

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-165652

(P2017-165652A)

(43) 公開日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24 Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/525 (2006.01)	C 0 7 K 14/525	4 B 0 2 4
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-135062 (P2014-135062)	(71) 出願人	504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
(22) 出願日	平成26年6月30日(2014.6.30)	(71) 出願人	504145308 国立大学法人 琉球大学 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地
		(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	菊地 利明 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
		(72) 発明者	平野 泰三 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】新規抗ヒトOX4オリガンド抗体、及びこれを含む抗インフルエンザ薬

(57) 【要約】

【課題】インフルエンザウイルスの細胞内への付着を抑制するという新たな機構でインフルエンザを治療し得る薬剤を提供すること

【解決手段】ヒトOX4OLのうち、90番目のアスパラギンを含む領域に特異的に結合する抗ヒトOX4OL抗体。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト O X 4 0 L のうち、90 番目のアスパラギンを含む領域に特異的に結合する抗ヒト O X 4 0 L 抗体。

【請求項 2】

ヒト O X 4 0 L のアミノ酸配列のうち、57～120 位の領域に特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

野生型のヒト O X 4 0 L に対する結合能よりも 90 位のアスパラギンをアラニンに変換した変異ペプチドに対する結合能のほうが高い、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

ヒト O X 4 0 L の 90 番目のアスパラギンを含むアミノ酸配列からなる 5～50 アミノ酸残基のペプチドである、ヒト O X 4 0 L ペプチドエピトープ。

【請求項 6】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む抗インフルエンザ薬。

【請求項 7】

請求項 4 又は 5 に記載のヒト O X 4 0 L ペプチドエピトープを用いた、抗インフルエンザ薬のスクリーニング方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗インフルエンザ薬、抗インフルエンザ薬に有用な抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザ感染症は毎冬流行する頻度の高い疾患である。その多くは自然に軽快するが、時に重症の肺炎を合併する事が知られている。しかし、現在抗インフルエンザの薬の治療効果は肺炎においては限定的であり、新規の治療薬が求められている。インフルエンザ感染症の重症化には気道上皮細胞へのウイルスの吸着が重要であり、これにはインフルエンザ受容体である α -2,6-シアル酸が上皮細胞の糖タンパク質に糖付加される事が必要である。近年、重症化の一因として、下気道の上皮細胞へのインフルエンザ受容体の発現・分布の重要性が報告された。しかし、細気管支領域においては、どの細胞がインフルエンザ受容体を有し、どの糖タンパク質が受容体として機能するのかに関して十分に分かっていない。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2003;289(2):179-86.

40

【非特許文献 2】T Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2004;292(11):1333-40.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明が解決すべき課題は、インフルエンザウイルスの細胞内への付着を抑制するという新たな機構でインフルエンザを治療し得る薬剤を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0005】

かかる状況の下、本発明者らは、OX40リガンド(以下OX40L)の90位のアスパラギンへのシアル酸の糖付加により、インフルエンザウイルスの細胞内感染を増加させることを見出した。

【0006】

具体的には、まず、OX40LはTNF super familyに含まれ、23個のアミノ酸の細胞内ドメインと133個のアミノ酸の細胞外ドメインよりなる糖タンパク質である(参考文献1)。

OX40Lは以下の名称で呼ばれることもある：

tumor necrosis factor ligand superfamily member 4；

tax-transcriptionally activated glycoprotein 1 (34kD) ；

OX40 antigen ligand ；

CD134 ligand ；

OX40 ligand (OX40L) ；

glycoprotein Gp34 ；

TAX transcriptionally-activated glycoprotein 1。

OX40Lは恒常的にはほとんど発現していないが、外来抗原を認識した際に炎症性サイトカインに誘導され、樹状細胞・ランゲルハンス細胞・マクロファージ・Natural Killer細胞などの血球系細胞に発現が誘導される(参考文献1～3)。また、近年、血管内皮細胞・平滑筋細胞などの非血球系の細胞でのOX40Lの発現が報告され、生理的な側面において非血球系細胞と血球系細胞が関与している事が示唆されている(参考文献4～6)。

【0007】

一方、OX40Lの受容体であるOX40は、主に活性型T細胞に発現し、T細胞の増殖と生存に関与する事が知られている(参考文献1、2)。インフルエンザモデルにおいて、OX40の抑制はOX40L-OX40機能を抑制し、T細胞の浸潤を抑制する事で肺の炎症を軽減すると共に、マウスのインフルエンザ肺炎の症状、体重減少を抑制したと報告されている(参考文献7、8)。

【0008】

インフルエンザ肺炎の重症化の機序に関しては、インフルエンザウイルス・サイトカイン・プロテアーゼの3つの因子のサイクルに依存すると言われている(参考文献9)。インフルエンザウイルスの上皮細胞への感染は感染部位への炎症細胞の浸潤を誘導する一方で、過剰なサイトカインの産生を伴うプロテアーゼの過剰産生は、肺炎の重症化に関与する事が知られている(参考文献10～12)。

【0009】

従って、OX40は、インフルエンザ肺炎の重症化の機序のうち、宿主の過剰免疫に関与する分子として報告されている(参考文献7、8)。一方OX40Lについては、インフルエンザ肺炎の重症化との関連性は報告されていない。上記のような状況の下、本発明者らは、OX40Lがインフルエンザ肺炎の重症化に対しOX40よりも強い影響をもたらすこと、及びOX40で報告された宿主の過剰免疫とは全く異なる機構で働くこと、すなわちインフルエンザウイルスの感染自体に関連することを見出した。さらに本発明者らは、上記新たな知見に基づき鋭意研究した結果、インフルエンザウイルスに寄与しているシアル酸の位置がOX40Lの90位のアスパラギンであることを見出した。本発明はかかる新規の知見に基づくものである。

【0010】

参考文献1：Croft M. Annual review of immunology. 2010;28:57-78.

参考文献2：Ishii N, Takahashi T, Soroosh P, et al. Advances in immunology. 2010;105:63-98.

参考文献3：Watts TH. Annual review of immunology. 2005;23:23-68.

参考文献4：Imura A, Hori T, Imada K, et al. The Journal of experimental medicine. 1996;183(5):2185-95.

10

20

30

40

50

参考文献 5 : Burgess JK, Carlin S, Pack RA, et al. The Journal of allergy and clinical immunology. 2004;113(4):683-9.

参考文献 6 : Siddiqui S, Mistry V, Doe C, et al. Chest. 2010;137(4):797-804.

参考文献 7 : Kopf M, Ruedl C, Schmitz N, et al. OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. Immunity. 1999;11(6):699-708.

参考文献 8 : Humphreys IR, Walzl G, Edwards L, et al. A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. The Journal of experimental medicine. 2003;198(8):1237-42.

参考文献 9 : Wang S, Le TQ, Kurihara N, et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. The Journal of infectious diseases. 2010;202(7):991-1001. 10

参考文献 10 : Braciale TJ, Sun J, Kim TS. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. Nature reviews Immunology. 2012;12(4):295-305.

参考文献 11 : Kim TS, Sun J, Braciale TJ. T cell responses during influenza infection: getting and keeping control. Trends in immunology. 2011;32(5):225-31.

参考文献 12 : Damjanovic D, Small CL, Jeyanathan M, et al. Immunopathology in influenza virus infection: uncoupling the friend from foe. Clinical immunology. 2012;144(1):57-69. 20

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、インフルエンザウイルスの細胞内への付着を抑制するという新たな機構でインフルエンザを治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 参考例1の試験結果を示す。

【図2】 参考例2の試験結果を示す。

【図3】 参考例3の試験結果を示す。

【図4】 参考例4及び5の試験結果を示す。 30

【図5】 参考例6の試験結果を示す。

【図6】 参考例6の試験結果を示す。

【図7】 参考例7の試験結果を示す。

【図8】 参考例8の試験結果を示す。

【図9】 参考例9の試験結果を示す。

【図10】 参考例10の試験結果を示す。

【図11】 参考例11の試験結果を示す。

【図12】 実施例1の試験結果を示す。

【図13】 実施例2の試験結果を示す。

【図14】 参考例12の試験結果を示す。 40

【図15】 実施例3の試験結果を示す。

【図16】 実施例4の試験結果を示す。

【図17】 実施例5の試験結果を示す。

【図18】 実施例6の試験結果を示す。

【図19】 実施例8の試験結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明において、「タンパク質」及び「ペプチド」は、オリゴペプチド及びポリペプチドを含む意味で用いられる。また、本明細書において、「タンパク質」及び「ペプチド」は、特に言及しない限り、糖鎖などによって修飾されているタンパク質及び非修飾のタン 50

パク質の両方を包含するものとする。このことは、タンパク質であることが明記されていないタンパク質についても同様である。

【0014】

抗体

本発明は、ヒトOX40Lのうち、90番目のアスパラギンを含む領域に特異的に結合する抗ヒトOX40L抗体を提供する。

【0015】

本発明において、ヒトOX40Lとは、前述した特徴を有するタンパク質であり、例えば、NCBIデータベースにアクセス番号NP_003317.1で記載されているもの、より具体的には下記のアミノ酸配列（配列番号1）を有するものが挙げられる：

10

mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv iqglglllcf tyiclhfsal qvshrypriq
sikvqfteyk kekfgiltsq kedeimkvqn nsviincdgi ylislkgyfs qevnislhyq
kdeepflfqlk kvrsvnslmv asltykdkvy lntttdntsl ddfhvnggel ilihqnpgef
cvl。

【0016】

本発明に係る抗体は、ヒトOX40リガンドのアミノ酸配列のうち、90位のアスパラギンを含む領域に特異的に結合する。

【0017】

本発明に係る抗体が上記に示すヒトOX40L由来のアミノ酸配列の領域に特異的に結合することは、公知の方法で可視化することができる。例えば、試験管内の試料を対象とするイムノアッセイ法（例えば、ELISA法）、免疫電気泳動法（例えばウェスタンブロット法）、および組織または細胞を対象とする免疫組織化学などが例として挙げられるが、これらに限定されるものではない。可視化にあたっては、本発明の抗体が蛍光物質（例えば、フルオレセインイソシアネート）、放射性同位体（例えば、ヨウ素125）、酵素（例えば、アルカリフォスファターゼ、西洋ワサビペルオキシターゼ）、その他のタンパク質（例えば、アビジン）などの分子によって標識化されていてもよい。あるいは、本発明の抗体を特異的に認識する二次抗体を用いてもよい。

20

【0018】

本発明に係る抗体のうち、ヒトOX40Lのアミノ酸配列のうち、57～120位の領域に特異的に結合するものが好ましく、57～113位の領域に特異的に結合するものが好ましい。

30

【0019】

本発明の抗体としては、ヒトOX40Lの90位のアスパラギンをアラニンに変換したペプチドに対し結合能が低下するものが好ましい。例えば、野生型のヒトOX40Lに対する結合能よりも90位のアスパラギン→アラニンへの変換ペプチドに対する結合能の方が低い抗体が挙げられ、90位のアスパラギン→アラニンへの変換ペプチドに対する結合能が、野生型のヒトOX40Lに対する結合能の70%以下の抗体が好ましく、野生型のヒトOX40Lに対する結合能の50%以下の抗体がより好ましい。ここで、ヒトOX40Lに対する結合能は、実施例3の方法で測定可能である。

【0020】

本発明にかかる抗ヒトOX40L抗体は、典型的には、軽鎖及び重鎖を含み、該軽鎖は、フレームワーク領域（FR）1、相補性決定領域（CDR）1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含み、該重鎖が、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む構造を有する。

40

【0021】

本発明の抗体は、上記に示すヒトOX40L由来のアミノ酸配列の領域と特異的に結合できる限りその免疫グロブリンクラスについては限定されるものではなく、例えばIgG、IgM、IgA、IgD、IgE、IgYなどが挙げられる。さらに、そのサブクラスも制限されない。好ましくは、IgGである。

【0022】

50

本発明の抗体は、抗体を産生しうる哺乳類（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ）または鳥類（例えば、ニワトリ、ダチョウ）由来である。

【0023】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。さらには、モノクローナル抗体のうち、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であってもよい。ここで、キメラ抗体およびヒト化抗体とは、免疫グロブリンタンパク質のうち、抗原と結合可能な部位以外がヒト由来である抗体を指す。ヒト抗体は、ヒト由来の抗体、または完全なヒト由来の免疫グロブリン遺伝子を有するヒト抗体産生マウス由来である抗体を指す。キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体は、ヒトにおける免疫原性が低く、抗体を医療製剤などに用いるに当たって有用である。従って、本発明の抗体を医療製剤などに用いる場合にあっては、モノクローナル抗体が好ましく、ヒト化抗体またはヒト抗体が特に好ましい。

