

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4185366号
(P4185366)

(45) 発行日 平成20年11月26日(2008.11.26)

(24) 登録日 平成20年9月12日(2008.9.12)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A 6 1 K 35/14 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A
 A 6 1 K 35/14 Z
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/02
 C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 7 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2002-589661 (P2002-589661)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月10日(2002.5.10)
 (65) 公表番号 特表2004-526459 (P2004-526459A)
 (43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/001586
 (87) 国際公開番号 W02002/092793
 (87) 国際公開日 平成14年11月21日(2002.11.21)
 審査請求日 平成17年4月15日(2005.4.15)
 (31) 優先権主張番号 01/06231
 (32) 優先日 平成13年5月11日(2001.5.11)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 500488225
 アンスティテュ ナショナル ド ラ サ
 ント エ ド ラ ルシュルシェ メディ
 カル (アンセルム)
 INSTITUT NATIONAL D
 E LA SANTE ET DE LA
 RECHERCHE MEDICALE
 (INSERM)
 フランス、エフ-75654 パリ セデ
 ックス 13、リュ ド トルビアク、1
 O1
 101, rue de Tolbiac,
 F-75654 Paris Cedex
 13 France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原-特異的 T r 1 リンパ球を得る方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原 - 特異的調節 T r 1 リンパ球を得るために、H L A系のクラスII分子およびヒト L F A - 3分子を発現するが、共刺激分子 B 7 - 1、B 7 - 2、B 7 - H 1、C D 4 0、C D 2 3または I C A M - 1のいずれも発現しない人工抗原 - 提示細胞の使用。

【請求項 2】

患者のリンパ球から抗原 - 特異的調節 T r 1 リンパ球を調製する方法であって、
 - 請求項 1 で定義したような人工抗原 - 提示細胞にて提示される選択抗原の存在下で、前記リンパ球をインビトロで活性化し、そして
 - 前記リンパ球から、前記抗原に特異的な少なくとも 5 0 % の T r 1 リンパ球を含む活性化された C D 4 + T リンパ球の集団を回収すること
 を含むことを特徴とする方法。

【請求項 3】

使用される人工抗原 - 提示細胞が、クラスII H L A分子の 鎖をエンコードする核酸配列と、クラスII H L A分子の 鎖をエンコードする核酸配列と、ヒト L F A - 3をエンコードする核酸配列とで、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、尿細管細胞、シュワン細胞、筋原細胞、内皮細胞の中から選択される哺乳類細胞をコトランスフェクションすることにより得られることを特徴とする請求項 2 で請求されている方法。

【請求項 4】

前記リンパ球のインビトロでの活性化を、選択抗原の存在下で、前記リンパ球と前記抗

10

20

原提示細胞を共培養することで行うことを特徴とする請求項 2 または 3 で請求されている方法。

【請求項 5】

C D 4⁺T リンパ球が、インビトロでの選択抗原の存在下で活性化される工程の繰り返しと、前記抗原に特異的な少なくとも 60 % の T r 1 リンパ球からなる細胞集団の回収とからなることを特徴とする請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 つで請求されている方法。

【請求項 6】

さらに、回収された細胞集団からの T r 1 リンパ球クローンの単離および増殖を含むことを特徴とする請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 つで請求されている方法。

【請求項 7】

請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 つによる方法によって抗原 - 特異的 T r 1 リンパ球を調製し、それらを患者に投与するのに適した製剤に、前記 T r 1 リンパ球を包装することを含むことを特徴とする炎症疾患および / または自己免疫疾患の治療を意図する医薬組成物の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自己免疫疾患および炎症疾患の予防および治療に使用されうる調節 C D 4⁺ T リンパ球を得ることに関するものである。

