(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3881691号
(P3881691)
(45)発行日　平成19年2月14日(2007.2.14)　(24)登録日　平成18年11月17日(2006.11.17)

| (51)Int.Cl. | | F I | |
|---|---|---|---|
| C12N 5/06 | (2006.01) | C12N 5/00 | E |
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N 15/00 | ZNAA |
| C12P 21/02 | (2006.01) | C12P 21/02 | C |
| C12R 1/91 | (2006.01) | C12P 21/02 | C |
| | | C12R 1:91 | |

請求項の数 12　(全 31 頁)

(21)出願番号　特願平7-528490
(86)(22)出願日　平成7年4月28日(1995.4.28)
(65)公表番号　特表平9-512441
(43)公表日　平成9年12月16日(1997.12.16)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/005448
(87)国際公開番号　WO1995/029935
(87)国際公開日　平成7年11月9日(1995.11.9)
審査請求日　平成14年4月30日(2002.4.30)
(31)優先権主張番号　08/234,580
(32)優先日　平成6年4月28日(1994.4.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ベーリンガー　インゲルハイム　ファーマシューティカルズ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　コネチカット州　０６８７７－０３６８　リッジフィールド　リッジバリー　ロード　９００　ピーオーボックス　３６８
(74)代理人
弁理士　中村　稔
(74)代理人
弁理士　大塚　文昭
(74)代理人
弁理士　宍戸　嘉一
(74)代理人
弁理士　竹内　英人

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｂ細胞の増殖方法及び分化方法並びにその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

一つ以上のＢ細胞を高濃度の膜結合CD40リガンドの存在下で培養する工程を含むＢ細胞の増殖方法であって、前記膜はCD40リガンドを自然に発現する細胞で見られる密度よりも少なくとも10倍大きい密度でCD40リガンドを含み、Ｂ細胞を少なくとも100倍増殖する前記方法。

【請求項２】

前記高密度の膜結合CD40リガンドがCD40リガンドを自然に発現する細胞よりも少なくとも100倍大きい密度で細胞膜に存在する、請求項１記載の方法。

【請求項３】

増殖しているＢ細胞を一種以上のサイトカイン及び高密度の膜結合CD40リガンドの存在下で培養する工程を含む増殖しているＢ細胞を抗体産生細胞に分化する方法であって、前記膜はCD40リガンドを自然に発現する細胞で見られる密度よりも少なくとも10倍大きい密度でCD40リガンドを含み、Ｂ細胞を少なくとも100倍増殖する前記方法。

【請求項４】

前記Ｂ細胞を約250倍増殖する、請求の範囲第1項～第3項のいずれか１項記載の方法。

【請求項５】

前記高密度の膜結合CD40リガンドを、CD40リガンドをコードするヌクレオチド配列からなるベクターでトランスフェクトされた培養昆虫細胞により産生する請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項６】
前記Ｂ細胞がヒトＢ細胞である請求の範囲第1項に記載の方法。
【請求項７】
前記サイトカインがTh2リンホカインである請求の範囲第3項に記載の方法。
【請求項８】
前記サイトカインが組換えヒトインターロイキン－１α（IL-1α）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10及びIL-11である請求の範囲第3項に記載の方法。
【請求項９】
前記サイトカインが抗CD3刺激ヒト末梢血Ｔ細胞からの上澄みである請求の範囲第3項に記載の方法。
【請求項１０】
前記Ｂ細胞を増殖中に抗原の存在下でインキュベートする請求の範囲第3項に記載の方法。
【請求項１１】
前記抗原を多工程培養操作の静止期中に添加する請求の範囲第3項に記載の方法。
【請求項１２】
前記抗原を、前記hdmb CD40リガンドを含む膜に共有結合する請求の範囲第3項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
関連出願の相互参照
この出願は1994年４月28日に出願された米国特許出願第08/234,580号の一部継続出願であり、その米国特許出願の内容が参考として本明細書に含まれる。
発明の分野
本発明は免疫学の分野に関する。詳しくは、本発明はＢ細胞の増殖方法及び分化方法を提供する。
関連技術
免疫応答中に、Ｂ細胞の活性化及び分化が高アフィニティー抗原特異性抗体の分泌をもたらす。抗体応答がタンパク質抗原に対し誘導される場合、抗体の産生はまた特定のヘルパーＴ（Th）細胞の活性化及びＢ細胞とのそれらの相互作用に依存する。活性化プロセス及び分化プロセス中に、Ｂ細胞は一つ以上の異なり、かつ不可逆性の経路に従って幾つかの同定可能な機能の一つを獲得する。例えば、初期に活性化されたＢ細胞は高レベルの増殖を受け、そして細胞分裂のこの期間中に、幾つかの異なるイベントが起こり得る。同位体スイッチングが起こって異なる一定領域（γサブクラス、α、またはε）に近位のＨ鎖可変(V)領域遺伝子の組換え及び異なる抗体クラスの分泌を生じ得る。体細胞突然変異がＨ鎖Ｖ領域及びＬ鎖Ｖ領域の遺伝子セグメント中で起こって高アフィニティー抗体結合部位を生じることがあり、またＢ細胞が分化して記憶細胞または有効な抗体分泌プラズマ細胞になることがある。
特別なＢ細胞がどの一つ以上の経路に従うのかは、多分、それが受ける刺激の型により決められる。これはおそらくその総合的な環境により決められる。例えば、その他の細胞型（Th細胞及び/又は濾胞樹状細胞の異なる型）の存在及び特定の抗原の存在または不在が異なるシグナルをＢ細胞に送り得る。幾つかのイベント、例えば、記憶Ｂ細胞を生じるシグナル並びに体細胞突然変異及び高アフィニティー抗体産生細胞の選択を誘導する分子メカニズムが、不十分に理解されている。その他のプロセス、例えば、自生Ｂ細胞を誘導して増殖させ、かつ特定の感作され、活性化されたTh細胞との接触により与えられる初期活性化シグナルが今では良く特性決定されている(Parker,D., Annu.Rev.Immunol. 11:331-360(1993))。更に、活性化Ｂ細胞に対する可溶性Th細胞由来リンホカインの効果がまた概説されている(Parker,D., Annu.Rev.Immunol. 11:331-360 (1993)；Hodgkinら, J.Immunol. 145:2025-2034 (1990)；Noelleら, J.Immunol. 146:1118-1124 (1991))。
感作され、活性化されたTh細胞の発生はＢ細胞活性化に要求されるので、Ｂ細胞応答を研

究するのに使用された古典的なin vitro系を使用してＢ細胞それ自体の用件を特定することは困難であった。これらの系（その多くが精製Ｂ細胞、抗原特異性Th細胞クローン、及び抗原を利用した）において、Th細胞活性化の要件がまたＢ細胞応答を生じるのに必須であった。

Ｉ．Th細胞からＢ細胞へのシグナルの接触依存性送出

Th細胞によるＢ細胞活性化に関与する工程は、主要組織適合性複合体(MHC）制限活性化及び特定のTh細胞の感作である第一工程と、Ｂ細胞活性化、増殖、及び分化を誘発するためのＢ細胞との二次活性化Th細胞の相互作用である第二工程に分けられる(Parker,D., Annu.Rev.Immunol. 11:331-360 (1993))。自生Th細胞は抗原提示細胞の表面でクラスII MHC分子に結合されたペプチド（プロセシングされた）に開裂された抗原との相互作用により感作される。Th細胞感作段階で、静止Ｂ細胞は抗原提示細胞として利用できない。何となれば、それらはTh細胞に必要な同時刺激性シグナルを与えることができないことが明らかであるからである。Th細胞感作に適当な同時刺激性シグナルを与えることができる抗原提示細胞は脾臓のＴ細胞に富む領域そしておそらく活性化Ｂ細胞中に見られる相互連結樹状細胞である。特定のTh細胞が一旦感作されると、それらの活性化要件はそれ程厳しくないことが明らかである。感作Th細胞は、特定の抗原受容体で抗原を捕獲し、それをペプチドにプロセシングした静止Ｂリンパ球により有効に活性化し得る(Parker,D., Annu.Rev.Immunol. 11:331-360 (1993))。一旦活性化されると、感作Th細胞は、それらに適当な接触依存性かつリンホカイン依存性の活性化シグナルを静止Ｂ細胞に相互送出させる遺伝子を発現する(Kehry,M.R.及びHodgkin,P.D., Sem.Immunol. 5:393-400 (1993))。

II．歴史的な展望

1980年代の幾つかの研究はＢ細胞に活性化感作Th細胞により送出された特定のシグナルの重要な特徴を記載していた(Coffmanら, Immunol.Rev. 102:5-28 (1988)；DeFrancoら, J.Exp.Med. 159:861-880 (1984))。Ｂ細胞－Th細胞接触が必要とされた。静止Ｂ細胞活性化を誘導するTh細胞由来シグナルは可溶性リンホカイン単独により置換し得なかった(Anderssonら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:1612-1616 (1980)；Juliusら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:1989-1993 (1982)；Owens,T., Eur.J.Immunol. 18:395-401 (1988)；Whalenら, J.Immunol. 141:2230-2239 (1988)；Hirohataら, J.Immunol. 140:3726-3744 (1988)；Noelleら, J.Immunol. 140:1807-1814 (1989)；Juliusら, Eur.J.Immunol. 18:381-386 (1988))。接触シグナルを静止Ｂ細胞に送出するのに関与する分子を特性決定するのに重要な知見は、前活性化Th細胞が活性化シグナルを送出するのに使用し得ることであった。これは、自生Ｂ細胞により受け取られた接触シグナルが同系である必要はないことを意味した。それらは抗原非依存性であり、制限されたMHCではなかった。Ｂ細胞活性化シグナルはTh細胞活性化に必要とされるシグナルとは異なることが明らかであり、こうして有意なバイスタンダーＢ細胞応答を生じることができた(Whalenら, J.Immunol. 141:2230-2239 (1988))。これは、Th細胞依存性接触シグナルのＢ細胞受容体が構成的に発現され、Ｂ細胞抗原受容体に多形性ではなく、または関連しないことを示唆した。更に、接触シグナルを送出するTh細胞分子はおそらく静止Th細胞中には機能上存在しなかった。これは、抗原特異性Th細胞活性化シグナルを受け取るのに初期に関与したＴ細胞受容体複合体の役割を除外する。

また、これらの研究は、分泌された抗体の量及び同位体を測定する際のTh細胞由来リンホカインの役割を概説した(Coffmanら, Immunol.Rev.102:5-28 (1988))。マウスでは、Ｂ細胞分化を誘導するTh細胞クローンの能力はその活性化後に分泌されたリンホカインのレパートリーに依存することが示された。IL-4及びIL-5を分泌するTh2型Th細胞クローンはIgMの産生及びIgG1、IgA、及びIgEへのスイッチングを誘発するのに有効である(Coffmanら, Immunol.Rev.102:5-28 (1988)；Mosmann &Coffman, Annu.Rev.Immunol. 7:145-173 (1989))。IL-2及びIFN-γを産生するTh1型Th細胞クローンがＢ細胞分化を刺激する能力について或る論争が初期にあったが、殆どのTh1細胞クローンは、Th2リンホカインが与えられる時に、適当な接触シグナル及び可溶性シグナルを与えて静止Ｂ細胞を活性化して抗体を分泌させることができることが明らかである(Abbasら, J.Immunol.144:2031-2037 (1990))

。
リンホカインの役割はＢ細胞分化を誘導することであり、活性化イベントを開始することではないと思われたが、可溶性シグナルからTh細胞接触を別々に送出する系が必要とされた。早期の研究は、Ｔ細胞からの膜成分がセンダイウイルス介在性融合イベントによりその他の細胞型に移入し得ることを実証した(Lindqvistら, Scand.J.Immunol. 23:119-125 (1986))。これらの細胞は、Ｔ細胞特異性遺伝子の活性化のためのシグナルを変換し得る機能性Ｔ細胞特異性膜タンパク質を含んでいたが、これらの細胞はＢ細胞を活性化する能力について試験されなかった。付加的な研究は、腫瘍細胞プラズマ膜が同種細胞毒性Ｔリンパ球を生じるのに充分であることを実証した(Stallcupら, Cell.Immunol. 89:144-150 (1984))。これは、細胞間の接触がリンパ球活性化を調節する重要なシグナルを与えることを示唆した。しかしながら、高用量のプラズマ膜はＴリンパ球応答及びＢリンパ球応答の両方に対し非特異的に抑制性であった(Stallcupら, Cell. Immunol. 89:144-150(1984))。数年後に、Sekitaらは種々のＴ細胞及びリンパ細胞系からプラズマ膜を調製し、Ｂ細胞増殖を刺激し、同時刺激するそれらの能力を実証した(Sekitaら, Eur.J.Immunol. 18:1405-1410 (1988))。しかしながら、これらの研究者らは、殆どの細胞型から調製された膜がＢ細胞を活性化し得ることを見出した(Se-kitaら, Eur.J.Immunol. 18:1405-1410 (1988))。特異性がTh細胞について観察されず、また静止Ｔ細胞に対し活性化されることについて観察されなかったので、これらの膜中の活性成分は通常の感作Th細胞の活性化により誘導されるものとは異なることが明らかであった。
Ｂ細胞に接触シグナルを送出するためのTh細胞を含まない系を開発するのに最も有望なものを示した研究は、活性化マウスTh2細胞クローン、D10.G4.1（D10）から調製された小胞のプラズマ膜に富むフラクションを使用してその他の細胞型の不在下で接触シグナルを送出した(Brian,A.A., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:564-568 (1988))。この研究において、特異性は、静止Th細胞から調製された膜がＢ細胞増殖について刺激性ではない点で実証された。しかしながら、Ｂ細胞集団は前活性化Ｂ細胞（これらは静止Ｂ細胞とは異なる活性化要件を有する）を排除するように精製されていなかった。前活性化Ｂ細胞は、Th細胞依存性接触シグナルの不在下でIgMを増殖、分泌することによりTh2リンホカイン単独（特に、IL-5）に応答する（Takatsuら, Immunol.Rev. 102:107-135 (1988))。プラズマ膜小胞からのリンホカインを含む汚染小胞体小胞を分離することは可能ではないので、実際の接触依存性刺激がTh細胞クローンからのプラズマ膜フラクションにより静止Ｂ細胞に送出し得るか否かは初期の研究(Brian,A.A., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:564-568 (1988))では明らかではなかった。
発明の要約
本発明は、高密度の膜結合CD40リガンド（以下、hdmb CD40リガンドと称する）が培養中にＢ細胞の長期増殖を誘導し得るという観察に基いている。加えて、リンホカイン及び／又は増殖中に存在する接触細胞の型及び濃度を変化させることにより、増殖しているＢ細胞を誘導して抗体産生細胞に分化（成熟）することができることがわかった。最後に、抗原の存在下の増殖及び分化はＢ細胞の分化している集団を優先的に増殖または選択して供給された抗原に特異性の抗体を産生する細胞の％を増大することが観察された。
上記の観察に基いて、本発明の一実施態様は、hdmb CD40リガンドの存在下で一つ以上のＢ細胞を培養する工程を含むＢ細胞の増殖方法を提供する。本発明の操作は哺乳類から単離されたＢ細胞に適用でき、最も好ましいものはヒトＢ細胞である。
現在特許請求された方法は、hdmb CD40リガンドを使用してＢ細胞を増殖しようとする先の試みを改良する。自然に単離された膜結合CD40リガンド、トランスフェクトされた動物細胞から産生された膜結合CD40リガンド、CD40リガンドの組換えにより産生された可溶性形態、及び抗CD40受容体抗体の存在下でＢ細胞集団を増殖する際の先の試みは、不十分な結果を生じた。増殖は適度である傾向があり、複製の１～４ラウンド後に終了し、増殖を刺激するためにリンホカインまたはサイトカイン（例えば、Thリンホカイン）の存在に関する要件がしばしばある。本発明の方法を使用して、250倍程度に大きい増殖応答が観察された。

本発明の方法は単一工程増殖操作または多工程操作において使用し得る。詳しくは、hdmb CD40リガンドは培養の初期中に培地中に含まれる。hdmb CD40リガンドの存在は、増殖の速度が低下するまで維持される。次いで細胞はhdmb CD40リガンドを含まない条件下で培養することにより静止される。細胞を静止した後、hdmb結合CD40リガンド及びサイトカインを培地に逆に添加することにより、細胞を再度刺激して増殖及び分化を続けさせることができる。

本発明の別の実施態様は、サイトカイン、細胞からの抽出物、及び／または選択されたフィーダー細胞が、増殖しているか、または上記の方法を使用して増殖されたＢ細胞に添加される時に、Ｂ細胞を刺激して抗体産生細胞に分化させるという観察に基いている。この観察に基いて、本発明はhdmb CD40リガンド及び一種以上のリンホカイン、フィーダー細胞、またはその抽出物の存在下でＢ細胞を培養する工程を含む増殖しているＢ細胞の分化方法を提供する。使用し得るサイトカイン及びフィーダー細胞の一例として、Th2リンホカイン及び濾胞樹状細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の第三の実施態様は、Ｂ細胞の分化が培地中に抗原を入れることにより部分的に調節し得るという観察に基いている。詳しくは、特定の抗原に選択的な抗体を産生するＢ細胞の％は、抗原を本明細書に記載された方法の増殖段階、静止段階、分化段階、または再増殖段階中に培地に添加することにより増大し得る。

in vitro使用に加えて、CD40リガンドのその他の形態が哺乳類宿主中でＢ細胞を増殖し、活性化する手段を与えるものとして文献に記載されていた。一般に、Ｂ細胞増殖及び活性化の抑制をもたらす病状は、CD40リガンドの既に生じた形態に代えて本発明のhdmb CD40リガンドを使用して治療し得る。哺乳類にhdmb CD40リガンドを供給することにより、Ｂ細胞集団はCD40リガンドの先に単離された形態で見られたのよりも大きいレベル及び速度で宿主中で増殖し得る。

