

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5561689号
(P5561689)

(45) 発行日 平成26年7月30日(2014.7.30)

(24) 登録日 平成26年6月20日(2014.6.20)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 Y

G O 1 N 33/15 (2006.01)

G O 1 N 33/15 Z

C O 7 K 16/24 (2006.01)

C O 7 K 16/24

請求項の数 8 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2009-543695 (P2009-543695)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月29日 (2008.8.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/065569
 (87) 国際公開番号 W02009/069355
 (87) 国際公開日 平成21年6月4日 (2009.6.4)
 審査請求日 平成23年8月29日 (2011.8.29)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-307981 (P2007-307981)
 (32) 優先日 平成19年11月28日 (2007.11.28)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 503359821
 独立行政法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74) 代理人 100122688
 弁理士 山本 健二
 (74) 代理人 100117743
 弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞を用いたアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の発症予測を目的とした、C D 4 陽性 I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞を検出する方法。

【請求項 2】

I L - 1 7 R B の細胞外領域とヒト I g G 1 の F c 領域とを結合させた I L - 1 7 R B 組換え体によって免疫されたヒト以外の哺乳動物から単離したリンパ球又は脾臓細胞とミエローム細胞株との融合細胞であって、その培養上清が I L - 1 7 R B と特異的に反応するハイブリドームにより産生され、I L - 1 7 R B を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

以下の工程を含む、アレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法：

C D 4 陽性 I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞に I L - 1 7 R B のリガンドの存在下、試験化合物を接触させる工程（工程 1）、

試験化合物を接触させた C D 4 陽性 I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞と試験化合物を接触させていない C D 4 陽性 I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞との、その T h 2 細胞様の機能を測定し、その結果を比較する工程（工程 2）、及び

有意に T h 2 細胞様の機能を抑制した試験化合物をアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬として選抜する工程（工程 3）。

【請求項 4】

Th2 細胞様の機能が、リガンド刺激依存性の Th2 サイトカイン・ケモカイン産生能である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

Th2 サイトカイン・ケモカインが、IL-4、IL-5、IL-13、TARC/CCL17 及び MDC/CCL22 からなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

以下の工程を含む、アレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法：

CD4 陽性 IL-17RB 陽性 NK T 細胞を有するヒト以外の哺乳動物に IL-17RB のリガンドの存在下、試験化合物を投与する工程（工程 1）、

試験化合物を投与した哺乳動物と、試験化合物を投与していない哺乳動物との、その Th2 細胞様の機能を測定し、その結果を比較する工程（工程 2）、及び

有意に Th2 細胞様の機能を抑制した試験化合物をアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬として選抜する工程（工程 3）。

【請求項 7】

Th2 細胞様の機能が、リガンド刺激依存性の気道抵抗の上昇である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

リガンドが、IL-17E/IL-25 である、請求項 3～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規なアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法に関する。より詳細には、IL-17RB 陽性 NK T 細胞の Th2 細胞様の機能を測定することを含むアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法ならびに IL-17RB 陽性 NK T 細胞の Th2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質を有効成分として含有するアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬等に関する。

【背景技術】

【0002】

IL-17 は 1993 年にマウスの T 細胞ハイブリドーマからクローニングされ、1995 年には、このタンパク質に NF-κB の活性化能や IL-6 誘導能があることが示されたサイトカインの 1 種である。IL-17 は分子量 20～30 kD のペプチドからなるホモダイマーの糖蛋白質であり、現在、IL-17（IL-17A と呼ぶ）以外に、相同性を持つ 6 個のファミリー分子（IL-17、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-25（IL-17E）、IL-17F）からなることが知られている。IL-17 は主に活性化 T 細胞（Th1 細胞、Th2 細胞）より産生され、線維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージ等種々の細胞に作用して、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子等、種々の因子を誘導して炎症を誘導することが知られている。

IL-17 が主に活性化 T 細胞から産生されるのに対し、IL-17 レセプター（以下、IL-17R と称する）は種々の細胞で構成的に発現している。リガンドと同様にレセプターもファミリー（IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD、IL-17RE）を形成していることが知られている。

【0003】

気管支喘息等のアレルギー性気道炎症は、Th2 細胞、好酸球、好中球、肥満細胞、好塩基球等の炎症局所へ浸潤した血球系細胞と、血管内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞等の組織細胞との相互作用により惹起される。Th2 細胞は、IL-4、IL-5、IL-1

10

20

30

40

50

3、TARC/CCL17、MDC/CCL22等のTh2サイトカイン・ケモカインを産生し、IGE産生、好酸球の活性化、気道上皮細胞からの粘液や他のサイトカイン・ケモカインの産生、血管内皮細胞上の接着分子の発現の誘導により、アレルギー性気道炎症の惹起に中心的な役割を果たしている。

近年、新たなTh2細胞サイトカインとしてIL-17ファミリーに属するIL-17E/IL-25が同定された(非特許文献1、2)。IL-17E/IL-25はIL-17RBのリガンドであり、IL-4、IL-5、IL-13等のTh2サイトカインの産生を誘導し、気道過敏症や喘息の惹起あるいは増悪をもたらす役割を担っているものと考えられている(非特許文献5~7)。しかしながら、その標的となるTh2サイトカイン産生細胞の詳細、特に特定のサブセットを有する細胞がアレルギー性気道炎症や気道過敏症へのIL-17E/IL-25の関与に重要であるということは明らかにされていない。

10

【0004】

ナチュラルキラーT(NKT)細胞は抗原提示細胞(APC)上の抗原提示分子CD1dに提示されたスフィンゴ糖脂質をリガンドとして認識・活性化され、Th1/2両方のサイトカインの産生、細胞障害活性を誘導し、特に抗腫瘍に重要な機能発現をもたらすことが知られている。NKT細胞は上記のような多機能性を有することから種々の病態の寛解に参与する一方で、増悪に参与するケースが報告されている。特に喘息の発症及び増悪においてはNKT細胞の活性化がその引き金となっていることが報告されている(非特許文献3、4)。また、喘息の治療には、主に吸入ステロイドを用いた対処療法が行われているが、ステロイド非感受性の喘息患者がいることが知られており、多くの場合、NKT細胞が増悪に参与しているケースと相関があるとの報告がある(非特許文献4)。

20

しかしながら、NKT細胞の特定のサブセットが喘息への関与に重要であることは知られていない。

【非特許文献1】Lee J., et al. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. J Biol Chem. 2001 Jan 12;276(2):1660-1664.

【非特許文献2】Fort M.M., et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. Immunity. 2001 Dec;15(6):985-995.

【非特許文献3】Akbari O., et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. Nat Med. 2003 May;9(5):582-588.

30

【非特許文献4】Umetsu D.T., DeKruyff R.H. A role for natural killer T cells in asthma. Nat Rev Immunol. 2006 Dec;6(12):953-8.

【非特許文献5】Angkasekwinai P., et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. J Exp Med. 2007 Jul 9;204(7):1509-17.

【非特許文献6】Wang Y.H., et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. J Exp Med. 2007 Aug 6;204(8):1837-47.

【非特許文献7】Ballantyne S.J., et al. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007 Sep 20.

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、アレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬を得る為のスクリーニング方法、新規な作用機序を有するアレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬、ならびにそれらを開発し得る種々の手段等を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意検討を行った結果、未刺激のNKT細胞(定常状態のNKT細胞)の一部にIL-17RBの特異的な発現が見られることを、抗IL-1

50

7 R Bモノクローナル抗体を用いて確認し、さらに、そのI L - 1 7 R B陽性のN K T細胞が活性化されることによりT h 2細胞様の機能を示すようになり、喘息の誘導に深く寄与していることを見出した。さらにI L - 1 7 R B陽性N K T細胞のT h 2細胞様の機能に及ぼす影響を調べることによってアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法を実施し得ることを見出して本発明を完成した。すなわち本発明は以下の通りである。

【 0 0 0 7 】

[1] I L - 1 7 R Bの細胞外領域とヒトI g G 1のF c領域とを結合させたI L - 1 7 R B組換え体によって免疫されたヒト以外の哺乳動物から単離したリンパ球又は脾臓細胞とミエローマ細胞株との融合細胞であって、その培養上清がI L - 1 7 R Bと特異的に反応するハイブリドーマ。

10

[2] 上記[1]に記載のハイブリドーマにより産生され、I L - 1 7 R Bを特異的に認識するモノクローナル抗体。

[3] 上記[2]に記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、I L - 1 7 R B陽性細胞を検出する方法。

[4] 定常状態においてはI L - 1 7 R B陽性細胞がI L - 1 7 R B陽性N K T細胞である、上記[3]記載の方法。

[5] 上記[2]に記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする、I L - 1 7 R B陽性細胞を他のリンパ球系細胞から分離する方法。

[6] 定常状態においてはI L - 1 7 R B陽性細胞がI L - 1 7 R B陽性N K T細胞である、上記[5]記載の方法。

20

[7] I L - 1 7 R B陽性N K T細胞のT h 2細胞様の機能を測定する工程を含む、アレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法。

[8] 以下の工程を含む、アレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法：

I L - 1 7 R B陽性N K T細胞にI L - 1 7 R Bのリガンドの存在下、試験化合物を接触させる工程（工程1）、

試験化合物を接触させたI L - 1 7 R B陽性N K T細胞と試験化合物を接触させていないI L - 1 7 R B陽性N K T細胞との、そのT h 2細胞様の機能を測定し、その結果を比較する工程（工程2）、及び

30

有意にT h 2細胞様の機能を抑制した試験化合物をアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬として選抜する工程（工程3）。

[9] T h 2細胞様の機能が、リガンド刺激依存性のT h 2サイトカイン・ケモカイン産生能である、上記[8]記載の方法。

[1 0] T h 2サイトカイン・ケモカインが、I L - 4、I L - 5、I L - 1 3、T A R C / C C L 1 7及びM D C / C C L 2 2からなる群から選択される少なくとも1種である、上記[9]記載の方法。

【 0 0 0 8 】

[1 1] 以下の工程を含む、アレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法：

40

I L - 1 7 R B陽性N K T細胞を有するヒト以外の哺乳動物にI L - 1 7 R Bのリガンドの存在下、試験化合物を投与する工程（工程1）、

試験化合物を投与した哺乳動物と、試験化合物を投与していない哺乳動物との、そのT h 2細胞様の機能を測定し、その結果を比較する工程（工程2）、及び

有意にT h 2細胞様の機能を抑制した試験化合物をアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬として選抜する工程（工程3）。

[1 2] T h 2細胞様の機能が、リガンド刺激依存性の気道抵抗の上昇である、上記[1 1]記載の方法。

[1 3] リガンドが、I L - 1 7 E / I L - 2 5である、上記[8]～[1 2]のいずれかに記載の方法。

50

[1 4] I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の T h 2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質を有効成分として含有する、アレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬。

[1 5] I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の T h 2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質を有効成分として含有する、好酸球増加症の治療薬。

[1 6] I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の T h 2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質が、I L - 1 7 R B に対するアンタゴニスティック抗体並びに低分子阻害剤、I L - 1 7 E / I L - 2 5 に対する抗体及び I L - 1 7 R B の可溶化型分子からなる群から選択される少なくとも 1 種である、上記 [1 4] 記載のアレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬。

[1 7] I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の T h 2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質が、I L - 1 7 R B に対するアンタゴニスティック抗体並びに低分子阻害剤、I L - 1 7 E / I L - 2 5 に対する抗体及び I L - 1 7 R B の可溶化型分子からなる群から選択される少なくとも 1 種である、上記 [1 5] 記載の好酸球増加症の治療薬。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明により、I L - 1 7 R B 陽性細胞あるいは I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞を選択的に検出することができる。また、I L - 1 7 R B 陽性細胞あるいは I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞を他のリンパ球系細胞から選択的に高い純度で分離することができる。さらに活性化された I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞はその機能解析の結果から T h 2 細胞様の機能を有し、リガンドである I L - 1 7 E / I L - 2 5 の刺激により大量の I L - 1 3 等の T h 2 サイトカインを産生することから、気道過敏症あるいはアレルギー性気道炎症の増悪に中心的な役割を担っているものと考えられる。これまで、喘息等のアレルギー疾患に関しては、ステロイドを用いた対処療法が施されてきたが、ステロイド不応性であるケースも知られており、N K T 細胞が増悪に関与している場合との相関性が指摘されている。これらの結果から、I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の機能を阻害あるいは除去することで免疫応答を制御し得ることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】I L - 1 7 R B のハイドロパシープロット解析の結果を示す図である。

【図 2】可溶化型 I L - 1 7 R B - I g 組換え体の発現と精製を示す図である。

【図 3】I L - 1 7 R B 特異的モノクローナル抗体 (B 5 F 6 C 1 1 、 3 H 8 E 9) の、I L - 1 7 R B 強制発現細胞株への反応性を示す図である。

【図 4】I L - 1 7 R B が N K T 細胞に特異的に発現することを示した図である。

【図 5】I L - 1 7 R B が T h 2 優位マウスの N K T 細胞に発現することを示した図である。T h 1 優位マウスの N K T 細胞には発現していない。

【図 6】I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の各臓器における存在様式を調べた結果を示す図である。I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞は肺に多く存在している。

【図 7】I L - 1 7 R B が C D 4 陽性の N K T 細胞に発現することを示した図である。

【図 8】N K T 細胞サブセットの表面マーカーの発現プロファイルを調べた結果を示す図である。

【図 9】N K T 細胞サブセットの遺伝子の発現プロファイルを調べた結果を示す図である。

【図 1 0】I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞がリガンド依存的に増殖することを示した図である。

【図 1 1】I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞がリガンド依存的に大量の T h 2 サイトカイン・ケモカインを産生することを示した図である。

【図 1 2】リガンドの投与により N K T 細胞依存的に気道抵抗値が上昇することを示した図である。

【図 1 3】リガンド投与により N K T 細胞依存的に I L - 1 3 が産生されることを示した図である。

10

20

30

40

50

【図14】各種細胞におけるIL-17RBの発現様式について解析した結果を示す図である。図14aは、腸管膜リンパ節のc-kit陽性非B非T細胞におけるIL-17RBの発現を、図14bは、脾臓細胞の各サブセットにおけるIL-17RBの発現を、図14cは、肺単核球の各サブセットにおけるIL-17RBの発現を示している。

