

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5626990号
(P5626990)

(45) 発行日 平成26年11月19日(2014.11.19)

(24) 登録日 平成26年10月10日(2014.10.10)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 L
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
請求項の数 21 (全 33 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2010-535650 (P2010-535650)
 (86) (22) 出願日 平成21年10月26日(2009.10.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/005625
 (87) 国際公開番号 W02010/050167
 (87) 国際公開日 平成22年5月6日(2010.5.6)
 審査請求日 平成24年4月19日(2012.4.19)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-281930 (P2008-281930)
 (32) 優先日 平成20年10月31日(2008.10.31)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 506208908
 学校法人兵庫医科大学
 兵庫県西宮市武庫川町1番1号
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
 (72) 発明者 中西 憲司
 日本国兵庫県西宮市武庫川町1番1号 学校法人兵庫医科大学内
 (72) 発明者 善本 知広
 日本国兵庫県西宮市武庫川町1番1号 学校法人兵庫医科大学内

審査官 太田 雄三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Th2細胞誘導用組成物およびTh2型疾患の治療組成物、ならびにこれらの利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導する方法であって、
 抗原と該抗原に結合するIgEとからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第1工程、
 該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、および
 ナーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程を包含する、方法。

【請求項2】

抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えている、請求項1に記載の方法においてナイーブT細胞をTh2細胞に誘導するためのキット。

【請求項3】

IL-4を生成する方法であって、
 抗原と該抗原に結合するIgEとからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第1工程、および
 該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程を包含する、方法。

【請求項4】

ナイーブT細胞を、上記第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程をさらに包含する、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、請求項 3 または 4 に記載の方法において I L - 4 を生成するためのキット。

【請求項 6】

I g E を生成する方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第 1 工程、

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、

ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程、ならびに

B 細胞を、該抗原および抗原提示細胞の存在下で、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養する第 4 工程

を包含する、方法。

【請求項 7】

上記第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、上記抗原、上記 T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程

をさらに包含する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、請求項 6 または 7 に記載の方法において I g E を生成するためのキット。

【請求項 9】

T h 2 型疾患に対する治療剤のスクリーニング方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第 1 工程、および

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程を包含する、方法。

【請求項 10】

上記第 2 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 2 工程後の好塩基球の細胞表面上に提示されている M H C クラス I I 分子または C D 8 0 分子の量を測定する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

ナイーブ T 細胞を、上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程をさらに包含し、

第 2 工程または第 3 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞の量を測定する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

B 細胞を、上記抗原および抗原提示細胞の存在下で、上記第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養して I g E を生成する第 4 工程をさらに包含し、

上記第 2 工程～第 4 工程の少なくとも 1 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 4 工程において生成された I g E の量を測定する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

上記第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、上記抗原、T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程をさらに包含し、

上記第 2 工程～第 5 工程の少なくとも 1 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 5 工程において生成された I g E の量を測定する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

T h 2 型疾患に対する治療剤のスクリーニング方法であって、

上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球を非ヒト動物に投与して非ヒトモデル動物を製する工程、

該非ヒトモデル動物に候補物質を投与する工程、および

10

20

30

40

50

該候補物質を投与した後の非ヒトモデル動物における、Th2型疾患に対する改善効果の有無を測定する工程をさらに包含する、請求項9に記載の方法。

【請求項15】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項9～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えている、請求項9～15のいずれか1項に記載の方法においてTh2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするためのキット。

10

【請求項17】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項16に記載のキット。

【請求項18】

Th2型疾患の非ヒトモデル動物を作製する方法であって、
 抗原と該抗原に結合するIgEとからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第1工程、
 該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、および
 該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を、非ヒト動物に投与する工程を包含する、方法。

20

【請求項19】

前記疾患が気管支喘息であり、前記複合体の存在下での培養後の好塩基球を経鼻投与することを包含する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えている、請求項18または19に記載の方法においてTh2型疾患の非ヒトモデル動物を作製するためのキット。

【請求項21】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項20に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Th2細胞を誘導するための組成物およびその利用に関するものであって、特に、Th2型の免疫応答を惹起する初期IL-4を産生するための組成物およびその利用に関するものである。また、本発明は、Th2型疾患を治療するための組成物およびその利用に関するものであり、特に、Th2型免疫応答を惹起する初期IL-4の産生をブロックするための組成物およびその利用に関するものである。

40

【背景技術】

【0002】

マクロファージや樹状細胞は、細菌の侵入の際に、Toll-likeレセプター(TLR)を介して樹状細胞(DC)が細菌を認識し、刺激補助分子を発現するように成熟し、Th1型の免疫応答を誘導するIL-12およびIL-18などを産生する。これらの分子を介してマクロファージや樹状細胞と結合するとともにIL-12が作用することによって、ナイーブT細胞はTh1細胞に分化する。このTh1細胞から分泌されるIFN- γ がマクロファージを活性化し、貪食、殺菌などの作用が活性化される。

【0003】

ナイーブT細胞は、IL-12によってTh1細胞に分化し、IL-4によってTh2

50

細胞に分化する。T h 2 細胞はT h 1 細胞とともに適応免疫系において重要な細胞といえる。しかし、T h 2 型の免疫応答の発達における先天性免疫細胞の役割はほとんど理解されていない。

【 0 0 0 4 】

好塩基球および肥満細胞は、I g E 媒介性のアレルギー性炎症における重要なエフェクター細胞である（非特許文献 1 ~ 4 参照）。また、寄生虫が感染した宿主マウスにおいて、T h 2 細胞、ならびに脾臓および肝臓での好塩基球の増殖が強く誘導される（非特許文献 5 参照）。このことは、好塩基球が、T h 2 応答の誘導および / または増加に寄与することを示唆する。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】Galli, S. J. Curr Opin Hematol 7: 32-9 (2000)

【非特許文献 2】Galli, S. J. et al. Annu Rev Immunol 23: 749-86 (2005)

【非特許文献 3】Kawakami, T. & Galli, S. J. Nat Rev Immunol 2: 773-86 (2002)

【非特許文献 4】Mukai, K. et al. Immunity 23: 191-202 (2005)

【非特許文献 5】Min, B. et al. J Exp Med 200: 507-17 (2004)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

20

しかし、ナイーブ C D 4 + T 細胞を T h 2 細胞に分化させるのに必要な初期 I L - 4 を産生する細胞の性質はまだ知られておらず、また、初期 I L - 4 を産生させるための初期刺激が、いかなる物質によって行われるのかも知られておらず、自然免疫担当細胞が T h 2 細胞を分化誘導するメカニズムは未だ明かされていない。

【 0 0 0 7 】

本発明は、上記の問題点を鑑みてなされたものであり、その目的は、T h 2 型の免疫応答の作用メカニズム、特に初期 I L - 4 の産生機序を明らかにすることによって、T h 2 型疾患を治療 / 予防する技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

30

本発明者らは、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともに I L - 4 を産生し、その I L - 4 存在下で好塩基球の表面に提示された抗原ペプチド / M H C クラス II 分子複合体を認識したナイーブ T 細胞が T h 2 細胞に誘導されることを見出した。そして、T h 2 細胞が誘導されると、刺激を受けた B 細胞を活性化して、抗原に対する I g E が産生されることを確認し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明に係る組成物は、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導するために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合する I g E をさらに含有していることがより好ましい。

【 0 0 0 9 】

本発明に係る組成物は、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係る T h 2 細胞誘導方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、およびナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程を包含することを特徴としている。

40

【 0 0 1 0 】

本発明に係る組成物は、I L - 4 を生成するために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合する I g E をさらに含有していることがより好ましい。

【 0 0 1 1 】

本発明に係る組成物は、I L - 4 を生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明

50

に係る I L - 4 産生方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I L - 4、特に初期 I L - 4 (primary IL-4) を産生し得る。また、本発明に係る I L - 4 産生方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、およびナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I L - 4、特に二次的 I L - 4 (secondary IL-4) を産生し得る。

【 0 0 1 2 】

本発明に係る組成物は、I g E を生成するために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合する I g E をさらに含有していることがより好ましい。

10

【 0 0 1 3 】

本発明に係る組成物は、I g E を生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係る I g E 生成方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程、ならびに B 細胞を、該抗原および抗原提示細胞の存在下で、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養する第 4 工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I g E、特に初期 I g E (primary IgE) を産生し得る。また、本発明に係る I g E 生成方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程、B 細胞を、該抗原および抗原提示細胞の存在下で、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養して I g E を生成する第 4 工程、ならびに第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、該抗原、該 T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I g E、特に二次的 I g E (secondary IgE) を産生し得る。

20

【 0 0 1 4 】

本発明に係る組成物は、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合する I g E をさらに含有していることがより好ましい。なお、上記 T h 2 型疾患は、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択されることが好ましい。

30

【 0 0 1 5 】

本発明に係る組成物は、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程を包含することを特徴としている。本発明に係るスクリーニング方法において、第 2 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 2 工程後の好塩基球の細胞表面上に提示されている M H C クラス I I 分子または C D 8 0 分子の量を測定することが好ましい。

40

【 0 0 1 6 】

また、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程をさらに包含し、第 2 工程または第 3 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞の量を測定してもよい。

【 0 0 1 7 】

さらに、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程 B 細胞を、上記抗原および抗原提示細胞の存在下で、第 3 工程に

50

において誘導されたTh2細胞とともに培養してIgEを生成する第4工程をさらに包含し、第2工程～第4工程の少なくとも1工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第4工程において生成されたIgEの量を測定してもよい。

【0018】

なおさらに、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程第4工程にて生成されたIgEの存在下で、上記抗原、Th2細胞およびB細胞を培養する第5工程を包含し、第2工程～第5工程の少なくとも1工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第5工程において生成されたIgEの量を測定してもよい。

【0019】

本発明に係るモデル動物作製方法は、Th2型疾患のモデル動物を作製するために、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、および該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を、動物に投与する工程を包含することを特徴としている。なお、上記Th2型疾患は、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択されることが好ましい。本発明に係る作製方法によって作製されるモデル動物は、気管支喘息のモデル動物であってもよく、この場合、上記複合体の存在下での培養後の好塩基球を静脈内投与した後に、当該抗原を経鼻投与することが好ましい。

【0020】

このような作製方法によって作製されたモデル動物は、Th2型疾患に対する治療剤のスクリーニングに用いられ得る。すなわち、本発明に係るスクリーニング方法は、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、第2工程にて培養した後の好塩基球を動物に投与してモデル動物を作製する工程、該モデル動物に候補物質を投与する工程、および該候補物質を投与した後のモデル動物における、Th2型疾患に対する改善効果の有無を測定する工程を包含することを特徴としている。

【0021】

本発明に係る組成物は、Th2型疾患を処置するために、好塩基球を枯渇させる物質またはFcγR1の機能を阻害する物質を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、FcγR1に対する抗体を含有していることが好ましい。

【0022】

本発明に係る方法は、Th2型疾患を処置するために、被験体から好塩基球を枯渇させる工程、または被験体にFcγR1の機能を阻害する物質を投与する工程を包含することを特徴としている。本発明に係る方法は、被験体に、FcγR1に対する抗体を投与する工程を包含することが好ましい。

【0023】

また、本発明者らは、抗原-IgE複合体によってパルスした好塩基球を用いることが好ましいこと、さらには、正常なマウスに移入した抗原-IgE複合体が内因性の好塩基球に起因するTh2応答を誘導することを見出した。すなわち、本発明に係る複合体は、抗原と該抗原に結合するIgEとからなることを特徴としている。本発明を用いれば、末梢血、脾臓、骨髄等に存在する好塩基球を用いてIL-4の産生を誘導し得る。このような好塩基球は脾臓等においてTh2応答を誘導することができる。また、本発明に係る組成物は、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。このような組成物を用いれば、本発明に係る複合体を生成することができるので、Th2応答を誘導することができる。さらに、本発明に係るキットは、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。このようなキットを用いれば、本発明に係る複合体を生成することができるので、Th2応答を誘導することができる。

【0024】

本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導する技術に利用可能である

10

20

30

40

50

。すなわち、本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導するために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導するために、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

【0025】

本発明に係る組成物は、IL-4を生成する技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、IL-4を生成するために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、二次的IL-4を生成するために、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

10

【0026】

本発明に係る組成物は、IgEを生成する技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、IgEを生成するために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、IgEを生成するために、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

【0027】

本発明に係る組成物は、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングする技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

20

【0028】

本発明に係る組成物は、Th2型疾患のモデル動物を作製する技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、Th2型疾患のモデル動物を作製するために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、Th2型疾患のモデル動物を作製するために、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

【発明の効果】

【0029】

本発明によれば、Th2型の免疫応答の作用メカニズム、特に初期IL-4の産生機序を明らかにすることができる。また、本発明を用いれば、Th2細胞誘導、IL-4生成、IgE生成、Th2疾患治療剤のスクリーニングが可能になる。さらに、本発明を用いれば、Th2型疾患モデル動物を作製し得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1(a)】正常マウスまたは寄生虫感染マウスから調製した脾臓の非B非T細胞におけるFcR1およびc-kitの発現を、フローサイトメトリーによって解析した結果、ならびにFcR1⁺/c-kit⁻細胞(好塩基球)を分離した結果を示す図である。

