

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-158687

(P2019-158687A)

(43) 公開日 令和1年9月19日(2019.9.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 5
CO 7 K 16/28 (2006.01)	CO 7 K 16/28	4 H O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-47304 (P2018-47304)
 (22) 出願日 平成30年3月14日 (2018.3.14)

(71) 出願人 506111240
 学校法人 愛知医科大学
 愛知県長久手市岩作雁又1番地1
 (74) 代理人 100114362
 弁理士 萩野 幹治
 (72) 発明者 鈴木 進
 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 学校法人 愛知医科大学内
 (72) 発明者 吉川 和宏
 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 学校法人 愛知医科大学内
 Fターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA36 FA37 FB03
 4B029 AA07 AA27 BB11 CC01 FA04
 4B065 AA94X AC20 BA30 BD14 CA44
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA50 DA76
 EA50 FA74

(54) 【発明の名称】 エフェクター制御性T細胞の検出及び調製

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 エフェクター制御性T細胞選択性の高いマーカー分子を見出し、エフェクター制御性T細胞を特異的に検出する手段を提供することを課題とする。

【解決手段】 ケモカイン受容体CXCRの発現と、転写因子FOXP3又はCD25の発現を併用させ、免疫組織化学によって(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性、を示すことを指標としてT細胞を含む試料の中からエフェクター制御性T細胞を検出する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ケモカイン受容体CXCR6 (C-X-C chemokine receptor type 6) の発現と、転写因子FOXP3又はCD25の発現を併用することを特徴とする、T細胞を含む試料の中からエフェクター制御性T細胞を検出する方法。

【請求項 2】

以下のマーカー特性、即ち、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性、を示すこと、を指標としてエフェクター制御性T細胞が検出される、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 3】

以下の(1)~(3)のステップを含む、請求項 2 に記載の検出方法：

(1)T細胞を含む試料の中からリンパ球の集団を特定し、分画するステップ、

(2)分画したリンパ球の中から、制御性T細胞を含み、且つ細胞障害性T細胞を含まない細胞集団を特定し、分画するステップ、

(3)前記細胞集団の中で以下のマーカー特性、即ち、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性、を示す細胞をエフェクター制御性T細胞として検出するステップ。

【請求項 4】

ステップ(2)で特定される細胞集団が、以下のマーカー特性、即ち、(i)CD4陽性、及び(ii)CD8陰性、を示す細胞集団である、請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

ステップ(2)で特定される細胞集団が、以下のマーカー特性、即ち、(i)CD4陽性、(ii)CD8陰性、及び(iii)CD45RA陰性、を示す細胞集団である、請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 6】

ステップ(3)において、更に以下のマーカー特性、即ち、(iii)CD45RA陰性、を示す細胞がエフェクター制御性T細胞として検出される、請求項 3 又は 4 に記載の検出方法。

【請求項 7】

検出した細胞がCD45RA陰性であることを確認するステップを更に含む、請求項 3 又は 4 に記載の検出方法。

【請求項 8】

前記各ステップをフローサイトメトリーで行う、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の検出方法。

【請求項 9】

免疫組織化学によってエフェクター制御性T細胞が検出される、請求項 1 又は 2 に記載の検出方法。

【請求項 10】

CXCR6を標的抗原とした染色とFOXP3を標的抗原とした染色を行い、両方の染色で陽性を示す細胞がエフェクター制御性T細胞として検出される、請求項 9 に記載の検出方法。

【請求項 11】

請求項1~8のいずれか一項に記載の方法で検出されたエフェクター制御性T細胞を分取するステップを含む、エフェクター制御性T細胞を調製する方法。

【請求項 12】

請求項 11 の調製方法で得られたエフェクター制御性T細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はエフェクター制御性T細胞の検出に関する。詳しくは、分子マーカーを利用してエフェクター制御性T細胞を検出する方法及びその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

エフェクター制御性T細胞 (eTreg) は、強力な免疫抑制活性を持ち、過度な免疫応答を

10

20

30

40

50

抑制する上で重要な役割を持っている。感染症における免疫反応の終息、自己免疫の抑制の他、腫瘍免疫の抑制など、生体内における免疫反応の抑制に広範に關与し、各種疾患の病態と深くかかわることが知られている。eTregの測定法としてはTregマスター遺伝子産物であるFOXP3の発現を指標とした方法が広く実施されているが（例えば非特許文献1を参照）、ヒトにおいてFOXP3陽性細胞は、Treg以外にも様々な機能を持ったCD4陽性T細胞にも発現がみられることが報告されており（例えば非特許文献2、3を参照）、Tregを反映するFOXP3陽性サブセット分子マーカーの確立が重要となっている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Clin Cancer Res. 2012 Jun 1;18(11):3022-9.

