

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005年10月27日 (27.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/100558 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/00, A61K 35/12, 35/76, 38/00, 39/00, 48/00, A61P 9/00, 9/10, 29/00, 35/00, 35/02, 37/04, 37/06, C07K 14/525, C12N 5/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/007298

(22) 国際出願日: 2005年4月15日 (15.04.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-121932 2004年4月16日 (16.04.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道 (HOKKAIDO) [JP/JP]; 〒0608588 北海道札幌市中央区北3条西6丁目1番地 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 和則 (KATO, Kazunori) [JP/JP]; 〒0640807 北海道札幌市中央区南7条西25丁目7-16-102 Hokkaido (JP). 濱田 洋文 (HAMADA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒0640959 北海道札幌市中央区宮ヶ丘2丁目1-30-602 Hokkaido (JP).

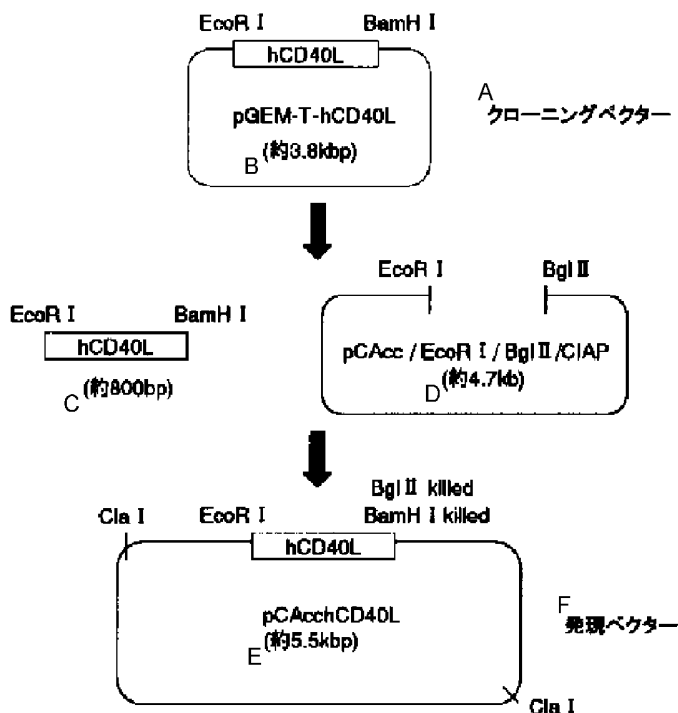
(74) 代理人: 葛和 清司 (KUZUWA, Kiyoshi); 〒1620067 東京都新宿区富久町8番21号 T & Tビル 葛和国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,

[続葉有]

(54) Title: CD40 LIGAND MUTANT AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: CD40リガンドの変異体およびその使用



(57) Abstract: A noncleavable functional mutant of a CD40 ligand which is noncleavable because of having an amino acid substitution; a nucleic acid molecule encoding the same; a vector containing this nucleic acid molecule; a cell transformed by this vector; a medicinal composition containing the same; and a method of modifying the immune reactivity of a cell by expressing the noncleavable CD40 ligand mutant on the cell.

(57) 要約: 本発明は、アミノ酸の置換を有することにより非切断性となっている、CD40リガンドの非切断性機能的変異体、これをコードする核酸分子、この核酸分子を含むベクター、およびこのベクターで形質転換した細胞、ならびにこれらを含む医薬組成物に関する。また、本発明は、非切断性のCD40リガンド変異体を細胞上に発現させることにより、細胞の免疫反応性を改変する方法にも関する。

A... CLONING VECTOR
B... ABOUT 3.8 kbp
C... ABOUT 800 bp

D... ABOUT 4.7 kb
E... ABOUT 5.5 kbp
F... EXPRESSION VECTOR



NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書

- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

CD40リガンドの変異体およびその使用

技術分野

[0001] 本発明は、CD40リガンド(CD40L)の非切断性変異体、これをコードする核酸分子、該核酸分子を含むベクター、該ベクターによって形質転換された細胞に関する。本発明はまた、該変異体により細胞の免疫反応性を改変する方法に関する。本発明はさらに、CD40陽性腫瘍、CD40-CD40リガンド相互作用の異常に起因する疾患、またはCD40-CD40リガンド相互作用を強化することにより予防および／もしくは治療が期待できる疾患を処置するための医薬、または、免疫増強剤、ならびにその製造方法にも関する。

背景技術

[0002] 動物の体内では、細胞同士が様々な方法で情報を伝達し合うことにより、協調して種々の機能を担っている。中でも免疫系の細胞は局所で作用する機会が多く、細胞間の情報伝達には細胞表面上に存在する種々のタンパク質分子を介した接触が重要な役割を果たしている。かかるタンパク質分子の1つにCD40L(CD154ともいう)がある。

CD40Lは、TNFファミリーに属する約39kDのII型膜タンパク質であり、活性化CD4⁺T細胞を始め、活性化CD8⁺T細胞、好塩基球、肥満細胞、血小板などに発現している。CD40Lは、B細胞、マクロファージ、濾胞性樹状細胞などの抗原提示細胞、上皮細胞、胸腺上皮細胞、血小板、線維芽細胞、および種々の癌細胞などに発現する膜タンパク質であるCD40と結合し、これを活性化する。

CD40Lの結合により活性化されたCD40は、発現している細胞を活性化に導き、B細胞においては、CD23、CD25、CD80、CD54、MHCクラスIIの発現増強、凝集の誘導、増殖の誘導、クラススイッチなどをもたらすことが、抗CD40抗体を用いた実験によって明らかにされている。またCD40陽性腫瘍細胞の一部(膀胱癌、腎癌、口腔癌など)では、CD40Lの結合がアポトーシス誘導、細胞増殖抑制などをもたらすことが明らかになっている。

- [0003] 一方、免疫系が腫瘍細胞を排除する能力を有することが分かっている。例えば、ヘルパーT細胞は、腫瘍細胞自身または抗原提示細胞との接触によって活性化されると、それ自身提示された腫瘍抗原を認識して腫瘍細胞と接触しFas－FasL相互作用によりアポトーシスに導くほか、IL－2、IFN－ γ などのサイトカインを放出することにより細胞傷害性T細胞を活性化させ、当該細胞の腫瘍攻撃を補助する。しかしながら、腫瘍細胞が免疫系による排除を回避する機構を有していることも分かっている。かかる機構としては、例えば腫瘍細胞の免疫原性の欠如や、腫瘍細胞による免疫系の抑制(免疫抑制分子の分泌、T細胞シグナル伝達異常、癌細胞上のFasリガンド発現によるT細胞アポトーシス誘導など)、腫瘍細胞上の免疫関連分子の欠失などが考えられている。
- [0004] 腫瘍免疫の要となるT細胞の活性化には、T細胞レセプター(TCR)からの抗原刺激の他に種々の補助刺激分子からの刺激が必要であることが明らかになっており、TCRからの刺激のみを受けた場合、このT細胞は活性化しないばかりでなく、その後同じ抗原刺激に不応答性となることが知られている。この機序は、免疫系構築の初期段階で、自己抗原に対する免疫寛容を誘導するのに有用であるが、腫瘍に対する免疫寛容をも誘導し得るため、腫瘍免疫には抑制的に作用する。かかる補助刺激分子のうち、腫瘍免疫で最も重要なものの1つにCD28があり、当該分子のリガンドはCD80である。
- [0005] CD40陽性の腫瘍細胞は、CD80を発現していないことが多く、したがってMHCを発現している場合にはT細胞を不応答性にし、免疫系による排除を回避していると考えられる。しかし、CD40を刺激すると、かかる細胞もCD80を発現するので、免疫系が認識できるようになる。このような効果を期待して、種々の可溶性CD40Lまたは抗CD40抗体を用いてCD40を刺激する試みがなされてきたが、これらの分子は細胞膜上に発現されるCD40リガンドほど有効ではなく、また、肺に炎症反応を起こすなど好ましくない生理的効果を惹起する可能性があるため(非特許文献1参照)、臨床的に使用できるものではなかった。
- [0006] かかる弊害を改善するために、CD40Lをコードする遺伝子を腫瘍細胞に導入して細胞表面上に発現させる試みがなされた(非特許文献2、特許文献1参照)。当該方

法によれば、細胞表面に発現したCD40Lが他の腫瘍細胞表面のCD40を次々と刺激してCD80の発現を誘導するため、CD80遺伝子を直接導入するより非常に効率がよい。ところが、上記の方法においては、ヒト腫瘍細胞にヒトCD40Lを導入してもin vivoでの発現および生物活性が十分ではなかった。そこで、ヒトCD40Lの代わりにマウスCD40Lを導入したところ、ヒトCD40リガンドを導入する方法に比べ比較的高い効果が認められた(非特許文献2参照)。ヒト腫瘍細胞に導入したヒトCD40LとマウスCD40Lとの間でかかる違いが生じる原因は現在のところ不明であるが、臨床試験ではマウスCD40リガンドを発現させる方法がとられ、ヒトの腫瘍治療においてある程度の成果を収めている(非特許文献3参照)。

[0007] しかしながら、マウスCD40リガンドはヒトにとって異種のタンパク質であり、抗原抗体反応など望ましくない現象を惹起する恐れがあるとともに、動物実験においては、上記方法を用いた場合、関節炎、浮腫、下痢などの炎症性病態の発症が認められており、ヒトにおいてもかかる副作用が生じる可能性があった。そこで、CD40陽性腫瘍の治療において、より副作用の危険の少ない方法が求められていた。

一方、非特許文献4には、111～123位のアミノ酸を欠失させた非切断性のヒトCD40L変異体を作製し、CD40Lの可溶化体と膜結合型との機能的な違いを、B細胞の増殖能およびIgE産生能について調査したところ、両者の間に実質的な違いが認められなかったことが記載されている。しかしながら、かかる変異体は、前記調査のために便宜的に作製されたに過ぎず、その応用やその他用途等については何ら言及されていない。

[0008] 特許文献1:特表2001-505782号公報

非特許文献1:「ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)」, 米国、平成9年3月15日、第158巻、第6号、p. 2932-2938

非特許文献2:「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベストメント(Journal of Clinical Investigation)」, 米国、平成10年3月、第101巻、第5号、p. 1133-1141

非特許文献3:「ブラッド(Blood)」, 米国、平成12年11月1日、第96巻、第9号、p. 2917-2924

非特許文献4:「ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(European Journal of

Immunology)」、ドイツ、平成8年3月、第26巻、第3号、p. 725—728

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、CD40陽性腫瘍、CD40—CD40L相互作用の異常に起因する病態、およびCD40—CD40リガンド相互作用を強化することにより予防および／もしくは治療が期待できる疾患を処置するための新規な分子、および、細胞の免疫反応性を改変するための新規な方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討を行う中で、ヒト細胞へのヒトCD40Lの導入によって所望の効果が得られないのは、遺伝子導入によって発現した該CD40Lが、生体内の酵素であるマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)によって切断され、細胞から脱離して可溶化体となるために、細胞表面上の発現が低く抑えられていると考えた。そして、かかる着眼点を基に、MMPに切断されず、かつ、CD40刺激活性を保持したヒトCD40Lの変異体の作製を試みたところ、CD40L中の特定のアミノ酸を変異させた変異体が、ヒト腫瘍細胞においても高い発現率を示すとともに、上記のような炎症性の副作用も少なく、しかも優れたCD40刺激効果を奏することを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0011] すなわち本発明は、アミノ酸の置換を有することにより非切断性となっており、CD40刺激活性を有する、CD40リガンドの非切断性変異体に関する。

また本発明は、アミノ酸の置換が、切断予想部位および／またはその近傍に位置する上記変異体に関する。

さらに本発明は、CD40リガンドがヒト由来である上記変異体に関する。

さらにまた本発明は、配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列を有する変異体、および該アミノ酸配列に任意の変異を有するが、なお該変異体と同等の機能を有する変異体からなる群から選択される上記変異体に関する。

本発明はまた、上記の変異体をコードする核酸配列またはその相補配列からなる核酸分子、その断片、およびこれらの核酸分子にストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸分子からなる群から選択される、核酸分子に関する。

本発明はさらに、配列番号7～10のいずれかの核酸配列を有する核酸分子、および該核酸配列に任意の変異を有するが、なお該核酸分子がコードする変異体と同等の機能を有する変異体をコードする核酸分子からなる群から選択される、上記核酸分子に関する。

[0012] 本発明はさらにまた、上記核酸分子を含むベクターに関する。

また本発明は、ウイルスベクターである上記ベクターに関する。

さらに本発明は、ウイルスベクターがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルスおよびバキュロウイルスからなる群から選択される、上記ベクターに関する。

さらにまた本発明は、ウイルスファイバーにRGD配列を含む、上記ベクターに関する。

本発明はまた、非ウイルスベクターである上記ベクターに関する。

本発明はさらに、非ウイルスベクターが、合成ウイルスまたはプラスミドベクターである、上記ベクターに関する。

本発明はさらにまた、上記のベクターで形質転換した細胞に関する。

また本発明は、腫瘍細胞である上記細胞に関する。

さらに本発明は、ヒトに由来する上記細胞に関する。

[0013] さらにまた本発明は、対象から採取した細胞を、上記のベクターで形質転換することを含む、上記細胞の作製方法に関する。

本発明はまた、前記変異体、前記核酸分子、前記ベクター、および、前記細胞からなる群から選択される成分を含む、医薬組成物に関する。

本発明はさらに、CD40リガンドの非切断性機能的変異体を、非ヒト動物の細胞上に発現させることにより、該細胞の免疫反応性を改変する方法に関する。

本発明はさらにまた、CD40リガンドの非切断性機能的変異体を、生体から単離した細胞上に発現させることにより、該細胞の免疫反応性を改変する方法に関する。

また本発明は、変異体が、上記いずれかの変異体である上記方法に関する。

さらに本発明は、変異体が、該変異体をコードする核酸分子を含むベクターを介して細胞上に発現される、上記方法に関する。

さらにまた本発明は、ベクターがアデノウイルスベクターである、上記方法に関する。

本発明はまた、アデノウイルスベクターがウイルスファイバーにRGD配列を含む、上記方法に関する。

[0014] 本発明はさらに、細胞が腫瘍細胞または正常細胞である、上記方法に関する。

本発明はさらにまた、腫瘍細胞が、白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌由来細胞からなる群から選択され、正常細胞が、間質細胞、線維芽細胞、ストローマ細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞、リンパ球、単球、樹状細胞および多核白血球からなる群から選択される、上記方法に関する。

また本発明は、細胞がヒト細胞である上記方法に関する。

[0015] さらに本発明は、前記変異体、前記核酸分子、前記ベクター、および前記細胞からなる群から選択される成分の、CD40陽性腫瘍、CD40-CD40リガンド相互作用の異常に起因する疾患、またはCD40-CD40リガンド相互作用を強化することにより予防および／もしくは治療が期待できる疾患を処置するための医薬、または、免疫増強剤の製造への使用に関する。

さらにまた本発明は、腫瘍が、白血病、リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌からなる群から選択され、CD40-CD40リガンド相互作用の異常に起因する疾患が、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、自己免疫性血管炎、アテローム性動脈硬化症およびX連鎖型高IgM症候群からなる群から選択され、CD40-CD40リガンド相互作用を強化することにより予防および／または治療が期待できる疾患が、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症からなる群より選択される、上記使用に関する。

発明の効果

[0016] 本発明の変異体を細胞表面に発現させることにより、CD40Lの可溶化体への開裂が抑えられ、可溶化体の産生が顕著に減少するとともに、細胞上にとどまるCD40Lの量を実質的に増やすことができる。これにより、少ない副作用でより効果的にCD40陽性腫瘍、ならびにX連鎖型高IgM症候群や全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ、自己免疫性血管炎などの自己免疫性疾患およびアテローム性動脈硬化などのCD40-CD40L相互作用の異常に起因する疾患を治療することが可能となり、かかる難病に苦しむ多くの患者を救うことができる。さらに、本発明の変異体によるCD40-CD40L相互作用の増強は、免疫力の強化をもたらすので、種々の感染症などの予防、治療効果が期待される。また、本発明の変異体はMMPによる切断を受けないため、CD40Lが細胞膜に結合した状態で長期間存在することが可能になることから、これまでに十分ではなかった、CD40Lの膜結合形態および可溶化形態の生体内での機能の解明に貢献することができる。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1]野生型hCD40Lのクローニングの手順を示した模式図である。
- [図2]野生型hCD40Lと、その種々の非切断性変異体の核酸配列およびアミノ酸配列を比較した図である。図中、置換されたアミノ酸および塩基を太字で、制限酵素サイトを下線で示した。
- [図3]変異型hCD40L核酸hCD40LM1～4を作製するための変異導入の戦略を示した模式図である。
- [図4]変異型hCD40L核酸hCD40LM1～3の発現ベクターへのクローニングの手順を示した模式図である。
- [図5]変異型hCD40L核酸hCD40LM4の発現ベクターへのクローニングの手順を示した模式図である。
- [0018] [図6]コスミドpWEAx-F/RGDおよびpAx3のクローニングサイトを示した模式図である。
- [図7]レトロウイルスベクターpRx1bsrの模式図である。
- [図8]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントの細胞膜上のCD40Lの発現状態を示したグラフである。

[図9]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントから産生される可溶化体CD40Lの量と、MMP阻害剤による影響を示したグラフである。

[図10]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントから産生される可溶化体CD40Lの量を示したグラフである。

[図11]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントと共培養したB細胞性白血病細胞における、細胞表面抗原の誘導の程度を示したグラフである。

[図12]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントと共培養したB細胞性リンパ腫細胞における、細胞表面抗原の誘導の程度を示したグラフである。

[図13]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントの移植マウスへの影響を示した写真である。

[0019] [図14]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスにおける関節炎の程度を示した写真である。

[図15]野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスの肝組織標本の写真である。

[図16]変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスの肝組織標本の写真である。

[図17]野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウス血清中の可溶化体CD40L値を示したグラフである。

[図18]アデノウイルスベクターで導入した野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントの、細胞膜上のCD40Lの発現状態を示したグラフである。

[図19]アデノウイルスベクターで導入した野生型または変異型hCD40Lトランスフェクタントによる可溶化体CD40Lの産生量を示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 本明細書中に別記のない限り、本発明に関して用いられる科学のおよび技術的用語は、当業者に通常理解されている意味を有するものとする。一般的に、本明細書中に記載された細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子およびタンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションに関して用いられる用語、およびその技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものとする。一般的に、別記のない限り、本発明の方法および技術は、当該技術分野においてよく知られた慣用の方法に従って、本明細書中で引用され、議論されている

種々の一般的なおよびより専門的な参考文献に記載されたとおりに行われる。かかる文献としては、例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) および Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992, および2000の補遺); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology - 4th Ed.*, Wiley & Sons (1999); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); および Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)などが挙げられる。

[0021] 酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従い、当該技術分野において通常なされているとおりに、または本明細書に記載のとおりに行うものとする。本明細書中に記載された分析化学、合成有機化学ならびに医薬品化学および薬化学に関して用いられる用語、ならびにその実験手順および技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものである。標準的な技術を、化学合成、化学分析、薬剤の製造、製剤および送達、ならびに対象の処置に用いるものとする。

[0022] 本発明の一側面は、CD40刺激活性を有する、CD40Lの非切断性変異体に関する。

本発明において、「CD40リガンド(CD40L)」は、CD40、またはその相同体もしくは断片(以下CD40等という)に結合し得るポリペプチドを意味する。本発明におけるCD40Lは、好ましくは天然のCD40L、その相同体、変異体、およびそれらの断片であり、特に好ましくは野生型のヒトCD40Lである。野生型CD40Lのアミノ酸配列は、例えばEMBL受託番号CAA78737(ヒト)、同CAA46448(マウス)として開示されている。野生型ヒトCD40Lのアミノ酸配列を配列番号5として示す。本発明において、CD40Lは好ましくは細胞膜上に発現しており、より好ましくはCD40等との結合に関与する部分が細胞外に存在するように細胞膜を貫通している。

[0023] 本発明において、「CD40Lの変異体」は、野生型CD40Lからの少なくとも1つのア

ミノ酸の置換、欠失、または挿入によって特徴づけられる、CD40Lまたはその断片を意味する。このような変異体は、例えば、CD40Lをコードする核酸配列に変異を導入することによって得ることができる。

