

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4961556号  
(P4961556)

(45) 発行日 平成24年6月27日(2012.6.27)

(24) 登録日 平成24年4月6日(2012.4.6)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 P
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 A
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 26 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-547702 (P2006-547702)	(73) 特許権者 504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(86) (22) 出願日 平成17年11月4日(2005.11.4)	(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀
(86) 国際出願番号 PCT/JP2005/020283	(72) 発明者 審良 静男 日本国大阪府吹田市山田丘1番1号 国立 大学法人大阪大学内
(87) 国際公開番号 W02006/061965	(72) 発明者 石井 健 日本国大阪府吹田市山田丘1番1号 国立 大学法人大阪大学内
(87) 国際公開日 平成18年6月15日(2006.6.15)	(72) 発明者 チョバン ジェヴァイア 日本国大阪府吹田市山田丘1番1号 国立 大学法人大阪大学内
審査請求日 平成20年10月27日(2008.10.27)	
(31) 優先権主張番号 特願2004-357255 (P2004-357255)	
(32) 優先日 平成16年12月9日(2004.12.9)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヘモゾイン誘導による自然免疫を利用したマラリア感染症の検出・測定、マラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング、及び該自然免疫誘導の調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検物質の存在下、合成ヘモゾインの誘導による、T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する自然免疫活性を検出・測定することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

【請求項2】

T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する自然免疫活性が、T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する免疫細胞の活性化であることを特徴とする請求項1に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

【請求項3】

合成ヘモゾインからなる、T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する自然免疫誘導調節用アジュバント。

【請求項4】

合成ヘモゾインを活性成分とする、T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する自然免疫誘導用免疫賦活剤。

【請求項5】

M y D 8 8 + / + 及び T L R 9 + / + の非ヒト動物に、被検物質と合成ヘモゾインを投与した場合におけるサイトカインの産生量と、M y D 8 8 - / - 及び / 又は T L R 9 - / - の非ヒト動物に被検物質と合成ヘモゾインを投与した場合におけるサイトカインの産生量とを測定・評価することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング

方法。

【請求項 6】

非ヒト動物におけるサイトカインの産生量を、非ヒト動物における血清サイトカインの量として E L I S A により測定することを特徴とする請求項 5 に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 7】

非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 8】

$MyD88^{+/+}$  及び  $TLR9^{+/+}$  の遺伝子が発現している細胞に、被検物質と 合成ヘモゾイン を投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量と、 $MyD88^{-/-}$  及び  $TLR9^{-/-}$  の遺伝子が発現している細胞に被検物質と 合成ヘモゾイン を投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量とを比較・評価することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

10

【請求項 9】

細胞が、脾臓細胞又は樹状細胞であることを特徴とする請求項 8 に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 10】

細胞におけるサイトカインの産生量を、細胞の培養上澄中のサイトカインの量として E L I S A により測定することを特徴とする請求項 8 又は 9 に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

20

【請求項 11】

サイトカインの産生量の測定が、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-12p40$ 、 $MCP-1$ 、 $IL-6$ 、及び  $IFN-\gamma$  のいずれか 1 以上のサイトカインの産生量の測定であることを特徴とする請求項 5 ~ 10 のいずれかに記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 12】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる TLR9 タンパク質を、合成ヘモゾインに対する受容体として使用する方法。

【請求項 13】

タンパク質が、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列を含む DNA にコードされることを特徴とする請求項 12 に記載の使用する方法。

30

【請求項 14】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる TLR9 タンパク質に対する、合成ヘモゾインのリガンドとしての使用方法。

【請求項 15】

タンパク質が、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列を含む DNA にコードされることを特徴とする請求項 14 に記載の使用する方法。

【請求項 16】

合成ヘモゾイン を有効成分として含有することを特徴とする TLR9 作動剤。

40

【請求項 17】

$MyD88$  を活性化することを特徴とする請求項 16 に記載の TLR9 作動剤。

【請求項 18】

TLR-MyD88 依存経路による免疫応答を誘導することを特徴とする請求項 17 に記載の TLR9 作動剤。

【請求項 19】

TLR-MyD88 依存経路による免疫応答が、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-12p40$ 、 $MCP-1$ 、 $IL-6$ 、及び  $IFN-\gamma$  のいずれか 1 以上のサイトカインの産生であることを特徴とする請求項 18 に記載の TLR9 作動剤。

【請求項 20】

50

T L R 9 を選択的に活性化することを特徴とする請求項 1 6 ~ 1 9 のいずれか記載の T L R 9 作動剤。

【請求項 2 1】

T L R 2、T L R 4、T L R 7、T R I F を活性化しないことを特徴とする請求項 2 0 に記載の T L R 9 作動剤。

【請求項 2 2】

自然免疫制御剤として用いられることを特徴とする請求項 1 6 ~ 2 1 のいずれかに記載の T L R 9 作動剤。

【請求項 2 3】

合成ヘモゾインを T L R 9 のリガンドとして使用する方法。

10

【請求項 2 4】

T L R 9 - M y D 8 8 依存経路による免疫応答を誘導させる方法を含むことを特徴とする請求項 2 3 に記載の使用する方法。

【請求項 2 5】

T L R - M y D 8 8 依存経路による免疫応答が、T N F - 、I L - 1 2 p 4 0、M C P - 1、I L - 6、及び I F N のいずれか 1 以上のサイトカインの産生であることを特徴とする請求項 2 4 に記載の使用する方法。

【請求項 2 6】

自然免疫の制御方法を含むことを特徴とする請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれかに記載の使用する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、マラリア原虫のヘモグロビン代謝産物である疎水性ヘムポリマーのヘモゾインの誘導による、T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する自然免疫活性を検出・測定することによるマラリア感染症の検出・測定方法、該検出・測定法を用いたマラリア感染症のワクチン又はマラリア感染症の予防或いは治療薬のスクリーニング、及び該ヘモゾイン或いは合成ヘモゾインをアジュバント或いは免疫賦活剤として用いる自然免疫誘導の調節、ヘモゾイン、合成ヘモゾイン又はそれらの誘導体を有効成分として含有する T L R 9 作動剤等に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

マラリア感染は、特に世界の熱帯地域における、ヒトの疾病や死亡の主要な原因である。マラリアの効果的な免疫治療が必要であるにも関わらず、ライフサイクルの複雑さ及び多型性の早さ (rapid polymorphism) が原因で、宿主 - 原虫の相互作用及びそれによるマラリア原虫に対する自然免疫応答は、ほとんど理解されていない (Nat. Med. 4: 520-524, 1998; Nat. Rev. Immunol. 4: 169-180, 2004)。マラリア原虫に応答した炎症誘発性サイトカイン (proinflammatory cytokine) の産出を含む、強い自然免疫活性及び / 又は感染し破壊した赤血球から放出された代謝物が、高熱等の主要な症状を導くとされていた (Ann. Trop. Med. Parasitol. 91: 533-542, 1997)。最近の論証は、トール様受容体 (T L R) が Plasmodium を含む様々な病原体に対する自然免疫応答に関与していることを示唆している (Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216, 2002; Nat. Rev. Immunol. 4: 499-511, 2004)。

40

【0 0 0 3】

マウスにおけるマラリア感染では、T L R を介したサイトカイン産出に必須のアダプター分子である骨髄分化因子 8 8 (M y D 8 8) が、肝臓障害を引き起こす Plasmodium berghei 原虫による I L - 1 2 誘導に重要であることが示されている (J. Immunol. 167: 5928-5934, 2001)。最近の研究は、P. falciparum blood-stage 原虫が、M y D 8 8 依存性及び T L R 9 依存性経路を通じて、ヒト plasmacytoid 樹状細胞 (D C) 及びマウス D C を活性化することを報告しているが、それに起因する分子はまだ同定されていないものの、

