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

特許第3837169号

(P3837169)

(45)発行日　平成18年10月25日(2006.10.25)　(24)登録日　平成18年8月4日(2006.8.4)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	
A61K 35/12	(2006.01)	A61K	35/12	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 5　(全 18 頁)

(21)出願番号　特願平5-247716
(22)出願日　平成5年10月4日(1993.10.4)
(65)公開番号　特開平7-69928
(43)公開日　平成7年3月14日(1995.3.14)
審査請求日　平成12年10月4日(2000.10.4)
(31)優先権主張番号　07/956123
(32)優先日　平成4年10月2日(1992.10.2)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　08/006102
(32)優先日　平成5年1月15日(1993.1.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　391015708
ブリストル－マイヤーズ　スクイブ　カンパニー
ＢＲＩＳＴＯＬ－ＭＹＥＲＳ　ＳＱＵＩＢＢ　ＣＯＭＰＡＮＹ
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　１０１５４　ニューヨーク　パーク　アベニュー　３４５
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔
(74)代理人　100067013
弁理士　大塚　文昭
(74)代理人　100065189
弁理士　宍戸　嘉一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｂ７－形質移入細胞の投与による腫瘍細胞成長の阻害方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Ｂ７表面抗原を発現する組換腫瘍細胞又はその膜を含む、Ｅ７を発現している腫瘍細胞の成長を阻害するための医薬組成物。

【請求項２】

前記腫瘍細胞がＨＰＶ感染細胞である請求項１記載の組成物。

【請求項３】

前記組換腫瘍細胞又はその膜が患者内で免疫応答を刺激して、Ｂ７－形質移入腫瘍細胞及び非形質移入腫瘍細胞の両方の拒絶をもたらす請求項１記載の組成物。

【請求項４】

転移体が拒絶される請求項３記載の組成物。

【請求項５】

腫瘍保有非ヒト哺乳動物内で抗腫瘍免疫応答を刺激する方法であって、１マウスあたり1×10^{5}～5×10^{6}の前記組換腫瘍細胞又はその膜を前記哺乳動物に投与して引き続く腫瘍成長の阻害を誘導することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は、腫瘍細胞成長を効果的に阻害する新規組成物及び方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】
癌研究の長年の目標は、腫瘍の免疫学的拒絶を刺激することである。この目標は、腫瘍が免疫系の標的として潜在的に役立ち得る外来抗原を発現するという仮説を基礎としたものである〔ヒメルウェイト(Himmelweit) (1957) The Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, Oxford, England 〕。通常の免疫化及び抗原投与実験において免疫系によって外来であると認識され得る抗原を自然発生腫瘍がどの程度まで発現するかは議論のあるところであるが〔ヘウィット（Hewitt）ら（1976) Br. J. Cancer 33:241-259〕、多くの実験上の腫瘍がそのような実験において腫瘍拒絶を媒介し得る抗原を発現するということは実証的によく記述されている〔ヘルストロム(Hellstrom）とヘルストロム(Hellstrom）（1991）Principles of Tumor Immunity: Tumor Antigens, In: The Biologic Therapy of Cancer. デ・ビタ, ジュニア（DeVita, Jr）ら編, J. B. Lippincott Co., PP.35-52；ブーン（Boon）(1992) Adv. Cancer Res, 58:177-211〕。
主としてＴリンパ球によって媒介される細胞性免疫は、抗原性腫瘍の拒絶において重要な役割を演じている。Ｔヘルパー細胞（Ｔｈ）及び細胞溶解性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の両方が関係している〔メリーフ（Melief) (1992) Adv. Cancer Res. 58:143-175；グリーンベルグ(Greenberg) (1991) Adv. Immunol.49:281-355〕。免疫学的標的の認識及び破壊は、ＭＨＣ分子の背景で提示される抗原性ペプチドのＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）を介するＴリンパ球認識を必要とする〔ジョークマン（Bjorkman）ら (1988) Nature 329:512-518；ウナヌエ（Unanue) (1984) Annu. Rev. Immunol.2:395 ；タウンセンド (Townsend) ら (1986) Cell44:959-968〕。Ｔ細胞免疫は幾つかの動物及びヒトの特異的腫瘍抗原に対して検出されてきたが〔ファン・デア・ブルゲン(van der Bruggen）ら (1991) Science 254:1643-1647 ；ファン・デア・アインデ(van der Eynde) ら (1991) J. Exp. Med. 173:1373-1384 ；アニチニ (Anichini) ら (1987) Immunol. Today 8:385-389 〕、これら“免疫原性”腫瘍は一般に漸進的に成長しついにはその宿主を死に至らしめる。
【０００３】
拒絶抗原を発現するそれら腫瘍でさえも免疫破壊を回避することができる幾つかの理由がある。それらには、ＭＨＣクラスＩ発現のレベルが低いために、腫瘍が抗原を適切にプロセシングしてＴ細胞に提供しないことが挙げられる〔エリオット (Elliot) ら (1989) Adv. Cancer Res.53:181-244〕。抗原プロセシングを高める、ＭＨＣクラスＩ遺伝子での形質移入〔フイ(Hui) ら (1984) Nature 311:750-752 ；タナカら (1984) Science 228:26-30 ；バリッヒ(Wallich) ら (1985) Nature 315:301-305 〕又はγ－インターフェロンＤＮＡでの形質移入〔レスチフォ(Restifo) ら (1992) J. Exp. Med. 175:1423-1431 〕によって、もしかするとこの逃げ道を遮断できるかも知れないということは課題である。効果的な抗腫瘍免疫応答の欠如も、腫瘍特異的ＣＴＬのクローン拡大〔フィーロン（Fearon）ら（1990）Cell 60:397-403〕並びに腫瘍破壊を起こすことのできるマクロファージ及び他の炎症細胞の活性化の両方に必要なＴヘルパー機能の腫瘍保有動物における欠損の結果として起こり得る。ＩＬ－２又はＩＬ－４ｃＤＮＡでの腫瘍細胞の形質移入は、腫瘍特異的ＣＴＬであるＴ細胞介助に代わり、腫瘍特異的ＣＴＬを誘導したリンフォカインのパラクリンＩＬ－２分泌をもたらして腫瘍拒絶を起こす〔フィーロンら (1990) Cell 60:397-403；ガンスバッハー (Gansbacher) ら (1990) J. Exp. Med. 172:1217-1224 ；レイ(Ley) ら (1991) Eur. J. Immunol. 21:851-854；ゴルンベク (Golumbek) ら (1991) Science 254:713-716 〕。同様に、ＩＬ－４ｃＤＮＡでの腫瘍の形質移入も腫瘍拒絶〔テッパー（Tepper）ら (1989) Cell 57:503-512〕及びＴ細胞媒介腫瘍免疫の発生を起こし得る〔ゴルンベクら (1991) Science 254:713-716 〕。
【０００４】
有効な腫瘍反応性Ｔ細胞の誘導に寄与し得るもう１つのメカニズムは、免疫細胞活性化のための２－シグナルモデルに関連している。このモデルは、もともと、非造血器官の細胞上に発現された抗原がなぜ移植拒絶の誘導に効果がないのかということの説明として〔ラファーティ (Lafferty) ら (1983) Ann. Rev. Immunol. 1:143 〕Ｂリンパ球について〔ブレッチャー(Bretscher) とコーン (Cohn) (1970) Science 169:1042-1049 〕提案され

たものであった。２－シグナルモデルは、今や全てのリンパ球に及んでいる〔ジェインウェイ (Janeway) (1989) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54:1-13 ；ノーサル (Nossal) (1989) Science 245:147-153 ；シュワルツ (Schwartz) (1989) Cell 57:1073-1081〕。これらモデルは、リンパ球は最適な活性化のために抗原レセプターを介して放たれる抗原特異的シグナルと２番目の抗原非特異的又は共刺激性（costimulatory ）であるシグナルの両方を必要とすることを前提としている。Ｔ細胞共刺激経路は、ＴＣＲ複合体進入機序が免疫細胞活性化又は不活性化のいずれをもたらすかを決定し〔ミュエラー(Mueller) ら (1989) Annu. Rev. Immunol. 7:445 ；シュワルツ (1989) Cell 57:1073-1081〕、Ｔ細胞共刺激不存在下での抗原提示は、機能的不活性化又はクローンアネルギー又は細胞死さえも含めたいずれを導くかを決定する〔シュワルツ (1989) Cell 57:1073-1081〕。