40

【図1(b)】分離した好塩基球の培養上清中のサイトカイン含量を示す図である。

【図1(c)】T細胞枯渇マウス脾細胞(T脾臓)、または寄生虫感染マウスからの好塩基球の存在下にて、ナイーブT細胞を、OVA₃₂₃₋₃₃₉で刺激し、生成したCD4⁺T細胞上における細胞質IL-4およびIFN- γ についてFACSによって解析した結果を示す図である。

【図1(d)】T細胞枯渇マウス脾細胞(T脾臓)、または寄生虫感染マウスからの好塩基球の存在下にて、ナイーブT細胞を、OVA₃₂₃₋₃₃₉で刺激し、生成したCD4⁺T細胞上のIL-33R鎖の発現を示す図である。

【図2(a)】骨髓由来の、FACSソートされた、好塩基球および肥満細胞、ならびにT細胞枯渇脾細胞(T脾臓)を、種々の表面マーカーによって染色した結果を示す図で

50

ある。

【図2(b)】骨髄由来の、FACSソートされた、好塩基球および肥満細胞を、MHCクラスII(I-A)およびFcR1の発現について、フローサイトメトリーで解析した結果を示す図である。

【図2(c)】ヒトIL-3の存在下にて培養したCD34⁺臍帯血細胞を、c-kitおよびCD203c(左)、ならびにCD203c⁺c-kit⁻である細胞中のHLA-DR(右)の発現について、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

【図3(a)】ナイーブT細胞を、T細胞枯渇マウス脾細胞(T脾臓)、骨髄由来の精製好塩基球または肥満細胞の存在下で、OVA₃₂₃₋₃₃₉で刺激し、生成したCD4⁺T細胞におけるIL-4およびIFN- γ の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。Th2細胞の誘導のために、IL-4(1000U/mL)を培養物にさらに添加した(Th2条件)。

10

【図3(b)】ナイーブT細胞を、骨髄由来の精製好塩基球(WT;野生型マウス、G4/G4;IL-4欠損マウス)、または脾臓DCの存在下で、OVA₃₂₃₋₃₃₉で刺激し、生成したCD4⁺T細胞におけるIL-4およびIFN- γ の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。

【図3(c)】ナイーブT細胞を、T細胞枯渇マウス脾細胞(T脾臓)、骨髄由来の精製好塩基球の存在下で、DNP-OVAで刺激し、生成したCD4⁺T細胞におけるIL-4およびIFN- γ の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。

20

【図3(d)】ナイーブT細胞を、T細胞枯渇マウス脾細胞(T脾臓)、骨髄由来の精製好塩基球の存在下で、抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVA(6.25~100 μ g/mL)で刺激し、生成したCD4⁺T細胞におけるIL-4およびIFN- γ の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。

【図4(a)】DNP-OVA/抗DNP IgEとともに培養した好塩基球または肥満細胞を用いて正常マウスを免疫し、4日後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの2日後にこのマウスから調製した脾臓CD4⁺T細胞を、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- γ の量をELISAによって測定した結果を示す図である。

30

【図4(b)】DNP-OVA/抗DNP IgEとともに培養した好塩基球を用いて正常マウスを免疫し、1週間後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの日にこのマウスから回収した血清中のOVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体を、ELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(c)】DNP-OVA/抗DNP IgEをとともに培養した好塩基球を用いて正常マウスを免疫し、1週間後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの2週間後にこのマウスから調製した脾臓CD4⁺T細胞を、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- γ の量をELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(d)】DNP-OVA/抗DNP IgEとともに培養した好塩基球を用いて正常マウスを免疫し、1週間後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの2週間後にこのマウスから調製した脾臓中のCD4⁺CD62L^{low}IL33R⁺Th2細胞の割合を測定した結果を示す図である。

40

【図4(e)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEの注入の前後のマウス末梢血、脾臓、骨髄におけるIL-4の産生を、IL-4のレポーターとしてのGFPの発現によって確認した結果を示す図である。

【図4(f)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEの注入の前後にFcR1(MAR-1)を腹腔内投与したマウスから、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後に調製した脾臓CD4⁺T細胞を、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- γ の量をE

50

ELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(g)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEの注入の前後に抗FcR1 (MAR-1)を腹腔内投与したマウスから、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後に調製した脾臓CD4⁺T細胞を、OVAでパルスしたAPC (T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- γ の量をELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(h)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEを注入したマウスを、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後にインタクトなOVAタンパク質を用いて静脈内チャレンジし、チャレンジの日にこのマウスから回収した血清中のOVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体を、ELISAによって測定した結果を示す図である。なお、好塩基球の数の枯渇または増加のために、マウスに、抗FcR1 (MAR-1)を注入している。

10

【図4(i)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEを注入したマウスを、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後にインタクトなOVAタンパク質を用いて静脈内チャレンジし、チャレンジの日にこのマウスから回収した血清中のOVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体を、ELISAによって測定した結果を示す図である。なお、好塩基球の数の枯渇または増加のために、マウスに、IL-3を注入している。

【図5】好塩基球によって駆動されたTh2細胞からのサイトカイン産生を示す図であり、T細胞枯渇マウス脾臓細胞 (T脾臓)、または寄生虫感染マウスからの好塩基球の存在下にて、ナイーブT細胞を、OVA₃₂₃₋₃₃₉で7日間刺激し、生成したCD4⁺T細胞を、照射したT細胞枯渇マウス脾臓細胞の存在下にて、IL-33ありまたはなしでOVA₃₂₃₋₃₃₉を用いて48時間チャレンジし、回収した上清における種々のサイトカイン産生を試験した結果を示す。

20

【図6(a)】マウス骨髄細胞をIL-3とともに10日間培養し、FcR1およびc-kitの発現について、フローサイトメトリーで解析し、次いで、FACS AriaによってFcR1⁺/c-kit⁻ (好塩基球)の細胞集団とFcR1⁺/c-kit⁺ (肥満細胞)の細胞集団とにソートした結果を示す図である。

【図6(b)】ソートしたFcR1⁺/c-kit⁻ (好塩基球)およびFcR1⁺/c-kit⁺ (肥満細胞)の細胞集団を、電子顕微鏡観察した結果を示す図である。

【図6(c)】陰性選別によって濃縮したヒト末梢血単核細胞の、選別後すぐ(左)またはヒトIL-3存在下で24時間培養した後(右)の、HLA-DRとCD203cの発現を測定した結果を示す図である。

30

【図6(d)】ソートしたCD203c⁺/HLA-DR⁺細胞集団の、ギムザ染色(左; 100 \times)および電子顕微鏡観察(右)の結果を示す図である。

【図7】好塩基球誘導性の抗原特異的T細胞増殖を示す図であり、ナイーブT細胞を、OVA₃₂₃₋₃₃₉ (1 μ M)、あるいは抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVAで、照射したT脾臓または好塩基球の存在下にて4日間刺激し、最終16時間の間のDNA合成を測定した結果を示す図である。

【図8(a)】ナイーブT細胞を、OVA₃₂₃₋₃₃₉、あるいは抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVAで、照射したT脾臓または好塩基球の存在下にて24時間刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4の産生を試験した結果を示す図である。

40

【図8(b)】骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞を、抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVAで16時間刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4またはIL-13の産生を試験した結果を示す図である。

【図8(c)】骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞から抽出したmRNAを、TLR遺伝子および β -アクトチンの発現についてRT-PCRによって解析した結果を示す図である。

【図8(d)】骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞を、IL-3、

50

および I L - 1 8、I L - 3 3、L P S または P G N で 2 4 時間刺激し、上清を回収し、E L I S A によって I L - 4、I L - 6 または I L - 1 3 の産生を試験した結果を示す図である。

【図 9 (a)】抗マウス F c 1 (M A R - 1 (+)) または P B S (M A R - 1 (-)) を腹腔内投与されたマウスから最終投与の 2 日後に調製した脾臓における好塩基球の数をフローサイトメトリーによって定量した結果を示す図である。

【図 9 (b)】抗マウス F c 1 (M A R - 1 (+)) または P B S (M A R - 1 (-)) を腹腔内投与されたマウスから最終投与の 2 日後に調製した肝臓における好塩基球の数をフローサイトメトリーによって定量した結果を示す図である。

【図 9 (c)】抗マウス F c 1 (M A R - 1 (+)) または P B S (M A R - 1 (-)) を腹腔内投与されたマウスに D N P - O V A / 抗 D N P I g E をさらに 3 日間、M A R - 1 または P B S とともに注入し、O V A での腹腔内チャレンジの後に、M A R - 1 または P B S でさらに処理し、調製した血液における好塩基球の数を定量した結果を示す図である。

10

【図 9 (d)】抗マウス F c 1 (M A R - 1 (+)) または P B S (M A R - 1 (-)) を腹腔内投与されたマウスに D N P - O V A / 抗 D N P I g E をさらに 3 日間、M A R - 1 または P B S とともに注入し、O V A での腹腔内チャレンジの後に、M A R - 1 または P B S でさらに処理し、調製した脾臓における好塩基球の数を定量した結果を示す図である。

【図 9 (e)】I L - 3 を注入したマウスからの好塩基球の頻度について、脾臓の非 B 非 T 細胞に対する F c R 1 + / D X 5 + 細胞の割合を示す図である。

20

【図 1 0】抗原でパルスされた好塩基球または I g E 複合体によるインビボでの T h 2 / I g E 誘導の機序を示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 1 】

〔 1 : 好塩基球およびその利用 〕

好塩基球および肥満細胞はアレルギー性炎症の効果細胞であることが、これまでによく知られている。今回、本発明者らは、好塩基球が主要組織適合性抗原クラス II 分子および C D 8 0 分子を発現することを見出し、好塩基球が抗原を細胞内に取り込み、さらに抗原由来のペプチド断片をクラス II 分子に結合させた態様で細胞表面に発現するとともに、I L - 4 を産生することを見出した。さらに、このような好塩基球を正常なマウスに移入すると、抗原特異的 T h 2 細胞が誘導され、さらに、O V A 溶液を経静脈投与すると O V A 特異的な I g E 産生が誘導され、経鼻投与すると気管支喘息が誘導されることを見出した。このように、本発明は、当業者に容易に予測し得ない新規知見に基づいて完成された。

30

【 0 0 3 2 】

本発明に係る組成物は、好塩基球を含有していることを特徴としている。上述したように、本発明者らは、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともに I L - 4 を産生し、その I L - 4 存在下で好塩基球の表面に提示された抗原ペプチド / M H C クラス II 分子複合体を認識したナイーブ T 細胞が T h 2 細胞に分化することを見出した。そして、T h 2 細胞が誘導されると、B 細胞を活性化して、抗原に対する I g E が産生されることを確認し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明に係る組成物は、ナイーブ T 細胞から T h 2 細胞への誘導、I L - 4 の生成、I g E の生成などに好適に用いられ得る。

40

【 0 0 3 3 】

抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるために、本発明に係る組成物は、好塩基球を含有していればよいといえるが、目的の抗原をさらに含有していてもよく、目的の抗原の取り込みをより促進するためには、該抗原に結合する I g E をさらに含有していることがより好ましい。さらに、好塩基球に取り込ませるべき抗原 - I g E 複合体の形成を促進するために、抗原にハプテンを連結していてもよい。この場合、I g E は抗ハプテン I

50

g Eであってもよく、本明細書中で使用される場合、抗ハプテン I g E もまた、該抗原に結合する I g E の範疇に含まれる。

【 0 0 3 4 】

本発明に用いられるに好ましい好塩基球は、種々の組織から調製され得るが、脾臓、脊髄などの組織由来の好塩基球が好ましい。生体内に存在する好塩基球の割合は非常に小さいので、組織から取得された好塩基球をインビトロで培養して増殖させて用いることがより好ましい。本発明に用いられるに好ましい抗原は、種々の疾患に関連する抗原（すなわち免疫原）となり得るタンパク質（ペプチドを含む。）であれば特に限定されない。当業者は、T h 2 型疾患を惹起する抗原を十分認識しているので、本発明に用いられるに好ましい抗原を周知技術に基づいて容易に取得し得る。また、標的とする抗原（免疫原）を取得した当業者は、本発明に用いられるに好ましい I g E を周知技術に基づいて容易に取得し得る。なお、本明細書中で使用される場合、「T h 2 型疾患」は、T h 2 細胞が誘導されたことに起因するアレルギー疾患が意図され、「T h 2 型アレルギー疾患」と交換可能に用いられ得る。T h 2 型疾患としては、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 3 5 】

「組成物」は各種成分が一物質中に含有されている形態であり、「キット」は各種成分の少なくとも1つが別物質中に含有されている形態であることが意図されるが、本明細書中で使用される場合、キットもまた組成物の一態様であることが意図される。なお、用語「キット」は、特定の材料を内包する容器（例えば、ボトル、プレート、チューブ、ディッシュなど）を備えた包装が意図される。好ましくは各材料を使用するための指示書を備える。本明細書中においてキットの局面において使用される場合、「備えた（備えている）」は、キットを構成する個々の容器のいずれかの中に内包されている状態が意図されるが、複数の成分を同一の容器に混合して備えていても別々の容器に備えていてもよい。「指示書」は、紙またはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、あるいは磁気テープ、コンピューター読み取り可能ディスクまたはテープ、CD-ROM などのような電子媒体に付されてもよい。本発明に係るキットはまた、希釈剤、溶媒、洗浄液またはその他の試薬を内包した容器を備え得る。さらに、本発明に係るキットは、適用に必要な器具をあわせて備えていてもよい。

