(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5016489号
(P5016489)

(45)発行日　平成24年9月5日(2012.9.5)　(24)登録日　平成24年6月15日(2012.6.15)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 5/0783	(2010.01)	C12N	5/00	202L
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61P 37/04	(2006.01)	A61P	37/04	

請求項の数 10　(全 39 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2007-526161 (P2007-526161)
(86)(22)出願日	平成17年8月11日 (2005.8.11)
(65)公表番号	特表2008-509683 (P2008-509683A)
(43)公表日	平成20年4月3日 (2008.4.3)
(86)国際出願番号	PCT/CH2005/000469
(87)国際公開番号	WO2006/017954
(87)国際公開日	平成18年2月23日 (2006.2.23)
審査請求日	平成20年6月18日 (2008.6.18)
(31)優先権主張番号	04405516.8
(32)優先日	平成16年8月19日 (2004.8.19)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号	05007214.9
(32)優先日	平成17年4月1日 (2005.4.1)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73)特許権者　504043462
ユニバーシティ　カレッジ　カーディフ　コンサルタンツ　リミテッド
イギリス　サウス　グラモーガン　シーエフ２４　Ｏディーイー　カーディフ　ニューポート　ロード　３０－３６
(74)代理人　100087398
弁理士　水野　勝文
(74)代理人　100067541
弁理士　岸田　正行
(74)代理人　100103506
弁理士　高野　弘晋
(72)発明者　モーゼル，ベルンハルト
スイス国　ウッツェンシュトルフ　ツェーハー－３４２７，アイシュトラーセ　７
最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製及び免疫療法における使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

樹状細胞と同等に抗原をプロセスして、抗原性ペプチドをαβＴ細胞に提示し、ナイーブαβＴ細胞に抗原特異的増殖及び分化を誘導する抗原提示能を有する抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製方法であって、

ヒト末梢血の単核細胞からγδＴ細胞を選別し、

前記選別された細胞を、イソペンテニルピロリン酸、４－ヒドロキシ－３－メチル－ブト－２－エニルピロリン酸、（Ｅ）－４－ヒドロキシ－３－メチル－ブト－２－エニルピロリン酸（ＨＭＢ－ＰＰ）、エチルピロリン酸（ＥＰＰ）、ファルネシルピロリン酸（ＦＰＰ）、ジメチルアリルリン酸（ＤＭＡＰ）、ジメチルアリルピロリン酸（ＤＭＡＰＰ）、エチル－アデノシン三リン酸（ＥＰＰＰＡ）、ゲラニルピロリン酸（ＧＰＰ）、ゲラニルゲラニルピロリン酸（ＧＧＰＰ）、イソペンテニル－アデノシン三リン酸（ＩＰＰＰＡ）、モノエチルリン酸（ＭＥＰ）、モノエチルピロリン酸（ＭＥＰＰ）、３－ホルミル－１－ブチル－ピロリン酸（ＴＵＢＡｇ１）、Ｘ－ピロリン酸（ＴＵＢＡｇ２）、３－ホルミル－１－ブチル－ウリジン三リン酸（ＴＵＢＡｇ３）、３－ホルミル－１－ブチル－デオキシチミジン三リン酸（ＴＵＢＡｇ４）、モノエチルアルキルアミン、アリルピロリン酸、クロトイルピロリン酸、ジメチルアリル－γ－ウリジン三リン酸、クロトイル－γ－ウリジン三リン酸、アリル－γ－ウリジン三リン酸、エチルアミン、イソブチルアミン、ｓｅｃ－ブチルアミン、イソ－アミルアミン、及び窒素含有ビスホスホネートからなる群から少なくとも１つ選択される抗原提示能を誘導するための刺激で処理し、

該細胞によって取込み、提示されるための抗原を細胞に投与する調製方法。
【請求項２】
γδＴ細胞の選別を、標準的プロトコールにより、ヒトＶγＶδＴ細胞受容体に対する抗体を用いた磁気細胞分離によって行う請求項１に記載の方法。
【請求項３】
γδＴ細胞の選別を、Ｖγ２Ｖδ２＋Ｔ細胞受容体鎖を発現しているγδＴ細胞の選択的増殖を誘導する、イソペンテニルピロリン酸の存在下、新鮮単離末梢血リンパ球を培養することによって行う請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記投与される抗原が、タンパク質、タンパク質混合物、または腫瘍もしくは感染細胞からの粗もしくは濃縮抽出物である請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記投与される抗原が、病原体または腫瘍細胞由来のペプチドである請求項１に記載の方法。
【請求項６】
抗原が病原体由来のタンパク質であり、該タンパク質の内在的発現を可能とする条件下でそれをコードするＤＮＡまたはＲＮＡとして投与される請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記ＤＮＡまたはＲＮＡが、精製されたＤＮＡまたはＲＮＡ、またはＤＮＡまたはＲＮＡを含む導入ベクターである請求項６に記載の方法。
【請求項８】
請求項１の方法によって調製された樹状細胞と同等に抗原をプロセスして、抗原性ペプチドをαβＴ細胞に提示し、ナイーブαβＴ細胞に抗原特異的増殖及び分化を誘導する抗原提示能を有する抗原提示ヒトγδＴ細胞。
【請求項９】
免疫療法またはワクチン接種に用いる薬剤の製造における、樹状細胞と同等に抗原をプロセスして、抗原性ペプチドをαβＴ細胞に提示し、ナイーブαβＴ細胞に抗原特異的増殖及び分化を誘導する抗原提示能を有する、請求項１に記載の方法によって調製された抗原提示ヒトγδＴ細胞の使用。
【請求項１０】
新たな腫瘍関連または病原体由来の抗原を特定するための方法であって、
ヒト末梢血の単核細胞からγδＴ細胞を選別し、
選別された細胞を、イソペンテニルピロリン酸、４－ヒドロキシ－３－メチル－ブト－２－エニルピロリン酸、（Ｅ）－４－ヒドロキシ－３－メチル－ブト－２－エニルピロリン酸（ＨＭＢ－ＰＰ）、エチルピロリン酸（ＥＰＰ）、ファルネシルピロリン酸（ＦＰＰ）、ジメチルアリルリン酸（ＤＭＡＰ）、ジメチルアリルピロリン酸（ＤＭＡＰＰ）、エチル－アデノシン三リン酸（ＥＰＰＰＡ）、ゲラニルピロリン酸（ＧＰＰ）、ゲラニルゲラニルピロリン酸（ＧＧＰＰ）、イソペンテニル－アデノシン三リン酸（ＩＰＰＰＡ）、モノエチルリン酸（ＭＥＰ）、モノエチルピロリン酸（ＭＥＰＰ）、３－ホルミル－１－ブチル－ピロリン酸（ＴＵＢＡｇ１）、Ｘ－ピロリン酸（ＴＵＢＡｇ２）、３－ホルミル－１－ブチル－ウリジン三リン酸（ＴＵＢＡｇ３）、３－ホルミル－１－ブチル－デオキシチミジン三リン酸（ＴＵＢＡｇ４）、モノエチルアルキルアミン、アリルピロリン酸、クロトイルピロリン酸、ジメチルアリル－γ－ウリジン三リン酸、クロトイル－γ－ウリジン三リン酸、アリル－γ－ウリジン三リン酸、エチルアミン、イソブチルアミン、ｓｅｃ－ブチルアミン、イソ－アミルアミン、及び窒素含有ビスホスホネートからなる群から少なくとも１つ選択される抗原提示能を誘導するための刺激で処理し、
タンパク質混合物の画分、あるいは腫瘍及び感染細胞からの粗または濃縮抽出物、あるいは腫瘍及び感染性物質から得られたＲＮＡまたはＤＮＡライブラリーを投与し、
自己ナイーブαβＴ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの活性化について試験し、
高い抗原性を示したタンパク質試料を選別する方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製方法、この方法によって調製されたγδＴ細胞、ならびに免疫療法、抗原特定および免疫能の診断におけるその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
適応免疫系の細胞成分
免疫系の細胞は先天性免疫系の細胞と適応（後天性または特異的）免疫系の細胞とに分けられる。先天性免疫系の細胞には、末梢血中に存在する単球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞や、皮膚、気道、消化管、尿生殖路などの末梢組織、各種内臓器、ならびに脾臓、リンパ節（ＬＮ）、パイエル板などの二次リンパ組織のような血管外コンパートメントに存在するマスト細胞、マクロファージ及び樹状細胞（ＤＣ）などがある。先天性免疫細胞の主な機能は、ａ）感染性粒子の伝播を中和、制限し、腫瘍細胞を除去することによる直接防御機構の提供、ｂ）健康な組織の免疫監視機能、ｃ）適応免疫応答の開始、である。適応免疫系の細胞としてはＴ細胞やＢ細胞などのリンパ球が挙げられる。これらの細胞にはＴ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）及びＢ細胞抗原受容体（ＢＣＲ）と呼ばれるクロノタイプの細胞表面抗原受容体が存在することから先天性免疫細胞と区別される。各リンパ球は特定の抗原を認識する異なるＴＣＲまたはＢＣＲを有している。抗原認識の特異性は、Ｔ細胞及びＢ細胞の分化過程と、エフェクターＴ細胞及びＢ細胞が分化する際の抗原親和性の成熟過程（アフィニティーマチュレーション）において、多数のＴＣＲまたはＢＣＲ可変遺伝子セグメントの再構成が起こることで決定される。抗原刺激を受けていない末梢血中のナイーブなＴ細胞は、それぞれのＴＣＲの抗原選択性において互いに異なっており、ナイーブＴ細胞はそれぞれが特異的に認識する抗原を有する物質によって免疫活性化されることによって増殖する。その結果、適応性免疫応答においては、潜在的な感染性物質に対して特異的なＴＣＲを有するナイーブＴ細胞群が細胞分裂によって増殖し、ａ）潜在的感染性物質に対する防御に直ちに参加するエフェクターＴ細胞へと分化するとともに、ｂ）この特定の潜在的感染性物質に対する長期的な防御を与えるメモリーＴ細胞へと分化する。エフェクターＴ細胞の寿命は短く、免疫応答の消失期には消失するのに対し、メモリーＴ細胞は長寿命であり、初期にこれらの細胞が存在した組織や選択的再循環経路に応じてメモリーＴ細胞のサブセットへと分化する（Ｍｏｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。Ｔ細胞は、ヘテロ二量体であるＴＣＲの構成要素によってαβＴ細胞とγδＴ細胞とに更に分けられる（下記参照）。αβ－ＴＣＲはα及びβタンパク鎖からなり、γδ－ＴＣＲはγ及びδタンパク鎖からなる。正常で健康なヒトでは、ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞の大半（＞８０％）はαβＴ細胞である。ＴＣＲには無変異のＣＤ３分子が結合しており、これによってＴ細胞はＢ細胞や他のすべての免疫細胞と区別される。αβＴ細胞の多くは、いわゆる主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子拘束性により抗原を認識する。これは、わずかな抗原とＭＨＣ非拘束的に結合するＢ細胞のＢＣＲとは対照的である。「ＭＨＣ拘束」とは、ＴＣＲによる抗原の認識の形態をいい、抗原性ペプチドをＭＨＣ分子とともにいわゆるＭＨＣ－ペプチド複合体として、ＤＣなどの抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に提示することを含む（下記参照）。ＭＨＣ分子はＭＨＣクラスＩ（ＭＨＣ－Ｉ）とＭＨＣクラスＩＩ（ＭＨＣ－ＩＩ）に大別され、これらはαβＴ細胞の２つの主要なサブクラスであるＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞とＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞のＴＣＲを活性化させる。ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞上のＴＣＲがＭＨＣ－ＩＩ－ペプチド複合体を認識するのに対し、ＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞上のＴＣＲはＭＨＣ－Ｉ－ペプチド複合体を認識する。これと大きく異なり、ヒトの末梢血中に存在する主要なサブセットであるγδＴ細胞はＣＤ４、ＣＤ８のいずれも発現せず、また、そのＴＣＲは、抗原認識についてＭＨＣ拘束を必要としない（下記参照）。
【０００３】
γδＴ細胞

γδＴ細胞は、Ｖγ及びＶδ遺伝子セグメントによってコードされるＴＣＲを有するＣＤ３＋細胞のサブセットである（Ｍｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．，２０００；Ｃａｒｄｉｎｇ ａｎｄ Ｅｇａｎ，２００２）。それらは、初期にこれらの細胞が存在する血液または組織、細胞のＶγＶδ－ＴＣＲのタンパク鎖の構成や抗原選択性によって更に分類される。ヒトの皮膚の上皮組織や上皮関連／粘膜組織、気道、消化管、尿生殖路及び幾つかの内臓ではＶδ１＋－ＴＣＲ鎖を発現しているγδＴ細胞（Ｖδ１＋Ｔ細胞）が大部分を占めるが、末梢血のγδＴ細胞ではそのごく一部（＜２０％）がＶδ１＋Ｔ細胞である。Ｖδ１＋Ｔ細胞のＴＣＲはＭＨＣ関連ＣＤ１分子が提示する脂質抗原を認識する。更にＶδ１＋Ｔ細胞は、ＭＨＣ関連分子であるＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、及びヒートショックタンパクなどのストレス関連タンパクに対して応答する。この細胞は、腫瘍やストレスを受けた細胞に対する最初の防御ラインとして機能すると考えられており、更には外傷の治癒、組織修復や自己免疫に関与しているものと考えられている。正常なヒトの末梢血では、γδＴ細胞は全ＣＤ３＋細胞の２～１０％程度であり、末梢血のγδＴ細胞の大半（＞８０％）はＶγ２Ｖδ２＋－ＴＣＲ鎖を発現しているγδＴ細胞（Ｖγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞）である（Ｍｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．，２０００；Ｃａｒｄｉｎｇ ａｎｄ Ｅｇａｎ，２００２）。この細胞は、ほとんどが微生物に由来する小型の非ペプチド抗原に対して高い選択性を示し、ペプチド選択的αβＴ細胞では一般的である（上記参照）古典的ＭＨＣ分子による抗原提示を必要としない。Ｖγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞の抗原としては、イソペンテニルピロリン酸（ＩＰＰ）などのプレニルピロリン酸、アルキルアミン、ならびに多くのヒトの微生物病原体や共生細菌で新たに発見されたイソプレノイド生合成経路の代謝産物などがある（Ｍｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．，２０００；Ｅｂｅｒｌ ｅｔ ａｌ．，２００３）。ＩＰＰやアルキルアミンなどのＶγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞の抗原の一部は壊死性組織細胞からも放出される。微生物由来の小型の非ペプチド抗原に対する選択性を有する相同的ＶγＶδ－ＴＣＲを有するヒトＶγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞の相同タンパクは、アカゲザルなどの高等霊長類にも存在するが、マウスやウサギなどのげっ歯類には存在しない。Ｖγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞の存在がなぜ高等霊長類に限定されているかは明らかではないが、こうした細胞は、微生物の特徴的な種特異的選択に対する細胞防御機構に対する特定の必要性を満たすべく進化したものと考えられる。Ｖγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの末梢血Ｖγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞の組織培養や、ｉｎ ｖｉｖｏでのアカゲザルなどの高等霊長類におけるワクチン接種実験で、モデル抗原としてのＩＰＰや微生物抽出物に応答して急速に増殖する（Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｌｅｔｖｉｎ，２００３）。また、ヒトにおける微生物感染では、末梢血中のＶγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞がしばしば急激に増殖し、末梢血中の全ＣＤ３＋細胞の６０％以上を占めるレベルに達する。これらの知見は、ヒトＶγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞が微生物感染における免疫プロセスにおいて重要な役割を担っているという考え方を支持するものである（Ｍｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ，２０００；Ｃａｒｄｉｎｇ ａｎｄ Ｅｇａｎ，２００２；Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｌｅｔｖｉｎ，２００３）。病原体や共生細菌などの微生物に一般的に見られる非ペプチド抗原に対するＶγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞の特有の選択性は、Ｖγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞のＴＣＲが微生物由来の多様なリガンドに応答して、樹状細胞（ＤＣ）や他の抗原提示細胞（ＡＰＣ）の活性化及び成熟を引き起こすＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）と同様の機能を有すること、γδＴ細胞が先天性免疫系の細胞を動員するケモカインや、抗原提示細胞を刺激して顆粒球、マクロファージ、ＮＫ細胞による細菌への攻撃を促す炎症性サイトカインを速やかに分泌することによって病原体の除去に寄与していることを示唆するものである（Ｍｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．，２０００；Ｃａｒｄｉｎｇ ａｎｄ Ｅｇａｎ，２００２；Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｌｅｔｖｉｎ，２００３）。Ｖγ２Ｖδ２＋γδＴ細胞はまた、感染または腫瘍性組織細胞を殺すナチュラルキラー細胞受容体を発現する。これらの知見は、ＴＮＦ－αなどの炎症性サイトカインの分泌が局所的な適応免疫応答に寄与することも知られているが、γδＴ細胞は自然免疫機能を第一に行うものであるという考え方を支持するものである。これに対して、適応免疫応答におけるγδＴ細胞の直接的な関与を示す証拠は明らかなものではない。例えば、ＣＤ１拘束性Ｔ細胞はＣＤ１－脂質複合体を提示する

樹状細胞（ＤＣ）の成熟を誘導することが報告されている。また、更なる説明はなされていないものの、マウスでの実験によって、γδＴ細胞のＢ細胞応答における一定の役割が示され、加えて、ヒトγδＴ細胞はｉｎ　ｖｉｔｒｏでの共培養でＢ細胞の応答を調節することが示された（Ｂｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。更に、アカゲザルでの研究によってＶγ２Ｖδ２$^{+}$γδＴ細胞はＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｂｏｖｉｓ　抗原に対してｉｎ　ｖｉｖｏで記憶応答を起こすことが示された（Ｃｈｅｎ　ａｎｄ　Ｌｅｔｖｉｎ，２００３）。これらの知見は、γδＴ細胞がＢ細胞や樹状細胞といった適応免疫系の細胞と相互作用を行うことの根拠を与えるものである。こうした免疫調節機能の多くはγδＴ細胞によるサイトカイン産生によるものと結論づけられたか、あるいは説明がなされていない。これらの知見はいずれも、抗原提示におけるγδＴ細胞の役割を支持するものではない点は重要である。