50

シゾン溶解物に含まれるタンパク質あるいはその複合体であることが示唆されている ( J. Immunol. 172: 4926-4933, 2004 )。

【 0 0 0 4 】

マラリア色素として知られるヘモゾイン ( Hemozoin : H Z ) は、 Plasmodium 原虫の食胞 ( food vacuoles ) に存在するヘム分子の解毒産物である ( Int. J. Parasitol. 32: 1645-1653, 2002; Ann. Trop. Med. Parasitol. 91: 501-516, 1997 )。細胞間の H Z は、シゾンの破壊中に血液に放出され、骨髄細胞に貪食され、細網内皮系内の H Z の集中を導く ( Ann. Trop. Med. Parasitol. 91: 501-516, 1997 )。すなわち、赤血球内のマラリア原虫は、宿主ヘモグロビンを、 H Z として知られる疎水性ヘムポリマー ( hydrophobic heme polymer ) へと消化し、かかるポリマーはその後血流に放出され、細網内皮系で捕獲され、そこに蓄積する。 P. falciparum から生成された H Z は、マクロファージを活性化し、炎症誘発性サイトカイン、ケモカイン、窒素を産出し、ヒト骨髄樹状細胞 ( DC ) の成熟を亢進することが報告されている ( J. Inflamm. 45: 85-96, 1995; Infect. Immun. 70: 3939-3943, 2002 )。これらの研究は、 H Z が自然免疫を活性化する分子秩序を研究し、マラリア原虫 - 宿主間の相互作用の理解を深める必要性を促している。

10

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】 Nat. Med. 4: 520-524, 1998。

【非特許文献 2】 Nat. Rev. Immunol. 4: 169-180, 2004。

【非特許文献 3】 Ann. Trop. Med. Parasitol. 91: 533-542, 1997。

【非特許文献 4】 Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216, 2002。

20

【非特許文献 5】 Nat. Rev. Immunol. 4: 499-511, 2004。

【非特許文献 6】 J. Immunol. 167: 5928-5934, 2001。

【非特許文献 7】 J. Immunol. 172: 4926-4933, 2004。

【非特許文献 8】 Int. J. Parasitol. 32: 1645-1653, 2002。

【非特許文献 9】 Ann. Trop. Med. Parasitol. 91: 501-516, 1997。

【非特許文献 1 1】 J. Inflamm. 45: 85-96, 1995。

【非特許文献 1 2】 Infect. Immun. 70: 3939-3943, 2002。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

30

本発明の課題は、マラリア感染における宿主とマラリア原虫の相互作用を解明し、該知見により、マラリア感染症の診断のための、マラリア原虫のヘモグロビン代謝産物である疎水性ヘムポリマーのヘモゾイン ( Hemozoin : H Z ) の誘導を利用したマラリア感染症の検出・測定方法、該検出・測定法を用いたマラリア感染症のワクチン及びマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法、及び該 H Z 又は合成 H Z 或いはその誘導体をアジュバント或いは免疫賦活剤として用いる自然免疫誘導の調節手段等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

40

赤血球内のマラリア原虫は、宿主ヘモグロビンを、ヘモゾイン ( H Z ) として知られる疎水性ヘムポリマー ( hydrophobic heme polymer ) に消化し、かかるポリマーはその後血流に放出され、細網内皮系で捕獲され、そこに蓄積される。本発明者は、マラリア原虫 - 宿主間の相互作用について、 H Z が自然免疫を活性化する免疫反応のメカニズムを分子レベルで解明すべく研究する中で、ヒト熱帯熱マラリア原虫の該ヘム代謝産物である H Z が自然免疫の受容体である Toll 様受容体 9 ( T L R 9 ) を強く刺激する新規のリガンドであることを見出した。すなわち、 P. falciparum から精製した H Z が、インビトロ、インビボの両方で T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存するマウス免疫細胞を活性化することを見出した。そして、この活性化は、公知の抗マラリア薬であるクロロキンにより阻害されることを確認した。

【 0 0 0 8 】

50

そして、これらの知見に基いて本発明者は、該 H Z の誘導による、 T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存する自然免疫活性を検出・測定することにより、マラリア感染症の検出・測定を行なうことが可能であり、該マラリア感染症の検出・測定をマラリア感染症の診断のために用いることが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。また、該 H Z の誘導による自然免疫活性の検出・測定によるマラリア感染症の検出・測定方法を用いて、マラリア感染症のワクチン或いはマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニングを行うことが可能であることを見出し、本発明をなした。更に、上記知見に基いて、 H Z 又は合成 H Z 或いはその誘導体をアジュバント或いは免疫賦活剤として用いて、 H Z の誘導による T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存する自然免疫誘導の調節を行うことが可能であることを見出した。すなわち、ヘモゾインが、 T L R 9 - M y D 8 8 依存経路を

10

## 【 0 0 0 9 】

すなわち本発明は、( 1 ) 被検物質の存在下、合成ヘモゾインの誘導による、 T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存する自然免疫活性を検出・測定することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、( 2 ) T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存する自然免疫活性が、T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存する免疫細胞の活性化であることを特徴とする前記( 1 )に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法に関する。

20

## 【 0 0 1 0 】

また本発明は、( 3 ) 合成ヘモゾインからなる、 T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存する自然免疫誘導調節用アジュバントや、( 4 ) 合成ヘモゾインを活性成分とする、 T L R 9 を介し、 M y D 8 8 に依存する自然免疫誘導用免疫賦活剤からなる。

## 【 0 0 1 1 】

また本発明は、( 5 ) M y D 8 8 <sup>+</sup> / <sup>+</sup> 及び T L R 9 <sup>+</sup> / <sup>+</sup> の非ヒト動物に、被検物質と合成ヘモゾインを投与した場合におけるサイトカインの産生量と、 M y D 8 8 <sup>-</sup> / <sup>-</sup> 及び / 又は T L R 9 <sup>-</sup> / <sup>-</sup> の非ヒト動物に被検物質と合成ヘモゾインを投与した場合におけるサイトカインの産生量とを測定・評価することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、( 6 ) 非ヒト動物におけるサイトカインの産生量を、非ヒト動物における血清サイトカインの量として E L I S A により測定することを特徴とする前記( 5 )に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、( 7 ) 非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする前記( 5 )又は( 6 )に記載のスクリーニング方法や、( 8 ) M y D 8 8 <sup>+</sup> / <sup>+</sup> 及び T L R 9 <sup>+</sup> / <sup>+</sup> の遺伝子が発現している細胞に、被検物質と合成ヘモゾインを投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量と、 M y D 8 8 <sup>-</sup> / <sup>-</sup> 及び / 又は T L R 9 <sup>-</sup> / <sup>-</sup> の遺伝子が発現している細胞に被検物質と合成ヘモゾインを投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量とを比較・評価することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、( 9 ) 細胞が、脾臓細胞又は樹状細胞であることを特徴とする前記( 8 )に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、( 1 0 ) 細胞におけるサイトカインの産生量を、細胞の培養上澄中のサイトカインの量として E L I S A により測定することを特徴とする前記( 8 )又は( 9 )に記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、( 1 1 ) サイトカインの産生量の測定が、 T N F - 、 I L - 1 2 p 4 0 、 M C P - 1 、 I L - 6 、及び I F N のいずれか 1 以上のサイトカインの産生量の測定であることを特徴とする前記( 5 ) ~ ( 1 0 ) のいずれかに記載のマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法に関する。

30

40

## 【 0 0 1 2 】

また本発明は、( 1 2 ) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる T L R 9 タンパク質を、合成ヘモゾインに対する受容体として使用する方法や、( 1 3 ) タンパク質が、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列を含む D N A にコードされることを特徴

50

とする前記(12)に記載の使用する方法や、(14)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるTLR9タンパク質に対する、ヘモジン、合成ヘモジンのリガンドとしての使用方法や、(15)タンパク質が、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列を含むDNAにコードされることを特徴とする前記(14)に記載の使用方法に関する。