10

【0024】

本発明の抗体は、免疫グロブリンタンパク質全長であっても、抗原と結合可能な部位を含むそれらの断片（フラグメント）であってもよい。また、抗体を含む組成物、例えば抗血清などであってもよい。

【0025】

本発明の抗体は、抗原を免疫動物に投与することで作製することができる。抗原としては、後述する本発明のヒトOX40Lペプチドエピトープを用いることができる。抗原を免疫動物に投与する場合にあっては、ペプチドは分子量が小さく、免疫応答を十分に起こせない場合があるため、ペプチドを適当なタンパク質（例えば、アルブミン、サイログロブリンヘモシアニン等）に結合させて抗原として用いてもよい。

20

【0026】

あるいは、多様な抗体またはその断片を産出しうる細胞またはファージなどのライブラリから、抗原と結合する抗体またはその断片を産出するものを探索することで、本発明の抗体を入手することもできる。この場合、抗原としては、後述する本発明のヒトOX40Lペプチドエピトープを用いることができる。

【0027】

抗原として用いるペプチドの入手方法は、特に制限されず公知の方法によることができ、例えば天然由来、化学合成、無細胞系合成、組換えペプチドであってもよい。

30

【0028】

一般的な抗体の作製方法については、例えば、Harlowらの「Using Antibodies : A laboratory manual」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(1998))、岩崎らの「単クローン抗体 ハイブリドーマとELISA, 講談社(1991)」などに記載されている。以下、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびヒト化抗体の各抗体の作製方法について簡単に説明する。

【0029】

(1) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、免疫動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ）を通常の方法により免疫し、血清を調製し、抗血清から抗体を精製することにより得ることができる。免疫は、例えば、免原溶液を等量のフロイントの完全アジュバント又は不完全アジュバントと乳化混合したものを接種（初回免疫）し、以後2～4週間の間隔で数回免疫することによって行うことができる。抗血清からのポリクローナル抗体の精製は、DEAEイオン交換クロマトグラフィー又はプロテインGアフィニティークロマトグラフィー等により行うことができる。

40

【0030】

(2) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを調製し、当該ハイブリドーマが産生した抗体を精製することで作製できる。または、ファージディスプレイ法、すなわち、多様な抗体または抗体断片を発現するファージライブラリより、抗原

50

に対して特異的に結合する抗体または抗体断片を探索する方法によって作製することもできる。

【0031】

ハイブリドーマを分離する方法は、自体公知であり（例えば、Kohlerら、Nature, 256: 495 (1975)など）、例えば、以下の方法により得ることができる。最終免疫して数日後の免疫動物（例えば、マウス）から脾臓を無菌的に摘出し、脾臓から脾臓細胞を調製する。脾臓細胞は、ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）とともに、細胞融合工程に用いる。ミエローマ細胞としては例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などを使用することができ、細胞融合の方法としては、例えばPEG等の融合促進剤を含む培地中で、脾臓細胞とミエローマ細胞とを、常法の混合比率（約1/5～1/10程度の割合）で混合することにより行うことができる。融合後、選択用培地（例えば、HAT培地）を用いて、ハイブリドーマのみを増殖させる。それらの内、培養上清中に目的のモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマは、例えば、培養上清とヒトOX40Lペプチドエピトープとの反応性を酵素結合免疫測定法（ELISA）でスクリーニングすることによって確認し、選択することができる。

10

【0032】

ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体は、これを培養することにより、容易に調製することができる。培養は適切な培地中（例えば、10%ウシ胎児血清を追加したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM））で、あるいは生体内（例えば、マウスの腹腔中）で行うことができる。培養上清、あるいは腹水などを出発材料として、抗体を精製することもできる。抗体の精製には、タンパク質の精製に一般的な方法、例えば硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、プロテインAもしくはプロテインG結合ポリマー等を用いるアフィニティークロマトグラフィー、または透析等の方法を適宜組み合わせる用いることができる。

20

【0033】

ファージディスプレイ法も自体公知であるが（例えば、Clacksonら、Nature 352:624-8 (1991)等）、以下に簡単に説明する。あらかじめ作製した多様な抗体の抗原認識部位を提示するファージライブラリから、ヒトOX40Lペプチドエピトープと結合する抗原認識部位を提示するファージを選択する。選択されたファージが提示する抗原認識部位をそのまま用いても良いし、遺伝子工学的手法によって完全長の抗体を産出可能なCHO細胞などに組み込むことで、完全長の抗体を得ることもできる。

30

【0034】

（3）ヒト化抗体、ヒト抗体

ヒト化抗体とは、抗体タンパク質のうち、抗原認識のために必要最小限な領域（相補性決定領域、complementarity-determining region: CDR）以外がヒト由来のものである。ヒト化抗体の製造方法は、例えば、EP0239400、US5585089号などに記載され公知である。

【0035】

ヒト抗体は、完全なヒト由来の免疫グロブリン遺伝子を有するヒト抗体産生マウスから得ることができる。ヒト抗体産生マウスについては、WO97/07671などに記載され公知である。

40

【0036】

エピトープ

本発明は、ヒトOX40Lの90番目のアスパラギンを含むアミノ酸配列からなる5～50アミノ酸残基のペプチドである、ヒトOX40Lペプチドエピトープを提供する。

【0037】

当該ヒトOX40Lペプチドエピトープは、好ましくは、50個以下のアミノ酸からなることが好ましく、30個以下のアミノ酸からなることがより好ましく、25個以下のアミノ酸からなることがさらに好ましい。当該ヒトOX40Lペプチドエピトープは、好ましくは、5個以上のアミノ酸からなることが好ましく、15個以上のアミノ酸からなるこ

50

とがより好ましく、20個以上のアミノ酸からなることがさらに好ましい。また、本発明のエピトープは、ヒトOX40Lの80～100位の領域を含むことが好ましく、ヒトOX40Lの85～95位の領域を含むことが好ましい。

【0038】

本発明のペプチドエピトープは、ヒトOX40L機能の阻害能を有する抗体を調製するために用いることができる。本発明のペプチドエピトープを抗原として用いる場合には、前述のように、適当なタンパク質に結合させて抗原として用いてもよい。

【0039】

ハイブリドーマ

本発明は、抗体を産生するハイブリドーマも提供する。ハイブリドーマの製造方法は、本願実施例の方法、抗体について前述した方法等、自体公知の方法に準じて行うことができる。

【0040】

抗インフルエンザ薬

本発明は、前述の抗体を含む、抗インフルエンザ薬を提供する。

【0041】

本発明の抗インフルエンザ薬は、当該抗体に薬学的に許容される各種担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤等が含まれる）と配合した製剤であってもよい。上記製剤は慣用の添加剤を含んでいてよい。

【0042】

本発明の抗インフルエンザ薬は、インフルエンザウイルスの中和反応により治療効果を奏するのではなく、細胞膜に存在するOX40Lの特定の位置に特異的に結合することによりインフルエンザウイルスの当該細胞内への付着を抑制することにより、治療効果をもたらす。従って、本発明の抗インフルエンザ薬は、インフルエンザウイルスの型、インフルエンザウイルスの細胞表面抗原の種類によらず治療効果をもたらすことができる。従って、本発明の抗インフルエンザ薬が対象とするインフルエンザウイルスは特に限定されず、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス及びC型インフルエンザウイルスのいずれもが対象となり得る。本発明の抗インフルエンザ薬は、細胞表面抗原のパターンが多いA型インフルエンザウイルスに対する治療効果があるため非常に有用である。

【0043】

製剤形態は、特に限定されず、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の経口投与剤；注射剤（静脈注射、筋肉注射、局所注射等）、含嗽剤、点滴剤、外用剤、座剤等の非経口投与剤等などの各種製剤形態を挙げることができる。好ましい製剤形態としては、例えば、局所注射剤、歯肉粘膜への塗布剤、含嗽剤等が挙げられる。

【0044】

製剤中の本発明の抗体の含有量は、投与経路、患者の年齢、体重、症状等によって異なり一概に規定できないが、ポリペプチドの1日投与量が通常10～1000mg程度、より好ましくは100～500mg程度になる量とすればよい。1日1回投与する場合は、1製剤中にこの量が含まれていればよく、1日3回投与する場合は、1製剤中にこの3分の1量が含まれてい

【0045】

本発明の治療又は予防剤は、哺乳動物等の患者に投与される。哺乳動物としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ等が挙げられる。

【0046】

スクリーニング方法

本発明は、ヒトOX40Lペプチドエピトープを用いた、抗インフルエンザ薬のスクリーニング方法を提供する。

【0047】

本発明においてスクリーニングし得る抗インフルエンザ薬としては、抗体医薬、ペプチド医薬、低分子化合物等が挙げられる。例えば、本発明の方法としては、前述のヒトOX40Lペプチドエピトープと候補物質とを接触させる工程、及び当該候補物質が当該ヒトOX40Lペプチドエピトープに特異的に結合するか否かを測定する工程を含むものが挙げられる。また、本発明の方法は、当該ヒトOX40Lペプチドエピトープに特異的に結合する候補物質を選択する工程を含んでいてもよい。本発明におけるヒトOX40Lペプチドエピトープと候補物質とを接触させる工程には、当該ヒトOX40Lペプチドエピトープの蛋白質そのものを候補物質に接触させる方法だけでなく、当該ヒトOX40Lペプチドエピトープを含むペプチド（例えば、ヒトOX40L全長ペプチド）を候補物質に接触させる方法（すなわち、当該ヒトOX40Lペプチドエピトープがあるペプチドの一部として存在している状態で候補物質と接触させる方法）、ヒトOX40Lペプチドエピトープ又は当該エピトープを含むペプチドを高発現するよう形質転換した細胞を候補物質に接触させる方法も含まれる。

10

【0048】

本発明の方法はまた、新規な薬剤を見出すことだけでなく、既存薬剤の投与順序や併用の組合せ等に関しても、最適な方法を見出すために、上記と同様のインビトロ又はインビボ実験を行うことができる。

【実施例】

【0049】

以下に、実施例等に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

20

【0050】

1 マウス

本研究プロトコルは東北大学動物実験委員会の承認の元、施行した。C57BL/6 マウス(H-2^b)は日本チャールズリバーより購入した。OX40欠損マウス・OX40L欠損マウスは以前の論文に記載された方法にて作成されたものを使用し、これらのマウスはC57BL/6マウスに交差してある(Pippig SD, Pena-Rossi C, Long J, et al. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1999;163(12):6520-9.; Murata K, Ishii N, Takano H, et al. The Journal of experimental medicine. 2000;191(2):365-74。マウスは全ての実験にて年齢を6-10週・性別をメスに統一し、特殊細菌の存在しない環境下にて飼育したものを

30

【0051】

2 骨髄キメラマウスの作成

骨髄キメラマウスはドナーに野生型・OX40L欠損マウスを使用し、どちらもレシピエントとして同様に野生型とOX40L欠損マウスに移植した計4種類のマウスを作製した。骨髄移植の方法は最初にレシピエントマウスに骨髄致死線量の10Gyのγ線を使用し、骨髄細胞を死滅させた後にドナーマウスの骨髄から採取した骨髄細胞を経血管性に 3×10^6 個移植して作成した(Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Circulation research. 1999; 85(3):221-8.)。その後、キメリズム解析を行い CD4 T細胞: 73%、CD8 T細胞: 67%、B細胞: 99%、NK細胞: 99%、NKT細胞: 49%、Myeloid、DC細胞: 100%、Lymphoid DC細胞: 99%、好中球: 100%と骨髄移植が成功している事を確認した。マウスは20週、性別メスのマウスを使用した。

40

【0052】

3 重症インフルエンザモデル（気道上皮壊死性モデル）

マウスにマウス感受性のある致死量のインフルエンザウイルス(H1N1 A/PR/8/34)を経気道的に投与した。インフルエンザウイルス量は徐々に増加し、野生型のマウスが死亡するMLD (mouse lethal dose)量を決定するとともに、このウイルス量が気道上皮細胞を減少させる量をフローサイトメトリーにて確認し、気道上皮壊死性モデルを作成した。この量は5MLDであった。マウスの生存期間の測定と体重に関しては、毎日同じ時間帯に施設にて目視にて生存を確認後、体重計を使用して安定時の体重を測定した。また、刺激により