【０００４】

リンパ球の機能は、ケモカイン受容体及び接着分子の発現によって定義されるリンパ球の遊走能と密接に関連している（Ｍｏｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。すなわちαβＴ細胞は、ａ）リンパ節ホーミングケモカイン受容体ＣＣＲ７を発現しているが、炎症性ケモカインの受容体は発現していないナイーブＴ細胞、ｂ）異なる組合せのケモカイン受容体を有し、炎症部位での炎症状態を反映する接着分子を誘導可能な短寿命のエフェクター細胞、及びｃ）３つのサブセットからなる休眠状態の長寿命のメモリーＴ細胞に分けられる。Ｔ細胞の遊走能に基づいたＴ細胞サブセット間の相違（細胞表面におけるケモカイン受容体と接着分子の発現プロファイル）は、細胞の分化の状態と免疫プロセスにおける機能と密接に関係している。ケモカイン受容体及び接着分子の「プロファイリング」は、樹状細胞（ＤＣ）やＴ細胞、Ｂ細胞などの白血球サブセットの表現形及び機能的な定義に広く用いられている（Ｍｏｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。ヒト末梢血のγδＴ細胞の遊走能は、ヒト末梢血のαβＴ細胞の遊走能と大きく異なっている（Ｂｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。最も特徴的な点として、大半（＞８０％）のＶγ２Ｖδ２$^{+}$γδＴ細胞（以下、「γδＴ細胞」と呼ぶ）ではＣＣＲ７は発現しておらず、二次リンパ組織から排除されるが、炎症性遊走プロファイルは有している（Ｂｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。対照的に、末梢血中のαβＴ細胞の大半（＞７０％）はＣＣＲ７を発現しており、このことは、αβＴ細胞が二次リンパ組織（脾臓、リンパ節、パイエル板）を常に再循環し、適当なＭＨＣ－ペプチド複合体の有無について抗原提示細胞のスキャニングを行うことと符合する。進行中の適応性免疫応答では、特定のαβＴ細胞群が同種抗原を提示している抗原提示細胞との接触によって活性化し、炎症部位へのホーミング能を有するＣＣＲ７ネガティブエフェクター細胞へと分化する。これに対し、末梢血のγδＴ細胞は、炎症部位で産生される炎症性ケモカインに応答して直ちに組織へと移動するための炎症部位遊走プログラムを有している。

【０００５】

微生物抽出抗原や上述の小型の非ペプチド抗原（例、ＩＰＰ）に対する応答のような活性化に際し、γδＴ細胞の遊走プロファイルは、炎症性ケモカインに対する受容体のダウンモジュレーションやＣＣＲ７の誘導に示されるように、炎症性からリンパ節ホーミングの表現型へと急速に変化する（Ｂｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。αβＴ細胞と異なり、γδＴ細胞はリンパ節では比較的稀であり、このことはγδＴ細胞の活性化がこれらの部位に存在するＭＨＣ拘束を行う抗原提示細胞とは完全に独立して行われることと符合する（Ｂｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。γδＴ細胞の存在頻度は、（特に胚中心における）疾病関連リンパ節において高く、γδＴ細胞の体液性（抗体）応答の開始ならびに他の適応性免疫プロセスに寄与している可能性を示唆するものである。

【０００６】

要約すると、ヒトγδＴ細胞の遊走特性、及びリンパ節にしばしばγδＴ細胞が存在することは、適応免疫応答の開始におけるこの細胞の役割を示唆するものである。しかしながら、この役割についてはより明らかにはされておらず、また、γδＴ細胞が抗原提示細胞として機能していることを示す根拠も存在しない。

【０００７】
樹状細胞（ＤＣ）
樹状細胞（ＤＣ）は白血球の一クラスであり、骨髄の造血前駆細胞から誘導され、上皮／粘膜組織（皮膚、気道、消化管、尿生殖路など）や二次リンパ組織（脾臓、リンパ節（ＬＮ）、パイエル板（ＰＰ）など）のような血管外部位に主に存在する（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ａｎｄ Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ｅｔ ａｌ．，２００４）。末梢血では、樹状細胞または樹状細胞の前駆細胞が単核白血球に占める割合は１％未満である。異なる樹状細胞のサブセットは、上皮の境界を形成する軟部組織に主として存在する間質性樹状細胞、真皮に存在するランゲルハンス細胞（ＬＣ）、及びリンパ節に対する選択的ホーミング能を有する形質細胞様樹状細胞などのように、組織における局在化の仕方が異なっている。これらの樹状細胞のサブセットは、完全に分化した非増殖性細胞であり、数日から数週間と限られた寿命を有するが、このことはこれらの細胞が安定的状態で骨髄由来の前駆細胞によって常に置き換えられていることを示している。対照的に、ヒトメモリーＴ細胞は何年にもわたって生き続け、安定的（恒常的）増殖によって維持されている。組織に存在する樹状細胞の主な機能は、局所での抗原の吸収とプロセシング、求心性リンパ管を介した流入領域リンパ節への抗原の移送、及び抗原特異的適応免疫応答の開始である（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ａｎｄ Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ｅｔ ａｌ．，２００４）。樹状細胞はまた、免疫寛容誘発的な条件下（炎症誘発性Ｔ細胞が共刺激されない）でＴ細胞に抗原が提示されると免疫寛容を誘導する。同様に抗原提示Ｂ細胞も免疫寛容を誘導することが示されている。自己抗原に対する免疫寛容の破綻はしばしば自己免疫疾患の原因となると考えられていることから、自己抗原を提示する免疫寛容誘発性樹状細胞は免疫恒常性の不可欠な調節因子である。正常な末梢組織では、樹状細胞は完全に分化しているが「未成熟」な状態で存在している。未成熟な樹状細胞は、局所的な感染、炎症または組織損傷部位へと速やかに動員されるように炎症性サイトカインに対する受容体を発現している。これらの細胞はそれ自体の免疫寛容誘発性は低い（一次適応免疫応答を誘導しない）が、（受容体を介したエンドサイトーシスや液相のピノサイトーシス機構による）抗原の取込み、抗原のプロセシング、細胞内のＭＨＣ－Ｉ／ＩＩ分子へのペプチドの結合、及びその細胞表面への提示に特化している。未成熟樹状細胞はリンパ節ホーミング受容体であるＣＣＲ７を通常発現しておらず、このタイプの樹状細胞がどのようにして脾臓、リンパ節やパイエル板のＴ細胞領域に到達するかは現時点では解明されていない。Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）を活性化するウイルスまたは細菌による刺激、ホスト細胞由来の炎症性メディエーター（特にインターフェロン［ＩＦＮ］－g、腫瘍壊死因子［ＴＮＦ］－a、インターロイキン［ＩＬ］－Ｉ、プロスタグランジンＥ２［ＰＧＥ２］、組織増殖因子）、及びＴ細胞共刺激分子（ＣＤ４０リガンド／ＣＤ１５４）など多くの成熟シグナルによって樹状細胞の「成熟」が誘導される（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ａｎｄ Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ｅｔ ａｌ．，２００４）。樹状細胞成熟の早期では、更なる樹状細胞や先天性免疫系の細胞（単核球、顆粒球、ナチュラルキラー細胞）の動員によって免疫応答を増強するために樹状細胞は高濃度の炎症性ケモカインを分泌する。この後、こうした炎症性遊走プログラムは、炎症性ケモカインに対する受容体がＣＣＲ７に置換されることを特徴とするリンパ節ホーミングプログラムに次第に移行していく。ＣＣＲ７は、リンパ管及び脾臓、リンパ節やパイエル板のＴ細胞領域に存在する２種類のＣＣＲ７選択的ケモカインであるＥＬＣ／ＣＣＬ１９及びＳＬＣ／ＣＣＬ２１に応答して、感作された樹状細胞が末梢組織から流入領域リンパ節へと有効に移動するうえで不可欠である。したがってＣＣＲ７の発現は成熟した、または成熟しつつある樹状細胞をマーキングするものである。リンパ節ホーミング能を有する以外に、成熟樹状細胞はその細胞表面に多数のＭＨＣ－Ｉ／ＩＩ－ペプチド複合体と、ナイーブな（抗原刺激を受けていない）αβＴ細胞の適正な刺激に必要とされる多様な共刺激分子を安定的に発現している（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ａｎｄ Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍ

ａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。樹状細胞は一次免疫応答においてナイーブαβＴ細胞を刺激する能力を有することから「プロフェッショナル」な抗原提示細胞とも呼ばれる。（抗原刺激を受けた）メモリーＴ細胞は活性化閾値が低く、弱い刺激レジメンに対しても応答する。ａ）末梢組織に存在する抗原プロセシングを行う未成熟樹状細胞と、ｂ）組織からの流入領域リンパ節に移動した、抗原提示及び共刺激を行う成熟樹状細胞という２つの分化状態を区別する樹状細胞の機能的二重性は、樹状細胞の生理学における大きな特徴であり、局所の炎症、感染や組織損傷と密接な関連がある。最後に、適応免疫応答の結果（質及び量）は、主として応答開始の「モード」によって決定される。樹状細胞はリンパ節やパイエル板のＴ細胞領域内で、ナイーブＴ細胞に病原体の排除に必要な免疫応答のタイプについての「指示」を与えることが知られている（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ　ａｎｄ　Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。したがって組織の炎症環境は樹状細胞の成熟に直接影響し、樹状細胞が移動することから流入領域リンパ節内でのＴ細胞の分化も決定する。ナイーブＴ細胞は、特化したヘルパーＴ細胞のサブセット（特にＩＦＮ－ｇ／ＴＮＦ－ａを産生する１型ヘルパーＴ（Ｔｈ１）細胞、ＩＬ－４／ＩＬ－５／ＩＬ－１３を産生する２型ヘルパーＴ（Ｔｈ２）細胞）、調節性Ｔ細胞、細胞障害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）などのエフェクターへと分化する。エフェクターＴ細胞は炎症部位にホーミングし、迅速なエフェクター機能（サイトカイン分泌、感染／腫瘍細胞の溶解／障害）を行う細胞であって、その寿命は短い。一方、メモリーＴ細胞は一次免疫によって生じる長寿命の細胞であり、リコール抗原に対して優れた免疫応答を示す。

【０００８】

免疫療法における樹状細胞

樹状細胞は、「天然の免疫賦活剤（アジュバント）」であり、言い換えれば、防御免疫応答の誘導を行う最も特化した細胞系を構成しているため、ヒトの免疫療法における使用が検討されている（Ｆｏｎｇ　ａｎｄ　Ｅｎｇｌｅｍａｎ，２０００；Ｓｔｅｉｎｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｓｃｈｕｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｆｉｇｄｏｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。考えられる応用領域としては、癌治療、病原体に対するワクチン接種（例えばヒト免疫不全ウイルス［ＨＩＶ］－ＩやＣ型肝炎ウイルス）、自己免疫疾患の治療などがあげられる。現在用いられている樹状細胞療法のプロトコールでは以下の段階を行う。

【０００９】

１．患者の血液からの前駆細胞の単離精製（骨髄由来ＣＤ３４$^{+}$造血前駆細胞や末梢血のＣＤ１４$^{+}$またはＣＤＨｃ$^{+}$細胞）。

【００１０】

２．ｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞培養による樹状細胞の生成。

【００１１】

３．成熟樹状細胞にペプチドを提示させるためのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの抗原のローディング。

【００１２】

４．ペプチド提示樹状細胞の単回または複数回注入による患者の治療。

【００１３】

現在、免疫療法における樹状細胞の応用には幾つかの問題点がある（Ｆｏｎｇ　ａｎｄ　Ｅｎｇｌｅｍａｎ，２０００；Ｓｔｅｉｎｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｓｃｈｕｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｆｉｇｄｏｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。簡単に説明すると、樹状細胞の前駆細胞は、末梢血中において非常に少なく、また、ｉｎ　ｖｉｔ

ｒｏ培養で増殖しないため、患者から多量の血液サンプルを採取して繰り返し操作を行う必要がある。樹状細胞は機能的に不均一であり、反対の効果または望ましくない効果をもたらす場合がある（例えば、エフェクターＴ細胞の生成の代わりに免疫抑制を引き起こす）。さらに樹状細胞は機能的に不安定であり、不可逆的な一連の分化のステップを経て、免疫機能の低下（疲弊）を引き起こす場合がある。このため、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ操作による機能的に均一な樹状細胞製剤の調製は、極めて困難である。最後に、免疫療法で用いるためのペプチド提示樹状細胞の生成には高度な技術を要し、時間とコストが嵩む。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００１４】

発明の概要

本発明は、抗原提示を行うヒトγδＴ細胞の簡便な単離方法及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ調製方法、ならびに免疫療法における有効である抗原提示細胞（ＡＰＣ）としての当該細胞の使用を開示するものである。ヒトγδＴ細胞は、その能力と効果において樹状細胞と同様であり、抗原をプロセスして、抗原性ペプチドをαβＴ細胞に提示し、ナイーブαβＴ細胞に抗原特異的応答（増殖及び分化）を誘導する。γδＴ細胞は末梢血中に比較的高頻度で見出され（ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞の２～１０％）、多くの簡便な方法によって末梢血から容易に精製することが可能であり、簡単な刺激条件化でのｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養で一日以内に「成熟」状態に達し（ＭＨＣ－ＩＩ及び基本的な接着分子及び共刺激分子の発現）、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養で７日間以上にわたって有効である抗原提示能を維持し、ヘルパーＴ細胞の強力な一次及び二次応答を誘導する。更に、γδＴ細胞は、保存して後に使用する目的でｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養で容易に増殖させることができる。

【００１５】

本発明は、有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製方法であって、ヒト末梢血の単核細胞からγδＴ細胞を選別し、選別された細胞を抗原提示能を誘導するための刺激で（抗原提示能の誘導の前、その間、または後に）処理し、抗原を細胞に投与することを行う方法、該方法によって調製された有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞、免疫療法及び免疫療法で用いるための薬剤の製造における該細胞の使用、そうした有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞による腫瘍、慢性または再発性感染症の治療方法、感染性または非感染性疾患を誘発する腫瘍または病原体に対するγδＴ細胞を標的としたワクチンによるワクチン接種方法ならびに薬剤の調製におけるそうしたγδＴ細胞標的化ワクチンの使用、新たな腫瘍または病原体由来抗原の特定方法、及びそうした有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞を用いた患者の免疫能の診断方法に関する。

【００１６】

発明の詳細な説明

「スキーム」に示したフロー図は、ヒト末梢血のγδＴ細胞を単離及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ処理することによる、有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞（Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$γδＴ細胞、以下「γδＴ細胞」と称する）を調製するための本発明の方法を要約したものである。γδＴ細胞の単離及びｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖のプロトコールはそれ自体知られているものであるが、刺激と抗原の投与またはペプチドローディングとの特定の組合わせについてはこれまでに述べられていない。開始物質はヒト末梢血であり、これを分画遠心法または免疫吸着法を用いて処理することによって、それぞれ高純度の、増殖または新鮮単離γδＴ細胞を得る。抗原の投与、またはペプチドの負荷とともに短時間（例えば２４時間）の刺激を加えることにより、免疫療法で使用するための有効である抗原提示能を有するγδＴ細胞が得ることができる。

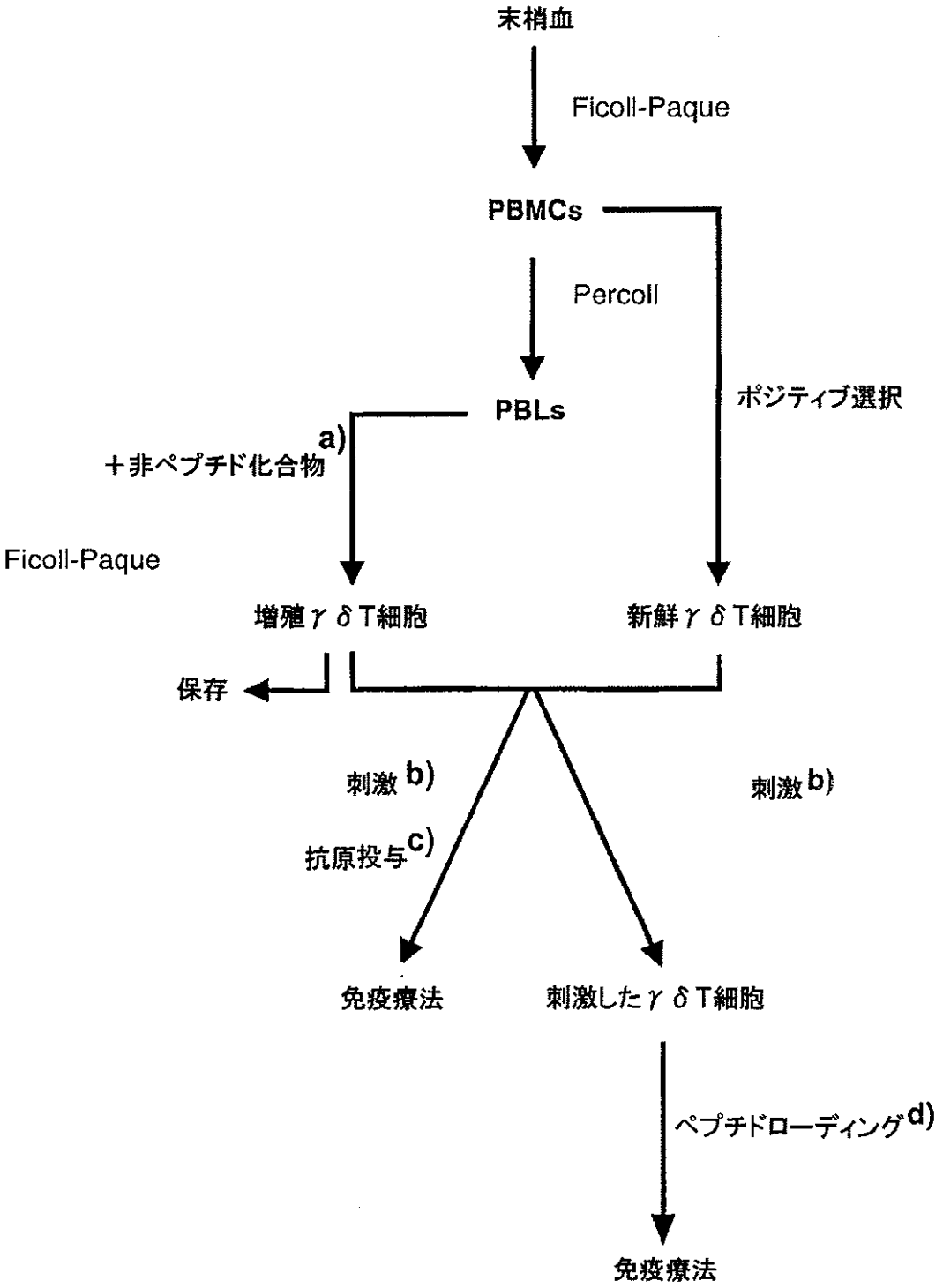
【００１７】

ａ）γδＴ細胞はイソペンテニルピロリン酸（ＩＰＰ）または後述するγδＴ細胞に選択性を有する他の低分子量の非ペプチド化合物の存在下で末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を培養することで容易に増殖させることができる（Ｍｏｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，２０００；Ｅｂｅｒｌ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。ＩＰＰまたはγδＴ細胞に対して選択性を有す