本発明において、「非切断性変異体」は、細胞膜上に発現した変異体の、細胞外に存在するCD40等との結合に関与する部分が、生体内で、例えば酵素などの作用により、細胞膜から分離されないような変異体を意味する。しかしながら、該非切断性は、上記分離が100%生じないことを包含するのは勿論、野生型CD40Lに比べて可溶化CD40Lの発生量が50%未満であることを含む。この割合は、好ましくは40%未満、より好ましくは30%未満、最も好ましくは20%未満であり、10%未満であることが特に好ましい。可溶化体の発生量が少ないもの程非切断性が優れており、本発明においては好ましい。可溶化CD40Lの発生量は、例えば、本明細書中の実施例12に記載の方法などにより容易に決定することができる。

[0024] 本発明において、「CD40刺激活性」とは、変異体が、細胞膜上に発現したCD40に結合し、その活性化を介して該細胞内に種々の変化を生じさせる能力を意味する。かかる変化としては、例えば、B細胞においては、細胞増殖の惹起、CD23、CD25、CD54、CD80、CD83、Fas、MHCクラスII分子などの発現増強、凝集の誘発、IL-4共存下におけるIgE産生の誘導、IL-10共存下におけるIgG、IgA、IgMの産生誘導などが、樹状細胞においては、CD80、CD86、MHCクラスII分子などの補助刺激分子の発現増強、CD25、CD83などの成熟マーカー分子発現誘導、IL-12産生におけるNK細胞、T細胞の2次的活性化などが挙げられる。本明細書においては、CD40刺激活性を有する変異体を「機能的変異体」と呼ぶこともある。

[0025] 上記活性は、例えば、本発明の変異体のCD40への結合能によって評価することができる。かかる結合能は、例えば、野生型CD40Lに対する抗体の該変異体への結合の程度を、免疫沈降法、免疫細胞化学、フローサイトメトリー法などの当業者に周知の技法を用いて決定することにより評価することができる。また、上記活性は、CD40LのCD40への結合によって発現が増強される分子の発現量を決定することにより評価することができる。かかる分子の例としては、CD23、CD25、CD54、CD80、CD83、CD86、Fas、MHCクラスIIなどが挙げられる。当該発現量の決定方法とし

ては、例えば、当該分子に特異的な抗体を用いた、免疫沈降法、免疫細胞化学、フローサイトメトリー法などの技法が挙げられる。上記活性はまた、細胞の増殖活性を測定することによって評価することもできる。増殖活性は、例えば、 $[H^3]$ －ウリジンまたは $[H^3]$ －チミジンの取込みの測定などによって容易に評価することができる。上記活性は、さらにB細胞のIgEの産生誘導を測定することなどによっても評価できる。上記評価方法は、当業者であればいずれも容易に行うことができる。

- [0026] 本発明の好ましい態様において、本発明の変異体は、アミノ酸の置換を有することにより非切断性となっている。すなわち、該変異体の非切断性に関与しているのは野生型CD40Lに対するアミノ酸の置換であって、アミノ酸の欠失や付加ではない。例えば、非特許文献4に示されるアミノ酸欠失CD40L(配列番号6)は非切断性を有しているが、後述のとおり、CD40Lとしての生物活性が、野生型CD40Lや本発明の変異体に比べて減弱していることが本発明者らによって確認されているし、アミノ酸付加体は活性発現に必要な3量体の形成を妨げ、結果として活性を有さないか、有するとしても野生型CD40Lに比べて低いレベルであることが予想される。

しかしながら、上記態様に係る変異体は、非切断性に関与せず、かつCD40刺激活性を損なわない任意のアミノ酸の置換、欠失および／または付加を含むことができる。非切断性に関与する置換の個数は特に制限されないが、好ましくは1～10アミノ酸、より好ましくは1～8アミノ酸、最も好ましくは2～6アミノ酸である。かかる置換は、連続して位置するアミノ酸に位置してもよく、または、連続して位置しないアミノ酸に位置してもよい。野生型CD40Lの生物活性をよりよく維持するためには、一般的により少ない数の置換の方が、タンパク質の構造に与える影響が少ないために好ましい。

- [0027] 非切断性に関与する置換は、好ましくは切断予想部位および／またはその近傍、より好ましくはプロテアーゼ切断予想部位および／またはその近傍に位置する。切断予想部位とは、CD40LのCD40等との結合に関与する部分が細胞から分離される際に、当該分離の原因となる物理的および／または化学的な作用を受けると考えられるCD40Lの部位を意味する。例えば、野生型CD40Lはマトリックスメタロプロテアーゼにより切断され、細胞から分離した可溶化体を生ずるが、この場合、切断予想部位の1つは、当該野生型CD40Lのアミノ酸配列上における、可溶化体との重複部分

の細胞側末端に位置するアミノ酸と、そのさらに細胞側に位置するアミノ酸との間の部位であり得る。ヒト野生型CD40Lの場合、かかる切断予想部位の1つは第115アミノ酸(リジン)と第116アミノ酸(グリシン)との間の位置である。しかしながら、かかる例は、本発明における切断予想部位の範囲を限定するものではない。

[0028] 本発明において、アミノ酸配列上のある部位の「近傍」とは、当該部位の前後13アミノ酸を含む部分を意味する。かかる部分は、好ましくは当該部位の前後10アミノ酸、より好ましくは8アミノ酸、最も好ましくは6アミノ酸を含む。

したがって、好ましい態様において、本発明の変異体は、切断予想部位の前後13アミノ酸、好ましくは10アミノ酸、より好ましくは8アミノ酸、最も好ましくは6アミノ酸の範囲に、好ましくは1～10個、より好ましくは1～8個、最も好ましくは2～6個の非切断性に関与する置換を有する。しかしながら、本発明の変異体は、かかる範囲以外に位置するが、該変異体に非切断性を与える置換を有してもよい。

[0029] また、本発明の好ましい変異体は、非キメラ変異体である。本明細書において、用語「キメラ変異体」は、その遺伝子の一部が第二の異なる遺伝子から誘導されて第一の遺伝子と合し、その結果得られるキメラ遺伝子に、少なくとも各遺伝子の一部が存在するような遺伝子から誘導された変異体を意味する。変異体のアミノ酸配列のどこか一部分が、第二のそして異なる遺伝子から誘導されているならば、その変異体はキメラであり得る。典型的なキメラ変異体は、一つの遺伝子由来の特定の機能的ドメインが第二の遺伝子に移され、そして第二の遺伝子の類似ドメインに取って代わっている遺伝子から誘導される変異体を包含する。例えば、かかるキメラ変異体は、マウス遺伝子から誘導された一つのドメインと、ヒト遺伝子から誘導された幾つかのドメインを有し得る。これらのドメインは、5個～数百個のアミノ酸の大きさの範囲であり得る。したがって、かかるキメラ変異体は、本発明の好ましい変異体に包含されない。CD40Lのヒト-マウスキメラ遺伝子は、例えば特許文献1に配列番号3～7として記載されている。しかし、このようなキメラ変異体が、非切断性とCD40刺激活性の両方を有することはこれまでに報告がなく、また、かかる変異体においては3量体形成が不十分になることが予想され、活性が弱くなることが推測される。

[0030] さらに好ましい態様では、本発明の変異体は配列番号1～4のアミノ酸配列を含み

、より好ましくは配列番号1～4のアミノ酸配列からなる。ただし、これらの変異体は、当該変異体の機能を損なうことのない任意の変異を含むことができるものとする。

[0031] 本発明の変異体は、当業者に公知の任意の技法を用いて作製することができる。

該変異体は、例えば、CD40Lをコードする核酸分子に変異を導入し、該核酸を発現させることによって得ることができる。CD40Lをコードする核酸配列は、例えば GenBank受託番号L07414(ヒト)や、同X65453(マウス)として開示されている。該核酸分子は、例えば、適切な細胞から抽出したRNAから、RT-PCR法により容易に得ることができる。また、適切なcDNAライブラリーから、通常のPCR法などによって得ることもできる。得られた核酸分子は、エラープローンPCR、部位特異的変異導入、アセンブリPCR、DNAシャッフリング、in vivo変異導入、カセット変異導入、リカーシブアンサンブル変異導入、およびエクスポネンシャルアンサンブル変異導入を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で知られた任意の方法によって変異させることができる。

[0032] 本発明においては、部位特異的変異導入が好ましい。該技法においては、例えば、自動DNA合成装置で所望の変異を含んだプライマーを作製し、野生型CD40LをテンプレートにPCRを行うことによって、所望の部位に所望の変異を含んだ変異型核酸分子を容易に得ることができる。次に、得られた核酸分子を適切なベクターに組み込み、適切な細胞に導入し、発現させることにより、上記の変異型核酸分子がコードする所望の変異体を得ることができる。

[0033] 本発明の他の側面は、上記のCD40Lの非切断性機能的変異体をコードする核酸分子、その相補鎖、これらの断片、および、ストリンジェントな条件下にこれらの核酸分子とハイブリダイズする他の核酸分子を含む。本発明の核酸分子は、好ましくは、アミノ酸の置換を有することにより非切断性となっている、CD40Lの非切断性機能的変異体をコードする核酸分子を含み、より好ましくは、配列番号1～4のアミノ酸配列を有する変異体をコードするヌクレオチド配列であって、それぞれ配列番号7～10の配列を含むものを包含する。

[0034] 本明細書で用いる「ストリンジェントな条件」という用語は、当該技術分野において周知のパラメータである。核酸のハイブリダイゼーションのパラメータは、標準的なブ

ロトコル集、例えばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001)や、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)などに記載されている。

- [0035] 具体的には、本明細書において用いるストリンジェントな条件は、65℃での、3.5×SSC、フィコール0.02%、ポリビニルピロリドン0.02%、ウシ血清アルブミン0.02%、 NaH_2PO_4 25mM (pH7)、SDS0.05%、EDTA2mMからなるハイブリダイゼーションバッファーによるハイブリダイゼーションを指す。なお、上記のうち、SSCは0.15M塩化ナトリウム／0.15Mクエン酸ナトリウム、pH7であり、SDSはドデシル硫酸ナトリウムであり、またEDTAはエチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーション後、DNAが移された膜は、2×SSCにて室温において、次いで0.1～0.5×SSC／0.1×SDSにて68℃までの温度において洗浄される。あるいは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、ExpressHyb(登録商標)緩衝液(Clontech社製)などの市販のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、製造者によって記載されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で行ってもよい。
- [0036] 同程度のストリンジェンシーを生じる結果となる使用可能な他の条件、試薬等が存在するが、当業者はかかる条件に通じていると思われるため、これらについては、本明細書中に特段記載はしていない。しかしながら、本発明の変異体をコードしている核酸の相同体または対立遺伝子の明確な同定ができるよう、条件を操作することが可能である。
- [0037] 一般的に相同体および対立遺伝子は、典型的には少なくとも90%のアミノ酸の同一性、および／または少なくとも75%のヌクレオチドの同一性を本発明の変異体のアミノ酸配列に対して、またはかかるポリペプチドをコードしている核酸に対してそれぞれ有し得る。いくつかの例においては、相同体および対立遺伝子は、少なくとも90%のヌクレオチドの同一性および／または少なくとも95%のアミノ酸の同一性を有し得、さらに別の例では、少なくとも95%のヌクレオチドの同一性および／または少なくとも99%のアミノ酸の同一性を有し得る。上記の核酸の相補体もまた本発明に含まれる。
- [0038] 本発明の変異体をコードしている核酸についてのスクリーニングにおいて、サザン

ブロットまたはノーザンブロットなどの核酸のハイブリダイゼーションは、上記の条件で、検出可能に標識されたプローブ（例えば、 ^{32}P などの放射性標識、化学発光標識、蛍光標識）を用いて行ってもよい。本発明の変異体をコードしているDNAが最終的に移された膜の洗浄後、放射性シグナルを検出すべく、X線フィルム、フォスフォイメージャーまたは他の検出装置に当該膜を設置することができる。

[0039] 本発明の核酸分子はまた、本発明の変異体と同一のアミノ酸配列をコードする代替コドンを含む核酸配列を含む。したがって本発明は、遺伝子コードの縮重のため、コドンの配列において、本発明の変異体をコードしている配列番号7～10のヌクレオチド配列を含む核酸分子とは異なる、縮重された核酸分子を含む。

また本発明の核酸分子は、発現ベクターにおける、ならびに原核性（例えば大腸菌）または真核性（例えば間質細胞、線維芽細胞、ストローマ細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞などの腫瘍関連細胞や、造血幹細胞、造血前駆細胞、リンパ球、単球、樹状細胞、多核白血球などの正常細胞、白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、脾臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌由来細胞などの腫瘍細胞、CHO細胞、COS細胞、TOP10細胞、BOSC23細胞、 ϕ CRIP-P131細胞、U251細胞などの細胞系、酵母の発現系、および昆虫細胞における組換えバキュロウイルスの発現系）の宿主細胞または細胞系をトランスフェクトするために用いることができる。

[0040] 本発明はさらに、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。本明細書に用いる場合、「ベクター」は、異なる遺伝的環境間の移送のため、または宿主細胞における発現のために、ダイジェストまたはライゲーションによって所望の核酸分子を導入できる任意の核酸を意味する。ベクターは典型的にはDNAから構成されるが、RNAベクターを用いることもできる。ベクターは、ファージ、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、バキュロウイルスなどのウイルスベクター、ファージミド、コスミドなどのプラスミドや合成ウイルスなどを包含する非ウイルスベクターを含むがこれらに限定されない。クローニングベクターは、自律的に、あるいはゲノムへの組込みの後に、宿主細胞中で複製することができるものであり、それはさらに1または2以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によって特徴づけられ、当該

ベクターはその部位で決定可能な様式で切断され、そこに所望の核酸配列を連結することができ、これにより、新規な組換えベクターは宿主中で目的とする核酸分子を複製することが可能となる。プラスミドの場合には、宿主細菌内のプラスミドのコピー数が増えることにより、所望の核酸分子が何度も複製されもてよく、あるいは細胞分裂によって宿主が再生される前に宿主あたり1回だけ複製されてもよい。ファージの場合には、複製は溶菌相の間は積極的に、あるいは溶原相の間は受動的に起きてもよい。

[0041] 発現ベクターは、その中に所望の核酸配列がダイジェストおよびライゲーションにより挿入され、それが調節配列に対して作動可能に連結されて、転写物として発現されるようにするものである。発現ベクターはさらに、当該ベクターによって形質転換またはトランスフェクトされたか、またはされていない細胞を同定するのに適当な1または2以上のマーカー配列を含んでもよい。マーカーは、例えば抗生物質または他の化合物に対する抵抗性または感受性のいずれかを亢進または低下させるタンパク質をコードしている遺伝子、その活性が当該技術分野における標準的な分析法によって検出可能な酵素(例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、またはアルカリホスファターゼ)をコードする遺伝子、および形質転換またはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニー、またはプラークの表現型に視覚的に影響する遺伝子を含む。好ましい発現ベクターは自律的な複製と、それに対してベクターが作動可能に連結されているDNAセグメントに存在する構造遺伝子産物の発現が可能なベクターである。

[0042] 本明細書においては、コード配列および調節配列は、当該コード配列の発現または転写が、当該調節配列の影響または支配下にあるように位置される様式において連結されている場合、「作動可能に」連結されているということとする。もし当該コード配列を機能的なタンパク質に翻訳することが望まれる場合には、2つのDNA配列は、もし5'調節配列におけるプロモーターによる誘導の結果、当該コード配列の転写が生じ、またもし当該2つのDNA配列の間の連結の性質が、(1)フレームシフト突然変異を誘導する結果とならず、(2)当該コード配列の転写を指示するための当該プロモーターの能力を妨害せず、あるいは(3)タンパク質に翻訳されるべき対応するRNA転写物の能力を妨害しない場合には、「作動可能に」連結されているといわれる。

したがってプロモーター領域は、もし当該プロモーター領域が、結果として得られる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳されるように、そのDNA配列を転写できれば、作動可能にコード配列に連結されていることになる。

[0043] 本発明において有用なベクターは、所望により、例えば哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫遺伝子から誘導される適当な転写または翻訳調節配列と機能的に結合した本発明の変異体をコードしている核酸分子を含む。かかる調節配列は、遺伝子発現において調節的役割を有する配列、例えば転写プロモーターまたはエンハンサー、転写を調節するためのオペレーター配列、メッセンジャーRNA内部のリボソーム結合部位をコードしている配列、ならびに、転写、翻訳開始または転写終了を調節する適切な配列を包含する。

[0044] 遺伝子発現に必要な調節配列の詳細な性質は、生物種または細胞種によって異なってもよいが、一般的には、少なくとも、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などの、各々転写および翻訳の開始に関与する5'非転写、および5'非翻訳配列を含み得る。特に、かかる5'非転写調節配列は、作動可能に連結された遺伝子の転写調節のためのプロモーター配列を含む、プロモーター領域を含み得る。調節配列はまた、エンハンサー配列か、または所望の上流のアクチベーター配列を含んでもよい。本発明のベクターは、任意に5'リーダーまたはシグナル配列を含んでもよい。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および自由裁量の範囲内にある。

[0045] 特に有用な調節配列は、種々の哺乳動物、ウイルス、微生物、および昆虫遺伝子由来のプロモーター領域を包含する。このプロモーター領域は、その遺伝子の転写の開始を指令し、そして補助分子リガンド遺伝子を含むDNAの全ての転写をもたらす。有用なプロモーター領域は、CAプロモーター、レトロウイルスのdLTRプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー／プロモーター領域、RSVのLTRプロモーター、lacプロモーター、およびアデノウイルスから分離したプロモーターを包含するが、真核生物、原核生物、ウイルス、または微生物細胞での遺伝子発現に有用な、当業者に公知の他の任意のプロモーターを用いることもできる。

[0046] 真核生物細胞内で、遺伝子およびタンパクを発現するのにとりわけ有用なその他の

プロモーターは、哺乳動物細胞プロモーター配列およびエンハンサー配列、例えばポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40ウイルス、およびヒトサイトメガロウイルスから誘導されるものを包含する。典型的にはSV40などのウイルスのウイルス複製起点に隣接して見出される、ウイルスの初期および後期プロモーターが、特に有用である。特定の有用なプロモーターの選択は、その細胞株、および、特定の細胞株内部で本発明の変異体を発現させるために使用する核酸構築物についての、他の様々なパラメータに依存する。さらに、本発明において有用な充分高いレベルで、標的細胞に遺伝子を発現させることが知られている任意のプロモーターを選択することができる。

- [0047] 本発明のベクターは、所望により、発現ベクターから生成されるmRNAの、タンパク質への効率的な翻訳を可能にするリボソーム結合部位、本発明の核酸分子に機能的に結合していてもよい種々のシグナルペプチドをコードしている核酸配列を包含する、種々のさらなる調節配列を含むことができる。シグナルペプチドは、もし存在するならば、翻訳されたポリペプチドの細胞外分泌の改善を可能にする前駆体アミノ酸として発現される。

したがって、本発明の核酸構築物は、プロモーター配列またはプロモーターおよびエンハンサー配列のいずれかと作動可能に結合し、さらにmRNAの終止およびポリアダニル化を指令するポリアダニル化配列に機能的に結合した、本発明の核酸分子の様々な型を包含する。本発明の核酸構築物は、所望の細胞内部でのその構築物の効率的な複製および発現を可能にするその他の遺伝子配列を含み得る。かかる配列は、天然CD40L遺伝子、またはウイルス遺伝子等から誘導されるイントロンを包含し得る。

- [0048] 本発明のベクターはさらに、直接細胞に感染して本発明の核酸分子を該細胞に導入することのできる、遺伝子治療用のベクターをも包含する。これらの遺伝子治療用ベクターは、対象から分離した細胞を直接感染させるのに役立ち、または、対象の内部に直接導入し、それによりその対象中の所望の細胞を直接感染させることができる。

なお、本発明において用いる用語「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは

動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、疾患の処置が企図される場合には、該疾患に罹患している患者である。

また、用語「処置」は、疾患の治療、一時的寛解または予防(防止)などを目的とする医学的に許容される全てのタイプの予防的および／または治療的介入を包含するものとする。例えば、疾患が癌の場合、「処置」の用語は、癌の進行の遅延または停止、癌の退縮または消失、癌の発症の予防または再発の予防などを含む種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

