

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-520921

(P2010-520921A)

(43) 公表日 平成22年6月17日(2010.6.17)

(51) Int.Cl.

**A61K 45/00** (2006.01)  
**C12N 1/15** (2006.01)  
**C12N 1/19** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

F 1

A 6 1 K 45/00  
C 1 2 N 1/15  
C 1 2 N 1/19  
C 1 2 N 1/21  
C 1 2 N 5/00 1 O 1

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5  
4 C 0 8 4  
4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-553199 (P2009-553199)  
(86) (22) 出願日 平成20年3月7日 (2008.3.7)  
(85) 翻訳文提出日 平成21年11月9日 (2009.11.9)  
(86) 國際出願番号 PCT/GB2008/000811  
(87) 國際公開番号 WO2008/110771  
(87) 國際公開日 平成20年9月18日 (2008.9.18)  
(31) 優先権主張番号 0704651.9  
(32) 優先日 平成19年3月9日 (2007.3.9)  
(33) 優先権主張国 英国(GB)

(71) 出願人 506417186  
ユーシーエル ビジネス パブリック リ  
ミテッド カンパニー  
イギリス国、ダブリュ1ティー 4ティー  
ピー、ロンドン、トッテナム コート ロ  
ード 97、ザ ネットワーク ビルディ  
ング  
(74) 代理人 100100549  
弁理士 川口 嘉之  
(74) 代理人 100090516  
弁理士 松倉 秀実  
(74) 代理人 100106622  
弁理士 和久田 純一  
(74) 代理人 100089244  
弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肝疾患および肝炎の治療に用いるための、IL-8遮断薬および／またはTRAIL遮断薬を含む組成物

## (57) 【要約】

本発明は肝障害、特にB型肝炎ウィルス(HBV)関連肝障害の治療方法に関する。本発明はまた、肝障害の治療における使用のための組成物およびキットに関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

肝疾患の治療および／または予防のための薬剤の製造における I L - 8 遮断薬の使用。

**【請求項 2】**

該薬剤が T R A I L 遮断薬を含まない、請求項 1 に記載の使用。

**【請求項 3】**

該薬剤が T R A I L 遮断薬を追加的に含む、請求項 1 に記載の使用。

**【請求項 4】**

肝炎の治療および／または予防のための薬剤の製造における T R A I L 遮断薬の使用。

**【請求項 5】**

該薬剤が I L - 8 遮断薬を追加的に含む、請求項 4 に記載の使用。

**【請求項 6】**

肝疾患の治療および／または予防のための薬剤の製造における、I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子の使用。

**【請求項 7】**

該薬剤が T R A I L 遮断薬または T R A I L 遮断薬をコードする核酸分子を含まない、請求項 6 に記載の使用。

**【請求項 8】**

該薬剤が T R A I L 遮断薬または T R A I L 遮断薬をコードする核酸を追加的に含む、請求項 6 に記載の使用。

**【請求項 9】**

肝炎の治療および／または予防のための薬剤の製造における、T R A I L 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子の使用。

**【請求項 10】**

該 I L - 8 遮断薬が肝細胞上に T R A I L - R 2 の発現を誘導する I L - 8 活性を遮断する、請求項 1 ~ 3 および請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 11】**

該 I L - 8 遮断薬が、可溶性 I L - 8 レセプターおよび I L - 8 に親和性を有する抗体分子からなる群より選択される、請求項 10 に記載の使用。

**【請求項 12】**

該 T R A I L 遮断薬が T R A I L リガンドと T R A I L 死誘導レセプターとの相互作用を阻止する、請求項 3 ~ 5 ならびに請求項 8 および 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 13】**

該 T R A I L 遮断薬が、可溶性 T R A I L レセプターおよび T R A I L リガンドまたは T R A I L 死誘導レセプターに親和性を有する抗体分子からなる群より選択される、請求項 12 に記載の使用。

**【請求項 14】**

該肝疾患が H B V 感染に関連する、請求項 1 ~ 3 および請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 15】**

該肝疾患が慢性 H B V 感染である、請求項 14 に記載の使用。

**【請求項 16】**

該肝疾患が e A g - C H B 感染である、請求項 14 に記載の使用。

**【請求項 17】**

該肝疾患が肝炎を呈する、請求項 14 に記載の使用。

**【請求項 18】**

該薬剤が、I F N - もしくは抗ウイルス逆転写酵素剤、または I F N - をコードする核酸分子もしくは抗ウイルス逆転写酵素剤を追加的に含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 19】**

10

20

30

40

50

該薬剤が肝疾患の治療および／または予防を補助する追加成分を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 20】

該追加成分が H B V 抗ウィルス剤である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

該薬剤の各成分が同時、連続的、または別々の送達のためである、請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 22】

該薬剤がヒトにおける疾患の治療および／または予防のためである、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 23】

該薬剤が肝障害および／または炎症の程度を減少させる、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 24】

T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬をコードする発現ベクター。

【請求項 25】

T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子により形質転換された宿主細胞。

【請求項 26】

有効量の I L - 8 遮断薬を個体へ送達することを含む、肝疾患を有する個体の治療および／または予防のための方法。

【請求項 27】

T R A I L 遮断薬を個体へ送達することを含まない、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

T R A I L 遮断薬を個体へ送達することを追加的に含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

有効量の T R A I L 遮断薬を個体へ送達することを含む、肝炎を有する個体の治療および／または予防する方法。

【請求項 30】

I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子の有効量を個体へ送達することを含む、肝疾患を有する個体の治療および／または予防する方法。

【請求項 31】

T R A I L 遮断薬または T R A I L 遮断薬をコードする核酸を個体へ送達することを含まない、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

T R A I L 遮断薬または T R A I L 遮断薬をコードする核酸を個体へ送達することを追加的に含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

T R A I L 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子の有効量を個体へ送達することを含む、肝炎を有する個体の治療および／または予防する方法。

【請求項 34】

有効量の I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤、または I F N - をコードする核酸もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を個体へ送達することを追加的に含む、請求項 26～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬、または T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸を 1 以上の薬理学的に許容される賦形剤と共に含む、薬理学的に許容される組成物。

【請求項 36】

I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤、または I F N - をコードする核酸分子

10

20

30

40

50

もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を追加的に含む、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

T R A I L 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、または T R A I L 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子および I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を 1 以上の薬理学的に許容される賦形剤と共に含む、薬理学的に許容される組成物。

【請求項 3 8】

I L - 8 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、または I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子および I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を 1 以上の薬理学的に許容される賦形剤と共に含む、薬理学的に許容される組成物。  
10

【請求項 3 9】

T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬、または T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸を含む、肝疾患を治療するためのキット。

【請求項 4 0】

I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤、または I F N - をコードする核酸分子もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を追加的に含む、請求項 3 9 に記載のキット。

【請求項 4 1】

T R A I L 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、または T R A I L 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子および I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を含む、肝炎を治療するためのキット。  
20

【請求項 4 2】

I L - 8 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、または I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子および I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を含む、肝疾患を治療するためのキット。

【請求項 4 3】

肝疾患の治療および / または予防のための薬剤の製造における T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬の使用。

【請求項 4 4】

肝疾患の治療および / または予防のための薬剤の製造における、T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子の使用。  
30

【請求項 4 5】

有効量の T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬を個体へ送達することを含む、肝疾患有する個体の治療および / または予防のための方法。

【請求項 4 6】

T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬をコードする 1 以上の核酸分子の有効量を個体へ送達することを含む、肝疾患有する個体の治療および / または予防のための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は肝障害、特に B 型肝炎ウィルス (H B V) 関連肝障害の治療方法に関する。本発明はまた、肝障害の治療に用いるための組成物およびキットに関する。  
40

【背景技術】

【0 0 0 2】

肝臓指向性の D N A ウィルスである B 型肝炎ウィルス (H B V) による慢性感染は、世界的な肝疾患の主原因である。3 億 5 千万人を超える人々が持続的に感染しており、肝硬変および肝細胞癌をもたらす慢性肝炎にかかる危険性がある。世界保健機関は、毎年少なくとも 100 万人の死亡が H B V 関連の肝疾患に直接起因していると推定する。多くの国でみられる慢性疾患の比率の増大は、「e 抗原」の発現を欠如するものの活発なウィルス複製および肝疾患に関連する、「e 抗原陰性慢性 B 型肝炎 (e A g - C H B )」と名付けられ  
50

たウィルス変異株の発生が原因である（非特許文献1）。eAg-CHBをもつ患者は肝炎において、大きな、説明できない変動により特徴付けられる、反復性、自発性の「肝炎」を起こしやすく、かつ重篤な肝纖維症へと迅速に進行する傾向にある（非特許文献2）。これらの肝炎は、凝縮された時間枠にわたって、ウィルス量および肝炎の動的変化に関連する機序を研究するための格好の機会を提供する。HBVは細胞壊死性ではないことから肝障害は免疫を介すると考えられているが、ヒトHBV感染において肝細胞死を導く分子経路はよく分かっていない。HBV感染による肝障害に寄与する免疫反応の種々の構成要素において方法を分析することへの差し迫った必要性があり、このことが肝炎を制限または阻止する一方で、ウィルス制御を増強する免疫治療戦略の合理的な発展を可能にし得る。

10

#### 【0003】

HBVに感染した患者における免疫介在性の肝障害は従来、ウィルス特異的なCD8T細胞による、感染肝細胞の細胞溶解性の死滅に起因すると考えられた。しかしながらこの仮説は、肝炎のいずれの形跡も無くHBV感染を制御している患者の肝臓に、活性化HBV特異的CD8T細胞が高頻度で存在することを示す以前の研究により異議を唱えられた。その代わりに、HBV関連慢性肝疾患有する患者と有さない患者を区別する特徴は、前グループの肝臓内に大きな、非抗原特異的リンパ球性浸潤物が存在することであった（非特許文献3）。この非特異的な炎症性浸潤物の動員および活性化をもたらす機序については、HBVのトランスジェニックマウスモデルにおいて調査された。このモデルでは、非特異的細胞性浸潤物の阻害によって肝障害の重症度を減少させることが可能であり（非特許文献4、5）、ウィルス特異的CD8により開始される肝炎が他のリンパ球によって増幅されるという概念が強固にされた（非特許文献6）。

20

#### 【0004】

HBVトランスジェニックマウスにおけるリンパ球性浸潤物の最大の構成物の一つは、炎症性浸潤物中での数が基本的水準に比べて10-12倍に増加しているNK細胞（NK<sup>1.1+ CD3-</sup>）である（非特許文献4、5）。NK細胞（CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>）はヒト肝臓内でも同様に、全肝臓内リンパ球の30-40%を構成する、細胞性浸潤物の主要な構成要素である（非特許文献7）。HBV感染の潜伏段階（incubation phase）における循環NK細胞の早期の増加が実証されており、これらがこの設定での初期のウィルス封じ込めに寄与しているかもしれないことを示唆している。（非特許文献8）。慢性HBV感染患者のNK細胞の、抗ウィルスおよび病原性の可能性についてはこれまでに取り組まれていない。

30

#### 【0005】

NK細胞を介する抗ウィルス細胞毒性を通した機序は臓器依存性であると思われる（非特許文献9）。現在のところパーフォリン/グランザイムを通したNK細胞毒性は、標的肝細胞がこの経路を通した溶解に対して比較的抵抗性であることから、肝臓の環境下での関連性は少ないと考えられている（非特許文献9、10）。肝障害においては、TNFスーパーファミリーに属するリガンド/レセプター対を通したレセプター介在性の細胞死がさらに重要な役割を果たしていると思われる（非特許文献11、12）。このような経路の一つは浸潤リンパ球上に発現するTNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）（非特許文献13）を介しており、これは肝細胞上のTRAIL死誘導レセプター（TRAIL-R1、TRAIL-R2）（非特許文献14）と相互作用する。このことはマウスのリストリアおよびコンカナバリン-A誘導性の肝炎における、in vivoでの肝障害の決定的な樹序として示された（非特許文献15）。肝臓のTRAIL介在性アポトーシスにおけるNK細胞の必須の役割は、腫瘍転移調査の設定において強調された（非特許文献16）。正常ヒト肝細胞もまたTRAIL介在性アポトーシスに感受性のあることが示されており（非特許文献17、18）、この経路に対する感受性はウィルス性肝炎の間に増大する可能性のあることが示唆された（非特許文献19、20）。本発明者らはTRAILを発現したNKが、慢性HBV感染における肝障害の非抗原特異的媒介に役割を果たす可能性があると仮定した。

40

50

## 【0006】

Liang et al. (非特許文献48)では、HBVトランスジェニックマウスにおける肝炎および肝細胞死を減少させるため、TRAILの機能を遮断する可溶性TRAILレセプターの使用が示された。Liu et al. (非特許文献56)では、TRAILの機能を遮断するためにヒト可溶性デスレセプター5が使用され、HBVを導入した肝細胞のアポトーシスの減少が示された。

## 【0007】

NK細胞のエフェクター機能はその活性化および抑制性レセプターを通したシグナルのバランスの結果であり、このバランスは局所的なサイトカイン環境により影響される。さらに、NK細胞はあるサイトカインにより抗ウィルス活性へと直接活性化でき、IFN-10

促進性細胞毒性(非特許文献21)およびTRAILの発現(非特許文献22)、ならびにIL-12によるIFN- $\gamma$ の産生(非特許文献21)を示す。IFN- $\gamma$ の産生は急性ウィルス感染の初期段階を特徴付けるが、その放出が慢性HBV感染にみられる持続的な高レベルの抗原刺激の背景で起こるウィルス量の変動によってもまた引き起こされるかどうかは不明である。産生されたIFN- $\gamma$ のいずれの下流の効果も、抗原活性化細胞中では減弱するか(非特許文献23、24)、またはIL-1(非特許文献25)およびIL-8(非特許文献26、27)のような他のサイトカインの上昇により修飾される可能性がある。

## 【0008】

肝障害、特にHBV感染が原因となる肝障害の有効な治療が必要とされている。HBV感染に関連する肝炎の有効な治療もまた必要とされている。特に進行型の肝疾患有する個体において、IFN- $\gamma$ の有害な影響、すなわち肝細胞死を克服することもまた必要とされている。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0009】

【非特許文献1】Bonino, F., and M.R. Brunette et al, J Hepatol 39 Suppl, 1, S 16 0-163, 2003.

【非特許文献2】Brunetto, M.R. et al, J Hepatol, 36, 263-270, 2002.

【非特許文献3】Maini, M.K. et al, J Exp Med, 191, 1269-1280, 2000.

【非特許文献4】Kakimi, K. et al, J Exp Med, 194, 1755-1766, 2001.

【非特許文献5】Sitia, G. et al, J Clin Invest, HI, 1158-1167, 2004.

【非特許文献6】Ando, K. et al, J Exp Med, 178, 1541-1554, 1993.

【非特許文献7】Norris, S et al, J Hepatol, 28, 84-90, 1998.

【非特許文献8】Webster, GJ. et al, Hepatology, 32, 1117-1124, 2000.

【非特許文献9】Tay, C.H., and R.M. Welsh. J et al, Virol, 71, 267-275, 1997.

【非特許文献10】Kafrouni, M.I. et al, J Immunol, 167, 1566-1574, 2001.

