

(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2010-514805

(P2010-514805A)

(43) 公表日 平成22年5月6日(2010.5.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47 ZNA	4B024
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4B063
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4C085
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 H	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-544308 (P2009-544308)	(71) 出願人	308032460
(86) (22) 出願日	平成19年12月28日 (2007.12.28)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ コロラド
(85) 翻訳文提出日	平成21年7月30日 (2009.7.30)		アメリカ合衆国 コロラド 80203, デンバー, グラント ストリート 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/089125		800, 8ティーエイチ フロアー
(87) 国際公開番号	W02008/083331	(74) 代理人	100068755
(87) 国際公開日	平成20年7月10日 (2008.7.10)		弁理士 恩田 博宣
(31) 優先権主張番号	60/882, 815	(74) 代理人	100105957
(32) 優先日	平成18年12月29日 (2006.12.29)		弁理士 恩田 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100142907
			弁理士 本田 淳
		(74) 代理人	100149641
			弁理士 池上 美穂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断上および治療上の標的ならびにその用途

(57) 【要約】

自己免疫性の1型糖尿病(T1D)、他の自己免疫疾患、ならびに他の糖尿病関連の疾患および状態における、自己抗原標的としてのZnT8の同定について述べる。さらに、この発見に基づいた様々な治療上、診断上および予後判定上のツールおよび方法についても述べる。疾患過程の開始および臨床的糖尿病に至る自己免疫性の進行において重要な役割を果たすものとしてのZnT8の遺伝的多様性の同定について開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 1 0 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 2】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 2 5 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 3】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 5 0 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

10

【請求項 4】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 7 5 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 5】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 1 0 0 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 6】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 1 0 1 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 7】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 1 0 2 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

20

【請求項 8】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 1 0 4 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 9】

Z n T 8 の C 末端の少なくとも 3 5 0 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 1 0】

少なくともアミノ酸配列 S L T I Q M E S (配列番号 2 の 3 4 6 ~ 3 5 3 位) を含むか、前記アミノ酸配列で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸配列で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

30

【請求項 1 1】

配列番号 2 に関して E 3 5 2 および S 3 5 3 から成る群から選択されたアミノ酸部位を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のフラグメント。

【請求項 1 2】

Z n T 8 はヒト Z n T 8 (配列番号 2) である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のフラグメント。

【請求項 1 3】

配列番号 2 の 3 2 5 位を含む、請求項 1 2 に記載のフラグメント。

40

【請求項 1 4】

Z n T 8 は配列番号 2 の多型パリアントである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のフラグメント。

【請求項 1 5】

配列番号 2 の 3 2 5 位を含む、請求項 1 4 に記載のフラグメント。

【請求項 1 6】

3 2 5 位のアミノ酸はトリプトファンである、請求項 1 5 に記載のフラグメント。

【請求項 1 7】

3 2 5 位のアミノ酸はグルタミンである、請求項 1 5 に記載のフラグメント。

【請求項 1 8】

50

Z n T 8 の N 末端の少なくとも 1 0 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 1 9】

Z n T 8 の N 末端の少なくとも 2 5 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 2 0】

Z n T 8 の N 末端の少なくとも 5 0 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 2 1】

Z n T 8 の N 末端の少なくとも 7 4 アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される、Z n T 8 のフラグメント。

10

【請求項 2 2】

配列番号 8 ~ 2 4 または 4 0 ~ 6 5 のうちいずれか 1 つによって表わされるフラグメントを含むか、前記フラグメントで本質的に構成されるか、または前記フラグメントで構成される、Z n T 8 のフラグメント。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれかに記載の任意の 2 つ以上のフラグメントを含むか、前記フラグメントで本質的に構成されるか、または前記フラグメントで構成される、キメラタンパク質。

【請求項 2 4】

Z n T 8 の N 末端フラグメントおよび Z n T 8 の C 末端フラグメントを含む、請求項 2 3 に記載のキメラタンパク質。

20

【請求項 2 5】

キメラタンパク質は Z n T 8 の C 末端フラグメントを 2 つ含み、該フラグメントはそれぞれアミノ酸部位 3 2 5 を含み、かつ該フラグメントはそれぞれ 3 2 5 位に異なるアミノ酸を含む、請求項 2 3 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 6】

1 つのフラグメントは 3 2 5 位にアルギニンを含み、別のフラグメントは 3 2 5 位にトリプトファンを含む、請求項 2 5 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 7】

抗 Z n T 8 抗体が選択的に結合する少なくとも 1 つの Z n T 8 エピトープを含む、Z n T 8 フラグメントまたは Z n T 8 相同体。

30

【請求項 2 8】

抗 Z n T 8 抗体は個体から得られた抗体である、請求項 2 7 に記載の Z n T 8 フラグメントまたは Z n T 8 相同体。

【請求項 2 9】

前記個体は 1 型糖尿病であるか、または 1 型糖尿病の疑いがある、請求項 2 7 に記載の Z n T 8 フラグメントまたは Z n T 8 相同体。

【請求項 3 0】

Z n T 8 特異的 T 細胞受容体によって特異的に認識される少なくとも 1 つの Z n T 8 エピトープを含む、Z n T 8 フラグメントまたは Z n T 8 相同体。

40

【請求項 3 1】

前記個体は 1 型糖尿病であるか、または 1 型糖尿病の疑いがある、請求項 3 0 に記載の Z n T 8 フラグメントまたは Z n T 8 相同体。

【請求項 3 2】

フラグメントまたはキメラタンパク質は、該フラグメントまたはキメラタンパク質が細胞または組織もしくは身体の一部を標的とするように、少なくとも 1 つの標的指向性部分と複合体化される、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載のフラグメントまたはキメラタンパク質。

【請求項 3 3】

50

標的指向性部分はT細胞を標的とする、請求項32に記載のフラグメントまたは相同体。

【請求項34】

標的指向性部分はZnT8特異的な自己反応性T細胞を標的とする、請求項32に記載のフラグメントまたは相同体。

【請求項35】

T細胞もしくはB細胞においてアポトーシスを引き起こす毒素、またはT細胞もしくはB細胞に対して別の毒性を有する毒素と複合体化される、請求項1～31のいずれか1項に記載のフラグメントまたはキメラタンパク質。

【請求項36】

フラグメントまたはキメラタンパク質は検出可能な標識に連結される、請求項1～31のいずれか1項に記載のフラグメントまたはキメラタンパク質。

【請求項37】

天然に存在するZnT8タンパク質との同一性が99%未満であり、かつ配列番号2に少なくとも90%同一なタンパク質を含む、ZnT8の相同体。

【請求項38】

該タンパク質は配列番号2に少なくとも95%同一である、請求項37に記載の相同体。

【請求項39】

該タンパク質は、配列番号2の325位を含み、325位のアミノ酸はアルギニン、トリプトファンまたはグルタミンである、請求項37または請求項38に記載の相同体。

【請求項40】

ZnT8またはそのパリアントもしくはフラグメントを含むワクチンであって、個体においてZnT8特異的な自己反応性T細胞を抑制または除去する免疫応答を誘発することを特徴とするワクチン。

【請求項41】

ZnT8またはそのフラグメントもしくはパリアントに選択的に結合し、個体においてZnT8特異的な自己免疫応答を抑制または低減する、抗体または該抗体の抗原結合フラグメント。

【請求項42】

モノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項41に記載の抗体。

【請求項43】

自己免疫疾患にかかりやすいか、または自己免疫疾患を発症しつつある個体を診断する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含み、該個体において陰性対照と比較して抗体の増加が検出されるとその個体は自己免疫疾患にかかりやすいかまたは自己免疫疾患を発症しつつあることが示されることを特徴とする方法。

【請求項44】

325位のアミノ酸がアルギニンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

325位のアミノ酸がトリプトファンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

325位のアミノ酸がグルタミンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項47】

325位のアミノ酸がアルギニンまたはトリプトファンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項48】

10

20

30

40

50

自己免疫疾患にかかりやすいか、または自己免疫疾患を発症しつつある個体を診断する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8特異的なT細胞応答を検出することを含み、該個体において陰性対照と比較してZnT8特異的なT細胞応答の増加が検出されるとその個体は自己免疫疾患にかかりやすいかまたは自己免疫疾患を発症しつつあることが示されることを特徴とする方法。

【請求項49】

325位にアルギニンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

325位にトリプトファンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項48に記載の方法。

10

【請求項51】

325位にグルタミンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項48に記載の方法。

【請求項52】

325位にアルギニンまたはトリプトファンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項48に記載の方法。

【請求項53】

個体が自己免疫疾患にかかりやすいかまたは自己免疫疾患を発症しつつある場合、該方法は、該個体において325位のアミノ酸を含むZnT8エピトープを標的とする治療薬を該個体に投与することをさらに含む、請求項43～52のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項54】

該治療薬はZnT8タンパク質に対する該個体の免疫応答を寛容化する、該個体のZnT8のタンパク質、ペプチドまたはアゴニストである、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

該治療薬はZnT8タンパク質に対する免疫応答を刺激する、請求項53に記載の方法。

【請求項56】

自己免疫疾患は1型糖尿病である、請求項43～55のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

個体における1型糖尿病自己免疫の、初期の良性の自己反応性から破壊的な膵島炎への進行を監視する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含み、該個体において、同じ個体の以前の抗体測定と比較して抗体の増加が検出されると、該個体が破壊的な膵島炎に向かって進行していることが示されることを特徴とする方法。

30

【請求項58】

325位のアミノ酸がアルギニンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

325位のアミノ酸がトリプトファンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項57に記載の方法。

40

【請求項60】

325位のアミノ酸がグルタミンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項57に記載の方法。

【請求項61】

325位のアミノ酸がアルギニンまたはトリプトファンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項57に記載の方法。

【請求項62】

個体における1型糖尿病自己免疫の、初期の良性の自己反応性から破壊的な膵島炎への進行を監視する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8特異的なT細胞応答を

50

検出することを含み、該個体において、同じ個体の以前のZnT8特異的なT細胞応答の測定と比較してZnT8特異的なT細胞応答の増加が検出されると、該個体が破壊的な膵島炎に向かって進行していることが示されることを特徴とする方法。

【請求項63】

325位にアルギニンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

325位にトリプトファンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項65】

325位にグルタミンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項66】

325位にアルギニンまたはトリプトファンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項67】

糖尿病前症の個体における、1型糖尿病の予防、1型糖尿病の発症の遅延、または自己免疫の軽減のための治療の有効性を観察する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含み、該個体において、同じ個体の以前の抗体測定と比較して抗体の減少またはほぼ同レベルの抗体が検出されると、治療が有効であることが示され、また該個体において、同じ個体の以前の抗体測定と比較して抗体の増加が検出されると、治療が有効ではないことが示されることを特徴とする方法。

【請求項68】

325位のアミノ酸がアルギニンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

325位のアミノ酸がトリプトファンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項70】

325位のアミノ酸がグルタミンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項71】

325位のアミノ酸がアルギニンまたはトリプトファンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項72】

糖尿病前症の個体における、1型糖尿病の予防、1型糖尿病の発症の遅延、または自己免疫の軽減のための治療の有効性を観察する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8特異的なT細胞応答を検出することを含み、

該個体において、同じ個体の以前のZnT8特異的なT細胞応答の測定と比較してZnT8特異的なT細胞応答の減少またはほぼ同レベルのZnT8特異的なT細胞応答が検出されると、治療が有効であることが示され、

該個体において、同じ個体の以前のZnT8特異的なT細胞応答の測定と比較してZnT8特異的なT細胞応答の増加が検出されると、治療が有効ではないことが示されることを特徴とする方法。

【請求項73】

325位にアルギニンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

325位にトリプトファンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項72に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 75】

325位にグルタミンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項72に記載の方法。

【請求項 76】

325位にアルギニンまたはトリプトファンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項 77】

該方法は、放射免疫沈降アッセイ、ELISA、時間分解蛍光アッセイ、および発光アッセイからなる群から選択されたアッセイの使用を含む、請求項43~47、53~61、または67~71のうちいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 78】

該方法は競合的ユーロピウムアッセイの使用を含む、請求項43~47、53~61、または67~71のうちいずれか1項に記載の方法。

【請求項 79】

該方法は、T細胞増殖アッセイ、可溶性MHCテトラマーを使用する結合アッセイ、可溶性T細胞受容体を使用する結合アッセイ、およびELISPOTアッセイからなる群から選択されたアッセイの使用を含む、請求項48~56、62~66、または72~76のうちいずれか1項に記載の方法。

【請求項 80】

該方法は、ZnT8またはそのフラグメントもしくはバリエーションの使用を含む、請求項43~79のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 81】

請求項43~47、53~61、または67~71のいずれか1項に記載の方法を実施するためのアッセイ・キットであって、

(a) ZnT8タンパク質またはそのバリエーションもしくはフラグメント；

(b) ZnT8に選択的に結合する抗体を検出するための1もしくは複数の試薬を含むキット。

【請求項 82】

請求項48~56、62~66、または72~76のいずれか1項に記載の方法を実施するためのアッセイ・キットであって、

(a) ZnT8タンパク質またはその相同体もしくはフラグメント；

(b) ZnT8特異的なT細胞応答を検出するための1もしくは複数の試薬を含むキット。

30

【請求項 83】

自己免疫疾患の予防、自己免疫疾患の発症の遅延、または自己免疫疾患の個体における自己免疫の軽減のための方法であって、自己免疫疾患の標的とされている患者体内の細胞または組織を保護するZnT8特異的な免疫応答を誘発する作用物質を、前記予防、前記遅延、または前記軽減を必要とする個体に投与することを含む方法。

【請求項 84】

自己免疫疾患は1型糖尿病であり、作用物質は膵島の細胞を保護することを特徴とする、請求項83に記載の方法。

40

【請求項 85】

自己免疫疾患の予防、自己免疫疾患の発症の遅延、または自己免疫疾患の個体における自己免疫の軽減のための方法であって、該個体においてZnT8特異的なT細胞を標的とし、かつZnT8特異的なT細胞のネクローシスまたはアポトーシスを誘導する作用物質を、前記予防、前記遅延、または前記軽減を必要とする個体に投与することを含む方法。

【請求項 86】

自己免疫疾患は1型糖尿病であり、作用物質はZnT8特異的なT細胞のネクローシスまたはアポトーシスを誘導することを特徴とする、請求項85に記載の方法。

【請求項 87】

50

自己免疫疾患の予防、自己免疫疾患の発症の遅延、または自己免疫疾患の個体における自己免疫の軽減のための方法であって、該個体においてZnT8特異的なT細胞に寛容性を生じさせる作用物質を、前記予防、前記遅延、または前記軽減を必要とする個体に投与することを含む方法。

【請求項88】

自己免疫疾患は1型糖尿病であり、作用物質は個体においてZnT8特異的なT細胞に寛容性を生じさせることを特徴とする、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

作用物質はZnT8、ZnT8の相同体、ZnT8のフラグメント、またはZnT8の合成ミメティックである、請求項83～88のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項90】

作用物質は、請求項1～38のいずれか1項に記載のフラグメントもしくはキメラタンパク質、相同体、またはそのフラグメントである、請求項89に記載の方法。

【請求項91】

作用物質は、個体におけるZnT8の結合について、個体体内の天然の自己抗体と競合する抗体である、請求項83～88のいずれか1項に記載の方法。

【請求項92】

作用物質は、325位にアルギニンを含むヒトZnT8の多型バリエーションに特異的である、請求項83～91のいずれか1項に記載の方法。

【請求項93】

作用物質は、325位にトリプトファンを含むヒトZnT8の多型バリエーションに特異的である、請求項83～91のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項94】

作用物質は、325位にグルタミンを含むヒトZnT8の多型バリエーションに特異的である、請求項83～91のいずれか1項に記載の方法。

【請求項95】

ZnT8、ZnT8のバリエーション、ZnT8のフラグメント、ZnT8の合成ミメティック、または前記ZnT8、前記ZnT8の相同体もしくは前記ZnT8のフラグメントに結合する抗体の、本明細書中に詳述されているような診断方法、予後判定方法または治療方法における使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して、自己抗原標的の同定、具体的には自己免疫性の1型糖尿病(T1D)における自己抗原標的の同定、さらに具体的には、新規な自己抗原としてのタンパク質ZnT8の同定に関し、該自己抗原は治療上、診断上および予後判定上のツールおよび方法の基盤となり、該ツールおよび方法は本明細書において説明される。

【背景技術】

【0002】

関連出願の相互参照

40

本願は、2006年12月29日に出願された米国仮特許出願第60/882,815号の全開示内容を援用する。

【0003】

本発明の背景技術

自己免疫疾患は、その身体自身の組織に対する免疫応答によって引き起こされる状態である。自己免疫疾患は、1種類以上の身体組織の破壊、器官の成長異常、または器官機能の変化をもたらす。該疾患は、1種類の器官または組織だけに影響を及ぼす場合もあれば、複数の器官および組織に影響を及ぼす場合もある。

【0004】

ヒトの自己免疫性の1型糖尿病(T1D)およびNODマウスモデルは多遺伝子性のT

50

細胞依存型自己免疫疾患であり、重要な免疫調節機構に先天性な欠陥を有する高感受性の個体(5)(例えば、自己に対して防御免疫応答ではなく病原性免疫応答を示す個体)における細胞抗原に対する寛容性の破綻(4)から生じるランゲルハンス島の細胞の選択的な破壊(1~3)を特徴とする。細胞と同じ発生上の系譜を共有し、細胞と直接接触することの多い膵臓の外分泌および内分泌細胞はほとんど影響を受けず、細胞が失われると膵島炎が解消することから、自己免疫の標的は主として細胞特異的であることが示唆される。インスリンおよびIGRPのような既知の糖尿病自己抗原の多くはこの細胞特異性を反映するが、既知の免疫標的のリストは決して包括的なものではない。このことは、細胞性免疫によって認識される抗原に特に当てはまり、大多数の糖尿病誘発性CD4⁺T細胞の標的は、10年を超える調査にもかかわらず捉えがたいままである。GAD65、IA-2およびICA69のような分子を最初に同定した免疫学的スクリーニング法を使用しても近年は新しい標的はほとんど明らかとなっていない。

10

【0005】

T1Dの強い遺伝的素因を備えた多くの人が顕性の疾患を発症せず(1人が糖尿病である一卵性双子の50%は不一致なままである)、非生殖細胞系列にコードされた要因はT1Dの進行速度に著しく影響を及ぼす(7)。このように浸透度が低く自然経過が可変的であることは、環境要因の重要性を指し示し、また免疫応答自体の確率的性質を示している。このバランスをより免疫寛容性の高い環境へと変化させる治療戦略は、自己免疫性が破壊的な膵島炎へと進行するのを防止または遅延させる可能性を有する。

【0006】

NODマウスの初期の膵臓浸潤巣では膵島細胞反応性のT細胞クローンの数は限られているようであり(16;17)、疾患の進行には、新しい自己抗原の動員(20)と共にエピトープスプレディング(epitope spreading)(18)および初期T細胞応答の親和力成熟(19)を必要とするようである。多数の膵島特異的CD4⁺およびCD8⁺T細胞クローンが、前糖尿病または糖尿病になったばかりのNODマウスの脾臓、リンパ節または膵島浸潤巣から分離されている(21~25)が、そのコグネイト抗原は十分には明らかにされず、またGAD65、インスリン顆粒膜タンパク質であるICA512(IA-2)およびフォグリン(IA-2)(20)、カルボキシペプチダーゼE(26)、ICA69(27)ならびに硫酸化された糖脂質(28)のようなヒトの糖尿病自己免疫の既知の血清学的マーカーのいずれにも相当するようには見えない。自己反応性T細胞の分子標的には、細胞の未確認の構成成分、または体液性応答を実質的に誘発することができない既知の細胞タンパク質のいずれかを挙げるができる。従って、該T細胞のコグネイト抗原を明らかにすることは依然として重要な目標であり、最近のゲノム技術およびプロテオーム技術の進歩とともに現在は現実的な目標のようである。こうして、十分に研究されたNY8.3 CD8⁺クローン(23)の標的は、高感度のバイオアッセイと、NIT1インスリノーマ細胞由来のH-2K^d分子から溶出されたプロテオームペプチドの分析との組み合わせを使用して、細胞タンパク質IGRP(膵島グルコース6-ホスファターゼ関連タンパク質)に由来するペプチドであることが最近示された(29)。

20

30

【0007】

体液性応答自体は恐らく該疾患の病原論にはほとんど寄与しない(30)が、B細胞はT1Dにおける抗原提示に役割を果たす(31)ので、Bリンパ球の分子標的の同定も重要な目的である。さらに、循環血中の自己抗体は、糖尿病自己免疫の有用な前臨床マーカーを提供する。高親和性抗体の産生はT細胞依存性のプロセスであり、したがって、自己抗体によって認識される分子が糖尿病誘発性の自己反応性T細胞の標的でもあるはずだと予想するのは合理的である。この仮説は、少なくともインスリン、フォグリンおよびGAD65については正しいようである(32~34)。既知の標的は数多くあるが、全く包括的ではない。このことは、分子のことで定義された自己抗原の中にはない別の標的を明らかにするというだけの理由で、ヒト膵臓の免疫組織化学的分析によって決定される前T1Dの血清学的診断法が依然として最も高感度の指標であるという事実から明らかであ

40

50

る。

【0008】

一次自己抗原または開始自己抗原が、T1Dおよびその他の自己免疫疾患に存在するかどうかに関しては、論争が続いている。T1Dについては、現時点でのNODマウスにおける最良の候補はインスリンである(33; 35~38)が、膵島浸潤巢中にIGRP抗原を認識するT細胞の前駆体が存在する頻度に基づいて、IGRPがこの重大な役割を果たす可能性があるとも提唱されてきた(29; 39; 40)。別の見方は、本来は同分子に対する調節性の細胞を生成する正常な免疫寛容機構の破綻による、ポリクローナルな活性化から疾患が起きるということである(41)。後者の筋書きであるとして、本発明者らは、T1Dにおける自己免疫の重要な標的であるあらゆる分子が、抗原療法で使用する候補であると仮定する。インスリン(42; 43)、GAD65(44~48)、HSP65(49)およびIGRP(50)の天然のエピトープを用いた免疫化に基づく、NODマウスで有効な寛容化戦略は、これを支持するよう見える。さらに、IA-2およびフォグリンを用いた本発明者らの予備的研究は、既知のマウスおよびヒトのペプチドエピトープ(ペプチド7(51))が、NODマウスに新生児期投与すると、同じように疾患の発症を遅らせることを示している。他の既知のT細胞標的、例えばIAPP(52)、IMOGEN38(53~57)は、この点に関しては特徴解析されていないようである。

10

【0009】

配列相同性に基づいた自己抗原とウイルスタンパク質との間の分子擬態と推定される例は、科学文献に数多く存在する(58)。例えば、T1Dの場合、GAD65とコクサッキーB3 P2-Cタンパク質(59)またはヒトサイトメガロウイルスの主要DNA結合タンパク質(60)との間、およびIA-2とロタウイルスVP7(61)またはコクサッキーB4 VP1(62)との交差反応性が提言されている。同様に、プロインスリンとGAD65との間の擬態も提唱されている(63)。分子模倣体と接触すると、免疫ネットワークの確立および統合により、自己免疫が誘発されるかまたは該分子模倣体に対する防御がなされるかのいずれかが考えられる。人での感染因子による自己免疫誘発の疫学的調査は、恐らくは該疾患の前駆症状が長いことと、関与する特定の生物体(または一般的病原体のまれな血清型)の同定の失敗から、特に有益なものではなかった(14)。まさにその性質から「衛生仮説」の中心となる防御反応を確立するのは一層困難である。

20

30

【0010】

非肥満性糖尿病(NOD)マウスは現時点で最良のヒトT1Dのモデルであり(8)、疾患進行の3つの病期、すなわち自己反応性T細胞の増殖(「チェックポイント0」)、該細胞の膵島へのホーミング(「チェックポイント1」)、および良性の膵島周囲炎(peri-insulinitis)から侵襲性の膵島炎へと移行とその結果としての細胞の破壊(「チェックポイント2」)が明白である(9)。「チェックポイント0」の通過は、膵リンパ節における細胞抗原の提示の増強をもたらす膵島細胞アポトーシスの高まりと同時に起こると提唱されてきた。関連する仮説は、この時(離乳している場合)に腸内で新しい抗原と接触する結果、Th1優位なT細胞活性化が起こり、該細胞が続いて膵臓に移動し、流入リンパ節内での反応を混乱させる結果、膵島細胞抗原に対する免疫原性の応答が生じることを示唆している。出生後の膵島細胞アポトーシス(10)、先天性の細胞異常(11)、および食餌(12; 13)または腸内ウイルス(14)の要因が同様に関与することも、ヒトのT1Dにおいて提言されているが、現時点では、これらの相対的な役割(ある場合)、および偶発的要因としての一般論は、依然として論争の的になったままである。しかしながら、膵島細胞抗原が該疾患の過程にとって極めて重要であること(15)、該抗原の分子特性についての詳細な知識が、免疫療法の合理的な設計、ならびに危険な状態にある個体の監視および同定のいずれにとっても必要であることは明らかである。

40

【0011】

米国だけでも200万人以上の1型糖尿病患者がおり、該患者はみな生き続けるために1日複数回のインスリン投与を生涯必要としている。これらの人々の大多数は生涯のうち

50

に糖尿病の合併症に苦しむことになり、年齢に関係なく寿命が最大で3分の1縮む可能性がある」とされている。従って、該疾患の予防、または発症を遅らせるだけでも、大きな社会的かつ経済的利益となるであろう。T1Dのげっ歯動物モデルにおいて非常に有効であることが判明し、現在は臨床試験で調べられている、糖尿病の予防および好転のための実験的な手法がいくつかある。例えば、抗CD3モノクローナル抗体療法を用いた予備的所見は特に有望である。効果的とするために、いかなる免疫療法も、治療介入が適切かどうかを立証し、またその疾患の病期に対していつ治療を実施するかを定めるための診断テストを必要とする。治療が始まれば、その短期および長期の有効性を評価することが必要である。疾患の進行を監視するのに役立つ、自己抗原への体液性または細胞性の自己反応に基づいた診断アッセイは、患者を治療するための何らかの決定を下すにあたって、またその後の治療結果の監視において、不可欠である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、疾患標的に基づいた新しい免疫療法だけでなく、改善されたT1D診断アッセイが当分野において必要とされ続けている。さらに、T1Dのような1つの自己免疫疾患で同定された多くの標的が、他の自己免疫疾患においても標的である場合があり、その結果として利用可能な診断方法および治療方法が様々な自己免疫状態に広がることになる。

【課題を解決するための手段】

20

【0013】

本発明の1つの実施形態は、ZnT8の様々なフラグメントに関する。1つの態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも10アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。1つの態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも25アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。別の態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも50アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。別の態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも75アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。さらに別の態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも100アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。1つの態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも101アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。1つの態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも102アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。別の態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも104アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。1つの態様では、フラグメントはZnT8のC末端の少なくとも350アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。別の態様では、フラグメントは少なくともアミノ酸配列SLTIQMES（配列番号2の346～353位）を含むか、前記アミノ酸配列で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸配列で構成される。1つの態様では、フラグメントはZnT8のN末端の少なくとも10アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。1つの態様では、フラグメントはZnT8のN末端の少なくとも25アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。別の態様では、フラグメントはZnT8のN末端の少なくとも50アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。1つの態様では、フラグメントはZnT8のN末端の少なくとも74アミノ酸を含むか、前記アミノ酸で本質的に構成されるか、または前記アミノ酸で構成される。

30

40

【0014】

50

本発明の上記態様のうちいずれにおいても、フラグメントは、配列番号2に関してE352およびS353から成る群から選択されたアミノ酸部位を含むことができる。

本発明の上記態様のうちいずれにおいても、ZnT8はヒトZnT8(配列番号2)であってよい。1つの態様では、フラグメントは配列番号2の325位を含む。別の態様では、ZnT8は配列番号2の多型バリエーションである。別の態様では、フラグメントは配列番号2の325位を含み、かつ本発明のこの態様の1つの実施形態では、325位のアミノ酸はトリプトファン、グルタミン、またはアルギニンである。

【0015】

本発明の別の実施形態は、配列番号8~24または40~65のうちいずれか1つによって表わされるフラグメントを含むか、前記フラグメントで本質的に構成されるか、または前記フラグメントで構成される、ZnT8フラグメントに関する。

10

【0016】

本発明の1つの実施形態は、本明細書中に記載されるような任意の2つ以上のフラグメントを含むか、前記フラグメントで本質的に構成されるか、または前記フラグメントで構成される、キメラタンパク質に関する。1つの態様では、キメラタンパク質はZnT8のN末端フラグメントおよびZnT8のC末端フラグメントを含む。別の態様では、キメラタンパク質はZnT8のC末端フラグメントを2つ含み、該フラグメントはそれぞれアミノ酸部位325を含み、かつ該フラグメントはそれぞれ325位に異なるアミノ酸を含む。1つの態様では、1つのフラグメントは325位にアルギニンを含み、別のフラグメントは325位にトリプトファンを含む。

20

【0017】

本発明のさらに別の実施形態は、抗ZnT8抗体が選択的に結合する少なくとも1つのZnT8エピトープを含む、ZnT8フラグメントまたはZnT8相同体に関する。1つの態様では、抗ZnT8抗体は個体から得られた抗体である。1つの態様では、前記個体は1型糖尿病であるか、1型糖尿病の疑いがある。

【0018】

本発明の別の実施形態は、ZnT8特異的T細胞受容体によって特異的に認識される少なくとも1つのZnT8エピトープを含む、ZnT8フラグメントまたはZnT8相同体に関する。1つの態様では、請求項30のZnT8フラグメントまたはZnT8相同体であって、個体は1型糖尿病であるか、1型糖尿病の疑いがあることを特徴とする。

30

【0019】

上記実施形態のうちいずれにおいても、1つの態様では、フラグメントまたはキメラタンパク質は、該フラグメントまたはキメラタンパク質が細胞または組織もしくは身体の部位を標的とするように、少なくとも1つの標的指向性(ターゲティング)部分と複合体化される。1つの態様では、標的指向性部分はT細胞を標的とする。別の態様では、標的指向性部分はZnT8特異的な自己反応性T細胞を標的とする。

【0020】

上記実施形態のうちいずれにおいても、1つの態様では、フラグメントまたはキメラタンパク質は、T細胞もしくはB細胞においてアポトーシスを引き起こす毒素、またはT細胞もしくはB細胞に対して別の毒性を有する毒素と、複合体化される。

40

【0021】

上記実施形態のうちいずれにおいても、1つの態様では、フラグメントまたはキメラタンパク質は検出可能な標識に連結される。

本発明の別の実施形態は、天然に存在するZnT8タンパク質との同一性が99%未満であり、かつ配列番号2に少なくとも90%同一なタンパク質を含む、ZnT8の相同体に関する。1つの態様では、該タンパク質は配列番号2に少なくとも95%同一である。別の態様では、該タンパク質は、配列番号2の325位を含み、325位のアミノ酸はアルギニン、トリプトファンまたはグルタミンである。

【0022】

本発明の別の実施形態は、ZnT8またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む

50

ワクチンであって、個体においてZnT8特異的な自己反応性T細胞を抑制または除去する免疫応答を誘発するワクチンに関する。

【0023】

本発明の別の実施形態は、ZnT8またはそのフラグメントもしくはバリエーションに選択的に結合し、個体においてZnT8特異的な自己免疫応答を抑制または低減する抗体または該抗体の抗原結合フラグメントに関する。1つの態様では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0024】

本発明のさらに別の実施形態は、自己免疫疾患にかかりやすいか、または自己免疫疾患を発症しつつある個体を診断する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含み、該個体において陰性対照と比較して抗体の増加が検出されるとその個体は自己免疫疾患にかかりやすいかまたは自己免疫疾患を発症しつつあることが示されることを特徴とする方法に関する。1つの態様では、該方法は、325位のアミノ酸がアルギニン、トリプトファン、および/またはグルタミンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む。

10

【0025】

本発明の別の実施形態は、自己免疫疾患にかかりやすいか、または自己免疫疾患を発症しつつある個体を診断する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8特異的なT細胞応答を検出することを含み、該個体において陰性対照と比較してZnT8特異的なT細胞応答の増加が検出されるとその個体は自己免疫疾患にかかりやすいかまたは自己免疫疾患を発症しつつあることが示されることを特徴とする方法に関する。1つの態様では、該方法は、325位にアルギニンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む。1つの態様では、該方法は、325位のアミノ酸がアルギニン、トリプトファン、および/またはグルタミンであるヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む。

20

【0026】

上記方法のうちいずれにおいても、個体が自己免疫疾患にかかりやすいかまたは自己免疫疾患を発症しつつある場合、該方法は、該個体において325位のアミノ酸を含むZnT8エピトープを標的とする治療薬を該個体に投与することをさらに含むことができる。1つの態様では、該治療薬は、該個体のZnT8タンパク質に対する免疫応答を寛容化する、該個体のZnT8のタンパク質、ペプチドまたはアゴニストである。1つの態様では、該治療薬は、ZnT8タンパク質に対する免疫応答を刺激する。

30

【0027】

上記方法のうちいずれにおいても、1つの態様では、自己免疫疾患は1型糖尿病である。

本発明の別の実施形態は、個体における1型糖尿病自己免疫の、初期の良性の自己反応性から破壊的な膵島炎への進行を監視する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含み、該個体において、同じ個体の以前の抗体測定と比較して抗体の増加が検出されると、該個体が破壊的な膵島炎に向かって進行していることが示されることを特徴とする方法に関する。1つの態様では、該方法は、325位のアミノ酸がアルギニン、トリプトファン、および/またはグルタミンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む。

40

【0028】

本発明の別の実施形態は、個体における1型糖尿病自己免疫の、初期の良性の自己反応性から破壊的な膵島炎への進行を監視する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8特異的なT細胞応答を検出することを含み、該個体において、同じ個体の以前のZnT8特異的なT細胞応答の測定と比較してZnT8特異的なT細胞応答の増加が検出されると、該個体が破壊的な膵島炎に向かって進行していることが示されることを特徴とする方法に関する。1つの態様では、該方法は、325位にアルギニン、トリプトファン、および/またはグルタミンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む

50

。

【0029】

本発明のさらに別の実施形態は、糖尿病前症の個体における、1型糖尿病の予防、1型糖尿病の発症の遅延、または自己免疫の軽減のための治療の有効性を観察する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含み、該個体において、同じ個体の以前の抗体測定と比較して抗体の減少またはほぼ同レベルの抗体が検出されると、治療が有効であることが示され、また該個体において、同じ個体の以前の抗体測定と比較して抗体の増加が検出されると、治療が有効ではないことが示されることを特徴とする方法に関する。1つの態様では、該方法は、325位のアミノ酸がアルギニン、トリプトファン、および/またはグルタミンであるヒトZnT8に選択的に結合する抗体を検出することを含む。

10

【0030】

本発明のさらに別の実施形態は、糖尿病前症の個体における、1型糖尿病の予防、1型糖尿病の発症の遅延、または自己免疫の軽減のための治療の有効性を観察する方法であって、該個体由来の試験試料中のZnT8特異的なT細胞応答を検出することを含み、該個体において、同じ個体の以前のZnT8特異的なT細胞応答の測定と比較してZnT8特異的なT細胞応答の減少またはほぼ同レベルのZnT8特異的なT細胞応答が検出されると、治療が有効であることが示され、また該個体において、同じ個体の以前のZnT8特異的なT細胞応答の測定と比較してZnT8特異的なT細胞応答の増加が検出されると、治療が有効ではないことが示されることを特徴とする方法に関する。1つの態様では、該方法は、325位にアルギニン、トリプトファンおよび/またはグルタミンを含むヒトZnT8に特異的なT細胞応答を検出することを含む。

20

【0031】

抗体を検出する上記方法のうちいずれかの1つの態様では、該方法は、限定するものではないが、放射免疫沈降アッセイ、ELISA、時間分解蛍光アッセイ、および発光アッセイから選択されたアッセイの使用を含むことができる。1つの態様では、該方法は、競合的ユーロピウムアッセイの使用を含む。

【0032】

T細胞応答を検出する上記方法のうちいずれかの1つの態様では、該方法は、限定するものではないが、T細胞増殖アッセイ、可溶性MHCテトラマーを使用する結合アッセイ、可溶性T細胞受容体を使用する結合アッセイ、およびELISPOTアッセイから選択されたアッセイの使用を含むことができる。

30

【0033】

上記に特定された方法のうちいずれにおいても、1つの実施形態では、該方法は、ZnT8またはそのフラグメントもしくはパリアント、例えば、限定するものではないが本明細書に記載されたZnT8フラグメントのいずれかの使用を含む。

【0034】

本発明のさらに別の実施形態は、本明細書に記載された任意の方法を実施するためのアッセイ・キットに関する。該キットは：(a) ZnT8タンパク質またはそのパリアントもしくはフラグメント；(b) ZnT8に選択的に結合する抗体を検出するための1もしくは複数の試薬、またはZnT8特異的なT細胞応答を検出するための1もしくは複数の試薬、のうち少なくともいずれか一方、を含む。

40

【0035】

本発明の別の実施形態は、自己免疫疾患の予防、自己免疫疾患の発症の遅延、または自己免疫疾患の個体における自己免疫の軽減（該疾患の任意の1つ以上の症状の軽減を含む）のための方法であって、自己免疫疾患の標的とされている患者体内の細胞または組織を保護するZnT8特異的な免疫応答を誘発する作用物質を、該予防、該遅延、または該軽減を必要とする個体に投与することを含む方法に関する。1つの態様では、自己免疫疾患は1型糖尿病であり、作用物質は膵島の細胞を保護する。

【0036】

50

本発明のさらに別の実施形態は、自己免疫疾患の予防、自己免疫疾患の発症の遅延、または自己免疫疾患の個体における自己免疫の軽減（該疾患の任意の1つ以上の症状の軽減を含む）のための方法であって、該個体においてZnT8特異的なT細胞を標的とし、ZnT8特異的なT細胞のネクローシスまたはアポトーシスを誘導する作用物質を、該予防、該遅延、または該軽減を必要とする個体に投与することを含む方法に関する。1つの態様では、自己免疫疾患は1型糖尿病であり、作用物質はZnT8特異的なT細胞のネクローシスまたはアポトーシスを誘導する。

【0037】

本発明の別の実施形態は、自己免疫疾患の予防、自己免疫疾患の発症の遅延、または自己免疫疾患の個体における自己免疫の軽減（該疾患の任意の1つ以上の症状の軽減を含む）のための方法であって、該個体においてZnT8特異的なT細胞に寛容性を生じさせる作用物質を、該予防、該遅延、または該軽減を必要とする個体に投与することを含む方法に関する。1つの態様では、自己免疫疾患は1型糖尿病であり、作用物質は個体においてZnT8特異的なT細胞に寛容性を生じさせる。

10

【0038】

上記治療方法のうちいずれにおいても、1つの態様では、作用物質はZnT8、ZnT8の相同体、ZnT8のフラグメント、またはZnT8の合成ミメティックである。1つの態様では、作用物質は、本明細書中の任意の場所に記載されているような、フラグメントもしくはキメラタンパク質、相同体、またはそのフラグメントである。1つの態様では、作用物質は、個体におけるZnT8の結合について、個体体内の天然の自己抗体と競合する抗体である。1つの態様では、作用物質は、325位にアルギニンを含むヒトZnT8の多型バリエーションに特異的である。1つの態様では、作用物質は、325位にトリプトファンを含むヒトZnT8の多型バリエーションに特異的である。1つの態様では、作用物質は、325位にグルタミンを含むヒトZnT8の多型バリエーションに特異的である。

20

【0039】

本発明の別の実施形態は、ZnT8、ZnT8のバリエーション、ZnT8のフラグメント、ZnT8の合成ミメティック、または前記ZnT8、前記ZnT8の相同体もしくは前記ZnT8のフラグメントに結合する抗体を、本明細書中に詳述したような診断方法、予後判定方法または治療方法において使用することに関する。

【0040】

本発明のさらに別の実施形態は、本明細書中に詳述されている任意の方法、試薬、ZnT8のフラグメント、相同体、バリエーション、キメラタンパク質、融合タンパク質、またはこれらをコードする核酸、またはこれらに選択的に結合する抗体に関する。

30

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】糖尿病特異的な、Slc30A8に対する自己抗体を示すグラフ。

【図2A】ショウジョウバエS2細胞における膜結合型の糖尿病自己抗原の発現および精製について示す図。図2Aは、mIGRP V5 His構築物の発現をS2細胞内で誘導し、細胞膜画分(CMF)を抗V5抗体とともにプロットして示すデジタル画像である。

40

【図2B】ショウジョウバエS2細胞における膜結合型の糖尿病自己抗原の発現および精製について示す図。図2Bは、IGRP-CMF T細胞ハイブリドーマ(クローン1-76-54)についての応答アッセイを示すグラフである。

【図3】様々なEST配列および予想される選択的翻訳産物に基づいて修正されたZnT8の遺伝子構造を示す図。記載の選択的翻訳産物を参照すると、「開始」配列MYCHは配列番号2の50~54位に相当し、「開始」配列MEFLERは配列番号2の1~6位に相当する。

【図4A】予想される膜貫通ドメインが暗灰色で強調表示された、ヒトZnT8のアミノ酸配列(SEQ ID NO:2(配列番号2))を示す図。

【図4B】ZnT8の予想される膜トポロジーを示し、ループのアミノ酸部位を示す図。

50

- 【図5】ZnT8のC末端プローブに関する標準的アッセイを例証する図。
- 【図6】様々なZnT8構築物を用いたDASPブライント試験の結果を示すグラフ。
- 【図7】ZnT8が、ICAおよびゴールドスタンダードである生化学的抗体について陰性の患者において、自己抗体を検出することを実証するグラフ。
- 【図8A】初発集団における、ZnT8に対する自己抗体と、インスリン(図8A)、GAD(図8B)およびIA2(図8C)に対する自己抗体との関係を示す一連のグラフ。
- 【図8B】初発集団における、ZnT8に対する自己抗体と、インスリン(図8A)、GAD(図8B)およびIA2(図8C)に対する自己抗体との関係を示す一連のグラフ。
- 【図8C】初発集団における、ZnT8に対する自己抗体と、インスリン(図8A)、GAD(図8B)およびIA2(図8C)に対する自己抗体との関係を示す一連のグラフ。
- 【図9A】疾患発症時の自己抗体の発現を年齢に対して示す一連のグラフ(図9A = ZnT8; 図9B = GAD; 図9C = インスリン; 図9D = IA2)。
- 【図9B】疾患発症時の自己抗体の発現を年齢に対して示す一連のグラフ(図9A = ZnT8; 図9B = GAD; 図9C = インスリン; 図9D = IA2)。
- 【図9C】疾患発症時の自己抗体の発現を年齢に対して示す一連のグラフ(図9A = ZnT8; 図9B = GAD; 図9C = インスリン; 図9D = IA2)。
- 【図9D】疾患発症時の自己抗体の発現を年齢に対して示す一連のグラフ(図9A = ZnT8; 図9B = GAD; 図9C = インスリン; 図9D = IA2)。
- 【図10A】T1D予測マーカーとしてのZnT8自己抗体の使用を、2名の異なる患者についてそれぞれ図10Aおよび10Bに表して例証するグラフ。
- 【図10B】T1D予測マーカーとしてのZnT8自己抗体の使用を、2名の異なる患者についてそれぞれ図10Aおよび10Bに表して例証するグラフ。
- 【図11】疾患発症時におけるT1D患者の糖尿病性自己抗体の状態を示す表。
- 【図12A】ZnT8抗体アッセイの受信者動作特性を示すグラフ(図12Aは免疫沈降指数を示し、図12Bは感度を示す)。
- 【図12B】ZnT8抗体アッセイの受信者動作特性を示すグラフ(図12Aは免疫沈降指数を示し、図12Bは感度を示す)。
- 【図13】ZnT8のORF、C末端およびN末端に対する反応性の関係を示すグラフ。
- 【図14A】ZnT8のN末端およびC末端が相互作用して新しいエピトープを生成するかどうかを調べる実験の結果を示す図。該実験は、免疫沈降アッセイにおいて標準物として使用した糖尿病のプール血清2つを用いて実施したが、該プール血清のうち第1はC末端プローブに対する強い反応に基づいて(図14A)、第2はN末端反応性に基づいて(図14B)選択されたものである。
- 【図14B】ZnT8のN末端およびC末端が相互作用して新しいエピトープを生成するかどうかを調べる実験の結果を示す図。該実験は、免疫沈降アッセイにおいて標準物として使用した糖尿病のプール血清2つを用いて実施したが、該プール血清のうち第1はC末端プローブに対する強い反応に基づいて(図14A)、第2はN末端反応性に基づいて(図14B)選択されたものである。
- 【図15A】マウスのSlc30A8(上; 配列番号4の267~367位を示す)、ヒトのSlc30A8(中; 配列番号2の268~369位を示す)およびマウスのSlc30A3(下; 配列番号25の配列)の配列をアラインメントして示す図。
- 【図15B】自己抗体反応性に対するC末端プローブの修飾の影響を示すグラフ(制限酵素切断部位を示すために記載された配列は配列番号2の336~369位である)。
- 【図15C】自己抗体反応性に対する、荷電残基(K340、H345およびE352)に点突然変異を有するC末端プローブの影響を示すグラフ。
- 【図16】自己反応性に関して重要なZnT8のC末端の残基を示す図。
- 【図17】欠失変異体およびマウス/ヒトキメラを使用したエピトープマッピングを示す図。示されたマウスZnT8配列は配列番号4の267~367位であり; 示されたヒトZnT8配列は配列番号2の268~369位である。
- 【図18】突然変異誘発実験を行うために使用した分子モデルを示す図。