【0013】

また本発明は、(16)合成ヘモジンを有効成分として含有することを特徴とするTLR9作動剤や、(17)MyD88を活性化することを特徴とする前記(16)に記載のTLR9作動剤や、(18)TLR-MyD88依存経路による免疫応答を誘導することを特徴とする前記(17)に記載のTLR9作動剤や、(19)TLR-MyD88依存経路による免疫応答が、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、MCP-1、IL-6、及びIFN $\gamma$ のいずれか1以上のサイトカインの産生であることを特徴とする前記(18)に記載のTLR9作動剤や、(20)TLR9を選択的に活性化することを特徴とする前記(16)～(19)のいずれか記載のTLR9作動剤や、(21)TLR2、TLR4、TLR7、TRIFを活性化しないことを特徴とする前記(20)に記載のTLR9作動剤や、(22)自然免疫制御剤として用いられることを特徴とする前記(16)～(21)のいずれか記載のTLR9作動剤に関する。

【0014】

また本発明は、(23)ヘモジン、合成ヘモジン又はそれらの誘導体をTLR9のリガンドとして使用する方法や、(24)TLR9-MyD88依存経路による免疫応答を誘導させる方法を含むことを特徴とする前記(23)に記載の使用する方法や、(25)TLR-MyD88依存経路による免疫応答が、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、MCP-1、IL-6、及びIFN $\gamma$ のいずれか1以上のサイトカインの産生であることを特徴とする前記(24)に記載の使用する方法や、(26)自然免疫の制御方法を含むことを特徴とする前記(23)～(25)にのいずれか記載の使用する方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の実施例において、P. falciparum由来の精製HZが、マウス免疫システムを活性化するかどうかを調べるために、脾臓細胞及びDC(ヒト骨髄樹状細胞)を、インビトロで精製HZで刺激し、培養上澄み中の炎症誘導性サイトカインの産出をELISAによって測定した結果を示す図である。

【図2】本発明の実施例において、HZ誘導性の自然免疫の活性化が、MyD88にのみ依存的事であることを確認するために、MyD88非依存性経路に必須のアダプター分子であるTRIF(Toll/IL-1レセプター(TR))領域含有アダプターが欠損しているマウスを用い、TNF $\alpha$ 又はIL-12p40の産生量をELISAで分析し、定量した結果を示す図である。

【図3】本発明の実施例において、HZ誘導性の自然免疫活性化が障害されているか、又は変更されているかを調べるために脾臓細胞及びDCを用いて、CD40及びCD88の発現をフローサイトメトリーで分析した結果(b)、FL-DCによるIFN $\gamma$ の産生を、ELISAで分析した結果(c)を示す図である。

【図4】本発明の実施例において、合成HZがTLR9依存形式で、自然免疫システムを活性化しているかどうかを調べるために、野生型マウス又はTLR9 $^{-/-}$ マウスに、合成HZを注入し、血清内のIL-6及びMCP-1産生量をELISAで測定した結果を示す図である。

【図5】本発明の実施例において、P. falciparumの培養物中、又はP. falciparum培養物からHZ調製中に混入物が入る可能性を排除するために、HZの精製度を定量するための分析を行った結果を示す図である。(a)は、DNAの混入を検出するために、HZをアガロースゲル上に移し、臭化プロマイドで染色した結果を、(b)は、C57/B6マウスのFL-DCを、HZ又はDNase処理、熱失活、及び/又はCQ(10 $\mu$ M)でインキュベートした後、ELISAでTNF $\alpha$ 又はIL-12p40を測定した結果を示す。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0016】

本発明は、マラリア原虫のヘモグロビン代謝産物である疎水性ヘムポリマーのH Z誘導による、TLR9を介し、MyD88に依存する自然免疫活性を検出・測定することによりマラリア感染症の検出・測定を行う方法よりなるものである。本発明において、H Z誘導による自然免疫活性の検出・測定には、脾臓細胞又は樹状細胞のような免疫細胞のH Zによる、TLR9を介し、MyD88に依存する活性化の状況を検出・測定することにより行うことができる。該H Zによる、TLR9を介し、MyD88に依存する活性化の検出・測定は、H Zの誘導による免疫細胞のサイトカインの産生を検出・測定することにより行うことができる。該サイトカインの産生の検出・測定としては、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、MCP-1、IL-6、及びIFN $\gamma$ のいずれか1以上のサイトカインの産生の検出・測定により行うことができる。該サイトカインの産生の検出・測定には、サイトカインELISA法のような公知のサイトカインの検出・測定法を用いることができる。本発明のマラリア感染症の検出・測定方法により、マラリア感染症の診断を行うことが可能である。

10

## 【0017】

また本発明は、本発明のH Z誘導によるマラリア感染症の検出・測定方法を、被検ワクチンの評価方法として用い、マラリア感染症のワクチンのスクリーニング方法又は検査方法として用いることからなる。該ワクチンのスクリーニング又は検査方法は、ワクチンの開発或いは開発したワクチンの製造に際しての検査等における被検ワクチンの評価方法として用いることができる。更に、本発明は、本発明のマラリア感染症の検出・測定方法を、マラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法として用いることよりなる。該スクリーニング方法は、被検物質の存在下、H Z又は合成H Z或いはその誘導体の誘導による、TLR9を介し、MyD88に依存する自然免疫活性を検出・測定する本発明の方法により行うことができる。

20

## 【0018】

また、本発明は、本発明においてTLR9の新規リガンドとして見い出されたH Z又は合成H Z或いはその誘導体を、自然免疫誘導調節用アジュバントとして、或いは自然免疫誘導用免疫賦活剤として用いることよりなる。H Z又は合成H Z或いはその誘導体を自然免疫誘導調節用アジュバント或いは自然免疫誘導用免疫賦活剤として用いることにより、TLR9を介し、MyD88に依存する自然免疫誘導の調節を行うことができる。本発明において、H Zは(不溶性クリスタロイド構造)は、*P. falciparum* (3D7株)で感染した赤血球から精製する方法で調製することができる(Infect. Immun. 70: 3939-3943, 2002; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93: 11865-11870, 1996; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88: 325-329, 1991)。また、合成H Z(ヘマチン)は、酢酸処理及びアルカリ炭酸水素塩洗浄に基づくJaramillo et al.のプロトコール(J. Immunol. 172:3101-3110)を用いて精製し、製造することができる。自然免疫誘導調節用アジュバント或いは自然免疫誘導用免疫賦活剤の利用は、いずれも公知の利用形態にしたがって行うことができる。

30

## 【0019】

また本発明は、野生型マウス等のMyD88<sup>+/+</sup>及びTLR9<sup>+/+</sup>の非ヒト動物に、被検物質とヘモジン、合成ヘモジン、又はそれらの誘導体を投与した場合におけるサイトカインの産生量と、MyD88<sup>-/-</sup>及び/又はTLR9<sup>-/-</sup>の非ヒト動物に被検物質とヘモジン、合成ヘモジン、又はそれらの誘導体を投与した場合におけるサイトカインの産生量とを測定・評価するマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、MyD88<sup>+/+</sup>及びTLR9<sup>+/+</sup>の遺伝子が発現している脾臓細胞、樹状細胞等の細胞に、被検物質とヘモジン、合成ヘモジン、又はそれらの誘導体を投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量と、MyD88<sup>-/-</sup>及び/又はTLR9<sup>-/-</sup>の遺伝子が発現している細胞に被検物質とヘモジン、合成ヘモジン、又はそれらの誘導体を投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量とを比較・評価するマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法に関し、上記サイトカインとしては、TN

40

50

F - 、 I L - 1 2 p 4 0、 M C P - 1、 I L - 6、 I F N 等を例示することができ、また、上記非ヒト動物におけるサイトカインの産生量は、非ヒト動物における血清サイトカインの量として E L I S A により測定することができ、細胞におけるサイトカインの産生量は、細胞の培養上澄中のサイトカインの量として E L I S A により測定することができる。そして、 M y D 8 8 - / - マウスや M y D 8 8 - / - の遺伝子が発現している細胞は W O 0 0 / 4 1 5 6 1 号公報に記載の方法により、 T L R 9 - / - マウスや T L R 9 - / - の遺伝子が発現している細胞は特開 2 0 0 2 - 3 4 5 6 5 号公報に記載の方法により調製することができる。

