活性化されている $CD4+T$ 細胞によってのみ発現されるという事実により、 mAb 5c8 は炎症反応に関与する $CD4+T$ 細胞に対して特異的かもしれないということが示唆された。

【0219】

従って、予備実験において、自己免疫および炎症疾患患者からの炎症組織中における 5c8 Ag の発現が調べられた。リュウマチ様関節炎では T - B A M 発現 $CD4+T$ 細胞はリュウマチ滑液性関節パンヌスに局在し、周辺の炎症組織中とこの状態を特徴付ける胚中心との両方に局在化されていた。炎症性関節炎の症例では、T - B A M 発現細胞は浸潤している炎症細胞中で明確に一成分となっている事が発見された。乾せん、アトピー性皮膚炎および高 - IgE 症候群において、T - B A M 発現 T 細胞は真皮中に浸潤しているリンパ球中で顕著に存在した。炎症性疾患を持つ個体からの標本とは対称的に、T - B A M 発現細胞は正常組織では初期のリンパ小節の外側には存在しなかった。

【0220】

10

20

30

40

50

T - B A M 発現細胞は疾患組織に浸潤しており、そして正常組織では一時的に再生している解剖学的構造に存在するという発見により、m A b 5 c 8 療法は治療に有用であるかもしれない、なぜならば 1 .) m A b 5 c 8 は静止期の循環している T 細胞に影響を与えずに病原性のある T リンパ球を標的とするかもしれない、そして 2 .) 5 c 8 を持つ T 細胞の枯渇は T - B A M 発現 T 細胞の持続的全身性の枯渇には至らないであろう、なぜなら細胞の活性化されたプールは循環している静止期のプールによって補充されるかもしれないからである。m A b 5 c 8 療法が病原性のある C D 4 + T 細胞を取り除くかあるいは免疫固定し、一時的に免疫抑制状態の結果をもたらす（胚中心 T 細胞の枯渇から）かもしれない可能性により、その様な治療は広範囲に使用されている、あるいは開発中の既存の免疫抑制剤を越えるほど重要な利益を持たらすかもしれない。

10

20

【 0 2 2 1 】

自己免疫疾患、突発性炎症疾患、およびアレルギー患者治療に現在使用されている免疫抑制剤は、C D 4 + T 細胞の機能を阻害する事によって一次的な治療効果を持つ。しかし、サイクロスボリン A (サンデムン)、アザトプリン (イムラン) およびサイクロフォスファミド (サイトキサン) のような現存する療法は、C D 4 + T 細胞機能を全体に渡って阻害し、その結果全身性の免疫抑制となる。従って、その様な薬剤の限界のため、我々自身を含む多くの研究室の目標は、特異的に C D 4 + T 細胞に作用する薬剤を開発することである。例えば、臨床試験は C D 4 + T 細胞の全身的な枯渇を媒介する C D 4 分子に対して向けられたネズミモノクローナル抗体を使用してヨーロッパおよび U . S . で実施されている。症例の大部分は、C D 4 + T 細胞の欠乏は一時的なものであるが、しかし、観察されている厄介な副作用は治療後に数か月、C D 4 + T 細胞の枯渇が長く続く場合があることである。その様な C D 4 + 細胞枯渇の臨床作用は観察されていないけれども、C D 4 + T 細胞の不在は A I D S に於ける主な病態生理学的出来事である。まとめると、これらの考察により、m A b 5 c 8 、抗 - T - B A M はすべてのリンパ球の活性化を阻害する治療剤（例えば免疫抑制剤）あるいはすべての C D 4 + T 細胞の活性を阻害する m A b s （例えば抗 - C D 4 m A b s ）あるいは活性化された T 細胞を標的とする薬剤（例えば I L - 2 のような活性化分子）をこえて、浸潤する C D 4 + T 細胞に媒介された疾患において、重要な治療有利性を持つかもしれないということが示唆された。

30

40

【 0 2 2 2 】

その様な全身性の免疫抑制とは対称的に、多くの努力が、特殊な民族の背景を持つ個体での特異的な病気に対して開発された特殊な免疫学的治療法に向けられている。特定の M H C クラス II ハプロタイプはリュウマチ様関節炎およびインスリン依存型糖尿病に対する遺伝的感受性が受けられることが知られている。これらの発見により多くの研究者が、クラス II M H C 分子および / あるいはペプチド抗原の関与を研究することによって、これらの疾患に対する診断および治療の戦略を追求している。この様に比較的均質の条件下においてさえも、結局は個々の患者に対し独特な治療を工夫する必要があるかもしれない。さらに、一般的な C D 4 + T 細胞 - M H C クラス II / 抗原相互作用に起因すると推測される疾患とは対称的に、乾せん、全身性狼そう、炎症性変形関節炎の様な幾つかの重要な特発性炎症疾患は、まだ M H C クラス II ハプロタイプとの関連があまり明確ではないが、初期の C D 4 + T 細胞浸潤が重要な病原性の特徴であるという点で、R A や糖尿病と共に通している。抗 - T - B A M 療法のような C D 4 + T 細胞を標的とする治療戦略の追求に都合の良いことは、主として、炎症反応を調節するために適切な M H C 分子あるいは抗原を同定することは必要ではないという事実のためである。さらに進んだ戦略は、m A b 5 c 8 療法のように、疾患組織において活性化された C D 4 + T 細胞を主要に標的とする条件は、T 細胞を除去あるいは機能調節する目的で選択するために各々の個々の免疫系の認識機能を利用しているかもしれない。これらの疑問を調べるために、次に示す実験を提案する：

方法：提案された研究目的は、広く種々にわたる免疫性疾患を持つ患者から外科あるいは針生検を行ない臨床的標本を得るという、研究者の能力に非常に依存している。P . I . はその様な標本を得るための理想的な立場にあり、事実、我々の予備的研究はこの能力

50

を示している。P.I.は医学部のリュウマチ学部門のメンバーであり、そして研究者はプレスピテリアン病院にあるエドワードダニール関節炎診療所で自己免疫疾患を持つ患者に対し精力的に治療している。さらに、関節標本を我々に提供してくれる整形外科学部の何人かのメンバーと共に進行中である。従って、P.I.は、自己免疫疾患および変型性関節炎を持つ個体からの末梢血液および関節組織から得たリンパ球のインビトロ機能に対し、mAb 5c8の評価を追求するのに適切な臨床標本を得るための良い立場に置かれている。さらに、アレスサンドラペルニス博士は、我々の研究チームの一員であり、かつアレルギーと免疫部門の精力的な臨床医でもある。ペルニス博士はアレルギー疾患を患有個体からの臨床標本を固定し、提供することで我々を援助してくれることになっている。さらに、我々はレオナルド チェス博士の“人に於ける免疫学研究”研究許可審議機構の研究者であり、その様な個体からのリンパ球を得ることが許可されている。さらに関節症疾患に於ける我々の研究は、皮膚学部のジャネット リストスキー博士と関係しており、最近、乾せんを研究する方法“乾せんおよび他の皮膚疾患に於ける皮膚のTリンパ球分析”的認可を得た。

10

20

30

40

50

【0223】

1. 疾患組織中のT-BAM発現の特徴付け

炎症、自己免疫およびアレルギー状態でのT-BAMの役割をさらに分析するために、疾患組織の免疫組織学的分析が、病気の状態および進行が種々の段階にあるリュウマチおよび変型性関節炎および乾せんの追加症例患者におけるスナップ凍結組織標本上のT-BAMの局在を研究することが拡大されるだろう。さらに、これらの分析は、全身性狼そう、アレルギー性喘息、糖尿病性臍臓、炎症性腸疾患および臍器移植の患者に拡大されるだろう。これらの分析は、T-BAM、CD4および様々な他のリンパ球表面分子のような特殊な表面構造の発現パターンが、病気および病気の状態と互いに関係があるかどうかを試みるだろう。

【0224】

2. 炎症、自己免疫およびアレルギー疾患を持つ個体からの細胞を使用したリンパ球のインビトロ系に於けるmAb 5c8の作用の評価

炎症疾患患者のT-BAM+CD4+T細胞浸潤組織が、これらの疾患において重要な病態生理学的出来事を仲介する役割を果たしているか否かは現在のところ明らかではない。特定の疾患はインビトロで研究できる病理学的免疫学的活性を持っている。それゆえに、リュウマチ性関節炎、全身性狼そう、アレルギー性喘息のようなアレルギー状態を持つ個体からの末梢血液および炎症組織のリンパ球が単離されるだろう。インビトロ実験においては、リュウマチ性関節炎のリュウマチ性因子(IgM抗-IgG)、全身性狼そうの抗-DNA抗体産生、あるいはアレルギーでのIgE産生をmAb 5c8が阻害するか否かを提案するだろう。これらの実験において、末梢血液あるいは損傷を受けた組織からのTおよびB細胞が単離されて、成長因子の存在下および5c8あるいはコントロールmAbsの存在下で共培養されて、そして自己抗体あるいはIgEの産生が特殊なELISAによって測定されるだろう。

【0225】

3. その様な動物での、最終的に安全性および薬物動態試験を実施することを目的とする、ヒト以外の靈長類(rhesus macaques)からのTリンパ球の機能に於けるmAb 5c8の作用の評価

rhesus macaquesリンパ球とmAb 5c8の相互作用は研究されて(生殖生物学部のミッシェル フェリン博士の方法にしたがって)そしてmAb 5c8はrhesus macaquesのT-BAM相同部分と相互作用することが発見された。将来的な実験は、rhesusはmAb 5c8の投薬のインビトロでの最終的な研究に対する適切な動物モデル可か否かを決定するために、mAb 5c8はmacaquesからのCD4+T細胞の機能を阻害するかどうかを提示することだろう(現在の計画には入っていない)rhesusリンパ球の機能的研究とそれらの機能に於けるmAb 5c8の作用は、ヒトリンパ球サブプピュレーションすでに実施した機能的研究と密接に並

立的に位置するだろう。

【0226】

4. 白血病 / リンパ腫の臨床的評価に於ける診断様式としての mAb 5c8 の潜在的な使用を評価する

病理学部のジオロジオ インギラム博士及びダニエルノウレス博士との共同研究において、白血病 / リンパ腫の100の以上の症例でのT-BAM発現が研究された。T細胞リンパ腫の約30%がリンパ節の凍結切片中でT-BAMを発現する。末梢血液中の白血病T細胞はその様な症例においてT-BAMを発現するか否かは現在のところ知られていない。従って、T-BAM発現が存在するか否か、および末梢T-BAM発現はリンパ節T-BAM発現とどの様な関係があるかを決定するために、白血病の症例の末梢血液を実験する予定である。これらの実験は白血病を持つ個体の評価において、mAb 5c8 が有効な診断抗体であることを示すだろう。さらに、これらの研究はその様な腫瘍の治療においてmAb 5c8 による治療試験を正当化するかもしれない。

【0227】

将来の進展 :

将来の研究は提案された予備的な前臨床探索の結果に異存するだろう。免疫組織学的研究の結果により、病気のあるセトに我々の注意を向けることになるだろう。インビトロ実験はその様な病気のあるサブセットにおいて臨床的な研究を正当化するだろう。結局、予備実験は臨床試験の正当な理由となるので、ヒト以外の靈長類での動物実験を実施するだろう、なぜならば、mAb 5c8 は *Rhesus macaque* の活性化されたT細胞上でT-BAM相同部分と反応することが知られているからである（上記参照）。動物実験はT-BAMを発現している細胞は一時的に存在し、そしてT-BAMを発現している細胞は静止期のT細胞の循環プールから再配置されるだろうという仮説を試験すると共に、mAb 5c8 の毒性および薬物動態様式を決定するために考案されるだろう。この疑問は mAb 5c8 処理の前後の正常動物のリンパ節針生検を免疫組織学によって研究することにより明確に試験されるだろう。最終的には、インビボで阻害されている免疫反応での5c8の役割は、5c8処理を行った場合と行わない場合で、および抗体の評価および実験動物の皮膚試験反応において、免疫された動物によって試験されるだろう。その様な実験を実施するために、別のIRB認可を得る必要があるだろう、なぜならば、我々の現在の方法中には提示されていないからである。しかしながら、その様な認可を得るためににはその様な研究に適した形態で5c8を得ることが重要であろう、そしてその様な試薬を得るための費用は現在申し出ている予算の一部である。

【0228】

これらの研究は、mAb 5c8 の現在の形が（ネズミ IgG2a - ヒト補体結合）CD4+T細胞機能の期待された特殊な調節を得るために最適ではないことを示しているかもしれない。このことに関しては、補体結合機能および /あるいは組織標的を決定する抗体のFc領域を変化させるためにmAb 5c8 を遺伝的修飾することが必要となるかもしれない。これにより、抗体のFc領域をヒトのFc領域に入れ替えた形を得るか、あるいはヒト抗体に密接に類似した結合部分を持つ抗体に変化させることができる、この過程は基礎研究社がかなり経験を持っている“ヒューマニゼイション”と呼ばれる技術であり、ヒト抗体をCD4分子のアミノ酸配列を含むものに劇的に変化させることも可能となっている（未発表）。抗体の機能的性質を正常抗体の異なるエフェクター機能を持つものに変化させることに加えて、mAb 5c8 のFc領域に対して毒を遺伝的に付着することが望ましいかもしれない、それは我々が現在交渉している幾つかの会社によって利用されている共通の方法である。

【0229】

動物実験の成功的な終了に続いて、ヒトでのmAb 5c8 の安全性および薬物動態の性質を決定するためにヒトの臨床第I相試験が行われるだろう。

【0230】

実験の第4シリーズ

10

20

30

40

50

B細胞に対する接触依存性ヘルパー機能を仲介するCD4+T細胞上の表面糖タンパクT-BAMをコードするcDNAの単離：TNFアルファ遺伝子スーパーファミリーの新規メンバー

T-BAMは、B細胞分化および分泌に対する接触依存性シグナルを仲介する、CD4+T細胞上の活性化誘起表面タンパクである。T-BAMは、表面T-BAMを構成的に表現する機能的にユニークなジャーカット(Jurkat)サブクローンD1.1上にT-BAMを結合するmAb 5c8によって同定された。このシリーズの実験において、T-BAMの構造が規定される。T-BAMタンパクをmAb 5c8を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりD1.1細胞溶解産物から精製した。単離したT-BAMタンパクのNH₂末端アミノ酸配列を自動マイクロ配列決定法により決定し、この配列を退化オリゴスクレオチドプローブ(T-BAM.2)を設計するために用いた。アンチセンス配位において、オリゴスクレオチドプローブは、T-BAMを表現するD1.1細胞から単離された2kB mRNAを認識したが、T-BAMを表現しない対照の非ヘルバージャーカット細胞B2.7から単離されたmRNAを認識しなかった。NH₂末端配列は、関連機能のタイプIIネズミT細胞表面分子CD40-Lのそれと関連していることが見い出された。D1.1mRNAのRNA-PCRは、サイズおよび配列がネズミCD-40Lの対応する領域、すなわち分子の細胞質および膜の近位部分をコードする領域と相同であるDNAの断片を増幅した。約330bpであるこの断片をサブクローン化し、gt-11におけるD1.1cDNAライブラリーをプローブするために用いた。1.8-2.2kB挿入物を含有する9種のクローニングを得た。

10

20

30

40

50

【0231】

クローニングの配列分析は、ネズミCD40-Lと相同性を有するタイプII表面膜糖タンパク、すなわちIgE分泌を誘発させる活性化ネズミT細胞上の分子を解明した。これらタンパクの両方は、広範種の免疫学的および他の機能を有するサイトカインおよび細胞表面エフェクターを含むTNFスーパーファミリーのメンバーである。T-BAMおよびCD40-Lに加えて、少なくとも1つの他の関連分子の存在がT-BAMプローブを用いたヒトDNAのサザン分析により示唆される。これらは機能的に別のものであるが、T-BAMおよびCD40-Lは同族体である可能性がなお存在し、その場合、T-BAMに関係する2つの新規分子が存在することとなる。

