

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 510016

(P2003 - 510016A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 3
16/18		19/00	4 B 0 6 4
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全136数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 500765(P2001 - 500765)

(86) (22)出願日 平成12年6月1日(2000.6.1)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月3日(2001.12.3)

(86)国際出願番号 PCT/US00/15345

(87)国際公開番号 W000/073453

(87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)

(31)優先権主張番号 60/137,085

(32)優先日 平成11年6月2日(1999.6.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 プレジデント・アンド・フェローズ・オブ  
・ハーバード・カレッジ  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02138ケン  
ブリッジ・マウントオーバーストリート  
124

(72)発明者 グリムシャー, ローリー・エイチ  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02165ウエ  
ストニュートン・ハンブシャー・ストリート  
51

(72)発明者 スザボ, スーザン・ジエイ  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02446ブル  
ックライン・ピーコンストリート1131

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T - b e t 組成物およびその使用の方法

(57)【要約】

T - b e t をコードする単離された核酸分子、および単離された T - b e t タンパク質を提供する。本発明は、さらに、アンチセンス核酸分子、本発明の核酸分子を含んでなる組換え発現ベクター、発現ベクターが導入された宿主細胞および T - b e t 導入遺伝子を有する非 - ヒトトランスジェニック動物を提供する。本発明はさらに、T - b e t 融合タンパク質および抗 T - b e t 抗体も提供する。本発明の T - b e t 組成物を使用する方法も開示し、これには、生物学的試料内の T - b e t 活性を検出するための方法、細胞内の T - b e t 活性を調節する方法、および T - b e t の活性を調節する薬剤を同定するための方法も含まれる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 T - b e t タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子。

【請求項2】 配列番号1に記載のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】 配列番号3のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項2記載の核酸分子。

【請求項4】 配列番号1の少なくとも約700の連続したヌクレオチドと少なくとも70%のヌクレオチド一致を有する、請求項1記載の核酸分子。

【請求項5】 配列番号3の少なくとも約500の連続したヌクレオチドと少なくとも70%のヌクレオチド一致を有する、請求項1記載の核酸分子。

【請求項6】 配列番号1の少なくとも約700の連続したヌクレオチドと少なくとも90%のヌクレオチド一致を有する、請求項1記載の核酸分子。

【請求項7】 配列番号3の少なくとも約500の連続したヌクレオチドと少なくとも90%のヌクレオチド一致を有する、請求項1記載の核酸分子。

【請求項8】 請求項1の核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項9】 発現ベクターである、請求項8のベクター。

【請求項10】 請求項9のベクターを含む宿主細胞。

【請求項11】 請求項10の宿主細胞を、T - b e t タンパク質が産生されるまで適当な媒体内で培養することを含んでなる、T - b e t タンパク質を産生するための方法。

【請求項12】 媒体または宿主細胞からT - b e t タンパク質を単離することを含んでなる、請求項11記載の方法。

【請求項13】 単離されたT - b e t タンパク質。

【請求項14】 配列番号1の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる、請求項12記載のタンパク質。

【請求項15】 配列番号3の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる、請求項12記載のタンパク質。

【請求項16】 配列番号2のアミノ酸配列を含んでなる、請求項12記載

のタンパク質。

【請求項17】 配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる、請求項12記載のタンパク質。

【請求項18】 配列番号2に記載のタンパク質と少なくとも70%のアミノ酸一致を有する、請求項12記載のタンパク質。

【請求項19】 配列番号4に記載のタンパク質と少なくとも70%のアミノ酸一致を有する、請求項12記載のタンパク質。

【請求項20】 配列番号2に記載のタンパク質と少なくとも90%のアミノ酸一致を有しそしてDNAへ結合する能力を有する、請求項12記載のタンパク質。

【請求項21】 T - b e t タンパク質以外のポリペプチドと操作可能に連結したT - b e t タンパク質を含んでなる融合タンパク質。

【請求項22】 特異的にT - b e t タンパク質を結合する抗体。

【請求項23】 ポリクローナル抗体である、請求項21記載の抗体。

【請求項24】 モノクローナル抗体である、請求項21記載の抗体。

【請求項25】 検出可能な物質にカプリングしている、請求項21記載の抗体。

【請求項26】 T - b e t タンパク質をコードする導入遺伝子を有する細胞を含む非 - ヒトトランスジェニック動物。

【請求項27】 生物学的試料をT - b e t の存在が生物学的試料内で検出されるようにT - b e t 活性の指標を検出することが可能な薬剤と接触させることを含んでなる、生物学的試料内のT - b e t の存在を検出するための方法。

【請求項28】 細胞を細胞内のT - b e t 活性が調節されるようにT - b e t 活性を調節する薬剤と接触させることを含んでなる、細胞内のT - b e t 活性を調節するための方法。

【請求項29】 T - b e t タンパク質の活性を調節する化合物を同定するための方法であって、

T - b e t タンパク質を含んでなる指標組成物を調製し、  
指標組成物を供試化合物と接触させ、そして

指標組成物内のT - b e tタンパク質の活性に対する供試化合物の作用を決定し、これによりT - b e tタンパク質の活性を調節する化合物を同定することを含んでなる方法。

【請求項30】 指標組成物がT - b e tタンパク質およびT - b e tタンパク質が結合するDNA分子を含んでなる細胞であり、そしてT - b e tタンパク質の活性に対する供試化合物の作用を、供試化合物の存在および不在におけるDNA分子に対するT - b e tタンパク質の結合を評価することにより決定する、請求項27記載の方法。

【請求項31】 指標組成物がT - b e tタンパク質およびT - b e tタンパク質に反応するレポーター遺伝子を含んでなり、そしてT - b e tタンパク質の活性に対する供試化合物の作用を、供試化合物の存在および不在におけるレポーター遺伝子の発現を評価することにより決定する、請求項27記載の方法。

【請求項32】 免疫反応に対する供試化合物の作用を決定し、これにより免疫反応を調節する化合物を同定することをさらに含んでなる、請求項27記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****政府の補助金**

ここに記載する本研究は、少なくともその一部分がアメリカ国立衛生研究所により供与された補助金A I / A G 3 7 8 3 3 , A I 3 9 6 4 6、A I 3 6 5 3 5、A R 6 - 2 2 2 7、T G A I 0 7 2 9 0により支援された。従って、米国政府は本発明において一定の権利を有する可能性がある。

**発明の背景**

免疫系の細胞は、細胞外および細胞内シグナルに反応して遺伝子発現のパターンを変化させる。種々の細胞タイプにおいて一連の生物学的活性に影響するサイトカインまたはリンホカインと名付けられたポリペプチドの群は、これらのシグナルの中で最も重要なものに属する。免疫系内の多数の細胞タイプがサイトカインを分泌するけれども、Tヘルパー(T h)リンパ球はこれらのポリペプチドの主要な供給源である。10年以上前に、T h細胞は、T細胞受容体連結(engagement)の際に2種の異なるサブセット、T h 1およびT h 2に分化し、これらの異なる機能能力および独自のサイトカインプロファイルにより両者に定義されることが発見された(Paul and Seder, 1994, Cell 76, 241-251; Mosmann and Coffman, 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173; Mosmann et al., 1986, J. Immunol. 136, 2348-2357; Snapper and Paul, 1987, Science 236, 944-947)。T h 1細胞は遅延タイプ過敏性反応およびマクロファージ活性化を媒介し、一方T h 2細胞はB細胞を支援しそしてアレルギー反応に重要である(Mosmann and Coffman, 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173; Paul and Seder, 1994, Cell 76, 241-251; Arthur and Mason, 1986, J. Exp. Med. 163, 774-786; Paliard et al., 1988, J. Immunol. 141, 849-855; Finkelman et al., 1988, J. Immunol. 141, 2335-2341)。T h 1細胞が細胞-媒介免疫を指令し、一方T h 2細胞が体液反応に関与するという証拠は、生物体が、病原に反応して細胞媒介または体液反応のいずれかを有する傾向があり、しかし両方ではないという観察に良く適合する。T hサブセット間のこれらの機能的な相違は、サイトカイン自体の活性により最も容易に説明できる。T h 1細胞はI L - 2、T N FおよびL Tも産

生するけれども、IFN- $\gamma$ がTh1細胞の「特徴(signature)」サイトカインである。Th2の相当する「特徴」サイトカインはIL-4である。Th2細胞は、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10およびIL-13も分泌する。

#### 【0002】

抗原に遭遇すると、ナイーブCD4-Tヘルパー前駆体(Thp)細胞は発生プログラムを開始し、最終的にはこれをTh1またはTh2系統に送る。極性化は抗原および同時刺激シグナル、すなわちThpが受ける「シグナル強さ」を操作して達成できるが(Constant and Bottomly, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15, 297-322)、エフェクターTh細胞の最も強力な誘導物質は、疑いなくサイトカイン自体である。IL-4はTh2分化を促進しそして同時にTh1発生を遮断し、これはStat6信号伝達経路により媒介される作用である。従って、IL-4またはStat6を欠失するマウスは、Th2細胞を発生しない(Kopf et al., 1993, Nature 362, 245-248; Kuhn et al. 1991, Science, 254, 707-710, Kaplan et al. 1996, Immunity 4, 313-319; Shimoda et al., 1996, Nature 380, 630-633; Takada et al., 1996, Nature 380, 627-630)。反対に、IL-12、IL-18およびIFN- $\gamma$ は、Th1細胞発生に重要なサイトカインである(Hsieh et al., 1993, Science 260, 547-549; Okamura et al., 1995, Nature 378, 88-91; Gu et al., 1997, Science 275, 206-209; Meraz et al., 1996, Cell 84, 431-442; Magram et al., 1996, Immunity 4, 471-481)。Stat1経路を介して作用するIFN- $\gamma$  (Meraz et al., 1996, Cell 84, 431-442)、およびStat4信号伝達経路を介して作用するIL-12 (Jacobson et al., 1995, J. Exp. Med. 181, 1755-1762) は、一緒になってTh1細胞の分化を促進しそしてTh2系統へのコミットメントを遮断する(Szabo et al., 1995, Immunity 2, 665-675; Szabo et al., 1997, J. Exp. Med. 185: 817-825)。IL-12またはStat4を欠失するマウスは、Th1細胞を持っていない(Magram et al., 1996, Immunity 4, 471-481; Takada et al., 1996, Nature 380, 627-630; Shimoda et al., 1996, Nature 380, 630-633)。別の重要なTh1誘導サイトカインはIL-18であり、その受容体はIL-1受容体ファミリーに関連する(Cerretti et al., 1992, Science 256, 97-100)。IL-18を欠失するマウスは

、生体内Th1反応を欠き(Takeda et al., 1998, Immunity 8, 383-390)そしてIL-12およびIL-18の両者はIFN- $\gamma$ 発現を調節する(Barbulescu et al., 1998, Eur. J. Immunol., 27, 1098-1107; Robinson et al., 1997, Immunity 7, 571-581; Ahn et al., 1997, J. Immunol. 159, 2125-2131)。従って、これらのサイトカイン自体はTh極性を駆動する正および負のフィードバック系を形成する(Powrie and Coffman, 1993, Immunol. Today 14, 270-274; Scott, 1991, J. Immunol. 147, 3149; Maggie et al., 1992, J. Immunol. 148, 2142; Paronchi et al., 1992, J. Immunol. 149, 2977; Fargeas et al., 1992, Eur. J. Immunol. 149, 2977; Menetti et al., 1993, J. Exp. Med. 177, 1199; Trinchieri, 1993, Immunol Today, 14, 335-338; Macatonia et al., 1993, Immunol. 5, 1119; Seder et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10188-10192; Wu et al., 1993, J. Immunol. 151, 1938; Hsieh et al., 1993, Science 260, 547-549)(総説は、Seder and Paul, 1994, In Annual Review of Immunology, Vol. 12, 635-673; Paul and Seder, 1994, Cell 76, 241-251; O'Garra, 1998, Immunity 8, 275-283)。

#### 【0003】

最近数年間に、Th2細胞へのTh中の転移を制御する転写因子の同定に著しい進歩がなされ、これはIL-4産生を駆動するこのような因子の能力により証明され、下記に概説されている(Glimcher and Singh, 1999 Cell 96, 13-23; Szabo et al., 1997, Current Opinions in Immunology 9, 776-781)。3種の異なるタンパク質、すなわちc-Mafプロト腫瘍遺伝子、転写因子である活性化T細胞の核因子(NFAT)、および新規の核抗原であるNFAT-相互作用タンパク質45kD(NIP45)の産生が、非-T細胞に内因性IL-4産生能力を与えることが証明された(Hodge et al., 1996, Science 274, 1903-1905; Ho et al., 1998, J. Exp. Med. 188:1859-1866)。これらの因子およびその他、例えばGATA-3(Zheng and Flavell, 1997, Cell 89, 587-596)およびStat6は、明らかにIL-4の産生、従ってTh2細胞の発生を、生体外および生体内の両方で駆動できる。

#### 【0004】

反対に、T h 1 分化の分子的基礎はほとんど知られていない。例えば、その不在がT h 1 細胞生成を不能とする既知のわずかな因子は、S t a t 4 (Thierfelder et al., 1996, Nature 382, 171-174; Kaplan et al., 1996, Nature 382, 174-177) およびI R F - 1 (Lohoff et al., 1997, Immunity: 681-689; Taki et al., 1997, Immunity 6: 673-679)であり、これらはいずれもT h 1 特異性ではない。S t a t 4 依存の様式でI L - 1 2 中に導入されるE t s ファミリーメンバーE R Mは、最近T h 1 特異性であると報告されたが、しかしこれはT h 1 サイトカインの産生に影響しない(Ouyang et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:3888)。S t a t 4 欠失マウス中のT h 1 細胞の不在は、T h 1 プログラムを駆動するI L - 1 2 の欠損の結果であり、一方、I R F - 1 欠失マウス中のT h 1 細胞の欠失は、I L - 1 2 遺伝子の転写制御における直接の作用によるものであるらしい(Lohoff et al., 1997, Immunity 6, 681-689; Taki et al., 1997, Immunity 6: 673-679)。しかし、このような推定T h 1 - 特異性調節因子上流にある信号伝達経路の一部は、解明され始めている。p 3 8 キナーゼは、このような信号伝達分子の一つであり、これはI F N - 産生をブーストする構成的活性化M A P キナーゼ・キナーゼ6 (M K K - 6) の能力により証明される。反対に、優性陰性(dominant negative) p 3 8 M A P キナーゼの過剰発現またはJ n k 2 またはJ n k 1 の標的破壊は、T h 1 反応を低下する(Rincon et al., 1998, EMBO J. 17, 2817-2829; Yang et al., 1998, Immunity 9, 575-585; Dong et al., 1998, Science 282, 2092-2095)。J N K 信号伝達経路は、I N F - 遺伝子の転写への直接作用によりT h 発生に影響するであろうが、しかしこれは証明されていない。例えば、A T F - 2 およびA P - 1 転写因子は、両者共にJ N K キナーゼの基質でありそしてこれらの因子ならびにN F B およびS t a t 4 タンパク質はI F N - プロモーター内の部位に結合することが知られている(Zhang et al., 1998, Immunol. 161, 6105-6112; Ye et al., 1996, Mol. Cell Biol. 16:4744; Barbulescu et al., 1997, Eur.J.Immunol. 27, 1098-1107; Sica et al., 1997, J.Biol.Chem. 272, 30412-30420)。しかし、I F N - の産生は、A T F - 2 を欠失するマウスでは正常である。サイトカインはT h 1 およびT h 2 細胞の発生に重要であり、そして、これにより、免疫反応が主として細

胞または体液的であるかの決定において重要なので、Th1および/またはTh2サイトカインの産生を調節するための組成物および方法は、免疫反応の調節において、甚大な利益であろう。

#### 【0005】

##### 【発明の概要】

本発明は、少なくともその一部分は、ナイーブTヘルパー前駆細胞(Thp)内でTh1表現型を促進するように、Th1細胞産生プログラムの開始およびTh2細胞内の対立プログラムの抑制の両方によって作用する新規の組成物の発見に基づく。具体的には、本発明は、T-betをコードする単離された核酸分子および単離されたT-betタンパク質を提供する。T-bet(Tbox expressed in T cell)は、創始メンバーがbrachyury遺伝子である転写因子のT-boxファミリーの新しいメンバーである。T-betは、胸腺細胞およびTh1細胞内で選択的に構成性発現される。T-betは、インターフェロン- $\gamma$ 遺伝子をトランス活性化し、レトロウイルス的に形質導入された一次T細胞内でインターフェロン- $\gamma$ 産生を誘導しそして極性化したTh2細胞をTH1経路内に転向することができる、最初のTh1特異性転写因子である。本発明は、これらの新規のT-bet組成物の使用方法も提供する。

#### 【0006】

本発明の一つの態様は、T-betをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。好ましい態様では、核酸分子は、配列番号1または3のヌクレオチド配列を含んでなる。他の態様では、核酸分子は、配列番号1の少なくとも約700の連続したヌクレオチドまたは配列番号3の少なくとも500の連続したヌクレオチドを含んでなる。好ましい態様では、核酸分子は、配列番号1の少なくとも約700の連続したヌクレオチドと少なくとも70%のヌクレオチド一致または配列番号3の少なくとも500の連続したヌクレオチドと少なくとも70%のヌクレオチド一致を有する。

#### 【0007】

T-betをコードする本発明の単離された核酸分子は、ベクター、例えば発

現ベクター内に組み込むことができ、そしてこのベクターは宿主細胞内に導入できる。本発明は、適当な培地内で本発明の宿主細胞（T - b e t 発現ベクターを有する）をT - b e t タンパク質が産生されるまで培養することによるT - b e t タンパク質を産生する方法も提供する。この方法は、さらに培地または宿主細胞からT - b e t タンパク質の単離を含むことができる。

【0008】

本発明の別の態様は、単離されたT - b e t タンパク質に関する。好ましくは、T - b e t タンパク質は配列番号2または4のアミノ酸配列を含んでなる。他の態様では、タンパク質は少なくとも60%のアミノ酸一致、少なくとも70%のアミノ酸一致、さらに好ましくは少なくとも80%のアミノ酸一致、その上さらに好ましくは少なくとも90%のアミノ酸一致を配列番号1または3記載のアミノ酸配列と有する。

【0009】

T - b e t 以外のポリペプチドと操作可能に連結したT - b e t タンパク質を含んでなる融合タンパク質も本発明に包含され、さらにT - b e t タンパク質を特異的に結合する抗体も包含される。例えば、抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることができる。一つの態様では、抗体は検出可能な物質にカプリングしている。

【0010】

本発明の別の態様は、T - b e t タンパク質をコードする導入遺伝子を有する細胞を含む非 - ヒトトランスジェニック動物に関する。

【0011】

本発明のさらに別の態様は、生物学的試料内のT - b e t の存在を検出するための方法に関する。この方法は、T - b e t の存在が生物学的試料中で検出されるT - b e t 活性の指標を検出する能力がある薬剤と生物学的試料とを接触させることを含む。本発明は、細胞内のT - b e t 活性が調節されるようにT - b e t 活性を調節する薬剤と生物学的試料とを接触させることを含んでなる細胞内のT - b e t 活性を調節するための方法も提供する。

【0012】

本発明のさらに別の態様は、T - b e t タンパク質の活性を調節する化合物を同定するための方法にも関する。このような方法は、一般に

T - b e t タンパク質を含んでなる指標組成物を調製し、  
指標組成物を供試化合物と接触させ、そして

指標組成物内のT - b e t タンパク質の活性に対する供試化合物の作用を決定し、これによりT - b e t タンパク質の活性を調節する化合物を同定することを含む。好ましい態様では、指標組成物は、T - b e t タンパク質が結合しそしてT - b e t タンパク質の活性に対する供試化合物の作用が供試化合物の存在または不在におけるDNA分子へのT - b e t タンパク質の結合を評価して決定されるT - b e t タンパク質およびDNA分子を含んでなる。さらに他の態様では、指標組成物がT - b e t タンパク質およびT - b e t タンパク質に反応するレポーター遺伝子を含んでなる細胞であり、そしてT - b e t タンパク質の活性に対する供試化合物の作用を、供試化合物の存在および不在におけるレポーター遺伝子の発現を評価することにより決定する。さらに別の態様では、本方法は、免疫反応に対する供試化合物の作用を決定し、これにより免疫反応を調節する化合物を同定する段階をさらに含む。

#### 【0013】

##### 【発明の詳細な記述】

本発明は、T - b e t 組成物、例えばT - b e t をコードする単離された核酸分子および単離されたT - b e t タンパク質、ならびにこれらの使用方法に関する。

#### 【0014】

本発明をさらに容易に理解できるように、一部の用語を最初に定義する。

#### 【0015】

本明細書中に使用される場合に、用語「T - b e t 分子」は、配列番号1および3に記載の核酸分子と構造的特徴を共有するT - b e t 核酸分子および配列番号2および4に記載のT - b e t タンパク質の特徴的な構造および機能的特徴を共有するT - b e t タンパク質を含む。T - b e t タンパク質は、タンパク質のT - b o xファミリーのメンバーでありそしてB r a n c h y u r y、T b x 1

- 6 . T - b r a i n - 1 ( T b r - 1 ) といくつかのアミノ酸配列相同を共有する。T - b o x タンパク質は、T - b o x 結合部位においてDNAに結合するT - b o x ドメインを含んでなる。さらにT - b e t タンパク質の構造および機能的特徴は以下に記載する。

【0016】

本明細書中に使用される場合に、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えばcDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えばmRNA）を含むと考える。核酸分子は、一本鎖状または二本鎖状でもよいが、しかし好ましくは二本鎖状DNAである。

【0017】

本明細書中に使用される場合に、「単離された核酸分子」は、核酸が誘導された生物体のゲノムDNA内の核酸に本来的に近接する遺伝子配列（すなわち、核酸が誘導された生物体のゲノムDNA内の単離された核分子に対する遺伝子に近接して位置する遺伝子配列）を含まない核酸分子を呼ぶ。例えば、種々の態様において、単離されたT - b e t 核酸分子は、代表的には、核酸が誘導された細胞のゲノムDNA内の核酸分子に本来的に近接するヌクレオチド配列の約10kb以下を含み、そしてさらに好ましくは、本来的に近接するヌクレオチド配列の約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kbまたは0.1kb以下を含む。しかし、「単離された」T - b e t 核酸分子は、ゲノムDNA内のT - b e t 配列に正常では近接しない他のヌクレオチド配列に連結してもよい（例えば、T - b e t ヌクレオチド配列はベクター配列に連結してもよい）。ある好ましい態様では、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子は、他の細胞物質を含まなくてもよい。しかし、T - b e t 核酸分子が「単離された」と考えられるために他の細胞物質を含まないという必要はない（例えば、他の哺乳類から分離されそして細菌細胞内に挿入されたT - b e t DNA分子は、まだ「単離された」と考えられる）。

【0018】

本明細書中に使用される場合に、用語「高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」は、たがいに本質的な相同性（例えば代表的には70%相同以

上)を有するヌクレオチド配列がたがいに安定してハイブリダイズされたままであるようなハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を記述することを意図する。高いストリンジェンシー条件の好ましいが制限的ではない例は、6 X 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウムを含むハイブリダイゼーション緩衝液 (SSC) 中、温度約 45 で数時間から一晩ハイブリダイゼーションし、次いで 0.2 X SSC、0.1% SDS を含む洗浄緩衝液中、温度約 50 ~ 65 での 1 回またはそれ以上の洗浄である。

#### 【0019】

用語「パーセント (%) 一致」は、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の範囲内で使用された場合 (例えば、一つのアミノ酸配列が他のアミノ酸配列に X% 一致である場合) に、最適に配列される場合に 2 個の配列の間で共有する一致した残基の百分率を呼ぶ。2 個のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の一致百分率を決定するために、配列を最適比較の目的で整列する (例えば一つの配列を他の配列と最適に整列するために間隙を挿入してもよい)。次いで、相当する位置にある残基を比較しそして一方の配列内の位置が他の配列の相当する位置に相当して同じ残基で占められている場合に、分子はその位置で一致する。従って、2 個の配列の間の一一致百分率は、2 個の配列が共有する一致した位置の数の関数である (すなわち、%一致 = (一致した位置の数 / 位置の全数) × 100)。

#### 【0020】

当該技術分野で公知のコンピューターアルゴリズムは、2 個のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を最適に整列しそして比較して、2 個の配列間の一一致百分率を決定するために使用できる。2 個の配列の比較のために使用される数学アルゴリズムの好ましいが制限的ではない例は、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268、変更は Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 の NBLAST および XBLAST プログラム中に組み込まれている。比較のためにギャップ入りの整列を得るためには、ギャップ入り BLAST が Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Research 25(17): 3389-3402 に記載されている。BLAST および

ギャップ入りBLASTプログラムを使用する場合に、それぞれのプログラム（例えばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターが使用できる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 参照。例えば、本発明のヌクレオチド配列は、ギャップペナルティーをexistence 5 およびextension 2 に設定したデフォルトBlastin マトリックス1 - 3を使用してBLAST処理した。本発明のアミノ酸配列は、下記のデフォルト設定を用いてBLAST処理した：ギャップペナルティーをexistence 11およびextension 1 に設定したBlosum62マトリックス。

#### 【0021】

配列の比較のために使用した数学アルゴリズムの別の好ましい非限定的例は、Myers and Miller, CABIOS(1989)のアルゴリズムである。このアルゴリズムは、GCG配列整列ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）内に組み込まれている。アミノ酸配列比較のためにALIGNプログラムを用いる場合には、PAM12 weight residue table、gap length penalty 12 およびgap penalty 4 が使用できる。配列比較のために複数のプログラムを使用する場合には、最適の整列（例えば2個の配列間の最高の一致パーセント）を与えるプログラムが比較の目的で使用される。

#### 【0022】

本明細書中に使用される場合に、「天然に存在する」核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド配列を有するRNAまたはDNA分子を呼ぶ（例えば天然タンパク質をコードする）。

#### 【0023】

本明細書中に使用される場合に、「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的、例えば二本鎖cDNA分子のコーディング鎖に相補的、mRNA配列に相補的または遺伝子のコーディング鎖に相補的なヌクレオチド配列を含んでなる。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合できる。

#### 【0024】

本明細書中に使用される場合に、用語「コード領域」は、アミノ酸に翻訳され

るコドンを含んでなるヌクレオチド配列の領域を呼び、一方用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域を呼ぶ（例えば5'および3'非翻訳領域）。

#### 【0025】

本明細書中に使用される場合に、用語「ベクター」は、これが連結している他の核酸を輸送できる核酸分子を呼ぶ。ベクターの一つのタイプは、「プラスミド」であり、これはその中に別のDNAセグメントが連結してもよい環状二本鎖DNAループを呼ぶ。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、ここでは別のDNAセグメントはウイルスゲノム内に連結されてもよい。ある種のベクターは、これが導入された宿主細胞内で自律複製ができる（例えば複製の細菌起点を有する細菌ベクターおよびエピソーマル哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば非-エピソーマル哺乳類ベクター）は、宿主細胞内への導入の際に宿主細胞のゲノム内に組み込まれ、そしてこれにより宿主ゲノムと同時に複製される。さらに、一部のベクターは、これらが操作可能に連結している遺伝子の発現を指令できる。このようなベクターは、本明細書中では「組換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形である。本明細書中で、「プラスミド」および「ベクター」は交換可能に使用されるが、それはプラスミドがベクターの最も普通に使用される形であるからである。しかし、本発明は、同等の機能に役立つ発現ベクター、例えばウイルスベクター（例えば複製欠失レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス）のような他の形も含むと考える。

#### 【0026】

本明細書中に使用される場合に、用語「宿主細胞」は、本発明の核酸、例えば本発明の組換え発現ベクターが導入された細胞を呼ぶと考える。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中では交換可能に使用される。このような用語は、特定の細胞タイプを呼ぶだけでなく、このような細胞の後代または可能な後代も呼ぶと考える。ある種の変化は、突然変異または環境の影響により後続世代に起きるのであるから、このような後代は実際には親細胞と同等ではないが、しかし本明細書中に使用される用語の範囲内に含まれる。

## 【0027】

本明細書中に使用される場合に、「トランスジェニック動物」は、動物の1個またはそれ以上の細胞が「導入遺伝子」を含む非-ヒト動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはマウスを呼ぶ。用語「導入遺伝子」は、これからトランスジェニック動物が発生しそして成熟動物のゲノム内に残る細胞のゲノム内に組み込まれる外因性DNAを呼び、例えばトランスジェニック動物の1個またはそれ以上の細胞タイプまたは組織内にコードされた遺伝子産物の発現を指令する。

## 【0028】

本明細書中に使用される場合に、「相同組換え動物」は、動物の発生前に先立って、外因性遺伝子が、その中で外因性遺伝子と動物の細胞、例えば動物の胚細胞内に導入された外因性DNA分子との間の相同性組換えにより改変されているトランスジェニック非ヒト動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはマウスのタイプを呼ぶ。

## 【0029】

本明細書中に使用される場合に、「単離されたタンパク質」は、細胞から単離されるかまたは組換えDNA技術により産生された場合に他のタンパク質、細胞物質および培地、または化学的に合成された場合に化学的前駆体または他の化学物質を本質的に含まないタンパク質を呼ぶ。

## 【0030】

本明細書中に使用される場合に、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原に特異的に結合（免疫反応）する抗原結合部位を含む分子を含むと考え、例えばFabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片である。本明細書中に使用される場合に、用語「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」は、抗原の特定のエピトープと免疫反応できる抗原結合部位の一種のみを含む抗体分子の集団を呼び、一方「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」は、特定の抗原と相互作用可能な抗原結合部位の複数の種類を含む抗体分子の集団を呼ぶ。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的には、これが免疫反応する特定の抗原に対する単一結合親和性を示す。

## 【0031】

特定のタンパク質のアミノ酸配列と、タンパク質をコードできるヌクレオチド配列との間には既知で一定の相関があり、これは遺伝暗号により定義される（以下に記載する）。同様に、特定の核酸分子のヌクレオチド配列と、核酸分子によりコードされるアミノ酸配列との間にも遺伝暗号により規定される既知で一定の相関がある。

遺伝暗号

アラニン (Ala, A)	CGA, GCC, GCG, GCT
アルギニン (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
アスパラギン (Asn, N)	AAC, AAT
アスパラギン酸 (Asp, D)	GAC, GAT
システイン (Cys, C)	TGC, TGT
グルタミン酸 (Glu, E)	GAA, GAG
グルタミン (Gln, Q)	CAA, CAG
グリシン (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
ヒスチジン (His, H)	CAC, CAT
イソロイシン (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
ロイシン (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
リシン (Lys, K)	AAA, AAG
メチオニン (Met, M)	ATG
フェニルアラニン (Phe, F)	TTC, TTT
プロリン (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
セリン (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
トレオニン (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
トリプトファン (Trp, W)	TGG
チロシン (Tyr, Y)	TAC, TAT

バリン (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
終止シグナル (末端)	TAA, TAG, TGA

遺伝暗号の重要で周知の特徴は、その重複性であり、これによりタンパク質を構成する大部分のアミノ酸に対して、1個を越えるコーディングヌクレオチドトリプレットを使用してもよい(以上に記載)。従って、多数の異なるヌクレオチド配列が一つの与えられたアミノ酸配列に対してコードできる。このようなヌクレオチド配列は、機能的に等価と考えられ、それはこれらがすべての生物体内で同じアミノ酸配列の産生をもたらすからである(しかし、一部の生物体は、ある種の配列が他のものに対するより一層迅速に翻訳できる)。さらに、場合により、プリンまたはピリミジンのメチル化変種が、与えられたヌクレオチド配列内に見いだされてもよい。このようなメチル化は、トリヌクレオチドコドンと相当するアミノ酸との間のコーディング関係に影響しない。

#### 【0032】

以上を考慮して、本発明のT-betタンパク質(またはそのいかなる部分でも)に対してコードするDNAまたはRNA分子のヌクレオチド配列は、DNAまたはRNA分子をアミノ酸配列に翻訳する遺伝暗号を用いてT-betアミノ酸配列を誘導するために使用できる。同様に、あらゆるT-betアミノ酸配列に対して、T-betタンパク質をコードできる相当するヌクレオチド配列が遺伝暗号から誘導できる(しかしその重複性により、これは与えられたアミノ酸配列に対して複数の核酸配列を生成する)。従って、T-betヌクレオチド配列に関する本明細書中での記述および/または開示は、ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列の記述および/または開示とも考えられるべきである。同様に、本明細書中のT-betアミノ酸配列の記述および/または開示は、アミノ酸配列をコードできるすべての可能なヌクレオチド配列の記述および/または開示とも考えるべきである。