【図15】NK細胞サブセットの遺伝子(IL-17/IL-17A、RORγt)の発現プロファイルを調べた結果を示す図である。

【図16】IL-17RB陽性NK細胞がリガンド依存的に大量のeosinophil chemotactic factor-L(ECL)を産生することを示した図である。

【図17】リガンド依存的な気道過敏症発症におけるIL-17RB陽性NK細胞の役割を解明するために行った実験のプロトコルを示す図である。

【図18】NK細胞欠損マウスでは、リガンド投与による気道抵抗値の上昇が抑制されていることを示す図である。

【図19】NK細胞欠損マウスでは、リガンド投与による肺胞液中への細胞浸潤が抑制されていることを示す図である。

【図20】NK細胞欠損マウスでは、リガンド投与によるIL-4及びIL-5産生が抑制されていることを示す図である。

【図21】リガンドの投与による好酸球や好中球の浸潤(図21a)及びムチン粘液過剰産生(図21b)について調べた結果を示す図である。Balb/cマウス(WT)あるいはNK細胞欠損マウス(Jα18^{-/-})について調べた。

【図22】抗IL-17RB抗体でIL-17RB陽性NK細胞を除去することによって、リガンドの投与による気道抵抗値の上昇を抑制し得ることを示した図である。図22aはIL-17RB陽性NK細胞が除去されていることを確認した図であり、図22bは気道抵抗値の測定結果を示した図である。

【図23】NK細胞欠損マウスにIL-17RB陽性NK細胞を移入することにより、リガンドの投与による気道抵抗値の上昇が確認されたことを示す図である。

【図24】RSV感染マウスの肺胞洗浄液中のIL-25、IL-6、IL-4あるいはIL-13の濃度を測定した結果を示す図である。

【図25】RSV感染によりNK細胞が肺胞液中に浸潤することを示した図である。

【図26】RSV依存的な気道過敏症発症におけるIL-17RB陽性NK細胞の関与を解析するためのプロトコルを示す図である。

【図27】RSV依存的な気道過敏症発症におけるIL-17RB陽性NK細胞の関与を示す図である。図27aは、リガンド投与による気道抵抗値の上昇について調べた結果を示す。図27bは、リガンド投与による肺胞液中への細胞浸潤について調べた結果を示す。

【図28】RSV依存的な気道過敏症発症におけるIL-17RB陽性NK細胞の関与を示す図である。図28aは、リガンド投与による肺胞液中への好酸球・好中球の浸潤を、図28bは、リガンド投与によるムチン過剰産生を、それぞれ調べた結果を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

文中で特に断らない限り、本明細書で用いるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味をもつ。本明細書に記載されたものと同様又は同等の任意の方法及び材料は、本発明の実施又は試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料を以下に記載する。本明細書で言及したすべての刊行物及び特許は、例えば、記載された発明に関連して使用されうる刊行物に記載されている、構築物及び方法論を記載及び開示する目的で、参照として本明細書に組み入れられる。

【0012】

本明細書中で使用するIL-17RBに対する抗体ならびに本発明のIL-17RBを特異的に認識するモノクローナル抗体(以下、便宜上両者をあわせて本発明の抗体とも称

10

20

30

40

50

する)は、本発明の抗体がIL-17RB分子のみが有するエピトープと免疫学的に交差反応し、他のファミリーのタンパク質と交差反応しないことを意味する。このようなエピトープは、例えばIL-17RBのアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列とを整列比較することによって、本質的に異なる配列部分(連続する少なくとも5アミノ酸、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸)を選択することによって決定できる。

【0013】

目的の抗体を得るための抗原エピトープは、IL-17RBのアミノ酸配列(推定アミノ酸配列を配列番号2に、塩基配列を配列番号1に示す)において抗原性の高い領域、表在性がある領域、二次構造をとらない可能性のある領域、他のタンパク質(特にIL-17RBが属するファミリーの他のタンパク質)と相同性がないか又は低い領域から選択されうる。ここで「相同性」という用語は、2つ以上のアミノ酸配列または塩基配列間での配列の同一性または類似性を意味し、配列は例えば対角線図形法や頻度分布法等を含む慣用的方法で比較しうる。抗原性の高い領域は、Parkerらの方法[Biochemistry、25巻、5425-5432頁(1986年)]によって推定可能である。表在性がある領域は、例えばハイドロパシーインデックスを計算しプロットすることによって推定可能である。二次構造をとらない可能性のある領域は、例えば、ChouとFasmanの方法[Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.、47巻 45-148頁(1978年)]によって推定可能である。さらに、特にIL-17RBが属する他のタンパク質とホモロジーがないか又は低い領域は、IL-17RBのアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列との相同性比較によって推定可能である。

【0014】

上記の手法で推定された抗原エピトープとして機能し得るIL-17RBの部分アミノ酸配列を基に、ペプチド合成法を利用することによって該アミノ酸配列からなるペプチドを合成することができる。目的のペプチドは、例えば、R.B. Merrifield[Science、232巻、341-347頁(1986年)]によって開発された固相ペプチド合成に基いた市販のペプチド合成機を使用して合成し、保護基を脱離後、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を単独もしくは組み合わせた方法により精製する。得られた精製ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)やアルブミン等のキャリアタンパク質と結合し免疫原として使用することができる。

【0015】

さらに、遺伝子組換えIL-17RB(以下、便宜上IL-17RB組換え体とも称する)を免疫原として用い、IL-17RBに対するポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を公知の手法により作製することもできる。この場合、IL-17RB、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または他のタンパク質に関して用いられる「組換え」という用語は、これらのタンパク質が宿主細胞内で組換えDNAによって生産されたものであることを意味する。当該組換え体は、上記した目的の抗体を得るための抗原エピトープ部分、すなわちIL-17RBの部分アミノ酸配列をコードするものであってもよいし、該配列を含む限りIL-17RB全長のアミノ酸配列あるいは任意の部分アミノ酸配列をコードするものであってもよい。組換えDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター(例えばプラスミド等)でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

【0016】

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいてIL-17RB組換え体をコードする遺伝子は、適当な転写/翻訳調節配列(例えば、プロモーター等)に機能的に連結されている。発現ベクターの種類としては、例えばプラスミ

ド、ファージ、コスミド、ウイルス等が挙げられる。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

【0017】

転写／翻訳調節配列には、使用する宿主／ベクター系に応じて選択されたプロモーターおよびエンハンサーを含めることができる。また、上記組換えDNAは必要に応じて、適切なターミネーターに機能的に結合されてもよい。さらに当該組換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル（例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの）、転写エンハンサー配列（例えばSV40エンハンサー）等の要素を有していてもよい。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子（テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等）をさらに含むこともできる。

10

【0018】

当該組換えDNAあるいは組換えベクターを適当な宿主に導入することによってIL-17RB組換え体を発現する形質転換体を作製することができる。DNAまたはベクターを導入される宿主細胞は、IL-17RB組換え体を発現できれば任意の細胞を使用できる。宿主細胞としては、原核細胞、酵母類、動物細胞、真菌細胞、昆虫細胞又は植物細胞等が使用可能である。

原核細胞の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なうことができる。酵母宿主へのベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。動物細胞へのベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

20

【0019】

形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞は適当な培養培地中で培養されて目的遺伝子を発現させ、産生したIL-17RB組換え体を培地中から、または宿主細胞中から回収する。細胞から回収する場合には、培養終了後、細胞を遠心分離等により分離し、水性緩衝液に懸濁し、音波処理、フレンチプレス、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。膜分子の単離精製は、タンパク質の精製に用いられる一般的方法、例えばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等のクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動法、脱塩法、有機溶媒沈殿法等を任意に組み合わせて行うことができる。

30

【0020】

本発明の「抗体」はペプチド抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよい。「抗体」は、マウスまたは他の適した宿主動物を免疫に用いられたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、産生するであろうリンパ球又は脾臓細胞を引き出すために、皮下、腹腔内、または筋肉内の経路によって、抗原あるいは抗原発現細胞により免疫化することによって得られる。抗原としては上記目的の抗体を得るための抗原エピトープや該エピトープを含む部分アミノ酸配列が挙げられ、抗原発現細胞としては、上記目的の抗体を得るための抗原エピトープや該エピトープを含む部分アミノ酸配列をコードする組換えDNAで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞が挙げられる。さらに宿主動物としてはヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、所望のヒト抗体を取得してもよい[Proc.

40

Natl. Acad. Sci. USA、97巻、722-727頁(2000年)、国際公開WO96/33735、WO97/07671、WO97/13852、W

50

098/37757参照]。そのかわりに、リンパ球を *in vitro* で免疫化してもよい。宿主動物から得られた血清から、抗原に結合する画分を集め、精製することにより、ポリクローナル抗体を取得することができる。また、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレングリコールのような適当な融合試薬を用いて、リンパ球又は脾臓細胞をミエローマ細胞株と融合させることにより、モノクローナル抗体を作製することができる (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁、Academic press、1986年)。例えば本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法 [Nature、256巻、495頁 (1975年)] を用いても、組換えDNA法 (Cabillyら、米国特許第4816567号) を用いても作製することができる。

10

【0021】

抗原タンパク質はIL-17RBのタンパク質の全てまたは部分配列をコードするDNAを、大腸菌や酵母、昆虫細胞、動物細胞等で発現させることにより調製することができる。得られた抗原タンパク質は、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を単独もしくは組み合わせた方法により精製し、この精製標品を免疫原として用いる。

【0022】

また、本発明の抗体は、無傷の抗体であってもよいし、あるいは (Fab')₂ や Fab 等の抗体断片であってもよいし、単鎖抗体等の組換え抗体であってもよい。

【0023】

また、定常領域をヒトの定常領域に置き換えたキメラ抗体 (例えばマウス-ヒトキメラ抗体; Cabillyら、米国特許4816567及びMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻、6851頁 (1984年))、定常領域および超可変領域 (または、Complementary-determining region; CDR) を除く全ての可変領域をヒトの配列に置き換えたヒト化抗体 (Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻、4285頁、1992年及びCarterら、Biotechnology、10巻、163頁、1992年) も本発明の抗体に含まれる。

20

【0024】

例えば、IL-17RBの細胞外ドメインと考えられる領域 (例えば配列番号2のアミノ酸1位~282位まで) とヒトIgG1のFc領域を結合させた組換え体を免疫原として用いることができる。該組換え体のアミノ酸配列を配列番号4に示す。本発明で用いる組換え体では、細胞表面上に存在するFcγ受容体に結合しないよう、3箇所のアミノ酸置換を行なった (配列番号4に示すアミノ酸配列中302位 (Leu→Ala)、303位 (Leu→Glu)、469位 (Val→Asp))。

30

【0025】

また、このようにして得られた本発明の抗体に対する抗体、すなわち抗イディオタイプ抗体もまた本発明に含まれる。

【0026】

このようにして得られたIL-17RBに対する各種抗体は、その特徴を生かすことができる様々な用途に使用可能である。本抗体を蛍光性物質 (ローダミン、フルオレサミン等) で標識し、周知のFACSを用いて目的の、IL-17RBを発現している細胞 (IL-17RB陽性細胞)、特にIL-17RB陽性NK細胞を検出・分離することができる。さらに種々の臓器におけるIL-17RB陽性NK細胞の存在様式を知ることができる。またビオチンで標識し、フィコエリスリン等が結合したアビジンを用いても同様にIL-17RB陽性NK細胞を検出・分離することができる。ここで分離とは、他の細胞、特にリンパ球系細胞、具体的にはB細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、IL-17RB陰性NK細胞、好中球、好酸球、好塩基球等の多型核白血球、マスト細胞等の免疫担当細胞、等からの分離を意味する。

40

【0027】

50

IL-17RBの検出に関しては、FACSでの検出にとどまるものではない。例えばウェスタンブロッティングにおいて本抗体を1次抗体として作用させることにより検出可能であることが予想されるし、タンパク質レベルでの発現確認を行うことができる。また本抗体を固相（ポリスチレンビーズ、マイクロタイターウエル表面、ラテックスビーズ等）に結合して不均一系で、あるいは均一系で、免疫学的反応を行って検出、定量（蛍光抗体法、ELISA、ラジオイムノアッセイ等の方法を使用）することができる。この場合、免疫学的反応は競合反応であってもよいし非競合反応であってもよい。また2つ以上の抗体（モノクローンまたはポリクローン）を用いるサンドイッチ法による反応も使用できる。上記における検出、定量のためには、当業界で公知のいずれの免疫学的手法も用いることができる。

10

【0028】

IL-17RB陽性NK細胞においてIL-17RBリガンドの刺激により活性化されTh2細胞様の機能が誘導されるようになることは、本発明において得られた知見である。

本発明において、IL-17RB陽性細胞としては、活性化Th2細胞、活性化好酸球等が挙げられる。また、定常状態では、IL-17RB陽性細胞として、好ましくはIL-17RB陽性NK細胞が挙げられる。IL-17RB陽性NK細胞は、NK細胞の中でも特にCD4陽性のNK細胞に見られ、CD4陽性のNK細胞のうち約1/3を占める。脾臓や胸腺、肺に多く見られる。ここで、「定常状態」とは、生体が健康な状態、特に喘息や潰瘍性大腸炎等のアレルギー疾患を有さない状態を示す。

20

【0029】

本発明は、IL-17RB陽性NK細胞、特にリガンド刺激により活性化されたIL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能を測定することを含む、アレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法を提供する。アレルギー性気道炎症とは、アレルギーの原因（例、ダニやハウスダスト等の環境性抗原）を吸い込んで気管支粘膜で免疫反応が起こり、ヒスタミン、ロイコトリエン、化学伝達物質が遊離され、マスト細胞、好酸球、好中球、リンパ球によるアレルギー性炎症反応が誘発されて生じる気道の炎症であり、喘息発作を伴う場合がある。気道過敏症では、非特異的な種々の刺激に反応して気管が収縮し、喘息発作を伴う。わずかな刺激でも気管が過剰に反応し、冷たい空気を吸ったり、急に走ったりするだけでも喘息発作が起こる場合がある。