50

体動しないマウスに関しては倫理的な観点より安楽死させた。肺の炎症の評価は、以前の報告に基づき検討した (Kikuchi T, The Journal of clinical investigation. 2001;108(6):917-27.; Kikuchi T, Worgall S, Singh R, et al. Nature medicine. 2000;6(10):1154-9.)。具体的には、マウスにインフルエンザウイルス投与し、7日後に肺胞洗浄液と肺組織を採取した。肺胞洗浄液は気道よりサーフローを介してリン酸緩衝生理食塩水 (以下PBS) 750 μ l を投与・回収を2回施行した。回収後、2300 g、5分にて遠心分離し、細胞塊と上清に分けた。細胞塊は再度1 mlのPBSにて攪拌しトリパンブルー (0.4%, life technology, Carlsbad, CA) を用いて総細胞数を測定した。また、上澄み液はBCL protein assay キット (Thermo scientific, Offenbourg, Germany) にて蛋白濃度を計算し血管透過性を測定した。細胞数測定後、200 μ l のPBSに2000個の細胞を調節し、その後、サイトスピンにてスライドグラスに落とし、Diff-Quick染色を施行した。最低200個/視野を3カ所で顕微鏡を介して目視にて細胞の形態からマクロファージ・好中球・リンパ球・好酸球数を計算した。採取した肺組織はホルマリン固定し、パラフィンにて封入後、ヘマトキシリンとエオジンにて染色した。

10

【0053】

4 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 法

RNAはフローサイトメトリーにて選別・回収した細胞と、In vitroにてインフルエンザ感染したMDCK細胞を対象とした。対象とした細胞をRNeasy Plus kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いてRNAを抽出し、RNA量をNanoDrop 1000 (Termo scientific) を用いて定量した後、同量のRNAをHigh-capacity RNA to cDNA kit (life technology) を用いてcDNAを作成した。非定量PCRではPlatinum Taq DNA polymerase (life technology) を用いた。PCRサイクルは94度、2分後に94度/30秒、58度/30秒、68度/45秒を1サイクルとして計30サイクル施行した後、2%アガロースゲル電気泳動にて解析した。定量PCRはSYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いてDNA Engine Opticon 2 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使用して行った。全ての定量PCRのmRNA量はglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 量にて平均化し、比較量を決定した。プライマーは次のものを使用した。

20

【0054】

Influenza nuclear protein (Flu NP)

5' - ACTCACATGATGATCTGG -3' (配列番号2)

30

5' - CTGCATTGTCTCCGAAGA-3' (配列番号3)

Mouse OX40L

5' - CCCTCCAATCCAAAGACTCA -3' (配列番号4)

5' - ATCCTTCGACCATCGTTCAG -3' (配列番号5)

Mouse GAPDH

5' - TGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3' (配列番号6)

5' - CCTGCTTCACCACCTTCTTGA -3' ; (配列番号7)

Canine GAPDH

5' - TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' (配列番号8)

5' - CATGTGGGCCATGAGGTCCAC-3' (配列番号9)。

40

【0055】

5 ウェスタンブロッティング法

マウスを麻酔後、肋骨を切除し、肺を露出し、取り出した後に気管を除去した。マウス肺をミンチした後、プロテインインヒビター (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を加えたRIPAバッファー (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) にて蛋白を抽出した。サンプルはプロテイン測定キット (Thermo Scientific) にて定量し、サンプルと同等量のNuPAGE (life technology) を加え、サンプルを準備した。50 μ gの蛋白を12%のBis-Tris gel (life technology) を用いてSDS-PAGEにて蛋白を展開し、セミドライブロッティング法 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いてPolyvinylidene difluorideフィルター膜 (PVDF, Life Technology) に転写した。転写後、PDGF膜を25度にて1時間、PDGF blocking r

50

eagent (Toyobo, Oosaka, Japan)を使用しブロッキングした後、希釈液 (1:500, Toyobo) に溶解した1次抗体を加え、4度で一晩震盪した。翌日、Tris Buffered Saline (TBS)に0.15 mol/Lの塩酸と0.001%のTween20を加えた溶液 (PH 7.5, 以下TBS-T溶液)で5分3回洗浄した後、希釈液 (1:2000, Toyobo)にて溶解したhorseradish peroxidase (HRP) が付加された2次抗体を加え、1時間、25℃にて震盪した後、再度TBS-T溶液にて3回洗浄した。プロットはECL detection system (GE Healthcare, Piscataway, NJ)を用いて可視化した (Kanehira M, Kikuchi T, Ohkouchi S, et al. PloS one. 2012;7(2):e32185.)。抗体は以下のものを使用した。

Anti- M2 protein (clone14C-2, Abcam, Cambridge, UK)

Anti- β -actin (clone AC-15, Sigma-Aldrich)。

10

【0056】

6 免疫蛍光染色

細胞染色時は、 2×10^4 個の細胞をスライドガラスに600 g、2分にてサイトスピンした後、10%ホルマリンにて15分間固定したのものを使用した。肺組織染色時は5 mmにて切り出した切片を10%ホルマリンにて固定した後、パラフィンワックスで包埋しておいたものを脱パラフィンとエタノール洗浄したのものを使用した。最初にヒストファイン (pH9, Nichirei)を加え、121℃、15分間オートクレーブにて抗原賦活を施行した後、1滴のprotein block serum free (Dako, Santa Barbara, CA)を加え、15分間、25℃で静置しブロッキングを施行した。次に、PBSにて溶解した1次抗体 (1:500)を加え4℃で一晩静置した。翌日にPBSにて洗浄を3回施行した後、PBSにて溶解した二次抗体 (1:200)を25度にて1時間加え、再度PBSで3回洗浄を施行した。最後に、DAPIが加わったブロッキング剤 (1.5 μ g/ml, Vector laboratories, Peterborough, UK)にて組織を封入し、蛍光画像をコンフォーカル顕微鏡 (Carl Zeiss LSM 780, jena, germany)を用いて画像を採取した。抗体は以下のものを使用した。陰性コントロールとしてコントロール抗体を使用した。

20

【0057】

1次抗体

Goat anti-CCSP (clone T-18, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

Rabbit anti SPC (cloneFL-197, Santa Cruz Biotechnology)

Mouse anti-influenza M2 protein (clone14C-2, Abcam)

Rat anti-OX40Ligand antibody (Clone RM134L, e-Bioscience, San Diego, CA)

30

蛍光付加2次抗体

488 Donkey anti rabbit antibody (life technology)

488 Goat anti mouse antibody (life technology)

594 Donkey anti goat antibody (life technology)

594 Goat anti rat antibody (life technology)。

【0058】

7 細胞の分離

マウスを麻酔下に肋骨を除去し、肺を露出し、気管にカニューレを挿入した。カニューレを介して0.2 μ M EGTAを加えたPBS溶液0.5 mlにて4回、肺をキレート洗浄した後、肺に0.5 mlのエラスターゼ (4 U/ml, Worthington biochemical corporation, New Jersey, CA)を注入し肺を分離した。肺を分離後、500 μ lのエラスターゼを再度カニューレより注入し、37℃、5%二酸化炭素にて5分間静置した。これを3回繰り返した後、肺葉を分離・ミンチを施行し、1 mlのDNAase (25 μ g/ml, Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を加え、37℃にて10分間静置した。分離された細胞を100 μ lのセルソーターを通した後、5 mlのRBC lysing buffer (Life technology)にて赤血球を除去し、再度70 μ lのセルソーターを通し70 μ lの細胞保存液 (10 mM HEPESと2% fetal bovine serum mediumを加えたHanks' balanced saline solution: 以下細胞保存液) に保存した (Kim CF, Jackson E L, Woolfenden AE, et al. Cell. 2005;121(6):823-35.)。

40

【0059】

8 フローサイトメトリー

50

フローサイトメトリーによる気道上皮前駆細胞の同定は以前に報告された方法を用いて行った (Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Cell. 2005;121(6):823-35.)。具体的には、上記の方法にて分離した70 μ l中の全肺細胞に次の1次抗体を2 μ lずつ加え、暗所にて1時間静置した。抗体は次のものを使用した：(PE)-Cy7 anti-CD31 (clone 390, 1:40, e-Bioscience)、PE-Cy7 anti-CD45 (clone 30F-11, 1:40, BD, Pharmingen, San Diego, CA)、Alexa Fluor 647 anti-CD34 (clone RAM34, 1:40, e-bioscience)、and PE anti-Sca-1 (clone D7, 1:40, BD)。その後1 mlの細胞保存液にて2回細胞洗浄した後、500 μ lの細胞保存液に混中し、フローサイトメトリー (BD FACSAriaTMII, BD) にて同定を行った。7-aminoactinomycin D (Beckman Coulter, miami, FL)を死細胞の除去目的に使用した。また、OX40L 陽性細胞・インフルエンザ受容体を同定するときには各種抗体を更に加えた：FITC-conjugated Sambucus nigra agglutinin lectin (100 μ g/ml, EY laboratory) or FITC-conjugated anti OX40L antibody (clone OX89, 1:40, e-Bioscience)。実細胞数はフローサイトメトリーにて測定した細胞割合に肺総細胞数をトリパンブルー (0.4%) にて測定したものを掛け合わせ計算した。陽性細胞割合は各種コントロール抗体を1%として評価した (Shibuya N, Goldstein IJ, Broekae rt WF, et al. The Journal of biological chemistry. 1987;262(4):1596-601.)。

【0060】

9 プラスミドの作製

ベクタープラスミドはpBluescript II vectors (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いBamHI制限酵素にて切断し、使用した。マウスOX40L cDNAは以前作成したOX40Lベクターを用い、EcoRI制限酵素にて切除後、gel extraction法 (QIAGEN, Valencia, CA)によりcDNAを精製した。人OX40L cDNAはpSGP34-1をXbaI制限酵素にて切除し、同様に精製した。次にマウス・人OX40L cDNAをプラスミドベクターにライゲーションする為、Blend Taq (Toyobo)を用いてlincker ligation法にてcDNAの両端にBamHI切断領域と同様の塩基配列 (5'-GGATCC-3', 5'-GGATCC-3')を挿入した。両端にBamHI領域を挿入後、BamHI制限酵素にてcDNAを切断し、gel extraction法により精製した。制限酵素にて準備したベクタープラスミドをAlkaline Phosphatase (Takara, Otsu, Japan)にてBap処理を施行した後、ベクタープラスミドとcDNAをBamHIサイトにてライゲーションを施行し、DH5 α (Takara)に形質転換した。形質転換したDH5 α Escherichia coliをLB培地 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD)にて培養した後にplasmid plus kit (QIAGEN, Valencia, CA)を用いてプラスミドDNAを精製した。精製したプラスミドDNAはダイターミネーター法 (life technology)を用いてシークエンスを行い、各種cDNAの導入が正確に行われた事をABI PRISM 3500XL (life technology)にて確認した。

【0061】

10 変異プラスミドの作製

ヒトOX40L変異プラスミドの作製はPrimers STAR mix DNA polymerase (Takara)を用いて高感度PCR法にて作製した。PCRサイクルは98 $^{\circ}$ C/10秒、55 $^{\circ}$ C/15秒 (点変異では58 $^{\circ}$ C)、72 $^{\circ}$ C/20秒を1サイクルとして計30サイクル施行後した。変異プラスミドは57Pro $\rightarrow$ 中止コドン (以下⁵⁷Pro)、121Lys $\rightarrow$ 中止コドン (以下¹²¹Lys)、90Asn $\rightarrow$ Ala (以下⁹⁰Asn)、114 Asn $\rightarrow$ Ala (以下¹¹⁴Asn)に変換したものを作成した。変異が正確に行われた事を上記の方法にてシークエンスを施行した。プライマーは以下のものを使用した (Liu D, Cramer CC, Sc afidi J, et al, Infection and immunity. 2005;73(8):4478-87)。

⁵⁷Pro:

5' -CGGTATTAGCGAATTCAAAGTATCAAAGT-3' (配列番号10)

5' -AATTCGCTAATACCGATGTGATACCTG-3' (配列番号11)

¹²¹Lys:

5' -TACCAGTAGGATGAGGAGCCCCTCTTCCAA-3' (配列番号12)

5' -CTCATCCTACTGGTAATGAAGGCTAAT-3' (配列番号13)

⁹⁰Asn:

5' -GTGCAGGCAAACCTCAGTCATCATCAAC-3' (配列番号14)

5' -TGAGTTTGCCTGCACCTTCATGATTTC-3' (配列番号 15)

¹¹⁴Asn:

5' -GAAGTCGCAATTAGCCTTCATTACCAG-3' (配列番号 16)

