

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4354276号
(P4354276)

(45) 発行日 平成21年10月28日(2009.10.28)

(24) 登録日 平成21年8月7日(2009.8.7)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/01	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 X
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 Y

請求項の数 23 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-552965 (P2003-552965)	(73) 特許権者	504288764
(86) (22) 出願日	平成14年12月17日(2002.12.17)		ミクシス フランス ソシエテ アノニム
(65) 公表番号	特表2005-527192 (P2005-527192A)		フランス国 エフ-75014 パリ、ブ
(43) 公表日	平成17年9月15日(2005.9.15)		ールヴァード ド モンパルナス、166
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/004375	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02003/052098		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成15年6月26日(2003.6.26)	(74) 代理人	100084146
審査請求日	平成17年11月8日(2005.11.8)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	01/16352	(74) 代理人	100116311
(32) 優先日	平成13年12月18日(2001.12.18)		弁理士 元山 忠行
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	02/10078		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成14年8月8日(2002.8.8)	(72) 発明者	レノー、クロード-アグネス
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		フランス、エフ-75015 パリ、リュ
			・ドゥ・ボジラル、156

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体細胞突然変異の制御誘発方法およびプロテオミクスにおけるその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インビトロの体細胞突然変異の誘発方法において、(1) Bリンパ腫細胞である突然変異させる細胞へ、前記細胞に適した培養条件下および培地中で、抗-IgMおよび抗-CD19抗体の組合わせ、抗-IgMおよび抗-CD21抗体の組合わせ、および抗-IgM、抗-CD19および抗-CD21抗体の組合わせから選択された、抗-IgM抗体を含んでいる抗体の少なくとも1つの組合わせの付加を含むこと、一方で(2)前記抗-IgM抗体が、ピオチン化され、支持体に共役されたストレプトアビジンによる特異的凝集に付されることを特徴とする、方法。

【請求項2】

前記支持体が、完全または一部、磁気球から構成されていることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

突然変異させる細胞として、バーキットBL2リンパ腫を利用することを特徴とする、請求項1~2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

DNAポリメラーゼイオタ(ボル・イオタ)量を調節して、前記体細胞突然変異を制御することを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

予め不活性化されたDNAポリメラーゼイオタ(ボル・イオタ)を、CMVプロモータ

ーの制御下に、完全ポル・イオタ cDNA の発現を生じる p I R E S ベクターのトランスフェクションによって修復することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

タンパク質および/または遺伝子レベルにおける超変異誘発のインビトロテストを実施するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法の使用。

【請求項 7】

バーキットリンパ腫細胞へ適用されることを特徴とする、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

バーキット B L 2 リンパ腫への突然変異の誘発のためであることを特徴とする、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

G 0 / G 1 期にあるバーキット B L 2 リンパ腫への突然変異の誘発を目的とすることを特徴とする、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

そのほかに、特に B リンパ腫、とりわけバーキット B L 2 リンパ腫への、タンパク質および/または遺伝子レベルでの超変異誘発のインビトロテストにおける超変異誘発の調節のための、DNA ポリメラーゼイオタ (ポル・イオタ) の使用を含むことを特徴とする、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 11】

1 ~ 数個の天然アミノ酸を置換した改良 DNA ポリメラーゼイオタ (ポル・イオタ) を用いることを特徴とする、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

ポル・イオタの前記改良は、そこで少なくとも 1 つのアミノ酸を置換するための環状 I I 領域の無作為突然変異生成によって実施されることを特徴とする、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

体細胞突然変異の誘発用キットにおいて、抗 - I g M および抗 - C D 1 9 抗体の組み合わせ、抗 - I g M および抗 - C D 2 1 抗体の組み合わせ、および抗 - I g M、抗 - C D 1 9、および抗 - C D 2 1 抗体の組み合わせから選択された、抗 - I g M 抗体を含んでいる抗体の少なくとも 1 つの組み合わせを含んでいる体細胞突然変異を誘発するための手段を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法に使用するためのキット。

【請求項 14】

前記抗 - I g M 抗体がビオチン化され、支持体、特に磁気球に共役されたストレプトアビジンによって特異的凝集に付されていることを特徴とする、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 15】

ポル・イオタ遺伝子の不活性化のため、および/またはポル・イオタ cDNA の発現によるポル・イオタ遺伝子の修復のための手段をさらに含むことを特徴とする、請求項 13 または 14 に記載のキット。

【請求項 16】

1 ~ 数個の天然アミノ酸を置換した改良 DNA ポリメラーゼイオタ (ポル・イオタ) を含むことを特徴とする、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

前記 DNA ポリメラーゼイオタ (ポル・イオタ) が、そこで少なくとも 1 つのアミノ酸を置換するための環状 I I 領域の無作為突然変異生成によって改良されたポル・イオタ酵素であることを特徴とする、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するための手段を含むことを特徴とする、体細胞突然変異の誘発用キット。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

特にタンパク質の分析による、ムタソームの成分を定性的および/または定量的に同定するための、請求項 13 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 20】

特に、誘発の間に出現するムタソームの成分、とりわけタンパク質成分の同定、単離、および分析による、誘発された翻訳後修飾の同定を含むことを特徴とする、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