30

本発明において「Th2細胞様の機能」とは、液性免疫を制御するIL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13等のサイトカインを産生し、B細胞の抗体産生を促進するヘルパーT細胞2型（Th2細胞）と同等の機能を意味する。具体的には、活性化されたIL-17RB陽性NK細胞がIL-4、IL-5、IL-13、TARC/CCL17、MDC/CCL22等のサイトカイン・ケモカインを産生する能力、産生された種々のサイトカイン・ケモカインが発揮し得る種々の作用を意味する。

さらに、リガンド刺激により活性化されたIL-17RB陽性NK細胞は、好酸球走化因子（ECF-L）を産生し、IL-5産生性の好酸球を局所に呼び寄せる機能を有する。

IL-4（インターロイキン-4）は、活性化されたCD4陽性T細胞（Th2細胞）、CD8陽性T細胞、マスト細胞（肥満細胞）、好塩基球、NK細胞から産生されるサイトカインの1種であり、Th2細胞の増殖や分化を促進し、活性化されたB細胞に作用してIgMから、IgG1、IgEへのクラススイッチを促進させ、IgG1抗体、IgE抗体の産生を促進する。また、マクロファージの活性化を抑制し、NO、プロスタグランジン（PGE₂）、IFN-γの産生を抑制することが知られている。

40

IL-5（インターロイキン-5）は、主として活性化T細胞および肥満細胞より産生され、B細胞や好酸球の活性化、増殖・分化に重要な役割を演じるサイトカインである。また、IL-2共存下の細胞傷害性T細胞の生成促進や好塩基球のヒスタミン遊離の増強作用も明らかになっている。アレルギー性鼻炎、喘息、アトピー性皮膚炎のようなアレルギー疾患とIL-5の関連を示唆する報告が多い。

50

IL-13 (インターロイキン-13) は、喘息のエフェクター分子として作用し、例えば無感作動物にIL-13を投与するだけで気道過敏性、好酸球性炎症、粘膜異形成といったアレルギー性喘息に特徴的な症状を発現することが報告されている。

TARC/CCCL17及びMDC/CCCL22は、ともにCCR4の特異的リガンドであり、Th2細胞に発現しているケモカインである。

従ってIL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能の測定としては、リガンド刺激依存性のTh2サイトカイン・ケモカイン(IL-4、IL-5、IL-13、TARC/CCCL17、MDC/CCCL22等)を産生する能力の測定、リガンド刺激依存性の気道抵抗の上昇の有無の測定(in vivoでの測定)、これに付随して肺胞洗浄液中に含まれる免疫担当細胞、特に好酸球の数の測定、等が挙げられる。詳細な測定方法・測定手順については後述する。

10

【0030】

本スクリーニング方法で用いるIL-17RB陽性NK細胞は、NK細胞を含有する細胞集団から上記した本発明の抗体を用いてIL-17RBを発現しているNK細胞を検出・分離して得ることができる。NK細胞は、その存在割合は少ないが免疫系で制御的な役割を担っているリンパ球の一種である。NK細胞はT細胞レセプター(TCR)とNKレセプターの2つの抗原レセプターを有する。NK細胞の由来は特に限定されず、ヒトを含む霊長類、げっ歯類、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ及びブタ等の哺乳動物の臍帯血、末梢血、肺、骨髓、脾臓、リンパ節、胸腺等から回収することができる。本明細書で用いる「霊長類」という用語は、サル、類人猿、及びヒトが含まれるがこれらに限定されない、哺乳類の群に属する、任意の動物を意味する。具体的には末梢血や肺、脾臓、胸腺のホモジネートから回収される単細胞の懸濁液を、NK細胞に高度に保持されたTCRに認識され得る、CD1d分子と結合した α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer若しくは α -GC)のような抗原糖脂質を用いてFACS解析することによって選別、回収し、次いで上記したIL-17RBに対する抗体(好ましくはモノクローナル抗体)を用いてIL-17RBを発現しているNK細胞のみを選別、回収する。あるいは、IL-17RBが定常状態にあるNK細胞の一部に特異的に発現していることから、末梢血や肺、脾臓、胸腺のホモジネートから回収される単細胞の懸濁液、好ましくは脾臓由来の白血球から直接IL-17RBに対する抗体(好ましくはモノクローナル抗体)を用いてIL-17RB陽性のNK細胞を選別、回収することもできる。

20

30

【0031】

本発明のアレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬のスクリーニング方法の一態様(態様1)を以下に示す。

態様1

(工程1) IL-17RB陽性NK細胞にIL-17RBのリガンドの存在下、試験化合物を接触させる工程。

本工程で用いるIL-17RB陽性NK細胞としては、上記したIL-17RBに対する抗体(好ましくはモノクローナル抗体)で検出・分離した細胞が挙げられる。該NK細胞は好ましくはAPCで活性化されているか、活性化される条件下で用いられる。具体的にはAPCの共存下で本工程を実施する。本工程で用いるリガンドとしては、IL-17RB陽性NK細胞に作用してTh2細胞様の機能を誘導する、すなわちTh2サイトカインやケモカインを産生させるような物質であれば特に限定されないが、IL-17RBのリガンドとして知られているIL-17E/IL-25を用いることが好ましい。使用するリガンドの濃度は、IL-17RB陽性NK細胞の増殖に不利に作用することのない、好ましくは増殖を促し、Th2サイトカインやケモカインを産生させることが可能な範囲で適宜設定されるが、反応系の媒体となる培養液や緩衝液中、通常0.1~10 ng/ml、好ましくは1 ng/ml程度である。ここで、当該リガンドは、リガンドがIL-17RB陽性NK細胞に作用してTh2サイトカインやケモカインを産生させるような状態で反応系に存在する限り、試験化合物とIL-17RB陽性NK細胞との接

40

50

触の前に反応系に添加されていても、接触の後に反応系に添加されていても、あるいは接触と同時に反応系に添加されるものであってもよい。

本明細書において「試験化合物」とは、IL-17RB陽性NK細胞に作用してその機能を阻害あるいは除去することができるか否かを調べる目的で選択あるいは合成された化合物であり、新規な化合物以外に、既に別の作用を有することが報告されている既知化合物をも包含する。また組成物として用いてもよい。例えば、核酸（例、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）、糖質（例、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖）、脂質（例、飽和又は不飽和の直鎖、分岐鎖及び/又は環を含む脂肪酸）、アミノ酸、タンパク質（例、オリゴペプチド、ポリペプチド）、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリ、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリ、天然成分（例、微生物、動植物、海洋生物等由来の成分）、あるいは食品、飲料水等が挙げられる。本発明のスクリーニング方法によりIL-17RB陽性NK細胞の機能を阻害あるいは除去する作用があると認められた化合物は、上述の如くアレルギー性気道炎症や気道過敏症への適用が期待される。

10

IL-17RB陽性NK細胞の試験化合物との接触は、該試験化合物が、活性化されたIL-17RB陽性NK細胞が有するTh2サイトカイン・ケモカイン産生能に影響を及ぼすか否かを判定できる限り、その方法は特に限定されないが、簡便にはIL-17RB陽性NK細胞及びその活性化物質（例えばリガンドや抗原提示細胞）を含有する細胞懸濁液等の反応系中、リガンドの存在下に所定の量で添加することによって実施される。試験化合物の添加量は、細胞の状況に応じて適宜設定されるが、通常、希釈系列を設定することが好ましい。接触に要する時間も、所望の効果が得られる範囲で適宜設定することができる。通常、24～120時間、好ましくは48～72時間程度である。

20

【0032】

（工程2）試験化合物を接触させたIL-17RB陽性NK細胞と試験化合物を接触させていないIL-17RB陽性NK細胞との、そのTh2細胞様の機能を測定し比較する工程。

IL-17RB陽性NK細胞は、抗原提示細胞（APC）等によって活性化されることが好ましい。かかるIL-17RB陽性NK細胞をIL-17RBのリガンド（例えばIL-17E/IL-25）で刺激することによって、Th2細胞様の機能が誘導される。Th2細胞様の機能としては具体的にはTh2サイトカイン・ケモカインの産生能が挙げられる。Th2サイトカイン・ケモカインとしては上述の如き、IL-13、IL-4、TARC/CCL17、MDC/CCL22等が挙げられる。これらサイトカイン・ケモカインの産生能は、通常、当分野で実施される方法、例えば各サイトカイン・ケモカインに対する抗体を用いたウェスタンブロットやELISA法、プローブを用いたノザンブロットやプライマーを用いた定量PCR等によって測定することができる。各種抗体やプローブ、プライマーは、各サイトカイン・ケモカインのアミノ酸配列や遺伝子配列、あるいは精製方法等の既知の情報に基づいて適宜調製することができるか、商業的に入手可能なものである。

30

【0033】

（工程3）有意にTh2細胞様の機能を抑制した試験化合物をアレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬として選抜する工程。

40

工程2同様、Th2細胞様の機能としてはTh2サイトカイン・ケモカインの産生能が挙げられる。IL-17RB陽性NK細胞が産生するTh2サイトカイン・ケモカインは、気道過敏症あるいは喘息の増悪に中心的な役割を担っているものと考えられ、従って、上記工程2で得られた情報に基づいて選抜された、有意にTh2細胞様の機能を抑制した、特にTh2サイトカイン・ケモカイン産生を抑制した試験化合物は、アレルギー性気道炎症及び/又は気道過敏症の治療薬の候補となり得る。効果の有意性は、通常、当分野で実施している統計学的処理に基づいて有意差検定を行なうことにより決定することができる。

【0034】

50

さらに、本発明が提供するスクリーニング方法の別態様（態様２）を以下に示す。

態様２

（工程１）ＩＬ－１７ＲＢ陽性ＮＫＴ細胞を有するヒト以外の哺乳動物にＩＬ－１７ＲＢのリガンドの存在下、試験化合物を投与する工程（工程１）。

本工程で用いる、ＩＬ－１７ＲＢ陽性ＮＫＴ細胞を有するヒト以外の哺乳動物としては、ＩＬ－１７ＲＢのリガンド刺激依存性のＴｈ２サイトカイン・ケモカインの産生や、気道抵抗の上昇等の作用が認められるヒト以外の哺乳動物であれば特に限定されず、ヒト以外の霊長類、げっ歯類、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ及びブタ等の哺乳動物が挙げられる。それらの中でも特にＴｈ２優位であることが望ましい。例えばマウスであれば、Ｔｈ１優位として知られるＣ５７ＢＬ／６やＣ３Ｈ／ＨｅＮ系統よりは、Ｔ

10

ｈ２優位として知られるＢａｌｂ／ｃやＤＢＡ／２ｃｒ系統のマウスが好ましく用いられる（実施例４参照）。ＩＬ－１７ＲＢのリガンド及び試験化合物としては、上記した本発明のスクリーニング方法の態様１で用いられるものと同様なものが挙げられる。

ＩＬ－１７ＲＢのリガンドの投与量は、ヒト以外の哺乳動物の体内に存在するＩＬ－１７ＲＢ陽性ＮＫＴ細胞（好ましくは活性化された状態）に対して、リガンド刺激依存的にＴｈ２細胞様の機能を誘導する、すなわち、Ｔｈ２サイトカイン・ケモカイン（ＩＬ－１３、ＩＬ－４、ＴＡＲＣ／ＣＣＬ１７、ＭＤＣ／ＣＣＬ２２等）を産生させる、及び／又は気道収縮物質（メタコリン等）刺激による気道抵抗の上昇をもたらすような量であれば特に限定されないが、通常体重１ｋｇあたり１～１００ｍｇ、好ましくは１～１０ｍｇ程度である。上記したＩＬ－１７ＲＢ陽性ＮＫＴ細胞のＴｈ２細胞様の機能が誘導され、該機能への試験化合物の影響が測定できれば、試験化合物及びリガンドを、ヒト以外の哺乳動物へ投与する順序は、特に制限されず、試験化合物の投与はリガンドの投与前であっても、リガンド投与後であっても構わない。また、アレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬、特に喘息の治療薬として所望される作用点に応じて、適宜投与するタイミングが検討され得る。

20

【００３５】

（工程２）試験化合物を投与した哺乳動物と、試験化合物を投与していない哺乳動物との、そのＴｈ２細胞様の機能を測定し、その結果を比較する工程。

本工程において「Ｔｈ２細胞様の機能」としては、上記本発明のスクリーニング方法の態様１で述べたものと同様なものが挙げられる。具体的にはリガンド刺激依存性のＴｈ２サイトカイン・ケモカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１３、ＴＡＲＣ／ＣＣＬ１７、ＭＤＣ／ＣＣＬ２２等）を産生する能力の測定、リガンド刺激依存性の気道抵抗の上昇の有無の測定、これに付随して肺胞洗浄液中に含まれる免疫担当細胞（特に好酸球）の数の測定等が挙げられる。リガンド刺激依存性のＴｈ２サイトカイン・ケモカインを産生する能力の測定は、上記本発明のスクリーニング方法の態様１で述べたものと同様な方法によって実施される。リガンド刺激依存性の気道抵抗の上昇の有無は、卵白アルブミン（ＯＶＡ）誘導性の気道炎症モデル（喘息モデル）を用いて測定することができる。ＯＶＡを用いた気道炎症モデルは、ＯＶＡ－ａｌｕｍで免疫後、ＯＶＡを吸入させて気道炎症を起こすものである。本発明では、このモデルを用いてＩＬ－１７ＲＢ陽性ＮＫＴ細胞のＴｈ２細胞様機能を測定することを目的とするのでＩＬ－１７ＲＢ陽性ＮＫＴ細胞のＴｈ２細胞様機能の誘導にはＩＬ－１７ＲＢのリガンドを用いる。該誘導により気管支周囲や血管周囲に好酸球性の浸潤が認められる。メタコリン等により気道収縮を起こしたときに非常に強く反応し、気道抵抗が上昇する。ＩＬ－１７ＲＢ陽性ＮＫＴ細胞のＴｈ２細胞様の機能はこの気道抵抗の上昇の程度に基づいて測定される。試験化合物がこの気道抵抗の上昇を抑制するか否かを測定することによって、試験化合物のアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬としての有用性を確認することができる。肺胞洗浄液中に含まれる免疫担当細胞（特に好酸球）の数の測定は、通常臨床試験の分野で実施されている方法を用いて行なうことができる。例えば好酸球はギムザ染色法により鑑別可能であり、肺胞洗浄液中の好酸球の数を測定し得る。あるいは好酸球特異的表面分子であるＣＣＲ３に注目し、ＣＣＲ３陽性の細胞を数えることで測定しうる。試験化合物が、例えば肺胞洗浄液中の