- [0049] 遺伝子を適切に送達し、所望の核酸分子の発現をもたらすことのできる数多くの種類の遺伝子治療用ベクターが開発され、例えば、Current Comm. Mol. Biol., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1987)などの文献に記載されてきた。さらに、リン酸カルシウムトランスフェクション(Berman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7176 (1984))、DEAEーデキストラントランスフェクション、プロトプラスト融合(Deans et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1292 (1984))、電気穿孔、リポソーム融合、ポリブレンを用いたトランスフェクションおよび細胞膜のレーザー微穿孔による遺伝子の直接的な送達を包含する、周知の多数の技法によって、裸のDNAを、ヒト細胞などの真核生物細胞中に物理的に導入することができる。当業者は、DNAを細胞のゲノムに組み込み、所望遺伝子の発現を可能にするように細胞内に適切に導入することのできる上記以外のいかなる技術も、本発明に用いることができる。特に、遺伝子の送達のための組換え感染性ウイルス粒子を利用した遺伝子治療ベクターがよく知られている(例えば、Brody, S. L. and R. G. Crystal, Ann. N. Y. Acad. Sci., 716:90 (1994)、Srivastava, A., Blood. Cells, 20:531 (1994)、Jolly, D., Cancer Gene Ther., 1:51 (1994)、Russell, S. J., Eur. J. Cancer, 30A:1165 (1994)、Yee, J. K., T. Friedmann, and J. C. Burns, Methods Cell Biol., 43 Pt A:99 (1994)、Boris-Lawrie, K. A. and H. M. Temin, Curr. Opin. Genet. Dev., 3:102 (1993)、Tolstoshev, P., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 33:573 (1993)、およびCarter, B. J., Curr. Biotechnol., 3:533 (1992)等を参照)。

- [0050] 本発明は、本発明の核酸分子を細胞内に導入することにより、該細胞の免疫反応

性を改変するための遺伝子治療ベクターを企図している。

本発明において、免疫反応性とは、免疫系に何らかの影響を与え、および／または、免疫系から何らかの影響を受ける能力のことをいい、例えば、サイトカインなどの免疫伝達物質の分泌、細胞表面分子を介した他の免疫系細胞への情報伝達、受容体などを介した免疫伝達刺激の受容などを包含するが、これらに限定されない。したがって、免疫反応性を改変するとは、例えば、これまで有していなかった免疫反応性の獲得、これまで有していた免疫反応性の喪失、増強もしくは減弱などを包含し得る。本発明における好ましい免疫反応性は、CD40刺激能の獲得または増強である。

[0051] 現在多くのウイルスベクターが遺伝子治療ベクターとして使用されており、それらには、SV40ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルスおよびバキュロウイルスなどから誘導されるウイルスベクターが包含される。また、合成ウイルスやプラスミドベクターなどの非ウイルスベクターも同様に遺伝子治療ベクターとして使用されている。これらのベクターは、本発明においても勿論使用することができる。本発明における有用な遺伝子治療ベクターは、本発明の核酸分子を標的細胞中に直接導入し、その核酸分子を細胞に存続させて本発明の変異体を該細胞内で、所望の様式で発現させるようにできるベクターであり得る。

本発明の遺伝子治療ベクターは、本発明の核酸分子を、ヒト細胞などの様々な哺乳動物細胞に導入するのに用いることができる。かかるベクターを用いて本発明の核酸分子を、造血またはリンパ系幹細胞、抗原提示細胞、胚性幹細胞、および、CD40をその表面に有する細胞を包含する、免疫系の中で抗原提示可能なその他の細胞に導入することができる。さらに、かかる遺伝子治療ベクターは、本発明の核酸分子を、ヒト腫瘍細胞、例えば急性骨髄性白血病(AML)、急性骨髄単球性白血病(AMML)、急性リンパ球性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性骨髄単球性白血病(CMML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)などの白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌由来細胞、または、抗原提示細胞としてもしくはバイスタンダー抗原提示細胞を刺激することのできる細胞として機能し得る任意の腫瘍細胞に導入することができる。また、本発明の遺伝子

治療ベクターは、非腫瘍性の間質細胞、線維芽細胞、ストローマ細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞などの腫瘍関連細胞や、造血幹細胞、造血前駆細胞、リンパ球、単球、樹状細胞、多核白血球などを包含する正常細胞にも用いることができる。さらに、免疫系に抗原を提示できるよう改変した細胞に、本発明の遺伝子治療ベクターを用いて、本発明の核酸分子を導入することもできる。

[0052] 本発明の好ましい態様においては、かかるベクターは、本発明の核酸分子の導入を企図する細胞に標的化されている。特定の細胞に標的化されたベクターとしては、例えば、特開2002-330789に記載の改変アデノウイルスが挙げられる。該アデノウイルスは、野生型アデノウイルスに対する主要なレセプターであるCAR(コクサッキーアデノウイルスレセプター)との結合能を実質的に有しないファイバータンパク質に、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および／または、実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質を有する。

[0053] ここで、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子としては、細胞表面上に存在する分子と特異的に相互作用する分子、例えば特異的レセプターのリガンドが好ましい。そのような分子としては、例えば、メラノーマのMSH(メラニン細胞刺激ホルモン)レセプターと結合する分子、インテグリンレセプターと結合する分子、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンNG2レセプターと結合する分子などが挙げられる。例えば、MSH(メラニン細胞刺激ホルモン)レセプターと結合する分子としてアミノ酸配列SYSMEHFRWGKPVを含むペプチド、インテグリンレセプターと結合する分子としてRGD(Arg-Gly-Asp)モチーフを含む分子、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子としてポリリジンを含む分子、コンドロイチン硫酸プロテグリカンNG2レセプターと結合する分子としてアミノ酸配列TAAまたはLTLRWVGLMSを含む分子などが挙げられる。アミノ酸配列SYSMEHFRWGKPVはメラノーマ細胞に対して、RGDモチーフは頭頸部癌、内皮細胞、平滑筋細胞等に対して、K7はマクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、T細胞に対して、TAASGVRSMおよびLTLRWVGLMSはメラ

ノーマ、脳腫瘍細胞等に対してそれぞれ親和性が高いため、これらの細胞を標的とする場合にそれぞれ適している。

[0054] かかる改変アデノウイルスベクターは、当該技術分野で周知の分子生物学的手法、例えば、ウイルスゲノムの両端に共有結合した末端タンパク質を保持したままの、ゲノム-末端タンパク質複合体(以下DNA-TPCと略す)を用いる方法(Yoshida et al. Hum. Gene Ther. 9:2503-1515 (1998)等を参照)などによって作製することができる。かかる手法はいずれも当業者に良く知られたものである。典型的には、まず、pAxCw、pAxCawt等のコスミドカセットに目的とする遺伝子を組み込んだコスミドを作製する一方、ウイルスからDNA-TPCを調製し、適当な制限酵素で切断しておく。次に、前述のコスミドおよび制限酵素処理したDNA-TPCを適切な宿主細胞、例えば293細胞にコトランスフェクションする。その後、適当な条件で一定期間培養し、培養液中にウイルス粒子として放出された組換えアデノウイルス粒子を回収することができる。

[0055] 本発明はまた、本発明のベクターで形質転換した細胞に関する。かかる細胞は本発明の変異体をコードしている核酸分子を含んでいる。これらの細胞は、微生物細胞、真核生物細胞、昆虫細胞、およびヒト細胞を包含する種々の哺乳動物細胞であることができる。また、かかる細胞は生体から採取したものであっても、培養用に樹立されたものであってもよい。本発明の好ましい態様では、これらの細胞は、ヒトの腫瘍細胞を包含する様々な腫瘍細胞を包含する。これらの腫瘍細胞はいかなる細胞型であってもよく、免疫系の細胞、およびその他の血液細胞を包含する。免疫系の中で抗原提示細胞として機能できる腫瘍細胞、または本発明の変異体の発現によってバイスタンダー抗原提示細胞を刺激することのできる腫瘍細胞が特に好ましい。典型的には、免疫系に抗原を提示するよう機能できるこれらの腫瘍は、CD40分子を細胞表面に持っているか、または持っていたものである。一般に、これらの細胞は、本来免疫系に抗原提示することができるものであるが、本発明は、本来は免疫系に抗原を提示できない細胞であったが、免疫系に抗原提示ができるよう遺伝的に改変されたものに、本発明の核酸分子を導入することをも企図している。典型的には、これらの細胞は、腫瘍化した様々な既知の細胞種、例えば単球、マクロファージ、B細胞、ランゲ

ルハンス細胞、指状嵌入細胞、濾胞樹状細胞またはクッパー細胞等を包含する。さらに、本発明はまた、本明細書に記載した核酸構築物を含む、種々の癌腫、例えばAML、AMML、ALL、CML、CMML、CLLなどの白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌由来の細胞を包含する。

[0056] 別の好ましい態様では、本発明の核酸分子を細胞に導入し、該細胞を、腫瘍床または関節などの処置部位に注入することができる。例えば、本発明の核酸分子を線維芽細胞に導入し、その細胞表面で本発明の変異体を発現させ、次いでこの線維芽細胞を処置部位に注入することにより、該細胞表面に存在する本発明の変異体に起因する所望の免疫効果を惹起することができる。かかる細胞はまた、その処置部位に存在する別の免疫細胞（バイスランダー細胞）を刺激することができる。上記方法により、免疫系に所望の効果をもたらすことができる。

[0057] 本発明の別の側面は、CD40Lの非切断性機能的変異体をコードする核酸分子を細胞中に導入することにより、該変異体が該細胞表面に発現されるようにすることを含む、細胞の免疫反応性を改変する方法に関する。かかる方法は、免疫系の標的として、または外来標的に応答する免疫系の一部として免疫反応に参加する任意の細胞にとって有用である。本発明のこの側面には、上記核酸分子を所望の細胞に導入するための、極めて多様な方法を包含する。かかる方法は、*ex vivo*法、*in vivo*法、および、該核酸分子を含むベクターの動物またはヒトへの注入（任意の動物またはヒトに存在する腫瘍床の中への直接注入を包含する）を含む、様々な方法を包含する。

[0058] 本発明の一態様では、上記核酸分子を導入すべき細胞を対象から採取し、次いで該核酸分子を、適当な方法を用いて当該分離された細胞内に導入する、*ex vivo*法が企図される。有用な*ex vivo*法の例は、例えばS. E., M. Grossman, D. J. Rader, J. G. Thoene, B. J. Clark, D. M. Kolansky, D. W. Muller, and J. M. Wilson, *Ann. Surg.*, 223: 116 (1996)、Lu, L., R. N. Shen, and H. E. Broxmeyer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 22: 61 (1996)、Koc, O. N., J. A. Allay, K. Lee, B. M. Davis, J. S. Reese, and S. L. Gerson, *Semin. Oncol.*, 23: 46 (1996)、Fisher, L. J. and J. Ray, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 4: 735 (1994)およびGoldspiel, B. R., L. Green, and K. A. Calis,

Clin. Pharm., 12: 488 (1993)などに記載されている。

[0059] 本発明の方法は、CD40Lの非切断性機能的変異体をコードする核酸分子を対象から採取した細胞に適切に導入した後、該細胞を、対象の特定の部位にまたは直接循環中に導入することを包含し得る。本発明の好ましい態様では、腫瘍マーカーまたは対象となる細胞に特異的な細胞表面マーカーを用いて、これらの細胞を特異的に対象から分離する。当業者には、このような分離法は良く知られており、例えば、蛍光活性化セルソーティング(FACS)、アフィニティカラムなど様々な態様を含む種々の免疫学的選別法が挙げられる。また、密度勾配遠心法などの物理学的選別法を用いることもできる。

[0060] 本発明はさらに、細胞を対象から分離することなく、上記核酸分子を対象の体内で所望の細胞に導入することを企図する。核酸分子を、*in vivo*で、または対象の体内で特定の細胞内に導入する方法は良く知られており、これは、遺伝子治療ベクターの使用および対象への様々な核酸構築物の注入を包含する。有用な方法の例は、Danko, I. and J. A. Wolff, Vaccine, 12: 1499 (1994)、Raz, E., A. Watanabe, S. M. Baird, R. A. Eisenberg, T. B. Parr, M. Lotz, T. J. Kipps, and D. A. Carson, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 4523 (1993)、Davis, H. L., R. G. Whalen, and B. A. Demeneix, Hum. Gene Ther., 4: 151 (1993)、Sugaya, S., K. Fujita, A. Kikuchi, H. Ueda, K. Takakuwa, S. Kodama, and K. Tanaka, Hum. Gene Ther., 7: 223 (1996)、Prentice, H., R. A. Kloner, Y. Li, L. Newman, and L. Kedes, J. Mol. Cell Cardio., 28: 133 (1996)、Soubrane, C., R. Mouawad, O. Rixe, V. Calvez, A. Ghomari, O. Verola, M. Weil, and D. Khayat, Eur. J. Cancer, 32A: 691 (1996)、Kass-Eisler, A., K. Li, and L. A. Leinwand, Ann. N. Y. Acad. Sci., 772: 232 (1995)、DeMatteo, R. P., S. E. Raper, M. Ahn, K. J. Fisher, C. Burke, A. Radu, G. Widera, B. R. Claytor, C. F. Barker, and J. F. Markmann, Ann. SURG., 222: 229 (1995)、Addison, C. L., T. Braciak, R. Ralston, W. J. Muller, J. Gauldie, and F. L. Graham, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92: 8522 (1995)、Hengge, U. R., P. S. Walker, and J. C. Vogel, J. Clin. Invest., 97: 2911 (1996)、Felgner, P. L., Y. J. Tsai, L. Sukhu, C. J. Wheeler, M. Manthorpe, J. Marshall, and S. H. Cheng, Ann. N. Y. Acad. Sci., 772:

126 (1995)、Furth, P. A., A. Shamay, and L. Hennighausen, Hybridoma, 14: 149 (1995)などに記載されている。

- [0061] 典型的な適用においては、上記核酸分子を含む遺伝子治療ベクターを、対象の循環内に、または限局した部位に導入し、該遺伝子治療ベクターが所望の細胞に特異的に感染できるようにする。別の好ましい態様では、遺伝子治療ベクターを、前記核酸分子を導入すべき細胞を含む対象の腫瘍床に直接注入する。

本発明はさらに、プロモーター、上記核酸分子、およびこれに続くポリアデニル化配列を有する核酸構築物を、対象に直接注入することをも企図する。かかる方法の有用な例は、Vile, R. G. and I. R. Hart, Ann. Oncol., 5 Suppl 4: 59 (1994)に記載されている。かかる核酸構築物は、対象の筋肉またはその他の部位、または対象の腫瘍床に直接注入することができる。

- [0062] 本発明の好ましい態様では、上記核酸分子を細胞内に導入することによって、該細胞の免疫反応または応答を改変することができる。かかる細胞は、特に限定されないが、好ましくはヒト細胞または非ヒト動物細胞、特にヒト抗原提示細胞を包含する。本態様において好ましい細胞は、細胞表面にCD40を有する細胞である。また、かかる細胞は、免疫系を刺激することのできる細胞、または細胞表面にCD80などの補助刺激分子を発現する能力を有する腫瘍化抗原提示細胞であってよい。幾つかの態様において、上記核酸分子を導入すべき細胞の表面に存在する補助刺激分子の量は極めて少ない。これは、補助刺激分子のダウンレギュレーションに起因する。

幾つかの態様においては、上記核酸分子を導入すべき細胞は、少なくとも低レベルのCD40が細胞表面に存在するか、または、細胞表面にCD40Lを発現していたが、その発現が低下または消失してしまった細胞である。

- [0063] 特定の細胞の免疫活性を改変する本発明の方法は、ヒト細胞を包含する動物細胞に適用可能である。かかる細胞には、種々の腫瘍細胞や正常細胞が包含される。腫瘍細胞の例としては白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌由来細胞が、正常細胞の例としては非腫瘍性の間質細胞、線維芽細胞、ストローマ細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞などの腫瘍関連細胞、

造血幹細胞、造血前駆細胞、リンパ球、単球、樹状細胞、多核白血球、さらにはマクロファージ、B細胞、ランゲルハンス細胞、指状嵌入細胞、濾胞樹状細胞、クッパー細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0064] 本発明の好ましい態様において、かかる細胞は、上記変異体が細胞に発現された場合に免疫活性が改変されるリンパ球であり得る。別の好ましい態様においては、該細胞は、該変異体が細胞に発現された場合にバースタンダー抗原提示細胞を刺激することのできる、腫瘍細胞または正常細胞であってもよい。本発明はまた、本来免疫系に対する抗原提示能を有しない細胞を、抗原提示に必要な分子をコードしている遺伝子を導入するよう遺伝的に改変し、それによりこれらの細胞が人工的な抗原提示細胞として振る舞うようにした上で、上記変異体をコードする核酸分子をこれら人工の抗原提示細胞中に導入することも企図している。細胞が抗原提示能を有するか否かは、例えば細胞増殖またはリンホカインの産生といった、公知の様々な試験によって決定することができる。

[0065] 上記の正常な細胞に加え、本発明はまた、腫瘍細胞または悪性細胞中に、上記核酸分子を導入することをも企図している。かかる腫瘍細胞は、AML細胞、AMML細胞、ALL細胞、CMML細胞、CML細胞、CLL細胞などの白血病細胞、リンパ腫細胞、骨髄腫細胞、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌由来細胞、および、該核酸分子がその細胞内に導入される時にバースタンダー抗原提示細胞を刺激することのできる任意の腫瘍細胞を包含する。かかる細胞は、好ましくは、抗原提示細胞として機能することができるものである。さらに、抗原提示細胞として挙動できる、または挙動するよう改変した、上記の腫瘍細胞もまた企図される。しかしながら本発明による免疫反応性の改変は、上記以外の悪性腫瘍細胞にも適用可能であり、したがって、動物またはヒトの免疫系の中で抗原を提示できる任意の腫瘍細胞、または、上記核酸分子がそれらの細胞中に導入された後に抗原提示細胞として挙動できる、またはバースタンダー抗原提示細胞を刺激できる任意の細胞を包含する。

[0066] 細胞の免疫活性を変える本方法は、免疫活性の改変が望まれる細胞の中に上記

核酸分子を導入することを企図している。また、本発明の方法は、CD40Lの非切断性機能的変異体をコードする核酸分子を含んでいる、遺伝子治療ベクターなどのベクターおよび核酸構築物の使用を企図する。典型的には、上記遺伝子治療ベクターなどのベクターおよび核酸構築物は、上記核酸分子と機能的に結合したプロモーター、およびこれに続くポリアデニル化配列を有している。この外、本発明の方法には、少なくとも上記核酸分子を含む任意のベクターまたは核酸構築物を用いることができる。

[0067] 本発明はさらに、腫瘍細胞中に、上記核酸分子を導入し、その結果、上記変異体はその腫瘍細胞の表面で発現されるようにすることを含む、腫瘍を処置する方法をも企図する。本発明の方法は、*in vivo*でも*ex vivo*でも適用可能である。したがって、本発明は、上記核酸分子を含む様々な核酸分子を対象内部に直接注入することによって、腫瘍を処置することを企図する。しかし、該方法は、腫瘍細胞中に当該核酸分子を導入し、CD40Lの非切断性機能的変異体が該細胞の表面で発現されるようにする工程を少なくとも含んでいれば、これ以外の任意の付加的な工程を含んでもよい。腫瘍細胞においてかかる変異体を発現させることにより、免疫系が調節され、該腫瘍の縮小または消失をもたらす。

[0068] 好ましい態様において、上記方法は、最初に対象から腫瘍細胞を採取し、次に、上記変異体が該細胞の表面で発現されるよう、採取された該細胞中に、上記核酸分子を導入する工程、および、細胞表面にかかる変異体を発現している該細胞を、該対象中に戻す工程をさらに含んでいる。対象から採取した細胞を体外で処理した後、再び同対象に戻す方法は、当該技術分野でよく知られている。

本発明の上記方法は、リンパ腫、白血病などの悪性腫瘍を包含する種々の腫瘍に適用できる。好ましい態様において、該腫瘍はヒト腫瘍であり、好ましくは、単球、マクロファージ、B細胞、ランゲルハンス細胞、交互嵌入細胞、濾胞樹状細胞、クッパー細胞等の、ヒト免疫系の抗原提示細胞由来の腫瘍である。別の好ましい態様では、ヒト腫瘍は、AML、AMML、ALL、CML、CMML、CLLなどの白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、ならびに中皮腫および類表皮

癌肺癌などの腫瘍である。

本発明の上記方法に有用なベクターおよび核酸構築物は上述のとおりであり、例えば、プロモーターが上記核酸分子と作動可能に連結し、これがさらにポリアデニル化配列と作動可能に連結している構築物を包含する。該方法は、本明細書に記載の核酸構築物、および遺伝子治療ベクターを含むベクターの使用を企図する。さらに本発明は、CD40Lの非切断性機能的変異体をコードする核酸分子自体の使用を企図する。この核酸分子は、プロモーターおよびその他の調節配列を含んでいても含んでいなくてもよい。

