

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/034961

発行日 平成22年12月24日 (2010.12.24)

(43) 国際公開日 平成21年3月19日 (2009.3.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	4 B O 6 3
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 5
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2009-532182 (P2009-532182)	(71) 出願人 503359821
(21) 国際出願番号 PCT/JP2008/066210	独立行政法人理化学研究所
(22) 国際出願日 平成20年9月9日 (2008.9.9)	埼玉県和光市広沢2番1号
(31) 優先権主張番号 特願2007-234734 (P2007-234734)	(74) 代理人 100080791
(32) 優先日 平成19年9月10日 (2007.9.10)	弁理士 高島 一
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100125070
	弁理士 土井 京子
	(74) 代理人 100136629
	弁理士 鎌田 光宜
	(74) 代理人 100121212
	弁理士 田村 弥栄子
	(74) 代理人 100122688
	弁理士 山本 健二
	(74) 代理人 100117743
	弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト樹状細胞の評価方法およびヒト細胞免疫療法剤

(57) 【要約】

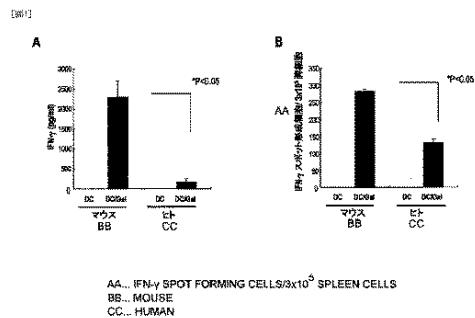
本発明は、以下の工程を含む、ヒト樹状細胞の抗原提示能の評価方法を提供する。

(1) α-ガラクトシルセラミドをパルスしたヒト樹状細胞を、非ヒト哺乳動物に投与する工程

(2) 該非ヒト哺乳動物からNK T細胞含有試料を採取する工程

(3) 該試料中に存在するNK T細胞の活性化を検出する工程

また、該方法により、NK T細胞に対して抗原提示能を有すると判定されたヒト樹状細胞を含有してなる、ヒトNK T細胞免疫療法剤も提供される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の工程を含む、ヒト樹状細胞の抗原提示能の評価方法：

(1)  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスしたヒト樹状細胞を、非ヒト哺乳動物に投与する工程；

(2) 該非ヒト哺乳動物からNK T細胞含有試料を採取する工程；

(3) 該試料中に存在するNK T細胞の活性化を検出する工程。

## 【請求項 2】

非ヒト哺乳動物がマウスである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

10

NK T細胞含有試料が、脾臓、肝臓または末梢血由来である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

NK T細胞の活性化を、該NK T細胞が産生する1種以上のサイトカインを指標として評価することを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

サイトカインが、インターフェロン- $\gamma$  および/またはインターロイキン-4を含む、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

ヒトNK T細胞免疫療法に使用するヒト樹状細胞を選別するためのものである、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。 20

## 【請求項 7】

ヒト樹状細胞がNK T細胞免疫療法により治療効果が得られうる疾患の患者由来である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

疾患が癌である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

請求項 6 または 7 に記載の方法により、NK T細胞に対して抗原提示能を有すると判定されたヒト樹状細胞を含有してなる、ヒトNK T細胞免疫療法剤。

## 【請求項 10】

30

癌の治療用である、請求項 9 記載の剤。

## 【請求項 11】

以下の工程を含む、ヒトNK T細胞を活性化し得るリガンドのスクリーニング方法：

(1) 被験物質をパルスしたヒト樹状細胞を、非ヒト哺乳動物に投与する工程；

(2) 該非ヒト哺乳動物からNK T細胞含有試料を採取する工程；

(3) 該試料中に存在するNK T細胞の活性化を検出する工程。

## 【請求項 12】

被験物質の代わりに $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを用いて前記(1)～(3)の工程を実施し、該被験物質をパルスした場合と $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスした場合との間で、NK T細胞の活性化の程度を比較することをさらに含む、請求項 10 記載の方法。 40

## 【請求項 13】

非ヒト哺乳動物がマウスである、請求項 11 または 12 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒトNK T細胞免疫療法に使用するヒト樹状細胞の有効性を評価可能なアッセイ方法、ヒトNK T細胞免疫療法剤等に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

NK T細胞は、自己反応性T細胞として免疫反応の調節制御に関与し、さらには癌細胞 50

の免疫監視に関わり、抗腫瘍効果を示すことが示唆されている。NK T細胞は、CD1d という、MHCに連鎖していないクラスI類似分子を認識して、糖脂質リガンドに反応することが知られている。したがって、NK T細胞を特異的に刺激すれば、MHC非依存的に癌細胞を攻撃することが期待される。実際に、ヒトV $\alpha$ 24<sup>+</sup> NK T細胞は、一度活性化されると、様々な種類の癌に対してMHC非依存的に抗腫瘍効果を発揮することが報告されている（非特許文献1）。

#### 【0003】

$\alpha$ -ガラクトシルセラミドは、樹状細胞表面のCD1d分子に結合して、NK T細胞を特異的に活性化する合成糖脂質リガンドである。 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドは、ヒトに投与できる薬剤基準値（GMPグレード）を満たしたものが入手可能になっている。そこで近年、癌患者に対して、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスした樹状細胞を静脈経路で投与し、NK T細胞を活性化させることにより癌を治療する、癌の免疫療法が試みられている。この癌免疫療法については、癌患者を対象にした臨床試験（Phase I相当）が既に終了しており、治療方法の安全性が確かめられている。しかし、樹状細胞を担癌患者自身から単離するため、免疫療法に用いられる樹状細胞そのものに異常がある場合や、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをロードするのに十分なパルス条件が、樹状細胞により必ずしも一定ではない可能性がある。しかし、現段階では、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスされたヒト樹状細胞が、ヒトNK T細胞に対する抗原提示細胞として有効であるか否かを評価する系が確立されていない。したがって、ヒトNK T細胞免疫療法を実施して、NK T細胞からインターフェロン $\gamma$ が産生しなかった場合に、樹状細胞の抗原提示能力に問題があるのか、あるいは患者側の他の要因が原因なのか、判断することができない場合がある。

#### 【0004】

ヒト樹状細胞の有効性を評価する方法として、ヒトNK T細胞株を使用する方法が考えられる。ヒトNK T細胞株は、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドおよびインターロイキン-2存在下において、ヒト初代NK T細胞を培養して樹立できる（非特許文献2）。しかし、樹立されたヒトNK T細胞株は、ヒト初代NK T細胞に比較して、リガンドに対して非常に強い親和性を示すことから、末梢血に存在するヒトNK T細胞とは性質が異なるものと考えられる。したがって、ヒトNK T細胞株を使用して得られた結果は、純粋にインビボの活性化機能を反映しているとは考えにくい。さらに、ヒトNK T細胞株は、長期間安定ではない。以上のことから、ヒト樹状細胞の抗原提示能を評価するために、ヒトNK T細胞株を使用することは、必ずしも適切ではない。

