

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-526938

(P2017-526938A)

(43) 公表日 平成29年9月14日(2017.9.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A 4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/574	D
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K
	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2017-521311 (P2017-521311)	(71) 出願人	517007264
(86) (22) 出願日	平成27年7月10日 (2015.7.10)		アンセルム (アンスティチュ ナショナル
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月6日 (2017.3.6)		ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/065797		エルシュ メディカル)
(87) 国際公開番号	W02016/005548		フランス国 エフ - 7 5 0 1 3 パリ
(87) 国際公開日	平成28年1月14日 (2016.1.14)		、リュ ドゥ トルビアック、1 0 1
(31) 優先権主張番号	14306134.9	(71) 出願人	517007275
(32) 優先日	平成26年7月11日 (2014.7.11)		サントル オスピタリエール ユニヴェル
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		シテール ドゥ モンペリエ
(31) 優先権主張番号	15305011.7		フランス国 エフ - 3 4 0 0 0 モン
(32) 優先日	平成27年1月7日 (2015.1.7)		ペリエ、アブニュ ドイエン ガストン
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ジロー、1 9 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液学的癌を診断するための方法

(57) 【要約】

本発明は、血液癌を診断するための方法に関する。特に、本発明は、i) 患者から得られた試料中の CD 4 5 R A R O NK細胞の存在を検出することと、ii) 患者は、血液癌に罹患していると結論することを含む、患者における血液癌を診断するための方法であって CD 4 5 R A R O NK細胞の存在がサンプルにおいて検出されると、少なくとも一つの表現型マーカーの存在は、血液がんの性質を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) 患者から得られた試料中の CD45RA RO NK細胞の存在を検出すること；並びに ii) CD45RA RO NK細胞が試料中に検出された時、患者が血液癌に罹患していると結論することを含む、患者における血液学的癌を診断するための方法。

【請求項 2】

血液癌は、白血病、リンパ腫および骨髄腫からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

血液癌は、成熟した（周辺）B細胞新生物である、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記血液癌が、B細胞慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫； B - 細胞前リンパ球性白血病； リンパ球性リンパ腫； 脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫（+/- 絨毛リンパ球）、節性辺縁帯リンパ腫（+/- 単球様B細胞）、および粘膜関連リンパ組織の節外性辺縁帯B細胞リンパ腫（MALT）タイプなどの辺縁帯リンパ腫； 有毛細胞白血病； 形質細胞性骨髄腫/プラズマ細胞腫； 濾胞性リンパ腫、濾胞中心（follicle center）； マントル細胞リンパ腫；（縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、および原発性滲出液リンパ腫を含む）びまん性大細胞型B細胞リンパ腫； およびパーキットリンパ腫/パーキット細胞白血病からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

血液癌が多発性骨髄腫（MM）、および非ホジキンリンパ腫（NHL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、濾胞性リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症（Waldenström's macroglobulinemia: WM）またはB細胞リンパ腫、及び、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）からなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記血液癌がB細胞新生物、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、T/NK細胞新生物、未分化大細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、B - リンパ芽球性白血病/リンパ腫前駆体、Tリンパ芽球性白血病/リンパ腫前駆体、パーキットリンパ腫、成人T細胞リンパ腫/白血病（HTLV1+）、原発性CNSリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、多型移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、AIDS関連リンパ腫、真性組織球性リンパ腫（true histiocytic lymphoma）、および芽球性NK細胞リンパ腫からなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、および小リンパ球性リンパ腫（SLL）からなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

試料は、血液試料または骨髄試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

CD45RA RO NK細胞の存在を検出することからなるステップは、他の細胞からNK細胞を区別するのに適している結合パートナーのセットと、CD45RAに特異的な指向を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーと、CD45ROに特異的な指向を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーの使用を含む、請求項 1 の方法。

40

【請求項 10】

さらにCD45RA RO NK細胞上の少なくとも一つの表現型マーカーの存在を検出する工程をさらに含み、ここで該少なくとも一つの表現型マーカーの存在は、血液癌の性質を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、

50

17、18、19または20の表現型マーカー検出からなるステップを含む、請求項10の方法。

【請求項12】

表現型マーカーが、CDLA、CD1b、CDLC、CD1d、CD1e、CD2、CD3delta、CD3epsilon、CD3gamma、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8alpha、CD8beta、CD9、CD10、のCD11a、のCD11b、CD11c、CDw12、CD13、CD14、CD15u、CD16A、CD16B、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD44R、CD46、CD47R、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD60b、CD60c、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75s、CD77、CD79A、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CDw93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107aの、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CDw113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CDw119、CD120a、CD120b、CD121a、CDw121b、CD122、CD123、CD124、CDw125、CD126、CD127、CDw128a、CDw128b、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CDw136、CDw137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CDw149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CDw156c、CD157、CD158、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD162、CD162R、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CDw186、CD191、CD192、CD193、CD195、CD196、CD197、CDw198、CDw199、CDw197、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CDw210、CD212、CD213a1、CD213a2、CDw217、CDw218a、CDw218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD235ab、CD236、CD236R、CD238、CD239、CD240CE、CD240D、CD240DCE、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD252、CD253、CD254、CD256、CD257、CD258、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、C

10

20

30

40

50

D 2 8 3、C D 2 8 4、C D 2 8 9、C D 2 9 2、C D w 2 9 3、C D 2 9 4、C D 2 9 5、C D 2 9 6、C D 2 9 7、C D 2 9 8、C D 2 9 9、C D 3 0 0 a、C D 3 0 0 c、C D 3 0 0 e、C D 3 0 1、C D 3 0 2、C D 3 0 3、C D 3 0 4、C D 3 0 5、C D 3 0 6、C D 3 0 7、C D 3 0 9、C D 3 1 2、C D 3 1 4、C D 3 1 5、C D 3 1 6、C D 3 1 7、C D 3 1 8、C D 3 1 9、C D 3 2 0、C D 3 2 1、C D 3 2 2、C D 3 2 4、C D w 3 2 5、C D 3 2 6、C D w 3 2 7、C D w 3 2 8、C D w 3 2 9、C D 3 3 1、C D 3 3 2、C D 3 3 3、C D 3 3 4、C D 3 3 5、C D 3 3 6、C D 3 3 7、C D w 3 3 8、およびC D 3 3 9からなる群から選択されたC D分子である、請求項10の方法。

【請求項13】

i) 患者からの血液試料中のC D 4 5 R A R O NK細胞の存在を検出し、及びii) C D 4 5 R A R O NK細胞の存在が、血液試料中に検出されない時、患者の治療が効率的であると結論することを含む、血液癌を患う患者における治療の有効性をモニタリングするための方法。

10

【請求項14】

以下の工程を含む、それを必要とする対象における血液癌を処置するための方法：

i) 請求項1～12のいずれかに記載の方法を実行することにより、血液癌を有する被験体を同定すること

ii) 該血液癌を有する被験体を、化学療法剤、標的癌治療、免疫療法剤または放射線療法剤で治療すること。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液癌を診断するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、リンパ球系列のメンバーであり、自然免疫系に属する。彼らは天然に細胞毒性を示し、サイトカインを生成する^{1, 2}。末梢血中のヒトNK細胞の大部分は、C D 3⁻ C D 5 6^{d i m}であり、一方少数がC D 3⁻ C D 5 6^{b r i g h t}表現型を示す。後者の集団は、サイトカイン産生に寄与する一方、C D 5 6^{d i m}細胞は主に細胞傷害活性を示す³。対照的にC D 3⁻ C D 5 6^{b r i g h t}細胞はリンパ節や扁桃腺において過半数を占めている。in vitroでの証拠がC D 5 6^{b r i g h t}細胞はC D 5 6^{d i m}の前駆体であることを示しており、これはin vivoでの場合とすることができる⁴。また、C D 1 6の発現は、NK細胞の発達が、この経路：C D 5 6^{b r i g h t} C D 1 6⁻ C D 5 6^{b r i g h t} C D 1 6^{d i m} C D 5 6^{d i m} C D 1 6^{d i m} C D 5 6^{d i m} C D 1 6⁺をたどることを示唆している。さらなるマーカーは、これらの集団内に追加サブセットを識別することができる^{5, 6}。対照的に、in vivoでの活性化NK細胞の同定は厳密に調べるのがより困難である。長期持続発現は不明であるが、C D 6 9の発現は、NK細胞の刺激後に増加し、ヒトを含めた活性化の真正なマーカーと考えられている⁷。マウスでは、長期的な刺激後のC D 6 9の安定した発現が論じられている：マウスCMV感染後のC D 6 9発現が一過性である⁸のに対し、I L - 1 5処置後は安定している⁹。

30

40

【0003】

NK細胞は、M H C - I発現をダウンレギュレートして細胞毒性Tリンパ球（CTL）による認識を回避する主要組織適合性複合体I（M H C - I）の発現の変化を有する細胞（形質転換又はウイルス感染細胞を含む）を標的として、それらの標的に遭遇した後に活性化される。「自己細胞欠落自己仮説」は、M H C - I発現に基づいて、NK細胞が、他の健康からの標的細胞を区別することを提案している。NK細胞の活性化は、活性化および抑制性受容体の両方によって媒介される複雑なシグナル伝達機構に依存する。メインのNK細胞抑制性受容体は、ヒトではH L Aと呼ばれるM H C - I複合体を認識し、H L A

50

- Eを認識するNKG2A、及び自己の古典的クラスI分子HLA-A、-Bおよび-Cを認識するキラー細胞免疫グロブリン様受容体(Killer cell immunoglobulin(Ig)-like receptor: KIR)を含む。活性化NK細胞受容体は、細胞へのストレスおよび/または非自己リガンドを認識する、すなわち、ストレス誘導性リガンドUL16結合タンパク質(ULBP)とMHCクラスIポリペプチド関連配列(MIC)は、活性化レセプターNKG2Dによって認識される²。

【0004】

NK細胞は血液由来の癌細胞を認識し、排除する。しかしながら、これらの腫瘍細胞は、免疫回避のために異なるメカニズムが見出し^{10, 11}、これらの患者のかなりの数が長期生存を制限される。これらの患者を治療するためのいくつかの選択肢は、免疫療法に
10
関連させることができる新規化学物質があげられる¹²。NK細胞のKIR媒介性阻害をブロックすることができる抗KIRを使用して、最初の臨床試験は、最近公開された⁷。これは、急性骨髄性白血病(AML)の同等の患者集団での報告に比べて毒性がないと好意的に全体的なおよび無再発生存率を示している。この療法に対する興味深い代替法は、臨床グレードの生産が効率的であることが証明されたため、同種異系NK細胞を使用する¹³及び造血細胞移植は安全と思われる後K細胞媒介性治療を行う方法がある¹⁴⁻¹⁶。しかし、NK細胞は、さまざまな生理活性を維持する異なるサブセットがあり、均一な集団ではない。また、異なるパターンでのNK細胞の活性化は(例えば、サイトカインvs標的細胞)異なる転写パターン由来である¹⁷。より高い抗腫瘍活性を有する集団を同定し、増殖のために選択し、及び/又は患者への注入のためにそれらを選択することは関
20
心が高い。

【0005】

タンパク質チロシンホスファターゼ(PTP)の分化、分裂周期、細胞増殖や癌化などの細胞プロセス調節する¹⁸。CD45は、特に造血細胞で発現されるPTPRC遺伝子によってコードされるPTPである¹⁹。CD45は、受容体複合体の構成要素との直接的な相互作用によって、または様々なSrcファミリーキナーゼ(SFK)(すなわちLck)を脱リン酸化し、活性化することにより、受容体シグナル伝達を調節する²⁰。しかし、JAKキナーゼ阻害することによって²¹、またはSrcの活性化残基を脱リン酸化することによって²⁰、サイトカイン受容体のシグナル伝達を阻害することができる。CD45活性は、重症複合免疫不全(SCID)表現型で、その欠乏の結果、マウス²²⁻²⁴と人間^{25, 26}の両方で、効率的な免疫応答に重要である。これは、このホスファターゼの高発現とその複雑な制御を説明することができる。

【0006】

CD45の発現は、細胞の成熟と共に増加する²⁷。CD45ファミリーは、単一の複雑な遺伝子に由来するいくつかのメンバーを含む²⁷。ナイーブTリンパ球は、通常、長いCD45RAアイソフォームに対して陽性である。活性化記憶T細胞はCD45RO(CD45mRNA前駆体の活性化によって誘発される選択的スプライシングによって最短CD45アイソフォーム)を発現する²⁷⁻³⁰。CD45ROの発現は、メモリーNK細胞を識別することが示唆されている³¹。

【0007】

CD45の機能のほとんどの研究は、T細胞でされてきた。CD45は積極的に、SFKsの阻害部位を脱リン酸化する能力を介してこれらの細胞の活性化を調節し、サイトカインおよびケモカインの産生を誘導することが一般的に認められているが、NK細胞上のその機能についてはあまり知られていない。しかし、CD45欠損マウス由来のNK細胞はインビトロでの細胞毒性をほんのわずかであるが損なわれている³²⁻⁴。また、TおよびB細胞とは対照的に、CD45欠損NK細胞は、複数のリン酸化たんぱく質の基底レベルのリン酸化の増加を示し、これは、SFKsの活性化チロシン残基を含む、NK細胞で複数の基質を脱リン酸化することを示唆している³⁴。in vivoでの研究は、CD45欠損NK細胞は、脱顆粒を含むすべての免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)依存性NK細胞機能の機能障害によってサイトメガロウイルス感染からマウ
40
50

スを保護しないことを示している^{3 5}。上に引用した結果のほとんどは、マウスモデルにおいて得られたものであるが、人間のスケッチを反映するものではなかった。したがって、活性化の種類や強さに依存する可能性があるヒトNK細胞におけるCD45の役割は、未解決の問題である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、血液癌を診断するための方法に関する。特に、本発明は、特許請求の範囲によって定義される。

【0009】

NK細胞リンパ球系統は、抗腫瘍免疫応答において重要な役割を果たしている。完全な成熟CD56^{dim}CD16⁺集団は、この機能へ関連性の高い細胞溶解活性を示したが、その原因となる細胞についてはほとんど知られていない。リンパ球系統の主要なマーカーの一つは、休止T細胞が発現するshortCD45ROアイソフォームとエフェクター/メモリーT細胞が発現するlargeCD45RAアイソフォームの2つの主要なアイソフォームで存在するホスファターゼCD45である。ここで、本発明者らは、健康なドナーからのNK細胞は、ほとんどCD45RA^{high}RO⁻であるのに対し、それらの3%は、CD45RA^{dim}RO⁻で、これはHSC同種移植患者で10倍以上豊富で、主に未成熟な細胞に相当することを発見した。血液癌患者も彼らの完全な成熟したNK細胞区画内で発見されたこの集団の5倍の増加を示している。しかし、これらの細胞は、高い脱顆粒活性を示さない。これらの患者からのいくつかのNK細胞は、CD45ROの発現が生じ、CD56^{dim}CD16^{dim}に属する、少数のCD45RA^{high}RO⁻細胞と、およびCD45RA発現を失っていない細胞の大部分：CD45RARO細胞を生成する。この集団は、完全な成熟区画に属し、抗腫瘍NK細胞を表す。これは、CD45RARO細胞が：i)すぐ、脱顆粒していること、ii)高サイズ(FS)および粒度(SS)を示すこと、iii)高代謝(CD71⁺)を示すこと、およびiv)増殖している(Ki-67⁺)に基づく。これらの細胞は抗腫瘍機能を実行することが決定的な証拠は、それらがヒト白血病患者においてインビボでトロゴサイトーシス(trogocytosis)を実行したという事実によって導きだされる。血液または骨髄中CD45RARONK細胞の存在は、血液由来癌患者を識別し、診断ツールとして使用することができる。

【0010】

従って、本発明は、i)患者から得られた試料中のCD45RARONK細胞の存在を検出すること；並びにii)CD45RARONK細胞試料中に検出された時、患者が血液癌に罹患していると結論することを含む、患者における血液学的癌を診断するための方法である。

【0011】

本明細書で使用する用語「血液癌」または「血液由来癌」は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、通常は血液細胞または骨髄細胞から発生する癌を意味する。

【0012】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、白血病、リンパ腫および骨髄腫からなる群から選択される血液癌を診断するのに特に適している。

【0013】

いくつかの実施形態では、リンパ腫などの血液学的癌は成熟(末梢)B細胞新生物である。特定の実施形態では、成熟B細胞新生物は、B細胞慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫B細胞前リンパ球性白血病。リンパ球性リンパ腫；脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫(+/-絨毛リンパ球)などの辺縁帯リンパ腫；節性辺縁帯リンパ腫(+/-単球様B細胞)および粘膜関連リンパ組織の節外性辺縁帯B細胞リンパ腫(MALT)タイプ；有毛細胞白血病；形質細胞性骨髄腫/プラズマ細胞腫；濾胞性リンパ腫、濾胞中心(Follicular lymphoma, follicle center)；マントル細胞リンパ腫；大細胞型B細胞リンパ腫(

10

20

30

40

50

縦隔大細胞型 B 細胞リンパ腫、血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫、および原発性滲出液リンパ腫を含む) ; およびパーキットリンパ腫 / パーキット細胞白血病からなる群から選択される。

【0014】

いくつかの実施形態では、リンパ腫のような血液癌は多発性骨髄腫 (MM)、および非ホジキンリンパ腫 (NHL)、マンツル細胞リンパ腫 (MCL)、濾胞性リンパ腫、ワルデンストレーママクログロブリン血症 (Waldenstrom's macroglobulinemia : WM) または B 細胞リンパ腫及び拡散大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) をからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、非ホジキンリンパ腫 (NHL) は二つのカテゴリー、アグレッシブ (aggressive) NHL または無痛性 (indolent) NHL のいずれに該当する。アグレッシブ NHL は急速に成長して、比較的迅速に被験者の死につながる可能性がある。未治療の生存期間は数ヶ月あるいは数週間で測定することができる。アグレッシブ NHL の例としては、B 細胞新生物、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、T / NK 細胞新生物、未分化大細胞リンパ腫、末梢 T 細胞リンパ腫、前駆 B リンパ芽球性白血病 / リンパ腫、前駆 T リンパ芽球性白血病 / リンパ腫、成人 T 細胞リンパ腫 / 白血病 (HTLV 1+)、原発性 CNS リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、多形移植後リンパ増殖性疾患 (PTLD)、AIDS 関連リンパ腫、真性組織球性リンパ腫 (true histiocytic lymphoma : 悪性組織球増殖症)、及び芽球性 NK 細胞リンパ腫を含む。アグレッシブ NHL の最も一般的なタイプは、びまん性大細胞リンパ腫である。無痛性 NHL は遅い成長しており、疾患が進行した段階に進行するまで、ほとんどの被験者のための明らかな症状が表れない。無痛性 NHL の被験者の未治療の生存率は、年間で測定することができる。非限定的な例としては、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫 (たとえば節外性辺縁帯リンパ腫 (MALT リンパ腫組織とも呼ばれる粘膜関連リンパ)、節性辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (単球様 B 細胞リンパ腫)、脾臓周辺帯リンパ腫)、およびリンパ性リンパ腫 (ワルデンストレーママクログロブリン血症) を含む。いくつかの例において組織学的形質転換が発生してもよい、例えば、被験者における無痛性 NHL はアグレッシブ NHL に変換してもよい。