- [0069] 本発明の好ましい態様では、細胞は、対象内部の腫瘍床と呼ばれる少なくとも一つの限局された部位に位置する。この腫瘍床は典型的には、腫瘍組織や腫瘍細胞を、これらに付随する幾つかの他の細胞と共に含んでいる。本発明は、上記変異体が腫瘍細胞表面で発現され、それにより該細胞が免疫系に認識されるようにするため、該変異体をコードする核酸分子を対象の腫瘍床に注入することにより、腫瘍床に存在するこうした腫瘍を処置する方法を企図する。かかる核酸分子は、核酸構築物または遺伝子治療ベクターなどのベクターの一部として存在し得る。好ましい態様では、上記腫瘍細胞は、細胞表面にCD40を発現している。

本発明の処置方法で使用する種々の遺伝子治療ベクターは、細胞に直接感染できるベクターを包含する。かかるベクターは多くの文献に記載されており、本発明に記載した方法に容易に適用できる。

- [0070] 本発明の処置方法には、Raper, S. E. et al., Ann. Surg., 223: 116 (1996)、Lu, L. et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 22: 61 (1996)、Koc, O. N. et al., Semin. Oncol., 23: 46 (1996)、Fisher, L. J. et al., Curr. Opin. Neurobiol., 4: 735 (1994)、Goldspiel, B. R. et al., Clin. Pharm., 12: 488 (1993)、Danko, I. et al., Vaccine, 12: 1499 (1994)、Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 4523 (1993)、Davis, H. L. et al., Hum. Gene Ther., 4: 151 (1993)、Sugaya, S. et al., Hum. Gene Ther., 7: 223 (1996)、Prentice, H. et al., J. Mol. Cell Cardiol., 28: 133 (1996)、Soubrane, C. et al., Eur. J. Cancer, 32A: 691 (1996)、Kass-Eisler, A. et al., ann. N. Y. Acad. Sci., 772: 232 (1995)、DeMatteo, R. P. et al., Ann. Surg., 222: 229 (1995)、Addison,

C. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92: 8522 (1995)、Hengge, U. R. et al., J. Clin. Invest., 97: 2911 (1996)、Felgner, P. L. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 772: 126 (1995)、Furth, P. A., Hybridoma, 14: 149 (1995)、Yovandich, J. et AL., Hum. Gene Ther., 6: 603 (1995)、Evans, C. H. et al., Hum. Gene Ther., 7: 1261などに記載の方法を包含する任意のタイプの遺伝子治療の手法を用いることができる。

[0071] 本発明はまた、本発明の変異体、核酸分子、ベクターおよび形質転換細胞からなる群から選択される成分を含む医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物における好ましい成分は、ベクターおよび/または形質転換細胞であるが、裸の核酸分子を含むことができる。かかる成分は単独で使用してもよいが、一般には薬学的に許容できる担体と共に使用される。そのような担体としては、水、生理食塩水、グルコース、ヒトアルブミン等の水性等張溶液が好ましい。更に、薬学的に通常使用される添加剤、保存剤、防腐剤、香料、アジュバント等を添加することもできる。そのように調製した医薬組成物は、治療すべき疾病に依存して適切な投与形態、投与経路によって投与することができる。

[0072] 投与形態としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル、錠剤、顆粒剤、注射剤、インプラント、軟膏等が挙げられるが、これらに限定されない。注射剤やインプラントなど、直接体内に注入または埋入する組成物は、好適には適切な滅菌処理を施す。本発明の医薬組成物がベクターを含む場合は、通常成人一人当たり1回に 10^8 個のベクターを、該組成物が形質転換細胞の場合は、通常成人一人当たり1回に 10^9 個の細胞を投与するのがそれぞれ好ましいが、かかる用量は疾病の状態や標的細胞・組織の性質によって適宜変更することができる。投与回数は、1日1回～数回でよく、投与期間は1日～数ヶ月以上にわたってもよく、1回～数回の投与を1クールとして、長期にわたって断続的に複数のクールを投与してもよい。投与経路は、特に限定されないが、非経腸投与が好ましく、このうち特に好ましいのは、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下などへの注射、点滴注入、インプラントの埋入である。

[0073] 本発明の医薬組成物は、CD40陽性腫瘍、またはCD40-CD40リガンド相互作用の異常に起因する疾患またはCD40-CD40リガンド相互作用を強化することにより予防、治療効果が期待される疾患の処置に好適に用いることができる。CD40陽性

腫瘍の例としては、リンパ腫、AML、AMML、ALL、CML、CMML、CLLなどの白血病、多発性骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌などの腫瘍が、CD40-CD40リガンド相互作用の異常に起因する疾患の例としては、X連鎖型高IgM症候群、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ、自己免疫性血管炎などの自己免疫性疾患およびアテローム性動脈硬化などが挙げられる。また、CD40-CD40リガンド相互作用を強化することにより予防、治療効果が期待される疾患の例としては、HIVやHTLV-1、CMVなどのウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症などの感染症などが挙げられる。

- [0074] 本発明の医薬組成物は、CD40-CD40リガンド相互作用の強化を介して免疫力を増強することができるので、一般的な免疫増強剤として用いることもできる。例えば、該医薬組成物を疾患に特異的なワクチンとともに対象に投与することにより、ワクチンの効果を増強することが可能となる。本発明の医薬組成物のかかる使用は、免疫機能が低下している対象、例えばAIDSなどの免疫機能の低下を伴う疾患に罹患している個体、老齢個体、被ストレス個体などにとりわけ有効である。

実施例

- [0075] 本発明を、以下の実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1:野生型ヒトCD40L(hCD40L)のクローニング

GenBank受託番号L07414として登録されたhCD40LのcDNAの塩基配列情報をもとに、下記のプライマーを作製した。

センスプライマー:

cggaattcagcatgatcgaaacatacaaccaaac (#1795、配列番号13)、

アンチセンスプライマー:

cgggatacctcagagtttgagtaagccaaaggacg (#1796、配列番号14)

ヒト末梢血から単核球をリンホセパール(IBL社製、カタログ番号23010)に重層遠心法で採取し、RPMI1640培地(シグマ社製)に10%牛胎児血清(JRH社製)を添加した培地にて、OKT3抗体(ヤンセンファーマ社製、薬品コード6399409A1029)とともに

に48時間インキュベーションし、活性化させた。該活性化細胞から定法に従いRNAを抽出し、これをテンプレートとして、以下の条件でRT-PCRを行った。

- [0076] (1) 90. 4°C、3分
(2) 94. 0°C、1分
(3) 60. 4°C、1分
(4) 72. 0°C、1分
(5) 72. 0°C、3分

(2)～(4)の工程は35サイクル繰り返し、工程(5)の後に得られたPCR産物を4°Cで保存した。

- [0077] 次に、該産物をEcoRIおよびBamHIで消化し、配列番号11の核酸配列を有する801bpの野生型hCD40L核酸断片を得た。得られたhCD40L断片7 μ lをpGEM-Tベクター(Promega社製、米国特許第4,766,072号参照)1 μ l、10×T4DNAリガーゼバッファー1 μ lおよびT4DNAリガーゼ1 μ l(合計10 μ l)からなる混合液を、16°Cで30分間インキュベートすることにより該断片をプラスミドpGEM-Tにクローニングし、hCD40LのcDNAクローン(pGEM-T-hCD40L(図1中の「クローニングベクター」に該当))を得た。得られたプラスミドを、製造者のプロトコルに従いTOP10細胞に導入し、上記断片が所望の位置および方向で挿入されたことを確認した。

- [0078] 実施例2:発現ベクターへのhCD40Lのクローニング

プラスミドpCAccAng1(Yamauchi et al., J. Gene Med., 5(11):994-1004, 2003参照)のEcoRI/BglIIサイトに上記で得たpGEM-T-hCD40LのEcoRI/BamHI断片をクローニングし、発現ベクターpCAcchCD40L(図1中の「発現ベクター」に該当)を得た。すなわち、50 μ lのpGEM-T-hCD40Lを、8 μ lの10×NEBバッファー、8 μ lの10×BSA、5 μ lのEcoRI、5 μ lのBamHIおよび4 μ lの蒸留水とともに、および2 μ l(2 μ gに相当)のpCAccAng1を、2 μ lの10×NEBバッファー、2 μ lの10×BSA、1 μ lのEcoRI、1 μ lのBglIIおよび12 μ lの2回蒸留水とともに、それぞれインキュベートした後、CIAPで処理し、hCD40LのEcoRI/BamHI断片(約800bp)およびpCAccAng1のpCAcc/EcoRI/BglII/CIAP断片(約4.7kb)を切り出し、それぞれ10 μ lのTEに溶解した。そして、定法に従い、上記EcoRI/BamHI断片を含む液6 μ l、

pCAcc/EcoRI/BglII/CIAP断片を含む液2 μ l、10×T4DNAリガーゼバッファー1 μ lおよびT4DNAリガーゼ1 μ l(合計10 μ l)からなる混合液を、16℃で3時間インキュベートすることによりpCAcchCD40L(約5.5kb、図1)を得た。得られたベクターを、製造者のプロトコルに従いTOP10細胞に導入し、EcoRI/BamHI断片が所望の位置および方向で挿入されたことを確認した。

[0079] 実施例3:置換型核酸分子hCD40LM1～3のクローニング

本発明のヒトCD40L変異体の例である、hCD40LM1～4は、それぞれ配列番号1～4のアミノ酸配列を有し、野生型hCD40Lと比較すると、hCD40LM1は、Gln114がProに、Lys115がArgに、Gln118がGluに、Asn119がAspに、hCD40LM2は、Gln114がProに、Lys115がArgに、Asp117がGluに、Pro120がSerに、hCD40LM3は、Gln114がProに、Lys115がArgに、Asp117がGluに、Gln118がGluに、Asn119がAspに、Pro120がSerに、そしてhCD40LM4は、Glu112がLysに、Met113がIleにそれぞれ置換されている。上記変異体は、野生型hCD40Lをコードする核酸分子に部位特異的変異導入を行うことにより得た。変異導入部位は、表1の通りである。

[0080] [表1]

本発明の変異体の変異導入部位

塩基番号	hCD40L	hCD40LM1	hCD40LM2	hCD40LM3	hCD40LM4
343	G	G	G	G	A
348	G	G	G	G	A
350	A	C	C	C	A
351	A	T	T	T	A
353	A	G	G	G	A
354	A	G	G	G	A
360	T	T	G	G	T
361	C	G	C	G	C
364	A	G	A	G	A
367	C	C	T	T	C

(変異させた塩基を下線付きの太字で示す。)

なお、アミノ酸および塩基の上記置換箇所は、図2中太字で示してある。

上記の置換を有する変異核酸分子のクローニングは、実施例1で得たpGEM-T-hCD40Lをテンプレートにした、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるPCR法と、それに引き続くTAクローニングにより行った。

まず、置換型核酸分子hCD40LM1のクローニングについて示す。変異導入は、該核酸分子の前半部分(配列番号1の1～356)および後半部分(同349～801)にそれぞれ対応する、以下のプライマーの組を用いたPCR法によって達成した(図3参照)。

[0081] 前半部分

センスプライマー:

cggaattcagcatgatcgaaacatacaaccaaac(#1795、配列番号13)

アンチセンスプライマー:

tgccctagggcatttcaaagctgttttcttt(#1998、配列番号15)

後半部分

センスプライマー:

tgccctaggggtgatgaggatcctcaaattgcgg(#1993、配列番号16)

アンチセンスプライマー:

cgggatacctcagagtttgagtaagccaaaggacg(#1796、配列番号14)

[0082] PCRは、いずれも以下の条件で行った。

温度条件

(1) 90. 4℃、3分

(2) 94. 0℃、30秒

(3) 60. 4℃、30秒

(4) 72. 0℃、1分

(5) 72. 0℃、3分

工程(1)～(5)の順に行い、(2)～(4)の工程は35サイクル繰り返し、工程(5)の後に得られたPCR産物を4℃で保存した。

[0083] [表2]

反応液の組成

	容量 (μ l)
テンプレート	0.1
10×PCRバッファー	2.0
25mM MgCl ₂	1.6
2.5mM dNTPs	1.6
25 μ Mセンスプライマー	0.5
25 μ Mアンチセンスプライマー	0.5
TAKARA Ex Taq	0.1
2回蒸留水	13.6
合計	20.0

得られた前半部分の断片(hCD40LM1-1)および後半部分の断片(hCD40LM1-2)を、それぞれ、実施例1と同様にしてTAクローニングした。こうして、置換型核酸分子hCD40LM1の前半部分を含むクローニングベクターpGEM-T-hCD40LM1-1および後半部分を含むクローニングベクターpGEM-T-hCD40LM1-2をそれぞれ得た。

- [0084] 置換型核酸分子hCD40LM2およびhCD40LM3の前半部分および後半部分のクローニングベクター(hCD40LM2前半部分:pGEM-T-hCD40LM2-1、hCD40LM2後半部分pGEM-T-hCD40LM2-2、hCD40LM3前半部分:pGEM-T-hCD40LM3-1、hCD40LM3後半部分:pGEM-T-hCD40LM3-2)は、後半部分のセンスプライマーが、hCD40LM2の場合はtgccctaggggtgagcagaattctcaaattgcggcac(#1995、配列番号17)、およびhCD40LM3の場合はtgccctaggggtgaggaggattctcaaattgcggca(#1997、配列番号18)であること以外は、hCD40LM1と同様にして得た(図3参照)。

[0085] 実施例4:発現ベクターへのhCD40LM1～3のクローニング

実施例2と同様の方法で、図4に示すように、置換型核酸分子hCD40LM1～3の前半部分(EcoRI/AvrII)、後半部分(AvrII/BamHI)および発現ベクターpCAccの断片(EcoRI/BglII/CIAP)を切り出し、ライゲーションさせることにより、全長hCD40LM1(配列番号7)、全長hCD40LM2(配列番号8)または全長hCD40LM3(配列番号9)をそれぞれ含む発現ベクターpCAcc-hCD40LM1、pCAcc-hCD40LM2またはpCAcc-hCD40LM3を得た。得られたベクターは、製造者のプロトコルに従いTOP10

細胞に導入し、各置換型核酸分子が所望の位置および方向で挿入されたことを確認した。

[0086] 実施例5:置換型核酸分子hCD40LM4のクローニング

置換型核酸分子hCD40LM4の変異導入は、当該核酸分子の前半部分(配列番号10の1～360)および後半部分(同330～801)を、それぞれに対応する以下のプライマーの組を用いたPCR法により増幅した後、得られた両部分を含む混合物をテンプレートに、実施例1で用いたプライマーの組を用いて再度PCR法を行う、2段階のPCRにより達成した。こうして1段階目のPCRで得られた前半部分および後半部分を、2段階目のPCRにおいてつなぎ合わせ、hCD40Lのコード領域全長に対応する置換型核酸分子hCD40LM4(配列番号10)を得ることができる。

[0087] 前半部分

センスプライマー:

cggaattcagcatgatcgaaacatacaaccaaac (#1795、配列番号13)

アンチセンスプライマー:

atcacctttttgtattttaagctgttttc (#1984、配列番号19)

後半部分

センスプライマー:

gaaaacagctttaaaatacaaaaaggtgat (#1983、配列番号20)

アンチセンスプライマー:

cgggatcctcagagtttgagtaagccaaaggacg (#1796、配列番号14)

[0088] PCRの条件を以下に示す。

温度条件

(1) 90. 4℃、3分

(2) 94. 0℃、30秒

(3) 60. 4℃、30秒

(4) 72. 0℃、1分

(5) 72. 0℃、3分

工程(1)～(5)の順に行い、(2)～(4)の工程は35サイクル繰り返し、工程(5)の後

に得られたPCR産物を4℃で保存した。温度条件は、1段階目、2段階目とも同じである。

[0089] [表3]

1段階目のPCRの反応液の組成

	容量 (μ l)
テンプレート	0.1
10×PCRバッファー	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
25 μ Mセンスプライマー	0.5
25 μ Mアンチセンスプライマー	0.5
TAKARA Ex Taq	0.1
2回蒸留水	13.6
合計	20.0

[0090] [表4]

2段階目のPCRの反応液の組成

	容量 (μ l)
前半部分	1.0
後半部分	1.0
10×PCRバッファー	10.0
25 mM $MgCl_2$	8.0
2.5 mM dNTPs	8.0
25 μ Mセンスプライマー	2.5
25 μ Mアンチセンスプライマー	2.5
TAKARA Ex Taq	1.0
2回蒸留水	66.0
合計	100.0

こうして、得られた断片を、実施例1と同様にしてTAクローニングし、全長変異核酸分子hCD40LM4を含むクローニングベクターpGEM-T-hCD40LM4を得た。得られたベクターは、製造者のプロトコルに従いTOP10細胞に導入し、該変異核酸分子が所望の位置および方向で挿入されたことを確認した。

[0091] 実施例6:発現ベクターへのhCD40LM4のクローニング

実施例2と同様の方法で、図5に示すように、変異核酸分子hCD40LM4 (EcoRI/BamHI) および発現ベクターpCAccの断片 (EcoRI/BglII/CIAP) を切り出し、ライゲーションさせることにより、変異核酸分子hCD40LM4を含む発現ベクターpCAcchCD40LM4を得た。得られたベクターは、製造者のプロトコルに従いTOP10細胞に導入し、該変異核酸分子が所望の位置および方向で挿入されたことを確認した。

[0092] 実施例7:欠失型変異体hCD40LD1のクローニング

欠失型の非切断性hCD40L変異体は、非特許文献4に記載のとおりに作製した。すなわち、野生型hCD40LのcDNA (実施例1参照) を、M13mp18ベクターのEcoRI制限サイトにクローニングし、Sculptor in vitro system (Amersham製) で、オリゴヌクレオチドtatgacatgtggcgctgttt-tctttcttccgを用いて、部位特異的に変異導入した。こうして、野生型hCD40LのPhe111~Ala123に相当する領域を欠く欠失型核酸分子hCD40LD1 (図2参照) を得た。得られた核酸分子は、実施例6と同様に発現ベクターpCAccに組込んだ。

[0093] 実施例8:野生型および変異型hCD40Lを含むコスミドの作製

野生型のpCAcchCD40L、および、変異型のpCAcchCD40LM1、pCAcchCD40LM2、pCAcchCD40LM3、pCAcchCD40LM4、pCAcchCD40LD1のそれぞれから、CAプロモーター、野生型もしくは変異型hCD40LのcDNA、およびポリA付加シグナルを含む発現カセットをClaIダイジェストで切り出し、ClaI断片CAcchCD40L/ClaI、CAcchCD40LM1/ClaI、CAcchCD40LM2/ClaIおよびCAcchCD40LM3/ClaI、CAcchCD40LM4/ClaI、CAcchCD40LD1/ClaIをそれぞれ得た。次に、CAcchCD40L/ClaI (野生型) を、コスミドpWEAx-F/RGD (約39401bp、Hum. Gene Ther., 13(5): 613-626, 2002に記載) のClaIサイトにクローニングし、コスミドpAxCAhCD40L-F/RGDを得た。

[0094] また、変異型のCAcchCD40LM1、CAcchCD40LM2、CAcchCD40LM3、CAcchCD40LM4、CAcchCD40LD1の発現カセット(ClaIフラグメント)は、コスミドpAx3にクローニングし、それぞれコスミドpAxCAhCD40LM1、pAxCAhCD40LM2、

pAxCAhCD40LM3、pAxCAhCD40LM4、pAxCAhCD40LD1を得た。なお、コスミド pAx3は、pWEAx-F/RGDから派生したプラスミドであり、pWEAx-F/RGDのアデノウイルスゲノム部分の左端がnt34～455までであるところ、pAx3コスミドではnt1～357までとなっている。図6に、コスミドpWEAx-F/RGDおよびpAx3の模式図を示す。具体的には、コスミドpAx3は、コスミドpAdex1（東京大学医科学研究所、齋藤泉教授から入手。Saito, I and Stark, G.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 8664-8668, 1986参照）を改変して作製し、pAdex1の右端と左端を全長とし、左端はnt1～357であり、右端のファイバーのHIループにはF/RGD変異が導入してある。本コスミドのバックボーンにはコスミドpWE15を用いており、F/RGD変異(CDCRGDCFC)を含むHIループ部分(166bp、配列番号21)は、pWEAx-F/RGDの場合と同様に、制限酵素サイトSacII、AseI、XhoI、BamHI、MluI、SalIと連なっている。発現カセットであるClaI断片をコスミドのClaIサイトにクローニングした場合、CAプロモーターの方向が、アデノウイルスゲノムに対して、右方向または左方向であるものが作られ得るが、本実施例においては、すべて左方向のものをを用いた(図6参照)。