#### 【0005】

また、樹状細胞の抗原提示能を評価するために、治療を必要とする患者自身のNK T細胞を使用する方法が考えられる。しかし第1に、NK T細胞は血液の中では極めて少量しか存在せず、通常末梢血のリンパ球の0.1%以下であることから、評価に十分な数のNK T細胞を得るためには、大量の末梢血が必要になる。第2に、NK T細胞免疫療法の対象である癌患者では、NK T細胞の数の減少や機能の欠損が見られるため（例えば、非特許文献3を参照）、抗原提示能が見られなかった場合に、樹状細胞が原因なのか、それとも患者のNK T細胞の機能欠損が原因なのか、判断できない。以上2つの理由により、患者自身のNK T細胞を樹状細胞の有効性評価に使用することは、現実的ではない。

#### 【0006】

CD1d分子が哺乳動物の間で高度に保存されていること（非特許文献4）、マウスNK T細胞が、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスされたヒト樹状細胞を認識することは、既に報告されている（非特許文献1、3）。しかし、ヒト樹状細胞をマウス個体に投与して、実際に免疫応答が見られたという報告はこれまでにない。

このように、ヒトNK T細胞免疫療法に使用するためのヒト樹状細胞の品質を事前に評価し得る有効な手段は存在しないのが現状である。

【非特許文献1】Cancer Res. 59, 5102-5105, 1999

【非特許文献2】J. Immunol. Meth. 272, 147-159, 2003

10

20

30

40

50

【非特許文献3】 J. Immunol. 177, 3484-3492, 2006

【非特許文献4】 Immunogenetics 50, 146-151, 1999

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明は、ヒトNK T細胞免疫療法に使用するヒト樹状細胞の抗原提示能の有効性を定量的に評価する新たな方法を提供すること、ならびにヒトNK T細胞免疫療法剤等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】

【0008】

10

本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスしたヒト樹状細胞をマウスに投与すると、意外にもマウスNK T細胞が活性化されることを見出した。しかも、このヒト樹状細胞によるマウスNK T細胞の活性化は、マウス樹状細胞によるマウスNK T細胞の活性化と相関しており、定量性があることが明らかとなった。この方法を用いれば、NK T細胞免疫療法に使用しようとしている樹状細胞が、NK T細胞を活性化し得る樹状細胞か否かを判定して、ヒトへの投与前に選別することが可能になる。以上の結果に基づき、本発明者らは、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下に関する。

(1) 以下の工程を含む、ヒト樹状細胞の抗原提示能の評価方法： 20

(a)  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスしたヒト樹状細胞を、非ヒト哺乳動物に投与する工程；

(b) 該非ヒト哺乳動物からNK T細胞含有試料を採取する工程；

(c) 該試料中に存在するNK T細胞の活性化を検出する工程。

(2) 非ヒト哺乳動物がマウスである、上記(1)に記載の方法。

(3) NK T細胞含有試料が、脾臓、肝臓または末梢血由来である、上記(1)または(2)に記載の方法。

(4) NK T細胞の活性化を、該NK T細胞が産生する1種以上のサイトカインを指標として評価することを特徴とする、上記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) サイトカインが、インターフェロン $\gamma$ および/またはインターロイキン-4を含む、上記(4)に記載の方法。 30

(6) ヒトNK T細胞免疫療法に使用するヒト樹状細胞を選別するためのものである、上記(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) ヒト樹状細胞がNK T細胞免疫療法により治療効果が得られうる疾患の患者由来である、上記(6)に記載の方法。

(8) 疾患が癌である、上記(7)に記載の方法。

(9) 上記(6)または(7)に記載の方法により、NK T細胞に対して抗原提示能を有すると判定されたヒト樹状細胞を含有してなる、ヒトNK T細胞免疫療法剤。

(10) 癌の治療用である、上記(9)記載の剤。

(11) 以下の工程を含む、ヒトNK T細胞を活性化し得るリガンドのスクリーニング方法： 40

(a) 被験物質をパルスしたヒト樹状細胞を、非ヒト哺乳動物に投与する工程；

(b) 該非ヒト哺乳動物からNK T細胞含有試料を採取する工程；

(c) 該試料中に存在するNK T細胞の活性化を検出する工程。

(12) 被験物質の代わりに $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを用いて前記(a)～(c)の工程を実施し、該被験物質をパルスした場合と $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをパルスした場合との間で、NK T細胞の活性化の程度を比較することをさらに含む、上記(10)記載の方法。

(13) 非ヒト哺乳動物がマウスである、上記(11)または(12)記載の方法。

【発明の効果】

50

## 【0010】

本発明の方法を用いれば、ヒトNK T細胞免疫療法に使用するヒト樹状細胞の選別が可能であり、さらには抗原提示能力の程度を評価することも可能である。また、ヒトNK T細胞免疫療法を継続中の患者の、有効性モニタリングに使用することも可能である。さらに、新規リガンドのスクリーニング方法としても有用である。また、本発明の剤は、癌を効率よく縮退させるのに有用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】 インビトロ、インビボにおけるhDC/Ga1投与によるマウスNK T細胞の活性化を示す図である。A.  $1 \times 10^5$  細胞のマウスDC (mDC) またはmDC/Ga1、あるいはヒトDC (hDC) またはhDC/Ga1を、 $1 \times 10^5$  細胞のC57BL/6マウス肝臓単核細胞と共に培養した。B.  $1 \times 10^6$  細胞のmDCまたはmDC/Ga1、およびhDCまたはhDC/Ga1をC57BL/6マウスに投与した。2日後、免疫したマウスの脾臓細胞を、IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイにより測定した。示したデータは、独立した3回の実験から得られた値の平均値である。(\*)は $p < 0.05$ であることを示す。

【図2】 hDC/Ga1投与後のマウスNK T細胞の活性化を示す図である。hDC/Ga1を段階的な量にて、C57BL/6マウスに投与した(A)。または $1 \times 10^6$ 細胞のhDC/Ga1をJ $\alpha$ 18 $^{-/-}$ マウスに投与した(B)。2日後、免疫したマウスの脾臓細胞を $\alpha$ GC存在下または非存在下において16時間培養し、次いでIFN- $\gamma$ およびIL-4 ELISPOTアッセイにより測定した。データは、同じような結果が得られた少なくとも2回の独立した実験のうち、代表的な例である。(\*)は $p < 0.05$ であることを示す。