る他の低分子量非ペプチド化合物を使用して後述するような選択されたγδＴ細胞に抗原提示能を誘導することもできる。１０～２１日間の培養後には、増殖した生細胞の大半が（Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$の）γδＴ細胞となる。これをＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ遠心分離によって死細胞から分離し、直ちに抗原提示細胞（ＡＰＣ）生成に使用するか、あるいは液体窒素中で保存する。または実施例で述べるように、γδＴ細胞を末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）からポジティブ選択によって直接単離する。

（スキーム）

スキーム：有効である抗原提示ヒトγδT細胞の調製



【００１８】

ｂ）抗原取り込み、抗原提示能、及び共刺激分子の発現を誘導するため、単離した新鮮または増殖γδＴ細胞を（Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$）γδＴ細胞選択的化合物またはフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）または後述する他の刺激因子で短時間（例えば、１２～９６時間）刺激する。

【００１９】

ｃ）γδＴ細胞を刺激段階（ｂ）の前、その間、または後に抗原で処理して抗原提示γδＴ細胞とする。この抗原投与段階は、例えば、腫瘍、微生物やウイルス感染細胞から得られるcomplex extractsや公知のタンパク質を添加したり、またはこれらの病原体由来のタンパク質をコードするＤＮＡ／ＲＮＡを、単離核酸物質として、または発現ベクターや弱毒ウイルスに組み込んだものとして添加して、γδＴ細胞にトランスフェクト／トランスダクトし、微生物、病原体または腫瘍細胞由来の抗原を内在的に発現させ、プロセスさせる、といった多くの異なる方法によって行うことができる。

【００２０】

ｄ）短時間の刺激段階の間にγδＴ細胞に抗原（タンパク質やＤＮＡ／ＲＮＡ）を添加する（ｂとｃの組み合わせ）代わりに、これらの段階を連続的に行ってもよい。その場合、刺激したγδＴ細胞に、タンパク分解によるプロセシングを必要としない公知のペプチド抗原を短時間「ロード」する。

【００２１】

ＩＰＰ以外にも、段階（ａ）での使用が考えられる（Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$）γδＴ細胞に対する選択性を有する低分子量の非ペプチド抗原として、（Ｅ）－４－ヒドロキシ－３－メチル－ブト－２－エニルピロリン酸（ＨＭＢ－ＰＰ）、エチルピロリン酸（ＥＰＰ）、ファルネシルピロリン酸（ＦＰＰ）、ジメチルアリルリン酸（ＤＭＡＰ）、ジメチルアリルピロリン酸（ＤＭＡＰＰ）、エチル－アデノシン三リン酸（ＥＰＰＰＡ）、ゲラニルピロリン酸（ＧＰＰ）、ゲラニルゲラニルピロリン酸（ＧＧＰＰ）、イソペンテニル－アデノシン三リン酸（ＩＰＰＰＡ）、モノエチルリン酸（ＭＥＰ）、モノエチルピロリン酸（ＭＥＰＰ）、３－ホルミル－１－ブチル－ピロリン酸（ＴＵＢＡｇ１）、Ｘ－ピロリン酸（ＴＵＢＡｇ２）、３－ホルミル－１－ブチル－ウリジン三リン酸（ＴＵＢＡｇ３）、３－ホルミル－１－ブチル－デオキシチミジン三リン酸（ＴＵＢＡｇ４）、モノエチルアルキルアミン、アリルピロリン酸、クロトイルピロリン酸、ジメチルアリル－γ－ウリジン三リン酸、クロトイル－γ－ウリジン三リン酸、アリル－γ－ウリジン三リン酸、エチルアミン、イソブチルアミン、ｓｅｃ－ブチルアミン、イソ－アミルアミン、及び窒素含有ビスホスホネートが挙げられる。好ましくはＢ細胞や代替物によって提示されるＩＰＰが投与される。

【００２２】

ポジティブ選択は、例えばヒトＶγ２Ｖδ２－ＴＣＲに対する抗体をヒト末梢血単核細胞に加えた（例、１～３時間インキュベートする）後、磁気細胞分離にかけることによって行う。またポジティブ選択は、ヒトＶγ２Ｖδ２－ＴＣＲに対する抗体をヒト末梢血単核細胞に加えた（Ｐａｎ－γδＴ細胞選択）後、磁気細胞分離にかけることによっても行うことができる。

【００２３】

段階（ｂ）で抗原提示能を誘導するための刺激として有用な（Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$）γδＴ細胞選択的化合物としては、ＩＰＰや段階（ａ）に関して上述した他の非ペプチド化合物（例、４－ヒドロキシ－３－メチル－ブト－２－エニルピロリン酸や関連する他の微生物代謝物）が挙げられる。また、抗原の取り込み、抗原提示能及び共刺激分子の発現を誘導するための刺激としてはＰＨＡや他の置換物も有用である。

【００２４】

刺激した細胞は、γδＴ細胞の増殖を阻害するために必要に応じて放射線照射する。

【００２５】

段階（ｃ）及び／または（ｄ）でタンパク質として用いられる抗原の例としては、樹状細胞を抗原提示細胞として使用する免疫療法のプロトコールで今日用いられているもので、腫瘍細胞、感染性物質（ウイルス、細菌、酵母、寄生虫などの微生物）及び病原体毒素などの治療対象に関連するものが挙げられる。こうした抗原としては（これらに限定されるものではないが）、腫瘍関連抗原（腫瘍特異的な代謝性、構造性、及び細胞表面タンパク質など）；ウイルス関連抗原（ウイルスによってコードされるエンベロープ、構造性、代謝性及び酵素タンパク質、例えば異なるウイルスクレードのＨＩＶｇｐ１２０タンパク

質、ＨＩＶ　Ｔａｔ、ＨＩＶプロテアーゼ、例えば肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、ヘルペスウイルスなどに由来するエンベロープ、構造性、代謝性及び酵素タンパク質）；細菌関連抗原（細菌によってコードされる細胞壁、構造性、代謝性及び酵素タンパク質など、例えばマイコバクテリア（例えば、Ｍ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、Ｍ．ｌｅｐｒａｅ）、リステリア菌、肺炎球菌、ブドウ球菌（例えば、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）、連鎖球菌（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、コレラ菌、破傷風菌などに由来するもの；酵母及び真菌類関連抗原（酵母／真菌によってコードされる細胞壁、構造性、代謝性及び酵素タンパク質など、例えばＣａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓなどに由来するもの）；及び病原体由来毒素（細菌のエンテロトキシン、例えばブドウ球菌エンテロトキシン、毒素性ショック症候群毒素、破傷風毒素など）が挙げられる。

【００２６】

タンパク質として用いられる抗原の例としては更に、抗生物質による治療に対して高い耐性を示す細菌や世界的に生命に関わる疾病の原因となっている微生物（例えばマラリア原虫（例えば、Ｐ．　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ，　Ｐ．　ｖｉｖａｘ，　Ｐ．　ｍａｌａｒｉａｅ）、リーシュマニア、トリパノソーマ、エントアメーバ、充血吸虫、フィラリアなど）に関連するものが挙げられる。

【００２７】

段階（ｃ）でＲＮＡ／ＤＮＡとして投与される抗原としては、血液や組織の細胞へのトランスフェクションプロトコールで今日用いられているものが挙げられ、上述したような腫瘍細胞、感染性物質（ウイルス、細菌、酵母、寄生虫などの微生物）や病原体関連毒素のタンパク質をコードするものが挙げられる（ただしこれらに限定されない）。

【００２８】

「有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞」において用いられる「有効である」とは、これらの細胞の抗原提示能が樹状細胞の抗原提示能と同等であることを意味する。「有効である」とは、例えば同様の条件下で樹状細胞の少なくとも１０％の効果を有することを意味し、その差は細胞の形状や表面積といった細胞の形態の差にもとづくものである。

【００２９】

短時間刺激したγδＴ細胞はケモカイン受容体であるＣＣＲ７を一様に発現する。このことは抗原提示細胞がリンパ節やパイエル板にホーミングするうえで必須条件であり、また、適応免疫応答の開始にとって重要な条件である。休眠状態の末梢血γδＴ細胞はＭＨＣ－ＩＩ分子を発現していないことから、免疫寛容誘発的にペプチド抗原を提示することはできない。こうした「安全（safety）」を保障する仕組みがある点で、γδＴ細胞は免疫寛容誘導能を有する樹状細胞やＢ細胞などの他の抗原提示細胞とは異なっている。抗原提示γδＴ細胞の用途としては特に、腫瘍患者の治療における腫瘍に対する免疫応答の誘導及び／または改善、及び慢性感染症や不適当な免疫能を有する患者の治療における微生物やウイルスに対する免疫応答の誘導及び／または改善が挙げられる。更に抗原提示γδＴ細胞の免疫療法における有望な用途として、新たな腫瘍や強力な免疫原性を有する病原体由来の抗原の特定に用いることも可能である。また、免疫抑制患者の適応免疫能（免疫適格状態）を監視するためのγδＴ細胞の応用についても述べる。

【００３０】

以下に本発明を、本発明の方法の効果を説明した付属の図面を参照して更に詳細に説明する。

【００３１】

図１は末梢血から単離直後または刺激後に１日間または７日間培養したγδＴ細胞上の細胞表面分子の発現状態を示したものである。比較のため、１日間刺激したαβＴ細胞と単離したばかりの単核球上の同じ細胞表面分子についても調べた。図１に示した細胞表面分子には、ＭＨＣ－ＩＩ；ナイーブ及びメモリーＴ細胞上に存在する受容体ＣＤ２８の２つの選択的リガンドである共刺激分子ＣＤ８０及びＣＤ８６；ＣＤ２７のリガンドである

ＣＤ７０；ＣＤ１５４／ＣＤ４０リガンドの受容体であるＣＤ４０、ならびに細胞同士の接触に関与する接着分子であるＣＤ５４／ＩＣＡＭ－１、ＣＤ１１ａ／αＬインテグリン及びＣＤ１８／β２インテグリンが含まれる。これらのデータは、新鮮単離γδＴ細胞はある程度の接着分子を有するが、ナイーブＴ細胞の活性化及び分化に不可欠なＭＨＣ－ＩＩ分子及び共刺激分子を欠いていることを示している。これに対し、γδＴ細胞の短時間（１日間）刺激によってＭＨＣ－ＩＩ及び共刺激分子が極めて高いレベルで発現し、接着分子の発現も更に増加した。注目すべき点として、ＣＤ４０とＣＤ５４を例外としてこれらの細胞表面分子の発現レベルは７日間のγδＴ細胞の培養期間中一定に保たれるかまたは一層増加した。極めて対照的に、同じ分子（単核球上のＣＤ８６を除く）がαβＴ細胞及び単核球上では発現が中程度かあるいは発現しなかった。

【００３２】

表１の数字は、γδＴ細胞及び比較のためαβＴ細胞、単核球、成熟樹状細胞上での細胞表面分子の発現を詳しく調べた結果をまとめたものである。表には図１に示した例以外に更なる細胞表面分子が含まれている。表中の数字は、平均蛍光強度（ＭＦＩ）の平均値として表した平均の発現レベルと対応する標準偏差（ＳＤ）を示している。注目すべき点として、活性化γδＴ細胞上のＭＨＣ－ＩＩ（ＨＬＡ－ＤＲ）、共刺激分子及び接着分子の陽性度は成熟樹状細胞と同程度であるが、活性化αβＴ細胞及び単核球に見られる発現レベルよりは遥かに高い点である。図２及び表２はＢｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３によって以前に報告された結果を示したものであり、本発明に関係する活性化ヒトγδＴ細胞の更なる特徴を説明するために示したものである。表２に示したケモカイン受容体の発現レベルでは、新鮮単離末梢血γδＴ細胞と刺激されたγδＴ細胞との間で、明らかな差異が認められる。末梢血中のγδＴ細胞は、炎症及び感染部位へ速やかに動員されるようにケモカイン受容体と接着分子（図１）を発現しているが、γδＴ細胞の短時間の活性化により、こうした炎症部位への遊走能は部分的に阻害され（ＣＣＲ２及びＣＣＲ５のダウンレギュレーション）、代わりに、脾臓、リンパ節やパイエル板のＴ細胞領域に有効にホーミングされるようにＣＣＲ７の発現が速やかに誘導される。

【００３３】

表１：ヒトγδＴ細胞上の細胞表面分子の発現レベル

	新鮮γδＴ細胞 MFI ± SD (n) [a]	１日γδＴ細胞 MFI ± SD (n)	７日γδＴ細胞 MFI ± SD (n)	１日γδＴ細胞 MFI ± SD (n)	新鮮単核球 MFI ± SD (n)	8 h LPS DC MFI ± SD (n)
HLA-DR	8 ± 13 (4)	1738 ± 229 (4)	2426 ± 1416 (4)	368 ± 200 (8)	743 ± 298 (4)	1873 ± 142 (3)
CD80	0 ± 0 (3)	157 ± 74 (3)	115 ± 30 (4)	3 ± 22 (8)	2 ± 2 (6)	109 ± 90 (3)
CD86	2 ± 1 (4)	499 ± 249 (4)	412 ± 256 (6)	89 ± 89 (12)	333 ± 130 (5)	299 ± 325 (2)
CD70	0 ± 0 (4)	293 ± 191 (3)	422 ± 229 (3)	11 ± 5 (6)	0 ± 0 (4)	0 ± 0 (2)
CD54	179 ± 44 (3)	3589 ± 646 (3)	511 ± 116 (3)	949 ± 529 (6)	602 ± 194 (3)	1272 ± 605 (2)
CD11a	274 ± 90 (3)	651 ± 86 (2)	2663 ± 919 (2)	154 ± 8 (2)	411 ± 179 (4)	4 (1)
CD18	233 ± 60 (3)	547 ± 18 (2)	1174 ± 420 (2)	129 ± 11 (2)	283 ± 34 (4)	5 (1)
CD40	10 ± 8 (3)	684 ± 41 (2)	46 ± 7 (3)	108 ± 13 (4)	69 ± 33 (3)	493 ± 179 (2)
CD11b	55 ± 11 (5)	141 ± 63 (6)	117 ± 182 (4)	11 ± 6 (8)	n.d. [b]	325 ± 118 (2)
CD11c	8 ± 2 (2)	100 ± 82 (3)	168 ± 42 (2)	46 (1)	n.d.	453 ± 141 (2)
CD50	381 (1)	347 ± 88 (2)	347 ± 88 (2)	n.d.	n.d.	30 ± 18 (2)
CD83	0 ± 0 (2)	85 ± 79 (2)	4 ± 1 (2)	n.d.	n.d.	33 ± 22 (2)

[a] 細胞は刺激し、示された分子の細胞表面での発現について実施例で述べたようにフローサイトメトリーで調べた。ＭＦＩ＝平均蛍光強度；ＳＤ＝標準偏差；（ｎ）は個々の実験の数

[b] ｎ．ｄ．＝未測定

【表２】

表２　ヒトγδＴ細胞でのケモカイン受容体の発現.