【０００５】

Ｔ細胞共刺激の分子的基礎はよく理解されていないが、Ｔ細胞表面レセプターによって認識される抗原提供細胞（ＡＰＣ）上の数個の分子に関連しているかも知れない〔ファン・セブンター (Van Seventer) ら (1991) Curr. Opinion Immunol. 3: 294-303〕。１つの重要な共刺激分子は、活性化したＢ細胞〔フリーマン(Freeman) ら (1989) J. Immunol. 143:2714〕及び他のＡＰＣ〔フリーマンら,1989 ；ラジ－ウォルフ(Razi-Wolf) ら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4210-4214〕上で発現するＢ７である。Ｂ７は、Ｔ細胞上でＣＤ２８〔リンスレイ(Linsley) ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5031-5035〕及びＣＴＬＡ－４〔リンスレイら (1991) J. Exp. Med. 173:721-730 〕レセプターに結合しており、ヒト及びマウスのＣＤ４$^+$ Ｔ細胞の増殖を共刺激する〔リンスレイら (1991) J. Exp. Med. 174:561-569 ；ギンミ(Gimmi) ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579；クオロバ(Kuolova) ら (1991) J. Exp. Med. 173:759-762 ；ダムレ(Damle) ら (1992) J. Immunol. 132:1985-1992 〕。インビトロでの実験は、ＣＤ２８レセプターによって変換されたシグナル〔ジュン (June) ら (1990) Immunol. Today 11:211-216〕が、ＴＣＲ保有が生産的免疫応答又はクローンアネルギーのいずれをもたらすかを決定できることを示唆している〔ジェンキンス(Jenkins) ら (1991) J. Immunol. 147:2641-2466 ；ハーディング(Harding) ら (1992) Nature 356:607-609 〕。インビボでの実験は、Ｂ７による共刺激の遮断が体液性応答を効果的に抑制できること〔リンスレイら (1992) Science 257:792-795 〕及び組織異種間移植の長期間受容を可能にできること〔レンスコフ (Lenschow) ら (1992) Science 257:792-795 〕を示している。

【０００６】

Ｂ７分子は、主として造血細胞上で発現し〔フリーマンら (1989) J. Immunol. 143:2714〕、多くの培養されたヒト腫瘍セルライン上に、もしあるとしても非常に低いレベルでのみ存在する。これら発見は、免疫原性腫瘍がしばしばＴ細胞破壊を免れることができる理由の１つはそれらが適切な共刺激分子を欠いていることである、ということを示唆している。腫瘍拒絶抗原を有する腫瘍の中に共刺激分子を導入すると、免疫担当宿主中での腫瘍撲滅に導く特異的抗腫瘍免疫を誘導する能力を高めるであろうということが、この仮説から予測することができる。この仮説は、“拒絶”抗原を発現するにもかかわらず宿主内で漸進的に成長する腫瘍についてのマウスモデルを使用して試験した。このモデルにおいて、ヒト乳頭腫ウィルス１６（ＨＰＶ－１６）Ｅ７遺伝子を免疫原性に乏しいＫ１７３５－Ｍ２メラノーマ〔フィドラー (Fidler) とハート (Hert) (1981) Cancer Res. 41:3266-3267〕に形質移入した(transfect) 。Ｅ７発現線維芽細胞で同系Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスを免疫化〔チェン (Chen) ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:110-114；チェンら (1992) J. Immunol. 148:2617-2621 〕することによって腫瘍形成性形質移入体であるＥ７Ｃ３を選択した。ＣＤ８$^+$ Ｔ細胞に媒介されかつＨＰＶ－１６Ｅ７特異的である腫瘍免疫がこれに対して生じ得る。本発明は、共刺激分子Ｂ７でのＥ７Ｃ３腫瘍細胞の形質移入がＥ７$^+$ 腫瘍に対する抗腫瘍免疫を誘導することを証明するものである。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、腫瘍細胞成長を効果的に阻害する新規組成物及び方法を提供することを目的とする。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

本発明は、腫瘍細胞成長を効果的に阻害する新規組成物及び方法に関する。この方法においては、細胞を腫瘍から分離し、次いで、Ｂ細胞のＢ７リガンドの免疫原性部分をコードするＤＮＡで形質移入する。該形質移入腫瘍細胞はその表面上でＢ７を発現し、次いで、患者の体内に再注入される。該Ｂ７形質移入腫瘍細胞は、形質移入及び非形質移入腫瘍細胞の両方に対して向けられた免疫応答を効果的に引き出す。かくして、本発明の方法は、もとの腫瘍細胞及び転移体に対する免疫応答を刺激する。形質移入細胞上でのＢ７の存在は、意外にも、この高められた応答の触媒又は刺激剤として作用する。本発明の方法は、病巣から細胞を分離し、これら細胞を形質移入又は形質導入して(transduce) Ｂ７を発現するようにし、次いで、該形質移入細胞を患者に再投与して散在する腫瘍細胞に対する広範でかつ特異的な免疫応答を刺激することによって、散在する転移性癌の治療の可能性を提供するものである。本発明においては、Ｂ７を発現するように形質移入した組換腫瘍細胞又はＢ７を発現するこれら細胞の膜のいずれかを含有する医薬組成物も意図される。

また、本発明は、Ｂ７－形質移入腫瘍細胞膜を患者に投与して、拒絶応答を誘導できるか又は引き続く腫瘍細胞暴露で細胞死滅させることのできる免疫応答を生成することによって、特異的腫瘍細胞に対して該患者を免疫する方法を包含する。

【０００９】

図面において、図１は形質移入したセルライン上でのＢ７の発現を説明するものである。ＣＴＬＡ－４Ｉｇ（実線）又はコントロールｍＡｂキメラＬ６（破線）のいずれかで細胞を染色し、続いて、実験操作に記載したＦＩＴＣ複合化ヤギ－抗－ヒトＩｇＣγ血清で細胞を染色した。各サンプルについて、総細胞数5,０００を分析した。パネルＡはＥ７Ｃ３細胞及びそのＢ７形質移入体を示し、パネルＢはＫ１７３５－Ｍ２細胞及びそのＢ７形質移入体を示す。

図２は、$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍が免疫担当、同系Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスによって拒絶されることを説明するものである。

（Ａ）$B7^-$ 及び$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍の写真。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに5×10^6 のＥ７Ｃ３細胞（左側の３匹のマウス）又は$PB7^+$ 細胞（右側の３匹のマウス）を皮下注射した。この写真は腫瘍細胞注射後２１日目に撮影したものである。

（Ｂ）$B7^-$ 及び$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍の成長速度。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに先に示した細胞（5×10^6 ）を皮下注射した。カリパスで垂直直径を測定することによって腫瘍の大きさを毎週評価した。結果はそれぞれが５匹のマウスからなるグループからの腫瘍のミリメーターで表した平均直径として表現した。誤差線は該平均直径の標準偏差を表す。同様な結果が各セルラインについての少なくとも３実験において得られた。

【００１０】

図３は、$B7^-$ 又は$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍の組織学を説明するものである。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに$PB7^-$ 細胞（パネルＡ）又は$PB7^+$ 細胞（パネルＢ～Ｄ）を皮下注射した。注射してから１０日目に腫瘍を切り取り組織学的分析用に調製した。（Ａ）$PB7^-$ 細胞によって誘導された腫瘍。表面真皮の中に伸びる内部に閉じ込められていない腫瘍小結節の存在に留意のこと。腫瘍性細胞の巣状壊死が見られる（倍率６６×）。（Ｂ）$PB7^+$ 細胞によって誘導された腫瘍。腫瘍細胞の中の腫瘍壊死と炎症細胞の浸潤からなる大きな中央領域の存在に留意のこと（倍率６６×）。（Ｃ）（Ｂ）の倍率をより高くしたもの。炎症細胞の隆起した浸潤に留意のこと（倍率６６０×）。（Ｄ）（Ｂ）の倍率を更に高くしたもの。腫瘍細胞は大きさ及び形状が様々であり不明瞭な細胞輪郭を有する淡いエオシン好性の細胞質を有している。リンパ球及びマクロファージが見られる（倍率１３５０×）。

図４は、ＣＴＬＡ４ＩｇがＢ７$^+$ Ｅ７Ｃ３細胞の拒絶を遮断することを説明するものであ

る。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに、５０μｇのＣＴＬＡ４Ｉｇと予め混合した5×10^{6}のＢＣ２２細胞を背中から皮下注射した。ＣＴＬＡ４Ｉｇ処理を一日置きで合計２週間静脈注射することによって継続した（１回の処理当たり５０μｇ）。ハンクス平衡塩類溶液（ＨＢＳＳ）かキメラｍＡｂＬ６（ＣｈｉＬ６）のいずれかで処理したマウスをコントロールとして使用した。図２に記載したようにして腫瘍の成長をモニターした。この実験を繰り返したが同じ結果が得られた。

【００１１】

図５は、$B7^{+}$ Ｅ７Ｃ３腫瘍の拒絶が$CD8^{+}$ Ｔ細胞によって媒介されることを説明するものである。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに、１ｍｇ／マウスの精製した抗－ＣＤ４又は抗－ＣＤ８抗体を１週間置きに２回静脈注射した。同量の抗－ヒトＣＤ５抗体10.2をコントロールとして注射した。次いで、マウスにＢＣ１６細胞を皮下接種し、図２に記載したようにして腫瘍の成長を評価した。この実験をもう１度行ったが同じ結果が得られた。

図６は、ＣＴＬが$B7^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞を接種したマウスから発生することを説明するものである。

（Ａ）ＭＨＣクラスＩ制限様式（restricted fashion）でＥ７遺伝子を発現する標的を溶解するＣＴＬの発生。ＢＣ１６細胞（5×10^{6}）をＣ３Ｈ／ＨｅＮマウスに皮下注射した。腫瘍のないマウスから脾臓を分離し、脾臓細胞をγ線照射した１６Ｎ７細胞と一緒に培養し、^{51}Ｃｒ－ラベル化標的細胞に対するＣＴＬ活性を実験操作に記載したようにして測定した。この細胞障害実験及び他の細胞障害実験を３～５回行ったが同じ結果が得られた。

