

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4326944号
(P4326944)

(45) 発行日 平成21年9月9日 (2009.9.9)

(24) 登録日 平成21年6月19日 (2009.6.19)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/06 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 G

A 6 1 K 39/395 U

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/06

請求項の数 30 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-514007 (P2003-514007)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月17日 (2002.7.17)
 (65) 公表番号 特表2005-507648 (P2005-507648A)
 (43) 公表日 平成17年3月24日 (2005.3.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/007945
 (87) 国際公開番号 W02003/008449
 (87) 国際公開日 平成15年1月30日 (2003.1.30)
 審査請求日 平成17年7月14日 (2005.7.14)
 (31) 優先権主張番号 01401946.7
 (32) 優先日 平成13年7月19日 (2001.7.19)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 504022515
 イネイト・ファーマ
 INNATE PHARMA
 フランス国、エフー13009 マルセイ
 ユ、アンシヤン・シュマン・デ・カシ、イ
 ムーブル・グラン・プレ 121
 (73) 特許権者 502174302
 ウニヴェルシタ ディ ジェノヴァ
 UNIVERSITA DI GENOV
 A
 イタリア国 イー16132 ジェノヴァ
 ヴィア エッレ. ピ. アルベルティ
 2
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナチュラルキラー細胞活性に関与する表面分子NTB-A

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) アミノ酸配列番号2を含むポリペプチドをコードしている核酸、および

(b) 核酸分子 (a) の相補鎖

から選ばれる核酸分子。

【請求項2】

アミノ酸配列番号2を含むポリペプチドをコードしている配列を含む、請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】

請求項1または2記載の核酸分子に相補的な配列を含み、請求項1または2記載の核酸分子と特異的に緊縮条件下でハイブリダイズする、核酸プローブ。

【請求項4】

少なくともその一方のプライマーが、請求項1または2記載の核酸分子に相補的な配列を含み、それと特異的に緊縮条件下でハイブリダイズする、一対の核酸プライマー。

【請求項5】

請求項1または2記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項6】

請求項5記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項7】

請求項1または2記載の核酸分子がコードしているアミノ酸配列を有するポリペプチド

10

20

。

【請求項 8】

アミノ酸配列番号 2 を含むポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 5 記載のベクターを含み、かつ、請求項 7 または 8 記載のポリペプチドを発現する宿主細胞。

【請求項 10】

ポリペプチドを発現する細胞を調製する方法であって、請求項 1 または 2 記載の核酸分子、または請求項 5 記載のベクターをインビトロで細胞に導入する工程と、該ポリペプチドを発現する細胞またはその子孫を選択する工程とを含む方法。

10

【請求項 11】

請求項 7 または 8 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 12】

抗体を調製する方法であって、請求項 7 または 8 記載のポリペプチドをヒトではない哺乳動物に注入する工程と、該哺乳動物の抗体、血清または抗体産生細胞を回収する工程とを含む方法。

【請求項 13】

化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物を請求項 7 または 8 記載のポリペプチドに接触させる工程と、該試験化合物が該ポリペプチドに結合することができる能力を決定する工程とを含む方法。

20

【請求項 14】

化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物を請求項 9 記載の宿主細胞に接触させる工程と、該試験化合物が該ポリペプチドに結合することができる能力を決定する工程とを含む方法。

【請求項 15】

化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物を、請求項 11 記載の抗体の存在下でNK細胞に接触させる工程と、該NK細胞の細胞溶解活性を測定することによって該試験化合物の活性を決定する工程とを含む方法。

【請求項 16】

化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物を、請求項 7 または 8 記載のポリペプチドの結合パートナーの存在下で該ポリペプチドに接触させる工程と、該試験化合物が該ポリペプチドと該結合パートナーとの相互作用を調整できる能力を評価する工程とを含む方法。

30

【請求項 17】

化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、(i) 試験化合物がNTB-Aポリペプチドに結合できる能力を決定する工程と、(ii) 工程(i)で選ばれた試験化合物が、NK細胞が介在する標的細胞の溶解を調節できる能力を決定する工程とを含む方法。

【請求項 18】

対象者における免疫機能を調節する医薬の製造におけるNTB-Aポリペプチドの活性を調節する請求項 11 記載の抗体の使用。

40

【請求項 19】

対象者におけるNK細胞の活性を調節する医薬の製造におけるNTB-Aポリペプチドの活性を調節する請求項 11 記載の抗体の使用。

【請求項 20】

NTB-Aの活性を調節する請求項 11 記載の抗体と、薬学的に許容され得るビヒクルまたは担体とを含む医薬組成物。

【請求項 21】

NTB-Aポリペプチドの活性を調節する請求項 11 記載の抗体と、2B4受容体を調節する化合物とを、併用、逐次使用または分離使用のために含む医薬組成物。

50

【請求項 22】

N T B－A 活性を阻害または低減する請求項 11 記載の抗体と、2 B 4 活性を阻害または軽減する抗体とを含む、請求項 21 記載の組成物。

【請求項 23】

抗体が N K 細胞表面上の N T B－A の架橋を仲介し、そして N K 細胞の細胞溶解活性を誘導できる、請求項 18 または 19 記載の使用。

【請求項 24】

抗体が I g G 1 である、請求項 23 記載の使用。

【請求項 25】

抗体が N T B－A を遮蔽し、そして N K 細胞の細胞溶解活性を阻害できる、請求項 18 または 19 記載の使用。 10

【請求項 26】

抗体がヒト化抗体である、請求項 23～25 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 27】

抗体が N K 細胞表面上の N T B－A の架橋を仲介し、そして N K 細胞の細胞溶解活性を誘導できる、請求項 20 または 21 記載の組成物。

【請求項 28】

抗体が I g G 1 である、請求項 27 記載の組成物。

【請求項 29】

抗体が N T B－A を遮蔽し、そして N K 細胞の細胞溶解活性を阻害できる、請求項 20 または 21 記載の組成物。 20

【請求項 30】

抗体がヒト化抗体である、請求項 27～29 のいずれか一項記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、N T B－A と称される新規なタンパク質、それをコードしている核酸分子、およびその使用に関するものである。本発明は、対象者における免疫応答を、N T B－A の活性をインビトロ、エキソビボまたはインビボで調節することによって調節する方法にも関するものである。本発明は、免疫細胞、特にナチュラルキラー細胞、T リンパ球および／または B リンパ球の活性を、N T B－A の活性をインビトロ、エキソビボまたはインビボで調節することによって調節する方法にも関するものである。本発明は、活性化合物を、N T B－A もしくはそのフラグメント、またはそれをコードしている核酸、または該ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を用いてスクリーニングする方法も含む。 30

【背景技術】

【0002】

宿主防衛におけるヒト N K 細胞の役割を我々が理解するのに、最近、重要な前進が遂げられた。進歩は、主として、N K 細胞表面で発現され、N K 細胞の機能を調節している、一連の受容体の発見の結果として生じている。これらの受容体のいくつかは、正常細胞表面の M H C クラス I 分子の発現を監視することによって、N K 細胞を阻害する [1～3] 40。その他の受容体は、N K 細胞の活性化の原因となっている [4]。これは、N K 細胞が、ウイルス感染または腫瘍形質転換の結果として、M H C クラス I 分子を発現しないか、または不適切な量のそれを発現する細胞と作用し合うときに生じる [5]。ヒトでは、異なるトリガリング (triggering) 受容体が特定されている。N K p 46 [6]、N K p 30 [8] および N K p 44 [9、10] は、集合的に「自然細胞傷害性受容体」(N C R) と呼ばれ [11]、N K 細胞によって選択的に発現され、自然細胞傷害性の誘導の際に互いに協力する。N C R は、結合表面発現を特徴とし、それらの表面密度と、N K 細胞が様々な腫瘍を死滅させることができる能力との間に、直接の相関関係が存在する [12]。N C R は、すべて、I g スーパーファミリー (I G－S F) の成員であり、低い程度の類似性を互いに示し、D C 3 ζ、F c ε R I γ および K A R A P / D A P 1 2 を包含する 50

、異なるシグナル変換アダプタータンパク質と結合する [8~10]。

【0003】

NK細胞によって発現されるもう一つの触発受容体は、NK G2 Dで表され、ヒト第12染色体上の「NK遺伝子複合体」内でコードされるC型レクチン表面分子である [13]。ストレス誘導性のMICA/B分子 [14] が標的細胞で認識されると、NK G2 Dは、NKが介在する細胞傷害性を強く増強する [14、15]。NCRとは異なり、NK G2 Dは、実質的にすべてのTCR- γ/δ +ばかりでなく、CD8 TCR- α/β +細胞によっても発現される。その機能は、DAP10 [16] またはKAP10 [17] と呼ばれる、新たに特定されたシグナリングサブユニットとの会合を必要とする。最近示されたとおり、NK G2 Dは、腫瘍細胞溶解におけるNCRの役割を補完するが、その相対的関与は、分析された標的および/またはエフェクター細胞の種類にもっぱら依存する [15]。

10

【0004】

注目すべきことに、NK細胞の最適の触発は、2B4と呼ばれるもう一つの分子 (CD244: 参考文献18~20) の機能を必要とし得る。この分子は、NK細胞ばかりでなく、単球、およびCD8 T細胞のサブユニットによっても発現される。NK細胞では、2B4のmAb介在架橋結合またはCD48 (すなわち2B4のリガンド) によるその結合が、細胞溶解活性の増強を招く [18~22]。クローンレベルでの分析は、この効果が、高いNCR表面密度を発現するNK細胞 (NCR高輝度) に限定されることを明確に示した。その上、NCRのmAb介在調整は、NK細胞の2B4結合不応答を招くが、その表面発現は、影響されない。したがって、2B4がNK細胞活性化を誘導できる能力は、NKp46を包含する主な触発受容体の同時結合に依存するようと思われる。これは、2B4が、真の受容体としてよりも共受容体として機能し得るという意見 [23] を裏付ける。2B4は、CD48、CD58、CD84、CD150 (SLAMとも呼ばれる) およびCD299 (Ly9) も包含する、Ig-SFのCD2サブファミリーの一員である [24]。2B4は、その細胞外部分の、膜遠位IgVドメインおよび膜近位IgC2ドメインを特徴とする。この貫膜領域は、免疫のチロシンに基づく活性化モチーフ (ITAM) を担持するシグナル変換ポリペプチドとの会合に関与する、荷電アミノ酸を欠く [21、22、25~27]。興味深いことに、細胞質尾部は、4個のチロシン基盤モチーフ (TxYxxI/V) を含み、これが、過バナジウム酸ナトリウム処理の際にリン酸化 [27、28]、または抗2B4mAbによる細胞触発 [29] を生じる。異なるポリペプチドが、2B4と会合し、2B4介在シグナル変換経路に参加することが示されている。このように、チロシンリン酸化の際には、2B4は、Src相同性2ドメイン含有タンパク質 (SH2D1A; 参考文献27および28) と呼ばれ、SLAM関連タンパク質 (SAP [30]) と同称される、小さい細胞質ポリペプチドと会合する。いずれのSH2含有ホスファターゼ (SHP) が2B4に結合するのかについては、なおも論議が存在する。2B4/SHP-2会合は、細胞トランスフェクション体で記載されているが [27]、正常なNK細胞では、2B4/SHP-1会合のみが検出できたにすぎない [28]。最近、正常NK細胞で、2B4は、T細胞活性化用リンカー (LAT [29]) と構成的に会合することが示されている。2B4のmAb介在架橋結合は、LATのチロシンリン酸化、ならびにPLC γ およびGrb2細胞質内シグナリング分子の動員を招く [29]。

20

30

40

【0005】

最近、X染色体関連リンパ球増殖性疾患 (XLP [28、31、32]) に罹患した個体で、2B4の劇的に変化した機能が検出された。XLPは、遺伝性の重篤な免疫不全であって、EBV感染が劇症伝染性単核症またはリンパ腫を生じるのを制御できないことを特徴とする [33、34]。XLPの遺伝学的基盤、すなわちSH2D1Aコーディング遺伝子の致死的な突然変異 [30、35、36] が特定されている。これらの突然変異のため、XLP-NK細胞では、2B4は、SH2D1Aとは会合できないが、SHP-1とは会合し、(活性化ではなく) 阻害性シグナルを仲介する [28]。したがって、EBV感染細胞で高密度に発現されるCD48との2B4の結合は、NK介在細胞傷害性の急

50

激な阻害を招く。

【0006】

本発明は、NTB-Aと呼ばれる新規なNK細胞表面分子の特定、クローニングおよび機能特性記述から生じた。

【0007】

NTB-Aは、60kDの糖タンパク質であって、ヒトNK、TおよびBリンパ球によって発現される。NTB-Aのモノクローナル抗体(mAb)を介しての架橋結合は、NK介在細胞傷害性の誘導を招く。NK細胞活性化の際に共受容体として機能する2B4(CD244)に似て、NTB-Aも、高表面密度の自然細胞傷害性受容体を発現するNK細胞でのみ細胞溶解活性を触発するにすぎない。これは、NTB-AがNK細胞活性化の過程で共受容体として機能し得ることを示している。NTB-A分子をコードしているcDNAの分子クローニングは、CD2サブファミリーに属する免疫グロブリンスーパーファミリーの新規な一員を明らかにした。NTB-Aは、その細胞外部分の、遠位のV型ドメインおよび近位のC2型ドメイン、ならびに3個のチロシン基盤モチーフを含む細胞質部分を特徴とする。NTB-Aは、チロシンリン酸化を受け、Src相同性2ドメイン含有タンパク質(SH2D1A)はもとより、SH2ドメイン含有ホスファターゼ(SHP)とも会合する。重要なことに、X染色体関連リンパ球増殖性疾患(XLP)の患者に由来するNK細胞の分析は、SH2D1Aタンパク質の欠如が、2B4ばかりでなくNTB-Aの機能にも多大に影響していることを示した。したがって、XLP-NK細胞では、NTB-Aは、活性化シグナルよりも阻害性シグナルを仲介する。これらの阻害性シグナルは、NTB-Aと、エプスタインバーウイルス(EBV)に感染した標的細胞で発現される、依然として定義されていないリガンドとの相互作用によって誘導される。その上、mAbを介してのNTB-Aの遮蔽は、部分的には、この阻害効果を逆転するが、標的細胞の溶解の最大回復は、2B4とNTB-Aとの双方を同時に遮蔽したときに達成することができる。したがって、NTB-Aの変化した機能は、XLP-NK細胞がEBV感染標的細胞を死滅させないことに重要な役割を果たしているらしい。