[0095] 実施例9: 組み換えアデノウイルスの作成

コスミドpAxCAhCD40L-F/RGDのアデノウイルスゲノムの右端を、PacIダイジェストで切断した。また、変異型のコスミドpAxCAhCD40LM1、pAxCAhCD40LM2、pAxCAhCD40LM3、pAxCAhCD40LM4、pAxCAhCD40LD1に関しては、アデノウイルスゲノムの左端と右端の両方をPacIダイジェストで切断した。得られた断片を、それぞれ、293細胞にトランスフェクトし、Yoshida et al., Human Gene Therapy, 9(17): 2503-2515, 1998などに記載された通常の方法に従って、野生型のhCD40Lを有する組み換えアデノウイルスAxCAhCD40L-F/RGD、ならびに、変異型のhCD40Lを持つ組み換えアデノウイルスAxCAhCD40LM1、AxCAhCD40LM2、AxCAhCD40LM3、AxCAhCD40LM4、AxCAhCD40LD1をそれぞれ樹立した。ただし、本実施例では、上記Yoshida et al.に記載されたDNA-TPCは使わず、コスミドDNAだけを293細胞にトランスフェクトして、アデノウイルスを作製した。

[0096] 実施例10: 野生型または変異型hCD40Lを発現する組み換えレトロウイルスベクターの作製

まず、野生型または変異型核酸を含む、レトロウイルス発現ベクターのプラスミドDNAを作製した。レトロウイルス発現プラスミドpRx1bsr(日本遺伝子治療学会編集:「遺伝子治療開発研究ハンドブック」、第3章「導入技術」、pp332-341、エヌ・ティー・エス、1999に記載)は、Wakimoto et al., Jp. J. Cancer Res., 88: 296-305, 1997に記載されたpRxプラスミドから派生したものであり、プラスチジン耐性マーカー遺伝子を有している。プラスミドpRx1bsrの模式図を図7に示す。

野生型hCD40L核酸を含むレトロウイルス発現プラスミド(pRx1hCD40L)は、pGEM-T-hCD40LからEcoRI/BamHIダイジェストでhCD40Lを切り出し、得られたhCD40LのEcoRI/BamHIフラグメント、pRx1bsrのサイトメガロウイルスエンハンサーCMVとレトロウイルスプロモーターdLTRを含むEcoRI/XhoIフラグメント(nt1~2057、2057bp)、およびpRx1bsrのIRES-bsrを含むBamHI/XhoIフラグメント(nt2087~6606、4519bp)からなる合計3つのフラグメントをライゲーションすることによって作製した。

[0097] 変異型核酸分子hCD40LM4を含むレトロウイルス発現プラスミド(pRx1hCD40LM4bsr)は、実施例5で作製したクローニングベクターpGEM-T-hCD40LM4からEcoRI/BamHIダイジェストで得たhCD40LM4のEcoRI/BamHIフラグメントを用いた以外は上記と同様にして作製した。

変異型核酸分子hCD40LM1を含むレトロウイルス発現プラスミド(pRx1hCD40LM1bsr)は、実施例3で作製したクローニングベクターpGEM-T-hCD40LM1-1からEcoRI/AvrIIダイジェストで得たhCD40LM1の前半部分(hCD40LM1-1/EcoRI/AvrII)、およびpGEM-T-hCD40LM1-2からAvrII/NotIダイジェストで得たhCD40LM1の後半部分(hCD40LM1-2/AvrII/NotI)を、pRx1bsrのEcoRI/NotIサイトにクローニングすることによって作製した。

[0098] 変異型核酸分子hCD40LM2を含むレトロウイルス発現プラスミド(pRx1hCD40LM2bsr)は、上記と同様に、実施例3で作製したクローニングベクターpGEM-T-hCD40LM2-1からEcoRI/AvrIIダイジェストで得たhCD40LM2の前半部分(hCD40LM2-1/EcoRI/AvrII)、およびpGEM-T-hCD40LM2-2からAvrII/SacIIダイジェストで得たhCD40LM2の後半部分(hCD40LM2-2/AvrII/SacII)を、pRx1bsrのEcoRI/SacIIサイトにクローニングすることによって作製した。

変異型核酸分子hCD40LM3を含むレトロウイルス発現プラスミド(pRx1hCD40LM3bsr)は、上記と同様に、実施例3で作製したクローニングベクターpGEM-T-hCD40LM3-1からEcoRI/AvrIIダイジェストで得たhCD40LM3の前半部分(hCD40LM3-1/EcoRI/AvrII)、pGEM-T-hCD40LM3-2からAvrII/BamHIダイジェストで得たhCD40LM3の後半部分(hCD40LM3-2/AvrII/BamHI)、pRx1bsrのサイトメガロウイルスエンハンサー(CMV)とレトロウイルスプロモーターdLTRを含むEcoRI/XhoIフラグメント(nt1~2057、2057bp)、および、pRx1bsrのIRES-bsrを含むBamHI/XhoIフラグメント(nt2087~6606、4519bp)の合計4つの部分をライゲーションすることによって作製した。

- [0099] 組み換えレトロウイルスの作製と細胞株の樹立は、前記「遺伝子治療ハンドブック」などに記載されている方法に従って行った。すなわち、pRx1hCD40Lbsr、pRx1hCD40LM1bsr、pRx1hCD40LM2bsr、pRx1hCD40LM3bsrおよびpRx1hCD40LM4bsrをエクトロピックレトロウイルス産生細胞であるBOSC23にそれぞれリポフェクションにより導入し、得られたエクトロピックレトロウイルスを含む培養上清を用いて、 ϕ CRIP-P131細胞を培養し、アンフトロピックレトロウイルスを産生する ϕ CRIP-P131細胞を、野生型および変異型hCD40Lのそれぞれについて得た。さらに、得られた各 ϕ CRIP-P131細胞の培養上清を用いてヒト神経膠腫細胞U251を培養することにより、U251細胞にアンフトロピックレトロウイルスを感染させ、ブラストサイジンによる薬剤選択を行うことにより、hCD40Lの野生型および4種の変異型をそれぞれ安定に発現するU251細胞の亜株を樹立し、それぞれ、U251/CD40L、U251/CD40LM1、U251/CD40LM2、U251/CD40LM3およびU251/CD40LM4とした。

[0100] 実施例11:野生型および変異型hCD40Lの細胞膜上での発現

レトロウイルス感染により作製した野生型hCD40Lおよび変異型hCD40LM1~4を発現するトランスフェクタントが、細胞膜上にそれぞれの遺伝子産物を実際に発現しているかを、フローサイトメトリー法にて確認した。すなわち、各トランスフェクタントを、選択薬剤ブラストサイジンの存在下で培養後、トリプシン-EDTA溶液5mlにより5分間室温で処理し、培養フラスコより剥離、回収した。回収した細胞は、10%牛胎児

血清加DMEM培地を等量添加し、1500rpm、5分の遠心により洗浄した。細胞ペレットを再び培地で攪拌後、 5×10^4 個の細胞を各チューブに入れ、陰性コントロールとしてフィコエリスリン(PE)標識マウスIgG1(BD社製)を、陽性コントロールとしてPE標識抗ヒトCD40L抗体TRAP-1(BD社製)をそれぞれ10 μ l添加し、4°Cで45分間反応させた。3回遠心洗浄後、リン酸緩衝食塩水PBSにヨウ化プロピジウム100ngを添加し、フローサイトメーター(BD社製)にて解析した。その結果、図8に示すように、野生型ならびに4種の変異型トランスフェクタントの細胞膜上に機能的なhCD40Lの発現を確認した。

[0101] 実施例12:変異型hCD40Lによる可溶化体産生の定量

実施例10で作製したトランスフェクタント(U251/CD40L、U251/CD40LM1、U251/CD40LM2、U251/CD40LM3およびU251/CD40LM4)が可溶化体hCD40Lを産生するか否かについて解析した。各トランスフェクタントを 3×10^4 個/mlまたは 1×10^4 個/mlの細胞濃度で、2日間37°Cで培養した。細胞培養液を回収し2000rpmで10分間遠心した後、0.45 μ mのフィルターで濾過し、培養上清とした。U251/CD40L、U251/CD40LM1およびU251/CD40LM2については、3 μ MのMMP阻害剤(カルビオケム社製、GM 6001)または同量のDMSOのいずれかを添加し、可溶化体産生に与えるMMPの影響を評価した。

[0102] 可溶化体hCD40Lの定量はKato et al., J. Clin. Invest., 104: 947-955, 1999に記載されたサンドイッチELISA法にて測定した。まず、ELISA用96穴プレート(Coster社製)に、5 μ g/mlの抗ヒトCD40L抗体TRAP-1を50 μ lずつ添加し、4°Cで16時間反応させた。5%FCS加PBSを200 μ lずつ添加してブロッキングを行った後、培養上清サンプルを100 μ lずつ添加した。陽性コントロールとして、リコンビナントhCD40Lタンパク質(Alexis社製)を10ng/mlの濃度を開始点として2倍希釈液を順次作製し100 μ lずつ添加した。室温で2時間反応後、非付着成分を0.05%Tween加PBSで3回洗浄し、2 μ g/mlのビオチン標識抗ヒトCD40L抗体Bio-24-31(eBioscience社製)を100 μ lずつ添加し、室温で1時間反応させた。0.05%Tween加PBSで4回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(Amersham社製)500倍希釈液を50 μ lずつ添加し、室温で1時間反応させた。

[0103] 0.05% Tween加PBSで5回洗浄後、ペルオキシダーゼ発色基質溶液(BD社製)を100 μ lずつ添加し、室温で10分間反応させ、2N硫酸溶液で発色反応を停止した。発色溶液の吸光度450nmと対照吸光度570nmを96穴プレートリーダーで測定し、数値化した。測定値はコンピューターにて解析し、標準タンパク質の吸光度から標準曲線および近似式を計算し、培養上清サンプルの吸光度の値から可溶化体hCD40L値を計算した。その結果を図9と図10に示す。野生型hCD40Lのトランスフェクタントから産生される可溶化体量に比べて、4種の変異体のトランスフェクタントでは、いずれも可溶化体の産生が低下していた。また、野生型hCD40Lのトランスフェクタントから産生される可溶化体の量はMMP阻害剤によって顕著に減少した。

[0104] 実施例13:野生型および変異型hCD40LのCD40刺激活性

実施例2、4または7でクローニングした野生型核酸分子hCD40L、置換型核酸分子hCD40LM3または欠失型核酸分子hCD40LD1を、それぞれレトロウイルスベクターを用いてU251細胞に遺伝子導入し、ブラストサイジン薬剤存在下で2週間培養し耐性株を選択した。これらの細胞をさらに抗CD40L抗体と抗マウスIgG抗体結合磁気ビーズを室温で1時間反応させ、AutoMACS(ミルテニー社製)を用いてCD40L陽性細胞を選択分離した。各遺伝子導入細胞を培養用6穴プレートに 1×10^4 個培養後、ヒトB細胞性白血病細胞(B-CLL)またはB細胞性リンパ腫細胞(Ramos)を 5×10^4 個添加し37°Cで2日間培養した。培養後、白血病細胞またはリンパ腫細胞をそれぞれ回収しFITC標識抗CD95抗体、FITC標識抗CD54抗体、PE標識抗CD83抗体、PE標識抗CD80抗体(いずれもBD社製)を各5ml添加し4°Cで1時間反応後、FACSにて抗原の発現量を解析した。その結果、図11および12に示すとおり、野生型CD40Lと置換型CD40LM3はともに各抗原の発現を同程度誘導したが、欠失型CD40LD1の発現誘導効果は前二者に比べて低く、生物活性が弱まることが確認された。

[0105] 実施例14:野生型および変異型hCD40Lのトランスフェクタントの生体への移入およびその影響

野生型および変異型hCD40Lの生体内での分布および各組織に与える影響を調べた。野生型hCD40Lトランスフェクタント(U251CD40L)または変異型hCD40Lトラ

ンスフェクタント(U251CD40LM3)を、培養フラスコからトリプシン-EDTA溶液を用いて回収し、遠心洗浄後、10万個の細胞をマトリジェル(BD社製)100 μ lに懸濁した。BALB/cヌードマウス腹側部皮下に、 1×10^5 個の各トランスフェクタントを26G針付注射筒を用いて移植した。

移植トランスフェクタントの生着(腫瘍)は1週間後に確認された。図13に示すとおり、移植21日後に、野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスにおいて全身性の血管浮腫(エデーマ)が認められたが、変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスでは認められなかった。

また、図14に示すように、移植28日後において、野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスの前肢および後肢に関節炎の所見が認められたが、変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスでは認められなかった。

さらに、移植28日後には、野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスにおいて軽度の下痢症状が確認されたが、変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスでは認められなかった。

[0106] 移植35日後に、野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスおよび変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスの肝臓、腎臓の組織学的解析を行った。深麻酔下にて安楽死した移植マウスから肝臓および腎臓を摘出し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(和光純薬製)中に浸潤させ、4°Cで24時間、組織固定を行った。各固定組織はパラフィン包埋後、薄利切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。その結果、図15に示すように、野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスでは、肝臓実質内および胆管周縁部に多数の炎症細胞の浸潤を確認できた(図中の円で囲んだ部分を参照)。これに対して、変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスでは、図16に示すように、明らかな炎症細胞の浸潤を認めなかった。腎臓においても糸球体の萎縮・損傷が野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスでは認められたが、変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスでは認められなかった。

[0107] 移植35日後の野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスおよび変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスの末梢血中の可溶化体hCD40L値をELISAにて

測定した。各移植マウスの末梢血をエッペンドルフチューブに採取後、10000rpmで5分間遠心し、その上清を血漿成分として回収した。血漿を3倍に希釈後、実施例12に記載の方法に従って可溶化体hCD40L値を測定した。その結果、図17に示すように、野生型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスの血中可溶化体hCD40L値は840pg/mlであった。これに対して正常非移植マウスおよび変異型hCD40Lトランスフェクタント移植マウスの可溶化体hCD40L値は検出限界値(20pg/ml)以下であった。

[0108] 実施例15: アデノウイルスベクターによる野生型または変異型hCD40L遺伝子の導入

実施例9で作製したアデノウイルスベクターAxCAhCD40L-F/RGD、AxCAhCD40LM3およびAxCAhCD40LM4を用いてU251細胞に遺伝子導入を行い、細胞膜上での発現と可溶化体の産生を解析した。U251細胞 1×10^5 個に対して各アデノウイルスベクター溶液を添加して3日間培養した。アデノウイルス量は細胞1個あたり10および100粒子ユニット(pu)加えた。遺伝子導入細胞は培養上清液を回収した後、EDTA溶液で細胞を回収し、3回遠心洗浄後、CD40Lの発現をフローサイトメトリー法で解析した。その結果、図18に示すように、野生型、変異型ともに膜上にCD40Lの発現が確認された。また図19に示すように、培養上清中に産生される可溶化体も、変異型のCD40LM3およびCD40LM4で低下しており、これはレトロウイルスベクターで遺伝子導入した場合と同様であった(図9～10参照)。

請求の範囲

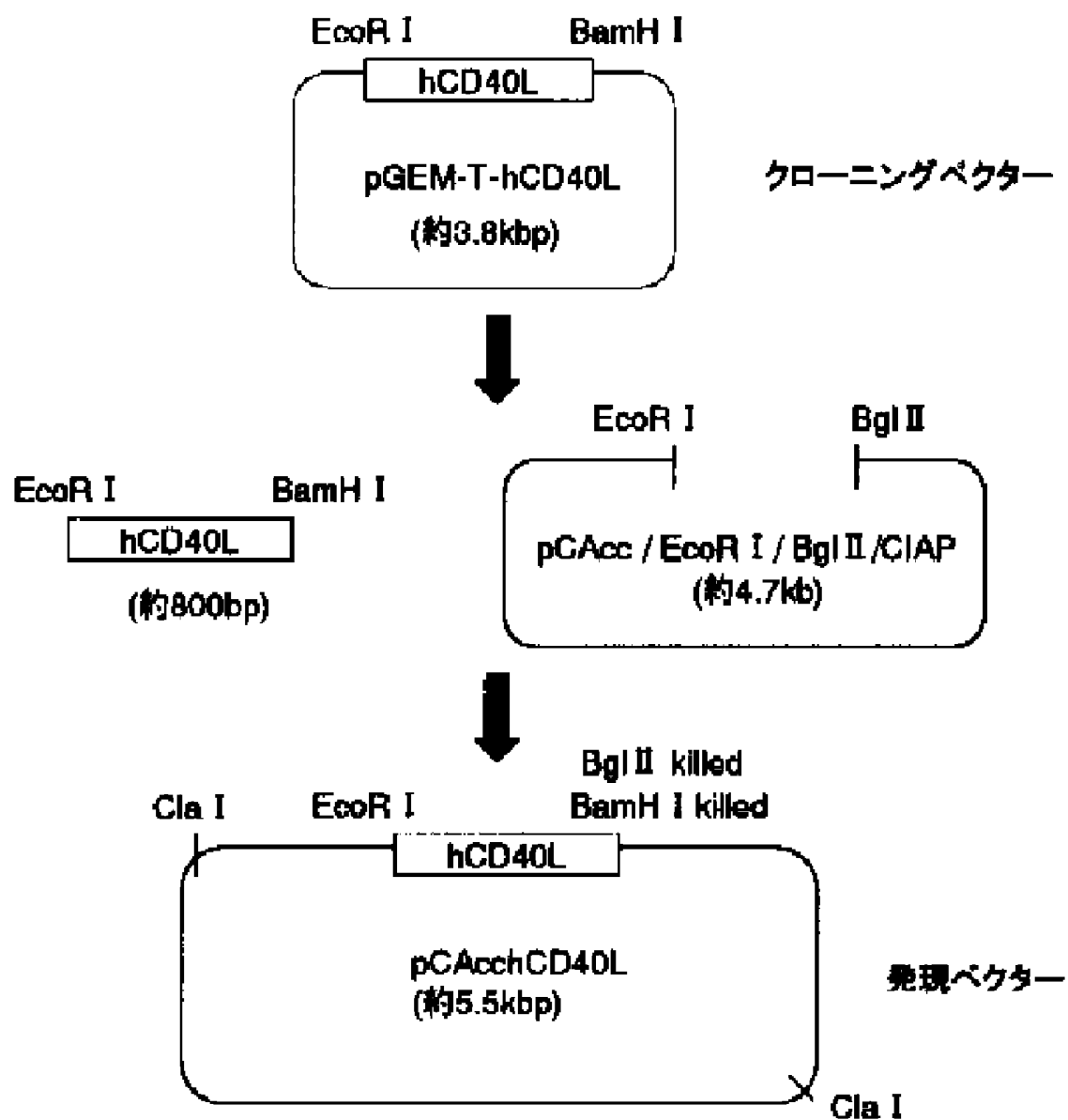
- [1] アミノ酸の置換を有することにより非切断性となっており、CD40刺激活性を有する、CD40リガンドの非切断性変異体。
- [2] アミノ酸の置換が、切断予想部位および/またはその近傍に位置する、請求項1に記載の変異体。
- [3] CD40リガンドがヒト由来である、請求項1または2に記載の変異体。
- [4] 配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列を有する変異体、および該アミノ酸配列に任意の変異を有するが、なお該変異体と同等の機能を有する変異体からなる群から選択される、請求項1～3のいずれかに記載の変異体。
- [5] 請求項1～4のいずれかに記載の変異体をコードする核酸配列またはその相補配列からなる核酸分子、その断片、およびこれらの核酸分子にストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸分子からなる群から選択される、核酸分子。
- [6] 配列番号7～10のいずれかの核酸配列を有する核酸分子、および該核酸配列に任意の変異を有するが、なお該核酸分子がコードする変異体と同等の機能を有する変異体をコードする核酸分子からなる群から選択される、請求項5に記載の核酸分子。
- [7] 請求項5または6に記載の核酸分子を含むベクター。
- [8] ウイルスベクターである、請求項7に記載のベクター。
- [9] ウイルスベクターがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルスおよびバキュロウイルスからなる群から選択される請求項8に記載のベクター。
- [10] ウイルスファイバーにRGD配列を含む、請求項8または9に記載のベクター。
- [11] 非ウイルスベクターである、請求項7に記載のベクター。
- [12] 非ウイルスベクターが、合成ウイルスまたはプラスミドベクターである、請求項11に記載のベクター。
- [13] 請求項7～12のいずれかに記載のベクターで形質転換した細胞。
- [14] 腫瘍細胞である、請求項13に記載の細胞。
- [15] ヒトに由来する、請求項13または14に記載の細胞。

