

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4800384号
(P4800384)

(45) 発行日 平成23年10月26日(2011.10.26)

(24) 登録日 平成23年8月12日(2011.8.12)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 Z N A A
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G O 1 N	33/50 (2006.01)	G O 1 N	33/50 Z
G O 1 N	33/53 (2006.01)	G O 1 N	33/53 D
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

請求項の数 18 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2008-515958 (P2008-515958)	(73) 特許権者	500294958 ヒタチ ケミカル リサーチ センター インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 926 17 アーバイン ヘルズ サイエンス ズ ロード 1003
(86) (22) 出願日	平成18年6月8日(2006.6.8)	(73) 特許権者	000004455 日立化成工業株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目1番1号
(65) 公表番号	特表2008-543286 (P2008-543286A)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(43) 公表日	平成20年12月4日(2008.12.4)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/022427	(74) 代理人	100106622 弁理士 和久田 純一
(87) 国際公開番号	W02006/133399		
(87) 国際公開日	平成18年12月14日(2006.12.14)		
審査請求日	平成20年2月15日(2008.2.15)		
(31) 優先権主張番号	60/688,744		
(32) 優先日	平成17年6月8日(2005.6.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/735,508		
(32) 優先日	平成17年11月11日(2005.11.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍細胞及び刺激された白血球における mRNA の発現プロファイルに基づく腫瘍性疾患に対する免疫応答を予測する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類の腫瘍性疾患の予後の重症度を予測する方法であって、
前記哺乳類から単離された全血の第1のサンプルにおいて、複数の腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリー亜群の発現レベルを求める工程、
前記哺乳類から単離された全血の第2のサンプルを該全血において白血球を活性化する刺激因子に曝す工程、
前記第2のサンプルにおいて、前記複数の腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリー亜群の発現レベルを求める工程、
前記第2のサンプルにおいて前記第1のサンプルよりも発現が増加した亜群を同定する工程、及び
前記同定されたTNFスーパーファミリー亜群が、前記哺乳類の腫瘍細胞で発現する特定の腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリー亜群に対応する場合、予後の重症度が低いと予測する工程を含む方法。

【請求項 2】

前記哺乳類から単離された腫瘍細胞を用い、該腫瘍細胞で発現するTNFRスーパーファミリー亜群を同定する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記腫瘍細胞で発現するTNFRスーパーファミリー亜群が、免疫染色、in situ

uハイブリダイゼーション、in situポリメラーゼ連鎖反応、及びin vitroポリメラーゼ連鎖反応から成る群より選択される方法により同定される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

全血の第2のサンプルを曝すことがヘパリンの添加を包含する、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

前記刺激因子が、熱凝集ヒトIgG及び抗ヒト / T細胞受容体モノクローナルIgGから成る群より選択される、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記腫瘍細胞で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、TNF-Rスーパーファミリー亜群1A、1B、3、4、5、6、7、8、9、10A、10B、10C、10D、11A、11B、12A、14、17、18及び25から成る群より選択される、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

前記全血で発現するTNFスーパーファミリー亜群が、TNFスーパーファミリー亜群1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、13B、14、15及び18から成る群より選択される、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

前記全血で発現するTNFスーパーファミリー亜群の発現レベルが、該TNFスーパーファミリー亜群のmRNAの発現レベルである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

哺乳類の腫瘍性疾患の予後の重症度を予測する方法であって、

前記哺乳類から単離された全血の第1のサンプルにおいて、複数のケモカインの発現レベルを求める工程、

前記哺乳類から単離された全血の第2のサンプルを該全血において白血球を活性化する刺激因子に曝す工程、

前記第2のサンプルにおいて、前記複数のケモカインの発現レベルを求める工程、及び前記第1のサンプルと前記第2のサンプルとの間で前記全血における発現レベルの有意な変化を示すケモカインが同定された場合、予後の重症度が低いと予測する工程

を含む方法。

【請求項10】

前記ケモカインが、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16、IL1B、IL5、IL6、IL8、IL12A、IL12B、IL15、及びIL16から成る群より選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

哺乳類において腫瘍性疾患を処置するための食物成分の有用性を予測する方法であって、前記哺乳類から単離された全血の第1のサンプルを用意する工程、

前記哺乳類から単離された全血の第2のサンプルを前記食物成分に曝す工程、

前記第1のサンプル及び前記第2のサンプルを該全血において白血球を活性化する刺激因子に曝す工程、

前記第1のサンプル及び前記第2のサンプルにおいて、複数のTNFスーパーファミリー亜群の発現レベルを求める工程、

前記第2のサンプルにおいて前記第1のサンプルよりも発現が増加した亜群を同定する工

10

20

30

40

50

程、及び

TNFスーパーファミリーの前記同定された亜群が、前記哺乳類の腫瘍細胞で発現する特定のTNF-Rスーパーファミリー亜群に対応する場合、前記食物成分が前記腫瘍性疾患を治療するのに有用性がある可能性が高いと判定する工程を含む方法。

【請求項12】

前記第1のサンプルが、前記全血において白血球を活性化する前記刺激因子に曝される前に対照の刺激因子に曝される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記腫瘍細胞で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、TNF-Rスーパーファミリー亜群1A、3、12A、及び14から成る群より選択される、請求項11または12に記載の方法。

10

【請求項14】

前記哺乳類から単離された腫瘍細胞を用い、該腫瘍細胞で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群を同定する工程を含む、請求項11～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

前記腫瘍細胞で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、免疫染色、*in situ*ハイブリダイゼーション、*in situ*ポリメラーゼ連鎖反応、及び*in vitro*ポリメラーゼ連鎖反応から成る群より選択される方法により同定される、請求項14に記載の方法。

20

【請求項16】

前記哺乳類から単離された全血の第3のサンプルにおいて、複数のケモカインの発現レベルを求める工程、

前記哺乳類から単離された全血の第4のサンプルを該全血において白血球を活性化する刺激因子に曝す工程、

前記第4のサンプルにおいて、前記複数のケモカインの発現レベルを求める工程、及び前記第3のサンプルと前記第4のサンプルとの間で前記全血における発現レベルの有意な変化を示すケモカインが同定された場合、予後の重症度が低いと予測する工程

をさらに含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記ケモカインが、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16、IL1B、IL5、IL6、IL8、IL12A、IL12B、IL15、及びIL16から成る群より選択される、請求項16に記載の方法。

30

【請求項18】

前記刺激因子が、熱凝集ヒトIgG及び抗ヒト / T細胞受容体モノクローナルIgGから成る群より選択される、請求項9に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍組織における腫瘍壊死因子受容体(TNF-R)スーパーファミリーのmRNAの発現プロファイル、及び循環白血球における腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーのmRNAの発現プロファイルに基づく腫瘍性疾患に対する哺乳類の免疫応答を予測する方法に関する。この方法では、腫瘍組織のサンプルが得られ、これらの組織で発現したTNF-Rスーパーファミリー亜群のmRNAを評価する。さらに哺乳類の全血

50

にこの血液のT細胞を活性化する刺激因子を与え、この刺激因子に応答して発現レベルの有意な変化を示すTNFスーパーファミリー亜群のmRNAを同定する。これらの腫瘍組織で発現したTNF-Rスーパーファミリー亜群に対応するTNFスーパーファミリー亜群における発現レベルの変化を示す個体は、これらの疾患において予後の重症度が低いと予測される。

【0002】

本出願は、2005年6月8日に提出された米国仮出願特許第60/688,744号及び2005年11月11日に提出された同第60/735,508号に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

癌治療の様々な様式は、社会における様々な種類の力の使用になぞらえることができる。化学療法は、都市において軍事力を広範囲に使用するようなことであり、関連兵器の圧倒的な力によって、文民への巻き添え損害が起こる危険性がある。これに対して、ヒト体内における癌細胞の主要な致死因子である循環末梢血における白血球は、路上犯罪に対処する市街路を巡回する警察官のようなものである。同様に、白血球が体内において癌細胞に接触する場合、これらの細胞は癌標的に対する最初の応答因子である。白血球は、フローサイトメトリ又は免疫組織化学的染色技法を使用する細胞表面マーカーの形態分析及び特徴付けに基づいて、多くの群と亜群とに分類される。これらの群及び亜群は、その制御及び識別パッチによって警察官を識別するようなことである。末梢血1mm³当たりの白血球の数は、都市における警察官の数に対応する。

【0004】

警察官が路上犯罪に遭遇したら、警察官は手にした武器でこの路上犯罪に対処しなければいけない。しかし、警察官は常に適切な武器を所持している訳ではない。同様に、細胞傷害性T細胞は、常に特異的な癌細胞に効く適切な抗腫瘍因子が与えられている訳ではない。癌細胞がIgGで覆われていると、細胞傷害性T細胞はIgG Fc受容体(FcR)を介して癌細胞を認識する。このプロセスは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)と呼ばれる。事実、IgGは抗ヒトIgGで染色することにより癌の周辺で度々認識される(例えば、Richman AV著「良性及び悪性のヒト乳房組織の免疫蛍光研究(Immunofluorescence studies of benign and malignant human mammary tissue)」(J. Natl. Cancer Inst. 1976; 57:263-7)、及びKoneval T他著「頭頸部の扁平上皮細胞癌の腫瘍及び悪性組織における免疫グロブリンのデモンストレーション(Demonstration of immunoglobulin in tumor and marginal tissues of squamous cell carcinomas of the head and neck)」(J. Natl. Cancer Inst. 1977; 59: 1089-97)を参照のこと)。単核白血球の癌病巣への浸潤も、多くの場合に見られる。細胞傷害性T細胞の表面上のFcRは、警察官が所持する様々な武器の入ったバッグのようなものである。CD16、CD32及びCD64等の様々な種類のFcRは、様々な種類のバッグに相応する。警棒は最初の武器であり、いつでも攻撃できるように保持している。細胞傷害性T細胞では、警棒はパーフォリンに相応し(Nakanishi他著「ヒト結腸直腸癌に浸潤した白血球におけるパーフォリン発現(Perforin expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer)」(Br. J. Cancer 1991; 64: 239-42)を参照のこと)、これは前合成され、細胞傷害性T細胞のサイトゾルに保存され、FcR活性化の際に即座に放出される。使用できる状態である他の前合成された「警棒」としては、グランザイム、消化酵素トリプシンに関連するプロテアーゼ、及びキモトリプシンが挙げられ、これらは標的細胞でアポトーシスを誘発するように作用することができる。

【0005】

警察官はより強力な銃も所持しており、これは細胞傷害性T細胞では腫瘍壊死因子(TNF)に相当し得る。通常、細胞の文脈における(TNF亜群の)「弾丸」は銃に装填されておらず、合成され、Fc受容体活性化の際にのみ細胞傷害性T細胞から放出される。TNFは、標的細胞の表面上に存在する特異的なTNF受容体と相互作用することにより

10

20

30

40

50

、アポトーシスを誘導することができる。広範な標的細胞に対する致死活性を維持するために、様々な種類のTNFリガンドが存在する(TNFスーパーファミリー(TNFSFと省略される)の一部として)。GenBank及びUniGene情報(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)によれば、ヒトTNFスーパーファミリーは、全体で17個のヒト成員において、最大でTNFスーパーファミリー18を包含し、幾つかが欠番し(16及び17)、同じ番号において複数の配列(13A及び13B)が存在する。対応するTNF受容体(TNF-Rスーパーファミリー(TNFRSFと省略される))に関して、ヒトTNF-Rスーパーファミリーは、最大でTNF-Rスーパーファミリー亜群21を包含する。TNF/TNF-Rスーパーファミリー亜群の相互作用は厳密には特異的ではないが、表1で示されるように一般的に、それぞれのリガンドが特異的な受容体と反応し、300を超える様々なTNFスーパーファミリー亜群とTNF-Rスーパーファミリーとの組み合わせが存在する。