【非特許文献2】Immunity. 2009 Jun 19;30(6):899-911.

【非特許文献3】Int J Cancer. 2017 Feb 1;140(3):686-695.

【非特許文献4】Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jun 9;112(23):7225-30.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

これまでも、CD25、CTLA4、CCR4などがeTregのマーカーとなることが報告されているが（例えば非特許文献4を参照）、選択性は必ずしも高くない。そこで本発明は、eTreg選択性の高いマーカー分子を見出し、eTregを特異的に検出する手段を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決すべく本発明者らは、臨床検体（頭頸部がん患者由来）を用いて研究を進めた。鋭意検討の末、ケモカイン受容体CXCR6（C-X-C chemokine receptor type 6）がeTregを反映するFOXP3陽性サブセット分子マーカーとして優れていることを見出した。即ち、eTregに特異的なマーカーであるCXCR6を同定することに成功し、CXCR6にFOXP3を併用すれば、CD4陽性T細胞の集団からeTregを高い選択性及び特異性で検出・同定、分離などが可能になることが明らかとなった。また、FOXP3と同様にCD25も、CXCR6との併用によってeTregの選択的/特異的な検出を可能にした。以上の成果及び考察に基づき、以下の発明が提供される。

[1] ケモカイン受容体CXCR6（C-X-C chemokine receptor type 6）の発現と、転写因子FOXP3又はCD25の発現を併用することの特徴とする、T細胞を含む試料の中からエフェクター制御性T細胞を検出する方法。

[2] 以下のマーカー特性、即ち、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性、を示すこと、を指標としてエフェクター制御性T細胞が検出される、[1]に記載の検出方法。

[3] 以下の(1)~(3)のステップを含む、[2]に記載の検出方法：

(1) T細胞を含む試料の中からリンパ球の集団を特定し、分画するステップ、

(2) 分画したリンパ球の中から、制御性T細胞を含み、且つ細胞障害性T細胞を含まない細胞集団を特定し、分画するステップ、

(3) 前記細胞集団の中で以下のマーカー特性、即ち、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性、を示す細胞をエフェクター制御性T細胞として検出するステップ。

[4] ステップ(2)で特定される細胞集団が、以下のマーカー特性、即ち、(i)CD4陽性、及び(ii)CD8陰性、を示す細胞集団である、[3]に記載の検出方法。

[5] ステップ(2)で特定される細胞集団が、以下のマーカー特性、即ち、(i)CD4陽性、(ii)CD8陰性、及び(iii)CD45RA陰性、を示す細胞集団である、[3]に記載の検出方法。

[6] ステップ(3)において、更に以下のマーカー特性、即ち、(iii)CD45RA陰性、を示す細胞がエフェクター制御性T細胞として検出される、[3]又は[4]に記載の検出方

10

20

30

40

50

法。

[7] 検出した細胞がCD45RA陰性であることを確認するステップを更に含む、[3] 又は [4] に記載の検出方法。

[8] 前記各ステップをフローサイトメトリーで行う、[3] ~ [7] のいずれか一項に記載の検出方法。

[9] 免疫組織化学によってエフェクター制御性T細胞が検出される、[1] 又は [2] に記載の検出方法。

[10] CXCR6を標的抗原とした染色とFOXP3を標的抗原とした染色を行い、両方の染色で陽性を示す細胞がエフェクター制御性T細胞として検出される、[9] に記載の検出方法。

[11] [1] ~ [8] のいずれか一項に記載の方法で検出されたエフェクター制御性T細胞を分取するステップを含む、エフェクター制御性T細胞を調製する方法。

[12] [11] の調製方法で得られたエフェクター制御性T細胞。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】頭頸部がん由来リンパ節リンパ球中エフェクター制御性T細胞(eTreg)の解析1

