

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4447058号
(P4447058)

(45) 発行日 平成22年4月7日 (2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月29日 (2010.1.29)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5
請求項の数 27 (全 33 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願平10-523036	(73) 特許権者	ザ ウエルズリー ホスピタル ファウン デーション
(86) (22) 出願日	平成9年11月18日 (1997.11.18)		カナダ エム5ジー 2シー4 オンタリ オ トロント エリザベス ストリート 2 O O
(65) 公表番号	特表2001-504695 (P2001-504695A)		
(43) 公表日	平成13年4月10日 (2001.4.10)	(74) 復代理人	弁理士 田村 正
(86) 国際出願番号	PCT/CA1997/000880		
(87) 国際公開番号	W01998/022580	(74) 代理人	弁理士 谷 義一
(87) 国際公開日	平成10年5月28日 (1998.5.28)	(74) 代理人	弁理士 阿部 和夫
審査請求日	平成16年11月16日 (2004.11.16)		
(31) 優先権主張番号	08/746,883		
(32) 優先日	平成8年11月18日 (1996.11.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ウシ泌乳関連向免疫性タンパク質 (C D 1 4)、コード遺伝子、およびB細胞活性化における適用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B細胞を活性化するのに使用される組成物であって、配列番号 4、配列番号 5 または配列番号 6 として同定されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または、これらのバリエーションとして同定されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を有し、且つ、B細胞を活性化するもの、を含む組成物。

【請求項 2】

前記ポリペプチドまたはバリエーションが、哺乳類の B細胞を活性化するのに使用される請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記哺乳類がヒトである請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記ヒトが乳児である請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記ヒトが T細胞免疫不全またはアレルギーに罹っている請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記ヒトが C D 4 O L 陰性の T細胞または C D 4 O L 不足 (deficient) T細胞を有する請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 7】

B細胞の、免疫グロブリン高率分泌細胞に至る成長および分化を誘導するのに使用される組成物であって、前記組成物が請求項1に記載のものである組成物。

【請求項8】

哺乳類の抗原特異的B細胞を活性化するのに使用されるワクチンであって、前記ワクチンが、請求項1に記載の組成物およびCD14以外の抗原を含むワクチン。

【請求項9】

使用される際に哺乳類B細胞を活性化させ、配列番号4として同定されるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド、または、そのバリエーションであって、配列番号4として同定されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を有し、且つ、B細胞を活性化するもののアミノ酸配列を有する純粋なタンパク質または前記タンパク質の翻訳時および／または翻訳後修飾された形態を調製する方法であり、

10

(i) 培養条件下で、前記タンパク質をコードする核酸分子を含有し、および前記タンパク質または前記タンパク質の翻訳時および／または翻訳後修飾された形態を発現できる原核生物宿主または真核生物宿主を培養する工程と、

(ii) 前記タンパク質または前記タンパク質の翻訳時および／または翻訳後修飾された形態を発現させる工程と、

(iii) 前記タンパク質を培養物から回収する工程とを含む方法。

【請求項10】

20

使用される際に哺乳類B細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションの、B細胞活性化を必要とする哺乳類内のB細胞を活性化するための医薬品の製造における使用であって、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項1において定義されたもののいずれかであることを特徴とする使用。

【請求項11】

人工栄養乳を製造する方法であって、前記乳中に、使用される際に哺乳類B細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションを組み込む工程を含み、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項1において定義されたもののいずれかであることを特徴とする方法。

【請求項12】

30

請求項11の方法によって製造される人工栄養乳。

【請求項13】

CD14以外の抗原を含有するワクチンを製造する方法であって、使用される際に哺乳類B細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションを組み込み、ワクチン処方剤にする工程を含み、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項1において定義されたもののいずれかであることを特徴とする方法。

【請求項14】

前記抗原と、前記ポリペプチドまたはバリエーションの共役結合体を形成してワクチン処方剤にする工程を含む請求項13に記載の方法。

【請求項15】

40

前記ワクチン処方剤に、前記抗原と、前記ポリペプチドまたはバリエーションを混合し、ワクチン処方剤にする工程を含む請求項13に記載の方法。

【請求項16】

CD14以外の抗原の所定量と、使用される際に哺乳類B細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションの所定量とを含むワクチン調製用キットであって、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項1において定義されたもののいずれかであることを特徴とするワクチン調製用キット。

【請求項17】

配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して生じる抗体であって、前記抗体は、ヒトB細胞の活性を低減ないし阻害しなければCD14の高い血清濃度の結果として

50

過剰に活性化されるヒト B 細胞の活性を低減ないし阻害するために使用される抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の抗体の、ヒト B 細胞の活性を低減または阻害する医薬品の製造における使用。

【請求項 1 9】

所望される抗原特異性を有する哺乳類 B 細胞が分泌するモノクローナル抗体を豊富にするために使用される組成物であって、前記組成物が請求項 1 に記載のものである組成物。

【請求項 2 0】

使用される際に哺乳類 B 細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションの、B 細胞を活性化させる医薬品の製造における使用であって、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項 1 において定義されたもののいずれかであることを特徴とする使用。

10

【請求項 2 1】

使用される際に哺乳類 B 細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションの、人工栄養乳の製造における使用であって、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項 1 において定義されたもののいずれかであることを特徴とする使用。

【請求項 2 2】

使用される際に哺乳類 B 細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションの、ワクチンの製造における使用であって、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項 1 において定義されたもののいずれかであることを特徴とする使用。

20

【請求項 2 3】

ワクチン調製のためのキットであって、前記キットが、使用される際に哺乳類 B 細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションの所定量を含み、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項 1 において定義されたもののいずれかであることを特徴とする、ワクチン調製のためのキット。

【請求項 2 4】

使用される際に哺乳類 B 細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションの、ヒト B 細胞の活性を低減または阻害する医薬品の製造における使用であって、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項 1 において定義されたもののいずれかであることを特徴とする使用。

30

【請求項 2 5】

請求項 2 1 に従って製造される人工栄養乳。

【請求項 2 6】

C D 1 4 以外の抗原を含有するワクチンを製造する方法であって、使用される際に哺乳類 B 細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションを組み込み、ワクチン処方剤にする工程を含み、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項 1 において定義されたもののいずれかであることを特徴とする方法。

【請求項 2 7】

人工栄養乳を製造する方法であって、使用される際に哺乳類 B 細胞を活性化させる単離されたポリペプチドまたはそのバリエーションを組み込み、前記乳にする工程を含み、前記ポリペプチドまたはそのバリエーションが請求項 1 において定義されたもののいずれかであることを特徴とする方法。

40

【発明の詳細な説明】

発明の分野

免疫学、生化学、ならびに細胞および分子生物学の分野の本発明は、B 細胞を活性化するタンパク質または翻訳時および／または翻訳後に修飾された L A I T タンパク質と呼ばれるタンパク質に関する。本発明はまた、医薬品製剤におけるそのようなタンパク質の利用、および L A I T タンパク質またはその機能誘導体を含む薬剤組成物も対象とする。本発明はまた、ウシ L A I T タンパク質またはその機能誘導体をコードする核酸分子、および B 細胞を活性化する天然形および組換え形の前記タンパク質の精製方法も対象とする。

50

発明の背景

一般にB細胞と呼ばれる骨髄由来「B」リンパ球は、リンパ液、血液、および免疫系の2次リンパ様組織に存在する一種の白血球である。B細胞は抗体分泌細胞、形質細胞の前駆体であり、それ自体体液性免疫応答の誘発に重要である。

成人の大部分の体液性免疫応答の誘発には、一般にT細胞と呼ばれる胸腺由来Tリンパ球、抗原提示細胞（APC）、およびB細胞間のいくつかの細胞相互作用が関与している〔J. Exp. Med. 147:1159, 1978; PNAS 77:1612, 1982; PNAS 79:1989, 1982; Immunol. Rev. 95:914, 1987〕。

現在理解されているように、T細胞依存性B細胞活性化は、主要組織適合性複体内（MHC）でコードされるタンパク質と共にAPCによって提示された抗原の認識によるT細胞の活性化を含み、これらのタンパク質はAPCの細胞表面に発現される。この抗原に特異的、MHC拘束性のT細胞とAPCの相互作用の結果、2種類の細胞の相互活性化が生じ、T細胞が生理変化して、「ヘルパー機能」が顕在化する。

ヘルパーT細胞は、抗原特異的なB細胞を活性化することができる。T細胞とB細胞の相互作用の抗原特異性は、APCとして機能するB細胞の最終的能力の結果、維持される。従って、静止している休止B細胞は有効なAPCではない（PNAS 79:1989, 1982）が、B細胞は膜結合免疫グロブリンを介して抗原と特異的に相互作用し、その特異性は、その娘細胞が分泌する免疫グロブリンの特異性を反映する（J. Exp. Med. 140:904, 1974）。

特定のB細胞による抗原の免疫グロブリン仲介インターナリゼーションには、さらに別の種類のAPCである濾胞樹状細胞による提示が関与する可能性があり、そのインターナリゼーションの結果、B細胞による抗原処理の開始、MHCクラスIIおよびB7の発現の上向き調節、およびMHCに関連した抗原由来のペプチドの提示を生じる（J. Exp. Med. 178:2055, 1993）。この経路で活性化されたB細胞が活性化ヘルパーT細胞の標的である。

T細胞のヘルパー機能は、T細胞とB細胞の接触と、サイトカインと呼ばれるT細胞由来の可溶性メディエータとB細胞の原形質膜上に発現されたそのコグネイトリガンドとの相互作用との両方を介して伝達されるシグナルを含む。T細胞とB細胞の接触も、T細胞とAPCの相互作用と同様に、MHC拘束性を持つ（Eur. J. Immunol. 12:627, 1982; Eur. J. Immunol. 12:634, 1982）。しかし、2つのリンパ球系統、特にT細胞抗原受容体（TCR）とB細胞によって発現されるMHC/抗原複合体との間のMHC拘束性相互作用を仲介する分子の特異的な相互作用は、B細胞の成長および分化の誘導を意味するものではない（Eur. J. Immunol. 18:375, 1988）。

T細胞とB細胞の接触の要件に反映される必須の分子相互作用は、B細胞の形質膜上で発現されるCD40、およびT細胞の原形質膜上で発現されるそのコグネイトリガンドgp39（またはCD40L）によって仲介される（PNAS 89:6550, 1992;

Nature 357:80, 1992）。このパラダイムは、T細胞とAPCの相互作用の際およびT細胞とB細胞の相互作用後に、後者の膜での発現が増加するという観察と一致する（PNAS 89:6550, 1992）。さらに、膜免疫グロブリンが仲介するB細胞と抗原の相互作用により、CD40の膜発現が増加する（Sem. in Immunol. 6:303, 1994）。CD40とCD40Lの間の相互作用は、B細胞の成長、B細胞の免疫グロブリン分泌細胞への分化、および免疫グロブリンのアイソタイプスイッチの誘発を意味する（J. Exp. Med. 178:1567, 1993）。このモデルは、可溶性CD40LまたはCD40に特異的なモノクローナル抗体（mAb）がB細胞の成長および免疫グロブリン分泌への分化を誘発できるという観察と一致する（Sem. in Immunol. 6:267, 1994; PNAS 83:4494, 1986; J. Immunol. 140:1425, 1988）。

T細胞とB細胞の接触の必須要件に加えて、いくつかのT細胞由来のサイトカイン、IL

10

20

30

40

50

ー 2、IL-4、および IL-5 が、B 細胞の成長および分化にとって重要である。これらのサイトカインに対する B 細胞の感受性は、事前の T 細胞との接触によって、大部分が制限される。従って、T 細胞との接触後、B 細胞はサイトカイン特異的膜受容体の発現を増加させる (PNAS 80:6628, 1983; J. Immunol. 145:2025, 1990; J. Immunol. 146:1118, 1991)。IL-2 および IL-5 は、活性化 B 細胞の成長を助けることが実証されている (PNAS 77:1612, 1980; Immunol. Rev. 52:115, 1980)。さらに、IL-4 および抗免疫グロブリンは、相乗的に B 細胞の成長を援助することが示されている (J. Exp. Med. 155:914, 1982)。

この点に関する顕著な例外は、IL-4 および IL-5 に対する休止 B 細胞の応答である。IL-4 は、MHC クラス II タンパク質の de novo 転写および翻訳を誘発し (J. Exp. Med. 155:914, 1982; PNAS 81:6149, 1984; J. Exp. Med. 160:679, 1984)、IL-5 は、細胞成長のない状態で休止 B 細胞の免疫グロブリン高率分泌細胞への分化を助けることができる (Eur. J. Immunol. 22:2323, 1992)。

いかなる場合も、T 細胞および B 細胞の膜分子間の分子相互作用および T 細胞由来のサイトカインと B 細胞におけるそれらのコクネイト受容体との相互作用からのシグナルは、複合シグナリングシステムの一部である。各シグナルは B 細胞を活性化の別の段階へ進め、B 細胞をその後の進行シグナルに感応可能にする。これらのシグナルは、個々に B 細胞の成長および分化の完全なプロセスを進める能力を持つのではなく、相互に補足し合う (Immunol. Rev. 95:177, 1987)。

1988 年に、ヒツジの初乳に独特の活性が発見された (J. Immunol. 140:1366, 1988)。タンパク質精製の古典的技術を用いて、プロリンの豊富なタンパク質 (PRP) を部分精製した。この物質は、休止 B 細胞の細胞周期の誘発を助け、かつその免疫グロブリン高率分泌細胞への分化を助けることが示された。これは明らかに、これらの機能を仲介する哺乳類由来のタンパク質の最初の報告であった。

その後、ヒツジの PRP に特異的なモノクローナル抗体が調製された。抗体を用いて調製したアフィニティカラムに PRP 標品を通したとき、溶離液および溶離物のウェスタンブロット分析によって評価すると、PRP は全てカラムに保持された。しかし、B 細胞刺激活性は全て、溶離物内に存在した。従って、ヒツジの初乳に存在する B 細胞向性生物活性の発表された特性は、PRP に起因するものではなかった (未発表情報)。

発明の概要

本発明は、新規のウシのタンパク質、およびそのタンパク質をコードする単離されたヌクレオチド配列を特徴とし、そのタンパク質は哺乳類由来の B 細胞を活性化することができる。実質的に純粋な LAIT タンパク質、または翻訳時および／または翻訳後に修飾した LAIT タンパク質は、生化学的精製またはそれが天然の関連している他のタンパク質を実質的に含まない原核または真核宿主における組換え手段によって生産することができる。また本発明は、ウシの初乳の乳漿から LAIT タンパク質、または翻訳時および／または翻訳後に修飾した形の本発明の LAIT タンパク質を精製するプロセスであって、

(i) サンプル内に含まれるタンパク質を塩析するステップ、

(ii) 従来のタンパク質分画法を利用して、ステップ (i) で塩析したタンパク質から LAIT タンパク質を濃縮し、最終的に精製するステップを含むプロセスも含む。

すべての場合において、このタンパク質は望ましい生物学的活性を有する。

本発明はまた、LAIT タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子も対象とする。核酸分子は cDNA またはゲノム DNA とすることができる。

単離したウシのタンパク質は、ヒト CD14 およびマウス CD14 と相同性を有しており、従ってウシ CD14 と呼ばれる。本発明は、CD14、組換え形のそのタンパク質、またはその機能誘導体を投与することによって、B 細胞を活性化する方法、特にそのような活性化を必要とする哺乳類の B 細胞を活性化する方法を含む。

好適な実施形態では、哺乳類はヒトの患者である。

1つの態様では、本発明はCD14を乳児用フォーミュラに混合することを含む。本発明はCD14を幼児に投与することを含み、好適な投与の形態はそのようなフォーミュラを幼児に摂取させることである。