10

20

【0015】

いくつかの実施形態では、白血病などの血液癌は急性リンパ性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、および小リンパ球性リンパ腫 (SLL) なる群から選択されます。急性リンパ性白血病は、急性リンパ芽球性白血病として知られており、本明細書において互換的に使用されてもよいです。両方の用語は、骨髄中の白血球、リンパ球、から始まる癌のタイプを記述する。

30

【0016】

いくつかの実施形態では、試料は血液試料であるか、または骨髄試料である。

【0017】

本明細書で使用する用語「血液サンプル」は、当該分野におけるその一般的な意味は、典型的には、患者から得られた全血試料を意味する。いくつかの実施形態において、血液試料は、PBMC サンプルである。本明細書で使用する用語「PBMC」または「末梢血単核細胞」または「未分画 PBMC」は、全 PBMC を指し、すなわち、所与のサブについて富化されていない円形の核を有する白血球を指す。典型的には、PBMC サンプルは (T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NK T 細胞と DC 前駆体を含む) 非接着 PBMC を含有する選択工程に供されていてもよい。本発明の PBMC サンプルは、したがって、リンパ球 (B 細胞、T 細胞、NK 細胞、NK T 細胞) を含む。典型的に、これらの細胞を、血液の層を分離するフィコール (Ficoll)、親水性多糖を用いて、プラズマの下層セルリングを形成させて、全血から抽出することができる。さらに、PBMC は、赤血球を優先的に溶解する低張溶解緩衝液を用いて全血から抽出することができる。このような手順は、当業者に知られている。NK 細胞は陰性枯渇法または FACS ソーティング方法によって、パーコール (Percoll) 密度勾配によって調製することができる。これらの細胞は、アビジン - ビオチン系を用いてカラム免疫吸着によって、または抗体で

40

50

グラフトされたマイクロビーズを用いて免疫選択によって単離することができる。必要に応じてプラスチック付着法と組み合わせて、これらの異なる技術の組み合わせを使用することも可能である。

【0018】

本明細書で使用される用語「骨髄サンプル」は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有します。用語「骨髄サンプル」は吸引により骨髄腔を引き出される骨髄吸引物を含み、これに限定しないが、骨髄吸引および骨髄生検を含む。

【0019】

本明細書で使用される用語「NK細胞」は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、ナチュラルキラー（NK）細胞を指す。当業者は容易に、例えば、特定の表現型マーカー（例えば、CD56）の発現および種々のサイトカインの種類や細胞毒性を誘導する能力を発現する能力を決定することによってNK細胞を同定することができる。

10

【0020】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、試料（例えば、PBMCサンプル）中のNK細胞の集団を単離することからなるステップを含む。NK細胞を単離するための方法は当該技術分野で周知である。NK細胞は、非標的細胞の枯渇によって分離されている（例えば、T細胞、B細胞、樹状細胞...）。非標的細胞は、系統特異的抗原に対するビオチン標識抗体のカクテルとマイクロビーズのカクテルで間接的かつ磁氣的に標識される。標識されていないNK細胞はカラムに素通りし、一方磁気標識された非標的細胞は、MACSセパレーターの磁場にMACSカラム内でそれらを保持することにより枯渇される。濃縮されたNK細胞の純度は、フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡により評価することができる。

20

【0021】

本明細書で使用される用語「CD45RARONK細胞」は両方のマーカーCD45RAおよびCD45ROを発現するNK細胞のサブセットを指す。

【0022】

本明細書で使用される用語「CD45」は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、特に造血細胞で発現されるPTPRC遺伝子によってコードされるタンパク質チロシンホスファターゼ（PTP）を意味する¹⁹。CD45すなわちLckの（SF）受容体複合体の構成要素との直接的な相互作用によって、または種々のSrcファミリーキナーゼを活性化し、脱リン酸化による受容体シグナル伝達を調節する²⁰。しかし、JAKキナーゼを阻害することによって、またはSrcの活性化残基を脱リン酸化することにより、サイトカイン受容体のシグナル伝達を阻害することができる²⁰。典型的には、CD45の二つのアイソフォーム：CD45RAおよびCD45ROを区別することが可能である。用語「CD45RA」はCD45遺伝子のエキソン4が発現していないCD45アイソフォームを指す。用語「CD45RO」は、CD45遺伝子のエキソン4、5、および6が発現されないCD45アイソフォームを指す。

30

【0023】

典型的には、患者の血液サンプル中CD45RARONK細胞の存在は、いくつかの特定の細胞表面マーカーの存在および/または非存在を検出することからなる。細胞表面（例えば、NK細胞の表面）に特異的 surface マーカーの発現を検出するための標準的な方法は、当該技術分野において周知である。典型的には、CD45RARONK細胞の存在を検出することからなるステップは、他の細胞からNK細胞を区別するのに適している結合パートナーのセットと、CD45RAに特異的な指向を有する少なくとも一つの特異的（differential）結合パートナーとCD45RO特異的な指向を有する少なくとも一つの特異的（differential）結合パートナーのセットの使用を含む。

40

【0024】

本明細書で使用される用語「表面マーカーに特異的な指向を有する結合パートナー」は、表面マーカーに特異的な指向の「高親和性で前記表面マーカー（例えばCD4RAまたはCD45RO）を結合することができる任意の分子（天然または天然でない）を意味する

50

。結合パートナーは限定されないが、抗体、アプタマー、およびペプチドが含まれる。結合パートナーは、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る抗体、好ましくはモノクローナル（例えば、Kit Milteny社製CD45RAおよびCD45RO抗体）であってもよい。いくつかの実施形態では、結合パートナーは、アプタマーのセットであってもよい。

【0025】

本発明のポリクローナル抗体またはその断片は、例えば、とりわけ、ブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、およびマウスから選択された宿主動物に適切な抗原またはエピトープを投与することにより、公知の方法に従って得ることができる。当技術分野で公知の種々のアジュバントは、抗体産生を増強するために使用することができる。本発明の実施に有用な抗体は、ポリクローナルであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。本発明のモノクローナル抗体またはその断片は、培養中の連続細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製単離することができる。産生および単離のための技術としては、元々のハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術およびEBVハイブリドーマ技術に限定されない。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、結合パートナーはアプタマーであってもよい。アプタマーは、分子認識の用語で抗体の代替を表す分子のクラスである。アプタマーは、高い親和性および特異性で、事実上の標的分子の任意のクラスを認識する能力を有するオリゴヌクレオチドまたはオリゴペプチド配列である。このようなりガンドは、ランダム配列ライブラリーの指数関数的濃縮（SELEX）によってリガンドの系統的進化を通して単離することができる。ランダム配列ライブラリーは、DNAまたはRNAのコンビナトリアル化学合成によって得ることができる。このライブラリーでは、各メンバーは、独特の配列の、最終的に化学的に修飾された、線状のオリゴマーである。ペプチドアプタマーは、2ハイブリッドの方法によってコンビナトリアルライブラリーから選択され、大腸菌チオレドキシンAなどのプラットフォームタンパク質によって提示された立体配座的に制限された抗体可変領域、から構成されている。

20

【0027】

そのような抗体またはアプタマーのような本発明の結合パートナーは、典型的には、検出可能な分子または物質、好ましくは蛍光分子、または放射性分子または当技術分野で公知の任意の他のラベルで標識される。ラベルは、一般的に（直接的または間接的に）シグナルを提供する当該技術分野で知られている。本明細書で使用される、用語「標識」は、抗体またはアプタマーに関して、フルオロフォア〔例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）またはフィコエリトリン（PE）またはインドシアニン（Cy5）〕または放射性物質をカップリング（すなわち、物理的に連結）による抗体またはアプタマーの直接標識を包含することが意図されてだけでなく、検出可能な物質との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を含む。本発明の抗体またはアプタマーは、当技術分野で公知の任意の方法によって放射性分子で標識することができる。例えば、放射性分子が含まれるが、 I^{123} 、 I^{124} 、 I^{111} 、 Re^{186} 、 Re^{188} のようなシンチグラフィ研究用の放射性原子限定されるものではない。いくつかの実施形態では、抗体は、既にフルオロフォアに結合される（例えば、FITCコンジュゲートおよび/またはPE結合）。

30

40

【0028】

上記アッセイは、典型的には、固体支持体への結合パートナー（すなわち抗体またはアプタマー）の結合を伴う。固体表面は、結合パートナーでコーティングされたマイクロタイタープレートでありうる。NK細胞サンプルのインキュベーションの後、特異的結合パートナーに結合したNK細胞は一般的なNK細胞マーカーに対する抗体を用いて検出することができる。また、固体表面は、活性化ビーズ、磁気反応性ビーズなどのビーズであってもよい。さらに、ビーズには、異なる材料、これらに限定されないが、ガラス、プラスチック、ポリスチレン、及びアクリルで作られていてもよい。また、ビーズは、好ましく

50

は蛍光で標識されている。好ましい実施形態では、蛍光ビーズは、ベクトン・ディッキンソン Biosciences 社（サンノゼ、カリフォルニア州）から入手可能な TruCount（登録商標）チューブに含まれる。

【0029】

本発明によれば、フローサイトメトリーの方法は CD45RARO NK 細胞を検出するための好ましい方法である。前記方法は当技術分野で周知である。例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）は、したがって、使用されてもよい。典型的には、例えば、ここに以下の実施例に記載のような FACS 法が使用される。

【0030】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、さらに少なくとも一つの CD45RARO NK 細胞上の表現型のマーカーの存在を検出する工程を含み；ここで少なくとも一つの表現型マーカーの存在は、血液がんの性質を示す。

10

【0031】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 の表現型マーカーを検出するステップを含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、表現型マーカーは CDLA、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3delta、CD3epsilon、CD3gamma、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8alpha、CD8beta、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CDw12、CD13、CD14、CD15u、CD16A、CD16B、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD44R、CD46、CD47R、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD60b、CD60c、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75s、CD77、CD79A、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CDw93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CDw113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CDw119、CD120a、CD120b、CD121a、CDw121b、CD122、CD123、CD124、CDw125、CD126、CD127、CDw128a、CDw128b、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CDw136、CDw137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CDw149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CDw156c、CD157、CD158、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD162、CD162R、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD

20

30

40

50

183、CD184、CD185、CDw186、CD191、CD192、CD193、CD195、CD196、CD197、CDw198、CDw199、CDw197、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CDw210、CD212、CD213a1、CD213a2、CDw217、CDw218a、CDw218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD235ab、CD236、CD236R、CD238、CD239、CD240CE、CD240D、CD240DCE、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD252、CD253、CD254、CD256、CD257、CD258、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD289、CD292、CDw293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300a、CD300c、CD300e、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD309、CD312、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD324、CDw325、CD326、CDw327、CDw328、CDw329、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CDw338、およびCD339からなる群から選択されたCD分子である。

10
20

【0033】

典型的に、CD5、CD10、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD79A、CD103、Pax-5、カッパ、ラムダ、CD200、細胞質カッパまたは細胞質ラムダからなる群から選択される少なくとも一つの表現型マーカーの存在は、血液癌は、B細胞から生じることを示す。たとえば、表Aは、B細胞から生じる血液癌の典型的な表現型マーカーを示している。

30

【表1】

表A：B細胞から生じる血液癌の典型的な表現型マーカー

(CLL B細胞慢性リンパ性白血病； B-PL B細胞前リンパ球性白血病； MCL マントル細胞リンパ腫； MZLB 辺縁帯リンパ腫B細胞リンパ腫； sMZLB 脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫； FL濾胞性リンパ腫)

	CD19	CD5	CD23	CD20	CD22	CD10	CD11c	CD25	CD103
CLL	+	+	+	+	+			+	
B-PL	+			+	+				
MCL	+	+		+	+				
MZLB	+			+	+		+		
sMZLB				+	+		+		+
FL	+			+	+	+			

40

【0034】

典型的に、CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、TCR-、TCR-、およびCD3からなる群から選択される少なくとも一つの表現型マーカーの存在は、血液癌がT細胞に由来することを示す。

50

【0035】

典型的には、のCD11b、CD13、CD14(MO2)、CD14(MY4)、CD15、CD33、CD41、CD61、CD64、CD117、CD235aおよびミエロペルオキシダーゼからなる群から選択される少なくとも一つの表現型マーカーの存在は、血液癌が骨髄細胞に由来することを示す。

【0036】

典型的には、表現型マーカーの検出は、CD45RAおよびCD45ROのために行ったように同じプロトコルに従って行われます。したがって、細胞選別(FACS)を活性化表現型マーカー及び蛍光の存在を決定するために使用することができる結合パートナーのパネルを用いることが好ましい。

10

【0037】

患者が血液癌に罹患していると診断されると、医師は、最も正確な治療を患者に投与するための選択肢を取ることができる。典型的には、治療は、化学療法、放射線療法、および免疫療法を含む。

【0038】

従って、本発明はまた、以下の工程を含む、必要とする対象における血液学的癌を治療する方法に関する：

(i) 本発明の方法に従った方法を実行することにより、血液癌を有する被験体を同定すること、

(ii) 血液癌を有する対象を、化学療法剤、標的癌治療、免疫療法剤または放射線療法剤で治療すること。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、一度血液癌に罹患していると診断された患者は、化学療法剤と共に投与される。「化学療法剤」という用語は、腫瘍増殖を阻害するのに有効である化学化合物を指す。化学療法剤の例には、チオテパ(thiotepa)やシクロホスファミド(cyclophosphamide)などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン等のアルキルスルホン酸塩；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、およびウレドーパ(uredopa)などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド(triethylenephosphoramidate)、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)とトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン(methylamelamines)；(特にプラタシンとプラタシノンである)アセトゲニン；(合成アナログトボテカンを含む)カンプトテシン；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；(そのアドゼレシン、カルゼレシンとビゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)CC-1065；(特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8である)クリプトフィシン；ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成類似体、KW-2189とCBI-TMIを含む)；エレウテロピン；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコジクチン(sarcodictyin)；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド(cholophosphamide)、エストラヌスオタチン(estrarustine)、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン(novembichin)、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素；エンジイン抗生物質などの抗生物質(例えばカリケアマイシン、特にカリケアマイシン(11およびカリケアマイシン211、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994)参照)；ダイネミシンA含むダイネミシン；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連色素タンパク質エネジイン抗生物質クロモモフォア(chromomop

30

40

50

hores)、アクラシノマイシン(acclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カニノマイシン(canninomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン(chromomycins)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン(モルホリノ-ドキシソルビシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシンとデオキシドキシソルビシン(deoxydoxorubicin)を含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダナルビシン(idanrbicin)、マーセロマイシン(marcellomycin) 10
 、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラシン(nogalarnycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ステレプトミグリン(streptomgrin)、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン; メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)などの抗代謝産物; デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキサートなどの葉酸類似体; フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン(thiamiprine)、チオグアニンなどのプリン類似体; アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体; 20
 カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン; アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤; frolinic酸などの葉酸補充液; アセグラトン; アルドホスファルニド(aldophospharnide)グリコシド; アミノレブリン酸; アムサクリン; ベストラブシル(bestrabucil); ビサントレン; エダトラキサート(edatraxate); デフォファミン(defofamine); デメコルチン; ジアジクオン(diaziquone); エルフォルニチン(elfornithine); エリプチニウム(elliptinium)アセテート; エポチロン; エトグルシド(etoglucid); 硝酸ガリウム; ヒドロキシウレア; 30
 レンチナン; ロニダミン; メイタンシンおよびアンサマイトシンのようなメイタンシノイド; ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダモール(mopidamol); ニトラクリン(nitracrine); ペントスタチン; フェナメット(phenamet); ピラルビシン; ポドフィリニック(podophyllin)酸; 2-エチルヒドラザイド; プロカルバジン; PSK(登録商標); ラゾキサ(razoxane); リゾキシシン; シゾフィラン; スピロゲナニウム(spirogenanium); テヌアゾン酸; トリアジコン(triaziquone); 2,2',2''-トリクロロトリエチルアルニン(trichlorotriethylarnine); トリコテセン(特にT-2トキシシン、verracurin A、roridin A及びanguidine); ウレタン; ビンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; mitobromtol; ミトラクトール、ピボプロマン、gacytosine; アラビノシド(「Ara-C」); シクロホスファミド; チオテパ; タキソイド、例えばパクリタキセル(タキソール(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N])およびドセタキセル(タキソテール(登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); クロラムブシル; ゲムシタピン; 40
 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; 例えば、シスプラチンやカルボプラチンなどの白金類似体; ビンブラスチン; 白金; エトボシド(VP-16); イホスファミド; マイトマイシンC; ミトキサントロン; ビンクリスチン; ビノレルピン; ナベルピン; ノバントロン; テニボシド; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロネート; CPT-1 1; トボイ 50

ソメラーゼインヒビター RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornithine) (DMFO)；レチノイン酸；カペシタピン；そして上記のいずれかの薬理的に許容されるその塩、酸、または誘導体。また、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、4(5)-イミダゾールを阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシ、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、LY 117018、オナプリストン、およびトレミフェン (Fareston) を含めた抗エストロゲン；並びにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤；及び薬理的に許容されるその塩、酸、または誘導体はこの定義に含まれる。

10

【0040】

いくつかの実施形態では、一旦血液癌に罹患していると診断された患者は、標的癌治療で投与される。標的癌治療は、癌の増殖、進行、および普及に参与している特定の分子（「分子標的」）に干渉することにより、癌の増殖と拡散を阻止する薬物または他の物質である。標的癌治療は時には「分子標的薬」、「分子標的治療薬」、「精密薬」または類似の名前と呼ばれている。いくつかの実施形態では、標的治療は、チロシンキナーゼ阻害剤を患者に投与することから成る。用語「チロシンキナーゼ阻害剤」は、受容体および/または非受容体チロシンキナーゼのような選択的または非選択的阻害剤として作用する治療薬または薬物の種々のいずれかを意味する。チロシンキナーゼ阻害剤及び関連化合物は、当技術分野で知られており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開2007/0254295に記載されている。当業者には理解されるように、チロシンキナーゼ阻害剤に関連する化合物は、このチロシンキナーゼ阻害剤と同じ効果が得られる、例えば、シグナル伝達経路のチロシンキナーゼの別のメンバーに作用し、このチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ阻害剤と同じ効果が得られる。本発明の実施形態の方法での使用に適したチロシンキナーゼ阻害剤と関連化合物は、限定されないが、ダサチニブ (BMS-354825)、PP2、BEZ235、サラカチニブ (sarakatinib)、ゲフィチニブ (イレッサ)、スニチニブ (スーテント; SU11248)、エルロチニブ (タルセバ; OSI-1774)、ラパチニブ (GW572016; GW2016)、カネルチニブ (CI1033)、semaxinib (SU5416)、パタラニブ (PTK787/ZK222584)、ソラフェニブ (BAY 43-9006)、イマチニブ (グリベック、STI571)、レフルノミド (SU101)、バンデタニブ (Zactima; ZD6474)、MK-2206 (8-[4-アミノシクロブチル]フェニル]-9-フェニル-1,2,4-トリアゾロ[3,4-f]の[1,6]ナフチリジン3(2H)-オン塩酸塩)、その誘導体、そのアナログ、およびそれらの組み合わせを含む。さらに本発明での使用に適したチロシンキナーゼ阻害剤と関連化合物は、例えば、米国特許公開2007/0254295、米国特許番号5618829、5639757、5728868、5804396、6100254、6127374、6245759、6306874、6313138、6316444、6329380、6344459、6420382、6479512、6498165、6544988、6562818、6586423、6586424、6740665、6794393、6875767、6927293、および6958340に記載され、これらのすべてはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、経口投与され、それは少なくとも一つの第I相臨床試験の対象、より好ましくは、少なくとも一つの第II相臨床、さらにより好ましくは少なくとも一つIII相臨床試験のそして最も好ましくは、少なくとも一つの血液または腫瘍学的適応症のためにFDAによって承認対象となっている小分子キナーゼ阻害剤である。そのような阻害剤の例は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ラパチニブ、カネルチニブ、BMS-599626 (AC-480)、ネラチニブ、KR-633、CEP-11981、イマチニブ、イロチニブ (ilotinib)、ダサチニブ、AZM-475271、CP-724714、TAK-165、スニチニブ、パタラニブ、CP-547632、バンデタニブ、ボスチニブ、レスタウル