【発明の開示】

【0008】

本発明の目的は、NTB-Aというポリペプチドをコードしている核酸分子にある。

【0009】

本発明のさらに一つの態様は、単離されたNTB-Aポリペプチドにある。

【0010】

本発明のさらに一つの態様は、NTB-Aポリペプチドに結合する抗体である。

【0011】

本発明のさらにもう一つの態様は、対象者における免疫応答を調節する方法であって、NTB-Aの活性を調節する化合物を対象者に投与する工程を含む方法である。

【0012】

本発明は、試験化合物がNTB-Aの活性を調節できることを決定する工程を含む、化合物をスクリーニングする方法にも関するものである。

【0013】

本発明は、NTB-Aの活性を調節する化合物と、薬学的に許容され得る賦形剤または担体とを含む製剤組成物にも関するものである。

【0014】

本発明は、対象者における機能不全を診断する方法であって、NTB-Aの遺伝子またはRNAにおける突然変異または変化の存在を決定する工程、またはNTB-Aポリペプチドの存在もしくは量を決定する工程を含む方法にも関するものである。

【0015】

本発明は、免疫細胞、特にNK細胞、T細胞および／またはB細胞の活性が関与する病理学を処置もしくは診断するのに特に適している。本発明は、NK細胞の活性が関与する病理学、たとえばウイルス感染、腫瘍その他の増殖性疾患、自己免疫疾患等々を処置また

10

20

30

40

50

は診断するのに特に適している。本発明は、例として、X染色体関連リンパ球増殖性疾患の患者を治療するのに用いることができる。

【0016】

核酸分子

本発明の特定の態様は、

(a) アミノ酸配列番号2を含むポリペプチドをコードしている核酸、

(b) 核酸(a)とか、または核酸(a)の連続する少なくとも30個のヌクレオチドを含むその部分とハイブリダイズする核酸、

(c) 核酸分子(a)または(b)の相補鎖、および

(d) 核酸分子(a)、(b)または(c)の連続する少なくとも9個のヌクレオチドを含むフラグメント

から選ばれる核酸分子である。

【0017】

特定の実施態様では、本発明は、アミノ酸配列番号2を含むポリペプチド、または配列番号2の連続する少なくとも5個のアミノ酸残基を含むポリペプチドをコードしている配列を含む、核酸分子に関するものである。

【0018】

本発明は、上記に定義されたとおりのヒトNTB-Aタンパク質またはポリペプチドをコードしている、いかなる核酸分子も包含する。

【0019】

該核酸分子は、DNAまたはRNA分子であることができる。gDNA、cDNAまたは合成もしくは半合成DNA、たとえば、イントロンのような付加配列、偏らせたコドン等々を含むものであることもできる。該核酸は、慣用のいかなる手法、たとえば人為的な合成、クローニングまたはそれらの組合せによって調製してもよい。

【0020】

好適である具体的な実施態様は、配列番号1を含む核酸もしくはその連続する少なくとも9個のヌクレオチドを含む一部分、またはそれらの相補鎖である。

【0021】

示したとおり、本発明は、アミノ酸配列番号2を含むポリペプチドをコードしている核酸、または核酸の連続する少なくとも30個のヌクレオチドを含むその一部分とハイブリダイズする、核酸分子を包含する。ハイブリダイゼーションは、緊縮または非緊縮条件のいずれか、好ましくは緊縮条件下で実施することができる。代表的には、包含される核酸は、下記の条件下で上記の配列とハイブリダイズするものである：50%ホルムアミド中42℃での温置、5xSSPE、5xデンハート溶液、0.1%SDS（1xSSPEは、0.15MNaCl、10mMNaH₂PO₄、1.3mMEDTAで構成される、pH7.4）。緊縮条件は、参考文献37にも記載されている。該核酸は、コーディング配列全体とか、または示したとおり、30個の連続ヌクレオチドを含む、その少なくとも一部分にハイブリダイズしなければならない。そのような長さは、ハイブリダイゼーションの高い特異性を確保すると考えられる。ハイブリダイズする核酸は、好ましくは、受容体機能を有するポリペプチドまたはその一部をコードしている。

【0022】

上記核酸分子の好適なフラグメント(d)は、連続する少なくとも15個のヌクレオチド、はるかに好ましくは少なくとも21個のヌクレオチドを含む。

【0023】

上記核酸分子は、NTB-Aポリペプチドをインビトロ、エキソビボまたはインビボで製造して、適切ないかなる細胞内でも、たとえばプローブまたはプライマーとして、核酸を増幅するのに用いてよい。これらの核酸は、アンチセンス分子として（またはアンチセンス分子を設計するために）用いて、細胞内でか、インビトロ、エキソビボまたはインビボでのNTB-Aの発現を調節してもよい。

【0024】

因みに、本発明の目的は、上記に定義されたとおりの核酸分子に相補的であり、かつ特異的にハイブリダイズする核酸プローブにある。該プローブは、好ましくは、一本鎖分子であって、好ましくは9～約300個のヌクレオチドを含む。該プローブは、NTB-Aポリペプチドをコードしている完全な核酸配列を含み得る。該プローブは、変異体、突然変異体または欠失体に特異的であり、サンプル中のそのような種を特異的に検出することができる。該プローブは、放射性、酵素性、蛍光性、発光性、化学的等々のような、慣用のいかなる手段によって標識化してもよい。該プローブは、サンプル中のNTB-Aの遺伝子またはRNAの存在、特にサンプル中のNTB-A遺伝子またはRNAにおける突然変異もしくは変化の存在を検出するのに用いることができる。

【0025】

本発明は、一对の核酸プライマーであって、該対の一方のプライマーが、上記に定義されたとおりの核酸分子に相補的であり、それと特異的にハイブリダイズする、一对の核酸プライマーも包含する。そのような一对のプライマーは、サンプル中で、NTB-Aをコードしている遺伝子またはRNAの全部もしくは一部を増幅するのに用いることができる。増幅は、実施例に記載されたとおり、PCRによってか、またはその他公知のいかなる手法によっても実施することができる。該プライマーは、好ましくは、長さが約50ヌクレオチド未満、代表的には長さが10～50ヌクレオチドの一本鎖核酸分子である。

【0026】

アンチセンス分子は、NTB-Aの遺伝子またはRNAに特異的にハイブリダイズし、その転写または翻訳を阻害もしくは低減する、いかなる核酸でもある。該アンチセンスは、一本鎖または二本鎖の、DNAもしくはRNAであってよく、好ましくは、上記のとおり

【0027】

ベクター

本発明は、上記に定義されたとおりの核酸分子を含むいかなるベクターにも関するものである。該ベクターは、いかなるプラスミド、ファージ、エピソーム、人工染色体、ウイルス等々であってもよい。代表的な例は、プラスミドベクター、たとえば、商業的に入手できるプラスミド(pUC、pBR322、pcDNA等々)に由来するものを包含する。その他の好適なベクターは、ウイルス、特に組換え(複製欠陥のある)ウイルス、たとえば、レトロウイルス、バクテリオファージ、レンチウイルス、AAV、アデノウイルス、ヘルペスウイルス等々に由来するそれである。該ベクターは、慣用の手法によって、たとえば、NTB-Aの核酸分子をベクターの適切なクローニング部位に結合することによって調製することができる。さらに、該ベクターは、調節配列、たとえばプロモーター、ターミネーター、エンハンサー、サイレンサー等々、複製起点、マーカー遺伝子等々を含んでもよい。プロモーターの代表的な例は、構成的であるか、または調節されたか、もしくは組織選択的である発現を許すプロモーター、細胞、ウイルスまたは合成起源の弱いか、もしくは強いプロモーター、たとえばRVS-LTR、SV40-IE、CMV-IEプロモーター、ドメスティック遺伝子(PGK等々)のプロモーター、細菌またはファージ(T7、Lac、Trp等々)のプロモーター等々を包含する。

【0028】

該ベクターは、本発明の核酸をインビトロ、エキソビボまたはインビボで発現するのに用いることができる。特に、該ベクターは、遺伝子治療プログラムにおいて、細胞内、インビトロまたはエキソビボはもとより、インビボで直接、NTB-Aポリペプチドを調製するのに用いることができる。

【0029】

ポリペプチド

本発明のもう一つの目的は、NTB-Aポリペプチドである。本発明の前後関係においては、NTB-Aポリペプチドは、配列番号2を含むいかなるポリペプチドはもとより、そのいかなる変異型、誘導体または相同体も含んで、それらの天然に産するいかなる誘導体、または様々な哺乳動物種(齧歯類、ウマ、ブタ等々を包含)から単離された相同体も

10

20

30

40

50

包含する。変異型は、より一般的には、配列番号2と比較して、一つまたはいくつかのアミノ酸の、単独でか、もしくは様々な組合せによる、突然変異、欠失、挿入および／もしくは置換を包含する、修飾を有するいかなるポリペプチドも包含する。より好ましくは、NTB-Aポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列またはそのフラグメントと70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有するポリペプチドである。同一性は、公知の方法、および商業的なコンピュータプログラム、たとえばCLUSTALまたはBLAST (NCBI)を用いて決定することができる。様々な検索また整列パラメーターを用いてもよい。好適実施態様では、アミノ酸（または核酸）の同一性の百分率は、CLUSTAL-Wというプログラム (Compugen)を用いて決定する。

10

【0030】

具体的な実施態様では、本発明は、アミノ酸配列番号2を含むポリペプチド、または配列番号2の連続する少なくとも5個のアミノ酸残基を含むそのフラグメントに関するものである。

【0031】

もう一つの具体的な実施態様では、本発明は、第266位に余分なアラニン残基を有するアミノ酸配列番号2を含むポリペプチド、または連続する少なくとも5個のアミノ酸残基を含むそのフラグメントに関するものである。本発明者らは、実際に、配列番号2の第266位にアラニン残基をコードしている余分なコドン (CAG)を含む、NTB-Aの対立遺伝子イソ型を特定した。そのため、得られるNTB-Aポリペプチドは、332個のアミノ酸を含む。

20

【0032】

ポリペプチドフラグメントは、エピトープ、特にBまたはT細胞エピトープ、ポリペプチドの、細胞内の他のタンパク質または分子との相互作用に関与する部分を包含する、ヒトNTB-Aの機能性ドメインもしくは部分、リン酸化ドメイン等々を含んでよい。本発明のポリペプチドフラグメントは、一般的には、300未満のアミノ酸、はるかに好ましくは250未満のアミノ酸を含む。

【0033】

本発明の特定のポリペプチドは、配列番号2の第22～第331アミノ酸残基を含むポリペプチド、または第266位に余分なアラニン残基を有するその変異型である。第22～第331残基は、成熟NTB-Aポリペプチドに相当する。

30

【0034】

本発明のもう一つのポリペプチドは、NTB-Aの単一ペプチド領域、特に配列番号2の第1～第21アミノ酸残基を含むポリペプチドである。

【0035】

本発明のもう一つのポリペプチドは、NTB-Aの細胞外領域、特に配列番号2の第22～第226アミノ酸残基を含むポリペプチド、または連続する少なくとも5個のアミノ酸を含むそのフラグメントである。より好適なフラグメントは、代表的には、連続する5～50個、はるかに好ましくは6～40個のアミノ酸を含む。この領域は、NTB-Aと、標的細胞上の推定されるリガンドとの相互作用の原因であり、NTB-Aの活性を調節すること、またはNTB-A活性のリガンド (内在性リガンドを包含する) もしくはモジュレーターについてスクリーニングすることに特に役立つ。そのサブフラグメントも、同様に用いることができる。

40

【0036】

本発明のもう一つのポリペプチドは、NTB-Aの貫膜領域、特に配列番号2の第227～第248アミノ酸残基を含むポリペプチド、または連続する少なくとも5個のアミノ酸を含むそのフラグメントである。より好適なフラグメントは、代表的には、連続する5～20個、はるかに好ましくは6～15個のアミノ酸を含む。

【0037】

本発明のもう一つのポリペプチドは、NTB-Aの細胞質内領域、特に配列番号2の第

50

249～第331アミノ酸残基を含むポリペプチド、または第266位に余分なアラニン残基を有するその変異型、または連続する少なくとも5個のアミノ酸を含むそのフラグメントである。より好適なフラグメントは、代表的には、連続する5～50個、はるかに好ましくは6～40個のアミノ酸を含む。この領域は、NTB-Aと、NK、BまたはT細胞による推定されるシグナリング分子もしくは受容体との相互作用の原因であり、NTB-Aの活性を調節すること、またはNTB-A活性の結合パートナーもしくはモジュレーターについてスクリーニングすることに役立つ。そのサブフラグメントも、同様に用いることができる。因みに、本発明のさらに一つのポリペプチドは、NTB-Aの機能性部分を含むポリペプチド、たとえば、SH2D1A結合ドメインまたはチロシン残基、特に配列番号2の第271～第276 (LEYVSV)、第282～第287 (TVYASV) または第306～第311 (TIYSTI) アミノ酸残基、またはNTB-Aの該残基を含む、より大きいポリペプチドフラグメントである。

10

【0038】

本発明は、一般的には、上記に定義されたとおりの核酸分子がコードしているアミノ酸配列を含むいかなるポリペプチドにも関するものである。

【0039】

本発明は、可溶性NTB-Aポリペプチドも包含する。

【0040】

本発明のポリペプチドは、いかなる異種配列または部分、たとえば安定剤、マーカー、タグ、標的化部分、薬物、サイトカイン、毒素等々に結合してもよい。それらは固体の支持体、たとえばカラム、ビーズ等々に結合または固定化してもよい。本発明のポリペプチドは、好ましくは、単離または精製された形態（すなわちその天然の環境にない）をなすか、または組換え宿主細胞から発現される。それらは、その他の活性分子またはアジュバントもしくは溶媒と組み合わせてもよい。該ポリペプチドは、抗体を生成し、免疫応答を調整し、NTB-Aの活性をインビトロ、エキソビボまたはインビボで調節し、NTB-A活性等々を調整する化合物についてスクリーニングするのに用いることができる。