別の態様では、本発明はCD14をワクチン注射の一部として組み込むことを含む。本発明は、免疫化を必要とする患者にCD14および抗原を投与することを含み、好適な投与の形態は、CD14および抗原の両方を含む単一調剤 (single preparation) の投与を含む。

別の態様では、本発明は、T細胞免疫不全の患者にCD14を投与することを含む。好適な態様では、本発明は、患者のT細胞の細胞表面のgp39 (CD40L) が発現不足であるかまたは全く存在しない特定のT細胞機能不全の患者に、CD14を投与することを含む。

10

別の態様では、本発明は、血清CD14が正常レベルより高いためにB細胞が過剰に活性化された機能不全患者に、CD14に対する抗体を投与することを含む。好適な態様では、本発明は、B細胞が血清CD14によって活性化された結果、リウマチ因子を分泌する慢性関節リウマチの患者に、CD14に対する抗体を投与することを含む。

本発明は、それに対する抗体を形成させたかった抗原と最適下 (suboptimal) の分裂促進濃度のCD14と共にB細胞を培養することによって、所望の特異性を有するmAbを分泌するハイブリドーマを作製する新規の方法を含む。この方法で活性化したB細胞の集団は、活性化された抗原特異的B細胞を非常に多く含み、これは次いで、所望の特異性を持つmAbを分泌するハイブリドーマの作製に使用される。

20

本発明は、B細胞の活性化を必要とする哺乳類でB細胞を活性化するための医薬品の調製におけるCD14の使用を含む。

本発明では天然のまたは組換えCD14を使用することができる。

本発明では、用語「CD14」は、マウス、ウシまたはヒトのCD14を含む。

用語の定義

「機能誘導体」は、特異的な抗体に結合するか、そのコクネイト受容体を有する細胞でその受容体に結合するなど、本発明に係るその利用を可能にするCD14の機能の少なくとも一部分を保持する。本明細書で使用する「機能誘導体」は、以下で定義するCD14の「断片」または「バリエーション」を含む。

30

CD14の「断片」とは、ポリペプチドの任意の部分集合、すなわちより短いペプチドを指す。用語「断片」は、C末端、N末端、および配列内の1つ以上の部位における1つ以上のアミノ酸の欠失を含む、天然のタンパク質配列を有するCD14から誘導されるポリペプチドを示すのに使用される。そのような断片は、無傷CD14ポリペプチドまたは翻訳時および／または翻訳後に修飾した形のCD14に特徴的な1つ以上の生物学的活性または機能を保持していなければならない。

CD14の「バリエーション」とは、天然のCD14またはその断片と同様の一次配列を有し、天然の活性が少なくとも部分的に保持されているポリペプチドを指す。変異ポリペプチドは合成手段またはポリペプチド内の欠失、挿入、または保存的アミノ酸置換を含む前記ポリペプチドの生物学的活性を保持する前記ポリペプチドをコードするcDNAの突然変異によって調製することができる。

40

本明細書で使用する用語「抗体」とは、免疫グロブリンタンパク質の非保存領域で明確なエピトープを結合する能力を持ち、それによって抗体が一つのタンパク質を別のタンパク質から区別することを可能にする免疫グロブリンタンパク質である。用語「エピトープ」は、抗体が結合できる分子の部分の部分を指すものである。用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (mAb) またはキメラ抗体を含む。

ポリクローナル抗体は、抗原で免疫した動物の血清由来の不均一な抗体分子の集団である。

モノクローナル抗体は、抗原の明確なエピトープと結合することができる均一な抗体の集団である。MAbは、当業者に周知の方法によって得ることができる。このような抗体は

50

、I g G、I g M、I g E、I g A、およびI g Dを含む任意の免疫グロブリンクラスおよびそれらの任意のサブクラスとすることができる。用語「抗体」はまた、無傷分子および抗原と結合できる例えばF a bやF (a b ')₂・などのその断片の両方を含むものである。F a bおよびF (a b ')₂・は、無傷抗体のF c断片を欠いており、循環からより速く除去され、非特異的組織結合が無傷抗体より少なくなる (W a h lら、J. N u c l. M e d. 24:316-325, 1983)。

キメラ抗体は、マウスm A b由来の可変部およびヒト免疫グロブリン由来の定常部を持つものなど、異なる部分が異なる動物種由来である分子である。

「抗原」は、抗原のエピトープに結合できる抗体を産生するように動物を追加的に誘導することが可能な、抗体が結合できる分子または分子の一部分である。抗原は、1つまたは1つを超えるエピトープを持つことができる。抗体がポリペプチド、その断片またはバリエーションに「特異的」と言うか、またはポリペプチド、その断片またはバリエーションに「結合することができる」と言う場合、それは、抗原が高度に選択的に、その対応する抗体と反応し、他の抗原によって形成される多数のその他の抗体とは反応しないことを意味する。

【図面の簡単な説明】

図1 A～図1 Cは、天然のウシL A I T (n B o - L A I T) タンパク質の精製を示している。図1 Aは、50 m gの62% (v/v) (N H₄)₂ S O₄沈殿物をかけたアニオン交換カラム [F P L C - M o n o - Q, P h a r m a c i a] からの溶離プロファイルである。結合タンパク質を、10 m Mのビスートリスプロパン中50～400 m MのN a C lの勾配および7.5～9.5の同時p H勾配で溶離した。表1 Aは、ピーク活性を持つ画分、画分# 57の生物活性を示す。浮遊密度の高いマウスの脾臓のB細胞を前述のように単離し (J. I m m u n o l. 131:581, 1983)、96ウェルクラスタ平底組織培養皿 (C o s t a r) で0.2 m lの血清を含まない培地0.2 m l中5×10⁴個の細胞で培養した。0.25 μ g / m lのL P Sの存在下または非存在下で、各画分を10% (v/v)の最終濃度になるように加えた。40時間後に、培地を1 μ C iの³H - T d Rでパルスし、6時間後にフィルタディスクに採取し、シンチレーション分光光度計でチミジン取込みを評価した。数字はc p m × 10⁻³を表す。図1 Bは、20 m gの画分# 57 (図1 A) をかけた分子ふるいカラム [F P L C - S u p e r d e x 75, P h a r m a c i a] からの溶離プロファイルである。カラムは、0.45 mのN a C lを含む20 m MのトリスH C Lのp H 8.0の緩衝液で平衡化した。表1 Bは、図1 Aに関連して説明したように評価した、ピーク画分、画分# 38の生物活性を示す。図1 Cは、1 m gの画分# 38 (図1 B) をかけたヒドロキシアパタイトカラム [H P L C - ヒドロキシアパタイト, P h a r m a c i a] からの溶離プロファイルである。結合タンパク質を、1 m MのN a C lを含む、K₂H P O₄勾配1～500 m Mのp H 6.8の緩衝液で溶離した。表1 Cは、図1 Aに関連して説明したように評価したピーク画分、画分# 25の生物活性を示す。図中の挿入図は、画分# 25からのタンパク質約5 μ gの銀染色S D S - P A G Eゲルを示す。左レーン：画分# 25；右レーン：M Wマーカ、上からそれぞれ97、66、45、31、21、および14 k D。

図2は、ヒトC D 14 (S E Q I D N O : 5) の既知の配列およびn B o - L A I Tのアラインメントさせた断片を示す。B o - L A I T断片は、アフィニティ精製した初乳n B o - L A I Tから生成した (図3参照)。ヒトC D 14の残基235～264および344～355に対応する断片は、C n B r切断で生成し、逆相H P L C (C 8カラム、P h a r m a c i a) で分離した各々約18 k Dの大きさのそれぞれメジャーおよびマイナーペプチドであった。ヒトC D 14の残基53～67に対応する断片は、C n B r切断で生成し、S D S - P A G EおよびP V D F膜への電気泳動で分離した24 k Dの断片の部分配列である。ヒトC D 14の残基19～36および151～165に対応する断片は、トリプシン切断で生成し、逆相H P L C (C 8カラム、P h a r m a c i a) で分離した。ヒトC D 14の予測された配列と重複するウシの配列の長さには、各断片について下線を付した。破線は同一アミノ酸を示し、ヒトの配列と異なるアミノ酸は明示されている

10

20

30

40

50

。

図3は、ウシおよびヒトのアフィニティ精製された初乳L A I Tタンパク質のS D S - P A G Eおよび銀染色を示す。レーン1：図1 Cで示したと同様のMWマーカ；レーン2：ウシの初乳の乳漿の62.5% (v/v) (NH₄)₂SO₄沈殿物；レーン3：#842セファロースアフィニティカラムからのpH2.5溶離液、レーン4：レーン5に表す物質をかけたC D 1 4特異的m A bの63D3 (P N A S 77:6764, 1980)セファロースアフィニティカラムからのpH2.5溶離液；レーン5：セファクリルS100HRで分画したヒトの初乳の乳漿レーン1~5の各々は5μgのタンパク質を含む。表2は、5×10⁴の高浮遊密度のマウス脾臓B細胞を、血清を含まない培地で、示した刺激の存在下で40時間培養し、1μCiの³H-TdRでパルスし、6時間後にフィルタ

10

ディスクに採取し、シンチレーション分光光度計でチミジン取込みを評価した。数字はc p m×10⁻³を表す。生物検定法の詳細は、図1 Aで説明した通りである。対照c p m×10⁻³：刺激無し、0.3:50μg/ml LPS、75.0;0.25μg/ml LPS [LPS↓]、0.8;および1μg/ml m l g M特異的m A bのb-7-6 (Eur. J. Immunol. 14:753, 1984)、0.7。

図4 Aおよび図4 Bは、n B o - L A I T活性の熱不安定性および抗体仲介阻害を示す。図4 Aは、n B o - L A I Tを95℃で10分間熱処理した場合(●)と熱処理しなかった場合(○)について、示した濃度のアフィニティ精製したn B o - L A I Tの存在下で図1 Aについて説明したように培養した5×10⁴の高浮遊密度のマウス脾臓B細胞によるチミジンの取込みを示す。培地を³H-TdRで40時間パルスし、6時間後に採取し、液体シンチレーション分光光度計でチミジン取込みを評価した。挿入図は、n B o - L A I Tを熱処理した(または熱処理しない)場合について、示した濃度のLPSを含む培地における応答を示す。図4 Bは、0.25μg/mlのアフィニティ精製したn B o - L A I Tまたは50μg/mlのLPSのいずれかの存在下で、図4 Aについて説明したように確立した培地におけるチミジンの取込みを示す。これらの各刺激について、上述の濃度のポリクローナルウサギIgG抗B o - L A I T、#842、または正常ウサギIgGのいずれかの存在下で培養した。n B o - L A I TおよびLPS仲介刺激の両方について#842のIgGによって仲介されたチミジン取込みの阻害率を括弧内に示す。正常ウサギIgGによって仲介された阻害のレベルは、n B o - L A I TおよびLPS刺激でそれぞれ9~20%および12~31%の範囲であった。単離した#842 IgGによって直接誘導されたCPMは0.4および50μg/mlでそれぞれ454±53から764±69の範囲内であり、正常ウサギIgGの場合、0.4および50μg/mlでそれぞれ297±34から420±31の範囲内であった。刺激を受けない対照では、どちらの組の実験でも195±29 c p mとなった。

20

30

図5 Aは、ウシC D 1 4遺伝子を含む7.1 kbのE c o R I - X h o I断片の制限酵素切断地図を示す。制限部位の略語は、X、X h o I；P、P s t I；O、N c o I；B、B a m H I；N、N o t I；D、B s s H I；T、B s t E I I；M、S m a I；S、S a c I I；C、H a p I；R、E c o R V；A、S p h I；G、B g I I I；H、H i n d I I I；E、E c o R Iである。図5 Bは、ウシC D 1 4の遺伝子座の略図である。黒く塗った部分は遺伝子のコード領域を表し、空白の囲みはイントロン配列である。A T G開始コドンの前の斜線部は5'非翻訳領域であり、T A A停止コドンの後の斜線部は3'非翻訳領域である。図5 Cは、選択する配列決定法を示す略図である。矢印は配列決定の方向を表す。断片番号は右側に示す(詳しくは本文を参照されたい)。

40

図6は、ウシ(配列番号No. 1)、ヒト(配列番号No. 2)、およびマウス(配列番号No. 3)のC D 1 4コード領域の核酸配列の比較を示す。最初の塩基位置はA T Gコドンの第1ヌクレオチドに対応し、最後のヌクレオチドはT A A停止コドンの第3ヌクレオチドに対応する。アラインメントはDNA S T A R - M e g a l i g nソフトウェアを使用し、加重残基表(w e i g h e d r e s i d u e t a b l e)を用いるクラスタル(C l u s t a l)法を適用して行われた。このアラインメントで使用するヒトc D N A配列(受入れ(a c c e s s i o n)番号P 0 8 5 7 1)およびマウスc D N A配列

50

(受入れ番号 P 0 8 5 7 1) は、スイスータンパク質データベースから引き出した。図 7 は、ウシ (配列番号 No. 4)、ヒト (配列番号 No. 5)、およびマウス (配列番号 No. 6) の CD 1 4 タンパク質のアミノ酸配列の比較を示す。アミノ酸配列は、図 6 に示す対応する cDNA 配列から演繹した。PAM 2 5 0 残基加重表と一緒に J. H e i n によって記述された方法 (Methods in Enzymology 1 8 3 : 6 2 6, 1 9 9 0) を用いてこのアラインメントを生成するために、DNA S t a r - M e g a l i g n ソフトウェアを使用した。

図 8 は、ウシ CD 1 4 の cDNA コード領域の増幅に使用するプライマーを示す。図 8 A は、バキュロウィルス発現系に使用する前進プライマー (配列番号 No. 7) および逆プライマー (配列番号 No. 8) を示す。図 8 B は、哺乳類発現系に使用する前進プライマー (配列番号 No. 9) および逆プライマー (配列番号 No. 1 0) を示す。

図 9 は、天然のウシ CD 1 4 および組換えウシ CD 1 4 の免疫プロットングを示す。ウェスタンブロット分析を使用して、n B o - L A I T タンパク質の大きさを組換え CD 1 4 タンパク質と比較評価した。2 5 0 n g の CD 1 4 タンパク質を 1 2 . 5 % の S D S ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、1 8 0 m A で 3 0 分間 P V D F 膜 (ミリポア) に電気泳動で転移させた。膜を T B S T (2 0 m M トリス H C l, p H 7 . 5, 1 5 0 m M N a C l, 0 . 0 2 5 % T w e e n 2 0) 中 5 % のスキムミルクで 1 時間ブロックし、その後 5 % のスキムミルクを補充した T B S T 中 2 . 5 μ g / m l の濃度のウサギ抗 B o - L A I T # 8 4 2 A b と共に 1 時間インキュベートした。ブロットを T B S T で、1 回につき 1 0 分間ずつ、3 回すすいだ。セイヨウワサビのペルオキシダーゼ (B i o R a d) を結合したヤギ抗ウサギ I g G を使用して、ウサギ抗体を検出した。次いで、膜を T B S T で 3 回すすいだ (1 0 分 / 回)。タンパク質を可視化するために、E C L キット (A m e r s h a m) を使用した。レーン 1 : M W マーカ; レーン 2 : n B o - L A I T 8 4 2 セファロースアフィニティ精製した n B o - L A I T タンパク質; レーン 3 : r B o - S f 9 - 1 2 C A 5 アフィニティ精製した S f 9 昆虫細胞由来組換えウシ CD 1 4 ; レーン 4 : r B o - C 1 2 7 - 8 4 2 セファロースアフィニティ精製した C 1 2 7 マウス乳房腫瘍細胞系由来組換えウシ CD 1 4 。