【図面の簡単な説明】

図１．マウス及びヒトのCD40及びCD40リガンドのＤＮＡ配列

マウス及びヒトのCD40リガンドのヌクレオチド配列。CD40は四つの反復のCysに富む細胞外ドメインを含むTNF受容体ファミリー(Mallett＆Barclay, Immunol.Today 12:220-223 (1991）の員である。マウスCD40リガンドは、長さが260アミノ酸であると予測され、活性化Ｔ細胞で発現された33,000-35,000MW型2幕糖タンパク質である。それはTNF（Farrah & Smith, Nature 358:26 (1992))及びTNF受容体ファミリー(Goodwinら, Cell 73:447-456 (1993)；Smithら, Cell 73:1349-1360 (1993)；Smithら, Cell 76:959-962 (1994)：Aruffoら, EMBO Ｊ. (1992)；Hollenbaughら, EMBO Ｊ. 11:4313-4321 (1992))のその他の員のリガンドに関係している。

図２．SF9細胞感染の時間経過

Ａ．SF9細胞を種々の時間についてマウスCD40リガンドを含む組換えバキュロウイルスで感染させた。濃縮プラズマ膜フラクションを調製し、夫々の膜製剤をＢ細胞増殖アッセイで適定した(72時間にわたって$2x10^4$B細胞／ウェル）。●、18時間感染；□、42時間感染；○、66時間感染；■、90時間感染。

Ｂ．上記のＡで産生されたhdmb CD40リガンドを使用してD10 sn（1/100；9時間刺激されたD10G4.1 Th2 T細胞クローンからのリンホカインを含み上澄み、Hodgkinら, J.Immunology 145:225-2034 (1990))の存在下でＢ細胞を刺激した。記号は図1Aと同じである。

図３．hdmb CD40リガンドにより誘導されたＢ細胞増殖の特異性

Ｂ細胞（$2 \times 10^4$／ウェル）を一定のhdmb CD40リガンド(1/200）で刺激した。●、含まれたCD40-IgG(最高濃度で35μg/ml);□、CD40-IgGなし。

図４．Ｂ細胞増殖に関する密度塗布効果

Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド(1/80)及びD10 sn(1/100）とともに96ウェルプレートに入れた($1x10^4$/ウェル）。細胞をカウントし、培地を48時間毎に交換した。５日目及び８日目に、細胞を再度懸濁し、1/8に分割した。▲、分割されなかった細胞；●、５日目に1/8分割；■、８日目に1/8分割；○、８倍に1/8分割；□、64倍に２回目の1/8分割。

図５．平底ウェル対“Ｖ”底ウェル中のＢ細胞膨張の比較

Ｂ細胞を平底または“Ｖ”底の96ウェルプレートに入れた(1x10$^3$/ウェル)。細胞をhdmb CD40リガンド及びD10 sn(++)またはhdmb CD40リガンド膜のみ(+-)と一緒にインキュベートした。細胞をカウントし、48時間毎に培地を除去し、交換した。■、平底プレート中のhdmb CD40リガンド及びD10 sn；○、“Ｖ”底プレート中のhdmb CD40リガンド及びD10 sn；□、平底プレート中のhdmb CD40リガンド；●、“Ｖ”底プレート中のCD40リガンド。

図６．hdmb CD40リガンド及びD10 snで刺激されたＢ細胞の増殖及び抗体分泌

Ａ．Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド(1/300）及びD10 sn(1/100）とともに96ウェル“Ｖ”底プレートに入れた(1x10$^3$細胞／ウェル）。48時間毎に細胞を取り出し、カウントした。□、生存細胞の合計数；●、生存していた細胞のフラクション。

Ｂ．反復試験ウェルからの培地を定量ELISAにより抗体濃度を測定するために取り出した。●、IgM;■、IgG1；▲、IgE。累積抗体濃度がng/mlで示される。

図７．培地交換してhdmb CD40リガンド及びD10 snで刺激されたＢ細胞の増殖及び抗体分泌

Ａ．Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド(1/300）及びD10 sn(1/100）とともに96ウェル“Ｖ”底プレートに入れた(1x10$^3$細胞／ウェル）。48時間毎に細胞を取り出し、カウントした。古い培地を除去し、新しい培地と交換した。□、生存細胞の合計数；●、生存していた細胞のフラクション。

Ｂ．反復試験ウェルからの培地を定量ELISAにより抗体濃度を測定するために取り出した。●、IgM;■、IgG1；▲、IgE。累積抗体濃度がng/mlで示される。

図８．培地交換してhdmb CD40リガンド及びD10 snで再度刺激されたＢ細胞の増殖及び抗体分泌

Ａ．Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド(1/300）及びD10 sn(1/100）とともに96ウェル“Ｖ”底プレートに入れた(1x10$^3$細胞／ウェル）。48時間毎に細胞を取り出し、カウントした。古い培地を除去し、新しい培地と交換した。+-、培地はhdmb CD40リガンドを含んでいた;--培地は添加物を含んでいなかった;++、培地はhdmb CD40リガンド及びD10 snを含んでいた。□、生存細胞の合計数；●、生存していた細胞のフラクション。

Ｂ．反復試験ウェルからの培地を定量ELISAにより抗体濃度を測定するために取り出した。●、IgM;■、IgG1；▲、IgE。累積抗体濃度がng/mlで示される。

図９．hdmb CD40リガンドに応答するＢ細胞の頻度

Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド(1/300）またはhdmb CD40リガンド(1/300）及びD10 sn(1/100）とともに96ウェル“Ｖ”底プレートに１、３、10、及び30細胞／ウェルで塗布した。６日後に、細胞を再度懸濁し、平底プレートに移し、生存細胞（≧細胞／ウェル）の存在についてスコアをつけた。

図10．ヒトＢ細胞の増殖

ヒトＢ細胞をＶ底ウェル中で示されたように組換えヒトIL-4、IL-6、またはIL-10を添加して、または添加しないで図７に記載されたようにしてインキュベートした。

図11．昆虫細胞膜中のヒトCD40リガンドは有効なヒトＢ細胞増殖を刺激する。

精製ヒト末梢血Ｂ細胞(7,000／ウェル）をヒトCD40リガンドを含む組換えバキュロウイルス（以下、hdmbヒトCD40リガンドと称する）で感染されたSF9細胞から精製されたプラズマ膜の形態の種々の濃度のヒトhdmb CD40リガンドとともにBCM（100μl)中でインキュベートした。（四角形）、膜の不在下のＢ細胞;(三角形）、hdmbヒトCD40リガンド;(円形）、hdmbヒトCD40リガンド及び組換えヒトリンホカイン(IL-1α、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、及びIL-11)の混合物。$^3$H-チミジン（１μCi/ウェル）を96時間の培養期間の最後の６時間中に添加した。夫々の点は二重試験ウェルの平均である。

図12．ヒトＢ細胞増殖及び分化のクローン頻度

精製ヒト末梢血Ｂ細胞をhdmbヒトCD40リガンド（１μg/ml）及び組換えIL-1α、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、及びIL-11の混合物（合計150μl)の存在下で96ウェル“Ｖ”底プレートに１、３、10、及び30細胞／ウェルで塗布した。４日目、８日目、そして11日目に、古い培地を除去し、hdmbヒトCD40リガンド及びリンホカインを含む新しい培地と交換した(A）生存細胞を含むウェル（≧４細胞／ウェル）を14日目に細胞を懸濁し、平底96ウェルプ

レートに移した後にスコアをつけた。破線は、培養物の37%が成長に陰性であった場合のＢ細胞の数／ウェルを示す。ポアソン分布によれば、この細胞数では、夫々のウェルは一つの成長細胞を含むであろう。(B)11日目にプレートから回収した培地を別々のELISAアッセイによりヒトIgM及びヒトIgGの存在について分析した。IgG及びIgMについて陽性のウェルの数をスコアリングについて合計した。破線は、培養物の37%が抗体産生について陰性であった場合のＢ細胞の数／ウェルを示す。

図13．異なるリンホカイン組み合わせで刺激されたヒトＢ細胞によるIgM及びIgG分泌

ヒト末梢血Ｂ細胞(500／ウェル）を14日間にわたって150μｌのBCM中の示されたリンホカインの存在下でhdmbヒトCD40リガンド（１μg/ml）とともにＶ底96ウェルプレート中でインキュベートした。培養上澄みを回収し、IgM及びIgGのレベルをELISAにより測定した。夫々の点は４回の反復試験ウェルの平均±S.E.である。リンホカインの濃度を実施例３、物質及び方法に記載されたようにして供給した。PHA/PMA sn、PHA及びPMA-活性化末梢血Ｔ細胞からの培養上澄み；αCD3 sn、抗CD3活性化末梢血Ｔ細胞からの培養上澄み。ヒトＴ細胞上澄みの最終濃度が示される。

図14．サイトカイン依存性ヒトＢ細胞分化

ヒト末梢血Ｂ細胞(500／ウェル）を150μｌのBCM中の抗CD3活性化末梢血Ｔ細胞からの上澄みの種々の希釈液の存在下でhdmbヒトCD40リガンド（１μg/ml）とともにＶ底96ウェルプレート中でインキュベートした。23日目に、培地を取り出し、IgMのレベル（点付きのバー）及びIgGのレベル（クロスハッチングしたバー）をELISAにより測定した。夫々の点は４回の反復試験ウェルの平均±S.E.である。

図15．未感作脾臓中の抗原特異性マウスＢ細胞のクローン頻度

稠密の脾臓マウスＢ細胞を150μｌのBCM中のマウスhdmbヒトCD40リガンド（0.1μg/ml）及びD10上澄み(1/100）の存在下でＶ底96ウェルプレート中で1000、3000、10,000、及び30,000細胞／ウェルで塗布した。５日目、８日目、そして12日目に、古い培地を取り出し、sf9$^{CD40L}$及びリンホカインを含む新しい培地と交換した。14日目に、ウェルを実施例３、物質及び方法に記載されたようにしてELISPOTによりKLH特異性抗体分泌細胞の存在について分析した。最初のプレートの夫々のウェルを二つの同一のELISPOTプレートの間で分けた。二重試験プレートの一つをIgMについて展開し、他のプレートをIgGについて展開した。ウェルを解剖顕微鏡のもとに特定のIgM分泌細胞（≧３スポット／ウェル）または特定のIgG分泌細胞（≧４スポット／ウェル）について陽性とスコアをつけた。破線は、培養物の37%が抗原特異性抗体産生について陰性であった場合のＢ細胞の数／ウェルを示す。

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明は、高密度の膜結合CD40リガンド（以下、hdmb CD40リガンドと称する）が培養中にＢ細胞の高レベルの増殖を誘導し得るという観察に基いている。加えて、サイトカイン及び／または増殖中に存在する接触細胞の型及び濃度を変化させることにより、増殖しているＢ細胞を誘導して抗体産生細胞に分化させることができることがわかった。最後に、抗原の存在下の増殖及び分化は分化しているＢ細胞を優先的に増殖または選択して供給された抗原に特異性の抗体を産生することが観察された。

上記の観察に基いて、本発明の一実施態様はhdmb CD40リガンドの存在下で一つ以上のＢ細胞を培養する工程を含むことを特徴とするＢ細胞の増殖方法を提供する。

本明細書に使用される増殖は、Ｂ細胞の数を一つ以上の細胞の開始点から多数の細胞まで増大（増加）するプロセスと定義される。以下の実施例において、250倍（６日間にわたる分裂の８ラウンド）の増殖の証拠が提示される。本発明の方法を使用して得られた増殖の程度及び量は、使用される初期のＢ細胞の型及び性質並びに使用される培養条件に応じて変化するであろう。しかしながら、培養中に存在する生存Ｂ細胞の数が分裂または分裂している集団の増大された生存の結果として増加する限り、Ｂ細胞は増殖していると言われる（図２、６、７、８及び10を参照のこと）。

本明細書に使用されるＢ細胞またはＢ細胞集団は、Ｂ細胞を含む一次外植体に由来する一つ以上の細胞またはそれに由来する培養物を表す（Ｂ細胞及びＢ細胞集団の定義について、Parker, Annu.Rev.Immunol. 11:331-360 (1993）を参照のこと）。本発明における使用

に好ましいＢ細胞は“小さい稠密なＢ細胞”と分類される。以下の実施例に記載されるように、小さい稠密なＢ細胞は、当業界で知られている技術（例えば、Hodgkinら，J.Immunology 145:2025-2034（1990）、Clarkら，J.Immunology 148:3327-3335（1992）、Thomasら，J.Immunology 150:821-834（1993)、Freudenthalら，PNAS USA 87:7698（1990）を参照のこと）を使用して哺乳類の脾臓、末梢血、骨髄またはリンパ系臓器から単離された細胞から精製し得る。

Ｂ細胞の初期の出発集団は単離された小さい稠密なＢ細胞（約1,000の細胞）の一次外植体からなり、単に単離されたＢ細胞の一次外植体であり、本明細書に記載された方法により生産された既存のＢ細胞培養物から得られ、または単離された末梢血細胞、骨髄細胞、及びリンパ系臓器に由来の細胞であり得る。当業者は既知のパラメーター（図４及び11を参照のこと）を使用して出発集団の源及びサイズに応じて培養の条件を変化させる方法を知るであろう。

本発明の操作は哺乳類から単離されたＢ細胞に適用し得る。下記の実施例はマウス及びヒトのＢ細胞の両方を増殖するhdmb CD40リガンドの能力の証拠を与える（図２、７及び９～12）。

本明細書に使用される“培養”は、細胞の集団（または単一細胞）がin vitroの細胞の生育または生存を支持することが示された条件下でインキュベートされる場合のin vitroで使用される操作の組を表す。当業界は培養系中で規定される必要がある多数のフォーマット、培地、温度範囲、ガス濃度等を認めている。これらのパラメーターは選択されたフォーマット及び本明細書に開示された方法を実施する個人の特定の要件に基いて変化するであろう。しかしながら、培養パラメーターの決定はその性質上ルーチンであることが認められている。

中空繊維技術及び固体担体または培養フラスコにおける固定化を含むが、これらに限定されない多種のフォーマットのいずれか一つが現在開示された方法における使用に適し得る。何となれば、このようなフォーマットはその他の哺乳類細胞型の培養に成功裏に使用されていたからである。以下の実施例において、Ｂ細胞を無菌プレートリド(platelid)とともにＶ底または平底96ウェルミクロタイタプレート中でインキュベートした（図５、10、及び11）。培養中に、プレートを5.5%の$CO_2$中で37℃でインキュベートした。これらの操作を使用して小さい稠密なＢ細胞塊（約1,000細胞の）並びに１、３、及び10の細胞／ウェルを培養して選択されたＢ細胞クローンを生育した。これらの操作を、使用し得る多種のフォーマット及び条件の例としてのみ選択した。

多種のフォーマットに加えて、現在知られている哺乳類細胞培養培地のいずれもが現在特許請求された方法において使用し得る。当業者は既知の操作を使用して特許請求された本発明の方法における使用について特別な培地及びフォーマット／培地組み合わせの適性を決めることができる。下記の実施例において、10%のウシ胎児血清（特性決定されたハイクローン(HyClone)）、10mMのヘペス(hepes)pH7.3、Ｌ－グルタミン、ペニシリン／ストレプトマイシン、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、RPMI 1640培地中$5x10^{-5}$Mのメルカプトエタノール及びギブコ(Gi-bco)からの100x補充物質からなるＢ細胞培地(BCM）を使用した。哺乳類細胞培養に使用されるその他の既知のフォーマット及び培養条件の詳細な総説が当業界で知られている。

現在特許請求された方法は主としてhdmb CD40リガンドの使用に基いている。本明細書に使用される“CD40リガンド”は、CD40リガンドの既知のアミノ酸配列の一つに実質的な類似性を有し、かつCD40リガンド活性を有するあらゆるタンパク質を表す（CD40リガンドをコードするアミノ酸配列及び核酸配列の総説について、Armitageら，Nature 357:80-82（1992)；Hollenbaughら，EMBO Ｊ. 11:4313-4321（1992）を参照のこと）。本明細書に使用される２種のタンパク質は、受容体結合に関与する活性ドメインまたは領域が80%以上のアミノ酸配列相同性を含む場合にアミノ酸配列中に実質的な類似性を有すると言われる。本発明の好ましいCD40リガンドはヒトCD40リガンド及びマウスCD40リガンドである。

本発明のCD40リガンドはCD40リガンドを自然に発現する細胞から単離でき、またはCD40リガンドを発現するように変性された細胞から精製し得る。CD40リガンドの産生への組換え