20

30

40

50

チニブ、Tandutinib、ミドスタウリン、エンザスタウリン、AEE-788、パゾパニブ、アキシチニブ、Motasenib、OSI-930、セジラニブ、KRN-951、Dovitinib、セリシクリブ、SNS-032、PD-0332991、MKC-I (RO-317453; R-440)、ソラフェニブ、ABT-869、Brivanib (BMS-582664)、SU-14813、Telatinib、SU-6668、(TSU-68)、L-21649、MLN-8054、AEW-541、およびPD-0325901を含むが、これらに限定されない。

【0041】

いくつかの実施形態では、一度血液癌に罹患していると診断された患者は、免疫療法剤と共に投与されます。本明細書で使用される用語「免疫療法剤」は、癌細胞に対する身体の免疫応答を間接的または直接的に増強、刺激または増大する化合物、組成物または治療を意味し、及び/あるいは他の抗癌療法の副作用を減少させる化合物、組成物または治療を意味する。免疫療法は、このように癌細胞に対する免疫系の応答を直接または間接的に刺激または増強し、および/または他の抗がん剤によって引き起こされた副作用を軽減する治療である。免疫療法はまた、免疫療法、生物学的療法、生物学的応答調節療法および生物療法などの当技術分野において言及されています。当技術分野で公知の一般的な免疫療法剤の例としては、サイトカイン、癌ワクチン、モノクローナル抗体および非サイトカインアジュバントを含むがこれに限定されない。あるいは免疫療法治療は、一定量の(T細胞、NK細胞、樹状細胞、B細胞などの)免疫細胞を患者に投与することからなり得る。

10

20

【0042】

免疫療法剤は非特異的であり得る、すなわち一般的に免疫システムを向上させ、がん細胞の成長及び/又は癌細胞の広がりと戦うことに、人体がより効果的になる、あるいは、それらは特異的であり得る、すなわち、癌細胞自身を標的とし、免疫治療レジメンは非特異的および特異的免疫療法剤の使用を組み合わせてもよい。

【0043】

非特異的な免疫療法剤は、免疫システムを刺激又は間接的に向上させる。非特異的免疫療法剤は、がんの治療のための主治療のみに用いられるだけでなく、主治療に加えて、非特異的免疫療法剤が、他の治療剤(たとえば、癌ワクチン)の効果を高めるアジュバントとして機能しうる。非特異的な免疫療法剤はまた、この後者の状況において、他の療法の副作用を低減するため、例えば特定の化学療法剤によって誘発される骨髄抑制を低減させるために機能しうる。非特異的免疫療法剤は、キーとなる免疫系細胞に作用し、サイトカインおよび免疫グロブリンの産生増加などの二次応答を引き起こす可能性がある。あるいは、薬剤は、それ自体がサイトカインを含むことができる。非特異的な免疫療法剤は、一般に、サイトカインまたは非サイトカインアジュバントとして分類される。

30

【0044】

多くのサイトカインは、免疫系を増強するように設計された一般的な非特異的免疫療法として、または他の治療を設けアジュバントとしてのいずれかの癌の治療に応用されている。適切なサイトカインとしては、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子を含むが、これらに限定されない。

40

【0045】

本発明によって企図されるインターフェロン(IFN)は、共通のIFNのタイプのIFN-アルファ(IFN-)、IFN-ベータ(IFN-)及びIFN-ガンマ(IFN-)が含まれる。IFNはがん細胞に直接作用し、例えば、その増殖を遅くすることにより、より正常なふるまいをする細胞への分化を促進し、および/または抗原の生産を増加させ、免疫システムの癌細胞の認識及び破壊を容易にする。IFNはまた、癌細胞に対して間接的に作用し、例えば、新脈管形成を減速することにより、免疫系を増強および/またはナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞およびマクロファージを刺激する。組換えIFN-アルファはロフェロン(Roche Pharmaceuticals)とイントロンA(Schering Corporation)として市販されている。

50

【0046】

本発明によって企図されるインターロイキンは、IL-2、IL-4、IL-11およびIL-12を含む。市販の組換えインターロイキンの例としては、Proleukin（登録商標）（IL-2；カイロン社）及びNeumega（登録商標）（IL-12；ワイエス医薬品）が挙げられる。ザイモジェネティクス社（ワシントン州シアトル）は現在、本発明の組合せで使用することが意図されているIL-21の組換え体をテストしている。

【0047】

本発明によって企図されるコロニー刺激因子（CSF）は、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSFまたはフィルグラスチム）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSFまたはサルグラモスチム）、およびエリスロポエチン（エポエチンアルファ、ダルベポエチン）を含む。一つ以上の成長因子を用いた治療は、従来の化学療法を受けている患者に新しい血液細胞の生成を刺激するのを助けることができる。したがって、CSFでの処置は、化学療法に関連する副作用を減少させるのに役立つことができ、使用される化学療法剤のより高い用量を可能にすることができる。様々な組換えコロニー刺激因子は、市販されている、たとえば、Neupogen（登録商標）（G-CSF；Amgen社）、ニューラスト（pegfilgrastim；Amgen社）、Leukine（GM-CSF；Berlex）、プロクリット（エリスロポエチン；オーソ・バイオテック）、エポゲン（エリスロポエチン；Amgen社）、Arnesp（erythropoietin）がある。

10

20

【0048】

特異的または非特異的な標的を有することに加えて、免疫療法剤は、活性であること、すなわち身体自体の免疫応答を刺激する、またはそれらが受動的であることができ、すなわち、身体の外で生成された免疫系の成分を含む。

【0049】

受動的な特異的免疫療法は、典型的には、癌細胞の表面上に見出される特定の抗原に特異的であるか、または、特定の細胞増殖因子に特異的である1つまたはそれ以上のモノクローナル抗体の使用を含む。モノクローナル抗体は、多くの方法で癌の治療に使用することができ、例えば、癌の特定のタイプに対する対象の免疫応答を増強し、血管形成における増殖因子のような、特定の細胞増殖因子を標的とすることによって癌細胞の増殖を妨害し、または化学療法剤、放射性粒子または毒素のような薬剤にリンクまたは結合した場合、癌細胞への他の抗癌剤の送達を増強することによって使用してもよい。

30

40

50

【0050】

現在、本発明の組み合わせに含めるのに適している癌免疫療法剤として使用されるモノクローナル抗体としては、限定されないが、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、イブリツモマブチウキセタン（ゼパリン（登録商標））、トシツモマブ（ベキサール（登録商標））、セツキシマブ（C-225、アービタックス（登録商標））、ペバシズマブ（アバスチン）、ゲムツズマブ・オゾガミシン（Mylotarg（登録商標））、アレムツズマブ（キャンパス（登録商標））、およびBL22が含まれる。他の例には、抗CTLA4抗体（例えばイピリムマブ）、抗PD-L抗体、抗PD-L2抗体、抗TIMP3抗体、抗LAG3抗体、抗B7H3抗体、抗B7H4抗体または抗B7H6抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、抗体は、B細胞枯渇抗体を含む。典型的なB細胞枯渇抗体としては、これに限定されるものではないが、抗CD20モノクローナル抗体[例えばリツキシマブ（Roche社）、イブリツモマブチウキセタン（バイエル・シエーリング）、トシツモマブ（グラクソ・スミスクライン）、AME-133V（アプライドモレキュラーエボリューション）、オクレリズマブ（ロシュ）、オフアツムマブ（HUMAX-CD20、Gemnab）、TRU-015（Trubion）及びIMMU-106（Immunomedics）]；抗CD22抗体[例えばエプラツズマブ、レナードら、臨床癌研究（Z004）10：53Z7-5334]；抗CD79A抗体；抗CD27抗体；または抗CD19抗体（例えば、米

国特許第7109304) ; 抗BAFF-R抗体(例えばベリムマブ、グラクソ・スミスクライン)、抗APRIL抗体(例えば、抗ヒトAPRIL抗体、ProSci INC)、および抗IL-6抗体[例えば、以前De Benedetti et al., J Immunol (2001) 166: 4334-4340及びSuzuki et al., Europ J of Immunol (1992) 22 (8) 1989-1993に記載されている: これらの文献は参照により本明細書に完全に組み込まれる]が含まれる。

【0051】

免疫療法の治療は、特に、同種移植の造血幹細胞HSCで同種移植片を構成することができる。Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley and Steven A. Rosenberg "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volume 12, April 2012によって記載されているように免疫療法の治療はまた、養子免疫療法で構成されてもよい。養子免疫療法は、患者の循環リンパ球、NK細胞は、インビトロで増幅され、患者に再投与される。活性化リンパ球またはNK細胞は、最も好ましくは、以前の血液または腫瘍試料から単離され、インビトロで活性化(または"増殖")された患者自身の細胞である。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、一度血液癌に罹患していると診断された患者は、放射線療法剤と共に投与されます。本明細書で使用する用語「放射線療法剤」は、これに限定するものではないが、癌を治療または改善するのに有効であることが当業者に知られている任意の放射線療法剤を意味することが意図される。例えば、放射線治療剤は、近接照射療法または放射性核種療法で投与されるような薬剤であり得る。このような方法は、必要に応じてさらに、1つまたは複数の追加の癌治療、これらに限定されないが、化学療法、および/または他の放射線治療するのを含むことができる。

20

【0053】

本発明のさらなる態様は、i)患者からの血液試料中のCD45RA⁺ NK細胞の存在を検出し、及びii)CD45RA⁺ NK細胞の存在が、血液試料中に検出されない時、患者の治療が効率的であると結論することを含む、血液癌を患う患者における治療の有効性をモニタリングするための方法に関する。

【0054】

典型的には、患者は、上記のように治療して投与される。

【0055】

本発明はさらに、以下の図面及び実施例により説明する。しかしながら、これらの実施例および図面は、本発明の範囲を限定すると決して解釈されるべきではない。

30

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】血液悪性腫瘍および健康なドナー 患者は異なるNK細胞サブセットプロファイルを有す。A)健康なドナーおよび多発性骨髄腫(MM)患者の血液サンプル(bs)から、又はMM患者の骨髄(bms)からのPBMCを染色した。異なるCD45アイソフォームを発現するNK細胞の割合は、パネルに示される。B)MM患者の血液サンプル由来の(CD45アイソフォームの発現に基づく)異なるNK細胞サブセットのFSとSS値および成熟度(CD56/CD16発現)。C)健康なドナーおよび血液癌患者におけるこれらのNK細胞集団の割合。バーは、それぞれの病状のための少なくとも4つの異なる個体の平均±SDを示す。HD、健康なドナー; MM、多発性骨髄腫; B-CLL、B細胞慢性リンパ球性白血病; BCL、B細胞リンパ腫; AML、急性骨髄性白血病; bs、血液サンプル; bms、骨髄サンプル。D)NK成熟の異なる段階(CD56/16発現)での、CD45RA、CD45RA⁺、CD45RA⁺の^{d i m}とCD45RA^{d i m}ROの割合。各点は、ドナーを表す。平均値±SDも示す。

40

【0057】

【図2】CMV+患者および血液癌の患者は異なるNK細胞サブセットプロファイルを有する。A)腎臓移植後のCMV感染の再活性化している患者(CMV+)または再活性化していない患者(CMVneg)からPBMCを精製し、NK細胞の割合を算出した。B

50

成熟 (CD56 / CD16) の異なる段階でのNK細胞の割合の存在量 (パーセンテージ) は (A) に記載のサンプルで分析した。C) 各NK細胞サブセットの割合 (CD45 アイソフォーム / CD69) が示される。(B) および (C) のバーは、それぞれの病状のための少なくとも4つの個体の平均 ± SD を表す。

【0058】

【図3】CD69、CD45RA および CD45RO は異なるNK細胞サブセットを識別する。A) 健康なドナー (HD) と異なる血液学的悪性腫瘍を有する患者からPBMCを精製し、CD69⁺の百分率及びNK細胞の成熟度 (CD56 / CD16) の異なる段階における細胞を計算した。バーは、それぞれの病状のための少なくとも4つの個体の平均 ± SD を表す。B) 異なる血液悪性腫瘍と健康なドナー (HD) 患者からのPBMCにおいてCD45RA、CD45RO および CD69 を発現する又は発現しないNK細胞の割合が示される。バーは、各医療条件のために、少なくとも4人の平均 ± SD を表す。C ~ D) 異なる血液由来の癌の患者の血液 (bs) 又は骨髄サンプル (bms) からのNK細胞におけるCD45RO または CD45RA vs CD69 の発現を示すグラフ。健康なドナーからの骨髄サンプルは、分析のために利用できなかった。

10

【0059】

【図4】CD45RO は異なるNK細胞集団を識別する。健康なドナー (HD) 及び異なる血液悪性腫瘍を有する患者からPBMCを精製した。A) NK細胞の百万当たり各NK細胞サブセット (CD45 / CD69 の発現) のCD107a⁺細胞の数。バーは、各医療条件のために、少なくとも4人の平均 ± SD を表す。B) 6つの異なるサブセット (CD45 / CD69) におけるCD107a⁺NK細胞の割合。C) 上のパネル: MMまたはAML患者の骨髄サンプル (bms) から単離された異なるNK細胞サブセットにおける、CD107a⁺細胞の割合 (比較のため、対応する血液試料 (bs) の割合を示す) にもパーセンテージを示す。下のパネル: K562腫瘍細胞を標的にする曝露後の異なるNK細胞サブセットのCD107a⁺細胞のパーセンテージを示す (図7に記載のin vitro細胞毒性アッセイ)。D ~ E) 健康なドナー (HD) 又はB細胞慢性リンパ性白血病 (B-CLL) 患者の血液サンプルからの6つの異なるNK細胞サブセット (CD45 / CD69) におけるCD71 または Ki-67 を発現するNK細胞のパーセンテージ。バーは、各医療条件のために、少なくとも4人の平均 ± SD を表す。

20

【0060】

【図5】CD45RARO細胞は、腫瘍細胞のトロゴサイトシス (trogocytosis) を行う。BCL (A) またはAML (B) を有する患者由来のPBMCを精製し、異なる抗体で染色した。この実験では、NK細胞集団は、CD56⁺NKP46⁺細胞に対応する。CD45RA / ROに関する各NK細胞サブセットの細胞の割合は、図に示されている。

30

【0061】

【図6】血液悪性腫瘍患者と健康なドナーは異なるNK細胞サブセットプロファイルを有する。A) 健康なドナー及び多発性骨髄腫 (MM) を伴う患者の血液サンプル (bs) からのPBMC、MM患者の骨髄 (BMS) からのサンプル、あるいは他の血液疾患を有する患者のサンプルを、抗CD19 (B細胞)、抗CD3 (T細胞、CD3⁺CD56⁻) および抗CD56 (NK細胞、CD56⁺CD3⁻) を用いてFACS分析のために染色して異なるリンパ球集団を同定し; 抗CD16を用いて、成熟の異なる段階におけるNK細胞サブセットを同定し; そして抗CD45RA及び抗CD45RO抗体を用いて染色した。異なるCD45アイソフォームを発現するNK細胞のパーセンテージは、パネルに示されている。B) 健康なドナーおよび血液癌の患者でのCD45RAおよびROの発現に基づく、異なるNK細胞集団の割合。集団は、図1Aの4分割に対応しています: 左上 (CD45RA)、左下 (CD45RA^{dim})、右上 (CD45RARO) 及び右下 (CD45RA^{dim}RO)。バーは、健康なドナーの血液 (左パネル) または骨髄 (右パネル) のサンプルと比較したスチューデントt検定における、各医療条件の平均 ± SD を示す: * は p < 0.01; ** は p < 0.001; *** は p < 0.0001。

40

50

HD、健康なドナー； MM、多発性骨髄腫； B - C L L、B細胞慢性リンパ球性白血病； B C L、B細胞リンパ腫； A M L、急性骨髄性白血病； b s、血液サンプル； b m s、骨髄サンプル。

【0062】

【図7】CD45RARO NK細胞の機能解析図。A) MM患者の血液試料由来のNK細胞サブセット(CD45アイソフォームの発現に基づく)のFSとSS値。B~C) 代表的なBCL患者における異なるNK細胞サブセットにおけるCD71およびKi67の発現。D~E) 異なる血液由来の癌の患者の血液(b s)または骨髄サンプル(b m s)由来のNK細胞におけるCD45ROまたはCD45RAvsCD69の発現を示す代表的グラフ。

10

【0063】

【図8】CD45RAROは、脱顆粒するNK細胞を識別する。健康なドナー(HD)及び異なる血液悪性腫瘍を有する患者由来のPBMCを精製する。A) NK細胞の百万当たりの、各NK細胞のサブセット(CD45RA/RO発現)におけるCD107a⁺細胞の数。バーは、各医療条件の平均±SDを表す(健康なドナーのサンプルと比較した学生t検定における)。B) 4つの異なるサブセットにおけるCD107a⁺NK細胞のパーセンテージ。C) 上部パネル: MMまたはAML患者の骨髄サンプル(b m s)から単離された異なるNK細胞サブセットにおけるCD107a⁺細胞の割合(対応する血液試料(BS)のパーセンテージも比較のため示す); 下のパネル: K562腫瘍細胞を標的に暴露した後の、異なるNK細胞サブセットにおけるCD107a⁺細胞の割合(インビトロ細胞毒性アッセイにおいて)。PBMCはエフェクター: ターゲットが10:1の割合においてターゲットK562腫瘍細胞と4時間インキュベートされた。

20

【0064】

【図9】補足図1 NK細胞サブセットは、血液由来の癌を有する患者において変調される。異なる血液学的悪性腫瘍の患者からのPBMCはCD45RA、CD45RO、CD56およびCD16に対する抗体で染色し、図3のように分析された。異なるCD45アイソフォームを発現するNK細胞のパーセンテージは、グラフに示されている。B - C L L、B細胞慢性リンパ球性白血病； B C L、B細胞リンパ腫； A M L、急性骨髄性白血病； b s、血液サンプル； b m s、骨髄サンプル。