突然変異を誘発することが望まれる少なくとも 1 つの遺伝子、特に目的のタンパク質をコードする遺伝子の供給を含み、一方、前記遺伝子は、I g G の重鎖または軽鎖をコードする遺伝子のプロモーターおよび活性化因子(エンハンサー)を含んでいるカセット中に含まれていること、および前記遺伝子がリンパ腫、特にバーキット B L 2 リンパ腫の細胞中にトランスフェクションされることを特徴とする、請求項 19 に記載の使用。

10

【請求項 22】

特定の配列を突然変異させるために、I g のプロモーターおよび活性化因子によって突然変異させる配列を、好ましくは突然変異カセット中にはめこむことを特徴とする、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 23】

特定の配列を突然変異させるために、2 つの転位された座の V 遺伝子の全部または一部の代わりに、免疫グロブリンの座へ相同的組換えによってこの配列を挿入することを特徴とする、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物学に関する。より具体的には、生物界に特異的な指向性突然変異による適応の分野に関する。より詳しくは本発明は、インビトロ体細胞突然変異の誘発、ならびにこのような技術の改良によって今後可能にされる用途に関する。

【0002】

特定の実施形態において、本発明は、バーキット B L 2 リンパ腫への突然変異の誘発に関する。

30

【背景技術】

【0003】

単純化のために、以下ではバーキット B L 2 リンパ腫が参照される。しかしながらこのことは、該技術および特許請求された発明の概念の開示を容易にすることのみが目的であって、本発明をこの点に関して限定するものではないと強調する必要がある。

【0004】

I B L 2 型バーキットリンパ腫の細胞系統は、胚中心 B 細胞の特徴を有する。この細胞系統は、胚中心の胚中心細胞の最も近い不死化された対応部分である。その胚中心起源は、バーキットリンパ腫の免疫グロブリンの V_H 遺伝子中の体細胞突然変異の存在によって確認された。

40

【0005】

適切な培養物中の B L 2 細胞の均質性および安定性が強調された(ドネプー(Denepeux), Sら、Immunity、第6巻、35~46ページ、1997年)。胚中心細胞の表現型に応じて、B L 2 は、複数の体細胞突然変異段階を受けた胚中心の胚中心細胞の形質転換の結果生じると考えることが提案された。

【0006】

さらには、B 細胞が胚中心細胞の段階で超変異を受けると考えられている(パスキュアル(Pascual), Vら、J. Exp. Med. 180、329~339ページ(1994年))。

【0007】

50

免疫グロブリンの超変異現象は、T依存型抗原によるB細胞の刺激後、胚中心において発生する。

【0008】

特にドネブー、Sら、(上記)は、リンパ腫細胞、特にBL2細胞は、1週間の培養後、表面受容体の凝集およびTヘルパー細胞または増殖性細胞との共培養後に、超変異プロセスを開始させることを論証した。この論文において、突然変異の頻度を増すことができるのは、BL2細胞の反復活性化によってであると結論された。同様にこれらの研究者らは、BL2ヘインビトロで誘発された突然変異は、IgMの定常部に影響を与えず、抗原による指向性選択を出現させないことも強調した。

【0009】

同様にイエラムス(Yelamos)、Jら、Nature、第376巻、225~229ページ(1995年)は、免疫グロブリンのV遺伝子のフラグメントは、超変異にとって不可欠なものでなく、人工的突然変異基質の構成は単純化されていることがあることを証明することを目的とする実験について記載している。

【0010】

これらの開発にもかかわらず、これらの現象を調査するための有効な手段、および特に診断および/または調査のため、ならびに満足すべき実用性および迅速性の条件下における腫瘍プロセスの処理のために、それから実際的な結果を引き出すための有効な手段は現在まで入手されていない。

【0011】

したがって迅速かつ信頼しうる体細胞超変異テストを実施することができる手段へのニーズがあった。より詳しくは、V遺伝子に適用しうるが、同様に特にヒトにおける腫瘍プロセスに含まれる可能性のある他の遺伝子、例えばBcl-6およびFasリガンド(FasL)遺伝子にも適用しうる体細胞突然変異の誘発モデルを入手しうる手段へのニーズが存在した。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

ところで、リンパ腫細胞、特にBL2細胞は、先行技術のデータとは逆に、加速された超変異プロセスを開始させることが今や発見された。以前のデータによれば、匹敵するプロセスは、利用するには時間がかかり、面倒なものであった。

【0013】

より正確には、モデルとしてBL2細胞を用いた場合、異例の迅速性および効率性の条件下で、前記細胞に適した培養条件および媒質中で、突然変異させる細胞に、抗CD19、抗CD21、および抗-IgM抗体の少なくとも三成分の組合わせを付加し、適切な細胞中における体細胞突然変異の誘発をインビトロで実施しうることで、今や意外にも発見された。

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって本発明は、インビトロまたは生体外での体細胞突然変異の誘発方法であって、(1)突然変異させる細胞へ、前記細胞に適した培養条件下および培地中で、抗-CD19、抗-CD21、および抗-IgM抗体の少なくとも1つの三成分の組合わせの付加を含み、一方で(2)前記抗-IgM抗体がビオチン化され、支持体、有利には全部または一部が磁気球から構成された支持体に共役されたストレプトアビジンによる特異的凝集に付される方法を、第一の目的とする。