30

40

50

好酸球数の増加を抑制するか否かを測定することによって、試験化合物のアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬としての有用性を確認することができる。

【 0 0 3 6 】

(工程3) 有意にTh2細胞様の機能を抑制した試験化合物をアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬として選抜する工程。

本工程は、上記本発明のスクリーニング方法の態様1の工程3と同様にして実施することができる。

【 0 0 3 7 】

本発明のスクリーニング方法では、好ましくは、陽性の対照化合物を用いることができる。陽性の対照化合物とは、IL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能、すなわちリガンドでの刺激によりTh2サイトカインやケモカインを産生する能力を抑制することがあらかじめわかっている化合物である。具体的には、IL-17RBに対するアンタゴニスティック抗体並びに低分子阻害剤、IL-17E/IL-25に対する抗体あるいはIL-17RBの可溶性分子等が挙げられる。

IL-17RBに対するアンタゴニスティック抗体は、ターゲット抗原であるIL-17RBに対してアンタゴニスティックに作用し、また、IL-17RBとそのリガンドとの結合を阻害することによって、IL-17E/IL-25に対する抗体は、IL-17RBとそのリガンドとの結合を阻害することによって、IL-17RB陽性NK細胞の機能を阻害あるいは除去する。IL-17RBに対する低分子阻害剤としては、IL-17RBとそのリガンドとの相互作用を調節してIL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能を阻害あるいは除去できる低分子物質やIL-17RBとそのリガンドに関わる細胞内シグナル経路を調節してIL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能を阻害あるいは除去できる低分子物質が挙げられる。さらにはIL-17RBの可溶性分子(すなわち、細胞外領域に相当する分子)は、競合的にリガンドと結合することによって、IL-17RB陽性NK細胞の機能を阻害あるいは除去する。陽性の対照化合物の使用濃度は、IL-17RB陽性NK細胞の機能を阻害あるいは除去する作用が確認される濃度であれば特に限定されず、用いる化合物の種類によっても異なるが、例えばIL-17RBに対するアンタゴニスティック抗体を用いる場合であれば、通常体重1kgあたり1~100mg、好ましくは1~10mg程度である。

IL-17RBに対するアンタゴニスティック抗体並びに低分子阻害剤、IL-17E/IL-25に対する抗体及びIL-17RBの可溶性分子としては、それぞれ、後述のアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬に含められる、IL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質と同様なものが用いられる。

【 0 0 3 8 】

本発明は、また、IL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能を阻害又は除去する物質を有効成分として含有するアレルギー性気道炎症及び／又は気道過敏症の治療薬を提供する。IL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能を阻害又は除去する物質としては、例えばIL-17RBに対するアンタゴニスティック抗体並びに低分子阻害剤、IL-17E/IL-25に対する抗体及びIL-17RBの可溶性分子等が挙げられる。さらにNK細胞においてIL-17RBが発現するのを阻害する様な物質、例えばアンチセンス核酸(例、DNA、RNA、又は修飾ヌクレオチド、あるいはそれらのキメラ分子)、リボザイム、RNAi誘導性核酸(細胞内に導入することによりRNAi効果を誘導し得るポリヌクレオチド、好ましくはRNA:例、siRNA)、アプタマー、並びにこれらをコードする核酸を含む発現ベクターが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

IL-17RBに対するアンタゴニスティック抗体としては、上記したIL-17RB陽性NK細胞を検出・分離するのに用いられる抗体のうち、IL-17RBに対してアンタゴニスティックに作用する抗体が挙げられる。作用の確認はリガンド刺激によって誘導されるIL-17RB陽性NK細胞のTh2細胞様の機能に対する影響を調べることによって行なうことができる。低分子阻害剤は、IL-17RB強制発現細胞(例えばI

10

20

30

40

50

IL-17RB 強制発現 293T 細胞)を用いたり可溶化型組換え体への結合性を測定したりすることによってスクリーニングされたものを用いることができる。本発明において用いられる IL-17E/IL-25 に対する抗体についても IL-17RB に対する抗体と同様、周知の免疫学的手法により、そのポリクローナル抗体、モノクローナル抗体として調製することができる。又、抗体のフラグメント(例、Fab、F(ab')₂)、組換え抗体(例、単鎖抗体)であってもよい。IL-17RB 陽性 NK T 細胞の Th2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質として IL-17RB 可溶化型分子を用いることができる。IL-17RB 可溶化型分子とは、IL-17RB の細胞外領域を含む部分アミノ酸配列を含むタンパク質分子であり、具体的には配列番号 2 中 1 位~282 位のアミノ酸配列を有する。

10

【0040】

活性成分である IL-17RB 陽性 NK T 細胞の Th2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質が、核酸分子又はタンパク質分子である場合、本発明の治療薬は、核酸分子又はタンパク質分子をコードする核酸分子を含む発現ベクターを有効成分とすることもできる。当該発現ベクターは、上記の核酸分子をコードするオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドが、投与対象である哺乳動物の細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されていなければならない。本発明の発現ベクターが含み得るプロモーターは、その制御下にある因子の発現を可能とする限り特に限定されず、因子の種類により適宜選択され得るが、例えば、polII プロモーター(例、tRNA プロモーター、U6 プロモーター、H1 プロモーター)、哺乳動物用プロモーター(例、CMV プロモーター、CAG プロモーター、SV40 プロモーター)が挙げられる。また、使用されるプロモーターとしては、リンパ球に特異的なプロモーター(例、Ick プロモーター、Pmed1 プロモーター)を用いてもよい。

20

【0041】

発現ベクターは、好ましくは核酸分子をコードするオリゴ(ポリ)ヌクレオチドの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含む。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子(テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等)をさらに含むこともできる。

30

【0042】

発現ベクターとして使用される基本骨格のベクターは、プラスミド又はウイルスベクターであり得るが、ヒト等の哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。

【0043】

本発明の治療薬は、IL-17RB 陽性 NK T 細胞の Th2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質に加え、任意の担体、例えば医薬上許容され得る担体を含むことができる。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニト、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム-グリコール-スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシリン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコー

40

50

ル、白灯油等のベースワックス等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【 0 0 4 4 】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水のような希釈液に有効量の物質を溶解させた液剤、有効量の物質を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤又は錠剤、適当な分散媒中に有効量の物質を懸濁させた懸濁液剤、有効量の物質を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤、あるいは散剤、顆粒剤等である。

【 0 0 4 5 】

非経口的な投与（例、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入等）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容され得る担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。

10

【 0 0 4 6 】

本発明の治療薬の活性成分である I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の T h 2 細胞様の機能を阻害又は除去し得る物質の投与方法および投与剤型は特に制限されないが、静脈、動脈内投与、筋内投与、経口投与、座剤投与等であり、薬学的に許容可能な賦形剤や希釈剤と組み合わせ経口用または非経口用に処方することができる。投与は 1 日あたり 1 回かまたは数回に分けて行い、投与量は患者の重篤度、年齢、性別、体重等の条件に応じて決定され、副作用を併発しない範囲である。

20

【実施例】

【 0 0 4 7 】

以下、実施例にそって本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は本発明の範囲を何ら限定するものではない。また、本発明において使用する試薬や装置、材料は特に言及されない限り、商業的に入手可能である。

【 0 0 4 8 】

実施例 1 : I L - 1 7 R B の同定

理研 R C A I より報告された各種免疫担当細胞の D N A マイクロアレイの結果 (B i o i n f o r m a t i c s , i n p r e s s , 2 0 0 7 年) をリファレンスデータベースとして、N K T 細胞に優位に発現する遺伝子の抽出を行った。その結果、I L - 1 7 R B (N M _ 0 1 9 5 8 3 , 1 4 2 0 7 8 9 _ a t) が N K T 細胞において他の免疫担当細胞よりも遺伝子発現レベルが高いことが明らかとなった。I L - 1 7 R B の推定 o p e n r e a d i n g f r a m e 構造を配列番号 1 に、推定されるアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

30

【 0 0 4 9 】

本膜分子の推定アミノ酸配列の一次構造について K y t e と D o o l i t t l e の方法 (J . E x p . M e d . , 1 5 7 巻、1 0 5 - 1 3 2 頁、1 9 8 2 年) に従い、ハイドロパシープロット解析を行なった (図 1) 。その結果、I L - 1 7 R B は N 末端にシグナル配列を有する I 型の細胞膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。I L - 1 7 R B は 4 9 9 アミノ酸残基からなり、ハイドロパシープロット解析結果から 1 7 アミノ酸残基のシグナル配列、2 6 5 アミノ酸残基の細胞外領域、2 3 アミノ酸残基の膜貫通領域、1 9 4 アミノ酸残基の細胞内領域を有していると予想される。さらにホモロジー検索並びにモチーフ検索の結果から細胞外領域は 4 ケ所のアスパラギン結合型糖鎖付加部位、1 0 個のシステイン残基を有することが明らかとなったが、予想される立体構造は未知であった。さらに、I L - 1 7 R B は細胞内領域に S E F I R ドメイン (3 2 9 - 4 7 6) を有することが明らかとなり、このドメインを介してアダプター分子と会合していることが予想され、この会合したアダプター分子を介してシグナルを伝達することが予想された。

40

【 0 0 5 0 】

50

実施例 2 : I L - 1 7 R B の可溶化型組換え体 (可溶化型 I L - 1 7 R B - I g) の作製
ハイドロパシープロット解析 (図 1) の結果から、細胞外ドメインと考えられる領域と
ヒト I g G 1 の F c 領域を結合させた組換え体を作製した。なおヒト I g G 1 の F c 領域
は各種細胞表面上に存在する F c γ 受容体への結合を防ぐために 3ヶ所のアミノ酸置換を
行った。具体的には細胞外領域として I L - 1 7 R B の配列番号 1 のアミノ酸 2 8 2 位ま
でを選択した。この可溶化型組換え体をコードする DNA 配列を配列番号 3 に、アミノ酸
配列を配列番号 4 に示す。F c 領域でアミノ酸置換を行った部位は配列番号 4 に示す 3 0
2 位 (L e u → A l a) 、 3 0 3 位 (L e u → G l u) 、 4 6 9 位 (V a l → A s p) に
相当する。この遺伝子を p I R E S 2 - E G F P ベクター (C l o n t e c h 社製) に導
入し、C M V プロモーター制御下 2 9 3 T 細胞で一過性に発現させ、得られた培養上清から
F c 領域に結合性を有するプロテイン A を結合させた樹脂を用いたアフィニティクロマ
トグラフィーにより発現産物 (I L - 1 7 R B 可溶化型組換え体) を精製した (図 2) 。

【 0 0 5 1 】

実施例 3 : I L - 1 7 R B に対する特異的モノクローナル抗体の樹立

実施例 2 に記載の I L - 1 7 R B 可溶化型組換え体をラットに免疫後、ラットミエロー
マ細胞株 P 3 U 1 と細胞融合することにより特異的モノクローナル抗体産生ハイブリド
マを得た。スクリーニングは実施例 2 に記載の組換え体を固相化し E L I S A 法により反
応性を有するクローンを選抜するとともに、I L - 1 7 R B 全長を強制的に発現させた 2
9 3 T 細胞に対する反応性をフローサイトメーターで解析することで特異的モノクロー
ナル抗体を選抜した。得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドマ (B 5 F 6 C 1 1 、
3 H 8 E 9) の培養上清と I L - 1 7 R B 全長強制発現株への反応性を確認した結果を図
3 に示す。

【 0 0 5 2 】

実施例 4 : マウス脾細胞へのモノクローナル抗体の反応性の検索

実施例 3 に記載の技術により樹立されたモノクローナル抗体を用いて I L - 1 7 R B の
発現の局在を確認した。該モノクローナル抗体をビオチン化した後 B a l b / c マウス脾
臓由来白血球に作用させ、フィコエリスリン結合アビジンを反応させることにより I L -
1 7 R B の発現細胞を確認した。未刺激の細胞では α - G a l C e r / C D 1 d d i m e r 陽性のインバリアント N K T 細胞の一部が反応性を有することが確認された (図 4)
。一方、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、N K 細胞等の免疫担当細胞においては I L - 1 7 R
B の発現は確認できなかった (図 4) 。さらに種々の系統マウスにおけるインバリアント
N K T 細胞の I L - 1 7 R B の発現について確認したところ、T h 2 優位マウスとして知
られる B a l b / c や D B A / 2 c r においては発現が見られるものの、T h 1 優位マウ
スとして知られる C 5 7 B L / 6 や C 3 H / H e N においては、ほとんど発現が見られな
かった (図 5) 。次に B a l b / c マウスにおける I L - 1 7 R B 陽性の N K T 細胞の種
々の臓器における存在様式を確認した。各臓器から細胞懸濁液を調製し、実施例 3 で得
られたモノクローナル抗体を用いて α - G a l C e r / C D 1 d d i m e r 陽性の N K T
細胞のうち、I L - 1 7 R B 陽性の N K T 細胞を検出した。その結果、確認した臓器のう
ち肺において非常に多く存在し、また、脾臓、胸腺には存在するが、肝臓においては存在
しないことが明らかとなった (図 6) 。