20

【0041】

宿主細胞

本発明は、上記に定義されたとおりの核酸分子またはベクターを含む宿主細胞にも関するものである。好適実施態様では、該宿主細胞は、上記に定義されたとおりの核酸分子またはベクターを含み、上記に定義されたとおりのポリペプチドを発現する。該ポリペプチドは、好ましくは、該細胞の表面で発現される。該ポリペプチドは、細胞の細胞質内で発現されてよい、またはいかなる手段によって細胞から放出されてもよい。該ポリペプチドは、特に、その部分（たとえばTMおよび／または細胞質ドメイン）を除去することによって可溶性であるか、または分泌される分子として発現されてよい。

30

【0042】

該組換え細胞は、培養できるいかなる細胞、たとえば、細菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物細胞等々を包含する、原核または真核細胞であることもできる。該細胞は、細胞系または初代細胞であってよい。代表的な例は、大腸菌、サッカロミセス属、クライベロミセス属Kluyveromyces、昆虫細胞、哺乳動物繊維芽細胞または胚性細胞、HEK、CHO、COS、3T3、293等々を包含する。本発明は、特定のいかなる種類の宿主細胞にも限定されることはないと理解すべきである。

40

【0043】

好適実施態様では、該宿主細胞は、ヒトNTB-Aポリペプチドを自発的には発現しない細胞である。そのような宿主細胞は、好都合には、増大させた選択性を有するスクリーニングアッセイに用いることができる。

【0044】

本発明のもう一つの目的は、NTB-Aポリペプチドを発現する細胞を調製する方法であって、上記に定義されたとおりの核酸分子またはベクターをインビトロで細胞に導入する工程と、該ペプチドを発現する細胞またはその子孫を選択する工程とを含む方法である

50

。該核酸分子またはベクターの導入は、公知の様々な方法、たとえばDNA直接転移、脂質介在トランスフェクション、リン酸カルシウム沈澱、電気穿孔等々によって達成し得る。該細胞は、適切ないかなる培地で培養し、慣用のいかなる方法で貯蔵してもよい。

【0045】

抗体

本発明は、上記に定義されたとおりのポリペプチドに結合する抗体にも関するものである。該抗体は、好ましくは、動物を上記に定義されたとおりのポリペプチド、または上記に定義されたとおりの宿主細胞で感作することによって得られる。因みに、本発明の目的は、抗体を調製する方法であって、上記に定義されたとおりのポリペプチドをヒトではない哺乳動物に注入する工程と、該哺乳動物の血清または抗体産生細胞を回収する工程とを含む方法も包含する。

10

【0046】

該抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体はもとより、そのフラグメントおよび誘導体、特に、実質的に同じ抗原特異性を有する該抗体のフラグメントおよび誘導体であってよい。これらは、抗体フラグメント（たとえばFab、Fab'2、CDR等々）、ヒト化抗体、多機能抗体、一本鎖抗体（ScFv）等々を包含する。これらは、動物の感作、および血清（ポリクローナル）または脾臓細胞（適切な細胞系との融合によってハイブリドーマを調製するため）の回収を包含する、慣用の方法に従って調製してよい。

【0047】

マウス、齧歯類、霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、家禽等々を包含する、様々な種からモノクローナル抗体を調製する方法は、たとえば、Harlowら [Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988] またはKohlerら [Nature 256 (1975) 495] に見出し得る。略述すると、これらの方法は、動物を抗原で感作した後、脾臓細胞を回収し、次いで、これを不死化した細胞、たとえば骨髓腫細胞と融合することを含む。得られるハイブリドーマは、モノクローナル抗体を産生し、限定希釈によって選択して、個々のクローンを単離することができる。

20

【0048】

抗体は、たとえばWardら [Nature, 341 (1989) 544] に開示されたとおり、免疫グロブリンの組合せライブラリーの選択によって調製してもよい。

【0049】

上記に列挙されたとおりの様々な種からポリクローナル抗体を産生する方法は、たとえば、Vaitukaitisら、1971、1971に見出し得る。略述すると、抗原をアジュバント（たとえばフロイントアジュバント）と組み合わせ、代表的には皮下注射によって、動物に投与する。血液サンプルを回収し、免疫グロブリンまたは血清を分離する。

30

【0050】

Fabまたは(Fab')2のフラグメントは、プロテアーゼ消化によって、慣用の手法に従って調製してよい。ヒト化抗体は、以前に記載されたとおりに [Jones, 1986] 調製することができる。

【0051】

本発明の好適な抗体は、上記のと通りのNTB-Aポリペプチド、好ましくは、配列番号2のポリペプチド、もしくは第266位に余分なアラニン残基を有する変異型、またはそのフラグメント、特にNTB-Aの細胞外ドメインの全部または一部を含むフラグメントによる感作によって調製される。因みに、本発明の特に好適な抗体は、配列番号2の第22～第226アミノ酸残基に含まれるエピトープに特異的に結合する（モノクローナル）抗体である。

40

【0052】

本発明の最も好適な抗体は、機能性抗体、すなわち、NTB-Aの活性を調節する抗体、より詳しくは、標的細胞とのNTB-Aの相互作用を活性化または遮断できる抗体である。そのような抗体は、上記に開示された抗体をNK細胞および標的細胞に接触させ、該抗体がNK介在標的細胞溶解を遮断または活性化できる能力を決定することによって、さ

50

らに選択することができる。本発明は、そのような機能性（すなわち遮断性）抗体を調製かつ使用して、免疫細胞の活性を調節できることを示す。

【0053】

該抗体は、異種部分、たとえば毒素、標識、薬物その他の治療剤に、直接にか、またはカップリング剤もしくはリンカーの使用によるかして、共有結合もしくは非共有結合でカップリングしてよい。標識は、放射性標識、酵素、蛍光標識、磁性粒子などを包含する。毒素は、ジフテリア毒、ボツリヌス毒等々を包含する。薬物または治療剤は、リンホカイン、抗体、アンチセンス、成長因子等々を包含する。

【0054】

そのような異種部分を用いる方法は、たとえば米国特許第4,277,149号および第3,996,345号明細書に例示されている。

【0055】

本発明の抗体は、治療および診断の用途を包含する、様々な適用を有し、たとえば、サンプル（たとえば血漿または血清サンプル）中のNTB-Aポリペプチドの免疫精製または検出にも用いてよい。特に、以下に記載することになるとおりのスクリーニングアッセイにか、または対象者から回収されたサンプル、代表的には、哺乳動物、具体的にはヒトという対象者からの血液サンプル中のNTB-Aポリペプチドの存在（または量）を検出または定量するのに、インビトロで用いることができる。

【0056】

スクリーニング

本発明は、NK細胞、およびあり得ることにはTおよびB細胞の活性、ならびに免疫系の調節に参与する新規な分子を提供する。この分子はもとより、対応する核酸、宿主細胞、プラスミドおよびその結合パートナーも、化合物、特に生物学的活性化合物、特に免疫調節およびNK調節の分野のそれについてスクリーニングするのに用いることができる。

【0057】

特に、本発明は、試験化合物がNTB-Aの活性を調節できる能力を決定する工程を含む、化合物のスクリーニングの方法にも関する。本発明の文脈中で、用語「NTB-Aの活性」は、NTB-Aの発現はもとより、NTB-Aポリペプチドの生物学的活性も包含する。したがって、NTB-Aの活性を調節することは、NTB-A合成の調節（たとえば、転写、翻訳、転送、細胞膜への輸出、翻訳後修飾等々）はもとより、NTB-Aの生物学的活性の調節（たとえばリガンドとのその相互作用、NTB-Aの架橋結合または内部化、NTB-Aのリン酸化または転移、細胞におけるその他のパートナーとのNTB-Aの会合等々）も包含する。

【0058】

好適化合物は、NTB-Aの活性を選択的に調節する、すなわち、もう一つのNK細胞受容体には基本的に直接干渉しないが、二次的効果が誘導され得るそれである。

【0059】

特定の実施態様では、この方法は、試験化合物が、

- NTB-Aに結合するか、
- NTB-Aを活性化するか、
- NTB-Aを阻害するか、
- NTB-A合成を阻害するか、
- NTB-A合成を刺激するか、
- 推定されるその内因性リガンドとのNTB-Aの結合を調整するか、
- 標的細胞とのNTB-A（またはNK細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、組換え細胞等々のような、NTB-Aを発現する細胞）の相互作用を調整（たとえば遮断または活性化）するか、
- NTB-Aが介在する、NK細胞によって誘導される標的細胞の溶解を調整（たとえば遮断または活性化）するか、
- NTB-AとSH2D1Aとの相互作用を調整するか、あるいは

10

20

30

40

50

－NTB－AとSHPとの相互作用を調整することができる能力を決定する工程を含む。

【0060】

特定の実施態様では、本発明は、化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物を上記に定義されたとおりのポリペプチドに接触させる工程と、該試験化合物が該ポリペプチドに結合できる能力を決定する工程とを含む方法にある。該ポリペプチドは、細胞によって、特に該細胞の表面で単離されるか、または発現されてよい。

【0061】

したがって、本発明は、化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物を上記に定義されたとおりの宿主細胞（該宿主細胞は、NTB－Aポリペプチドを発現する）に接触させる工程と、該試験化合物が該ポリペプチドに結合できる能力を決定する工程とを含む方法にも関するものである。

【0062】

試験化合物がNTB－Aポリペプチドに結合できる能力は、当技術に公知の様々な手法によって決定してよい。インビトロでは、この結合は、電気泳動、SPA、FRET等々、またはNTB－Aポリペプチドの標識化されたりガンドとの競合によって決定してよい。因みに、好適実施態様では、結合は、試験化合物が標識化されたりガンドの結合を調整できる能力を測定することによって決定される。標識化されたりガンドは、たとえば抗体であってよい。

【0063】

本発明は、化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物を上記に定義されたとおりの宿主細胞（該宿主細胞は、NTB－Aポリペプチドを発現する）に接触させる工程と、該試験化合物がNTB－Aポリペプチドに特徴的な生物学的応答を誘導できる能力を決定する工程とを含む方法にも関する。該生物学的応答は、たとえば、結合パートナー、細胞溶解活性等々であってよい。

【0064】

特定の実施態様では、本発明は、試験化合物を、NTB－Aに特異的な抗体の存在下でNK細胞に接触させる工程と、該NK細胞の細胞溶解活性を測定することによって該試験化合物の活性を決定する工程とを含む。

【0065】

さらに一つの実施態様では、本発明は、化合物を選択、スクリーニングまたは特徴付ける方法であって、試験化合物をNTB－Aポリペプチドに、その結合パートナーの存在下で接触させる工程と、該試験化合物が該NTB－Aポリペプチドと該結合パートナーとの相互作用を調整できる受容能力を評価する工程とを含む方法に関する。該結合パートナーは、たとえば、SH2D1AまたはSHPの全部もしくは一部である。本発明は、NTB－Aが細胞質内ドメイン内に、SH2D1AまたはSHPのようなシグナリング分子との結合を許す領域を含むことを実際に示す。さらに、本発明は、そのような相互作用が、生理学的条件下で実際に生じることを示す。したがって、該相互作用に干渉できる能力を有する化合物のスクリーニングは、NTB－Aの活性を調節できる能力を有する分子を提供する。そのようなスクリーニングは、NTB－Aポリペプチド（またはその細胞質内ドメインの全部もしくは一部を含むその一部分）を試験化合物および結合パートナーに接触させることによって、インビトロで実施することができる。

【0066】

もう一つの実施態様では、該結合パートナーは、NTB－Aのリガンド、特に標的細胞が発現するリガンドである。したがって、該相互作用に干渉できる能力を有する化合物のスクリーニングは、NK細胞が介在する標的細胞の溶解を遮断または刺激できる能力を有する分子を提供する。そのようなスクリーニングは、NTB－Aポリペプチド（またはその細胞質外ドメインの全部もしくは一部を含むその一部分）を試験化合物およびリガンド、または該リガンドを発現する標的細胞に接触させることによって、インビトロで実施す

10

20

30

40

50

ることができる。

【0067】

特定の実施態様では、スクリーニング方法は、(i) 試験化合物がNTB-Aポリペプチドに結合できる能力を決定する工程と、(ii) 工程(i)で選ばれた試験化合物が、NK細胞が介在する標的細胞の溶解を調節（たとえば遮断、緩和または刺激）できる能力を決定する工程とを含む。

【0068】

該試験化合物は、有機生成物、脂質、ペプチド、タンパク質、核酸（たとえばアンチセンス）等々を包含する、いかなる合成化合物であってもよい。該アッセイは、適切ないかなる装置、たとえばプレート、試験管、ディッシュ、フラスコ等々内で実施してもよい。10
代表的には、該アッセイは、多穴プレートで実施する。いくつかの試験化合物を平行して検定することができる。さらに、該試験化合物は、様々な起源、性質および組成のものであってよい。単離されているか、または他の物質との混合物中のいかなる有機もしくは無機物質であってもよい。該化合物は、たとえば、生成物の組合せライブラリーの全部または一部であってもよい。

【0069】

使用

本発明は、新規タンパク質および対応するスクリーニング方法を開示する。該タンパク質は、免疫機能の調節に関与し、そのため、その調整または調節は、インビボでの免疫機能の調節を生じることができる。特に、NTB-Aの活性を調節する化合物は、NK細胞20
、B細胞またはT細胞の活性を調節するのに、特にNK細胞の活性、より具体的にはNK細胞介在細胞溶解を刺激または阻害するのに用いてよい。したがって、そのような化合物は、NK細胞の活性が関与する病理学、たとえばウイルス感染、腫瘍その他の増殖性疾患、自己免疫疾患等々の治療、予防または診断に用いるのに適している。例示するならば、本発明は、X染色体関連リンパ球増殖性疾患の患者を治療するのに用いることができる。