【0065】

【図10】補足図2 CD45RA^{dim}細胞は、インビトロ活性化後のCD69の発現を得る。血液サンプルから単離したPBMCはターゲットK562腫瘍細胞と、エフェクター: ターゲットが10:1の割合で、4時間インキュベートされた。PBMCを、インビトロ細胞毒性アッセイの終了時に(after)、またはアッセイの前に(before)CD45RAおよびCD69に対する抗体を用いてex vivoで標識した。各NK細胞サブセットの細胞の割合(CD45RA及びCD69の発現に基づく)が示されている。B細胞慢性リンパ性白血病(B - C L L)、またはB細胞リンパ腫(B C L)を有する2人の患者からの代表的なデータ。

30

【0066】

【図11】補足図3 CD45RARO細胞は、B - C L L患者の腫瘍細胞上トログオサイトシス(trogocytosis)を行う。B - C L L患者由来のPBMCを精製し、異なる抗体で染色した。この実験では、NK細胞集団は、CD56⁺NK P46⁺細胞に対応する。CD45RA/ROに関する各NK細胞サブセットの細胞の割合は、図に示されている。

40

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0067】

材料&方法

細胞培養

K562細胞株(ATTC CCL 243)は、RPMI 1640培地(Gibco

50

GlutaMAX (登録商標) 培地); 10%ウシ胎児血清(FBS)(Gibco) 中で対数増殖に維持した。細胞は、5%CO₂の加湿チャンバー内で37℃で培養し、1週間に2回1:10で継代した。骨髓および末梢血試料は、インフォームドコンセントの後に別の血液疾患を有する患者及び、健康なドナーから得た。細胞は、Ficoll-Hypaque (Sigma) を用いて密度勾配遠心分離により精製しました。プライマリー細胞は、加湿大気中、37℃で5%CO₂を補充したRPMI 1640培地(Gibco GlutaMAX (登録商標) 培地); 10%FBS中で培養した。

【0068】

末梢血単核細胞(PBMC)の精製

PBMCはHistopaque - 1077 (シグマ) を使用して回収した。簡潔には、3 - 6 ml のRPMIで1:2希釈した血液または1:3希釈した骨髓サンプルを5 mlのHistopaqueの上に添加しました。細胞は30分間中断せずに1600rpmで、20℃で遠心分離された。単核細胞は、中間の白い輪から収集しました。RPMIで洗浄した後、細胞を10%FBS(Invitrogen)で補充した完全RPMI培地に懸濁した。

10

【0069】

患者/健康なドナーの選択

異なる血液癌を有する患者からのデータ及び試料は、患者のインフォームドコンセントの後、フランスCHUモンペリエ、腫瘍学および臨床血液学部門で収集した。患者は“Comites de Protection des Personnes Sud Mediterranee I (ref 1324)”及びID-RCB: 2011-A00924-37によって承認された二つの独立した臨床プログラムに登録された。

20

【0070】

細胞表面マーカーの多色染色

PBMCは、7AAD(ベックマン)で染色して生細胞を識別し、細胞表面マーカーに対する抗体である、次の抗CD25-FITC、-CD45RO-FITC、-CD69-PE、-CD138-PE、-CD62L-PE、-CD19-PE、-CD3-PE、-CD19-ECD、-CD38-ECD、-CD56-PECy7、-CD56-APC、-CD3-APC、-CD45-APC AlexaFluor750、-CD45RA-APC AlexaFluor750、-CD16-PacificBlue、-CD57-PacificBlue、-CD45-KromeOrange、-CD16-KromeOrange(ベックマン)、-CD158b-FITC、-CD158a-PE、-CD107a-HV500、-KI-67-V450(BD Biosciences社)及び-CD71-APC(ImmunoTools)抗体で、細胞フェノタイピングのため染色した。簡単に述べると、 1×10^6 細胞を37℃で30分間PBS/2%FBS中で異なる抗体と共にインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、200~250µlPBS/2%FBSに懸濁し、染色はGalliosフローサイトメーター(Beckman)とKaluzasoftウェアを用いて分析した。

30

【0071】

生存可能なリンパ球は、FSC/SSCおよび7AAD染色を用いてゲートした。Bリンパ球(CD19+)、Tリンパ球(CD3+CD56-)およびNK細胞(CD56+CD3-)はCD19、CD3またはCD56の発現に基づいて識別した。NK細胞は、その後、CD45RAおよびCD45ROの発現に基づいて、4つの異なる集団に分離した。CD45RA⁺RO⁻(CD45RA)、CD45RA⁺RO⁺(CD45RARO)、CD45RA^{dimm}RO⁺(CD45RA^{dimm})、CD45RA^{dimm}RO⁺(CD45RA^{dimm}RO)。これらの異なる集団は、その後、CD16、CD69、CD62L、CD57及びCD107aの発現および細胞サイズ/粒度(FSC/SSC)について分析した。

40

【0072】

インビトロCD107aの脱顆粒アッセイ

PBMCの精製およびNK細胞の定量化後、300万個の細胞を、37℃で4時間、最終500µl(10%FBSおよび10u/mlのIL2を含むRPMIグルタマックス

50

）体積中、10：1の：エフェクター（NK細胞）：ターゲットの比率でターゲットK562細胞とインキュベートした。培地は、1.5μlの抗CD107aは抗体（BD Biosciences社、フランクリンレイクス、ニュージャージー州）及びCD107a分解を防止するため1μlのモネンシンを含んだ。その後、細胞を、抗CD45RO-FITC、-CD69-PE、-CD19-ECD、-7AAD、-CD56-PECy7、-CD3-APC、-CD45RA-APCAlexaFluor750、-CD107a-HV500及び-CD16-KO抗体（BD Biosciences社、ベックマン）を含む抗体カクテル50μlに再懸濁された。いくつかの実験では、PBMCを標的細胞にも暴露する前に、抗CD69及び-CD45RA抗体と共にインキュベートした。サンプルは、Kaluzasoftウェアを用いた、ベックマンコールターFACS Galliosで分析した。イベントは、最初にリンパ球を識別するために、前方および側方散乱（SSC）でゲートしました。CD3に対するCD56の二変量プロットは、10,000以上のNK細胞を取得するために使用した。

【0073】

細胞表面や細胞内マーカーのための多色染色

PBMCの精製後、100万個の細胞は、15分間、室温で10%正常ヒト血清とのインキュベーションによりプレブロックされ、それから50μlの細胞表面マーカーに対するPANELのKi-67抗体カクテル（抗CD45RO-FITC、-CD69-PE、-CD19-ECD、-CD3-PE-Cy5.5を、-CD56-APC、-CD45RA-APCAlexaFluor750、-Ki-67及び-CD16-KO抗体）（BD Biosciences社、ベックマン）で染色した。細胞を、染色緩衝液で2回洗浄し、20分間4℃で250μlBD Perm/Wash溶液に再懸濁した。細胞をBD Perm/Wash溶液で2回洗浄した。次に、細胞を暗所で4℃で30分間、図で説明したように、細胞内マーカーに対する抗体のカクテルを含む50μlBD Perm/Wash溶液中で固定及び透過処理をした。細胞をBD Perm/Wash溶液で2回洗浄し、染色緩衝液に再懸濁した。その後Kaluzasoftウェアを使用したベックマンコールターFACS Galliosフローサイトメトリー分析を行った。イベントは、最初にリンパ球を識別するために、前方および側方散乱（SSC）でゲートしました。CD3に対するCD56の二変量プロットは、10,000以上のNK細胞を取得するために使用した。

【0074】

EBV細胞培養：

K562細胞株（ATCC CCL243）、およびリンパ芽球様EBV細胞株PLH（IHW番号：9047）は、10%ウシ胎児血清（FBS）（Gibco）RPMI 1640培地（Gibco（登録商標）GlutaMAX™培地）中で対数増殖で維持した。細胞は、空气中5%のCO₂の加湿チャンパー内で37℃で培養し、および1週間に2回1：10に継代した。

【0075】

純粋な単一のNK細胞の同定

一次CD56+NK細胞は、CD56+NK細胞単離キット（Miltenyi Biotech社、オーバーン、CA、USA）を用いてB細胞リンパ腫の患者のPBMCから濃縮し、精製した。フローサイトメトリーによるCD56+NK細胞の純度（CD56+CD3-の%）は、>90%であった。精製されたCD56+NK細胞は抗CD335（NKp46の）-PEで染色され、正式に抗CD45RA-FITC、-CD45RO-APC及び-CD19-VioBlueでNK細胞を同定した（trogoctosis可能なNK細胞の検出）。精製し、染色されたNK細胞は、DEPアレイ™システム（シリコンバイオシステムズ、メナリーニ）で分析されている。この新技術により、単一細胞を検出し列挙し、そして単一写真を撮ることができた。

【0076】

DEP Array（登録商標）プロトコール

10

20

30

40

50

製造業者の説明書および(Lianidouら、2013)に記載されるように細胞選別実験を行った。簡単に言えば、精製され染色されたNK細胞を緩衝溶液中に回収するため、DEP Arrayカートリッジを手動で、14 μ lのサンプルと800 μ lの緩衝溶液をセットした。DEP Arrayシステムにカートリッジをロードした後、サンプルの~9.26 μ lは自動的に細胞が自発的に個々の細胞がトラップされている16000電気ケージから成るあらかじめプログラムされた電界に編成されたカートリッジのマイクロチャンパー内にシステムによって注入された。画像は、4つの蛍光フィルタキューブ(FITC、PE、APCおよびDAPI/ヘキスト/VioBlue/PacificBlue)ごとにマイクロチャンパーの表面積全体を覆うフレームと明視野画像を捕捉した。キャプチャされた画像をデジタル処理してオペレータによって目的の細胞の選択を可能にするソフトウェアモジュールに提示された。

10

【0077】

インビトロNK細胞刺激プロトコル

PBMC 1.10⁶細胞/mlを、高用量IL-2(1000U/ml e Biosciences)で、又はIL-2(100U/ml)及びIL-15(5ng/ml、ミリテニー)と共にリンパ芽球様EBV細胞株PLHで、10日又は20日間刺激した。

【0078】

統計

図面に示される全ての実験は、少なくともそれぞれの6人の悪性腫瘍患者と同じ数の健康なドナーからのサンプルを用いて行った。

20

【0079】

結果：

CD45は、成熟ヒトNK細胞のマーカーである

高CD45の発現は、他のリンパ球の種類(26)のようにヒトNK細胞でも細胞成熟のマーカーであるかどうかを決定するために、我々は、PBMCから誘導されたヒトのリンパ球(T、BおよびNK細胞)の3種類でCD45の発現を解析した。B及びT細胞がCD45発現の匹敵するレベルで、比較的均一な集団を示しました。CD56^{bright}(従って比較的未熟な)NK細胞はCD45がリンパ球の成熟のマーカーであるという概念と一致して、低い総CD45発現を示した。非常に少数がCD45ROを発現したのに対し、ほとんどのNK細胞およびB細胞は、CD45RAを発現した。対照的に、多数のT細胞集団は、CD45RO代わりにCD45RAを発現した。

30

【0080】

私たちは、その後、既知のNK細胞マーカーとの総CD45発現の関連性を分析した。NK細胞におけるCD45発現はKIR、CD158a及びCD158b及びCD16の発現(NK細胞成熟のマーカー(14、34))と関連していた。逆に、CD45の発現は、CD25(細胞増殖マーカー)に対して陽性の細胞中で低かった。CD45陽性細胞はまた、CD45陰性細胞よりも、NK細胞の細胞溶解活性(35)に関連付けられているより頻繁にCD69を発現した。これらの結果は、NK細胞において、総CD45の発現は主にCD16とのKIRなどのNK細胞成熟マーカーの高い発現、ならびにCD56およびCD25の低発現(未成熟NK細胞のマーカー)に関連していることを示している。

40

【0081】

in vivoでの異なるCD45アイソフォームの発現：健康なドナー

以前の結果は、NK細胞は、T細胞と比較して、ほとんどCD45ROを発現しないことを示している。健康なドナーからのNK細胞の細胞表面マーカーの発現の詳細な分析は、NK細胞の大部分がCD45RA⁺CD69⁻細胞とわずが5%がCD69を発現したことを示した。低いCD45RA発現(CD45RA^{dim})のNK細胞の4%中、わずが1%が、CD69⁺であった。さらに、CD56およびCD16の発現に基づいて、CD45RA⁺RO⁻(CD45RA)が完全に成熟した細胞と考えられる一方、CD45RA^{dim}RO⁻(CD45RA^{dim})細胞は一貫して未熟な集団であることがわかった。

50

非常に少数の $CD45RA^+RO^+$ ($CD45RARO$) 細胞が $CD56^{dim}CD16^+$ である一方、 $CD56^{dim}RO^+$ ($CD45RA^{dim}RO$) 細胞は $CD56^{dim}CD16^{dim}$ であることがわかった。これらの結果は、 $CD45RA$ および $CD45RO$ の発現は健康なドナーにおけるNK細胞の成熟と関連していることを示唆している。

【0082】

in vivoでの異なるCD45アイソフォームの発現：同種移植患者

我々は、次に、NK細胞集団をドナーの造血幹細胞から再構成した人に同種移植患者におけるNK細胞のプロファイル調べた。これらの患者では、 $CD45RO$ および/または $CD45RA^{dim}$ NK細胞は、健常対照よりも豊富であり、両方のマーカーがグラフ中にプロットされた時、彗星様の形状を生成する。期待通り、同種移植患者から血液試料中において、未成熟NK細胞の数が、 $CD56$ と $CD16^-$ であり、彼らはデノボで作製されたNK細胞であり、活性化後 $CD56$ 発現を獲得した $CD56^{bright}$ 細胞はないことを示唆する。*in vivo*での成熟中に $CD56^{bright}$ 細胞はパーフォリンを産生する $CD56^{dim}CD62L^+CD57^-$ 細胞になり、一方サイトカインに応答して、高IFN- γ 産生を維持する (12、36)。それから $CD56^{dim}CD62L^-CD57^+$ 細胞はサイトカインに低い応答性と高い細胞傷害能を示す (12、37)。実際に、 $CD16$ の発現とは独立して、同種移植患者で、 $CD62L$ の発現は、 $CD56^{bright}$ 細胞の方が、 $CD56^{dim}$ 細胞より高かった。そして $CD57$ 発現の密度が、 $CD56^{dim}$ 細胞の方が、 $CD56^{bright}$ 細胞の方がより高かった。また、同種移植患者からのすべてのNK細胞集団は、健常ドナーと比較して、 $CD45RA^{dim}$ 、及び $CD45RO$ 細胞に濃縮されていた。しかし、 $CD45RA^{dim}$ 細胞のパーセンテージは健康なドナーで観察されるように、より成熟したNK細胞サブセットにおいて、より減少した。

10

20

【0083】

in vivoでの異なるCD45アイソフォームの発現：血液悪性腫瘍の患者

先に説明した患者は、異なる血液癌の治療として、骨髄移植をした。すべてのこれらの患者では、 $CD45RO$ および/または $CD45RA^{dim}$ NK細胞は、健常対照よりも豊富だった。特に、いくつかの $CD45RA$ 細胞は、 $CD45RO^+$ でもあった。そこで我々は、 $CD45RA$ 発現の減少を伴う未成熟NK細胞の集団に加えて、いくつかのNK細胞は、標的腫瘍細胞によって活性化されている可能性があるという仮説を立てた。そこで我々は、異なる血液悪性腫瘍を有する患者のNK細胞のプロファイル調べた。

30

【0084】

以前に健康なドナーについて記載されたように、NK細胞は、主に成熟した $CD45RA$ 細胞であり、特に未成熟NK細胞サブセットに見出される $CD45RA^{dim}$ 細胞をほとんど伴わない。 $CD45RARO$ 細胞は全NK細胞のおよそ0.2%程度を占めた (図1上のパネル)。多発性骨髄腫 (MM) 患者からの血液サンプルは4倍以上の $CD45RA^{dim}$ 細胞と、驚くべきことに、一般的に $CD45RA$ 発現が維持された $CD45RO$ 細胞を約5%含んでいた (図3A中央パネル)。MMは、骨髄中の腫瘍細胞の蓄積によって特徴付けられているので、我々はまた、腫瘍細胞との緊密な接触にあるべき骨髄NK細胞は、多くのNK細胞を循環させるよりも活性化されたかどうかを調べた。その結果、これは、 $CD45RA^{dim}$ および $CD45RO$ 細胞のパーセンテージは血液と骨髄サンプルで同様であるケースではなかった (図1のA、中段、下段のパネル)。

40

【0085】

また、MM患者からのNK細胞のサブセットは、サイズ (FS) が大きく、高い粒度 (SS) でした (図1B)。この集団は、 $CD56^{dim}CD16^+$ サブセットにほぼ独占的に属する $CD45RARO$ 細胞に主に対応していた (図1A及び図1B下のパネル)。これら $CD45RARO$ 細胞の大きなサイズ (FS) および粒度 (SS) は、サイズと粒度がわずかに $CD45RA^{dim}RO$ 細胞 (主に $CD56^{dim}CD16^{dim}$) でも増加したものの、彼らは、他のNKサブセットに比べて高い代謝活性を有することを示唆している (IB)。逆に、 $CD45RA^{dim}$ 細胞は、低FSとSSの値を持っており、明らかに未熟な画分に濃縮された。

50

【0086】

CD45RA^{dim}およびCD45RO集団における同様の増加は、急性骨髄性白血病（AML）、B細胞慢性リンパ球性白血病（B-CLL）及びB細胞リンパ腫（BCL）のような他の血液癌を有する患者からの血液サンプルにおいても観察された（補足図1）。要約すると、健常対照と比較して、血液悪性腫瘍の患者からのすべての分析されたサンプルで、CD45RA集団は減少し、CD45RA^{dim}、CD45RA^{dim}ROとCD45RARO細胞分画は増加した（図1C）。

【0087】

最後に、我々は、血液のがんを有する患者と健康なドナーをからの試料中の4つのNK細胞の発達段階で異なるCD45アイソフォームの発現を定量化した（CD56/CD16の発現に基づき）（図1D）。健康なドナーにおいて、未成熟画分には15%のCD45RA^{dim}細胞が含まれており、一方この集団は、NK細胞の完全に成熟したサブセットに、基本的には存在しなかった。しかし、CD45RARO細胞は、もっぱら、成熟区画に見出された。（腫瘍タイプとは独立して）血液癌を有する全ての患者においてCD45RA^{dim}RO細胞は成熟NK細胞区画において増加した。CD45RA^{dim}RO細胞は未成熟の区画で増加し、CD45RARO細胞は、特に、最も成熟したNK細胞のサブセットで強く増加した。事実、血液癌を有する患者由来のCD56^{dim}CD16⁺NK細胞サブセットにおけるCD45RA^{dim}及びCD45RARO集団の強い増加は、明らかに健康なドナーからそれらを区別できるものであり、診断ツールとして使用することができる。