（Ｂ）細胞障害活性は$CD8^{+}$ Ｔ細胞によって媒介される。ＢＣ２２細胞を接種したマウスから生じたエフェクター細胞を、補体の存在下で抗－ＣＤ４、抗－ＣＤ８又は抗－アシアロ（asialo）ＧＭ１　Ａｂｓと３７℃で１時間前処理し、^{51}Ｃｒ－ラベル化１６Ｎ７細胞と異なるＥ：Ｔ比でインキュベートする前に２回洗浄した。

（Ｃ）異なる腫瘍を注入されたマウスにおけるＣＴＬ活性。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスにＫ１７３５－Ｍ２、Ｅ７Ｃ３、ＢＣ１６又は照射（10,000ｒａｄ）したＥ７Ｃ３細胞を皮下注射した。４週間後、該マウスから脾臓細胞を調製してインビトロでγ線照射した１６Ｎ７細胞と一緒に６日間培養した。次いで、^{51}Ｃｒ－ラベル化１６Ｎ７細胞に対する細胞障害活性を実験操作に記載したようにして測定した。

【００１２】

図７は、$B7^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞が遠隔部位で$B7^{-}$ Ｅ７Ｃ３腫瘍に対する免疫を誘導することを説明するものである。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスの左側腹部にＨＢＳＳ、Ｅ７Ｃ３又はＢＣ２２細胞（5×10^{6}）を皮下注射した。そのすぐ後に、Ｅ７Ｃ３（上方のパネル）又はＥ６Ｂ２（下方のパネル）細胞（5×10^{6}細胞）の右側腹部への皮下注射によって該マウスに抗原投与した。右側腹部での腫瘍の成長は、図２に記載したようにして測定した。ＢＣ２２細胞を注射した５匹のマウスのうち４匹はＥ７Ｃ３腫瘍を完全に拒絶したが、他の全てのグループで漸進的なＥ７Ｃ３腫瘍成長がみられた。この実験を再度繰り返したが同じ結果が得られた。

図８は、$B7^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞が定着した転移腫瘍に対する免疫を誘導することを説明するものである。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウス（１グループ当たり１０匹）に1×10^{5}のＥ７Ｃ３（Ａ）、Ｅ６Ｂ２（Ｂ）又はＫ１７３５－Ｍ２細胞（Ｃ）を静脈注射した。４日後、ＢＣ１６細胞（1×10^{6}）を静脈注射することによってマウスを処理した。続いて、５日間置きに処理を２回以上繰り返した。腫瘍保有マウスの生存率をモニターした。Ｅ７Ｃ３腫瘍を有さないマウスの生存率はＢＣ１６細胞での処理によっては影響を受けなかった。

【００１３】

本発明は、Ｂリンパ球中に存在するＢ７タンパクをコードするＤＮＡで形質移入した腫瘍細胞の投与によって、腫瘍成長を治療及び阻害する方法に向けられている。この形質移入は免疫系を刺激して、Ｂ７－形質移入された腫瘍細胞及び形質移入されていない腫瘍細胞の両方に対する応答を高める。

本発明者らは、ＨＰＶ－１６Ｅ７転写解読枠を発現するマウス腫瘍細胞中へのＴ細胞共刺

激分子Ｂ７の形質移入が、それらを免疫担当、同系宿主中に移植したときに拒絶されるようにさせるということを証明してきた。Ｂ７$^+$及びＢ７$^-$腫瘍はヌードマウス中で一様によく成長したので、拒絶はＥ７及びＢ７発現の両方を必要とし、かつ、Ｔ細胞が媒介するものであった。Ｂ７の可溶性高結合力レセプターであるＣＴＬＡ４Ｉｇでのマウスの処理はＢ７$^+$ Ｅ７$^+$腫瘍細胞の拒絶を遮断したので（図４）、拒絶を起こす免疫応答はＢ７－依存性であった。Ｂ７$^+$腫瘍の拒絶も遠隔部位でＢ７$^-$ Ｅ７$^+$腫瘍細胞の拒絶を導いた。Ｂ７がインビトロでのＴ細胞活性化を共刺激できるという多くの証拠がある〔リンスレイら（1991）Ｊ．Exp．Med． 174:561-569 ；ギンミら（1991）Proc．Natl．Acad．Sci．USA 88:6575-6579；クオロバら（1991）Ｊ．Exp．Med． 173:759-762 ；ダムレら（1992）Ｊ．Immunol．148:1985-1992 〕。本発明では、インビボでＴ細胞活性化を刺激するに際しての並びに腫瘍免疫を調節するためのＢ７についての役割を直接に証明することによって、これらの所見を拡張する。従って、このデータはリンパ球活性化についての“２－シグナル”モデルを支持する。このモデルによれば、形質移入Ｅ７腫瘍抗原は、ＭＨＣクラスＩ分子を介して提供された場合、活性Ｔ細胞上でＴＣＲ複合体のトリガーになる抗原特異的“シグナル１”を供給する。腫瘍細胞上で発現したＢ７は、そのレセプターであるＣＤ２８及びＣＴＬＡ－４とＴ細胞上で結合することによって、抗原非特異的“シグナル２”を供給し、それによって、Ｅ７$^+$腫瘍に対する免疫応答を共刺激する。

【００１４】

抗－ＣＤ２８ｍＡｂはＴ細胞活性化の間に幾つかのリンフォカインの生成を刺激できるということは十分に確立されており〔ジュンら（1990）Immunol．Today11:211-216〕、より最近では、ＣＤ２８のカウンターレセプターであるＢ７によるＣＤ２８の進入機序がＩＬ－２のＴ細胞生成を刺激しているということが示されている〔リンスレイら（1991）Ｊ．Exp．Med． 174:561-569 ；ギンミら（1991）Proc．Natl．Acad．Sci．USA 88:6575-6579〕。合わせ考慮すると、これら研究は、ＣＤ２８がＴ細胞リンフォカイン生成の主要な調節器として機能していることを示唆している。ＣＴＬＡ－４が類似の機能を有しているかどうか現時点では知られていない。腫瘍中へのリンフォカイン遺伝子の形質移入を包含する実験からの結果〔テッパーら（1989）Cell 57:503-512；フィーロンら（1990）Cell 60:397-403；ガンスバッハーら（1990）Cancer Res．50:7820-7825；ガンスバッハーら（1990）Ｊ．Exp．Med． 172:1217-1224 ；レイら（1991）Eur．Ｊ．Immunol． 21:851-854；ゴルンベクら（1991）Science 254:713-716 〕は、腫瘍反応性リンパ球がときどき腫瘍保有動物中に存在するが、Ｔ細胞リンフォカインを十分に利用できないために拒絶を起こすことができないということを示唆してきた。本発明は、ＣＤ２８レセプタートリガリングの欠如が腫瘍保有動物中での不十分なＴ細胞リンフォカイン生成の一因となるファクターであり得ることを提案するものである。

【００１５】

抗腫瘍免疫はインビボ及びインビトロで抗－ＣＤ４ｍＡｂではなく抗－ＣＤ８によって阻害され、ＣＤ８$^+$ ＣＴＬはＢ７$^+$ Ｅ７$^+$腫瘍を拒絶したマウスから容易に生成した。ＣＤ８$^+$ ＣＴＬはまた免疫化及び抗原投与実験におけるＢ７$^+$ Ｅ７$^+$腫瘍の拒絶の原因にもなる〔チェンら（1991）Proc．Natl．Acad．Sci．USA 88:110-114；チェンら（1992）Ｊ．Immunol．148:2617-2621 〕。インビボでの腫瘍拒絶及びインビトロでの細胞溶解は、標的細胞上でのＢ７の発現を必要としなかった（図６及び７）。このことは、細胞溶解性のエフェクター相上でのＢ７の効果〔アズマら（1992）Ｊ．Exp．Med． 175:353-360 〕ではその結果を説明できないことを示している。むしろ、これら実験におけるＢ７の役割は、リンフォカイン生成及びＣＤ８$^+$ ＣＴＬの拡大の直接のトリガーになることであるというのが最も可能性が高かった。ＣＤ４$^+$ Ｔ細胞をインビボで＞９５％除去しても腫瘍拒絶を遮断しなかったので（図５）、ＣＤ４$^+$ Ｔｈ細胞はこれらＣＴＬの生成において主要な役割を演じなかったようである。最近の研究は、Ｂ７がＣＤ４$^+$ Ｔ細胞の不存在下で抗－雄（Ｈ－Ｙ）抗原に特異的なトランスジェニックＴＣＲを発現するリンフォカイン生成及びＣＤ８$^+$ Ｔ細胞のクローン拡大を刺激することを示しており、特異的ｍＡｂを使用するＣＤ２８のトリガリングがＣＴＬ活性を誘導するという証拠もある〔ユング（Jung）ら（1987

) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:4611 ；ニユイス (Nijuis) ら (1990) Cancer Immunol. Immunother. 32:245-250〕。ＣＤ２８トリガリングによるリンフォカイン放出の刺激は、インビボでの腫瘍細胞上でのＭＨＣクラスＩ分子の発現を上方に調節するか又は腫瘍破壊を助長する炎症細胞（図３）を漸増することによっても、腫瘍拒絶に寄与してきたかも知れない。

【００１６】

インビボでのＣＤ２８／ＣＴＬＡ－４とＢ７の相互反応を遮断すれば長期間のドナー特異的移植生存を導くことができる〔レンスコフら (1992) Science 257:789-792 〕。このことは、外来抗原の継続的存在下でＣＤ２８レセプターの共刺激を遮断するとＴ細胞非応答性を導くということを示すものである。循環腫瘍抗原及び免疫複合体が腫瘍の免疫学的拒絶からの逃避に寄与するので〔ヘルストロムとヘルストロム（1991）Principles of Tumor Immunity: Tumor Antigens, In: The Biologic Therapy of Cancer. デビタ・ジュニア（DeVita, Jr）ら編, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PP.35-52〕、Ｂ７の如き分子による適切な共刺激の不存在下で腫瘍上に提供され又は腫瘍から放出された外来抗原による継続的ＴＣＲ刺激は抗腫瘍免疫を抑制するであろう、と考えさせる。

免疫化及び抗原投与実験において多くの腫瘍が拒絶応答を誘導できないことは、これら腫瘍が外来抗原決定基を発現することができないことの証拠として解釈されてきた〔ヘウィットら（1976）Br. J. Cancer 33:241-259〕。腫瘍が免疫応答を誘導できないのは、それらが外来抗原決定基を欠いているからではなく、それらがＴ細胞共刺激シグナルを伝達又は引き出すことができないからである。そのような腫瘍は、内部でプロセシングされた腫瘍抗原を認識するＣＤ８$^+$ Ｔ細胞の拡大を直接に刺激するための適切なＴ共刺激分子を発現することができない。また、Ｂ７$^+$ ＡＰＣは、ＣＤ４$^+$ Ｔ細胞応答を引き出す適切な量の抗原性ペプチドを提供することができない。換言すれば、“シグナル１”又は“シグナル２”が欠如しているので、腫瘍は非免疫原性であってもよいのである。

【００１７】

非免疫原性Ｋ１７３５－Ｍ２細胞はＢ７で形質移入した後でさえ拒絶されなかったので、ここで使用した方法はある種の腫瘍の免疫原性欠如を克服しない。しかしながら、インビトロで最適なＴ細胞共刺激を得るには、Ｂ７以外の他の分子も必要である〔ファン・セブンターら (1991) Curr. Opinion Immunol. 3: 294-303〕。ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－３、ＶＣＡＭ－１の如き分子〔ファン・セブンターら (1991) Curr. Opinion Immunol. 3: 294-303〕又は熱安定性抗原〔リウ(Liu) ら (1992) Eur. J. Immunol. 22:2855-2859〕のいずれが抗腫瘍免疫を刺激できるかは現時点では分からない。ここに示した実験的方法は、Ｋ１７３５－Ｍ２の如き“非免疫原性”腫瘍の拒絶が、Ｂ７以外の共刺激分子又はＢ７を加えた他の共刺激分子でそれらを形質移入することによって誘導され得るという可能性を提案するものである。

【００１８】

最後に、これらデータは、癌患者における抗腫瘍免疫応答はＣＤ２８レセプターをインビボで刺激することによって増加するかも知れないということを提案する。インビボで腫瘍上又は腫瘍細胞からの潜在的抗原性ペプチドを提供するＡＰＣ上で、Ｂ７（又は腫瘍細胞表面への標的Ｂ７）発現を上方に調節することが可能である。また、インビトロで腫瘍細胞中にＢ７を移入したり、患者のリンパ球をそれらのＢ７$^+$ 腫瘍細胞に曝すことによってインビボ注入剤用の腫瘍反応性リンパ球の個体群を拡張することも可能である。最終的な目標は、インビボで腫瘍細胞中に直接にＢ７を導入することによって、腫瘍抗原に対する全身性免疫を生じさせることである。Ｂ７$^+$ Ｅ７$^+$ 腫瘍細胞はＢ７$^-$ Ｅ７$^+$ 腫瘍に対する免疫を遠隔部位で刺激したので（図７）、治療的に有益な拒絶応答の発生は、Ｂ７を幾つかの腫瘍細胞中にインビボで導入することだけを必要とし得る。

本発明を一般的に説明してきたが、具体的実施例を参照することによって更に深い理解が得られる。ここに記載した実施例は説明のためだけのものであり、特に断らない限り本発明の限定を意図したものではない。

ここに記載した実施例で説明する研究を行うため、以下の実験操作及び実験結果を利用し

た。

【００１９】

実験操作

マウス

チャールズ・リバー・ブリーディング・ラボラトリーズ (Charles River Breeding Laboratories)（マサチューセッツ州ウィルミントン）からメスのＣ３Ｈ／ＨｅＮマウス（６～８週齢）を入手した。ハーラン・スプラギュー・ダウレイ社 (Harlan Sprague Dawley Co.)（インディアナ州インディアナポリス）からメスのＢＡＬＢ／ｃ（nu／nu）マウス（４～８週齢）を入手した。

セルライン

Ｋ１７３５－Ｍ２細胞は、Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ（Ｈ－２^{k}）マウスの器官からのものであった〔フィドラーとハート，1981〕。Ｅ７Ｃ３及びＥ６Ｂ２は、ＨＰＶ－１６Ｅ７又はＥ６遺伝子をそれぞれ発現するＫ１７３５－Ｍ２形質移入体である〔チェンら (1992) Ｊ. Immunol. 148:2617-2621 〕。ラインｐ２５５５及び１６Ｎ７は、線維肉腫ＮＣＴＣ２５５５（Ｈ－２^{k}）〔アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ＡＴＣＣ）、メリーランド州ロックビル〕から誘導したものであり、それぞれＨＰＶ－１６Ｅ７遺伝子を含有する単一又は複数の原種ｐＬＸＳＮレトロウィルスを移入したものである〔チェンら (1992) Ｊ. Immunol. 148:2617-2621 〕。ｐ８１５Ｅ７は、レトロウィルスＨＰＶ－１６Ｅ７で形質導入したＤＢＡ／２－誘導肥満細胞腫（Ｈ－２^{d}）（ＡＣＴＴ）である〔ハルベルト(Halbert) ら (1991) Ｊ. Viol. 65:4417 〕。全ての細胞を、１０％牛胎児血清（ステライル・システム、ハイクローン (Sterile System、HyClone)、ユタ州ローガン）を含有するダルベッコ変性イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で３７℃に維持した。

【００２０】

ねずみ科Ｂ７のクローニング及び形質移入

ねずみ科Ｂ７をコードするＤＮＡフラグメント〔フリーマンら (1991) Ｊ. Immunol. 143:2714-2722 〕をリウら (1992) Eur. Ｊ. Immunol. In Press に記載されたＰＣＲによって増幅し、ｐＬＮ発現プラスミドベクター〔ブリストル－マイヤーズ・スクウィブ医薬研究所（ワシントン州シアトル）の提供による〕中にクローン化した。得られた発現構築物（ｐｍｕｒＢ７）をジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）ｃＤＮＡ〔Ｄ^{R}／ｐｉｃ、ブリストル－マイヤーズ・スクウィブ医薬研究所（ワシントン州シアトル）の提供による〕を含有する発現可能な突然変異株と共にリポフェション試薬〔ギブコ(Gibco) BRL、ニューヨーク州グランドアイランド〕を使用してＥ７Ｃ３細胞中に同時形質移入した。形質移入体は、0.３３μＭ ＭＴＸを含有するＤＭＥＭ＋１０％牛胎児血清（ＦＢＳ）中で選択した。個々のＭＴＸ耐性コロニーを採取し、ＣＴＬＡ－４Ｉｇ結合によりＢ７発現について分析した〔リンスレイら (1991) Ｊ. Exp. Med. 174:561-569 〕。プールしたコロニー（～２５）も、フロー・サイトメトリーによる選別を２回することによって、Ｂ７陽性（ＰＢ７$^{+}$）及びＢ７陰性（ＰＢ７$^{-}$）個体群に分けた。Ｋ１７３５－Ｍ２細胞も、ｐｍｕｒＢ７及びＰＣＭＩpola〔ストラタジェン（Stratagene）、カリフォルニア州　ラ・ホラ〕によって同時形質移入し、１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８〔ギブコ(Gibco) BRL、ニューヨーク州グランドアイランド〕を含有する、１０％ＦＢＳを有するＤＭＥＭ中で選択した。

