

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-22702

(P2008-22702A)

(43) 公開日 平成20年2月7日(2008.2.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q</b> 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
<b>G O 1 N</b> 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
<b>G O 1 N</b> 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 B O 6 3
C O 7 K 14/15 (2006.01)	C O 7 K 14/15	4 H O 4 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-317378 (P2004-317378)  
 (22) 出願日 平成16年10月29日 (2004.10.29)

(71) 出願人 504179255  
 国立大学法人 東京医科歯科大学  
 東京都文京区湯島 1-5-4 5  
 (74) 代理人 100107984  
 弁理士 廣田 雅紀  
 (74) 代理人 100102255  
 弁理士 小澤 誠次  
 (74) 代理人 100123168  
 弁理士 大▲高▼ とし子  
 (74) 代理人 100120086  
 弁理士 ▲高▼津 一也  
 (72) 発明者 神奈木 真理  
 東京都文京区湯島 1丁目5番45号 国立  
 大学法人東京医科歯科大学内

最終頁に続く

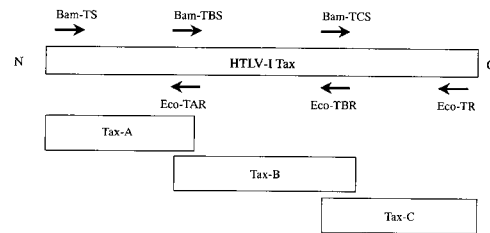
(54) 【発明の名称】 HTLV-I 特異的 T 細胞応答検定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒトでの HTLV-I 特異的 T 細胞応答を追跡したり、種々の病態を示す患者の T 細胞応答を調べるための、検査室レベルで簡便に測定できる HTLV-I 特異的 T 細胞応答検定方法やそのための試薬を提供すること。

【解決手段】グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) - Tax 融合タンパク質を用いる簡便な HTLV-I 特異的 T 細胞応答の検出系を試作した。Tax はそれ自身が細胞増殖やアポトーシス抑制活性を持つため Tax タンパク質を 3 分割するようデザインした。HTLV-I 感染者の末梢血単核球に GST-Tax 融合タンパク質を添加して培養し、培養上清中の IFN を測定することにより、HTLV-I 特異的細胞性免疫応答を主要エピトープの部位に応じて感度良く測定する。

【選択図】図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

H T L V - I 感染者の末梢血単核球に、2 ~ 10 個に分割された T a x タンパク質を添加して培養し、ヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答を検出することを特徴とする H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法。

## 【請求項 2】

2 ~ 10 個に分割された T a x タンパク質が、T a x タンパク質の N 末端側と中央部と C 末端側の 3 分割された T a x タンパク質であることを特徴とする請求項 1 記載の H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法。

## 【請求項 3】

T a x タンパク質として、融合タンパク質を用いることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法。

## 【請求項 4】

融合タンパク質として、タグタンパク質との融合タンパク質を用いることを特徴とする請求項 3 記載の H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法。

## 【請求項 5】

タグタンパク質として、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( G S T ) を用いることを特徴とする請求項 4 記載の H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法。

## 【請求項 6】

ヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答を、培養上清中に産生された I F N 量を測定することにより検出することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法。

## 【請求項 7】

2 ~ 10 個に分割された T a x タンパク質を備えたことを特徴とするヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬。

## 【請求項 8】

2 ~ 10 個に分割された T a x タンパク質が、T a x タンパク質の N 末端側と中央部と C 末端側の 3 分割された T a x タンパク質であることを特徴とする請求項 7 記載のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬。

## 【請求項 9】

T a x タンパク質が、融合タンパク質であることを特徴とする請求項 7 又は 8 記載のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬。

## 【請求項 10】

融合タンパク質が、タグタンパク質との融合タンパク質であることを特徴とする請求項 9 記載のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬。

## 【請求項 11】

タグタンパク質が、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( G S T ) であることを特徴とする請求項 10 記載のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬。