#### 【 0 0 2 0 】

また本発明は、ヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体からなるリガンドに対する、( a ) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質；又は( b ) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体に対して反応性を有するタンパク質；の受容体としての使用方法に関する。上記タンパク質としては、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列を含む D N A にコードされるタンパク質；配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列を含む D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする D N A にコードされ、かつヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体に対して反応性を有するタンパク質；を用いることができる。ここで、ストリンジェントな条件下とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、具体的には、5 0 ~ 7 0 % 以上の相同性を有する D N A 同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い D N A 同士がハイブリダイズしない条件あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である 6 5 、 1 × S S C、0 . 1 % S D S、又は 0 . 1 × S S C、0 . 1 % S D S に相当する塩濃度でハイブリダイズする条件を挙げることができる。

#### 【 0 0 2 1 】

上記本発明の使用法の具体的な態様としては、ヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体誘導による、T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する自然免疫活性を検出・測定するマラリア感染症の検出・測定方法や、マラリア感染症のワクチンのスクリーニング又は品質検査方法や、ヘモゾイン又は合成ヘモゾイン或いはその誘導体の誘導による、T L R 9 を介し、M y D 8 8 に依存する自然免疫活性を検出・測定するマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、M y D 8 8 + / + 及び T L R 9 + / + の非ヒト動物に、被検物質とヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体を投与した場合におけるサイトカインの産生量と、M y D 8 8 - / - 及び / 又は T L R 9 - / - の非ヒト動物に被検物質とヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体を投与した場合におけるサイトカインの産生量とを測定・評価することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、M y D 8 8 + / + 及び T L R 9 + / + の遺伝子が発現している細胞に、被検物質とヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体を投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量と、M y D 8 8 - / - 及び / 又は T L R 9 - / - の遺伝子が発現している細胞に被検物質とヘモゾイン、合成ヘモゾイン、又はそれらの誘導体を投与した場合の細胞におけるサイトカインの産生量とを比較・評価することを特徴とするマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法や、T L R 9 - M y D 8 8 依存経路による免疫応答誘導のメカニズムを解明する方法等を挙げることができる。

#### 【 0 0 2 2 】

また本発明は、ヘモゾイン、合成ヘモゾイン又はそれらの誘導体を有効成分として含有する、T L R 9 と相互作用して全活性の細胞内シグナル伝達を引き起こす物質である T L R 9 作動剤(アゴニスト)に関し、かかる T L R 9 作動剤は、M y D 8 8 を活性化することや、T N F - 、 I L - 1 2 p 4 0、 M C P - 1、 I L - 6、及び I F N のいずれか 1 以上のサイトカインの産生等を伴う T L R - M y D 8 8 依存経路による免疫応答を誘導することや、T L R 2、T L R 4、T L R 7、T R I F を活性化することなく、T L R 9 を選択的に活性化することが可能で、自然免疫制御剤として用いることができる。

## 【 0 0 2 3 】

さらに本発明は、ヘモゾイン、合成ヘモゾイン又はそれらの誘導体を TLR9 のリガンドとして使用する方法に関し、かかる方法は、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、MCP-1、IL-6、及び IFN $\gamma$  のいずれか 1 以上のサイトカインの産生等を伴う TLR9-MyD88 依存経路による免疫応答を誘導させる方法や、自然免疫の制御方法を含み、その具体的態様としては、前記の本発明の使用法の具体的態様として例示した方法を挙げることができる。

## 【 0 0 2 4 】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

## 【実施例 1】

## 【 0 0 2 5 】

『 H Z の自然免疫活性の活性化とその調節 』

## [ 材料及び方法 ]

( マウス )

変異マウス ( MyD88<sup>-/-</sup>、TRIF<sup>-/-</sup>、TLR2<sup>-/-</sup>、TLR4<sup>-/-</sup>、TLR7<sup>-/-</sup>、TLR9 欠損マウス ) を、129/Ola x C57/BL6 又は C57/BL6 をバックグラウンドとし、文献 ( Immunity 9: 143-150, 1999; Immunity 11: 443-451, 1999; Nature 408: 740-745, 2000; Nat. Immunol. 3: 196-200, 2002; Science 301: 640-643, 2003 ) 記載の通りに産出した。同年齢の野生型マウスと変異マウスを実験に使用した。インビボの研究には、*P. falciparum* 培養物から精製した HZ 1500  $\mu$ g と合成 HZ ( ヘマチン ) とを、野生型マウス、MyD88<sup>-/-</sup> マウス又は TLR9<sup>-/-</sup> マウスの腹腔内に注入した ( J. Immunol. 172: 3101-3110, 2004 )。サイトカイン ELISA 用に、1、2、4 及び 6 時間後に尾から血清を収集した。

## 【 0 0 2 6 】

( 試薬 )

合成 CpG オリゴデオキシヌクレオチド ( ODN ) D35 は、北海道システムサイエンス株式会社より購入、合成した。Salmonella minnesota Re-595 由来リポポリサッカリド ( LPS )、塩化ヘミン ( hemin chloride ) 及びクロロキン ( CQ ) は Sigma-Aldrich より購入した。DNase ( Dnase- I ) は Invitrogen から購入した。

## 【 0 0 2 7 】

( H Z 及び合成 H Z ( ヘマチン ) の調製 )

HZ ( 不溶性クリスタロイド構造 ) は、*P. falciparum* ( 3 D 7 株 ) で感染した赤血球から精製した ( Infect. Immun. 70: 3939-3943, 2002; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93: 1865-11870, 1996; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88: 325-329, 1991 )。要約すると、赤血球をサポニンで溶解した後、原虫を超音波処理し、2% のドデシル硫酸ナトリウム ( SDS ) で 7 ~ 8 回洗浄した。次に、ペレットをプロテイナーゼ K ( 2 mg / ml ) と共に、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。ペレットはその後、2% の SDS 内で 3 回洗浄し、6 M の尿素内で室温で 3 時間、シェーカー上でインキュベートした。HZ ペレットを 2% の SDS で洗浄した後、蒸留水で 3 ~ 5 回洗浄し、蒸留水に再懸濁し、使用前に再び超音波処理した。いくつかの実験において、文献 ( J. Immunol. 167: 2602-2607, 2001 ) 記載の通りに、HZ は、95 $^{\circ}$ C で 15 分間の熱失活を行うか又は、100 U / ml の DNase-I で 1 時間処理を行った。DNase-I 処理は、*P. falciparum* の粗抽出物から完全にゲノム DNA を除去することによって行った ( 図 5 a )。

## 【 0 0 2 8 】

核酸、タンパク質の定量化は、分光光度計を使用するか、又はアガロースゲル内の臭化エチジウム染色法、BCA 法 ( Biorad ) 若しくはピロガロールレッド方法 ( 和光純薬工業 ) によって行った。全脂質 ( TP ) は、Bligh-Dyer 法 ( 東レリサーチセンター ) による TLC ( 薄層クロマトグラフィー ) 又は Iatron LQ ( 三菱化学ヤトロン ) を使用した酵素方法によって測定した。合成 HZ ( ヘマチン ) は、酢酸処理及びアルカリ炭酸水素塩

10

20

30

40

50

洗浄に基づくJaramillo et al.のプロトコール(J. Immunol. 172:3101-3110)を用いて精製した。エンドトキシンの混入を避けるために、全ての溶液はエンドトキシンを含まないPBS又は蒸留水を用いて調製した。LAL分析(Bio-Whittaker)により測定したエンドトキシンの量は、使用したHZ 1 nmol当たり0.001 EU未満であった。