#### 【0033】

BrachyuryまたはTは、T-boxと呼ばれる200アミノ酸DNA結合ドメインを共有する転写因子のファミリーの創始メンバーである(総説は、(Smith, 1997; Papaioannou, 1997; Meisler, 1997中)。Brachyury(

「短尾」のギリシャ語)突然変異は、短くて少しねじれた尾を持った異型接合変異動物内で、1927年に最初に記載された(Herrmann et al., 1990)。Brachyury T-boxタンパク質のアミノ-末端の半分(アミノ酸1~229)は、配列特異性DNA結合活性を示すことが知られているT-boxとして知られる保存ドメインを含む(Kispert, A. & Herrmann, B.G. 1993, EMBO J. 12:3211; Papapetrou, C., et al. 1997, FEBS Lett. 409:201; Kispert, A., et al., 1995, EMBO J. 14:4763)。C-末端の半分は、トランス活性化および抑制ドメインの2対を含む。オルソログ種内のT-box領域の間の配列の類似性は、99%と高くそして非オルソログ遺伝子間では40~70%である。T-box領域は最近DNAと同時結晶化され、そしてタンパク質がDNAと大溝(major groove)および小溝(minor groove)内の両方で接触する新規の配列特異性DNA認識構造を証明する(Mueller, C.W. & Herrmann, B.G., 1997, Nature 389, 884)。

#### 【0034】

酵母ワンハイブリッド(yeast one hybrid)法を、Th-1特異性転写因子を同定するために使用した。酵母細胞は、IL-2プロモーター-レポーター遺伝子構築物を発現するように作製されそして抗-CD3活性化Th1細胞クローンから作製されたcDNAライブラリーを用いて形質転換された。IL-2プロモーターの検査は、NF- $\kappa$ B部位の5'-240-220丁度の優れたT-box結合部位を明らかにした。後記の実施例に記載するように、TbetはIL-2プロモーターを結合する能力に基づいて酵母ワンハイブリッドスクリーニングアッセイで単離された。

#### 【0035】

ネズミ(murine)Tbetをコードするヌクレオチド配列を配列番号3に示す。ネズミTbetは530アミノ酸タンパク質であり、その190アミノ酸のT-boxドメインは残基136-326に位置する。ネズミTbetのアミノ酸配列を配列番号4に示す。ネズミTbet配列を本明細書中の記載のようにクローンした後、いままでどの既知のタンパク質をコードするか知られていなかった核酸断片からTbetのヒトオルソログの配列を編集できた。ヒトT-

b e t のヌクレオチド配列を配列番号 1 に示す。ヒト T - b e t は、535 アミノ酸タンパク質で、その 190 アミノ酸 T - b o x ドメインは残基 138 - 327 に位置する。ヒト T - b e t 遺伝子は、染色体 17 に位置決定されている。タンパク質の T - b e t ファミリーの 2 メンバー ( ヒトおよびマウス ) のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図 1 および配列番号 1 ~ 4 に示す。

#### 【 0 0 3 6 】

本発明の T - b e t タンパク質は、T - b o x タンパク質と相同性を有する。B r a c h y u r y を含まないマウス中に 8 種の T - b o x 遺伝子が存在する。これらは、T b x 1 ~ 6、T - b r a i n - 1 ( T b r - 1 ) およびいまや T - b e t を含み、それぞれ明確で通常は複雑な発現パターンを有する。例えば、T - b r a i n - 1 発現は、大部分が脳皮質内の明確なドメインに限定される ( B u l f o n e , A . e t a l . , 1995, Neuron 15, 63 ) 。 T - b e t は T b r - 1 の配列に最も類似している。T - b o x の外で、本発明の T - b e t タンパク質は他の T - b o x タンパク質と一致性を有していない。

#### 【 0 0 3 7 】

T - b e t は、T 細胞内のみで発現される T - b o x タンパク質であり、そして T b r - 1 に配列が最も類似している。他の種も B r a c h y u r y 様の遺伝子を発現する。このような脊椎動物種は、ゼノプス ( X e n o p u s ) 、ミノカサゴ ( Z e b r a f i s h ) 、ヒヨコおよびヒトであり ( R a o , 1994; H o r b a n d T h o m s e n , 1997; C o n l o n e t a l . , 1996; R y a n e t a l . , 1996; S c h u l t e - M e r k e r e t a l . , 1994; E d w a r d s e t a l . , 1996; M o r r i s o n e t a l . , 1996; L a w e t a l . , 1995; C a m b e l l e t a l . , 1998 ) ならびにさらに遠位の種、例えばナメクジウオ ( a m p h i o x u s ) 、ホヤ ( a s c i d i a n s ) 、キョク皮動物 ( e c h i n o d e r m ) 、C . エレガンス ( C a e n o r h a b d i t i s e l e g a n s ) 、ショウジョウバエ ( d r o s o p h i l a ) などの昆虫である ( H o l l a n d e t a l . , 1995 ) 。これらの遺伝子は配列でも発現パターンでも保存されている。

#### 【 0 0 3 8 】

T - b e t はチロシンリン酸化で唯一の T - b o x タンパク質として特異である。2 個の共通チロシンリン酸化部位がヒト T - b e t のアミノ酸 328 - 336 および 526 - 534 およびネズミ T - b e t の 327 - 335 および 521

- 529に存在する。核局在化配列は、ヒトT - b e tのアミノ酸498 - 501およびネズミT - b e tの493 - 496にも存在する。地図作製実験は、2個のトランス活性化部位、すなわちT - b o xドメインの一方は5'、他方は3'に位置決定した。ここに記載したデータは、T - b e tが共通T - b o x部位に(生体外標的部位選択により、5' - G G G A A T T T C A C A C C T A G G T G T G A A A T T C C C - 3'と決定)およびIL - 2プロモーター内のT - b o x部位に結合することを証明する。T - b e tは胸腺内および末梢リンパ系内のみ発現する。末梢系においてT - b e tはTh1細胞内のみ発現され、ここでこれはTcR刺激およびIL - 12の両方に反応して誘導される。胸腺内においてT - b e tのレベルは、DNおよびrag2 - / - 胸腺細胞内で最高である。

#### 【0039】

これらのデータは、新規のT - b o xファミリーメンバーであるT - b e tの組織特異性IFN - 発現の原因となる選択的発現を証明する。T - b e tは、Th1内でのみ発現されTh2細胞内では発現されず、そしてT細胞受容体を介するシグナルの伝達に応じて前者内で誘導される。T - b e tの発現は、Th1細胞、NK細胞およびB細胞中のIFN - 発現と相関し、そしてT - b e tはIFN - 遺伝子の有力なトランス活性化剤である。最ももっともらしいのは、T - b e tを用いるThp、Th1および極性化Th2およびTc2細胞のレトロウイルス媒介形質導入が、IFN - 発現の印象的な誘導をもたらすことである。これは、IL - 2およびIL - 4産生の両方の抑制により達成される。従って、T - b e tの機能は、IFN - 遺伝子転写の単なる制御を越えて延びる。T - b e tは極性化エフェクターTh2細胞および極性化Tc2細胞をそれぞれ対立する1およびTc1サブセットへ変換する。総合して考えると、これらのデータは、T - b e tがナイーブThp細胞からのTh1系統発生を開始する発生プログラムに関与し、そしてTh1発生プログラムの開始によりそしてTh2細胞内の対立プログラムを抑制することの両方により作用することを証明する。

#### 【0040】

本発明の種々の態様をさらに詳細に以下の章に記述する。

## 1. 単離された核酸分子

本発明の一つの態様は、T - b e t をコードする核酸分子の単離に関する。好ましい態様では、本発明の核酸分子は、配列番号1または配列番号3に記載のヌクレオチド配列を含んでなる。別の態様では、本発明の核酸分子は、配列番号1の連続したヌクレオチドを少なくとも約700個または配列番号3の連続したヌクレオチドを少なくとも約500個を含んでなる。好ましい態様では、本発明の核酸分子は、配列番号1の連続したヌクレオチド少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200、少なくとも約1400または少なくとも約1600個を含んでなる。別の好ましい態様では、本発明の核酸分子は、配列番号3の連続したヌクレオチド少なくとも約600、少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200または少なくとも約1400個を含んでなる。

### 【0041】

他の態様では、核酸分子は、配列番号1の連続したヌクレオチド少なくとも700、少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200、少なくとも約1400または少なくとも約1600個を含んでなる核酸分子と、少なくとも70%一致、さらに好ましくは80%一致、そしてその上さらに好ましくは90%ヌクレオチド一致を有する。別の態様では、核酸分子は、配列番号3の連続したヌクレオチド少なくとも約600、少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200または少なくとも約1400個を含んでなる核酸分子と、少なくとも70%一致、さらに好ましくは80%一致、そしてその上さらに好ましくは90%ヌクレオチド一致を有する。

### 【0042】

遺伝暗号の縮重により配列番号1または3とは異り、従って配列番号1または3によりコードされると同じT - b e t タンパク質をコードする核酸分子は、本発明に包含される。従って、別の態様では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

### 【0043】

さらに、T - b e t タンパク質をコードする核酸分子は、標準の分子生物学技術および本明細書中に提供する配列情報を用いて、他の起原から単離できる。例えばT - b e t DNAは、ハイブリダイゼーションプローブとして配列番号1または3の全体または一部分、および標準ハイブリダイゼーション技術（例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989）を用いてヒトゲノムDNAライブラリーから単離できる。さらに、T - b e t 遺伝子の全体または一部分を包含する核酸分子は、配列番号1または3の配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応により単離できる。例えばmRNAは細胞から単離でき（例えばChirgwin et al (1979) Biochemistry 18: 5294-5299のグアニジウム- チオシアナート抽出法により）、そしてcDNAは、逆転写酵素（例えば、Gibco/BRL, Bethesda, MDから入手できるMoloney MLV 逆転写酵素；またはSeikagaku America Inc., St. Petersburg, FLから入手できるAMV 逆転写酵素）を用いて調製できる。PCR増幅のための合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1または3記載のヌクレオチド配列に基づいて設計できる。本発明の核酸は、cDNAまたはゲノムDNAを鋳型としておよび適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用い、標準PCR増幅技術に従って増幅できる。このようにして増幅した核酸は、適当なベクター内にクローンできそしてDNA配列決定分析により特性試験ができる。さらに、T - b e tヌクレオチド配列に相当するオリゴヌクレオチドは、標準の合成技術、例えば自動化DNA合成装置により調製できる。

#### 【0044】

配列番号1および3記載のT - b e tヌクレオチド配列に加えて、T - b e tのヌクレオチドまたはアミノ酸配列に小さい変化をもたらすDNA配列多型が集団内に存在してもよいことは当該技術分野の熟練者により認められる。このようなT - b e t 遺伝子内の遺伝多型は、自然の対立遺伝子変動により集団内の個体間に存在してもよい。このような自然の対立遺伝子変動は遺伝子のヌクレオチド配列内に代表的には1～2%の変動をもたらす。このようなヌクレオチド変動の結果でありそしてT - b e tの機能的活性を変更しないT - b e t内のこのよう

なヌクレオチド変動およびその結果であるアミノ酸多型のいずれもまたすべてが、本発明の範囲内に入ると考える。

#### 【0045】

本発明の T - b e t DNA の天然対立遺伝子変種に相当する核酸分子は、ヒト DNA、またはその一部分を、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下の標準ハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとして、本明細書中に開示する T - b e t 核酸分子へのこれらの相同性に基づいて単離できる。従って、別の態様では、本発明の単離された核酸分子は、高ストリンジェンシー条件下で、配列番号 1 または 3 のヌクレオチド配列を含んでなる第二の核酸分子にハイブリダイズする。好ましくは、高ストリンジェンシー条件下で、配列番号 1 または 3 の配列にハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子である。一つの態様では、このような核酸分子は、長さが少なくとも約 700、800、900、1000、1200、1300、1400、1500 または 1600 ヌクレオチドである。他の態様では、このような核酸分子は、配列番号 1 の連続したヌクレオチド少なくとも約 700、800、900、1000、1200、1300、1400、1500 または 1600 個、または配列番号 3 の連続したヌクレオチド少なくとも約 500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、または 1500 個を含んでなる。好ましくは、単離された核酸分子は、T - b e t 核酸分子の天然に存在する対立遺伝子変種に相当する。

#### 【0046】

集団内に存在してもよい T - b e t 配列の天然に存在する対立遺伝子変種に加えて、熟練者は、配列番号 1 または 3 のヌクレオチド配列内へ突然変異により小さい変化が導入され、これにより T - b e t タンパク質の機能的活性を変化することなくコードするタンパク質のアミノ酸配列内に変化をもたらしてもよいことをさらに認めるであろう。例えば、「非 - 必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換に導くヌクレオチド置換は、配列番号 1 または 3 内で起きてもよい。「非 - 必須」アミノ酸残基は、T - b e t の機能的活性、例えば DNA と相互作用するその能力または I F N - プロモーターからの転写を促進するその能力を変化す

ることなく、T - b e tの野生型配列（例えば配列番号1または3の配列）から変化され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸は残基は、機能的活性のために必要である。

#### 【0047】

従って、本発明の他の態様は、T - b e t活性に必須でないアミノ酸残基内に変化を含むT - b e tタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなT - b e tタンパク質は、配列番号2または4からのアミノ酸配列とは異なるがしかしT - b e t活性は保持する。T - b e tタンパク質の非 - 天然変種をコードする単離された核酸分子は、配列番号1または3のヌクレオチド配列内への1個またはそれ以上のヌクレオチド置換の導入、付加または除去により創成され、例えば1個またはそれ以上のアミノ酸置換、付加または除去はコードされたタンパク質内への導入される。突然変異は、標準技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCR - 媒介変異誘発により配列番号1または3内に導入できる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1個またはそれ以上の非 - 必須アミノ酸残基に行われる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似した側鎖を有するアミノ酸残基により置換されることである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野では規定されており、これには塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\beta$  - 分枝側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。従って、T - b e t内の非 - 必須アミノ酸残基は、好ましくは同じ側鎖ファミリー内の他のアミノ酸残基により置換される。

#### 【0048】

あるいは、別の態様では、突然変異は、T - b e tコード領域の全体または一部分に沿ってランダムに、例えば飽和変異誘発により導入でき、そしてもたらされた変異体は、機能的活性を保持している変異体を同定するために、DNAおよ

び/または活性転写体へ結合するその能力に関してスクリーニングできる。変異誘発に続き、コードされたT - b e t 変異タンパク質は宿主細胞内に組換え的に発現でき、そして変異タンパク質の機能的活性は、T - b e t 活性をアッセイするための当該技術分野で利用できるアッセイを用いて決定できる(例えばDNA中に存在するT - b o x 結合要素へ結合するタンパク質の能力の測定により、またはT細胞内のT h 1またはT h 2表現型を調節するタンパク質の能力を測定することによる)。

#### 【0049】

本発明の別の態様は、T - b e t mRNAまたは遺伝子のコーディング鎖に対してアンチセンスである単離された核酸分子に関する。本発明のアンチセンス核酸は、全T - b e t コーディング鎖に対して、またはその一部分に対してのみ相補的であることができる。一つの態様では、アンチセンス核酸分子は、タンパク質のT - b e t ファミリーに独特であるかまたは特定の種からのT - b e t 配列に独特である、T - b e t をコードする核酸配列のコーディング鎖のコード領域に対してアンチセンスである。別の態様では、アンチセンス核酸分子は、タンパク質のT - b e t ファミリーに独特であるかまたは特定の種からのT - b e t 配列に独特である、T - b e t をコードするヌクレオチド配列のコーディング鎖の非コード領域に対してアンチセンスである。好ましい態様では、本発明のアンチセンス分子は、配列番号1の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドを少なくとも約700個、さらに好ましくは、配列番号1の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドの少なくとも800、1000、1200、1400、または1600個、または配列番号3の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドを少なくとも約500個、さらに好ましくは、配列番号3の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドを少なくとも600、800、1000、1200、または1400個を含んでなる。

#### 【0050】

本明細書中で開示するT - b e t をコードするコーディング鎖配列(例えば配列番号1および3)を与えると、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickの塩基対規則に従って設計できる。アンチセンス核酸分子は、T - b e t

mRNAの全コード領域に相補的であってもよく、あるいはT - b e t mRNAのコードまたは非コード領域の一部のみにアンチセンスであるオリゴヌクレオチドであることもできる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T - b e t mRNAの翻訳開始部位の周囲の領域に相補的であってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば長さ約15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチドであることができる。本発明のアンチセンス核酸は、当該技術分野では公知の方法を用いて化学合成および酵素連結反応を用いて構築できる。例えば、アンチセンス核酸(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然に存在するヌクレオチドを用いて化学的に合成でき、または分子の生物学的安定性を増加するためまたはアンチセンスとセンス核酸の間に形成される二本鎖の物理的安定性を増加するために設計された種々の変性ヌクレオチド、例えばホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用できる。あるいは、アンチセンス核酸は、その中に核酸がアンチセンス方向にサブクローンされている発現ベクターを用いて生物学的に産生できる(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、関係する標的核酸にアンチセンス方向であり、これは以下にさらに記述する)。

#### 【0051】

他の態様では、本発明のアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、一本鎖核酸、例えばこれらが相補領域を有するmRNAを開裂できるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。T - b e t - コード化核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示するT - b e t 遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計できる。例えば、テトラヒメナ(Tetrahymena) L - 19 IVS RNAの誘導体は、活性部位の塩基配列がT - b e t をコードするmRNA内の開裂される塩基配列に相補的であるものの中で構築できる。例えば、Cech et al., 米国特許(US)第4,987,071号およびCech et al., 米国特許(US)第5,116,742号参照。あるいは、T - b e t mRNAは、RNA分子のプールからの特異性リボヌクレアーゼ活性を有する触媒生RNAを選択するために使用できる。例えば、Bartel, D. and Szostak, J. W., (1993) Science 261:1411-1418参照。

## 【0052】

本発明のさらに別の態様は、T - b e t 融合タンパク質をコードする単離された核酸分子に関する。非 - T - b e t タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする第二ヌクレオチド配列に操作可能に連結する T - b e t タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする少なくとも1個の第一ヌクレオチド配列を含んでなるこのような核酸分子は、標準の組換えDNA技術により調製できる。T - b e t 融合タンパク質は、以下のサブセクションIII中にさらに記述される。

III. 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の別の態様は、T - b e t (またはその一部分) をコードする核酸を含むベクター、好ましくは組換え発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内の核酸の発現に適する形にある本発明の核酸を含んでなり、これは、組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択され、発現される核酸配列に操作可能に連結する1個またはそれ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「操作可能に連結」とは、関係するヌクレオチド配列が、調節配列に対してヌクレオチド配列の発現を許容する様式で連結していることを意味すると考える(例えば、生体外転写/翻訳系内またはベクターが宿主細胞内に導入された場合の宿主細胞内)。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよびその他の発現制御要素(例えばポリアデニル化シグナル)を含む。このような調節配列は、例えばGoeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)中に記載されている。調節配列は、多くの種類の宿主細胞内のヌクレオチド配列の構成的発現を指令するものおよびある種の宿主細胞内のみでヌクレオチド配列の発現を指令するもの(例えば組織特異性調節配列)を含む。当該技術分野の熟練者は、発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの因子に依存することを認めるであろう。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され、これにより本明細書に記載の核酸によりコードされる融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチドを産生する(例えばT - b e t タンパク質、T - b e t タンパク質の変異形、

T - b e t 融合タンパク質など)。

【0053】

本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞中の T - b e t タンパク質の発現のために設計できる。例えば、T - b e t は、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞 (バキュロウイルス発現ベクターを用い)、酵母細胞または哺乳類細胞内に発現できる。適当な宿主細胞は、Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990) 中にさらに考察されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば T7 プロモーター調節配列および T7 ポリメラーゼを用いて生体外で転写および翻訳してもよい。

【0054】

原核生物内のタンパク質の発現は、大腸菌内で、融合または非 - 融合タンパク質のいずれかの発現を指令する構成的または誘導的プロモーターを含むベクターを用いて最もしばしば行われる。融合ベクターは、その中にコードされるタンパク質に多数のアミノ酸を、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に加える。このような融合ベクターは、1種またはそれ以上の目的に役立つことができる。1) 組換えタンパク質の発現を増加するため、2) 組換えタンパク質の溶解度を上昇するため、3) アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製を支援するため、4) タンパク質の検出および/または精製を支援するためのエピトープタグを提供するため、および/または5) タンパク質の検出を支援するためのマーカーを提供するため (例えば - ガラクトシダーゼ融合を用いるカラーマーカー)。しばしば、融合発現ベクター中で、タンパク質分解開裂部位が融合部分の結合部に導入されそして融合タンパク質の精製の後に組換えタンパク質に融合部分から組換えタンパク質の分裂を可能とさせる。このような酵素、およびこれらの同起原の認識配列は、X a 因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターは、p G E X (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S.(1988) Gene 67:31-40)、p M A L (New England Biolabs, Beverly, MA)および p R I T 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) を含み、これらはグルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T

)、マルトースE結合タンパク質、またはタンパク質Aを標的組換えタンパク質にそれぞれ融合する。組換えタンパク質は、真核細胞内にも上記と同じ目的で融合タンパク質として発現できる。

#### 【0055】

適当な誘導可能な非-融合大腸菌発現ベクターの例は、pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) およびpET11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods In Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-85) を含む。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存する。pET11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現したウイルスRNAポリメラーゼ(T7gn1)により媒介されるT7gn10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV5プロモーターの転写制御下のT7gn1遺伝子を内包する常在性プロファージからの宿主系列BL21(DE3)またはHMS174(DE3)により提供される。

#### 【0056】

大腸菌内の組換えタンパク質発現を最大化するための一つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に開裂することに損傷された能力を有する宿主細胞内のタンパク質を発現することである(Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California(1990) 119-128)。別の戦略は、それぞれのアミノ酸に対する個別のコドンが大腸菌内に優先的に使用されるものであるように、発現ベクター内に挿入される核酸の核酸配列を変更することである(Wada et al., (1992) Nuc. Acids Res. 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準のDNA合成技術により実行できる。

#### 【0057】

別の態様では、T-bet発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母S.セリビシエ(S. Cerevisiae)内の発現のためのベクターの例は、pYepSec1 (Baldari et al., (1987) EMBO J. 6: 229-234)、pMfa (Kurjan and Herskowi

tz, (1982) Cell 30: 933-943)、p J R Y 8 8 (Schultz et al., (1987) Gene 54 :113-123) および p Y E S 2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) を含む。

#### 【0058】

あるいは、T - b e t はバキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞内に発現できる。培養した昆虫細胞（例えばS f 9細胞）内のタンパク質の発現のために利用できるバキュロウイルスベクターは、p A c シリーズ(Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) および p V L シリーズ(Lucklow, V.A., and Summers, M.D., (1989) Virology 170:31-39)を含む。

#### 【0059】

さらに別の態様では、本発明の核酸は、哺乳類発現ベクターを用いて哺乳類細胞内で発現される。哺乳類発現ベクターの例は、p M e x - N e o 1 . p C D M 8 (Seed, B., (1987) Nature 329:840 および p M T 2 P C (Kaufman et al., (1987) EMBO J. 6:187-195) を含む。哺乳類細胞内に使用された場合に、発現ベクターの制御機能はしばしばウイルス調節要素により提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス40から誘導される。

#### 【0060】

他の態様では、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞タイプ内に優先的に核酸の発現を指令する能力がある（例えば組織特異性調節要素が、核酸を発現するために使用される）。組織特異性調節要素は、当該技術分野で公知である。適当な組織特異性プロモーターの非制限的な例は、リンパ系特異性プロモーター(Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、特にはT細胞受容体(Winoto and Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) および免疫グロブリン(Banerji et al., (1983) Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741-748)アルブミンプロモーター（肝臓特異性;Pinkert et al.(1987) Genes Dev. 1 : 268-277)、ニューロン特異性プロモーター（例えば神経フィラメントプロモーター; Byrne and Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477)、膵臓特異性プロモーター(Edlund et al., (1985) Science 230: 912-916) 、 およ

び乳腺特異性プロモーター（例えば乳漿プロモーター、米国特許（I S）第4,873,316号および欧州特許出願公開第264,166号）を含む。発生的に調節されるプロモーター、例えばネズミ *hox* プロモーター(Kessel and Guss (1990) *Science* 249:374-379)および - フェトタンパク質プロモーター(Campes and Tilghman (1989) *Gene Dev.* 3:537-546)も包含される。

#### 【0061】

さらに、哺乳類細胞に使用するための誘導性調節系が、当該技術分野に公知であり、例えば遺伝子発現が重金属イオンにより調節される系（例えばMayo et al (1989) *Cell* 29:99-108; Brinster et al (1982) *Nature* 296: 39-42; Searle et al (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 1480-1489 参照）、熱ショック（例えばNour et al.,(1991) in *Heat Shock Response*, e.d. Nour, L., CRC. Boca Raton, FL pp167-220参照）、ホルモン（例えばLee et al.,(1981) *Nature* 294, 228-232; Haynes et al.(1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2038-2042; Klock et al.,(1987) *Nature* 329: 734-736; Israel & Kaufman (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2589-2604; およびPCT 公開番号W093/23431号参照）、FK506 - 関連分子（例えばPCT 公開番号W094/18317号参照）またはテトラサイクリン(Gossen, M. and Bujard, H.(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Gossen, M.et al.,(1995) *Science* 268:1766-1769; PCT公開番号 WO 94/29442号および PCT公開番号W096/01313号)がある。従って、別の態様では、本発明は T - b e t DNAが誘導可能な真核プロモーターに操作可能に連結し、これにより真核細胞内の T - b e t タンパク質の発現を誘導可能に発現させる組換え発現ベクターを提供する。

#### 【0062】

本発明は、さらにアンチセンス方向に発現ベクター内にクローンされた本発明のDNA分子を含んでなる組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、T - b e t mRNAにアンチセンスであるRNA分子の発現（DNA分子の転写による）を可能とする様式で調節配列に操作可能に連結している。アンチセンス方向にクローンされた核酸に操作可能に連結する調節配列は、種々の細胞タイプ内のアンチセンスRNA、例えばウイルスプロモーターおよび/または

エンハンサーの連続発現を指令するように選択でき、または調節配列は、構成的、組織特異的または細胞タイプ特異的なアンチセンスRNA発現を指令するように選択できる。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファジェミド (phagemid) または弱毒化ウイルスの形であることができ、その中でアンチセンス核酸は高効率調節領域の制御下で産生され、その活性はベクターが導入される細胞タイプにより決定できる。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節の考察に関しては、Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1)1986 参照。

#### 【0063】

本発明の別の態様は、本発明のベクター、好ましくは組換え発現ベクターが導入された組換え宿主細胞に関する。宿主細胞は、原核または真核細胞であることができる。例えば、T - b e t タンパク質は、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞、酵母または哺乳類細胞（例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）内で発現されてもよい。その他の適当な宿主細胞は、当該技術分野の熟練者には公知である。ベクターDNAは、原核または真核細胞内に、慣用の形質転換またはトランスフェクション技術を利用して導入できる。本明細書中に使用する場合に、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、宿主細胞内への外来核酸（例えばDNA）を導入するための当該技術分野で認められた各種の技術を呼び、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈法、DEAE - デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションを含む。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションする適当な方法は、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、およびその他の実験用マニュアル内に見いだすことができる。

#### 【0064】

哺乳類細胞の安定なトランスフェクションのために、使用する発現ベクターおよびトランスフェクション技術に応じて、細胞の小さい部分だけがそのゲノム内に外来DNAを組み込んでよいことが知られている。これらの組込物を同定および選択するために、選択可能なマーカー（例えば抗体への抵抗性）をコードす

る遺伝子を一般に宿主細胞内に、関係する遺伝子と同時に導入する。好ましい選択可能なマーカーは、薬剤、例えばG418、ハイグロマイシンおよびメトトレキセートに抵抗性を与えるものを含む。選択可能マーカーをコードする核酸は、T - b e t をコードするものと同じベクターで宿主細胞内に導入してもよくまたは別のベクターで導入してもよい。導入された核酸を用いて安定にトランスフェクションされた細胞は、薬剤選択により同定できる（例えば選択可能なマーカー遺伝子を組み込まれた細胞は生存し、一方他の細胞は死滅する）。

#### 【0065】

培養物内の本発明の宿主細胞、例えば原核または真核宿主細胞は、T - b e t タンパク質を産生（即ち発現）するために使用できる。従って、本発明は、さらに本発明の宿主細胞を用いるT - b e t タンパク質発現のための方法も提供する。一つの態様では、この方法は、T - b e t が産生されるまで適当な培地内で本発明の宿主細胞（その中にT - b e t をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を培養することを含んでなる。別の態様では、本発明方法は、さらに培地または宿主細胞からT - b e t を単離することを含んでなる。その本来の形で、T - b e t タンパク質は細胞内タンパク質であり、従って、組換えT - b e t タンパク質は組換え宿主細胞内で細胞内的に発現でき、次いで例えば宿主細胞を溶解、そして溶解物から組換えT - b e t タンパク質を回収して宿主細胞から単離される。あるいは、組換えT - b e t タンパク質は、非相同シグナル配列をタンパク質のアミノ末端に、タンパク質が宿主細胞から分泌されるように操作可能に連結して細胞外タンパク質として調製できる。この場合に、組換えT - b e t タンパク質は、細胞が培養された培地から回収できる。

#### 【0066】

本発明のある種の宿主細胞は、非 - ヒトトランスジェニック動物を作製するためにも使用できる。例えば、一つの態様では、本発明の宿主細胞は、T - b e t コード配列が導入された受精卵母細胞または胚幹細胞である。従って、このような宿主細胞は、外因性T - b e t 配列がそのゲノム内に導入された非 - ヒトトランスジェニック動物または内因性T - b e t 配列が改変された相同組換え動物を創成するために使用できる。このような動物は、T - b e t の機能および/また

は活性の研究のためおよびT - b e t活性のモジュレーターの同定または評価のために有用である。従って、本発明の別の態様は、T - b e tタンパク質またはT - b e tタンパク質の一部をコードする導入遺伝子を有する細胞を含む非 - ヒトトランスジェニック動物に関する。本発明のトランスジェニック動物に関する従属態様では、導入遺伝子は内因性T - b e tタンパク質をコードする内因性遺伝子を改変する(例えば内因性T - b e t遺伝子が機能的に破壊または「ノックアウト」されたか、または内因性T - b e t遺伝子のヌクレオチド配列が突然変異したかまたは内因性T - b e t遺伝子の転写調節領域が改変された相同組換え動物)。

#### 【0067】

本発明のトランスジェニック動物は、T - b e tをコードする核酸を受精した卵母細胞のオス前核内に、例えばマイクロ注入により導入し、そして卵母細胞を擬妊娠メス養育動物内に発生させて創成できる。配列番号1または3のT - b e tヌクレオチド配列は、導入遺伝子として非 - ヒト動物のゲノム内に導入できる。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルも導入遺伝子内に含めて導入遺伝子の発現の効率を高くするために含めることができる。組織特異性調節配列は、T - b e t導入遺伝子に操作可能に連結して、特定の細胞にT - b e tタンパク質の発現を指令することができる。胚操作およびマイクロ注入を介するトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物を作製するための方法は、当該技術分野では慣用となっておりそして例えば、米国特許(US)第4,736,866号および第4,870,009号(共にLeder et al.)、米国特許(US)第4,873,191号(Wagner et al.)およびHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作製にも使用される。トランスジェニック創始(founder)動物は、そのゲノム内のT - b e t導入遺伝子の存在および/または動物の組織または細胞中のT - b e t mRNAの発現に基づいて同定できる。次いで、トランスジェニック創始動物は、導入遺伝子を有する別の動物を育種するために使用できる。さらに、T - b e tをコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェ

ニック動物にも育種できる。

【0068】

相同組換え動物を創成するために、欠失、付加または置換が導入され、これにより内因性 T - b e t 遺伝子を改変、例えば機能性に破壊する T - b e t 遺伝子の少なくとも一部分を含むベクターを調製する。一つの態様では、相同組換えの際に、内因性 T - b e t 遺伝子が機能的に破壊される（すなわち機能性タンパク質をコードしなくなり、「ノクアウト」ベクターとも呼ばれる）ように相同組換えベクターを設計する。あるいは、ベクターは、相同組換えの際に、内因性 T - b e t 遺伝子が T - b e t 遺伝子により置換されるように設計できる。相同組換えベクター中で、T - b e t 遺伝子の改変部分は、T - b e t 遺伝子の付加核酸によりその 5' および 3' 末端に近接し、相同組換えをベクターによりもたらされた外因性 T - b e t 遺伝子と胚幹細胞内の内因性 T - b e t 遺伝子との間に起こさせる。付加的な近接 T - b e t 核酸は、内因性遺伝子との相同組換え成功のために十分な長さである。代表的には、数千塩基の近接 DNA（5' および 3' 末端の両方）がベクター内に含まれる（例えば相同組換えベクターの説明に関しては Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 参照）。ベクターは胚幹細胞系列内に導入され（例えばエレクトロポレーションにより）、そして導入された T - b e t 遺伝子が内因性 T - b e t 遺伝子と相同的に組み換えられている細胞を選択する（例えば Li et al., (1992) Cell 69:915 参照）。次いで選択された細胞を動物（例えばマウス）の胚盤胞内に注入して集合キメラを形成する（例えば Bradley, A. in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson ed. (IRL, Oxford, 1987) pp113-152）。次いで、キメラ胚は、適当な疑妊娠雌養育動物内に移植され、そして胚を生育させる。生殖細胞内に相同組換え DNA を内包する後代は、動物のすべての細胞が導入遺伝子の生殖細胞系転移により相同組換え DNA を含む動物を育種するために使用できる。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法は、さらに Bradley, A. (1991) Current Opinion in Biotechnology 2:823-829 および PCT 国際公開番号 WO 90/11354号 (Mouellec et al.); WO 91/01140号 (Smithies et al.); WO 92/0968 号 (Zijlstra et al); および WO 93/04169 号 (Berns et al.)