20

30

【 0 0 3 6 】

すなわち、一実施形態において、本発明に係る組成物は、好塩基球を備えているキットであることを特徴としている。本実施形態に係るキットは、抗原をさらに備えていることが好ましく、該抗原に結合する I g E をさらに備えていることがより好ましい。

【 0 0 3 7 】

上述したように、本発明に係る組成物は、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係る T h 2 細胞誘導方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、およびナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程を包含することを特徴としている。

40

【 0 0 3 8 】

また、本発明に係る組成物は、I L - 4 を生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係る I L - 4 産生方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I L - 4、特に初期 I L - 4 (primary IL-4) を産生し得る。また、本発明に係る I L - 4 産生方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、およびナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I L - 4、特に二次的 I L - 4 (secondary IL-4) を産生し得る。

50

【0039】

さらに、本発明に係る組成物は、I g Eを生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るI g E生成方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、ならびにB細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh2細胞とともに培養する第4工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I g E、特に初期I g E (primary IgE)を産生し得る。また、本発明に係るI g E生成方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、B細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh2細胞とともに培養してI g Eを生成する第4工程、ならびに第4工程にて生成されたI g Eの存在下で、該抗原、該Th2細胞およびB細胞を培養する第5工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I g E、特に二次的I g E (secondary IgE)を産生し得る。

10

【0040】

本発明において培養される細胞は、好塩基球、ナイーブT細胞、Th2細胞、およびB細胞であり、これらの細胞の培養手順(培養条件)は、当該分野において周知である。よって、当業者は、本発明を実行する際に、周知の培養手順を適宜設計し得る。

【0041】

本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞からTh2細胞への誘導、IL-4の生成、I g Eの生成などに好適に用いられ得る。よって、本発明に係る組成物を用いた際の、ナイーブT細胞からTh2細胞への誘導、IL-4の生成、I g Eの生成が抑制または阻害されるか否かを指標にすれば、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングすることができる。また、本発明に係る組成物を用いれば、Th2型疾患のモデル動物を作製し得るとともに、該モデル動物を用いれば、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングすることができる。

20

【0042】

Th2サイトカインによって惹起されるTh2型アレルギー性疾患の治療には、現在、I g E抗体とTh2サイトカインとによって活性化されたエフェクター細胞(肥満細胞など)から産生される様々な化学伝達物質を抑制することを目的としたものが用いられている。Th2サイトカイン自体の産生を抑制するTh2型アレルギー性疾患治療薬の開発はあまり進んでいない。

30

【0043】

Th2サイトカイン自体の産生を抑制する方法として、IL-12の大量投与や、IL-12とIL-18との組合せ投与が、現在知られている。IL-12とIL-18との生体内投与は様々な細胞に作用してIFN- γ の産生を誘導し、産生されたIFN- γ は細胞内寄生性病原体の感染防御作用や抗アレルギー作用を発揮する。しかし、IL-12とIL-18との組合せ投与は、過剰なIFN- γ の産生を誘導するため、これによる過度の炎症反応を惹起することで、肝臓毒等の副作用が強く、実際の治療には不適切である。

40

【0044】

ナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への分化誘導を抑制すること、誘導されたTh2細胞からのTh2サイトカイン産生を抑制することによって、感染症やアレルギー性疾患といったTh2型疾患を治療/予防する技術は、有効かつ副作用がないことが大いに期待される。しかし、ナイーブCD4⁺T細胞をTh2細胞に発達させるに必要な初期IL-4を産生する細胞の性質はまだ知られておらず、自然免疫担当細胞からTh2細胞への作用メカニズムは未だ明かされていない。

【0045】

本発明によって、Th2型の免疫応答を開始するメカニズムが明らかになった。これに

50

より、ナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への分化誘導を抑制するための医薬を得るための手段や、誘導されたTh2細胞からのTh2サイトカイン産生を抑制するための医薬を得るための手段が明らかとなった。

【0046】

本発明は、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法を提供する。上述したように、好塩基球は抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させる。よって、候補物質を存在させることによって、好塩基球における表面提示が抑制または阻害された場合は、その候補物質が、Th2型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

【0047】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程を包含し、第2工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第2工程後の好塩基球の細胞表面上に提示されているMHCクラスII分子またはCD80分子の量を測定することを包含することを特徴としている。好塩基球の細胞表面上に提示されているMHCクラスII分子またはCD80分子の量は、これらのタンパク質に対する抗体を用いれば、容易に測定され得る。

10

【0048】

また、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともにIL-4を産生し、ナイーブT細胞は、そのIL-4存在下で好塩基球の表面に提示されたMHCクラスII分子/抗原ペプチド複合体を認識し、Th2細胞に誘導される。よって、候補物質を存在させることによって、Th2細胞の誘導が抑制または阻害された場合は、その候補物質が、Th2型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

20

【0049】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、およびナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程を包含し、第2工程または第3工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第3工程において誘導されたTh2細胞の量を測定することを包含することを特徴としている。誘導されたTh2細胞の量は、表面マーカーを用いたフローサイトメトリーなどによって、容易に測定され得る。

30

【0050】

さらに、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともにIL-4を産生し、ナイーブT細胞が、そのIL-4存在下で好塩基球の表面に提示された複合体を認識し、Th2細胞に誘導され、Th2細胞が誘導されると、B細胞は、Th2細胞の作用を受けて、抗原に対するIgEを産生する。よって、候補物質を存在させることによって、IgEの産生が抑制または阻害された場合は、その候補物質が、Th2型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

【0051】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、ならびにB細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh2細胞とともに培養してIgEを生成する第4工程を包含し、第2工程～第4工程の少なくとも1工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第4工程において生成されたIgEの量を測定することを包含することを特徴としている。IgEの量は、抗IgE抗体などによって、容易に測定され得る。

40

【0052】

なお、上記実施形態において測定されるIgEはいわゆる初期IgEである。上述したように、本発明は二次的IgEを生成する方法もまた提供している。よって、候補物質を存在させることによって、二次的IgEの産生が抑制または阻害された場合は、その候補

50

物質が、T h 2 型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

【 0 0 5 3 】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程、B 細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養して I g E を生成する第 4 工程、ならびに第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、該抗原、該 T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程を包含し、第 2 工程～第 5 工程の少なくとも 1 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 5 工程において生成された I g E の量を測定することを包含することを特徴としている。

10

【 0 0 5 4 】

後述する T h 2 型疾患のモデル動物を用いて、疾患に対する改善効果の有無を測定すれば、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングし得ることを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、好塩基球を、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体の存在下で培養する工程、該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を動物に投与してモデル動物を作製する工程、該モデル動物に候補物質を投与する工程、および該候補物質を投与した後のモデル動物における、T h 2 型疾患に対する改善効果の有無を測定する工程を包含することを特徴としている。

20

【 0 0 5 5 】

上述したように、本発明に係る組成物は、T h 2 型疾患のモデル動物を作製する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るモデル動物作製方法は、T h 2 型疾患のモデル動物を作製するために、好塩基球を、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体の存在下で培養する工程、および該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を、動物に投与する工程を包含することを特徴としている。なお、上記 T h 2 型疾患は、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択されることが好ましい。本発明に係る作製方法によって作製されるモデル動物は、気管支喘息のモデル動物であってもよく、この場合、上記複合体の存在下での培養後の好塩基球を経鼻投与することが好ましい。

30

【 0 0 5 6 】

本発明に係るモデル動物の作製方法は、アジュバントを必要としない。T h 2 型疾患について、これまで多くのモデル動物が作製されているが、アジュバントを用いることなく作製された例はない。

【 0 0 5 7 】

〔 2 : 抗原 - I g E 複合体およびその利用 〕

上述したように、今回、本発明者らは、好塩基球による T h 2 応答の誘導を見出した。これと同時に、抗原 - I g E 複合体を正常なマウスに移入することによって同様の T h 2 応答が誘導されることを見出した。具体的には、後述する実施例に示すように、D N P - O V A / 抗 D N P I g E 複合体とともに培養した好塩基球を用いて免疫したマウスの脾臓において、T h 2 細胞が迅速に誘導される。また、D N P - O V A / 抗 D N P I g E 複合体を注入したナイーブマウスでは、末梢血、脾臓、骨髄において初期 I L - 4 の産生が誘導され、I g E 複合体を注入されたマウスの脾臓において、T h 2 細胞が迅速に誘導される。一方、D N P - O V A / 抗 D N P I g E 複合体を注入した好塩基球枯渇マウス (M A R - 1 処理マウス) の脾臓においては T h 2 細胞が誘導されない。これらのことは、好塩基球が初期 I L - 4 を産生し、次いで T h 2 応答を誘導するというだけでなく、抗原と該抗原に結合する I g E とからなる複合体が、好塩基球による初期 I L - 4 産生についての初期刺激物質であることを示している。より詳細には、本発明者らによる上記新規知見は、好塩基球による T h 2 応答の誘導であるとともに、I g E とその抗原との複合体による T h 2 応答の誘導でもある。このように、本発明は、当業者に容易に予測し得

40

50

ない新規知見に基づいて完成された。

【0058】

すなわち、本発明は、抗原と該抗原に結合するIgEとからなる複合体を提供する。本発明に係る複合体を用いれば、好塩基球から初期IL-4を産生させることができ、その結果、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導すること、二次的IL-4を生成させること、抗原に対するIgEを生成させることができる。さらに、本発明に係る複合体を用いれば、Th2疾患治療剤のスクリーニング、およびTh2型疾患モデル動物の作製が可能になる。

【0059】

一般に、抗原とその抗体とからなる免疫複合体は、大量の抗体が存在する条件下において形成され得るので、生体内では血中濃度が非常に高いIgGまたはIgMについて観察され得る。IgEは、免疫グロブリンの一種とはいえ、IgGおよびIgMと比較すると、その血中濃度は極めて低い。よって、生体内にて抗原と結合するIgEは、そのFc領域を介して好塩基球または肥満細胞とすでに結合している。すなわち、生体内では抗原-IgE複合体が血中に存在するのではなく、抗原-IgE-細胞の複合体として存在し、抗原-IgE-細胞の複合体がアレルギー反応に関与すると考えられている。

【0060】

本発明に係る複合体は、抗原と該抗原に結合するIgEとからなり、そのIgEのFc領域は細胞（例えば、好塩基球および肥満細胞）に結合していない。この観点から、本発明に係る複合体は遊離複合体ともいえる。

【0061】

このように、IgEとその抗原とからなる複合体は当該分野において認識されていない。さらには、そのような複合体が、好塩基球からの初期IL-4の産生を担っているという事は、これまで知られていないばかりか、当業者が全く予測し得ないことである。

【0062】

なお、上述したように、好塩基球に取り込ませるべき抗原-IgE複合体の形成を促進するために、抗原はハプテンが連結されていてもよい。この場合、IgEは抗ハプテンIgEであり得、本明細書中で使用される場合、抗ハプテンIgEもまた、抗原に結合するIgEの範疇に含まれる。

【0063】

さらに、本発明は、上記遊離複合体を形成させるための組成物およびキットを提供する。本発明に係る組成物およびキットは、上記遊離複合体を形成させることができるので、好塩基球から初期IL-4を産生させることができ、その結果、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導すること、二次的IL-4を生成させること、抗原に対するIgEを生成させることができる。さらに、本発明に係る組成物およびキットを用いれば、Th2疾患治療剤のスクリーニング、およびTh2型疾患モデル動物の作製が可能になる。

【0064】

すなわち、本発明に係る組成物およびキットは、好塩基球から初期IL-4を産生させるための組成物およびキットであり得、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導するための組成物およびキットであり得、二次的IL-4を生成させるための組成物およびキットであり得、抗原に対するIgEを生成させるための組成物およびキットであり得、Th2疾患治療剤をスクリーニングするための組成物およびキットであり得、そしてTh2型疾患モデル動物を作製するための組成物およびキットであり得る。

【0065】

本発明に係る組成物は、抗原および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。抗原と該抗原に結合するIgEとからなる複合体を形成させることを目的としているので、本発明に係る組成物は、IgEのFc領域と結合し得る細胞（例えば、好塩基球）を含有していないことが好ましい。本発明に係る組成物に含有されている抗原およびIgEは複合体化していてもしていなくてもよい。複合体化していない状態であっても、組成物という限定された空間内に両者を存在させた状態で生体へ提供された際に、組

10

20

30

40

50

成物中の I g E が生体内の細胞と結合する前に組成物中の抗原と結合する機会が非常に高く、その結果、本発明の効果が有意に導かれ得る。なお、本発明に係る組成物は、抗原と該抗原に結合する I g E とを独立して備えているキット形態であってもよく、限定された空間内に両者を存在させた状態で生体へ提供されればよい。すなわち、本発明に係る組成物は、生体内で I g E - 細胞の結合が生じるよりも前に抗原 - I g E 複合体を生じさせることができる態様であればよいといえる。