【００２１】

抗体

ラット抗－マウスＣＤ４（Ｌ３Ｔ４）ｍＡｂＧＫ1.５、ラット抗－マウスＣＤ８（Ｌｙｔ2.１）ｍＡｂ１１６－13.1、及びマウス抗－Ｈ－２Ｋ^{k} Ｄ^{k} ｍＡｂ１５－３－１Ｓを産生するハイブリドーマをＡＴＣＣから購入した。ラット抗－ヒトＣＤ５ｍＡｂ１０.２をコントロールとして使用した〔チェン (Chen) ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:110-114〕。プリスタン（pristane）処理したヌードマウスにハイブリドーマを腹腔内注射し、腹水をセファロースＣＬ－４Ｂに結合したタンパクＡ〔ファルマシア(Pharmasia Fine Chemicals)、ニュージャージー州　ピスカタウェイ〕上でアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。ウサギ抗－アシアロＧＭ１血清を和光純薬ＵＳＡ（バージニア州

リッチモンド）から購入した。ヒトＣＴＬＡ－４の細胞外領域とヒトＩｇＣγ鎖の間の可溶性融解タンパクであるＣＴＬＡ－４Ｉｇはリンスレイら (1991) J. Exp. Med. 174: 561-569 に記載されている。精製したヒト－マウスキメラｍＡｂＬ６（ヒトＣγ１Ｆｃ部分を有する）ＩｇはリウＵら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443に記載されているようにして調製した。

【００２２】

免疫染色及びフロー・サイトメトリー分析

Ｂ７発現の免疫染色法は、リンスレイら (1991) J. Exp. Med. 174:561-569 に記載されている。簡単に言えば、まず、形質移入した細胞を１０％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭ中でキメラＬ６又はＣＴＬＡ－４Ｉｇのどちらかと共に１０μｇ／ｍｌで４℃で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄して更に１時間フルオレセイン・イソチオシアネート（ＦＩＴＣ）複合化ヤギ－抗－ヒトＩｇＣγ血清〔タゴ社（Tago Corp.）、カリフォルニア州　バーリンゲーム(Burlingame)]と共に４℃でインキュベートした。脾臓細胞に関するＣＤ４及びＣＤ８発現の分析用に、単細胞懸濁液をＦＩＴＣと複合化した抗－ＣＤ４（ＧＦ1.5）又は抗－ＣＤ８（５３.６）ｍＡｂと共に４℃で３０分間インキュベートし、培地で２回洗浄した。次いで、１０,０００個の細胞全量をフロー・サイトメトリー〔ベクトン・ディッキンソン社（Becton Dickinson & Co.)、カリフォルニア州　マウンテン・ヴュー(Mountain View)〕で分析した。

【００２３】

インビボ腫瘍拒絶

マウスを５又は１０匹のグループに分け、それぞれについて毛を剃った側腹部に５×１０^{6}個の細胞を皮下注射した。各マウスについて、カリパスで毎週２つの垂直直径（ｍｍ）を測定することによって腫瘍の大きさを評価した。結果は腫瘍の平均直径として表した。

Ｔ細胞のインビボ除去

インビボ除去実験用に、マウスに１ｍｇ／マウスの投与量でＣＤ４（ＧＦ1.5）又はＣＤ８（１１６－１３.１）に対する精製したｍＡｂを腫瘍接種の当日７日前に２回静脈注射した。同量の抗－ヒトＣＤ５ｍＡｂ１０.２をコントロールとして使用した。４～５週間後、マウスを殺して脾臓細胞懸濁液を調製し、除去効率について、ＦＩＴＣラベル化抗－ＣＤ４及びＣＤ８抗体によるフロー・サイトメトリーで試験した。９５％を越える特異的Ｔ細胞サブセットが他のサブセットに影響を及ぼすことなく一様に除去された。

【００２４】

組織学的評価

注射後１０日目に腫瘍細胞接種部位から組織を分離し、１０％ホルマリン中で固定し、パラフィン中に封鎖し、４～６μｍの薄片にしてヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。図４に示したように、顕微鏡評価を行った。

ＣＴＬ分析

ＣＴＬ活性を測定するための実験操作は、チェンら (1992) J. Immunol. 148:2617-2612 に記載されている。簡単に言えば、腫瘍接種後４～１０週間目にマウスから脾臓を分離し、該脾臓細胞（５×１０^{6}）をγ線照射（１０,０００ｒａｄ）した１６Ｎ７細胞（１×１０^{5}）と共に２４ウェルプレート〔コスター（Costar)、マサチューセッツ州　ケンブリッジ　(Cambridge)〕中１ウェル当たり２ｍｌの培地中で同時培養した。６日後に細胞を採取し、エフェクター細胞として計測した。２百万の標的細胞を２５０μＣｉの^{51}Ｃｒ〔ニューイングランド・ヌクレアー(New England Nuclear)、　マサチューセッツ州ボストン〕で４５分間（ｐ８１５Ｅ７について）又は一晩（ｐ２５５５及び１６Ｎ７細胞について）ラベル化し、そのあと、ラベル化した標的細胞（5,０００細胞／ウェル）をエフェクター細胞と共に異なるエフェクター／標的（Ｅ：％）比で４時間同時培養した。上清を集めてγ線カウンターで計測した。％特異的細胞溶解を以下のように計算した：１００×〔（実測ｃｐｍ－自然ｃｐｍ）／（最大ｃｐｍ－自然ｃｐｍ）〕。全ての実験において、ＣＴＬ不存在下での自然放出はトリトンＸ－１００（１：１００）による最大放出の５～２０％であった。細胞除去分析において、示したように、１／１０希釈ウサギ補体〔セダル

ラン研究所（Cedarlane Laboratories)、 カナダ、オンタリオ州 ホーンバイ〕の存在下で、１×１０^{6}／ｍｌのエフェクター細胞を３０μｇ／ｍｌのｍＡｂで３７℃で６０分間前処理し、使用前に３回洗浄した。

【００２５】

【実施例】

実施例１ Ｅ７Ｃ３及びＫ１７３５－Ｍ２腫瘍セルラインでのマウスＢ７の形質移入及び発現

ＨＰＶ－１６のＥ７遺伝子〔チェンら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA88:110-114〕をＫ１７３５－Ｍ２ライン〔フィドラーとハート, 1981〕に形質移入することによって、マウスメラノーマセルラインＥ７Ｃ３（Ｂ７$^{-}$ Ｅ７$^{+}$）を誘導した。実験操作に記載したようにしてＥ７Ｃ３細胞をｐｍＢ７及びＤ^{R}／ｐｉｃで同時形質移入し、形質移入体をメトトレキセート（ＭＴＸ）耐性について選択した。Ｋ１７３５－Ｍ２細胞をｐｍＢ７及びｐＣＭ１ｎｅｏＰｏｌｙＡで同時形質移入し、ネオマイシン耐性について選択した。高い結合力でヒト〔リンスレイら (1991) J. Exp. Med. 173:721-730 〕及びマウス〔リウ(Liu）ら (1992) Eur. J. Immunol. 22:2855-2859〕Ｂ７に結合しているＣＴＬＡ－４の細胞外領域の可溶性型であるＣＴＬＡ４Ｉｇで間接免疫蛍光染色した後、薬物耐性細胞クローンをフロー・サイトメトリーによりＢ７の発現について試験した。更なる研究用に３つのＥ７Ｃ３形質移入体を選択した；これらのうち２つ（ＢＣ１６及びＢＣ２２）はＢ７に関して陽性に染色され１つ（ＢＣ１３）は陰性に染色された。Ｅ７Ｃ３形質移入体からの$^{-}$２５ＭＴＸ耐性クローンのプールも、フロー・サイトメトリーによりＢ７陽性（ＰＢ７$^{+}$）とＢ７陰性（ＰＢ７$^{-}$）個体群に選別した。Ｋ１７３５－Ｍ２形質移入体から、２つのＢ７陽性クローン（Ｋ／１８.２及びＫ／Ｐ１２）を選択した。これら細胞についてのＢ７発現のレベルは、フロー・サイトメトリーにより比較した（図１）。他の実験において、全ての選択されたセルラインは、半定量的逆転写酵素結合ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）分析により、大よそ同レベルのＨＰＣ－１６Ｅ７遺伝子発現を示した。全てのラインは、フロー・サイトメトリーにより判定した場合に低いレベルでＭＨＣクラスＩ分子を発現し、γインターフェロンでの処理の後にＭＨＣクラスＩ分子の類似の誘導を示した。

【００２６】

実施例２ インビボでのＢ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３腫瘍退縮

Ｂ７発現がＥ７Ｃ３腫瘍に対するＴ細胞免疫を高めるかどうかを試験するために、Ｂ７$^{+}$及びＢ７$^{-}$形質移入体をＣ３Ｈ／ＨｅＮマウス及びＴ細胞欠如ヌードマウス（ＢＡＬＢ／ｃ nu／nu）に皮下注射し、それらの腫瘍形成性を試験した（表１）。Ｅ７Ｃ３細胞は、純粋なＣ３Ｈ／ＨｅＮマウスにおいて原種のＫ１７３５－Ｍ２細胞よりも低腫瘍形成性であったが、ヌードマウスにおいては両ラインとも類似の腫瘍形成性を示した（表１）。これらの結果は、腫瘍成長を遅くする免疫担当マウスにおいてＴ細胞媒介免疫応答はＥ７Ｃ３腫瘍によって誘導されたが、２／１５のマウス（～１３％）がそれらの腫瘍を拒絶しただけなので、殆どのマウスでは腫瘍撲滅をもたらさなかったことを示唆している。