【0088】

in vivoでの異なるCD45アイソフォームの発現：CMV-再活性化を伴う患者

我々は、ウイルス感染のような、NK細胞の活性化をもたらす他の条件が、類似の表現型を生じさせることができるかどうかを検討した。そこで我々は、腎移植後のCMV感染の再活性化のある（CMV+）または、ない（CMVneg）患者からのPBMC試料を分析した。CMVの再活性化は、NK細胞の総数の増加を誘導した（図2A）。また、CMV+患者は、CMVneg患者に比べ、CD56^{dim}CD16^{dim}細胞の増加を示し、同時にCD56^{bright}サブセットの減少を示した（図2B）これらの変化の理由は、上述したように、私たちに明らかではないが、例えばCMV誘導性のNK細胞の成熟（38）、またはCMV感染細胞内の異なるNK細胞マーカーの発現に及ぼす影響など、さまざまな要因に起因する可能性があり、以前脱落膜（decidual）NK細胞として記載されている（39）。これらの変化は、CD45アイソフォームの発現パターンの小さな変動、主にCD69およびCD45ROも発現するCD45RA^{dim}の増加に付随していた（図2C）。これらの結果は、ウイルスによって活性化されたNK細胞におけるCD45アイソフォームの発現パターンは血液癌と異なることを示している。とりわけ、CD45RARO細胞は、血液癌を有する患者からの試料中に主に存在しているのに対し、同種移植またはウイルス感染患者のわずかな割合しか示さない。

【0089】

CD45アイソフォーム及びCD69発現の関係

CD69の発現は、NK細胞の刺激後に増加し、生体内を含め（6）、NK細胞活性化（17）の真正なマーカーと考えられている。健康なドナーにおいて、CD69は、主に、完全に成熟したCD56^{dim}CD16⁺細胞で発現していた（図3A）、一方、血液癌の患者において、CD69⁺細胞は他のNK細胞サブセットにおいても検出した（図3A）。実際、このような患者では、CD69の発現は、健康なドナーと比較して、それらの成熟とか関係なく、全てNKサブセットに観察された（図3B）。患者における異なるCD45集団におけるCD69発現の分析は、健常対照と比較して、CD69およびCD45ROを共発現するCD45RAおよびCD45RA^{dim}は多くの量の存在があることを示した（図3B及びC）。CD45RO⁺細胞は、主にCD69⁺であったが（図3C）。しかし、逆は真ではなく、大半のCD69⁺細胞はCD45ROでなかった。健常ドナーのCD45RO⁺細胞の非常に少ない量は、この集団のいずれかの意味のある分析を

10

20

30

40

50

排除しました。

【0090】

健康なドナーでは、CD45RA^{dim}細胞は、主にCD69⁻であった(図3B及びD)。CD45RA^{dim}細胞は有意に患者において増加し、多くはまた、CD69⁺であった。しかし、CD45RA発現の減少は、必ずしもCD69発現の増加と関連していなかった。実際には、患者のサンプルは、特にCD45RA^{dim}CD69⁻とCD45RA⁺CD69⁺に富み、低い範囲で、CD45RA^{dim}CD69⁺細胞に富んでいた。AML患者からの血液サンプルは入手できなかったため、我々は、骨髓(bm)のサンプルを使用し、同様の結果を得た(図3C及びD)。MM患者からの骨髓が同様のパターンを示しました。残念ながら、我々は、健康なドナーからの骨髓サンプルを分析することができなかったので、我々はしっかりと血液学的悪性腫瘍及び健康ドナーの患者から骨髓サンプルにおけるNK細胞のプロファイルは、血液サンプルのように、異なっていることを結論付けることはできない。しかし、NK細胞集団は、MMを有する患者からの血液および骨髓試料で類似している知見は、血液に見られる健康なドナー～患者間の差はまた、骨髓中に存在することを示唆している。

10

【0091】

結論として、患者は、全てのNK細胞サブセットにおけるCD69発現の増加を示したが、CD69⁺細胞の相対的な割合は、CD45RA^{dim}細胞よりもCD45RA細胞で高かった(図3B)。これらのデータは、CD45RAのダウンレギュレーションおよびCD45ROのアプレギュレーションと一緒にCD69のアプレギュレーションは、NK細胞の活性化と互換性があることを示唆し(図3A)、一方CD45RA^{dim}細胞は大半が未熟集団(CD56^{bright}およびCD56^{dim}CD16^{dim})であった。この見解は、CD45RA発現の損失及びCD69発現の獲得は、2つの異なる生理学的プロセスを特定し、これら2つの集団は、異なる機能を持っているかもしれないことを示唆する。逆に、異なるNK細胞サブセットにおけるCD69発現は、CD45のアイソフォームの発現と比較し、血液学的悪性腫瘍の患者の識別を改善しなかった。

20

【0092】

異なるCD45アイソフォームの発現は、ex vivoで異なるNK細胞機能を同定する

異なるNK細胞サブセットの機能を同定するために、最初に我々は、抗CD107aの抗体でPBMCのex vivo染色を行い、細胞の脱顆粒を評価した(図4A)。健康なドナーにおいては、約40×10³細胞/百万NK細胞のCD107a⁺であった。これらの細胞の大部分は、CD69⁺または-のいずれかであるCD45RAであり、CD45RO⁺細胞を含んでいた。驚くべきことに、すべてのCD45RAROおよびCD45RA^{dim}RO細胞のほとんどは、CD107a⁺であった(図4B)。全体的に、CD107aの発現は、CD69⁻細胞よりもCD69⁺細胞の中でより多く観察され、CD45RAのダウンレギュレーションは、CD107a発現に関連していなかった。

30

【0093】

血液癌を有する患者由来のNK細胞はCD107a⁺の大きな増加を示した(図4A)、特にCD69⁺および/またはCD45RO⁺サブセットにおいて、特にこれらの患者において増加していた。また、CD107a⁺細胞の割合は、CD69⁻よりもCD69⁺で高かった、一方、CD45RA発現の減少は増加した脱顆粒と関連していなかった(図4B)。健康なドナーと同様に、CD45RARO⁺CD69⁺及び、低い割合であるが、CD45RA^{dim}RO⁺CD69⁺画分は、大半が脱顆粒した細胞を含んでいた。これは、循環するNK細胞を除くものではなかった、なぜなら、同様の結果がMMとAML患者の骨髓サンプル由来のNK細胞についても得られたからである(図4C、上パネル)。

40

【0094】

我々は、次に、細胞にトランスフェリンからの鉄の送達のために必要とされるトランスフェリン受容体タンパク質1(TfR1またはCD71)の発現を評価した。鉄は、酸素

50

輸送、エネルギー代謝およびDNA合成のような基本的な生化学的活性のための補因子であるので、CD71の発現は、高度に代謝細胞において増加する(40)。CD45RA RO細胞の高い代謝活性と一致して(図4B)、CD71の発現は、健常対照者と血液悪性腫瘍患者の両方のCD45RO⁺細胞においてより高かった(図4D)。また、これらの細胞のほとんどはまた、増殖マーカーのKi-67を発現した(図4E)。CD71およびKi-67の発現も、CD69⁻サブセットより、CD69⁺サブセットで適度に高かった。

【0095】

結論として我々の結果は、CD45RO⁺細胞(特にCD45RAも発現する場合)、CD69発現を得、より大きくより高い粒状性と代謝を有し(図4D)、増殖し(図4E)および脱顆粒した(図4B)。これらの知見は、CD45RARO細胞、おそらくCD45RA^{d i m}RO細胞が、腫瘍細胞を認識し、脱顆粒するNK細胞であることを示す一方、CD45RARO CD107a⁺細胞は、主にCD56^{d i m}CD16⁺画分に属し、CD45RA^{d i m}RO CD107a⁺細胞は、主にCD56^{d i m}CD16^{d i m}細胞であることを示す。

【0096】

血液癌の患者から他のNK細胞サブセットは、インビトロでK562細胞に対する細胞溶解活性を示す

血液癌の患者から他のNK細胞サブセットは、脱顆粒における固有の欠陥を持っているかどうかを調べるために、我々は、K562標的細胞と共に健康なドナーまたは患者からのPBMCをインキュベートした。健康なドナーには、ex vivoですでに高かった、脱顆粒するCD45RO⁺細胞の数は、ほぼ100%に増加した。CD107a⁺細胞の割合は、特にCD45RA^{d i m}サブセットとCD69⁺サブセットで増加していた。同様に、血液悪性腫瘍の患者からのすべてのNK細胞集団はまた、脱顆粒する能力、特にCD45RA^{d i m}細胞を脱顆粒する能力を特に保持していた。

【0097】

しかし、我々の分析では、4時間標的細胞とのインキュベーション後、CD69および/またはCD45アイソフォームの発現が変更された可能性があるので、脱顆粒したCD69⁻またはCD45RA^{d i m}細胞の割合を低く見積もることができた。私たちは、このようにして、最初にPBMCを抗CD69及び-CD45RA抗体と共にインキュベートし、基底NK細胞の表現型を決定し、そしてその後、我々は、K562細胞への曝露後の、CD107aの発現を分析した(補足図2)。実際に、標的細胞との接触前のNK細胞のプロファイルは、ex vivoで観察された表現型と類似しており、これは効率的なアプローチであったことを示す。標的細胞とin vitroインキュベーション後(4時間)、CD69⁺細胞の数が急速にCD45RAおよびCD45RA^{d i m}の両方の集団で増加した(両方のサブセットで約100%増)。しかし、CD45RAおよびCD45RA^{d i m}細胞の全体的な割合は、この時間の間に安定なままであった(補足図2)。我々は、健康なドナーからのCD69⁻NK細胞の脱顆粒は図7Aに示したより高かったことがわかった(図7C)。活性化された細胞は、おそらく同時にCD69とCD107aの発現を得た。これは、その細胞の大部分が脱顆粒化していた、血液癌を有する患者由来のNK細胞が、最初CD69⁻細胞であったことからより明らかであった。標的細胞への曝露後のCD69発現を獲得したCD45RA^{d i m}細胞は、主にCD56^{d i m}CD16^{d i m}と完全に成熟したCD56^{d i m}CD16⁺であった。要するに、CD45RA^{d i m}細胞はまた、少なくともCD69およびCD107a発現を得て、刺激に応答することができる。

【0098】

CD45RARO NK細胞は、インビボでトロゴサイトーシスを行った

CD45RARO細胞がインビボで抗腫瘍活性を実行したかどうかを調べるために、これらの細胞が、腫瘍標的に対してトロゴサイトーシスを実行したか調べた。トロゴサイトーシスは、リンパ球が相互作用する細胞からの表面分子を抽出し、それらを自分自身の表

10

20

30

40

50

面上に発現し、Bリンパ芽球性白血病(B ALL)の*ex vivo*で観察されているプロセスのことである。この実験では、我々は他の細胞型のマーカーを研究しているため、我々は、NK細胞を識別するために、二重標識を使用し、CD56⁺NKp46⁺細胞にゲートした。我々は、BCL患者由来のNK細胞の14%は、それらの膜(図5A)におけるBCLマーカーCD19を発現することを観察した。この値は、CD45RA^{RO}集団だと、52%に増加し、それが他の集団においてははるかに低かった。集団は主にCD45RA^{d i m R O}だが、NK細胞はまた、骨髄性マーカーCD14を低いレベルの発現で得た。しかし、両方のマーカーについて陽性に染色されたNK細胞は非常にまれであった。これは、二つの異なるNK細胞集団はトロゴサイトーシスを実行し、CD45RA^{RO}は腫瘍細胞にそれをしていたことを示唆した。私たちは、別のCD19⁺疾患:B-CLLにおいて類似した結果を観察した(補足図3)。NK細胞は、すべての腫瘍において、CD19を得なかったことを除外するために、我々は、AML患者からのNK細胞を調べた(図5B)。NK細胞の約10%は、AMLマーカーCD14を発現し、わずか3%が、すべてのNK細胞集団で発現したCD19を発現した。これとは対照的に、CD45RA^{RO}の90%は、CD14を発現し、AML患者のCD14⁺集団において大規模なトロゴサイトーシスを実行していることを示した。要約すると、我々のデータは、NK細胞は、腫瘍細胞上でトロゴサイトーシスを行い、およびCD45RA^{RO}集団がその原因であることを示した。したがって、CD45RA^{RO} NK細胞の使用は、血液癌患者(この集団が存在する場合)および疾患の種類(膜に発現マーカー)を同定するための診断ツールとして使用することができる。

【0099】

CD45RA^{RO}集団の表現型の特徴

CD45RA^{RO}細胞は、CD56⁺CD16⁺サブセットに属し、主に成熟マーカーCD57を発現しているものの、半分がCD67Lを共発現した。CD45RA^{RO}集団は、KIRを発現する細胞をより高い割合で含んでいるものの、それはCD158eのみ統計的に有意であった。Gzmb⁺細胞の割合は、他のサブセットと同様であったが、このサイトカインの細胞内レベルは低かった。これは、生産の欠損または細胞内貯蔵を空にした最近の脱顆粒によるものである可能性がある。CD45RA^{RO}細胞はまた、受容体サブファミリーB、メンバー1(KLRB1)または天然の細胞毒性レセプター(NCR)NKp46のと活性化NKG2D受容体のわずかに高いレベルのようなCD161/キラー細胞レクチン別の成熟マーカーのCD45RAよりも同様のレベルで発現した。しかし、彼らは、CD94糖タンパク質とおそらく、抑制性NK受容体NKG2Aを低いレベルを示した。要約すると、CD45RA^{RO}細胞は、主に成熟細胞のNK受容体を発現する完全に成熟したNK細胞である。

【0100】

CD45RA^{RO}集団の代謝特性評価

活性化リンパ球は、一般に、そのサイズを大きくし(Skak et al., 2008; Zarccone et al., 1987)、高度に代謝的に活性な細胞になる(Sanchez-Martinez et al., 2015; Sanchez-Martinez et al., 2014)。セリン/スレオニンキナーゼmTORは、おそらくNK細胞の活性化後、代謝シフトおよび細胞骨格組織とリンクする。我々は、より大きなサイズ(FS)で、高い粒度(SS)を有し、CD45RA^{RO}細胞に対応するMM患者からのNK細胞のサブセットを観察した(図7A)。これは、それらが、他のNKサブセットと比較してより高い代謝活性を有している活性化した細胞であることを示唆した。したがって、我々は、エプスタイン・バーウイルス(EBV)リンパ芽球細胞株PLHと共にそれらをインキュベートすることによりインビトロでNK細胞を活性化した。NK細胞の生存を支持するために、我々は、低濃度の、二つのNK細胞活性化サイトカイン:IL-2(100U/ml)およびIL-15(5ng/ml)を添加した(Anel et al., 2012)。我々は、長期の活性化を反映するために最大20日間、NK細胞をインキュベートした。以前の報告(Skak et al., 2008; Zarccone et al., 1987)と一致して、10日間の活性化は、20日目により適切であったサイズ(FCS)および粒度(SSC)の増加を誘導し

た。

【0101】

*in vitro*での活性化の3日後に、NK細胞は、CD45RAを失い始めた。実際にCD45RARO集団が現れたのか、あるいは細胞がCD45ROを得、CD45RAを失ったのかは疑問が残った。最初の活性化の10日後、ほとんどの細胞がCD45RA⁻CD45RO⁺であった。しかし、20日目でCD45RARO集団は、培養中に現れた。これは、アクセサリ細胞の存在を否定するものではない。なぜなら、サイトカインとの長期的な活性化は同様のパターンを生成したからである、要約すると、CD45RARO NK細胞はまた、長い活性化の後に、*in vitro*で存在する。次に、私たちは、患者CD45RARO集団の*in vitro*での活性化を評価した。サイトカイン誘導活性化を三日間行うと、CD45のアイソフォームの発現に強い転位が誘導され、個々の集団の存在を評価することは不可能だった。これらの結果は、さらにCD45RARO細胞は、少なくとも*in vitro*で、彼らのCD45表現型を変化させることが示唆された。

10

【0102】

我々は、次に、細胞にトランスフェリンからの鉄の送達のために必要とされるトランスフェリン受容体タンパク質1 (TfR1またはCD71)の発現を評価した。鉄は、酸素輸送、エネルギー代謝およびDNA合成 (Wang and Pantopoulos, 2011)などの基本的な生化学的活性のための補因子であるため、CD71の発現は、アクティブな代謝細胞内で増加する。CD45RARO細胞の高いFSとSSによって示唆される優れた代謝活性と一致して、CD71の発現は健常対照者と血液悪性腫瘍の患者の両方において、CD45RO⁺細胞の方が高かった (図7B)。また、これらの細胞のほとんどはまた、増殖マーカーのKi-67を発現した (図7C)。要約すると、CD45RARO細胞は増殖中、高度な代謝細胞のNKのサブセットを表す。

20

【0103】

CD69発現はNK細胞刺激後増加し、*ex vivo* (Vey et al., 2012)を含むとは、NK細胞の活性化 (Elpek et al., 2010)の真正なマーカーと考えられている。患者における異なるCD45集団におけるCD69発現の分析は、CD45RO⁺細胞は主にCD69⁺であることを示した (図7D)；しかし、反対に、ほとんどのCD69⁺細胞はCD45ROではなかった。CD45RO⁺細胞は健常ドナーにおいて非常に少なく、この集団のいずれかの意味のある分析することができなかった。

30

【0104】

健康なドナーでは、CD45RA^{dim}細胞は、主にCD69⁻だった (図7E)。CD45RA^{dim}細胞は有意に患者において増加し、多くはまた、CD69⁺であった。しかし、CD45RA発現の減少は、必ずしもCD69発現の増加と関連していなかった。実際、患者のサンプルは、特にCD45RA^{dim}CD69⁻とCD45RA⁻CD69⁺細胞が豊富であり、わずかではあるが、CD45RA^{dim}CD69⁺が豊富だった。この知見は、CD45RAの損失およびCD69発現の獲得は、2つの異なる生理学的プロセスを特定し、これら2つの集団は、異なる機能を持っているかもしれないことを示唆している。

40

【0105】

CD45RARO集団の機能解析

異なるNK細胞サブセットの機能を同定するために、最初に我々は、抗CD107aの抗体を用いたPBMCの*ex vivo*での染色によって細胞の脱顆粒を評価した (図8A)。健康なドナーにおいて、1%程度のNK細胞はCD107a⁺だった。これらの細胞のほとんどは、CD45RAであり、少数がCD45RO⁺細胞であった。驚くべきことに、ほとんどのCD45RAROおよびCD45RA^{dim}RO細胞の半分がCD107a⁺であった (図8B)。