【非特許文献11】Galle, P.R. et al, J Exp Med, 182, 1223-1230, 1995.

【非特許文献12】Balkow, S. et al, J Virol, 75, 8781-8791, 2001.

【非特許文献13】Wiley, S.R. et al, Immunity, 3, 673-682, 1995.

【非特許文献14】Sheridan, J.P. et al, Science, 277, 818-821, 1997.

【非特許文献15】Zheng, SJ. et al, J Clin Invest, UI, 58-64, 2004.

【非特許文献16】Takeda, K. et al, Nat Med, 7, 94- 100, 2001.

【非特許文献17】Jo, M. et al, Nat Med, 6, 564-567, 2000.

【非特許文献18】Lawrence, D. et al, Nat Med, 7, 383-385, 2001.

【非特許文献19】Mundt, B. et al, Faseb J, J7, 94-96, 2003.

【非特許文献20】Saitou, Y. et al, Hum Pathol, 36, 1066-1073, 2005.

【非特許文献21】Nguyen, K.B. et al, J Immunol, 169, 4279-4287, 2002.

【非特許文献22】Sato, K. et al, Eur J Immunol, 31, 3138-3146, 2001.

【非特許文献23】Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell et al, J Exp Med, 189 50

, 521-530, 1999.

【非特許文献 24】Dondi, E. et al, J Immunol, 170, 749-756, 2003.

【非特許文献 25】Tian, Z. et al, X. J Immunol, 165, 3959-3965, 2000.

【非特許文献 26】Khabar, K.S. et al, J Exp Med, 186, 1077-1085, 1997.

【非特許文献 27】Polyak, S.J. et al, J Virol, 75, 6209-6211, 2001.

【非特許文献 28】Guidotti, L.G. et al, Science 284, 825-829, 1999.

【非特許文献 29】Myers, R.P. et al, J Hepatol, 39, 222-2305 2003.

【非特許文献 30】Kashii, Y. et al, J Immunol, 163, 5358-5366, 1999.

【非特許文献 31】Mirandola, P. et al, Blood, 104, 2418-2424, 2004.

【非特許文献 32】Ishiyama, K. et al, Hepatology, 43, 362-372, 2006.

【非特許文献 33】Cooper, M.A. et al, Trends Immunol, 22, 633-640, 2001.

【非特許文献 34】Sprengers, D. et al, J Med Virol, 78, 561-568, 2006.

【非特許文献 35】Ichikawa, K. et al, Nat Med, 7, 954-960, 2001.

【非特許文献 36】Clancy, L. et al, Proc Natl Acad Sci U S A 102, 18099-18104, 2005.

【非特許文献 37】Rossol, S. et al, J Clin Invest, 99, 3025-3033, 1997.

【非特許文献 38】Tsai, S.L. et al, J Clin Invest, 89, 87-96, 1992.

【非特許文献 39】Lohr, H.F. et al, Hepatology, 22, 61-68, 1995 .

【非特許文献 40】Sato, K. et al, J Exp Me, 203, 239-250, 2006.

【非特許文献 41】Herbeauval, J.P. et al, Blood, 106, 3524-3531, 2005.

【非特許文献 42】Radaeva, S. et al, Gastroenterology, 130, 435-452, 2006.

【非特許文献 43】Ashkenazi, A. et al, J Clin Invest, 104, 55-162, 1999.

【非特許文献 44】Walczak, H. et al, Nat Med, 5, 157-163, 1999.

【非特許文献 45】Schneider, P. et al, J Exp Med, 187, 1205-1213, 1998.

【非特許文献 46】Higuchi, H. et al, J Biol Chem, 276, 38610-38618, 2001 .

【非特許文献 47】Janssen, H.L. et al, J Hepatol, 39, 414-420, 2003.

【非特許文献 48】Liang, X. et al, J Immunol, 178, 503-510, 2007.

【非特許文献 49】Mahe, Y. et al, J Biol Chem, 266, 13759-13763, 1991.

【非特許文献 50】Campbell, J.J. et al, J Immunol, 166, 6477-6482, 2001.

【非特許文献 51】Salazar-Mather, T.P. et al, J Clin Invest, JJO, 321-330, 2002.

【非特許文献 52】Kakimi, K. et al, J Exp Med, 192, 921-930, 2000.

【非特許文献 53】Kayagaki, N. et al, J Exp Med, 189, 1451-1460, 1999.

【非特許文献 54】Reynolds, G.M. et al, Br J Haematol, 118, 195-201, 2002.

【非特許文献 55】Afford, S.C. et al, J Exp Med, 189, 441-446, 1999.

【非特許文献 56】Liu, Yu-Gang et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 352, 329-334, 2007.

### 【発明の概要】

#### 【0010】

本発明の第一の態様によれば、肝疾患の治療および／または予防のための薬剤の製造におけるIL-8遮断薬の使用が提供される。

#### 【0011】

驚くべきことにIL-8遮断薬は、TRAIL遮断薬非存在下での肝疾患の治療および予防に有効であることが見出された。

#### 【0012】

本発明の第一の態様の特定の実施形態において、該薬剤はTRAIL遮断薬を含まない。

#### 【0013】

本発明の第一の態様の別の特定の実施形態において、該薬剤はTRAIL遮断薬を追加的に含む。

#### 【0014】

10

20

30

40

50

T R A I L 遮断薬およびI L - 8 遮断薬の使用は、肝疾患の治療および予防において特に有効であることが見出された。特に両遮断薬の組み合わせは、T R A I L 遮断薬の単独使用よりもさらに有効であることが見出された。

【0015】

本明細書において「I L - 8 遮断薬」という用語は、I L - 8 活性、特に肝細胞上のT R A I L - R 2 の発現を誘導するI L - 8 活性および/またはN K 細胞を化学遊走させるI L - 8 活性を遮断できるいずれの薬剤をも指す。適切な遮断薬は、可溶性I L - 8 レセプター、I L - 8 またはそのレセプターに親和性を有する抗体分子、I L - 8 またはそのレセプターに親和性を有する他の分子（例えばアフィボディ）、小分子などを含む。

【0016】

本明細書において「抗体分子」という用語は、いずれかのアイソタイプのポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその抗原結合断片、例えばF v、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片および单鎖F v 断片を指す。抗体分子はキメラ抗体分子、C D R 接合抗体分子、またはその抗原結合断片のような組み換え抗体分子であってよい。このような抗体およびその产生方法は周知である。抗体分子はいずれの適切な方法、例えばハイブリドーマまたはファージ技術を用いて产生できる。当業者であれば、望まれる親和性を有する抗体をどのように产生するかを知り得るであろう。Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al. Cold Spring Harbour Laboratory 1988を参照のこと。抗体分子はいずれの適切な生物、例えばヒツジ、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ラクダ、ラマもしくはサメから、または分子生物学技術を通して作製された特異的ライブラリーから产生できる。

【0017】

I L - 8 遮断薬は、I L - 8 またはそのレセプターに親和性を有する抗体分子であることが特に好ましい。I L - 8 に親和性を有する幾つかの抗体が知られている（例えばA B X - I L - 8 (Mahler et al., Chest, 126, 926 - 34, 2004)）。

【0018】

本明細書において「T R A I L 遮断薬」という用語は、T R A I L 介在性アポトーシスを阻止できるいずれの薬剤をも指す。該遮断薬は、好ましくはT R A I L リガンドとT R A I L 死誘導レセプター（T R A I L - R 1 およびT R A I L - R 2 ）との相互作用を阻止する。適切な遮断薬は、可溶性T R A I L レセプター（例えば可溶性デスレセプター（Li u et al., (非特許文献56) およびLiang et al., (非特許文献48) を参照のこと））、T R A I L リガンドまたはレセプターに親和性を有する抗体分子、T R A I L リガンドまたはレセプターに親和性を有する他の分子（例えばアフィボディ）、小分子などを含む。

【0019】

T R A I L 遮断薬は、T R A I L リガンドまたはレセプターに親和性を有する抗体分子であることが特に好ましい。

【0020】

T R A I L 死誘導レセプターに親和性を有する抗体（例えばm A b 3 7 5、T R A I L - R 1 - P E およびT R A I L - R 2 - P E (R & D Systems、アビンドン、英国)）と同様に、T R A I L リガンドに親和性を有する幾つかの抗体（例えばT R A I L - P E (Pharmingen BD Biosciences、カウリー、英国)）が知られている。

【0021】

肝疾患の治療および/または予防には、I L - 8 遮断薬の単独使用、またはT R A I L 遮断薬とI L - 8 遮断薬との併用が特に有効であることが見出された。

【0022】

本発明の第一の態様の特に好ましい実施形態では、肝疾患の治療および/または予防の

10

20

30

40

50

ための薬剤の製造における T R A I L 遮断薬および I L - 8 遮断薬の使用が提供される。

【 0 0 2 3 】

本明細書において「肝疾患」という用語は、T R A I L 経路が肝細胞のアポトーシスを導くいずれの肝疾患にも適用される。肝疾患は H B V もしくは H C V 感染、H B V もしくは H C V の H I Vとの同時感染、または脂肪酸肝疾患 (fatty acid liver disease) であってよい。好ましくは、肝疾患は H B V 感染に関連する。肝疾患は慢性 H B V 感染、好ましくは e A g - C H B 感染であることがさらに好ましい。肝疾患は、慢性 H B V 感染に関連し、肝炎における大きな増大により特徴付けられる肝炎に関連することがさらになお好ましい。

【 0 0 2 4 】

本発明の第一の態様による使用においては、該薬剤は I F N - を追加的に含んでよい。I F N - は N K 細胞を細胞障害性となるように促進することから、しばしばウィルス感染の治療に用いられる。従って本発明者らは、I F N - 活性化 N K 細胞はウィルス制御および肝障害において二重の役割を持つと考える。さらに、H B V 感染の治療における I F N - の外来性の使用は、特に進行型の肝疾患を有する個体において肝炎およびそれによる肝障害の原因となる傾向のため、しばしば制限される。従って、I F N - を I L - 8 遮断薬および / または T R A I L 遮断薬と共に投与することにより、I F N - の有害な影響 (すなわち肝障害) を減少できる。抗ウィルス薬としての作用を提供するいずれの形の I F N - も使用できる。好ましくは、I F N - はペグ化されている。

【 0 0 2 5 】

本発明の第一の態様によるさらなる使用において、該薬剤は抗ウィルス逆転写酵素剤 (reverse transcriptase antiviral) を追加的に含んでよい。抗ウィルス逆転写酵素剤はしばしばウィルス感染の治療に使用され、その使用は肝炎に関連している。H B V 感染の治療における抗ウィルス逆転写酵素剤の外来性の使用は、特に進行型の肝疾患を有する個体において、肝炎およびそれによる肝障害を導く、薬剤耐性の発生に起因するウィルス抑制の喪失によりしばしば制限される。従って I L - 8 遮断薬および / または T R A I L 遮断薬は、抗ウィルス逆転写酵素剤に対する薬剤耐性の発生に起因するウィルス抑制の喪失により形成される、肝炎を予防するために使用されてよい。さらに、抗ウィルス逆転写酵素剤を I L - 8 遮断薬および / または T R A I L 遮断薬と共に投与することにより、抗ウィルス逆転写酵素剤の有害な影響 (すなわち肝障害) を減少できる。ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、クレブジン、テノホビルおよびこれらの組み合わせを含むいずれの抗ウィルス逆転写酵素剤も、H B V 感染の治療のために使用できる。

【 0 0 2 6 】

本発明の第一の態様による使用において、該薬剤は I F N - または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体の肝疾患の治療のために使用されてよい。I F N - および抗ウィルス逆転写酵素剤の使用は肝炎の発生に関連する傾向があることから、該薬剤は特に I F N - または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体における肝炎の予防または減少に有用であろう。

【 0 0 2 7 】

本発明の第一の態様による使用において該薬剤はまた、肝疾患の治療および / または予防を補助するいずれの追加成分も含むことができる。適切な追加成分は、肝疾患がウィルス感染 (例えば H B V 感染、または H B V および H I V の同時感染) に関連する際には抗ウィルス剤を含む。適切な抗 H B V および抗 H I V 剤はヌクレオシド系阻害剤を含む。

【 0 0 2 8 】

薬剤の各成分は、免疫反応を起こすことのできる動物へ同時に、連続的に、または別々に送達できる。好ましくは、各成分は同時に投与される。組成物は反復投与できる。

【 0 0 2 9 】

本発明の第一の態様による使用において、該薬剤はヒト、家畜または愛玩動物のどのようないずれの適切な動物における肝疾患の治療のためにある。好ましくは、該動物は哺乳類ま

10

20

30

40

50

たは鳥類である。特に、該動物はヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジおよび鳥類を含む群から選択されてよい。該動物はヒトであることが特に好ましい。

【0030】

本明細書において「治療」という用語は、血清トランスアミナーゼのような肝炎および肝障害の測定値のいずれの低下、または生検における肝炎の減少に適用される。

【0031】

本明細書において「予防」という用語は、肝炎および肝障害の程度を阻止、遅延または減弱することに適用される。

【0032】

当業者により理解されるように、IL-8遮断薬および/またはTRAIL遮断薬は、一種または複数種の該遮断薬をコードする1以上の核酸の形で投与できる。従って本発明の第一の態様の別の実施形態では、肝疾患の治療および/または予防のための薬剤の製造における、IL-8遮断薬をコードする1以上の核酸分子の使用が提供される。該薬剤は、好ましくはTRAIL遮断薬をコードする1以上の核酸もまた含む。

10

【0033】

一種または複数種の該遮断薬を望まれる場へ送達するための1以上の核酸の使用は、肝疾患治療のための別 の方法である。TRAIL遮断薬およびIL-8遮断薬の両方が1以上の核酸によりコードされる際、これらは単一の核酸分子または別々の核酸分子によりコードできる。

20

【0034】

本発明の1以上の核酸は、周知の方法により得られる。例えば天然配列は、適切な細胞株から、またはヒトもしくはマウスのような生物の組織から直接由来する、DNAまたはcDNAからのゲノムクローニングまたはcDNAクローニングにより得られてよい。あるいは、配列はホスホラミダイト法のような標準的な合成法を用いて合成できる。

30

【0035】

合成またはクローニング法により得られた核酸配列を改変するために、多数の技術が用いられてよい。このような技術は当業者に周知である。例えばDNA配列を改変するために、部位特異的変異誘発、またはオリゴヌクレオチド定方向突然変異誘発およびPCR技術が用いられてよい。このような技術は当業者に周知であり、かつ公知の文献の大部分に記載されている。

30

【0036】

該1以上の核酸分子は、好ましくは発現ベクターである。発現ベクターは、哺乳類細胞を含む様々な異なる生物に核酸を発現することがよく知られている。本発明の発現ベクターは、好ましくはプロモーターおよび1以上の阻害剤をコードする機能的に連結した核酸分子を含む。さらに該ベクターは、核酸分子の発現を得るために必要とされるいずれのその他の制御配列を含むことが好ましい。

【0037】

適切な制御配列は、核酸配列が体内の望まれる部位、すなわち肝臓に発現することが確実となり得る配列を含む。

40

【0038】

本発明は、TRAIL遮断薬およびIL-8遮断薬をコードする発現ベクターを提供する。

【0039】

本発明はまた、TRAIL遮断薬およびIL-8遮断薬をコードする1以上の核酸分子により形質転換された宿主細胞も提供する。該遮断薬は、単一の核酸分子または別々の核酸分子によりコードできる。