【0070】

したがって、本発明の目的は、対象者における免疫応答を調節する方法であって、NK細胞の活性を（選択的に）調節する化合物を該対象者に投与する工程を含む方法にある。本発明は、NTB-Aの活性を（選択的に）調節する化合物を、対象者における免疫応答を調節する医薬を製造するのに用いる使用にも関する。30

【0071】

本発明は、NTB-Aの活性を調節する化合物と、薬学的に許容され得る賦形剤または担体とを含む製剤組成物にも関する。特定の組成物は、NTB-Aの活性を刺激するか、またはNTB-Aの活性を阻害する化合物を含む。

【0072】

本発明の組成物は、もう一つのNK細胞受容体、特に2B4受容体を調節する化合物をさらに含む。そのような組成物は、特にXLP疾患において、そのような患者のNKまたはT細胞活性を回復することによって、インビボでの有意な効果をもたらす。したがって、本発明の特定の目的は、NTB-A受容体を調節する化合物と、2B4受容体を調節する化合物とを、併用、逐次使用または分離使用のために含む組成物にある。該化合物は、40
好ましくは、NTB-A活性を阻害または低減する化合物、特に上記の方法によって選択されたか、または特定された抗体もしくは分子である。以下に与えられる実施例は、そのような組み合わせられた処置が、XLP疾患の患者においてNK細胞の活性を回復する効力を例示する。

【0073】

該化合物は、様々な経路に従って、たとえば静脈内、動脈内、筋内、皮内、腹腔内等々によって投与してよい。該化合物は、当業者が適合させることができる様々な投与量で用いてよい。

【0074】

該化合物は、ヒトである対象者の免疫応答を刺激するのに、特にヒトである対象者のN 50

K細胞を刺激するのに特に適している。

【0075】

本発明は、対象者における機能不全を診断する方法であって、NTB-A遺伝子またはRNAの突然変異もしくは変更の存在を決定する工程、またはNTB-Aポリペプチドの存在もしくは量を決定する工程を含む方法にも関するものである。これらの方法は、上記の抗体または核酸プライマーもしくはプローブを用いて実施してよい。該方法は、該対象者に由来するいかなるサンプル、たとえば血清、血液、血漿、その他の生物学的流体、組織サンプル等々で実施することもできる。

【0076】

本発明のそれ以上の態様および利点は、下記の実施例に開示されることになるが、これらは、本願の対象範囲を例示するものと見なさなければならず、限定するものと見なしてはならない。引用された参考文献は、すべて、参照によってここに組み込まれる。

【0077】

材料および方法

モノクローナル抗体 (mAb)

5週齢のBALB/c系マウスを、以前に記載されたとおり[6、8、9]、NKクローンであるKK4(表面表現型:CD3;CD16;CD56NCR;CD94/NKG2A)で感作することによって、MA127のmAbを得た。本発明者らの研究室で調製した下記のmAbをこの研究に用いた:JT3A(IgG2a、抗CD3)、BAB281およびKL247(それぞれIgG1およびIgM、抗NKp46)、Z231およびKS38(それぞれIgG1およびIgM、抗NKp44)、Z25およびF252(それぞれIgG1およびIgM、抗NKp30)、PP35およびS39(それぞれIgG1およびIgG2a、抗2B4)、KD1およびc127(それぞれIgG2aおよびIgG1、抗CD16)、c218およびGPR165(それぞれIgG1およびIgG2a、抗CD56)、A6-136(IgM、抗HLAクラスI)、XA185(IgG1、抗CD94)、ならびにZ199およびZ270(それぞれIgG2aおよびIgG1、抗NKG2A)。D1.12(IgG2a、抗HLA-DR)というmAbは、R.S. Accolla博士(Pavia、イタリア国)が提供した。HP2.6(IgG2a、抗CD4)というmAbは、P. Sanchez-Madrid博士(Madrid、スペイン国)が提供した。WT31(IgG1、抗TCR-)は、Becton Dickinsonが購入した。

【0078】

ポリクローナルまたはクローナルNK細胞集団の精製

PBLを得るために、PBMCをFicoll-Hipaque勾配上で単離し、プラスチック付着性細胞を枯渇させた[6]。PBLを抗CD3(JT3A)、抗CD4(HP2.6)および抗HLA-DR(D1.12)mAbとともに(4℃で30分)、次いでヤギ抗マウス被覆したDynabeads(Dynal)とともに(4℃で30分)温置し、免疫磁気枯渇させることによって[6]、富裕化されたNK細胞を単離した。CD3、CD4、DR細胞を、照射した支持細胞上で、100U/mlのrIL-2(プロロイキン;Chiron Corp.)および1.5ng/mlのPHA(Gibco BRL)の存在下で培養して、ポリクローナルNK細胞集団、または限定希釈後に[6、8]NK細胞クローンを得た。

【0079】

XL Pの患者

この研究で分析したXL P患者は、イソロイシンのアミノ酸変化への移行へと導く、翻訳開始コドンにおけるGからTへのヌクレオチド変化(ATGからATTへ)(患者A)、および第55コドンでの成熟前終結へと導く、第163位におけるCからTへのヌクレオチド変化(患者BおよびC)によって代表される、SH2D1Aの座での突然変異に影響される。以前に記載した通り[28]、これらの突然変異は、SH2D1Aタンパク質の完全な不在を招く。

【0080】

細胞溶解活性および流動細胞蛍光測定法による分析

NK細胞を、以前に記載されたとおりの〔6、8、9、28〕、4時間の 51Cr 放出アッセイで、(FcR) P815というマウス mast 細胞腫細胞系、またはリンパ芽球腫細胞系 (LCL) 721.221というEBV細胞系 (HLAクラスI; CD48; FcR) に対する細胞溶解活性について、NK細胞を試験した。加えた様々なmAbの濃度は、再指向致死については 0.5g/ml 、または遮蔽実験については 10g/ml であった。E/T比は、文脈中に示す。単色または二色細胞蛍光測定分析 (FACSscan (登録商標); Becton Dickinson) のためには、細胞を、適切なmAb、次いで、PEまたはFITC結合イソ型特異的ヤギ抗マウス第二試薬 (Southern Biotechnology Associates, Inc. [6、8、9]) で染色した。

【0081】

10

NTB-A分子の生化学的特性記述

20106細胞を、以前に記載された〔28〕とおり、ビオチン (Pierce Chemical Co.) で標識化した。1%のNP-40細胞溶解物を、セファロース-P (Amersham Pharmacia Biotech) 結合mAbで免疫沈降させた。サンプルを、N-グリコシダーゼF (Boehringer; 参考文献28) で消化していないか、または消化した不連続SDS-PAGEによって分析し、Immobilon P (Millipore) に移転した。Neutravidin (Pierce Chemical Co) で染色した後、Renaissance Chemiluminescence Kit (NEN Life Science Products) を用いて検出した。

【0082】

NTB-Aシグナル形質導入経路の分析

20

NK細胞〔10、8〕を、100Mの過バナジン酸ナトリウムで刺激したか、またはしなかった〔28〕。1%NP-40または1%ジギトニン細胞溶解物を、セファロース-P (Amersham Pharmacia Biotech) 結合mAbで免疫沈降させた。サンプルを、不連続SDS-PAGEにて分析し、Immobilon P (Millipore) に移転し、(a) 抗ホスホチロシンmAb (PY20-HRPO; Transduction Laboratories) で; (b) 抗SHP-2または抗SHP-1mAb (それぞれPTP1DおよびPTP1D; Transduction Laboratories)、次いでウサギ抗マウスHRPO (Dako) で; (c) 抗SH2D1Aウサギ抗血清 (Eurogentec S.A.が製造; 参考文献28)、次いでロバ抗ウサギHRPO (Amersham Pharmacia Biotech) で調べた。検出には、Renaissance Chemiluminescence Kit (NEN Life Science Products) を用いた。NTB-Aの既知のシグナル形質導入分子との推定される会合は、1%ジギトニン細胞溶解物から得られた抗FcRI (E. Vivier, Marseille、フランス国が提供)、抗DAP12 (SI-28; 参考文献10) および抗LAT (UBI; Upstate Biotechnology) 抗血清でか、または抗CD3mAb (TIA/2; Immunotech) によるNTB-A免疫沈降物を調べることによって分析した。

30

【0083】

COS-7におけるcDNA発現によるライブラリスクリーニング、およびSib選択

以前に記載された〔7〕とおり、ライブラリスクリーニングを実施した。略述すると、異なる10のプールに分画したcDNAライブラリを、非リボソームFuGene-6試薬 (Roche) を用いて、製造者の指示に従って、COS-7細胞に一時的トランスフェクションした。陽性プールの選択は、特異的な抗NTB-AmAbのMA127を用いた免疫細胞化学的染色、およびsib選択によって実施した。

40

【0084】

DNA配列および逆転写PCR分析

d-ローダミンターミネーターサイクル配列決定キット、および377ABIの自動配列決定装置 (PerkinElmer/Applied Biosystems) を用いて、DNA配列決定を実施した。KALI cDNAがコードしている、推定されるタンパク質の解析を、GeneWorksの2.5.1Nおよび<http://genome.cbs.dtu.dk/htbin/nph-webface>というサイトを用いて実施した。RNAzol (Cinna/Biotecx) を用いて抽出したRNA、およびオリゴ (dT) で開始したcDNAを、標準的手法によってポリクローナルNK細胞集団および胸腺細胞から製造した。プライマーのKALIアップ (ATGの開始コドンを含む) : 5 GCG

50

GAA AGC ATG TTG TGG、およびK A L I ダウン（3の非翻訳領域内に設定）：5' TCA TTC CCG AAT TCC TCT Gのセットを用いて、K A L I - O R Fを増幅した。95℃で12分の予備活性化後に、30サイクルのPCR（30秒、95℃；30秒、60℃；および30秒、72℃）を、T A Q - G O L D（PerkinElmer/Applied Biosystems）を用いて実施した。得られた増幅生成物を、真核T O P O - T A クローニングキット（Invitrogen）を用いてp c D N A 3. 1 / V 5 / H i s - T O P O ベクター内にクローニングした。

【0085】

一時的トランスフェクション

C O S - 7 細胞（ 5×10^5 /プレート）に、V R 1 0 1 2 / K A L I 構成体を、FuGen e-6試薬（Roche；参考文献23）を用いてトランスフェクションした。48時間後、トランスフェクションした細胞を、M A 1 2 7（抗N T B - A）およびP P 3 5（抗2 B 4；負の対照として）のm A b、次いでI g G 1のP E結合ヤギ抗マウス第二試薬で染色し、F A C S o r t（登録商標；Becton Dickinson）を用いたフローサイトメトリーによって分析した。

【0086】

染色体の定位およびZoo-Blot分析

20の多染色体ヒト/ハムスター体細胞ハイブリッドに加えて3種類の対照ゲノムDNA（ヒト、ハムスターおよびマウス）を有する、体細胞ハイブリッドブロッティング（BIOS Laboratories）を用いて、K A L I 遺伝子を特定の染色体に割り当てた[10]。K A L I 遺伝子の読み取り枠をプローブとして用いて、高緊縮ハイブリダイゼーションを実施した[37]。K A L I 遺伝子の交差特異性保存の分析を、CLONTECH LaboratoriesからのZoo-Blotを用いて実施した。このサザンブロットは、ヒト、アカゲザル、Sprague-Dawley系ラット、B A L B / c 系マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリおよび酵母サッカロミセス・セレビシエからのゲノムDNAを含んだ。洗浄は、低緊縮条件下で実施した[7]。

【0087】

結果

N T B - A 分子の特定および細胞内分布

マウスを、ヒトNK細胞クローンのK K 4（表面表現型：C D 3；C D 1 6；C D 5 6 N C R；C D 9 4 / N K G 2 A）で感作した。細胞融合の後、M A 1 2 7（I g G 1）と呼ばれるm A bを、F c R P 8 1 5というマウス標的細胞に対する再指向致死アッセイにおいてポリクローナルまたはクローナルNK細胞（感作中のNK細胞クローンK K 4を包含）に細胞傷害性を誘導できるその能力に基づいて選択した（下記を参照されたい）。M A 1 2 7 反応性分子の細胞表面分布を、正常な供与者からの末梢血単核細胞（P B M C）における間接免疫蛍光および細胞蛍光測定分析によって分析した。表Iに示したとおり、M A 1 2 7 m A bは、NK、TおよびBリンパ球を明るく染色した。一方、単球、顆粒球、および一群の非リンパ細胞系では、反応性が全く検出されなかった。NK細胞またはT C R - / 細胞もしくは胸腺細胞のいずれのポリクローナル集団も、ビオチンで表面標識化され、M A 1 2 7 m A bによって細胞溶解物が免疫沈降した。すべての事例で、このm A bは、還元性（図1）および非還元性（図示せず）の両条件下で、60kDの表面分子を免疫沈降させた。N-グリコシダーゼによる処理後に残留したタンパク質骨格は、37kDの分子量を示した。これらのデータは、M A 1 2 7 m A bが、NK細胞ばかりでなく、TおよびBリンパ球によっても発現される、新規な触発性分子を認識し得ることを示唆しており；以後、この分子をN K - T - B 抗原（N T B - A）と呼んだ。

【0088】

抗N T B - A m A b 介在交差結合に対する応答におけるクローンの不均質性

NK細胞クローン間には、与えられたH L A クラス I 陰性の標的細胞を死滅できるその能力に不均質性が存在し、これは、N C R のディファレンシャル発現を反映することが示されている[12]。そのため、強い細胞溶解活性を示すNK細胞クローンは、高レベルのN C R を発現する（N C R ブライト）のに対し、低い細胞溶解活性を有するものは、少