5' - GCTAATTGCGACTTCCTGGGAGAAAGTA-3' (配列番号 17)。

【0062】

11 プラスミドの遺伝子導入とインフルエンザウイルスの細胞感染

犬の腎臓の細胞であるMDCK細胞はRIKEN BioResource Center (Tsukuba, Japan)より獲得し、10%FCSと100 units/mlペニシリンを加えたDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いて、37℃、5%二酸化炭素条件下にて維持した。7×10⁴個のMDCK細胞を12ウェルプレートにて48時間培養後に、細胞が80-90%に増殖している事を確認し、プラスミドDNAをリポフェクタミン法にてMDCK細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入にはlipofectamin plus reagent (Invitrogen)を用い、1ウェル毎に50 μlのOpti-MEM溶液 (life technology) に1 μlのplus reagentと1 μgのプラスミドDNAを加え、5分間後に3 μlのlipofectaminを加えた後に30分間25℃で静置した。作製した50 μlの遺伝子導入用溶液と培養用溶液950 μlを1ウェルのMDCK細胞に加え、37℃、5%二酸化炭素にて維持した。48時間後、FCS無しの1 ml MEM 溶液で細胞を洗浄2度行い、インフルエンザウイルスを細胞に感染させた。インフルエンザウイルスは100 μlのMEM溶液にmultiplicity of infection (MOI) of 0.001 となるように溶解し、ウイルスを細胞に投与した。また、15分毎に細胞が乾燥しないように手動にて振盪を加えた。90分経過後にウイルス溶液を回収し、FCSフリーのMEMメディウムにて2度洗浄後し、ウイルス培養溶液 (MEM溶液 (life technology)に2 mM L-glutamine (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan), 25 mMの Hepes (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)、4% のbovine serum albumin (Wako, Tokyo, Japan), 2 μg/mlのL-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone (TPCK) treated trypsin (Takara)を混合した溶液)を加えた。その後、34℃、5%CO₂にて24時間培養後、細胞をPBSにて洗浄後EDTAトリプシンにて細胞を回収した (Wu S, Patel KB, Booth LJ, et al. BMC complementary and alternative medicine. 2010;10:69. ; Hashem AM, Flaman AS, Farnsworth A, et al. PloS one. 2009;4(12):e8350.)。遺伝子導入の確認は以下のプライマーを使用した。

Mouse OX40L

5' - CCCTCCAATCCAAAGACTCA -3' (配列番号 18)

5' - ATCCTTCGACCATCGTTCAG -3' (配列番号 19)

Human OX40L

5' - TTCCAGGGGTTGGACCCTTT-3' (配列番号 20)

5' - CCTGGTGAATTCTGTGTCCT-3' (配列番号 21)。

【0063】

12 人臨床検体の免疫化学染色

人臨床検体は東北大学倫理委員会の承認の元、東北大学病院呼吸器内科、東北大学関連病院にて病理解剖を施行した患者の肺組織を使用した。インフルエンザ肺炎で死亡した患者は42歳の女性、インフルエンザ迅速キットにてインフルエンザAと診断された検体を使用した。誤嚥性肺炎にて死亡した患者の検体は79歳の男性のものをを使用した。免疫化学染色は、免疫抗体染色と同様に抗原賦活、ブロックングを施行した。その後に、2 mMの過酸化水素を含んだメタノールにて内因性ペルオキシダーゼ除去した後、PBSにて溶解した1次抗体であるMouse anti human OX40Ligand antigen (clone 11C3.1, Biolegend, 1:500)を加え、4℃にて1晩静置した。翌日、PBSにて3回洗浄後、2次抗体としてビオチンで付加された抗マウス抗体とストレプトアビジン標識のペルオキシダーゼ (Nichirei bioscience, Tokyo, japan)を添加した。最後に、15分間Dab (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)にてペルオキシダーゼを染色し、ヘマトキシレンにて核染色を施行した後に、光学顕微鏡 (BX51, Olympus, Shinjuku, japan)にて観察・画像採取を施行した。陽性コントロールとして、脾臓組織を使用し、陰性コントロールとしてコントロール抗体を使用した。

【0064】

13 統計処理

統計学的有意差は群間の比較ではstudent's t検定で求め、多群間の比較ではHSD検定 (Tukey's honestly significant difference test)を用いた。生存率はカプラン・マイヤー (Kaplan-Meier)法を用いて検討した。P値は0.05未満で統計学的有意差があったとした。

【0065】

参考例1. OX40Lの欠損のインフルエンザ肺炎抵抗性に対する影響

最初にOX40Lの欠損がOX40の欠損と同様にインフルエンザ肺炎の抵抗性に関与するかを検討した

(1) 生存期間の検討

インフルエンザ致死性肺炎モデルを用い、野生型マウス・OX40L欠損マウス・OX40欠損マウスの生存期間を検討した (図1A)。陰性コントロールとして野生型マウスにPBS (Mock)のみの溶液を同様に投与した。野生型マウスでは7日目より徐々に生存割合が低下し12日目に全てのマウスの死亡を確認した。OX40欠損マウスは8日目より徐々に死亡が確認され、13日目にはほぼ全てのマウスの死亡が確認され、野生型マウスとの差は認めなかった ($P > 0.05$)。一方、OX40L欠損マウスは12日目より2匹のマウスが死亡したが、8割近くのマウスが生存した ($P < 0.05$)。

【0066】

(2) 肺の炎症の検討

インフルエンザ致死性肺炎モデルを用い、野生型マウス・OX40L欠損マウス・OX40欠損マウスの肺の炎症の評価として、肺胞洗浄中の細胞数・細胞の種類・血管の透過性・肺組織を検討した。また、陰性コントロールとして、野生型マウスにPBS (Mock)のみ投与した。

【0067】

最初に肺胞洗浄液中の炎症細胞を検討した (図1B)。肺胞洗浄液中の炎症細胞数は、Mockに比べて致死性インフルエンザ肺炎は増加した。OX40欠損マウスは野生型マウスに比較して炎症細胞数が軽減した。OX40L欠損マウスではOX40欠損マウスに比較して、更に有意に炎症細胞数は軽減した (肺胞洗浄液中の炎症細胞数/ ml OX40L KO: $19 \pm 5 \times 10^6$ 個 OX40 KO: $37 \pm 1 \times 10^6$ 個, $P < 0.05$, $N = 3$)。次に、肺胞洗浄液中の細胞の種類を検討した (図1C)。炎症細胞の種類は、Mockに比較して致死性インフルエンザ肺炎モデルでは、好中球・リンパ球割合が増加した。OX40L・OX40欠損マウスは野生型マウスに比較して、リンパ球割合が低下していた ($P < 0.05$)。しかし、OX40L・OX40欠損マウス間では有意な差は認めなかった (肺胞洗浄液中のリンパ球割合 OX40L KO: $6.7 \pm 0.3\%$, OX40 KO: $6.6 \pm 0.9\%$, 野生型: $10 \pm 1.5\%$, $N = 3$)。

【0068】

血管透過性の評価として肺胞洗浄液中のタンパク量を検討した (図1D)。血管透過性は、致死性インフルエンザ肺炎ではMockに比較して増加していた。OX40欠損マウスは野生型マウスに比較し血管透過性の増加が軽減した ($P < 0.05$)。OX40L欠損マウスはOX40欠損マウスに比較して更に血管透過性の増加が更に軽減した (肺胞洗浄液中のタンパク量/ 25 μ l OX40L KO: $1624 \pm 57 \mu$ g, OX40 KO: $1955 \pm 156 \mu$ g, $P < 0.05$, $N = 3$)。

【0069】

次に肺への炎症細胞の浸潤を肺組織のHE染色にて評価した (図1E)。野生型マウスでは気道周囲、肺胞への炎症細胞の浸潤に伴い、非常に強い炎症所見に加え、気道の拡張や肺の間質の繊維化など肺の線維化の所見を認めた。OX40欠損マウスでは、野生型マウスに比較して気道周囲、肺胞への細胞の浸潤の低下を認め、線維化の所見はほとんど認めなかった。OX40L欠損マウスでは、炎症細胞数などの結果と同様にOX40欠損マウスより細胞の浸潤が、特に気道周囲にて低下していた。

【0070】

図1A-図1EよりOX40L欠損するとOX40欠損よりも更にインフルエンザ肺炎に抵抗性を示した。

10

20

30

40

50

【0071】

参考例2. 非骨髄由来細胞のOX40Lがインフルエンザ肺炎の抵抗性に重要である

次にインフルエンザ肺炎の抵抗性に関与するOX40Lが骨髄細胞由来か、非骨髄由来細胞由来かを骨髄キメラマウスを用いて検討した。

(1) 体重の評価

インフルエンザ致死性肺炎モデルにおける各種骨髄キメラマウスの体重減少率を検討した (図2A)。レシピエントが野生型マウスでは、骨髄ドナーがOX40L欠損マウス (以下: $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$) は野生型マウス (以下: $^{BM}WT \rightarrow WT$) と有意な差を認めなかった ($P > 0.05$)。一方、レシピエントがOX40L欠損マウスでは、骨髄ドナーがOX40L欠損マウス (以下: $^{BM}OX40LKO \rightarrow OX40LKO$) と野生型マウス (以下: $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$) は、 $^{BM}WT \rightarrow WT$ マウスよりも体重減少率が低下した ($P < 0.05$)。この結果から、レシピエントのOX40Lがインフルエンザ肺炎の体重減少に重要である事が示唆された (7日目体重減少率 $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$: $24.3 \pm 2.2\%$, $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$: $28.7 \pm 0.7\%$, $P < 0.05$, $N = 3$)。

(2) 肺の炎症の検討

次にインフルエンザ致死性肺炎モデルにおける骨髄キメラマウスの肺の炎症を検討した。(図2B)。レシピエントが野生型マウスでは、骨髄ドナーが野生型マウス (以下: $^{BM}WT \rightarrow WT$) よりもOX40L欠損マウス (以下: $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$) で炎症が少なかった ($P < 0.05$)。レシピエントがOX40L欠損マウスではドナーが野生型マウス (以下: $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$) とOX40L欠損マウス (以下: $^{BM}OX40LKO \rightarrow OX40LKO$) は $^{BM}WT \rightarrow WT$ マウスに比較して炎症が少なかった ($P < 0.05$)。体重減少と同様に、 $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$ マウスは $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$ マウスよりも、肺の炎症が少なかった (肺胞洗浄液炎症細胞数/ ml $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$: $82 \pm 1 \times 10^6$ 個, $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$: $90 \pm 8 \times 10^6$ 個, $P < 0.05$, $N = 4$)。

【0072】

血管透過性の評価として肺胞洗浄液中のタンパク量を検討した (図2C)。 $^{BM}WT \rightarrow WT$ マウスに比較して、その他 ($^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$, $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$, $^{BM}OX40LKO \rightarrow OX40LKO$) のマウスでは血管透過性が低下していた ($P < 0.05$)。 $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$ マウスと $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$ マウスでの有意な差は認められなかった (肺胞洗浄液蛋白量/25 μ l $^{BM}WT \rightarrow WT$: $6660 \pm 779 \mu$ g, $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$: $4116 \pm 408 \mu$ g, $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$: $5095 \pm 384 \mu$ g, $^{BM}OX40LKO \rightarrow OX40LKO$: $4908 \pm 509 \mu$ g, $N = 4$)。

【0073】

次に肺の炎症を肺組織のHE染色にて検討した (図2E)。 $^{BM}WT \rightarrow WT$ マウスでは、気道周囲の炎症に伴い肺胞への細胞浸潤と肺の繊維化所見を広範囲に認めた。 $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$ マウスは、 $^{BM}WT \rightarrow WT$ マウスに比較して肺の炎症細胞の浸潤が低下傾向であった。肺の炎症評価と同様に、 $^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$ 、 $^{BM}OX40LKO \rightarrow OX40LKO$ マウスは、 $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$ よりも、更に気管支周囲と肺の炎症が低下していた。

【0074】

上記結果から、非骨髄細胞由来のOX40Lがインフルエンザ肺炎肺に重要である事が示唆された。

(3) インフルエンザウイルス量の検討

次に非骨髄性由来細胞のOX40Lがインフルエンザウイルスの細胞内感染の増加に関与すると仮定し、骨髄キメラマウスの肺内のインフルエンザウイルス感染量を検討した。

【0075】

インフルエンザウイルス投与7日目にインフルエンザM2蛋白を用いて免疫蛍光染色にて検討した (図2E)。レシピエントが野生型のマウス ($^{BM}WT \rightarrow WT$, $^{BM}OX40LKO \rightarrow WT$) では、細気管支領域を中心にインフルエンザM2蛋白の発現を認めた。一方、レシピエントがOX40L欠損のマウス ($^{BM}WT \rightarrow OX40LKO$, $^{BM}OX40LKO \rightarrow OX40LKO$) では、この細気管支領域におけるM2蛋白の発現が低下していた。

【0076】

次に、インフルエンザウイルス投与7日目に肺内のインフルエンザM2蛋白をウエスタンブロット法にて検討した (図2D)。肺内インフルエンザM2蛋白は蛍光染色と同様に、レシ