【0232】

導入

接触依存性シグナルの解明の進展は、休止末梢B細胞を構成的に活性化するジャーカットT細胞白血病系D1.1の機能的にユニークなサブクローンの最近の同定(イエリン(Yellin)ら、1991)により達成された。D1.1クローニングは、休止B細胞を誘起して表面CD23分子を表現させ、B細胞を増殖させ、B細胞のAb形成細胞への分化を誘起するものであることが以前に示された(イエリンら、1991)。パラホルムアルデヒド固定化D1.1はB細胞を活性化する能力を保持したが、D1.1上澄は不活性であったので、D1.1のB細胞活性化能は細胞表面に局在化された(イエリンら、1991)。併せてこれらデータは、D1.1が、接触依存性ヘルパー機能を仲介する活性化T細胞と表面構造を共有することを示唆した。

【0233】

前のシリーズの実験において、T-BAM(5c8Ag)と名付けたそのような1つの構造がD1.1と特異的に反応し、D1.1によるB細胞の機能的活性化を阻害するmAbに対するハイブリドーマをスクリーニングすることによって同定された。mAbは、活性化CD4+T細胞(CD8+T細胞、B細胞または单核細胞ではない)上に表現された新規30kDa構造を同定した。PHAおよびPMA刺激後のT-BAMの細胞表面表現の動態は、最大の表現が6h後に生じるが24hによりベースライン(無)表現をもたらすダウンレギュレーションが続いて生じるという点で比較的ユニークである(レーダーマン(Lederman)ら、1992)。機能アッセイにおいて、抗T-BAM mAb 5c8は正常CD4+T細胞が抗体生成性細胞へのB細胞の分化を誘発する能力を阻害する(レーダーマン(Lederman)ら、1992)。

マンら、1992)。加えて、T-BAMを表現するリンパ腫T細胞ジャーカットD1.1は、リンパ器官からのB細胞、およびB細胞リンパ腫クローンRAMOS266(シーゲル(Siegel)ら、1990)を、抗T-BAM(mAb 5c8)によって阻害され、われわれが末梢B細胞について以前に記述した効果と同様である様態で活性化する。インビボで、T-BAMは、T細胞のB細胞との相互作用の解剖学的部位であるリンパ節の外套および中心細胞領域において主に、T細胞によって表現される(レーダーマンら、1992)。併せてこれらデータは、T-BAMが接触依存性ヘルパー機能を仲介するCD4+T細胞上の表面構造の一成分であることを立証している。

【0234】

B細胞に対するT-BAM特異的効果は、CD40に対し mAb によってブロックされることが見い出され、それほど多くはない他のB細胞分子がリンパ組織における接触依存性シグナルを受け取る上で役割をなしていると考えられている。ヒトB細胞表面上のCD40分子はリンパ節B細胞分化に関連した興味のあるシグナル機能を有する(クラーク(Clark)ら、1986; クラークら、1988; レッドベター(Ledbetter)ら、1987; レッドベターら、1986)。抗CD40(mAb G28-5(クラークら、1986))はプログラムされた胚中心B細胞壊死(アポプトシス)を防止し(リュー(Liu)ら、1989)、またヒトB細胞の増殖、分化および長期成長を誘起することが示されている(バンチャロー(Banchereau)ら、1991a; バンチャローら、1991b)からである。CD23表現に対する抗CD40の効果がrIL-4の最大下投与で相加的であることが見い出されたので、T-BAM特異的ヘルプに対する抗CD40 mAb の効果は、B細胞の応答性の一般的な阻害からは生じなかった。加えて、mAb ないし CD40は、形質移入ネズミ線維芽細胞の層上のFc受容体上に存在したとき、D1.1の効果を模倣するようであった。併せてこれら知見は、T-BAMおよびCD40が、おそらく受容体-反受容体(counter-anti-counter)関係で、相互に作用しあっているかもしれないという考え方と一致した。

【0235】

続いて、CD40分子に対するネズミリガンドは、キメラヒトCD40-Ig鎖分子を用いたネズミcDNAライブラリーの表現クローニングにより同定されている。CD40-LcDNAは、33kDaタイプ-II表面膜タンパクをコードする(アーミテージ(Armistage)ら、1992)。初めは新規遺伝子として報告されたが、われわれの研究室による後の分析(発表せず)および著者らによる後の分析(ファラー(Farrah)ら、1992)によりCD40-Lはtnf- α と関係していることが明らかにされた。CD40-Lがtnf- α と相同であるという考えは、それらの受容体tnf-R1およびIIがCD40に関連していれば、興味のあるものである。CD40-LのCD40との結合相互作用は、T-BAMをCD40特異的シグナリングと結び付ける機能的証拠と考え併せると、T-BAMとCD40-Lとは関連する分子でありえることを示唆している。さらに、CD40-LとT-BAMとの関連性は、B細胞トリガリングにおけるそれらの関連する機能と、それらの類似する見かけの分子量の双方により示唆される。しかしながら、CD40-LのT-BAMとの正確な関係は、未知のままである。

【0236】

それ故、このシリーズの実験では、T-BAMの構造を調べ、PCR断片と部分cDNAを単離し、これらがCD40-Lとの有意の相同をもってタイプII表面膜タンパクをコードすることを見い出した(アーミテージら、1992)。機能的証拠はT-BAMとCD40-Lとは異なるものであることを示唆しているが、T-BAMがCD40-Lのヒト同族体であるという可能性がなお存在する。T-BAMおよびCD40-Lに加えて、このファミリーの少なくとも他の関連メンバーの存在は、T-BAMを用いたヒトゲノミックDNAのサザンプロット分析により示唆される。T-BAMとCD40-Lが相同であることが見い出された場合は、サザンデータは、そのような形態の他の2つのメンバーが存在し得ることを示唆する。構造の情報は、T-ヘルパー機能のいくつかの分子的姿に光を当てるものであり、T細胞上の少なくとも2つの分子がCD40細胞を経由するシグ

10

20

30

40

50

ナーリングを含む相互作用において異なるB細胞応答を指向させるということを示唆している。

【0237】

材料および方法

細胞系。ジャーカットクローンD1.1およびB2.7は、記述されている（イエリンら、1991；レダーマンら、1992）。

【0238】

T-BAMペプチドの単離

精製T-BAMタンパクを得るために、ジャーカットD1.1細胞を、「細胞工場」(NUNC)と10個のフラスコ(600mLフラスコ)の双方において、10%ウシ胎児血清(ハイクローン(Hyclone))中のイスコブ(Iscoive)の変性ダルベッコ培地(ギブコ(Gibco))において成長させた。これら培養は、併せて 14×10^9 個の細胞を得た。細胞ペレットを氷冷分解緩衝液(1%NP40、13mMトリス、15mMNaCl、10μg/mLフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、5mM EDTA、10μg/mLヨードアセトアミド(IAA))125mL中で分解した。溶解産物を渦動処理に供し、回転シェーカーで1時間混合し、7000rpmで20分間遠心して不溶物をペレット化した。溶解産物の上澄を順次0.45および0.2mフィルター(ナルジーン(Nalgene))を通してろ過した。ろ過した溶解産物(80mL)を0.1M重炭酸塩緩衝液(0.5MNaCl、pH8.3)で1:1で希釈した後、アフィニティークロマトグラフィーに供した。

10

20

【0239】

アフィニティーコロマトグラフィーによるT-BAMの精製

mAb 5c8およびOKT4をタンパクGカラム(ファルマシア(Pharmacia))で精製した。各mAb当たり0.142グラムのCNBr活性化セファロース4Bビーズ(ファルマシア、アップサラ、スウェーデン)とともに結合用緩衝液(0.25M重炭酸塩緩衝液、0.5M NaCl、pH8.75)中でmAb(3.88mg/2mLの5c8、および3.0mg/1.5mLのOKT4)をインキュベートすることにより、精製されたmAbはビーズに共有結合された。mAb溶液を室温で3時間ビーズと反応させ、0.3Mトリス中pH8.0で3時間クエンチングした。mAbで被覆されたビーズを用いて短いカラム(シュライチャーおよびシュエル)中で0.5mLゲルを作り、結合用重炭酸塩緩衝液および溶出緩衝液(アセテート緩衝液、0.5M NaCl、pH4.0)で交互に洗浄した。

30

【0240】

T-BAMを精製するためには、D1.1溶解産物を、5c8カラムに通じる前に、OKT4カラムに通じて予備精製した。溶解産物を両方のカラムに通じた後、mAbカラムを重炭酸塩緩衝液200mLで洗浄してから、0.1Mアセテート、pH4.0で溶出させ、15mLのポリプロピレン製のコニカルチューブ(サーフィット、プリンストン、NJ)中で0.5mLずつの分画を得た。各分画中のタンパクを-20°のアセトン5mLで一晩沈殿させた。ついで、沈殿物を3000Gでの遠心により集め、空気乾燥した。

40

【0241】

T-BAMペプチドのNH₂末端配列決定

各カラム分画からのアセトンによる沈殿物を60mLのゲル充填用緩衝液中に再懸濁させ(バイオラッドの指示)、バイオラッド縦型電気泳動装置中の20cm12.5% SDS-PAGEゲル上に充填し、約6時間100Vに供した後、(バイオラッドトランスプロット装置においてCAPS緩衝液中70ボルトで90分間プロブロット(Problott)PVDFペーパー(アドバンスト・バイオシステムズ、シアトルWA)へ移植した。移植は、予備染色したタンパク標準(低分子量および高分子量標準(バイオラッド、ロックビルセンター、NY))を用いて最適化した。

【0242】

移植後、タンパクバンドをコマジーブルー(comassieblue)R-450で染色し、膜を

50

空気乾燥した。T-BAMの相対移動に対応する31KDバンド(p31K)を剃刀の刃で切除し、コロンビア大学ハワード・ヒューズ・メディカル・インスチチュート、プロテイン・コア・ファシリティのメアリー・アン・ガビノビッチ博士により、アプライド・バイオシステムズ470A気相シーケンサー/120A PTHアナライザ上での20サイクルの配列決定に供した。決定されたNH₂末端配列は、(M)IE(T)YNQ(Q)SP(PXAAAS)(SEQ ID No. 11)であった。

【0243】

cDNAライブラリーの構成およびスクリーニング

D1.1ポリA⁺RNAをFAST-TRACK(インビトロゲン(Invitrogen))により単離し、ファルマシアのプロトコールによりストラテゲン(Strategene)(サンジエゴ、CA)からのアームを用い、約4×10⁶個の独立クローンを含有するオリゴ-dT感作-gt11ライブラリーを生成した。

【0244】

増幅されたライブラリーから、約1×10⁶個のブラークをスクリーニングし、8個の独立クローンを同定し、各ブラークをYTI090(インビトロゲン、サンジエゴ、CA)上で4回のクローン化により精製した。

【0245】

オリゴ合成

コロンビア大学ハワード・ヒューズ・メディカル・インスチチュート、プロテイン・コア・ファシリティによりアプライド・バイオシステムズDNAシンセサイザーモデル380B上で以下のオリゴデオキシヌクレオチドが合成された。

【化1】

TBAM.1 (17量体) 5'-AT(A/C/T) GA(A/G) AC(A/G/C/T) TA(C/T)
AA(C/T) CA-3' (SEQ ID No. 1)

TBAM.2 (20量体) 5'-ATG AT(A/C/T) GA(A/G) AC(A/G/C/T)
TA(C/T) AA(C/T) CA-3' (SEQ ID No. 2)

TBAM.2 アンチセンス (20量体) 5'-TG(G/A) TT(G/A) TAI GT(C/T)
TC(T/G/A) ATC AT-3' (SEQ ID No. 3)

CD40L(11-31) 5'-GCA TGA TAG AAA CAT ACA GCC AAC-3' (SEQ
ID No. 4)

CD40L(54-75) 5'-AAC TGG ACT TCC AGC GAG CAT G-3' (SEQ ID
No. 5)

CD40L(369-348) 5'-GGA TCC TCA TCA CCT CTT TGC-3' (SEQ ID
No. 6)

CD40L(389-368) 5'-ACA ACG TGT GCT GCA ATT TGA GG-3' (SEQ
ID No. 7)

λ gt11-rev (24量体) 5'-TGA CAC CAG ACC AAC TGG TAA TGG-3'
(SEQ ID No. 8)

Mu12/T-BAM.2 5'-CTT TCA GTC AGC .T-BAM-3' (SEQ ID No. 12)

【0246】

RNAポリメラーゼ連鎖反応

5×10⁸個のD1.1細胞からポリ-A⁺RNAを単離し、200単位のモロニーネズミ白血病ウイルス(MMLV)逆転写酵素(ベセスタ・リサーチ・ラプズ(BRL(商品

10

20

30

40

50

名)) を用い、50 mM のトリス - HCl 、pH 8.3 、75 mM のKCl 、3 mM のMgCl₂ 、10 mM のDTT および20 単位のRNAsin (ファルマシア (商品名)) を含有する緩衝液 20 mL 中 5 pM のプライマー CD40L (369 - 348) を含有する反応液において 42 °C で 30 分間にわたる約 1.0 µg の全 RNA の転写により cDNA を調製した。反応混合物を 5 分間 95 °C に熱して酵素を失活させた。

【 0247 】

第 1 の鎖を以下の条件下で PCR により増幅した：初めのテンプレート変性工程 (94 °C で 8 分) 、ついで、55 °C での 3 分間 (アニーリング) 、2.5 単位の DNATaq - ポリメラーゼ (パーキン - エルマー - セタス、ニューウォーク、CT) 、dATP 、dCTP 、dTTP および dGTP それぞれ 200 mM (パーキン - エルマー - セタス、および PCR 缓衝液 (10 mM のトリス - HCl 、pH 8.3 、50 mM のKCl 、1.5 mM のMgCl₂ 、0.001 % のゼラチン) 100 mL 最終容量中の 50 pM のプライマー CD40L (11 - 31) および CD40L (369 - 348)) を用いた 72 °C での 2 分間 (変性) の 30 倍繰り返しサイクル。増幅後、試料を、1.0 % 寒天ゲル上で電気泳動により分析し、エチジウムプロミドで染色した。

【 0248 】

サブクローニング

EcoR5 消化ブルースクリプト (プロメガ (Promega)) への PCR 生成物の鈍端結さつによりブルースクリプト / p3.1 を生成した。予め子ウシ腸ホスファターゼで処理した EcoR1 消化ブルースクリプト 11SK+ (プロメガ) への g t - 11 ファージ DNA マキシプレップ (maxipreps) の一晩の EcoR1 消化の結さつによりブルースクリプト / p5-1 を生成した。ブルースクリプト中への結さつは、コンピテント E . Coli 中への T4DNA リガーゼを用いて行い、アンピシリン (25 µg / mL) プレート上に成長させた。

【 0249 】

g t - 11 ライブラリーのスクリーニング

PCR 生成プローブをランダムヘキサマー法により放射線標識し、 g t - 11 プラクをスクリーニングするために用いた。

【 0250 】

DNA 配列決定

DNA 配列決定は、アプライド・バイオシステムズの自動 DNA シーケンサー上でコロンビア大学のコンプリヘンシブ・キャンサー・センター・コア・ファシリティにより行われた。

【 0251 】

293 細胞の形質移入

形質移入の 48 時間前に、2 × 10⁶ 個の 293 細胞を 100 mm のペトリ皿上で平板培養する。形質移入の 1 時間前に、細胞に新鮮な培地を供給する。1 皿につき 20 mg のプラスミド DNA を用いてリン酸カルシウム沈殿物を調製する。5 % CO₂ 中 37 °C で 15 時間後、細胞に新鮮な培地を供給する。形質移入の 36 時間後、細胞をトリプシン - EDTA での処理により収穫し、FACS により調べる。