【0015】

1つの特徴によれば、本発明による体細胞突然変異の誘発は、短期間、実際には1時間30分(1時間半)程度の期間にわたって実施される。

【0016】

有利な特徴によれば、本発明による方法は、もう1つの細胞型の細胞、特にT細胞との

10

20

30

40

50

共培養の利用を含んでいない。

【0017】

実際、支持体、例えば好ましくは磁気球に共役されたストレプトアビジンによってビオチン化された抗-IgM抗体の特異的凝集、ならびに抗-CD19、抗-CD21、および抗-IgMの少なくとも3つの抗体の組合わせが実施される、本発明によって推奨される方法では、これらの抗体の存在下、先行技術によるインビトロ突然変異の獲得に対して示されている期間とは比べものにならないほど非常に短い時間で、培養された細胞の迅速な突然変異をインビトロで入手することができることが確認された。

【0018】

1つの変形実施態様によれば、本発明による方法は、抗-IgMおよび抗-CD19抗体の組合わせ、抗-IgMおよび抗-CD21抗体の組合わせ、およびあらゆる割合におけるこれらの混合物から選択される抗-IgM抗体の組合わせを含んでいてもよい。

10

【0019】

他の特徴によれば、本発明による方法は、パーキットBL2リンパ腫への突然変異の誘発のために利用される。

【0020】

本発明はまた、タンパク質および/または遺伝子レベルでの超変異誘発のインビトロテストの実施のための体細胞突然変異のこの誘発方法の使用も目的とする。

【0021】

1つの実施態様によれば、この使用は、Bリンパ腫、特にヒトBリンパ腫、より詳しくはパーキットBL2リンパ腫への突然変異の誘発に適用される。

20

【0022】

特に好ましい実施態様によれば、本発明によるシステムは、G0/G1期にあるパーキットBL2リンパ腫への突然変異の誘発に用いられる。

【0023】

本発明はまた、体細胞突然変異の誘発用キットであって、上に規定されている体細胞突然変異の誘発系を含むことを特徴とするキットも目的とする。

【0024】

本発明の他の目的は、特にタンパク質の分析による、ムタソームの成分の定性的および/または定量的同定のためのこのキットの使用である。

30

【0025】

1つの実施形態において、本発明によるこのキットの使用は、同定の間に出現するムタソームの成分、特にタンパク質成分の同定、単離、および分析による、誘発された翻訳後修飾の同定を含んでいる。

【0026】

好ましい実施特徴によれば、この使用は、突然変異を誘発することが望まれる少なくとも1つの遺伝子、特に該タンパク質についてコードする遺伝子の供給を含み、一方で、前記遺伝子は、IgGの重鎖または軽鎖についてコードする遺伝子のプロモーターおよび活性化因子(エンハンサー)を含んでいるカセット中に含まれ、かつ前記遺伝子が、リンパ腫、特にパーキットBL2リンパ腫の細胞中にトランスフェクションされる。

40

【0027】

有利な実施形態によれば、なんらかの配列を突然変異させるために、Igのプロモーターおよび活性化因子によって突然変異させる配列を好ましくは突然変異カセット中にはめこむ。

【0028】

本発明は、以下において実施例を参照して記載されるが、実施例は、純粋に例証的なものであり、本発明の実施のための実際的な指示を当業者にもたらすことを目的とする。これらの指示および当業者の固有の知識に基づき、このようにして当業者は、本発明の枠から逸脱することなく、類似または同等のテストシステム、および本明細書に記載されている使用と異なるか、類似であるか、またはそうではない具体的な使用を考えることができ

50

る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

BL2細胞へのインビトロ体細胞突然変異の誘発のために、次のように実施した。

【0030】

BL2細胞の培養条件

BL2細胞を供給し、37で24時間、5%のCO₂で、1mlあたり10⁵細胞の割合で完全培地中にこれらを維持した。

【0031】

培養培地は、10%のFCSで補足されたRPMI1640培地、ならびに100U/ml(単位/ml)のペニシリン、および100μg/mlのストレプトマイシンであった。

10

【0032】

刺激

約1,500回転/分で7分間、4~10の温度での遠心分離によって、血清のあらゆる痕跡を除去するために、RPMI培地中でこれらの細胞を洗浄した。

【0033】

BL2細胞を、500μlに対して10⁶細胞の割合でRPMI培地中に再び取った。

【0034】

15mlのフラスコにおいて、10⁶細胞を氷中に導入し、次のものを添加した。

20

【0035】

・FITC(イムノテック(Immunotech)によって供給されたもの)に共役された抗-CD19を20μl。

【0036】

・PE(ベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson)によって供給されたもの)に共役された抗-CD21を20μl。

【0037】

ビオチン(イムノテックによって供給されたもの)に共役された抗-IgMを4μl。

【0038】

均質混合物が得られるまで攪拌した後、これを氷上に載せ、約20分間放置した。

30

【0039】

ついでこの混合物の細胞を、RPMI培地10ml中で(4で)洗浄し、ついで1,500回転/分で7分間遠心分離に付した。このように洗浄された細胞を、エッペンドルフチューブ(1.5ml)において、500μlのRPMI中に再び取り、ストレプトアビジンが共役されている、ディナル(Dynal)という名称で販売されている磁気球20μlを添加した。このチューブに、約4で15分間、ホイール上の回転(retournement sur une roue)を受けさせた。