【図3】 IFN- $\gamma$ 分泌は、NK T細胞の存在に依存的であることを示す図である。IFN- $\gamma$ スポットが、NK T細胞に依存的かどうかを調べるために、 $1 \times 10^6$ 細胞のhDC/Ga1を投与されたマウスから回収した脾臓細胞から、NK1.1 $^{+}$ 細胞、CD3 $^{+}$ 細胞、またはCD1d-ダイマー $^{+}$ 細胞を除去した。これらの細胞を記載したように培養し、ELISPOTアッセイで解析した。示したデータは、独立した3回の実験の平均値である。(\*)は $p < 0.05$ であることを示す。

【図4】 ヒトDC/Ga1は、様々な遺伝的系統のマウスのNK T細胞を活性化できることを示す図である。hDC/Ga1投与後のNK T細胞活性化について、C57BL/6、DBA/2およびBALB/cマウスについて評価した。投与2日後、脾臓細胞を回収して、CD1d-Ga1-ダイマー-PEおよびCD19-FITC (CD1d-ダイマー $^{+}$  CD19 $^{-}$ 細胞)を使用してFACSによりNK T細胞数について解析した(A)。同様に、IFN- $\gamma$ およびIL-4の分泌について、ELISPOTアッセイで解析した(B)。データは、独立した3回の実験の平均値である。

【図5】 マウスNK T細胞の活性化は、hDC上の $\alpha$ GCロード状況に依存することを示す図である。(A) hDCを $\alpha$ GCと共に様々な時間インキュベートしたときの効果を評価した。hDCを0.5時間、2時間または24時間 $\alpha$ GCと共にインキュベートした後に、C57BL/6マウスに投与した。2日後、脾臓細胞を回収してELISPOTアッセイを先に記載したように行った。(B) フレッシュなhDC/Ga1と、液体窒素で2週間凍結保存したhDC/Ga1を、C57BL/6マウスに投与した。2日後、脾臓細胞を回収してIFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイを行った。示したデータは独立した3回の実験から得られた平均値である。(\*)は $p < 0.05$ であることを示す。(\*\*)は $p < 0.01$ であることを示す。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0012】

本発明はヒト樹状細胞(以下、「hDC」ともいう)の抗原提示能の評価方法(以下、「本発明の評価方法」ともいう)を提供する。ここで「抗原提示能」とは、樹状細胞表面上のCD1d分子上にNK T細胞を活性化し得るリガンド、例えば $\alpha$ -ガラクトシルセラ

ミド（以下、「 $\alpha$ GC」ともいう）をロードする能力だけでなく、リガンドをロードしたhDCがNK T細胞を活性化する能力をも含む意味で用いられる。

【0013】

被験対象となるhDCは、 $\alpha$ GCを介してNK T細胞を活性化し得るヒト由来の樹状細胞であれば特に制限はなく、ミエロイド系の樹状細胞（DC1）、リンパ系の樹状細胞（DC2）のいずれであってもよいが、好ましくはDC1である。hDCは自体公知のいかなる方法によって調製されてもよく、ヒトの表皮、リンパ系組織のT細胞領域、末梢非リンパ系組織、輸入リンパ、真皮などから分離することもできるが、好ましくは、例えば、ヒト末梢血等から密度勾配遠心法などにより単球、骨髄球などを分離し、GM-CSFおよびIL-4存在下で約7～約10日間培養して、調製することができる。

10

【0014】

hDCをパルスするのに用いられる $\alpha$ GCには、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドまたはその塩もしくはそのエステルなどの他、CD1dに結合する $\alpha$ -C-GalCerなど全ての糖脂質誘導体、樹状細胞を活性化してNK T細胞に抗原提示され得る限り任意のその誘導体（例えば、OCHなどの脂肪鎖を短縮した合成脂質等）も包含される。これらは自体公知の方法により合成することができる。hDCがヒトへの投与を目的とするものである場合は、用いる $\alpha$ GCはGMPグレードのものであることが望ましい。

$\alpha$ GCによるhDCのパルスは周知慣用の手法により行えばよく、例えば、 $\alpha$ GCを約100～約200ng/mlの濃度で含有する培地（例えば、RPMI-1640培地等）中で、hDCを約12～約48時間培養することにより実施することができる。 $\alpha$ GCのパルスは、上記未成熟のhDCをGM-CSFおよびIL-4存在下で培養・成熟させる過程で、培地に $\alpha$ GCを添加することにより行ってもよい。

20

【0015】

$\alpha$ GCでパルスしたhDCを投与する非ヒト哺乳動物は特に制限されないが、好ましくは、マウス、ラット、イヌ、サルなどであり、より好ましくはマウスである。マウスの場合、系統に特に制限はないが、例えば、C57BL/6、DBA/2、BALB/cマウスなどが好ましく挙げられる。性別や齢にも特に制限はないが、例えばマウスの場合、約6～約8週齢のものをを用いることが望ましい。非ヒト哺乳動物の飼育環境にも特に制限はないが、SPFグレード以上のものをを用いることが望ましい。

30

【0016】

hDCは $\alpha$ GCでパルスした直後にレシピエントである非ヒト哺乳動物に投与してもよいし、通常樹状細胞の凍結保存に用いられる方法（例えば、液体窒素中での保存）により凍結保存し、用時融解して用いてもよい。

【0017】

hDCの投与経路および投与量は、レシピエントである非ヒト哺乳動物のNK T細胞が活性化され得る限り特に限定されないが、例えば、マウスの場合、静脈内投与、腹腔内投与等により、約 $10^6$ ～約 $2 \times 10^6$ 細胞を投与することが好ましい。

【0018】

hDCの投与後、非ヒト哺乳動物を通常の飼育条件下で、NK T細胞が活性化されるのに十分な時間飼育した後、該動物からNK T細胞含有試料を採取する。NK T細胞含有試料は特に制限されるものではないが、例えば、脾臓、肝臓、末梢血由来のものであり、好ましくは脾臓もしくは肝臓由来のものである。例えば、マウス脾臓由来の試料を用いる場合であれば、hDCの投与から約2～約4日後にマウスから脾臓を切除し、遊離させたものを、後のNK T細胞の活性化を検出する工程に使用することができる。あるいは、 $\alpha$ GCなどの特異的リガンドを用いてNK T細胞を予めソーティングしておいてもよい。