	新鮮γδＴ細胞 陽性度(%)[a] S. D. ±平均値(n)	活性化γδＴ細胞 陽性度(%) S. D. ±平均値(n)
CXCR3	66.5 ± 8.2 (10)	65.9 ± 18.9 (9)
CXCR4	53.1 ± 13.8 (7)	57.2 ± 21.6 (6)
CXCR5	2.3 ± 1.8 (7)	2.0 ± 2.9 (5)
CCR1	20.6 ± 10.7 (5)	24.5 ± 16.9 (4)
CCR2	23.0 ± 7.2 (9)	14.1 ± 5.3 (7)
CCR4	13.3 ± 10.2 (12)	29.9 ± 10.8 (12)
CCR5	61.2 ± 10.4 (12)	2.5 ± 5.4 (9)
CCR6	20.1 ± 11.1 (6)	15.2 ± 14.7 (4)
CCR7	18.9 ± 9.7 (23)	77.6 ± 14.7 (14)

[a] データはBrandes et al., Blood (2003)より

【００３５】
図２は、短時間活性化されたγδＴ細胞の遊走能をｉｎ　ｖｉｔｒｏでの走化性分析によって評価した結果を示す（Ｂｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。データは、活性化されたγδＴ細胞ではＣＣＲ７のリガンドであるＳＬＣ／ＣＣＬ２１に対する応答性が高く、ＣＣＲ５（及びＣＣＲ１、ＣＣＲ３）のリガンドであるＲＡＮＴＥＳ／ＣＣＬ５に対する応答性が大幅に低下していることを明らかに示している。このデータは更に、細胞表面の各ケモカイン受容体の発現レベルの変化は、対応するケモカインに対する遊走応答に直接反映されることを示している。
【００３６】
まとめると、図１及び図２ならびに表１及び表２に示された結果は、刺激されているが休眠状態にない（新鮮単離）末梢血γδＴ細胞は、接着分子及び共刺激分子、ならびにリンパ節ホーミングやナイーブＴ細胞の刺激に必要とされるケモカイン受容体などの多くの不可欠因子を発現していることを示すものである。活性化によって誘導されるこうした遊走や抗原提示細胞関連のパラメータの調節は、活性化によって誘導される樹状細胞の変化とよく符合する（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ　ａｎｄ　Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。更にこれらのデータは、刺激されたヒトγδＴ細胞は樹状細胞に匹敵する強力な抗原提示細胞として機能することを示すものである。
【００３７】
急速かつ多量な、抗原とは無関係の細胞クラスターの形成は、樹状細胞とＴ細胞の相互作用に特徴的であり、また、抗原とは無関係なナイーブＴ細胞の刺激及び分化にとっての必須条件である。図３は、刺激されたγδＴ細胞もまた、培養３時間以内にナイーブ（休眠）ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞と顕著な細胞クラスターを形成する様子を示したものである。注

目すべき点としては、これらのクラスターが抗原の非存在下で形成される点であり、接着分子及び共刺激分子がこうした効果の原因となっている可能性を示唆するものである。γδＴ細胞は成熟樹状細胞と少なくとも同程度の有効性でクラスター形成を媒介する。対照的に、１日間の活性化を行ったαβＴ細胞や新鮮単離単核球（図示せず）ではその効果は大幅に低く、このことはこれらの細胞上での接着分子及び共刺激分子の発現レベルが低いことと符合する。これらのデータは、短時間の活性化を行ったγδＴ細胞が強力な抗原提示能を示すことの更なる証拠を与えるものである。

【００３８】

活性化されたγδＴ細胞は更に、抗原特異的なＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞系の応答が引き起こされるよう、抗原を取り込み、プロセスして提示する能力を有する。図４は、短時間刺激した破傷風トキソイド（ＴＴ）提示γδＴ細胞、または対照としてのＴＴ提示樹状細胞に応答してＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞が増殖する様子を示したものである。ＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞系はγδＴ細胞と同じドナーから得られたものである。休眠状態のＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞にＣＦＳＥをロードし、フローサイトメトリーによって培養細胞のＣＦＳＥシグナルの低下を測定することによって応答性細胞の増殖を調べた（実施例を参照）。細胞分裂の際、ＣＦＳＥを含有する細胞質は２個の娘細胞に分割されることから毎回の細胞分裂によってＣＦＳＥシグナルは５０％ずつ低下する。こうした分析によって、ａ）増殖細胞に対する非応答性細胞の割合（低下したＣＦＳＥシグナルに対するインプット／最大値）、ｂ）異なる回毎の細胞分裂における細胞のサブセット、及びｃ）抗原提示細胞に応答した実験開始時の細胞の割合を決定することが可能である。こうした情報は、細胞増殖を調べるための別の方法である^{3}Ｈ－チミジン取り込みアッセイでは得られないものである。図４は、γδＴ細胞がＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の増殖を誘導すること、及びＴＴの非存在下で刺激されたγδＴ細胞が不活性であることから、こうした応答が抗原に完全に依存していることを示している。ＣＦＳＥシグナルが更に低下している（図４における蛍光シグナルの左方へのシフト）ことから、この結果は更に培養の４日目と６日目の間にもＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が増殖し続けたことを示している。注目すべき点としては、こうした応答においてγδＴ細胞が成熟樹状細胞と同様の強力な効果を示す点であり、このことは短時間刺激されたγδＴ細胞が強力な抗原提示能を有することを示すものである。

【００３９】

図５は、ＴＴ特異的増殖応答には、ＴＴ提示γδＴ細胞と応答性のＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞（応答性細胞）との細胞接触が必要であることを示したものである。ＴＴ提示γδＴ細胞と応答性細胞を含む共培養から多孔質膜によって隔離されている応答性細胞は増殖しない。多孔質膜は、２個の培養区画間において、細胞の移動は阻止するが、可溶性メディエーターの移動は阻止しない。したがって図５の結果は、ＴＴ提示γδＴ細胞と応答性細胞の共培養で産生されたサイトカインや増殖因子は、別に培養された応答性細胞の増殖には何らの影響も及ぼさないことも示している。

【００４０】

ＴＣＲが活性化されるとＴＣＲの内在化が起こり、細胞表面のＴＣＲ及びＣＤ３などのアクセサリー分子の発現が低下する。図６は、ＴＴ提示γδＴ細胞による、ＴＴ特異的応答性細胞におけるＴＣＲの発現低下の誘導（図４参照）を細胞表面のＣＤ３の発現量の低下によって評価した結果を示したものである。この結果、γδＴ細胞はＴＴを取り込んでプロセスし、ＴＴ由来のペプチドをＭＨＣ－ＩＩ－ペプチド複合体として、ＴＣＲの結合に充分な態様でＴＴ特異的応答性細胞に対して提示することが可能となる。活性化されているが休止状態にない末梢血γδＴ細胞は細胞表面にＭＨＣ－ＩＩ分子を発現していることから、抗原提示能はγδＴ細胞の活性化と密接に関連していると考えられる。図６は更に、ＴＣＲの発現低下は刺激されたγδＴ細胞上のＴＴペプチドの密度の関数であることを示している。γδＴ細胞上のＴＴペプチドの密度は、γδＴ細胞を刺激する際に添加されるＴＴの量を変化させることによって制御される。明らかな点として、刺激されたγδＴ細胞上に存在するＴＴ由来ＭＨＣ－ＩＩ－ペプチド複合体の量が多ければ多いほど、応

答性細胞上のより多くのＴＣＲが結合し、またその発現は低下する。γδＴ細胞と樹状細胞との間のＴＣＲの発現低下（ダウンモジュレーション）に対する効果の差は、これらの細胞の形態が大きく異なることによるものであると考えられる。成熟した抗原提示樹状細胞の細胞表面積は、刺激されたγδＴ細胞の１０倍以上である（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。

【００４１】

増殖に加えて、ＴＴ提示γδＴ細胞は、ＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞における活性化マーカーの発現を誘導する。図７は、応答性細胞の細胞表面での、ＣＤ２５、ＩＣＯＳ及びＣＤ１３４／ＯＸ４０などのＴ細胞活性化マーカーのアップレギュレーションを示したものである。これらの活性化マーカーはＴＣＲ活性化に応答して新たに発現または増加する。これらの活性化マーカーがＴＴの非存在下で刺激されたγδＴ細胞によって誘導されることはないため、Ｔ細胞の増殖の誘導と同様、こうした活性化マーカーの高レベルの発現は、短時間刺激されたγδＴ細胞によるＴＴ－ペプチドの提示に完全に依存していると考えられる。

【００４２】

図８は、エプスタイン・バーウイルス（ＥＶＢ）で不死化した異種Ｂ細胞及び自己応答性細胞はＴＴ提示能を欠いていることを示している。γδＴ細胞を刺激するためのプロトコールの１つとして、自己のＢ細胞か、あるいはｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験の便宜上、ＥＢＶ－Ｂ細胞系（異種ＣＰ．ＥＢＶ系）をＩＰＰ提示細胞として使用し、これを放射線照射したものを使用するものがある。図８は、ＴＴ処理したＣＰ．ＥＢＶ細胞はＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞の増殖を誘導しなかったことを示しており、このことはＣＰ．ＥＢＶの物質がＴＴ－ペプチド提示γδＴ細胞で得られた強力な増殖応答と無関係であることを示している。更に図８は、αβＴ細胞系がそれ自体でＴＴを提示する能力は低いことを示している。

【００４３】

ＴＴについて図４～８で示されたものと同様の効果が、複雑な未定義抗原であるMycobacterium tuberculosis精製タンパク質誘導体（ＰＰＤ）でも得られる。図９は、抗原提示細胞としてのＰＰＤ－ペプチド提示γδＴ細胞またはＰＰＤ－ペプチド提示樹状細胞によって刺激した後、４日間または８日間培養した後のＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞の増殖応答を示したものである。この場合も実験は自己条件下で行った、すなわち抗原提示細胞（γδＴ細胞及び樹状細胞）及び応答性細胞（ＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞系）は同じドナーから得た。ＴＴに関して述べたのと同様に、増殖応答はＰＰＤ特異的であり、γδＴ細胞と樹状細胞との間で大きく異なることはなかった。またαβＴ細胞系自体はＰＰＤ特異的応答性細胞の増殖を誘導することはなかった。同じ抗原濃度では、γδＴ細胞及び樹状細胞はＰＰＤと比較してより著明な応答をＴＴに対して誘導した。これはＴＴ（Ｍｒ［ＴＴ］：１５０ｋＤａ）とＰＰＤ（Ｍｒ［ＰＰＤ］：≧１０，０００ｋＤａ）との複雑さの差によるものと考えられる。ＰＰＤや微生物の全体のような複雑な抗原では、抗原性ペプチドのレパートリーが非常に多様であることから、各抗原提示細胞はまちまちなＭＨＣ－ペプチド複合体を低レベルで提示することになる。これと一致して、クローン化されたＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞のＰＰＤ提示抗原提示細胞との共培養では、ＴＴ系と比較して目立ったＴＣＲの発現低下（downmodulation）は認められなかった（図６）。

【００４４】

以上まとめると、ＴＴ特異的及びＰＰＤ特異的応答性細胞での実験によって、ヒト末梢血から得られる、刺激された（ただし休眠状態にはない）γδＴ細胞は、強力な抗原取り込み能、抗原提示能及びＴ細胞刺激能を有しているという本発明の知見が得られた。こうしたγδＴ細胞の能力及び効果は注目に値するものであり、樹状細胞に匹敵するものである。

【００４５】

樹状細胞などの有効である抗原提示細胞の特徴は、ナイーブ（抗原刺激を受けていない

）なＴ細胞が刺激され、そのＴ細胞がサイトカインを産生し、標的細胞を殺す能力を有する抗原特異的なエフェクターＴ細胞へと分化する一次適応免疫応答を誘導する能力にある（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ａｎｄ Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ｅｔ ａｌ．，２００４）。完全に分化したメモリーＴ細胞は活性化の閾値が低く、エフェクター細胞として機能するためには共刺激の非存在下でのＴＣＲ活性化で充分である。下記に示す図の実験結果は、刺激されたγδＴ細胞は樹状細胞に匹敵する抗原提示能を更に有することを示している。したがって抗原刺激を受けたＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞系（図４～９）の代わりに単離したばかりの自己のナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞を応答性細胞として使用することが可能である。

【００４６】

図１０は、ＣＦＳＥ標識したナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞が、毒素性ショック症候群毒素（ＴＳＳＴ－１）をロードした短時間刺激γδＴ細胞、及びＴＳＳＴ－１をロードした成熟樹状細胞に応答して増殖する場合の増殖度を、ＴＳＳＴ－１をロードした刺激αβＴ細胞またはＴＳＳＴ－１をロードした新鮮単離単核球に対する応答と比較して示したものである。ＴＳＳＴ－１は抗原提示細胞上のＭＨＣ－ＩＩ分子に結合し、Ｖβ２鎖を有するαβＴＣＲに対する選択性を有する。末梢血のＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞の４～１０％はＶβ２$^{+}$であり、ＴＳＳＴ－１提示抗原提示細胞に対して高い親和性で応答する。図１０に示されるように、ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞は、ＣＦＳＥシグナルの低下によって示されるようにナイーブなＶβ２$^{+}$Ｔ細胞の増殖の誘導に特化した抗原提示細胞であり、この応答は、Ｖβ２ネガティブＴＣＲを有するナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞よりもＶβ２$^{+}$ＴＣＲを有するナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞において顕著である。細胞増殖の終了後には、得られたメモリーＴ細胞の大半がＶβ２$^{+}$ＴＣＲを発現している（表３も参照）。重要な点として、これらの増殖応答がＴＳＳＴ－１をロードした樹状細胞と同等である点である。こうした条件下では、ＴＳＳＴ－１をロードしたαβＴ細胞または単核球は完全に不活性であり、このことはこれらの細胞におけるＴＳＳＴ－１の提示及び／または共刺激のレベルが有効であるＴ細胞の一次応答を誘導するには不十分であることを示している。

【００４７】

【表３】

表３　長期培養（２１日間）におけるαβＴ細胞の発現及びＴｈ細胞分化

APC[a]	比	抗原[b]	ng/ml	Vβ2[+] (%)[c]	Th0 (%)[d]	Th1 (%)	Th2 (%)
γδT	1:5	TSST-1	10	32	18	25	16
γδT	1:1	TSST-1	10	70	2	73	1
γδT	1:5	TSST-1	100	99	9	46	6
γδT	1:5	TSST-1	1000	93	13	50	5
DC	1:5	TSST-1	10	80	6	84	<1
DC	1:5	TSST-1	100	83	2	86	<1
DC	1:5	TSST-1	1000	67	1	82	<1
–		PHA	1000	9	n.d.[e]	n.d.	n.d.

[a] 抗原提示細胞としてＴＳＳＴ－１をロードした１日刺激γδＴ細胞またはＴＳＳＴ－１をロードした成熟樹状細胞を用い、１：５～１：１の比でナイーブなＣＤ４[+]αβＴ細胞に加えた。
[b] ＴＳＳＴ－１は抗原提示細胞をロードするのに用いた抗原である。またはナイーブなＣＤ４[+]αβＴ細胞を抗原提示細胞の非存在下、ＰＨＡで直接活性化した。
[c] Ｖβ２＋応答性細胞の比率は図１０に述べたようにフローサイトメトリーにより求めた。
[d] サイトカイン分極化Ｔｈ細胞の比率は図１３に述べたように細胞内サイトカインを測定することにより求めた。
[e] データ未測定。

【００４８】

ナイーブなＣＤ４[+]αβＴ細胞の増殖の速度論及び程度を決定する共刺激分子以外の主要なパラメータとして、抗原提示細胞上のＭＨＣ－ＩＩ－ＴＳＳＴ－１複合体の密度や抗原提示細胞と応答性細胞との比があげられる。図１１は、異なる種類の抗原提示細胞に濃度を増大させてロードしたＴＳＳＴ－１に対して応答したＶβ２[+]ナイーブ応答性細胞の増殖の様子を示したものである。ナイーブＣＤ４[+]αβＴ細胞の添加に先立ち、抗原提示細胞を洗浄して過剰なＴＳＳＴ－１を除去した（実施例参照）。自己の抗原提示細胞としては、１日間または７日間刺激したγδＴ細胞、樹状細胞、新鮮単離単核球及び１日間刺激したαβＴ細胞を使用した。１日間刺激したγδＴ細胞は、１ｎｇ／ｍｌ程度の低いＴＳＳＴ－１濃度でＴ細胞の増殖応答を誘導し、最大応答に関しては樹状細胞と同程度の有効性であった。樹状細胞の約１０倍高い効果は、樹状細胞の細胞表面積が大きいことに起因すると考えられる（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。大きな表面積を有することにより、応答性細胞とのより高頻度かつ広範な接触が可能となる（図６も参照）。ＴＳＳＴ－１をロードする前に７日間培養して増殖させた刺激γδＴ細胞においても顕著な増殖応答が見られた点は注目に値する。γδＴ細胞は明らかに長期にわたって抗原提示細胞の機能を維持したが、このことは、観察された接着分子及び共刺激分子の維持と符合する（図１及び表１も参照）。単核球及びαβＴ細胞はγδＴ細胞と比べて１００倍以上効果が低かった。これらのデータは、刺激されたγδＴ細胞が高い抗原提示能を有することを示すものである。

【００４９】

図１２に示した実験では、抗原提示細胞をローディングする間にＴＳＳＴ－１の濃度を変化させる代わりに、ＴＳＳＴ－１の濃度を１００ｎｇ／ｍＬまたは１ｎｇ／ｍＬに維持し、ナイーブな応答性細胞に対する抗原提示細胞の比を１：５～１：２００の間で変化させた。ナイーブなＶβ２$^{+}$ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞の増殖応答は図１１と同様に分析を行った。１日間の刺激を行ったγδＴ細胞と樹状細胞との間には著明な差は認められず、抗原提示細胞の希釈度が最も高い場合（１：２００）にも、増殖応答は最大応答の２８％～４０％の範囲であった。これらのデータは更に有効である抗原提示細胞としてのγδＴ細胞の長所を示すものである。

【００５０】

一次免疫応答では、ナイーブなＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞がそれぞれ１型（ＩＦＮ－γ）、２型（ＩＬ－４）または０型（ＩＦＮ－γ＋ＩＬ－４）サイトカインを産生する分極化したＴｈ１、Ｔｈ２またはＴｈ０細胞に分化する。ナイーブなＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、これらの分極化Ｔｈ細胞のいずれかに分化する分化能を有する。Ｔ細胞の分極化は、ナイーブＴ細胞のプライミングのときに抗原提示細胞によって与えられる共刺激環境によって決定される。有効である抗原提示細胞は、ナイーブＴ細胞の増殖を誘導するばかりでなくナイーブＴ細胞のエフェクター細胞への分化も促進する。図１３は、刺激されたγδＴ細胞は、エフェクターＴｈ細胞を生成するための共刺激に関連して、有効にＴＳＳＴ－１を提示する能力を有することを示すものである。ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞によるプライミングの４日後には、殆どのＶβ２$^{+}$ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が増殖及びメモリーマーカーであるＣＤ４５ＲＯの発現による応答を示している。培養２１日後には、大半の細胞が休眠状態に戻り、ＣＤ４５ＲＯを均一に発現するＶβ２$^{+}$Ｔ細胞となっている（表３）。重要な点として、大半の細胞がＴｈ１、Ｔｈ２またはＴｈ０細胞に通常見られるサイトカインを産生しており、Ｔｈ１への分極化がＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞と応答性細胞との比を１：１に大きくすることで更に促進された点である。ここでもやはり樹状細胞の顕著な効果は、上述したような形態的な特徴によるものであると考えられる（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）（図６及び９も参照）。対照的に、抗原非特異的な活性化（フィトヘマグルチニン）はＶβ２$^{+}$細胞の選択的増殖を引き起こさず（表３）、刺激したαβＴ細胞はＣＤ４５ＲＯの発現及びナイーブなＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞の増殖を誘導しなかった（図１３）。

【００５１】

ＴＴ特異的及びＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞で見られたように（図５参照）、ナイーブなＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞の応答の誘導はＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞との細胞接触に完全に依存している（図１４）。刺激されたγδＴ細胞はナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞に強力な抗原特異的応答を誘導し、その増殖及び分化を有効である抗原提示細胞に一般的に見られる態様で促進する。