#### 【0029】

(HZ又は合成HZ(bヘマチン)の定量化)

HZ又は合成HZの濃度は、ヘムポリマーを、20 mM水酸化ナトリウム/2% SDSの溶液内で、室温で、2時間脱重合して定量し、ODは400 nmであった(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93: 11865-11870, 1996)。ヘムのモラー吸光係数は400 nmで $1 \times 10^5$ であり、25  $\mu$ gのP. falciparum HZは、ヘム含有量29 nmolと同等である。

10

#### 【0030】

(細胞)

脾臓細胞の単一細胞懸濁液(single cell suspension)( $5 \times 10^5$ 細胞/ウェル)を、10%のFCSを添加した完全RPMI 1640培地内で48時間培養した。Flt3リガンド誘導骨髄由来DC(FL-DC)( $1 \times 10^5$ 細胞/ウェル)は、骨髄細胞とFlt3リガンド(100 ng/ml; Pepro Tech社製)とを、10%のFCSを含むDMEM培地内で8~9日間培養して産出した。細胞を、指定の刺激によって刺激し、サイトカインELISA用に、上澄みを回収した。

#### 【0031】

(サイトカインELISA)

マウスのTNF- $\alpha$ 、IL-12p40、MCP-1、IL-6(R & D Systems)及びIFN- $\gamma$ (PBL Bio. Lab社製)を、上澄み又は血清のいずれかで、製造者の指示に従ってELISAで測定した。

20

#### 【0032】

(共刺激による分子発現のフローサイトメトリー分析)

刺激した細胞の細胞表面の分子発現を、文献(J. Exp. Med. 196: 269-274, 2002)記載の通り測定した。要約すると、刺激した細胞を、冷却したPBS内で洗浄し、固定し、抗CD16抗体の存在下で、FITC標識抗体、PE標識抗体、Cy-Chrome標識抗体及びAPC標識抗体で、室温で30分染色した。染色した細胞を洗浄し、PBS/0.1%BSA/0.1%NaN<sub>3</sub>内に再懸濁し、FACS caliberで分析した後、CellQuest software(BD社製)で分析した。全ての抗体は、BDより入手した。

30

#### 【0033】

(統計的分析)

統計的な有意差は、Student's t-testを用いて分析した。P < 0.05は有意とみなした。

#### 【0034】

[試験、結果及び評価]

(P. falciparum由来の精製HZの、MyD88依存性経路を通してのマウスの脾臓細胞及び樹状細胞の活性化)

40

P. falciparum由来の精製HZが、マウス免疫システムを活性化するかどうかを調べるために、脾臓細胞及びDC(マウス骨髄樹状細胞)を、インピトロで精製HZで刺激し、培養上澄み中の炎症誘導性サイトカインの産出をELISAによって測定した。FL-DC(Flt3リガンド誘導骨髄由来DC)は、HZにตอบสนองして、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、単球走化性因子-1(MCP-1)及びIL-6を、用量依存的に大量に産出し、その量はCpG ODNとほぼ同様の値だった(図1a)。HZ誘導性の自然免疫活性化における、TLRの役割を調べるために、多数のTLRが介するサイトカイン誘導に必須の分子アダプターであるMyD88が欠損しているマウスを用いた(Nat. Rev. Immunol. 4: 499-511, 2004)。MyD88<sup>-/-</sup>マウス由来のFL-DCでは、HZ刺激により、TNF- $\alpha$ 、IL12p40、MCP-1及びIL-6の産出が著しく障害された(図1b)

50

)。

【0035】

同様に、MyD88<sup>-/-</sup>脾臓細胞では、HZに应答して、MCP-1、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-12p40及びIFN誘導性タンパク質10(IP-10)を産出する应答が障害されていた(図1c)。更に、ヘモゾインは、FL-DCのCD11c<sup>+</sup>、B220<sup>+</sup>plasmacytoidDCサブセット及びCD11c<sup>+</sup>、B220<sup>-</sup>骨髄DCサブセットの両方を刺激し、MyD88<sup>-/-</sup>マウスにおいて、FL-DCの両サブセットで阻害されていたCD40及びCD86の発現をアップレギュレートした(図1d)。

【0036】

(自然免疫应答のHZ活性化のTRIF依存性)

HZ誘導性の自然免疫の活性化が、MyD88にのみ依存的事であることを確認するために、MyD88非依存性経路に必須のアダプター分子であるTRIF(Toll/IL-1レセプター(TIR)領域含有アダプター)が欠損しているマウスを用いた(Nat. Rev. Immunol. 4: 499-511, 2004)。MyD88<sup>-/-</sup>マウスとは対照的に、TRIF<sup>-/-</sup>マウスのFL-DCは、HZに应答し、TNF $\alpha$ 及びIL-12p40(p<0.05、TRIF<sup>-/-</sup>vs培地)を産出し、野生型マウス(p>0.05)の値とほぼ同じであった(図2)。LPS誘導性のTNF $\alpha$ 及びIL-12p40は、TRIF<sup>-/-</sup>マウスのFL-DCで障害され、P. falciparum培養物から精製した多量のHZに、LPSが混入していないことを示唆した。これらのデータは、HZがMyD88を通してマウスにおける炎症誘発性应答を活性化することを示し、MyD88依存性TLRの1つがHZの認識に關与していることを示した。

【0037】

(自然免疫应答のHZ活性化のTLR-9依存性)

TLR2<sup>-/-</sup>マウス、TLR4<sup>-/-</sup>マウス、TLR7<sup>-/-</sup>マウス及びTLR9<sup>-/-</sup>マウスから得た脾臓細胞及びDCを用いて、HZ誘導性の自然免疫活性化が障害されているか、又は変更されているかを調べるために、さらに実験を行った。HZは、野生型マウス、TLR2<sup>-/-</sup>マウス、TLR4<sup>-/-</sup>マウス、TLR7<sup>-/-</sup>マウスにおいて、FL-DCを刺激し、CD11c<sup>+</sup>、B220<sup>+</sup>plasmacytoidDCサブセット及びCD11c<sup>+</sup>、B220<sup>-</sup>骨髄DCサブセットの両方で、CD40及びCD86をアップレギュレートした(図3a)。対照的に、TLR9<sup>-/-</sup>マウス由来のFL-DCの両サブセットでは、HZに应答してCD40及びCD86をアップレギュレートしなかった(図3a)。

【0038】

同様に、野生型マウス、TLR2<sup>-/-</sup>マウス、TLR4<sup>-/-</sup>マウス、TLR7<sup>-/-</sup>マウス由来のFL-DCは、HZに应答して、TNF $\alpha$ 、IL-12p40、MCP-1及びIL-6を産出したが、TLR9<sup>-/-</sup>マウスでは産出しなかった(図3b)。HZはFL-DCによってIFN $\gamma$ を誘導しなかった点は注目すべきであり、HZ誘導性サイトカインの特性が、K型CpGODN(B型としても知られている)と同様であるが、D型ODN(A型としても知られている)、細菌性若しくはウイルス性DNA等のTLR9の既知の天然DNAリガンドとは異なることを示唆している(図3c)(Nat. Rev. Immunol. 4: 249-258, 2004)。それにもかかわらず、これらのデータは、TLR9及びMyD88が、マウス脾臓細胞及びDCにおけるHZ誘導性の活性化に重要であることを、明らかに証明している。

【0039】

(炎症誘導性サイトカインのHZ活性化のインピボにおけるMyD88/TLR9依存性)

HZ活性化が、インピボで、TLR9に介され、MyD88に依存的事であることを確認するために、P. falciparum精製HZを、野生型マウス及びMyD88<sup>-/-</sup>マウス又はTLR9<sup>-/-</sup>マウスの腹腔内に注入し、血清サイトカインの産出をモニターした。HZの注入により、野生型マウスのMCP-1及びIL-6の血清量が著しく上昇し、その値は