図 1 0 は、n B o - L A I T と L P S の成長促進活性の比較を示す。図 1 A について記載したように、高浮遊密度の休止マウス脾臓 B 細胞を調製し、培養し、採取した。示した濃度のアフィニティ精製した n B o - L A I T (図 1 について記載したようにアフィニティ精製した) または S . t y p h o s a (D i f c o) から得た L P S のいずれかを、培養の開始時に添加した。

図 1 1 は、n B o - L A I T と L P S の分化促進活性の比較を示す。図 1 A について記載したように、高浮遊密度の休止マウス脾臓 B 細胞を調製し、培養した。1 0 μ g / m l の L P S [S . t y p h o s a (D i f c o)] または 5 0 0 n g / m l のアフィニティ精製 n B o - L A I T を使用して 2 組の培養を開始し、示した時間後に採取した。市販の E L I S A キットを使用して、上清中に存在する I g M を定量することによって、累積 I g M の産生を評価した。

図 1 2 は、n B o - および r B o - L A I T タンパク質の成長促進活性と L P S の成長促進活性との比較を示す。図 1 A について記載したように、高浮遊密度の休止マウス脾臓 B 細胞を調製し、培養し、採取した。示した濃度の n B o - L A I T (図 1 A について記載したように精製する)、昆虫細胞または哺乳類細胞で生成した r B o - L A I T、および L P S [S . t y p h o s a (D i f c o)] を培養の開示時に添加した。昆虫細胞から得られた組換え B o - L A I T は、B o - L A I T の cDNA をトランスフェクトした S f 9 細胞の培養上清からアフィニティ精製した。発現ベクトルは、インフルエンザヘムアグルチニン (H A t a g) 由来のナペプチドをコードする 3 ' 2 7 m e r を含んでいた。H A タグを認識する、m A b の 1 2 C A 5 (C e l l 5 7 : 7 8 7, 1 9 8 4) を結合したセファロースに S f 9 上清を通すことによってアフィニティ精製を実施した。哺乳類発現系 C 1 2 7 から得た組換え B o - L A I T のアフィニティ精製は、ウサギ 8 4 2 由来のポリクローナル抗血清から単離した I g G を結合したセファロースを使用して、n B o

10

20

30

40

50

ーL A I Tについて実施した。

図13は、精製した一次B細胞およびT細胞の集団に対するn B oーL A I Tの成長促進活性の比較分析を示す。高浮遊濃度の休止マウス脾臓B細胞を、図1Aについて記載したように調製した。一次T細胞は、脾臓B細胞を単離したのと同じ動物のリンパ節から単離した。具体的には、リンパ節懸濁液を、製造者の指示に従って、かつ前述のように抗I g カラム (B i o t e x L a b o r a) に通した (E u r. J. I m m u n o l 24; 967, 1994)。免疫蛍光染色およびF A C S分析によって評価すると、T細胞集団では、 $>95\%$ がC D 3⁺、であり $<0.5\%$ がm l g⁺であった。左の図は、示した濃度のアフィニティ精製n B oーL A I Tに対して応答する、 1.5×10^5 個の精製したT細胞またはB細胞を含む培地の増殖応答を示す。右の図は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL P S [S . t y p h o s a (D i f c o)] または $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコンカナバリンA (シグマ)のいずれかに対する同数のB細胞またはT細胞の増殖応答を示す。血清を含まない条件を使用し、全ての刺激は培養の開始時に添加した。40時間後に、培地を $1 \mu\text{Ci}$ の³H-T d Rでパルスし、6時間後にフィルタディスク上に採取し、シンチレーション分光光度計でチミジン取込みを評価した。提示した数字は、2回の培養の平均c p mを表す。

図14は、n B oーL A I T仲介マウスB細胞成長のウシ胎児血清に対する独立性を示す。高浮遊濃度の休止マウス脾臓B細胞は、図1Aについて記載したように調製し、培養し、採取した。血清を含まない培地に、示した濃度の熱不活化した (56°C で1時間) ウシ胎児血清 (G i b c o B R L) と、刺激無し (■)、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィニティn B oーL A I T (○)、または $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL P S [S . t y p h o s a (D i f c o)] (●)のいずれかとを補った。40時間後に培地を $1 \mu\text{Ci}$ の³H-T d Rでパルスし、6時間後にフィルタディスク上に採取し、シンチレーション分光光度計によってチミジン取込みを評価した。提示した数字は、2回の培養の平均c p mを表す。

図15は、(1) 分画していない脾臓細胞、(2) 図1Aについて記載したように調製した高浮遊密度の休止マウス脾臓B細胞、および(3) 後者の高浮遊濃度の休止集団から得られたF A C Sソーティングm l g⁺B細胞に含まれるC D 14のノーザンブロット分析を示す。F A C Sソーティングの場合、高浮遊濃度の細胞は、マウスI g kに特異的なF I T C結合m A b 187.1と共にインキュベートした (H y b r i d o m a 1:5, 1981)。3つの集団の各々におけるm l g⁺細胞の割合を示す。トリゾール法 (G i b c o B R L L i f e T e c h n o l o g i e s) を用い、製造者の指示に従って、3つの集団の各々の 10^7 個の細胞から全RNAを分離し、 1.2% のホルムアルデヒドゲル上で分離した。真空ブロットシステム (P h a r m a c i a) を用いて、RNAをナイロン膜 (G e n e S c r e e n) に移した。膜製造者が推薦する通りに、架橋、プレハイブリッド形成、およびハイブリッド形成を行った。マウスのC D 14に特異的なプローブは、前進プライマー5'-C T A G A A T T C T C T C C C G C C C C A C C A G A G C C C T G C G-3' (配列番号No. 11) および逆プライマー5'-C T A G A A T T C T T A A A C A A A G A G G C G A T C T C C T A G G-3' (配列番号No. 12) を使用してP C Rによって形成されたゲノムマウスC D 14断片から得た。増幅断片は、アガロースゲル電気泳動によって分離し、切り出し、精製した。大きいリボソームサブユニットタンパク質の構成的に発現するmRNAに特異的なL 32のc D N Aプローブ (N u c l. A c i d R e s. 16: 10751, 1988) を使用して、RNAのローディングを標準化した。プローブ (各 100ng) は、オリゴラベリングキット (P h a r m a c i a) を用いて、DNAの $0.2 \sim 1 \times 10^9\text{cpm}/\mu\text{g}$ の比活性で標識した。次に膜を $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $1\% \text{SDS}$ で 65°C で2時間洗浄し、X線フィルム (K o d a k, B i o m a x M S) に1から5日間暴露した。

図16は、図15で記述したm l g⁺細胞についてさらに精製したか、または精製していない高浮遊密度の休止マウス脾臓B細胞の $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL P S [S . t y p h o s a (D i f c o)] および $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィニティ精製n B oーL A I Tに対する応答を示す。図1Aについて記載したように、培地を確立し、トリチウム標識チミジンで

パルスし、採取し、チミジン取込みを評価した。提示する数字は、2回の培養の平均 c p mを表す。

図17は、組換え B o - L A I T 仲介 B 細胞の活性からの C D 4 0 の独立性を示す。高浮遊密度の休止マウス脾臓 B 細胞を、従来の C 5 7 B L / 6 マウスか、C D 4 0 座の標的破壊によって形成された C D 4 0 欠損動物 (I m m u n i t y 1 : 1 6 7 , 1 9 9 4) のいずれかから単離した。細胞 (1.5×10^5) を $10 \mu\text{g/ml}$ の L P S 、または昆虫の細胞の発現系から得た示した濃度の r B O - L A I T の存在下で培養した。図1Aに関連して記載したように、培地にパルスを与え、採取した。提示した数字は、2回の培養の平均 c p mを表す。

図18は、ヒト (n H u) 、ウシ (n B o) 、およびマウス (n M o) から得た天然 C D 1 4 の銀染色分析 (左の図) および免疫ブロット分析 (右の図) の比較を示す。n H u は、上述の通り、ネフローゼ患者の尿から分離した (E u r . J . I m m u n o l . 2 4 : 1 7 7 9 , 1 9 9 4) 。 n B o は、図3について記述したように、ウシの初乳からアフィニティ精製した。 n M o は、C D 1 4 特異性 m A b 3 C 1 0 を固定したセファロース 4 B (J . E x p . M e d . 1 5 : 1 2 6 , 1 9 8 3) を使用して、アフィニティクロマトグラフィによって、マウスのハイブリドーマ O K T 3 の上清から分離した (P N A S U S A 7 7 : 4 9 1 4 , 1 9 8 0) 。銀染色の場合、各々の試料 $1 \mu\text{g}$ を 1 0 % S D S - P A G E で 2 0 0 V で 4 5 分間分離した。タンパク質は、製造者の指示に従って銀染色法 (B i o r a d) によって可視化した。免疫ブロットの場合、各々の試料 250 ng を 1 0 % S D S - P A G E により 180 mA で 4 5 分間分離し、電気泳動により 180 mA で 3 0 分間 P V D F 膜 (M i l l i p o r e) に移した。膜は T B S T (2 0 m M の トリス H C l 、 p H 7 . 5 、 1 5 0 m M の N a C l 、 0 . 0 2 5 % の T w e e n 2 0) 中 5 % のスキムミルクで 1 時間ブロックし、その後 5 % のスキムミルクを補足した T B S T で $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度の m A b 3 C 1 0 (J . E x p . M e d . 1 5 : 1 2 6 , 1 9 8 3) と共に 1 時間インキュベートした。ブロットは、T B S T で 1 回につき 1 0 分ずつ、3 回すすいだ。セイヨウワサビペルオキシダーゼ (B i o R a d) と結合させたヤギの抗マウス I g G を使用して、マウス抗体を検出した。次に、膜を T B S T で 3 回 (1 回につき 1 0 分) すすいだ。E C L キット (A m e r s h a m) を使用して、タンパク質を可視化した。

図19は、マウス B 細胞の成長を刺激するためのヒト (n H u) 、ウシ (n B o) 、およびマウス (n M o) から得た天然 C D 1 4 の比較分析を示す。これらの 3 つのタンパク質は、図18で記載したように精製した。図1Aで記載したように分離した高浮遊密度の休止マウス脾臓 B 細胞の示した濃度の 3 つのタンパク質に対する応答を評価した。培地は 4 0 時間経過後に $1 \mu\text{Ci}$ の ^3H - T d r でパルスを与え、4 6 時間経過後に採取した。提示した数字は、示した濃度の n H u 、 n B o 、および n M o で刺激した 2 つの培養物の平均 c p m を刺激を含まない 2 つの培養物の平均 c p m で除することによって得られた、賦活化指数 (i n d e x o f s t i m u l a t i o n) を表す。

図20Aおよび図20Bは、臍帯血および扁桃腺からそれぞれ単離したヒト B 細胞に対する n B o - L A I T の成長促進活性を示す。図20Aは、正の選択によって単離した臍帯血 B 細胞によるチミジンの取込みを示す。臍帯血の白血球懸濁液を、全 B 細胞マーカー C D 7 2 に特異的なフルオレセイン標識 m A b で染色した。次に C D 7 2 の正の臍帯白血球を蛍光活性化細胞選別器 (F A C S t a r P l u s 、 B e c t o n D i c k e n s o n) で分離し、結果的に 9 8 % を超える純度を得た。図1Aについて記載したように、B 細胞 (1.5×10^5) を刺激が存在しない状態で、または $2 \mu\text{g/ml}$ の n B o - L A I T が存在する状態で培養した。B 細胞は、1 つはヒト I g k [L O - H K 3 (I n " R a t H y b r i d o m a s a n d R a t M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s " e d . H . B a z i n , C R C P r e s s , B o c a R a t o n , F L , U S A)] に特異的で、1 つはヒト I g λ [L O - H L 2 , (I n " R a t H y b r i d o m a s a n d R a t M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s " e d . H . B a z i n , C R C P r e s s , B o c a R a t o n , F L , U S A)] に特

10

20

30

40

50

異的な2つのmAbを各々 $1.5 \mu\text{g/ml}$ のコーティング濃度で9時間予めコーティングしたウェルで、追加刺激の存在しない状態または $2 \mu\text{g/ml}$ のnBo-LAITの存在する状態で培養した。60時間後に培地を $1 \mu\text{Ci}$ の $^3\text{H-TdR}$ でパルスし、12時間後にフィルタディスク上に採取し、シンチレーション分光光度計によってチミジン取込みを評価した。図20Bは、負の選択によって形成した扁桃腺B細胞を用いて得られた結果を示す。具体的には、CD3 ϵ (Becton Dickinson) に特異的なビオチニル化mAbで白血球懸濁液にラベル付けを行い、その後に「マイクロビーズ」を含む鉄を結合したアビジンを加えた (Becton Dickinson)。標識した集団をMACSに通し (Becton Dickinson)、溶離液を採集した。この集団は、系特異的mAbで免疫蛍光染色することによって評価したとき、1%未満のT細胞および97%を超えるB細胞を含んでいた。B細胞 (1.5×10^5) は、図1Aに関連して記載したように培養した。臍帯血B細胞に関しては、扁桃腺B細胞を、ヒトIgkおよび λ に特異的なプレートに結合したmAbが存在する状態および存在しない状態で培養したが、この場合、ウェルは、濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の各々のmAbを使用して予めコーティングした。培地は、図20Aについて記載したようにパルスし、採取し、チミジンの取込みを評価した。

10

図21は、分娩後の経過時間に対する母乳内のCD14の濃度を示す。母乳は、分娩後の示した時間の経過時に2名の提供者 (A. D. および S. B.) から採集した。清澄乳漿を調製し、含まれるCD14の濃度を、CD14特異的ELISAキット (IBL、Hamburg) を使用し、製造者の指示に従って評価した。

20

好ましい実施形態の説明

下記の実験は、本明細書ではウシCD14とも呼ぶ天然ウシLAITタンパク質 (nBo-LAIT) の初乳乳漿からの精製を示す。精製したnBo-LAITのアミノ酸配列分析を示すが、ヒトCD14との相同性を示している。ヒトCD14の精製法を示す。ハイブリドーマ上清からのマウスCD14の精製法を示す。

*in vitro*でのB細胞刺激アッセイを、アフィニティ精製した初乳Bo-LAIT、ヒト初乳CD14、尿から得たヒトCD14およびハイブリドーマ上清から得たマウスCD14について記載する。マウス由来の高浮遊密度休止脾臓B細胞については、これら3種から得たLAITタンパク質に反応して、細胞周期が始まり、進行していることと、ウシ由来LAITタンパク質への暴露に反応して、免疫グロブリン高率分泌細胞に分化することが示される。これらの活性化は規定の無血清培地で起こり、培地中のウシ胎児血清の存在はLAITタンパク質媒介B細胞活性化に影響しないことも示される。nBo-LAITが特異的にネズミのB細胞を活性化し、ネズミのT細胞は活性化しないこと、LAITタンパク質はCD14 mRNAが検出されないB細胞集団を活性化することを示す実験を示す。ウシCD14が、CD40が発現されないB細胞の成長を誘導することを示す実験も示す。

30

ウシCD14をコードするゲノムDNAおよびcDNAの両者について単離、クローニングおよび配列決定を示す。文献で周知のマウスCD14およびヒトCD14の配列との比較により、Bo-LAITとこれらの既知のCD14との間の配列の関係を示す。組換えウシCD14に関係するB細胞の成長および分化活性を示す。

40

昆虫および哺乳類の系の両方で組換えウシCD14を発現する方法を示す。特に、昆虫細胞内での組換えタンパク質の発現を容易にするために、バキュロウィルス発現ベクターを使用した。天然のBo-LAIT (nBo-LAIT) とバキュロウィルス発現系から得た組換えBo-CD14 (rBo-LAIT) のB細胞成長および分化特性を比較すると、後者は機能性であり、nBo-LAITの約50%の比活性を有することが明らかとなった。