【0106】

血液癌を有する患者由来のNK細胞はCD107a⁺細胞の大きな増加を示し、特にこ

50

これらの患者において特異的に増加するCD45RO⁺サブセットで増加した(図8A)。CD45RA発現の減少は、増加した脱顆粒と関連していなかった(図8B)。健康なドナーと同様に、CD45RAROと、より低い程度ではあるが、CD45RA^{d i m}RO画分で、脱顆粒した細胞をおもに含んでいた(図8B)。これら2つの集団のCD107a-MFIの中央値は、主にCD45RO⁻集団に比べて増加した。同様の結果は、MMおよびAML(図8Bおよび8C上のパネル)患者の骨髓サンプル由来のNK細胞についても得られたので、これは、NK細胞を循環の否定するものでなかった。対照的に、CD45RARO細胞は低いGzmb含量を示しました。CD45RARO細胞は、最近、*in vivo*で脱顆粒したというのが、我々の見解である。

【0107】

CD45RARO細胞は、標的細胞としてK562を用いた*in vitro*分析の後に、より高い脱顆粒率を示し続けた(図8C下のパネル)が、他の集団は有意に脱顆粒を増加させた。興味深いことに、異なるCD45NK細胞サブセットは、*in vitro*細胞毒性アッセイで4時間後に変化しなかった。これと*in vitro*での活性化の結果は、CD45RAおよびCD45ROの発現が、短時間で安定しているが、長期的な活性化の後に変化しうることを示している。

【0108】

討論：

新規のヒトNK細胞集団の同定は、それらの生理学を理解するため、および診療所での治療的使用を改善するために重要である。ここでは、異なったNK細胞集団の同定はまた、宿主の生理学的状態に関する貴重な情報を与えることができることを示している。実際、CD45RA^{d i m}及びCD45RO⁺細胞が成熟した区画内の多く存在することは、明らかに血液悪性腫瘍の患者を識別する。そこで我々は、これらの特定のNK細胞集団は、標的腫瘍細胞を除去すると減少するはずであるので、それらの検出は、血液癌の診断ツールとして使用することができ、また、抗腫瘍治療の有効性を評価すると仮定している。

【0109】

宿主免疫系が損なわれる場合白血病が向上する(41、42)。その他には、我々はいくつかのマウスモデルにおいて、血液由来腫瘍を根絶するための完全に機能するNK細胞の必要性を示しており(43-48)、NK細胞の浸潤はいくつかの癌で良好な予後と関連していることを示した(49-51)。アロ反応性(同種抗原反応性)NK細胞の使用は、新たな癌治療、特異的に、造血起源の腫瘍のための癌治療を提示しうる。実際、主にNK細胞アロ反応性に基づく、移植片対宿主(GvH)方向のKIR-KIRリガンドの非互換性は、臨床で無関係な臍帯血幹細胞移植(UCBT)後の成果を改善する(52、53)。また、NK細胞は：i)はGvH病(GVHD)の原因ではなくii)「分化」細胞として注入することができるので、長い時間患者の体内で生き残るために必要はなく；iii)おそらく、BおよびT細胞、マクロファージや、より重要なのは、多形核細胞に対する免疫調節効果によって(54)、日和見感染症(52)から保護する。我々は、その分析のための有効な方法がないため、インビボでのNK細胞活性化の評価は困難である。CD69の発現は、日常的に使用されている(6、17)。しかしながら、我々の結果は、CD69発現が、NK細胞の抗腫瘍活性の最も重要な成分であると考えられている、脱顆粒、および細胞溶解活性を意味するものではないことを示している(12)。逆に、私たちの研究は、CD45ROの発現が、血液悪性腫瘍の患者で脱顆粒しているNK細胞サブセットを識別することを示している。我々は、腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体のような、NK細胞活性をも伴う効率的な抗腫瘍治療は、これらのNK細胞集団を増やすと考えている。

【0110】

また、臨床においてアロ反応性NK細胞の標準的な使用をする前に最も重要な未解決問題は、臨床的に効率的な抗腫瘍活性を示す細胞の十分な数の移植である。この目的のために、異なるNK細胞集団およびそれらの細胞溶解活性を同定することは重要である。ここで、我々は、CD45のアイソフォームの発現は、この課題を容易にし、脱顆粒がCD4

10

20

30

40

50

5 R A R O 集団において増強されることを示している。したがって、自家NK細胞の増殖中CD45RO⁺サブセットを増加させるプロトコルは、より良い臨床結果を与えられると思われ。

【0111】

CD45活性は、二量体化によって調節され、細胞膜での自発的なCD45のホモ二量体は、その活性を阻害する(55)。CD45細胞外ドメインの大きさは、CD45の二量体化の程度、したがって自己阻害に反比例する(55)。CD45RAのような、より大きなCD45アイソフォームは、あまり効率的に二量体化せず、したがって、CD45RO(19)のような小さいアイソフォームよりTCRシグナル伝達を促進すると思われる。しかしながら、CD45の活性はまた、細胞膜局在で、したがって、その細胞外領域に依存する(19、56)。少なくともT細胞において、高すぎるCD45活性が、Srcのキナーゼで活性化残基の脱リン酸化につながるのに対して、低すぎるCD45活性は、阻害残基のリン酸化を残す可能性がある。したがって、CD45活性が特定のウィンドウ内に残り(26)、特定のCD45のアイソフォームの量が最終的な活性を調節することが、効率的なNK細胞の活性化のために重要である。我々はCD45RARONK細胞は、最大の細胞溶解活性を示すことを見出し、これはCD45RAおよびCD45RO両方のアイソフォームの発現が、NK細胞にそれらの細胞溶解活性を増強するための効率的なシグナリングのためのCD45活性の適切なレベルを与えるかもしれないことを示唆している。これは、CD45は、NK細胞の完全な細胞毒性活性のために必要とされる、マウスにおけるインビボでの結果と一致している(57)。しかし、CD45は、インビトロにおけるNK細胞の細胞毒性のために必要とされていない(31-33)。一致して、我々はまた、インビトロで異なるCD45アイソフォームを発現する他のNK細胞サブセットにおいて、細胞傷害活性を示すことを観察した。

10

20

【0112】

また、別のCD45アイソフォームの発現は、CD45リガンドの認識を変化させる。例えば、異なるCD45アイソフォーム上のO-グリカンの存在量および種類は、ガレクチン1(58)に対する細胞の感受性を調節する。腫瘍細胞によって豊富に産生されるガレクチン1は、T細胞媒介性細胞傷害性応答をブロックし(59)、胸腺細胞およびT細胞のアポトーシスを誘導する(58)。抗腫瘍NK細胞は、ガレクチン-1に対する耐性、またはCD45ROの発現を介して、他のリガンドに対する耐性に基いて選択されることが可能である。実際、O-グリカンは主にCD45細胞外ドメインに結合するので、短いCD45アイソフォームを発現する細胞は、CD45ROのように、比較的少数のO-グリカンを持つことになるので、ガレクチン1に対してより耐性になる。

30

【0113】

ex vivoで、我々は健康なドナーからの末梢血試料中のCD45ROを発現する非常に少数のNK細胞を発見した。これは、(30)で示唆されているようにCD45ROの発現は、メモリーNK細胞を同定する場合は特に、驚くべきことです。この知見は、メモリーNK細胞の量は、血液サンプル中の非常に低い可能性があること、またはCD45ROはメモリーNK細胞のマーカーではないかもしれないことを示唆しています。また、NK細胞におけるCD45RO発現は、具体的にex vivoでサンプル処理中に失われた可能性がある。我々は、NK細胞は、他のリンパ球のタイプよりも総CD45(図1)のわずかに高いレベルで発現するので、その可能性は低いと思っている。実際に、我々は、CD45ROは主にエフェクターNK細胞と関連していることを見出した。しかしながら、異なるほとんどのT細胞集団で観察されたものから、CD45RAダウンレギュレーションは、NK細胞の活性化のために必要とされていない。これは、NK細胞における異なるCD45アイソフォームの発現は、T細胞とは異なる役割を果たしていることを示唆している。

40

【0114】

参考文献：

本出願を通して、種々の参考文献は、本発明が属する技術分野の状態を記載する。これ

50

らの参考文献の開示は、本開示中に参考として援用される。

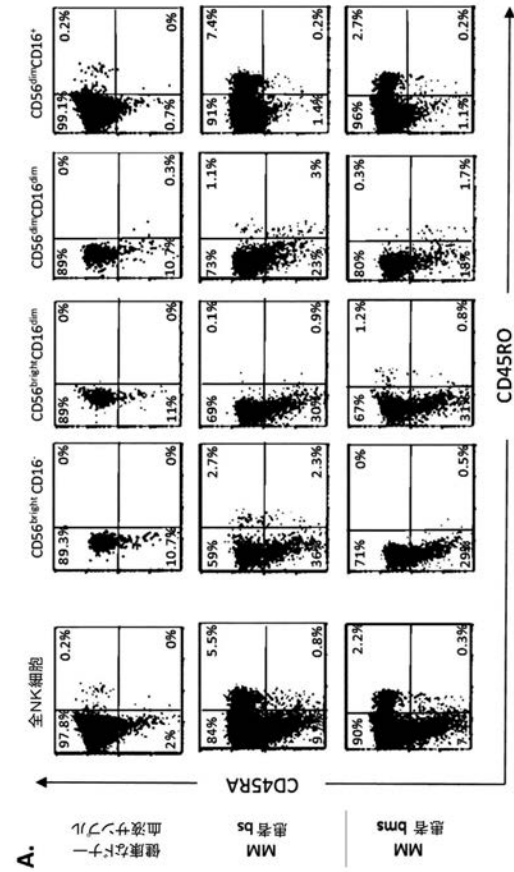
1. A. Velardi, Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol* 20, 581-587 (2008).
2. L. L. Lanier, Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495-502 (2008).
3. C. Baier, A. Fino, C. Sanchez, L. Farnault, P. Rihet, B. Kahn-Perles, R. T. Costello, Natural Killer Cells Modulation in Hematological Malignancies. *Frontiers in immunology* 4, 459 (2013).
4. M. Villalba, M. G. Rathore, N. Lopez-Royuela, E. Krzywinska, J. Garaude, N. Allende-Vega, From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 106-113 (2013). 10
5. M. Villalba, N. Lopez-Royuela, E. Krzywinska, M. G. Rathore, R. A. Hipskind, H. Haouas, N. Allende-Vega, Chemical metabolic inhibitors for the treatment of blood-borne cancers. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 14, 223-232 (2014).
6. N. Vey, J. H. Bourhis, N. Boissel, D. Bordessoule, T. Prebet, A. Charbonnier, A. Etienne, P. Andre, F. Romagne, D. Benson, H. Dombret, D. Olive, A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood* 120, 4317-4323 (2012).
7. D. H. McKenna, Jr., D. Sumstad, N. Bostrom, D. M. Kadidlo, S. Fautsch, S. McNearney, R. Dewaard, P. B. McGlave, D. J. Weisdorf, J. E. Wagner, J. McCullough, J. S. Miller, Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience. *Transfusion* 47, 520-528 (2007). 20
8. J. S. Miller, Y. Soignier, A. Panoskaltsis-Mortari, S. A. McNearney, G. H. Yun, S. K. Fautsch, D. McKenna, C. Le, T. E. Defor, L. J. Burns, P. J. Orchard, B. R. Blazar, J. E. Wagner, A. Slungaard, D. J. Weisdorf, I. J. Okazaki, P. B. McGlave, Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105, 3051-3057 (2005).
9. L. Ruggeri, A. Mancusi, E. Burchielli, F. Aversa, M. F. Martelli, A. Velardi, Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol* 19, 142-147 (2007). 30
10. J. E. Rubnitz, H. Inaba, R. C. Ribeiro, S. Pounds, B. Rooney, T. Bell, C. H. Pui, W. Leung, NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28, 955-959 (2010).
11. D. Sanchez-Martinez, E. Krzywinska, M. G. Rathore, A. Saumet, A. Cornillon, N. Lopez-Royuela, L. Martinez-Lostao, A. Ramirez-Labrada, Z. Y. Lu, J. F. Rossi, D. Fernandez-Orth, S. Escorza, A. Anel, C. H. Lecellier, J. Pardo, M. Villalba, All-trans retinoic acid (ATRA) induces miR-23a expression, decreases CTSC expression and granzyme B activity leading to impaired NK cell cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 49, 42-52 (2014). 40
12. Y. T. Bryceson, S. C. Chiang, S. Darmanin, C. Fauriat, H. Schlums, J. Theorell, S. M. Wood, Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *Journal of innate immunity* 3, 216-226 (2011).
13. C. I. Domaica, M. B. Fuertes, I. Uriarte, M. V. Girart, J. Sardanons, D. I. Comas, D. Di Giovanni, M. I. Gaillard, L. Bezrodnik, N. W. Zwirner, Human natural killer cell maturation defect supports in vivo CD56(bright) to CD56(dim) lineage development. *PLoS One* 7, e51677 (2012).
14. L. Moretta, Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood* 116, 3689-3691 (2010). 50

15. A. G. Freud, J. Yu, M. A. Caligiuri, Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Seminars in immunology* 26, 132-137 (2014).
16. L. A. Fogel, M. M. Sun, T. L. Geurs, L. N. Carayannopoulos, A. R. French, Markers of nonselective and specific NK cell activation. *J Immunol* 190, 6269-6276 (2013).
17. K. G. Elpek, M. P. Rubinstein, A. Bellemare-Pelletier, A. W. Goldrath, S. J. Turley, Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15Ralpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21647-21652 (2010).
18. R. Kaplan, B. Morse, K. Huebner, C. Croce, R. Howk, M. Ravera, G. Ricca, M. Jaye, J. Schlessinger, Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7000-7004 (1990). 10
19. I. Rhee, A. Veillette, Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol* 13, 439-447 (2012).
20. J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C. D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D. M. Rothstein, J. M. Penninger, CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349-354 (2001). 20
21. K. Kishihara, J. Penninger, V. A. Wallace, T. M. Kundig, K. Kawai, A. Wakeham, E. Timms, K. Pfeffer, P. S. Ohashi, M. L. Thomas, et al., Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 74, 143-156 (1993).
22. K. F. Byth, L. A. Conroy, S. Howlett, A. J. Smith, J. May, D. R. Alexander, N. Holmes, CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* 183, 1707-1718 (1996).
23. P. J. Mee, M. Turner, M. A. Basson, P. S. Costello, R. Zamoyska, V. L. Tybulewicz, Greatly reduced efficiency of both positive and negative selection of thymocytes in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mice. *Eur J Immunol* 29, 2923-2933 (1999). 30
24. C. Kung, J. T. Pingel, M. Heikinheimo, T. Klemola, K. Varkila, L. I. Yoo, K. Vuopala, M. Poyhonen, M. Uhari, M. Rogers, S. H. Speck, T. Chatila, M. L. Thomas, Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med* 6, 343-345 (2000).
25. E. Z. Tchilian, D. L. Wallace, R. S. Wells, D. R. Flower, G. Morgan, P. C. Beverley, A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol* 166, 1308-1313 (2001).
26. M. L. Hermiston, J. Zikherman, J. W. Zhu, CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol Rev* 228, 288-311 (2009). 40
27. H. S. Warren, L. J. Skipsey, Loss of activation-induced CD45RO with maintenance of CD45RA expression during prolonged culture of T cells and NK cells. *Immunology* 74, 78-85 (1991).
28. M. D. Roth, Interleukin 2 induces the expression of CD45RO and the memory phenotype by CD45RA+ peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 179, 857-864 (1994).
29. K. W. Lynch, A. Weiss, A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Mol Cell Biol* 20, 70-80 (2000). 50

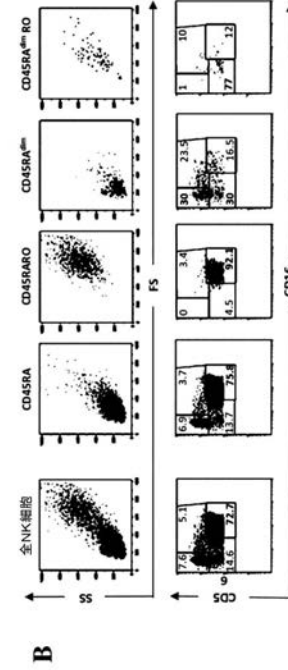
30. X. Fu, Y. Liu, L. Li, Q. Li, D. Qiao, H. Wang, S. Lao, Y. Fan, C. Wu, Human natural killer cells expressing the memory-associated marker CD45RO from tuberculous pleurisy respond more strongly and rapidly than CD45RO- natural killer cells following stimulation with interleukin-12. *Immunology* 134, 41-49 (2011).
31. N. D. Huntington, Y. Xu, S. L. Nutt, D. M. Tarlinton, A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J Exp Med* 201, 1421-1433 (2005).
32. D. G. Hesslein, R. Takaki, M. L. Hermiston, A. Weiss, L. L. Lanier, Dysregulation of signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated cytotoxicity and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7012-7017 (2006). 10
33. L. H. Mason, J. Willette-Brown, L. S. Taylor, D. W. McVicar, Regulation of Ly49D/DAP12 signal transduction by Src-family kinases and CD45. *J Immunol* 176, 6615-6623 (2006).
34. V. Beziat, B. Descours, C. Parizot, P. Debre, V. Vieillard, NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* 5, e11966 (2010).
35. J. Clausen, B. Vergeiner, M. Enk, A. L. Petzer, G. Gastl, E. Gunsilius, Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* 207, 85-93 (2003). 20
36. K. Juelke, M. Killig, M. Luetke-Eversloh, E. Parente, J. Gruen, B. Morandi, G. Ferlazzo, A. Thiel, I. Schmitt-Knosalla, C. Romagnani, CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood* 116, 1299-1307 (2010).
37. S. Lopez-Verges, J. M. Milush, S. Pandey, V. A. York, J. Arakawa-Hoyt, H. Pircher, P. J. Norris, D. F. Nixon, L. L. Lanier, CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116, 3865-3874 (2010).
38. M. Della Chiesa, L. Muccio, A. Moretta, CMV induces rapid NK cell maturation in HSCT recipients. *Immunology letters* 155, 11-13 (2013). 30
39. J. Siewiera, H. El Costa, J. Tabiasco, A. Berrebi, G. Cartron, P. Le Bouteiller, N. Jabrane-Ferrat, Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS pathogens* 9, e1003257 (2013).
40. J. Wang, K. Pantopoulos, Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 434, 365-381 (2011).
41. J. Garaude, S. Kaminski, S. Charni, J. I. Aguilo, C. Jacquet, M. Plays, J. Hernandez, F. Rodriguez, R. A. Hipskind, A. Anel, M. Villalba, Impaired anti-leukemic immune response in PKC θ -deficient mice. *Mol Immunol* 45, 3463-3469 (2008).
42. S. Kaminski, O. Adjali, C. Jacquet, J. Garaude, A. Keriél, A. Lassaux, R. Hipskind, M. Sitbon, N. Taylor, M. Villalba, The protooncogene Vav1 regulates murine leukemia virus-induced T-cell leukemogenesis. *Oncoimmunology* 1, 600-608 (2012). 40
43. K. Karre, H. G. Ljunggren, G. Piontek, R. Kiessling, Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678 (1986).
44. M. F. van den Broek, D. Kagi, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner, Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol* 25, 3514-3516 (1995).
45. J. Pardo, S. Balkow, A. Anel, M. M. Simon, Granzymes are essential for natu 50