操作の適用の詳細な総説について、Armitage, Nature 357:80-82 (1992)及びHollenbaughら, EMBO J. 11:4313-4321 (1992)、並びに下記の実施例を参照のこと。
本発明の方法において使用されるCD40リガンドはCD40リガンドの膜結合状態である。本明細書に使用される“膜結合CD40リガンド”は脂質またはプラズマ膜に付着されているCD40リガンドを表す。膜へのCD40リガンドの付着は幾つかの様式で行い得る。例えば、CD40リガンドはCD40リガンドの天然のトランスメンブランドメインを使用して膜に付着し得る。何となれば、CD40リガンドは天然産トランスメンブランタンパク質であるからである。天然産CD40リガンドを、CD40リガンドを自然に発現する細胞またはCD40リガンドを発現するように変性された細胞から単離することにより、得られるCD40リガンドは膜結合状態である。濃縮または精製CD40リガンドは細胞から膜フラクションとして得られ、または可溶化分子として単離され、脂質で再生されて人工膜を形成し得る。
また、CD40リガンドまたはCD40リガンドの可溶性誘導体は、適当な膜タンパク質リンカー及びタンパク質架橋剤またはGPI結合の使用によりプラズマ膜に付着し得る。一般に、タンパク質を膜につなぎとめる概念及び操作は当業界で公知である。例えば、既知のタンパク質架橋剤は、露出された活性化可能な残基を有する細胞膜内タンパク質を含む脂質膜にCD40リガンドを架橋するのに使用し得る。当業者は膜結合CD40リガンドを得るために種々の既知の膜をつなぎとめ技術のいずれか一つを容易に採用し得る。
本明細書に使用される“高密度”は、CD40リガンドを自然に発現する細胞で見られる密度より少なくとも10倍大きい密度、更に好ましくは100倍大きい密度でCD40リガンドを含む膜を表す。組換え宿主中でCD40リガンドを発現しようとする先の試みは、CD40リガンドを自然に発現する細胞で見られる密度と同様の密度でCD40リガンドの産生をもたらすことが観察されていた。
種々の操作がCD40リガンドの“密度”を測定するのに使用し得る。これらとして、蛍光顕微鏡検査、蛍光活性化細胞分析、受容体／リガンド結合アッセイ、及び免疫反応性が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Castleら, J. Immunol.151:1777-1778 (1993)を参照のこと）。
先に説明したように、種々の操作が高密度の膜結合CD40リガンドを得るのに使用し得る。本発明の好ましい方法は修飾バキュロウイルスベクターで感染された培養昆虫細胞中でCD40リガンドを発現することである。CD40リガンドは昆虫細胞培養物中で高密度の膜結合形態として容易に発現し得ることがわかった。当業者は既知のバキュロウイルス発現系を容易に採用してCD40リガンドを高密度の膜結合形態で産生し得る。下記の実施例は、現在特許請求された方法に使用するためのhdmb CD40リガンドを産生するための培養SF9細胞の使用を実証する（図２を参照のこと）。
自然に単離された膜結合CD40リガンド、トランスフェクトされた動物細胞から産生された膜結合CD40リガンド、またはCD40リガンドの組換え発現された可溶性誘導体の存在下でＢ細胞を増殖しようとする先の試みは不十分な結果を生じた。増殖は適度である傾向があり、複製の１～４ラウンド後に終了する。本発明は、増殖応答が250倍程度に大きいことが実証された点でCD40リガンドの従来の形態の使用よりも改良を与える。リンホカインの存在は、hdmb CD40リガンドが使用される時に、抗体産生細胞への増殖しているＢ細胞の分化をもたらす。
本発明の方法は単一工程増殖操作または多工程操作で使用し得る。多工程操作において、hdmb CD40リガンドは培養の初期中に培地中に含まれる。hdmb CD40リガンドの存在は、増殖の速度が低下するまで維持される。次いで細胞は、hdmb CD40リガンドが存在しない条件下で培養することにより静止される。細胞を静止した後、hdmb CD40リガンド及びサイトカインを培養物に逆に添加することにより細胞を再度刺激して増殖を続けることができる（図８を参照のこと）。静止段階、続いてhdmb CD40リガンドを使用する増殖段階の基礎となるメカニズムは不明である。しかしながら、多くの活性化Ｂ細胞集団は、初期増殖の速度が低下した後にこのような静止期を必要とすることがわかった。当業者はＢ細胞増殖を容易に監視し、そしてＢ細胞の増殖の速度が低下する時にhdmb CD40リガンドを培地から除去することができる。

種々の操作がＢ細胞の増殖を監視するのに使用し得る。これらとして、標識化合物、例えば、トリチウム標識チミジンのとり込みの測定、または直接の細胞カウンティング技術が挙げられるが、これらに限定されない。これらの操作の両方が下記の実施例に更に詳しく記載される。

多工程増殖操作に特別な時点は、上記の操作を使用して当業者により容易に決定し得る。下記の実施例にいて、使用された操作は６日間（増殖段階）にわたってhdmb CD40リガンドの存在下でＢ細胞（単離された小さい稠密集団）を培養することであった。６日の培養後に、hdmb CD40リガンドを培地から除去し、細胞をもう６日間（静止段階）にわたって栄養補給する。hdmb CD40リガンドが存在しない静止期の６日目後に、細胞をhdmb CD40リガンド及び適当なサイトカインの存在下で再度培養した（再増殖段階）。

本発明の別の実施態様は、サイトカイン、選択された細胞からの抽出物、表面受容体およびIg分子を架橋する薬剤、及び／または選択されたフィーダー細胞集団が、増殖しているか、または上記の方法を使用して増殖されたＢ細胞に添加された時に、Ｂ細胞を刺激して抗体産生細胞に分化させるという観察に基いている。この観察に基いて、本発明はＢ細胞をhdmb CD40リガンド及びサイトカイン、フィーダー細胞またはその抽出物の存在下で培養する工程を含むことを特徴とする増殖しているＢ細胞の分化方法を提供する。

本明細書に使用されるサイトカインは、細胞分化活性及び／または成長促進活性を有するものと実証された分子のクラスを表す。サイトカインは同定され、高度に精製された形態、例えば、精製されたインターロイキン－１、IL-2、IL-4、INF-α、等として培地に添加でき、またはサイトカインを産生する刺激細胞から得られた上澄みまたは抽出物として供給し得る。本発明において、Th2リンホカインを使用してマウス脾臓Ｂ細胞を分化し、一方、抗CD3活性化Ｔ細胞により分泌されたリンホカインまたは組換えIL-2、IL-4、IL-6、及びIL-10の組み合わせがhdmb CD40L刺激ヒト末梢血Ｂ細胞の分化を支持した。詳しくは、マウスＢ細胞について、Th2クローンD10.G4.1を９時間にわたってコンカナバリンＡで刺激し、培養上澄みをマンノース／アガロース吸収させ、30分間にわたって100,000gで超遠心分離し、滅菌濾過し、使用前に-80℃で貯蔵した(Th2 SNまたはTh2上澄み)(Hodgkinら, J.Immunology 145:2025-2034 (1990) を参照のこと）。次いで単離されたTh2上澄みを使用して増殖しているマウスＢ細胞の分化を刺激した。

ヒト末梢血Ｂ細胞の分化のために、リンホカインを含む上澄みを以下のようにして調製した。フィコール－ハイペーク(Ficoll-Hypaque)による遠心分離後に得られた末梢血単核細胞を、抗CD14（５μg/ml）、抗CD14及び抗CD19（夫々2.5μg/ml）、及び抗CD8(５μg/ml）で一夜被覆されたプレートで連続的にパンニングした。パニングは４℃で１時間にわたってハンクス平衡塩溶液、５％のFBS、10mMのヘペス、pH7.3中であった。非付着性細胞を洗浄し、温かいBCM［10％のFBS、10mMのヘペス（pH7.3）、２mMのＬ－グルタミン（ギブコ（GIBCO）、グランドアイランド、NY）、0.1mMの非必須アミノ酸（ギブコ）、１mMのピルビン酸ナトリウム、$5X10^{-5}$Mの２－メルカプトエタノール、及び夫々100U/mlのペニシリン及びストレプトマイシン（ギブコ）で補給されたRPMI 1640］中で$4X10^{6}$細胞/mlで再度懸濁させた。抗CD3刺激のために、細胞を48時間にわたって37℃で抗CD34μg/mlで被覆された組織培養皿に入れた。PHA/PMAによる刺激のために、細胞をPHA2.5μg/ml及びPMA 10ng/mlとともに２時間にわたって37℃インキュベートし、洗浄し、新しい温かいBCM中で46時間にわたって37℃でインキュベートした。低速遠心分離による細胞の除去後に、上澄みを10,000Xgで遠心分離し、0.2μMの膜で濾過し、-80℃でアリコート中に貯蔵した。

更に、特定の抗原の存在下または不在下で、樹状細胞、濾胞樹状細胞、及びその他の抗原提示細胞を含む、その他の細胞型により産生されたサイトカインが刺激として培養物中に含まれ得る。Th2及び実施例に使用された抗CD3刺激上澄みの他に、当業者は本分化操作においてあらゆる既知のサイトカインを容易に使用し得る。

特定のサイトカインまたはサイトカインを含む上澄みの他に、フィーダー層、Ｂ細胞分化に関与するその他の細胞から得られた細胞抽出物、及び／またはＢ細胞表面分子を架橋する薬剤が、増殖しているＢ細胞に添加されて分化を刺激し得る。例えば、Ｂ細胞は突然変異中に濾胞樹状細胞と相互作用することが知られている。濾胞樹状細胞に由来する膜抽出

物、培養上澄みまたは精製分子（Th2上澄みについて記載された方法と同じ方法で得られる）、または濾胞樹状細胞のフィーダー層が増殖しているＢ細胞の分化を刺激し、または上記のその他のサイトカインの使用により刺激される分化を増進するのに使用し得る。更に、表面受容体を架橋する抗体の如き薬剤が増殖されたＢ細胞及び増殖しているＢ細胞の分化にシグナルを送る（或る場合には、これらの薬剤はＢ細胞内のＤＮＡをコードする抗体の可変領域のCDR中で体細胞の超突然変異（hypermutation）を誘発するであろう）。Ｂ細胞にある膜結合Ig分子を架橋する抗IgD抗体または抗IgM抗体は分泌された抗体についてクラススイッチングを刺激することが示された（例えば、高レベルのIgA抗体の産生をもたらす）。

分化を刺激するのに使用されるサイトカイン、細胞抽出物／上澄み、またはフィーダー細胞は、培養中の種々の時点のいずれか一つでＢ細胞に添加し得る。例えば、サイトカインは培養の開始時に添加し得る。このような操作を使用して、抗体産生は通常８日目または10日目付近に開始する（図６、７、10及び13）。また、多工程プロセスが使用される場合、サイトカインは静止期または再増殖期中に添加し得る。多工程アプローチの利点は、初期の小さいＢ細胞集団が分化の前に増殖かつ／または選択されることを可能にすることである。

種々の操作がＢ細胞の分化を監視するのに使用し得る。このような操作として、増殖している細胞の形態学的特徴の試験、抗体タンパク質の存在を測定するアッセイ、細胞表面マーカーに関するアッセイ、及び抗体をコードする核酸配列の存在について分析する方法（図６、７、10、13及び14）が挙げられるが、これらに限定されない。当業者はこれらの操作のいずれかを容易に採用して、本明細書に開示された方法を使用して得られる増殖しているＢ細胞の分化を監視することができる。

分化中に、クローン細胞系を得るために増殖しているＢ細胞の選択された個体または亜集団をクローンアウト（clone out）することが好ましい場合がある。このような操作は当業者で知られている細胞塗布技術を使用して最も容易に達成される（図９、12、及び15を参照のこと）。当業者はこのようなクローニング操作を本明細書に開示された方法により生産された増殖し、分化しているＢ細胞に容易に適用し得る。

本発明の第三の実施態様は、増殖しているＢ細胞の分化が抗原を培地に入れることにより部分的に調節し得るという観察に基いている。詳しくは、特定の抗原に選択的な抗体を産生するＢ細胞の％は、抗原を本明細書に記載された方法の増殖期、分化期、または再増殖期中に培地に添加することにより増大し得る。

本明細書に使用される抗原は、哺乳類宿主に投与された時に抗体応答を刺激することが示され、または示し得る化合物である。抗原は種々の形態であり、タンパク質、炭水化物、合成化合物、及びビタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。当業者は既知の操作を容易に適用して特別な化合物の抗原性を測定し得る。

上記の方法の一つの適用において、サイトカイン（またはその他の分化剤）が存在する場合に、抗原が培地に添加される。例えば、サイトカインが初期増殖中に添加される操作において、抗原はインキュベーションのその段階で供給される。サイトカインが初期増殖段階後に添加される操作において、抗原はその段階で添加される。更に、当業者は既知の操作を容易に使用して抗原の抗原性を増大し得るだけでなく、抗原が増殖し、分化しているＢ細胞と接触することを確実にし得る。このような操作として、抗原をタンパク質または炭水化物キャリヤーにカップリングして溶解性及び抗原性の如き性質を増大すること、または抗原を膜もしくはプラスチック培養ウェルの表面にカップリングして表面抗体を発現する分化しているＢ細胞をカップリングされた抗原に選択的に付着（パンニング）することが挙げられる。

抗原使用の一つの例において、抗原がhdmb CD40リガンドを含む膜にカップリングされる。hdmb CD40リガンドへの抗原のカップリングはhdmb CD40リガンドをその特別な抗原を認識するＢ細胞に優先的にターゲッティングするように作用する。別の例において、抗原または抗原／hdmb CD40リガンドがデキストランコポリマーとして用意される。デキストランとの共重合は抗原のエピトープ密度を増大し、こうして利用できるＢ細胞接触の数及び

程度を増大することが知られている。
抗原刺激は分化して抗原に誘導された抗体を産生するＢ細胞の％を増大することがわかったが、このような優先は増殖しているＢ細胞の全集団にわたって完全ではない。それ故、当業者は、供給された抗原に対し誘導された抗体を産生する分化Ｂ細胞の特定のクローン系を単離するために既知のクローニング操作またはパンニング操作を使用する必要があるであろう。
増殖及び分化に関する上記の操作は種々の目的及び使用のために使用し得る。当業者は多数のＢ細胞、特にヒトＢ細胞を増殖して得ることができる価値を容易に認識することができる。詳しくは、このような操作は使用可能／作業可能な量のＢ細胞由来物質を得るためのＢ細胞系の不死化の必要を排除する。Ｂ細胞由来物質は抗体をベースとする医薬化合物の開発に有益と認識される。本件出願人の発明の前に、ヒトＢ細胞に関する研究は出発物質の入手可能性のために制限された。本発明はこのような試みのために増加されたＢ細胞の供給を今提供する。
分化された、または分化されなかった増殖Ｂ細胞は、抗体分子の全部または一部をコードするｍＲＮＡの源として利用できる。Ｂ細胞により産生される抗体をコードするｍＲＮＡの制限された量、並びに哺乳類宿主中に見られるＢ細胞のポリクローナル性質及び制限された量のクローン数のために、組換え抗体産生技術に使用するための単一Ｂ細胞から所望の抗体をコードする充分な量のｍＲＮＡを得ることは困難である。Ｂ細胞を増殖し、分化する方法を提供することにより、本発明は、当業者が抗体をコードするｍＲＮＡを得るのに使用し得る出発物質の源を提供する。
更に、当業者は更なる使用のために特定の抗原と反応するＢ細胞を同定することができる。抗体エンジニアリングにかかわる前に、Ｂ細胞またはＢ細胞クローンにより産生された抗体の特異性（どの抗原が認識されるのか）を測定することが好ましい。PCR操作は単一細胞のように少ない細胞から抗体をコードするヌクレオチド配列を単離することを可能にするが、少なくとも100の細胞の細胞塊が分泌抗体の性質を分離し、特性決定するのに必要とされる。本発明はこのような物質を得る方法を提供する。
in vitro使用の他に、CD40リガンドは哺乳類宿主中でＢ細胞を増殖し、活性化する手段を与えるものと文献に記載されていた。一般に、Ｂ細胞の増殖及び活性化の抑制をもたらす症状は、本発明のhdmb CD40リガンドを使用して治療し得る。哺乳類にhdmb CD40リガンドを供給することにより、Ｂ細胞集団はCD40リガンドの従来産生された形態で見られたレベルよりも極めて大きいレベルで宿主中で増殖し得る。更に、hdmb CD40リガンドはin vitroでＢ細胞を増殖かつ／または分化するのに使用でき、次いでこれらのＢ細胞はそれらが除去された宿主または別の適合性宿主に逆に供給し得る。このような操作は宿主外部のＢ細胞の増殖を可能にし、in vivo治療の負の効果のリスクを低減する。
本発明の薬剤の治療効果は、hdmb CD40リガンド（以下、薬剤と称する）をあらゆる好適な手段（即ち、吸入、静脈内、筋肉内、皮下、腸内、または非経口）により患者に与えることにより得られる。血液中に有効な濃度を得るように本発明の薬剤を投与することが好ましい。血液中に有効な濃度を得るために、好ましい方法は薬剤を注射により投与することである。投与は連続注入、または単一もしくは多重の注射によるものであってもよい。
患者にhdmb CD40リガンドを与える際に、投与される薬剤の投薬量は患者の年齢、体重、身長、性別、全般の医療状態、以前の医療履歴、等の如き因子に応じて変化するであろう。一般に、レシピエントに約１pg/kgから10mg/kg（患者の体重）までの範囲である投薬量の薬剤を与えることが望ましいが、それより少ないか、または多い投薬量が投与されてもよい。
治療有効投薬量は、免疫刺激活性を有するその他の薬剤（例えば、IL-4、IL-14、特定の抗原、または抗免疫グロブリン抗体）と組み合わせて本発明の組成物を使用することにより低減し得る。本明細書に使用される２種以上の化合物は、（１）夫々の化合物の生理学的効果、または（２）夫々の化合物の血清濃度が同時に測定し得る時に互いに“組み合わせて”投与されると言われる。
本発明の薬剤は宿主中でＢ細胞の数を増加するのに充分な量でレシピエント患者に与えら

れることが意図されている。本発明の一種以上の薬剤の投与は、“予防”目的または“治療”目的のためであってもよい。予防上与えられる場合、一種以上の薬剤は宿主中に存在するＢ細胞の数または血清抗体レベルの減少の前に与えられる。一種以上の薬剤の予防投与はＢ細胞の数のその後の低下を防止または減少するのに利用できる。治療投与される場合、一種以上の薬剤は血液試料中に存在するＢ細胞または抗体の数の減少の開始時（または直後）に与えられる。一種以上の化合物の治療投与はＢ細胞の数または抗体レベルの実際の低下を減少するのに利用できる。