【 0 0 6 6 】

本発明に係るキットは、抗原、該抗原に結合する I g E および好塩基球を備えていることを特徴としている。なお、上記遊離複合体を形成させることを目的としているので、本発明に係るキットにおいて、I g E と細胞とが独立して備えられていればよく、抗原、該抗原に結合する I g E および好塩基球が独立して備えられている態様であっても、抗原および該抗原に結合する I g E を含有している組成物と好塩基球とが独立して備えられている態様であってもよい。なお、本発明に係るキットもまた、抗原と該抗原に結合する I g E とを、限定された空間内に両者を存在させた状態で生体へ提供し得るものであればよく、生体内で I g E - 細胞の結合が生じるよりも前に抗原 - I g E 複合体を生じさせることができる態様であればよいといえる。

10

【 0 0 6 7 】

なお、上記「好塩基球およびその利用」における記載に基づけば、本発明に係る遊離複合体（抗原 - I g E 複合体）を用いた、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導する方法、I L - 4 を生成させる方法、I g E を生成させる方法、T h 2 疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法、および T h 2 型疾患のモデル動物を作製する方法を実施し得るということを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解し得る。

20

【 0 0 6 8 】

〔 3 : さらなる利用 〕

上述したように、本発明者らは、内因性の好塩基球による抗原提示が初期 T h 2 応答の誘導に非常に重要であるということを示した。さらに、生体内の好塩基球を枯渇させることにより T h 2 細胞の誘導が阻害されることも実証した。すなわち、本発明は、T h 2 型疾患を処置する技術を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「処置」は、症状の軽減または排除が意図され、予防的（発症前）または治療的（発症後）に行われ得るもののいずれもが包含される。「T h 2 型疾患を処置する」とは、T h 2 細胞誘導を抑制または阻止することが意図される。T h 2 細胞の誘導は、T h 2 型疾患における症状の緩和が生じる程度まで抑制されることが好ましく、T h 2 型疾患における症状が消滅する（すなわち疾患が治癒する）程度まで T h 2 細胞の誘導が抑制されることがより好ましい。

30

【 0 0 6 9 】

本発明は、T h 2 型疾患を処置するための組成物を提供する。上述したように、被験体から好塩基球を枯渇させることによって T h 2 型疾患を処置することができる。すなわち、本発明に係る組成物は、好塩基球を枯渇させる物質を含んでいればよいといえる。このような物質としては、F c R 1 に対する抗体が好ましい。また、F c R 1 に対する抗体は、F c R 1 の機能を阻害する（例えば、F c R 1 による結合を阻害する）物質であるといえる。すなわち、本発明に係る組成物は、F c R 1 の機能を阻害する物質を含んでいてもよいといえる。本発明に係る組成物の形態は、血中または末梢組織にて好塩基球を枯渇し得る形態、すなわち、注入可能な形態であることが好ましいがこれに限定されない。なお、本発明に係る組成物は、上述したようなキット形態で提供されてもよい。すなわち、本発明は、T h 2 型疾患を処置するためのキットを提供する。組成物の態様であってもキットの態様であっても、当業者は、本発明における有効成分以外の成分を、適宜選択し得る。

40

【 0 0 7 0 】

本発明はまた、T h 2 型疾患を処置する方法を提供する。本発明に係る方法は、上述した組成物を用いる方法であり得、すなわち、被験体から好塩基球を枯渇させる工程、または被験体に F c R 1 の機能を阻害する物質を投与する工程を包含すればよいといえる。

50

本発明に係る方法もまた、予防的に用いられても治療的に用いられてもよい。また、投与形態や投与経路についても特に限定されない。

【0071】

本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【0072】

また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

【実施例】

【0073】

〔1. 材料および方法〕

〔マウス〕

BALB/cマウスをJackson Laboratoryから購入した。OVA₃₂₃₋₃₃₉ (DO11.10)を認識するTCRについてのトランスジェニックマウス、およびBALB/c G4ホモ接合性(IL-4欠損)マウスを、兵庫医科大学の動物施設にてSPF条件下で交配させた。全ての動物実験を、the Institutional Animal Care Committee of Hyogo College of Medicineのガイドラインに従って行った。

【0074】

〔細胞精製〕

以前の報告(Kondo, Y. et al. Int Immunol 20, 791-800 (2008)およびYoshimoto, T. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 13962-6 (1999))に従って、マウス骨髄由来の好塩基球および肥満細胞を調製した。精製した集団の純度は96%を超えた。ヒト好塩基球およびマウスCD4⁺CD62L⁺休止T細胞についてのさらなる情報および精製については後述する。

【0075】

〔インビトロでの培養〕

DO11.10マウスからのナイーブ脾臓CD4⁺CD62L⁺T細胞(1×10⁵個/mL)を、5×10⁵個/mLの慣用的なAPC(照射されたT細胞枯渇BALB/c脾細胞)、照射された脾臓樹状細胞、照射された精製好塩基球または精製肥満細胞の存在下にて、IL-2(100pM)、IL-3(20U/mL)およびOVA₃₂₃₋₃₃₉(1μM)またはDNP-OVA(6.25~100μg/mL)で、48ウェルプレート中で7日間刺激した。Th2細胞の誘導のために、IL-4(1000U/mL)を培養物にさらに添加した。プライム開始後に、細胞を洗浄し、PMA(50ng/mL)およびイオノマイシン(500ng/mL)とともにさらに4時間培養し、サイトゾルのIL-4およびIFN- γ についてFACS解析を行った。いくつかの実験において、プライム開始後に、CD4⁺T細胞(1×10⁵個/0.2mLウェル)を、照射した慣用的なAPC(1×10⁵個)の存在下にて、IL-2(100pM)、OVA₃₂₃₋₃₃₉(1μM)で、96ウェルプレート中で48時間再度刺激した。上清を回収し、サイトカイン産生についてELISA kits (R&D Systems)またはBio-Plex system (BioRad)によって試験した。

【0076】

〔寄生虫〕

BALB/cマウスに*S. venezuelensis*の3期幼虫(5000匹)を皮下摂取して完全な感染を開始させた。

【0077】

〔統計〕

データは、平均±SEMとして示した。2つの実験群の統計学的比較を、GraphPad Instat Softwareによって実施した対応学生t検定によって決定した。P値(<0.05)を顕著に差異があるとみなした。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

〔抗体および試薬〕

抗マウス I L - 4 (1 1 B 1 1) を、本発明者らの研究室にて精製した。P E - 抗マウス C D 4、F I T C - 抗マウス C D 6 2 L、F I T C - 抗マウス I - A^d、F I T C - 抗マウス C D 4 0、F I T C - 抗マウス C D 8 0、F I T C - 抗マウス C D 8 6、F I T C - 抗マウス C D 1 1 c、P E - 抗マウス c - k i t、F I T C - 抗マウス c - k i t、F I T C - 抗マウス D X 5、F I T C - 抗ヒト H L A - D R、および A P C - 抗ヒト C D 2 0 3 a を、BD Biosciences から購入した。F I T C - 抗マウス T 1 / S T 2 (D J 8)、ビオチン抗マウス F c 1 (M A R 1)、ストレプトアビジン P E、およびストレプトアビジン A P C を、eBioscience から購入した。以下の、P E 標識化抗ヒト m A b を、BD Biosciences から購入した：抗 C D 3、抗 C D 7、抗 C D 1 4、抗 C D 1 5、抗 C D 1 6、抗 C D 1 9、抗 C D 3 6、抗 C D 4 5 R A および抗 C D 2 3 5 a。リコンビナントマウス I L - 2、I L - 3、I L - 4 およびヒト I L - 3 を、R&D Systems から購入した。I L - 1 8 を M B L から購入した。リコンビナントヒト I L - 3 3 を、本発明者らの研究室にて精製した。抗 D N P I g E m A B、O V A (クレード V)、Salmonella minnesota Re-595 または E. coli 055:B5 から L P S、および Staphylococcus aureus から P G N を、S i g m a から購入した。O V A - D N P を、Eisen, H. N. et al. J Immunol 73, 296-308 (1954) の方法に従って調製した。

10

【 0 0 7 9 】

〔フローサイトメトリーおよび細胞精製〕

骨髓由来の好塩基球を調製するために、骨髓細胞を、1 0 % F B S、2 - M E (5 0 μ M)、L - グルタミン (2 m M)、ペニシリン (1 0 0 U / m L) およびストレプトマイシン (1 0 0 μ g / m L) を補充した R P M I 1 6 4 0 中で I L - 3 (1 0 U / m L) とともに 1 4 日間培養し、2 回洗浄した。細胞を、先ず、抗 F c R I I / I I I (1 0 μ g / m L) を用いて、4 度で 3 0 分間刺激し、ビオチン抗マウス F c R 1 (5 μ g / m L) を用いて、染色緩衝液 (P B S、1 % F B S) 中にて 4 で 1 時間処理した。2 回洗浄した後、細胞を、ストレプトアビジン A P C および P E - 抗マウス c - k i t で 3 0 分間染色した。サンプルを、FACS Calibur (BD Biosciences) で解析し、蛍光セルソーター (FACS Aria; BD Biosciences) によって F c R 1⁺ / c - k i t⁻ 細胞 (好塩基球) と F c R 1⁺ / c - k i t⁺ 細胞 (肥満細胞) とに分離した。各集団の残りを、表面マーカーの分析のために F I T C 標識化抗体でさらに染色した。脾臓好塩基球の調製のために、B A L B / c マウスからの脾細胞を、先ず、MACS system (MiltenyiBiotec) によって T h y 1 . 2⁺ T 細胞および B 2 2 0⁺ 細胞を枯渇させ、次いで、残りの細胞をさらに染色し、F A C S A r i a によって F c R 1⁺ / c - k i t⁻ 細胞と F c R 1⁺ / c - k i t⁺ 細胞とに分離した。各集団の純度は 9 6 % を超えた。脾臓 C D 4⁺ C D 6 2 L⁺ 休止 T 細胞の調製のため、および細胞内サイトカイン染色のために、以下の手順を行った。

20

30

【 0 0 8 0 】

インフォームドコンセントの後に、正常ボランティアからのヒト末梢血、および臨月の正常人の臍帯血を取得し、プロセスした。研究所の倫理委員会は、この実験プランを承認している。F i c o l l 密度勾配遠心分離によって、末梢血および臍帯血から単核細胞を単離した。末梢血の単核細胞について、C D 3、C D 7、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6、C D 1 9、C D 3 6、C D 4 5 R A および C D 2 3 5 a に対する、P E 標識した抗ヒトモノクローナル抗体のカクテル、ならびに抗 P E マイクロビーズ (MiltenyiBiotec) を用いて、T 細胞、単球、好酸球、ナチュラルキラー細胞、B 細胞、血小板、樹状細胞および赤血球をさらに枯渇させた。マイクロビーズを用いて、臍帯血の単核細胞をさらに C D 3 4⁺ 細胞に富化させた。これらの C D 3 4⁺ 前駆細胞を、5 × 1 0⁵ 個 / m L の細胞密度で、1 2 ウェルプレートに播種し、1 0 % F B S、2 - M E (5 0 μ M)、L - グルタミン (0 . 5 m M)、ペニシリン (5 0 U / m L) およびストレプトマイシン (5 0 μ g / m L) ならびにヒト I L - 3 (1 0 n g / m L) を補充した STEM PRO-34 SFM medium (GIBC

40

50

0)中で7日間培養した。

【0081】

〔電子顕微鏡〕

ソートした、マウス骨髄由来細胞 (FcR1⁺/c-kit⁻細胞およびFcR1⁺/c-kit⁺細胞) およびヒト細胞 (CD203c⁺HLA-DR細胞) を、2%パラホルムアルデヒドおよび1.25%グルタルアルデヒドで固定し、1%OsO₄で後固定し、Epon中に包埋した。超薄切片を、ウラニル酢酸およびクエン酸鉛で二重染色し、JEM 1220 transmission electron microscopy (JEOL)で観察した。

【0082】

〔増殖アッセイ〕

DO11.10マウスからのナイーブ脾細胞CD4⁺CD62L⁺T細胞 (5×10⁴個/0.2mLウェル) を、2.5×10⁵個/mLの慣用的なAPCまたは精製された好塩基球の存在下にて、DNP IgEに対するモノクローナル抗体 (10μg/mL) の存在下または非存在下にて、IL-2 (100pM)、IL-3 (20U/mL) およびOVA₃₂₃₋₃₃₉ (1μM) またはDNP-OVA (6.25~100μg/mL) で、96ウェルプレート中において4日間刺激した。最後の16時間の間、DNA合成を、1μCiの [³H]チミジンの添加によって測定した。

【0083】

〔ELISAアッセイ〕

OVA特異的血清IgEを、Mouse OVA-IgE ELISA kit (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)によって測定した。OVA特異的血清IgG1を、Mouse OVA-IgG1 ELISA kit (AKRIE-04, Shibayagi) によって測定した。