## 【請求項 12】

さらに、末梢血単核球培養用の培地を含むことを特徴とする請求項 7 ~ 11 のいずれか記載のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬。

## 【請求項 13】

さらに、I F N 測定用の E L I S A キットを含むことを特徴とする請求項 7 ~ 12 のいずれか記載のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、H T L V - I 特異的細胞性免疫応答を主要エピトープの部位に応じて感度良く測定できる H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法や、該検定方法に用いられるヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)は終生持続感染し、感染者の大部分は無症候キャリアであるが、一部は成人T細胞白血病(ATL)を発症する(例えば、非特許文献1, 2参照)。感染者の別の一部はHTLV-I随伴脊髄症/熱帯性痲痺性対麻痺(HAM/TSP)その他の炎症性疾患を発症する。ATLは、HTLV-I感染T細胞クローンの悪性増殖による腫瘍性疾患である。HTLV-Iのコードする調節タンパク質Taxは、細胞増殖やアポトーシス抑制に関与する種々の細胞因子を活性化させることが知られており、感染細胞の維持と腫瘍化に貢献すると考えられている(例えば、非特許文献3参照)。

10

## 【0003】

一方、HAM-TSP患者や無症候HTLV-Iキャリア末梢血リンパ球から、試験管内でHTLV-I特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が誘導できることが知られている。このCTLの主要標的抗原はHTLV-I Taxである(例えば、非特許文献4, 5参照)。ATL患者からCTLが誘導されることは稀であるが、造血幹細胞移植後のATL患者ではTax特異的CTL応答が著しく活性化する例が報告されている(例えば、非特許文献6参照)。また、ラットのHTLV-I感染腫瘍モデルでは、Taxを抗原とするワクチンは抗腫瘍免疫を誘導できることも知られている(例えば、非特許文献7, 8参照)。これらのことから、HTLV-I感染において、Tax特異的CTLは抗腫瘍免疫監視機構として働いていると考えられる。

20

## 【0004】

【非特許文献1】Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A 1980;77(12):7415-9.

【非特許文献2】Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita K I, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78(10):6476-80.

【非特許文献3】Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. Annu Rev Immunol 2001;19:475-96.

30

【非特許文献4】Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. Nature 1990;348(6298):245-8.

【非特許文献5】Kannagi M, Harada S, Maruyama I, Inoko H, Igarashi H, Kuwashima G, et al. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. Int Immunol 1991;3(8):761-7.

【非特許文献6】Harashima N, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, et al. Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. Cancer Res 2004;64(1):391-9.

40

【非特許文献7】Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Tateno H, Takemura F, Tsukahara T, et al. Prevention of adult T-cell leukemia-like lymphoproliferative disease in rats by adoptively transferred T cells from a donor immunized with human T-cell leukemia virus type 1 Tax-coding DNA vaccine. J Virol 2000;74(20):9610-6.

【非特許文献8】Hanabuchi S, Ohashi T, Koya Y, Kato H, Hasegawa A, Takemura F, et al. Regression of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated lymphomas in a rat model: peptide-induced T-cell immunity. J Natl Cancer Inst 2001;93(23):1775-83.

## 【発明の開示】

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

何故、A T L患者でC T L誘導率が低いのか、ずっと低いままなのか、発症後に低下したのか、詳細はわかっていない。これを明らかにすることは、A T Lの発症予防や治療に免疫学的なアプローチを行うために不可欠である。本発明の課題は、ヒトでのH T L V - I特異的T細胞応答を追跡したり、種々の病態を示す患者のT細胞応答を調べるための、検査室レベルで簡便に測定できるH T L V - I特異的T細胞応答検定方法やそのための試薬を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