ピエントが野生型マウスでは、気道上皮細胞と肺胞にM2蛋白を多く認めたのに対して、レシピエントがOX40L欠損マウスでは肺内でのM2蛋白が軽減していた。

【0077】

上記の結果より、非骨髓細胞由来のOX40Lがインフルエンザウイルスの細胞内感染に重要である事が示唆された。

【0078】

参考例3 インフルエンザ肺炎で肺のOX40L陽性細胞数が増加する。また、OX40L陽性細胞の約25%は気道上皮前駆細胞群と一致する

(1) インフルエンザ致死性肺炎におけるOX40Lの発現の検討

最初にインフルエンザ致死性肺炎モデルにおける全肺のOX40L陽性細胞数の増加を検討した (図3A)。対照としてPBS (Mock)のみを投与したマウスを使用した。OX40Lの発現はMockに比較してインフルエンザ投与後ではOX40L発現細胞割合 (OX40L陽性割合/肺 インフルエンザ肺炎: $8.8 \pm 0.6\%$, Mock: $1.7\% \pm 0.9\%$, $P < 0.05$, $N = 3$)、OX40L陽性細胞数が増加していた (OX40L陽性細胞数/肺 インフルエンザ肺炎: 776700 ± 33974 個, Mock: 109800 ± 43312 個, $P < 0.05$, $N = 3$)。 10

(2) OX40L陽性細胞追跡

次に、インフルエンザ致死性肺炎モデルにおける非骨髓細胞のOX40L発現細胞の割合を検討した (図3B)。インフルエンザ肺炎における全肺のOX40L陽性細胞の約75%は血球・内皮マーカーであるCD31/45陽性細胞 (血球細胞, 内皮細胞)であったが、約25%はCD31/45陰性細胞 (上皮細胞)であった (CD31/45陰性細胞割合/肺のOX40L陽性細胞: $24.6 \pm 1\%$, CD31/45陽性細胞割合/肺のOX40L陽性細胞: $75.6 \pm 1.1\%$, $N = 3$)。 20

【0079】

次にCD31/45陰性・OX40L陽性細胞を更に細分化する為に以前に報告されたフローサイトメトリーでの上皮細胞の細分化の分類を使用し、検討した (図3C) (Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Cell. 2005;121(6):823-35.)。CD31/45陰性・OX40L陽性細胞のうち98%は間葉系マーカーであるCD34陰性で、幹細胞マーカーであるSca1弱陽性の細胞群であった。また、この細胞群のうち約88%は、気道上皮前駆細胞の細胞群である自己蛍光が弱い細胞群と一致した。

【0080】

参考例4 気道上皮前駆細胞はインフルエンザ肺炎にてOX40Lの発現が増強した 30

次に気道上皮前駆細胞のOX40Lの発現割合を検討した (図6A)。Mockでは、気道上皮前駆細胞のOX40L発現は軽度であるのに対して、インフルエンザ致死性肺炎では、気道上皮前駆細胞のOX40Lの発現が増強された (OX40L 発現細胞割合 インフルエンザ: 41% , Mock 9%)。

【0081】

次に気道上皮前駆細胞のOX40LのmRNAの発現量を検討した (図6B)。インフルエンザ致死性肺炎では気道上皮前駆細胞のOX40LのmRNA量はMockに比べて増強していた (気道上皮前駆細胞のOX40L mRNA発現比 インフルエンザ肺炎: 11.5 ± 3.7 , Mock: 1 ± 0.3 , $P < 0.05$, $N = 3$)。インフルエンザ肺炎7日後のクララ細胞は激減しているため、RNAを作製するのに十分な量が確保できず、測定できなかった。 40

【0082】

最後に気道上皮前駆細胞のOX40L蛋白の発現を免疫蛍光染色にて検討した (図6C)。インフルエンザウイルス投与7日目に気道上皮前駆細胞とクララ細胞をフローサイトメトリーにて選別・回収し、OX40L蛋白の発現とDAPIにて核染色した。気道上皮前駆細胞ではOX40Lを発現しているのに対して、クララ細胞ではOX40Lの発現を認めなかった。

【0083】

インフルエンザ感染にて気道上皮前駆細胞はOX40Lの発現を増強した (図6A-図6C)。

【0084】

参考例5 インフルエンザ肺炎にて気道上皮前駆細胞数は増加する

次に致死性インフルエンザ肺炎モデルにおける気道上皮前駆細胞数の変化を検討した。 50

Stript等はフローサイトメトリーにて、CD31かつ45陰性の上皮細胞群の中で、間葉系マーカーであるCD34が陰性・幹細胞マーカーであるSca1が弱陽性の細胞群の内、自己蛍光が弱い細胞を気道上皮前駆細胞、自己蛍光が強い細胞群がクララ細胞と報告した(25)。最初に、実際に行ったフローサイトメトリーでの気道上皮前駆細胞の同定を図4Aに挿入する。

【0085】

次にインフルエンザ致死性肺炎モデルにおける気道上皮前駆細胞数とクララ細胞数をフローサイトメトリーにて検討した(図4B,図4C)。気道上皮前駆細胞数はインフルエンザ致死性肺炎にて共に増加していた(気道上皮前駆細胞数/肺 インフルエンザ致死性肺炎: $46.1 \pm 4.6 \times 10^4$ 個, Mock $14.7 \pm 4.1 \times 10^4$ 個, $P < 0.05$, $N = 3$)。一方、クララ細胞数は有意に減少した(クララ細胞数/肺 インフルエンザ致死性肺炎: $2.7 \pm 0.2 \times 10^4$ 個, Mock $24.5 \pm 3.9 \times 10^4$ 個, $P < 0.05$, $N = 3$)。 10

【0086】

参考例6 インフルエンザ肺炎での気道上皮前駆細胞数の増加を他のマーカー(CCSP/SPC)を用いて確認した

気道上皮前駆細胞は細胞内蛋白であるクララ細胞のマーカーであるCCSPと2型肺胞上皮細胞のマーカーであるSPCが共陽性である事が報告されている(30)。次にインフルエンザ致死性肺炎での気道上皮前駆細胞数の変化を、細胞内マーカーであるCCSPとSPCを用いて免疫蛍光染色にて検討した。最初に気道上皮前駆細胞とクララ細胞をフローサイトメトリーにて選別・回収し、個々の細胞のCCSPとSPCの発現を検討した(図5A)。以前の報告の様に気道上皮前駆細胞はCCSPとSPCが陽性であった、一方、クララ細胞はCCSPのみ陽性であった。 20

【0087】

次にインフルエンザ致死性肺炎モデルにおける肺組織にてCCSP・SPC共陽性細胞数を検討した(図5B)。コントロールとして、PBS(Mock)のみを投与したマウスの肺組織を使用した。CCSP・SPC共陽性細胞はMockでは細気管支領域に数個存在しているのに対し、インフルエンザ致死性肺炎では気道上皮前駆細胞は炎症部分において増加していた。

【0088】

次にCCSP・SPC陽性細胞(気道上皮前駆細胞)数を定量する為にTissue FACSを用いて定量した(図5C)。MockではCCSP・SPC陽性細胞は2%であったのに対して、インフルエンザ肺炎では4%と増加していた。 30

【0089】

上記2つの異なる実験(図4、5)から、インフルエンザ肺炎にて気道上皮前駆細胞数が増加している事を示した。また、炎症部にて増加している事から、炎症の修復に関与している事が示唆された。

【0090】

参考例7 気道上皮前駆細胞はインフルエンザウイルスに易感染性であり、また、気道上皮前駆細胞のOX40Lはインフルエンザウイルスとの局在が一致する

(1) 気道上皮前駆細胞はインフルエンザウイルスに易感染性である

次に、気道上皮前駆細胞のインフルエンザウイルスへの感受性に関して検討した。インフルエンザウイルスを投与3日後に、気道上皮前駆細胞とクララ細胞内のインフルエンザヌクレオプロテイン(Nucleoprotein:以下 Flu NP)を用いてRT-PCRにて比較・検討した(図7A)。気道上皮前駆細胞はクララ細胞に比べて細胞内の感染ウイルス量が増加していた(定量Flu NP発現比 気道上皮前駆細胞: 31.2 ± 1.6 , クララ細胞: 1 ± 0.5 , $P < 0.05$, $N = 3$)。 40

(2) 気道上皮前駆細胞のOX40Lはインフルエンザウイルスと局在が一致した。

【0091】

以上の結果より、インフルエンザ致死性肺炎モデルにて、気道上皮前駆細胞はOX40Lの発現を増強すると共に、インフルエンザウイルス感染量が同様に増加していた。このことから、気道上皮前駆細胞のOX40Lがインフルエンザウイルスの細胞内感染に関与すると仮定し、インフルエンザ致死性肺炎における気道上皮前駆細胞のOX40Lの機能を検討した。 50

【0092】

インフルエンザウイルス投与3日後に、気道上皮前駆細胞とクララ細胞をフローサイトメトリーにて選別・回収し、インフルエンザM2蛋白とOX40L蛋白の発現と両蛋白の局在を免疫蛍光染色にて検討した(図7B)。気道上皮前駆細胞ではOX40L蛋白の発現が増強すると共に、インフルエンザM2蛋白の発現も認めた。一方、クララ細胞は、OX40Lの発現は認めず、インフルエンザM2蛋白発現も軽度であった。また、気道上皮前駆細胞のOX40L蛋白とインフルエンザM2蛋白の局在は一致していた。

(3) OX40L陽性細胞はインフルエンザウイルスに易感染性である

次にOX40L陽性細胞のインフルエンザウイルス感受性をRT-PCR法にて検討した(図7C)。OX40L陽性細胞は陰性細胞に比べて易感染性であった(定量Flu NP/肺 OX40L陽性細胞： 6.8 ± 1.88 , OX40L陰性細胞： 1 ± 0.2 , $P < 0.05$, $N = 3$)。

10

【0093】

次にインフルエンザウイルスの感染量を蛋白レベルにて検討する為、OX40L陽性細胞と陰性細胞をフローサイトメトリーにて選別・回収し、インフルエンザM2蛋白とDAPIにて蛍光染色で比較・検討した(図7D)。OX40L陽性細胞は、インフルエンザM2蛋白陽性細胞が多いのに対して、OX40L陰性細胞では少数であった。

【0094】

OX40L陽性細胞はインフルエンザウイルスに易感染性であり、また、気道上皮前駆細胞のOX40Lとインフルエンザウイルスの局在が一致した(図7A-図7D)。

【0095】

20

参考例8 OX40Lの欠損は気道上皮前駆細胞のインフルエンザウイルス感染性を低下した

(1) OX40L欠損マウスではインフルエンザウイルス感染量が低下する

次に野生型・OX40L欠損マウスを用いてインフルエンザウイルスの細胞内感染量を比較・検討した。

【0096】

インフルエンザ肺炎モデルにおける野生型マウスとOX40L欠損マウスのインフルエンザウイルス量を、1・3・5・7日目にウエスタンブロッティング法にて検討した(図8A)。野生型マウスでは3日目をピークに5・7日目と徐々にインフルエンザタンパク量が減少した。一方、OX40L欠損マウスでは、野生型に比較して3日目での肺内のウイルス蛋白量が低下していた。また、同様に5・7日目でも肺内のインフルエンザ蛋白量は更に低下していた。

30

【0097】

次にインフルエンザモデルにおけるインフルエンザ蛋白の発現量を免疫蛍光染色にて検討した(図8B)。野生型マウスでは細気管支領域にてインフルエンザM2蛋白の発現を多く認めたが、OX40L欠損マウスでは同部位のM2蛋白の発現が低下していた。

(2) OX40L欠損でのインフルエンザウイルス量の低下は、気道上皮前駆細胞に依存した。

【0098】

次に、野生型マウスとOX40L欠損マウスでの気道上皮前駆細胞のインフルエンザ感染量を比較・検討した。インフルエンザウイルス投与3日後に、気道上皮前駆細胞の細胞内ウイルス感染量をRT-PCR法にて検討した(図8C)。OX40L欠損マウスは野生型マウスに比較して気道上皮前駆細胞内のインフルエンザウイルスmRNAが低下した(定量Flu NP発現比野生型マウスの気道上皮前駆細胞： 6.84 ± 1.3 , OX40L欠損マウスの気道上皮前駆細胞： 1 ± 0.5 , $P < 0.05$, $N = 3$)。