【背景技術】

【0002】

自己免疫疾患は、生物のそれ自体の抗原に対する好まざる免疫応答にて現れる免疫系の自由化 (deregulation) の結果である。

これらの病状を引き起こす抗原、またはこれら抗原に特異的である悪性の T 細胞を操作することが試みられているが、得られた結果は、特に、問題の病状に関連する全ての抗原の知見が欠如しているため、非常に限定されたものであることが多い。このことは、実際の自己抗原、または炎症疾患および自己免疫疾患に応答しうる抗原が、常に知られていないか、個体間で異なるためである。これら疾患に対して近年使用されている治療は、一時しのぎの治療 (糖尿病の場合インスリン、アレルギー性疾患の場合抗ヒスタミン)、または抗 - 炎症 (A I N S) および / または免疫抑制 (グルココルチコイド、シクロスポリン、抗体など) を使った全身治療のいずれかである。それゆえ、強力であるが、影響器官、またはより正確には免疫系の機能亢進領域が限定される免疫抑制治療の必要が明らかにある。

【0003】

免疫応答の調節に関連する多数の薬剤の中で、T - ヘルパーリンパ球としても引用されている C D 4⁺ T リンパ球がある。従来、T - ヘルパーリンパ球の 2 つの主なタイプに区別されている。

すなわち、細胞免疫応答の発生に関連し、インターロイキン - 2 (I L - 2) およびインターフェロン (I F N) のようなプロ - 炎症サイトカインを生産し、そしてマクロファージ - 活性化活性を有する T h 1 リンパ球。

インターロイキン I L - 4、I L - 6、I L - 10 および I L - 13 のようなサイトカインを生産し、抗体の分泌を促進する T h 2 リンパ球。

【0004】

発明者の一人が関係した最近の研究は、インターロイキン 10 (I L - 10) の存在下で、C D 4⁺ T 細胞の活性化によって増殖が誘導され、T r 1 リンパ球と称されている調節 T 細胞の新規なカテゴリーをなんとか見出した (PCT 出願 WO 97/42324)。この研究を続けることで、T r 1 リンパ球と称される調節 T 細胞の新規な亜集団を単離し、そして特徴付けることができた (Groux ら、Nature、389、737 ~ 742、1997)。このリンパ球の亜集団は、抗原およびインターロイキン 10 (I L - 10) の存在下で、C D 4⁺ T 細胞を繰り返し活性化させることで得られる。T r 1 細胞は、それらの誘導に使用される抗原によって

10

20

30

40

50

再び刺激されると、それらは弱く増殖するのみで、多量の I L - 1 0、多量の T G F - (腫瘍生育因子)、少量の I L - 2 を生産するが、I L - 4 を生産しない。活性化 T r 1 細胞を、その他の C D 4 + T 細胞の存在下で生育させると、それらは、抗原に対する応答で後者の増殖を抑制し、この効果は、T r リンパ球によるサイトカイン、特に I L - 1 0 の分泌によるものであり、C D 4 + T 細胞上での後者の直接的な作用によるものではなく、それゆえ、これら細胞の増殖に応答しうる抗原を識別しなくとも得ることができる。このことは、自己免疫疾患の場合、非常に有利であり、それゆえ病原性細胞に対する正確な抗原を知る必要性なく治療を想定することができる。

【 0 0 0 5 】

つまり、食品での卵白アルブミンの投与との組合せで、卵白アルブミンに対する T r 1 細胞の動物に対する投与が結腸の慢性炎症が予防されることを、プロ - 炎症細胞が腸内フローラの共生バクテリアに指向しているマウスでのクローン病の実験モデルで観察している。

【 0 0 0 6 】

第二に、発明者らは、多発性硬化症または移植片対宿主反応のクローン病の様々な動物モデルでの近年の研究で、調節 T r 1 細胞が、これら様々な病状を予防できるだけでなく、治療できることも証明した。さらに、彼らは、T r 1 細胞が炎症の様々な部位に特異的かつ集約的に広がることを観察した。T r 1 細胞のこの特性は、これらの細胞の使用で、深刻な炎症の部位で抗 - 炎症分子用のベクターとして付加的な利点を示している。それゆえ、患者の T 細胞由来の T r 1 細胞は、この患者で免疫応答を調節するための細胞治療の現場で潜在的に有用である。その結果、それらを、特に、上記の自己免疫疾患および炎症疾患のみではなく、同様に糖尿病、乾癬、粥状硬化症、リュウマチ性多発関節炎または喘息のような異常(aberrant)炎症応答によって特徴付けられるその他のあらゆる病状(それらは、同様に移植拒絶反応または移植片対宿主反応の治療で使用されうる)を予防または治療するために使用することができる。