本発明の薬剤は医薬上許される形態で治療有効濃度で哺乳類に投与される。組成物は、その投与がレシピエント患者により寛容し得る場合に“生理的に許される”と言われる。このような薬剤は、投与された量が生理学上有意である場合に“治療有効量”で投与されると言われる。薬剤は、その存在がレシピエント患者の生理において検出できる変化をもたらす場合に生理学上有意である。

本発明の薬剤は医薬上有益な組成物を調製するのに知られている方法に従って製剤化でき、それによりこれらの物質、またはそれらの機能性誘導体が医薬上許される担体ビヒクルと混合して合わされる。その他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む、好適なビヒクル及びそれらの製剤化、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences（第16編,Osol,A.編集,Mack,EastonPA(1980)）に記載されている。有効な投与に適した医薬上許される組成物を生成するために、このような組成物は適当な量の担体ビヒクルと一緒に有効量の本発明の一種以上の薬剤を含むであろう。

付加的な製薬方法が作用の期間を調節するのに使用し得る。徐放性製剤が本発明の一種以上の薬剤を錯生成または吸収するためのポリマーの使用により得られてもよい。調節された送出は、適当な巨大分子（例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレン酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはプロタミン、スルフェート）及び巨大分子の濃度並びに放出を調節するための混入の方法を選択することにより実施し得る。徐放性製剤により作用の期間を調節する別の可能な方法は、本発明の薬剤をポリマー物質、例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ（乳酸）またはエチレン酢酸ビニルコポリマーの粒子に混入することである。また、これらの薬剤をポリマー粒子に混入するのに代えて、これらの物質を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルの夫々中に、またはコロイドの薬剤送出系、例えば、リポソーム、アルブミン微小球、ミクロエマルション、ナノ粒子、及びナノカプセル中に、またはマクロエマルション中に閉じ込めることが可能である。このような技術がRemington's Pharmaceutical Sciences（第16編,Osol,A.編集,Mack,EastonPA(1980)）に開示されている。

今、本発明を一般に説明したが、本発明は下記の実施例を参考として更に容易に理解されるであろう。これらの実施例は説明のために示され、特にことわらない限り、本発明の限定であることを目的とするものではない。

実施例

実施例１　Ｂ細胞の増殖及び分化に関与する因子の同定

Ａ．細胞接触シグナル及びリンホカインシグナルの分離

リンホカインの役割はＢ細胞分化を誘導することであり、活性化イベントを開始することにあるのではないと思われるが、細胞接触及びリンホカインの両方が抗体応答を生じるのに必須であることが明らかである。細胞接触シグナル及びリンホカインシグナルが静止Ｂ細胞に異なる効果を与えたか否かが明らかに評価される必要があった。更に、Ｂ細胞活性化、分化、及び同位体スイッチングを支持したリンホカインの同定は明らかではなかった。Th2細胞クローンD10は静止Ｂ細胞に必要な接触依存性シグナル及びリンホカイン依存性シグナルの全てを与えることができたので、この抗原特異性クローンを初期研究及びプラズマ膜の調製に選択した。D10細胞の抗原非依存性活性化は、細胞をマイトジェンコンカナバリンＡ（Con A）またはプラスチック皿に吸着された抗CD3抗体とともにインキュベートすることにより達成された。回収後に、細胞を使用してBrian,A.A.(Proc.Natl.Acad.Sc

i.USA 85:564-568 (1988))により記載されたようにしてプラズマ膜のために濃縮された膜小胞を調製し、培養上澄みを超遠心分離して膜性分を除去し、残っているCon Aを吸収することによりTh2リンホカインの源として使用した。その他の研究はプラズマ膜－濃縮フラクションの調製のために同様の方法を使用した（Noelleら,J.Immunol.146:1118-1124 (1991);Sekitaら,Eur.J.Immunol.18:1405-1410 (1988)）。

１．細胞接触の役割

活性化D10 Th細胞から調製した膜は小さい静止Ｂ細胞の強い増殖を誘導した。刺激活性をCon AによるTh細胞の３時間の活性化により検出でき、６時間でピークに達し、その後低レベルに低下した。これらの速度論は同細胞によるリンホカイン産生の速度論に近似して従い、細胞表面及び分泌されたＢ細胞刺激成分の両方に共通の調節経路を示唆した（Hodgkinら,J.Immunol.145:2025-2034 (1990)）。共通のシグナリング経路に関する更なる証拠は、イムノフィリン結合免疫抑制薬であるシクロスポリンＡ（Bramら,Molec.Cell.Biol.13:4760-4769 (1993)）がリンホカイン分泌及びＢ細胞刺激活性の誘導（Hodgkin,P.D.及びKehry,M.R.,Advances in Molec.Cell.Immunol.1A:127-160 Greenwich, CT:JAI Press,Inc. (1993)）の両方を抑制することであった。プラズマ膜の非特異的抑制特性に関するStallcupらの初期の結果（Stallcupら,Cell.Immunol.89:144-150 (1984)）と同様に、活性化Th細胞からの膜の高投与量はＢ細胞増殖に対する非特異的抑制効果を生じた（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2035 (1990)）。

Th膜によるＢ細胞活性化の顕著な特徴は、それが抗原非依存性であり、MHC非制限であることであった。これらの観察と一致して、Th膜刺激はポリクローナルであり、小さい静止Ｂ細胞の70%までを誘導して刺激の48時間以内に細胞サイクルのＳ期に入らせた（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990)）。更に、誘導された活性は記載されなかった分子であることが明らかであった。何となれば、そればクラスII MHC、Ｔ細胞受容体、CD4、LFA-1、Thy-1、またはCD28の如き候補分子の抗体によりブロックされなかったからである。こうして、リンホカインの不在下の接触シグナルはポリクローナルＢ細胞ＤＮＡ合成の誘導に必要なシグナルを全て送出することが明らかであった。

活性化Th細胞膜により刺激されたＢ細胞は、D10細胞からのリンホカインを含む上澄みが培養物に入れられない限り、免疫グロブリンを分泌しなかった。注目すべきことに、産生された主要免疫グロブリン同位体（IgM、IgG1、及びIgE）の量は無傷D10細胞により直接刺激されたＢ細胞により生じた量と近似していた。こうして、Th膜及びリンホカインによるＢ細胞の抗原非依存性活性化は、Ｂ細胞増殖、免疫グロブリンクラススイッチング、及び免疫グロブリン分泌への分化（Hodgkinら,J.Immunol.145:2025-2034 (1990);Noelleら,J.Immunol. 146:1118-1124 (1991)）を誘導するのに必要な全てのシグナルを与えることが明らかであった。

２．リンホカインの役割

細胞クローンを活性化後のそれらのリンホカイン分泌プロフィール（Mosmann&Coffman, Annu.Rev.Immunol. 7:145-173) 1989)）によりカテゴリーに分けることができる。Th1 Ｔ細胞はIL-2及びIFN-γを特異的に分泌し、一般にin vitroのＢ細胞免疫グロブリン分泌の不十分な刺激物質である。Th2細胞はIL-4及びIL-5を分泌し、Ｂ細胞から強い免疫グロブリン分泌を誘導する。免疫グロブリン分泌を誘導する異なる能力は、分泌されるリンホカインの相違のため、または適当な刺激性細胞表面リガンドを生じるためのTh1細胞の損傷のためであり得る。これらの可能性を試験するために、膜を６種の異なるTh1細胞クローンから調製した。夫々が強いＢ細胞増殖を刺激し、Th2膜と同様に、Th1膜単独が免疫グロブリン分泌を誘導しなかった（Hodgkinら,J.Immunol. 147:3696-3702 (1991)）。活性化されたTh2細胞からの上澄みをTh1膜に添加した時、Ｂ細胞により分泌された免疫グロブリン同位体はTh2膜及びTh2リンホカインによる活性化後に分泌されたものと同じであった。更にTh1細胞クローンの夫々からのリンホカインを含む上澄みは、Th1細胞またはTh2細胞から調製された膜で刺激されたＢ細胞から免疫グロブリン分泌を誘導することができなかった（Hodgkinら,J.Immunol. 147:3696-3702 (1991)）。それ故、それはTh1細胞のリンホカインレパートリーであることが明らかであり、in vitroの不十分なＢ細胞刺激物質であ

るTh1細胞をもたらす接触依存性シグナルを与えることができないことはない。
Th2リンホカインIL-4及びIL-5の両方が膜刺激Ｂ細胞の分化に影響して免疫グロブリンを分泌するという役割を果たした。組換えIL-4及びIL-5の組み合わせはIgM、IgG1、及びIgE合成を誘導するTh2上澄みの能力を再現し、抗IL-4抗体は免疫グロブリン分泌を完全に阻止した（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990);Noelleら,J.Immunol. 146:1118-1124 (1991)）（公表されなかった観察）。ヒトＢ細胞増殖に使用されるサイトカインは、マウス細胞分化に使用されたものと異なっていてもよい。IL-4及びIL-5の組み合わせの更に詳細な研究は、これらのリンホカインの夫々の効果が非常に複雑であることを明らかにした。IL-4単独はTh細胞膜により誘導されたＢ細胞増殖を増進した（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990)）。IL-4はＢ細胞が細胞サイクルのＳ期に入るのに必須ではなかったが、Th膜刺激に対するＢ細胞の感受性を約10倍増加した。対照的に、IL-5を含むその他のリンホカインはTh膜誘導増殖に効果を有していなかった。IL-4単独はまた膜刺激Ｂ細胞を誘導して免疫グロブリンを分泌した（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990)）。しかしながら、顕著な投薬量応答不一致があった。Ｂ細胞増殖の増進は免疫グロブリン分泌の誘導よりも100倍少ないIL-4を必要とした。IL-5の効果は免疫グロブリン分泌へとＢ細胞分化を誘導するIL-4の能力を高めることであることが明らかであり、低いIL-4濃度でその最大の効果を与えた。また、IL-4単独がTh1膜刺激Ｂ細胞に免疫グロブリンを分泌させるように誘導し得ないこと（Noelleら,J.Immunol. 146:1118-1124 (1991);Hodgkinら,J.Immunol. 147:3696-3702 (1991)）は、この投薬量－応答不一致及びTh1膜小胞中の残留IFN-γの存在の両方により説明し得ることが明らかである。何となれば、抗IFN-γの存在下のTh1膜及びIL-4により刺激されたＢ細胞が多量の免疫グロブリンを合成するからである（公表されなかった観察）。
Ｂ細胞活性化において異なるイベントを分離するTh膜系の能力は、本発明者らにリンホカインが免疫グロブリン分泌を誘導するのに必要とされる時を測定させた。Th膜で培養を開始し、種々の時間後にD10上澄みを添加または除去することにより、本発明者らはリンホカインがＢ細胞増殖の期間に近似する時間帯中に決定的に必要とされることを見出した（Hodgkinら,Eur.J.Immunol. 24:239-246 (1994)）。これらの実験は、免疫グロブリン分泌細胞に分化するリンホカイン依存性の開始が細胞分裂の最初のラウンドの前に起こることを示した。更に、細胞が増殖中にリンホカインに長く露出される程、それらがおそらくより多く分化してIgEを分泌した。経時実験は、IgM分泌細胞が３日目に培養物中に最初に現れ、IgG1分泌細胞より24時間先行することを実証した。IgE分泌細胞は５日目に現れ、IgM分泌細胞の数が減少するにつれて増加した。
Ｂ．TH細胞膜によるＢ細胞活性化の構築
どの分子がＢ細胞を活性化するのかというメカニズムの多くの特徴を、膜小胞中でTh細胞表面分子を生化学的に単離し、再生するように最初に設計された研究により特性決定した。Th膜の洗剤可溶化は、静止Ｂ細胞を活性化するこれらの膜の能力を排除することが最初に示された。しかしながら、可溶性フラクションを使用してＢ細胞増殖を刺激する無傷Th膜の能力と競合することができた（M.R.K.、公表されなかった観察）。3Mの塩溶液によるTh膜の洗浄はその活性に効果を有しなかったので（M.R.K.、公表されなかった観察）、Ｂ細胞活性化分子は細胞膜内タンパク質であることが明らかであった。
活性Th膜小胞の物理的特徴を、膜活性を調製中及び短い音波処理後の種々の時点で分析することにより調べた。生物学的アッセイと平行して、透過電子顕微鏡検査を夫々の膜製剤について行った（Kehryら,“リンパ球活性化及び免疫調節のメカニズムIV”:Cellular Communications, Plenum Press,ニューヨーク(1992),139-148頁）。新たに調製され、蔗糖パッドに遠心分離された膜小胞は低活性を含み、殆ど個々であり、凝集されていないことがわかった。ペレットへの超遠心分離及び再懸濁後に、これらの小胞はＢ細胞増殖を刺激するのに最高の活性を有し、多くの極めて大きい凝集物からなっていた。同様に、活性膜小胞の音波処理はそれらの活性を低下し、小さい凝集されていない小胞を生じた。音波処理された小胞の超遠心分離は完全な活性を回復し、更に大きい凝集物を生じた（Kehryら,“リンパ球活性化及び免疫調節のメカニズムIV”:Cellular Communications, Plenum Pre

ss,ニューヨーク(1992),139-148頁）。これらの結果、最高のＢ細胞刺激活性を有するTh膜小胞が実際にＢ細胞表面を広範囲で架橋できるような小胞凝集物であることを示唆した。

また、静止Ｂ細胞による培養中のTh膜小胞の結合及び運命を調べた。Ｂ細胞は抗B220抗体による染色により視覚化でき、抗CD4はＢ細胞を活性化するTh膜の能力をブロックしなかったので（Hodgkinら,J.Immunol.145:2025-2034 (1990)）、抗CD4を使用してＢ細胞に結合されたTh膜小胞を視覚化することができた。広範囲で凝集されたTh膜を24時間の培養によりＢ細胞に結合し、Ｂ細胞の凝集を72時間で最大に誘導した。４日の経過（その時点までに、最高のＢ細胞増殖が起こっていた）にわたってTh膜小胞は脱凝集したが、Th膜とＢ細胞の接触を保ち、膜小胞の内在化またはキャッピングが観察されなかった（Kehryら,“リンパ球活性化及び免疫調製のメカニズムIV”:Cellular Communications, Plenum Press,ニューヨーク(1992),139-148頁）。

また、２価の金属イオンキレート剤を含む氷冷緩衝液によるTh膜により刺激されたＢ細胞の洗浄は、機能性Ｂ細胞刺激を阻止できることがわかった。これを使用して、Ｂ細胞増殖の誘導に必要とされるTh膜－Ｂ細胞接触の時間の長さを調べた。膜を培養の種々の時間後に洗浄し、接触が早く起こったが、Ｂ細胞とTh膜の延長された接触期間（24～36時間）が最高のＢ細胞成長を誘導するのに必要とされることがわかった。これは、静止Ｂ細胞がＤＮＡ合成の誘導を得るためにこの期間にわたって連続のシグナリングを必要とすることを意味した（Kehryら,“リンパ球活性化及び免疫調節のメカニズムIV”:Cellular Communications, Plenum Press,ニューヨーク(1992),139-148頁）。こうして、Ｂ細胞活性化分子は、静止Ｂ細胞を誘導して増殖させるためにＢ細胞表面を広範囲に架橋し、少なくとも24時間にわたって機能性シグナルを与えることを必要とした。

Ｃ．受容体－リガンド対の同定

接触シグナルを静止Ｂ細胞に送出するのに関与するＢ細胞活性化分子の初期の特性決定は活性Th細胞膜に生化学的研究（Hodgkinら,J.Immunol.145:2025-2034 (1990)）から得られた。多数の洗浄技術、タンパク質分解技術、及び洗剤可溶化技術を使用することにより、Ｂ細胞活性化分子はそれらの発現のために新しいｍＲＮＡ及びタンパク質合成を必要とする細胞膜内タンパク質であることがわかった。あらゆる点で、Ｂ細胞活性化分子は活性化Th細胞膜のリンホカイン様成分であった（Hodgkinら,J.Immunol.145:2025-2034 (1990)）。それらをTh細胞活性化後にde novo合成した。活性化Th細胞によるそれらの合成は迅速であり、一過性であり、それらは非同系様式でその他の細胞型に対しそれらの効果を与えた。Ｂ細胞活性化分子の同定に関する第一工程において、Ledermanらは上記の特性の全てを示すTh細胞特異性分子の抗体を単離した（Ledermanら,J.Exp.Med. 175:1019-1101 (1992)）。同時のアプローチは、静止Ｂ細胞表面におけるＢ細胞活性化分子の構成的に発現された受容体の可能な候補を考えた。幾つかの系列の証拠は、Ｂ細胞活性化の可能なＢ細胞受容体がCD40分子であることを示唆した。リンホカインの存在下のCD40の抗体によるヒトＢ細胞の刺激は、Th依存性Ｂ細胞活性化、増殖、及び分化の多くの特徴を再現することが明らかであった（Jabaraら,J.Exp.Med. 172:1861-1864 (1990);Roussetら,J.Exp.Med. 173:705-710 (1991);Zhangら,J.Immunol.146:1836-1842 (1991);Banchereauら,Science 251:70-72 (1991)）。CD40はTNF受容体ファミリー（その員は反復のCysに富む細胞外ドメインを特徴としている）に属する。TNF受容体との機能性相同性により、CD40の可溶性リガンドに関する研究が進行中であった（Clark,E.A., Tiss.Antigens 35:33-36 (1990)）。しかしながら、抗CD40抗体の活性及び長期ヒトＢ細胞成長を誘導するFc受容体発現Ｌ細胞に固定されたこれらの抗体の能力（Banchereauら,Science 251:70-72(1991)）は、CD40のリガンドが膜結合し得ることを可能にした。