【図2】頭頸部がん由来リンパ節リンパ球中エフェクター制御性T細胞(eTreg)の解析2

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明の第1の局面はエフェクター制御性T細胞(「eTreg」と略称することがある)を検出する方法(以下、「本発明の検出方法」とも呼ぶ)に関する。「エフェクター制御性T細胞」とは、活性化型の制御性T細胞であり、強力な免疫抑制活性を示す。本発明の検出方法は、ケモカイン受容体CXCR6(C-X-C chemokine receptor type 6)の発現と、転写因子FOXP3又はCD25の発現を併用する点で特徴づけられる。換言すれば、大別して2種類のマーカー分子、即ち、CXCR6(便宜上、「第1マーカー分子」と呼ぶ)と、FOXP3又はCD25(便宜上、これら二つをまとめて「第2マーカー分子」と呼ぶ)を利用してeTregを検出する点が、本発明の最大の特徴の一つである。後述の実施例に示すように、本発明らの検討の結果、CXCR6とFOXP3の併用又はCXCR6とCD25の併用がeTregに特異的なサブセット分子マーカーとなり、CXCR6陽性且つFOXP3強陽性を示すこと、又はCXCR6陽性且つCD25強陽性を示すこと、を指標とすればeTregを高い選択性で検出できることが明らかとなった。この知見に加え、FOXP3の発現とCD25の発現が相関を示す事実に基づき、本発明の検出方法では、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性、を示すことを指標としてeTregが検出される。

【0008】

各マーカー分子の発現状態は、マーカー分子特異的な抗体を用いて検出ないし確認することができる。例えば、マーカー分子特異的な標識抗体による標識化及び標識の検出によって、或いはマーカー分子特異的な非標識抗体(1次抗体)と2次抗体(標識化抗体)を用いた2段階の標識化及び標識の検出によって、各マーカー分子の発現を検出可能である。

【0009】

本発明の検出方法では、精度、特異性等の点から、好ましくは第2マーカー分子としてFOXP3を用いる(即ち、CXCR6の発現とFOXP3の発現を併用してeTregを検出する)。他方、検出後に細胞(eTreg)を分取し(即ち、後述の調製方法)、別の用途(移植用材料の調製、研究等)に供する場合には、第2マーカー分子としてCD25を用いるとよい(即ち、CXCR6の発現とCD25の発現を併用してeTregを検出し、分取する)。FOXP3の検出の場合とは異なり、CD25の検出には細胞の膜透過処理が必要ではない。従って、第2マーカー分子としてCD25を採用すれば、膜透過処理による傷害のないeTregの回収が可能となる。

【0010】

CD25はIL-2受容体のサブセットの一つであり、インターロイキン2受容体鎖であるCD122及びインターロイキン2受容体鎖であるCD132とともに、インターロイキン2受容体を

10

20

30

40

50

構成する。CD25は活性化T細胞、活性化B細胞、活性化マクロファージ等にその発現が認められ、また、制御性T細胞（Treg）のマーカーとしても知られている。

【0011】

本発明の検出方法ではT細胞を含む試料が用いられ、当該試料の中からeTregが検出される。例えば、末梢血、腹水、胸水などの体液、腫瘍組織、リンパ節等の組織から調製した単核球画分（PBMC）を試料として用いる。尚、例えば密度勾配遠心法によって、生体から採取した血液から血漿成分、赤血球、血小板及び顆粒球を除去することによりPBMCを得ることができる。PBMCはT細胞、B細胞、NK（ナチュラルキラー）細胞、単球、樹状細胞等のリンパ球から構成される。

【0012】

一方、本発明では、生体から採取した組織片（例えば、腫瘍組織、リンパ節）、生体から採取した組織片を生体外で培養（即ち組織培養）して得られた構造体、或いは生体から採取した細胞（採取後に特定の条件下での培養、遺伝子操作（遺伝子導入や遺伝子組換え等）等の加工を行ってもよい）を、必要に応じて他の細胞とともに培養して得られた構造体等を試料として用いてもよく、この場合には、好ましくは、免疫組織化学を利用して試料中のeTregを検出する。免疫組織化学を利用した検出の詳細については後述する。

【0013】

単核球画分のような浮遊状態ないし分散状態の細胞集団を含む試料の場合、典型的には以下の(1)～(3)のステップを行い、試料中のeTregを検出する。

(1)T細胞を含む試料の中からリンパ球の集団を特定し、分画するステップ

(2)分画したリンパ球の中から、制御性T細胞を含み、且つ細胞障害性T細胞を含まない細胞集団を特定し、分画するステップ

(3)前記細胞集団の中で以下のマーカー特性、即ち、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性、を示す細胞をエフェクター制御性T細胞（eTreg）として検出するステップ