に記載されている。

【0069】

上記に加えて、熟練者は、相同組換えに対する当該技術分野で公知の別の方法が本発明に適用できることを認めるであろう。酵素支援部位特異性組込み系は、当該技術分野では公知でありそして第二の標的DNA分子内の所定の位置にDNA分子を組み込むために適用できる。このような酵素支援組込み系の例は、Cre組換え-lox標的系(例えばBaubonis, W. and Sauer, B.(1993) Nucl. Acids Res. 21:2025-2029; およびFukushige. S. and Sauer, B.(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7905-7909 に記載) およびFLPレコンビナーゼ-FRT標的系(例えばDang, D.T. and Perrimon, N.(1992) Dev. Genet. 13:367-375: およびFiering S. et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8469-8473 に記載)を含む。テトラサイクリン調節誘導可能相同組換え系、例えばPCT公開番号W094/29442号およびPCT公開番号W0 96/01313 号に記載のものも使用できる。

【0070】

別の態様では、トランスジェニック動物は、例えば、CD4エンハンサーを用いてT-betをすべてのT細胞内に発現するように作製できる(Zheng, W-P. & Flavell, R.A. 1997, Cell 89, 587)。最近の研究は、CD2エンハンサーも使用できることを示唆している。実際に、これはT細胞内の高レベルでの発現に一層強力であり、発現は多様ではなくそして導入遺伝子発現はコピー数依存性である(Zhumabekov, T. et al. 1995, J. Immunol. Meth. 185, 1331; Sharp, L.L. et al., 1997, Immunity 7,609)。T-bet RNAの高レベル発現を有するマウス(導入遺伝子駆動T-bet RNAを内因性T-betと区別するためのプロンプとしてヒト成長ホルモンイントロンを使用)は、創始体の適当な数をスクリーニングして同定できる。

【0071】

別の方法では、ドミナントプレッサートランスジェニックを創成できる。例えばドミナントプレッサート-betは、T-betの融合を駆動して近位Ickエンハンサーを用いて作製できる(Alberola-Ila, J. et al., 1996, J. Exp. Med. 184,9)、そしてengrailedが作製できる(Taylor, D. 1996, Ge

nes Dev. 10.2732; Li, J., Thurm H. et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10885)。この構築物は、多量体化T - b e tレポーターのT - b e tトランス活性化を特異的に抑制しそしてNFAT依存性レポータートランス活性化に影響しない。

#### 【0072】

あるいは、ヌル変異がES細胞内の標的変異誘発により発生できる(Ranger, A.M., et al., 1998, Nature 392,186; Hodge, M.R., et al. 1996, Immunity 4:1,144; Grusby, M.J., et al., 1991, Science 253, 1417; Reimold, A.M., et al. Nature 379:262; Kaplan, M.H., 1996, Immunity: 313; Kaplan, M.H., et al., 1996, Nature 382, 174; Smiley, S.T. et al., 1997, Science 275.977)。例えば当該技術分野には公知の技術を用いて、ゲノムT - b e tクローンをゲノムライブラリーから単離し、イントロン - エキソン機構を調整し、そして第一エクソンおよびプロモーター配列の上流450bpを欠失するc r e - l o xベクター内の標的構築物を創成できる(下記参照)。この構築物は、ES細胞系統内にエレクトロポレートでき、そして二重薬剤抵抗性(例えばネオマイシン、ガンシクロビル)クローンがサザンブロット分析により同定できる。次いで、T - b e t座内に相同組換えイベントを有するクローンを同定できそして3 . 5日のBALB / c妊娠マウスから得た胚盤胞内に注入した。次いでキメラマウスを作製し、そして野生型BALB / cマウスにかけ合わせて破壊されたT - b e t遺伝子の生殖細胞系伝達を発生させた。

#### 【0073】

他の態様では、RAG2 - 欠失胚盤胞内への移植(Chen, J., et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4528) またはc r e - l o x誘導可能な欠失方法が、免疫系内でT - b e tのみを欠失するマウス発生に使用できる。例えば、標的構築物は、c r e - l o xベクター内に作製できる。胚盤胞補足系をNFATc、胚致死表現型研究のために使用した(Ranger, A.M. et al., 1998, Immunity 8:125)。この方法は、ES細胞内の両方の染色体上のT - b e t遺伝子を破壊することを要求し、これは例えば、記載(Chen, J., et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4528) のようにして、変異ネオマイシン遺伝子を用いそして

ES培養物内のG418の濃度を上昇することにより、またはcre-lox部位を有するneo遺伝子に近接して行うことができる。第二対立遺伝子を破壊するために、ネオマイシン遺伝子は、レコンビナーゼを用いてESクローンをトランスフェクションして欠失でき、次いでESクローンを同じ標的構築物を用いてトランスフェクションして両方の対立遺伝子上のT-bet欠失を有するクローンを選択できる。cre-レコンビナーゼを用いる第三のトランスフェクションは、所望の二重標的ES細胞を生成する。次いで、この二重標的ES細胞をRAG2胚盤胞細胞内に移植しそしてのようにして生成したキメラマウスのリンパ器官は転移したES細胞により完全にコロニー化される。これは、T-betの不在が致死を招きかねない他の臓器形質転換への影響を及ぼすことなく、リンパ系の細胞へのT-betの不在の影響の評価を可能とする。

#### 【0074】

cre-lox系を用いる条件的除去法も使用できる。要約すると、除去すべきエクソンに近接するイントロン領域内にlox組換え配列を位置させた標的構築物を作製する。次いで、この構築物をES細胞中にトランスフェクションしそして変異マウスを上記のようにして作製する。次いで得られた変異マウスを、誘導可能なプロモーターにより駆動されるcreレコンビナーゼに対してトランスジェニックなマウスにかけ合わせる。creが発現されると、これは、T-bet遺伝子内に導入されたlox部位の間の組換えを誘導し、従って遺伝子機能を有効に破壊する。この方法の主要な特徴は、遺伝子破壊が、creレコンビナーゼを活性化することにより意のままに成熟動物内に導入できることである。

#### 【0075】

組織特異性プロモーターは、免疫系以外の臓器内の異状を避けるために使用できる。cre発現性導入遺伝子は、誘導可能プロモーターにより駆動されてもよい。数種の誘導可能系がcre-lox組換え戦略にいまでは使用され、最も一般的にはテトラサイクリンおよびエクジソン系である。組織特異性誘導可能プロモーターは、T-betヌルマウス内に胚的致死性がある場合に使用できる。

#### 【0076】

別の方法は、調節されたT-bet遺伝子を内包するトランスジェニックマウ

スの作製である(例えばテトラサイクリン・オフプロモーターの使用、例えばSt-Onge, et al, 1996, Nuc. Acidres. 24, 3875-3877)次いでこのトランスジェニックをT - b e t 欠失マウスへ養育する。この方法は、正常なT - b e t 機能を有するマウスの創成を可能とする。テトラサイクリンは成熟マウスに投与でき、末梢T細胞内にT - b e t 機能の破壊を誘導し、次いでT - b e t 欠失の効果は時間経過により試験できる。投与の反復サイクル、次いで薬剤(テトラサイクリン)の除去は、T - b e t 遺伝子のオンおよびオフを意のままに変更できるようにする。

### III. 単離されたT - b e t タンパク質および抗T - b e t 抗体

本発明の別の態様は、単離されたT - b e t タンパク質に関する。好ましくは、T - b e t タンパク質は、配列番号1または3によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる。別の好ましい態様では、タンパク質は配列番号2または4のアミノ酸配列を含んでなる。別の態様では、タンパク質は配列番号2または4記載のアミノ酸配列と、少なくとも60%のアミノ酸一致、さらに好ましくは70%のアミノ酸一致、さらに好ましくは80%のアミノ酸一致、その上さらに好ましくは90%または95%のアミノ酸一致を有する。

#### 【0077】

別の態様では、本発明は、T - b e t タンパク質の単離された部分を提供する。例えば、本発明は、さらにT - b o x ドメインを含むT - b e t のアミノ末端部分を包含する。種々の態様において、このアミノ末端部分は、ヒトT - b e t の少なくともアミノ酸138 - 327またはマウスT - b e t の少なくともアミノ酸137 - 326を包含する。本発明により提供される別の単離されたT - b e t の部分は、チロシンリン酸化部位を包含する部分である。この部分は、少なくともヒトT - b e t のアミノ酸324 - 366および/または523 - 534またはネズミT - b e t のアミノ酸323 - 335または518 - 529を包含する。本明細書で提供するさらに別のT - b e t の単離された部分は、ヒトT - b e t のアミノ酸498 - 501またはネズミT - b e t の493 - 396内に記載の核局在化配列を包含する部分である。

#### 【0078】

本発明のT - b e tタンパク質は、好ましくは組換えDNA技術により產生される。例えば、タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクター内にクローンし（以上に記載）、発現ベクターを宿主細胞内に導入し（以上に記載）そしてT - b e tタンパク質を宿主細胞内に発現させる。次いで、標準のタンパク質精製技術を用いる適当な精製手順によりT - b e tタンパク質を細胞から単離できる。組換え発現の別の方法では、T - b e tポリペプチドを標準のペプチド合成技術を用いて化学的に合成できる。さらに、例えば抗T - b e t抗体を用いる免疫沈降により、ナイーブT - b e tタンパク質を細胞から分離する（例えばT細胞から）。

#### 【0079】

本発明は、T - b e t融合タンパク質も提供する。本明細書に使用する場合に、T - b e t「融合タンパク質」は、T - b e t以外のポリペプチドに操作可能に連結したT - b e tポリペプチドを含んでなる。「T - b e tポリペプチド」は、T - b e tタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはT - b e tタンパク質の独特のそのペプチド断片を呼び、ここで、「T - b e t以外のポリペプチド」は、他のタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを呼ぶ。融合タンパク質内で、用語「操作可能に連結」は、T - b e tポリペプチドおよび他のポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すと考える。他のポリペプチドは、T - b e tポリペプチドのN - 末端またはC - 末端に融合してもよい。例えば、一つの態様では、融合タンパク質は、T - b e t配列がGST配列のC - 末端に融合しているGST - T - b e t融合タンパク質である。別の態様では、融合タンパク質は、T - b e tヌクレオチド配列がベクター、例えばpCEP4 - HAベクター内に挿入されたT - b e t - HA融合タンパク質であり(Herrscher, R.F. et al., (1995) Genes Dev. 9: 3067-3082)、T - b e t配列はインフルエンザ・ヘマグルチニン・エプítőブタグにインフレームで融合している。このような融合タンパク質は、組換えT - b e tの精製を容易にすることができる。

#### 【0080】

好ましくは、本発明のT - b e t融合タンパク質は、標準の組換えDNA技術

により産生される。例えば、種々のポリペプチド配列をコードするDNA断片を慣用の方法に従い、例えば結合のための平滑終止または段違い(staged)終止末端、適当な末端を得るための制限酵素消化、希望しない結合を避けるための適当なアルカリ性ホスファターゼ処置としての付着末端の充填、および酵素結合を用いてインフレイムと一緒に結合する。別の態様では、融合遺伝子は、自動化DNA合成装置を含む慣用の技術により合成できる。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、2この連続断片の間の相補的オーバーハングを発生させるアンカープライマーを用いて行うことができ、これはその後アニールしそして再度増幅してキメラ遺伝子配列を作製できる(例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, eds. Ausbel et al., John Wiley & Sons, 1992 参照)。さらに、すでに融合部分をコードした多数の発現ベクターが市販により入手可能である(例えばGSTポリペプチドまたはHAエピトープタグ)。T-betコード核酸は、融合部分をT-betタンパク質にインフレイムで連結するようにこのような発現ベクター内にクローンができる。

#### 【0081】

単離されたT-betタンパク質またはその断片は、ポリクローナルおよびモノクローナル調製のための標準方法を用いて、T-betに特異的に結合する抗体を産生させるための免疫原として使用できる。T-betタンパク質は、抗体産生に使用できる。例えば、ポリクローナル抗血清は、ラビット内で免疫原として全長組換え細菌産生T-betを用いて産生できる。この同じ免疫原は、マウスを免疫化しそして免疫化されたマウスから脾臓細胞を取り出すことによるmAbを産生するために使用できる。T-betに対する免疫反応を備えたマウスからの脾臓細胞は、ミエローマ細胞、例えばSP2/O-Ag14ミエローマに融合できる。後記の実施例に記載のように、この方法は、T-betに結合するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製するために使用された。

#### 【0082】

あるいは、T-betの抗原ペプチド断片は免疫原として使用できる。T-betの抗原ペプチド断片は、代表的には配列番号2または4記載のアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を含んでなり、そしてペプチドに対して発生した抗

体がT - b e tと特異性免疫複合体を形成するようにT - b e tのエピトープを包含する。好ましくは、抗原ペプチドは少なくともアミノ酸残基10個を含んでなり、さらに好ましくは少なくともアミノ酸残基15個を含んでなり、その上さらに好ましくは少なくともアミノ酸残基20個を含んでなり、そして最も好ましくは少なくともアミノ酸残基30個を含んでなる。抗原ペプチドに包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面、例えば親水性領域上に位置し、そしてT - b e tに独特であるT - b e tの領域である。一つの態様では、このようなエピトープは、一つの種、例えばマウスまたはヒトからのT - b e tタンパク質に対して特異的であることができる(すなわち、種間では保存されないT - b e tの領域を有する抗原性ペプチドが免疫原として使用される。このような保存されない残基は、本明細書中に記載のような整列を用いて決定できる)。T - b e tタンパク質の標準疎水性分析は、親水性領域を同定するために行うことができる。

#### 【0083】

T - b e t免疫原は、代表的には、適当な対象体(例えばラビット、ヤギ、マウスまたはその他の哺乳類)を免疫原を用いて免疫化して抗体を調製するために使用される。適当な免疫原調製物は、例えば、組換え的に発現したT - b e tタンパク質または化学的に合成したT - b e tペプチドを含むことができる。調製物は、さらにアジュバント、例えばフロイントの完全または不完全アジュバント、または類似の免疫刺激性薬剤を含むことができる。免疫原性T - b e t調製物を用いる適当な対象体の免疫化は、ポリクローナル抗T - b e t抗体反応を誘発する。

#### 【0084】

従って、本発明の別の態様は、抗T - b e t抗体に関する。ポリクローナル抗T - b e t抗体は、上記のようにして、適当な対象体をT - b e t免疫原を用いて免疫化して調製できる。免疫化された対象体中の抗T - b e t抗体力価は、標準技術、例えば免疫化T - b e tを用いる酵素免疫測定法(ELISA)により時間に対して測定できる。希望する場合には、T - b e tに対抗する抗体分子は、哺乳類から(例えば血液から)単離しそしてさらに周知の方法、例えばタンパ

ク質Aクロマトグラフィーにより精製してIgG画分を得ることができる。免疫化から適当な時間において、例えば抗T - b e t 抗体力価が最高になった時点で、抗体産生細胞が対象体から得られそして標準の方法、例えばKohler and Milstein(1975, Nature 256:495-497) により最初に記述されたハイブリドーマ技術(Brown et al (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown et al.,(1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh et al.(1976) PNAS 76:2927-31;およびYeh et al.(1982) Int J. Cancer 29:269-75も参照)、さらに最近ではヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al.(1983) Immunol. Today 4:72)、EBV - ハイブリドーマ技術(Cole et al.(1985)), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp77-96)またはトリオーマ技術によりモノクローナル抗体を調製するために使用される。モノクローナル抗体ハイブリドーマ産生のための技術は周知である(一般的には、R.H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp. New York, New York(1980); E.A. Lerner(1981) Yale J. Biol. Med.,54:387-402; M.L. Gefter et al.(1977) Somatic Cell Genet.,3:231-36参照)。要約すると、不死細胞系統(代表的にはミエローマ)を、上記のようにしてT - b e t 免疫原を用いて免疫化した哺乳類からのリンパ細胞(代表的には脾細胞)に融合させ、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、T - b e t に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

#### 【0085】

リンパ細胞および不死細胞系統の融合に対して使用した周知の多数のプロトコールのいずれも、抗T - b e t モノクローナル抗体を産生する目的で適用できる(例えばG. Galfre et al.,(1975) Nature 254:205-206; Gefter et al., Somatic Cell Genet.以上に引用; Lerner, Yale J. Biol. Med.以上に引用、Kenneth, Monoclonal antibodies、以上に引用も参照)。さらに、通常の技術者は、有用な多数のこのような方法の変形が存在することを認めるであろう。代表的には、不死細胞系統(例えばニエローマ細胞系統)は、リンパ細胞と同じ哺乳類種から誘導される。例えば、ネズミハイブリドーマは、本発明の免疫原調製物を用いて免疫化したマウスからのリンパ細胞を、不死化マウス細胞系統と融合して作製できる

。好ましい不死細胞系統は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地（「HAT培地」）に感受性であるマウスミエローマ細胞系統である。多数のミエローマ細胞系統のいずれも、標準方法に従う融合相手として使用してもよく、例えばP3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/O-Ag14ミエローマ系統である。これらのミエローマ系統は、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md) から入手できる。代表的には、HAT感受性マウスミエローマ細胞を、ポリエチレングリコール（「PEG」）を用いてマウス脾細胞に融合する。次いで、融合からもたらされたハイブリドーマ細胞を、非融合および非産生性に融合されたミエローマ細胞を殺すHAT培地を用いて選択する（非融合脾細胞は、これらが形質転換されていないので数日後に死滅する）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば標準ELISA法を用いて、T-betを結合する抗体に関してハイブリドーマ培養上清をスクリーニングして検出される。

#### 【0086】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代わりに、モノクローナル抗T-bet抗体が、組換えコンビナトリアル(combinatorial)免疫グロブリンライブラリー（例えば抗体ファージ表示(display)ライブラリー）をT-betを用いてスクリーニングして、これによりT-betを結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することにより固定および単離できる。ファージ表示ライブラリーを作製およびスクリーニングするためのキットは、市場で入手できる（例えばPharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-1;およびStratagene SurfZAP™ Phage Display Kit、カタログ番号240612）。さらに、抗体表示ライブラリーの作製およびスクリーニングに使用するための特に適する方法および試薬の例は、例えば下記から見いだすことができる。Ladner et al.:米国特許(US)第5,223,409号; Kang et al. 国際出願番号WO 92/18619号; Dower et al.国際出願番号WO 91/17271号; Winter et al. 国際出願番号WO 92/20791号; Markland et al. 国際出願番号WO 92/15679号; Breitling et al.国際出願番号WO 93/01288号; McCafferty et al. 国際出願番号WO 92/01047号; Garrard et al.国際出願番号WO 92/09690号; Ladner et al. 国際出願

番号W0 90/02809 号; Fuchs et al.(1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay e t al.(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al.,(1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al.(1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al.(1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clarkson et al.(1991) Nature 352:624-628 ; Gram et al.(1992) PNSA 89: 3576-3580; Garrad et al.(1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al.(1991) Nuc. Acid Res. 19:4133-4137; Barbes et al.(1991) PNAS 88: 7978-7982;およびMcCafferty et al. Nature (1990) 348:552-554。

#### 【0087】

さらに、ヒトおよび非 - ヒト部分を含んでなり、標準組換えDNA技術を用いて作製できる組換え抗T - b e t抗体、例えばキメラ性および人体適応モノクローナル抗体は、本発明の範囲内である。このようなキメラ性および人体適応モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の組換えDNA技術により産生でき、例えば下記の方法を用いる。Robinson et al. 国際出願番号PCT/US86/02269号; Akira et al. 欧州特許出願184,187 号; Taniguchi M. 欧州特許出願172,496 号; Morrison et al. 欧州特許出願173,494 号; Neuberger et al. PCT出願 W0 86/01533号; Cabilly et al. 米国特許(US)4,816,567 号; Cabilly et al. 欧州特許出願125,023 号; Butter et al.(1988) Science 240:1041-1043; Liu et al.(1987) PNAS 84: 3439-3443; Liu et al.(1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al.(1987)PNAS 84: 214-218; Nishimura et al.(1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al.(1985) Nature 314:446-449;およびShaw et al.(1988) J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison S.L. Science 229:1202-1207; Oi et al.(1986) BioTechniques 4: 214; Winter米国特許(US)5,225,539 号; Jones et al.(1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan et al.(1988) Science 239: 1534:およびBeidler et al.,(1988) J. Immunol. 141: 4053-4060。

#### 【0088】

抗T - b e t抗体(例えばモノクローナル抗体)は、標準技術、例えばアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降法によりT - b e tを単離するために使用できる。抗T - b e t抗体は、細胞からの本来のT - b e tおよび宿主細

胞内で発現された組換え産生 T - b e t の精製を容易にすることができる。さらに、抗 T - b e t 抗体は、T - b e t タンパク質を検出するために使用できる（例えば細胞溶解物または細胞上清中）。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリング（物理的連結）すると容易になるであろう。従って、一つの態様では、本発明の抗 T - b e t 抗体は、検出可能な物質により標識される。検出可能な物質の例は、種々の酵素、接合分子族、蛍光性物質、発光性物質および放射性物質を含む。適当な酵素の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む、適当な接合分子族複合体の例は、ストレプトタビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含む。適当な蛍光性物質の例はウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン・フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンを含む、発光性物質の例は、ルミノールを含み、そして適当な放射性物質の例は、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ を含む。

#### 【0089】

本発明発明のさらに別の態様は、

- (a) 動物を免疫原性 T - b e t タンパク質、または T - b e t タンパク質に独特なその免疫原部分を用いて免疫化し、そして
- (b) T - b e t タンパク質に特異的に結合した動物抗体から単離することを含んでなる方法により得られる抗 T - b e t 抗体に関する。

#### 【0090】

特異性抗 T - b e t 抗体の免疫化および回収の方法は、別途記載する。

#### IV. 薬剤組成物

本発明の T - b e t モジュレーター（例えば、T - b e t 核酸分子、タンパク質、抗体、または T - b e t 活性のモジュレーターとして同定された化合物を含む T - b e t 阻害または刺激剤）は、投与に適する薬剤組成物内に組み込むことができる。このような組成物は、代表的には、調節剤および薬剤的に許容できるキャリアーを含んでなる。本明細書中に使用する場合に、用語「薬剤的に許容できるキャリアー」は、薬剤投与に適合するあらゆる溶剤、分散媒体、被覆、抗細

菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むと考える。薬剂的に活性の物質に対するこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野では周知である。あらゆる慣用の媒体または薬剤が活性化合物と非適合である場合を除いて、組成物中でのこれらの使用を考える。補足的活性化合物を組成物内に混和してもよい。

#### 【0091】

本発明の薬剤組成物は、意図するその投与経路に適合するように調剤される。例えば、非経口、皮内、または皮下適用のために使用される液剤または懸濁剤は、下記の成分を含むことができる：滅菌した希釈剤、例えば注射用の水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、ポリプロピレングリコールまたはその他の合成溶剤、抗細菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム、キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸、緩衝液、例えばアセテート、サイトレートまたはホスフェートおよび毒性の調節のための薬剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース。pHは酸または塩基、例えば塩化水素酸または水酸化ナトリウムを用いて調整できる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または反復使用の調剤バイアル内に収容してもよい。

#### 【0092】

注射使用に適する薬剤組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液または滅菌した注射用液または分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与のために適するキャリアーは、生理食塩水、静菌水、クレモフォルEL™（Cremophor EL., BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝塩水(PBS)を含む。すべての場合に、組成物は滅菌されそして容易な注射性となる範囲で液状でなければならない。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならないそして微生物、例えば細菌および真菌の汚染作用に対して保護されなければならない。キャリアーは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど）、および適合するこれらの混合物を含む溶剤または分散媒体であることができる。適当な液体状態は、例えばコーティング例えばレシチンの使用により、分散液の場合に要求される粒

径の維持によりおよび界面活性剤の使用により維持できる。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの使用により達成できる。多くの場合に、等張剤、例えば糖類、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化などを組成物内に含むと好ましい。注射用組成物の長時間の吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物内に含めてもたらずことができる。

#### 【0093】

滅菌した注射用液剤は、適当な溶剤中の所要量の活性化化合物を必要に応じて以上に列記した成分の1種または組み合わせを混和し、次いで濾過滅菌して調製できる。一般に、分散液は、塩基性分散媒体を含む滅菌ビヒクルおよび以上に列挙したものから所要のその他成分中に活性化化合物を混和して調製できる。滅菌注射用液剤の調製のための滅菌粉末の場合に、好ましい調製方法は、有効成分の粉末およびあらかじめ滅菌濾過したこれらの溶液からの追加の所望の成分が得られる真空乾燥および凍結乾燥である。

#### 【0094】

経口組成物は、一般に不活性希釈剤または食用に適するキャリアーを含む。これらはゼラチンカプセル内に封入または錠剤内に圧縮されることができる。経口治療投与の目的で、活性化化合物は賦形剤と混和しそして錠剤、トローチ、またはカプセルの形で使用される。経口組成物は、口内洗浄剤として使用するために液体キャリアーを使用して調製でき、その際、液体キャリアー内の化合物は経口で適用されそしてガラガラとしそして吐き出すかまたは呑み込む。薬剤的に適する結合剤、および/またはアジュバント物質を組成物の一部分として含むことができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチ等は、下記の成分、または同様な性質の化合物のいずれも含むことができる：結合剤、例えばマイクロクリスタリンセルロース、トラガントガムまたはゼラチン、賦形剤、例えばデンプンまたはラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、プリモゲル(Primogel)、またはトウモロコシデンプン、潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムまたはステロート(Sterote)、滑り剤例えばコロイド状二酸化ケイ素、甘味剤例えばスクロースまたはサッカ

リン、または調味剤例えばペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ風味。

#### 【0095】

一つの態様では、活性化合物は、化合物の体内からの早期の排出を防止するキャリアーを用いて、例えば移植およびマイクロカプセル投与系も含む制御放出調剤として調製される。生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水酸、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ酪酸が使用できる。このような調剤の製造方法は、当該技術分野の熟練者には明らかである。材料はAlza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc から入手できる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染された細胞を標的としたリポソームを含む）も、薬剂的に許容できるキャリアーとして使用できる。これらは当該技術分野の熟練者には公知の方法、例えば米国特許（US）第4,522,811号に記載の方法に従って調製してもよい。

#### V. 本発明の方法

本発明の別の態様は、本発明の種々のT - b e t 組成物を使用する方法に関する。例えば、本発明は、生物学的試料中のT - b e t 活性の存在を検出するための方法を提供する。この方法は、生物学的試料をT - b e t 活性検出可能な薬剤、例えばT - b e t タンパク質またはT - b e t mRNAと、生物学的試料中のT - b e t 活性の存在を検出できるように接触させることを含む。

#### 【0096】

T - b e t mRNAを検出するための好ましい薬剤は、T - b e t mRNAに特異的にハイブリダイズできる標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば配列番号1または3のT - b e t DNA、例えば長さが少なくとも約500、600、800、900、1000、1200、1400、または1600ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドでありそしてストリンジェント条件下でT - b e t mRNAに特異的にハイブリダイズするものであることができる。

#### 【0097】

T - b e t タンパク質を検出するための好ましい薬剤は、T - b e t タンパク

質を結合できる標識された抗体である。抗体は、ポリクローナル、またはさらに好ましくはモノクローナルであることができる。変化していない抗体、またはその断片（例えばFabまたはF(ab')<sub>2</sub>）が使用できる。プローブまたは抗体に関連する用語「標識」は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリング（すなわち物理的に連結）することによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに直接標識された他の薬剤との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を包含すると考える。間接標識の例は、蛍光標識二次抗体を用いる一次抗体の検出および蛍光標識したストレプトアビジンを用いて検出できるようなビオチンを用いるDNAプローブの末端標識を含む。用語「生物学的試料」は、組織、細胞および生物学的液体を含むと考える。例えば、Tbet mRNAを検出するための技術は、ノーザンハイブリダイゼーションおよびin situ ハイブリダイゼーションを含む。Tbetタンパク質の検出のための技術は、酵素連結免疫吸着剤アッセイ（ELISA）、ウエスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光を含む。

#### 【0098】

このようなアッセイは、発育不全により特徴付けられる症候群の検出に有用である。例えば、ヒトTbx遺伝子TBX5およびTBX3内（マウスTbx5およびTbx3のオルソログ）の突然変異が、それぞれ常染色体優性遺伝性疾患ホルト-オーラム(Holt-Oram) 症候群および尺骨-乳腺症候群の原因である（Bamshad, M. et al. 1997, Nature Genetics 16:311; Basson, C.T., et al., 1997, Nature Genetics 15: 30; Li, Q.Y., et al., 1997, Nature Genetics 15: 21; Spranger, S., et al., 1997, J. Med. Genet. 3:978）。これらの症候群は、発育不全により特徴付けられ、そしてそれぞれTbx5およびTbx3の発現のパターンにより予想される。ホルト-オーラム症候群は、心臓および上肢に影響し、一方尺骨-乳腺症候群は手足、アポクリン腺、歯および生殖器発育に影響する。両方の症候群も発育不全が特徴であり、そしてそしてそれぞれTbx5およびTbx3の発現のパターンにより予想される。これらの患者内の突然変異は、Tbx遺伝子のただ1個の対立遺伝子のみが関係し、従って、Tbx3およびTbx5のハプロタイプ不全(haploinsufficiency)は、がこれら2種の

疾患を起こすと考えられる。最近、発生中のヒヨコ胚へのTbx4およびTbx5の供給が肢芽体を制御することが証明された(Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999)。これらの発見は、脊椎動物発生におけるこのファミリーの重要性を強調する。

#### 【0099】

さらに、多くの種内でのT遺伝子相同性の存在は、中胚葉発生に関係するまだ未知の標的遺伝子の組を調節する転写因子としてのその機能に対する強い証拠を提供する。T-bboxファミリーの最近の突出は、種々の発生過程におけるその明瞭な重要性から起きたものであり、ヒト疾患におけるT-bbox突然変異により最も劇的に例示される。胸腺幹細胞からの成熟T細胞およびナイーブ前駆体から分化したTh細胞の発生は、緊密に調節された発生過程として考えられている。TbetがTh1系統の発生に関係するというこの発見は、リンパ系におけるこの最新のT-bboxファミリーメンバーの重要な役割を証明する。

#### 【0100】

本発明は、さらに、Tbetタンパク質の活性を調節する化合物を同定するための方法を提供する。例えば、本発明は、

Tbetタンパク質を含んでなる指標組成物を調製し、  
指標組成物を供試化合物と接触させ、そして

指標組成物内のTbetタンパク質の活性に対する供試化合物の作用を決定し、これによりTbetタンパク質の活性を調節する化合物を同定することを含んでなる、Tbetタンパク質の活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。

#### 【0101】

本発明のスクリーニング法の特定の態様は、DNAに結合する(例えばIL-2またはIFN-プロモーターに結合する能力)、および/または遺伝子発現を調節する(例えばTh1関連サイトカイン遺伝子の発現を、例えばIL-2遺伝子を抑制、IFN-遺伝子をトランス活性化して調節)および/または極性化合物Th2細胞をTh1経路に転向するためのTbetタンパク質の能力を利用する。

## 【0102】

本発明スクリーニングアッセイの好ましい態様では、指標組成物は指標細胞を含んでなりここで該指標細胞は、(i) T - b e t タンパク質および(ii) T - b e t タンパク質に反応するレポーター遺伝子を含んでなる。好ましくは、指標細胞は、

i) T - b e t をコードする組換え発現ベクター、および

ii) レポーター遺伝子に操作可能に連結した T h 1 - 関連サイトカイン遺伝子の調節配列を含んでなるベクター

を含み、そして該方法は、

a) 指標細胞を供試化合物と接触させ、

b) 供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルを決定し、そして

c) 供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルを供試化合物の不在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルと比較し、これにより T - b e t の活性を調節する化合物を同定することを含んでなる。