【0040】

「形質転換」という用語は、外来性の核酸分子を宿主細胞中に挿入することに適用され、挿入に用いられた方法、例えば直接の取り込み、形質導入、f-接合またはエレクトロポレーションは問わない。外来性の核酸は非組み込み型のベクター（エピソーム）として

50

得られるか、または宿主ゲノムへ取り込まれてよい。

【0041】

好ましくは、宿主細胞は真核細胞、さらに好ましくはチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、H P M C、He L a 細胞、ベビーハムスター腎臓（B H K）細胞、He p G 2 細胞のような肝臓由来の細胞、およびミエローマもしくはハイブリドーマ細胞株のような哺乳類細胞である。好ましくは、宿主細胞は肝臓由来である。

【0042】

第二の態様によれば本発明は、有効量のI L - 8 遮断薬を個体へ送達することを含む、肝疾患を有する個体の治療および／または予防のための方法を提供する。

【0043】

本発明の第二の態様の特定の実施形態において、該方法はT R A I L 遮断薬を個体へ送達することを含まない。

【0044】

本発明の第二の態様の別の特定の実施形態において、該方法は有効量のT R A I L 遮断薬を個体へ送達することを追加的に含む。

【0045】

本発明の第二の態様の特に好ましい実施形態において、有効量のT R A I L 遮断薬およびI L - 8 遮断薬を個体へ送達することを含む、肝疾患を有する個体の治療および／または予防のための方法が提供される。

【0046】

本発明の第二の態様による方法は、有効量のI F N - を個体へ送達することを追加的に含んでよい。I F N - の有効量とは、H B V の複製を抑制する量である。

【0047】

本発明の第二の態様による方法はまた、有効量の抗ウィルス逆転写酵素剤を個体へ送達することも追加的に含んでよい。抗ウィルス逆転写酵素剤の有効量とは、H B V の複製を抑制する量である。

【0048】

本発明の第二の態様による方法においては、肝疾患の治療および／または予防を補助するいずれの追加成分もまた個体へ送達できる。適切な追加成分は、本発明の第一の態様に30  
関して上に述べられている。

【0049】

本発明の第二の態様による方法は、I F N - または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体の肝疾患を治療するために用いられてよい。I F N - および抗ウィルス逆転写酵素剤は肝炎をもたらす傾向があることから、該方法は特にI F N - または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体における肝炎の予防または減少に有用であろう。

【0050】

本発明の第一の態様について上に示すように、I L - 8 遮断薬および／またはT R A I L 遮断薬は、一種または複数種の該遮断薬をコードする1以上の核酸の形で投与できる。従って本発明の第二の態様の別の実施形態において、I L - 8 遮断薬をコードする1以上の核酸分子の有効量を個体へ送達することを含む、肝疾患を有する個体の治療および／または予防のための方法が提供される。好ましくは、該方法はT R A I L 遮断薬をコードする1以上の核酸の有効量を個体へ送達することを追加的に含む。

【0051】

T R A I L 遮断薬およびI L - 8 遮断薬の両方が1以上の核酸によりコードされる際、これらは単一の核酸分子または別々の核酸分子によりコードできる。

【0052】

本発明の第三の態様によれば、肝炎の治療および／または予防のための薬剤の製造における、T R A I L 遮断薬の使用が提供される。

【0053】

驚くべきことにT R A I L 遮断薬は、肝炎の減少および予防に有効であることが見出さ

10

20

30

40

50

れた。

【0054】

肝炎は、増大した肝炎の急性の症状発現である。このような肝炎は、アルコール乱用またはウィルス感染に関連し得る。「肝炎」という用語は、好ましくはHBV感染、またはHBVおよびHIVの同時感染により起こる肝炎に適用される。HBV感染は、好ましくはeAg-CHB感染である。好ましくは、肝炎はeAg-CHB感染により起こる。

【0055】

本発明の第三の態様の使用において、該薬剤は1以上のIL-8遮断薬、IFN-<sup>10</sup>、または抗ウィルス逆転写酵素剤を追加的に含んでよい。このような追加薬剤の存在により、肝炎の治療および/または予防を改善できる。

【0056】

本発明の第三の態様の使用において該薬剤はまた、肝炎の治療および/または予防を補助するいずれの追加成分も含むことができる。適切な追加成分は、本発明の第一の態様に関する上に述べられている。

【0057】

本発明の第三の態様による使用において、該薬剤はIFN-<sup>20</sup>または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体の肝炎の治療のために使用されてよい。IFN-<sup>20</sup>および抗ウィルス逆転写酵素剤は肝炎をもたらす傾向があることから、該薬剤は特にIFN-<sup>20</sup>または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体における肝炎の予防または減少に有用であろう。

【0058】

当業者は、TRAIL遮断薬が、該TRAIL遮断薬をコードする1以上の核酸の形で投与できることを理解するであろう。従って本発明の第三の態様の別の実施形態において、肝炎を治療するための薬剤の製造における、TRAIL遮断薬をコードする1以上の核酸分子の使用が提供される。

【0059】

第四の態様によれば本発明は、有効量のTRAIL遮断薬を個体へ送達することを含む、肝炎を有する個体の治療および/または予防のための方法を提供する。

【0060】

該方法は、有効量の1以上のIL-8遮断薬、IFN-<sup>30</sup>、または抗ウィルス逆転写酵素剤を個体へ送達することを追加的に含んでよい。

【0061】

本発明の第四の態様による方法においては、肝炎の治療および/または予防を補助するいずれの追加成分も個体へ送達できる。適切な追加成分は、本発明の第一の態様に関する上に述べられている。

【0062】

本発明の第四の態様による方法は、IFN-<sup>40</sup>または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体の肝炎の治療のために使用されてよい。IFN-<sup>40</sup>および抗ウィルス逆転写酵素剤は肝炎を起こす傾向を持つことから、該方法は特にIFN-<sup>40</sup>または抗ウィルス逆転写酵素剤を投与されている個体における肝炎の予防または減少に有用であろう。

【0063】

当業者は、TRAIL遮断薬が、該TRAIL遮断薬をコードする1以上の核酸の形で投与できることを理解するであろう。従って本発明の第四の態様の別の実施形態において、TRAIL遮断薬をコードする1以上の核酸分子の有効量を個体へ送達することを含む、肝炎を有する個体の治療および/または予防のための方法が提供される。

【0064】

本発明はまた、TRAIL遮断薬およびIL-8遮断薬、またはTRAIL遮断薬およびIL-8遮断薬をコードする1以上の核酸を1以上の薬理学的に許容される賦形剤と共に含む、薬理学的に許容される組成物も提供する。該組成物は、IFN-<sup>50</sup>もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤、またはIFN-<sup>50</sup>をコードする核酸分子もしくは抗ウィルス逆転写

酵素剤を追加的に含んでよい。

【0065】

本発明はまた、T R A I L 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、またはT R A I L 遮断薬をコードする1以上の核酸分子およびI F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を1以上の薬理学的に許容される賦形剤と共に含む、薬理学的に許容される組成物も提供する。

【0066】

本発明はまた、I L - 8 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、またはI L - 8 遮断薬をコードする1以上の核酸分子と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を1以上の薬理学的に許容される賦形剤と共に含む、薬理学的に許容される組成物も提供する。

10

【0067】

適切な賦形剤は当業者に周知である。

【0068】

本発明の薬理学的に許容される組成物の各成分の具体的な量は標準的な方法論を用いて、かつ以下の実施例の項で用いられた具体的な値からの推定により決定できる。用いられる具体的な量は、治療される動物の大きさおよび代謝を含む幾つかの要因に依存し得る。

【0069】

本発明の医薬組成物は、経口、非経口、または埋め込み型リザーバー経由を含むいずれの適切な方法で投与されてよい。好ましくは、該医薬組成物は経口または注射により投与される。

20

【0070】

該医薬組成物は、例えば水性または油性の無菌注射用懸濁液のような、無菌注射用製剤の形であってよい。この懸濁液は当該技術分野で公知の方法により、適切な分散剤または湿潤剤（例えば、T w e e n 8 0 ）および懸濁剤を用いて処方されてよい。該無菌注射用製剤はまた、無毒性の非経口投与可能な希釈剤または溶媒、例えば1，3 - ブタンジオール溶液としての無菌注射用溶液または懸濁液であってよい。許容されるビヒクリおよび溶媒のうちで使用されてよいものは、マンニトール、水、リンゲル液および生理食塩水である。さらに、従来から、無菌の固定油が溶媒または懸濁化剤として使用されている。この目的のため、合成モノ - またはジグリセリドを含む、いずれの無菌性固定油も使用されてよい。オレイン酸のような脂肪酸およびそのグリセリド誘導体は、オリーブオイルまたはヒマシ油のような天然の薬理学的に許容される油、特にこれらのポリオキシエチル化された形として、注射液の製剤に有用である。これらの油溶液または懸濁液はまた、P h . H e l v または類似アルコールのような長鎖アルコール希釈液または分散剤を含んでよい。

30

【0071】

本発明の医薬組成物は、カプセル、錠剤、および水性懸濁液および溶液を含むがこれらに限定されない、いずれの経口に使用可能な剤形により経口投与されてよい。経口使用のための錠剤の場合、一般に用いられる担体はラクトースおよびコーンスタークを含む。ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤もまた、典型的に添加される。カプセルの形による経口投与のための有用な希釈剤は、ラクトースおよび乾燥コーンスタークを含む。水性懸濁液を経口投与する場合、有効成分は乳化剤および懸濁剤と組み合わされる。必要に応じ、特定の甘味料および / または香料および / または着色料が添加されてよい。

40

【0072】

本発明はまた、治療、特に肝疾患の治療における使用のため、本発明の医薬組成物のいずれか一種も提供する。

【0073】

本発明はまた、T R A I L 遮断薬およびI L - 8 遮断薬、またはT R A I L 遮断薬およびI L - 8 遮断薬をコードする1以上の核酸を含む、肝疾患を治療するためのキットも提供する。該キットは、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤、またはI F N - をコードする核酸分子もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を追加的に含んでよい。

50

## 【0074】

本発明はまた、T R A I L 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、またはT R A I L 遮断薬をコードする1以上の核酸分子およびI F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を含む、肝炎を治療するためのキットも提供する。

## 【0075】

本発明はまた、I L - 8 遮断薬と、I F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤との組み合わせ、またはI L - 8 遮断薬をコードする1以上の核酸分子およびI F N - もしくは抗ウィルス逆転写酵素剤を含む、肝疾患を治療するためのキットも提供する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0076】

10

これより本発明を例としてのみの目的により、以下の図を参照して記述する。

## 【0077】

【図1-1】肝炎を有するC H B 患者血清中における、I L - 8 およびI F N - 濃度の上昇を示す。(a) 代表的な患者(患者1)から採取された長期的な血清サンプル中に、C B A (I L - 8、I L - 1 、I L - 6、I L - 1 0、T N F 、I L - 1 2 p 7 0 )およびサンドイッチE L I S A (I F N - )アッセイにより検出された複数のサイトカインの循環濃度。炎症性サイトカインの濃度は、C B A ソフトウェアまたはP r i s mにより決定した。

【図1-2】肝炎を有するC H B 患者血清中における、I L - 8 およびI F N - 濃度の上昇を示す。(b) アッセイした14人の患者のうちの4人の代表的な患者における、血清I L - 8 およびI F N - 濃度、ならびに肝炎(A L T )およびウィルス量(H B V - D N A )の時間的な関連性。

20

【図1-3】肝炎を有するC H B 患者血清中における、I L - 8 およびI F N - 濃度の上昇を示す。健常ドナー、低A L T (昨年に対し、A L T < 6 0 I U / l )を有するH B V 患者、および上昇したA L T (サンプル採取時に、A L T > 6 0 I U / l )を有するH B V 患者においてサンドイッチE L I S A により定量したI L - 8 (c) およびI F N - (d) 濃度の横断的な比較。有意性検定はM a n n W h i t n e y U 検定を行なった。

20

【図2-1】C H B 患者におけるN K 細胞のT R A I L 発現と肝炎の, e x v i v o での直接の相互関係を示す。(a) C D 3 、C D 5 6 およびT R A I L に対するm A b で染色し、C D 3 + 細胞にゲートをかけた、C H B 患者由来の代表的なフローサイトメトリー・ドットプロット。パーセンテージは、T R A I L で染色した、新しく単離したC D 3 + C D 5 6 + N K 細胞の比率を示す。

30

【図2-2】C H B 患者におけるN K 細胞のT R A I L 発現と肝炎の, e x v i v o での直接の相互関係を示す。(b) 上のパネル: e A g - C H B を有する患者由来のP B M C をe x v i v o で染色した。フローサイトメトリーにおいてT R A I L を発現するN K (C D 3 + C D 5 6 + )のパーセンテージはA L T と相関していた。C D 6 9 + N K 細胞は全リンパ球のパーセントとして示す。下のパネル: 全C D 3 + C D 5 6 + N K 細胞のうちの、C D 5 6 bright N K 細胞のパーセント。T R A I L 陽性であったこれらC D 5 6 bright N K 細胞のパーセントをA L T に対してプロットした。

40

【図2-3】C H B 患者におけるN K 細胞のT R A I L 発現と肝炎の, e x v i v o での直接の相互関係を示す。(c) 健常ドナー、低A L T (昨年に対し、A L T < 6 0 I U / l )を有するH B V 患者、および上昇したA L T (サンプル採取時に、A L T > 6 0 I U / l )を有するH B V 患者由来のC D 3 + C D 5 6 + N K 細胞における、e x v i v o 表面T R A I L 発現の横断的な分析。有意性検定はM a n n W h i t n e y U 検定を用いて行なった。

40

【図3】末梢に比較して豊富な、肝臓内でのN K 細胞の数、T R A I L 発現および活性化を示す。(a) 代表的なC H B 患者の末梢および肝臓由来の单核細胞をC D 3 およびC D 5 6 に対する抗体で染色し、C D 3 + T 細胞、C D 3 + C D 5 6 + N K T 細胞およびC D 3 - C D 5 6 + N K 細胞の割合(四角で強調)をフローサイトメトリーにより決定した。慢性

50

的にHBVに感染した5人の患者由来の肝浸潤リンパ球（IHL）および循環リンパ球（PBL）由来のNK細胞（CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>）のCD69発現（b）およびTRA1L発現（d）を、ex vivoで評価した。P値はMann Whitney U検定により決定した。（c）CD56<sup>bright</sup>およびCD56<sup>dim</sup>NK細胞サブセットにおいて肝臓内NK細胞の活性化を比較した、代表的なCHB患者のフローサイトメトリー・ドットプロット分析。（e）肝臓より分離されたCD56<sup>bright</sup>およびCD56<sup>dim</sup>NK細胞サブセットおよびCD3<sup>+</sup>T細胞のTRA1L発現を比較したヒストグラム。（f）7人のHBV患者から採取したパラフィン包埋肝臓切片を、抗TRA1L mAbにより染色した。左パネルの四角で囲んだ領域は、右パネルの視界を示す。TRA1L陽性細胞は茶色に染色され、黒の矢印で強調している。