【0014】

ステップ(1)

このステップでは、事前に用意しておいた、T細胞を含む試料の中からリンパ球の集団を特定し、分画する。これに限定する訳ではないが、簡便な操作で実施可能な点や高い精度が得られる点などから、このステップを含め、本発明の各ステップにはフローサイトメトリーを利用するとよい。フローサイトメトリーとは、短時間に多量の細胞を定量的に測定する分析手法（サイトメトリー）の一つであり、細胞の浮遊液/懸濁液を細管に通し、散乱光や蛍光の検出によって細胞を分析する手法である。フローサイトメトリーの操作、特徴などについては例えば、実験医学別冊 ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A 編者 戸村道夫 2017年11月20日に詳しい。

【0015】

フローサイトメトリーでは所定のレーザー光を試料に照射し、前方散乱光（FSC）と側方散乱光（SSC）が検出される。リンパ球の集団は前方散乱光の強度と側方散乱光の強度に基づき特定することができる。例えば、ヒト末梢血から調製したPBMCが試料の場合、FSCとSSCの2パラメータヒストグラム（サイトグラム）を作成すると、リンパ球の集団、単球の集団、及び顆粒球の集団に分かれる。比較的小さくて内部構造も単純なリンパ球は、前方散乱光の強度と側方散乱光の強度がいずれも低い細胞集団となる。従って、このステップでは通常、当該細胞集団を指定する（ゲーティング）。このようにして分画したリンパ球を次の解析（ステップ(2)）に供する。

【0016】

前方散乱光と側方散乱光を同時に検出することは必須ではないが、操作の簡便化、効率的な検出などの観点から、通常は同時に検出する。既存のフローサイトメーターによれば、前方散乱光と側方散乱光を同時に検出し、各々の強度を解析することが可能である。

【0017】

ステップ(2)

10

20

30

40

50

ステップ(1)に続くステップ(2)では、分画したリンパ球の中から、制御性T細胞を含み、且つ細胞障害性T細胞を含まない細胞集団を特定し、分画する。換言すれば、ステップ(1)で分画したリンパ球の中から細胞障害性T細胞を排除し、細胞障害性T細胞を含まない細胞集団(通常は、制御性T細胞に加え、ヘルパーT細胞も含む)を得る。フローサイトメトリーを利用する場合、例えば、CD4の発現とCD8の発現を指標としてステップ(2)を実施することができる。典型的には、CD4とCD8で展開してサイトグラムを作成し、CD4陽性且つCD8陰性の細胞集団を指定する(ゲーティング)。このようにして分画した、CD4陽性CD8陰性を示す細胞集団を次の解析(ステップ(3))に供する。一態様では、このステップ(2)において、eTregのマーカーとして利用されているCD45RAも併用し、検出されるeTregの均一性ないし純度の向上を図る。具体的には、CD4陽性、CD8陰性、且つCD45RA陰性の細胞集団を特定し、当該細胞集団を次の解析(ステップ(3))に供する。この場合、例えば、以下の2段階の分画によって目的の細胞集団を特定することができる。まず、ステップ(1)で分画したリンパ球をCD45RAと側方散乱光で展開し、CD45RA陰性で側方散乱光強度が低い細胞集団を指定する。次に、指定した細胞集団をCD4とCD8で展開し、CD4陽性CD8陰性の細胞集団を特定する。

10

【0018】

ステップ(3)

ステップ(2)に続くステップ(3)では、大別して2種類のマーカーによってeTregを検出する。具体的には、第1マーカー分子としてCXCR6を用い、第2マーカー分子としてFOXP3又はCD25を用い、ステップ(2)で分画した細胞集団の中でCXCR6陽性、且つFOXP3強陽性(第2マーカー分子としてFOXP3を用いる場合)又はCD25強陽性(第2マーカー分子としてCD25を用いる場合)の細胞をeTregとして検出する。CXCR6は主にT細胞、NK細胞、B細胞等の免疫系の細胞に発現し、リガンドであるCXCL16に対し走化性を示し、様々な組織内への、これら免疫系細胞の遊走、浸潤に関わる。FOXP3はTregのマスター遺伝子であり、Tregの分化、機能発現に必須である。CD25はTregに選択的に発現するが、活性化したT細胞、NK細胞、B細胞にも発現し、これらの免疫系細胞の分化、増殖に関わる。

20

【0019】

ステップ(3)において、CD45RAもマーカーとして併用し、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性に加え、(iii)CD45RA陰性を示す細胞集団をeTregとして検出することにしてもよい。ステップ(3)においてCD45RAを利用するのではなく、ステップ(3)の後に、検出した細胞がCD45RA陰性であることを確認することにしてもよい。尚、このようにステップ(3)又はその後にCD45RAを用いる場合には、通常、ステップ(2)ではCD45RAを利用しないことになる。

30

【0020】

フローサイトメトリーを利用する場合、通常は、ステップ(1)~(3)に先立って、各ステップの実施に必要な標識化を行う。標識化の操作の具体例を以下に示す。まず、事前に用意した試料に蛍光標識抗CD4抗体、蛍光標識抗CD8抗体、蛍光標識抗CXCR6抗体を添加し、インキュベートする(標識抗体との接触による標識化)。CD45RAもマーカーとして併用する場合には蛍光標識抗CD45RA抗体も添加し、CD45RAを標的とした標識化も行う。更に、第2マーカー分子としてCD25を採用する場合には、併せて蛍光標識抗CD25抗体も添加し、CD25を標的とした標識化も行う。他方、第2マーカー分子としてFOXP3を採用する場合には、上記標識化の後、ホルマリン等を用いた固定及びそれに続く膜透過処理を行った後、蛍光標識抗FOXP3抗体を添加し、インキュベートする。

40

【0021】

各抗体の蛍光標識に使用する蛍光分子の例は、APC-CyTM7、BV511TM、PerCP、BV421TM、PE、Alexa488である。フローサイトメトリーでの検出、識別などが可能なように蛍光分子が選択される。様々な組み合わせが可能であるが、以下、組み合わせの一例を挙げる。

抗CD4抗体の標識にBV511TMを使用

抗CD8抗体の標識にPerCPを使用

抗CD25抗体の標識にPEを使用

50

抗CXCR6抗体の標識にBV421TMを使用
 抗CD45RA抗体の標識にAPC-CyTM7を使用
 抗CD25抗体又は抗FOXP3抗体の標識に Alexa488を使用

【0022】

尚、APC-CTMy7標識抗CD45RA抗体は例えばBD Bioscienceより、BV511TM標識抗CD4抗体は例えばBD Bioscienceより、PerCP標識抗CD8抗体は例えばBD Bioscienceより、BV421TM標識CXCR6抗体は例えば BD Bioscienceより、PE標識CD25抗体は例えばBD Bioscienceより、Alexa488標識抗FOXP3抗体は例えばBD Bioscienceより、それぞれ入手可能である。

【0023】

ここで、フローサイトメトリーを利用した検出の手順・操作の具体例（一例）を以下に示す。

- (1) 生体サンプル（末梢血、腹水、胸水等の体液、組織など）から単核球画分を分離する。
- (2) 分離した単核球画分を標識抗体（BV511TM標識抗CD4抗体、PerCP標識抗CD8抗体、BV421TM標識抗CXCR6抗体及びAPC-CyTM7標識抗CD45RA抗体）と4 で20分反応させる。
- (3) PBS(0.2% BSA)で1回洗浄する。
- (4) 市販の固定液を用いて4 で30分反応させる。
- (5) 市販の細胞浸透液を用いて2回洗浄する。
- (6) 市販の細胞浸透液内で、固定した単核球とAlexa488標識抗FOXP3抗体を4 で30分反応させる。
- (7) 市販の細胞浸透液を用いて1回洗浄した後、フローサイトメーターを用いて測定する。

【0024】

ところで、本発明の検出法によれば試料中のeTregを高い選択性で検出することができる。従って、検出されたeTregを分取すれば、純度の高いeTregが得られる。このように、本発明の検出法を利用すれば純度の高いeTregを調製することができる。そこで本発明は別の局面として、本発明の検出法で検出されたeTregを分取するステップを含むことを特徴とする、eTregを調製する方法を提供する。本発明の調製方法によって得られたeTregはそれ自体の研究（例えばeTregの特性/特徴の解析や、がん等、様々な疾患における免疫病理学的解析等）に利用可能である。また、各種アッセイ（例えば、eTregに対する薬剤の作用・効果を評価するアッセイ）に用いる細胞として、或いは、移植材料（例えば、自己免疫疾患、移植後GVHD等の治療への適用）としても利用され得る。

【0025】

上記の通り、生体から採取した組織片等が試料の場合、好ましくは、免疫組織化学を利用して試料中のeTregを検出する。免疫組織化学を利用する場合も、本発明ではCXCR6の発現と転写因子FOXP3又はCD25の発現が併用される（換言すれば、(i)CXCR6陽性、及び(ii)FOXP3強陽性又はCD25強陽性を示すことを指標としてeTregが検出される）。具体的には、抗CXCR6抗体を用いた染色と抗FOXP3抗体又は抗CD25抗体を用いた染色を併用し、二重染色された細胞をeTregとして検出する。

【0026】

免疫組織化学では酵素抗体法、蛍光抗体法のいずれを用いてもよい。また、異種動物由来の一次抗体を混合させて用いることにより、複数の抗原に対する一次抗体反応を同時に進行させる方法（カクテル法）を用いてもよい。尚、CXCR6を標的抗原とした染色とFOXP3又はCD25を抗原とした染色の順序は特に限定されない。

【0027】

免疫組織化学による検出は以下の手順で実施することができる。尚、説明の便宜上、CXCR6を抗原とした染色を1段階目の染色とし、FOXP3又はCD25を抗原とした染色を2段階目の染色としているが、勿論、順序を逆にしてもよい。

【0028】

- (1) 前処理

(1-1) 固定・パラフィン包埋

試料をホルマリンやパラフォルムアルデヒド、無水エチルアルコール等によって固定する。その後パラフィン包埋する。一般にアルコールで脱水した後キシレンで処理し、最後にパラフィンで包埋する。パラフィンで包埋された標本を所望の厚さ（例えば3~5µm厚）に薄切し、スライドガラス上に伸展させる。尚、パラフィン包埋標本に代えてアルコール固定標本、乾燥封入した標本、凍結標本などを用いる場合もある。

(1-2) 脱パラフィン

一般にキシレン、アルコール（例えばエタノール）、及び水（脱イオン水や精製水）で順に処理する。

(1-3) 前処理（抗原賦活）

必要に応じて抗原賦活のために酵素処理、加熱処理及び/又は加圧処理等を行う。例えば、10mM Tris-HCl pH 9.0中に標本（スライドガラス）を浸漬し、オートクレーブ（105、10分間）に供する。オートクレーブ後は自然冷却し、PBS等で洗浄しておく。

(1-4) その他の処理

染色の際の標識物質としてペルオキシダーゼを使用する場合、過酸化水素水で処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を除去しておくことよい。一方、ウシ血清アルブミン溶液（例えば1%溶液）等で数分から数十分程度処理して非特異的反応を阻害しておくことにしてもよい。ウシ血清アルブミン等を含ませた抗体溶液を使用して次の一次抗体反応を行うことにし、当該処理を省略することもできる。

【0029】

(2) 1段階目の染色

(2-1) 一次抗体反応

適当な濃度に希釈した抗CXCR6抗体をスライドガラス上の標本に滴下し、その後、数十分~数時間（例えば室温で1時間）反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。洗浄操作は複数回（例えば3回）行うとよい。

(2-2) 標識試薬の添加

標識物質としてペルオキシダーゼ（例えばHRP）、アルカリホスファターゼ（AP）が頻用される。標識物質を結合させた二次抗体をスライドガラス上の標本に滴下し、その後数十分~数時間（例えば室温で1時間）反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。洗浄操作は複数回（例えば3回）行うとよい。

(2-3) 発色反応

発色試薬を添加、反応させる。発色試薬にはDAB（3,3'-diaminobenzidine）、Betazoid DAB、Cardassian DAB、Vina GreenTM、Romulin AEC、Bajoran Purple、Ferangi BlueTM、Vulcan Fast Red、Warp RedTM等を用いることができる。例えば、DABを用いた場合、室温で5~10分反応させると茶褐色に着色する。発色後、標本を水道水で十分に洗浄し、発色試薬を除去する。

(2-4) 抗体の除去

加熱処理（例えば、電子レンジで煮沸させた10mM Tris-HCl, pH 9.0中に標本（スライドガラス）を浸漬する）等及び洗浄操作によって、(2-1)及び(2-2)によって標本上に結合した抗体を除去する。

【0030】

(3) 2段階目の染色

(3-1) 一次抗体反応

適当な濃度に希釈した抗FOXP3抗体（第2マーカー分子としてFOXP3を使用する場合）又は抗CD25抗体（第2マーカー分子としてCD25を使用する場合）をスライドガラス上の標本に滴下し、その後、数十分~数時間（例えば室温で1時間）反応させる。反応終了後、リン酸緩衝液など適当な緩衝液で洗浄する。洗浄操作は複数回（例えば3回）行うとよい。

(3-2) 標識試薬の添加

上記（2-2）と同様の操作で二次抗体を結合させる。

(3-3) 発色反応

上記(2-3)と同様の操作で発色させる。但し、1段階目の染色による発色との間で識別可能な発色が得られるように発色試薬を選定する。識別を可能にする2種類の発色試薬の組み合わせの例を挙げると、DABとVina greenTMの組み合わせである。例えば、Vina greenTMを用いた場合、室温で5~10分反応させると緑色に着色する。発色後は、標本を水道水で十分に洗浄し、発色試薬を除去する。

【0031】

(4)核染色、脱水/透徹/封入

必要に応じて核染色も行う。例えば、マイヤーのヘマトキシリンを数秒~数十秒反応させて核染色を行う。流水で洗浄し色出しする(通常、数分間)。また、必要に応じて、脱水/透徹/封入の処理を行う。例えば、アルコールで脱水した後、キシレンで透徹処理し、最後に合成樹脂やグリセリン、ゴムシロップなどで封入する。

【0032】

(5)観察・記録・画像解析

2色(1段階目の染色と2段階目の染色)で染色された細胞をeTregとして検出する。必要に応じて記録(撮影など)・画像解析等に供する。

【実施例】

【0033】

1. 臨床検体(頭頸部がん患者由来)中のeTregの検出

(1) 頭頸部がん由来リンパ節リンパ球中エフェクター制御性T細胞(eTreg)の解析1(図1)

頭頸部がん患者から摘出されたリンパ節からリンパ球を単離し、モノクローナル抗体を用いた6重染色(CD45RA/CD4/CD8/CD25/CXCR6/FOXP3)を行い、フローサイトメトリーにてeTregの解析を行った。リンパ球分画にゲートをかけ(A)、ゲート内の細胞をCD4/CD8で二次元展開し、さらに、CD4陽性細胞にゲートをかけ(B)、ゲート内の細胞をCD45RA/FOXP3で二次元展開した。CD45RA⁻FOXP3⁺⁺の細胞集団がeTreg分画となる(C 太黒線枠)。次に、同じCD4陽性細胞集団をCXCR6/CD25で二次元展開し、5カ所にゲートをかかけた(D, a - e)。ゲートa(CD25⁺⁺CXCR6⁺)内をCD45RA/FOXP3で二次元展開すると、Cで示したeTreg分画に細胞集団が集中した(E)。このことから、CD4⁺CD25⁺⁺CXCR6⁺のリンパ球サブセット内にeTregが選択的に含まれることが明らかとなった。

【0034】

(2) 頭頸部がん由来リンパ節リンパ球中エフェクター制御性T細胞(eTreg)の解析2(図2)

頭頸部がん患者から摘出されたリンパ節からリンパ球を単離し、モノクローナル抗体を用いた6重染色(CD45RA/CD4/CD8/CD25/CXCR6/FOXP3)を行い、フローサイトメトリーにてeTregの解析を行った。リンパ球分画にゲートをかけ(A)、ゲート内の細胞をCD4/CD8で二次元展開し、さらに、CD4陽性細胞にゲートをかけ(B)、ゲート内の細胞をCD45RA/FOXP3で二次元展開した。CD45RA⁻FOXP3⁺⁺の細胞集団がeTreg分画となる(C 太黒線枠)。次に、CD4陽性細胞集団を、CXCR6/FOXP3で二次元展開し、5カ所にゲートをかかけた(D, a - e)。ゲートa(FOXP3⁺⁺CXCR6⁺)内をCD45RA/FOXP3で二次元展開すると、Cで示したeTreg分画に細胞集団が集中した(E)。このことから、CD4⁺FOXP3⁺⁺CXCR6⁺のリンパ球サブセット内にeTregが

【産業上の利用可能性】

【0035】

エフェクター制御性T細胞(eTreg)は生体内での免疫反応の抑制に広範に関与し、各種疾患の病態形成や進展、或いは治癒等に重要な役割を果たす。このように重要な細胞の特異的な検出を可能にする本発明には、免疫系疾患に対する治療・診断技術の開発ないし確立への多大な貢献が期待できる。

【0036】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこ

10

20

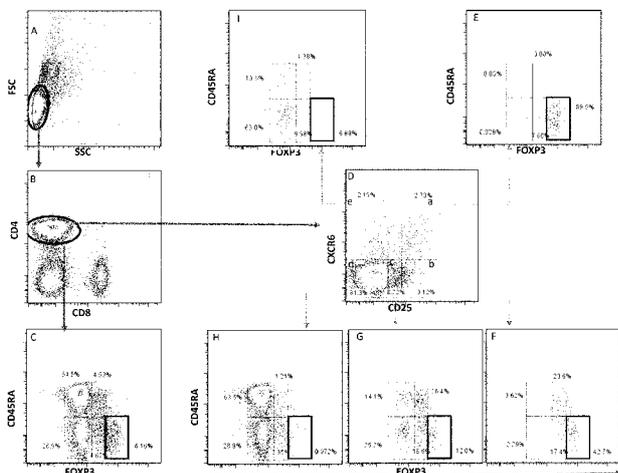
30

40

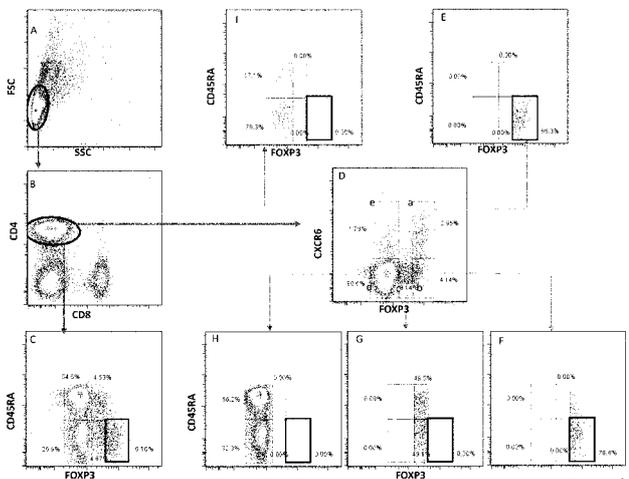
50

の発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/543 5 9 7

テーマコード(参考)

专利名称(译)	效应控制T细胞的检测和制备		
公开(公告)号	JP2019158687A	公开(公告)日	2019-09-19
申请号	JP2018047304	申请日	2018-03-14
申请(专利权)人(译)	学校法人 爱知医科大学		
[标]发明人	鈴木進 吉川和宏		
发明人	鈴木 進 吉川 和宏		
IPC分类号	G01N33/68 C12N5/0783 C12M1/00 C07K16/28 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/68 C12N5/0783 C12M1/00.A C07K16/28 G01N33/53.Y G01N33/543.597		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 4B029/AA07 4B029/AA27 4B029/BB11 4B029/CC01 4B029/FA04 4B065/AA94X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BD14 4B065/CA44 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	萩野 干治		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

为了提供一种寻找具有高效效应子控制T细胞选择性的标记分子的方法，以特异地检测效应子控制T细胞的方法。解决方案：以表达为指标，从含有T细胞的样品中检测出效应子对照T细胞。(i) CXCR6阳性和(ii) FOXP3强阳性或CD25强阳性的免疫组织化学分析，同时结合了趋化因子受体CXCR的表达和转录因子FOXP3或CD25的表达。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2019-158687 (P2019-158687A) 令和1年9月19日(2019.9.19)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO1N 33/68 (2006.01)	GO1N 33/68	2G045
C12N 5/0783 (2010.01)	C12N 5/0783	4B029
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00	A 4B065
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	Y
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 11 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 (22) 出願日	特願2018-47304(P2018-47304) 平成30年3月14日(2018.3.14)	(71) 出願人 50611240 学校法人 愛知医科大学 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 100114362
(72) 発明者	鈴木 進 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 学校法人 愛知医科大学内	(74) 代理人 弁理士 萩野 幹治
(72) 発明者	吉川 和宏 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 学校法人 愛知医科大学内	(72) 発明者 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 学校法人 愛知医科大学内
Fターム(参考)	20045 AA26 CB01 DA36 FA37 FB03 4B029 AA07 AA27 BB11 CC01 FA04 4B065 AA94X AC20 BA30 BD14 CA44 4H045 AA11 AA30 CA40 DA50 DA76 EA50 FA74	

(54) 【発明の名称】 エフェクター制御性T細胞の検出及び調製