T細胞応答はその機能が組織適合性抗原(M H C - I , II)に拘束されるため、抗原抗体反応のような液相の反応系では検出できない。これまで、H T L V - I特異的T細胞応答を調べるために用いられてきた方法のうち、最も確実なのは、自己のH T L V - I感染細胞株を樹立して抗原として用いる方法である。しかし、細胞株の樹立は難しく成功率が低いうえ樹立できたとしても時間がかかりすぎる。2番目に挙げられるものは、オリゴペプチドを抗原とする方法である。オリゴペプチドはM H C - I、IIに提示されるエピトープ部位が分かっている場合には良い抗原となり得る。しかし、遺伝的に雑多な集団であるヒトでは提示部位の予測が難しいため、結局、標的タンパク質の全領域を網羅するためには何十から何百もの重複する連続オリゴペプチドライブラリーを作製しなければならない。3番目にはM H C / ペプチド複合体のテトラマーが挙げられる。テトラマーは、血液中のC T Lを特異的に定量的に測ることができる。しかし、既知のC T Lエピトープの数が限られているため、H T L V - I特異的T細胞応答の全体に対して検出できる部分は非常に少ない。

## 【0007】

H T L V - I特異的細胞性免疫の低下は、H T L V - IキャリアのA T L発症リスクの指標の一つである。しかしT細胞応答はM H C拘束を受けるため、検定方法は非常に煩雑である。そこで、本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究し、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ(G S T) - T a x融合タンパク質を用いる簡便なH T L V - I特異的T細胞応答の検出系を試作した。T a xはそれ自身が細胞増殖やアポトーシス抑制活性を持つためT a xタンパク質を3分割するようデザインした。このことは融合タンパク質の収量を向上させ、また、T a xのどの部分にT細胞が強く反応するかを区別するのにも役立つ。そして、H T L V - I感染者の末梢血単核球にG S T - T a x融合タンパク質を添加して培養することにより、H T L V - I特異的細胞性免疫応答を主要エピトープの部位に応じて感度良く測定できることを見出した。また、このG S T - T a x融合タンパク質など、2 ~ 10個に分割されたT a xタンパク質を用いたアッセイ系が、免疫ラットやヒトH T L V - I感染者のT a x特異的T細胞応答を検出するに有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0008】

すなわち本発明は、(1) H T L V - I感染者の末梢血単核球に、2 ~ 10個に分割されたT a xタンパク質を添加して培養し、ヒトH T L V - I感染者のT a x特異的T細胞応答を検出することを特徴とするH T L V - I特異的T細胞応答検定方法や、(2) 2 ~ 10個に分割されたT a xタンパク質が、T a xタンパク質のN末端側と中央部とC末端側の3分割されたT a xタンパク質であることを特徴とする前記(1)記載のH T L V - I特異的T細胞応答検定方法や、(3) T a xタンパク質として、融合タンパク質を用いることを特徴とする前記(1)又は(2)記載のH T L V - I特異的T細胞応答検定方法や、(4) 融合タンパク質として、タグタンパク質との融合タンパク質を用いることを特徴とする前記(3)記載のH T L V - I特異的T細胞応答検定方法や、(5) タグタンパク質として、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ(G S T)を用いることを特徴とする前記(4)記載のH T L V - I特異的T細胞応答検定方法や、(6) ヒトH T L V - I感染者のT a x特異的T細胞応答を、培養上清中に産生されたI F N量を測定すること

10

20

30

40

50

により検出することを特徴とする前記(1)～(5)のいずれか記載のHTLV-I特異的T細胞応答検定方法に関する。

【0009】

また本発明は、(7)2～10個に分割されたTaxタンパク質を備えたことを特徴とするヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬や、(8)2～10個に分割されたTaxタンパク質が、Taxタンパク質のN末端側と中央部とC末端側の3分割されたTaxタンパク質であることを特徴とする前記(7)記載のヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬や、(9)Taxタンパク質が、融合タンパク質であることを特徴とする前記(7)又は(8)記載のヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬や、(10)融合タンパク質が、タグタンパク質との融合タンパク質であることを特徴とする前記(9)記載のヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬や、(11)タグタンパク質が、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)であることを特徴とする前記(10)記載のヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬や、(12)さらに、末梢血単核球培養用の培地を含むことを特徴とする前記(7)～(11)のいずれか記載のヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬や、(13)さらに、IFN測定用のELISAキットを含むことを特徴とする前記(7)～(12)のいずれか記載のヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬に関する。