【００２７】

対照的に、Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスへのＢＣ１６、ＢＣ２２又はＰＢ７$^{+}$細胞の接種は、一時的な腫瘍成長に続いて２～３週間以内に１００％のマウスに退縮をもたらした（表１）。クローンＢＣ１３及びＰＢ７$^{-}$個体群は、原種のＥ７Ｃ３細胞と同じく成長する腫瘍を形成した（それぞれ１０％及び０％退縮）。Ｅ７Ｃ３及びＰＢ７$^{+}$注射Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスの写真を図２Ａに示し、Ｅ７Ｃ３及び幾らかの形質移入誘導体の腫瘍成長速度を図２Ｂに示した。全てのＥ７Ｃ３誘導細胞はヌードマウスにおいて腫瘍を形成した。Ｅ７Ｃ３細胞でのＢ７の発現はＣ３Ｈ／ＨｅＮマウスによる腫瘍拒絶を導いたが、２つのＫ１７３５－Ｍ２誘導Ｅ７陰性クローン（Ｋ／１８.２及びＫ／Ｐ１２）によるＢ７の発現は腫瘍拒絶を導かなかった。

拒絶を受けている成長中のＢ７$^{-}$腫瘍及びＢ７$^{+}$腫瘍からの組織学的切片を図３に示した。注射後１０日目にＰＢ７$^{-}$細胞により誘導された腫瘍は、真皮の深部から表面に伸びる、漸進的に成長する腫瘍性細胞を見せた。Ｅ７Ｃ３誘導腫瘍からの組織学的切片も同じで

あった。ＰＢ７$^{+}$細胞腫瘍の試験は、図３Ｂに示すように、炎症細胞で浸潤した腫瘍性細胞の薄い縁によって囲まれた甚だしく壊死性の芯部を見せた（図３Ｂ～Ｄ）。同様の結果がＢＣ１６腫瘍で得られた。

【００２８】

【表１】

表　１

免疫担当及びヌードマウスでの

Ｂ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３セルラインの腫瘍形成特性のまとめ

マウスへの皮下接種後２１日目の腫瘍の状態

セルライン	Ｅ７	Ｂ７	Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ 腫瘍形成率（%）*1	Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ 平均腫瘍直径の範囲（mm）*2	ＢＡＬＢ／ｃ（nu／nu） 腫瘍形成率（%）	ＢＡＬＢ／ｃ（nu／nu） 平均腫瘍直径の範囲（mm）
Ｅ７Ｃ３	＋	－	13/15(87)	0-12	15/15(100)	14-19
ＰＢ７$^{-}$	＋	－	9/10(90)	0-7	10/10(100)	15-20
ＢＣ１３	＋	－	10/10(100)	4-8	10/10(100)	18-24
ＰＢ７$^{+}$	＋	＋	0/10(0)	0	10/10(100)	14-21
ＢＣ１６	＋	＋	0/9(0)	0	10/10(100)	16-21
ＢＣ２２	＋	＋	0/15(0)	0	10/10(100)	5-10
K1735-M2	－	－	10/10(100)	15-23	15/15(100)	16-26
Ｋ／１８.２	－	＋	10/10(100)	12-24	ND*3	ND*3
Ｋ／Ｐ１２	－	＋	9/9(100)	13-21	ND*3	ND*3

*1　0.1ｍｌＨＢＳＳ中の５×１０^{6}細胞のアリコートを６～８週齢Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ又はＢＡＬＢ／ｃ（nu／nu）マウスに皮下注射した。腫瘍の大きさは、各マウスについて毎週カリパスで２つの垂直直径（mm）を測定することによって評価した。直径が２mmより小さい腫瘍を有するマウスを腫瘍形成に関して陰性と記録した。

*2　結果を腫瘍の平均直径で表した。示したマウスの数における平均腫瘍直径の範囲を示した。

*3　実施せず。

【００２９】

実施例３　Ｂ７依存免疫応答によって媒介されるＢ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞の拒絶

Ｂ７$^{+}$ Ｅ７$^{+}$腫瘍細胞の拒絶がＢ７媒介免疫応答によって起こるか否かを決定するために、ＣＴＬＡ４Ｉｇでのインビボ処理よって腫瘍拒絶が遮断されるかどうかを試験した。こ

のＣＴＬＡ４ＩｇはＣＤ２８及びＣＴＬＡ－４の両方へのＢ７結合を遮断し、それによって、インビトロ及びインビボでの免疫応答を抑制する〔リンスレイら（1991）Ｊ．Exp．Med．173:721-730 ；リンスレイら（1992）Science 257:792-795 ；レンスコフら（1992）Science 257:792-795 〕。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに注射する前にＢＣ２２細胞を５０μｇのＣＴＬＡ４Ｉｇと混合してから、５０μｇのＣＴＬＡ４Ｉｇを１日置きに１２日間静脈注射した；ＣＴＬＡ４Ｉｇ処理のこの様式は以前にマウスの膵島細胞異種移植の拒絶を遮断するために使用したものである〔レンスコフら（1992）Science 257:792-795 〕。コントロールとして、当量のイソタイプ一致キメラモノクローナル抗体（ｍＡｂ）Ｌ６〔フェル（Fell）ら（1992）Ｊ．Biol．Chem．267:15552-15558 〕を使用した。図４に示すように、ＣＴＬＡ４Ｉｇ処理はＢＣ２２細胞によって起こる腫瘍の拒絶を妨害したが、コントロールｍＡｂは妨害しなかった。同様の結果がＢＣ１６細胞で得られた。これらの結果は、免疫担当同系宿主におけるＢ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞の拒絶はＢ７とそのレセプターの相互作用によって媒介されることを示している。

【００３０】

実施例４　Ｅ７$^{+}$ 腫瘍に対するＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞応答を誘導するＢ７発現

Ｂ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３腫瘍細胞の拒絶におけるＴ細胞サブセットの役割を解析するために、ＣＤ４$^{+}$ 又はＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞のいずれかに対するｍＡｂをマウスに注射してインビボでこれら細胞を特異的に除去した。この操作は、フロー・サイトメトリーで判定して、＞９５％のＴ細胞のいずれかの個体群を他の細胞個体群に影響することなく除去した。ＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞の除去は、ＢＣ１６（図５）及びＢＣ２２の両方を含むＢ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞の拒絶を完全に阻害した。これに反して、抗－ＣＤ４ｍＡｂ又はコントロールｍＡｂの注射は腫瘍拒絶に影響を及ぼさなかった（図５）。これらの結果は、Ｂ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞に対して誘導される拒絶は主としてＣＤ８$^{+}$ Ｔ細胞によって媒介されたことを示している。

【００３１】

Ｂ７$^{+}$ Ｅ７$^{+}$ 腫瘍細胞の注射はＣＴＬ発生を招来した（図６）。腫瘍細胞をマウスに皮下注射し、脾臓を取り出し、そして、脾臓細胞をインビトロでＥ７$^{+}$ 腫瘍細胞での第２の刺激に付してポリクローナルＣＴＬを生じさせた〔チェンら（1992）Ｊ．Immunol．148:2617-2621 〕。細胞障害を^{51}Ｃｒ－ラベル化１６Ｎ７標的細胞に対して測定した；これらは、ＭＨＣクラスＩ（Ｈ－２^{k} ）陽性、Ｅ７陽性線維肉腫細胞であって〔チェンら（1992）Ｊ．Immunol．148:2617-2621 〕、インビボ細胞障害分析においてＥ７Ｃ３細胞よりもより一貫した結果を与えた。１６Ｎ７細胞によるインビトロでの再刺激後にＢＣ１６細胞を注射したマウスから取った脾臓細胞で強いＣＴＬ活性を検出した（図６Ａ）。該ＣＴＬは、Ｅ７（ｐ２５５５細胞）を発現しないコントロール線維肉腫細胞又は異なるＭＨＣハプロタイプのＥ７発現細胞（ｐ８１５Ｅ７）（図６Ａ）を溶解しなかった。このことは、標的細胞溶解は抗原特異的であり、かつ、ＭＨＣクラスＩ制限的であったことを示唆している。細胞溶媒活性は、補体の存在下でエフェクター細胞を抗－ＣＤ８ｍＡｂで前処理することにより著しく低下したが、抗－ＣＤ４又は抗－ＮＫ細胞抗体で処理しても低下しなかった（図６Ｂ）。細胞溶解活性のレベルは、Ｅ７Ｃ３、ＢＣ１６又は照射したＥ７Ｃ３細胞を注射し１６Ｎ７細胞で第２のインビトロ刺激に付したマウスからの脾臓細胞中で測定した（図６Ｃ）。ＢＣ１６細胞を注射したマウスからの脾臓細胞だけが、有意なＣＴＬ活性を有した。合わせ考慮すると、これら結果は、Ｅ７Ｃ３細胞上でのＢ７の発現はＢ７の発現に関係なくＥ７$^{+}$ 腫瘍細胞に特異的なＣＤ８$^{+}$ ＣＴＬの誘導を増加することを示している。

【００３２】

実施例５　Ｂ７$^{-}$ Ｅ７Ｃ３腫瘍に対する抗腫瘍免疫のＢ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞による遠隔部位での誘導