ウシ由来のCD14をコードするcDNAのレシピエントとして、マウス乳癌細胞株C127を使用した。cDNAをウシのパピローマウィルス発現ベクターにクローニングした。安定なC127形質転換体を確立し、アフィニティクロマトグラフィにより、C127の集密的培養物の上清から組換えCD14タンパク質を単離した。昆虫細胞およびC12

50

7由来の組換えL A I Tタンパク質のウェスタンブロット分析により、この2つの発現系で種々の翻訳時および／または翻訳後修飾が生じていることが明らかとなった。哺乳類細胞由来の組換えウシC D 1 4の比活性は昆虫細胞由来の組換え物質と同じであった。

天然のB o - L A I Tと昆虫細胞および哺乳類細胞由来の組換えウシC D 1 4によるB細胞成長促進活性の比較を示す。また、扁桃腺および臍帯血から単離したヒトB細胞に対する天然のB o - L A I Tの成長促進活性を示す。結果は、ネズミB細胞に関しては、新生児または成人から単離したヒトB細胞はB o - L A I T媒介成長を受けやすいことを示している。

ヒト初乳中および分娩後78日目までの乳中に存在するC D 1 4の濃度は、健常人ドナー血清中の3～20倍高いことが示される。

10

方法

ウシL A I Tタンパク質の精製

出産直後のウシの最初の乳腺分泌物から5リットル超の初乳を得た。

(i) 最初に4, 420gで30分間初乳を遠心して、細胞と細胞デブリを除去することにより、清澄な初乳乳漿を調製した。次いで、この遠心上清を250, 000gで2時間遠心した。浮遊する脂肪およびペレット化したカゼインを捨て、清澄な初乳乳漿をさらに分画した。

各分画手法から得た各画分を*in vitro*でB細胞成長促進活性についてアッセイした。すなわち、各画分を広範な濃度にわたり、既述(J. Immunol. 131: 581, 1983)のように、マウスの脾臓から得た浮遊密度の高い休止B細胞の成長刺激能についてアッセイした。これらの分析を通して、規定の無血清培地を使用した[5×10⁻⁵2-β-メルカプトエタノール、5μg/ml鉄飽和トランスフェリン(Boehringer, Lewes、英国)、0.5mg/ml脱脂BSA(Boehringer)、100U/mlペニシリン(Gibco)、100μg/mlストレプトマイシン(Gibco)および必須アミノ酸を補ったIMDM(Gibco)]。下記の単離スキームから得た画分を、分裂促進下(submitogenic)濃度のLPS(0.25μg/ml)と共に、直接調べた。下記のように、L A I Tタンパク質が純粋に近づくにつれて、直接的分裂促進特性が明らかとなった。

20

(ii) (NH₄)₂SO₄中での逐次沈殿により、初乳乳漿調製物に含まれるタンパク質を塩析した。使用した漸増的な塩濃度は42%、50%、62%、65%(v/v)硫酸アンモニウム(AS)であった。従って、42%で沈殿した物質の上清中のAS濃度を50%に上昇させ、50%で沈殿した物質を取り出してから、残りの上清中のAS濃度を62%に上昇させるなどした。ASで沈殿したペレットをそれぞれ、0.15MのNaClおよび1mMのAEBSF(TNAEBSF)を含む10mMトリス塩酸(pH8.0)に可溶化させた。これらの画分を脱塩し、10DGカラムを使用してバッファをTNAEBSFに換え、生物活性をアッセイした。B細胞成長促進活性の大部分は、上記スキームで62%のASで沈殿したもののの中に単離された(示さず)。

30

(iii) 3種の逐次タンパク質分画手法を使用して活性を実質的に高め、最終的に精製した。62%ASで沈殿した高活性画分50mgを陰イオン交換カラムにかけ、10mMピストリスプロパン中50mMから400mMのNaCl塩勾配および7.5から9.5のpH勾配を同時に使用して物質を分離した。図1Aは、このカラムからの溶離プロフィールを示しており、表1Aはピーク活性を有する画分である画分#57を示している。次いで、画分#57 20mgを、0.45M NaClを含む20mMトリス塩酸(pH8.0)で平衡化した分子ふるいカラムにかけた。この分画の溶離プロフィールを図1Bに示し、ピーク画分#38の活性を表1Bに示す。

40

表 1 A	CPM x 10 ⁻³
刺激なし	0.8
LPS 50 μ g/ml	152.5
LPS 0.25 μ g/ml	3.9
画分 5 7 + 0.25 μ g/ml LPS	108.7

表 1 B	CPM x 10 ⁻³
刺激なし	0.4
LPS 50 μ g/ml	102.1
LPS 0.25 μ g/ml	1.3
画分 3 6 + 0.25 μ g/ml LPS	76.0

表 1 C	CPM x 10 ⁻³
刺激なし	0.7
LPS 50 μ g/ml	135.2
LPS 0.25 μ g/ml	3.5
画分 2 5 + 0.25 μ g/ml LPS	112.0

次いで、1 mg の画分 # 3 8 を 1 mM NaCl 中のヒドロキシアパタイトカラムにかけ、リン酸バッファ (pH 6. 8) 中 1 mM から 500 mM のリン酸カリウム勾配で溶離した。溶離プロファイルを図 1 C に、関連する活性を表 1 C に示す。

図 1 C の挿入図は、ピーク活性を有する画分を SDS-PAGE で分析し、銀染色したものを示し、相対分子量 46 ~ 50 kD を有する単一の主バンドが示されている。

ウシ LAIT タンパク質の配列分析

精製した nBo-LAIT の配列を分析した。N 末端はブロックされていることが判った。この物質を臭化シアンまたはトリプシンで加水分解した。5 つの画分が得られ、これらを逆相 HPLC または SDS-PAGE 後に PVD F 膜に電気泳動的に転写して精製してから、配列決定を実施した。

図 2 に示すように、5 つの画分はすべてヒト CD 14 と顕著に相同性を持って整列していた。

ウシおよびヒト初乳からの LAIT タンパク質のアフィニティ精製

従来のタンパク質分画手法を使用して単離した nBo-LAIT を使用して、ウサギ (# 842) ポリクローナル抗体を調製した。この抗血清の IgG 分画をプロテイン A-セファロースで精製し、次いで、セファロース 4 B に結合させた。

nBo-LAIT とヒト CD 14 (HuCD 14) の配列の相同性は、Bo-LAIT がウシの CD 14 相同体である可能性を示唆した。このことを、入手できる HuCD 14 に特異的なモノクローナル抗体 (mAb) を使用するアフィニティカラムを作製してさらに探索した。この抗体 63D3 (PNAS 77: 6764, 1980) を、mAb 187. 1 からなるアフィニティカラム [ラット抗マウスカッパ (Hybridoma 1: 5, 1981)] で対応のハイブリドーマ上清から生成し、セファロース 4 B に結合させ、次いで、生成した mAb をセファロース 4 B に結合させた。

清澄にしたウシ初乳乳漿を上記のように、硫酸アンモニウムで逐次塩析した。ヒト初乳乳漿はセファクリル S 100 HR カラムで分画した。次いで、B 細胞成長促進活性がピークの画分を、ウシからの物質については 842-セファロースカラムを、ヒトからの物質に

10

20

30

40

50

ついては63D3-セファロースカラムを使用してアフィニティ精製した。アフィニティ精製した初乳B o - L A I Tおよびアフィニティ精製した初乳C D 1 4のS D S - P A G E分析を図3に示し、関連したB細胞成長促進活性を表2に示す。図示したように、両方の初乳調製物、p 4 6 ~ 5 0ウシからの物質(図3、レーン3)およびp 5 0 ~ 5 2ヒトからの分子(図3、レーン4)から主要なバンドが単離された。

表 2	ウシ # 8 4 2 p H 2 . 5 溶離液	ヒト 6 3 0 3 p H 2 . 5 溶離液
100 ng/ml	20.00*	0.3
10 ng/ml	1.49	0.3
• + LPS↓	16.5	21.1
• + b-7-6	5.17	8.5

* 数字は40時間培養後のc p m $\times 10^{-3}$ を表す。

表2に示す生物活性は、100 ng/mlの濃度のアフィニティ精製したB o - L A I Tはマウスの休止B細胞の成長を刺激したことを示している。10 ng/mlで添加すると、この物質は分裂を促進しなくなり、分裂促進下濃度のL P SまたはマウスI g Mに特異的なm A bであるb - 7 - 6 (E u r . J . I m m u n o l . 1 4 : 7 5 3 , 1 9 8 4) を添加すると副刺激が実施される。アフィニティ精製したヒトの物質は、調べた濃度ではそれ自身分裂促進性であることは認められなかったが、10 ng/mlでは、B細胞の成長はウシからの物質とほぼ等しい効率で、同じ副刺激により刺激された。

n B o - L A I Tの生物活性は熱に不安定であった。図4Aに示すように、アフィニティ精製したB o - L A I Tを95℃で10分間処理すると、関連するB細胞成長促進活性が失われる。L P Sを同様に処理してもその活性に影響しなかった(図4Aの挿入図)。また、ポリクローナル抗B o - L A I T # 8 4 2は効率的にn B o - L A I TのB細胞成長促進活性をブロックしたが、L P Sの活性には影響を与えなかった。図4Bおよび挿入図を参照のこと。

ウシゲノムC D 1 4の分子クローニング

ウシゲノムE M B L 3 S P 6 / T 7 ラムダライブラリ(C l o n t e c h)を、(S c r i p p s I n s t i t u t eのR, U l e v i t c hから入手した)ヒトC D 1 4 c D N Aの1.5 kbフラグメントでスクリーニングした。15個の正のシグナルが得られ、シグナルの最も強いクローン「B 2」を選択して、ウシC D 1 4をさらに分析し、クローニングした。

クローンB 2から単離、精製したファージDNAの挿入サイズは約15 kbであった。精製したDNAを消化し、得られたヒトC D 1 4に相同の配列を含む7.1 kbのE c o R I - X h o I断片をp B l u e s c r i p t S K⁺(S t r a t a g e n e)にサブクローニングした。広範な酵素を使用した制限マッピングをした後、ヒトC D 1 4プローブとハイブリッド形成すると、ウシC D 1 4遺伝子をクローニングした断片内に局在化させることができる(図5A)。別の制限マッピングを使用して、4つの短い断片(I ~ I V)をp B l u e s c r i p t S K⁺にサブクローニングすると、次の約5 kbの配列決定に、ウシC D 1 4遺伝子全体が含まれる(図5C)。断片I (E c o R I - B a m H I、3.2 kb)、I I (P s t I - P s t I、1.35 kb)、I I I (P s t I - P s t I、0.3 kb)およびI V (P s t I - X h o I、0.95 kb)を使用して、入れ子重複一方向欠失を構築した。これらの断片は、ウシC D 1 4の遺伝子座の連続した配列を提供した。図5BはウシC D 1 4ゲノム断片の組織を示す。

ウシC D 1 4 c D N Aの分子クローニング

ポリ(A⁺) RNAをウシの末梢血単球から単離し、G i g a p a c k I I P a c k a g i n g E x t r a c t (S t r a t a g e n e)を使用して、組換えラムダファ-

10

20

30

40

50

ジDNAをパッケージングした。「Time Saver cDNA合成キット」(Pharmacia)と共にExcell EcoRI/CIPベクターを使用してcDNAライブラリを作成した。

ライブラリは、PCRにより、ウシゲノムCD14断片のコーディング翻訳領域からのプローブでスクリーニングした(詳細は、下記のウシCD14断片を有するバキュロウィルス組換え発現ベクターの調製の項に示す)。ランダムヘキサヌクレオチドでプライムした第二鎖合成によりプローブを³²Pで標識した(Oligolabellingキット、Pharmacia Biotech)。非常に厳しい条件(0.1×SSC、1%SDS、65℃、3時間)下でスクリーニング手順を実施した。得られたクローンの1つ(Excell/BoCD14-1)は1.4kbの挿入を有し、これをpBluescript SK⁺にサブクロニングし、進行性(progressive)重複一方向欠失を含むpBS/BoCD14サブクローンを使用して配列決定した(Nested Deletionキット、Pharmacia)。

このウシCD14 cDNAクローンは1327bpからなる。ATG開始コドンの次に、1116ntのオープンリーディングフレームが続く、ヌクレオチド1202に停止コドンTAAがある。このオープンリーディングフレームは82bpの5'非翻訳配列および122bpの3'非翻訳配列に隣接した。ポリアデニル化シグナル5'-ATTAA A-3'は停止コドンの3'の105bpにある。

ウシCD14のゲノムおよびcDNA配列のアラインメントから、これらがcDNAの5'開始部分から、ATG開始コドンの直後に認められる最初で唯一のイントロン(88bp)まで同一線形であることが明らかになる。コード配列の残り部分は連続している。従って、ヒトおよびマウスのCD14について既述のイントロン-エキソンの構成はウシCD14に正確に保存されている。ウシCD14 cDNAの翻訳ヌクレオチド配列をヒトおよびマウスのCD14 cDNAの翻訳ヌクレオチド配列と比較すると、コード領域のヌクレオチドが各々74.2%および62.6%同一であることが明らかとなった(図6)。

ウシCD14タンパク質の一次構造をcDNA配列から推測し、ウシCD14タンパク質は374個のアミノ酸からなる。最初のメチオニンの次に、真核細胞のシグナルペプチドに典型的な疎水性および/または中性の残基15個が続く。ウシCD14のアミノ酸配列をヒトおよびマウスのCD14と並べると、各々73.1%および62.3%が同じであることが明らかとなった(図7)。3つの可能なN結合型グリコシル化部位(Asn-X-Thr/Ser)があり、そのすべてがヒトおよびマウスCD14に保存されている。さらに、ウシCD14は、ヒトおよびマウスのCD14に共通な、ロイシンを多く含む反復モチーフ(LXXLXL)を10個含んでいる(J. Immunol. 145:331, 1990)。

昆虫細胞での組換えウシCD14の発現

組換えCD14タンパク質を作製するためのDNAの調製では、CD14翻訳領域の全長断片をPCRで作製した。PCRプライマーの特別なセットは、ウシCD14 cDNAから得た配列情報に基づいて表した。5'末端のためのPCRプライマーは、NheI用の2つの認識配列、コザック配列、ATG開始コドンおよび最初の17~21ヌクレオチドの翻訳コード領域を含んでいた。3'末端のためのPCRプライマーは、NheI用の2つの認識配列、TAA停止コドンまでで、停止コドンを含まない翻訳コード領域の最後の21~24ヌクレオチドを含んでいた(図8A)。

ウシCD14翻訳領域を、7.1kbのEcoRI-XhoIゲノムCD14断片(上記参照)を鋳型として使用して増幅した。PCRはPwoDNAポリメラーゼ(Boehringer)を使用して実施した。最終体積100μlに対して、鋳型DNA5ng、10mMトリス塩酸(pH8.85)、25mM KCl、5mM (NH₄)₂SO₄、2mM MgSO₄、各dNTP250mM、各プライマー250nM、PwoDNAポリメラーゼ5単位を加えて、増幅を実施した。試料をDNA Thermal Cycler(Perkin Elmer)を使用し、アニーリング温度70℃で30サイクル増幅し

10

20

30

40

50

た。

増幅した断片をNheIで消化し、個々にバキュロウィルストランスファベクターpETL-HA (C. Richardson, OCI/Amgen) のポリヘドリンプロモータの下流にサブクロニングした。このベクターはpETL由来のものであり (Methods in Molecular Biology 39: 161, 1995)、インフルエンザヘムアグルチニン (HA) 由来のノナペプチドをコードする3'の30bpのNheI-BamHI DNA断片と停止コドンTAGを含む (5'-TAC CAA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TAG-3') (配列番号13)。組換えトランスファベクターは個々に、野生型バキュロウィルスAutographa californica核ポリヘドロシスウィルス (AcMNPV, Linear Transfection Module, Invitrogen) と共にSf9細胞にトランスフェクトした (Methods in Molecular Biology 39: 161, 1995)。組換えバキュロウィルスクローンを選択し、確立されたプロトコールに従って精製した (Methods in Molecular Biology 39: 161, 1995)。Sf9細胞に5~10:1倍率で組換えバキュロウィルスに感染させた。