【図4】患者血清中に観察されるIFN- $\gamma$ の濃度による、CHB患者から分離されたNK細胞の増大した表面TRA1L発現および活性化の誘導を示す。健常ドナー（白棒）およびCHB患者（黒棒）由来のPBMCを、IFN- $\gamma$ （1000U/mL）、IL-8（5ng/mL）、またはIFN- $\gamma$ およびIL-8と共にin vitroで24時間培養した。この培養のTRA1L発現（a）およびNK細胞活性化（b）の効果をフローサイトメトリーにより評価した。NK細胞はCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>として同定した。グラフは、未処理のコントロールに観察されるCD69またはTRA1Lの基本的な量を、サイトカイン処理した後に観察されるそれらから差し引くことによりプロットした。

【図5】HBVに感染した肝細胞のTRA1Lレセプター発現を示す。（a）HBV感染（左パネル）および健常コントロール（右パネル）肝臓由来のパラフィン包埋切片を、抗TRA1L-R2mAbにより染色した。膜局在型（矢印）および細胞質（\*）TRA1L-R2の発現を、茶色の色素原反応性（brown chromogen reactivity）により示す。（b）未処理およびアイソタイプコントロールと比較した、IL-8培養後（10ng/mLで24時間）のHepG2 TRA1L-R2量のMFI。（c）未処理およびアイソタイプコントロールと比較した、24時間のIFN- $\gamma$ （1000U/mL）後のHepG2 TRA1L-R2量のMFI。これらは別々の5回の実験の代表例である。

【図6-1】CHB患者由来のIFN- $\gamma$ 活性化NK細胞は、TRA1L誘導性肝細胞アポトーシスを介し得ることを示す。（a）HepG2細胞を、IL-8（10ng/mL）の存在下または非存在下で24時間培養した。同時に、PBMCをIFN- $\gamma$ （1000U/mL）の存在下または非存在下で24時間培養した。上のパネル：その後PBMCをHepG2細胞に10:1のE:T比で加え、4時間後にカスバーゼ活性化をフルオレセイン標識Z-VAD-fmkにより可視化し、フローサイトメトリーで検出して平均蛍光強度（MFI）として表した。下のパネル：TRA1L遮断抗体（10ng/mL）の添加以外は上記の通りである実験手順。（b）健常ドナー、低ALTを有するCHB患者、および高ALTを有するCHB患者由来のPBMCをIFN- $\gamma$ （1000U/mL）と共に24時間培養し、その後上記のようにIL-8処理HepG2のカスバーゼ活性化を評価した代表的な結果。

【図6-2】CHB患者由来のIFN- $\gamma$ 活性化NK細胞は、TRA1L誘導性肝細胞アポトーシスを介し得ることを示す。（c）高ALTのHBV患者由来のex vivo PBMCによるHepG2カスバーゼ誘導、およびそのTRA1L遮断mAbの添加による減少の代表例。（d）健常ドナー、低ALTを有するCHB患者、および高ALTを有するCHB患者からex vivoで直接採取したPBMCの添加による、HepG2カスバーゼ誘導の代表例。（e）肝傷害を有するHBV患者（高ALT患者、n=6）からex vivoで直接採取したPBMCを用いたHepG2カスバーゼ誘導の程度を、コントロール（上昇したALTを有さないHBV患者 n=3、および健常コントロール n=3）由来のPBMCと比較した概要（p=0.03、Mann Whitney U検定）。

【図7】CHB患者由来のNK細胞が、初代ヒト肝細胞においてTRA1L誘導性アポトーシスを介し得ることを示す。初代ヒト肝細胞はIL-8（10ng/mL）を添加し

て48時間培養し、最後の24時間にはIFN- $\alpha$ (1000U/mL)を添加した。同時に、3人の健常ドナー、3人の低ALTを有するCHB患者、および4人の高ALTを有するCHB患者由来のPBMCを、IFN- $\alpha$ の存在下または非存在下で37において24時間培養した。肝細胞およびPBMCは、10:1のE:T比で、インターフェロン処理ウェル内においてTRAIL遮断抗体の存在下または非存在下で18時間共培養した。アポトーシスの程度は、in situ DNA末端標識法(ISEL)によるDNA断片化の検出により決定した。(a) PBMC非存在下で培養したコントロール肝細胞の代表的イメージ。(b) 高ALTを有するCHB患者由来のPBMCと共に18時間培養した後の肝細胞の代表的イメージ。矢印はISEL陽性肝細胞を表す。(c) 高ALTの患者(n=4)由来のPBMCを用いた%ISEL陽性肝細胞のコントロール(低ALT患者n=3、および健常ドナーn=3)に対する要約データ。IFN- $\alpha$ 処理無(白棒)または有(黒棒)、ならびにIFN- $\alpha$ 処理ウェルのTRAIL遮断有(斜線棒)。結果は、PBMCの添加なしでみられる14%の肝細胞アポトーシスを平均基本的な量として差し引いた後に示し、Mann Whitney U検定による有意性検定を行なった。

【図8】IL-8の非存在下で24時間培養した肝細胞HepG2細胞のアポトーシスを阻止するための、抗IL-8抗体と抗TRAIL抗体を組み合わせた使用の結果を示す。2人の異なるドナー((a)NB84;(b)GE83)由来のPBMCをIFN- $\alpha$ (1000U/mL)の存在下で同時に24時間培養した。その後、1μg/mlの抗IL-8モノクローナル抗体および/または抗TRAILモノクローナル抗体(10ng/ml)の存在下または非存在下で、PBMCをHepG2細胞に10:1のE:T比で加え、4時間後にカスパーゼ活性化をフルオレセイン標識Z-VAD-fmkにより可視化し、フローサイトメトリーで検出して平均蛍光強度(MFI)として表した。

【図9】HBVに感染している患者の肝臓由来の肝細胞の増大したIL-8染色を、HBVに感染していない肝臓由来の肝細胞との比較において示す。

【図10】HBVに感染した個体の、NK細胞のCD56<sup>bright</sup>サブセットを含むNK細胞が、高アフィニティ-IL-8レセプター(CXCR1)を発現することを示す。

【図11】機能的走化性アッセイの結果を示す。(A)アッセイのセットアップを示す。(B)IL-8によって化学遊走したNK細胞による肝細胞のアポトーシス誘導の量(ケモカインの添加なしに遊走したNK細胞による誘導に対して)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0078】

実施例

NK細胞活性に影響するサイトカイン環境を理解するため、本発明者らは慢性HBV感染を有する患者において、IFN- $\alpha$ 、ならびにその他の鍵となる幾つかの炎症性および免疫調節性サイトカインを定量した。本発明者らは、血清サイトカイン濃度の鋭敏な測定を肝炎の変化と関連させるため、複数の肝炎の前、その間、およびその後に繰り返し採取され、よく特徴付けられたeAg-CHBを有する患者のコホートを利用した。本発明者らは、肝炎に関連した、血清IFN- $\alpha$ およびIL-8濃度の大きな変動を観察した。肝炎を有するCHB患者における循環IFN- $\alpha$ およびIL-8の増大は、NK細胞の活性化およびex vivoで直接測定した表面TRAIL発現の増大を伴っていた。そこで本発明者らは、結果としての肝障害を説明し得る、これらex vivoでの観察の根底にある機序を探索した。本発明者らは、in vivoで產生されたIFN- $\alpha$ およびIL-8の濃度が、NK細胞による死滅のTRAIL経路を、リガンドおよびレセプター両方への作用において促進することを確立した。本発明者らは、このサイトカインの組み合わせにおいて、慢性HBV感染を有する患者由来のNK細胞がTRAILの仲介により肝細胞を死滅させられることを確認した。

【0079】

材料および方法

患者およびコントロール

10

20

30

40

50

慢性HBV感染(HBsAg陽性)を有する72人の患者を完全な倫理的承認および説明と同意により採用した。そのうち11人の患者はHBeAg陽性であり、残りはHBeAg陰性および抗HBeAb陽性であった(Murex Diagnostics(ダートフォード、英国)から市販されている酵素免疫アッセイキットにより測定した)。HBV-DNAウイルス量を、Roche AmpliCorモニターアッセイ(Roche Laboratories)により定量した。患者は、C型肝炎ウイルスおよびデルタ肝炎ウイルスに対する抗体、ならびにHIV-1および2に対する抗体は陰性であった(Ortho Diagnostic System、Murex Diagnostics)。この研究に含まれる患者のいずれも、抗ウイルス療法または免疫抑制剤を受けていなかった。53人の患者から血清を得て直ちに凍結した。46人の患者からPBMCを、20人の患者から肝生検/外植片またはパラフィン包埋切片を得た。14人のHBeAg陰性CHB患者のサブセットを、複数の血清およびPBMCサンプルの採取により長期的な分析に供与した(表2)。血清サンプルは平行して分析し、PBMCは直接ex vivoで分析した。

10

## 【0080】

コントロールサンプルは、14および13人の健常ドナーそれぞれからの血清およびPBMC、ならびに4人の健常ドナーおよび4人のアルコール性肝炎を有する患者からのパラフィン包埋肝切片により構成された。

20

## 【0081】

## 抗体および試薬

抗体CD3-Cy5.5/PerCP、CD56-FITC、TRAIL-PE、CD69-APC(Pharmingen、BD Biosciences、カウリー、英国)、TRAIL-R1-PE、TRAIL-R2-PE、TRAIL-R3-PE、TRAIL-R4-PE、抗IL8およびCD56-PE(R&D Systems、アビンドン、英国)は、他に記載のない限り製造者の推奨する濃度においてフローサイトメトリ-分析に使用した。生物活性を中和するための抗TRAIL抗体(R&D Systems)は、10ng/mLの濃度において使用した。組み換えヒトIFN-2a(rhIFN-; PBL Biomedical Laboratories、ピスカタウェイ、ニュージャージー州、米国)および組み換えヒトIL-8(rhIL-8; R&D Systems)は各実験に対して記載された濃度で使用した。

30

## 【0082】

## 血清サイトカイン濃度の決定

Cytometric Bead Array(CBA)Inflammationキット(BD Biosciences)を製造者のプロトコルに従って使用し、血清サイトカイン濃度を確認した。簡単に述べると、50μLの患者血清または標準組み換えタンパク質の希釈を、サイトカイン(IL-8、IL-1、IL-6、IL-10、TNF、IL-12p70)のパネルに対するmAbをコーティングした捕獲ビーズおよびPEを結合した検出試薬の混合物に加えた。3時間後、捕獲ビーズを洗浄し、FACSCaliberフローサイトメーター(BD Biosciences)において取得した。組み換え標準物質および供給されたBD CBAソフトウェアを用いて、サイトカイン濃度を各血清サンプルにつき定量した。血清IFN-は標準的なサンドイッチELISAキット(PBL Biomedical Laboratories)を用いてアッセイした。製造者の高感度プロトコルに従い、50μLの患者血清を分析した。

40

## 【0083】

## NK細胞のex vivo染色

HBV患者および健常ドナーから新しく単離したPBMC、または以前に記載された通りに(非特許文献3)HBV患者から単離した肝臓内リンパ球を、CD3、CD56、CD69およびTRAILに対する抗体と共に4で30分間インキュベートした。PBMCはPBS+1%FCSで2回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定した後、FACSCaliberフローサイトメーターにおいて取得した。CD69およびTRAIL特

50

異的 mAb で染色された陽性集団を限定するため、アイソタイプの一致したコントロール mAb を使用した。

#### 【0084】

#### TRAIL および TRAIL レセプターに対する肝臓サンプルの免疫組織化学

15例の CHB、4例のアルコール性肝疾患症例および4人の健常ドナー由来の保存されたパラフィンブロックを、TRAIL レセプター 1 および 2 の発現について染色した。7人の eAg - CHB 患者からの連続切片を、TRAIL の発現について染色した。切片 (4 μm) を、荷電スライド (Surgipath、英国) 上に切り出し、60 で 1 時間加熱した。脱パラフィンおよび再水和の後、内在性のペルオキシダーゼ活性を遮断するため、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水溶液で処理した。抗原の回収は、以前に記載された通りに (非特許文献 54) ALTEC 技術を用いて行なった。水中での短い洗浄に続き、切片を Seq uenza (Shandon、英国) 上に置き、TBS / Tween pH 7.6 で洗浄した。TRAIL - R1 に対するモノクローナル抗体 (1:100 希釈、R&D Systems)、または TRAIL - R2 に対するモノクローナル抗体 (1:50 希釈、R&D Systems) を室温で 40 分間適用した。切片を TBS / Tween 中で洗浄し、抗体を Dako Chemate Envision 西洋わさびペルオキシダーゼキット (Dako、英国) を用いて検出した。切片を水中で洗浄、ヘマトキシリントンで対比染色、脱水、キシレン中に置き、DPX 中にマウントした。

10

#### 【0085】

#### サイトカイン誘導性の NK 細胞活性化および TRAIL 発現の上方調節

PBMC を、補足された RPMI 10% FCS に再浮遊し、丸底 96 ウェル組織培養プレートに  $3 \times 10^5$  細胞 / ウェルにてまき、rhIFN - (1000 U / mL)、rhIL - 8 (5 ng / mL) あるいは IFN - および IL - 8 と共に 37 で 24 時間培養した。サイトカイン誘導性の NK 活性化および TRAIL 発現の増加の程度は、基本的水準の CD69 または TRAIL 発現を、サイトカイン処理後に観察されたそれらから差し引くことにより決定した。

20

#### 【0086】

#### HepG2 ヘパトーマ細胞株における TRAIL - R 発現のサイトカイン誘導性の変化

HepG2 ヘパトーマ細胞を  $75 \text{ cm}^2$  フラスコからトリプシン処理し、48 ウェル平底組織培養プレートに  $2 \times 10^5$  細胞 / ウェルにてまいた。細胞を 5 時間接着させ、rhIL - 8 (10 ng / mL) または rhIFN - (1000 U / mL) を添加して 37 で 24 時間培養した。ウェルを PBS で 2 回洗浄し、氷上で 5 mM EDTA と共に 45 分間インキュベートした。このようなプレートからの穏やかな剥離は、表面 TRAIL - R 発現の損失を防いだ。次いで、細胞を PBS + 1% FCS で 2 回洗浄して EDTA を除いた後、4 種の膜結合型 TRAIL - R に対する mAb と共に 4 で 30 分間インキュベートし、FACSCaliber フローサイトメーターにおいて取得した。

30

#### 【0087】

TRAIL を発現した NK 細胞により仲介される、HepG2 細胞株のアポトーシス HepG2 を  $75 \text{ cm}^3$  フラスコからトリプシン処理し、48 ウェル平底組織培養プレートに  $1 \times 10^5$  細胞 / ウェルにてまき、接着させた。接着した細胞は、IL - 8 (10 ng / mL) または IFN - (1000 U / mL) の存在下および非存在下で、37 において 24 時間培養した。慢性 HBV 患者由来の PBMC (または、純化した NK 細胞もしくは NK を除いた PBMC) もまた、IFN - (1000 U / mL) の存在下および非存在下で、37 において 24 時間培養した。この培養後、TRAIL 遮断抗体および / または IL - 8 遮断抗体を関連するウェルに添加し、1 時間後に PBMC を HepG2 のウェルに 10 : 1 (PBMC : HepG2) の割合で加えた。4 時間後、カスパーーゼ活性化の程度をカルボキシフルオレセイン - FLICA アポトーシス検出キット (Serotec、キドリントン、オックスフォード、英国) を用い、フローサイトメトリーによる検出のための製造者のプロトコルを用いて決定した。