【0084】

〔マウスのインビボ処理〕

骨髄由来のまたはFACSソートした、好塩基球および肥満細胞 (各5×10⁵個/mL) を、IL-3 (20U/mL)、DNP-OVA (100μg/mL) および抗DNP IgE mAb (10μg/mL) とともに、48ウェルプレート中で16日間培養した。プライムした後、好塩基球または肥満細胞 (2.5~5×10⁵個/マウス) を、尾静脈を介してBALB/cマウスに移した (1群あたり5匹)。再構築の4日後または1週間後に、マウスを、PBS中のOVAタンパク質 (100μg) で、静脈内にチャレンジした。いくつかの実験において、BALB/cマウス (1群あたり5匹) について、DNP-OVA (100μg/マウス) および抗DNP IgE mAb (200μg/マウス) の混合物を、静脈内注入した。注入後、IL-4のレポーターとしてのGFPの発現を、FACSを用いて経時的に測定することによって、好塩基球におけるIL-4の発現を測定した。好塩基球のインビボ枯渇については、Denzelらの方法に従った。5μgの抗マウスFcR1 (MAR-1) またはコントロールハムスターIgG (eBioscience) を、腹腔内投与にて1日2回で3日間注入した。マウスを2日間休息させて、次いで、DNP-OVAおよび抗DNP IgE mAbの混合物をマウスに注入し、続いて、これらのマウスにMAR-1またはハムスターIgGを1日2回でさらに3日間注入した。DNP-OVAおよび抗DNP IgEの注入の4日後に、脾臓CD4⁺T細胞 (1×10⁵細胞/0.2mLウェル) を、照射した慣用的なAPC (1×10⁵個) の存在下で、IL-2 (100pM)、OVA (100μg/mL) で、96ウェルプレート中にて5日間刺激した。脾臓CD4⁺T細胞を、PVAでパルスしたAPCで5日間刺激した。

【0085】

〔TLR mRNAの発現解析〕

ソートした好塩基球および肥満細胞から、Trizol試薬を用いて総RNAを抽出し、DNase Iで処理し、Superscript II RTおよびoligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen)を用いて逆転写した。全てのTLRのポジティブコントロールとして、総脾臓細胞から抽出したRNAを用いた。TLR mRNAの発現解析のために、mRNAを、標準的な

10

20

30

40

50

R T - P C R 増幅手順を改変して用いることにより、増幅した。特異的 T L R プライマー配列およびそれぞれのアニーリング温度を設計した。c D N A を、1 サイクルあたり、9 5 で 3 0 秒間、5 5 で 3 0 秒間、7 2 で 3 0 秒間、さらに 7 2 で 1 0 分間伸ばさせ、3 5 サイクル増幅した。3 5 サイクルの後、分析するまでサンプルを 4 で保存した。増幅後に、P C R 産物を、1 . 7 % アガロースゲルにて電気泳動し、U V 光照射によって可視化した。

【 0 0 8 6 】

〔 2 . 結果および考察 〕

本発明者らは、今回、I L - 4 の産生、およびナイーブ C D 4 + 細胞への M H C クラス I I / ペプチド複合体の提示によって、インビトロおよびインビボでの T h 2 / I g E 応答に対する好塩基球の寄与を示した。

10

【 0 0 8 7 】

まず、T h 2 サイトカインを産生し、インビトロでナイーブ C D 4 + T 細胞が T h 2 細胞に発達することについての、脾臓好塩基球の能力を試験した。ナイーブマウスからの非 T 細胞機能および非 B 細胞機能は、0 . 2 0 % の F c R 1 + / c - k i t - 細胞を含んでいたが、*Strongyloides venezuelensis* (*S. venezuelensis*) が感染したマウスでは、寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) が感染したマウスでの報告と同様に、この割合が顕著に増加していた (5 . 8 4 % ; 図 1 (a)) 。 F c R 1 + / c - k i t - 細胞 (好塩基球) を、ナイーブマウスおよび感染マウスの脾臓から精製した。I L - 3 存在下で 2 4 時間培養した、感染マウスからの脾臓好塩基球は、多量の I L - 4 、 I L - 6 および I L - 1 3 を産生したが、I L - 1 2 を産生しなかった。一方、ナイーブマウスからの脾臓好塩基球は、I L - 3 に応答して少量の I L - 4 、 I L - 6 および I L - 1 3 を産生した。これらのことは、感染マウスの脾臓好塩基球は、I L - 2 を含む培養において I L - 4 、 I L - 6 および I L - 1 3 を強く産生する能力を獲得したということを示唆する (図 1 (b)) 。

20

【 0 0 8 8 】

O V A 特異的ナイーブ C D 4 + T 細胞から T h 2 細胞への発達を誘導する、感染マウスからの好塩基球の能力を、O V A ペプチド (O V A _{3 2 3 - 3 3 9}) 、 I L - 2 および I L - 3 の存在下で試験した。また、ナイーブ C D 4 + T 細胞を慣用的な A P C (T 細胞枯渇脾臓細胞) とともに、O V A _{3 2 3 - 3 3 9} および I L - 2 の存在下で培養した。*S. venezuelensis* 感染マウスからの脾臓好塩基球は、I L - 4 非存在下でナイーブ C D 4 + T 細胞から T h 2 細胞への発達を誘導する著しい能力を有していた (図 1 (c)) 。対照的に、他でも報告されているように、慣用的な A P C は T h 0 条件 (O V A _{3 2 3 - 3 3 9} および I L - 2 のみ) の下では T h 2 細胞の発達を誘導しなかった (図 1 (c)) 。発達した T h 2 細胞は、T h 2 マーカーである I L - 3 3 R を発現し (図 1 (d)) 、O V A チャレンジの際に T h 2 サイトカインを産生し、抗原および I L - 3 3 でのチャレンジの際に I L - 4 以外の産生をさらに増加させた。

30

【 0 0 8 9 】

脾臓好塩基球への D C の潜在的な夾雑を避けるために、高度に精製した骨髄好塩基球の、インビトロでの T h 2 細胞の発達を誘導する能力を試験した (図 6 (a) , 図 6 (b)) 。まず、M H C クラス I I 分子および刺激補助分子 C D 8 0 および C D 8 6 の発現を試験した。さらに、肥満細胞および慣用的な A P C によるこれらの発現を同時に試験した (図 2 (a)) 。骨髄由来の好塩基球および慣用的な A P C は、クラス I I 分子、C D 8 0 および C D 8 6 を明らかに発現したが、C D 1 1 c を発現しなかった。対照的に、肥満細胞は、これらの分子をごく軽度しか発現しなかった (図 2 (a) 、図 2 (b)) 。脾臓好塩基球は、C D 6 2 L (リンパ節ホーミング分子) を発現する。このことは、リンパ組織への侵入について優位であることが示唆される。臍帯血または末梢血由来のヒト好塩基球 (C D 2 0 3 c + / c - k i t -) はまた、H L A - D R を発現している (図 2 (c) 、図 6 (c) 、図 6 (d)) 。

40

【 0 0 9 0 】

50

予期したように、*S. venezuelensis*感染マウスからの脾臓好塩基球と同様に、骨髄由来の好塩基球は、プロフェッショナルAPCが完全に非存在であっても、Th0条件(OVA₃₂₃₋₃₃₉、IL-2およびIL-3の存在、かつIL-4非存在)の下でナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への発達を誘導する能力を有している(20.7%)(図3(a))。

【0091】

どのように好塩基球がTh2細胞の発達を誘導しているのかについてのメカニズムを調べた。ナイーブCD4⁺T細胞をOVA₃₂₃₋₃₃₉、慣用的なAPC(T脾臓)、IL-2およびIL-4(Th2条件下)で刺激した場合に、ナイーブCD4⁺T細胞はTh2細胞に発達した(19.1%)(図3(a))。同様に、ナイーブCD4⁺T細胞をOVA₃₂₃₋₃₃₉、肥満細胞、IL-2、IL-3およびIL-4(Th2条件下)で刺激した場合に、ナイーブCD4⁺T細胞はTh2細胞に発達した(17.2%)(図3(a))。対照的に、さらなるIL-4刺激(Th2条件下)は、この好塩基球依存的Th2細胞の発達を中程度にのみ増強した(25.2%;図3(a))。さらに、IL-4枯渇マウスからの好塩基球は、このTh2発達がほぼ完全に排除され(3.1%)、野生型好塩基球は、Th0条件下で、ナイーブCD4⁺T細胞をTh2細胞へ誘導したが、プロフェッショナルAPCは誘導しなかった(図3(b))。これらの結果は、好塩基球がIL-4を産生し、OVAペプチドを提示することを示すとともに、ナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への発達を誘導することを示す。

【0092】

次いで、DNP-複合体化OVA(DNP-OVA)を抗原としてOVAペプチド(OVA₃₂₃₋₃₃₉)の代わりに用いた。IL-3およびDNP-OVAの存在下でありかつIL-4の非存在下にて、OVA特異的ナイーブCD4⁺T細胞を好塩基球とともに培養することによって、OVA特異的Th2細胞を誘導し得た(図3(c))。これらの結果は、好塩基球がネイティブなOVAを取り込み、OVA₃₂₃₋₃₃₉にプロセスし、MHCクラスIIと共同してペプチドフラグメントを提示し、IL-4を産生する能力を有していることを示唆する。次いで、抗DNP IgEモノクローナル抗体の添加が、好塩基球のAPC能を上方制御するか否かを試験した(図3(d))。OVA特異的ナイーブCD4⁺T細胞を、100 μg/ml、25 μg/mlあるいは6.2 μg/mlのDNP-結合OVAの存在下、かつ10 μg/mlの抗DNP-IgEモノクローナル抗体の存在下で、好塩基球とともに7日間培養した。培養終了後、細胞を良く洗浄して、PMA+ionomycin存在下で4時間培養後、細胞質内のIL-4とIFN- γ の発現をFACSで測定した。数字は、CD4⁺T細胞の中で細胞質内にIL-4あるいはIFN- γ を有する細胞の割合である。低用量(6.2 μg/ml)のDNP-OVAでパルスした好塩基球は、Th2細胞を中程度に誘導した(3.2%)。一方、高用量(100 μg/ml)のDNP-OVAでパルスした好塩基球は、Th2細胞を顕著に誘導した(11.3%)。抗DNP-IgEモノクローナル抗体の添加は、Th2細胞を顕著に誘導した(抗IgEなしの場合の3.2%、4.2%、11.3%に対して、抗IgEありの場合の10.5%、12.5%、16.8%;図3(d))。よって、好塩基球誘導性のTh2発達に対する抗DNP-IgEモノクローナル抗体の増強効果は、最低濃度のDNP-OVAで好塩基球をパルスした場合に明らかである。さらに、プロフェッショナルAPCと比較して、少数の好塩基球が、抗DNP-IgEモノクローナル抗体を用いたTh2条件下でナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への発達を誘導する(図3(d))。

【0093】

続いて、抗DNP-IgEモノクローナル抗体が上述した上方制御効果をどのように示したのかを試験した。抗DNP-IgEの存在下にてDNP-OVAでパルスした好塩基球は、特に、好塩基球が低濃度のDNP-OVAでパルスされた場合に、OVA特異的T細胞の増殖を誘導する能力を増加させた(図7)。対照的に、抗DNP-IgE抗体の存在下でパルスされた慣用的なAPCは、T細胞の増殖を誘導する能力を増加させなかった

(図7)。さらに、これまでに報告されているように、好塩基球のみが、抗DNP-IgE抗体の存在下でDNP-OVAでパルスされた場合に、IL-4を産生する能力を顕著に増加させた(図8(a), 図8(b))。DNP-OVA/抗DNP-IgEでパルスした肥満細胞は、IL-13を産生し得たがIL-4を産生しなかった(図8(b))。さらに、好塩基球のみが、IL-3、およびIL-18、IL-33、PGNまたはLPSで刺激した場合に、IL-4を産生した(図8(c)、図8(d))。

【0094】

OVAでパルスした好塩基球がTh2応答をインビボで誘導し得るのか否かを試験するために、DNP-OVA/抗DNP-IgEとともに培養することによって、OVAペプチドでの強力なパルスを好塩基球に試みた。また、この抗原/抗体複合体で肥満細胞を同時に処理した。次いで、これらの好塩基球または肥満細胞を、尾静脈を介して正常マウスに移した。4日後、PBSに溶解したインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスをチャレンジした。チャレンジの2日後、脾臓CD4⁺T細胞を調製し、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)でこれらの細胞を刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- γ の含有量を測定した。この脾臓において、OVAでパルスした好塩基球のみが、迅速かつ強力でTh2細胞を誘導し、Th1細胞を中程度に誘導した(図4(a))。次いで、OVAでパルスした好塩基球で免疫したマウスの、OVAの静脈内チャレンジの際にIgEおよびIgG1を産生する能力を試験した。アジュバントを用いないこの全身性のOVA投与は、IgE応答をナイーブなマウスにおいて誘導しなかった。対照的に、OVAでパルスした好塩基球でプライムしたマウスは、OVAチャレンジに応答してIgEおよびIgG1を産生した(図4(b))。これらのマウスは、脾臓内においてCD4⁺CD62L^{low}IL33R⁺Th2細胞を発達させた(図4(c), 図4(d))。CD62L分子はTh2細胞の再循環に必要なマーカーであるので、OVAでパルスした好塩基球はプロフェッショナルAPC様であり、OVA特異的Th2細胞を誘導する。なお、このOVA特異的Th2細胞は、OVAで活性化されたB細胞がインビボでIgG1およびIgEを産生することを補助する。