10

【発明の効果】

【0010】

本発明によると、ヒトでのHTLV-I特異的T細胞応答を追跡したり、種々の病態を示す患者のT細胞応答を調べるに際し、検査室レベルで簡便に、HTLV-I特異的細胞性免疫応答を主要エピトープの部位に応じて感度良く測定できる。また、主要エピトープ部位が含まれる領域を決定することにより、HTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドの検索を容易にすることができ、個々のHTLV-I感染者に特異的な免疫応答誘導用ワクチンの開発が可能となる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明のHTLV-I特異的T細胞応答検定方法としては、2～10個に分割されたTaxタンパク質を添加して培養し、ヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答を検出する方法であれば特に制限されず、また、本発明のヒトHTLV-I感染者のTax特異的T細胞応答の検出試薬としては、2～10個に分割されたTaxタンパク質を備えた試薬であれば特に制限されるものではなく、上記2～10個に分割されたTaxタンパク質としては、例えば3個など、2～5個に分割されたTaxタンパク質が好ましい。10個を越えて分割されたTaxタンパク質を用いる場合、主要エピトープ部位が分割される可能性があり好ましくなく、他方、未分割の完全長のTaxタンパク質を用いる場合、T細胞等の免疫細胞が非特異的に活性化され、Tax特異的T細胞応答の精確な検出が妨げられることから好ましくない。また、上記2～10個に分割されたTaxタンパク質としては、分割された各々のTaxタンパク質(断片)をつなぎあわせた場合、Taxタンパク質のN末端からC末端までの全領域をカバーするものが好ましく、一部重複部分を有するものであってもよい。また、その大きさ(アミノ酸残基数)がほぼ等しいものから構成することが好ましい。なかでも、Taxタンパク質のN末端からC末端までの全領域をカバーする、GST-Tax(N末端側)融合タンパク質とGST-Tax(中央部)融合タンパク質とGST-Tax(C末端側)融合タンパク質とからなるGST-Tax融合タンパク質を好適に例示することができる。

30

40

【0012】

上記2～10個に分割されたTaxタンパク質は、融合タンパク質(融合ペプチドも含む)としても用いることができる。2～10個に分割されたTaxタンパク質と融合するタンパク質としては、T細胞等の免疫細胞が刺激を受けないタンパク質が好ましく、GST、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タ

50

グや H A、 F L A G、 M y c 等のエピトープタグなどのタグタンパク質（タグペプチドも含む）や、抗体の F c 領域や、アルカリフォスファターゼ等のマーカータンパク質を挙げることができる。そして、本発明の検定方法や検出試薬を用いる場合においては、2 ~ 10 個に分割された T a x タンパク質や融合タンパク質を個別にすべて使用することやこれらの混合物を使用することもできるが、これらの混合物をまず使用し、次いで個別に順次使用して主要エピトープ部位が含まれる領域を決定することもできる。

【0013】

上記2 ~ 10 個に分割された T a x タンパク質は、バキュロウイルスベクターなどを用いて発現精製した T a x タンパク質をプロテアーゼで分解することにより行うことができるが、例えば T a x c D N A（アクセションナンバー J 0 2 0 2 9）に分割数に等しいプライマーセットを用いて所望数の分割 T a x タンパク質をコードする D N A を作製し、発現ベクターにインフレームで組み込み大腸菌等の宿主細胞に導入し、かかる宿主細胞を培養することにより調製することができる。また、2 ~ 10 個に分割された T a x タンパク質を融合タンパク質として用いる場合は、T a x c D N A（アクセションナンバー J 0 2 0 2 9）に分割数に等しいプライマーセットを用いて所望数の分割 T a x タンパク質をコードする D N A を作製し、これらの D N A を G S T 遺伝子等のタグタンパク質などの 3' 側にそれぞれインフレームで連結することにより発現ベクターを構築し、大腸菌等の宿主細胞に導入し、かかる宿主細胞を培養することにより調製することができる。かかる G S T - T a x 融合タンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、H P L C を含めた公知の方法を適宜組み合わせ用いることができる。