40

【0099】

図8A-図8Cより、気道上皮前駆細胞のOX40Lはインフルエンザウイルスの細胞内感染に重要である事が示された。

【0100】

参考例9 気道上皮前駆細胞はインフルエンザ受容体を有する

次に、気道上皮前駆細胞のインフルエンザ易感染性がインフルエンザ受容体に依存するのかを検討した。

50

【0101】

気道上皮前駆細胞とクララ細胞のインフルエンザ受容体の発現をフローサイトメトリーにて検討した (図9A)。気道上皮前駆細胞はクララ細胞より α -2,6-シアル酸の陽性細胞が多かった (α -2,6-シアル酸陽性細胞割合/肺 気道上皮前駆細胞: 54%, クララ細胞: 34%)。

【0102】

次に気道上皮前駆細胞とクララ細胞をフローサイトメトリーにて選別・回収し、免疫蛍光染色にて α -2,6-シアル酸の発現を検討した (図9B)。気道上皮前駆細胞は α -2,6-シアル酸の発現を認めたが、クララ細胞では α -2,6-シアル酸の発現を認めなかった。

【0103】

最後に α -2,6-シアル酸産生に關与する α -2,6-シアル酸転移酵素であるST6Galの発現量をmicroarrayにて検討した (図9C)。しかし、ST6galの発現量はクララ細胞の方が気道上皮前駆細胞より多かった (ST6galマイクロアレイ値 気道上皮前駆細胞: 1126 ± 292 クララ細胞: 2085 ± 101 , $P < 0.05$, $N =$ 図9A-図9Cの結果より、気道上皮前駆細胞がインフルエンザ受容体である α -2,6-シアル酸を発現している事を示し、これはST6Gal1に関連しなかった。

【0104】

参考例 10 マウスOX40Lの強発現はインフルエンザ受容体の付加を増強し、インフルエンザの細胞内感染量を増加させる

(1) マウスOX40Lの強発現はインフルエンザウイルスの細胞内感染を増加する

上記の結果より気道上皮前駆細胞に発現する糖タンパクであるOX40Lがインフルエンザ受容体である α -2,6-シアル酸を付加される事により、インフルエンザウイルスの細胞内感染を増悪すると仮定した。これを検討する為にマウスOX40Lの発現系を作製・検討した。まず、OX40Lの遺伝子導入が成功している事を確認する為にRT-PCR法にて細胞のマウスOX40L発現を確認した。陰性コントロールとして逆転写酵素を加えないものを使用した (図10A)。

【0105】

次にOX40Lの遺伝子発現系を用いて、インフルエンザウイルスの細胞への感染量をRT-PCR法にて比較した (図10B)。マウスOX40LプラスミドはNullプラスミドに比較してインフルエンザウイルスの細胞内感染量が増加した (定量Flu NP OX40Lプラスミド: 15.9 ± 0.4 , Nullプラスミド: 10.3 ± 0.1 , $P < 0.05$, $N = 3$)。

【0106】

次にマウスOX40Lの発現とインフルエンザウイルス吸着の関連を検討するため、免疫蛍光染色にて両蛋白の発現と局在を比較した (図10C)。遺伝子導入したMDCK細胞とコントロールMDCK細胞にインフルエンザウイルスを感染した後、細胞をOX40L蛋白とインフルエンザM2蛋白にて染色した。マウスOX40L発現MDCK細胞では、コントロールMDCK細胞に比べ、インフルエンザM2蛋白の発現が増加した。また、マウスOX40L蛋白とインフルエンザM2蛋白の局在は一致した。

(2) マウスOX40Lの発現は α -2,6-シアル酸の付加を増強する

次に、OX40Lとインフルエンザ受容体である α -2,6-シアル酸との関連を検討するため、 α -2,6-シアル酸の付加される量をフローサイトメトリーにて検討した (図10C)。

【0107】

マウスOX40L発現MDCK細胞はコントロールベクターに比較して α -2,6-シアル酸の付加量が増加していた (α -2,6-シアル酸付加量 (平均蛍光強度) OX40Lプラスミド: 27750, Nullプラスミド: 9211)。

【0108】

参考例 11 ヒトOX40Lの強発現はインフルエンザ受容体発現量の付加量を増加し、インフルエンザ細胞内感染を増加させる

(1) ヒトOX40Lはインフルエンザ細胞内感染を増加する

次にヒトのOX40LがマウスOX40Lと同様の機能を有するかを検討した。同様にヒトOX40L

10

20

30

40

50

をMDCK細胞に遺伝子導入した発現系を作製した。最初に、遺伝子導入が成功している事を確認するため、RT-PCR法とフローサイトメトリーにてOX40Lの発現を確認した (図11A)。

【0109】

次にインフルエンザウイルスの細胞内感染量をRT-PCR法にて比較した (図11C)。ヒトOX40L発現MDCK細胞は、コントロールに比較してインフルエンザウイルスの細胞内感染量が増加した (定量Flu NP OX40Lプラスミド: 11.4 ± 1.1 , Nullプラスミド: 1 ± 0.4 , $P < 0.05$, $N = 3$)。

(2) ヒトOX40Lの発現は α -2,6-シアル酸の糖付加を増加する

次にヒトOX40Lと α -2,6-シアル酸との関連を検討した (図11D)。ヒトOX40L発現MDCK細胞はコントロールに比べ、 α -2,6-シアル酸の付加量が多かった (α -2,6-シアル酸付加量 (平均蛍光強度) OX40Lプラスミド: 26312 ± 1578 , Nullプラスミド: 14309 ± 2070 , $P < 0.05$, $N = 3$)

以上よりヒトOX40Lの強発現はインフルエンザ受容体である α -2,6-シアル酸付加を増強し、インフルエンザウイルスの細胞内感染を増加させることを示唆した。

【0110】

実施例1 ヒトOX40Lの90番アスパラギン (Asn)がインフルエンザ細胞内感染に重要である

(1) ヒトOX40Lの90番アスパラギンがインフルエンザ感染を増悪に重要である

インフルエンザウイルスの受容体である α -2,6-シアル酸はN結合型の糖鎖であり、Asn-X-Ser/Thrの特異的なアミノ酸配列のアスパラギン (Asn)に糖付加される事が知られている (Petrescu AJ, Milac AL, Petrescu SM, et al. Glycobiology. 2004;14(2):103-14.)。人OX40Lでは183個のアミノ酸より構成されており、この特異的なアミノ酸配列は90・114・152・157番に4カ所存在する。インフルエンザウイルスの細胞内感染にどのアミノ酸が重要であるのかを種々の変異プラスミドを用い、検討した。OX40Lの糖付加部位と作製したプラスミドを図12Aに挿入した。

【0111】

種々の変異プラスミドをMDCK細胞に遺伝子導入し、インフルエンザウイルスの感染量をRT-PCR法にて比較した (図12B)。121-183番のアミノ酸を欠損したプラスミド (以下: 121 Lys)と、114番のAsnをAlaに変異したプラスミド (以下: 114 Asn)では、全長OX40Lプラスミドに比べ、インフルエンザウイルス量に変化を認めなかった。一方、57-183番のアミノ酸を欠損したプラスミド (以下: 57 Pro)、90番AsnをAlaに変異したプラスミド (以下: 90 Asn)では、全長OX40Lに比べ、インフルエンザ感染量が増加していた (Flu NP 発現比 (対全長OX40Lプラスミド): OX40L Full: 18.6 ± 6.5 , 121 Lys: 17.0 ± 4.0 , 57 Pro: 2.9 ± 0.1 , $P < 0.05$ 114 Asn: 16.1 ± 0.7 , 90 Asn: 0.9 ± 0.3 , $P < 0.05$ pNull: 1 ± 0.2 , $P < 0.05$, $N = 3$)。

(2) ヒトOX40Lの90番アスパラギンに α -2,6-シアル酸が付加に重要である

次に種々の変異プラスミドをMDCK細胞に遺伝子導入し、 α -2,6-シアル酸の付加量をフローサイトメトリーにて比較した (図12C)。インフルエンザ感染量と同様に、 121 Lysと 114 Asnでは全長OX40Lプラスミドに比べ、 α -2,6-シアル酸付加量に変化を認めなかった。一方、 57 Proと 90 Asnでは全長OX40Lに比べ、 α -2,6-シアル酸付加量が増加していた (%シアル酸付加細胞MFI値 ; 対全長OX40Lプラスミド 全長OX40L: $185 \pm 18.4\%$, 121 Lys: $167 \pm 7.1\%$, 57 Pro: $114 \pm 6.8\%$, $P < 0.05$, 114 Asn: $158 \pm 3.2\%$, 90 Asn: $122 \pm 3.0\%$, $P < 0.05$, pNull: $100 \pm 6.9\%$, $P < 0.05$, $N = 3$)。

【0112】

以上の結果より、ヒトOX40Lの90番アスパラギンにインフルエンザ受容体を付加され、インフルエンザの細胞内感染に重要であった。

【0113】

実施例2 抗OX40L中和抗体はインフルエンザ肺炎を抵抗性を示す

次に、抗OX40L中和抗体のインフルエンザ致死性肺炎モデルでの効果を検討した。0日目に野生型マウスにインフルエンザウイルスを投与、翌日に抗OX40L中和抗体を経鼻投与し

10

20

30

40

50

、生存期間を確認し体重を測定した（図13A）。陰性コントロールには非特異的抗体を投与した。非特異的抗体は全てのマウスが6日目より死亡数が増加し、10日目に全て死亡した。一方、抗OX40L中和抗体を投与したマウスは4割が生存した（ $P < 0.05$, $N = 10$ ）。次に体重の減少率について検討した（図13A）。非特異的抗体投与のマウスは徐々に全身状態が悪化し、7日目には30%近く体重が減少し、死亡した。一方、抗OX40L中和抗体では2日目、4日目までは徐々に体重が減少するが、コントロールと比較して体重減少が軽度であった。また、6日目に体重減少のピークを迎え、体重が徐々に回復した（ $P < 0.05$, $N = 4$ ）

参考例 1 2 ヒト臨床検体においても、気道上皮にOX40Lの発現が認められる

次にインフルエンザ肺炎のヒト臨床検体を用い、実際のヒト症例において、OX40Lが上皮細胞に発現しているのかを免疫化学染色にて検討した（図14）。陽性コントロールとして脾臓組織を使用し、陰性コントロールとして、非特異的抗体を使用した。

10

【0114】

インフルエンザ肺炎のヒト検体においても気道上皮にOX40Lの発現が増強された。しかし、誤嚥性肺炎ではOX40Lの発現は軽度であった。両症例とも平滑筋細胞はOX40Lの発現を認めなかった。また、気道の腺細胞において弱いOX40Lの発現を認めた。

【0115】

上記の結果より、ヒト臨床検体でも上皮細胞のOX40Lの発現する事を示した。

【0116】

実施例 3

ヒトOX40Lおよびその各種変異体に対するW66抗ヒトOX40L抗体の結合能を比較した（図15A）。ヒトOX40Lおよびその各種変異体を発現するプラスミドを犬腎臓由来のMDCK細胞へ遺伝子導入し、その細胞表面へ発現させた後に、W66抗ヒトOX40L抗体との結合量をフローサイトメトリーで測定した。121番目のアミノ酸以降を欠損させた変異体や114番目のアミノ酸を変異させた変異体は、野生型OX40Lと同様の結合能を示したが、57番目のアミノ酸以降を欠損させた変異体や90番目のアミノ酸を変異させた変異体は、野生型OX40Lに比し、有意にW66抗ヒトOX40L抗体との結合能が低下した。

20

W66抗ヒトOX40L抗体のインフルエンザ感染防御能を検討した（図15Bと図15C）。ヒトOX40Lを発現するプラスミドを犬腎臓由来のMDCK細胞へ遺伝子導入し、W66抗ヒトOX40L抗体あるいは対照抗体で処理した後に、A型インフルエンザウイルスH1N1を感染させた。インフルエンザの核蛋白質をコードするmRNA量をRT-PCR法で測定したところ、W66抗ヒトOX40L抗体で処理したMDCK細胞のウイルス感染は抑制され、対照抗体で処理したMDCK細胞に比し、核蛋白質をコードするmRNA量が有意に低下していた（図15B）。インフルエンザウイルス由来のM2蛋白質量をウェスタンブロット法で確認しても同様の結果であった（図15C）。

30

【0117】

実施例 4

A型インフルエンザウイルスH3N2を用いて、参考例 5（図4C）、参考例 4（図6A）、参考例 1 1（図11C）、実施例 3（図15B）と同様の実験を行った。その結果、A型インフルエンザウイルスH1N1と同様の結果が得られた（図16A-D）。