ない量のNCRを発現する(NCRダル)。重要なことに、NCRの表面密度も、2B4の機能と相関することが見出された。したがって、2B4は、両種類のNK細胞クローンで類似する表面密度を発現されるが、NCRブライトのものによってのみ、細胞傷害性を誘導する[23]。NCRブライトまたはNCRダルの表現型のいずれかを示す一群のNK細胞クローンを、MA127mAbの存在下でのP815標的細胞に対する再指向致死アッセイで分析した。図2に示したとおり、NKp46ブライトクローンは、抗NCRおよび抗2B4または抗NTB-AmAbの双方に対して応答性を有したが、NKp46ダルクローンは、これらのmAbのすべてに対して不十分に応答したにすぎない(抗CD16mAbには十分に応答したが)。顕著なことに、分析したNK細胞クローンは、すべて、NTB-Aの類似する表面密度を発現した(図示せず)。抗NTB-AmAbに対する応答性とNKp46の表面密度との関連性をさらに探求するために、本発明者らは、NKp46分子の表面調整の効果を分析した。このために、NKp46ブライトクローンを、固定化された抗NKp46mAb(KL247、IgM)の存在下で終夜温置した。これは、細胞表面からのNKp46分子の実質的に完全な消滅を招いた[23; データ示さず]。この処理は、NTB-Aまたは他のNK細胞表面分子の表面発現に影響しなかった。異なる表面分子に仕向けたmAbに対するその応答性を分析するため、P815標的細胞に対する再指向致死アッセイにおけるエフェクターとして、NKp46で調整したクローンをを用いた。NKp46が、マウスの標的の認識および溶解の際に主要なヒト受容体として機能することを示す、以前のデータ[7、12、38]に一致して、NKp46調整NK細胞は、P815細胞を(mAbの不在下で; 図2b; 参考文献23)自発的に溶解できる能力の明確な減退を示した。重要なことに、異なるmAbの効果の分析は、不応性は、抗NKp46または抗2B4mAb[23]ばかりでなく、抗NTB-AmAbにも限られる。逆に、抗NKp44、抗NKp30または抗CD16mAbに対する応答は、影響されなかった[23]。これらのデータは、抗2B4mAbを用いた以前のデータ[23]を思い出させ、NTB-AもNK細胞活性化の機序における共受容体として機能し得ることを示唆する。しかし、NTB-Aの細胞表面分布と分子量とは、ともに、2B4のそれとは明確に別個であることに注目されたい(表Iおよび図1を参照されたい)。

【0089】

EBV標的細胞のNK介在致死におけるNTB-Aの関与

2B4は、(HLAクラスI; CD48; FcR)のLCL721.221のようなEBV感染細胞の認識および致死の過程で、NKp46に協力することが示されている[28]。逆に、NKp30、NKp44およびNKG2Dを包含する、NK細胞が発現するその他の触発性受容体の、LCL721.221のNK介在溶解への寄与は、極めて僅かであるか、または不在である(データ示さず)。本発明者らは、NTB-Aも、これらの標的細胞の溶解に関与しているか否かを分析した。そのため、正常な供与者に由来するNK細胞クローンを、LCL721.221(図2c)またはドーディバーキットリンパ腫(図示せず)の細胞系に対する細胞溶解活性について、NTB-A、2B4またはNKp46に仕向けたmAbの不在もしくは存在のいずれかの下で評価した。mAbが介在するNTB-Aまたは2B4のいずれかの遮断は、これらの標的のNK介在致死に有意には影響しなかった。しかし、NTB-Aおよび2B4に仕向けたmAbの併用は、溶解の部分的阻害を招いた。重要なことに、NKp46のmAb介在遮断によって得られる阻害効果は、抗NTB-Aまたは抗2B4mAbのいずれかの存在下で有意に増強され、3分子がそれぞれのmAbによって同時に遮断されたときに、最大の阻害が得られた。単独でか、または併せて用いられた、イソ型に合わされた抗CD56mAbは、阻害効果が皆無であった(示さず)。これらのデータは、正常細胞では、NTB-Aは、2B4とともに、EBV標的細胞に対するNK介在細胞傷害性の誘導の際、NKp46に協力することを示唆する。その上、データは、NTB-Aが、2B4と同様に、EBV標的細胞で発現された細胞表面リガンドを認識することを示唆する。しかし、正常なNK細胞を用いて得られたデータは、EBV標的細胞に対する細胞溶解活性には、異なる受容体(たとえばNKp46)および共受容体(たとえばNTB-Aおよび2B4)が関与するため、説明が困難で

あり得ることを強調しなければならない。一方、NTB-Aが、2B4と同様に[28]、EBV標的細胞を実際に認識できることは、NK92という白血病NK細胞系をエフェクター細胞源として用いる実験によって確認された。この細胞系は、NTB-A 2B4であるが、非常に少量のNKp46を発現する(示さず)。したがって、NKp46のmAb介在交差結合は、再指向致死アッセイでは、P815に対するNK92介在細胞傷害性を誘導できなかった(図2d)。しかし、重要なことに、このアッセイでは、NK92細胞の細胞傷害性は、NTB-Aまたは2B4のいずれかのmAb介在交差結合によって強く増強されることができなかった。これらのデータは、(正常なNK細胞と異なる)NK92細胞の場合、NTB-Aおよび2B4介在活性化は、ほとんどNKp46依存性であることを示唆する。そのため、NK92細胞系は、EBV標的細胞の認識および致死へのNTB-Aの関与を解明するための有用な手段を提供する。実際、図2dに示したとおり、NK92細胞は、LCL721、221標的細胞に対しては強い細胞溶解性を有した。NTB-Aまたは2B4のいずれかのmAb介在遮蔽は、細胞傷害性の一貫した阻害を招いたのに対し、両mAbの併用は、LCL721、221のNK92介在致死の実質的な排除を招いた。併せると、これらのデータは、NTB-AがEBV標的の認識に関与するという意見を裏付ける。

【0090】

NTB-A介在シグナル形質導入経路

NTB-A分子を、過バナジン酸ナトリウムで処理したか、または処理しなかったポリクローナルNK細胞集団から免疫沈降させた。NTB-A分子のチロシンリン酸化は、過バナジン酸ナトリウム処理した細胞から得た免疫沈降物では一貫して検出できたが、未処理細胞からのものでは検出できなかった(図3a)。逆に、NTB-Aは、CD3、FcRIおよびDAP12を包含する、シグナル形質導入ポリペプチドとは会合しなかった。これらのデータは、NCRとは異なるが、2B4とは同様に、NTB-A分子が、その細胞質内部分にチロシンに基づくモチーフを示し得ることを示唆する。これらのモチーフは、活性化シグナルの形質導入に関与する、細胞質内分子との会合に介在する可能性があった。この可能性を分析するため、上記のとおり得たNTB-A免疫沈降物を、抗SH2D1A抗血清、またはSHP-1もしくはSHP-2に特異的なmAbを用いて調べた。対照としては、同一の細胞溶解物を、2B4、または阻害性受容体タンパク質60(IRp60)もしくはNKp46に特異的なmAbで免疫沈降させた。2B4は、SHP-1と、また過バナジン酸ナトリウム処理またはmAb介在交差結合の際には、SH2D1Aと会合することが示されている[27~29]。一方、IRp60は、SHP-1とSHP-2との双方と会合する、チロシンに基づく免疫阻害モチーフ(ITIM)を有する受容体である[39]が、NKp46は、細胞質の尾部にチロシンに基づくモチーフを欠き、CD3およびFcRIのITAM含有貫膜アダプター分子との会合を介して、活性化シグナルを形質導入する[4]。この分析は、未処理および過バナジン酸ナトリウム処理細胞の双方から得られたNTB-A免疫沈降物中の、SHP-1の存在を明らかにした。対照的に、SHP-2とのNTB-Aの会合は、処理細胞にのみ検出できたにすぎない(図3c)。注目すべきことに、過バナジン酸ナトリウムによる処理は、SH2D1A分子とのNTB-Aの会合にも導いた(図3c)。併せると、これらのデータは、NTB-A分子が、PBMCには明確な表面分布を示すものの、2B4と同様の機能的および分子的特徴性を示すとの理念を強化した。

【0091】

NTB-Aは、XLP-NK細胞では活性化シグナルではなく阻害シグナルを仲介する

2B4との類似性に注目して、本発明者らは、XLPに罹患した異なる患者からのポリクローナルおよびクローナルNK細胞におけるNTB-Aの機能を分析した(材料および方法を参照されたい)。NTB-Aおよび2B4を包含する様々な表面分子に特異的なmAbの存在もしくは不在のいずれかの下での、P815マウス標的に対する、再指向致死アッセイで分析した。図4aに示したとおり、かつ以前のデータ[28]と一致して、代表的なXLP患者AからのNK細胞では、2B4は、活性化ではなく阻害性の機能を示し

10

20

30

40

50

たが、CD16（示さず）およびNCRは、正常な触発能を示した。重要なことに、特異的mAbによるNTB-Aの交差結合も、自発的な細胞傷害性の顕著な阻害をまねいた。はるかに大きい阻害効果は、NTB-Aおよび2B4mAb双方の存在下で観察された（図4a）。その上、NTB-Aの交差結合は、抗CD16（示さず）または抗NCRMAbによって誘導される細胞溶解活性を阻害することができた。以前の結果に整合して[28]、抗2B4mAbの存在下で、類似する阻害活性が観察された。示されてはいないが、XLP-NK細胞内のSH2D1Aの不在は、細胞表面でのNTB-Aの発現レベルに影響しなかった。NTB-Aが、2B4と同様に、EBV標的細胞で発現された細胞表面リガンドを認識し得るとの観察に基づき（上記を参照されたい）、本発明者らは、XLP-NK細胞では、この相互作用がNTB-Aを介しての阻害シグナルの発生を誘導できるか否かを問うた。XLP-NK細胞を、大量のCD48（すなわち2B4の天然のリガンド）を発現する、（HLAクラスI；CD48；FcR）LCL721.221というEBV細胞系を溶解できるその能力について、さらに分析した。以前の報告[28]に一致して、これらの標的細胞は、正常なNK細胞によって十分に溶解されたが、XLP-NK細胞による溶解には耐性であった（図4b）。2B4[28]またはNTB-A分子のいずれかのmAb介在遮蔽は、LCL721.221細胞の溶解の部分的回復を招き；この効果は、両分子の同時遮蔽によってさらに増強された（図4b）。2B4とは異なり、NTB-A分子が、エフェクター（NK細胞）と標的（B細胞）との双方によって発現されることは、注目すべきである。しかし、溶解の回復は、標的細胞ではなくエフェクターの抗NTB-AmAbによる前処理の際にのみ検出できたにすぎない（示さず）。同様な結果は、患者B[28]、および同じ突然変異を有する患者Cに由来するXLP-NK細胞で得られた（示さず）。

【0092】

こうして、XLP患者におけるSH2D1Aの欠如は、2B4ばかりでなく、新たに特定されたNTB-A分子の著しい機能不全も招いた。したがって、両分子とも、XLP-NK細胞がEBV標的細胞を死滅できる能力に寄与するように思われる。

【0093】

NTB-A表面分子をコードしているcDNAの分子クローニングおよび特性記述

NTB-A分子をコードしているcDNAを、NK細胞由来cDNAの発現ライブラリーから、MA127mAbを用いて単離した[7]。このcDNA（KALIと称される）は、2,744bpの長さを特徴とした。COS-7細胞内のVR1012/KALI構成体のトランスフェクションは、MA127mAbによって明るく染色される分子の表面発現を許した（図5）。その上、MA127mAbは、細胞トランスフェクション物から、あるタンパク質を特異的に免疫沈降させ、それは、N-グリコシダーゼFによる処理後に、ポリクローナルNK細胞に由来するNTB-A分子のそれと同一のタンパク質骨格を示した（示さず）。予測されたアミノ酸配列は、Ig-SFに属する331アミノ酸のI型貫膜タンパク質と一致する（図6）。NTB-A分子は、204残基の細胞外領域に先行する、21アミノ酸のリーダーペプチドを特徴とする。タンパク質の配列分析は、細胞外部分が、N末端のV型ドメイン（古典的なジスルフィド結合を欠く）と、後続するC2型ドメイン（二つの可能なドメイン内ジスルフィド結合を特徴とする）とによって構成されることを示唆する。細胞外部分は、Nに結合した可能な糖鎖形成部位を含むが、推定されたO-糖鎖形成部位は含まれなかった。23アミノ酸長の貫膜領域は、荷電したアミノ酸残基を欠くが、3個のチロシン残基を有する比較的長い（83アミノ酸）細胞質内部分が先行する。二つのチロシン残基は、TxYxxV/Iという、2B4細胞質尾部で最近記載された[25~28]モチーフの一部である。注目すべきことに、これらのモチーフは、SH2D1Aとの会合のための共通配列を表すと考えられる。第三のチロシン残基は、2B4細胞質尾部に不在である、古典的なITIM（L/V/L/SxYxxL/V；参考文献3）に包含される。異なるNK細胞クローンに由来するRNAに対して、KALIのORF特異性プライマーを用いて実施した逆転写（RT）PCRは、NTB-Aの推定される対立遺伝子イソ型をコードしている、第二のcDNAの存在を明らかにした。

このcDNAは、成熟タンパク質の第266位のAla残基の挿入を招く、余分なコドン(CAG)を特徴とする。GenBank/EMBL/DBJデータベース内のNTB-Aのアミノ酸配列と、以前に特定されたその他のタンパク質との比較は、CD84との相同性(25%の同一性)を明らかにした[40]。サザンブロット分析による染色体の定位は、ヒトの第一染色体上のNTB-Aコーディング遺伝子の分離を明らかにした(示さず)。顕著なことに、CD2サブファミリーの様々な成員をコードしているすべての遺伝子についても、同じ染色体定位が確立している[24]。この発見は、Ig様ドメインの詳しいコア構造(N末端の非ジスルフィド結合IgVドメイン、およびあり得る二つのドメイン内ジスルフィド結合を有する膜近位IgC2ドメインを特徴とする)と相まって、NTB-Aが、CD2サブファミリーの新規な成員を表すことを示唆する。最後に、KAL1