10

20

【0014】

上記 H T L V - I 感染者の末梢血単核球は、例えばヘパリン添加静脈血を、Ficoll-Paque<sup>TM</sup>PLUS（アマシャムバイオサイエンス社）を用いた密度勾配遠心分離により単離するなど、常法により調製することができる。かかる末梢血単核球、好ましくは未培養の末梢血単核球に G S T - T a x 融合タンパク質を添加して培養する際の培地としては、末梢血単核球の培養に用いることができる培地であれば特に制限されず、例えば10%牛胎児血清添加 R P M I 1 6 4 0 培地を好適に例示することができる。また、培養温度は37 が好ましい。

30

【0015】

上記のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答を検出する方法としては、G S T - T a x 融合タンパク質により誘導される H T L V - I 特異的 T 細胞活性を検出する方法であれば特に制限されず、例えば培養上清中の インターフェロン（I F N）、T N F、I L - 2 などの産生量を E L I S A 法により測定する方法や、反応した免疫 T 細胞の細胞数を E L I S P O T 法やフローサイトメーターにより測定する方法を具体的に例示することができる。

【0016】

本発明のヒト H T L V - I 感染者の T a x 特異的 T 細胞応答の検出試薬は、上記本発明の H T L V - I 特異的 T 細胞応答検定方法に好適に用いることができ、G S T - T a x 融合タンパク質の他、末梢血単核球培養用の培地や、I F N、T N F、I L - 2 測定用の E L I S A キットを備えたものを好適に例示することができる。

40

【0017】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0018】

（G S T - T a x 融合タンパク質の作製）

H T L V - I T a x - G S T 融合タンパク質を作製するため、図1に示すように、T a x c D N A を含む p M T - 2 T a x（Matsumoto K, Akashi K, Shibata H, Yutsudo M, Hakura A. Single amino acid substitution (58Pro-->Ser) in HTLV-I tax results

50

in loss of ras cooperative focus formation in rat embryo fibroblasts. *Virology* 1994;200(2):813-5) から 3 種類のプライマーセット ( 矢印 ) を用いて 3 種類の DNA 断片 ( 白四角 ) を得た。それぞれを Tax - A ( N 末側 )、Tax - B ( 中央部 )、Tax - C ( C 末側 ) と名付け、BamH1 と EcoR1 リンカーを介して GST 発現ベクター pGEX - 2T ( アマシャムバイオサイエンス株式会社 ) 中に挿入した。これを大腸菌 DH5 に導入し、封入体中の GST - Tax 融合タンパク質を抽出し GST4B カラム吸着分画を HPLC で精製した。プライマーとしては、Bam-TS: 5' -TTGGATCCATGGCCCACTTCCCAGGGTT-3' ( 配列番号 1 )、Eco-TAR: 5' -TTGAATTCCTGCTGCCCAAGGGTGGGTT-3' ( 配列番号 2 )、Bam-TBS: 5' -TTGGATCCTCCCTTCCGAAATGGATA-3' ( 配列番号 3 )、Eco-TBR: 5' -TTGAATTCGGAACGGAAGGAGGCCGTTTT-3' ( 配列番号 4 )、Bam-TCS: 5' -TTGGATCCCGCTCACGCTAACAGCCTG-3' ( 配列番号 5 )、Eco-TR: 5' -TTGAATTCCTCAGACTTCTGTTTCTCGGA-3' ( 配列番号 6 ) を用いた。

10

#### 【実施例 2】

##### 【0019】

( 免疫細胞の調整 )