【 0 0 5 3 】

実施例 5 : I L - 1 7 R B 陽性 N K T 細胞の表面抗原解析

N K T 細胞は C D 4 をマーカーとして、機能的に異なる 2 つのサブセット (C D 4 陽性
と D N) に分けられるとの報告 (J . E x p . M e d . 、 2 0 2 巻、 1 2 7 9 - 1 2 8 8
頁、 2 0 0 5 年) に基づいて、I L - 1 7 R B の N K T 細胞における表面抗原の発現様式
を実施例 3 に記載のモノクローナル抗体、及び各表面抗原の抗体を用いて F A C S 解析
により調べた。その結果、I L - 1 7 R B は主に C D 4 陽性の N K T 細胞に発現し、その
C D 4 陽性の N K T 細胞のうち約 1 / 3 が I L - 1 7 R B 陽性であることが明らかとなった
(図 7) 。すなわち N K T 細胞は (A) C D 4 陰性 I L - 1 7 R B 陰性 (D N) 、 (B)
C D 4 陽性 I L - 1 7 R B 陰性、 (C) C D 4 陽性 I L - 1 7 R B 陽性の 3 つのサブセッ

トに分けられることが示された。次に (A)、(B)、(C) 3つのサブセットについて、発現する表面抗原の解析を行った (図8)。その結果、(C)においては(A)、(B)に比してCD69、CD122の発現が低いこと、キラーレセプターNKG2D陰性であること、CD62L陰性であること等の知見が得られた。

CD4発現にはパシフィックブルー標識抗マウスCD4抗体(RM4-5、BD Biosciences社製)を用いた。CD69発現にはフィコエリスリン標識抗マウスCD69抗体(H1.2F3、BD Biosciences社製)を用いた。CD122発現にはフィコエリスリン標識抗マウスCD122抗体(TM-β1、BD Biosciences社製)を用いた。NKG2D発現にはフィコエリスリン標識抗マウスNKG2D抗体(C7、eBioscience社製)を用いた。CD62Lの発現にはフィコエリスリン標識抗マウスCD62L抗体(BVD6-24G2、eBioscience社製)を用いた。

10

【0054】

実施例6：IL-17RB陽性NK細胞の遺伝子発現解析

実施例5で同定されたNK細胞の3つのサブセットについて、mRNAを調製し、定量PCR法による相対的遺伝子発現レベルを確認した (図9)。mRNAの調製や定量PCRについては、通常、当分野で行われている方法を用いて実施した。具体的には、Platinum SYBR Green定量PCR (Invitrogen社製)を用い、プライマーは表1に記す組み合わせを用いた。その結果、(C)においては、Th1細胞を規定する遺伝子群の発現は(A)、(B)に比べて相対的に低いこと、Th2細胞を規定する遺伝子群の発現は(A)、(B)に比べて同程度若しくは相対的に高いことが明らかとなった。また細胞障害活性に関わる遺伝子群は(A)のみで発現が見られることが明らかとなった。さらに、ケモカインレセプターCCR4の発現が(C)において、(A)、(B)に比して高いことが明らかとなった。実施例5及び実施例6の結果を併せて考えると、IL-17RB陽性NK細胞はTh2細胞と表現型が非常に良く似ていることが明らかとなった。

20

検出の対象となったTh1細胞を規定する遺伝子及びTh2細胞を規定する遺伝子、細胞障害活性に関わる遺伝子、ならびにケモカイン・ケモカインレセプター遺伝子を、その検出の為にプライマー情報とともに表1にまとめる。尚、各遺伝子の発現はHPRT遺伝子の発現で標準化した。

30

【0055】

【表 1】

		センズ	アンチセンス
Th1細胞を 規定する遺伝子	IFN- γ	配列番号5	配列番号6
	IFN- γ R	配列番号7	配列番号8
	IL-12R β 2	配列番号9	配列番号10
	IL-18R β	配列番号11	配列番号12
	STAT4	配列番号13	配列番号14
	T-bet	配列番号15	配列番号16
Th2細胞を 規定する遺伝子	IL-4	配列番号17	配列番号18
	IL-5	配列番号19	配列番号20
	IL-10	配列番号21	配列番号22
	IL-13	配列番号23	配列番号24
	STAT6	配列番号25	配列番号26
	GATA3	配列番号27	配列番号28
細胞障害活性に 関わる遺伝子	Granzyme A	配列番号29	配列番号30
	Perforin1	配列番号31	配列番号32
	Klra7	配列番号33	配列番号34
	Klrc1	配列番号35	配列番号36
	Klrd1	配列番号37	配列番号38
	Klrg1	配列番号39	配列番号40
ケモカイン・ケモカインレプター 遺伝子	CXCR6	配列番号41	配列番号42
	CCR4	配列番号43	配列番号44
	TARC/CCL17	配列番号45	配列番号46
	MDC/CCL22	配列番号47	配列番号48
Th17細胞を 規定する遺伝子	IL-17A	配列番号49	配列番号50
	ROR γ t	配列番号51	配列番号52

10

20

【0056】

実施例7：IL-17RB陽性NK T細胞の*in vitro*での機能評価(1)

IL-17RBに対するリガンドとしてIL-17E/IL-25が知られている(J. Biol. Chem.、276巻、1660-1664頁、2001年)。そこで、実施例5に記した(A)、(B)、(C)3つのサブセットについて、IL-17E/IL-25に対する反応性を確認した。その結果、(C)のみでIL-17E/IL-25依存的な細胞増殖活性が見られた(図10)。細胞増殖は³Hの取込によって測定した。さらに、IL-17E/IL-25依存的な反応は(C)から大量のIL-13、IL-4、TARC/CCL17、MDC/CCL22といったTh2サイトカイン・ケモカインの産生をもたらすことが明らかとなった(図11)。IFN- γ 、IL-5、IL-2、IL-10、IL-4及びIL-13については、各サイトカイン・ケモカインの抗体を用いたELISA法で、TARC/CCL17及びMDC/CCL22については、各ケモカイン遺伝子に対するプライマーを用いた定量PCR法により測定した。各プライマーの組み合わせを上記表1に示す。尚定量PCR法ではHPR T遺伝子の発現で標準化した。この結果はIL-17RB陽性NK T細胞がIL-17E/IL-25依存的に増殖し、Th2サイトカイン・ケモカインの産生能を有することを示すものである。

30

40

【0057】

実施例8：IL-17RB陽性NK T細胞の*in vivo*での機能評価

実施例7に記載するようにIL-17RB陽性NK T細胞が、アレルギー性気道炎症や気道過敏症の発症に重要となるサイトカイン、特にIL-13を産生することから、喘息モデルにおける該細胞の役割を明らかとした。Balb/cマウスあるいは本発明者らによって樹立されたNK T細胞欠損マウス(J α 18欠損マウス(Balb/cバックグラウンド)(Science、278巻、1623-1626頁、1997年)をOVA/Alumを皮下免疫後IL-17E/IL-25あるいはPBS(コントロール)を静注

50

し、再度OVAを経鼻投与して、メタコリン刺激で誘導した気道抵抗を測定した。その結果、B a l b / c マウスにおいてはIL - 17 E / IL - 25 依存的に気道抵抗値の上昇が見られるのに対して、NK T 細胞欠損マウスにおいてはIL - 17 E / IL - 25 投与による気道抵抗値の上昇が見られなかった(図12)。さらに気道抵抗値と相関するように、血中のIL - 13 濃度はIL - 17 E / IL - 25 処理したB a l b / c マウスでは上昇が見られるものの、NK T 細胞欠損マウスではほとんど上昇が見られなかった(図13)。

【0058】

実施例9：IL - 17 R B 発現細胞の解析

実施例3に記載の技術により樹立されたマウスIL - 17 R B 特異的モノクローナル抗体を用いて、脾臓細胞と肺の単核球におけるIL - 17 R B の発現様式について、詳細に解析を行なった。これまでIL - 17 R B は腸管膜リンパ節(M L N)のc - k i t 陽性非B 非T 細胞(c - k i t + N B N T 細胞)に発現が見られるという報告(Fallon, P.G., S.J. Ballantyne, N.E. Mangan, J.L. Barlow, A. Dasvarma, D.R. Hewett, A. McIlgo rm, H.E. Jolin, and A.N. McKenzie 2006. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of h elminth expulsion. J. Exp. Med. 203:1105-1116)があることから、本細胞について、本発明の抗体を用いてその染色性を確認したところ、約20%の細胞が陽性であることが確認できた(図14a)。そこで本抗体を用いて、脾臓細胞と肺の単核球の各サブセットについて発現を確認した。実施例3に記載のモノクローナル抗体、及び各サブセットに特有の各表面抗原の抗体を用いてF A C S 解析により調べた。結果、脾臓細胞(図14b)及び肺単核球(図14c)のいずれにおいてもC D 1 d 拘束性のNK T 細胞の一部でのみ発現が確認され、IL - 17 R B の発現の局在が明らかとなった。

【0059】

実施例10：IL - 17 R B 陽性NK T 細胞の遺伝子発現解析

実施例5でNK T 細胞は(A)C D 4 陰性IL - 17 R B 陰性(D N)、(B)C D 4 陽性IL - 17 R B 陰性、及び(C)C D 4 陽性IL - 17 R B 陽性の3つのサブセットに分けられることが示された。これらNK T 細胞の3つのサブセットについて、m R N A を調製し、定量P C R 法による相対的遺伝子発現レベルをさらに確認した。T 細胞の新しいサブセットとして認知されたIL - 17 産生性ヘルパーT 細胞(T h 17)は、転写因子R O R y t をマスター遺伝子としている。そこで、IL - 17 (IL - 17 A)とR O R y t のm R N A を定量P C R にて確認したところ、(A)において(B)(C)よりも有意に高いことが明らかとなった。この結果は(C)が既に報告のあるIL - 17 産生性NK T 細胞(Michel, M.L., A.C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P.B. Savage, C.H. Wong, E. Schneider, M. Dy, and M.C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. J. Exp. Med. 204:995-1001.)とは異なる細胞群であることを示しており、IL - 17 R B 陽性NK T 細胞が新しく同定された細胞集団であることを強く示唆するものである(図15)。

本実施例において定量P C R は、実施例6と同様の手順で行った。検出の対象となったT h 17 細胞を規定する遺伝子のプライマー情報を表1に示した。

【0060】

実施例11：IL - 17 R B 陽性NK T 細胞のin vitroでの機能評価(2)

実施例10に記した(A)、(B)、(C)3つのサブセットについて、IL - 17 E / IL - 25 に対する反応性を確認した。その結果、IL - 17 E / IL - 25 依存的に(C)IL - 17 R B 陽性NK T 細胞から大量のe o s i n o p h i l c h e m o t a c t i c f a c t o r - L (E C F - L)を産生することを示された(図16、上段)。この結果は、IL - 5 産生性の好酸球を局所に呼び寄せる機能を有することを示しており、活性化したIL - 17 R B 陽性NK T 細胞がIL - 17 E / IL - 25 依存的に間接的な好酸球増加症(e o s i n o p h i l i a)を誘導することが示唆された。またIL

- 17Aの発現はIL-25刺激前後でほとんど変わらないことも明らかとなった(図16、下段)。

【0061】

実施例12: IL-17E/IL-25依存的な気道過敏症発症におけるIL-17RB陽性NK細胞の役割の解明

マウスでの喘息モデルとして卵白アルブミン(OVA)を用いた気道炎症モデルがある。これは、OVA-alumで免疫後、OVAを吸入させて気道炎症を起こすものである。通常OVA-alum(100 μ g/2mg)を腹腔内に2-3回一週間間隔で免疫後、OVA(100 μ g)を点鼻で3日間投与することにより、メタコリン誘発性気道炎症を発症させることができる。本実施例では、IL-17E/IL-25の作用を確認するために、OVA-alum(50 μ g/2mg)を腹腔内に2回一週間間隔で免疫後、OVA(50 μ g)を点鼻で1回投与する、メタコリン誘発性気道炎症の発症が見られない条件下で、Balb/cマウス(WT)とNK細胞欠損マウス(J α 18KOマウス、J α 18^{-/-})におけるIL-17E/IL-25の作用を確認した。一連のプロトコルを図17に示す。

本モデルにおいて気道圧の上昇を指標に気道炎症の発症を確認したところ、Balb/cマウスではIL-17E/IL-25依存的な気道炎症を発症したが、NK細胞欠損マウスでは発症しなかった(図18)。本条件下ではOVA吸入後の肺胞洗浄液中への細胞浸潤を確認したところ、総細胞数(Total)、マクロファージ(M ϕ)、好酸球(Eos)、好中球(Neu)、リンパ球(Lym)のいずれにおいてもIL-17E/IL-25投与群においてはNK細胞欠損マウスに比べてコントロールマウスにおいて著しい浸潤が確認された(図19)。さらに肺胞洗浄液中のサイトカイン濃度についても、IL-13およびIL-4について同様の傾向が強く認められた(図20)。これらマウスの肺組織からミクロトームにより組織切片を作製し、該切片を、ヘマトキシリン・エオシン染色あるいはパス染色により調べた。その結果、IL-17E/IL-25投与コントロールマウスにおいて好酸球・好中球の浸潤(ヘマトキシリン・エオシン染色(図21a))やムチン粘液過剰産生(パス染色(図22b))が確認できた。これらの結果は、IL-17RB陽性NK細胞がIL-17E/IL-25依存的な気道過敏症発症において中心的な役割を担っていることを示唆するものである。また、上記モデルにおいて、IL-17E/IL-25投与前に抗IL-17RB抗体でIL-17RB陽性NK細胞を除去することによってIL-17RB陽性NK細胞の役割を確認した(図22)。IL-17RB陽性NK細胞が除去されていることはFACS解析により確認した(図22a)。IL-17RB陽性NK細胞が除去されることにより、Balb/cマウスにおいてもIL-17E/IL-25依存的な気道炎症が抑制されることがわかった(図22b)。さらにIL-17E/IL-25投与前にNK細胞欠損マウスにIL-17RB陽性NK細胞を移入した系でIL-17RB陽性NK細胞の役割を確認した。IL-17E/IL-25投与前にNK細胞欠損マウスにIL-17RB陽性NK細胞を移入することにより、細胞数依存的に気道炎症の増悪がみられることも確認された(図23)。