- ral killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *Eur J Immunol* 32, 2881-2887 (2002).
46. J. I. Aguiló, J. Garaude, J. Pardo, M. Villalba, A. Anel, Protein kinase C- θ is required for NK cell activation and in vivo control of tumor progression. *J Immunol* 182, 1972-1981 (2009).
47. S. Charni, J. I. Aguiló, J. Garaude, G. de Bettignies, C. Jacquet, R. A. Hipskind, D. Singer, A. Anel, M. Villalba, ERK5 Knockdown generates mouse leukemia cells with low MHC class I levels that activate NK cells and block tumorigenesis. *J Immunol* 182, 3398-3405 (2009).
48. S. Charni, G. de Bettignies, M. G. Rathore, J. I. Aguiló, P. J. van den Elsen, D. Haouzi, R. A. Hipskind, J. A. Enriquez, M. Sanchez-Beato, J. Pardo, A. Anel, M. Villalba, Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway. *J Immunol* 185, 3498-3503 (2010).
49. L. Senovilla, E. Vacchelli, J. Galon, S. Adjemian, A. Eggermont, W. H. Fridman, C. Sautes-Fridman, Y. Ma, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer, L. Galluzzi, Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 1, 1323-1343 (2012).
50. E. Mamessier, L. C. Pradel, M. L. Thibult, C. Drevet, A. Zouine, J. Jacquemier, G. Houvenaeghel, F. Bertucci, D. Birnbaum, D. Olive, Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets. *J Immunol* 190, 2424-2436 (2013).
51. E. Mamessier, F. Bertucci, R. Sabatier, D. Birnbaum, D. Olive, "Stealth" tumors: Breast cancer cells shun NK-cells anti-tumor immunity. *Oncoimmunology* 1, 366-368 (2012).
52. R. Willemze, C. A. Rodrigues, M. Labopin, G. Sanz, G. Michel, G. Socie, B. Rio, A. Sirvent, M. Renaud, L. Madero, M. Mohty, C. Ferrà, F. Garnier, P. Loiseau, J. Garcia, L. Lecchi, G. Kogler, Y. Beguin, C. Navarrete, T. Devos, I. Ionescu, K. Boudjedir, A. L. Herr, E. Gluckman, V. Rocha, KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia* 23, 492-500 (2009).
53. M. Stern, L. Ruggeri, A. Mancusi, M. E. Bernardo, C. de Angelis, C. Bucher, F. Locatelli, F. Aversa, A. Velardi, Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. *Blood* 112, 2990-2995 (2008).
54. N. Bhatnagar, H. S. Hong, J. K. Krishnaswamy, A. Haghikia, G. M. Behrens, R. E. Schmidt, R. Jacobs, Cytokine-activated NK cells inhibit PMN apoptosis and preserve their functional capacity. *Blood* 116, 1308-1316 (2010).
55. Z. Xu, A. Weiss, Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat Immunol* 3, 764-771 (2002).
56. T. Mustelin, T. Vang, N. Bottini, Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol* 5, 43-57 (2005).
57. D. G. Hesslein, E. H. Palacios, J. C. Sun, J. N. Beilke, S. R. Watson, A. Weiss, L. L. Lanier, Differential requirements for CD45 in NK-cell function reveal distinct roles for Syk-family kinases. *Blood* 117, 3087-3095 (2011).
58. L. A. Earl, S. Bi, L. G. Baum, N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem* 285, 2232-2244 (2010).
59. K. Ito, K. Stannard, E. Gabutero, A. M. Clark, S. Y. Neo, S. Onturk, H. Blanchard, S. J. Ralph, Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer metastasis reviews* 31, 763-778 (2012).

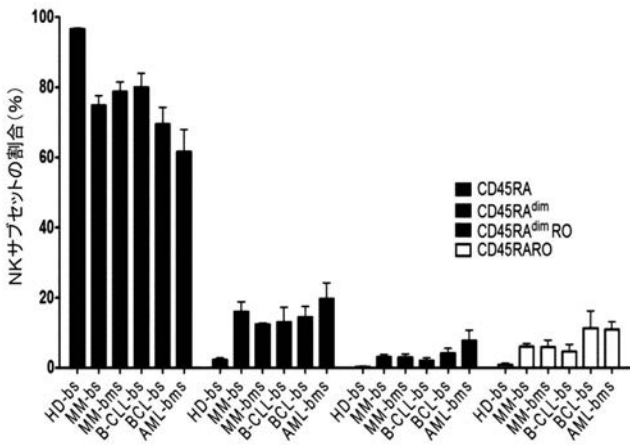
【 図 1 A 】



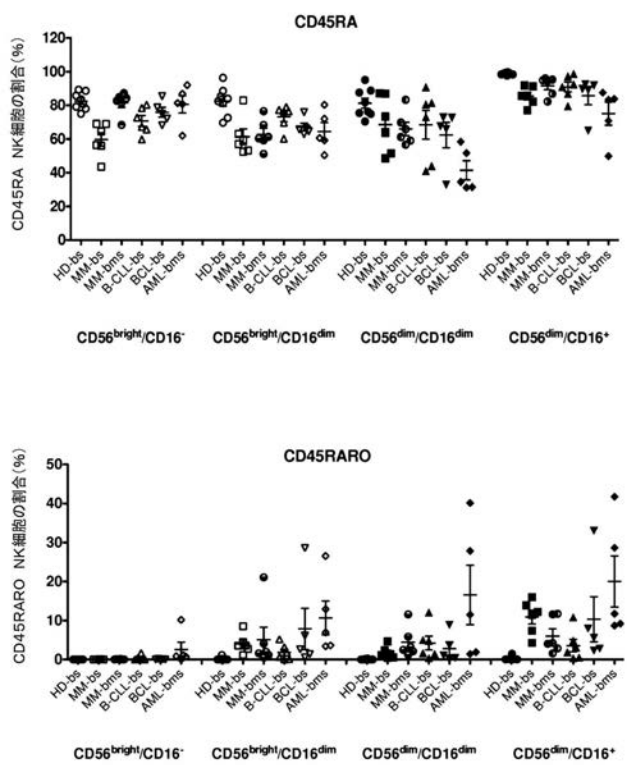
【 図 1 B 】



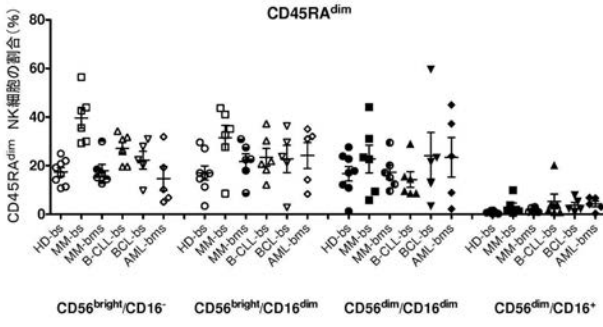
【 図 1 C 】



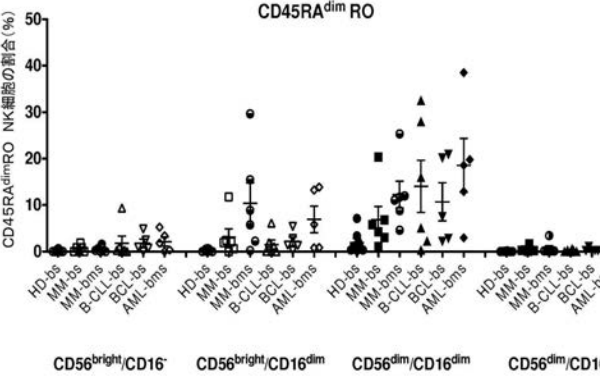
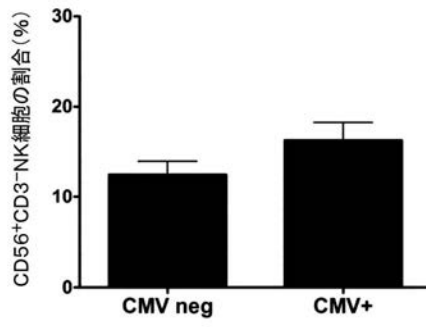
【 図 1 D - 1 】