幾つかの研究所はヒトIgG1のFc部分にヒトCD40の細胞外ドメインを結合するCD40の可溶性形態を生産した（Fanslowら,J.Immunol. 149:655-660 (1992);Castleら,J.Immunol. 151:1777-1788(1993)）。この融合タンパク質はTh細胞依存性Ｂ細胞活性化をブロックすることができ（Castleら,J.Immunol. 151:1777-1788 (1993);Noelleら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:6550-6554 (1992)、これを使用してCD40のリガンドを同定し、クローン化した（Ar

mitageら,Nature 357:80-82(1992))。CD40リガンドを、その他のタンパク質と共有結合されず、かつ活性化Ｔ細胞により発現される分子量33,000-35,000の糖タンパク質と同定した。組換えCD40リガンドを繊維芽細胞の表面で発現した時、それは比較的低いレベルではあるが、Ｂ細胞増殖を刺激することができた（Armitageら,Nature 357:80-82 (1992))。同時に、ヒトＢ細胞活性化分子（Ledermanら,J.Exp.Med. 175:1091-1101 (1992)）及びマウスＢ細胞活性化分子（Noelleら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:6550-6554 (1992)）の両方を認識する抗体を産生した。これらの抗体はTh依存性Ｂ細胞活性化イベントをブロックする性質を有し、CD40のリガンドを認識することが実証された。

CD40リガンドはＢ細胞活性化分子及び膜関連リンホカインの性質の全てを有する（Farrah＆Smith, Nature 358:26 (1992)）。CD40リガンドの最も顕著な構造上の特徴はTNF-α及びTNF-βとのその相同性（Farrah＆Smith, Nature 358:26 (1992);Smith, Cell 76:959-962 (1994)）及び型２膜糖タンパク質としてのその可能な配向である。Th細胞クローン中のCD40リガンド遺伝子の発現の調節はIL-2遺伝子調節のそれと同様であることがわかり（Castleら,J.Immunol. 151:1777-1788(1993))、CD40リガンドが膜関連リンホカインの新しいクラスの員であることを再度示唆した。これはTNF受容体ファミリーの二つのその他の員の関連細胞表面リガンド、CD27（Goodwinら,Cell 73:417-456 (1993)）及びCD30（Smithら,Cell 73:1349-1360 (1993)）の最近のクローニングにより支持される。Th細胞依存性Ｂ細胞活性化におけるCD40リガンドの重要な役割は、免疫不全症、Ｘ染色体性高IgM症候群をTh細胞における機能性CD40リガンドの発現の欠如に相関させることにより実証された。その欠陥はCD40リガンド遺伝子中の種々の突然変異により生じる（Allenら,Science 259:990-993 (1993);Aruffoら,Cell 72:291-300 (1993);Korthauerら,Nature 361:539-541 (1993);DiSantoら,Nature 361:541-543 (1993))。この症候群はスイッチされたIgG分泌Ｂ細胞、IgA分泌Ｂ細胞、及びIgE分泌Ｂ細胞の不在並びに相当する抗体の欠如を特徴とする。

組換えヒト及びマウスCD40リガンドの幾つかの形態の最近の研究は、活性化イベント及び増殖イベントの誘導に関する静止Ｂ細胞の要件の本発明者らの理解を増した。CD8αの細胞外ドメインを有する融合タンパク質として、可溶性CD40リガンドはＢ細胞増殖を刺激することについて低レベルの活性を有することがわかった（Laneら,J.Exp.Med.177:1209-1213 (1993);Hollenbaughら,EMBO J.11:4313-4321(1992))。外部架橋の不在下で、可溶性CD40リガンドはフォルボールエステル、抗CD20、または抗μと協力して主としてＢ細胞増殖の共刺激物質として作用した（Laneら,J.Exp.Med. 177:1209-1213 (1993);Hollenbaughら,EMBO J.11:4313-4321(1992))。本発明者らは、CD8-CD40リガンド融合タンパク質が抗CD8による架橋後またはTh2リンホカイン（B.Castle及びM.R.K.,Sem.Immunol.6:287-294 (1994)または表面IgMもしくはIgD架橋（Snapper,C.M.ら,J.Immunol.154:1177-1187 (1995)）とともに共刺激物質として使用された時にのみ静止Ｂ細胞増殖を誘導することができることを観察した。可溶性CD40はモノマーではないので（B.Castle及びM.R.K.,公表されていない観察）、これは静止Ｂ細胞が増殖の誘導に高度のCD40架橋を必要とすることを意味する。更に、IL-4は、抗CD40抗体を使用してわかったように、低レベルのCD40架橋に対する静止Ｂ細胞の感受性を増大することが明らかである（Clark,E.A., Tiss.Antigens 35:33-36 (1990);Roussetら,J.Exp.Med. 173:705-710 (1991);Gordonら,Eur.J.Immunol. 17:1535-1538 (1987))。同様の応答が、IL-4及び抗μ抗体を使用して見られた（Hodgkinら,Cell.Immunol. 134:14-30 (1991))。こうして、広範囲の架橋を誘導する条件下で、CD40リガンドは静止Ｂ細胞を活性化するのに充分であることが明らかである。最適以下の架橋条件下で、CD40リガンドはリンホカインまたはその他のＢ細胞表面分子とともに共刺激物質として作用する。Ｂ活性化のどの条件が正常なTh細胞により誘導されたものと同様であるのかを測定することが残されている。

Ｂ細胞増殖を可溶性CD40リガンドとともに同時刺激するTh2リンホカインの能力は、Th膜により誘導されたＢ細胞増殖に関するIL-4の効果の不一致の説明を与える（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990);Noelleら,J.Immunol. 146:1118-1124 (1991))。或る研究において、Th膜は静止Ｂ細胞ＲＮＡ合成の増大を刺激することができるが、ＤＮＡ合成

を行うのにIL-4の添加を必要とすることがわかった（Noelleら,J.Immunol. 146:1118-1124 (1991)）。異なる研究において、Th膜は添加リンホカインの不在下でＢ細胞増殖を刺激することができるが、IL-4がＢ細胞増殖をかなり増進することがわかった（Hodgkinら,J.Immunol.145:2025-2034 (1990)）。CD40リガンド単独の組換え膜形態はＢ細胞増殖を刺激することができることが今知られている（Armitageら,Nature 357:80-82 (1992)）（以下を参照のこと）。その二つの研究においてTh膜を調製するのに使用した方法は、異なる均一化プロトコルが活性化Th細胞について行われた一つの場合（Noelleら,J.Immunol. 146:1118-1124 (1991)）において、小さいそれ程凝集されていない小胞が生じたかもしれないように異なっていたかもしれないことが明らかである。これらは上記の音波処理されたTh膜小胞（Kehryら,“リンパ球活性化及び免疫調節のメカニズムIV”:Cellular Communications, PlenumPress,ニューヨーク(1992),139-148頁）または可溶性CD40リガンドに類似であるようであり、Ｂ細胞増殖を誘導するのに同時刺激を必要とするであろう。

また、CD40リガンドは繊維芽細胞中で膜形態として一時的に発現された。この物質はまたＢ細胞増殖を誘導するのに充分であるが、その応答の程度は無傷Th細胞により得られたものから大きく低下する（Armitageら,Nature 357:80-82 (1992);Grabsteinら,J.Immunol. 150:3141-3147 (1993)）。適当なリンホカイン及び組換え膜CD40リガンドの存在下で、Ｂ細胞分化が起こる（Grabsteinら,J.Immunol. 150:3141-3147(1993);Armitageら,J.Immunol. 150:3671-3680 (1993);Spriggsら,J.Exp.Med. 176:1543-1550 (1992);Maliszewskiら,Eur.J.Immunol. 23:1044-1049 (1993)）。しかしながら、Th細胞及び組換えCD40リガンドで刺激されたＢ細胞の間でリンホカイン要求に幾つかの相違があることが明らかである（Grabsteinら,J.Immunol. 150:3141-3147 (1993);Armitageら,J.Immunol. 150:3671-3680 (1993)）。また、最近の研究は、CD40リガンド発現のレベルとＢ細胞増殖を誘導するTh細胞の能力の間の不一致を示した（Castleら,J.Immunol. 151:1777-1788 (1993);Royら,J.Immunol. 151:2497-2510 (1993)）。Th細胞中で新たに合成されたCD40リガンドは接触シグナルを静止Ｂ細胞に送出するのに充分には応答能がないことが明らかである。その他のTh細胞表面タンパク質（即ち、共刺激物質Ｂ細胞活性化分子）との会合または新たに合成されたCD40リガンドそれ自体もしくは細胞骨格とのアッセンブリー（Castleら,J.Immunol. 151:1777-1788 (1993)）に或る要件があるかもしれない。CD40リガンドの或る密度は最高のＢ細胞応答を誘導するのに重要であり得ることが可能である。これらの研究から、付加的なＢ細胞活性化分子を発見することが残されているかもしれないことが明らかである。

また、Ｂ細胞活性化分子としてのCD40リガンドの特徴は、Th細胞膜の洗剤可溶化後にＢ細胞増殖活性を再生することができないこと（上記されている）と一致する。CD40リガンドがTNF-α及びTNF-βと共有する相同性は、会合されたトリマー構造（Farrah＆Smith,Nature 358:26 (1992)）を形成するのに関与しているTNF分子の特別なβ－シート領域に制限される。これは、膜CD40リガンドの天然の四次構造がトリマーであるかもしれないことを意味する。CD40リガンドはそれ自体でジスルフィド結合されないので、このような構造は洗剤可溶化後に解離し、非常に特定の条件下でのみ再形成するものと予想し得る。更に、その他のTh細胞膜タンパク質または共刺激物質との非共有結合会合が最高の増殖応答のためにＢ細胞表面の架橋を誘導するのに必要とされる場合、これらはまた洗剤可溶化後に容易に解離し得る。

Ｄ．in vivo状況下のＢ細胞－Th細胞相互作用の導入

脾臓中で、Ｂ細胞活性化及び増殖は二つの部位、増殖巣及び胚中心で起こる。免疫化の２日または３日後に最初に検出し得る増殖巣を開始するために、抗原刺激Ｂ細胞は脾臓白髄質のＴ細胞に富む外動脈周囲のリンパ系シース（PALS）領域に移動する（Kupfer＆Singer, J.Exp.Med. 170:1697-1713 (1991)）。適当なＴ細胞との接触がなされる場合、Ｔ細胞及びＢ細胞の両方の増殖が起こり、Ｂ細胞がIgGサブクラスをスイッチし、分泌する。また、それらは末端細動脈に沿って赤色脾髄に移動し、おそらく脾臓から出る（Van Rooijen,N., Immunol.Today 11:436-439 (1990)）。免疫応答中の一次抗体の殆どはこれらの増殖巣中でＢ細胞から生じる（Tsiagbeら,Immunol.Rev. 126:113-141 (1992)）。胚中心応答は増殖巣の形成の二三日後に開始される。胚中心Ｂ細胞はおそらく増殖巣中で活性化さ

れたＢ細胞から誘導される（Jacob＆Kelsoe,J.Exp.Med. 176:679-687 (1992)）。胚中心は高アフィニティーの過突然変異（hypermutated）抗体を産生するＢ細胞の発生及び選択に必要な強いＢ細胞増殖の部位である。

Th膜及びリンホカインによりin vitroで再現されたＢ細胞活性化のメカニズムは、in vivoで見られる一次増殖巣中のＢ細胞活性化のメカニズムと近似している（Kehry,M.R.及びHodgkin,P.D., Sem.Immunol. 5:393-400 (1993)）。免疫されたマウスのリンパ系臓器中のCD40リガンドのin situ局在化の最近の優れた免疫組織化学研究がこの結論と一致する。CD40リガンドは外PALS領域中のＴ細胞のみに見られ、または末端細動脈と会合された（Van der Eertweghら,J.Exp.Med. 178:1555-1656 (1993)）。更に、CD40リガンド出現の速度論は胚中心形成の速度論よりむしろ増殖巣形成の速度論と相関関係があった。実際に、CD40リガンドは胚中心中で観察されなかった。

Ｅ．Ｂ細胞－Ｔ細胞相互作用を研究するための新しい系

正常な未形質転換Ｂ細胞を延長された期間にわたって生存して保つことは可能ではなかったので（Tischら,Immunol.Today 9:145-150 (1988)）、Ｂ細胞応答を研究するための既存のin vitro系は脾臓、扁桃腺、または末梢血から新たに単離されたＢ細胞を使用する。これらのＢ細胞集団は本来異なっており、不均一であり、この変動が異なるライブラリー間だけでなく、マウスＢ細胞研究とヒトＢ細胞研究の間の多くの異なる実験結果の原因であり得る。Ｔ細胞クローンに類似するＢ細胞系を樹立することは可能ではなかった（Tischら,Immunol.Today 9:145-150 (1988)）。平均で、培養Ｂ細胞は刺激の不在下で２日未満にわたって生存して残る。Th細胞によりin vitroで一旦活性化されると、Ｂ細胞は細胞分裂の２または３ラウンドを受けることが明らかであり、またTh2リンホカインが存在する場合、それらは分化して抗体を分泌するであろう（Hodgkinら,Eur.J.Immunol.24:239-246 (1994)）。しかしながら、初期の増殖期間後に、広範囲のＢ細胞死滅が起こり、その結果、７日後の実際の生存度は10％未満であろう（Hodgkinら,Eur.J.Immunol.24:239-246 (1994)）。これはＢ細胞応答の不十分に理解された局面の幾つか、例えば、記憶Ｂ細胞を生じるシグナル並びに体細胞突然変異及び高アフィニティー抗体産生細胞の選択を誘導する分子メカニズムを研究するためのin vitroの系を樹立することを不可能にした。延長された期間にわたってヒトＢ細胞を生育するためにIL-4及びFc受容体陽性繊維芽細胞に固定された高CD40抗体を使用する（Roussetら,J.Exp.Med. 173:705-710 (1991);Banchereauら,Science 251:70-72(1991);Galibertら,J.Immunol. 152:22-29 (1994)はＢ細胞系に最も近似していた。しかしながら、細胞倍加時間は遅く（Galibertら,J.Immunol. 152:22-29 (1994)）、しかもIL-4に関する要件が不均一培養で抗体産生細胞を生じた（Banchereauら,Science 251:70-72 (1991)）。

実施例２　hdmb CD40リガンドを使用するＢ細胞の有効な増殖及び分化

物質及び方法

高密度膜結合マウスCD40リガンドの発現を誘導する組換えバキュロウイルスベクターの構築及び単離は以下のとおりであった。この研究に使用した移入ベクターはCharles Has博士及びJ.Donald Capra博士（Southwestern Medical Center, ダラス,TX）（Hasemann及びCapra,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:3942-3946 (1990)のギフトであるプラスミド$ph_{r1}360$の誘導体である。マウスCD40リガンドをコードするｃＤＮＡを含むプラスミド及びマウスCD40リガンドは当業界で知られている。CD40リガンドｃＤＮＡを移入ベクターに挿入するために、PCR突然変異誘発を使用して、CD40リガンドｃＤＮＡのATG開始コドンと正確に一致するNco I部位及び翻訳終止コドンに直ぐに遠位のXba I部位を導入した。増幅ＤＮＡをPTZ 19Rに初期にクローン化し、次いで免疫グロブリンＨ鎖ｃＤＮＡをNco I/Xba I消化により除去した後に、$ph_{r1}360$にサブクローン化した。得られるプラスミドを$CaCl_2$沈殿操作によりAcMNPVウイルスＤＮＡでコントランスフェクトした。咬合陰性ウイルスプラークを単離し、通常の技術（Summers及びSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin (1987),1555頁）を使用してプラークを精製した。

通常の技術（O'Reillyら,バキュロウイルス発現ベクター、実験マニュアル,W.H.Freeman and Company,ニューヨーク,ニューヨーク(1992)）を使用してSF9細胞中で生育された高力

価ウイルス株を使用して27℃で66時間にわたって懸濁培養で生育されたSf9細胞を感染した（MOI 100）。感染されたSf9細胞を遠心分離により回収し、1.0mMの$CaCl_2$を含む氷冷リナルジニ塩溶液（シグマ・ケミカル社、セントルイス、MO）で２回洗浄し、膜を記載されたようにして調製した（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990);Brian, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:564(1988);Maedaら,Biochim.Biophy.Acta 731:115 (1983)）。hdmbマウスCD40リガンドと称された膜を洗浄し、ダルベッコPBS中に再度懸濁させ、液体窒素で貯蔵した。合計の膜タンパク質濃度を夫々の調製について測定した（ミクロBCAアッセイ、ピアス）。膜のバッチをＢ細胞増殖アッセイ（以下を参照のこと）で滴定した。

ヒトＢ細胞調製　高度に精製されたＢ細胞を記載されたようにして調製した（Amoroso及びLipsky, J.Immunol. 145:3155 (1990)）。簡単に言うと、PBMCをナトリウムジアトリゾエート／フィコール勾配で遠心分離により健康な成人からのヘパリン処理血液（ファーマシア社、ピスキャットウェイ、NJ）から調製した。PBMCを無血清RPMI 1640中で再度懸濁させ、単球及びナチュラルキラー細胞を枯渇するために室温で45分間にわたって5mMのＬ－ロイシンメチルエステルHClで処理した。主としてＢ細胞からなる非リセッティング（non-resetting）細胞を回収し、残存NK細胞及び単球を枯渇するために室温で15分間にわたって100μモルのＬ－ロイシル－ロイシンメチルエステルで処理した（Thiele及びLipsky, J.Immunol.136:1038 (1986)）。この処理後に、細胞を再度ロゼット形成し、SRBCロゼット形成細胞を遠心分離により除去した。このようにして調製されたＢ細胞は、CD20またはCD19のmAbによる染色により示されるように90％以上純粋であった。また、製造業者により記載されたような抗CD19被覆磁性ビーズ（ダイナールからのダイナビーズ）を使用して、Ｂ細胞を精製することができる。