【 0252 】

単一クローニング抗体。mAb 5c8 (IgG2a) については、記述されている (レーダーマンら、1992) 。mAb 5c8 は、記述されている。mAb OKT4 (抗 CD4) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ロックビル、MD) から入手できる。全ての mAb は、タンパク A (バイオラッド、ロックビル・センター、NY) またはタンパク G カラム上で腹水から精製した。

【 0253 】

結果

T - BAM は、B 細胞分化および IgG 分泌のための接触依存性シグナルを仲介する、CD4+T 細胞上の活性化誘起表面タンパクである。T - BAM は、構成的に T - BAM

10

20

30

40

50

を表現する機能的にユニークなジャーカットサブクローンD1.1上にT-BAMを結合するmAb 5c8により同定された。

【0254】

本報告では、T-BAMの構造は、タンパク化学による、またT-BAMをコードするcDNAの単離による研究であった。

【0255】

T-BAMタンパクは、D1.1細胞溶解産物からT-BAMを親和精製するためにmAb 5c8を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製された。単離されたT-BAMタンパクのNH₂末端アミノ酸配列は、自動マイクロ配列決定法により決定され、この配列を退化オリゴヌクレオチドプローブ(T-BAM.2)を設計するために用いた。アンチセンス配位において、末端標識退化オリゴヌクレオチドプローブは、T-BAM+D1.1細胞からのノーザンプロットおよびコントロールT-BAM-ジャーカットB2.7細胞系をプローブするために用いた。アンチセンスプローブは、T-BAMを表現するD1.1細胞中で特異的にはほぼ2kB mRNA種と交雑したが、T-BAM-コントロール、非ヘルバージャーカット細胞B2.7とはしなかった。

10

【0256】

この時点で、ネズミCD40分子のためのリガンドの配列が、アーミテージら(1992)により発表された。この分子は、関連する機能を有し、また興味のあることに、非常に相同のNH₂末端配列を持っていたことに注目される。2つの配列を比較して以下に示す。

20

【化2】

T-BAM	(M) IE(T) YNQ(Q) SP(PXAAS) (SEQ ID No. 9)
	* * * * * * * * * *
CD40-L	M IE T YSQ P SP RSVAT (SEQ ID No. 10)

30

40

【0257】

T-BAMのクローニングの初期の研究は、gt-11中のD1.1cDNAライブラリーをスクリーニングするために退化オリゴヌクレオチド(T-BAM.2)を用いることを含んでいたが、T-BAMとCD40-Lの配列の関係は、それらの配列関係がより長い2本鎖DNAプローブを精製するために利用できることを示唆した。この考えを支持して、CD40-LのNH₂末端がタイプII細胞膜内タンパクの細胞質尾部をコードすること、および類推により、T-BAMの高度相同性NH₂末端が、関連するタンパクのアイソフォーム(isoform)間で高度に維持された細胞質尾部であり得るということがある。

【0258】

50

それ故、次のシリーズの実験は、ネズミ配列の C D 4 0 - L c D N A (細胞質および膜近位領域から) 由来の対のオリゴヌクレオチドプローブが、T - B A M c D N A の相同配列を増幅するかどうかに向けられた。したがって、D 1 . 1 からの m R N A の R N A - P C R は、まず C D 4 0 L (3 6 9 - 3 4 8) で感作された c D N A を合成することによって行い、ついでプライマー-C D 4 0 L (1 1 - 3 1) および C D 4 0 L (3 6 9 - 3 4 8) で増幅した。この反応は、D 1 . 1 D N A からの約 3 3 0 b p の断片を増幅した。P C R 生成物は、ブルースクリプトへの鈍端結さつによりサブクローン化し、一方向に配列した 4 つの挿入物のうち 1 つのクローンを同定した。これは、3 3 0 k B 挿入物であり、ネズミ C D 4 0 - L と約 8 5 % 相同であった。

【0259】

10

プラスミド p 3 - 1 / ブルースクリプト IIS K + は、特許出願手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の規定の下に、米国メリーランド 2 0 8 5 2、ロックビル、1 2 3 0 1 パークローン・ドライブ所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に寄託した。プラスミド p 3 - 1 / ブルースクリプト IIS K + は、ATCC 受託番号 () を与えられた。

【0260】

C D 4 0 - L 配列と増幅された P C R 生成物 p 3 - 1 を比較して以下に示す。

【化3】

【 0 2 6 1 】

さらに、D 1 . 1 からの RNA、T - BAM - ジャーカットクローン B 2 . 7 および RAMOS B 細胞系からのコントロール RNA を比較するノーザン分析により、p 3 . 1 プローブは、D 1 . 1 細胞系中で排他的に 2 kB mRNA 種に交雑した。アンチセンス T - BAM . 2 プローブのノーザン分析、および T - BAM が D 1 . 1 中で排他的に表現されるが、B 2 . 7 ジャーカット細胞にはされないというタンパクデータと考え併せると、これらデータは、330 bp 挿入物が T - BAM cDNA から由来し得ることを示唆した。

(0 2 6 2)

したがって、この約330bpの挿入物を、D1.1cDNAライブラリーからgt-11をスクリーニングするためのプローブとして用いた。ランダムヘキサマー標識プローブとして330bp挿入物を用いたそのようなスクリーニングは、サイズが1.8から2.4kbにわたる挿入物を含有する9個の独立gt-11クローンを同定した。

【 0 2 6 3 】

ファージDNAのPCRは、挿入物をフランク（flank）する、ファージDNAの領域に交雑するプローブを用いて行い、クローンが、サイズが1.8~2.1kBの範囲の挿入物を含有していることを明らかにした。ノーザン分析によるNH₂末端配列から由来するアンチセンスオリゴを用いた、T-BAMのmRNAのサイズが約2kBであるという観察があれば、これらクローンの最も大きなものは、T-BAMをコードするmRNAの全長cDNAまたはほぼ全長cDNAのいずれかを表わすということが有望である。

【 0 2 6 4 】

9個のクローニングの各々において、EcoR1挿入物の離脱(EcoR1による消化による)は、すべての場合に2つの断片が得られたので、すべての8つの挿入物が内部EcoR1部位を含有していたことを明らかにした。gt-11クローン1-1b(これは、PCRによる最も大きな2.1kBの挿入物を持つものであった)の場合には、生成した2つのEcoR1断片は、1.3kBおよび0.8kBであった。これら2つの断片を消化したEcoR1中にクローニングした。子ウシ腸ホスファターゼ処理ブルースクリプトIISK+は、p1-1b(1.3kB)/ブルースクリプトIISK+およびp1-1b(0.8kB)/ブルースクリプトIISK+を生成した。

0

【 0 2 6 5 】

プラスミド P 1 - 1 B (1 . 3 K B) / ブルースクリプト IIS K+ および p 1 - 1 b (0 . 8 k B) / ブルースクリプト IIS K+ は、特許出願手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の規定の下に、米国メリーランド 2 0 8 5 2 、ロックビル、 1 2 3 0 1 パークローン・ドライブ所在のアメリカン・タイプ・カルチャーレコレクション (ATCC) に寄託した。プラスミド P 1 - 1 B (1 . 3 K B) / ブルースクリプト IIS K+ は、 ATCC 受託番号 () を与えられ、およびプラスミド p 1 - 1 b (0 . 8 k B) / ブルースクリプト IIS K+ は、 ATCC 受託番号 () を与えられた。

0

(0 2 6 6)

0.8 kB挿入物の部分DNA配列決定は、それが、クローニングされた生成物p3-1と約150bpだけ有意のオーバーラップを持つことを明らかにした。比較を以下に示す。

【化 4】

9

```

p1-1b(0.8kB)2 tgcaacacaggagaaagat.ccttateccttactgcaactgtgaggagatt 50
          ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||

p3-1      546 TGCAACACAGGAGAAAGATCCCTTATCCTTACTG.AACTGTGAGGGAGATT 594

p1-1b(0.8kB)    S1 aaaa 54 (SEQ ID No. 15)
          ||||

p3-1      595 AAAA 598 (SEQ ID No. 16)

```

0

[0 2 6 7]

加えて、p1-1b(0.8)kBの5'末端は、成熟タンパクの、最初のコドンへ向けて、約200bp3'である。このことは、全長cDNAに関して以下のクローンの配列を与える

【化5】

```
*****T-BAM cDNA*(bp)*****
-- 200 --400 --600 -- 800 --1000 --1200 -----/ / --2300
/*p3-1****/
/*****pl-1b(0.8 kB)*****/
/ **pl-1b(1.3 kB) */ /*****/
/
BstYI           EcoR1
/****/
```

約
150~bp オーバーラップ°
/******/

30 kDa タンパク (T-BAM) のプローフ可能なコード配列

>>>>>>>>>>>

10

20

30

【0268】

このマップは、p1-1b (1.3 kB) が 3' - UTR (翻訳されない領域) 中の配列に由来する、その理由は、メッセージがそのように長い 5' UTR 領域をもつとはあまり普通ではないからである、という仮定に基づいている。この仮定をさらに支持するものとして、CD40-Lに対する関連する cDNA が類似の大きさの 3' UTR (約 1 kB) を有するという観察がある。

【0269】

したがって、全長 cDNA は、成熟タンパク (30 kDa) のサイズが与えられれば、そして PCR 生成物が NH₂ 末端配列から誘導されたので、おそらく共に T-BAM cDNA の全コード化領域を含むところのクローン化 PCR 生成物 (P3-1) およびクローン化 cDNA (p1-1b (0.8 kB)) の組み合わせにより得ることができる。加えて、我々が提供したクローン化 DNA は、当該分子の可溶性組み替え体に使用される全てのアミノ酸をコードするようである。

【0270】

T-BAM の表現のために、p1-1b (1.3 kB) は、それが dDNA の 3' - UTR 領域をコードするので、おそらく必要ではない。しかしながら、cDNA の 3' - UTR 領域は、他の 3' - UTR と同様に、T-BAM 表現の調節に関与するようであり、それ故

40

50

、 p 1 - 1 b (1 . 3) は、将来の研究において、調節機能における 3' U T の役割を確立するために重要であろう。

【 0 2 7 1 】

T - B A M 表現を指示するクローンを生成するために、 p 3 - 1 に類似しているが、さらにプライマ - m u 1 2 / T - B A M . 2 および 3' T - B A M 配列を用いた P C R によりアニールされた m u C D 4 0 - L のネズミリーダー配列を有するクローン化 P C R 断片を生成する。ネズミ C D 4 0 - L へのリーダー配列は、 T - B A M クローンの表現を生じさせるに充分であることが予期される。そのような断片は、 p 1 - 1 b (0 . 8) から欠落した (5 ' - 2 0 0 b p) 断片を含み、 p 1 - 1 b (0 . 8) および P C R 生成物のオーバーラップ領域において B s t Y I 部位をフランクする N H₂ 末端のほぼ 6 0 a a をコードするものである。この B s t Y I 部位が両方の断片の制限マッピング（および配列決定）後にユニークではないようであれば、他の 6 つの部位が近くに存在する。

【 化 6 】

```
*****T-BAM cDNA (bp)*****
-15 -- 0 ---+15 -- 30 --/ /-----220-----260
*****                         ****
12 bp - T-BAM.2             / PCR プライマー#2
m u l 2 / T-BAM.2 リーダー   BstYI
```

10

20

30

40

【 0 2 7 2 】

この断片は、ついで、 B s t Y I による p 1 - 1 b (0 . 8 k B) の消化、および指向性（鈍端）クローン化のための B s t Y I および E c o R 5 による P C R 断片の消化によって p 1 - 1 b (0 . 8 k B) へ結さつされる。得られた挿入物（ 1 5 b p ネズミリーダー - - 2 0 0 b p P C R 断片 - および 6 0 0 b p B s t Y I / p 1 - 1 b (0 . 8 k B) 断片を含む）は、中間体ベクターから表現ベクター中に指向的にクローン化されて T - B A M タンパク合成を誘発する。

【 0 2 7 3 】

全長クローンがそのような表現ベクター中に結さつされると、線維芽細胞系（ 2 9 3 細胞のような）中に一時的に形質移入され得、ついで F A C S により T - B A M 表現についてアッセイされる。さらに、 T - B A M を表現する線維芽細胞は、休止ヒト B リンパ球で培養することができ、または R A M O S 2 6 6 クローンおよびついで B 細胞を表面 C D 2 3 表現の誘起にかんして研究することができる。

【 0 2 7 4 】

T - B A M の全長 c D N A 配列を決定するために、最終的には、 D 1 . 1 m R N A を用いて新規 g t 1 1 ライブライマーが構築されるであろう。 T - B A M ライブライマーは、 p 1 - 1 b (0 . 8 k B) 断片由来の T - B A M 配列に特異的なオリゴヌクレオチドで感作される。このライブライマーは、 p 3 - 1 からの挿入物でスクリーニングして、 T - B A M c D N A の 5' 領域をコードする g t 1 1 クローンを得る。この新しい挿入物の D N A 配列と p 1 - 1 b (0 . 8 k B) および p 1 - 1 b (1 . 3 k B) からの配列を決定する。新規配列 5' c D N A の分析は、 N H₂ 末端ペプチド配列を明らかにするにちがいない。

【 0 2 7 5 】

p 1 - 1 b (1 . 3) k B を含む全長挿入物の構造は、また、クローン 1 - 1 b の g

50

t - 11 DNA の PCR を行い、ついでこの断片のブルースクリプトへの鈍端クローニングを行うことによっても決定することができる。このクローン化された PCR 断片の全長配列の DNA 配列を決定する。この配列と p1 - 1 b (1.3 kB) および p1 - 1 b (0.8 kB) の 1.3 および 0.8 kB 挿入物のそれとの比較は、それらの正確な p1 - 1 b (1.3 kB) の 5' - 3' 配位の決定を容易にする。これらの断片から全長 cDNA クローンを生成させるために、1.3 kB 挿入物を p1 - 1 b (1.3 kB) / ブルースクリプト IIS K+ クローンの Eco R 1 消化により遊離させ、ゲル精製する。ついで、p1 - 1 b (0.8 kB) / ブルースクリプト IIS K+ プラスミドの部分 Eco R 1 消化を行い、線形体をゲル精製する。次に、1.3 kB Eco R 1 挿入物を部分的に消化された（線形化）p1 - 1 b (0.8 kB) / ブルースクリプト SK+ プラスミド中に結さつし、コンピテントバクテリアを形質転換する。この形質転換からのクローンの詳細な制限マップは、正しい配位に結さつされた 1.3 および 0.8 kB 挿入物を共に有する全長 cDNA 挿入物の同定を可能にする。ついで、この全長挿入物 (pT - BAM / ブルースクリプト IIS K+) の配列決定を行い、それが正しい配位に 2 つの挿入物を有していることを確認する。次に、ブルースクリプト上のポリ - リンカーによりこれら断片を pCDNA - 1 のような真核性表現ベクター中に指向的にクローン化することが可能になる。ついで、この pCDNA - 1 / pT - BAM 293 細胞のような線維芽細胞中に形質移入し、これを表面 T - BAM タンパクの表現について研究することができる。

10

20

【0276】

このクローンを表現するに当たり、予知されない問題があるかもしれない。5' または 3' 非翻訳配列のいくつかが除去されて表現を許容する場合がある。これは、得られた配列情報を用いて容易に達成できる。加えて、pT - BAM / pCDNA - 1 のような cDNA クローンがライブラリーのオリジナルな発生から派生する配列中でエラーを有するという場合がまれにある（典型的に、逆転写酵素反応）。この場合は、他の 8 つの g t - 11 クローンを上に述べたと同様に研究し、これらクローンを再構築して T - BAM のための表現プラスミドを生成させる。