40

#### 【0088】

50

T R A I L を発現した N K 細胞により仲介される、初代ヒト肝細胞のアポトーシス

初代ヒト肝細胞は非疾患の肝外植片組織からコラゲナーゼ灌流（非特許文献 55）を用いて分離し、ハイドロコルチゾン、インスリン、グルタミンを含む Williams E 培地に再浮遊させ、48 ウェル平底培養プレートに  $1 \times 10^5$  細胞 / ウェルにてまき、2 時間接着させた。培地を交換して細胞を 24 時間静止させ、その後 IL - 8 (10 ng / mL) および IFN - (1000 U / mL) により、37 において 24 時間刺激した。CHB または健常ドナー由来の PBMC を、IFN - (1000 U / mL) の存在下または非存在下で、37 において 24 時間培養した。この後、T R A I L 遮断抗体 (10 ng / mL) を関連するウェルに添加し、2 時間後に PBMC を肝細胞のウェルに 10 : 1 (PBMC : 肝細胞) の割合で加え、37 においてさらに 18 時間培養した後、メタノールで固定した。アポトーシスの程度は、in situ DNA 末端標識法 (ISEL) による DNA 断片化の検出により決定した（非特許文献 55）。簡単に述べると、固定した細胞を ISEL 混合物 (5 mM MgCl<sub>2</sub> を加えた TBS pH 7.6, 10 mM 2-メルカプトエタノール、5 mg / mL ウシ血清アルブミン、20 ユニット Klenow DNA ポリメラーゼ (Boehringer, ロンドン、英国) 0.01 M ヌクレオチド dATP, dCTP および dGTP (Invitrogen, ペーズリー、英国)、およびジゴキシゲニン標識 dUTP (Roche Laboratories)) と共に 37 において 1 時間インキュベートした。その後切片を蒸留水で洗浄し、ヒツジ抗ジゴキシゲニンアルカリファスター結合 Fab 断片 (1 : 200 希釀；Roche Laboratories) と共に室温にて 1 時間インキュベートした。TBS pH 7.6 によるさらなる洗浄の後、切片をアルカリファスター基質と共に 15 分間インキュベートし、マイヤーのヘマトキシリンで対比染色した後、4 においてメタノールで再固定した。アポトーシスの誘導は、この研究計画について知らされていない無関係の観察者により定量され、この観察者は各ウェル中に少なくとも 200 の肝細胞を計数した。

#### 【0089】

#### 結果

慢性 H B V 感染における肝疾患の再燃の間の、IFN - および IL - 8 の循環濃度の大きな変動

e Ag 陰性の慢性 B 型肝炎 (e Ag - CHB) を有する患者は、ウィルス量の迅速な変化に関連する、肝炎の自発性の「再燃」にかかりやすい。これらの再燃は、長期的な標本抽出によって捉えることが十分に予測可能で、動的な変動期間の間の H B V 関連肝障害の機序を研究する機会を提供する。以前に反復性の肝炎を起こしやすいことが確認された 14 人の e Ag - CHB 患者のコホートを採用し、長期的に研究した（非特許文献 2）。頻繁なサンプル採取を通じ、この研究において血清アラニントランスアミナーゼ (ALT) が基本的な値の 2 倍を超えるか、かつ正常値上限の 3 倍を超える（女性では < 35 IU / L、男性では < 50 IU / L）急激な上昇として定義された 1 以上の再燃の前、その間、およびその後に血清を得た。血清 ALT は、これが H B V に感染したチンパンジー（非特許文献 28）およびヒト（非特許文献 29）における研究で肝炎の組織学的所見を正確に予見することが示されたことから、肝障害の代用マーカーとして使用された。含まれる全ての患者は、少なくとも 1 年の臨床モニターによる十分に特徴付けられた疾患の経過、および通常 1 - 2 ヶ月の間隔をとった、研究に使用できる 4 ないし 10 の連続したサンプルを有していた（表 2）。Inflammatory Cytometric Bead Array (CBA) キットおよび酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) 技術を用い、少量の血清から同時に複数のサイトカインを定量することが可能であった。分析したサイトカインは、インターロイキン - 8 (IL - 8)、IL - 1、IL - 6、IL - 10、腫瘍壞死因子 (TNF)、IL - 12 p 70 およびインターフェロン - アルファ (IFN - ) であった。試験した 7 種のサイトカインのうち、IL - 8 および IFN - のみが一貫して検出され、患者におけるピーク濃度は他の 5 種のサイトカインに観察されたそれをはるかに超過しており、かつ健常コントロールよりも著しく高かった（表 1）。これら 2 種のサイトカインの血清濃度は、複数の再燃を有する症例において反復性の大きな変動を起

10

20

30

40

50

こすことが観察され(図1a)、これらの患者はアッセイされた炎症現象の間に実質的に倍の変化を一貫して示した(表2)。このような一定の大きな変動は、測定したその他のサイトカインには観察されなかった(図1a)。

#### 【0090】

このコホート内でのこれらの患者は、再燃の絶頂において、著しい程度の肝炎(最大のALTとして示す。表2)および高いウィルス量(最大ウィルス量を参照のこと。表2)を有していた。血清中のIFN- $\alpha$ およびIL-8の量は、ALTおよびHBV-DNAの変動と時間的な関連を示した(図1b)。大部分の患者(10/14)にとって、IL-8の血清濃度のピークは肝炎の発症に先行しており(ALTのピークに少しだけ先立つサンプル)、ウィルス量の急な増大と同時かまたはその直後であった(図1bおよび表2)。IFN- $\alpha$ の最大の血清濃度は肝炎のピークと同時に起こり(図1bおよび表2、IFN- $\alpha$ のピークとALTのピークの間隔の中央値=0)、このときIL-8の濃度は減少しているが、健常コントロールに比べて高く上昇していた(図1aおよび図1b)。

10

#### 【0091】

IL-8およびIFN- $\alpha$ の上昇した濃度が活動期の疾患有するHBV患者に限定されるのか、または肝炎の無い状態でも見出されるのかということを確立するため、本発明者らは大規模な横断的研究を行なった。HBVに感染していないコントロール、肝炎の証明の無い慢性HBV感染の患者(サンプル採取時点でALT < 60 IU/L、および前年にALT > 60 IU/Lが記録されなかった)、および肝炎を有するHBV感染患者(サンプル採取時点でALT > 60 IU/L)において、血清IFN- $\alpha$ およびIL-8濃度を比較した。肝炎を有するHBV患者は、コントロール群に比べIL-8(図1c)およびIFN- $\alpha$ (図1d)の両方において濃度が著しく上昇していた。一方、健常ドナーのこれら2種のサイトカインは一貫して低濃度または検出できない濃度であり、肝炎の証明の無い慢性HBV患者では、健常ドナーに比べIL-8およびIFN- $\alpha$ は有意に増大しなかった(図1c、d)。これらのデータのさらなる分析は、上昇したIL-8濃度と高HBVウィルス量との同様の相関を明らかにし(データ未提示)、このことはIL-8濃度の変動がHBV-DNAのそれを反映しているという最初の観察を支持している(図1b)。

20

#### 【0092】

アポトーシス促進性のリガンドであるTRAILのNK細胞による発現と、HBV関連肝炎の、ex vivoでの直接の関連性

30

IFN- $\alpha$ により活性化されたNK細胞の細胞毒性の大部分は、肝障害のマウスモデルにおける主要なエフェクターとして最近同定された(非特許文献15)、アポトーシス促進性リガンドのTRAILを介している(非特許文献22)。IFN- $\alpha$ およびIL-8が再燃の間の優位なサイトカインとして確立され、本発明者らはNK細胞のTRAIL経路がこれに関連して活性化されるかどうかについて調べた。ヒトNK細胞は、健常ドナー血液から新しく分離したときには、その表面にTRAILリガンドを少量発現しているかまたは発現していないことが報告された(非特許文献30-32)。しかしながら幾つかのNK細胞のTRAILは、透過処理によって検出可能になり(非特許文献30)、かつ培養での活性化によってそれを増加できる(非特許文献31、32)。一方、反復性の再燃を有するeAg-CHB患者由来のCD3 $^+$ CD56 $^+$ NK細胞は、直接ex vivoで抗TRAILmAbによって表面が共染色される明らかな集団を有することが見出された(図2a)。表面TRAILを発現するNK細胞の割合は、ALTが上昇しているときにはさらに増大していた(図2a)。

40

#### 【0093】

再燃の前、その間、およびその後の連続的なPBM Cが入手可能である、eAg-CHB患者の長期的コホートからの5人の患者のサブセットにおいて、本発明者らはNK細胞活性化およびTRAIL発現の時間的分析を行なうことができた。図2bに2人の代表的患者について例証したように、NK細胞の表面TRAIL発現は、ex vivoで肝炎に一致した大きな変動を示した(図2bの上のパネルを参照のこと)。活性化マーカーで

50

ある C D 6 9 の N K 細胞による発現もまた、肝炎と密接に相関しており、活性化のピークは A L T の最大値（図 2 b の上のパネル）、ならびに I L - 8 および I F N - の上昇した濃度と一致していた（表 2）。

#### 【 0 0 9 4 】

大部分の T R A I L は、N K 細胞のパーフォリン仲介性の細胞毒性の原因である比較的大きな C D 5 6<sup>dim</sup> サブセット（非特許文献 3 3）よりも、C D 5 6<sup>bright</sup> サブセット上有ることが注目された（図 2 a の代表的サンプルを参照のこと）。再燃の間の N K 細胞による T R A I L 発現の全体的な増大は、N K 細胞のうちの C D 5 6<sup>bright</sup> サブセットのパーセントの増大、および T R A I L を発現するこれら C D 5 6<sup>bright</sup> N K 細胞の割合の増大（図 2 b の下のパネル）によることが注目された。 10

#### 【 0 0 9 5 】

その後本発明者らは、肝炎を有するかまたは有さない、健常ドナーおよび H B V 患者の比較的大きな横断的コホートにおいて、N K 細胞による表面 T R A I L 発現量を比較した。直接 e x v i v o で表面に T R A I L を発現する N K 細胞のパーセンテージは、正常 A L T ( $p < 0.001$ ) を有する H B V 患者または健常ドナー ( $p < 0.0001$ ) に比較し、肝炎を有する患者で 4 倍を超えて増大していた（図 2 c）。肝炎を有さない患者に比較し、有する患者において増大した T R A I L 発現もまた、C D 5 6<sup>bright</sup> サブセット内に観察された ( $p < 0.0005$ ；データ未提示）。

#### 【 0 0 9 6 】

注目すべきことに、H B V 患者の長期的および横断的分析において、肝炎の程度に関わらず、C D 3<sup>+</sup> T 細胞上に発現した T R A I L の量は低いままであった（データ未提示）。さらに、H B V のコアおよび表面抗原に対する T 細胞の増殖量は、このパラメーターを長期的に調べた 3 人の患者において、再燃時期の周辺での増大を示さなかった。 20

#### 【 0 0 9 7 】

T R A I L を発現する活性化された N K 細胞の i n v i v o での増加を示すこれらのデータは、H B V 誘導性肝疾患の病原性においてこの経路を利用する N K 細胞の役割を示唆する。

#### 【 0 0 9 8 】

高度に活性化された、高い量の T R A I L を発現する肝臓内 N K 細胞

次に本発明者らは、N K 細胞の T R A I L 経路が、H B V の活発な複製の場である肝臓内で機能するかどうかについて調べた。既に、健康な肝臓内では末梢に比較して N K 細胞が濃縮されていることは十分に確立されている（7）。C H B 患者の肝臓内で N K 細胞の数が同様に増加しているかを確認するため、H B V に感染した肝臓（3 例の肝硬変および 2 例の再燃）から肝臓内単核球を分離し、C D 3<sup>+</sup> T 細胞、C D 3<sup>-</sup> C D 5 6<sup>+</sup> N K 細胞、および C D 3<sup>+</sup> C D 5 6<sup>+</sup> N K T 細胞の比率をフローサイトメトリーにより決定した。図 3 a に示すように、N K および N K T 細胞の両方が、H B V 感染患者の末梢に比較して肝臓内に濃縮されており、C D 3<sup>-</sup> C D 5 6<sup>+</sup> N K 細胞が典型的に全肝臓内リンパ球の 40 % までを構成していた。このことは N K 細胞が、ウィルス量、A L T または組織像に関わらず、H B V 患者の肝臓内リンパ球の 30 - 40 % を構成する（健常コントロールと同じように）ことを示している最近のデータ（非特許文献 3 4）に適合する。 30

#### 【 0 0 9 9 】

これら肝臓内 N K 細胞の活性化状態を評価した際、比較的大きな割合の肝臓内 N K 細胞が、同患者からの末梢 N K 細胞よりも増加した C D 6 9 を有していた（図 3 b）。注目すべきことに、肝臓内の最も高度に活性化された N K 細胞サブセットは、肝臓内に優先的に濃縮されている（データ未提示）C D 5 6<sup>bright</sup> サブセットであった（図 3 c）。 40

#### 【 0 1 0 0 】

I s h i y a m a による最近の論文は、生体移植の際の健常肝臓から抽出された N K 細胞に T R A I L が検出されなかつことを示した（非特許文献 3 2）。一方、本発明者らはこれらの H B V に感染した肝臓から分離した肝臓内 N K 細胞が、同患者の末梢にみられるよりもさらに高めの量において、直接 e x v i v o で T R A I L を発現することを

見出した(図3d)。末梢と同様、TRAILは優先的に活性化されたCD56<sup>bright</sup>NKサブセットに主に発現し、かつ肝臓内CD3<sup>+</sup>T細胞は少量のTRAILを発現していた(図3e)。

#### 【0101】

肝臓内NKのTRAIL量と肝炎の関連性をさらに調べるために、本発明者らは、組織学的にeAg-CHBが証明された患者のALT再燃時期の周辺に採取された5例の生検を、正常ALTおよび組織像によって非活動性疾患が確認されたHBV患者由来の2例の生検と比較した。免疫組織化学により、5例のeAg-CHB切片のうち4例をTRAIL陽性リンパ球(これらは末梢または肝臓において著しいTRAILを発現する唯一の集団であったことからNK細胞と推定された)と同定した(図3f)。一方、非活動性HBV感染を有する2人の患者由来の切片は、同定できるTRAIL発現リンパ球をもたない健常肝臓の報告(非特許文献32)に類似していた。この結果は、肝臓内NK細胞によるTRAIL発現はHBVに関連する肝炎と相關することを示唆する。