## 【0103】

別の好ましい態様では、指標組成物は、(i) T - b e t タンパク質、および(ii) T - b e t が結合する DNA 分子の調製を含んでなり、そして該方法は、

a) 指標組成物を供試化合物と接触させ、

b) 供試化合物の存在下での T - b e t タンパク質と DNA 分子との相互作用の程度を決定し、そして

c) 供試化合物の存在下での T - b e t と DNA 分子との相互作用の程度を供試化合物の不在下での T - b e t と DNA 分子との相互作用の程度と比較し、これにより T - b e t の活性を調節する化合物を同定することを含んでなる。

## 【0104】

好ましくは、T - b e t が結合する DNA 分子は、T - b o x 結合配列を含ん

でなる。

【0105】

別の好ましい態様では、本方法はT - b e tと相互作用するタンパク質を同定する。この態様では、

指標組成物は、指標細胞が

i ) 転写調節配列に操作可能に連結したレポーター遺伝子、および

i i ) 第一融合タンパク質をコードする第一キメラ遺伝子を含んでなり、該第一融合タンパク質はT - b e tを含む

指標細胞であり、

供試化合物は第二キメラ遺伝子のライブラリーを含んでなり、該ライブラリーは第二融合タンパク質をコードし、

レポーター遺伝子の発現は、第一融合タンパク質、第二融合タンパク質および転写調節配列の間の相互作用に感受性であり、そして

ここで指標組成物内のT - b e tに対する供試化合物の作用が、指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルを決定することにより決定され、これによりT - b e tと相互作用するタンパク質を含んでなる供試化合物を同定する。

【0106】

好ましい態様では、第二キメラ遺伝子のライブラリーは、Th 2細胞からのcDNAライブラリーから調製される。

【0107】

本発明のスクリーニングアッセイの好ましい態様では、供試化合物がT - b e tの活性を調節すると同定された場合に、免疫反応に対する供試化合物の作用を次いで試験する。従って、本発明のスクリーニング法は、免疫反応に対する化合物の作用を決定し、これにより免疫反応を調節する化合物を同定することをさらに含んでなるおとができる。一つの態様では、免疫反応に対する化合物の作用は、Th 1 - 関連サイトカイン遺伝子、例えばインターフェロン - 遺伝子の発現に対する化合物の作用を決定して決定される。本明細書中に使用する場合に、用語「Th 1 - 関連サイトカイン」は、Th 2細胞ではなくむしろTh 1細胞により優先的または独占的に産生されるサイトカインを呼ぶと考える。Th 1 - 関連

サイトカインの例は、IFN- $\gamma$ 、IL-2、およびリンホトキシン(LT)を含む。別の態様では、免疫反応に対する関係する化合物の作用は、Tヘルパータイプ1(Th1)またはTヘルパータイプ2(Th2)細胞の発生に対する化合物の作用を決定して決定される。

#### 【0108】

指標細胞内のT-betの発現のために使用できる組換え発現ベクターは、当該技術分野では公知である(上記の考察参照)。一つの態様では、発現ベクター内で、T-betコーディング配列は、指標細胞内のT-betの構成的発現を許容する調節配列に操作可能に連結する(例えばウイルス調節配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサーが使用できる)。指標細胞内のT-betの構成的発現を許容する組換え発現ベクターの使用が、T-betの活性を促進または阻害する化合物の同定のために好ましい。別の態様では、発現ベクター内で、T-betコーディング配列は、内因性T-bet遺伝子の調節配列に操作可能に連結する(すなわち内因性T-bet遺伝子から誘導されたプロモーター調節領域)。T-bet発現が内因性調節配列により制御される組換え発現ベクターの使用が、T-betの転写発現を促進または阻害する化合物の同定のために好ましい。

#### 【0109】

Th1-関連サイトカイン遺伝子が使用される方法(例えばレポーター遺伝子として)において、好ましくはTh1-関連サイトカインはインターフェロン- $\gamma$ またはIL-2である。例えば、IL-2プロモーターは、MF-1 B部位の5'の-240~-220丁度にあるT-box結合部位を明らかにする。下記の実施例に記載するように、T-betは、IL-2プロモーターに結合するその能力に基づいて酵母ワンハイブリッドスクリーニングアッセイで単離される。したがって、一つの態様では、本発明の方法は、近位IL-2プロモーターのこの領域、最も好ましくは、IL-2プロモーターのヌクレオチド-240~-220を含むレポーター遺伝子構築物を利用する。

#### 【0110】

種々のレポーター遺伝子が当該技術分野で公知でありそして本発明のスクリー

ニングアッセイでの使用に適合する。適合するレポーター遺伝子の例は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼをコードするものを含む。これらの遺伝子産物の活性を測定するための標準方法は、当該技術分野では公知である。

#### 【0111】

種々の細胞タイプがスクリーニングアッセイにおける指標細胞としての使用に適合する。好ましくは、通常はT-betを発現しない細胞系統、例えばB細胞またはTh2細胞クローンが使用される。非リンパ細胞系統、例えばHe p G 2ヘパトーマ細胞系統も指標細胞として使用できる。酵母細胞も指標細胞として使用できる。

#### 【0112】

一つの態様では、供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルは、供試化合物の不在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルよりも高くそして供試化合物はT-betの発現または活性を刺激する化合物として同定される。別の態様では、供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルは、供試化合物の不在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルよりも低く、そして供試化合物はT-betの発現または活性を阻害する化合物として同定される。

#### 【0113】

レポーター遺伝子構築物の使用の代わりに、T-betの発現または活性を調節する化合物が他の「読み取り(read-out)」を用いて同定できる。例えば、指標細胞はT-bet発現ベクターを用いてトランスフェクションでき、供試化合物の存在および不在でインキュベーションされ、そしてTh1-関連サイトカイン産生は指標細胞内のサイトカインmRNA（例えばインターフェロン- $\gamma$  mRNA）または培地上清内へのサイトカイン分泌（例えばインターフェロン- $\gamma$ ）を検出して評価できる。サイトカインmRNAを検出するための標準方法、例えば逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)は当該技術分野では公知である。培地上清内のサイトカインタンパク質を検出するための標準方法、例えば酵素連結免疫吸着法(ELISA)も当該技術分野では公知である。

## 【0114】

以上に記載のように、本発明は、T - b e t と相互作用するタンパク質（例えばTh1細胞内のタンパク質）を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。

## 【0115】

一つの態様では、このようなアッセイは、当該技術分野では公知のツーハイブリッドアッセイ（相互作用トラップアッセイとも呼ばれる）に基づいて設計できる（例えばField 米国特許（US）第5,283,173号；Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232；Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054；Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924；およびIwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696参照）。ツーハイブリッドアッセイは、一般に特定の標的タンパク質と相互作用するタンパク質を同定するために使用される。このアッセイは、機能性転写活性化物質を再構築する相互作用が可能なタンパク質を同定するために遺伝子融合を利用する。転写活性化物質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインから成り、ここで両方のドメインは標的配列から下流側の遺伝子を転写を活性化することを要求される（例えばGAL4に対する上流活性化物質配列（USA））。標的「餌(bait)」タンパク質をコードするDNA配列がこれらのドメインのいずれかにDNA融合されそして配列のライブラリーは他のドメインに融合される。標的 - 融合タンパク質（例えば標的GAL4 - 融合「餌」）に結合できる「魚(fish)」融合タンパク質（融合ライブラリーから作製）は、一般に二つのドメイン（DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメイン）を標的配列から下流に挿入されたレポーター遺伝子の転写を活性化するために十分近位に持ってくる。従って「魚」タンパク質は、機能性転写活性化物質を再構築するその能力により同定できる（例えば機能性GAL4トランス活性化物質）。

## 【0116】

この一般的なツー - ハイブリッド系は、標的T - b e t 融合タンパク質（例えば「餌」としてのT - b e t / GAL4結合ドメイン融合物）の構築によりT - b e t と相互作用する細胞（例えばTh1細胞）内のタンパク質および「魚」融合タンパク質のcDNAライブラリー（例えばcDNA / GAL4）活性化ドメ

インライブラリー)の同定に適用でき、ここでcDNAライブラリーは関係する細胞タイプ(例えばTh1細胞)のmRNAから調製でき、そしてこれらの構築物を、T-betに反応する調節配列(例えばIL-2プロモーター配列、例えば以上に考察)に連結するレポーター遺伝子構築物も含む宿主細胞内に導入する。好ましくは、T-betのトランス活性化ドメイン(これは5'および3'の両方に位置する)は、「餌」構築物内に欠失するであろう。好ましい態様では、餌構築物は、T-boxドメインを含む。一つの態様では、チロシンリン酸化の少なくとも一つの部位も含まれる。優性陰性T-betタンパク質も、相互作用に必要なT-betの部位をさらに定位するために相互作用物質のスクリーニングに使用できる。T-betと相互作用するタンパク質をコードするcDNAは、レポーター遺伝子構築物のトランス活性化に基づいて同定できる。

#### 【0117】

あるいは、「シングル-ハイブリッド」アッセイ、例えばSieweke, M.H. et al. (1996) Cell 85:49-60 記載のものは、T-betと相互作用するタンパク質を同定するために使用できる。このアッセイは、上記のツーハイブリッド系の変形である。この系では、「餌」は、トランス活性化ドメインが除去された転写因子(例えばトランス活性化ドメインが除去されたT-bet)であり、そして「魚」は、非融合cDNAライブラリーである(例えばTh1細胞から調製したcDNAライブラリー)。これらの構築物は、T-betに反応する調節配列(例えばT-box結合領域、例えばT-betに反応するIL-2プロモーターの領域)に連結されたレポーター遺伝子構築物も含む宿主細胞(例えば酵母細胞)内に導入される。T-betと相互作用するタンパク質をコードするcDNAは、レポーター遺伝子構築物のトランス活性化に基づいて同定できる。

#### 【0118】

別の態様では、T-bet標的遺伝子を単離するための代表差異分析(representational differential analysis)(RDA)およびマイクロチップ(microchip)DNAアレイ分析がある。例えば、PCRと組み合わせた差異ディスプレイまたは差し引き法(RDA:例えばHubank, M. % Schatz, D.G., 1994, Nuc. Acid Res. 22, 5640-5648; Chang Y. et al., 1994, Science 266: 1865; von Stein

O.D. et al., 1997, Nuc. Acid Res. 25:2598; Lisitsyn, N. & Wigler, M., 1993, Science 259, 946 参照) は差し引きまた非差し引きプローブを用い、または最近では、DNAマイクロチップアレイハイブリダイゼーション(Welford et al., 1998, Nucl. Acid. Res. 15:3059)が使用できる。このようなアッセイを行う場合に、種々の細胞、例えば正常細胞、T - b e tを発現するように操作された細胞、またはT - b e t欠失またはT - b e t過剰発現のマウス(例えばトランスジェニック非 - ヒト動物)からの細胞も使用できる。

#### 【0119】

上記のように、本発明は、T - b e tとT - b o x結合領域(例えばIL - 2遺伝子調節領域)の相互作用を調節する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。DNA結合タンパク質と標的DNA配列の相互作用を検出するアッセイは当該技術分野で公知である(例えば電気泳動移動度シフトアッセイ、DNAアーゼIフットプリントアッセイなど)。供試化合物の存在または不在におけるこのアッセイを行う場合に、これらのアッセイは、DNA結合タンパク質とその標的DNA配列との相互作用を調節(例えば阻害または促進)する化合物を同定するために使用できる。

#### 【0120】

一つの態様では、供試化合物の存在下でのDNA断片へのT - b e tの結合の量は、供試化合物の不在下でのDNA断片へのT - b e tの結合の量より大きく、その場合に供試化合物はT - b e tの結合を促進する化合物として同定される。別の態様では、供試化合物の存在下でのDNA断片へのT - b e tの結合の量は、供試化合物の不在下でのDNA断片へのT - b e tの結合の量より小さく、その場合に供試化合物はT - b e tの結合を阻害する化合物として同定される。

#### 【0121】

本発明のさらの別の態様は、細胞内のT - b e t活性を調節方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、細胞内のT - b e t活性が調節されるようにT - b e t活性を調節する薬剤と接触させることを含む。この薬剤は、細胞内のT - b e tタンパク質の活性の調節により、またはT - b e t遺伝子の転写またはT - b e t m R N Aの翻訳の調節により作用してもよい。本明細書中に使用する場合

に、用語「調節」は、T - b e t 活性を阻害または低下およびT - b e t 活性を刺激または増進することを含むと考える。従って、一つの態様では、薬剤はT - b e t 活性を阻害する。別の態様では、薬剤はT - b e t 活性を刺激する。

#### 【0122】

さらに別の態様では、本発明は、細胞によるTヘルパー - タイプ2およびTヘルパー - タイプ1サイトカインの量の調節のための方法を提供する。この方法は、細胞を、T - b e t の活性を調節する薬剤と接触させることを含む。例えば、T - b e t 活性を刺激する薬剤は、T h 1 サイトカインI F N - を上昇制御し、一方、これらの同じ薬剤は、T h 2 サイトカインI L - 4 を下降制御する。

#### 【0123】

別の態様では、本発明は細胞により産生されるサイトカインのパターンを調節するための方法を提供する。本方法は、細胞をT - b e t の活性を調節する薬剤と接触させることを含む。例えば、T - b e t 活性を刺激する薬剤は、通常はI F N - を産生しない細胞内でI F N - 産生を誘導でき、そしてI L - 4 産生を抑制できる。このような薬剤は、例えばT h 2 のサイトカイン分泌プロフィールをT h 1 細胞のものに転向するために使用できる。

#### A . 阻害剤

本発明の調節方法に従って、T - b e t 活性は、細胞を阻害剤と接触させることにより細胞内で阻害される。本発明の阻害剤は、例えばT - b e t の発現または活性を阻害するように作用する細胞内結合分子であることができる。本明細書内に使用する場合に、用語「細胞内結合分子」は、タンパク質自体、タンパク質またはタンパク質をコードする核酸（例えばm R N A 分子に）またはタンパク質が通常相互作用する標的に（例えばT - b e t が結合するD N A 標的配列に）結合することによりタンパク質の発現または活性を阻害するように細胞内で作用する分子を含むと考える。細胞内結合分子の例は、以下にさらに詳細に記述するが、アンチセンスT - b e t 核酸分子（例えばT - b e t m R N A の翻訳を阻害する）、細胞内抗T - b e t 抗体（例えばT - b e t タンパク質の活性を阻害）およびT - b e t タンパク質の優性陰性変異体を含む。

#### 【0124】

一つの態様では、本発明の阻害剤は、T - b e t をコードする遺伝子または該遺伝子の一部分に相補的なアンチセンス核酸分子、または該アンチセンス核酸分子をコードする組換え発現ベクターである。細胞内の特定のタンパク質の発現を下降制御するためのアンチセンス核酸の使用は、当該技術分野で周知である（例えばWeintraub, H. et al., 「遺伝子分析のための分子的道具としてのアンチセンスRNA」 Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986; Askari, F.K. and McDonnell, W.M. (1996) N. Eng. J. Med. 334:316-318; Bennett, M.R. and Schwartz, S.M. (1995) Circulation 92:1981-1993; Mercola, D. and Cohen, J.S. (1995) Cancer Gene Ther. 2:47-59; Rossi, J.J. (1995) Br. Med. Bull. 51:217-225; Wagner, R.W. (1994) Nature 372:333-335)。アンチセンス核酸分子は、他の核酸分子（例えばmRNA配列）のコーディング鎖に相補的であり、従って他の核酸分子のコーディング鎖に水素結合が可能であるヌクレオチド配列を含んでなる。mRNAの配列に相補的なアンチセンス配列は、mRNAのコード領域内に見られる配列、mRNAの5'または3'非翻訳領域またはコード領域と非翻訳領域とを架橋する領域（例えば5'非翻訳領域とコード領域との結合部分）に相補的であることができる。さらに、アンチセンス核酸は、mRNAをコードする遺伝子の調節領域への配列、例えば転写開始配列または調節要素に相補的であることができる。好ましくは、アンチセンス核酸は、コーディング鎖上の開始コドンの前またはそれを含む領域またはmRNAの3'非翻訳領域に相補的であるように設計される。細胞内でT - b e t タンパク質の発現を阻害するためのアンチセンス核酸は、T - b e t タンパク質をコードする核酸配列（例えば配列番号1または3）に基づいて設計し、WatsonおよびCrickの塩基対法則に従って構築できる。

#### 【0125】

アンチセンス核酸は、種々の異なる形で存在できる。例えば、アンチセンス核酸は、T - b e t 遺伝子の一部分に対してのみ相補的であるオリゴヌクレオチドであることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該技術分野では公知の化学合成法を用いて構築できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性を上昇するためまたはアン

チセンスとセンス核酸の間に形成された二本鎖の物理的安定性を上昇させるために設計された種々の変性ヌクレオチドを用いて化学的に合成でき、例えばホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用できる。培地中の細胞内のT - b e t 発現を阻害するために、1個またはそれ以上のオリゴヌクレオチドは、培地内の細胞に、代表的には約200  $\mu$ g (オリゴヌクレオチド) / ml で加えることができる。

#### 【0126】

あるいはアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローンされた発現ベクターを用いて生物学的に産生できる(すなわち挿入された核酸から転写された核酸は、関係する標的核酸に対してアンチセンス方向となるであろう)。関係する細胞内のアンチセンスRNA分子の発現を指令し、アンチセンス方向にクローンされた核酸に操作可能に連結した調節配列が選択でき、例えば、アンチセンスRNAの発現を構成的、組織特異的または誘導可能に指令するプロモーターおよび/またはエンハンサーまたはその他の調節配列が選択できる。例えば、アンチセンスRNAの誘導可能な発現のために、誘導可能な真核調節系、例えばT e t 系(例えばGossen, M. and Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268:1766-1769; PCT公開番号W094/29442号およびPCT 公開番号W096/01313号に記載)が使用できる。アンチセンス発現ベクターは、組換え発現ベクターに関して以上に記載したようにして調製できるが、しかし、cDNA(またはそのタンパク質)はアンチセンス方向にベクター中にクローンされる。アンチセンス発現ベクターは、例えば組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形であることができる。アンチセンス発現ベクターは、標準のトランスフェクション技術、例えば組換え発現ベクターに関して以上に記載した方法を用いて細胞内に導入できる。

#### 【0127】

別の態様では、阻害剤として使用するためのアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、これらが相補領域を有する一本鎖核酸、例えばmRNAを開裂できるリボヌクレオチドを有する触媒性RNA分子である(リボザイムに関する総説としては、例えばOhkawa, J. et al. (1995) J. Biochem. 118:251-258

; Sigurdsson, S.T. and Eckstein, F. (1995) Trends Biotechnol. 13:286-289  
; Rossi, J.J., (1995) Trends Biotechnol. 13: 301-306; Kiehn, M. et al.  
(1995) J. Mol. Med. 73:65-71参照)。T - b e t mRNAに特異性を有するリボザイムは、T - b e t cDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計できる。例えば、テトラヒメナL - 19IVS RNAの誘導体は、活性部位の塩基配列が、T - b e t mRNA内で開裂される塩基配列に相補的であるように構築できる。例えば米国特許(US)第4,987,071号および第5,116,742号(両方共にChech et al.)参照。あるいはT - b e t mRNAは、RNA分子のプールから特異性リボヌクレオチド活性を有する触媒生RNAを選択するために使用できる。例えばBartel, D. and Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418参照。

#### 【0128】

細胞内のT - b e tの発現および/または活性を阻害するために使用できる阻害剤の別の種類は、T - b e tタンパク質に特異的な細胞内抗体である。細胞内のタンパク質機能を阻害するための細胞内抗体の使用は当該技術分野では公知である(例えばCarlson J.R. (1988) Mol. Cell Biol. 8:2638-2646; Biocca S. et al. (1990) EMBO J. 9: 101-108; Werge T.M. (1990) et al., FEBS Letters 274:193-198; Carlson J.R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-7428; Marasco W.A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Biocca S. et al. (1994) Bio/Technology 12:396-399; Chen, S-Y. et al. (1994) Human Gene Therapy 5:595-601; Duan, L. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5075-5079; Chen, S-Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5932-5936; Beerli, R.R. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936; Beerli, R.R. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672; Mhashilkar, A.M. et al. (1995) RMBIO J. 14:1542-1551; Richardson, J. H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; PCT公開番号W09/4/02610(Marasco et al.); およびPCT 公開番号W095/03832(Duan et al.)参照)。

#### 【0129】

細胞内抗体を用いてタンパク質活性を阻害するために、細胞内へのベクターの導入の際に、抗体鎖が細胞の細胞内コンパートメント内の機能性抗体として発現されるような形の抗体鎖をコードする組換え発現ベクターを調製する。本発明の阻害方法に従うT - b e t 活性の阻害のために、T - b e t タンパク質を特異的に結合する細胞内抗体を細胞の細胞質内に発現する。細胞内抗体発現ベクターを調製するために、関係する標的タンパク質、例えばT - b e t に対して特異的な抗体鎖をコードする抗体軽鎖および重鎖 c D N A を、代表的にはT - b e t タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマから単離する。抗T - b e t モノクローナル抗体、または組換え抗 - T - b e t モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、上記のようにして産生できる。T - b e t タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体が同定されると(例えばハイブリドーマ誘導モノクローナル抗体またはコンビナトリアルライブラリーからの組換え抗体)、モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖をコードするD N A は、標準の分子生物学技術により単離される。ハイブリドーマ誘導抗体に対して、軽鎖および重鎖D N A は、例えばP C R 増幅またはc D N A ライブラリースクリーニングにより得ることができる。例えばファージ表示ライブラリーからの組換え抗体に対して、軽鎖および重鎖をコードするD N A は、ライブラリースクリーニング過程の間に単離された表示パッケージ(例えばファージ)から回収できる。それからP C R プライマーまたはc D N A ライブラリープローブが調製できる抗体軽鎖および重鎖遺伝子のヌクレオチド配列は、当該技術分野では公知である。例えば、多数のこのような配列は、Kabat, E.a. et al., (1990)「免疫学で関係するタンパク質の配列」(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)および「V b a s e」ヒト - 生殖細胞系配列データベースに公開されている。

#### 【0130】

一旦入手されると、抗体軽鎖および重鎖配列は、標準方法を用いて組換え発現ベクター内にクローンされる。軽鎖および重鎖の細胞質発現を可能とするために、軽鎖および重鎖の疎水性リーダーをコードするヌクレオチド配列を除去する。

細胞内抗体発現ベクターは、種々の異なる形の中の一つとして細胞内抗体をコードできる。例えば、一つの態様では、ベクターは全長抗体が細胞内に発現されるように、全長抗体軽鎖および重鎖をコードする。別の態様では、ベクターは全長軽鎖はコードするがしかしF a b断片が細胞内に発現されるように、重鎖のVH / CH1領域のみをコードする。最も好ましい態様では、一本鎖抗体 ( s c F v ) をコードし、ここで、軽鎖および重鎖の変動領域がフレキシブルなペプチドリinker (例えば ( G l y<sub>4</sub> S e r )<sub>3</sub> ) により連結されそして一本鎖分子として発現される。細胞内のT - b e t活性を阻害するために、T - b e t細胞内抗体をコードする発現ベクターを、以下に記載する標準トランスフェクション方法により細胞内に導入する。

#### 【0131】

本発明の阻害剤のさらに別の形は、本明細書内で優性陰性阻害剤とも呼ばれるT - b e tの阻害形、例えばチロシンリン酸化部位が変異されているT - b e tの形、または例えばトランス活性化ドメインが除去されているT - b e tの変異形である。このような優性陰性T - b e tタンパク質は、T - b e tタンパク質をコードする組換え発現ベクターを用いて細胞内に発現でき、これは標準トランスフェクション法により細胞内に導入される。T - b e t欠失チロシンリン酸化部位またはトランス活性化ドメインの変異形を発現するために、T - b e tのトランス活性化ドメインをコードするヌクレオチド配列を、標準組換えDNA技術を用いてT - b e tコード配列から変異または除去する。末端切除DNAを組換え発現ベクター内に挿入し、次いでこれを細胞内に導入し、細胞内でT - b e tの改変された形の発現を可能とする。

#### 【0132】

T - b e tタンパク質の活性を阻害するために使用できる他の阻害剤は、T - b e t活性を直接阻害するかまたはT - b e tと標的DNAまたは他のタンパク質との間の相互作用を阻害する化学化合物である。このような化合物は、このような化合物を選択するスクリーニングアッセイを用いて同定でき、以上に記載されている。

B . 刺激剤

本発明の調節方法に従って、T - b e t 活性は刺激剤と細胞とを接触させて細胞内で刺激される。このような刺激剤の例は、活性T - b e t タンパク質および細胞内でのT - b e t 活性を上昇させるように細胞内に導入されるT - b e t をコードする核酸分子を含む。好ましい刺激剤は、T - b e t タンパク質をコードする核酸分子であり、ここで核酸分子は、細胞内の活性T - b e t タンパク質の発現のために適する形で細胞内に導入される。細胞内でT - b e t タンパク質を発現するために、代表的には、T - b e t をコードするDNAを、本明細書中に記載するように標準分子生物学技術を用いて最初に組換え発現ベクター内に導入する。T - b e t コードDNAは、例えばT - b e t ヌクレオチド配列に基づくプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いる増幅により得ることができる。T - b e t コードDNAの単離または増幅に続いて、DNA断片を発現ベクター内に導入しそして本明細書中に記載する標準方法により標的細胞内にトランスフェクションする。

#### 【0133】

T - b e t タンパク質の活性を刺激するために使用できる他の刺激剤は、細胞内のT - b e t 活性を刺激する化学化合物、例えばT - b e t タンパク質を直接刺激する化合物およびT - b e t と標的DNAまたは他のタンパク質との間の相互作用を促進する化合物である。このような化合物は、以上に詳細に記載したような化合物を選択するスクリーニングアッセイを用いて同定できる。

#### 【0134】

本発明の調節方法は、生体外(例えば細胞を薬剤と一緒に培養するかまたは培地中の細胞内へ薬剤を導入することにより)、あるいは、生体内(例えば対象体に薬剤を投与するかまたは対象体の細胞内に薬剤を、例えば遺伝子治療により導入することにより)で行うことができる。生体外で調節方法を実施するために、細胞を対象体から標準方法により入手しそして本発明の調節剤を用いて生体外でインキュベーション(すなわち培養)して細胞内のT - b e t 活性を調節できる。例えば、末梢血液単球(PBMC)を対象体から入手しそして密度勾配遠心分離、例えばフィコル/ハイパック(Ficoll/Hypaque)により単離できる。特異性細胞集団は、標準法を用いて除去または濃縮できる。例えば、T細胞は、例えばT

細胞表面マーカーに対する抗体を用いる正の選択、例えば細胞を特異性一次モノクローナル抗体 (mAb) と一緒にインキュベーションし、次いで一次mAbを結合する二次抗体を用いて被覆した磁気ビーズを用いてmAbを結合する細胞の単離により濃縮できる。特異性細胞集団は、標準方法による蛍光活性化細胞選別により単離できる。希望する場合には、本発明の調節剤を用いて生体外で処理された細胞は、対象体に再投与できる。対象体に投与するために、対象体に投与する前に細胞から培地内の残留薬剤を最初に除去することが好ましい。これは、例えば細胞のフィコル/ハイパック勾配遠心分離により行うことができる。細胞の生体外遺伝子モディフィケーションおよび引き続いての対象体への再投与のこれ以上の考察は、米国特許第5,399,346号(W.F. Anderson et al) 参照。

#### 【0135】

対象体内の生体内調節方法を実行するために、調節剤は、対象体の細胞内のT - b e t 活性が調節されるように対象体に投与できる。用語「対象体」は、免疫反応を誘発できる生体を含むと考える。好ましい対象体は哺乳類である。対象体の例は、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ヤギおよびヒツジである。

#### 【0136】

核酸 (T - b e t タンパク質、アンチセンスRNA、細胞内抗体または優性陰性阻害剤をコードする組換え発現ベクターを含む) を含んでなる刺激または阻害剤に対して、薬剤は、生体内の細胞内へ核酸 (例えばDNA) を導入するための当該技術分野では公知の方法を用いて対象体の細胞内へ導入できる。このような方法の例は、非ウイルスおよびウイルス法を含み、下記を含む。

#### 【0137】

直接注入：裸のDNAは、DNAを細胞内への直接注入して生体内細胞内に導入できる (例えばAcsadi et al. (1991) Nature 332:815-818; Wolff et al. (1990) Science 247:1465-1468参照)。例えばDNAを細胞内へ生体内で注入するための投与装置 (例えば「ジーンガン (gene gun)」) が使用できる。このような装置は、市場で入手できる (例えばBioRadから)。

#### 【0138】

カチオン性脂質：裸のDNAは、DNAをカチオン性脂質と複合するかまたはDNAをカチオン性リポソーム内にカプセル化して生体内細胞内に導入できる。適当なカチオン性脂質製剤の例は、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]N,N,N-トリエチルアンモニウム・クロリド(DOTMA)および1,2-ミリスチルオキシ-プロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウム・ブロミド(DMRIE)とジオレオイル・ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)との1:1モル比を含む(例えばLogan, J.J. et al. (1995) Gene Therapy 2: 38-49; San H. et al. (1993) Human Gene Therapy 4: 781-788 参照)。

#### 【0139】

受容体-媒介DNA取り込み：裸のDNAは、DNAをカチオン、例えば細胞表面受容体に対するリガンドとカプリングするポリリシンに複合して生体内で細胞に導入することもできる(例えばWu, G and Wu, C.H. (1988) J. Biol. Chem. 263:14621; Wilson et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:963-967;および米国特許(US)第5,166,320号参照)DNA-リガンド複合体の受容体への結合は、受容体-媒介エンドサイトーシスによりDNAの取り込みを容易にする。本来的にエンドソームを破壊するアデノウイルスキャプシドに連結し、これにより細胞質内へ物質を放出するDNA-リガンド複合体は、細胞内リソソームによる複合体の分解を回避するために使用できる(例えばCuriel et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850; Cristiano et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126参照)。

#### 【0140】

レトロウイルス：欠損ウイルスは、遺伝子治療目的の遺伝子転移に使用するために特性が良く知られている(総説はMiller, A.D. (1990) Blood 76:271参照)。組換えレトロウイルスは、レトロウイルスゲノム内に組み込まれた関係するヌクレオチド配列を持って構築できる。さらに、レトロウイルスゲノムの一部分を除去してレトロウイルス複製欠損を与えることができる。次いで、複製欠損レトロウイルスをビリオン内にパッケージし、これは標準技術によりヘルパーウイルスの使用を通じて標的細胞を感染するために使用できる。組換えレトロウイルス

作製およびこのウイルスを用いる生体外および生体内での細胞感染のためのプロトコールは、「分子生物学の最近のプロトコール」(Current Protocols in Molecular Biology, Ausbel, F.M. et al.(eds.) Greene Publishing Associates, (1989) 第9.10-9.14章およびその他の標準実験マニュアル中に見いだすことができる。適当なレトロウイルスの例は、pLJ、pZIP、pWEおよびpEMであって、これらは当該技術分野の熟練者には良く特性が知られている。適当なパッケージングウイルス系統の例は、Crip、Cre、2およびAmである。レトロウイルスは、種々の遺伝子を多数の異なる細胞タイプ、上皮細胞、内皮細胞、リンパ球、筋芽細胞、肝細胞、骨髄細胞を含めて、生体外または生体内で導入するために使用される(例えばEglitis, et al. (1985) Science 230: 1395-1398; Danos and Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; 米国特許(US)第4,868,116号; 米国特許(US)第4,980,286号; PCT出願W089/07136; PCT出願W089/02468; PCT出願W089/05345; および PCT出願W092/07573参照)。レトロウイルスゲノム(およびこれに挿入された外来核酸)を宿主ゲノム内に組み込んで安定に核酸を細胞内に導入するために、レトロウイルスベクターは、標的細胞分裂を必要とする。従って、標的細胞の複製を刺激する必要があるであろう。

#### 【0141】

アデノウイルス: アデノウイルスのゲノムは、これが関係する遺伝子産物をコードしそして発現するがしかし正常な溶解ウイルスライフサイクル中で複製する能力に関しては不活性化されるように操作できる。例えばBerkner et al. (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al. (1991) Science 252:431-434; およ