【0095】

最後に、内因性の好塩基球による抗原提示がインビボでの初期Th2応答の誘導に非常に重要であるという直接的な証拠を示すために、DNP-OVA/抗DNP-IgE複合体をナイーブマウスまたは好塩基球枯渇マウスに注入した。好塩基球を枯渇させるために、Denzelらの方法に従って、FcR1に対する抗体(MAR-1)をマウスに1日2回で3日間の腹腔内投与した。MAR-1(コントロールのハムスターIgGではない)の最終投与の2日後に、脾臓および肝臓での好塩基球の完全な枯渇を達成した(図9)。IL-4のレポーターとしてのGFPの発現を、DNP-OVA(100 μ g)/抗DNP-IgE(200 μ g)の注入から経時的にFACSを用いて測定することによって、好塩基球におけるIL-4の発現を測定したところ、注入から12時間後または24時間後の好塩基球においてIL-4の顕著な産生が認められた。さらに、注入から4日後に、脾臓CD4⁺T細胞を調製し、OVAパルスしたAPCでこれらの細胞を刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- γ の含有量を測定した。DNP-OVA/抗DNP-IgE複合体を、好塩基球枯渇マウスではなくナイーブマウスに注入した場合に、脾臓にてTh2細胞が迅速に誘導されることを見出した(図4(c))。

【0096】

独特なプロフェッショナルAPCが、Th2細胞をインビトロおよびインビボの両方で優先的に誘導することを実証した。慣用的なAPCと同様に、好塩基球はMHCクラスII、CD80およびCD86を発現し、抗原タンパク質の取り込みおよびプロセッシングを行い、ペプチドをMHCクラスIIとともに発現する(図2(a)、図3)。対照的に、肥満細胞はこれらの分子の発現が極めて軽度である(図2(a))。さらに、OVAペプチドで強くパルスした好塩基球は、ナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への発達を強く誘導し、OVAでパルスした肥満細胞は、ナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への発達を誘導しなかった。このことは、インビボでのTh2応答の誘導に大きな差異が

10

20

30

40

50

あることを示唆する(図4(a))。これまでに報告されているように、Th2細胞は、脾臓およびリンパ節での好塩基球の数を顕著に増加させ、好塩基球のレベルとTh2細胞のレベルとの間でポジティブフィードバック制御があるようである。

【0097】

従って、好塩基球の下方制御は、Th2/IgE応答の制御的処置に重要な戦略である。IgEはまた、重要な標的分子である。なぜなら、IgEは好塩基球とTh2細胞との間のポジティブフィードバック制御を開始させるからである。好塩基球は、一般に、IL-4を生成し、抗原を、実際の抗原提示を行う樹状細胞に移すだけの細胞であると認識されている。好塩基球自身による潜在的APC機能の認識は、単一のアレルゲンに対する陽性反応を有する患者が同一の抗原によりどのようにして強く陽性になるのか、どのように複数のアレルゲンに対する陽性反応を発達させるのかについてのメカニズムを理解するために重要と思われる。ポリクローナル抗体で感作された好塩基球が対応アレルゲンを取り込み、複数のT細胞エピトープを提示することによって複数のTh2細胞クローンを誘導することが予想された。ヒト臍帯血細胞も、IL-3含有培地中で増殖させた後にヒトに輸血されると、好塩基球がコン有しており、これらがMHCクラスII分子を発現するため、臍帯血細胞輸血を受けた患者においてTh2/IgE応答が誘導される危険性があることを示唆する。

10

【0098】

以上のように、好塩基球がTh2優位な免疫応答を誘導する抗原提示細胞であることを、本発明において示した。また、好塩基球を種々の方法で制御することでアレルギー疾患を制御し得る可能性を示した。

20

【0099】

本発明者らは、好塩基球がMHCクラスII分子およびCD80/86を発現しており、種々の刺激の下でIL-4を産生することを示した。このことは、プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)の非存在下でのナイーブCD4⁺T細胞からTh2細胞への発達を、好塩基球が誘導することを示唆する。

【0100】

好塩基球、OVAペプチドまたはDNP-OVAとともに、IL-3存在下でIL-4非存在下にて培養したオブアルブミン(OVA)特異的ナイーブCD4⁺細胞が、Th2細胞に発達した。このような好塩基球によるTh2誘導作用はIL-4欠損好塩基球では全く認められなかった。このことは、OVAでパルスされた好塩基球によって放出されたIL-4が、Th2細胞の発達に不可欠であることを示唆する。さらに、DNP-OVAおよび抗DNP-IgEとともに培養した好塩基球は、DNP-OVA単独とともに培養された好塩基球よりも多くOVAを取り込み、より多くプロセッシングするため、DNP-OVA単独とともに培養した好塩基球よりも強力なAPC活性を示した。

30

【0101】

さらに、OVAで強くパルスした好塩基球の静脈内投与は、強くかつ迅速にTh2細胞を誘導したが、OVAでパルスした肥満細胞ではTh2細胞の誘導は起こらなかった。好塩基球によるTh2細胞の誘導に続いて、OVAで刺激されたB細胞はOVA特異的IgE抗体を産生するようになるが、Th2細胞がこの過程を強力に促進している。このことは、好塩基球によるIgE依存的な抗原の取り込みによってTh2/IgE応答のポジティブフィードバックが制御されていることを示唆する。

40

【0102】

{ 3. 図面について }

図1(a)~図1(d)には、寄生虫によって誘導される脾臓好塩基球による抗原提示を示した。図1(a)には、BALB/cマウス、または*S. venezuelensis*の3期幼虫を10日間感染させたBALB/cマウスから、脾臓の非B非T細胞を新鮮に調製し、FcR1およびc-kitの発現を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す。*S. venezuelensis*の感染ありまたはなしのマウスからの脾臓の非B非T細胞を、FACS AriaによってFcR1⁺/c-kit⁻細胞にさらに分離した。FcR1⁺/

50

c - k i t⁺ 細胞の割合を数字で示した。

【 0 1 0 3 】

図 1 (b) には、図 1 (a) に示した、ソートした好塩基球 (1×10^5 個 / 0.2 mL ウェル) を、 $\text{IL} - 3$ ($20 \text{ U} / \text{mL}$) とともに 96 ウェルプレート中で 24 時間培養し、その上清を回収し、 $\text{Bio} - \text{Plex}$ システムによってサイトカイン含量を試験した結果を、1 群あたり 3 匹のマウスからの好塩基球の、2 回の独立した実験によって得た平均 + SEM で示した。

【 0 1 0 4 】

図 1 (c) には、 $\text{DO}11.10$ からナイーブ $\text{CD}4^+ \text{CD}62\text{L}^+$ T 細胞 (1×10^5 個 / mL) を、 5×10^5 個 / mL の、照射した T 細胞枯渇 BALB / c 脾細胞 (T 脾臓)、または照射した、 $S. \text{venezuelensis}$ 感染マウスからの脾臓好塩基球 (寄生虫誘導性好塩基球) ($\text{IL} - 4$ なし ($\text{Th}0$ 条件)) の存在下にて、 $\text{IL} - 2$ (100 pM)、 $\text{IL} - 3$ ($20 \text{ U} / \text{mL}$) および $\text{OVA}_{323-339}$ ($1 \mu\text{M}$) で、48 ウェルプレート中にて 7 日間刺激し、プライム開始後に、細胞を洗浄し、 PMA ($50 \text{ ng} / \text{mL}$) およびイオノマイシン ($500 \text{ ng} / \text{mL}$) とともに 4 時間再度培養し、細胞質 $\text{IL} - 4$ および $\text{IFN} - \gamma$ について FACS によって解析した結果を示した。 $\text{CD}4^+$ T 細胞について、 $\text{IL} - 4^+$ 細胞または $\text{IFN} - \gamma^+$ 細胞の割合を数字で示した。

【 0 1 0 5 】

図 1 (d) は、図 1 (c) でフローサイトメトリーによって示した、T 脾臓または寄生虫誘導性好塩基球とともに 7 日間培養した $\text{CD}4^+$ T 細胞上の $\text{IL} - 33\text{R}$ 鎖の発現を示した。 $\text{CD}4^+$ 細胞における $\text{IL} - 33\text{R}$ 鎖⁺ 細胞の割合を、パーセントで示した。

【 0 1 0 6 】

図 2 (a) ~ 図 2 (c) には、好塩基球上での MHC クラス II 分子の発現を示した。図 2 (a) には、骨髄由来の、 FACS ソートされた、好塩基球および肥満細胞 (図 6 に示す)、ならびに T 細胞枯渇脾細胞 (T 脾臓) を、図中に示した表面マーカーで染色した結果を示した。図中の陰影領域はマーカー染色したものを示し、白抜き領域は未染色のものを示す。

【 0 1 0 7 】

図 2 (b) には、骨髄由来の、 FACS ソートされた、好塩基球および肥満細胞を、 MHC クラス II ($\text{I} - \text{A}$) および $\text{Fc}\gamma\text{R}1$ の発現について、フローサイトメトリーで解析した結果を示した。 $\text{Fc}\gamma\text{R}1^+ \text{I} - \text{A}^+$ 細胞の割合をパーセントで示した。4 回の独立した実験の代表的な結果を示す。

【 0 1 0 8 】

図 2 (c) には、ヒト $\text{IL} - 3$ ($10 \text{ ng} / \text{mL}$) とともに 7 日間培養した $\text{CD}34^+$ 臍帯血細胞を、 $\text{c} - \text{k} \text{i} \text{t}$ および $\text{CD}203\text{c}$ (左)、ならびに $\text{CD}203\text{c}^+ \text{c} - \text{k} \text{i} \text{t}^+$ である細胞中の $\text{HLA} - \text{DR}$ (右) の発現について、フローサイトメトリーによって解析した結果を示した。3 回の独立した実験の代表的な結果を示す。

【 0 1 0 9 】

図 3 (a) ~ 図 3 (d) には、骨髄由来の好塩基球による抗原提示の結果を示した。 $\text{DO}11.10$ マウスからのナイーブ脾臓 $\text{CD}4^+ \text{CD}62\text{L}^+$ T 細胞 (1×10^5 個 / mL) を、照射した T 細胞枯渇 BALB / c 脾細胞 (T 脾臓) (5×10^5 個 / mL)、照射された、骨髄由来の精製好塩基球 (WT ; 野生型マウス、 $\text{G}4 / \text{G}4$; $\text{IL} - 4$ 欠損マウス)、肥満細胞または脾臓 DC の存在下で、48 ウェルプレートにて総容量 1 mL の培地中で 7 日間刺激した ($\text{Th}0$ 条件)。刺激には、 $\text{IL} - 2$ (100 pM)、 $\text{IL} - 3$ ($20 \text{ U} / \text{mL}$) および $\text{OVA}_{323-339}$ ($1 \mu\text{M}$) (図 3 (a) および 図 3 (b))、 $\text{DNP} - \text{OVA}$ ($100 \mu\text{g} / \text{mL}$) (図 3 (c))、ならびに抗 $\text{DNP} - \text{IgE}$ mAb ($10 \mu\text{g} / \text{mL}$) の存在下または非存在下での $\text{DNP} - \text{OVA}$ ($6.25 \sim 100 \mu\text{g} / \text{mL}$) (図 3 (d)) を用いた。 $\text{Th}2$ 細胞の誘導のために、 $\text{IL} - 4$ ($1000 \text{ U} / \text{mL}$) を培養物にさらに添加した ($\text{Th}2$ 条件)。プライム開始後に、細胞を洗浄

10

20

30

40

50

し、PMA (50 ng/mL) およびイオノマイシン (500 ng/mL) とともに4時間再度培養し、細胞質内のIL-4 およびIFN- γ の発現をFACSによって解析した。CD4⁺T細胞について、IL-4⁺細胞またはIFN- γ ⁺細胞の割合を数字で示した。3回の独立した実験の代表的な結果を示す。

【0110】

図4(a)~図4(i)には、好塩基球に誘導された、インビボでの抗原特異的Th2応答を示した。図4(a)~図4(d)について、骨髓由来の、FACSソートされた好塩基球または肥満細胞(各 5×10^5 個/mL)を、IL-3(20 U/mL)、DNP-OVA(100 μ g/mL) および抗DNP IgE mAb(10 μ g/mL)とともに、48ウェルプレート中にて16時間培養した。プライム後に、好塩基球または肥満細胞を、各 2.5×10^5 個/マウスで、BALB/cマウス(1群あたり5匹)に尾静脈を介して移した。移入の4日後(図4(a))または1週間後(図4(b)~図4(d))のマウスを、OVAタンパク質(100 μ g/マウス)で静脈内にチャレンジした。コントロールマウスに、OVAタンパク質(100 μ g)のみを注入した。チャレンジ(0日目)の後、血清を回収し、OVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体を、ELISAによって決定した(図4(b))。チャレンジの2日後(図4(a))または2週間後(図4(c))に、各マウスからの脾臓CD4⁺T細胞(2×10^5 個/0.2 mLウェル)を、照射したT脾臓(2×10^5 個/0.2 mLウェル)の存在下にて、96ウェルプレート中にてOVAタンパク質(100 μ g/mL)で再度刺激した。

【0111】

図4(e)~図4(g)について、BALB/cマウス(1群あたり5匹)に、OVA-DNPおよび抗DNP IgE抗体の混合物(免疫複合体I.C)を、図中に示した濃度で注入した。好塩基球の枯渇のために、マウスに5 μ gの抗FcR1(MAR-1)を1日2回で3日連続して、I.C投与の前後に腹腔内に投与した。I.C投与の4日後に、各マウスからの脾臓CD4⁺T細胞(2×10^5 個/0.2 mLウェル)を、照射したT脾臓(2×10^5 個/0.2 mLウェル)の存在下にて、OVAタンパク質(100 μ g/mL)で再度刺激した。インビトロ刺激の5日後に、上清を回収し、IL-4、IL-13およびIFN- γ の産生をELISAによって試験した(図4(a)、図4(c)、図4(f)、図4(g))。結果は、1群あたり5匹の平均+SEMであり、2つの独立した実験の代表例を示す。