- [16] 対象から採取した細胞を、請求項7～12のいずれかに記載のベクターで形質転換することを含む、請求項13～15のいずれかに記載の細胞の作製方法。
- [17] 請求項1～4のいずれかに記載の変異体、請求項5または6に記載の核酸分子、請求項7～12のいずれかに記載のベクター、および、請求項13～15のいずれかに記載の細胞からなる群から選択される成分を含む医薬組成物。
- [18] CD40リガンドの非切断性機能的変異体を、非ヒト動物の細胞上に発現させることにより、該細胞の免疫反応性を改変する方法。
- [19] CD40リガンドの非切断性機能的変異体を、生体から単離した細胞上に発現させることにより、該細胞の免疫反応性を改変する方法。
- [20] 変異体が、請求項1～4に記載の変異体である、請求項18または19に記載の方法。
- [21] 変異体が、該変異体をコードする核酸分子を含むベクターを介して細胞上に発現される、請求項18～20のいずれかに記載の方法。
- [22] ベクターがアデノウイルスベクターである、請求項21に記載の方法。
- [23] アデノウイルスベクターがウイルスファイバーにRGD配列を含む、請求項22に記載の方法。
- [24] 細胞が腫瘍細胞または正常細胞である、請求項18～23のいずれかに記載の方法。
- [25] 腫瘍細胞が、白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌由来細胞からなる群から選択され、正常細胞が、間質細胞、線維芽細胞、ストローマ細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞、リンパ球、単球、樹状細胞および多核白血球からなる群から選択される、請求項24に記載の方法。
- [26] 細胞がヒト細胞である、請求項19～25のいずれかに記載の方法。
- [27] 請求項1～4のいずれかに記載の変異体、請求項5または6に記載の核酸分子、請求項7～12のいずれかに記載のベクター、および請求項13～15のいずれかに記載の細胞からなる群から選択される成分の、CD40陽性腫瘍、CD40-CD40リガンド

相互作用の異常に起因する疾患、またはCD40－CD40リガンド相互作用を強化することにより予防および／もしくは治療が期待できる疾患を処置するための医薬、または、免疫増強剤の製造への使用。

- [28] 腫瘍が、白血病、リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、扁平上皮癌、肝細胞癌、胆管癌、中皮腫および類表皮癌からなる群から選択され、CD40－CD40リガンド相互作用の異常に起因する疾患が、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、自己免疫性血管炎、アテローム性動脈硬化症およびX連鎖型高IgM症候群からなる群から選択され、CD40－CD40リガンド相互作用を強化することにより予防および／または治療が期待できる疾患が、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症からなる群より選択される、請求項27に記載の使用。

[図1]



[図2]

切断予想部位

野生型hCD40L

gag acg aag aaa gaa aac agc ttt gaa atg caa aaa ggt gat cag aat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc
E T K K E N S F E M Q K G D Q N P Q I A A H V I S E A
104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130

変異型hCD40LM1

gag acg aag aaa gaa aac agc ttt gaa atg cct agg ggt gat gag gat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc
E T K K E N S F E M P R G D E D P Q I A A H V I S E A
114 115 118 119

変異型hCD40LM2

gag acg aag aaa gaa aac agc ttt gaa atg cct agg ggt gag cag aat tct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc
E T K K E N S F E M P R G E Q N S Q I A A H V I S E A
114 115 117 120

変異型hCD40LM3

gag acg aag aaa gaa aac agc ttt gaa atg cct agg ggt gag gag gat tct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc
E T K K E N S F E M P R G E E D S Q I A A H V I S E A
114 115 117 118 119 120

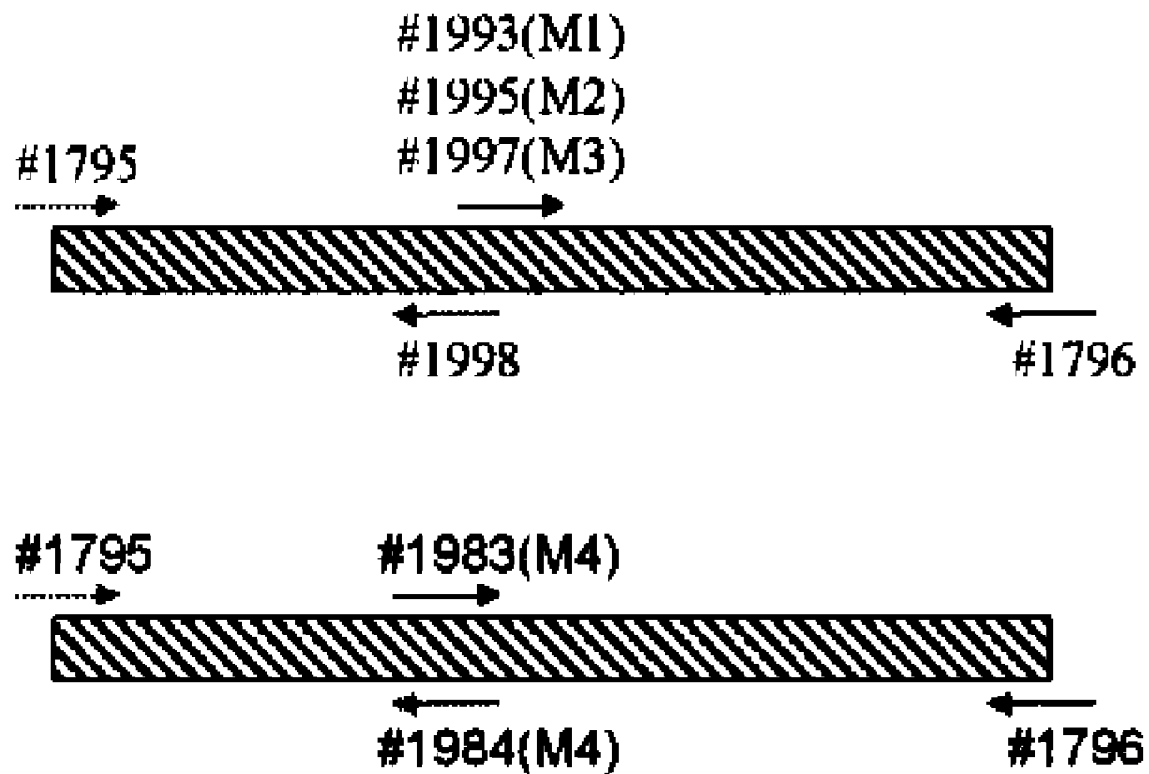
変異型hCD40LM4

gag acg aag aaa gaa aac agc ttt aaa ata caa aaa ggt gat cag aat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc
E T K K E N S F K I Q K G D Q N P Q I A A H V I S E A
112 113

変異型hCD40LD1

gag acg aag aaa gaa aac agc _____ gca cat gtc ata agt gag gcc
E T K K E N S _____ 13 aa A H V I S E A
104 105 106 107 108 109 110 124 125 126 127 128 129 130

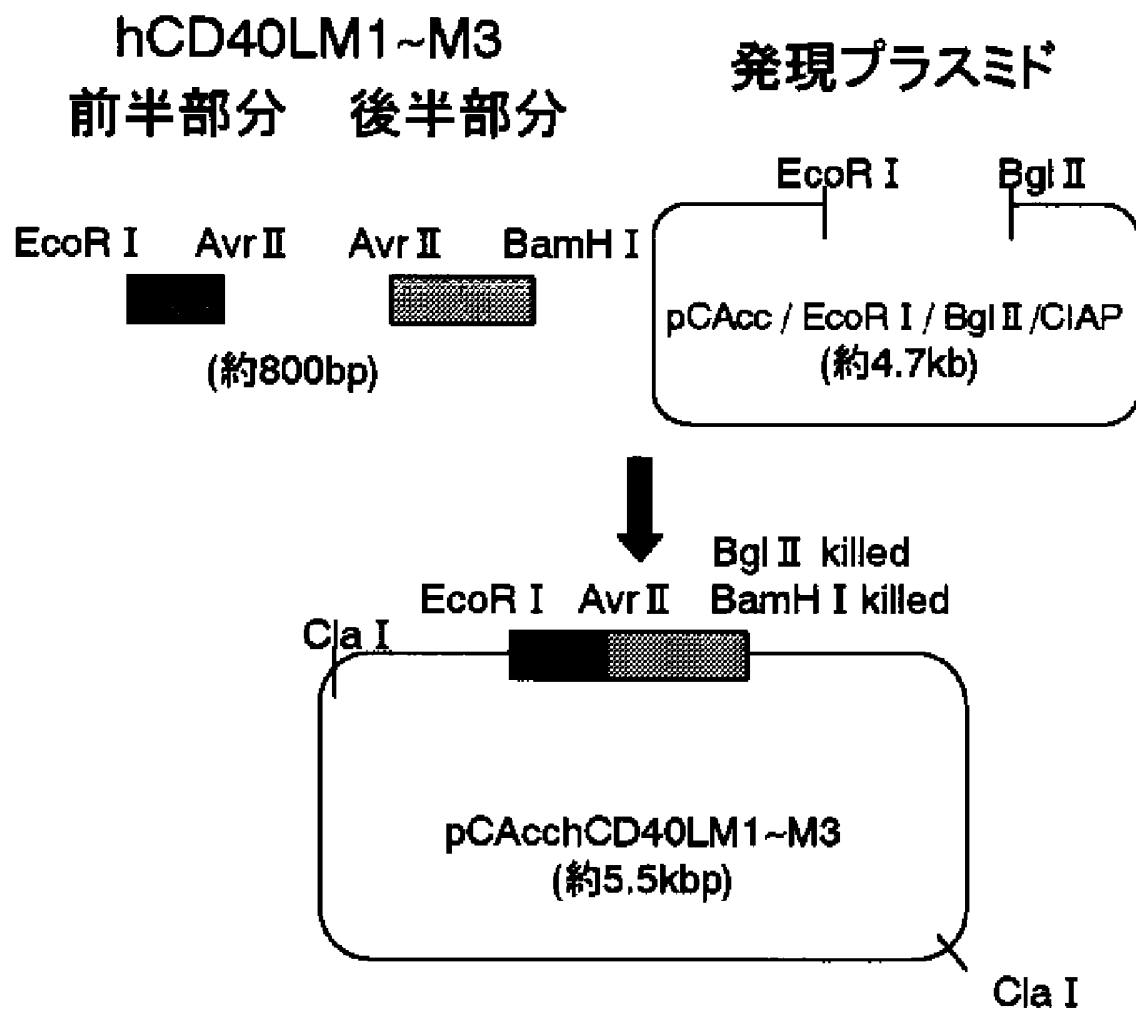
[図3]



使用したプライマーの組

	前半	後半
M1	#1795#1998	#1993#1796
M2	#1795#1998	#1995#1796
M3	#1795#1998	#1997#1796
M4	#1795#1984	#1983#1796

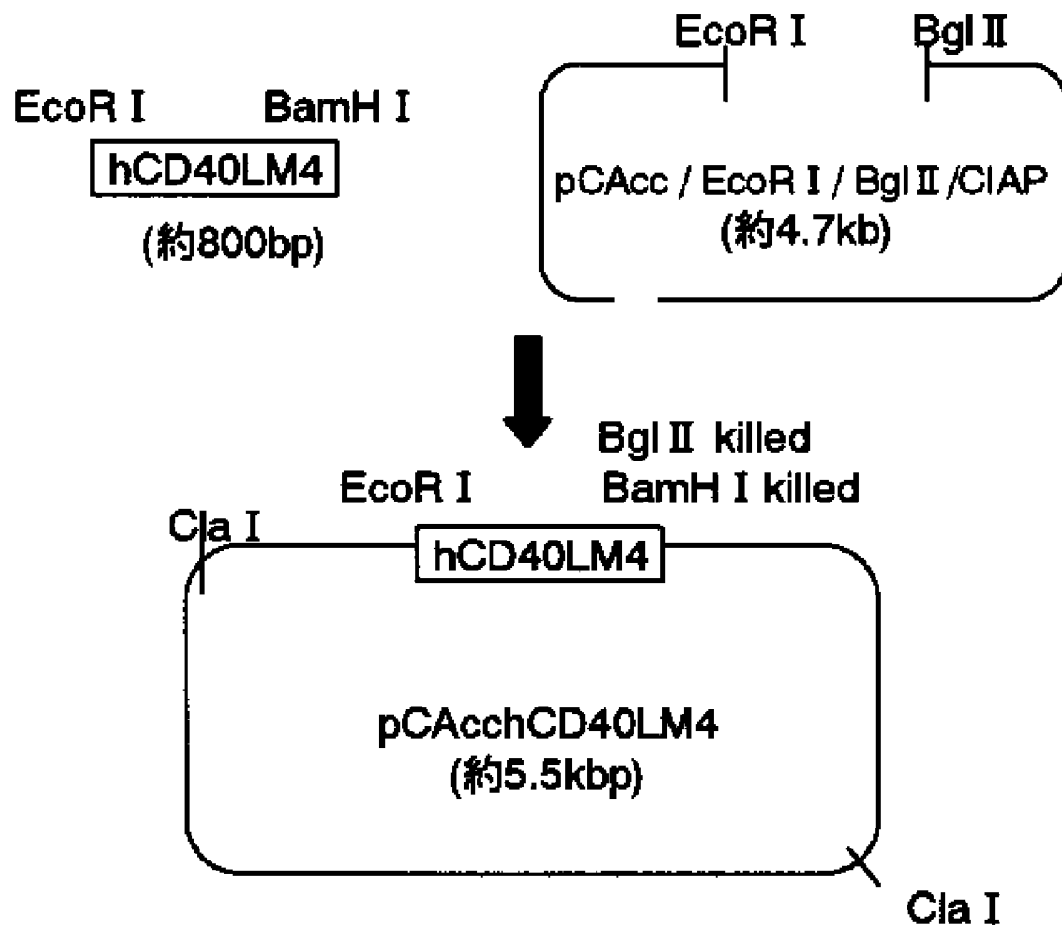
[図4]



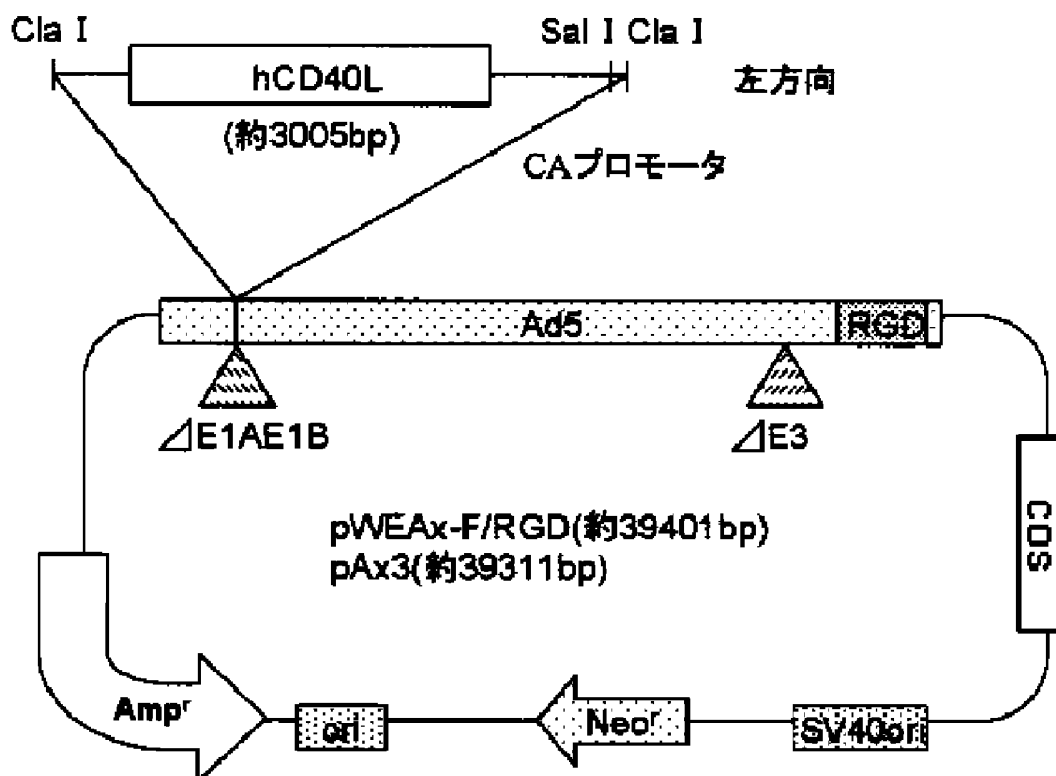
[図5]

全長hCD40LM4

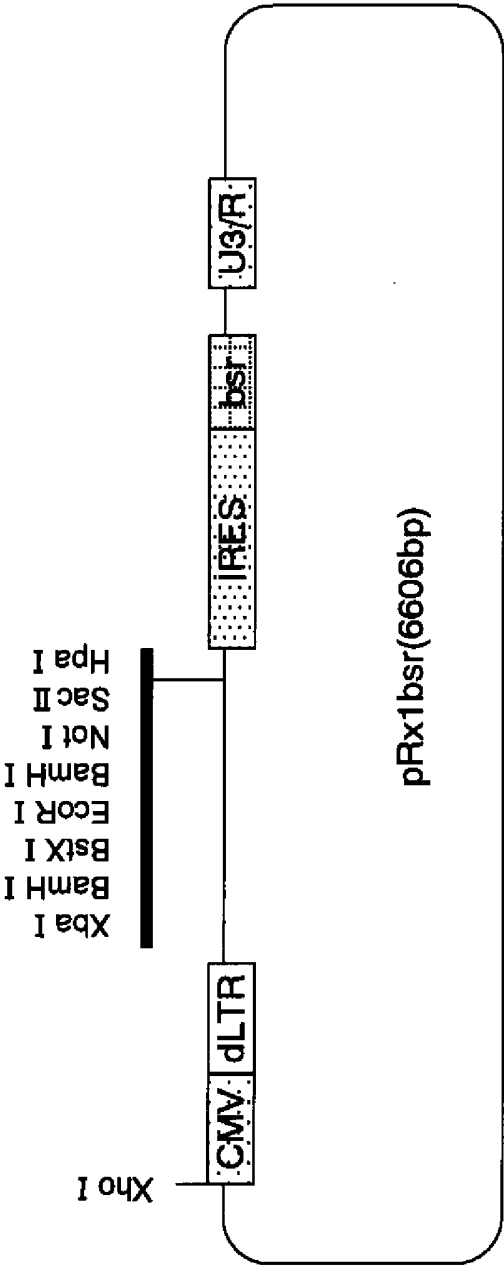
発現プラスミド



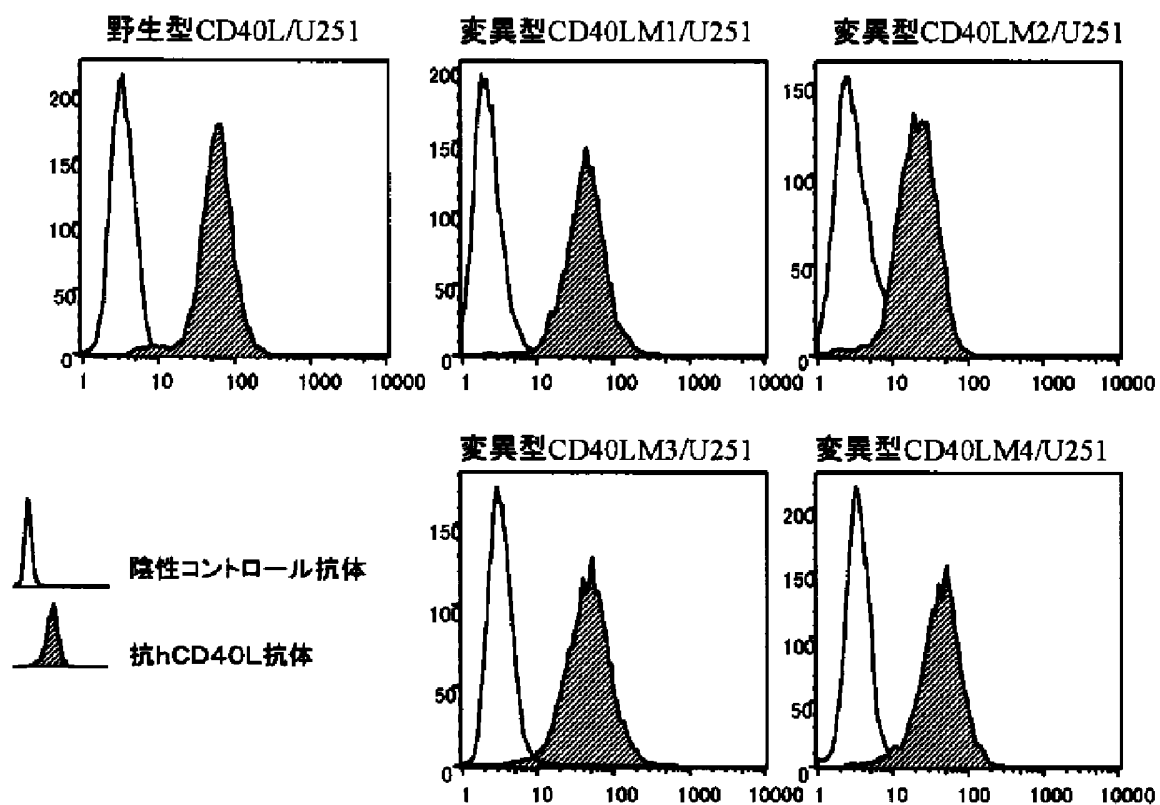
[図6]