びRosenfeld et al. (1992) Cell 68: 143-155参照。アデノウイルス株Adタイプ5d1324またはその他のアデノウイルスの株(例えばAd2、Ad3、Ad7など)から誘導される適当なアデノウイルスベクターは、当該技術分野の熟練者には周知である。組換えアデノウイルスは、これらが有効な遺伝子伝達ビヒクルであるために細胞分裂を必要とせずそして気道外皮(Rosenfeld et al. (1992)、以上に引用)、内皮細胞(Lemarchand et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-6486)、肝細胞(Herz and Gerard (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816)、および筋肉細胞(Quantin et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584)を含む広範囲の種々の細胞タイプに感染するために使用できるという長所を有する。さらに、導入されたアデノウイルスDNA(およびその中に含まれる外来DNA)は、宿主細胞のゲノム内に組み込まれないでエピソームとして残り、これにより、導入されたDNAが宿主ゲノム内に組み込まれる状況(例えばレトロウイルスDNA)における挿入突然変異誘発の結果として起きる可能性がある問題を回避する。さらに、外来DNAに対するアデノウイルスゲノムの保持能力は、他の遺伝子伝達ベクターと比較して大きい(8 kbまで)(Berkner et al, 以上に引用; Haj-Ahmand and Graham (1986) J. Virol. 57:267)。現在使用されている大部分の複製 - 欠損アデノウイルスベクターは、ウイルスE1およびE3遺伝子の全体または一部分を欠損しているが、しかしレトロウイルス遺伝物質の80%は保持している。

#### 【0142】

アデノ関連ウイルス：アデノ関連ウイルス(AAV)は、有効な複製および生産的なライフサイクルのためのヘルパーウイルスとしてアデノウイルスまたはヘルペスウイルスのような他のウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである(概説としてMuzyszka et al. Curr, Topics in Micro. and Immunol. (1992) 158:97-129 参照)。これはまたそのDNAを分裂しない細胞内に組込んでもよく、そして安定な組込みを高い頻度で発現する数少ないウイルスの一つである(例えばFlotte et al. (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828;およびMcLaughlin et al. (1989) J. Virol. 62:1963-1973 参照)。AAVの300塩基対しか含まない

ベクターをパッケージングできそして組込みができる。外来性DNAに対するスペースは、約4.5 kbに限られる。Tratschin et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:3251-3260 により記載されたようなAAVベクターは、DNAを細胞内に導入するために使用できる。種々の核酸がAAVベクターを用いて種々の細胞タイプ内に導入された(例えばHermonat et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985) Mol. Cell Biol. 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin et al. (1984) J. Virol. 51:611-619; およびFlotte et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790 参照)。

#### 【0143】

特定の発現ベクター系の効力および細胞内に核酸を導入する方法は、当該技術分野で日常的に使用されている標準の方法により評価できる。例えば、細胞内に導入されるDNAは、フィルターハイブリダイゼーション技術(例えばサザンブロットティング)で検出でき、そして導入されたDNAの転写により産生されたRNAは、例えばノーザンブロットティング、RNAアーゼ保護または逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により検出できる。遺伝子産物は、適当なアッセイ、例えば産生されたタンパク質の免疫学的検出、例えば特異性抗体を使用する方法により、または遺伝子産物の機能的活性の免疫学的検出により検出できる。

#### 【0144】

好ましい態様では、T-betをコーディングするレトロウイルス発現ベクターを生体内細胞内でのT-betタンパク質発現に使用し、これにより生体内のT-betタンパク質活性を刺激する。このようなレトロウイルスベクターは、当該技術分野では公知の標準方法に従って調製できる(考察は上記参照)。

#### 【0145】

調節剤、例えば化学的化合物は、対象体に薬剤組成物として投与できる。このような組成物は、代表的には調節剤および薬剤的に許容できるキャリアーを含んでなる。本明細書中に使用する場合に、用語「薬剤的に許容できるキャリアー」は、あらゆる溶剤、分散媒体、被覆、抗細菌および抗真菌薬剤、等張剤および吸

収遅延剤等を含み、薬剤投与に適するものを考える。このような媒体および薬剤の薬剤的な活性物質のための使用は、当該技術分野では周知である。活性化化合物と適合しないすべての慣用の媒体または薬剤を除いて、組成物中へのこれらの使用を考える。補足の活性化化合物も組成物内に混和されることができる。薬剤組成物は、上記のI V項に記載のようにして調製できる。

#### 【0146】

本明細書中に記載のTh1細胞の発生、およびTh2表現型の抑制における主要な調節剤としてのT-betの同定は、本発明の調節方法を用いて、種々の臨床状態における細胞サブセットの選択操作を可能とする。本発明の刺激方法（すなわちT-bet活性を増進するための刺激剤を使用する方法）は、IFN- $\gamma$ の産生と同時にTh1反応の促進およびIL-2およびIL-4両方の下降制御を同時に行い、従ってTh2反応の下降調節をもたらす。反対に、本発明の阻害方法（すなわちT-bet活性を下降調節するための抑制剤を使用する方法）は、IFN- $\gamma$ の産生の阻害と同時にTh1反応の下降制御およびTh2反応の促進をもたらす。従って、Th1反応が有益な疾患状態を治療するためには、Th1反応を促進し一方ではTh2反応を下降制御するように本発明の刺激方法を選択する。あるいは、Th2反応が有益な疾患状態を治療するためには、Th1反応を下降制御し一方ではTh2反応を促進するように本発明の阻害方法を選択する。疾患状態の治療への本発明の方法の適用は、病状の治癒、病状に関連する症状の種類および数の減少を長期または短期のいずれかでもたらすか（すなわち病状の改善）または単に対象体に一時的な有利な作用をもたらす。

#### 【0147】

優勢なTh1またはTh2タイプの反応と関連する多数の疾患状態が同定され、これらの病状を患う個体内に存在する反応の種類と同定および調節の利益を受けるであろう。本発明の免疫調節的方法のこれらの疾患への適用をさらに以下に記載する。

#### A. アレルギー

アレルギーは、IgGを通じて媒介され、その産生は、Th2細胞およびこれにより産生されるサイトカインの活性により調節される。アレルギー反応におい

て、IL-4がTh2細胞により産生され、これはIgE抗体の産生およびアレルギー反応を媒介する細胞、すなわちマスト細胞および好塩基球の活性化をさらに刺激する。IL-4は、好酸球媒介炎症反応にも重要な役割を演じる。従って、本発明の刺激方法は、病原性IgG抗体の産生を下降制御する手段として、アレルギー患者におけるTh2関連サイトカイン、特にIL-4の産生を阻害することができる。刺激剤は、対象体に直接投与してもよく、または細胞（例えばThp細胞またはTh2細胞）を対象体から入手し、刺激剤と生体外で接触させそして対象体に再投与してもよい。さらに、ある種の状態では、アレルゲンを刺激剤または刺激剤を用いて処置した細胞と一緒に対象体に同時投与して、アレルゲン特異性反応を阻害（すなわち脱感作）すると有益である。処置は、他のTh1-促進剤、例えばサイトカインIL-12またはTh2-関連サイトカイン（例えば抗IL-4抗体）に対する抗体を、Th1タイプ反応をさらに刺激するために十分な量でアレルギー対象体に投与してさらに促進してもよい。

#### B. ガン

Th2-促進サイトカインの発現は、ガン患者内で上昇すると報告されており（例えばYamamura, M., et al. (1993) J. Clin. Invest. 91: 1005-1010; Pisa, P., et al. (1992) Proc Natl. Acad. Sci. USA 89:7708-7712）そして悪性疾患はしばしば疾患の経過の悪化に従ってTh1タイプ反応からTh2タイプ反応へのシフトが関連している。従って、本発明の刺激方法は、Th1からTh2へのシフトに対抗して作用する手段としてガン患者内のTh2関連サイトカインの産生を阻害し、これにより患者内で起きているTh1反応を促進し、疾患の経過を改善するために使用できる。刺激方法は、ガンを有する対象体への刺激剤の直接投与でも、または対象体から得た細胞（例えばThpまたはTh2細胞）の刺激剤を用いる生体外処置および引き続いての対象体への細胞の再送達のいずれでも可能である。処置は、他のTh1促進剤、例えばサイトカインIL-12またはTh2-関連サイトカインへの抗体（例えば抗IL-4抗体）を、レシピエントに、Th1タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で投与してさらに促進してもよい。

#### C. 感染疾患

Th 2 - 促進サイトカインの発現は、HIV感染、肺炎、リューシマニア症、住血吸虫症、糸状線虫感染および腸管線虫感染を含む種々の感染疾患の間に増加すると報告されており（例えばShearer, G.M. and Clerici, M. (1992) *Prog. C hem. Immunol.* 54:21-43; Clerici, M. and Shearer, G.M. (1993) *Immunology Today* 14:107-111; Fauci, A.S. (1988) *Science* 239:617-623; Locksley, R.M. and Scott, P (1992) *Immunoparasitology Today* 1: A58-A61; Pearce, E.J. et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173:159-166; Grzych, J-M., et al. (1991) *J. Immunol.* 141:1322-1327; Kullberg, M.C., et al. (1992) *J. Immunol.* 148:3264-3270; Bancroft, A.J. et al. (1993) *J. Immunol.* 150:1395-1402; Pearlman, E. et al. (1993) *Infect. Immun.* 61:1105-1112; Else, K.J., et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:347-351 参照)、そしてこのような感染疾患は、免疫反応におけるTh 1からTh 2へのシフトと関連もしている。従って、本発明の刺激方法は、感染疾患を有する対象体内に、Th 1からTh 2へのシフトに対抗する手段として使用して、Th 2関連サイトカインの産生を阻害して、これにより患者内の進行しているTh 1反応を促進し感染の経過を改善することができる。刺激方法は、感染疾患を有する対象体への阻害剤の直接投与または対象体から得た細胞（例えばTh pまたはTh 2細胞）の刺激剤を用いる生体外処置、その後の対象体への細胞の再投与のいずれかを含むことができる。処置は、他のTh 1促進剤、例えばサイトカインIL - 2またはTh 2関連サイトカインへの抗体（例えば抗IL - 4抗体）をレシピエントへ、Th 1タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で投与してさらに促進してもよい。

#### D . 自己免疫疾患

本発明の阻害方法は、Th 2タイプ機能不全と関連する自己免疫疾患の処置に治療的に使用できる。多数の自己免疫疾患は、自己の組織に対して反応性でありそして失陥の病理に関するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進するT細胞の不適切な活性化の結果である。T - ヘルパー - タイプ反応の調節は、自己免疫疾患の経過に影響することができる。例えば、実験的なアレルギー性脳脊髄炎（EAE）において、疾患の誘導期間におけるIL - 4の投与によるTh 2 - タイプ反応の刺激は、自己免疫疾患の強度を低下する(Paul, W.E., et al. (1994) *C*

ell 76: 241-251)。さらに、疾患から動物の回復は、Th2 - タイプ反応の増加と関連することが示され、これはTh2特異性サイトカインの増加により証明される(Koury, S.J., et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1355-1364)。さらに、EAE分泌を抑制できるT細胞は、Th2特異性サイトカインを分泌する(Chen, C., et al. (1994) Immunity 1: 147-154)。EAEにおけるTh2タイプ反応の刺激は、疾患に対する保護作用を有するので、多発性硬化症(EAEがこれのモデルである)を有する対象体内のTh2反応の刺激は、治療的に有益であるらしい。本発明の阻害方法は、このような低下を起こさせるために使用できる。

#### 【0148】

同様に、マウス内のタイプI糖尿病におけるTh2タイプ反応の刺激は、疾患に対する保護作用を与える。実際に、IL-4(これはTh2反応を促進する)を用いるNODマウスの処置は、これらのマウス内に通常は発生するタイプI糖尿病の発症を防止または遅延する(Rapport, M.J., et al. (1993) J. Exp. Med. 178:87-99)。従って、糖尿病を患っているかまたは疑いがある対象体内のTh2反応の刺激は、疾患の作用を改善するかまたは疾患の発症を阻害するであろう。

#### 【0149】

Th2タイプ反応が有益であるさらに別の自己免疫疾患は、リウマチ様関節炎(RA)である。研究から、リウマチ様関節炎を有する患者は滑膜組織中に優勢なTh1細胞を有することが示された(Simon, A.K., et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5862-5866)。RAを有する対象体内でTh2反応を刺激して、有害なTh1反応が同時に下降調節され、これにより疾患の影響を改善することができる。

#### 【0150】

従って、本発明の阻害方法は、Th2タイプ反応が疾患の経過に有益である自己免疫疾患を患っているかまたは疑いがある対象体内にTh2 - 関連サイトカインの産生を刺激するために使用できる。この阻害方法は、対象体への阻害剤の直接投与または対象体から得た細胞(例えばThp、Th1細胞、B細胞、非リンパ細胞)の生体外処置およびその後の対象体への細胞の再投与のいずれかを含む

ことができる。処置は、さらに他のTh2促進剤、例えばIL-4自体またはTh1-関連サイトカインに対する抗体を、Th2タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で対象体に投与して促進してもよい。

#### 【0151】

Th2反応が望ましい上記の自己免疫疾患とは反対に、別の自己免疫疾患は、Th1-タイプ反応により改善されることもある。このような疾患は、本発明の刺激剤を用いて改善できる（ガンおよび感染疾患に対する上記のように）。この処置は、Th1-促進サイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）を対象体にTh1-タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で投与してさらに促進してもよい。

#### 【0152】

自己免疫疾患処置のための薬剤の効力は、ヒト疾患の上記の動物モデルで試験できる（例えば多発性硬化症のモデルとしてのEAEおよび糖尿病のモデルとしてのNODマウス）かまたは別の良く特性が知られたヒト自己免疫疾患の動物モデルで試験できる。このような動物モデルは、エリテマトーデスに対するモデルとしてのmrl/lpr/lprマウス、リウマチ様関節炎に対するモデルとしてのネズミコラーゲン誘発関節炎、およびネズミ実験重症筋無力症を含む(Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp840-856 参照)。本発明の調節（すなわち刺激または阻害）剤を試験動物に投与し、そして試験動物内の疾患の経過を、使用した特定のモデルに対する標準方法により監視する。調節剤の有効性は、未処置動物（または対象薬剤で処置した動物）と比較して、薬剤を用いて処置した動物内の疾患状態の改善により明らかとなる。

#### 【0153】

本発明に従って処置してもよい自己免疫疾患および自己免疫成分を有する疾患の限定的でない例は、真性糖尿病、関節炎（リウマチ様関節炎、若年性リウマチ性関節炎、骨関節炎、乾癬性関節炎を含む）、多発性硬化症、重症筋無力症、全身エリテマトーデス、自己免疫甲状腺症、皮膚炎（アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎を含む）、乾癬、シェーングレン症候群、シェーングレン症候群に従属する乾性角結膜炎を含む、円形脱毛症、節足動物咬傷反応によるアレルギー反応、クローン疾患、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、結腸炎、ゼンソク

、アレルギー性ゼンソク、皮膚エリテマトーデス、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、らい病拮抗反応、血節性紅斑らい。自己免疫性ぶどう膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死出血性脳障害、特発性両側進行性感覚神経性難聴、再生不全性貧血、真性赤血球貧血、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ウエグナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スチーブン - ジョンソン症候群、特発性スプルー、偏平舌癬、クローン症、重症眼障害、サルコイドーシス、初期両側肝硬変、後部ぶどう膜炎、および間質性肺繊維症を含む。

#### E . 移植

移植片拒絶および移植片受容は、グラフトレシピエント内の特定のT細胞サブセット（例えばTh1またはTh2細胞）の作用にのみ帰することはできないけれども（考察に関しては、Dallen, M.J. (1995) *Curr. Opin. Immunol.* 7:632-638参照）、多数の研究は、長期間の移植片持続における優勢なTh2反応または移植片拒絶における優勢なTh2反応を示している。例えば、移植片受容はTh2サイトカインパターンの産生に関連しおよび/または移植片拒絶はTh1サイトカインパターンの産生に関連する（例えばTakeuchi, T. et al. (1992) *Transplantation* 53: 1281-1291; Tzakis, A.G. et al., (1994) *J. Pediatr. Surg.* 29:754-756; Thai, N.L. et al. (1995) *Transplantation* 59: 274-281参照）。さらに、Th2サイトカイン表現型を有する細胞の養子移入は、皮膚移植片持続を延長し(Maeda, H. et al. (1994) *Int. Immunol.* 6, 855-862)、そして移植片体宿主病を低下する(Fowler, D.H. et al. (1994) *Blood* 84: 3540-3549; Fowler, D.H. et al. (1994) *Prog. Clin. Biol. Res.* 389:533-540)。さらに、Th2分化を促進するIL-4の投与は、心臓同種移植片持続を延長し(Levy, A.E. and Alexander, J.W. (1995) *Transplantation* 60: 405-406)、一方、Th1分化を促進する抗IL-10抗体と組み合わせたIL-12の投与は、皮膚同種移植片拒絶を増進する(Gorczyński, R.M. et al. (1995) *Transplantation* 60: 1337-1341)。

#### 【0154】

従って、本発明の阻害方法は、移植レシピエント内にTh2-関連サイトカインの産生を刺激して移植片持続を延長することができる。この阻害方法は、固体

臓器移植および骨髄移植（例えば移植片対宿主病を阻害する）の両方に使用できる。阻害方法は、移植レシピエントに対する阻害剤の直接投与でもまたは対象体から得た細胞（例えばThp、Th1細胞、B細胞、非リンパ細胞）の阻害剤を用いる生体外処置および引き続く対象体への細胞の再投与のいずれも含むことができる。処置は、さらに他のTh2促進剤、例えばIL-4自体またはTh1-関連サイトカインに対する抗体をレシピエントに、Th2タイプ反応をさらに阻害するために十分な量で投与してさらに促進できる。

#### 【0155】

上記の疾患状態に加えて、本発明の調節方法は、他の目的にも有用である。例えば、本発明の刺激方法（すなわち刺激剤を用いる方法）は、Th1促進サイトカインの商業的産生のための生体外Th1促進サイトカイン（例えばインターフェロン- $\gamma$ ）の産生を刺激するために使用できる（例えば、細胞を生体外で刺激剤と接触させてインターフェロン- $\gamma$ 産生を刺激でき、そしてインターフェロン- $\gamma$ は培養物上清から回収でき、必要な場合にはさらに精製し、そして商業使用のために包装する）。

#### 【0156】

さらに、本発明の調節方法は、対象体内の関係する抗原に対するTh1またはTh2反応のいずれかを促進するワクチン接種に適用できる。すなわち、本発明の薬剤は、Th1反応またはTh2反応のいずれかのワクチンに対する免疫反応を指令するアジュバントとして役立つことができる。例えば、関係する抗原に対する抗体反応を促進するために（すなわちワクチン接種の目的で）、抗原および本発明の阻害剤を対象体に同時投与して対象体内の抗原に対するTh2反応を促進でき、それはTh2反応が有効なB細胞ヘルプを提供しそしてIgG1産生を促進するからである。あるいは、関係する抗原に対する細胞免疫反応を促進するために、抗原および本発明の刺激剤を対象体に同時投与して対象体内の抗原に対するTh1反応を促進でき、それはTh1反応が細胞媒介免疫反応（例えば遅延した過敏性反応）の発生を有利とするからである。関係する抗原および調節剤は、単一の薬剤組成物内に一緒に、または別々の組成物内に調剤できる。好ましい態様では、関係する抗原および調節剤は、対象体に同時に投与される。あるいは

、ある状況では、抗原を最初に、次いで調節剤を投与するか、または逆が望ましいこともある（例えば、本来的にTh1反応を引き起こす抗原の場合には、最初に抗原を単独で投与して反応を刺激し、次いで阻害剤を単独または抗原のブーストと一緒に投与して免疫反応をTh2反応にシフトされると有益である）。

#### 【0157】

本発明は、さらに下記の実施例で説明され、これらは限定的と解釈してはならない。この明細書中に引用したすべての引用文献、特許および公開特許の内容は、引用することにより編入される。さらに、本明細書中で言及した公開データベース内に寄託されたすべてのヌクレオチドおよび核酸配列も、引用することにより編入される。

#### 【0158】

pJG4-5ベクターのEcoRI部位内にクローンされたマウスT-bet cDNAを含んでなる核酸分子は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) に1999年11月9日付けで寄託され、そして寄託番号PTA-930が割り当てられた。PCR2.1-TOPOベクター内にクローンされたヒトT-bet cDNA（ヒトTh1クローンROT-10からのRNAから調製）含んでなる核酸は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) に2000年1月28日付けで寄託され、そして寄託番号PTA-1339が割り当てられた。両方の寄託物はブダペスト条約の規定に準拠してなされた。

#### 【0159】

##### 実施例

下記の実験手順を実施例で使用した。

##### マウス、細胞系統、サイトカイン、抗体およびプラスミド

BALB/cマウスは、Jackson Laboratoriesから入手し、DO11.10 TcR-トランスジェニックマウス(Jacobson, N.G., et al. 1995, J. Exp. Med. 181, 1755-1762)、およびMBP TcRトランスジェニックマウス(Lafaille, J.J., 1994, Cell 78, 399-408)が記載されている。マウスは5～6週齢で使用した。細胞系統(line)および一次細胞は、10%ウシ胎児血清(HyClone Laboratories)、グルタミン(2 mM)、ペニシリン(50単位/ml)、ストレプトマ

イシン (50  $\mu$ g/ml)、Hepes (100 mM) および  $\beta$ -ME (50  $\mu$ g) を補足した RPMI 1640 を含む完全培地内で維持した。Jurkat はヒト Th1 リンパ腫、EL4 はマウス Th0 胸腺腫、NK3.3 はヒト NK 細胞系統 (Ye, J., 1995, J. Leuko. Biol. 58.225-233; Kornbluth, J., 1982, J. Immunol. 129.2831-2837)、YT はヒト NK 細胞系統 (Yodoi, J., 1985, J. of Immunol. 134, 1623-1630)、AE7 はマウス Th1 クローン、D10 はマウス Th2 クローンそして M12 は B 細胞リンパ腫系統である。組換え IL-4 は DNA X から入手し、ヒト rIL-2 は Chiron Corp. から入手した。rIL-12 は Hoffman LaRoche から入手し、そして rIL-18 は Peprotech Inc. から購入した。モノクローナル抗 IL-12、モノクローナル抗 IFN- $\gamma$  およびモノクローナル抗 IL-4 (11B11) も使用した (Ohara, J. and Paul, W.E., 1985, Nature 315, 333-336)。ラビット内で産生した T-bet ポリクローナル抗血清 および mAb は両方共に全長組換え細菌産生 T-bet に対して作製した。mAb は、マウスからの脾細胞を SP2/O-Ag14 骨髄腫 (myeloma) に融合して作製そして IgG1 サブタイプである。発現プラスミドは、c-Maf (pMex-maf) (Ho, I-C., et al, 1996, Cell 85, 973-983)、NFATp (Hodge, M.R., et al. 1996, Immunity 4, 1-20) および p65 を含んでおり、後の 2 者は pCDNA ベクター内にクローンした。

#### CD4 + T 細胞精製および生体外培養

CD4 + T 細胞は、リンパ節 (LN) から PE-接合抗 CD4 (RM4-4) (Pharmingen) を用いるフローサイトメトリーにより精製しそして FACS (MoFlo, Becton Dickenson) を用いて純度 98 ~ 99% まで選別した。生体外活性化のために、 $2 \times 10^6$  / ml の CD4 + 細胞を完全培地内に再懸濁しそしてプレート結合 1  $\mu$ g/ml 抗 CD3 (2C11) および 2  $\mu$ g/ml 抗 CD28 (Pharmingen) を用いて 3 日間、100 単位/ml の IL2 の存在下で活性化した。次いで細胞を完全培地に 1 : 4 スプリットし、そして 4 日間、100 単位/ml の IL2 の存在下で培養した。一次刺激の 7 日後に、細胞を採取し、2 回洗浄しそして 1  $\mu$ g/ml プレート結合抗 CD3 を用いて  $1 \times 10^6$  細胞/ml で 1、3 および 6 時間再刺激した。Th1 および Th2 分化培養のために、非-トランスジ

エニックまたはDO11.10LNおよび脾細胞をプールし、 $1 \times 10^6$  細胞/ml 完全培地内に再懸濁しそしてTh1 (10 mg/ml 抗IL4 [11B11]、10 ng/ml rIL12) またはTh2 (10 mg/ml 抗IFN- $\gamma$ 、10 ng/ml IL4) 条件下、1  $\mu$ g/ml プレート結合抗CD3を用いて培養した。細胞を3日目に、完全培地+100 u/ml IL2を用いて1:4スプリットした。7日目に、細胞を1  $\mu$ g/ml 抗CD3を用いて4時間再刺激しそしてRNA調製のために採取した(Jacobson, N.G., et al. 1995, J. Exp. Med. 181, 1755-1762)。上清を24時間目に採取しサイトカインを試験した。

#### ノーザンおよびウエスタンブロット分析

全RNAを休眠から単離しそしてTRIzol試薬(Gibco/BRL)を用いて細胞を刺激しそしてそれぞれの試料10  $\mu$ gを1.2%アガロース6%ホルムアルデヒドゲル上で分離し、20X SSC中のGenescreen膜(NEN)上に一晩移行し、そしてUV Stratalinker(Stratagene)を用いて共有結合した。ブロットのハイブリダイゼーションは、32P:Tbet、 $\beta$ -アクチンを用いて標識した下記のcDNAプローブを用いて記載(Hodge, M.R., et al. 1996, Immunity 4, 1-20)に従って42°Cで行った。ウエスタンブロット分析のための核および細胞質抽出物をAE7、D10およびNK3.3細胞から調製した。核を記載(Dolmetsch, R.E., et al. 1997, Nature 386, 855-858)に従って単離した。抽出したタンパク質を8%PAGEにより分離し、次いでニトロセルロース膜にエレクトロトランスファーし、そしてTbetに特異性のmAbを用いてプローブし、次いでホースラディッシュペルオキシダーゼ-接合ヤギ抗マウスIgGによりプローブしそしてメーカー(Amersham)の指定に従って化学発光を促進した。

#### 一過性トランスフェクションアッセイ

EL4およびJurkat細胞を、5  $\mu$ gレポータープラスミドおよび5~10  $\mu$ g発現プラスミドを用いてトランスフェクション当たりに0.4 ml RPMI中の細胞 $5 \times 10^6$ 個を用いるBioRadエレクトロポレーター(280V、975  $\mu$ F)を用いてトランスフェクションした。ルシフェラーゼアッセイは、24時間後に各試料の20%内でルシフェラーゼ活性を用い、指定に従って測定し

た(Promega)。IFN- $\gamma$  レポータールシフェラーゼ構築物は、全ヒトIFN- $\gamma$  遺伝子を含むプラスミドpB9から誘導した(P. Gray and D.V. Goeddel, 1982, Nature, 298:859)。pGL2ルシフェラーゼ遺伝子をpB9・IL-2プロモーター-レポーター構築物の第一エクソン内に挿入した。IL-4プロモーター-レポーター構築物、IL-4Luc、は、ネズミIL-4遺伝子の807bp上流を含む。

#### レトロウイルス構築物および形質導入

GFP-RVビシストロン性ベクターは、Phoenix-Ecoパッケージング細胞系統(Kinoshita, S. et al. 1998, Cell, 95, 595-604)を有するとして記載されている(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)。GFP-RVベクターは、脳心筋炎ウイルス内部リボソーム入口配列(IRES)およびGFP対立遺伝子をMSCV2.2レトロウイルスベクター(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)またはIL-2-MSCVベクター内に挿入して構築した。両方のベクターは2個のcDNA、TbetおよびGFPをコードするcDNAを、IRESを使用して同時に発現しそれぞれのmRNAの翻訳を個別に開始した。パッケージング細胞系統のトランスフェクションおよび一次T細胞のレトロウイルス形質導入は、本質的に記載の通りに行った(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)。

#### 細胞内サイトカイン染色およびFACS分析

サイトカインの細胞内染色は記載の通りに行った(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)。指定通りの種々の期間にわたってレトロウイルスを用いて感染した一次トランスジェニックまたは非-トランスジェニックT細胞をPMA(50ng/ml)およびイオノマイシン(1uM)を用いて2時間刺激し、そしてブレフェルジン(Brefeldin)A 10ug/mlをさらに2時間で加えた。

#### 【0160】

##### 実施例1. 新規の転写因子、Tbetのクローニング

IL-2プロモーターのTh1-特異性領域は良く定位されているので(Brombacher, F. et al., 1994, Int. Immunol. 6: 189-197; Rooney, J., et al., 1

995, Mol. Cell. Biol. 15, 6299-6310; Lederer, J.A., et al. 1994, J. Immunol. 152, 77-86; Durand, D., et al. 1988, Mol. Cell Biol. 8, 1715-1724; Hoyos, B., et al. Science 244, 457-450)、IL-2プロモーターレポーターおよびOF6 Th1クローンから作製したcDNAライブラリーを用いる酵母ワンハイブリッド法を、Th1特異性転写因子を同定するために選択した。この方法を実証するために、IL-4プロモーターのTh2特異性領域を酵母内で発現しそしてc-Mafの導入によりトランス活性化され、数種の他の転写因子(例えばNFAT)ではされないことを実証した。c-Mafトランス活性化は、c-Maf反応要素(MARE)が変異した場合には起きなかった。従って、酵母ワンハイブリッド法を使用した。

#### 【0161】

EGY48酵母株をIL-2プロモーター/ヒスチジン構築物を用いて安定に組込みそして抗-CD3活性化Th1細胞クローン、OF6から作製したcDNAライブラリーを用いて形質転換した。スクリーニングした $5.6 \times 10^6$ 個のクローン中、488個が一次スクリーニングで陽性であった。二次スクリーニングで試験した210個のクローン中、72個がIL-2プロモーターに特異性であることが証明された。陽性クローンの数を減らすために、我々は酵母クローンcDNAを、Th1およびTh2細胞系統内で分化的に発現したcDNAとハイブリダイズした。これらのTh1-Th2およびTh2-Th1 cDNAをClontech PCR選択キットを用いて作製し、放射能標識しそして最初にパイロット実験に使用して最も強い陽性のクローン16個をスクリーニングした。これらのクローン16個の中で、8個がTh1(PL17)特異性cDNA産物プローブと陽性であり、Th2(D10)特異性cDNA産物プローブとはそうではなかった。代表差異分析(RDA、例えばLisitsyn, 1993, Science, 259:946; O'Neill and Sinclair, 1997, Nucleic Acids Res. 25:2681; Hubank and Schatz, 1994, Nucleic Acids Res. 22:5640; Welford et al. 1998 Nucleic Acids Res. 26:3059)をTh1-Th2プローブを用いて16個の陽性クローンに関し、IL-2、IFN- $\gamma$ およびIL-4に対するプローブの対照ハイブリダイゼーションを用いて行った。Th1およびTh2差し引きcDNAプローブの特異性は

、それぞれIL-2およびIFN- $\gamma$ 対IL-4の検出により証明された。

#### 【0162】

制限酵素分析および配列決定データは、クローンのすべて8個が関連することを明らかにした。これらは5'および3'非翻訳領域内の差異に基づいて3群に分類され、これらの群のそれぞれは独立したcDNA分子を表す。これらのクローンの配列をNCBIジーンバンク配列データベースと比較すると、転写因子のT-boxファミリーとの相同性が得られた。図1は、T-betの核酸およびアミノ酸配列を示す。

#### 【0163】

実施例2. T-betは、T-boxファミリーメンバーT-brainおよびエオメソデルミン(eomesodermin)と相同の領域を共有する

BrachyuryまたはTは、T-boxと呼ばれる200アミノ酸DNA結合ドメインを共有する転写因子のファミリーの創始メンバーである(総説はSmith, J. 1997, Current Opinion in Genetics & Development 7, 474-480; Papaioannou, and Silver, 1998, Bioassay, 20:9; Meisler, M.H. 1997, Mammalian Genome 8, 799-800)。Brachyury(ギリシャ語で「短尾」)突然変異は、短くて少しねじれた尾を持った異型接合動物内で、1927年に最初に記載された(Herrmann, B.G., 1990, Nature 343, 617-622)。今ではBrachyuryを含まないマウス中の8種のT-box遺伝子が存在する。これらはTbx-6、T-brain-1(Tbr-1)およびいまではT-betを含み、それぞれ明確で通常は複雑な発現パターンを有する。転写因子のT-boxファミリーは、DNA結合ドメイン内のファミリーメンバーの相同性により定義される。T-bet DNA結合ドメイン(ネズミT-betの残基138-327)は、ネズミT-brainのT-boxドメインおよびゼノプスエオメソデルミンのT-boxドメインに最も類似し、従ってT-box遺伝子ファミリーのTbr-1サブファミリー内にT-betを位置させる。ネズミT-betタンパク質のヒト同族体は、マウスT-betに約88%一致する。図1Aは、Lipman-Pearsonタンパク質整列(G penalty設定4およびlength penalty設定12)を用いて誘導した。類似性指数は、86.6と算出された(Gap number 2、gap length 5