10

【0006】

【表1】

表I. TNFRSFのmRNA及びTNFSFのmRNAのGenBank登録リスト及びUniGeneの登録リスト

TNFRSF (UniGene番号)	対応するTNFSF (UniGene番号)
1A (Hs. 279594)	2 (Hs. 241570)
1B (Hs. 256278)	2 (Hs. 241570)
3 (Hs. 1116)	1 (Hs. 36)
	3 (Hs. 376208)
4 (Hs. 129780)	4 (Hs. 181097)
5 (Hs. 472860)	5 (Hs. 652)
6 (Hs. 244139)	6 (Hs. 2007)
7 (Hs. 355307)	7 (Hs. 501497)
8 (Hs. 1314)	8 (Hs. 494901)
9 (Hs. 193418)	9 (Hs. 1524)
10A (Hs. 401745)	10 (Hs. 478275)
10B (Hs. 521456)	10 (Hs. 478275)
10C (Hs. 119684)	10 (Hs. 478275)
10C (Hs. 119684)	10 (Hs. 478275)
10D (Hs. 213467)	10 (Hs. 478275)
11A (Hs. 204044)	11 (Hs. 333791)
11B (Hs. 81791)	11 (Hs. 333791)
12A (Hs. 355899)	12 (NM003809) *
14 (Hs. 512898)	14 (Hs. 129708)
17 (Hs. 2556)	13 (Hs. 54673)
	13B (Hs. 525157)
18 (Hs. 212680)	18 (Hs. 248197)
25 (Hs. 462529)	15 (Hs. 241382)

*はGeneBankアクセッション番号である(UniGene登録は見つからなかった)

20

30

40

【0007】

適切なTNFスーパーファミリー亜群が浸潤する細胞傷害性T細胞から放出される場合、癌の完全な根絶が起こり得る。癌が奇跡的に生存する稀なケースは、TNFスーパーファミリー亜群とTNF-Rスーパーファミリー亜群との組み合わせが完全である場合に起こり得る。

【0008】

抗体依存性細胞傷害(ADCC)は、抗体と共に白血球の細胞溶解機能に関与する別の仕組みである(Perrussia他著「ヒトのナチュラルキラー細胞における抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び逆ADCC(転嫁細胞傷害性)に関するアッセイ(Assays for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and reverse ADCC (redirected cyto

50

toxicity) in human natural killer cells)」(Methods Mol Biol. 2000; 121: 179-92)を参照のこと)。I g GのF a b部分が標的細胞と結合すると、I g GのF c部分が白血球上のF c受容体を活性化し、その後これらの白血球が活性化することにより、標的細胞を攻撃する。A D C Cは長年研究されてきたが、A D C Cを伴う*i n v i t r o*実験の条件は、人工の溶液で懸濁された純粋な細胞系におけるエフェクター細胞傷害性T細胞と標的細胞との間の比に応じて変わる。さらに、細胞溶解は標的細胞からのアイソトープ(クロム - 5 1)の放出によって一般的に定量化されたので、観察された細胞溶解がパーフォリン又はT N Fのいずれを介して行われたのか知られていなかった。いずれのT N Fスーパーファミリー亜群がA D C Cに参与しているのかも知られていない。

【 0 0 0 9 】

最終的に、白血球が癌と闘うさらなる重要な仕組みは、より多くの白血球を疾患部位に補充するためのケモカインの放出である。多くのこのようなサイトカインが発見されている。特定のケモカインと補充される白血球の特定集団との間に相関関係は確立されていないが、ケモカイン放出及び白血球補充の現象が癌と闘うのに重要である。これに類似するのは、犯罪組織に立ち向かう警察官がより多くの援軍のために折り返し本部に無線連絡することであり得る。

【 0 0 1 0 】

手短に言うと、特定の癌マーカーを認識することができる適切な白血球のサブセットを育てるために、複雑な細胞メカニズムが必要であり、また適切な走化性因子を放出し、これらの成熟した白血球を病巣に引き込まなければいけないが、実際に癌の致死が2つの別々の方法で起こる。これらの白血球からのパーフォリンの放出、その後のT N Fの合成及び放出を介するアポトーシスの緩徐性で且つ持続性の誘導によって、即座に癌の致死が起こる(Vujanovic著「ナチュラルキラー細胞の抗腫瘍活性におけるT N Fファミリーリガンドの役割(Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells)」(Int. Rev. Immunol. 2001 Jun; 20(3-4): 415-37)を参照のこと)。T N Fは、標的細胞表面上での特異的な受容体との結合を介してアポトーシスを誘導する。このことは、白血球が癌細胞に存在する受容体に対応する特異的なT N Fリガンド(複数可)を放出する必要があることを意味する。疾患の結果を予測するものとして、T N F / T N F受容体の比の実用性が考慮されてきたが(McDermott著「健康及び疾患におけるT N F及びT N F Rの生物学(TNF and TNFR biology in health and disease)」(Cell. Mol. Biol. (N oisy-le-grand). 2001 Jun; 47(4): 619-35)を参照のこと)、癌細胞におけるT N F受容体のプロファイル、及び白血球におけるリガンドの誘導についてはほとんど知られておらず、またどのように適切な白血球集団が補充されるのかも知られていない。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 1 】

病理組織検体において癌部周辺のI g G沈着が見られる場合、このことは、患者が少なくとも癌を認識するI g Gを高めることができることを意味する。単核白血球の浸潤が癌集団(cancer mass)の周辺に存在する場合、このことは、患者の白血球が、癌と結合するI g Gの補体の活性化の間に、おそらくは走化性因子(C 3 a、C 5 a、C 5 6 7)の放出により(Becker著「補体誘導性因子(C 3 a、C 5 a及びC 5 6 7)及び細菌の走化性因子の走化性挙動とそれらのウサギの多形核白血球のプロエステラーゼ1を活性化する能力との関係(The relationship of the chemotactic behavior of the complement-derived factors, C3a, C5a, and C567, and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the proesterase 1 of rabbit polymorphonuclear leukocytes)」(J. Exp. Med. 1972; 135: 376-87)を参照のこと)、何とか癌病巣に引き込まれることを意味する。癌細胞の表面上で発現したT N F - Rスーパーファミリー亜群の種類は、例えば、免疫染色(抗体が利用可能である場合)、*i n s i t u*ハイブリダイゼーション、又は*i n s i t u* P C R(配列はG e n B a n kから利用可能である)によって同定することができる。F c R を未だに活性化することができないために、浸潤する単核細胞で発

10

20

30

40

50

現したTNFスーパーファミリー亜群の同定は難しいと考えられる。末梢血の白血球は増援された警察官のようなものなので、末梢血において適切で且つ完全に整った細胞傷害性T細胞を供給することは、癌に対する闘いにおいて必須の最初の工程である。このように、この方法は、末梢血の白血球における適切なTNFスーパーファミリー亜群の誘導性を定量化することによって、それぞれの患者における抗癌免疫性を予測することを可能にする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

したがって、本発明の一実施の形態は、哺乳類の腫瘍性疾患の予後の重症度を予測する方法であって、哺乳類由来の全血の第1のサンプルにおいて、複数の腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリー亜群の発現レベルを求める工程、哺乳類の全血の第2のサンプルを全血においてT細胞を活性化する刺激因子に曝す工程、第2のサンプルにおいて、複数の腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリー亜群の発現レベルを求める工程、第1のサンプルと第2のサンプルとの間で全血における発現レベルの有意な変化を示す亜群を同定する工程、及びTNFスーパーファミリーの同定された亜群が、哺乳類の腫瘍細胞で発現する特定の腫瘍壊死因子受容体(TNF-R)スーパーファミリー亜群に対応する場合、予後の重症度が低いと予測することを含む方法を提供する。

10

【0013】

さらなる一態様において、腫瘍組織で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、TNF-Rスーパーファミリー亜群1A、3、12A、及び14から成る群より選択される。別の態様では、腫瘍組織で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が同定される。さらなる一態様では、腫瘍組織で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、免疫染色、in situハイブリダイゼーション、in situポリメラーゼ連鎖反応、及びin vitroポリメラーゼ連鎖反応から成る群より選択される方法により同定される。

20

【0014】

さらなる一態様において、全血を曝すことがヘパリンの添加を包含する。別の態様では、刺激因子が、熱凝集ヒトIgG及び抗ヒト / T細胞受容体モノクローナルIgGから成る群より選択される。さらなる一態様では、異常細胞により発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、TNF-Rスーパーファミリー亜群1A、1B、3、4、5、6、7、8、9、10A、10B、10C、10D、11A、11B、12A、14、17、18及び25から成る群より選択される。別の態様では、上記曝された全血で発現するTNFスーパーファミリーのmRNA亜群が、TNFスーパーファミリー亜群1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、13B、14、15及び18から成る群より選択される。

30

【0015】

別の態様において、本方法は、哺乳類由来の全血の第3のサンプルにおいて、複数のケモカインの発現レベルを求める工程、哺乳類の全血の第4のサンプルを全血においてT細胞を活性化する刺激因子に曝す工程、第4のサンプルにおいて、複数のケモカインの発現レベルを求める工程、及び上記第3のサンプルと上記第4のサンプルとの間の全血において、発現レベルの有意な変化を示すケモカインが同定された場合、予後の重症度が低いと予測することをさらに含む。さらなる態様では、ケモカインが、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16、IL1B、IL5、IL6、IL8、IL12A、IL12B、IL15、及びIL16から成る群より選択される。

40

50

【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる一実施の形態は、哺乳類において腫瘍性疾患を処置するための食事成分の有用性を予測する方法であって、哺乳類の全血の第1のサンプルを得る工程、哺乳類の全血の第2のサンプルを食事成分に曝す工程、哺乳類の全血の第1のサンプル及び第2のサンプルを全血においてT細胞を活性化する刺激因子に曝す工程、哺乳類由来の全血の第1のサンプル及び第2のサンプルにおいて、複数のTNFスーパーファミリー亜群の発現のレベルを求める工程、上記第1のサンプルと上記第2のサンプルとの間で上記全血における発現レベルの有意な変化を示す亜群を同定する工程、及びTNFスーパーファミリーの同定された亜群が、哺乳類の腫瘍細胞で発現する特定のTNF-Rスーパーファミリー亜群に対応する場合、食事成分が腫瘍性疾患を治療する有用性がある可能性が高いと判定する工程を含む方法を提供する。

10

【 0 0 1 7 】

さらなる一態様において、第1のサンプルが、全血においてT細胞を活性化する刺激因子に曝される前に対照の刺激因子に曝される。別の態様では、腫瘍組織で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、TNF-Rスーパーファミリー亜群1A、3、12A、及び14から成る群より選択される。さらなる一態様では、腫瘍組織で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が同定される。別の態様では、腫瘍組織で発現するTNF-Rスーパーファミリー亜群が、免疫染色、*in situ*ハイブリダイゼーション、*in situ*ポリメラーゼ連鎖反応、及び*in vitro*ポリメラーゼ連鎖反応から成る群より選択される方法により同定される。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 8 】

mRNAの定量

本発明者らは、全血の白血球における遺伝子発現の微小な変化を定量することができるHem(A)⁺系として知られる独自の技術を開発している。この技術は、米国特許出願第10/796,298号及びPCT国際出願第PCT/US2004/036309号に詳細に記載されており、これらは共に参照により本明細書中に援用される(Mitsubishi著「表現型遺伝子発現に基づく診断用モデルとしてのヒト血液の白血球におけるmRNAの絶対量測定(Absolute quantitation of mRNA in human blood leukocytes as a model for phenotypic gene expression-based diagnostics)」(Clin Chem, 52: 4 (2006))も参照のこと)。