10

20

30

40

50

1 ~ 4 時間に最大となり、6 時間以内に減少した (図 4 a)。対照的に、MyD88<sup>-/-</sup> マウス及びTLR9<sup>-/-</sup> マウスでは、この上昇は、完全に阻害されていた。6 時間後、サイトカインの量は、野生型マウスで減少した。これらのデータは、インビボ及びインビトロの両方で、HZ 誘導性の炎症誘導性応答が、TLR9 及び MyD88 によって介されていることを明確に示している。

#### 【0040】

合成 HZ (ヘマチン、実験室条件で短量体ヘムより合成) は、原虫で天然に形成された HZ と構造が似ており (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93: 11865-11870, 1996; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88: 325-329, 1991)、原虫又は培養物由来の混入物を含んでいない。合成 HZ が TLR9 依存形式で、自然免疫システムを活性化しているかどうか調べるために、野生型マウス又は TLR9<sup>-/-</sup> マウスに、合成 HZ を注入し、血清内の IL-6 及び MCP-1 産生量をモニターした。野生型マウスへの合成 HZ の注入は、血清内の MCP-1 及び IL-6 産出を誘導し、その量は 1 ~ 4 時間に最大となった (図 4 b)。対照的に、この応答は、TLR9<sup>-/-</sup> マウスでは阻害されていた (図 4 b)。これらのデータは、合成 HZ と同様 *P. falciparum* 由来精製天然 HZ も、マウスの自然免疫システムを刺激していることを示唆し、HZ 誘導性の、TLR9 仲介自然免疫活性化に他の混入物が関与している可能性を排除している。

#### 【0041】

*P. falciparum* の培養物中、又は *P. falciparum* 培養物から HZ 調製中に混入物が入る可能性を排除するために、上記の多くの精製方法に加えて、HZ の精製度を定量するために、一連の分析を行った (Infect. Immun. 70: 3939-3943, 2002)。臭化プロマイド染色アガロースゲル (図 5) でも、分光光度計でも、HZ 又は DNase 処理 HZ 溶液 (1 mM) において、DNA も RNA も検出されなかった。DNase 処理又は熱失活も、TNF $\alpha$  及び IL-12 p40 の HZ 誘導 DC 産出に影響しなかった (図 5 b)。さらに、*P. falciparum* から単離したゲノム DNA 及び RNA は、TNF $\alpha$  及び IL-12 の産出を含む自然免疫応答を著しく活性化しなかった (未公表の実験及び (J. Immunol. 172: 3989-3993, 2004))。どの方法でも、HZ 溶液 (1 mM) 内に、タンパク質も脂質も検出されなかった。つまり、これらのデータを合わせると、HZ 誘導性、TLR9 - 仲介性の自然免疫活性は、他の混入物に起因するものではないことを、強く示唆している。

#### 【0042】

(HZ 誘導性自然免疫の活性化のクロロキン感受性)  
坑マラリア製剤クロロキン (CQ) は、エンドソーム/リソソームの成熟、マラリアヘモゾインのクリスタル形成 (crystal formation) を阻害するほか、マラリア感染中の炎症誘導性応答を阻害することが報告されているが、CQ の坑マラリア効果の正確なメカニズムは、未だに論争中である (Int. J. Parasitol. 32: 1645-1653, 2002; Life Sci. 74: 1957-1972, 2004)。最近の論拠は、CQ は、TLR9 仲介性自然免疫活性化も阻害することを示唆している (J. Immunol. 160: 1122-1131, 1998)。HZ 誘導性の炎症誘導性応答に対する CQ の効果を調べるために、CQ の存在下で、FL-DC を HZ で刺激した。HZ 誘導性の TNF $\alpha$  及び IL-12 p40 の産出は、CQ により減少した (図 5 b)。

#### 【0043】

これらは、既知のメカニズムである、マラリア病原体による CQ 阻害に加えて、CQ が、マラリア感染中の HZ 誘導性、TLR9 仲介性の自然免疫応答を阻害することができ、それは治療効果に貢献する可能性があることを示唆している。さらなる研究が必要ではあるが、HZ 形成を阻害する能力に加えて、CQ が HZ と TLR9 の相互作用に干渉し、又は食胞を含む HZ の成熟を阻害し、結果的に以下の自然免疫活性化を阻害する可能性がある。

#### 【0044】

TLR9 が特異的 IgG により、細菌性 DNA 又は自己 DNA クロマチン複合体中に CpG モチーフを認識することは報告されているが、TLR9 リガンドとしての非 DNA 分子は報告されていない (Trends Immunol. 25: 381-386, 2004; Annu. Rev. Immunol. 20:

10

20

30

40

50

709-760, 2002)。最近の研究によって、TLR9により認識される非DNAリガンドの最初の論拠が報告されている。HZは、赤血球からヘモグロビンが分解される間に寄生虫の食胞に産出した重合ヘム (ferriprotoporphylin IX) の結晶形である。マクロファージ、DC等の貪食細胞に捕獲されると、HZは、TLR9がP13キナーゼを經由して、小胞体から補充されることがあるファゴソーム内に蓄積する (J. Exp. Med. 196: 269-274, 2002; Nat. Immunol. 5: 190-198, 2004)。これは、TLR9が、ファゴソーム内でHZを認識しうることを示唆している。

#### 【0045】

HZは、高疎水性であり、最近提案された仮説に従うと、免疫刺激効果に關与する可能性がある (Nat. Rev. Immunol. 4: 469-478, 2004)。HZは本来、宿主赤血球内のヘモグロビンに由来しているが、生存し続けるために、原虫によって、毒性のヘムから、原虫に無毒の代謝物であるHZへと、変更されることは興味深い。これは、不活性自己分子 (inert self molecule) (ヘム) が、マラリア感染中に不活性免疫システム内において、活性化した“非自己”分子となることを示唆している。

#### 【0046】

マラリア感染中のHZ誘導性、TLR9仲介性の自己免疫活性化及びそれに対する宿主の防御の生物学的な役割は現在調査中である。予備的な結果により、マラリア原虫に対する自然免疫応答は、TLRを含む宿主やPlasmodiumの複数の要因に依存していることを示唆している。最近の研究を含む、マラリア感染中のTLR仲介性の自然免疫活性化が、宿主防御免疫 (host protective immunity) に寄与しているのか、マラリア免疫逃避メカニズム (malarial immune escape mechanism) に寄与しているのかを、研究することは重要である。また、TLR9がCpG DNA及びHZを識別する分子メカニズムを研究することも重要である。それにもかかわらず、現在までの観察により、マラリア感染中のヘム代謝物であるHZは、TLR9仲介性、MyD88依存性及びクロロキンピン感受性の経路を通して、不活性免疫システムを活性化することを確かに証明しており、これは、不活性免疫におけるマラリア寄生虫-宿主相互作用をさらに理解する鍵となる。

#### 【0047】

##### [ 図の説明 ]

図1 . P. Falciparum由来精製HZは、MyD88依存性経路を通して、炎症誘発性応答を活性化する：

(a) 野生型 (WT) マウスのFL-DCを、精製ヘモジン (HZ) (30及び100  $\mu$ M) で24時間刺激した。ELISAで、上澄み中のTNF、IL-12p40、MCP-1又はIL-6の産生を測定した。コントロールとして、3  $\mu$ MのCpG DNA (D35) を用いた。野生型 (黒いバー)、MyD88<sup>-/-</sup>マウス (白いバー) の (b) FL-DC、及び (c) 脾臓細胞を、30  $\mu$ MのHZ及びCpG DNA (D35、3  $\mu$ M) 又はLPS (100 ng/ml) で、24時間刺激した。培養上澄み中のTNF、IL-12p40、MCP-1又はIL-6の産生をELISAで測定した。 (d) CD40及びCD86の発現を調べるために、骨髄DC (CD11c<sup>+</sup>、B220<sup>-</sup>) 及びplasmacytoid DC (CD11c<sup>+</sup>、B220<sup>+</sup>) を、フローサイトメトリーによって分析した。斜線部分は、HZで刺激されていない細胞を現し、実線はHZで刺激された細胞を現す。結果は、2度の培養の平均値 + S.D. を現し、少なくとも5回の別個の実験の代表例である。「n.d.」は、「検出されず」を意味する。