およびconsensus length 535)。T - b e tは、T - b o xファミリーメンバーのT - b r a i nおよびエオメソデリウムを相同の領域を共有する。ネズミT - b e t DNA結合ドメインは、ネズミT - b r a i nのT - b o xおよびゼノプスエオメソデリウムに最も類似している。3個のT - b o x領域間で約69%のアミノ酸一致がある。T - b e tはT - b o xドメインの外では他のT - b o xファミリーメンバーと配列相同性を持っていない。

#### 【0164】

実施例3. T - b e tは共通T - b o x部位に結合してトランス活性化しそして5'および3'領域の双方をマップする機能的に重要なドメインを有する

組換えT - b e tタンパク質は、I L - 2プロモーター内の共通T - b o x部位およびT - b e t部位に結合し、そして抗 - C D 3 - 刺激A E 7 Th 1細胞からの核抽出物内に存在する複合体は、共通 ( G G G A A T T T C A C A C C T A G G T G A A A T T C C ) T - b o xオリゴヌクレオチドプローブに特異的に結合する。T細胞内のT - b e tの活性を試験するために、下記の実験を行った。J u r k a t Th 1細胞にT - b e tとルシフェラーゼレポーター構築物とを同時トランスフェクションした。図2 Aは、共通T - b o x部位の4コピーを有するかまたは有していない最少チミジンキナーゼ ( T K ) プロモーターを含むルシフェラーゼレポーター構築物のJ u k a t細胞内の基底レベル (中空棒) およびPMA ( 5 0 n g / m l ) プラスイオノマイシン ( 1 u M ) 誘発 (黒棒) プロモーター活性を示す。それぞれのレポーター構築物は、図中に示すように、空のp C D N Aベクターまたは全長T - b e t c D N Aを含むp C D N Aと同時トランスフェクションされた。示したデータは、3回の独立した実験の代表である。図2 Bは、最少TKプロモーターを含むルシフェラーゼレポーター構築物を用いて一時的にトランスフェクションしたJ u r k a t細胞および棒グラフの左側に示したT - b e t c D N Aの指定領域を含む多量体化した共通T - b o x部位およびp C D N Aベクターを示す。ルシフェラーゼ活性は、感染の24時間後に測定した。実験を3回反復して同じ結果を得た。得られた基底レベル (中空棒) およびPMA ( 5 0 n g / m l ) プラスイオノマイシン ( 1 u M ) 誘発 (黒棒) プロモーター活性は、T - b e tがT細胞内で活性であり、そしてその活性

が刺激によりさらに増加できることを証明した。

【0165】

実施例4. T細胞内のT - b e t発現はTh1サブセットに限定されそしてTcRを介して伝達されるシグナルにより調節される

T - b e tをTh1 cDNAライブラリーから単離しそして複数の臓器のノーザンブロット分析は、肺、胸腺および末梢リンパ器官内にのみ存在するT - b e t転写物を明らかにした。

【0166】

図3Aは、T - b e tがダブルネガティブ(double negative) (DN)胸腺細胞内に優先的に発現し、ダブルポジティブ(Double positive) (DP)およびシングルポジティブ(single positive) (SP)細胞内では発現しないことを示す。培地またはプレート結合抗CD3 (2C11)を用いて6時間処理されたTh1細胞クローン(AE7およびD1.1)またはTh2クローン(D10およびCDC35)から単離された全細胞RNAのノーザンブロット分析は、Th1クローン内のみでT - b e t転写物が明らかになった。全細胞RNAは、培地またはプレート結合抗CD3 (2C11)を用いて6時間処理されたTh1細胞クローン(AE7およびD1.1)またはTh2クローン(D10およびCDC35)から単離された。全RNAは、培地またはPMA (50 ng/ml)およびイオノマイシン (1 uM)を用いて6時間処理されたM12 (B細胞リンパ腫)およびEL4 (T細胞リンパ腫)からも単離された。ノーザンブロット分析は、標準方法を用いてレーンあたりに全RNA 10 ugを用いて行い、そして全長T - b e t cDNAを用いてプローブした。T - b e tは、Th1クローン中に優先的に発現された。さらに、T - b e t発現のレベルは、TcRを介して伝達されたシグナルにより増加し、これは抗 - CD3によるT - b e t転写物の誘導により証明された。T - b e t転写物は、細胞を培地またはPMA (50 ng/ml)およびイオノマイシン (1 uM)を用いて6時間処理した場合に、M12、B細胞リンパ腫内、T細胞リンパ腫Jurkat内またはEL4、Th0細胞胸腺腫内のいずれでも検出されなかった。

【0167】

一次T細胞中のT - b e tのタンパク質レベルを決定するために、D O 1 1 . 1 0 T c Rトランスジェニック脾細胞をT h 1またはT h 2極性化条件下で培養した。72時間後に、200U/ml I L - 2を有する新しい培地内で細胞を3倍に拡大した。一次刺激から7日目に、核およびサイトゾル抽出物を、休息またはP M A / イオノマイシン活性化(1時間)バルクカルチャーD O 1 1 . 1 0 T h 1およびT h 2細胞から調製した。核抽出物も休息していたM 1 2、E L 4、J u r k a t、N K 3 . 3およびY T細胞から調製した。図3Cに示すように、細胞系統中で、T - b e tタンパク質はY T細胞内にのみ存在した。図3Cは、T - b e tタンパク質がT h 1細胞およびN K細胞内のみ限定されていることを示す。ウエスタンブロット試験を、休息またはP M A / イオノマイシン活性化(1時間)したバルクカルチャーD O 1 1 . 1 0 T h 1およびT h 2細胞から上記のように調製した核およびサイトゾル抽出物に関して行った。要約すると、D O 1 1 . 1 0テルトランスジェニック(tertransgenic)脾細胞を、T h 1表現型発生を促進するためには10ng/ml I L - 1 2および10ug/ml抗I L - 4(11B11)、T h 2表現型発生を促進するためには10ng/ml I L - 4および10ug/ml抗I F N -  $\gamma$ の存在下で、 $3 \times 10^6$ 細胞/mlのO V Aペプチド(323-339)を用いて活性化した。72時間後に、細胞を200U/ml I L - 2を用いて新しい培地中で3倍に拡大した。一次刺激から7日目に、核およびサイトゾル抽出物を、休息またはP M A / イオノマイシン活性化(1時間)バルクカルチャーD O 1 1 . 1 0 T h 1およびT h 2細胞から調製した。核抽出物も休息していたM 1 2細胞、E L 4、J u r k a t、N K 3 . 3、およびY Tから調製した。核およびサイトゾル抽出物の30ugをS D S - P A G E(8%ゲル)により分離し、ニトロセルロースへ移行し、そして抗T - b e t抗血清を用いてプローブした。一次T細胞中で、T - b e tタンパク質が、T h 1駆動T細胞内で選択的に発現され、T h 2経路では発現されず、これは上記のT細胞クローンおよび一次T細胞のノーザンブロット分析と一致する。

#### 【0168】

T - b e tに特異的なモノクローナル抗体(m A b)は、F A C S分析により

T - b e t タンパク質の直接可視化を可能とした。図3 Dは、T - b e t が、活性化されたA E 7 T h 1細胞内でのF A C Sにより可視化できることを示す。D 1 0 ( T h 2 ) またはA E 7 ( T h 1 ) 細胞を、培地またはイオノマイシン ( 1 u M ) を加えたP M A ( 5 0 n g / m l ) 中で2時間および2 n Mモネムシンでさらに3時間用いて処理した。細胞をP B Sを用いて洗浄し、4 %パラホルムアルデヒド中で固定し、0 . 5 %サポニンを浸透させ、そして培地 ( 破線 ) またはI g G 1 アイソタイプ対照抗体 ( 点線 ) またはアフィニティー精製した抗T - b e t モノクローナル抗体 3 D 1 0 ( 実線 ) を用いて染色し次いでヤギ - マウスI g G 1 - P E 染色した。F A C S キャリバー ( Calibur ) 上のフローサイトメトリーを用いて細胞を分析した。マウスモノクローナル抗体は、細菌産生T - b e t に対して作製した。T - b e t タンパク質は、D 1 0 細胞中では検出できず、非刺激A E 7細胞中には低いレベルで存在しそして刺激A E 7細胞中では増加したレベルで存在した。これらを総合すると、ここに詳細に記載した実験は、T細胞中で、T - b e t はT h 1細胞内で選択的に発現されこれ発現のレベルはT c R に由来するシグナルにより調節されることを証明する。

#### 【 0 1 6 9 】

##### 実施例5 . T - b e t 発現はNKおよびB細胞中のI F N - 誘導と相関する

I L - 2 プロモーター中のT - b o x 部位への結合によりその単離と連結するT - b e t のT h 1 限定発現は、T - b e t がI L - 2 遺伝子の転写を活性化するのではないかと示唆する。しかし、2種のI L - 2 産生細胞系統、J u r k a t およびE I . 4 がT - b e t を発現せず、一方、I F N - を産生するがI L - 2 はしないNK細胞系統Y T は、T - b e t を発現することは謎である。さらに、I L - 2 プロモーター中の優れたT - b o x 部位の存在にもかかわらず、予備的実験は、T - b e t によるI L - 2 遺伝子のトランス活性化を証明しなかった。他のT h 1 特異性サイトカインは、I F N - 、T N F およびL T を含む。T - b e t の発現は、I F N - の発現と良く相関する。さらに、T - b o x 部位は、ヒトI F N - 遺伝子の第三イントロン内に存在することが分かった。T h 1 特異性D N A ーゼ過敏性部位がこの領域に位置決定されたので、このことは特に注目に値する。

## 【0170】

T - b e t が I F N -  $\gamma$  遺伝子の発現を制御する可能性を試験するために、T h 1 細胞以外の細胞内での T - b e t の発現および I F N -  $\gamma$  の発現を測定した。I F N -  $\gamma$  は、天然キラー (NK) 細胞内で低レベルで発現し、そして I L - 2 および I L - 1 2 を用いる処理で高レベルに誘導される (Kornbluth, J., et al. 1982, J. Immunol. 129:2831; Ye et al. 1995, J. Leuko. Biol. 58:225)。従って、NK 3 . 3 細胞系統を 2 4 時間、I L - 2、I L - 1 2 および I L - 2 + I L - 1 2 を用いて処理し、溶解物を調製しそして上記のように T - b e t m A b を用いてウエスタンブロット試験を行った。図 4 b は、T - b e t タンパク質の協力誘導および NK 3 . 3 細胞内での I F N -  $\gamma$  の分泌を示す。NK 3 . 3 細胞系統を 2 4 時間、NK 細胞内で I F N -  $\gamma$  を誘導することが知られている試薬、I L - 2、I L - 1 2 および I L - 2 + I L - 1 2 を用いて処理し、溶解物を調製し、そして上記のように T - b e t m A b を用いてウエスタンブロット試験を行った。細胞から採取した上清上で E L I S A を行った。

## 【0171】

基底で I F N -  $\gamma$  を産生しない B 細胞は、抗 C D - 4 0 抗体および I L - 1 2 および I L - 1 8 の組み合わせを用いる処理により、大量の I F N -  $\gamma$  を産生するように駆動できる (Yoshimoto, T., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3948-3953)。精製した B 細胞を 7 2 時間、抗 - C D 4 0 m A b、r I L - 1 2 および r I L - 1 8 を用いて処理し、R N A を単離し、そして上記のように T - b e t c D N A を用いてノーザンブロットを行った。図 4 A は、この試薬の組み合わせを用いて処理した B 細胞内の T - b e t m R N A の誘導を示し、そしてこれらの細胞内の I F N -  $\gamma$  転写物の誘導を確認した。結論として、いずれの細胞タイプも T - b e t を構成的に発現しないが、NK 3 . 3 細胞および B 細胞の両者は、I F N -  $\gamma$  産生ももたらす条件下でそのように誘導できる。従って、T - b e t の発現のパターンは、I F N -  $\gamma$  遺伝子の転写と良く相関する。

## 【0172】

実施例 6 . T - b e t は T h 細胞内の I F N -  $\gamma$  遺伝子をトランス活性化する  
I F N -  $\gamma$  遺伝子の調節領域に関してはこれまでほとんど知られていない。特

に、組織 - 特異性発現を指令する遺伝子の領域は生体外でも生体内でも同定されていない。上流配列の500bpまたは3kbを含むレポーター構築物がTh1およびTh2細胞内で発現されることが証明された(Young, H.A., 1994, J. of Immunol. 153:3606-3610)。IFN- $\gamma$  プロモーターまたはイントロン中のATF-2、NF- $\kappa$ B、AP-1およびStat4部位は、機能的に重要と考えられるが、しかし明らかに組織特異性発現には関与しない(Young, H.A., 1994, J. of Immunol. 153:3606-3610; Sica, A., 1997, J. Biol. Chem. 272,30412-30420; Penix, L. 1993, J. Exp. Med. 178, 1483-1496; Penix, L. A., 1996, J. Biol. Chem. 271, 31964-31972)。同様に、Th1優先DNアーゼ過敏部位が第一および第三イントロンの両方の中で認められているが、これらのイントロン中に位置する関連cis要素は同定されていない(Young, H.A., 1994, J. of Immunol. 153:3603-3610; Agarwal, S. and Rao, A. 1998, Immunity 9, 765-775)。従って、全IFN- $\gamma$  遺伝子を含むレポーター構築物をこの研究に使用した。使用されたIFN- $\gamma$  レポーター遺伝子は、上流配列3kb、3種すべてのイントロンを有する全コーディング配列、および下流の1.5kbを含む(Xu, X., et al. 1996, Science 273, 794-796)。

#### 【0173】

JurkatヒトTh1リンパ腫およびマウスEL4 Th0胸腺腫(tymoma)内のIFN- $\gamma$  遺伝子の9kbを含むルシフェラーゼレポーター構築物の活性を試験した。それぞれのレポーター構築物(10ug)を空のpCDNAベクターまたは全長T-bet cDNA、c-Maf、NFATpまたはp65(10ug)を含むpCDNAを用いて同時トランスフェクションした。構築物は-400~-40 IL-2およびIL-4ルシフェラーゼレポーターも含む。

#### 【0174】

IL-2およびIL-4を産生するがしかしIFN- $\gamma$  は産生しないTh0マウスT細胞胸腺腫EL4を、T-bet cDNA発現プラスミドおよびIFN- $\gamma$  ルシフェラーゼレポーターを用いてトランスフェクションした(図5)。T-bet発現プラスミドの導入は、空のベクター単独と比較して、IFN- $\gamma$  遺伝子の(約20~30倍)トランス活性化をもたらした。これは、2種の他の因

子、すなわちTh2-特異性転写因子c-MafおよびTh-非-選択性転写因子MFAFによるトランス活性化が存在しない場合と対照的である。興味あることには、NF- $\kappa$ Bファミリーメンバーp65は、それ自体上のIFN- $\gamma$ レポーターをトランス活性化しないけれども、T-betおよびp65の構築物は、共同作用活性化をもたらす。

#### 【0175】

IL-2プロモーターの試験をTh1-特異性であると知られているプロモーターの領域を用いて行った(Lederer, J.A., et al. 1994, J. Immunol. 152, 77-86)。T-betは、IL-2プロモーターの活性を約10倍抑制した。これは特にPMAおよびイオノマイシンを用いるプロモーターの活性化の場合に著しい。前と同様に、IFN- $\gamma$ 遺伝子の本質的なトランス活性化が認められた。T-bet活性は、IL-2およびIFN- $\gamma$ 遺伝子に対して特異性であり、それはIL-4プロモーター(図5)またはTNF- $\alpha$ プロモーターのトランス活性化に対する作用が存在しないからである。これらのデータは、T-betがIFN- $\gamma$ 遺伝子の転写を特異的に活性化し、そしてIL-2遺伝子の転写を抑制することを証明する。

#### 【0176】

内因性遺伝子発現を試験するために、EL-4細胞を一時的にT-betまたは空ベクターを用いてトランスフェクションし、そしてIFN- $\gamma$ 産生をELISAにより、PMA/イオノマイシンを用いる刺激の48時間後に測定した(図5)。上記のトランス活性化データと一致して、EL4細胞内のT-betのエピトープ性発現は測定可能なIFN- $\gamma$ 産生に導き、一方対照ベクターを用いたトランスフェクションは検出可能なIFN- $\gamma$ をもたらさなかった。

#### 【0177】

実施例7. 一次Th細胞内へのT-betのレトロウイルス遺伝子媒介転移は、増加したIFN- $\gamma$ 産生をもたらす

上記の実験は、IFN- $\gamma$ 遺伝子の転写制御におけるT-betの重要な役割を強く主張する。

#### 【0178】

ウシコラーゲン特異性Th0ハイブリッドを、T-bet GFPまたはGFPのみを含むレトロウイルス構築物を用い、TcR誘導可能IL-2プロモーターの制御下で形質導入した。形質導入した集団をGFP上で2回FACS選別し、休息し次いで抗CD3を用いて刺激しそして60時間後に上清を集め、ELISAによりサイトカイン産生を測定した(図6)。作用を受けなかった対照レトロウイルスベクターは、アンチセンスT-betを含んでいた。

【0179】

T-betがIFN- $\gamma$ の組織特異性発現の原因であるかどうかをさらに試験するために、非-トランスジェニックおよびTcRトランスジェニックの両方の一次T細胞内に、T-betのレトロウイルス遺伝子媒介転移を行った。T-betおよびGFPの両者を発現する2種の異なるビストロン性レトロウイルスを使用した。第一はIL-2誘導可能プロモーターの制御下でT-betを発現し、そして第二はMSCV LTRの制御下でT-betを発現する。両方の構築物で類似した結果が得られた。

【0180】

抗CD3+抗CD28による一次活性化の36時間後にBALB/c CD4 T細胞を感染し、7日目に採取しそして細胞内IFN- $\gamma$ およびIL-2染色をPMAおよびイオノマイシン刺激の5時間後に、実験手順に記載の方法で行った。データは、CD4の発現に関してゲートを設けたイベントのGFP発現(FL1)対細胞内サイトカイン(FL2)を示す二色プロットである。MBP TcRトランスジェニックマウスからの一次T細胞を6 $\mu$ MのMBP(Ac1-11)を用いて刺激しそして感染は1日目にIL-2/GFPおよびIL-2/T-bet/GFPを用いて行った。7日目に、GFP発現に関して細胞を選別し、1日休息し、次いでPMAおよびイオノマイシンを用いる刺激の5時間後に細胞内サイトカイン分析を行った。

【0181】

ナイーブMBPトランスジェニックまたは非-トランスジェニックBALB/c CD4 T細胞を、MBP 1-11および抗CD3を用い、非-極性化条件下で活性化し、そして一次活性化の1日目後にレトロウイルスを用いて記載(0

uyang, W. et al., 1998, Immunity 9:745-755) のようにして感染させた。細胞を7日間培養し、次いでGFP発現を測定して感染された細胞の割合を決定した。GFP陽性細胞を選別しそしてサイトカイン産生を、PMAおよびイオノマイシンを用いる刺激からさらに4時間後に細胞内染色により測定した。MBR-TcRトランスジェニックおよび非トランスジェニックT細胞のT-betを用いる形質導入は、GFP単独で形質導入した細胞と比較してIFN- $\gamma$ を産生する細胞の数および細胞あたりに産生されるIFN- $\gamma$ の量の両方で印象的な増加をもたらした(図7)。

#### 【0182】

刺激の後の初期のナイーブThp細胞は大量のIL-2を産生し、次いでこれはエフェクターサイトカインIFN- $\gamma$  およびIL-4により極性化Th細胞中に逐次置換される。極性化Th1細胞はIL-2を産生するが、しかしナイーブThpよりも著しく少ない量である。極性化Th2細胞はIL-2産生を遮断する。T-bet形質導入Th細胞は、GFP/RV対照形質導入細胞よりいくらか少量のIL-2を産生し、これは我々がEL-4細胞内で観察したT-betによるIL-2プロモータートランス活性化の抑制と一致する。T-betによるIL-2の抑制は、ナイーブ前駆体細胞から完全に分化したエフェクター細胞への系統コミットメントの駆動におけるT-betに対する機能と一致する。

#### 【0183】

実施例8. T-betは、発生中のTh2細胞においてIFN- $\gamma$ を活性化しそしてIL-4産生を抑制する。

#### 【0184】

上記の実験は、T-betが非偏向(unskew)Th細胞をTh1経路へ指令できることを証明する。通常はTh2経路へ駆動する刺激がない場合でもTh1経路に沿って遺伝プログラムを指令するようにT-betがTh細胞を強制できることを試験した。図8の実験において、BALB/c CD4+T細胞をrIL-4ならびにIFN- $\gamma$  およびIL-12に対する抗体の存在下で抗-CD3および抗CD28を用いて活性化し、レトロウイルス感染を36時間後に行い、細胞をIL-2を用いて拡大し、GFP陽性細胞を7日目に選別し、そしてPAM+

イオノマイシンを用いる刺激のさらに4時間後にサイトカイン産生を細胞内染色により測定した。GFP-RV単独を用いる形質導入は、13.4%IL-4産生細胞および0.9%IFN- $\gamma$ 産生体を含む集団をもたらした(図8)。期待の通りに、Thp細胞は、この時点では完全には極性化されていない。T-bet/GFP/RVの導入は、ThpのTh1経路への実質的なシフトを生み、これはTh1分化を阻害する条件下(rIL-4および抗IL-12)でもIFN- $\gamma$ を産生する多数の細胞(50%)およびIL-4を産生する細胞の数(3.5%)の低下により証明された。従って、T-betは、サイトカインにより送られるTh2-促進シグナルを克服してTh細胞発生をTh1経路内に駆動できる。

#### 【0185】

##### 実施例9. T-betは極性化Th2細胞をTh1経路に転向する

Th1およびTh2集団の可逆性が極性化条件下での長期刺激の後に失われることが証明された。可逆性は、一週間後に大部分が排除され、3週間後には完全に失われる(Murphy, E. et al., 1996, J. Exp. Med. 183, 901-913)。T-betがすでに極性化されたTh2細胞の純粹の集団のコミットメントを転向できるかどうかを決定するために、CD4+T細胞を上記のように培養しそしてレトロウイルス遺伝子性質導入を増殖の9日目に行った。Th2極性化条件下で9日間培養したTh細胞中で、対照GFP/RV形質導入細胞は、実際的にすべてIL-4およびIL-5産生体(23%および11%)であり、ほとんど検出できないIFN- $\gamma$ 産生細胞(6%)を伴っていた(図9)。従って、期待の通りに、ほぼ完全な極性化が起きた。注目すべきは、これらの完全に極性化したTh2細胞中へのT-betの導入は、これらを極性化Th1細胞に転向または変換し、これはIFN- $\gamma$ 発現の誘導およびIL-4およびIL-5発現の欠失により証明された。この変換は、外因性IL-4の存在下で起きた。T-bet-形質導入Th2細胞の77%全部がここでIFN- $\gamma$ を産生し、一方IL-4およびIL-5を産生する細胞の割合は、それぞれ13%および1%に低下した。従って、これらのT-bet形質導入細胞は、IFN- $\gamma$ およびIL-4の両方を産生するTh0細胞ではない。従って、T-betは、Th2細胞内で単にIFN-

発現を誘導するだけでなく、実際にTh2細胞を反対のTh1サブセット内に再プログラムする。

#### 実施例10. T-betは極性化Tc2細胞もTh1経路に転向する

最大の注目はCD+4 Tリンパ細胞に向けられているけれども、細胞毒性CD+8 T細胞もIFN- $\gamma$  産生(Tc1)およびIL-4産生(Tc2)サブセットに分裂することも明らかである。完全に極性化されたTc2細胞をTc1経路に転向するT-betの能力を試験した。従って、精製したCD+8 T細胞をTc2極性化条件下で9日間分化させて完全な分化に達した。図10は、T-betがTc2細胞を形質導入し、これはT-betがCD4を形質導入したと類似していたことを示している。Th2細胞はIFN- $\gamma$  を産生し(85%対15%)、そしてIL-4およびIL-5産生を抑制(それぞれ3%対34%および1%対45%)するようにプログラムされた。従って、T-betは完全に分化したCD+8 Tc2細胞をTc1細胞に転換できる。

【0186】

#### 実施例11. T-betはチロシンリン酸化である

T-betがチロシンリン酸化タンパク質であるかどうかを決定するために、AE7 Th1細胞からの全細胞溶解物を、ペルバナデート(pervanadate)を用いるインキュベーションの0、5、10、30分後に調製した。溶解物をT-bet抗血清を用いて免疫沈降し、SDS-PAGE(8%ゲル)により分離し、ニトロセルロースに移行し、そして抗ホスホチロシンmAb 4G10を用いてプローブした。暴露の後、プロットをストリップしそして抗T-bet抗血清を用いて再プローブした。図11に示すように、T-betは明らかにT細胞内でチロシンリン酸化されたタンパク質である。

【0187】

#### 実施例12. 優性陰性T-bet分子の創成

キメラcDNA分子を、T-bet DNA結合ドメイン(残基138-327)およびショウジョウバエタンパク質engrailedのレプレッサードメインを用いて作製した。engrailedタンパク質は、転写の強力で活性なレプレッサーである(Taylor, D., 1996, Genes Dev. 10,2732; Li, J. Thurm, H.

et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10885)。多量体化 T - b o x 共通部位 / T K 最少プロモーターシフェラーゼレポーター構築物を生体外で用いた T - b e t - e n g r a i l e d 構築物。図 1 2 に示すように、T - b e t / e n g r a i l e d は、T - b o x レポーター構築物を 5 : 1 比でトランス活性化する w t T - b e t の能力を特異的かつ著しく抑制し、それぞれ N F A T p および p 6 5 発現構築物による N F A T および N F B レポーターのトランス活性化を抑制しない。

### 【 0 1 8 8 】

#### 実施例 1 3 . I L - 2 プロモーターの T - b o x の変異は I L - 2 プロモーター活性を低下する

最近、DNA に結合した B r a c h y u r y 遺伝子の T - b o x 領域の結晶構造が解明されそして特異性 DNA コンタクト (contact) またはマイナーコンタクトに本質的なアミノ酸部分が誘導された。ヒトおよびネズミ I L - 2 近位プロモーターの検査は、T - b o x ファミリーメンバーを結合するために重要なヌクレオチドが存在することを示す。具体的には、ネズミ I L - 2 プロモーターの - 2 4 0 ~ - 2 2 0 b p は共通 T - b o x 部位に強い類似性を有する。共通 T - b o x 部位は、A A T T T C A C A C C T A G G T G T G A A A T T を含んでなる、ヒト I L - 2 プロモーターは、g A g c T a t C A C C T A a G T G T G g g c T a を含んでなる。ネズミ I L - 2 プロモーターは、A A a c T g c C A C C T A g G T G T G g g c T a を含んでなる。変異 T - b o x m I L - 2 プロモーターは、A A a c T g c t g t C T A a a c a T G g g c T a を含んでなる (DNA コンタクトは太字、マイナーコンタクトは下線を付した)。DNA - タンパク質相互作用に本質的な結晶構造により示されるトランスバージョンル・ヌクレオチド置換は、この推定 T - b o x 部位内に、ネズミ - 4 4 0 ~ - 4 0 b p I L - 2 プロモーターの範囲内で作製された。I L - 2 リシフェラーゼレポーター構築物の J u r k a t 細胞 (左) または A E 7 T h 1 クローン (右) 内の基礎レベル (中空棒) および P M A ( 5 0 n g / m l ) プラス イオノマイシン ( 1 u M ) 誘導 (黒棒) プロモーター活性を示した (図 1 3 )。

## 【0189】

T - b e t の役割は、T h 細胞の分化を駆動することであり、これは同時に I F N -  $\gamma$  遺伝子を誘導および I L - 2 遺伝子を抑制するその能力により証明される。抗原を未経験の T h p 細胞は I L - 2 のみを産生する。刺激を受けると、I L - 2 産生は低下しそして T h 成熟エフェクターサイトカインの産生により置換される。特に、T h 2 細胞は、I L - 4 を産生する能力を取得すると I L - 2 産生を停止し、そして同時に I F N -  $\gamma$  を誘導そして I L - 2 遺伝子を抑制する T - b e t の能力は、T h 2 細胞内に特に顕著である。同時に I F N -  $\gamma$  プロモーターをトランス活性化しそして I L - 2 プロモーターを抑制する T - b e t の能力は、従ってナイーブ T h p の分化の推進における T - b e t の役割と一致する。T - b e t は、上流プロモーター配列の 3 k b のみを含む構築物をトランス活性化することが示され、これは位置 - 2300 ~ - 2291 および - 1957 ~ - 1948 における 2 個の T - b o x 部位の存在と一致する。しかし、プロモーターのこの領域は T h 1 - 特異性ではないので、第三イントロン内の T - b o x 部位も重要でありそして遺伝子のどこかに追加の T - b o x 部位が存在すると考えられる。

## 【0190】

T - b o x ドメインは、最近 DNA と同時結晶化されそしてメジャーおよびマイナーグループ両方の中でタンパク質が DNA に接触している新規の配列特異性 DNA 認識構造を証明した (Mueller, C.W. and Herrmann, B.G., 1997, Nature 389, 884-888)。生体外標的部位選択により規定された共通 T - b o x 結合部位は、パリンドローム 5' - G G G A A T T T C A C A C C T A G G T G T G A A A T T C C C - 3' であった。I L - 2 プロモーターの検査は、組換え T - b e t タンパク質が結合する N F -  $\kappa$  B 部位の 5' の - 240 ~ - 220 丁度にある優れた T - b o x 部位を明らかにした。I L - 2 プロモーターへの T - b e t の結合は、酵母ワンハイブリッドスクリーンにおけるその単離を説明し、ここで、リードアウトは、I L - 2 プロモーター内の T - b o x 部位への T - b e t の結合に単に依存して人工レポーターを駆動する。T - b e t による I L - 2 活性の明瞭な抑制にもかかわらず、T - b o x 部位の変異の際の I L - 2 プロモーター活性

の低下が観察された。しかし、そのT - b e tはT - b o x部位が変異されたI L - 2プロモーター構築物のトランス活性化をまだ抑制できる。これは、I L - 2プロモーター中の別のT - b o x部位の存在か、または近くで結合する別の正に作用する因子との干渉のいずれかの存在を示唆する。この因子の良い候補は、T - b o x部位に丁度隣接する部位T G G G C Cに結合するRothenbergらが記載した活性である(Chen, D. and Rothenberg, E.V., 1994, J. Exp. Med. 179,931-942)。

#### 【0191】

さらに、T - b e tはT h pおよびT h 2細胞内のT h 2プログラムを抑制する。これは、I F N - とI L - 4との間の前者に有利な不均衡の直接の結果ではないと考えられる。T h 2プログラムを抑制し、同時にT h 1プログラムを促進するT - b e tの作用は、G A T A - 3およびc - M a fの記憶であり、この両者ともに間接的にI F N - 発現を抑制し、前者はI L - 1 2受容体 2鎖の発現への影響を通じる(Ho, I-C., et al. 1998, J. Exp. Med. 188:1359-1366; Ouyang, W. et al., 1998, Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4 independent mechanism. Immunity 9: 745-755)。しかし、G A T A - 3およびc - M a fとは異なり、T - b e tは実際に反対経路内に完全に極性化したエフェクターT h細胞を変換できる。

#### 【0192】

##### 均等事項

当該技術分野の熟練者は、日常的な実験を越えることなく、本明細書中に記載した本発明の特定の態様に等価な多数の事項を認め、または確認できるであろう。このような等価事項は、別記の特許請求の範囲内に包含されると考える。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> President and Fellows of Harvard College

<120> T-BET COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> HUI-040PC

<140>

<141>

<150> USSN 60/137,085

<151> 02-06-1999

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1608

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1605)