Ｂ７$^{+}$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導されたＴ細胞免疫が遠隔部位に移植されたＢ７$^{-}$ Ｅ７Ｃ３細胞に対して効果があるか否かを決定するために、Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスの片方の側腹部にＢＣ２２細胞、Ｅ７Ｃ３細胞又は培地だけを注射し、他方の側腹部に同時に注射したＥ７Ｃ３腫瘍細胞の成長をモニターした。反対の側腹部に接種したＢＣ２２細胞を有する

マウスにおいて、Ｅ７Ｃ３腫瘍の成長は有意に阻害された；これらマウスの４／５は腫瘍を完全に拒絶した。培地又はＢ７$^-$ Ｅ７Ｃ３腫瘍を接種したマウスにおいては、Ｅ７Ｃ３腫瘍の成長は影響を受けなかった（図７Ａ）。照射したＥ７Ｃ３腫瘍は、反対の側腹部に接種したＥ７Ｃ３腫瘍の成長に影響を及ぼさなかった（データは示していない）。ＢＣ２２の注射は、反対の側腹部に注射したＥ６Ｂ２腫瘍、Ｋ１７３５－Ｍ２誘導ＨＰＶ－１６Ｅ６形質移入体〔チェンら (1992) Ｊ．Immunol．148:2617-2621 〕の成長を阻害しなかった（図７Ｂ）。これらの結果は、Ｂ７$^+$ Ｅ７$^+$ 細胞の移植はＢ７$^-$ 原種Ｅ７Ｃ３腫瘍での抗原投与に対する全身腫瘍拒絶応答を誘導し、該拒絶はＥ７$^+$ 腫瘍細胞に特異的であったことを証明するものである。

次いで、樹立した転移性腫瘍の治療のために、ＢＣ１６細胞を使用して更なる研究を行った。Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスを１グループ当たり１０匹に分け、Ｅ７Ｃ３細胞（図８Ａ）、Ｅ６Ｂ２細胞（図８Ｂ）又はＫ１７３５－Ｍ２細胞（図８Ｃ）のいずれかの細胞×10^5 を各マウスに静脈注射した。４日後、各マウスに1×10^6 のＢＣ１６細胞を静脈注射した；このＢＣ１６細胞の接種は５日間置きに２回繰り返した。マウスの生存率をモニターして図８に描写した。図８は、ＢＣ１６細胞の投与は、Ｅ７Ｃ３腫瘍を有するマウスの生存率を有意に増加させたが、他の腫瘍を有するマウスの生存率に影響を及ぼさなかったことを示すものである。

【００３３】

実施例６　Ｂ７形質移入した細胞及び形質移入していない細胞による腫瘍誘導の比較

異なる腫瘍セルラインをそれぞれ２つの大まかなグループに分割した。第１の細胞ブループは遺伝的に変えられていなかった（モック）；一方、第２の細胞ブループはＢ７をコードするＤＮＡで形質移入された（Ｂ７$^+$ 細胞）結果、該形質移入細胞はＢ７を発現した。次いで、異なる腫瘍セルラインについての２つのグループのいずれかから腫瘍形成量の細胞（１マウス当たり1×10^5 ～5×10^6 ）をマウスに接種し、接種後４週間腫瘍形成率をモニターした。これら研究の結果を表２に示した。表２は、Ｂ７形質移入細胞からの腫瘍形成が非形質移入腫瘍セルラインからの腫瘍形成率と比較して無視できるか又は有意に阻害されていることを説明するものである。

上に示したように、Ｅ７陽性、Ｂ７陽性細胞によって生じた免疫は、樹立した腫瘍を治療するのに有効であった。散在性転移を肺に形成できるＥ７Ｃ３細胞をマウスに静脈注射した。Ｅ７Ｃ３腫瘍の樹立後４日目にＥ７陽性／Ｂ７陽性細胞を注射すると、全ての処理されたマウスの生存が延長され、４０％長い生存期間を導く。

もう１つの研究において、ｐ９７関連腫瘍拒絶抗原の遺伝子が挿入されたＫ１７３５－Ｍ２マウスメラノーマ細胞（ｃ１６２）を免疫担当マウスに接種し十分に成長させて腫瘍をつくらせた。この細胞をＢ７で形質移入して該Ｂ７陽性ｃ１６２細胞を免疫担当マウスに接種した場合、腫瘍形成は起こらなかった。

【００３４】

【表２】

Ｔ細胞共刺激分子Ｂ７を発現する
セルラインの腫瘍形成特性のまとめ

腫瘍	タイプ	株	免疫原性*	腫瘍形成率＃ モック	$B7^+$ 細胞	
Ｅ７Ｃ３（$E7^+$）	メラノーマ	Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ	＋＋	18/20	0/30	
Ｅ６Ｂ２（$E6^+$）	メラノーマ	Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ	＋＋	20/20	0/10	
ｃ１６２（$p97^+$）	メラノーマ	Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ	＋＋	19/20	0/10	
Ｋ１７３５－Ｍ２	メラノーマ	Ｃ３Ｈ／ＨｅＮ	－	20/20	20/20	**
ＥＬ－４	リンパ腫	Ｃ５７ＢＬ／６	＋	20/20	1/10	
Ｂ１６	メラノーマ	Ｃ５７ＢＬ／６	－	15/15	2/10	
ｐ８１５	肥満細胞腫	ＤＢＡ／２	＋	15/15	0/5	

＊　標準免疫化及び抗原投与実験から判定。

＃　腫瘍接種後４週間目の腫瘍形成率。

＊＊　より小さな腫瘍。

【００３５】
ＥＬ－４Ｔ細胞マウスリンパ腫、Ｂ１６メラノーマ及びｐ８１５肥満細胞腫の如き異なる腫瘍セルラインでの研究において同様な結果が得られた。
前の記載及び実施例は本発明を説明するものであって限定するものではない。本発明の真の思想及び範囲から逸脱することなく、多数の変更及び修正を加えることができる。

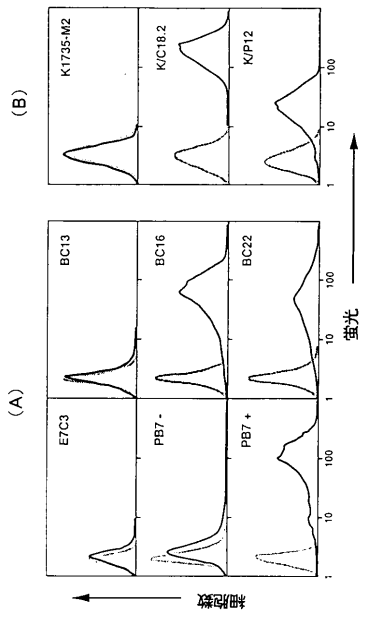
【図面の簡単な説明】
【図１】形質移入したセルライン上でのＢ７の発現を説明するものである。実線はＣＴＬＡ４Ｉｇ及びＦＩＴＣ複合化ヤギ－抗－ヒトＩｇＣγ血清で順次細胞を染色したものであり、破線はコントロールｍＡｂキメラＬ６及びＦＩＴＣ複合化ヤギ－抗－ヒトＩｇＣγ血清で順次細胞を染色したものである。パネルＡはＥ７Ｃ３細胞及びそのＢ７形質移入体を示し、パネルＢはＫ１７３５－Ｍ２細胞及びそのＢ７形質移入体を示す。
【図２】$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍が免疫適格、同系Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスによって拒絶されることを説明するものである。Ａは$B7^-$及び$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍を有するマウスについての生物の形態を表す写真であり、Ｂは$B7^-$及び$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍の成長速度のグラフである。
【図３】$B7^-$又は$B7^+$ Ｅ７Ｃ３細胞によって誘導された腫瘍の組織学を説明するものである。ＡはＰ$B7^-$細胞によって誘導された腫瘍であり（倍率６６×）、Ｂは$PB7^+$細胞によって誘導された腫瘍であり（倍率６６×）、ＣはＢの倍率を６６０×にしたものであり、ＤはＢの倍率を１３５０×にしたものである。
【図４】ＣＴＬＡ４ＩｇがＢ7^+ Ｅ７Ｃ３細胞の拒絶を遮断することを説明するものである。
【図５】Ｂ7^+ Ｅ７Ｃ３腫瘍の拒絶がＣＤ8^+ Ｔ細胞によって媒介されることを説明するものである。
【図６】ＣＴＬがＢ7^+ Ｅ７Ｃ３細胞を接種したマウスから発生することを説明するものである。ＡはＭＨＣクラスＩ制限様式（ｒｅｓｔｒｉｃｔｅｄ　ｆａｓｈｉｏｎ）でＥ７

遺伝子を発現する標的を溶解するＣＴＬの発生を示し、Ｂは細胞障害活性がＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞によって媒介されることを示し、Ｃは異なる腫瘍を注入されたマウスにおけるＣＴＬ活性を示すものである。