【００５２】

ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が抗原提示細胞上のＭＨＣクラスＩＩ－ペプチド複合体を認識するのに対して、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は抗原提示細胞上のＭＨＣクラスＩ－ペプチド複合体を認識する。ＭＨＣクラスＩ分子は、血液及び組織の細胞で広範に発現しているため、体内のすべての細胞はＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の標的細胞となりうる。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞はウイルス感染や腫瘍に対する防御において重要な役割を担っており、効果的なワクチン接種はしばしば抗原選択的な細胞障害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の生成に依存する。図１５は、Ｖδ２$^{+}$Ｔ細胞がＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞による一次応答を誘導するうえで極めて強力な抗原提示細胞として機能することを示したものである。抗原提示細胞としてＩＰＰで刺激したγδＴ細胞、成熟樹状細胞またはスーパー抗原で刺激したαβＴ細胞（すべて同じドナーから得た）を用いた増殖アッセイにおいて応答性細胞としてナイーブな、抗原による刺激を受けていないＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞を使用した。γδＴ細胞はＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞の増殖を誘導するうえで樹状細胞と完全に同等またはこれを上回る効果を示したが、αβＴ細胞の抗原提示能は低かった。図１６はγδＴ細胞が細胞障害性を有するエフェクターT細胞の分化を誘導することを示したものである。データは、ナイーブなＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞をアロ抗原特異的な細胞障害性Ｔ細胞

へと分化させるうえでγδＴ細胞と樹状細胞とは同等の効果を有することを示している。以上まとめると、ＴＣＲによって刺激されたＶδ２$^{+}$Ｔ細胞は、ナイーブなＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞のいずれにおいても強力な炎症誘発性の応答を「プロフェッショナル」な抗原提示細胞と同様の態様で誘導することが示された。

【００５３】

γδＴ細胞はまた、多くのタンパク質及び非タンパク質リガンドに対して選択性を有するＣ型レクチンＤＥＣ－２０５（ＣＤ２０５）やインテグリンサブユニットであるＣＤ１１ｂのようなエンドサイトーシス性の受容体も発現する。ＣＤ２０５及びＣＤ１１ｂは樹状細胞で高レベルで発現していることが知られている（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ａｎｄ Ｓｔｅｉｎｍａｎ，１９９８；Ｓｔｅｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ ｅｔ ａｌ．，２００４）。図１７は、γδＴ細胞が樹状細胞と同様、これらのエンドサイトーシス性受容体を高レベルで内在的に発現することを示したものである。樹状細胞に抗原を与えるための新規な方法と同様、これらのデータは、腫瘍や感染性物質に対するタンパク質ワクチンなどの抗原をγδＴ細胞に与えることによってｉｎ ｖｉｖｏで抗原プロセシング及び抗原提示させることが可能であることを示している。

【００５４】

これらの実験結果は、ヒト末梢血の単核細胞からγδＴ細胞を選別し、選別された細胞を抗原提示能を誘導するための刺激で処理し、刺激された細胞に抗原を投与する、本発明の有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製方法によって、樹状細胞に匹敵する抗原提示細胞が提供されることを示している。

【００５５】

特に、本発明は、γδＴ細胞の選別をヒトＶγＶδ－Ｔ細胞受容体に対する抗体を用いた磁気細胞分離によって行う、有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製方法に関するものである。また、γδＴ細胞の選別は、Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$Ｔ細胞受容体鎖を発現しているγδＴ細胞の選択的増殖を誘導する、構造的に定義された低分子量の非ペプチド化合物の存在下（例えばＢ細胞や代替物によって提示されるようなＩＰＰの存在下）で、新鮮単離された末梢血リンパ球を培養することによって行うことも可能である。

【００５６】

本発明は更に、有効である抗原提示能を誘導するための刺激が低分子量の非ペプチド化合物または代替物またはフィトヘマグルチニンである前記方法、及び、前記抗原が、定義されたタンパク質、未定義のタンパク質混合物、または腫瘍や感染細胞からの粗抽出物または濃縮抽出物である前記方法に関する。投与される抗原としては例えば、病原体または腫瘍細胞由来のペプチド、または病原体由来タンパク質があげられる。病原体由来タンパク質は、病原体由来タンパク質の内在的な発現を可能とする条件下で病原体由来タンパク質をコードしたＤＮＡまたはＲＮＡとして、特に精製したＤＮＡまたはＲＮＡ、またはＤＮＡやＲＮＡを含む導入ベクターとして投与される。抗原がＤＮＡやＲＮＡである場合、これらのＤＮＡやＲＮＡが適当に発現されるような条件が選択される。抗原はγδＴ細胞の刺激の前、その間、あるいは後に投与して抗原提示能を誘導する。抗原がペプチド（タンパク質断片）として投与される場合、抗原は「ペプチドローディング」と呼ばれる別の段階の後に投与することも可能である。

【００５７】

本発明に基づいて調製される有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞は本明細書で述べるように免疫療法に用いることが可能である。本発明のγδＴ細胞は公知の樹状細胞と同様に免疫療法に使用することが可能であり、末梢血中の存在が非常に少なく、ｉｎ ｖｉｔｒｏで増殖できない、不均一かつ機能的に不安定であるといった樹状細胞の使用にともなう困難の解決を図ることができる。

【００５８】

特に本明細書で述べる本発明に基づいて調製される有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞は、免疫療法で用いるための薬剤（医薬組成物）の製造に使用することができる。

【００５９】

本発明は更に、上述したような本発明に基づいて調製された有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞を含み、特に前述または後述の疾患の治療に用いられる医薬組成物に関する。組成物は、静脈内、筋内、皮下、粘膜または粘膜下投与などのヒトに非経口投与されるものが特に好ましい。組成物は、薬学的に許容される担体とともに細胞を含んでいてもよい。本発明の細胞の用量は治療を要する疾患、年齢、体重、個々の患者の状態、個々の患者の薬物動態学的データ及び投与形態に応じて異なる。医薬組成物は、約０．０１％～約５０％の本発明の細胞を含む。単位剤形としては、アンプルやバイアルが挙げられる。

【００６０】

等張水性懸濁液で使用されることが好ましい。医薬組成物は、保存料、安定化剤、湿潤剤及び／または乳化剤、可溶化剤、浸透圧を調節するための塩類及び／または緩衝剤などの賦形剤を含んでいてもよく、従来の混合法などの公知の方法によって調製することができる。注射剤の製造、アンプルやバイアルなどへの充填、及び容器の密封は通常滅菌条件下で行われる。

【００６１】

本発明は更に、治療を要する患者に有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞を注射することを特徴とする腫瘍及び慢性または再発性感染症の治療方法に関する。本方法では特に、前記のγδＴ細胞、例えば当該細胞を含む医薬組成物を、皮内、皮下、筋内、静脈内、粘膜または粘膜下の投与経路によって単回または反復投与する。

【００６２】

本発明の腫瘍の治療方法では、定義された腫瘍タンパクまたは腫瘍細胞の粗（未定義）抽出物の存在下で刺激したか、または生きた血液または組織細胞のトランスフェクション／トランスダクションに一般的に用いられる組み換えＲＮＡ／ＤＮＡ技術で処理することによって得られたγδＴ細胞を使用する。細胞表面のＭＨＣ分子に直接ロードされる定義された腫瘍ペプチドが知られている場合、これらのペプチドを刺激したγδＴ細胞に添加、培養、洗浄した後、直ちに治療に用いることが好ましい。１回の投与で使用するγδＴ細胞の数、γδＴ細胞の投与の経路及び頻度は、使用される個々の腫瘍抗原による免疫応答誘導の有効性、及び個々の患者における腫瘍の種類や位置に応じて異なる点は重要である。好ましいプロトコールの例としては、１～２０×10^6細胞／０．５～２ｍｌの投与の後、同量もしくはそれ以下の量の細胞を２週間から２ヶ月の間隔で１回～６回、追加投与する。

【００６３】

本発明の慢性または再発性感染症の治療方法では、好ましくは弱毒化された、定義された感染性物質または感染細胞の粗（未定義）抽出物の存在下で刺激したか、または生きた血液または組織細胞のトランスフェクション／トランスダクションに一般的に用いられる組み換えＲＮＡ／ＤＮＡ技術で処理することによって得られたγδＴ細胞を使用する。好ましい治療プロトコールは上述したものに準ずる。

【００６４】

本発明は更に、非感染性または非腫瘍誘発性の抗原を投与した有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞をワクチン接種が必要な患者に注射することを特徴とする腫瘍及び慢性または再発性感染症に対するワクチン接種方法に関する。ワクチン接種においては非感染性または非腫瘍誘発性の抗原を投与したγδＴ細胞を使用する点以外は上記と同様の方法を用いる。腫瘍抗原または感染性物質に対する患者のワクチン接種のための抗原提示γδＴ細胞ワクチンの調製ならびに当該細胞の投与は腫瘍免疫療法の説明に準ずる（上記参照）。好ましいプロトコールとしては、樹状細胞を用いたワクチン接種で現在用いられているプロトコールを用いることができる。こうした療法を受けた患者の免疫状態、言い換えればワクチン応答の質（効果、動態など）の評価方法については後述する。

【００６５】

本発明は更に、γδＴ細胞標的化ワクチンを個体に投与することを特徴とする腫瘍に対する（予防または治療）ワクチン接種、及び感染性または非感染性疾患を誘発する病原体に対するワクチン接種の別の方法に関する。好ましくはこうしたγδＴ細胞標的化ワクチ

ンは、ワクチン物質及びγδＴ細胞標的化分子からなるハイブリッド組成物である。γδＴ細胞標的化分子は、ＣＤ１１ｂやＣＤ２０５などのγδＴ細胞上のエンドサイトーシス性受容体に対して特異性を有する抗体またはリガンドである。ワクチン物質は、免疫防御されることが望ましいタンパク質や関連する分子である。

【００６６】

γδＴ細胞標的化ワクチンの投与では、注射、経口投与や最適な免疫防御を誘導する他のワクチン接種プロトコールによってγδＴ細胞標的化ワクチンを個体に繰り返し処置する必要がある。

【００６７】

本発明は更に、新たな腫瘍または病原体由来の抗原を特定するための方法であって、ヒト末梢血の単核細胞からγδＴ細胞を選別し、選別された細胞を高い抗原提示能を誘導するための刺激で処理し、未定義のタンパク質混合物の画分、腫瘍及び感染細胞からの粗または濃縮抽出物、または腫瘍及び感染性物質から得られたＲＮＡまたはＤＮＡライブラリーを投与し、自己ナイーブαβＴ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの活性化について試験し、異なる抗原の画分の活性化試験の結果を比較する方法に関する。

【００６８】

この方法では、治療または予防ワクチン接種で使用するための新たな、または改良された抗原を特定するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏのスクリーニングツールとしてγδＴ細胞を利用する。γδＴ細胞の単離、選別及び刺激は有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製方法について述べたのと同様にして行う。抗原を投与する段階では、抗原の粗調製物（例、細胞抽出物や未定義混合物）や、腫瘍及び感染性物質から得られたＲＮＡ／ＤＮＡライブラリーを使用する。このように調製したγδＴ細胞を同じドナーから得たナイーブなαβＴ細胞（自己αβＴ細胞）の活性化について試験する。これらのｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫応答アッセイでは、αβＴ細胞の増殖、サイトカイン産生、またはαβＴ細胞の活性化を示す他の簡単な指標値を測定する。培養条件としては、図１０～１４においてＴＳＳＴ－１提示γδＴ細胞に対するαβＴ細胞の応答に関して上述し、また実施例において述べるような条件が好ましい。異なる抗原の画分の活性化試験の結果と比較して、αβＴ細胞の応答が高ければその抗原源は免疫原性という点について、「活性有り（enriched）」であることを示す。該当する「活性有り」画分を更に処理し、更に分画された抗原について全実験サイクルを繰り返す。「活性有り」抗原源（タンパク質やＤＮＡライブラリーの画分）を繰り返し分画することにより、最終的に、強い免疫刺激能を有する単一のタンパク質が得られる。こうした新たなタンパク質は、タンパク質切断によって更に処理し、抗原提示細胞に直接ロードすることが可能な（小型の）免疫原性ペプチドの生成について切断混合物を分析してもよい。

【００６９】

本発明は更に、患者の免疫能を診断するための方法であって、ヒト末梢血の単核細胞からγδＴ細胞を選別し、選別された細胞を高い抗原提示能を誘導するための刺激で処理し、それに対する免疫能を決定すべき抗原を細胞に投与し、自己αβＴ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性化について試験する方法に関する。

【００７０】

この方法では、γδＴ細胞及び同じドナーから得られた抗原特異的メモリーαβＴ細胞に対するその影響を、特定の抗原に関して患者の免疫能を診断するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏツールとして、またワクチン接種が有効であったかを判定するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏツールとして利用する。γδＴ細胞の単離、選別及び刺激は有効である抗原提示ヒトγδＴ細胞の調製方法について述べたのと同様にして行う。抗原を投与する段階では、それに対する免疫能を決定すべき特定の抗原を刺激したγδＴ細胞に投与する。培養条件及びαβＴ細胞の応答を調べる（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫応答アッセイ）ための指標値としては、図１０～１４ならびに実施例においてＴＳＳＴ－１提示γδＴ細胞に対するαβＴ細胞の応答に関して述べたようなものが好ましい。大きな相違点は、抗原提示γδＴ細胞による刺激の際に活性化した免疫応答（増殖、サイトカイン産生など）をナイーブなαβＴ細胞

の代わりにメモリーＴ細胞を用いて調べる点である。免疫療法（ワクチン接種）が効果的である場合、抗原特異的なエフェクター／メモリーＴ細胞が産生されるが、これらの細胞は免疫状態のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの観察においてナイーブなαβＴ細胞と比較して数倍も高い免疫応答を示す。抗原特異的なメモリーαβＴ細胞は効果的なワクチン接種を受けた個体では高濃度で存在することから、これらのアッセイはバルク（分画化していない）αβＴ細胞を用いて行うことが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【００７１】

実施例

略号

ＤＣ：樹状細胞
ＬＮ：リンパ節
ＰＰ：パイエル板
ＴＣＲ：Ｔ細胞抗原受容体
ＢＣＲ：Ｂ細胞抗原受容体
ＭＨＣ：主要組織適合遺伝子複合体
ＡＰＣ：抗原提示細胞
Ｖδ^{+}Ｔ細胞：Ｖδ^{+}ＴＣＲ鎖を発現しているγδＴ細胞
Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$Ｔ細胞：Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$ＴＣＲ鎖を発現しているγδＴ細胞
ＩＰＰ：イソペンテニルピロリン酸
ＴＴ：破傷風菌毒素
ＰＰＤ：結核菌精製タンパク質誘導体
ＴＳＳＴ－１：毒素性ショック症候群毒素１
ＰＨＡ：フィトヘマグルチニン
ＩＦＮ－γ：インターフェロンγ
ＴＮＦ－α：腫瘍壊死因子α
ＩＬ：インターロイキン
ＦＡＣＳ：蛍光励起細胞分離装置
ＭＦＩ：平均蛍光強度
ＳＤ：標準誤差
ＣＦＳＥ：カルボキシフルオロセイン・ジアセテート・スクシンイミジル・エステル

１．細胞の単離及び生成

γδＴ細胞

ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を標準的プロトコールにしたがって、ヘパリン処理したドナー血液のバフィーコート、または新鮮血からＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ遠心分離によって単離した（Ｂｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社の磁気細胞分離装置を用い、ヒトＶγＶδ－ＴＣＲに対する抗体によってＰＢＭＣからγδＴ細胞をポジティブ選択した。この方法によれば通常、５０ｍｌの新鮮血から２～５×１０^{6}個の細胞を９８～９９％のγδＴ細胞の純度で得ることができる。

【００７２】

ナイーブαβＴ細胞

抗原刺激を受けていないナイーブなＣＤ４$^{+}$またはＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞（純度９８～９９％）を、それぞれＶγＶδ－ＴＣＲ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２５、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ５６、ＨＬＡ－ＤＲ及びＣＤ４またはＣＤ８に対する特異的抗原を用いたネガティブ磁気細胞分離によってＰＢＭＣから単離した後、これらのマーカーについて細胞をネガティブに染色する蛍光励起細胞分離を行った。

【００７３】

αβＴ細胞系

ヒトＣＤ４に対する抗体を用いて磁気細胞分離によりＰＢＭＣからＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞をポジティブ選択した。ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞を、ＴＴまたはＰＰＤを提示する放射線照射

（３０Ｇｙ）自己ＰＢＭＣによって最初のサイクルで１：１００、続くサイクルで１：１０の比となるように刺激した後、ＩＬ－２含有培地で増殖させた。抗原性に基づく選択及び増殖を３サイクル繰り返した後、ＣＦＳＥに基づく増殖アッセイ（後述）を行って抗原特異性を確認した。

【００７４】

Ｂ細胞

ネガティブ磁気細胞分離によってＰＢＭＣからＢ細胞を単離した。Ｂ細胞はγδＴ細胞の刺激に直接用いるか（後述）、あるいは標準的なプロトコールにしたがったＥＢＶ誘発形質転換によりＢ細胞系を確立してからγδＴ細胞の刺激に用いた。

【００７５】

単核球

ヒトＣＤ１４に対する抗体を用いたポジティブ磁気細胞分離によってＰＢＭＣから単核球を分離した。磁気的に捕集された細胞を分離カラムに流す前にカラムを厳密に洗浄することでＣＤ１４高発現（$CD14^{high}$）単核球を高濃度で得た。

【００７６】

樹状細胞

ＩＬ－４（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＧＭ－ＣＳＦ（２５ｎｇ／ｍｌ）の存在下、１０％ＦＣＳを含有する培地中でＣＤ１４高発現細胞を培養することによって単核球由来の樹状細胞を得た。６～７日間の培養後、ＨＬＡ■ＤＲ、ＣＤ１ａ、ＣＤ１４、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６及びＣＣＲ７に対する細胞表面の染色によって評価した結果、大半の細胞は未成熟であった。１００ｎｇ／ｍｌのＬＰＳ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ａｂｏｒｔｕｓ ｅｑｕｉ由来）の存在下、更に８時間培養することによって樹状細胞の成熟を誘導した（Ｌａｎｇｅｎｋａｍｐ ｅｔ ａｌ．，２０００）。細胞表面に存在する樹状細胞の成熟を示すマーカーであるＨＬＡ■ＤＲ、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６及びＣＣＲ７についてフローサイトメトリー染色を行って樹状細胞の成熟を確認した。

【００７７】

２．Ｔ細胞の刺激

γδＴ細胞

異種または自己のＥＢＶ形質転換Ｂ細胞系または初期Ｂ細胞によって提示されるイソペンテニルピロリン酸（ＩＰＰ）５０μＭを１：１０の希釈度で用い、前述したように（単離したばかりの）休眠状態γδＴ細胞を活性化した（Ｂｒａｎｄｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００３）。γδＴ細胞を、８％ヒト血清を加えた培地中でＩＬ－２（２０または２００ＩＵ／ｍｌ）の存在下培養した。