30

【 0 0 1 9 】

この定量技法では、全血を96ウェルのフィルタープレートに添加し、白血球を捕捉する。合成される外部対照RNA及び特定のリバースプライマーの両方を含む溶解緩衝液をフィルタープレートに添加し、ハイブリダイゼーションのために、細胞溶解物をオリゴ(dT)固定化マイクロプレートに移す。それから、オリゴ(dT)固定化マイクロプレートで、これらのプライマー部位からcDNAを合成する。特定のリバースプライマープライム化cDNAを含む溶液をリアルタイムPCRに使用する。オリゴ(dT)プライム化した固定化cDNAを含むプレートをcDNAバンクとして保存することができる。

40

【 0 0 2 0 】

より詳細には、アッセイ手法は3つの主要工程から成る：(a)フィルタープレート上での白血球の単離及び溶解、(b)オリゴ(dT)固定化マイクロプレートでのmRNA単離、リバースプライマーハイブリダイゼーション、及びcDNA合成、並びに(c)リアルタイム定量PCR。白血球減少膜(Leukosorb, Pall)で集合化(assembly)することによって、特注の96ウェルのフィルタープレートを例えばWhatman又はPallで製造することができる。これらのフィルタープレートを回収プレート上に置き、5mmol/Lのトリス(pH7.4)150µLを添加し、フィルター膜を湿らせる。この膜からトリス溶液を除去するために、4、120gで1分間遠心分離した後、十分に混合した全血サンプル50µLを各ウェルに添加し、直ぐに4、120gで2分間遠心分離する。それからウェルをリン酸緩衝生理食塩水300µLで1回洗浄する。生理食塩溶液を

50

除去するために4、2000gで5分間、遠心分離した後、ストック溶解緩衝液(5g/LのN-ラウロイルサルコシン、4×標準クエン酸生理食塩水、10mmol/LのトリスHCl(pH7.4)、1mmol/LのEDTA、1mL/LのIGEPAL CA-630(NP-40の代用)、1.79mol/Lのチオシアン酸グアニジン(全てSigma製))60μLに1mL/Lの2-メルカプトエタノール(Bio-Rad)、0.5g/LのプロテイナーゼK(Pierce)、0.1g/Lのサケ精子DNA(5 Prime Eppendorf/Brinkman)、0.1g/Lの大腸菌tRNA(Sigma)、それぞれ5nmol/Lの特定のリバースプライマー、及び10⁹個の分子/Lの合成RNA34(外部対照として)をさらに加えて、フィルタープレートの各ウェルに添加する。それから、プレートを37で10分間インキュベートし、オリゴ(dT)固定化マイクロプレート(GenePlate、RNA 10
 ture)上に置き、4、2000gで5分間遠心分離する。4で一晚保存した後、マイクロプレートをプレーン(plain)溶解緩衝液100μLで3回、それから4で洗浄緩衝液(0.5mol/LのNaCl、10mmol/Lのトリス(pH7.4)、1mmol/LのEDTA)150μLで3回洗浄する。

【0021】

cDNAは、1×逆転写緩衝液(50mMKCl、10mMトリスHCl(pH8.3)、5.5mMMgCl₂、1mL/Lトウエン20)、それぞれ1.25mMデオキシヌクレオチド三リン酸、4単位のrRNAsin、及び80UのMMLV逆転写酵素(プライマーを除いてPromega製)を含む緩衝液30μLを添加し、37で2時間インキュベートすることによって、それぞれのウェルで直接合成することができる。それぞれ30
 20
 0μLの反応液からcDNA4μLを直接384ウェルのPCRプレートに移し、TaqMan universal master mixture(Applied Biosystems)5μL及びオリゴヌクレオチドカクテル(それぞれ5μMのフォワードプライマー及びリバースプライマー、及び1~2μMのTaqManプローブ)を添加する。PRISM 7900HT(Applied Biosystems)において、95で10分を1サイクル、その後95で30秒、55で30秒、そして60で1分を45サイクルでPCRを行うことができる。それぞれの遺伝子が別個のウェルで増幅される。サイクル閾値(Ct)、すなわち(蛍光に基づく)或る特定の量のPCR産物を発生するサイクルを分析用ソフトウェア(SDS、Applied Biosystems)で判定する。

【0022】

定量のための検量線を構築するために、フォワードプライマー及びリバースプライマーの配列並びにTaqManプローブを含む長い合成DNAオリゴヌクレオチドがそれぞれの標的で合成される。例えば、対照RNA34のTaqManプローブは、CCAAGGCC
 40
 CCAAGCCCTCACACA(配列番号1)である。代替的には、SYBRGreenのPCRを用いることができる。それぞれのオリゴヌクレオチドをHPLCで95%を超える純度まで精製することができる。各PCRには、10~10⁶個の分子/これらの鋳型オリゴヌクレオチドのウェルが含まれる。DNAオリゴヌクレオチドによって生成した対照RNA34の検量線を使用して、サンプルのCt値を分子数/PCRのウェル(cDNA4μL)に変換することができる。それから7.5(30÷4)を掛けることにより、分子数/サンプル(cDNA30μL)を得る。RNA34の回収率は、これらの値を元の緩衝液60μL(6×10⁵=10⁷/mL×60μL)におけるRNA34の量で割ることにより得られる。天然mRNAに関して、上記のようにそれぞれの検量線で分子数/PCRウェルを求め、それから7.5(30÷4)を掛け、それぞれのサンプルにおけるRNA34の回収率で割って、フィルタープレートのそれぞれのウェルに添加した血液量(通常50μL)で割ることによって、これらの値を血液1μL当たりの分子数に変換する。平均(SD)を三重アリコート
 40
 の全血から算出し、スチューデントt検定を統計分析に使用することができる。

【0023】

複数の実施例において、上記のmRNA定量系(Hem(A)⁺)を使用することにより、TNF受容体スーパーファミリー(TNFRSF)のmRNAの発現プロファイル
 50

様々な癌検体の間で特徴付けた。それから、ヘパリン化全血をマウス抗ヒトT細胞受容体モノクローナル抗体又は細胞傷害性T細胞介在性反応及び抗体依存性細胞傷害(ADCC)の*ex vivo*モデルとしての熱凝集IgGでそれぞれ刺激することによって、TNFスーパーファミリー(TNFSF)のmRNAの誘導性を定量化した。当該技術分野で既知の統計法を使用して、発現レベルの有意な誘導又は低減を算出した。p値は0.05以下を用いた。個体間のかなりの変動が見られることにより、本発明の実施例を個体に合わせた癌の免疫療法の基盤作りに利用することができることが示される。

【実施例1】

【0024】

上記のmRNA定量方法を用いて、熱凝集IgG(HAG)を使用した*ex vivo* 10
刺激の有り無しの両方で、全ての種類のTNFスーパーファミリーのmRNAを定量し、これを免疫複合刺激のモデルとして用いた(Ostreiko他著「所定の分子量による熱凝集IgG複合体の産出及び特徴付け：光散乱の研究(Production and characterization of heat-aggregated IgG complexes with predetermined molecular masses: light-scattering study)」(Immunol Lett. 1987; 15: 311-6)を参照のこと)。標的細胞と結合したIgG分子が白血球においてFc受容体と高親和性で結合すると免疫複合体が形成され、Fc受容体の架橋及び白血球の活性化シグナルの発生を引き起こす。

【0025】

それぞれ50µLのヘパリン化全血の三重アリコート(37°C)で2時間、200µg/mLのHAGでインキュベートした。それから、血液サンプルを96ウェルのフィルタープレートに添加し、白血球を捕捉して、上記のように、ポリ(A)⁺mRNAの単離のため、細胞溶解物を96ウェルのオリゴ(dT)固定化マイクロプレートに移した。cDNAをマイクロプレート上で合成し、SYBR Greenの蛍光をモニタリングすることにより、384ウェルのプレートでのリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に使用した(Morrison他著「増幅中の連続SYBR Green Iモニタリングによる低コピー転写物の定量化(Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification)」(Biotechniques 1998; 24: 954-8, 960, 96)を参照のこと)。手短かに言うと、cDNAを水で3~4倍に希釈すること及びcDNA溶液4µLを直接、384ウェルのPCRプレートに移すことにより、SYBR Green PCRを行い、これにmaster mix(BioRad, Hercules, CA)5µL及びオリゴヌクレオチドカクテル(それぞれ15µMのフォワードプライマー及びリバースプライマー)1µLを添加し、PRISM7900HT(ABI)において95°Cで10分を1サイクル、その後95°Cで30秒、60°Cで1分を45サイクルでPCRを行った。それぞれの遺伝子が別々のウェルで増幅された。分析用ソフトウェア(SDS、ABI)でCtを求めた。プライマー二量体を全く用いずに、溶解曲線の分析において単一の適切なピークを検出するように、PCR条件を慎重に最適化した。アッセイ条件を有効にするために、合成RNA34を溶解緩衝液に入れ、またこのRNA34もリアルタイムPCRにより定量した。プライマーの配列特異性をblast分析により確認した(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。或る特定の量のPCR産物を生成したPCRサイクルと同様にCtを設定し、刺激サンプルのCt値から非刺激サンプルのCt値を引くことでデルタCt(ΔCt)も算出した。Ctは対数尺度であるので、1-ΔCtは2倍量又は2分の1量を意味し、負のΔCtは、発現の増大を示す。

【0026】

結果を図1A及び図1Bに示す。これらの図では、SYBR GreenリアルタイムPCRによって、TNFSFのmRNA(1~18)及び入れられた(spiked: スパイク)対照RNA34を定量した。3、2、1、0、-1、-2及び-3のCt値は、それぞれ1/8、1/4、1/2、0、2、4、8倍の増大を示す。図1Aでは、それぞれの記号は各個体の平均値である。記号が有意な増大(p<0.05)を示す一方で、記号は有意な低減(p<0.05)を示し、xは変化がないことを示す。図1Bは、同じ個体を使用して、2日間連続で分析を繰り返した結果を示す。記号は、それぞれの個体の平均 50

±標準偏差である。それぞれ、 Δ はTNFSF-2(TNF α)であり、 \square はTNFSF-8であり、 \circ はTNFSF-15である。実線は、2つのデータ組が同一である線である。点線は、 ± 0.5 Ctを示す。