【0112】

図4(a)において、**は、肥満細胞を移しOVAを注入したマウスと比較したスチューデントt検定での結果が $P < 0.0001$ であることを示す。図4(b)~図4(d)において、*は $P < 0.01$ であり、†は $P < 0.05$ であり、‡は $P < 0.005$ であることを示す(いずれもOVAのみを注入したコントロール群と比較した)。図4(b)において、好塩基球を枯渇させた群と比較したスチューデントt検定での結果として、*は $P = 0.191$ であり、†は $P < 0.005$ であることを示す。

【0113】

図4(h)~図4(i)について、BALB/cマウス(1群あたり5匹)に、OVA-DNPおよび抗DNP IgE抗体の混合物(I.C)を図中に示した用量で注入した。I.C投与の4日後のマウスを、OVAタンパク質(100 μ g/マウス)で静脈内にチャレンジし、血清を回収し、OVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体をELISAによって決定した。好塩基球の数の枯渇または増加のために、マウスに、抗FcR1(MAR-1)またはIL-3を注入した。コントロール群と比較したスチューデントt検定の結果として、*は $P < 0.001$ であり、†は $P < 0.05$ であることを示す。

【0114】

図5には、好塩基球によって駆動されたTh2細胞からのサイトカイン産生を示した。DO11.10からのナイーブCD4⁺CD62L⁺T細胞(1×10^5 個/mL)を、 5×10^5 個/mLの、照射したT細胞枯渇BALB/c脾細胞(T脾臓)、または照射した、S. venezuelensis感染マウスからの脾臓好塩基球(寄生虫誘導性好塩基球)(I

10

20

30

40

50

L-4なし(Th0条件)の存在下にて、IL-2(100 pM)、IL-3(20 U/mL)およびOVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μM)で、48ウェルプレート中にて7日間刺激した。プライム開始後に、CD4⁺T細胞(1×10⁵個/0.2 mLウェル)を、照射したT細胞枯渇BALB/c脾細胞(1×10⁵個)の存在下で、IL-3(100 ng/mL)ありまたはなしで、96ウェルプレート中にてIL-2(100 pM)、OVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μM)で48時間再度刺激した。上清を回収し、Bio-Plexシステムによってサイトカイン産生を試験した。3回の独立した実験の代表的な結果を示す。

【0115】

図6(a)~図6(d)には、マウス骨髄由来好塩基球およびヒト末梢血好塩基球の精製および免疫学的試験の結果を示した。図6(a)には、BALB/cマウスからの骨髄細胞をIL-3(10 U/mL)とともに10日間培養し、FcγR1およびc-kitの発現について、フローサイトメトリーで解析し、次いで、FACS AriaによってFcγR1⁺/c-kit⁻(好塩基球)の細胞集団とFcγR1⁺/c-kit⁺(肥満細胞)の細胞集団とにソートした結果を示した。選別された集団における細胞のパーセントを示した。

10

【0116】

図6(b)には、ソートしたFcγR1⁺/c-kit⁻(好塩基球)およびFcγR1⁺/c-kit⁺(肥満細胞)の細胞集団を、電子顕微鏡観察した結果を示した。スケールバーは1 μmである。

20

【0117】

図6(c)は、陰性選別によって濃縮したヒト末梢血単核細胞(CD3⁻、CD7⁻、CD14⁻、CD15⁻、CD16⁻、CD19⁻、CD36⁻、CD45RA⁻およびCD235a⁻)の、HLA-DRとCD203cの発現を選別後すぐに測定した結果(左)と、ヒトIL-3(10 ng/mL)存在下で24時間培養した後のHLA-DRとCD203cの発現を測定した結果(右)である。CD203c⁺細胞に対するHLA-DR⁺細胞の細胞集団のパーセントを示す。

【0118】

図6(d)には、ソートしたCD203c⁺/HLA-DR⁺細胞集団の、ギムザ染色(左; 100×)、電子顕微鏡観察(右)の結果を示した。スケールバーは1 μmである。

30

【0119】

図7には、好酸球誘導性の抗原特異的T細胞増殖を示した。DO11.10マウスからのナイーブ脾臓CD4⁺CD62L⁺T細胞(5×10⁴個/mL)を、IL-2(100 pM)、IL-3(20 U/mL)およびOVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μM)、あるいは抗DNP IgE mAb(10 μg/mL)の存在下または非存在下でのDNP-OVA(6.25~100 μg/mL)で、照射したT脾臓または精製した好塩基球(2.5×10⁵個/mL)の存在下で、96ウェルプレートにて4日間刺激した。1 μCiの[³H]を添加することによって、最終16時間の間のDNA合成を測定した。

【0120】

40

図8(a)~図8(d)には、骨髄由来の好塩基球および肥満細胞からのTh2サイトカイン産生を示した。図8(a)には、DO11.10マウスからのナイーブ脾臓CD4⁺CD62L⁺T細胞(1×10⁵個/mL)を、OVA₃₂₃₋₃₃₉(1 μM)、あるいは抗DNP IgE mAb(10 μg/mL)の存在下または非存在下でのDNP-OVA(100 μg/mL)で、照射したT脾臓または精製した好塩基球(5×10⁵個/mL)の存在下で、48ウェルプレートにて24時間刺激した結果を示した。

【0121】

図8(b)には、骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞(各1×10⁵個/0.2 mLウェル)を、IL-3(20 U/mL)、あるいは抗DNP IgE mAb(10 μg/mL)の存在下または非存在下でのDNP-OVA(100 μg/

50

mL)で、96ウェルプレート中にて16時間再度刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4またはIL-13の産生を試験した結果を、平均+SEMで示した。5回の独立した実験の代表例を示す。ndは検出し得なかったことを示す。

【0122】

図8(c)には、骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞から抽出したmRNAを、TLR遺伝子およびアクチンの発現についてRT-PCRによって解析した結果を示した。TLR mRNAについてのポジティブコントロール(posit.)として、マウス脾臓細胞から抽出したmRNAを使用した。

【0123】

図8(d)には、骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞(各 1×10^5 個/0.2mLウェルを、IL-3(20U/mL)、およびIL-18(50ng/mL)、IL-33(100ng/mL)、LPS(1 μ g/mL)またはPGN(10 μ g/mL)で、それぞれ96ウェルプレート中にて24時間再度刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4、IL-6またはIL-13の産生を試験した結果を、平均+SEMで示した。5回の独立した実験の代表例を示す。

【0124】

図9(a)~図9(e)には、抗FcR1を有する好塩基球の枯渇を示した。図9(a)~図9(d)について、5 μ gの抗マウスFcR1(MAR-1(+))またはPBS(MAR-1(-))を1日2回で3日間腹腔内投与とされたBALB/cマウスにおける、好塩基球(FcR1⁺/c-kit⁻細胞またはFcR1⁺/DX5⁺細胞)のフローサイトメトリーおよび頻度を示す。最終投与の2日後に、好塩基球の数を定量した(図9(a):脾臓、図9(b):肝臓)。次いで、マウスにDNP-OVAおよび抗DNP IgEの混合物を1日2回でさらなる3日間、MAR-1またはPBSとともに注入した。OVAでの腹腔内チャレンジの後、I.C投与の4日後に、マウスを、週に連続5日間で2週間にわたって、MAR-1またはPBSでさらに処理した。OVAチャレンジの1週間または2週間の後、血液(図9(c))または脾臓(図9(d))における好塩基球の数を定量した。

【0125】

図9(e)には、IL-3(0~10 μ g/体重/2週間)を浸透圧ポンプを用いて注入したBALB/cマウスからの好塩基球(FcR1⁺/DX5⁺細胞)の頻度についての、代表的な実験データを示した。5回の独立した実験の代表例を示す。脾臓の非B非T細胞に対するFcR1⁺/c-kit⁻細胞またはFcR1⁺/DX5⁺細胞の割合をパーセントで示す。

【0126】

図10には、抗原でパルスされた好塩基球によるインピボでのTh2/IgE誘導の概略図を示した。抗原A(例えば、OVA)を正常な動物に投与すると、先ず、抗原Aが好塩基球に取り込まれる(図中1)。OVAでパルスされた好塩基球が末梢リンパ器官(例えば、脾臓)に循環され、そこでOVA特異的ナイーブCD4⁺T細胞に対してIL-4刺激と抗原ペプチド/MHCクラスII刺激とを与える。次いで、DCからの補助作用を必要とすることなく、好塩基球からの抗原刺激およびIL-4刺激のみによって、OVA特異的ナイーブCD4⁺T細胞はTh2細胞に分化する(すなわち、好塩基球依存性のTh2細胞誘導フェーズ;図中2)。同時に、生体に投与されたOVAもまた末梢リンパ器官に循環されている。ここで、OVAがOVA特異的B細胞の抗原受容体に結合する。OVAでパルスされたB細胞はOVA特異的Th2細胞を刺激するので、刺激されたTh2細胞はCD40リガンドおよびIL-4を産生する。産生されたCD40リガンドおよびIL-4は、OVAでパルスされたB細胞を刺激してOVA特異的IgE産生を誘導する(すなわち、Th2依存型のB細胞活性化フェーズ;図中3)。一旦、OVA特異的IgEが産生されると、OVAと抗OVA特異的IgE抗体とによって構成されるIgE免疫複合体が好塩基球上のFcR1に結合する(すなわち、好塩基球がIgEに感作される;図中4)。感作された好塩基球の刺激によって、メモリーTh2細胞は刺激されて増殖

10

20

30

40

50

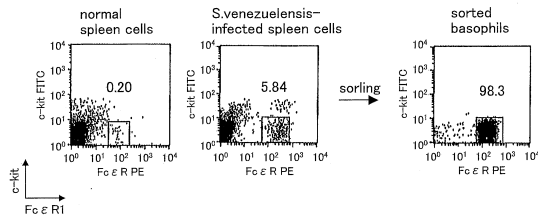
する（図中5）。さらに、OVAで刺激されたメモリーB細胞は、メモリーTh2細胞の刺激を受けて、OVAに対する結合親和性が高いIgE抗体を産生する（図中6）。

【産業上の利用可能性】

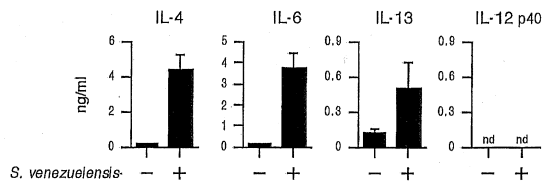
【0127】

本発明は、これまで不明であったTh2型免疫応答、特に初期IL-4産生の作用メカニズムを明らかにしたので、Th2型疾患に対する新規治療薬・治療方法の開発などに好適に用いることができる。すなわち、本発明は、医療分野、医薬品分野をはじめ、幅広い分野に利用可能である。