10

【0094】

考察

この研究で、本発明者らは、NTB-Aを特定し、分子的に特性記述し、クローニングしたが、それは、CD2サブファミリーに属する新規な触発性表面分子であって、NK、TおよびBリンパ球を包含する、休止および活性化リンパ系集団で発現される。2B4と同様に[23]、NTB-Aを介しての正常NK細胞の触発は、NKp46の同時結合を必要とする。共受容体としてのNTB-Aの役割は、mAb介在遮蔽実験によってさらに文書化される。これらの実験では、正常なNK細胞が介在する、EBVに感染したB細胞系の溶解を、NTB-A、NKp46および2B4の同時遮蔽によって阻害した。生化学的分析は、NTB-Aが、2B4と同様に[27、28]、SH2D1AおよびSHPと会合することを明らかにした。SH2D1Aは、小さい細胞質内アダプター分子であって、その発現は、高度に調節されているように思われる。実際、休止細胞では、非常に低レベルのSH2D1Aを検出することができるが、細胞を活性化すると、それらは劇的に増加する[41]。SH2D1Aが同時刺激に直接的な役割を果たし得ると思われぬ。一方、SH2D1Aは、NTB-A介在活性化シグナルの形質導入に、この活性化共受容体との結合について細胞質内ホスファターゼと競合することによって、単純に参加するように思われる。この流れに沿って、従来の報告は、SH2D1Aが、2B4[27、28]およびCD150[42]を介しての活性化シグナルの形質導入に決定的重要であることを示した。その上、2B4のチロシンリン酸化、およびSH2D1Aとの会合が、過バナジン酸ナトリウム処理ばかりでなく、2B4mAb介在交差結合の際にも検出された[29]。NTB-Aが、チロシンリン酸化の際にSH2D1Aと会合するとの発見は、本発明者らに、XLPに罹患した個体におけるNTB-Aの機能を調べさせることになった[33、34]。XLPは、SH2D1Aコーディング遺伝子の死活的な突然変異を特徴とする[30、35、36]。XLP患者は、EBV感染の制御不能を招く重篤な免疫不全に苦しむ。従来の研究は、SH2D1Aと会合した分子が、細胞溶解性細胞がEBV感染標的細胞を死滅させるのに失敗することに重要な役割を果たし得ることを示唆した。この前後関係で、正常なNK細胞で触発性共受容体として機能する[23]、2B4分子は、XLP-NK細胞の場合には、シグナリング経路の絶大な変化を示すことが示されている。したがって、SH2D1A会合の不在のため、2B4は、反対の機能を示す、すなわち活性化シグナルではなく阻害シグナルを仲介する。特異的mAb、またはEBV感染細胞で高密度に発現されるその天然リガンド(CD48)のいずれかによる、2B4の結合は、XLP-NK細胞が介在する細胞傷害性のダウンレギュレーションを招いた。これは、異なる活性化受容体(すなわちNKp46;参考文献28および本報告)を介して誘導された、自発的な細胞溶解活性とNK細胞触発との双方に該当する。ポリクローナルXLP-NK細胞でRT-PCRによって得られた、増幅されたcDNAの分析は、分析されたすべてのサンプルで、NTB-Aの配列が、健康な供与者から得られたそれと同一であることを明らかにした(示さず)。その上、XLP-NK細胞の細胞蛍光測定分析は、SH2D1A分子の不在が、NTB-Aの表面発現に影響しないことを示した。重要なこと

20

30

40

50

に、XLP-NK細胞では、NTB-Aは、2B4と同様の役割を果たすように思われる[28]。実際、SH2D1Aの不在下では、NTB-Aは、阻害シグナルではなく、触発シグナルを形質導入しない。これは、再指向致死アッセイでは容易に認識することができて、NTB-AのmAb介在交差結合が、XLP-NK細胞の自発的およびNCR介在性の双方の細胞傷害性の阻害を招く。より重要なことに、同様の阻害シグナルが、XLP-NK細胞がEBV標的細胞と作用し合ったときに発生した。2B4/CD48相互作用[28]に加え、NTB-Aと、EBV細胞で発現される、依然として未知のリガンドとの相互作用によって、もう一つの阻害シグナルが発生した。したがって、NTB-AのmAb介在遮断は、XLP-NK細胞が介在するEBV標的の溶解を部分的に回復するが、黒色腫、肺癌、T細胞リンパ腫および子宮頸管癌を包含する、異なる腫瘍標的の溶解には、その効果が皆無であった(示さず)。このことは、CD48と同様に、NTB-Aリガンドの発現が、一定の細胞型に限定され得ることを示唆する。これに代えて、いくつかの細胞のみが、NTB-Aによる結合の際のシグナリングを許すのに十分な表面密度のリガンドを発現するのにすぎない可能性もある。NTB-Aは、CD150と同様に[42]、ホモフィリック相互作用を示すか、または(CD2/CD48、CD2/CD58および2B4/CD48相互作用の場合のように)CD2サブファミリーの他の成員と作用し合うことも可能である[21、22、43]。予備データは、NTB-Aに対するリガンドが、CD48(すなわち2B4のリガンド)によっては説明されないことを示唆すると思われる。したがって、NTB-Aおよび2B4の双方を同時遮断すると、EBV標的細胞のXLP-NK細胞介在溶解の回復に追加的な効果が生じる(上記を参照されたい)。その上、EBV標的細胞上のCD48のmAb介在遮断の際は、NK介在細胞傷害性の部分的回復が生じたが、XLP-NK細胞のNTB-Aの同時遮断によって、溶解の強い増強を検出することができた(データは示さず)。この研究では、EBV標的に対するXLP-NK細胞の細胞溶解活性の分析は、キラー阻害性受容体(KIR)/HLAクラスI相互作用による干渉を避けるために、主として、HLAクラスIのEBVLCCLに対して評価がなされた。本発明者らは、以前に、XLP患者で、自己HLAクラスIEBVLCCL細胞に対するNK介在細胞傷害性の復旧は、HLA/KIR相互作用のmAb介在破断の際に生じないことを示した。正常な供与者とは異なり、これらの患者では、HLAクラスIおよび2B4の同時mAb介在遮断のみが、細胞傷害性の再構成へと導くにすぎなかった[28]。示してはいないが、同様の結果は、HLAクラスIおよびNTB-Aの同時遮断によっても得ることができた。したがって、正常な個体とは異なり、XLP患者では、2B4、NTB-Aおよびそれらのリガンド間に活性化ではなく、阻害性の相互作用が生じるために、HLA不全EBV感染細胞の清掃が損なわれるものと思われる。この前後関係で、異なる研究が、EBV感染の際には、HLAクラスI分子のダウンレギュレーションが生じることを報告した[44~46]。しかし、この事象は、EBV感染の与えられた段階でのみ、「インビボ」で生じ得るにすぎず、かつ/または一つもしくはいくつかのHLAクラスI対立遺伝子に影響し得るにすぎない。実際、ほとんどのEBV感染細胞は、HLAクラスIのフレームワーク決定域に仕向けたmAbで分析したとき、HLAクラスIを招き得ないが、この分析は、明らかに、単一の対立遺伝子損失を明らかにするには不適切である。単一の対立遺伝子のダウンレギュレーションは、標的細胞を、失われた対立遺伝子に特異的なKIRを発現するNK細胞の効果を受けやすくする[1]ことが強調されなければならない。他の報告では、XLP-NK細胞では2B4の阻害機能が全く観察されていない。これらの研究は、2B4の「機能の欠如」を示唆した[31、32]。これ以上の研究は、互いに異なるこれらの結果を、特に、それらが患者の表現型の不均質性を反映するのか、それともその他のなおも未知の機序を反映するのかを解明しなければならない。本発明者らは、現在、患者A、BおよびCとは異なるSH2D1A遺伝子座に突然変異を有する、追加の3名のXLP患者を調査している。予備データは、これらの患者でも、2B4およびNTB-Aが、ともに、阻害機能を示すことを示唆する(データは示さず)。したがって、異なる6名の患者で、本発明者らは、一貫した結果を得ることができた。これらの発見は、2B4またはNTB-Aとそれらのリガンドとの相互作用

10

20

30

40

50

の破断が、細胞溶解機能の回復へと導き得ることから、特に適切であり得る。このことは、XLP患者における、さもなければ致命的である急性EBV感染の治療に対して、重要な意味を有し得る。再指向致死アッセイでのT細胞介在細胞溶解活性の分析が示唆しており、NTB-Aは、これらの細胞で細胞傷害性を触発することができない。また、この発見は、2B4分子に関する以前のデータを思い出させる[28]。注目すべきことに、T細胞は、再指向致死アッセイに用いたP815標的細胞のような、マウス細胞に存在するリガンドに特異的なNKp46受容体を発現しない。したがって、この実験の設定で、CTLは、2B4およびNTB-Aに特異的なmAbに不応性であり得るが、それは、単に、両分子とも、共受容体として作用し、その機能には、真の受容体（たとえばNKp46）が与える同時刺激を必要とするためである。一方、T細胞では、他の触発性受容体が、2B4およびNTB-Aシグナリングに必要とされるシグナルの提供に生理学的に関与し得ると考えることもできる。この流れに沿って、その後の研究は、EBV特異的なCTLが、共受容体として、2B4およびNTB-Aを実際に用いているのか否か、およびこれらの分子が、XLP患者では、EBVに対するT細胞が介在する応答を阻害し得るのか否かを解明しなければならない。Bリンパ球におけるNTB-Aの機能に関しては、この論点を解明するための研究が進行中である。これまで、SH2D1Aは、正常なB細胞はもとより、ほとんどのB細胞系で検出することができなかった[41]ことは、注目すべきことである。したがって、B細胞にシグナルを形質導入するには、NTB-Aは、別個の細胞質内アダプター分子との会合を必要とし得るように思われる。この前後関係で、あり得る候補は、B細胞で発現され、SH2D1Aとの高い同一性を示す、最近記載されたEAT-2分子によって説明される[41]。分子クローニングは、NTB-Aが、CD2サブファミリーの新規な一員を表すことを明らかにした[24]。これらの分子は、比較的限られたアミノ酸同一性を示すものの、ヒト第1染色体に密集し、Ig様ドメインの顕著に類似するコア構造を示す。NTB-Aは、DAP12、CD3およびFcRIシグナル形質導入ポリペプチドと会合しない。その上、2B4とは異なり、NTB-Aは、LATとも会合しない（示さず）。この前後関係で、配列分析は、NTB-Aが、貫膜領域内の荷電アミノ酸残基と、貫膜／細胞質部分中のCxC／モチーフ（すなわち正に荷電した残基に囲まれたCxC配列）とをともに欠くことを明らかにした。これらのモチーフは、異なる受容体／アダプター相互作用に決定的な役割を果たすことが示唆されている[4、47]。2B4と共通するその他の特徴[28]は、SHP-1に、およびチロシンリン酸化の際はSH2D1Aにも結合できる、NTB-Aの能力である。後者の会合と一致して、NTB-Aの細胞質尾部は、SH2D1Aとの会合のための共通配列を表すと考えられる、二つのTxYxxV/Iモチーフを含む[4]。その上、NTB-Aと会合するSHP-1の量は、過バナジン酸処理およびSH2D1A結合の際に、減少するように思われる（図3を参照されたい）。これらのデータは、2B4で得られたもの[28]に類似し、SH2D1Aが、NTB-Aの場合にも、SHP-1との結合について競合し得ることを示唆する。2B4とは矛盾して、NTB-Aは、細胞質部分における古典的なITIMモチーフを特徴都市、チロシンリン酸化に際してSHP-2と会合することができる。SHP-2は、阻害および活性化受容体の双方と会合することが見出されていて[48]、SHP-2の動員の最終的な機能的結果が、異なるSHP-2特異的基質の機能的特性に依存し得ることを示唆する。したがって、これまで、NTB-A介在シグナリングにおけるこのリン酸エステルの実際の役割は、決定を待つままとなっている。

【0095】

10

20

30

40

【表 1】

表1:MA127反応性分子の表面発現

細胞	組織型	MA127mAb	抗2B4mAb	
休止NK細胞		+	+	10
活性化NK細胞		+	+	
休止T細胞		+	+(サブセット)	
PHA芽球		+	+(サブセット)	
休止B細胞		+	-	
胸腺細胞		+	+	
単球		-	+	
顆粒球		-	-	
YT	NK細胞系	+	+	
NKL	NK細胞系	+	+	
NK3.2	NK細胞系	+	+	20
NK92	NK細胞系	+	+	
JA3	T白血病	+	+	
H9	T白血病	+	-	
HSB2	T白血病	+	+	
Raji	バーキットリンパ腫	+	-	
DAUDI	バーキットリンパ腫	+	-	
LCL 721.221	EBV細胞系	+	-	
U937	組織球性リンパ腫	-	+	30
HL60	前骨髄球性白血病	-	+	
TF1	前骨髄球性白血病	-	+	
MM6	前骨髄球性白血病	-	+	
Eo/A3	好酸球性白血病	-	+	
MEL15392	黒色腫	-	-	
MEL501	黒色腫	-	-	
F0-1	黒色腫	-	-	
1074 mel	黒色腫	-	-	
A549	肺癌	-	-	
SMMC	肝癌	-	-	
HELA	子宮頸管癌	-	-	
IGROV-1	子宮頸管癌	-	-	
YAC-1	マウス胸腺腫	-	-	
BW1502	マウス胸腺腫	-	-	
P815	マウスマスト細胞腫	-	-	
COS-7	サル腎繊維芽細胞	-	-	

【0096】

異なる組織型の正常細胞および腫瘍細胞系を、MA127およびPP35（抗2B4）mAb、次いでPE結合したヤギ抗マウスIgG1との反応性について、免疫蛍光およびFACS分析によって分析した。細胞は、別途指定されない限り、ヒトのそれである。

40

【0097】

【表 2】

参考文献

1. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M.C. Mingari, and L. Moretta. 1996. Receptors for HLA-class I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14:619–648.
2. Lanier, L.L. 1998. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16:359–393.
3. Long, E.O. 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17:875–904. 10
4. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and co-receptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:197–223.
5. Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera, J.J. Pérez-Villar, M. López-Botet, M. Duggan-Keen, and P.L. Stern. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA-class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today.* 18:89–95.
6. Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule which mediates cell activation. *J. Exp. Med.* 186:1129–1136. 20
7. Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, and A. Moretta. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 188:953–960.
8. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, et al. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 190:1505–1516. 30
9. Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Casticoni, R. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187:2065–2072.
10. Cantoni, C., C. Bottino, M. Vitale, A. Pessino, R. Augugliaro, A. Malaspina, S. Parolini, L. Moretta, A. Moretta, and R. Biassoni. 1999. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* 189:787–796. 40

11. Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M.C. Mingari, and L. Moretta. 2000. Natural cytotoxicity Receptors that trigger human NK-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today*. 21:228–234.
12. Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human natural killer cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity. against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur.J. Immunol.* 29:1656–1666. 10
13. Houchins, J.P., T. Yabe, C. McSherry, and F.H. Bach. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 173:1017–1020.
14. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285:727–729.
15. Pende, D., C. Cantoni, P. Rivera, M. Vitale, R. Castriconi, S. Marcenaro, M. Nanni, R. Biassoni, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta. 2001. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of non epithelial origin. *Eur. J. Immunol.* 31:1076-1086. 20
16. Wu, J., Y. Song, A.B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 285: 730–732.
17. Chang, C., J. Dietrich, A.G. Harpur, J.A. Lindquist, A. Haude, Y.W. Loke, A. King, M. Colonna, J. Trowsdale, and M.J. Wilson. 1999. KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J. Immunol.* 163:4651–4654. 30
18. Moretta, A., C. Bottino, G. Tripodi, M. Vitale, D. Pende, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, E. Ciccone, R. Millo, and L. Moretta. 1992. Novel surface molecules involved in human NK cell activation and triggering of the lytic machinery. *Int. J. Cancer*. 7:6–10.
19. Valiante, N.M., and G. Trinchieri. 1993. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178:1397–1406. 40

20. Garni-Wagner, B.A., A. Purohit, P.A. Mathew, M. Bennett, and V. Kumar. 1993. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by ac-tivated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* 151:60–70.
21. Kubin, M.Z., D.L. Parsley, W. Din, J.Y. Waugh, T. Davis-Smith, C.A. Smith, B.M. Macduff, R.J. Armitage, W. Chin, L. Cassiano, et al. 1999. Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. *Eur. J. Immunol.* 29:3466–3477.
22. Nakajima, H., M. Cella, H. Langen, A. Friedlein, and M. Colonna. 1999. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur. J. Immunol.* 29: 1676–1683.
23. Sivori, S., S. Parolini, M. Falco, E. Marcenaro, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2000. 2B4 functions as a co-receptor in human natural killer cell activation. *Eur. J. Immunol.* 30:787–793.
24. Tangye, S.G., J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 2000. The CD2- subset of the Ig superfamily of cell surface molecule: recep-tor- ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin. Immunol.* 12:149–157.
25. Boles, K.S., H. Nakajima, M. Colonna, S.S. Chuang, S.E. Stepp, M. Bennett, V. Kumar, and P.A. Mathew. 1999. Mo-lecular characterization of a novel human natural killer cell receptor homologous to mouse 2B4. *Tissue Antigens* 54:27– 34.
26. Mathew, P.A., B.A. Garni-Wagner, K. Land, A. Takashima, E. Stoneman, M. Bennett, and V. Kumar. 1993. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associ-ated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* 151:5328–5337.
27. Tangye, S., G.S. Lazetic, E. Woollatt, G.R. Sutherland, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1999. Human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol.* 162:6981–6985.
28. Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Giliani, R. Franceschini, H.D. Ochs, H. Wolf, J.Y. Bonnefoy, R. Biassoni, L. Moretta, L.D. Notarangelo, and A. Moretta. 2000. X-linked lymphoproliferative disease: 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are re-sponsible for the inability of NK cells to kill EBV-infected cells. *J. Exp. Med.* 192:337–346.
29. Bottino, C., R. Augugliaro, R. Castricon, M. Nanni, R. Bi-assoni, L. Moretta, and A. Moretta. 2000. Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell

10

20

30

40

activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells (LAT). *Eur. J. Immunol.* 30:3718–3722.

30. Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M.G. Roncarolo, et al. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* 395:462–469.

31. Nakajima, H., M. Cella, A. Bouchon, H.L. Grierson, J. Lewis, C.S. Duckett, J.I. Cohen, and M. Colonna. 2000. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 30:3309–3318.

32. Tangye, S.G., J.H. Phillips, L.L. Lanier, and K.E. Nichols 2000. Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunol.* 165:2932–2936.

33. Purtilo, D.T., C.K. Cassel, and J.P.S. Yang. 1974. Fatal infectious mononucleosis in familial lymphohistiocytosis. *N. Engl. J. Med.* 201:736.

34. Seemayer, T.A., T.G. Gross, R.M. Egeler, S.J. Pirruccello, J.R. Davis, C.M. Kelly, M. Okano, A. Lanyi, and J. Sumegi. 1995. X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatr. Res.* 38:471–478.

35. Nichols, K.E., D.P. Harkin, S. Levitz, M. Krainer, K.A. Kolquist, C. Genovese, A. Bernard, M. Ferguson, L. Zuo, E. Snyder, et al. 1998. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13765–13770.

36. Coffey, A.J., R.A. Brooksbank, O. Brandau, T. Ohashi, G.R. Howell, J.M. Bye, A.P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, et al. 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat. Genet.* 20:129–135.

37. Biassoni, R., S. Ferrini, I. Prigione, A. Moretta, and E.O. Long. 1988. CD3-negative lymphokine-activated cytotoxic cells express the CD3 epsilon-gene. *J. Immunol.* 140:1685–1689.

38. Biassoni, R., A. Pessino, C. Bottino, D. Pende, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 29:1014–1020.

39. Cantoni, C., C. Bottino, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, R. Castriconi, M. Vitale, D. Pende, S. Sivori, R. Millo, et al. 1999. Molecular and functional

10

20

30

40

characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that.12 A Novel SH2D1A-associated Triggering Receptor functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 29:3148–3159.

40. De la Fuente, M.A., P. Pizcueta, M. Nadal, J. Bosh, and P. Engel. 1997. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood.* 90:2398–2405.

41. Morra, M., D. Howie, M. Simarro Grande, J. Sayos, N. Wang, C. Wu, P. Engel, and C. Terhorst. 2001. X-linked lymphoproliferative disease: progressive immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 657–682. 10

42. Mavaddat, N., D.W. Mason, P.D. Atkinson, E.J. Evans, R.J. Gilbert, D.I. Stuart, J.A. Fennelly, A.N. Barclay, S.J. Davis, and M.H. Brown. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J. Biol. Chem.* 275:28100-28109.

43. Davis, S.J., and P.A. Van der Merwe. 1996. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol. Today.* 17:177–187.

44. Masucci, M.G., S. Torsteindottir, B.J. Colombani, C. Braut-bar, E. Klein, and G. Klein. 1987. Down-regulation of Class I HLA antigens and of the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein (LMP) in Burkitt lymphoma lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4567–4571. 20

45. Zeidler, R., G. Eissner, P. Meissner, S. Uebel, R. Tampe, S. Lazis, and W. Hammerschmidt. 1997. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood.* 90:2390–2397.

46. Rowe, M., R. Khanna, C.A. Jacob, V. Argat, A. Kelly, S. Powis, M. Belich, D. Croom-Carter, S. Lee, S.R. Burrows, et al. 1995. Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur. J. Immunol.* 25:1374–1384. 30

47. Bosselut, R., W. Zhang, J.M. Ashe, J.L. Kopacz, L.E. Samelson, and A. Singer. 1999. Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J. Exp. Med.* 190:1517–1526.

48. Tomasello, E., M. Blery, E. Vely, and E. Vivier. 2000. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin. Immunol.* 12:139–147. 40

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】NTB-A分子の生化学的特性記述を示す図である。NK細胞、TCR γ/δ 細胞、および胸腺細胞(Thy)の集団を、EBV標的細胞の再指向致死アッセイおよびNK介在致死アッセイで、NTB-A分子について表面標識分析した。(a)代表的なNK p46ブライト(MX367、CC16)およびNK p46ダル(HER12、HER13)のNK細胞クローンを、(FcR)P815マウス標的細胞に対する再指向致死アッ 50

セイで、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。mAbは、すべて、IgG1サブクラスのものであった。(b)抗NKp46(KL247、IgM)mAbで未処理であるか、または調整されたかのいずれかの代表的なNKp46ブライトクローン(MOA110)を、細胞溶解活性について、マウスP815標的細胞に対する再指向致死アッセイにて、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で試験した。実験の双方で、用いたE/T比は8:1であった。(c)二つの代表的なNKp46ブライトのNK細胞クローン(MX367およびMOA110)を、LCL721.221EBV細胞系(HLAクラスI、CD48FcR)に対する細胞溶解活性について、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。用いたE/T比は2:1であった。(d)NK92というNK細胞系を、(FcR)P815マウス標的細胞、またはLCL721.221というEBV細胞系に対する細胞溶解活性について、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。用いたE/T比は5:1であった。結果は、7通りの無関係な実験を表している。三重試行の平均の標準偏差は、4%であった。

10

【図2a】EBV+標的細胞の再指向致死アッセイおよびNK介在致死における、NTB-A分子の機能分析を示すグラフである。(a)代表的なNKp46ブライト(MX367、CC16)およびNKp46ダル(HER12、HER3)のNK細胞を、(FcγR+)P815マウス標的細胞に対する再指向致死アッセイにて、図示された分子の不在または存在双方の下で分析した。mAbは、すべて、IgG1サブクラスのものであった。

20

【図2b】EBV+標的細胞の再指向致死アッセイおよびNK介在致死における、NTB-A分子の機能分析を示すグラフである。(b)抗NKp46(KL247、IgM)で未処理であるか、または調整したかのいずれかの代表的なNKp46ブライトクローン(MOA110)を、細胞溶解活性について、マウスP815標的細胞に対する再指向致死アッセイにて、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。実験の双方で、用いたE/T比は8:1であった。

【図2c】EBV+標的細胞の再指向致死アッセイおよびNK介在致死における、NTB-A分子の機能分析を示すグラフである。(c)二つの代表的なNKp46ブライトNK細胞クローン(MX367およびMOA110)を、LCL721.221のEBV細胞系(HLAクラスI-、CD48+、FcγR-)に対する細胞溶解活性について、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。用いたE/T比は2:1であった。

30

【図2d】EBV+標的細胞の再指向致死アッセイおよびNK介在致死における、NTB-A分子の機能分析を示すグラフである。(d)NK92のNK細胞系を、(FcγR+)P815マウス標的細胞、またはLCL721.221というEBV細胞系に対する細胞溶解活性について、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。用いたE/T比は5:1であった。結果は、7通りの無関係な実験を表している。三重試行の平均の標準偏差は、<4%であった。

【図3a】NTB-A特異的シグナル形質導入経路の分析を示す図である。(a)過バナジン酸ナトリウム(100M、10分、37℃)で未処理であるか(-)、または処理されたか(+)のいずれかのポリクローナルNK細胞集団に由来する細胞溶解物を、抗2B4および抗NTB-A mAbで、逐次、免疫沈降させた(IP)。サンプルは、8%SDS-PAGE中の還元性条件下で分析し、抗ホスホチロシンを用いて調べた。

40

【図3b】NTB-A特異的シグナル形質導入経路の分析を示す図である。(b)(a)のとおり由来する細胞溶解物を、抗2B4、抗NTB-A、抗NKp46および抗IRp60で、逐次、免疫沈降させた。等量の各免疫沈降物を、8%SDS-PAGE中の還元性条件下で分析し、抗SHP-1または抗SHP-2 mAbのいずれかを用いて調べた。

【図3c】NTB-A特異的シグナル形質導入経路の分析を示す図である。(c)(a)のとおり由来する細胞溶解物を、抗2B4、抗NTB-Aおよび抗SH2D1Aで、逐

50

次、免疫沈降させた。サンプルは、14% SDS-PAGE中の還元性条件下で分析し、抗SH2D1A抗血清を用いて調べた。各パネルに、分子量マーカー(kD)を示す。

【図4a】XLP患者に由来するNK細胞内のNTB-Aの機能分析を示すグラフである。(a)XLP患者Aに由来するポリクローナルNK細胞集団を、細胞溶解活性について、(FcγR+)P815標的細胞系に対する再指向致死アッセイにて、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。用いたE/T比は8:1であった。この実験に用いたmAbは、すべて、IgG1イソ型のものであった。

【図4b】XLP患者に由来するNK細胞内のNTB-Aの機能分析を示すグラフである。(b)XLP患者A、または健康な供与者に由来するポリクローナルNK細胞集団を、LC721、221のEBV細胞系(HLAクラスI、CD48、FcγR+)に対する細胞溶解活性について、図示された分子に特異的なmAbの不在または存在のいずれかの下で分析した。用いたE/T比は6:1であった。結果は、6通りの無関係な実験を表している。三重試行の平均の標準偏差は、5%であった。

【図5】VR1012/KALI構成体をトランスフェクションしたCOS-7細胞におけるNTB-Aの表面発現を示すグラフである。VR1012/KALI構成体をトランスフェクションしたCOS-7細胞を、MA127(抗NTB-A)またはPP35(抗2B4)mAb、次いでPE結合したヤギ抗マウス第二試薬で染色し、フローサイトメリーによって分析した。白色の像は、第二試薬のみとともに温置した細胞を示す。

【図6a】NTB-A分子のアミノ酸配列(配列番号2)を示す図である。推定されるシグナルペプチドを、小文字で示し(第1~第21残基)、貫膜領域を、箱で囲んだ。細胞質尾部に存在するチロシンに基づくモチーフは、下線を施した。

【図6b】NTB-A分子の核酸およびアミノ酸配列(配列番号1)を示す図である。

【配列表】

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> INNATE PHARMA

<120> NTB-A, a Novel Surface Molecule Involved in Natural
Killer Cells Activity.

<130> B0092WO

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2728

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino acid
sequence of SF-1.