【 0 0 0 7 】

Grouxらの発表で記載され、上記で引用されている T r 1 リンパ球を得る方法は、I L - 1 0 の存在下で、抗原を使った T 細胞の繰り返しの刺激を必要とする。この方法は、面倒であり、治療処置で使用されうる T r 1 リンパ球集団を、患者から素早く得ることができない。

様々なチームは、T r 1 細胞のこれらと類似した特性を有する細胞を得るなかで、特に I L - 1 0 の生産で、さまざまな共刺激(costimulation)分子の関連を報告している。関連するであろうこれら刺激分子は、大変多様であり、報告されているその効果は、時として矛盾しているようである。

【 0 0 0 8 】

Bleijrsら(Eur. J. Immunol., 29, 2248, 1999)は、L F A - 1 と I C A M - 1、I C A M - 2 または I C A M - 3 との相互作用による共刺激が、抗 - C D 3 抗体で刺激される T リンパ球による G M - C S F (顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子)、I F N - および I L - 1 0 の高生産を誘導することを観察した。I L - 1 0 の生産は、共刺激が L F A - 1 / I C A M - 1 相互作用によって行われる場合、特に高い。Bullensら(Int. Immunol. 13, 181~191, 2001)は、C D 5 8 による共刺激が、抗 - C D 3 抗体にて刺激される T 細胞によって I L - 1 0 および I N F - の生産を誘導することを報告している。Do ngら(Nat. Med., 5, 1365, 1999)は、B - 7 族に属し、そして I L - 1 0 の分泌を優先的に誘導する B 7 - H 1 として引用されている共刺激分子を記載している。

【 0 0 0 9 】

Van Goolら(Eur. J. Immunol., 29, 2367, 1999)は、C D 8 0 / C D 2 8 または C D 8 6 / C D 2 8、および C D 4 0 / C D 4 0 L 相互作用をブロックする抗体の存在下で、同種抗原による T 細胞の活性化が、I F N - の生産の減少と I L - 1 0 の生産の増加によって成し遂げられる抗原 - 特異的なアネルギーを誘導することを観察した。

Chabotら(J. Immunol., 162, 6819, 1999)は、小膠細胞と T リンパ球の相互作用によっ

10

20

30

40

50

て誘導される I L - 1 0 の生産が、C D 4 0 / C D 4 0 L、B 7 / C T L A - 4 または B 7 / C D 2 8、あるいは C D 2 3 のブロックによって低減されることを報告している。

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、I L - 1 0 の存在下で、C D 4 + T 細胞の活性化によって得られる量より十分にまさる量で素早く、抗原 - 特異的 T r 1 リンパ球を得ることを可能にする新規な方法をまさに開発した。このことは、それらが、誘導体抗原の存在下での増殖性 C D 4 + 細胞と、クラス II H L A 分子ならびにヒト L F A - 3 (C D 5 8) 分子を発現する抗原を提示するが、共刺激分子 B 7 - 1 (C D 8 0)、B 7 - 2 (C D 8 6)、B 7 - H 1、C D 4 0、C D 2 3 および I C A M - 1 (C D 5 4) のいずれも発現しない細胞が、先の抗原に特異的な T r 1 細胞の分化を誘導することを見出したためである。

10

【 0 0 1 1 】

L F A - 3 分子は、T リンパ球の C D 2 受容体のリガンドである。L F A - 3 の 2 つの形態、トランスメンブランの形態 (Walner ら、J. Exp. Med. 166、923 ~ 932、1987 ; PCT 出願 WO 88/09826)、およびホスファチジルイノシトールを含有するグリコリピッドにて細胞膜に固定される「P I 結合 L F A 3」として引用されている形態 (PCT 出願 WO 90/02181) を記載している。

本発明は、抗原 - 特異的調節 T r 1 リンパ球を得るために、H L A 系のクラス II 分子およびヒト L F A - 3 分子を発現するが、共刺激分子 B 7 - 1、B 7 - 2、B 7 - H 1、C D 4 0、C D 2 3 または I C A M - 1 (C D 5 4) のいずれも発現しない人工抗原 - 提示細胞の使用に関する。