【0062】

実施例13: RSウイルス依存的な気道過敏症発症におけるIL-17RB陽性NK細胞の役割の解明

RSウイルス(respiratory syncytial virus: RSV)は、乳児急性気道感染症(細気管支炎、肺炎など)の主な原因ウイルスである。RSウイルスは接触や飛沫を介して気道に感染し、2-5日の潜伏期の後、発熱、鼻水、咳などで発症、通常1-2週間で軽快するが、2歳以下の乳幼児ではしばしば上気道炎から下気道炎に進展して細気管支炎、肺炎を発症し、免疫不全児、低出生体重児や呼吸器・循環器に基礎疾患をもつ乳幼児は重症化しやすく、特に注意が必要である。RSV感染症に効果のあるワクチンはなく、多くの場合は症状を抑える対症療法である。RSV感染マウスの肺胞洗浄液を用いて、該洗浄液中に含まれるサイトカインについて調べた。IL-25、I

IL - 6、IL - 4 及び IL - 13 濃度を各サイトカイン・ケモカインの抗体を用いた ELISA 法で測定した。RSV 感染により肺胞液中に早期に IL - 25 が誘導された (図 24)。これは Th2 サイトカインである IL - 13 / IL - 4 や炎症性サイトカインである IL - 6 よりも早い (図 24)。また肺胞洗浄液中の NK T 細胞割合について調べたところ、RSV 感染により NK T 細胞が肺胞洗浄液中に浸潤することがわかった (図 25)。これらの結果から、RSV 依存的な気道過敏症発症における IL - 17RB 陽性 NK T 細胞の関与について解析を行なった。実施例 11 に記載の OVA - alum の気道炎症発症モデルにおいて、OVA / alum 免疫 3 日前に 3 回感染させ、OVA による惹起で発症を観察した。一連のプロトコルを図 26 に示す。その結果、NK T 細胞欠損マウスにおいては、気道圧の上昇 (図 27a)、肺胞液中への細胞浸潤 (図 27b)、好酸球・好中球の浸潤 (図 28a)、ムチン過剰産生 (図 28b)、いずれもが Ba1b / c マウスよりも増悪していることが明らかとなった。これらの結果は、RSV による気道過敏症発症において IL - 17RB 陽性 NK T 細胞がその増悪に関与していることを強く示唆するものである。

10

本出願は、日本で出願された特願 2007 - 307981 を基礎としておりその内容は本明細書に全て包含されるものである。

【配列表フリーテキスト】

【0063】

20

配列番号 3 : IL - 17RB の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc 領域の融合蛋白質。

配列番号 4 : IL - 17RB の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc 領域の融合蛋白質。

配列番号 5 : IFN - γ 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 6 : IFN - γ 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 7 : IFN - γ R 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 8 : IFN - γ R 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 9 : IL - 12R β 2 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 10 : IL - 12R β 2 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 11 : IL - 18R β 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 12 : IL - 18R β 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

30

配列番号 13 : STAT4 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 14 : STAT4 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 15 : T - bet 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 16 : T - bet 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 17 : IL - 4 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 18 : IL - 4 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 19 : IL - 5 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 20 : IL - 5 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 21 : IL - 10 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 22 : IL - 10 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

40

配列番号 23 : IL - 13 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 24 : IL - 13 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 25 : STAT6 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 26 : STAT6 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 27 : GATA3 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 28 : GATA3 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 29 : Granzyme A 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 30 : Granzyme A 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

配列番号 31 : Perforin1 検出用 PCR プライマー (センス)

配列番号 32 : Perforin1 検出用 PCR プライマー (アンチセンス)

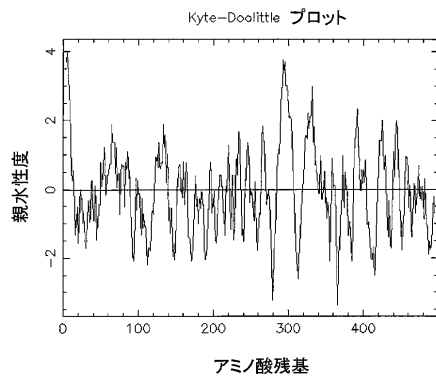
50

配列番号 33 : K l r a 7 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 34 : K l r a 7 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 35 : K l r c 1 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 36 : K l r c 1 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 37 : K l r d 1 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 38 : K l r d 1 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 39 : K l r g 1 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 40 : K l r g 1 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 41 : C X C R 6 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 42 : C X C R 6 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 43 : C C R 4 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 44 : C C R 4 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 45 : T A R C / C C L 1 7 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 46 : T A R C / C C L 1 7 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 47 : M D C / C C L 2 2 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 48 : M D C / C C L 2 2 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 49 : I L - 1 7 A 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 50 : I L - 1 7 A 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)
 配列番号 51 : R O R y t 検出用 P C R プライマー (センス)
 配列番号 52 : R O R y t 検出用 P C R プライマー (アンチセンス)