30

30

【0277】

クローンの配列分析は、IgE 分泌を誘発する、活性化ネズミ T 細胞上の分子であるネズミ CD40 - L と相同を有するタイプ II 表面膜糖タンパクをすでに明らかにしている。これらタンパクの両方は、広範な免疫学的および他の機能を有するサイトカインおよび細胞表面エフェクター分子を含む TNF スーパーファミリーのメンバーである。

40

40

【0278】

他の関連する遺伝子が存在するかどうかを決定するために、クローン p3 - 1 / ブルースクリプト IIS K+ の 330 bp 插入物を用いてヒト DNA (ヘラ・セルズ (HeLa Cells) から) のサザンプロットをプローブした。興味のあることに、3 つのバンドが観察された。T - BAM および CD40 - L がこれらバンドの 2 つを説明するようであることを考え併せると、これらデータは、「T - ヘルパー - エフェクター」分子のこのファミリーの少なくとも 1 つの他のメンバーが存在することを示唆している。あるいは、T - BAM および CD40 - L の機能的性質は別のものであるが、T - BAM が CD40 - L のヒト同族体であるという可能性がなお存在する。T - BAM と CD40 - L が同族であることが見い出されたら、サザンデータは、そのような形態のヘルパー分子の他の 2 つのメンバーが存在し得ることを示唆する。

50

50

【0279】
考察

本研究において、B 細胞分化を指示する、CD4 + T リンパ球上の細胞表面タンパク T - BAM を共にコードする PCR 生成物および cDNA クローン

T - BAM は、tnf 遺伝子スーパーファミリーのメンバーであることがわかった。非常に有意であることに、T - BAM は、マウス中で（アーミティージら、1992）、特にヒト T - BAM とネズミ CD40 - L との間の配列同一性が約 85 % であった細胞質膜内外および茎領域において最近同定された CD40 - L と関連している。これらの新しい

データは、T - B A M および C D 4 0 - L は、B 細胞誘起 T 細胞表面分子の構造的に異なるアイソフォームであることを示唆している。もっとも、そのような概念の直接的な確認には、両アイソフォームのネズミおよびヒト同族体の同定と、特に、p 1 - 1 (0 . 8 k B) クローンの残燈におけるコード領域の配列決定を要するであろう。

【 0 2 8 0 】

従前のデータは、T - B A M と C D 4 0 - L とは関連しているが、機能的には別のものであることを示唆している。T - B A M は Ig G 合成を指示するが、C D 4 0 - L は Ig E の合成を指示する（アーミテージら、1992）。Ig G に体する T - B A M ヘルパー機能の制限は、最近、D 1 . 1 が r I L 4 の存在下に R A M O S B 細胞の Ig M + クローンを誘発して Ig E および他の異性タイプではなく排他的に Ig G 1 へクラススイッチさせる（未公表）という観察により強化された。これらの実験において、R a m o s 細胞（1 ウェル当たり 30 細胞）を 100 のミトマイシン - C - 処理 D 1 . 1 細胞のフィーダー上で 2 ないし 3 週間培養し、培養した上澄をアイソタイプおよびサブクラス特異的 E L I S A により、Ig 分泌について研究した。D 1 . 1 細胞および r I L - 4 の存在下でのみ、R a m o s 細胞は Ig G 1 を分泌する細胞系（実験 1 における 4 / 15 クローンおよび実験 2 における 19 / 59 クローン）に分化した。これに対し、B 2 . 7 細胞は分化およびアイソタイプスイッチングを誘起しなかった。さらに組み換え体 1 L - 4 はアイソタイプスイッチングに必要であった。これらデータは、T - B A M および C D 4 0 が別のアイソタイプの 19 の表現を指示する B 細胞誘起 T 細胞表面分子のアイソフォームであることを示唆している。

10

20

30

40

【 0 2 8 1 】

この点に関し、m A b 抗 C D 4 0 が増殖、分化および全てのアイソタイプ 19 を含むポリクローン性 Ig 生産を誘起することが示された（バンチエローら、1991a；バンチエローら、1991b）ことは、興味のあることである。さらに、両分子が B 細胞上の C D 4 分子を含む重要な相互作用を有するらしいことは、興味のあることである。C D 4 0 - L の場合には、C D 4 0 - L および C D 4 0 は、受容体 - c o - 受容体関係を含むようである（アーミテージら、1992）。T - B A M の場合には、そのような関係は、2 つの異なる構造に対する m A b によるそれらの機能のレシプロカル遮断により示唆されるが、受容体リガンド関係の直接の証拠は存在しない。それらの機能的差異と考え併せると、これらデータは、C D 4 0 - L と T - B A M は、両者が B 細胞上の C D 4 0 分子と相互作用するらしいという事実にもかかわらず、異なる機能的重要性を持つことを示唆する。

【 0 2 8 2 】

抗体アイソタイプに対する異なる効果に加えて、T - B A M および C D 4 0 - L は、異なるパターンの表現と B 細胞増殖についての要求を持つ。P H A および P M A 刺激後の 5 c 8 A g の細胞表面表現の動態は、最適表現が 6 時間後に生じるが、24 時間までにベースライン（無）表現をもたらすダウンレグレーションが起こるという点（デーマンら、1992）で比較的ユニークである。これに対し、C D 4 0 - L は、同様の刺激により、> 72 時間持続されるようである。さらに、T - B A M + D 1 . 1 細胞は、r I L 4 または P H A の文脈においてのみ B 細胞表現を誘起するが、C D 4 0 - L + トランスフェクトーマは、加えたサイトカインまたはレクチンの不存在下で B 細胞増殖を誘起する（アーミテージら、1992）。これらデータは、C D 4 0 - L と T - B A M により B 細胞に提供されたシグナルは異なるものであり、それゆえ、これら分子が関連はするが別の機能を有する異なるアイソフォームであるという構造的示唆と一致する。

【 0 2 8 3 】

B 細胞表面上の C D 4 0 分子は、リンパ節 B 細胞分化に関連した興味のあるシグナリング機能を有する（クラークら、1986；クラークら、1988；レドベターら、1987；レドベターら 1986）。何故なら、抗 C D 4 0 (m A b G 2 8 - 5 (クラークら、1986)) は、プログラムされた胚中心 B 細胞壞死（アポプトシス）を防止するからである（リューら、1989）。この点で、C D 4 0 がアポプトシシに体する T および B 細胞表面受容体である F A S (イトーラ、1991) と同族であることは興味のあることで

50

ある。リンパ器官中のT-B相互作用がアポプトシスを含むという程度まで、これらデータは、CD40分子との相互作用に加えてT-BAMはFAS(イトーら、1991)と相互作用し得ることを示唆する。事実、我々は、最近、mAb抗FAS(Apo-1)(エームラ、1992；イトーら、1991)がCD23のRAMOS266およびB細胞誘起に対するD1.1効果を部分的に疎外することを観察した(未公表観察)。T-BAMがCD40とFAS双方と相互作用し得るという考えは、CD40t o FASが異なる受容対構造であり得るか、またはヘテロ二量体受容体を形成し得るという考えを示唆する。ある種のTNFR様分子は、多量体として、CD27の場合にはおそらくホモ二量体として存在することが知られている(カメリニら、1991)。tnf様分子の多量体受容体との相互作用は、また、このファミリーの唯一の結晶化メンバーであるtnf(ハコシマラ、1988；スミスラ、1987)およびngf(マクドナルドら、1991)の分配された三量体構造によっても示唆される。FASおよびTNFがヘテロ二量体を形成し得るという証拠がある。これら分子は、リンパ球表面上の抗FAS抗体により共に調節されるからである(ヨネハラら、1989)。単一tnf様リガンドがTNFR様分子の混合ヘテロ二量体を含む多重リガンドと相互作用し得るということは、また、tnf様分子の他の例によても示唆される。たとえば、tnfおよびtnf(リンフォトキシン)は、両方ともTNFRの2つの別の鎖(IおよびII)と反応する(グッドウインら、1991；ローズら、1991；ノファーら、1990；エンゲルマンら、1990；ルイスラ、1991；ヒムラーら、1990；ウミエルら、1987；ヘラーら、1990；グレーら、1990；スミスラ、1990；レッチャーラ、1990；デムビックラ、1990)。加えて、これら鎖のヘテロ二量体組み合わせが、バイオ化学的分析により示唆されている(ノファーら、1990；エンゲルマンら、1990)。共に、これら観察は、tnfおよびTNFRファミリーのメンバーは、一般に、ことなる様態でB細胞をシグナルするために関連した受容体の組み合わせと相互作用し得るということを示唆する。tnfファミリーのメンバーの共有特徴と思われる他の性質は、TNFR、CD40およびFAS(ワタナベら、1992)が全てアポプトシスシグナルのための受容体であるということである。

【0284】

TおよびB細胞間で作用するtnf様およびTNFR様相互作用の多くの例が以下の表6に示されている。tnf様分子の性質および機能に関し、正確な機能CD38(ジャクソンら、1990)は未知であり、ngfはがB細胞分化に効果を有することは報告されている(キマタラ、1991；オッテンら、1989)が、B細胞生理学におけるngf-NGFR(セーガルら、1989；チャオら、1986；ジョンソンら、1986)相互作用の役割は、現在、わかっていない。TNFR様分子の中で、CD27およびOX40の機能は現在未知であるが、CD27(マレットら、1991)が2つの形態として表現され、OX40(マレットら、1990)表現がCD8+T細胞ではなくCD4+に制限されるということは、興味深い。これら両方の分子は、T細胞活性化により誘起される。「ホジキン(Hodgkm)の抗原」CD30(ダーコプラ、1992)の生理学的役割は未知である。

【表6】

表 6

T及びB細胞上の tnf α -tnf α Rファミリーのメンバーを含む細胞表面相互作用T細胞
ヘルペスウツラセ体T-BAM (ヘルペス IgG)
CD40-L (ヘルペス IgE)アポフロトニスメディエーター/受容体tnf α (細胞表面)
tnf α (可溶性)tnf β (リノフォトキシン)tnf α R
(2アソシオーラ)?FAS/FAS
?FAS/tnf α R

?

未知の機能の表面分子CD27/CD27
CD27/CD27a
sCD27

?

Ox-40 (ラット, マウス)
(CD4+ T細胞特異性)CD38 (OKT10)
(活性化誘導)

ngf

?

B細胞CD40/"x"
CD40/"y"TNF α RI/TNF α RI
TNF α RII/TNF α RII
TNF α RI/TNF α RII
sTNF α RI
sTNF α RIITNF α R
others?tnf α

?

FAS/FAS
FAS/tnf α R

?

?

CD27/CD27

??

??

NGFR

CD30 (ホジキンの Assoc.
Ag)

10

20

30

40

【0285】

tnf科のいくつかの部分の重要な特徴は、tnfのプロサイトカイン表面品種の

50

蛋白分解の分裂が TNF の溶解サイトカイン品種を生じることである。将来の研究は、T-BAMがプロテアーゼで分解されならば、かつ溶液T-BAMの役割はもし同定されるならば、T-Bセル相互作用で働くならかもしないことが決定するはずである。TNFRs(ウミールら、1987；ヒーラーら、1990；グライラ、1990)およびCD27(ローインラ、1992；ディヨングラ、1991)分子は溶液形態を有することが重要であり、CD40分子の溶液形態が存在し、かつT-B相互作用で役割を果たすであろうことを示唆する。

【0286】

その上に、CD40のBセルとのTセル表面分子の相互作用の複雑さは、CD40-L(39kDa対33kDa)に比べてかなり大きな分子量を有する他のねずみ科のCD40-Lの最近リポートによって示唆されている(アーミテージら、1992；ノエルら、1992)。しかしながら、その正確な構成またはT-BAMまたはCD40-Lの関係は正確には知られていない。

【0287】

けれども、いくつかの他のBセル表面分子はリンパ組織中で従属信号を受けることで役割を果たすかもしれないことが述べられている。しかしながら、阻害するD1.1-Bセル相互作用のmAb 5c8の効果は、BセルとのD1.1相互作用で効果のない抗CR2、抗LFA1、抗LFA3または抗ICAMで試験される抗体間で比較的独特のことがあることが明らかである。したがって、T-B相互作用の前記T-BAM従属段階は促進効果因子の分別する工程であることが明らかである。

【0288】

T-BAM発現の瞬間的性質は、そのT-B“同源対”を安定にする役割をなすかもしれないことを示唆する。“同源”天然のままのプロテイン特異Bセルとの活性ペプチド特異CD4+Tセルの物理的関連は、“抗原ブリッジ”として生理学的に規定の分子基本であることが明らかである。

【0289】

T-BAMとCD40-L間の関係を明らかにすることに加えて、T-BAMを暗号化するcDNAの有益さは、別の一種、特にT-BAM因子の生理学的様子が過発現(遷移因子中)によるかまたは標的にされる因子分裂によって宛名書きができるねずみ、の中の同種の遺伝子を確認することを許容する。さらに、T-BAM特異cDNAプローブの有益さは、組み換えレベルでT-BAM発現の規則の分析を促進し、同様に遺伝子操作によってT-BAM因子性状の構造決定を研究するための手段を供する。

【0290】

免疫性生理機能のそれら役割に加えて、いくつかのTNFR科員はウイルス性病原体によって利用されていることが明らかである。粘液種ウイルスはウイルス病原性を伴うTNFRに対して同種の分泌タンパク質を発現する(アプトンら、1991)。さらに、シープフィブロマウイルスからの読み取り棒によって暗号化されたタンパク質はTNFRに対して同種である(スミスら、1990)。したがって、これら分子を理解することの付加的な特徴は免疫性病原体、例えば自己免疫疾患を誘発するT-BAMのような分子の機能範囲を利用する新規なウイルスの識別化または特徴付けであるかもしれない。

【参考文献】

【0291】

10

20

30

40

参考文献

Andersson, J., M. H. Schreier, and F. Melchers. 1980. T-Cell-dependent B-cell stimulation is H-2 restricted and antigen dependent only at the resting B-cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:1612.

Armitage, R. J., W. C. Fanslow, L. Strockbine, T. A. Sato, K. N. Clifford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, C. R. Maliszewski, E. A. Clark, C. A. Smith, K. H. Grabstein, D. Cosman, and M. K. Spriggs, 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357:80-82.

Ashman, R. B. and A. Mullbacher. 1979. A T helper cell for anti-viral cytotoxic T-cell responses. *J. Exp. Med.* 150:1277.

Askonas, B. A. and A. R. Williamson. 1972. Factors affecting the propagation of a B cell clone forming antibody to the 2,4-dinitrophenyl group. *Eur. J. Immunol.* 2:487.

Banchereau, J., P. De Paoli, A. Valle, E. Garcia, and F. Rousset. 1991a. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* 251:70.

Banchereau, J. and F. Rousset. 1991b. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature* 353:678.

Bank, I., R. A. DePinho, M. B. Brenner, J. Cassimeris, F.

10

20

30

40

W. Alt, and L. Chess. 1986. A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322:179.

Barrett, T. B., G. Shu, and E. A. Clark. 1991. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J. Immunol.* 146:1722.

10

Bartlett, W. C., J. McCann, D. M. Shepherd, M. Roy, and R. J. Noelle. 1990. Cognate interactions between helper T cells and B cells. IV. Requirements for the expression of effector phase activity by helper T cells. *J. Immunol.* 145:3956.

Bartlett, W. C., A. Michael, J. McCann, D. Yuan, E. Claassen, and R. . Noelle. 1989. Cognate interactions between helper T cells and B cells. II. Dissection of cognate help by using a class II-restricted, antigen-specific, IL-2-dependent helper T cell clone. *J. Immunol.* 143:1745.

20

Bennink, J. R. and P. C. Doherty. 1978. Different rules govern help for cytotoxic T cells and B cells. *Nature* 276:829.

30

Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran, and M. A. Gimbrone. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:9238.