【0040】

これらの細胞、およびこれらの細胞が固定されている球を、ADCM(フランス国リヨンのサントル・ド・トランスヒュジオン(Centre de transfusion)から入手したもの)が添加された完全培地約4μl中に再び取り、ついで、このように処理された細胞を、細胞培養用の24ウエルを含んでいる滴定プレート上に分配した(1ウエルあたり約2×10⁵細胞の割合)。

40

【0041】

これらの細胞を、37で約1時間30分インキュベートさせておいた。次いで1つのウエルの内容物全部を1.5mlのエッペンドルフチューブに再び取り、2,000回転/分で10分間遠心分離した。

【0042】

遠心分離生成物を再び取って、上澄み液を除去し、遠心分離残滓を液体窒素中に沈めた。

50

【 0 0 4 3 】

当業者によって一般に実施されている既知の従来の分子技術によって、DNA中で突然変異をテストした。

【 0 0 4 4 】

得られた結果の分析、およびV_Hの様々な遺伝子に対して平行して行なわれた調査、および/またはBL2以外の細胞を用いた調査の結果の分析は、表面受容体群の刺激によって転位されたV_H遺伝子へ、このようにしてBL2細胞中のインビトロ突然変異を誘発させることができることを証明している。

【 0 0 4 5 】

変形例として、Ig配列を、例えば原核生物配列、例えばネオマイシンへの耐性遺伝子と置換することができ、BL2を用いて同様な突然変異を得ることができる。

10

【 0 0 4 6 】

したがって本発明によって、次のことを明らかにすることができた：

・突然変異は、T細胞との共培養の不存在下に、抗原への受容体および補受容体群による刺激の約1時間30分後に誘発することができる。

【 0 0 4 7 】

・平均してこれらの細胞の約1/3が、超変異のメカニズムを受ける。

【 0 0 4 8 】

・本発明によって誘発された突然変異は、Dアクチノマイシンの存在下に発生し、これは転写を完全に阻害する。

20

【 0 0 4 9 】

・突然変異は、これらの細胞がヒドロキシウレアによってG0/G1に維持される時に誘発される。

【 0 0 5 0 】

・突然変異はまた、これらの細胞がエルトリエーションによってG0/G1期に調製される時に約30分後に誘発される。

【 0 0 5 1 】

これらの結果は、先行技術の教示とは矛盾し、これらは、超変異プロセスが転写および姉妹染色分体の不存在下に発生しうることを証明している。

【 0 0 5 2 】

実際、このようにしてタンパク質の喪失および出現を二次元でゲルにおいて調べることができるが、同様にこれらの翻訳後修飾も調べることができる。

30

【 0 0 5 3 】

そのほかに、本発明にしたがってこのように実施された体細胞突然変異は、適切な細胞、例えばパーキットBL2リンパ腫中に、表面受容体の刺激によって再誘発することができた。この型の刺激は、生体内でも同様に生じる可能性が高い。

【 0 0 5 4 】

本発明による方法および手段によって、根本的により高性能で確実な条件下に、遺伝子、特に免疫グロブリンの遺伝子の超変異現象の決定の調査およびテストに取り掛かることができる。

40

【 0 0 5 5 】

本発明による手段の利用によって目指すことができるあるいくつかの開発およびあるいくつかの用途が、以下に要約される。この列挙は、限定的なものではなく、ほかの用途も同様に考えることができることは明らかである。

【 0 0 5 6 】

例えば、現在まで実施することができなかった条件下で、胚中心におけるB細胞の悪性形質転換における体細胞超変異の役割および重要性がどんなものであるかを、本発明にしたがって決定しうることは重要である。

【 0 0 5 7 】

本発明によって、体細胞突然変異の誘発の単純性および迅速性のユニークなモデルを入

50

手し、超変異プロセスが転写および姉妹染色分体の不存在下に発生しうることを証明することができた。

【0058】

同様に本発明によって、特にヒトBリンパ腫に適用しうる単純なテストを入手しうることを目的として、タンパク質および遺伝子レベルで超変異サイン(signature)の入手のための手段も得ることができる。

【0059】

今日まで解決されていないほかの問題は特に、超変異の分子メカニズムの問題、および高度に突然変異誘発性のポリメラーゼの場合による存在の問題、ならびに存在する補因子の問題である。

10

【0060】

実際、補因子、すなわち免疫応答の正確な段階で転位された V_H および V_L 遺伝子に対する超変異プロセスの標的設定を可能にする μ タソームの成分は知られていないことを思い出す必要がある。本発明によるテストシステムによって、このような超変異プロセスの動力学を追跡するため、および当業者が本発明の記載によって明らかになった知識、および当業者の固有の知識に基づいて、特にヒトBリンパ腫に適用しうる、迅速で経済的なテストを実施することができるように、信頼性のある迅速な手段を入手することができる。

【0061】

したがって本発明のさらに他の目的は、超変異の誘発のため、およびこれに関連したテストの実施のための手段のキットまたはセットであって、迅速な超変異の誘発のための手段が例えば上記されているような抗体の組合わせを含んでいるものである。