10

#### 【0102】

慢性HBV感染患者由来のNK細胞は、肝炎の間に見出されるサイトカイン濃度により活性化され、かつTRAIL発現を誘導される

本発明者らは次に、ALTが上昇した患者におけるex vivoでの発見である、IFN-、IL-8の増大とTRAILを発現したNKとの可能な機構的関連を探査することを考えた。HBVに関連した炎症の間に高濃度が観察されるこれら2種のサイトカインは、NK細胞およびTRAIL経路における免疫調節効果による肝障害に寄与し得る。IFN-はNK細胞機能の修飾因子であるが、その抗ウイルス効力の阻害因子であるIL-8によりどのように影響されるかは不明であった(非特許文献26、27)。さらに、長期的なHBV関連性の炎症を有するこれらの患者にありがちな反復性の刺激の後で、NK細胞がIFN-を介する調節に抵抗性になることは可能であった。これについて調べるために、健常志願者および慢性HBV患者由来のPBMCまたは純化したNK細胞を、IFN-もしくはIL-8単独、または組み合わせと共にin vitroで24時間、肝炎の間に観察された濃度において培養した。PBMCまたは純化したNK細胞は、IFN-と共に培養することにより、TRAILを発現するNK細胞のパーセンテージの実質的な増加を示した(図4a)。IL-8はTRAIL発現を増加させるIFN-の能力への直接の効果を持たず、また阻害もしなかった。再燃を起こしている患者を含んだ慢性HBV感染患者由来のNK細胞は、IFN-の効果に対して抵抗性になるよりも、健常ドナー由来のNK細胞に対するのと同様の量によってTRAILを増加した(図4a)。肝炎を有するHBV患者はそれ故、NK細胞がex vivoで最初から高めのTRAILを発現している結果、in vitroでのIFN-処理の後に比較的高い全NK細胞のTRAIL量を達成した。

20

#### 【0103】

慢性HBV感染患者由来のNK細胞はまた、IFN-により健常ドナー由来のNK細胞に見出されるのと同等量のCD69の増加を伴って活性化される能力を維持しており、かつ再びこの効果はIL-8により阻害されなかった(図4b)。IFN-は高度に純化したNK細胞に同等量の活性化を誘導し、このサイトカインの直接効果を示している(データ未提示)。従って、NK細胞のTRAILおよびCD69の発現の増加のin vivoでの観察は、肝炎を有するCHB患者における循環サイトカインの濃度と同等の濃度を用いたin vitroに反映された。

30

#### 【0104】

HBV感染肝細胞におけるサイトカイン調節性のTRAILレセプター発現

TRAILがレセプターを介する細胞死を誘導するためには、標的細胞上の死ドメインレセプターを会合することが必要である(非特許文献14)。以前の研究は、健常肝臓におけるTRAIL死誘導レセプターの最少のタンパク質発現を示唆した(非特許文献19、35)。しかしながら死誘導レセプターであるTRAIL-R1およびTRAIL-R2のmRNAがヒト肝細胞から単離されており(非特許文献14、17)、これは培養に

40

50

よって T R A I L 誘導性アポトーシスに感受性になることから（非特許文献 17）、増加の可能性を示唆している。H B V に感染した肝臓の肝細胞が、T R A I L を発現する N K により会合できる死誘導レセプターを発現するかどうかを確認するため、H B V 感染およびコントロールからのパラフィン包埋肝切片を T R A I L - R 1 および T R A I L - R 2 に対して染色した。H B V 感染およびコントロールの肝臓に T R A I L - R 1 は検出されなかった（データ未提示）。しかしながら、染色した 13 例の H B V 感染の肝臓切片のうち 10 例で、肝細胞により T R A I L - R 2 が発現されていた（組織像が軽度から中度の炎症性浸潤または肝硬変を示している、e A g - C H B の患者由来）。T R A I L - R 2 の免疫染色は主に肝細胞の表面に局在しており（図 5 a、×1000 の拡大率）、その範囲は 3 人の患者において強、2 人において中、および 6 人において弱であった。肝疾患の段階との明らかな相関はみられなかった。しかしながら、T R A I L - R 2 は、正常 A L T および非活動性疾患を有する 2 人のコントロール H B V 患者由来の切片にはみられなかった。T R A I L - R 2 の染色は脂肪肝を有するコントロールドナーには検出されたが、健常ドナーからの 3 例、アルコール性肝炎患者からの 4 例の、他の試験されたコントロール肝切片には検出されなかった（図 5 b）。

10

## 【 0105 】

本発明者らは、I F N - または I L - 8 が、肝細胞死を促進するために、H B V に感染した炎症性の肝臓に観察されるこのような変化した T R A I L - R の発現パターンを部分的に仲介している可能性があると仮定した。これについて調べるために、H e p G 2 肝細胞を患者の循環濃度と同じ濃度の I L - 8 または I F N - と共に培養し、死誘導性（T R A I L - R 1 および - R 2）ならびに阻害性（T R A I L - R 3 および - R 4）T R A I L レセプターの量をフローサイトメトリーにより決定した。I L - 8 は、C H B 患者の肝細胞上での増加が観察される死ドメインレセプターである T R A I L - R 2（図 5 a）の発現をおおよそ倍に誘導することが一貫して見出された（図 5 c）。I L - 8 との培養は、その他のいずれの T R A I L - R の表面発現も変化させなかった（データ未提示）。I F N - は T R A I L - R 2 の発現に影響しなかったが（データ未提示）、デコイ／調節性レセプターである T R A I L - R 4 の発現を再現性よく、かつ実質的に減少させた（図 5 d）。T R A I L - R 4 は、アポトーシス誘導を阻害するため、T R A I L - R 2 とリガンド非依存性の会合を形成することが最近示された（非特許文献 36）。まとめると、これらの結果は高濃度の I L - 8 および I F N - の組み合わせが、死誘導レセプターの増加および阻害性レセプターの減少の両方に作用できることを示唆し、従って肝細胞を T R A I L の介在で至適に細胞死させやすくする。

20

## 【 0106 】

H B V の再燃の間に循環しているサイトカインは、N K 細胞が T R A I L リガンド／レセプター相互作用を通して肝細胞を死滅させられるようにできる

H B V 患者から分離した N K 細胞が T R A I L を用いて肝細胞を死滅させられるかどうかをテストするため、本発明者らは、T R A I L により利用されるカスパーーゼカスケード経路を通じたレセプター介在性細胞死の程度を直接測定できるアッセイを利用した。患者由来の P B M C を、N K 細胞上に最大の T R A I L 発現を誘導するように、I F N - の存在下または非存在下においてオーバーナイトで培養した。同時に、H e p G 2 ヘパトーマ細胞を、I L - 8 の存在下または非存在下においてオーバーナイトで前培養した。活性化された P B M C をその後 H e p G 2 細胞に加え、H e p G 2 細胞のカスパーーゼ活性化の程度をフローサイトメトリーで評価した。H e p G 2 細胞または P B M C がサイトカイン処理されていないとき、H e p G 2 細胞のバックグラウンドの量に比較してわずかなカスパーーゼの活性化が存在した（データ未提示）。H e p G 2 細胞の I L - 8 による前処理は P B M C を介したカスパーーゼ活性化の量を増大し、これは P B M C を I F N - と前培養したとき更に増大した（図 6 a の上のパネル）。

30

## 【 0107 】

この I F N - により誘導されたカスパーーゼ活性化が T R A I L を介していることを確認するため、H e p G 2 細胞を T R A I L に対する遮断抗体と共に前インキュベートした

40

50

。図 6 a の下のパネルにみられるように、T R A I L が遮断されたとき、I F N - により誘導されたカスパーぜ活性化が抗体未処理の細胞に比較して減少した。このことは、T R A I L が I F N - により誘導されたカスパーぜ活性化に主要な役割を果たすことを示唆するが、これが関連する唯一の機序ではないかもしれない。I F N - により誘導された T R A I L を介する死の増大は純化した N K 細胞を用いることで維持され、N K 細胞を除去した分画では取り消された（データ未提示）。

#### 【 0 1 0 8 】

肝炎を有さない H B V 患者または健常コントロール由来の P B M C は、in vitroでの I F N - 处理による N K 細胞の T R A I L の増加に続くカスパーぜカスケードの開始に少ない効果を示した（図 6 b）。再燃患者由来の I F N - により活性化された P B M C を用いると（図 6 a および b）、健常ドナー由来（図 6 b）に比較して 2 倍のカスパーぜ誘導がみられた。H B V 関連肝炎の患者由来の P B M C はまた、ex vivo で直接 H e p G 2 に加えたときアポトーシスを誘導することができ、これは全てのケースにおいて T R A I L 遮断 m A b の添加により部分的に遮断された（図 6 c）。H B V 肝炎を有する患者（n = 6）は、バックグラウンドを超えて平均 28% のカスパーぜ誘導を示し、これは正常 A L T を有する H B V 患者または健常コントロール（n = 6）由来の P B M C の使用でみられたカスパーぜ誘導よりも著しく大きかった（図 6 d、e）。

#### 【 0 1 0 9 】

従ってこれらの実験は、H B V 再燃の間に誘導されたサイトカインの影響の下で、N K 細胞は T R A I L 経路を通した H e p G 2 ヘパトーマ細胞の死を誘導できるようになることを確認した。

#### 【 0 1 1 0 】

上記の実験は反復したが、I L - 8 を添加する代わりに、本発明者らは抗 I L - 8 遮断 m A b により内在性の I L - 8 を遮断した。前記のように、I F N - を用いて N K 細胞が T R A I L を発現するよう活性化させ、カスパーぜ活性化に対する F L I C A アッセイを用いてアポトーシスを測定した。図 8 a および 8 b は、2人のドナー由来の P B M C 細胞を用いて得られた結果を示す。両方のケースにおいて抗 I L - 8 は内在性の I L - 8 を遮断し、肝細胞のアポトーシスの減少をもたらした。1 ケースで、抗 I L - 8 および抗 T R A I L の相加的効果がみられ、別のケースでは抗 T R A I L よりも抗 I L - 8 によって更に著明な肝細胞死の阻害がみられた。両方のケースで、抗 I L - 8 および抗 T R A I L の組み合わせは、抗 T R A I L 単独での使用よりも優れていた。I L - 8 の濃度は in vitro よりも in vivo でかなり高いとみられることから、遮断 I L - 8 あるいは I L - 8 および T R A I L の効果は in vivo においてさらに重要であろう。さらに、I L - 8 は主に肝細胞により産生されることから、遮断 I L - 8 は N K 細胞の誘引における I L - 8 の走化性効果を加えて阻止し得る。

#### 【 0 1 1 1 】

再燃を有する H B V 患者由来の N K 細胞は、初代ヒト肝細胞の T R A I L 誘導性アポトーシスを惹起できる

H e p G 2 ヘパトーマ細胞株はこの経路の活性化の機序の分析に好都合なモデルを提供したが、初代ヒト肝細胞もまた N K T R A I L を介したアポトーシスに感受性であることを確認することが重要であった。肝細胞を非疾患の肝外植片より灌流により分離し、48 時間培養した。T R A I L レセプターの発現を調節するため、最後の 24 時間には I F N - および I L - 8 を加えた。P B M C を添加しない状態での肝細胞の生存率は良好であった（全てのウェルにおいて 80% を超えた）（図 7 a）。一方、再燃を有し、直接 ex vivo で T R A I L を発現している N K 細胞を有する H B V 患者由来の P B M C と共に培養した肝細胞は、肝細胞アポトーシスの誘導を示した（図 7 b）。肝炎発症の間、N K 細胞に T R A I L を発現している患者由来の I F N - で処理した P B M C は、初代ヒト肝細胞のアポトーシスの誘導において、再燃を有さない H B V 患者または健常ドナー由来の P B M C よりもさらに効果的であった（p = 0.02、Mann Whitney U 検定、図 7 c）。高 A L T 患者の 4 人のうち 3 人は、I F N - で処理した P B M

10

20

30

40

50

Cにより誘導されたアポトーシスが30%を超えて、TRAILを通して遮断できた(4人の患者において、平均28%の遮断)。IFN- $\gamma$ の非存在下で24時間培養したPBM Cによるアポトーシスの誘導は、あまり確實には誘発されなかった(肝疾患患者のバックグラウンド量を超える平均15%の増加を示し( $p = 0.04$ )、このグループでの量の増加はコントロールに比較して有意ではない傾向にあった。図7c)。患者グループの間の違いを確認するためには、PBM Cを直接ex vivoで用いる更に大規模な研究が必要とされるだろう。しかしながら本発明者らは、NK細胞がTRAILを発現している、肝炎を有するHBV患者由来のPBM Cは初代ヒト肝細胞の死を仲介する能力があると結論できる。

## 【0112】

10

## NK細胞のHBV肝臓への走化性におけるIL-8の役割

本発明者らは既に、高レベルのHBV感染患者の循環中で、IL-8が低レベルキャリアまたは健常ドナーに比較して上昇していることを確認した(上記参照)。本発明者らはここで、HBV感染肝臓がこのIL-8の源であることを示した。本発明者らはこれを、肝外植片およびHBVに関連した再燃または肝硬変患者由来の生検から得たヒト肝臓の11切片を、IL-8特異的なモノクローナル(R&D Systems)で染色し、Dako Chemate Envision西洋わさびペルオキシダーゼキットを用いて検出することにより行なった。免疫組織化学は、全てのHBV肝臓に、アルコール性肝炎を含むその他の肝疾患患者由来の8例のコントロール肝切片における弱いかまたは無の染色に比較して、強いIL-8の染色を明らかにした(代表的染色を図9に示す)。

20

## 【0113】

本発明者らはHBV感染患者由来のNK細胞が、それらのIL-8シグナルへの反応を可能にする、IL-8に対する高アフィニティーレセプター(CXC R1)を発現するかどうかについて調べた。本発明者らは、低または高レベルのHBV感染を有する患者対健常コントロール由来のPBM Cを、CXC R1に対するモノクローナルにより直接ex vivoで染色し、NK細胞がCD3陰性およびCD56陽性であることを確認した(R&D Systemsからのモノクローナル)。本発明者らは、TRAILを発現することが知られているCD56<sup>bright</sup>サブセットを含むHBV患者由来のNK細胞上に、高レベルのCXC R1の発現を見出した(図10)。

## 【0114】

30

本発明者らはまた、HBV患者由来のNK細胞がin vitroでIL-8リガンドへ遊走することによって、これらのレセプターが機能的であることを示した。これはトランスウェルシステム(NeuroprobeからのChemoTX)、およびHBV患者に見出された濃度の組み換えIL-8(R&D Systems)を用いて行なった。PBM Cを上のチャンバーに加え、組み換えIL-8(濃度は5ないし500ng/ml)を下のチャンバーに加えて37℃において2時間培養した後、フローサイトメトリーにより遊走した細胞の構成をケモカインを用いなかつそれと比較した(上記のNK細胞特異的なモノクローナルを用いた)。

## 【0115】

本発明者らはその後、これらの遊走したNK細胞がヒト肝細胞を死滅させられることを示すためのアッセイを開発した。本発明者らは上記のトランスウェルシステムを、下のウェルにHepG2ヒトヘパトーマ細胞株を加えることにより(前記のようにTRAILレセプター発現のために最適化された、チャンバーあたり10,000細胞)改変した。本発明者らは、下のチャンバーにIL-8、および上のチャンバーにPBM Cを加えることにより、HepG2細胞を死滅させられるNK細胞の遊走の誘導が可能であることを示した。この死滅を、前記のようにカスパーーゼ活性化についてFLICAアッセイを用いて測定した。図11に、培地のみのバックグラウンドに比較した、500ng/mlの組み換えIL-8によって誘導されたPBM Cの遊走による、FLICA(肝細胞の死滅)における代表的な増大について示す。