20

【 0 0 1 2 】

抗原 - 特異的調節 T r 1 リンパ球として定義される細胞は、前記抗原で再び刺激した後、次の特性を有する細胞である。

- それらは、多量の I L - 1 0、すなわち 10^6 細胞あたり 3×10^3 p g 以上の量、一般に 10^6 細胞あたり $5 \times 10^3 \sim 20 \times 10^3$ p g の I L - 1 0 を生産する。

- それらは、 10^6 細胞あたり 50 p g 以下の量の I L - 2 を生産し、前記細胞にて生産される I L - 1 0 / I L - 2 割合は、少なくとも 50 / 1、一般には 100 / 1 ~ 500 / 1 である。

- それらは、 10^6 細胞あたり 50 p g 以下の量の I L - 4 を生産し、前記細胞にて生産される I L - 1 0 / I L - 4 割合は、少なくとも 300 / 1、一般には 500 / 1 ~ 1000 / 1 である。

30

- T r 1 細胞の存在下で、抗原にて刺激される C D 4 + T 細胞の増殖は、少なくとも 2 倍、一般には少なくとも 2 ~ 100 倍に減少する。

【 0 0 1 3 】

特に、本発明は、患者のリンパ球由来の抗原 - 特異的調節 T r 1 リンパ球の調製方法であって、

- 前記で定義したような人工抗原 - 提示細胞にて提示される選択抗原の存在下で、前記リンパ球をインビトロで活性化し、そして

- 前記リンパ球から、少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 50 %、より特に好ましくは少なくとも 80 % の前記抗原に特異的な T r 1 リンパ球を含む活性化された C D 4 + T リンパ球の集団を回収すること

40

を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

本発明を実行するのに使用できる人工抗原 - 提示細胞は、有利には、クラス II H L A 分子の鎖をエンコードする核酸配列、クラス II H L A 分子の鎖をエンコードする核酸配列および L F A - 3 の 2 つの形態のいずれかをエンコードする核酸配列で、上記共刺激分子のいずれも発現しない動物細胞を、コトランスフェクト (cotransfect) することで得ることができる。所見により、これら細胞は、同様に、T r 1 リンパ球の特異性が誘導される抗原をエンコードする核酸配列でトランスフェクトできる。これら核酸配列は、異なる核酸分子を持つことができ、またはその他にそれらの 2 つ以上が同一の核酸分子を持つ

50

ことができる。

【0015】

前記人工抗原 - 提示細胞を得るために使用できる動物細胞は、ヒト、自己または異種の起源の細胞、あるいはその他の異種起源の細胞、特に哺乳類の細胞でありうる。近年、単離された一次培養物が使用できる。一般に、より同種であり、かつ幾つもの世代にわたって増殖しうる確立された細胞系列を使用することが好ましいであろう。

例えば、それらは、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、尿細管細胞、シュワン細胞、筋原細胞、内皮細胞などの形態を取りうる。

【0016】

人工抗原 - 提示細胞にて発現されるクラスII CMH分子は、CD4⁺Tリンパ球が得られる患者のHLAクラスIIタイプおよびTr1細胞の意図される用途に従って入手しうる異なるヒトHLA - 2分子の中から選択されるであろう。

【0017】

一般に、患者にても発現されるHLA - 2分子を発現する人工抗原 - 提示細胞が使用されるであろう。しかし、患者にて発現されるものとは異なるHLA - 2分子を選択することも可能である。例えば、移植拒絶反応を予防するために使用できるTr1細胞を生産したい場合、これは、移植細胞にて発現されるHLA - 2分子の形態を取ってもよい。この場合、HLA - 2分子は、得られたTr1細胞が指向するであろう抗原を構築する。

本発明による方法を実行するために使用される抗原は、生産すべき抗原 - 特異的Tr1細胞を意図する用途に従って選択されるであろう。抗原は、炎症または自己免疫の病状と関連する抗原の形態を取りうる。同様に、特定の病状とは関係なしに、Tr1細胞が、好まざる免疫応答を制御するために活性化される場合に、投与できる抗原の形態を取ってもよい。