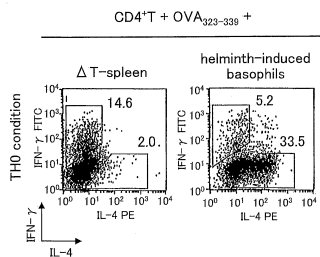
【図1(a)】



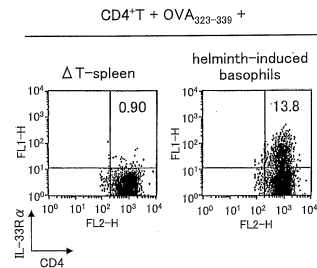
【図1(b)】



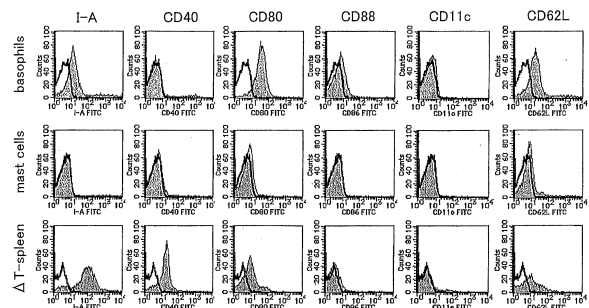
【図1(c)】



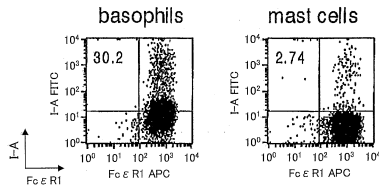
【図1(d)】



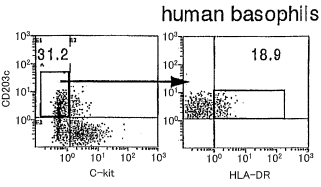
【図2(a)】



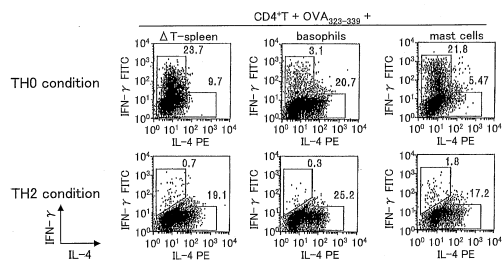
【 図 2 (b) 】



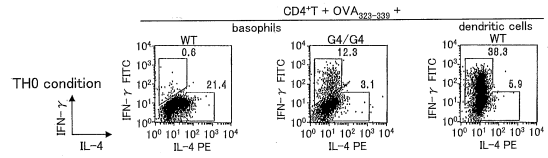
【 図 2 (c) 】



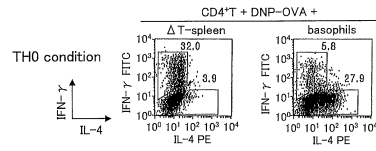
【 図 3 (a) 】



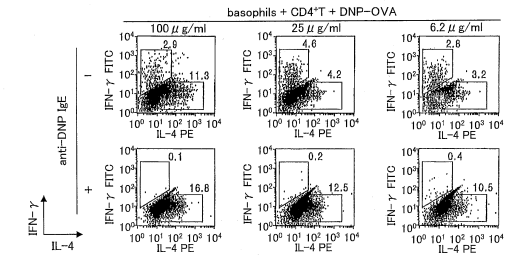
【 図 3 (b) 】



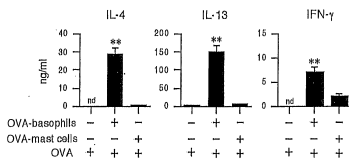
【 図 3 (c) 】



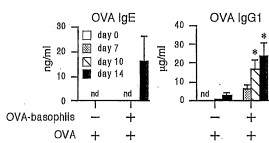
【 図 3 (d) 】



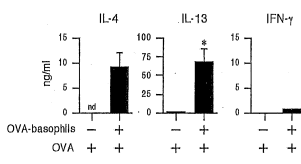
【 図 4 (a) 】



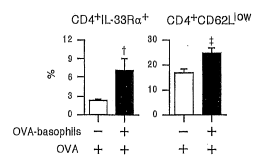
【 図 4 (b) 】



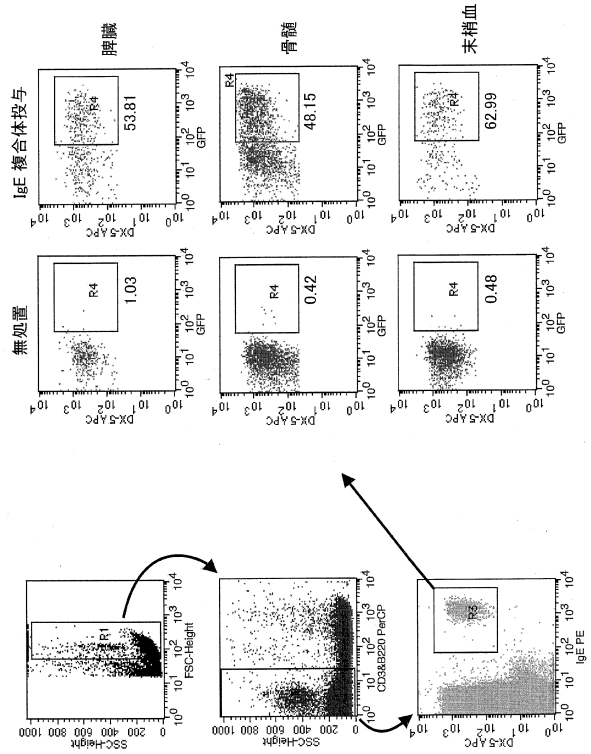
【 図 4 (c) 】



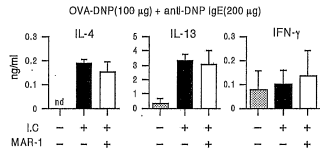
【 図 4 (d) 】



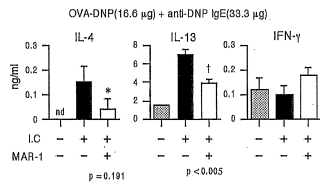
【 図 4 (e) 】



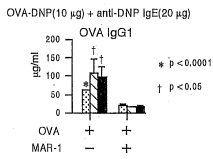
【 4 (f) 】



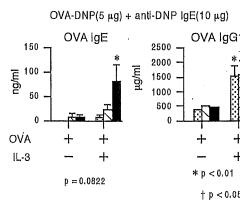
【 4 (g) 】



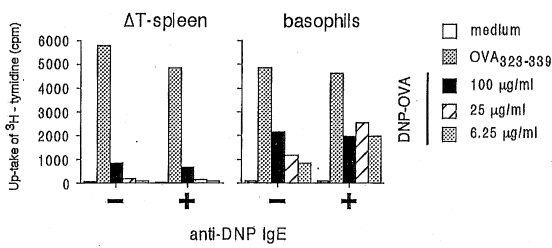
【 4 (h) 】



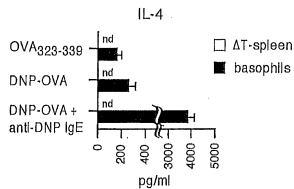
【 4 (i) 】



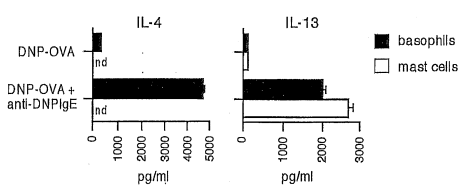
【 7 】



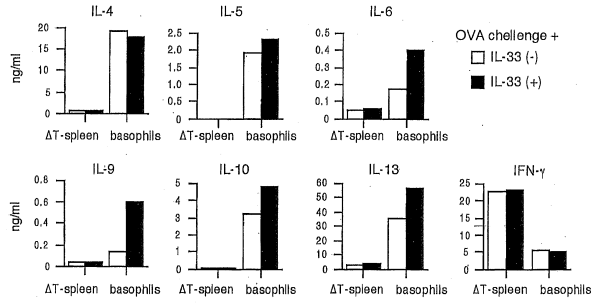
【 8 (a) 】



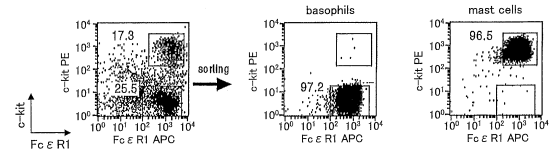
【 8 (b) 】



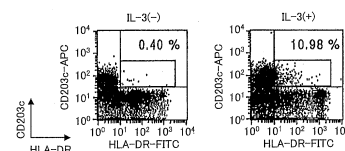
【 5 】



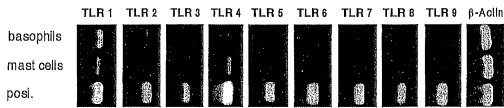
【 6 (a) 】



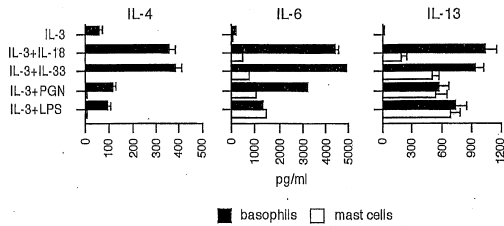
【 6 (c) 】



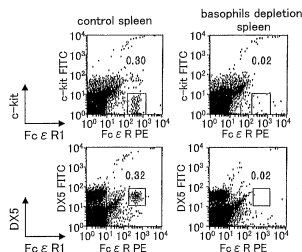
【 8 (c) 】



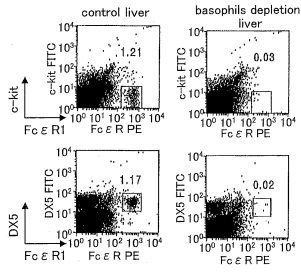
【 8 (d) 】



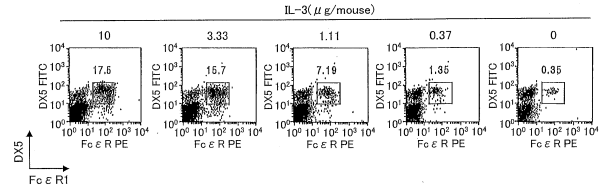
【 9 (a) 】



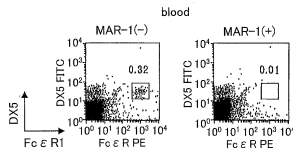
【 9 (b) 】



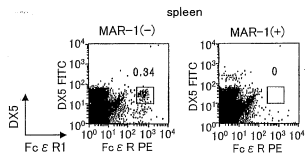
【 9 (e) 】



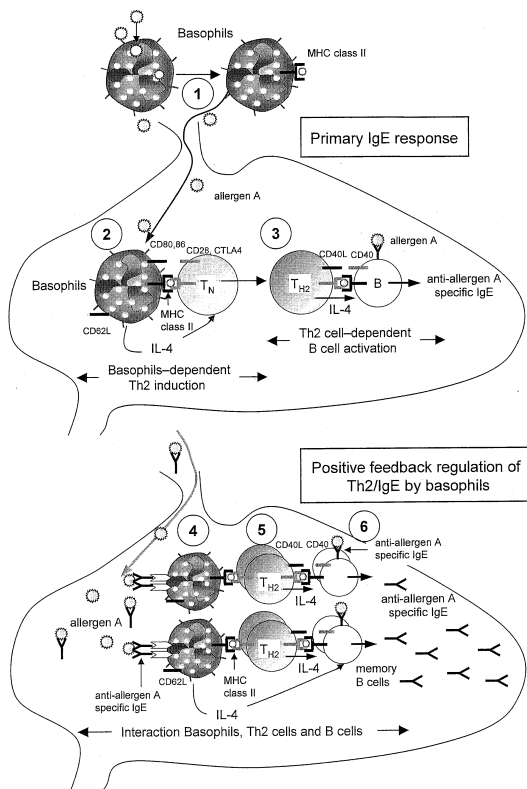
【 9 (c) 】




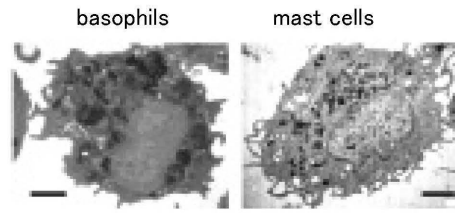
【 9 (d) 】




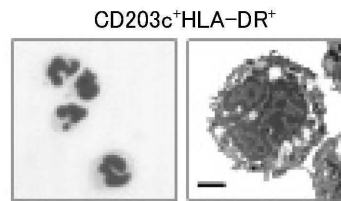
【 10 】



【 6 (b)】



【 6 (d)】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	C 0 7 K	14/54	
			C 0 7 K	16/28	
			A 0 1 K	67/027	

- (56)参考文献 The Journal of Immunology, 2000年, Vol. 164, p. 2667-2673
 European Journal of Immunology, 1990年, Vol. 20, p. 1547-1551
 辻村祐ら, 好塩基球の21世紀ルネサンス - 生体内における好塩基球のユニークな役割が続々と明らかに -, 臨床血液, 2008年 7月30日, Vol. 49, No. 7, pp. 489-497, 全文

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 A 6 1 K 4 5 / 0 0
 A 6 1 P 1 / 0 0
 A 6 1 P 1 1 / 0 2
 A 6 1 P 1 1 / 0 6
 A 6 1 P 1 7 / 0 0
 A 6 1 P 2 7 / 0 2
 A 6 1 P 3 7 / 0 2
 A 6 1 P 3 7 / 0 8
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 C 1 2 Q 1 / 0 2
 G 0 1 N 3 3 / 1 5
 G 0 1 N 3 3 / 5 0
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 A 0 1 K 6 7 / 0 2 7
 C 0 7 K 1 4 / 5 4
 C 0 7 K 1 6 / 2 8
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d
 C i N i i
 W P I D S (S T N)

专利名称(译)	用于诱导Th2细胞的组合物和用于Th2型疾病的治疗组合物，及其用途		
公开(公告)号	JP5626990B2	公开(公告)日	2014-11-19
申请号	JP2010535650	申请日	2009-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人兵库医科大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人兵库医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人兵库医科大学		
[标]发明人	中西憲司 善本知広		
发明人	中西 憲司 善本 知広		
IPC分类号	C12N5/0783 C12Q1/02 A61K45/00 A61P43/00 A61P37/02 A61K39/395 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/02 A61P27/02 A61P1/00 A61P17/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K14/54 C07K16/28 A01K67/027		
CPC分类号	A61K39/39583 A61K47/6901 A61K49/0008 A61K2039/5158 A61K2039/57 A61K2039/6056 A61P1/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/02 C12N5/0636 C12N5/0642 C12N2502/11 G01N33/5047 G01N33/505 G01N33/5088 G01N2800/122 G01N2800/24 A61K2300/00		
FI分类号	C12N5/00.202.L C12Q1/02 A61K45/00 A61P43/00.111 A61P37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/08 A61P11/06 A61P11/02 A61P27/02 A61P1/00 A61P17/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/53.D C07K14/54 C07K16/28 A01K67/027		
审查员(译)	太田雄三		
优先权	2008281930 2008-10-31 JP		
其他公开文献	JPWO2010050167A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了包含与抗原结合的抗原和IgE的复合物，含有与抗原结合的抗原和IgE的组合物，以及使用该复合物或组合物的方法。根据本发明，可以将幼稚T细胞诱导为Th2细胞。此外，本发明揭示了Th2型免疫应答的作用机制，特别是初始IL-4的产生机制，因此使用本发明提供了治疗/预防Th2型疾病的技术。可以。

【图2(a)】

