

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 504005

(P2003 - 504005A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 P 1/04	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		3/10	4 B 0 2 4
A 6 1 P 1/04		5/14	4 B 0 6 3
		9/10	4 C 0 8 4
		19/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 69数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 601204(P2000 - 601204)

(86)(22)出願日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月23日(2001.8.23)

(86)国際出願番号 PCT/US00/40006

(87)国際公開番号 W000/050641

(87)国際公開日 平成12年8月31日(2000.8.31)

(31)優先権主張番号 60/121,311

(32)優先日 平成11年2月23日(1999.2.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ベイラー カレッジ オブ メディシン
BAYLOR COLLEGE OF
MEDICINE

アメリカ合衆国 テキサス州 77030 ヒュ
ーストン ワン ベイラー プラザ (番地
なし)

(72)発明者 ジングウ、ゼッド・ツァン
アメリカ合衆国テキサス州、ミズリーシテ
ィー、パークビュー、レイン、2219

(74)代理人 弁理士 吉武 賢次 (外 3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞レセプターV - D - J 配列およびその検出法

(57)【要約】

一態様では、本発明は、5' -CTAGGGCGGGC

GGGACTCACCTAC-3'のまたはから誘導さ

れる配列、またはそれに相補的な核酸配列を含んでなる
第一のオリゴヌクレオチドに関する。第一のオリゴヌク
レオチドは15 ~ 30ヌクレオチドであり、第一のオリ
ゴヌクレオチドの配列を含まずかつV 13 . 1 T細胞
におけるV 13 . 1 遺伝子のV ~ J の領域に見い
だされる核酸と共に用い、オリゴヌクレオチドと核酸の
配列はV 13 . 1 遺伝子対の同じ鎖上には見いだされ
ないものであり、V 13 . 1 遺伝子の一部を増幅する
ことができる。あるいは、第一のオリゴヌクレオチドは
、V 13 . 1 遺伝子のT細胞レセプターに見いだされ
るLGRAGLTYモチーフの検出法において、標識残
基と共に用いることができる。このモチーフは、多発性硬
化症 (MS) のような自己免疫疾患と関連している。こ
のモチーフが検出されると、自己免疫疾患を治療する
ことができ、またはその進行を監視することができる。自
己免疫疾患は、LGRAGLTYモチーフを含んでなる
ペプチドを投与することによって治療することができる
。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる、長さが約15～30ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸。

【請求項2】

配列番号：1の少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含んでなる、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸。

【請求項3】

配列番号：1の配列を含んでなる、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸。

【請求項4】

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドの第一のプライマー、またはそれに相補的な核酸、および

(b) (a)の配列を含まずかつT細胞レセプターT細胞におけるV_H13.1遺伝子のV_H～J_Hの領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの核酸を含んでなる第二のプライマーを含んでなるプライマーペアであって、

上記第一および第二のプライマーの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られないことを特徴とする、プライマーペア。

【請求項5】

V_H13.1遺伝子配列が配列番号：2である、請求項4に記載のプライマーペア。

【請求項6】

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約10～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 標識残基

を含んでなる、オリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項7】

標識残基が³²Pまたはジゴキシゲニンから選択される、請求項6に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項8】

T細胞レセプターLGRAGLTYモチーフを発現するMBP83-99V13.1 T細胞の検出法であって、

(a) MBP83-99V13.1 T細胞から核酸試料を得て、

(b) 核酸試料を、

(i) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15~30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(ii) 第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプターT細胞におけるV13.1遺伝子のV~Jの領域に見いだされる長さが約15~30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドから選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られず、

(c) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出することを特徴とする、方法。

【請求項9】

V13.1遺伝子が配列番号：2である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

核酸試料の断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅する、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

検出段階が、

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 標識残基

を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブを用いてプロービングすることを含んでなる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

検出段階が、オートラジオグラフィーを含んでなる、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチドであって、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる上記第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸を含んでなる試験キット。

【請求項14】

上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まず、T細胞レセプターT細胞のV13.1遺伝子のV～Jの領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドをも含んでなり、第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られない、請求項13に記載の試験キット。

【請求項15】

V13.1遺伝子配列が配列番号：2である、請求項14に記載の試験キット。

【請求項16】

標識残基をも含んでなり、標識残基が³²Pまたはジゴキシゲニンから選択される、請求項13に記載の試験キット。

【請求項17】

ヒトの自己免疫疾患の治療法であって、

(a) ヒトからMBP83-99V13.1T細胞を得て、

(b) MBP83-99V13.1T細胞から核酸試料を得て、

(c) 核酸試料を、

(i) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる、長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、および

(iii) 上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプター-T細胞のV_{13.1}遺伝子のV_{~J}の領域に見いだされる長さが約15~30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチド

から選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

(d) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(e) Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号: 3) ペプチドをヒトに投与する

ことを特徴とする、方法。

【請求項18】

V_{13.1}遺伝子配列が配列番号: 2である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

投与段階が、T細胞活性化マーカーペプチドの投与も含んでなる、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

自己免疫疾患の監視法であって、

(A) ヒトからMBP83-99V_{13.1}T細胞を得て、

(B)(i) MBP83-99V_{13.1}T細胞から核酸試料を得て、

(ii) 核酸試料を、

(a) 配列番号: 1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15~30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプター-T細胞のV_{13.1}遺伝子のV_{~J}の領域に見いだされる長さが約15~30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドであって、

上記第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列はT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見いだされないもの

から選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させることによってLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、

(c) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が
検出される場合には、

(C) 核酸の量を定量する
ことを特徴とする、方法。

【請求項21】

V 13.1 遺伝子配列が配列番号：2である、請求項20に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の背景】**

1. 発明の分野

本発明は、一般的には多発性硬化症（MS）のような自己免疫疾患の治療の分野に関する。

【0002】

更に詳細には、本発明は、幾人かのMS患者で見られるT細胞レセプター配列、およびその検出法に関する。

【0003】

2. 関連技術の説明

ヒトおよび他の哺乳類において、T細胞レセプターはT細胞上に見いだされる。T細胞レセプターは および 鎖を含んでなり、鎖は下記のN末端からC末端までの領域V - D - J - C を含んでなる。T細胞レセプターは、本来V - D - J 領域で変動する。

【0004】

抗原が抗原提示細胞（APC）によってT細胞に提示されると、偶々抗原を認識した可変領域（V - D - J など）を含むT細胞レセプターはAPC上で抗原に結合する。従って、T細胞レセプターを有するT細胞が活性化（クローン拡張）する。

【0005】

多くの自己免疫疾患の病因は、通常は生体によって提示される抗原に対する自己免疫T細胞応答にあると考えられている。このような疾患の一例は多発性硬化症（MS）であり、これはミエリン抗原、特にミエリン塩基性タンパク質（MBP）に対するT細胞応答で発生すると一般に考えられている。MBP反応性T細胞はイン・ビボで活性化することが見いだされており、対照被験者とは異なり、MS患者の血液や脳脊髄液に一層高い前駆体頻度で存在する。これらのMBP反応性T細胞は、Th1サイトカイン、例えばIL-2、TNFおよび - インターフェロンを産生する。これらのTh1サイトカインは、炎症細胞の中樞神経系

への移行を促進し、MSでのミエリン破壊性炎症反応を悪化させる。

【0006】

多くの調節機構を、MSの治療に用いることができる。一つの方法は、細胞外ドメインを有する限定された数のT細胞の1個以上を用いるワクチン接種である。Vandenbarkの米国特許第5,614,192号明細書には、T細胞レセプターの第二の相補性決定領域(CDR2)の少なくとも一部を含んでなる15~30個のアミノ酸の免疫原性T細胞レセプターペプチドを用いる自己免疫疾患の治療が開示されている。Zhangの同時係属米国特許出願明細書(60/099,102)には、免疫原性T細胞レセプターペプチドを免疫原性T細胞活性化マーカーペプチドと組み合わせて用いることによる自己免疫疾患の治療が開示されている。

【0007】

T細胞レセプターペプチドを用いるワクチン接種を改良することができる一つの領域は、MSのような自己免疫疾患患者のT細胞レセプターにどの共通モチーフが見いだされるかを決定することによるものである。このようなモチーフが見いだされれば、患者にモチーフと同一のペプチドをワクチン接種して治療を容易にすることができる。

【0008】

従って、自己免疫疾患の患者のT細胞レセプターに見いだされる共通モチーフのアミノ酸配列を有することが望ましい。また、PCRのような通常の方法によって患者試料中のこれらのモチーフを容易に検出することも望ましい。更に、検出されたモチーフと同一のペプチドを用いて、自己免疫疾患患者を治療することが望ましい。

【0009】

本発明は、V 13.1 T細胞のサブセットのT細胞レセプターに見いだされるような共通モチーフである「LGRAGLTYモチーフ」であって、アミノ酸配列Leu Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr(配列番号:3)を有するもの、並びにPCRによるその容易な検出法を開示する。このモチーフは、MBPのアミノ酸83~99(以後、「MBP83-99」)を認識する幾つかのT細胞の幾つか

のT細胞レセプターに見いだされる。V 13 . 1 T細胞のこのサブセットに関するモチーフは、以後「V 13 . 1 - L G R A G L T Y」と表されることがある。このモチーフと同一のペプチドを用いて患者にワクチン接種し、V 13 . 1 - L G R A G L T Yが関連する自己免疫疾患を治療または予防することができる。このような自己免疫疾患には、MSがある。

【0010】

【発明の概要】

一態様では、本発明は、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的なまたはそれから誘導される配列に関する。更に好ましいものは、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなる、長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

【0011】

一連の他の態様では、オリゴヌクレオチドを、V 13 . 1 - L G R A G L T Y T細胞に見いだされる核酸配列の増幅または検出に用いることができる。これらの態様のサブシリーズでは、オリゴヌクレオチドをプライマーペアであって、(a) 長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる第一のプライマー、またはそれに相補的な配列、および

(b) 配列(a)を含まない長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドである第二のプライマーであって、この第二のプライマー配列はT細胞レセプターT細胞におけるV 13 . 1遺伝子(配列番号：2)のV～Jの領域に見いだすことができるもの

を含んでなりまたはから誘導され、

(a)および(b)の配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られないこと

を特徴とする、プライマーペアに用いられる。

【0012】

好ましくは、上記第一のプライマーは、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなる、長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

【0013】

これらの態様のもう一つのサブシリーズでは、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブであって、

(a) 長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列、および

(b) 標識残基

を含んでなる、オリゴヌクレオチドプローブとして用いられる。

【0014】

好ましくは、オリゴヌクレオチドは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチド、またはそれに相補的な配列を含んでなる。最も好ましいものは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそれに相補的な配列を含んでなる。標識残基は、好ましくは³²Pまたはジゴキシゲニンから選択される

【0015】

もう一つの態様では、本発明は、LGRAGLTYモチーフを発現するMBP83-99V 13.1T細胞の検出法であって、

(i) MBP83-99V 13.1T細胞から核酸試料を得て、

(ii) 核酸試料を、

(a) 長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含んでな

り、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる第一のプライマー、またはそれに相補的なまたはそこから誘導される配列、および

(b) (a)の配列を含まずかつV_{13.1}T細胞(配列番号：2)におけるV_{13.1}遺伝子のV_{~J}の領域に見いだされる長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含んでなる第二のプライマーから選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

(a)および(b)の配列がV_{13.1}遺伝子の同一鎖上には見られず、

(iii) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出することを特徴とする、方法に関する。

【0016】

好ましくは、第一のプライマーは、長さが約15~30ヌクレオチドであって、配列番号：の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそれに相補的な配列を含んでなる。

【0017】

更にもう一つの態様では、本発明は、自己免疫疾患の治療法であって、

(a) ヒトからMBP83-99V_{13.1}T細胞を得て、

(b) 上記の方法によってLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(c) Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr(配列番号：3)ペプチドをヒトに投与する

ことを特徴とする、方法に関する。

【0018】

更にもう一つの態様では、本発明は、自己免疫疾患の監視法であって、

(a) ヒトからMBP83-99V_{13.1}T細胞を得て、

(b) 上記の方法によってLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(c) 核酸を定量する

ことを特徴とする、方法に関する。

【0019】

図面は本明細書の一部を形成しており、本発明の幾つかの態様を更に説明する目的で包含される。本発明は、本明細書に提示された特定の態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1以上を参照することによって更に良好に理解されるであろう。

【0020】

【好ましい態様の説明】

本発明の理解を助けるために、幾つかの用語を下記に定義する。

【0021】

「PCR」は、米国特許第4,683,202号明細書(1987年7月28日、Mullinsに発行)に総括的に記載されているように、ポリメラーゼ連鎖反応を意味し、上記特許請求の範囲の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される。PCRは、選択されたオリゴヌクレオチドまたはプライマーを重合剤(例えば、ポリメラーゼ)および4種類のヌクレオチドトリホスフェートの存在下にて核酸鋳型にハイブリダイゼーションし、伸張生成物をプライマーから形成させる増幅技術を意味する。次に、これらの生成物を変性させ、循環反応の鋳型として用い、存在する核酸の数および量を増幅し、続いて行うそれらの検出を容易にする。様々なPCR技術を利用することができ、本発明による方法と共に用いることができる。

【0022】

「プライマー」とは、鋳型分子上の特異的DNA配列に相補的なDNA合成の開始点として作用することができる天然または合成のいずれのオリゴヌクレオチドをも意味する。

【0023】

「から誘導される(複数の)プライマーまたは(複数の)プローブ」という用語に関する「から誘導される」とは、プライマーまたはプローブが上記の(複数の)ヌクレオチド配列に限定されず、上記の(複数の)配列に対する変化がV

13.1 - LGRAGLTY配列、すなわちLue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号: 3) をコードするT細胞レセプターDNAの検出においてプライマーとして作用する能力を保持している程度までヌクレオチド付加、欠失、または置換などの上記の(複数の)ヌクレオチド配列における変動をも包含することを意味する。

【0024】

「免疫原性」とは、ペプチドの記載に用いるときには、ペプチドがT細胞依存性、抗体または両方の免疫応答を誘発することができることを意味する。「抗原性」とは、ペプチドを、遊離の形態で抗体によってまたは抗原特異的T細胞の場合にはMHC分子に関して認識することができることを意味する。

【0025】

「免疫関連疾患」とは、免疫系が疾患の病因に関与している疾患を意味する。免疫関連疾患のサブセットは、自己免疫疾患である。本発明によって考えられる自己免疫疾患としては、慢性関節リウマチ、重症筋無力症、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、グレーブズ病、炎症性腸疾患、自己免疫ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、およびある種の糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の開示により、当業者であれば、本発明の組成物および方法によって治療可能な自己免疫疾患を容易に理解することができる。「T細胞依存性疾患」とは、T細胞が生体に通常に見られるペプチドを認識する結果として、生体で起こされる疾患を意味する。

【0026】

「治療」または「治療する」とは、動物を疾患から保護することを表すときには、疾患の予防、抑制または抑圧を意味する。疾患の予防は、疾患の誘発前に動物に本発明の組成物を投与することを伴う。疾患の抑制は、疾患の誘発後であるが臨床的出現の前に動物に本発明の組成物を投与することを伴う。疾患の抑圧は、疾患の臨床的出現の後に動物に本発明の組成物を投与することを伴う。ヒト医薬では、疾患誘発の経過において本発明の組成物を投与するときを常に知ることはできないことを理解されるであろう。

【0027】

一態様では、本発明は、

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸である第一のプライマー、および

(b) (a)の配列を含まずかつV_{13.1}T細胞におけるT細胞レセプター遺伝子のV_{13.1}～J_{13.1}の領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドである第二のプライマー

の配列またはから誘導される配列を含んでなるプライマーペアであって、

(a)および(b)の配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られないことを特徴とする、プライマーペアに関する。

【0028】

好ましくは、上記第一のプライマーは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

【0029】

本発明によるプライマーは、ヒトV_{13.1}T細胞のT細胞レセプターをコードする遺伝子の断片であって、アミノ酸モチーフLue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr（配列番号：3）を含んでなる断片を増幅するようにデザインされている。LGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターをコードするV_{13.1}T細胞由来の遺伝子は、登録番号AF117132でGenBankに寄託されている。LGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターをコードするV_{13.1}T細胞由来の遺伝子の配列は、本明細書では配列番号：2として示す。本発明による方法では、V_{13.1}T細胞からのT細胞レセプター遺伝子の約400bpの断片は、第一のプライマーがCDR3領域にあり、第二のプライマーがC₁領域にある二種類のプライマーを用いて増幅される。T細胞レセプター遺伝子のV_{13.1}-D_{13.1}-J_{13.1}は、CDR3とC₁領域の間にある。好ましい態様

では、プライマーは上記のプライマーペアである。

【0030】

本発明によるプライマーは、プライマー(a)および(b)から誘導されるオリゴヌクレオチドも包含する。配列がこれらのプライマーの一方と実質的に同一の配列を有するかまたは含み、上記とほぼ同一のV_{13.1}T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子のV-D-J領域のCDR3またはC領域に選択的にアニールする能力を保持している場合には、この配列はプライマー(a)または(b)から誘導される。更に詳細には、このプライマーは、V_{13.1}T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子のV-D-J領域の同定された領域に対する選択性を保持している限り、プライマー(a)または(b)とは長さまたは配列に沿った1以上の位置における核酸の種類が異なってもよい。例えば、このプライマーは、少なくとも15ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドであってもよく、15ヌクレオチドはプライマー(a)-(b)の配列から選択されまたは誘導された一連の15個の連続した核酸と同一である。このプライマーは、プライマー(a)-(b)の配列から選択されまたは誘導された配列を有する部分を含んでなる約30ヌクレオチド以下の任意のオリゴヌクレオチドであってもよい。プライマー中のヌクレオチドの数は、プライマー合成およびPCR手続きにおける選択性を保持するのに十分な高さでありかつ効率性および操作性を保持するのに十分な低さであるべきである。プライマーは、プライマー(a)-(b)の配列の変化がV_{13.1}-LGRAGLTYの検出においてプライマーとして作用する能力を保持している程度までヌクレオチド欠失、付加または置換などの変動を有することができる。

【0031】

本発明によるV_{13.1}-LGRAGLTY検出法は、試料中の任意のV_{13.1}-LGRAGLTYの存在を検出する手続きにおいて、上記プライマーの対を用いる。V_{13.1}-LGRAGLTYの存在について試験を行う試料は、核酸であり、好ましくはDNAである。このDNAは、ゲノムDNA、cDNA、PCRによって予め増幅されたDNA、または任意の他の形態のDNAであることができる。試料は、T細胞レセプター鎖遺伝子を発現する任意の動物またはヒトの体組織から直接または間接的に単離することができる。好ましい体

組織は、末梢血単核細胞（P B M C）である。試料がゲノムDNAである場合には、これは体組織から直接単離することができる。試料がcDNAであるときには、これは体組織から直接単離したmRNAの逆転写によって間接的に単離される。試料がPCRによって予め増幅されたDNAであるときには、これはゲノムDNA、cDNAまたは任意の他の形態のDNAの増幅によって間接的に単離される。

【0032】

好ましい態様では、V 13 . 1 T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子の一部であって、L G R A G L T Yモチーフをコードする配列を含んでなる部分を増幅して、V 13 . 1 - L G R A G L T Y (5'-CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC-3' (配列番号：1))の存在を検出する能力を高める。増幅は、試料中の部分を高感度で選択的および迅速に増幅するいずれか特定のPCR技術または装置を用いてPCR反応によって行うことができる。

【0033】

例えば、PCR増幅は、下記の成分：5 μ l 10 \times PCR緩衝液II (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl)、3 μ l 25mM MgCl₂、1 μ l 10mM dNTP混合物、0.3 μ l Taqポリメラーゼ (5U/ μ l) (Ampli Taq Gold, Perkin Elmer, ノーウォーク, コネティカット)、プライマーA 30ピコモル、およびプライマーB 30ピコモルを含む反応混合物を調製する手続きの後に行うことができる。本発明の開示を考慮すれば、当業者であれば、適当なプライマーAおよびBを選択し、V 13 . 1 T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子の部分をPCR増幅することができるであろう。上記混合物は、試料DNA 1 μ lを増幅するのに適している。以後、増幅を行うDNAを、「鋳型」と呼ぶことができる。

【0034】

試料DNAを上記反応混合物に加えたならば、PCR反応を、95 $^{\circ}$ Cで1分間 (変性)、56 $^{\circ}$ Cで20秒間 (アニーリング)、および72 $^{\circ}$ Cで40秒間 (伸張) の全部で35サイクルの増幅プロフィールで行うことができる。

【0035】

PCR反応において、鋳型を熱変性し、アニーリングして、二種類のオリゴヌクレオチドプライマーとすることができる。オリゴヌクレオチドは、増幅を行う核酸配列の領域を一括している。熱に安定なDNAポリメラーゼは、反応混合物に含まれる。ポリメラーゼは、適当な相補的ヌクレオチドを加えることによって相補的DNAにアニーリングしたプライマーを伸張する。好ましいポリメラーゼは、少なくとも95の温度で安定であるという特徴を有し、50~60の加工性(processivity)を有し、毎分50ヌクレオチドを上回る伸張速度を有する。

【0036】

約40PCRサイクルが、典型的なPCR増幅反応で用いられる。しかしながら、ある種のPCR反応では、15~20サイクル程度または50サイクル程度を処理することができる。それぞれのサイクルは、鋳型を約95を上回る温度にまで加熱する溶融段階からなっている。

【0037】

次に、PCR反応の温度を下げて、プライマーを鋳型にアニーリングする。このアニーリング段階では、反応温度を約55~72に約20秒間調節する。特定の反応によっては、これより長または短時間処理することもできる。

【0038】

次に、PCR反応の温度を上げて、ポリメラーゼによってプライマーの伸張を最大にする。この伸張段階では、反応温度を、約70~75に約40秒間調節する。特定の反応によっては、これより高温または低温、および/またはこれより長または短時間処理することもできる。

【0039】

更に、一回目のサイクルを開始する前に、反応混合物に初期変性を約5分~15分間行うことができる。同様に、最後のサイクルを終了した後、反応混合物に最終伸張を約5分~10分間行うこともできる。

【0040】

増幅は、二段階PCRを用いて行うことができる。この手法では、第一のPCR増幅反応を行って、目的とする領域より大きくかつを含んでなる第一の領域を増幅する。次に、第二のPCR増幅反応を、第一の領域を鋳型として用いて行い

、目的とする領域を増幅する。第一のPCR反応からのいずれのプライマーも第二のPCR反応で用いることができるときには、第二のPCR反応は「セミ-ネステド(semi-nested)」である。第一のPCR反応からのプライマーのいずれも第二のPCR反応で用いることができないときには、第二のPCR反応は「ネステド(nested)」である。

【0041】

本発明の方法を行う好ましい方法では、V_{13.1}-LGRAGLTYモチーフを二段階PCRによって増幅する。第一のPCR反応では、試料をT細胞レセプター遺伝子のV領域にアニーリングする第一のプライマーおよびT細胞レセプター遺伝子のC領域にアニーリングする第二のプライマーを用いて、反応混合物および上記のプロフィールを用いて増幅する。第一のPCR反応は、約600bpである第一の領域を増幅し、VからV-D-J接合を介してCへ伸張する。第二のPCR反応はネステドまたはセミ-ネステドであり、第一の領域の一部は、プライマー(a)-(b)を用いて部分増幅される。第二のPCR反応では、目的とする領域を増幅する。

【0042】

試料中のV_{13.1}-LGRAGLTYをコードする任意のDNAを増幅した後、増幅生成物を検出する。この検出は、多数の方法によって行うことができる。例えば、増幅生成物の一部を電気泳動ゲルに装填し、これに電場をかけて、大きさによってDNA分子を分離することができる。もう一つの方法では、増幅生成物の一部を、SYBRグリーン、臭化エチジウム、またはDNAに結合して検出可能なシグナルを発する別の分子で染色したゲルに装填する。例えば、私有化エチジウムはDNAに結合し、紫外光線で照明すると可視光線を放射する。乾燥ゲルは、増幅した鋳型の配列の一部に相補的な放射能-または化学-標識オリゴヌクレオチド(以後、「オリゴヌクレオチドプローブ」と呼ぶことができる)を含み、これからゲルをフィルムに暴露することによってオートラジオグラフを行うこともできた。

【0043】

もう一つの態様では、本発明は、

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約10～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 標識残基を含んでなる、オリゴヌクレオチドプローブに関する。

【0044】

好ましくは、「(a)」は、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましくは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。好ましくは、標識残基は、³²Pまたはジゴキシゲニンから選択される。

【0045】

本発明のプライマーを用いて生成された増幅生成物の検出に有用な典型的な放射能標識したオリゴヌクレオチドを、V - D - J 領域から取り出す。V 13 . 1 - L G R A G L T Y領域を、上記の二段階のセミネステドPCRによって増幅し、L G R A G L T Yモチーフをコードする配列に相当するプライマーを用いるときには、約10以上のヌクレオチド、好ましくは約18以上のヌクレオチドを有し、増幅したV 13 . 1 - L G R A G L T Y領域のいずれかの鎖の一部に相補的な任意のオリゴヌクレオチドを用いることができる。更に好ましくは、オリゴヌクレオチド5'-CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC-3' (配列番号：1)またはそれに相補的な核酸配列が、プローブとして用いられる。

【0046】

本発明は、第一のプライマー(a)で長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドまたはそれに相補的な核酸配列を含んでなる、試験キットでもある。

【0047】

好ましい態様では、この試験キットは、第二のプライマー(b)をも含んでなり

、第二のプライマーは、(a)のオリゴヌクレオチドの配列を含まず、T細胞におけるV_{13.1} T細胞レセプター遺伝子のV_{13.1} ~ J_{13.1} の領域に見いだされる長さが約15 ~ 30ヌクレオチドの核酸配列であり、

(a)および(b)の配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られない。

【0048】

更に好ましくは、上記第一のプライマーは、長さが約15 ~ 30ヌクレオチドであり、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15 ~ 30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、長さが約15 ~ 30ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

【0049】

この態様では、試験キットは、上記のPCR技術によるV_{13.1} - LGRAGLTY DNAの増幅に有用な少なくとも一種類の試薬をも含んでなる。このキットに配合することができる代表的試薬としては、緩衝液、デオキシヌクレオシドトリホスフェート、熱に安定なDNAポリメラーゼ、例えばTaqポリメラーゼ、正の対照に対するV_{13.1} - LGRAGLTY DNA、および負の対照に対する非-V_{13.1} - LGRAGLTY DNAが挙げられるが、これらに限定されない。試験キットに配合することができる他の試薬は、当業者には知られている。

【0050】

もう一つの好ましい態様では、試験キットは標識残基をも含んでなる。好ましくは、標識残基は³²Pまたはジゴキシゲニンである。

【0051】

本発明は、自己免疫疾患の治療法をも含んでなる。この疾患は、少なくとも幾人かの患者については、LGRAGLTYを含んでなるT細胞レセプターがV_{13.1} T細胞上に見いだされるものである。他の種類のT細胞、および/またはLGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターを欠くV_{13.1}

T細胞を患者が有することもある。

【0052】

自己免疫疾患の治療法は、

- (a) ヒトからMBP 83 - 99 V 13 . 1 T細胞を得て、
- (b) T細胞中にLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出されるときには、
- (c) Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号：3) ペプチドをヒトに投与することを特徴とする。

【0053】

自己免疫疾患は、LGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターがV 13 . 1 T細胞上に見いだされる任意の自己免疫疾患であることができる。本発明により考えられる自己免疫疾患としては、慢性関節リウマチ、重症筋無力症、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、グレーブズ病、炎症性腸疾患、自己免疫ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、およびある種の糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい自己免疫疾患は多発性硬化症(MS)である。

【0054】

LGRAGLTYモチーフをコードする核酸が上記の方法によって検出されるときには、自己免疫疾患はLue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号：3)を含んでなるペプチドを投与することによって治療することができる。このペプチドは、単独で、またはT細胞活性化マーカーペプチドと組み合わせて投与することができる。好ましくは、ペプチドは、Zhangの米国特許出願明細書60/099,102の開示に準じてT細胞活性化マーカーペプチドと組み合わせて投与されるのであり、上記特許出願明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される。ペプチドを投与することにより、免疫原性応答を生じ、患者はV 13 . 1 T細胞上に見いだされるT細胞レセプターのLGRAGLTYモチーフを認識してこれに結合する抗体およびT細胞レセプターを発現することができる。

【0055】

V 13.1 - LGRAGLTYはMSに罹っている患者およびこの疾患にかかっていない正常な被験者のいずれにも存在することができるので、Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号: 3) ペプチドをMS患者および正常な被験者のいずれにも投与することができると考えられる。

【0056】

もう一つの態様では、LGRAGLTYモチーフをコードする核酸が上記方法によって検出されるときには、自己免疫疾患は核酸を定量することによって監視することができる。PBMCのような試料に含まれる核酸の量が多くなれば、V 13.1 T細胞の数は増加し、自己免疫疾患の症状の予想される重さも大きくなる。また、増加したV 13.1 T細胞水準の提示および症状の出現の間の時間によっては、臨床医は症状の重さを最小限にし、および/または症状が現れる前に疾患を治療する目的で治療を行う機会を得ることができる。

【0057】

下記の例は、本発明の好ましい態様を例示する目的で挙げられている。当業者であれば、下記の例に開示されている技術は、発明の実施において良好に機能するように本発明者によって見いだされた技術を表し、従って、その実施の好ましい様式を構成すると考えることができることが理解されるであろう。しかしながら、当業者は、本発明の開示に関して、開示されている特定の態様に多くの変更を行うことができ、本発明の精神および範囲から離反することなく類似または同様な結果を得ることができることを理解すべきである。

【0058】

【実施例】

例1

T細胞レセプターV - D - J DNA配列、および様々なMS患者から誘導されるMBP83-99特異的T細胞クローンの間で共有される配列モチーフ

20CD4+独立T細胞クローンのパネルを、7名のMS患者から作成した。総てのT細胞クローンは、抗原提示細胞としてDRB1*1501をトランスフェクションしたマウス繊維芽腫細胞(L細胞)を用いて測定したHLA-DR2

に関してミエリン塩基性タンパク質(MBP83-99)の83~99ペプチドを認識した。T細胞クローンを、V_H-およびV_L-特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる逆転写PCR(RT-PCR)におけるTCR_V遺伝子転位について特性決定した後、V_H-J_HおよびV_L-D_L-J_L結合領域について配列決定した。結合領域の配列を、表1および2に示す。

【0059】

表1は、V_H遺伝子ファミリーに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーのパネルを用いる逆転写PCRによりV_H遺伝子の用法に準じて特性決定した20名の独立MBP83-99特異的T細胞クローンのパネルを用いる分析の結果をまとめている(使用したユニークプライマーの配列は、それぞれのクローンに相当するDNA配列に下線を施すことによって示す)。それぞれのクローンの「V_H」、「n」、「J_H」および「C_H」部分のアミノ酸配列を、下記のように表1に示し、「n」部分は下線を施し、「V_H」および「J_H」配列は「n」配列の両側で肉太活字で示し、「C_H」配列は下線を施さない通常フォントで示す。増幅したPCR生成物をジゴキシゲニン標識C_λcDNAプローブとハイブリダイゼーションした後、DNA配列について分析した。

【0060】

表2は、20名の独立MBP83-99特異的T細胞クローンのパネルの分析結果をまとめている。クローンを26のV_H遺伝子ファミリーに特異的な一組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いる逆転写PCRによってV_H遺伝子の用法について分析した(それぞれのクローンの特異的プライマーの配列は、相当するDNA配列に下線を施すことによって示す)。それぞれのクローンの「V_H」、「D」、「J_H」および「C_H」部分を下記のように表2に示し、「D」部分は下線を施し、「V_H」および「J_H」配列は、「D」配列の両側で肉太活字で示し、残りの配列である「C_H」配列は通常フォントで示す(下線を施したりまたは肉太活字にしたりしない)。増幅したPCR生成物をジゴキシゲニン標識C_λcDNAプローブでハイブリダイゼーションした後、DNA配列について分析した。

【0061】

【表1】

表1： MBP83-99ペプチドに特異的なTCRV α 遺伝子

T細胞クローン (GenBank登録 番号)	V遺伝子	DNAまたはアミノ酸配列	V α - <u>n</u> -J α -C α
MS7-E3.1 (AF117142)	V α 22	アミノ酸	YFCAL <u>SRGGS</u> NYKLTFGKGTL Δ TVNPNI QN (配列番号：4)
		DNA	TACTTCTGTGCTCTGAGTAGGGGAGGTA GCAACTATAAACTGACATTTGGAAAAGG AACTCTCTTAACCGTGAATCCAAATATC CAGAAC (配列番号：5)
MS-7-D2.2 (AF117143)	V α 9	アミノ酸	YYCAL <u>KRNFGNE</u> KLTFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号：6)
		DNA	TATTACTGTGCTCTAAAAAGAACTTTG GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG AACAAGACTCACCATCATACCCAATATC CAGAAC (配列番号：7)
MS7-E2.6 (AF117144)	V α 17	アミノ酸	YFCAAS <u>PGGS</u> NYKLTFGKGTL Δ TVNPNI QN (配列番号：8)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAAGCCCCGGAGGT AGCAACTATAAACTGACATTTGGAAAAG GAACTCTCTTAACCGTGAATCCAAATAT CCAGAAC (配列番号：9)
MS7-C3.1 (AF117145)	V α 17	アミノ酸	YFCAAM <u>GDFGNE</u> KLTFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号：10)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAATGGGGGACTTTG GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG AACAAGACTCACCATCATACCCAATATC CAGAAC (配列番号：11)

MS27-D7.16 (AF117145)	V α 17	アミノ酸	YFCAAMGDFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号 : 1 2)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAATGGGGGACTTTG GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG AACAAGACTCACCATCATACCCAATATC CAGAAC (配列番号 : 1 3)
MS27-F3.4 (AF117145)	V α 17	アミノ酸	YFCAAMGDFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号 : 1 4)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAATGGGGGACTTTG GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG AACAAGACTCACCATCATACCCAATATC CAGAAC (配列番号 : 1 5)
MS27-D4.4 (AF117146)	V α 22	アミノ酸	YFCALSVAGGTSYGKLTFGQGTLTVHP NIQN (配列番号 : 1 6)
		DNA	TACTTCTGTGCTCTGAGCGTTGCTGGTG GTACTAGCTATGGAAAGCTGACATTTGG ACAAGGACCATCTTGACTGTCCATCCA AATATCCAGAAC (配列番号 : 1 7)
MS32-F5.12 (AF117147)	V α 16	アミノ酸	YYCLVGDVVRPGGNKLTFGTGTQLKV ELNIQN (配列番号 : 1 8)
		DNA	TACTACTGCCTCGTGGGTGACGCCGTG AGGCCGGGAGGAGGAAACAAACTCACC TTTGGGACAGGCACTCAGCTAAAAGTG GAACTCAATATCCAGAAC (配列番号 : 1 9)

MS32-B9.8 (AF117147)	V α 16	アミノ酸	YYCLVGD <u>AVRPGGGNKLTFGTGTQLKV</u> ELNIQN (配列番号: 20)
		DNA	TACTACTGCCTCGTGGGTGACGCCGTG AGGCCGGGAGGAGGAAACAAACTCACC TTTGGGACAGGCACTCAGCTAAAAGTG GAACTCAATATCCAGAAC (配列番号: 21)
MS37-D9.3 (AF117148)	V α 3	アミノ酸	YFCATDAGGTYKYIFGTGTRLKVLANIQ N (配列番号: 22)
		DNA	TACTTCTGTGCTACGGACGCAGGAGGA ACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCA CCAGGCTGAAGGTTTTAGCAAATATCCA GAAC (配列番号: 23)
MS37-B9.1 (AF117149)	V α 16	アミノ酸	YYCLVGD <u>IDDMRFGAGTRLTVKPNIQN</u> (配列番号: 24)
		DNA	TACTACTGCCTCGTGGGTGACATCGATG ACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAGAC TGACAGTAAAACCAAATATCCAGAAC (配列番号: 25)
MS9-C.26 (AF117150)	V α 3	アミノ酸	YFCATSVNTDKLIFGTGTRLQVFPNIQN (配列番号: 26)
		DNA	TACTTCTGTGCTACATCGGTTAACACCG ACAAGCTCATCTTTGGGACTGGGACCA GATTACAAGTCTTTCCAAATATCCAGAA C (配列番号: 27)

【0062】

【表2】

表2：MBP83-99ペプチドに特異的なTCRV β 遺伝子

T細胞クローン (GenBank登録 番号)	V遺伝子	DNAま たはアミ ノ酸配列	V β -D-J β -C β
MS7-E3.1 (AF117130)	V β 9	アミノ酸	YFCASSQDRFWGGTVNTEAFFGQTRLT VVEDLNK (配列番号：28)
		DNA	TATTTCTGTGCCAGCAGCCAAGATCGTT TTTGGGGGGGACGGTGAACACTGAAG CTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCAC AGTTGTAGAGGACCTGAACAAG (配列 番号：29)
MS7-D2.2 (AF117131)	V β 1	アミノ酸	YFCASSAMGETQYFGPGTRLLVLEDLKN (配列番号：30)
		DNA	TATTTCTGTGCCAGCAGCGCTATGGGAG AGACCCAGTACTTCGGGCCAGGCACGC GGCTCCTGGTGCTCGAGGACCTGAAAA AC (配列番号：31)
MS7-E2.6 (AF117132)	V β 13.1	アミノ酸	YFCASSLGRAGLTYEQYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号：32)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号：33)
MS27-C3.1 (AF117132)	V β 13.1	アミノ酸	YFCASSLGRAGLTYEQYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号：34)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号：35)

MS27-D7.16 (AF117132)	V β 13.1Y	アミノ酸	YCASSLGRAGLTYEQYFGPGTRLTVTED LKN (配列番号 : 36)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 37)
MS27-F3.4 (AF117132)	V β 13.1	アミノ酸	YFCASSLGRAGLTYEQYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号 : 38)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 39)
MS27-D4.4 (AF117133)	V β 9	アミノ酸	YFCASSSPVNYGYTFGSGTRLTVVEDLN K (配列番号 : 40)
		DNA	TATTTCTGTGCCAGCAGCCCGACAGTTA ACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGAC CAGGTTAACCGTTGTAGAGGACCTGAA CAAG (配列番号 : 41)
MS32-F5.12 (AF117134)	V β 13.1	アミノ酸	YFCASSYSIRGQGNEQYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号 : 42)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGTTACTCGATTA GGGGACAGGGTAACGAGCAGTACTTCG GGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAG AGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 43)
MS32-B9.8 (AF117134)	V β 13.1	アミノ酸	YFCASSSIRGOGNEQYFRPGTRLTVTED LKN (配列番号 : 44)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGTTACTCGATTA GGGGACAGGGTAACGAGCAGTACTTCC GGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAG AGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 45)

MS37-D9.3 (AF119246)	V β 7	アミノ酸	YLCASSQDRVAPQYFGPGTRLLVLEDLKN (配列番号: 46)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCCAAGATCGG GTTGCGCCACAGTACTTCGGGCCAGGC ACGCGGCTCCTGGTGCTCGAGGACCTG AAAAAC (配列番号: 47)
MS37-B9.1 (AF117135)	V β 17	アミノ酸	YLCASSTRQGPQETQYFGPGTRLLVLEDLKN (配列番号: 48)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGTAGTACCCGGCAAG GACCTCAAGAGACCCAGTACTTCGGGC CAGGCACGCGGCTCCTGGTGCTCGAGG ACCTGAAAAAC (配列番号: 49)
MS8-D2.7 (AF117136)	V β 8	アミノ酸	YLCASSLGQGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号: 50)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCTTAGGACAGG GGGCTTACGAGCAGTACTTCGGGCCGG GCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACC TGAAAAAC (配列番号: 51)
MS8-A2.7 (AF117136)	V β 8	アミノ酸	YLCASSLGQGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号: 52)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCTTAGGACAGG GGGCTTACGAGCAGTACTTCGGGCCGG GCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACC TGAAAAAC (配列番号: 53)
MS8-A1.15 (AF117136)	V β 8	アミノ酸	YLCASSLGQGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号: 54)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCTTAGGACAGG GGGCTTACGAGCAGTACTTCGGGCCGG GCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACC TGAAAAAC (配列番号: 55)

MS8-D1.3 (AF117137)	V β 8	アミノ酸	YFCASSLQVYSPLHFGNGTRLTVTEDLN K (配列番号 : 56)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGTTTACAAGTGT ATTCACCCCTCCACTTTGGGAACGGGAC CAGGCTCACTGTGACAGAGGACCTGAA CAAG (配列番号 : 57)
MS33-D1.2 (AF117138)	V β 12	アミノ酸	YFCAISESIGTGTEAFFGQGTRLTVVEDL NK (配列番号 : 58)
		DNA	TACTTCTGTGCCATCAGTGAGTCGATTG GTACGGGAACTGAAGCTTTCTTTGGACA AGGCACCAGACTCACAGTTGTAGAGGA CCTGAACAAG (配列番号 : 59)
MS33-D3.3 (AF117138)	V β 12	アミノ酸	YFCAISESIGTGTEAFFGQGTRLTVVEDL NK (配列番号 : 60)
		DNA	TACTTCTGTGCCATCAGTGAGTCGATTG GTACGGGAACTGAAGCTTTCTTTGGACA AGGCACCAGACTCACAGTTGTAGAGGA CCTGAACAAG (配列番号 : 61)
MS33-D8.1 (AF117139)	V β 3	アミノ酸	YLCASRDRSYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号 : 62)
		DNA	TACCTCTGTGCCAGCCGGGACAGGTCC TACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACC AGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAA AAC (配列番号 : 63)
MS9-C.26 (AF117140)	V β 12	アミノ酸	YFCAISEGSSSGNTIYFGECSWLTVVEDL NK (配列番号 : 64)
		DNA	TACTTCTGTGCCATCAGTGAGGGGTCCA GCTCTGAAAACACCATATATTTTGGAGA GGGAAGTTGGCTCACTGTTGTAGAGGA CCTGAACAAG (配列番号 : 65)

MS35-C7.2 (AF117141)	V β 2	アミノ酸	FYICSAIDGYTFGSGTRLTVVEDLNK (配列番号: 66)
		DNA	TTCTACATCTGCAGTGCTATAGACGGCT ACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAA CCGTTGTAGAGGACCTGAACAAG (配列番号: 67)

【0063】

V およびV 転位は個々のMBP83-99T細胞クローンの間で変化したが、所定の被験者由来のこれらの独立T細胞クローンの多くは、同一のV - J およびV - D - J 結合領域の配列を有する同一のV およびV 鎖を共有した。この知見は、以前に報告された(Vandevyver 1995, Wucherpfenning 1994)所定のMS患者でのMBP83-99特異的T細胞のイン・ビボでのクローン伸張と一致する。

【0064】

興味深いことには、表1および2に示したように、ある患者(MS-1)由来の独立T細胞クローン(クローンE2.6)は、別の患者(MS-2)から得た4個のT細胞の3個(クローンC3.1、D7.16およびF3.4)を有する同じV 13.1およびV 17を共有した。これらのT細胞クローンのV 13.1は、V - D - J 接合領域内に同一のDNA配列を共有した。

【0065】

例2

V - D - J 特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、元のMBP83-99T細胞クローン並びに元のMBP83-99T細胞クローンを含むPBMCに含まれる相当するDNA配列の検出に極めて特異的かつ高感度であった

14個のオリゴヌクレオチドプライマーの組を独立MBP83-99T細胞クローンのV - D - J 結合領域内でDNA配列に準じて合成した後、RT-PCRでのそれらの特異性について検討した。これらのオリゴヌクレオチドプライマーのDNA配列を、表3に示す。

【0066】

【表3】

表3：V β -D β -J β 特異的オリゴヌクレオチドプライマーのDNA配列

T細胞クローン	DNA配列	配列番号
MS1-E3.1	AGCAGCCAAGATCGTTTTTGG	配列番号：68
MS1-E2.6	CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC	配列番号：69
MS2-C3.1	CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC	配列番号：70
MS2-D4.4		
MS3-F5.12	TACTCGATTAGGGGACAGGGTAAC	配列番号：71
MS3-B9.8		
MS4-D9.3	CAAGATCGGGTTGCGCCA	配列番号：72
MS4-B9.1	ACCCGGCAAGGACCTCAAGAGACC	配列番号：73
MS5-D2.7	AGCTTAGGACAGGGGGCT	配列番号：74
MS5-D1.3		
MS6-D8.1	GCCAGCCGGGACAGGTCC	配列番号：75
MS6-D1.2	GAGTAGATTGGTACGGGA	配列番号：76
MS7-C.26		
MS8-C7.2	TACATCTGAAGTGCTATAGAC	配列番号：77

【0067】

これらのV - D - J 特異的プライマーは元のMBP83-99T細胞クローンに含まれるDNA配列のみに結合し、関連のないMBP83-99T細胞クローン由来の配列には結合せず(図2)、元のV - D - J DNA配列に対する特異性が高いことを示唆していた。唯一の例外はクローンMS1-E2.6およびクローンMS2-C3.1について見られ、V - D - J 結合DNA配列に結合した同一プライマーがこれらの両T細胞クローンによって共有された。

【0068】

V - D - J オリゴヌクレオチドプライマーが特異的でありかつPCR検出系の感度が高いことを考慮し、5' V プライマーおよびV - D - J 特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いるこの二段階PCR検出系を用いて、

MBP83-99T細胞クローンが生じる末梢血単核細胞(PBMC)標本に含まれる相当するV-D-J DNA配列を検出することができるかどうかを検討した。二種類の別々の実験の結果は、元のPBMC標本におけるV-D-J配列の正の検出を示した。従って、これらの知見は、V-D-J配列が指紋として役に立つPCR検出系が、同一DNA配列のプロベイングによる末梢血単核細胞に含まれるMBP83-99T細胞のトレースにおいて特異的かつ敏感であることを示していた。

【0069】

例3

様々なMS患者および健常被験者由来のPBMC標本での共通のV-D-J DNA配列の検出

次に、MBP83-99T細胞クローンのV-D-J結合領域に相当するDNA配列を、MS患者および健常被験者の群から無作為に選択したPBMC標本で検出することができるかどうかを検討した。(第一のPCRにおける)相当するVファミリーに特異的なプライマーおよび(第二のセミ-ネステドPCRにおける)V-D-J配列に特異的なプライマーを用いる同じPCR増幅系を用いた。これを、相当するV-D-Jプローブを有するサザンロット分析と組み合わせて、ハイブリダイゼーションを行った。二段階PCR検出系の特異的要件およびV-D-Jプライマーおよびプローブの特異性を考慮すれば、同一DNA配列は特異的TCRV鎖に由来し、目的とするV-D-J配列と同一または類似している。

【0070】

これらの結果は、一種類のV-D-Jオリゴヌクレオチドプライマー(MS1-E2.6, V13.1-LGRAGLTY)のみが、様々なMS患者から得た48個のPBMC標本の15個(31%)において相補的TCRV13.1DNA配列を検出することを示唆した。従って、この知見は、これらのMS患者にV13.1-LGRAGLTYを発現するMBP83-99T細胞が含まれることを示唆している。同様の実験条件下で、同じプライマーは健常被験者由来の20個のPBMC標本の5個(25%)でも相当するDNA配列を検出

した。残りの13個のV-D-Jプライマーは、同じパネルのPBMC標本での任意の配列シグナルの同定に失敗した。これらの結果は、三つの別々の実験で再現性を有していた。同定したDNA生成物は、V13.1を発現するT細胞由来のE2.6プライマーによって増幅したが、V13.1特異的プライマーを最初のPCRで用いて増幅したからである。

【0071】

更に、同定したV13.1-LGRAGLTY配列を、PBMC標本がV13.1-LGRAGLTY配列を含むことが示された5名のMS患者由来の24個の短期MBP83-99T細胞系の13個(54%)でも増幅した。これらの結果から、V13.1-LGRAGLTY DNA配列がMBP83-99を認識するT細胞由来のPBMC標本で検出されることを確かめた。この知見は、V13.1-LGRAGLTY配列を発現するMBP83-99T細胞が幾人かのMS患者で見られるMBP83-99T細胞系の総てまたは大半であることも示している。

【0072】

V-D-J配列が指紋として用いられる組合せPCR-DNAハイブリダイゼーション検出系は、同一のV-D-J結合配列を検出することによって抗原特異的T細胞のトレースに強力な手段を提供した。検出系の特異性が高くかつ高感度であることにより、末梢血T細胞中の特異的V-D-J配列が同定された。本研究は、MBPの主要抗原83-99ペプチドを認識し、同一のV-D-J配列を均一に発現するV13.1T細胞の共通のサブセットはMS患者の約30%に存在することを初めて立証した。この結論は、本明細書に記載の段階的実験に基づいてなされる。第一に、同一のDNA配列(V13.1-LGRAGLTY)が、様々なMS患者由来の独立したMBP83-99T細胞クローン中に見いだされた。第二に、様々なMS患者から得たPBMC標本のTCRV13.1から増幅したcDNA生成物で、配列を同定した。第三に、V13.1-LGRAGLTY配列を含むことが示されたPBMC標本由来の短期独立MBP83-99T細胞系で、配列を検出した。V13.1-LGRAGLTY配列を発現するMBP83-99T細胞は、幾人かのMS患者

由来のMBP 83 - 99 T細胞系の総てまたは大半であると思われる。最後に、PBMC標本におけるV 13 . 1 - LGRAGLTY配列の存在は、組換えDNAクローニングおよび直接DNA配列決定によって立証された。

【0073】

更に、共通のV 13 . 1 - LGRAGLTY配列を発現するMBP 83 - 99 T細胞は、健常被験者中にも存在することは、意外なことではない。これまでに報告された研究は、主要抗原83 - 99ペプチドを認識するT細胞などのMBP反応性T細胞は健常被験者にも存在することを示唆している(Zhang 1994, Ota 1990)。しかしながら、これらのT細胞は、健常被験者とは異なり、MS患者ではイン・ビボでの活性化およびクローン伸張を行うという機能上の差異がある(Zhang, 1994)。

【0074】

共通のV - D - J 配列を共有するこれらのV 13 . 1 MBP 83 - 99 T細胞は、幾人かのMS患者で見られるMBP 83 - 99 T細胞の有意な画分を表すことがある。この可能性は、2回の刺激サイクルの後にMS患者由来の短期MBP 83 - 99 T細胞系の40%にV 13 . 1 - LGRAGLTY配列が存在するという観察によって支持される。

【0075】

同定した共通のV - D - J 配列を定量的PCR検出系で特異的マーカーとして用いて、MS患者の大きな群の血液および脳脊髄液におけるMBP 83 - 99 T細胞の共通のサブセットを検出し、イン・ビボでのクローン伸張およびこの疾患と潜在的に関連したイン・ビボ活性を観察することができる。この方法は、通常の細胞培養に基づいた分析法より優れており、MBP反応性T細胞のイン・ビボでの選択および伸張は、細胞培養に固有の様々な阻害因子によって妨げられることが多いからである。これは、直接エクス・ビボ分析を用いてMBP反応性T細胞を定量するときには、MBP反応性T細胞の頻度がMS患者で予想外に高いことが見いだされた細菌の研究と一致している(Hafler as last author JEM 1997)。

【0076】

更に、TCRに相当する合成ペプチドは、MS患者でのMBP反応性T細胞に対する抗イディオタイプT細胞を誘導することが示された(Chou et al., J.I.)。従って、共通CDR3配列を含むTCRペプチドは、抗イディオタイプT細胞を誘導して、MBP83-99T細胞が共通CDR3配列モチーフを有する患者の群におけるMBP83-99反応性T細胞の特異的サブセットを抑制する大きな可能性を有することがある。このような共通CDR3ペプチドで免役することは、MS患者における可能な治療手続きとしてのCDR3ペプチドまたは個体依存性のCDR3ペプチドと比較して遊離である(Vandenbark 1996)。

【0077】

本明細書に開示し、特許請求した総ての組成物および/または方法は、本発明の開示を考慮すれば、過度の実験なしに作成し、実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して説明してきたが、組成物および/または方法、および本明細書記載の方法の段階または段階の順序において本発明の概念、精神および範囲から離反することなく変更を加えることができることは当業者には明らかであろう。更に具体的には、化学的および生理学的に関連しているある種の薬剤を本明細書記載の薬剤の代わりに用いることができ、同一または類似の結果が得られることは明らかであろう。当業者に明らかなこれら総ての同様な置換基および改質は、特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲および概念の範囲内にあると考えられる。

【0078】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Jingwu, Zhang Z.

5 <120> T Cell Receptor VB-DB-JB Sequence and Methods For Its
Detection

<130> BCOL003

10 <140>
<141>

<160> 77

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 24
<212> DNA

20 <213> SYNTHETIC

<400> 1
ctagggcggg cgggactcac ctac 24

25 <210> 2
<211> 400
<212> DNA
<213> Homo sapiens

30 <400> 2
catgtctccg ataaccaga ggatttcccg ctccaggtgc tctcggctgc tccctcccag 60
acatctgtgt acttctgtgc cagcagccta gggcgggagg gactcaccta cgagcagtac 120
tccgggcccg gcaccaggct caccgtcaca gaggacctga aaaacgtgtt cccaccggag 180
35 gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag atctcccaca cccaaaaggc cacactggta 240
tgcctggcca caggcttcta ccccgaccac gtggagctga gctgggtggg gaatgggaag 300
gaggtgcaca gtgggtcag cacagaccg cagccctca aggagcagcc cgcctcaat 360
gactccagat actgcctgag cagccgctg agggctcctg 400

40 <210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 3
Leu Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr
1 5

50 <210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55

<400> 4
 Tyr Phe Cys Ala Leu Ser Arg Gly Gly Ser Asn Tyr Lys Leu Thr Phe
 1 5 10 15

5 Gly Lys Gly Thr Leu Leu Thr Val Asn Pro Asn Ile Gln Asn
 20 25 30

<210> 5
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 15 tacttctgtg ctctgagtag gggaggtagc aactataaac tgacatttgg aaaaggaact 60
 ctcttaaccg tgaatccaaa tatccagaac 90

<210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 25 Tyr Tyr Cys Ala Leu Lys Arg Asn Phe Gly Asn Glu Lys Leu Thr Phe
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gln Asn
 20 25 30

30

<210> 7
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 40 tattactgtg ctctaaaaag aaactttgga aatgagaaat taacctttgg gactggaaca 60
 agactcacca tcatacccaa tatccagaac 90

<210> 8
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Tyr Phe Cys Ala Ala Ser Pro Gly Gly Ser Asn Tyr Lys Leu Thr Phe
 1 5 10 15

50 Gly Lys Gly Thr Leu Leu Thr Val Asn Pro Asn Ile Gln Asn
 20 25 30

55

<210> 9
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 9
 tactttctgtg cagcaagccc cggaggtagc aactataaac tgacatttgg aaaaggaact 60
 ctcttaaccg tgaatccaaa tatccagaac 90

10
 <210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 10
 Tyr Phe Cys Ala Ala Met Gly Asp Phe Gly Asn Glu Lys Leu Thr Phe
 1 5 10 15
 20 Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gln Asn
 20 25 30

25
 <210> 11
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 11
 tactttctgtg cagcaatggg ggactttgga aatgagaaat taacctttgg gactggaaca 60
 agactcacca tcatacccaa tatccagaac 90

35
 <210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 12
 Tyr Phe Cys Ala Ala Met Gly Asp Phe Gly Asn Glu Lys Leu Thr Phe
 1 5 10 15
 Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gln Asn
 20 25 30

45
 <210> 13
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 13
 tactttctgtg cagcaatggg ggactttgga aatgagaaat taacctttgg gactggaaca 60
 agactcacca tcatacccaa tatccagaac 90

55

<210> 14
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Tyr Phe Cys Ala Ala Met Gly Asp Phe Gly Asn Glu Lys Leu Thr Phe
 1 5 10 15
 10 Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gln Asn
 20 25 30

15 <210> 15
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15
 tacttctgtg cagcaatggg ggactttgga aatgagaaat taacctttgg gactggaaca 60
 agactcacca tcatacccaa tatccagaac 90

25 <210> 16
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 16
 Tyr Phe Cys Ala Leu Ser Val Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu
 1 5 10 15
 35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Ile Leu Thr Val His Pro Asn Ile Gln Asn
 20 25 30

40 <210> 17
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

45 <400> 17
 tacttctgtg ctctgagcgt tgctgggtgt actagctatg gaaagctgac atttggacaa 60
 gggaccatct tgactgtcca tccaaatata cagaac 96

50 <210> 18
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55

<400> 18
 Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Ala Val Arg Pro Gly Gly Gly Asn Lys
 1 5 10 15

5 Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Lys Val Glu Leu Asn Ile Gln
 20 25 30

Asn

10

<210> 19
 <211> 99
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens

<400> 19
 tactactgcc tcgtgggtga cgccgtgagg cggggaggag gaaacaaact cacctttggg 60
 acaggcactc agctaaaagt ggaactcaat atccagaac 99

20

<210> 20
 <211> 33
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Ala Val Arg Pro Gly Gly Gly Asn Lys
 1 5 10 15

30 Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Lys Val Glu Leu Asn Ile Gln
 20 25 30

Asn

35

<210> 21
 <211> 99
 40 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 tactactgcc tcgtgggtga cgccgtgagg cggggaggag gaaacaaact cacctttggg 60
 45 acaggcactc agctaaaagt ggaactcaat atccagaac 99

<210> 22
 <211> 29
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Tyr Phe Cys Ala Thr Asp Ala Gly Gly Thr Tyr Lys Tyr Ile Phe Gly
 1 5 10 15

55

<400> 27
 tacttctgtg ctacatcggg taacaccgac aagctcatct ttgggactgg gaccagatta 60
 caagtctttc caaatatcca gaac 84
 5

<210> 28
 <211> 35
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Gln Asp Arg Phe Trp Gly Gly Thr Val Asn
 1 5 10 15
 15 Thr Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp
 20 25 30
 20 Leu Asn Lys 35

<210> 29
 <211> 105
 25 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 tatttctgtg ccagcagcca agatcgtttt tgggggggga cggtgaacac tgaagctttc 60
 30 tttggacaag gcaccagact cacagttgta gaggacctga acaag 105

<210> 30
 <211> 28
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ala Met Gly Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 40 Gly Thr Arg Leu Leu Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25

45 <210> 31
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

50 <400> 31
 tatttctgtg ccagcagcgc tatgggagag acccagtact tggggccagg cacgggctc 60
 ctggtgctcg aggacctgaa aaac 84

55

<210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 32
 Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 10 Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

 15
 <210> 33
 <211> 96
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens

 <400> 33
 tacttctgtg ccagcagcct agggcgggcg ggactcacct acgagcagta ctcggggccg 60
 ggcaccaggc tcacggtcac agaggacctg aaaaac 96
 25

 <210> 34
 <211> 32
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 34
 Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 35 Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

 40
 <210> 35
 <211> 96
 <212> DNA
 45 <213> Homo sapiens

 <400> 35
 tacttctgtg ccagcagcct agggcgggcg ggactcacct acgagcagta ctcggggccg 60
 ggcaccaggc tcacggtcac agaggacctg aaaaac 96
 50

 <210> 36
 <211> 31
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys
 20 25

5 <210> 41
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <400> 41
 tatttctgtg ccagcagccc gacagttaac tatggctaca ccttcgggttc ggggaccagg 60
 ttaaccgttg tagaggacct gaacaag 87

15 <210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 42
 Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Ser Ile Arg Gly Gln Gly Asn Glu Gln
 1 5 10 15
 Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

30 <210> 43
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

35 <400> 43
 tacttctgtg ccagcagtta ctcgattagg ggacagggta acgagcagta cttcgggccc 60
 ggcaccaggc tcacggtcac agaggacctg aaaaac 96

40 <210> 44
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 44
 Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Ser Ile Arg Gly Gln Gly Asn Glu Gln
 1 5 10 15
 Tyr Phe Arg Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

55

<210> 45
 <211> 96
 <212> DNA
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 45
 tacttctgtg ccagcagtta ctcgattagg ggacagggta acgagcagta cttccggccg 60
 10 ggcaccaggc tcacggtcac agaggacctg aaaaac 96

 <210> 46
 <211> 29
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 46
 Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Tyr Phe Gly
 1 5 10 15
 20 Pro Gly Thr Arg Leu Leu Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25

 25 <210> 47
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 47
 tatctctgtg ccagcagcca agatcggggt gcgccacagt acttcggggc aggcacggcg 60
 ctctctgtgc tcgaggacct gaaaaac 87

 35 <210> 48
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 48
 Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Thr Arg Gln Gly Pro Gln Glu Thr Gln Tyr
 1 5 10 15
 45 Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Leu Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

 <210> 49
 <211> 93
 50 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 49
 55 tatctctgtg ccagtagtac ccggcaagga cctcaagaga cccagtactt cgggcccaggc 60
 acgcggtcc tggtgctcga ggacctgaaa aac 93

<210> 50
 <211> 30
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 50
 Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gln Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe
 10 1 5 10 15

 Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

 15
 <210> 51
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 51
 tatctctgtg ccagcagctt aggacagggg gcttacgagc agtacttcgg gccgggcacc 60
 aggctcacgg tcacagagga cctgaaaaac 90

 25
 <210> 52
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 52
 Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gln Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10 15

 35 Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

 40
 <210> 53
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 45
 <400> 53
 tatctctgtg ccagcagctt aggacagggg gcttacgagc agtacttcgg gccgggcacc 60
 aggctcacgg tcacagagga cctgaaaaac 90

 50
 <210> 54
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 55

<400> 54
 Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gln Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10 15
 5 Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25 30

<210> 55
 10 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 15 tatctctgtg ccagcagctt aggacagggg gcttacgagc agtacttcgg gccgggcacc 60
 aggctcacgg tcacagagga cctgaaaaac 90

<210> 56
 20 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 25 Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gln Val Tyr Ser Pro Leu His Phe Gly
 1 5 10 15
 Asn Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Asn Lys
 20 25

30
 <210> 57
 <211> 87
 <212> DNA
 35 <213> Homo sapiens

<400> 57
 40 tacttctgtg ccagcagttt acaagtgtat tcaccctccc actttgggaa cgggaccagg 60
 ctcactgtga cagaggacct gaacaag 87

<210> 58
 <211> 31
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

<400> 58
 Tyr Phe Cys Ala Ile Ser Glu Ser Ile Gly Thr Gly Thr Glu Ala Phe
 1 5 10 15
 50 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys
 20 25 30

55

<210> 58
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 59
 tactttctgtg ccatacagtga gtcgattggt acgggaactg aagctttctt tggacaaggc 60
 accagactca cagttgtaga ggacctgaac aag 93

10
 <210> 60
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 60
 Tyr Phe Cys Ala Ile Ser Glu Ser Ile Gly Thr Gly Thr Glu Ala Phe
 1 5 10 15

20 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys
 20 25 30

25
 <210> 61
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 61
 tactttctgtg ccatacagtga gtcgattggt acgggaactg aagctttctt tggacaaggc 60
 accagactca cagttgtaga ggacctgaac aag 93

35
 <210> 62
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asp Arg Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 20 25

45
 <210> 63
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 63
 tacctctgtg ccagccggga caggtcctac gagcagtact tcgggccggg caccaggctc 60
 acggtcacag aggacctgaa aaac 84

55

<210> 64
 <211> 31
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 64
 Tyr Phe Cys Ala Ile Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ile Tyr
 1 5 10 15
 10 Phe Gly Glu Gly Ser Trp Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys
 20 25 30

 15 <210> 65
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 65
 tacttctgtg ccatcagtga ggggtccagc tctggaaca ccatatattt tggagaggga 60
 agttggctca ctgtttaga ggacctgaac aag 93

 25 <210> 66
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 66
 Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Ile Asp Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr
 1 5 10 15
 35 Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys
 20 25

 40 <210> 67
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 67
 45 ttctacatct gcagtgcctat agacggctac accttcgggtt cggggaccag gttaacctgt 60
 gtagaggacc tgaacaag 78

 50 <210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 68
 55 agcagccaag atcgtttttg g 21

	<210> 69	
	<211> 24	
	<212> DNA	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 69	
	ctagggcggg cgggactcac ctac	24
10		
	<210> 70	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
15		
	<400> 70	
	ctagggcggg cgggactcac ctac	24
20		
	<210> 71	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
25		
	<400> 71	
	tactcgatta ggggacaggg taac	24
30		
	<210> 72	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
35		
	<400> 72	
	caagatcggg ttgcgcca	18
40		
	<210> 73	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
45		
	<400> 73	
	accgggcaag gacctcaaga gacc	24
50		
	<210> 74	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
55		
	<400> 74	
	agcttaggac agggggct	18

```

5   <210> 75
    <211> 18
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens
    <400> 75
    gccagccggg acaggtcc 18

10  <210> 76
    <211> 18
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens

15  <400> 76
    gagtagattg gtacggga 18

20  <210> 77
    <211> 21
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens

25  <400> 77
    tacatctgaa gtgctataga c 21

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

P B M C 由来の P C R 生成物のクローニングおよび配列決定の実験手続き。P B M C 標本由来の c D N A を V 13 . 1 プライマーによって増幅し、L G R A G L T Y モチーフの発現について陽性の四種類の P B M C 標本由来の J プライマーを T A クローニングベクター p C R 2 . 1 に連結し、E. coli に形質転換した。プラスミド D N A を、M 13 プライマーおよび L G R A G L T Y 特異的プライマーを用いる P C R によってスクリーニングした。P C R によって視認し得る増幅を示した陽性プラスミドを、V 13 . 1 プライマーを用いて V D J 配列について配列決定した。

【図2】

単一のアラニン置換を有する類似ペプチドに対する二種類の M B P 83 - 99 T 細胞の反応性パターン。同一の V 13 . 1 転位 (M S 7 - E 2 . 6 および M S 27 - C 3 . 1 について) および類似の V - J 結合配列 (M S 7 - E 2 . 6 および M S 27 - C 3 . 1 について) を示した 2 対の M B P 83 - 99 T 細胞クローンを、[³H] - チミジン組込み分析法におけるアラニン置換ペプチドのパネルに対する反応性について検討した。D R B 1 * 1501 を発現するマウス繊維芽腫細胞系を、抗原提示細胞の供給源として用いた。それぞれの類似体ペプ

チドに対するクローンの増殖応答を72時間後に測定し、結果を組込まれたCPMとして示す。隈取りしたボックスは、類似体ペプチドに応答してT細胞クローンの増殖が>50%減少したことを表している。

【図3】

元のおよび関連のないT細胞クローンを用いるCDR3オリゴヌクレオチドの特異性の交差検討。TCRVDJ領域に特異的なオリゴヌクレオチドの組を、元のMBP83-99T細胞クローン並びに同一および異なる被験者由来の関連のないMBP83-99T細胞クローンに含まれる既知の標的DNA配列の検出における特異性について検討した。CDR3に特異的なオリゴヌクレオチドを前進プライマーとして3'-Cプライマーを復帰プライマーとして用いてPCR反応を行った。無地ボックスは、元のT細胞クローンまたは同一のCDR3配列を共有する(複数の)T細胞クローンに含まれるDNA配列の陽性検出を表す。総てのプライマーを、関連のないCDR3配列(無地ボックス)を有する無作為に選択されたT細胞クローンのDNA生成物へのそれらの結合についても検討した。

【図4】

MS患者由来の無作為に選択したPBMC標本におけるモチーフV13.1-LGRAGLTYに相補的な標的DNA配列の検出。無作為に選択したMS患者(n=48)からのPBMC標本から調製したcDNAを、5'-V13.1特異的プライマーおよび3'-Cプライマーを用いてRT-PCRで最初に増幅した。次に、増幅したPCR生成物を、LGRAGLTYモチーフに特異的なジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションした。元のMBP83-99クローン(MS7-E2.6)および関連のないT細胞クローン(MS32-B9.8)を、それぞれ正および負の対照として用いた。MS-7およびMS-27は元のPBMC標本であり、これからクローンMS7-E2.6(表1のMS-7)およびクローンMS27-C3.1(表1のMS-27)を誘導した。星印は、DRB1*1501の正の発現を示す。

【図5】

正常被験者由来の無作為に選択したPBMC標本におけるV13.1-LG

RAGLTYモチーフの検出。20名の正常被験者(NS)から得たPBMC標本を、図4の凡例に記載されているのと同条件で分析した。元のクローン(MS7-E2.6)および関連のないT細胞クローン(MS32-B9.8)を、それぞれ正および負の対照として用いた。星印は、DRB1*1501の正の発現を示す。

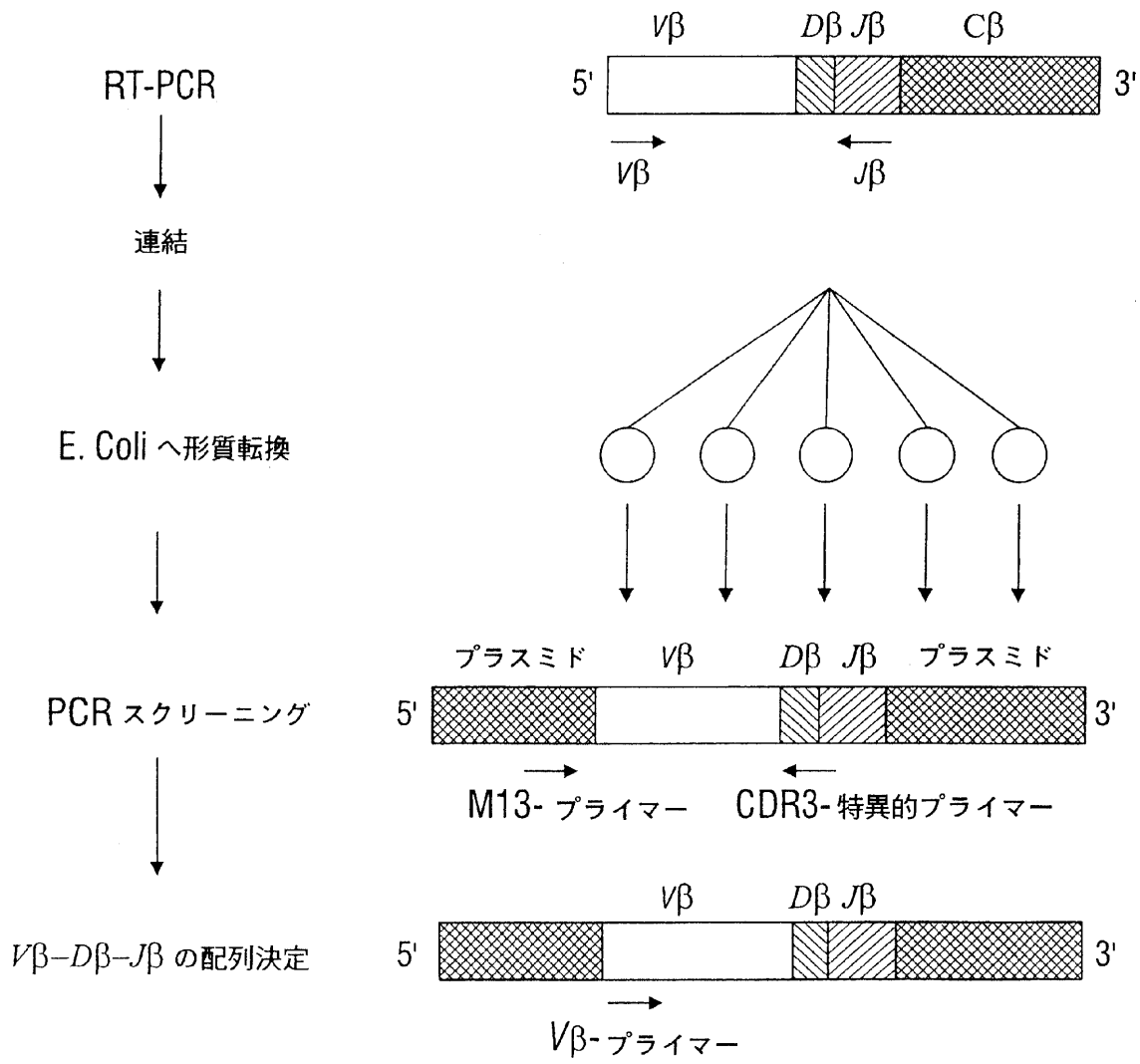
【図6】

MS患者および正常被験者由来のPBMC標本におけるLGRAGLTYモチーフの発現の半定量的比較。モチーフV13.1-LGRAGLTYの発現を、MSおよび正常被験者のPBMC由来のそれぞれのcDNAにおけるC発現に関して半定量的PCRによって分析した。相対発現レベルを、(LGRAGLTYモチーフ/Cの発現)×100%として計算した。

【図7】

MS患者由来の短期MBP83-99T細胞系におけるV13.1-LGRAGLTYモチーフの検出。独立した短期MBP83-99T細胞系のパネルを、MBPの合成83~99ペプチドを用いて5名のMS患者から生成させた。これら総てのT細胞系を、MBP83-99ペプチドに対するそれらの特異的反応性を確かめた(MBP83-99に対するCPM/対照CPM>5)。cDNA生成物を、PCRにおいて5'-V13.1特異的プライマーおよび3'-Cプライマーを用いて増幅した。次に、増幅したPCR生成物を、サザンブロット分析でV13.1-LGRAGLTYモチーフに相当するジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションした。元のMBP83-99クローン(MS7-E2.6)および関連のないT細胞クローン(MS32-B9.8)由来のcDNA生成物を、それぞれ正および負の対照として用いた。

【図1】



【図2】




T細胞の反応性 (CPM±SD)

アラニン置換ペプチド	MS1-E2.6	MS1-C3.1	MS1-E3.1
83-ENPVHFFKNIIVTPRTP-99	74,189 ± 6,224	28,966 ± 1,100	31,236 ± 3,099
A-----	59,328 ± 2,583	42,446 ± 676	38,880 ± 1,483
-A-----	68,881 ± 3,155	33,165 ± 1,883	31,243 ± 1,036
--A-----	64,901 ± 377	27,019 ± 3,085	24,487 ± 731
---A-----	65,519 ± 588	21,340 ± 1,288	34,289 ± 357
----A-----	65,205 ± 241	35,032 ± 5,649	34,080 ± 2,274
-----A-----	74,224 ± 526	16,199 ± 412	35,242 ± 300
-----A-----	67,916 ± 1,979	34,437 ± 88	16,853 ± 690
-----A-----	2,504 ± 519	907 ± 10	334 ± 38
-----A-----	51,052 ± 4,329	26,400 ± 3,969	12,577 ± 610
-----A-----	1,787 ± 120	3,364 ± 275	1,658 ± 78
-----A-----	69,699 ± 3,649	7,649 ± 337	16,598 ± 440
-----A-----	1,710 ± 34	35,340 ± 476	42,982 ± 1,605
-----A-----	48,169 ± 1,418	32,109 ± 570	21,977 ± 1,354
-----A-----	70,946 ± 1,326	23,662 ± 529	10,237 ± 22
-----A-----	2,389 ± 473	21,401 ± 432	2,424 ± 126
-----A-----	1,859 ± 110	32,035 ± 257	36,930 ± 623
-----A-----	1,569 ± 32	31,506 ± 351	34,389 ± 457
-----A-----	1,763 ± 132	999 ± 57	715 ± 53
培地のみ			

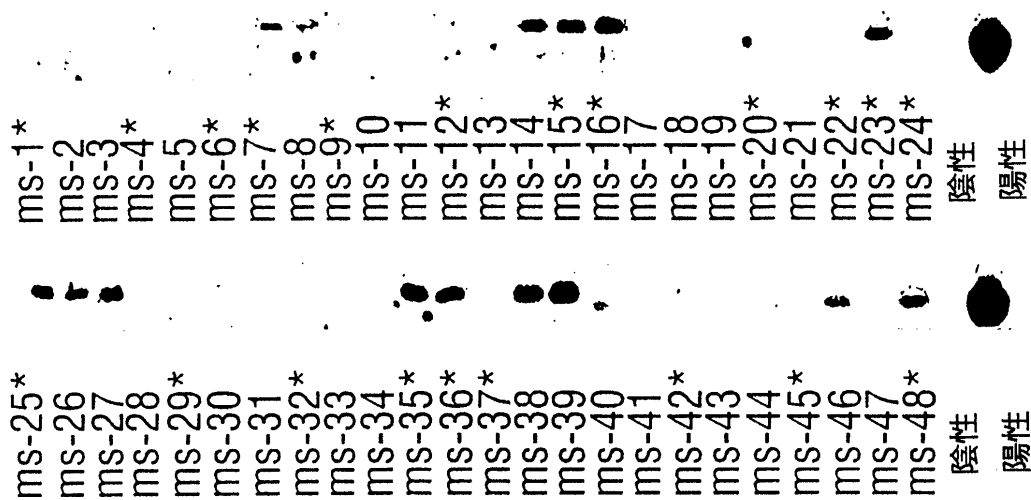
【図3】

下記のものに相当するVβ-Dβ-Jβ 特異的プライマー

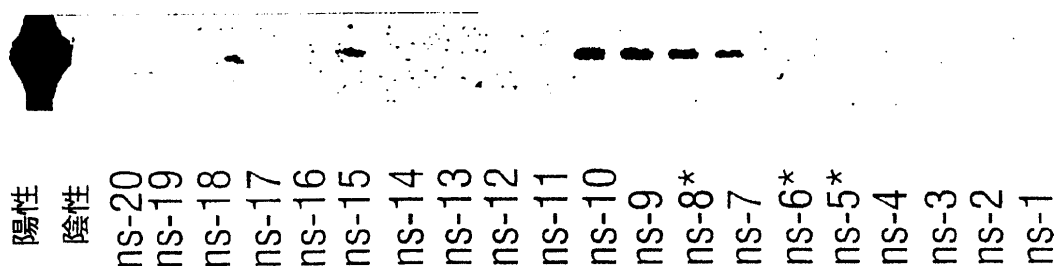
T細胞クローン	MS1-E3.1	MS1-E2.6	MS2-C3.1	MS3-F5.12	MS4-D9.3	MS4-B9.1	MS8-C.26	MS5-D2.7	MS6-D8.1	MS6-D1.2	MS2-D4.4	MS3-B9.8	MS5-D1.3	MS8-C7.2
MS1-E3.1	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS1-E2.6	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS2-C3.1	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS2-C3.1	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS4-D9.3	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS4-B9.1	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS8-C.26	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS5-D2.7	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS5-D8.1	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS6-D8.1	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
MS2-D4.4	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性
MS3-B9.8	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性
MS5-D1.3	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
MS8-C7.2	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性

 陽性
 陰性
 試験せず

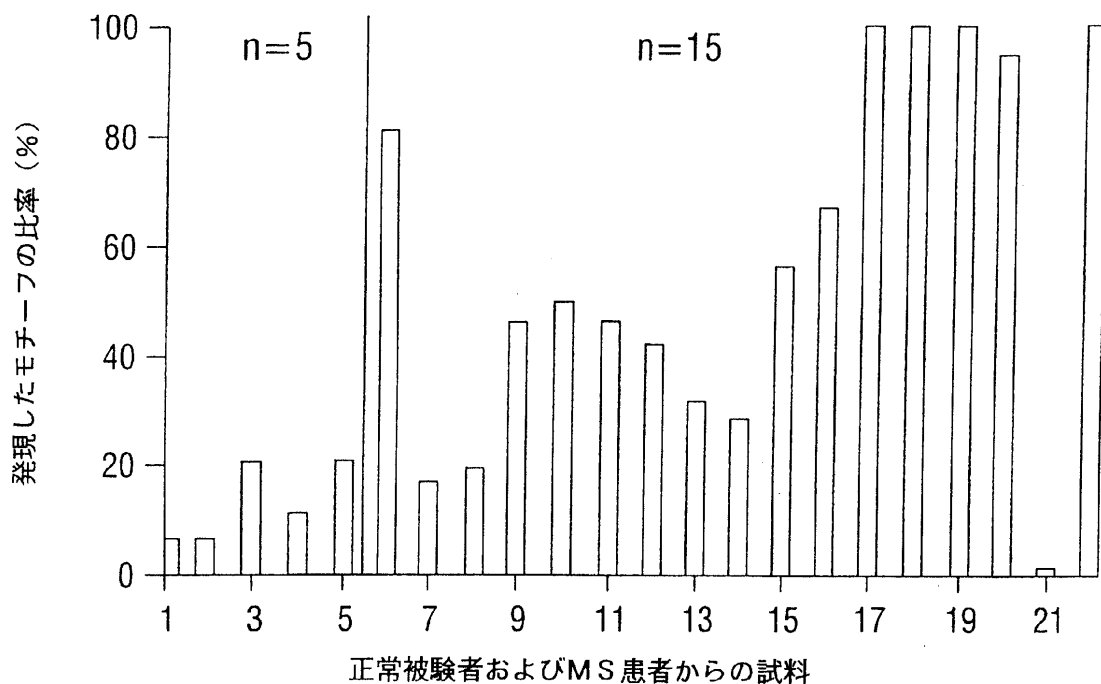
【図4】



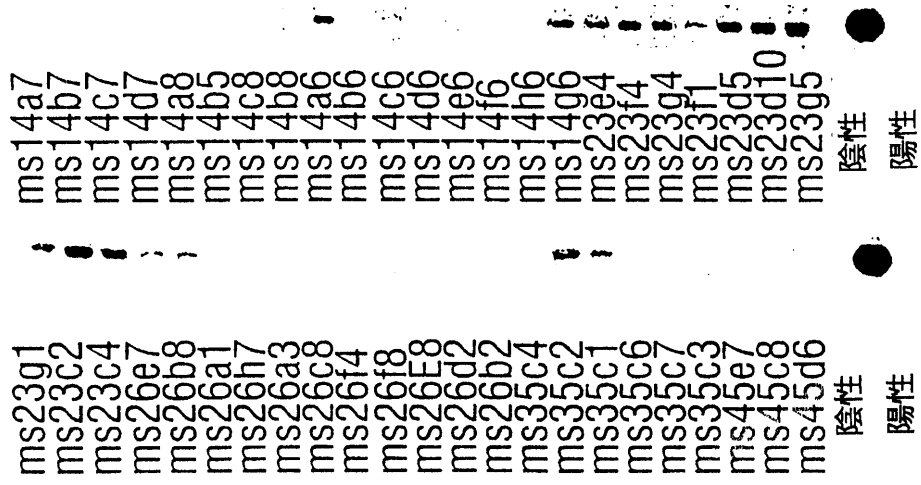
【図5】



【図6】



【图7】



【手続補正書】

【提出日】平成14年2月22日(2002.2.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる、長さが約15～30ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチド、またはそれに完全に相補的な核酸。

【請求項2】

配列番号：1の少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含んでなる、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド、またはそれに完全に相補的な核酸。

【請求項3】

配列番号：1の配列を含んでなる、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド、またはそれに完全に相補的な核酸。

【請求項4】

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドの第一のプライマー、またはそれに相補的な核酸、および

(b) (a)の配列を含まずかつT細胞レセプターT細胞におけるV_H13.1遺伝子のV_H～J_Hの領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの核酸を含んでなる第二のプライマーを含んでなるプライマーペアであって、

上記第一および第二のプライマーの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られないことを特徴とする、プライマーペア。

【請求項5】

V 13.1 遺伝子配列が配列番号：2である、請求項4に記載のプライマーペア。

【請求項6】

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約10～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに完全に相補的な核酸、および

(b) 標識残基を含んでなる、オリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項7】

標識残基が³²Pまたはジゴキシゲニンから選択される、請求項6に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項8】

T細胞レセプターLGRAGLTYモチーフを発現するMBP83-99V 13.1 T細胞の検出法であって、

(a) MBP83-99V 13.1 T細胞から核酸試料を得て、

(b) 核酸試料を、

(i) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(ii) 第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプターT細胞におけるV 13.1 遺伝子のV ~ J の領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドから選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られず、

(c) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出することを特徴とする、方法。

【請求項9】

V 13.1 遺伝子が配列番号：2である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

核酸試料の断片をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅する、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

検出段階が、

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 標識残基

を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブを用いてプロービングすることを含んでなる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

検出段階が、オートラジオグラフィーを含んでなる、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチドであって、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる上記第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに完全に相補的な核酸を含んでなる試験キット。

【請求項14】

上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まず、T細胞レセプターT細胞のV13.1遺伝子のV～Jの領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドをも含んでなり、第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られない、請求項13に記載の試験キット。

【請求項15】

V13.1遺伝子配列が配列番号：2である、請求項14に記載の試験キット。

【請求項16】

標識残基をも含んでなり、標識残基が³²Pまたはジゴキシゲニンから選択される、請求項13に記載の試験キット。

【請求項17】

ヒトの自己免疫疾患の治療法であって、

- (a) ヒトからMBP83-99V 13.1T細胞を得て、
- (b) MBP83-99V 13.1T細胞から核酸試料を得て、
- (c) 核酸試料を、

(i) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる、長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、および

(iii) 上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプター-T細胞のV 13.1遺伝子のV～Jの領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチド

から選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

(d) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(e) Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号：3) ペプチドをヒトに投与する

ことを特徴とする、方法。

【請求項18】

V 13.1遺伝子配列が配列番号：2である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

投与段階が、T細胞活性化マーカーペプチドの投与も含んでなる、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

自己免疫疾患の監視法であって、

- (A) ヒトからMBP83-99V 13.1T細胞を得て、
- (B)(i) MBP83-99V 13.1T細胞から核酸試料を得て、
- (ii) 核酸試料を、

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプター-T細胞のV_{13.1}遺伝子のV₁~J₁の領域に見いだされる長さが約15~30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドであって、

上記第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列はT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見いだされないものから選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させることによってLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、


(c) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(C) 核酸の量を定量することを特徴とする、方法。

【請求項21】

V_{13.1}遺伝子配列が配列番号：2である、請求項20に記載の方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/40006
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C07H 21/02, 21/04; A01N 37/18; A61K 38/00 US CL : 435/6; 536/23.1, 24.3; 514/2 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; 536/23.1, 24.3; 514/2 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) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION. Boehringer Mannheim Biochemicals 1993 Catalog. 1993, page 87, see entire document.	1-3, 6-7, 13 and 16
A, P	HONG et al. A Common TCR V-D-J Sequence in VB13.1 T Cells Recognizing an Immunodominant Peptide of Myelin Basic Protein in Multiple Sclerosis. Journal of Immunology. September 1999, Vol. 163, No. 6, pages 3530-3538, see the entire document.	1-21
A	KOZOVSKA et al. T Cell Recognition Motifs of an Immunodominant Peptide of Myelin Basic Protein in Patients with Multiple Sclerosis: Structural Requirements and Clinical Implications. European Journal of Immunology. June 1998, Vol. 28, No. 6, pages 1894-1901, see the entire document.	1-21
<input checked="" 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 "E" earlier document published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conformity with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *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 *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 *S* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 15 MAY 2000		Date of mailing of the international search report 12 JUN 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer ETHAN WHISENANT, PH.D.  Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/40006

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZANG et al. Restricted TCR V α Gene Rearrangements in T Cells Recognizing an Immunodominant Peptide of Myelin Basic Protein in DR2 Patients with Multiple Sclerosis. International Immunology. July 1998, Vol. 10, No. 7, pages 991-998, see the entire document.	1-21
A	Database CAPLUS, Accession No. 1998:787586, ZHANG, J. 'Emerging Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis: Suppression and Elimination of Myelin-Autoreactive T-Lymphocytes,' abstract, Emerging Therapeutic Targets. 1998, Vol. 2, No. 2, pages 137-156, see entire abstract.	17-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/40006

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

USPATFULL, MEDLINE, CAPLUS

search terms : T cell receptor, gene, autoimmune disease

专利名称(译)	T细胞受体Vβ-Dβ-Jβ序列及其检测方法		
公开(公告)号	JP2003504005A	公开(公告)日	2003-02-04
申请号	JP2000601204	申请日	2000-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒医学院		
申请(专利权)人(译)	Medisuin的贝勒医学院		
[标]发明人	ジングウゼッドツアン		
发明人	ジングウ、ゼッド.ツアン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/08 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/10 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 C07H21/02 C07H21/04 C12N15/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	A61P1/04 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/10 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P37/06 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/CA18 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB07 2G045/JA20 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR50 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX07 4C084/BA01 4C084/BA17 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA662 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB082 4C084/ZB152 4C084/ZC062 4C084/ZC352		
优先权	60/121311 1999-02-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一方面，本发明涉及包含5′-CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC-3′;或衍生序列或与其互补的核酸序列的第一寡核苷酸。第一寡核苷酸为15至30个核苷酸，不包含第一寡核苷酸的序列，并且与在Vβ13.1T细胞的Vβ13.1基因的Vβ至Jβ区域中发现的核酸一起使用，该寡核苷酸和该核酸在Vβ13.1基因对的同一链上未发现，可扩增Vβ13.1基因的一部分。或者，在检测在Vβ13.1基因的T细胞受体中发现的LGRAGLTY基序的方法中，第一寡核苷酸可以与标记的残基一起使用。该基序与自身免疫性疾病（例如多发性硬化症（MS））相关。当检测到该基序时，就可以治疗自身免疫性疾病或监测其进展。自身免疫性疾病可以通过施用包含LGRAGLTY基序的肽来治疗。

T 細胞クローン (GenBank 登録番号)	V 遺伝子	DNA または アミノ酸配列	V α - β - J α - C α
MS7-E3.1 (AF117142)	V α 22	アミノ酸	YFCALSRGGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQN (配列番号: 4)
		DNA	TACTTCTGTGCTCTGAGTAGGGGAGGTA GCAACTATAAATGACATTTGGAAAAGG AAGTCTCTTAACCGTGAATCCAAATATC CAGAAC (配列番号: 5)
MS-7-D2.2 (AF117143)	V α 9	アミノ酸	YYCALKRNEGNEKLTFTGTGTRLTTHPNIQN (配列番号: 6)
		DNA	TATTACTGTGCTCTAAAAAGAAAACTTTG GAAATGAGAAAATTAACCTTTGGGACTGG AACAAGACTCACCATCATAACCAATATC CAGAAC (配列番号: 7)
MS7-E2.6 (AF117144)	V α 17	アミノ酸	YFCAASEGGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQN (配列番号: 8)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAAGCCCGGAGGT AGCAACTATAAATGACATTTGGAAAAG GAAGTCTCTTAACCGTGAATCCAAATAT CAGAAC (配列番号: 9)
MS7-C3.1 (AF117145)	V α 17	アミノ酸	YFCAAMGDEGNEKLTFTGTGTRLTTHPNIQN (配列番号: 10)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAATGGGGGACTTTG GAAATGAGAAAATTAACCTTTGGGACTGG AACAAGACTCACCATCATAACCAATATC CAGAAC (配列番号: 11)