【0118】

実施例 5

抗マウスOX40L抗体のインフルエンザ感染防御能を検討した（図17D）。マウスOX40Lを発現するプラスミドを犬腎臓由来のMDCK細胞へ遺伝子導入し、抗マウスOX40L抗体あるいは対照抗体で処理した後に、A型インフルエンザウイルスH1N1を感染させた。インフルエンザの核蛋白質をコードするmRNA量をRT-PCR法で測定したところ、抗マウスOX40L抗体で処理したMDCK細胞のウイルス感染は抑制され、対照抗体で処理したMDCK細胞に比し、核蛋白質をコードするmRNA量が有意に低下していた（図17D）。

40

【0119】

実施例 6

まず、抗ヒトOX40L抗体を下記の方法により製造した：

まず、WKAラットの腎臓上皮細胞をSV40で株化した細胞株W7KSVにヒトOX40L遺伝子を導

50

入した。これを同系のラットの腹空に複数回免疫し（2000万個/回/匹）、得られた免疫脾臓細胞とSP2/0細胞をポリエチレングリコールで融合させ、常法にしたがってHAT選択後、増殖したハイブリドーマの上清について抗OX40L抗体の有無をスクリーニングし、陽性細胞を限界希釈法で2回クローニングした。各ハイブリドーマクローンをヌードマウス腹空に移植し、得られた腹水からIgGをSuperdex200カラムを用いたゲルろ過法で精製した。

【0120】

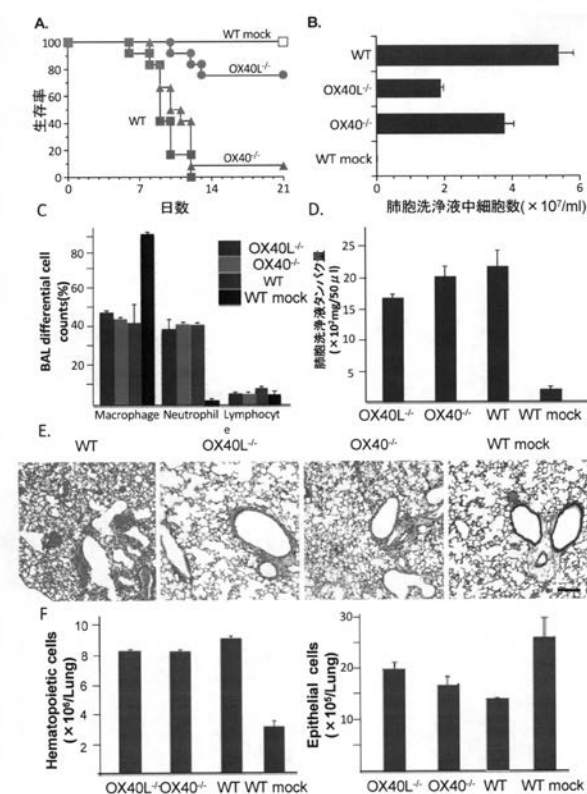
得られた抗ヒトOX40L抗体を用いて、ヒトOX40Lおよびその90番目のアミノ酸をアラニンに変異させた変異体と、各種抗ヒトOX40L抗体の結合能を比較した（図18）。ヒトOX40Lおよびその90番目のアミノ酸をアラニンに変異させた変異体を発現するプラスミドを犬腎臓由来のMDCK細胞へ遺伝子導入し、その細胞表面へ発現させた後に、各種抗ヒトOX40L抗体との結合量をフローサイトメトリーで測定した。W66抗ヒトOX40L抗体のみが、野生型ヒトOX40Lに比し、90番目のアミノ酸をアラニンに変異させた変異体に対する結合能を著明に低下させていた。

【0121】

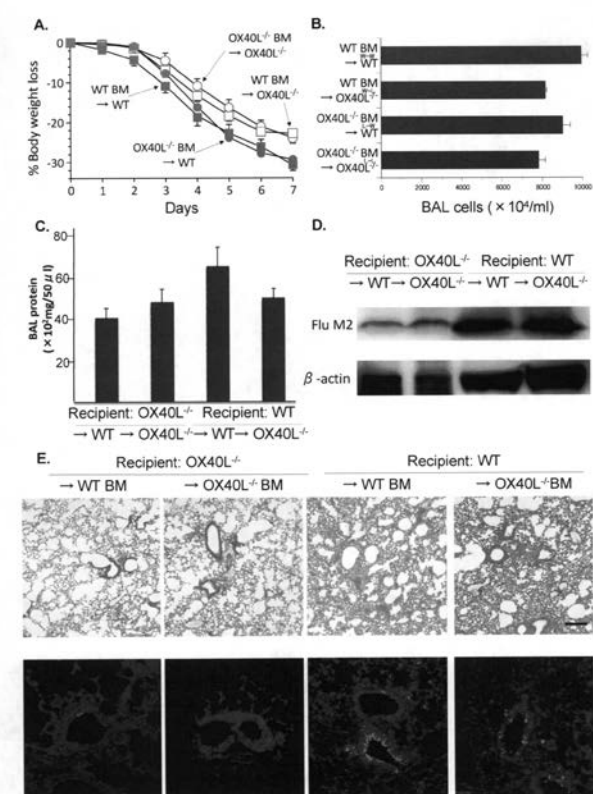
実施例7

W66抗ヒトOX40L抗体のインフルエンザ感染防御能を、他の抗ヒトOX40L抗体と比較した（図19）。ヒトOX40Lを発現するプラスミドを犬腎臓由来のMDCK細胞へ遺伝子導入し、W66抗ヒトOX40L抗体、他の抗ヒトOX40L抗体、あるいは対照抗体で処理した後に、A型インフルエンザウイルスH1N1を感染させた。インフルエンザの核蛋白質をコードするmRNA量をRT-PCR法で測定したところ、W66抗ヒトOX40L抗体で処理したMDCK細胞のウイルス感染は抑制され、他の抗ヒトOX40L抗体や対照抗体で処理したMDCK細胞に比し、核蛋白質をコードするmRNA量が有意に低下していた（図19）。