【0027】

この技法によって、血液の白血球において全ての成員のTNFスーパーファミリーのmRNAの基礎レベルを検出することができた。図1Aに示されるように、全血をHAGに曝した場合、TNFスーパーファミリーのmRNAの有意な誘導が同定された。個体間の大きな変動が存在するが、有力なTNFスーパーファミリーのmRNAは、TNFスーパーファミリー亜群2(TNF α)、8、及び15であった。これらのmRNAは、それぞれ試験個体の80%(12/15)、73%(11/15)、及び60%(9/15)においてHAG誘導性応答を示した。TNFスーパーファミリー亜群1、3、4、6(すなわち、FasL)、7、9、10(すなわち、TRAIL)、14、及び18のmRNAは、少なくとも1つの試験個体においてHAG誘導性応答を示した。TNFスーパーファミリー亜群5、11、12、13、及び13BのmRNAは、いずれの試験個体においてもHAG誘導性応答を示さなかった。TNFスーパーファミリー亜群2、8及び15のうちの少なくとも1つがそれぞれの試験個体のHAG曝露によって誘導された。例えば、HAG誘導性のTNFスーパーファミリー亜群2の応答を示さなかった3つの個体が全て、亜群15の応答を示した一方で、HAG誘導性の亜群15の応答を示さなかった6つの個体は亜群2の応答を示した。TNFスーパーファミリー亜群8がHAG誘導性応答を示さなかった4つの個体は、亜群2又は亜群15のいずれかにおいて応答を示した。図1Aに示されるように、対照の入れられたRNA34のCtは全て、 ± 0.5 以内であった。これらの実験をさらに有効にするために、2日間連続で2回、同じ個体から血液サンプルを得た。図1Bに示されるように、TNFスーパーファミリー亜群2、8、15及びRNA34の値は、標準偏差 ± 0.5 以内で再現性があった。それぞれのサンプルにおける三重全血アリコート内の変動も 0.5 Ct未満であった(図1B、それぞれの記号のX-Yバー)。

【0028】

この方法を以下のように一実施例に適用することができる。外科切除又は生検を受けた哺乳類患者から取り除いた癌検体をIgG沈着、単核白血球の浸潤、及び癌細胞で発現したTNF-Rスーパーファミリー亜群の種類について分析した。それから同じ個体から血液サンプルを得て、どの種類のTNFスーパーファミリーのmRNAがHAG刺激によって誘導されるか、及びどの程度誘導されるかを求める分析を行った。個体を誘導されたTNFスーパーファミリーと発現したTNF-Rとが適合する群、及びそれらが適合しない群に分類する。2つの群における臨床転帰の比較結果によって、適合群の予後の重症度が小さくなることが示される。早期の不可視の転移病変等を有する癌塊が小さい場合、適切なTNFスーパーファミリー介在性の免疫系の攻撃は癌の再発を予防するのに十分であり得る。したがって、比較された臨床転帰は寛解期間、及び再発(転移)頻度を含む必要がある。

【実施例2】

【0029】

表1に示すように、TNF-Rスーパーファミリー及びTNFスーパーファミリーのmRNAのDNA配列をGenBankからダウンロードして、以下の表2で示されるプライマー配列をPrimer Express(Applied Biosystems)及びHYBsimulator(RNAture)によって設計した。このような変異が存在する場合には、複数の転写物間で共通の領域でこれらの配列を設計した。cDNAなし(プライマー二量体なし)では増幅は起こらず、融解曲線分析で単一ピークを検出した。

【0030】

【表 2 - 1】

表 2 : 使用したプライマー配列

標的 mRNA	フォワード	リバース
TNFRSF-1A	CCTGCCAGGAGAAACAGAAACA (配列番号 2)	GGAGACACACTCGTTTTCTCTTAG AA (配列番号 3)
TNFRSF-1B	CAAGCCAGCTCCACAATGG (配列番号 4)	TGACCGAAAGGCACATTTCCT (配列番号 5)
TNFRSF-3	CCTCCCGGGCTCTCTACAC (配列番号 6)	TCATGGGTGATAAATTGGTTCCT (配列番号 7)
TNFRSF-4	ACGACGTGGTCAGCTCCAA (配列番号 8)	GCGGCAGACTGTGTCTCTGTGT (配列番号 9)
TNFRSF-5	GGCCAAGAAGCCAACCAATA (配列番号 10)	GAAGATCGTCGGGAAAATTGAT (配列番号 11)
TNFRSF-6	TGGCATCAACTTCATGGAAAGA (配列番号 12)	GCAAGAGTACAAAGATTGGCTTTT T (配列番号 13)
TNFRSF-7	CTGCAGAGCCTTGTCGTTACAG (配列番号 14)	GCTCCGGTTTTTCGGTAATCC (配列番号 15)
TNFRSF-8	GGTTGAGGCAGCAAACAGATG (配列番号 16)	GCCTGGTGGTTAAGGTCTGATG (配列番号 17)
TNFRSF-9	CGTCGACTGCGTTGCTCTT (配列番号 18)	TTCTGCCCGTTTAAACAACAG (配列番号 19)
TNFRSF-10A	TGAGGACAATGCTCACAACGA (配列番号 20)	TTGCTGCTCAGAGACGAAAGTG (配列番号 21)
TNFRSF-10B	CTGAGACAGTGCTTCGATGACTTT (配列番号 22)	CCATGAGGCCCAACTTCCT (配列番号 23)
TNFRSF-10C	GGAAGTGTAGCAGGTGCCCTAGT (配列番号 24)	ACCAAATTCCTTCAACACACTGGAT AT (配列番号 25)
TNFRSF-10D	ATGGACTTACGAGGGTTCGACTTA G (配列番号 26)	GGAAAAGAGATGTACAGCCTACAG TAGTAAGC (配列番号 27)
TNFRSF-11A	GGAAACAGTAACTCCACGTTTCATC T (配列番号 28)	GCGAGTCTGGCTGACGTA (配列番号 29)
TNFRSF-11B	TGCAAACCCAGTGACCAGATC (配列番号 30)	ΛAGGTGTCTTGGTCCGCAAT (配列番号 31)
TNFRSF-12A	CGCTGATCCAGTGACAATGTG (配列番号 32)	GCGTCTGGGAGGCAGAGA (配列番号 33)
TNFRSF-14	CAGGGAGCCTCGTCATCGT (配列番号 34)	CACCCCTTGGCTTTCTTCTTT (配列番号 35)
TNFRSF-17	GGAGGAAGGCGCAACCAT (配列番号 36)	GCAGCTGGCAGGCTCTTG (配列番号 37)
TNFRSF-18	AGTTTTGGCTTCCAGTGATCGA (配列番号 38)	GCAGTCTGTCCAAGGTTTGCA (配列番号 39)
TNFRSF-25	CCTGCTCGCCCTATCG (配列番号 40)	TTACCCCTCTCGACATTC (配列番号 41)
TNFSF-1	CAGCTATCCACCCACACAGATG (配列番号 42)	CGAAGGCTCCAAAGAAGACAGT (配列番号 43)
TNFSF-2	CGAAGGCTCCAAAGAAGACAGT (配列番号 44)	CAGGGCAATGATCCCAAAGT (配列番号 45)

10

20

30

40

【表 2 - 2】

TNFSF-3	AGGGTGTACGTCAACATCAGTCA (配列番号46)	CACGGCCCCAAAGAAGGT (配列番号47)	
TNFSF-4	GCCCCTCTTCCAACTGAAGAA (配列番号48)	GGTATTGTCAGTGGTCACATTCAA G (配列番号49)	
TNFSF-5	CCACAGTTCCGCCAAACCT (配列番号50)	CACCTGGTTGCAATTCAAATACTC (配列番号51)	
TNFSF-6	TGGCAGCATCTTCACTTCTA AAT G (配列番号52)	GAAATGAGTCCCCAAAACAT CTC T (配列番号53)	
TNFSF-7	CACACTCTGCACCAACCTCACT (配列番号54)	TGCACTCCAAAGAAGGTCTCATC (配列番号55)	10
TNFSF-8	ACCACCATATCAGTCAATGTGGAT (配列番号56)	GAAGATGGACAACACATTCTCAA A (配列番号57)	
TNFSF-9	AGCTACAAAGAGGACACGAAGGA (配列番号58)	CGCAGCTCTAGTTGAAAGAAAGACA (配列番号59)	
TNFSF-10	GGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAA TG (配列番号60)	AAAAGGCCCCGAAAAAACTG (配列番号61)	
TNFSF-12	TACTGTCAGGTGCACTTTGATGAG (配列番号62)	CGCAGTGGCTGAGAATTCCT (配列番号63)	
TNFSF-13	ATATGGTGTCGAATCCAGGAT (配列番号64)	CCTGACCCATGGTGAAAGTCA (配列番号65)	
TNFSF-13B	ATGCCTGAAACACTACCCAATAAT T (配列番号66)	GCAAGTTGGAGTTCATCTCCTTCT (配列番号67)	
TNFSF-14	CGTCCGTGTGCTGGATGA (配列番号68)	CATGAAAGCCCCGAAGTAAGAC (配列番号69)	20
TNFSF-15	TGCGAAGTAGGTAGCAACTGGTT (配列番号70)	CCATTAGCTTGTCCCCTTCTTG (配列番号71)	
TNFSF-18	CGGCTGTATAAAAAACAAAGACATG AT (配列番号72)	TCCCAACATGCAATTCATAAG (配列番号73)	
RNA 34	AGCCCCCTCACTCCCAA (配列番号74)	GGGTGCTGTGCTTCTGTGAAC (配列番号75)	

【0031】

以下で修正されるような上記の方法で、それぞれのmRNAの量を求めた。手短に言う
と、約125mgの凍結癌検体を1% 2-メルカプトエタノール(BioRad)、0.5m
g/mLのプロテイナーゼK(Pierce)、0.1mg/mLのサケ精子DNA(5 Prime Epp
endorf/Brinkmann)、0.1mg/mLの大腸菌tRNA(Sigma)、それぞれ10mMの特
定のリバースTNF-Rスーパーファミリー亜群プライマー、及び外部対照として 10^7
個の分子/mLの合成RNA34をさらに加えた溶解緩衝液1mLに混合し、Polyt
ron(Brinkmann)で均質化させた。70 μ Lのこれらの溶解物をmRNA精製のオリ
ゴ(dT)固定化マイクロプレート(GenePlate, RNAture)に添加した。4
で一晩のインキュベート後、マイクロプレートをプレーン溶解緩衝液100 μ Lで3回、
それから4 で洗浄緩衝液(0.5mol/LのNaCl、10mmol/Lのトリス(pH7.4)、
1mmol/LのEDTA)150 μ Lで3回洗浄した。1 \times RT緩衝液
(50mmol/LのKCl、10mmol/LのトリスHCl(pH8.3)、5.5
mmol/LのMgCl₂、ジチオスレイトールなし)、それぞれ1.25mmol/L
のdNTP、4単位のrRNasin、及び80単位のMMLV逆転写酵素(プライマー
を除いてPromega製)を含む緩衝液30 μ Lを添加し、37 で2時間インキュベートす
ることによって、それぞれのウェルでcDNAを直接合成した。100 μ Lの水をこれら
の30 μ LのcDNAに添加し、cDNA4 μ Lを384ウェルのPCRプレートに移し
、これにiTaq SYBR master mix(BioRad)5 μ L及びプライマーカク
テル(それぞれ10 μ mol/Lのフォワードプライマー及びリバースプライマー)1 μ
Lを添加して、PRISM 7900HT(Applied Biosystems)において、95 で10
分を1サイクル、その後95 で30秒、60 で1分を45サイクルでPCRを行った
。それぞれの遺伝子が別個のウェルで増幅された。或る特定の量のPCR産物(蛍光)を

30

40

50

発生するPCRのサイクルであったサイクル閾値(Ct)を分析用ソフトウェア(SDS、Applied Biosystems)を使用して求めた。cDNAなし(プライマー二量体なし)では増幅は確認されず、単一ピークを融解曲線分析で検出した。20個の異なるmRNA間で複数のサンプルを比較するために、それぞれのCtを同じサンプル由来のTNFRSF1AのCtで引いた(Ct、Y軸)。正のCtは、TNFRSF1Aより低い発現を意味し、1-Ctは発現が半分であることを意味する。それぞれの記号は1つの検体の平均値を示す。図2の各列の左側()は、結腸、肝臓、胃、子宮等の腺癌、及び3つの症例の乳癌()、並びにメラノーマのサンプルの結果を示す。右側()は、肺癌、咽頭癌、舌癌及び子宮頸癌等の扁平上皮細胞癌のサンプルの結果を示す。