経時的な分析を実施して、感染したSf9細胞が組換えCD14タンパク質を分泌するのに必要とする最適時間を決定した。抗HAモノクローナル抗体12CA5を使用した、種々の時点で採取した細胞培地のイムノブロット分析 (Cell 57: 787, 1984) により、組換えCD14タンパク質の発現は96時間後に最高に達することが明らかとなった。その後の生物アッセイ用の組換えタンパク質を作製する実験ではこの時間を選択した (下記参照)。Sf9由来の組換えウシCD14のウェスタンブロット分析を図9に示す。

組換えウシCD14の哺乳類細胞での発現

哺乳類細胞で組換えウシCD14を安定して発現させるために、改変したpBPV Episomal Mammalian Expression Vector (Pharmacia) を使用した。形質転換細胞の直接選択を可能にするために、発現カセットの3.4kb上流に挿入する、ネオマイシン耐性遺伝子を含むことによりpBPVを改変した。このために、pBCMG Sneo (Eur. J. Immunol. 18: 98, 1988) からの1.95kbのHindIII-XbaI断片をpCRII (Invitrogen) にサブクロニングした。組換え構築体pCRII-neoを精製し、クロニングした断片をPCRで増幅した。PCRプライマーは、5'末端と3'末端の両方にSalI認識配列を含むようにデザインした。プライマーの配列は、HindIII (プライマーA) とXbaI (プライマーB) のクロニング部位をフランクするpCRIIベクターのポリリンカー領域に相補的であった。

プライマーA: 5'-GCA GTC GAC ACT ATA GAA TAC TCA AGC-3'

(配列番号14)

プライマーB: 5'-TTC GTC GAC ATT GGG CCC TCT AGA-3'

(配列番号15)

最終産物をSalIで消化し、ゲル精製し、内蔵発現カセットの転写オリエンテーションと同じ転写オリエンテーションでpBPVのSalIクロニング部位にサブクロニングした。修飾発現ベクターのプラスミド調製物pBPVneo-13を作製した (Plasmid Maxi Kit, Qiagen)。

pETL-HAベクター内で遺伝子をPCR増幅することにより、ウシCD14の翻訳領域をコードするDNA断片を調製した。増幅反応に使用した5'末端PCRプライマーは

次のものを含んだ。Xho I 認識配列、次いで、Nhe I 認識配列（pETL-HAベクター内に存在）、コザック配列、ATG開始コドン、および翻訳領域の最初の11から13ヌクレオチド。HAコード配列に含まれる3'末端用のコアPCRプライマーは、Xho I 認識配列を含めることにより、5'配列について伸長した。プライマーを図8Bに示す。

Pwo DNAポリメラーゼ（Boehringer Mannheim）を使用して、PCRを実施した。最終体積100 μ l中に、DNA鋳型5 ng、10 mM トリス塩酸（pH 8.85）、25 mM KCl、5 mM (NH₄)₂SO₄、2 mM MgSO₄、250 mMの各dNTP、250 nMの各プライマー、Pwo DNAポリメラーゼ5単位を加えて増幅を実施した。サンプルは、DNA Thermal Cycler（Perkin Elmer）を使用してアニーリング温度70℃で30サイクル増幅した。

増幅した断片をXho Iで消化し、ゲル精製した。次いで、これらの断片をマウスメタロチオネインIプロモータの下流のpBPVneo-13にサブクロニングした。サブクロニングする前に、pBPVneo-13を適切な制限酵素で予処理し、仔ウシ腸ホスファターゼで脱リン酸化した。Plasmid Maxi Kit（Qiagen）を使用して組換えプラスミドを調製した。

細胞10⁷個当たりDNA 20 μ g使用して、組換えプラスミド（pBPVneo13-BoCD14）をマウス乳癌細胞株C127（PNAS 78:2727, 1981）にトランスフェクトした。Geneパルサ（Bio-Rad Laboratories）を使用し、960 μ F/280 Vで電気穿孔して、DNAを移した。1.5 mg/mlのG418（Life Technologies）の存在下で安定な形質転換産物を選択した。

免疫蛍光染色後、Becton Dickinson FACStar Plusを使用する蛍光活性化細胞ソーティングを実施して、高レベルの膜CD14を発現するトランスフェクト産物（トランスフェクトしていないC127はCD14陰性である）濃度を上げた。外来タンパク質の膜発現レベルは、トランスフェクトしたC127細胞の48時間集密培養上清で回収した分泌CD14の量とよく相関した。昆虫細胞で得られた組換え物質の精製とは異なり、12CA5-セファロースアフィニティカラムでC127由来の物質をアフィニティ精製することはできないことが明らかとなった。これは、C127細胞由来の組換えタンパク質ではC末端HAタグが消失していることによる可能性がある。その結果、C127由来の組換えウシCD14は842-セファロースでアフィニティ精製した。C127細胞由来の組換えウシCD14のイムノブロット分析を図9に示す。

nBo-LAITとLPSの成長および分化促進活性の比較

図10に示す結果は、天然のBo-LAITがLPSの約200倍の効率で、高浮遊密度ネズミ休止脾臓B細胞の成長を支持することを示している。50 ng/mlのnBo-LAITは、10 μ g/mlのLPSの存在下で認められたものと同等のDNA合成を誘導する。

nBo-LAITのB細胞成長誘導能は、免疫グロブリンを分泌するよう高浮遊密度ネズミ休止脾臓B細胞の分化を誘導する能力と一致する。図11に示すように、500 ng/mlのnBo-LAITで誘導されたIgMの累積量は10 μ g/mlのLPSで誘導されたものと同等であった。培養期間24時間以内に分泌されたIgMの量を評価した。500 ng/mlのnBo-LAITは、48~72時間、72~96時間、96~120時間の24時間培養期間にそれぞれ、956 $\pm$ 10 ng/ml、754 $\pm$ 8.7 ng/ml、25 $\pm$ 1.4 ng/mlのIgMを誘導した。10 μ g/mlのLPSで刺激した培養物についての値はそれぞれ、1442 $\pm$ 71 ng/ml、874 $\pm$ 32 ng/mlおよび183 $\pm$ 3 ng/mlであった。従って、nBo-LAITは、B細胞を現在知られている最も強力な刺激で刺激したときに認められるものと同等の率で、高浮遊密度ネズミ休止脾臓B細胞で免疫グロブリンの分泌を誘導する能力を有する。さらに、nBo-LAITはLPSの1~10%の濃度で上記能力を有する。

nBo-LAITがネズミ休止B細胞でアイソタイプスイッチングを誘導する能力も評

価した。上記培養物の上清も IgG アイソタイプの存在について評価した。500 ng/ml の nBo-LAIT および 10 µg/ml の LPS は各々、5 日目までの累積レベル (ng/ml) で、IgG1 を 7.0 ± 0.1 および 5.6 ± 0.6 、IgG2a を 358 ± 3 および 406 ± 8 、IgG2b を 8 ± 1 および 11 ± 2 、IgG3 を 75 ± 5 および 75 ± 0.5 、IgA を 6.5 ± 1.5 および 5.0 ± 0.3 誘導することが観察された。従って、nBo-LAIT は T 細胞のない状態でネズミ休止 B 細胞によるアイソタイプスイッチングを誘導する能力を有する。

nBo-LAIT タンパク質および rBo-LAIT タンパク質の成長促進活性の比較昆虫細胞由来および哺乳類細胞由来の両方のウシ CD14 の組換え体は高浮遊密度ネズミ休止脾臓 B 細胞の分化を誘導する能力を有している。図 12 に図示するように、昆虫細胞から得て、12CA5-セファロースでアフィニティ精製した rBoCD14 は $0.2 \sim 3 \mu\text{g/ml}$ の濃度で強固な (robust) DNA 合成を誘導する。哺乳類発現系由来の組換え物質により同等の活性が支持され、両方の組換え体も ng/ml の濃度で、初乳由来の nBo-LAIT で認められたと同等の活性で、B 細胞成長を支持する。

従来のタンパク質分画手法またはアフィニティ精製のいずれかでウシ初乳から単離した nBo-LAIT が仲介する生物活性が、観察されたタンパク質で仲介されることは、組換えウシ CD14 が仲介した生物活性の評価から確認される。図 9 に示すように、ウシ CD14 の組換え体のいずれの見かけ上の分子量も nBo-LAIT の見かけ上の分子量とは等しくなかった。見かけ上の分子量に差が認められた理由は明らかではないが、翻訳時および/または翻訳後修飾の差、コアタンパク質サイズの差のいずれかまたはその両者による可能性がある。単球由来可溶性 CD14 については文献で証明されており、これは現在理解されている 3 つの機構の 1 つで生成することができるが、その各機構により異なる分子量のタンパク質が生成される。単球由来可溶性 CD14 は完全長分子として分泌されることができ (Eur. J. Immunol. 23: 2144, 1993; Eur. J. Immunol. 25: 604, 1995)、膜発現 GPI 共役結合体はホスホリパーゼで切断でき (J. Immunol. 141: 547, 1988; EMBO J. 13: 1741, 1994)、膜発現 GPI 共役結合体はセリン/スレオニンプロテアーゼで切断され、単球自体の外側形質膜で推定的に発現され、まだ特性付けられていない方法で活性される (J. Immunol. 147: 1567, 1991)。rBo-LAIT および初乳由来の nBo-LAIT の見かけ上の分子量の差がそれぞれの発現系で支持された組換え物質の翻訳時および/または翻訳後修飾の差またはコアタンパク質サイズの差またはその両者によるものであるのかはまだ決定されていない。

nBo-LAIT の成長促進活性は B 細胞特異的である

ネズミ B 細胞に対する nBo-LAIT の生物活性が認められているため、ネズミ T 細胞の生理に対する作用を調べた。単離、精製した B 細胞は nBo-LAIT に反応しないという事実は、Bo-LAIT が T 細胞も活性化できるという可能性を除外するものではない。

リンパ節 T 細胞は、既述 (Eur. J. Immunol. 24: 967, 1994) のように抗 Ig カラム (Biotex Labora) で負の選択で単離した。得られた溶離物集団は、免疫蛍光染色および FACS 分析で評価すると、CD3⁺ を 95% 超、mIg⁺ 細胞を 0.5% 超含んでいた。同じマウスから高浮遊密度脾臓 B 細胞を単離し、リンパ節 T 細胞および脾臓 B 細胞の両者の nBo-LAIT に対する反応性を評価した。これらの集団の純度は、B 細胞特異的有糸分裂促進剤 LPS および T 細胞特異的有糸分裂促進剤コンカナバリン A (ConA) に対する反応を分析することにより機能的に評価した。図 13 の右パネルに示したように、B 細胞は強固な DNA 合成については LPS に反応したが、T 細胞は反応せず、ConA に対しては T 細胞は反応したが、B 細胞は反応しなかった。左パネルに示したように、T 細胞は調べた用量範囲にわたり nBo-LAIT に反応しなかったが、B 細胞は 10 ng/ml 以上の濃度で nBo-LAIT に反応した。

LAIT タンパク質が誘導する B 細胞の成長とウシ胎児血清

最近、単球が、血清由来のリボ多糖結合タンパク質 (LBP) が存在しないときに、前炎

10

20

30

40

50

症性 (proinflammatory) サイトカインの産生を伴うネフローゼ患者の尿から単離された可溶性CD14 (sCD14) に反応することが示されている (Eur. J. Immunol. 24: 17790, 1994)。対照的に、低濃度のLPSがCD14発現単球によるこれらの同じサイトカインを刺激する力は血清依存性である (J. Exp. Med. 176: 719, 1992)。この血清依存性は高濃度のLPSでは克服される。従って、10 ng/mlのLPSで誘導された単球によるサイトカインの産生は血清/LBPに厳密に依存するが、50 ng/mlのLPSで誘導された産生は依存しない。

ウシ胎児血清LBPの存在が低濃度のnBo-LAITの高浮遊密度ネズミB細胞の成長誘導能に影響するかを決定するために、500 ng/mlのnBo-LAITで誘導された反応を、50 µg/mlのLPSで誘導された反応と比較し、広範囲のFBS濃度にわたり評価した。図14に示すように、これらの刺激に対するB細胞の反応は培地中9%までのFBSの存在では影響を受けなかった。

LAITタンパク質が誘導するB細胞の成長とmCD14

LPS仲介活性化に対するB細胞と単球の感受性の差は後者による膜CD14 (mCD14) の発現と関係する可能性がある。LPS仲介活性化の感受性は、反応細胞上のmCD14の存在により劇的に増強できることが直接示されている。特に、mCD14陰性のプレB細胞株のLPSに対する感受性は、外因性GPI結合mCD14の強制発現により約1000倍上昇することが示されている (J. Exp. Med. 175: 1697, 1992)。一次B細胞がmCD14を発現するかについてはまだ議論がある。B細胞活性化におけるLPSの比活性に比較してBo-LAITの比活性が高いことは、この活性化様式がmCD14発現に依存していないことと一致する。

Bo-LAITが仲介するB細胞活性化へのmCD14の発現の関与を直接評価するために、CD14特異的mRNAの存在を、反応体として使用した高浮遊密度ネズミB細胞集団で評価した。下記の3つの脾臓由来の各集団の10⁷個の細胞から全RNAを得た。これらは、未分画脾臓細胞と、LAITタンパク質仲介成長アッセイに日常的に使用されている、T細胞を枯渇させ、Percol1分画した高浮遊密度細胞と、FITCと結合した、マウスIgKに特異的なラットmAbで免疫蛍光標識し [187. 1 (Hybridoma 1: 5, 1981)]、次いで、Becton Dickinson FACSstar Plusセルソータで精製して、高浮遊密度T細胞枯渇集団から単離した膜Ig発現細胞であった。図15に示すように、これらの3つの集団はそれぞれmIg⁺細胞を59.2%、83.5%、99.8%含んでいた。これらの集団から単離したRNAを1.2%ホルムアルデヒドゲルで分離し、ナイロン膜 (Gene Screen) に移し、架橋結合させ、予備ハイブリッド形成させ、2つのプローブと順次ハイブリッド形成させた。

マウスCD14プローブはゲノムDNAからPCRによって得た。具体的には、0.4 µgのBalb/cゲノムDNAに、前向きプライマー5'-CTA GAA TTC TCT CCC GCC CCA CCA GAG CCC TGC G-3' (配列番号11) および逆向きプライマー5'-CTA GAA TTC TTA AAC AAA GAG GCG ATC TCC TAG G-3' (配列番号12) と共に、Pwo DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim) を加えることにより、増幅を実施した。サンプルはアニーリング温度55℃を使用し、DNA thermal cycler (Perkin Elmer) で30サイクル増幅した。増幅断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、ゲルから切り出し、精製した。L32プローブ (Nuc1. Acid. Res. 16: 10751, 1988) を使用し、RNA付加を正常化した。各プローブ (100 ng) はoligo labelling kit (Parrmachia) を使用して比活性0.2~1×10⁹ cpm/µg DNAまで標識した。膜をプローブし、65℃で2時間、0.2×SSC、1% SDSで洗い、曝露した。

図15に示すように、未分画脾細胞およびT細胞枯渇高浮遊密度脾細胞から得たRNAはCD14特異的mRNAを含んでいたが、FACSで精製したB細胞は含んでいなかった

。本明細書で休止B細胞と呼ぶT細胞枯渇高浮遊密度脾細胞を免疫蛍光染色およびFACS分析で評価すると、85～90%がmIg⁺であったが、98%超がMHCクラスII⁺であることから、これらのCD14シグナルは混在する単球によるものと思われる。従って、この集団におけるB細胞のB₀-L A I T 伸介成長は間接的なものであり、含まれる単球の活性化を介している可能性がある。