ラットの免疫細胞として、pMT - 2Tax プラスミドを遺伝子銃で 2 回免疫したラットの脾細胞を未培養で用いた。対照として Tax を含まないベクタープラスミドを免疫したラットの脾細胞を用いた。ヒト由来の免疫細胞として、造血幹細胞移植後の ATL 患者末梢血単核球分画を未培養で用いた。対照として非感染者の末梢血単核球分画を未培養で用いた。用いた pMT - 2Tax 免疫ラット T 細胞と移植後 ATL 患者 T 細胞は、い

20

#### 【実施例 3】

##### 【0020】

( IFN および細胞増殖アッセイ )

10% 牛胎児血清添加 RPMI 1640 培地に T 細胞を浮遊させ、96 ウエルプレートに分注し (  $2 \times 10^5$  / well )、種々の濃度の GST - Tax 融合タンパク質あるいは合成ペプチドカクテルを添加したのち 37 °C で培養した。4 日目および 7 日目の上清中 IFN 量は ELISA で測定した。

30

#### 【実施例 4】

##### 【0021】

( ペプチドカクテルの調製 )

Tax のアミノ酸配列に従い、アミノ酸 5 個ずつの重複を持たせ、合計 35 個の連続オリゴペプチド ( 各 15 mer ) を合成した。N 末端から 12 個のオリゴペプチドを混合したものを Tax p1 - 12 カクテル、13 - 22 個目までのオリゴペプチドを混合したものを Tax p13 - 22 カクテル、22 個目から C 末端までのオリゴペプチドを混合したものを Tax p23 - 35 カクテルとした。Tax p1 - 12、p13 - 22、p23 - 35 がカバーする領域は、GST - Tax - A、- B、- C にそれぞれ相当する。

#### 【実施例 5】

##### 【0022】

( 免疫ラット脾 T 細胞の GST - Tax 反応特異性 )

pMT - 2Tax 免疫ラット脾細胞に、GST - Tax - A、- B、- C の各単独を 0.078、0.3125、1.25  $\mu$ g / well の 3 段階の濃度で、3 種の混合物を 0.234、0.938、3.75  $\mu$ g / well の 3 段階の濃度で添加し、培養 4 日目の上清中に産生された IFN 量を測定した。結果を図 2 に示す。その結果、GST - Tax - A、- B、- C の混合物を添加した場合に最も高い IFN 産生を示した。それぞれを単独で添加した場合は、GST - Tax - A、- B、- C のうち GST - Tax - B に対して最も高い反応を示した。しかし、GST タンパク質のみを加えてもほとんど反応しなかった。また、GST - Tax に対する T 細胞の IFN 産生は量依存性であった。

40

50

## 【実施例 6】

## 【0023】

(GST-Tax とペプチドカクテルの比較)

p bMT-2Tax 免疫ラット脾細胞に、GST-Tax と同濃度 (最終濃度  $0.075 \sim 1.3 \mu\text{g}/\text{well}$ ) のペプチドカクテルを添加し、培養4日目の上清中に産生されたIFN 量を測定したところ、ほとんど反応が認められなかった。そこで、ペプチドカクテルの濃度を上げ、 $1.625$ 、 $6.25$ 、 $26 \mu\text{g}/\text{well}$  の3段階の濃度のペプチドカクテルを用いた。結果を図3に示す。その結果、 $1.625 \sim 26 \mu\text{g}/\text{well}$  の3段階の濃度のペプチドカクテル添加した場合に、有意なレベルのIFN 産生が認められた。ところが、GST-Tax の場合には、GST-Tax-B が最も反応性が高かったのに対して、これに相当するペプチドカクテル p13-22 にはほとんど反応しなかった。以上のように、GST-Tax を用いた場合のT細胞反応性はペプチドカクテルを用いた場合より感度が良く、反応部位には解離が認められた。