20

【0062】

より一般的には本発明によって、DNAおよびタンパク質のレベルでの体細胞突然変異プロセスの第一分子工程の研究および調査を可能にする手段を入手することができる。

【0063】

要するに、このようにして、本発明にしたがって実施される手段によって、相同的組換えにより遺伝子を修飾することができるか、または例えばBL2細胞においてこれを不活性化することができる。これらの細胞、特にBL2細胞においてこのようにして実施可能にされた本発明による技術によって、これらの細胞の突然変異誘発特性を改良することができるが、同様に、これらの分子が、B細胞およびパーキットリンパ腫の生理学において果たしうる役割をテストすることもできる。

30

【0064】

本発明による手段を利用することによって、したがって非限定的な例として、BL2中のあるいくつかの遺伝子の過剰発現を得ることができ、したがってこの細胞の突然変異誘発性細胞の性能を改良することができ、一方で、このプロセス中に含まれるように見える分子のトランスフェクションは、とりわけAID、MSH2、MSH6、またはRAD30Aおよび/またはRAD30B型の酵素に関することがある。

【0065】

これらの突然変異は、細胞サイクルのG1期において誘発され、娘細胞の1つにおける複製によって可能な固定を伴って、転位された V_H 遺伝子のDNA鎖(brin)上に生じる。

40

【0066】

本発明者らはさらにまた、免疫グロブリンの遺伝子のこのような体細胞超変異(SHM)プロセスにおいて、Y族のDNAポリメラーゼであるポル・イオタの決定的な役割を明らかにすることができた。

【0067】

ポル・イオタ(これは、DNAの短い隙間の充填のエラーを非常に受けやすいポリメラーゼ活性を有するRAD30酵母の2つのヒト相同体のうちの1つである)欠失BL2クローンを生成するために、AID(活性化によって誘発されたシチジンデアミナーゼ、または英語で「活性化誘発シチジンデアミナーゼ」)の遺伝子の不活性化のために開発され

50

たものと同様な遺伝子の不活性化方法が用いられた。AID分子は、次の文献によって記載されている。特にムラマツ, Mら、「クラススイッチ組換えおよび超変異は、潜在的RNA編集酵素である活性化誘発シチジンデアミナーゼ(AID)を必要とする(Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase(AID), a Potential RNA Editing Enzyme)」, Cell 102, 553~63ページ(2000年);およびレビー(Revy), P.ら、「活性化誘発シチジンデアミナーゼ(AID)欠失は、高IgM症候群(HIGM2)の常染色体劣性形態を引起す(Activation-Induced Cytidine Deaminase(AID) Deficiency Causes the Autosomal Recessive Form of the Hyper-IgM Syndrome(HIGM2))」, Cell 102, 565~75ページ(2000年)である。

【0068】

2つのボル・イオタ⁺クローン(54および267)が、ボル・イオタの異型接合体クローンから発生させられた。適切な構成が、これらの2つの対立遺伝子を不活性化するために用いられた。2つのイオタ⁺クローンは、もとのBL2細胞系統と同じ増殖速度を有しており、同様な分裂指数および細胞周期プロフィールを有し、染色体異常または転座を示さなかった。ヒトボル・イオタに対するウサギの高ポリクローナル抗体を用いた場合、イオタ⁺クローン54および267の細胞抽出物のウエスタンブロットにおいて、ボル・イオタの発現はまったく検出されなかった。ボル・イオタの発現は、CMVプロモーターの制御下に、完全ヒトボル・イオタcDNAの発現を指令するpIRESベクターのトランスフェクションによって修復された。実施された実験において、発現率は、ウエスタンブロットによる定量化に固有の変動限度内において、正常BL2細胞の系統中に観察されるものに匹敵しうるものであった。いくつかの試みの後、正常なバックグラウンドでも、ボル・イオタ欠失のバックグラウンドでも、ボル・イオタを過剰発現するクローンを得ることは不可能であった。各標的細胞について修復された2つのクローンが、その後の分析のために選択された。

【0069】

BL2細胞系統中に、その転位V_H遺伝子の超変異を誘発するために、2つの異なる方法を用いることができる。第一方法は、ヘルパーTクローン、またはヘルパーT細胞系統との共培養として、抗-IgMの交差結合または網状化を介入させる。この場合、突然変異は、生じるとすれば、培養の3日後に観察される(ドネプー, Sら、上記;およびポルトラツキー(Poltratsky), Vら、「Ig体細胞超変異のために活性化されたBL2細胞における変異性ポリメラーゼの発現(Expression of Error-prone Polymerases in BL2 Cells Activated for Ig Somatic Hypermutation)」, Proc. Natl. Acad. Sci. 米国98, 7676~81ページ(2001年))。これらの試験において、SHMのこの誘発系は、CB15細胞系統の使用によって適応させられた。これは、共培養のリスザル(Saimiri)ヘルペスウイルス、およびIgMの交差結合、ついでストレプトアビジン球によってビオチン化された抗-IgM抗体の凝集によって形質転換されたヘルパーT細胞である。第二方法は、3つの表面受容体、IgM、CD19、およびCD21、またはIgM+CD19、および/またはIgM+CD21の組合わせの網状化または交差結合、ついでストレプトアビジン球によるビオチン化抗-IgM抗体の同じ凝集しか介入させない。この場合、突然変異は、90分のインキュベーション後のみ観察された。単一ラウンドの突然変異生成の結果生じた突然変異の頻度は、これらの2つの方法にしたがった場合に同様であった。すなわち、1塩基対あたり4~6×10⁻⁴である(後の表1参照)。BL2細胞系統はまた、培養に維持される場合、非常に低い頻度の、その転位V_H遺伝子を構成する突然変異を有する。実際に、2~3ヶ月の培養後、1塩基対あたり10⁻⁴突然変異を超えない。