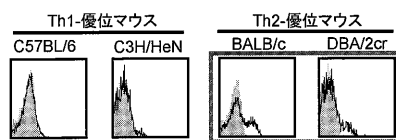
10

20

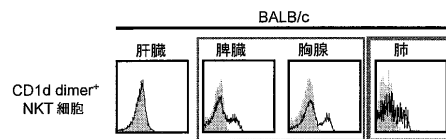
【図 1】



【図 5】

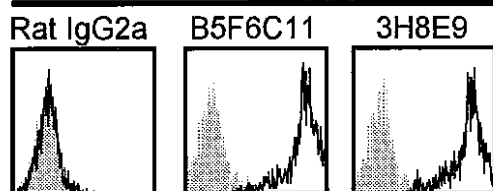


【図 6】

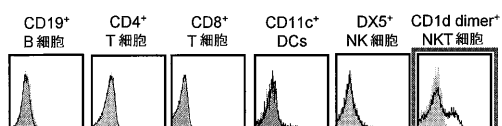


【図 3】

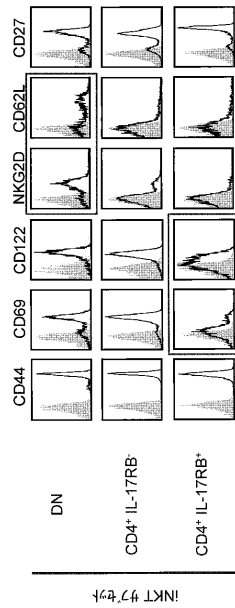
IL-17RB トランスフェクトされた HEK293T



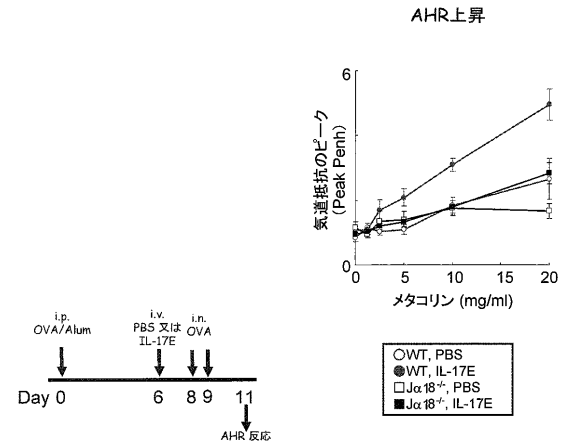
【図 4】



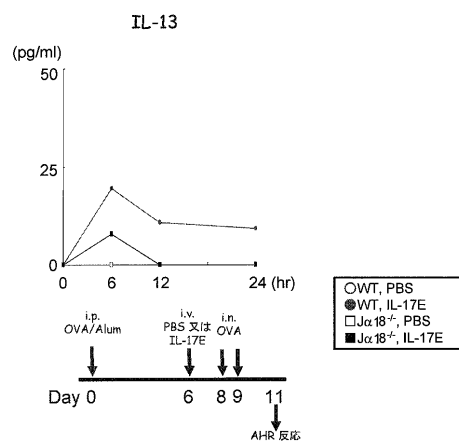
【図 8】



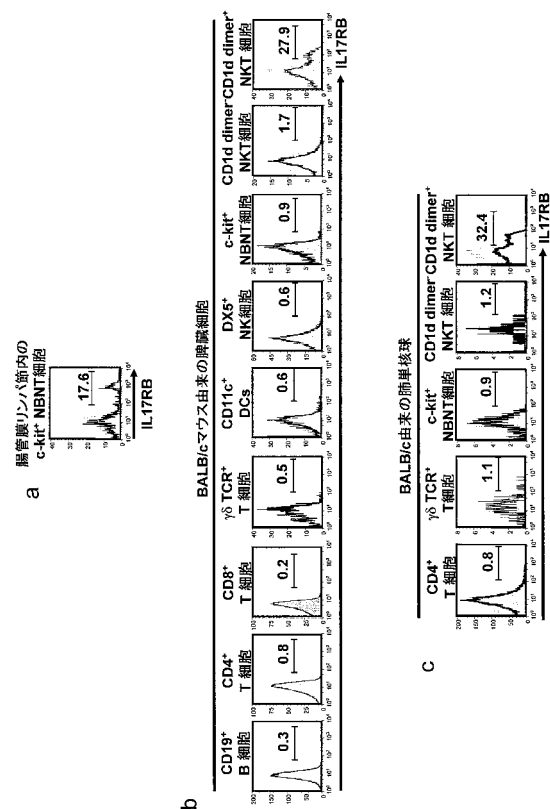
【図 1 2】



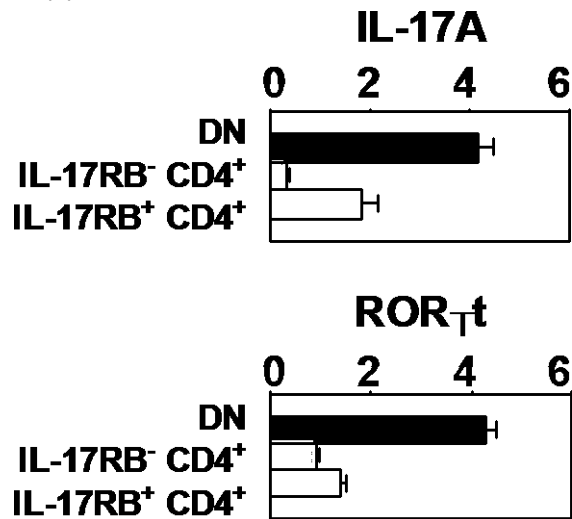
【図 1 3】



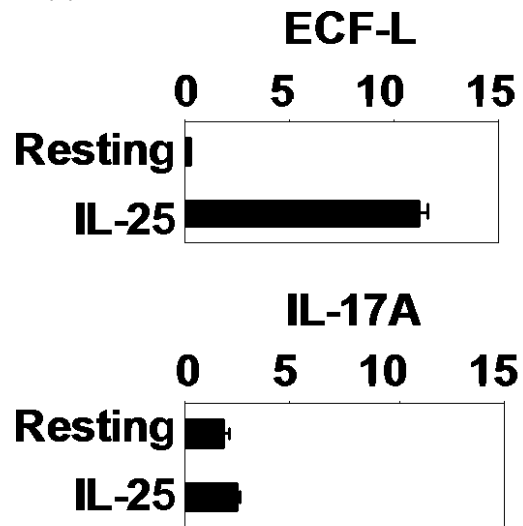
【図 1 4】



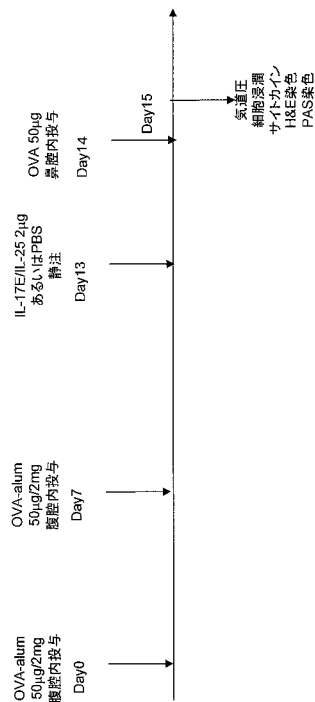
【図 15】



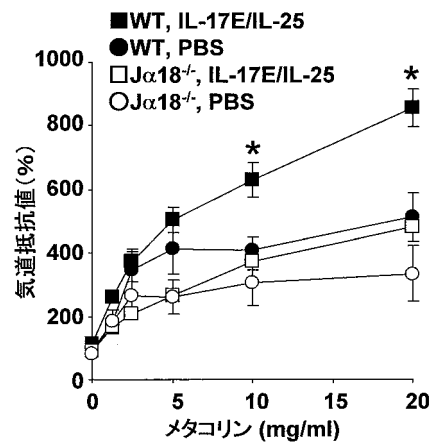
【図 16】



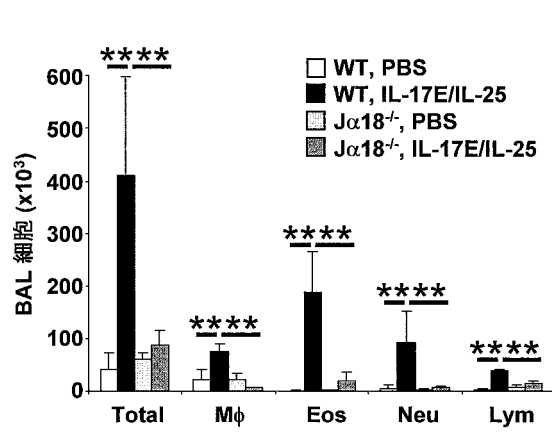
【図 17】



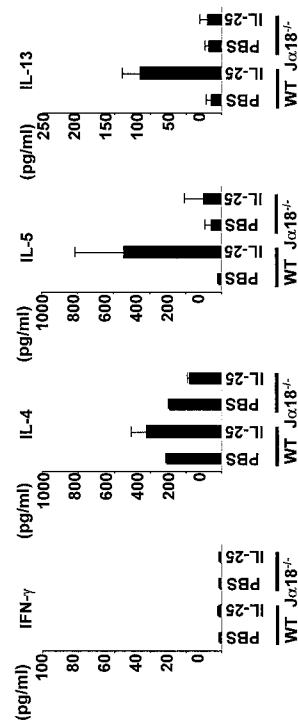
【図 18】



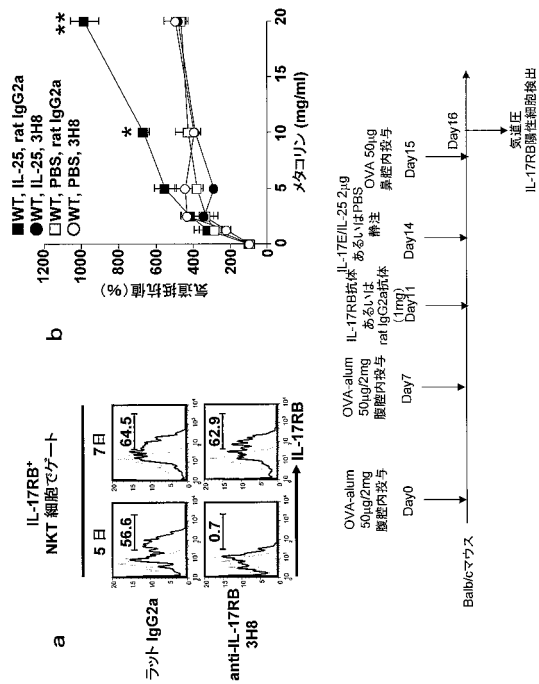
【図 19】



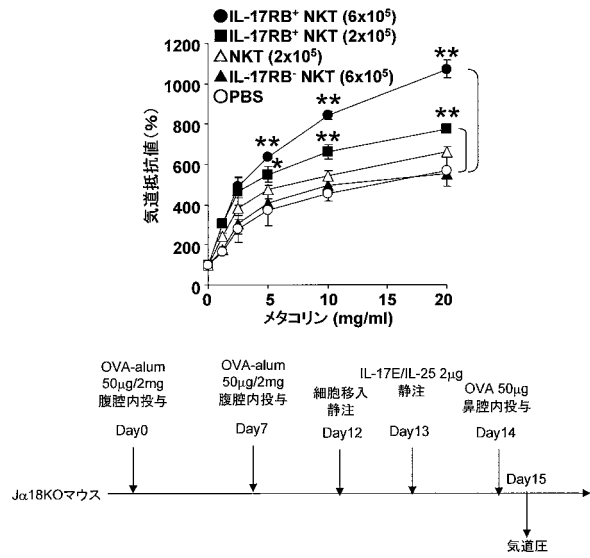
【図 20】



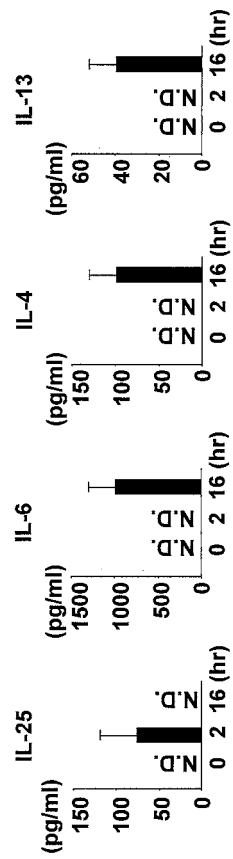
【図 22】



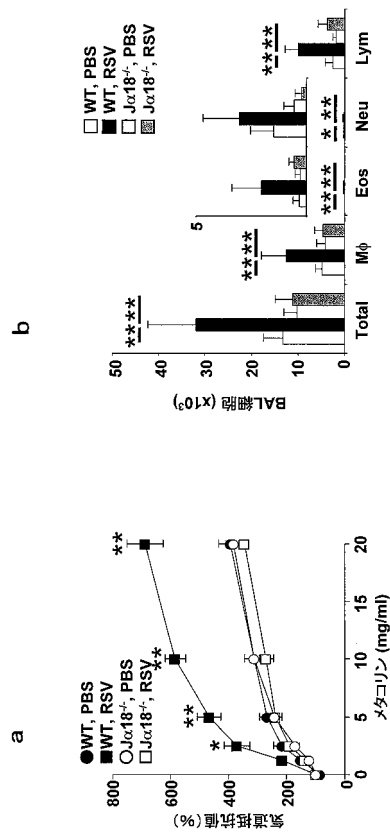
【図 23】



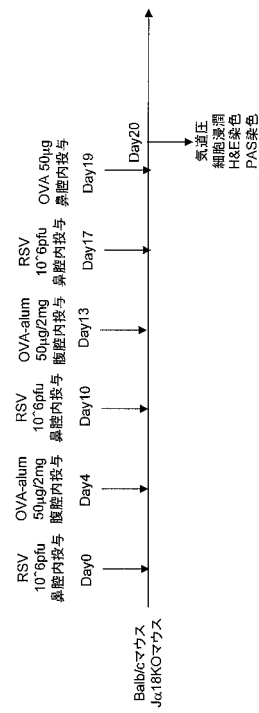
【図 2 4】



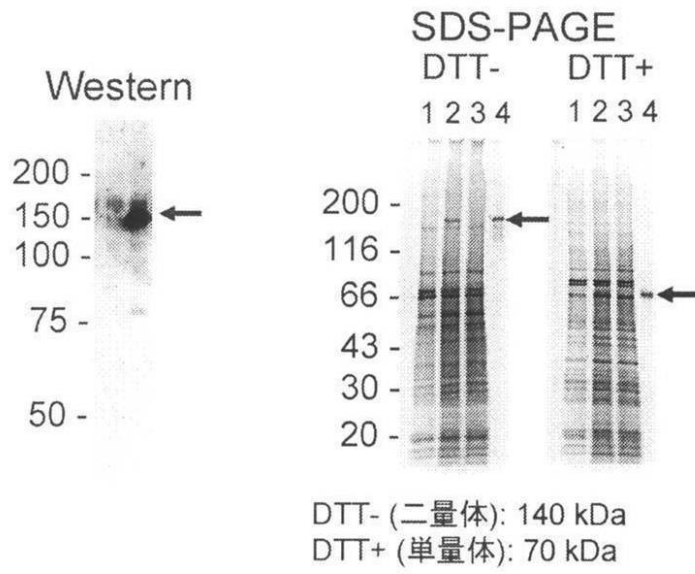
【図 2 7】



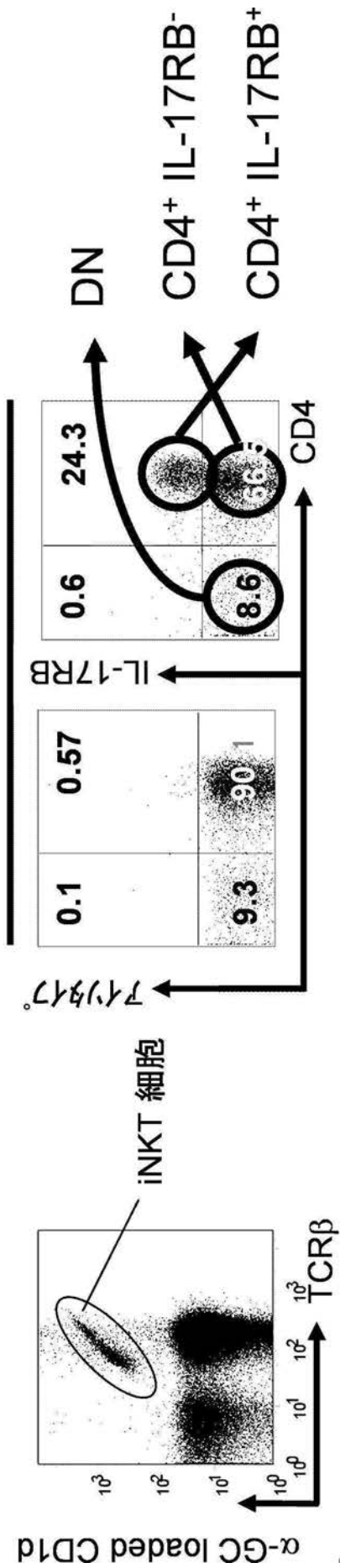
【図 2 6】



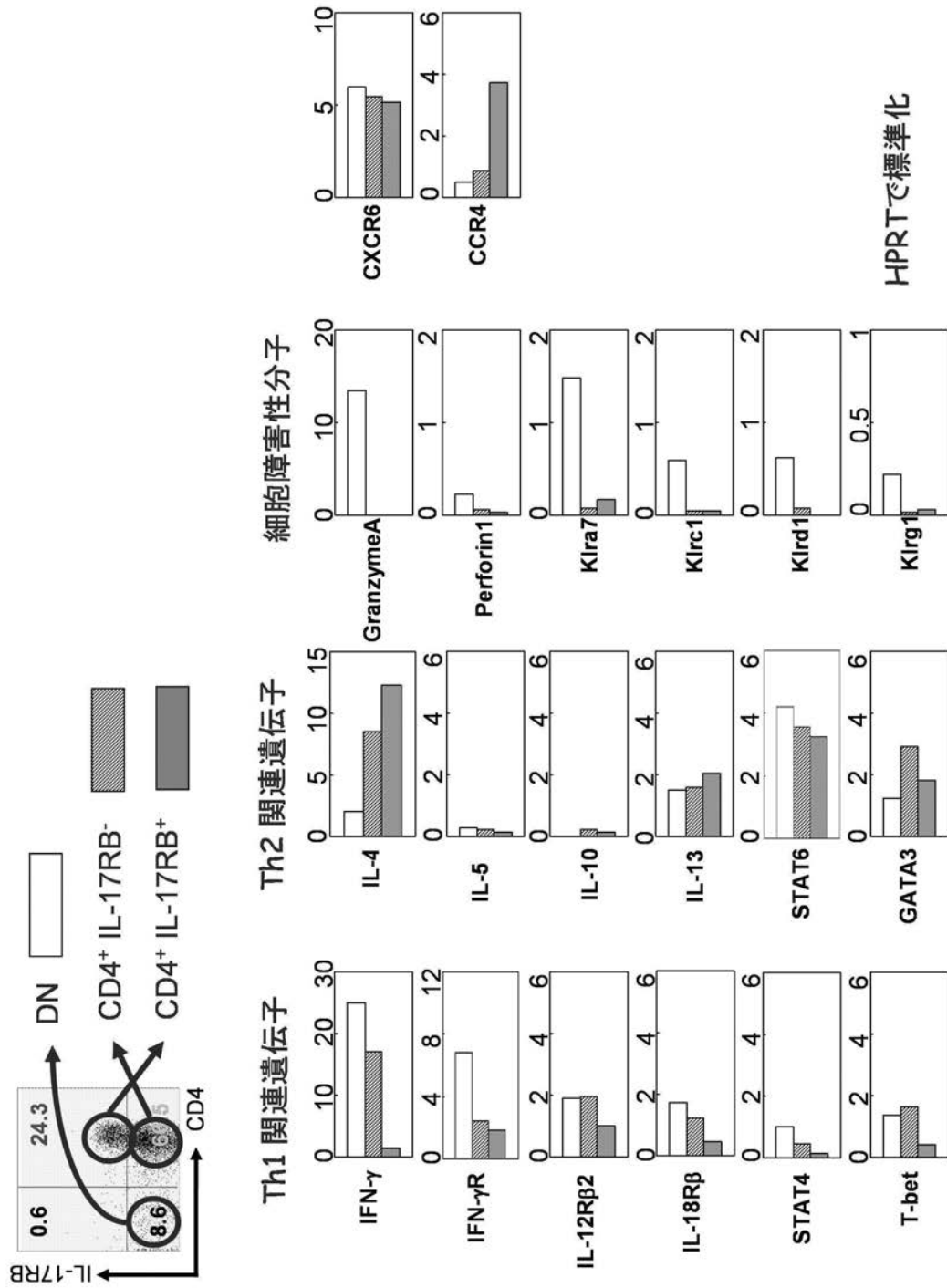
【図 2】



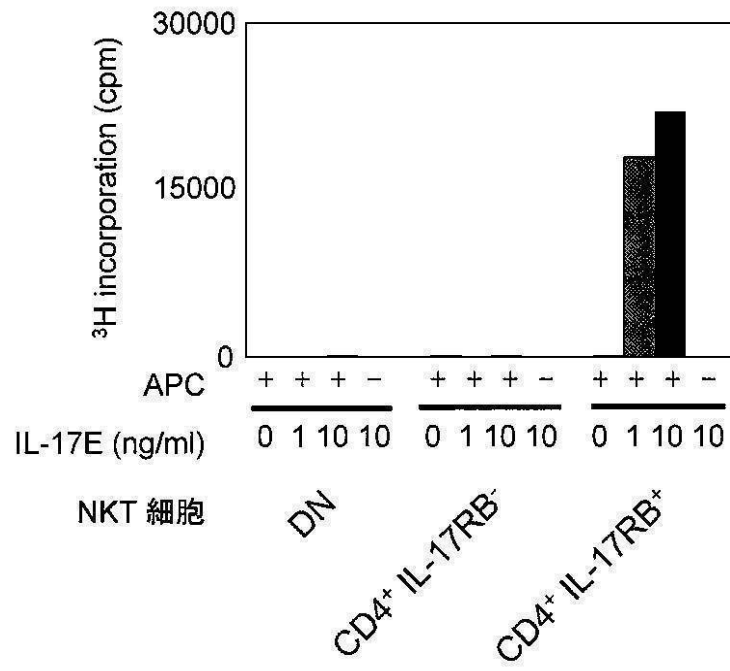
【図7】



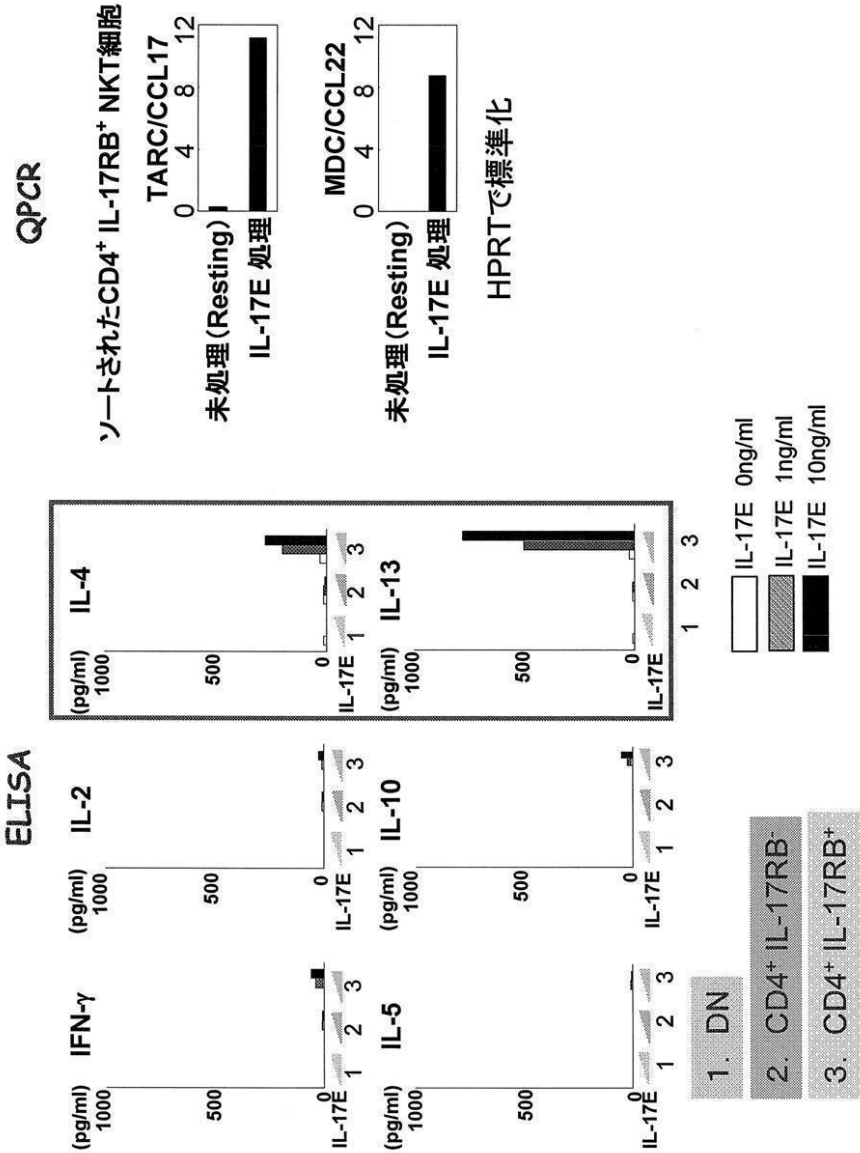
【図9】



【図 10】

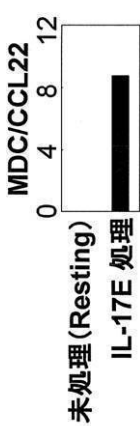
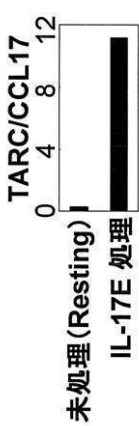


【図 1 1】



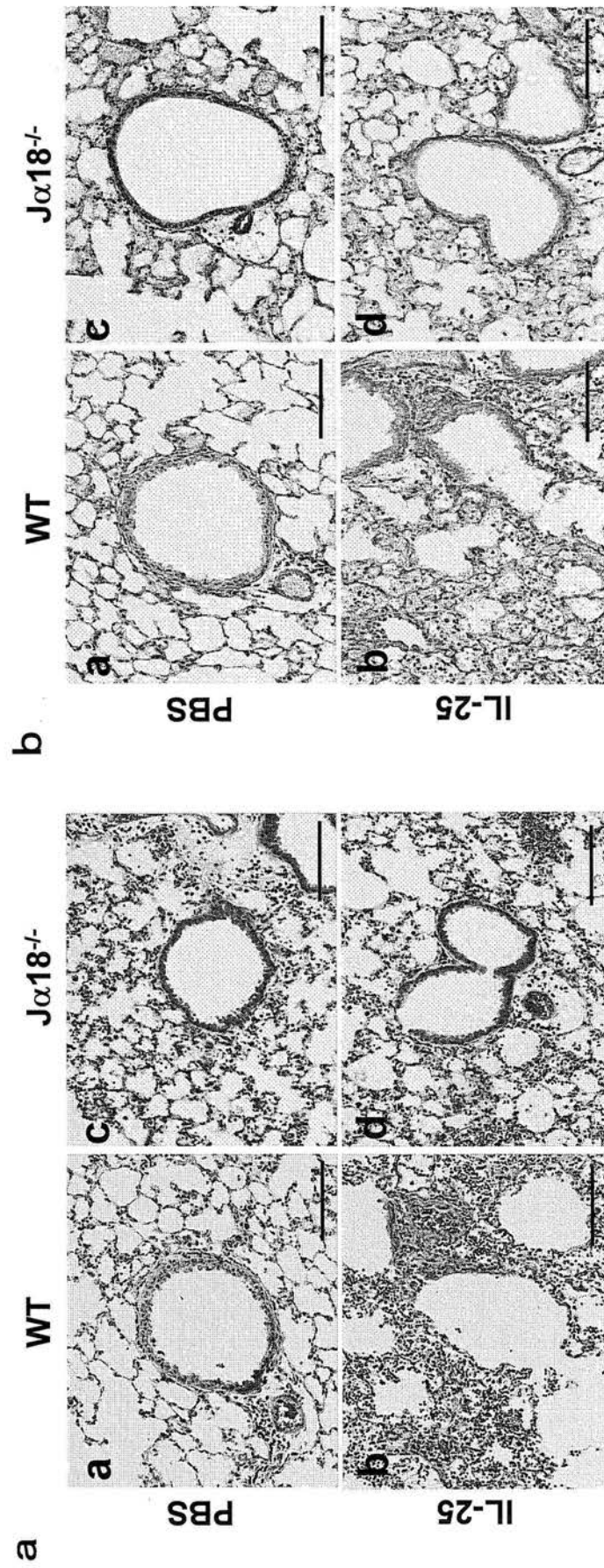
QPCR

ソートされたCD4⁺ IL-17RB⁺ NKT細胞

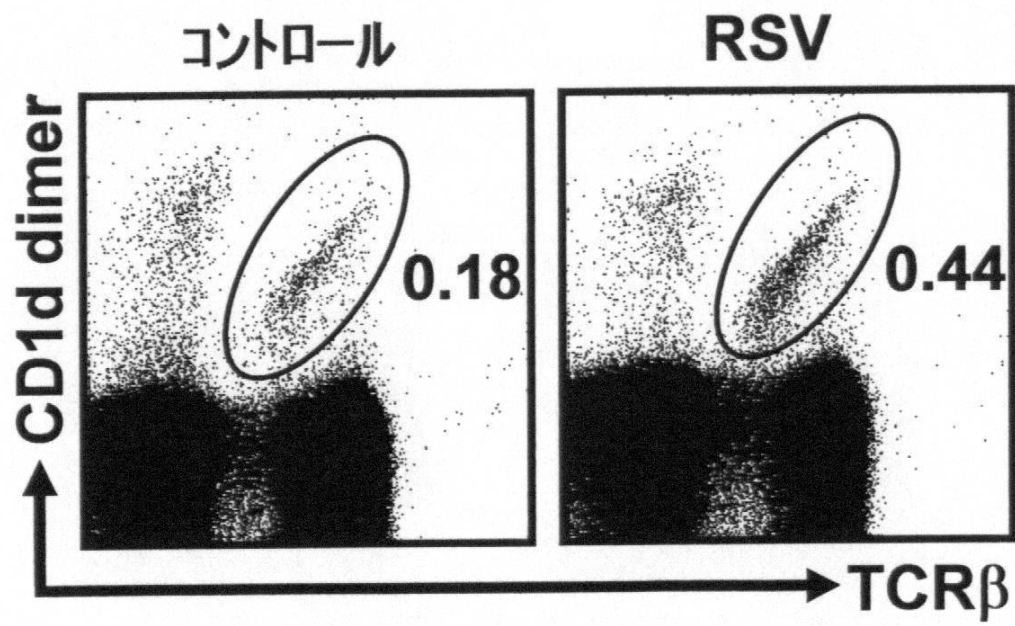


HPRTで標準化

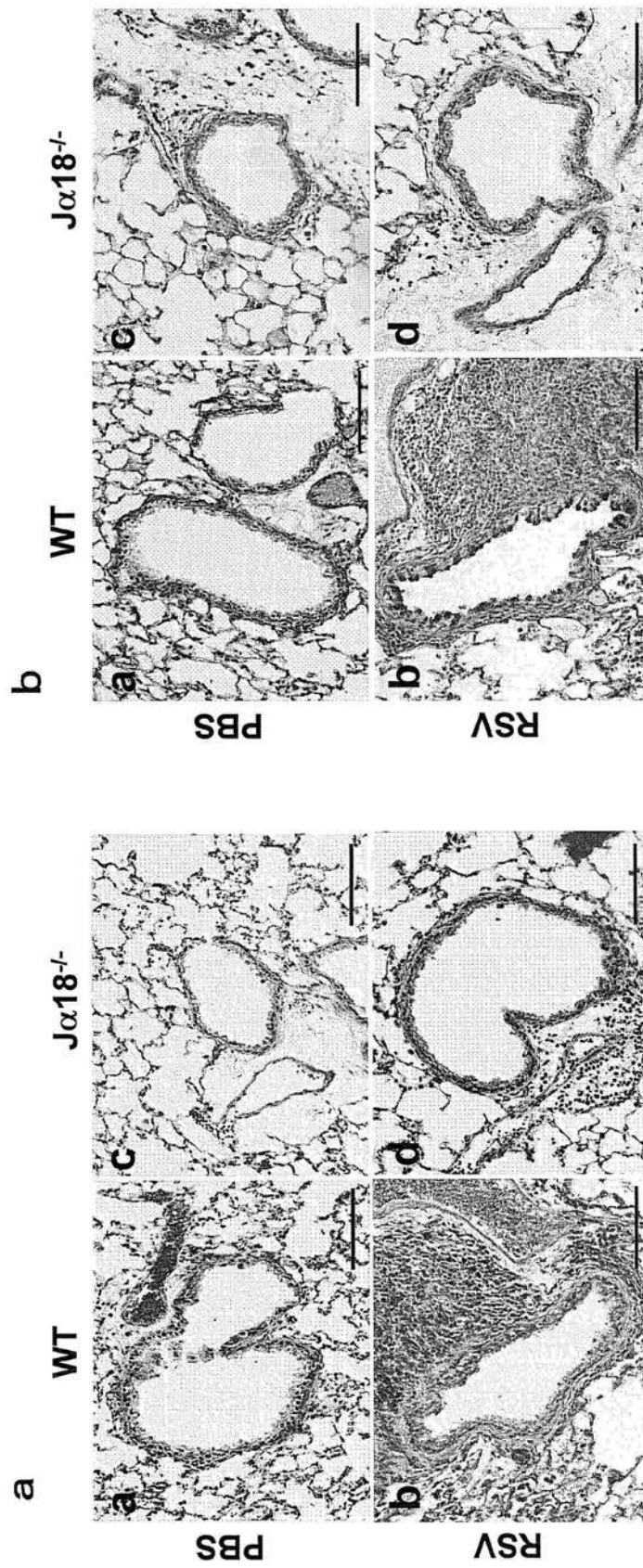
【 図 2 1 】



【図 25】



【図 28】



【配列表】

0005561689000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 渡会 浩志

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72)発明者 谷口 克

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2003-527117(JP,A)