【0018】

人工抗原 - 提示細胞は、細胞と抗原を共インキュベート(coincubate)することによる従来の方法で、抗原でチャージされうる。抗原は、天然の形態で提示でき、抗原 - 提示細胞で調製できる。同様に、抗原は前記細胞にて発現されるHLA - 2分子で直接付着できる1以上の抗原性ペプチドの形態で提示されうる。対して、抗原がそれをエンコードする核酸配列であらかじめトランスフェクトされている場合、抗原は、人工抗原 - 提示細胞にて発現できる。

【0019】

本発明による方法を実行するために、リンパ球のインビトロでの活性化を、患者から得たPBMC（末梢血単核細胞）で直接行うことができる。これらPBMCからあらかじめ単離されているCD4⁺T細胞でも行うことができる。

リンパ球は、それらを2～10日にわたって、好ましくは6～8日にわたって、選択された抗原をチャージしている上記の人工抗原 - 提示細胞の存在下で、共培養(coculture)することで活性化される。

【0020】

この培養期間の最後に、活性化されたCD4⁺Tリンパ球を、CD4⁺マーカーおよびCD25、CD69、CD45ROなどのような1つ以上の活性マーカーの発現に基づいて選択する。

この培養期間の最後に、Tr1リンパ球が、活性化された抗原 - 特異的Tリンパ球の少なくとも10%、一般には50～80%の間に達する細胞集団が得られる。

【0021】

この集団で、さらにいっそうTr1リンパ球を濃縮するために、上記で規定した条件下で刺激を繰り返してもよい。

その結果、抗原 - 特異的T細胞の中で、Tr1リンパ球の少なくとも30%、一般には60～90%の間からなる活性化されたCD4⁺Tリンパ球の集団が得られる。

同様に、Tr1リンパ球クローンを、この集団から単離することができる。これらクローンを、上記で規定したように、Tr1リンパ球の特徴的なサイトカイン生産プロフィー

10

20

30

40

50

ルに基づいて素早く同定することができる。

【 0 0 2 2 】

クローン増殖を、IL - 4 および IL - 2 のような非特異的な成長因子を含む栄養培地内で行ってもよい。好ましい実施の形態は、刺激剤として、抗 - CD 3 - および抗 - CD 2 8 - 抗体 - 結合ビーズを使用することからなる。

本発明による方法で得られる Tr 1 細胞は、IL - 1 0 の存在下で、CD 4⁺ T リンパ球の活性化によって得られる Tr 1 細胞の特性の全てを提示し、それゆえ、免疫応答を調節するにおいて、後者と同一な用途を有する。

【 0 0 2 3 】

本発明は、炎症疾患および / または自己免疫疾患の治療を意図する医薬品の調製方法に関し、本発明による方法によって抗原 - 特異的 Tr 1 リンパ球を調製し、それらを患者に投与するのに適した製剤に、前記 Tr 1 リンパ球を包装することを含むことを特徴とする。

10

本発明は、続く残りの記載によって、より理解されるであろうし、本発明による方法をどのようにして実行するかを説明する実施例に限定されるものではないことを記載する。

【 0 0 2 4 】

実施例 1 : Tr リンパ球の調製

CD 4⁺ T 細胞の単離

末梢単核細胞 (P B M C) を、フィコール - ハイパック (H y p a q u e) 上で、遠心分離にて得る。

20

CD 4⁺ T 細胞を、次のプロトコルで記載のような抗 - CD 8 (L 5 3 3)、抗 - CD 1 1 b (O K M 1) および抗 - CD 2 0 (2 H 7) 抗体を使って、非 - CD 4⁺ 細胞を排除することで得る。細胞を、飽和抗体濃度 (saturating antibody concentration) にて、4 で 2 0 分間インキュベートする。洗浄後、ダイナビーズ (D y n a b e a d) (D y n a l、オスロ、ノルウェー) を、1 / 1 のビーズ / 標的細胞の割合で加え、混合物を 4 で、1 時間インキュベートする。それらに付着した非 - CD 4⁺ 細胞を有するビーズを、電磁場の適用によって、排除する。フローサイトメトリー (F A C S スター、Becton Dickinson) による残存する細胞の解析は、それらが 9 0 ~ 9 5 % の CD 4⁺ T 細胞を含むことを立証している。