【００７８】

αβＴ細胞

ポジティブ選択したαβＴ細胞を、１０μｇ／ｍｌの抗ＣＤ３抗体（ＯＣＴ３）及び２５０ｎｇ／ｍｌの抗ＣＤ２８抗体（２８．２）、または１０ｎｇ／ｍｌのフォルボール１２－ミリスチン酸１３－酢酸（ＰＭＡ）及び１μｇ／ｍｌのイオノマイシン、または１μｇ／ｍｌのＰＨＡでコーティングしたプレート上で活性化し、８％ヒト血清を加えた培地中でＩＬ－２（２００ＩＵ／ｍｌ）の存在下培養した。

【００７９】

３．カルボキシフルオロセイン・ジアセテート・スクシンイミジル・エステル（ＣＦＳＥ）による標識

細胞をＰＢＳ$^{-}$で洗浄し、１％ＦＣＳを加えたＰＢＳ$^{-}$中で４分間、室温で２．５μＭのＣＦＳＥ（モレキュラー・プローブズ社、オレゴン州ユージーン）で標識した。５％ＦＣＳを加え、氷で冷やしたＰＢＳ$^{-}$で細胞を繰り返し洗浄することにより、標識を停止した。ＣＦＳＥ標識した細胞は直ちに細胞活性化及び増殖アッセイに使用した。

【００８０】

４．Ｉｎ ｖｉｔｒｏ抗原提示アッセイ

αβＴ細胞系に対する抗原提示

血液のγδＴ細胞を、１０～２０μｇ／ｍｌのＴＴ（ベルナ・バイオテック社、ベルン、スイス）または２０μｇ／ｍｌのＰＰＤ（スタテンス・シーラム・インスティテュート社、コペンハーゲン、デンマーク）の存在下、ＩＰＰを提示する放射線照射（１００Ｇｙ）異種ＥＢＶ－Ｂ細胞系ＣＰ－ＥＢＶ（上記参照）によって２４～６０時間活性化した。単核球由来樹状細胞をＴＴまたはＰＰＤと同じ時間培養し、最後の８時間に成熟させた（上記参照）。放射線照射（γδＴ細胞及び樹状細胞に対してそれぞれ２６及び４０Ｇｙ）及び集中的な洗浄の後、これらの抗原提示細胞を用いてＴＴ及びＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞のクローンを（特に断らない限り）１：５の比で刺激した。培養中の異なる時点で、フローサイトメトリーで応答性細胞を活性化マーカー（ＨＬＡ－ＤＲ、ＩＣＯＳ及びＣＤ２５）、ＴＣＲの内在化（細胞表面ＣＤ３の消失）及び細胞増殖（ＣＦＳＥシグナルの低下）について調べた。

【００８１】

ナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞のプライミング

γδＴ細胞及びαβＴ細胞の刺激後、または単核球由来樹状細胞の刺激後、またはＰＢＭＣからの単核球の単離後、これらの潜在的抗原提示細胞を異なる濃度の毒素性ショック症候群毒素（ＴＳＳＴ－１）（トキシン・テクノロジー社、フロリダ州サラソタ）で１時間、３７℃でパルスした。次いで潜在的抗原提示細胞を１２Ｇｙ（樹状細胞は４０Ｇｙ）で放射線照射し、よく洗浄してからＣＦＳＥ標識したナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞と混合（通常１：５の比）した。一般的には９６穴丸底プレートに外因性サイトカインを添加しない培地中、８×１０^{3}個の抗原提示細胞と４×１０^{4}個のＣＦＳＥ標識した応答性細胞を入れる。４日後に細胞の増殖をフローサイトメトリーにより調べた。次いでＴｈ細胞分化についてアッセイを行った。このアッセイでは、培養5日目に１００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を加えた後、１０～１６日間、応答性細胞が増殖を停止して休眠状態に戻るまで細胞を増殖させた（Ｌａｎｇｅｎｋａｍｐ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）。２１日目にＴｈ細胞の分化を細胞内のサイトカイン産生を測定することによって調べた。細胞を１０μｇ／ｍｌのブレフェルジンＡ（シグマ・アルドリッチ社）の存在下、ＰＭＡ／イオノマイシンで６時間刺激した後、２％パラホルムアルデヒドで固定し、２％ＦＣＳを加えたＰＢＳ中で０．５％サポニンによって透過性を与え、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４及びＶβ２－ＴＣＲに対する抗体で染色してからフローサイトメトリーで分析を行った。

【００８２】

ＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞のプライミング

混合白血球応答において、放射線照射したＩＰＰ刺激γδＴ細胞、スーパー抗原で活性化したαβＴ細胞またはＬＰＳで成熟させた樹状細胞を、ＣＦＳＥ標識した異種ナイーブＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞と共培養した。一般的には９６穴丸底プレートに１穴当たり４×１０^{4}個のＣＦＳＥ標識した応答性細胞と、４×１０^{4}個～４個の抗原提示細胞を入れる。これにより抗原提示細胞：応答性細胞の比は１：１～１：１０，０００となる。６日間の培養後、フローサイトメトリーで細胞の増殖を分析した。１４日間のナイーブＣＤ８$^{+}$αβＴ細胞との混合白血球応答後に、高濃度（１μＭ）及び低濃度（０．０５μＭ）のＣＦＳＥでそれぞれ標識した異種（真の標的）及び自己（ネガティブコントロール）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の混合物と１２時間共培養を行った後、フローサイトメトリーでＣＦＳＥシグナルを調べる細胞溶解アッセイを行ってＣＤ８$^{+}$エフェクター細胞の生成を調べた。真の標的細胞のカウントの減少は、ＣＤ８$^{+}$エフェクター細胞による抗原特異的な細胞障害を示し、ネガティブコントロール細胞のカウントの減少はＣＤ８$^{+}$エフェクター細胞による非特異的な細胞障害を示す。

【００８３】

５．細胞培地

実験全体を通じて使用した培地は、２ｍＭのＬ－グルタミン、１％非必須アミノ酸、１％ピルビン酸ナトリウム、５０μｇ／ｍｌペニシリン／ストレプトマイシン、５×１０$^{-5}$Ｍの２－メルカプトエタノール、及び１０％ＦＣＳ（ハイクローン・ラボラトリーズ社、ユタ州ローガン、またはギブコ　ビー・アール・エル社）または８％ヒト血清（スイス

・レッドクロス社、ベルン、スイス）を補ったＲＰＭＩ１６４０培地である。ヒト組換えＩＬ－２はミエローマ発現系を用いて産生されたものを使用した。

【００８４】

６．フローサイトメトリー

細胞の調製

細胞を２％ＦＣＳ及び０．０１％ナトリウム－酸を補った氷冷ＰＢＳ中で２回洗浄した。この細胞を１０ｍｇ／ｍｌヒト免疫グロブリンで１０分間ブロックした後、多様な細胞タンパク質に対して特異性を有する一次抗体またはアイソタイプが一致したコントロール抗体とともに氷上で２０分間インキュベートしてから、洗浄し、非標識一次抗体の場合には蛍光標識した二次試薬とともに更にインキュベートした。最後に洗浄した後、細胞の蛍光をＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（ベクトン・ディキンソン社、カリフォルニア州サンホセ）によって測定し、記録されたデータをＣｅｌｌＱｕｅｓｔＰｒｏソフトウェア（ベクトン・ディキンソン）によって分析した。

【００８５】

抗体

抗体は以下から入手した。マウスモノクローナル抗体である抗ＣＤ１ａ（ＨＩ１４９）、ＣＤ３（ＵＣＨＴ１）、ＣＤ４（ＲＰＡ－Ｔ４）、ＣＤ８（ＨＩＴ８α）、ＣＤ１１ｂ（Ｄ１２）、ＣＤ１４（ＭΦＰ９）、ＣＤ１６（３Ｇ８）、ＣＤ１９（ＨＩＢ１９）、ＣＤ２０（２Ｈ７）、ＣＤ２５（Ｍ－Ａ２５１）、ＣＤ４０（５Ｃ３）、ＣＤ４５ＲＡ（ＨＩ１００）、ＣＤ４５ＲＯ（ＵＣＨＬ－１）、ＣＤ５０（ＴＵ４１）、ＣＤ５４（ＨＡ５８）、ＣＤ５６（Ｂ１５９）、ＣＤｗ７０（Ｋｉ－２４）、ＣＤ８０（Ｌ３０７．４）、ＣＤ８３（ＨＢ１５ｅ）、ＣＤ８６（２３３１；ＦＵＮ１）、ＣＤ１３４（Ｌ１０６）、ＣＤ２０５（ＭＧ３８）、ＨＬＡ－ＤＲ（Ｇ４６－６）、ｐａｎ－Ｖγ Ｖδ－ＴＣＲ（１１Ｆ２）、ＩＬ－２（ＭＱ１－１７Ｈ１２）、ＩＬ－４（８Ｄ４－８）、ＩＦＮγ（Ｂ２７）及びＩＬ-１０（Ｎｏ２０７０５Ａ）はＢＤファーミンゲン社（カリフォルニア州サンディエゴ）より；マウスモノクローナル抗体である抗ＣＤ１ａ（Ｎａｌ／３４－ＨＬＫ）及びＣＤ１９（ＨＤ３７）はダコ・ダイアグノスティクス社（グラストラップ、スウェーデン）より；マウスモノクローナル抗体である抗ＴＣＲＶβ２（ＭＰＢ２Ｄ５）はイミュノテック社（マルセーユ、フランス）より；マウスモノクローナル抗体である抗ＣＤ１３８（Ｂ－Ｂ４）はジアクローン社（ベサンコン、フランス）より；モノクローナル抗体である抗ＣＤ１０２（Ｂ－Ｔ１）はレインコ・テクノロジーズ社（ミズーリ州セントルイス）より；マウスモノクローナル抗体である抗ＣＤ１１ａ（ＴＳ１－２２）及びＣＤ１８（ＴＳ１－１８）はＲ．パルディ社（ミラノ、イタリア）より；マウスモノクローナル抗体である抗ＩＣＯＳ（Ｆ４４）は、Ｒ．Ａ．クロツェック社（ベルリン、ドイツ）より；ラットモノクローナル抗体である抗ＣＣＲ７（３Ｄ１２）はＭ．リップ社（ベルリン、ドイツ）より入手した。これらの抗体をフローサイトメトリー分析または細胞の単離に使用した。また以下の二次抗体、接合体、及びコントロール抗体を使用した。ＲＰＥ標識ヤギ抗マウスＩｇＧはシグマ・アルドリッチ社（ミズーリ州セントルイス）より；ＲＰＥ標識ロバ抗ラットＩｇＧはジャクソン・イミュノリサーチ・ラボラトリーズ社（ペンシルベニア州ウエストグローブ）より；ＲＰＥならびにＲＰＥ－Ｃｙ５標識ストレプトアビジン（ＳＡ）はダコ社より；ＡＰＣ標識ＳＡはＢＤファーミンゲン社より；マウスコントロールＩｇＧＩ（ＭＯＰＣ２１）はシグマ・アルドリッチ社より；他のアイソタイプコントロール抗体はＢＤファーミンゲン社より入手した。

【００８６】

７．腫瘍または慢性／再発性感染症の免疫療法

刺激された腫瘍抗原提示γδＴ細胞を調製するため、腫瘍患者（または慢性／再発性感染症患者、下記参照）から５０～１５０ｍｌの末梢血を採取し、γδＴ細胞の単離と抗原のロードを上述のようにして行った。また、単離したばかりのγδＴ細胞を２０～１０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２の存在下、Ｖγ２Ｖδ２$^{+}$ＴＣＲ刺激条件下（前述のＩＰＰによるγδＴ細胞の活性化の方法を参照）でｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養することによって増殖させ

、液体窒素中で保存し、後で腫瘍（またはワクチン、下記参照）抗原提示γδＴ細胞の調製に使用してもよい。定義された腫瘍／ワクチンタンパク質以外にも、腫瘍細胞の粗（未定義の）抽出物や感染細胞からの抽出物（下記参照）、あるいは生きた血液や組織細胞のトランスフェクションやトランスダクションに通常用いられる組換えＲＮＡ／ＤＮＡ技術によるγδＴ細胞の処置など、γδＴ細胞に抗原を与える他の多くの方法が可能である点は重要である。また、細胞表面のＭＨＣ分子に直接ロードする腫瘍（またはワクチン、下記参照）ペプチドが既知のものである場合、こうしたペプチドを０．１～１０μｇ／ｍｌの濃度で１～１０×１０^{6}細胞／ｍｌの細胞密度の刺激されたγδＴ細胞に添加し、この細胞を２０～３７℃で短時間インキュベートしてから、等張リン酸緩衝溶液で２回洗浄し、直ちに治療に用いることも可能である。１回の投与で使用するγδＴ細胞の数、γδＴ細胞の投与の経路及び頻度は、使用される個々の腫瘍（またはワクチン、下記参照）抗原による免疫応答誘導の有効性、及び個々の患者における腫瘍の種類や位置に応じて異なる点は重要である。各プロトコールは樹状細胞による免疫療法で現在用いられているものにしたがう（Ｆｏｎｇ ａｎｄ Ｅｎｇｌｅｍａｎ，２０００；Ｓｔｅｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｓｃｈｕｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｆｉｇｄｏｒ ｅｔ ａｌ．，２００４）。すなわち、１～２０×１０^{6}細胞／０．５～２ｍｌの投与の後、同量もしくはそれ以下の量の細胞を２週間から２ヶ月の間隔で１回～６回、追加投与する。

【００８７】

参考文献

Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ，Ｊ．，Ｐａｓｃｕａｌ，Ｖ．，ａｎｄ Ｐａｌｕｃｋａ，Ａ．Ｋ．（２００４）．Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ ｔｈｒｏｕｇｈ ｃｙｔｏｋｉｎｅ－ｉｎｄｕｃｅｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２０，５３９－５５０．

Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ，Ｊ．ａｎｄ Ｓｔｅｉｎｍａｎ，Ｒ．Ｍ．（１９９８）．Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ｔｈｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｎａｔｕｒｅ ３９２，２４５－２５２．

Ｂｒａｎｄｅｓ，Ｍ．，Ｗｉｌｌｉｍａｎｎ，Ｋ．，Ｌａｎｇ，Ａ．Ｂ．，Ｎａｍ，Ｋ．Ｈ．，Ｊｉｎ，Ｃ．，Ｂｒｅｎｎｅｒ，Ｍ．Ｂ．，Ｍｏｒｉｔａ，Ｃ．Ｔ．，ａｎｄ Ｍｏｓｅｒ，Ｂ．（２００３）．Ｆｌｅｘｉｂｌｅ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ｐｒｏｇｒａｍ ｒｅｇｕｌａｔｅｓ ｇａｍｍａ ｄｅｌｔａ Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｎｖｏｌｖｅｍｅｎｔ ｉｎ ｈｕｍｏｒａｌ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｂｌｏｏｄ １０２，３６９３－３７０１．

Ｃａｒｄｉｎｇ，Ｓ．Ｒ．ａｎｄ Ｅｇａｎ，Ｐ．Ｊ．（２００２）．Ｇａｍｍａ ｄｅｌｔａ Ｔ ｃｅｌｌｓ：ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｐｌａｓｔｉｃｉｔｙ ａｎｄ ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２，３３６－３４５．

Ｃｈｅｎ，Ｚ．Ｗ．ａｎｄ Ｌｅｔｖｉｎ，Ｎ．Ｌ．（２００３）．Ａｄａｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｏｆ Ｖｇａｍｍａ２Ｖｄｅｌｔａ２ Ｔ ｃｅｌｌｓ：ａ ｎｅｗ ｐａｒａｄｉｇｍ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４，２１３－２１９．

Ｅｂｅｒｌ，Ｍ．，Ｈｉｎｔｚ，Ｍ．，Ｒｅｉｃｈｅｎｂｅｒｇ，Ａ．，Ｋｏｌｌａｓ，Ａ．Ｋ．，Ｗｉｅｓｎｅｒ，Ｊ．，ａｎｄ Ｊｏｍａａ，Ｈ．（２００３）．Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ ｉｓｏｐｒｅｎｏｉｄ ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｈｕｍａｎ ｇａｍｍａｄｅｌｔａ Ｔ ｃｅｌｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ．ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５４４，４－１０．

Ｆｉｇｄｏｒ，Ｃ．Ｇ．，ｄｅ Ｖｒｉｅｓ，Ｉ．Ｊ．，Ｌｅｓｔｅｒｈｕｉｓ，Ｗ．Ｊ．，ａｎｄ Ｍｅｌｉｅｆ，Ｃ．Ｊ．（２００４）．Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ：ｍａｐｐｉｎｇ ｔｈｅ ｗａｙ．Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１０，４７５－４８０．

Ｆｏｎｇ，Ｌ．ａｎｄ Ｅｎｇｌｅｍａｎ，Ｅ．Ｇ．（２０００）．Ｄｅｎｄｒｉ

tic cells in cancer immunotherapy. Annu. Rev. Immunol. 18, 245−273.
Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat. Immunol. 1, 311−316.
Miller, M. J., Hejazi, A. S., Wei, S. H., Cahalan, M. D., and Parker, I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101, 998−1003.
Morita, C. T., Mariuzza, R. A., and Brenner, M. B. (2000). Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. Springer Semin. Immunopathol. 22, 191−217.
Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. Trends Immunol. 25, 75−84.
Schuler, G., Schuler−Thurner, B., and Steinman, R. M. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. Curr. Opin. Immunol. 15, 138−147.
Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 21, 685−711.
Zhong, G., Reis e Sousa, and Germain, R. N. (1997). Antigen−unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen−major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. J. Exp. Med. 186, 673−682.