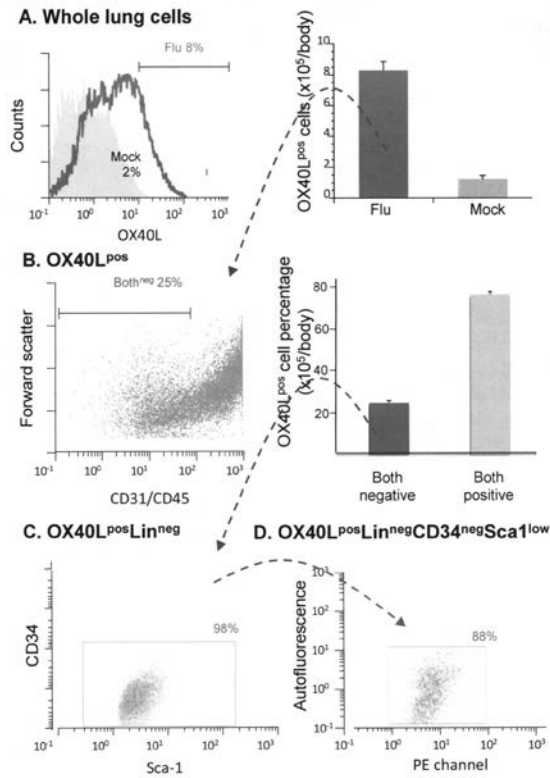
【図1】



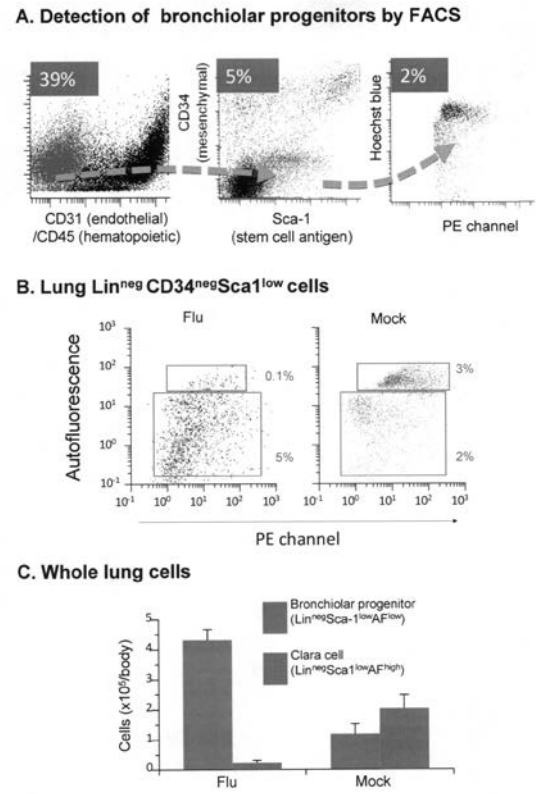
【図2】



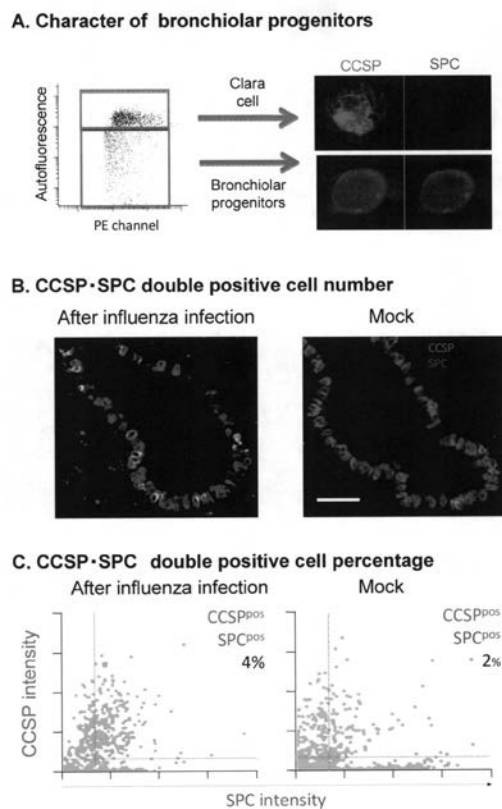
【 図 3 】



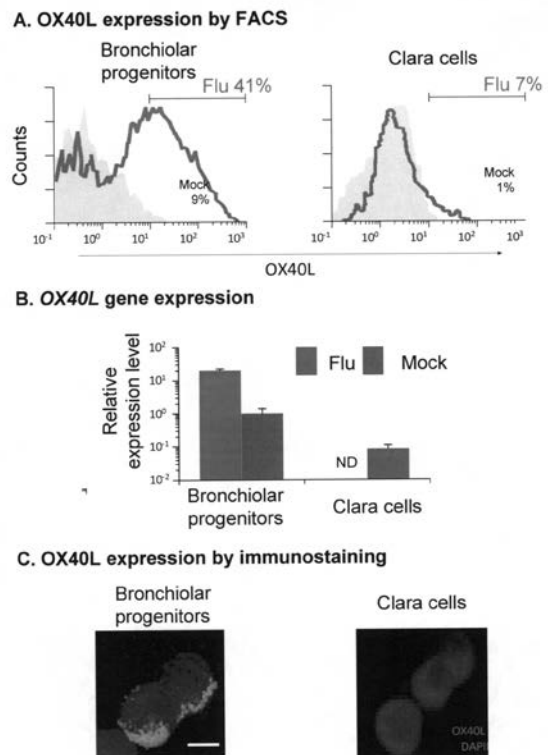
【 図 4 】



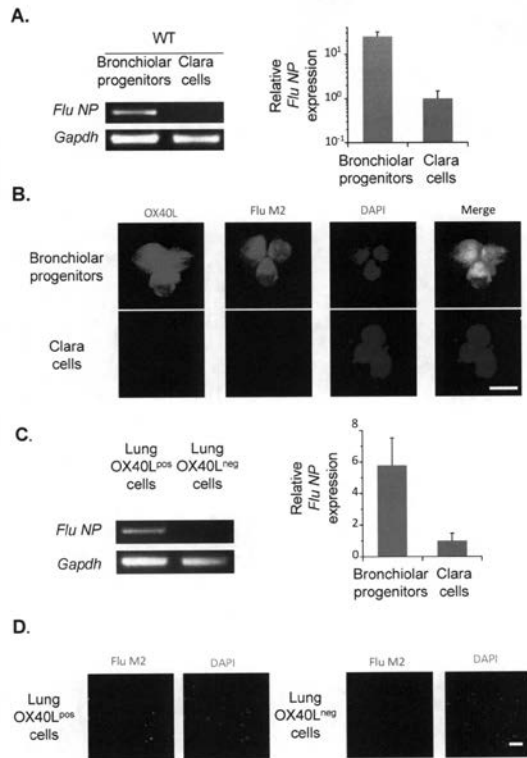
【 図 5 】



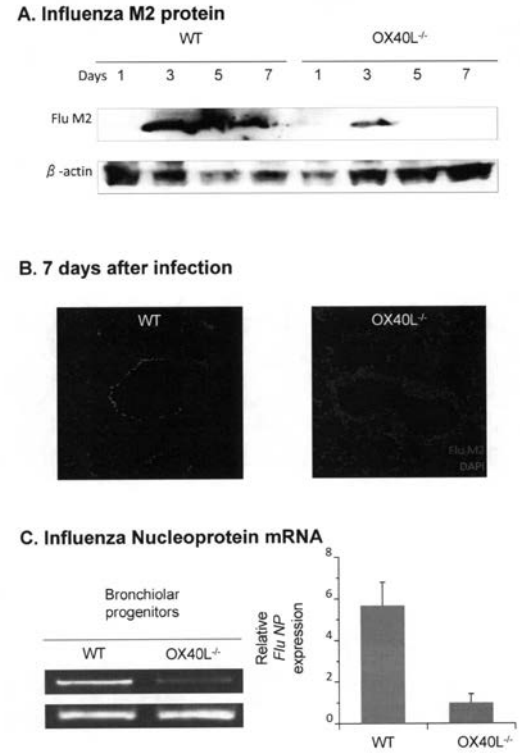
【 図 6 】



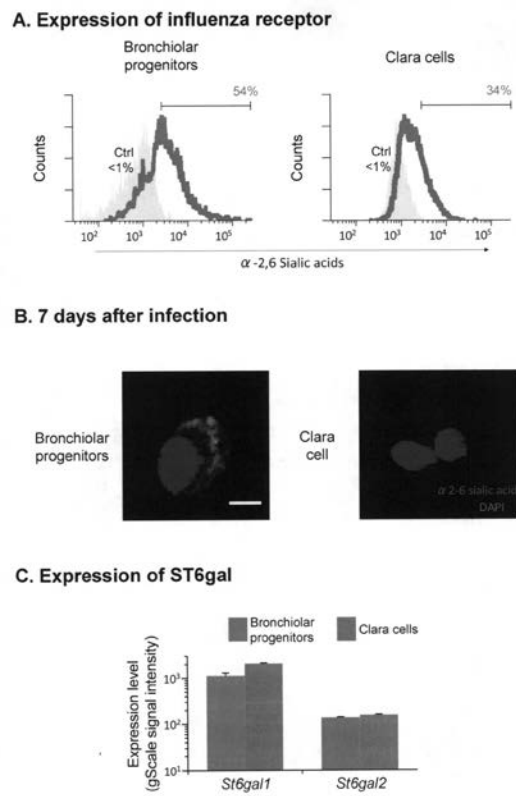
【 図 7 】



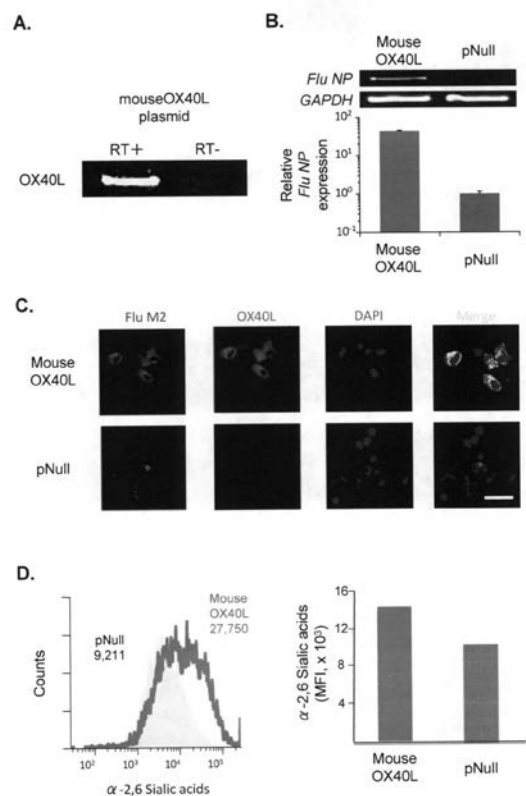
【 図 8 】



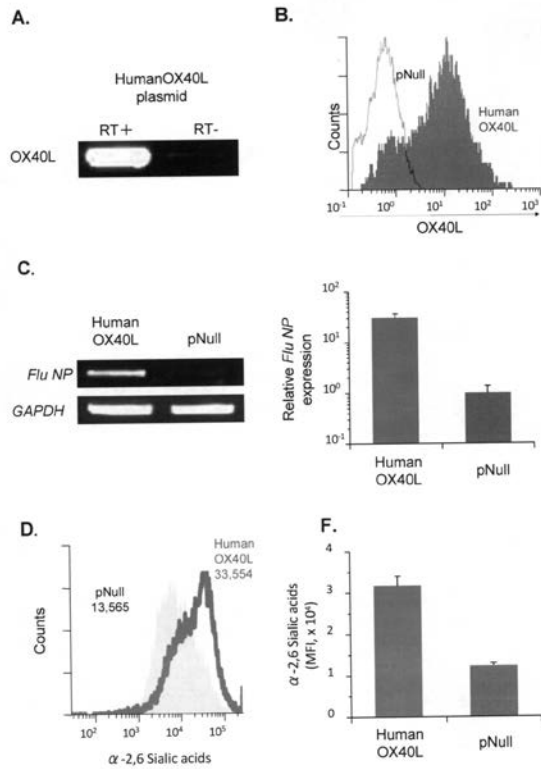
【 図 9 】



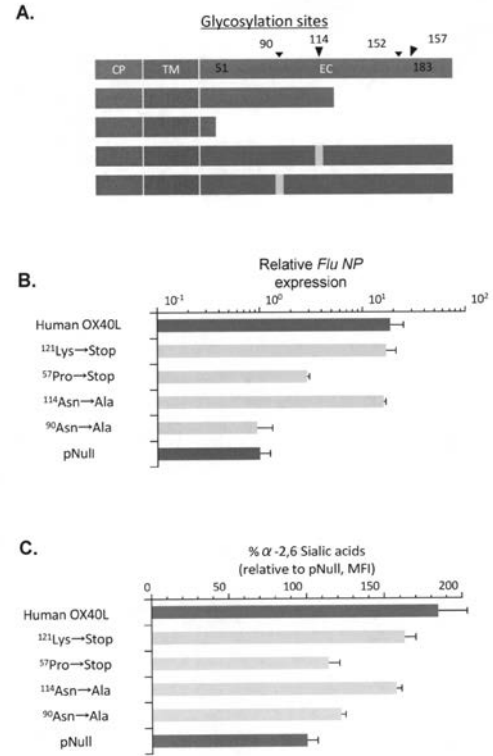
【 図 10 】



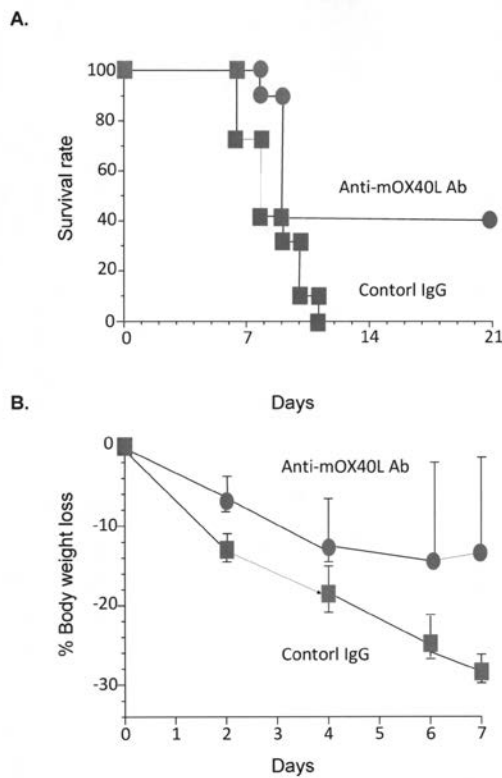
【図 1 1】



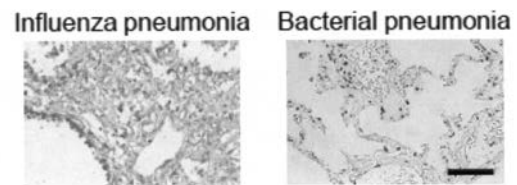
【図 1 2】



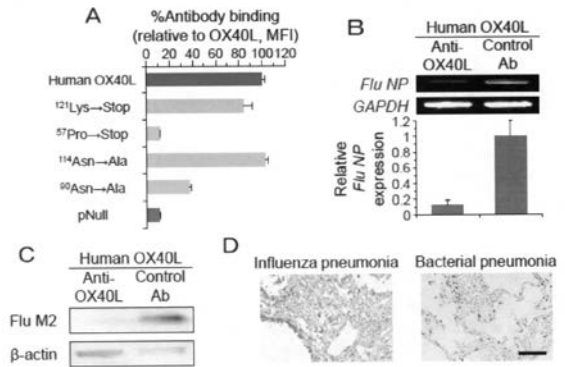
【図 1 3】



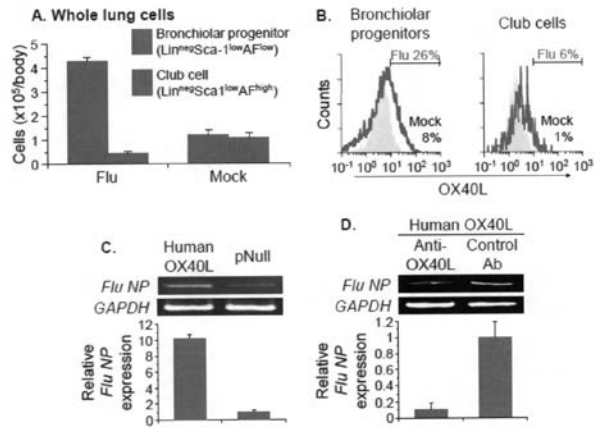
【図 1 4】



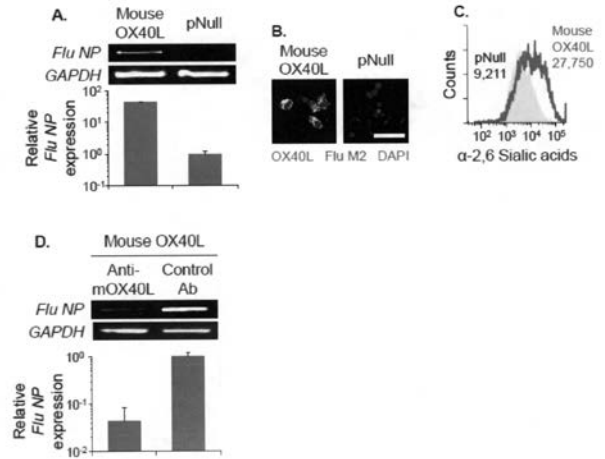
【図 1 5】



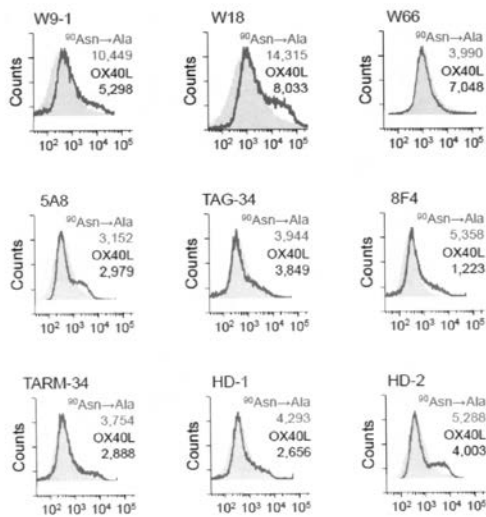
【図 16】



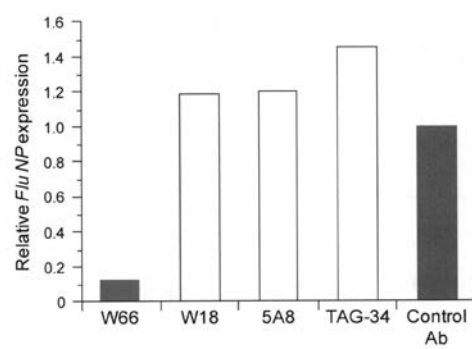
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】

2017165652000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
			C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 一ノ瀬 正和
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

(72)発明者 石井 直人
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

(72)発明者 田中 勇悦
沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 国立大学法人琉球大学内

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03
4B024 AA01 BA56 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04
GA11 HA01
4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4C085 AA13 AA14 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 CC23 EE01
GG02 GG03 GG08 GG10
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA14 DA75 DA76 EA20 EA29 FA74