【0032】

抗ヒトT細胞受容体(TCR)モノクローナル抗体によるヘパリン化全血におけるTNFスーパーファミリーのmRNAの誘導の分析(その結果は図3に示される)に関しては、5µg/mLの抗TCR / 又は対照IgGによって三重で、37 で2時間だけ全血60µLを刺激した。上記のように、50µLの血液サンプルをフィルタープレートに添加し、白血球を補足した後、溶解緩衝液を添加することによって膜に溶解させた。上記のように、ポリ(A)⁺mRNAの精製、cDNA合成、及びリアルタイムPCRを行った。抗TCR / のCtから対照IgGのCt値を引くことでCtを算出した。それぞれの記号は単一個体の三重血液アリコート(複製)の平均Ctを示す。溶解緩衝液に入れられた合成RNA34も定量して、外部対照としてそれぞれのアッセイを有効にした。

【0033】

或る特定の量のPCR産物(蛍光)を発生するPCRのサイクルであったサイクル閾値(Ct)を分析用ソフトウェア(SDS、Applied Biosystems)を使用して求めた。DNAチップ技術(Schena他著「相補的DNAマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの定量的モニタリング(Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray)」(Science 1995; 270: 467-70)を参照のこと)によって、多くの遺伝子を同時に分析することができるが、正確に定量することができず、一般的に有意な結果として3倍を超える増大が必要になる。これに対して、上記のDNA定量技術は、それぞれのサンプルにおけるmRNAの回収及びcDNA合成効率を考慮することにより、より正確な定量化を提供し、150%(1.5倍)ほどの小さい変化を統計的有意性をもって検出することができる。したがって上記のように、この方法で調製されたそれぞれ個別のcDNA由来の各mRNAをSYBR GreenリアルタイムPCRで分析した(Morrison他著「増幅中の連続SYBR Green Iモニタリングによる低コピー転写物の定量化(Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification)」(Biotechniques 1998 Jun; 24(6): 954-8, 960, 962)を参照のこと)。

【0034】

図2は、様々な癌におけるTNFスーパーファミリーのmRNA発現の結果を示す(結腸、乳房、肝臓、胃、子宮、メラノーマ、肺、咽頭、舌及び頸部)。20個の異なるmRNA間で複数のサンプルを比較するために、観察されたそれぞれのCtから同じサンプル由来のTNFスーパーファミリー亜群1AのCtを引いた(Ct、Y軸)。正のCt値は発現レベルがTNFスーパーファミリー亜群1Aよりも低いことを意味し、1-Ctは発現レベルが半分であることを意味する。図2で示されるように、ほとんど全ての癌組織は、TNFスーパーファミリー亜群1A、3、12A及び14を高いレベルで発現した。このことは、癌浸潤白血球が、浸潤部位でTNFスーパーファミリー亜群1(すなわち、リンホトキシン)(TNFスーパーファミリー亜群3に対応)、TNFスーパーファミリー亜群2(すなわち、TNF)(TNFスーパーファミリー亜群1A及び1Bに対応)、TNFスーパーファミリー亜群12(TNFスーパーファミリー亜群12Aに対応)、TNFスーパーファミリー亜群14(TNFスーパーファミリー亜群14に対応)、又はこれらのリガンドの組み合わせを産出することができる場合、これらの種類の癌を全て根絶することができることを示している。TNF-Rス

10

20

30

40

50

ーパーファミリー亜群 4、5、8、9、11A 及び 11B、並びに 17 の発現レベルは評価されたサンプルにおいて非常に低かったが(図 2)、他のサンプルがこれらの受容体亜群を発現する可能性を無視することはできない。したがって、白血球における TNF スーパーファミリー亜群 4 (TNF-R スーパーファミリー亜群 4 に対応)、TNF スーパーファミリー亜群 5 (すなわち、CD40 リガンド)(TNF-R スーパーファミリー亜群 5 に対応)、TNF スーパーファミリー亜群 8 (すなわち、CD30 リガンド)(TNF-R スーパーファミリー亜群 8 に対応)、並びに TNF スーパーファミリー亜群 13 及び 13B (TNF-R スーパーファミリー亜群 17 に対応)の誘導性も、癌免疫療法には重要であり得る。個体間で非常に大きな変動が存在するが、白血球における TNF スーパーファミリー亜群 6 (すなわち、Fas リガンド)(TNF-R スーパーファミリー亜群 6 に対応)、TNF スーパーファミリー亜群 7 (すなわち、CD27 リガンド)(TNF-R スーパーファミリー亜群 7 に対応)、TNF スーパーファミリー亜群 11 (TNF-R スーパーファミリー亜群 11A 及び 11B に対応)、TNF スーパーファミリー亜群 18 (TNF-R スーパーファミリー亜群 18 に対応)、及び TNF スーパーファミリー亜群 15 (すなわち、DR3 のリガンド)(TNF-R スーパーファミリー亜群 25 に対応)の誘導性は、対応する受容体の発現レベルが高い癌にとって重要であり得る。TNF-R スーパーファミリー亜群 10A の mRNA が癌において高い発現を示したが、*in vivo* 受容体 TNF-R スーパーファミリー亜群 10B (Sheridan 他著「ファミリーのシグナル及び *in vivo* 受容体による TRAIL 誘導性アポトーシスの制御(Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors)」(Science 1997 Aug 8; 277(5327): 818-21) 及び Pan 他著「TRAIL に関するアンタゴニスト *in vivo* 受容体及び致死ドメイン含有受容体(An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL)」(Science 1997 Aug 8; 277(5327): 815-8)を参照のこと)の mRNA 発現は TNF-R スーパーファミリー亜群 10A より高かった。それにもかかわらず、依然として TNF-R スーパーファミリー亜群 10 (すなわち、TRAIL)は、幾つかの癌の治療に有用な標的であり得る。腺癌/メラノーマ(図 2 のそれぞれの列の左側に示される)と扁平上皮細胞癌(図のそれぞれの列の右側に示される)との間に大きな差はない。

【0035】

T 細胞受容体(TCR)は、特定の外部の非自己分子を認識する細胞傷害性 T 細胞の細胞表面分子である。抗原提示及び癌致死の最初の工程における TCR の役割が既知である(例えば、Mami-Chouaib 著「ヒト肺癌における抗腫瘍細胞傷害性 T リンパ球応答: 腫瘍関連抗原の同定(Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen)」(Immunol Rev. 2002 Oct; 188: 114-21)を参照のこと)。細胞免疫学における一般的な実験は人工溶液に懸濁された単離細胞を使用する純粋な細胞系を用いるが、本実施例で用いた mRNA アッセイによって、全血の *in vivo* 刺激後の様々な mRNA レベルの変化の同定が可能になる。後者が前者の純粋な細胞系より生理的であるため、本実施例は細胞間及び細胞-プラズマ間の相互作用が存在する全血における TCR 標的分子相互作用の刺激を利用する。

【0036】

全血には、細胞傷害性 T 細胞だけでなく、他の種類の白血球も含まれるので、TCR は、抗ヒト / TCR マウスモノクローナル IgG1 k により特異的に刺激された(「抗 TCR」(BioLegend 製))。対照として、同じ濃度の精製マウス IgG1 k (これも BioLegend 製)も使用した。60 μ L の全血を 5 μ g/mL の抗 TCR 又は対照 IgG1 k により三重で 37 °C で 2 時間だけ刺激した。末梢血の白血球における TNF SF の mRNA 発現に関する抗 TCR 抗体の効果の予後分析によって、用量及びインキュベーション時間を決定し、その結果を図 4A 及び図 4B に示す。用量応答及び動態に関して、図 4A に示されるように、それぞれ 60 μ L のヘパリン化全血の三重アリコートに PBS ()、10 () 若しくは 1 () μ g/mL のマウス抗ヒト / TCR IgG1 k、又は 10 () 若しくは 1 () μ g/mL の精製マウス IgG1 k と混合し、37 °C で 0~7 時間インキュベーションした。それから上記のように、TNF SF - 2 の mRNA を定量した

10

20

30

40

50

。動態に関して、図4Bに示されるように、TNFSF-2()、TNFSF-5()、TNFSF-6()、TNFSF-9()、及びTNFSF-14()のCt値から対照IgGのCt値を引くことにより、それぞれのCtを算出した。それぞれのデータは、全血の三重アリコートの平均±標準偏差であった。抗TCRを使用して得たCt値から対照のIgGを使用して得たCt値を引くことによって、Ctを算出した。

【0037】

図3に示されるように、抗TCR刺激はTNFスーパーファミリー亜群2、5、6、9、10及び14を特異的に誘導した。これらの受容体のmRNAの発現レベルが全ての種類の癌で高かった(図2を参照のこと)、TNFスーパーファミリー亜群2及び14の結果は特に興味深い。複数のTNF/TNF-Rスーパーファミリー亜群関連のカスケードの同時活性化によって、併用化学療法と同程度まで癌細胞の耐性機構を抑制することができる。溶解緩衝液に入れた対照の合成RNA34により得られた結果は、±0.3Ct未満の非常に小さい変化を示し(図3のRNA34)、これによりこのアッセイ系は信頼性があることが示唆される。さらに重要なことに、TCR応答が個体間のかなりの変動を示し、9つの内の6つ(66%)、及び9つの内の5つ(56%)の個体がTNFスーパーファミリー亜群2及び14それぞれで、抗TCR介在性誘導を示さなかった。さらに、TNFスーパーファミリー亜群2の応答が負を示した個体は、TNFスーパーファミリー亜群14の応答も負を示した。しかし、これらの個体は、他のTNFスーパーファミリーリガンドにおいては正を示した。

【実施例3】

【0038】

本実施例において、実施例1のように、ADCCで見られる免疫複合体のモデルとして広く使用される熱凝集ヒトIgG(HAG)を使用して、全血において白血球のFc受容体を刺激した。手短に言うと、ヒトIgG(Sigma)を20mg/mLのPBSに懸濁し、63°Cで20分間加熱した。200µg/mLのHAG又は対照のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)により三重で、37°Cで2~4時間だけ60µLの全血を刺激した。図5及び図6に示されるように、HAGの用量及びインキュベーション時間を予備分析によって決定した。

【0039】

図5Aは、用量応答の分析結果を示す。それぞれ60µLのヘパリン化全血の三重アリコートを様々な濃度のヒトIgG()又はHAG()と混合し、37°Cで2時間インキュベートした。図5Bは動態の分析結果を示す。それぞれ60µLのヘパリン化全血の三重アリコートをPBS()又は200mg/mLのHAG()と混合し、37°Cで0~12時間インキュベートした。それから、TNFSF-15のmRNAを定量した。それぞれのデータは、全血の三重アリコートの平均±標準偏差であった。

【0040】

図6は、再現性の分析結果を示す。1~3日以内で同じ個体から血液を採取し、HAG誘導性TNFSFのmRNA及び対照RNA34を定量した。記号はそれぞれ、○:RNA34、△:TNFSF-2、□:TNFSF-8、及び◇:TNFSF-15を示す。それぞれのデータは、全血の三重アリコートの平均±標準偏差であった。実線は2つのデータが同一である線である。点線は±0.5Ctを示す。