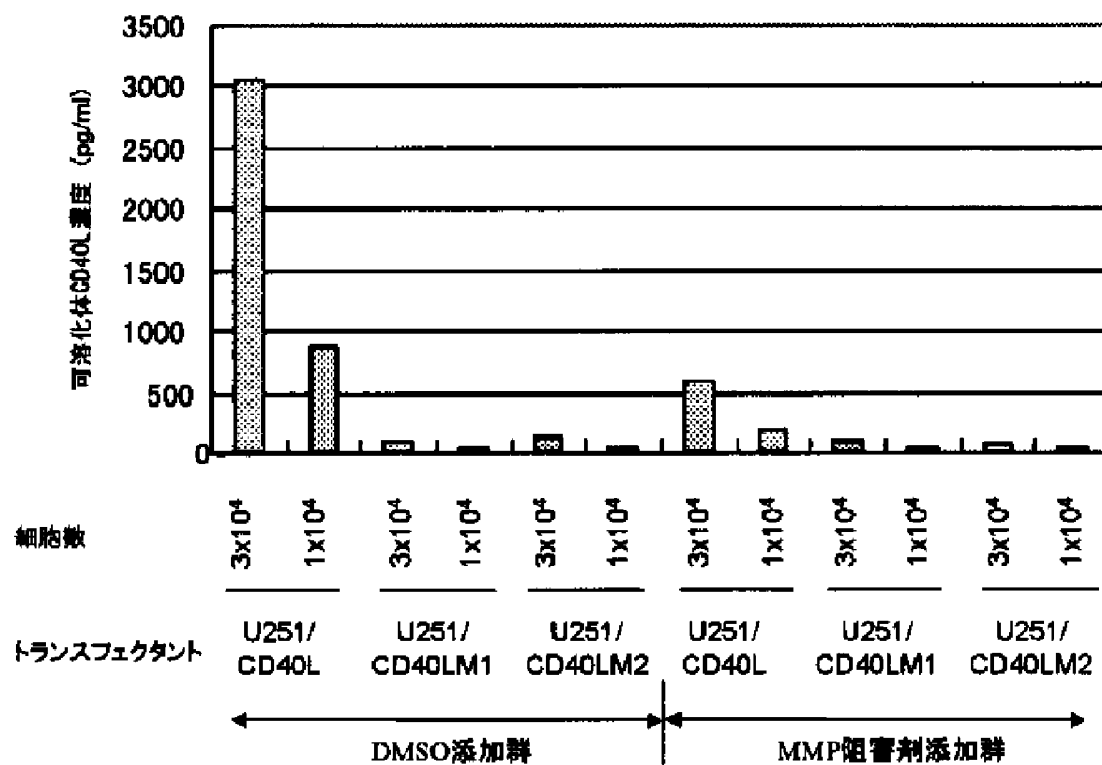
[図7]



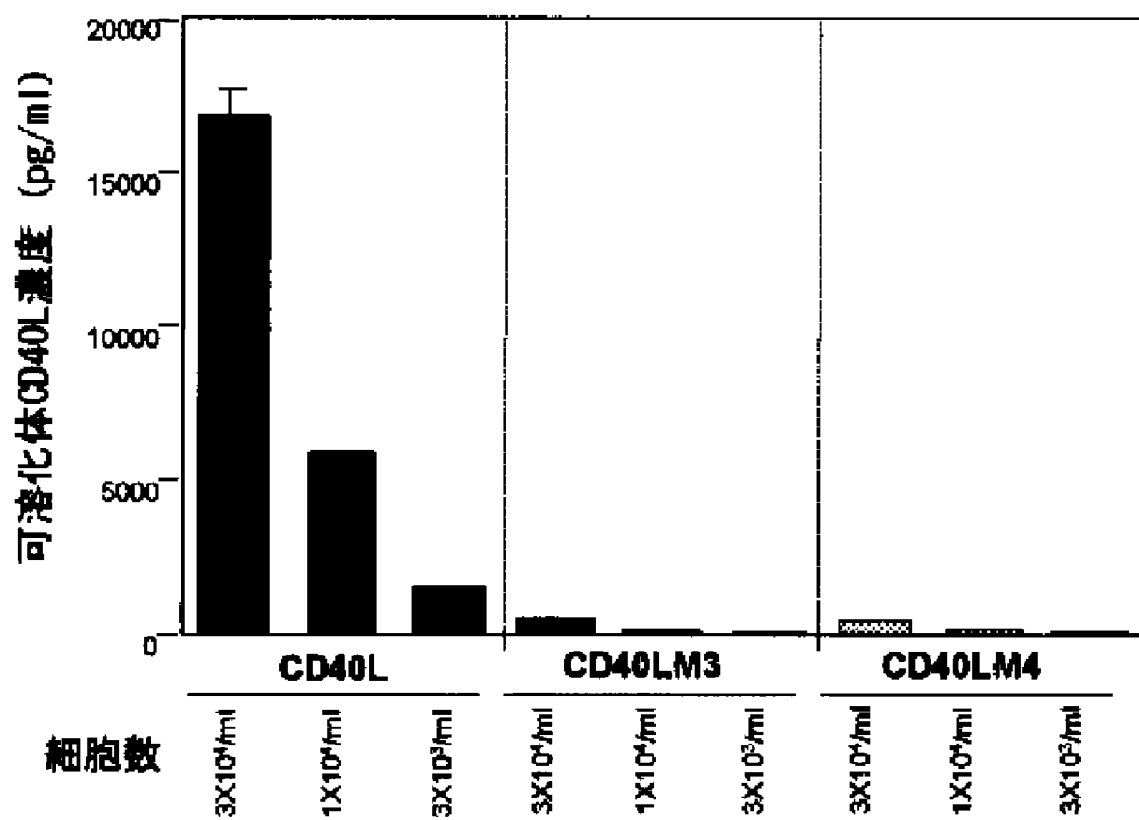
[図8]



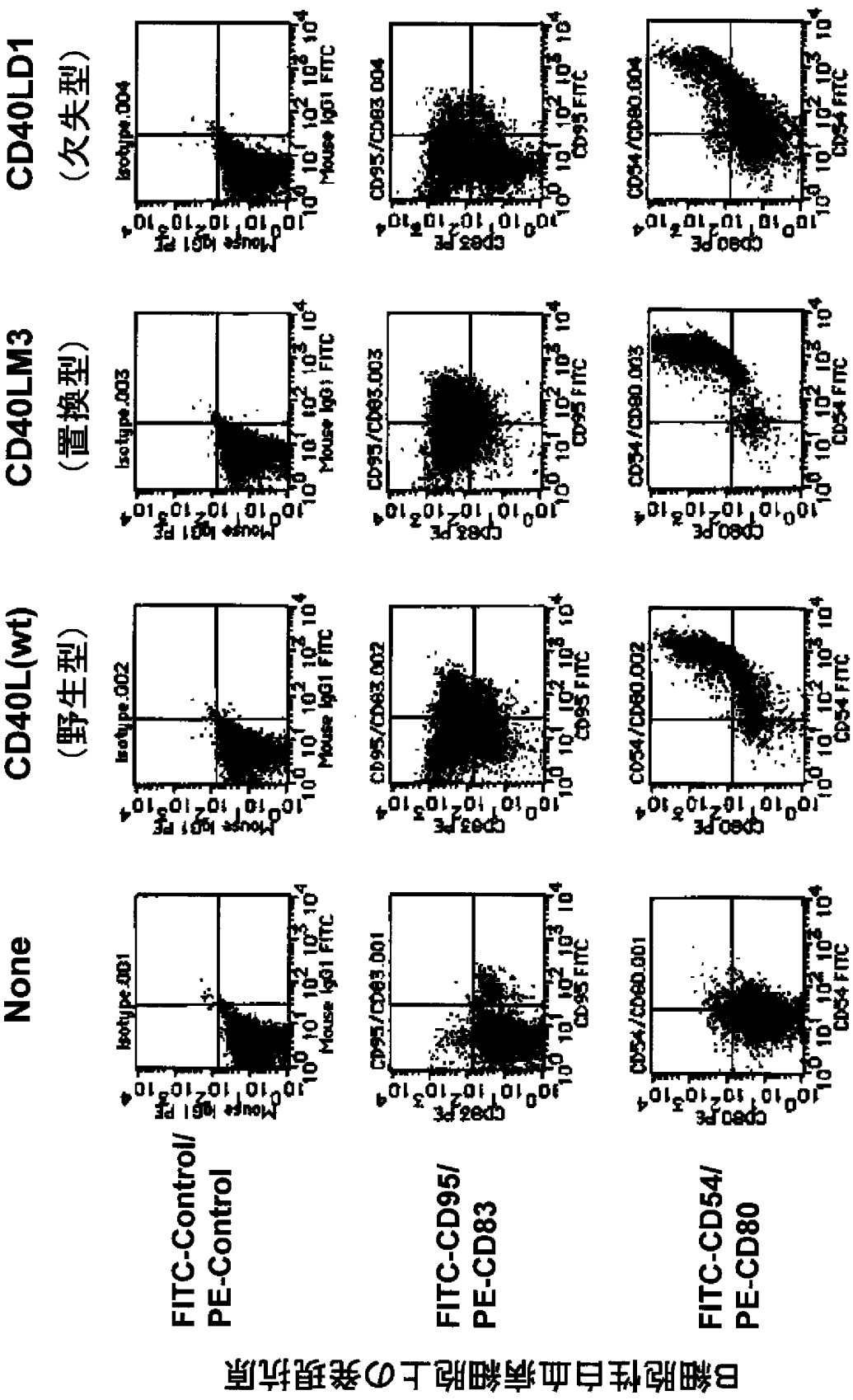
[図9]



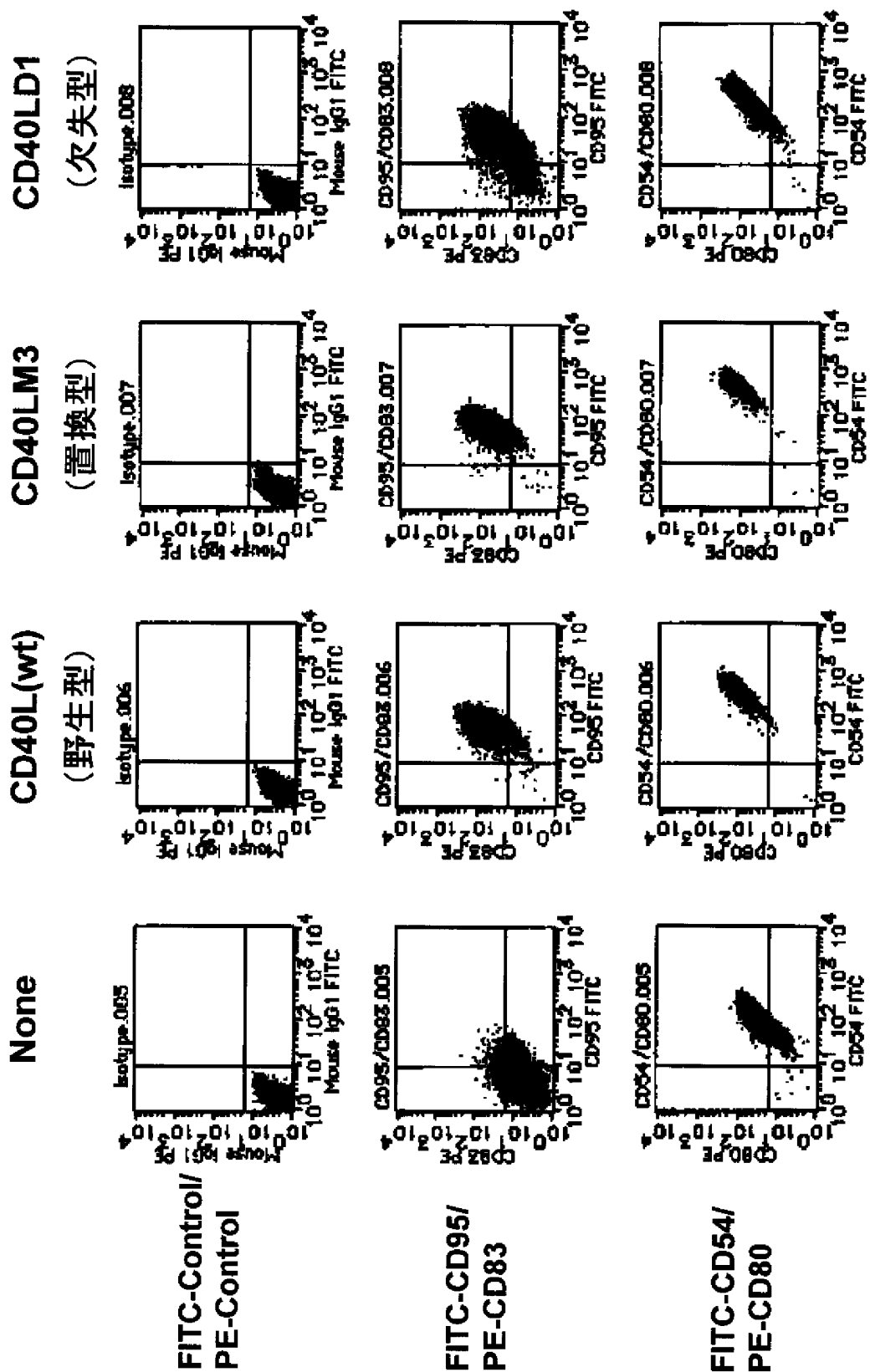
[図10]



[図11]

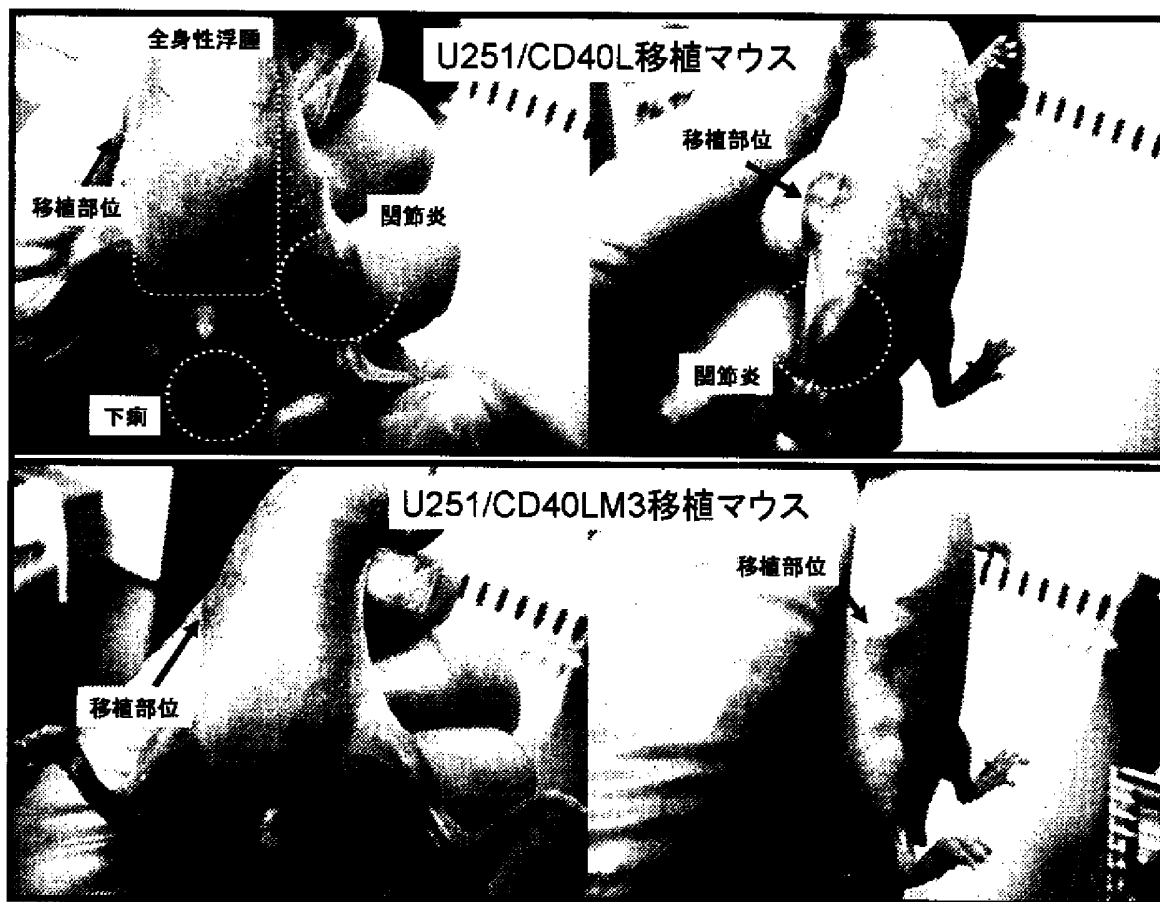


[図12]