国際公開第2006/026807(WO,A1)

Immunology, 2007年10月, vol.123, no.1, pp.45-56

J. Exp. Med., 2007年 8月, vol.204, no.8, pp.1837-1847

J. Allergy Clin. Immunol., 2007年 9月, vol.120, no.6, pp.1324-1331

J. Allergy Clin. Immunol., 2006年, vol.118, no.3, pp.606-614

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 16/00 - 16/46

C07K 14/705 - 14/74

C12Q 1/02

G01N 33/53

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 /

W P I D 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

专利名称(译)	使用IL-17RB阳性NKT细胞筛选过敏性气道炎症和/或气道高反应性治疗剂的方法		
公开(公告)号	JP5561689B2	公开(公告)日	2014-07-30
申请号	JP2009543695	申请日	2008-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
[标]发明人	渡会浩志 谷口克		
发明人	渡会 浩志 谷口 克		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/15 C07K16/24		
CPC分类号	A61P11/00 C07K16/2866 G01N33/505 G01N33/6869		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N33/15.Z C07K16/24		
代理人(译)	高岛肇 山本健二		
优先权	2007307981 2007-11-28 JP		
其他公开文献	JPWO2009069355A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了筛选用于过敏性气道炎症和/或气道超敏反应的治疗剂的方法，包括使用IL-17RB阳性NKT细胞，以及用于过敏性气道炎症和/或气道超敏反应的治疗剂，其包含能够作为活性成分，抑制或消除IL-17RB阳性NKT细胞的Th2细胞样功能的作用。

		センス	アンチセンス
Th1細胞を規定する遺伝子	IFN- γ	配列番号5	配列番号6
	IFN- γ R	配列番号7	配列番号8
	IL-12R β 2	配列番号9	配列番号10
	IL-18R β	配列番号11	配列番号12
	STAT4	配列番号13	配列番号14
	T-bet	配列番号15	配列番号16
Th2細胞を規定する遺伝子	IL-4	配列番号17	配列番号18
	IL-5	配列番号19	配列番号20
	IL-10	配列番号21	配列番号22
	IL-13	配列番号23	配列番号24
	STAT6	配列番号25	配列番号26
	GATA3	配列番号27	配列番号28
細胞障害活性に関わる遺伝子	GranzymeA	配列番号29	配列番号30
	Perforin1	配列番号31	配列番号32
	Klra7	配列番号33	配列番号34
	Klrc1	配列番号35	配列番号36
	Klrd1	配列番号37	配列番号38
	Klrg1	配列番号39	配列番号40
ケモカイン・ケモカインレセプター遺伝子	CXCR6	配列番号41	配列番号42
	CCR4	配列番号43	配列番号44
	TARC/CCL17	配列番号45	配列番号46
	MDC/CCL22	配列番号47	配列番号48
Th17細胞を規定する遺伝子	IL-17A	配列番号49	配列番号50
	ROR γ t	配列番号51	配列番号52