40

## 【0116】

50

## 考察

慢性H B V感染における肝疾患発生の遅延性で予測不可能な自然経過は、肝障害の免疫に関連した長期的な標本抽出を困難にする。慢性H B Vの背景で起こる反復性の肝炎は、肝疾患およびウィルス量の迅速な変化に関連する免疫病理学的現象の圧縮されたバージョンの捕獲を可能にすることによってこの問題を克服する。以前の研究は、抗H B e抗体陽転に対するe A gに関連する再燃、ならびに血清I L - 1 2（非特許文献37）およびC D 4 T細胞反応性（非特許文献37-39）の増大を示す、治療中の患者に見出される再燃について調べた。この研究で本発明者らは最初、疾患の後期の再活性化を有する患者に見られる特徴的なタイプの再燃、いわゆるe A g - C H Bに焦点を当てた。これらの患者は通常、高ウィルス量にもかかわらずe A gの発現減少をもたらす基本コアプロモーター領域の変異または終止コドンを有し、纖維症および肝硬変へと進行する特に高いリスクにある（非特許文献1、2）。e A g - C H B患者のコホートを繰り返し標本抽出することにより、本発明者らは、再燃の間にI L - 8およびI F N - の濃度が上昇、および高い変動を示すことを確認できた。C D 6 9およびアポトーシス誘導性T R A I Lリガンドを直接e x v i v oで発現する活性化されたN K細胞の割合もまた、肝炎に平行して変動していた。比較的大きな横断的研究は、活動性の肝炎を有するH B V感染患者の血清I L - 8、I F N - 、およびN K細胞のT R A I Lの量が、健常H B Vキャリアまたはコントロールに対して上昇していることの発見に及んだ。T R A I Lを発現するN K細胞は、H B V患者の肝臓内では更に濃縮かつ活性化されているのに対し、健常コントロールにおいてe x v i v oでの肝臓内T R A I L発現はみられなかった（非特許文献32）。これらのサイトカインの誘導とN K細胞T R A I L経路の誘導との可能な機能的関連についての研究は、I L - 8がT R A I Lの死誘導レセプターを増加できることを明らかにし、その増加した発現がC H Bの肝臓において観察された。再燃の間の循環濃度のI F N - は、T R A I L経路を通した細胞死を、N K細胞上のリガンド発現の誘導および肝細胞上の調節性レセプターによる阻害の減少の両方によって促進できた。まとめると、これらはT R A I Lを通してN K細胞が肝細胞を死滅させられるようになる。

## 【0117】

N K細胞は、健常ドナーおよびH B V患者の両方の肝臓に濃縮されており、主要な肝臓内リンパ球集団を構成するが、H B V関連肝障害におけるその役割はよく定義されていない。ここで本発明者らは、N K細胞の活性化が肝炎の再燃と並行することおよびH B Vに感染した肝臓において活性化N K細胞が豊富であることを示す、N K細胞のH B V関連肝障害に対する重要な貢献を支持するデータを提示する。C D 5 6<sup>dim</sup>サブセットは大部分のN K細胞パフォリンおよびグランザイムを発現するが、肝細胞はこれらの古典的な細胞溶解性エフェクター分子に対して比較的抵抗性である（非特許文献9、10）。再燃の間に末梢に選択的に濃縮されており、肝臓内で優先的に濃縮かつ活性化されることが知られているN K細胞のC D 5 6<sup>bright</sup>サブセットは、I F N - のようなサイトカインの強力な源となる、その免疫調節的能力により知られている（非特許文献33）。この研究で本発明者らは、これらC D 5 6<sup>bright</sup>N K細胞が、レセプターを介する肝細胞死を誘導するT R A I Lを利用した、別の細胞毒性経路を通して肝障害を仲介する可能性に集中した。T R A I Lはマウス肝臓内に見出されたN K細胞のサブセットにより内在的に発現することが示されたが（非特許文献16）、これはヒトには当てはまらず、健常人の末梢および肝臓内N K細胞の両方はわずかな表面T R A I L発現を示す（非特許文献30-32）。しかしながら、ヒトN K細胞はi n v i t r oでのI L - 2（非特許文献31、32）またはI F N - （非特許文献22）の刺激によりT R A I L発現を増加させられることが報告されており、本発明者らはN K細胞が、慢性H B V感染を有するこれらの患者にみられる反復性の炎症の年数にかかわらず、i n v i t r oおよびi n v i v oの両方においてT R A I Lを増加させる能力を保持することを示す。N K細胞のT R A I Lが、肝炎を示すこれらのH B V患者においてのみ上昇するという事実（長期的および横断的研究の両方において）は、このリガンドの肝細胞障害における役割を支持する。

## 【0118】

10

20

30

40

50

T R A I L 経路は最初、形質転換細胞に限定され、T R A I L を発現するN K は肝臓内の環境で腫瘍に対し防御することが提唱された（非特許文献16）。しかしながら最近のヒトでの研究は、急性冠不全症候群における動脈硬化プラークの、リンパ球を介するT R A I L 誘導性アポトーシス（非特許文献40）、およびH I V 感染におけるC D 4 T 細胞（非特許文献41）により、腫瘍の文脈外でのこの経路の病原性の役割に焦点を当てた。肝疾患のモデルマウスでの研究は、in vivoでの非悪性組織の障害を誘導するT R A I L を発現するN K 細胞についての概念を強化し、T R A I L 依存性の肝細胞死（非特許文献15）および肝星状細胞（非特許文献42）を示した。ヒト肝細胞のT R A I L 誘導性アポトーシスへの感受性は、可溶性T R A I L で処理したマウスおよび靈長類の肝臓毒性の欠如についての最初の報告（非特許文献43、44）に続き、論争の対象であった。しかしながら膜結合型T N F 関連リガンドは、その可溶性対応物よりも強いアポトーシス促進の可能性および肝臓毒性を有する（非特許文献35、45）。ヒト膜結合型T R A I L は、マウスにおいて、広範なアポトーシス、ネクローシスおよびリンパ球性浸潤をもたらし（非特許文献35）、慢性H B V 肝炎の病理に適合する肝細胞アポトーシスを誘導する。さらに、正常ヒト肝細胞はT R A I L に対する死誘導レセプターを発現する能力があり、in vitroでのT R A I L 誘導性アポトーシスに感受性である（非特許文献17、18）。死誘導レセプター対調節性レセプターの発現の比は、T R A I L 誘導死に対する感受性を繊細に調整するための手段を提供することが示された（非特許文献36）。このバランスは、胆汁酸滞留（非特許文献46）およびウィルス性肝炎のような肝炎の状況において死へと傾くことが既に示唆されている。後者の証明は、C 型肝炎ウィルスに感染した肝臓の免疫染色（非特許文献20）、および急性のH B V を介した肝不全からの全肝臓抽出物のウェスタンプロット法（非特許文献19）に由来する。本発明者らは、C H B 患者の肝細胞上で死誘導T R A I L レセプターの発現が増加している免疫染色によって示す。調節の一機序は、H B V によりコードされるX 抗原が死誘導レセプターの一つを増加させ（非特許文献47）、かつ細胞内B a x の調節を通してT R A I L 誘導性アポトーシスを起こしやすくする（非特許文献48）というin vitroでの観察に基づくと、ウィルスそれ自体による可能性がある。ここで本発明者らは、H B V の再燃の間に產生されたサイトカインは肝細胞のアポトーシスを最大にするため、死誘導T R A I L レセプターの増加、および調節性T R A I L レセプターの減少の両方に対し協調して作用し得るという、さらなる機序を示す。このデータは、肝細胞癌のような悪性腫瘍の治療における可溶性T R A I L の使用を支持する。これらは、H B V 感染および活動性肝炎の発症を同時に有する腫瘍患者は、このような治療アプローチ由来の肝臓毒性に対して更に感受性である可能性を示唆する。

#### 【0119】

ケモカイン、リガンド／レセプターの対は、この大規模な殺到するN K 細胞の遊走をH B V に感染した肝臓へ導くことが分析された。上に示すように、I L - 8 はH B V 患者に見出される濃度と同じ濃度においてN K 細胞の走化性を誘導する。I L - 8 はその走化性の機能によりよく知られており、再燃の間の高濃度での循環は肝臓由来であると思われる。ここで研究した患者では、I L - 8 遺伝子をトランス活性化するH B V の報告された能力（非特許文献49）に従い、I L - 8 の濃度はH B V D N A の増加と共に典型的に増加した。N K 細胞は高アフィニティーI L - 8 レセプターであるC X C R 1 を発現し、かつI L - 8 に反応して遊走することが示された（非特許文献50）。インターフェロンもまた、H B V トランスジェニックマウスにおけるインターフェロン-ガンマ誘導タンパク質（I P - 10 ）（非特許文献4）およびマウスC M V 感染におけるM I P - 1 （非特許文献51）のようなケモカインの誘導により、N K 細胞の肝臓への輸送を調節することが示された。本発明者らは、この研究で確認されたI F N - の急増がどこに由来するのかを示していないが、考えられる源には、形質細胞様樹状細胞を含む肝浸潤白血球に加え、ウィルスに感染した肝細胞がある。本発明者らはI L - 8 、および可能性としてI F N - が、N K 介在性肝細胞障害の経路の活性化に加え、活動性の炎症を発症する間のH B V 肝臓へのN K 細胞の走化性に貢献することを示した。

10

20

30

40

50

## 【0120】

H B V 感染のトランスジェニックマウスマodelにおいて、N K 細胞は強力な抗ウイルス効力を有し、この効果はタイプ1インターフェロンレセプター欠損マウスにおいては減弱している（非特許文献52）。I F N - αにより活性化されたN K 細胞は、ヒトH B V 感染でもまた、ウイルスコントロールおよび肝障害において二重の役割を有していると考えられる（非特許文献52）。N K 細胞によるH B V 感染肝細胞のT R A I L 誘導性アポトーシスは幾らかのウイルス感染細胞を除去し、この過程は再燃の後にしばしば観察されるウイルス量の部分的な減少に貢献する可能性がある。しかしながら、この手段によるいずれのウイルス減少も常に肝障害という犠牲があり、それ故、治療的に進めるには危険な戦略である。事実、H B V に関連した肝硬変の治療における外来性I F N - αの使用は、肝の代償不全を誘発するのに十分に重篤になり得る肝炎を起こす傾向があるため、しばしば制限される。ここに示すように、I L - 8 およびT R A I L 経路を遮断することにより、肝疾患および／またはI F N - α 治療に関連する肝細胞アポトーシスを制限することが可能となる。

## 【0121】

引用した全ての文献は参考によってここに取り込まれる。

## 【0122】

## 【表1】

	サイトカイン濃度ピーケの中央値 (p g / mL)		
	C H B 患者	健常コントロール	p - 値
I L - 8	630	13	<0.0001
I L - 1 β	79	b l q	0.07
I L - 6	11	b l q	0.08
I L - 10	9	1.7	0.04
T N F	4	b l q	0.64
I L - 12 p 70	17	2.6	0.1
I F N - α	253	20	0.005

## 【0123】

## [表1]

再燃を有するe A g - C H B 患者由来の血清中において、I L - 8 およびI F N - α 濃度は高度に上昇している。中央値は、肝炎の再燃を起こしている12人のC H B 患者および14人の健常コントロールドナーから得られた最大のサイトカイン濃度に関するものである。b l q = b e l o w l e v e l o f q u a n t i f i c a t i o n (定量濃度未満)。有意性検定はMann Whitney U 検定を用いて行ない、統計学的な有意性は太字で強調した。

## 【0124】

10

20

30

40

【表2】

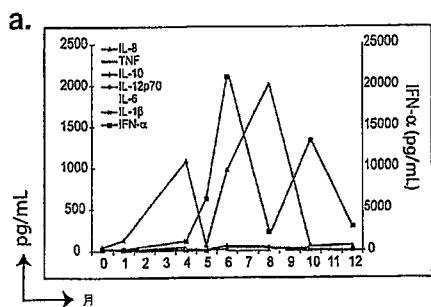
	サンプル 数	最大AL T (IU/ L)	IL-8		IFN- $\alpha$	
			最大倍率 変化 <sup>a</sup>	ピークAL T濃度 からのサ ンプル数	最大倍率 変化	ピークAL T濃度 からのサ ンプル数
患者1	7	546	136	-1	152	-3
患者2	10	285	686	0	7	0
患者3	7	569	237	-2	6.8	-1
患者4	8	208	417	-2	12	na
患者5	8	495	40	2	7.2	-5
患者6	7	313	8.2	-1	7	0
患者7	7	214	29	-1	20	0
患者8	5	201	303	-3	3.7	0
患者9	4	565	11	0	2.4	-1
患者10	4	880	1.7	-3	3.2	0
患者11	5	403	5.2	0	2.3	2
患者12	5	614	5.4	-1	1.4	-2
患者13	5	158	32	0	8.2	1
患者14	4	196	70	-1	9.5	0
中央値			36	-1	7	0

【0125】

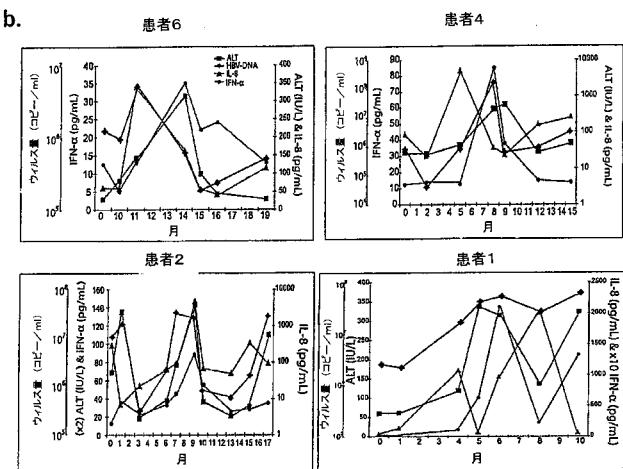
[表2]

肝炎の間の、IL-8およびIFN- $\alpha$ の血清濃度の大きな増加。<sup>a</sup>最大倍率変化は、IL-8およびIFN- $\alpha$ の基本的な量からサイトカイン変動のピークまでの倍率変化。na-data not available(データ未取得)。