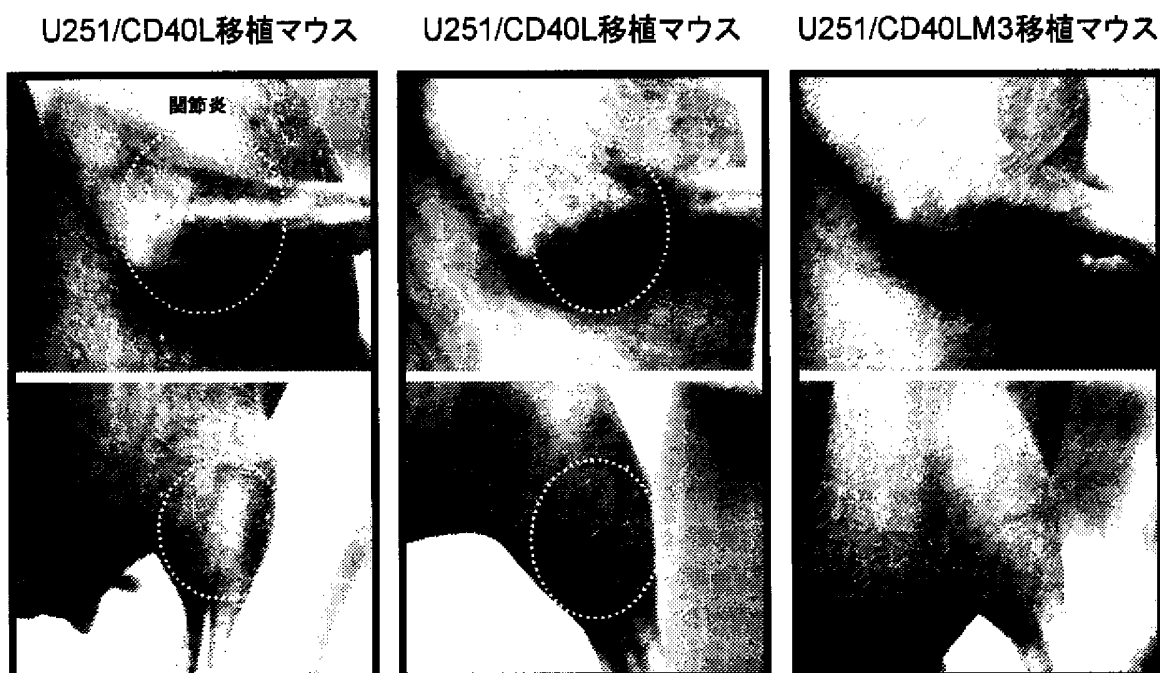


Ｂ細胞性リンパ腫細胞上の発現抗原

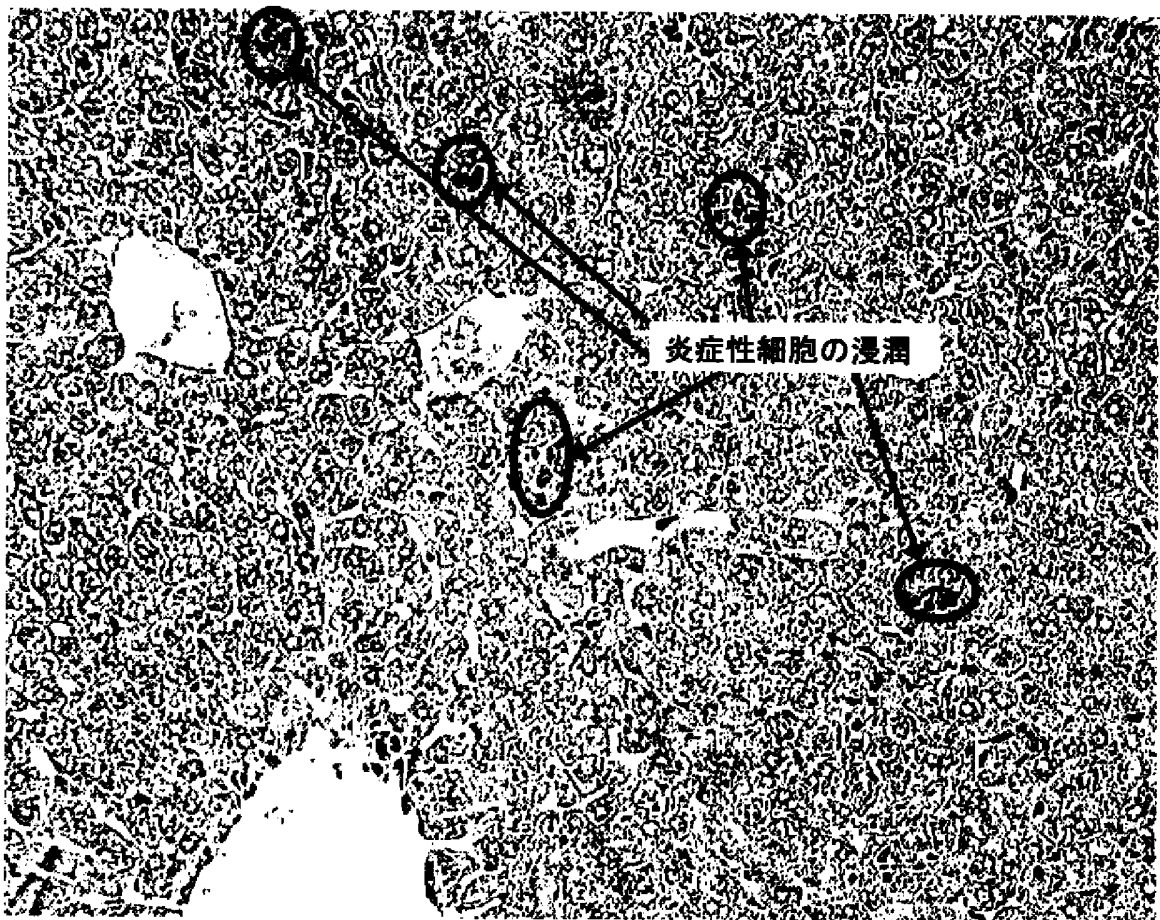
[図13]



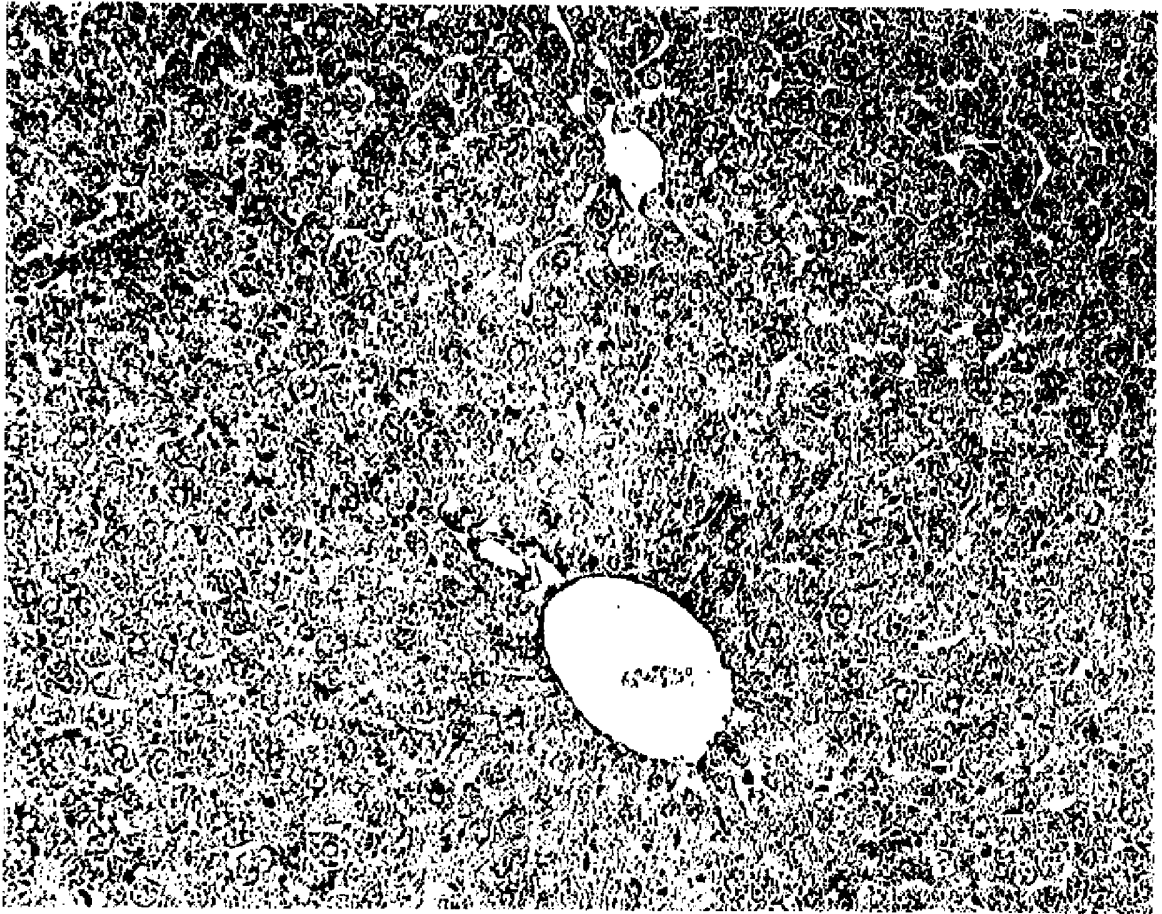
[図14]



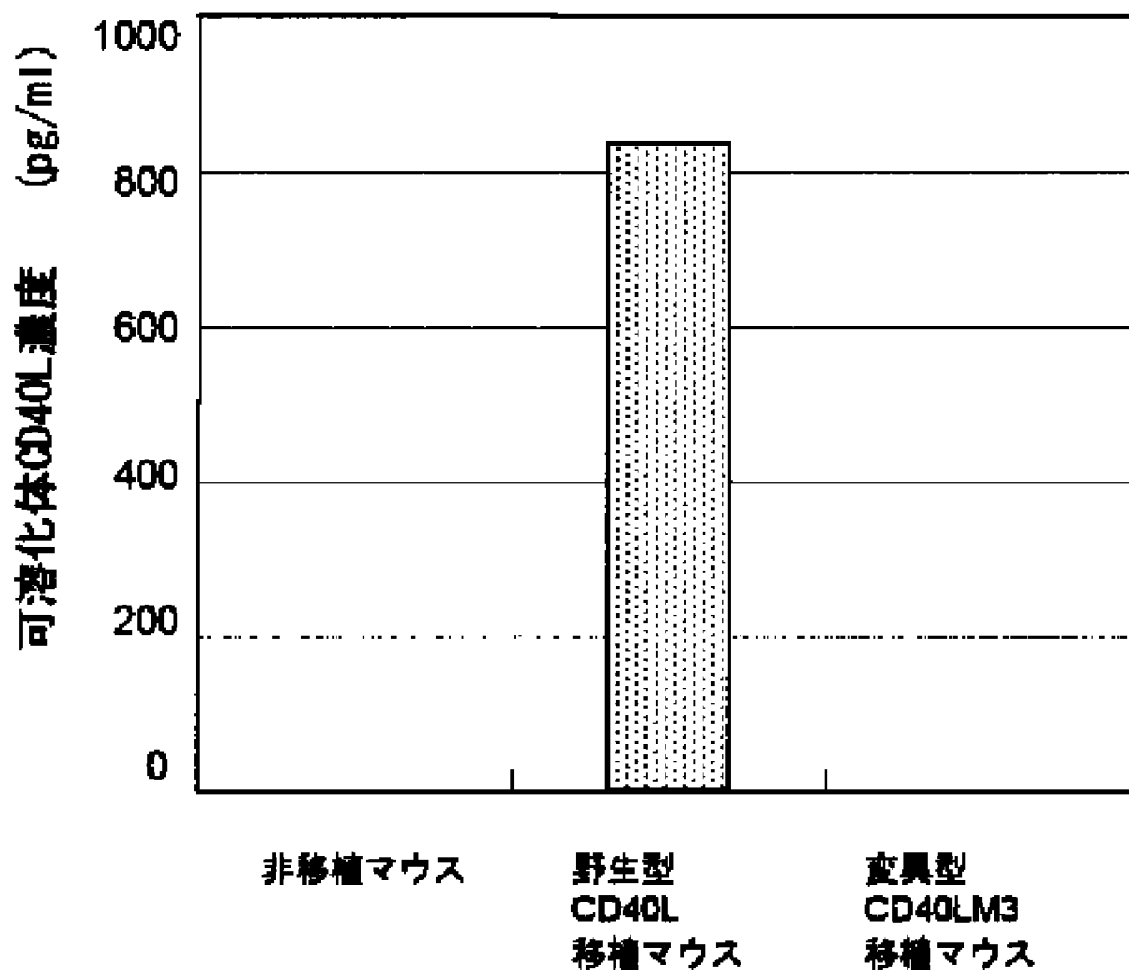
[図15]



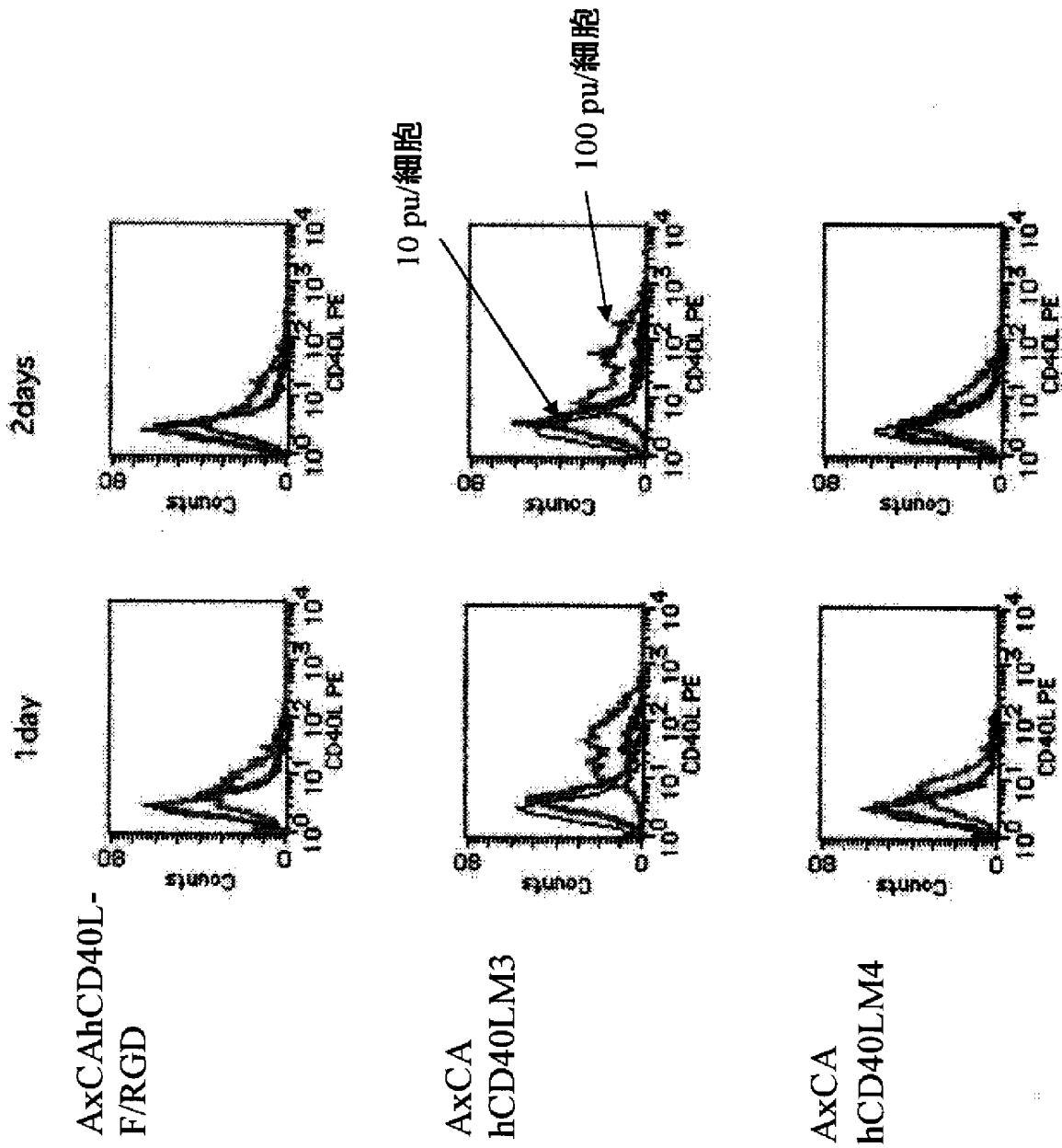
[図16]



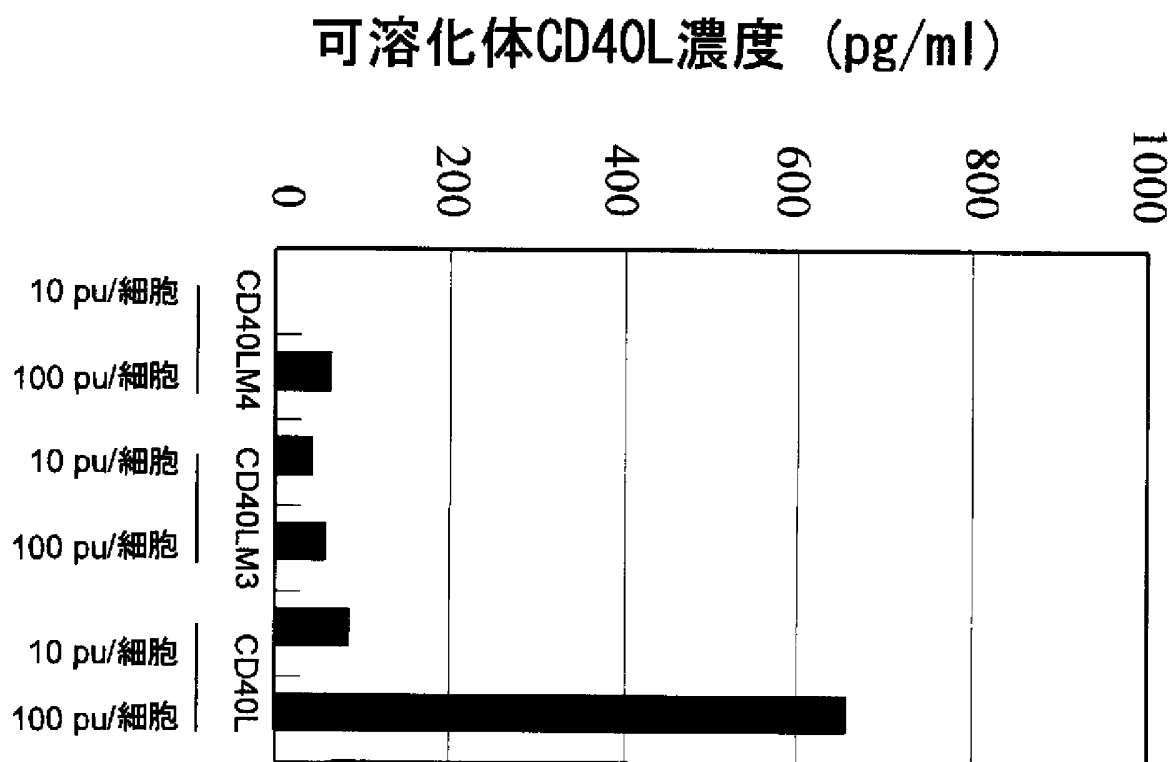
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/00, A61K35/12, 35/76, 38/00, 39/00, 48/00, A61P9/00,
9/10, 29/00, 35/00, 35/02, 37/04, 37/06, C07K14/525, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/00, A61K35/12, 35/76, 38/00, 39/00, 48/00, A61P9/00,
9/10, 29/00, 35/00, 35/02, 37/04, 37/06, C07K14/525, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	TONG, A.W. et al., CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells, Leuk. Lymphoma, 2000, Vol.36, No.5-6, pages 543 to 558	1-28/1-28
Y	PIETRAVALLE F. et al., Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation, Eur.J.Immunol., 1996, Vol.26, No.3, pages 725 to 728	1-28
P,X	Yukari MASUDA et al., "Kaihengata CD40 Ligand ni yoru Koshuyo Men'eki Oto Yudo to Zenshin Fukusayo no Keigen Koka no Kaiseki", Dai 63 Kai Nihon Gan Gakkai Gakujutsu Sokai Kiji, 25 August, 2004 (25.08.04), page 410, W-381	1-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 July, 2005 (12.07.05)

Date of mailing of the international search report
16 August, 2005 (16.08.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007298

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HERMANN A. et al., CD40 ligand (CD40L) does not stimulate proliferation of smooth muscle cells, Eur.J.Cell.Biol., 2002, Vol.81, No.4, pages 213 to 221	1-28
A	AUKRUST P. et al., Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable anina. Poossible refrection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute cornary syndromes, Circulation, 1999, Vol.100, No.6, pages 614 to 620	1-28
A	WO 2001/096397 A2 (BIOGEN INC.), 20 December, 2001 (20.12.01), & JP 2004-503237 A & US 2003/0212025 A1	1-28

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. ⁷ C12N15/00, A61K35/12, 35/76, 38/00, 39/00, 48/00, A61P9/00, 9/10, 29/00, 35/00, 35/02, 37/04, 37/06, C07K14/525, C12N5/10			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. ⁷ C12N15/00, A61K35/12, 35/76, 38/00, 39/00, 48/00, A61P9/00, 9/10, 29/00, 35/00, 35/02, 37/04, 37/06, C07K14/525, C12N5/10			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報		1922-1996年	
日本国公開実用新案公報		1971-2005年	
日本国実用新案登録公報		1996-2005年	
日本国登録実用新案公報		1994-2005年	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), Cplus (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/ Y	TONG, A.W. et al., CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells, Leuk. Lymphoma, 2000, Vol.36, No.5-6, pages 543 to 558	1-28/ 1-28	
Y	PIETRAVALLE F. et al., Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation, Eur. J. Immunol., 1996, Vol.26, No.3, pages 725 to 728	1-28	
☒ C欄の続きにも文献が列举されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 12.07.2005		国際調査報告の発送日 16.8.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	増田ゆかり等, 改変型CD40リガンドによる抗腫瘍免疫応答誘導と全身性副作用の軽減効果の解析, 第63回 日本癌学会学術総会記事, 2004. 08. 25, p. 410, W-381	1-28
A	HERMANN A. et al., CD40 ligand (CD40L) does not stimulate proliferation of smooth muscle cells, Eur. J. Cell Biol. 2002, Vol.81, No.4, pages 213 to 221	1-28
A	AUKRUST P. et al., Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable anina. Poossible refrection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute cornary syndromes, Circulation, 1999, Vol.100 No.6, pages 614 to 620	1-28
A	WO 2001/096397 A2 (BIOGEN INC.) 2001.12.20 & JP 2004-503237 A & US 2003/0212025 A1	1-28