【 0 0 7 0 】

T細胞の培養においても、上記3つの抗体を用いる試験においても、ボル・イオタ欠失クローン54または267を超変異誘発した時、突然変異の頻度の検出可能な増加はまったく観察されなかった。刺激前の222配列のうちの5に対して、刺激後の298V配列のうちの7突然変異に上げただけである。これに対して、突然変異の誘発は、これらのクローン中のボル・イオタのcDNAの再発現によって、正常BL2が示したものに匹敵するレベル、すなわち、刺激前の547V配列中の6に対して、刺激後の547V配列中の83突然変異に回復された。さらにはボル・イオタを発現するこれらのクローンにおいて修復された突然変異の図式は、BL2の突然変異の図式と同様であり、GC塩基対の高い標的設定、およびトランジションへの傾向を有する(表2参照)。正常BL2の場合のように、ボル・イオタの修復されたクローンのC μ 遺伝子は、誘発後、突然変異に対して標的されているようには思われなかった。

【 0 0 7 1 】

【表1】

表1

ボル・イオタ欠失およびボル・イオタに対して受容能力のあるBL2サブクローンにおけるV遺伝子の突然変異の頻度

細胞型	刺激されていない	刺激された	
		抗-IgM/CD19 /CD21	抗-IgM/CB15
BL2	0, 71 \times 10 ⁻⁴ (7/236)	3, 7 \times 10 ⁻⁴ (29/187)	3, 8 \times 10 ⁻⁴ (26/165)
ボル・イオタ ⁺ クローン			
54	0, 82 \times 10 ⁻⁴ (3/88)	0, 96 \times 10 ⁻⁴ (4/100)	0, 51 \times 10 ⁻⁴ (2/95)
267	0, 36 \times 10 ⁻⁴ (2/134)	1, 00 \times 10 ⁻⁴ (1/24)	<0, 30 \times 10 ⁻⁴ (0/79)
ボル・イオタcDNA で修復されたボル・イ オタ ⁺ クローン			
54-7	0, 31 \times 10 ⁻⁴ (1/78)	2, 9 \times 10 ⁻⁴ (14/115)	3, 1 \times 10 ⁻⁴ (9/69)
54-10	0, 43 \times 10 ⁻⁴ (2/111)	2, 4 \times 10 ⁻⁴ (8/79)	n. d.
267-20	0, 27 \times 10 ⁻⁴ (1/89)	4, 0 \times 10 ⁻⁴ (19/113)	5, 1 \times 10 ⁻⁴ (22/104)
267-12	0, 50 \times 10 ⁻⁴ (2/97)	4, 0 \times 10 ⁻⁴ (11/67)	n. d.

註：突然変異の頻度は、1ヌクレオチドあたりの突然変異として表示され、配列決定された1つのV遺伝子(416pb)あたりの突然変異総数は、カッコ内に示されている。

【 0 0 7 2 】

【表 2】

表 2

ボル・イオタ^aの発現のために修復されたBL2のボル・イオタ^a細胞系統のV4-39-JH5 遺伝子中に発生させられた突然変異におけるヌクレオチドの置換のパーセンテージ

De:	A:	A	T	G	C	Total
A			3,6 (0,9)	7,2 (4,6)	1,8 (1,4)	24,9 (20,5)
T	4,6 (3,1)			0 (2,7)	7,7 (7,8)	
G	28,1 (26,3)	13,5 (4,8)			1,3 (7,5)	75,1 (79,5)
C	9,6 (10,6)	19,0 (24,2)	3,6 (6,1)			
トランジション:	62,0 (62,9)			トランスバージョン:	38,0 (37,1)	

註：VDJ配列の416pbにおいて標的された塩基の74置換が、9挿入を含んでいる全部で83突然変異に対して分析された(表1に示されている)。置換のパーセンテージは、Vセグメントの塩基組成が修正されている。太字の数字は、修復されたボル・イオタクローンにおいて誘発された突然変異に関しており、一方、正常BL2の誘発に関する値は、カッコに入れられている。

【0073】

本発明の他の目的は、特にBリンパ腫、とりわけパーキットBL2リンパ腫へのタンパク質および/または遺伝子レベルでのインビトロ超変異誘発テストにおける超変異誘発の調節のための、DNAポリメラーゼボル・イオタの使用である。

【0074】

本発明のさらに他の目的は、このようなテストにおける超変異誘発の増加のための、当業者に知られている技術によるその天然アミノ酸の少なくとも1つの変更後に改良された、特に修復された、DNAポリメラーゼボル・イオタの使用である。本発明によれば、ボル・イオタのこの改良は有利には、そこで少なくとも1つのアミノ酸を置換するための環状II領域(「リングフィンガー(Ring Finger)」)の無作為突然変異生成、ついで酵素の機能性の回復によって実施される。