【0041】

図7に示されるように、HAGは主に、TNFスーパーファミリー亜群2、8、14、15及び18の発現を誘導した。TNFスーパーファミリー亜群15の誘導は、抗TCR刺激で得られたTNFスーパーファミリー亜群の誘導より高かった(図3)。さらに、HAG応答は個体間でかなりの変動を示した。幾つかの個体はTNFスーパーファミリー亜群15のみを発現し、それ以外の個体はTNFスーパーファミリー亜群15の応答なしで、TNFスーパーファミリー亜群2及び8を発現した。興味深いことに、全ての個体が少なくとも1つのTNFスーパーファミリー応答を示した。溶解緩衝液に入れた対照RNA34の結果は、±0.6Ct未満の非常に小さい変化を示し(図3のRNA34)、そ

10

20

30

40

50

れによりこのアッセイ系は信頼性があることが示唆された。アッセイの再現性を試験するために、1～3日以内に2回同じ個体から血液を採取した。しかし結果は、Ct差が0.5未満で非常に類似していた(図6)。HAG及び抗TCR刺激を独立して使用して血液を試験した9つの個体の中で、HAG刺激で誘導したTNFスーパーファミリー亜群15の発現応答は、抗TCR刺激で誘導したTNFスーパーファミリー亜群2及び14の発現応答と相関関係がなかった。

【実施例4】

【0042】

本実施例において、幾つかの個体由来の全血をHAG刺激して、ケモカイン群のmRNAレベルの変化を実施例1に記載のと同じように評価した。RNA34及びCD4のmRNAを対照として用いた。分析されたケモカインのmRNAのフォワードプライマー配列及びリバースプライマー配列は図8に示される。

10

【0043】

分析結果を図9に示す。この図では、丸は、特定のケモカインのmRNAレベルがHAG刺激によって有意に誘導された個体を示す。三角は、刺激後のmRNAレベルの有意な低減を示し、記号Xは有意な変化がないことを示す。図9から分かるように、応答は個体間で異なるが、例えば、全ての試験個体がCCL-3及びCCL-20、CXCL-1、CXCL-2、及びCXCL-3、並びにIL-8及びIL-1Bの有意な誘導を示したという共通点が存在した。

【0044】

20

これらの結果によって、癌患者が疾患領域により多くの白血球を補充することができる可能性を確認することができることが示され、特定のケモカインと特定の白血球集合との間に相関関係が確立される場合、図9に示されるようなデータを使用して、補充された白血球集合と腫瘍細胞との間のTNF/TNF-R適合分析に基づいて、腫瘍を効果的に攻撃できる白血球集合を補充する可能性を判断することができる。

【実施例5】

【0045】

本実施例において、TNFスーパーファミリー亜群3のmRNAレベルのHAG誘導性変化に対するサプリメント等の様々な食事成分の効果を評価した。「食事成分」は、哺乳類が消化することのできる任意の化合物又は物質を指し、「食事サプリメント(dietary supplements)」は、哺乳類の食事を補助するのに使用されるこれらの有益な食事成分(例えば、ビタミン及び天然抽出物)並びに調合薬等の他の化学化合物を示す。このように、「食事成分」は意味が広く、その中に「食事サプリメント」が含まれる。用いられる食事成分は、ビタミンA(最終濃度10nM)、ゲニステイン(ダイズ)(100nM)、クルクミン(香辛料のウコン)(100nM)、及びケルセチン(植物色素のフラボノイド)(100nM)であった。これらの食事成分は全て、免疫系若しくは癌又はその両方に対する効果が報告されている。ビタミンAは免疫系を刺激することが知られている。ゲニステインは抗癌性の活動を有することが幾つかの研究で見出されており、考え得る活動機構としては、アポトーシスの上方調節、血管形成の阻害、DNAトポイソメラーゼIIの阻害及びタンパク質チロシンキナーゼの阻害が挙げられる。クルクミンは腫瘍細胞においてアポトーシス促進効果があり、転写因子NF- κ Bの活性を阻害し、このような細胞において強く過剰発現することが多い。ケルセチンは、ラットにおけるナチュラルキラー細胞の活性をブースト化すること並びにマスト細胞、好塩基球及び好中球の脱顆粒を阻害することが示されている。この実施例において、リン酸緩衝生理食塩水を対照として用いた。

30

40

【0046】

ヘパリン化全血を(上記のような血液濃度で)37℃で1時間、様々な食事サプリメントで前インキュベート(pre-incubated: 前培養)した後、4時間、1.2 μ Lの熱凝集IgGで刺激した。それから、血液を37℃で2時間インキュベートした。それから、実施例1に記載の方法を使用して、TNFスーパーファミリー亜群3のmRNAのレベルを評

50

価した。プライマー配列を上記の表2で与える。TNFスーパーファミリー亜群3は、リンホトキシン- β (LT β)、腫瘍壊死因子- β (TNF- β)、及びリンホトキシン- γ (LT γ)としても知られている。分泌されたLT β が可溶性ホモ三量体LT β 3として集合化する。分泌されたLT β が膜関連LT β と複合体化して、2種類のヘテロ三量体、LT β 1/ β 2及びLT β 2/ β 1を形成する。亜群3が、活性化した未感作CD4細胞、非偏極(unpolarized)IL-2分泌エフェクター及びTh1エフェクターによって発現され、亜群3に特異的な受容体を幾つかの腫瘍細胞により発現する。

【0047】

結果を図10に示す。図10では、白丸がPBS対照を使用して得られたTNFスーパーファミリー亜群3の値を示す一方で、黒丸はHAG刺激を使用したときに得られた亜群3の値を示す。亜群3のmRNAの基礎レベルは、食事サプリメントによる前処理では変わらなかった(白丸)。しかしこの結果は、HAGによって、ケルセチンに曝した血液中のTNFスーパーファミリー亜群3の発現の有意な($p = 0.03$)誘導が引き起こされたことを示している。この個体も適切なTNF-R亜群(亜群3)を発現する腫瘍細胞を有する場合、この遺伝子の発現の増大によって腫瘍のアポトーシスが増大され得るので、ケルセチンは、この個体における抗癌特性を有する食事に含まれる良好な候補物質である。図10のY軸の値はサイクル閾値(Ct)を示す。それぞれの記号は、ヘパリン化全血50mLの三重アリコート平均 \pm 標準偏差である。

10

【0048】

当業者には、特定のTNFスーパーファミリー亜群又はケモカインの発現における同様の効果に関して、調合薬及び他の化学化合物をスクリーニングすることも可能であるので、本実施例の系を広く利用し、特定の個体の癌に対する免疫応答を増大させるのに有用である物質に関してスクリーニングすることができることが理解されよう。

20

【0049】

癌浸潤白血球は、病理学試験によって外科切除した組織検体で度々観察される。しかし、これらの発見が常に患者におけるはっきりした良好な徴候である訳ではなく、白血球の浸潤が存在する場合でさえ、癌の進行が起こる場合がある。これが起こると、病理学者は当惑することが多い。本実施例は、この技法のさらなる改良を提供し、特にケモカインの誘導も実証される場合に、癌細胞のTNF-Rスーパーファミリー亜群と浸潤白血球のTNFスーパーファミリー亜群とを適合することが良好な予後の徴候であり得る。本発明者らはそれぞれの白血球が癌細胞を包含しているか否か、及びTNFスーパーファミリーのカスケードが活性化しているか否かを知らないので、浸潤白血球の病理分析を解釈することは困難である。定量化した基線のTNFスーパーファミリーのmRNAのレベルも解釈することが困難である。代わりに、本発明の実施例は、抗TCR又はHAG刺激後のTNFスーパーファミリーのmRNA亜群の発現の機能的変化の分析を利用する。浸潤白血球が血流によってもたらされるので、本実施例の*ex vivo*機能アッセイは、診断、治療的モニタリング、予後マーカー並びに効果的自己免疫調節剤、モノクローナル抗体系薬、遺伝子治療及びワクチンの同定に関して、癌患者だけでなく、自己免疫疾患、炎症、移植等の他の疾患を患う患者においても免疫機能の分析に有用なツールである。このアッセイは単純で、生理学的であり(白血球を単離せず2~4時間の全血のインキュベート)、有意な統計分析により正確であり(開始材料として全血の三重アリコート)、且つ感度が高い(全血60 μ Lが全ての17個のTNFスーパーファミリー亜群のmRNAの定量化に十分である)。全血の三重アリコート間のmRNAデータにおける非常に小さい変動のために、アッセイが、多くの場合、0.5~1.0 Ct程の小さい遺伝子発現における有意な変化を確認することが可能であり、このことはDNAチップに基づく方法論又は従来のリアルタイムPCRよりもはるかに良好である。それぞれの細胞集合が特定の細胞表面マーカーで同定される場合、NK細胞又は細胞傷害性T細胞の数は、フローサイトメトリー分析又は免疫組織化学染色で定量することができる。しかし、これらのマーカー陽性細胞がこの分析の時に実際に予測される機能を有しているか否かは明らかではない。本実施例の方法によって、それぞれのTNFスーパーファミリー亜群のmRNAの刺激応答で

30

40

50

特定の細胞集合が同定されないが、個々人の病状把握に有用な機能全体を示す。得られた広範囲の個体の変動によって、個体の特定の遺伝子構造の発見が見られる。TNFスーパーファミリー応答は1～3日以内で良好な再現性を示す(図6)が、長期間にわたって、食事サプリメントの投与及び運動によって変化することもでき、これにより非遺伝因子の関与が示唆される。このように、本実施例の方法は、個体に合わせた癌の将来の免疫療法に対する利点を示す。

【0050】

このような個体に合わせた癌の免疫療法は、血液白血球における適切なTNFスーパーファミリー亜群の発現を増大させること、及び適切なケモカインシグナル化を介して、亜群特異的な白血球を補充することに基づいている。上記の実施例の系及び方法は、薬剤のスクリーニング、検証、及び臨床試験に有用である。さらに、適切なTNFスーパーファミリーの阻害が薬剤標的になる場合、同じ系は自己免疫疾患に適用可能であり得る。

10

【0051】

都市において適切な装備を有する警察官の十分な供給は、彼らを犯罪現場に送り出す場合にのみ、意味のあるものになる。警察官が犯罪グループに接触するとき、警察官の最初の仕事は、単独で犯罪グループを逮捕することを試みるよりも救援を呼び、より多くの仲間を現場に派遣することである。細胞障害性T細胞において、この活動は、CCL及びCXCLケモカイン等の化学走化性因子並びにインターロイキン(IL)の放出に対応し得る(配列はGenBank及びUniGeneから利用可能である)。したがって、末梢血の白血球においてCCL、CXCLのHAG誘導性をモニタリングすることも重要である。警察官派遣係のように、腫瘍学者は、末梢血においてこれらの供給をモニタリングすることによって、患者自身それぞれの免疫細胞を組織化することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1A】熱凝集IgG(HAG)への全血の曝露後に末梢血の白血球で誘導されたTNFスーパーファミリーのmRNAの分析結果を示す図である。