Bjorndahl, J. M., S. Nakamura, T. Hara, L. K. Jung, and S. M. Fu. 1988. The 28-kDa/32-kDa activation antigen EA1. Further characterization and signal requirements for its

40

expression. *J. Immunol.* 141:4094.

Borst, J., C. Sluyser, E. De Vries, H. Klein, C. J. Melief, and R. A. van Lier. 1989. Alternative molecular form of human T cell-specific antigen CD27 expressed upon T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 19:357.

10

Brian, A. A. 1988. Stimulation of B-cell proliferation by membrane-associated molecules from activated T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:564.

Brian, A. A. 1988. Stimulation of B-cell proliferation by membrane-associated molecules from activated T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:564.

20

Cambier, J. C. and M. H. Julius. 1988. Early changes in quiescent B cell physiology subsequent to cognate and bystander interaction with helper T cells. *Scand. J. Immunol.* 27:59.

Carter, R. H., M. O. Spycher, Y. C. Ng, R. Hoffman, and D. T. Fearon. 1988. Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J. Immunol.* 141:457.

30

Chao, M. V., M. A. Bothwell, A. H. Ross, H. Koprowski, A. A. Lanahan, C. R. Buck, and A. Sehgal. 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232:518.

Clark, E. A. and J. A. Ledbetter. 1986. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl.*

40

Acad. Sci. U. S. A. 83:4494.

Clark, E. A., T. C. Yip, J. A. Ledbetter, H. Yukawa, H. Kikutani, T. Kishimoto, and M. H. Ng. 1988. CDw40 and BLCA-specific monoclonal antibodies detect two distinct molecules which transmit progression signals to human B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 18:451.

10

Clark, E. A., G. L. Shu, B. Luscher, K. E. Draves, J. Banchereau, J. A. Ledbetter, and M. A. Valentine. 1989. Activation of human B cells. Comparison of the signal transduced by IL-4 to four different competence signals. *J. Immunol.* 143:3873.

Clark, E. A. 1990. CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens.* 36:33.

20

Clement, L. T., M. K. Dagg, and G. L. Gartland. 1984. Small, resting B cells can be induced to proliferate by direct signals from activated helper T cells. *J. Immunol.* 132:740.

Camerini, D., G. Walz, W. A. Loenen, J. Borst, and B. Seed. 1991. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J. Immunol.* 147:3165.

30

Crow, M. K. and H. G. Kunkel. 1985. Activated B lymphocytes: stimulators of an augmented autologous mixed leukocyte reaction. *Cell Immunol.* 90:555.

Crow, M. K., B. Kushner, J. A. Jovers, S. M. Friedman, S. E. Mechanic, and W. Stohl. 1989. Human peripheral blood

40

T helper cell-induced B cell activation results in B cell surface expression of the CD23 (BLAST-2) antigen. *Cell Immunol.* 121:99.

Crow, M. K., J. A. Jover, and S. M. Friedman. 1986. Direct T helper-B cell interactions induce an early B cell activation antigen. *J. Exp. Med.* 164:1760.

10

Chestnut, R. W. and H. M. Grey. 1981. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 126:1075.

Damle, N. K., P. S. Linsley, and J. A. Ledbetter. 1991. Direct helper T cell-induced B cell differentiation involves interaction between T cell antigen CD28 and B cell activation antigen B7. *Eur. J. Immunol.* 21:1277.

20

Doech, H. M., R. K. Schuurman, and E. W. Gelfant. 1980. Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro-II. Reappraisal of T and B cell-specific mitogens. *J. Immunol.* 125:827.

30

DeFranco, A. L., J. D. Ashwell, R. H. Schwartz, and W. E. Paul. 1984. Polyclonal stimulation of resting B lymphocytes by antigen-specific T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 159:861.

De Jong, R., W. A. Loenen, M. Brouwer, L. van Emmerik, E. F. de Vries, J. Borst, and R. A. van Lier. 1991. Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *J. Immunol.* 146:2488.

40

Dembic, Z., H. Loetscher, U. Gubler, Y. C. Pan, H. W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, and W. Lesslauer. 1990. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine*. 2:231.

10

Depper, J. M., W. J. Leonard, M. Kronke, P. D. Noguchi, R. E., Cunningham, T. A. Waldmann, and W. C. Greene. 1984. Regulation of interleukin 2 receptor expression: effects of phorbol diester, phospholipase C, and reexposure to lectin or antigen. *J. Immunol.* 133:3054.

Doyle, C. and J. L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330:256.

20

Dirkopf, H., U. Latza, M. Hummel, F. Eitelbach, B. Seed, and H. Stein. 1992. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 69:421.

30

Emilie, D., C. Wallon, P. Galanaud, A. Fischer, D. Olive, and J. F. Delfraissy. 1988. Role of the LFA3-CD2 interaction in human specific B cell differentiation. *J. Immunol.* 141:1912.

Engelmann, H., H. Holtmann, C. Brakebusch, Y. S. Avni, I. Sarov, Y. Nophar, E. Hadas, O. Leitner, and D. Wallach. 1990. Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J. Biol.*

40

Chem. 265:14497.

Fan, S. T., A. L. Glasebrook, and T. S. Edgington. 1990. Clonal analysis of CD4+ T helper cell subsets that induce the monocyte procoagulant response. *Cell Immunol.* 128:52.

Fan, S. T. and T. S. Edgington. 1988. Clonal analysis of mechanisms of murine T helper cell collaboration with effector cells of macrophage lineage. *J. Immunol.* 141:1819. 10

Farrah, T. and C. A. Smith. 1992. Emerging cytokine family. *Nature* 358:26.

Friedman, S. M., J. M. Breard, and L. Chess. 1976. Triggering of human peripheral blood B cells: polyclonal induction and modulation of an in vitro PFC response. *J. Immunol.* 117:2021. 20

Friedman, S. M., M. K. Crow, O. H. Irigoyen, C. Russo, D. N. Posnett, and L. Rogozinski. 1986. Human helper-T-cell function does not require T4 antigen expression. *Cell Immunol.* 103:105. 30

Goodwin, R. G., D. Anderson, R. Jerzy, T. Davis, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and C. A. Smith. 1991. Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol. Cell Biol.* 11:3020.

Goldberg, D., A. Green, A. B. Gottlieb, M. K. Crow, A. Lewison, and S. M. Friedman. 1985. Cloned allospecific human helper T cell lines induce an MHC-restricted 40

proliferative response by resting B cells. *J Immunol.*
135:1012.

Gray, D. and H. Skarvall. 1988. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336:70.

Gray, D., M. Kosco, and B. Stockinger. 1991. Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory. *Int. Immunol.* 3:141.

10

Gray, P. W., K. Barrett, D. Chantry, M. Turner, and M. Feldmann. 1990. Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:7380.

20

Grusby, M. J., R. S. Johnson, V. E. Papaioannou, and L. H. Glimcher. 1991. Depletion of CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 253:1417.

Hakoshima, T. and K. Tomita. 1988. Crystallization and preliminary X-ray investigation reveals that tumor necrosis factor is a compact trimer furnished with 3-fold symmetry. *J. Mol. Biol.* 201:455.

30

Hara, T., L. K. Jung, J. M. Bjorndahl, and S. M. Fu. 1986. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J. Exp. Med.* 164:1988.

40

Hart, D. N. and J. L. McKenzie. 1988. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J. Exp. Med.* 168:157.

Heller, R. A., K. Song, M. A. Onasch, W. H. Fischer, D. Chang, and G. M. Ringold. 1990. Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:6151.

10

Himmller, A., I. Maurer Fog, M. Kronke, P. Scheurich, K. Pfizenmaier, M. Lantz, I. Olsson, R. Hauptmann, C. Stratowa, and G. R. Adolf. 1990. Molecular cloning and expression of human and rat tumor necrosis factor receptor chain (p60) and its soluble derivative, tumor necrosis factor-binding protein. *DNA Cell Biol.* 9:705.

20

Hirohata, S., D. F. Jelinek, and P. E. Lipsky. 1988. T cell-dependent activation of B cell proliferation and differentiation by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J. Immunol.* 140:3736.

Hodgkin, P. D., L. C. Yamashita, R. L. Coffman, and M. R. Kehry. 1990. Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines. *J. Immunol.* 145:2025.

30

Inghirami, G., B. Y. Zhu, L. Chess, and D. M. Knowles. 1990. Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the gamma/delta T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *Am. J. Pathol.* 136:357.

40

Inghirami, G., D. R. Foitl, A. Sabichi, B. Y. Zhu, and D. M. Knowles. 1991. Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD5 antigen expression. *Blood* 78:1503.

Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, and S. Nagata. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233.

10

Jackson, D. G. and J. I. Bell. 1990. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J. Immunol.* 144:2811.

20

Janeway, C. A., S. Carding, B. Jones, J. Murray, P. Portoles, R. Rasmussen, J. Rojo, K. Saizawa, J. West, and K. Bottomly 1988. CD4⁺ T cells: specificity and function. *Immunol. Rev.* 101:39.

30

Johnson, D., A. Lanahan, C. R. Buck, A. Sehgal, C. Morgan, E. Mercer, M. Bothwell, and M. Chao. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545.

Jones, B. and C. A. Janeway. 1981. Cooperative interaction of B lymphocytes with antigen-specific helper T lymphocytes is MHC restricted. *Nature* 292:547.

40

Jover, J. A., E. K. Chartash, B. Kushner, S. M. Friedman,

and M. K. Crow. 1989. T helper cell-induced CD23 (BLAST-2) expression: an activation marker for the high density fraction of human B cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53:99.

Julius, M. H., J. M. Chiller, and C. L. Sidman. 1982. Major histocompatibility complex-restricted cellular interactions determining B cell activation. *Eur. J. Immunol.* 12:627.

10

Julius, M. H. and H. G. Rammensee. 1988. T helper cell-dependent induction of resting B cell differentiation need not require cognate cell interaction. *Eur. J. Immunol.* 18:375.

20

Julius, M. H., H. G. Rammensee, M. J. Ratcliffe, M. C. Lamers, J. Langhorne, and G. Kohler. 1988. The molecular interactions with helper T cells which limit antigen-specific B cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 18:381.

Kast, W. M., A. M. Bronkhorst, L. P. de Waal, and C. J. Melief. 1986. Cooperation between cytotoxic and helper T lymphocytes in protection against lethal Sendai virus infection. Protection by T cells is MHC-restricted and MHC-regulated; a model for MHC-disease associations. *J. Exp. Med.* 164:723.

30

Katz, D. H., T. Hamaoka, M. E. Dorf, and B. Benacerraf. 1973. Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. The H-2 gene complex determines successful physiologic lymphocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70:2624.

40

Kimata, H., A. Yoshida, C. Ishioka, T. Kusunoki, S. Hosoi, and H. Mikawa. 1991. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur. J. Immunol.* 21:137.

Kirchevsky, A., E. G. Armstrong, J. Schlatterer, S. Birken, J. O'Connor, K. Bikel, S. Silverberg, J. W. Lustbader, and R. E. Canfield. 1988. Preparation and characterization of antibodies to the urinary fragment of the human chorionic gonadotropin beta-subunit. *Endocrinology* 123:584.

Ko, H. S., S. M. Fu, R. J. Winchester, D. T. Yu, and H. G. Kunkel. 1979. Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells. *J. Exp. Med.* 150:246.

Krensky, A. M., C. Clayberger, C. S. Reiss, J. L. Strominger, and S. J. Burakoff. 1982. Specificity of OKT4+ cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 129:2001.

Krusemeier, M. and E. C. Snow. 1988. Induction of lymphokine responsiveness of hapten-specific B lymphocytes promoted through an antigen-mediated T helper lymphocyte interaction. *J. Immunol.* 140:367.

Kubota, E., D. T. McKenzie, R. W. Dutton, and S. L. Swain. 1991. Role of T cells in the B-cell response: glutaraldehyde-fixed T-helper hybridoma cells synergize with the lymphokines IL-4 to induce B-cell activation and proliferation. *Immunology*. 72:40.

10

20

30

40

Kupfer, A. and S. J. Singer. 1989. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu. Rev. Immunol.* 7:309.

Kupfer, A., S. L. Swain, and S. J. Singer. 1987. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J. Exp. Med.* 165:1565.

10

Ledbetter, J. A., G. Shu, M. Gallagher, and E. A. Clark. 1987. Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40). *J. Immunol.* 138:788.

20

Ledbetter, J. A. and E. A. Clark. 1986. Surface phenotype and function of tonsillar germinal center and mantle zone B cell subsets. *Hum. Immunol.* 15:30.

Lederman, S., M. J. Yellin, A. Krichevsky, J. Belko, J. J. Lee, and L. Chess. 1992. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact dependent B cell differentiation (help). *J. Exp. Med.* 175:1091.

30

Leist, T. P., M. Kohler, and R. M. Zinkernagel. 1989. Impaired generation of anti-viral cytotoxicity against lymphocytic choriomeningitis and vaccinia virus in mice treated with CD4-specific monoclonal antibody. *Scand. J. Immunol.* 30:679.

40

Lewis, M., L. A. Tartaglia, A. Lee, G. L. Bennett, G. C. Rice, G. H. Wong, E. Y. Chen, and D. V. Goeddel. 1991. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:2830.

10

Linsley, P. S., E. A. Clark, and J. A. Ledbetter. 1990. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:5031.

Liu, Y. J., D. E. Joshua, G. T. Williams, C. A. Smith, J. Gordon, and I. C. MacLennan. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929.

20

Liu, Y-J., G. D. Johnson, J. Gordon, and I. C. M. MacLennan. 1992. Germinal centers in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol. Today* 13:17.

Liu, Y. J., J. A. Cairns, M. J. Holder, S. D. Abbot, K. U. Jansen, J. Y. Bonnefoy, J. Gordon, and I. C. MacLennan. 1991. Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 21:1107.

30

Loenen, W. A., E. De Vries, L. A. Gravestein, R. Q. Hintzen, R. A. van Lier, and J. Borst. 1992. The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve

40

receptor endocytosis. *Eur. J. Immunol.* 22:447.

Loetscher, H., Y. C. Pan, H. W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, H. Tabuchi, and W. Lesslauer. 1990. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61:351.

10

Lohoff, M., M. Dirks, P. Rohwer, and M. Rollinghoff. 1989. Studies on the mechanism of polyclonal B cell stimulation by Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 19:77.

Mallett, S., S. Fossum, and A. N. Barclay. 1990. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J.* 9:1063.

20

Martin, P. J., J. A. Ledbetter, Y. Morishita, C. H. June, P. G. Beatty, and J. A. Hansen. 1986. A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 136:3282.

Martinez, A. C. and A. Coutinho. 1981. B-cell activation is a two step process. *Nature* 290:60.

30

McDonald, N. Q., R. Lapatto, J. Murray Rust, J. Gunning, A. Wlodawer, and T. L. Blundell. 1991. New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354:411.

Mitchell, G. F. and J. F. Miller. 1968. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp.*

40

Med. 128:821.

Mitchison, N. A. 1971. The carrier effect in the secondary response to haptens-protein conjugates. V. Use of antilymphocyte serum to deplete animals of helper cells. *Eur. J. Immunol.* 1:68.

10

Nemerow, G. R., M. E. McNaughton, and N. R. Cooper. 1985. Binding of monoclonal antibody to the Epstein Barr virus (EBV)/CR2 receptor induces activation and differentiation of human B lymphocytes. *J. Immunol.* 135:3068.

Noelle, R. J., J. Daum, W. C. Bartlett, J. McCann, and D. M. Shepherd. 1991. Cognate interactions between helper T cells and B cells. V. Reconstitution of T helper cell function using purified plasma membranes from activated Th1 and Th2 helper cells and lymphokines. *J. Immunol.* 146:1118.

20

Noelle, R. J., M. Roy, D. M. Shepherd, I. Stamenkovic, J. A. Ledbetter, and A. Aruffo. 1992. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:6550.

30

Noelle, R. J. and E. C. Snow. 1990. Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol. Today* 11:361.