【0075】

本発明はさらに、上記のような体細胞突然変異の誘発用のキットであって、さらにボル・イオタ遺伝子の不活性化のため、および/またはボル・イオタcDNAの発現によるこれの修復のための手段を含むキットを目的とする。

【0076】

ボル・イオタのこの寄与の同定は、次の実験部分においてさらに詳細に例証される。

【0077】

BL2細胞系統におけるV遺伝子の超変異の誘発

V遺伝子の超変異は、異なる2つの操作モードにしたがって誘発された。第一操作モードを用いて、上記のプロトコルにしたがって、IgM、CD19、およびCD21表面受容体の交差結合を実施した。第二活性化モードは、リスザルヘルペスウイルスによって形質転換されたヘルパーT細胞の系統である、CB15細胞系との共培養に基づいていた。CB15は、10%胎児ウシ血清(ハイクローン(Hyclone))、ペニシリン/ストレプトマイシン(インビトロジェン(Invitrogen))、および50単位/mlのIL2(シグマ)で補足された、RPMI1640(インビトロジェン)中で培養さ

れた。CB15は、4,000ラッドで照射され、完全培地プラス2%のカリヨゼール(Caryoser)(リヨンのCTS)中に再懸濁され、抗-CD3で一晩、被覆された24個のウエルまたはくぼみを有するプレート中に1ウエルあたり500,000細胞の割合で入れられた(OKT3、ジャンセン-シラグ(Janssen-Cilag)、2.5µg/ウエル)。氷上で20分間、ビオチン化抗-IgM抗体(0.6mg/ml、カルタグ・ラボラトリーズ(Caltag Laboratories))で、0.5mlのRPMI中で 2×10^6 細胞をインキュベートし、ついで低温で回転板上で20分間、ストレプトアビジンに共役された磁気球(ディナールのダイナビーズ(Dynabeads)M280)で網状化した。BL2は、2%のカリヨゼールで補足されたRPMI培地中に100,000細胞/mlの割合で再懸濁され、照射されたCB15および抗-CD3が入っている24ウエルを有するプレートの1ウエルあたり0.5mlを入れた(BL2:CB15比1:10において)。これらの細胞は、37°Cで3日間のインキュベーション後に採取され、DNAは、DNeasy組織キット(キアゲン(Qiagen))という名称の適切なキットを用いて抽出され、突然変異は、V4-39-JH5遺伝子の増幅後に分析された。これらの突然変異は、電気泳動図の多重アラインメントおよびオートアSEMBラー(AutoAssembler)(アプレラ(Applera))ソフトウェアの使用によって同定された。

【0078】

BL2におけるボル・イオタ遺伝子の不活性化

ヒトボル・イオタゲノム配列が、すべてのコーディングエキソンを含んでいる、180kbのHTGSクローンAC0210325から収集された。標的構成を発生させるために用いられたDNAのフラグメントは、BL2のゲノムDNAから増幅され、まずACPTOPOL-XL(インビトロ)用のクローニングキットでクローンされ、これらの部位がACPプライマーに付加されているならばSmaIおよびXhoIを用いて、または制限部位が含まれていないならばMluI-NotIフラグメントの形態で切除され、SfiIおよびMluIがそのポリリンカー(polylinker)のSacI部位中に付加されているpBSKベクター(ストラタジーン(Stratagene))の対応部位においてクローンされた。ネオマイシンまたはヒグロマイシンへの耐性遺伝子は、5'および3'はめこみフラグメント間に挿入された。次のACPプライマーが、増幅のために用いられた。

【0079】

第一対立遺伝子:

フラグメント5', 5'-イオタ1-5', CACTCGAGTACCAGCCGCTCTGGTGTTTG、

および5'-イオタ1-3', CAGTCGACTACAGTCTCCAGTCGCTC(3.1kb);

フラグメント3', 3'-イオタ1-5', CACTCGAGCTCAAATCCAGAGCTAAAAG、

および3'-イオタ1-3', CAGTCGACATAGTTGCAGGTAACCAAC(2.5kb)。

【0080】

第二対立遺伝子:

フラグメント5', 5'-イオタ-2-5', CACTCGAGAGAGCGACTGGAGACTGTAG、

および5'-イオタ2-3', ACGTCGACAGGAAGAATGCAGAGTGAACG(1.8kb);

フラグメント3', 3'-イオタ2-5', CTCAGTCGACGGTGGTTACCTGCAACTATG、

および3'-イオタ2-3', CCAAGTCTCTCAACAACCTGG(3.8kb)。

【0081】

第一構成の5'フラグメントの増幅のためにポリメラーゼPfuターボ(ストラタジーン)、および第二構成の3'フラグメントのためにヘルキュラーゼ(Herculaase)(ストラタジーン)(94で30秒、62で30秒、および68で12分、40サイクル)、第一構成の3'フラグメントのためにACPエクスパンド・ロング・テンプレートPCRシステム(ロッシュ(Roche))(供給業者の条件にしたがって40サイクル、経時的伸長インクリメントを含む)、および第二構成の5'フラグメントのために、ACPアドバンテージ2PCRキット(クロンテック(Clontech))(94で30秒、64で30秒、および68で4分)を用いた。NotIまたはMluIによって線状化された構成物30μgのトランスフェクションは、ベルトツシ(Bertocci)、Bら、Immunity 9、257~65ページ(1998年)によって記載されているように実施された。この遺伝子の標的クローンの標的設定は、この構成の外側、およびネオマイシンまたはヒグロマイシンへの耐性遺伝子の内側に位置する次のプライマーを用いて、10クローンのプールに対するACPによって実施された。