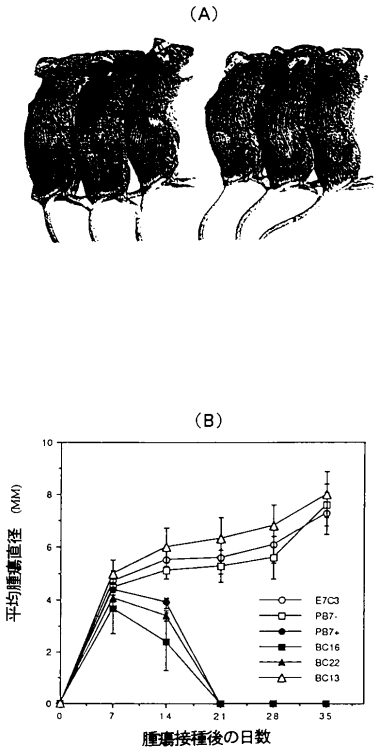
【図７】Ｂ７$^{+}$Ｅ７Ｃ３細胞が遠隔部位でＢ７$^{-}$Ｅ７Ｃ３腫瘍に対する免疫を誘導することを説明するものである。上方のパネルはＥ７Ｃ３に関するものであり、下方のパネルはＥ６Ｂ２に関するものである。

【図８】Ｂ７$^{+}$Ｅ７Ｃ３細胞が定着した転移腫瘍に対する免疫を誘導することを説明するものである。ＡはＥ７Ｃ３細胞に関するものであり、ＢはＥ６Ｂ２細胞に関するものであり、ＣはＫ１７３５－Ｍ２細胞に関するものである。

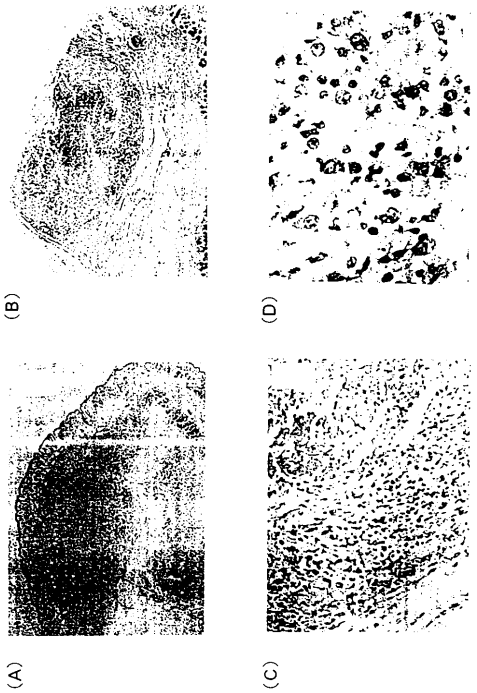
【図１】



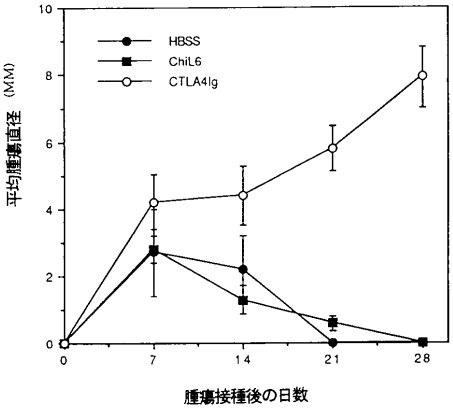
【図２】



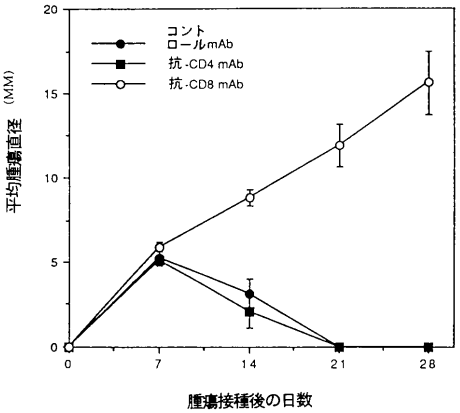
【図３】


(B)
(D)
(A)
(C)

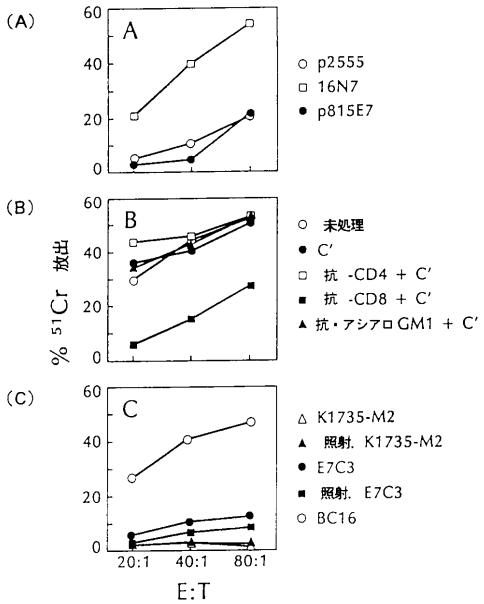
【図４】


HBSS
ChiL6
CTLA4Ig
平均腫瘍直径 (MM)
腫瘍接種後の日数

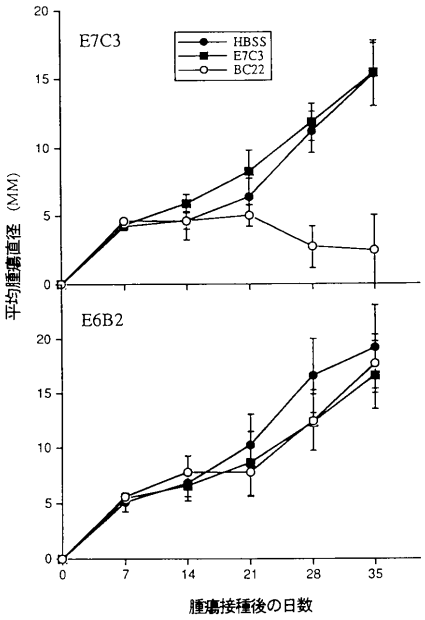
【図５】


コントロールmAb
抗-CD4 mAb
抗-CD8 mAb
平均腫瘍直径 (MM)
腫瘍接種後の日数

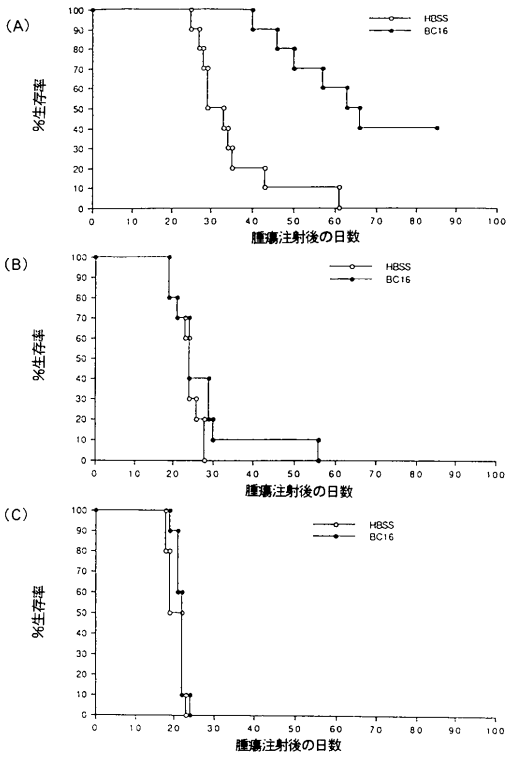
【図６】


(A)
A
p2555
16N7
p815E7
(B)
B
未処理
C′
抗 -CD4 + C′
抗 -CD8 + C′
抗・アシアロGM1 + C′
% 51Cr 放出
(C)
C
K1735-M2
照射. K1735-M2
E7C3
照射. E7C3
BC16
20:1
40:1
80:1
E:T

【図７】


E7C3
HBSS
E7C3
BC22
E6B2
平均腫瘍直径（MM）
腫瘍接種後の日数

【図８】


(A)
(B)
(C)
HBSS
BC16
%生存率
腫瘍注射後の日数

フロントページの続き

(74)代理人 100096194
弁理士 竹内 英人
(74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(72)発明者 リーピング チェン
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１１５ シアトル フォーティース アベニュー ノースイースト ８０４５
(72)発明者 インゲガード ヘルストレーム
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１０５ シアトル サーバー ドライヴ ３９２５
(72)発明者 カルル エリック ヘルストレーム
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１０５ シアトル サーバー ドライヴ ３９２５
(72)発明者 ジェフリー エイ レドベッター
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１７７ シアトル ノースウェスト ワンハンドレッドアンドサーティーンス プレイス ３０６
(72)発明者 ピーター エス リンズリー
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１１９ シアトル ナインス アベニュー ウェスト ２４３０

審査官 今村 玲英子

(56)参考文献 GIMMI C.D., B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2, Proceedings of the National Academy of Sciences(USA), １９９１年, Vol.88, No.15, p.6575-6579
LINSLEY P.S., T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1, Proceedings of the National Academy of Sciences(USA), １９９０年, Vol.87, No.13, p.5031-5035

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 39/00
A61K 35/12
A61P 35/00
C12N 5/10
C12N 15/09
BIOSIS(STN)
CA(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)
JMEDPlus(JDream2)
JST7580(JDream2)
JSTPlus(JDream2)