#### 【0048】

図2 . HZ誘導性のDC活性化はTRIF非依存的である：  
野生型 (WT) マウス及びTRIF<sup>-/-</sup>マウスのFL-DCは、30  $\mu$ MのHZ及びLPS (100 ng/ml) で24時間インキュベートし、その後上澄みをELISAで分析し、TNF又はIL-12p40の産生量を定量した。結果は、平均値 + 4回の別個の実験のSEM (n = 4) である。P > 0.05、HZ (WT) vs HZ (TRIF<sup>-/-</sup>)。「n.d.」は、「検出されず」を意味する。

#### 【0049】

図3. TLR9はHZ誘導性の自然免疫活性化を仲介する：  
 (a) 野生型(WT)マウス及びTLR2<sup>-/-</sup>マウス、TLR4<sup>-/-</sup>マウス、TLR7<sup>-/-</sup>マウス、TLR9<sup>-/-</sup>マウスの骨髄DC(CD11c<sup>+</sup>、B220<sup>-</sup>)及びplasmacytoid DC(CD11c<sup>+</sup>、B220<sup>+</sup>)を、フローサイトメトリーで分析し、CD40及びCD88の発現を定量した。斜線部分はHZで刺激されていない細胞を現し、実線はHZで刺激された細胞を現す。野生型及びTLR9<sup>-/-</sup>細胞は指定の刺激でインキュベートし、(b)脾臓細胞によるTNF $\alpha$ 、IL-12p40、MCP-1又はIL-6の産生、及び(c)FL-DCによるIFN $\gamma$ 産生を、ELISAで分析した。結果は、少なくとも5回の別個の実験の代表例である。「n.d.」は、「検出されず」を意味する。

10

## 【0050】

図4. インピボのHZ及び合成HZ(ヘマチン)による血清サイトカインの産生はMyD88及びTLR9依存的である：  
 1500 $\mu$ gの(a)P. falciparum精製HZ、又は(b)合成HZ(sHZ)のいずれかを、MyD88<sup>-/-</sup>マウス、TLR9<sup>-/-</sup>マウス又は野生型(WT)マウスの腹腔内に注入した。MCP-1及びIL-6の血清量は指定の時点においてELISAで測定した。

## 【0051】

図5. ヘモゾインはDNAを含まず、HZ誘導性の炎症誘導性サイトカインの産生は、DNase耐性及び熱耐性であるが、クロロキン感受性である：

20

(a) DNAの混入を検出するために、HZをアガロースゲル上に移し、臭化プロマイドで染色した。M、マーカー；レーン1、HZ溶液(1mM、5 $\mu$ l)；レーン2、熱失活HZ(1mM、5 $\mu$ l)；レーン3、DNase処理HZ(1mM、5 $\mu$ l)；レーン4P. falciparum粗抽出物(4.5%の寄生虫血症を含む100mlの濃縮培養物から5 $\mu$ l)；DNase処理粗抽出物(5 $\mu$ l)。(b) C57/B6マウスのFL-DCを、30 $\mu$ MのHZ又はDNase処理、熱失活、及び/又はCQ(10 $\mu$ M)で24時間インキュベートした。その後、上澄みを回収し、ELISAでTNF $\alpha$ 又はIL-12p40を測定した。コントロールとして、CpGODN(D35)を3 $\mu$ Mで用いた。D35のTNF $\alpha$ の値を図に示す。結果は、2度ずつ行った、3回の別個の実験の内の1つの代表例である(平均+S.D.)。\*P.<0.05、HZvsHZ+CQ；\*\*P.<0.05、CpGODNvsCpGODN+CQ。「n.d.」は、「検出されず」を意味する。

30

## 【産業上の利用可能性】

## 【0052】

本発明において、マラリア原虫-宿主間の相互作用について、HZが自然免疫を活性化する免疫反応のメカニズムを分子レベルで解明した。本発明は、この知見に基いて、マラリア感染症の診断のために用いることができるマラリア感染症の検出・測定方法、該HZの誘導によるマラリア感染症の検出・測定方法を用いたマラリア感染症のワクチン或いはマラリア感染症の予防又は治療薬のスクリーニング方法を開発したものである。更に、上記知見に基いて、HZ又は合成HZ或いはその誘導体をアジュバント或いは免疫賦活剤として用いることによる、HZの誘導によるTLR9を介し、MyD88に依存する自然免疫誘導の調節手段を開発した。

40

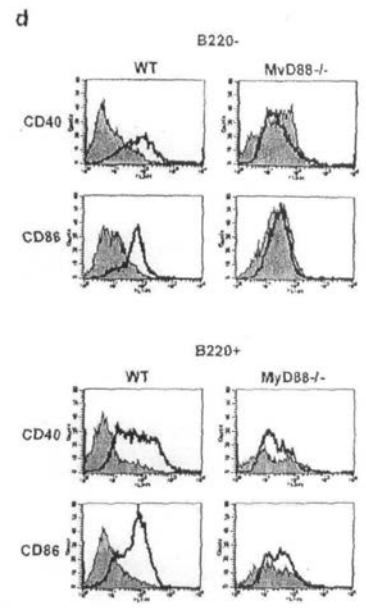
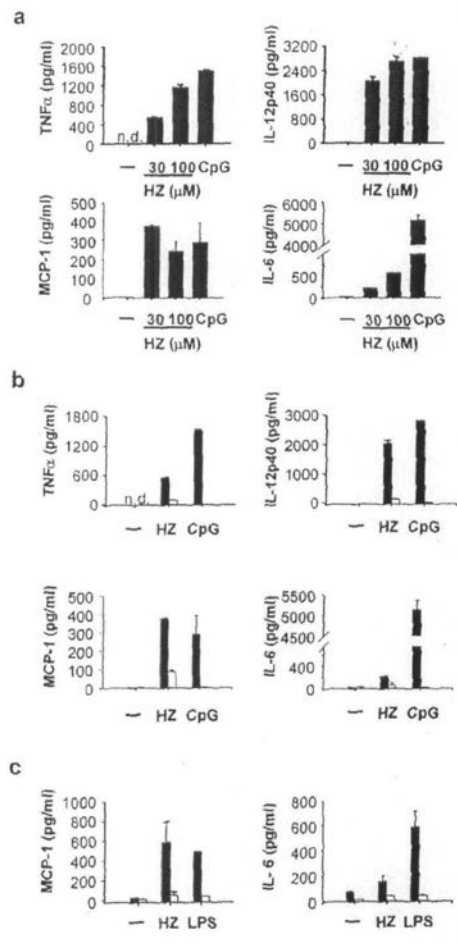
## 【0053】

本発明は、これらの開発により、マラリア感染症の診断、マラリア感染症のワクチン又は予防或いは治療薬の創製、更にはマラリア感染症に対する免疫療法としての自然免疫誘導の調節、すなわち、HZ、TLR9(Toll様受容体9)、MyD88を含む自然免疫関連分子若しくはそのシグナル経路をターゲットにしたマラリア感染症の診断、抗マラリア薬や免疫療法の開発に対処する方策を提示し、これらの分野での利用に大きな貢献が期待できるものである。そして、TLR9リガンドとして知られているCpGODNは、自然免疫賦活剤として、癌や感染症の治療薬とのCpGODNの併用療法や、抗アレルギー薬、およびワクチンアジュバントとして開発されていることから、ヘモゾイン、合成ヘモゾ