【 0 0 2 5 】

30

人工抗原 - 提示細胞の収得

マウス L 繊維芽細胞 (A T C C C C L - 1) を、L F A - 3 およびクラス II H L A 分子をエンコードする核酸配列でコトランスフェクトした。

【 0 0 2 6 】

L F A - 3 - エンコード c D N A の収得

L F A - 3 - エンコード c D N A を、K p n I サイトにて 5 ' がフランクされたヒト L F A - 3 (ジーンバンク 受理番号 X 0 6 2 9 6) をエンコードする配列のヌクレオチド 1 3 ~ 3 3 の配列、5 ' L F A - 3 と呼ばれるプライマーおよび N o t I サイトにて 5 ' がフランクされたヒト L F A - 3 をエンコードする配列のヌクレオチド 7 0 8 ~ 7 2 8 の配列を含み、3 ' L F A - 3 と呼ばれるプライマーを使い、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 法にて、ヒト末梢単核細胞の完全な c D N A ライブラリーから調製した。

40

【 0 0 2 7 】

D R 1 - エンコード c D N A の収得

D R 1 鎖をエンコードする c D N A を、D R 1 鎖をエンコードする配列 (ジーンバンク 受理番号 K 0 1 1 7 1)、ならびにヌクレオチド 1 5 1 ~ 1 7 6 の配列およびヌクレオチド 7 6 9 ~ 7 9 2 の配列をそれぞれ含む D R 1 A 5 ' および D R 1 A 3 ' と呼ばれるプライマーを使い、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) にて、D R 1⁺ ドナー由来のヒト末梢単核細胞の完全な c D N A ライブラリーから得た。D R 1 鎖をエンコードする c D N A を、D R 1 鎖をエンコードする配列 (ジーンバンク 受理番号 N M 0 0 2 1 2 4) のヌクレオチド 5 2 ~ 7 4 および 8 5 0 ~ 9 2 3 の配列をそれぞれ含む D R 1 B 5 '

50

およびDR1B3'のような上記で参照したプライマーを使い、同様な方法で得た。

【0028】

細胞のトランスフェクション

得られた各々のcDNAを、ベクターpcDNA3.1/ハイグロ(Invitrogen)のTAサイトにクローンした。得たベクターを、エレクトロポレーションにて、L細胞をコトランスフェクトさせるために使用した。

【0029】

安定したトランスフェクタントを、細胞を抗-LFA-3抗体(1C3)および抗-DR抗体(L243)でラベルすることで、フローサイトメトリー(FACSヴァンテージSE、Becton Dickinson)にて分離させる。LFA-3およびDRを同時に発現する細胞を、そしてペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した10%仔牛血清(Boehringer)で補充したF12培地(Life Technologies)上に保持し、培養する。

10

【0030】

LFA-3およびDR1を共発現(coexpress)する抗原-提示細胞を、同様に、P815細胞(ATCC-TIB64)をコトランスフェクトさせることで上記のように調製した。

トランスフェクトされていないL細胞またはP815細胞、あるいはDR1分子のみを発現するL細胞またはP815細胞のトランスフェクトにて得られる細胞を、同様に対照として使用した。

20

【0031】

Trリンパ球の収得

非-DR1ドナーのPBMCから、上記のように単離したCD4⁺T細胞を、Yssel培地(Ysselら、J.Immunol.Methods、72、219~227、1984)中、 2×10^6 細胞/mlの濃度で懸濁する。細胞懸濁を、1ml/穴で24-穴培養プレート内に分ける。上記のようにして得られたトランスフェクトされたL-DR1-LFA3細胞またはトランスフェクトされたL-DR1細胞、あるいはコントロールとしてB-EBV DR1⁺リンパ芽球状細胞を、ガンマ線照射し(60GY)、そして各々の穴に 5×10^5 細胞/mlの濃度で加える。