Noelle, R. J. and E. C. Snow. 1991. T helper cell-dependent B cell activation. *FASEB J.* 5:2770.

40

Noelle, R. J., J. McCann, L. Marshall, and W. C.

Bartlett. 1989. Cognate interactions between helper T cells and B cells. III. Contact-dependent, lymphokine-independent induction of B cell cycle entry by activated helper T cells. *J. Immunol.* 143:1807.

Noelle, R. J., E. C. Snow, J. W. Uhr, and E. S. Vitetta. 1983. Activation of antigen-specific B cells: role of T cells, cytokines, and antigen in induction of growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:6628.

Nophar, Y., O. Kemper, C. Brakebusch, H. Englemann, R. Zwang, D. Aderka, H. Holtmann, and D. Wallach. 1990. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J.* 9:3269.

Nossal, G. J. 1992. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell* 68:1.

O'Brien, R.L., P. Marrack, U. Storb, and J. W. Kappler. 1988. B cells expressing Ig transgenes respond to a T-dependent antigen only in the presence of Ia-compatible T cells. *J. Immunol.* 141:3335.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Paulita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., et al. 1992 Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the Tumor Necrosis Factor / Never Growth Factor Receptor Superfamily. Sequence Identity with the Fas Antigen. *J. Biol. Chem.* 267(15):10709.

Otten, U., P. Ehrhard, and R. Peck. 1989. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:10059.

Owens, T. 1988. A noncognate interaction with anti-receptor antibody-activated helper T cells induces small resting murine B cells to proliferate and to secrete antibody. *Eur. J. Immunol.* 18:395.

10

Paterson, D. J., W. A. Jefferies, J. R. Green, M. R. Brandon, P. Corthesy, M. Puklavec, and A. F. Williams. 1987. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol. Immunol.* 24:1281.

20

Poo, W. J., L. Conrad, and C. A. Janeway. 1988. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 332:378.

Pollok, K. E., V. O'Brien, L. Marshall, J. W. Olson, R. J. Noelle, and E. C. Snow. 1991. The development of competence in resting B cells. The induction of cyclic AMP and ornithine decarboxylase activity after direct contact between B and T helper cells. *J. Immunol.* 146:1633.

30

Principato, M. A., G. S. Thompson, and S. M. Friedman. 1983. A cloned major histocompatibility complex-restricted trinitrophenyl-reactive human helper T cell line that activates B cell subsets via two distinct pathways. *J. Exp. Med.* 158:1444.

40

Rabin, E. M., J. Ohara, and W. E. Paul. 1985. B-cell

stimulatory factor 1 activates resting B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:2935.

Rahemtulla, A., W. P. Fung-Leung, M. W. Schilham, T. M. Kundig, S. R. Sambhara, A. Narendran, A. Arabian, A. Wakeham, C. J. Paige, R. M. Zinkernagel, R. G. Miller, and T. W. Mak. 1991. Normal development and function of CD8⁺ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353:180.

10

Reinherz, E.L., P. C. Kung, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1979. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76:4061.

20

Reinherz, E. L., P. C. Kung, J. M. Breard, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1980. T cell requirements for generation of helper factor(s) in man: analysis of the subsets involved. *J. Immunol.* 124:1883.

Reinherz, E. L., P. C. Kung, J. M. Pesando, J. Ritz, G. Goldstein, and S. F. Schlossman. 1979. Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. Activation stimuli required for expression. *J. Exp. Med.* 150:1472.

30

Riedel, C., T. Owens, and G. J. Nossal. 1988. A significant proportion of normal resting B cells are induced to secrete immunoglobulin through contact with anti-receptor antibody-activated helper T cells in clonal cultures. *Eur. J. Immunol.* 18:403.

40

Risso, A., D. Smilovich, M. C. Capra, I. Baldissarro, G.,

Yan, A. Bargellesi, and M. E. Cosulich. 1991. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J. Immunol.* 146:4105.

Rogozinski, L., A. Bass, E. Glickman, M. A. Talle, G. Goldstein, J. Wang, L. Chess, and Y. Thomas. 1984. The T4 surface antigen is involved in the induction of helper function. *J. Immunol.* 126:735.

10

Rothe, J. G., M. Brockhaus, R. Gentz, and W. Lesslauer. 1991. Molecular cloning and expression of the mouse Tnf receptor type b. *Immunogenetics* 34:338.

Rothlein, R., M. L. Dustin, S. D. Marlin, and T. A. Springer. 1986. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 137:1270.

20

Sanchez Madrid, F., A. M. Krensky, C. F. Ware, E. Robbins, J. L. Strominger, S. J. Burakoff, and T. A. Springer. 1982. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytolysis: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:7489.

30

Sanders, V. M., J. M. Snyder, J. W. Uhr, and E. S. Vitetta. 1986. Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells. *J. Immunol.* 137:2395.

Sanders, V. M. and E. S. Vitetta. 1991. B cell-associated LFA-1 and T cell-associated ICAM-1 transiently cluster in the area of contact between interacting cells. *Cell Immunol.* 132:45.

40

Sehgal, A., M. Bothwell, and M. Chao. 1989. Gene transfer of truncated NGF receptor clones leads to cell surface expression in mouse fibroblasts. *Nucleic. Acids. Res.* 17:5623.

Sekita, K., C. Straub, D. Hoessli, and R. H. Zubler. 1988. B cell-stimulating activity of lymphoid cell membrane fractions. *Eur. J. Immunol.* 18:1405.

10

Sen, J., P. Bossu, S. J. Burakoff, and A. K. Abbas. 1992. T cell surface molecules regulating noncognate B lymphocyte activation. Role of CD2 and LFA-1. *J. Immunol.* 148:1037.

Shields, J. G., R. J. Armitage, B. N. Jamieson, P. C. Beverley, and R. E. Callard. 1989. Increased expression of surface IgM but not IgD or IgG on human B cells in response to IL-4. *Immunology* 66:224.

20

Siegel, J. P. and H. S. Mostowski. 1990. A bioassay for the measurement of human interleukin-4. *J. Immunol. Methods* 132:287.

30

Smith, S. H. M. H. Brown, D. Rowe, R E. Callard, and P. C. Beverley. 1986. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology* 58:63.

Smith, R. A. and C. Baglioni. 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* 262:6951.

40

Smith, C. A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M. P.

Beckmann, R. Jerzy, S. K. Dower, D. Cosman, and R. G. Goodwin. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019.

Snow, E. C., R. J. Noelle, J. W. Uhr, and E. S. Vitetta. 1983. Activation of antigen-enriched B cells. II. Role of linked recognition in B cell proliferation to thymus-dependent antigens. *J. Immunol.* 130:614.

10

Spiegel, H., H. Herbst, G. Niedobitek, H. D. Foss, and H. Stein. 1992. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am. J. Pathol.* 140:15.

20

Sprent, J. 1978a. Restricted helper function of F1 hybrid T cells positively selected to heterologous erythrocytes in irradiated parental strain mice. II. Evidence for restrictions affecting helper cell induction and T-B collaboration, both mapping to the K-end of the H-2 complex. *J. Exp. Med.* 147:1159.

30

Sprent, J. 1978b. Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice in vivo. *Immunol. Rev.* 42:108.

Stamenkovic, I., D. Sgroi, A. Aruffo, M. S. Sy, and T. Anderson. 1991. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell* 66:1133.

40

Stamenkovic, I., E. A. Clark, and B. Seed. 1989. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* 8:1403.

Tesch, H., F. I. Smith, W. J. Muller Hermes, and K. Rajewsky. 1984. Heterogeneous and monoclonal helper T cells induce similar anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibody populations in the primary adoptive response. I. Isotype distribution. *Eur. J. Immunol.* 14:188.

10

Thomas, Y., J. Sosman, L. Rogozinski, O. Irigoyen, P. C. Kung, G. Goldstein, and L. Chess. 1981. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. III. Regulation of helper factor production by T cell subsets. *J. Immunol.* 126:1948.

20

Thomas, T., L. Rogozinski, O. H. Irigoyen, S. M. Friedman, P. C. Kung, G. Goldstein, and L. Chess. 1981. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. IV. Induction of suppressor cells within the OKT4+ population. *J. Exp. Med.* 154:459.

30

Thomas, Y., J. Sosman, O. Irigoyen, S. M. Friedman, P. C. Kung, G. Goldstein, and L. Chess. 1980. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B cell differentiation. *J. Immunol.* 125:2402.

Thomas, Y., L. Rogozinski, O. H. Irigoyen, H. H. Shen, M. A. Talle, G. Goldstein, and L. Chess. 1982. Functional

40

analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. V. Suppressor cells within the activated OKT4+ population belong to a distinct subset. *J. Immunol.* 128:1386.

Thompson, C. B., M. E. Schaefer, F. D. Finkelman, I. Scher, J. Farrar, and J. J. Mond. 1985. T cell-derived B cell growth factor(s) can induce stimulation of both resting and activated B cells. *J. Immunol.* 134:369.

10

Tohma, S., S. Hirohata, and P. E. Lipsky. 1991. The role of CD11a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation. *J. Immunol.* 146:492.

Tohma, S. and P. E. Lipsky. 1991. Analysis of the mechanism of T cell-dependent polyclonal activation of human B cells. Induction of human B cell responses by fixed activated T cells. *J. Immunol.* 146:2544.

20

Torimoto, Y., K. Sugita, D. S. Weinberg, N. H. Dang, C. Donahue, N. L. Letvin, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1991. Development of a monoclonal antibody, anti-6C2, which is involved in the interaction of CD4 T helper cells and activated B cells. *J. Immunol.* 146:2176.

30

Umiel, T., L. M. Nadler, I. J. Cohen, H. Levine, B. Stark, Z. Mammon, M. Dzaldetti, G. Rechavi, F. Simoni, and N. Katzir. 1987. Undifferentiated leukemia of infancy with t(11:17) chromosomal rearrangement. Coexpressing myeloid and B cell restricted antigens. *Cancer* 59:1143.

Upton, C., J. L. Macen, M. Schreiber, and G. McFadden. 1991. Myxoma virus expresses a secreted protein with

40

homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 184:370.

Van de Velde, H., I. Von Hoegen, W. Luo, J. R. Parnes, and K. Theilemans. 1991. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 351:662. 10

Vitetta, E. S., R. Fernandez Botran, C. D. Myers, and V. M. Sanders. 1989. Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv. Immunol.* 45:1.

Wasik, M. A., R. P. Donnelly, and D. I. Beller. 1988. Lymphokine-independent induction of macrophage membrane IL-1 by autoreactive T cells recognizing either class I or class II MHC determinants. *J. Immunol.* 141:3456. 20

Watanabe F., R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314.

Weaver, C. T., L. M. Duncan, and E. R. Unanue. 1989. T cell induction of macrophage IL-1 during antigen presentation. Characterization of a lymphokine mediator and comparison of TH1 and TH2 subsets. *J. Immunol.* 142:3469. 30

Weigert, M. G., I. M. Cesari, S. J. Yonkovich, and M. Cohn. 1970. Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 228:1045. 40

Whalen, B. J., H. P. Tony, and D. C. Parker. 1988.

Characterization of the effector mechanism of help for antigen-presenting and bystander resting B cell growth mediated by Ia-restricted Th2 helper T cell lines. *J. Immunol.* 141:2230.

White, R. A., Mason, D. W. Mason, A. F. Williams, G. Galfre, and C. Milstein. 1978. T-lymphocyte heterogeneity in the rat: separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 148:664.

10

Yellin, M. J., J. J. Lee, L. Chess, and S. Lederman. 1991. A human CD4⁺ leukemic subclone with contact dependent helper function. *J. Immunol.* 147:3389.

Yamada, H., P. J. Martin, M. A. Bean, M. P. Braun, P. G. Beatty, K. Sadamoto, and J. A. Hansen. 1985. Monoclonal antibody 9.3 and anti-CD11 antibodies define reciprocal subsets of lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 15:1164.

20

Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169:1747.

30

Zimecki, M., Z. Wieczorek, J. A. Kapp, and C. W. Pierce. 1988. Secretion of interleukin 1 (IL-1) by peritoneal macrophages upon contact with syngeneic T cells is Ia-restricted and antigen-independent process. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 36:661.

Zimecki, M., Z. Wieczorek, J. A. Kapp, and C. W. Pierce. 1989. Structures on T cells and macrophages involved in interleukin 1 (Il-1) secretion by macrophages upon

40

contact with syngeneic thymocytes. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 37:587.

Zinkernagel, R. M. 1976. T helpers may be sensitized by antigen-specifically altered structures, which are coded by the I region of the H-2 gene complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 66:527.

10

Zinkernagel, R. M., G. N. Callahan, A. Althage, S. Cooper, J. W. Streilein, and J. Klein. 1978. The lymphoreticular system in triggering virus plus self-specific cytotoxic T cells: evidence for T help. *J. Exp. Med.* 147:897.

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0292】

【図1】CD4⁺ Jurkat D1.1の細胞表面の表現型を示す図。

50

【図2】B細胞単独で、あるいはCD4⁻Jurkat(D1.1)、又はCD4⁺Jurkat(B2.7)と共に24時間培養した後の、粘性を失った高密度B細胞の2色FACS分析の結果を示す図。

【図3】D1.1に誘導されたCD23発現の投与応答を示す図。

【図4】PHA存在下でJurkat D1.1がB細胞の増殖を誘導することを示す図。

【図5-1】Jurkat D1.1の、Ig分泌細胞へのB細胞分化の誘導を示す図。

【図5-2】Jurkat D1.1の、Ig分泌細胞へのB細胞分化の誘導を示す図。

【図6】D1.1ではなくrIL-4のB細胞のsigM発現の増加を示す図。

【図7】mAb 5c8のJurkat D1.1細胞への結合を示す図。

【図8】mAb 5c8が、Bリンパ球によるCD23の発現を誘導するJurkat D1.1を阻害することを示す24時間培養後の粘性を失った高密度B細胞の2色FACS分析を示す図。

【図9】mAb 5c8とコントロールmAbにより免疫沈降した表面蛋白のSDS/PAGE分析を示す図。

【図10】T細胞の活性化と活性化されたT細胞の抗原5c8の発現における代謝的阻害因子の影響を示す図。

【図11】単離されたCD4⁺、CD8⁺T細胞サブセット上での5c8の発現のカイネティクスを示す図。

【図12】D1.1が、B細胞又はRAMOS266上での表面CD23発現を誘導することを示す図。

【図13】扁桃のB細胞に対するD1.1の影響を示す図。

【図14A】D1.1-B細胞活性化におけるT-BAMとCD40の役割を示す図。

【図14B】D1.1-B細胞活性化におけるT-BAMとCD40の役割を示す図。

【図15】末梢性B細胞のD1.1活性化に対する抗CD40mAbの影響を示す図。

【図16A】B細胞CD23発現に対する抗CD40のCD32⁺L細胞へ及ぼす影響を示す図。

【図16B】B細胞CD23発現に対する抗CD40のCD32⁺L細胞へ及ぼす影響を示す図。

【図17-1】ヒト正常リンパ球組織でのT-BAM発現を示す図。

【図17-2】ヒト正常リンパ球組織でのT-BAM発現を示す図。

【図17-3】ヒト正常リンパ球組織でのT-BAM発現を示す図。

【図18】T-B分子の相互作用モデルを示す図。

【図19A-1】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図19A-2】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図19B-1】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図19B-2】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図19C-1】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図19C-2】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図19D-1】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図19D-2】慢性関節リューマチの滑膜パンヌスにおけるCD4⁺Tリンパ球上のT-BAMの発現を示す図。