マウスＢ細胞調製　マウスＢ細胞をHodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990)により記載されたようにして調製した。

サイトカイン　活性化D10.G4.1(D10)細胞からの上澄みを先に記載されたようにして得た（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025 (1990)）。簡単に言うと、刺激後３週間にわたってペトリ皿中で生育されたD10 Th2細胞を回収し、IL-2を欠いている培地中で２回洗浄し、９時間にわたって５μg/mlのコンカナバリンＡ（シグマ・ケミカル社、セントルイス、MO）で刺激した。低速遠心分離による細胞の除去後に、上澄みを95,000Xgで遠心分離し、0.22μmの膜で濾過し、マンノース－アガロースカラム（E-Yラボラトリーズ、サンマテオ、CA）で吸収した。D10上澄みをＢ細胞増殖アッセイ及び抗体産生アッセイで滴定し、1/100の最終希釈で使用した。更に、樹状細胞、濾胞樹状細胞、及びその他の抗原提示細胞を含むが、これらに限定されないその他の細胞型により産生されたサイトカインは、特定の抗原の存在下または不在下で、培養物中に入れることができる。

培養条件、Ｂ細胞をＢ細胞培地(BCM):RPMI-1640中の10％のウシ胎児血清（特性決定されたハイクローン）；10mMのヘペスpH7.3；Ｌ－グルタミン；ペニシリン／ストレプトマイシン；非必須アミノ酸；ピルビン酸ナトリウム；及び$5x10^{-5}$Mの２－メルカプトエタノール中で生育した。培地及び100X補給物をギブコから入手した。

長期生育実験について、Ｂ細胞をＶ底96ウェル　ミクロタイタプレート（001-010-2701、ダイナテク・ラボラトリーズ社、チャンチリィ、VA）中で150μlのBCM中で37℃、5.5％の$CO_2$で培養した。最初に、hdmbマウスCD40リガンドはD10 sn（1/100最終希釈）を含み、または含まないで最終濃度３μg/mlであり、これを100μlのBCM中に添加した。小さな稠密なＢ細胞（1,000／ウェル）を50μlのBCM中に添加した。48時間毎に、プレートに以下のようにして新しい培地成分を供給した。プレートを７分間にわたって1600rpmで遠心分離し（GS-6KR遠心分離機、ベックマン）、培地を吸引して約15μlを残し、新しい培地（150μl）を添加した。

抗体測定　培養物からの上澄みを抗体アッセイのために３回の反復実験試料ウェルから培養上澄み140μLを除去することにより回収した。BCM 140μLをウェルに逆に添加し、140μLを残留抗体濃縮のために除去した。これらのウェルを更に使用しなかった。IgM、IgG、及びIgEレベルを既に記載されたようにして同位体特異性ELISAにより測定した（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025-2034 (1990);Hodgkinら,Eur.J.Immunol. 24:239-246 (1994)）

。新しい培地による交換（次の時点に繰り越される）後の夫々のウェル中の夫々の同位体の残留レベルを夫々の値から引いた。

結果

SF9細胞を、種々の時間にわたってマウスCD40リガンドを含む組換えバキュロウイルスで感染させた（図２）。濃縮されたプラズマ膜フラクションを調製し、夫々の膜製剤をＢ細胞増殖アッセイで滴定した（72時間にわたって$2x10^4$ Ｂ細胞／ウェル）。細胞分裂のマーカーとして放射能標識化合物のとり込みを使用して、$^3$H-TdR（4hパルス）の最大とり込みを66時間SF9感染細胞（66時間、hdmb CD40リガンド）から調製された膜で観察した。hdmb CD40リガンドを使用してD10sn（1/100；９時間刺激されたD10.G4.1Th2 Ｔ細胞クローンからのリンホカインを含む上澄み、Hodgkinら,1990）の存在下でＢ細胞を刺激した時、44時間、66時間、及び90時間感染SF9細胞からのプラズマ膜は、Ｂ細胞を刺激するそれらの能力において均等であった（図2B）。

観察された増殖応答がhdmb CD40リガンドにより媒介されることを実証するために、Ｂ細胞（$2x10^4$／ウェル）をCD40-IgG1融合タンパク質（Castleら,J.Immunol. 151:1777-1788(1993)の存在下または不在下で一定量のhdmb CD40リガンド（1/200）で刺激した（図３）。●、CD40-IgGが含まれた（最高濃度で35μg/ml）；□、CD40-IgGなし。hdmb CD40リガンドにより生じた増殖はCD40-IgGにより特異的に抑制することができ、増殖がhdmb CD40リガンドにより誘導されることを実証した。

細胞増殖に関する密度の効果を測定するために、Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド(1/80)及びD10 sn(1/100)とともに96ウェルプレートに入れた（$1x10^4$／ウェル）。細胞をカウントし、培地を48時間毎に交換した。５日目及び８日目に、細胞を再度懸濁し、1/8に分割した（図４）。▲、細胞は分割されなかった；●、５日目に1/8に分割；■、８日目に1/8に分割；○、８倍の1/8に分割；□、64倍の２回目の1/8に分割。$5x10^4$/mlを上回るインプット細胞濃度では、細胞数の減少が最高の増殖を得るのに必要であった。

種々の培養フォーマットを試験するために、Ｂ細胞を平底または“Ｖ”底96ウェルプレートに入れた（$1x10^3$／ウェル）。細胞をhdmb CD40リガンド及びD10 sn(++)またはhdmb CD40リガンドのみ(+-)とともにインキュベートした。細胞をカウントし、培地を除去し、48時間毎に交換した（図５）。■、平底プレート中のhdmb CD40リガンド及びD10 sn；○、“Ｖ”底プレート中のhdmb CD40リガンド及びD10 sn；□、平底プレート中のhdmb CD40リガンド；●、“Ｖ”底プレート中のhdmb CD40リガンド。図５に示されるように、リンホカインが存在しなかった場合、多数のＢ細胞が“Ｖ”底ウェルを含むプレートから回収された。

増殖され、分化されたＢ細胞からの抗体分泌について分析するために、Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド（1/300）及びD10 sn（1/100）とともに96ウェル“Ｖ”底プレートに入れた（$1x10^3$細胞／ウェル）。48時間毎に、細胞を除去し、カウントし、培地を交換しなかった（図6A）。□、生存細胞の合計数；●、生存していた細胞のフラクション。

反復実験ウェルからの培地を除去し、抗体濃度を定量ELISAにより測定した（図6B）。●、IgM；■、IgG1；▲、IgE。累積抗体濃度がng/mlで示される。最高細胞数がほぼ８日目に生じ（細胞数の50倍の増加）、一方、IgM産生の大半が８日目～12日目に起こった（図6B）。

Ｂ細胞増殖及び分化に関する培地交換の効果を測定するために、Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド（1/30）及びD10 sn（1/100）とともに96ウェル“Ｖ”底プレートに入れた（$1x10^3$細胞／ウェル）。48時間毎に、細胞を除去し、カウントし、古い培地を除去し、新しい培地と交換した（図7A）。□、生存細胞の合計数；●、生存していた細胞のフラクション。

反復実験ウェルからの培地を除去し、抗体濃度を定量ELISAにより測定した（図7B）。●、IgM；■、IgG1；▲、IgE。累計抗体濃度がng/mlで示される。最高細胞数がほぼ10日目に生じ（細胞数の200倍の増加）、一方、IgM産生の大半が８日目～22日目に起こった。

抗体分泌に関する多工程増殖プロトコルの効果を試験するために、Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド（1/300）及びD10 sn（1/100）とともに96ウェル“Ｖ”底プレートに入れた（$1x10^3$細胞／ウェル）（図８）。48時間毎に、細胞を除去し、カウントし、古い培地を除去し、

新しい培地と交換した（図８）。+-、培地がhdmb CD40リガンドを含んだ；--、培地が添加物を含まなかった；++、培地がhdmb CD40リガンド及びD10 snを含んだ。□、生存細胞の合計数；●、生存していた細胞のフラクション。
反復実験ウェル用の培地を除去し、抗体濃度を定量ELISAにより測定した。●、IgM；■、IgG1；▲、IgE。累計抗体濃度がng/mlで示される（図８）。最高細胞数がほぼ18日目に生じ（細胞数の100倍の増加）、一方、IgM産生の大半が16日目～34日目に起こった。
Ｂ細胞がhdmb CD40リガンドに応答する頻度を測定するために、Ｂ細胞をhdmb CD40リガンド（1/300）またはhdmb CD40リガンド（1/300）及びD10 sn（1/100）とともに96ウェル“V”底プレートに１、３、10、及び30細胞／ウェルで塗布した（図９）。６日後に、細胞を再度懸濁させ、平底プレートに移し、分裂した生存細胞の存在についてスコアをつけた。hdmb CD40リガンドで刺激された培養物中で、Ｂ細胞のほぼ1/8が成長した。hdmb CD40リガンド及びD10 snで刺激された培養物中で、Ｂ細胞のほぼ1/2が成長した。
ヒトＢ細胞に関するhdmb CD40リガンドの増殖効果を試験するために、ヒトＢ細胞を単離し、マウス細胞に関して上記されたようにして生育した（図10）。ヒトＢ細胞は少なくとも100倍増加し、Ig産生が10日目～14日目に観察された。
実施例３　ヒトＢ細胞の増殖及び分化
先の研究において、正常なマウスＢリンパ球を増殖し、分化する方法が確立された。その方法はＢ細胞分化を支持することができるサイトカインの源と組み合わせて昆虫細胞中で発現されたhdmb組換えマウスCD40リガンドの使用を伴った。これらの条件下で、マウスＢリンパ球は約250倍に増加し、個々のクローンと同程度に高い頻度で生育させることができた（1/2細胞応答）。増加したクローンの全てがまた分化して高レベルのIgM及び／またはIgG抗体を分泌した。この研究の目的は、正常なヒトＢリンパ球を使用する同様の細胞増加及び分化が本明細書に開示された方法を使用して得られることを実証するためである。本発明の方法を使用して、ヒトＢ細胞はヒトサイトカインと組み合わせて昆虫細胞中で発現されたhdmb組換えヒトCD40リガンドに対して有効な増殖応答を示した。ヒトＢ細胞クローンを高頻度で生育して、免疫グロブリン分泌のための分化を得ることが可能であった。
物質及び方法
抗体及び試薬　モノクローナル抗ヒトCD3（64.1）をJohn Hansen博士（フレッド・ハチンソン癌センター、シアトル、WA）により産生した。パンニングに使用したモノクローナル抗ヒトCD3、抗ヒトCD8、抗ヒトCD14及び抗ヒトCD19をファーミンゲン（サンジエゴ、CA）から購入した。ヒト抗体レベルをELISAにより定量するために、$F(ab')_2$ヤギ抗ヒトIgM（精製され、ビオチン接合された）及び$F(ab')_2$ヤギ抗ヒトIgG（Fc特異性）（精製され、ビオチン接合された）、並びにストレプトアビジン-HRPはジャクソン・イムノリサーチ（ウェスト・グローブ、PA）からのものであった。マウスＢ細胞に関するELISPOTアッセイのために、ビオチン接合ヤギ抗マウスIgMはザイムド（ソウ、サンフランシスコ、CA）からのものであり、ビオチンヤギ抗マウスIgGはサザン・バイオテクノロジー社（バーミンガム、AL）からのものであった。ELISA標準物質として使用した精製ヒトミエローマIgM、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4をザ・バインディング・サイト社（バーミンガム、英国）から入手した。精製キーホールリンペットヘモシアニン（イムジェクトKLH）はピアス・ケミカル社（ロックフォード、IL）からのものであった。
サイトカイン、組換えヒトIL-1a、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、及びIL-11をゲンザイム（ケンブリッジ、MA）から購入した。夫々をＢ細胞培地（BCM；下記を参照のこと）中で希釈し、0.2μM濾過し、-80℃でアリコート中で貯蔵することにより原液溶液を調製した。
活性化されたヒト末梢血Ｔ細胞からの上澄みを以下のようにして得た。フィコール－ハイペークによる遠心分離後に得られた末梢血単核細胞を抗CD14（５μg/ml）、抗CD14及び抗CD19（夫々2.5μg/ml）、及び抗CD8（５μg/ml）で一夜被覆されたプレートで連続的にパンニングした。パンニングは４℃で１時間にわたってハンクス平衡塩溶液、５％のFBS、10mMのヘペス、pH7.3中であった。非付着性細胞を洗浄し、温かいBCM［10％のFBS、10mMのヘペス（pH7.3）、２mMのＬ－グルタミン（ギブコ、グランド・アイランド、NY）、0.1mM

の非必須アミノ酸（ギブコ）、1mMのピルビン酸ナトリウム、5X10$^{-5}$Mの２－メルカプトエタノール、及び夫々100U/mlのペニシリン及びストレプトマイシン（ギブコ）を補給したRPMI 1640］中で4X10$^{6}$細胞／mlで再度懸濁させた。抗CD3刺激のために、細胞を37℃で48時間にわたって４μg/mlの抗CD3で被覆された組織培養皿に入れた。PHA/PMAによる刺激のために、細胞を37℃で２時間にわたって2.5μg/mlのPHA及び10ng/mlのPMAとともにインキュベートし、洗浄し、37℃で46時間にわたって新しい温かいBCM中でインキュベートした。低速遠心分離による細胞の除去後に、上澄みを100,000Xgで遠心分離し、0.2μMの膜で濾過し、-80℃でアリコート中で貯蔵した。

更に、特定の抗原の存在下または不在下で、樹状細胞、濾胞樹状細胞、及びその他の抗原提示細胞を含むその他の細胞型により産生されたサイトカインを刺激として培養物中に入れることができる。

バキュロウイルス増殖、昆虫細胞感染、及び膜の調製、完全長ヒトCD40リガンドをコードする組換えバキュロウイルスを通常の技術（O'Reilly,D.R.,L.K.Mil-ler,及びV.A.Luckow.1992.バキュロウイルス発現ベクター、実験マニュアル.W.H.Freeman and Company,ニューヨーク,ニューヨーク）により構築した。通常の技術（O'Reilly,D.R.,L.K.Mil-ler,及びV.A.Luckow.1992.バキュロウイルス発現ベクター、実験マニュアル.W.H.Freeman and Company,ニューヨーク,ニューヨーク）を使用してSF9細胞中で増殖した高力価ウイルス株を使用して27℃で48時間にわたって懸濁培養物中で生育されたSF9細胞を感染した（１のMOI）。感染したSF9細胞を遠心分離により回収し、1.0mMの$CaCl_2$を含む氷冷リナルジニ塩溶液（シグマ・ケミカル社、セントルイス、MO）で２回洗浄し、膜を記載されたようにして調製した（Hodgkinら,J.Immunol. 145:2025 (1990),Brian,A.A.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:564 (1988),Maeda,T.ら,Biochim.Biophy.Acta 731:115 (1983)）。膜、hdmb CD40リガンドを洗浄し、ダルベッコPBS中で再度懸濁させ、液体窒素で貯蔵した。合計膜タンパク質濃度を夫々の製剤について測定した（ミクロBCAアッセイ、ピアス）。膜のバッチをＢ細胞増殖アッセイ（以下を参照のこと）で滴定した。

フローサイトメトリー　SF9昆虫細胞の表面におけるCD40リガンドの発現をフローサイトメトリーにより定量した。hdmb CD40リガンドのバキュロウイルス組換え体で種々の時間にわたって感染されたSF9細胞を昆虫FACS緩衝液（２％のBSA及び0.2%のアジ化ナトリウムを含むリナルジニ塩溶液）中で洗浄し、昆虫FACS緩衝液中で４℃で30分間にわたって５μg/mlの非特異性マウスIgG1とともにプレインキュベートした。細胞を10μg/mlのCD40-IgG1（Castleら,J.Immunol. 11:1777 (1993)）または対照ヒトIgG1、続いてビオチニル化モノクロナールマウス抗ヒトIgG1（10μg/ml；ザイムド）及びフィコエリスリン(PE)-ストレプトアビジン（20μg/ml；ジャクソン・イムノリサーチ）で染色した。全ての染色は、５μg/mlの非特異性マウスIgG1を含む昆虫FACS緩衝液中であった。蛍光をFACScanフローサイトメーター（ベクトン・ディキンソン、サンホセ、CA）でlog単色モードで分析した。

ヒトＢ細胞の調製　フィコール－ハイペークによる遠心分離後に得られたヒト末梢血単核細胞をビオチニル化抗CD19（セルプロ、ボセル、WA）とともにインキュベートし、アビジン接合ビーズ（セプレートLC-19カラム；セルプロ）に結合し、製造業者の指示に従って溶離した。溶離した細胞を夫々５μg/mlの抗CD3及び抗CD4で一夜被覆されたペトリ皿上でパンニングした。非付着性細胞（約1X10$^{6}$/血液100ml）は、既に記載されたようにして（Kehryら,Cell,Immunol. 118:504 (1989)）、PE抗CD3及びFITC抗CD19による二重染色により、またPE抗CD20及びFITC抗IgMによる二重染色により分析して、84%～93%のＢ細胞であった。蛍光をFACScanフローサイトメーターでlog二色モードで分析した。また、Ｂ細胞を同様の技術により、または蛍光標識した抗CD19もしくは抗CD20または特定の抗原で染色した後にフローサイトメーターで選別することにより扁桃腺、脾臓、及び骨髄から単離することができる。