<400> 1

atg ggc atc gtg gag ccg ggt tgc gga gac atg ctg acg ggc acc gag	48
Met Gly Ile Val Glu Pro Gly Cys Gly Asp Met Leu Thr Gly Thr Glu	
1 5 10 15	
ccg atg ccg ggg agc gac gag ggc cgg gcg cct gcc gcc gac ccg cag	96
Pro Met Pro Gly Ser Asp Glu Gly Arg Ala Pro Gly Ala Asp Pro Gln	
20 25 30	
cac cgc tac ttc tac ccg gag ccg gcc gcg cag gac gcg gac gag cgt	144
His Arg Tyr Phe Tyr Pro Glu Pro Gly Ala Gln Asp Ala Asp Glu Arg	
35 40 45	
cgc ggg ggc ggc agc ctg ggg tct ccc tac ccg ggg ggc gcc ttg gtg	192
Arg Gly Gly Gly Ser Leu Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Gly Ala Leu Val	
50 55 60	
ccc gcc ccg ccg agc ccg ttc ctt gga gcc tac gcc tac ccg ccg cga	240
Pro Ala Pro Pro Ser Arg Phe Leu Gly Ala Tyr Ala Tyr Pro Pro Arg	
65 70 75 80	
ccc cag gcg gcc ggc ttc ccc ggc gcg gcc gag tcc ttc ccg ccg ccc	288
Pro Gln Ala Ala Gly Phe Pro Gly Ala Gly Glu Ser Phe Pro Pro Pro	
85 90 95	
gcg gac gcc gag ggc tac cag ccg gcc gag gcc tac gcc gcc ccg gac	336
Ala Asp Ala Glu Gly Tyr Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Ala Ala Pro Asp	
100 105 110	
ccg cgc gcc ggg ctc tac ccg ggg ccg cgt gag gac tac gcg cta ccc	384
Pro Arg Ala Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Arg Glu Asp Tyr Ala Leu Pro	
115 120 125	

gcg gga ctg gag gtg tgg ggg aaa ctg agg gtc gcg ctc aac aac cac	432
Ala Gly Leu Glu Val Ser Gly Lys Leu Arg Val Ala Leu Asn Asn His	
130 135 140	
ctg ttg tgg tcc aag ttt aat cag cac cag aca gag atg atc atc acc	480
Leu Leu Trp Ser Lys Phe Asn Gln His Gln Thr Glu Met Ile Ile Thr	
145 150 155 160	
aag cag gga cgg cgg atg ttc cca ttc ctg tca ttt act gtg gcc ggg	528
Lys Gln Gly Arg Arg Met Phe Pro Phe Leu Ser Phe Thr Val Ala Gly	
165 170 175	
ctg gag ccc acc agc cac tac agg atg ttt gtg gac gtg gtc ttg gtg	576
Leu Glu Pro Thr Ser His Tyr Arg Met Phe Val Asp Val Val Leu Val	
180 185 190	
gac cag cac cac tgg cgg tac cag agc ggc aag tgg gtg cag tgt gga	624
Asp Gln His His Trp Arg Tyr Gln Ser Gly Lys Trp Val Gln Cys Gly	
195 200 205	
aag gcc gag ggc agc atg cca gga aac cgc ctg tac gtc cac ccg gac	672
Lys Ala Glu Gly Ser Met Pro Gly Asn Arg Leu Tyr Val His Pro Asp	
210 215 220	
tcc ccc aac aca gga cgg cac tgg atg cgc cag gaa gtt tca ttt ggg	720
Ser Pro Asn Thr Gly Ala His Trp Met Arg Gln Glu Val Ser Phe Gly	
225 230 235 240	
aaa cta aag ctc aca aac aac aag ggg gcg tcc aac aat gtg acc cag	768
Lys Leu Lys Leu Thr Asn Asn Lys Gly Ala Ser Asn Asn Val Thr Gln	
245 250 255	
atg att gtg ctc cag tcc ctc cat aag tac cag ccc cgg ctg cat atc	816
Met Ile Val Leu Gln Ser Leu His Lys Tyr Gln Pro Arg Leu His Ile	
260 265 270	
gtt gag gtg aac gac gga gag cca gag gca gcc tgc aac gct tcc aac	864
Val Glu Val Asn Asp Gly Glu Pro Glu Ala Ala Cys Asn Ala Ser Asn	
275 280 285	
acg cat atc ttt act ttc caa gaa acc cag ttc att gcc gtg act gcc	912
Thr His Ile Phe Thr Phe Gln Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala	
290 295 300	
tac cag aat gcc gag att act cag ctg aaa att gat aat aac ccc ttt	960
Tyr Gln Asn Ala Glu Ile Thr Gln Leu Lys Ile Asp Asn Asn Pro Phe	
305 310 315 320	
gcc aaa gga ttc cgg gag aac ttt gag tcc atg tac aca tct gtt gac	1008
Ala Lys Gly Phe Arg Glu Asn Phe Glu Ser Met Tyr Thr Ser Val Asp	
325 330 335	
acc agc atc ccc tcc cgg cct gga ccc aac tgt caa ttc ctt ggg gga	1056
Thr Ser Ile Pro Ser Pro Pro Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Gly Gly	
340 345 350	
gat cac tac tct cct ctc cta ccc aac cag tat cct gtt ccc agc cgc	1104
Asp His Tyr Ser Pro Leu Leu Pro Asn Gln Tyr Pro Val Pro Ser Arg	

355	360	365	
ttc tac ccc gac ctt cct gcc cag gcg aag gat gtg gtt ccc cag gct Phe Tyr Pro Asp Leu Pro Gly Gln Ala Lys Asp Val Val Pro Gln Ala 370 375 380			1152
tac tgg ctg ggg gcc ccc cgg gac cac agc tat gag gct gag ttt cga Tyr Trp Leu Gly Ala Pro Arg Asp His Ser Tyr Glu Ala Glu Phe Arg 385 390 395 400			1200
gca gtc agc atg aag cct gca ttc ttg ccc tct gcc cct ggg ccc acc Ala Val Ser Met Lys Pro Ala Phe Leu Pro Ser Ala Pro Gly Pro Thr 405 410 415			1248
atg tcc tac tac cga gcc cag gag gtc ctg gca cct gga gct ggc tgg Met Ser Tyr Tyr Arg Gly Gln Glu Val Leu Ala Pro Gly Ala Gly Trp 420 425 430			1296
cct gtg gca ccc cag tac cct ccc aag atg gcc ccg gcc agc tgg ttc Pro Val Ala Pro Gln Tyr Pro Pro Lys Met Gly Pro Ala Ser Trp Phe 435 440 445			1344
cgc cct atg cgg act ctg ccc atg gaa ccc gcc cct gga gcc tca gag Arg Pro Met Arg Thr Leu Pro Met Glu Pro Gly Pro Gly Gly Ser Glu 450 455 460			1392
gga cgg gga cca gag gac cag ggt ccc ccc ttg gtg tgg act gag att Gly Arg Gly Pro Glu Asp Gln Gly Pro Pro Leu Val Trp Thr Glu Ile 465 470 475 480			1440
gcc ccc atc cgg ccg gaa tcc agt gat tca gga ctg gcc gaa gga gac Ala Pro Ile Arg Pro Glu Ser Ser Asp Ser Gly Leu Gly Glu Gly Asp 485 490 495			1488
tct aag agg agg cgc gcg tcc ccc tat cct tcc agt ggt gac agc tcc Ser Lys Arg Arg Arg Val Ser Pro Tyr Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser 500 505 510			1536
tcc cct gct ggg gcc cct tct cct ttt gat aag gaa gct gaa gga cag Ser Pro Ala Gly Ala Pro Ser Pro Phe Asp Lys Glu Ala Glu Gly Gln 515 520 525			1584
ttt tat aac tat ttt ccc aac tga Phe Tyr Asn Tyr Phe Pro Asn 530 535			1608
 <210> 2 <211> 535 <212> PRT <213> Hemo sapiens			
 <400> 2 Met Gly Ile Val Glu Pro Gly Cys Gly Asp Met Leu Thr Gly Thr Glu 1 5 10 15 Pro Met Pro Gly Ser Asp Glu Gly Arg Ala Pro Gly Ala Asp Pro Gln 20 25 30			

His Arg Tyr Phe Tyr Pro Glu Pro Gly Ala Gln Asp Ala Asp Glu Arg  
 35 40 45  
 Arg Gly Gly Gly Ser Leu Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Gly Ala Leu Val  
 50 55 60  
 Pro Ala Pro Pro Ser Arg Phe Leu Gly Ala Tyr Ala Tyr Pro Pro Arg  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Ala Ala Gly Phe Pro Gly Ala Gly Glu Ser Phe Pro Pro Pro  
 85 90 95  
 Ala Asp Ala Glu Gly Tyr Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Ala Ala Pro Asp  
 100 105 110  
 Pro Arg Ala Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Arg Glu Asp Tyr Ala Leu Pro  
 115 120 125  
 Ala Gly Leu Glu Val Ser Gly Lys Leu Arg Val Ala Leu Asn Asn His  
 130 135 140  
 Leu Leu Trp Ser Lys Phe Asn Gln His Gln Thr Glu Met Ile Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Lys Gln Gly Arg Arg Met Phe Pro Phe Leu Ser Phe Thr Val Ala Gly  
 165 170 175  
 Leu Glu Pro Thr Ser His Tyr Arg Met Phe Val Asp Val Val Leu Val  
 180 185 190  
 Asp Gln His His Trp Arg Tyr Gln Ser Gly Lys Trp Val Gln Cys Gly  
 195 200 205  
 Lys Ala Glu Gly Ser Met Pro Gly Asn Arg Leu Tyr Val His Pro Asp  
 210 215 220  
 Ser Pro Asn Thr Gly Ala His Trp Met Arg Gln Glu Val Ser Phe Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Lys Leu Thr Asn Asn Lys Gly Ala Ser Asn Asn Val Thr Gln  
 245 250 255  
 Met Ile Val Leu Gln Ser Leu His Lys Tyr Gln Pro Arg Leu His Ile  
 260 265 270  
 Val Glu Val Asn Asp Gly Glu Pro Glu Ala Ala Cys Asn Ala Ser Asn  
 275 280 285  
 Thr His Ile Phe Thr Phe Gln Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala  
 290 295 300  
 Tyr Gln Asn Ala Glu Ile Thr Gln Leu Lys Ile Asp Asn Asn Pro Phe  
 305 310 315 320  
 Ala Lys Gly Phe Arg Glu Asn Phe Glu Ser Met Tyr Thr Ser Val Asp  
 325 330 335  
 Thr Ser Ile Pro Ser Pro Pro Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Gly Gly  
 340 345 350

Asp His Tyr Ser Pro Leu Leu Pro Asn Gln Tyr Pro Val Pro Ser Arg  
 355 360 365  
 Phe Tyr Pro Asp Leu Pro Gly Gln Ala Lys Asp Val Val Pro Gln Ala  
 370 375 380  
 Tyr Trp Leu Gly Ala Pro Arg Asp His Ser Tyr Glu Ala Glu Phe Arg  
 385 390 395 400  
 Ala Val Ser Met Lys Pro Ala Phe Leu Pro Ser Ala Pro Gly Pro Thr  
 405 410 415  
 Met Ser Tyr Tyr Arg Gly Gln Glu Val Leu Ala Pro Gly Ala Gly Trp  
 420 425 430  
 Pro Val Ala Pro Gln Tyr Pro Pro Lys Met Gly Pro Ala Ser Trp Phe  
 435 440 445  
 Arg Pro Met Arg Thr Leu Pro Met Glu Pro Gly Pro Gly Gly Ser Glu  
 450 455 460  
 Gly Arg Gly Pro Glu Asp Gln Gly Pro Pro Leu Val Trp Thr Glu Ile  
 465 470 475 480  
 Ala Pro Ile Arg Pro Glu Ser Ser Asp Ser Gly Leu Gly Glu Gly Asp  
 485 490 495  
 Ser Lys Arg Arg Arg Val Ser Pro Tyr Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser  
 500 505 510  
 Ser Pro Ala Gly Ala Pro Ser Pro Phe Asp Lys Glu Ala Glu Gly Gln  
 515 520 525  
 Phe Tyr Asn Tyr Phe Pro Asn  
 530 535

<210> 3  
 <211> 1593  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1590)

<400> 3  
 atg ggc atc gtg gag ccg ggc tgc gga gac atg ctg acc ggc acc gag 48  
 Met Gly Ile Val Glu Pro Gly Cys Gly Asp Met Leu Thr Gly Thr Glu  
 1 5 10 15  
 ccg atg ccg agt gac gag ggc cgg ggg ccc gga gcg gac caa cag cat 96  
 Pro Met Pro Ser Asp Glu Gly Arg Gly Pro Gly Ala Asp Gln Gln His  
 20 25 30  
 cgt ttc ttc tat ccc gag ccg ggc gca cag gac ccg acc gat cgc cgc 144  
 Arg Phe Phe Tyr Pro Glu Pro Gly Ala Gln Asp Pro Thr Asp Arg Arg  
 35 40 45

gca ggt agc agc ctg ggg acg ccc tac tct ggg ggc gcc ctg gtg cct	192
Ala Gly Ser Ser Leu Gly Thr Pro Tyr Ser Gly Gly Ala Leu Val Pro	
50 55 60	
gcc gcg ccg ggt cgc ttc att gga tcc ttc gcc tac ccg ccc egg gct	240
Ala Ala Pro Gly Arg Phe Leu Gly Ser Phe Ala Tyr Pro Pro Arg Ala	
65 70 75 80	
cag gtg gct ggc tta ccc ggg cct ggc gag ttc ttc ccg ccg ccc ggg	288
Gln Val Ala Gly Phe Pro Gly Pro Gly Glu Phe Phe Pro Pro Pro Ala	
85 90 95	
ggg gcg gag ggc tac ccg ccc gtg gat ggc tac cct gcc cct gac ccg	336
Gly Ala Glu Gly Tyr Pro Pro Val Asp Gly Tyr Pro Ala Pro Asp Pro	
100 105 110	
cgc gcg ggg ctc tac cca ggg ccg cgc gag gac tac gca ttg ccc gcg	384
Arg Ala Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Arg Glu Asp Tyr Ala Leu Pro Ala	
115 120 125	
ggg ttg gag gtg tct ggg aag ctg aga gtc gcg ctc agc aac cac ctg	432
Gly Leu Glu Val Ser Gly Lys Leu Arg Val Ala Leu Ser Asn His Leu	
130 135 140	
ttg tgg tcc aag ttc aac cag cac cag aca gag atg atc atc act aag	480
Leu Trp Ser Lys Phe Asn Gln His Gln Thr Glu Met Ile Ile Thr Lys	
145 150 155 160	
caa gga ccg cga atg ttc cca ttc ctg tcc ttc acc gtg gcc ggg ctg	528
Gln Gly Arg Arg Met Phe Pro Phe Leu Ser Phe Thr Val Ala Gly Leu	
165 170 175	
gag ccc aca agc cat tac agg atg ttt gtg gat gtg gtc ttg gtg gac	576
Glu Pro Thr Ser His Tyr Arg Met Phe Val Asp Val Val Leu Val Asp	
180 185 190	
cag cac cac tgg ccg tac cag agc ggc aag tqg gtg cag tgt gga aag	624
Gln His His Trp Arg Tyr Gln Ser Gly Lys Trp Val Gln Cys Gly Lys	
195 200 205	
gca gaa ggc agc atg cca ggg aac cgc tta tat gtc cac cca gac tcc	672
Ala Glu Gly Ser Met Pro Gly Asn Arg Leu Tyr Val His Pro Asp Ser	
210 215 220	
ccc aac acc gga gcc cac tgg atg cgc cag gaa gtt tca ttt ggg aag	720
Pro Asn Thr Gly Ala His Trp Met Arg Gln Glu Val Ser Phe Gly Lys	
225 230 235 240	
cta aag ctc acc aac aac aag ggg gct tcc aac aat gtg acc cag atg	768
Leu Lys Leu Thr Asn Asn Lys Gly Ala Ser Asn Asn Val Thr Gln Met	
245 250 255	
atc gtc ctg cag tct ctc cac aag tac cag ccc ccg ctg cac atc gtg	816
Ile Val Leu Gln Ser Leu His Lys Tyr Gln Pro Arg Leu His Ile Val	
260 265 270	
gag gtg aat gat gga gag cca gag gct gcc tgc agt gct tct aac aca	864
Glu Val Asn Asp Gly Glu Pro Glu Ala Ala Cys Ser Ala Ser Asn Thr	

275	280	285	
cac gtc ttt act ttc caa gag acc cag ttc att gca gtg act gcc tac			912
His Val Phe Thr Phe Gln Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr			
290	295	300	
cag aac gca gag atc act cag ctg aaa atc gac aac aac ccc ttt gcc			960
Gln Asn Ala Glu Ile Thr Gln Leu Lys Ile Asp Asn Asn Pro Phe Ala			
305	310	315	320
aaa gga ttc cgg gag aac ttt gag tcc atg tac gca tct gtt gat acg			1008
Lys Gly Phe Arg Glu Asn Phe Glu Ser Met Tyr Ala Ser Val Asp Thr			
325	330	335	
agt gtc ccc tog cca cct gga ccc aac tgt caa ctg ctt ggg gga gac			1056
Ser Val Pro Ser Pro Pro Gly Pro Asn Cys Gln Leu Leu Gly Gly Asp			
340	345	350	
ccc ttc tca cct ctt cta tcc aac cag tat cct gtt ccc agc cgt ttc			1104
Pro Phe Ser Pro Leu Leu Ser Asn Gln Tyr Pro Val Pro Ser Arg Phe			
355	360	365	
tac ccc gac ctt cca ggc cag ccc aag gat atg atc tca cag cct tac			1152
Tyr Pro Asp Leu Pro Gly Gln Pro Lys Asp Met Ile Ser Gln Pro Tyr			
370	375	380	
tgg ctg ggg aca cct cgg gaa cac agt tat gaa gcg gag ttc cga gct			1200
Trp Leu Gly Thr Pro Arg Glu His Ser Tyr Glu Ala Glu Phe Arg Ala			
385	390	395	400
gtg agc atg aag ccc aca ctc cta ccc tct gcc ccg ggg ccc act gtg			1248
Val Ser Met Lys Pro Thr Leu Leu Pro Ser Ala Pro Gly Pro Thr Val			
405	410	415	
ccc tac tac cgg ggc caa gac gtc ctg gcg cct gga gct ggt tgg ccc			1296
Pro Tyr Tyr Arg Gly Gln Asp Val Leu Ala Pro Gly Ala Gly Trp Pro			
420	425	430	
gtg gcc cct caa tac cgg ccc aag atg agc cca gct ggc tgg ttc cgg			1344
Val Ala Pro Gln Tyr Pro Pro Lys Met Ser Pro Ala Gly Trp Phe Arg			
435	440	445	
ccc atg cga act ctg ccc atg gac ccg gcc ctg gga tcc tca gag gaa			1392
Pro Met Arg Thr Leu Pro Met Asp Pro Gly Leu Gly Ser Ser Glu Glu			
450	455	460	
cag gcc tcc tcc ccc tog ctg tgg cct gag gtc acc tcc ctc cag ccg			1440
Gln Gly Ser Ser Pro Ser Leu Trp Pro Glu Val Thr Ser Leu Gln Pro			
465	470	475	480
gag ccc agc gac tca gga cta gcc gaa gga gac act aag agg agg agg			1488
Glu Pro Ser Asp Ser Gly Leu Gly Glu Gly Asp Thr Lys Arg Arg Arg			
485	490	495	
ata tcc ccc tat cct tcc agt gcc gac agc tcc tet ccc gct ggg gcc			1536
Ile Ser Pro Tyr Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Ser Pro Ala Gly Ala			
500	505	510	
cct tct cct ttt gat aag gaa acc gaa gcc cag ttt tat aat tat ttt			1584

Pro Ser Pro Phe Asp Lys Glu Thr Glu Gly Gln Phe Tyr Asn Tyr Phe  
 515 520 525

ccc aac tga  
 Pro Asn  
 530

1593

<210> 4  
 <211> 530  
 <212> FRT  
 <213> Mus musculus

<400> 4  
 Met Gly Ile Val Glu Pro Gly Cys Gly Asp Met Leu Thr Gly Thr Glu  
 1 5 10 15

Pro Met Pro Ser Asp Glu Gly Arg Gly Pro Gly Ala Asp Gln Gln His  
 20 25 30

Arg Phe Phe Tyr Pro Glu Pro Gly Ala Gln Asp Pro Thr Asp Arg Arg  
 35 40 45

Ala Gly Ser Ser Leu Gly Thr Pro Tyr Ser Gly Gly Ala Leu Val Pro  
 50 55 60

Ala Ala Pro Gly Arg Phe Leu Gly Ser Phe Ala Tyr Pro Pro Arg Ala  
 65 70 75 80

Gln Val Ala Gly Phe Pro Gly Pro Gly Glu Phe Phe Pro Pro Ala  
 85 90 95

Gly Ala Glu Gly Tyr Pro Pro Val Asp Gly Tyr Pro Ala Pro Asp Pro  
 100 105 110

Arg Ala Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Arg Glu Asp Tyr Ala Leu Pro Ala  
 115 120 125

Gly Leu Glu Val Ser Gly Lys Leu Arg Val Ala Leu Ser Asn His Leu  
 130 135 140

Leu Trp Ser Lys Phe Asn Gln His Gln Thr Glu Met Ile Ile Thr Lys  
 145 150 155 160

Gln Gly Arg Arg Met Phe Pro Phe Leu Ser Phe Thr Val Ala Gly Leu  
 165 170 175

Glu Pro Thr Ser His Tyr Arg Met Phe Val Asp Val Val Leu Val Asp  
 180 185 190

Gln His His Trp Arg Tyr Gln Ser Gly Lys Trp Val Gln Cys Gly Lys  
 195 200 205

Ala Glu Gly Ser Met Pro Gly Asn Arg Leu Tyr Val His Pro Asp Ser  
 210 215 220

Pro Asn Thr Gly Ala His Trp Met Arg Gln Glu Val Ser Phe Gly Lys  
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Thr Asn Asn Lys Gly Ala Ser Asn Asn Val Thr Gln Met  
 245 250 255  
 Ile Val Leu Gln Ser Leu His Lys Tyr Gln Pro Arg Leu His Ile Val  
 260 265 270  
 Glu Val Asn Asp Gly Glu Pro Glu Ala Ala Cys Ser Ala Ser Asn Thr  
 275 280 285  
 His Val Phe Thr Phe Gln Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr  
 290 295 300  
 Gln Asn Ala Glu Ile Thr Gln Leu Lys Ile Asp Asn Asn Pro Phe Ala  
 305 310 315 320  
 Lys Gly Phe Arg Glu Asn Phe Glu Ser Met Tyr Ala Ser Val Asp Thr  
 325 330 335  
 Ser Val Pro Ser Pro Pro Gly Pro Asn Cys Gln Leu Leu Gly Gly Asp  
 340 345 350  
 Pro Phe Ser Pro Leu Leu Ser Asn Gln Tyr Pro Val Pro Ser Arg Phe  
 355 360 365  
 Tyr Pro Asp Leu Pro Gly Gln Pro Lys Asp Met Ile Ser Gln Pro Tyr  
 370 375 380  
 Trp Leu Gly Thr Pro Arg Glu His Ser Tyr Glu Ala Glu Phe Arg Ala  
 385 390 395 400  
 Val Ser Met Lys Pro Thr Leu Leu Pro Ser Ala Pro Gly Pro Thr Val  
 405 410 415  
 Pro Tyr Tyr Arg Gly Gln Asp Val Leu Ala Pro Gly Ala Gly Trp Pro  
 420 425 430  
 Val Ala Pro Gln Tyr Pro Pro Lys Met Ser Pro Ala Gly Trp Phe Arg  
 435 440 445  
 Pro Met Arg Thr Leu Pro Met Asp Pro Gly Leu Gly Ser Ser Glu Glu  
 450 455 460  
 Gln Gly Ser Ser Pro Ser Leu Trp Pro Glu Val Thr Ser Leu Gln Pro  
 465 470 475 480  
 Glu Pro Ser Asp Ser Gly Leu Gly Glu Gly Asp Thr Lys Arg Arg Arg  
 485 490 495  
 Ile Ser Pro Tyr Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Ser Pro Ala Gly Ala  
 500 505 510  
 Pro Ser Pro Phe Asp Lys Glu Thr Glu Gly Gln Phe Tyr Asn Tyr Phe  
 515 520 525  
 Pro Asn  
 530

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

1 AはネズミおよびヒトT - b e tのヌクレオチド配列整列を示す。この整列は、ALIGNプログラムを用いて作製された。1 Bは、Lipman Pearsonタンパク質整列プログラムを用いて作製したネズミおよびヒトT - b e tのアミノ酸配列整列を示す。T - b o x配列を太字で示す。チロシンリン酸化部位は下線を付けた。核局在化部位は矢印で示す。

**【図2】**

2AおよびBは、5'および3'の両方に位置する機能的に重要なドメインを有する共通T-box部位にTbetが結合しトランス活性化することを示す。

**【図3】**

3Aは、Tbetがダブルネガティブ胸腺細胞内で優先的に発現されることを示す。パネルBは、Thクローンの探索において、Tbet発現がTh1細胞に限定されることを示す。パネルCは、Tbetのウエスタンブロット分析を示す。パネルDは、Tbet発現のFACS分析を示す。

**【図4】**

4AおよびBは、Tbet発現が、NKおよびB細胞内のIFN-γ誘導と相関することを示す。

**【図5】**

TbetがTh細胞内のIFN-γ遺伝子をトランス活性化することを示す。

**【図6】**

Tbetのレトロウイルス遺伝子形質導入がIFN-γ産生を増加しそしてIL-2産生を抑制することを示す。

**【図7】**

Tbetが、一次T細胞内でIFN-γ産生を活性化しそしてIL-2産生を抑制することを示す。

**【図8】**

Tbetが、発生中のTh2細胞内でIFN-γ産生を誘発しそしてIL-2産生を阻害することを示す。

**【図9】**

Tbetが極性化Th2細胞をTh1経路内に転向することを示す。Th偏向は、上記のように実行されそしてレトロウイルス感染は培養の9日目に行った。

**【図10】**

T - b e t が極性化 T c 2 細胞を T c 1 経路内に転向することを示す。C D 8 + T 細胞は M o F 1 o により精製しそして上記の T h 2 偏向条件で培養しそしてレトロウイルス形質導入は培養の 8 日目に行った。

【図 1 1】

T - b e t がチロシンリン酸化されていることを示す。

【図 1 2】

T - b e t 優性陰性変異体の活性を示す。

【図 1 3】

I L - 2 プロモーターの T - b o x 要素の変異体が I L - 2 プロモーター活性を低下することを示す。

## 【図1Aa】

## ヒおよびマウスT-BET整列

	10	20	30	40	50	60
ヒ	MGIVEPGCGDMLTGTEPMPGSDEGRAPGADPQHRFYFYPEPGAQDADERRGGGSLGSPYPG					
	.....					
マウス	MGIVEPGCGDMLTGTEPMP-SDEGRGPGADQQRFFYPEPGAQDPTDRRAGSSLGTPYSG					
	10	20	30	40	50	
CONS	MGIVEPGCGDMLTGTEPMP SDEGR PGAD QHR FYPEPGAQD RR G SLG PY G					
	70	80	90	100	110	120
ヒ	GALVPAPPSRFLGAYAYPPRPQAAGFPGAGESFPPPAEAGYQPGEGYAAPDPRAGLYPG					
	.....					
マウス	GALVPAAPGRFLGSFAYPPRAQVAGFPGPGEFFPPAGAEGYPPVDGYAPDPRAGLYPG					
	60	70	80	90	100	110
CONS	GALVPA P RFLG AYPPR Q AGFPG GE FPPPA AEGY P GY APDPRAGLYPG					
	130	140	150	160	170	180
ヒ	PREDYALPAGLEVSGKLRVALNNHLLWSKFNHQTEMIITKQGRRMFPFLSFTVAGLEPT					
	.....					
マウス	PREDYALPAGLEVSGKLRVALSNHLLWSKFNHQTEMIITKQGRRMFPFLSFTVAGLEPT					
	120	130	140	150	160	170
CONS	PREDYALPAGLEVSGKLRVAL NHLLWSKFNHQTEMIITKQGRRMFPFLSFTVAGLEPT					
	190	200	210	220	230	240
ヒ	SHYRMFVDVVLVDQHHWRYQSGKWWQCGKAEGSMGPNRLYVHPDSPNTGAHWMRQEV SFG					
	.....					
マウス	SHYRMFVDVVLVDQHHWRYQSGKWWQCGKAEGSMGPNRLYVHPDSPNTGAHWMRQEV SFG					
	180	190	200	210	220	230
CONS	SHYRMFVDVVLVDQHHWRYQSGKWWQCGKAEGSMGPNRLYVHPDSPNTGAHWMRQEV SFG					
	250	260	270	280	290	300
ヒ	KLKLTNNKGASNNVTQMIVLQSLHKYQPR LHIVEVNDGEPEAACNASNTHVFTFQETQFI					
	.....					
マウス	KLKLTNNKGASNNVTQMIVLQSLHKYQPR LHIVEVNDGEPEAACNASNTHVFTFQETQFI					
	240	250	260	270	280	290
CONS	KLKLTNNKGASNNVTQMIVLQSLHKYQPR LHIVEVNDGEPEAAC ASNTH VFTFQETQFI					

FIGURE 1A











【図2】

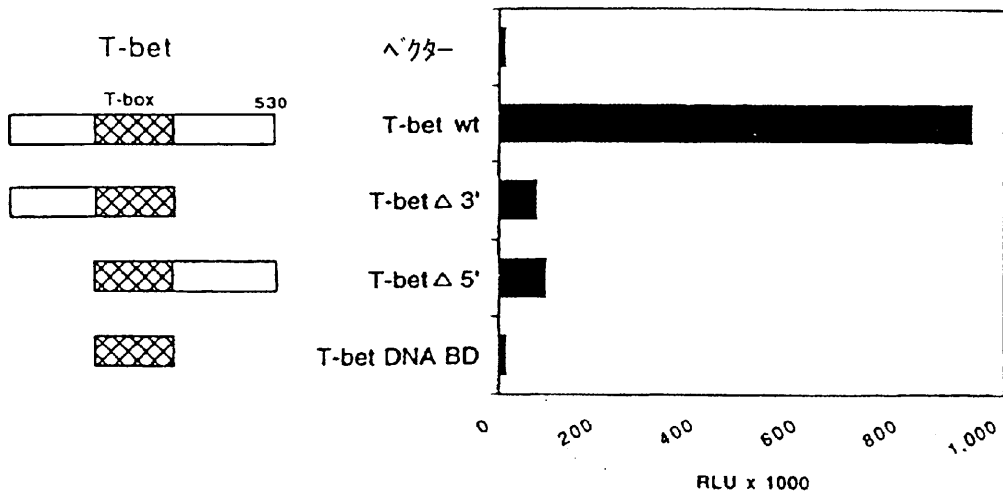
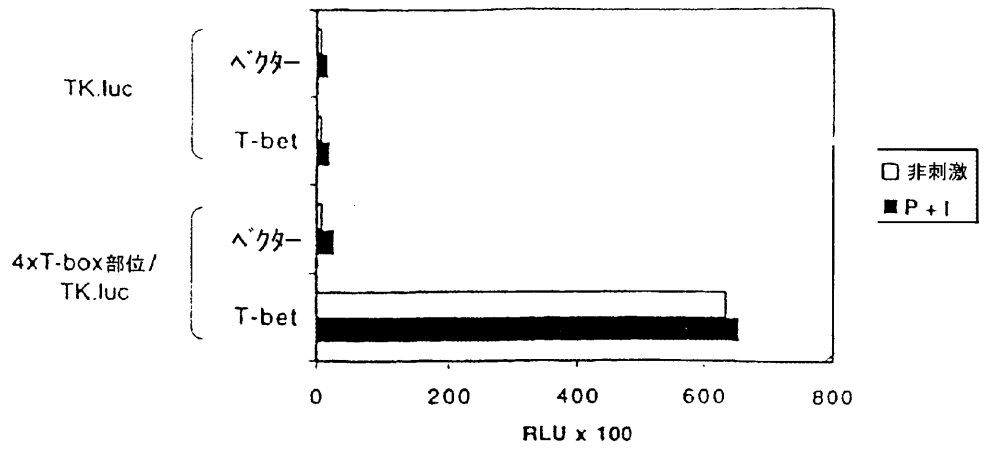