【図20A-1】浸潤性乾癬損傷のTリンパ球でのT-BAMの発現を示す図。

【図20A-2】浸潤性乾癬損傷のTリンパ球でのT-BAMの発現を示す図。

10

20

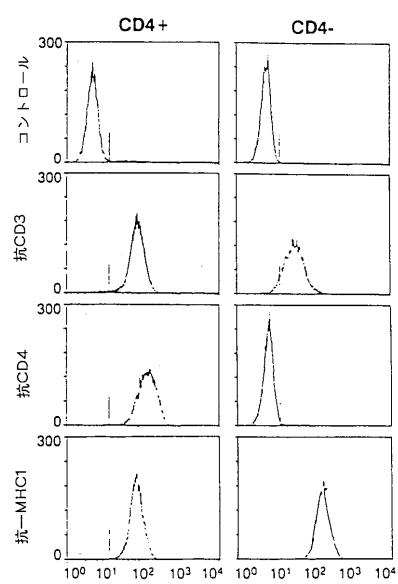
30

40

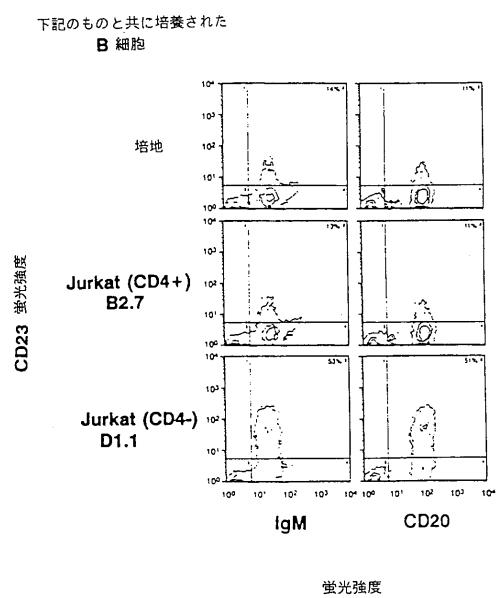
50

- 【図20B-1】浸潤性乾癐損傷のTリンパ球でのT-BAMの発現を示す図。
- 【図20B-2】浸潤性乾癐損傷のTリンパ球でのT-BAMの発現を示す図。
- 【図21A-1】非ホジキンリンパ腫細胞でのT-BAMの発現を示す図。
- 【図21A-2】非ホジキンリンパ腫細胞でのT-BAMの発現を示す図。
- 【図21B-1】非ホジキンリンパ腫細胞でのT-BAMの発現を示す図。
- 【図21B-2】非ホジキンリンパ腫細胞でのT-BAMの発現を示す図。

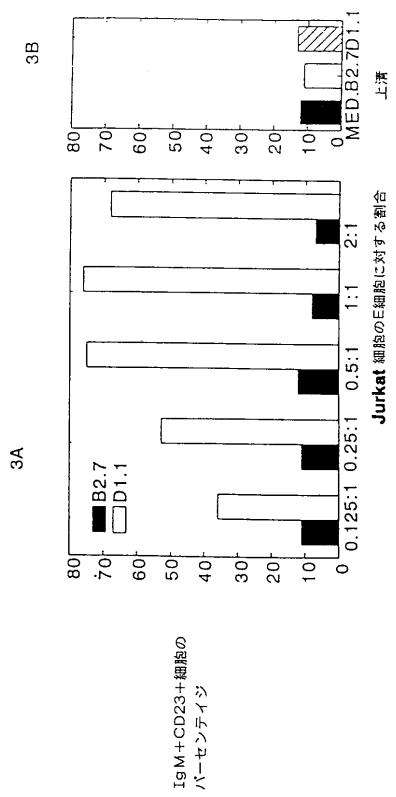
【図1】



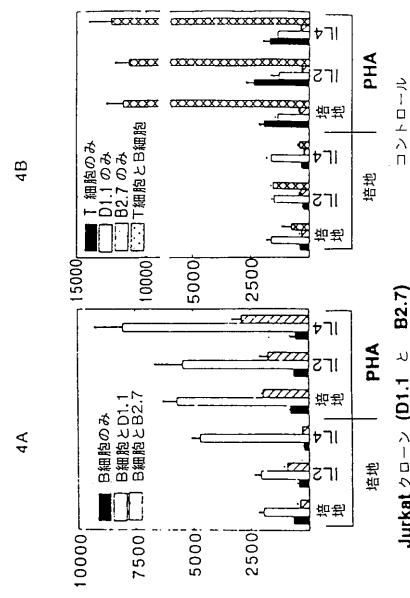
【図2】



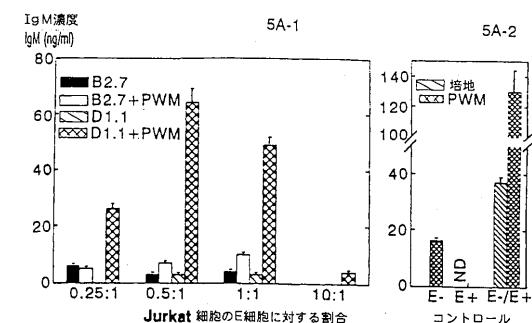
【図3】



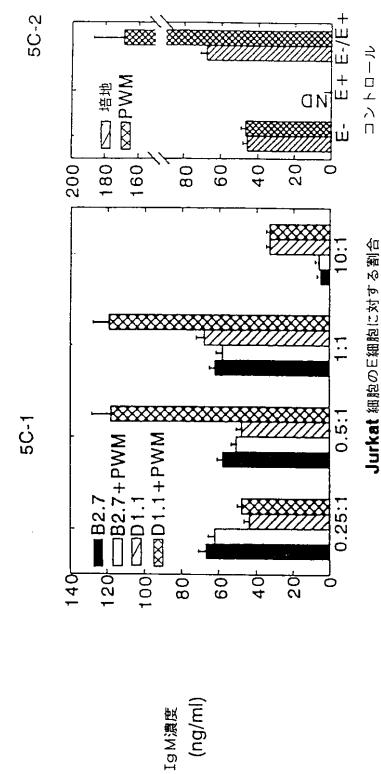
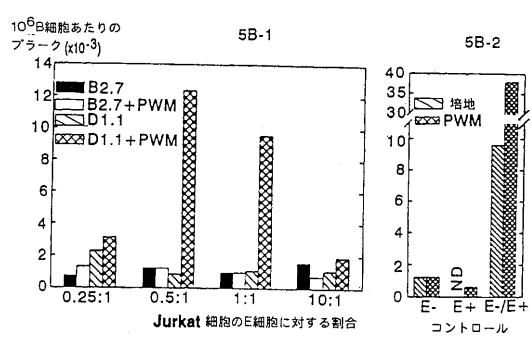
【図4】