Ｂ細胞アッセイ　増殖研究のために、Ｂ細胞（5X10$^{3}$～1X10$^{4}$/ウェル）を100μlのBCM中の膜の連続希釈物とともに37℃で96時間インキュベートした（ファルコン3072 96-ウェルミクロタイタプレート）。使用した組換えリンホカインの最終濃度は１ng/mlのIL-1α、5ng

/mlのIL-11、及び夫々10ng/mlのIL-2、IL-4、IL-6、及びIL-10であった。培養の最後の６時間中に、［メチル１’，２’－$^{3}$H］チミジン（120Ci/ミリモル；アメーシャム、アーリントンハイツ、IL）を添加した（１μCi/ウェル）。培養物をシンチレーションカウンティング（ベックマン、フラートン、CA）のために自動化96-ウェル細胞回収装置（トムテク、オレンジ、CT）で回収した。生存Ｂ細胞数の測定を細胞カウンティングにより行った。３回反復実験ウェルからの細胞を合わせ、遠心分離により回収し、50μlのBCM中で再度懸濁させ、等しい容積の0.85％のNaCl中の0.4％のトリパンブルーと混合した。生細胞をヘモサイトメーターでカウントし、反復実験ウェルに関する平均数を計算した。

長期生育実験のために、Ｂ細胞（5X10$^{2}$～1X10$^{3}$/ウェル）をＶ底96ウェルミクロタイタプレート（001-010-2701、ダイナテク・ラボラトリーズ社、チャンチリィ、VA）中で150μlのBCM中で37℃、5.5％の$CO_2$で培養した。hdmbヒト CD40リガンド及びリンホカインを含むＴ細胞上澄みを示された濃度で添加した。組換えリンホカインを上記の濃度で添加した。培養ウェルに以下に示された日に新しい培地成分を供給した。プレートを７分間にわたって1600rpmで遠心分離し（GS-6KR遠心分離機、ベックマン）、培地を吸引して約15μlを残し、新しい培地（150μl）を添加した。

上記の試薬を使用して、既に記載されたようにして（Hodgkinら,Eur.J.Immunol.24:239 (1994)）、IgMレベル及びIgGレベルを同位体特異性サンドイッチELISAにより測定した。モノクローナルヒトIgM（50ng/ml）並びにモノクローナルヒトIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4の等モル混合物（合計50ng/ml）を標準物質として使用した。培地試料（140μl/ウェル）を生育Ｂ細胞の反復実験ウェルから回収した。

抗原特異性抗体分泌細胞を検出するためのELISPOTアッセイは既に記載されたとおりのものであった（Hodgkinら,Eur.J.Immunol.24:239 (1994)、Czerkinskyら,J.Immunol.Methods 110:29 (1988)）。マルチスクリーンHA フィルター底96ウェルプレート（ミリポア、ベッドフォード、MA）を４℃で一夜にわたって５μg/mlのKLHで被覆した。生育Ｂ細胞を含むプレートを遠心分離し、細胞を新しいBCM 100μl中の再懸濁の前に２回洗浄した。夫々のウェルからの細胞を被覆マルチスクリーンプレートに二重に移し、37℃で16時間にわたって100μlのBCM/ウェル中でインキュベートした。既に記載されたようにして（Hodgkinら,Eur.J.Immunol.24:239 (1994)）。ビオチニル化された抗マウスIgM試薬または抗マウスIgG試薬を使用してプレートを展開した。反応を停止した後、ウェルを暗所で数日乾燥させ、特定のIgM抗体またはIgG抗体に相当するスポットを解剖顕微鏡で教えた。

結果

昆虫細胞膜中のヒトCD40リガンドは有効なヒトＢ細胞増殖を刺激する。

SF9昆虫細胞中のヒトCD40リガンドの最適の発現を、SF9細胞を種々の時間にわたって組換えバキュロウイルスで感染させ、発現レベルをフローサイトメトリーにより定量することにより測定した。ヒトCD40リガンドの発現は感染の48時間後に最高であることがわかった。濃縮プラズマ膜フラクションを48時間感染されたSF9細胞から調製し、その後の実験（hdmbヒトCD40リガンド）に使用した。精製ヒトＢ細胞はhdmbヒトCD40リガンドに有効に応答して増殖し、その応答は組換えヒトIL-1a、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、及びIL-11の混合物を入れることにより増進された（図11）。hdmbヒトCD40リガンドの不在下では、ヒトＢ細胞は分裂しなかった（図11）。

ヒトＢ細胞増殖及び分化のクローン頻度

限界希釈で塗布された応答Ｂ細胞の頻度分析は、14日後に、約1/2.5のＢ細胞がhdmbヒトCD40リガンド及び先に使用した組換えヒトリンホカインの混合物に応答して増殖することを示した（図12A）。多くのＢ細胞クローンは約20～50の細胞を含んでいた。限界希釈からのＢ細胞分化培養上澄みの頻度を得るために、培養物を11日目に回収し、ヒトIgM及びIgGの存在についてELISAによりスクリーニングした。約1/70のＢ細胞がhdmbヒトCD40リガンド及び組換えヒトリンホカインに応答して分化しIgMまたはIgGを分泌した（図12B）。成長の頻度と一緒に、これは成長したＢ細胞の約1/28が分化して抗体を分泌したことを意味する。

免疫グロブリン分泌へのヒトＢ細胞分化の最適化

hdmbヒトCD40リガンドに応答するヒトＢ細胞のクローン成長の頻度はマウス脾臓Ｂ細胞の頻度と非常に似ているので、２種のＢ細胞の間の免疫グロブリン分泌の異なる頻度の可能性はＢ細胞源（末梢血対脾臓）または必要とされるリンホカイン（組換えリンホカイン対活性化ヘルパーＴ細胞からの上澄み）であった。ヒトＢ細胞分化に必要とされるリンホカインを最適化するために、上澄みを48時間にわたって固定化抗CD3またはPHA及びPMAのパルスで活性化された末梢血Ｔ細胞から調製した。ヒトＴ細胞上澄みを、hdmbヒトCD40リガンドにより刺激されたヒトＢ細胞の分化を支持する能力について試験した。上澄みを付加的な組換えヒトリンホカインの存在下または不在下で試験した。PHA-及びPMA-活性化Ｔ細胞により分泌されたリンホカインはhdmbヒトCD40リガンド刺激Ｂ細胞の分化を支持せず、しかも組換えヒトIL-2、IL-4、IL-6、及びIL-10の組み合わせに添加された時に抑制性であった（図13）。対照的に、抗CD3活性化Ｔ細胞により分泌されたリンホカインhdmbヒトCD40リガンド刺激Ｂ細胞並びに組換えリンホカインの分化を支持した。僅かに低いレベルのIgM及び高レベルのIgGが、hdmbヒトCD40リガンド及び組換えIL-2、IL-4、IL-6、及びIL-10で刺激された細胞に対し、hdmbヒトCD40リガンド及び抗CD3上澄みにより刺激されたＢ細胞により産生された（図13）。hdmbヒトCD40リガンド刺激ヒトＢ細胞により産生されたIGM及びIgGの量は抗CD3活性化Ｔ細胞により分泌されたリンホカインの次第に増加する量につれて投薬量依存様式で増加した（図14）。更に、IgM及びIgG産生はリンホカインの存在に依存することが明らかであり、hdmbヒトCD40リガンド単独の存在下では検出できなかった。図13及び14に示された実験で得られたヒト免疫グロブリン産生のレベルは、類似条件下で刺激されたマウス脾臓Ｂ細胞により産生されたレベルより約10倍低かったが、ヒトＢ細胞の20～100倍多い数により分泌されると文献に報告されたヒト免疫グロブリンのレベルに似ている（Roussetら,J.Exp.Med. 173:705(1991)、Armitageら,J.Immunol. 150:3671 (1993)、Nonoyamaら,J.Exp.Med. 178:1097 (1993)）。

未感作集団中の抗原特異性Ｂ細胞分化の頻度

この研究の目標は抗原特異性抗体のその後の単離のために抗原特異性Ｂ細胞クローンを増加することである。細胞の未感作集団中の抗原特異性Ｂ細胞の頻度を分析するために、マウス脾臓Ｂ細胞を最適以下の投薬量のhdmbマウスCD40リガンド及びD10上澄みの存在下で限界希釈で塗布し、KLH特異性抗体分泌細胞の頻度を14日後に測定した。約2500/1の細胞がKLH特異性IgMを分泌し、1/10,000の細胞がKLH特異性IgGを分泌した（図15）。これらの頻度は、KLH特異性抗体について1000の細胞/ウェルで塗布されたランダムウェルからの培養上澄みを分析することにより予想されたとおりである（1/8陽性）。

この知見は、hdmbヒトCD40リガンド及びリンホカインに応答するＢ細胞の高頻度が与えられれば、抗原特異性応答細胞を$1X10^{6}$程度に少ない細胞を含むＢ細胞製剤中で妥当な頻度で同定することができることを実証する。更に、抗原特異性抗体分泌Ｂ細胞を同定するのに使用したELISPOT方法を改良して抗原被覆ウェルでのパンニングにより抗原特異性Ｂ細胞を単離することができる。この様式において、増加されたＢ細胞は、それらが免疫グロブリン分泌に分化したか否かにかかわらず、それらの表面免疫グロブリンの特異性のために回収し得る。

【図１Ａ】
マウス

```
CTTTCAGTCA GC ATG ATA GAA ACA TAC AGC CAA CCT TCC CCC AGA TCC
                Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser

GTG GCA ACT GGA CTT CCA GCG AGC ATG AAG ATT TTT ATG TAT TTA CTT
Val Ala Thr Gly Leu Pro Ala Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu

ACT GTT TTC CTT ATC ACC CAA ATG ATT GGA TCT GTG CTT TTT GCT GTG
Thr Val Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Val Leu Phe Ala Val
                TM

TAT CTT CAT AGA AGA TTG GAT AAG GTC GAA GAG GAA GTA AAC CTT CAT
Tyr Leu His Arg Arg Leu Asp Lys Val Glu Glu Glu Val Asn Leu His

GAA GAT TTT GTA TTC ATA AAA AAG CTA AAG AGA TGC AAC AAA GGA GAA
Glu Asp Phe Val Phe Ile Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asn Lys Gly Glu

GGA TCT TTA TCC TTG CTG AAC TGT GAG GAG ATG AGA AGG CAA TTT GAA
Gly Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Met Arg Arg Gln Phe Glu

GAC CTT GTC AAG GAT ATA ACG TTA AAC AAA GAA GAG AAA AAA GAA AAC
Asp Leu Val Lys Asp Ile Thr Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Glu Asn

AGC TTT GAA ATG CAA AGA GGT GAT GAG GAT CCT CAA ATT GCA GCA CAC
Ser Phe Glu Met Gln Arg Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His

GTT GTA AGC GAA GCC AAC AGT AAT GCA GCA TCC GTT CTA CAG TGG GCC
Val Val Ser Glu Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala

AAG AAA GGA TAT TAT ACC ATG AAA AGC AAC TTG GTA ATG CTT GAA AAT
Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn

GGG AAA CAG CTG ACG GTT AAA AGA GAA GGA CTC TAT TAT GTC TAC ACT
Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr

CAA GTC ACC TTC TGC TCT AAT CGG GAG CCT TCG AGT CAA CGC CCA TTC
Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe

ATC GTC GGC CTC TGG CTG AAG CCC AGC ATT GGA TCT GAG AGA ATC TTA
Ile Val Gly Leu Trp Leu Lys Pro Ser Ile Gly Ser Glu Arg Ile Leu
```

FIG 1A

【図１Ｂ】

```
CTC AAG GCG GCA AAT ACC CAC AGT TCC TCC CAG CTT TGC GAG CAG CAG
Leu Lys Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln

TCT GTT CAC TTG GGC GGA GTG TTT GAA TTA CAA GCT GGT GCT TCT GTG
Ser Val His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val

TTT GTC AAC GTG ACT GAA GCA AGC CAA GTG ATC CAC AGA GTT GGC TTC
Phe Val Asn Val Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe
                                  ---CHO-----

TCA TCT TTT GGC TTA CTC AAA CTC TGAACAGTGC GCTGTCCTAG GCTGCA      818
Ser Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu END                               260
```

ヒト

```
CCATTTCAAC TTTAACACAG C ATG ATC GAA ACA TAC AAC CAA ACT TCT CCC
                       Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro
                                  ---CHO-----

CGA TCT GCG GCC ACT GGA CTG CCC ATC AGC ATG AAA ATT TTT ATG TAT
Arg Ser Ala Ala Thr Gly Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr

TTA CTT ACT GTT TTT CTT ATC ACC CAG ATG ATT GGG TCA GCA CTT TTT
Leu Leu Thr Val Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe
                TM
GCT GTG TAT CTT CAT AGA AGG TTG GAC AAG ATA GAA GAT GAA AGG AAT
Ala Val Tyr Leu His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn

CTT CAT GAA GAT TTT GTA TTC ATG AAA ACG ATA CAG AGA TGC AAC ACA
Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr

GGA GAA AGA TCC TTA TCC TTA CTG AAC TGT GAG GAG ATT AAA AGC CAG
Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln

TTT GAA GGC TTT GTG AAG GAT ATA ATG TTA AAC AAA GAG GAG ACG AAG
Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys

AAA GAA AAC AGC TTT GAA ATG CAA AAA GGT GAT CAG AAT CCT CAA ATT
Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile

GCG GCA CAT GTC ATA AGT GAG GCC AGC AGT AAA ACA ACA TCT GTG TTA
Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu
```

FIG.1B

【図１Ｃ】

```
CAG TGG GCT GAA AAA GGA TAC TAC ACC ATG AGC AAC AAC TTG GTA ACC
Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr

CTG GAA AAT GGG AAA CAG CTG ACC GTT AAA AGA CAA GGA CTC TAT TAT
Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr

ATC TAT GCC CAA GTC ACC TTC TGT TCC AAT CGG GAA GCT TCG AGT CAA
Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln

GCT CCA TTT ATA GCC AGC CTC TGC CTA AAG TCC CCC GGT AGA TTC GAG
Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu

AGA ATC TTA CTC AGA GCT GCA AAT ACC CAC AGT TCC GCC AAA CCT TGC
Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys

GGG CAA CAA TCC ATT CAC TTG GGA GGA GTA TTT GAA TTG CAA CCA GGT
Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly

GCT TCG GTG TTT GTC AAT GTG ACT GAT CCA AGC CAA GTG AGC CAT GGC
Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly
                    --- CHO ---
ACT GGC TTC ACG TCC TTT GGC TTA CTC AAA CTC TGAACAGTGT CACCTTGCAG
Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu END

GCTGTGGTGG AGCTGA
```