FIGURE 2

【图3A】

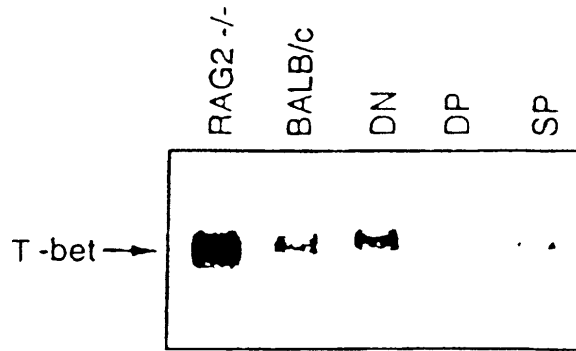


FIGURE 3A

【图3B】

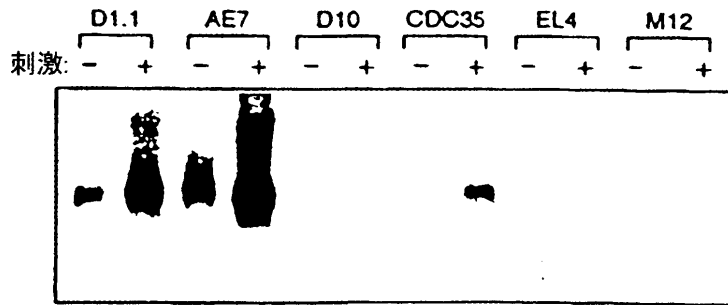


FIGURE 3B

【图3C】

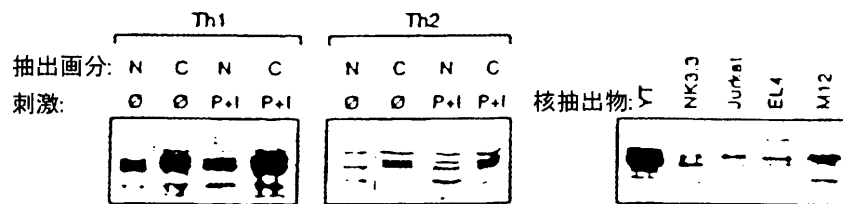


FIGURE 3C

【図3D】

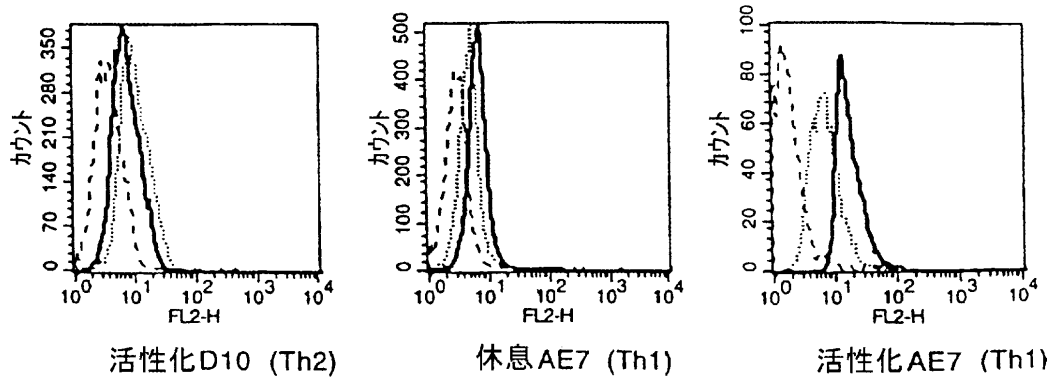


FIGURE 3D

【図4A】

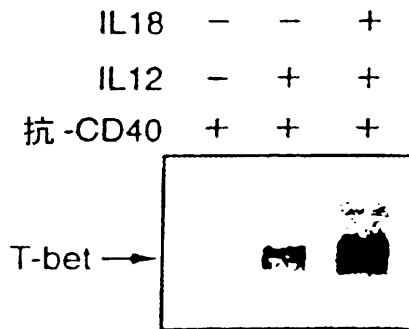


FIGURE 4A

【図4B】

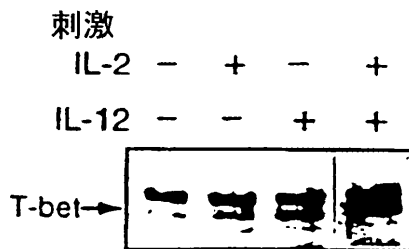


FIGURE 4B

【図5】

T-betはTh細胞中のIFN- $\gamma$ 遺伝子をトランス活性化化する

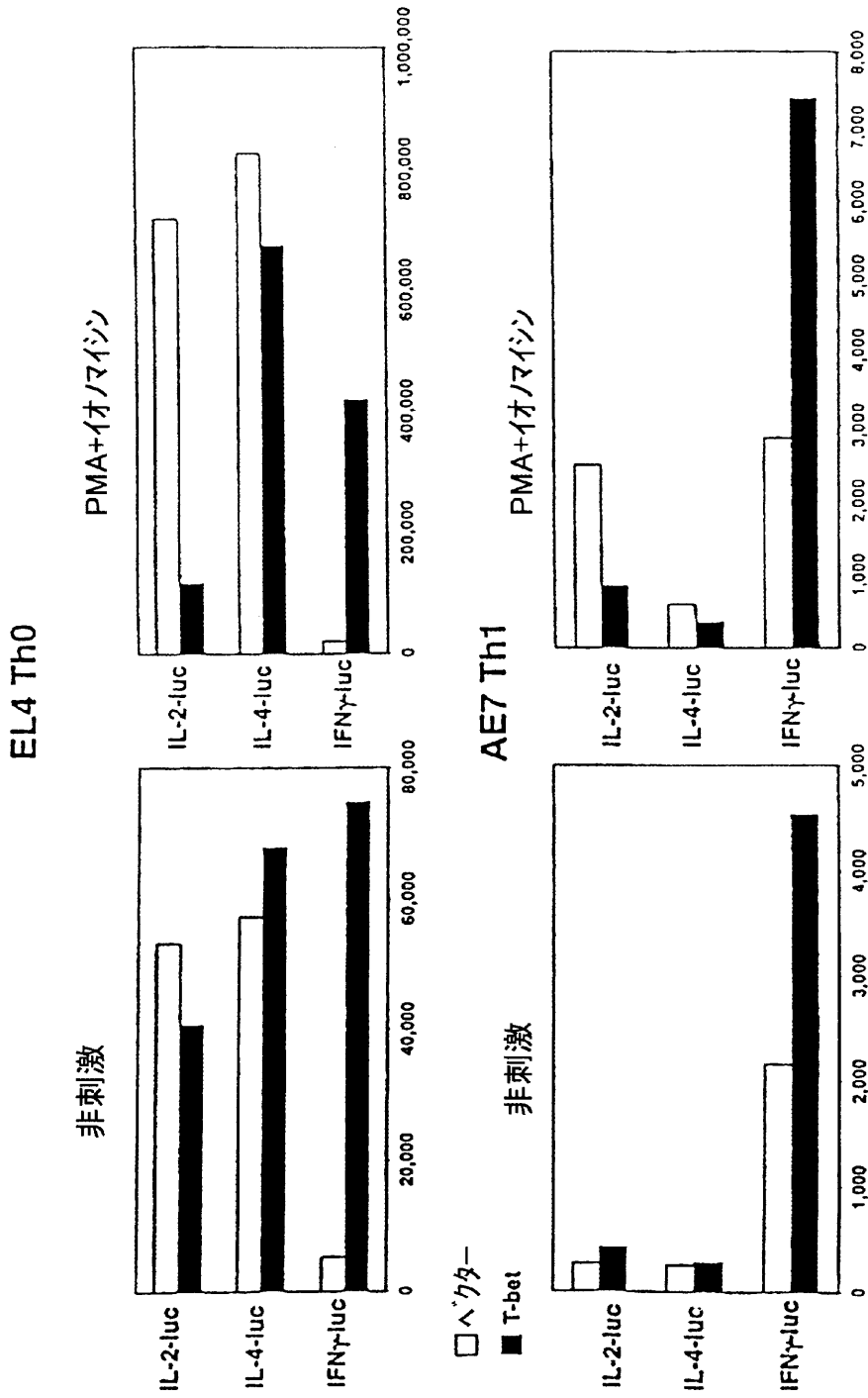


FIGURE 5

【图 6】

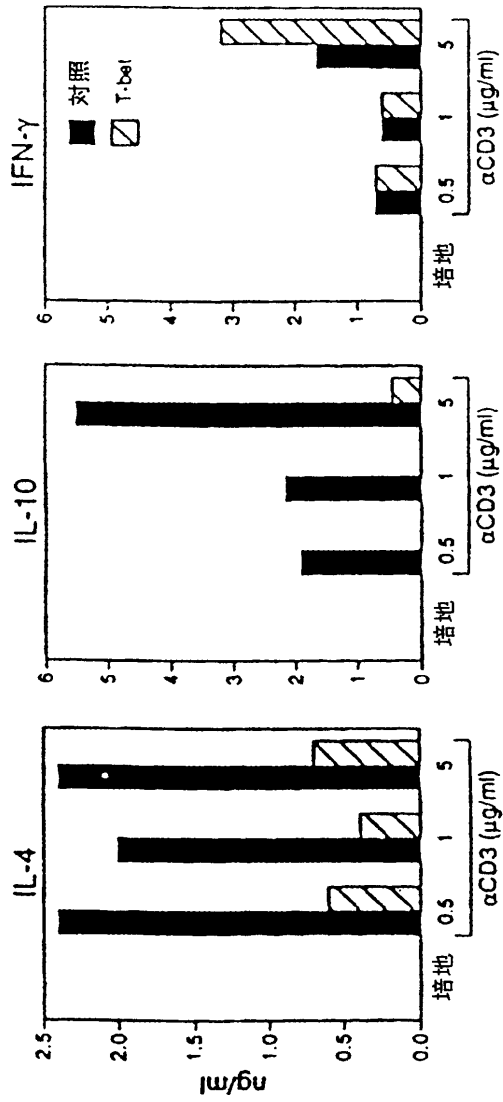


FIGURE 6

【図7】

T-betは一次T細胞内でIFN- $\gamma$ を強力に誘導しそしてIL-2を穏和に抑制する

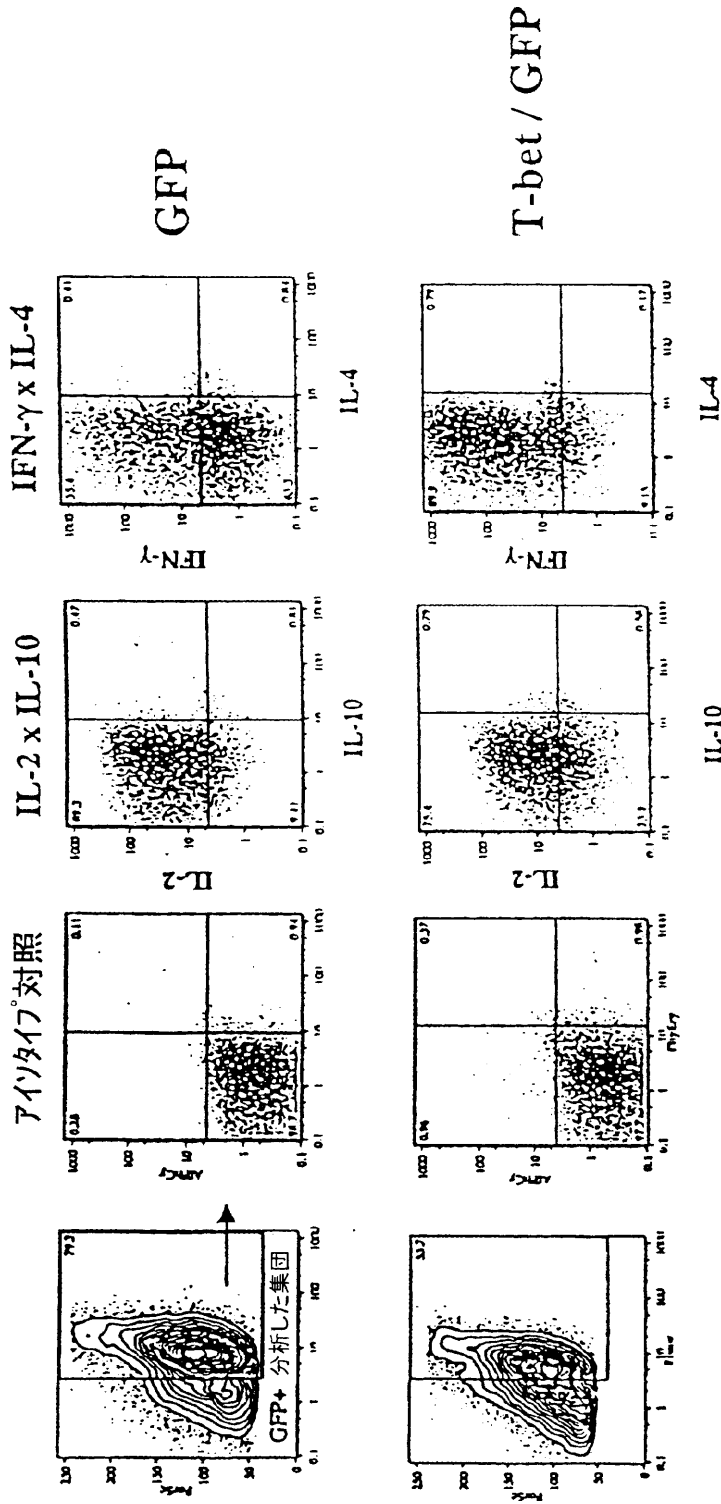
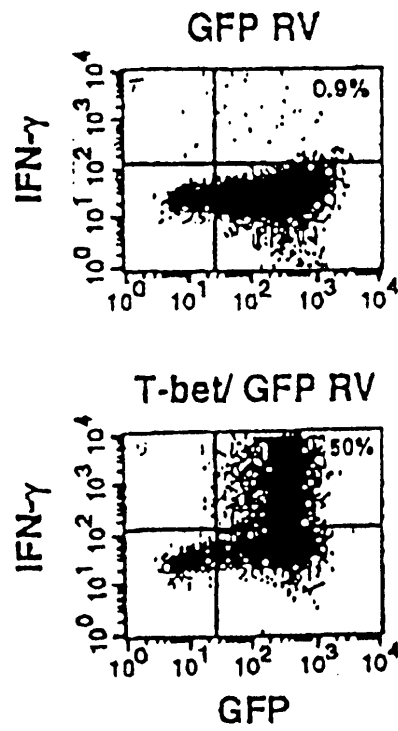


FIGURE 7

【図8A】

FIGURE 8A

T-betは発生中の  
Th2細胞中でIFN- $\gamma$   
産生を誘導する



【図8B】

T-betは発生中の  
Th2細胞中でIL-4  
産生を阻害する

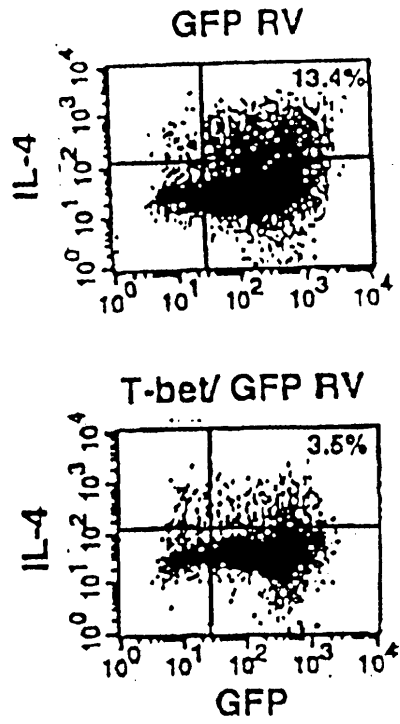


FIGURE 8B

【図9A】

T-betは極性化Th2細胞中でIFN- $\gamma$ を誘導する

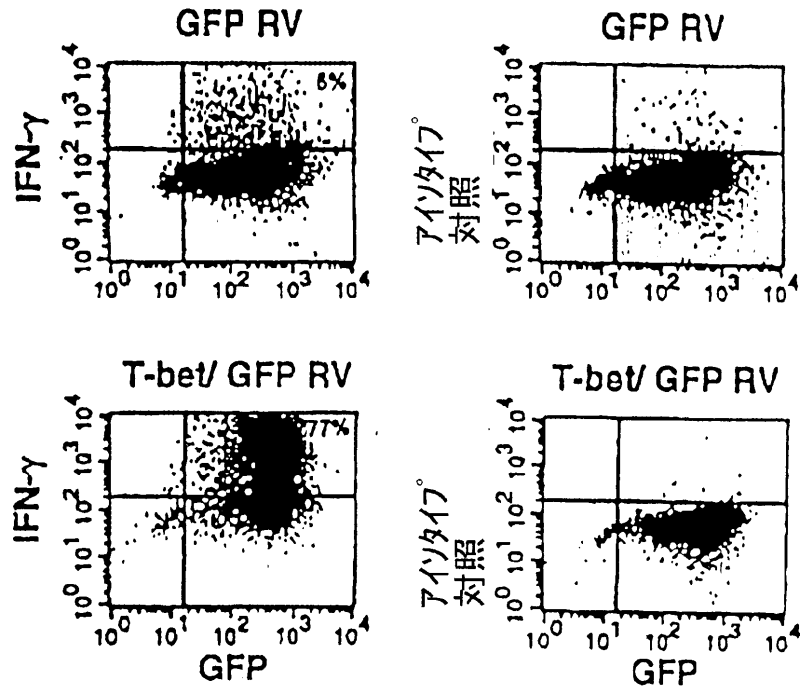


FIGURE 9A

【図9B】

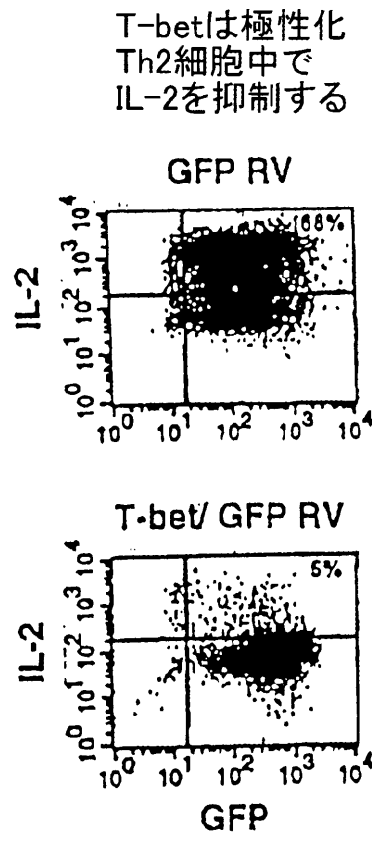


FIGURE 9B

【図9C】

T-betは極性化  
Th2細胞中で  
IL-4を抑制する

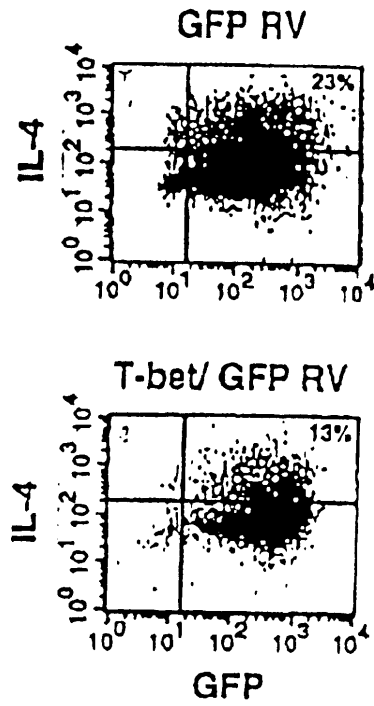


FIGURE 9C

【図9D】

T-betは極性化  
Th2細胞中で  
IL-5を抑制する

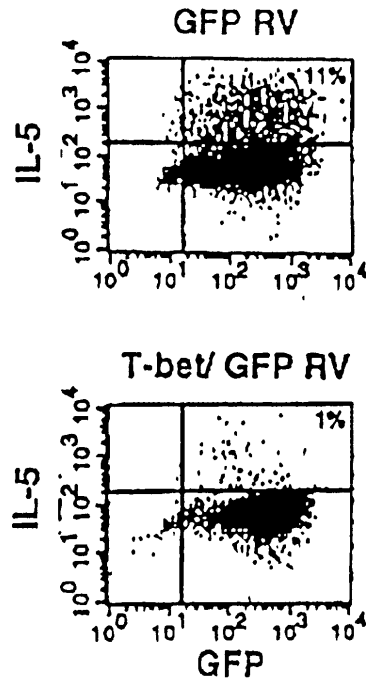


FIGURE 9D

【図10A】

T-betは極性化Tc2細胞中でIFN- $\gamma$ を

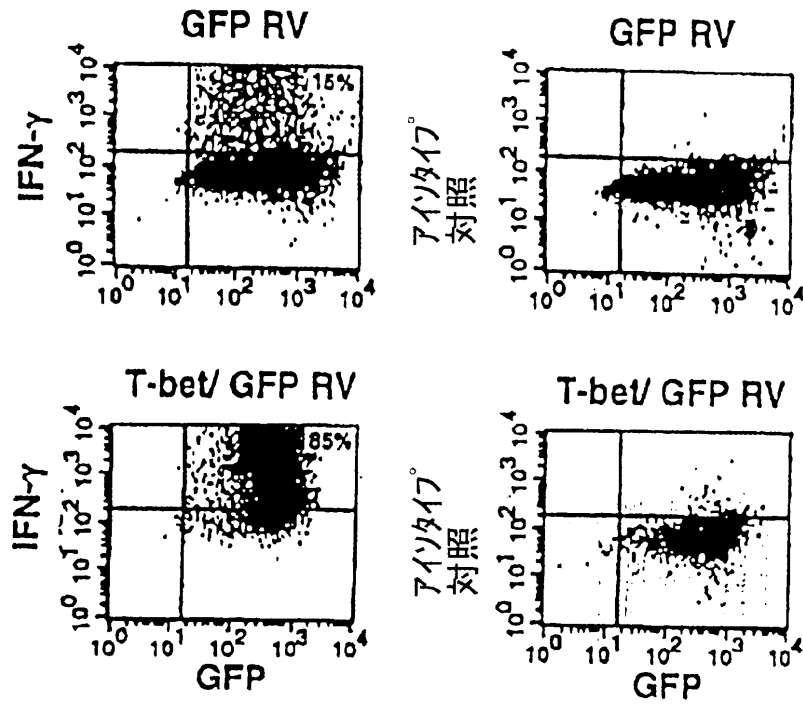


FIGURE 10A

【図10B】

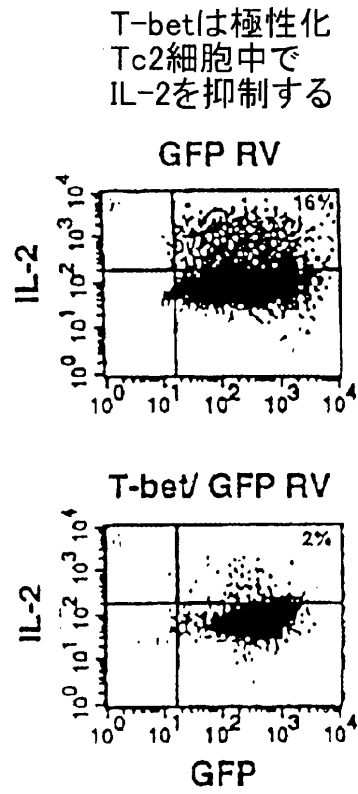


FIGURE 10B

【図10C】

T-betは極性化  
Tc2細胞中で  
IL-5を抑制する

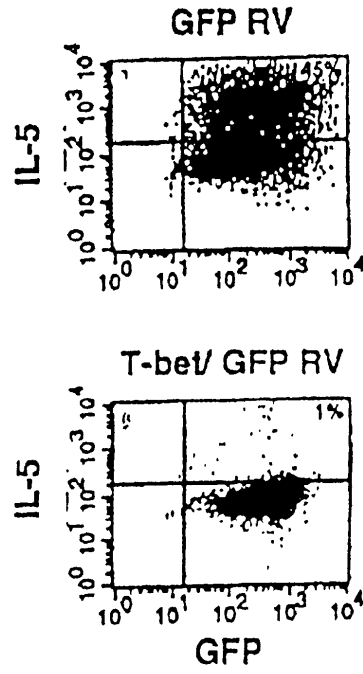


FIGURE 10C

【図10D】

T-betは極性化  
Tc2細胞中で  
IL-4を抑制する

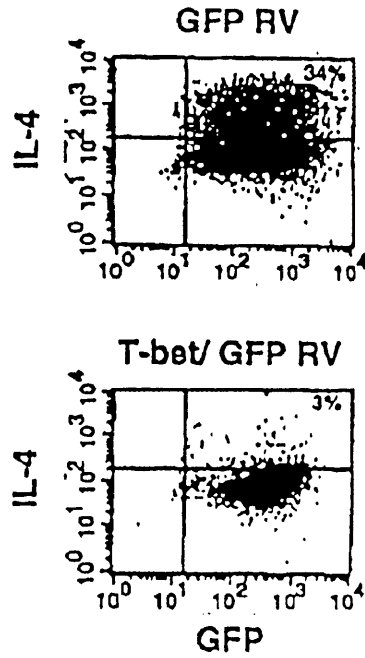


FIGURE 10D

【図11】

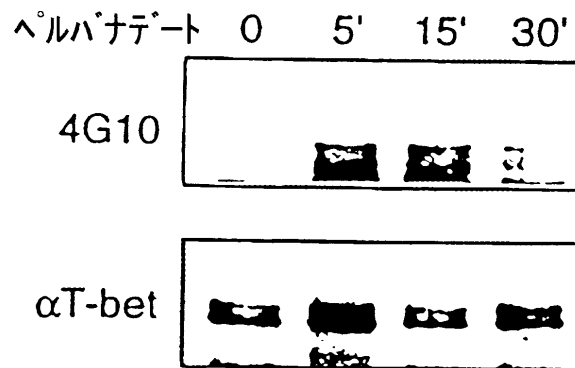


FIGURE 11

【図12】

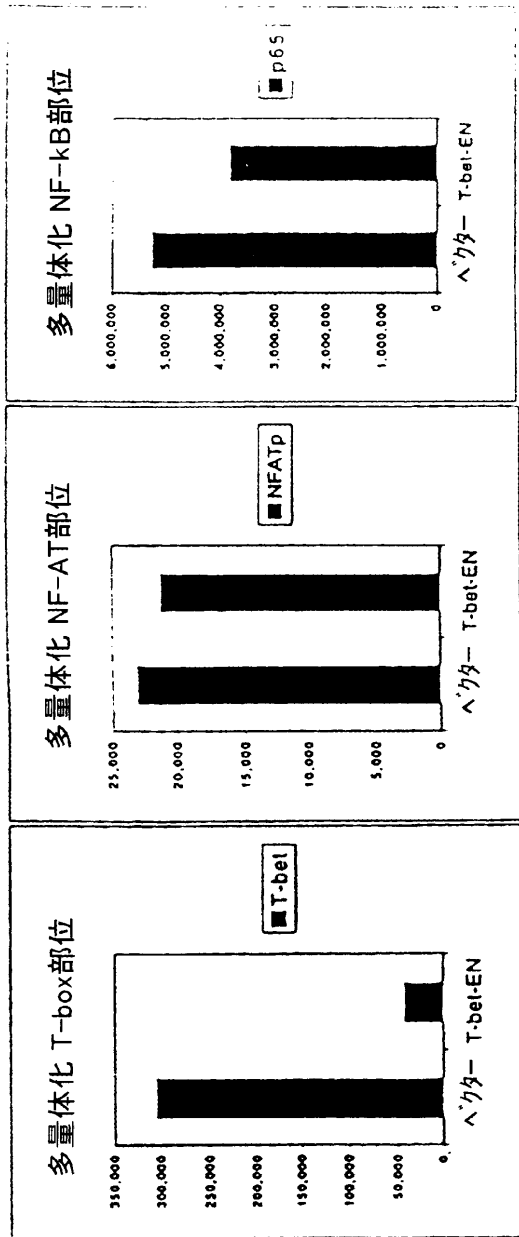


FIGURE 12

【図13】

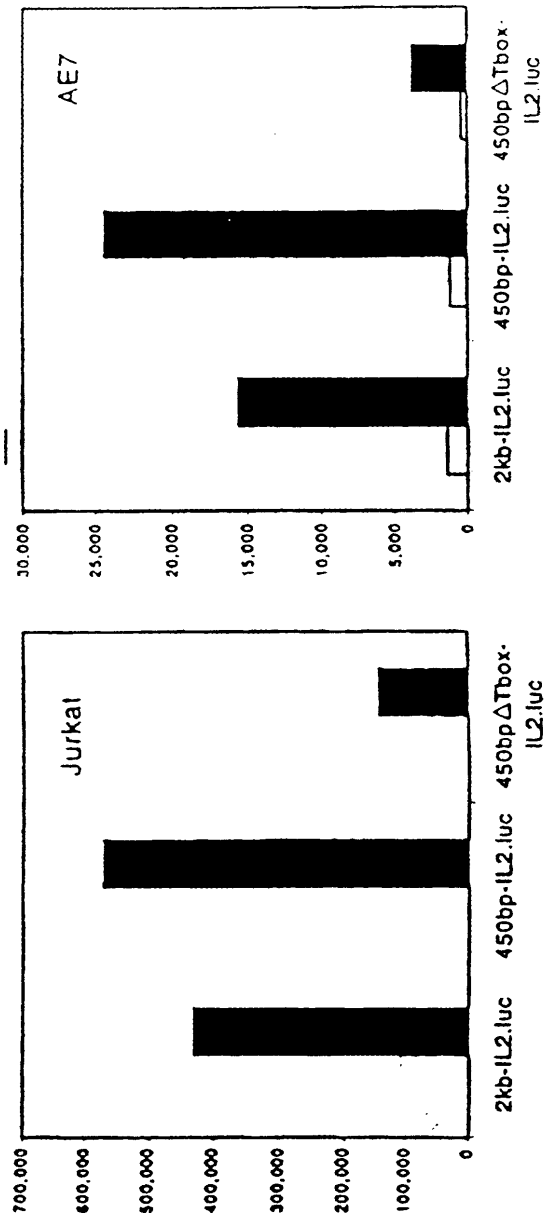


FIGURE 13

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/15345		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/12 C12N5/10 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/50 C12Q1/68 A01K67/027 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N C12Q A01K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, STRAND, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SZABO S.J. ET AL.: "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." CELL, vol. 100, March 2000 (2000-03), pages 655-669, XP002148616 the whole document ---	1-32
P,X	DATABASE EMBL SEQUENCES 'Online! Accession No. AF093098, 16 October 1999 (1999-10-16) YANG S.: "Cloning and characterization of a new member of T-box gene Family (H. sapiens TBLYM)." XP002148618 TBLYM is identical to T-bet --- -/--	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 September 2000		Date of mailing of the international search report 13/10/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Galli, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/15345

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BULFONE A ET AL: "T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex" NEURON,CAMBRIDGE, MA,US, vol. 15, no. 1, July 1995 (1995-07), pages 63-78, XP000864769 the whole document ---</p>	1-32
A	<p>SMITH J: "T-box genes: what they do and how they do it" TRENDS IN GENETICS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, vol. 15, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 154-158, XP004162854 ISSN: 0168-9525 the whole document ---</p>	1-32
A	<p>NOBLE A. ET AL.: "Regulation of Tc1/Tc2 and Th1/Th2 subset commitment by altered peptides and TCR-mediated signalling events." FASEB J., vol. 13, no. suppl., 15 March 1999 (1999-03-15), page A939 XP002148617 the whole document -----</p>	1-32

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターム(参考)
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	4 H 0 4 5
	1/19		
	1/21		
	5/10	C 1 2 P	C
C 1 2 P	21/02	C 1 2 Q	A
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	Z
G 0 1 N	33/15		Z
	33/50		D
	33/53	C 1 2 N	Z N A A
			A

(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y ,  
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
 T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J  
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,  
 M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K  
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G  
 , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,  
 R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M , A T ,  
 A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C  
 H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z  
 , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M ,  
 H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K  
 G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T  
 , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W ,  
 M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S  
 D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R  
 , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U ,  
 Z A , Z W

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB50 DA36 FB02  
 4B024 AA01 AA11 BA44 CA01 CA07  
 GA11  
 4B063 QA01 QQ91 QR48 QR77 QS22  
 QS31 QS33 QX01  
 4B064 AG01 CA19 CC24 DA01  
 4B065 AA90Y AB04 AC14 BA02  
 CA24 CA25 CA44 CA46  
 4H045 AA10 AA11 BA41 CA40 DA76  
 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	T-bet组合物及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003510016A</a>	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001500765	申请日	2000-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会		
申请(专利权)人(译)	总统和Fuerozu哈佛Karetsuji		
[标]发明人	グリムシャーローリーエイチ スザボスーザンジエイ		
发明人	グリムシャー,ローリー・エイチ スザボ,スーザン・ジエイ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P11/06 A61P15/02 A61P17/00 A61P17/06 A61P17 /14 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/4705 C07K2319/00		
FI分类号	A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1 /68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB50 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024 /CA01 4B024/CA07 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS22 4B063/QS31 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065 /AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045 /FA74		
优先权	60/137085 1999-06-02 US		
其他公开文献	JP4427218B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

提供编码T-bet的分离的核酸分子和分离的T-bet蛋白。本发明进一步提供了反义核酸分子，包含本发明的核酸分子的重组表达载体，已导入表达载体的宿主细胞，以及具有T-bet转基因的非人转基因动物。。本发明进一步提供了T-bet融合蛋白和抗T-bet抗体。还公开了使用本发明的T-bet组合物的方法，其包括用于检测生物样品中的T-bet活性的方法，用于调节细胞中的T-bet活性的方法，以及还包括鉴定调节T-bet活性的试剂的方法。