

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報

(A) (11)特許出願公開番号

特開2002－112784

(P2002－112784A)

(43)公開日 平成14年4月16日(2002.4.16)

(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 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76		39/395	N 4 B 0 6 4
38/00			D 4 B 0 6 5
39/395		45/00	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 29 O L (全 18数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000－306677(P2000－306677)

(22)出願日 平成12年10月5日(2000.10.5)

特許法第30条第1項適用申請有り 2000年4月26日 日本リウマチ学会発行の「第44回日本リウマチ学会総会・学術集会」に発表

(71)出願人 899000079

学校法人 慶應義塾

東京都港区三田2丁目15番45号

(72)発明者 河上 裕

神奈川県横浜市神奈川区片倉町757－120

(72)発明者 桑名 正隆

東京都杉並区浜田山4－31－36

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗リン脂質抗体症候群治療用T細胞レセプター可変領域

(57)【要約】

【課題】 抗リン脂質抗体症候群（A P S）の原因物質である抗リン脂質抗体の産生を誘導するβ₂グリコプロテイン I（β₂G P I）反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドや、かかるペプチドを有効成分とするA P S治療予防剤等を提供すること。

【解決手段】 末梢血をβ₂G P Iで刺激し、β₂G P I反応性T細胞株を樹立し、それらのT C R部分の遺伝子解析を行う。β₂G P I反応性T細胞のT C R β鎖には高頻度にV β 7やV β 8が用いられていること、β₂G P I反応性T細胞のT C R β鎖のC D R 3には特定のアミノ酸モチーフが存在すること、複数のA P S患者からC D R 3領域に全く同一のアミノ酸配列をもつT C R β鎖が存在することから、このC D R 3領域のアミノ酸配列を含むペプチドを用いて、β₂G P I反応性T細胞に対する免疫反応を誘発する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗リン脂質抗体産生を誘導するベータ2グリコプロテインI (β_2 GPI) 反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドであって、 β_2 GPI反応性T細胞の表面に存在するT細胞レセプター(TCR)のアミノ酸配列を有することを特徴とする実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項2】 β_2 GPI反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドが、TCRのCDR3のアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする請求項1記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項3】 TCRのCDR3が、TCR β 鎖のCDR3であることを特徴とする請求項2記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項4】 TCR β 鎖のCDR3が、TCRV β 7のCDR3であることを特徴とする請求項3記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項5】 TCRV β 7のCDR3のアミノ酸配列が、Thr-Gly-Xaa-Xaa-Asn (Xaaは任意のアミノ酸を表す。)を含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項4記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項6】 Thr-Gly-Xaa-Xaa-Asnを含むアミノ酸配列が、Thr-Gly-Ala-Ser-Asnを含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項5記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項7】 Thr-Gly-Ala-Ser-Asnを含むアミノ酸配列が、Ser-His-Asp-Thr-Gly-Ala-Ser-Asn-Tyr-Gly-Tyr-Thrを含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項6記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項8】 TCR β 鎖のCDR3が、TCRV β 8のCDR3であることを特徴とする請求項3記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項9】 TCRV β 8のCDR3のアミノ酸配列が、Pro-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Asp/Glu-Xaa-Gln-Tyr (Xaaは任意のアミノ酸を表す。)を含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項8記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドをコードするDNA又はその相補的配列。

【請求項11】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドと、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合ペプチド。

【請求項12】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項13】 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項12記載の抗体。

【請求項14】 請求項12又は13記載の抗体が特異的に結合する組換えペプチド。

【請求項15】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドをコードするDNAが組み込まれたことを特徴とする*50

*発現ベクター。

【請求項16】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドを発現することができる発現系を含んでなる細胞。

【請求項17】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物。

【請求項18】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドを過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。

【請求項19】 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項17又は18記載の非ヒト動物。

【請求項20】 被検物質と、 β_2 GPIと、V β 7及び／又はV β 8をもつTCRを有する β_2 GPI反応性T細胞とを用い、該T細胞における抗リン脂質抗体産生誘導活性を測定・評価することを特徴とする抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項17～19のいずれか記載の非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物の血中における抗リン脂質抗体産生量を測定・評価することを特徴とする抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項22】 請求項20又は21記載のスクリーニング方法により得られる抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制物質。

【請求項23】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドを有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤。

【請求項24】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドとアジュバンドとを有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤。

【請求項25】 請求項12又は13記載の抗体を有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤。

【請求項26】 請求項15記載の発現ベクターを有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤。

【請求項27】 請求項16記載の細胞を有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤。

【請求項28】 請求項1～9のいずれか記載のペプチドを抗原として提示することができる樹状細胞を有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤。

【請求項29】 TCRV β 7又はTCRV β 8の可変領域(CDR1, CDR2)のアミノ酸配列を含むペプチドを有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、抗リン脂質抗体症

候群 (anti-phospholipid syndrome; APS) の治療等に有用なT細胞レセプター (T cell receptor; TCR) の可変領域を含むペプチド、詳しくはAPSの原因物質である抗リン脂質抗体の産生を誘導するベータ2グリコプロテインI (β_2 -glycoprotein I; β_2 GPI) 反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドや、かかるペプチド等を有効成分とするAPS治療予防剤などに関する。

【0002】

【従来の技術】APSは、繰り返す脳梗塞、肺塞栓症、下肢深部静脈血栓症などの動静脈血栓症、習慣性流産を呈する疾患で、血液中にリン脂質と結合する血漿蛋白に対する抗体 (抗リン脂質抗体) が検出される。抗リン脂質抗体の主要な標的は β_2 GPIであり、抗リン脂質抗体が β_2 GPIの持つ凝固抑制活性を阻害することにより過凝固状態となり血栓症や流産が誘導されることが知られている (ArthritisRhem 39, 1444-1454, 1996)。

【0003】APSを診断する方法としては、抗リン脂質抗体を検出・測定する方法を挙げることができ、これらの方法は多数提案されている (特開2000-9731号公報、特開平11-295312号公報、特開平10-282096号公報、特開平10-132821号公報、特開平08-114597号公報、特開平07-103981号公報、特開平07-103980号公報、特開平06-331628号公報、特開平06-88823号公報、特開平05-60755号公報等)。しかし、APSの治療には抗血小板薬、抗凝固薬、免疫抑制薬が用いられているが、いずれもコントロールを用いた臨床試験での有効性は証明されておらず、また、抗血小板薬や抗凝固薬による治療法には重篤な出血の危険性があり、副腎皮質ステロイドをはじめとした免疫抑制薬では易感染症性や動脈硬化、骨粗しょう症促進などの副作用があり、臨床上大きな問題になっている。この問題点を解決するためには、抗リン脂質抗体の産生を選択的に抑制する治療法が必要となっており、米国特許第5, 874, 409号には、抗リン脂質抗体エпитオプのアナログを用いた抗リン脂質抗体産生抑制によるAPSの治療法が開示されている。

【0004】他方、T細胞の抗原認識を担う膜表面のTCRには、 α 鎖・ β 鎖から成るヘテロ二量体と γ 鎖・ δ 鎖から成るヘテロ二量体の二種類が同定されている。TCR遺伝子は免疫グロブリン遺伝子と同様に、可変領域 (V: variable)、多様性領域 (D: diversity)、結合領域 (J: joining)、定常領域 (C: constant) の各領域から成り、これらのアミノ酸配列はT細胞ごとに異なっていることから、TCRは抗原認識分子であると同時に個々のT細胞の目印にもなっている。このTCRの多様性は後天的なTCR遺伝子の再構成によって生みだされており、TCR β 、 δ 鎖はV-D-Jを、TCR α 、 γ 鎖はV-Jを再構成することが知られている。

【0005】T細胞の初期分化は、B細胞と同様にTCRの α 鎖及び β 鎖遺伝子の再構成と密接に関わっている。TCR β 鎖遺伝子の再構成はDN-T細胞 (double negative: CD4⁻8⁻) の段階で開始され、 β 鎖遺伝子の再構成に成功した細胞は β 鎖タンパク質と代替 α 鎖 (preT α) の複合体、つまりプレTCRを細胞表面に発現する。そして、CD4及びCD8分子の発現が誘導され、DP-T細胞 (double positive: CD4⁺8⁺) へと移行し、DPとなったT細胞は、次にTCRの α 鎖遺伝子の再構成に成功した細胞のみが、TCRを表面に発現できることが知られている。

【0006】上記TCR β 鎖には、染色体DNAには少なくとも24のV β 、2つのD β 、14のJ β 、2つのC β 遺伝子が存在し、V β 中に2つの可変領域 (CDR1、CDR2) が存在することも知られている。これら遺伝子の中からV β 、D β 、J β 、C β が各1つずつ選ばれて結合し、TCR β 鎖をコードするDNAが構成されている。この際、V β -D β -J β 遺伝子の結合部にはランダムな塩基の挿入や欠失が起こり、無限に近い多様性が生みだされている。このV β -D β -J β 遺伝子の結合部位は、CDR3 (相補性決定領域3: third complementaritydetermining region)、結合部 (junctional) 領域、又はN-D-N領域と呼ばれ、TCRの中で最も多型性に富む部分であることから、あるTCRは細菌やウイルスなどの外来抗原を認識するが、別のTCRは自己抗原である β_2 GPIを認識することができる。従来、多発性硬化症、重症筋無力症などの自己免疫疾患では病因的なT細胞のTCRには共通した構造 (モチーフ) が存在することが示されており (Nat Med 2, 1109-1115, 1996)、APS患者においても抗リン脂質抗体産生を誘導する β_2 GPI反応性T細胞が共通した構造を持ったTCR鎖を用いている可能性がある。

【0007】また、特定のT細胞がメディエイトする慢性関節リウマチ等の疾患を予防若しくは抑制する方法として、TCRの可変領域由来のペプチドや、該ペプチドを含んでなるワクチン (例えば、米国特許第5, 612, 035号、米国特許第5, 837, 246号、米国特許第5, 861, 164号、米国特許第5, 985, 552号、米国特許第6, 007, 815号など) や、TCRの可変領域をコードするDNAをレシピエントの中に導入することにより、炎症性T応答を特異的に阻害する方法 (例えば、米国特許第5, 939, 400号など) 等が知られている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】現在までに、APS患者に有効性が証明されている治療法は知られておらず、他に治療法がないために血栓症の予防を目的として抗血小板薬、抗凝固薬、免疫抑制薬などの治療法が行われているのが現状である。ただし、抗血小板薬や抗凝固薬による治療では重篤な出血の危険性があり、また副腎皮質

ステロイドをはじめとした免疫抑制薬では易感染症性や動脈硬化促進などの副作用があり、臨床上大きな問題になっている。本発明の課題は、副作用のないAPSの治療・予防剤として有用なペプチド、すなわちAPSの原因物質である抗リン脂質抗体の産生を誘導する β_2 GPI反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドや、かかるペプチドを有効成分とするAPS治療予防剤等を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、抗リン脂質抗体産生を誘導している病因的な β_2 GPI反応性T細胞に共通して用いられているTCR部分を分子レベルで同定すれば、それらTCRは β_2 GPI反応性T細胞を特徴付ける目印となり、ワクチン等の手法を用いて上記 β_2 GPI反応性T細胞のTCRに対する特異的免疫応答を誘導すれば、 β_2 GPI反応性T細胞を選択的に除去して抗リン脂質抗体産生を抑制することができるのではないかと考え、APS患者における β_2 GPI反応性T細胞株の樹立とそれらのTCR部分の遺伝子解析を行い、APS患者における抗リン脂質抗体産生を誘導する β_2 GPI反応性T細胞のTCR β 鎖には高頻度にV β 7が用いられており、数少ないがV β 7が検出されなかった例ではV β 8遺伝子という可変領域遺伝子が用いられていること、 β_2 GPI反応性T細胞のTCR β 鎖のCDR3には特定のアミノ酸モチーフが存在すること、特に複数のAPS患者からCDR3領域に全く同一のアミノ酸配列をもつTCR β 鎖が存在することを見出し、また、TCR β 鎖の可変領域V β 7又はV β 8陽性のT細胞を除去することにより、抗リン脂質抗体産生がほぼ完全に抑制されることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち本発明は、抗リン脂質抗体産生を誘導するベータ2グロブリンI (β_2 GPI) 反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドであって、 β_2 GPI反応性T細胞の表面に存在するT細胞レセプター (TCR) のアミノ酸配列を有することを特徴とする実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項1) や、 β_2 GPI反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドが、TCRのCDR3のアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする請求項1記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項2) や、TCRのCDR3が、TCR β 鎖のCDR3であることを特徴とする請求項2記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項3) や、TCR β 鎖のCDR3が、TCRV β 7のCDR3であることを特徴とする請求項3記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項4) や、TCRV β 7のCDR3のアミノ酸配列が、Thr-Gly-Xaa-Xaa-Asn (Xaa は任意のアミノ酸を表す。) を含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項4記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項5) や、Thr-Gly-Xaa-Xaa-Asn を含むアミノ酸配列

が、Thr-Gly-Ala-Ser-Asn を含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項5記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項6) や、Thr-Gly-Ala-Ser-Asn を含むアミノ酸配列が、Ser-His-Asp-Thr-Gly-Ala-Ser-Asn-Tyr-Gly-Tyr-Thr を含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項6記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項7) や、TCR β 鎖のCDR3が、TCRV β 8のCDR3であることを特徴とする請求項3記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項8) や、TCRV β 8のCDR3のアミノ酸配列が、Pro-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Asp/Glu-Xaa-Gln-Tyr (Xaa は任意のアミノ酸を表す。) を含むアミノ酸配列であることを特徴とする請求項8記載の実質的に純粋な単鎖ペプチド (請求項9) に関する。

【0011】また本発明は、請求項1～9のいずれか記載のペプチドをコードするDNA又はその相補的配列 (請求項10) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドと、マーカートンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合ペプチド (請求項11) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドに特異的に結合する抗体 (請求項12) や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項12記載の抗体 (請求項13) や、請求項12又は13記載の抗体が特異的に結合する組換えペプチド (請求項14) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドをコードするDNAが組み込まれたことを特徴とする発現ベクター (請求項15) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドを発現することができる発現系を含んでなる細胞 (請求項16) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物 (請求項17) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドを過剰発現することを特徴とする非ヒト動物 (請求項18) や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項17又は18記載の非ヒト動物 (請求項19) に関する。

【0012】さらに本発明は、被検物質と、 β_2 GPIと、V β 7及び／又はV β 8をもつTCRを有する β_2 GPI反応性T細胞とを用い、該T細胞における抗リン脂質抗体産生誘導活性を測定・評価することを特徴とする抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制又は促進物質のスクリーニング方法 (請求項20) や、請求項17～19のいずれか記載の非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物の血中における抗リン脂質抗体産生量を測定・評価することを特徴とする抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制又は促進物質のスクリーニング方法 (請求項21) や、請求項20又は21記載のスクリーニング方法により得られる抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制物質 (請求項22) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドを有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤 (請求項23) や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドとアジュバンドとを有効成分とすること

を特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤（請求項24）や、請求項12又は13記載の抗体を有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤（請求項25）や、請求項15記載の発現ベクターを有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤（請求項26）や、請求項16記載の細胞を有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤（請求項27）や、請求項1～9のいずれか記載のペプチドを抗原として提示することができる樹状細胞を有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤（請求項28）や、TCRV β 7又はTCRV β 8の可変領域（CDR1, CDR2）のアミノ酸配列を含むペプチドを有効成分とすることを特徴とする抗リン脂質抗体症候群治療予防剤（請求項29）に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明の対象となるペプチドとしては、抗リン脂質抗体産生を誘導する β_2 GPI反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドであって、 β_2 GPI反応性T細胞の表面に存在するTCRのアミノ酸配列を有する実質的に純粋な単鎖ペプチドであれば特に制限されるものではなく、ここで、 β_2 GPI反応性T細胞とは、 β_2 GPIを特異的に認識するTCRをその膜表面に有するT細胞をいい、かかる β_2 GPI反応性T細胞は、例えば末梢血T細胞をインターロイキン2（IL-2）存在下で β_2 GPIのリコンビナント蛋白と自己の抗原提示細胞（末梢血単核球、EBウイルスでトランスフォームしたB細胞など）で複数回刺激することによって、 β_2 GPI反応性T細胞株として樹立することにより、当業者であれば過度の実験なしで、容易に得ることができる。

【0014】上記抗リン脂質抗体産生を誘導する β_2 GPI反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドとしては、TCRのCDR3のアミノ酸配列を含むペプチド、好ましくはTCR β 鎖のCDR3のアミノ酸配列を含むペプチド、より好ましくは、例えば配列表の配列番号8～14のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその一部からなるペプチド、又はそれらペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド等の、TCRV β 7やTCRV β 8のCDR3のアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができる。上記TCRV β 7のCDR3のアミノ酸配列を含むペプチドとしては、Thr-Gly-Xaa-Xaa-Asn（配列番号15、なおXaaは任意のアミノ酸を表す。以下同じ。）を含むアミノ酸配列、好ましくはThr-Gly-Ala-Ser-Asn（配列番号16）を含むアミノ酸配列、より好ましくはSer-His-Asp-Thr-Gly-Ala-Ser-Asn-Tyr-Gly-Tyr-Thr（配列番号18）を含むアミノ酸配列からなるペプチドを具体的に挙げることが

でき、Ser-His-Asp-Thr-Gly-Ala-Ser-Asn-Tyr-Gly-Tyr-Thrで示されるアミノ酸配列からなるペプチドや、TCRV β 7、2のC末端に上記CDR3のアミノ酸配列が結合したペプチドをより具体的に例示することができる。また、上記TCRV β 8のCDR3のアミノ酸配列を含むペプチドとしては、Pro-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Asp/Glu-Xaa-Gln-Tyr（配列番号19）を含むアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドを具体的に挙げることができ、TCRV β 8、1やTCRV β 8、2のC末端に上記CDR3のアミノ酸配列が結合したペプチドをより具体的に例示することができる。

【0015】本発明の対象となるDNA又はその相補的配列としては、例えば配列番号1～7のいずれかに示される塩基配列からなるDNAの全部又はその一部である、上記本発明のペプチドをコードするDNAであれば特に制限されるものではないが、配列番号17に示される塩基配列又はその相補的配列を含むDNAを好適に例示することができる。例えば、上記本発明のペプチドをコードするcDNAは、前記 β_2 GPI反応性T細胞株から得られたmRNAを用いて一本鎖cDNAを合成し、既知のTCRのV β 1～24の塩基配列に相補的な26種類のプライマーと、共通するC β 領域のプライマーとを用いて各V β ごとにポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことによってTCRのDNAを増幅し、得られた各PCR産物をアガロースゲル電気泳動後のデンシトメトリーにより解析し、末梢血T細胞に比べて β_2 GPI反応性T細胞株で増加したV β を、 β_2 GPI反応性T細胞により用いられているTCR β 鎖の候補とし、候補としたこれらV β のPCR産物を一本鎖DNAとして一本鎖コンフォメーション多型性（single-strand conformation polymorphisms: SSCP）の解析を行い、 β_2 GPI反応性T細胞株においてオリゴクローナルな増加を示したDNAとして得ることができる。また、本発明のDNA又はその相補的配列は、上記本発明のペプチドのアミノ酸配列情報から常法により合成することもできる。本発明のペプチドをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部は、APSの診断用プローブとして利用することができる。

【0016】本発明の融合ペプチドとしては、本発明のペプチドとマーカートタンパク質及び／又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよく、マーカートタンパク質としては、従来知られているマーカートタンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合ペプチドは常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した本

発明のペプチドの精製や、T細胞誘導活性を有するタンパク質の検出や、本発明のペプチドに対する抗体の定量に有用であり、また当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0017】本発明の前記タンパク質やペプチドに特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記本発明のペプチド又はその一部を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点で好ましく、特に前記TCRβ鎖のCDR3のアミノ酸配列を特異的に認識するモノクローナル抗体がより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の抗体は、例えば、APSの予防治療ばかりでなく、APSの発症機構を明らかにする上で有用である。

【0018】また、本発明の抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に本発明のペプチドあるいは本発明のペプチドと担体（シュレッパー）との結合物を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。

【0019】本発明の上記本発明のペプチドに対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その本発明のペプチドを発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。また、本発明には、これら抗体が特異的に結合する組換えペプチドも包含される。

【0020】本発明はまた、上記本発明のペプチドをコードするDNAが組み込まれた発現ベクターや、本発明のペプチドを発現することができる発現系を含んでなる細胞に関する。かかる発現ベクターや発現系としては、上記本発明のペプチドを宿主細胞内で発現させることができるベクターや発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソード及びウイルスに由来するベクターや発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミ

ドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。これらベクターや発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0021】そして、上記宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowes悪性黒色腫細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げることができる。これらの細胞の中でも、HLA発現能を有する宿主細胞が好ましく、かかる宿主細胞としては、元来HLA発現能を有する細胞の他、元来HLA発現能を有さない細胞にHLAcDNAをトランスフェクションした細胞を挙げることができる。これらHLA発現能を有する宿主細胞の場合、本発明のペプチドが細胞表面に提示され、免疫応答を誘発することができる。

【0022】また、本発明のペプチドをコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transfection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレーピング(scrapping)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。

【0023】上記本発明のペプチドをコードするDNAが組み込まれた発現ベクターや上記発現系を含んでなる細胞は、APSの治療予防薬として適用しうる可能性があり、また、上記発現系を含んでなる細胞を用いると、本発明のペプチドを製造することができ、かかる細胞の培養物から本発明のペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、本発明のペプチドに対する抗体を結合させたカラムや、上記本発明のペプチドに通常のペプチドタグを付加

した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、本発明のペプチドを得ることができる。

【0024】本発明において、上記本発明のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の本発明のペプチドをコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、本発明のペプチドを発現する機能を失なった非ヒト動物をいい、また、本発明のペプチドを過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる本発明のペプチドを大量に産生する非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0025】ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、本発明のペプチド欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち本発明のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる本発明のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、本発明のペプチドのノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。

【0026】例えば、本発明のペプチドをコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち本発明のペプチドノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、本発明のペプチドをコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた本発明のペプチドをコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの本発明のペプチドをコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲティングベクターを作製する。

【0027】この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目

的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の本発明のペプチドノックアウトマウスを作製することができる。また、本発明のペプチドノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0028】本発明のペプチドのトランスジェニックマウスは、本発明のペプチドをコードするcDNAにチキンβ-アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビットβ-グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した本発明のペプチドをコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

【0029】また、上記本発明のペプチドをコードするDNA、本発明のペプチド、本発明のペプチドとマーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合ペプチド、本発明のペプチドに対する抗体、本発明のペプチドをコードするDNAが組み込まれた発現ベクター、本発明のペプチドを発現することができる発現系を含んでなる細胞等は、APSの予防や治療に有用に用いることができるばかりでなく、β₂GPI反応性T細胞の誘導等免疫応答のメカニズムの解明にも使用することができる。

【0030】本発明の抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制又は促進物質のスクリーニング方法としては、被検物質と、β₂GPIと、Vβ7及び／又はVβ8をもつTCRを有するβ₂GPI反応性T細胞とを用い、該T細胞における抗リン脂質抗体産生誘導活性を測定・評価する方法を挙げることができ、例えば、被検物質の存在下にβ₂GPIを用いて末梢血中の上記β₂GPI反応性T細胞をインビトロで刺激し、該末梢血中の抗リン脂質抗体産生量を測定し、対照としての被検物質非存在下における場合と比較することにより抗リン脂質抗体産生誘導活

性抑制又は促進物質をスクリーニングすることができる。上記V β 7及び／又はV β 8をもつTCRを有する β_2 GPI反応性T細胞としては、V β 7.1若しくはV β 7.2及び／又はV β 8.1若しくはV β 8.2をもつTCRを有する β_2 GPI反応性T細胞が好ましい。また、例えば被検物質が β_2 GPIのアンタゴニストの場合、かかる被検物質は抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制物質としてAPSの治療予防剤として用いることができる可能性がある。また、他の態様の本発明の抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制又は促進物質のスクリーニング方法としては、前記ノックアウトマウスやトランスジェニックマウス等の非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物の血中における抗リン脂質抗体産生量を測定・評価する方法を挙げることができる。例えば、被検物質を投与したトランスジェニックマウスの血中における抗リン脂質抗体産生量が対照に比べて有意に低下したときは、かかる被検物質は抗リン脂質抗体産生誘導活性抑制物質としてAPSの治療予防剤として用いることができる可能性がある。

【0031】本発明の抗リン脂質抗体症候群治療予防剤としては、本発明のペプチドを有効成分とするワクチンや、本発明のペプチドとアジュバンドとを有効成分とするワクチンを挙げることができ、上記本発明のペプチドは担体との結合物とすることもできる。これらの治療予防剤には、通常の製薬上の賦形剤を含んでいてもよく、体内に静注等により投与されることにより、かかる本発明のペプチドに対する抗体の産生が促され、かかる抗体により β_2 GPI反応性T細胞による抗リン脂質抗体産生誘導が抑制される。これらのことから明らかなように、本発明の前記抗体も抗体ワクチンとして、本発明の抗リン脂質抗体症候群治療予防剤として有用である。

【0032】本発明の他の態様の抗リン脂質抗体症候群治療予防剤としては、本発明のペプチドをコードするDNAが組み込まれた発現ベクターや、本発明のペプチドを発現することができる発現系を含んでなる細胞を有効成分とするDNAワクチンや細胞ワクチンを例示することができる。これらワクチンは、生体内で本発明のペプチドを産生することができることから、上記ワクチンと同様に、生体内に本発明のペプチドに対する抗体の産生を促し、かかる抗体により β_2 GPI反応性T細胞による抗リン脂質抗体産生誘導を抑制することができる。また、本発明の他の態様の抗リン脂質抗体症候群治療予防剤としては、本発明のペプチドを抗原として提示することができる樹状細胞を有効成分とする樹状細胞ワクチンを挙げることができる。かかる樹状細胞ワクチンは、樹状細胞を本発明のペプチドで刺激することにより調製することができ、該樹状細胞表面に提示されたMHCII結合抗原によりT細胞が誘発され、その結果本発明のペプチドに特異的な抗体産生が促されることになる。この本発明のペプチドの強力な抗原提示細胞である樹状細胞は

生体内投与により免疫誘導を行うことができる他、養子免疫療法においても有効に用いることができる。さらに、本発明の他の態様の抗リン脂質抗体症候群治療予防剤としては、CDR3を含まないTCRV β 7、好ましくはTCRV β 7.1やTCRV β 7.2、及びCDR3を含まないTCRV β 8、好ましくはTCRV β 8.1やTCRV β 8.2的可変領域(CDR1、CDR2)のアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができる。これらのペプチドを用いると、TCRV β 7陽性T細胞やTCRV β 8陽性T細胞に対する免疫反応が誘発され、その結果これらのペプチドに特異的な抗体産生が促されることになる。TCRV β 7.1、TCRV β 7.2、TCRV β 8.1及びTCRV β 8.2のアミノ酸配列を図1に示す。なお、これらV β 7(7.1、7.2)及びV β 8(8.1、8.2)の塩基配列はいずれもすでにGenBankに登録されているが、ゲノムの塩基配列(アクセッション番号:U66059、L36092)あるいは何らかのT細胞株のTCRのmRNAの塩基配列(アクセッション番号:X57728、AJ403831など)として登録されているため、個々のV β セグメントとしてのアクセッション番号は付されていない。

【0033】

【実施例】以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、対象として、これまでに血栓症又は流産を繰り返していたAPS患者5例(P1～P5の全例が抗リン脂質抗体陽性であり、末梢血中に β_2 GPIと反応するT細胞を有する)及び健康人コントロール3例(D1～D3の全例が抗リン脂質抗体陰性)を用いた。

【0034】(β_2 GPI反応性T細胞のTCRの同定)末梢血単核球分画から分離した末梢血T細胞を、インターロイキン2の存在下において、大腸菌で発現させたリコンビナント β_2 GPI(10 μ g/ml)及び自己抗原提示細胞(末梢血単核球)で1週間おきに2回刺激することにより、 β_2 GPI反応性T細胞株を樹立した。この β_2 GPI反応性T細胞株(2 $\times$ 10⁶個)からグアニジン塩化セシウム超遠心法により全RNAを抽出し、2 μ gの全RNAをテンプレートとして、oligo(dT)プライマーと逆転写酵素AMV Reverse Transcriptase(Takara社製)を用いて一本鎖cDNAを合成した。

【0035】文献(Biotechniques 13, 248, 1992)記載の方法に従って、TCRのV β 1～24の塩基配列に相補的な26種類のプライマーと、共通するC β 領域のプライマーのセット(サワディー社製)とを用いて各V β ごとにPCRを行うことによってTCRのDNAを増幅した。なお、PCRの反応条件は、反応酵素にEx-Taq(Takara)を使用し、熱変性94 $^{\circ}$ Cで30秒間、アニーリング65 $^{\circ}$ Cで30秒間、伸長反応72 $^{\circ}$ Cで1分間というサイクルで32サイクル行った。得られた各P

CR産物はアガロースゲル電気泳動後のデンストメトリーにより解析し、末梢血T細胞に比べて β_2 GPI反応性T細胞株で増加したV β を、 β_2 GPI反応性T細胞により用いられているTCR β 鎖の候補とした。候補としたこれらV β のPCR産物2 μ lにホルムアミド溶液（95%のホルムアミド、20mMのEDTA）を48 μ l加え、100℃で5分間熱処理することにより一本鎖DNAを調製し、一本鎖コンフォメーション多型性（single-strand conformation polymorphisms: SSCP）の解析を行った。

【0036】上記 β_2 GPI反応性T細胞株のSSCP解析の結果を表1に示す。この結果からもわかるよう *

症例	β2GPI刺激でオリゴクローナルに増殖したVβ					
APS患者						
P1		4	<u>8</u>		15	
P2	<u>1</u>		<u>7</u>		<u>13</u>	24
P3			<u>7</u>			
P4	<u>1</u>		<u>7</u>	5		
P5		3	<u>7</u>	<u>8</u>		
健常人						
D1			<u>8</u>			22
D2			<u>7</u>	<u>8</u>	<u>13</u>	<u>18</u> 21
D3			<u>7</u>		12	<u>18</u>

* 2人以上で検出されたV β 。

【0038】上記SSCP解析の結果、 β_2 GPI反応性T細胞株においてオリゴクローナルに増殖したV β 7、V β 8を有するTCR β 鎖をコードするDNAを、SSCP解析後のゲルから回収し、それらの塩基配列をDNAシーケンサー（Applied Biosystems社製）により決定した。V β 7陽性の6つのTCR（P2、P3、P4、P5、D2）及びV β 8陽性の3つのTCR（P5、D1、D2）の塩基配列を、それぞれ配列番号1（P2）、配列番号2（P3）、配列番号3（P3～

*に、APS患者及び健常人全例において β_2 GPI反応性T細胞のTCR β 鎖が得られた。得られた β_2 GPI反応性T細胞のTCR β 鎖には各種V β が用いられていることがわかった。その中で、V β 7は8例中6例（APS患者4例、健常人2例）に、V β 8は8例中4例（APS患者2例、健常人2例）に高頻度で検出されていた。今回検討した全例においてV β 7、V β 8のいずれかが β_2 GPI反応性T細胞に用いられていたことから、V β 7やV β 8を β_2 GPI反応性T細胞に用いられる主要なV β セグメントと考えた。

【0037】

【表1】

*5）、配列番号4（D2）、配列番号5（P5）、配列番号6（D1）及び配列番号7（D2）に示す。また、それらTCRの塩基配列から予測されるアミノ酸配列を表2並びに配列番号8（P2）、配列番号9（P3）、配列番号10（P3～5）、配列番号11（D2）、配列番号12（P5）、配列番号13（D1）及び配列番号14（D2）に示す。

【0039】

【表2】

V β		アミノ酸配列			遺伝子			CDR3長
遺伝子	症例	V β	CDR3	J β	V β	J β	C β	
V β 7	P2	CAS	SQFWTGRNGGYT	FGSGTRLTVV	7.1	1.2	1	12
	P3	CAS	SQAGRTGGDQPOH	FGDGTRLTSL	7.1	1.1	1	13
	P3	CAS	SHDTGASNYGYT	FGSGTRLTVV	7.2	1.2	1	12
	P4	CAS	SHDTGASNYGYT	FGSGTRLTVV	7.2	1.2	1	12
	P5	CAS	SHDTGASNYGYT	FGSGTRLTVV	7.2	1.2	1	12
	D2	CAS	SQDLETGGSNYSPLH	FGNGTRLTVT	7.2	1.6	1	16
V β 8	P5	CAS	RPSAGADTOY	FGPGTRLTVL	8.1/8.2	2.3	2	10
	D1	CAS	SPRADYEQY	FGPGTRLTVT	8.1/8.2	2.7	2	9
	D2	CAS	GPSAGADTOY	FGPGTRLTVL	8.1/8.2	2.3	2	10

【0040】TCR β 鎖の塩基配列はNCBI（National Center for Biotechnology Information；<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）のサイトでホモロジー検索を行い、相同性のある既知の遺伝子及びアミノ酸配列を検索した。この結果、いずれのTCR β 鎖の塩基配列やアミノ酸配列に一致する配列はGenBankに登録されていなかった。次にV β 、J β 及びC β 遺伝子セグメントを既知の配列から調べてみた。この結果、V β 7陽性TCRに

おいては、V β 遺伝子としてはV β 7.1又はV β 7.2が、J β 遺伝子としてはJ β 1.1、J β 1.2又はJ β 1.6が、C β 遺伝子としてはC β 1が用いられていたが、V β 8陽性TCRにおいては、V β 遺伝子としてはV β 8.1/V β 8.2（塩基配列を決定した部分ではいずれのV β 遺伝子かは鑑別が不可能）が、J β 遺伝子としてはJ β 2.3又はJ β 2.7が、C β 遺伝子としてはC β 2が用いられていた。

【0041】また、全てのV β 7陽性TCR β 鎖のCDR3のアミノ酸配列では、Thr-Gly-Xaa-Xaa-Asn（配列番号15）若しくは類似したモチーフが確認できた。このCDR3のアミノ酸数（CDR3長）は健康人由来のD2を除いては全て12～13個であった。注目すべきことに、3人のAPS患者（P3、P4、P5）から全く同一のアミノ酸配列を持つTCR β 鎖が検出された。一方、V β 8陽性TCR β 鎖のCDR3のアミノ酸配列ではPro-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Asp/Glu-Xaa-Gln-Tyr（配列番号19）という配列が見られ、かかるアミノ酸配列も9～10個と共通していた。以上のことから、 β_2 GPI反応性T細胞には限られたCDR3のモチーフを有するV β 7又はV β 8陽性のTCR β 鎖が用いられていることがわかった。

【0042】次に、SSCP法により得られたTCR β 鎖が β_2 GPI反応性T細胞由来であることを確認するために、APS患者2例（P4、P2）から樹立された β_2 GPI反応性T細胞株から限界希釈法により β_2 GPI*

*Iと反応する単一のT細胞集団（ β_2 GPI反応性T細胞クローン）を計3株樹立し、この樹立した β_2 GPI反応性T細胞クローンのTCR β 鎖を、前記と同様に各V β のプライマーを用いたRT-PCR法により検出し、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。 β_2 GPI反応性T細胞クローンの塩基配列から推測されるアミノ酸配列を表3に示す。この結果から、P4から樹立した2つのクローン（P1-2、P1-7）のTCR β 鎖の塩基配列はCDR3の塩基配列も含めて、APS患者3例（P3、P4、P5）に共通して見出された塩基配列と一致していた。また、P2から樹立したクローン（P3-3）の塩基配列及びアミノ酸配列は、同じ患者からSSCP法で検出されたV β 7陽性のTCR β 鎖のものと一致していた。これらのことから、これらTCR β 鎖は β_2 GPI由来の抗原ペプチドを認識することが認められた。

【0043】

【表3】

β2GPI反応性 T細胞クローン	症例	アミノ酸配列		遺伝子	CDR3長		
		Vβ	CDR3	Jβ	Vβ	Jβ	Cβ
P1-2	P4	CAS	SHDTGASNYGYT	FGSGTRLTVV	7.2	1.2	1
P1-7	P4	CAS	SHDTGASNYGYT	FGSGTRLTVV	7.2	1.2	1
P3-3	P2	CAS	SQFWTGRNGGYT	FGSGTRLTVV	7.1	1.2	1

【0044】（TCRV β 7又はV β 8陽性T細胞除去によるin vitroでの抗リン脂質抗体産生に及ぼす影響の検討）本発明者らはこれまで、APS患者の末梢血単核球をリコンビナント β_2 GPI存在下で培養すると上清中に抗リン脂質抗体が産生されることを報告している

（Arthritis Rheum 43, 65-75, 2000）。この反応は抗原刺激により活性化された β_2 GPI反応性T細胞がB細胞を刺激して抗リン脂質抗体産生を誘導することから、APS患者3例（P1、P3、P4）において、 β_2 GPI反応性T細胞に用いられているTCRV β 7、V β 8陽性T細胞を除去することで、抗リン脂質抗体の産生が抑制されるかどうかをin vitroで調べてみた。APS患者3例（P1、P3、P4）から得られた末梢血単核球を、RPMI 1640培地中でヒトTCRV β 7又はV β 8に対するマウス由来モノクローナル抗体、抗V β 7抗体（Immunotech社製）又は抗V β 8抗体（Immunotech社製）と室温で30分間反応させ、さらに微細鉄粒子結合抗マウスIgG抗体（DynaI社製）と室温で30分間反応させた。反応後、鉄粒子が結合したT細胞を磁気装置（Promega社製）により除去し、V β 7又はV β 8陽性T細胞を除去した末梢血単核球 [V β 7（-）、V β 8（-）] を調製した。また、コントロールとして β_2 GPI反応性T細胞に用いられていないV β 2陽性T細胞を、ヒトTCRV β 2に対するマウス由来モノクローナル抗体、抗V β 2抗体（Immunotech社製）を用いて除去し、V β 2陽性T細胞を除去した末梢

血単核球 [V β 2（-）] を調製した。

【0045】末梢血単核球及び各TCRV β 鎖を発現するT細胞（V β 2、7、8陽性T細胞）を除去した末梢血単核球を、10 μ g/mlのリコンビナント β_2 GPIを含有したRPMI 1640培地により37℃で10日間培養し、上清中に産生された抗リン脂質抗体をELISAキット（ヤマサ社製）を用いて測定した。結果を図2に示す。この結果から、 β_2 GPI反応性T細胞にV β 7が用いられていたAPS患者2例（P3、P4）ではV β 7陽性T細胞の除去により抗リン脂質抗体産生はほぼ完全に抑制された。一方、 β_2 GPI反応性T細胞においてV β 8が用いられていたAPS患者P1では、V β 7陽性T細胞除去による抗リン脂質抗体産生抑制は見られなかったが、V β 8陽性T細胞除去により抗リン脂質抗体産生が抑制された。

【0046】以上のことから、 β_2 GPI反応性T細胞のTCR β 鎖には高頻度にV β 7が用いられており、V β 7が検出されなかった例ではV β 8が用いられていたことや、 β_2 GPI反応性T細胞のTCR β 鎖のCDR3には特定のアミノ酸モチーフが検出されたことや、V β 7又はV β 8陽性T細胞の除去によりAPS患者末梢血単核球からの抗リン脂質抗体産生が抑制されることがわかった。したがって、 β_2 GPI反応性T細胞のTCR β 鎖には非常に限定された構造が存在し、それらTCR β 鎖を標的（目印）として β_2 GPI反応性T細胞を除去すれば抗リン脂質抗体産生の抑制を介したAPSの

新たな治療法になり得ると考えられる。

【0047】

【発明の効果】本発明によると、副作用のないAPSの治療・予防剤として有用なペプチド、すなわちAPSの原因物質である抗リン脂質抗体の産生を誘導する β_2 G

PI反応性T細胞に対する免疫反応を誘発するペプチドや、かかるペプチドを有効成分とするAPS治療予防剤等を提供することができる。

【0048】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> KEIO UNIVERSITY
<120> A variable region of Tcell
      receptor for the treatment
      of anti-phospholipid syndrome
<130> 000000087
<140>
<141>

<160> 19
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 309
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
cctgaatgcc ccaacagctc tctcttaaac cttc
acctac acgccctgca gccagaagac 60
tcagccctgt atctctgcgc cagcagccaa tttt
ggacag ggaggaacgg cggtacacc 120
ttcggttcgg ggaccaggtt aaccgttggtg gagg
acctga acaaggtgtt cccaccgag 180
gtcgtgtgt ttgagccatc agaagcagag atct
cccaca cccaaaaggc cacttggtg 240
tgcctggcca caggtatctt cctgaccac gtgg
agctga gctggtgggt gaatgggaag 300
gaggtgcac
      309
<210> 2
<211> 312
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
cctgaatgcc ccaacagctc tctcttaaac cttc
acctac acgccctgca gccagaagac 60
tcagccctgt atctctgcgc cagcagccaa gctg
gacgga caggaggtga tcagcccag 120
cattttggtg atgggactcg actctccatc ctag
aggacc tgaacaaggt gtccacccc 180
gaggtcgtg tgtttgagcc atcagaagca gaga
tctccc acacccaaa ggccacactg 240
gtgtgcctgg ccacaggtat cttccctgac cacg
tgagc tgagctggtg ggtgaatggg 300
aaggaggtgc ac
      312
<210> 3
<211> 309

```

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 cctgaatgcc ccaacagctc tcatttattc cttc
 acctac acaccctgca gccagaagac 60
 tcggccctgt atctctgtgc cagcagccaa gatc
 tggaga cagggggctc aaactataat 120
 tcaccctcc actttgggaa tgggaccagg ctca
 ctgtga cagaggacct gaacaagggtg 180
 ttcccacccg aggtcgtgtg gtttgagcca tcag
 aagcag agatctccca caccctaaag 240
 gccacactgg tgtgcctggc cacaggtatc ttcc
 ctgacc acgtggagct gagctggtgg 300
 gtgaatggga aggaggtgca c
 321

<210> 5
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 tggtagacagac agaccatgat gcggggactg gagt
 tgctca tttactttaa caacaacgtt 60
 ccgatagatg attcaggat gcccgaggat cgat
 tctcag ctaagatgcc taatgcatca 120
 ttctccactc tgaagatcca gcctcagaa ccca
 gggact cagctgtgta cttctgtgcc 180
 agcaggccca gcgcgggggc agatacgagc tatt
 ttggcc caggcaccgc gctgacagtg 240
 ctcgaggacc tgaaaaacgt gttcccaccg gagg
 tcgctg tgtttgagcc atcagaagca 300
 gagatctccc acacccaaaa ggccacactg gtgt
 gcttgg ccacaggctt ctaccccgac 360
 cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg aagg
 aggtgc ac 402

<210> 6
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 tggtagacagac agaccatgat gcggggactg gagt
 tgctca tttactttaa caacaacgtt 60
 ccgatagatg attcaggat gcccgaggat cgat
 tctcag ctaagatgcc taatgcatca 120
 ttctccactc tgaagatcca gcctcagaa ccca
 gggact cagctgtgta cttctgtgcc 180
 agcagtcacc gggccgacta cgagcagtac ttcg
 ggccgg gcaccaggct cagggtcaca 240
 gaggacctga aaaacgtgtt cccaccgagc gtcg
 ctgtgt ttgagccatc agaagcagag 300
 atctccaca cccaaaaggc cacactggtg tgcc
 tggcca caggtctcta ccccgaccac 360
 gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gagg
 tgcac 399

Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn
 Leu His Leu His Ala Leu
 1 5 10 15
 Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys
 Ala Ser Ser Gln Phe Trp
 20 25 30
 Thr Gly Arg Asn Gly Gly Tyr Thr Phe Gly
 Ser Gly Thr Arg Leu Thr
 35 40 45
 Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro
 Pro Glu Val Ala Val Phe
 50 55 60
 Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr
 Gln Lys Ala Thr Leu Val
 65 70 75 80

 Cys Leu Ala Thr Gly Ile Phe Pro Asp His
 Val Glu Leu Ser Trp Trp
 85 90 95
 Val Asn Gly Lys Glu Val His
 100
 <210> 9
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn
 Leu His Leu His Ala Leu
 1 5 10 15
 Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys
 Ala Ser Ser Gln Ala Gly
 20 25 30

 Arg Thr Gly Gly Asp Gln Pro Gln His Phe
 Gly Asp Gly Thr Arg Leu
 35 40 45
 Ser Ile Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe
 Pro Pro Glu Val Ala Val
 50 55 60
 Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His
 Thr Gln Lys Ala Thr Leu
 65 70 75 80

 Val Cys Leu Ala Thr Gly Ile Phe Pro Asp
 His Val Glu Leu Ser Trp
 85 90 95
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His
 100
 <210> 10
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Cys Leu Ala Thr Gly Ile Phe Pro Asp His
 Val Glu Leu Ser Trp Trp
 85 90 95
 Val Asn Gly Lys Glu Val His
 100
 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe
 Leu His Leu His Thr Leu
 1 5 10 15
 Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys
 Ala Ser Ser Gln Asp Leu
 20 25 30
 Glu Thr Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Ser Pro
 Leu His Phe Gly Asn Gly
 35 40 45
 Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Asn
 Lys Val Phe Pro Pro Glu
 50 55 60
 Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu
 Ile Ser His Thr Gln Lys
 65 70 75 80

 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Ile
 Phe Pro Asp His Val Glu
 85 90 95
 Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val
 His
 100 105
 <210> 12
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu
 Glu Leu Leu Ile Tyr Phe
 1 5 10 15
 Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly
 Met Pro Glu Asp Arg Phe
 20 25 30
 Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser
 Thr Leu Lys Ile Gln Pro
 35 40 45

 Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 Cys Ala Ser Arg Pro Ser
 50 55 60
 Ala Gly Ala Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro
 Gly Thr Arg Leu Thr Val
 65 70 75 80

<213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu

Glu Leu Leu Ile Tyr Phe

1

5

10

15

Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly

Met Pro Glu Asp Arg Phe

20

25

30

Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser

Thr Leu Lys Ile Gln Pro

35

40

45

Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe

Cys Ala Ser Ser Pro Arg

50

55

60

Ala Asp Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly

Thr Arg Leu Thr Val Thr

65

70

75

80

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu

Val Ala Val Phe Glu Pro

85

90

95

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys

Ala Thr Leu Val Cys Leu

100

105

110

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu

Leu Ser Trp Trp Val Asn

115

120

125

Gly Lys Glu Val His

130

<210> 14

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu

Glu Leu Leu Ile Tyr Phe

1

5

10

15

Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly

Met Pro Glu Asp Arg Phe

20

25

30

Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser

Thr Leu Lys Ile Gln Pro

35

40

45

Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe

Cys Ala Ser Gly Pro Ser

50

55

60

Ala Gly Ala Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro

Gly Thr Arg Leu Thr Val

65

70

75

80

Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro

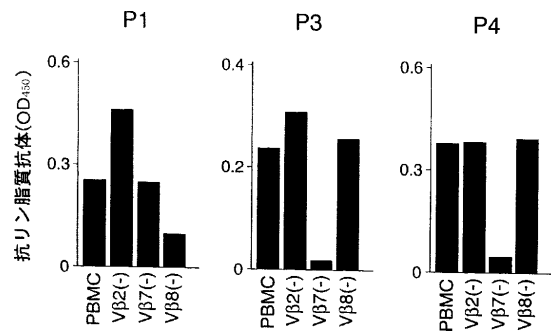
<213> Homo sapiens
<400> 15
Thr Gly Xaa Xaa Asn
1 5
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Thr Gly Ala Ser Asn
1 5
<210> 17
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 17
agccatgaca caggggcctc taactatggc taca
cc 36

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Ser His Asp Thr Gly Ala Ser Asn Tyr Gly
Tyr Thr
1 5 10
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19 21

22

【図面の簡単な説明】Pro Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Tyr 【図2】Vβ7及びVβ8陽性T細胞除去のin vitroで
【図1】TCRVβ7I(7. 1、7. 2)及びVβ8 の抗リン脂質抗体産生の抑制効果を示す図である。
(8. 1、8. 2)のアミノ酸配列を示す図である。

【図2】



【図1】

Vβ7.1

MGCRLLC~~CAVLC~~LLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHM~~GH~~RAMYWKQAKKPP~~EL~~MFVYSYEK
LSINESVPSRFSPEC~~PN~~SSLLNLHLHALQPEDSALYLCASS

Vβ7.2

MGCRLLC~~CAVLC~~LLGAVPMETGVTQTPRHLVMGMTNKKSLKCEQHL~~GH~~NAMYWKQS~~AKK~~PLELMFVYNFKE
QTENNSVPSRFSPEC~~PN~~SSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASS

Vβ8.1

MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFN~~NN~~V
PIDDSGMPEDRFS~~AK~~MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASR

Vβ8.2

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGH~~DY~~LFWYRQTMMRGLELLIYFN~~NN~~V
PIDDSGMPEDRFS~~AK~~MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASR

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
	45/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 7
	48/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P	9/00		
	15/06		
	43/00	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K	14/705		
	16/28		
	19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N	1/15		
	1/19		
	1/21	G 0 1 N 33/15	Z
	5/10		Z
G 0 1 N	33/15		D
	33/50		B
	33/53	C 1 2 P 21/02	C
	33/577		
// C 1 2 P	21/02		
	21/08	C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 N	5/10	(C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 P	21/02	(C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 P	21/08	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R	1:91)	A 6 1 K 37/02	
		C 1 2 N 5/00	A
			B
		C 1 2 R 1:91)	

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 CA18 CA25 CB17
DA13 DA36 DA77 FB03
4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA04
DA02 EA04 GA14 HA01
4B064 AG01 AG20 AG27 CA10 CA19
CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA91X AA93Y AB01 BA02
BA03 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 AA16 BA01 BA16
BA17 BA18 BA21 NA14 ZA362
ZA812 ZC412
4C085 AA13 AA14
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14
ZA36 ZA81 ZC41
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA42
DA50 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	T细胞受体可变区用于治疗抗磷脂抗体综合征		
公开(公告)号	JP2002112784A	公开(公告)日	2002-04-16
申请号	JP2000306677	申请日	2000-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人 慶應義塾		
[标]发明人	河上裕 桑名正隆		
发明人	河上 裕 桑名 正隆		
IPC分类号	A01K67/027 A61K35/17 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/14 A61K38/16 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P15/06 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	A01K67/027 A61K35/76 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P15/06 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/02.C C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A C12N5/00.B A61K35/17.A A61K38/00 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/14 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/CA18 2G045/CA25 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA01 4B064/AG01 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA21 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA812 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA81 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA42 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：要获得一种肽，该肽可诱导对β2糖蛋白I (β2GPI) 反应性T细胞的免疫反应，从而诱导产生抗磷脂抗体，该抗体是抗磷脂抗体综合征 (APS) 的病原体，提供包含肽作为有效成分的APS治疗/预防剂。 解决方案：用β2GPI刺激外周血，建立β2GPI反应性T细胞系，并对那些TCR部分进行基因分析。 Vβ7和Vβ8经常用于β2GPI反应性T细胞的TCRβ链中，并且特定的氨基酸基序存在于β2GPI反应性T细胞的TCRβ链的CDR3中。 由于来自多个APS患者的CDR3区中存在完全相同氨基酸序列的TCRβ链，因此使用含有该CDR3区氨基酸序列的肽对β2GPI反应性T细胞进行免疫反应。 诱导。

に示す。この結果からもわかるよう * 【表1】

症例	β2GPI刺激でオリゴクローナルに増殖したVβ				
APS患者					
P1		4	<u>8</u>	15	
P2	<u>1</u>		<u>7</u>	<u>13</u>	24
P3			<u>7</u>		
P4	<u>1</u>	5	<u>7</u>		
P5	3		<u>7</u>	<u>8</u>	
健康人					
D1			<u>8</u>		22
D2		<u>7</u>	<u>8</u>	<u>13</u>	18 21
D3		<u>7</u>		12	18

* 2人以上で検出されたVβ。