T細胞枯渇Percoll分画脾細胞およびこの集団由来のFACS精製したmIg⁺細胞のnB₀-L A I T およびLPS誘導成長に対する反応を比較した。図16に示すように、両集団とも、両方の刺激に強く反応した。99.8%純粋なB細胞集団では10倍高い刺激指数が得られたが、これはこれらの培養で認められた非刺激バックグラウンドの低下によるものであった(図16)。

10

L A I Tタンパク質誘導B細胞成長とCD40

上記のように、B細胞膜上で発現されるCD40に特異的なmAbがネズミB細胞の成長を誘導することが観察されている(Sem. in Immunol. 6:267, 1994; PNAS 83:4494, 1986; J. Immunol. 140:1425, 1988)。

抗CD40とL A I Tタンパク質誘導B細胞活性化の間に何らかの関係があるかを調べるために、従来のC57BL/6マウスまたは標的遺伝子を破壊することによりCD40の発現をなくしたC57BL/6マウスから単離した高浮遊密度脾B細胞の成長を刺激するrB₀-L A I Tの能力を調べた(Immunity 1:167, 1994)。図17に示すように、調べたrB₀-L A I Tの濃度範囲にわたり、これらのB細胞の反応に差は認められなかった。

20

これらの結果は、CD40自体が必ずしもL A I Tタンパク質シグナリングに関与する必要はないが、CD40が利用する第二のメッセンジャ発生系および推定上のL A I Tタンパク質に対する膜受容体が共用されている可能性は排除されないことを示唆している。

天然ヒト、ウシおよびネズミCD14の比較分析

ネズミB細胞に対するnB₀-L A I TおよびrB₀CD14の活性が認められたので、初乳以外の流体から単離したマウスCD14(Mo)およびヒトCD14(Hu)の活性を調べた。Hu-CD14はネフローゼ患者の尿中に存在することが示されている(Eur. J. Immunol. 24:1779, 1994)。Hu-CD14は変更したプロトコルで単離した。尿に飽和(NH₄)₂SO₄を最終濃度45%(v/v)まで加えて沈殿させ、14,000gで30分間遠心して、沈殿した物質を除去した。次いで、この遠心上清中の(NH₄)₂SO₄濃度は75%(v/v)まで上昇させた。沈殿を14,000gで30分間遠心してペレット化し、10mMトリス、150mM NaCl、「完全」プロテアーゼ阻害剤カクテル(Boehringer Mannheim)を含むTNバッファに溶かした。13,000gで15分間遠心して、不溶性物質を除去した。この遠心上清を、TNバッファ(pH8.0)で平衡化したG-10カラム(Bio Rad)で脱塩した。次いで、この物質を、ヒトCD14特異的mAbの3C10(J. Exp. Med. 15:126, 1983)を結合させてあるセファロース4Bに通した。結合した物質を100mMアセテート、150mM NaCl、pH2.8で溶離し、直ちに10倍量の1Mトリス(pH8.0)を加えて中和した。溶離液をspeed-vacで濃縮し、タンパク質濃度を比色により決定した。

30

ネズミCD14はマウスハイブリドーマOKT3(PNAS USA 77:4919, 1980)の上清から単離した。CD14特異的mRNAの発現について細胞集団をスクリーニング分析する間に、アッセイしたすべてのハイブリドーマがメッセージを含んでいることが観察された。ドナーと融合パートナーの両方がネズミ起源であれば、産生されたCD14もネズミ起源であろうということになる。ハイブリドーマOKT3はこれらの条件を満足した。CD14タンパク質がOKT3により、単離に十分な量で産生されていたかを評価するため、1リットルのOKT3培養上清に含まれる物質を、ヒト尿由来CD14について上記したように、3C10-セファロースでアフィニティ精製した。3C10の特異性は、ヒトCD14の残基7～10についてマッピングされている(J. Biol

40

50

. Chem. 270: 361, 1995)。これらの残基はウシおよびネズミCD14によく保存されていた。

図18の左のパネルは、アフィニティ精製したヒト尿Cd14 (nHu)、初乳ウシCD14 (nBO) およびOKT3由来マウスCD14 (nMO) 各1 μ gの銀染色分析の比較を示している。図18の右パネルは、mAb3C10でプローブした同じ3種のCD14各250 ngのイムノブロット分析の比較を示している。図示したように、mAb3C10に対する反応性と同様に、3つの調製物の純度はすべて同等であった。

それぞれのcDNAでコードされたアミノ酸の数が異なるこれら3種のCD14の分子量が明らかに異なるのは、翻訳時および／または翻訳後修飾による可能性がある。この点に関して、マウス、ヒトおよびウシCD14が各々5個、4個および3個の可能なN-グリ

10

コシル化部位を含むことは明らかである。これらの3つのCD14調製物のネズミB細胞成長刺激能を評価した。図19に示すように、これら3種から単離したCD14は比活性が同等で、ng/mlの濃度範囲で活性であった。この結果はまた、同質遺伝子物質が機能性であり、具体的には、ネズミのCD14がネズミB細胞を刺激できることを示している。この結果はまた、初乳CD14はそのB細胞刺激能について特有のものではなく、従って、泌乳の特別な環境で生成される特別な形の分子ではないようであることも示している。

ヒト臍帯血B細胞に対するnBo-LAITの成長促進活性

ネズミB細胞に対するnBo-LAITの種々の生物活性が認められたので、ヒトB細胞の生理に対する作用を検討した。2つの起源のB細胞を使用した。LAITタンパク質の1つの可能な役割は新生児の免疫系の発達の促進に関与することであるため、新生児から得たB細胞、具体的には臍帯血から単離したB細胞の増殖を刺激する能力を評価した。

20

臍帯血はリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)で1:1に希釈し、Percoll (Pharmacia)、 $\rho = 1.077$ に載せた。図1Aに関連して記載したように、勾配遠心した。 $\rho = 1.077/1.000$ 界面を採取し、5%ウシ胎児血清(FBS)を添加したPBSで2回洗った。次いで、得られた白血球調製物を、フルオレセインと結合したB細胞膜マーカーCD72に特異的なmAbで染色した。次いで、CD72陽性の臍帯血白血球をFACSで正の選択をすると、98%超の純度が得られた。次いで、これらの正の選択をしたB細胞を、ネズミB細胞の場合と同様に、無血清規定培地で培養した。ネズミB細胞の成長アッセイとヒトB細胞成長アッセイの唯一の違いは、ヒトB細胞の場合には、40時間で6時間ではなく、60時間で12時間チミジンでパルスしたことであった。

30

図20Aに示すように、nBo-LAITは新生児B細胞成長誘導能において、IgKおよびIg λ に特異的なmAbと共に作用する。固定化(プレート固定)した抗軽鎖mAbと2 μ g/mlのnBo-LAITの両者はそれぞれ、バックグラウンドに比べチミジンの取り込みを上昇させるが、この2つを組み合わせるとさらに5倍上昇した。

これらの結果は、母乳を与える新生児が消費するLAITタンパク質はT細胞の代用物として機能し、完全に発達したT細胞コンパートメントがない状態で、抗原に出会ったB細胞を刺激して、Ig分泌細胞への成長、分化を助けるという可能性を示唆している(J. Exp. Med. 169: 2149, 1989; Science 245: 749, 1989; Intl. Immunol. 2: 859, 1990; Intl. Immunol. 2: 869, 1990)。

40

ヒト初乳および正常血清中のCD14

初乳および正常血清中に存在するCD14濃度を決定するために、2人のドナーからの初乳サンプルと、5人の健常人ドナーからの血清サンプルとを、特異的ELISA (IBL-Hamburg)を使用して、CD14の存在についてアッセイした。表3に示すように、この健常人コホートからの血清のCD14濃度は1.7~3.2 μ g/mlの範囲であり、性別に依存しなかった。これらの値はGrunwald他の報告した値(J. Immunol. Method 155: 225, 1992)とよく対応している。

表 3		
ドナー	性別	$\mu\text{g}/\text{ml} *$
A. M.	女	2. 8
N. J.	女	2. 7
M. J.	男	1. 7
E. K.	男	2. 9
A. D.	男	3. 2

10

***ELISAキットの製造業者 (IBL, Hamburg) によると 2. 6 ~ 3. 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$**

図 2 1 に示すように、分娩 2 2 時間後に採取した初乳 (A. D.) および分娩 4 日後に採取した早期母乳 (S. B.) の CD 1 4 含量は正常血清の約 2 0 倍高かった。1 人のドナーからは分娩 7 8 日後まで複数のサンプルを採取した (S. B.)。CD 1 4 濃度は 4 日後の濃度と比べるとかなり低下したが、アッセイしたスクリーニング期間を通して、正常血清中の濃度の約 3 ~ 5 倍高い濃度を維持した (図 2 1)。

授乳中の女性での血清 CD 1 4 濃度に関する情報はまだ得られていない。従って、初乳および母乳中で認められた高濃度の CD 1 4 がこれらの流体にのみ限定されるものであるか、授乳中の女性のすべての体液に一般的な CD 1 4 を反映するものかはまだ決定されていない。

20

新生児の免疫系の初乳 CD 1 4 の B 細胞向性成長および分化活性への一時的曝露が新生児免疫応答機構の発達に部分的に役割を果たしている可能性がある。初乳にこの活性が存在することの生理学的関連性は、上記のように、おそらく初乳や早期母乳中に TGF β 1 および TGF β 2 が高濃度に存在することにより、新生児の T 細胞機能が低下するという観察と一致する (J. Cell. Biol. 105: 1039, 1987; Cell 49: 437, 1987; EMBO J. 6: 1633, 1987)。表 2 に示すように、分裂促進下濃度の CD 1 4 は分裂促進下濃度の膜免疫グロブリン特異的 mAb と共に B 細胞の活性化を支持する。CD 1 4 は発達中の新生児免疫系では T 細胞代替物として機能する可能性がある。このように、CD 1 4 を乳児用フォーミュラ添加剤として使用すると、乳児用合成フォーミュラを使用せずに、その免疫刺激作用に曝露されて、新生児に役立てることができる。

30

ヒト扁桃腺 B 細胞に対する nBo-LAIT の成長促進活性

成人から単離した B 細胞に対する nBo-LAIT の、単独または固定化 (プレート固定) 抗軽鎖 mAb との併用での、ヒト扁桃腺から単離した B 細胞を刺激する生物活性を評価した。

扁桃腺 B 細胞は負の選択で調製した。扁桃腺白血球は臍帯血白血球と同様に調製した。得られた集団を、ビオチニル化した CD 3 ϵ 特異的 mAb (Becton Dickinson) で標識した後、鉄含有「マイクロビーズ」(Becton Dickinson) で標識した。1 回洗った後、標識した集団を MACS (Becton Dickinson) に通し、溶離物を集めた。この集団は、系統特異的 mAb を使用した免疫蛍光染色で評価すると、T 細胞を 1 % 未満、B 細胞を 9 7 % 超含んでいた。次いで、これらの B 細胞を、高浮遊密度ネズミ B 細胞の単離に使用したと同様に、Percoll 不連続密度勾配で分画した。記載したアッセイでは、 $\rho = 1.085 / 1.079$ 界面で結合するこれらの B 細胞を使用した。これらの負の選択をし、密度分画した休止 B 細胞は下記のように培養し、パルスし、臍帯血 B 細胞の場合と同様に採取した。

40

図 2 0 B に示すように、新生児から単離した B 細胞について得られた結果とは対照的に、nBo-LAIT は単独で、300 ng/ml の低濃度でこれらの休止扁桃腺 B 細胞の強

50

力な成長を刺激した。また、固定化抗軽鎖mAbと併用して評価すると、一部の濃度のnBooLAITでの反応が実質的に増強された。

成熟したヒトB細胞はnBooLAITの成長促進活性に感受性であり、これらの活性はB細胞抗原受容体との同時連結との併用で増幅される。これらの結果は、そのアジュバント特性を高めるために、またはおそらくアジュバントの必要性を低減させることにより、ワクチン単体へのLAITタンパク質の潜在的な使用を特性付ける。

ワクチン技術の限界は特定の抗原製剤の免疫原性である。ある種のアジュバントは、抗原特異的T細胞を動員し、活性化することにより機能すると思われる。CD14は、抗原特異的B細胞反応のT細胞代替物として、B細胞は大きくなり、抗体分泌細胞に分化するだけでなく、活性化された後、T細胞動員用の効率的なAPCとして機能するように、抗原特異的B細胞を活性化する改良された手段を提供できる。このことは、特異的免疫応答およびT細胞仲介アイソタイプスイッチングの普及の両方を増強するであろう。

T細胞免疫不全が知られている。gp39 (CD40L) (X染色体にマップされる)の発現を欠くことによるT細胞機能不全に関連する免疫不全状態は、以下の特徴をもつ。(i) X-結合ハイパーIgM症候群(HIM)、(ii) 共通可変免疫不全(CVI)および(iii) X-結合無ガンマグロブリン尿症(XLA)。これらの疾患状態の一部(HIM)で、患者から単離したT細胞はB細胞を活性化できないことが示されており(Science 259: 990, 1993)、この発現形は機能性gp39 (CD40L)のないことと相関する。これらの状況では、CD14は特異的な体液性反応の誘導を標的とした場合またはポリクローナルB細胞活性化剤として投与した場合、潜在的な環境的病原体への日常的な攻撃に対する防御と一致する、同質遺伝子Igのレベルを誘導/維持する働きをする可能性がある。

初乳中にCD14が存在することは、母乳を飲む新生児でのB細胞刺激における役割と一致する。新生児の免疫系の発達を助けるCD14の有効性を動物モデルで評価できる。

CD14の座を標的破壊することにより作成したCD14不足の雌をヘテロ接合またはCD14不足の雄と交配させる。この結果、CD14を発現するまたは発現しない仔イヌでのB細胞の発達に対する初乳CD14のないことの作用を評価できる。具体的には、B細胞の個体発生および血清IgMおよびIgGレベルの累積発達を比較し、これらの仔イヌが特異的免疫応答を起こす能力も比較する。

また、「天然」IgMの循環濃度の維持における血清CD14 (sCD14)の役割を評価できる。IgGおよびIgMの循環濃度は別々の制御下にある。血清IgGは、無抗原環境下で飼育したマウスでは実質的に認められなかったが、IgMレベルは変化しなかった。血清IgMレベルの調節におけるsCD14の潜在的な役割を扱うために、上記の交配で得られたCD14が十分なマウスと不十分なマウスとをノトバイオティックに育てた。

sCD14の調節不全の発現は特別な疾患状態の病理と関係する。慢性関節リウマチ(RA)患者では血清sCD14レベルが上昇する(Clin. Exp. Immunol. 91(2): 207, 1993)。また、RA患者の滑膜中の活性化されたCD14⁺単球数の上昇も報告されている(Br. J. Rheumatol. 29(2): 84, 1990; J. Rheumatol. 22(4): 600, 1995)。RA患者の滑液中のsCD14レベルが上昇しているかはまだ決定されていないが、CD14⁺単球は活性化されると、膜CD14を切断できる膜関連プロテアーゼを発現し、その結果、sCD14が産生される(Eur. J. Immunol. 25: 604, 1995)。本明細書に記載したsCD14のヒトB細胞活性化能と一致して、RA患者の滑液は高頻度で活性化されたB細胞を含んでおり、その少なくとも一部はリウマチ因子を産生している可能性がある(Clin. Immunol. Immunopathol. 31(2): 272, 1984; Clin. Exp. Immunol. 55(1): 91, 1984)。従って、RA患者におけるsCD14産生の増加およびそれがリウマチ因子の産生を生じるB細胞の活性化に関与する可能性に関連する例が生じる。従って、抗体仲介のsCD14のクリアランスの結果、RA患者でB細胞活性化の調節不全およびリウマチ因子の産