【図面の簡単な説明】

【００８８】

【図１Ａ】刺激されたγδＴ細胞は多くの抗原提示分子、共刺激分子、接着分子を発現する。

【図１Ｂ】刺激されたγδＴ細胞は多くの抗原提示分子、共刺激分子、接着分子を発現する。

【００８９】

末梢血から新鮮単離したか、ＩＰＰによる刺激後、１日間または７日間にわたってｉｎｖｉｔｒｏ培養したγδＴ細胞（γδＴ）、抗ＣＤ３／ＣＤ２８による１日間の刺激を行ったαβＴ細胞（αβＴ）、または新鮮単離末梢血単核球（Ｍ）について、フローサイトメトリーによる細胞表面分子の状態の観察を行った。各ドットブロットの上に示した数字は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ培養の時間を示す。（０ｄ）新鮮単離したもの、（１ｄ）１日間、（７ｄ）７日間。陽性度は、アイソタイプが一致したコントロール抗体による染色によ

って決定した。横線は、９９％バックグラウンド染色のゲートを表す。
【図２】刺激されたγδＴ細胞は機能性ＣＣＲ７を発現し、リンパ節ケモカインＳＬＣ／ＣＣＬ２１に応答する。
【００９０】
これらのデータはＢｒａｎｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００３より引用したものである。Ａ）ＩＰＰで３６時間刺激したγδＴ細胞の走化性応答を調べ、細胞中の比率（％）で示したもの（図に示したケモカインに応答して遊走した細胞の全細胞に対する％）。Ｃ＝コントロール（ブランク）。Ｂ）ＣＣＲ７の発現率をフローサイトメトリーによって調べた。ｎ＝細胞計数。実線及び破線はそれぞれＩＰＰ刺激した（走化性の図を参照）末梢血γδＴ細胞及び休眠状態の末梢血γδＴ細胞上のＣＣＲ７の発現率を示す。黒塗りのヒストグラムはアイソタイプ抗体によるコントロール染色を示す。
【図３】刺激されたγδＴ細胞とナイーブαβＴ細胞の急速かつ多量の凝集体の形成。
【００９１】
１日間刺激したγδＴ細胞を自己ナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞と１：５の比率で３時間一緒に培養した（γδＴ、２例）。ポジティブ及びネガティブコントロールとして、成熟した単核球由来樹状細胞（ＤＣ）及び１日間刺激したαβＴ細胞（αβＴ）をそれぞれ自己ナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞と混合した。細胞は抗原性相互作用を排除するためすべて同一のドナーから単離した。蛍光顕微鏡法による特定を可能とするためナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞にＣＳＦＥをロードした。Ｚｅｉｓｓ－Ａｘｉｏｖｅｒｔ３５倒立顕微鏡を用いて生きた細胞の位相差顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真を撮影し、画像を重ねて合成した。
【図４】刺激されたγδＴ細胞は、休眠状態のＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞に強力なＴＴ特異的増殖応答を誘導する。
【００９２】
γδＴ細胞を２０ｍｇ／ｍｌのＴＴの存在下で１日刺激した後、洗浄し、ＣＦＳＥ標識したＴＴ特異的αβＴ細胞に１：２の比で加えた。４日間（４ｄ）及び６日間（６ｄ）の培養の後、ＣＤ４$^{+}$細胞のＣＦＳＥシグナルをフローサイトメトリーで調べた（γδＴ（＋ＴＴ））。ポジティブコントロールとして単核球由来の樹状細胞を２０ｍｇ／ｍｌのＴＴの存在下で成熟させ（ＤＣ（＋ＴＴ））、この細胞を用いてＴＴ提示γδＴ細胞と同じ条件下でαβＴ細胞を１：１０の比で刺激した。ネガティブコントロールとして、αβＴ細胞をγδＴ細胞（γδＴ（－ＴＴ））及び樹状細胞（ＤＣ（－ＴＴ））と共培養し、ＴＴの非存在下でそれぞれ刺激して成熟させた。ヒストグラムの上に示した横棒線は、非分裂（無応答）細胞のＣＦＳＥシグナルの位置を示す。ｎ＝細胞計数。
【図５】ＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞の増殖にはＴＴ提示γδＴ細胞との接触が必要である。
【００９３】
ＴＴ提示γδＴ細胞及びＣＦＳＥ標識応答性細胞の調製ならびにデータ分析を図４と同様に行った。２室式組織培養システムを用い、ＴＴ提示γδＴ細胞及びＴＴ特異的応答（ＣＤ４$^{+}$αβ^{+}Ｔ）細胞を下室（Ｂ）に加え、応答性細胞のみを上室（Ａ）に加えた。２室は多孔性膜で分離され、可溶性タンパク質は自由に通過できるが細胞は通過できなくなっている。ヒストグラムの上に示した横棒線は非分裂ＣＦＳＥ標識細胞のゲートを示す。
【図６】ＴＴ提示γδＴ細胞はＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞にＴＣＲダウンレギュレーションを誘導する。
【００９４】
γδＴ細胞及び樹状細胞を０（ＴＴを加えない）から１０００ｍｍｇ／ｍｌまでＴＴの濃度を増加させてそれぞれ刺激し、成熟させ、休眠状態のＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞と抗原提示細胞：応答性細胞の比が１：２となるように培養した。１８時間後のαβＴ細胞上のＣＤ３の発現レベルをフローサイトメトリーで調べ、ＴＴを加えない細胞と比較した平均蛍光強度（ＭＦＩ）の比率で示した。ＴＴ提示γδＴ細胞及び応答性細胞の調製ならびにデータ分析は図４と同様に行った。
【図７】ＴＴ提示γδＴ細胞はＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞上に活性化マーカーの発現

を誘導する。

【００９５】

ＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞（応答性細胞）上における活性化マーカーＣＤ２５、ＩＣＯＳ及びＯＸ４０の発現レベルを、１０ｍｇ／ｍｌのＴＴの存在下（＋ＴＴ）または非存在下（－ＴＴ）で刺激したγδＴ細胞と５日間培養した後にフローサイトメトリーで調べた（図４参照）。空白及び黒塗りのヒストグラムはそれぞれ特異的及びコントロールのアイソタイプ抗体による蛍光染色を示す。ｎ＝細胞計数。横棒線はマーカー陽性細胞のゲートを示し、各ヒストグラムの上に示した数字は陽性細胞の比率（％）で示した陽性度と平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す。

【図８】異種ＥＢＶ－Ｂ細胞及びＴＴ特異的ＣＤＡ$^{+}$αβＴ細胞はＴＴ特異的応答性細胞に対してＴＴを機能的に提示しない。

【００９６】

ＣＰ．ＥＶＢ細胞、応答性細胞（ＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞）及びγδＴ細胞（ポジティブコントロール）を２０ｍｇ／ｍｌのＴＴの存在下で１日間培養した後、洗浄し、放射線照射してからＴＴ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞に１：２の比率となるように加えた。３日間（３ｄ）及び８日間（８ｄ）の培養の後、ＣＤ４$^{+}$細胞のＣＦＳＥシグナルをフローサイトメトリーで調べた。ＣＰ．ＥＶＢ細胞、応答性細胞の調製、ＣＦＳＥ標識及びフローサイトメトリーは実施例で述べたとおりである。

【図９】刺激されたγδＴ細胞は複合タンパク質抗原（ＰＰＤ）のプロセス及び提示も有効に行うことができる。

【００９７】

γδＴ細胞及び樹状細胞を２０ｍｇ／ｍｌのＰＰＤの存在下（＋ＰＰＤ）または非存在下（－ＰＰＤ）で刺激／成熟させ、休眠状態の自己ＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞における増殖の誘導を調べた。更なるネガティブコントロールとして、ＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞を、γδＴ細胞及び樹状細胞の非存在下かつ２０ｍｇ／ｍｌ　ＰＰＤの存在下で培養した。実験装置は図４と同じものを使用した。γδＴ細胞、樹状細胞の調製、ＰＰＤ特異的ＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞のＣＦＳＥ標識、及びフローサイトメトリーは実施例で述べたとおりである。

【図１０】ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞は自己ナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞の増殖を誘導する。

【００９８】

刺激したγδＴ細胞（γδＴ）、刺激したＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞（αβＴ）、成熟樹状細胞（ＤＣ）及び新鮮単離した血中単核球（Ｍ）に１０ｎｇ／ｍｌのＴＳＳＴ－１をロードし、新鮮単離したＣＦＳＥ標識ナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞と１：５の比で混合した。４日間の培養後、Ｖｂ２$^{+}$αβＴ細胞（Ｖｂ２）の増殖応答をフローサイトメトリーで調べた。ドットブロット図中の縦線及び横線はＶｂ２$^{+}$αβＴ細胞及び分割細胞のゲートを示す。左上及び左下の象限は、それぞれ分割Ｖｂ２$^{+}$細胞及び分割Ｖｂ２ネガティブ（Ｖｂ２^{neg}）細胞を示し、右上及び右下の象限はそれぞれ非分割のＶｂ２$^{+}$細胞及び非分割のＶｂ２ネガティブ細胞を示す。数字は各象限内に存在する全細胞の比率を示す。細胞の調製、ＴＳＳＴ－１のロード法及びフローサイトメトリーは実施例にもとづいて行った。

【図１１】ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞は、強力な抗原提示能を示す（ＴＳＳＴ－１濃度の変化）。

【００９９】

刺激したγδＴ細胞（γδＴ）及びαβＴ細胞（αβＴ）、樹状細胞（ＤＣ）及び単核球（Ｍ）にＴＳＳＴ－１の濃度を増加させてロードし、ＣＦＳＥ標識したナイーブＣＤ４$^{+}$αβＴ細胞と１：５の比で混合した。４日間の培養の後、各培養ウェル毎に分裂したＶｂ２$^{+}$αβＴ細胞の数（Ｖｂ２＋Ｔ）をフローサイトメトリーによって調べた（図１０の左上の象限）。試験を行った抗原提示細胞は図１０に示したもの以外に、７日間の培養後、異なる濃度のＴＳＳＴ－１をロードした刺激γδＴ細胞（γδＴ７ｄ）を用いた。各データポイントと誤差線は別々に行った２実験から得られた値の平均値±標準偏差（ＳＤ）を

表す。データは別々に行った３実験の代表値である。細胞の調製、ＴＳＳＴ－１のロード法及びフローサイトメトリーは実施例にもとづいて行った。
【図１２】ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞は、強力な抗原提示能を示す（抗原提示細胞濃度の変化）。
【０１００】
刺激したγδＴ細胞と成熟樹状細胞に１ｍｇ／ｍｌまたは１００ｎｇ／ｍｌのＴＳＳＴ－１をロードし、ナイーブＣＤ４$^+$αβＴ細胞に増殖が誘導されるかについて異なる希釈度（１：５～１：２００）の抗原提示細胞：αβＴ細胞（抗原提示細胞：γδＴ細胞または成熟樹状細胞）を用いて試験を行った。細胞の調製、ＴＳＳＴ－１のロード法及びフローサイトメトリーは実施例にもとづいて行った。
【図１３Ａ】ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞は、ナイーブＣＤ４$^+$αβＴ細胞のヘルパーＴ細胞への分化を誘導する。
【図１３Ｂ】ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞は、ナイーブＣＤ４$^+$αβＴ細胞のヘルパーＴ細胞への分化を誘導する。
【０１０１】
１０ｎｇ／ｍｌのＴＳＳＴ－１をロードした刺激γδＴ細胞、αβＴ細胞または成熟樹状細胞をナイーブＣＤ４$^+$αβＴ細胞と混合し、図１０で述べたようにＶｂ２$^+$応答性細胞の増殖について調べた。４日間の培養後、メモリーマーカーであるＣＤ４５ＲＯの発現レベルと細胞の分裂度をＶｂ２$^+$応答性細胞のフローサイトメトリーによって調べた。２１日間の培養後に細胞が休眠した非増殖状態に戻った時点で、細胞をＰＭＡ／イオノマイシンで刺激して細胞内サイトカインであるＩＬ－４及びＩＦＮ－γの産生についてフローサイトメトリーで調べた（図１３Ｂ）。左上、右上及び右下の各象限の数字は、それぞれ生成したＴｈ２、ＴｈＯ及びＴｈ１細胞の割合（全細胞の比率）を示す。各ドットブロット図の上に示した数字は、細胞培養の開始のときにおける応答性細胞に対する抗原提示細胞の比を示す。細胞の調製、ＴＳＳＴ－１のロード法及びサイトカイン産生の判定法は実施例で述べたとおりである。
【図１４】ＴＳＳＴ－１をロードしたγδＴ細胞によるナイーブＣＤ４$^+$αβＴ細胞の増殖の誘導は細胞接触に依存する。
【０１０２】
刺激したγδＴ細胞に１００ｎｇ／ｍｌのＴＳＳＴ－１をロードし、ＣＦＳＥ標識したナイーブＣＤ４$^+$αβＴ細胞を、単独で（Ａ）またはγδＴ細胞と（Ｂ）、抗原提示細胞：応答性細胞の比が１：５となるように培養した。２室式培養システムとＣＦＳＥフローサイトメトリーのデータ分析は図５に示した。
【図１５】γδＴ細胞は一次ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の応答を誘導する。
【０１０３】
ナイーブなＣＤ８$^+$αβＴ細胞と、異種ＩＰＰで刺激したγδＴ細胞（丸）、ＬＰＳで成熟させた単核球由来樹状細胞（四角）、またはスーパー抗原で刺激したαβＴ細胞（三角）とを抗原提示細胞：応答性細胞の比を減少させて反応させた混合白血球応答（６重で行った実験の代表値）。ＣＦＳＥ標識したＣＤ８$^+$応答性細胞の増殖応答を図５で述べたようなフローサイトメトリーデータ分析法によって評価した。
【図１６Ａ】γδＴ細胞はナイーブなＣＤ８$^+$細胞の細胞障害性Ｔ細胞への分化を誘導する。
【図１６Ｂ】γδＴ細胞はナイーブなＣＤ８$^+$細胞の細胞障害性Ｔ細胞への分化を誘導する。
【０１０４】
図１５で述べたような混合白血球応答から誘導されたＣＤ８$^+$Ｔ細胞を１４日間の培養後に細胞障害活性について調べた。細胞障害性アッセイでは、エフェクター細胞（混合白血球応答から誘導されたＣＤ８$^+$Ｔ細胞）とＣＦＳＥ標識した標的細胞を使用した。標的細胞の混合物として真の標的細胞（異種ＣＤ４$^+$αβＴ細胞）とネガティブコントロールの標的細胞（自己ＣＤ４$^+$αβＴ細胞）を１：１の比で含有するものを用いた。真の標的

細胞及びネガティブコントロールの標的細胞は、これら２つの標的細胞のサブセットを区別するために混合前に異なる濃度のＣＦＳＥで標識した。

【０１０５】

（Ａ）エフェクター細胞の非存在下での標的細胞混合物のフローサイトメトリー分析では、ネガティブコントロール（Ｃ）と真の標的細胞（Ｔ）の細胞集団が認められた。

【０１０６】

（Ｂ）ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞と標的細胞とを３０：１、１０：１、３：１及び１：１の比で１２時間共培養した後、標的細胞の障害度を真の標的細胞集団の数の減少を測定することによって評価した（矢印）。各矢印の横に示した数字は特異的な細胞障害率を示し、ＣＦＳＥによる蛍光が高い細胞計数（真の標的細胞）の減少を、ＣＦＳＥによる蛍光が低いコントロール細胞計数と比較したものである。

【０１０７】

左列：抗原提示細胞としてＩＰＰで刺激したγδＴ細胞を用いた混合白血球応答からＣＤ８$^{+}$細胞が誘導された。

【０１０８】

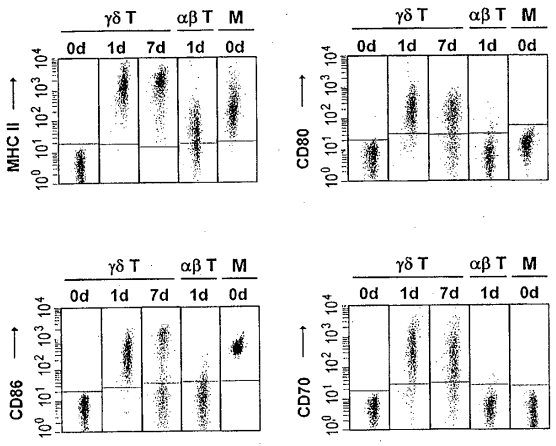
右列：抗原提示細胞として成熟樹状細胞を用いた混合白血球応答からＣＤ８$^{+}$細胞が誘導された。

【図１７】γδＴ細胞はエンドサイトーシス性の細胞表面タンパク質ＤＥＣ２０５（ＣＤ２０５）及びＣＤ１１ｂを高レベルで発現する。

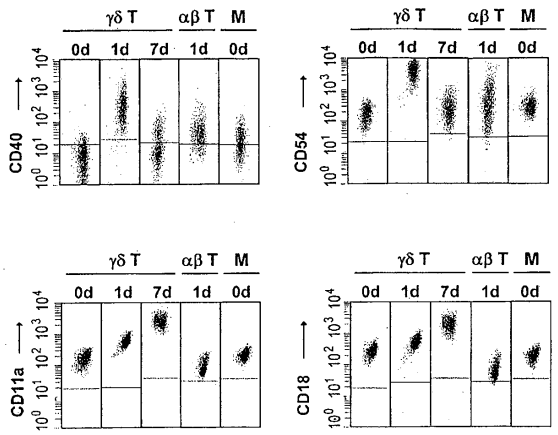
【０１０９】

末梢血から新鮮単離したγδＴ細胞（γδＴ）及び成熟樹状細胞（ＤＣ）を図７で述べたようにフローサイトメトリーによってＣＤ２０５及びＣＤ１１ｂの発現レベルについて分析した。ドットブロット図中の縦線及び横線はＣＤ２０５またはＣＤ１１ｂを発現している細胞のゲートを示す。図の右上の象限は、ＣＤ２０５及びＣＤ１１ｂの双方について陽性を示した細胞を示す。数字は各象限内に存在する全細胞の比率を示す。陽性度は、アイソタイプが一致したコントロール抗体による染色によって決定した。横線または縦線は、９９％バックグラウンド染色のゲートを表す。