【0032】

7日間インキュベートした後、細胞を回収し、PBSで洗浄し、そして抗-CD4抗体(RPA-T4)および抗-CD25抗体(M-A251)を使ってラベルする。CD4⁺CD25⁺細胞を、フローサイトメトリーにて分離し、Yssel培地で96-穴プレート中、1細胞/穴でクローンする。クローン増殖を、IL-2およびIL-4の存在下で、SpitsおよびYsselにて記載されている技術(J.Immunol.Methods、9、416~421、1996)にて行う。クローンの増殖後、様々なクローンを、B-EBV DR1⁺リンパ芽球状細胞で再び刺激する。刺激48時間後、細胞懸濁を回収し、そしてこの刺激に应答するサイトカインIL-10およびIFN- γ の生産のプロフィールを、Abramsらにて記載されているプロトコル(Curr.Protocols Immunol.、13、pp6.1-6-15、1995)に従ってELISAにてこれらサイトカインを定量分析することで分析した。

30

40

【0033】

下記の表1で説明する結果は、2つの異なるドナー由来のTr1細胞によるサイトカインIL-10およびIFN- γ の生産を示している(10クローンの平均 \pm 標準偏差)。

【0034】

【表 1】

表 1

細胞	ドナー 1		ドナー 2	
	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
L-DR1	326 \pm 40	13372 \pm 1500	3657 \pm 324	9638 \pm 63
L-DR1-LFA-3	2315 \pm 183	19403 \pm 975	6402 \pm 272	914 \pm 322
B-EBV DR1+	<40	16005 \pm 123	174 \pm 59	4930 \pm 685

10

【 0 0 3 5 】

その他の実験系で、DR1⁺ドナー由来のPBMCから単離したCD4⁺T細胞を、上記したように、DR1分子およびLFA-3分子を発現する抗原-提示細胞と混合する。

誘導体抗原（ヘモフィルス インフルエンザ (Haemophilus influenzae) ウイルスのカプシド抗原のフラグメントに相当するペプチドHA 307-319)を、50 μ g/mlの濃度で、細胞混合物に加える。

【 0 0 3 6 】

3日間インキュベートした後、CD4⁺CD25⁺細胞を、フローサイトメトリーにて分離し、上記したようにクローンする。

20

クローンの増殖後、様々なクローンを、HAペプチド(10 μ M)でチャージされたB-EBVリンパ芽球状細胞で再び刺激する。刺激48時間後、細胞懸濁を回収し、この刺激の応答で、サイトカインIL-2、IL-4、IL-10およびIFN- γ の生産のプロフィールを、Abramsと共同研究者にて記載されたプロトコルに従ってELISAにてこれらサイトカインの定量分析にて分析した。

単離されたCD4⁺CD25⁺クローンのほとんど(約70%)は、TR1細胞のサイトカイン生産プロフィールを示す。

9つのこれらTr1クローンのサイトカイン生産プロフィールを、下記の表2で説明する。

30

【 0 0 3 7 】

【表 2】

表 2

クローン	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
HA-1A12	<20	<40	12358	521
HA-1B6	<20	<40	11897	497
HA-1C9	<20	<40	14598	1369
HA-1E5	<20	<40	13549	314
HA-1E7	40	<40	11697	876
HA-1F2	<20	<40	10597	1057
HA-2B6	<20	<40	17891	697
HA-2D5	32	<40	16589	503
HA-2F2	<20	<40	17803	873

40

【 0 0 3 8 】

同様なサイトカイン生産プロフィールを有するTr1細胞クローンは、抗原-提示細胞

50

として P 8 1 5 - D R 1 - L F A - 3 細胞を使っても得られ、そのことは、T r 1 細胞を得ることが、抗原 - 提示細胞が得られる細胞系列の特性とは関連していないことを証明している。

【 0 0 3 9 】

実施例 2：本発明による方法で得られる T R 1 リンパ球の免疫調節特性

抗原 - 特異的 T r 1 細胞の免疫特性を、次のように試験した。

D R 1 + ドナー由来のヒト C D 4 + T 細胞 ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) を、ペプチド H A 3 0 7 - 3 1 9 ($50 \mu\text{M}$) および破傷風アノキシン (T T : $50 \mu\text{g} / \text{ml}$) の存在下で、ガンマ線照射 (60Gy) された同系の単核細胞 ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) で刺激する。