10

## 【実施例 7】

## 【0024】

(ヒトHTLV-I感染者末梢血からのTax 特異的T細胞応答の検出)

造血幹細胞移植後緩解に至ったATL患者の末梢血単核球分画 ( $2 \times 10^5/\text{well}$ ) にGST-Tax-A、-B、-Cの各単独を $1.25 \mu\text{g}/\text{well}$ の濃度で、3種の混合物を $3.75 \mu\text{g}/\text{well}$ の濃度で添加し、培養4日目及び7日目の上清中に産生されたIFN 量をELISA法により定量した。結果を図4に示す。非感染者の末梢血単核球分画はほとんど反応しないのに対し、HTLV-I感染者 (造血幹細胞移植後のATL患者) ではGST-Tax に対し高いレベルのIFN 産生が認められた。ラットの場合と同様にGST-Tax-A、-B、-Cの混合物を添加した時に高い反応性が認められたが、単独で添加した場合はGST-Tax-A が最も反応性が高かった。GSTのみでは反応せず、Tax 特異性が確認された。

20

## 【0025】

(まとめ)

以上のことから、GST-Tax 融合タンパク質を用いてTax 特異的T細胞応答を検出できることが分かった。HTLV-I感染自家細胞株はMHC-I、-IIとも豊富でTax 以外にも多くのHTLV-I抗原を発現している。GST-Tax を用いたアッセイで検出できるのはその一部であると考えられる。しかし、今回の実験データから、GST-Tax 融合タンパク質は末梢血単核球分画中の抗原提示細胞にプロセスおよび提示され、感染個体のHTLV-I特異的T細胞に認識され得ることがわかった。

30

## 【0026】

これまで、HTLV-I感染自家細胞株を樹立することが難しいために、ATL発症リスクの一つである感染者のHTLV-I特異的T細胞応答を測定することは、容易ではなかった。しかし、本発明方法では、細胞株の樹立は不要であり、MHC (ヒトではHLA型) を調べる必要もなく、末梢血単核球分画に直接GST-Tax を添加して培養するだけでT細胞応答を調べることができる。

40

## 【0027】

ペプチドカクテルを用いたアッセイも類似のT細胞応答を検出できる。しかし、免疫ラットT細胞が融合タンパク質GST-Tax-Bに強く反応したのに対し、相当する領域のペプチドカクテル p13-22 には反応が乏しかった。これは、今回用いた5個のアミノ酸の重複をもつ連続ペプチドでは、実際に細胞内でプロセスされるペプチドを完全に網羅できない可能性を示唆している。また、反応に要求されるタンパク質量はペプチドカクテルの方が高かった。

## 【0028】

Tax の全体を3つの領域に分割した理由は、Tax 自体の生理活性の影響をさけること、GST-Tax 融合タンパク質の収量を向上させることに加え、T細胞の主要エピートプの存在領域を知るためである。免疫ラットのT細胞は、GST-Tax-B と特に強

50

く反応したが、このラットの系統ではCD8陽性細胞傷害性T細胞（CTL）のメジャーエピトープはTax180-188であることが分かっている。これは、GST-Tax-Bの領域に含まれている。また、実験で用いたヒト感染者サンプルはGST-Tax-Aに強く反応したが、このサンプルは以前の解析でTax11-19エピトープを認識するCD8陽性CTLを多く含むことが分かっている。この領域はGST-Tax-Aに含まれている。

【0029】

GST-Taxのようなタンパク質抗原を用いた方法ではMHC-IよりMHC-IIに強く抗原提示されると考えられており、いわゆる“cross presentation”により一部の抗原はMHC-Iに提示されると考えられている。また、ヘルパーエピトープとキラーエピトープが近傍に存在することも報告されている。従って、今回の結果は、GST-Tax-A、-B、-Cに対する反応性が、T細胞エピトープの位置予測にも役立つことを示している。