FIG. 1C

【図２Ａ】

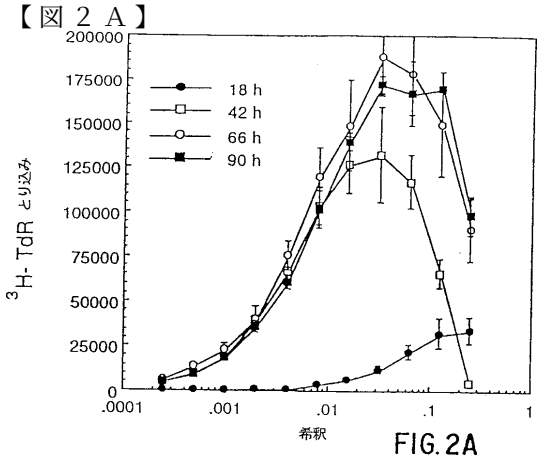


FIG.2A

【図２Ｂ】

261
840

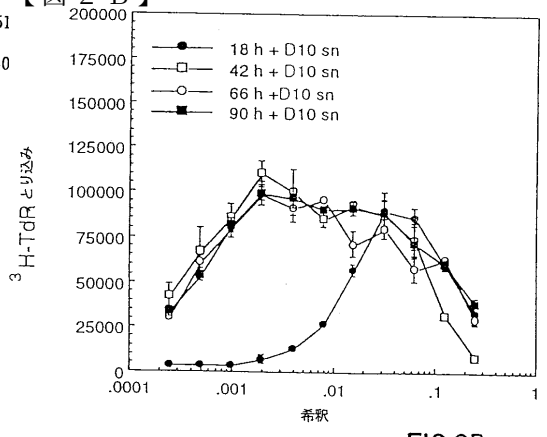


FIG.2B

【図３】

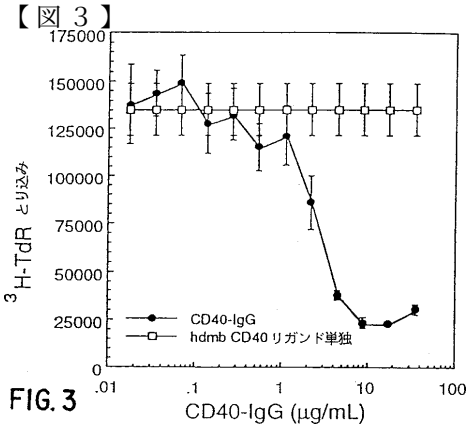


FIG. 3

【図４】

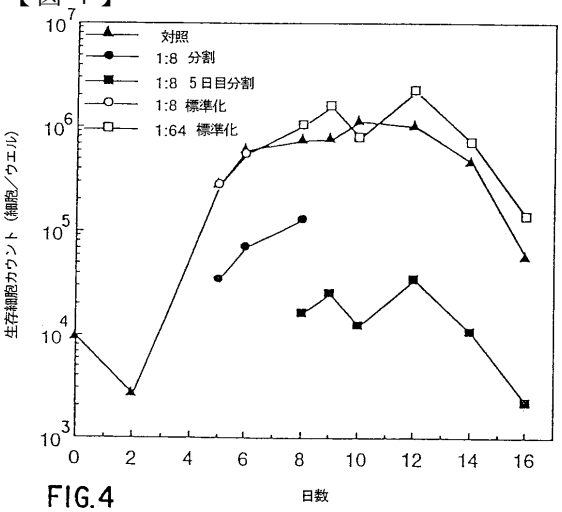


FIG.4

【図５】

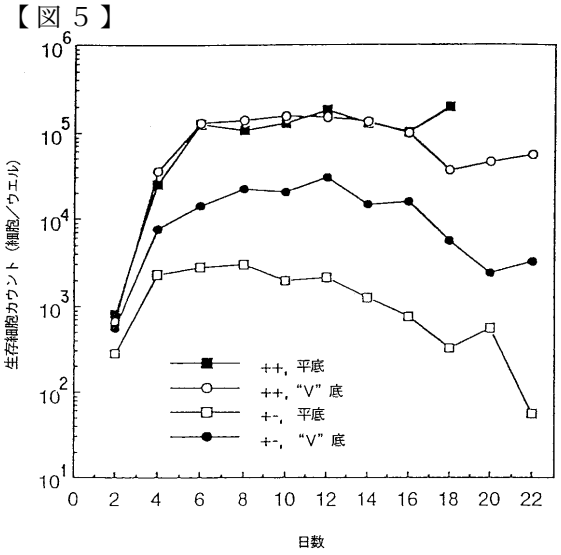


FIG.5

【図６Ａ】

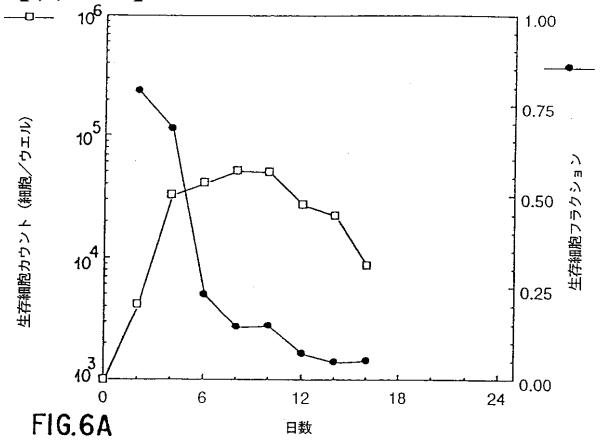


FIG.6A

【図６Ｂ】

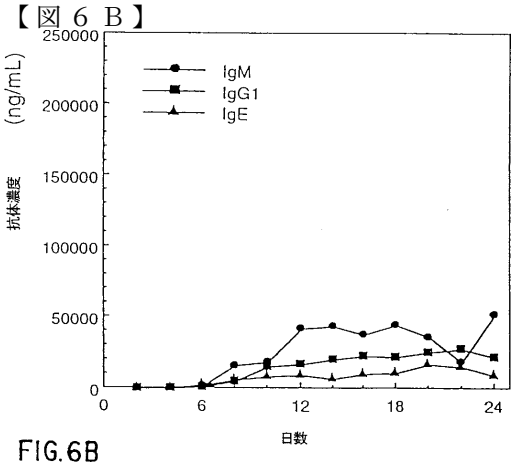


FIG.6B

【図７Ａ】

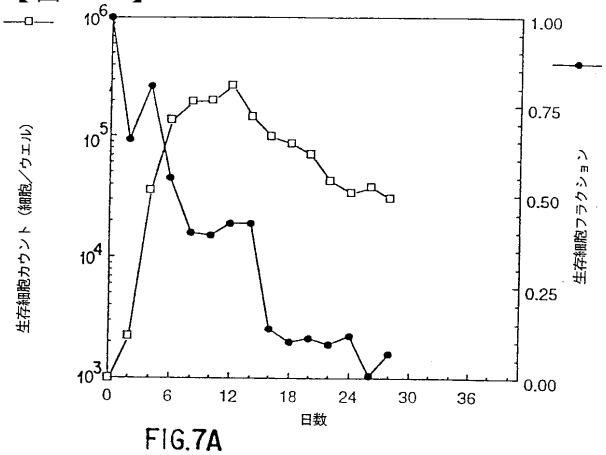


FIG.7A

【図７Ｂ】

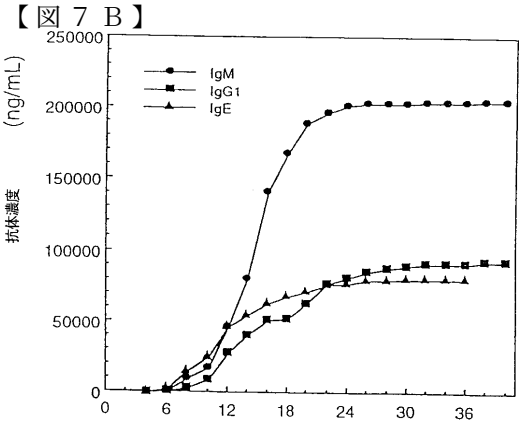


FIG.7B

【図８Ａ】

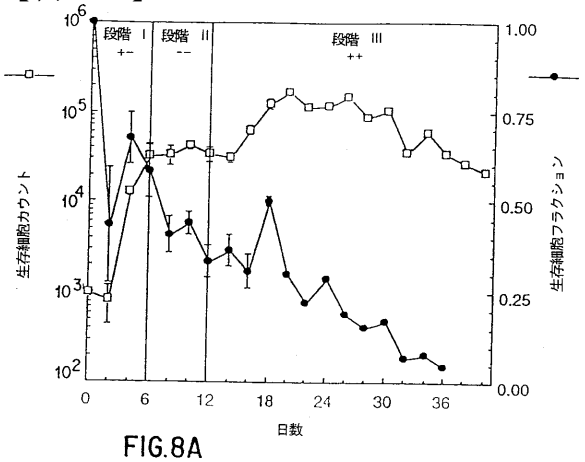


FIG.8A

【図８Ｂ】

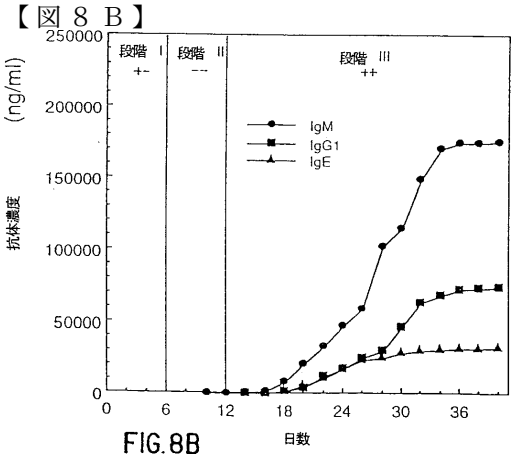


FIG.8B

【図９】

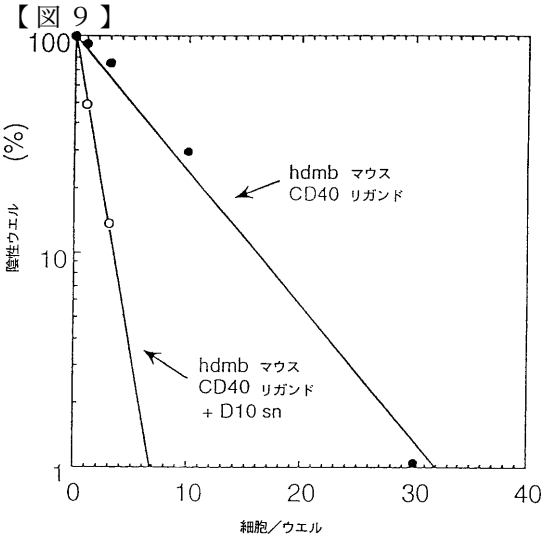


FIG.9

【図１０】

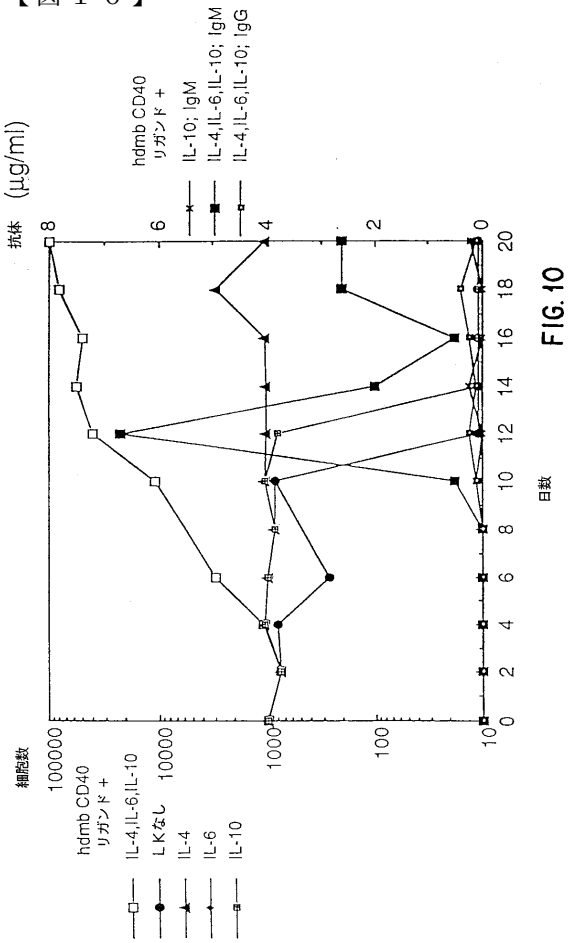


FIG. 10

【図１１】

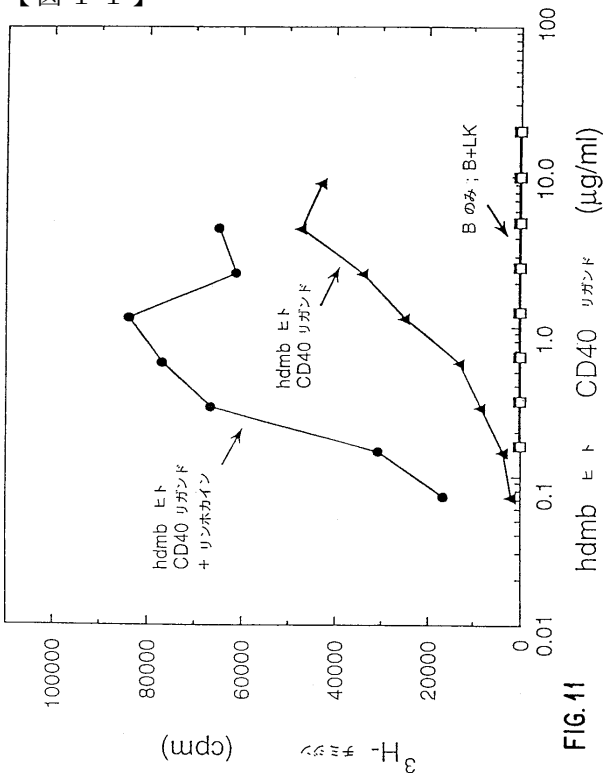


FIG. 11

【図１２Ａ】

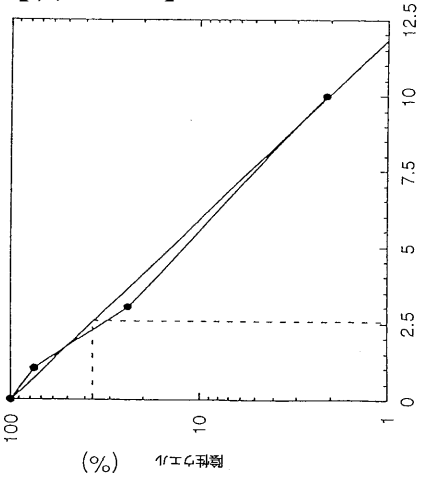


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

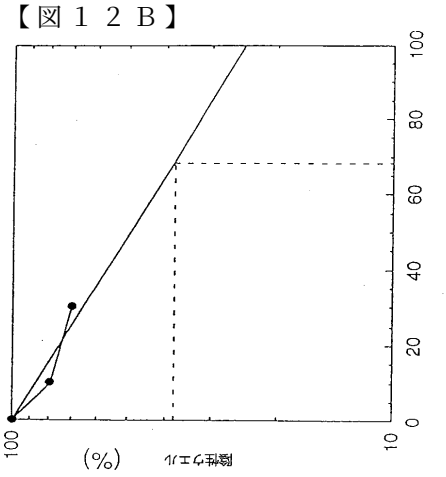


FIG. 12B

【図１３】

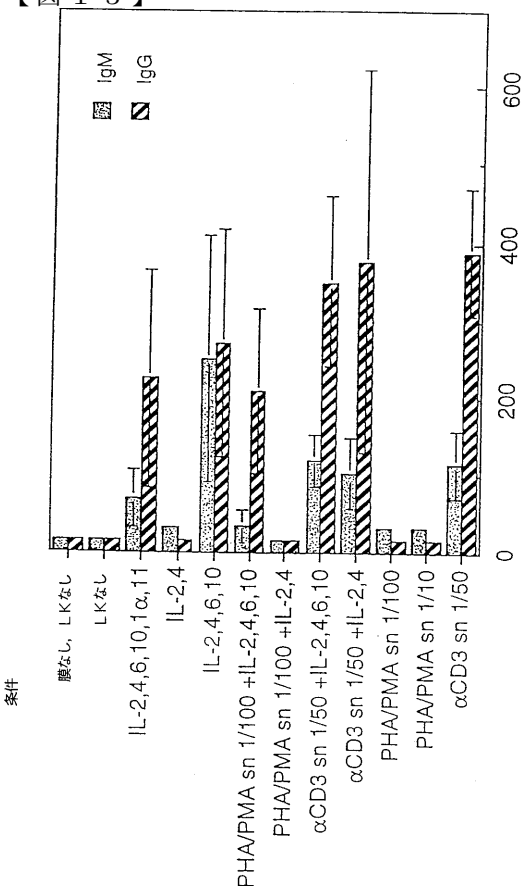


FIG. 13

【図１４】

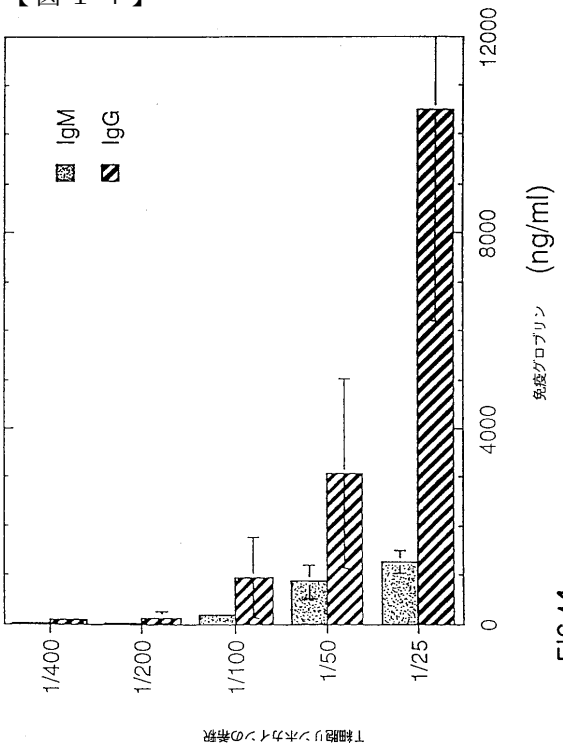


FIG. 14

【図１５】

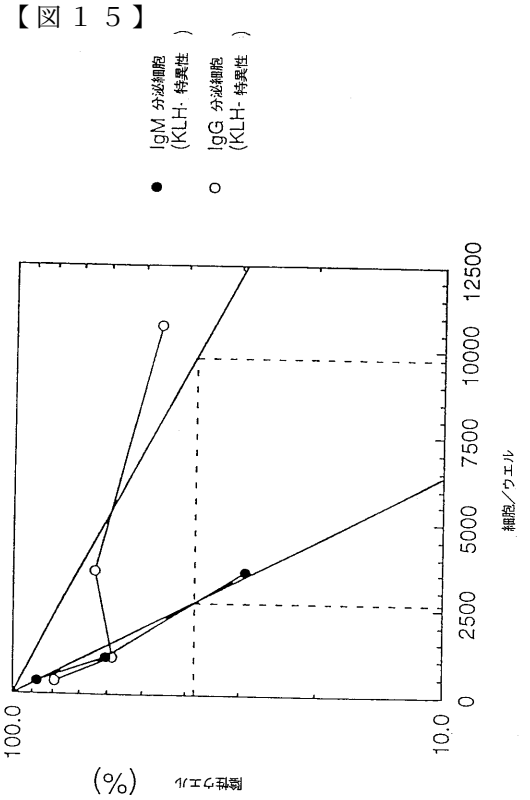


FIG. 15

フロントページの続き

(74)代理人
弁理士 今城 俊夫
(74)代理人
弁理士 小川 信夫
(74)代理人
弁理士 村社 厚夫
(74)代理人
弁理士 箱田 篤
(72)発明者 ケーリー マリリン
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６８１０－８３５８ ダンバリー シエラ ウェイ ９
(72)発明者 キャッスル ブライアン イー
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６８１２－３２２２ ニュー フェアフィールド ヒルサイド ドライヴ ２５

審査官 田村 明照

(56)参考文献 Journal of Immunology, Vol.150, pp.3671-3680 (1993)
Eur.J.Immunol., Vol.23, pp.1044-1049 (1993)
Seminars in Immunology, Vol.5, pp.401-412 (1993)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.87, pp.3942-3946 (1990)

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 5/00
C12N 15/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed