

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-60894

(P2009-60894A)

(43) 公開日 平成21年3月26日(2009.3.26)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06 (2006.01)		C 1 2 N	5/00	E 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q	1/02	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/12 (2006.01)		A 6 1 K	35/12	4 C 0 8 7
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P	37/06	
審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 21 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2008-201830 (P2008-201830)	(71) 出願人	503431699
(22) 出願日	平成20年8月5日 (2008.8.5)		アルゴス セラピューティクス, インコ
(62) 分割の表示	特願2002-571855 (P2002-571855)		ーボレイテッド
原出願日	平成14年3月12日 (2002.3.12)		アメリカ合衆国 ノースキャロライナ州
(31) 優先権主張番号	01106033.2		27704, ダーハム, テクノロジー ド
(32) 優先日	平成13年3月12日 (2001.3.12)	(74) 代理人	100092783
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒト血液由来のCD4+CD25+調節T細胞

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】抑制性および/または調節性ヒトCD4+CD25+T細胞、該細胞を増殖させる方法、ならびに該抑制性および/または調節性ヒトCD4+CD25+T細胞および該増殖させたT細胞の調節剤としての使用の提供。

【解決手段】ヒト末梢血から好ましくは適切なモノクローナル抗体によって、および磁性分離または免疫吸着法を用いて単離する、抑制性および/または調節性ヒトCD4+CD25+T細胞。CTLA-4+であり、かつ調節特性を有する、該細胞。T細胞刺激剤または抗原提示細胞を用いて細胞をex vivoおよびin vivoで刺激することを含んでなる、該細胞を増殖させる方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抑制性および / または調節性ヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞。

【請求項 2】

ヒト末梢血から好ましくは適切なモノクローナル抗体によって、および磁性分離または免疫吸着法を用いて単離しうる、請求項 1 に記載の T 細胞。

【請求項 3】

CTL A - 4^+ であり、かつ調節特性を有する、請求項 1 または 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

T 細胞刺激剤または抗原提示細胞を用いて細胞を *ex vivo* および *in vivo* で刺激することを含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の $CD4^+CD25^+$ T 細胞を増殖させる方法。

【請求項 5】

該 T 細胞刺激剤が

(a) スーパーアゴニスト性抗体を含む、抗 $CD3$ および / または抗 $CD28$ リガンド / モノクローナル抗体、

(b) $CD4^+CD25^+$ T 細胞表面上の T 細胞受容体に対する、または T 細胞受容体成分に対するリガンド / 抗体 ; または

(c) 調節 T 細胞の表面に発現された T 細胞受容体に結合する MHC - ペプチド複合体 ; または

(d) ホルボールエステルおよびカルシウムイオノフォア ;

を含む組成物である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

該抗原提示細胞が自己、非自己、人工抗原提示細胞、等から選択される、好ましくは該抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

該 T 細胞刺激剤および該抗原提示細胞が IL - 2 および / または IL - 5、IL - 7 および / または IL - 9、IFN - α および / または IL - 10 と共に用いられる、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載の方法によって得られる、増殖させたヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞。

【請求項 9】

好ましくはパラホルムアルデヒドで *ex vivo* 処理することによって得られる、固定された $CD4^+CD25^+$ 細胞である、請求項 8 に記載の増殖させたヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載のヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞を含む医薬組成物。

【請求項 11】

規制医薬品を調製するための、請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載の $CD4^+CD25^+$ T 細胞の使用。

【請求項 12】

$CD4^+CD25^+$ T 細胞をヒトの血液または他の組織から *ex vivo* または *in vivo* で同定し、モニターしおよび / または除去する方法であって、

(i) T 細胞上の $CD4$ 、および / または $CD25$ 、および / または CTL - A4 ($CD154$) 分子 (*entities*) と特異的に結合する作用物質 / リガンド、好ましくは抗 $CD4$ 、および / または抗 $CD25$ 、および / または抗 CTL - A4 抗体を用いる ; および / または

(ii) 免疫吸着法を用いる ; および / または

10

20

30

40

50

(i i i) 請求項 4 ~ 7 に記載の刺激剤または抗原提示細胞を用いる ;
ことを含む該方法。

【請求項 1 3】

調節性 $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞を *in vivo* で誘導する作用物質を調製するための、好ましくは患者の自己免疫疾患を治療するための作用物質を調製するための、請求項 5 ~ 7 に記載の T 細胞刺激剤または抗原提示細胞の使用。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載の $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞の :

(a) 他の増殖および / または機能的修飾性 (抑制性 / 促進性) / アポトーシス性または抗アポトーシス性因子の同定を可能とするようなアッセイにおける

(b) $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞上の新規分子の同定を含む、 $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞によって発現される分子を同定するため、または製薬的に活性とみなされる分子を提示しているかどうかを同定するため、または

(c) 調節性 $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞の前駆体細胞または子孫を同定するため、の使用。

【請求項 1 5】

養子免疫伝達療法のための作用物質、自己免疫疾患を含むがそれらだけに限定されない、免疫性が増大した疾患を治療するための作用物質、または移植片対宿主病、移植片拒絶、等の移植反応を阻止 / 治療する作用物質を調製するための、請求項 1 ~ 3 に記載の富化された $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞、または請求項 8 に記載の増殖させた T 細胞、または請求項 9 に記載の固定化された T 細胞の使用。

【請求項 1 6】

養子免疫伝達療法のための方法であって、強すぎる、および / または病原性の免疫反応を阻止または治療するため、または移植片対宿主病および移植片拒絶、等の移植反応を阻止 / 治療するために、請求項 1 ~ 3、8 または 9 のいずれかに記載の富化 / 増殖させた自己または非自己の調節性 $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞を患者に注射 / 注入することを含む、該養子免疫伝達療法の方法。

【請求項 1 7】

特定の所望の抗原特異的 T 細胞受容体を用いて $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞を調製する方法であって、

(i) 抗原提示細胞、好ましくは該抗原を提示する未成熟または成熟樹状細胞 (DC) を用いて請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞を *in vitro* または *in vivo* で活性化し / 刺激し / 増殖させる ; または、

(i i) $CD4^{+}CD25^{+}$ 調節 T 細胞 (のサブセット) 上に発現される特定の T 細胞受容体に対するリガンド / 抗体、または $CD4^{+}CD25^{+}T$ 細胞 (のサブセット) 上の特定の T 細胞受容体に結合する MHC - ペプチド複合体を用いる ;

ことを含む該方法。

【請求項 1 8】

該抗原提示細胞が組織または任意の規定されたもしくは規定されない抗原をパルスされ / 負荷され / 供給され、ここで :

(i) 該規定された抗原が、好ましくは自己抗原 (尋常性天疱瘡の場合にはデスモグレイン 3 ; 白斑の場合にはメラニン A またはチロシナーゼ ; 甲状腺炎の場合にはサイログロブリンを含むが、それらだけに限定されない)、外来抗原 (C 型肝炎のような病原体由来抗原を含む)、または同種異系抗原 / 移植抗原であり、かつ

(i i) 該規定されない抗原が、好ましくは組織または細胞由来抗原 (壊死性またはアポトーシス性細胞、または組織由来 RNA、または興味のある細胞と樹状細胞 / 抗原提示細胞とのハイブリッドの形態、規定されない抗原の樹状細胞もしくは他の抗原提示細胞へのデリバリーという他の形態を含むが、それらだけに限定されない) または病原体由来抗原である、

請求項 1 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

特定の所望の抗原特異的 T 細胞受容体を有し、かつ請求項 17 または 18 の方法によって、または所望の抗原特異性を有する T 細胞受容体を単離された又は増殖させた T 細胞に *ex vivo* でトランスフェクションすることによって得られる、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の T 細胞を含む医薬組成物であって、好ましくは該医薬組成物が自己免疫疾患、移植片対宿主病および移植片拒絶を含むがそれらだけに限定されない、免疫性が増大した疾患を治療するのに適する、該医薬組成物。

【請求項 21】

10

抗 $CD25$ および / または抗 CTL - A4 モノクローナル抗体等のリガンド / 抗体、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞 (のサブセット) 上の T 細胞受容体と結合する抗体または MHC - ペプチド複合体または他のリガンドを含むが、それらだけに限定されない T 細胞上の $CD4$ 、および / または $CD25$ および / または CTL - A4 ($CD154$) 分子 (*entities*) と特異的に結合する作用物質の、例えば腫瘍免疫を高めるための $CD4^+CD25^+$ T 細胞による *in vivo* 弱体化調節を含む免疫応答を増強するために $CD4^+CD25^+$ T 細胞を *in vivo* で除去する又はその機能を損傷させる薬剤を調製するための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、抑制性および / または調節性ヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞、該細胞を増殖させる方法、ならびに該抑制性および / または調節性ヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞および対応する増殖させた T 細胞の調節剤としての使用を提供する。

【背景技術】

【0002】

免疫学的自己寛容は、自己免疫の阻止および免疫ホメオスタシスの維持にとって重大である。免疫系が自己と非自己を識別する能力は、中枢および末梢寛容の作用機構によって制御されている。中枢寛容は、発生の初期段階において胸腺中の自己反応性リンパ球の除去をもたらす (Rocha, B. および von Boehmer, H., *Science* 251: 1225 - 1228 (1991); Kisielow, P. ら, *Nature* 333: 742 - 746 (1988))。T 細胞アネルギーおよび非認識を含む、末梢寛容のいくつかの作用機構が記載されている (Rocha, B. および von Boehmer, H., *Science* 251: 1225 - 1228 (1991); Kisielow, P. ら, *Nature* 333: 742 - 746 (1988); Schwartz, R. H., *Science* 248: 1349 - 1356 (1990); Miller, J. F. A. P. および Heath, W. R., *Immunol. Rev.* 133: 131 - 150 (1993))。齧歯類を用いて 10 年以上続けられた研究により、他の寛容作用機構から逃れた自己反応性 T 細胞の活性化およびエフェクター機能の両方を活性かつ優勢に阻止する「プロフェッショナルな」調節 / 抑制 T 細胞というユニークな $CD4^+CD25^+$ 集団が存在するという確かな証拠が提供された (Sakaguchi, S. ら, *J. Immunol.* 155: 1151 - 1164 (1995); Takahashi, T. ら, *Int. Immunol.* 10: 1969 - 1980 (1998); Itoh, M. ら, *J. Immunol.* 162: 5317 - 5326 (1999))。これらの細胞の排除または不活性化は、重篤な自己免疫疾患をもたらし、また同種異系抗原およびさらには腫瘍に対する免疫応答を増大させることが見出された (Sakaguchi, S. ら, *J. Immunol.* 155: 1151 - 1164 (1995); Itoh, M. ら, *J. Immunol.* 162: 5317 - 5326 (1999); Shimizu, J. ら, *J. Immunol.* 163: 5211 - 5218 (1999))。最近の研究では、 $CD4^+CD25^+$ 調節 T 細胞がかなり相同な集団を構成すること (Thor

30

40

50

ton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164: 183 - 190 (2000))、胸腺に由来すること (Itoh, M. ら, J. Immunol. 162: 5317 - 5326 (1999))、本来的にはTCRによる刺激に対して非増殖性 (すなわち、アネルギー性) であるが、抑制性となることおよびCD4⁺またはCD8⁺T細胞の増殖を抑制するためにはTCRを介した活性化が必要であることを明らかにした。しかし、いったん活性化されると、それらの調節/抑制機能は完全に抗原非特異的であり、サイトカイン非依存的で、かつ細胞接触依存的であった (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164: 183 - 190 (2000))。正確な抑制作用機構、特にT-T相互作用に関与する細胞表面および/または近傍の可溶性分子の抑制は、今後の特定を待たなければならない。新しいin vitroのデータによれば、CD4⁺CD25⁺T細胞がレスポンダーのIL-2産生を抑制することによってレスポンダーの増殖を抑制することが示唆されている (Thornton, A. M., Shevach, E. M., J. Exp. Med. 188: 287 - 296 (1998))。最近のin vivo研究によれば、CD4⁺CD25⁺T細胞の機能は、CD4⁺CD25⁺T細胞上に構成的に発現されることが見出されたCTLA-4/CD152分子を介したシグナル伝達に決定的に依存していることが示唆されている (Read, S. ら, J. Exp. Med. 192: 295 - 302 (2000); Salomon, B. ら, Immunity 12: 431 - 440 (2000); Takahashi, T. T. ら, J. Exp. Med. 192: 303 - 310 (2000))。

【0003】

齧歯類においてはCD4⁺CD25⁺T細胞集団が、自然発生性自己免疫疾患の阻止に極めて重大である「プロフェッショナルな」調節/抑制T細胞のユニークな系統を構成することが何年も前から明らかであったが (Sakaguchi, S. ら, J. Immunol. 155: 1151 - 1164 (1995))、類似の機能特性を示すCD4⁺4T細胞がヒトにおいて本来的に存在するかどうかは今日でも知られていない。マウスを例えば抗CD25および/または抗CTLA-4モノクローナル抗体 (mAb) で処理する等によって、マウス中のこれらの細胞をin vivoで除去し、および/またはその機能を損傷すると、種々の自然発生性自己免疫疾患が誘導され、かつ腫瘍の拒絶が誘導される。この作用機構は、これらの細胞の除去/機能損傷により、自己反応性T細胞に対するこれらの負の制御が除去され、その結果これら自己反応性T細胞が活性化する、というものである。養子免疫伝達によってCD4⁺CD25⁺T細胞をこれらの動物に戻してやると、調節が回復され、また自己免疫/腫瘍拒絶が停止する。

【0004】

上記のように、類似の機能特性を示すCD4⁺T細胞がヒトにおいて本来的に存在するかどうかは今日まで全く知られていない。CD4⁺CD25⁺T細胞ではないが、調節特性を有するヒトT細胞の調製は当技術分野で公知である。例えば、Jonuleit, H. ら, J. Exp. Med. 192: 1213 - 1222 (2000) には、未成熟樹状細胞を用いた反復刺激により、ヒト末処置T細胞から調節T細胞が誘導されることが記載されている。この研究の殆どは、真に未処置のT細胞の最も豊富な供給源である臍帯血由来のT細胞を用いて実施された。CD4⁺CD25⁺T細胞は初期の時点からヒト血液中に構成的に検出可能である、ということに注目すべきである。Jonuleitらの対象は本来的に存在する集団ではない。De Jong, P. ら, Int. Immunol. 6: 631 - 638 (1994) は、未処置のCD4⁺T細胞および記憶CD4⁺T細胞に対するTGF-β1の作用を記載している。一次活性化CD45RA⁺CD4⁺T細胞に対する刺激作用とともに差動作用が示される。CD45RO⁺CD4⁺T細胞または二次刺激化CD45RO⁺細胞の増殖は抑制される。CD45RA⁺T細胞の場合は、TGF-βはCD25の蛍光の平均値の増大をもたらす。この文献に記載されている作用は、T細胞の増殖にのみ関連するものである。未処置のTGF-βで処理したT細胞の調節能は示されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

驚くべきことに、 $CD4^+CD25^+$ 、主として $CD45RO^+T$ 細胞($CD4^+T$ 細胞の平均6%) (以下、単に" $CD4^+CD25^+T$ 細胞"という)はヒト血液中、特に成人の健康なボランティアの末梢血に存在する。過去において、この表現型を示すT細胞(すなわち、抑制性/調節性 $CD4^+CD25^+T$ 細胞)は数年前から知られていたが、従来の記憶細胞であると誤って解釈されていた(Kanegane, H.ら, *Int. Immunol.* 3:1349-1356(1991); Taka, K.ら, *Immunol.* 72:15-19(1990); Jackson, A. L.ら, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54:126-133(1990))。以前の報告とは対照的に、ヒト $CD4^+CD25^+T$ 細胞は従来の記憶細胞ではなく、むしろそれら細胞の歯類対応物と同一の機能特性を示す調節細胞である。例えば、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞の*in vivo*抑制活性に必須のCTLA-4($CD152$)は構成的に発現され、そして刺激後、強くアップレギュレーションされたままであった。 $CD4^+CD25^+T$ 細胞は、それらのTCRを介した刺激に対して非増殖性であったが、アネルギー状態はIL-2およびIL-15によって部分的にくつがえされた。同種であるが同系ではない成熟樹状細胞またはプレート結合抗CD3および抗CD28で刺激すると、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞はIL-10を放出した。また、共培養実験においては、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞は $CD4^+$ および $CD8^+T$ 細胞の活性化および増殖を抑制した。抑制はIL-10に依存しないこと、かつマウスにおけるように接触依存性であることが実証された。調節性 $CD4^+CD25^+T$ 細胞の同定は、ヒトにおける寛容の研究のために、特に自己免疫、移植および癌に関連して重大な意味を有する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、以下のものを提供する：

- (1) 抑制性および/または調節性ヒト $CD4^+CD25^+T$ 細胞；
- (2) T細胞刺激剤または抗原提示細胞を用いて細胞を*ex vivo*および*in vivo*で刺激することを含んでなる、上記(1)に記載の $CD4^+CD25^+T$ 細胞を増殖させる方法；
- (3) 上記(2)に記載の方法、好ましくは上記(2)に記載の*ex vivo*法によって得られる、増殖させたヒト $CD4^+CD25^+T$ 細胞；
- (4) 上記(1)または(3)に記載のヒト $CD4^+CD25^+T$ 細胞を含む医薬組成物；
- (5) 規制医薬品を調製するための、上記(1)または(3)に記載のヒト $CD4^+CD25^+T$ 細胞の使用；
- (6) $CD4^+CD25^+T$ 細胞をヒトの血液または他の組織から*ex vivo*または*in vivo*で同定し、モニターし、および/または除去する方法であって、
 - (i) T細胞上のCD4、および/またはCD25、および/またはCTLA-4($CD154$)分子(entities)と特異的に結合する作用物質/リガンド、好ましくは抗CD4、および/または抗CD25、および/または抗CTLA-4抗体を用いる；
 - (ii) 免疫吸着法を用いる；および/または
 - (iii) 上記(2)に記載の刺激剤または抗原提示細胞を用いる；
 ことを含む該方法；
- (7) 調節性 $CD4^+CD25^+T$ 細胞を*in vivo*で誘導する作用物質を調製するための、好ましくは患者の自己免疫疾患を治療するための作用物質を調製するための、上記(2)に記載のT細胞刺激剤または抗原提示細胞の使用；
- (8) 上記(1)または(3)に記載の $CD4^+CD25^+T$ 細胞の、
 - (a) 他の増殖および/または機能的修飾(抑制する/促進する)/アポトーシス性または抗アポトーシス性因子の同定を可能とするようなアッセイにおける
 - (b) $CD4^+CD25^+T$ 細胞上の新規分子の同定を含む、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞に

よって発現される分子を同定するため、または製薬的に活性とみなされる分子を提示しているかどうかを同定するため、または

(c) 調節性 $CD4^+CD25^+$ T 細胞の前駆体細胞または子孫を同定するため、の使用；

(9) 養子免疫伝達療法のための作用物質、自己免疫疾患を含むがそれらだけに限定されない、免疫性が増大した疾患を治療するための作用物質、または移植片対宿主病および移植片拒絶、等の移植反応を阻止／治療する作用物質を調製するための、上記(1)に記載の富化された $CD4^+CD25^+$ T 細胞、または上記(3)に記載の増殖させた T 細胞、または請求項 9 に記載の固定化された T 細胞の使用；

(10) 養子免疫伝達療法の方法であって、強すぎる、および／または病原性の免疫反応を阻止または治療するため、または移植片対宿主病および移植片拒絶、等の移植反応を阻止／治療するために、上記(1)または(3)に記載の富化／増殖させた自己または非自己の調節性 $CD4^+CD25^+$ T 細胞を患者に注射／注入することを含む、該養子免疫伝達療法の方法；

(11) 特定の所望の抗原特異的 T 細胞受容体を用いて $CD4^+CD25^+$ T 細胞を調製する方法であって、

(i) 抗原提示細胞、好ましくは該抗原を提示する未成熟または成熟樹状細胞 (DC) を用いて上記(1)に記載の $CD4^+CD25^+$ T 細胞を *in vitro* または *in vivo* で活性化し／刺激し／増殖させる；または、

(ii) $CD4^+CD25^+$ 調節 T 細胞 (のサブセット) 上に発現される特定の T 細胞受容体に対するリガンド／抗体、または $CD4^+CD25^+$ T 細胞 (のサブセット) 上の特定の T 細胞受容体に結合する MHC - ペプチド複合体を用いる；
ことを含む該方法；

(12) 上記(11)に記載の方法によって、または所望の抗原特異性を有する T 細胞受容体を単離された又は増殖させた T 細胞に *ex vivo* でトランスフェクションすることによって得られる $CD4^+CD25^+$ T 細胞；

(13) 上記(12)に記載の T 細胞を含む医薬組成物であって、好ましくは該医薬組成物が自己免疫疾患、移植片対宿主病および移植片拒絶を含むがそれらだけに限定されない、免疫性が増大した疾患を治療するのに適する、該医薬組成物；および

(14) 抗 $CD25$ および／または抗 CTL - A4 モノクローナル抗体等のリガンド／抗体、 $CD4^+CD25^+$ T 細胞 (のサブセット) 上の T 細胞受容体と結合する抗体または MHC - ペプチド複合体または他のリガンドを含むが、それらだけに限定されない T 細胞上の $CD4$ および／または $CD25$ および／または CTL - A4 ($CD154$) 分子 (entities) と特異的に結合する作用物質の、例えば腫瘍免疫を高めるための $CD4^+CD25^+$ T 細胞による *in vivo* 弱化学調節を含む免疫応答を増強するために $CD4^+CD25^+$ T 細胞を *in vivo* で除去する又はその機能を損傷させる薬剤を調製するための使用。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明の実施形態(1)から(14)を以下に詳細に説明する：

(A) ヒト $CD4^+CD25^+$ T 細胞の表現型の特定により、ヒトの血液または他の組織からこれらの細胞を *ex vivo* (以下、時々「*in vitro*」という)または *in vivo* で同定し、モニターし (例えば、FACS によって)、単離および除去することが可能となる。この単離または除去は、ヒトの血液または他の組織を適切な作用物質と *ex vivo* で接触させることによって達成しうる。適切な作用物質とは、特に抗 $CD4$ 、抗 $CD25$ 、抗 CTL - A4 ($CD154$) 抗体等である。

【0008】

(B) $CD4^+CD25^+$ T 細胞は、適切な T 細胞刺激剤または抗原提示細胞 (以下、「APC」と略す) で処理することによって該細胞を刺激することにより、*ex vivo* で増殖させることができる。上記(2)および(6)に記載の方法に適した適切な T 細胞

10

20

30

40

50

刺激剤としては、以下のものを含む組成物が挙げられる；

(a) スーパーアゴニスト性抗体を含む、抗CD3および/または抗CD28リガンド/モノクローナル抗体(mAb)、

(b) CD4⁺CD25⁺T細胞表面上のT細胞受容体に対する、またはT細胞受容体成分に対するリガンド/抗体；または

(c) 調節T細胞の表面に発現されたT細胞受容体に結合するMHC-ペプチド複合体；または

(d) PMA(および他のホルボールエステル)+イオノマイシン(または他のカルシウムイオノフォア)。

【0009】

本発明に用いる「リガンド」または「リガンド類」という用語は、特定の分子(ポリヌクレオチド、および細胞受容体、CD25、CTL-A4、等のポリペプチドを含む)のに結合可能なあらゆる種類の化合物に関する。好ましいリガンドは、モノクローナル抗体またはそのフラグメントである。「リガンド」および「抗体」という用語は、本出願明細書を通して相互交換可能に用いられる。

【0010】

適切なAPCとしては、自己または非自己または人工の抗原提示細胞(例えば、樹状細胞(樹状細胞の調整については、例えば、WO93/20185、WO97/29182およびEP-A-0 922 758参照)等)が含まれる。該T細胞刺激剤および抗原提示細胞は、IL-2またはIL-15またはそれらの組み合わせと共に用いることができる。IL-2/IL-15の代わりに、いくつかのサイトカイン受容体に共通したγ鎖を用いる他のサイトカイン(IL-7およびIL-9を含むが、これらだけに限定されない)も使用可能である。さらに、他の調節細胞の生成を促進することが知られているIFNαおよびIL-10(Groux, H.ら, Nature 389:737-742(1997); Roncarolo, M.G., J. Exp. Med. 193:F5-F9(2001))もまたこれらの細胞の生成/増殖を促進する。最後に、ポリクローナルなまたはオリゴクローナルな(例えば、スーパー抗原による)T細胞刺激のための他の方法もまた適用可能である(スーパーアゴニスト性抗体を含む抗CD3および/または抗CD28リガンド/抗原; PMA+イオノマイシン; 等)。これらの刺激剤または抗原提示細胞は、当業者にとって周知の量で増殖に使用することができる。

【0011】

(C) CD4⁺CD25⁺T細胞の同定は、例えば、自己免疫疾患と対抗するために調節T細胞を誘導するため、CD4⁺CD25⁺T細胞をin vivoでモニターし、増殖させる(例えば、IL-2+IL-15、IL-10+IFNα等の上記T細胞刺激剤を樹状細胞/抗原提示細胞と共に又は単独で患者に投与することによって)ことも可能とする。

【0012】

(D) 上記(1)または(3)に記載のCD4⁺CD25⁺T細胞または増殖させたCD4⁺CD25⁺T細胞は、in vitroまたはin vivoで(例えば、CD4⁺CD25⁺T細胞を刺激する、または除去する、またはその機能を妨げるために)用いることができる他の増殖および/または機能的修飾(抑制性/促進性)/(アポトーシス性または抗アポトーシス性)因子を同定しうるアッセイに用いることができる。これらのT細胞は、CD4⁺CD25⁺T細胞によって発現される分子を、mAb生成、プロテオミクス、DNAチップ分析、差引きハイブリダイゼーション等の方法による同定にも適する。(特に、(a)「新規な」、すなわち、これまで知られていない分子の同定、または(b)これらの分子が、CD4⁺CD25⁺T細胞をin vitroおよびin vivoで「スイッチオン」または「スイッチオフ」するための新規な刺激性、抑制性またはアポトーシス誘導性薬剤を開発するにあたって、適切な医薬標的構造であるかどうかの同定。)また、これらのT細胞は、調節性CD4⁺CD25⁺T細胞の前駆体細胞または子孫を同定するためにも適している。

10

20

30

40

50

【0013】

(E) 上記(1)または(3)に記載の $CD4^+CD25^+$ T細胞または増殖させた $CD4^+CD25^+$ T細胞は、養子免疫伝達療法に用いることができる。すなわち、あまりに強い、および/または病原性の免疫応答を阻止または治療するために、すなわち最も広い意味における自己免疫(エリテマトーデス、慢性間接リウマチ、多発硬化、尋常性天疱瘡、甲状腺炎、等の古典的自己免疫疾患、ならびに白斑、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、等の病因に少なくとも何らかの自己免疫的側面を含むが、それらだけに限定されない)を治療するために、富化した/増殖させた自己または非自己の調節T細胞を患者に注射/注入するのである。また、これはGVHD(移植片対宿主病)および移植片拒絶、等の移植反応を阻止/治療するためにも行われるものである。

10

【0014】

(F) 上記(1)または(3)に記載の $CD4^+CD25^+$ T細胞または増殖させた $CD4^+CD25^+$ T細胞[ならびに上記(2)に記載の増殖方法、上記(4)に記載の医薬組成物、および上記(5)および(7)から(9)に記載の使用]は、 $CD4^+CD25^+$ T細胞を*in vitro*または*in vivo*で活性化する/刺激する/増殖させるために、特定の所望の抗原特異的TCR(T細胞受容体)を有する $CD4^+CD25^+$ T細胞を生成し/増殖させるため、熟樹状細胞(DC)(または人工細胞を含む他の抗原提示細胞)と共に用いることができる。該樹状細胞または他の抗原提示細胞は、組織または(規定された、もしくは規定されていない)他の任意の抗原をパルスされ/負荷され/供給されるか、またはされない。規定された抗原の例としては、自己抗原(例えば、尋常性天疱瘡の場合にはデスモグレイン(desmoglein)3;白斑の場合にはメラニンAまたはチロシナーゼ;甲状腺炎の場合にはサイログロブリン)または外来抗原(例えば、C型肝炎のような病原体由来抗原を含む)、または同種異系抗原/移植抗原が含まれる。規定されていない抗原としては、組織または細胞由来抗原(例えば、壊死性またはアポトーシス性細胞、または組織由来RNA、または興味のある細胞と樹状細胞/抗原提示細胞とのハイブリッド形態、または規定されない抗原の樹状細胞もしくは他の抗原提示細胞への送達という他の形態)または病原体由来抗原が含まれる。自己または非自己 $CD4^+CD25^+$ T細胞および/または樹状細胞を用いる。

20

【0015】

(G) 上記(14)に記載のT細胞上の $CD4$ および/または $CD25$ および/またはCTL-A4($CD154$)分子(entities)と特異的に結合する作用物質は、免疫応答、例えば、 $CD4^+CD25^+$ T細胞による、腫瘍免疫を高めるための*in vivo*弱体化調節を増大させるために、例えば、抗 $CD25$ および/または抗CTL-A4mAb(未改変の、またはトキシンとコンジュゲート化する等の改変されたmAb)によって、または免疫吸着法によって(血液をカラムに通し、そして $CD4^+CD25^+$ T細胞は該細胞の表面上に発現される分子に対する固相結合抗体、例えば、 $CD25$ によって除去される)、 $CD4^+CD25^+$ T細胞を*in vivo*で除去するため、およびその除去をモニターするために用いることができる。

30

【0016】

(H) 本発明の別の好ましい実施形態においては、上記(3)に記載の増殖させた(すなわち、活性化された) $CD4^+CD25^+$ T細胞(ならびに上記(1)および(12)に記載のT細胞)は固定することができる。そのような固定化T細胞は、(増殖させた)T細胞を適切な固定剤(パラホルムアルデヒドを含むが、それだけに限定されない)を用いて*ex vivo*処理することによって得ることができる。好ましくは、固定化は細胞を0.5から5%(w/w)パラホルムアルデヒド水溶液、最も好ましくは約2%(w/w)パラホルムアルデヒド水溶液に15分から3時間、最も好ましくは1時間懸濁し、その後適切な洗浄工程を実施することによって達成される。

40

【0017】

(I) 上記(5)に記載の薬剤、上記(9)および(14)に記載の作用物質、または上記(10)に記載の方法において使用される $CD4^+CD25^+$ T細胞は、自己または非

50

自己調節T細胞であることができる。非自己調節T細胞の場合、該T細胞は上記(H)に記載するように固定化されることが好ましい。

【0018】

(J)上記(4)および(13)に記載の医薬組成物、上記(5)に記載の薬剤、上記(7)、(9)および(14)に記載の作用物質、および上記(6)、(8)および(10)に記載の方法に用いられるT細胞は、当業者に公知の薬学上/診断上適切な担体、溶剤、希釈剤および添加剤、等のさらなる成分を含んでもよい。これらの成分の濃度は、当業者によってそれぞれの目的に合わせて適切に選択される。

【0019】

過去2～3年の間に齧歯類における数個の調節細胞種(これらの相互関係はまだ最終的に明らかにされていない)がさらに報告されたことにより、サプレッサーまたは免疫調節T細胞という概念は再生した。いわゆるTr1およびTh3細胞は、直接的な細胞接触を必要とせずに、高レベルのIL-10およびTGF-βをそれぞれ分泌することによってバISTアンダー抑制を介在する(Groux, H.ら, Nature 389:737-742(1997); Fukaura, H.ら, J. Clin. Invest. 98:70-77(1996))。調節T細胞集団のうち、これまでに最もよく特定され、そして最も重要と思われる集団のうち、同定された集団はCD4⁺CD25⁺T細胞である。この細胞は齧歯類に本来的に存在し(リンパ器官におけるCD4⁺細胞の約10%に相当する)、CD25(IL-2R-α)の構成発現によって特定され、そしてin vivoにおける寛容の維持および自己免疫疾患の防止に決定的に重要であることが明らかである。驚くべきことに、ヒトにおける等価の特性を示す細胞集団は今日まで報告がない。ここに我々は、従来の記憶T細胞に相当すると考えられていたヒト血液中のCD4⁺CD25⁺T細胞が(Kanegane, H.ら, Int. Immunol. 3:1349-1356(1991); Taka, K.ら, Immunol. 72:15-19(1990); Jackson, A.L.ら, Clin. Immunol. Immunopathol. 54:126-133(1990))、実は、齧歯類において長年にわたって知られ、かつ研究されてきた固有のCD4⁺CD25⁺調節T細胞のヒトにおける対応物であると思われることを示した。我々は、成人血液からかなりの量(CD4⁺細胞の平均6%)のCD4⁺CD25⁺T細胞を単離することができ、詳細な研究およびCD4⁺CD25⁺T細胞との比較を行うことができた。その結果、ヒトCD4⁺CD25⁺T細胞はマウスCD4⁺CD25⁺免疫調節T細胞と重大な表現型および機能的特徴を共有することが判明した。最も興味深く、以前には同定されなかった表現型的特徴は、CTLA-4分子(CD152)がヒトCD4⁺CD25⁺T細胞によってすでに構成的に発現されており(細胞内では高レベルで、表面では低レベルで)、TCRを介した刺激後、さらにアップレギュレーションされ、そしてその後少なくとも1週間は表面で高レベルを維持したことであった(これは、刺激後、de novoにおいてCTLA-4を発現したが、その発現はごく一過性であったCD4⁺CD25⁺T細胞とはっきりとした対照をなす)(Thompson, C.B., Allison, J.P., Immunity, 7:445-450(1998); Chambers, C.A.ら, Immunol. Rev. 153:27-46(1996))。CD4⁺CD25⁺によるCTLA-4の発現パターンは、マウスCD4⁺CD25⁺調節T細胞との関係をすでに裏付けるものであった。なぜなら、後者の細胞はそのin vivo抑制活性に必須の分子としてCTLA-4を構成的に発現するからである(Read, S.ら, J. Exp. Med. 192:295-302(2000); Salomon, B.ら, Immunity, 12:431-440(2000))。マウス対応物と同様に、ヒトCD4⁺CD25⁺T細胞も、プレート結合抗CD3および抗CD28によってポリクローナルな活性化に対しても、その後の最も有効な本来的な免疫刺激細胞、すなわち成熟(同種異系)DCを用いて刺激しても(反復してさえも)、刺激に際してほとんど増殖を示さなかった。これらの刺激を高用量のIL-2(500 U/ml)と組み合わせた場合、マウスについて記載されているようにアネルギーが部分的にくつがえされた(Thornton, A.M., Shevach, E.M., J. Immunol. 158:1105-1111(1997))。

10

20

30

40

50

o l . 1 6 4 : 1 8 3 - 1 9 0 (2 0 0 0)) 。高用量の I L - 1 5 (5 0 - 1 0 0 n g / m l) が匹敵する増殖を誘導したこと、および I L = 2 および I L - 5 を組み合わせた場合の作用は低用量 (それぞれ 1 0 U / m l および 1 0 n g / m l) でも強力な相乗作用を有し、活発な増殖を誘導した、という新たな発見があった。C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞の増殖は、潜在的な治療の適用および更に詳細な研究 (作用機構および分子的研究を含む) のためのこれらの細胞のクローニングに不可欠であるため、上記の発見が重要であることが判明するであろう。興味深いのは、中和性抗 I L - 1 0 m A b が増殖を促進しなかったことで、これらの細胞による I L - 1 0 放出が自己分泌様式においてアレルギーを引き起こしていないことが示された。共培養実験において、C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞は別の重要な特徴を示した。すなわち、これらの細胞は自身の T C R を介して活性化された後にのみ、接触および用量依存的で、かつサイトカイン非依存的に、C D 2 5 ⁺ C D 4 ⁺ または C D 8 ⁺ T 細胞の増殖を抑制した。我々の e x v i v o 系では、この抑制が最近 T C R トランスジェニックマウスを用いて示されたように (Thorton, A. M., Shevach, E. M., J. Immunol. 164: 183 - 190 (2000))、完全に抗原非特異的なものかどうか調べることはできなかった。しかし、これらの細胞を増殖させるための我々の I L - 2 + I L - 1 5 アプローチを用いれば、個々の作用機構研究は可能であろう。

注目すべきことは、我々がヒト血液から e x v i v o で単離した C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞と実質的に同一の調節特性および表現型を有する T 細胞が、未成熟 D C を用いてヒトの未処置 T 細胞を反復刺激することによって i n v i t r o で作製できると示した最近の報告である (Jonuleit, H. ら, J. Exp. Med. 192: 1213 - 1222 (2000))。マウスにおいては、C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ 調節 T 細胞集団は胸腺でたえず作られているが (Itoh, M. ら, J. Immunol. 162: 5317 - 5326 (1999))、末梢における調節 T 細胞の維持には組織特異抗原および I L - 2 の存在が必要である (25, 26)。2つの他の発見 (Jonuleit, H. ら, J. Exp. Med. 192: 1213 - 1222 (2000)) に基づいて、アポトーシス性抗体の摂取を介して末梢組織をサンプリングした未成熟 D C (Steinman, R. M. ら, J. Exp. Med. 191: 411 - 416 (2000); Roncarolo, M. G., J. Exp. Med. 193: F5 - F9 (2001)) および最近の普遍的又は組織特異的な自己抗原が、胸腺調節 T 細胞の移動における生存およびおそらく増殖程度がわずかなであることの原因であると確かに推測しがちである。E x v i v o で単離された C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ 調節 T 細胞の生存は未成熟 D C との相互作用によって促進されうと思われる。また、最近報告された、未成熟 D C による未処置 T 細胞からの C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞の i n v i t r o 「生成」は (Jonuleit, H. ら, J. Exp. Med. 192: 1213 - 1222 (2000))、むしろ最初の接種物中にあらかじめ存在している C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ が持続的に生存していることを表すものと思われる。同種異系の成熟 D C は調節の有効なインデューサーであったが、e x v i v o で単離されたヒト C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞と同遺伝子型成熟 D C との相互作用は、それらの抑制特性を活性化するには不十分であることが見出されたことにもまた注目すべきである。この観察は、検証可能な仮説を再度示唆する。例えば、成熟同系 D C に対して未成熟な同系 D C は C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞を活性化するか (それらが相互作用のための何らかの特異的リガンドを担持することを示唆する)、または上記 D C はアポトーシス体の摂取後にのみ、その活性化を行うか (自己抗原の提示が必要であることを示唆する)? さらに、ごくわずかのリコール抗原 (例: インフルエンザタンパク質 / ペプチド) を提示する成熟 D C は、C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞集団および C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞集団の両方で T 細胞を刺激できるか (自己抗原の他に外来抗原の認識も炎症部位において調節の引き金をひきうること示唆する)。

【0020】

要約すれば、健常なヒト成人の末梢血中に、かなり大きい集団 (約 6 %) の C D 4 ⁺ C D 2 5 ⁺ T 細胞が存在することが示された。以前に考えられていたのとは対照的に、これ

らの細胞は従来の記憶T細胞ではなく、齧歯類において多年にわたって研究されてきた $CD4^+CD25^-$ 「プロフェッショナル」抑制/調節T細胞のユニークな集団と同等な調節T細胞である。ヒト $CD4^+CD25^+$ 調節T細胞の同定および特定は、種々の病態におけるそれらのモニタリングを可能とし、そして自己免疫、移植片拒絶、および癌を理解し、治療するうえで重大な意味がある。

【0021】

本発明を以下の図および実施例によってさらに詳しく説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0022】

図

図1： $CD4^+CD25^+$ T細胞は、 $CD4^+CD25^-$ T細胞に対して明確な表現型の相違を示す。陰性MACSソーティングによってPBMCから $CD4^+$ T細胞を単離し、高度に精製された未処置 $CD4^+$ T細胞を得た。これらの細胞を抗 $CD25$ 磁性ビーズで標識し、ソーティングした。

(A)：ソーティングにより実質的に純粋な $CD25^+$ T細胞が得られた。20回の独立した、標準化された実験の代表的な結果を示す。

(B)： $CD4^+CD25^+$ 、 $CD4^+CD25^-$ および活性化 $CD4^+CD25^-$ T細胞の表現型を「材料および方法」の項に記載するように分析した。さらに、固定化抗 $CD3$ +可溶性抗 $CD28$ を用いて $CD4^+CD25^-$ T細胞を活性化した。活性化後、細胞を抗 $CD25$ 磁性ビーズで標識し、ソーティングした。5つの独立した実験で、結果は類似していた。

(C)：抗CTLA-4抗体を用いて $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を37℃で2時間染色した。染色はex vivoで、そして固定化抗 $CD3$ +可溶性抗 $CD28$ を用いた活性化の後の異なる時点で実施した。4つの独立した実験の代表的結果を示す。

【0023】

図2： $CD4^+CD25^+$ T細胞は、同種異系刺激およびポリクローナルな刺激の両方に対して非増殖性/アネルギー性である。これはIL-2および/またはIL-15の添加によって部分的にくつがえされるが、中和性抗IL-10抗体によってはくつがえされない。

(A)： $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を図1に示すMACSソーティングによって成人血液から単離した。T細胞 1×10^5 個/96ウェルを異なる数の成熟同種異系DCで刺激した。T細胞の増殖(3つの培養物)を $[^3H]$ Tdr取り込みによって測定した。6つの独立した実験において結果は類似していた。

(B)：全 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を上記(A)に記載するように処理した。3つの培養物における増殖を $[^3H]$ Tdr取り込みによって測定した(5つの独立した実験の代表的結果)。

(C)：MACSソーティングを行った $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞をプライミングし、同ドナー由来の成熟同種異系DCで毎週再刺激した(DC:T細胞比は1:20)。増殖(T細胞 1×10^5 個/96ウェル)を $[^3H]$ Tdr取り込みによって測定した。3つの独立した実験において類似の結果が得られた。

(D)：固定化抗 $CD3$ ($10 \mu g/ml$)および可溶性抗 $CD28$ ($10 \mu g/ml$)を用いて(上のパネル)、または成熟同種異系DCを用いて上記(A)に記載するように(下のパネル)、 $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-$ T細胞を刺激した。 $500 U/ml$ のIL-2、 $100 ng/ml$ のIL-15、 $10 U/ml$ のIL-2 + $1 ng/ml$ のIL-15の混合物、または $10 \mu g/ml$ の抗IL-10を培養開始時に添加した。培養開始の5日後に $[^3H]$ Tdr取り込みを測定した。3つの独立した実験のうち1つを示す。ポリクローナルなまたは同種異系T細胞刺激物の不存在下でのIL-2および/またはIL-15の添加は、 $CD25^+$ または $CD25^-$ T細胞サブセットにおいて著しい増殖を誘導しなかった(データはここに示していない)。

10

20

30

40

50

【0024】

図3：TCRによって刺激された場合、CD4⁺CD25⁺T細胞はCD4⁺およびCD8⁺T細胞の活性化を細胞接触および用量依存的に抑制する。

(A, B)：MACSソーティングを行った全CD4⁺(A)およびCD8⁺(B)T細胞(1×10⁵個/96ウェル)を図に示した比でCD4⁺CD25⁺T細胞に添加し、そしてDC対CD4⁺またはCD8⁺T細胞の比を1:20として同種異系DCで刺激した。5日後に[³H]Tdr取り込みによって増殖を測定した。5つの独立した実験のうち1つを示す。

(C)：同一ドナー(ドナーI)からDCおよびCD4⁺CD25⁺T細胞を生成させ/単離した。さらに、別のドナー(ドナーII)から全CD4⁺T細胞およびCD4⁺CD25⁺T細胞を単離した。全CD4⁺T細胞10⁵個/96ウェルをDC細胞5×10³個/ウェルと共に培養した(すなわち、DC:T比=1:20;結果はDC:T比が1:100の場合(データはここに示していない)に匹敵した)。次に、ドナーIおよびドナーII由来のCD4⁺CD25⁺T細胞をそれぞれ添加した。培養開始から5日後に[³H]Tdr取り込みによって増殖を測定した。3つの独立した実験の代表的な結果を示す。

(D)：全CD4⁺T細胞またはCD4⁺CD25⁺T細胞(T細胞10⁵個/96ウェル)を5×10³個の同種異系成熟DCで刺激した(DC:T比=1:20)(上の2つのパネル)。さらに、全CD4⁺T細胞を1:1の比でCD4⁺CD25⁺T細胞と共に共培養し(T細胞10⁵個/96ウェルのそれぞれ)、そして10μg/mlの抗IL-10、2μg/mlのTGF-β、500U/mlのIL-2、50ng/mlのIL-15、または10U/mlのIL-2と1ng/mlのIL-15との混合物の存在下または不存在下で、DC:T比を1:20として同種異系DCを用いて再度刺激した。平行して行ったTranswellアプローチでは、同種異系DCを用いてTranswellチェンバー内でCD4⁺CD25⁺T細胞を刺激し(DC/T細胞比は1:20)、そして全CD4⁺T細胞レスポンドを同種異系DCと共にDC:T比=1:20で再度ウェルに入れた。培養開始から5日後に[³H]Tdr取り込みによって増殖を測定した。4つの代表的実験のうち1つを示す。

【0025】

図4：CD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞の異なるサイトカインプロファイル。

(A)：MACSソーティングを行ったCD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞をPMA(20ng/ml)およびA23187Ca²⁺イオノフォア(500μg/ml)で6時間刺激した。最後の5時間の間、モノニン(Monensin)(2μM)を添加した。CD3表面発現の染色を実施した。細胞を洗浄し、固定し、透過性とし、そして細胞内サイトカインの検出のためFITC-またはPE-結合特定抗体を用いて染色した。類似の結果が得られた5つの独立した実験のうち1つを示す。結果は、T細胞をプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28ABで刺激した場合(データはここに示していない)と同じであった。

(B)：CD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞をプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28で活性化した。培養開始48時間後に、RNAseプロテクションアッセイによりRNA発現の分析を実施した。

(C)：上清中のサイトカインをELISAによって測定した(5つの独立した実験のうち1つを示す)。

【0026】

材料および方法

培養培地：1%熱不活化自己血漿、20μg/mlゲンタマイシン(Merck)および2mMグルタミン(BioWhittaker)を補充したRPMI 1640(BioWhittaker)を樹状細胞(DC)の作製に用いた;1%熱不活化単一ドナーヒト血清、20μg/mlゲンタマイシン(Merck)および2mMグルタミン(BioWhittaker)を補充したX-VIVO-20(BioWhittaker)

er) を T 細胞培養に用いた。

サイトカイン：この実験に用いた全てのサイトカインは組み換えヒトタンパク質であった。最終濃度は、GM-CSF 1,000 U/ml (LeukomaxTM; Novartis)、IL-4 800 U/ml (Sandoz) であった。IL-2 (Proleukin; Chiron Corp.) および IL-15 (PeproTech) は、指示した濃度で使用した。DC を成熟させるため、我々は IL-1 β 2 ng/ml (Sigma); IL-6 1000 U/ml (Sandoz); TNF- α 10 ng/ml (Bender, Vienna) および PGE₂ 1 μ g/ml (Sigma) からなるカクテルを用いた。

抗体：免疫染色のため、CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD19、CD25、CD28、CD45RA、CD45RO、CD56、CD62L、CD80、CD83、CD86、CD95、CD95L、CD122、CD152、CD154、HLA-DR に対する PE- および FITC- 結合抗体 (Ab) (すべて BD Pharmingen 製)、ならびにそれぞれのマウスおよびラットイソタイプ対照を用いた。細胞内サイトカイン染色に用いた Ab は、FITC- および PE- 結合抗 IL-2 (MQ1-17H12)、抗 IL-4 (8D4-8)、抗 IL-10 (JES3-19F1) および抗 IFN- γ (4S.B3) (すべて BD Pharmingen 製) であった。未結合抗 IL-10 (JES3-19F1) (Pharmingen) および抗 TGF- β (R&D Systems) を中和実験に使用し、抗 CD3 (UCHT1) および抗 CD28 (CD28.2) を T 細胞のポリクローナルな活性化に用いた。

サイトカインアッセイ：X-VIVO-20 + 1% 血清中で、T 細胞を同種異系 DC またはプレート結合抗 CD3 (10 μ g/ml) + 可溶性抗 CD28 (10 μ g/ml) で刺激した。ヒト IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ および TGF- β 用の市販の ELISA キット (BD Pharmingen) を用いた上清の分析によって、異なる時点で、サイトカイン分析を実施した。細胞内サイトカイン産生を分析するため、T 細胞を PMA (20 ng/ml) および Ca²⁺イオノフォア A23187 (500 μ g/ml) (ともに Sigma 製) で 6 時間、またはプレート結合抗 CD3 および可溶性抗 CD28 Ab で 6 時間刺激した。培養の最後の 5 時間の間、モネンシン 2 μ M (Sigma) を添加した。細胞を回収し、洗浄し、固定し、サボニンで透過性とし (Fix/per m 溶液、BD Pharmingen)、そしてサイトカイン特異的 Ab またはイソタイプで染色した。サイトカイン mRNA 分析のためには、T 細胞をプレート結合抗 CD3 および可溶性抗 CD28 Ab で刺激した。RNase プロテクションアッセイテンプレートセット (BD Pharmingen) によって細胞を分析した。

細胞単離および DC 作製：DC は、軟膜または白血球採血物 (両方とも Department of Transfusion Medicine より入手。インフォームドコンセントが与えられた後に健常なドナーから得たもの) から文献に記載されているように作製した (18、19)。すなわち、フィコール密度勾配遠心分離により PBMC を単離した。プラスチック接着によって単球を単離し、そして IL-4 および GM-CSF を補充した RPMI 培地で培養した。6 日目に成熟カクテル (IL-1 β 、IL-6、PGE₂ および TNF α) を添加した。7 日目に非接着性細胞を回収し、共刺激分子 (CD80、CD86 および CD83) について 90% 以上二重陽性である成熟 DC を構成した。

陰性 CD4⁺T 細胞単離セット (Miltenyi Biotec) を用いて PBMC から CD4⁺T 細胞を単離した。CD25 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、純粋な未処置 CD4⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺T 細胞を単離した。CD8⁺T 細胞の単離は、陰性 CD8⁺T 細胞単離セット (Miltenyi Biotec) を用いて実施した。FACS によって純度を評価した。

フローサイトメトリー分析：免疫蛍光染色のため、細胞を洗浄し、各抗体の最適希釈物を 20 分間 4 で染色した。細胞を再度洗浄し、フローサイトメトリーで分析した (FACS ScanTM CELL QuestTM ソフトウェア; Becton Dickinson)。細胞表面 CD152 発現の分析のため、細胞を適切な抗体を 2 時間 37 で染色し

10

20

30

40

50

た。

増殖アッセイ：異なるCD4⁺サブタイプの増殖を評価するため、ソーティングしたT細胞10⁵個をX-VIVO-20中で異なる数のDCと共に、または異なる濃度のプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28と共に、96ウエルプレートを用いてインキュベートした。調節特性を評価するためには、10⁵個のバルクCD4⁺T細胞を96ウエルプレート中で5×10³個（いくつかの実験では1×10³個）のDCと共に培養した。精製CD4⁺CD25⁺またはCD4⁺CD25⁻T細胞を異なる濃度で添加した。4-5日培養した後、[³H]Tdr（37KBq/ウエル）を添加し、さらに16時間培養した。液体シンチレーションカウンターを用いて増殖を測定した。

Transwell実験：24ウエルプレートを用いてTranswell実験を実施した。10⁶個のバルクCD4⁺T細胞を5×10³個のDCで刺激した。さらに、10⁶個のCD4⁺CD25⁺またはCD4⁺CD25⁻T細胞を培養物に直接添加するか、またはTranswellチェンバー（Millicell, 0.4μm: Millicipore）に入れた。5日間培養後、T細胞を96ウエルプレート3枚に移した（10⁵個/ウエル）。[³H]Tdrで16時間パルスした後、液体シンチレーションカウンターを用いて増殖を測定した。

【実施例】

【0027】

実施例1：CD4⁺CD25⁺T細胞は、同種異系およびポリクローナルな刺激の両方に対して増殖応答が低い。

増殖可能性が低いことは、マウス系において十分特定された調節性CD4⁺CD25⁺T細胞に高度に特徴的である（Sakaguchi, S.ら, J. Immunol., 155: 1151-1164 (1995)）。ヒトCD4⁺亜集団の増殖能を分析するため、CD4⁺T細胞をCD25の発現について磁性によりソーティングした。MACS CD4陰性選択キットを用い、その後でCD25について陽性選択を用いることによって、CD4⁺CD25⁺T細胞の95%以上純粋な集団を得た（図1A）。これらの細胞は、我々が試験した健常な成人の血液中の末梢CD4⁺T細胞の約6%（2.8-17.2%, n=20）を構成していた。

成熟DCは最も強力な抗原提示細胞として知られている（Banchereau, J., Steinman, R. M., Nature 392: 245-252 (1998)）。しかし、CD4⁺CD25⁺T細胞は十分成熟した同種異系DCでin vitroで刺激された場合、増殖応答を実質的にまったく示さなかった。これはCD4⁺CD25⁻T細胞（図2A、B）または全CD4⁺集団（図2B）とはっきりとした対照をなした。興味深いことに、CD25⁺T細胞を枯渇させたCD4⁺集団は、同種異系DCで刺激された場合、全CD4⁺集団よりも高い増殖を示した（図2B）。

次に、CD4⁺CD25⁺T細胞は成熟DCで反復刺激した場合にのみ増殖するのかどうかを確認した。再刺激後、CD25⁻T細胞の増殖応答は幾分増大したが、CD25⁺T細胞の応答は非常に低いままであった（図2C）。同種異系成熟DCによるプライミングおよび再刺激は、再刺激の2ラウンド終了後にCD25⁻集団の30から50倍の増大をもたらした。対照的に、CD25⁺集団には著しい増大は見られなかった（データはここに示していない）。最初の接種物と比較すると絶対数が軽度（約10%）に低下したCD4⁺CD25⁺T細胞が、反復刺激後に、著しいアポトーシスまたは壊死が明らかに存在しない状態で回収された（データはここに示していない）。

CD4⁺CD25⁺T細胞の増殖応答が非常に低いことは、これらの細胞集団をプレート結合抗CD3+可溶性抗CD28でポリクローナルに刺激した場合にも明らかであった（図2D）。T細胞増殖因子であるIL-2およびIL-15が増殖可能性に影響を及ぼさるかどうかを試験するため、種々の用量をCD4⁺CD25⁺およびCD4⁺CD25⁻T細胞に添加し、これらの細胞を固定化抗CD3+可溶性抗CD28（図2D、上のパネル）または成熟同種異系DC（図2D、下のパネル）で刺激した。一連の予備実験は、高用量（100-1000 U/ml）の場合にのみIL-2がCD25⁺T細胞の増殖を促進

10

20

30

40

50

することを明らかにした。IL - 15 は、50 - 100 ng / ml という非常に高い用量でのみ類似の効果を有した。これらのサイトカインを混合した場合、それらは強い相乗効果を有し、10 U / ml の IL - 2 および 10 ng / ml の IL - 15 という用量が CD 4⁺CD 25⁺T 細胞の増殖を促進するに十分であった。ポリクローナルまたは同種異系 T 細胞刺激がない状態で IL - 2 および / または IL - 15 を添加しても、CD 25⁺または CD 25⁻T 細胞サブセットの顕著な増殖は誘導されなかった（データはここに示していない）。

【0028】

実施例 2：CD 4⁺CD 25⁺T 細胞は、CD 4⁺CD 25⁻T 細胞に対して明確な表現型的相違を示す。

CD 4⁺CD 25⁺T 細胞集団をさらに特定するため、CD 4⁺CD 25⁺および CD 4⁺CD 25⁻上の種々の表面分子の発現を、刺激した CD 4⁺CD 25⁻T 細胞上の分子の発現と比較した（図 1 B）。3 つの集団の全てが CD 3 および CD 4 の相同発現を示した。FACS 分析の結果、単球、B 細胞、CD 8⁺T 細胞または NK 細胞等の細胞の混入は全く見られなかった（データはここに示していない）。予め刺激しない場合、すなわち *ex vivo* で CD 25⁺集団はすでに細胞内で高レベルにおよび細胞表面 CTLA - 4（CD 152）で低レベルに発現していた。*Ex vivo* で単離された CD 4⁺CD 25⁺T 細胞はさらに CD 122（IL - 2 R β 鎖）および HLA - DR（約 50 %）を構成的に発現し、そして主として（約 80 %）記憶 T 細胞表現型に類似した CD 45 RO 細胞から成っていた。きわめて対照的に、*ex vivo* で単離された CD 4⁺CD 25⁻T 細胞は、CTLA - 4（細胞内にも表面上にも）、CD 122 または HLA - DR を発現せず、CD 45 RO よりも CD 45 RA を発現する細胞の方が多かった。しかし、プレート結合抗 CD 3 + 可溶性抗 CD 28 で活性化した後、ほとんどの CD 4⁺CD 25⁻は強く CD 25⁺となり（CD 25 の発現レベルは CD 4⁺CD 25⁺T 細胞と比較して約 1 対数分だけ高かった）、そして予想通り、高レベルの HLA - DR および CD 122 を示した（ここでも CD 4⁺CD 25⁺T 細胞と比較して約 1 対数分だけ高かった）。さらに、細胞内および表面 CTLA - 4 の両者は、24 - 48 時間以内にアップレギュレーションされたが、予想通りその後急速にダウンレギュレーションされた（図 1 C）。CTLA - 4 / CD 152 発現の速度論は、CD 4⁺CD 25⁺T 細胞が刺激された場合は顕著に異なることが判明した。これらの細胞もまた（わずかとはいえ構成的にすでに存在している）CD 152 表面発現をアップレギュレーションし、CD 152 の発現は、強度に 1 週間以上にわたって一定を保たれた（図 1 C）。抗 CD 28、CD 62 L、CD 69、CD 95、CD 95 L、CD 154（CD 40 L）等のいくつかの他の mAb を用いた染色では、CD 4⁺CD 25⁺と CD 4⁺CD 25⁻T 細胞との間で再現性はなく、著しい相違も明らかにされなかった。

【0029】

実施例 3：CD 4⁺CD 25⁺T 細胞は、TCR を介して刺激された場合、CD 4⁺および CD 8⁺T 細胞の活性化を細胞接触依存のおよび用量依存的に抑制する。

CD 25⁺T 細胞の推定上の調節特性を分析するため、共培養実験を実施した。最初の一連の試験で、我々は特定のドナーから全 CD 4⁺集団ならびに CD 25⁺および CD 25⁻画分を単離した。次に、全 CD 4⁺T 細胞を CD 4⁺CD 25⁺または CD 4⁺CD 25⁻T 細胞亜集団と指示された比で混合し、同種異系成熟 DC で刺激した（図 3 A）。CD 4⁺CD 25⁺T 細胞は全 CD 4⁺T 細胞の増殖を著しい程度に抑制し、そして 1 : 1 の比では増殖を実質的にブロックした（cpm は CD 25⁺T 細胞増殖のバックグラウンドレベルを表す；図 2 A - D 参照）。CD 25⁺T 細胞の代わりに CD 25⁻T 細胞を添加すると、増殖がわずかに増大した（データはここに示していない）。CD 4⁺CD 25⁻はポリクローナルに（図 1 B 参照）または同種異系 DC によって（データはここに示していない）刺激されると迅速に CD 25 および CD 122（すなわち、IL - 2 R の両方の鎖）を発現するので、この所見は CD 4⁺CD 25⁺T 細胞サブセットの抑制活性が単に IL - 2 の消費または IL - 2 R を介したその受動的吸着によるものではないことを示した。CD 4

10

20

30

40

50

$CD4^+CD25^+$ T細胞はまた、ダウンレギュレーションの強さはより小さいが、全 $CD4^+$ T細胞に対して抑制活性を発揮した(図3B)。

さらなる1組の実験において、同遺伝子型DCによる $CD4^+CD25^+$ T細胞の活性化は、それらの調節特性の誘導にとって十分かどうかを確認した。この目的のため、同一ドナー(ドナーI)から成熟DCおよび $CD4^+CD25^+$ T細胞を生成させ/単離した。さらに、別のドナー(ドナーII)から全 $CD4^+$ T細胞および $CD4^+CD25^+$ T細胞サブセットを単離した。次に、全 $CD4^+$ T細胞(ドナーII)を、ドナーIまたはドナーIIから単離した種々の数の $CD4^+CD25^+$ T細胞の不存在下(図3C、 $CD4^+$ のみ)または存在下で、同種異系成熟DC(ドナーI)で刺激した(図3C)。ドナーII由来の全 $CD4^+$ T細胞は、同種異系のドナーI由来DCで刺激した場合、予想通り活発に増殖した(図3C、 $CD4^+$ のみ)。ドナーI由来 $CD4^+CD25^+$ T細胞(すなわち、用いたDCに対して同遺伝子型)の存在下では、全ドナーII由来 $CD4^+$ T細胞の増殖(すなわち、同種反応性)は全く抑制されなかった(図3C)。しかし、ドナーII由来 $CD4^+CD25^+$ T細胞(すなわち、用いたDCに対して同種異系)が添加されると強度の抑制が起こった(図3C)。DC、全 $CD4^+$ T細胞および $CD4^+CD25^+$ T細胞が3人の異なるドナーに由来する実験においても、抑制が観察された。これらのデータは、 $CD4^+CD25^+$ T細胞のTCR媒介性活性化は、それらの細胞に調節機能を発揮させるために必要であること、および同遺伝子型DCは $CD4^+CD25^+$ T細胞の抑制活性を誘導するには不十分であることを示した。

次に、Transwellチェンバー実験を実施して、 $CD4^+CD25^+$ T細胞の調節機能が主として可溶性因子によって媒介されるかどうか、また細胞-細胞接触を必要とするかどうかを調べた(図3D)。図3Dに示すように、 $CD4^+CD25^+$ T細胞は同種異系DCの存在下で全 $CD4^+$ T細胞の増殖をほぼ完全に抑制する。Transwellチェンバーを用いた上記2つの集団の分離は、 $CD4^+CD25^+$ T細胞の抑制作用を実質的に排除した。これらの観察は、 $CD4^+CD25^+$ T細胞の抑制能にとって直接的な細胞接触が必須であることを示唆した。なぜなら、Transwellチェンバーの半透過膜は可溶性因子は自由に通過できるが、直接的な細胞接触は回避されるからである。またTranswell実験により、 $CD4^+CD25^+$ T細胞によるIL-2の消費は抑制に関与する作用機構ではないことが確認された。

【0030】

調節細胞と応答細胞の間の密接な相互作用が必要であることは自明であるにもかかわらず、抗原提示DCのターゲティングも可溶性因子の役割もTranswell実験によって排除されなかった。したがって、プレート結合抗CD3Ab(と可溶性抗CD28Abとの組み合わせ)もまた、抗原提示細胞非依存性およびポリクローナル性T細胞刺激物として用いられた。これで刺激すると、全 $CD4^+$ T細胞のみが強い増殖を示した。上記のように(図2D)、 $CD4^+CD25^+$ T細胞は増殖しなかった。両集団の共培養においては、比が1:1の場合、対照と比較して少なくとも75%の低下が見られた(データはここに示していない)。これらのデータは、主として調節はAPC機能の調節を介して起こるのではないことを示唆していた。サイトカインIL-10およびTGF- β (それぞれいわゆるTr1およびTh3の抑制活性にとって決定的)(Groux, H.ら, Nature 389:737-742(1997); Fukaura, H.ら, J. Clin. Invest., 98:70-77(1996))に対する中和抗体は、 $CD4^+CD25^+$ T細胞の調節活性を排除しなかった。このことは、これらのサイトカインが少なくとも我々が実施したアッセイの中では何ら重要な抑制的役割を果たしていないことを示している。共培養物に $CD4^+CD25^+$ T細胞の増殖を促進する高用量でIL-2および/またはIL-15を添加すると(図2D参照)、それらの細胞の抑制作用が低下した。しかし、抑制活性は排除されなかったように思われる。データを解釈する際には、 $CD4^+CD25^+$ T細胞の著しい程度の増殖を考慮に入れなければならないからである(図3D)。

【0031】

実施例 4 : $CD4^+CD25^+T$ 細胞は $IL-10$ を優勢に分泌する。

サイトカインプロファイル进行分析し、比較するため、新たにソーティングした $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-T$ 細胞をプレート結合抗 $CD3$ + 抗 $CD28$ で活性化した。次に上清を $ELISA$ によって分析し、そして RNA 発現を $RT-PCR$ プロテクションアッセイによって分析した。さらに、細胞内サイトカインの染色を実施して、特定のサイトカインを放出する細胞の百分率を測定した。図 4 に示すように、 $CD4^+CD25^-T$ 細胞は $IFN-\gamma$ および $IL-2$ を優勢に分泌し、 $IL-10$ および $IL-4$ はほとんど分泌せず、 $Th1$ 様プロファイルに似ていた。他方、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞は $IL-10$ を優勢に産生し、 $IL-2$ 、 $IL-4$ および $IFN-\gamma$ は低レベルで産生するのみであり、 $Tr1$ 細胞に類似していた。 RNA レベルにおける両亜集団の比較は、 $CD25^-T$ 細胞と比較して $CD25^+T$ 細胞がより多い $IL-10$ 、より少ない $IFN-\gamma$ および類似したレベルの $IL-2$ $mRNA$ を発現することを明らかにした。 $IL-1$ 受容体アンタゴニスト ($IL-1Ra$) $mRNA$ は $CD4^+CD25^+T$ 細胞中に優勢に見出されたが、他方、著しいレベルの $IL-1\beta$ $mRNA$ は $CD4^+CD25^-T$ 細胞にのみ存在した。 $TGF-\beta$ は、両方の細胞種において類似の低レベルで発現されていた。

【0032】

実施例 5 : 活性化し、その後固定した $CD4^+CD25^+T$ 細胞はなお調節能を示す。

$MACS^{TM}$ ソーティングによって、成人血液由来の全 $CD4^+T$ 細胞から $CD4^+CD25^-$ および $CD4^+CD25^+T$ 細胞を単離した。 $CD4^+CD25^+T$ 細胞を 3 つの部分に分割した。1 つの画分は $10\mu g/ml$ のプレート結合抗 $CD3$ 抗体 + $10\mu g/ml$ の可溶性抗 $CD28$ 抗体を用いて一晩活性化した。翌日、この画分および非活性化 $CD4^+CD25^+T$ 細胞の 1 部を 2 %ホルムアルデヒドで 1 時間固定した。3 つ目の画分は未処理のままにした。細胞を 3 回洗浄した。

未固定 $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-T$ 細胞を単独で、ならびに $CD4^+CD25^-T$ 細胞と 1 : 1 の比で混合した $CD4^+CD25^+T$ 細胞の各画分を固定化抗 $CD3$ および可溶性抗 $CD28$ で活性化した。5 日後、 $[^3H]$ Tdr 取り込みによって増殖を測定した。5 つの独立した実験のうち代表的なものを図 5 に示す。図中、記号は以下のものを表す：

$CD4^+CD25^-$ 未固定 $CD4^+CD25^-$ 細胞

$CD4^+CD25^+$ 未固定 $CD4^+CD25^+$ 細胞

Reg. 1 : 1 未固定 $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-T$ 細胞、比 1 : 1

Reg. 1 : 1

$CD25 + stim$ fix 活性化、固定化 $CD4^+CD25^+T$ 細胞および未固定 $CD4^+CD25^-T$ 細胞、比 1 : 1

Reg. 1 : 1

$CD25 + fix$ 非活性化、固定化 $CD4^+CD25^+T$ 細胞および未固定 $CD4^+CD25^-T$ 細胞、比 1 : 1

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図 1】 $CD4^+CD25^-T$ 細胞と比較した、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞が明確な表現型の相違を示すことを示す。

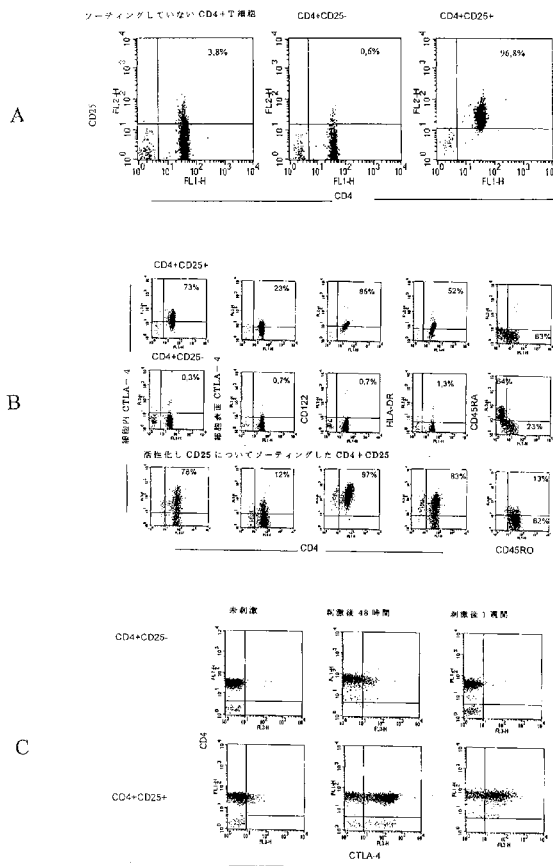
【図 2】 $CD4^+CD25^+T$ 細胞が同種異系およびポリクローナルな刺激の両方に対して非増殖性 / アネルギー性であることを示す。これは $IL-2$ および / または $IL-15$ の添加によって部分的にくつがえされるが、中和性抗 $IL-10$ 抗体によってはくつがえされない。

【図 3】 TCR を介して刺激された場合、 $CD4^+CD25^+T$ 細胞が $CD4^+$ および $CD8^+T$ 細胞の活性化を細胞接触および用量依存的に抑制することを示す。

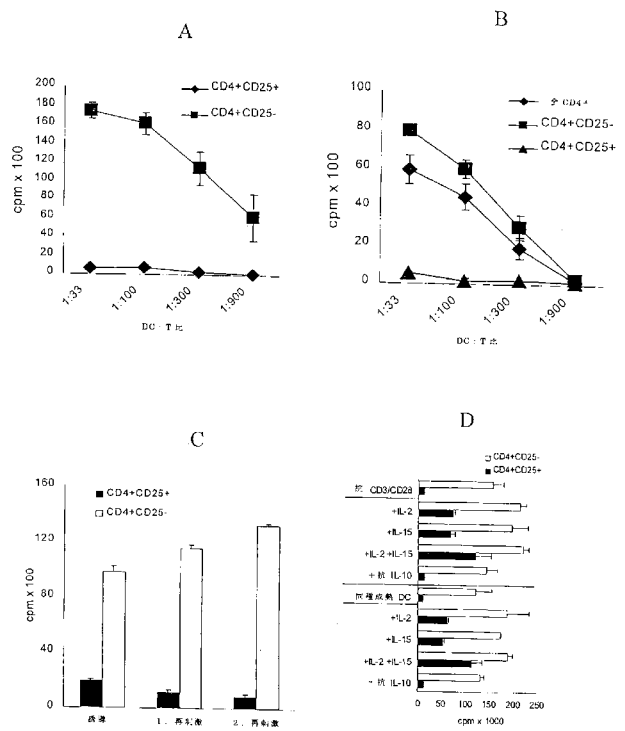
【図 4】 $CD4^+CD25^+$ および $CD4^+CD25^-T$ 細胞のサイトカインプロファイルが異なることを示す。

【図 5】 活性化され、固定された $CD4^+CD25^+$ 細胞がなお調節能を有することを示す。

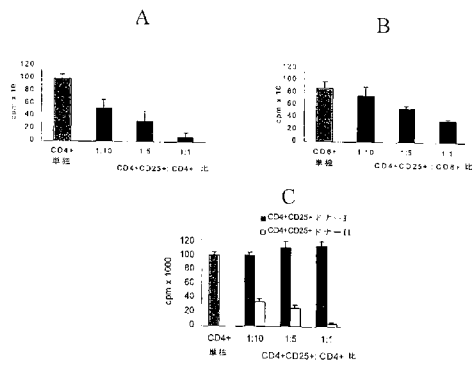
【図 1】



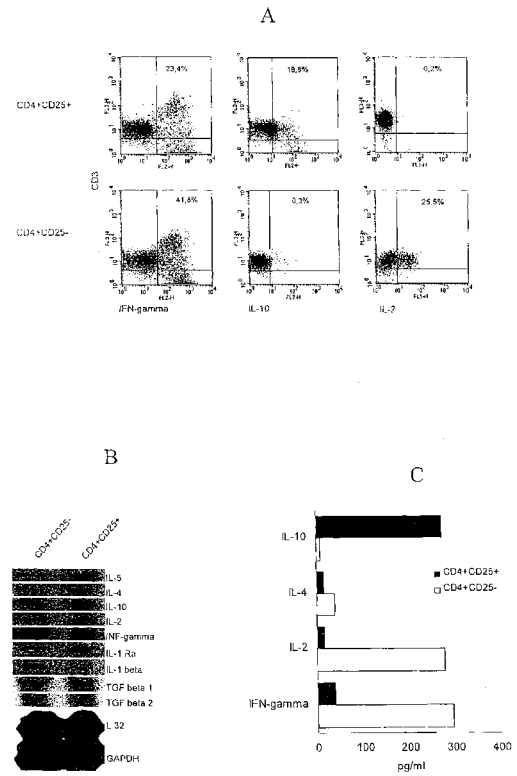
【図 2】



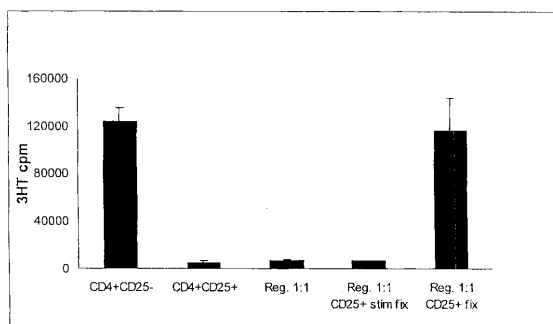
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	K	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z	

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 シューラー, ジェロルド

ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 0 スパルドルフ, アム ベイルチェンバーグ 2 5

(72)発明者 ディックマン, デトレフ

ドイツ連邦共和国 9 1 0 8 0 ウッテンルース, ライプジガー シュトラーセ 1 6

F ターム(参考) 4B063 QA05 QA18 QQ08 QR69 QR77 QS24 QS36 QX01

4B065 AA94X AC14 BA25 BB04 BB19 BC11 CA44 CA46

4C087 AA01 AA02 AA04 BB63 CA04 NA14 ZB07 ZB08

专利名称(译)	人体血液中的cd4 + cd25 +调节性T细胞		
公开(公告)号	JP2009060894A	公开(公告)日	2009-03-26
申请号	JP2008201830	申请日	2008-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔戈斯Therapeutics公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔戈斯Therapeutics公司		
[标]发明人	シューラージェロルド ディックマンデトレフ		
发明人	シューラー,ジェロルド ディックマン,デトレフ		
IPC分类号	C12N5/06 C12Q1/02 A61K35/12 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/53 G01N33/15 A61K35/17 A61P37/00 A61P37/04 C12N5/0783 G01N33/50		
CPC分类号	A61K35/17 A61K2035/122 A61K2035/124 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 C12N5/0636 C12N2500/14 C12N2501/01 C12N2501/23 C12N2501/51 C12N2501/515 G01N33/5002 G01N33/505 G01N2333/70596		
FI分类号	C12N5/00.E C12Q1/02 A61K35/12 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/53.K G01N33/15.Z A61K35/14.C A61K35/17.A A61K35/17.Z A61P37/00 C12N5/00.202.L C12N5/0783		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS36 4B063/QX01 4B065/AA94X 4B065/AC14 4B065/BA25 4B065/BB04 4B065/BB19 4B065/BC11 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA04 4C087/BB63 4C087/CA04 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB08		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 小林顺子 铃木康仁		
优先权	2001106033 2001-03-12 EP		
其他公开文献	JP4714767B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

抑制性和/或调节性人CD4+CD25+T细胞，扩增该细胞的方法以及抑制性和/或调节性人CD4+CD25+T细胞，以及 提供使用扩增的T细胞作为调节剂。抑制性和/或调节性人CD4 + CD25 + T细胞，优选通过合适的单克隆抗体并使用磁分离或免疫吸附法从人外周血中分离出来。该细胞为CTLA-4 +并具有调节特性。一种扩增细胞的方法，其包括用T细胞刺激物或抗原呈递细胞离体和体内刺激细胞。 [选择图]无