【図面の簡単な説明】

【0030】

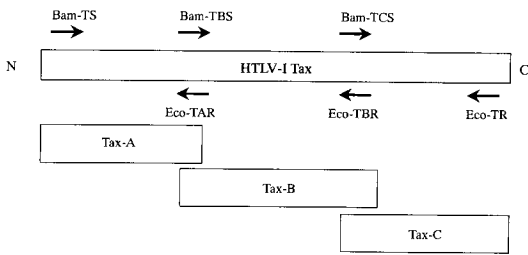
【図1】 GST-Tax融合タンパク質作製に用いたTax遺伝子断片とプライマーの位置を示す図である。

【図2】 GST-Taxに対する免疫ラットのT細胞応答の結果を示す図である。

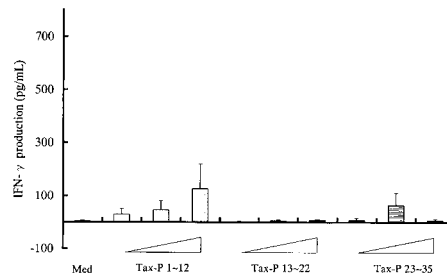
【図3】 ペプチドカクテルに対する免疫ラットのT細胞応答の結果を示す図である。

【図4】 ヒトHTLV-I感染者のT細胞応答の検出結果を示す図である。

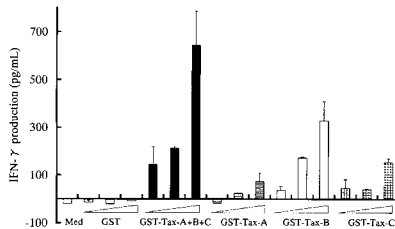
【図1】



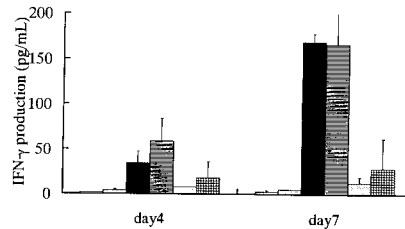
【図3】



【図2】



【図4】



- Medium
- ▨ GST
- GST-Tax-A+B+C
- ▤ GST-Tax-A
- ▥ GST-Tax-B
- ▧ GST-Tax-C

10

20

【配列表】

2008022702000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 栗原 清

東京都文京区湯島1丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内

Fターム(参考) 2G045 BB20 CB01 DA36 FB03  
4B024 AA14 BA80 CA02 CA09 DA06 EA04 FA10 GA18 HA11  
4B063 QA07 QA19 QQ08 QQ79 QR06 QR48 QR56 QS33 QS38  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA04 DA86 DA89 EA52 FA74

专利名称(译)	htlv-i特异性t细胞反应的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008022702A</a>	公开(公告)日	2008-02-07
申请号	JP2004317378	申请日	2004-10-29
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京医科齿科大学		
[标]发明人	神奈木真理 栗原清		
发明人	神奈木 真理 栗原 清		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/68 C07K14/15 C07K19/00 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/505 G01N33/56988		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA G01N33/53.D G01N33/68 C07K14/15 C07K19/00 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA14 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA18 4B024/HA11 4B063/QA07 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR06 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QS38 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA04 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	▲▼高津哉		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：轻松测量人体中HTLV-I特异性T细胞的反应，以追踪人类HTLV-I特异性T细胞的反应并研究各种病理状况患者的T细胞反应。提供测定方法及其试剂。解决方案：使用谷胱甘肽-S-转移酶 ( GST ) -Tax融合蛋白的简单HTLV-I特异性T细胞反应检测系统被原型化。Tax被设计为将Tax蛋白分为三种，因为它具有细胞增殖和凋亡抑制活性。将GST-Tax融合蛋白添加到HTLV-1感染细胞的外周血单核细胞中并进行培养，并测量培养上清液中的IFN $\gamma$ 以确定主要表位处的HTLV-1特异性细胞免疫应答。视情况而定，以良好的灵敏度进行测量。 [选型图]图1