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(1005)

<400> 1

```

accgcggaaa gc atg ttg tgg ctg ttc caa tcg ctc ctg ttt gtc ttc tgc 51
      Met Leu Trp Leu Phe Gln Ser Leu Leu Phe Val Phe Cys
            1             5             10

```

```

ttt ggc cca ggg aat gta gtt tca caa agc agc tta acc cca ttg atg 99
Phe Gly Pro Gly Asn Val Val Ser Gln Ser Ser Leu Thr Pro Leu Met
      15             20             25

```

```

gtg aac ggg att ctg ggg gag tca gta act ctt ccc ctg gag ttt cct 147
Val Asn Gly Ile Leu Gly Glu Ser Val Thr Leu Pro Leu Glu Phe Pro
      30             35             40             45

```

```

gca gga gag aag gtc aac ttc atc act tgg ctt ttc aat gaa aca tct 195
Ala Gly Glu Lys Val Asn Phe Ile Thr Trp Leu Phe Asn Glu Thr Ser
            50             55             60

```

```

ctt gcc ttc ata gta ccc cat gaa acc aaa agt cca gaa atc cac gtg 243
Leu Ala Phe Ile Val Pro His Glu Thr Lys Ser Pro Glu Ile His Val

```

10

20

30

40

65	70	75		
act aat ccg aaa cag gga aag cga ctg aac ttc acc cag tcc tac tcc	291			
Thr Asn Pro Lys Gln Gly Lys Arg Leu Asn Phe Thr Gln Ser Tyr Ser				
80 85 90				
ctg caa ctc agc aac ctg aag atg gaa gac aca ggc tct tac aga gcc	339			
Leu Gln Leu Ser Asn Leu Lys Met Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Arg Ala				
95 100 105				
cag ata tcc aca aag acc tct gca aag ctg tcc agt tac act ctg agg	387			
Gln Ile Ser Thr Lys Thr Ser Ala Lys Leu Ser Ser Tyr Thr Leu Arg				10
110 115 120 125				
ata tta aga caa ctg agg aac ata caa gtt acc aat cac agt cag cta	435			
Ile Leu Arg Gln Leu Arg Asn Ile Gln Val Thr Asn His Ser Gln Leu				
130 135 140				
ttt cag aat atg acc tgt gag ctc cat ctg act tgc tct gtg gag gat	483			
Phe Gln Asn Met Thr Cys Glu Leu His Leu Thr Cys Ser Val Glu Asp				
145 150 155				
gca gat gac aat gtc tca ttc aga tgg gag gcc ttg gga aac aca ctt	531			
Ala Asp Asp Asn Val Ser Phe Arg Trp Glu Ala Leu Gly Asn Thr Leu				20
160 165 170				
tca agt cag cca aac ctc act gtc tcc tgg gac ccc agg att tcc agt	579			
Ser Ser Gln Pro Asn Leu Thr Val Ser Trp Asp Pro Arg Ile Ser Ser				
175 180 185				
gaa cag gac tac acc tgc ata gca gag aat gct gtc agt aat tta tcc	627			
Glu Gln Asp Tyr Thr Cys Ile Ala Glu Asn Ala Val Ser Asn Leu Ser				
190 195 200 205				
ttc tct gtc tct gcc cag aag ctt tgc gaa gat gtt aaa att caa tat	675			
Phe Ser Val Ser Ala Gln Lys Leu Cys Glu Asp Val Lys Ile Gln Tyr				30
210 215 220				
aca gat acc aaa atg att ctg ttt atg gtt tct ggg ata tgc ata gtc	723			
Thr Asp Thr Lys Met Ile Leu Phe Met Val Ser Gly Ile Cys Ile Val				
225 230 235				
ttc ggt ttc atc ata ctg ctg ita ctt gtt ttg agg aaa aga aga gat	771			
Phe Gly Phe Ile Ile Leu Leu Leu Leu Val Leu Arg Lys Arg Arg Asp				
240 245 250				
tcc cta tct ttg tct act cag cga aca cag ggc ccc gag tcc gca agg	819			
Ser Leu Ser Leu Ser Thr Gln Arg Thr Gln Gly Pro Glu Ser Ala Arg				40

255	260	265		
aac cta gag tat gtt tca gtg tct cca acg aac aac act gtg tat gct			867	
Asn Leu Glu Tyr Val Ser Val Ser Pro Thr Asn Asn Thr Val Tyr Ala				
270	275	280	285	
tca gtc act cat tca aac agg gaa aca gaa atc tgg aca cct aga gaa			915	
Ser Val Thr His Ser Asn Arg Glu Thr Glu Ile Trp Thr Pro Arg Glu				
	290	295	300	
aat gat act atc aca att tac tcc aca att aat cat tcc aaa gag agt			963	
Asn Asp Thr Ile Thr Ile Tyr Ser Thr Ile Asn His Ser Lys Glu Ser				10
	305	310	315	
aaa ccc act ttt tcc agg gca act gcc ctt gac aat gtc gtg			1005	
Lys Pro Thr Phe Ser Arg Ala Thr Ala Leu Asp Asn Val Val				
	320	325	330	
taagttgctg aaaggcctca gaggaattcg ggaatgacac gtctttctgat cccatgagac			1065	
agaacaaaga acaggaagct tggttcctgt tgttcctggc aacagaattt gaatatctag			1125	
gataggatga tcacctccag tccttcggac ttaaacctgc ctacctgagt caaacacct			1185	20
aggataacat catttccagc atgtggttca aataatattt tccaatccac ttcaggccaa			1245	
aacatgctaa agataacaca ccagcacatt gactctctct ttgataacta agcaaatgga			1305	
attatgggtg acagagagtt tatgatccag aagacaacca cttctctcct nntagaaagc			1365	
agcaggattg acttattgag aaataatgca gtgtgttggg tacatgtgta gtctctggag			1425	
ttggatgggc ccactctgat acaagttgag catcccttgt ctgaaatgct tgggattaga			1485	
aatgtttcag atttcaattt tttttcagat ttgggaatat ttgcattata tttagcggtt			1545	30
gagtatccaa atccaaaaat ccaaaattca aaatgctcca ataagcattt cccttgagtt			1605	
tcattgatgt cgatgcagtg ctcaaaatct cagatttttg agcatttttg atattggatt			1665	
tttggatttg ggatgctcaa ctgttacaat gtttattaga cacatctcct gggacatact			1725	
gcctaacctt ttggagcctt agtctccag actgaaaaag gaagaggatg gtattacatc			1785	
agctccattg tttgagccaa gaatctaagt catccctgac tccagtgtct ttgtcaccag			1845	
gccctttgga ctctacctca gaaatatttc ttggaccttc cacttctcct ccaactcctt			1905	

gaccaccatc ctgtatccaa ccataccac ctctaacctg aatcctacct taagatcaga 1965
 acagttgtcc tcacttttgt tcttgtccct ctccaacca ctctccacaa gatggccaga 2025
 gtaatgtttt taatataaat tggatccttc agtttctctg ttaaaacctt gcaggtttcc 2085
 caatgcactc agaagaaat ccagttttca tggccctgga tggctctggc cacctccagc 2145
 ctcagctagc attaccttc tgacactctc tatgtagcct cctgatctt ctttcagctc 2205
 ctctattaaa ggaaaagtcc tttatgttaa ttatttacat ctctctgcag gcccttctc 2265
 tgctgtctgg ggtcctccta ttcttttaggt ttaattttta atatgtcacc tctaagaga 2325
 aaccttccca gaccactctt tctaaaatga atcttctagg ctgggcatgg tggctcacac 2385
 ctgtaatccc agtacttttg gaggccagg ggggagatca cttgaggtca ggagttcaag 2445
 cccagcctgg ccactttggt taaacctcgt ytttwtwaa aatacaaaaa aattagccmg 2505
 gsskggkkgk gccccctaa aatccagct cctttaraga ytnaggcagg araatccctt 2565
 kaaccagga ggkggrggtt ccaktkagcc aaaatcatgc caatgtwtc cmgtttgggk 2625
 grcaaartra ractygttyy caaaaatwa attaatataa twaatkaaa ttgttttttt 2685
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2728

10

20

<210> 2
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: Amino acid
 sequence of SF-1.

30

<400> 2
 Met Leu Trp Leu Phe Gln Ser Leu Leu Phe Val Phe Cys Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Gly Asn Val Val Ser Gln Ser Ser Leu Thr Pro Leu Met Val Asn Gly
 20 25 30
 Ile Leu Gly Glu Ser Val Thr Leu Pro Leu Glu Phe Pro Ala Gly Glu
 35 40 45
 Lys Val Asn Phe Ile Thr Trp Leu Phe Asn Glu Thr Ser Leu Ala Phe
 50 55 60

40

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

10

20

30

Phe Ser Arg Ala Thr Ala Leu Asp Asn Val Val
325 330

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
KALI-up.

10

<400> 3
gcggaaagca tggtgtgg

18

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

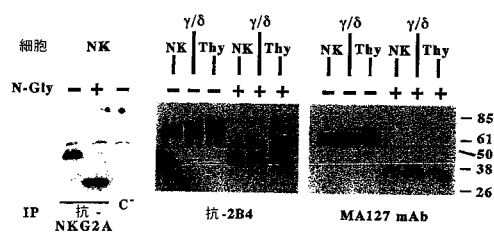
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer
KALI-down.

20

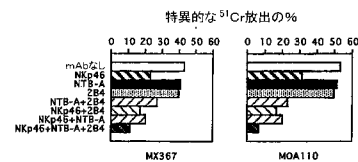
<400> 4
tcattcccca attctcttg

19

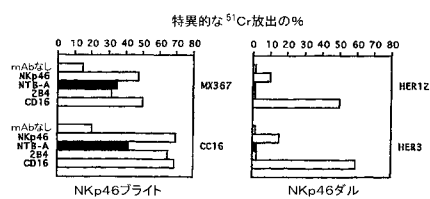
【図 1】



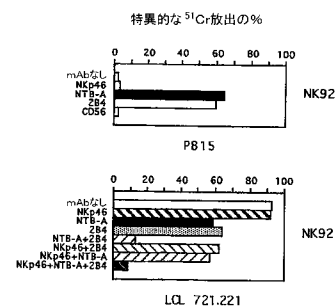
【図 2 c】



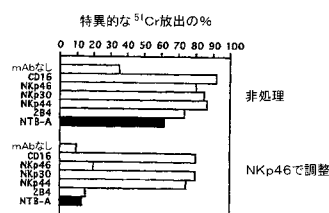
【図 2 a】



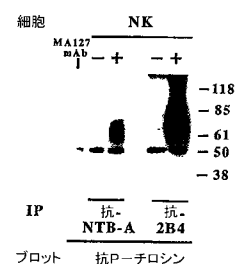
【図 2 d】



【図 2 b】



【図 3 a】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 14/705	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 1
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
		G 0 1 N 33/53	G

(74)代理人 100075225

弁理士 篠田 文雄

(72)発明者 モレッタ, アレッサンドロ

イタリア国、イー 1 6 1 3 3 ジェノヴァ、ヴィア・ニッツァ 1 8 / 8

(72)発明者 ボッティーノ, クリスティーナ

イタリア国、イー 1 6 1 3 3 ジェノヴァ、ヴィア・ニッツァ 1 8 / 8

(72)発明者 ビアッソーニ, ロベルト

イタリア国、イー 1 6 1 3 3 ジェノヴァ、ヴィア・トレ・ピニ 4 3 / 5

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 1 2 2 3 2 1 8 (E P, A 1)

国際公開第 0 1 / 0 5 5 3 3 6 (W O, A 1)

国際公開第 0 2 / 0 7 7 1 7 3 (W O, A 1)

国際公開第 0 2 / 0 2 4 8 8 8 (W O, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

专利名称(译)	表面分子参与自然杀伤细胞活性NTB-A		
公开(公告)号	JP4326944B2	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	JP2003514007	申请日	2002-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	伊纳特医药公司 海胆威赛迪悉热那亚 热那亚大学		
申请(专利权)人(译)	Ineito制药 Univerushita迪热那亚		
当前申请(专利权)人(译)	Ineito制药 Univerushita迪热那亚		
[标]发明人	モレッタアレッサンドロ ポッティーノクリスティーナ ビアッソーニロベルト		
发明人	モレッタ,アレッサンドロ ポッティーノ,クリスティーナ ビアッソーニ,ロベルト		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61K45/00 A61K45/06 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17		
CPC分类号	C07K16/2803 A61K38/00 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.G A61K39/395.U A61K45/00 A61K45/06 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P43/00.101 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.G		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001401946 2001-07-19 EP		
其他公开文献	JP2005507648A JP2005507648A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及称为NTB-A的新蛋白质，编码它的核酸分子及其用途。本发明还涉及通过体外，离体或体内调节NTB-A活性来调节天然杀伤细胞活性的方法。本发明还包括使用NTB-A或其片段，或编码它的核酸，或表达所述多肽的重组宿主细胞筛选活性化合物的方法。

細胞	組織型	MA127mAb	抗2B4mAb
休止NK細胞		+	+
活性化NK細胞		+	+
休止T細胞		+	+(サブセット)
PHA芽球		+	+(サブセット)
休止白細胞		+	-
胸腺細胞		+	+
単球		-	+
顆粒球		-	-
YT	NK細胞系	+	+
NKL	NK細胞系	+	+
NK3.2	NK細胞系	+	+
NK92	NK細胞系	+	+
JA3	T白血病	+	+
F9	T白血病	+	-
HSB2	T白血病	+	+
Raji	バークットリンパ腫	+	-
DAUDI	バークットリンパ腫	+	-
LCL 721.221	EBV細胞系	+	-
U937	組織球性リンパ腫	-	+
HL60	前骨髄球性白血病	-	+
TF1	前骨髄球性白血病	-	+
MM6	前骨髄球性白血病	-	+
Bo/A3	好酸球性白血病	-	+
MEL15392	黒色腫	-	-
MEL501	黒色腫	-	-
FO-1	黒色腫	-	-
1074 mel	黒色腫	-	-
A549	肺癌	-	-
SMMC	肝癌	-	-
HEL4	子宮頸管癌	-	-
IGROV-1	子宮頸管癌	-	-
YAC-1	マウス胸腺腫	-	-
BW1502	マウス胸腺腫	-	-
P815	マウスマスト細胞腫	-	-
COS-7	サル腎細胞系	-	-