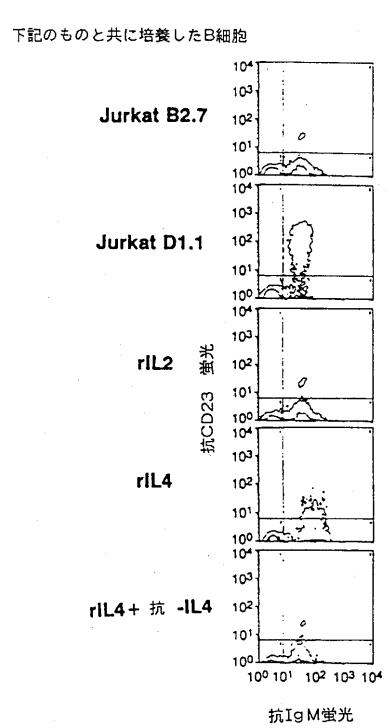
【図5-1】



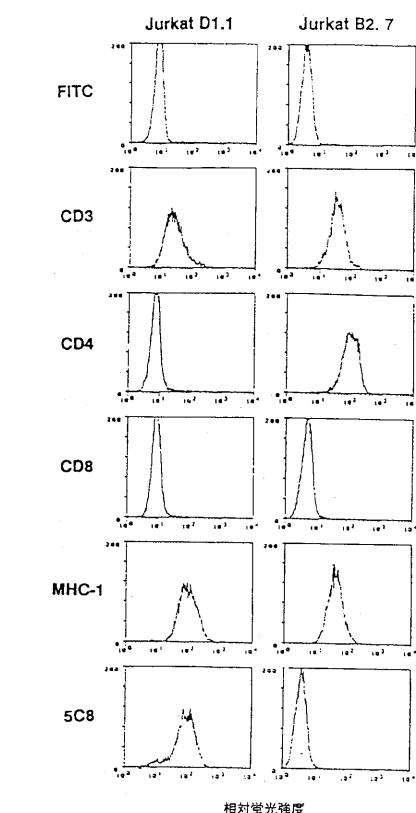
【図5-2】



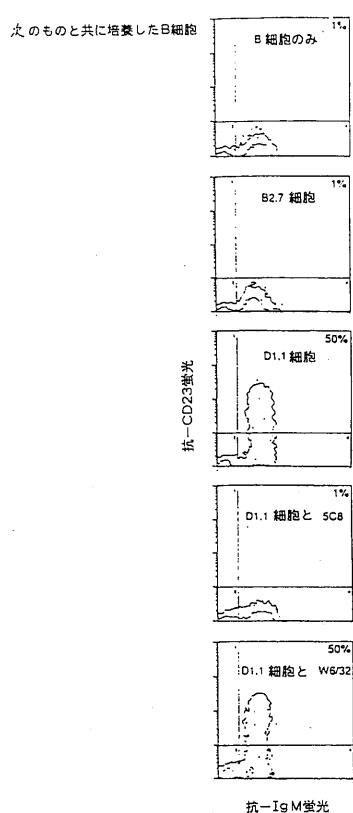
【図6】



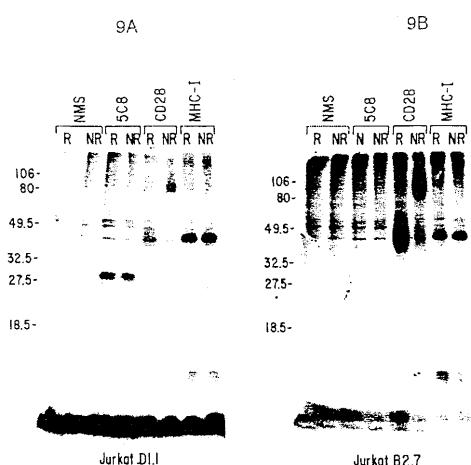
【図7】



【図8】



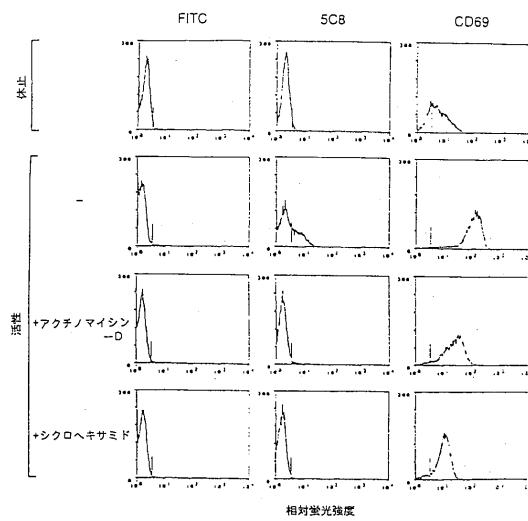
【図9】



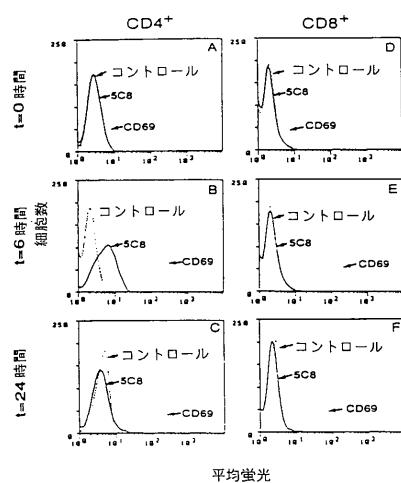
Jurkat D1.1

Jurkat B2.7

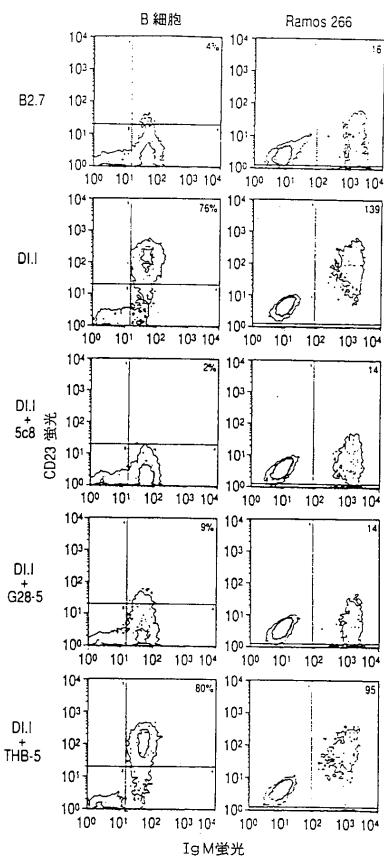
【図10】



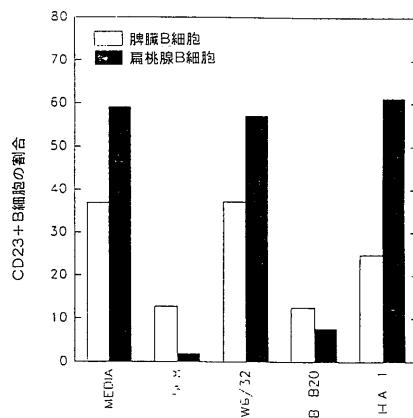
【図11】



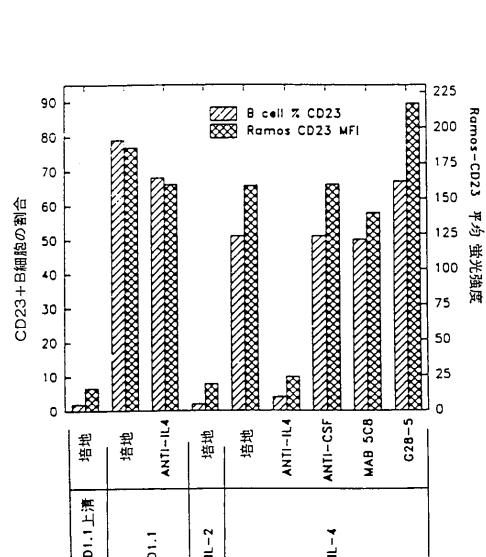
【図12】



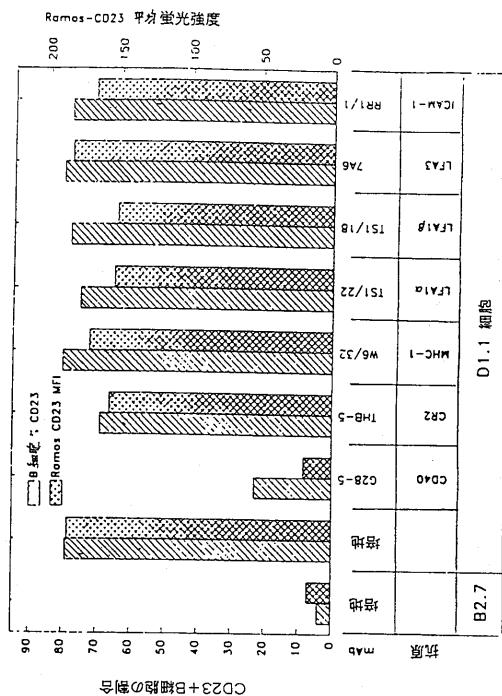
【図13】



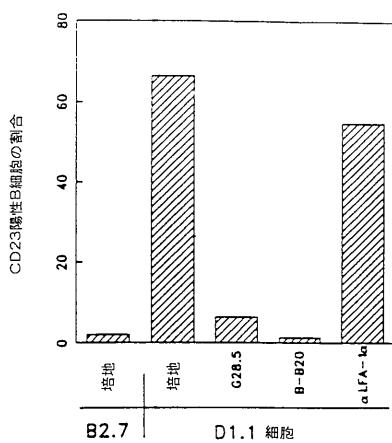
【図 14 A】



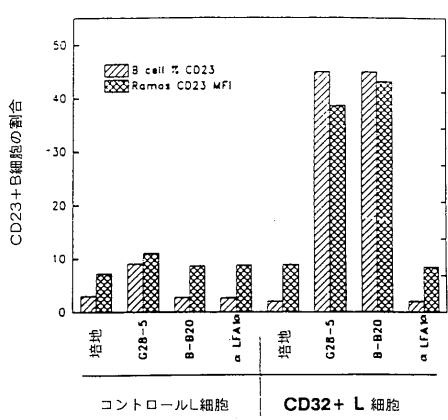
【図 14 B】



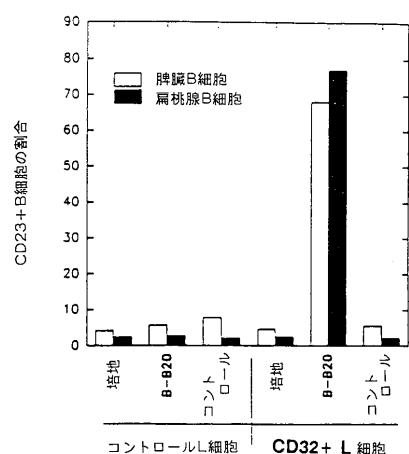
【図 15】



【図 16 A】



【図 16B】



【図 17-1】

17A

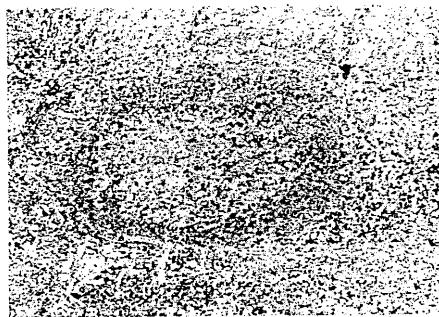


17B



【図 17-2】

17C



【図 17-3】

17D



17E

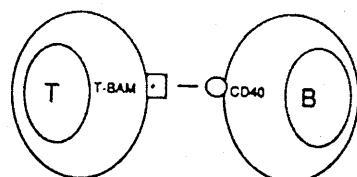


【図18】

分子的-B相互作用のモデル

モデル #1

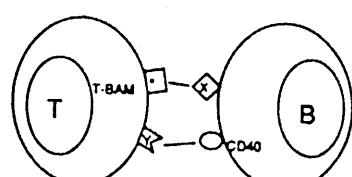
T-BAM-CD40: レセプターとリガンドの関係



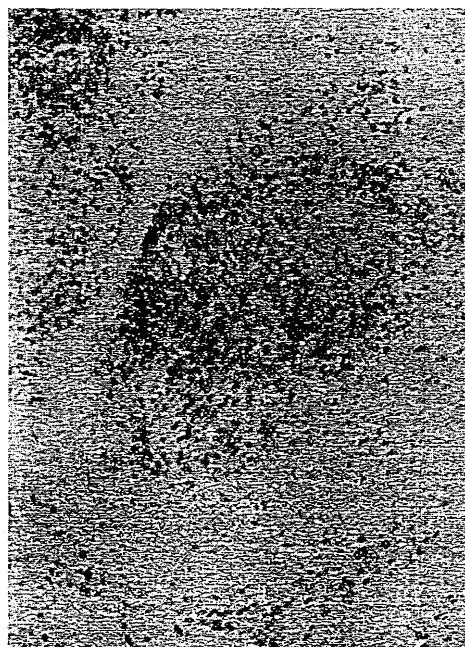
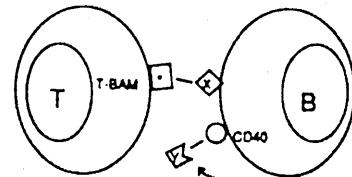
モデル #2

T-BAMおよびCD40の異なるリガンドとの相互作用は、両方ともB細胞活性化に必要である

CD40は異なるT細胞リガンドのレセプターである

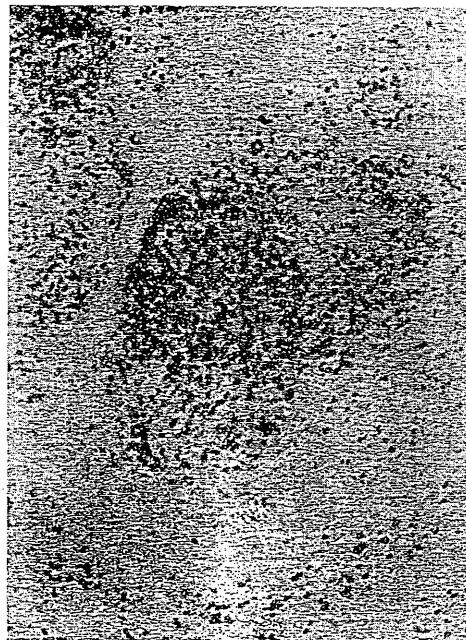


CD40は可溶性 "autocrine" B細胞因子である

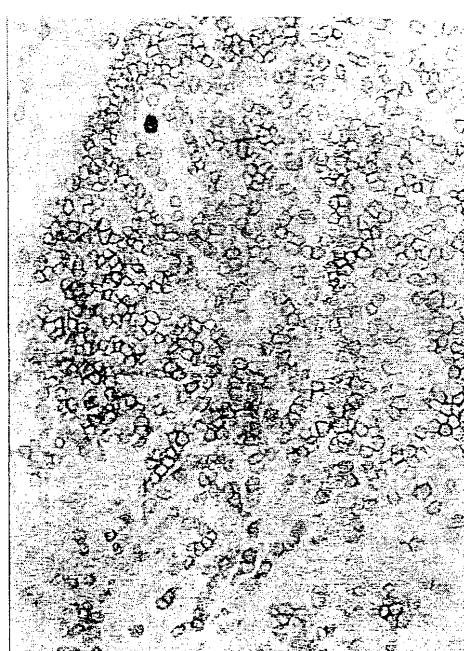


【図19A-2】

【図19B-1】

リューマチ様 関節炎
αCD3 DAB 高パワー

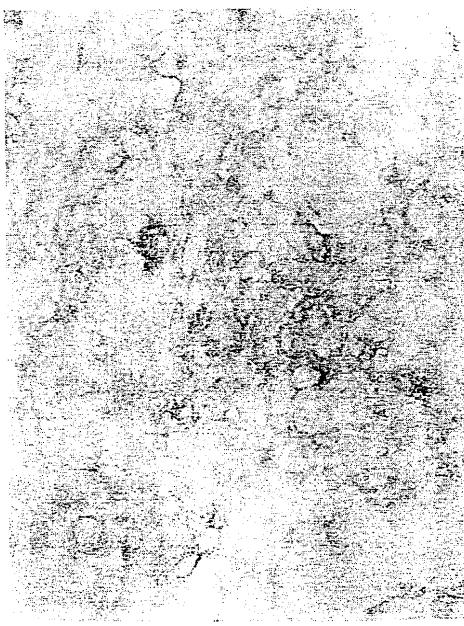
【図 19 B - 2】



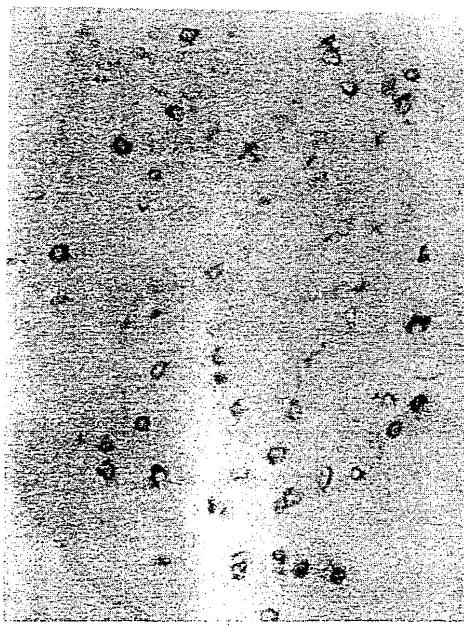
【図 19 C - 1】



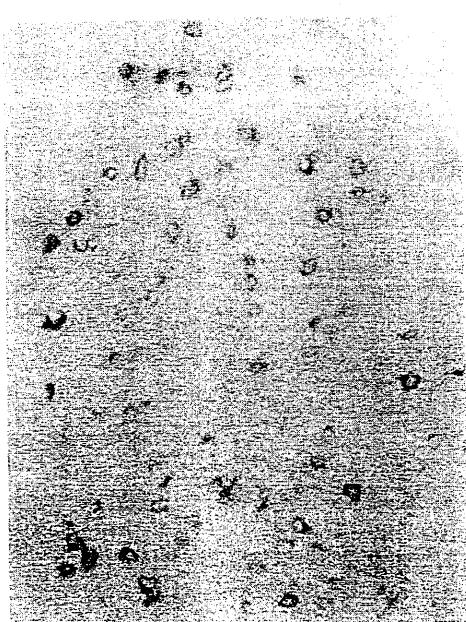
【図 19 C - 2】



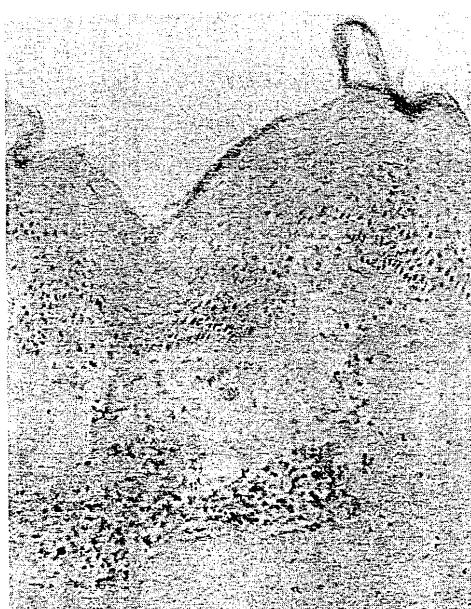
【図 19 D - 1】



【図19D-2】

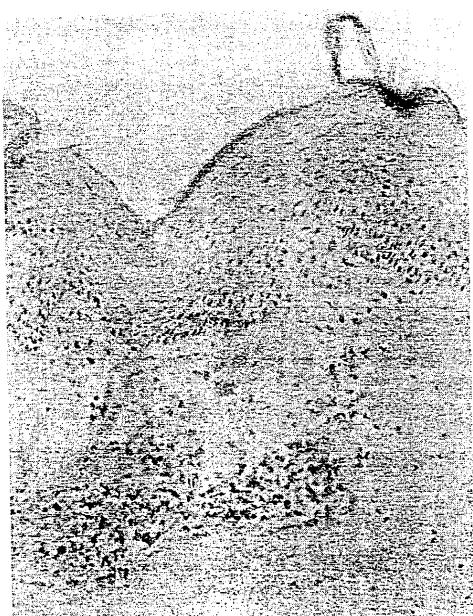


【図20A-1】



乾燥 - 低パワー

【図20A-2】



【図20B-1】



乾燥 - 高パワー

【図20B-2】



【図21A-1】



非ホジキンリンパ腫

【図21A-2】

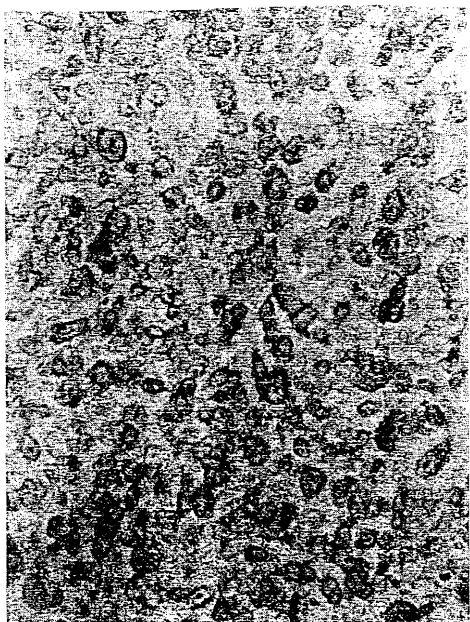


【図21B-1】



非ホジキンリンパ腫

【図21B-2】



【配列表】

2006034294000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100091351

弁理士 河野 哲

(74)代理人 100088683

弁理士 中村 誠

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 セス・レダーマン

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10027、ニューヨーク、アパートメント 44、ウエスト
・ワンハンドレッドトウエンティファースト・ストリート 523

(72)発明者 レオナード・チェス

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10538、スカースデール、グリーン・アクレス・アベニュー
- 81

(72)発明者 マイケル・ジェイ・イエリン

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10463、リバーデール、インデペンデンス・アベニュー
2736

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA15 BA45 BA46 BA80 CA02 DA02 EA04 GA11
 HA03 HA14
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA05 DA14
 4C085 AA14 AA21 HH03 KA04 KA29 LL18
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA76 EA22 EA28 EA51 EA54
 FA72 FA74

专利名称(译)	单克隆抗体5c8特异性结合的蛋白质		
公开(公告)号	JP2006034294A	公开(公告)日	2006-02-09
申请号	JP2005223497	申请日	2005-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
申请(专利权)人(译)	受托人Koranbia-大学在纽约市		
[标]发明人	セスレーダーマン レオナード・チェス マイケル・ジェイ・エイリン		
发明人	セス・レーダーマン レオナード・・チェス マイケル・・ジェイ・エイリン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 A61K39/395 A61P43/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P7/00 A61P7/06 A61P3/10 A61P37/06 A61P37/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P31/12 A61K49/00 G01N33/574 C12P21/08 G01N33/50 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K51/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P17/06 A61P31/14 A61P37/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/725 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/09 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/12 C12N15/13 C12P21/02 C12Q1/02 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K47/68 A61K47/6849 A61K51/1039 A61K51/1087 A61K2123/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P29/00 C07K14/705 C07K14/70575 C07K16/2875 C07K2317/24 C07K2319/00 C12N5/0694 Y02A50/401 Y10S514/885		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 A61K39/395.N A61P43/00.105 A61P37/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P21/04 A61P7/00 A61P7/06 A61P3/10 A61P37/06 A61P37/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P31/12 A61K49/00.A G01N33/574.D C12P21/08 A61K49/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA15 4B024/BA45 4B024/BA46 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA14 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA14 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/HH03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	河野 哲 中村诚		
优先权	07/792728 1991-11-15 US		
其他公开文献	JP4037882B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供与由ATCC登录号HB10916的杂交瘤产生的单克隆抗体有关的技术。解决方案：本发明提供了可与用ATCC保藏号HB10916的杂交瘤产生的单克隆抗体5c8特异性识别的蛋白质结合的单克隆抗体。本发明进一步提供了由ATCC保藏号HB10916杂交瘤产生的单克隆抗体5c8特异性识别的分离蛋白，HB10916是一种分离的核酸分子，其编码用ATCC登录号HB10916的杂交瘤产生的单克隆抗体5c8特异性识别的蛋白质。和ATCC登录号CRL 10915的人CD4-T细胞白血病细胞称为D1.1，并且能够基本上赋予具有接触依赖性辅助功能的B细胞。 Ž

表 2

マイトイシンCおよびIL-4に対する抗体の、
ジャーカットD1. 1細胞に誘発されるB細胞CD23発現への効果

B細胞	<u>ジャーカットクローニング</u>						
	C	rIL-4	rIL-2	D1.1	B2.7	D1.1/M	B2.7/M
プラス	14	64	17	81	16	57	14
抗IL-4 ND	28	ND	84	ND	64	ND	
抗IL-2 ND	ND	60	ND	86	ND	60	ND