10

20

30

40

50

生を介した症状を改善する可能性がある。また、抗体を介した s C D 1 4 のクリアランスにより、単球によるプロ炎症性サイトカインの s C D 1 4 誘導で支持された炎症を改善するであろう (E u r . J . I m m u n o l . 2 4 : 1 7 7 9 , 1 9 9 4)。

ヒトモノクローナル抗体 (m A b) の日常的な製造はいくつかの理由から難しく、その理由の多くは活性化したヒト B 細胞で所望の抗原特異性を高めることができないことである。所望の抗原特異性を有するヒト B 細胞を誘導する、s C D 1 4 の能力。s C D 1 4 が i n v i t r o でヒト B 細胞の成長と分化を誘導できることから、s C D 1 4 を抗原特異的 m A b の製造に使用することが可能となる。本明細書で、高濃度 (0 . 5 ~ 1 μ g / m l) の s C D 1 4 はポリクローナルな様式でヒト B 細胞を活性化することを示している。しかし、最適下分裂促進濃度の s C D 1 4 は抗原 B 細胞受容体 (B c R) 特異的 m A b と相乗的に作用することが示されている。従って、最適下濃度の s C D 1 4 は B c R を介して相補シグナルを受ける B 細胞を選択的に活性化する。B c R 特異的 m A b はこれらの状況下で抗原代替物として機能する。B c R シグナルの伝達に特異性を付与すると、その結果に起こる B 細胞の反応も特異的であろう。従って、抗 B c R を特異的抗原で置き換えると、s C D 1 4 が同時に存在することにより提供される相乗的な刺激が抗原特異的 B 細胞にのみ向けられよう。従って、その結果の抗体産性は抗原特異性であろう。このように活性化した B 細胞の集団は活性化された抗原特異的 B 細胞を非常に大量に含み、そのため、所望の特異性を有する m A b を分泌するヒトハイブリドーマの作製が促進されよう。

ワクチン技術におけるアジュバントとしての C D 1 4 の有効性は動物モデルを使用して評価できる。B o - C D 1 4 および H u - C D 1 4 をハプテン T N P で修飾する。ハプテン修飾した物質を i n v i t r o でポリクローナル B 細胞活性化能について評価し、ハプテン化が C D 1 4 の生物活性を変化させなかったことを確認する。共役結合体を皮下または筋肉内注射して、血清をその特異抗体濃度について経時的に評価する。別のシリーズのマウスを使用して、排出リンパ節を収集し、含まれる抗体分泌細胞数を計測する。さらに、種々の量の C D 1 4 とタンパク質または細胞抗原との混合物でレシピエントを免疫する。血清の抗体価および抗原特異的 I g 分泌細胞および総 I g 分泌細胞を計測する。

C D 1 4 の毒性はマウス、ラットおよびサルでの静脈内投与急性毒性試験で評価できる。ラットでの急性皮下投与刺激試験、および 3 種での複数回の皮下および静脈内注射を含む長期試験も実施できる。総体的な病理学および病理組織学的評価とともに、血清化学および血液分析も実施する。哺乳類細胞で i n v i t r o で、マウスで微小核アッセイにより、遺伝子毒性能を評価できる。妊娠マウス、ラットおよびサルで催奇形性能を評価できる。

C D 1 4 をヒト対象に投与する際には、従来の医薬品の慣行を使用できる。乳児用フォーミュラへの添加剤として、製造時にフォーミュラに添加することができる。錠剤またはカプセルまたは投与直前に混合する粉末として調製できる。ワクチン製剤の場合には、それ以外は標準の手順に従って製造するワクチンの一部として含めることができる。任意の慣用手段、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、心室内、頭蓋内、嚢内、髄腔内、大槽内、腹腔内、または経口で投与できる。

非経口用処方液体溶液または懸濁液の形とすることができる。

処方を作製するために当技術分野で知られている方法は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」に見られる。非経口投与用の処方例えば賦形剤として滅菌水または食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物油、水添ナフタレン等を含むことができる。

投与用の C D 1 4 濃度は、例えば、投与量および投与経路により変化する。

C D 1 4 の天然のアミノ酸配列からの変形としては、少なくとも、保存的に置換 (c o n s e r v a t i v e l y s u b s t i t u t e d) を実施できる。保存的に置換は、特許文献、例えば、米国特許第 5, 2 2 6 4, 5 5 8 号に記載されている。従って、例えば、非極性脂肪族中性アミノ酸、グリシン、アラニン、プロリン、バリンおよびイソロイシンの間での交換が可能であると思われる。同様に、極性脂肪族中性アミノ酸、セリン、スレオニン、メチオニン、アスパラギンおよびグルタミンの間での置換も可能である。荷電

10

20

30

40

50

された酸性アミノ酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸の間の置換も、荷電された塩基性アミノ酸、リジンおよびアルギニンの間での置換と同様可能である。フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、チロシンを含めた芳香族アミノ酸の間での置換も同様に可能であろう。これらの置換または相互交換は当業者によく知られている。その他の置換も可能であろう。もちろん、バリエーションタンパク質の天然のタンパク質との相同の割合が高いほど、代謝活性が保持されると考えられる。

【図 1】

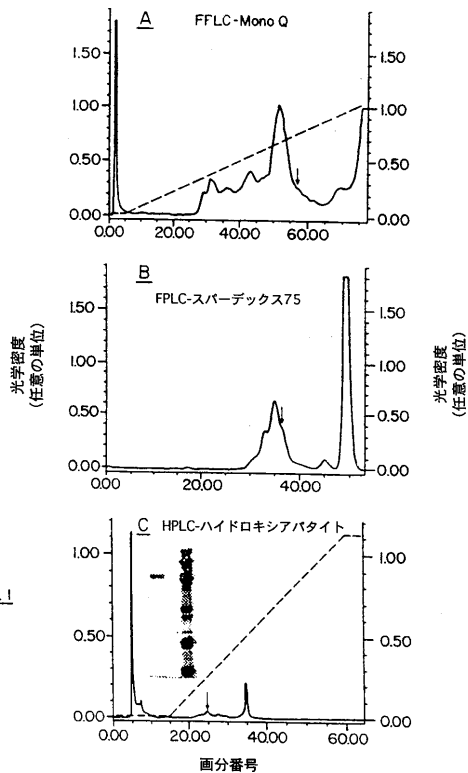


FIG. 1

```

1
MERASCLLLL LLPLVHVSAT TPERCELDDE DFCVCNFSE PQPDWSEAFQ
D -?---NN? ??-?-?

51
CVSAVEVEIH AGGENCEPFL KRVDADADPR QYADTVKALR VRRLTVGAAQ
V----?-S ---LSL?

101
VPAQLLVGAL RVLAYSRLKE LTLEDLKITG TMPPLPLEAT GLALSSLRLR

151
NVSATGRSW LAELOQWLKP GLKVLISIAQA HSPAFSYEQV RAFPALTSLD
?---T--GA? -G---

201
LSDNPGLGER GLMAALCPHK FPAIQNLALR NTGMEITPTGV CAALAAAGVO
---S-P A-----LR--

251
PHSLDLSHNS LRATVNFSAP ROMWSSALNS LNLSFAGLEQ VPKGLPAKLR
-Q-----? -?V?

301
VLDLSCNRLN RAPQDELPE VDNLTLDGNP FLVPGTALPH EGSMNSGVVP
L-----V

351
ACARSTLSVG VSGTLVLLQG ARGFA
???--