10

【0082】

第一対立遺伝子、イオタ-5'-テスト、ATGACCCAGCTCAAGACAGC

およびネオ(登録商標):5'におけるCATAGCGTTGGCTACCCGTG、
 および3'-イオタ2-3'および逆ネオ(登録商標):3'におけるCACGGGT
 AGCCAAACGCTATG;

20

第二対立遺伝子、イオタ-5'-テスト

およびヒグロ(登録商標):GCTGTGTAGAACTCGCC
 (エクスパンド・ロング・テンプレートPCR系(ロッシュ))。

【0083】

第一対立遺伝子の場合、相同的組換えは、518トランスフェクション体(transfectant)のうちの1つのクローンにおいて得られた。

【0084】

第二対立遺伝子の場合、535のうちの2クローンが正確に標的された。

【0085】

このような低い頻度は、標的設定ベクターの構成における低い忠実度を有するACP酵素の使用のせいであるとされた。相同的組換えに対する菌株の特異的多形性のこのような活性は、ネズミのES細胞中で観察された。この場合、0.6%の配列の差は、標的設定の効果をもとに50で割る結果になることが明らかになった。同様に、用いられた増幅条件下、1塩基対あたり 10^{-4} 未満のエラー頻度を有する酵素である、DNAポリメラーゼPfuターボ(ストラタジーン)のみを用いて増幅された構成での、それ以後BL2に対して実施された遺伝子のその他の不活性化は、1%~2%の範囲の標的頻度を生じた。

30

【0086】

ポル・イオタ欠失BL2クローンのトランスフェクション

ポル・イオタ欠失BL2クローンが、ピュロ(puro)pIRESベクター(インビトロンゲン)のBamHI部位において、次のプライマー:

40

5'-イオタ、GCGGATCCACGACGAGGAAGACG、および

3'-イオタ、GCGGATCCCTACGCTTTGTGCCAG

(下線のBamHI部位)での全体の長さのヒトポル・イオタcDNAの増幅によって構成されたポル・イオタの発現ベクターでトランスフェクションされた(マクドナルド(McDonald), J.P.ら、Genomics 60、20~30ページ(1999年))。

【0087】

RT-ACPおよびウエスタンブロットによるBL2クローンの分析

ウエスタンブロットが、ポル・イオタに対するポリクローナル抗体(終末C末端における、KLH-共役15-母-ペプチド)を用いて従来の方法で実施された。

50

【 0 0 8 8 】

そのほかに、当業者に知られている技術にしたがって（特にプラカシュ（Prakash）技術参照）ポル・イオタをさらに改良することができ、ポル・エータ酵素のために開発することができ、この酵素は、ポル・イオタのように、環状II領域（「リングフィンガー」）を有し、ここにおいて、前記II領域の無作為突然変異生成によって、この「リングフィンガー」領域中に存在する少なくとも1つのアミノ酸を突然変異させることができ、その結果として、このように突然変異された酵素の活性の有意な増加を伴うことが明らかになった。

【 0 0 8 9 】

本発明はしたがってまた、上記のような体細胞突然変異の誘発用キットであって、そこで少なくとも1つのアミノ酸を変化させ、その結果としてこれらの性能を改良することができるようにするための、その環状II領域の無作為突然変異生成、ついで上記のもののような手段による酵素の修復によってこのように改良されたポル・イオタ酵素を含むキットも目的とする。

10

【 0 0 9 0 】

上に開示されている様々な実施変形例におけるこのシステムによって、このようにして特に、該タンパク質の性能を改良するために必要な突然変異を同定することができる。例えば、BL2においてトランスフェクションされたプロモーター-活性化因子カセット中に入れられた、インシュリンについてコードする遺伝子の非限定的な例証の場合、BL2は多くの分子を生産することができ、これらの分子のうち、最良の性能を有するものは、優先的にその基質上に固定されるであろう。ついでこの優先的なタンパク質についてコードする突然変異された遺伝子の配列決定、およびこの性能の改良を可能にした修飾されたアミノ酸の既知の手段による同定を行なうことによって、本発明の方法にしたがって、より性能のよいインシュリンを得ることができる突然変異を非常に迅速に同定することができる。

20

【 配列表 】

0004354276000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 8 3
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 5/06	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	E

(72)発明者 バイル, ジャン - クロード
 フランス、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ボジラール、1 5 6

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 LUXEMBOURG ALAIN T, JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1 9 9 4年, V153 N10, P4448-4457
 Immunity, vol. 6, pages 35-46 (1997)
 Immunity, vol. 6, pages 107-118 (1997)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 98, pages 7976-7981 (July 2001)
 Nature, vol. 419, pages 944-947 (2002)
 Nat. Immunol., vol. 3, pages 815-821 (2002)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/01
 C12N 15/09
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)