【図1B】図1Aの分析を繰り返した結果を示す図である。

【図2】様々な腺癌及び扁平上皮細胞癌から採取した組織サンプルで発現したTNFスーパーファミリーのmRNAの分析結果を示す図である。

【図3】抗ヒトT細胞受容体(TCR)モノクローナル抗体への全血の曝露後に末梢血の白血球で誘導されたTNFスーパーファミリーのmRNAの分析結果を示す図である。

30

【図4A】末梢血の白血球を抗TCR抗体に曝したときの用量反応及び動態の分析結果を示す図であり、TNFスーパーファミリー亜群2のmRNA発現を定量する。

【図4B】末梢血の白血球を抗TCR抗体に曝したときの動態の分析結果を示す図であり、TNFスーパーファミリー亜群2のmRNA発現を定量する。

【図5A】末梢血の白血球をHAGに曝したときの用量反応及び動態の分析結果を示す図であり、TNFスーパーファミリー亜群15のmRNA発現を定量する。

【図5B】末梢血の白血球をHAGに曝したときの動態の分析結果を示す図であり、TNFスーパーファミリー亜群15のmRNA発現を定量する。

【図6】幾つかのTNFスーパーファミリー亜群のmRNA及び対照mRNAに関する図5の分析を繰り返した結果を示す図である。

40

【図7】HAGへの全血の曝露の後に末梢血の白血球で誘導されたTNFスーパーファミリーのmRNAの分析結果を示す図である。

【図8A】実施例4で用いられるケモカインプライマー配列を示す図である。

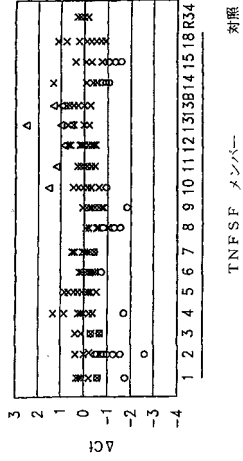
【図8B】実施例4で用いられるケモカインプライマー配列を示す図である。

【図9】HAGへの全血の曝露の後に末梢血の白血球で誘導されたケモカインmRNAの分析結果を示す図である。

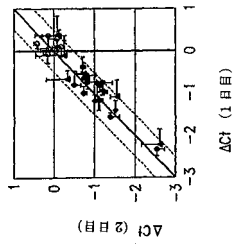
【図10】HAGへの前もって栄養補助又は対照刺激で刺激された全血アリコート曝露の後に末梢血の白血球で誘導されたTNFスーパーファミリー亜群3のmRNAの分析結果を示す図である。

50

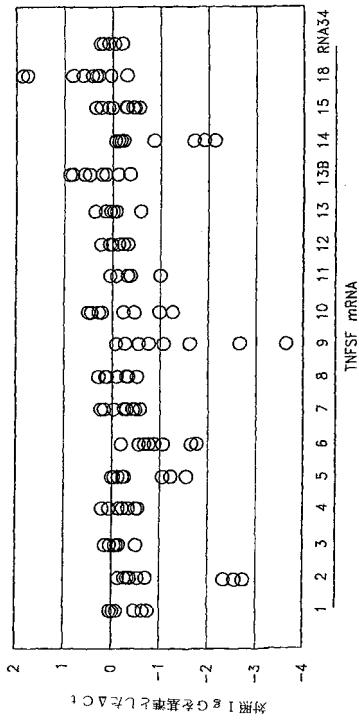
【図 1 A】



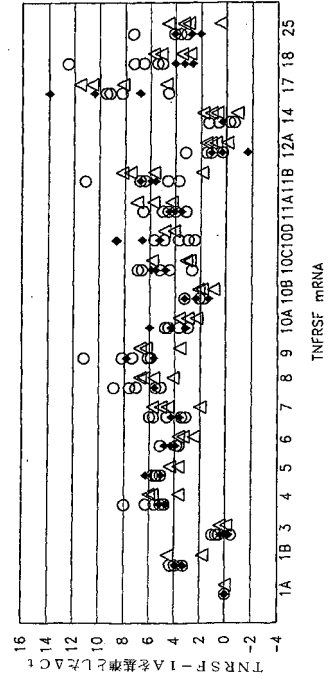
【図 1 B】



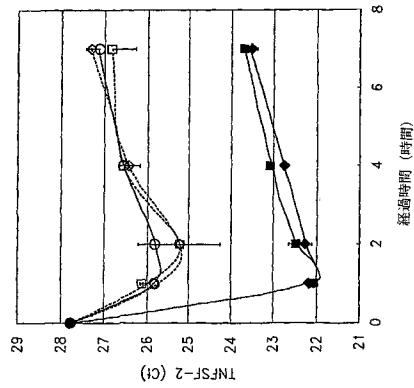
【図 3】



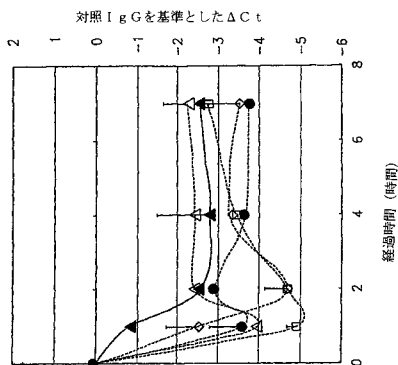
【図 2】



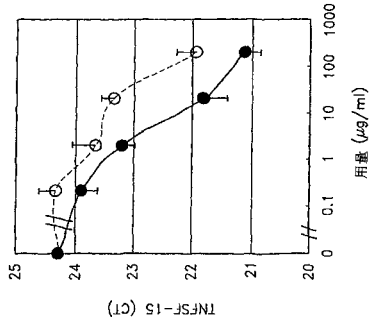
【図 4 A】



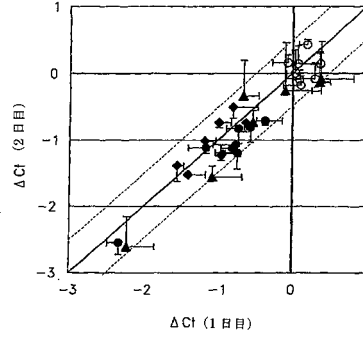
【図 4 B】



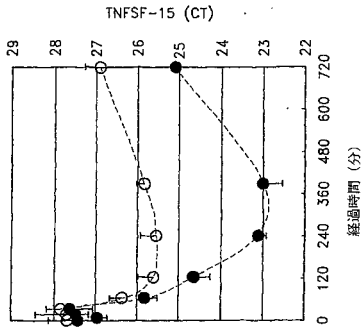
【図 5 A】



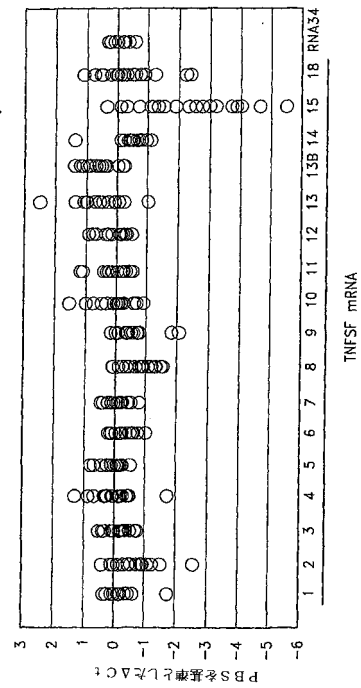
【図 6】



【図 5 B】



【図 7】



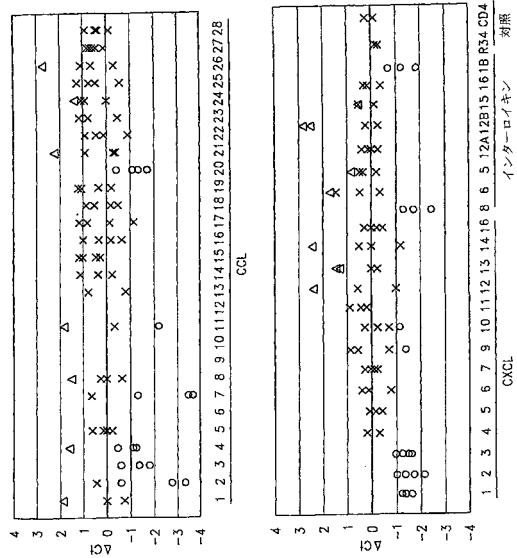
【図 8 A】

- CCL-1 MM282: GGCTGCGCCTTGG (配列番号 7 6)
- MM283: GGGCAGTGCCTCAGATTT (配列番号 7 7)
- CCL-2 MM284: CCATTGTGGCCAGGAGATC (配列番号 7 8)
- MM285: TGTCCAGGTGGTCCATGGA (配列番号 7 9)
- CCL-3 MM286: CACAGAATTCATAGCTGACTCTTTGA (配列番号 8 0)
- MM287: TCGCTTGGTTAGGAAGATGACA (配列番号 8 1)
- CCL-4 MM288: GGTATTCCAAACCAAGAAAGCA (配列番号 8 2)
- MM289: GTTCAGTCCAGGTCCATACCGTACT (配列番号 8 3)
- CCL-5 MM290: AGTCGTCTTTGTACCCGAAA (配列番号 8 4)
- MM291: AGCTGATCCAAAGAGTTGATGTAC (配列番号 8 5)
- CCL-7 MM292: TGTGCTGACCCACACAGA (配列番号 8 6)
- MM293: GUTTTGGAGTTTGGGTTTTCTTG (配列番号 8 7)
- CCL-8 MM294: AGAGTCACAGAATCACCACATC (配列番号 8 8)
- MM295: AGACCTCCTTGCCCCGTTT (配列番号 8 9)
- CCL-11 MM296: CCCAGAAAGCTGTGATCTTCAA (配列番号 9 0)
- MM297: TCCTGCACCCACTTCTCTTGG (配列番号 9 1)
- CCL-13 MM298: CCAAAGTGGCAAGGAGATCT (配列番号 9 2)
- MM299: GGCCAGGCTTTTCATATAATTCT (配列番号 9 3)
- CCL-14 MM300: TGCTTCACTACACTACACAAAGATC (配列番号 9 4)
- MM301: GACAATTCGGGCTTGG (配列番号 9 5)
- CCL-15 MM302: CCAAGCCAGGTGTCAATTTCT (配列番号 9 6)
- MM303: TGAGTAGGGTTTCACTTTTCA (配列番号 9 7)
- CCL-16 MM304: CAAGGATCCCAACCTCTTTG (配列番号 9 8)
- MM305: GGTGACCATCTTTGCTGTAATAATT (配列番号 9 9)
- CCL-17 MM306: GGGCAGGCCATCTGTTC (配列番号 1 0 0)
- MM307: TCTCAAGGCTTTGCAGGTATTTAA (配列番号 1 0 1)
- CCL-18 MM308: CAGATTCACAAAAGTTTCATAGTTGAC (配列番号 1 0 2)
- MM309: CCGGCTCTCTTGGTTAGG (配列番号 1 0 3)
- CCL-19 MM310: CTGCTGTAGTGTCCACACACTGA (配列番号 1 0 4)
- MM311: CAGTCTCTGGATGATGCGTTCT (配列番号 1 0 5)
- CCL-20 MM312: GATACACAGACCGTATTTCTCATCTCAA (配列番号 1 0 6)
- MM313: TGAAGATGATAGCATTTGATGTACA (配列番号 1 0 7)
- CCL-21 MM314: CGCTCTCAGGCAGAGCTATGT (配列番号 1 0 8)
- MM315: CTTGTCCAGATGCTGCACAG (配列番号 1 0 9)
- CCL-22 MM316: GCGCGTGGTGAACAACCTTC (配列番号 1 1 0)
- MM317: ATCGGCACAGATCTCTCTATCC (配列番号 1 1 1)
- CCL-23 MM318: CGAAGCATCCCGTGTCTACT (配列番号 1 1 2)
- MM319: GATGACACCCGGCTTGA (配列番号 1 1 3)
- CCL-24 MM320: CAGGAGTATCTTACCACCAA (配列番号 1 1 4)
- MM321: GCGTCCAGGTTCTTCATGT (配列番号 1 1 5)
- CCL-25 MM322: GCGCGCTGGACTTACC (配列番号 1 1 6)
- MM323: GTAGAATATCGCAGCAGGCAGAT (配列番号 1 1 7)
- CCL-26 MM324: CTGCTTCCAATACGCCAAG (配列番号 1 1 8)
- MM325: GAGCAGCTGTTACTGGTGAATTA (配列番号 1 1 9)
- CCL-27 MM326: CGTGTTCACCTGGCTCAA (配列番号 1 2 0)
- MM327: GGTGTCAAACCACTGTGACA (配列番号 1 2 1)
- CCL-28 MM328: GGAATGTTTGCACAGGAAGA (配列番号 1 2 2)
- MM329: TGTTCTGTGTTCCCTTGATG (配列番号 1 2 3)