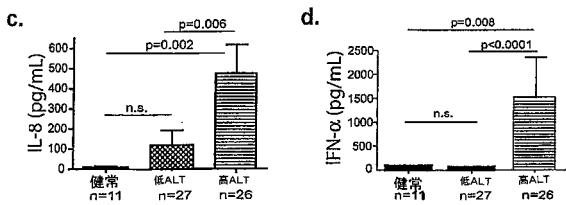
【図1-1】



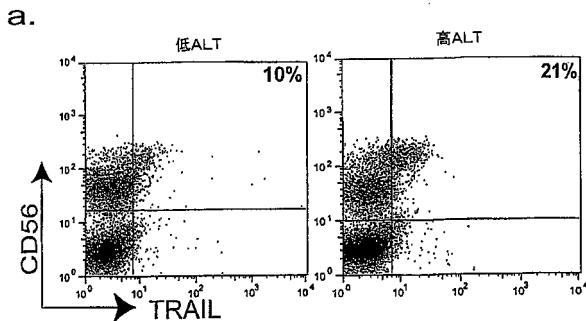
【図1-2】



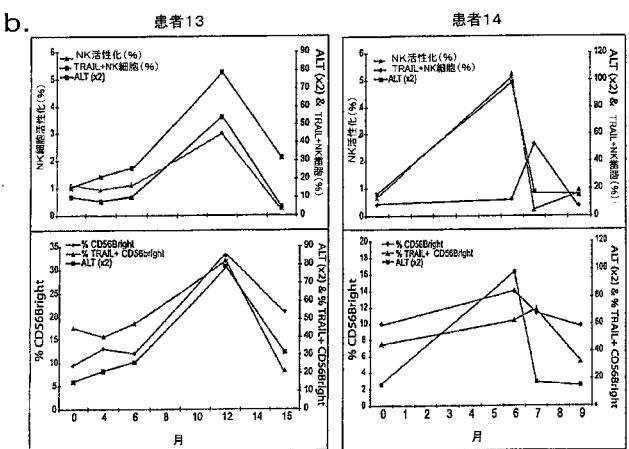
【図1-3】



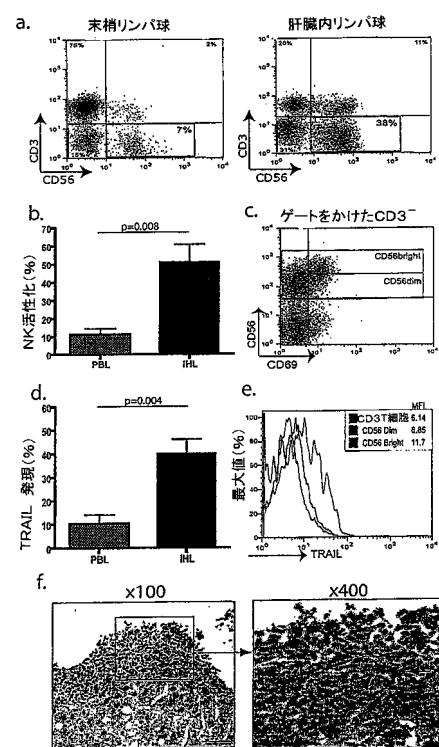
【図2-1】



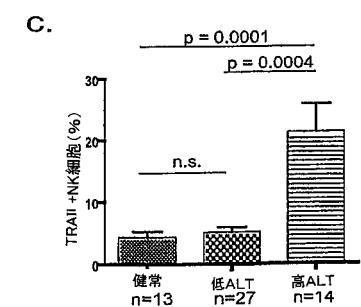
【図2-2】



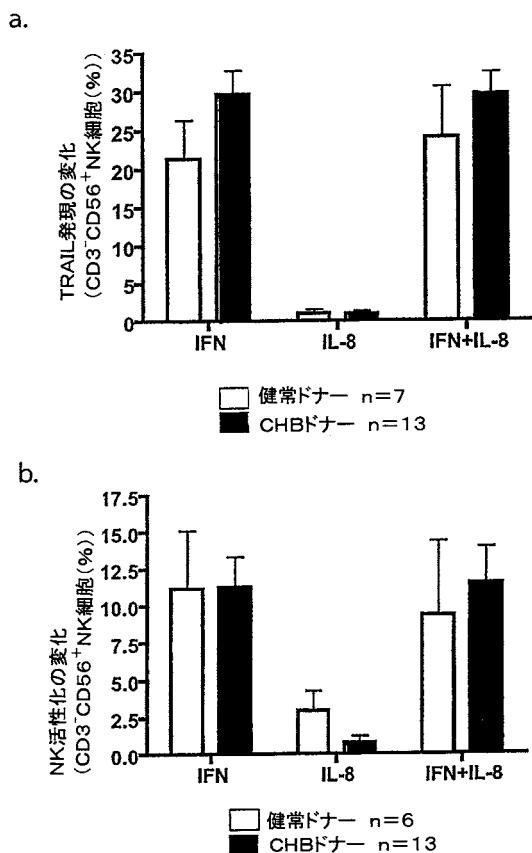
【図3】



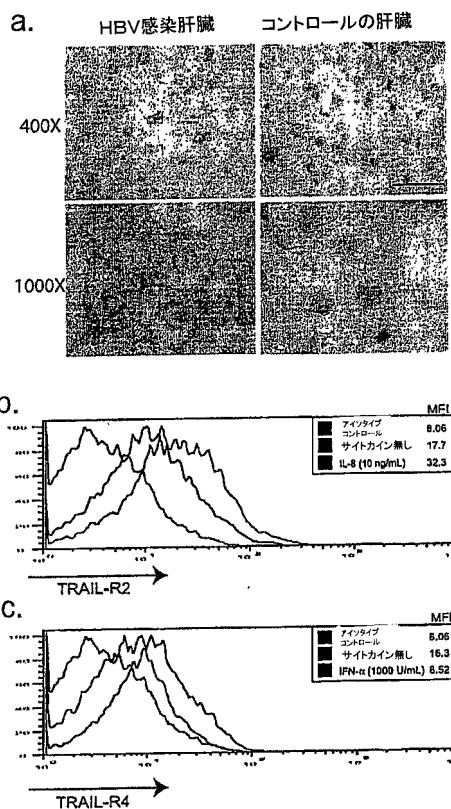
【図2-3】



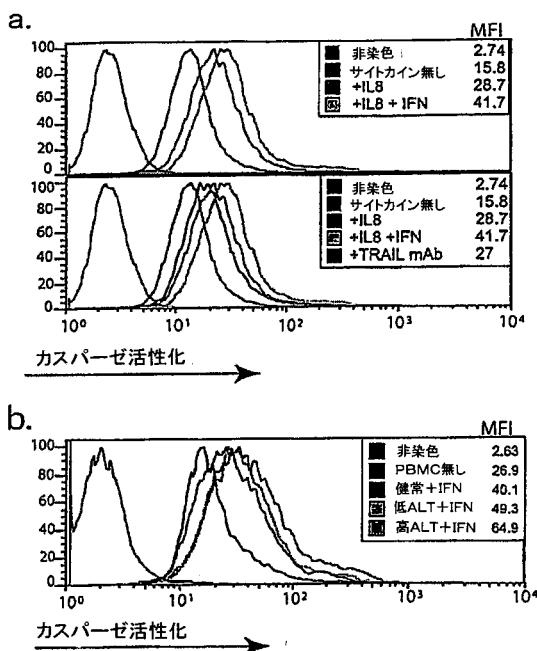
【図4】



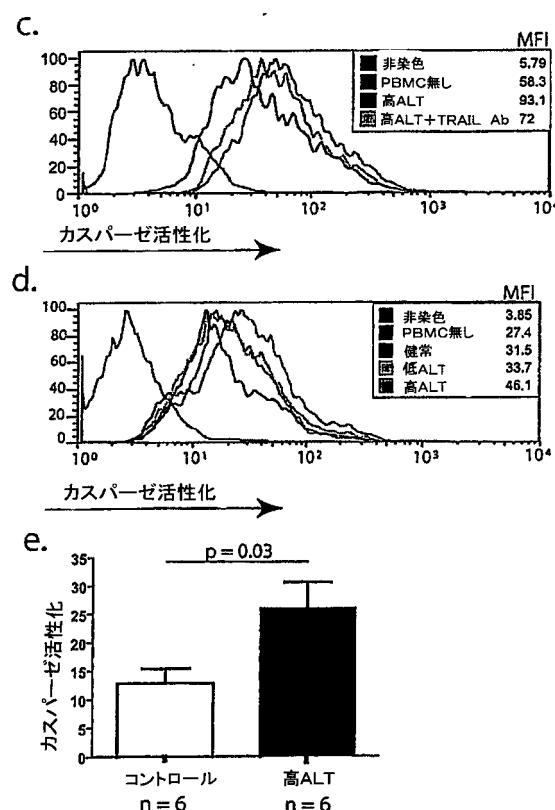
【図5】



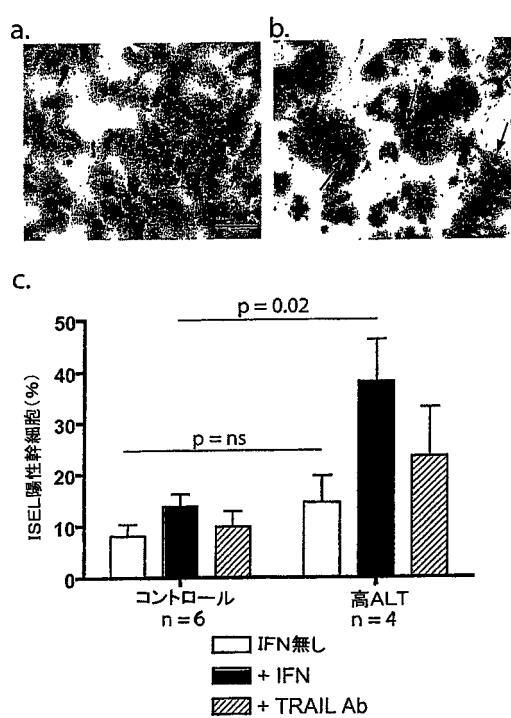
【図6-1】



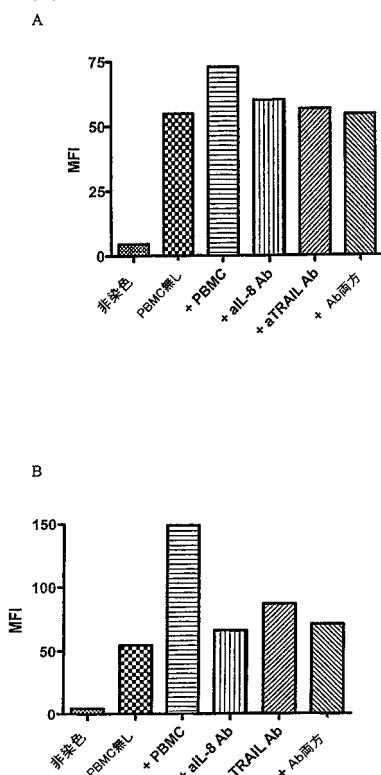
【図6-2】



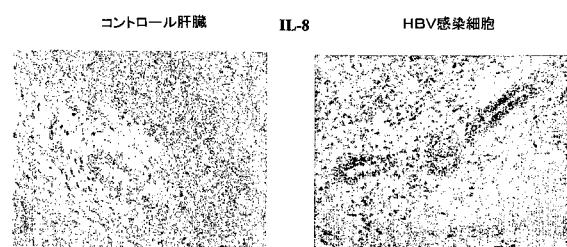
【図7】



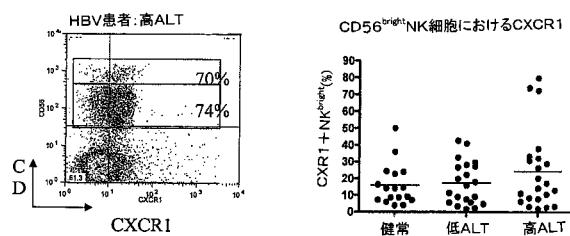
【図8】



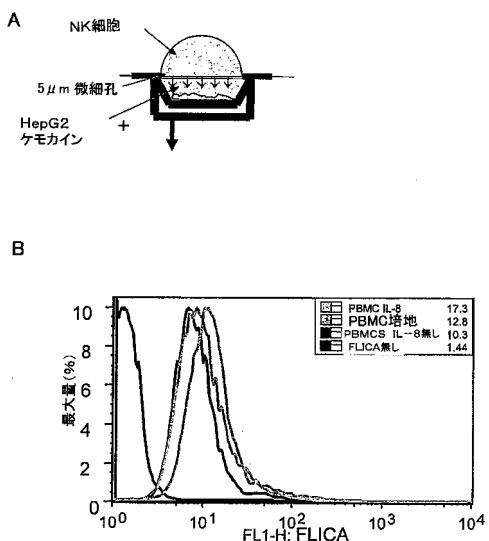
【図9】



【図10】



【図11】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2008/000811
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61K38/17 A61K39/395 A61K38/21 A61K38/45 A61P1/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/058797 A (MEDAREX INC [US]; GENMAB AS [DK]; TEELING JESSICA [NL]; PARREN PAUL [EN] 15 July 2004 (2004-07-15) abstract page 9, lines 6,11,12,29	1-46
X	WO 00/76515 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; WIDDOWSON KATHERINE L [US]; BENSON GREGO) 21 December 2000 (2000-12-21) abstract page 28, lines 22,23	1-46 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  15 October 2008		Date of mailing of the international search report  30/10/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Vandenbogaerde, Ann

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2008/000811

C(continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"397 Immunomodulatory effects of the large fluctuations in IFN-alpha and IL-8 accompanying hepatic flares in anti-HBV chronic HBV patients" JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, vol. 42, 1 April 2005 (2005-04-01), page 146, XP005060208 ISSN: 0168-8278 abstract	1-46
X	US 2006/228352 A1 (SCHOENBERGER STEPHEN P [US] ET AL) 12 October 2006 (2006-10-12) claims 41,43,44,61-63	1-46
X	LIU ET AL: "Blockade of TRAIL pathway ameliorates HBV-induced hepatocyte apoptosis in an acute hepatitis model" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 352, no. 2, 5 December 2006 (2006-12-05), pages 329-334, XP005724510 ISSN: 0006-291X abstract	1-46
X	LIANG XIAOHONG ET AL: "Hepatitis B virus sensitizes hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis through Bax" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 178, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 503-510, XP002499709 ISSN: 0022-1767 abstract	1-46
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; February 2003 (2003-02), HEATHCOTE JENNY: "Treatment of HBe antigen-positive chronic hepatitis B." XP002499710 Database accession no. PREV200300428950 abstract & SEMINARS IN LIVER DISEASE, vol. 23, no. 1, February 2003 (2003-02), pages 69-79, ISSN: 0272-8087	1-46

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No PCT/GB2008/000811
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004058797 A	15-07-2004	AU 2003299641 A1 CA 2510087 A1 EP 1590364 A2 JP 2006523088 T	22-07-2004 15-07-2004 02-11-2005 12-10-2006
WO 0076515 A	21-12-2000	AU 767000 B2 AU 5875000 A BR 0011567 A CA 2377391 A1 CN 1356902 A CZ 20014491 A3 EP 1185271 A1 HU 0202004 A2 JP 2003501470 T MX PA01013089 A NO 20016102 A NZ 515609 A PL 352222 A1 TR 200103608 T2 UY 26206 A1 ZA 200110205 A	30-10-2003 02-01-2001 05-03-2002 21-12-2000 03-07-2002 17-07-2002 13-03-2002 28-10-2002 14-01-2003 04-06-2002 12-02-2002 28-11-2003 11-08-2003 21-06-2002 29-12-2000 12-08-2002
US 2006228352 A1	12-10-2006	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 1/16 A 6 1 P 31/20	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T  
R),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,  
BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K  
G,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT  
,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100126505

弁理士 佐貫 伸一

(74)代理人 100131392

弁理士 丹羽 武司

(72)発明者 マイニ,マーラ,ケー.

イギリス ロンドン W1T 4JF クリープラント ストリート 46 ユニバーシティ カ  
レッジ ロンドン ウィンディーサー インスティテュート オブ メディカル サイエンシ  
ズ

Fターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44

4C084 AA17 NA14 ZA751 ZB331

4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 BB41 BB43 CC02 CC22