上記したように得た H A - 特異的 T r 1 クローンを、細胞 ($2 \times 10^5 / \text{ml}$) のみ、あるいは I L - 1 0 受容体 (抗 - I L - 1 0 R、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$) に対する抗体、抗 - T G F - 抗体 ($20 \mu\text{g} / \text{ml}$) またはこれら 2 つの抗体の混合物の存在下で加える同様な実験を平行して行う。

【 0 0 4 0 】

C D 4 + T 細胞の増殖を、5 日後に、トリチウム化されたチミジンの取り込みを測定することで分析する。

3 つの H A - 特異的 T r 1 クローンについて得られた結果を、図 1 で説明する。

図 1 に対するキー：

X 軸：増殖 (取り込まれたトリチウム化されたチミジン、c p m)

Y 軸：

媒体：刺激されていない C D 4 + T 細胞

T T + H A ペプチド：H A 3 0 7 - 3 1 9 ペプチドおよび破傷風アノキシンにて刺激される C D 4 + T 細胞

+ T r 1 H A - 特異性：H A 抗原に特異的な T r 1 細胞の存在下で、ペプチド H A 3 0 7 - 3 1 9 および破傷風アノキシンにて刺激される C D 4 + T 細胞

+ 抗 I L - 1 0 R：H A 抗原に特異的な T r 1 細胞および抗 - I L - 1 0 R 抗体の存在下で、ペプチド H A 3 0 7 - 3 1 9 および破傷風アノキシンにて刺激される C D 4 + T 細胞

+ 抗 - T G F - ：H A 抗原に特異的な T r 1 細胞および抗 - T G F - 抗体の存在下で、ペプチド H A 3 0 7 - 3 1 9 および破傷風アノキシンにて刺激される C D 4 + T 細胞

+ 抗 - I L - 1 0 R + 抗 - T G F - ：H A 抗原に特異的な T r 1 細胞および抗 - I L - 1 0 R 抗体と抗 - T G F - 抗体との混合物の存在下で、ペプチド H A 3 0 7 - 3 1 9 および破傷風アノキシンにて刺激される C D 4 + T 細胞

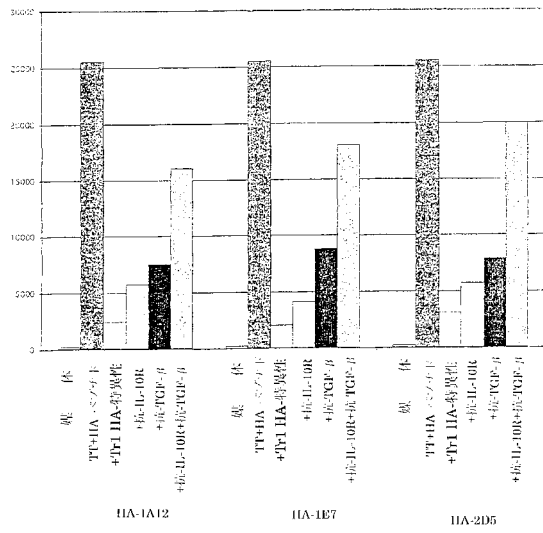
【 0 0 4 1 】

これらの結果は、本発明による方法で得られる T r 1 リンパ球が、C D 4 + T 細胞の抗原 - 特異的な増殖をかなり低下させることを立証している。この抑制効果は、抗 - I L - 1 0 R 抗体または抗 - T G F - 抗体のみでわずかに弱められるだけであり、かつ 2 つの抗体の混合物によって部分的に無効にされる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 2 】

【図 1】



フロントページの続き

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 グルー, ハーヴ

フランス、エフ - 0 6 4 1 0 ビオット、アヴェニュー デ コリブリス、27

(72)発明者 コットレツ, フランソワ

フランス、エフ - 0 6 4 1 0 ビオット、アヴェニュー デ コリブリス、27

(72)発明者 ワッカチ, アブデリラ

フランス、エフ - 0 6 1 0 0 ナイス、リュ ボール ブーニン、34

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表2000-511898(JP, A)

Nature, 1997, Vol.389, pp.737-742

Clinical & Experimental Immunology, 1998, Vol.111, pp.12-19

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12N 5/00

PubMed

JSTPlus(JDreamII)