(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5686814号

(P5686814)

(45) 発行日 平成27年3月18日 (2015.3.18)

(24) 登録日 平成27年1月30日 (2015.1.30)

(51) Int.Cl.	F I		
A 6 1 K 31/712	5 (2006.01) A 6 1 K	31/7125	ZNA
A61K 48/00	(2006.01) A 6 1 K	48/00	
A61P 1/04	(2006.01) A 6 1 P	1/04	
A61P 29/00	(2006.01) A 6 1 P	29/00	
A61P 31/04	(2006.01) A 6 1 P	31/04	
			諸求項の数 5 (全 70 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2012-534041 (P2012-534041)	(73)特許権者	¥ 503360115
(86) (22) 出願日	平成23年9月14日 (2011.9.14)		独立行政法人科学技術振興機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/071023		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02012/036215	(74)代理人	100088155
(87) 国際公開日	平成24年3月22日 (2012.3.22)		弁理士 長谷川 芳樹
審査請求日	平成26年5月16日 (2014.5.16)	(74) 代理人	100124291
審判番号	不服2014-23004 (P2014-23004/J1)		弁理士 石田 悟
審判請求日	平成26年11月11日 (2014.11.11)	(74) 代理人	100126653
(31) 優先権主張番号	特願2011-138825 (P2011-138825)		弁理士 木元 克輔
(32) 優先日	平成23年6月22日 (2011.6.22)	(74) 代理人	100139000
(33)優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 城戸 博兒
(31) 優先権主張番号	特願2010-209587 (P2010-209587)	(74) 代理人	100152191
(32) 優先日	平成22年9月17日 (2010.9.17)		弁理士 池田 正人
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		(72)発明者	谷口維紹
			東京都文京区西方2-14-15
早期審理対象出願			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤及びスクリーニング方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

<u>非メチル化CG配列を含まず、長さが15~30塩基のホスホロチオエートオリゴヌク</u> レオチドからなる、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤であ

って、

前記ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、

配列番号40に記載の塩基配列、又は、

配列番号40に記載の塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、HMGBタンパクに対する結合能を有する塩基配列、

からなるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである、抑制剤。

【請求項2】

<u>非メチル化CG配列を含まず、長さが15~30塩基のホスホロチオエートオリゴヌク</u> レオチドからなる、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤であ

って、

- 前記ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、
- 配列番号40に記載の塩基配列、又は、
- 配列番号40に記載の塩基配列において1~3個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、HMGBタンパクに対する結合能を有する塩基配列、
- からなるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである<u>、抑</u>制剤。 【ませ頃 2】

【請求項3】

細胞内において、免疫応答を活性化する核酸とHMGBタンパクとの結合を阻害する、 請求項1<u>又は2</u>に記載の抑制剤。

【請求項4】

HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化が、抗原特異的な適応免疫系、 多発性硬化症、死細胞による過剰な免疫応答、移植臓器拒絶反応、自己免疫疾患、炎症性 腸疾患、アレルギー、敗血症、炎症による腫瘍の増殖、及び核酸含有病原体により引き起 こされる炎症性疾患からなる群から選択される、請求項1~<u>3</u>のいずれか一項に記載の抑 制剤。

【請求項5】

請求項1~<u>4</u>のいずれか一項に記載の抑制剤及び薬学的に許容される担体を含有する、 ¹⁰ HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

[0001]

本発明は、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤、及び、H MGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニン グ方法に関する。

【背景技術】

[0002]

免疫応答とその制御において、自己と非自己の識別はその根幹を担っている。自然免疫 20 系及び適応免疫系は、それぞれに特有の機構によってこの識別を担うとともに、自己に応 答しない仕組み、いわゆる免疫寛容を確立・維持している。自然免疫応答の活性化は適応 免疫応答の誘導にも関与していることが知られていることから、自然免疫応答の抑制は適 応免疫応答の抑制にも有効であることが知られている。

【0003】

適応免疫系においては、ランダムな抗原受容体を発現するリンパ球レパートリーを構築 後、ほとんどの自己反応性リンパ球が中枢性寛容機構によって排除され、末梢になお残存 する自己反応性リンパ球は、末梢性寛容機構によって抑制されることが明らかにされてき た。

[0004]

適応免疫系による抗原の認識はリンパ球の抗原受容体による特異的な分子構造認識を特 徴とするが、自然免疫系では、病原体等が持つ分子のパターンを認識するとされており、 Toll様受容体(Toll-like receptor、TLR)をはじめとして、 多くの自然免疫活性化受容体が知られている。特に、核酸による自然免疫活性化はウイル ス等の病原体の排除に重要であるとともに、一方で種々の免疫病態の発症や増悪に関与す するとされていることから大きな関心が寄せられている。しかしながら、自然免疫系にお ける核酸の識別機構には未だ不明な点が多く、核酸により活性化される免疫応答を担う分 子群として、Toll様受容体(Toll-like receptor、TLR)3、 TLR7、TLR9、RIG-I様受容体(RIG-I-like receptor) 、DAI、AIM2等の受容体分子群が同定されてきたが、未だにその全貌は不明である (例えば非特許文献1~3を参照)。

【0005】

HMGB(high - mobility group box)タンパクには、HMG B1、HMGB2及びHMGB3が存在することが知られている。これらのHMGBタン パクは、核内に多く存在し、クロマチン構造や転写の制御に関わっていると考えられてい る。また、細胞質や細胞外にも存在することが知られている。

[0006]

特許文献1には、細胞外に分泌されたHMGB1タンパクと、細胞表面の最終糖化産物 受容体(RAGE)との結合を阻害する、合成二本鎖核酸又は核酸アナログ分子が記載さ れている。 30

40

[0007]特許文献2には、細胞外に分泌されたHMGB1タンパクとRAGEの相互作用を阻害 する、HMGB1アンタゴニストが記載されている。 [0008]非特許文献4には、塩基フリーホスホロチオエートデオキシリボースホモポリマーがT LR9及びTLR7に高い親和性を有し、これらのTLRのアンタゴニストとして作用す ることが記載されている。 [0009]非特許文献 5 には、 5 '- T C C A T G A C G T T C C T G A T G C T - 3 '(配列番 号37)の塩基配列を有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドのマウスへの投与が IFN (インターフェロン) - 応答を誘導するのに対し、5'-TCCATGAGCT TCCTGATGCT - 3'(配列番号 38)の塩基配列を有するホスホロチオエートオ リゴヌクレオチドはこのような応答を起こさないことが記載されている。 【先行技術文献】 【特許文献】 [0010]【特許文献1】特表2008-504335号広報 【特許文献2】特表2009-517404号広報 【非特許文献】 [0011]【非特許文献1】Kawai T.et al,Nat.Rev.Immunol 7: 131-137,2006. 【非特許文献2】Yoneyama et al,J.Biol.Chem 282:1 5315-15318,2007. 【非特許文献 3】Burckstummer T.et al, Nat.Immunol . 1 0 : 2 6 6 - 2 7 2 , 2 0 0 9 . 【非特許文献4】Haas T.et al, Immunity, 28:315-323 . 2008. 【非特許文献5】Cowdery JS.et al,J.Immunol.156:4 570-4575,1996. 【発明の概要】 【発明が解決しようとする課題】 [0012]本発明は、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤及び、HM GBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニング 方法を提供することを目的とする。 【課題を解決するための手段】 [0013]本発明は、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド及びその誘導体からなる群から選択 される1種以上の化合物からなり、HMGBタンパクに結合することによって、HMGB タンパクによって仲介される免疫応答の活性化を抑制する、HMGBタンパクによって仲 介される免疫応答の活性化の抑制剤を提供する。 [0014]本発明はまた、生体にホスホロチオエートオリゴヌクレオチド及びその誘導体からなる 群から選択される1種以上の化合物を投与する工程を含む、HMGBタンパクによって仲 介される免疫応答の活性化の抑制方法を提供する。 [0015]

本発明はまた、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤として の使用のための、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド及びその誘導体からなる群から 選択される 1 種以上の化合物を提供する。

(3)

30

20

10

40

[0016]

本発明はまた、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド及びその誘導体からなる群から 選択される1種以上の化合物の、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化 の抑制剤への応用を提供する。

【0017】

発明者らは、核酸によって仲介される免疫応答の活性化には、 H M G B タンパクが必須 であることを明らかにした。すなわち、発明者らは、核酸によって仲介される免疫応答の 活性化は、 H M G B タンパクによって仲介されることを明らかにした。発明者らは、さら に、上記の化合物が、 H M G B タンパクに強く結合することによって、 H M G B タンパク によって仲介される免疫応答の活性化を強力に抑制することを明らかにした。したがって 、上記の化合物は、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤とし て利用することができる。上記の抑制剤は、核酸によって仲介される免疫応答に限らず、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答に限らず、 C 0 0 1 8 】

上記の化合物は、非メチル化CG配列を含まず、長さが5~40塩基のホスホロチオエ ートオリゴヌクレオチドであることが好ましく、(1)配列番号40に記載の塩基配列又 は(2)配列番号40に記載の塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若し くは付加された塩基配列であって、HMGBタンパクに対する結合能を有する塩基配列、 からなるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドであることがより好ましい。

【0019】

これらのホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤として利用することができる。

[0020]

上記の化合物は、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの誘導体であり、当該誘導体 は、塩基フリーホスホロチオエートデオキシリボースホモポリマー(以下、「PS」とい う場合がある。)であってもよい。PSは、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドから 塩基部分を除いた構造を有する化合物である。

【0021】

実施例で示すように、PSは、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤として利用することができる。

【0022】

本発明の抑制剤は、細胞内において、免疫応答を活性化する核酸とHMGBタンパクと の結合を阻害することにより、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化を 強力に抑制する。すなわち、本発明の抑制剤は、発明者らが今回初めて明らかにした機構 に基づいて、細胞内のHMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化を抑制する ものである。

【0023】

HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化としては、抗原特異的な適応免 疫系、多発性硬化症、死細胞による過剰な免疫応答、移植臓器拒絶反応、自己免疫疾患、 炎症性腸疾患、アレルギー、敗血症、炎症による腫瘍の増殖、核酸含有病原体により引き 起こされる炎症性疾患等が例示される。本発明の抑制剤を投与することにより、ヒト及び 動物の生体において、これらの症状を予防又は治療(改善)することができる。 【0024】

本発明はまた、上記の抑制剤及び薬学的に許容される担体を含有する、 H M G B タンパ クによって仲介される免疫応答の活性化の抑制用組成物を提供する。

【0025】

本発明はまた、被検物質の存在下及び非存在下で、 H M G B タンパクと標識核酸とを混合する混合ステップと、標識核酸に結合した H M G B タンパクを定量する定量ステップと、被検物質の存在下で標識核酸に結合した H M G B タンパクの量が、 被検物質の非存在下で標識核酸に結合した H M G B タンパクの量よりも少ない場合に、当該被検物質が、 H M

10

20

GBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤であると判定し、被検物質の 存在下で標識核酸に結合したHMGBタンパクの量が、被検物質の非存在下で標識核酸に 結合したHMGBタンパクの量よりも多い場合に、当該被検物質が、HMGBタンパクに よって仲介される免疫応答の活性化の促進剤であると判定する、判定ステップと、を含む 、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリー ニング方法を提供する。

(5)

[0026]

本発明はまた、被検物質の存在下及び非存在下で、固相化されたHMGBタンパクを放 置する放置(インキュベーション)ステップと、放置ステップ後の固相化されたHMGB タンパクに、標識核酸を接触させる、標識核酸接触ステップと、固相化されたHMGBタ ンパクに結合した標識核酸を定量する定量ステップと、被検物質の存在下で放置ステップ を行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量が、被検物質の非存在 下で放置ステップを行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量より も少ない場合に、当該被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性 化の抑制剤であると判定し、被検物質の存在下で放置ステップを行った、固相化されたH MGBタンパクに結合した標識核酸の量が、被検物質の非存在下で放置ステップを行った 、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量よりも多い場合に、当該被検物 質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の促進剤であると判定する 、判定ステップと、を含む、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑 制剤又は促進剤のスクリーニング方法を提供する。

[0027]

本発明はまた、被検物質の存在下及び非存在下で、固相化された核酸とHMGBタンパ クとを接触させる、接触ステップと、固相化された核酸に結合したHMGBタンパクを定 量する定量ステップと、被検物質の存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパ クの量が、被検物質の非存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパクの量より も少ない場合に、当該被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性 化の抑制剤であると判定し、被検物質の存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタ ンパクの量が、被検物質の非存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパクの量 よりも多い場合に、当該被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活 性化の促進剤であると判定する、判定ステップと、を含む、HMGBタンパクによって仲 介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニング方法を提供する。 [0028]

上記本発明のスクリーニング方法によれば、HMGBタンパクによって仲介される免疫 応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニングを可能にすることができる。これらの スクリーニング方法は、発明者らが今回初めて明らかにした、免疫応答の活性化がHMG B タンパクによって仲介されるという新たな機構に基づくものである。これらのスクリー ニング方法により、簡便に効率よくスクリーニングを行うことができる。

【発明の効果】

[0029]

本発明により、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化、すなわち、死 細胞による過剰な免疫応答、移植臓器拒絶反応、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、アレルギ ー、敗血症、炎症による腫瘍の増殖、核酸含有病原体により引き起こされる炎症性疾患等 の新たな原理に基づいた抑制剤が提供される。また、HMGBタンパクによって仲介され る免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニング方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

 $\begin{bmatrix} 0 & 0 & 3 & 0 \end{bmatrix}$

【図1】実施例1の結果を示すグラフである。

【図2】実施例2の結果を示すグラフである。

【図3】実施例3の結果を示すグラフである。

【図4】実施例4の結果を示すグラフである。

30

【図5】実施例5の結果を示す写真である。 【図6】実施例6の結果を示す写真である。 【図7】実施例7の結果を示すグラフである。 【図8】実施例8の結果を示すグラフである。 【図9】実施例9の結果を示すグラフである。 【図10】実施例10の結果を示すグラフである。 【図11】実施例11の結果を示すグラフである。 【図12】実施例12の結果を示す写真である。 【図13】実施例13の結果を示す写真である。 【図14】実施例14の結果を示す写真である。 【図15】実施例15の結果を示す写真である。 【図16】実施例16の結果を示すグラフである。 【図17】実施例17の結果を示すグラフである。 【図18】実施例18の結果を示すグラフである。 【図19】実施例19の結果を示すグラフである。 【図20】実施例20の結果を示すグラフである。 【図21】実施例21の結果を示す写真である。 【図22】実施例22の結果を示すグラフである。 【図23】実施例23の結果を示す写真である。 【図24】実施例24の結果を示すグラフである。 【図25】実施例25の結果を示すグラフである。 【図26】実施例26の結果を示すグラフである。 【図27】実施例27の結果を示すグラフである。 【図28】実施例28の結果を示す写真である。 【図29】実施例29の結果を示すグラフである。 【図30】実施例30の結果を示すグラフである。 【図31】実施例31の結果を示すグラフである。 【図32】実施例32の結果を示すグラフである。 【図33】実施例33の結果を示すグラフである。 【図34】実施例34の結果を示すグラフである。 【図35】実施例35の結果を示すグラフである。 【図36】実施例36の結果を示すグラフである。 【図37】実施例37の結果を示すグラフである。 【図38】実施例38の結果を示すグラフである。 【図39】実施例39の結果を示すグラフである。 【図40】実施例40の結果を示すグラフである。 【図41】実施例41の結果を示す写真である。 【図42】実施例42の結果を示す写真である。 【図43】HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の概略図である。 【図44】HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤のスクリーニ ング方法の1つの態様を示す図である。 【図45】実施例43の結果を示す写真(a)及びグラフ(b)である。 【図46】CpG-B(S)、CpG-Rev(S)、CpG-M(S)及びPSの構造 を示す図である。 【図47】実施例44の結果を示す写真である。 【図48】実施例45の結果を示すグラフである。

【図49】実施例46の結果を示すグラフである。

- 【図50】実施例47の結果を示すグラフである。
- 【図51】実施例48の結果を示すグラフである。
- 【図52】実施例49の結果を示すグラフである。

10

20

30

40

【図53】実施例50の結果を示すグラフである。
【図54】実施例51の結果を示すグラフである。
【図55】実施例52の結果を示す写真である。
【図56】実施例53の結果を示すグラフである。
【図57】実施例550結果を示すグラフである。
【図59】実施例550結果を示すグラフである。
【図60】実施例57の結果を示すグラフである。
【図61】実施例58の結果を示すグラフである。
【図62】実施例590結果を示すグラフである。
【図62】実施例590結果を示すグラフである。
【密62】実施例590結果を示すグラフである。

(0031**)**

発明者らが新たに解明した機構に基づいた、 H M G B タンパクによって仲介される免疫 応答の活性化の抑制剤が提供される。この抑制剤は、ホスホロチオエートオリゴヌクレオ チド及びその誘導体からなる群から選択される 1 種以上の化合物からなる。

(7)

【 0 0 3 2 】

ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドとは、オリゴデオキシリボヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体である。

【0033】

抑制剤は、非メチル化CG配列を含まず、長さが5~100塩基であるホスホロチオエ ートオリゴヌクレオチドからなることが好ましい。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチ ドの長さは、10~40塩基であることがより好ましく、15~30塩基であることが更 に好ましく、15~20塩基であることが特に好ましい。このようなホスホロチオエート オリゴヌクレオチドは、HMGBタンパクと結合して、HMGBタンパクをマスクするこ とにより、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化を抑制することができ る。非メチル化シトシン・グアニン(CG)配列とは、5′-CG-3′の塩基配列であ って、メチル化されていない配列を意味する。非メチル化CG配列を含まない5~100 塩基のオリゴヌクレオチドは、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答を活性化し ない。一方、100塩基を超える長さのオリゴヌクレオチドは、免疫応答を活性化する場 合がある。

【0034】

上記のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、配列番号40に記載の塩基配列又は 配列番号40に記載の塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加 された塩基配列であって、HMGBタンパクに対する結合能を有する塩基配列からなるホ スホロチオエートオリゴヌクレオチドであることがより好ましい。配列番号40の塩基配 列は、5'-TCCATGAGSTTCCTGATGCT-3'であり、ここでSはG又 はCを表す。また、SがCである場合の塩基配列からなるホスホロチオエートオリゴヌク レオチドは後述するCpG-Rev(S)(配列番号38)に対応し、SがGである場合 の塩基配列からなるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは後述するCpG-M(S) (配列番号39)に対応する。また、1若しくは数個とは、1~10個、より好ましくは 1~5個、更により好ましくは1~3個、特に好ましくは1又は2個を意味する。 【0035】

ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、配列番号40に記載の塩基配列からなることが更に好ましい。このような塩基配列からなるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化を強力に抑制することができる。

[0036]

ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの誘導体としては、HMGBタンパクに対する 結合能を有するものであれば特に制限されず、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの

10

20

30

骨格の少なくとも一部をリン酸ジエステル結合に変換したもの、少なくとも一部のデオキ シリボースをリボースに変換したもの、少なくとも一部の塩基を除いたもの、少なくとも 一部をPNA(peptide nucleic acid)に変換したもの、少なくと も一部をLNA(Locked nucleic acid)に変換したもの、少なくと も一部の塩基を塩基アナログに変換したもの等を例示できる。これらの誘導体の中でも、 塩基フリーホスホロチオエートデオキシリボースホモポリマー(PS)が好ましい。 【0037】

PSとは、化学式(C₅H₈O₄PS)_nで表される化合物であり、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドから塩基部分を全て除いた構造を持つ。nは10~100であることが好ましく、15~25であることがより好ましい。

【 0 0 3 8 】

上記のホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、 PS又はこれらの誘導体は、核酸合成 装置等を用いて合成したものでもよく、北海道システムサイエンスやファスマック等のメ ーカーから購入したものでもよい。

【0039】

実施例に示すように、PSは、インビトロにおいて、0.1~50µM、より好ましく は1~10µM、特に好ましくは5µMの濃度で投与することにより、HMGBタンパク によって仲介される免疫応答の活性化を抑制することができる。この結果は、そのままイ ンビボにも適用することができる。

[0040]

CpG-B ODNは、実施例に示すように、TLR9(Toll様受容体9)を欠失 した細胞、又は、TLR9の発現量が少ないMEF等の細胞を用いたインビトロ実験にお いて、0.1~10µM、より好ましくは0.3~3µM、特に好ましくは1µMの濃度 で投与することにより、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化を抑制す ることができる。この結果は、そのままインビボにも適用することができる。 【0041】

HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤を臨床で使用する際に は、抑制剤に、賦形剤、安定化剤、保存剤、緩衝剤、溶解補助剤、乳化剤、希釈剤、等張 化剤等の添加剤が適宜混合された、組成物の形態であってもよい。HMGBタンパクによ って仲介される免疫応答の活性化の抑制用組成物は、必須成分である上記の抑制剤の他に 、薬学的に許容される担体を含む。薬学的に許容される担体としては、医薬品等に通常使 用される各種の成分、すなわち、水、低級アルコール、多価アルコール、油剤、界面活性 剤、保湿剤、水溶性高分子化合物、増粘剤、皮膜剤、粉体、キレート剤、pH調整剤、動 植物・微生物由来の抽出物、糖類、アミノ酸類、有機アミン類、合成樹脂エマルジョン、 皮膚栄養剤、ビタミン類、酸化防止剤、酸化防止助剤、香料、各種薬効剤等が挙げられ、 上記の抑制剤の効果を損なわない範囲で適宜加えることができる。投与形態としては、錠 剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口剤、注射剤、坐剤、液剤等によ る非経口剤、あるいは軟膏剤、クリーム剤、貼付剤等による局所投与等を挙げることがで きる。抑制剤の使用量は症状、年齢、体重、投与方法等に応じて適宜選択される。 【0042】

1 実施形態において、上記の抑制剤が抑制する、HMGBタンパクによって仲介される 免疫応答の活性化は、核酸によって仲介される免疫応答の活性化である。免疫応答を活性 化する核酸とは、二本鎖RNA(double-stranded RNA、dsRNA)、一本鎖RNA(single-stranded RNA、ssRNA)、5[,] 三リ ン酸化RNA、microRNA、ウイルスRNA、ウイルスDNA、微生物DNA(微 生物由来のDNA)、真核生物DNA、B-DNA(通常のDNAの立体構造をとった合 成DNA、B型DNA)ISD(IFN-stimulatory DNA)、非メチル 化オリゴヌクレオチド等を意味する。ISDとは、45塩基の合成DNA(配列番号36)であり、ISDを細胞内に導入するとI型IFN誘導が起こるが、これはTLR非依存 性に、IRF-3の活性化を介して行われることが知られている。本明細書において、こ 20

10

30

れらの免疫応答を活性化する核酸を総称して「全ての免疫原性核酸」と呼ぶ場合がある。 また、本明細書において、用語「免疫応答」は「自然免疫応答」及び「適応免疫応答」の 双方を含む。

【0043】

1 実施形態において、上記の抑制剤が抑制する、HMGBタンパクによって仲介される 免疫応答の活性化は、核酸によって仲介される免疫応答の活性化ではなく、HMGBタン パクのサイトカインとしての機能に基づく免疫応答の活性化である。上記の抑制剤がHM GBタンパクに結合することによって、HMGBタンパクのサイトカインとしての機能に 基づく免疫応答の活性化が抑制される。

【0044】

HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化としては、抗原特異的な適応免 疫系、多発性硬化症、死細胞による過剰な免疫応答、移植臓器拒絶反応、関節リウマチ等 の自己免疫疾患、炎症性腸疾患、アレルギー、敗血症、炎症による腫瘍の増殖、核酸含有 病原体により引き起こされる炎症性疾患が例示される。これらの免疫応答は不利益をもた らす例である。ここで、過剰な免疫応答とは、例えば肝臓の壊死性炎症のように、ウイル ス感染、循環異常や代謝異常、単純炎症反応等の外的要因で壊死した細胞が炎症を誘発し 、さらにこの炎症が新たな細胞の壊死を引き起こすという負の連鎖反応を意味する。また 、死細胞は、壊死細胞であることが好ましい。また、核酸含有病原体とは、ウイルス、微 生物、寄生虫等を意味する。

【0045】

上記の免疫応答を活性化する核酸をリポフェクトアミン(商品名、インビトロジェン社)やDOTAP(商品名、ロシュ社)等の陽イオン性脂質を用いてヒト細胞を含む動物細胞の細胞質内に投与すると、IFN-、IFN-1、IFN-4等のI型IFN(インターフェロン)やケモカイン、炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導し、免疫応答が惹起されることが知られている。

[0046]

非メチル化オリゴヌクレオチドとしてCpG オリゴデオキシリボヌクレオチド(以下 、CpG ODNという場合がある。)が、dsRNAとしてpoly(I:C)が、s sRNAとしてpoly(U)が、B-DNAとしてpoly(dA:dT)・(dT: dA)等が用いられる場合がある。

【0047】

CpG ODNとは、細菌DNAに出現頻度の高い、非メチル化CG配列(5'-CG-3')を含む合成オリゴヌクレオチドである。CpG ODNにはポリGテールを有す るCpG-A ODN(D型とも言われる。)や、B細胞を強力に活性化し、Th1型サ イトカインの産生を誘導するCpG-B ODN(K型とも言われる。)等が存在する。 CpG-B ODNとしては、例えば、5'-TCCATGACGTTCCTGATGC T-3'(配列番号1)等の配列を有するものが使用可能である。また、CpG-A O DNとしては、例えば、5'-GGTGCATCGATGCAGGGGGGG-3'(配列 番号2)等の配列を有するものが使用可能である。これらのCpG ODNは、部分的に リン酸ジエステル結合をホスホロチオエート結合等に変換した構造を持つものであっても よい。

【0048】

CpG ODNは10~30merのものが好ましく、poly(I:C)は10~1 0000merのものが好ましく、poly(U)は10~10000merのものが好 ましく、poly(dA:dT)・(dT:dA)は10~10000merのものが好 ましい。

【0049】

本発明は、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法の第1の実施形態は、被検物 質の存在下及び非存在下で、 H M G B タンパクと、標識核酸とを混合する混合ステップと 10



、標識核酸に結合した H M G B タンパクを定量する定量ステップと、被検物質の存在下で 標識核酸に結合した H M G B タンパクの量と、被検物質の非存在下で標識核酸に結合した H M G B タンパクの量とを比較し、被検物質の存在下で標識核酸に結合した H M G B タン パクの量が、被検物質の非存在下における標識核酸に結合した H M G B タンパクの量より も少ない場合に、被検物質が、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答の活性化の 抑制剤であると判定し、被検物質の存在下で標識核酸に結合した H M G B タンパクの量が 、被検物質の非存在下で標識核酸に結合した H M G B タンパクの量よりも多い場合に、被 検物質が、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答の活性化の促進剤であると判定 する、判定ステップと、を含むものである。

【 0 0 5 0 】

10

混合ステップにおいて、HMGBタンパクとしては、HMGB1、2又は3の組換え体 をいずれも好適に使用できる。発明者らは、HMGBタンパクが、全ての免疫原性核酸に 結合することを初めて明らかにした。

【0051】

標識核酸としては特に制限はないが、CpG ODN、poly(I:C)、poly (U)、B-DNA、5'三リン酸化RNA、microRNA等の合成核酸、HSV‐ 1やワクシニアウイルスDNA等のウイルスDNA、微生物DNA、ウシ胸腺DNA等が 例示できる。しかしながら、より均質であることから合成核酸であることがより好ましい 。上記の合成核酸は10~100merであることが好ましく、15~25merである ことがより好ましい。標識には特に制限はなく、ビオチン、FITC等の蛍光色素、ジゴ キシゲニン(digoxigenin)、放射性同位元素等で行われてよい。

【0052】

被検物質としては、被検物質単体でヒト細胞を含む動物細胞を刺激した場合に、免疫応 答を活性化しないものであれば特に制限はなく、核酸、核酸類似体、タンパク、低分子化 合物等を使用できる。

【0053】

被検物質で動物細胞を刺激した場合に免疫応答が活性化されるか否かは、被検物質による刺激によって、IFN - 、IFN - 1、IFN - 4等のI型IFN(インターフェロン)やケモカイン、炎症性サイトカインなどの発現が増加するか否かを測定することにより調べることができる。こららの遺伝子又はタンパクの発現が増加した場合には、免疫応答が活性化したと判断することができる。

30

20

混合ステップにおいて、被検物質の濃度は、0.1~100µMであることが好ましい。また、HMGBタンパクの濃度は1~200µg/mlであることが好ましい。また、 標識核酸の濃度は0.1~100µMであることが好ましい。これらを適切なプロテアー ゼ阻害剤を含むバッファー等の溶媒中で混合し、0.5~24時間反応させることが好ま しい。

[0055]

【0054】

定量ステップは、ストレプトアビジン結合磁性ビーズや、抗FITC抗体結合磁性ビー ズ等を用いたプルダウンアッセイによって行ってもよいし、Electrophoret ⁴⁰ ic Mobility Shift Assay(EMSA)等によって行ってもよい

[0056]

例えば、標識核酸にビオチン標識核酸を用い、ストレプトアビジン結合磁性ビーズを用 いたプルダウンアッセイを行う場合、混合ステップにより得られたサンプルにストレプト アビジン結合磁性ビーズを添加し、サンプル中のビオチン標識核酸をストレプトアビジン 結合磁性ビーズに結合させる。続いて、磁性ビーズの磁気を利用して、標識核酸に結合し たHMGBタンパクを回収する。回収したサンプルを、例えばSDS - ポリアクリルアミ ドゲル電気泳動(SDS - PAGE)に供した後、ゲル上のHMBGタンパクを、例えば PVDF膜に転写し、抗HMGB抗体を用いて染色した後、デンシトメトリー解析等によ

⁵⁰

り定量することができる。

【0057】

判定ステップにおいて、被検物質の存在下及び非存在下で標識核酸に結合したHMGB タンパクの量を比較し、被検物質の存在下で標識核酸に結合したHMGBタンパクの量が 、被検物質の非存在下における標識核酸に結合したHMGBタンパクの量よりも少ない場 合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤であ ると判定する。また、被検物質の存在下で標識核酸に結合したHMGBタンパクの量が、 被検物質の非存在下における標識核酸に結合したHMGBタンパクの量よりも多い場合に 、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の促進剤であると 判定する。

【0058】

第1実施形態のスクリーニング方法において、次のような変形が可能である。標識核酸 として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド及びその誘導体からなる群から選択され る化合物、例えば、配列番号40に記載の塩基配列からなるホスホロチオエートオリゴヌ クレオチドを用いる。

【0059】

ここで、上記の標識核酸と、HMGBタンパクのそれぞれを、互いにFRET(Flu orescence Resonance Energy Transfer、蛍光共鳴 エネルギー移動)を起こす関係にある蛍光物質で標識しておく。このような関係にある蛍 光物質の対としては、例えば、N,N,N',N"-テトラメチル-6-カルボキシロー ダミン(TAMRA)と5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、6-カルボキシ・X -ローダミン(ROX)とFAM、BHQ-1と2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジク ロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)等が挙げられる。これにより、上記の化 合物とHMGBタンパクが結合するとFRETが起こり、励起波長に対して生じる蛍光波 長が変化する。したがって、試料の蛍光を観察することにより、上記の化合物とHMGB タンパクとが結合したか否かを容易に検出することが可能となる。

[0060]

混合ステップにおいて、被検物質の存在下及び非存在下で、標識した標識核酸と、標識 したHMGBタンパクとを混合する。そして、定量ステップにおいて、蛍光観察によりF RETが起きたか否かを測定することにより、標識核酸とHMGBタンパクとの結合の程 度を定量的に評価することにより、標識核酸に結合したHMGBタンパクを定量する。 【0061】

続いて、判定ステップにおいて、被検物質の存在下及び非存在下で標識核酸に結合した HMGBタンパクの量を比較し、被検物質の存在下で標識核酸に結合したHMGBタンパ クの量が、被検物質の非存在下における標識核酸に結合したHMGBタンパクの量よりも 少ない場合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑 制剤であると判定する。また、被検物質の存在下で標識核酸に結合したHMGBタンパク の量が、被検物質の非存在下における標識核酸に結合したHMGBタンパクの量よりも多 い場合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の促進剤 であると判定する。

40

[0062]

このような変形により、更に簡便に、効率よく、 H M G B タンパクによって仲介される 免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニングを行うことができる。 【 0 0 6 3 】

HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリー ニング方法の第2実施形態は、被検物質の存在下及び非存在下で、固相化されたHMGB タンパクを放置する放置(インキュベーション)ステップと、放置ステップ後の固相化さ れたHMGBタンパクに、標識核酸を接触させる、標識核酸接触ステップと、固相化され たHMGBタンパクに結合した標識核酸を定量する定量ステップと、被検物質の存在下で 放置ステップを行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量が、被検 10

20

物質の非存在下で放置ステップを行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識 核酸の量よりも少ない場合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応 答の活性化の抑制剤であると判定し、被検物質の存在下で放置ステップを行った、固相化 されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量が、被検物質の非存在下で放置ステップ を行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量よりも多い場合に、被 検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の促進剤であると判定 する、判定ステップと、を含むものである。

[0064]

このスクリーニング方法により、より簡便に、効率よく、HMGBタンパクによって仲 介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニングを行うことができる。 【0065】

放置ステップでは、固相化された H M G B タンパクを被検物質の存在下及び非存在下で 放置する。 H M G B タンパクとしては、 H M G B 1 、 2 又は 3 の組換え体をいずれも好適 に使用できる。

【0066】

HMGBタンパクは固相担体にあらかじめ固相化して使用する。固相担体としては、特に制限されないが、例えば、ガラス、セラミックス、金属酸化物等の無機物質、天然高分子、合成高分子等からなり、マイクロプレート、マイクロチップ、ビーズ、フィルム、シート等の形態のものが利用できる。固相担体は、表面がアミノ基(-NH₂)やカルボキシル基(-COOH)等の官能基で修飾されていてもよい。

【0067】

例えば、固相担体として、96ウェルマイクロプレートを用いる場合、リン酸緩衝生理 食塩水(PBS)等の緩衝液に1~100µg/m1の濃度で溶解したHMGBタンパク の溶液を、マイクロプレートの各ウェルに分注し、4~37 で0.5~24時間放置す ることにより、HMGBタンパクを固相化することができる。このマイクロプレートは、 使用前にPBS等の緩衝液で洗浄し、結合しなかったHMGBタンパクを除去することが 好ましい。また、非特異的な吸着を抑制するために、2%ウシ血清アルブミン(BSA) 含有PBS(2%BSA-PBS)等の緩衝液を添加してブロッキングすることが好まし い。

【0068】

被検物質としては、被検物質単体でヒト細胞を含む動物細胞を刺激した場合に、免疫応答を活性化しないものであれば特に制限はなく、核酸、核酸類似体、タンパク、低分子化合物等を使用できる。被検物質の溶媒としては、PBS等の緩衝液を用いることができる。被検物質の非存在下で放置ステップを行う場合には、被検物質を含まない緩衝液のみを用いればよい。放置ステップにおける被検物質の濃度は、0.1~100µMであることが好ましい。また、放置ステップにおいて、対照物質の存在下で放置ステップを行う試験群を設けてもよい。対照物質としては、HMGBタンパクに結合することが分かっている 核酸や、結合しないことが分かっている化合物等を用いることができ、例えば、HMGBタンパクに結合することが分かっている化合物等を用いることができる。放置ステップは、4~37 で0.5~24時間行うことが好ましい。放置ステップの後に PBS等の緩衝液で洗浄し、未反応の被検物質や対照物質を除去することが好ましい。

標識核酸接触ステップにおいて、放置ステップ後の固相化されたHMGBタンパクに、 標識核酸を接触させる。標識核酸としては特に制限はないが、CpG ODN、poly (I:C)、poly(U)、B-DNA、5['] 三リン酸化RNA、microRNA等 の合成核酸、HSV-1やワクシニアウイルスDNA等のウイルスDNA、微生物DNA 、ウシ胸腺DNA等が例示できる。しかしながら、より均質であることから合成核酸であ ることがより好ましい。上記の合成核酸は10~100merであることが好ましく、1 5~25merであることがより好ましい。HMGBタンパクがHMGB1である場合に は、標識核酸はRNAであってもよい。標識には特に制限はなく、ビオチン、FITC等

20

10

30

の蛍光色素、ジゴキシゲニン(digoxigenin)、放射性同位元素等で行われて よい。標識核酸接触ステップの後にPBS等の緩衝液で洗浄し、未反応の標識核酸を除去 することが好ましい。ここで、放置ステップで添加した被検物質が、標識核酸のHMGB タンパクへの結合を阻害する場合があり、このような阻害を行う被検物質は、HMGBタ ンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤である。

【0070】

定量ステップにおいて、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸を定量する。標識核酸の定量方法には特に制限はない。例えば、標識核酸がビオチンで標識されていた場合には、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)やアルカリフォスファターゼ(AP)等で標識された、抗ビオチン抗体を反応させ、未反応の抗体を洗浄した後、抗体に結合していたHRPやAP等の酵素に対応した基質を反応させて、発光や発色を得る。得られた発光や発色を、プレートリーダー等を用いて定量する。

10

あるいは、標識核酸がビオチンで標識されていた場合には、抗ビオチン抗体の代わりに H R P や A P で標識されたストレプトアビジンを用いてもよい。

[0072]

例えば、標識核酸がFITCで標識されていた場合には、抗FITC抗体を反応させて 標識核酸を定量してもよいし、標識核酸のFITCに励起光を照射し、発生する蛍光を、 蛍光プレートリーダー等を用いて定量してもよい。

【0073】

例えば、標識核酸が放射性同位元素で標識されていた場合には、マイクロプレートシン チレーションカウンター等を用いて標識核酸を定量してもよい。

【0074】

判定ステップにおいて、被検物質の存在下で放置ステップを行った、固相化されたHM GBタンパクに結合した標識核酸の量と、被検物質の非存在下で放置ステップを行った、 固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量とを比較し、被検物質の存在下で 放置ステップを行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量が、被検 物質の非存在下で放置ステップを行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識 核酸の量よりも少ない場合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応 答の活性化の抑制剤であると判定する。また、被検物質の存在下で放置ステップを行った 、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量が、被検物質の非存在下で放置 ステップを行った、固相化されたHMGBタンパクに結合した標識核酸の量よりも多い場 合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の促進剤であ ると判定する。

【0075】

図44に、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤 のスクリーニング方法の1つの態様を示す。放置ステップ(図44a)において、被検物 質3の存在下及び非存在下並びに陽性対照物質2の存在下で、固相化されたHMGBタン パク1を放置する。続いて標識核酸接触ステップ(図44b)において、ビオチン標識B - DNA 4を接触させる。続いて定量ステップ(図44c及び図44d)において、固 相化されたHMGBタンパク1に結合したビオチン標識B-DNA 4を定量する。図4 4 cでは、酵素標識された抗ビオチン抗体5を反応させている。続いて酵素の基質6を添 加し(図44d)、発光又は発色をプレートリーダー等を用いて定量する。被検物質3の 非存在下(陰性対照)で放置ステップを行ったサンプルにおいては、固相化されたHMG Bタンパク1に標識核酸が結合する。これに対し、陽性対照物質2の存在下で放置ステッ プを行ったサンプルにおいては、固相化されたHMGBタンパク1への標識核酸の結合が 阻害される。図44の被検物質3の場合は、被検物質3の存在下で放置ステップを行った サンプルにおいて、固相化されたHMGBタンパク1へのビオチン標識B-DNA 4 (標識核酸)の結合が阻害されている。そして、被検物質3の非存在下で放置ステップを行 った、固相化されたHMGBタンパク1に結合したビオチン標識B-DNA 4の量より

30

20

も、被検物質3の存在下で放置ステップを行った、固相化されたHMGBタンパク1に結合したビオチン標識B-DNA 4の量が少ないため、被検物質3が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤であると判定される。

【0076】

HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリー ニング方法の第3実施形態は、被検物質の存在下及び非存在下で、固相化された核酸とH MGBタンパクとを接触させる、接触ステップと、固相化された核酸に結合したHMGB タンパクを定量する定量ステップと、被検物質の存在下で固相化された核酸に結合したH MGBタンパクの量が、被検物質の非存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタン パクの量よりも少ない場合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応 答の活性化の抑制剤であると判定し、被検物質の存在下で固相化された核酸に結合したH MGBタンパクの量が、被検物質の非存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタン パクの量よりも多い場合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答 の活性化の促進剤であると判定する、判定ステップと、を含むものである。 【0077万】

このスクリーニング方法により、より簡便に、効率よく、 HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスクリーニングを行うことができる。 【0078】

接触ステップでは、被検物質の存在下及び非存在下で固相化された核酸とHMGBタンパクとを接触させる。核酸としては、例えば、配列番号40に記載の塩基配列からなるホ 20 スホロチオエートオリゴヌクレオチドを用いることができる。核酸の固相化方法は特に制限されないが、例えば、ストレプトアビジンをコートしたマルチウェルプレートに、ビオ チン標識した上記の核酸を結合させること等によって行うことができる。HMGBタンパ クとしては、HMGB1、2又は3の組換え体をいずれも好適に使用できる。 【0079】

被検物質としては、被検物質単体でヒト細胞を含む動物細胞を刺激した場合に、免疫応答を活性化しないものであれば特に制限はなく、核酸、核酸類似体、タンパク、低分子化合物等を使用できる。被検物質の溶媒としては、PBS等の緩衝液を用いることができる。接触ステップにおける被検物質の濃度は、0.1~100µMであることが好ましい。接触ステップは、4~37 で0.5~24時間行うことが好ましい。接触ステップの後にPBS等の緩衝液で洗浄し、未反応の被検物質や対照物質を除去することが好ましい。接触ステップで添加した被検物質が、核酸とHMGBタンパクとの結合を阻害する場合があり、このような阻害を行う被検物質は、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤である。

[0080]

定量ステップにおいて、固相化された核酸に結合したHMGBタンパクを定量する。標 識核酸の定量方法には特に制限はない。例えば、予めHMGBタンパクを蛍光物質で標識 しておき、この蛍光を定量することができる。あるいは、HMGBタンパクに対する抗体 を用いてHMGBタンパクを定量してもよい。

【0081】

判定ステップにおいて、被検物質の存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタン パクの量と、被検物質の非存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパクの量と を比較し、被検物質の存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパクの量が、被 検物質の非存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパクの量よりも少ない場合 に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤である と判定する。また、被検物質の存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパクの 量が、被検物質の非存在下で固相化された核酸に結合したHMGBタンパクの量よりも多 い場合に、被検物質が、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の促進剤 であると判定する。

【0082】

10

30

上記のスクリーニング方法により得られた、HMGBタンパクによって仲介される免疫 応答の活性化の促進剤は、ウイルス、微生物、寄生虫等による感染症の防御機構の活性化 、抗ウイルス活性の増大、免疫細胞の分化のバランスを制御してアレルギーの病状を改善 する、抗腫瘍応答を活性化する等の目的で使用することができる。これらの免疫応答は有 利な効果をもたらす例である。

【実施例】

[0083]

(プルダウンアッセイ)

質量分析の前に、マウス胎児繊維芽細胞(mouse embryonic fibr oblast、MEFs)をpoly(dA:dT)・(dT:dA)(B-DNA、1 0µg/m1)で4時間刺激した。刺激後、細胞をダウンスホモジナイザー(Wheat on science社)を用いてホモジナイザーションバッファー(20mM HEP ΕS pH7.4、20%グリセロール、50mM KC1、2mM MgCl₂、1m M PMSF、10 μ g/ml アプロチニン、10 μ g/ml ロイペプチン)中でホ モジナイズした。細胞質タンパク抽出物は、ホモジナイズしたサンプルを14500rp mで30分遠心して調製した。細胞質タンパク抽出物を、5[,]末端をビオチン標識したB - DNA 1.4 µg/mlとともにインキュベートした後、ストレプトアビジン結合磁 気ビーズ(インビトロジェン社)を添加して4 で15分間インキュベートした。プルダ ウンしたサンプルをDNase I(インビトロジェン社)と反応バッファー(20mM 20 Tris-Cl pH8.4、20mM MgCl₂、50mM KCl)中で反応さ せ、上清を銀染色(インビトロジェン社)又は質量分析に供した。

[0084]

インビトロプルダウンアッセイは、次のようにして行った。HMGB1、2又は3の組 換え体を、まず、競合物質の存在下及び非存在下で室温で30分処理した。上清をビオチ ン標識 B-DNAと4 で30分混合した後、ストレプトアビジン結合磁気ビーズ(イン ビトロジェン社)を添加して結合バッファー(50mM Tris‐Cl pH7.5、 150mM NaCl、1mM EDTA、1%NP-40、100µg/ml ロイペ プチン、1 m M P M S F、1 m M N a $_{3}$ V O $_{4}$) 中でインキュベーションした。 続い て混合物を結合バッファーでよく洗浄し、SDS-PAGEで分離後、抗HMGB1、2 又は3抗体を用いてイムノブロットした。

[0085]

(マウス、細胞、試薬)

Balb/cの遺伝的背景を持つTlr9^{-/}マウス以外は、C57BL/6の遺伝 的背景を持つマウスを用いた。Tlr9^{-/-}、Hmgb1^{-/-}、Hmgb2^{-/-}マ ウスの作成は常法により行った。MEFs、RAW264.7、NIH3T3、HEK2 93 T細胞、Tlr9^{-/-}マウスの骨髄由来cDCs(conventional d endritic cells)及びpDCs(plasmacytoid dendr itic cell precursors)の維持は常法により行った。Hmgb1⁻ ^{/ ・}マクロファージ、 cDCs及びpDCsは、胎児肝臓造血前駆細胞(分化マーカーの ない細胞をミルテニー社のMACS Lineage depletion kitで精 製したもの)を、SCF(20ng/ml)、IL-3(10ng/ml)及びIL-6 (10ng/ml)の存在下で2日間培養した後、20ng/ml M-CSF(マクロ) ファージ)、20ng/ml GM-CSF(cDCs)、100ng/mlヒトFlt 3 L (p D C s) の存在下で6日間培養することにより調製した。 S C F 、 I L - 3 及び IL-6はペプロテック社から購入した。IFN- 及びTNF- はR&Dシステムズ から購入した。IFN- は東レ株式会社から親切にも提供された。B-DNA及びウシ 胸腺DNAはシグマ社から購入した。ビオチン標識poly(dA:dT)・(dT:d A)は北海道システムサイエンス社から購入した。ISD(IFN-stimulato ry DNA)、CpG ODN、FITC標識塩基フリーホスホロチオエートデオキシ リボースホモポリマー(PS、20mer)及びFITC標識塩基フリーナチュラルデオ

10

キシリボースホモポリマー(PD、20mer)はファスマック社から購入した。PDと は、PSのホスホロチオエート結合をホスホジエステル結合に変換したものである。精製 ワクシニアウイルスDNA(MO株)はA.Kato及びM.Kidokoroより提供 された。HSV DNAはY. Kawaguchiから親切にも提供された。5 '- 三リ ン酸RNAはC.Reis e Sousa及びJ.Rehwinkelから提供された 。大腸菌DNA(微生物DNA)及びR837はインビボジェン社から購入した。po1 y (U)及びリポポリサッカライド(LPS)はシグマ社から購入した。poly(I: C)はGEヘルスケアバイオサイエンス社から購入した。B-DNA、poly(I:C))及びその他の核酸リガンドは、特記しない限り10µg/mlの濃度で使用した。Cp G - A ODNとDOTAP(ロシュ社)の複合体形成は常法により行った。MitoT Deep Red 633はインビトロジェン社から購入した。抗HMG racker B 1 抗体及び抗HMGB2 抗体はアブカム社から購入した。抗HMGB3 抗体はトランス ジェニック社から購入した。抗IRF3抗体(ZM3)はZymed社から購入した。抗 -アクチン抗体(AC-15)はシグマ社から購入した。抗NF- B p65抗体(C 2 0)はサンタクルズバイオテクノロジー社から購入した。抗リン酸化 S T A T 1 抗体 (58D6)はセルシグナリング社から購入した。

(16)

[0086]

(プラスミド構築)

マウス H M G B C D N A は M E F S 由来の全 R N A をもとに、 R T - P C R により得 20 て、 p G E X 4 T 3 ベクター (G E ヘルスケアバイオサイエンス社)の S a l I 及び N Iサイトにクローニングした。グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タグ o t 付きHMGBタンパクは、グルタチオンセファロースビーズ(GEヘルスケアバイオサイ エンス社)を用いて精製した。HMGBタンパク及びGSTタンパクはトロンビンプロテ アーゼ(ノバジェン社)処理によって分離した。

[0087]

マウスRIG-I(配列番号3)、HMGB1(配列番号4)及びRab5(配列番号 5)のcDNAは、MEF由来の全RNAに対する、逆転写を伴うポリメラーゼ連鎖反応 (以下、RT-PCRという場合がある)により得られ、pCAGGS-CFP、pCA GGS-YFP及びpCAGGS-RFPベクター(Proc.Natl.Acad.S ci.USA、101、15416-15421、2004を参照)のXhoI及びNo t I 認識部位にそれぞれクローニングし、CFP-RIG-I、YFP-HMGB1及び R F P - R a b 5 を得た。

[0088]

(イムノブロット解析)

細胞溶解及びイムノブロット解析は常法により行った。IRFダイマーはネイティブP AGE及び後に続く抗マウスIRF3抗体を使用したイムノブロット解析により行った。 IRF3ダイマーの定量はNIH Imageソフトウエアにより行った。3回の独立し た実験により同様の結果が得られた。

[0089]

(RNA解析)

R N A 抽出及び逆転写反応は常法により行った。定量的リアルタイム R T - P C R 解析 (定量的RT-PCR)はライトサイクラー480(商品名、ロシュ社)及びSYBR Greenシステム(ロシュ社)を用いて行った。全データはグリセルアルデヒド三リン 酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子について得られた結果を用いて標準化した、相対的発 現単位で表示した。データは3重に測定し、平均±標準偏差として表示した。全てのデー タについて、2回以上の独立した実験において同様の結果が得られた。 [0090]

定量的RT-PCRのためのプライマー配列は次のとおりであった。HMGB1 セン ス 5 '- C C A A A G G G G A G A C C A A A A A G - 3 '(配列番号6)、 H M G B アンチセンス 5'-TCATAGGGCTGCTTGTCATCT-3'(配列番 1

10



号7)、HMGB2 センス 5'-TGCCTTCTTCCTGTTTTGCT-3' (配列番号8)、HMGB2 アンチセンス 5'-GGACCCTTCTTTCCTG CTTC-3'(配列番号9)、HMGB3 センス 5'-GGAGATGAAAGA TTATGGACCAG-3'(配列番号10)、HMGB3 アンチセンス 5'-C TTTGCTGCCTTGGTG-3'(配列番号11)、GBP1 センス 5'-C TCAGCAGCAGTGCAAAAGG - 3'(配列番号12)、GBP1 アンチセ ンス 5 '-GCTCCTGGAGGGTTTCTGTG-3 '(配列番号13)、IR F7 センス 5'-GCAAGGGTCACCACACTA-3'(配列番号14)、 IRF7 アンチセンス 5'-CAAGCACAAGCCGAGACT-3'(配列番 号15)、IL-12p40 センス 5'-GACACGCCTGAAGAAGATG AC-3'(配列番号16)、IL-12p40 アンチセンス 5'-TAGTCCC TTTGGTCCAGTGTG-3'(配列番号17)、GAPDH センス 5'-C T C A T G A C C A C A G T C C A T G C - 3 '(配列番号18)、G A P D H アンチ センス 5'-CACATTGGGGGGTAGGAACAC-3'(配列番号19)、I L-6 センス 5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACT-3'(配列番号20)、IL-6 アンチセンス 5'-CACTAGGTTTGCCGAGT AGATCTC-3'(配列番号21)、RANTES センス 5'-ACGTCAA GGAGTATTTCTACAC-3'(配列番号22)、RANTES アンチセンス 5 ' - GATGTATTCTTGAACCCACT - 3 ' (配列番号23)、 I B -センス 5'-TTGGTGACTTTGGGTGCT-3'(配列番号24)、I アンチセンス 5['] - TGACATCAGCCCCACATTT - 3['](配列 В-番号25)、IFN- 1 センス 5′-GCCTTGACACTCCTGGTACA AATGAG-3'(配列番号26)、IFN- 1 アンチセンス 5'-CAGCA CATTGGCAGAGGAAGACAG-3'(配列番号27)、IFN- 4 セン ス 5 '- GACGACAGCCAAAGAAGTGA - 3 '(配列番号28)、IFN - 4 アンチセンス 5'-GAGCTATGTCTTGGCCTTCC-3'(配列) 番号29)、IFN- センス 5'-CCACCAGAGCCTCTCCATCA A C T A T - 3 ' (配列番号 3 0)、 I F N - アンチセンス 5 ' - C A A G T G G

[0091]

但し、実施例50、54及び56における定量的RT-PCRで使用したプライマーの 塩基配列は次の通りであった。Ifna4 フォワード鎖(Fw)5'-CAATGAC CTCAAAGCCTGTGTG-3'(配列番号47)、Ifna4 リバース鎖(R v) 5 ' - C A C A G T G A T C C T G T G G A A G T - 3 ' (配列番号 4 8)、 I f n b1(Fw)5'-CCACCACAGCCCTCTCCATCAACTAT-3'(配 列番号 4 9)、 I f n b 1 (R v) 5 ' - C A A G T G G A G A G C A G T T G A G G A CATC-3'(配列番号50)、I16(Fw)5'-ACGATGATGCACTT GCAGAA-3'(配列番号51)、I16(Rv)5'-GTAGCTATGGTA CTCCAGAAGAC-3'(配列番号52)、Tnfa(Fw)5'-TCATAC CAGGAGAAAGTCAACCTC-3'(配列番号53)、Tnfa(Rv)5' - GTATATGGGCTCATACCAGGGTTT-3'(配列番号54)、Cc1 5 (RANTES) (FW) 5 ' - ACGTCAAGGAGTATTTCTACAC - 3 '(配列番号22)、Cc15(RANTES)(Rv)5 ' - GATGTATTCTT GAACCCACT - 3 ' (配列番号23)、Gapdh (Fw) 5 ' - CTCATGA CCACAGTCCATGC - 3 ' (配列番号18)、Gapdh (Rv) 5 ' - CAC ATTGGGGGTAGGAACAC-3'(配列番号19)。 [0092]

(統計解析)

対照群及び試験群の結果はスチューデントのt検定により評価した。

AGAGCAGTTGAGGACATC-3'(配列番号31)。

【0093】

10

20

30

(ELISA)

マウスIFN- 、IL-6及びIL-1 はELISAにより測定した。IFN-ELISAキットはPBLバイオメディカルラボラトリーズ社から購入した。IL-6 ELISAキットはR&Dシステムズ社から購入した。全データについ 及びIL-1 て、追加の独立した2回の試験において同様の結果が得られた。

[0094]

(RNA干涉)

s i R N A ベクターは、オリゴヌクレオチドを p S U P E R . r e t r o . p u r o レトロウイルスベクターのEcoRI及びHindIIIサイトに挿入することにより構 築 し た 。 マ ウ ス H M G B 1 、 2 及 び 3 (p a n - H M G B - s i R N A 、 以 下 、 H M B G - siという場合がある。); HMGB2; 及びレニラルシフェラーゼ(Renilla luciferase)(対照、以下、Ctrl-siという場合がある。)のsiR NAの標的配列は、それぞれ5'-GTATGAGAAGGATATTGCT-3'(配 列番号32)、5'-GCGTTACGAGAAACCAGTT-3'(配列番号33) 及び5 '-GTAGCGCGGTGTATTATACA-3 '(配列番号34)であった 。遺伝子導入されたMEFs細胞はピューロマイシン(シグマ社)2μg/mlで、RA W264.7細胞はピューロマイシン4µg/mlで48時間選択した。

[0095]

Electrophoretic mobility shift assay (EM SA)

20

30

10

EMSAは常法により行った。NF- Bのコンセンサス配列(5'-TCGACCC G G G A C T T T C C G C C G G G A C T T T C C G C C G G G A C T T T C C G G - 3 '、配列番号35)を用いた。NF- B-DNA複合体中に存在するp65の存在は、 抗p65抗体を用いたスーパーシフトバンドの検出により確認した。

[0096]

(ウイルス感染)

MOI(multiplicity of infection) 1.00 HSV-1 又はVSVを12時間細胞に感染させた。HSV‐1及びVSVの収率を測定する場合に は、常法によりプラーク形成アッセイを行った。全データについて、追加の独立した2回 の試験において同様の結果が得られた。ウイルスの調製は常法により行った。

[0097]

(蛍光顕微鏡観察)

H e L a 細胞 (5 × 1 0⁴ 個) を、底面がガラス製の 3 5 m m 組織培養ディッシュ (松 浪硝子工業株式会社)上で培養した。蛍光顕微鏡観察は、レーザー走査型共焦点顕微鏡I X81(オリンパス株式会社)を用いて行った。2重及び3重カラーイメージは連続取得 モードにより撮影し、交差励起を防いだ。

【0098】

(オリゴヌクレオチド)

ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドであるCpG-B(配列番号37、以下「Cp 40 G - B (S)」と標記する場合がある。)、CpG - R e v (配列番号 3 8、以下「Cp G - R e v (S)」と標記する場合がある。)及びC p G - M (配列番号 3 9、以下「C pG-M(S)」と標記する場合がある。)並びにPSを用いた。これらの化合物の塩基 配列を図46に示す。図46において、下線を付した、CG(CpG-B(S))、GC (C p G - R e v (S)) 及びG G (C p G - M (S)) は、各ホスホロチオエートオリ ゴヌクレオチドにおける特徴的な塩基配列である。また、上記のほか、次のホスホロチオ エートオリゴヌクレオチドも使用した。CpG ODN 1018(S)5'- TGAC TGTGAACGTTCGAGATGA - 3 '(配列番号55)、ODN 1019(S) 5 ' - TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA - 3 ' (配列番号56)。また 、次のオリゴヌクレオチドも使用した。CpG-A 5'-ggTGCATCGATGC AgggggG-3'(配列番号2)。CpG-Aは、小文字表記の塩基はホスホロチオ 50 エート骨格をもち、大文字表記の塩基はリン酸ジエステル骨格をもつ。

【 0 0 9 9 】

(マウス脾細胞の調製)

C57BL/6Jマウスの脾臓を摘出し、これにDNase I・collagena se D入りPBSを25Gの注射針(Nipro)で注入し、滲出した細胞浮遊液を回 収した。さらに脾臓を新たなDNase I・collagenase D入りPBS中 で細切し、これを回収して37 インキュベーション(30分)した。両者をセルストレ イナー(メッシュサイズ40µm、BD)に通し、PFE(PBS pH7.2(インビ トロジェン)に1mM EDTA(GIBCO)及び2%FCS(HyClone)を添 加したもの)で洗浄した後1×RBC Lysis Buffer(eBioscien ce)に懸濁し赤血球を溶血させた。得られた細胞をさらに2度PFEで洗浄した後、再 度セルストレイナー(メッシュサイズ40µm、BD)に通し、RPMI培地に懸濁した

。 【0100】

(ウェスタンブロッティングによるシグナル伝達経路の活性化の解析)

実施例53において、1次抗体として、次の抗体を使用した。ウサギ抗IRF3ポリクローナル抗体(Invitrogen)、ウサギ抗リン酸化IRF3(Ser396)(4D4G)抗体(Cell Signaling)、マウス抗I B (L35A5)抗体(Cell Signaling)、ウサギ抗リン酸化I B (Ser32)(14D4)抗体、(Cell Signaling)、ウサギ抗リン酸化I B (Ser32)(14D4)抗体、(Cell Signaling)、ウサギ抗JNK抗体(Cell Signaling)、ウサギ 抗リン酸化JNK(Thr183/Tyr185)(81E1))抗体(Cell Signaling)、ウサギ抗P38 MAPキナーゼ抗体(Cell Signaling)、ウサギ抗リン酸化p38 MAPキナーゼ(Thr180/Tyr182))、ウサギ抗リン酸化p38 MAPキナーゼ(Thr180/Tyr182))、ウサギIgG HRP結合抗体(GE Healthcare)) 抗マウスIgG HRP結合抗体 (GE Healthcare)。

[0101]

(細胞質 D N A 又は R N A により活性化される免疫応答における H M G B の役割)
 (実施例 1)

Hmgb1⁺/⁺MEF細胞又はHmgb1⁻/⁻MEF細胞を、B-DNA(図1a 30)又はpoly(I:C)(図1b)で6時間、又はリポポリサッカライド(LPS)(200ng/ml)(図1c)で2時間刺激した。IFN- mRNAの誘導レベルを定量的RT-PCRで測定した。結果を図1に示す。「*」はHmgb1⁺/⁺MEF細胞と比較した場合にp<0.01であることを示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。NDは検出されなかったことを意味する。</p>

H m g b 1 ^{- / -} M E F 細胞では、細胞質への D N A 又は R N A の送達による I F N - 誘導が低下した。

[0102]

(実施例2)

Hmgb2^{+ / +} MEF細胞又はHmgb2^{- / -} MEF細胞をB - DNA(図2a) 40 又はpoly(I:C)(図2b)で6時間、又はLPS(200ng/ml)(図2c))で2時間刺激した。IFN - mRNAの誘導レベルを定量的RT - PCRで測定し た。結果を図2に示す。「*」はHmgb2^{+ / +} MEF細胞と比較した場合にp<0. 001であることを示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。ND は検出されなかったことを意味する。

【0103】

Hmgb2 ^{- / -} MEF細胞における、IFN - 誘導の低下は、細胞質へのDNAの 送達により観察されたが、RNAの送達によっては観察されなかった。

【0104】

(実施例3)

10

全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(C trl-si)を発現するレトロウイルスで形質転換したMEFに、B-DNA又はpo ly(I:C)を脂質導入(リポフェクション)した。続いて、IFN- (図3a及び e)、IFN- 4(図3b及びf)、IL-6(図3c及びg)、RANTES(図3 d及びh)のmRNAの発現レベルを定量的RT-PCRで測定した。結果を図3に示す 。「*」はCtrl-si-MEFと比較した場合にp<0.01であることを示す。デ ータは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。NDは検出されなかったことを意 味する。

【0105】

全てのHMGBを欠失したMEFは、細胞質DNA又はRNAに対する免疫応答が欠損 ¹⁰していた。

【0106】

(実施例4)

全てのHMGBを欠失したMEFに、様々な供給源から調製された核酸、すなわち、H SV-1 DNA(図4a)、ワクシニアウイルスDNA(図4b)、5'-三リン酸R NA(図4c)、微生物DNA(図4d)、ウシ胸腺DNA(図4e)、ISD(図4f)を、脂質導入により、細胞質に送達した。ISDの塩基配列は5'-TACAGATC TACTAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGATCTACAA3' (配列番号36)である。対照としてLPSによる刺激も行った(図4g)。脂質導入か ら6時間後におけるIFN- mRNAの発現量を定量的RT-PCRで測定した。結 果を図4に示す。「*」はCtrl-si-MEFと比較した場合にp<0.01である ことを示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。NDは検出されな かったことを意味する。

20

【0107】

全てのHMGBを欠失したMEFを、LPS(200ng/m1)により2時間刺激した結果、IFN- が誘導された(図4g)。これに対し、全てのHMGBを欠失したM EFは、様々な供給源から調製された核酸の細胞質への送達から6時間後におけるIFN - 誘導が欠損していた(図4a~h)。

[0108]

(細胞質核酸受容体に媒介されたシグナル経路の活性化、及び抗ウイルス免疫応答におけ 30 るHMGBの必要性)

(実施例5)

全ての H M G B を標的とした s i R N A (H M B G - s i)、又は対照 s i R N A (C t r l - s i)を発現するレトロウイルスで形質転換した M E F に、 B - D N A 又は p o l y (I:C)を脂質導入(リポフェクション)した。I R F 3 の二量体化をネイティブ P A G E 及びそれに続くイムノブロットにより評価した。結果を図 5 に示す。

【0109】

(実施例6)

全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(C trl-si)を発現するレトロウイルスで形質転換したMEFに、B-DNA又はpo ⁴⁰ ly(I:C)を脂質導入(リポフェクション)した。NF- Bの活性化をEMSAに より評価した。結果を図6に示す。

【 0 1 1 0 】

(実施例7)

ウイルス感染による I 型 I F N の誘導を検討した。全ての H M G B を標的とした s i R N A (H M B G - s i)、又は対照 s i R N A (C t r l - s i)を発現するレトロウイ ルスで形質転換した M E F に、 V S V 又は H S V - 1 を感染させた。 I 型 I F N、すなわ ち、 I F N - (図 7 a 及び b)、 I F N - 1 (図 7 c 及び d)、 I F N - 4 (図 7 e 及び f)のm R N A の発現レベルを定量的 R T - P C R で測定した。結果を図 7 に示す 。データは全て平均 ± 標準偏差(n = 3)として表示した。 N D は検出されなかったこと

を意味する。「*」はCtrl-si-MEFと比較した場合にp<0.01であること を示し、「**」はCtrl-si-MEFと比較した場合にp<0.05であることを 示す。

[0111**]**

(実施例8)

樹状細胞(DCs)のサブセットの1つである形質細胞様樹状細胞の前駆細胞(pla smacytoid dendritic cell precursors、pDCs)においては、TLR9を介して大量のI型IFNの産生が誘導されることが知られてい る。脾臓由来のpDCsにおいては、DNAウイルスである1型単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virustype 1、HSV-1)により感染を受 けると、TLR9を介してI型IFNの発現が誘導されるが、骨髄由来のpDCsやcD Cs(conventional DCs)においては、HSV-IによるI型IFNの 発現誘導に、TLR9非依存性の経路も存在することが報告されている。 【0112】

Hmgb1^{+ / +}又はHmgb1^{- / -} cDCsを、TLRリガンド、すなわち、po ly(I:C)(図8a及びb)、CpG-B ODN(図8c及びd)で刺激した。対 照としてLPSによる刺激も行った(図8e及びf)。続いて、IL-6(図8a、c、 e)及びTNF- (図8b、d、f)のmRNAの発現レベルを定量的RT-PCRで 測定した。結果を図8に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。 NDは検出されなかったことを意味する。「*」は野生型細胞と比較した場合にp<0. 01であることを示す。

【0113】

(実施例9)

Hmgb1⁺/⁺又はHmgb1⁻/⁻pDCsを、TLRリガンド、すなわち、CpG-BODN(図9a)及びpoly(U)(図9b)で刺激した。対照としてR837(TLR7アゴニスト)による刺激も行った(図9c)。続いて、IFN-のmRNAの発現レベルを定量的RT-PCRで測定した。結果を図9に示す。データは全て平均 ±標準偏差(n=3)として表示した。「*」は野生型細胞と比較した場合にp<0.0 1であることを示す。

[0114]

(HMGBへの高結合親和性核酸類似体を用いた、核酸により活性化される免疫応答の干渉)

(実施例10)

MEFはTLR9の発現量が少ないことが知られている。MEFを、1µMのCpGB ODNによる30分間の前処理の有無の後に、B-DNA(図10a)、poly(
I:C)(図10b)又はLPS(図10c)の細胞質への送達により刺激した。IFN
- mRNAの発現レベルを定量的RT-PCRで測定した。結果を図10に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。NDは検出されなかったことを意味する。「*」は前処理された細胞の結果が、前処理されなかった細胞の結果に対してp
<0.01であることを示す。

【0115】

(実施例11)

骨髄由来のTlr9^{-/-}pDCsを、5µM PS又は1µM CpG-B ODN による30分間の前処理の有無の後に、1µg/mlのpoly(U)(図11a)の脂 質導入又は25µg/mlのR837(図11b)のいずれかにより8時間刺激した。I FN- mRNAの発現を定量的RT-PCRで測定した。結果を図11に示す。「* 」は前処理された細胞の結果が、前処理されなかった細胞の結果に対してp<0.01で あることを示す。 【0116】

(HMGBの同定とそのDNA及びRNAへの結合)

10

30

(実施例12)

HMGBを同定した。B-DNAで4時間刺激したMEFの細胞質抽出物を、ビオチン 結合B-DNA及びストレプトアビジン結合磁性ビーズを用いたプルダウンアッセイに供 した。B-DNAに結合したタンパクをDNase I処理により溶出した。溶出された タンパク質は、SDS-PAGE及びそれに続く銀染色により可視化され(図12a)、 続いて質量分析により解析された。図12aに銀染色の結果を示す。図12bにHMGB 1、2及び3に対する抗体を用いたイムノブロット解析の結果を示す。

[0117]

(実施例13)

HMGBのDNA、RNA及び塩基フリーホスホロチオエートデオキシリボースホモポ 10 リマー(PS)への結合を検討した。図13に結果を示す。組換えHMGB1又は2並び にビオチン結合B-DNAを用いたインビトロプルダウンアッセイを、1、3、10、3 0、100µg/mlの非標識核酸(B-DNA、poly(I:C)、poly(U) 、ウシ胸腺DNA、微生物DNA)、R837(1、3、10、30、100µg/ml)(上及び中段パネル)、塩基フリーナチュラルデオキシリボースホモポリマー(PD; 0.01、0.1、0.3、1、3µg/ml;下段パネル)、及び塩基フリーホスホロ チオエートデオキシリボースホモポリマー(PS;0.01、0.1、0.3、1、3µ g/ml;下段パネル)の存在下で行った。下段パネルでは、段階的に増加する非標識B -DNA又はCpG-B ODN(0.1、0.3、1、3µg/ml)も使用した。C pG-B ODN及びPSの半数阻害濃度(IC₅₀)は非標識B-DNAのそれよりも 20 、それぞれ150分の1及び100分の1であった。

【0118】

(実施例14)

組換えHMGB1及びビオチン結合poly(U)を用いて、段階的に増加する非標識 CpG-B ODN、PS又はR837(0.1、1又は10µg/ml)の存在下で、 インビトロプルダウンアッセイを行った。結果を図14に示す。

【0119】

(実施例15)

組換えHMGB3及びビオチン結合B-DNAを用いて、1又は10µg/mlの非標 識B-DNA又はpoly(I:C)の存在下又は非存在下で、インビトロプルダウンア ³⁰ ッセイを行った。結果を図15に示す。

[0120]

(核酸により活性化される免疫応答における H M G B の必須の役割)

(実施例16)

Hmgb1^{+ / +}又はHmgb1^{- / -}MEFにB-DNA(図16a、b、c)又は poly(I:C)(図16d、e、f)を脂質導入(リポフェクション)した。続いて 、IFN- 4(図16a及びd)、IL-6(図16b及びe)、RANTES(図1 6c及びf)のmRNAの発現レベルを定量的RT-PCRで測定した。結果を図16に 示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。NDは検出されなかった ことを意味する。「*」はHmgb1^{+ / +}MEF細胞と比較した場合にp<0.01で あることを示す。HMGB1の非存在下では、様々なサイトカイン及びケモカイン遺伝子 の誘導が低下した。

【0121】

(実施例17)

野生型及び同腹仔由来のHmgb1^{-/-}MEFを段階的に増加するB-DNA(0. 1、1、5、10µg/ml)(図17a及びb)又はpoly(I:C)(0.1、1 、5、10µg/ml)(図17c及びd)で6時間刺激、又はLPS(10、50、1 00、500ng/ml)(図17e及びf)で2時間刺激した。IFN- (図17a 、c、e)及びIL-6(図17b、d、f)のmRNAの発現を定量的RT-PCRで 測定した。結果を図17に示す。

(22)

50

【0122】

(実施例18)

Hmgb1^{+ / +}又はHmgb1^{- / -} cDCs(conventional den dritic cells)にB-DNA(図18a、b、c)又はpoly(I:C) (図18d、e、f)を脂質導入(リポフェクション)した。続いて、IFN- (図1 8a及びd)、IFN- 4(図18b及びe)、IL-6(図18c及びf)のmRN Aの発現レベルを定量的RT-PCRで測定した。結果を図18に示す。データは全て平 均±標準偏差(n=3)として表示した。NDは検出されなかったことを意味する。「* 」はHmgb1^{+ / +} cDCs細胞と比較した場合にp<0.01であることを示す。 【0123】

HMGB1の非存在下では、様々なサイトカイン及びケモカイン遺伝子の誘導が低下した。 cDCsにおけるpoly(I:C)に対する応答はRLR及びTLR3の双方により媒介されていると考えられる。

【0124】

(実施例19)

HMGB2の非存在下でのサイトカイン遺伝子の誘導を検討した。野生型及び同腹仔由 来のHmgb2^{-/-}MEFを段階的に増加するB-DNA(0.1、1、5、10µg /m1)(図19a及びb)又はpoly(I:C)(0.1、1、5、10µg/m1)(図19c及びd)で6時間刺激、又はLPS(10、50、100、500ng/m 1)(図19e及びf)で2時間刺激した。IFN- (図19a、c、e)及びIL-6(図19b、d、f)のmRNAの発現を定量的RT-PCRで測定した。結果を図1 9に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。

20

10

(実施例20)

Hmgb1^{--/-}MEFにおけるHMGB2のノックダウンの影響を検討した。HMG B2を標的としたsiRNA(HMBG2-si)、又は対照siRNA(Ctrl-s i)を発現するレトロウイルスで形質転換したHmgb1^{--/-}MEFを、B-DNA(図20a及びb)又はpoly(I:C)(図20c及びd)で刺激し、IFN- (図 20a及びc)又はIFN- 4(図20b及びd)のmRNAの発現を定量的RT-P CRで測定した。対照siRNA(Ctrl-si)を発現するHmgb1^{+/+}につい ても、比較のために解析した。結果を図20に示す。データは全て平均±標準偏差(n= 3)として表示した。「*」は対照siRNA(Ctrl-si)を発現する細胞と比較 した場合にp<0.01であることを示す。

[0126]

(実施例21)

HMGB2を標的としたsiRNAの効果を検討した。野生型のMEFを、示されたs iRNAレトロウイルスで形質転換し、各HMGBタンパクの発現をイムノブロット解析 により解析した。結果を図21に示す。

[0127]

(実施例22)

全てのHMGBを標的としたsiRNAの効果を検討した。野生型のMEFを、全ての HMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(Ctrlsi)を発現するレトロウイルスで形質転換し、HMGB1(図22a)、HMGB2(図22b)及びHMGB3(図22c)タンパクの発現を定量的RT-PCRにより解析 した。結果を図22に示す。「*」はCtrl-siを導入したMEFと比較した場合に p<0.01であることを示す。

【0128】

(実施例23)

全てのHMGBを標的としたsiRNAの効果を検討した。野生型のMEFを、全ての HMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(Ctrl- ⁵⁰

si)を発現するレトロウイルスで形質転換し、各HMGBタンパクの発現をイムノブロット解析により解析した。結果を図23に示す。

【0129】

(実施例24)

HMGB欠失細胞における、様々な核酸による細胞質の刺激に対する、免疫応答の欠損を検討した。全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照si RNA(Ctrl-si)を発現するレトロウイルスで形質転換したMEFを、HSV-1 DNA(図24a)、ワクシニアウイルスDNA(図24b)、5'-三リン酸RN A(図24c)、微生物DNA(図24d)、ウシ胸腺DNA(図24e)、ISD(図 24f)示された核酸で6時間、又はLPS(200ng/ml)(図24g)で2時間 刺激した。IL-6遺伝子のmRNA発現レベルを定量的RT-PCRで測定した。結果 を図24に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。「*」はCt rl-siを導入したMEFと比較した場合にp<0.01であることを示す。 【0130】

(実施例25)

HMGB欠失細胞における、様々な濃度の核酸リガンドに対する免疫応答の欠損を検討 した。全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA (Ctrl-si)を発現するMEFを、段階的に増加するB-DNA(0.1、1、5 、10µg/ml)(図25a、d)又はpoly(I:C)(0.1、1、5、10µ g/ml)(図25b、e)で6時間刺激、又はLPS(10、50、100、500n g/ml)(図25c、f)で2時間刺激した。IFN- (図25a、b、c)又はI L-6(図25d、e、f)のmRNAの発現を定量的RT-PCRで測定した。結果を 図25に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。

【0131】

(実施例26)

HMGB欠失細胞における、様々な濃度の核酸リガンドに対する免疫応答の欠損を検討 した。全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA (Ctrl-si)を発現するMEFを、段階的に増加するB-DNA(0.1、1、5 、10µg/ml)(図26a、c)又はpoly(I:C)(0.1、1、5、10µ g/ml)(図26b、d)で6時間刺激、又はLPS(10、50、100、500n g/ml)(図26e)で2時間刺激した。IFN- (図26a及びb)又はIL-6 (図26c、d、e)の発現をELISAで測定した。結果を図26に示す。データは全 て平均±標準偏差(n=3)として表示した。

【0132】

(実施例27)

HMGB欠失細胞の、様々なサイトカイン刺激への応答を検討した。全てのHMGBを 標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(Ctrl-si)を発 現するMEFを、B-DNA(10µg/ml)で6時間(図27a)、IFN- (5 00ユニット/ml)で6時間(図27b)、IFN- (1ユニット/ml)で2時間 (図27c)又はTNF- (10ng/ml)で2時間(図27d)刺激した。IFN - (図27a)、IRF7(図27b)、GBP1(図27c)及びI B- (図2 7d)のmRNA発現量を定量的RT-PCRで測定した。結果を図27に示す。データ は全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。基本的に、これらのリガンドの異なる 量においても同じ結果が得られた。

[0133]

(実施例28)

HMGB欠失細胞における、IFN- に誘導されたSTAT1の活性化を検討した。 全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(Ct rl-si)を発現するMEFをIFN- (1又は10ユニット/ml)で30分間刺 激した。リン酸化されたSTAT1及び - アクチンを、抗リン酸化STAT1(p-S 10

20



TAT1)及び抗 - アクチン抗体でそれぞれ検出した。結果を図28に示す。 [0134](実施例29) HMGB欠失RAW264.7細胞における、核酸による細胞質刺激に対する免疫応答 の 欠損 を 検討 した。 全ての HMGB を 標的 とした si RNA (HMBG - si)、 又は 対 照siRNA(Ctrl-si)を発現するRAW264.7細胞を、B-DNA(図2 9a)又はpoly(I:C)(図29b)で示された時間刺激した。IFN- 遺伝子 のmRNA発現量を定量的RT-PCRで測定した。結果を図29に示す。「*」はCt r 1 - s i 発現細胞と比較した場合にp < 0 . 0 1 であることを示す。 10 [0135](実施例30) HMBG-si又はCtrl-siを発現するRAW264.7細胞を、段階的に増加 する B - D N A (0 . 1 、 1 、 5 、 1 0 μ g / m l)(図 3 0 a 及び d)又は p o l y(I:C)(0.1、1、5、10µg/ml)(図30b及びe)で6時間刺激、又はL PS(10、50、100、500ng/ml)(図30c及びf)で2時間刺激した。 示されたサイトカイン遺伝子のmRNA発現量を定量的RT-PCRで測定した。結果を 図30に示す。データは全て平均 ± 標準偏差(n = 3)として表示した。 [0136](実施例31) 20 HMGB欠失NIH3T3細胞における、核酸による細胞質刺激に対する免疫応答を検 討した。全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRN A (C t r l - s i) を発現するN I H 3 T 3 細胞を、B - D N A (図31a) 又はp o 1 y (I:C) (図31b) で示された時間刺激した。IFN- 遺伝子のmRNA発現 量を定量的RT-PCRで測定した。結果を図31に示す。「*」はCtrl-si発現 細胞と比較した場合にp<0.01であることを示す。 [0137] (実施例32) HMBG-si又はCtrl-siを発現するNIH3T3細胞を、段階的に増加する B - DNA(0.1、1、5、10µg/ml)(図32a及びc)又はpoly(I: 30 C)(0.1、1、5、10µg/ml)(図32b及びd)で9時間刺激、又はLPS (10、50、100、500ng/ml)(図32e)で2時間刺激した。IFN-(図32a及びb)又はIL-6(図32c、d、e)のmRNA発現量を定量的RT-PCRで測定した。結果を図32に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として 表示した。 [0138] (実施例33) B - D N A 刺激によるインフラマソーム(i n f l a m m a s o m e) 経路の活性化と 細胞死におけるHMGBの関与を検討した。 [0139]40 Hmgb1^{+/+}又はHmgb1^{-/-}胎児肝臓造血前駆細胞由来マクロファージ(図 3 3 a)、及び全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照s i R N A (C t r l - s i)を発現する R A W 2 6 4 . 7 細胞(図 3 3 b) に B - D N A を脂質導入し、12時間後に分泌された成熟IL-1 の量をELISAで測定した。R AW264.7細胞は50ng/mlのLPSで16時間刺激し、インフラマソームを活 性化させた。結果を図33に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示し た。図33に結果を示す。「*」は野生型細胞又はCtrl-si発現細胞と比較した場

HMBG-si又はCtrl-siを発現するRAW264.7細胞を、段階的に増加 する B-DNAで刺激した。細胞は24時間の刺激後に回収し、トリパンブルーで染色し 50

合にp<0.01であることを示す。NDは検出されなかったことを意味する。

[0140]

た。未処理細胞に対する生細胞の百分率を計算した。結果を図33cに示す。HMGBsiを発現しているRAW264.7細胞は、DNAに誘導される細胞死に対して、より 耐性であった。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。 [0141](実施例34) 全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(C trl-si)を発現するMEFに、VSV(図34a)又はHSV-1(図34b)を 感染させ、24時間後にウイルスタイターを測定した。結果を図34に示す。データは全 て平均 ± 標準偏差(n = 3)として表示した。「 * 」はC t r 1 - s i 発現細胞と比較し 10 た場合にp<0.01であることを示す。 [0142](実施例35) 全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(C trl-si)を発現するRAW264.7細胞に、VSV(図35a、b、c)又はH SV-1(図35d、e、f)を感染させた。続いて、IFN- (図35a及びd)、 IFN - 1 (図35 b 及び e) 及び I F N - 4 (c 及び f) の m R N A 発現量を測定 した。結果を図35に示す。「*」はCtrl-si発現細胞と比較した場合にp<0. 01であることを示し、「**」はCtrl-si発現細胞と比較した場合にp<0.0 5であることを示す。NDは検出されなかったことを意味する。 [0143] (実施例36) 全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(C trl-si)を発現するRAW264.7細胞に、VSV又はHSV-1を感染させた 。続いて、ウイルスタイターを測定した。結果を図36に示す。「*」はCtrl-si 発現細胞と比較した場合にp<0.01であることを示す。 [0144](核酸に媒介されたTLRの活性化にはHMGBが必要である) (実施例37) 全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(C trl-si)を発現するRAW264.7細胞を、poly(I:C)(図37a及び) b)又はCpG-B ODN(図37c及びd)で刺激し、IL-6(図37a及びc) 及びTNF- (図37b及びd)のmRNAの発現量を定量的RT-PCRで測定した 。結果を図 3 7 に示す。データは全て平均 ± 標準偏差(n = 3)として表示した。「 * 」 はCtrl-si発現細胞と比較した場合にp<0.01であることを示す。NDは検出 されなかったことを意味する。 [0145] (実施例38) 全てのHMGBを標的としたsiRNA(HMBG-si)、又は対照siRNA(C trl-si)を発現するRAW264.7細胞を、CpG-A ODN、並びにCpG - A ODN及びDOTAPで刺激し、IFN- (図38a)及びIFN- 4(図3 8 b)のmRNAの発現量を定量的RT - PCRで測定した。DOTAP(商品名、ロシ ュ・ダイアグノスティックス株式会社)はDNA、RNA等の負に帯電した分子を真核細 胞中にカチオンリポソームを介して導入するための試薬である。結果を図38に示す。デ ータは全て平均 ± 標準偏差(n = 3)として表示した。「*」はCtrl-si発現細胞

と比較した場合にp<0.01であることを示す。

(実施例39)

核酸類似体を用いた刺激による、核酸により活性化される免疫応答の阻害を検討した。 MEFにB-DNAを脂質導入した後、1μM CpG-B ODNで0、1、2、3 時間共刺激し、IFN- の誘導をELISAで測定した。結果を図39に示す。データ

20

30

^[0146]

(実施例40)

骨髄由来Tlr9^{-/-} cDCsを、5µM PS又は1µM CpG-B ODNで 30分の前処理の有無の後に、50µg/mlのpoly(I:C)(脂質導入なし)(図40a)、又は25µg/mlのR837(図40b)で4時間刺激した。IL-12 p40 mRNAの発現量を定量的RT-PCRで測定した。結果を図40に示す。デー タは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。「*」は、前処理された細胞の結果 に対する、前処理されなかった細胞の結果がp<0.01であることを示す。NDは検出 されなかったことを意味する。

10

30

40

【0148】 (実施例41)

HMGB1及びRIG-Iの細胞内局在を検討した。HeLa細胞に、CFPタグを付けたRIG-I(CFP-RIG-I)及びYFPタグを付けたHMGB1(YFP-H MGB1)の発現ベクターを、RFPタグを付けたRab5(RFP-Rab5)と共に 又はRFP-Rab5なしで導入した。遺伝子導入から16時間後、細胞をpoly(I :C)で2時間刺激し、レーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。 【0149】

図41に発現ベクター(CFP-RIG-I、YFP-HMGB1、RFP-Rab5 20)を共導入された細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。図41の上段及び下段は、それぞれ単独(左から右に、RIG-I、HMGB1、Rab5)及び重ね合わせ(左から右に、CFP-RIG-I+YFP-HMGB1、CFP-RIG-I+RFP-Rab5、YFP-HMGB1+RFP-Rab5、CFP-RIG-I+YFP-HMGB1+RFP-Rab5)の写真を示す。スケールバーは5µmを示す。多くの細胞で観察された、代表的な結果を示す。RIG-I及びHMGB1の双方が部分的にRab5と重なっており、これは、RIG-I及びHMGB1のエンドソーム膜への動員、及びおそらくはHMGBによるRIG-Iの活性化を示している。

【0150】

(実施例42)

CFP-RIG-I及びYFP-HMGB1発現ベクターを共導入した細胞を、pol y(I:C)刺激後に、MitoTracker Deep Red 633(mito TR、インビトロジェン社)で染色し、レーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて蛍光顕微鏡 観察を行った。図42に細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。図42の上段及び下段は、それぞ れ単独(左から右に、CFP-RIG-I、YFP-HMGB1、mitoTR)及び重 ね合わせ(左から右に、CFP-RIG-I+YFP-HMGB1、CFP-RIG-I +mitoTR、YFP-HMGB1+mitoTR、CFP-RIG-I+YFP-H MGB1+mitoTR)の写真をそれぞれ示す。スケールバーは5µmを示す。 【0151】

ここで示されるように、 R I G - I はm i t o T R と重なっており、 H M G B 1 及びm i t o T R の間には、重なりは全く見られなかった。実施例 4 1 で示された結果と共に、 この結果は、次のように解釈される。 H M G B 1 による p o 1 y (I : C) 認識の後、 R I G - I が活性化されてミトコンドリアに局在化し、そこで I P S - 1 / M A V S と相互 作用する。

[0152]

これらの観察は、核酸認識及び免疫応答の活性化の一連の活動における「スナップショット」であり、この観察においては、RIG-Iの一部の画分がHMGB1と相互作用し、一方で他の画分がHMGB1から解離してIPS-1/MAVSと結合している。 【0153】

図43に、上記の実施例の結果に基づいて作成した、核酸によって仲介される免疫応答 50

の活性化、すなわちHMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の概略図を示 す。全ての免疫原性核酸はHMGBに結合し(promiscuous sensing 、広範な認識)、これは後に続く免疫応答を活性化するための特異的パターン認識受容体 による認識(discriminative sensing、特異的な認識)に必要で ある。

(28)

[0154]

(実施例43)

マイクロプレートを用いて、固相化されたHMGBタンパクを用いた、HMGBタンパ クによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤のスクリーニング方法を評価した。5μ 10 g/mlの濃度でPBSに溶解した組換えHMGB1タンパクを、100µlずつ、96 ウェルマイクロプレートに分注し、2.5 で1時間放置して固相化した。各ウェルをPB S溶液で2回洗浄後、2%BSA-PBS溶液を100µlずつ加え、25 で1時間放 置してブロッキングした。各ウェルをPBS溶液で2回洗浄後、PBS溶液のみ、75μ g/mlのB-DNA、100µg/mlのpoly(I:C)、100ng/mlのL PS及び25µg/mlのR837を溶解したPBS溶液を100µlずつ添加し、25 で1時間放置した。続いて、各ウェルをPBS溶液で2回洗浄後、1µMの5'末端を ビオチン標識した B-DNA又は PBS溶液のみを100µ1ずつ加え、25 で1時間 放置した。続いて、各ウェルをPBS溶液で2回洗浄後、PBS溶液で200倍希釈した H R P 標識抗ビオチン抗体(R & D 社)を100µlずつ加え、25 で1時間放置した 。各ウェルをPBS溶液で2回洗浄後、HRPの基質溶液(BD バイオサイエンス社) 20 を100 μ 】ずつ加え、25 で15分間発色させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレ ートリーダー(Model 680、バイオラッド社)で定量した。図45(a)に発色 後のマイクロプレートの写真を示し、図45(b)に各サンプルの吸光度のグラフを示す 。データは全て平均 ± 標準偏差(n = 3)として表示した。

[0155]

(HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化に対する、ホスホロチオエート オリゴヌクレオチド及びPSの効果)

ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドであるCpG-B(S)、CpG-Rev(S)及びCpG-M(S)並びにPSを用いた実験を行った。これらの化合物の塩基配列を 図46に示す。図46において、下線を付した、CG(CpG-B(S))、GC(Cp G - R e v (S))及びGG (C p G - M (S))は、各ホスホロチオエートオリゴヌク レオチドにおける特徴的な塩基配列である。

[0156]

(インビトロプルダウンアッセイ)

(実施例44)

実施例13と同様にして、0.1、0.5、2.5、12.5、62.5µg/mlの C p G - B (S)、 C p G - R e v (S)、 C p G - M (S) 及び P S を 競合物質として 、 組換えHMGB1及びビオチン結合B-DNAを用いたインビトロプルダウンアッセイ を行った。結果を図47に示す。CpG-Rev(S)及びCpG-M(S)(データ示 さず)は PSよりも強い競合性を示した。

40

50

[0157**]**

(HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制) (実施例45)

MEFの培地に0.1、0.25、0.5、0.75、1µMの濃度のCpG-B(S)、 CpG-Rev(S)又はPSを添加し、1時間処理した。続いて、これらのMEF に5µg/mlのB - DNA又は5µg/mlのpoly(I:C)を脂質導入して24 時間刺激し、IFN- の産生をELISA法により測定した。結果を図48に示す。デ ータは全て平均±標準偏差(n = 3)として表示した。(a)~(c)はB-DNAで刺 激した結果を示し、(d)~(f)はpoly(I:C)で刺激した結果を示す。その結 果、CpG-B(S)(図48a及びd)又はCpG-Rev(S)(図48b及びe)

で処理したMEFにおいて、IFN - の産生が顕著に減弱していた。また、今回実験した濃度においては、PSを用いた場合のMEFによるIFN - の産生の抑制は、CpG - B(S)又はCpG - Rev(S)を用いた場合と比較して弱いことが明らかとなった(図48c及びf)。

【0158】

以上の結果から、MEFによるIFN - の産生の抑制には、塩基部分の存在が重要で あることが明らかとなった。TLR9を介した免疫応答の活性化にはCpG-B(配列番 号1)の第8番目及び第9番目の塩基がCGの配列であることが重要であることが知られ ているが、この配列をGCに変え、リン酸ジエステル結合を全てホスホロチオエート結合 に置き換えたCpG-Rev(S)(配列番号38)で処理したMEFにおいて、IFN - の産生が顕著に減弱していた。この結果から、HMGBタンパクによって仲介される 免疫応答の活性化の抑制には、非メチル化CG配列(5'-CG-3')は重要ではなく 、(1)ホスホロチオエート結合を有していること、及び(2)塩基を有していること、 が重要であると考えられる。

【0159】

(実施例46)

野生型マウス由来の骨髄細胞を、上述したようにヒトF1t3Lで分化誘導してpDC sを得た。このpDCs(以下、「F1t3‐DCs」という場合がある。)を、3µM のCpG‐M(S)の存在下で1時間処理した後、1µMのCpG‐A(TLR9アゴニ スト)又は5µg/mlのpoly(U)(TLR7アゴニスト)を脂質導入して24時 間刺激し、IFN‐ 及びIFN‐ の産生をELISA法により測定した。結果を図4 9に示す。(a)及び(b)はIFN‐ の産生量の測定結果を示し、(c)及び(d) はIFN‐ の産生量の測定結果を示す。また、(a)及び(c)はCpG‐Aで刺激し た結果を示し、(b)及び(d)はpoly(U)で刺激した結果を示す。データは全て 平均±標準偏差(n=3)として表示した。その結果、F1t3‐DCsは、CpG‐M (S)による処理によって、CpG‐A又はpoly(U)で刺激された場合のIFN‐ 及びIFN‐ の産生が顕著に抑制されることが明らかとなった。

[0160]

(インビボ敗血症モデル)

(実施例47)

マウスへのLPS投与は、敗血症のモデルとして用いられる。致死量のLPSをマウス に投与した場合、血中における炎症性サイトカインTNF- 、IL-1 、IL-6の 濃度はLPS投与後間もなく上昇し、2~3時間後にピークを迎え、その後数時間で基底 濃度に戻る。一方、マウスの生存の経過を追うと、多くの個体が死に至るにはLPS投与 から12~48時間の経過を要する。この時期に血中で高濃度に存在するサイトカインと して見出されたのが、HMGB1である。HMGB1の血中濃度は、LPS投与後8時間 のうちには変化が見られず、その後上昇して、投与から16~36時間後に高濃度を維持 する。血中のHMGB1濃度と敗血症の重症度が相関していること、HMGB1の寄与の 重要性が伺える。

【0161】

また、敗血症モデルにおいては肝細胞が壊死(ネクローシス)を起こすことが知られて おり、壊死細胞によって放出される核酸などのDAMPsが症状を増悪させている可能性 が考えられる。これらのいわゆる炎症メディエーターを阻害することで、症状を改善でき る可能性について検討した。

【0162】

C57BL/6マウスにLPS 1.25mg/匹を腹腔内投与した場合に惹起される 敗血症モデルにおいて、CpG-M(S)の効果を検討した。LPSの投与の1時間前に 、100µg/匹のCpG-M(S)又は生理食塩水を尾静脈投与し、マウスの生存率を 測定した。結果を図50に示す。CpG-M(S)を投与したマウスにおいて、生存率の 10

20



改善が認められた。LPSの投与により、肝臓等において細胞死が生じ、核酸が放出され、これらの核酸によって、HMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化が誘導 されると考えられる。特定の理論に拘泥する物ではないが、CpG-M(S)の投与によ り、このようなHMGBタンパクによって仲介される免疫応答の活性化が抑制されている ことが考えられる。

【0163】

図50に示すように、CpG-M(S)の投与を行わなかった対照群(n=10)では LPS注射後12~48時間後に全個体が死亡したのに対し、CpG-M(S)を投与後 にLPSを注射したサンプル群(n=10)では70%が生存した。

[0164]

(塩基配列の検討)

(実施例48)

MEFに5mer、10mer(配列番号41)、15mer(配列番号42)及び2 0mer(配列番号43)の塩基数のpoly(dA)(プリン塩基)の塩基配列を有す るホスホロチオエートオリゴヌクレオチド(以下「poly(dA)(S)」と標記する 場合がある。)又は5mer、10mer(配列番号44)、15mer(配列番号45) 及び20mer(配列番号46)の塩基数のpoly(dC)(ピリミジン塩基)の塩 基配列を有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチド(以下「poly(dC)(S) 」と標記する場合がある。)を1時間1µMで前処理した。続いて、5µg/mlの濃度 のB-DNAを脂質導入することで前処理後のMEFを刺激し、3時間後又は6時間後の IFN- のmRNAの誘導をRT-PCRにて検討した。

【0165】

結果を図51に示す。データは全て平均±標準偏差(n=3)として表示した。(a) はpoly(dA)(S)の結果を示し、(b)はpoly(dC)(S)の結果を示す 。陽性対照としてCpG-M(S)で前処理したものを用い、陰性対照としてオリゴを添 加せずに前処理したものを用いた。poly(dA)(S)及びpoly(dC)(S) のいずれも、B-DNA刺激によるIFN-mRNAの誘導を抑制した。特にプリン 塩基であるpoly(dA)(S)を用いた場合のIFN-mRNAの誘導の抑制は 顕著であった。また、15mer以上の長さのホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは 、IFN-mRNAの誘導の抑制効果が大きかった。

[0166]

(核酸認識受容体シグナルを阻害する非免疫原性オリゴデオキシリボヌクレオチドの探索)

(各種オリゴデオキシリボヌクレオチド(ODN)のI型IFN産生抑制能の比較) (実施例49)

poly(dA:dT)・(dT:dA)(B型コンフォメーションをとるdsDNA、以下、「B-DNA」という。)、dsRNAであるpoly(I:C)をマウス胎児線維芽細胞(MEF)の細胞内にリポフェクション法によって導入すると、I型IFN(IFN- /)及び炎症性サイトカインが産生されることが報告されている。そこでまず、予め培地中にODNを加えておくこと(以下、「ODN前処理」という。)による免疫応答抑制を、核酸刺激によるI型IFNの産生量を指標として検討した。核酸刺激の1時間前に各種ODNによる前処理を行った場合、行わなかった場合について、MEFにおけるI型IFNの産生量をELISAにて定量した。その結果、CpG-B(S)、CpG-Rev(S)、CpG-M(S)、CpG ODN 1018(S)、ODN 1019(S)を前処理に用いると、培地中のODN濃度上昇に依存してI型IFNの産生が抑制された。また、塩基をもたずホスホロチオエート骨格のみからなるODN(PS)は、上記の塩基をもつODNで前処理を行った場合よりも、I型IFN産生抑制能が低いことが明らかになった。結果を図52に示す。

【 0 1 6 7 】

より詳細には、MEFにおいて、各種ODN(CpG-B(S)、CpG-Rev(S ⁵⁰

(30)

40

20

)、CpG-M(S)、CpG ODN 1018(S)、ODN 1019(S)、P
 S)による前処理の1時間後に、5µg/mL B-DNA(A-F)、或いは5µg/mL poly(I:C)(G-L)で刺激を行い、24時間後の培養液上清中のIFN
 - をELISAで定量した。それぞれ独立した2つのサンプルを用いて、平均値と標準 偏差を示した。図52中、「*」はP<0.05で、「**」はP<0.01でCpG-M(S)(+)とCpG-M(S)(-)の値に有意差があることを示す。

【0168】 (実施例50)

タンパク質の合成阻害がODNによる免疫応答抑制の原因である可能性を検討した。C pG-B(S)及びCpG-M(S)について、MEFにおけるI型IFN及び炎症性サ イトカインのmRNAの誘導を定量的RT-PCRにて検討した。その結果、図53に示 すように、CpG-B(S)、又はCpG-M(S)を前処理に用いると、I型IFN及 び炎症性サイトカインのいずれも、mRNAの発現誘導が抑制された。よって、これらの ODNはmRNA発現誘導より上流を標的として免疫応答抑制を行っていることが示唆さ れた。また、CpG-M(S)と同じ塩基配列をもち且つリン酸ジエステル骨格からなる ODN(CpG-M)を前処理に用いた場合には、CpG-M(S)で前処理を行った場 合のようなI型IFN及び炎症性サイトカインの発現誘導の抑制が見られなかった。 【0169】

より詳細には、MEFにおいて、各種ODN(CpG-B(S)、CpG-M(S)、 CpG-M(S)と同じ配列でリン酸ジエステル骨格をもつODN(CpG-M))によ る前処理の1時間後に、5µg/mL B-DNA、或いは5µg/mL poly(I : C)を細胞内に導入し、刺激を行った。刺激から3、6時間後に全RNAを回収し、(A)Ifna4、(B)Ifnb1、(C)I16、(D)Cc15のmRNAの誘導を 定量的RT-PCRにより定量した。それぞれ独立した2つのサンプルを用いて、平均値 と標準偏差を示した。図53中、N.D.は検出不能を示す。「*」はP<0.05で、 「**」はP<0.01でCpG-M(S)(-)の値との間に有意差があることを示す

[0170]

(核酸の取込み効率の解析)

(実施例51)

実施例50の解析より、MEFにODN前処理を施すことでB-DNA、poly(I :C)刺激によるIFN産生が抑制されることが示された。これについて、ODNはどの ような機構でIFN産生を抑制しているのかについて検討した。B-DNA、poly(I:C)を用いて細胞を刺激する際、リポフェクション法によって核酸を導入する必要が ある。したがって、実施例50においては、ODNがリポフェクションによるB-DNA 、poly(I:C)の細胞内への取込みを阻害することにより、結果としてIFN産生 が抑制されている可能性が考えられた。そこで、5′末端がFITC標識されたB-DN Aを細胞内に取り込ませる際、TLR9を活性化しないと考えられるCpG-Rev (S)、CpG-M(S)、ODN 1019(S)の前処理の有無がB-DNA取込みに与 える影響について検討した。結果を図54に示す。FITC標識B-DNAを導入したM EFにおいて、FITCに由来する蛍光をフローサイトメトリーにて観測した。フローサ イトメトリー解析はFACSCalibur(BD)を用いて行った。この条件下におい て、IFN産生を阻害するCpG-B(S)、CpG-Rev(S)、CpG-M(S) で前処理したサンプル(図54、C、D、E)では処理無しのコントロール(図54、B)と比較し、同程度若しくはより強い蛍光が観測され、 B - D N A の取り込みを阻害して いないことが明らかとなった。一方で、ODN 1019(S)による前処理を行ったM EF(図54、F)では、コントロールの細胞群(図54、B)と比較し、FITC由来 の蛍光を発する細胞が少なかったことから、ODN 1019(S)はリポフェクション による B-DNAのMEFへの取込みを阻害していることが判明した。 **[**0171**]**

10

30

40

50

より詳細には、各種ODNによる前処理を行わず、FITC標識 B - DNAを導入しな かったMEF(A)、3µg/mL FITC標識 B - DNAのみを導入したMEF(B)、及び1µM CpG - B(S)(C)、1µM CpG - Rev(S)(D)、1µ M CpG - M(S)(E)、1µM ODN 1019(S)(F)による前処理を1 時間行った後、3µg/mL FITC標識 B - DNAを導入したMEFについて、細胞 内に取込まれたFITC標識 B - DNA由来の蛍光を、フローサイトメトリーにて検出し た。FITC由来蛍光の蛍光強度を横軸とし、細胞数をヒストグラムで示した。図54中 、各パネル中の数値は、FITC陽性細胞の全体に占める割合を示す。

【0172】

ODN 1019(S)がどのようにリポフェクションによる核酸の細胞質内への導入 ¹⁰ を阻害しているかその機構は不明であるが、この様式の抑制作用の解析は、ここでは主眼 とはしていない。したがって本明細書においては、ODN 1019(S)による取り込 み阻害機構についてはこれ以上の解析を行わず、以下の実験には、CpG-B(S)と同 様に核酸の取込みを阻害しない CpG-M(S)を用いた。

[0173]

(CpG-M(S)とHMGBタンパク質との結合及び核酸受容体シグナル経路の抑制)
 (実施例52)

上記の結果から、CpG-M(S)によるIFN産生の抑制は、核酸の取り込み阻害に よるものではないことが明らかとなった。そこで、CpG-M(S)による抑制の作用点 はどこかについて検討した。核酸認識に関連するシグナル伝達分子に着目し、解析を進め た。B-DNAやpoly(I:C)の刺激によってI型IFNの誘導のみならずNF-

B経路及びMAPキナーゼ経路が活性化されることが知られているが、B-DNAやpoly(I:C)とHMGBタンパク質との結合を阻害することで、これらのシグナル伝達経路の活性化が抑制される可能性を検討した。CpG-M(S)とHMGBタンパク質との結合についてインビトロプルダウンアッセイにて検討した。HMGB1の組換えタンパク質を精製し、ビオチン標識B-DNAと混合すると、図55Aに示すように、HMGB1はB-DNAと結合した。この結合はCpG-B(S)を競合物として加えていくこ

20

30

40

50

とで完全に阻害された。次に、このHMGB1とCpG-B(S)との強い結合をCpG - M(S)によって阻害できるかどうかを検討した。図55Bに示すように、ビオチン標 識CpG-B(S)とHMGB1タンパク質を混合し、ここにCpG-M(S)を添加し ていくと用量依存的にCpG-B(S)とHMGB1との強い結合を阻害できることが判 明した。ビオチン標識していないCpG-B(S)を添加した場合と同等に結合が阻害さ れたことから、CpG-M(S)はCpG-B(S)と同程度に強くHMGB1と結合す ることが示唆された。また同時に、図55Bに示すように、CpG-M(S)は、塩基を もたないホスホロチオエート骨格のみのODN(PS)及びCpG-M(S)と同じ配列 でリン酸ジエステル骨格をもつODN(CpG-M)よりも強くHMGB1と結合するこ とが示された。

【0174】

より詳細には、HMGB1の組換えタンパク質2µgと終濃度2.5µg/mLのビオ チン標識B-DNAに対し、競合物(Competitor)として終濃度0、0.1、 0.5、2.5、12.5、62.5µg/mLのCpG-B(S)を加え、インキュベ ーションした(室温、30分)。ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いてビオチン標 識B-DNAをプルダウンし、共沈したタンパク質に対し抗HMGB1抗体を用いて、ウ ェスタンブロッティングによりHMGB1を検出した。結果を図55Aに示す。また、H MGB1の組換えタンパク質2µgと終濃度0.2µMのビオチン標識CpG-B(S) に対し、競合物として終濃度0、1、2、4、8、16、32µMのビオチン標識してい ないCpG-B(S)、CpG-M(S)、塩基をもたないホスホロチオエート骨格のみ のODN(PS)、CpG-M(S)と同じ配列でリン酸ジエステル骨格をもつODN(CpG-M)を加えた。ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いてビオチン標識CpG -Bをプルダウンし、共沈したタンパク質に対し抗HMGB1抗体を用いて、ウェスタン

(32)

ブロッティングによりHMGB1を検出した。結果を図55Bに示す。

[0175]

(実施例53)

実施例49の検討において、HMGB1に高い結合親和性を有すると考えられるCpG - M (S)の方が、ホスホロチオエート骨格のみのPSよりも核酸刺激によるIFN誘導 の抑制能が強かったこと、実施例50の検討において、CpG-M(S)がI型IFN及 び炎症性サイトカインのmRNA誘導を抑制するのに対しCpG - Mは抑制しなかったこ とを考慮すると、CpG-M(S)による免疫応答抑制作用は、CpG-M(S)がHM GBタンパク質と強く結合することによって、免疫原性核酸のHMGBタンパク質への結 合による下流の免疫受容体への結合及びシグナル伝達を阻害することに起因するのではな いかと考えられた。この仮説に則れば、CpG-M(S)の抑制作用はI型IFNの誘導 のみにとどまらず、NF- BやMAPキナーゼの活性化経路にまで及んでいるはずであ る。そこで次に、核酸刺激によるこれら転写因子やシグナル伝達分子の活性化へのCpG - M (S)の抑制作用について検討した。

(33)

[0176]

B - D N A や p o l y (I:C)等の核酸刺激による I 型 I F N の誘導には転写因子で あるIFN regulatory factor 3(IRF3)が重要な役割を果た していることが報告されている。IRF3は、無刺激時は単量体として細胞質内に存在す るが、リン酸化等によって活性化を受けると、ホモニ量体を形成し核内移行することが知 られている。そこでIRF3の活性化を、リン酸化を指標に検討した。図56に結果を示 す。核酸刺激によるIRF3のリン酸化は、CpG-M(S)の前処理によって顕著に抑 制されていることが明らかになった。次に、NF- B経路の活性化をI B のリン酸 化を指標として、またMAPキナーゼ経路の活性化をc-Jun N-terminal k i n a s e (J N K)、 p 3 8 のリン酸化を指標として検討した。その結果、やはり CpG-M(S)の前処理により、これらの転写因子、シグナル伝達分子の活性化も著明 に減弱していることが明らかとなった。以上のことから、 С р G - M (S) は H M G B タ ンパク質と結合することにより、B-DNAやpolv(I:C)とHMGBタンパク質 との結合を阻害し、それらによる自然免疫受容体刺激によるシグナル経路を抑制している ことが示唆された。

[0177]

より詳細には、1µM CpG-M(S)による1時間の前処理を行った、或いは行わ なかったC57BL/6Jマウス由来のMEFに対し、1µg/mL B-DNA(A) 或いは1µg/mL poly(I:C)(B)を細胞質内に導入し、刺激を行った。刺 激後0.5、1、1.5、2、3、4時間後のタンパク質のサンプルを回収し、IRF3 、 I B 、 JNK、 p38のリン酸化(p-IRF3、p-I B 、p-JNK、p - p38)を、ウェスタンブロッティングにより検出した。

(CpG-M(S)の抑制作用におけるTLR9の関与の検討)

(実施例54)

40 上記の結果から、CpG-M(S)はB-DNAの細胞内への取込みには影響を与えず 、細胞内核酸認識受容体下流のシグナル伝達経路の活性化を阻害することが明らかになっ た。CpG-M(S)はHMGBタンパク質を標的として免疫応答を抑制していることが 強く示唆される。ところで、CpG-M(S)は、TLR9アゴニストであるCpG-B (S)と1塩基のみ異なる配列をもつ。そこで、TLR9が発現している細胞種において も、CpG-M(S)は核酸刺激による免疫系の活性化を抑制できるか否かについて検討 した。また、CpG-M(S)自体がTLR9によって認識され、アゴニストとして作用 してしまう可能性について検討した。 Tlr9遺伝子欠損(Tlr9^{-/-})マウス及び 対照(Tlr9^{*/-})マウス由来の c D C を用い、細胞内核酸刺激に対する応答が C p G - M (S)前処理によって抑制されるか検討した。図57に示すように、これらのマウ ス由来の c D C を B - D N A 又は p o l y (I:C)で刺激すると、両者の c D C におい 50

10



て I型 I F N 及び炎症性サイトカインの遺伝子の発現が同等に誘導された。このとき、 C p G - M (S)の前処理によって、 T 1 r 9 * / * c D C、 T 1 r 9 * / * c D Cの いずれの場合においても I 型 I F N 及び炎症性サイトカイン遺伝子の発現誘導が抑制され た。以上のことより、 M E F 以外の細胞種においても C p G - M (S)は核酸刺激による 免疫系活性を抑制することが明らかになった。また、この抑制作用は T L R 9 のシグナル には依存せず、 T L R 9 より上流の、おそらく H M G B タンパク質と C p G - M (S)の 結合によってもたらされるものと推察された。さらに、 B - D N A 又は p o 1 y (I : C)で刺激せず、 C p G - M (S)のみ添加した場合には I 型 I F N も炎症性サイトカイン も誘導されなかったことから、 C p G - M (S)は T L R 9 のアゴニストである C p G -B (S)とは異なり、免疫原性をもたないことが明らかになった。

【0179】

より詳細には、Tlr9遺伝子欠損マウス(Tlr9^{-/-})及び対照マウス(Tlr 9^{+/-})由来のcDCに1µM CpG-M(S)により前処理を行い、或いはコント ロールとして前処理を行わず、1時間後に5µg/mL B-DNA、5µg/mL p oly(I:C)を細胞内に導入し、刺激を行った。刺激から3、6時間後に全RNAを 回収し、(A)Ifna4、(B)Ifnb1、(C)Il6、(D)TnfaのmRN Aの誘導を定量的RT-PCRにより定量した。それぞれ独立した2つのサンプルを用い て、平均値と標準偏差を示した。図54中、N.D.は検出不能を示す。「*」はP<0 .05で、「**」はP<0.01でCpG-M(S)(+)とCpG-M(S)(-) の値に有意差があることを示す。

20

10

【 0 1 8 0 】

(CpG-M(S)によるTLR経路の抑制の検討)

(実施例55)

実施例54の結果より、CpG-M(S)がTLR9のさらに上流を標的として核酸刺激による免疫系活性を抑制すると考えられた。そこで、同じく核酸を認識する膜型受容体であるTLR7の下流のシグナル経路も、同様にCpG-M(S)によって抑制され得るかについて検討した。CpG-M(S)はTLR9のアゴニストとして免疫原性をもたない。よって、TLR7及びTLR9を多く発現し、それぞれのリガンドであるssRNA、CpGモチーフをもつDNAを認識すると大量のI型IFNを産生する細胞、pDCを用いて、TLR7、TLR9が核酸認識した際のI型IFNの誘導がCpG-M(S)によって抑制されるか検討した。図58に示すように、pDCをTLR9リガンドであるCpG-A、又はTLR7リガンドであるpoly(U)で刺激すると、IFN-の産生が誘導されたが、この産生はCpG-M(S)での前処理によって抑制された。

【0181】

より詳細には、 3 µ M C p G - M (S)で前処理を行った、或いは行わなかったC 5 7 B L / 6 J マウス由来の p D C を、 (A) T L R 9 リガンドである 1 µ M C p G - A 、 (B) T L R 7 リガンドである 5 µ g / m L p o 1 y (U)で刺激し、 2 4 時間後の 培養上清中の I F N - を E L I S A にて定量した。「**」はC p G - M (S) (-) と (+) との値に P < 0.01で有意差があることを示す。

【0182】

(実施例56)

次に、定量的RT-PCRにてI型IFN遺伝子の発現誘導を解析したところ、図59 に示すように、CpG-A、poly(U)のいずれを用いて刺激した場合も、mRNA のレベルでI型IFN遺伝子の発現が抑制された。このことから、CpG-M(S)はT LR7、TLR9による核酸認識に共通した機構を標的として、I型IFNの誘導を抑制 していることが示唆された。

【0183】

より詳細には、10µM CpG-M(S)で前処理を行った、或いは行わなかったC 57BL/6Jマウス由来のpDCを、1µM CpG-Aで刺激した際の(A)Ifn a4、(B)Ifnb1、及び、5µg/mL poly(U)で刺激した際の(C)I

30

fna4、(D) Ifnb1のmRNA誘導を定量的RT-PCRにて定量した。いずれ もそれぞれ独立した2つのサンプルを用いて、平均値と標準偏差を示した。N.D.は検 出不能を示す。「*」はP<0.05で、「**」はP<0.01でCpG-M(S)(+)とCpG-M(S)(-)との値に有意差があることを示す。

【0184】

(CpG-M(S)の核酸刺激による適応免疫系活性化の抑制及び病態モデルにおける評価)

上記の結果から、インビトロにおけるCpG-M(S)の自然免疫応答抑制能が示された。病原体由来分子パターン(Pathogen-associated molecu lar patterns;PAMPs)や自己の組織に由来するダメージ関連分子パタ ーン(Damage-associated molecular patterns; DAMPs)を素早く認識し、応答を行う自然免疫は、生体内の非自己を速やかに排除す る点で重要である。しかし同時に、適応免疫系を活性化し、より特異性の高い免疫応答を 惹起することもまた自然免疫の重要な役割である。

【0185】

そこで、まず、インビボにおける自然免疫応答、及びこれにより活性化される適応免疫 応答は、CpG-M(S)によって抑制され得るか否かをCD8⁺T細胞の活性化を指標 に検討した。さらに、CpG-M(S)による適応免疫系の抑制に加え、上記の結果から 示された、CpG-M(S)には免疫原性がないことに着眼し、実験的自己免疫性脳脊髄 炎(Experimental autoimmune encephalomyeli tis;EAE)や敗血症などの病態モデルにおいてCpG-M(S)が与える影響につ いて検討した。

20

30

10

[0186]

(CpG-M(S)による抗原特異的CD8⁺T細胞の活性化抑制)

(実施例57)

自然免疫系の活性化は適応免疫系の活性化と密接に関連している。抗原とアジュバント を投与することで抗原に特異的な適応免疫系が活性化されることは良く知られており、ア ジュバントが自然免疫系を活性化し、樹状細胞等において共刺激分子を発現させ、成熟化 を促すことでT細胞への抗原提示を促進していると考えられている。核酸と抗原の投与に よって抗原特異的な適応免疫系が惹起されることは多数報告されており、ここでは適応免 疫系の活性化をCpG-M(S)が抑制できるか否か、核酸としてB-DNAを用い、抗 原として卵白アルブミンタンパク質(ovalbumin;OVA)を投与した際に誘導 されるOVA特異的CD8⁺T細胞を指標に検討を行った。マウスをOVAとB-DNA で免疫する際、CpG-M(S)を投与する群と投与しない群を用意した。免疫後8日目 に脾細胞を調製し、OVA特異的MHCクラスIテトラマーを用いてOVAに特異的に反 応するCD8 ⁺ T細胞をフローサイトメトリーにて検出した。図60に示すように、OV Aのみでマウスを感作させた場合(0.97%)と比較し、 B - D N A と一緒にO V A で 免疫した場合ではOVA特異的CD8^{*}T細胞の割合(12.6%)は有意に増強してい た。このとき、CpG-M(S)を投与したマウスではこの割合(2.41%)は著明に 減弱していた。すなわち、CpG-M(S)は核酸による適応免疫系の活性化を抑制でき ることが示された。

[0 1 8 7 **]**

より詳細には、(A)OVAのみ(B - DNA(-))、(B)OVAとB - DNA(B - DNA(+))、又は(C)OVAとB - DNAに更にCpG - M(S)を加えたも の(B - DNA(+)・CpG - M(S)(+))をC57BL/6Jマウスに腹腔内投 与した。8日後の脾臓におけるOVA特異的CD8⁺T細胞の割合を、MHCクラスIテ トラマーを用いて、フローサイトメトリーにより解析した。図60に、CD8⁺T細胞に ついてゲートをかけた細胞を表示している。また、CD44陽性且つMHCテトラマー陽 性の分画を赤枠で囲んでいる。表記の数字はCD8⁺T細胞にゲートをかけた細胞集団に おけるCD44陽性且つMHCテトラマー陽性分画の割合を示す。

(35)

50

【0188】

(EAE病態におけるCpG-M(S)の評価)(実施例58)

EAEはヒトの多発性硬化症(Multiple sclerosis;MS)の動物 モデルのひとつである。MSは中枢神経系における自己免疫性の脱ミエリン炎症疾患であ り、マウスのEAEでは、ミエリン由来のペプチド(MOGペプチド35-55、Ope ron、以下「MOGペプチド」という。)をフロイント完全アジュバント(compl ete Freund's adjuvant;CFA)とともに正常マウスに投与し、 免疫することで発症させることができる。MSとEAEに共通する病理的所見は、中枢神 経系へのB細胞、T細胞、マクロファージの浸潤とその結果生じる神経障害であり、その 病態の増悪には核酸が関与しているという報告もある。

【0189】

そこで、CpG-M(S)を投与することによってEAEの病態を軽減できるのではな いかと考え、実験を行った。EAEでは、尾や四肢の麻痺といった神経障害の重症度をス コア化することで、自己免疫性炎症の進行を評価できる。EAEの病態スコアは、表1の 基準に基づいて判定した。MOGペプチドとCFAとをマウス後背部に皮下注射し、免疫 した。注射1週間後から2日おきに3回、CpG-M(S)(n=4)又はコントロール としてPBSを投与(n=4)し、その後の病態の評価を行った。結果を図61に示す。 CpG-M(S)投与群では、対照群と比較しEAEの病態が顕著に軽減されていた。す なわち、CpG-M(S)はEAEの病態を軽減できることが示された。

【0190】

より詳細には、C57BL/6Jマウスの後背部へのMOGペプチド及びCFAの投与 後1週間後から2日おきに3回、CpG-M(S)(CpG-M(S)(+)、n=4) 又は対照としてPBS(CpG-M(S)(-)、n=4)を尾静脈注射により投与した 。図61に、MOGペプチドの投与からの日数を横軸として、各群の病態スコアの経過を 平均値と標準偏差で示した。「*」はP<0.05で、「**」はP<0.01で、「* **」はP<0.001でCpG-M(S)(+)とCpG-M(S)(-)との値に有 意差があることを示す。

【0191】 【表1】

EAEスコア				
0	正常			
0.5	尾の先端が垂れ下がる			
1	尾の麻痺			
2	協調的な運動の欠如;後肢の運動不全			
2.5	片後肢の麻痺			
3	両後肢の麻痺			
3.5	両後肢の麻痺および前肢の脱力			
4	両前肢の麻痺			
5	瀕死状態			

40

50

【0192】

(壊死細胞による免疫系活性化に対する C p G - M (S)の抑制効果)

(実施例59)

次に、壊死細胞によって惹起される免疫系の活性化(死細胞による過剰な免疫応答)を CpG-M(S)が抑制できるかどうかについて検討した。マウスマクロファージ系細胞 株であるJ774.1細胞を繰り返し凍結融解することで壊死を誘導し、この壊死細胞を CpG-M(S)の存在下、非存在下で脾細胞と混合して、炎症性サイトカインであるI L-6及びTNF-の産生をELISAにて検討した。図62に示すように、CpG-

(36)

20

M(S)で前処理した脾細胞では、前処理のCpG-M(S)の濃度の上昇に依存してI L-6及びTNF-の産生量が減弱する結果が得られた。これらの結果は、ターゲット の脾細胞での応答を抑制しているのか、又は壊死細胞によって放出される炎症性メディエ ーターを直接阻害しているのか不明ではあるが、CpG-M(S)が壊死細胞によって惹 起される免疫系活性化を抑制できることを示しているものと考えられた。

【0193】

図62において、J774.1細胞に壊死を誘導させ、CpG-M(S)の存在下、非 存在下で脾細胞と混合し、24時間後の培養上清中の(A)IL-6及び(B)TNF-をELISAにて定量した結果を示す。

【0194】

(考察)

(免疫応答抑制 O D N の探索と C p G - M (S)の作用点の解析)

CpG-B(S)はCGモチーフを1箇所もち、このCGがTLR9に認識されることで細胞内の免疫応答が惹起される。よって、TLR9の発現が低いMEFにおいてはCpG-B(S)は免疫応答を惹起しないものの、TLR9を発現するpDCやマクロファージも存在する生体内においては、免疫応答抑制効果のみを期待することは困難である。したがって、TLR9による認識を免れることを目的として、CpG-B(S)の配列中のCGをGCに置き換えたCpG-Rev(S)、GGに置き換えたCpG-M(S)を合成し、これらがMEFにおいてCpG-B(S)と同様のI型IFN産生抑制効果を持つことを確認した。また同じくCGモチーフをもつCpG ODN 1018(S)に対し、CGをGG及びAGで置き換えたODN 1019(S)の両者ともにMEFにおいてI型IFN産生抑制を示した。

【0195】

続いて行った各種ODNによるB-DNA取込み阻害の検討において、CpG-Rev (S)及びCpG-M(S)と、ODN 1019(S)とでは大きな違いが見られた。 CpG-Rev(S)及びCpG-M(S)ではB-DNAの取り込みに影響を与えなか ったものの、ODN 1019(S)による前処理を行ったMEFでは細胞内に取込まれ たB-DNAが少なかったことから、ODN 1019(S)はB-DNAの細胞内への 取り込みを阻害していると考えられた。取り込み阻害機構の詳細は不明であるが、ODN の全体配列やこれに起因するODNの立体構造が何らかの影響を与えていると考えられる 。取り込み阻害による免疫系抑制効果は本研究の焦点とするものではないため、ODN 1019(S)を用いたその後の検討は行なわず、CpG-M(S)に焦点をあて、解析 を進めた。

【0196】

CpG-M(S)はどのようにして核酸刺激に対する応答を阻害しているのか、阻害の 作用点はどこかについて検討した。CpG-M(S)はHMGBタンパク質と強く結合し 、その機能を阻害することで、核酸に対する免疫応答を抑制しているのではないかと考え た。まずインビトロプルダウンアッセイによる解析から、CpG-M(S)はHMGB1 と強く結合することが示された。さらに、CpG-M(S)がHMGBタンパク質の機能 を阻害することで核酸刺激による応答を抑制しているとする仮説は、本研究で得られた以 下の4つの結果によって支持される。

【0197】

(i)細胞内核酸刺激によって活性化される主要な転写因子、シグナル伝達分子である、IRF3、NF- B及びMAPキナーゼのいずれも、CpG-M(S)での前処理によって活性化が顕著に抑制されていた。このことから、CpG-M(S)がこれらの転写 因子やシグナル伝達分子の活性化経路の上流で作用していることが示唆される。また、B-DNA、poly(I:C)のどちらの刺激によるシグナル経路活性化もCpG-M(S)によって抑制されたことから、CpG-M(S)は細胞内のDNA及びRNAの両者の認識機構に共通するしくみを標的としていると考えられる。 20

10

【0198】

(ii) CpG-M(S)による抑制作用は、Tlr9遺伝子欠損 cDCにおいても観察された。すなわち、CpG-M(S)による抑制の作用点はTLR9のシグナル伝達系よりさらに上流であることが示唆される。TLR9のシグナル経路の活性化にもHMGB 1が必要であるという報告と併せて考えると、CpG-M(S)はTLR9より上流においてHMGB1を阻害しているものと考えられた。

【0199】

(i i i) p D C において、 T L R 7、 9 のどちらの刺激による I 型 I F N 誘導も C p G - M (S)によって抑制された。このことから、上述の(i)、(i i)と併せて、 C p G - M (S)は細胞内核酸認識機構のみならず T L R による核酸認識にも共通するしくみを標的としていると考えられる。これは、 C p G - M (S)がH M G B 1 を阻害しているとする仮説を支持するものと考えられる。

[0200]

(iv) CpG-M(S)のHMGB1に対する結合は、塩基部分をもたずホスホロチ オエート骨格のみからなるPSのそれと比較し、非常に強いことが明らかとなった。PS もHMGB1と結合はするものの結合親和性は低く、また同時に核酸刺激に対する免疫応 答の抑制作用も、CpG-M(S)と比較して非常に弱いことが判明した。このことは、 ODNとHMGB1との結合の強さがODNの免疫応答の抑制作用の強さと相関している ことを示唆しており、ODNがHMGB1を阻害することによってこの抑制作用がもたら されるという仮説を支持しているものと考えられる。

20

30

40

10

[0201]

HMGBタンパク質に強く結合するための核酸の要因として、以下の3つの要素が必要 であると考えられる。

【0202】

(i)ホスホロチオエート結合骨格を有するオリゴDNAは、通常のホスホジエステル 結合骨格のオリゴDNAよりも、HMGB1との結合が強い。

【0203】

(i i)塩基部位が存在するODNの方が、塩基をもたない骨格のみのものより、HM GB1との結合が強い。このとき、結合親和性は塩基配列には依存しないと考えられる。 実際、塩基部位が全てアデニンもしくはチミンであり且つホスホロチオエート骨格をもつ ODNを前処理に用いた場合においても、核酸刺激による免疫応答は抑制されるという知 見を得ている。ただし、CpG-B(S)のようにオリゴDNA内にCGモチーフをもつ ことでTLR9に認識されてしまい、免疫応答を活性化してしまう可能性も考えられる。 なお、CGモチーフを有しないCpG-M(S)には免疫系活性化能は認められなかった

[0204]

(i i i) ODNによる抑制作用には15mer以上の鎖長が必要である。上記のホス ホロチオエート骨格、及びアデニンもしくはチミンのみから成る塩基部位を有する、鎖長 5mer、10mer、15mer又は20merのODNを用いて抑制作用を検討した ところ、20merのものでは抑制効果が見られたが、それ以下の鎖長ではほとんど抑制 が認められなかった。これらの知見から、オリゴDNAとHMGBタンパク質との結合、 及び免疫応答の抑制作用には、ホスホロチオエート骨格を有し、20mer程度の鎖長で 且つ塩基部位を有することが重要であると推察される。これらの特徴を明らかにしたこと は、HMGBタンパク質を標的とした抑制剤を考える上で有用な情報であると期待される

【0205】

次に、 C p G - M (S)には免疫系活性化能はないことに着眼し、核酸が関与するよう な病態を軽減する抑制剤として、 C p G - M (S)を用いることについて検討した。 O V Aを抗原として B - D N A と一緒にマウスに免疫した際の O V A 特異的 C D 8 ⁺ T 細胞の 活性化は C p G - M (S)の投与によって顕著に抑制されていることが明らかとなった。 すなわち、CpG-M(S)は自然免疫系の活性化を抑制するのみならず、インビボにお いて適応免疫系をも抑制できることが判明した。抗原特異的CD8⁺ T細胞の活性化に関 しては、CD40とTLRの刺激が相乗的に働くことが報告されており、このときのTL Rの刺激はI型IFNの誘導を行う要因として考えられている。したがって、CpG-M (S)投与によって観察されたCD8⁺ T細胞の活性化の抑制は、CpG-M(S)が樹 状細胞等において自然免疫系の活性化を阻害されることで、引き続いて誘導される適応免 疫系をも抑制されるものと考えられる。しかし、CpG-M(S)が直接CD8⁺ T細胞 に感作する可能性等、その他の影響も厳密には否定できない。

【0206】

CpG-M(S)は自然免疫系のみならず適応免疫系をも抑制できるという観点から、 自己免疫疾患のモデルの1つであるEAE病態モデルにおいて、CpG-M(S)の評価 を行った。その結果、CpG-M(S)の投与によってEAEの病態が劇的に改善できる ことが判明した。今回の解析で用いたプロトコルでは、MOGペプチドをCFAと混合し て正常マウスに投与した。よって、MOGペプチド特異的MHCクラスII拘束性CD4 ⁺ T細胞の活性化が誘導される。しかし、EAEの病態には、T細胞応答に留まらず、様 々な因子がその増悪に寄与していることが報告されており、TLR9を介したシグナルの 関与も指摘されている。EAEの病態の軽減は、こうした核酸認識受容体シグナルをCp G-M(S)が抑制している可能性も考えられた。

【0207】

(HMGB1の炎症性サイトカインとしての役割とCpG-M(S))

CpG-M(S)を抗HMGB1抗体のように個体に投与することによってHMGB1 の炎症性サイトカイン機能を阻害し、敗血症の病態を抑制できる可能性を検討した。マウ スへのLPS投与による敗血症モデルにおいて評価した結果、CpG-M(S)を予め投 与しておくことによって、生存率が顕著に改善することが明らかとなった。MEFやRA W264.7などの細胞において、LPS刺激によるサイトカインの産生自体はCpG-M(S)は抑制しないという知見が得られており、CpG-M(S)は細胞へのLPS刺 激そのものを抑制しているものではないことが示唆される。

【0208】

CpG-M(S)の作用点の可能性として、LPS投与によって血中に放出されたHM GB1とCpG-M(S)が会合し、HMGB1の炎症性メディエーターとしての機能を 阻害していることが考えられる。或いは、LPS投与によって肝細胞が壊死を起こすこと が知られていることから、壊死などによって放出された核酸が惹起する免疫応答を、Cp G-M(S)が抑制していることも考えられる。

[0209]

そこで、J774.1細胞に壊死を生じさせ、脾細胞と混合したところ、ODNを投与しない場合には脾細胞において産生されるIL-6やTNF- などの炎症性サイトカインが、CpG-M(S)の投与によって抑制されていた。調製した壊死細胞溶液には、細胞から流出したHMGB1と壊死細胞由来の核酸の両者に加え、それらの複合体も含まれていると考えられることから、この結果は、現段階では上記の2つのいずれの仮説にも矛盾しない。炎症性メディエーターとしてのHMGB1をCpG-M(S)が結合することで阻害しているのか、壊死細胞による免疫系活性化を抑制しているのか、その両者の可能性があるのか、さらには核酸の関与の有無などを明らかすることで、今後CpG-M(S)を生体に投与することも視野に入れることができると考えられる。

【産業上の利用可能性】

[0210]

本発明により、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答の活性化、すなわち、抗 原特異的な適応免疫系、多発性硬化症、死細胞による過剰な免疫応答、移植臓器拒絶反応 、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、アレルギー、敗血症、炎症による腫瘍の増殖、核酸含有 病原体により引き起こされる炎症性疾患等の新たな原理に基づいた抑制剤が提供される。 また、 H M G B タンパクによって仲介される免疫応答の活性化の抑制剤又は促進剤のスク

20

10

リーニング方法が提供される。

- 【符号の説明】
- 【0211】

1… H M G B タンパク、2… 陽性対照物質、3… 被検物質、4… ビオチン標識 B - D N A、5… 抗ビオチン抗体、6…基質。

【図1】



【図2】





an an

*1777

an an

*17/

an an

*17

an an

回避:

0.02

0 [刺激:

「魚」

C 刺激:

現業成 10.006 1004 0.002

ANAm 8-NAI

ANЯm &-NЯI 現発校財

現業成計 相対発現 0.05

ANAm &-NAI

現発技群 10.06 40.05

ANAm &-NAI

MEFs □Ctrl-si ⊠HMGB-si

(g

(f) MEFs ⊟Ctrl-si ⊠HMGB-si

(e) MEFs ⊟Ctrl-si ⊠HMGB-si `` * ™

(d) MEFs ⊟Ctrl-si ⊠HMGB-si

しい 置 腔 DNA

0.25₁

後 DNA

0.10 0.08

0.20

an an

an an

an an

刺激

0.02

現発校財

0.06 0.04 刺激:

刺激:

N

現発校時

現業技術 10.01

ISD

0.08 0.06 0.04 0.02

LPS

0.010 r

0.008



【図7】

(a)

【図3】

MEFs □Ctrl-si ⊠HMGB-si

MEFs □Ctrl-si ⊠HMGB-si

MEFs □Ctrl-si ⊠HMGB-si

MEFs □Ctrl-si ⊠HMGB-si

1.0 [IFN- B mRNA

0.8

1.0 [IFN-α4 mRNA

0.8

1.2 [IL-6 mRNA

0.8

þ

<u></u>

q

^{2.0} [RANTES mRNA





MEFs Ctrl-si HMGB-si



【図8】







(f) cDCs □Hmgb1^{+/+} ⊠Hmgb1^{-/-} 0.4 [TNF- α mRNA 0.3

3

0

0.09 石 田 の 0.03

0.03

3

6 (時間)

6 (時間)



(41)







【図11】



【図16】







【図19】



【図20】







【図25】





【図26】

q

(a)







【図29】



【図31】









(46)

図33】



【図34】



【図35】



【図37】





【図38】







【図40】

【図43】





【図44】



r	39	Λ	6	٦
	쓰	4	0	

CpG-B(S)	TCCATGA <u>CG</u> TTCCTGATGCT
CpG-Rev(S)	TCCATGA <u>GC</u> TTCCTGATGCT
CpG-M(S)	TCCATGA <u>GG</u> TTCCTGATGCT
PS	塩基無し(骨格のみを有する)





【図50】





【図52】









【図58】





∢

Ifna4 mRNA

∢

貶発校財

















【図12】





【図13】



B-DNAプルダウン

(55)

JP 5686814 B2 2015.3.18



【図15】



【図21】



【図23】



【図28】



【図41】





【図45】

(a)







【図47】









【図54】

【図55】







【図56】

(68)





【配列表】 0005686814000001.app

フロントページの続き

(51)Int.CI.			FΙ	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08

(72)発明者 柳井 秀元 東京都文京区本郷3-6-15-1202

合議体

審判長 内田 淳子 審判官 横山 敏志

審判官 渕野 留香

(56)参考文献 特開2011-084517(JP,A) 特表2008-504335(JP,A) 特表2009-517404(JP,A) NATURE,2009年11月5日,Vol.462,p.99-104 NAT.REV.IMMUNOL,2004年,Vol.4,No.4,p.249-258

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K31/00-33/44 A61P1/00-43/00 C A P L U S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN) U N I P R O T / G E N B A N K / E M B L / D D B J / G E N E S E Q