40

【0019】

NK T細胞の活性化の有無およびその程度は、自体公知のいかなる方法によっても測定することができるが、例えば、活性化したNK T細胞が産生するサイトカインの量を指標として、NK T細胞の活性化を評価することができる。活性化したNK T細胞が産生するサイトカインとしては、IFN- $\gamma$ 、IL-4、GM-CSF、IL-10等が挙げられ

50

る。好ましくはIFN- $\gamma$ 、IL-4である。測定するサイトカインは1種のみであってもよいし、2種以上であってもよいが、少なくとも1種はIFN- $\gamma$ もしくはIL-4であることが望ましい。

#### 【0020】

NKT細胞におけるサイトカインの産生は、例えば、該サイトカインに対する抗体を用いて測定することができる。例えば、細胞培養上清を用いてRIA法、FIA法、EIA法などの慣用のイムノアッセイによりNKT細胞の活性化を評価することもできるが、好ましい一実施態様においては、抗サイトカイン抗体を固定化した固相にNKT細胞含有試料を接触させ、固液分離後に固相に結合したサイトカインを、標識した抗サイトカイン抗体を用いてサンドイッチ法により検出・計数する方法が用いられる。標識剤としては酵素、蛍光物質、発光物質、色素、放射性同位元素などが挙げられる。ビオチン化した抗サイトカイン抗体と標識剤を結合した(ストレプト)アビジンとを用いてもよい。標識剤としてアルカリフォスファターゼ等の酵素を用いたアッセイ系は、ELISPOTの名で、サイトカイン産生細胞の検出用として知られている。

10

#### 【0021】

NKT細胞含有試料を抗サイトカイン抗体と接触させる前に、あるいは接触させている間に、NKT細胞を $\alpha$ GCで再刺激する。対照として、 $\alpha$ GCで再刺激しなかったNKT細胞についてもサイトカイン産生を測定することが望ましいが、 $\alpha$ GCで再刺激しない場合の産生が検出限界以下であることが既知のサイトカインを指標として用いる場合には、省略することも可能である。

20

#### 【0022】

例えば、上記ELISPOTアッセイにおいて、 $\alpha$ GCで再刺激した場合のサイトカイン産生細胞を示すスポット数が、再刺激しなかった場合と比較して有意に増加した場合、被験対象であるhDCはNKT細胞に対して抗原提示能を有すると判定することができる。

本発明の評価方法によれば、hDCの投与量依存的にNKT細胞が活性化されるので、hDCの定性的評価のみならず定量的な評価も可能である。さらに、hDCによる非ヒト哺乳動物NKT細胞の活性化は、レシピエント由来のDCによるNKT細胞の活性化とも定量性よく相関するので、レシピエントの個体差による評価のばらつきを補正することも可能である。

30

#### 【0023】

本発明の評価方法は、ヒトに実際に投与することなくhDCの抗原提示能の有無およびその程度を判別することができるので、NKT細胞免疫療法に使用するhDCを選別するために使用できる。例えば、hDCに対して一定条件で $\alpha$ GCをパルスしても、 $\alpha$ GCのロード率が悪いhDCや、あるいは $\alpha$ GCのロード率は良くてもNKT細胞を活性化できないhDCが存在する可能性があることから、パルスされた全てのhDCが、NKT細胞に対して効率よく抗原提示できるわけではない。したがって、NKT細胞免疫療法を実施する前に、有効なhDCを事前に選別することが好ましい。特に自家移植を行う場合には、患者由来のDCがNKT細胞を活性化するのに十分な抗原提示能を有するか否かを事前に判別できれば、治療戦略の決定上極めて有意義である。即ち、NKT細胞免疫療法の適応対象である患者の末梢血等から上記と同様の手法により単離したDCについて、本発明の評価方法を実施した結果、該患者のDCがNKT細胞に対して十分な抗原提示能を有すると判定された場合には、自家移植によるNKT細胞免疫療法を選択することができる、もしくは選択することが好ましいと判定することができる、該DCがNKT細胞に対して十分な抗原提示能を有しないと判定された場合には、同種異系移植もしくはNKT細胞免疫療法以外の治療法を選択すべきである、もしくは選択することが好ましいと判定することができる。

40

#### 【0024】

また、上述の通り、本発明の評価方法は定量的であることから、hDCのNKT細胞活性化能の程度を評価するために使用できる。例えば、同種異系移植を選択する場合、本発

50

明の評価方法を用いてよりNK T細胞の活性化能力の高いh DCを選別することができる。また、個々のh DC能力値に基づいて、投与するh DC数を決定することが可能である。さらに、長期凍結保存したh DCを用時融解して用いる場合、投与前にh DCの品質管理を行う目的で、NK T細胞の活性化能力が維持されていることを確認するのに用いることができる。

#### 【0025】

また、本発明の評価方法は、NK T細胞免疫療法を継続中の患者について、治療の有効性モニタリングを行うために使用できる。例えば、免疫療法開始前と開始後に得た患者由来のh DCについて、それぞれNK T細胞活性化能を評価して比較することにより、該患者に対するNK T細胞免疫療法が有効であるか否かについて、検討することが可能である。この場合、h DCの評価は、患者から単離した際にその都度行ってもよいし、治療開始前に単離したh DCを凍結保存しておき、治療開始後に単離したh DCと同時に抗原提示能の評価を実施してもよい。

10

#### 【0026】

NK T細胞免疫療法の適応対象となる疾患としては、例えば、癌、糖尿病（I型糖尿病）、アレルギー疾患、関節リウマチ、膠原病などの自己免疫疾患、気管支喘息などが挙げられるが、h DCによるNK T細胞の活性化により症状が緩和され得る疾患であれば、これらに限定されない。癌としては、あらゆる種類の原発性癌が挙げられ、また、初期癌および転移・浸潤能を有する進行癌を含むあらゆる状態の癌が挙げられる。

20

#### 【0027】

本発明はまた、本発明の評価方法により抗原提示能を有すると判定されたh DCを有効成分として含有してなる、ヒトNK T細胞免疫療法剤を提供する。ここで「ヒトNK T細胞免疫療法剤」とは、その薬剤を投与した結果、投与対象であるヒト体内のNK T細胞が活性化され得る医薬を意味する。本発明のヒトNK T細胞免疫療法剤（以下、「本発明の剤」ともいう）は、例えば、ヒトにおける上記した各種疾患の予防・治療に有用である。

#### 【0028】

本発明の剤は、常套手段にしたがって、 $\alpha$  GCでパルスした有効量の上記h DCを医薬として許容される担体と混合するなどして、経口/非経口製剤として製造することができる。h DCは、本発明の評価方法により抗原提示能を有すると判定されたh DCの由来するヒトから、あらためて単離し、上記と同様にして培養し、 $\alpha$  GCでパルスしたものであってもよいし、 $\alpha$  GCでパルスしたh DCの一部を上記評価方法に用い、残りを凍結保存しておいて、用時融解して用いてもよい。

30

#### 【0029】

本発明の剤は、通常は、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造される。当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などの注射用の水性液を挙げることができる。本発明の剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤、酸化防止剤などと配合しても良い。

40

#### 【0030】

本発明の剤を水性懸濁液剤として製剤化する場合、上記水性液に約 $5 \times 10^6$  ~ 約 $1 \times 10^7$  細胞/mlとなるように、 $\alpha$  GCでパルスしたh DCを懸濁させればよい。

#### 【0031】

このようにして得られる製剤は、安定で低毒性であるので、ヒトに対して安全に投与することができる。投与対象はh DCの由来する患者本人であること（即ち、自家移植）が好ましいが、投与されるh DCに対して適合性があることが予測されるヒトであれば、これに限定されない。投与方法は特に限定されず、経口又は非経口的に投与することができるが、好ましくは注射もしくは点滴投与であり、静脈内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、患部直接投与などが挙げられる。本発明の剤の投与量は、投与対象

50

、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、通常、成人の患者（体重60kgとして）においては、例えば、非経口投与の場合、1回につきhDC量として約 $6 \times 10^5$ ～約 $1 \times 10^7$ 細胞を、約1～約2週間隔で、約4～約8回投与するのが好都合である。

#### 【0032】

本発明はまたヒトNK T細胞を活性化し得る、または $\alpha$ GCによる活性化を調節（阻害および増強）し得る物質のスクリーニング方法を提供する。該方法は以下の工程を含む。

- (a) 被験物質をパルスしたhDCを、非ヒト哺乳動物に投与する工程；
- (b) 該非ヒト哺乳動物からNK T細胞含有試料を採取する工程；
- (c) 該試料中に存在するNK T細胞の活性化を検出する工程。

10

#### 【0033】

本発明のスクリーニング方法の工程（a）において、スクリーニングに用いられる被験物質は、任意の公知化合物および新規化合物、またはそれらの化合物ライブラリーであり得る。化合物としては、例えば、タンパク質（オリゴペプチド、ポリペプチドなど）、糖鎖（細菌多糖体など）、糖脂質（血液型物質など）、糖タンパク質、脂質、核酸（DNA、RNAなど）、単純化学物質（低分子化学物質など）などが挙げられる。スクリーニングに用いられる被験物質は、単独または複数個（2個～1000個など）の組み合わせにて、同時にパルスされ得る。例えば、化合物ライブラリーのスクリーニング工程においては、組み合わせる候補被験物質の数を絞り込んでいくことにより、最終的な候補被験物質が同定され得る。 $\alpha$ GCによる活性化を調節し得る物質をスクリーニングする場合には、被験物質とともに $\alpha$ GCをhDCにパルスする。

20

#### 【0034】

工程（a）で用いるhDCは、 $\alpha$ GCでパルスした場合にNK T細胞を活性化し得ることが予め確認されているものであることが望ましい。しかし、その場合でも、被験物質と $\alpha$ GCとのリガンドとしての性能、即ち、NK T細胞の活性化能力を正しく比較するために、また、該hDCの抗原提示能が維持されていることを確認する意味でも、被験物質の代わりに $\alpha$ GCを用いて、同様に工程（a）～（c）を行うことが好ましい。

#### 【0035】

本発明のスクリーニング方法において、工程（a）～（c）は上記した本発明の評価方法と同様の方法により行うことができる。尚、工程（c）において、NK T細胞含有試料中に存在するNK T細胞の活性化を、抗サイトカイン抗体を用い活性化NK T細胞が産生するサイトカインを指標として行う場合、抗サイトカイン抗体と接触させる前に、あるいは接触させている間に、パルスした単独または複数個の被験物質でNK T細胞を再刺激する。対照として、被験物質で再刺激しなかったNK T細胞についてもサイトカイン産生を測定することが望ましい。

30

#### 【0036】

例えば、上記したELISPOTアッセイにおいて、被験物質で再刺激した場合のサイトカイン産生細胞を示すスポット数が、再刺激しなかった場合と比較して有意に増加した場合、該被験物質はNK T細胞を活性化するリガンドとして作用し得ると判定することができる。また、陽性対照である $\alpha$ GCでパルスした場合と比較することにより、該被験物質のNK T細胞活性化能力の程度を定量的に評価することもできる。

40

一方、 $\alpha$ GCおよび被験物質でパルスした場合に、 $\alpha$ GCのみでパルスした場合に比べて有意に変化した場合、該被験物質は $\alpha$ GCによるNK T細胞の活性化を調節し得ると判定することができる。該被験物質が $\alpha$ GCと競合的にCD1d上にロードされるのか、あるいは、 $\alpha$ GCのロード率やロードされた $\alpha$ GCのNK T細胞活性化能力を変化させるのかは、被験物質のみでhDCをパルスした場合に、該hDCがNK T細胞を活性化し得るかどうかによって判別することができる。

#### 【0037】

上記のスクリーニング方法により得られた、NK T細胞を活性化し得るリガンド化合物もしくは $\alpha$ GCによる該細胞の活性化能力を増強し得る化合物は、 $\alpha$ GCの代わりに、あ

50

るいはそれとともに、本発明の評価方法に用いることができる。また、該化合物で、あるいは該化合物および $\alpha$ GCでパルスしたhDCを、上記ヒトNK T細胞免疫療法剤に有効成分として配合することができる。

#### 【実施例】

##### 【0038】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは単なる例示であって本発明の範囲を何ら限定するものではない。

##### 【0039】

(試料の回収および調製)

健康な血液供与者から得た静脈血から、末梢血単核球細胞(PBMC)を、Ficoll 10  
1-Hypaque (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) 密度勾配遠心により分離した。PBSでPBMCを3回洗浄し、使用するまで液体窒素タンク中に保管した。書面によるインフォームド Consent は、ヘルシンキ宣言にしたがって患者から得た。全ての研究は理化学研究所治験審査委員会により承認を得た。

##### 【0040】

(マウス)

6~8週齢の、無菌C57BL/6、DBA/2およびBALB/cメスマウスを日本クレア(東京)から購入した。これらのマウスおよびJ $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>マウスは、SPF条  
20 件下で飼育、維持し、研究所の指針にしたがって、研究を行った。

##### 【0041】

(試薬)

$\alpha$ GCは、理化学研究所にて合成した。 $\alpha$ GCおよびビヒクル(0.4% DMSO)は、PBSに希釈した。ヒトリコンビナント(r)GM-CSFおよびIL-4は、R&D systems (Minneapolis, MN)から購入した。抗マウス-CD19モノクローナル抗体(1D3)、抗-TCR $\beta$ モノクローナル抗体(H57-597)およびマウスIgG1(A85-1)は、BD Pharmingen (San Diego, CA)から購入した。NK T細胞のフローサイトメトリーには、リコンビナントの可溶性二量体の、マウスCD1d:Ig(BD Pharmingen)-PEおよびFITC標識した抗マウスCD19抗体を使用した。解析には、FACS Calibur 30<sup>TM</sup>装置およびCELLQuest<sup>TM</sup>(BD Biosciences)を使用した。

##### 【0042】

(ヒトおよびマウスDCの生成)

磁気ビーズ(Miltenyi Biotec Inc. Auburn, CA)を使用して、PBMCから、CD14<sup>+</sup>単球を精製し、500U/mlヒトIL-4および100ng/mlヒトGM-CSF存在下にて、7日間培養した。 $\alpha$ GC(100ng/ml)または等量のビヒクルを6日目にhDCに添加して、さらに24時間培養した。マウス骨髄由来のDCは、既に報告されたように、5%FCSおよびマウスGM-CSFを含むRPMI-1640中で骨髄前駆体から増殖した(J. Exp. Med. 176, 1693-1702, 1992)。6日目に、 $\alpha$ GC(100ng/ml)を未成熟DCに添加し、多くの実験では、さらに2日間培養した。 $\alpha$ GCをパルスしたDC(DC/Gal)は、8日目に回収した。 40

##### 【0043】

(免疫したマウスの脾臓におけるNK T細胞のサイトカイン産生量を定量するための単細胞ELISPOTアッセイ)

96穴タイタープレート(Millipore, Bedford, MA)を抗マウスIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体または抗マウスIL-4モノクローナル抗体(どちらも10 $\mu$ g/ml、BD Pharmingen)で被覆した。ヒトDC/Galで免疫した2日後、脾臓細胞(3 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/穴)を、ビヒクルまたは $\alpha$ GC(100ng/ml)のいずれかと共に16時間培養した。培養後、プレートを洗浄し、ビオチン化した抗マウ 50

スIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体または抗マウスIL-4モノクローナル抗体（どちらも $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、BD Pharmingen）と共にインキュベートした。IFN- $\gamma$ またはIL-4スポット形成細胞数（SFC）は、顕微鏡で定量した。

【0044】

（統計解析）

マンホイットニーのU検定を使用してデータの相違を解析した。P<0.05は、統計的有意であると考えられる。

【0045】

実施例1 インビトロおよびインビボでのhDCによるNK T細胞活性化

C57BL/6由来の肝臓単核細胞を刺激するために、 $\alpha\text{GC}$ をロードしたヒトまたはマウスDCを使用した（図1）。インビトロでは、マウスDCは、 $\alpha\text{GC}$ 依存的にNK T細胞を刺激して、IFN- $\gamma$ が産生された一方、ヒトDCはNK T細胞を効率的に刺激しなかった（図1A）。次に、 $\alpha\text{GC}$ でパルスしたマウスDC（mDC/Ga1）またはヒトDC（hDC/Ga1）を投与した2日後に、免疫したマウスにおけるNK T細胞反応を試験した（図1B）。その結果、hDC/Ga1を投与したマウスから、100個以上の $\alpha\text{GC}$ 特異的なIFN- $\gamma$ スポットが検出された。この結果から、この手法がNK T細胞刺激に対するDC機能を評価するのに有用であることが示された。ヒトDCをマウスに投与した場合、非特異的な応答が生じてしまうと考えられたが、図1のように評価に使えるようになるとは、予想していない結果であった。

【0046】

実施例2 hDC/Ga1投与によるマウスNK T細胞活性化の用量依存性

$\alpha\text{GC}$ をパルスしたhDCを段階的な量にてC57BL/6マウスに投与した2日後に、NK T細胞によるIFN- $\gamma$ およびIL-4産生について調べた（図2A）。パルスしていないhDCをマウスに投与しても、IFN- $\gamma$ スポットは検出されなかった。hDC/Ga1を投与したマウスでは、IFN- $\gamma$ 産生スポット数は投与したhDC/Ga1の数に相関して増加し、 $1\times 10^6$ 細胞が適量であると決定した。NK T細胞欠損マウスであるJ $\alpha 18^{-/-}$ マウスに、 $1\times 10^6$ 個のhDC/Ga1を投与しても、IFN- $\gamma$ またはIL-4産生スポットはいずれも観察されなかった（図2B）。このことから観察されるサイトカイン産生は、リガンドとNK T細胞の相互作用に依存していることが示された。

【0047】

実施例3 インビトロ機能アッセイにおけるNK T細胞依存性の確認

ELISPOTアッセイでみられたIFN- $\gamma$ スポットが、NK T細胞およびリガンドの存在に依存的か否かを検討した（図3）。ELISPOTアッセイを行う前に、 $1\times 10^6$ 個のhDC/Ga1を投与したマウスの脾臓細胞由来のNK1.1<sup>+</sup>細胞、CD3<sup>+</sup>細胞、またはCD1d-ダイマー<sup>+</sup>細胞を除去すると、ほとんどのスポットが消失することを見出した。このことから、IFN- $\gamma$ 産生細胞は、少なくともNK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD1d-ダイマー<sup>+</sup>細胞に依存していることが示された。

【0048】

実施例4 hDC/Ga1によるNK T細胞活性化のマウス系統非依存性の確認

NK T細胞の活性化がマウスの系統依存的かどうかを調べるために、様々な系統のマウスにおいて、hDC/Ga1に対するNK T細胞の反応について試験した。hDC/Ga1を投与した2日後に、C57BL/6、DBA/2およびBALB/cマウス由来の脾臓細胞を回収して、FACS解析を行った。全てのマウス系統において、NK T細胞数が2倍以上増加していることが明らかとなった（図4A）。試験した系統のマウス全てにおいて、IFN- $\gamma$ およびIL-4を産生する細胞が同様に増加していることも見出した（図4B）。これらの結果から、マウスの特異的な遺伝的バックグラウンド、すなわちC57BL/6に限定して実験が成功したのではなく、野生型マウスの多くの系統が、この方法を用いてhDCの有効性について評価する際に使用できることが示された。

【0049】

実施例5

(a) αGCパルスの条件検討

hDCをαGCと共に0.5時間、2時間または24時間培養した後に、hDCがインビボにおいてマウスNK T細胞を活性化する能力について試験した。αGCを0.5時間パルスしたhDCを投与したマウスにおけるIFN-γ産生NK T細胞は、ほとんどゼロに等しいが、αGCを2時間パルスしたhDCは、αGCを24時間パルスしたhDCを投与したマウスのおよそ半分の活性が見られた(図5A)。

【0050】

(b) hDC/Ga1の安定性試験

さらに、安定性試験として、液体窒素中に2週間保存したhDC/Ga1と比較して、フレッシュなhDC/Ga1培養物を投与したマウスにおけるNK T細胞活性化に相違があるかどうかについて調べた。図5Bに示した結果から、フレッシュでも、予め凍結したhDCでもどちらも同程度のNK T細胞反応を示すことが明らかとなった。このことは、αGCを一度ロードしたhDCは非常に安定であり、凍結保存により長期使用が可能であることを示している。

10

【産業上の利用可能性】

【0051】

本発明の方法を用いれば、ヒトNK T細胞免疫療法に使用するヒト樹状細胞の選別が可能であり、さらには抗原提示能力の程度を評価することも可能である。また、ヒトNK T細胞免疫療法を継続中の患者の、有効性モニタリングに使用することも可能である。さらに、新規リガンドのスクリーニング方法としても有用である。また、本発明の剤は、癌を効率よく縮退させるのに有用である。

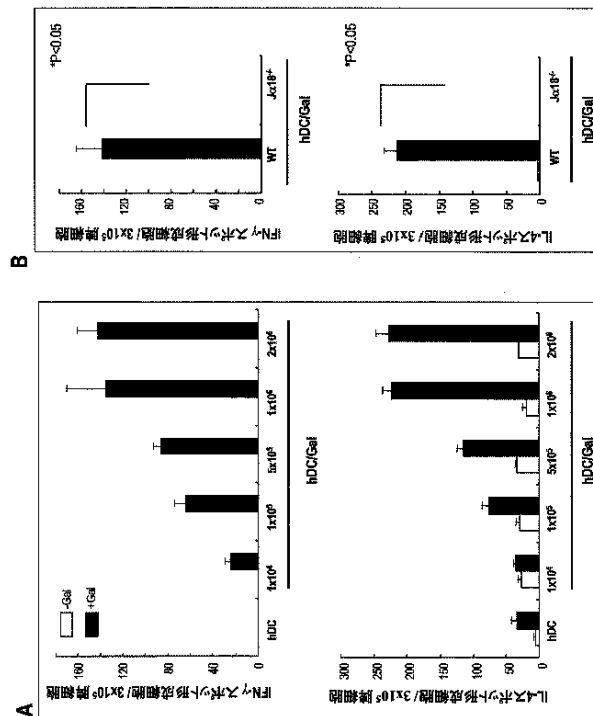
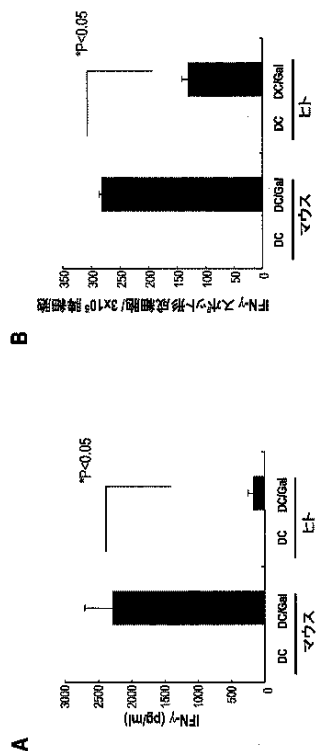
20

【0052】

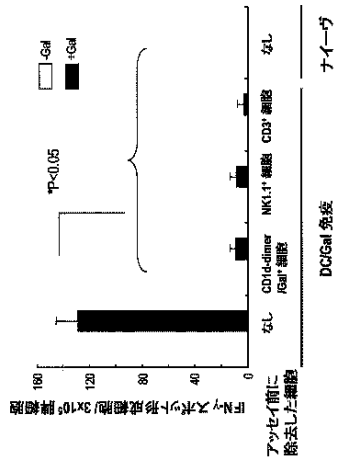
本発明は、2007年9月10日出願の日本国特許出願、特願2007-234734を基礎としており、その内容は全て本明細書に包含される。

【図1】

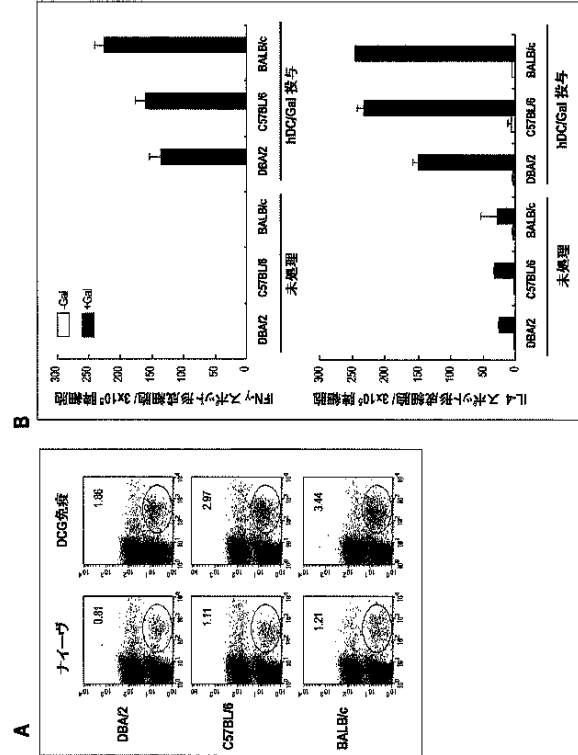
【図2】



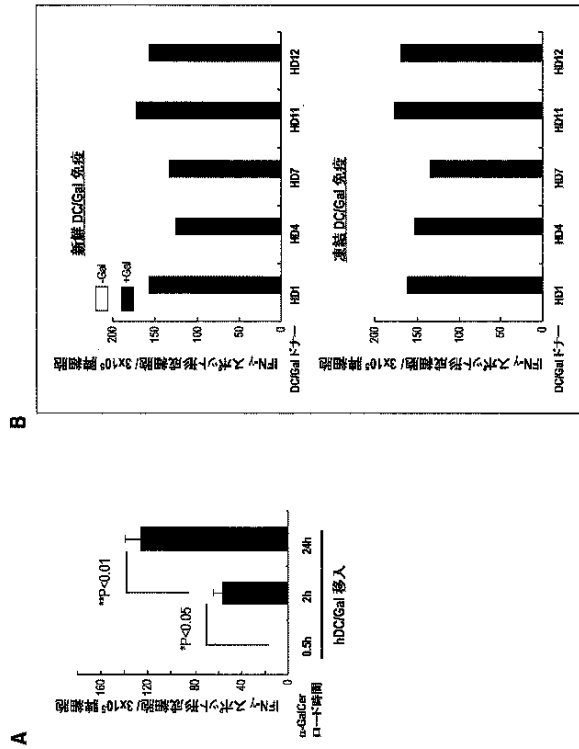
【図 3】



【図 4】



【図 5】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/066210
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/50(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/50, A61K35/12, A61P35/00, A61P37/02, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), ESBIOBASE (STN), MEDLINE (STN), LIFESCI (STN), SCISEARCH (STN), WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII),		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2007/043630 A1 (Riken, Japan), 19 April, 2007 (19.04.07), (Family: none)	9, 10/1-8, 11-13
A	WO 2007/097370 A1 (Riken, Japan), 30 August, 2007 (30.08.07), (Family: none)	1-13
X/A	MIE NIEDA, et al., Therapeutic activation of Vα24 <sup>+</sup> Vβ11 <sup>+</sup> NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity, Blood, 2004, Vol. 103, No.2, p.383-389	9, 10/1-8, 11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 September, 2008 (30.09.08)		Date of mailing of the international search report 07 October, 2008 (07.10.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2008/066210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	KEN-ICHIRO SEINO, et al., Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications., Cancer Sci., 2006, Vol.97, No.9, p.807-812	9,10/1-8, 11-13
A	WO 2006/135032 A1 (Riken, Japan), 21 December, 2006 (21.12.06), (Family: none)	1-13
X/A	KANAKO SHIMIZU, et al., Evaluation of the function of human invariant NKT Cells from cancer patients using $\alpha$ -galactosylceramide-loaded murine dendritic cells., J.Immunol., 2006, Vol.177, No.5, p.3484-3492	9,10/1-8, 11-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2008/066210

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted during the international search  
(name of data base and, where practicable, search terms used)

JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII), GALACTOSYLCERAMIDE, NKT(W)CELL

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 6 6 2 1 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/50, A61K35/12, A61P35/00, A61P37/02, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), CAplus (STN), EMBASE (STN), EMBASE (STN), ESBIODBASE (STN), MEDLINE (STN), LIFESCI (STN), SCISEARCH (STN), WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII), GALACTOSYLCERAMIDE, NKT(W)CELL			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/A	WO 2007/043630 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2007.04.19, (ファミリーなし)	9, 10/ 1-8, 11-13	
A	WO 2007/097370 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2007.08.30, (ファミリーなし)	1-13	
X/A	MIE NIEDA, et al., Therapeutic activation of V $\alpha$ 24 <sup>+</sup> V $\beta$ 11 <sup>+</sup> NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity, Blood, 2004,	9, 10/ 1-8, 11-13	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日に後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 30.09.2008		国際調査報告の発送日 07.10.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 佳代子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 9516

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 6 6 2 1 0

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Vol.103, No.2, p.383-389 KEN-ICHIRO SEINO, et al., Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications., Cancer Sci., 2006, Vol.97, No.9, p.807-812	9,10/ 1-8,11-13
A	WO 2006/135032 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2006.12.21, (ファミリーなし)	1-13
X/A	KANAKO SHIMIZU, et al., Evaluation of the function of human invariant NKT Cells from cancer patients using $\alpha$ -galactosylceramide-loaded murine dendritic cells., J.Immunol., 2006, Vol.177, No.5, p.3484-3492	9,10/ 1-8,11-13

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 L

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR), OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 藤井 眞一郎

神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72)発明者 清水 佳奈子

神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

F ターム(参考) 2G045 AA29 BB20 CB01 CB17 CB26 DA36 FB03  
 4B063 QA01 QA05 QQ08 QR48 QR51 QR77 QR84 QS33 QX01  
 4B065 AA91X AB01 AC12 BB14 BB19 BB23 CA46  
 4C087 AA01 AA02 BB63 NA14 ZB02 ZB09 ZB26

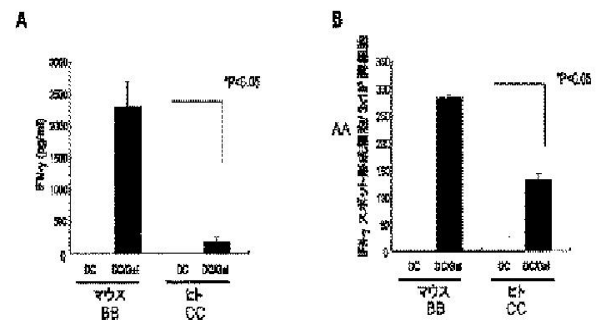
(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	评价人树突细胞和人细胞免疫治疗剂的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2009034961A1</a>	公开(公告)日	2010-12-24
申请号	JP2009532182	申请日	2008-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
[标]发明人	藤井真一郎 清水佳奈子		
发明人	藤井 真一郎 清水 佳奈子		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 A61K35/12 A61P37/02 A61P35/00 C12Q1/02 G01N33/15 C12N5/0783 A61K35/15 G01N33/48		
CPC分类号	A61K35/15 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 G01N33/5047		
FI分类号	G01N33/50.Z G01N33/53.P A61K35/12 A61P37/02 A61P35/00 C12Q1/02 G01N33/15.Z C12N5/00.202.L		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QR84 4B063/QS33 4B063/QX01 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/BB14 4B065/BB19 4B065/BB23 4B065/CA46 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/NA14 4C087/ZB02 4C087/ZB09 4C087/ZB26		
代理人(译)	高岛肇 山本健二		
优先权	2007234734 2007-09-10 JP		
其他公开文献	JP5382529B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于评估人树突细胞的抗原呈递能力的方法，其包括以下步骤。(1) 将经α-半乳糖苷神经酰胺脉冲的人树突细胞施用于非人哺乳动物的步骤 (2) 从非人类哺乳动物中收集含有NKT细胞的样品的步骤 (3) 检测样品中存在的NKT细胞活化的步骤 还提供了包含人树突状细胞的人NKT细胞免疫治疗剂，所述人树突状细胞经所述方法确定对NKT细胞具有抗原呈递能力。

図1



AA... IFN-γ SPOT FORMING CELLS/10<sup>5</sup> SPLEEN CELLS  
 BB... MOUSE  
 CC... HUMAN