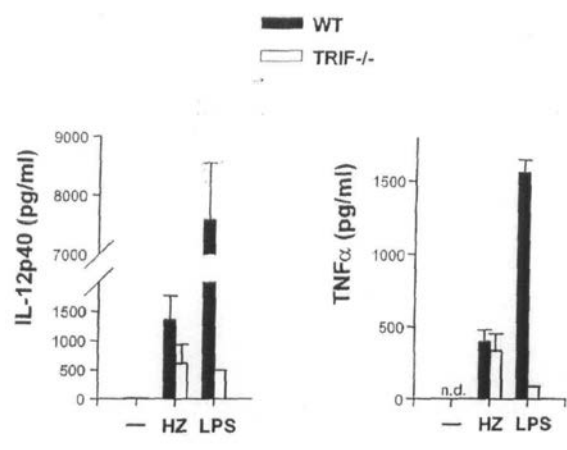
50

イン、又はそれらの誘導体は、CpGODNと同様に、自然免疫賦活剤として、癌や感染症の治療薬との併用療法や、抗アレルギー薬、およびワクチンアジュバントとして開発され得る。また、ヘモゾインはマウスPDCにおいてIFNを誘導しないことも、各種のCpGODNの活性と比較するうえで重要な知見である。

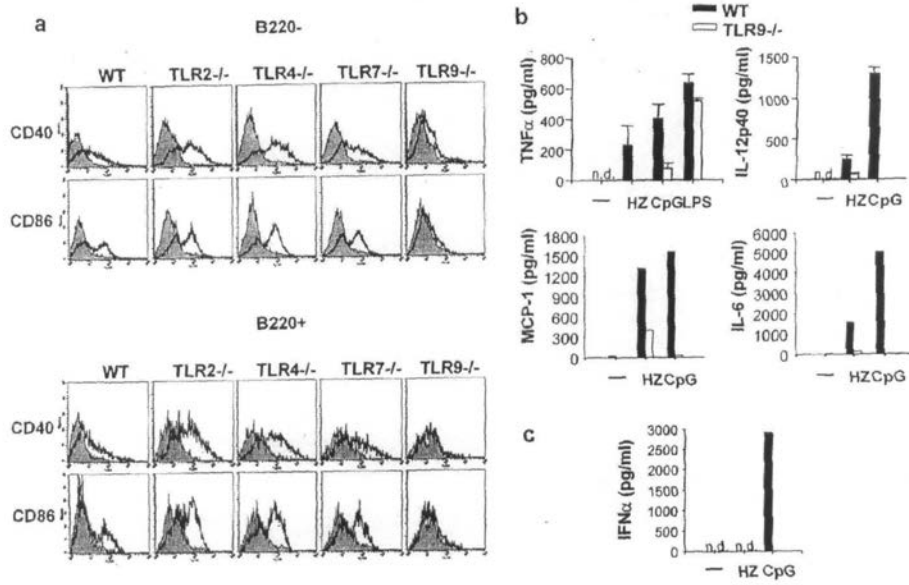
【 1 】



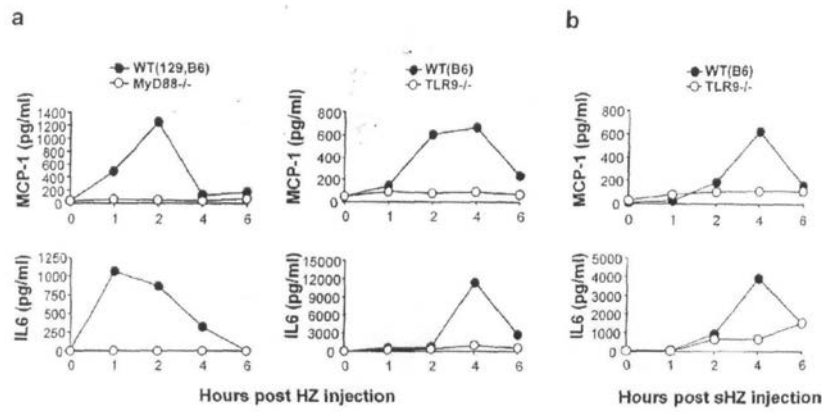
【 2 】



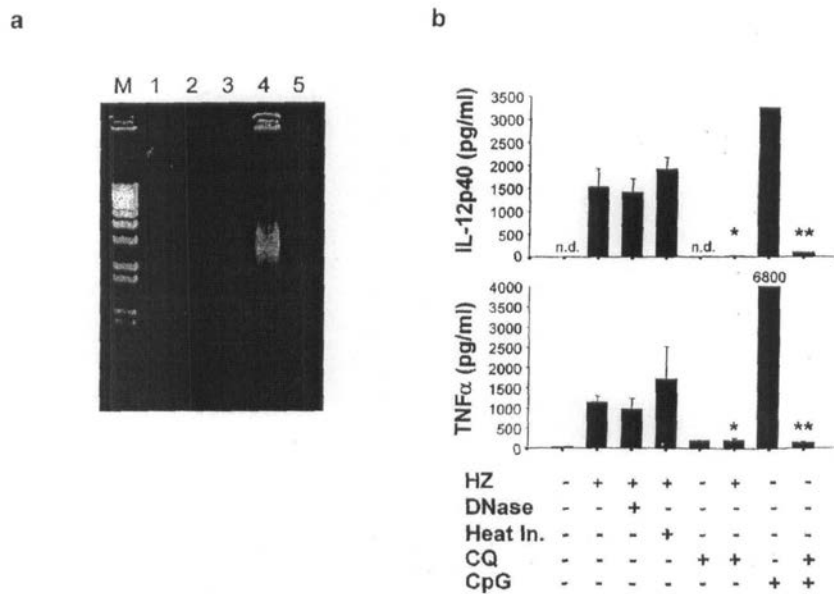
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

0004961556000001.app

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
A 6 1 K 39/002 (2006.01) A 6 1 K 39/002  
A 6 1 P 33/06 (2006.01) A 6 1 P 33/06

審査官 宮澤 浩

(56) 参考文献 特開 2 0 0 2 - 0 3 4 5 6 5 ( J P , A )  
国際公開第 0 1 / 0 5 5 3 8 6 ( W O , A 1 )  
The Journal of Immunology , vol.172 , p.4926-4933  
International Immunopharmacology , vol.4 , p.223-234  
日本免疫学会総会・学術集会記録 , 第34巻 , 第175頁左上欄 2-D-W23-17-0/P

(58) 調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12Q 1/02  
A61K 39/002  
A61P 33/06  
G01N 33/15  
G01N 33/50  
G01N 33/53  
G01N 33/569

专利名称(译)	使用hemozoin诱导的先天免疫检测和测量疟疾感染，筛选疟疾感染的预防或治疗剂，以及调节先天免疫诱导		
公开(公告)号	<a href="#">JP4961556B2</a>	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	JP2006547702	申请日	2005-11-04
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
[标]发明人	審良 静男 石井 健 チョパンジェヴァイア		
发明人	審良 静男 石井 健 チョパン ジェヴァイア		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/50 G01N33/15 A61K39/002 A61P33/06		
CPC分类号	A61K39/015 A01K2267/0387 A61K2039/572 G01N33/56905 G01N2333/445 G01N2333/70596 G01N2500/10 Y02A50/58		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA G01N33/53.P G01N33/569.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K39/002 A61P33/06		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	2004357255 2004-12-09 JP		
其他公开文献	JPWO2006061965A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供一种利用血红素 ( HZ ) 诱导检测和测量疟疾感染的方法;使用检测和测量方法筛选疟疾感染的疫苗和疟疾感染的预防或治疗剂的方法;以及使用HZ, 合成HZ或其衍生物作为佐剂或免疫刺激剂来调节先天免疫的诱导的手段。通过检测和测量HZ诱导的, TLR9介导的和MyD88依赖性先天免疫活性来检测和测量疟疾感染。疟疾感染的检测和测量可用于诊断疟疾感染。检测和测量的方法也用于筛选疟疾感染的疫苗和疟疾感染的预防或治疗剂。此外, HZ, 合成HZ或其衍生物用作佐剂或免疫刺激剂以调节HZ诱导的先天性免疫诱导。