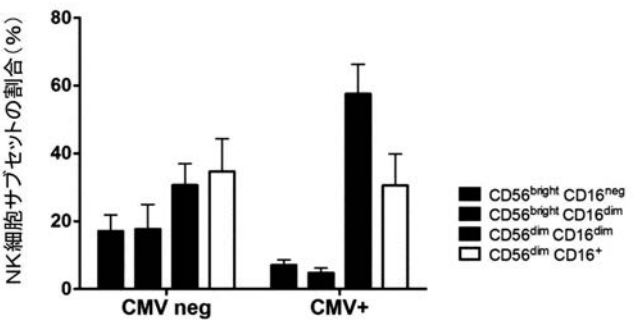
【 図 1 D - 2 】



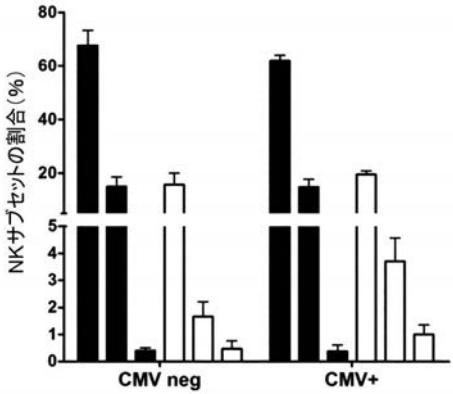
【 図 2 A 】



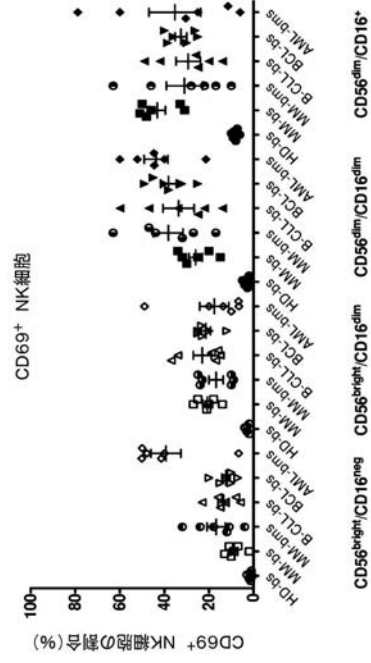
【 図 2 B 】



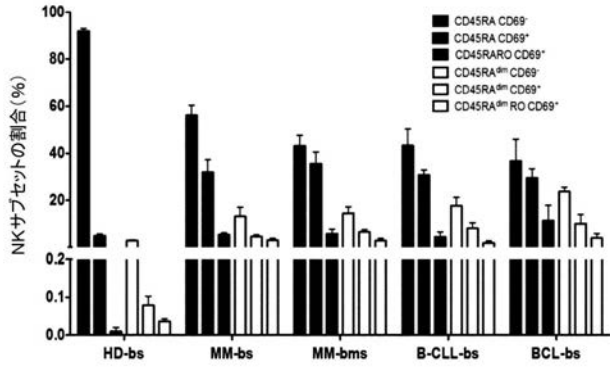
【 図 2 C 】



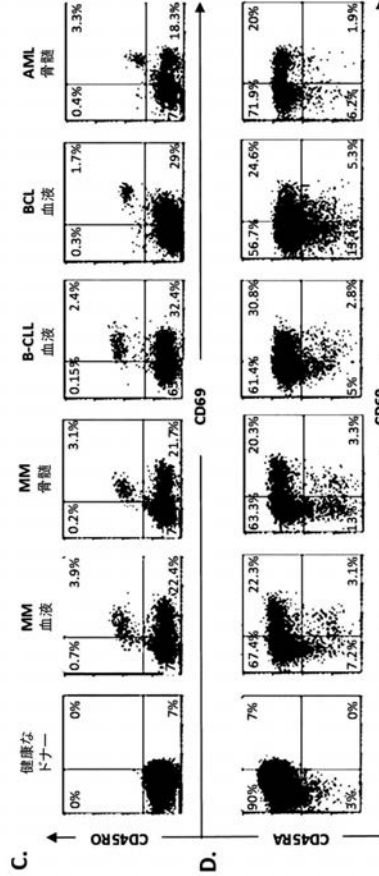
【 図 3 A 】



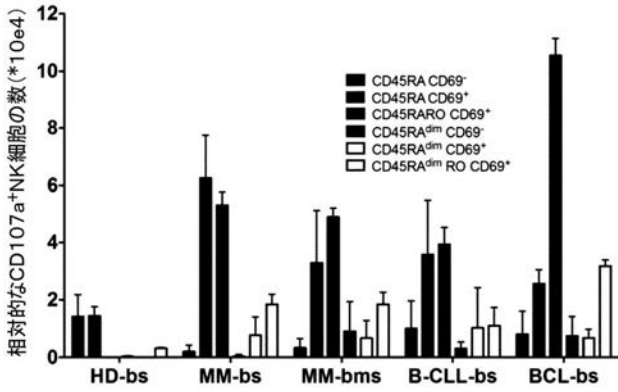
【 図 3 B 】



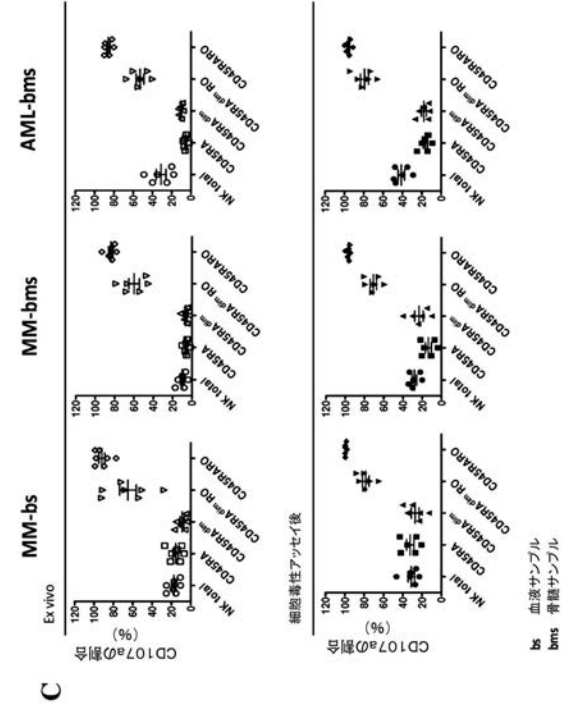
【 図 3 C - D 】



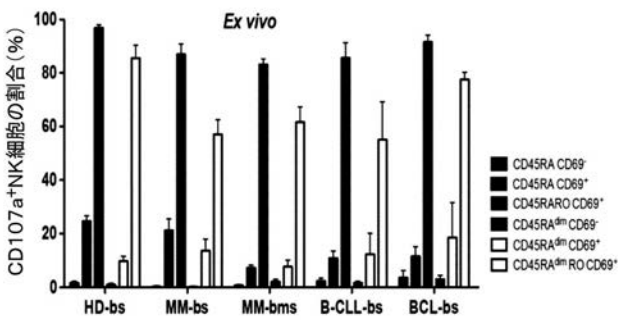
【 図 4 A 】



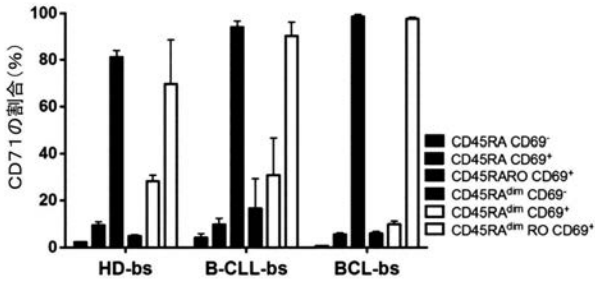
【 図 4 C 】



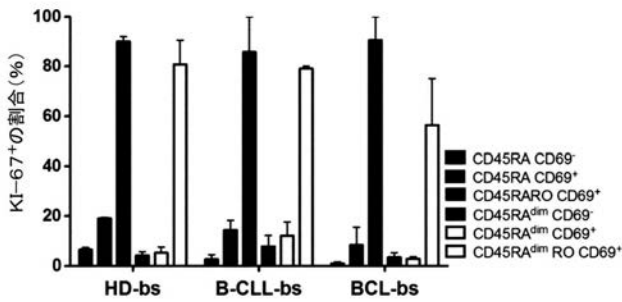
【 図 4 B 】



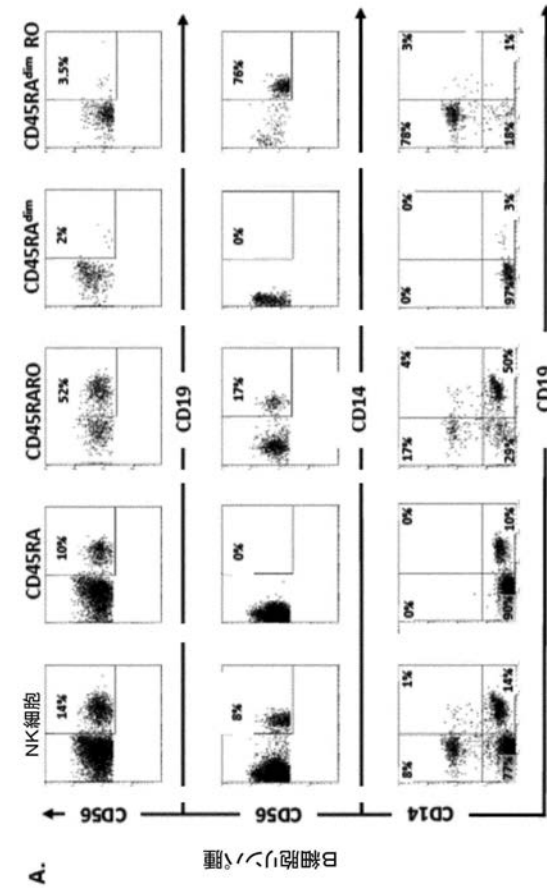
【 図 4 D 】



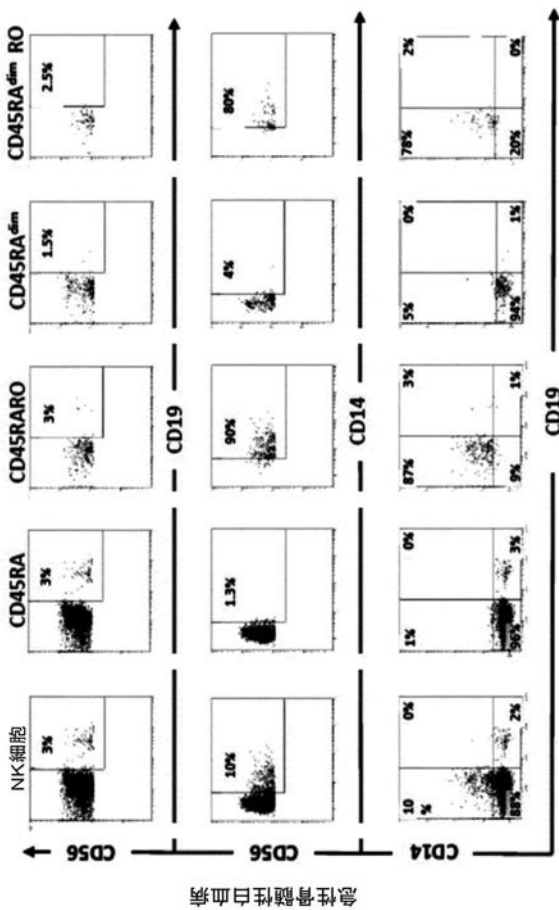
【 図 4 E 】



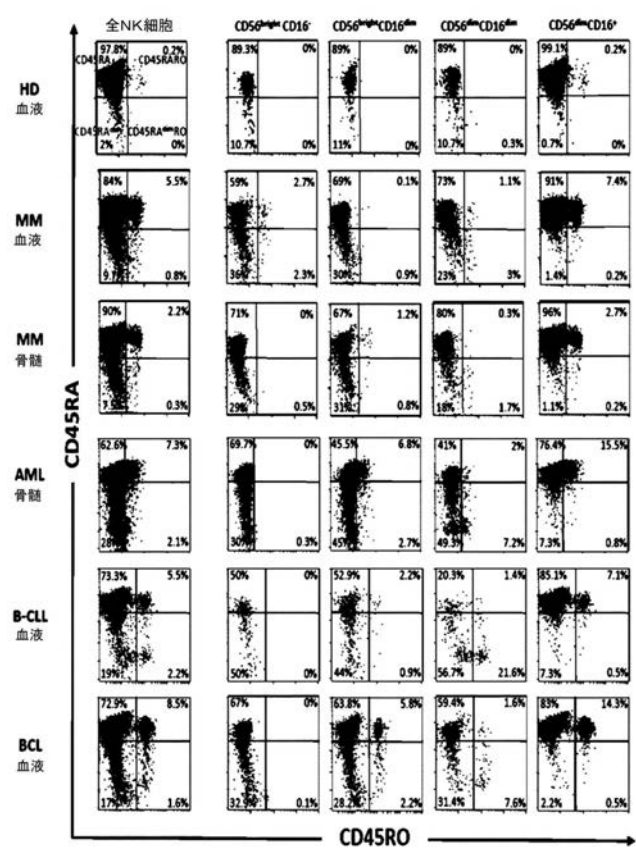
【 図 5 A 】



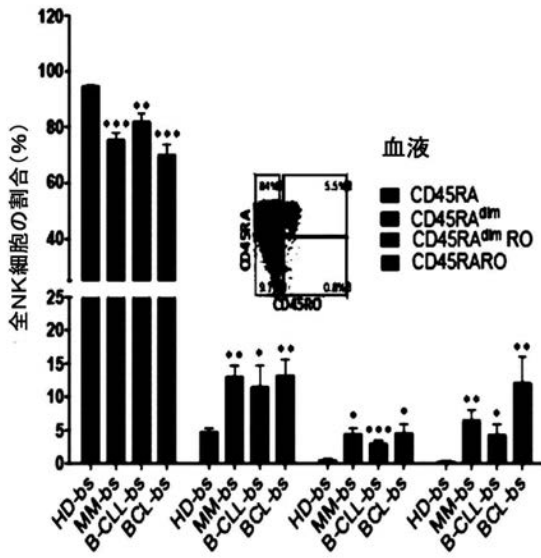
【 図 5 B 】



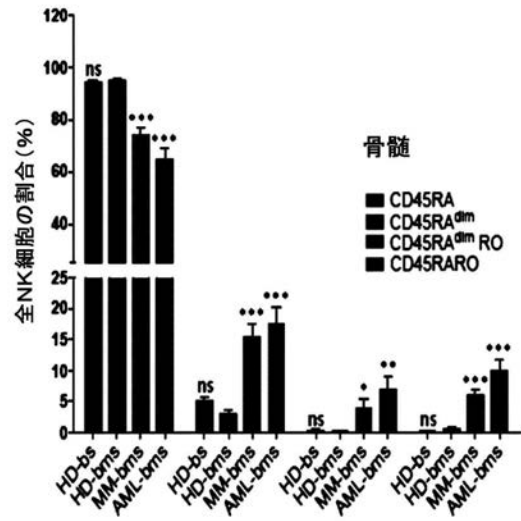
【 図 6 A 】



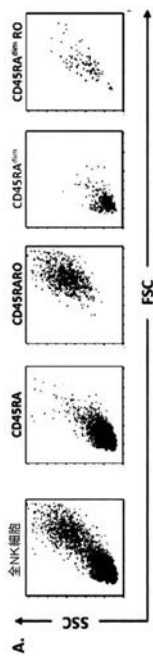
【 図 6 B - 1 】



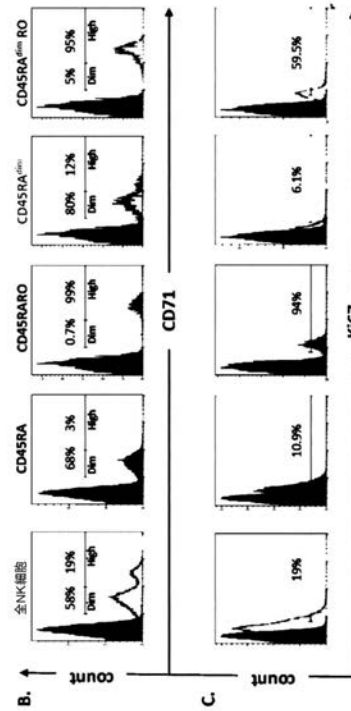
【 図 6 B - 2 】



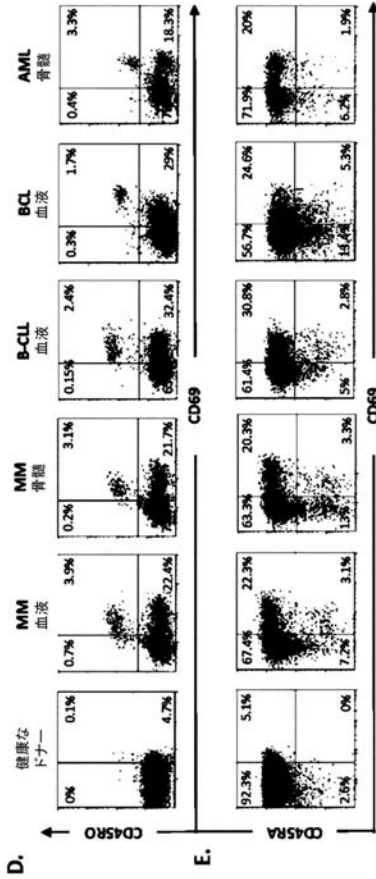
【 図 7 A 】



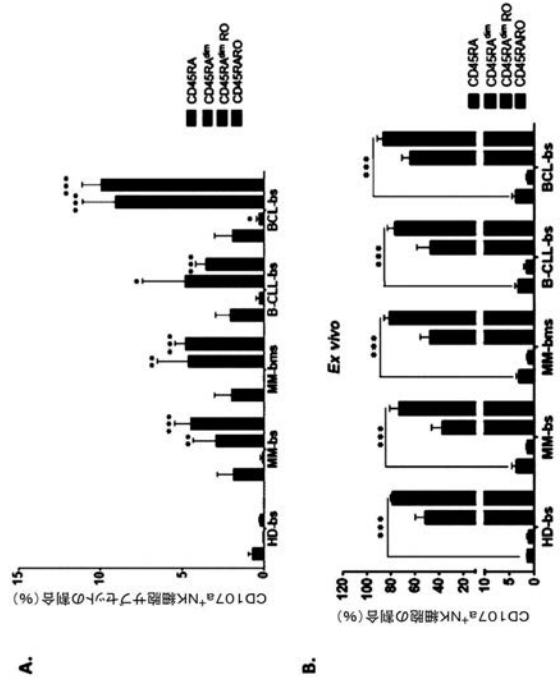
【 図 7 B - C 】



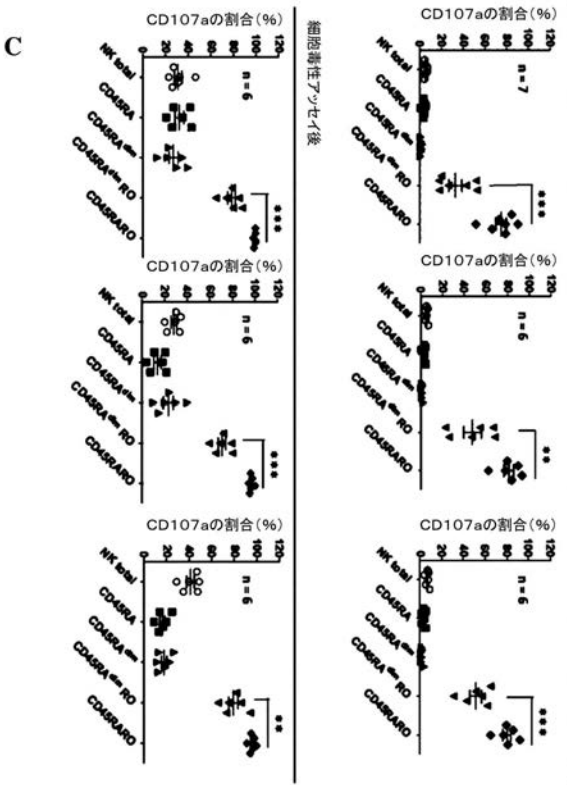
【 図 7 D - E 】



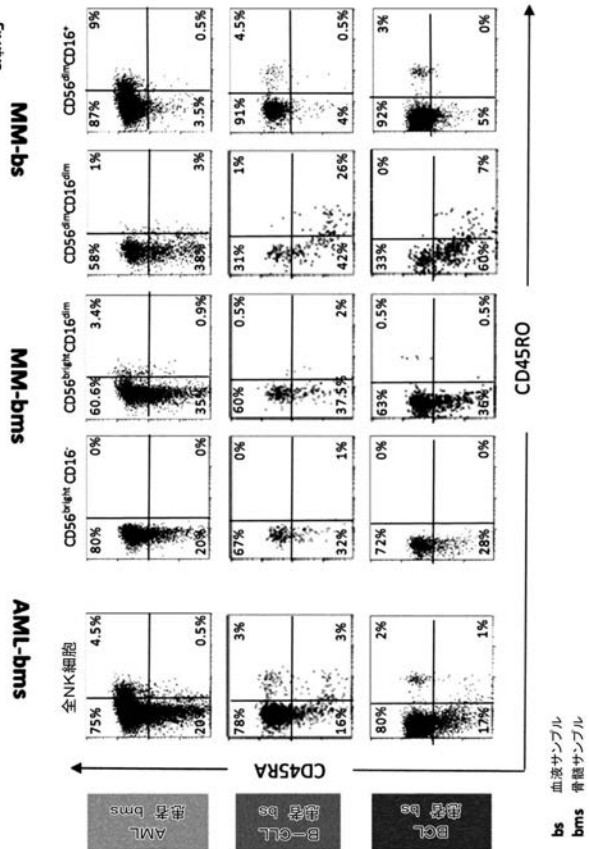
【 図 8 A - B 】



【 図 8 C 】

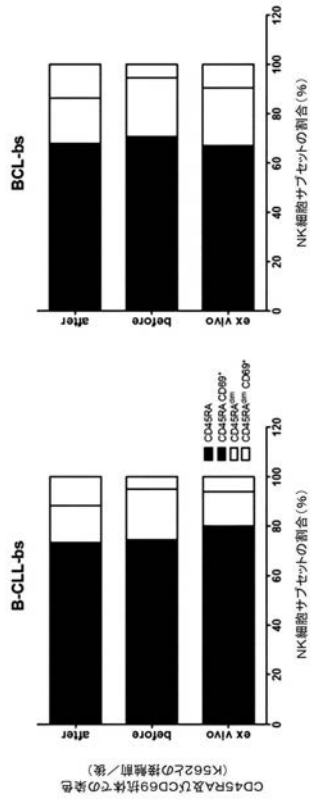


【 図 9 】



補足図1

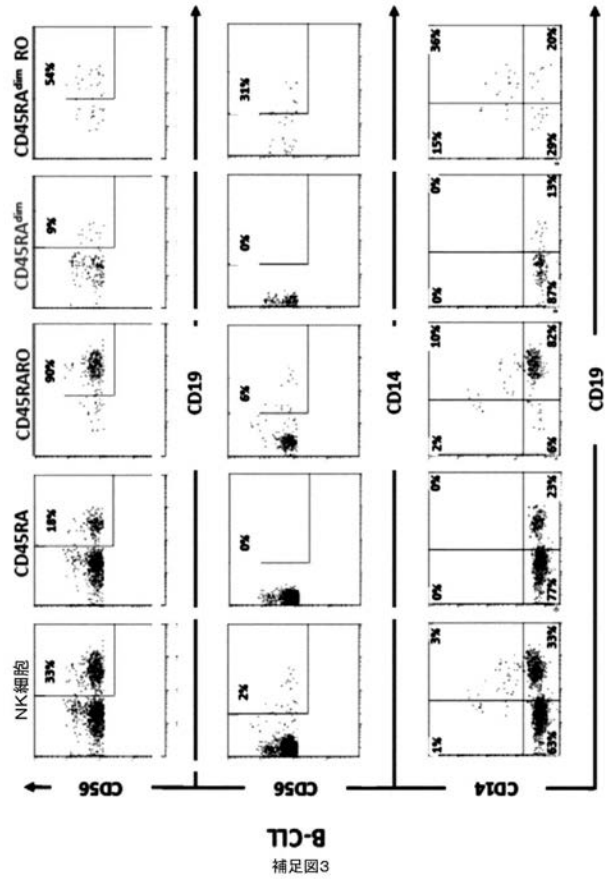
【 ☒ 1 0 】



補足図2

bs 血液サンプル
bms 骨髄サンプル

【 ☒ 1 1 1 】



補足図3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/065797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARGARIDA LIMA ET AL: "The "ex Vivo" Patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR Expression Identify Acute/Early and Chronic/Late NK-Cell Activation States", BLOOD CELLS, MOLECULES, AND DISEASES, vol. 28, no. 2, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 181-190, XP055084047, ISSN: 1079-9796, DOI: 10.1006/bcmd.2002.0506 whole document, especially abstract; p. 182, col. 2, par. 1-3; p. 182, col. 2 - p. 183, col. 1, par. 2; p. 188, col. 1, par. 1;table 1, table 2). ----- -/--	1-12,14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
3 August 2015		14/08/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Chrétien, Eva Maria

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/065797

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. A. OLSON ET AL: "NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects", BLOOD, vol. 115, no. 21, 16 March 2010 (2010-03-16), pages 4293-4301, XP055159145, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2009-05-222190 whole document, especially p. p. 4298, col. 1-2; bridging par.; p. 4300, col. 2, par. 4; fig. 7	13
A	----- XIAOYING FU ET AL: "Human natural killer cells expressing the memory-associated marker CD45RO from tuberculous pleurisy respond more strongly and rapidly than CD45RO- natural killer cells following stimulation with interleukin-12", IMMUNOLOGY, vol. 134, no. 1, 29 June 2011 (2011-06-29), pages 41-49, XP055146559, ISSN: 0019-2805, DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03464.x the whole document	1-14
A	----- Rizwan Romee ET AL: "Cytokine activation induces human memory-like NK cells", Blood, vol. 120, no. 24 1 January 2012 (2012-01-01), pages 4751-4760, XP055159210, DOI: 10.1182/blood-2012- Retrieved from the Internet: URL:http://www.bloodjournal.org/content/120/24/4751.full.pdf [retrieved on 2014-12-31] the whole document	1-14
A	----- MICHAEL A CALIGIURI: "Human natural killer cells", BLOOD, vol. 112, no. 3, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 461-469, XP055160731, DOI: 10.1182/blood- the whole document	1-14
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/065797

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Ewelina Krzywinska ET AL: "ImmunoTools IT-Box-139 Award 2013", 17 May 2013 (2013-05-17), pages 1-2, XP055160734, Retrieved from the Internet: URL:http://www.immunotools.de/html/award/EwelinaKrzywinska.pdf [retrieved on 2015-01-08] the whole document -----</p>	1-14

1

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 517007286

ユニヴェルスイテ ドゥ モンペリエ

フランス国 エフ - 3 4 0 9 0 モンペリエ、リュ オーギュスト ブルッソネット 1 6 3

(74)代理人 110000855

特許業務法人浅村特許事務所

(72)発明者 ヴィラルバ ゴンザレス、マルタン

フランス国、モンペリエ、アブニュ オーギュスタン フリシェ 8 0、セアシュウ モンペリエ、イエルペー、アンセルム ウ 1 0 4 0

(72)発明者 クルツイウンスカ、エヴェリーナ

フランス国、モンペリエ セデクス 5、アブニュ オーギュスタン フリシェ 8 0、オピタルサン - テロワ、セアシュウ モンペリエ、イエルエムペー、アンセルム ウ 1 0 4 0

Fターム(参考) 4B063 QA07 QA18 QQ08 QR48 QS32

專利名稱(譯)	診断血液癌の方法		
公開(公告)号	JP2017526938A	公開(公告)日	2017-09-14
申請号	JP2017521311	申請日	2015-07-10
[標]發明人	ウイルスバゴンザレスマルタン クルツイウインスカエヴェリーナ		
發明人	ウイルスバゴンザレス、マルタン クルツイウインスカ、エヴェリーナ		
IPC分類号	G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/04		
CPC分類号	G01N33/57426 G01N33/57484 G01N2333/70589 G01N2800/52		
FI分類号	G01N33/574.A G01N33/574.D G01N33/53.K C12Q1/04		
F-TERM分類号	4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS32		
優先权	2014306134 2014-07-11 EP 2015305011 2015-01-07 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(譯)

本發明涉及用于診斷血液學癌症的方法。特別地，本發明包括：i) 檢測從患者獲得的樣品中CD45RARO NK細胞的存在，和ii) 得出結論認為患者患有血液癌症，包括患者中的血液癌。當在樣品中檢測到診斷方法和CD45RARO NK細胞的存在時，至少一種表型標記物的存在是血液癌的特征。

(19) 日本國特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2017-526938 (2017-526938A)
	(43) 公表日	平成29年9月14日(2017.9.14)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード(参考) 4B063
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574	A
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/574	D
C12Q 1/04 (2006.01)	GO1N 33/53	K
	C12Q 1/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)		
(21) 出願番号	特願2017-521311(P2017-521311)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成27年7月10日(2015.7.10)	アンセルム(アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルジ エルシュ メディカル)
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月6日(2017.3.6)	フランス国 エフー 75013 パリ 、リュ ドゥ トルビアック、101
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/065797	(71) 出願人
(87) 国際公開番号	W02016/005548	517007275
(87) 国際公開日	平成28年1月14日(2016.1.14)	サントル オスピタリエール ユニヴェル シテール ドゥ モンパリエ フランス国 エフー 34000 モン パリエ、アブニユ ドイエン ガストン ジロー、191
(31) 優先権主張番号	14306134.9	
(32) 優先日	平成26年7月11日(2014.7.11)	
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)	
(31) 優先権主張番号	15305011.7	
(32) 優先日	平成27年1月7日(2015.1.7)	
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 血液学的感を診断するための方法		