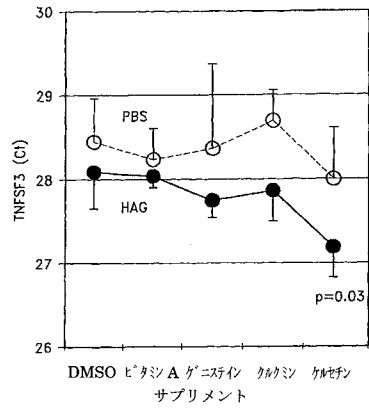
【 図 8 B 】

- CXCL-1 MM330: CCACTGGGCCAAACC (配列番号 1 2 4)
- MM331: GCAGGATTGAGGCAAGCTTT (配列番号 1 2 5)
- CXCL-2 MM332: CCCCTGGCCACTGAACTG (配列番号 1 2 6)
- MM333: TGGATGTTCTTGAGGTGAATTCC (配列番号 1 2 7)
- CXCL-3 MM334: GGAATTACACTCAAGAACATCCA (配列番号 1 2 8)
- MM335: GTGGCTATGACTTCGGTTTGG (配列番号 1 2 9)
- CXCL-4 MM336: CCGTCCGAGGCACATCAC (配列番号 1 3 0)
- MM337: GCAAATTTTCCTTCCATFTCTCA (配列番号 1 3 1)
- CXCL-5 MM338: AGAGCTGCGTTGCGTTTGT (配列番号 1 3 2)
- MM339: TGGCGAACACTTGCAGATTACT (配列番号 1 3 3)
- CXCL-6 MM340: CAGAGCTGCGTTGCATCTGT (配列番号 1 3 4)
- MM341: ACACCTGCAGTTTACCAATCGTT (配列番号 1 3 5)
- CXCL-7 MM342: TCTGGAATTCACCAAAAACA (配列番号 1 3 6)
- MM343: ACTTCGACTTGGTTGCAATGG (配列番号 1 3 7)
- CXCL-9 MM344: CCACCTACAATCCTTGAAAGACCTT (配列番号 1 3 8)
- MM345: CAGTGTAGCAATGATTTCAATTTTCTC (配列番号 1 3 9)
- CXCL-10 MM346: TCCACGTGTGAGATCATTGC (配列番号 1 4 0)
- MM347: TCTGTATGGCCTTCGATCTGT (配列番号 1 4 1)
- CXCL-11 MM348: AGGACGCTGCTTTGCAATGG (配列番号 1 4 2)
- MM349: GGATCGTTGCTCTTATTTTCTTTC (配列番号 1 4 3)
- CXCL-12 MM350: TGCCAGAGCCAACCTCAAG (配列番号 1 4 4)
- MM351: CAGCCGGGCTACAATCTGA (配列番号 1 4 5)
- CXCL-13 MM352: GAGCTTCATTGATCGAATCA (配列番号 1 4 6)
- MM353: TTCTTCCAGACTATGATTTCTTTCTTG (配列番号 1 4 7)
- CXCL-14 MM354: AAGCTGGAATGAAGCCAAAAGT (配列番号 1 4 8)
- MM355: ACACGCTCTTGGTGTGATG (配列番号 1 4 9)
- CXCL-16 MM356: CCCACAGCCAGGACATCAG (配列番号 1 5 0)
- MM357: CTTGCACAGCAGATAGGAAAGG (配列番号 1 5 1)
- IL-8 MM358: TGCCTAAAGAACTTAGATGTCAGTGCAT (配列番号 1 5 2)
- MM359: TGGTCCACTCTCAATCACTCTCA (配列番号 1 5 3)
- IL-5 MM360: GCTCTTGGAGCTGCCTACGT (配列番号 1 5 4)
- MM361: AAGGTCTCTTTACCAATGCACCT (配列番号 1 5 5)
- IL-6 MM362: TCATCATCTGGTCTTTTGGAGTTTG (配列番号 1 5 6)
- MM363: TCTGCACAGCTCTGGCTTGT (配列番号 1 5 7)
- IL-12A MM364: GCAGCCCTGAATTTCAACA (配列番号 1 5 8)
- MM365: GAAGTATGCAGAGCTTGATTTAGTTTTA (配列番号 1 5 9)
- IL-12B MM366: CGGTCATCTGCCGCAAA (配列番号 1 6 0)
- MM367: CCCATTGCT CCAAGATGAG (配列番号 1 6 1)
- IL-15 MM368: TGAAGTGTCTTTCTTGGAGTTACA (配列番号 1 6 2)
- MM369: CATTCCATTAGAAGCAAACTGTTG (配列番号 1 6 3)
- IL-16c MM370: AAAACCTCTTGGGAAGCATGAG (配列番号 1 6 4)
- MM371: GGGACCCGAGGACAGTACT (配列番号 1 6 5)
- IL-1B MM372: GAAGATGAAAAGCAATTTGCTTT (配列番号 1 6 6)
- MM373: GGGCATGTTTTCTGCTTGAGA (配列番号 1 6 7)

【 図 9 】



【 図 1 0 】



フロントページの続き

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(72)発明者 ミツハシ, マサト

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92614 アーバイン フェアドーン 11

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 日本免疫学会総会・学術集会記録, 第34巻, 第257頁, 3-C-W36-06-P(2004年)

Geriatric Medicine, 第38巻, 第1485-1490頁(2000年)

現代医療, 第35巻, 第1873-1879頁(2003年)

BIO Clinica, 第19巻, 第140-145頁(2004年)

J. Exp. Med., vol. 187, pages 875-883 (1998)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12Q 1/02

G01N 33/50

G01N 33/53

C12N 15/09

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	基于肿瘤细胞和受刺激的白细胞中的mRNA表达谱预测对肿瘤疾病的免疫应答的方法		
公开(公告)号	JP4800384B2	公开(公告)日	2011-10-26
申请号	JP2008515958	申请日	2006-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
[标]发明人	ミツハシマサト		
发明人	ミツハシ,マサト		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/505 C12Q1/6806 C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/574		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
审查员(译)	石丸聪		
优先权	60/688744 2005-06-08 US 60/735508 2005-11-11 US		
其他公开文献	JP2008543286A5 JP2008543286A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

肿瘤坏死因子 (TNF) 可通过与癌细胞表面特异性TNF受体相互作用诱导细胞凋亡。由于多个成员TNF配体和受体存在于每个超家族中，因此存在超过300种不同的配体 - 受体组合。活化的血液白细胞产生TNF作为对癌症的免疫应答的一部分并产生趋化因子以将其他白细胞吸引到该部位。本发明公开了一种检测全血暴露于热聚集的IgG或抗T受体抗体作为免疫系统相互作用模型时血液白细胞中各种TNF超家族亚组和趋化因子mRNA的显著诱导的方法。完成了。在TNF亚组和诱导的趋化因子中观察到相当大的个体间变异性。因为外周血白细胞是抗癌免疫细胞的供应，所以量化血液中适当的TNF配体和趋化因子的离体诱导能力对于个体化癌症的免疫疗法是有用的。如果具有早期隐形转移性病变等的肿瘤块较小，则适当的TNF发作可能足以预防复发。

表 1: 使用したプライマー配列

標的mRNA	プライマー	リボース
TNFRSF-1A	CTTCCAGGAGAACAGAAACA (配列番号2)	GGAGACACACTCGTTTCTCTTAG AA (配列番号3)
TNFRSF-1B	CAAGCCAGCTCCACAATGG (配列番号4)	TGACCGAAAAGGCACATTCTT (配列番号6)
TNFRSF-3	CTCCCGGGCTCTCTACAC (配列番号8)	TCATGGGTGATAAAATTGGTTCTT (配列番号7)
TNFRSF-4	AGGACCTGGTCAGCTCAA (配列番号8)	GCCGACAGCTGGTGCTGTGT (配列番号9)
TNFRSF-5	GCCAAAGAACCAACAATA (配列番号10)	GAAATCTCTGGGAAAATTGAT (配列番号11)
TNFRSF-6	TGGCTCAACTTCATGGAAACA (配列番号12)	CCAAAGATACA AAGATTGGCTTTT T (配列番号13)
TNFRSF-7	CTCCAGGCCTTGTGTTACAG (配列番号14)	GCTCGGTTTTCGGTAATCC (配列番号15)
TNFRSF-8	GGTTGAGGAGCAACACAGATG (配列番号16)	GCTGGTGGTTAAGGTTCTGATG (配列番号17)
TNFRSF-9	CGTCGACTGCGTTCTCTT (配列番号18)	TTCTCCCGCTTTAACAACAG (配列番号19)
TNFRSF-10A	TGAGGACAATGCTCACACGA (配列番号20)	TTGCTGCTCAGAGACGAAAAGTG (配列番号21)
TNFRSF-10B	CTGAGACAGTGCCTCGATGACTTT (配列番号22)	CCATGAGGCCCAACTTCTCT (配列番号23)
TNFRSF-10C	GGAAGTGTAGCAGGTGCCCTAGT (配列番号24)	ACGAAATCTTCAACACACTGGAT AT (配列番号25)
TNFRSF-10D	ATGGACTTACGAGGTTTCGACTTA G (配列番号26)	GGAAAAGAGATGTACAGCTACAG TAGTAAGC (配列番号27)
TNFRSF-11A	GGAAACAGTAACCTCCAGTTCATG T (配列番号28)	GGAGGTCCTGGCTGACGTA (配列番号29)
TNFRSF-11B	TGCCAAACCCAGTGACCAGATC (配列番号30)	AAAGTGTCTTGGTGCCCATTT (配列番号31)
TNFRSF-12A	AGCTTTGGCTTCCAGTGTATCGA G (配列番号32)	GCTCTGGGAGGCGAGAGA (配列番号33)
TNFRSF-14	CAGGGAGCCTCGTCATCGT (配列番号34)	CACCCCTTGGCTTTCTTTCTTT (配列番号35)
TNFRSF-17	GGAGGAAGGGGCAACCAT (配列番号36)	GCAGCTGGCAGGCTCTTG (配列番号37)
TNFRSF-18	AGTTTGGCTTCCAGTGTATCGA (配列番号38)	GCAAGCTGTCCAAAGTTTTGCA (配列番号39)
TNFRSF-25	CTGCTGCGCCCTATCG (配列番号40)	TTCACTCCCTCTCGCATTTT (配列番号41)
TNFRSF-1	CAGCTATCCACCCACACAGATG (配列番号42)	CGAAGGCTCCAAAAGAGACAGT (配列番号43)
TNFRSF-2	CGAAGGCTCCAAAAGAGACAGT (配列番号44)	CAGGCAATGATCCCAAAGT (配列番号45)