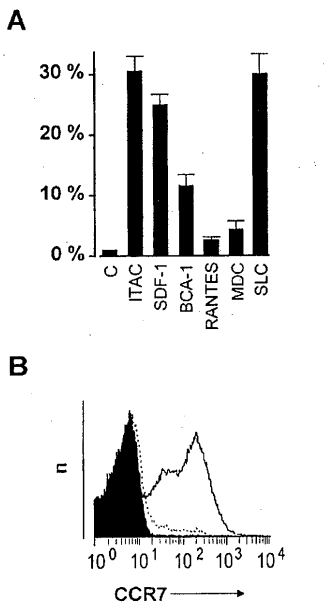
【図１Ａ】


γδ T
αβ T
M
0d
1d
7d
1d
0d
MHC II
CD80
CD86
CD70

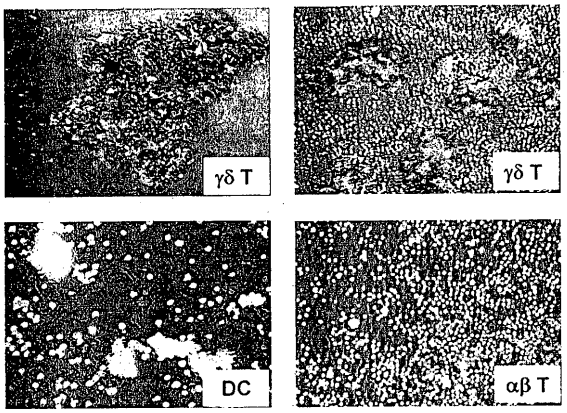
【図１Ｂ】


γδ T
αβ T
M
0d
1d
7d
1d
0d
CD40
CD54
CD11a
CD18

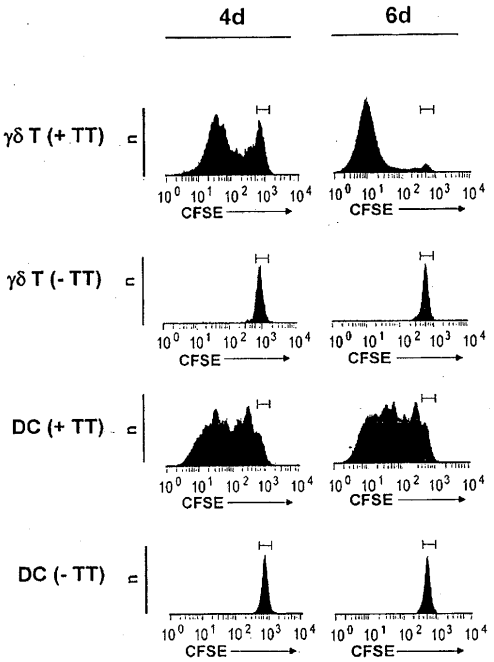
【図２】


A
30 %
20 %
10 %
0 %
C
ITAC
SDF-1
BCA-1
RANTES
MDC
SLC
B
n
CCR7

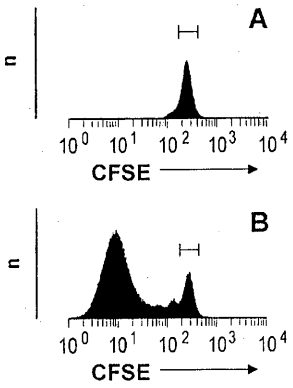
【図３】


γδ T
γδ T
DC
αβ T

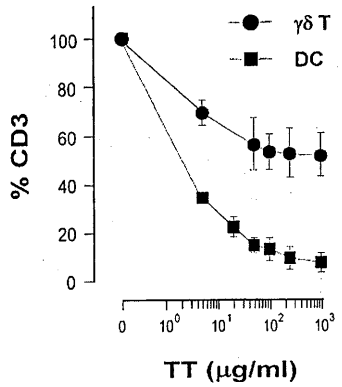
【図４】


4d
6d
γδ T (+ TT)
γδ T (- TT)
DC (+ TT)
DC (- TT)
CFSE

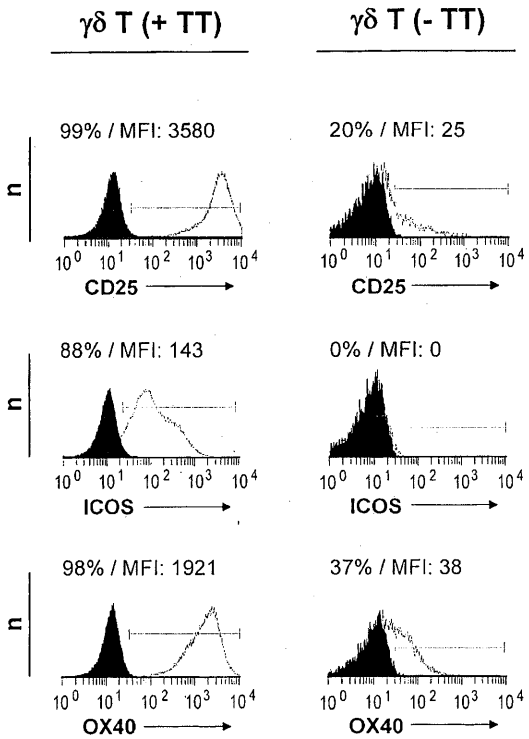
【図５】


A
B
CFSE

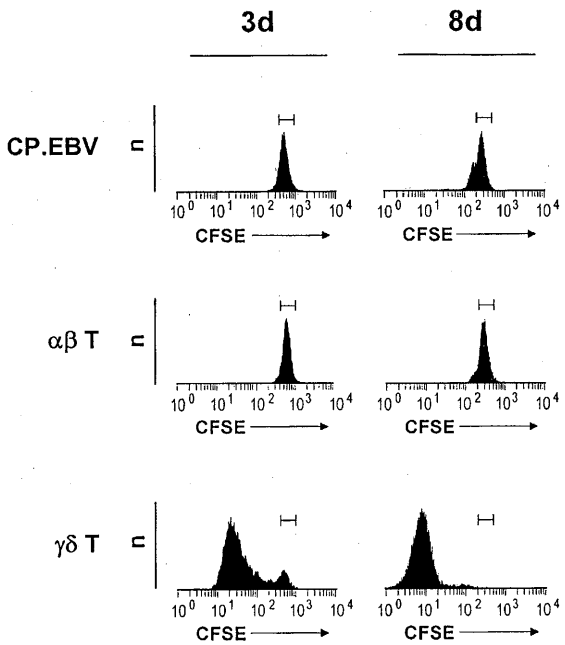
【図６】


γδ T
DC
% CD3
TT (μg/ml)

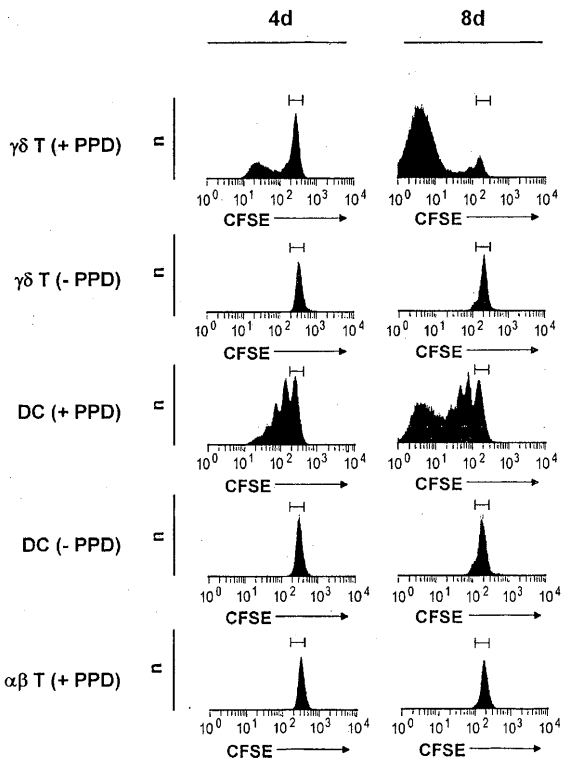
【図７】


γδ T (+ TT)
γδ T (- TT)
99% / MFI: 3580
20% / MFI: 25
CD25
88% / MFI: 143
0% / MFI: 0
ICOS
98% / MFI: 1921
37% / MFI: 38
OX40

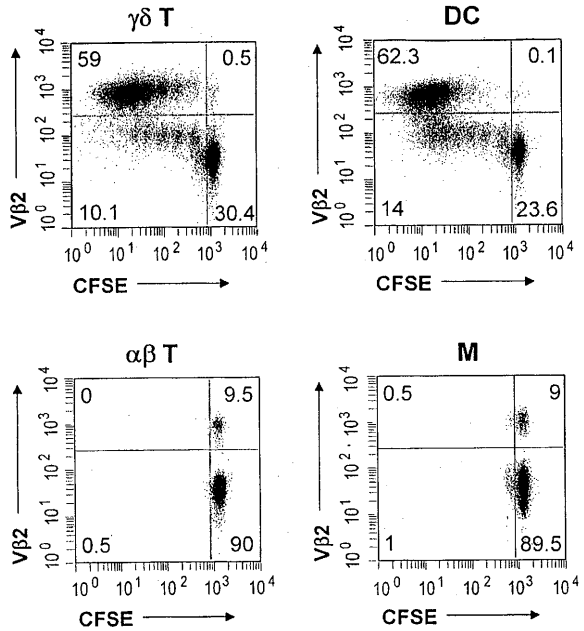
【図８】


3d
8d
CP.EBV
αβ T
γδ T
CFSE

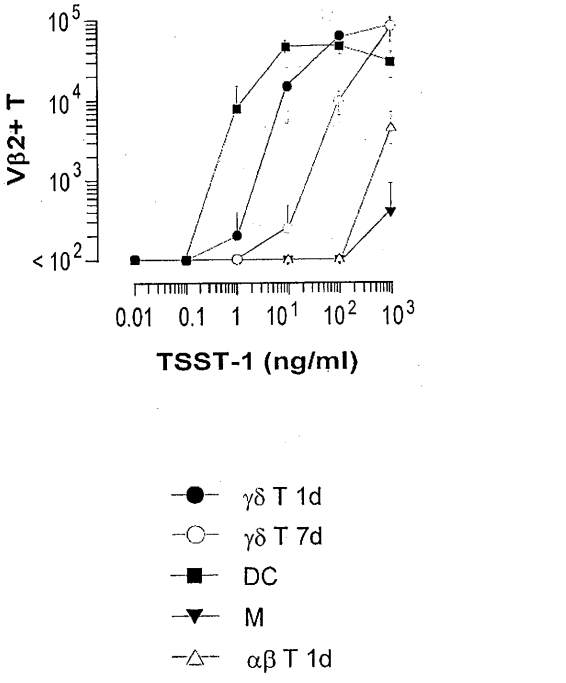
【図９】


4d
8d
γδ T (+ PPD)
γδ T (- PPD)
DC (+ PPD)
DC (- PPD)
αβ T (+ PPD)
CFSE

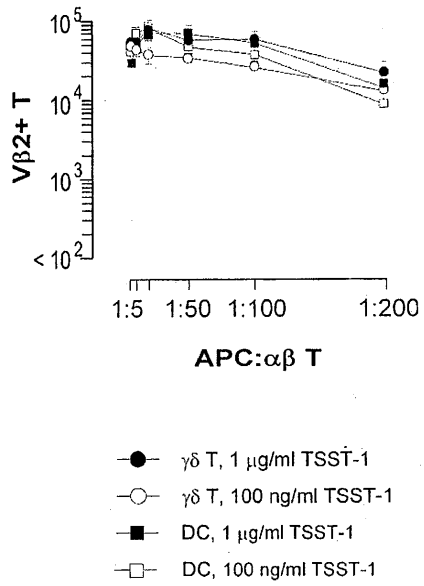
【図１０】


γδ T
DC
αβ T
M
Vβ2
CFSE
59
0.5
10.1
30.4
62.3
0.1
14
23.6
0
9.5
0.5
90
0.5
9
1
89.5

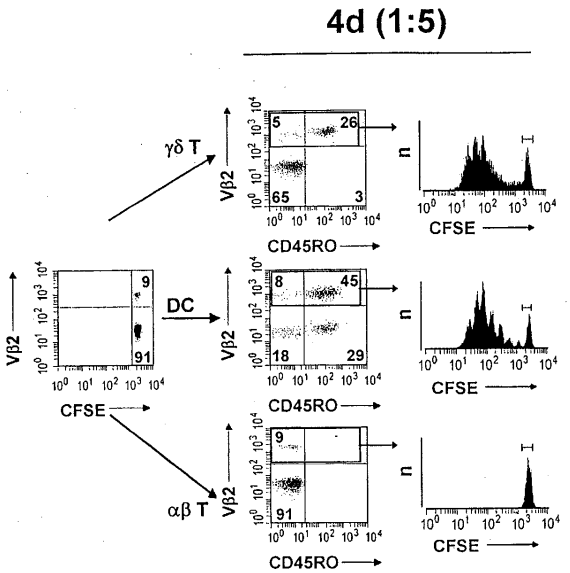
【図１１】


Vβ2+ T
TSST-1 (ng/ml)
γδ T 1d
γδ T 7d
DC
M
αβ T 1d

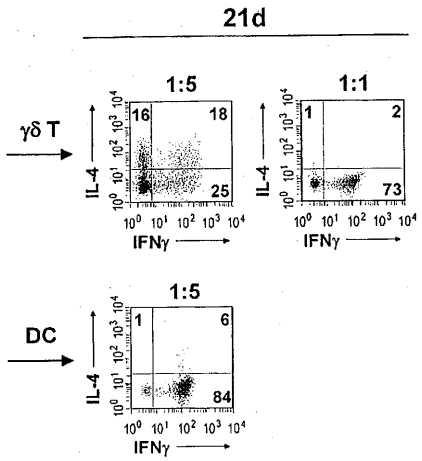
【図１２】



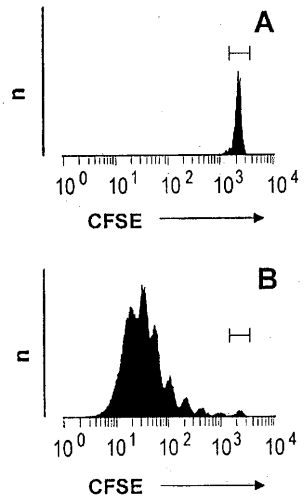
【図１３Ａ】



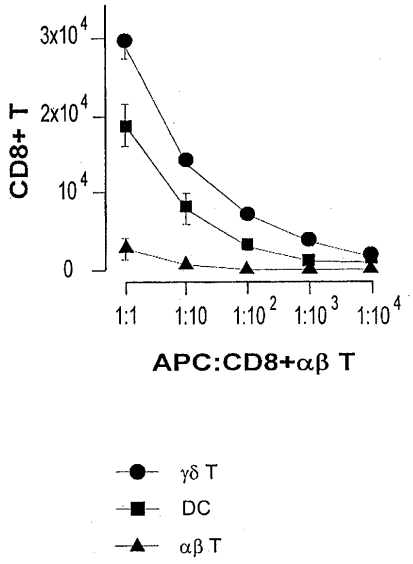
【図１３Ｂ】



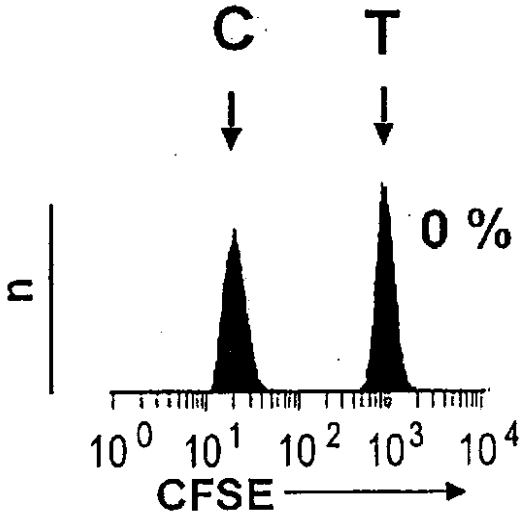
【図１４】



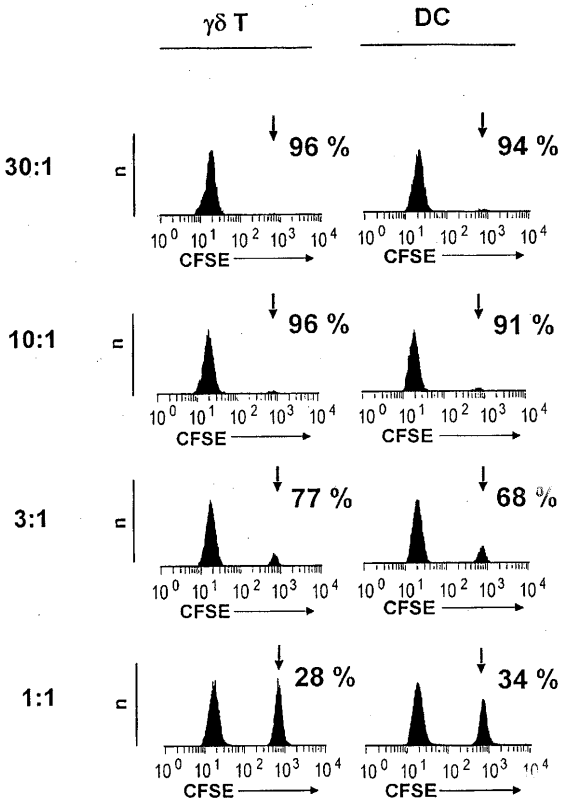
【図１５】



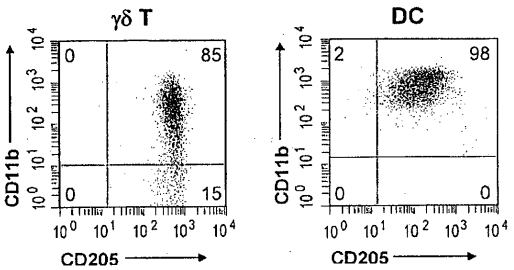
【図１６Ａ】



【図１６Ｂ】



【図１７】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ａ６１Ｐ 43/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 43/00 １１１

(72)発明者 ブランデス、マルレーネ
スイス国 ベルン ツェーハー－３００７，ヴァーベルンシュトラーセ ９４

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表２００１－５２０６３３（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５２８１１５（ＪＰ，Ａ）
J.Leukoc.Biol., 1998, Vol. 63, No. 1, pp. 707-714
Vet.Immunol.Immunopathol., 2002, Vol. 87, No. 3-4, pp. 223-224
Blood, 2003, Vol. 102, No. 10, pp. 3693-3701
Science, 2005.07.08, Vol. 309, pp. 264-268
Science, 2005.07.08, Vol. 309, pp. 252-253

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
C12N 1/00-7/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)