【図19】T1D自己抗体の標的とされる領域におけるZnT8残基の保存を示す図(Mse N末端配列は配列番号4の1~74位; Hum N末端配列は配列番号2の1~75位; Xen N末端配列は配列番号38; Mse C末端配列は配列番号4の267~367位; Hum C末端配列は配列番号2の268~369位; Xen C末端配列は配列番号39である)。

【図20】ヒトSlc30Aファミリーの配列相同性を示す図。

【図21A】マウスZnT8の部位特異的突然変異誘発による、CR限定的な自己抗体応答(図21A)、CW限定的な自己抗体応答(図21B)およびCQ自己抗体応答(図21C)に関するZnT8構造内の主要エピトープの同定を示す図。

【図21B】マウスZnT8の部位特異的突然変異誘発による、CR限定的な自己抗体応答(図21A)、CW限定的な自己抗体応答(図21B)およびCQ自己抗体応答(図21C)に関するZnT8構造内の主要エピトープの同定を示す図。

【図21C】マウスZnT8の部位特異的突然変異誘発による、CR限定的な自己抗体応答(図21A)、CW限定的な自己抗体応答(図21B)およびCQ自己抗体応答(図21C)に関するZnT8構造内の主要エピトープの同定を示す図。

【図22A】マウスZnT8の多点突然変異によるヒトZnT8の反応性の概括を示す図(図22A=mCArgプローブ、hCArg反応性の血清を使用; 図22B=mCArg(Arg Glu Lys Lys)、hCArg反応性の血清を使用; 図22C=mCTrpプローブ、hCTrp反応性の血清を使用; 図22D=mCArg(Arg Glu Lys Lys)プローブ、hCTrp反応性の血清を使用)。

【図22B】マウスZnT8の多点突然変異によるヒトZnT8の反応性の概括を示す図(図22A=mCArgプローブ、hCArg反応性の血清を使用; 図22B=mCArg(Arg Glu Lys Lys)、hCArg反応性の血清を使用; 図22C=mCTrpプローブ、hCTrp反応性の血清を使用; 図22D=mCArg(Arg Glu Lys Lys)プローブ、hCTrp反応性の血清を使用)。

【図22C】マウスZnT8の多点突然変異によるヒトZnT8の反応性の概括を示す図(図22A=mCArgプローブ、hCArg反応性の血清を使用; 図22B=mCArg(Arg Glu Lys Lys)、hCArg反応性の血清を使用; 図22C=mCTrpプローブ、hCTrp反応性の血清を使用; 図22D=mCArg(Arg Glu Lys Lys)プローブ、hCTrp反応性の血清を使用)。

【図22D】マウスZnT8の多点突然変異によるヒトZnT8の反応性の概括を示す図(図22A=mCArgプローブ、hCArg反応性の血清を使用; 図22B=mCArg(Arg Glu Lys Lys)、hCArg反応性の血清を使用; 図22C=mCTrpプローブ、hCTrp反応性の血清を使用; 図22D=mCArg(Arg Glu Lys Lys)プローブ、hCTrp反応性の血清を使用)。

【図23A】ヒトの多型プローブおよびマウスの部位特異的突然変異によって検出された抗体レベルの関係を示す図(図23AはhCArg-Glnの指数とmCArgの指数を示し; 図23BはmCArg、hCArgおよびhCArg-Glnの指数を示し; 図23CはmCTrpの指数とhCTrp-Glnの指数を示し; 図23DはmCTrp、hCTrpおよびhCTrp-Glnの指数を示す)。

【図23B】ヒトの多型プローブおよびマウスの部位特異的突然変異によって検出された抗体レベルの関係を示す図(図23AはhCArg-Glnの指数とmCArgの指数を示し; 図23BはmCArg、hCArgおよびhCArg-Glnの指数を示し; 図23CはmCTrpの指数とhCTrp-Glnの指数を示し; 図23DはmCTrp、hCTrpおよびhCTrp-Glnの指数を示す)。

【図23C】ヒトの多型プローブおよびマウスの部位特異的突然変異によって検出された抗体レベルの関係を示す図(図23AはhCArg-Glnの指数とmCArgの指数を示し; 図23BはmCArg、hCArgおよびhCArg-Glnの指数を示し; 図23CはmCTrpの指数とhCTrp-Glnの指数を示し; 図23DはmCTrp、hCTrpおよびhCTrp-Glnの指数を示す)。

10

20

30

40

50

【図23D】ヒトの多型プローブおよびマウスの部位特異的突然変異によって検出された抗体レベルの関係を示す図（図23AはhCArg-Glnの指数とmCArgの指数を示し；図23BはmCArg、hCArgおよびhCArg-Glnの指数を示し；図23CはmCTrpの指数とhCTrp-Glnの指数を示し；図23DはmCTrp、hCTrpおよびhCTrp-Glnの指数を示す）。

【図24A】Slc30A8 aa325多型とZnT8Aとの関係を示す図。図24Aおよび24Bは、Glnプローブに対する応答とArgプローブおよびTrpプローブに対する応答との関係の検討において、同じ層別化を使用している。

【図24B】Slc30A8 aa325多型とZnT8Aとの関係を示す図。図24Aおよび24Bは、Glnプローブに対する応答とArgプローブおよびTrpプローブに対する応答との関係の検討において、同じ層別化を使用している。

【図24C】Slc30A8 aa325多型とZnT8Aとの関係を示す図。図24Cは、一般的なArgバリエーションおよびTrpバリエーションに対する応答の関係を示し、Trp（垂直）およびArg（水平）のみの応答について95%点のカットオフ、ならびにアッセイ中の15%CVを仮定した両プローブについて等価な応答 $\pm 3SD$ の境界を表わす対角線に基づいた、5つの領域に分割されている。

【図24D】Slc30A8 aa325多型とZnT8Aとの関係を示す図。図24Dは、個々のプローブまたはプローブの組み合わせに対する応答に基づいて分けた応答のレベルおよび度数を示す。

【図25】aa325をコードする遺伝子型に関するZnT8Aの保有率を示す図。

【図26】遺伝子型とhCRプローブおよびhCWプローブに対する反応性との間の相関を示す図。

【図27】Slc30A8遺伝子型と糖尿病発症年齢との関連を示す図。

【図28A】Slc30A8遺伝子型と抗体レベルを示す図（図28Aは遺伝子型に関してSlc30A8自己抗体反応のレベルを示し；図28Bは遺伝子型に関して他の自己抗体反応のレベルを示す）。

【図28B】Slc30A8遺伝子型と抗体レベルを示す図（図28Aは遺伝子型に関してSlc30A8自己抗体反応のレベルを示し；図28Bは遺伝子型に関して他の自己抗体反応のレベルを示す）。

【図29】現行のZnT8アッセイのまとめを示す図。

【図30】N末端、C末端、内腔側ループ、細胞質側ループおよび多型の残基を組み合わせた様々なZnT8構築物への自己反応性を示す図。

【図31A】発症後0～2年の抗体とCペプチドとを示す図（図31A～Cは対Cペプチド；図31D～Fは対GADAおよびIA-2A）。

【図31B】発症後0～2年の抗体とCペプチドとを示す図（図31A～Cは対Cペプチド；図31D～Fは対GADAおよびIA-2A）。

【図31C】発症後0～2年の抗体とCペプチドとを示す図（図31A～Cは対Cペプチド；図31D～Fは対GADAおよびIA-2A）。

【図31D】発症後0～2年の抗体とCペプチドとを示す図（図31A～Cは対Cペプチド；図31D～Fは対GADAおよびIA-2A）。

【図31E】発症後0～2年の抗体とCペプチドとを示す図（図31A～Cは対Cペプチド；図31D～Fは対GADAおよびIA-2A）。

【図31F】発症後0～2年の抗体とCペプチドとを示す図（図31A～Cは対Cペプチド；図31D～Fは対GADAおよびIA-2A）。

【図32】発症5～10年後のZnT8AおよびCペプチドのレベルを示す図。

【図33A】検出率の変化として概念を例証する図（黒色はZnT8を使用；白色は使用せず）。

【図33B】ZnT8抗体測定法を加える差動効果を示す図。

【図34】ヒト胎児の膵臓のリアルタイムPCRにより高い膵島特異性が示されることを例証するグラフ。

10

20

30

40

50

【図35】新たに診断されたT1D患者がZnT8合成ペプチドに対する末梢T細胞応答を示すことを示す図。

【図36】異なるZnT8エピトープを区別するための組換え型タンパク質の有用性を実証する自己抗体予備吸着実験を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0042】

発明の詳細な説明

本発明は概して、自己抗原標的の同定、具体的には自己免疫性の1型糖尿病(T1D)における自己抗原標的の同定、さらに具体的には、新規な自己抗原としてのタンパク質ZnT8の同定に関し、該自己抗原は治療上、診断上および予後判定上のツールおよび方法の基盤となり、該ツールおよび方法は本明細書において説明される。本発明はさらに、疾患過程の開始および臨床的糖尿病への自己免疫の進行における重要な存在として本明細書中に記載されているZnT8の遺伝的変異の同定に関するものでもある。これらの知見により、本発明者らは、該疾患の経過の予後評価を改良し、かつ該疾患の症状発現前の段階における治療的介入の有効性を観察するために使用可能な新しい診断ツールを提供することができた。該分子そのもの、誘導されたペプチド、ペプチドアナログおよび二次的な免疫試薬は、自己免疫の発症または臨床疾患への進行を防止するための治療的介入の根拠としても役立つ。自己免疫過程が確立してしまった時点で自己免疫過程を好転させるよりも発生の防止のほうが容易のように思われるので、個体が生まれたらすぐにその遺伝子型を決定する能力は、治療的処置の実施に対して明らかな利点を備えている。

10

20

【0043】

これまでに、上記に議論されるように、インスリンはその組織関連性に基づいて、GAD65およびIA-2は患者の血清が放射性同位体標識された膵島由来のタンパク質を免疫沈殿させる能力から(64~66)、またIGRPは糖尿病自然発症マウス由来のT細胞クローンを刺激したMHC H-2 K^dに結合したペプチドとして、候補遺伝子として定義された。本発明者らは、自己抗原の細胞生物学および分子生物学について現在理解されていることに基づき標的自己抗原の同定に対するより系統的な手法を開発可能であるかという問題について、またマイクロアレイ分析により異なる組織におけるゲノム全体の発現を研究および分析するツールの利用可能性について、問いかけてきた。目的は、細胞で発現される15,000程度の遺伝子転写物の中から合計50以上のタンパク質に達する可能性もある主として重要な糖尿病自己抗原を含む候補遺伝子のリストを作成することであった。次いで、強健なアッセイを使用してそのような分子への細胞性および体液性免疫応答を検出することができる。この研究の結果を、新規な標的自己抗原すなわちZnT8の発見を特に強調しながら以下に述べる。

30

【0044】

より具体的には、MHC分子およびT細胞受容体分子はいずれも広範囲のペプチド結合特異性を有し、親和性が比較的低いので、抗原提示およびT細胞認識の構造生物学からは新規なT1D自己抗原の同定について比較的わずかな手掛かりしか得られなかった。ミモトープペプチドの結合特性に関する詳細な情報が知られている場合さえ、天然のエピトープを同定するのは困難であることが判明しているが、これは単に、接触残基の数が少なく、保存的アミノ酸置換が容易に生じるからである。本発明者らは、ゲノム全体について自己抗原の候補を同定するための、情報に基づいたアルゴリズムの開発について本明細書で述べる。「理想の」自己抗原のいくつかの主要な属性および二次的属性は、最初は経験的な情報に基づいて仮定され、適宜重み付けされる。理想的な属性それぞれに対する抗原の一致度が重み付けされて「自己抗原スコア」が導かれ、こうして最良の候補の順序づけられたリストが得られる。その後、遺伝子オンロジー機能および遺伝子座決定のような情報に基づいたメタ分析を検討してから、NODマウスにおける自然発生およびプライミングによる細胞性自己免疫応答、ならびにNODマウスおよびヒトの血清の両方で測定された体液性の自己反応性に基づいた最終候補リストの評価に着手する。この手法を補強するマイクロアレイデータは大規模に取得済みである。従って、最初にヒト被験者の血清学的

40

50

解析によって候補抗原をスクリーニングし、次にトランスジェニックマウス中のHLA-D R 3、- D R 4、D Q 2 - および - D Q 8 H L A A 2 ならびにその他のクラス I H L A 糖尿病感受性対立遺伝子を、候補抗原に対する細胞性免疫応答についてスクリーニングする。

【 0 0 4 5 】

この手法を使用して、本発明者らは、亜鉛輸送体タンパク質 8 (Z n T 8、S l c 3 0 A 8 としても知られる) を、T 1 D に関連する予後判定、診断および治療の方法のための新たな自己抗原標的として同定した。Z n T 8 は、ヒトおよびマウスではインスリンを産生する膵島細胞に限定されていると思われるタンパク質である。本発明者らは、Z n T 8 が、T 1 D を発症するヒト被験者の自己抗体の標的であることを実証し、Z n T 8 の多型バリエーションを、1 型糖尿病感受性、自己免疫の状態、自己抗体の特異性ならびに疾患の進行および重症度の遺伝マーカーとして同定した。Z n T 8 に対する自己抗体は臨床疾患の発症の前に出現し、初期糖尿病の新規なマーカーであると考えられる。

10

【 0 0 4 6 】

さらに本発明者らは、Z n T 8 自己抗体が該分子の 2 つの異なる領域を標的とすること、これらの領域のうち的一方が、免疫応答の特異性および規模の両方を決定するのに重大な役割を果たす 3 種の異なるアミノ酸のうちの一つを包含することを発見した。自己免疫および糖尿病が発症する前の任意の時点で塩基変異多型分析を使用して個体の遺伝子型を決定することにより、どのアミノ酸バリエーションがコードされているかに関して情報が得られるので、遺伝子型の決定を治療および看護に関する臨床上の決定を下すのに使用することができる。さらに、本発明により、Z n T 8 に対する自己抗体の特異性の精密な分析が可能となり、さらに Z n T 8 のバリエーションのうちいずれを免疫系の標的としているかについて抗体を分類することが可能となる。現在、該分子の 3 2 5 位のアミノ酸バリエーション (A r g、T r p または G l n) が何であるかに依存する 3 つの主要な形態 (本明細書では「イソエピトープ」と呼ばれる) と、保存されたアミノ酸 (a a 3 2 5 とは無関係) を包含する第 4 のエピトープとが認識されている。個体の応答は、8 つの異なる応答、すなわち (1) 無し ; (2) A r g 3 2 5 限定的 ; (3) T r p 3 2 5 限定的 ; (4) G l n 3 2 5 限定的 ; (5) A r g 3 2 5 および T r p 3 2 5 限定的 ; (6) A r g 3 2 5 および G l n 3 2 5 限定的 ; (7) T r p 3 2 5 および G l n 3 2 5 限定的 ; (8) アミノ酸 3 2 5 とは無関係、のうちの一つとして分類することができる。自己抗体応答のこのような層別化が、疾患の進行に関する情報を提供するために本明細書において提案され、抗原特異的な治療薬を用いて T 1 D 自己免疫をどのように治療するかを決定する際に不可欠となるであろう。

20

30

【 0 0 4 7 】

より具体的には、本発明者らは以下のことを示した :

- ・ 初発 T 1 D 患者の 6 0 % が Z n T 8 に対する自己抗体について陽性であること ;
- ・ 生化学的手段 (G A D、I n s および I A 2 の自己抗体) または組織学的手段 (膵島細胞質の自己抗体) によって測定された他の自己抗体に関して陰性の T 1 D 患者の 2 0 ~ 3 0 % は、Z n T 8 に対する自己抗体について陽性であること ;
- ・ Z n T 8 に対する自己抗体の同定により、1 0 % の T 1 D 患者が低リスク分類 (上記 1) から高リスク分類 (上記 2) に変わること ;
- ・ G A D を用いた単一のアッセイ形式において、抗 Z n T 8 アッセイは初発 T 1 D 患者の 9 0 % を検出すること ;
- ・ 本発明により患者の大規模スクリーニングが可能となること ;
- ・ Z n T 8 自己抗体は、分子の 2 つの異なる領域 (N 末端および C 末端) を標的とし、そのうちの後者は免疫応答の質および規模の両方を決定する際に重大な役割を果たす 3 種類の異なるアミノ酸のうちの一つを包含していること ;
- ・ 上記に特定した部位に対する自己抗体は、遺伝子がコードする配列と一致し、したがって真に自己反応性であり、また対立遺伝子は高頻度 (7 5 %)、中間的頻度 (2 5 %) および低頻度 (1 %) で存在し、人種集団間の顕著な変動を示していること ;

40

50

・ 3歳前に糖尿病を発症する幼い子供は、ZnT8のCC(Arg325ホモ接合の遺伝子型)が期待されるよりも高頻度であり(55%に対して75%)、ZnT8のCT遺伝子型(Arg325およびTrp325のヘテロ接合の遺伝子型)が低頻度(40%に対して35%)であること。年長の子供は、正常な集団で報告されたのと同様の遺伝子型頻度を示すこと。従って、CC遺伝子型は糖尿病のリスク因子であると考えられるかもしれないこと。

【0048】

本発明に先立って、ZnT8の一部をコードする部分ヌクレオチド配列が同定され、細胞、肝臓または腎臓よりも膵臓細胞においてより大量に発現したmRNAとして、特に膵臓細胞に関連した分子の同定を目指した発表において報告された(ネオフィトウ(Neophytou)ら、1996, Diabetes 45: 127-133)。クローン化された2つの部分ヌクレオチド配列は、GENBANK(R)に受託番号Z47772(クローン23)およびZ47779(クローン41)として寄託された。しかしながらこの発表では、ZnT8の完全長のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を同定しておらず、またこの発表は、該部分配列を潜在的な自己抗原をコードするものとして同定も実証もしていない。

10

【0049】

ZnT8分子全体は、主に重金属イオン輸送タンパク質について研究しているスイスのグループによって2004年に最初にクローニングされた(キミエンティ(Chimienti)ら、Biometals 2005 Aug;18(4):313-7;キミエンティ(Chimienti)ら、Diabetes 2004 Sep;53(9):2330-7;およびセーブ(Seve)ら、BMC Genomics 2004 May 23;5(1):32(それぞれ全体が参照により本願に組込まれる))。バイオインフォマティクス法および免疫組織化学法から、キミエンティらは、該分子が膵島で発現されることを観察し、また該分子とインスリン分泌顆粒との関連を報告している。さらにキミエンティらは、ZnT8をHEL細胞で過剰発現させると細胞内小胞に亜鉛が蓄積することを教示し、ZnT8が、細胞質の亜鉛の細胞内小胞への移動に關与するZnTであることを示唆している。しかしながら、これらの報告においてZnT8が潜在的な自己抗原であることには言及されておらず、従って、本明細書で述べるような診断方法または治療方法におけるZnT8の使用についても記載されていない。

20

【0050】

本発明者らが1型糖尿病の自己抗原としてのZnT8の重要な役割を認識したのは、ZnT8が初発の1型糖尿病患者における体液性自己反応の標的であるかという疑問に明確に取り組んだ、本発明者らの実験室で行なわれた一連の最近の実験からである。本発明者らが実施した最初の研究から、患者の約10%がZnT8に対して軽度の自己反応性を示すことが示された(実施例を参照)。完全長のZnT8の代わりに該分子のCOOH末端(C末端)フラグメントを使用したアッセイ(後述)をさらに開発することにより、アッセイの感度が著しく上昇し、対応する対照が1%未満であるのに対してT1D被験者の70%までが疾患発症時に陽性の試験結果となった。このような感度は、周知の分子すなわちインスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65)およびIA-2(PTn)を用いたT1D被験者における体液性の自己反応について現在用いられているアッセイと同じか、またはそれ以上に良い。本発明者らは、ZnT8が独立した疾患マーカーであり、かつそういうものとして、抗体を用いるアッセイの感度を補完かつ拡張することも実証した。10年にわたって集められた一連の試料の調査を通じて、ZnT8に対する抗体が糖尿病前症の進行においては他の抗体より後に現われることが示され、このことは、膵島炎の破壊的な最終段階を示す、従って初期臨床疾患のマーカーを示すかもしれない。

30

40

【0051】

さらに、本発明者らは、ZnT8自己抗体が該分子の2つの異なる領域を標的とし、これらの領域のうち的一方が、免疫応答の質および規模の両方を決定する際に重大な役割を果たす3種の異なるアミノ酸のうちの一つを包含することを発見した。アミノ酸配列バリエーションはゲノムのヌクレオチド配列によって決まるので、どのアミノ酸バリエーションがコードされているかを測定することは可能である。本発明者らは、この部位に対する自己抗体

50

が、遺伝子にコードされる配列と一致し、従って真に自己反応性であることを初めて実証した。該遺伝子は、高頻度（75%）、中間的頻度（25%）および低頻度（1%）で存在する3つの既知の対立遺伝子を示し、人種集団間の顕著な変動を示している。正しい（自己の）または誤った（非自己の）コード配列を対象とすることは、所望の結果によって有益な場合もあれば有害な場合もあるので、上記のことは、自己免疫を診断する方法、および治療的処置を進める方法に関して影響を及ぼす。例えば、免疫療法の目的は、免疫寛容の誘導である場合もあるし、または反対に、破壊的なエフェクターT細胞もしくは保護的な調節性T細胞のような免疫構成要素の構成要素をそれぞれ関与させるかまたは削除することにより免疫系を整理することである場合もある。

【0052】

本発明に先立ち、ZnT8が抗体または細胞性免疫のいずれかによって認識される自己抗原であるかもしれないと演繹的に疑う理由はなかった。実際、本発明者らの知る限りでは、ZnT8は自己免疫性糖尿病との関連において研究されたことはなく、免疫学的関連における該分子に関する他の公表データもない。上記に議論されるように、他の自己免疫疾患および糖尿病関連で、診断薬および治療薬としての自己抗原の使用に関する文献報告は存在する。しかしながらこれらは、構造上、細胞生物学上および免疫学上の見地からZnT8とは無関係な、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD65）、IA2、フォグリンおよび熱ショックタンパク質60のような分子を対象としたものである。

【0053】

さらに、タンパク質中の1つのアミノ酸の差異、または1つのアミノ酸の例えばリン酸化もしくはシトルリン化による翻訳後修飾の同定には、先例がないわけではないが、そのような変化が、本発明者らが示したような自己抗体の特異性の明確な決定因子なのではないかと疑う理由はない。実際に、ヒトZnT8をコードする配列中の非同義変異をコードする一塩基多型（SNP）番号rs13266634およびrs16889462が、全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）一塩基多型データベースに公表されている。このSNPは、ZnT8（配列番号2）のアミノ酸325に代替としてArgまたはTrpをコードしているが、これは本発明者らの研究で同定された多型バリエーションと一致する。しかしながら、このSNPと1型糖尿病（T1D）との関連は、本発明者らの知る限りではこれまで確認されていない。ゲノム全体の関連研究から、ZnT8は、先述のrs13266634など2型糖尿病に関係するいくつかのSNPを含んでいることが確認され（スラデック（Sladek）ら、2007年、Nature. 2007 Feb 22;445(7130):881-5. Epub 2007 Feb 11）、最近ではZnT8多型と細胞機能との関連についてのインターネット上の報告がなされている（シュタイガー（Staiger）ら、2007年、PLoS ONE. 2007 Sep 5;2(9):e832）。しかしながら、2型糖尿病は自己免疫疾患ではなく、このSNPと1型糖尿病との関連は本発明者らの知る限りではこれまで確認されていない。さらに、2型糖尿病患者がZnT8自己抗体を有すると示されたことはない。

【0054】

他のT1D自己抗原、すなわちGAD65およびIA2の配列中の多型バリエーションは確認されているが、これらはいずれも1型糖尿病におけるこれらの自己抗原の自己反応性の変化には関与していなかった。IA2では、組織特異的な様式で生じうる、免疫監視機構からの逃避をもたらすと考えられるmRNAの選択的スプライシングが存在するようである。しかしながらこれは、本発明者らが本明細書で報告した遺伝的バリエーションのタイプ、すなわち自己抗体による分子の特異的認識に関係している単一アミノ酸の変化に匹敵するものではない。したがって、発明者らによる本開示には先例がない。通常が多型によってコードされた2つの形態のZnT8が質的に異なる免疫応答を引き起こし、従って自己抗体の測定を新たなレベルに移行させるといふ、本明細書に記載の発見である。この発見は、該分子の異なる形態を使用して免疫系の異なる構成成分を標的とし、異なる免疫学的結果を引き起こすことができることも示している。

【0055】

従って、本発明者らは、様々な診断用および治療用のツールおよびアッセイの開発にお

10

20

30

40

50

ける、ZnT8をコードする遺伝子、該遺伝子から誘導された核酸分子、そのような遺伝子および核酸分子にコードされたZnT8タンパク質またはそのフラグメント、加えてそのような遺伝子およびタンパク質の相同体ならびに関連物質（例えば抗体、アゴニスト、アンタゴニスト）、ならびにZnT8の多型パリアントの使用、ならびにそのような遺伝子、核酸、タンパク質、相同体、パリアント、もしくは関連物質のうち少なくともいずれかの使用または標的化、または上記の物を含む組成物もしくは製剤、について本明細書で述べる。そのようなツールおよびアッセイには、限定するものではないが以下を挙げることができる：

1. ZnT8、該分子の特定のドメイン、および該タンパク質由来のペプチドに対する抗体反応に基づいた、糖尿病関連自己免疫の検出のためのヒトおよび実験動物におけるアッセイ。そのようなアッセイは、放射免疫沈降アッセイ、ELISA、時間分解蛍光アッセイおよび発光アッセイの形式で提供されるが、その他の形式も本発明に包含される。そのようなアッセイを使用して以下のことを行うことができる：

a. 個体および被験者群における1型糖尿病の発症に対する感受性を予測すること；
b. 初期の良性の自己反応性から破壊的な膵島炎への自己免疫の進行を監視すること；かつ/または

c. 前糖尿病状態において自己免疫を予防または軽減することを目指した治療の有効性を監視すること。そのような治療は、ZnT8分子自体において設計されたものを含む、一連の潜在的な免疫抑制物質に基づくことが考えられる。

【0056】

2. ZnT8の3つのパリアントに対するプローブと、3つのパリアントをコードする組換え型タンパク質の競合物質または妨害物質としての使用とに基づいた、糖尿病関連自己免疫の検出のためのヒトおよび実験動物におけるエピトープ特異的自己抗体アッセイ。そのようなアッセイは、放射免疫沈降アッセイ、ELISA、時間分解蛍光アッセイ、および発光アッセイの形式であることが考えられるが、その他の形式も本発明に包含される。そのようなアッセイを使用して以下のことを行うことができる：

a. 上記(1)のように、抗体の保有率、反応のレベル、抗体の力価、または応答の結合力、親和性もしくはクローン性から、個体および被験者群における1型糖尿病の発症に対する感受性を概ね予測すること；

b. 特定の個体において3つのうちいずれのエピトープが標的であるかを決定し、疾患および治療の経過における、進行および治療への応答の尺度として応答特異性の変化を測定すること；

c. 遺伝子型決定を組み合わせることにより、免疫応答の標的エピトープ特異性の見込みを測定し、したがって前もって最良の治療法を決定すること；かつ/または

d. 前糖尿病状態において自己免疫を予防または軽減することを目指した治療の有効性を監視すること。そのような治療は、ZnT8分子自体において設計されたものなど、一連の潜在的な免疫抑制物質に基づくことが考えられる。

【0057】

3. リンパ球増殖反応、MHCクラスIおよびIIのテトラマー試薬、およびELISPOTアッセイを用いた、該タンパク質および誘導ペプチドとのTリンパ球の反応性に基づく、糖尿病関連自己免疫の検出のためのヒトおよび実験動物におけるアッセイ。

【0058】

4. 抗原に対する標識抗体、およびアッセイの手段として標識抗体を用いた自己抗体の競合に基づいたアッセイ。

5. リガンドの模倣体としての抗イディオタイプ抗体。

【0059】

6. 抗原、抗原に結合した抗体、および/または細胞に結合した抗原もしくは抗体に基づいた治療。

7. さらなる診断目的のためのZnT8に基づいた試薬。これらは、該分子、ペプチド、ペプチド模倣体および改変ペプチドに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル

10

20

30

40

50

抗体であって、*in vivo*投与された場合に疾患の経過に影響を与えると思われるもの、または自己免疫患者由来のT細胞を刺激して異なる表現型とし、従ってより寛容性とするために*ex vivo*で使用できるとと思われるものを含む。

【0060】

8. 抗原特異的な免疫治療薬であって、コグネイトのペプチドエピトープもしくは改変ペプチドがそのMHC分子と作用物質とともに結合し、該作用物質は該ペプチド/MHC複合体に関わるT細胞に対して毒性であるもの、または抗原ペプチドを認識するモノクローナル抗体、または模倣体、例えば個々の分子、もしくはペプチド/MHC複合体もしくはペプチド/T細胞受容体複合体のような別の分子の構成成分と複合体化した分子であって、正常なペプチド相互作用およびシグナル伝達のアゴニストもしくはアンタゴニストとして作用するもの、に基づいた免疫治療薬。個体の遺伝子型およびその時に保有している抗体のエピトープ特異性によって、該治療薬は抗体の特異性と一致していてもよいし、別の免疫応答を刺激するために不一致であってもよい。

10

【0061】

9. 破壊するのではなく保護する方法で免疫系の応答を変化させるための、組換え型タンパク質としてのZnT8分子の使用。これは、組換え型タンパク質、化学的もしくは物理的に修飾された形態の該タンパク質、該タンパク質由来のペプチド配列、または化学的もしくは物理的に修飾されたペプチド、およびペプチド相同体であってワクチンとして使用できるとと思われるものの使用を含んでいる。

20

【0062】

10. 自己免疫反応を支持する免疫プロセスを極めて特異的に標的とするために、エフェクター分子と、ZnT8エピトープ特異ペプチドまたは試薬（小分子もしくは抗体など）とのコンジュゲートまたは組み合わせを生成すること。これは、抗体が特異的B細胞の産物であり、該B細胞は自己反応性のT細胞に対する抗原提示細胞としても作用し、該T細胞はひいてはB細胞を活性化して分化を引き起こすシグナルを提供するという概念に基づいている。

【0063】

11. 欠失を含むヒトおよびマウスのZnT8 mRNA、キメラ構築物、コード配列を変更する単一および複数部位での点突然変異に基づいたcDNA構築物、ならびにそのような構築物の、診断薬としての、または免疫応答の特異性を研究するための使用。

30

【0064】

12. エピトープタグ付きの、GFP、GST、NUSおよびポリHis配列を含む融合タンパク質、哺乳動物細胞、酵母および大腸菌においてZnT8を発現するためにベクターに入ったもの、およびそのような構築物の、診断薬としての、または免疫応答の特異性を研究するための使用。

【0065】

13. 哺乳動物細胞にZnT8を形質導入して発現するためのアデノウイルス構築物、例えば多型バリエーションならびにエピトープタグ付きタンパク質およびレポータータンパク質の構築物、ならびにそのような構築物の、診断薬としての、または免疫応答の特異性を研究するための使用。

40

【0066】

図20はヒトで知られている10種のS1c30A遺伝子バリエーションの比較を示すが、そのうち1つ(S1c30A9)はそのアミノ酸配列の同一性および類似性が低いことを考えると恐らく真の相同体ではない(上記括弧内に示す)。ZnT8に最も近い類縁体は、リソソームタンパク質のS1c30A2、シナプス小胞関連タンパク質のS1c30A3、およびS1c30A4である。S1c30A8に対してウサギで作製された抗体が、S1c30A3とのある程度の交差反応性を示すことから、多発性硬化症のような他のヒト自己免疫疾患においても反応性または交差反応性が生じる可能性が高まる。反対に、S1c30A8反応性のT細胞に対する糖尿病性のS1c30A8自己抗体が、他の組織をも標的とし、糖尿病の合併症に寄与することも考えられる。従って、本発明のツールおよ

50

び方法は、T 1 D以外の自己免疫疾患、例えば、限定するものではないが、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、セリアック病、自己免疫性甲状腺炎、アジソン病、グレーブス病およびリウマチ性心臓炎についても有用かつ適用可能であると考えられる。本発明の方法は、S 1 c 3 0 A 8 (Z n T 8) または相同体が標的または自己抗原 (自己抗体またはT細胞自己抗原) であるあらゆる自己免疫疾患に適用可能である。

【 0 0 6 7 】

さらに、本発明者らは、Z n T 8 に対する自己抗体を有する個体が、場合によっては、他のZ n T 輸送体をコードするS 1 c 3 0 A 遺伝子ファミリーの他のメンバーに反応性を示すことを示した。例えば、本発明者らは、ニューロン特異的なアイソフォームと通常は考えられているZ n T 3 に対するある程度の反応性について示す。この発見の重要な意味は、そのような反応性が膵臓の外側の組織において病理学的な結果を有することができたことである。糖尿病、特に1型糖尿病は末梢神経障害と関連があることが知られており、抗原の交差反応性は、これらの状態の間のつながりを表している可能性がある。従って、本発明のツールおよび方法は、抗原の交差反応性によって関連づけられる他の状態、例えば、限定するものではないが末梢神経障害についても有用かつ適用可能であると考えられる。

10

【 0 0 6 8 】

本明細書中で実証される本発明の態様には次の臨床上の観察すなわち：

- ・ 糖尿病前症：

20

- Z n T 8 自己抗体が通常は初期に、G A D A およびI A A の後にI A 2 A と一緒に出現する。

【 0 0 6 9 】

- 出現の厳密な序列はなく、Z n T 8 は糖尿病よりも1 ~ 1 2 年先行することもある。

- ・ 初発

- Z n T 8 の保有率は2 ~ 3 年後の発症時には上昇し、1 6 ~ 1 8 歳で6 0 ~ 8 0 % の最大に達する

- ・ 発症後

- Z n T 8 は発症後には下降し、恐らくはC ペプチドによって計測される細胞量の損失と平行し、半減期は1 年である。

30

【 0 0 7 0 】

- Z n T 8 はG A D またはI A 2 ほど長く存在しない。

- Z n T 8 は、測定可能なC ペプチドが存在しない状態で存続可能であり、逆の場合も同じである。

【 0 0 7 1 】

Z n T 8 の核酸、タンパク質、多型バリエーション、相同体、フラグメント、抗体、および組成物

Z n T 8 の遺伝子、構造的情報、核酸およびアミノ酸配列

一実施形態では、本発明は、Z n T 8 をコードする遺伝子、ならびに、そのような遺伝子のコード領域および/または制御領域の少なくとも一部に由来するかまたは少なくとも一部を含む、またそのような遺伝子の任意の多型バリエーションを含む、核酸分子の使用を包含する。本発明はさらに、任意のZ n T 8 タンパク質、該タンパク質の相同体もしくはフラグメント、例えば該タンパク質の任意の多型バリエーション、または該タンパク質のアゴニストもしくはアンタゴニストであって、例えば上述の遺伝子もしくは核酸分子によってコードされるものの使用も包含する。新規なZ n T 8 核酸分子およびタンパク質 (Z n T 8 の様々な新しい相同体、バリエーション、フラグメント、融合タンパク質、およびキメラタンパク質を含む)、ならびにこれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、物の組成物として本発明に包含される。本発明は、本発明の様々な方法に役立つZ n T 8 抗体、該抗体の抗原結合フラグメント、および抗原結合性ペプチドをさらに含む。

40

50

【0072】

亜鉛輸送体タンパク質8 (ZnT8、Slc30A8としても知られる)はZnT8遺伝子によってコードされる369アミノ酸のタンパク質である。ZnT8は、他のZnTタンパク質のように、6つの膜貫通ドメインと、膜貫通ドメインIVおよびVの間のヒスチジンに富んだループとを含む(キミエンティ(Chimienti)ら、2004年、Diabetes(上述)および本明細書に示す図4を参照)。このタンパク質は、膵臓中でのみ転写され、より具体的にはランゲルハンス島の細胞内でのみ発現される。キミエンティら(既述)が述べているように、ZnT8遺伝子は染色体8q24.11に位置し、8つのエキソンを含み、長さ37kbである。ヒトのZnT-8タンパク質のcDNAおよび推定アミノ酸配列は、キミエンティらの文献(既述)に提供されており、またこの文献は、ヒトZnT8の遺伝子構造、染色体上の位置および推定上のスプライシングを示している(キミエンティら(既述)の図1Aを参照)。ヒトZnT8をコードするcDNA配列および推定アミノ酸配列は、キミエンティら(既述)の図1Bに示されており、同図にはZnT8の予測膜貫通ドメインも示されている。キミエンティら(既述)の図1Cは、hsZnT-8、mmZnT-8およびrnZnT-8のアミノ酸配列の比較を示し、同一の残基を黒色のボックスで示している。ヒトZnT8をコードする核酸配列は、配列番号1として本明細書中に示されている。配列番号1はヒトZnT8タンパク質をコードし、該タンパク質のアミノ酸配列は配列番号2として本明細書中に示されている。マウスのZnT8も当分野において知られている。マウスのZnT8をコードする核酸配列は、配列番号3として本明細書中に示されている。配列番号3はマウスのZnT8タンパク質をコードし、該タンパク質のアミノ酸配列は配列番号4として本明細書中に示されている。ヒトZnT8をコードするヌクレオチド配列は、全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)データベースの受託番号NM_173851(gi:64762488)にも記載されている。ヒトZnT8のアミノ酸配列も、NCBIデータベース受託番号NP_776250(gi:64762489)に見られる。ラットZnT8をコードするヌクレオチド配列も知られている。データベース受託番号、および本明細書中に参考文献として記載された出版物に含まれる情報はすべて、参照により本願に組込まれる。上記配列の様々な多型バリエーション、フラグメント、キメラタンパク質および融合タンパク質は本明細書中の他所に記載されており、これらも本発明に包含される。

10

20

【0073】

キミエンティら(既述)の図3A-Dは、ZnT8の構造分析、例えばZnT8の予測膜貫通ドメイン、およびヒスチジンリッチドメインの位置などについてさらに説明しているが、これはZnTファミリーの他のZnTの間で共通である(キミエンティらを参照)。これらの構造モチーフはラットおよびマウスのZnT-8で保存されている。ヒトZnT8タンパク質では、保存されたヒスチジンが、配列番号2に関して197、203および205位に見られる。マウスでは、配列番号4の196位のヒスチジンがヒトのHis197とアラインメントし、配列番号4の204位のヒスチジンがヒトのHis205とアラインメントする。したがって、ZnT8の核酸配列およびアミノ酸配列に関する、本発明の時点で利用可能な構造上および機能上の情報は豊富であった。

30

【0074】

本発明に包含されるZnT8の相同体、バリエーション、フラグメントおよびエピトープ本発明はさらに、ZnT8の天然に存在するバリエーションおよび合成的に誘導されたバリエーション(相同体)、例えば遺伝子中のヌクレオチドおよびアミノ酸の多型、選択的開始部位でコードされたタンパク質、ならびに様々なフラグメント、融合タンパク質およびキメラタンパク質、ならびにそのようなフラグメント、融合タンパク質およびキメラタンパク質をコードする核酸分子も多数包含する。以下に議論するように、上記のポリヌクレオチドおよびタンパク質またはペプチドは、様々な診断上、治療上、および研究上の本発明の適用において有用である。

40

【0075】

本発明の一実施形態では、本明細書に記載の方法のうち任意の方法において有用なZn

50

T 8 タンパク質の相同体またはバリエーションは、野生型 Z n T 8 タンパク質、特に、本明細書に記載のヒト Z n T 8 タンパク質のアミノ酸配列と、少なくとも約 45%、または少なくとも約 50%、または少なくとも約 55%、または少なくとも約 60%、または少なくとも約 65%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95% 同一、または少なくとも約 95% 同一、または少なくとも約 96% 同一、または少なくとも約 97% 同一、または少なくとも約 98% 同一、または少なくとも約 99% 同一（または、全体的に増分を整数として 45% と 99% の間の任意の割合 (%) が同一）であるアミノ酸配列を含むか、該アミノ酸配列でほぼ構成されるか、該アミノ酸配列で構成される（上記の議論を参照）。一実施形態では、相同体は、Z n T 8 タンパク質の天然

10

20

30

40

50

【0076】

本発明はまた、選択的開始部位でコードされたタンパク質である Z n T 8 の天然に存在するバリエーションおよび合成的に誘導されたバリエーション、ならびにそのフラグメント（ペプチド）、融合タンパク質、またはそのキメラタンパク質であって、本明細書に記載の任意の診断上、治療上、および研究上の方法において有用なものも含む。例えば、選択的開始部位を備えたヒト Z n T 8 の天然のバリエーションが、配列番号 5 として本明細書中に示されている。このタンパク質は配列番号 2 のアミノ酸部位 50 ~ 367 に及ぶ。図 3 を参照すると、示されている遺伝子構造は、公開された E S T 配列および遺伝子のアラインメントから本発明者らが推定したものである。しかしながら該遺伝子構造は、「正常」として認められている 8 エキソン構造の遺伝子とは異なっている。具体的には、約 210 個の E S T 配列について評価し、5' U T R が変化するので組織内発現が変化する可能性を生じうる顕著なスプライス部位変異を同定した。エキソン 4 がスプライシングされる場合、該配列がリーディングフレームから外れ、短縮型の転写物、典型的には

【0077】

【化 1】

MEFLERAYLVNDKAAKMYAFTLERRSCK*

（配列番号 6）となるが、7 位がアラニンの代わりにトレオニンであり、27 位がシステインの代わりにアルギニンである別の短縮型が

【0078】

【化 2】

MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLERRSRK*

（配列番号 7）によって表わされる。下流の M e t を選択的開始部位として使用する結果、配列の N H 2 末端の短縮が生じうるようである。このことが組織特異的な方法で起きる、例えば胸腺で起きるが脾臓では起きない場合、免疫系の標的となりうる隠れたエピトープが生じる。本発明者らの実験室には、上記の発生および他の糖尿病関連の自己抗原（I A - 2 および I G R P）に対する自己反応性への寄与についての証拠がある。選択的な翻訳産物も「外来の」ペプチドエピトープとして免疫系に提示されるかもしれない。さらに、完全長 Z n T 8 タンパク質の天然の多型バリエーションが同定されており、該バリエーションは、限定するものではないが、配列番号 2 の 18 位のチロシンのヒスチジンへの置換、配列番号 2 の 261 位のアラニンのバリンへの置換、および配列番号 2 の 325 位のアルギニ

ンの、トリプトファンまたはグルタミンへの置換を含む。ZnT8の、特に325位の多型バリエーションは、本発明において特に興味深いものであり、以下に詳細に議論する。そのような多型を含むタンパク質、バリエーション、フラグメント、キメラタンパク質、および融合タンパク質、ならびにこれらをコードするヌクレオチドは、本発明に包含される。

【0079】

図4Aおよび4Bを参照すると、NH₂末端およびCOOH末端は膜の同じ側にあると予想される。N末端は、基準配列の場合には長い74aa、選択的開始部位を備えたアイソフォームの場合は25aaである。94aaのCOOH末端は1型糖尿病における主要な体液性免疫の決定基を包含する。このエピトープは完全長の分子に潜在し、最後の15aaの除去によって引き起こされる抗原性への影響が最小であることによって示されるように、aa268~358に位置する。興味深いことに、これは異なる生物種のZnT輸送体の中で強く保存されている領域である。従って、ZnT8タンパク質（膵臓の細胞に特異的）に対して、さらには感染性微生物の相同タンパク質によっても自己反応性が生じることも起こりうる。同様の関係は別の糖尿病自己抗原IA2で観察されている（未公表）。よって、一般的な原則からすれば、同様のZn輸送体を備えた微生物による軽微な感染が引き金となってT1Dにおける自己免疫が生じるかもしれないと仮定することができる。同様に、明らかにされた感染因子エピトープを用いて免疫化することも可能であるかもしれない。第2の比較的弱いエピトープは、保存されていないN末端に位置する。

10

【0080】

同定されたエピトープは、自己抗原IA2およびGAD65の場合と同じように細胞内部に存在するようである。図4Bを参照すると、図の上側の短いループ（97~105位；164~168位、および239~252位で表わされる部位を包含する）は、分泌経路の細胞要素の内腔に向かって位置づけられているようである。これは潜在的には小胞体、ゴルジ、インスリン分泌顆粒および最終的には細胞外液腔を含むことができる。前記ループは、正常な分泌時のインスリン顆粒の正常な細胞外放出の際に、または細胞が何らかのかたちで損傷を受けた場合に、細胞表面上に露出すると思われる。したがって、これらのループに相当するペプチドに対する抗体はZnT8の検出のために本願に包含され、従ってZnT8は、*in vivo*で細胞集団を画像化し、細胞の活性を決定し（分泌が多いことは露出が多いことに相当する）、かつ、幹細胞のような他の供給源からの、また正常な発生における、細胞の生成を観察するために使用可能なバイオマーカーとしての役割を果たす。細胞生物学的用途のためにマウスZnT8の内腔側ドメイン2の配列（配列番号4の163~183位、すなわちERLLYPDYQIQAGIMITVSGC）に対して作製された本発明の1つの抗体を提供する。さらに、グルタチオンSトランスフェラーゼとの融合タンパク質としてのヒトのC末端に対する抗体が作製されている（以下を参照）。本明細書に提供する指針を用いて、N末端およびC末端領域の配列に対するその他の抗ペプチド抗体を生産することもできる。抗ホスホペプチド抗体を生成させることもできる。

20

30

【0081】

第2の細胞内ドメイン、およびC末端ループには該分子の潜在的リン酸化部位がある。これらの部位のリン酸化が、該分子の細胞内局在化およびZn輸送体としての活性を決定しているということも考えられる。新世代の治療薬はプロテインキナーゼを標的とし、したがって投薬を通じて*in vivo*での該タンパク質の活性を調整することができるかもしれない。

40

【0082】

第3の細胞内ループ（図4Bにおいて配列番号2の残基196~215として表示）は、Znおよびその他の重金属との結合において重要と思われるヒスチジン残基に富んでいる（配列番号2の197、203および205位）。これは、該分子が細胞質から分泌経路を構成する膜で包まれたコンパートメントの内腔へとZnを輸送するメカニズムの一部であるということも考えられる。

【0083】

50

本発明の一実施形態では、ZnT8のフラグメントは、診断方法および治療方法において使用するために、または抗体の生成のために包含される。本発明によれば、ZnT8タンパク質、タンパク質の一部（例えばフラグメント、部分、ドメインなど）、またはタンパク質の領域もしくはエピトープの最小の大きさは、エピトープすなわち抗体生成のための保存された結合表面として、または*in vitro*アッセイにおける標的としての役割を果たすのに十分な大きさである。一実施形態では、本発明のタンパク質は、長さが（例えば、抗体エピトープまたはアッセイで検出可能なペプチドとして好適な）少なくとも約4、5、6、7または8アミノ酸であるか、または長さが少なくとも25のアミノ酸、または長さが少なくとも50アミノ酸、または長さが少なくとも100アミノ酸、または長さが少なくとも150アミノ酸などであり、4アミノ酸からZnT8タンパク質もしくはその一部の長さ全体またはより長くまで、全部の整数（例えば8、9、10、...25、26、...300、301、...）の、任意の長さである。好適なヒトZnT8およびその任意の多型を含む、任意の生物種由来のZnT8タンパク質に関して、任意の長さの任意のN末端フラグメント、C末端フラグメント、これらのキメラまたは欠失フラグメントが本発明に包含される。例えば、表1および図15~19、21および25は、自己反応性を左右するC末端の残基の同定を含む、ZnT8のエピトープおよびイソエピトープの位置確認に関するさらなる情報について述べている。この情報は、本明細書に記載された診断上、予後判定上および治療上の方法のうちいずれかにおける、ZnT8の様々なフラグメントおよび相同体の設計、生産、および使用を可能にする。

10

20

30

40

50

【0084】

上記に議論されるように、図4Aおよび4Bは、ZnT8タンパク質の予測膜貫通ドメインを示している。これらのドメインは、該ドメインが通常は脂質に囲まれており、そうでない場合には非常に粘質であるため該タンパク質が沈殿するかまたはフォールディングしないので、アッセイの設計における問題を提起する。そのような領域はT細胞の標的であるかもしれず、従って本発明によるフラグメントでの使用のために包含されるが、該領域は恐らく抗体の標的ではない。完全長の配列は循環血中の抗体に反応を示し、したがって対照者よりも糖尿病患者において反応性が高い。しかしながら、該アッセイは、疾患を最近発症した個体のわずか10~20%しか検出せず、従って、本発明者らは、別のプローブ、すなわち以下に述べるようなN末端、C末端およびZn結合ループのプローブを提供した。

【0085】

本発明において有用な特に好ましいZnT8タンパク質フラグメントは、ZnT8の任意のN末端またはC末端のフラグメント、特に好ましくはC末端フラグメントである。ZnT8の別の好ましいフラグメントは、ZnT8のN末端およびC末端フラグメントの混合物またはハイブリッド（キメラ）である。ZnT8の特に好ましいフラグメントは、ヒトZnT8のC末端の約110残基からC末端の約8残基までの任意のC末端フラグメントを含むか、該フラグメントでほぼ構成されるか、または該フラグメントで構成される。特に好ましいC末端フラグメントは、ヒトZnT8のC末端の101残基および102残基を含む。

【0086】

本発明の様々な実施形態で使用可能な様々なタンパク質、バリエーション、キメラタンパク質およびフラグメントを、以下の表1に例証する。これらのタンパク質、バリエーション、キメラタンパク質またはフラグメントのいずれにも、1個、2個またはそれ以上のアミノ酸残基（例えば以下にC末端フラグメントについて示すような、フラグメントのN末端のメチオニン）を追加することができる。さらに、これらの構築物および実施例において提供される情報が用意されれば、当業者は、他の構築物であってさらなるアミノ酸が削除されるもの、キメラのドメインの順序が逆であるもの、または別のキメラタンパク質を生産するために本明細書に記載された2個以上のフラグメントもしくはその一部が組み合わされたもの、を容易に創り出すことができるであろう。

【0087】

【表 1】

<u>N3プローブ 配列番号2の(N末端フラグメント) 1-74アミノ酸 Mr=8576 pI=6.72</u>	
MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLESVELQQKPVNKDQCPRERPEELESGGMYHCHSGSKPT EKGANEYAYAKWKL (配列番号8)	
<u>C4プローブ 配列番号2の(C末端フラグメント) 268-369アミノ酸 Mr=11235 pI=4.95</u>	
MKDFSILLMEGVPKSLNYSVGVKELILAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQW	
RREIAKALSFSFTMHSITIQMESPVDDPCLFCEDPCD (配列番号9)	
<u>切断型C末端プローブ1 (本明細書に記載のアッセイで活性)</u>	
MKDFSILLMEGVPKSLNYSVGVKELILAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQW	10
RREIAKALSFSFTMHSITIQMES (配列番号10)	
<u>切断型C末端プローブ2 (本明細書に記載のアッセイで活性)</u>	
MKDFSILLMEGVPKSLNYSVGVKELILAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQW	
RREIAKALSFSFTM (配列番号11)	
<u>変異型C末端プローブ (本明細書に記載のアッセイで低減された活性)</u>	
MKDFSILLMEGVPKSLNYSVGVKELILAVDGVLSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQW	
RREIAKALSASFTMASLTIQMAAPVDQDPCLFCEDPCD (配列番号12)	
<u>亜鉛結合ループ</u>	
VLTVVLHQRCLGHNHKEVQANASVRA (配列番号13)	
<u>M275プローブ 配列番号2の275-369アミノ酸 Mr=10414 pI=5.21</u>	
MEGVPKSLNY SGVKELILAV DGVLSVHSLH IWSLTMNQVI LSAHVATAAS RDSQVVRREI AKALSFSFTM HSLTIQMESPVDDPCLFC EDPCD (配列番号14)	20
<u>M282プローブ 配列番号2の283-369アミノ酸 Mr=9703 pI=5.15</u>	
MNYSVGVKELI LAVDGVLSVH SLHIWSLTM QVILSAHVAT AASRDSQVVR REIAKALSFS FTMHSITIQM ESPVDQDPCLFCEDPCD (配列番号15)	
<u>M282プローブ 配列番号2の290-369アミノ酸 Mr=8699 pI=5.08</u>	
MILAVDGVLS VHSIHTWSLT MNQVILSAHV ATAASRDSQV VRREIAKALS KSFTMHSITIQMESPVDDPCLFCEDPCD (配列番号16)	
<u>M300プローブ 配列番号2の300-369アミノ酸 Mr=7845 pI=5.50</u>	
MHSLHIWSLT MNQVILSAHV ATAASRDSQV VRREIAKALS KSFTMHSITIQMESPVDDPCLFCEDPCD (配列番号17)	
<u>M305 プローブ 配列番号2の300-369アミノ酸 Mr=7257 pI=4.74</u>	
MWSLTMNQVI LSAHVATAAS RDSQVVRREI AKALSFSFTM HSLTIQMESPVDDPCLFC EDPCD (配列番号18)	30
<u>C4プローブ 配列番号2の293-369アミノ酸 Mr=2827 pI=4.68 (SalI 切断)</u>	
MDFSILLMEG VPKSLNYSVGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAAS (配列番号20)	
<u>C4プローブ 配列番号2の344-369アミノ酸 Mr=8282 pI=8.87 (HphI 切断)</u>	
MDFSILLMEG VPKSLNYSVGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFTMHSITIQMESPVDDPCLFCEDPCD (配列番号21)	
<u>C4プローブ 配列番号2の351-369アミノ酸 Mr=9093 pI=8.87 (BstXI 切断)</u>	
MDFSILLMEG VPKSLNYSVGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFTMHSITIQMESPVDDPCLFCEDPCD (配列番号22)	40
<u>C4プローブ 配列番号2の357-369アミノ酸 Mr=9752 pI=6.86 (BstNI 切断)</u>	
MDFSILLMEG VPKSLNYSVGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFTMHSITIQMESPVDDPCLFCEDPCD (配列番号23)	
<u>C4野生型 配列番号2の268-369アミノ酸 Mr=11235 pI=4.95 (変異部位に下線)</u>	
MDFSILLMEG VPKSLNYSVGV KELILAVDGV LSVHSLHIWS LTMNQVILSA HVATAASRDS QVVRREIAKA LSKSFTMHSITIQMESPVDDPCLFCEDPCD	

TIQMESPVDQ QDPDCLFCEDP QD (配列番号24)

更なるC4変異型プローブ (配列番号2の位置に関連する変異を有する配列番号9) :

K340A; Mr=1 1177 p1=4.74

H345A; Mr=11 168 p1=4.74

E352A; Mr=1 1176 p1=5.17

S353A; Mr=1 1218 p1=4.95

S353D; Mr=11262 p1=4.77

3変異 K340A、H345A、E345A; Mr=11053 p1=4.67

マウスZnT8アミノ酸配列バリエント

mSLC30a8 C末端 Met266、Gln324

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASQD

SQSVRTGIAQ ALSSFDLHSL TIQIESAADQ DPSCLLCEDP QD (配列番号40)

mSLC30a8 C末端 Met266、Arg324

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASRD SQSVRTGIAQ ALSSFDLHSL

TIQIESAADQ DPSCLLCEDP QD (配列番号41)

mSLC30a8 C末端 Met266、Trp324

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASWD

SQSVRTGIAQ ALSSFDLHSL TIQIESAADQ DPSCLLCEDP QD (配列番号42)

mSLC30a8 C末端 Met266、Lys339 (インサート)

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASQD

SQSVRTGIAQ ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (配列番号43)

mSLC30a8 C末端 Met266、Arg324、Lys339 (インサート)

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASRD SQSVRTGIAQ ALSKSFDLHS

LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (配列番号44)

mSLC30a8 C末端 Met266、Trp324、Lys339 (インサート)

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASWD

SQSVRTGIAQ ALSKSFDLHS LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (配列番号45)

Met266REKK変異型TGIAQALS331-338>REIAKALSK332-340

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASQD SQSVRREIAK ALSKSFDLHS

LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (配列番号46)

Met266RREKK変異型変異型 (R325; TGIAQALS331-338>REIAKALSK

LSK332-340

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASRD SQSVRREIAK ALSKSFDLHS

LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (配列番号47)

Met266WREKK変異型 (R325; TGIAQALS331-338>REIAKALSK

332-340

MKDFSILLME GVPKGLSYNS VKEIILAVDG VISVHSLHIW SLTVNQVILS VHVATAASWD SQSVRREIAK ALSKSFDLHS

LTIQIESAAD QDPSCLLCED PQD (配列番号48)

ヒトZnT8アミノ酸配列バリエント

hSLC30a8 C末端267Met、325Arg

MKDFSILLME GVPKSLNYSV VKEIILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD

SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCD (配列番号49)

hSLC30a8 C末端267Met、325Gln

MKDFSILLME GVPKSLNYSV VKEIILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASQD

SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCD (配列番号50)

hSLC30a8 C末端267Met、325Trp

MKDFSILLME GVPKSLNYSV VKEIILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASWD

SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCD (配列番号51)

hSLC30A8リンカー配列

PSTPPGSSGG G (配列番号52)

hSLC30a8 C末端ダイマー 1Met、59Arg、リンカー、172Arg (59および

172位は野生型アミノ酸325に対応する)

10

20

30

40

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD
 SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL
 LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV ILSAHVATAA SRDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES
 PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号53)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Arg, リンカー, 172Gln

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS
 LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV
 ILSAHVATAA SQDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号54)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Arg, リンカー, 172Trp

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS
 LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV
 ILSAHVATAA SWDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号55)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Gln, リンカー, 172Gln

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS
 LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV
 ILSAHVATAA SQDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号56)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Gln, リンカー, 172Arg

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS
 LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV
 ILSAHVATAA SRDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号57)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Gln, リンカー, 172Trp (59および
 172位は野生型の325アミノ酸に対応)

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD
 SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL
 LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV ILSAHVATAA SQDSQWRRE
 IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号58)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Trp, リンカー, 172Trp

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS
 LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV
 ILSAHVATAA SWDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号59)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Trp, リンカー, 172Arg

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS
 LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV
 ILSAHVATAA SRDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号60)

h S L C 3 0 a 8 C末端ダイマー 1Met, 59Trp, リンカー, 172Gln

MKDFSILLME GVPKSLNYSY VKELILAVDG VLSVHSLHIW SLTMNQVILS AHVATAASRD SQVVRREIAK ALSKSFTMHS
 LTIQMESPV D QDPDCLFCED PCDPSTPPGS SGGGKDFSIL LMEGVPKSLN YSGVKELILA VDGVLVSHSL HIWLSLTMNQV
 ILSAHVATAA SQDSQWRRE IAKALSKSFT MHSLLTIQMES PVDQDPDCLF CEDPCD (配列番号61)

h S L C 3 0 a 8 N末端/C末端融合野生型Trp325バリエント

MEFLERTYLV NDKAAKMYAF TLESVELQQK PVNKDQCPRE RPEELES GGM YHCHSGSKPT
 EKGANEYAYA KWKLC SGGGK DFSILLMEGV PKSLNYSYGVK ELILAVDGV L SVHSLHIW S L
 TMNQVILSAH VATAASWDSQ VVRREIAKAL SKSFTMHS L T IQMESPV D Q D P D C L F C E D P C D (配列番号62)

h S L C 3 0 a 8 N末端/C末端融合野生型Arg325バリエント

MEFLERTYLV NDKAAKMYAF TLESVELQQK PVNKDQCPRE RPEELES GGM YHCHSGSKPT
 EKGANEYAYA KWKLC SGGGK DFSILLMEGV PKSLNYSYGVK ELILAVDGV L SVHSLHIW S L
 TMNQVILSAH VATAASRD SQ VVRREIAKAL SKSFTMHS L T IQMESPV D Q D P D C L F C E D P C D (配列番号63)

h S L C 3 0 a 8 N末端/C末端融合野生型Trp325バリエントー選択的開始コドン

MYHCHSGSKP TEKGANEYAY AKWKLC SGGGK KDFSILLMEG VPKSLNYSYGVK ELILAVDGV L SVHSLHIW S L
 TMNQVILSAH VATAASWDSQ VVRREIAKAL SKSFTMHS L T IQMESPV D Q D P D C L F C E D P C D (配列番号64)

h S L C 3 0 a 8 N末端/C末端融合野生型Arg325バリエントー選択的開始コドン

MYHCHSGSKP TEKGANEYAY AKWKLC SGGGK KDFSILLMEG VPKSLNYSYGVK ELILAVDGV L SVHSLHIW S L
 TMNQVILSAH VATAASRD SQ VVRREIAKAL SKSFTMHS L T IQMESPV D Q D P D C L F C E D P C D (配列番号65)

10

20

30

40

hS L C 3 0 a 8 C末端/N末端融合野生型A r g 3 2 5バリエント

MKDFSILLME GVPKSLNYSG VKELILAVDG VLSVHSLH IW SLTMNQVILS AHVATAASRD

SQVVRREIAK ALSKSFTMHS LTIQMESPVD QDPDCLFCED PCDGGGMEFL ERTYI.VNDKA

AKMYAFTLES VELQKPVNK DQCPREPEE LESGGMYHCH SGSKPTEKGA NEYAYAKWKL CS (配列番号66)

T mセグメントT r p 3 2 5バリエントのないh S L C 3 0 a 8配列

MEFLERTYLV NDKAAKMYAF TLESVELQQK PVNKDQCPRE RPEELES GGM YHCHSGSKPT EKGANEYAYA KWKLCASDA

AHLJ.IDSSKP PSKRLTFGWH RAECERLLYP DYQIQATLHQ RCLGHNHKEV QANASVRKPE YKKDFSILLM EGVPKSLNYS

GVKELILAVD GVLVHSLHI WSLTMNQVIL SAHVATAASW DSQVVRREIA KALSFSFTMH SLTIQMESPV DQDPDCLFCE

DPCD (配列番号67)

10

(配列番号67)

表1に列挙した配列は、患者の自己反応性の様々な特徴を試験し、患者をより正しく判別するか、または反対に汎反応性であるかのいずれかのアッセイを設計するために、本発明者らが設計したものである。以下に列挙したものは、本発明者らが上述の配列を患者の自己反応性(患者の血清試料)に関してどのように分類したかを示している。括弧に入っていない配列について述べる場合は、その配列を含む構築物に対する患者の反応性の同定を示し;括弧内に示す配列は、まだ定義されていない他の特異性の結果と思われる、低い活性または変動的な活性のいずれかを示す。特定の種類の試料に関して配列番号が特定されていない場合は、反応性の欠如を示す。G l n 3 2 5限定的な反応性の場合、試験した500を超える血清からこれまでわずか1人の患者の血清だけが同定されたので、情報が

20

【0088】

- ・ N末端に反応性の試料: 配列番号8、63、64、65
- ・ A r g 3 2 5限定的な反応性: 配列番号9、10、(11)、(12)、14、15、(16~21)、(22)、23、(24~30)、(40)、41、(42)、(43)、44、47、49、(52)、53、54、55、57、60、63、65
- ・ T r p 3 2 5限定的な反応性: 配列番号(40)、(41)、42、(43)、45、48、51、(52)、55、58、59、60、61、62、64
- ・ G l n 3 2 5限定的な反応性: 配列番号40、(41)、(42)、50
- ・ アミノ酸325とは無関係: 配列番号9~16、(17~21)、22、23、24、(25~30)、(40、41)、42、(43)、47~51、(52)、53~65

30

本発明はさらに、抗原ペプチドもしくはT細胞エピトープ(主要組織適合性複合体(MHC)結合ペプチドとも呼ばれる)を含むか、該抗原ペプチドもしくはT細胞エピトープからほぼ構成されるか、または抗原ペプチドもしくはT細胞エピトープで構成されるZ n T 8タンパク質を含む。そのようなペプチドには、MHCペプチド複合体がT細胞受容体(TcR)に結合することが可能なように、好ましい実施形態では従ってT細胞応答(例えば下記に述べる刺激性または寛容性の反応)を誘導するように、MHCタンパク質に結合する能力を有する任意のペプチドが挙げられる。MHC分子に結合し、MHC分子と共にT細胞受容体によって認識されるMHC結合ペプチドは、抗原ペプチドであると考えられる。自然界において、抗原の加水分解によって生じるペプチドは、該抗原のMHCタンパク質への結合に先立って加水分解される。クラスI MHCタンパク質は一般に、細胞の細胞質で活発に合成されたタンパク質に由来する抗原ペプチドを提示する。これに対し、クラスII MHCタンパク質は一般に、細胞のエンドサイトーシス経路に入る外来タンパク質、または小胞体(ER)で合成されたタンパク質のいずれかに由来する抗原ペプチドを提示する。細胞内輸送により、抗原ペプチドがMHCタンパク質と結合できるようになることができる。その後、生じたMHC-ペプチド複合体は、細胞の表面へ移動し、そこでTcRと相互作用できるようになる。

40

【0089】

MHCのペプチド結合溝へのペプチドの結合により、TcRによって認識されるMHC

50

および/またはペプチドのアミノ酸残基の空間的配置が制御可能となる。そのような空間的制御は、一部にはペプチドとMHCタンパク質との間で形成された水素結合による。好ましくは、T細胞エピトープの長さは約5～約40アミノ酸残基、より好ましくは約6～約30アミノ酸残基、さらにより好ましくは約8～約20アミノ酸残基、およびさらにより好ましくは約9～11アミノ酸残基であり、長さ5～40アミノ酸の全ての整数変動値（すなわち5、6、7、8、9...40）を含む任意の大きさのペプチドが含まれる。自然状態でMHCクラスIIに結合するペプチドは約9アミノ酸から40アミノ酸まで様々であるが、ほとんどすべての場合において該ペプチドはMHC結合活性やT細胞認識を失うことなく約9～11アミノ酸コアに短縮することが可能である。

【0090】

ポリヌクレオチド、タンパク質またはペプチドに関する一般的な定義および実施形態

本発明の実施には、別途記載のないかぎり、当業者に良く知られた従来の分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学および免疫学の技術を使用する。そのような技術は文献に十分に説明されており、該文献は例えば、ガスリー（Guthrie）ら編「Methods of Enzymology」、第194巻、コールドスプリングハーバー研究所出版（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（1990）；「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第二版、（サンプルック（Sambrook）ら、1989年）および「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第三版、（サンプルック（Sambrook）およびラッセル（Russell）、2001年）（本明細書中では合わせて「サンプルック」と呼ぶ）；「Current Protocols in Molecular Biology」（F. M. オースベル（F. M. Ausubel）ら編、1987年、2001年までの補遺を含む）；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」（マリス（Mullis）ら編、1994年）；ハーロー（Harlow）およびレーン（Lane）、1988年、「Antibodies, A Laboratory Manual」、ニューヨーク所在のコールドスプリングハーバー出版（Cold placePlaceTypeSpring PlaceTypeHarbor Publications）；ハーロー（Harlow）およびレーン（Lane）「Using Antibodies: A Laboratory Manual」、ニューヨークコールドスプリングハーバー所在のコールドスプリングハーバー研究所出版（本明細書中では合わせて「ハーローおよびレーン」と呼ぶ）、ビューページ（Beaucage）ら編、「Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry」ニューヨーク所在のジョン・ワイリー・アンド・サンズ（John Wiley and Sons, Inc.）、2000年である。

【0091】

本発明によれば、単離ポリヌクレオチド（単離核酸分子とも呼ぶ）とは、その天然の環境から取り出された（例えば、ヒトに操作された）核酸分子であり、その天然の環境とは自然界において核酸分子が見出されるゲノムまたは染色体である。そういうものとして、「単離（された）」とは、必ずしも核酸分子が精製されている程度を反映するものではなく、該分子が、自然界において核酸分子が見出されるゲノム全体または染色体全体は含んでいないことを示す。本発明において有用なポリヌクレオチドは、典型的には、所与の試料中の完全長の遺伝子（またはその一部）を同定するためのハイブリダイゼーションプロブもしくはPCRプライマーとしての使用に適しているか、またはZnT8タンパク質もしくはそのフラグメントをコードするのに適しているか、または治療薬（例えば、アンチセンスまたはアプタマー）として適切な、本発明の遺伝子の一部（センス鎖または非センス鎖）である。単離核酸分子は、例えばリポーター構築物または組換えタンパク質を生産するための、遺伝子または遺伝子の一部（例えば制御領域またはプロモーター）を含むことができる。遺伝子を含む単離核酸分子は、その遺伝子を含む染色体のフラグメントではなく、該遺伝子に関するコード領域と制御領域とを含むが、天然では同じ染色体上に見られる別の遺伝子は含まない。単離核酸分子は、ある特定の核酸配列であって自然界では通常はその特定の核酸配列に隣接していない追加の核酸（すなわち異種の配列）が隣接している（すなわち配列の5'末端および/または3'末端にある）核酸配列を含むこともできる。単離核酸分子は、DNA、RNA（例えばmRNA）、またはDNAもしくはRNAのいずれかの誘導體（例えばcDNA）を含むことができる。「核酸分子」という語

10

20

30

40

50

句は主として物理的な核酸分子を指し、「核酸配列」という語句は主として核酸分子上のヌクレオチドの配列を指すが、2つの語句は、特にタンパク質をコードする能力を有する核酸分子、または核酸配列に関しては、互換的に使用することが可能である。好ましくは、本発明の単離核酸分子は、組換えDNA技術（例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、クローニング）または化学合成を使用して生産される。

【0092】

本発明の核酸分子またはポリヌクレオチドの最小の大きさは、所望の生物学的活性を有するタンパク質をコードするのに十分であるか、天然のタンパク質をコードする核酸分子の相補配列と安定なハイブリッドを（例えば中程度、高度もしくは極めて高度にストリンジентな条件下で）形成することができるプローブもしくはプライマーオリゴヌクレオチドを形成するのに十分であるか、または他の場合には本明細書中で議論されるアッセイもしくは任意の治療方法において標的もしくは作用物質として使用される大きさである。ポリヌクレオチドがオリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーである場合、ポリヌクレオチドの大きさは、核酸の組成および該核酸分子と相補配列との間の相同性または同一性（%）ならびにハイブリダイゼーション条件そのもの（例えば温度、塩濃度およびホルムアミド濃度）に応じて決めることができる。オリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーとして使用されるポリヌクレオチドの最小の大きさは、少なくとも約5ヌクレオチドの長さ、好ましくは約5～約50または約500ヌクレオチド以上（1000、2000など）に及び、間の整数値全部（すなわち5、6、7、8、9、10、...33、34、...256、257、...500...1000...）の任意の長さを含み、より好ましくは約10～約40ヌクレオチド、最も好ましくは約15～約40ヌクレオチドの長さである。1つの態様では、核酸分子のGC含量が高い場合はオリゴヌクレオチドのプライマーまたはプローブは典型的には少なくとも約12～約15ヌクレオチドの長さであり、核酸分子のAT含量が高い場合は少なくとも約15～約18塩基の長さである。本発明の核酸分子は、タンパク質をコードする配列すなわち完全長タンパク質をコードする核酸配列の一部を含むことができるという点で、本発明の核酸分子の最大の大きさには実用上の制限以外に制限はない。

【0093】

本発明によれば、オリゴヌクレオチドプローブ（または単にプローブ）は、最も典型的には長さ約8ヌクレオチド～数百ヌクレオチドの大きさの核酸分子である。そのような分子は一般に、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で標的核酸配列にハイブリダイズすることにより、試料中のそのような標的核酸配列を同定するために使用される。本明細書で使用されるように、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件とは、類似の核酸分子を識別するために核酸分子を使用する標準的ハイブリダイゼーション条件を指す。そのような標準的条件は、例えばサムブルック（Sambrook）らの「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、コールドスプリングハーバー研究所出版（Cold Spring Harbor Labs Press）、1989年に開示されている。サムブルックら（既述）はその全体が参照により本願に組込まれる（特に第9.31-9.62ページを参照）。さらに、様々な程度のヌクレオチドのミスマッチが可能なハイブリダイゼーションを行うのに適したハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を計算する式は、例えばマインコス（Meinkoth）ら、1984年、Anal. Biochem. 138, 267-284に記載されており；マインコスら（既述）はその全体が参照により本願に組込まれる。

【0094】

より具体的には、中程度にストリンジентなハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件とは、本明細書で述べるように、そのハイブリダイゼーション反応で調べるために使用される核酸分子と少なくとも約70%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を可能にする条件（すなわち約30%未満のヌクレオチドのミスマッチを許容する条件）を指す。高度にストリンジентなハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件とは、本明細書で述べるように、そのハイブリダイゼーション反応で調べるために使用される核酸分子と少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を可能にする条件（すなわち約

20%未満のヌクレオチドのミスマッチを許容する条件)を指す。極めて高度にストリンジентなハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件とは、本明細書で述べるように、そのハイブリダイゼーション反応で調べるために使用される核酸分子と少なくとも約90%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を可能にする条件(すなわち約10%未満のヌクレオチドのミスマッチを許容する条件)を指す。上記に議論されるように、当業者はマインコスら(既述)の式を使用して、これら特定のレベルのヌクレオチド・ミスマッチを実現するための適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を計算することができる。そのような条件は、DNA:RNAハイブリッドが形成されるか、またはDNA:DNAハイブリッドが形成されるかによって変わることになる。DNA:DNAハイブリッドについて計算される融解温度はDNA:RNAハイブリッドよりも10%低い。特定の実施形態では、DNA:DNAハイブリッドのためのストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、 $6 \times SSC (0.9 M Na^+)$ のイオン強度で、温度が約20~約35(低ストリンジент)、より好ましくは約28~約40(よりストリンジент)、さらにより好ましくは約35~約45(さらによりストリンジент)で、適切な洗浄条件を備えたハイブリダイゼーションを含む。特定の実施形態では、DNA:RNAハイブリッドのためのストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、 $6 \times SSC (0.9 M Na^+)$ のイオン強度で、温度が約30~約45、より好ましくは、約38~約50、さらにより好ましくは約45~約55で、同様にストリンジентな洗浄条件を備えたハイブリダイゼーションを含む。これらの値は、約100ヌクレオチドより大きく、0%のホルムアミドで約40%のG+C含量の分子に関する融解温度の計算に基づいている。別例として、サンプルックら(上述)の第9.31~9.62ページに述べられているようにして実験的に T_m を計算することもできる。一般に、洗浄条件は可能な限りストリンジентであるべきであり、選ばれたハイブリダイゼーション条件に対して適切でなければならない。例えば、ハイブリダイゼーション条件は、特定のハイブリッドの T_m 計算値よりもおよそ20~25%低い温度および塩の条件の組み合わせを含むことが可能であり、洗浄条件は一般に、特定のハイブリッドの T_m 計算値よりもおよそ12~20%低い温度および塩の条件の組み合わせを含む。DNA:DNAハイブリッドとともに使用するのに適したハイブリダイゼーション条件の一例は、 $6 \times SSC (50\% \text{ホルムアミド})$ 中にて約42で2~24時間のハイブリダイゼーション、続いて、約 $2 \times SSC$ 中にて室温で1回以上の洗浄とその後のさらに高温かつ低イオン強度の追加洗浄(例えば、約 $0.1 \times \sim 0.5 \times SSC$ 中にて37で少なくとも1回の洗浄とその後の約 $0.1 \times \sim 0.5 \times SSC$ 中にて約68で少なくとも1回の洗浄)を含む洗浄ステップを含む。

【0095】

PCRプライマーも核酸配列であるが、PCRプライマーは典型的にはポリメラーゼ連鎖反応において使用されるかなり短い長さのオリゴヌクレオチドである。PCRプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブは、標的配列からの配列情報を使用して、当業者が容易に開発および生産することができる。(例えば、サンプルックら(上述)、またはグリック(Glick)およびパステルナーク(Pasternak)、「Molecular Biotechnology」第二版、ワシントンD.C.所在のASMプレス、1998年、pp.555-590を参照)。

【0096】

本発明の特定の核酸分子の核酸配列を知ることにより、当業者は、例えば(a)それらの核酸分子のコピーの作製および/または(b)そのような核酸分子(例えば完全長の遺伝子、完全長のコード領域、調節管理配列、短縮されたコード領域を含む核酸分子)の少なくとも一部を含む核酸分子の取得が可能となる。そのような核酸分子は、適切なライブラリもしくはDNAをスクリーニングするためのオリゴヌクレオチドプローブを使用する従来のクローニング技法、またはオリゴヌクレオチドプライマーを使用する適切なライブラリもしくはDNAのPCR増幅を含む、様々な方法で得ることができる。スクリーニングまたは核酸分子増幅のための好ましいライブラリには、哺乳類のゲノムDNAライブラ

リが挙げられる。遺伝子をクローニングおよび増幅する技術は、例えばサンプルックら（既述）に開示されている。

【0097】

本明細書で使用されるように、アンチセンス核酸分子とは、高度にストリンジェントな条件下でタンパク質をコードする遺伝子にハイブリダイズすることにより、該タンパク質の発現を低減する単離核酸分子として定義される。そのような核酸分子は、該タンパク質をコードする遺伝子に十分に類似しているため、高度にストリンジェントな条件下で天然タンパク質をコードする遺伝子またはRNAのコーディング鎖または相補鎖にハイブリダイズすることが可能である。

【0098】

RNA干渉（RNAi）とは、相補的な遺伝子の発現を阻害すなわちサイレンシングするために、二本鎖RNA（哺乳類の系では短い干渉RNA（siRNA））が使用されるプロセスである。標的細胞内において、siRNAはほどけてRNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）と会合し、次いでRISCがsiRNAに相補的なmRNA配列へ導かれることによって、RISCが該mRNAを切断する。

【0099】

リボザイムは、標的RNA成分に結合することにより機能するRNAセグメントであり、特定の切断部位でリン酸ジエステルバックボーンを切断することにより標的RNA成分を不活性化する。リボザイムは核酸分子用の標的指向性送達手段として機能することが可能であり、または別例として、リボザイムはバイオマーカーをコードするRNAを標的として該RNAに結合することにより、例えば該バイオマーカーの翻訳を有効に抑制することができる。

【0100】

アダプターは、高い親和性および特異性で所定の特定の標的分子に結合する能力により、ランダムなコンビナトリアル核酸ライブラリから選択された、短鎖合成核酸（通常はRNAであるがDNAの場合もある）である。アダプターは明確な三次元構造をとり、非常に小さな構造上の違いを有する化合物を区別することができる。

【0101】

組換え核酸分子とは、ZnT8タンパク質または本明細書に記載されたその他のタンパク質をコードする任意の核酸配列のうち少なくとも1つを含むことができる分子である。一実施形態では、組換え核酸分子は、宿主細胞での核酸分子の発現を有効に制御することができる少なくとも1つの発現調節配列に作動可能なように連結される。組換え核酸分子は組換えDNA技術（例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、クローニング）を使用して生産されることが好ましい。組換え核酸分子は組換えベクターを含み、該組換えベクターは任意の核酸配列、典型的には異種配列であって、タンパク質（例えばZnT8）をコードする単離核酸分子に作動可能なように連結され、該タンパク質の組換え生産を実現することができるか、または本発明に従って*in vitro*、*ex vivo*、もしくは*in vivo*で宿主細胞に該核酸分子を送達することができる。そのようなベクターは、該ベクターに挿入される単離核酸分子に自然界では隣接していない核酸配列を含むことができる。ベクターはRNAまたはDNAのいずれでもよく、原核生物または真核生物のいずれのものでもよく、本発明においてはウイルスまたはプラスミドであることが好ましい。組換えベクターは、クローニング、配列決定、および/またはその他の核酸分子の操作において使用することができる。組換えベクターは、核酸分子の発現において使用されることが好ましく、発現ベクターと呼ぶこともできる。好ましい組換えベクターは、トランスフェクションされた宿主細胞内で、特に、トランスフェクションされた哺乳類の宿主細胞において*in vivo*で、発現可能である。

【0102】

本発明の組換え分子においては、核酸分子は、転写調節配列、翻訳調節配列、複製開始点、および宿主細胞に適合しかつ本発明の核酸分子の発現を制御するその他の調節配列のような調節配列を含む発現ベクターに作動可能なように連結される。「作動可能なように

10

20

30

40

50

連結」という語句は、核酸分子が宿主細胞にトランスフェクション（すなわち形質転換、形質導入、またはトランスフェクション）されたときに発現するようなかたちで該核酸分子を発現調節配列に連結することを指す。

【0103】

転写調節配列は、転写の開始、伸長および停止を制御する配列である。特に重要な転写調節配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーターおよびリプレッサー配列のような転写開始を制御するものである。適切な転写調節配列には、本発明に従って宿主細胞内で機能することができる任意の転写調節配列が含まれる。様々な適切な転写調節配列が当業者に知られている。特に好ましい転写調節配列には、誘導型プロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター（例えばインスリンプロモーター）およびエンハンサーが挙げられる。本発明の転写調節配列は、単離される前の、発現させようとするタンパク質に自然界で関係している天然に存在する転写調節配列を含むこともできる。一実施形態では、転写調節配列は誘導型プロモーターを含む。

10

【0104】

本発明の組換え核酸分子に有用な組換えベクターの1つのタイプは、組換えウイルスベクターである。そのようなベクターは、動物体内で、または投与後に *ex vivo* で宿主細胞内にて発現可能なウイルス外被にパッケージされる本発明の Z n T 8 タンパク質をコードする組換え核酸配列を含んでいる。いくつかの組換えのウイルスベクター、例えば、限定するものではないが、アルファウイルス、ボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびレトロウイルスに基づいたウイルスベクターを使用することができる。特に好ましいウイルスベクターはアデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスに基づいたものである。遺伝子送達に適したウイルスベクターは当分野において良く知られており、本発明で使用するために当業者が選択することができる。現行のウイルスベクターについての詳細な議論は、グリック (Glick) およびパステルナーク (Pasternak)、「Molecular Biotechnology」第二版、ワシントン D . C . 所在の A S M プレス、1998年、pp . 555 - 590 (全体が参照により本願に組込まれる) に提供されている。

20

【0105】

本発明による組換え核酸分子を用いてトランスフェクションするのに適した宿主細胞には、トランスフェクション可能な任意の微生物、昆虫、または動物細胞が挙げられる。宿主細胞は、トランスフェクションされていない細胞、または少なくとも1つの核酸分子で既にトランスフェクションされている細胞のいずれでもよい。

30

【0106】

本発明によれば、用語「トランスフェクション」は、外来の核酸分子（すなわち組換え核酸分子）を細胞内に挿入することができる任意の方法を指すために使用される。用語「形質転換」は、その用語が細菌および酵母のような微生物細胞内に核酸分子を導入することを指すために使用される場合には、用語「トランスフェクション」と互換的に使用することができる。微生物の系においては、用語「形質転換」は、微生物が外来の核酸を獲得することによる遺伝性の変化について述べるために使用され、用語「トランスフェクション」と本質的に同義である。しかしながら、動物細胞では、形質転換には、例えば細胞ががんになった後の培養物中の細胞の増殖特性の変化を指すことができる別の意味が獲得されている。したがって、混乱を回避するために、用語「トランスフェクション」を動物細胞内への外来の核酸の導入に関して使用することが好ましく、また用語「トランスフェクション」は本明細書において、一般に動物細胞のトランスフェクションおよび微生物細胞の形質転換の両方を包含するように、該用語が細胞内への外来の核酸の導入に関係するという程度で使用されることになる。したがって、トランスフェクション技術には、限定するものではないが、形質転換、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、感染およびプロトプラスト融合が含まれる。

40

【0107】

本明細書で使用されるように、Z n T 8 タンパク質などの本発明における単離タンパク

50

質またはポリペプチドを言う場合は、その自然界における環境から取り出されている（すなわち人為操作を受けている）タンパク質であり、完全長のタンパク質、融合タンパク質もしくはキメラタンパク質、またはそのようなタンパク質の任意のフラグメントもしくは相同体が含まれる。そのようなタンパク質には、限定するものではないが、精製タンパク質、部分精製タンパク質、組換え生産されたタンパク質、合成的に生産されたタンパク質、膜に結合したタンパク質、脂質と複合体化したタンパク質、可溶性タンパク質、および他のタンパク質と会合した単離タンパク質が挙げられる。そのため、「単離（された）」とは、タンパク質が精製済みであるという程度を反映するものではない。本発明の単離タンパク質は組換え生産されることが好ましい。さらに、ここでも例として、「ヒトZnT8タンパク質」またはヒトZnT8タンパク質に「由来する」タンパク質とは、ヒト（ホモ・サピエンス）から得たZnT8タンパク質（天然に存在するZnT8タンパク質の相同体を一般に含む）、またはホモ・サピエンスから得られる天然に存在するZnT8タンパク質の構造（例えば配列）および恐らくは機能についての知識から別の方法で生産されたZnT8タンパク質を指す。言い換えれば、ヒトZnT8タンパク質には、ホモ・サピエンスから得られる天然に存在するZnT8タンパク質と本質的に同様の構造および機能を有するか、または本明細書中で詳細に述べるようなホモ・サピエンスから得られる天然に存在するZnT8タンパク質の生物学的に活性な（すなわち生物学的活性を有する）相同体である、任意のZnT8タンパク質が含まれる。そのため、ヒトZnT8タンパク質は、精製タンパク質、部分精製タンパク質、組換えタンパク質、突然変異/修飾タンパク質、および合成タンパク質を含むことができる。本発明によれば、用語「修飾」および「突然変異」は、特に本明細書に記述されたタンパク質のアミノ酸配列（または核酸配列）に対する修飾/突然変異に関しては、互換的に使用することができる。本発明によるアンタゴニストまたはアゴニストとして有用な単離タンパク質は、その天然供給源から単離されてもよいし、組換え生産または合成的に生産されてもよい。

10

20

【0108】

融合タンパク質およびキメラタンパク質も本発明に包含される。融合タンパク質は本発明のタンパク質またはペプチド（例えば、ZnT8またはそのバリエーションもしくはフラグメント）を、融合パートナー（融合セグメント）に連結する（典型的には組換えによるが、化学的連結またはその他の種類の連結も本発明に包含される）ことにより生産されたタンパク質である。本発明とともに使用するのに適した融合パートナーには、限定するものではないが、タンパク質の安定性を増強すること；宿主細胞からのタンパク質の分泌を増強もしくは可能にすること；他の生物学的活性を提供すること；または宿主細胞からのタンパク質の精製（例えば親和性クロマトグラフィによる精製）を支援すること、のうち少なくともいずれか1つが可能である融合パートナーが挙げられる。適切な融合パートナーは、所望の機能を有する（例えば、安定性、溶解度、作用もしくは活性を増大させる；他の活性を提供する；かつ/またはタンパク質の精製を簡易化する）タンパク質またはそのドメインもしくは任意の大きさのフラグメントであってよい。融合パートナーは、対象とするタンパク質（例えばZnT8）のアミノ末端またはカルボキシル末端のうち少なくともいずれか一方に連結させることが可能であり、発現された外来タンパク質の簡単な回収を可能にするために切断を受けやすくてもよい。キメラタンパク質は融合タンパク質に似ており、これら用語は互換的に使用可能であるが、ただしキメラタンパク質の場合、融合パートナーは最も典型的には所望の生物学的活性を備えた第2のタンパク質のような、第2の対象タンパク質（またはそのフラグメント）である。従って、キメラタンパク質はタンパク質/ペプチド構成成分の各々の/両方の活性を有することもできるし、タンパク質ドメインの組み合わせに起因する新たな活性を有することもできる。

30

40

【0109】

1つの好ましい実施形態では、タンパク質（ペプチドおよび相同体を含む）は、網状赤血球溶解液、コムギ麦芽、酵母および細菌を用いる系のような*in vitro*の翻訳系を使用して生産される。該翻訳系は、タンパク質を例えばタンパク質分解および/またはグリコシル化によって正確に翻訳後修飾することが好ましい。*in vitro*翻訳系の

50

産物は本発明の方法において最も典型的に使用されるが、本発明はそのような産物に限定されない。

【0110】

本明細書で使用されるように、用語「相同体」または「バリエーション」は、天然に存在するタンパク質またはペプチド（すなわち「原型」または「野生型」タンパク質）に対する軽微な修飾により、天然に存在するタンパク質またはペプチドとは異なっているが、天然に存在する形態の基本的なタンパク質および側鎖の構造を維持しているタンパク質またはペプチドを指すために使用される。そのような変化には、限定するものではないが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはさらに若干のアミノ酸側鎖の変化；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはさらに若干のアミノ酸の、欠失（例えば該タンパク質もしくはペプチドの短縮型）、挿入もしくは置換のうち少なくともいずれかの変化；1個もしくは数個の原子の立体化学的变化；かつ/または軽微な誘導体化、例えば、限定するものではないが：メチル化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミチン酸化（palmitation）、アミド化および/もしくはグリコシルホスファチジルイノシトールの付加、が挙げられる。相同体は、天然に存在するタンパク質またはペプチドと比較して増強された、低下した、またはほぼ同様の特性を有することができる。相同体は、タンパク質のアゴニストまたはタンパク質のアンタゴニストを含むこともできる。

10

【0111】

相同体は、天然の対立遺伝子性の変異または遺伝的多型の結果であってもよいし、何らかの自然突然変異であってもよい。タンパク質をコードする核酸の、天然に存在する対立遺伝子性のバリエーションまたは遺伝的多型とは、そのタンパク質をコードしている遺伝子と本質的にゲノム中の同じ遺伝子座（または複数の遺伝子座）に生じるが、天然の変異が原因で、類似しているが同一ではない配列を有する遺伝子である。対立遺伝子性のバリエーションは、典型的には、該バリエーションと比較されている遺伝子によってコードされるタンパク質の活性と同様の活性を有するタンパク質をコードする。一塩基多型（SNP）は、ゲノム中の単一ヌクレオチドがある生物種のメンバーの間で、または個体内で対をなした染色体の間で異なっている場合に生じるDNA塩基配列変異である。ヒト集団の間の変動により、1つの地理的グループまたは人種グループにおいて一般的なSNP対立遺伝子が、別のグループにおいては極めて珍しいこともある。さらに、ヒトのDNA塩基配列における変動は、ヒトがどのように疾患を発症し、病原体、化学物質、薬物、ワクチンおよびその他の作用物質にどのように応答するかに影響する場合があります、このことはZnT8遺伝子に生じる多型性に対する自己抗体反応によって本明細書で例証されている。

20

30

【0112】

1つの種類の対立遺伝子性バリエーションは、同じタンパク質をコードするが遺伝子コードの縮重により異なる核酸配列を有することができる。対立遺伝子性バリエーションは、遺伝子の5'または3'非翻訳領域における（例えば調節管理領域における）変化を含むこともできる。対立遺伝子性のバリエーションは当業者によく知られている。

【0113】

相同体は、タンパク質を生産するための当分野で既知の技術、例えば、限定するものではないが、単離された天然に存在するタンパク質の直接的修飾、直接的タンパク質合成、またはタンパク質をコードする核酸配列の、例えばランダム突然変異誘発もしくは標的遺伝子突然変異誘発を行うための古典的技術もしくは組換えDNA技術を使用する修飾を用いて、生産することができる。

40

【0114】

本発明によれば、単離タンパク質（その生物学的に活性な相同体またはフラグメントを含む）は、野生型すなわち天然に存在する基準のタンパク質の生物学的活性の少なくとも1つの特徴（相同体もしくはフラグメントが該タンパク質のアゴニストであるかアンタゴニストであるか、または該タンパク質のアゴニストミメティックについて述べているかアンタゴニストミメティックについて述べているかに依存して変わりうる）を有する。概し

50

て、タンパク質の生物学的活性または生物作用とは、*in vivo*（すなわち該タンパク質の天然の生理的環境下）または*in vitro*（すなわち実験室条件下）で計測または観察されるような、該タンパク質の天然に存在する形態に起因する、該タンパク質が発揮もしくは遂行する任意の機能を指す。

【0115】

本発明のZnT8タンパク質の生物学的活性は、細胞から亜鉛を運び出すこと、または細胞内コンパートメント内へ亜鉛を輸送することを含む。より具体的には、本発明によるZnT8の生物学的活性は、膵島細胞の細胞内小胞の中へ細胞質の亜鉛を移動させることを含む。本発明において有用なZnT8の他の生物活性には、ZnT8に対する、細胞性および体液性の両方の免疫応答を含む免疫応答の誘導、ならびにアッセイにおいて結合作用物質により認識される（例えば、ZnT8特異的な結合作用物質によって認識可能な一次構造もしくは三次構造または立体構造エピトープを形成する）能力が挙げられる。

10

【0116】

タンパク質発現の低下またはタンパク質の活性低下をもたらす修飾、活性または相互作用は、タンパク質の不活性化（全面的または部分的）、ダウンレギュレーション、作用低下、または作用もしくは活性の減少と称することができる。同様に、タンパク質発現の増大またはタンパク質の活性上昇をもたらす修飾、活性または相互作用は、タンパク質の増幅、過剰生産、活性化、増強、アップレギュレーションまたは作用増大と称することができる。本発明によるタンパク質、特にZnT8タンパク質の生物学的活性は、当分野で知られているようなタンパク質の生物活性のための任意のアッセイを使用して測定または評価することができる。そのようなアッセイとしては、限定するものではないが、結合アッセイ（様々な免疫学的アッセイを含む）、タンパク質および/もしくは関連タンパク質の内在化もしくは局在化を測定するためのアッセイ、亜鉛輸送アッセイ（例えば、キミエンティら、2004, *Diabetes*（上述）に記載されているジンクイン（zincin）アッセイを参照）、またはタンパク質の活性に起因する下流の細胞内事象を測定するためのアッセイを挙げることができる。

20

【0117】

本明細書で使用されるように、別段の定めがない限り、同一性（％）について述べる場合は、（1）標準初期設定パラメータを用いた、アミノ酸検索にはblastp、核酸の検索にはblastnを使用するBLAST 2.0 Basic BLASTホモロジー検索であって、検索配列には初期設定により低複雑領域のフィルタリングを行うもの（参照により全体が本願に組み込まれるアルトシュル、S.F.（Altschul, S.F.）、マッデン、T.L.（Madden, T.L.）、シェーファー、A.A.（Schaeffer, A.A.）、チャン、J.（Zhang, J.）、チャン、Z.（Zhang, Z.）、ミラー、W.（Miller, W.）およびリプマン、D.J.（Lipman, D.J.）、（1997）「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.」、*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402に記載されている）；（2）BLAST 2アラインメント（後述のパラメータを使用）；（3）および/または標準初期設定パラメータを用いたPSI-BLAST（Position-Specific Iterated BLAST）、を使用して行なわれる相同性の評価を指す。注意すべきことは、BLAST 2.0 Basic BLASTおよびBLAST 2の間で標準パラメータの若干の差があることから、BLAST 2プログラムを使用すると2つの特定の配列が顕著な相同性を有するものと認識される一方で、検索配列として該配列のうちの1つを使用してBLAST 2.0 Basic BLASTで実施された検索ではもう1つの配列が上位ヒットにならないこともありうることである。さらに、PSI-BLASTは、配列相同体を見つけるための高感度な方法である、自動で使いやすい形式の「プロファイル」検索を提供している。該プログラムは最初にギャップを考慮したBLASTデータベース検索を行なう。PSI-BLASTプログラムは、得られたあらゆる有意なアラインメントからの情報を使用して位置特異的スコア行列を構築し、これを次に行うデータベース探索のための検索配列とする。したがって、当然ながらこれらのプログラムのうちいずれかを使用して同一性（％）を決定

30

40

50

することができる。

【0118】

2つの特定の配列を、タツソバ (Tatusova) およびマッデン (Madden)、(1999)、「Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences」、FEMS Microbiol Lett. 174:247-250 (全体が参照により本願に組み込まれる)に記載されているように、BLAST 2 sequenceを使用して互いにアラインメントすることができる。BLAST 2の配列アラインメントは、アラインメント結果にギャップ(欠失および挿入)が入ることを可能にする2配列間のGapped BLAST検索(BLAST 2.0)を行なうために、BLAST 2.0アルゴリズムを使用してblastpまたはblastnで実施する。本明細書において明確にするために、BLAST 2配列アラインメントは以下のような標準初期設定パラメータ、すなわち：

blastnについては、0 BLOSUM62行列を使用：

Reward for match = 1

Penalty for mismatch = -2

Open gap (5) and extension gap (2) penalties

gap x dropoff (50) expect (10) word size (11) filter (on)

blastpについては、0 BLOSUM62行列を使用：

Open gap (11) and extension gap (1) penalties

gap x dropoff (50) expect (10) word size (3) filter (on)

を使用して実施する。

【0119】

本明細書で使用されるように、所与のタンパク質の「アゴニスト」について述べる場合は、天然に存在するタンパク質の生物学的活性をアゴナイズする(例えば、刺激する、誘導する、増大させる、増強する、もしくは模倣する)能力を特徴とする任意の化合物を指し、任意の相同体、結合タンパク質(例えば抗体)、タンパク質もしくはタンパク質が結合した受容体と相互作用する作用物質、または天然に存在するタンパク質の生物学的活性を、基準タンパク質である天然のアゴニストと同様の方法でアゴナイズする(例えば、刺激する、誘導する、増大させる、増強する)能力を特徴とする薬物/化合物/ペプチドを設計もしくは選択した結果得られる任意の適切な産物を挙げるができる。

【0120】

同様に、「アンタゴニスト」について述べる場合は、上述のような所与のタンパク質のアゴニスト(該タンパク質自体を含む)の作用を阻害する(例えば、拮抗する、低下させる、低減する、遮断する、逆行させる、変更する)任意の化合物を指す。より具体的には、アンタゴニストは、タンパク質の活性に関して、天然のアゴニストまたは基準のタンパク質の生物学的活性が、該タンパク質の天然の作用に対して拮抗的である(例えば、対立する、逆作用である、反対である)ようなかたちで低減されるように作用することができる。そのようなアンタゴニストには、限定するものではないが、タンパク質、ペプチド、もしくは核酸(リボザイム、RNAi、アプタマーおよびアンチセンスを含む)、抗体および抗体の抗原結合フラグメント、または拮抗的な作用をもたらす薬物/化合物/ペプチドを設計もしくは選択した結果得られる産物が挙げられる。

【0121】

ペプチドおよび非ペプチドのアゴニストおよびアンタゴニスト(アナログ)を含む、ZnT8のような所与のタンパク質の相同体は、薬物の設計または選択の結果得られる産物であってもよく、当分野で既知の様々な方法を使用して生産することができる。そのような相同体をミメティックと呼ぶことができる。本発明においてミメティックまたはその他の治療用化合物を設計または選択するために有用な、様々な薬物設計の方法は、モーリク(Maulik)ら、1997年、「Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies」、ワイリーリス・インコーポレイテッド(Wiley-Liss, Inc.)に開示されており、同文献の全容は参照により本願に組み込まれる。

【0122】

10

20

30

40

50

本明細書で使用されるように、ミメティックとは、天然に存在するペプチドの生物学的作用を模倣することができる任意のペプチドまたは非ペプチド化合物を指し、模倣できる理由は多くの場合、ミメティックが天然に存在するペプチドの基本構造を模倣している基本構造を有するか、または天然に存在するペプチドの顕著な生物学的特性を有するかのうち少なくともいずれかであることである。ミメティックとしては、限定するものではないが、天然に存在するペプチドとの側鎖の類似点がないような、原型に対して多大な修飾（そのような修飾は、例えば、天然に存在するペプチドの分解感受性を低減することができる）を有するペプチド；抗イディオタイプ抗体もしくは触媒抗体のうち少なくともいずれか一方、もしくはこれらのフラグメント；単離タンパク質の非タンパク質部分（例えば炭水化物構造）；または、合成もしくは天然の有機分子、例えば核酸およびコンビナトリアル・ケミストリーによって同定された薬物など、が挙げられる。そのようなミメティックは、当分野で既知の様々な方法を使用して、設計し、選択し、かつ/または他の方法で同定することができる。

10

20

30

40

50

【0123】

ミメティックは、分子多様性戦略（化学的に多様な大きな分子ライブラリの迅速な構築を可能にする関連戦略の組み合わせ）の、天然化合物もしくは合成化合物ライブラリから、具体的にはケミカルライブラリもしくはコンビナトリアルライブラリ（すなわち、配列または大きさは異なるが同様のビルディングブロックを有する化合物のライブラリ）から、または合理的、指向的、もしくは無作為な薬物設計によって、得ることができる。例えば、モーリク（Maulik）ら（上述）を参照されたい。

【0124】

分子多様性戦略では、例えばペプチド、オリゴヌクレオチド、炭水化物または合成有機分子のうち少なくともいずれか1つから、生物学的、酵素的かつ/または化学的手法を用いて大きな化合物ライブラリが合成される。分子多様性戦略の展開における重大なパラメータには、サブユニットの多様性、分子の大きさおよびライブラリの多様性が挙げられる。そのようなライブラリをスクリーニングするという普遍的目標は、組み合わせ的選択を順次適用することにより所望の標的に対する高親和性のリガンドを得ること、次いで無作為な設計戦略または指向的な設計戦略のいずれかによりリード分子を最適化することである。分子多様性の方法は、モーリク（Maulik）ら（既述）に詳細に述べられている。

【0125】

合理的な薬物設計手法では、調節化合物の三次元構造を、例えば核磁気共鳴（NMR）またはX線結晶解析によって分析することができる。その後、この三次元構造を使用して、例えばコンピュータ・モデリングにより、潜在的な調節作用物質など、潜在性を有する化合物の構造を予測することができる。予測された化合物構造は、例えば分子多様性の方法により、導かれたリード化合物を最適化するために使用することができる。さらに、予測された化合物構造を、例えば化学合成、組換えDNA技術、または天然供給源（例えば植物、動物、細菌および真菌）からミメトープ（mimotope）の単離によって作り出すことができる。

【0126】

モーリク（Maulik）らはさらに、例えば、適切に選択されたフラグメントのフラグメントライブラリから新規な分子を創出する過程をユーザが指定する指向的な設計方法；ユーザがフラグメントおよびその組み合わせを無作為に突然変異させるための遺伝的またはその他のアルゴリズムを使用する一方で候補リガンドの適性を評価するための選択基準を同時に適用するランダム設計；ならびに、ユーザが受容体の三次元構造と小さなフラグメントプローブとの間の相互作用エネルギーを計算し、続いて有望なプローブ部位を合わせて連結するグリッドベースの手法、も開示されている。

【0127】

本発明の抗体および抗原結合性のパートナー

さらに本発明に含まれるのは、ZnT8に選択的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに本明細書に記載の方法のいずれかにおけるそのような抗体および抗

原結合フラグメントの使用である。タンパク質に選択的に結合する抗体は、該タンパク質について利用可能な構造上の情報（例えば該タンパク質の少なくとも一部のアミノ酸配列）を使用して作り出すことができる。本明細書で使用されるように、用語「～に選択的に結合する」とは、あるタンパク質が別のタンパク質に（例えば抗体、抗体フラグメント、または結合パートナーが抗原に）特異的に結合することを指し、その結合のレベル（任意の標準的アッセイ（例えばイムノアッセイ）によって測定されるもの）は、該アッセイのバックグラウンド対照よりも統計的に有意に高い。例えば、イムノアッセイを実施する場合、対照は典型的には抗体または抗原結合フラグメントのみが入った（すなわち抗原が存在しない）反応ウエル/チューブであって、抗原が存在しない状態での抗体またはその抗原結合フラグメントによる反応量（例えばウエルへの非特異的結合）がバックグラウンドとみなされる。結合は、当分野において標準的な様々な方法、例えば、限定するものではないが、ウェスタンブロット法、イムノブロット法、酵素免疫測定法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、免疫沈降、表面プラズモン共鳴、化学発光、蛍光偏光法、リン光法、免疫組織化学分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型（M A L D I - T O F）質量分析法、マイクロサイトメリー法、マイクロアレイ法、顕微鏡検査法、蛍光活性化細胞分類（F A C S）、およびフローサイトメリー法を使用して測定することができる。

10

【0128】

本発明によれば、所与のタンパク質もしくはペプチド、または他の分子の「エピトープ」は、一般に、抗体に関して、抗体またはその抗原結合フラグメントが結合対象の、かつ抗体が生産される対象の、より大きな分子の一部または該分子上の部位として定義される。エピトープという用語は、所与のタンパク質すなわち抗原の「抗原決定基」、「抗体結合部位」、または「保存された結合表面」という用語と互換的に使用することができる。より具体的には、エピトープは、抗体の結合に関与するアミノ酸残基、および三次元空間における該残基の立体配座（例えば立体配座依存型エピトープまたは保存された結合表面）の両方によっても定義することができる。エピトープは、アミノ酸残基約4～6個ほどのペプチドに包含されてもよいし、より大きなタンパク質セグメントに包含されてもよく、特に抗体に結合するエピトープに関してエピトープの三次元構造に言及する場合、連続したアミノ酸残基で構成される必要はない。抗体に結合するエピトープは、連続的なエピトープ（すなわち線状エピトープ）よりはむしろ立体配座依存型エピトープ、言い換えれば、抗体が結合するタンパク質またはポリペプチドの表面上で三次元的に配置されたアミノ酸残基によって規定されたエピトープであることが多い。上述のように、立体配座依存型エピトープはアミノ酸残基の連続配列で構成されるのではなく、その代わりに該残基は恐らくタンパク質一次配列中で大きく離れており、該タンパク質がフォールディングして固有の三次元立体配座となる方式で寄せ集められて結合表面を形成する。従って、本発明は、Z n T 8 エピトープを含むかまたはZ n T 8 エピトープで構成される任意のタンパク質またはペプチド、ならびにZ n T 8 タンパク質の任意のエピトープに結合する抗体、抗原結合フラグメント、またはその他の結合性パートナー（結合性ペプチド）を含む。

20

30

【0129】

「イソエピトープ」は、本発明によれば、多型による異なるアミノ酸部位を含むエピトープのような、バリエーション型またはアイソフォーム（天然のものでも合成設計によるものでもよい）の状態が存在するエピトープである。イソエピトープの一例は、本明細書中では、1つのイソエピトープは325位にアルギニンを含み、その位置に2つの他のバリエーション（T r p 3 2 5 および G l n 3 2 5）が天然に存在するZ n T 8 の325位を含むエピトープについて記載されている。これらの3つのバリエーションはイソエピトープである。

40

【0130】

当業者は、既知の技術、例えば突然変異分析（例えば部位特異的変異誘発）；タンパク質分解からの保護（タンパク質フットプリント法）；例えば合成ペプチドとペプスキャン（pepscan）法、B I A C O R E、もしくはE L I S A とを使用するミモトープ分析；抗体競合によるマッピング；コンビナトリアルペプチドライブラリのスクリーニング；マト

50

リックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析法;または3次元モデリング(例えば、任意の適切なソフトウェア・プログラムであって限定するものではないがMOLSCRIPT 2.0(アバターソフトウェアAB(Avatar Software AB)、スウェーデン国ストックホルムSE 11731、ヘレネボルグスガタン(Heleneborgsgatan) 21C所在)、グラフ表示プログラムO(ジョーンズ(Jones)ら、Acta Crystallography, vol. A47, p. 110, 1991)、グラフ表示プログラムGRASP、またはグラフ表示プログラムINSIGHT)などを使用して、立体配座依存型エピトープおよび/または連続性エピトープを同定かつ/または組み立てることができる。例えば、分子の置換またはその他の技法および関連タンパク質の既知の三次元構造を使用して、ZnT8の三次元構造をモデル化し、かつこの構造に結合する抗体の立体配座依存型エピトープを予測することができる。実際に、そのような技法の1つまたは任意の組み合わせを使用して抗体結合エピトープを明らかにすることができる。

10

【0131】

本発明において有用な抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、二価および一価抗体、二重特異性または多重特異性の抗体、そのような抗体を含む血清、様々な程度に精製された抗体、ならびに完全な抗体の任意の機能的相当物を挙げることができる。本発明の単離抗体には、そのような抗体を含む血清、または様々な程度に精製された抗体が含まれる。別例として、完全な抗体の機能的相当物、例えば1つ以上の抗体ドメインが短縮されているかもしくは存在しない抗原結合フラグメント(例えばFv、Fab、Fab'、もしくはF(ab)₂フラグメント)、ならびに遺伝子組換え型の抗体もしくはその抗原結合フラグメント、例えば単鎖抗体もしくは2以上のエピトープに結合することができる抗体(例えば二重特異性抗体)、または1以上の異なる抗原に結合することができる抗体(例えば二重特異性または多重特異性の抗体)も、本発明において使用することができる。

20

【0132】

遺伝子組換え型の抗体には、抗体の可変領域または定常領域のうち少なくともいずれか一方をコードするDNAの操作および再発現を伴う標準的な組換えDNA技術によって生産されたものが含まれる。特定の例としては、抗体のV_Hドメインおよび/またはV_Lドメインが抗体の残りの部分とは異なる供給源由来であるキメラ抗体、ならびに、少なくとも1つのCDR配列および場合によっては少なくとも1つの可変領域構成アミノ酸が1つの供給源に由来し、可変領域の残りの部分および定常領域(必要に応じて)は異なる供給源に由来するCDR移植抗体(およびその抗原結合フラグメント)が挙げられる。キメラ抗体およびCDR移植抗体の構築については、例えば欧州特許出願公開第EP-A 0194276号、同第EP-A 0239400号、同第EP-A 0451216号および同第EP-A 0460617号に記載されている。

30

【0133】

一般に、抗体の生産においては、例えば、限定するものではないが、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、マウス、ラットまたはニワトリのような適切な実験動物を、抗体が所望される抗原に曝露する。典型的には、動物を、該動物に注入される有効な量の抗原を用いて免疫化する。有効な量の抗原とは、その動物が抗体産生を引き起こすのに必要な量を指す。その後、所定の期間にわたって動物の免疫系に应答させておく。免疫系が抗原に対する抗体を産生していることが分かるまで、免疫化処置を繰り返すことができる。抗原に特異的なポリクローナル抗体を得るためには、所望の抗体を含む動物から血清を回収する(またはニワトリの場合には、抗体を卵から回収することができる)。そのような血清は試薬として有用である。例えば該血清を硫酸アンモニウムで処理することにより、血清(または卵)からポリクローナル抗体をさらに精製することができる。

40

【0134】

モノクローナル抗体は、ケーラー(Kohler)およびミルシテイン(Milstein)の方法(Nature 256:495-497, 1975)によって生産することが可能である。例えば、免疫化した動物の脾臓(または任意の適切な組織)からBリンパ球を回収し、次にミエローマ細胞と融

50

合させて、適切な培地中で継続的に増殖可能なハイブリドーマ細胞の集団を得る。ハイブリドーマによって産産された抗体が所望の抗原に結合する能力を試験することにより、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択する。

【0135】

本発明は、対象とするタンパク質に選択的に結合するように設計された、抗原結合パートナーまたは抗原結合ペプチドと呼ばれることもある非抗体ポリペプチドにも及ぶ。規定のリガンド特異性を所有するそのようなポリペプチドの設計の例は、参照により全体が本願に組み込まれるベスト（Beste）らの文献（Proc. Natl. Acad. Sci. 96:1898-1903, 1999）に示されている。

【0136】

本発明によれば、本明細書中で一般に使用される用語「抗原」は：天然に存在するかまたは合成的に誘導されたタンパク質の任意の部分（ペプチド、部分的タンパク質、完全長タンパク質）、細胞の構成成分（細胞全体、細胞溶解産物または破壊された細胞）、生物（生物全体、溶解産物または破壊された細胞）または炭水化物もしくはその他の分子、またはその一部を指し、該抗原は、抗原特異的免疫応答（体液性および/または細胞性免疫応答）を誘発するか、もしくは別例として、抗原が投与される動物の細胞および組織内部で遭遇するのと同じまたは同様の抗原に対する、トレラゲン（toleragen）として作用する。

【0137】

本発明の一実施形態において、免疫応答を刺激することが望ましい場合、用語「抗原」は、用語「免疫原」と互換的に使用することが可能であり、本明細書では、動物に（例えば本発明のワクチンにより）該免疫原を投与すると該動物の組織内部で遭遇するのと同じまたは同様の抗原に対する抗原特異的免疫応答が開始されるように体液性および/または細胞性免疫応答を誘発する（すなわち、免疫原性である）抗原について述べるために使用される。別の実施形態では、所与の抗原に対する免疫応答を抑制することが望ましい場合、抗原はトレラゲンを含むことができる。本発明によれば、「トレラゲン」は、抗原であって、該抗原に対する免疫応答が低下または変化し、かつ好ましくは、ほぼ無反応であるか、アレルギーであるか、その他の不活性であるか、またはトレラゲンもしくはそのようなトレラゲンを発現もしくは提示している細胞との接触に対応する免疫細胞が欠落しているような形態、量もしくは投与経路で提供される抗原について述べるために使用される。

【0138】

「ワクチン接種用抗原」は免疫原でもトレラゲンでもよいが、ワクチン中で使用される抗原であり、生物学的応答（免疫応答、寛容性誘発）は該ワクチン接種用抗原に対して誘発されることになる。

【0139】

所与の抗原の免疫原性のドメイン（部分、フラグメント、エピトープ）は、動物に投与された時に免疫原（またはトレラゲン性ドメインについてはトレラゲン）として作用する少なくとも1つのエピトープを含む、抗原の任意の部分（例えばペプチドの断片もしくはサブユニット、または抗体エピトープもしくはその他の立体配座依存性エピトープ）であってよい。例えば、単一のタンパク質が複数の異なる免疫原性ドメインを含むことができる。免疫原性ドメインは、体液性応答の場合にはタンパク質内の線状の配列である必要はない。

【0140】

一般的には、エピトープは、免疫応答を誘発するのに十分な、所与の抗原内部の単一の免疫原性部位、または免疫応答を抑制、除去、もしくは不活性化するのに十分な、所与の抗原内部の単一のトレラゲン性部位として、本明細書中で定義される。上記に議論されるように、当業者は、T細胞エピトープはB細胞エピトープとは異なる大きさおよび組成であること、またクラスI MHC経路を通過して提示されたエピトープはクラスII MHC経路を通過して提示されたエピトープとは異なることを認識するであろう。エピトープは、免疫応答の種類に応じて、線状配列のエピトープであっても立体配座依存性エピトープ

10

20

30

40

50

ブ（保存された結合領域）であってもよい。抗原は、単一のエピトープと同程度に小さくても、より大きくてもよく、複数のエピトープを含むことができる。そのため、抗原の大きさは約5～12アミノ酸程度（例えばペプチド）であってもよいし、また、完全長のタンパク質、例えば多量体タンパク質および融合タンパク質、キメラタンパク質、細胞全体、微生物全体、またはこれらの一部（例えば細胞全体の溶解産物または微生物の抽出物）などと同程度に大きくてもよい。

【0141】

本発明の組成物および製剤

ZnT8タンパク質、相同体（改変ペプチドを含む）、フラグメント、ペプチド、ペプチドおよび非ペプチドのミメティック、ならびに抗体およびその抗原結合フラグメントは、本発明において有用な組成物、製剤および特にワクチンに含めることができる。そのような組成物、製剤またはワクチンは、薬学的に許容可能な担体を含むことが可能であり、該担体には薬学的に許容可能な添加剤および/または送達用ビヒクルが挙げられる。本明細書で使用されるように、薬学的に許容可能な担体とは、適切な*in vivo*または*ex vivo*の部位に本発明の方法に有用な組成物、製剤またはワクチンを送達するのに適した任意の物質を指す。好ましい薬学的に許容可能な担体は、送達すべき作用物質（例えばZnT8タンパク質、相同体（改変ペプチドを含む）、フラグメント、ペプチド、ペプチドおよび非ペプチドのミメティック、ならびに抗体およびその抗原結合フラグメント）を、該作用物質が標的細胞または標的部位に到着するとすぐにその細胞または部位で作用することができる（例えば、免疫応答を引き起こすことができる）形態に維持することができる。本発明の適切な添加剤には、作用物質を輸送するかまたは輸送を支援するが、ある部位へ向けて作用物質を特異的に差し向ける（標的化する）のではない添加剤または処方物（本明細書では非標的化担体とも呼ぶ）が挙げられる。薬学的に許容可能な添加剤の例としては、限定するものではないが、水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、血清含有溶液、ハंक溶液、その他の水性の生理的平衡液、油、エステルおよびグリコールが挙げられる。水性担体は、例えば化学的安定性および等張性の増強により被投与者の生理学的条件に接近するのに必要な、適切な補助物質を含むことができる。適切な補助物質には例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ならびに、リン酸緩衝液、トリス緩衝液および重炭酸緩衝液を生産するために使用されるその他の物質が含まれる。補助物質はさらに、チメロサル、*m*-クレゾールまたは*o*-クレゾール、ホルマリンおよびベンゾールアルコールのような保存剤を含むこともできる。本発明の組成物は従来の方法によって滅菌されてもよいし、かつ/または凍結乾燥されてもよい。

【0142】

ある種類の薬学的に許容可能な担体は、本発明の組成物を動物体内に徐々に放出することができる制御放出製剤を含む。本明細書で使用されるように、制御放出製剤は本発明において有用な作用物質を制御放出用ビヒクル中に含む。適切な制御放出用ビヒクルには、限定するものではないが、生体適合性のポリマー、他のポリマーマトリックス、カプセル、マイクロカプセル、微粒子、ポーラス調製物、浸透圧ポンプ、拡散デバイス、リポソーム、リボスフェア、および経皮送達システムが含まれる。適切な送達ビヒクルには、限定するものではないが、リポソーム、ウイルスベクターまたは他の送達ビヒクル、例えばリポザイムも含まれる。天然の脂質を含む送達ビヒクルには細胞および細胞膜が挙げられる。人工の脂質を含む送達ビヒクルにはリポソームおよびミセルが挙げられる。本発明の送達ビヒクルは、患者の特定の部位を標的とするための修飾を受けることにより、作用物質をその部位に標的化し該部位で活用することができる。適切な修飾には、送達ビヒクルの脂質部分の化学組成を操作すること、かつ/または該ビヒクル内に、好ましい部位、例えば好ましい種類の細胞に対して送達ビヒクルを特異的に標的化することが可能な標的指向性物質を導入することが挙げられる。

【0143】

ワクチンは、特定の抗原に対して動物を免疫化または寛容化するために使用される特定

10

20

30

40

50

の種類組成物である。従って、ワクチンは、該ワクチンの投与の結果として、抗原またはその免疫原性部分もしくはトレラゲン性部分に対する免疫応答を誘発する、少なくとも1つの化合物または作用物質を含む。ワクチンの投与は、好ましくは保護効果または治療効果をもたらす、その後の抗原（または抗原の供給源）への曝露により、該動物の疾患または症状を縮小または予防する、該抗原（または供給源）に対する免疫応答が誘発される。そのような免疫応答は、一般に抗原に対する免疫応答を増強または抑制することが可能であり、ZnT8の場合には、ワクチンがZnT8および/または膵島細胞に対する免疫応答を抑制することが好ましい。ワクチン接種の概念は当分野において良く知られている。本発明の治療用組成物の投与によって誘発される免疫応答は、ワクチンを投与しない状態と比較して、免疫応答の任意の面（例えば細胞性応答、体液性応答、サイトカイン産生）において何らかの検出可能な変化であってよい。

10

【0144】

本発明の方法

本発明は、1型糖尿病（T1D）に關与する新規な自己抗原としてのZnT8の同定を利用する様々な方法をも含んでいる。そのような方法には、診断アッセイおよび疾患の進行または治療の有効性を監視するためのアッセイ、ならびに免疫療法およびワクチン戦略を含む予防方法および治療方法が挙げられる。ZnT8は、T1Dの診断、予防および/または治療に役立つ化合物を同定するための新規な標的として使用することもできる。本発明の方法は、上述のZnT8タンパク質、ペプチド、ミメティック、相同体、抗体、または核酸分子などのうち任意のものを利用する。いくつかの実施形態では、そのような作用物質は方法の有効性を増大させるために他の診断用もしくは治療用成分と組み合わせられる。例えば、ZnT8以外の他の自己抗原（例えばインスリン、インスリンノーマ抗原、および/またはグルタミン酸脱炭酸酵素）の検出を、診断アッセイの有効性、感度および特異性を拡張するためにZnT8の検出と組み合わせることが可能であり、様々な治療用成分（例えば毒素、抗炎症薬、抗原）をZnT8作用物質と組み合わせるかまたは結合させて、患者における治療効果を増強することもできる。

20

【0145】

従って、本発明の1つの実施形態は、糖尿病関連の自己免疫（すなわち1型糖尿病またはT1D）を検出する方法およびアッセイに関する。そのようなアッセイを、（例えば、T1Dを発症している患者もしくは被験者群を同定するため、またはT1Dに対する感受性を予測するための）診断アッセイとして、または予後判定/監視アッセイとして使用することができる。後者のアッセイは、自己免疫反応の最初の良性の（非破壊的な）兆候から明白なT1Dを示す破壊的膵島炎まで、患者または被験者群における自己免疫の進行を監視するために使用することができる。後者のアッセイは、糖尿病前症の被験者の自己免疫を予防および/または治療もしくは軽減を対象とした治療の有効性を監視するために使用することもできる。例えば、被験者に、1以上の免疫抑制剤または予防薬、例えば、限定するものではないがZnT8分子自体に基づいた作用薬を投与し、次いでT1Dへと進行するかしないかを本発明のアッセイを使用して監視することができる。アッセイは、被験者におけるZnT8に対する自己抗体反応の検出に基づくものでもよいし、または被験者におけるZnT8の抗原性エピトープへのTリンパ球の反応性の検出に基づくものでもよい。上記アッセイは、別々に使用してもよいし互いに併用してもよい。

30

40

【0146】

一実施形態では、本発明は、ZnT8に特異的に結合する抗体が被験者に存在するか否かを検出する抗体アッセイを含む。本発明の方法を使用して、患者の血清中のZnT8に対する抗体のレベルに基づいて、1型糖尿病を発症する可能性が最も高いかまたは発症している患者を有効に同定または選択する、例えば発症までの時間のような要素を予測する、または疾患の進行もしくは病期を監視するために使用することができる。該方法は、特定の治療手段に回答する患者または回答しない患者を有効に同定または選択するために使用することもできる（すなわち、該方法は特定の患者について治療手段を示したり禁忌を示したりするために使用される）。

50

【0147】

本発明の自己抗体アッセイの1つの態様では、ZnT8の遺伝子およびタンパク質の多型性によって規定される特定のイソエピトープが検出される。イソエピトープ特異性の診断は、完全なタンパク質または該タンパク質由来のペプチドとしての特異的リガンドに対する抗体の結合を用いることができる簡単な診断テストで達成することができる。特異性の詳しい分析は、過剰量の特異的タンパク質バリエーションまたは誘導ペプチドが抗体のリガンドとの相互作用と競合する能力を測定することにより達成することができる。そのようなアッセイのための分析の基盤は、放射免疫沈降法、ELISA、ルミネッセンス時間分解蛍光法またはいくつかの他の一般的なアッセイ形式であってよい。

【0148】

該方法は一般に、任意の適切な技法を使用して患者または被験者の試料（試験試料）中のZnT8に選択的に結合する自己抗体を検出することを含む。試験試料が臨床的またはその他の点に関連するレベルの抗ZnT8抗体を含むかどうかを判断するために、患者の抗体結合のレベルを、陽性対照（例えば血清の陽性対照）に対して標準化し、抗原（ZnT8）およびアッセイについて実験的に測定されたかまたは予め規定されたカットオフ（陰性対照のレベル）と比較することができる。該アッセイは、ZnT8以外の追加の自己抗原、例えば、限定するものではないが、インスリン、インスリノーマ抗原およびグルタミン酸脱炭酸酵素についてスクリーニングする能力を備えていてもよい。

【0149】

本発明のこの方法またはアッセイは、さらに具体的には、患者の抗体を検出することができるZnT8抗原を提供することを含む。ZnT8抗原は、患者体内のZnT8に対する血清抗体を検出する任意の適切なZnT8由来の抗原、例えば完全長のZnT8タンパク質、またはその相同体、フラグメント、融合タンパク質、改変ペプチドもしくはペプチドミメティックを含むことができる。ZnT8抗原は少なくとも1つの抗体エピトープを含んでいる。特に好ましいZnT8抗原は、上記に詳細に述べたZnT8タンパク質のC末端ペプチドである。

【0150】

本発明に従い、本明細書に述べるようなこの情報の意図した用途に従って抗体をスクリーニングするのに有効な条件下でアッセイを実施する。有効な条件には、限定するものではないが、細胞増殖を可能にする適切な培地、温度、pHおよび酸素の条件が挙げられる。一般に、患者由来の試験試料を、競合的または非競合的な条件下でZnT8抗原と接触させ、ZnT8抗原への試験試料中の自己抗体の結合を検出し、定量し、陰性および/または陽性対照と比較する。試料中のZnT8に対する自己抗体を検出するために使用される技法には、任意の適切なアッセイ、例えば、限定するものではないが、ELISA（直接的または間接的）、放射免疫沈降法、時間分解蛍光法および発光アッセイを挙げることができる。そのようなアッセイ形式は当分野において良く知られている。

【0151】

本発明のこの実施形態において使用するのに好適な1つのアッセイは、競合的ユーロピウムアッセイである。そのようなアッセイは、米国仮特許出願第60/822,786号明細書に詳細に述べられており、該文献は参照により全体が本願に組み込まれる。この方法は概して、検出方法にユーロピウム蛍光を使用する競合的抗体アッセイを行なうことを含む。より具体的には、該方法は、アッセイ用プレートのウェルまたはその他の適切な基材のような基材に、目的の抗体が選択的に結合する抗原を固定化するステップと；基材上の非特異的結合部位をブロックするステップと；流体状の抗原の存在下および非存在下でプレインキュベーションした試験試料（例えば抗体について評価すべき被験者由来の血清試料）を、プレートに載せるステップ（すなわち競合ステップ）と；最後に、ユーロピウムを用いる検出法を使用して、固定化された抗原に結合した抗体を検出するステップであって、該抗体は例えば作用薬（例えばビオチン）と、次いでユーロピウムで標識された第1の作用薬に結合する第2の作用薬（例えばストレプトアビジン）とコンジュゲートした二次抗体である、ステップとを含む。その後、ユーロピウムにより放出される蛍光の

10

20

30

40

50

レベルを、標準的な検出法を使用して検出することができる。該アッセイは競合アッセイであるので、抗原とともにプレインキュベーションした試料からの蛍光カウント値を、抗原とともにプレインキュベーションしなかった試料からの蛍光カウント値から差し引いて結果のレベルを得る。試験試料が臨床的またはその他の点に関連するレベルの抗体を含むかどうかを判断するために、上記のレベルを血清の陽性対照に対して標準化し、抗原およびアッセイについて実験的に測定したかまたは予め規定したカットオフ値（陰性対照レベル）と比較することができる。

【0152】

本発明によれば、用語「試験試料」は、本発明によって検出しようとする抗体を含むと考えられるか、含む可能性がある任意の種類（個人、患者、動物）から得られた任意の生体試料である。したがって、試料には、検出しようとする抗体を含む可能性がある細胞上清液、体液、組織またはその他の培地を挙げるることができる。試料採取に適した体液には、限定するものではないが、血液、粘液、および母乳が含まれ、最も好ましいのは血液試料または血清試料、特に好ましいのは血清である。

【0153】

上記に議論されるように、本発明のアッセイは、1つの抗体特異性（すなわちZnT8）を検出するために構成されてもよいし、2以上の（例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10種の）抗体特異性を検出（すなわち異なる抗原もしくは同じ抗原の異なるエピトープ、またはその組み合わせに結合する抗体を検出）するために構成されてもよいし、多数（>10）の抗体特異性を検出するために構成されてもよい。言い換えれば、該方法は、単一のアッセイまたは実験において1つ、2以上、または多数の異なる抗体を検出するために（例えば、該アッセイにより単一の試料が多数の異なる抗体についてスクリーニングされるように、単一のプレートまたはアッセイ用基材の異なるウェルに異なる抗原および/または抗原エピトープ（一群の抗原および/またはエピトープ）を入れることにより）構成される。さらに、該アッセイは、被験者集団に関する情報を得るためにハイスループット方式で多数の被験者をスクリーニングするように構成されてもよい。

【0154】

本発明の方法にはいくつかの異なる用途がある。本発明の方法は、臨床（例えば、診断、予後判定、および治療）目的および研究目的の両方を含む任意の有用な目的のために試料中の抗体を検出するために使用することができる。本発明の方法はヒトまたはヒト以外の動物の試料を使用して行なうことができる。第1に、該方法は、被験者におけるT1Dを診断するために、またはより重要なこととしてはT1Dが発症する可能性または発症開始までの時間を判断するために使用することができる。被験者は、T1Dの疑いのある人でも、T1Dになりやすいことが分かっている人でもよいし、または健康であると推定されるが所定のスクリーニングもしくは診断上のスクリーニングを受けている人であってもよい。被験者は、以前にT1Dと診断されて治療が開始された人で、現在はT1Dの進行について監視下にある人でもよい。用語「診断する」、「診断」、「診断すること」およびこれらの変形語は、疾患または状態をその兆候および症状に基づいて同定することを指す。本明細書で使用されるように、「陽性の診断」は、疾患もしくは状態、または該疾患もしくは状態を発症する可能性が同定されたことを示す。対照的に、「陰性の診断」は、疾患もしくは状態、または該疾患もしくは状態を発症する可能性が同別されていないことを示す。

【0155】

本発明の別の実施形態では、該方法はT1Dのための治療手段が有益であるかまたは有益でないと予測される患者を選択するために使用することができる。同様に、該方法はある特定の患者についてある特定の治療手段を示すか該治療手段が禁忌であることを示すために使用することができる。この実施形態では、該方法は一般に、次のステップ：（a）本明細書中で詳細に記述されるように抗体の検出のための本発明の方法を実施するステッ

ブ；(b)患者の試料中の抗体のレベルを、抗体の対照レベルであって以下の：(1)治療手段に対する反応性と関連している抗体の対照レベル；および(2)治療手段に対する非反応性と関連している対照レベル、から選択される対照レベルと比較するステップ；ならびに(c)患者の試料中の抗体のレベルが、治療手段に対する非反応性と関連している抗体の対照レベルよりも、治療手段に対する反応性と関連している抗体の対照レベルに統計的により類似している場合に、該治療手段が有益であると予測されるとして患者を選択するステップ；または(d)患者の試料中の抗体のレベルが、治療手段に対する反応性と関連している抗体の対照レベルよりも、治療手段に対する非反応性と関連している抗体のレベルに統計的により類似しているかもしくは該レベル未満である場合に、該治療手段が有益ではないと予測されるとして患者を選択するステップ、を含む。例えば、そのような方法は、患者への抗炎症薬の投与、またはZnT8もしくは別の自己抗原もしくはこれらの発現を選択的に標的とする作用薬の投与を示すか該投与が禁忌であることを示すのに有用となりうる。この実施形態の他の態様は、当業者には明白であろう。

10

20

30

40

50

【0156】

本発明の方法を使用する抗体の検出に関しての陽性の診断または予後判定は、抗体が試料中に、同じタイプの試料中の実験的に測定したかまたは予め規定した陰性すなわち「正常な」レベルの抗体よりも統計的に有意に高いレベルで存在することを示す(すなわち、「正常な」レベルとは、T1Dではない被験者に見出される抗体検出レベルであるかまたはT1Dではない被験者に見出されるレベルの平均である)。陽性の診断または予後判定を確立するためには、試験試料中に検出された抗体のレベルは、設定または測定したベースラインよりも統計的に有意な(すなわち、少なくとも95%信頼水準または $p < 0.05$ の)量だけ上回る。試料中の抗体レベルを標準化する方法、または該レベルの「指数」を作成する方法は、当分野において周知である。本発明の方法を使用する抗体の検出に関しての陰性の診断または予後判定は、抗体が試料中に検出不可能であるか、または同じタイプの試料中の実験的に測定したかまたは予め規定した陰性すなわち「正常な」レベルの抗体よりも統計的に有意に高いレベルほど統計的に有意に高くはない(低い場合もある)レベルであるかのいずれかであることを示す。

【0157】

本発明のさらに別の実施形態は、ZnT8に特異的に結合するT細胞が被験者に存在するか否かを検出するTリンパ球アッセイを含む。上記に議論した抗体アッセイと同様に、本発明のこの方法を使用して、患者の血清中におけるZnT8に対するT細胞の応答性のレベルに基づいて、1型糖尿病を最も発症しやすい、または発症しつつある患者を有効に特定または選択することを、発病までの時間のような要因の予測、または疾患の進行もしくは病期の観察も含めて、行うことができる。該方法は、ある特定の治療手段に応答するか、または応答しない患者を有効に特定または選択するために使用することもできる(すなわち、該方法は特別の患者について治療手段を示すかまたは該手段が禁忌であることを示すために使用される)。

【0158】

この実施形態の1つの態様では、該方法は、ZnT8の多型性に関して本明細書に記載されるイソエピトープの検出を含む。アッセイは、分子の変異領域または不変領域のいずれかを含むタンパク質配列をコードする、典型的には長さ8~20アミノ酸の小さなペプチドを区別することができる。T細胞応答は、典型的には末梢血中で観察されるが、身体の他の部分から得られたリンパ球集団について適用することも考えられる。そのようなアッセイ用の分析の基盤は、増殖、サイトカイン産生もしくは他の表面に出る活性化マーカー、または細胞内のタンパク質マーカーもしくは脂質もしくは炭水化物に基づくものということも考えられる。これらのアッセイの解釈には、通常はその人のHLAクラス1およびクラス2遺伝子型についての情報も必要であろう。

【0159】

本発明のこれらの実施形態では、少なくとも1つのZnT8 T細胞エピトープを含むZnT8抗原は、患者からの試験試料中のZnT8特異的Tリンパ球(T細胞)応答を検

出するアッセイにおいて提供される。T細胞エピトープを含むZnT8タンパク質および抗原については、上記に詳細に議論されている。例えば、一実施形態では、本アッセイにおいて*in vitro*翻訳系の産物が有用である。アッセイ形式は、抗原についての任意の適切なTリンパ球アッセイ、例えば、限定するものではないが、Tリンパ球増殖反応測定法、MHCクラスIおよびIIのテトラマー試薬を用いるアッセイ、フローサイトメトリー法、およびELISPOTアッセイでよい。従って、適切なアッセイには細胞系のアッセイおよび非細胞系アッセイを含めることができる。後者の場合、可溶性T細胞受容体を、例えば可溶性MHC分子（例えばテトラマー試薬）に結合したZnT8抗原を検出するための結合アッセイまたはイムノアッセイに使用することができる。前者の場合、細胞表面上のT細胞受容体への抗原の結合を、典型的には該細胞の増殖またはサイトカイン

10

【0160】

抗体アッセイと同様に、ZnT8 T細胞応答の検出に関しての陽性の診断または予後判定は、ZnT8特異的なT細胞（自己反応性T細胞）が、患者の試料中に、同じタイプの試料中の実験的に測定したかまたは予め規定した陰性すなわち「正常な」レベルのそのようなT細胞応答（すなわち、「正常な」レベルは、T1Dではない被験者に見出されるT細胞応答のレベルであるかまたは該レベルの平均である）よりも統計的に有意に高いことを示す。陽性の診断または予後判定を確立するためには、試験試料中に検出されるZnT8特異的なT細胞応答のレベルは、設定または測定したベースラインよりも統計的に有意な（すなわち、少なくとも95%信頼水準または $p < 0.05$ の）量だけ上回る。試料中のZnT8特異的なT細胞応答のレベルを標準化する方法、または該レベルの「指数」を作成する方法は、当分野において周知である。本発明の方法を使用するZnT8特異的なT細胞応答の検出に関しての陰性の診断または予後判定は、ZnT8特異的なT細胞応答が試料中に検出不能であるか、または同じタイプの試料中の実験的に測定したかまたは予め規定した陰性すなわち「正常な」そのような応答のレベルよりも統計的に有意に高いレベルほど統計的に有意に高くはない（低い場合もある）レベルであるかのいずれかであることを示す。

20

【0161】

本発明に含まれるのは、上述のような診断法のうちいずれかを実施するためのキットである。該キットは、(a)アッセイ中で使用するためのZnT8抗原（上述のタンパク質、ペプチドまたはミメティックのうち任意のものなど）であって、流体相または基材上に固定化されたもの（抗原は既に固定化された状態で提供されてもよいし、固定化に適した形態で提供されてもよい）；ならびに(b)（細胞を用いるアッセイまたは非細胞系のアッセイにおいて）抗原への抗体の結合を検出するために使用される1もしくは複数の試薬、または抗原へのT細胞受容体の結合を検出するために使用される1もしくは複数の試薬のうち少なくともいずれか一方、を含む。アッセイを実施するのに有用な他の試薬、例えば、限定するものではないが、バッファー、二次抗体、アッセイを読み取るのに役立つ検出可能な標識および試薬、可溶性の結合タンパク質（例えば可溶性MHC、可溶性のT細胞受容体）、ならびに他の有用な試薬も含まれる。

30

40

【0162】

本発明の別の実施形態は、個体における1型糖尿病の発症を予防、遅延もしくは軽減するために対象者にワクチン接種を行い、膵島細胞に対する自己反応性のT細胞応答を抑制もしくは無効化し、かつ/または、膵島細胞に対する免疫応答を、破壊的な反応からそれほど破壊的でないかもしくはより保護的な応答へと変更するための、治療的かつ予防的戦略における重要な自己抗原としてのZnT8の同定に基づいた、様々な試薬の開発および使用に関する。

【0163】

一実施形態では、ZnT8タンパク質、ペプチド、相同体、ミメティック、ZnT8抗

50

体またはその抗原結合フラグメント、およびその他のZnT8由来の試薬またはZnT8ベースの試薬（該ペプチドまたは抗体が化学的または物理的に修飾されたものを含む）は、T1Dの進行または発症の経過を変更するため、かつ/または対象者において破壊的ではなくトレラゲン性もしくは保護的なZnT8特異的なTリンパ球応答を誘導するために、*ex vivo*または*in vivo*で対象者に投与される。一実施形態では、そのような作用物質はワクチンとして投与される。そのようなZnT8関連の作用物質/試薬については上述した。

【0164】

別の実施形態では、ZnT8特異的な自己反応性T細胞を標的として設計された、ZnT8を基にした抗原特異試薬を、T細胞にアポトーシスを誘導するかまたは他のかたちでT細胞に有毒な作用物質と併せて対象者に投与する。この方法は*in vivo*または*ex vivo*で実施することができる。例えば、ペプチド結合溝を形成する可溶性MHC分子（例えば米国特許第5,820,866号明細書を参照）を、ZnT8の抗原性もしくはトレラゲン性ペプチド（MHCに結合して本実施形態に従ってT細胞応答を誘導することができるZnT8の改変ペプチドおよび相同体を含む）と結合させる。そのような複合体を、T細胞がそのT細胞受容体を介して該MHCペプチド複合体に結合した時にT細胞のネクローシスまたはアポトーシスを引き起こすであろう毒素またはその他の作用物質と（任意の共有結合または非共有結合技法によって）さらに複合体化することができる。

10

【0165】

ZnT8のペプチドおよび相同体と複合体化（コンジュゲート、カップリング）するための作用物質として本発明で使用するのに有用な適切な毒素には、任意の毒素もしくはタンパク質、作用物質または分子であって細胞に対して毒性（ネクローシス性またはアポトーシス性）のものが含まれ、また本明細書に記載の治療用の環境において使用することができる任意の毒素が含まれる。そのような毒素には、限定するものではないが、Fasリガンド、アメリカヤマゴボウの抗ウイルスタンパク質、ボツリヌス毒素、リシンなどが挙げられる。

20

【0166】

さらに、本明細書に記載の遺伝学的分析、自己抗体アッセイ、およびT細胞アッセイから得ることができる知見は、特定の治療体制の使用についての決断に適用することができる。そのような治療体制は、ZnT8すなわちS1c30A8と無関係な作用物質、または抗原特異的な作用物質、例えば組換えZnT8タンパク質、ZnT8由来ペプチドであって単独もしくは別の作用物質、例えば毒素、リンパ球のような細胞、HLA分子もしくは免疫グロブリンのような分子と連結させたもの、またはS1c30A8 DNAであって単独もしくは別の作用物質と連結させたものに基づくものとするのが考えられる。治療は、抗原または抗原をコードするもしくは抗原の発現を阻害する核酸のいずれかに基づくものとするのも考えられるし、また所望の結果に応じてイソエピトープに一致するか mismatch であるかのいずれかに合わせることも考えられる。イソエピトープを、自己反応性を有する患者と一致させると、寛容性の状態を誘導することによって保護的とすることができる。他方、mismatch させると、有益な効果のために利用することも可能な免疫化のかたちとなる。個々のイソエピトープの状態によってどの経路が後続するかが決まり、作用物質のどのアイソフォームを使用するかが決まるので、最初は個々のイソエピトープの状態を知ることが不可欠であろう。

30

40

【0167】

そのような治療方法は、治療薬の有効性を試験することを目標とした診断アッセイと結び付けられることになる。そのような診断法は、場合によっては上述の自己抗体アッセイおよびT細胞アッセイの繰り返しになるであろうが；作製される試薬の中には疾患特異的な対象物に対して適用できるものがありうる。例えば、治療薬を含むかまたはコードしているイソエピトープを使用して、特定の種類の細胞を増殖させるか、活性化するか、または除去する目的でBリンパ球を関与させることが可能である。治療の有効性は、標的となる種類の細胞集団を追跡調査することにより評価することが考えられ、また、例えば、

50

B細胞集団にタグを付けるために蛍光性分子の酵素に連結されたイソエピトープペプチドを使用し、その後B細胞集団をフローサイトメトリーによって計数して表現型で特徴解析することが考えられる。そのような方法を適用して、パニング法または蛍光活性化細胞分類法によりそのような細胞集団を単離することも考えられる。

【0168】

本発明の予防方法および治療方法で使用される上記作用物質は、単独で、組成物として、製剤として、もしくはワクチンとして投与されてもよいし、かつ/またはT1Dの予防もしくは治療に有用な他の作用物質の投与と共に（一緒に、または連続的に）投与されてもよい。上記に議論されるように、本発明の組成物または作用物質は、該作用物質を標的細胞もしくは標的部位に送達し、その結果として該作用物質が標的部位で作用し、かつ/または標的細胞に対して効果を有するのに有効なやり方で患者に投与される。適切な投与プロトコールには任意の*in vivo*または*ex vivo*の投与プロトコールが含まれる。有効な投与プロトコール（すなわち、本発明の組成物または作用物質を有効なやり方で投与すること）は、対象者または細胞内において該組成物または作用物質の所望の活性、例えば自己反応性T細胞の自己抗原ZnT8に対する寛容性、自己反応性T細胞のアポトーシス、膵島炎および/または膵島細胞の破壊の予防または低減、ならびにT1Dの予防、発症の遅延、または重症度の軽減、をもたらす適切な用量パラメータおよび投与形式を含む。そのような投与から、患者が何らかの測定可能、観察可能または認識される利益を得ることが好ましい。有効用量のパラメータは、例えば、*in vitro*の細胞培養、*in vivo*の動物モデル、および最終的には、患者がヒトであれば臨床試験を使用して、実験によって決定することができる。有効用量のパラメータは、患者が罹患しているかまたは発症のリスクを有している特定の疾患または状態についての当分野で標準的な方法を利用して決定することができる。そのような方法には、例えば、生存率、副作用（すなわち毒性）、および該疾患の発症、進行または退行の測定が含まれる。

10

20

【0169】

投与経路には、*in vivo*、*in vitro*および*ex vivo*の経路が含まれる。*in vivo*の経路には、限定するものではないが、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、リンパ節内投与、冠状動脈内投与、動脈内投与（例えば頸動脈内）、皮下投与、経皮的送達、気管内投与、皮下投与、関節内投与、脳室内投与、吸入（例えばエアロゾル）、頭蓋内、脊髄内、眼内、耳内、鼻腔内、経口、経肺投与、カテーテルの注入、および組織内への直接注射が挙げられる。本発明の1つの好ましい実施形態では、非経口経路（例えば皮下、皮内、静脈内、筋肉内および腹腔内経路）によって組成物が投与される。静脈内、腹腔内、皮内、皮下および筋肉内投与は、当分野において標準的な方法を用いて実施可能である。耳内送達には点耳剤、鼻腔内送達には点鼻剤または鼻腔内注射、眼内送達には点眼剤を挙げることができる。エアロゾル（吸入）送達は、当分野において標準的な方法を用いて実施することができる（例えば、参照により全体が本願に組み込まれる、ストリプリング（Stripling）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992を参照のこと）。経口送達は、本発明の作用物質または組成物を、動物の消化管内の消化酵素による分解に耐えることができる担体と複合体化することにより行なうことができる。そのような担体の例には、当分野で知られているようなプラスチック製のカプセルまたはタブレットが含まれる。

30

40

【0170】

*ex vivo*とは、患者から取り出された細胞の集団に作用物質または組成物を送達する（または該細胞を作用物質もしくは組成物と接触させる）ことによるなど、規定のステップの一部を患者の体外で実施し、処理した細胞を患者に戻すことを指す。そのような細胞としては、例えばT細胞が考えられ、該T細胞は*in vivo*でZnT8と接触した時に生じる免疫応答の種類が変化するように誘導される。宿主細胞の培養物に対する組成物の*in vitro*および*ex vivo*の投与経路は、例えば、限定するものではないが、トランスフェクション、形質転換、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、プロトプラスト融合、タンパク質担持物質の使用、

50

イオン担持物質の使用、細胞透過化のための界面活性剤の使用、および培養物中で化合物を標的細胞および/もしくは標的タンパク質と単に混合する(例えば、合わせる)ことなどの方法によって実行されうる。

【0171】

タンパク質、小分子(すなわち薬物設計の産物)または抗体については、そのような作用物質の好ましい1回用量は、典型的には、動物の体重1キログラム当たり約0.01マイクログラム(約0.01マイクログラム×キログラム⁻¹)~体重1キログラム当たり約10ミリグラム(約10マイクログラム×キログラム⁻¹)からなる。作用物質のより好ましい1回用量は、動物の体重1キログラム当たり約1マイクログラム(約1マイクログラム×キログラム⁻¹)~体重1キログラム当たり約10ミリグラム(約10ミリグラム×キログラム⁻¹)からなる。作用物質のさらにより好ましい一回用量は、動物の体重1キログラム当たり約5マイクログラム(約5マイクログラム×キログラム⁻¹)~体重1キログラム当たり約7ミリグラム(約7ミリグラム×キログラム⁻¹)からなる。作用物質のさらにより好ましい一回用量は、動物の体重1キログラム当たり約10マイクログラム(約10マイクログラム×キログラム⁻¹)~体重1キログラム当たり約5ミリグラム(約5ミリグラム×キログラム⁻¹)からなる。作用物質の別の特に好ましい一回用量は、該作用物質が非経口的に送達される場合、動物の体重1キログラム当たり約0.1マイクログラム(約0.1マイクログラム×キログラム⁻¹)~体重1キログラム当たり約10マイクログラム(約10マイクログラム×キログラム⁻¹)からなる。

10

【0172】

本明細書に記載の方法から得られる予防上または治療上の有益性は、必ずしも特定の疾患または状態(例えば1型糖尿病)の治療というわけではなく、むしろ、糖尿病前症もしくは顕性T1Dの発症の遅延、または該疾患の破壊的様相の軽減により、治療しない場合に予測されるよりも長く、完全な膵島破壊を遅延させ、したがって患者が、インスリン療法に完全に依存し、その他の治療的介入を受け、また下流における該疾患の健康への有害な影響を受けるまでの時間をより長く与えることを最も含む結果を包含することも可能である。本明細書で使用されるように、「疾患から保護(される)」という語句は、該疾患の症状を低減すること;該疾患の発生もしくは発症を低減すること、および/または該疾患の重症度を低減することを指す。患者の保護とは、本発明の作用物質または組成物が該患者に投与されたとき、疾患の発生を予防する、かつ/または疾患の症状、兆候もしくは原因を治療もしくは緩和する能力を指すこともできる。そのため、患者を疾患から保護するとは、該疾患の発生を予防または遅延させること(予防的処置)、および疾患もしくは疾患前状態の患者を治療すること(治療的処置)のいずれをも含む。用語「疾患」は一般に、哺乳動物の正常な健康状態からの何らかの乖離を指し、疾患の症状が存在する時の状態と、乖離(膵島細胞の破壊)が生じてしまっているが症状はまだ表われていない状態とを含む。

20

30

【0173】

本発明の別の実施形態は、本明細書に記載のような診断アッセイにおいて、または本明細書に記載の発明の予防方法もしくは治療方法において有用な化合物を同定する方法に関する。そのような方法は、ZnT8をベースとした物質(例えばZnT8の核酸分子、タンパク質もしくはペプチド、相同体、ミメティック、抗体もしくはこれらのフラグメント、またはZnT8特異的なT細胞受容体)を、推定上の調節化合物と接触させるステップと、その推定上の調節化合物とZnT8をベースとした物質との間の相互作用および/または該相互作用から生じる影響を検出するステップとを含む。そのようなアッセイは細胞を用いるものであってもよいし、非細胞系アッセイであってもよい。例えば、上述のZnT8タンパク質(そのフラグメントおよび相同体を含む)を使用して、ZnT8に選択的に結合する抗体および該抗体の抗原結合フラグメントを同定することができる。ZnT8抗体またはZnT8特異的なT細胞受容体を使用して、診断用アッセイまたは治療用アッセイにおいて有用となるZnT8の相同体、ペプチドミメティック、改変ペプチドおよびフラグメントを同定することもできる。ZnT8をベースとした試薬を使用して、本明細

40

50

書に記載された診断方法または治療方法において使用するための、ミメティックを含む新規な合成試薬を設計することができる。ZnT8の核酸分子、タンパク質、ペプチド、ミメティックまたは抗体を使用して、個体におけるZnT8への免疫応答を抑制または変更することが可能な様々な調節化合物を同定することもできる。

【0174】

そのような方法のステップには一般に、ZnT8をベースとした物質を推定上の調節化合物と接触させるステップ、ならびにアッセイ中のZnT8をベースとした物質または細胞に対する影響を測定するステップ、例えばZnT8 mRNAの転写を（例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写PCR（RT-PCR）、*in situ*ハイブリダイゼーション、ノーザンブロット法、配列分析またはレポーター遺伝子の検出により）検出するステップ；ZnT8の翻訳を（例えばイムノブロット法、酵素免疫測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫沈降、免疫組織化学法および免疫蛍光法により）検出するステップ；および/またはZnT8の生物学的活性を（例えば、本明細書に記載のようなZnT8の活性のうちいずれかを検出すること、またはそのような活動の阻害もしくは抑制を検出することにより）検出するステップが挙げられる。この方法で検出された化合物は、本明細書に記載された診断方法、予防方法、または治療方法において使用することができる。

10

【0175】

本発明によれば、本明細書に記載された方法およびアッセイは、脊椎動物、哺乳類、例えば、限定するものではないが、霊長類、家畜および家庭用ペット（例えばコンパニオンアニマル）である患者（患者）において使用するのに適している。最も典型的には、患者はヒト患者であろう。

20

【0176】

以下の実施例は例証の目的で提供されるものであり、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。以下および本明細書中の他所で開示された各出版物またはその他の参考文献は、参照により全体が本願に組み込まれる。

【実施例1】

【0177】

以下の実施例は、新規な糖尿病自己抗原としてのZnT8（Slc30a8としても知られている）の最初の同定について述べる。

30

本発明者らは、事実上全ゲノムをカバーするアフィメトリクス社（Affymetrics）のヒトU133チップおよびマウスMOE430チップ、ならびにマウス膵臓中の遺伝子転写物について報告するPanchip 5.0を使用して、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイ実験を実施した。データは、正常なマウス、糖尿病モデル（NODおよびob/ob）ならびにIAPP遺伝子およびNgn3における欠失を備えたマウスから単離された膵島から、ならびにマウス膵臓腫瘍細胞株（aTC1-6グルカゴノーマ、TC3、およびMin6インスリノーマおよびmPAC腺管腫瘍株）から得た。データを解析して、膵島細胞種に特異的な発現を示す転写物、および膵臓の細胞と細胞との間の該転写物の区別を明らかにした。遺伝子オンロジー（GO）の注釈に基づいたさらなる分析を使用して、ヒトおよびマウス両方の候補自己抗原についての遺伝子リストを作成した。最高スコアの10候補のうち、5つは既知の糖尿病自己抗原であり、これに促されて本発明者らは、最高スコアの転写物のうちの1つ（ZnT8に相当）について、初発のヒトT1D被験者における体液性自己免疫の標的としての概念を検証する実験を実施した。この候補物に対して開発された血清学的アッセイは、糖尿病の被験者の20%において免疫反応性を検出し、対照では検出しなかった（<2.5%）。現時点での計画は、体液性自己免疫および細胞性自己免疫の両方のアッセイを使用して、上記リスト上でこの遺伝子およびその他の遺伝子の候補を調査すべく努めることである。

40

【0178】

具体的には、コードされるマウスmRNAのほぼ完全な範囲（トランスクリプトーム）をカバーする遺伝子マイクロアレイの出現により、膵島で発現する遺伝子サブセットの特

50

定が可能となった。いくつかの公表された研究により、膵島組織において、膵島細胞の種類に特異的に、また膵島由来の細胞株において発現する遺伝子が記録されている(67)(シャレフ(Shalev)、2002年)(68)。さらに、*in vitro*におけるグルコースまたは炎症性サイトカインを用いた刺激のような生理的かつ病態生理学的操作に対する膵島の反応についての研究、また膵臓の機能または発生に影響する突然変異遺伝子を有するマウスからの研究が報告されている。残念ながら、このデータの多くは、現在のところ中央管理機関の公的データベースを通じてアクセスすることができないか、様々なマイクロアレイ基盤上においてデータの正規化が困難であるかのいずれかである。本発明者らは、それぞれの生物種由来の事実上すべての転写物について報告する、ヒトU133オリゴヌクレオチドチップおよびマウスMOE430オリゴヌクレオチドチップの両方を使用して、50を超えるマイクロアレイ実験を実施した。これは、正常なマウス、糖尿病モデルマウス(NODおよびob/ob)ならびにIAPP遺伝子およびNgn3に欠失を有するマウスからのデータを含む。後者は、膵臓の内分泌細胞が完全に欠けており、したがって、様々な在胎時点での分析から、発生の全体を通して外分泌腺および腺管組織と比較して内分泌細胞内で高度に発現される転写物の同定が可能となった(69)。これらのデータを、組織の種類が45種の大きな非膵臓組織プールからのアレイデータおよびdbEST配列データ(ノバルティス(Novartis)データセットおよびユニジェン(Unigene)発現プロファイル)と比較した。マウス膵臓腫瘍細胞株(TC1-6グルカゴノーマ、TC3、およびMin6インスリノーマならびにmPAC腺管腫瘍株)の分析から、膵島細胞の種類に特異的な発現を示す可能性の高い転写物を選択するための予測スコアの作成、ならびに膵臓の細胞と細胞との間の該転写物の区別がさらに可能となった。これらの細胞株は、腫瘍細胞の表現型と関係する遺伝子を発現するので、ラットのインスリン2プロモーター下でEGFPに連結された自己抗原フォグリンを発現するトランスジェニックマウスから単離された膵臓細胞についても分析を実施した。表2は、ANOVA分析によって、第1にNgn3の野生型マウスおよびノックアウトマウスにおいて任意の胎生齢で差次的に発現するとして(膵臓の内分泌腺および前駆体)、また第2に成体マウスの膵島に存在するとして転写物が定義された遺伝子の一部をリストしている。次いで、該リストをTCおよびTC細胞株における相対的発現に基づいて層別化した。これらの手法により、Ipf1、Arx、Pax4、Pax6、Brn4、NeuroDのような膵島の発生に関与する既知の転写調節要素の大部分の膵島細胞特異性、ならびにいくつかの細胞および細胞遺伝子の既知の細胞種特異性がうまく予測された。PTPRN(IA-2)、プロホルモン転換酵素(Pcsk1、Pcsk2、Cpe)およびグラニン(Chga、Chgb、Scg2、Sgne1)のような既知の神経内分泌系の転写物は、共通のTCおよびTC転写物のプール内にあった。他の膵島内分泌細胞に関連した遺伝子は、予測のとおり、いずれ(Ppy、Pyyおよびグレリン)においても発現されなかった。既知の遺伝子の中にはいくつか驚くべきことがあり、例えば、ウィリアムズ・ビューレン症候群の染色体領域14の遺伝子が、細胞特異性を示す転写物として出現した。この転写因子は解糖系酵素および糖新生酵素の重要な調整因子であり、肝臓を起源とする2型糖尿病の形態と関連する(70)。該因子は広範囲に分布するものと一般に考えられている。*in situ*ハイブリダイゼーション分析を用いた追跡調査(データは示さない)から、実際に、該転写物は、発生途上の膵臓の内分泌細胞が出現する領域に見出され、また成体の膵臓においては細胞特異性と一致する分布状態で膵島に限局されることが示された。

【0179】

表2. e12.5、e15.5またはe18.5におけるNgn3 *ko*の膵臓で激減した遺伝子転写物を、内分泌細胞株TCおよびTCならびに成体の膵島における発現について調べた。膵島内分泌細胞の構成成分には下線が付され；既知の自己抗原は太字で強調されている。

【0180】

10

20

30

40

【表 2】

αTCで5倍未満の濃縮	βTCで5倍未満の濃縮	αTCでもβTCでも濃縮されず	αTCでもβTCでも発現されず
1110005D19Rik 1700040L02Rik 2310014L03Rik 2810431N21Rik 2900052J15Rik 6430527G18Rik 6430527G18Rik 7420452D20Rik 9430022M17Rik 9430023B20 9530058B02Rik A630013F22Rik Apoa2 Arx B230206N24Rik B230309E09Rik B430319H24Rik Btg2 Cald1 Car2 CGI-141- pending Copg2as2 D6Ert253e Ednra Eno2 Epb7.2 Fbp2 Fev -pending Foxf2 Galnt7 Gcg Gfra1 Glcc1 Gpr30 Gstt2 Hes1 Hs3st1 Ier3 Irx2 Iih2 Kap LOC224093 Mttp Pde3a Pde3a Pou3f4 Rbp4 Rgs4 Sbsn-pending Sdc4 Sdc4 Slc38a1 Soat1 Spp1 Tfpi Tle6 Trf Ttr 4930459B04Rik Ttyh1 Ttyh1 Vegfc Vldlr Zdhc14 Zfp52.	1100001E04Rik 1110035L05Rik 1700041C02Rik 1810018P12Rik 2010011I20Rik 2310007H09Rik 2610016M12Rik 2700049B16Rik 2900001G08Rik 3100002J23Rik 3110018A08Rik 3110050F08Rik 5830437M04Rik 5930418K15Rik 9330186A19Rik 9830147J24Rik A530058N18Rik A930001M12Rik A930009L07Rik Adcy7 Adra2a Al173274 Al315068 Al987662 Ang Asc -pending Atp2a3 AW125421 B630019K06Rik B930068K11Rik BC026600 BC052055 Bicc1 Bok Cat Cav2 Cd44 Crip Crp D930029E11Rik Dach2 Dcx Dpep1 Dpp4 Dscr111 Ebf3 Eif2s3y Elovl2 F13a Frabin -pending G6pc-rs Gch Gck Gipr Glp1r Gna13 Gpr27 H2-D1 Hlxb9 Hpca Hspa12a- pending Iapp Ins1 Ins2 Insm1 lpf1 Iqgap1 Krt2-8 Lgals2 Lhx2 Lmwdsp20- pending LOC194126 LOC215866 LOC328644 Maob Mbc2 MGC47419 Myo7b Necab2 -pending Nmi Nnat Npy Nudt7 Papss2 Papss2 Pclo Ppp1r1a Prcad -pending Prkcb Pvr13 Ramp1 Rasd1 Rasgrf1 Sepp1 Slc12a7 Slc2a2 Sli1l2 Stx3 Svil Sytl4 Tec Tnnt1 Ubap1 Wbscr14.	7-Sep 9030612M13Rik 9830160H19Rik A430107J06Rik Abcc8 Aco1 Actr3 ank Aplp1 Atp1a1 AW011752 AW011752 Banf1 BC016198 BC042620 BC061928 C130083N04Rik C230068E13 C820002P14Rik Calm1 Capza2 Ccnb1 Ccnh Ccni Cda08 -pending Cdc5l Cdkn2d Cgef2 -pending Chga Chab Chic1 Clcn3 Cotl1 Cpe Csnk1d D16lum22e D7Ert2743e D9Wsu20e Ddx9 Donson Dscr2 Emb Emb Foxa2 Gna11 Gng5 H2-D1 Hdac2 Hmgcr Hmgn3 Hmgn3 Hnrpab Hnrpu Hspa5 Ierep04 -pending Isl1 Khdrbs3 Kif11 Kif5b LOC218490 LOC226144 LOC231887 LOC240396 Map3k7 Matr3 Matr3 MGC65558 MGC6694 Mrps16 Mtch2 -pending Ndr3 Neurod1 Nkx2-2 Np95 Paxip1 Pcsk1n Pcsk2 Pctk1 Pfdn1 Pitpnb Pmp Psk1 -pending Psmb3 Ptprn Pttg1 Rab6 Rad21 Ramp2 Ranbp1 Rbpms Rcn2 Refbp2 Resp18 Risc -pending Rnpc2 Scq2 Sdfr1 Sfrs3 Sgne1 Smc41 Spi1-1 Sqle Ssb Syt13 Syt7 Syt7 Tmpo Tomm20- pending Txnrd1 Ube1c Ubl3 Ubqln2 Vdu1 -pending Wwp4 -pending Xlr3a Ywhab Ywhaz Yy1 Zfp364.	1810044E12Rik 2310010I16Rik 2310067E08Rik 4731413G05Rik 5133401E04Rik 5730453H04Rik 5930418K15Rik 6430401D08 6720464I07Rik 8430421H08Rik 9030425P06Rik AA589382 Ace2 Acvr2 Apoa1 Arfgef1 Asah2 B230312I18Rik BC027756 BC054438 Braf C030034I22Rik C130047D21Rik C130099L13Rik C1qb C3 C430010P07Rik Cdw92 Ceacam2 Cfh Cpne3 Ctss Dnajc13 E130113K08Rik Ecm1 Enah Fabp1 Fabp4 Fbxl12 Fcgr2b Fgl2 Fit1 Foxa3 Frzb Gbp2 Gca Ghr1 H2-Ab1 Hba-a1 Homez Hpvc2 I16ra Insr Jarid1c Kif9 LOC214424 LOC56628 Lyzs Lyzs Lyzs Mapk14 MGC25863 Mglap Mta3 Narg2 Ndel1 Nedd9 Nov Pah Pkhd1 Ppy Pvy Rbp7 Ret Rgpr -pending S100a6 S100a8 Scp2 Siat8c Sst Sycp3 Tacstd1 Timp3 Tm4sf3 Tnfrsf11b Tor3a Tpra40 -pending Trim44 Tslf2 -pending Usp15 Usp47 Utx Vcam1 Wasip1 Zfp219 Zfp3611 Zfp40 Zfpn1a2.

10

20

30

表 2 は、既知の T 1 D 自己抗原の分布についても、太字で強調して示している。この比較的単純なバイオインフォマティクス分析により、インスリン 1 および 2、IGRP (G6Pc-rs)、IAPP ならびに IA-2 (PTPRN) については予想された細胞部位に示されたが、GAD65 は示されなかった。しかしながら GAD65 は、ヒトの膵島には豊富でも (71)、マウスの膵島では本発明者らを含むほとんどの研究者によって検出されない。上記の分析は、多くの自己抗原が細胞種特異性を示すという事実を明確に示している。しかしながら、そのこと自体は候補物を規定するのには十分ではなく、したがってこのバイオインフォマティクス手法は、自己抗原候補の特質であると考えられるいくつかの特徴を考慮し、かつ同時に存在 / 不在の判定に基づいて候補を除外しないように改良されてきた。このモデルは本質的に次の特徴を考慮に入れている。

40

【 0 1 8 1 】

1. 必ずしも絶対的ではないが、自己抗原は標的細胞を伴う特異性を示す。
2. 大多数の自己抗原は標的細胞において中程度 ~ 高レベルで発現される。
3. T 1 D 自己抗原は、制御された分泌経路の構成分子と物理的に結合するようである。

50

【 0 1 8 2 】

- 4 . 細胞性自己免疫の標的の多くは、膜結合型のものである。
- 5 . ほとんどが末梢抗原を発現する胸腺細胞でも発現される。
- 6 . いくつかは組織特異的な選択的スプライシングを示す。

【 0 1 8 3 】

特徴 1 ~ 4 は、マイクロアレイのデータセットの共通部分および構成要素の遺伝子の注釈に基づいて評価することができる。そのようなデータに基づいて「自己抗原指数」を得ることは可能であると考えられるが、特定の構造的、分子生物学的、および細胞生物学的な特徴を抗原性に寄与するものとして重視する程度は、細胞性応答と比較した体液性応答への相対的寄与率のように、判定中である。上記の問題を扱うために、本発明者らは、発現の量および膵臓内分泌部への特異性に基づいて 2 組の遺伝子 (1 つはマウス、1 つはヒトの遺伝子) についてまとめた (表 3) ; マウスのデータは表 2 のデータに由来し、発現データのヒトのデータは、79 種のヒト組織のノバルティス (Novartis) Gene Atlas (7 2) に由来する。解析を Gene Spring および Gene Speed で実施したが、後者はジャン・ジェンセン (Jan Jensen) らによりコロラド州デンバー所在のバーバラ・デイビス・センター (Barbara Davis Center) で開発されたタンパク質ドメイン・データベースである。

10

【 0 1 8 4 】

表 3

A : マウス 細胞の転写物

308 個の転写物は、Ngn3 機能喪失 (null) マウスの膵臓中に存在しないこと、成体の膵島には存在すること、および β -TC 細胞株に存在すること、に基づいて選択された。これらの遺伝子それぞれについて UniGene EST 発現データベースを検索して、膵臓 (ただし膵島ではない) を含む 38 種の異なるマウス組織において各遺伝子が転写される頻度を測定した。100 万当たりの EST クローンの頻度を、全組織中の合計と比較して膵臓で観察された転写物の割合 (%) と共に表に示す (特異性)。発現量 (abundance) と特異性 (specificity) との積を用いてデータをソートした。既知の糖尿病自己抗原をコードする転写物は強調表示されている。

20

【 0 1 8 5 】

B : ヒトの転写物

71 種の異なるヒト組織を表わすノバルティスのカスタムオリゴヌクレオチドアレイについて、最初に、膵島データセット中のどの遺伝子が他のすべての組織のメジアン値と著しく異なるシグナルを示したかを判定するためにクエリを行った (ANOVA カットオフ < 0.0002)。すべての組織のメジアンのシグナルより 5 倍大きいシグナルを示したこれら転写物のサブセットにフィルタをかけ、低いシグナル強度 (< 200) を示す転写物、および膵島と比べて膵臓でより高いレベルで発現された転写物を除去した。その後、これらの基準を満たした 140 種の遺伝子を用いて UniGene EST 発現データベースを検索し、各遺伝子が膵臓を含む 52 種の異なるヒト組織で転写される頻度を測定した。膵臓についての 100 万当たりの EST クローンの頻度 (発現量、abundance) を、全組織中に対する膵臓中の転写物の割合 (%) と共に表に示す (特異性、specificity)。データを $Abu * Spec$ 指数によってソートした。既知の糖尿病自己抗原をコードする転写物は強調表示されている。

30

40

【 0 1 8 6 】

【表3】

マウス遺伝子					ヒト遺伝子						
名称	Unigene	ランク	存在量	特異性	Abu*Spec	名称	Unigene	ランク	存在量	特異性	Abu*Spec
Ins2	Mm.4946	1	8880.0	99.5	8834.2	INS	Hs.89832	1	15491.0	99.9	15470.0
Ins1	Mm.46269	2	8224.0	99.6	8190.1	SGNE1	Hs.156540	2	1884.0	50.7	955.7
Iapp	Mm.415	3	4458.0	98.7	4400.7	IAPP	Hs.46835	3	1670.0	51.2	854.7
G6pc-rs	Mm.140768	4	282.0	94.6	266.9	SLC30A8	Hs.532270	4	830.0	81.7	678.1
SLC30A8	Mm.208831	5	151.0	100.0	151.0	PCSK1N	Hs.522640	5	1026.0	42.9	439.9
Pcsk2	Mm.294493	6	765.0	18.2	138.9	GNAS	Hs.125898	6	4600.0	9.4	434.2
2900001G08f	Mm.102196	7	173.0	64.8	112.1	GAD65	Hs.231829	7	356.0	75.9	270.2
ERO1LB	Mm.326609	9	231.0	29.2	67.5	TM4SF4	Hs.133527	8	565.0	43.3	244.4
EST	Mm.25089	10	71.0	63.4	45.0	G6PC2	Hs.283963	9	260.0	84.7	220.2
TM4SF4	Mm.26618	11	127.0	34.1	43.4	CPE	Hs.75360	10	675.0	29.6	199.7
Ppp1r9a	Mm.332901	12	273.0	15.7	42.8	CEL	Hs.533258	11	428.0	39.8	170.4
PCSK1	Mm.1333	13	98.0	36.6	35.8	NKX2.2	Hs.516922	12	187.0	90.3	168.9
PTPrN	Mm.2902	14	346.0	10.2	35.2	ERO1LB	Hs.558519	13	424.0	29.6	125.4
GNAS	Mm.125770	15	729.0	3.9	28.5	CHGB	Hs.516874	14	784.0	14.8	116.1
EST	Mm.380993	16	160.0	17.6	28.2	PCSK2	Hs.315186	15	433.0	23.9	103.4
Iqgap1	Mm.207619	17	328.0	7.5	24.5	IPF1	Hs.32938	16	91.0	100.0	91.0
Supt16h	Mm.286066	18	200.0	12.2	24.3	INSM1	Hs.89584	17	187.0	46.2	86.3
EST	Mm.156365	19	54.0	34.2	18.5	PAX6	Hs.591993	18	292.0	28.9	84.3
GNG12	Mm.234342	20	267.0	6.3	16.8	SCGN	Hs.116428	19	187.0	42.7	79.8
Gipr	Mm.333633	21	54.0	29.7	16.0	PCSK1	Hs.78977	20	214.0	28.5	61.0
Rasgrf1	Mm.44561	23	136.0	10.6	14.4	APLP1	Hs.74565	21	328.0	15.5	50.7
Tmem54	Mm.25295	24	100.0	13.6	13.6	SCG3	Hs.232618	22	177.0	23.4	41.5
SGNE	Mm.4836	25	237.0	5.3	12.5	CFTR	Hs.489786	23	200.0	20.5	40.9
PAPSS2	Mm.203916	26	115.0	9.5	10.9	SCG2	Hs.516726	24	282.0	14.0	39.6
PTPrN2	Mm.206054	27	145.0	7.3	10.6	KRT17	Hs.2785	25	2276.0	1.7	38.0
Pcsk1N	Mm.4881	47	109.0	3.7	4.0	PTPrN	Hs.89655	26	150.0	18.1	27.2
ICAB9	Mm.275683	48	72.0	5.1	3.7	PTPrN2	Hs.490789	44	187.0	6.3	11.7
Dmpk	Mm.6529	99	9.0	0.8	0.1	ICAB9	Hs.487581	56	66.0	5.7	4.9
						GAD67	Hs.420036	96	4.0	0.5	0.0

10

20

いずれの場合においても、既知の糖尿病自己抗原はリストで高位に出現し、ICAB9 およびGAD67のような比較的重要なでない体液性自己免疫標的でも上位100候補に入っている。両リストの転写物はかなり重複し、その相対存在量および組織特異性は、マウス膵島でヒトと比べて発現に乏しいGAD65を例外として、類似していた。上位100のタンパク質の多くは、SWISS PROT、PrositeおよびEPCONdbデータベースの遺伝子オントロジー(GO)機能の検討によって判定されるように、分泌経路に関連した分泌顆粒タンパク質または膜タンパク質である。

【0187】

これらの遺伝子リストが実際に自己抗原性の標的を予測することができるかという疑問に取り組むために、本発明者らは、量は中程度だが組織特異性の高い転写物としてマウス およびヒトの遺伝子リストのいずれにおいても高位に出現している膜貫通型のカチオン輸送体、Slc30a8(ここではZnT8として知られる)についての免疫沈降アッセイを開発した。クローニングした配列のin vitro翻訳、ならびにインスリン療法を受ける前の44名の初発の被験者ならびに年齢およびHLAが一致する40名の対照者由来のヒト血清を用いて、放射免疫沈降アッセイを開発した(図1)。具体的には、Slc30A8をヒトの膵島cDNAから増幅し、pCDNA3 directional topo(R)ベクター内にクローニングし、配列を確認し、5µCiの³⁵Sメチオニンを用いたin vitro翻訳反応において網状赤血球抽出液中で鑄型(0.5µg)として使用した。ヒト血清試料(5µl)を、0.1%のNP40を含む50µlのトリス緩衝生理食塩水中で20,000dpmの翻訳産物とともに4で一晚インキュベーションした。固定化したプロテインAを各インキュベーション物に添加し、免疫グロブリンに結合した放射活性を濾過により単離し、シンチレーション計数によって測定した。

30

40

【0188】

T1D血清試料のうち9つは、該アッセイ中で示された放射性リガンドの50%まで達する、対照の血清で観察されたレベルを上回る有意な結合を示した(マン・ホイットニーのノンパラメトリックな両側検定)。自己抗体は、初期の発病患者(<8歳)およびそれより年上の患者(>8歳)のいずれにも存在した。9名の陽性の患者のうち、6名はインスリン自己抗体について、5名はGADについて、また6名はIA-2について陽性の試験結果が出た。Slc30a8は、独立した疾患マーカーであるように思われる。

【0189】

50

血清学的な診断アッセイおよび細胞性自己免疫のためのアッセイをさらに開発するには、少なくとも機能上は純粋物で、本来の立体配座にフォールディングされ、細胞分裂促進性の不純物を含まない抗原の生産が必要である。このことは、特に過剰発現した場合に細菌および真核細胞に対して毒性の傾向を有する S 1 c 3 0 a 8 および I G R P のような膜貫通型タンパク質については、些細な問題ではない。

【 0 1 9 0 】

I G R P の場合には、本発明者らは以前に、制御型メタロチオネイン・プロモーターにより駆動される構築物を使用して、ショウジョウバエ S 2 細胞を安定的にトランスフェクションすることにより、高レベルの抗原を本来の形態で発現することができている。そのような細胞からの粗製膜画分 (C M F) について、I G R P で免疫化した N O D マウス由来の流入リンパ節細胞を、I L - 2 プロモーターの制御下で L a c Z を安定に発現する B W Z 3 6 リンパ腫細胞株 (7 3) と融合させることによって生成された、I G R P 反応性の T 細胞ハイブリドーマのクローンをを用いて試験した。

10

【 0 1 9 1 】

例えば、図 2 A に示すデジタル化画像では、S 2 細胞を m I G R P V 5 H i s 構築物で安定的にトランスフェクションし、0 . 5 m M C u で発現を誘導し、細胞膜フラクション (C M F) を抗 V 5 抗体とともにプロットした。該タンパク質は T X - 1 0 0 で効率良く抽出され、これを金属キレートアフィニティカラムに結合させ、非変性条件下にてイミダゾールで溶出させた。図 2 B は、I G R P - C M F T 細胞ハイブリドーマ (クローン 1 - 7 6 - 5 4) についての反応アッセイを示すグラフである。T 細胞ハイブリドーマ (細胞 2×10^5 個 / ウェル) を、A P C として放射線照射した N O D 脾細胞 (細胞 1×10^6 個 / ウェル) および抗原 (I G R P - C M F または S 2 - C M F 、 $10 \mu g$ タンパク質 / ウェル) とともに一晚インキュベーションし、ガラクトシダーゼ活性を分光測光分析した。図 2 A - 3 B は、I G R P 産生がメタロチオネイン・プロモーターによってしっかりと制御されていること (図 2 A) 、粗製膜画分が哺乳類の A P C によってプロセシングされ、I G R P 反応性の T 細胞ハイブリドーマクローンから、クロロフェノールレッド - ガラクトシドを基質とした分光測光法で計測される I G R P 特異的な応答を引き起こすことが可能であること (図 2 B) を実証している。推定上の抗原の昆虫細胞による発現と、T 細胞増殖アッセイまたはハイブリドーマ活性化アッセイのいずれかとを組み合わせることにより、可溶性の膜構成成分を含む様々なタンパク質ならびにグリコシル化およびその他の翻訳後修飾を必要とするタンパク質に適応可能であるはずの、総括的であるが堅牢な一式の標準的操作プロトコールが提供される。

20

30

【 実施例 2 】

【 0 1 9 2 】

次の実施例は、表 3 (実施例 1 を参照) の有力候補の最終候補リストをさらに評価することにより体液性および細胞性自己免疫の新たな標的を同定するためのアッセイについて述べる。

【 0 1 9 3 】

最初に、E S T としてのみ表わされた見慣れない候補物および分子について、完全長のクローンを得て、細胞における発現を確認するためにヒトおよびマウス臍臓組織において *i n s i t u* ハイブリダイゼーション分析を実施する。

40

【 0 1 9 4 】

ヒト被験者の血清学的解析による候補抗原のスクリーニング

このアッセイはヒト被験者で行うのが最も良い。というのは、免疫反応遺伝子群の遺伝的な多様性および複雑さから、ヒト被験者はより広範囲の自己免疫反応を示す可能性が高いからである。1 試料当たりのコストが低い 9 6 ウェル形式で半自動的手順を使用して、1 日に多数の試料をスクリーニングすることもできる。バーバラ・デイビス・センター (Barbara Davis Center) には、十分に注釈が付され、また H L A ハプロタイプと、T 1 D に関連する分子 (インスリン、G A D 6 5 、 I A 2 、 フォグリン) 、セリアック病に関連する分子 (トランスグルタミナーゼ I g A) ならびに多腺性内分泌疾患に関連する分子で

50

あって副腎皮質に影響を与えるもの（アジソン病の21-ヒドロキシラーゼ（74））および甲状腺に影響を与えるもの（TSH受容体（75））への自己反応性とに関して分析がなされた何万もの試料が保管されている。新たな初発の患者由来の20,000を超える血清、加えてそれより少数の、T1Dに関して不一致な一卵性双生児由来の試料、ならびに糖尿病患者の一等親血縁者から得られた、抗体陰性から単一および複数の抗体陽性ならびに疾患の発症に至る病期に及ぶ連続試料を利用可能である。

【0195】

最初に2種類のアッセイを、それぞれ放射免疫沈降法および時間分解蛍光検出法（TRF）に基づいて開発する。いずれのアッセイも候補抗原のクローニングおよび発現を必要とし、本発明者らは、配列をインビトロジェン（Invitrogen）のGATEWAY（R）エントリー・ベクターに挿入するように設計されたプライマーを使用するPCR鑄型として役立つことになる、逆転写したmRNAまたは保証付きのMGCプラスミドのいずれかを用いて開始する一般的な方法をとった。エントリー・ベクターから、該配列を、単一段階の組換えを介して*in vitro*翻訳、細菌の組換え型タンパク質の生成、アデノウイルスまたはバキュロウイルス産生へと進めることができる。

10

【0196】

放射免疫沈降アッセイについては、CMVプロモーター下にクローニングしたcDNAを、網状赤血球抽出液および $5 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S}$ メチオニンを用いる転写/翻訳共役反応（TNTキット；プロメガ（Promega））において鑄型（ $0.5 \mu\text{g}$ ）として使用することになる。96ウェルプレートに入れた血清試料（ $5 \mu\text{l}$ ）を、 0.1% のNP40を含む $50 \mu\text{l}$ のトリス緩衝生理食塩水中にて20,000 dpmの翻訳産物とともに4で一晚インキュベーションする。その後、固定化したプロテインAを各インキュベーション物に添加して免疫グロブリンに結合した放射活性を捕捉し、次いで該放射活性を濾過により回収し、シンチレーション計数によって測定した。標準化および正規化を行うために、陽性および陰性の参照用血清も各アッセイに加える。

20

【0197】

TRFアッセイについては、cDNAを大腸菌（*E. coli*）または昆虫の細胞中でヒスタジンタグ付きの構築物として適切に発現させ、金属キレートクロマトグラフィによって精製する。96ウェルプレートを該精製タンパク質（ $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ ）でコーティングし、ブロックを行い、次いで 0.1% のNP40を含む $50 \mu\text{l}$ のトリス緩衝生理食塩水中にて血清とともに4で一晚インキュベーションする。プレートへの免疫グロブリンの結合を、ユーロピウムとコンジュゲートしたマウス抗ヒトIgG（DELTA）および時間分解蛍光測定法を使用して、酸性pHにて測定する（ヴィクター（Victor）2、多重チャンネルカウンター）。いずれのタイプのアッセイにおいても、特異性に関して試験し、かつ異好性抗体のアーチファクトを除外するために、抗体を組換え型抗原で予め吸着処理して制御する。膜結合型の抗原の場合には、完全長の分子ではなくドメイン特異的な構築物を用いて作用させる必要があると判明する場合があるが、これは、特異ドメインを増幅するプライマーを設計し、上述したのと同じ方法でクローニングすることにより、容易に達成することができる。

30

【0198】

最初の目的は、190例の初発T1Dの血清および190例の一致した対照物のバンクをスクリーニングし、許容可能なカットオフ値を決定するために受信者動作曲線分析を、統計的有意差を判定するためにマン・ホイットニーのノンパラメトリック検定を使用して（Prismソフトウェア；グラフパッド社（Graphpad Inc.））各アッセイの特異性および感度を確立することになる。糖尿病の血清を用いた陽性結果に続いて、バックグラウンドを最小限にしてシグナル/ノイズを最大限にするために、アッセイ手順のさらなる最適化を行うことになる。真の陰性結果（低バックグラウンドでありシグナル/ノイズが1）に続いてさらに、アッセイの改変、例えば*in vitro*翻訳アッセイへの腭臓ミクロソームの導入を行うことができる。疾患特異性の低いアッセイは、疎水性のドメインを含まない構築物、別の妨害物質、異なる免疫グロブリン捕捉手順の使用により、また試験

40

50

用血清を組換え型抗原で予め吸着処理した試料と一致させることにより、アッセイにおけるノイズを低減するための協調努力で改善することができる場合もある。トラブルシューティングに対してどれだけ努力するかは、明らかに、その問題の性質および疾患特異的な自己反応性が疑われるかどうかの兆候によって決まることになる。有望なアッセイについては、疾患の自然な経過のうちいつ自己反応性が生じるのか、他の自己抗原との自己反応性の重複、および患者の年齢またはHLAの状態との関連があるかどうかという疑問を解くために、他の利用可能な臨床試料に適用することによって追跡調査することになる。本発明者らの研究室およびパーバラ・デイビス・センターからのいくつかの出版物が、そのような研究のひな型として役立つ(76; 77)。

【0199】

候補抗原への細胞性免疫応答に関するHLA-DRS、-DR4および-DQ8トランスジェニックマウスのスクリーニング

本発明者らの以前のデータから、バックグラウンドがB10.MであるHLA-DQ8 + I-A^{°/°}マウスは、フォグリンのエピトープペプチド2および7に対するCD4 + T細胞のリコール反応を示すことができること、ならびにその同じペプチドが、多くはDR4/DQ8ハプロタイプを有する初発ヒト患者で末梢T細胞の標的とされることが示されている(78)。これらの従来の研究は、ヒトのHLA-DQ8がマウスI-A⁸⁷と同様の結合特異性を有し、該-DQ8分子が、マウスまたはヒトのいずれかの共刺激分子およびアクセサリー分子との関係において抗原を提示することも考えられるという予測を支持していた。該研究は、HLA導入遺伝子が厳密に糖尿病感受性のバックグラウンド上に担持されていなくてもヒトの疾患に関連するエピトープを同定する手段としての、トランスジェニックマウスモデルの有用性を支持する。1A型糖尿病のヒトのMHC感受性遺伝子座によって提示される可能性のあるあらゆる候補抗原からのあらゆるT細胞エピトープを評価するために、既知の糖尿病感受性遺伝子座を表わすものとしてHLA-DQ8、-DR3(DRB1*0301)および-DR4(DRB1*0401)トランスジェニックマウス、糖尿病との関連のない「保護的」クラスII分子の対照としてHLA-DR2(DRB1*1502)を使用して、ヒト組換えタンパク質で免疫化した後のT細胞のリコール反応を分析する。

【0200】

動物：数系統のHLA-DRおよび-DQトランスジェニックマウスが作製され、T1D、実験的自己免疫性脳炎および全身性エリテマトーデスのような疾患において免疫応答が形成される際のこれらの分子の役割が評価されている(79; 80)。本発明者らは、HLA-DQ8 + I-A^{°/°}、-DR2、-DR3および-DR4トランスジェニックマウスを、米国ミネソタ州ロチェスター所在のメイヨークリニック(Mayo Clinic)免疫学部門(Department of Immunology)のシェラ・デービッド博士(Dr. Chella David)から入手しており、これらのコロニーを発明者らのセンターにおいて確立済みである。ヒトCD4を有する別のHLA-DR4系統をスタンフォード大学のグレッタ・ソンダーストラップ博士(Dr. Greta Sonderstrup)から最近入手し、現在数を増やしているところである。HLA-DQ8(DQA1*0301/DQB1*0302)マウスを、ゲノム構築物を用いてI-A^{°/°}I-Ea^{°/°}バックグラウンド上に生成させ、したがってHLA-DQ8は唯一のクラスII分子として生成される。ゲノムの-DR2(DRB1*1502)ならびにcDNA構築物-DR4(DRB1*0401)および-DR3(DRB1*0301)を、マウスI-EaまたはヒトDRa導入遺伝子のいずれかと組み合わせる。すべてのトランスジェニック動物について、尾部から得たDNAのPCRによりMHC発現について遺伝子型を確認し、またPBMCおよび脾細胞についてFACS分析を実施してヒトの導入遺伝子の発現レベルを確立し、かつマウスMHC遺伝子産物の発現を観察する。

【0201】

抗原提示細胞(APC)：放射線照射(20~35 Gy)した同系マウスの脾細胞または骨髄由来のDCを、タンパク質抗原(1~100 μg/ml)またはペプチド(0.1

10

20

30

40

50

~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下で共にインキュベーションすることによる CD4⁺ 細胞の *in vitro* 刺激に使用する。使用時には、25 ゲージの注射器針を用いた洗浄後に 8 ~ 12 週齢のオスのマウスの脛骨および大腿骨の骨髓から DC を調製する。残屑および大きな細胞凝集物を濾過 (70 μm メッシュ) により取り除き、赤血球を NH₄Cl で溶解させ、細胞を、10% の熱不活性化 FBS (エンドトキシンフリー) を含み抗生物質、ピルベート (1 mM)、 β -メルカプトエタノール (50 μM) および 10 ng/ml の GM-CSF が添加された RPMI 1640 に再懸濁した。第 2 日および第 4 日目の培養物から、新鮮な培地に置き換えることにより非付着性の細胞を取り除き、緩く付着性の細胞を第 6 日に回収する (大部分が未熟な DC であり、単球および顆粒球がある程度混入している)。この時点で、細胞を 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 細菌性リポ多糖 (LPS) と一緒に組換え抗原に 24 ~ 48 時間曝露して、「成熟」およびクラス II MHC 分子のアップレギュレーションを引き起こす。

【0202】

T 細胞株およびハイブリドーマ: T 細胞の細胞株およびクローンは本発明者らが以前に使用した (78) 方策によってトランスジェニックマウスから作製するが、該方策は、抗原特異的な応答を引き起こすための免疫化 (5 ~ 100 μg の組換え抗原を、50 μl の CFA に含めて尾の基部に皮下注射) を利用する。免疫化 8 ~ 10 日後に鼠蹊部および大動脈周囲のリンパ節から T 細胞をハーベストし、好ましくは別のベクター系で生産された抗原に対する CD4⁺ リコール反応について試験する (すなわち、免疫化には S2 由来の His タグ付き抗原を用い; リコールには細菌の GST ハイブリッドを用いる)。続いて抗原特異的な細胞を用いて T 細胞ハイブリドーマを作製する。T 細胞に *in vitro* で刺激を 1 回与えてから、IL-2 プロモーター由来の NFAT 要素の制御下で LacZ を安定に発現する BWZ 36 胸腺腫細胞株と、ポリエチレングリコールを介して融合させる (73)。耐 HAT 性の細胞株を RPMI/FBS 中で増殖させ、限界希釈法によってクローニングし、 1×10^5 個のハイブリドーマ細胞を RPMI/FBS 中の 1×10^6 個の同系の脾細胞および抗原とともに共培養することにより分析する。16 ~ 24 時間後に、誘導された β -ガラクトシダーゼを、可溶性の比色定量用基質であるクロロフェノールレッド β -ガラクトシドを使用して計測するか (図 1 を参照)、または X-Gal を使用して個々の固定したハイブリドーマ細胞について計測する。MHC 拘束性を確認するために、ハイブリドーマについて、同じ遺伝的バックグラウンドの非トランスジェニックマウス由来の脾細胞など別の APC と、本発明者らが T1D および対照の器官ドナーから現在確立しつつある EBV 形質転換 B リンパ芽球様細胞株のパネルとを使用したアッセイも行う; (78) を参照のこと。クローン性を保証し、かつクローンの多様性を評価するために、逆 PCR (81) によって全 RNA から調製した cDNA の配列決定を行うことにより TCR の使用頻度を測定する。

【0203】

HLA-DQ8⁺ および DR4⁺ トランスジェニック動物におけるフォグリン細胞質ドメインに対する T 細胞応答を調べた本発明者らの以前の経験は、免疫原性があるとすれば、他の抗原に対する応答もこれらの動物において得られるはずであること、該応答から情報が得られるであろうことを示している。I-A^b および β -DQ8 は、これらが関連ペプチドを提示する能力の点から、これらの分子を担持する APC がオーソログ分子に拘束された T 細胞に対して交差提示しないとしても、機能上極めて類似している。高親和性のクラス II スイッチ抗体の産生は T 細胞依存性のプロセスであるので、リコール反応は、上述の実験で自己抗体を誘発することが先に示された抗原で免疫化された動物から検出されると思われる。しかしながら、逆は必ずしも真実ではなく、体液性応答を示さない抗原が依然として細胞性免疫の標的である可能性がある。HLA-DR2 導入遺伝子は、糖尿病感受性に関係せず、また疾患関連ではない異なるエピトープに連結されることも考えられるクラス II 分子として、本研究に含められている。本発明者らの以前の経験から、T 細胞クローンではなくハイブリドーマを使用すればより多様性の大きい TCR が得られる可能性が高いことが示唆されるため、本発明者らが最初に重点を置くのはそのような試薬を生

10

20

30

40

50

成することになる。

【0204】

NODマウスとは異なり、ヒトの糖尿病被験者は多数のMHCクラスII分子を発現しており、潜在的な将来の研究分野は、二重トランスジェニック動物において様々な糖尿病感受性または保護性の対立遺伝子を調査することである。例えば、HLA-DR3/-DQ8動物は、より重篤な膵島炎（しかし糖尿病ではない）を発症し、親動物と比較してGAD65に対する自発的な応答の増大を示す（82；83）。理論によって拘束されるものではないが、本発明者らは、この動物が候補自己抗原に対する反応性の増大も示すかもしれないと考えている。同様に、HLA-DR3と-DQ8またはHLA-DR2と-DQ8の共発現の影響を検討することも考えられる。

10

【実施例3】

【0205】

次の実施例は、糖尿病自己免疫の新規なマーカーおよび標的としてのZnT8の同定に関する別の実験について述べる。

ZnT8をコードするcDNAが糖尿病自己免疫のマーカーとして興味深いかもしれないという概念は、遺伝子ノックアウトマウス（Ngn3機能喪失）由来のマイクロアレイデータセットのバイオインフォマティクス分析および他の組織における組織発現パターンとの比較（実施例1）から生じた。当初、該マーカーは、Riken EST C820002P14に対応するUniGene Mm.208831として注釈が付与され、次いでZnT8に相当することが認識された。

20

【0206】

本発明者らは完全長ZnT8を生産し、該タンパク質を、一連の実験において初発の糖尿病の血清を用いて放射免疫沈降アッセイで試験した。初期のデータは、患者の10%が反応を示し、ZnT8が1型糖尿病の診断アッセイに役立つ新規な自己抗原であるかもしれないことが示されたことを表している。

【0207】

その後本発明者らは、完全長分子のうち最後のおよそ102アミノ酸に相当するZnT8のC末端フラグメントを設計し、生産した。アッセイにおけるこのフラグメントの試験について以下にまとめる。

【0208】

144名の初発のT1D患者（年齢は1～55歳；平均年齢11.9歳）由来の血清を、ZnT8フラグメントを使用して試験すると、45%は放射免疫沈降アッセイにおいて血清反応陽性であり、対して年齢およびHLAが一致する対照集団では<1%であった。年齢による層別化から、抗体は年長の個体においてより高い傾向を示し、12～15歳で糖尿病を発症した群では70%の最高値であった。この年齢プロファイルは、他の糖尿病自己抗原であるGAD65およびIA2のプロファイルに類似していたが、インスリン抗体よりは遅く現われる。この新しい抗原に対する自己反応性は、IAA、GADおよびIA2への自己反応性のレベルとは相関が無く、したがって独立したマーカーと考えられる。

30

【0209】

1歳未満から臨床的糖尿病の発症まで追跡調査した9名の人々からの試料を分析した。これらはパーバラ・デイビス・センターのDAISY研究の兄弟コホートから得たものである。これらの人々のうちの8名は糖尿病前症の間に血清反応陽性であった。自己反応性は、糖尿病前症の後期に現われる傾向があり、通常はGADおよびインスリンの自己抗体の出現に続いて現れた。発症時期は一部の例においてIA2自己反応性の前後であった。対象者のうちの1名では、抗ZnT8が疾患の発症前に検出される唯一の抗体であり、この新しい自己抗原の発見の重要性を明確に示していた。

40

【0210】

インスリン GADまたはIA2抗体について陰性の8名の初発患者を試験した。この群のうち、2名は新しい抗原に陽性の試験結果であり、再び該抗原が既存のマーカーとは

50

独立に予測に役立つという概念が強化された。

【0211】

より具体的には、図5を参照すると、この図は、ZnT8のC末端プローブのための標準的アッセイを示している。曲線は、7回の別個の実験において二連でアッセイされた希釈系列の平均±SDを示している。この実験は3か月にわたって実施され、実験には異なる*in vitro*翻訳反応が使用された。*in vitro*で翻訳された³⁵S標識プローブ(20000cpm)を、0.15%のトゥイン(Tween)20、1%のBSAおよび0.01%のNaアジ化物を含む50μlのPBS(pH7.4)の中で5μlの血清とともに一晚インキュベーションしてから、20μlの50%(体積比)プロテインAアガロースビーズ懸濁液を添加した。45分後、濾過によってビーズを回収し、4回洗

10

【0212】

図6は、様々なZnT8構築物を用いたDASPのブラインド試験の結果を示す。*in vitro*で翻訳された³⁵S標識構築物(20000cpm)を、0.15%のトゥイン20、1%のBSAおよび0.01%のNaアジ化物を含む50μlのPBSの中で5μlの血清とともに一晚インキュベーションしてから、20μlの50%(体積比)プロテインAアガロースビーズ懸濁液を添加した。45分後、濾過によってビーズを回収し、4回洗

20

30

【0213】

図6に示すように、ORFアッセイおよびN末端アッセイではいくつかの対照血清が一貫して陽性の試験結果を示した。該アッセイは感度も比較的低く、C末端アッセイと比べて低いシグナル対ノイズ比を示した。すべてのアッセイにおいて糖尿病試料と対照試料との間の差は有意であったが($P < 0.0001$ マン・ホイットニーのランク検定)、最も堅牢なアッセイはC末端構築物(C4プローブ 配列番号24)を用いるアッセイであった。より高性能のC末端アッセイは、より溶解度の高いプローブ(膜貫通領域が存在しない)および/またはその他の潜在エピトープとの接触と関係している可能性がある。

40

【0214】

図7に示す実験は、ZnT8がICAおよびゴールドスタンダードの生化学的抗体について陰性の患者の自己抗体を検出することを示している。糖尿病の自己抗体の検出のための最初のゴールドスタンダードはICA(膵島細胞質抗体)であり、血液型O型のヒト由来の組織学的膵臓切片の血清への曝露と、その後の蛍光標識した二次抗体とのインキュベーションおよび訓練された観察者による顕微鏡観察とを必然的に伴う、複雑で、時間を要する、比較的主観的なアッセイである。このアッセイは、3種の生化学的抗体のアッセイ(インスリン GADおよびIA2)で完全に置き換えられてはいないが、これはICA陽性であるが生化学的抗体については陰性の人がいるからである。したがって、6000を超える被験者に関する大規模な糖尿病予防治験(Diabetes Prevention Trial)1については、ICAはリスクの高いT1D患者の一親等血縁者の集団において自己免疫性

50

を明らかにするための手法として使用された。

【0215】

I C A 陽性だがインスリン、G A D および I A 2 については陰性であった30例の初発患者の血清の分析から、24%がZ n T 8のC末端プローブに反応性であることが示され、Z n T 8がI C A アッセイで検出される抗体の構成成分かもしれないことが示唆された。さらに一層注目すべきなのは、インスリン、G A D および I A 2 だけでなくI C A も陰性であった個体由来の試料のうち30例(20.3%)に、Z n T 8抗体について陽性の試験結果が出たという知見である。これは、C末端プローブによって検出されるエピトープがO R F 分子では恐らく隠れていること(後の研究で確認された推定)を示している。Z n T 8への反応性は、広く自己免疫に関係するものではないが糖尿病に特異的であるかもしれないという可能性がある。抗D N A抗体について陽性の試験結果が出た個体の一連の24例の試料は、Z n T 8自己抗体アッセイにおいて陰性であった。

10

【0216】

図8A - Cは、初発集団における、Z n T 8に対する自己抗体と、I n s (図8A)、G A D (図8B)およびI A 2 (図8C)それぞれの自己抗体との関係を示している。この実験では、Z n T 8のC末端プローブに対する自己抗体との関係を3つのゴールドスタンダードと比較した。データはB D Cコレクション中の175名の初発患者に由来する。全領域のデータおよびデータの重複を示すために、結果を対数目盛の抗原性指数として示している。

20

【0217】

図9A - 9Dは、疾患発症時の自己抗体の発現を年齢に対して示している(図9A = Z n T 8 ; 図9B = G A D ; 図9C = インスリン ; 図9D = I A 2)。具体的には、この実験は、Z n T 8血清反応陽性が疾患発症時に比較的年長の対象者において高く、インスリン自己反応性は低くなることを示している。データは、糖尿病の発症年齢が9か月から18歳までの237名の対象者に由来するものであった。年齢の関数として頻度のプロファイルを引き出すために、データを1年間隔でビン化した。Z n T 8 C末端反応性は発症年齢の関数として増大し、インスリン反応性は公表された研究で見られるような予期された低下を示した。G A D反応性も劇的ではないが増大する傾向があった。より年長の対象者において自己反応性を検出するマーカーは、年長の個体におけるマーカーとしては利用性に乏しいインスリンを補う。疾患を治療するために使用される外来のインスリンに対して抗体が生成されるので、疾患発症後にインスリンを使用することはできない。この実験は、比較的年長の対象者では2型糖尿病として誤診されて不適当な治療が行われることの多い、加齢を伴う糖尿病の潜在している自己免疫(L A D Aあるいは型1.5糖尿病)を検出するための良い指数が、Z n T 8抗体によってもたらされるはずであることを示している。米国には、恐らく多くのL A D A患者が1型患者として存在している。

30

【0218】

図10Aおよび10Bは、T 1 Dの予測的マーカーとしてZ n T 8自己抗体を調べる実験の結果を示す。年齢9か月から糖尿病まで追跡調査されてきた43名の人々からの試料パネルを、Z n T 8に対する自己抗体ならびにインスリン、G A D 65およびI A 2に対する3つのゴールドスタンダード抗体について遡及的にアッセイした。ここでは9名の人々に由来する一連の結果が例として示されている。抗体反応性は、c p mとして、被験者から対照者を差し引いて対照者の応答の標準偏差で割って、表されている。アッセイにおけるカットオフ値は、3 S Dに相当するかまたは陽性のアッセイが偶然生じる確率がおよそ1%であるグレーエリアによって定義される。図10Aのパネルに示される患者は、インスリンに対する自己抗体は生じなかったが、1.5歳でI A 2およびG A Dに対して陽性の試験結果が出た。I A 2抗体は一時的な発現であったが4歳で再発した。その間に、Z n T 8に対する高く持続的な反応性が生じた。その後、I A 2抗体は再発し、5年後にこの人は臨床的糖尿病となった。図10Bに示される患者は、インスリン、I A 2またはG A D 65に対する自己抗体は生じなかったが、臨床疾患の18か月前である2歳の時にZ n T 8抗体を示した。

40

50

【0219】

図11は、疾患発症時の糖尿病性自己抗体の状態を示す表である。ZnT8自己抗体の計測により、3つのゴールドスタンダード自己抗原IA2、インスリンおよびGAD65に対してさらなる予測力が提供される。公表された研究から、抗体の力価ではなく検出された抗体の数が疾患を最も強力に予測することが示されている。しかしながら、一部の人は、3つのゴールドスタンダード抗体IA2、GAD65およびインスリンを全く示すことなくT1Dを発症する。このことは、見失われている反応性が存在することを示しており、この推定はINS、GADおよびIA2抗体の同時測定よりも多くの患者を検出する自己抗原の免疫組織化学的アッセイによって同様に支持される。しかしながら、ICAアッセイは時間を要し、主観的である。ゴールドスタンダード抗体のうち1つだけを示す個体については、5年以内に疾患を発症する相対危険度は低いが、2以上の抗体では予後不良が示唆され、仮にこれが利用可能ならば、治療的介入の指標となるであろう。図11の上部は、糖尿病を発症した人々の臨床診断時の抗体の状態を示している。結果は、糖尿病自己抗原標準化プログラム(Diabetes Autoantigen Standardization Program)により提供された50名の初発糖尿病被験者および100名の年齢が一致した対照者についてのブラインド試験、ならびに先のスライドに示されたデータに由来するものである。ZnT8自己反応性についてのアッセイを追加すると、抗体陰性であった人の数は14%から8%へと著しく低下し、さらに12%はリスクがより高いことが示された。言い換えれば、抗体陰性と評価されたであろう7名の人のうち43%が実際にはZnT8に対する抗体を有していた。重ねて言えば、「低リスク」の1Abグループの7名の人のうち、3名(43%)は、この3名をより高リスクに分類するZnT8抗体について陽性の試験結果を示した。

10

20

【0220】

3つのゴールドスタンダードのうち、インスリン自己抗体は測定するのが難しく、実験室間で該アッセイによる再現性が不十分である。仮にインスリンアッセイを廃棄してZnT8アッセイに置き換えたならば、0Ab患者の数が14%から8%に低下したままで、同程度の数の二重陽性および三重陽性の患者が存在することになるという利点があるであろう。さらに診断力があることを示すためには長期的な連続試験が行なわれる必要があるであろうが、ZnT8/GAD/IA2がINS/GAD/IA2よりもよい組み合わせになるだろうと仮定することは合理的である。さらに、¹²⁵I標識したリガンドの使用を回避し、抗インスリンアッセイに必要とされるような抗原の前吸着を実施することが可能であろう。

30

【0221】

図11の一部は、抗体が、異なる区分に分類された患者間でどのように分布しているかを示している。ZnT8 C末端抗体は、このグループの唯一の抗体として出現することが多いようであり、ここでもGADに類似しており予測に役立つことを証明している。ICA陽性であるが3つのゴールドスタンダードは陰性である人を選択した集団では、25%がZnT8 C末端陽性であった。

【0222】

図12Aおよび12Bは、ZnT8抗体アッセイの受信者動作特性を示す。データは、米国コロラド州デンバー所在のバーバラ・デイビス・センターにおける初発患者と、DASP提供の試料セットとの組み合わせから得た。この組み合わせは、発症時の年齢が1.5歳から5.9歳にわたる人々を包含していた。カットオフ値は、16例の対照血清群の3SDを限度として決定した。ROCプロットは、対照と糖尿病群とをその都度比較することによって生成した。図12Aは免疫沈降指数を示し、図12Bは、各アッセイの感度および特異性の関係を示す。

40

【0223】

図13は、ZnT8のORFプローブ、C末端プローブおよびN末端プローブに対する抗体の反応性の関係を示す。データは、バーバラ・デイビス・センターにおける初発患者と、DASP提供の試料セットとの組み合わせ、合計227名の人のデータに由来するものとし

50

た。C末端陽性の上位50名の患者は、ZnT8 ORFおよびZnT8 N末端プローブへの反応性について陽性の試験結果を示した人々の大部分を含んでいた。N末端プローブおよびORFへの反応性にはかなりの相関があったが、ORFとC末端プローブの間にはなかった。これは、N末端との反応性に関与するエピトープはORFプローブによって検出されるエピトープのサブセットであるが、C末端は別の患者を検出し、ORF翻訳産物よりも良好な自己反応性の指標であったことを示唆している。ORFプローブは、膜貫通領域が誤って折りたたまれて正常なC末端のフォールディングを歪めるために正確にフォールディングできないので、上記のことが発生しうると思われる。C末端は、完全な分子から切り離されなければ一部は隠れていたかもしれない別のエピトープを含む可能性が考えられる。

10

【0224】

図14Aおよび14Bの実験は、ZnT8のN末端およびC末端が相互作用して両方のドメインに依存する新しいエピトープを生成するのか、またはN末端配列がC末端の中のエピトープを覆い隠すのかを調べている。

【0225】

該実験は、C末端プローブに強く応答したがN末端との反応性は低い(図14A)か、N末端との反応性が高い(図14B)かのいずれかであった、2つの糖尿病の血清のプールを用いて実施した。いずれの混合物を用いても、N末端およびC末端への反応性は独立であること、プローブを混合して免疫沈降させた放射活性は個々のプローブの合計と等価であることは明白であった。この実験の変法には、これらのドメインの相互作用に関与する可能性のある要因としてZnイオンの添加または内在性Znのキレート化を含めた。結果は、N末端およびC末端の相互作用が免疫反応性に影響しないことを示唆する上述の結果と変わらなかった。

20

【0226】

図15A-15Cを参照すると、これらの図は、ZnT8のC末端の自己抗体エピトープの位置確認を目的とした実験の結果を示している。図15Aは、マウスのSlc30A8(上列;配列番号4の267~367位が示されている)、ヒトのSlc30A8(中列;配列番号2の268~369位が示されている)およびマウスのSlc30A3(下列;配列は配列番号25である)の配列をアラインメントして示している。マウスのSlc30A8およびSlc30A3は大多数のT1D血清によって認識されないため、該データは、異なっている残基がヒトSlc30A8配列中のエピトープを予測するための鍵を握る可能性が高いことを示している。本発明者は、したがって最後の11アミノ酸(PDCLFCEDPCD;配列番号2の359~369位)が抗原エピトープであるかもしれないと仮定した;しかしながら、この領域を削除したプローブ(BstN1消化、図15B;制限酵素切断部位を示すために参照した配列は配列番号2の336~369位である)は、9例の糖尿病の血清をプールしたのものによって野生型C末端と同程度の効率で免疫沈降した(図15B)。さらに6アミノ酸を削除すると自己抗体との結合が低下し、12アミノ酸を削除すると抗体と結合しなくなり、この領域が特に重要であることが示唆された。これらのプローブの配列は、本明細書中の表1に示されている。

30

【0227】

図15Cに示すように、抗原性に寄与する可能性のある荷電残基(K340、H345およびE352)、およびカゼインキナーゼの推定リン酸化部位であって翻訳後修飾を受けられる可能性のあるセリン353に、点突然変異を有するC末端プローブを作製した。上記と同じ、糖尿病の血清をプールしたのものを用いて試験すると、これらの残基の各々が免疫反応性に寄与することが明白であり、3つの荷電残基すべてを変更した突然変異体(AAA)においては相加的であることが判明した。これらのプローブの配列は、本明細書中の表1に示されている。

40

【0228】

考えられる妨害物質(データは示さない)としてこの領域を包含する20量体の合成ペプチドを重複させて、さらなる実験を実施した。該ペプチドが結合を妨害する能力はせい

50

ぜい中程度であり (< 33% 低減)、自己抗体エピトープは恐らく自然界では立体配座をとり、単純な直線状の配列ではないことが示唆された。さらなる手法は、C末端領域の全体的な立体配座を保持するが二次構造の阻害を伴って重要な配列をすっかり交換することを可能にする S1c30A8 および S1c30A3 のキメラ分子を創出することである。これらのキメラ分子は、該タンパク質に対する T 細胞応答をマッピングする役割を果たすことにもなる。

【0229】

図16は、自己反応性にとって重要な Z n T 8 の C 末端の残基を示し、また明らかにされたエピトープが動物種の間で保存されていることを図示している。短縮型および突然変異型の突然変異体 (上記の表1に記載) は、コア配列 S L T I Q M E S (配列番号2の346 ~ 353位) がヒトの S1c30A8 への自己抗体反応性に重要であること、ならびに個々の残基 E 3 5 2 および S 3 5 3 が抗体の結合に重要な寄与をなすことを示している。配列全体は、異なる脊椎動物種の S1c30A8 においてよく保存されているが、最も近縁の哺乳類の相同体 S1c30A2 および S1c30A3 ではそれほどでもない。後者のタンパク質を C 末端フラグメントとして発現させても、糖尿病の自己抗体によって検出されない。

10

【0230】

興味深いことに、より関係の薄い細菌生物種由来のカチオン排出タンパク質 (他の C z c D)、ならびに2つの無関係なタンパク質すなわち大腸菌の接合伝達タンパク質 (conjugation transfer protein) およびヒトの R E E P 3 において相同な配列が観察される。このことから、分子擬態が、人における亜鉛輸送体への自己反応性の発生に役割を果たしている、または免疫応答の抗原エピトープスプレディングおよびバイスタンダー活性化に寄与しているという可能性が高まる。

20

【0231】

まとめると、Z n T 8 は1型糖尿病に先行する自己免疫の独立した血清学的マーカーであり、進行中の自己反応から初期の糖尿病への移行を予測するのに特に有用であると期待される。

【0232】

本明細書に記載のアッセイ形式は、1日当たり500例もの試料のスクリーニングが可能であり、その処理能力を高めるために容易に自動化することも考えられる。ヒト被験者が Z n T 8 に対して自己抗体を有するという事実は、自己反応性の T 細胞応答が起きる可能性が極めて高いことを示している。これはひいては、新たな診断アッセイを上記に詳細に述べたように開発しうること、ならびに1型糖尿病の治療および予防への新たな治療的手法も上記に詳細に述べたように開発しうることを意味する。

30

【実施例4】

【0233】

次の実施例は、欠失変異体およびマウス/ヒトキメラ体を使用した Z n T 8 のさらなる自己抗体エピトープマッピングについて述べる。

この実験では、実験結果は図17に反映されているが、C末端の自己抗体結合部位を包含する領域の境界を、NH₂またはCOOH末端が短縮されている一連の Z n T 8 ペプチドを使用して、またはヒトおよびマウスの Z n T 8 配列からキメラを作製することによって (マウスの Z n T 8 配列は標準アッセイにおいて免疫反応性ではない)、マッピングした。重複の程度は一定の縮尺で図示されており、欠失の範囲は、削除されたアミノ酸の数として (欠失略図)、または融合タンパク質が繋ぎ合わせられたアミノ酸部位の番号として該アミノ酸一文字表記の後に (キメラ略図)、示されている。

40

【0234】

大腸菌の Y i i p カチオン排出輸送体の結晶構造を用いて、MODELLERを使用してヒト Z n T 8 C 末端の三次元モデルを作成した (図18)。薄灰色で強調された残基は、ヒトおよびマウスの配列間で異なっており、中間的灰色で強調された残基は、NH₂ および COOH の欠失構築物の免疫学的分析に基づいて抗原性に乏しいことが示された。

50

ヒト Z n T 8 の 3 2 5 位の多型の残基は、最も濃い灰色の残基としてこの空間充填モデル中に示されている（この図の中の全ての部位は配列番号 2 に関するものである）。

【 0 2 3 5 】

コーカサス集団における Z n T 8 の主なヒト多型バリエーション、 T r p 3 2 5 および A r g 3 2 5 は、該構造の細胞質側の極にあって膜から遠位に位置し、大部分がヒトとマウスとの間で保存された残基に囲まれている。 A r g 側鎖は溶媒内へと伸びるが、 T r p のインドール環は分子側に折り返すので、全体的なフォールディングを歪ませることなく非常に様々な表面を作り出す可能性がある。 G l n 3 2 5 バリエーションは、幾何学的には A r g 側鎖に近いが、 S e r 3 5 3 周辺からの該構造の回転をもたらすと予測される。トポロジーが多型の影響をほとんど受けない第 2 のらせんセグメント（ a a 3 2 8 ~ 3 4 1 ）のバリエーション残基の一団は、多型バリエーションを担持するプロープ群によって等しく認識されるエピトープの強力な候補であると仮定された。 A r g 3 3 2、 G l u 3 3 3、 A r g 3 3 6 および A r g 3 4 0 が近接しており、かつ溶媒と接触することは、この点に関して注目に値するものであった。

10

【 0 2 3 6 】

図 1 9 を参照すると、 T 1 D 自己抗体が標的とする領域の Z n T 8 残基の保存性が示されている。 N 末端は患者のおよそ 5 % において抗体の標的であるのに対し、 T 1 D 被験者の 8 0 % までが C 末端に対する抗体を示す。 C 末端の開始部および終端部の構築物を作製して C 末端のエピトープの境界がマッピングされている。灰色で影を付けた領域は、ほとんどの自己反応性が集中する場所である。マウス、ヒトおよびヒキガエルの Z n t 8 配列の比較は、（配列番号 2 に関して）アミノ酸 3 2 2 ~ 3 4 1 を例外として、該エピトープ領域のほとんどが保存されていることを示している。この領域は、他の生物種では見られないヒトの主な多型バリエーション（ 3 2 5 R または 3 2 5 W ）を包含している。

20

【 実施例 5 】

【 0 2 3 7 】

次の実施例は、 Z n T 8 の遺伝子およびタンパク質中の多型性に関する本発明の実施形態と関連した実験について述べる。

マウスの Z n T 8 C 末端は、 1 0 4 アミノ酸のうち 1 8 アミノ酸がヒトの Z n T 8 とは異なり、初発の糖尿病患者の血清とは反応しない。この異なっているアミノ酸のうち 1 つまたは複数、対応するヒトのアミノ酸で置き換えた、マウス配列を基にした構築物を作製した。この実験の結果を図 2 1 A ~ 2 1 C に示す。各データポイントは、ヒトの A r g 3 2 5 (C R) もしくは T r p 3 2 5 (C W) 多型バリエーションのいずれかに限定的であるか、またはヒトの A r g 3 2 5、 T r p 3 2 5 もしくは G l n 3 2 5 (C Q) バリエーションに同程度に反応性であるかについて予め分類済みのヒト血清を用いて測定した、 2 ~ 7 回の応答の平均である。アミノ酸の番号付けは、ヒト配列の部位（配列番号 2 ）に関するものである。

30

【 0 2 3 8 】

結果から、アミノ酸 3 2 5 の、対応するヒトのアミノ酸への変更は、 C R および C W に限定的な血清による結合を回復させたが、一致するアミノ酸を用いた場合のみであることが示された。単一のアミノ酸変更では、 C Q に応答する血清の反応性は回復しなかった。しかしながら、アミノ酸 3 3 2、 3 3 3、 3 3 6 の置換と、マウス配列では欠けている a a 3 4 0 のアミノ酸の包含とを組み合わせると、反応性が回復した。これは、 3 2 5 位に A r g を含めることによりさらに増強された。

40

【 0 2 3 9 】

図 2 2 A ~ 2 2 D は、マウス Z n T 8 の多点突然変異による、ヒト Z n T 8 の反応性の概括を示している。この実験では、図 2 2 A は、マウス配列の単一の点突然変異が、依然としていくつかのヒトの A r g 反応性の抗体反応を検出することができる一方で、大多数の血清に反応しないことを示している。しかしながら、ここでは、ヒトおよびマウスの構造の差異に基づいた別の 4 残基突然変異（ R E K K 突然変異）により、マウス配列はヒトの A r g 3 2 5 の本来の構造とほとんど同程度の反応性となった（図 2 2 B）。この同じ

50

プローブは、大多数の h T r p 反応性の血清では検出されなかった（図 2 2 D）。その同じ血清は、m T r p のみのプローブと弱く反応した（図 2 2 C）。

【0240】

図 2 3 A ~ 2 3 D に示す別の実験では、171 例の初発 T 1 D 被験者由来の Z n T 8 を、m Q > R 3 2 5、m Q > W 3 2 5、h R 3 2 5、h W 3 2 5 および h Q 3 2 5 プローブでアッセイし、データをウサギ抗 C 末端抗体と比較して計算した（B U N - E）。32 例の人々が h A r g 3 2 5 限定的な抗体結合を示し、そのうちの 19 例は m A r g 3 2 5 プローブに対する応答を示した。13 例は h T r p 3 2 5 限定的な抗体結合を示し、そのうちの 10 例は、m A r g 3 2 5 プローブに対する応答を示した。m A r g 3 2 5 または m T r p 3 2 5 への結合は、ヒトの相当物の不在下では観察されなかった。A r g 3 2 5 限定的な応答は、ヒトおよびマウスの間で相関し、h Q 3 2 5 プローブによって表わされる結合に対して補正した後は同程度であった。m T r p 3 2 5 プローブの結合は、h T r p 3 2 5 限定的な応答にマッピングされた一方で、h Q 3 2 5 の結合に対して補正した後でも少なかった。これらのデータは、325 位のアミノ酸が自己抗体エピトープ特異性の決定基であり、A r g バリエーションの場合には、マウスの点突然変異体が本来のヒトの立体配座に類似していることを示している。

10

【0241】

別の実験では、初発 T 1 D 患者における Z n T 8 自己抗体反応をアミノ酸 3 2 5 のバリエーションを用いて測定した。Z n T 8 3 2 5 の A r g、T r p および G l n バリエーションに基づいた突然変異型 C 末端プローブを用いて、300 名の初発患者における体液性免疫応答を測定した。図 2 4 D は、個々のプローブまたはプローブの組み合わせに対する応答に基づいて分けた応答のレベルおよび度数を示す。図 2 4 C は、通常の A r g および T r p バリエーションに対する応答の関係を示し、T r p（垂直軸）および A r g（水平軸）のみの応答について 95% 点のカットオフ、および該アッセイでは 15% C V と仮定した両プローブへ等価な反応 $\pm 3 S D$ の境界を表わす対角線に基づいて、5 つの領域に分割されている。図 2 4 A および 2 4 B は、G l n プローブに対する応答と A r g および T r p プローブに対する応答との関係を調べる際に同じ層別化が使用されている。

20

【0242】

図 2 5 は、Z n T 8 自己抗体特異性とアミノ酸 3 2 5 のコドンに関する患者の遺伝子型（S N P r s 1 3 2 6 6 6 3 4）との関係を示す。新たに診断された T 1 D 被験者について T a q M a n プローブを用いて遺伝子型を分析し、a a 3 2 5 に G l n（Q）、A r g（R）または T r p（W）を包含するヒト Z n T 8 C 末端構築物で血清をアッセイした。アッセイのカットオフ値は 0.02 指数に設定した。R または W の間のシグナルが Q プローブのシグナルを上回った時に、それぞれの測定のカットオフが 15% であると仮定し、指数が 3 S D より大きく（> 3 S D）異なった場合に二重反応性を陽性とした。

30

【0243】

このデータからいくつかの重要な結論が引き出される：

1) G l n プローブ（h C Q）への反応性は遺伝子型の影響を比較的受けにくい一方、A r g 反応性（h C R）は C 対立遺伝子（A r g をコードする）を有する個体、T r p 活性は T 対立遺伝子（T r p をコードする）を有する個体においてより高い。

40

【0244】

2) 300 名のうち 1 名のみについて、h C Q プローブに反応するが h C W または h C R には反応しないことが示された。この人は恐らく a a 3 2 5 に G l n 残基をコードしている（ヌクレオチド配列決定分析）。A r g に限定的な反応を示す人々（A r g のみ）は全員が C 対立遺伝子を有していた。T r p に限定的な反応を示す人々（T r p のみ）は全員が T 対立遺伝子を有していた。h C Q 反応を上回る h C R および h C W 反応を示した人々についてもほぼ同じことが言えた。

【0245】

3) h C R および h C W に反応性を示したが h C Q には示さなかった人々は、主にヘテロ接合であった。

50

これらのデータを図26にまとめるが、同図は、遺伝子型と、hCRおよびhCWプロープへの反応性との間の相関を示している。より具体的には、図26は、Arg325エピトープに限定された反応性はC対立遺伝子および特にCC遺伝子型に強く関係し、反対に、Trp325エピトープに限定された抗体反応性はT対立遺伝子および特にTT遺伝子型に関係している、という主要な知見をまとめたものである。

【0246】

図27は、Slc30A8遺伝子型を糖尿病発症年齢との関連で示している。遺伝子型と、T1Dが診断される年齢との間に明白な相関はない。しかしながら、例えば、TT遺伝子型を有する人は6歳より前に該疾患を発症しにくいようであると結論するには、その傾向があり、その結論が治療介入の点で重要なものであっても、より多くの試料が必要であろう。

10

【0247】

本発明者らによる糖尿病集団における遺伝子型と、対照の被験者について文献に報告されたものとは若干の歪みがある。本発明者らの観察では56.8%のCC、35.1%のCTおよび8.1%のTT(n=285)である。報告されているヨーロッパ集団における遺伝子型頻度は、52.3%のCC、44.1%のCTおよび3.6%のTT(n=168)(P=0.05 フィッシャーの正確確率検定)である。しかしながら、74.4%のCおよび25.6%のTの対立遺伝子頻度は、両集団において同一である。遺伝子型の分布は、ハーディー・ワインベルク分布(55.33%のCC、38.11%のCTおよび6.56%のTT)と著しく異なっていない。ヘテロ接合体とホモ接合体TTについて見ると(P=0.026)違いはより明白であり、TT遺伝子型がより多くヘテロ接合体がより少ないことを示唆しているとも考えられる。

20

【0248】

集団調査からは、第8染色体上のSlc30A8が位置する領域の遺伝子と関連したT1Dの存在は報告されない。しかしながらゲノムワイドなSNP分析は、Slc30A8のT対立遺伝子の2型糖尿病との関連を示し、検出に約8000名の被験者の分析を必要としたそのような関連は、約1.2のオッズ比およびP<0.05を示している。

【0249】

免疫学的データおよび遺伝学的データの組み合わせの興味深い特徴は、Argに限定的な抗体の保有率はヘテロ接合体よりもCCホモ接合体の群においてより高く、同様に、Trpに限定的な抗体ではヘテロ接合体よりもTTホモ接合体の群においてより高いという観察結果であった。これは、一部には、抗原の発現が多いほどより多くの自己反応性に関連するという遺伝子量効果であるとも考えられる。

30

【0250】

図28A~Bには、使用されたプロープおよびSlc30A8遺伝子型に対して自己抗体反応性のレベルが示されている。CC遺伝子型は169例、CTは108例、TTは23例の試料で表わされている。ZnT8 hC Gl nプロープはREKKエピトープへの抗体結合のみを反映することが予測されるが、hC ArgプロープはこのエピトープおよびArg325残基を中心としたエピトープの両方に結合する。hC Trpプロープは、REKKとの結合およびArg325を中心としたエピトープの両方を報告する。hC Argの反応性の平均レベルおよび保有率は、遺伝子型によって、予測された傾向すなわちC対立遺伝子頻度(Arg325をコードする)に関連した反応性の増大、という影響を受けた(図28A)。同様に、hC Trpの反応性の平均レベルおよび保有率は、T対立遺伝子頻度(Trp325をコードする)につれて増大した(図28A)。hC Gl nの反応性は、保有率またはレベルのいずれに関しても顕著ではないがC対立遺伝子とともに増大する傾向を示した(図28A)。他の生化学的自己抗体、IAA、GADAおよびIA2Aへの反応性は、Slc30A8遺伝子型による影響を受けなかった(図28B)。

40

【0251】

ZnT8Aアッセイの開発の現状をまとめる実験を図29に示す。アッセイは、50名

50

の初発糖尿病患者および99名の対照者で構成された、米国疾病予防管理センター（CDC）の糖尿病自己抗原プログラム（Diabetes Autoantigen Program）（DASP）から提供された一連のブラインド試料について実施した。アッセイは、マウス（m）またはヒト（h）のいずれかのZnT8配列を基にして*in vitro*翻訳され^{3 5}Sメチオニン放射標識されたプローブを用いる基本的な放射免疫沈降法の形式を使用して実施した。プローブはすべて、ヒトアミノ酸部位325にGln（Q）（配列番号50）、Arg（R）（配列番号49）またはTrp（W）（配列番号51）を有するZnT8のC末端104aa（C）を包含するものであった。さらに、3つのグリシン残基のリンカー配列を用いたZnT8のN末端74aa（N）とC末端との融合物（例えばhNCW）によって、またはフレキシブルなリンカーアーム（配列番号52）を介してhCW構築物がhCR構築物に連結されてhCWR構築物（配列番号60）を生じる、C末端の二量体を創出することによって、プローブを作製した。リンカーアームは免疫グロブリン重鎖配列に由来するものであり、該配列の定常領域と可変領域との間にフレキシブルな接続を提供することが知られている。該リンカー（配列PSTPPGSSGGG；配列番号52）により、単一の抗体分子が2箇所でもプローブに接続することができるためより高い結合力で結合することが可能となる可能性がある。あるいは、このプローブは、異なるエピトープ特異性の免疫グロブリンを含む2つの抗体分子に同時に結合することができる。

10

【0252】

全く同一の試料で得られる結果は、当分野の現況の多くを、また糖尿病の自己反応性の特徴を明らかにしている。すなわち：

20

1) ヒトT1D自己抗体は、天然のマウス配列（配列番号40）に対してはヒトの相当物（hCQ）（配列番号50）と比較して反応性が低い{mCQ対hCQ}。

【0253】

2) アミノ酸324のGln残基（配列番号41）（ヒトのaa325と等価）をArg残基（配列番号49）に置き換える単一の点突然変異によって、マウスZnT8に対する抗体の結合が増大する{mCQデータ対mCRデータ}。

【0254】

3) 325位に単一アミノ酸変化を有するヒトプローブに対する反応性は様々である（発症時における自己抗体の保有率は常にhCR > hCW > hCQの順である）。これは、hCRプローブ（配列番号49）およびhCWプローブ（配列番号51）が、aa325位を中心とした別のエピトープを有するからであり、また、大部分がコーカサス人である発症者らの集団ではArgバリエーションに対する抗体がTrpバリエーションよりも高頻度で生じているからである。

30

【0255】

4) N末端と、C末端のWバリエーション（配列番号62）またはRバリエーション（配列番号63）との融合により、T1D集団の5～8%によって認識されるN末端エピトープを、より反応性の高いC末端エピトープと並べて包含することができるようになる。しかしながら、このようにして計測された抗体の全体的な保有率は、実際には、該アッセイのバックグラウンドが高く、従ってカットオフ値が高いために、C末端プローブ単独の場合よりも低い。分子のさらなる設計により、これは是正されるであろう。

40

【0256】

5) CWドメインおよびCRドメインを融合して1つの分子（配列番号60）とすることにより、CR、CWおよびCQプローブに反応性を有する人の自己反応性を検出するプローブが創出された。さらに、そのシグナルは、バックグラウンド中に埋もれることなく高性能のアッセイをもたらし、3つの異なるアッセイの組み合わせよりも糖尿病被験者においてより高かった。プローブをさらに多量体化することにより検出レベルがさらに増加することも考えられる。検出率78%は、他のいかなる生化学的糖尿病自己抗体マーカーと比べても同程度であるか、またはより高い。

【0257】

図30は、N末端、C末端、内腔側ループ、細胞質側ループおよび多型の残基を組み合

50

わせた様々なZnT8構築物に対する自己反応性を示す。hCTrp-TM（配列番号67）は、6つの膜貫通ドメインを接続する3つの細胞外（内腔側）ループおよび2つの細胞質側ループを包含する構築物であり、これらのループに存在するあらゆるエピトープを捕捉するように設計されている。該構築物は、初発患者のさらに4%を検出した。hCAArgNはN末端およびC末端の両方を、ただし逆の順序で包含している（配列番号66）。このプローブによって計測した抗体のレベルは、hCAArg単独で計測したレベルと相關するが、さらに何人かの患者、特に低レベルの反応性を示す患者をもとらえた。データはさらに、325位のArgをTrpと交換する多型が、アミノ酸325を包含するエピトープに同程度または独立に反応する患者に加えて、hCAArgまたはhCTrpのみに対する抗体反応に限定されたかなりの数の患者を同定するという事例も例証している。

10

【実施例6】

【0258】

次の実施例は、1型糖尿病の新規な標的およびマーカーとしてのZnT8に関する追加データを提供する。

図31A~Fは、ZnT8に対する自己抗体を、23名の初発T1D被験者群において経時的にCペプチド（食後2時間）および他の自己抗体と比較した研究の結果を示す。この分析の主な結果は、ZnT8に対する自己抗体は、疾患発病後に、Cペプチド応答性の低下に反映される細胞塊の損失に類似の速度論をもって低下することである。このデータから本発明者らは当初、図31A~31CにおいてC末端構築物に対する応答は見られるが、N-C融合構築物と同等である（図31A）場合もあれば全く異なる（図31B~

20

【0259】

図32は、発症後5~10年におけるZnT8AおよびCペプチドのレベルを示している。以前の研究（上記の実施例に記載）から10年の追跡調査により、抗体は人々において一貫して減少したこと、最初高レベルであった抗体ほど持続されていたことが示されている。5年後までに約60%の試料でセロコンバージョンが起こり、全例においてレベルは平均で90%低下した。Abレベルが低い（ < 0.4 ）試料は、より早くセロコンバージョンする傾向があった。高レベルの抗体を有する一部の試料には、ランダムCペプチド陽性で示されるように残存細胞塊があった。

30

【0260】

インスリン、GADおよびIA2に加えてのZnT8自己抗体の測定について、本明細書中の先行する実施例で述べてきた。それらの実施例において、本発明者らは単にhCR反応性を測定しており、これはTrp325反応性を除外してきたことになる。図33A

40

【実施例7】

【0261】

次の実施例は、異なるZnT8エピトープを区別するための組換え型タンパク質の有用性を示す、自己抗体予備吸着実験について説明する。

いくつかの組換えZnT8分子が、pGEX（グルタチオンアガロースで精製することが可能なグルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質を生産する）またはpQEシリーズ（金属キレートクロマトグラフィによって精製することが可能な、タンパク質のN末端もしくはC末端にポリヒスチジンタグが付いたタンパク質を生産する）のようなベク

50

ターを使用して生成されてきた。しかしながら、精製が困難で、適切にフォールディングして抗原性エピトープを再作成できないものは、不溶性の封入体を生じることが分かった。本発明者らは、金属キレートアフィニティ精製のためのHisタグと、細菌のシャペロンであり適切なフォールディングを確実にするタンパク質融合パートナーとの両方を組み込むベクター（pET43.1ベクター、ノバジェン（Novagen）、EMDバイオサイエンス（EMD Biosciences））の使用に解決策を見出した。該タンパク質はBL-21（DE3）細菌（ノバジェン）中で発現される。

【0262】

NUS hZnT8 C末端タンパク質であって、配列番号49に基づくもの（Arg325バリエーション）、配列番号50に基づくもの（Gln325バリエーション）および配列番号51に基づくもの（Trp325バリエーション）を生成させてNiキレートカラムで精製し、20マイクログラムの試料をT1D血清とともに室温で2時間インキュベートしてから、35S Met 標識したhCArg、hCTrp、およびhCGlnプローブを添加して従来の放射免疫沈降アッセイを実施した。

10

【0263】

図2Cに示す実験では、Arg325に限定的である（血清#541827、hCArgと表示）、Trp325に限定的である（血清#533855、hCTrpと表示）、および325位のアミノ酸と無関係にすべてのhC末端構築物により共有されるエピトープと反応する（血清#BT、hCGlnと表示）ことが分かっている、3種の血清を選択した。

20

【0264】

結果は、325位の多型によって規定されたエピトープに限定的な血清の著しい特異性を示している。この結果はさらに、TrpおよびArg構築物は325位に限定的でない血清では識別することができないことを示している。実際問題として、このことにより、Arg325、Trp325および非限定的なエピトープが同じ試料中に表われている場合の、これらのエピトープに対する血清の相対的反応性を決定するよりよい手段が提供される。現在、単一の外部の全反応的なC末端標準品（BUN-E）を使用する3つのラジオアッセイを用いて反応を校正し、次に、数値を互いに差し引いている。本明細書に記載の組換え型タンパク質を利用すれば、反応性のレベルは、1つの適切なプローブを使用し、異なる組換え型タンパク質によってシグナルが抑制される程度を測定することにより、決定することができる。

30

【0265】

したがって、期待されたエピトープ特異性を示す、本明細書に記載のhCNUS融合タンパク質のようなZnT8を基にした融合タンパク質を利用できることは、アイソトープを用いない手順に基づく固相での自己抗体アッセイ法を作成するうえでの重要なステップである。

【実施例8】

【0266】

次の実施例は、hZnT8をコードするアデノウイルスベクターの製造、および宿主細胞におけるhZnT8の発現について述べる。

40

本発明者らはさらに、完全長hZnT8の発現用のアデノウイルスベクターを製造した。対照アデノウイルス（AdLacZ）またはAd-hZnT8-V5-His（）を用いて、MOIを100としてCos7細胞を形質導入した。48時間後に細胞をハーベストし、SDS-PAGEおよびウサギ抗hZnT8ポリクローナル抗体を用いたイムノブロットングによって発現を観察し（データは示さない）、グルクロニダーゼ（GUS）またはhZnT8-V5-Hisを製造業者の指示に従ってin vitro翻訳し（RTS 100コムギ麦芽CECFキット、ロッシュ（Roche））、混合物1μl（2%）をウェスタンブロットによって分析した。hZnT8タンパク質の発現が検出された（データは示さない）。

【実施例9】

50

【 0 2 6 7 】

次の実施例は、様々な細胞における Z n T 8 の免疫組織化学的な位置確認について示す。

I N S - 1 細胞は膵臓 細胞に由来する 細胞株であり、 細胞の良好な細胞培養モデルを提供する。上記の分析の中で使用される抗体は、 B U N - E と名ばれる組換え融合タンパク質に対して作られたものであり、 S l c 3 0 A 8 遺伝子によってコードされる Z n T 8 の細胞内局在を確認するために使用される。該抗体は、大きさがおよそ 0 . 2 ~ 0 . 5 ミクロン (データは示さない) の細胞内の点状の細胞小器官を強調表示する。この細胞小器官は、インスリン顆粒をマーキングするインスリンと同様のパターンで細胞内に分布するが、インスリン顆粒には以前の研究により Z n T 8 が位置確認されている。この実施例で述べる本発明者らの免疫組織化学的研究から (データは示さない) 、 Z n T 8 は全てが顆粒内にあるわけではなく、トランスゴルジネットワークのマーカである T G N 3 8 と部分的な重なり合いを示すことが示唆されている。 Z n T 8 は、初期エンドソームのマーカ E E A 1 またはトランスフェリンレセプターによってマーキングされるようなりサイクリングエンドソームでは位置確認されないが、成熟したリソソームのマーカである L A M P 1 でも実質的な重なり合いは生じない。全体として、これらのデータは、 Z n T 8 が分泌顆粒限定的なタンパク質であるという以前の報告 (キミエンティら、既述) と一致しない。

【 実施例 1 0 】

【 0 2 6 8 】

次の実施例は、ヒト胎児の膵臓のリアルタイム P C R により、 Z n T 8 が遺伝子ファミリーの関連遺伝子 (Z n T 1 - 7 および Z n T 9) とは異なる高い膵島特異性を有することが示されることを示す。

【 0 2 6 9 】

記載の週齢のヒト胎児の膵臓を入手し、 m R N A を抽出し、次いで発生途中 (妊娠第 9 週および第 2 3 週) および成人の膵島における発現レベルの測定に使用した。第 9 週では、膵臓は大部分が未分化の間充組織で構成されている。第 2 3 週までに肉眼上の構造は成体の構造と類似し、実質的な Z n T 1 (S l c 3 0 A 1) および特に Z n T 8 (S l c 3 0 A 8) の発現増加を示す (図 3 4 を参照) 。単離された膵島には Z n T 1 が少ないが、これは Z n T 1 が主に外分泌腺組織に局限しているからである。

【 実施例 1 1 】

【 0 2 7 0 】

次の実施例は、新たに診断された T 1 D 患者が Z n T 8 合成ペプチドに対する末梢の T 細胞応答を示すことを実証する。

この実験は、糖尿病となったばかりの被験者由来の P B M C による h Z n T 8 依存性の I F N - 産生を示す。 P B M C を 4 名の糖尿病となったばかりの被験者から単離し、 7 a a が重複する 2 0 量体ペプチドとしてヒト Z n T 8 配列全体にわたる h Z n T 8 ペプチドのうち連続した 2 つをプールしたもの (1 0 μ g / m l) とともに 4 8 時間培養した。洗浄した後、細胞を抗 I F N - モノクローナル抗体でコーティングした E L I S P O T プレートに移し、さらに 1 7 時間培養した。洗浄して細胞と培地を取り除いた後、分泌されたサイトカインを、別の部位がビオチン化された抗 I F N g モノクローナル抗体、 G A B A および沈殿銀溶液を使用して検出した。スポットを、 B i o r e a d e r (R) 4 0 0 0 P r o X (バイオシス (B I O S Y S)) で計数した。対照の被験者はいずれのペプチドにも有意なシグナル (S I = 3) を生じなかったが、陽性対照の破傷風トキソイド / ジフテリア毒素については S I = 2 2 を示した。試験した全ての患者が、少なくとも 3 つのペプチドに対して有意な I F N - 応答を示し (S I = 3) 、被験者 N o . 3 はペプチドのプール化物のうち 1 2 種に対して応答したが、対照者では応答はなかった。個体間では相関はほとんど観察されず、唯一プール 1 7 (E 5 + F 5) がすべての被験者によって認識されている。

【 0 2 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 4】

References

1. Wucherpfennig KW, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2:767-768, 2001
2. Yoon JW, Jun HS: Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 928:200-211, 2001
3. Rosmalen JG, van Ewijk W, Leenen PJ: T-cell education in autoimmune diabetes: teachers and students. *Trends Immunol* 23:40-46, 2002
4. Rossini AA: Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. *Diabetes* 53:267-275, 2004 10
5. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N: Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109:131-140, 2002
6. Arif S, Tree TI, Astill TP, Tremble JM, Bishop AJ, Dayan CM, Roep BO, Peakman M: Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Invest* 113:451-463, 2004
7. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD: Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 44:354-362, 2001
8. Atkinson MA, Leiter EH: The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 5:601-604, 1999 20
9. Andre I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D: Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2260-2263, 1996
10. Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, Glaser B: Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49:1325-1333, 2000
11. Rosmalen JG, Leenen PJ, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F: Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 13:209-214, 2002
12. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E: Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *Jama* 290:1721-1728, 2003 30
13. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M: Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *Jama* 290:1713-1720, 2003
14. Hyoty H, Taylor KW: The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45:1353-1361, 2002
15. Larger E, Becourt C, Bach JF, Boitard C: Pancreatic islet beta cells drive T cell-immune responses in the nonobese diabetic mouse model. *J Exp Med* 181:1635-1642, 1995
16. Baker FJ, Lee M, Chien YH, Davis MM: Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9374-9379, 2002 40
17. Yang Y, Charlton B, Shimada A, Dal Canto R, Fathman CG: Monoclonal T cells identified in early NOD islet infiltrates. *Immunity* 4:189-194, 1996
18. Tian J, Gregori S, Adorini L, Kaufman DL: The frequency of high avidity T cells determines the hierarchy of determinant spreading. *J Immunol* 166:7144-7150, 2001

19. Amrani A, Verdaguer J, Serra P, Tafuro S, Tan R, Santamaria P: Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature* 406:739-742, 2000

20. Notkins AL, Lernmark A: Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 108:1247-1252, 2001

21. Bowie L, Tite J, Cooke A: Generation and maintenance of autoantigen-specific CD8(+) T cell clones isolated from NOD mice. *J Immunol Methods* 228:87-95, 1999

22. Haskins K, Portas M, Bergman B, Lafferty K, Bradley B: Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8000-8004, 1989

23. Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW: Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 152:2042-2050, 1994

24. Wegmann DR, Shehadeh N, Lafferty KJ, Norbury-Glaser M, Gill RG: Establishment of islet-specific T-cell lines and clones from islet isografts placed in spontaneously diabetic NOD mice. *J Autoimmun* 6:517-527, 1993

25. Gelber C, Paborsky L, Singer S, McAteer D, Tisch R, Jolicoeur C, Buelow R, McDevitt H, Fathman CG: Isolation of nonobese diabetic mouse T-cells that recognize novel autoantigens involved in the early events of diabetes. *Diabetes* 43:33-39, 1994

26. Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS: Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1197-1201, 1991

27. Martin S, Lampasona V, Dosch M, Pietropaolo M: Islet cell autoantigen 69 antibodies in IDDM. *Diabetologia* 39:747, 1996

28. Buschard K, Josefsen K, Horn T, Fredman P: Sulphatide and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342:840, 1993

29. Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP: Identification of the {beta} cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8384-8388, 2003

30. Eisenbarth GS, Moriyama H, Robles DT, Liu E, Yu L, Babu S, Redondo M, Gottlieb P, Wegmann D, Rewers M: Insulin autoimmunity: prediction/precipitation/prevention type 1A diabetes. *Autoimmun Rev* 1:139-145, 2002

31. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM: B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 161:3912-3918, 1998

32. Kelemen K, Wegmann D, JC H: T cell epitope regions on phogrin and IA-2 in the NOD mouse. *Diabetologia* 43:A98, 2000

33. Wegmann DR, Norbury-Glaser M, Daniel D: Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice. *Eur J Immunol* 24:1853-1857, 1994

34. Zekzer D, Wong FS, Ayalon O, Millet I, Altieri M, Shintani S, Solimena M, Sherwin RS: GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin Invest* 101:68-73, 1998

10

20

30

40

35. Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, Shastri N, Pamer EG, Janeway CA, Jr.: Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med* 5:1026-1031, 1999

36. Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D: Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol* 25:1056-1062, 1995

37. Chen W, Bergerot I, Elliott JF, Harrison LC, Abiru N, Eisenbarth GS, Delovitch TL: Evidence that a peptide spanning the B-C junction of proinsulin is an early Autoantigen epitope in the pathogenesis of type 1 diabetes. *J Immunol* 167:4926-4935, 2001

38. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS: Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435:220-223, 2005

39. DiLorenzo TP, Graser RT, Ono T, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, Nathenson SG, Serreze DV: Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12538-12543., 1998

40. Trudeau JD, Kelly-Smith C, Verchere CB, Elliott JF, Dutz JP, Finegood DT, Santamaria P, Tan R: Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood. *J Clin Invest* 111:217-223, 2003

41. Herold KC: Achieving antigen-specific immune regulation. *J Clin Invest* 113:346-349, 2004

42. Daniel D, Wegmann DR: Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:956-960, 1996

43. Wolfe T, Bot A, Hughes A, Mohrle U, Rodrigo E, Jaume JC, Baekkeskov S, von Herrath M: Endogenous expression levels of autoantigens influence success or failure of DNA immunizations to prevent type 1 diabetes: addition of IL-4 increases safety. *Eur J Immunol* 32:113-121, 2002

44. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366:69-72, 1993

45. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO: Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366:72-75, 1993

46. Petersen JS, Karlsen AE, Markholst H, Worsaae A, Dyrberg T, Michelsen B: Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 43:1478-1484, 1994

47. Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans C, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnick N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL: Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat Med* 2:1348-1353, 1996

48. Ramiya VK, Shang XZ, Wasserfall CH, Maclaren NK: Effect of oral and intravenous insulin and glutamic acid decarboxylase in NOD mice. *Autoimmunity* 26:139-151, 1997

10

20

30

40

49. Ablamunits V, Elias D, Cohen IR: The pathogenicity of islet-infiltrating lymphocytes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Clin Exp Immunol* 115:260-267, 1999
50. Mukherjee R, Wagar D, Stephens TA, Lee-Chan E, Singh B: Identification of CD4+ T cell-specific epitopes of islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein: a novel beta cell autoantigen in type 1 diabetes. *J Immunol* 174:5306-5315, 2005
51. Kelemen K, Wegmann DR, Hutton JC: T-cell epitope analysis on the autoantigen phogrin (IA-2beta) in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 50:1729-1734, 2001
52. Panagiotopoulos C, Qin H, Tan R, Verchere CB: Identification of a beta-cell-specific HLA class I restricted epitope in type 1 diabetes. *Diabetes* 52:2647-2651, 2003
53. Van Vliet E, Roep BO, Meulenbroek L, Bruining GJ, De Vries RR: Human T cell clones with specificity for insulinoma cell antigens. *Eur J Immunol* 19:213-216, 1989
54. Roep BO, Arden SD, de Vries RR, Hutton JC: T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. *Nature* 345:632-634, 1990
55. Neophytou PI, Ozegbe P, Healey D, Quartey-Papafio R, Cooke A, Hutton JC: Development of a procedure for the direct cloning of T-cell epitopes using bacterial expression systems. *J Immunol Methods* 196:63-72, 1996
56. Arden SD, Roep BO, Neophytou PI, Usac EF, Duinkerken G, de Vries RR, Hutton JC: Imogen 38: a novel 38-kD islet mitochondrial autoantigen recognized by T cells from a newly diagnosed type 1 diabetic patient. *J Clin Invest* 97:551-561, 1996
57. Kallan AA, Roep BO, Arden SD, Hutton JC, de Vries RR: Beta-cell reactive T-cell clones from type I diabetes patients are not beta cell specific and recognize multiple antigens. *J Autoimmun* 8:887-899, 1995
58. Benoist C, Mathis D: Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2:797-801, 2001
59. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 94:2125-2129, 1994
60. Roep BO, Hiemstra HS, Schloot NC, De Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW: Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus. *Ann N Y Acad Sci* 958:163-165, 2002
61. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC: T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med* 4:231-239, 1998
62. Harkonen T, Lankinen H, Davydova B, Hovi T, Roivainen M: Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J Med Virol* 66:340-350, 2002
63. Rudy G, Stone N, Harrison LC, Colman PG, McNair P, Brusica V, French MB, Honeyman MC, Tait B, Lew AM: Similar peptides from two beta cell autoantigens, proinsulin and glutamic acid decarboxylase, stimulate T cells of individuals at risk for insulin-dependent diabetes. *Mol Med* 1:625-633, 1995
64. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298:167-169, 1982

65. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347:151-156, 1990

66. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E: Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155:5419-5426, 1995

67. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhoffer M, Orntoft T, Eizirik DL: A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886, 2001

68. Lilla V, Webb G, Rickenbach K, Maturana A, Steiner DF, Halban PA, Irminger JC: Differential gene expression in well-regulated and dysregulated pancreatic beta-cell (MIN6) sublines. *Endocrinology* 144:1368-1379, 2003

69. Gradwohl G, Dierich A, LeMour M, Guillemot F: neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1607-1611, 2000

70. Iizuka K, Miller B, Uyeda K: Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E358-364, 2006

71. Kash SF, Condie BG, Baekkeskov S: Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: lessons from knock-out mice. *Horm Metab Res* 31:340-344, 1999

72. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB: A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6062-6067, 2004

73. Malarkannan S, Mendoza LM, Shastri N: Generation of antigen-specific, lacZ-inducible T-cell hybrids. *Methods Mol Biol* 156:265-272, 2001

74. Bednarek J, Furmaniak J, Wedlock N, Kiso Y, Baumann-Antczak A, Fowler S, Krishnan H, Craft JA, Rees Smith B: Steroid 21-hydroxylase is a major autoantigen involved in adult onset autoimmune Addison's disease. *FEBS Lett* 309:51-55, 1992

75. Mullins RJ, Cohen SB, Webb LM, Chernajovsky Y, Dayan CM, Londei M, Feldmann M: Identification of thyroid stimulating hormone receptor-specific T cells in Graves' disease thyroid using autoantigen-transfected Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *J Clin Invest* 96:30-37, 1995

76. Kawasaki E, Eisenbarth GS, Wasmeier C, Hutton JC: Autoantibodies to protein tyrosine phosphatase-like proteins in type I diabetes. Overlapping specificities to phogrin and ICA512/IA-2. *Diabetes* 45:1344-1349, 1996

77. Kawasaki E, Yu L, Rewers MJ, Hutton JC, Eisenbarth GS: Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 47:733-742, 1998

78. Kelemen K, Gottlieb PA, Putnam AL, Davidson HW, Wegmann DR, Hutton JC: HLA-DQ8-associated T cell responses to the diabetes autoantigen phogrin (IA-2 beta) in human prediabetes. *J Immunol* 172:3955-3962, 2004

10

20

30

40

79. Taneja V, David CS: HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol Rev* 169:67-79, 1999
80. Sonderstrup G, McDevitt H: Identification of autoantigen epitopes in MHC class II transgenic mice. *Immunol Rev* 164:129-138, 1998
81. Inaba T, Koseki H, Suzuki M, Taniguchi M: Double-step and inverse polymerase chain reaction for sensitive detection and cloning of T cell receptor variable region sequences. *Int Immunol* 3:1053-1057, 1991
82. Abraham RS, Wen L, Marietta EV, David CS: Type 1 diabetes-predisposing MHC alleles influence the selection of glutamic acid decarboxylase (GAD) 65-specific T cells in a transgenic model. *J Immunol* 166:1370-1379, 2001
83. Abraham RS, Kudva YC, Wilson SB, Strominger JL, David CS: Co-expression of HLA DR3 and DQ8 results in the development of spontaneous insulinitis and loss of tolerance to GAD65 in transgenic mice. *Diabetes* 49:548-554, 2000
84. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH: Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 42:44-55, 1993
85. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr.: CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* 183:67-76, 1996
86. Wang B, Gonzalez A, Benoist C, Mathis D: The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 26:1762-1769, 1996
87. Amrani A, Verdaguer J, Anderson B, Utsugi T, Bou S, Santamaria P: Perforin-independent beta-cell destruction by diabetogenic CD8(+) T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice. *J Clin Invest* 103:1201-1209, 1999
88. Graser RT, DiLorenzo TP, Wang F, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, Nathenson SG, Serreze DV: Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. *J Immunol* 164:3913-3918., 2000
89. Haskins K, McDuffie M: Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 249:1433-1436, 1990
90. Takaki T, Marron MP, Mathews CE, Guttmann ST, Bottino R, Trucco M, DiLorenzo TP, Serreze DV: HLA-A*0201-restricted T cells from humanized NOD mice recognize autoantigens of potential clinical relevance to type 1 diabetes. *J Immunol* 176:3257-3265, 2006

10

20

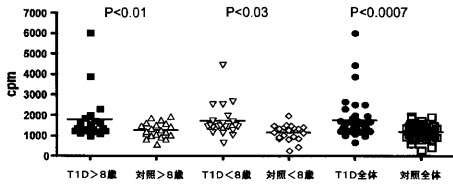
30

本明細書中に引用された各出版物は参照によって全体が本願に組み込まれる。

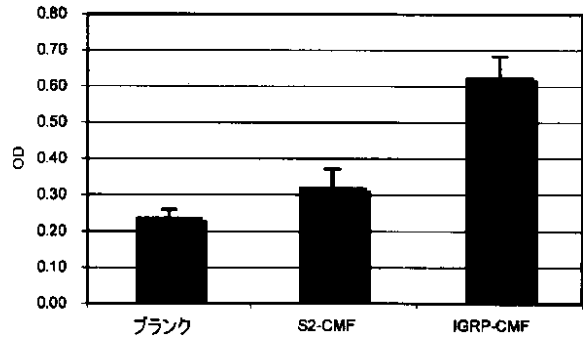
【 0 2 7 2 】

本発明の様々な実施形態について詳細に述べてきたが、当然ながら、当業者にはそれらの実施形態の修正形態および改変形態が想起されるであろう。しかしながら、そのような修正形態および改変形態は、添付の特許請求の範囲に述べる本発明の範囲内にあることは明確に理解されるべきである。

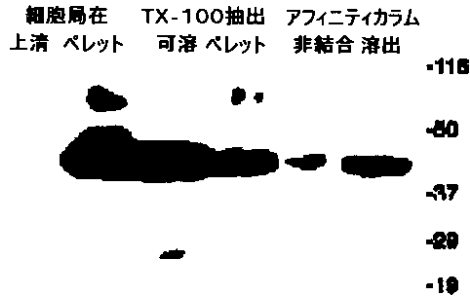
【 図 1 】



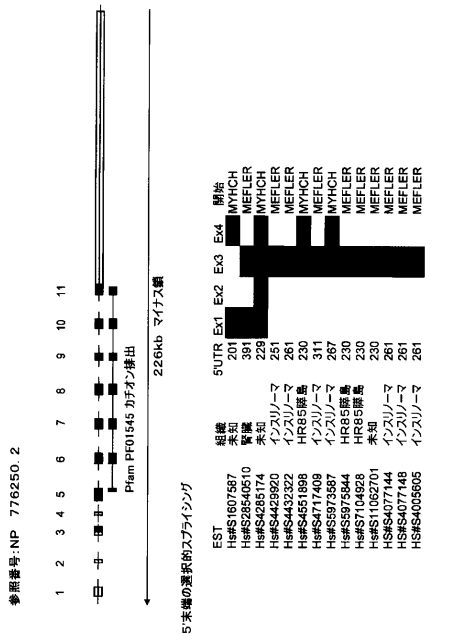
【 図 2 B 】



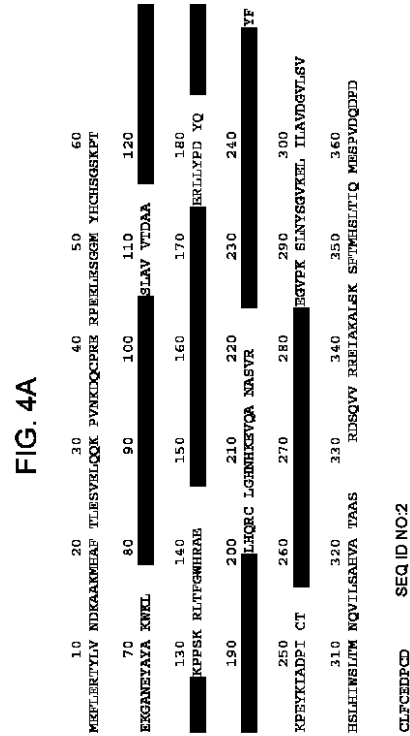
【 図 2 A 】



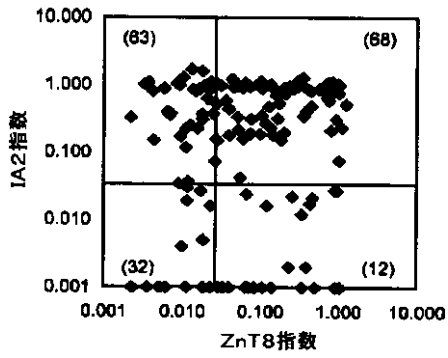
【 図 3 】



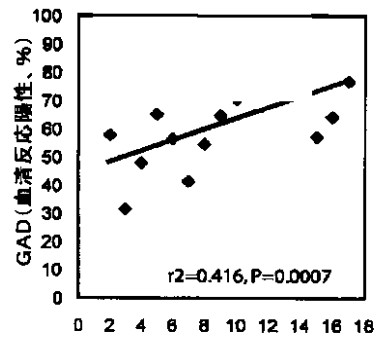
【 図 4 A 】



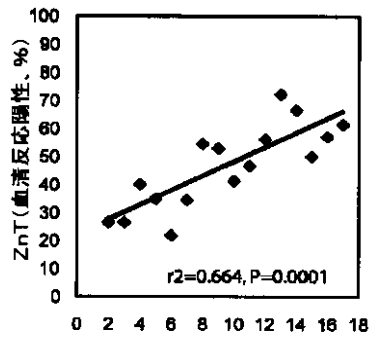
【 図 8 C 】



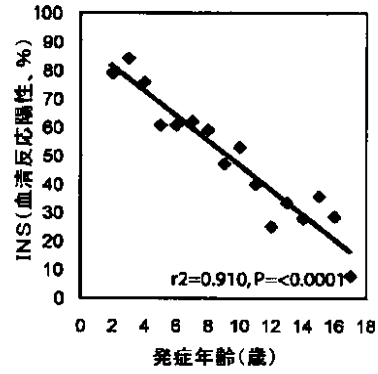
【 図 9 B 】



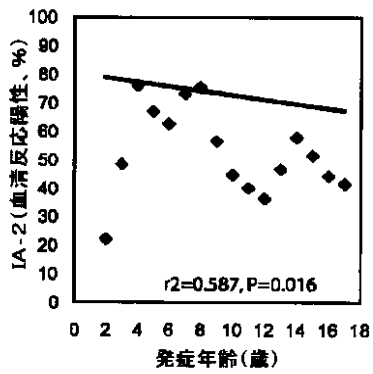
【 図 9 A 】



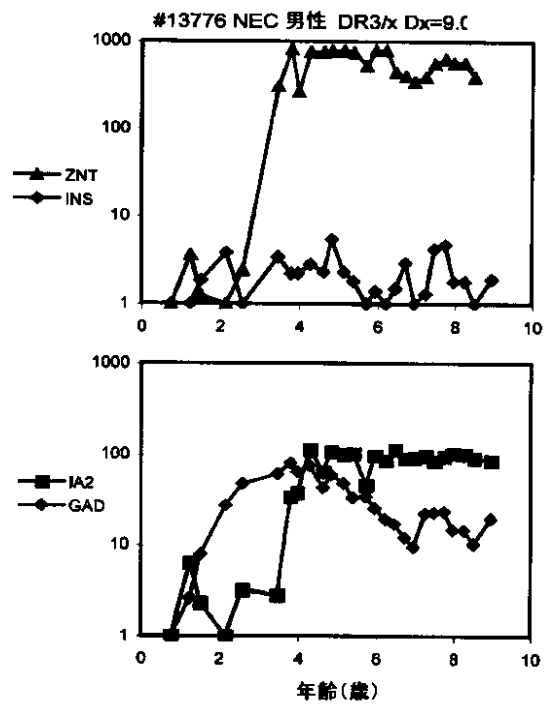
【 図 9 C 】



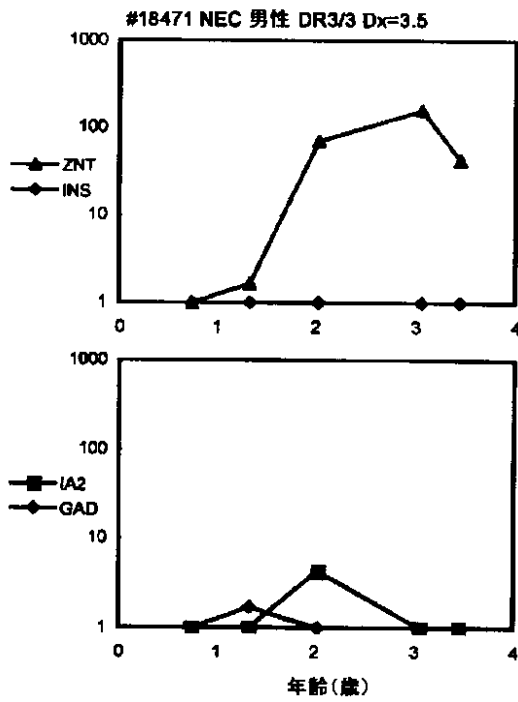
【 図 9 D 】



【 図 10 A 】



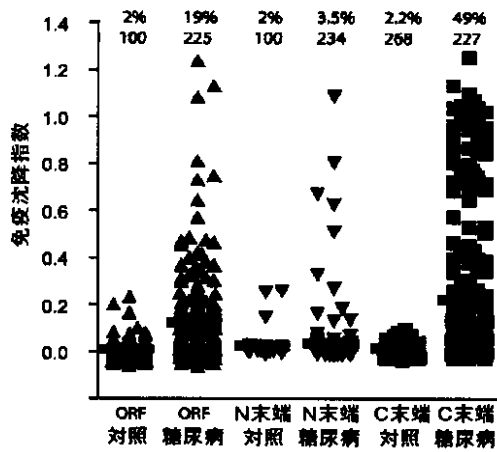
【 図 1 0 B 】



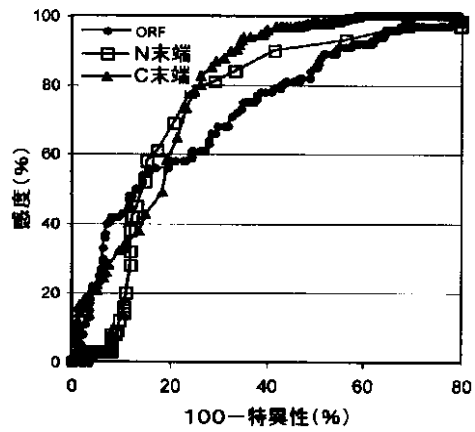
【 図 1 1 】

抗体の状態	ZnT8		ZnT8C		ZnT8ORF		ZnT8C		ZnT8C		ZnT8C		ZnT8C	
	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2	INS/GAD/IA2
5Ab	-	16	-	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
>4Ab	44	34	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
>3Ab	72	64	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
>2Ab	86	78	9	12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
>1Ab	14	92	1	6	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
0Ab	-	8	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ICA+のみ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

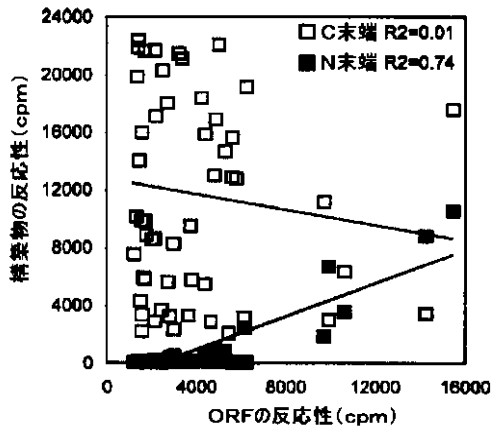
【 図 1 2 A 】



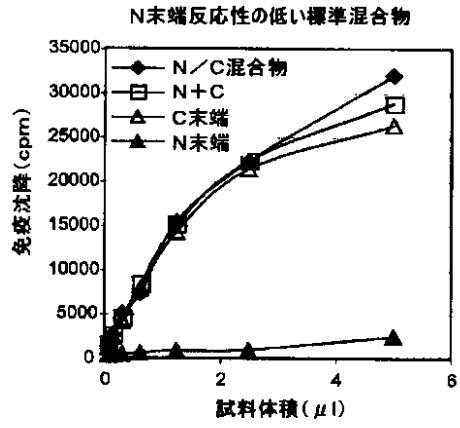
【 図 1 2 B 】



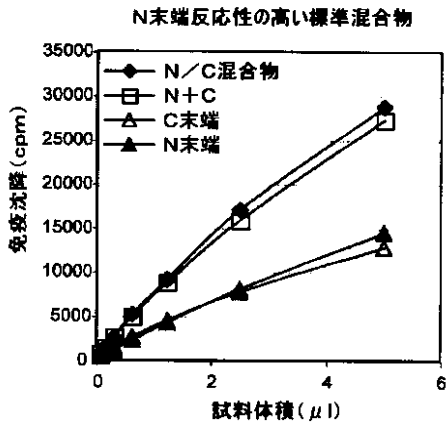
【 図 1 3 】



【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】



【 図 1 5 A 】

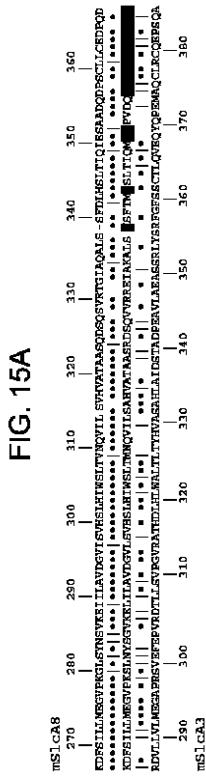
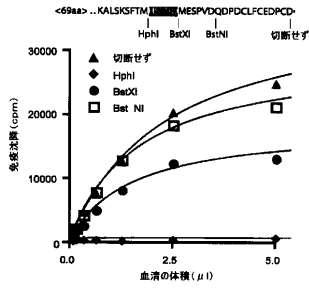
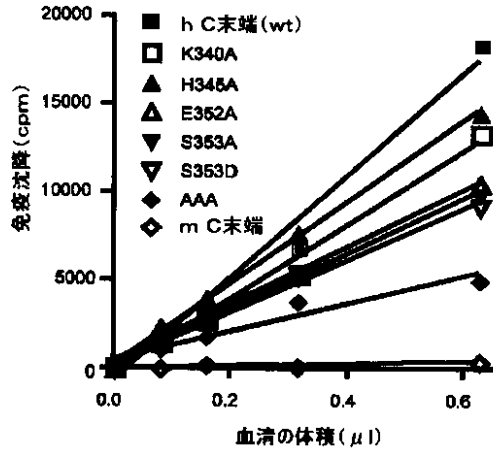


FIG. 15A

【 図 1 5 B 】



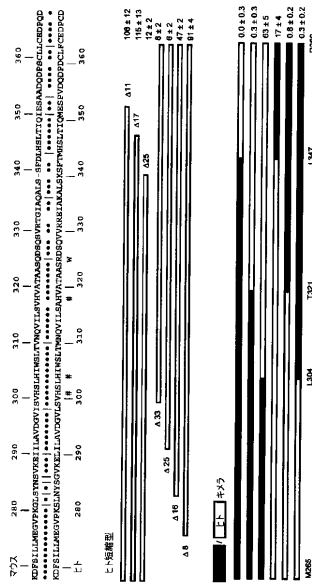
【 図 1 5 C 】



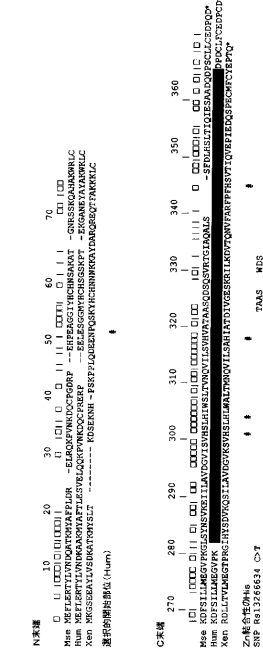
【 図 1 6 】

Slc30A8		
ヒト	Y V Y	配列番号26342~358
サル	V V Y	配列番号26
イヌ	V V Y	配列番号27
ラット	D I L	H A A 配列番号28
マウス	D I L	H A A 配列番号40340~356
ウシ	H P F	H A A 配列番号29
ヒキガエル	P P F	V P I F S 配列番号30
ゴウリ	Y S F	H H S G S E 配列番号31
魚	Y S F	V P I P Q A R 配列番号32
他のCzcD		
hSlc30A2	H F T V	H D V S D M 配列番号33
hSlc30A3	G F S S C	H V Q Y Q P E M 配列番号34
バロロカス	G I T H V	L T G R C K R 配列番号35
無関係		
大腸菌	V D C N Q	K I V Q 配列番号36
hRREP3	S M H D L	G D E G R 配列番号37

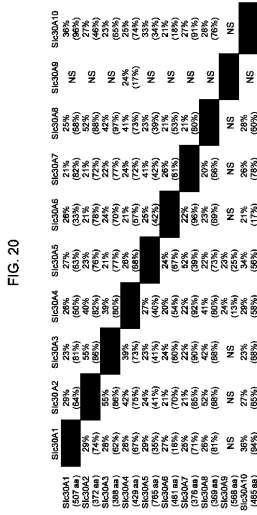
【 図 1 7 】



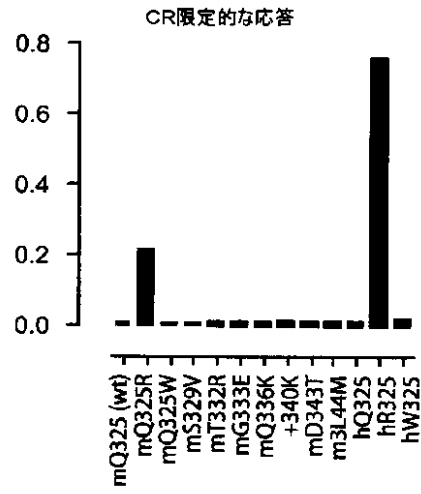
【 図 1 9 】



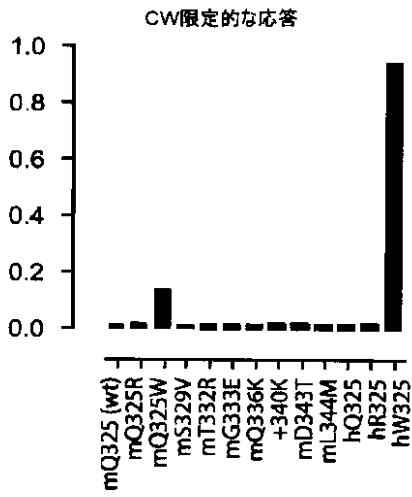
【 図 2 0 】



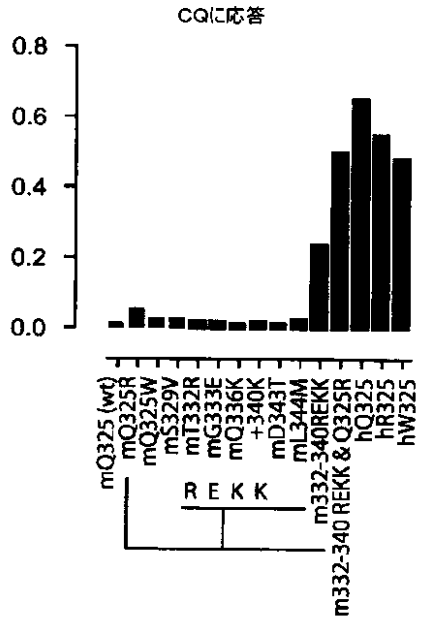
【 図 2 1 A 】



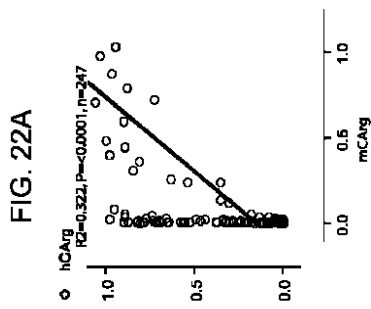
【 図 2 1 B 】



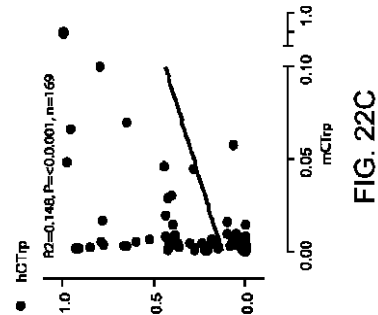
【 図 2 1 C 】



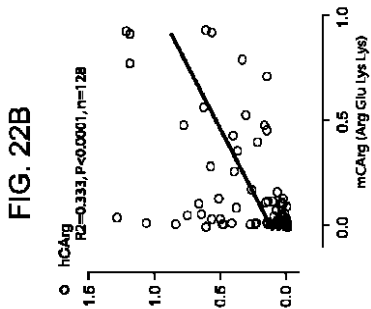
【 図 2 2 A 】



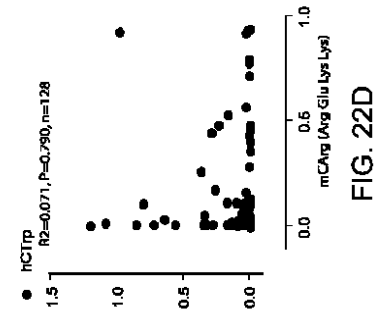
【 図 2 2 C 】



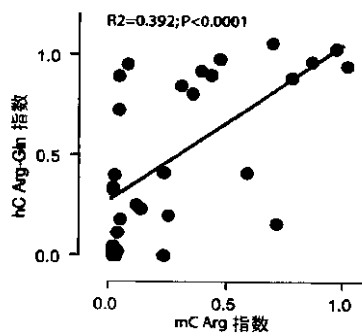
【 図 2 2 B 】



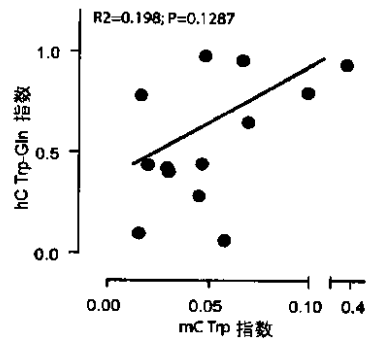
【 図 2 2 D 】



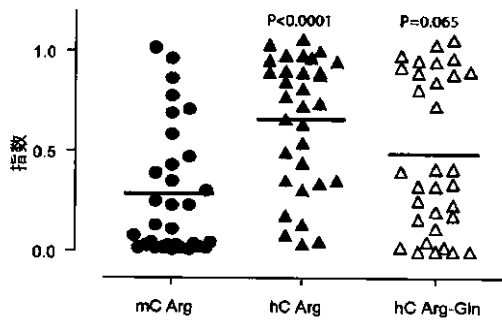
【 図 2 3 A 】



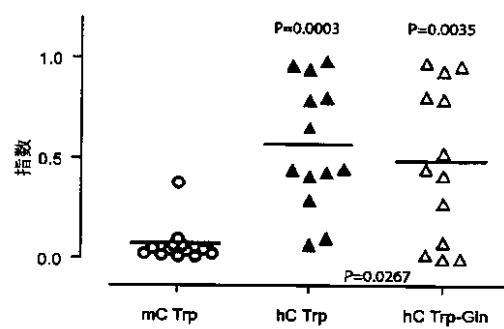
【 図 2 3 C 】



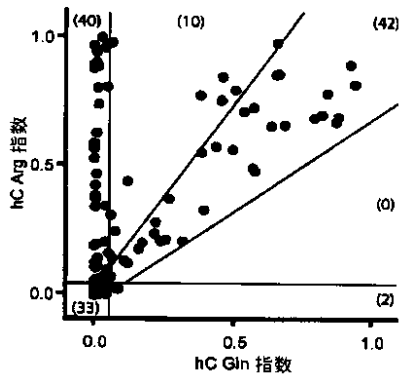
【 図 2 3 B 】



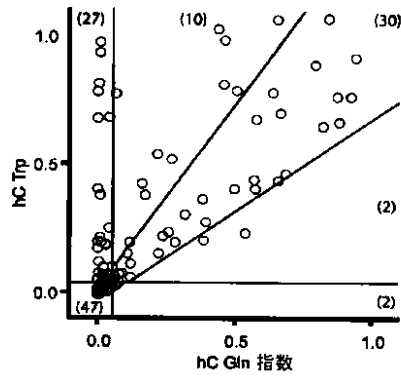
【 図 2 3 D 】



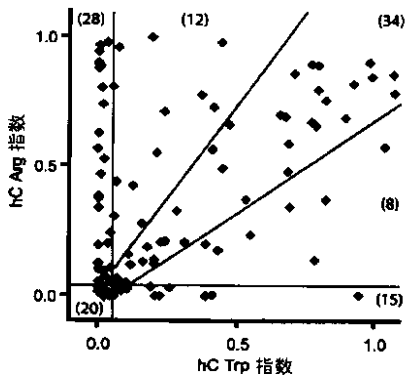
【 図 2 4 A 】



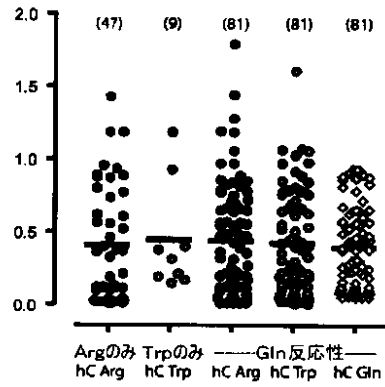
【 図 2 4 B 】



【 図 2 4 C 】



【 図 2 4 D 】

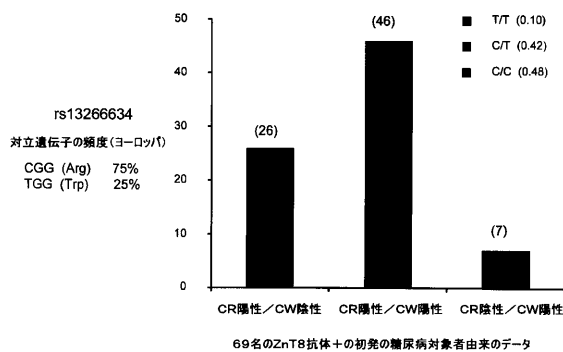


【 図 2 5 】

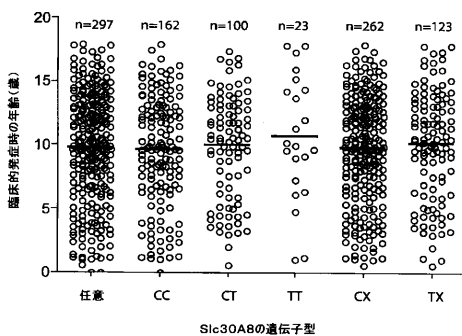
アミノ酸残基の 位置	遺伝子型					
	CC (169)		CT (108)		TT (23)	
	n	%	n	%	n	%
171T/C	198	66.0	116	68.6	63	82.6
全部	96	32.0	58	34.3	33	30.6
Gln	113	37.7	69	40.8	38	35.2
Arg	179	59.7	115	68.0	57	52.8
Trp	138	46.0	64	37.9	55	50.9
Glnのみ	1*	0.3	1	0.6	0	0.0
Argのみ	47	15.7	41	24.3	6	5.6
Trpのみ	15	5.0	0	0.0	4	3.7
Arg&Trp (Gln<0.02)	13	4.3	2*	1.2	11	10.2
Arg<Gln	55	18.3	50	29.6	5	4.6
Trp<Gln	17	5.7	1	0.6	12	11.1
Arg<Gln & Trp<Gln	3	1.0	1	0.6	2	1.9

77遺伝子の正確な決定: * 相対<0.05; 行1: P=0.046; TT対CT: 0.029; 行2: P=0.441; 行3: P=0.314; 行4: P=0.0005; 行5: P=0.0001; 行6: P=0.678; 行7: P=0.0001; 行8: P=0.0001; 行9: P=0.0009; 行10: P<0.0001; 行11: P<0.0001; 行12: P=0.519

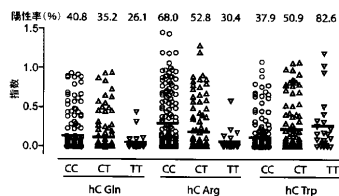
【 図 2 6 】



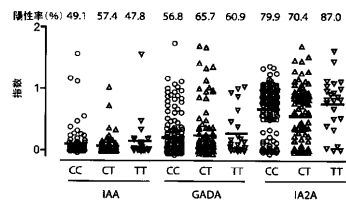
【 図 2 7 】



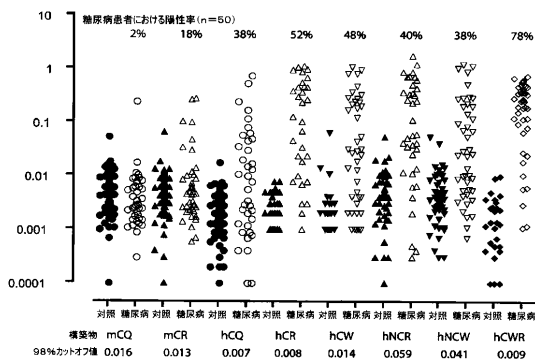
【 図 2 8 A 】



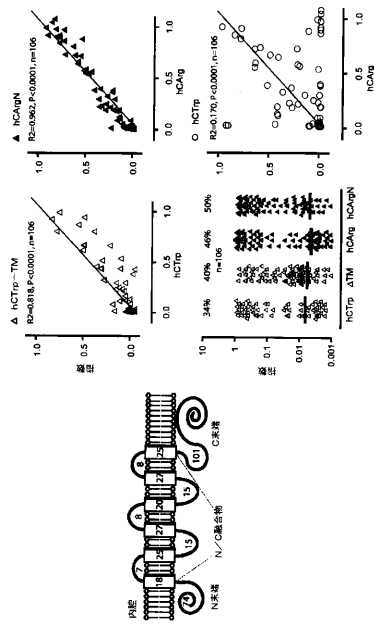
【 図 2 8 B 】



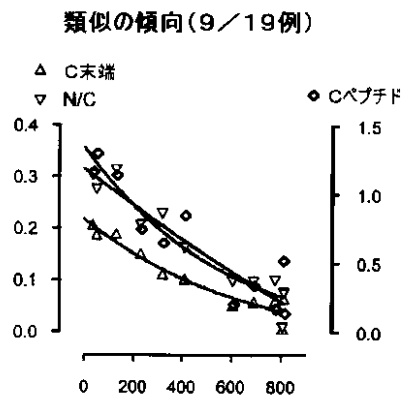
【 図 2 9 】



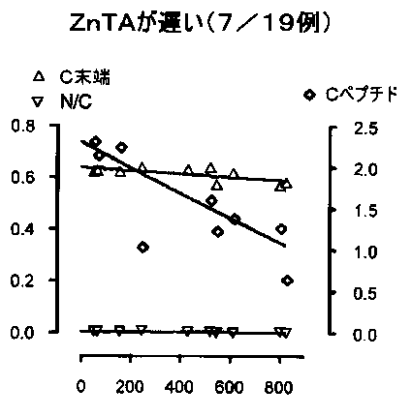
【 図 3 0 】



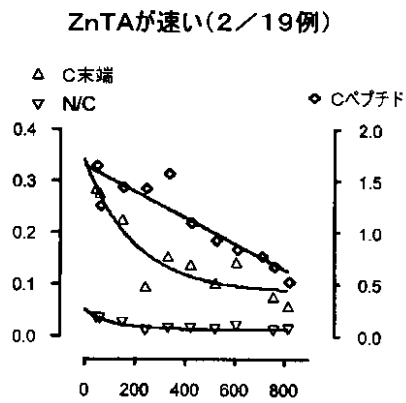
【 図 3 1 A 】



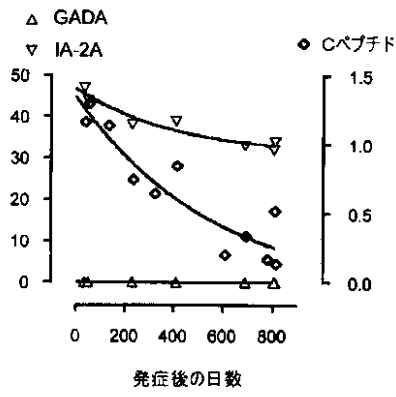
【 図 3 1 B 】



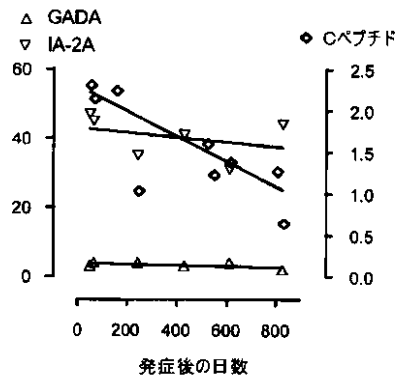
【 図 3 1 C 】



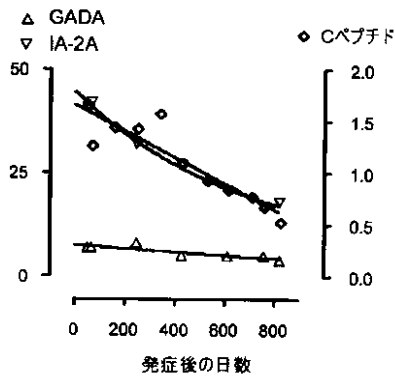
【図 3 1 D】



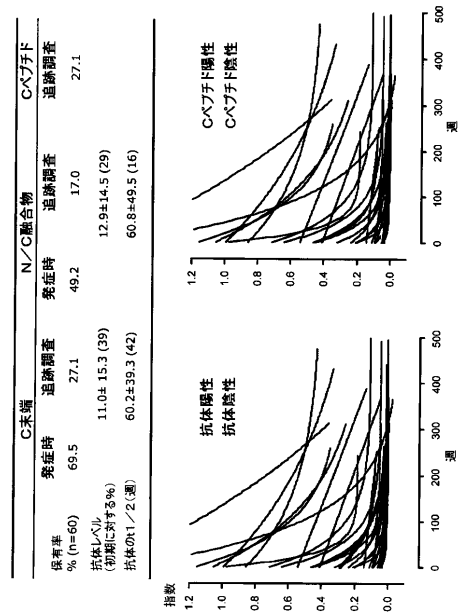
【図 3 1 E】



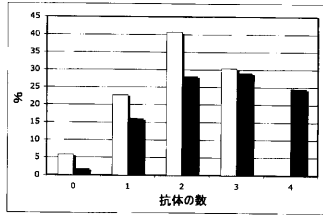
【図 3 1 F】



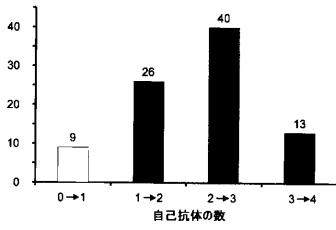
【図 3 2】



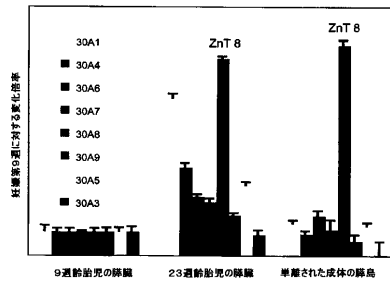
【 図 3 3 A 】



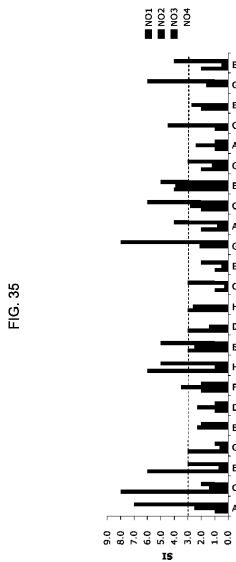
【 図 3 3 B 】



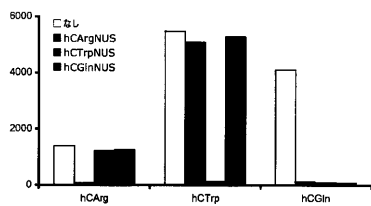
【 図 3 4 】



【 図 3 5 】

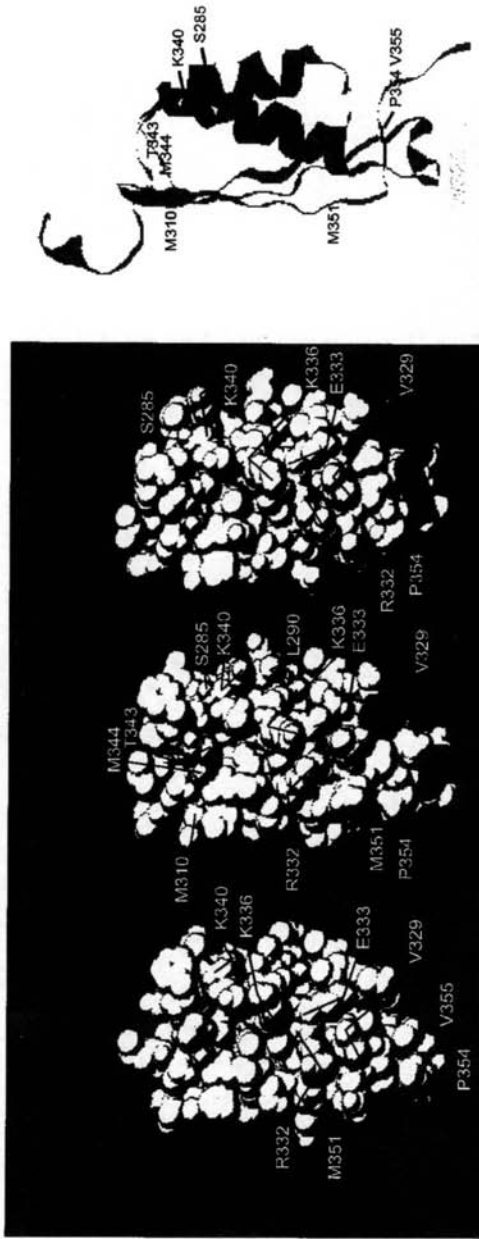


【 図 3 6 】



【 図 1 8 】

膜に対して垂直な二量体界面



Q325

R325 W325

細胞質側から膜に向かって見た図



【 配列表 】

2010514805000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/89125
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12Q 1/68(2006.01);C07K 14/72(2006.01) USPC: 435/6,7.2,69.1;530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.2, 69.1; 530/350 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 practicable, search terms used) EAST and SCORE (sequence database repository SEQ ID NO: 2 searched).		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0246442 A1 (SEVE et al.) 02 November 2006 (02.11.2006), see entire document, SEQ ID NO: 2 of application, claims, particularly claim 28.	1-22, 27-31, 37-42, 57, 83-89 and 91
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"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)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"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 28 July 2008 (28.07.2008)		Date of mailing of the international search report 08 AUG 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Anand Desai <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-0947

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/89125

The species are as follows: the amino acid sequences of ZnT8 that are being claimed. The chemical structure of the ZnT8 molecules. The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the species do not define a contribution over the prior art, because Seve et al. discloses a species with 99.7% identity to ZnT8 identified as SEQ ID NO: 2 in the instant application.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/89125

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - on paper
 - in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in electronic form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/89125

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 95
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claim is a use claim without any recited steps.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: 23-26,32-36,56,77-82,90 and 92-94
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/89125

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-22, 27-31 and 37-40, drawn to a fragment of ZnT8.

Group II, claim(s) 41 and 42, drawn to an antibody that selectively binds to ZnT8.

Group III, claim(s) 43-55, drawn to a method to diagnose an individual who is susceptible to or who is developing an autoimmune disease, comprising detecting antibodies that selectively bind to ZnT8 in a test sample from the individual, wherein detection of increased antibodies in the individual as compared to a negative control, indicates the individual is susceptible to or is developing the autoimmune disease.

Group IV, claim(s) 57-76, drawn to a method to monitor the progression of type I diabetes autoimmunity in an individual from an initial benign autoreactivity to destructive insulinitis, comprising detecting antibodies that selectively bind to ZnT8 in a test sample from the individual, wherein detection of increased antibodies in the individual as compared to a prior measurement of antibodies in the same individual, indicates that the individual is progressing toward destructive insulinitis.

Group V, claim(s) 67-80, drawn to a method to monitor the efficacy of a treatment for preventing type I diabetes, delaying the onset of type I diabetes, or ameliorating autoimmunity in prediabetic individuals, comprising detecting antibodies that selectively bind to ZnT8 in a test sample from the individual, wherein detection of decreased or substantially the same level of antibodies in the individual as compared to a prior measurement of antibodies in the same individual, indicates that the treatment is effective, and wherein detection of increased antibodies in the individual as compared to a prior measurement of antibodies in the same individual indicates that the treatment is not effective.

Group VI, claim(s) 83-89 and 91, drawn to a method to prevent an autoimmune disease, delay the onset of the autoimmune disease, or ameliorate autoimmunity in an individual with the autoimmune disease, comprising administering to an individual in need thereof, an agent that elicits a ZnT8-specific immune response that protects cells or tissues in the patient that are targeted by the autoimmune disease.

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the technical feature linking the groups appears to be that they all relate to fragments of ZnT8. However, Seve et al. (US 2006/0246442) disclose a fragment of ZnT8 (see SEQ ID NO: 2, which has 99.7% identity with the disclosed ZnT8 amino acid sequence). Therefore, the technical feature linking the inventions of groups I-VI does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art. Accordingly, groups I-VI are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

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 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N	33/564	(2006.01)	G 0 1 N 33/564	Z
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), 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, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, 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

(72)発明者 ハットン、ジョン シー .

アメリカ合衆国 8 0 2 2 0 コロラド州 デンバー パーチ ストリート 1 3 2 4

(72)発明者 ウェンツロウ、ジャネット エム .

アメリカ合衆国 8 0 1 1 1 コロラド州 グリーンウッド ビレッジ エス . アクロン ストリート 4 3 9 7

(72)発明者 ジェンセン、ジャン

アメリカ合衆国 4 4 1 2 0 オハイオ州 シェイカー ハイツ アルダーサイド ドライブ 1 6 3 0 3

(72)発明者 デイビッドソン、ハワード

アメリカ合衆国 8 0 2 2 0 コロラド州 デンバー トレントン ストリート 1 9 5 0 アパートメント 3 4 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA04 DA02 EA02 GA11
 4B063 QA01 QQ08 QR90 QS33
 4C085 AA03 BB11 CC32 EE01 GG01
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 BA18 BA19 BA21 DA86 EA20 FA74
 GA26

专利名称(译)	自身免疫疾病的诊断和治疗目标及其用途		
公开(公告)号	JP2010514805A	公开(公告)日	2010-05-06
申请号	JP2009544308	申请日	2007-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	科罗拉多州立大学董事会		
申请(专利权)人(译)	科罗拉多大学董事会		
[标]发明人	ハットンジョンシー ウェンツロウジャネットエム ジェンセンジャン デイビッドソンハワード		
发明人	ハットン、ジョンシー、 ウェンツロウ、ジャネットエム、 ジェンセン、ジャン デイビッドソン、ハワード		
IPC分类号	C07K14/47 C07K7/06 C07K16/18 C12N15/09 A61K39/00 A61P3/10 G01N33/53 G01N33/564 C12Q1/02		
CPC分类号	C07K14/47 C07K14/705 G01N33/564 G01N2800/042 G01N2800/52		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K7/06 C07K16/18 C12N15/00.A A61K39/00.H A61P3/10 G01N33/53.D G01N33/564.Z C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR90 4B063/QS33 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA21 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	60/882815 2006-12-29 US		
其他公开文献	JP2010514805A5 JP5694668B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
描述了ZnT8作为I型自身免疫性糖尿病 (T1D)，其他自身免疫疾病和其他糖尿病相关疾病和病症中的自身抗原靶标的鉴定。还描述了基于该发现的各种治疗，诊断和预后工具和方法。本文公开了ZnT8中遗传变异的鉴定，其作为疾病过程开始和自身免疫进展为临床糖尿病的重要参与者。

15倍未満の濃縮	β TCで5倍未満の濃縮	α TCでもβ TCでも濃縮されず	α TCでもβ TCでも発現されず
19Rrk 32Rrk 23Rrk 21Rrk 18Rrk 17Rrk 20Rrk 17Rrk 20 32Rrk 22Rrk 24Rrk 39Rrk 24Rrk Blg2 r2 Cgl-141- ppg2ae2 e Edmra Eno2 ip2 Fev-pending in7 Gsa Gfra1 r30 Gst2 Hga1 r3 Ipc2 Ihc2 Kap 3 Mtp Pde3a sd4 Rfp4 Rfp4 ing Sdc4 Sdc4 roat1 Spp1 Ttpi Tf 4Rrk Tlyh1 lls Vidr Zdhc14	1100001E04Rrk 1110035L05Rrk 32Rrk 1700041C02Rrk 1810018P12Rrk 2010011120Rrk 2310007H05Rrk 2610016M12Rrk 20Rrk 2900001C06Rrk 3100002J23Rrk 3110018A08Rrk 3110005F08Rrk 5830437M04Rrk 9930418K15Rrk 9330186A19Rrk 9630147J24Rrk A930068L07Rrk Adcy7 Adra2a A1173274 A1315068 A1987662 Ang Asc-pending Atp2a3 AW129421 B530019K05Rrk B930069K11Rrk BC026600 BC052055 Bicc1 Bok Cat Cav2 Cd44 Crip Crip D080029E11Rrk Dhac2 Dox Dpdp1 Dpp4 Dscr111 Ebf3 Erf3a3y Elov2 F13a Frabin G6pc-2a Gch Gch Gir Gp1t Gn13 Gpr77 H2-D1 H3b H3c H3d H3e H3f H3g H3h H3i H3j H3k H3l H3m H3n H3o H3p H3q H3r H3s H3t H3u H3v H3w H3x H3y H3z H4a H4b H4c H4d H4e H4f H4g H4h H4i H4j H4k H4l H4m H4n H4o H4p H4q H4r H4s H4t H4u H4v H4w H4x H4y H4z H5a H5b H5c H5d H5e H5f H5g H5h H5i H5j H5k H5l H5m H5n H5o H5p H5q H5r H5s H5t H5u H5v H5w H5x H5y H5z H6a H6b H6c H6d H6e H6f H6g H6h H6i H6j H6k H6l H6m H6n H6o H6p H6q H6r H6s H6t H6u H6v H6w H6x H6y H6z H7a H7b H7c H7d H7e H7f H7g H7h H7i H7j H7k H7l H7m H7n H7o H7p H7q H7r H7s H7t H7u H7v H7w H7x H7y H7z H8a H8b H8c H8d H8e H8f H8g H8h H8i H8j H8k H8l H8m H8n H8o H8p H8q H8r H8s H8t H8u H8v H8w H8x H8y H8z H9a H9b H9c H9d H9e H9f H9g H9h H9i H9j H9k H9l H9m H9n H9o H9p H9q H9r H9s H9t H9u H9v H9w H9x H9y H9z H10a H10b H10c H10d H10e H10f H10g H10h H10i H10j H10k H10l H10m H10n H10o H10p H10q H10r H10s H10t H10u H10v H10w H10x H10y H10z H11a H11b H11c H11d H11e H11f H11g H11h H11i H11j H11k H11l H11m H11n H11o H11p H11q H11r H11s H11t H11u H11v H11w H11x H11y H11z H12a H12b H12c H12d H12e H12f H12g H12h H12i H12j H12k H12l H12m H12n H12o H12p H12q H12r H12s H12t H12u H12v H12w H12x H12y H12z H13a H13b H13c H13d H13e H13f H13g H13h H13i H13j H13k H13l H13m H13n H13o H13p H13q H13r H13s H13t H13u H13v H13w H13x H13y H13z H14a H14b H14c H14d H14e H14f H14g H14h H14i H14j H14k H14l H14m H14n H14o H14p H14q H14r H14s H14t H14u H14v H14w H14x H14y H14z H15a H15b H15c H15d H15e H15f H15g H15h H15i H15j H15k H15l H15m H15n H15o H15p H15q H15r H15s H15t H15u H15v H15w H15x H15y H15z H16a H16b H16c H16d H16e H16f H16g H16h H16i H16j H16k H16l H16m H16n H16o H16p H16q H16r H16s H16t H16u H16v H16w H16x H16y H16z H17a H17b H17c H17d H17e H17f H17g H17h H17i H17j H17k H17l H17m H17n H17o H17p H17q H17r H17s H17t H17u H17v H17w H17x H17y H17z H18a H18b H18c H18d H18e H18f H18g H18h H18i H18j H18k H18l H18m H18n H18o H18p H18q H18r H18s H18t H18u H18v H18w H18x H18y H18z H19a H19b H19c H19d H19e H19f H19g H19h H19i H19j H19k H19l H19m H19n H19o H19p H19q H19r H19s H19t H19u H19v H19w H19x H19y H19z H20a H20b H20c H20d H20e H20f H20g H20h H20i H20j H20k H20l H20m H20n H20o H20p H20q H20r H20s H20t H20u H20v H20w H20x H20y H20z H21a H21b H21c H21d H21e H21f H21g H21h H21i H21j H21k H21l H21m H21n H21o H21p H21q H21r H21s H21t H21u H21v H21w H21x H21y H21z H22a H22b H22c H22d H22e H22f H22g H22h H22i H22j H22k H22l H22m H22n H22o H22p H22q H22r H22s H22t H22u H22v H22w H22x H22y H22z H23a H23b H23c H23d H23e H23f H23g H23h H23i H23j H23k H23l H23m H23n H23o H23p H23q H23r H23s H23t H23u H23v H23w H23x H23y H23z H24a H24b H24c H24d H24e H24f H24g H24h H24i H24j H24k H24l H24m H24n H24o H24p H24q H24r H24s H24t H24u H24v H24w H24x H24y H24z H25a H25b H25c H25d H25e H25f H25g H25h H25i H25j H25k H25l H25m H25n H25o H25p H25q H25r H25s H25t H25u H25v H25w H25x H25y H25z H26a H26b H26c H26d H26e H26f H26g H26h H26i H26j H26k H26l H26m H26n H26o H26p H26q H26r H26s H26t H26u H26v H26w H26x H26y H26z H27a H27b H27c H27d H27e H27f H27g H27h H27i H27j H27k H27l H27m H27n H27o H27p H27q H27r H27s H27t H27u H27v H27w H27x H27y H27z H28a H28b H28c H28d H28e H28f H28g H28h H28i H28j H28k H28l H28m H28n H28o H28p H28q H28r H28s H28t H28u H28v H28w H28x H28y H28z H29a H29b H29c H29d H29e H29f H29g H29h H29i H29j H29k H29l H29m H29n H29o H29p H29q H29r H29s H29t H29u H29v H29w H29x H29y H29z H30a H30b H30c H30d H30e H30f H30g H30h H30i H30j H30k H30l H30m H30n H30o H30p H30q H30r H30s H30t H30u H30v H30w H30x H30y H30z H31a H31b H31c H31d H31e H31f H31g H31h H31i H31j H31k H31l H31m H31n H31o H31p H31q H31r H31s H31t H31u H31v H31w H31x H31y H31z H32a H32b H32c H32d H32e H32f H32g H32h H32i H32j H32k H32l H32m H32n H32o H32p H32q H32r H32s H32t H32u H32v H32w H32x H32y H32z H33a H33b H33c H33d H33e H33f H33g H33h H33i H33j H33k H33l H33m H33n H33o H33p H33q H33r H33s H33t H33u H33v H33w H33x H33y H33z H34a H34b H34c H34d H34e H34f H34g H34h H34i H34j H34k H34l H34m H34n H34o H34p H34q H34r H34s H34t H34u H34v H34w H34x H34y H34z H35a H35b H35c H35d H35e H35f H35g H35h H35i H35j H35k H35l H35m H35n H35o H35p H35q H35r H35s H35t H35u H35v H35w H35x H35y H35z H36a H36b H36c H36d H36e H36f H36g H36h H36i H36j H36k H36l H36m H36n H36o H36p H36q H36r H36s H36t H36u H36v H36w H36x H36y H36z H37a H37b H37c H37d H37e H37f H37g H37h H37i H37j H37k H37l H37m H37n H37o H37p H37q H37r H37s H37t H37u H37v H37w H37x H37y H37z H38a H38b H38c H38d H38e H38f H38g H38h H38i H38j H38k H38l H38m H38n H38o H38p H38q H38r H38s H38t H38u H38v H38w H38x H38y H38z H39a H39b H39c H39d H39e H39f H39g H39h H39i H39j H39k H39l H39m H39n H39o H39p H39q H39r H39s H39t H39u H39v H39w H39x H39y H39z H40a H40b H40c H40d H40e H40f H40g H40h H40i H40j H40k H40l H40m H40n H40o H40p H40q H40r H40s H40t H40u H40v H40w H40x H40y H40z H41a H41b H41c H41d H41e H41f H41g H41h H41i H41j H41k H41l H41m H41n H41o H41p H41q H41r H41s H41t H41u H41v H41w H41x H41y H41z H42a H42b H42c H42d H42e H42f H42g H42h H42i H42j H42k H42l H42m H42n H42o H42p H42q H42r H42s H42t H42u H42v H42w H42x H42y H42z H43a H43b H43c H43d H43e H43f H43g H43h H43i H43j H43k H43l H43m H43n H43o H43p H43q H43r H43s H43t H43u H43v H43w H43x H43y H43z H44a H44b H44c H44d H44e H44f H44g H44h H44i H44j H44k H44l H44m H44n H44o H44p H44q H44r H44s H44t H44u H44v H44w H44x H44y H44z H45a H45b H45c H45d H45e H45f H45g H45h H45i H45j H45k H45l H45m H45n H45o H45p H45q H45r H45s H45t H45u H45v H45w H45x H45y H45z H46a H46b H46c H46d H46e H46f H46g H46h H46i H46j H46k H46l H46m H46n H46o H46p H46q H46r H46s H46t H46u H46v H46w H46x H46y H46z H47a H47b H47c H47d H47e H47f H47g H47h H47i H47j H47k H47l H47m H47n H47o H47p H47q H47r H47s H47t H47u H47v H47w H47x H47y H47z H48a H48b H48c H48d H48e H48f H48g H48h H48i H48j H48k H48l H48m H48n H48o H48p H48q H48r H48s H48t H48u H48v H48w H48x H48y H48z H49a H49b H49c H49d H49e H49f H49g H49h H49i H49j H49k H49l H49m H49n H49o H49p H49q H49r H49s H49t H49u H49v H49w H49x H49y H49z H50a H50b H50c H50d H50e H50f H50g H50h H50i H50j H50k H50l H50m H50n H50o H50p H50q H50r H50s H50t H50u H50v H50w H50x H50y H50z H51a H51b H51c H51d H51e H51f H51g H51h H51i H51j H51k H51l H51m H51n H51o H51p H51q H51r H51s H51t H51u H51v H51w H51x H51y H51z H52a H52b H52c H52d H52e H52f H52g H52h H52i H52j H52k H52l H52m H52n H52o H52p H52q H52r H52s H52t H52u H52v H52w H52x H52y H52z H53a H53b H53c H53d H53e H53f H53g H53h H53i H53j H53k H53l H53m H53n H53o H53p H53q H53r H53s H53t H53u H53v H53w H53x H53y H53z H54a H54b H54c H54d H54e H54f H54g H54h H54i H54j H54k H54l H54m H54n H54o H54p H54q H54r H54s H54t H54u H54v H54w H54x H54y H54z H55a H55b H55c H55d H55e H55f H55g H55h H55i H55j H55k H55l H55m H55n H55o H55p H55q H55r H55s H55t H55u H55v H55w H55x H55y H55z H56a H56b H56c H56d H56e H56f H56g H56h H56i H56j H56k H56l H56m H56n H56o H56p H56q H56r H56s H56t H56u H56v H56w H56x H56y H56z H57a H57b H57c H57d H57e H57f H57g H57h H57i H57j H57k H57l H57m H57n H57o H57p H57q H57r H57s H57t H57u H57v H57w H57x H57y H57z H58a H58b H58c H58d H58e H58f H58g H58h H58i H58j H58k H58l H58m H58n H58o H58p H58q H58r H58s H58t H58u H58v H58w H58x H58y H58z H59a H59b H59c H59d H59e H59f H59g H59h H59i H59j H59k H59l H59m H59n H59o H59p H59q H59r H59s H59t H59u H59v H59w H59x H59y H59z H60a H60b H60c H60d H60e H60f H60g H60h H60i H60j H60k H60l H60m H60n H60o H60p H60q H60r H60s H60t H60u H60v H60w H60x H60y H60z H61a H61b H61c H61d H61e H61f H61g H61h H61i H61j H61k H61l H61m H61n H61o H61p H61q H61r H61s H61t H61u H61v H61w H61x H61y H61z H62a H62b H62c H62d H62e H62f H62g H62h H62i H62j H62k H62l H62m H62n H62o H62p H62q H62r H62s H62t H62u H62v H62w H62x H62y H62z H63a H63b H63c H63d H63e H63f H63g H63h H63i H63j H63k H63l H63m H63n H63o H63p H63q H63r H63s H63t H63u H63v H63w H63x H63y H63z H64a H64b H64c H64d H64e H64f H64g H64h H64i H64j H64k H64l H64m H64n H64o H64p H64q H64r H64s H64t H64u H64v H64w H64x H64y H64z H65a H65b H65c H65d H65e H65f H65g H65h H65i H65j H65k H65l H65m H65n H65o H65p H65q H65r H65s H65t H65u H65v H65w H65x H65y H65z H66a H66b H66c H66d H66e H66f H66g H66h H66i H66j H66k H66l H66m H66n H66o H66p H66q H66r H66s H66t H66u H66v H66w H66x H66y H66z H67a H67b H67c H67d H67e H67f H67g H67h H67i H67j H67k H67l H67m H67n H67o H67p H67q H67r H67s H67t H67u H67v H67w H67x H67y H67z H68a H68b H68c H68d H68e H68f H68g H68h H68i H68j H68k H68l H68m H68n H68o H68p H68q H68r H68s H68t H68u H68v H68w H68x H68y H68z H69a H69b H69c H69d H69e H69f H69g H69h H69i H69j H69k H69l H69m H69n H69o H69p H69q H69r H69s H69t H69u		