```



FIG. 3

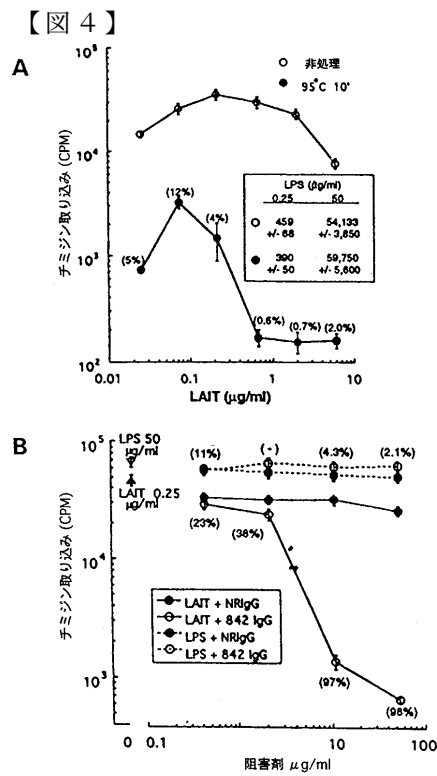


FIG. 4

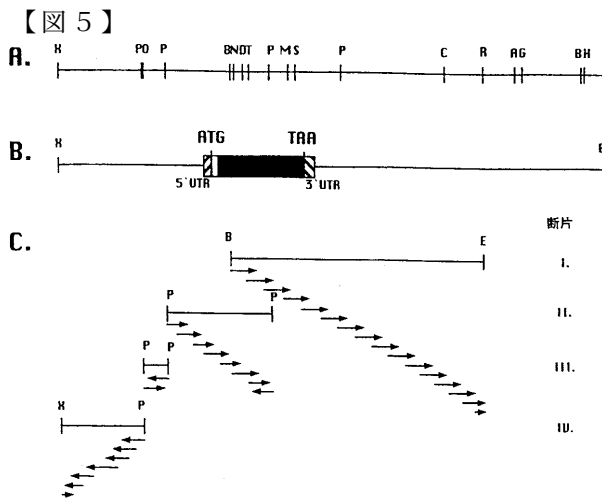


FIG. 5

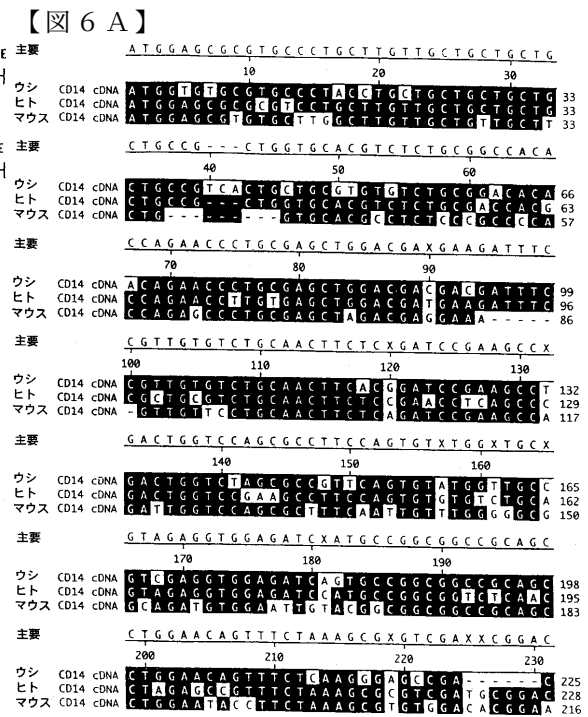


FIG. 6 A

【図 6 B】

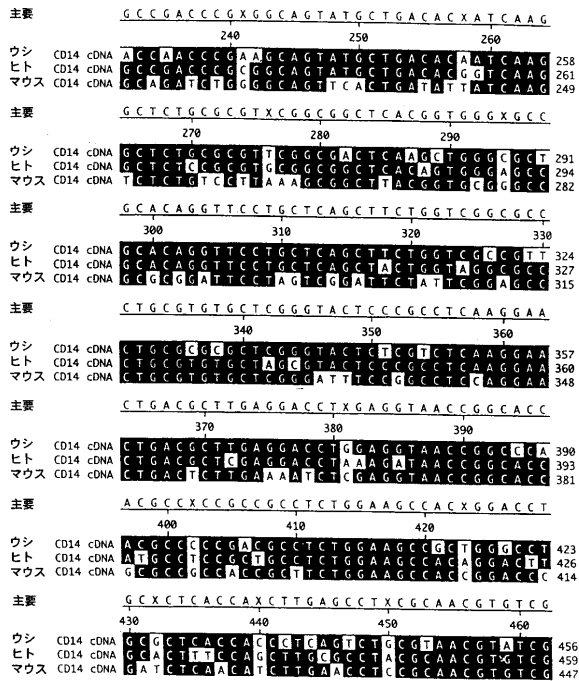


FIG. 6 B

【図 6 C】

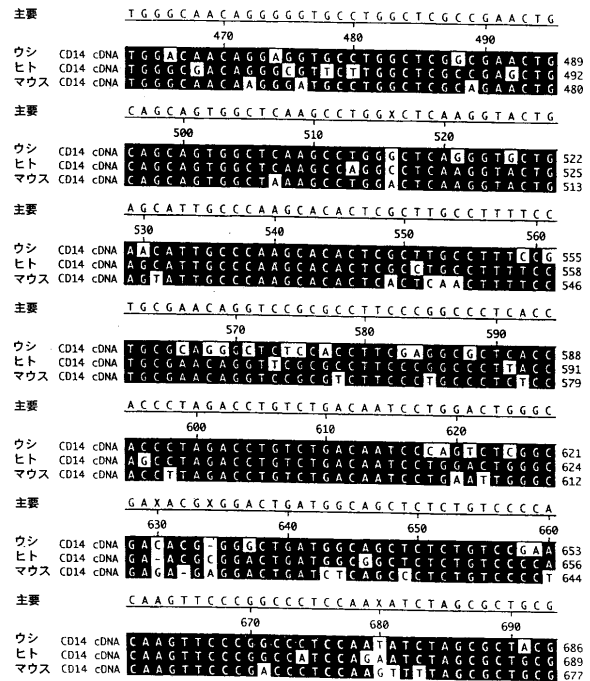


FIG. 6 C

【図 6 D】

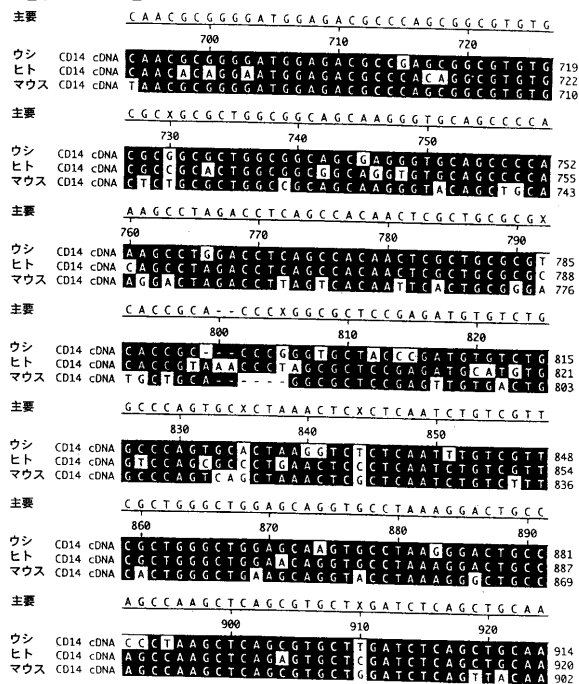


FIG. 6 D

【図 6 E】

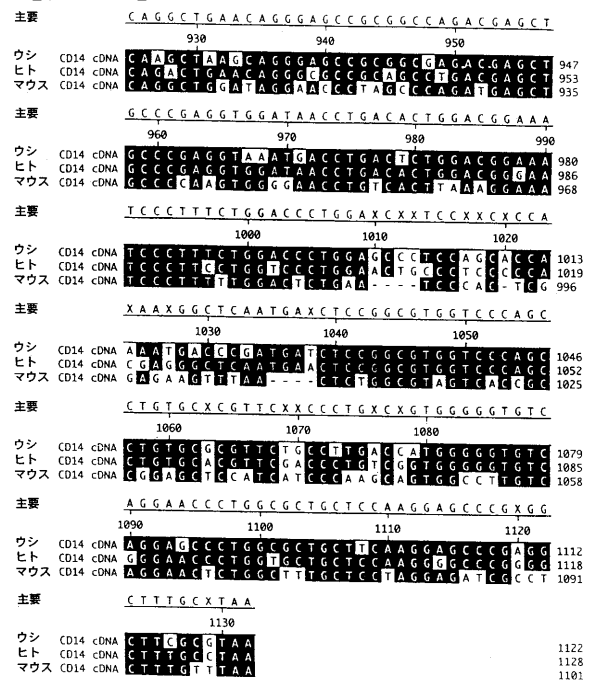


FIG. 6 E

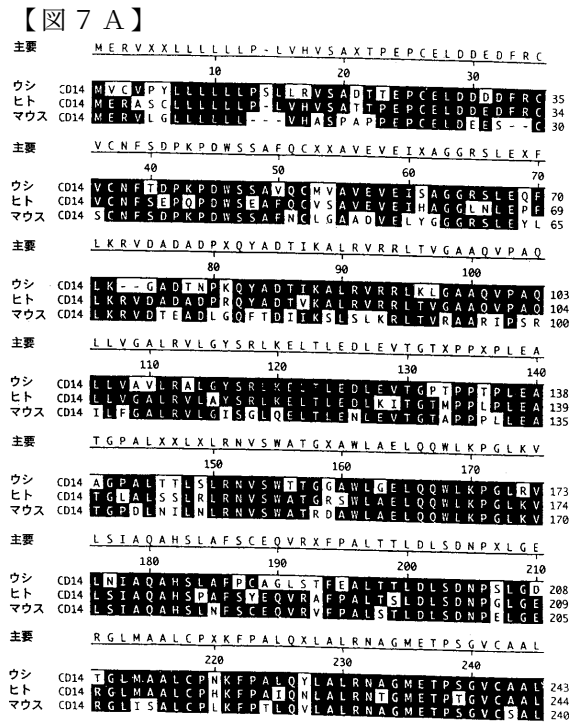


FIG. 7 A

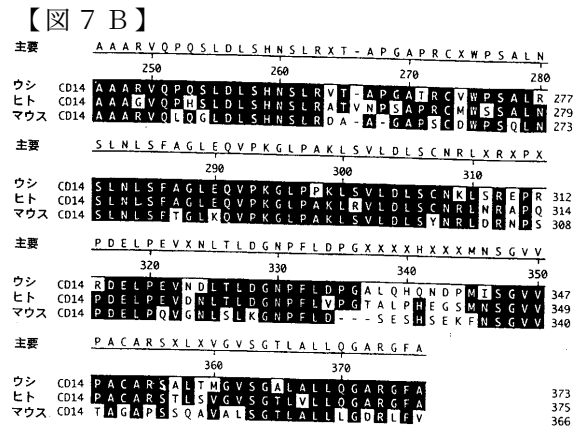


FIG. 7 B

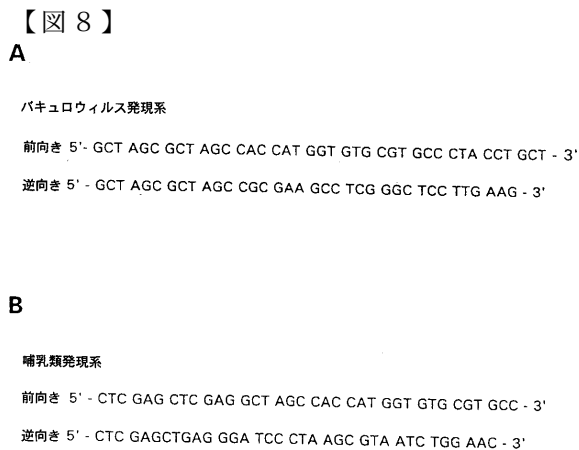


FIG. 8

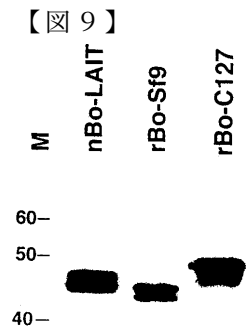


FIG. 9

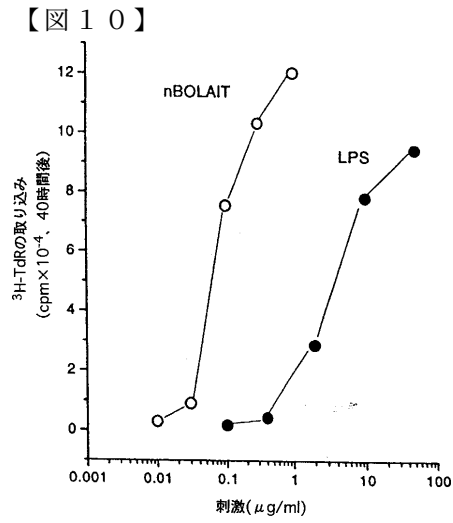


FIG. 10

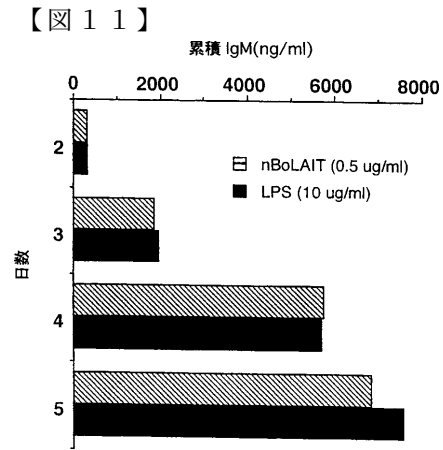


FIG. 11

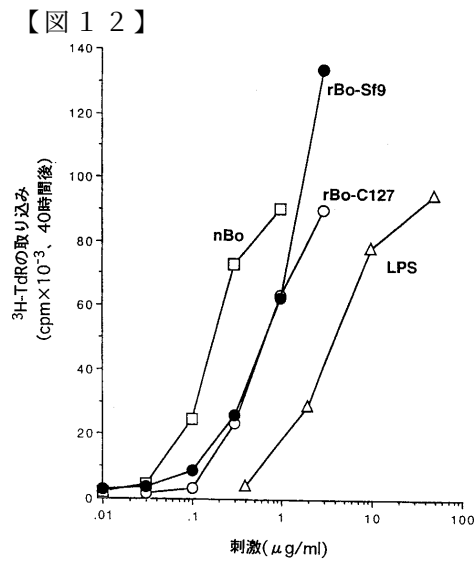


FIG. 12

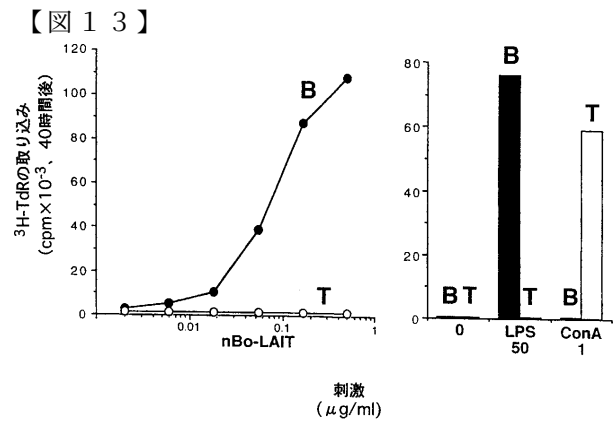


FIG. 13

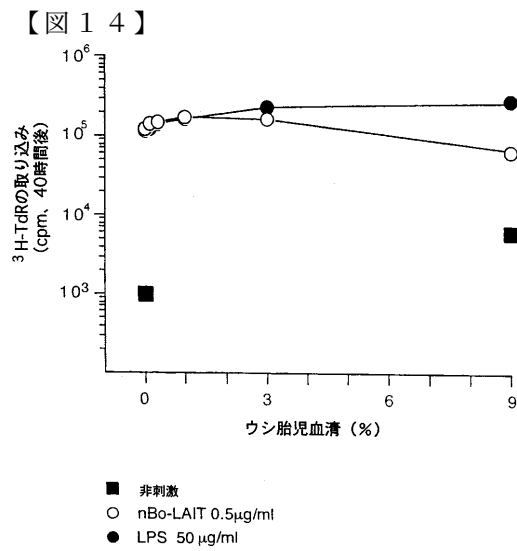
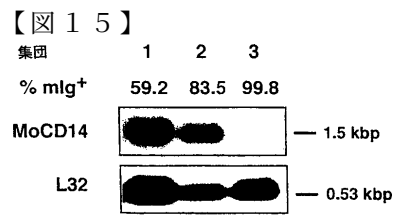
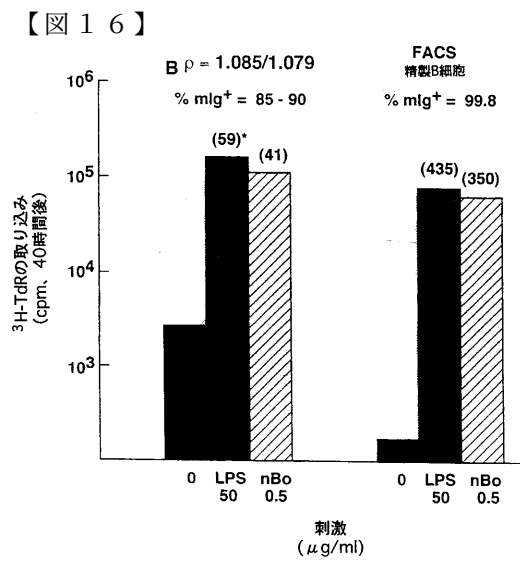


FIG. 14



集団 : 1-未分画脾細胞
2-T細胞欠失、 $\rho = 1.085/1.079$ 脾細胞
3-集団2からのFACS精製したmlg⁺B細胞

FIG. 15



* () = 刺激指数

FIG. 16

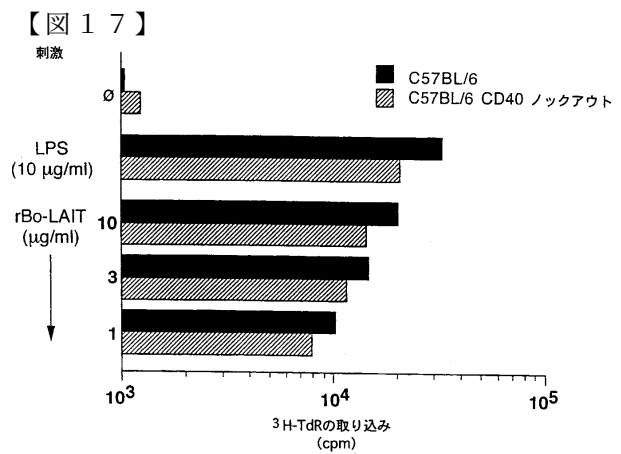


FIG. 17

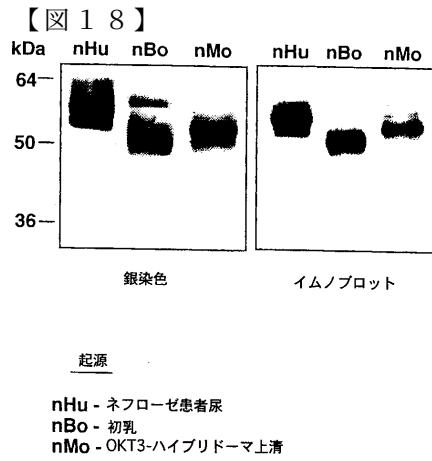


FIG. 18

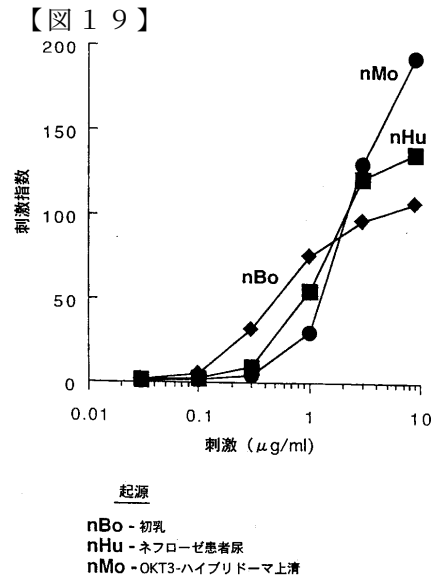


FIG. 19

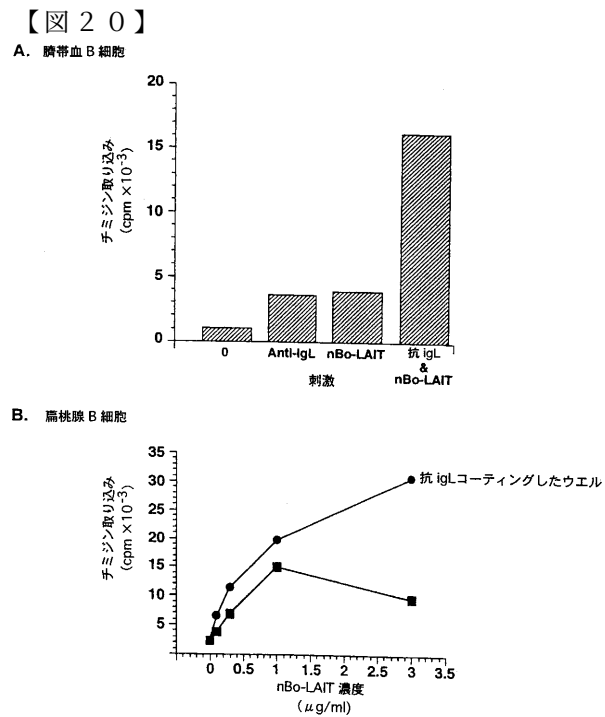


FIG. 20

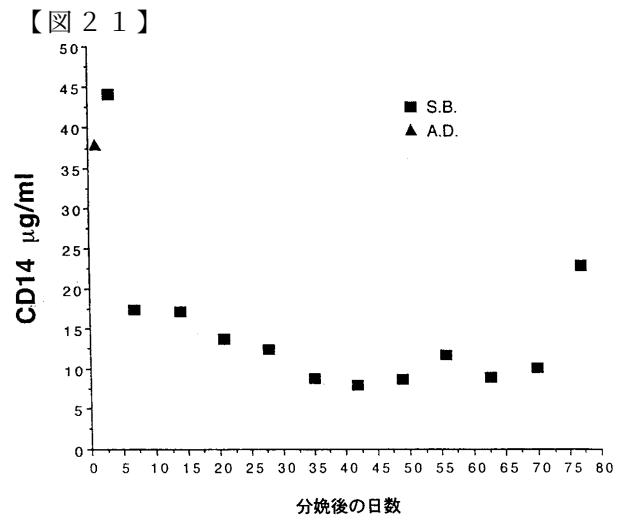


FIG. 21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 K	14/715	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)

(72)発明者 ジュリアス, マイケル, エイチ.
 カナダ エム4ワイ 1エム3 オンタリオ州 トロント タウンハウス ナンバー 9 アール
 ストリート 38

(72)発明者 フィリップ, ドミニク.
 カナダ エム5ワイ 1ケー4 オンタリオ州 トロント ダンドナルド ストリート 704ー
 15

(72)発明者 アリザベアキアビ, カメル.
 カナダ エヌ6エー 3エル6 オンタリオ州 ロンドン リッチモンド ストリート 618ー
 1201

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996年, Vol.93, p.5156-5160
 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 1996年 9月12日, Accessin No. U48356, UR
 L, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1532130>
 J. Immunol., 1994年, Vol.153, p.972-978

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
 C12N 1/00
 C12P 21/00
 C07K 14/00 - 16/00
 C12Q 1/00
 G01N 33/00
 A61K 31/00 - 48/00
 A61P 1/00 - 43/00
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq