

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/077811

発行日 平成26年5月22日 (2014. 5. 22)

(43) 国際公開日 **平成24年6月14日 (2012. 6. 14)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 L	4 B O 6 5
A 6 1 K 35/12 (2006. 01)	A 6 1 K 35/12 Z N A	4 C O 8 7
A 6 1 P 29/00 (2006. 01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04 (2006. 01)	A 6 1 P 31/04	
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 有 (全 92 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2012-547938 (P2012-547938)	(71) 出願人 500507630 株式会社ゴルフファーマ
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/078623	香川県高松市伏石町884番地3-302号
(22) 国際出願日 平成23年12月9日 (2011. 12. 9)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-274467 (P2010-274467)	(74) 代理人 100115255 弁理士 辻丸 光一郎
(32) 優先日 平成22年12月9日 (2010. 12. 9)	(74) 代理人 100129137 弁理士 中山 ゆみ
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100154081 弁理士 伊佐治 創
	(72) 発明者 平島 光臣 香川県高松市伏石町884番地3-302号 株式会社ゴルフファーマ内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガレクチン9を分泌する細胞、その製造方法及びその用途

(57) 【要約】

ガレクチン9に基づく生理活性を発現し得る細胞、その製造方法及び用途を提供する。
前記目的を達成するために、本発明の細胞は、ガレクチン9を含む細胞であって、前記ガレクチン9を細胞表面に発現していることを特徴とする。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
ガレクチン 9 を含む細胞であって、
前記ガレクチン 9 を細胞表面に発現していることを特徴とする細胞。
- 【請求項 2】
T細胞である請求項 1 に記載の細胞。
- 【請求項 3】
CD4陽性T細胞である請求項 2 に記載の細胞。
- 【請求項 4】
濾胞性BヘルパーT細胞 (Follicular B helper T cells:TFH) である請求項 3 に記載の細胞。 10
- 【請求項 5】
T細胞受容体 (TCR) で刺激することにより、CD25の発現量が上昇し、さらに、ガレクチン 9 及びインターロイキン 10 (IL - 10) の少なくとも一方を分泌する請求項 3 又は 4 に記載の細胞。
- 【請求項 6】
Foxp3を発現していない請求項 3 から 5 のいずれか一項に記載の細胞。
- 【請求項 7】
T細胞である請求項 2 に記載の細胞。 20
- 【請求項 8】
ナチュラルキラー細胞 (NK細胞) である請求項 1 に記載の細胞。
- 【請求項 9】
B細胞である請求項 1 に記載の細胞。
- 【請求項 10】
NKT細胞である請求項 1 に記載の細胞。
- 【請求項 11】
古典的樹状細胞 (cDC) である請求項 1 に記載の細胞。
- 【請求項 12】
形質細胞様樹状細胞 (pDC) である請求項 1 に記載の細胞。
- 【請求項 13】 30
pDC様マクロファージ (pDC-M) である請求項 1 に記載の細胞。
- 【請求項 14】
動物にガレクチン 9 を投与することにより、前記動物における少なくとも一部の細胞の細胞表面にガレクチン 9 を発現させる、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。
- 【請求項 15】
動物の細胞を、ガレクチン 9 の存在下で培養することにより、前記動物の細胞の細胞表面にガレクチン 9 を発現させる、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。
- 【請求項 16】 40
前記動物の細胞が、細胞表面にガレクチン 9 を発現している細胞を含み、
前記動物の細胞を、ガレクチン 9 の存在下で培養することにより、細胞表面にガレクチン 9 を発現している細胞の割合を増加させる、請求項 15 に記載の細胞の製造方法。
- 【請求項 17】
前記動物が、哺乳類である請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の製造方法。
- 【請求項 18】
前記哺乳類が、ヒトである請求項 17 に記載の製造方法。
- 【請求項 19】
請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを含む医薬。 50

- 【請求項 20】
ガレクチン 9 の生理活性又は生物活性の不足又は欠如に起因する疾患の治療又は症状の軽減に用いる請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 21】
ガレクチン 9 又はガレクチン 9 結合性物質を含む細胞の有無の診断に用いる診断剤である、請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 22】
免疫調節剤である、請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 23】
抗腫瘍剤である、請求項 19 に記載の医薬。 10
- 【請求項 24】
前記腫瘍が、悪性腫瘍である請求項 23 に記載の医薬。
- 【請求項 25】
前記悪性腫瘍が、上皮性悪性腫瘍である請求項 24 に記載の医薬。
- 【請求項 26】
前記悪性腫瘍が、非上皮性悪性腫瘍である請求項 24 に記載の医薬。
- 【請求項 27】
前記非上皮性悪性腫瘍が、腫瘍形成性の非上皮性悪性腫瘍及び腫瘍非形成性の非上皮性悪性腫瘍の少なくとも一方である請求項 26 に記載の医薬。
- 【請求項 28】
前記悪性腫瘍が、皮膚ガン、メラノーマ、乳ガン、卵巣ガン、子宮ガン、睾丸悪性腫瘍、前立腺ガン、膀胱ガン、腎ガン、甲状腺ガン、咽頭・喉頭ガン、舌ガン、上顎ガン、食道ガン、胃ガン、結腸・直腸ガン、肺・気管支ガン、肝ガン、肝細胞癌、肝内胆管ガン、肝外胆管・胆嚢ガン、膵臓ガン、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、悪性血管腫、悪性血管内皮腫、脳腫瘍、メニンギオーマ、グリオーマ、及びアストロサイトーマからなる群から選択される少なくとも一つである請求項 24 に記載の医薬。 20
- 【請求項 29】
抗アレルギー剤である。請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 30】
自己免疫疾患用剤である。請求項 19 に記載の医薬。 30
- 【請求項 31】
抗炎症剤である、請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 32】
副腎皮質ステロイドホルモン代替用剤である、請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 33】
細胞、組織、又は器官の移植に伴う拒絶反応の抑制剤である、請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 34】
敗血症の治療又は症状の軽減に用いる、請求項 19 に記載の医薬。 40
- 【請求項 35】
感染症の治療又は症状の軽減に用いる、請求項 19 に記載の医薬。
- 【請求項 36】
請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを用いて、被検細胞におけるガレクチン 9 又はガレクチン 9 結合性物質の有無を診断する方法。
- 【請求項 37】
請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを動物に投与する工程を含む、前記動物の疾患の治療又は前記疾患に由来する症状の軽減方法。 50

- 【請求項 38】
前記動物が、哺乳類である請求項 37 に記載の方法。
- 【請求項 39】
前記哺乳類が、ヒトである請求項 38 に記載の方法。
- 【請求項 40】
前記疾患が、ガレクチン 9 の生理活性又は生物活性の不足又は欠如に起因する疾患である請求項 37 から 39 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 41】
前記疾患が、免疫の異常に起因する疾患である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。 10
- 【請求項 42】
前記疾患が、自己免疫性疾患である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 43】
前記疾患が、腫瘍である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 44】
前記腫瘍が、悪性腫瘍である請求項 43 に記載の方法。
- 【請求項 45】
前記悪性腫瘍が、上皮性悪性腫瘍である請求項 44 に記載の方法。
- 【請求項 46】
前記悪性腫瘍が、非上皮性悪性腫瘍である請求項 44 に記載の方法。 20
- 【請求項 47】
前記非上皮性悪性腫瘍が、腫瘍形成性の非上皮性悪性腫瘍及び腫瘍非形成性の非上皮性悪性腫瘍の少なくとも一方である請求項 46 に記載の方法。
- 【請求項 48】
前記悪性腫瘍が、皮膚ガン、メラノーマ、乳ガン、卵巣ガン、子宮ガン、睾丸悪性腫瘍、前立腺ガン、膀胱ガン、腎ガン、甲状腺ガン、咽頭・喉頭ガン、舌ガン、上顎ガン、食道ガン、胃ガン、結腸・直腸ガン、肺・気管支ガン、肝ガン、肝細胞癌、肝内胆管ガン、肝外胆管・胆嚢ガン、膵臓ガン、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、悪性血管腫、悪性血管内皮腫、脳腫瘍、メニンギオーマ、グリオーマ、及びアストロサイトーマからなる群から選択される少なくとも一つである請求項 44 に記載の方法。 30
- 【請求項 49】
前記疾患が、アレルギー性疾患である。請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 50】
前記疾患が、細胞、組織、又は器官の移植に伴う拒絶反応である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 51】
前記疾患が、敗血症である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。 40
- 【請求項 52】
前記疾患が、感染症である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 53】
前記疾患に由来する症状が、炎症である、請求項 37 から 52 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 54】
請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞を動物に投与して、前記動物の免疫を制御する免疫制御方法。
- 【請求項 55】
請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞の細胞表面に発現されたガレクチン 9 を 50

マーカーとして検出することにより、前記細胞を検出する方法。

【請求項 5 6】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞が、IL-10産生タイプ1制御性T細胞 (Tr1細胞) である請求項 5 5 に記載の細胞検出方法。

【請求項 5 7】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞が、制御性免疫細胞である請求項 5 5 に記載の細胞検出方法。

【請求項 5 8】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を含むか又は含まない動物組織において、請求項 5 5 から 5 7 のいずれか一項に記載の細胞検出方法により、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を定性的又は定量的に検出する工程を含む、前記動物の疾患又は前記疾患に由来する症状の診断方法。

10

【請求項 5 9】

動物の疾患の治療効果の判定方法であって、
前記動物に対し、前記疾患の治療を行う工程と、
前記治療の前後において、それぞれ、請求項 5 8 に記載の診断方法により、前記疾患又は前記疾患に由来する症状を診断する工程と、
前記治療の前後における前記診断結果を対比する工程とを含むことを特徴とする、前記動物の疾患の治療効果の判定方法。

【請求項 6 0】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を含む動物組織において、請求項 5 5 から 5 7 のいずれか一項に記載の細胞検出方法により、前記細胞を検出し、検出された前記細胞を、前記動物組織中の他の細胞から分離する、細胞の分離方法。

20

【請求項 6 1】

請求項 6 0 に記載の細胞の分離方法により請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を前記動物組織から分離する工程を含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。

【請求項 6 2】

請求項 6 0 に記載の細胞の分離方法により請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を前記動物組織から分離する工程をさらに含む、請求項 1 4 から 1 6 のいずれか一項に記載の製造方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ガレクチン 9 を分泌する細胞、その製造方法及びその用途に関する。例えば、本発明は、Gal-9 を分泌する CD4⁺ T 細胞及びその応用技術に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ガレクチン 9 (galectin 9; Gal-9) は、ガレクチンファミリーに属し、N-またはO-glycan のガラクトシドに結合して生理活性を発揮する (非特許文献 1)。ガレクチン 9 は T 細胞アポトーシス誘導因子 (非特許文献 2) 及び好酸球遊走因子 (非特許文献 3) として発見同定されたが、それ以降、現在までに多岐に渡る活性が報告されている。T 細胞に関しては、ガレクチン 9 は Tim-3 に結合して Tim-3 陽性 T_H1 細胞のアポトーシスを誘導し、過剰な T_H1 反応を収束させることで自己免疫性の炎症を抑制する (非特許文献 4)。T_H17 細胞は自己免疫疾患、アレルギーや癌等、様々な難治性疾患の原因または増悪因子の一つと考えられている細胞で、この細胞にも Tim-3 が発現している (非特許文献 5 ~ 6)。ガレクチン 9 投与は T_H17 細胞を減少させ、一方で炎症抑制性の Treg 細胞を増加させる (非特許文献 7)。現在のところ、この T_H17 細胞減少への Tim-3 の関与、およびメカニズムは不明である。

40

【0 0 0 3】

ガレクチン 9 の T 細胞以外への作用には前述の好酸球遊走活性以外にも CD11bLy-6C 単球

50

タイプ骨髄由来抑制細胞の誘導(非特許文献8)、CD11bLy-6G好中球タイプ骨髄由来抑制細胞の誘導(非特許文献9~10)や形質細胞様樹状細胞の誘導(非特許文献11)、肥満細胞からの脱顆粒抑制(非特許文献12)等が知られている。これまでの報告はガレクチン9の過剰免疫抑制作用に着目したものが多く、ガレクチン9は場面によっては免疫を高進する。ガレクチン9は単球や樹状細胞上のTim-3に結合してこれらの細胞を活性化し、炎症性サイトカイン産生を促進する(非特許文献13)。またマクロファージでガレクチン9とTim-3が相互作用すると結核菌を排除する免疫が高進する(非特許文献14)。つまりガレクチン9は免疫を両方向性に調整することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第2005/093064号パンフレット(WO 2005/093064)

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hirabayashi, J. et al. Oligosaccharide specificity of galactins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*, 1572, 232-254 (2002)

【非特許文献2】Wada, J., Ota, K., Kumar, A., Wallner, E.I. & Kanwar, Y.S. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a α -galactoside binding lectin. *J Clin Invest*, 99, 2452-2461 (1997)

【非特許文献3】Matsumoto, R. et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem*, 273, 16976-16984 (1998)

【非特許文献4】Zhu, C. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, 6, 1245-1252 (2005)

【非特許文献5】Chen, Y. et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 116, 1317-1326 (2006)

【非特許文献6】Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H. & Galli, S.J. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol*, 81, 1258-1268 (2007)

【非特許文献7】Seki, M. et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol*, 127, 78-88 (2008)

【非特許文献8】Arikawa, T. et al. Galectin-9 expands immunosuppressive macrophages to ameliorate T-cell-mediated lung inflammation. *Eur J Immunol*, 40, 548-558 (2010)

【非特許文献9】Tsuboi, Y. et al. Galectin-9 protects mice from the Shwartzman reaction by attracting prostaglandin E2-producing polymorphonuclear leukocytes. *Clin Immunol*, 124, 221-233 (2007)

【非特許文献10】Dardalhon, V. et al. Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *J Immunol*, 185, 1383-1392 (2010)

【非特許文献11】Nobumoto, A. et al. Galectin-9 expands unique macrophages exhibiting plasmacytoid dendritic cell-like phenotypes that activate NK cells in tumor-bearing mice. *Clin Immunol*, 130, 322-330 (2009)

【非特許文献12】Niki, T, et al. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem*, 284, 32344-32352 (2009)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 3】Anderson, A.C. et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*, 318, 1141-1143 (2007)
- 【非特許文献 1 4】Jayaraman, P. Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med*, 207, 2343-2354 (2010)
- 【非特許文献 1 5】Kato, S. et al. Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 176, 27-35 (2007)
- 【非特許文献 1 6】Nobumoto, A. et al. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology*, 18, 735-744 (2008) 10
- 【非特許文献 1 7】Mishra, R. et al. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 17633-17638 (2010)
- 【非特許文献 1 8】Tanikawa, R. et al. Galectin-9 induces osteoblast differentiation through the CD44/Smad signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 317-322 (2010)
- 【非特許文献 1 9】Chabot, S. et al. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology*, 12, 111-118 (2002) 20
- 【非特許文献 2 0】Fujio, K., Okamura, T. & Yamamoto, K. The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Adv Immunol*, 105, 99-130 (2010)
- 【非特許文献 2 1】Ochi, H. et al. Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells. *Nat Med*, 12, 627-635 (2006)
- 【非特許文献 2 2】Okamura, T. et al. CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13974-13979 (2009)
- 【非特許文献 2 3】Wakkach, A. et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*, 18, 605-617 (2003) 30
- 【非特許文献 2 4】Jangpatarapongsa, K. et al. Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 38, 2697-2705 (2008)
- 【非特許文献 2 5】Kavousanaki, M., Makrigiannakis, A., Boumpas, D. & Verginis, P. Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum*, 62, 53-63 (2010)
- 【非特許文献 2 6】Awasthi, A. et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol*, 8, 1380-1389 (2007) 40
- 【非特許文献 2 7】Stumhofer, J.S. et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol*, 8, 1363-1371 (2007)
- 【非特許文献 2 8】Fitzgerald, D.C. et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol*, 8, 1372-1379 (2007)
- 【非特許文献 2 9】Barrat, F.J. et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive 50

drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med*, 195, 603-616 (2002)

【非特許文献30】Uhlig, H.H. et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol*, 177, 5852-5860 (2006)

【非特許文献31】Maynard, C.L. et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*, 8, 931-941 (2007)

【非特許文献32】Nagahara, K. et al. Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J Immunol*, 181, 7660-7669 (2008)

【非特許文献33】Nishi, N. et al. Development of highly stable galectins: truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins. *FEBS Lett*, 579, 2058-2064 (2005)

【非特許文献34】Seki, M. et al. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 56, 3968-3976 (2007)

【非特許文献35】Wilson, N.J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 8, 950-957 (2007)

【非特許文献36】Oomizu, S. et al. Oral administration of pulverized *Kojia* glucomannan prevents the increase of plasma immunoglobulin E and immunoglobulin G levels induced by the injection of syngeneic keratinocyte extracts in BALB/c mice. *Clin. Exp. Allergy*, 36, 102-110 (2006)

【非特許文献37】Lu, L.H. et al. Characterization of galectin-9-induced death of Jurkat T cells. *J Biochem*, 141, 157-172 (2007)

【非特許文献38】Park, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6, 1133-1141 (2005)

【非特許文献39】Laurence, A. et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26, 371-381 (2007)

【非特許文献40】Mills, K.H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol*, 38, 2636-2649 (2008)

【非特許文献41】Brun, V., Bastian, H., Neveu, V. & Foussat, A. Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int Immunopharmacol*, 9, 609-613 (2009)

【非特許文献42】Levings, M.K. et al. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood*, 105, 1162-1169 (2005)

【非特許文献43】Roncarolo, M.G. & Gregori, S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur J Immunol*, 38, 925-927 (2008)

【非特許文献44】Kojima, K. et al. Galectin-9 attenuates acute lung injury by expanding CD14- plasmacytoid dendritic cell-like macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*, 184, 328-339 (2011)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

前述のようなガレクチン9の活性の解明は、その殆どがリコンビナントタンパク質を投

10

20

30

40

50

与・添加することによって行われてきた。例えば、ガレクチン9投与は、マウスのコラーゲン誘導関節炎に治療効果を発揮し、Tim-3陽性T細胞の減少とTreg細胞の増加、及びIFN- γ やIL-17等の炎症性サイトカイン産生を抑制する(非特許文献7)。重要なことに、ガレクチン9ノックアウトマウスは関節リウマチ誘導刺激に高感受性で、野生型と比較してTim-3陽性CD4⁺T細胞(T_H1 及び T_H17)の増加とTreg細胞の減少が見られる(非特許文献7)。これらの性質はリコンビナントタンパク質を投与して解明されたガレクチン9の作用に矛盾しない。従ってガレクチン9は内在性の免疫制御因子として分泌され、免疫バランスを調整していることは自明である。しかし、生体内でガレクチン9を分泌し、又は免疫を調整している細胞は未だ同定されていない。

【0007】

10

Tim-3はガレクチン9のターゲットとして最も研究が進んでいるが、ガレクチン9の多彩な活性の全てをTim-3で説明することは不可能である。実際に現在までに活性化リンパ球の接着因子であるCD44、インテグリンやIgEがガレクチン9のターゲットとして同定されており、それらのターゲットを介してアレルギー性の過剰免疫抑制や癌細胞の転移抑制が起こる(非特許文献12、15~16)。今後、研究の進展によって更にターゲットが増えることは予想に難くない。このように複数のターゲットに相互作用して多彩な活性を示すのは多くのレクチンに共通した性質である。ところで以上に挙げたガレクチン9のターゲットはどれも細胞膜上に存在しており、細胞外に分泌されたガレクチン9がそれらのターゲットに結合して機能を発揮するのは言うまでも無いように思われる。

【0008】

20

ところが、ガレクチン9はシグナルペプチドを持たず、基本的に細胞質に局在しており、細胞質または核内での役割も報告されている(非特許文献17~18)。しかし、前述の細胞膜上のターゲットおよびガレクチン9の作用を考えるとガレクチン9の少なくとも一部は分泌される筈である。実際にT細胞や肥満細胞に由来する株化細胞からガレクチン9が分泌される報告があるが(非特許文献12、19)、その分泌メカニズムは全く不明であり、また株化細胞ゆえに生体内でも同系統の細胞から同様な分泌が行われる確証は無い。何よりガレクチン9を発現している細胞が必ずしもそれを分泌するとは限らないことが、ガレクチン9分泌細胞の同定を著しく困難にしている。

【0009】

30

ガレクチン9は重要な免疫制御因子であり、その分泌細胞を同定することが出来れば、免疫バランスを知る指標として有用と考えられ、例えば様々な免疫疾患の診断または治療の効果を判定するサロゲートマーカーとなり得る。更にその細胞を精製する技術と組み合わせることで細胞療法にも使用可能と考えられ、自己免疫疾患、アレルギー、癌などの難治性疾患治療への応用も想定される。

【0010】

このように、ガレクチン9は、多彩な免疫制御活性を持つが、その作用メカニズムの詳細は不明な部分が多い。また、生体内においてガレクチン9を分泌し、又は免疫反応を制御している細胞等も未同定である。ガレクチン9による免疫制御の詳細、例えば T_H17 とTreg細胞の分化制御の詳細を明らかにすること、又は、生体内でガレクチン9を分泌し、若しくは免疫反応を制御する細胞等の、ガレクチン9に基づく生理活性を発現し得る細胞の同定が望まれている。

40

【0011】

そこで、本発明は、ガレクチン9に基づく生理活性を発現し得る細胞、その製造方法及び用途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】

【0012】

前記目的を達成するために、本発明の細胞は、ガレクチン9を含む細胞であって、前記ガレクチン9を細胞表面に発現していることを特徴とする。

【0013】

本発明の細胞の第1の製造方法は、動物にガレクチン9を投与することにより、前記動

50

物における少なくとも一部の細胞の細胞表面にガレクチン9を発現させる、前記本発明の細胞の製造方法である。

【0014】

本発明の細胞の第2の製造方法は、動物の細胞を、ガレクチン9の存在下で培養することにより、前記動物の細胞の細胞表面にガレクチン9を発現させる、前記本発明の細胞の製造方法である。

【0015】

本発明の医薬は、前記本発明の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを含む医薬である。

【0016】

本発明の診断方法は、前記本発明の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを用いて、被検細胞におけるガレクチン9又はガレクチン9結合性物質の有無を診断する方法である。

【0017】

本発明による疾患の治療方法又は前記疾患に由来する症状の軽減方法は、前記本発明の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを動物に投与する工程を含む、前記動物の疾患の治療又は前記疾患に由来する症状の軽減方法である。

【0018】

本発明の免疫制御方法は、前記本発明の細胞を動物に投与して、前記動物の免疫を制御する免疫制御方法である。

【0019】

本発明の細胞検出方法は、前記本発明の細胞の細胞表面に発現されたガレクチン9をマーカーとして検出することにより、前記細胞を検出する方法である。

【0020】

本発明による、動物の疾患又は前記疾患に由来する症状の診断方法は、前記本発明の細胞を含むか又は含まない動物組織において、前記本発明の細胞検出方法により、前記本発明の細胞を定性的又は定量的に検出する工程を含む、前記動物の疾患又は前記疾患に由来する症状の診断方法である。

【0021】

本発明による動物の疾患の治療効果の判定方法は、前記動物に対し、前記疾患の治療を行う工程と、前記治療の前後において、それぞれ、本発明による前記動物の疾患又は前記疾患に由来する症状の診断方法により、前記疾患又は前記疾患に由来する症状を診断する工程と、前記治療の前後における前記診断結果を対比する工程とを含むことを特徴とする。

【0022】

本発明による細胞の分離方法は、前記本発明の細胞を含む動物組織において、前記本発明の細胞検出方法により、前記細胞を検出し、検出された前記細胞を、前記動物組織中の他の細胞から分離する、細胞の分離方法である。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、上記のとおり、ガレクチン9に基づく生理活性を発現し得る細胞、その製造方法及び用途を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】実施例における、ラットコラーゲン誘導関節炎モデルにおけるヒト安定化ガレクチン9の治療効果を示す図である。(a)のスケジュールに従ってLewis rat (、6~7週齢)を感作し、足の腫れが顕著になった初回感作より14日目より表示用量のヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールとしてPBS)を皮下投与し、足の腫れを経時的にモニターした。(b)は、3回/週投与の結果を示すグラフである。(c)は、一回の投与量を0.6mg/kgに固定し、1回/週または2回/週で投与した時の結果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

(b) 及び (c) において、横軸は、初回感作時からの経過日数を表し、縦軸は、足の容積の増加率 (%) を表す。「Vehicle」は、対照実験として溶媒のみ (ヒト安定化ガレクチン9の投与なし) で行った結果を表し、「non-arthritis」は、関節炎を発症していないラットの測定結果を表す。

【図2】実施例における、ヒト安定化ガレクチン9のラットにおける体内動態試験結果を示すグラフである。すなわち、同図は、Lewis rat (, 6~7週齢) に表示用量のヒト安定化ガレクチン9を単回皮下投与し、血漿中のヒト安定化ガレクチン9を特異的ELISAで測定した結果を表す。横軸は、経過時間を表し、縦軸は、血漿中のヒト安定化ガレクチン9濃度を表す。

【図3】実施例における、マウスMOG誘導性実験的アレルギー性脳炎 (EAE) へのガレクチン9作用を示す図である。(a) 雌性C57BL/6Jマウス(WT)と同系統のガレクチン9ノックアウトマウス(Gal-9 KO)における経時的なEAE臨床スコアのグラフである。横軸は、免疫感作後の経過時間を表し、縦軸は、臨床スコアを表す。(b) 感作後20週目のマウス(WTとGal-9 KO(Gal-9^{-/-})) 脊髄のヘマトキシリン/エオシン染色と、抗CD3抗体による免疫染色の組織顕微鏡写真である。(c) 感作後20週目のEAE感作野生型マウス(WT)、EAE感作ガレクチン9ノックアウトマウス(Gal-9 KO)および週齢をあわせた未感作マウス(Naive)より、それぞれ調製した鼠径部リンパ節の細胞を、CD4、CD25、IL-17及びFoxp3抗体で染色した結果を示す図である。図中、「Naive」は、ナイーブT細胞を表す。(d) CD4⁺ CD62L⁺ ナイーブT細胞を野生型マウス(WT)及びガレクチン9ノックアウトマウス(Gal-9 KO)の脾臓細胞より調製し、抗CD3抗体をコーティングした96-ウェルプレート中で抗CD28抗体を添加して培養(No skewed)、またはさらにヒトTGF- β 1、マウスIL-2及びマウスIL-6を添加して培養し、T_H17細胞分化を誘導した(T_H17 skewed)結果を示すグラフである。より具体的には、96時間培養後の培養上清中のIL-17A濃度をELISAで定量した結果を表す。(e) 上記(d)で培養上清を抽出後に残った細胞内のIL-10 mRNA量をリアルタイムRT-PCR法で定量した結果を示すグラフである。(f) 上記(a)の系で雌性C57BL/6JマウスにEAEを発症させ、感作後14日目と16日目にヒト安定化ガレクチン9を皮下投与 (コントロール群にPBSを投与) し、感作19日目まで臨床スコアを記録し、その後マウス脊髄をヘマトキシリン/エオシンで組織染色した結果を示す図である。グラフ中、横軸は、免疫感作後の経過時間を表し、縦軸は、臨床スコアを表す。

【図4】実施例における、ガレクチン9によるT_H17細胞分化抑制が、Tim3/Gal-9相互作用に依存するか否かを調べた結果を示すグラフである。(a) 図3(d)の方法でナイーブT細胞にT_H17細胞分化誘導刺激を96時間与え、ヒト安定化ガレクチン9 (30nM) を表示の期間添加して培養上清中のIL-17A濃度をELISAで定量した結果を表す。横軸は、ガレクチン9による処理時間を表し、縦軸は、IL-17A濃度を表す。(b) ヒト安定化ガレクチン9存在下でT_H17細胞分化誘導刺激を24時間与え、IL-17F、IL-21、IL-22及びIL23R mRNA発現をリアルタイムRT-PCR法で定量した結果を示すグラフである。(c) ナイーブT細胞をT_H17分化誘導刺激下で24時間培養した場合(T_H17 skewed)と、同分化誘導刺激よりTGF- β 1及びIL-6を除いた場合(No skewed)のフローサイトメトリーによるCD4⁺Tim-3⁺細胞の解析 (左) とTim-3中和抗体存在下でヒト安定化ガレクチン9によるT_H17分化誘導抑制アッセイを行った結果 (右) を示すグラフである。(d) ナイーブT細胞をT_H17分化誘導刺激下で96時間培養後、ヒト安定化ガレクチン9を添加してアポトーシスを起こしたTim-3陽性細胞(T_H17細胞)をフローサイトメトリーで測定した結果を示すグラフである。

【図5】実施例において、ガレクチン9によるT_H17分化誘導抑制に、N-結合型糖鎖とO-結合型糖鎖のいずれが関与するかを調べた結果を示すグラフである。(a) T_H17分化誘導アッセイをヒト安定化ガレクチン9と表示濃度のラクトース (ガレクチン阻害剤) 存在下で行った結果を示す。ラクトースのコントロールにはスクロースを用いた。横軸は、ラクトース又はスクロースの濃度を表し、縦軸は、IL-17Aの濃度を表す。(b) (a) のT_H17分化誘導アッセイをN-グリコシレーション阻害剤のswainsonine(2 μ g/ml) またはO-グリコシレーション阻害剤のBenzyl N-acetyl- β -D-galactosaminide(Benzyl- β -GalNAc, 2mM) 中に行った結果を表すグラフである。横軸は、swainsonine又はBenzyl- β -GalNAcの濃度を

表し、縦軸は、IL-17Aの濃度を表す。

【図6】実施例において、 T_H1 、 T_H2 及び T_H17 細胞分化に及ぼすGal-9の効果を測定した結果を示すグラフである。(a) ナイーブT細胞を T_H1 、 T_H2 または T_H17 に分化誘導するアッセイ系にヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールのPBS)を添加し、それぞれの分化を各 T_H サブタイプに特異的なmRNA発現で定量した結果を表す。No skewedはTCR刺激のみの場合。(b)上記(a)の安定化ガレクチン9存在下で T_H17 分化誘導を行った細胞のIFN- γ 及びIL-4 mRNAの発現を表す。

【図7】実施例において、ガレクチン9による T_H17 /Tregバランス調整がIL-2に依存するか否かを調べた結果を示す図である。(a)ナイーブT細胞にヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールのPBS)を添加し、 T_H17 分化誘導条件下に培養した細胞のCD4 $^+$ CD25 $^+$ 細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した結果を表す図である。(b)上記(a)のCD4 $^+$ CD25 $^+$ Foxp3 $^+$ 細胞の割合を表す図である。(c)ナイーブT細胞にヒト安定化ガレクチン9(コントロールはPBS)及び表示濃度のIL-2を添加して、 T_H17 分化誘導条件下に培養し、培養上清中のIL-17A濃度をELISAで定量した結果。(d)上記(c)の条件で培養した時のTreg細胞(CD4 $^+$ CD25 $^+$ Foxp3 $^+$ 細胞)の割合をフローサイトメトリーで測定した結果を示すグラフである。(e) ナイーブT細胞にヒト安定化ガレクチン9(コントロールはPBS)を添加し、 T_H17 分化誘導条件下に培養した後、PMAとイオノマイシン及びbrefeldin A存在下で更に培養し、CD4陽性細胞中のIL-17 $^+$ Foxp3 $^-$ 細胞とIL-17 $^-$ Foxp3 $^+$ 細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した結果を表す図である。(f)ナイーブT細胞を上記(e)の条件で培養し、各時点でCD25及びFoxp3のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで定量した結果を表すグラフである。横軸は、経過時間を表し、縦軸は、発現量を表す。

【図8】実施例における、細胞表面にガレクチン9を発現するCD4陽性T細胞(T_H GAL9)の確認(同定)を表す図である。(a)ナイーブT細胞を図6aの各条件、及び未刺激(No stim)で培養し、培養上清中のガレクチン9濃度をELISAで定量した結果を表す。TCR刺激のみはNo skewedと表記した。(b)ナイーブT細胞を T_H17 に分化誘導する条件(T_H17 skewed; TCR刺激に加えてIL-2、TGF- β 1及びIL-6刺激)またはそれからIL-6を除いたもの(TGF- β 1 alone)、またはそれからTGF- β 1を除いたもの(IL-6 alone)またはTCR刺激のみ(No skewed)の各条件で培養後に上清中のガレクチン9をELISAで定量した結果を表す。(c) ナイーブT細胞にヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールのPBS)を添加し、未刺激(No stim)、TCR刺激のみ(No skewed)及び T_H17 分化誘導刺激条件下で培養した後、上清中のガレクチン9をELISAで定量した結果を表す。(d)上記(c)の細胞を用いてガレクチン9 mRNA量をリアルタイムRT-PCRで定量した結果を示す。(e)上記(a)の各条件で培養した細胞の、細胞表面ガレクチン9とCD25を染色してフローサイトメトリーで測定した結果を示す。(f)上記(e)のNo skewed条件で培養した細胞を細胞表面ガレクチン9陽性(Gal-9 $^+$)と陰性(Gal-9 $^-$)に分けてソーティングし、ガレクチン9 mRNAをリアルタイムRT-PCRで定量した結果(左)及びそれら細胞を固定化/細胞膜浸透化後に抗ガレクチン9抗体で染色して細胞の全ガレクチン9を染色した時のフローサイトメトリーによる測定結果を示す。

【図9】実施例において、 T_H GAL9の機能を調べた結果を示す。(a)マウス脾臓細胞より調製したナイーブT細胞(左側)を、細胞表面ガレクチン9陽性(T_H GAL9細胞:Gal-9 $^+$ T_H)と陰性(non- T_H GAL9:Gal-9 $^-$ T_H)にソーティングし(中側)、それぞれをTCR刺激して培養上清中に分泌されたガレクチン9をELISAで定量した結果(右側)を示す。(b)上記細胞のサイトカインmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで調べた結果を示す。(c)ナイーブT細胞を T_H17 分化誘導刺激下で培養後、 T_H GAL9細胞(Gal-9 $^+$ T_H)またはnon- T_H GAL9(Gal-9 $^-$ T_H)細胞と1:1の比で混合し、その後はTCR刺激のみを与えて共培養し、培養上清中のIL-17AをELISAで(左側)、Foxp3 mRNAの発現をリアルタイムRT-PCRで定量(右側)した結果を示す。(d)上記の共培養を、ガレクチン9の阻害剤、ラクトース(またはコントロールのスクロース)存在下で行い、培養上清中のIL-17A濃度をELISAで定量した結果を示す。(e)上記(c)の共培養をIL-10中和抗体またはTGF- β 1中和抗体存在下で行った結果を示す。(f)ナイーブT細胞をIL-10またはヒト安定化ガレクチン9存在下に T_H17 分化誘導刺激し、培養上清中のIL-17A濃度をELISAで定量した結果を示す。

10

20

30

40

50

【図10】実施例において、CD25⁺T_HGAL9からのガレクチン9、IL-10及びTGF- β 1の産生を調べた結果を示すグラフである。(a)ナイーブCD4⁺T細胞をTCR刺激下で培養し、ソーティングによりCD25⁺T_HGAL9、CD25⁺non-T_HGAL9及びCD25⁻non-T_HGAL9に分離後、それぞれの細胞をさらにTCR刺激下で培養し、培養上清中のガレクチン9濃度をELISAで定量した結果を示す。(b)上記(a)の細胞のIL-10及びTGF- β 1発現をリアルタイムRT-PCRによって定量した結果を示す。

【図11】実施例において、T_HGAL9細胞がガレクチン9添加により誘導されることを調べた結果を示すグラフである。(a)ナイーブCD4⁺T細胞にヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールのPBS)を添加し、未刺激(No stim)、TCR刺激のみ(Neutral)またはT_H17分化誘導刺激条件下(Th17 skewed)で培養した後、細胞表面のガレクチン9、CD25の発現をフローサイトメトリー法で調べた結果を示す。(b)ナイーブCD4⁺T細胞をIL-10中和抗体、IL-10R中和抗体またはTGF- β 1中和抗体の存在下でTCR刺激し、T_HGAL9細胞の出現をフローサイトメトリー法で調べた結果を示す。(c)ナイーブCD4⁺T細胞にIL-10またはヒト安定化ガレクチン9を添加し、TCR刺激下で培養した後、T_HGAL9細胞の出現をフローサイトメトリー法で調べた結果を示す。

【図12】実施例において、T_HGAL9とTr1に高い類似性があることを検証した結果を示す図である。(a)ナイーブCD4⁺T細胞を細胞表面ガレクチン9を染色すると共に、既報のTr1細胞マーカーであるLAP、NKG2D、LAG-3及びCTLA-4の各抗体で染色し、フローサイトメトリー法で調べた結果を示す。(b)ナイーブCD4⁺T細胞をTCR刺激し、CD25陽性となったT細胞集団で(a)と同じ染色及びFoxp3染色を行い、フローサイトメトリー法で調べた結果を示す。(c)(b)で調製した細胞を細胞表面のガレクチン9、Tim-3及びCD25の発現をフローサイトメトリー法で調べた結果を示す。(d)ナイーブCD4⁺T細胞をIL-27添加によるTr1細胞分化刺激下で培養した後、PMAとイオノマイシンで更に刺激し、培養上清中のIL-10をELISAで定量した結果を示す。(e)上記(d)の培養上清中のガレクチン9をELISAで定量した結果を示す。(f)上記(d)のPMA/イオノマイシン処理をbrefeldin A (10 μ g/ml)存在下で行って細胞内部にIL-10を蓄積させ、細胞表面のガレクチン9と細胞内のIL-10を染色してフローサイトメトリー法で測定した結果を示す。

【図13】実施例において、ガレクチン9ノックアウトマウスではTr1マーカーを持つ細胞が減少することを調べた結果を示す。(a)ガレクチン9ノックアウトマウスと野生型マウスの脾臓細胞におけるCD4、NKG2D、LAG-3、LAP、CTLA-4の発現をフローサイトメトリー法で測定した結果を示す。(b)ガレクチン9ノックアウトマウスと野生型マウスのナイーブCD4⁺T細胞をTCR刺激のみ(No skewed)またはT_H17分化誘導刺激条件下(Th17 skewed)で培養し、IL-10 mRNAの発現をリアルタイムRT-PCRで調べた結果を示す。(c)(b)のNo skewed条件で培養した細胞をbrefeldin A (10 μ g/ml)存在下でPMA/イオノマイシン処理時を行い、細胞内部に蓄積したIL-10を染色してフローサイトメトリー法で測定した結果を示す。

【図14】実施例において、ヒトT_H17/Treg分化に対するガレクチン9の作用を調べた結果及びヒトT_HGAL9細胞を同定した結果を示す。(a)健常人4人より得た抹消血CD4⁺T細胞にヒト安定化ガレクチン9(若しくはコントロールのPBS)を添加し、TCR刺激下または未刺激で培養してCD25陽性細胞をフローサイトメトリー法で測定した結果を示す。(b)上記(a)細胞のCD25⁺Foxp3⁺割合をフローサイトメトリー法で測定した結果を示す。(c)ヒトCD4⁺T細胞にヒト安定化ガレクチン9(若しくはコントロールのPBS)を添加し、T_H17細胞分化誘導刺激下で培養して、培養上清中のIL-17をELISAで定量した結果を示す。(d)ヒトCD4⁺T細胞をTCR刺激下、または未刺激で培養し、細胞表面のガレクチン9とCD25を染色してフローサイトメトリー法で測定した結果を示す。(e)ヒトCD4⁺T細胞をTCR刺激下培養した後、ソーティングにより細胞表面ガレクチン9陽性(CD25⁺T_HGAL9)と陰性(CD25⁺non-T_HGAL9)に分離し、それぞれをTCR刺激下でさらに培養後、上清中のガレクチン9をELISAで定量、各サイトカインmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで測定した結果を示す。

【図15】重篤な腹膜炎モデルである盲腸結紮穿孔法(cecal ligation and puncture: CLP)の処置を施したマウスを例示する写真である。

10

20

30

40

50

【図16】実施例において、ヒト安定化ガレクチン9の重篤な腹膜炎モデルにおける有効性を調べた結果を示すグラフである。盲腸結紮穿孔法（cecal ligation and puncture : CLP）により腹膜炎を発症させ、経時的に生存率を調べた。（a）C57BL/6J野生型マウス（WT）とマウスガレクチン9のトランスジェニックマウス（Gal-9 Tg）の比較を示す。（b）WTマウスにCLPと同時にヒト安定化ガレクチン9（30 μg/マウス；またはコントロールとしてPBS）を単回静脈内投与したときの生存率を示す。（c）WTマウスにCLP処置を施し、その24時間後にヒト安定化ガレクチン9（30 μg/マウス；またはコントロールとしてPBS）を単回静脈内投与したときの生存率を示す。（d）WTマウスにCLP処置を施し、その24時間後にヒト安定化ガレクチン9（30 μg/マウス；またはコントロールとしてPBS）を単回皮下投与したときの生存率を示す。（e）ヌードマウスにCLPと同時にヒト安定化ガレクチン9（30 μg/マウス；またはコントロールとしてPBS）を単回皮下投与したときの生存率を示す。各図において、横軸は、CLP処置後の経過日数を表し、縦軸は、生存率を表す。

【図17】実施例において、CLPマウスにヒト安定化ガレクチン9を投与することで起こるサイトカインバランスの変化を調べた結果を示すグラフである。同図は、WTマウスにCLPと同時にヒト安定化ガレクチン9（30 μg/マウス；またはコントロールとしてPBS）を単回静脈内投与し、その24時間後に取り出した脾臓細胞を24時間培養して、培養上清中のサイトカインをELISAで定量した結果を示す。縦軸は、サイトカインの濃度を表す。

【図18】実施例において、CLPマウスにヒト安定化ガレクチン9を投与することで誘導される細胞表面ガレクチン9陽性細胞を調べた結果を示す。WTマウスにCLPと同時にヒト安定化ガレクチン9（30 μg/マウス；またはコントロールとしてPBS）を単回静脈内投与し、その24時間後に取り出した脾臓細胞の細胞表面CD3、NK1.1、GL-3及び細胞表面ガレクチン9の発現を各抗体で染色してフローサイトメトリー法で測定した結果。CD3⁺NK1.1⁺ : NK細胞、CD3⁺NK1.1⁻ : NK細胞、CD3⁺GL-3⁺ : T細胞。T_HGal9細胞はCD3⁺NK1.1⁻Gal-9⁺及びCD3⁺GL-3⁻Gal-9⁺の分画に含まれる。同図中の「Spleen cells from CLP mouse」は、「CLPマウスから取り出した脾臓細胞」を意味する。

【図19】既報のようにヒト安定化ガレクチン9を坦癌マウスに投与すると生存率が上昇するが、その際に起こる免疫細胞の変化及びそれら細胞表面のガレクチン9発現を実施例において調べた結果を示す。マウス繊維肉腫Meth Aを既報の方法（非特許文献32）に従って腹腔内に導入し、その直後よりヒト安定化ガレクチン9を3回/週投与（30 μg/マウス）した。Meth A移植より7日後に腹腔内細胞と脾臓細胞を取り出して表示の細胞表面マーカーを染色し、フローサイトメトリー法で測定した結果を示す。（a）腹腔細胞の内CD4陽性細胞をCD25と細胞表面ガレクチン9発現で展開した結果。ヒト安定化ガレクチン9投与によって細胞表面にガレクチン9を発現した細胞の割合が著しく増加し、一方CD25⁺Gal-9⁻は減少した。CD25⁺Gal-9⁻細胞は、癌に対する免疫を抑制すると考えられるTregを含む細胞集団である。（b）腹腔細胞の内CD8陽性細胞をCD25と細胞表面ガレクチン9発現で展開した結果を示す。ヒト安定化ガレクチン9投与によって細胞表面にガレクチン9を発現したCD8⁺細胞の割合が著しく増加している。（c）ヒト安定化ガレクチン9を投与したMeth A坦癌マウスの脾臓細胞をPDCA-1、CD11c及び細胞表面ガレクチン9で染色し、フローサイトメトリー法で測定した結果を示す。形質細胞様樹状細胞：pDC、pDC様マクロファージ：pDC-M、古典的樹状細胞：cDC、及び樹状細胞やマクロファージと異なる細胞：nonDCM（図中では、「other spleen cells」）のそれぞれで細胞表面ガレクチン9発現レベルを比較した。

【図20】実施例において、ヒト安定化ガレクチン9の自然発症性自己免疫疾患モデルでの有効性を調べた結果を示す。MRL/MpJUmmCrj-1pr/1prマウスは全身性エリテマトーデスのモデルとして汎用される自然発症性自己免疫疾患モデルである。このマウス（、8週齢）にヒト安定化ガレクチン9を表示の用量で3回/週のスケジュールで22週齢まで腹腔内投与し、経時的に後肢足蹠浮腫容積測定（週一回）、体重測定（週三回）、尿中蛋白濃度測定（週一回）を行った。本図では尿蛋白濃度変化（a）と体重変化（b）を調べた結果を示す。図20（a）において、横軸は、投与後の経過週数を表し、縦軸は、尿中蛋白濃度を表す。すべてのデータは、所定の各時点におけるn = 7 ~ 10の動物の平均値を表す

10

20

30

40

50

。統計的な違いは、双方向のANOVAを用いて分析し、グループ間の差異は、ボンフェローニのposttestsを用いて評価した (*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。図 2 0 (b)において、横軸は、投与後の経過日数を表し、縦軸は、体重増加量を表す。すべてのデータは、所定の各時点における n = 6 ~ 8 の動物の平均値 ± SEMを表す。統計的な違いは、双方向のANOVAを用いて分析し、グループ間の差異は、ボンフェローニのposttestsを用いて評価した (*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。

【図 2 1】図 2 0 の実験における後肢足蹠浮腫容積変化 (a) と、実験終了時 (22週齢目) のヘマトクリット値 (b) を調べた結果を示す。図 2 1 (a) において、横軸は、投与後の経過週数を表し、縦軸は、後肢足蹠浮腫容積変化を表す。すべてのデータは、所定の各時点における n = 6 ~ 10 の動物の平均値 ± SEMを表す。統計的な違いは、双方向のANOVAを用いて分析し、グループ間の差異は、ボンフェローニのposttestsを用いて評価した (*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。図 2 1 (b) において、横軸は、ヒト安定化ガレクチン 9 投与用量を表し、縦軸は、実験終了時 (22週齢目) のヘマトクリット値を表す。すべてのデータは、所定の各時点における n = 6 ~ 8 の動物の平均値 ± SEMを表す。統計的な違いは、双方向のANOVAを用いて分析し、グループ間の差異は、ダネットの多重比較検定を用いて評価した (*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001)。

【図 2 2】実施例において、ヒト安定化ガレクチンの抗体産生に与える影響を調べた結果を示す。羊赤血球 (SRBC) をマウスに投与すると羊赤血球に対する IgM 抗体産生が著しく惹起されるため、このシステムは薬物の抗体産生への影響を調べる目的に汎用される。C57BL/6J マウス () に SRBC を腹腔内投与し、その直後にヒト安定化ガレクチン 9 (30 µg/マウス) またはコントロールとして PBS を単回腹腔内投与した。それぞれの時点で、3-5 匹のマウスより採血及び脾臓摘出を行い抗体産生及び B 細胞を調べた。(a) SRBC 特異的な IgM 濃度、(b) 全 IgM 濃度、(c) 全 IgG 濃度をそれぞれの特異的な ELISA で調べた結果を示す。(d) MRL/MpJ UmmCrj-1pr/1pr マウス (、 8 週齢) に 30 µg/マウスのヒト安定化ガレクチン 9 またはコントロールとして PBS を 3 回 / 週投与し、7 日目に採血した。血清中の抗二本鎖 DNA 抗体 (代表的な自己抗体) 濃度を特異的な ELISA で測定した結果を示す。図中、「Days after SRBC injection」は、SRBC 腹腔内投与後の経過日数を意味する。

【図 2 3】実施例における、脾臓細胞に含まれる Germinal center B 細胞のフローサイトメトリー法による解析方法を示す。脾臓細胞を抗 CD19 抗体と抗 GL-7 抗体で染色し、CD19⁺GL-7⁺ の細胞集団を Germinal center B 細胞とした。Germinal center B 細胞を構成する Centrocyte と Centroblast は細胞の大きさが異なり、Centroblast の方が大きいことが知られている。そこで Germinal center B 細胞集団を FSC と SSC に展開し、細胞の大きさに相関する FSC で約 350 付近を目安に二つの細胞集団に分離し、仮にそれぞれ Centrocyte と Centroblast とした。それぞれの CXCR4 発現を調べたところ、Centroblast で高い発現が確認された。これは公知の Centroblast と Centrocyte の性質に一致する。よって以後の解析で Centrocyte と Centroblast を分離して解析する必要がある際には本図に示した方法、すなわち CD19⁺GL-7⁺ の細胞集団を FSC と SSC に展開して分離する方法で行った。

【図 2 4】実施例において、ガレクチン 9 は B 細胞にも作用することを調べた結果を示す。C57BL/6J マウス () またはガレクチン 9 ノックアウトマウスに SRBC を腹腔内投与し、その直後にヒト安定化ガレクチン 9 (30 µg/マウス) またはコントロールとして PBS を単回腹腔内投与した。それぞれの時点で、3-5 匹のマウスより採血及び脾臓摘出を行い、B 細胞を図 2 3 に示したフローサイトメトリー法により調べた結果を示す。(a) SRBC 投与後 4 日目のフローサイトメトリー法による解析結果の一例を示す。(b) Germinal center B 細胞 (GC B cell)、Centroblast および Centrocyte 数の経時変化を示す。「Day post immunization」は、免疫感作後の経過日数を意味する。(c) SRBC 投与後 4 日目の Germinal center B 細胞 (GC B cell)、Centroblast および Centrocyte 数を示す。ガレクチン 9 ノックアウトマウス (Gal-9 KO) には SRBC 投与後に PBS を投与した。

【図 2 5】実施例において、B 細胞の細胞表面にガレクチン 9 が発現していることを調べた結果を示す。(a) SRBC 投与 7 日目の脾臓細胞を、図 2 3 に示したフローサイトメトリー法で Germinal center B 細胞とその他の B 細胞に分離し、それぞれの細胞集団の細胞表面

10

20

30

40

50

ガレクチン9発現を調べた結果を示す。(b)(a)のGerminal center B細胞を図23に示したフローサイトメトリー法で更にCentrocyteとCentroblastに分離し、それぞれの細胞集団の細胞表面ガレクチン9発現を調べた結果を示す。(c)図24(B)で調べたGerminal center B細胞の細胞表面ガレクチン9発現を調べた結果を示す。SRBC投与によって細胞表面にガレクチン9を発現したGerminal center B細胞の割合は増加したが、ヒト安定化ガレクチン9を投与してもその割合に変化は無かった。

【図26】実施例において、抗体産生刺激下の脾臓細胞中ヘルパーT細胞のサブタイプと、それぞれの細胞表面ガレクチン9発現を解析した結果を示す。前述のようにガレクチン9は抗体産生及びB細胞にも作用する。生体内でB細胞の分化、抗体産生はヘルパーT細胞に制御されており、特にFollicular B helper T cells (TFH)と呼ばれるCD4陽性細胞の役割が大きいと言われている。そこで、SRBC投与前(Day0)と投与7日目(Day7)のマウス脾臓細胞をCD4及びTFHのマーカーと言われているCXCR5及びICOSで染色し、それぞれの細胞集団の細胞表面ガレクチン9発現をフローサイトメトリー法により調べた。(a)CD4陽性細胞をCXCR4とICOS発現で展開したドットプロットの例と、CXCR4とICOS発現で4分割した各細胞集団の細胞表面ガレクチン9発現を示す。(b)それぞれの細胞集団の割合の経時変化を示す。(c)ヒト安定化ガレクチン9投与によってそれぞれのCD4陽性細胞の割合が変化するかどうかを調べた結果を示す。(d)それぞれの細胞集団の細胞表面ガレクチン9陽性割合がSRBC投与後に上昇する結果を示す。(e)それぞれの細胞集団の細胞表面ガレクチン9の発現量(MFI)がSRBC投与後に上昇する結果を示す。図中、「Days after SRBC injection」は、SRBC腹腔内投与後の経過日数を意味する。

【図27】ヒト安定化ガレクチン9投与によって起こる作用を模式的に例示する図である。

【図28】実施例における、ガレクチン9改変体組換え蛋白質の電気泳動図である。

【図29】実施例において、ガレクチン9投与がLLC坦癌マウスの生存を延長し、その際にpDC様マクロファージが増加したことを示す図である。(a)マウス肺癌由来腫瘍細胞株LLCを腹腔接種したマウスに、30 μ gのヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールとしてPBS)を3回/週で坦癌時より腹腔内投与した時の生存率を調べた結果を示すグラフである。横軸の「Days after tumor inoculation」は、腫瘍接種後の日数を意味する。縦軸の「Percent survival」は、生存率を表す。(b)LLC接種7日後の腹腔内細胞をマクロファージマーカー(Ly-6C及びF4/80)、樹状細胞マーカー(CD11c)及び形質細胞用樹状細胞マーカー(PDCA-1)の抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した結果を示す。

【図30】実施例において、ガレクチン9が試験管内でM-CSFによるCD11c陽性細胞の分化をTim-3非依存的に促進したことを示す図である。(a)マウス骨髄細胞をGM-CSFまたはM-CSF中で7日間培養して樹状細胞への分化を促進し樹状細胞のマーカーの一つであるCD11cの発現を調べた。安定化ガレクチン9(30nM)の分化へ与える影響を調べた結果を示す。(b)(a)の分化アッセイをガレクチン9の阻害剤であるラクトース(コントロールにはスクロース)またはTim-3の中和抗体中で行った結果を示す。

【図31】実施例において、ガレクチン9とM-CSFで分化したCD11c陽性細胞がpDC様マクロファージの前駆体細胞であることを確認した結果を示す図である。(a)図30のM-CSFまたはM-CSFとガレクチン9で7日間培養した細胞を表示のマクロファージ及び樹状細胞マーカーの抗体で染色し、フローサイトメトリー法で解析した結果を示す。グレーで内塗られたヒストグラムはアイソタイプコントロール、グレーの実線がM-CSFで分化させたマクロファージを表示の抗体で染色したもの、黒の実線がM-CSFとガレクチン9で分化させたマクロファージを表示の抗体で染色したもの。(b)上記細胞の転写因子mRNA発現をリアルタイムRT-PCRで解析し、2マイクログロブリンまたはグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼのmRNA発現で標準化した結果を縦軸に示す。それぞれサンプル数は4で統計解析を行っている。(c)上記細胞のToll-likeリセプターmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで解析し、2マイクログロブリンまたはグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼのmRNA発現で標準化した結果(Relative mRNA level: 相対的なRNAレベル)を縦軸に示す

10

20

30

40

50

。それぞれサンプル数は4で統計解析を行っている。(d)上記細胞に表示のToll-likeリセプターアゴニストを添加して6時間後のIFN- γ とIFN- β mRNA発現をリアルタイムRT-PCRで解析し、 β 2ミクログロブリンまたはグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼのmRNA発現で標準化した結果を縦軸に示す。それぞれサンプル数は4で統計解析を行っている。横軸の「Stimulated with」は、どのアゴニスト(または、対照としてのPBS)で刺激したかを意味する。

【図32】実施例において、ガレクチン9とM-CSFで分化したCD11c陽性細胞がLPS刺激によってpDC様マクロファージに成熟したことを示す図である。(a)図30の方法でM-CSFとガレクチン9で分化したマクロファージをLPS中で24時間培養し(コントロールはPBS)、CD11c、PDCA-1、F4/80およびLy-6Cの発現をフローサイトメトリー法によって解析した結果を示す。(b)図30の方法でM-CSFとガレクチン9で分化したマクロファージをLPS中で6時間または24時間培養し、表示のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで解析した結果(Relative mRNA level: 相対的なRNAレベル)を縦軸に示す。(c)図30の方法でM-CSFとガレクチン9で分化させたマクロファージをLPSで24時間培養した(コントロールはPBS)後、I-A/I-Eの発現をフローサイトメトリー法で解析した結果の一例を示す。グレーのヒストグラムはアイソタイプコントロール、破線のヒストグラムがPBSコントロール、実線のヒストグラムがLPS刺激。LPS処理群とコントロールPBS群(それぞれn=4)で、I-A/I-E陽性細胞の割合を棒グラフに表し、統計解析した結果を示す。

【図33】実施例において、LPS刺激によってより成熟した表現系を持つようになったpDC様マクロファージの機能を調べた結果を示す図である。(a)図32(a)の方法でLPS刺激を与えることで成熟させたpDC様マクロファージに横軸に表示した各TLRアゴニスト(コントロールはPBS)を添加し、18時間培養した培養上清中のIFN- γ とIFN- β をELISAで調べた結果を示す。縦軸は濃度を表す。サンプル数は各4で統計解析している。***P<0.001。(b)図32(a)の方法でLPS刺激を与えることで成熟させたpDC様マクロファージがNK細胞を活性化して抗癌活性を高めることを調べた結果を示す。左図横軸表示のNKはマウスリンパ腫Yac-1細胞とマウスより調製したナイーブNK細胞共培養(Yac-1:NK=1:30)した場合、NK+pDC-MはYac-1、ナイーブNK及び成熟したpDC様マクロファージを1:30:60の割合で共培養した場合、(-)はYac-1単独培養の結果で、それぞれ5時間培養後に細胞死を起こしたYac-1細胞の割合をフローサイトメトリー法で解析して縦軸に示した。サンプル数はそれぞれ4で統計解析している。***P<0.001。右図はナイーブNK細胞と成熟したpDC様マクロファージを5時間共培養した後にNK細胞のGranzymeBとPerforin発現をフローサイトメトリー法で調べた結果を示す。サンプル数はそれぞれ4で統計解析している。*P<0.05。

【発明を実施するための形態】

【0025】

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の説明により限定されない。

【0026】

本発明者らは、鋭意研究を行い、ガレクチン9による免疫制御の詳細を明らかにすること、中でもT_H17とTreg細胞の分化制御の詳細と、生体内でガレクチン9を分泌し、免疫反応を制御する細胞の同定に注力した。こうした中で本発明者らは、ガレクチン9を分泌する新規のCD4陽性T細胞(T_HGAL9細胞)を同定することに成功し、この細胞がT_H17とTreg細胞の分化を制御することを明らかにした。さらに本発明者らはin vitroにおいてT_HGAL9細胞がガレクチン9の添加で増加することを発見した。T_HGAL9細胞は、細胞表面にガレクチン9を発現しているだけでなく、既知のTr1細胞マーカーも発現しており、またIL-10を分泌することから現時点で定義されるTr1細胞と同一またはその部分集団である可能性が示唆された。その場合、ガレクチン9はTr1細胞のマーカーとしても有用であり、Tr1細胞の精製とその治療への応用へも極めて重要となる。なお、本発明において、「細胞表面」は、特に限定されないが、例えば、細胞膜の細胞外に面した側の表面をいう。すなわち、ガレクチン9を細胞表面に発現している状態とは、特に限定されないが、例えば、ガレクチン9を細胞膜またはその表面に発現しており、ガレクチン9の全体または一部を細胞外

に露出している状態をいう。

【0027】

本発明者らは、自己免疫疾患モデルの一つであるマウスEAEモデルを用いてガレクチン9による T_H17 細胞分化抑制とTreg細胞分化促進はIL-2に依存するがTim-3には依存しないことを明らかにした。一方で、ガレクチン9は、分化したTim-3陽性 T_H17 細胞にTim-3依存的なアポトーシスを誘導した。本発明者らは、CD4陽性T細胞の中に、ガレクチン9を細胞表面に発現した集団があることを見出した。以下において、ガレクチン9を細胞表面に発現したCD4陽性T細胞を「 T_H GAL9細胞」ということがある。 T_H GAL9細胞をTCRで刺激すると、例えば、CD25の発現上昇に引き続いてガレクチン9やIL-10を分泌することが可能である。Treg細胞もIL-10を分泌することがあるが、 T_H GAL9細胞はTregのマーカーであるFoxp3を発現しておらず、Treg細胞とは異なる細胞であると考えられた。 T_H GAL9は既報のIL-10産生タイプ1制御性T細胞(Tr1細胞)マーカーの全てを発現していた。ところが、これらのTr1マーカーは、TCR刺激を受けた殆どのCD25陽性CD4細胞が発現誘導するためにTr1の決定的なマーカーでは無かった。興味深いことに T_H GAL9以外のCD4⁺T細胞も細胞内部には T_H GAL9と同等量のガレクチン9を発現していた。 T_H GAL9細胞を T_H17 細胞分化にコミットしたナイーブT細胞と共培養するとIL-17の産生を抑制し、Treg細胞を増加させた。これらの作用はリコンビナントガレクチン9と同様であり、生体内でガレクチン9の分泌を介した免疫制御を行う細胞が、 T_H GAL9細胞であることが強く示唆された。また、ヒトにも同様の性質を持つ T_H GAL9細胞が存在することが示された。以上の知見は、細胞表面のガレクチン9はTr1の優れたマーカーであり、さらには T_H GAL9細胞は自己免疫疾患、アレルギー疾患や腫瘍その他の疾患治療に直接または間接的に使用可能な極めて有用な細胞であることを示すものである。

10

20

【0028】

さらに、本発明者らは、 T_H GAL9細胞による T_H17 細胞分化抑制はガレクチン9の阻害剤によって抑制されるが、IL-10やTGF- β 阻害剤では抑制されないことを示し、本抑制においてはガレクチン9が活性の本体であることを明らかにした。

【0029】

さらに、本発明者らは、CD4陽性T細胞以外の他のT細胞、T細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)、B細胞等においても、同様に、細胞表面にガレクチン9を発現している細胞が存在することを見出し、本発明の細胞を発明するに至った。本発明の細胞は、前述のとおり、ガレクチン9を含む細胞であって、前記ガレクチン9を細胞表面に発現していることを特徴とし、それ以外は特に限定されない。

30

【0030】

本発明の細胞がガレクチン9を細胞表面に発現していることは、本発明の細胞がガレクチン9を分泌する細胞であることを裏付けていると考えられる。すなわち、細胞内部のガレクチン9が分泌されて細胞外部に排出される過程で、細胞表面におけるガレクチン9発現が観察されると考えられる。ただし、この説明は、可能性のあるメカニズムの一つを示すものであり、本発明の細胞は、この説明により限定されない。

【0031】

本発明の細胞(T_H GAL9細胞等)は、例えば、自己免疫疾患、アレルギー疾患や腫瘍その他の疾患治療に直接または間接的に使用可能な極めて有用な細胞であり、例えば、免疫制御をして病気の予防・治療に有用であり、また、例えば、感染症対策、免疫疾患、臓器移植などの医療分野、さらには、アッセイ、バイオなどの分野に用いる試薬などとしても有用である。

40

【0032】

なお、本発明において、「ガレクチン9」とは、天然(野生型)ガレクチン9のみに限定されず、例えば、天然(野生型)ガレクチン9と実質的に同等の活性を有するガレクチン9改変体(パリアント)等であっても良い。ガレクチン9改変体は、例えば、ガレクチン9の糖鎖認識部位が保有する特定の糖鎖に対して特異的に結合するといった活性又はそれと類似した活性(本活性のうちには定性的な活性及び/又は定量的な活性が含まれてよ

50

い)を提供する物質であっても良い。ガレクチン9(野生型ガレクチン9)は、例えば、特定の細胞に対してアポトーシス誘導活性を有するが、本発明において、前記ガレクチン9改変体は野生型ガレクチン9が有するアポトーシス誘導活性あるいはそれと類縁の活性を有するものであってよく、ガレクチン9が有する生物活性が改変又は修飾されているものであってよいし、ある場合には好ましい。本発明において、ガレクチン9改変体とは、生物活性を有する試薬として、臨床検査の分野、分析の分野、あるいは医学又は医薬などの分野で、野生型ガレクチン9と同等又は野生型ガレクチン9よりは好ましい性質を示すものであってよい。

【0033】

本発明において、「ガレクチン9改変体」は、特に限定されないが、例えば、特許文献1に記載のガレクチン9改変体等であっても良く、より具体的には、例えば、以下のとおりである。ガレクチン9改変体は、例えば、野生型ガレクチン9又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域が改変されているタンパク質又はその塩、野生型ガレクチン9又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域のアミノ酸配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、野生型ガレクチン9と比較して少なくともリンクペプチドに対する分解感受性が改質されているといった改変の施されたタンパク質又はその塩、野生型ガレクチン9と実質的に同等の活性を有するタンパク質であって且つガレクチン9のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の同一性、又は少なくとも75%以上の同一性、又は少なくとも80%以上の同一性、又は少なくとも85%以上の同一性、又は少なくとも90%以上の同一性、又は少なくとも95%以上の同一性を有するタンパク質又はその塩、(1)野生型ガレクチン9のN末端側の糖鎖認識領域(NCRD)又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドと(2)野生型ガレクチン9のC末端側の糖鎖認識領域(CCRD)又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドとを、(3)野生型ガレクチン9のリンクペプチドのアミノ酸配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる改変リンクペプチドを介して結合してあるタンパク質又はその塩などであってよい。

【0034】

好ましい態様では、ガレクチン9改変体は、例えば、(1)野生型ガレクチン9のNCRDとして下記配列番号7に示されているアミノ酸配列又はその配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたもの、あるいは、下記配列番号7に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70%以上の同一性、又は少なくとも75%以上の同一性、又は少なくとも80%以上の同一性、又は少なくとも85%以上の同一性、又は少なくとも90%以上の同一性、又は少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つ、ラクトース結合能を有するものであって、(2)野生型ガレクチン9のCCRDとして下記配列番号8に示されているアミノ酸配列又はその配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたもの、あるいは、下記配列番号8に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70%以上の同一性、又は少なくとも75%以上の同一性、又は少なくとも80%以上の同一性、又は少なくとも85%以上の同一性、又は少なくとも90%以上の同一性、又は少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つ、ラクトース結合能を有するものであって、(3)上記(1)と(2)を結合しているリンク領域として下記配列番号9に示されているアミノ酸配列又はその配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたもので、好ましくはマトリックスメタロプロテアーゼなどのタンパク分解酵素に対してネイティブな(野生型の)ガレクチン9より安定化されているものが挙げられる。当該リンク領域(3)としては、下記配列番号9に示されているアミノ酸配列中のアミノ酸残基が1個以上(例えば、1~2個、好ましくは3~4個、さらに好ましくは5~6個、さらに好ましくは7~8個、特に1~9個など)欠けている欠失類縁体、該アミノ酸残基の1個以上(例えば、1~9個、好ましくは1~8個、さらに好ましくは1~6個、さらに好ましくは1~4個、特に1~2個など)が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上(例えば、1~60個、好ましくは1~40個、さらに好まし

10

20

30

40

50

くは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に1~5個など)のアミノ酸残基(ただし、下記配列番号10及び11に示されているアミノ酸配列のうち下記配列番号9に示されているアミノ酸配列を除いた部分で示されるものは除く)が付加されている付加類縁体も包含する。代表的な場合、当該リンク領域(3)としては、下記配列番号9に示されているアミノ酸配列をHM,RIP,又は任意の2アミノ酸の配列で置換したものなどが挙げられる。アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、ポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないものであることもできるし、ある場合には好ましい変化を与えるものであることができる。該アミノ酸配列中のアミノ酸の置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性(中性)としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸(塩基性アミノ酸)としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸(酸性アミノ酸)としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

10

【0035】

また、当該リンク領域(3)としては、下記配列番号10又は11に示されているアミノ酸配列を、下記配列番号9に示されているアミノ酸配列部分を除いて、HM,RIP,又は任意の2アミノ酸の配列で置換したもの、下記配列番号10又は11に示されているアミノ酸配列のうち下記配列番号9に示されているアミノ酸配列部分を除いてそのうちの6アミノ酸を残して、それ以外の残基を削除したものなどが挙げられる。また、当該リンク領域(3)としては、下記配列番号10又は11に示されているアミノ酸配列中のアミノ酸残基(ただし、例えば、下記配列番号9に示されているアミノ酸配列部分を除いて、あるいは、下記配列番号10の場合、下記配列番号11に示されているアミノ酸配列部分を除いてよい)が1個以上(例えば、1~5個、好ましくは3~10個、さらに好ましくは5~15個、さらに好ましくは7~20個、特に1~32個など)欠けている欠失類縁体、該アミノ酸残基の1個以上(例えば、1~9個、好ましくは1~8個、さらに好ましくは1~6個、さらに好ましくは1~4個、特に1~2個など)が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上(例えば、1~60個、好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に1~5個など)のアミノ酸残基(ただし、下記配列番号10及び11に示されているアミノ酸配列のうち下記配列番号9に示されているアミノ酸配列を除いた部分で示されるものは除く)が付加されている付加類縁体も包含する。

20

30

【0036】

例えば、天然(野生型)のヒトガレクチン9タンパク質の特徴であるドメイン構造あるいは糖結合能が維持されている上記変異体は、全て本発明に包含される。また本発明のペプチドあるいはポリペプチドは天然のヒトガレクチン9タンパク質と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のものと実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。本発明において、ヒト由来のタンパク質(又はペプチドあるいはポリペプチド)は、例えば、W002/37114A1の配列表のSEQ ID NO:1~3から成る群から選ばれたアミノ酸配列に対し、60%、場合によっては70%より高い相同性を有しているものが挙げられ、より好ましくはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられる。本発明において、ヒト由来のタンパク質の一部のものとは、該ヒト由来のタンパク質の一部のペプチド(すなわち、該タンパク質の部分ペプチド)であって、本発明の、ガレクチン9タンパク質と実質的に同等な活性を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、該本発明のタンパク質の部分ペプチドは、該ヒトガレクチン9の構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは50個以上、より好ましくは70個以上、もっと好ましくは100個以上、ある場合には200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられ、好ましくはそれらは連続したアミノ酸残基に対応するものであるか、あるいは、例

40

50

えば、該W002/37114A1の配列表のSEQ ID NO:1~3のいずれか一で示されるアミノ酸配列のうち対応する領域に対する相同性に関して、上記と同様の相同性を有するものが挙げられる。

【 0 0 3 7 】

(配列番号 7)

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
 20 25 30

10

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
 35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
 50 55 60

20

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly
 65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
 85 90 95

30

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val
 100 105 110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe
 115 120 125

40

His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr
 130 135 140

Ile Ser Phe Gln
 145

(配列番号 8)

50

Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro Met
 1 5 10 15

Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser Ile
 20 25 30

10

Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile Asn
 35 40 45

Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe Asp
 50 55 60

20

Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly Ser
 65 70 75 80

Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln Ser
 85 90 95

30

Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala Val
 100 105 110

Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu Pro
 115 120 125

40

Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His Val
 130 135 140

Gln Thr
 145

50

Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe
 1 5 10 15

Ser

(配列番号 1 0)

Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser Thr Val Pro Phe
 1 5 10 15

10

Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly Arg Arg Gln Lys
 20 25 30

Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile Thr Gln Thr Val
 35 40 45

20

Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe Ser
 50 55 60

(配列番号 1 1)

Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile Thr Gln Thr Val
 1 5 10 15

30

Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe Ser
 20 25

【 0 0 3 8 】

本発明において、ガレクチン9 変体の活性と野生型(天然)ガレクチン9の活性が「実質的に同等」とは、例えば、前記ガレクチン9 変体が天然型ガレクチン9の糖鎖認識活性を保持していることをいう。別の観点からは、ガレクチン9 変体の活性と野生型(天然)ガレクチン9の活性が「実質的に同等」とは、例えば、タンパク質の活性、より具体的には、例えば、所定の細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性、抗炎症活性、抗アレルギー活性、免疫調節活性、糖鎖結合活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、結合活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、結合活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性などの活性が、同等(例えば、約0.001~約1000倍、好ましくは約0.01~約100倍、より好ましくは約0.1~約20倍、さらに好ましくは約0.5~約2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。

40

【 0 0 3 9 】

50

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び/又は改変(あるいは修飾)をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【0040】

本発明ではガレクチン9を細胞表面に発現するCD4陽性T細胞を見出し、それがガレクチン9を分泌して T_H17 細胞とTreg細胞のバランスを制御することを見出して T_H GAL9細胞と命名した。 T_H GAL9細胞はIL-10を産生することおよび細胞表面にLatency-associated peptide(LAP)、NKG2D、lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)、Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4)を発現していることよりFoxp3陰性の抑制性T細胞すなわちTr1細胞(非特許文献20~22)と同一またはその部分集団である可能性が示唆された。

Tr1細胞は形質細胞様樹状細胞によって誘導される免疫寛容に重要な役割を果たす細胞であり(非特許文献20、23~25、15~18)、in vitroではナイーブCD4⁺T細胞をIL-27またはVitamin D3/dexamethasoneの存在下でTCR刺激を与えることで誘導される(非特許文献26~29)。Tr1細胞の細胞表面マーカーとして前述のLAP、NKG2D、LAG-3、CTLA-4が知られているが、これらはIL-10を産生しないCD4⁺CD25⁺細胞にも発現しているため、信頼に足るTr1細胞マーカーはその機能の本体と考えられている抑制性サイトカインIL-10の高発現である。ところがIL-10の産生はTr1細胞だけでなくTreg細胞を含む他の細胞群にも見られることから、確定的なマーカーには成り得ず(非特許文献30~31)、また細胞内に存在するIL-10の発現を指標に、生きたまま細胞を簡便に精製する技術も存在しないことは、Tr1研究およびその応用を困難にしている。

【0041】

本発明では、前述のとおり、細胞表面にガレクチン9を発現する T_H GAL9以外の免疫細胞も見出した。それらの細胞群についても T_H GAL9細胞同様に診断のサロゲートマーカーとして、または細胞表面のガレクチン9を用いて精製し細胞療法へ応用する可能性が示唆される。

【0042】

本発明は、ガレクチン9を分泌する細胞及びその応用技術を提供する。例えば、本発明は、Gal-9とIL-10を分泌するタイプ1制御性T細胞及びその応用技術を提供する。本発明は、ガレクチン9を分泌し得る新規のT細胞(T_H GAL9細胞)を同定し、それを利用可能とする技術を提供している。該 T_H GAL9細胞を利用して、 T_H17 細胞とTreg細胞の分化を制御する技術も提供する。 T_H GAL9細胞は、細胞表面にガレクチン9を発現しているだけでなく、例えば、既知のTr1細胞マーカーも発現し、またIL-10を分泌し得る。本発明では、ガレクチン9をTr1細胞のマーカーとして利用し、該Tr1細胞を精製すると共にそれを治療への応用に利用する技術も提供する。本発明では、 T_H GAL9細胞をTCRで刺激して、CD25の発現上昇、ガレクチン9やIL-10の分泌誘導を行う技術を提供する。また、本発明では、 T_H GAL9細胞を T_H17 細胞分化にコミットしたナイーブT細胞と共培養することにより、IL-17の産生を抑制したり、及び/又は、Treg細胞を増加させる技術も提供している。本発明は、また、生体内で、 T_H GAL9細胞でもって、免疫制御を行う技術を提供する。また、本発明は、細胞表面のガレクチン9をマーカーとして使用し、制御性免疫細胞を分別する細胞分別技術や、さらには、細胞表面のガレクチン9をマーカーとして使用し、IL-10産生タイプ1制御性T細胞(Tr1細胞)を分別するTr1細胞分別技術を提供する。

【0043】

本発明で見出された細胞、例えば、 T_H GAL9細胞は、生物活性を有する試薬として、診断材、治療剤などとして、剤臨床検査の分野、分析の分野、あるいは医学又は医薬などの分野で有用である。

【 0 0 4 4 】

本発明の細胞（例えば、 T_H GAL9細胞）を、生体（動物）の組織から分離（又は単離）する方法は、特に限定されず、当業者であれば、本願明細書及び図面の記載、並びに本願出願時の技術常識に基づいて、過度の試行錯誤を要せずに行うことができる。例えば、本発明の細胞（例えば、 T_H GAL9細胞）を、生体（動物）の組織から分離（又は単離）する方法は、後述の実施例に記載のように、細胞を抗ガレクチン9抗体で染色し、ソーティングにより分離（又は単離）するという方法でも良い。

【 0 0 4 5 】

本発明の細胞（例えば、 T_H GAL9細胞）の製造方法も特に限定されず、例えば、すでに本発明の細胞を有している動物の組織から、本発明の細胞を分離（又は単離）する方法でも良い。また、これに加え、又はこれに代えて、本発明の細胞の製造方法は、ガレクチン9を細胞表面に発現していない細胞の細胞表面にガレクチン9を発現させて本発明の細胞に変換する工程を含んでいても良い。この工程は、例えば、生体内（*in vivo*）で行うこともできるし、生体外（*in vitro*）で行うこともできる。生体内（*in vivo*）で行う方法としては、例えば、本発明の前記第1の製造方法のように、動物にガレクチン9を投与することにより、前記動物における少なくとも一部の細胞の細胞表面にガレクチン9を発現させる方法でも良い。生体外（*in vitro*）で行う方法としては、例えば、本発明の前記第2の製造方法のように、動物の細胞を、ガレクチン9の存在下で培養することにより、前記動物の細胞の細胞表面にガレクチン9を発現させる方法でも良い。また、本発明の前記第2の製造方法は、例えば、前記動物の細胞が、細胞表面にガレクチン9を発現している細胞を含み、前記動物の細胞を、ガレクチン9の存在下で培養することにより、細胞表面にガレクチン9を発現している細胞の割合を増加させる、本発明の細胞の製造方法であっても良い。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用の用語「診断剤」とは、本発明における診断において使用する1つまたはそれ以上のその診断行為に寄与するような任意の薬剤をいう。これらものの診断への使用は、ガレクチン9産生細胞の存在を決定するための方法あるいはガレクチン9結合性物質を提示する細胞の存在を決定するための方法を含むものであってよい。診断剤としては、例えば、細胞表面にガレクチン9を発現する細胞またはその細胞ホモジュネートからなる群から選択されたものを含有するものが挙げられる。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用の用語「治療剤」とは、本発明における治療において使用する1つまたはそれ以上のその治療行為を達成するかまたは達成するのに寄与する任意の薬剤であってよい。例えば、治療剤が細胞表面にガレクチン9を発現する細胞またはその細胞ホモジュネートである場合、その薬剤は、哺乳動物に投与されることができる。該治療剤は、単独で、あるいは他の薬剤（例えば、ガレクチン9改変体の投与と共に使用され且つ特定の腫瘍あるいは自己免疫などに対するその他の公知の処置法に使用されるような薬物、あるいは哺乳動物でのガレクチン9の発現を容易に行いような遺伝子送達ビヒクルなど）と組み合わせて、その治療目的を達成するものであってよい。例えば、該治療剤は、他の目的のために開発されたガレクチン9改変体を含むものであってよく、さらには、ガレクチン9のアゴニスト、ガレクチン9活性を修飾又は調節する薬物を含むものであってよく、例えば、有機低分子化合物又は物質、ペプチド、ペプチド様化合物又は物質、ガレクチン9改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ガレクチン9改変体ポリペプチド、プロテアーゼに対してネイティブなガレクチン9より安定化されているガレクチン9改変体のキメラ体あるいは変異体などを発現し且つ形質転換された細胞であってよい。

【 0 0 4 8 】

本明細書で「患者」とは、生きている生物で任意の治療又は予防処置可能なものをさしてよく、真核生物を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、患者である真核生物としては、脊椎動物であってよい。したがって、例えば、患者は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物としては、例えば、ヒトが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0049】

本発明の治療剤及び/又は診断剤の一般的製造および使用法を以下説明する。1つの態様では、本発明は、ガレクチン9が保有する生理活性又は生物活性の不足又は欠如に起因する疾患・病気・異常状態を処置する技術を提供する。該処置技術としては、例えば、本発明の細胞(例えば、T_HGAL9細胞等)含有治療剤を提供する工程及び/又は当該疾患などを有する哺乳動物に有効量の本発明の細胞(例えば、T_HGAL9細胞等)含有治療剤を投与する工程などが挙げられる。本発明の細胞(例えば、T_HGAL9細胞等)は、悪性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性、悪性腫瘍細胞に対してのアポトーシス誘導活性、悪性腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性(抗ガン活性)、活性化T細胞のアポトーシス誘導活性、特にCD4陽性T細胞のアポトーシス誘導活性、免疫調節活性、抗炎症作用、抗アレルギー作用を發揮するように使用してよく、抗腫瘍剤(抗ガン剤)、抗アレルギー剤、免疫調節剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤及び副腎皮質ステロイドホルモン代替用剤として期待できる。

10

【0050】

該処置技術は、活性化T細胞が顕著な自己免疫疾患を処置する方法を包含する。「自己免疫疾患」、および「自己免疫」とはすべて、哺乳動物での自己免疫によって特徴づけられる障害(これは、自己成分に対する免疫系の応答である)をいう。自己免疫応答は、臨床的兆候を現す症状に進展し得るものである。厳密にいえば、移植拒絶は自己免疫反応ではないが、患者が症状的に細胞、組織、または器官を置換したりあるいは移植するといった外科手術を受ける場合、同種移植を受ける体というものは、外来移植に対して免疫学的に反応するものである。種の1つのメンバーから他の種への、細胞、組織、または器官の同種移植中に、受容体(レシピエント)では移植された細胞、組織、または器官を拒絶するのに十分な免疫応答が生じる場合では、「移植拒絶」が起こるのである。

20

【0051】

本発明の方法および治療剤によって処置することができる「腫瘍」の例としては、悪性腫瘍が含まれていてよく、例えば、転移をする腫瘍は悪性腫瘍で、一般的にその悪性腫瘍は上皮性と非上皮性のものがあるとされ、ある場合には、ガン、肉腫、白血病などに区分して考えられることもあるが、単に「ガン」と呼んだ場合、一般人では悪性腫瘍を指すことが多い。本明細書で「ガン」とは、広い意味で解釈してよく、単に上皮性の悪性腫瘍と解釈すべきではない。本明細書において「ガン」とは、上皮性悪性腫瘍及び非上皮性悪性腫瘍(腫瘍形成性のものも非形成性のものも含む)を包含してよく、皮膚ガン(メラノーマを含めてよい)、乳ガン、卵巣ガン、子宮ガン、睾丸悪性腫瘍、前立腺ガン、膀胱ガン、腎ガン、甲状腺ガン、咽頭・喉頭ガン、舌ガン、上顎ガン、食道ガン、胃ガン、結腸・直腸ガン、肺・気管支ガン、肝ガン(肝細胞癌、肝内胆管ガンを含む)、肝外胆管・胆嚢ガン、膵臓ガン、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、悪性血管腫、悪性血管内皮腫、脳腫瘍(メニンギオーマ、グリオーマ、アストロサイトーマなどを含む)等が挙げられるが、これらに限定されることなく、本発明の細胞(例えば、T_HGAL9細胞等)を使用することで好ましい結果が得られるもの、さらには本発明の細胞(例えば、T_HGAL9細胞等)が関与して何らかの生理的又は生物学的な応答が得られるものは含まれてよいと理解されるべきである。

30

【0052】

本発明の方法および治療剤によって処置することができる「自己免疫疾患」の例としては、多発性硬化症、橋本甲状腺炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、グッドパスチャー(Goodpasture)症候群、天疱瘡、レセプター自己免疫、自己免疫溶血性貧血、自己免疫血小板減少性紫斑病、変形性関節症、慢性関節炎リウマチ、抗コラーゲン抗体による強皮症(scleroderma)、複合化結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自発性不妊症、糸球体腎炎、水疱性類天疱瘡、アドレナリン作用性薬物耐性、慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫ベースの内分泌腺不全、白斑、脈管炎、心筋梗塞後遺症(post-myocardial infarction)、心臓穿孔症候群、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫ベースの喘息、自己免疫ベースの炎症性反応、肉芽腫症障害、強直性(alkylizing)脊椎炎、連鎖球菌感染後(poststreptococcal)糸球体腎炎、自己免疫溶血性貧血、脳炎、リンパ腫に対

40

50

する二次的自己免疫反応、変性障害、萎縮性障害などが挙げられる。レセプター自己免疫を表す自己免疫疾患としては、例えば、グレーブス病、重症筋無力症、インスリン耐性症などが挙げられる。アドレナリン性薬物耐性の自己免疫疾患としては、例えば、喘息および嚢胞性線維症などが挙げられる。

【0053】

本発明における他の自己免疫疾患としては、例えば、動物モデルが存在するものが挙げられ、例えば、シェーグレン症候群（自己免疫涙腺炎(dacryodentis)または免疫媒介唾液腺炎）、自己免疫心筋炎、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、炎症性心臓病、水銀誘導性腎自己免疫、インスリン依存性糖尿病(1型糖尿病またはIDD)、胸腺切除術後自己免疫、中枢神経系(CNS)脱髄障害、CNS狼瘡、睡眠発作、免疫媒介PNS障害、変形性関節症、慢性関節炎リウマチ、ブドウ膜炎、髄質嚢胞性線維症、自己免疫溶血性疾患、自己免疫脈管炎、卵巣自己免疫疾患、ト強皮症(scleroderma)などが挙げられる。中枢神経系(CNS)脱髄障害によって特徴づけられる自己免疫疾患としては、例えば、多発性硬化症(MS)などが挙げられる。末梢神経系(PNS)自己免疫疾患は、例えば、ギヤン-バレー症候群(GBS)であってよい。

10

【0054】

本発明は、ガンなどの悪性腫瘍を含む腫瘍、アレルギー性疾患、炎症、免疫異常、活性化リンパ球（特には活性化T細胞が挙げられ、また活性化B細胞を含んでいてもよい）を含む自己免疫疾患などの疾患や病気に悩む哺乳動物を、本発明の細胞（例えば、 T_H GAL9細胞等）、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを含む治療剤（例えば、治療活性成分として本発明の細胞（例えば、 T_H GAL9細胞等）もしくは当該細胞刺激剤などを含む組成物）の投与により処置する方法を開示するものである。本発明の方法および組成物により処置されることのできる自己免疫疾患としては、任意の自己免疫疾患または移植拒絶（例えば、本明細書中に列挙される自己免疫疾患を含むが、それらに限定されない）が挙げられる。

20

本発明に関し、ガンなどの悪性腫瘍細胞を含む腫瘍細胞に対して細胞傷害作用を得たり、抗アレルギー作用を得たり、抗炎症作用を得たり、免疫異常を正常化せしめたり、活性化リンパ球（特には活性化T細胞を含んでいてもよい）に対してアポトーシスを誘導せしめる場合も、上記自己免疫の場合と同様に理解されるべきである。

【0055】

本発明の細胞（例えば、 T_H GAL9細胞等）、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを含むものは、抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤、副腎皮質ステロイドホルモンと同様な活性を利用する薬剤として有望で、次に示すような病的症状並びに疾患に対して有用な生物活性を示すと考えられる。

30

炎症性疾患には、各臓器でおこる種々の急性および慢性炎症、アレルギー性および自己免疫性の炎症、感染症等がある。

急性および慢性疾患としては、肺炎では、例えば、気管支炎、気管支肺炎、間質性肺炎、肺臓炎、細気管支炎や急性縦隔炎などが挙げられ、さらにその他の臓器の炎症、例えば、心外膜炎、心内膜炎、心筋炎、口内炎、口角炎、扁桃炎、咽頭炎、喉頭炎、食道炎、腹膜炎、急性胃炎、慢性胃炎、急性腸炎、虫垂炎、虚血性大腸炎、薬物性大腸炎、直腸炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎などの種々の急性および慢性肝炎や肝硬変、胆嚢炎、急性膵炎、慢性膵炎、また急性および慢性腎炎、膜性腎炎、糸球体腎炎、IgA腎症などや、種々の膀胱炎、脳髄炎、乳腺炎、皮膚炎、表層角膜炎、乾性角結膜炎、種々の中耳炎や鼻炎、副鼻腔炎や鼻茸など、歯肉炎、歯周炎、歯周囲炎など、種々様々な炎症が含まれる。

40

【0056】

また、本発明の細胞（例えば、 T_H GAL9細胞等）、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを含むものは、例えば、神経性炎症（例えば、神経性胃炎、神経性膀胱炎など）にも効果を発揮し得る。例えば、ガレクチン9はカプサイシン誘導神経性皮膚炎症モデルにおいて、その炎症反応に対する強い抑制効果が認められた。カプサイシンは末梢神経を刺激することにより、神経性炎症や痛みを引き起こす物質である。カプ

50

サイシンは、知覚神経C線維末端に貯蔵されている神経ペプチドであるサブスタンスPの遊離刺激作用を有する。サブスタンスPは肥満細胞からヒスタミンを遊離させる作用を有し、その結果血管が拡張され、浮腫が生じる。また、遊離されたヒスタミンにより知覚神経が刺激を受け、C線維末端からサブスタンスPが放出され、その周囲の肥満細胞に作用し、更にヒスタミンを遊離させるという増強サイクルが成立する。ガレクチンはこの病態形成の抑制作用を有する。

【0057】

さらに、カプサイシンは、感覚神経終末の痛み受容センサーであるカプサイシン受容体（パニロイドレセプター）に結合し、痛みを引き起こす。痛みは化学的刺激（酸など）、熱刺激（熱湯など）や過剰な機械的刺激（打撲など）によって感覚神経終末が活性化されることによって引き起こされ、カプサイシン受容体はこのような刺激による痛みにも関与している。そこで、ガレクチン9がカプサイシン受容体による神経終末の活性化を抑制することが示唆され、ガンや炎症に伴う痛みの軽減等、鎮痛作用への可能性も期待できる。

アレルギー性炎症疾患には、全身性アナフィラキシー、気管支喘息、過敏性肺炎、花粉症、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、免疫複合体がおこすアレルギー性疾患、血管神経性浮腫等が挙げられる。

【0058】

また、自己免疫性の炎症（自己免疫疾患）には、全身性（慢性関節リウマチ、全身性エリトマトーデス（エリテマトーデス）、結節性多発性動脈炎、強皮症、多発性筋炎・皮膚筋炎、シェーグレン症候群、ベーチェット病など）、神経系（多発性硬化症、重症筋無力症、HAM(HTLV-1脊髄症)、筋萎縮性側索硬化症など）、内分泌性（バセドウ病、橋本病、1型糖尿病など）、血液（特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血、再生不良性貧血など）、呼吸器（サルコイドーシス、肺繊維症など）、消化管（潰瘍性大腸炎、クローン病など）、肝臓（自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性胆管炎など）、腎・尿路系（抗好中球細胞質抗体関連腎炎、血管炎、グッドパスチャー症候群、抗糸球体基底膜抗体病など）等がある。

【0059】

感染症は、病原体が生体の細胞・組織・臓器を傷害することによって生じる疾患の総称である。なお、感染症については、監修：町並陸生、編集：秦順一、坂本穆彦、「標準病理学（第2版）」、医学書院、2002年3月15日発行を参考にすることができる。ヒトに感染症をもたらす病原体には、1）細菌（スピロヘータ、クラミジア、リケッチアを含む）、2）ウイルス、3）真菌、4）植物（藻類）、5）原虫、6）寄生虫（吸虫、条虫、線虫）、7）節足動物がある。各病原体がもたらす主な疾患には、細菌性感染症（コレラ、ペスト、大腸菌感染症など）、スピロヘータ感染症（レプトスピラ症など）、クラミジア感染症（オウム病など）、リケッチア感染症（発疹チフス、破傷風など）、ウイルス性感染症（帯状疱疹、ウイルス性出血熱、狂犬病など）、真菌症（カンジダ症、クリプトコッカス症、アスペルギウス症など）、原虫性疾患（アメーバ赤痢、マラリア、トキソプラズマ症など）、寄生虫（吸虫症、線虫症など）、その他、マイコプラズマ感染症（マイコプラズマ肺炎など）、ミコバクテリア感染症（結核、非定型抗酸菌症など）が挙げられる。

【0060】

ガンおよび肉腫については、脳腫瘍（多型性膠芽腫など）、脊髄腫瘍、上顎洞ガン、膵液腺ガン、歯肉ガン、舌ガン、口唇ガン、上咽頭ガン、中咽頭ガン、下咽頭ガン、喉頭ガン、甲状腺ガン、副甲状腺ガン、肺ガン、胸膜腫瘍、癌性腹膜炎、癌性胸膜炎、食道ガン、胃ガン、大腸ガン、胆管ガン、胆嚢ガン、膵臓ガン、肝ガン、腎臓のガン、膀胱ガン、前立腺ガン、陰茎ガン、精巣腫瘍、副腎のガン、子宮頸ガン、子宮体ガン、膣ガン、外陰ガン、卵巣ガン、繊毛上皮腫、悪性骨腫瘍、軟部肉腫、乳ガン、皮膚ガン、悪性黒色腫、基底細胞腫、白血病、骨髄化性を伴う骨髄線維症、悪性リンパ腫、ホジキン病、形質細胞腫、グリオーマなどが挙げられる。

【0061】

10

20

30

40

50

本発明によれば、例えば、前述のとおり、前記本発明の細胞を含むか又は含まない動物組織において、前記本発明の細胞検出方法により、前記本発明の細胞を定性的又は定量的に検出することにより、動物の疾患又は前記疾患に由来する症状を診断することができる。前記動物の疾患は、特に限定されないが、例えば、前述の各疾患が挙げられる。また、本発明によれば、例えば、前述のとおり、動物の疾患の治療効果の判定方法は、前記動物に対し、前記疾患の治療を行う工程と、前記治療の前後において、それぞれ、本発明による前記動物の疾患又は前記疾患に由来する症状の診断方法により、前記疾患又は前記疾患に由来する症状を診断する工程と、前記治療の前後における前記診断結果を対比する工程とを含む方法により、動物の疾患の治療効果を判定することができる。前記動物の疾患は、特に限定されないが、例えば、前述の各疾患が挙げられる。

10

【実施例】

【0062】

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

【0063】

以下の実施例は、当業者であれば、当該実施例における詳細な記載及び本願出願時の技術常識に基づいて、過度の試行錯誤を要することなく実施することができる。また、以下の実施例において、観察された現象が起こるメカニズムの考察を示している場合は、そのメカニズムは、可能性の一つを示すものであって、本発明を限定するものではない。

20

【0064】

〔実験材料及び方法〕

以下に、特に重要な実験材料及び方法の詳細を記す。

(リコンビナントガレクチン9)

本実施例で用いたリコンビナントガレクチン9は、全てヒト安定化ガレクチン9 (G9NC(null))であり、既報(非特許文献12、33、特許文献1)の方法に準じて調製した。標品はSDS-PAGE及びクマシー・ブリリアントブルー染色によるタンパク質純度検定で95%以上、またリムラス比濁動態試験によるエンドトキシン混入量は1mgヒト安定化ガレクチンあたり0.1ng以下であった。また、ヒト安定化ガレクチン9のマウスTim-3への結合親和性はマウスガレクチン9と同等である。モル濃度の計算は分子量33065として行った。

30

【0065】

なお、特許文献1に記載の、ヒト安定化ガレクチン9 (G9NC(null))の調製方法は、下記のとおりである。

【0066】

(A) ガレクチン9 改変体発現ベクターの構築

発現ベクターの作製には、

(1) Jurkat細胞のpoly(A)⁺RNA画分から調製したcDNA

(2) pET-11aベクター (STRATEGENE)

40

(3) PCR用プライマー：

G9NCRD1：CGTCCTCATATGGCCTTCAAGCGGTTC C C A G 配列番号1

G9NCRD6：CGACCGCATATGCTGGAAGCTGATGTAGGACA G 配列番号2

G9CCR D5：CGTCCTCATATGACTCCCGCCATCCACCTAT G 配列番号3

G9CCR D6：CGACCGGGATCCCTATGTCTGCACATGGGTCA G 配列番号4

を使用した。

50

【0067】

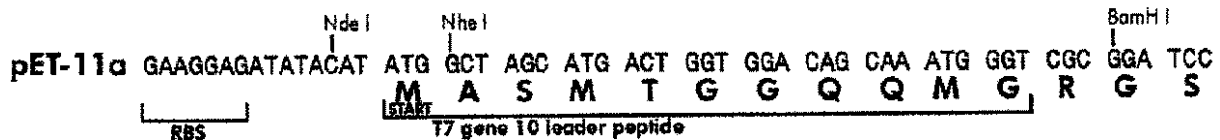
Jurkat細胞（T細胞由来細胞）は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）より入手した。セルラインは、10% FCSを添加したRPMI-1640培地（Sigma、セントルイス、米国）中で5% CO₂の条件下37℃で維持した。Jurkat細胞からのtotal RNAの抽出は、次のようにして行った。すなわち、10% FBSを含むRPMI-1640培地を用いて培養したJurkat細胞を遠心して集める。10mlのPBSで細胞を2度洗浄する。洗浄した細胞の沈殿に、細胞2 × 10⁸個あたり15mlのISOGEN（商品名：ニッポンジーン）を加え、マニュアル（ニッポンジーン）に従ってtotal RNAを抽出する。total RNAからのpoly(A)⁺RNAの精製とcDNA合成は、次のようにして行った。すなわち、Jurkat細胞から抽出したtotal RNAを、1mg/mlの濃度になるようDEPC処理水に溶解する。PolyATtract mRNA Isolation System（商品名：Promega）を用い、マニュアルに従ってtotal RNAからpoly(A)⁺RNAを精製する。精製したpoly(A)⁺RNAを5µg/20µlの濃度になるようDEPC処理水に溶解する。First-Strand cDNA Synthesis Kit（商品名：Amersham Biosciences）を用い、マニュアルに従って5µgのpoly(A)⁺RNAからcDNAを合成する（プライマーにはNot I-d(T)₁₈を使用する）。

10

【0068】

次に、下記スキームに示す手順でpET-11aベクターのNdeI-BamHI siteにガレクチン9のN-末端側糖鎖結合ドメイン（N-terminal carbohydrate recognition domain, NCRD）とC-末端側糖鎖結合ドメイン（CCRD）を挿入し、リンカーペプチドを欠く改変型ガレクチン9（G9NC (null)）の発現ベクターを作製した。

20



30

↓ Nde I + Bam HI 処理

G9CCRD 挿入

↓ Nde I 処理、脱リン酸化

G9NCRD 挿入

40

G9NC (null)

【0069】

まず、ガレクチン9 cDNAからそれぞれ（1）ヒトガレクチン9のC-末端側CRDに対応するcDNAと（2）ヒトガレクチン9のN-末端側CRDに対応するcDNAを取得した。すなわち、cDNAからPCR用プライマー：G9CCRD5 + G9CCR

50

D6を用いてヒトガレクチン9のC-末端側CRDに対応するcDNA(G9CCRD)を増幅した。G9CCRDを制限酵素(NdeI+BamHI)で切断した後、同じ制限酵素で処理したpET-11aベクターに挿入してpET-G9CCRDを得た。PCRは、KOD DNA polymerase kit(TOYOBO Code No. KOD-101)を使用して行った。PCR Reaction mixture(dNTP mix, 25mM MgCl₂, 10x Buffer, KOD DNA polymerase(0.05u), プライマー及び鋳型cDNA)を以下のようなPCRのサイクルの条件で反応させた: 94 で2分処理した後、サイクル(98 で15秒、次に65 で2秒、そして74 で30秒処理)を25回行い、最後に4 で反応を停止した。PCR増幅された断片のベクターへの挿入は、Ligation high kit(TOYOBO Code No. LGK-101)を使用して行った。反応は、インサート:ベクターのモル比を約5:1で混合し、その総DNA溶液(体積)量の1/2(体積)量の試薬Ligation highを加えて混合して行った。16 で16時間(O/N)反応させることで挿入した。

10

【0070】

一方、該ガレクチン9cDNAからPCR用プライマー:G9NCRD1+G9NCRD6を用いてヒトガレクチン9のN-末端側CRDに対応するcDNA(G9NCRD)を増幅した。G9NCRDを制限酵素(NdeI)で切断した後、得られた断片を同じ制限酵素(NdeI)で処理し、さらに脱リン酸化したpET-G9CCRDに挿入してpET-G9NC(null)を得た。PCR増幅並びにベクターへの組み込みは上記と同様にして行った。pET-G9NC(null)は、ヒトのM型ガレクチン9の第149番目のProから第177番目のSerまでの29個のアミノ酸配列をHis-Met配列に置き換えたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。すなわち、下記配列番号5で示される塩基配列を持つものであり、下記配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。

20

(配列番号5)

tac cca tcc aag tcc atc ctc ctg tca ggc act gtc ctg ccc agt gct 576
 Tyr Pro Ser Lys Ser Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala
 180 185 190

cag agg ttc cac atc aac ctg tgc tct ggg aac cac atc gcc ttc cac 624
 Gln Arg Phe His Ile Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His
 195 200 205

ctg aac ccc cgt ttt gat gag aat gct gtg gtc cgc aac acc cag atc 672
 Leu Asn Pro Arg Phe Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile
 210 215 220

gac aac tcc tgg ggg tct gag gag cga agt ctg ccc cga aaa atg ccc 720
 Asp Asn Ser Trp Gly Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro
 225 230 235 240

ttc gtc cgt ggc cag agc ttc tca gtg tgg atc ttg tgt gaa gct cac 768
 Phe Val Arg Gly Gln Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His
 245 250 255

tgc ctc aag gtg gcc gtg gat ggt cag cac ctg ttt gaa tac tac cat 816
 Cys Leu Lys Val Ala Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His
 260 265 270

cgc ctg agg aac ctg ccc acc atc aac aga ctg gaa gtg ggg ggc gac 864
 Arg Leu Arg Asn Leu Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp
 275 280 285

atc cag ctg acc cat gtg cag aca tag 891
 Ile Gln Leu Thr His Val Gln Thr
 290 295

(配列番号 6)

10

20

30

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
 20 25 30

10

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
 35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
 50 55 60

20

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly
 65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
 85 90 95

30

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val
 100 105 110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe
 115 120 125

40

His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr
 130 135 140

Ile Ser Phe Gln His Met Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro

145 150 155 160

His Pro Ala Tyr Pro Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu
165 170 175

Tyr Pro Ser Lys Ser Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala
180 185 190

Gln Arg Phe His Ile Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His
195 200 205

Leu Asn Pro Arg Phe Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile
210 215 220

Asp Asn Ser Trp Gly Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro
225 230 235 240

Phe Val Arg Gly Gln Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His
245 250 255

Cys Leu Lys Val Ala Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His
260 265 270

Arg Leu Arg Asn Leu Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp
275 280 285

Ile Gln Leu Thr His Val Gln Thr
290 295

[0 0 7 1]

10

20

30

40

50

(B) ガレクチン9 改変体組換え蛋白質の発現及び精製

上記工程(A)で得られた発現用プラスミドベクター pET-G9NC (null) を大腸菌 (BL21 (DE3)) に導入した。導入は、エレクトロポレーション法により行った。すなわち、competent BL21 (DE3) とプラスミドベクター水溶液を混合し、1.8 kV の電圧でのエレクトロポレーション法によりトランスフェクションを行った。

【0072】

組換え蛋白質の発現は、大腸菌を2% (w/v) グルコース及び100 µg/ml アンピシリン含有 2 × YT 培地中で培養し、600 nm での吸光度が0.7に達した時点で0.1 M イソプロピル-D-チオガラクトピラノシドを添加(最終濃度、0.1 mM)して、組換え蛋白質の発現を誘導して行った。20 で18時間培養した後、遠心により菌体を集め、10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF に懸濁した。懸濁液を10分間音波処理した後、10% (w/v) Triton X-100 を加え(最終濃度、1%) 4 で30分間攪拌した。15,000 × g で30分間遠心し、得られた上清液中の組換えタンパク質を、ラクトース-アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。エンドトキシンの除去にはセルファインETクリーンL(チッソ)を用い、エンドトキシンが除去されたことはトキシノメーターを用いたリムラス比濁キネティック法によって確認した。

10

【0073】

結果、純度の高い標品が比較的高い収率で得られた。得られた組換え蛋白質の電気泳動の結果を図28に示す。SDS-PAGE 条件は次の通りである: Gel, Acrylamide-BIS (12% gel), 電気泳動用バッファ, 25 mM Tris-192 mM グリシン-0.1% SDS, 泳動条件, 180 V, 45 min., 染色, CBB, 60 / 30 min. 電気泳動サンプルは、Strata CleanTM Resin (Stratagene) に吸着させ、1 × sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (W/V) 2-ME, Glycerol) で0.2 mg/ml に調整し、98 / 3 min. の熱処理後レーンあたり約2 µg のタンパク量で電気泳動をした。精製されたG9NC (null) は、4 で600日間以上安定に保存することができた。

20

【0074】

(抗体)

細胞の染色には、以下の抗体を用いた。抗マウスCD4-FITC抗体 (Becton Dickinson または eBioscience, San Diego, CA)、抗マウスTim-3-PE抗体 (eBioscience)、抗マウスガレクチン9-Alexa488抗体(クローン108A2, Galpharma)、抗マウスガレクチン9-PE抗体(クローン108A2, Biolegend)、抗マウスCD25-APC抗体(Biolegend)、抗マウスFoxp3-APC抗体(eBioscience)、抗ヒト/マウスLAP-PE抗体(R&D Systems)、抗マウスNKG2D-PE抗体(Biolegend)、抗マウスLAG-3-PE抗体(Biolegend)、抗マウスCTLA-4-PE抗体(Biolegend)、抗マウスIL-17抗体-(FACS用)、抗マウスPDCA-1-APC抗体(Biolegend)、抗マウスCD11c-Alexa488抗体(Biolegend)、抗マウスCD19抗体(Biolegend)、抗マウスGL-7抗体(Biolegend)、抗マウスCXCR4抗体(Biolegend)、抗マウスICOS-PE抗体(eBiosciences)、抗マウスCXCR5-APC抗体(BD Pharmingen) 抗ヒトガレクチン9-Alexa488抗体(クローン9M1-3, Galpharma)、抗ヒトCD4-FITC抗体(Biolegend)、抗ヒトCD4-PE抗体(Biolegend)、抗ヒトCD25-APC抗体(Biolegend)、抗ヒト/マウスFoxp3-PE抗体(Biolegend)、抗マウスIL-10抗体(Biolegend)、抗マウスIL-10中和抗体(R & D Systems)、抗マウスIL-10R中和抗体(R & D Systems)、抗マウスTGF-中和抗体(R & D Systems)。

30

40

【0075】

(その他の試薬)

アポトーシス測定にはAnnexin V-EGFP Apoptosis Detection kit (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)を用いた。細胞内部抗原の染色にはBD Cyt ofix/Cytoperm Kit(Becton Dickinson)を用いて細胞の固定化及び細胞膜浸透化を行っ

50

た。これらのキットはメーカー提供の使用説明書に従って用いた。

【0076】

(フローサイトメトリー)

染色した細胞の測定はFACS Calibur (Becton Dickinson)を用いて行い、データの解析にはFlowJo software (Tree Star, Ashland, OR)を用いた。細胞の分取が必用な時にはFACS Aria (Becton Dickinson)を用いた。

【0077】

(ELISA)

ヒトガレクチン9濃度の定量は既報の方法に従って行った(非特許文献34)。

マウスガレクチン9濃度の定量は既報の方法(非特許文献16)に準じ、以下の3点を改良して行った。一つ目はプレートにコートする抗マウスガレクチン9抗体をクローン108A2(Galpharma)に変更した点で、二つ目は検出用の抗体にビオチンラベルした抗マウスガレクチン9ポリクローナル抗体 (Galpharma)を用いた点、三つ目は検出用抗体の変更に伴って三次抗体の代わりに西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン(Endogen)を用いて発色反応を行った点である。この系はマウスガレクチン9を特異的に検出し、測定サンプル中にヒト安定化ガレクチン9が30 nMで添加されていても反応しない。マウスまたはヒトIL-17A、マウスTNF- α 、マウスIL-12、マウスIFN- γ 、マウスIL-13の検出はそれぞれ適当なDuoSet (R&D Systems)を、マウスIL-10の検出にはMouse IL-10 ELISA MAX Standard (Biolegend)を、抗マウスSRBC IgMの検出には、Mouse Anti-SRBC IgM ELISA Kit (Life Diagnostics)、マウス全IgM抗体及びマウス全IgG抗体の検出はそれぞれMouse Total IgM ELISA KitとMouse Total IgG ELISA Kit (共にBethyl)を、抗dsDNA抗体の検出はレビス 抗dsDNA - マウス ELISA KIT (シバヤギ)を用い、それぞれメーカー提供の使用説明書に従って行った。

10

20

30

40

50

【0078】

(動物)

C57BL/6J マウス及びMRL/MpJUmmCrj-1pr/1prマウスは日本チャールズリバー (Yokohama, Japan)より、同系統のガレクチン9ノックアウトマウス及びマウスガレクチン9トランスジェニックマウスはGalpharma (Takamatsu, Japan)より入手した。Lewis系ラット(LEW/Ssn)は日本エスエルシー (Hamamatsu, Japan)より入手した。実験に供するマウスには12時間毎の昼夜リズムと自由に採食・採水できる通常的环境を与え、国法と国際指針に準拠した人道的な配慮のもと飼育した。また本研究プロトコールは香川大学実験動物委員会の承認済みである。

【0079】

以下に実験方法を説明する。

〔マウスナイーブT細胞の単離と培養〕

CD4⁺ CD62L⁺ナイーブT細胞は8~10週齢の雄性C57BL/6Jマウスより得た脾臓細胞よりCD4⁺CD62L⁺ T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用い、メーカー提供の使用説明書に従って単離し、純度は94%以上のナイーブT細胞を得た。ナイーブT細胞を10%の加熱非動化済みの牛胎児血清及びpenicillin G (10 IU/ml, Sigma-Aldrich)とstreptomycin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich)を含むRPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)培地中に懸濁し、抗CD3抗体を1 µg/mlの濃度でコーティングした96-wellプレート(Becton Dickinson) に2x10⁵ cells/0.1ml/ wellの密度で播種して抗CD28抗体(2 µg/ml, Becton Dickinson)を添加後に72-96時間37度のCO₂インキュベーター内で培養した。T_H17細胞分化誘導にはこの系中にヒトTGF- β 1 (3ng/ml, R&D systems)、マウスIL-2 (5ng/ml, R&D systems) 及びマウスIL-6 (20ng/ml, R&D systems) を添加した。T_H1細胞分化誘導にはマウスIL-12(10 ng/ml, R&D systems)及び抗IL-4抗体(10 µg/ml, Becton Dickinson) を、T_H2細胞分化誘導にはマウスIL-4 (20ng/ml, R&D systems)及び抗IL-12抗体(10 µg/ml, Becton Dickinson)を添加した。Tr1分化には抗CD3抗体を10 µg/mlの濃度でコーティングした96-wellプレートを用い、2 µg/mlの抗CD28抗体と25 ng/mlのIL-27存在下でナイーブT細胞を3日間培養した。ま

た実験によってはヒト安定化ガレクチン9 (30nM)、ラクトース(3, 10, 30mM)、スクロース (3, 10, 30 mM)、抗Tim-3中和抗体 (10 µg/ml, eBioscience)やラットIgG2a (10 µg/ml, eBioscience)等を添加して培養した。

【0080】

〔T_HGAL9細胞のT_H17細胞分化への作用〕

CD25陰性T_HGAL9(細胞表面にガレクチン9を発現しているCD25⁻CD4⁺T細胞)とnon-T_HGAL9細胞(細胞表面ガレクチン9⁻CD25⁻CD4⁺T細胞)はソーティングで単離した(細胞純度97%以上)。一方、ナイーブT細胞をT_H17分化誘導条件下で6時間培養してT_H17への分化をコミットさせた後に回収し、CD25陰性T_HGAL9またはnon-T_HGAL9細胞と1:1(5x10⁴ cells:5x10⁴ cells)の比で混合し、その後はTCR刺激のみで90時間培養した。ガレクチン9の作用を阻害するには、系中に30 mMのラクトースを添加した。

10

【0081】

〔ヒトCD4⁺T細胞の単離と培養〕

末梢血単核細胞は健常人の抹消血を比重分離液 (リンホセパール、Nakalai Tesque, Kyoto, Japan)に重層し、メーカー提供の使用説明書に従って遠心分離して単離した。得られた抹消血単各細胞よりCD4⁺T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec)を用い、メーカー提供の使用説明書に従ってCD4⁺T細胞を単離した。CD4⁺T細胞をTCR刺激するには、マウスナイーブT細胞の培養と同様に、細胞を10%の加熱非動化済みの牛胎児血清及びpenicillin Gとstreptomycinを含むRPMI 1640培地中に懸濁し、抗CD3抗体を1 µg/mlの濃度でコーティングした96-wellプレートに2x10⁵ cells/0.1 ml/wellの密度で播種して抗CD28抗体 (2 µg/ml, Becton Dickinson)を添加後に96時間培養した。

20

この培養細胞よりヒトT_HGAL9細胞及びヒトnon-T_H17細胞を分離するには細胞を抗ヒトガレクチン9-Alexa488抗体(クローン9M1-3、Galpharma)で染色し、FACS Ariaを用いてソーティングした。ソーティング後の細胞純度は97%以上であった。細胞は上記のTCR刺激下でさらに96時間培養し、実験に供した。ヒトCD4⁺T細胞のT_H17細胞への分化誘導は既報(非特許文献35)の方法を用いた。簡潔には、上記TCR刺激に加えてヒトIL-2(5 ng/ml, R&D systems)を用い、さらにヒトIL-1 (50 ng/ml, R&D systems)または同IL-1とIL-6の組合せ、もしくは同IL-1とマウスIL-23 (50 ng/ml, R&D systems)の組合せ刺激下で9日間培養した。

30

【0082】

〔リアルタイムRT-PCR〕

mRNAの定量は既報に準じてリアルタイムRT-PCR法で行い、増幅した核酸の染色にSYBR Green Iを、測定にはABI PRISM 7000 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いた(非特許文献36)。プライマーはタカラバイオ (Otsu, Japan)より購入した。特定のmRNA発現量は同方法によって定量されたglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のmRNA発現量を内部標準としてその比で表した。

【0083】

〔統計解析〕

データの統計解析には解析ソフトPrism(Graphpad software)を用い、nonparametric two-tailed Mann-Whitney法、Logrank test法、及び2-way ANOVA法等によって統計的な有意差の有無を判定し、p<0.05を持って有意とした。棒グラフまたは折れ線グラフのデータは全てMean±SEM(n>3)である。

40

【0084】

〔実験結果と考察〕

〔ヒト安定化ガレクチン9はラット関節炎に持続的な治療効果を示す〕

図1にラットコラーゲン誘導性関節炎におけるヒト安定化ガレクチン9の治療効果を示す。感作に用いるコラーゲン溶液は以下の要領で用事調整した。ウシタイプIIコラーゲン(B CII; Collagen Research Center)とMuramyl dipeptide(MDP; Peptide Institute)をそれぞれ1.6 mg/mlと0.4 mg/mlになるように混合し、それと同体積のincomplete Freund's adjuvant(IFA; Difco)を添加して混合し、乳化した。このコラーゲン溶液をLew

50

is rat (, 6~7週齢)一匹あたり1mlを背部の皮内に投与した (Day0)。投与は少なくとも10箇所/ラットに分散して行った。7日目に同様に調製したコラーゲン溶液0.3ml/ラットを尾基底部にブースター投与した。安定化ガレクチン9はブースター投与後7日目より表示の用量・スケジュールで皮下投与した (a)。関節炎発症に伴う足の腫脹の測定は2人の観察者がそれぞれ独立にplethysmometer (Muromachi Kikai Co., Ltd)を用いて行った。両後足の体積の合計を経時的に測定し、初期値からの変化割合 (%) で表した。ヒト安定化ガレクチン9を本モデルにおいて週3回皮下投与すると、既に発症した関節の腫れを用量依存的に縮小し、0.06mg/kgでほぼ完全な治療効果を呈した (b)。次に投与量を0.6mg/kgに固定して週1回と週2回投与で治療効果を比較したところ、両者共にほぼ同等の治療効果を示した (c)。皮下注射により薬効が持続する例はよく知られており、例えば抗体薬では皮下投与すると徐々に血中に放出されるため、全身投与と比較して体内により長く循環する。

【0085】

〔ヒト安定化ガレクチン9皮下投与における体内動態〕

そこで安定化ガレクチン9皮下投与時の体内動態を調べた。Lewis rat (, 6~7週齢)に表示の用量のヒト安定化ガレクチン9を単回皮下投与し、投与前 (0分)、投与後5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、16時間、24時間、48時間及び72時間に経時的に血漿採血し、血中安定化ガレクチン9濃度を特異的なELISAによって測定した。ELISAの一次抗体は抗ヒトガレクチン9モノクローナル抗体9S2-3を用いた。この抗体はガレクチン9のN末側の糖鎖認識ドメインを認識し、SDSで変性したヒトガレクチン9には反応しないことより、正しい立体構造のタンパク質を認識すると考えられる。一方、二次抗体には抗ヒトガレクチン9CTウサギポリクローナル抗体を用いた。この抗体はウサギをヒトガレクチン9のC末側の糖鎖認識ドメインで免疫して調製し、他のガレクチンに対する交差反応は吸収除去してある。また本ELISAはマウス及びラットのガレクチン9に交差しない。つまり本ELISAは分解・変性を受けていない完全なヒト安定化ガレクチン9を測定することが出来る。

血中ヒト安定化ガレクチン9濃度を元にモーメント解析ソフトウェア (田端健司、藤沢薬品工業、京都大学大学院薬学研究科より提供) を使用し、モーメント解析法による薬物動態解析を行った。その結果、図2及び表2に示すように、血中の安定化ガレクチン9濃度は非常に低く、先の関節炎モデルで十分な治療効果を示した0.6mg/kg投与では血中最高濃度が0.943ng/ml、 $t_{1/2}$ が7.6時間、MRTが12.5時間であった。In vitroのIL-17産生抑制においては安定化ガレクチン9の効果がみられるのが10nM (約0.3 μ g/ml)以上の濃度が必要で、30nM (約1 μ g/ml)で統計的有意差が見られた (非特許文献7)。つまり血中に出て来たヒト安定化ガレクチン9が薬効を示すとは考えられず、恐らく投与部位及びリンパ管・リンパ節を経由する比較的高濃度の間に免疫系細胞に影響を与えていると想像される。また投与後速やかに体内から排出されることは本実験および別の体内動態試験より確認されている。つまり安定化ガレクチン9の持続した薬効は投与時から短い間に作用を受けた細胞に担われており、安定化ガレクチン9の直接的な作用では無いと考えられる。生体内にはガレクチン9を産生・放出して免疫を制御している細胞が存在しているのは、前記背景技術において説明したように自明であるがその同定は非常に困難である。ガレクチン9を分泌して免疫を制御している細胞を同定することは、ガレクチン9の作用メカニズムの詳細を解明することと合わせて重要な課題であり、それを達成することは医学・産業への大きな貢献となる。

〔ガレクチン9はEAEを抑制する内在性因子である〕

図3に、MOG誘導性実験的アレルギー性脳炎 (EAE) へのガレクチン9の治療効果を示す。このモデルでの脳炎発症はTh17依存的であることが知られている。(a)EAE発症には雌性C57BL/6Jマウス (WT) または同系統のガレクチン9ノックアウトマウス (Gal-9 KO) を用いた。300 μ gのMycobacterium tuberculosis (H37RA, Difo) を添加したCFA中に調製した150 μ gのMOG (35-55) ペプチドをマウスに皮下投与して感作し、その同日及び2日後に200ngのpertussis toxin (List Biological Laboratory) を静脈投与し、経時的に臨床ス

10

20

30

40

50

コアを目視により記録した。臨床スコアは以下の基準によって判定した。

- 臨床スコア0: 異常なし
 臨床スコア1: 尾の緊張低下
 臨床スコア2: 後肢の不全対麻痺
 臨床スコア3: 後肢の対麻痺
 臨床スコア4: 四肢麻痺
 臨床スコア5: 瀕死又は死亡

【0086】

(b)感作後20週目の上記マウス脊髄のヘマトキシリン/エオシン染色と、抗CD3抗体による免疫染色。野生型(WT)と比較してガレクチン9ノックアウトマウス(Gal-9^{-/-})の脊髄には細胞の浸潤と組織破壊が顕著に見られた。浸潤細胞の多くはCD3陽性であることよりT細胞だと考えられる。

10

(c)感作後20週目のEAE感作野生型マウス(WT)、EAE感作ガレクチン9ノックアウトマウス(Gal-9 KO)および週齢をあわせた未感作マウス(Naive)より脾臓細胞を調製し、CD4、CD25、IL-17及びFoxp3抗体で染色した。ガレクチン9ノックアウトマウスでは野生型に比してCD4⁺CD25⁺IL-17⁺細胞が有意に増加しており一方CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞は有意に減少していた。

【0087】

(d)ナイーブT細胞を野生型マウス(WT)及びガレクチン9ノックアウトマウス(Gal-9 KO)の脾臓細胞より調製し、抗CD3抗体をコーティングした96-well plate (Becton Dickinson) に2x10⁵ cells/0.1 ml/ wellの密度で播種して抗CD28抗体(2 µg/ml, Becton Dickinson)を添加後に96時間培養した(No skewed)。T_H17細胞分化誘導にはこの系中にヒトTGF-1(3 ng/ml, R&D systems)、マウスIL-2(5 ng/ml, R&D systems)及びマウスIL-6(20 ng/ml, R&D systems)を添加した条件で96時間培養した(T_H17 skewed)。それぞれの細胞培養上清中のIL-17A濃度をELISAで定量したところ、T_H17分化誘導刺激によってIL-17A発現は著明に誘導されるが、その誘導は野生型に比べてガレクチン9ノックアウトマウスの方が有意に高かった。

20

【0088】

(e)上記で培養上清を抽出後に残った細胞内のIL-10 mRNA量をリアルタイムRT-PCR法で定量した。IL-10 mRNA発現量は同方法によって測定されたglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のシグナルを内部標準とし、その比で表した。IL-10 mRNA発現レベルはNo skewed、T_H17 skewed共にガレクチン9ノックアウトマウスの方が野生型に比して有意に低かった。

30

(f)前述(a)の系で野生型雌性C57BL/6JマウスにEAEを発症させ、感作後14日目と16日目にヒト安定化ガレクチン9を0.3 µg/マウスまたは3 µg/マウスで皮下投与した。コントロール群にはPBSを投与した。感作19日目まで臨床スコアを記録し、その後マウスの脊髄をヘマトキシリン/エオシン染色した。ヒト安定化ガレクチン9投与は0.3 µg/マウスの投与で臨床スコアを低下させる傾向を示し、3 µg/マウスでは統計的に有意な臨床スコア低下を示した(p<0.05、2-way ANOVA法)。

【0089】

40

ガレクチン9ノックアウトマウスでは、野生型のマウスに比してMOG(33-55)で誘導した実験的アレルギー性脳炎(EAE)の症状がより重篤でかつ持続した(図3a)。野生型マウスではEAE発症から20週後の局所にCD3陽性細胞の浸潤は殆ど見られないが、ノックアウトマウスではCD3陽性細胞の浸潤が明らかである(図3b)。発症後20週目におけるノックアウトマウスの脾臓では野生型に比してIL-17を産生するCD4⁺CD25⁺細胞の増加とFoxp3陽性細胞の減少が観察された(図3c)。さらにノックアウトマウスのナイーブT細胞(CD4⁺CD62L⁺CD25⁻)でT_H17を分化誘導すると野生型の細胞を用いるのとは比してIL-17産生が明らかに上昇していたが(図3d)、その一方でIL-10 mRNA発現はノックアウトマウスで低下していた(図3e)。そこでガレクチン9のEAEモデルでの治療効果を検討したところ、症状が顕著になる免疫後14日よりガレクチン9を週2回皮下投与すると、0.3 µgでも臨床症状

50

及び組織学的所見が明らかに改善した(図3f)。

これらの結果はガレクチン9は内在性の免疫制御因子としてTh17/Tregバランスを調整していることを示しており、既報のマウス関節炎の実験結果より引き出された帰結(非特許文献7)がEAEにおいて更に確認・検証されたことになる。

【0090】

[ガレクチン9による T_H17 細胞分化抑制はTim3に依存しない]

図4には、ガレクチン9が、Tim3/Gal-9相互作用に依存しないで T_H17 細胞分化を抑制する効果を示す。

(a) 図3(d)の方法で、C57BL/6Jマウスより調製した $CD4^+ CD62L^+$ ナイーブT細胞に T_H17 細胞分化誘導刺激を与えた。刺激開始時を0時間とし、図に示したそれぞれの期間30 nMのヒト安定化ガレクチン9またはコントロールのPBS存在下で培養した。その後、細胞を培地で洗浄し、 T_H17 細胞分化誘導刺激を継続した。96時間目の培養上清を抽出し、培地中のIL-17濃度を前述のELISAで定量した。 T_H17 細胞分化誘導の0~18時間にヒト安定化ガレクチン9が存在すると、 T_H17 細胞分化は顕著に抑制された。一方で分化誘導前24時間のヒト安定化ガレクチン9処理は無効であった。

(b) 前述の30 nMヒト安定化ガレクチン9を T_H17 細胞分化誘導開始から24時間添加した細胞及びコントロールのPBS添加細胞のIL-17F、IL-21、IL-22及びIL23R mRNA発現をリアルタイムRT-PCR法で定量した。ヒト安定化ガレクチン9によって、これら全てのmRNA発現が有意に低下した。

【0091】

(c) ナイーブT細胞を T_H17 分化誘導刺激下で24時間培養し(T_H17 skewed)、 $CD4^+$ Tim-3+細胞をフローサイトメトリーで測定した。同分化誘導刺激よりTGF- β 1及びIL-6を除いた条件で24時間培養したナイーブT細胞をコントロールとした(No skewed)。どちらにおいてもTim-3の発現細胞はほとんど検出されなかった。また前述(a: 0~96)の条件でヒト安定化ガレクチン9による T_H17 分化誘導抑制試験を行い、ヒト安定化ガレクチン9存在時に抗Tim-3中和抗体(10 μ g/ml、Tim-3)またはアイソタイプコントロール抗体(10 μ g/ml、IgG2a)を添加した。培養96時間目の上清中のIL-17AをELISAで定量したところ、抗Tim-3抗体によるヒト安定化ガレクチン9の作用抑制は見られなかった。

(d) ナイーブT細胞を T_H17 分化誘導刺激下で96時間培養後、分化した T_H17 細胞を含む細胞集団にヒト安定化ガレクチン9(30 nM)を添加し、4時間後にアポトーシスを起こしたTim-3陽性細胞、つまり、 T_H17 をフローサイトメトリーで検出した。ヒト安定化ガレクチン9添加時に抗Tim-3抗体(10 μ g/ml、Tim-3)またはアイソタイプコントロール抗体(10 μ g/ml、IgG2a)を添加した条件でも実験を行った。ヒト安定化ガレクチン9によって T_H17 細胞のアポトーシスが誘導され、その効果は抗Tim-3抗体によって有意に抑制された。この結果は、分化した T_H17 細胞は、Tim-3依存的にガレクチン9によってアポトーシスの誘導を受けられることを示唆する。

【0092】

IL-17産生はナイーブT細胞を抗CD3抗体コーティングしたプレート中で抗CD28抗体、IL-2、TGF- β 1およびIL-6で刺激し、4日間培養すると強く誘導される。この T_H17 分化誘導系に30nMのガレクチン9を添加したところ分化開始から18時間までのガレクチン9処置によってIL-17産生は著明に抑制され、最初の24時間ガレクチン9処理を行うと4日間通してのガレクチン9処理と同等のIL-17産生抑制効果を示した(図4a)。これに反して、 T_H17 分化誘導前24時間前処置では抑制効果は無かった(図4a)。 T_H17 の分化に関連するIL-17F、IL-21、IL-22およびIL-23RのmRNAレベルを検討したところ、 T_H17 分化開始より24時間ガレクチン9処置を行った場合にはIL-17Aのみならずこれら全ての T_H17 関連遺伝子の発現が抑制されており(図4b)、そのために T_H17 細胞分化が抑制される可能性が示唆された。ガレクチン9はTim-3のリガンドであり、Tim-3発現 T_H17 細胞と相互作用してアポトーシスを誘導する(非特許文献4)。 T_H17 細胞にもTim-3の発現が報告されているので(非特許文献5~6)、ガレクチン9による T_H17 分化抑制にTim-3が関与している可能性を検討した。ところがガレクチン9が分化抑制作用を示す T_H17 細胞分化誘導開始より24時間目ではTim-3発現

10

20

30

40

50

細胞は殆ど検出されず(図4c)、またガレクチン9による T_H17 分化抑制はTim-3中和抗体を添加しても解除されなかった(図4c)。その一方で分化誘導4日目では5~10%のT細胞がTim-3を発現しており、この T_H17 細胞はガレクチン9でアポトーシスを起こし、抗Tim-3中和抗体はそれを有為に抑制した(図4d)。これらの結果は、ガレクチン9による T_H17 細胞分化抑制にはTim-3の関与は無いが、Tim-3を発現している活性化 T_H17 細胞のアポトーシス誘導にはTim-3が関与していることを強く示唆する。

【0093】

〔ガレクチン9による T_H17 分化誘導抑制にはO-結合型糖鎖が関与する〕

図5に、ガレクチン9による T_H17 分化誘導抑制にはN-結合型糖鎖でなく、O-結合型糖鎖が関与することを示唆する結果を示す。

(a) ナイーブT細胞を T_H17 分化誘導刺激条件下で培養し、最初の24時間にヒト安定化ガレクチン9(30 nM)またはコントロールとしてPBSを添加した。その24時間の間にガレクチンの阻害剤であるラクトースを3 mM、10 mMまたは30 mMの濃度で添加し、96時間後に培養上清中のIL-17A濃度を定量した。ラクトースのコントロールとしてはガレクチン9に作用を持たないスクロースを用いた。ヒト安定化ガレクチン9による抑制作用はラクトースによって濃度依存的に消失したことより、ヒト安定化ガレクチン9のレクチン活性が T_H17 分化抑制に必要であることが示された。

(b) 前述(a)の条件で、今度は、ラクトースの代わりにN-グリコシレーション阻害剤のswainsonine (2 µg/ml)またはO-グリコシレーション阻害剤のBenzyl -D-galactosaminide (Benzyl -GalNAc, 2mM)を添加した。96時間後に培養上清中のIL-17A濃度を定量したところ、swainsonineではヒト安定化ガレクチン9の効果が有意に残存していたが、Benzyl -GalNAcではヒト安定化ガレクチン9の効果に有意差が見られなくなった。この結果はガレクチン9による T_H17 分化抑制にはO-グリコシレーションを受けた糖タンパクが関与していることを暗示する。

【0094】

ガレクチン9による T_H17 細胞分化抑制をガレクチン9の低分子リガンドであるラクトース存在下で行ったところ、 T_H17 分化抑制効果は添加するラクトースの濃度依存的に減少したが、ガレクチン9に結合しないスクロースは全く影響を与えなかった(図5a)。この結果は T_H17 分化抑制にはガレクチン9のレクチン活性が必需であり、ターゲット細胞が発現する多糖へ結合して作用することを示唆している。そこでガレクチン9のターゲットがO-グリカンなのかN-グリカンなのかを絞り込むために、O-グリカンの阻害剤Benzyl -GalNAcおよびN-グリカンの阻害剤swainsonineを用いたところ、ガレクチン9による T_H17 分化抑制活性はBenzyl -GalNAcによって有意に抑制された(図5b)。これまでにガレクチン9によるアポトーシス誘導にはN-グリカンが重要であることが知られていたが(非特許文献4、37)、 T_H17 細胞分化抑制にはO-グリカンが重要であることが暗示された。

【0095】

〔ガレクチン9による T_H1 、 T_H2 及び T_H17 細胞分化への作用〕

図6には、 T_H1 、 T_H2 及び T_H17 細胞分化に及ぼすGal-9の効果を示す。

(a) ナイーブT細胞に30 nMのヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールのPBS)を添加し、 T_H1 、 T_H2 、 T_H17 の各分化誘導刺激、または抗CD3抗体及び抗CD28抗体によるTCR刺激のみ(No skewed)のそれぞれの条件下に96時間培養後、各 T_H サブタイプに特異的なmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで定量した。ヒト安定化ガレクチン9は T_H1 及び T_H2 細胞に特異的なmRNAの発現に影響を与えず、唯一 T_H17 細胞に特異的なIL-17A及びROR γ tのmRNA発現を有意に抑制した。

(b) 上記実験の T_H17 分化誘導条件におけるIFN- γ とIL-4 mRNAを測定したところ、どちらもヒト安定化ガレクチン9による発現の変化は見られなかった。 T_H17 分化はこれらのサイトカインによって抑制されることが知られているが、ガレクチン9の作用はこれらのサイトカイン発現を上昇させるためではないことが示唆された。

【0096】

10

20

30

40

50

ガレクチン9によるヘルパーT細胞分化抑制は T_H17 細胞に特異的で、IL-12による T_H1 細胞分化やIL-4による T_H2 細胞分化に対しては無効であり、 T_H1 、 T_H2 、 T_H17 それぞれの分化特異的な転写因子の発現においてもガレクチン9で抑制されるのは T_H17 の転写因子RORのみであった(図6a)。また T_H1 や T_H2 への分化が増強された場合には T_H17 細胞分化が抑制されることが知られているが(非特許文献38)、ガレクチン9を添加した T_H17 分化誘導系においてIFN- γ やIL-4のmRNAは増強されておらず、従って T_H1 や T_H2 の増強は可能性から排除された(図6b)。

【0097】

〔ガレクチン9はIL-2依存的にIL-17産生を抑制し、またCD25とFoxp3発現を増強する〕

図7は、ガレクチン9によるCD25とFoxp3発現上昇はIL-2に依存するという結果を示す

10

(a)ナイーブT細胞に30 nMのヒト安定化ガレクチン9を添加し(またはコントロールのPBS)、 T_H17 分化誘導条件下に24時間培養するとヒト安定化ガレクチン9添加によってCD4⁺CD25⁺細胞の割合が有意に上昇し、これはCD25 mRNAの上昇にも反映されていた。

(b)上記(a)の条件で96時間培養後にCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の割合を調べると、安定化ガレクチン9の添加により有意に上昇していた。

(c)ナイーブT細胞に30 nMのヒト安定化ガレクチン9(コントロールはPBS)及び図に示した濃度のIL-2を添加して、 T_H17 分化誘導条件下に96時間培養し、培養上清中のIL-17A濃度を定量した。ガレクチン9によるIL-17A産生抑制作用はIL-2存在下でのみ発揮された。一方IL-2単独でもIL-17A産生抑制傾向は見られたがその作用は弱く、100 ng/ml IL-2

20

(d)上記(c)の条件で96時間培養した細胞中のTreg細胞の割合を測定した。安定化ガレクチン9によってCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞、つまりTreg細胞が増加するのはIL-2を添加した場合に限定された。

【0098】

(e)ナイーブT細胞に30 nMのヒト安定化ガレクチン9を添加(コントロールはPBS)し、 T_H17 分化誘導条件下に96時間培養した後、PMA(50 ng/ml)とイオノマイシン(1 μ g/ml)及びbrefeldin A(10 μ g/ml)存在下で更に6時間培養した。CD4陽性細胞中のIL-17⁺Foxp3⁻細胞とIL-17⁻Foxp3⁺細胞の割合をフローサイトメトリーで測定すると、ガレクチン9はIL-17⁺Foxp3⁻細胞の減少とIL-17⁻Foxp3⁺細胞の増加を誘導していた。

30

(f)ナイーブT細胞を上記(e)の条件で培養し、図に示した各時点でCD25及びFoxp3のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで定量した。CD25の発現は T_H17 分化誘導刺激開始24時間で上昇したが、Foxp3の上昇には72時間を要した。どちらのmRNA発現も安定化ガレクチン9添加によって有意に上昇した。

【0099】

ガレクチン9は T_H17 細胞分化誘導条件でCD4⁺CD25⁺細胞の増加とCD25のmRNAレベルを増加させ(図7a)、 T_H17 細胞分化条件にも係わらずCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞を増加させたことより(図7b)、ガレクチン9には強力なTreg細胞分化誘導作用があることが示唆された。CD25のリガンドであるIL-2は、 T_H17 細胞分化を抑制すると報告されており(非特許文献39)、実際に本実施例で用いている T_H17 細胞分化誘導系においてもIL-2は濃度依存的にIL-17産生を抑制したがIL-2単独の効果は弱く(図7c)、ガレクチン9の添加によって相乗的に高められた(図7c)。またガレクチン9によるFoxp3発現増強はIL-2存在下でのみ誘導された(図7d)。 T_H17 細胞分化誘導によってCD25陽性CD4細胞中の約7%がFoxp3⁻IL-17A⁺に、約25%がFoxp3⁺IL17A⁻細胞となるが、ガレクチン9を添加するとFoxp3⁻IL-17A⁺細胞が約2%に減少し、一方でFoxp3⁺IL17A⁻細胞は約50%に増加した(図7e)。この系におけるCD25の発現は分化誘導後24時間後より増強されるがFoxp3発現増強には72時間を要し、いずれもガレクチン9によって発現量が上昇した(図7f)。

40

【0100】

〔細胞表面Gal-9陽性細胞の同定〕

図8には、細胞表面にガレクチン9を発現する T_H 細胞の同定を行った結果を示す。

50

(a) ナイーブT細胞を図6aの各条件、及び未刺激(No stim)で96時間培養し、培養上清中のガレクチン9濃度をELISAで定量した。ガレクチン9の分泌はTCR刺激のみ(No skewed)、 T_H1 及び T_H2 細胞への分化条件では上昇したが、 T_H17 への分化条件では抑制された。

(b) ナイーブT細胞を T_H17 に分化誘導する系にはTCR刺激に加えてIL-2、TGF- β 1及びIL-6が添加されている。この完全系(T_H17 skewed)よりIL-6を除いたもの(TGF- β 1 alone)、TGF- β 1を除いたもの(IL-6 alone)およびTCR刺激のみ(No skewed)の各条件で96時間培養後の上清に含まれるガレクチン9をELISAで定量した。IL-6の添加によってガレクチン9濃度は顕著に低下した。一方TGF- β 1の添加にもガレクチン9の濃度を低下させる傾向が見られたが有意差は無かった。

(c) ナイーブT細胞に30 nMのヒト安定化ガレクチン9(またはコントロールのPBS)を添加し、未刺激(No stim)、TCR刺激のみ(No skewed)及び T_H17 分化誘導刺激条件下でそれぞれ96時間培養した後、上清中のガレクチン9をELISAで定量した。ELISAはマウスガレクチン9に特異的で、添加した30 nMのヒト安定化ガレクチン9の影響を受けない。ヒト安定化ガレクチン9はこれらの条件で培養したナイーブT細胞からのガレクチン9分泌を上昇させた。

【0101】

(d) 上記(c)の細胞を用いてガレクチン9 mRNA量をリアルタイムRT-PCRで定量したが、図中の各条件の細胞において統計的有意差は認められなかった。

(e) その一方で、上記(a)の細胞表面のガレクチン9とCD25を染色してフローサイトメトリーで測定したところ、細胞表面にガレクチン9を発現する細胞の割合は未刺激ではCD4陽性細胞の2%弱であるが、 $TH1$ 、 $TH2$ 分化誘導刺激下、またはTCR刺激下に約4%に上昇した。その一方で T_H17 分化誘導条件では2%弱に留まった。各分化刺激による細胞表面ガレクチン9陽性細胞の割合はガレクチン9の分泌とよく一致している。

(f) 上記の細胞を細胞表面ガレクチン9陽性と陰性にソーティングして分け、ガレクチン9 mRNAをリアルタイムRT-PCRで定量したところ、両者に統計的な差は見られなかった。またそれら細胞を固定化/細胞膜浸透化後に抗ガレクチン9抗体で染色して細胞が含有する全てのガレクチン9を染色してフローサイトメトリーにより測定したが、この場合にも両細胞に差は見られなかった。

【0102】

これまでに示したようにガレクチン9の添加は T_H17 分化を強力に抑制する。また既に報告されているようにTCRのみの刺激時や、 T_H1 や T_H2 への細胞分化条件は T_H17 細胞分化を抑制する。そこでこれらの条件で培養したナイーブT細胞の培養上清中ガレクチン9濃度を調べたところ、 T_H1 および T_H2 細胞への分化条件においてその濃度は高く、 T_H17 細胞分化条件では抑制されていた(図8a)。 T_H17 細胞分化誘導にはTGF- β とIL-6を必要とするが、IL-6がガレクチン9の分泌抑制を起こしていることが判った(図8b)。既に示したように T_H17 細胞分化条件においてもリコンビナントガレクチン9を添加すると T_H17 分化が抑制されるが、このガレクチンの添加によって内在性ガレクチン9の分泌も増強された(図8c)。ちなみに添加したリコンビナントガレクチン9はヒト型であり、マウス細胞にも生理活性を示すが培養上清中のガレクチン9測定に用いるELISAでは検出されない。またガレクチン9の分泌量に差があるにもかかわらずガレクチン9のmRNA量は T_H17 誘導条件下と非誘導条件で有意な差を示さなかった(図8d)。

【0103】

これらの結果よりNo skewed、 T_H1 や T_H2 分化誘導系にはガレクチン9を分泌する細胞が存在していることが判った。ガレクチン9はシグナルペプチドを持たず、その分泌メカニズムについては全く不明であるが、その局在場所である細胞質から直接、または何らかの輸送装置を通して細胞膜を通過することは間違いないと考えられる。発明者らはガレクチン9を分泌する細胞には細胞表面に分泌の中間状態のガレクチン9が検出できるのではないかと考え、抗ガレクチン9抗体を用いて細胞を染色した。その結果、細胞表面にガレクチン9発現する細胞集団を検出することに成功した。ところで、このガレクチン9染色はラクトース存在下で行った。ガレクチン9は細胞表面に数多く存在する糖脂質や糖タンバ

10

20

30

40

50

ク質に結合するので、分泌したガレクチン9が二次的に細胞表面に結合したものと、目的の細胞とを区別するためである。予備検討の結果、30 mMのラクトースは二次的なガレクチン9の細胞への結合を完全に抑制し、一方で抗原抗体反応には影響を与えないことを確認し、細胞表面のガレクチン9染色時には常に30 mMラクトースを添加した。TCR刺激前のナイーブT細胞の2%弱は細胞表面にガレクチン9を発現しており、当然ながらそのほとんどはCD25⁻細胞である(図8 e)。TCR刺激はCD25⁺細胞を増加させるが、同時にガレクチン9陽性細胞も増加させ、CD25⁺細胞集団の約10%に上った(図8 e)。これに対して、T_H17細胞分化誘導条件ではCD25⁺細胞もCD25⁺Gal-9⁺細胞も明らかに減少した(図8 e)。それぞれのT_H細胞分化系におけるガレクチン9分泌(図8 a)と細胞表面にガレクチン9を発現する細胞の割合(図8 e)はよく相関しているおり、ガレクチン9を分泌する細胞はこれら細胞表面にガレクチン9を発現している細胞集団である可能性が強く示唆された。ガレクチン9を分泌する細胞はガレクチン9を高発現している可能性が高いと考え、CD4⁺CD25⁺T細胞を細胞表面のガレクチン9発現の有無でフローサイトメトリー法を用いて分離精製し、それぞれのガレクチン9 mRNA量をReal time RT-PCRで調べたが、予想に反して両者に有為な差は見られなかった(図8 f)。またそれぞれの細胞を細胞膜浸透化キット(BD Cytotfix/Cytoperm)を用いて細胞内外に存在する全てのガレクチン9を染色したところ、ガレクチン9の発現に差は見られなかった(図8 f)。これらの結果は図8 dとも良く一致するが、細胞表面のガレクチン9発現と分泌の関係については更なる実験で証明が必要となった。以後、ガレクチン9を細胞表面に発現しているCD4⁺T細胞をT_HGAL9と仮称する。

10

20

【0104】

〔T_HGAL9細胞の活性〕

図9には、T_HGAL9はTCR刺激によりガレクチン9を分泌し、IL-10及びTGF- β を発現上昇すること、及びT_HGAL9はT_H17/Tregバランスを制御する結果を示す。

(a)マウス脾臓細胞よりナイーブT細胞を調製し、さらに細胞表面ガレクチン9陽性細胞(T_HGAL9細胞:Gal-9⁺T_H)と陰性細胞(non-T_HGAL9:Gal-9⁻T_H)をソーティングにより分取した。それぞれの細胞をTCR刺激(抗CD3抗体コートプレート中で抗CD28抗体を添加)の有無の条件下96時間培養し、培養上清に分泌されたガレクチン9をELISAで定量した。T_HGAL9細胞のみTCR刺激によってガレクチン9分泌が誘導された。

(b)上記細胞のサイトカインmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで調べた。T_HGAL9細胞はnon-T_HGAL9細胞と比較してIL-10及びTGF- β の発現が高く、一方でIL-4及びIL-17Aの発現は低かった。

(c)ナイーブT細胞をT_H17分化誘導刺激下で6時間培養後、T_HGAL9細胞(Gal-9⁺T_H)またはnon-T_HGAL9(Gal-9⁻T_H)細胞と1:1の比で混合し、その後はTCR刺激のみ与えて90時間共培養した。培養上清に分泌されたIL-17AをELISAで定量し、一方Foxp3 mRNAの発現はリアルタイムRT-PCRで定量した。T_HGAL9細胞の添加によりIL-17A分泌が抑制され、一方でFoxp3の発現は上昇した。

(d)上記の共培養を、ガレクチン9を拮抗阻害する30mMのラクトース(またはコントロールのスクロース)存在下で行った。ラクトース添加によってT_HGAL9細胞によるIL-17A産生抑制は解除された。この結果は、T_HGAL9細胞は抑制性サイトカインIL-10やTGF- β を産生しているがT_H17分化抑制においてはガレクチン9が必須な働きをしていることを示唆する。

(e)T_HGAL9によるT_H17分化抑制作用にIL-10とTGF- β の関与が低いことを裏付けるため、前述(c)のT_HGAL9は共培養によるT_H17抑制系にIL-10及びTGF- β の中和抗体をそれぞれ10 μ g/mlの濃度で添加したところ、これらの中和抗体はT_HGAL9の作用を阻害しなかった。

(f)更にIL-10の関与を問うために前述(c)のアッセイ系にリコンビナントIL-10を添加してIL-17産生への作用を調べた。調べた範囲の濃度においてIL-10は統計的に有為な抑制効果を示さなかった。

【0105】

図8で発見した細胞表面にガレクチン9を発現するCD4⁺T細胞をT_HGAL9と仮称し、これ

30

40

50

がガレクチン 9 を分泌してTH17/Tregバランスを制御する細胞であると仮定したが、その一方で、 T_H GAL9はそれ以外のT細胞と比較して有為の高いガレクチン 9 を発現しているわけではなかった(図 8 f)。図 9 では T_H GAL9をソーティングで精製し、その性質を調べることで T_H GAL9が実際にガレクチン 9 を放出することを発見した。 T_H GAL9は抑制性サイトカインであるIL-10、TGF- β も高発現しており、一方でIL-4、IL-17の発現は有為に低かった。更に T_H GAL9が T_H 17を抑制しTreg分化を促進することを共培養実験によって証明した。 T_H GAL9が高発現するIL-10は抑制性サイトカインの代表格で、 T_H 17分化を抑制するという報告もあるが(非特許文献 40)、少なくとも図 9 で用いたアッセイ系において T_H 17分化誘導を抑制する薬効の本体は大部分ガレクチン 9 であることが阻害剤を用いた実験(d、e)及びリコンビナントIL-10を用いた実験(f)で示された。ところで T_H GAL9から分泌されたガレクチン 9 の培養上清中濃度は、図 9 aの実験結果では150pg/ml程度であり、安定化ガレクチン 9 を用いて薬効が見られる濃度(30nM:1 μ g/ml)よりも遥かに低い。恐らく T_H GAL9はターゲット細胞に非常に近接した状態、もしくは接着した状態でパラクラインもしくは細胞表面のガレクチン 9 を用いて相互作用し、ターゲット細胞へ作用しているのではないかと考えられる。ガレクチン 9 は高濃度においては多くの細胞に細胞死を誘導する。よって無闇な分泌は危険であり、 T_H GAL9はターゲット細胞にコンタクトして認識した上でガレクチン 9 による制御を行っていると思われ。

10

【0106】

図 10 には、 $CD25^+T_H$ GAL9はTCR刺激によりIL-10とTGF- β 1を産生する結果を示す。

20

(a) ナイーブCD4⁺T細胞をTCR刺激下で96時間培養し、ソーティングにより $CD25^+T_H$ GAL9、 $CD25^+$ non- T_H GAL9及び $CD25^-$ non- T_H GAL9に分離する。それぞれの細胞をさらにTCR刺激下で96時間培養し、培養上清中のガレクチン 9 をELISAで定量した。

(b) 上記(a)の細胞のIL-10及びTGF- β 1発現をリアルタイムRT-PCRによって定量した。

その結果、 T_H GAL9細胞をTCR反復刺激するとガレクチン 9 分泌量の増加とIL-10及びTGF- β 1のmRNA発現レベルの増加が観察された。

【0107】

[T_H GAL9は安定化ガレクチン 9 添加で増加する]

図 11 には T_H GAL9が安定化ガレクチン 9 添加によって増加する結果を示す。

(a) 図 8 (c) の細胞をCD25と細胞表面ガレクチン 9 で染色し、フローサイトメトリー法で測定した結果を示す。ヒト安定化ガレクチン 9 の添加は未刺激のnaive CD4⁺T細胞にも働き、Gal-9⁺CD25⁺細胞を増加させた。 T_H 17分化誘導条件では T_H GAL9が減少するが(図 8 e)、安定化ガレクチン 9 添加によって T_H GAL9の割合は有為に上昇した。またガレクチン 9 を多く分泌するGal-9⁺CD25⁺細胞の割合もTCR刺激依存的にヒト安定化ガレクチン 9 添加が有為に上昇させた。一方、安定化ガレクチン 9 添加はGal-9⁻CD25⁺細胞の割合もTCR刺激依存的に上昇させた。この細胞集団にはTregが含まれており、ガレクチン 9 のTreg分化促進作用の結果だと考えられる。

30

(b) T_H GAL9はガレクチン 9 に加えてIL-10、TGF- β 1を産生する。これらのサイトカインがTCR刺激による T_H GAL9の増加に関与している可能性を調べるために、ナイーブCD4⁺T細胞をIL-10中和抗体、IL-10R中和抗体またはTGF- β 1中和抗体の存在下でTCR刺激し、 T_H GAL9細胞の出現をフローサイトメトリー法で調べた結果を示す。これらサイトカインの中和は T_H GAL9の増加に全く影響を与えなかった。

40

(c) IL-10は抑制性のT細胞であるTr1の分化を促進することが知られており、 T_H GAL9の増加にも影響する可能性が考えられる、(b)の結果より少なくともTCR刺激による T_H GAL9の増加においてはIL-10の関与は低いと考えられた。そこで今度はナイーブCD4⁺T細胞にIL-10(またはコントロールとしてヒト安定化ガレクチン 9)を添加し、TCR刺激下で培養して T_H GAL9細胞の出現をフローサイトメトリー法で調べた結果が、本実験系においてIL-10による T_H GAL9の増加は見られなかった。

[T_H GAL9細胞とTr1細胞の比較]

図 12 には T_H GAL9細胞とTr1細胞の比較を行った結果を示す。IL-10産生タイプ1制御性T細胞(Tr1細胞)は様々な場で免疫を制御しており、Tr1細胞を用いた自己免疫疾患や癌治療

50

についての可能性も議論されている。このTr1細胞には現在いくつかのマーカーが提唱されているが、この細胞のもっとも顕著な特徴は大量にIL-10を分泌することにある。本発明者らの見出した T_H GAL9細胞もIL-10を産生していることより、Tr1細胞との比較を行った。これまで報告されているマウスのTr1細胞マーカーにはLAP(非特許文献21)、NKG2D(非特許文献20)、LAG-3(非特許文献22)及びCTLA-4(非特許文献41)がある。またTregとは対照的にTr1細胞はFoxp3を発現していないと考えられている(非特許文献42~43)。そこでナイーブ $CD4^+$ T細胞のTCR刺激前後で、Tr1細胞マーカー発現を検討した。

【0108】

(a)ナイーブ $CD4^+$ T細胞を既報のTr1細胞マーカーであるLAP、NKG2D、LAG-3及びCTLA-4で染色し、 T_H GAL9細胞との関連をフローサイトメトリー法で調べた。CD25 $^-$ T_H GAL9細胞はこれら全てのTr1細胞マーカーを発現していたが、CD25 $^-$ non- T_H GAL9細胞には発現が見られなかった。

10

(b)これら細胞をTCR刺激し、CD25陽性となったT細胞集団で同じ測定を行うと、殆ど全てのCD25陽性 $CD4$ 細胞がTr1マーカーを発現するようになった。

(c)(b)の細胞を細胞表面ガレクチン9とTim-3で染色した結果を示す。 T_H GAL9にはTim-3発現が無いことが示された。

(d,e,f)ナイーブ $CD4^+$ T細胞をIL-27(25ng/ml)の存在下または非存在下でTCR刺激を加え、3日間培養しTr1への分化誘導を促進した。3日後の培養上清を一部回収しIL-10(d)及びガレクチン9濃度(e)をELISAにより定量した。残った細胞はbrefeldin A (10 μ g/ml)存在下でPMA(50ng/ml)とイオノマイシン(1 μ g/ml)で4時間刺激し、細胞内部のIL-10と細胞表面のガレクチン9で染色してフローサイトメトリー法にて測定した(f)。

20

【0109】

TCR刺激前のCD25 $^-$ T_H GAL9細胞は、既知のTr1細胞マーカーの全てを発現していたが、細胞表面にガレクチン9を発現しないCD25 $^-$ $CD4^+$ Non- T_H GAL9細胞には発現が見られなかった(図12a)。この結果は T_H GAL9とTr1が非常に似通った細胞であることを示している。一方で、TCR刺激によってCD25を発現した細胞では、発現量には違いがあるが殆どの細胞が上記のTr1細胞マーカーを発現するようになった(図12b)。もともとTr1マーカーとして報じられているこれらのマーカーは細胞の活性化マーカーでもあり、TCR刺激を受けた細胞では量の多少はあれ発現が見られることはむしろ当然だと考えられる。また T_H GAL9細胞にはFoxp3が発現しておらず、Tregとは異なる細胞であることが確認された(図12b)。また T_H GAL9にはTim-3の発現も見られなかった(図12c)。 T_H GAL9とTr1は類似の性質を持っており、 T_H GAL9はTr1と同一もしくはその部分集団である可能性が示唆された。そこでTr1の分化因子の一つであるIL-27存在下でナイーブT細胞をTCR刺激下で3日間培養したところ、IL-27を添加することでIL-10及びガレクチン9分泌が有為に高まることが示された(図12d,e)。更に分化誘導後の細胞を細胞表面ガレクチン9陽性と陰性で分け、それぞれのIL-10発現量を比較したところ、ガレクチン9陽性の細胞集団の約半分がIL-10を発現しており、一方でガレクチン9陰性の細胞集団では20%以下であった(図12f)。今回の結果は T_H GAL9がTr1と非常に良く似た性質の細胞であることを示した。実際のところ現在のTr1の定義を T_H GAL9は満たしておりその意味においてTr1の部分集団だといえる。これまでTr1の免疫制御活性はその多くがIL-10に依存すると考えられてきたが、図9で示したように T_H 17/Tregのバランス制御においてはIL-10ではなくガレクチン9が必須である。ところでTr1の誘導法を示した中には高濃度IL-10を用いた方法もあるが、その場合には数週間の培養を要する。図11cにおいてIL-10の添加で T_H GAL9の増加を調べた際には96時間の培養であり、IL-10の効果が発揮されるには短時間であった可能性も考えられる。

30

40

【0110】

図13では T_H GAL9とTr1の関係を更に明らかにするために、ガレクチン9ノックアウトマウスでTr1マーカーを持つ細胞を調べた。

(a)ガレクチン9ノックアウトマウスと野生型マウスの脾臓細胞をCD4及びNKG2D、LAG-3、LAPまたはCTLA-4で染色し、フローサイトメトリー法で測定した結果を示す。ガレクチン9ノックアウトマウスではTr1マーカー陽性細胞の割合が野生型と比較して減少して

50

いた。

(b) ガレクチン9ノックアウトマウスと野生型マウスのナイーブCD4⁺T細胞をTCR刺激のみ(No skewed)またはT_H17分化誘導刺激条件下(Th17 skewed)で培養し、IL-10mRNAの発現をリアルタイムRT-PCRで調べた結果を示す。ガレクチン9ノックアウトマウスではIL-10産生が有為に減少していた。

(c) (b)のNo skewed条件で培養した細胞をbrefeldin A(10 μg/ml)存在下でPMA(50 ng/ml)とイオノマイシン(1 μg/ml)処理を4時間行い、細胞内部に蓄積したIL-10を染色してフローサイトメトリー法で測定した結果を示す。ガレクチン9ノックアウトマウスではIL-10陽性細胞が優位に減少していた。

これらの結果は、全て、T_HGAL9とTr1が非常に似通った細胞であり、現在のTr1定義においてはTHGAL9がTr1と同一もしくはその部分集団であることを示すものである。

10

【0111】

下記表1に、各臓器におけるCD4陽性T細胞中の細胞表面ガレクチン9陽性細胞(T_HGAL9)の割合を調べた結果を示す。下記表1中、「Organs」は、「臓器」を意味する。「Thymus」は、「胸腺」を意味する。「LN」は、リンパ節を意味する。「Spleen」は、「脾臓」を意味する。「Peyer's patch」は、「パイエル板」を意味する。「PBMC」は、「末梢血単核球」を意味する。「Phenotype」は、「表現型(Phenotype)」を意味する。「cells」は、「細胞」を意味する。Thymus(胸腺)においてはT細胞の多くがCD4とCD8の二重陽性の未熟な状態であるので、ここではCD4⁺SP(CD4単陽性)のT細胞にのみに着目した。なお、T_HGAL9細胞の存在を、種々のリンパ器官で調べたところ、胸腺のCD4単陽性細胞の約1/4、リンパ節、脾臓、抹消血及びパイエル盤由来のCD4⁺CD25⁻T細胞の各4%、7%、15%及び7%であった。

20

【0112】

【表1】

Organs	Phenotype	% of Gal -9+ CD25 - cells	SD
Thymus	in CD4 SP	24.6	0.4
LN	in CD4	3.6	0.4
Spleen	in CD4	6.5	0.8
Peyer's patch	in CD4	14.8	0.7
PBMC	in CD4	7.2	0.9

30

【0113】

〔ヒトT_H17/Treg分化に対するガレクチン9の作用とヒトT_HGAL9細胞の同定〕

ヒトとマウスの免疫系が同一で無いことは良く知られていることから、本研究におけるマウス及びマウスの細胞を用いて解明したガレクチン9の機能がヒトにも当てはまる保証は無い。ヒトでもガレクチン9がT_H17/Tregバランス制御を行うこと、およびヒトにもT_HGAL9細胞が存在していることを確認することが臨床応用を考える上で必須である。図14には、ヒトT細胞へのガレクチン9の作用とT_HGAL9細胞を同定した結果を示す。

40

(a) 健康人4人より得た抹消血CD4⁺T細胞にヒト安定化ガレクチン9(30nM)若しくはコントロールのPBSを添加し、TCR刺激下96時間培養した。CD25を染色し、フローサイトメトリー法で測定した。

(b) 上記(a)の細胞をCD25及びFoxp3で染色し、それぞれの発現をフローサイトメトリー法で測定した。

(c) ヒトCD4⁺T細胞にヒト安定化ガレクチン9(30nM)若しくはコントロールのPBSを添加

50

し、 T_H17 細胞への分化誘導刺激下で9日間培養し、培養上清中のIL-17濃度をELISAで定量した。

(d) ヒト $CD4^+$ T細胞をTCR刺激下、または未刺激で96時間培養し、細胞表面のガレクチン9とCD25を染色してフローサイトメトリー法で測定した。

(e) ヒト $CD4^+$ T細胞をTCR刺激下96時間培養した後、ソーティングにより細胞表面にガレクチン9陽性細胞($CD25^+T_HGAL9$)と陰性細胞($CD25^+non-T_HGAL9$)に分取した。それぞれをTCR刺激下でさらに96時間培養し、培養上清中のガレクチン9をELISAで定量し、一方図に示した各サイトカインmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで測定した。

【0114】

ヒト抹消血より得た $CD4^+$ T細胞をガレクチン9存在下で培養したところ、ガレクチン9によって $CD25^+$ 陽性細胞と $CD25^+Foxp3^+$ 細胞の割合が増加し、その増加はTCR刺激によってさらに増強した(図10a~b)。つぎに、ヒト T_H17 分化誘導系にガレクチン9を添加し、IL-17の放出を指標に T_H17 分化を調べたところ、ガレクチン9によってIL-17分泌は抑制された(図10c)。これらの知見はマウス細胞で解明されたガレクチン9の機能と同等である。さらに、健康人の抹消血中には、細胞表面にガレクチン9を発現する $CD4^+CD25^-$ T細胞が1-4%存在しており、これをTCR刺激すると細胞表面にガレクチン9を発現する $CD4^+CD25^+$ T細胞が顕著に増加した(図10d)。この細胞は細胞表面にガレクチン9を発現しない $CD4^+CD25^+$ T細胞と比較して有意に多くのガレクチン9を分泌し、IL-10及びTGF- β のmRNA発現も高かった(図10e)。その一方でIL-2及びINF- γ のmRNA発現には優位差が無く、IL-4及びIL-17 mRNA発現はむしろ細胞表面にガレクチン9を発現する細胞において低値を示した(図10e)。これらの結果よりガレクチン9の機能はヒトとマウスで同等であり、ヒトにおいて T_HGAL9 細胞が存在していることが明らかとなった。

【0115】

本実施例によれば、 T_HGAL9 が、ガレクチン9を分泌し、 T_H17 /Tregバランスを調整する細胞として機能し得ることが確認された。ガレクチン9の作用がマウスにおいてもヒトにおいても同様であることはガレクチン9、特に安定化ガレクチン9の臨床応用においては非常に重要な知見である。さらに T_HGAL9 がヒトにも存在していることが示されたことより、ガレクチン9による免疫制御は動物種を超えてよく保存されていると考えられる。 T_HGAL9 は細胞表面のガレクチン9で検出できるため、図9aで示したように、細胞を生きたまま単離精製することが可能であり、この細胞を利用した応用技術の開発も容易である。更に T_HGAL9 は安定化ガレクチン9添加で増加することが示され、この将来様々な応用に有用だと考えられる細胞をin vitroで増加させる技術の一つも発見した。 T_HGAL9 以外のT細胞も同等のガレクチン9を発現しているにも関わらずそれを分泌しない。 T_HGAL9 のみガレクチン9を分泌できるのは、この細胞に存在する分泌メカニズムによると考えられ、それを制御することが出来れば、免疫制御の新たな方法ともなり得る。 T_HGAL9 の発見は、ガレクチン9分泌メカニズムの解明にも重要な貢献となると考えられる。例えば T_HGAL9 とそれ以外のT細胞を用いた網羅的な発現プロファイリングをmRNAレベルやタンパクレベルで行うことが方法として考えられる。また T_HGAL9 は免疫バランスを間接的に知るサロゲートマーカーとして利用できる可能性もあり、例えば様々な免疫性疾患、癌、感染症などの診断やそれらへの感受性の診断または薬剤の効果調べる指標としてである。

【0116】

〔 T_HGAL9 以外の細胞表面にガレクチン9を発現する細胞〕

ヒト安定化ガレクチン9投与は前述の自己免疫疾患モデル以外にも様々な病態モデルにおいて薬効を示すことが示されている。これらの場面においても投与したガレクチン9が引き金となり、 T_HGAL9 ガレクチン9を含むガレクチン9分泌細胞が誘導されている可能性がある。 T_HGAL9 は細胞表面にガレクチン9を発現する細胞として同定され、それがガレクチン9分泌能を持つことが確認された。発明者らは細胞表面のガレクチン9は分泌の中間体として検出されていると考えており、よって細胞表面のガレクチン9発現を指標に T_HGAL9 以外のガレクチン9発現細胞を探索することができると予想される。少なくとも細胞表面に露出していることは既に細胞膜をトランスロケートした結果であり、広義には分泌さ

10

20

30

40

50

れていることになる。そこで様々な病態モデルにおいて細胞表面にガレクチンを発現した細胞群の存在を調べた。

【0117】

〔腹膜炎モデルでの安定化ガレクチン9の作用とその際に誘導される細胞表面ガレクチン9発現細胞〕

図15には重篤な腹膜炎モデルである盲腸結紮穿孔法による腹膜炎 (cecal ligation and puncture: CLP) の処置を施したマウスを示す。ここではBALB/cマウスを用いている。G21のニードルを用いて結紮した盲腸に穴を開け、その後の生存を経時的に調べるモデルである。

【0118】

図16にはヒト安定化ガレクチン9投与のCLPでの有効性を調べた結果を示す。この知見は岡山大学医学部、松川昭博教授によって行われ、既に学会等で発表されているのでここでは結果の概略を説明する。CLPにより腹膜炎を発症させ、経時的に生存率を調べた。

(a) C57BL/6J野生型マウス (WT) とマウスガレクチン9のトランスジェニックマウス (Gal-9 Tg) の比較。(b) WTマウスにCLPと同時にヒト安定化ガレクチン9 (30 µg/マウス; またはコントロールとしてPBS) を単回静脈内投与したときの生存率。(c) WTマウスにCLP処置を施し、その24時間後にヒト安定化ガレクチン9 (30 µg/マウス; またはコントロールとしてPBS) を単回静脈内投与したときの生存率。(d) WTマウスにCLP処置を施し、その24時間後にヒト安定化ガレクチン9 (30 µg/マウス; またはコントロールとしてPBS) を単回皮下投与したときの生存率。(e) ノードマウスにCLPと同時にヒト安定化ガレクチン9 (30 µg/マウス; またはコントロールとしてPBS) を単回皮下投与したときの生存率。

安定化ガレクチン9はこの重篤な腹膜炎に対してもCLP直後またはCLPから24時間後の単回投与でマウスの生存率を有為に延長した。しかしながら、この効果はノードマウスでは見られなかったことより (図16e)、安定化ガレクチン9がT細胞を介して作用していることが強く示唆された。

【0119】

図17にはCLP後24時間のマウスより脾臓細胞を取り出して24時間培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を調べた結果を示す。これも岡山大学医学部、松川昭博教授らにより学会等で既報である。安定化ガレクチン9投与したマウス脾臓細胞ではTNF- α 、IL-12、IL-10の産生が低下し、一方でIL-17の産生が上昇していた。これまで自己免疫疾患モデルにおいてガレクチン9はIL-17を低下させる作用を示したがここでは上昇させた。ガレクチン9は両方向性の免疫調整因子であり、場面によって、または細胞によって作用が異なる。例えば自己免疫疾患においてTNF- α を抑制するが、一方で単球や樹状細胞に作用してTNF- α 産生を刺激することは既報であり (非特許文献13)、IL-17においても場面によってガレクチン9の方向性が変わることは想像に難くない。TNF- α 、IL-12、IL-17などの炎症性サイトカインは微生物排除に働く一方で過度の炎症惹起によって組織破壊も起こす。詳細なメカニズムは不明であるが、安定化ガレクチン9投与が生存率を向上させている事実は、ここで見られたサイトカインバランスの変化が腹膜炎下での生存に有利に働いていると考えられる。ガレクチン9腹膜炎 (または敗血症) においても重要な働きを行っていることは自明である。

【0120】

図18はCLP24時間後の脾臓細胞をCD3、NK1.1、GL-3および細胞表面ガレクチン9で染色し、フローサイトメトリー法で解析した結果を示す。安定化ガレクチン9投与によって細胞表面ガレクチン9発現細胞が増加している。特に目立った増加を見せたのはNKT細胞 (CD3⁺NK1.1⁺)、T_HGAL9を含む細胞集団 (CD3⁺NK1.1⁻及びCD3⁺GL-3⁻)、T細胞 (CD3⁺GL3⁺) である。特にNKT細胞、NK細胞及びT細胞は少なくともこのモデルにおいては、その殆ど全てが細胞表面ガレクチン9陽性であることが始めて示された。これらの細胞はT_HGAL9同様に、ガレクチン9によって免疫を制御している可能性が非常に高い。これらの細胞を移入することが重篤な腹膜炎治療に有用であることが示唆される。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

図 1 9 は坦癌マウスに安定化ガレクチン 9 を投与し、その際の細胞表面ガレクチン 9 陽性細胞を調べた結果を示す。既報のように安定化ガレクチン 9 投与はマウス繊維肉腫Meth Aを腹腔内に移植したマウスに投与すると生存を延長する（非特許文献 3 2）。その方法に従ってMeth Aを腹腔内に導入し、その直後よりヒト安定化ガレクチン 9 を3回 / 週で腹腔内投与（30 μg / マウス）した。Meth A移植より7日後に腹腔内細胞と脾臓細胞を取り出して表示の細胞表面マーカーを染色し、フローサイトメトリー法で測定した結果を示す。

(a) 腹腔細胞の内CD4陽性細胞をCD25と細胞表面ガレクチン 9 発現で展開した結果を示す。ヒト安定化ガレクチン 9 投与によって細胞表面にガレクチン 9 を発現した細胞の割合が著しく増加し、一方CD25⁺Gal⁻9⁻は減少した。CD25⁺Gal⁻9⁻細胞は癌に対する免疫を抑制すると考えられるTregを含む細胞集団である。

(b) (a) の細胞を内CD8陽性細胞をCD25と細胞表面ガレクチン 9 発現で展開した結果を示す。ヒト安定化ガレクチン 9 投与によって細胞表面にガレクチン 9 を発現したCD8細胞の割合が著しく増加した。

(c) ヒト安定化ガレクチン 9 を投与したMeth A坦癌マウスの脾臓細胞をPDCA-1、CD11c 及び細胞表面ガレクチン 9 で染色し、フローサイトメトリー法で測定した結果を示す。形質細胞様樹状細胞：pDC、pDC様マクロファージ：pDC-M、古典的樹状細胞：cDC、及び樹状細胞やマクロファージと異なる細胞：nonDCM のそれぞれで細胞表面ガレクチン 9 発現レベルを比較した。pDC様マクロファージは急性肺障害のモデルにおいてそれを細胞移入すると症状を抑制することが示されている（非特許文献 4 4）。この場合にもpDC様マクロファージが分泌するガレクチン 9 が効果の主体を成していることが想像される。

この坦癌モデルにおいても投与した安定化ガレクチン 9 が薬効を示すときに前述したように細胞表面にガレクチン 9 を発現した細胞が出現している。これらの細胞の移入が癌治療に有用であることが示唆され、またこれら細胞をマーカーとして癌の進行や治療の効果を診断できる可能性が示唆される。

【 0 1 2 2 】

図 2 0 ~ 2 1 はヒト安定化ガレクチン 9 の自然発症性自己免疫疾患モデルでの有効性を調べた結果を示す。MRL/MpJUmmCrj-1pr/1prマウスは全身性エリテマトーデスのモデルとして汎用される自然発症性自己免疫疾患モデルである。このマウス（、8週齢）にヒト安定化ガレクチン 9 を表示の用量で3回 / 週のスケジュールで22週齢まで腹腔内投与し、経時的に後肢足蹠浮腫容積測定（週一回；図 1 と同様にPLETHYSMOMETERを用いて測定）、体重測定（週三回）、尿中蛋白濃度測定（週一回）を行った。高用量30 μg / マウスでは尿蛋白濃度（図 2 0 a）、体重変化（図 2 0 b）、後肢足蹠浮腫容積変化（図 2 1 a）と、実験終了時（22週齢目）のヘマトクリット値（図 2 1 b）の全てにおいて統計的に有意な治療効果を示した。全身性エリテマトーデスは非常に重篤な自己免疫疾患であり、過去50年間高用量のステロイド投与以外の治療選択肢が無かった。この疾患は自己抗体の産生が顕著であり、よって抗体産生を抑制する治療法が解決策だと考えられてきた。2011年にFDAより認可されたbelimumabはB細胞を抑制する抗体であり、この疾患治療のターゲットとしてB細胞及び自己反応性抗体の産生抑制が重要であることが臨床研究により裏付けされた。

【 0 1 2 3 】

図 2 2 は安定化ガレクチン 9 の抗体産生に対する作用を調べた結果を示す。前述したように安定化ガレクチン 9 は全身性エリテマトーデスのモデルマウスに有効性を示すため、抗体産生及びB細胞抑制に作用している可能性が示唆される。そこで抗体産生への薬物の効果を調べる際に汎用される羊赤血球（SRBC）投与による抗羊赤血球IgM抗体産生系を用い、安定化ガレクチン 9 の作用を調べた。C57BL/6Jマウス（）にSRBCを腹腔内投与し、その直後にヒト安定化ガレクチン 9（30 μg / マウス）またはコントロールとしてPBSを単回腹腔内投与した。それぞれの時点で、3-5匹のマウスより採血及び脾臓摘出を行い抗体産生及びB細胞を調べた。その結果、ヒト安定化ガレクチン 9 投与によってSRBC特異的なIgM

の濃度は低下したが (a)、全IgM濃度 (b)、全IgG濃度 (c) には統計的な変化を与えないことが判明した。更にMRL/MpJUmmCrj-1pr/1prマウス (、8週齢) に30 µg/マウスのヒト安定化ガレクチン9またはコントロールとしてPBSを3回/週投与し、7日目に採血し、血清中の抗二本鎖DNA抗体 (自己免疫性抗体の代表) 濃度を調べたところ、安定化ガレクチン9投与によって抗二本鎖DNA抗体が有為に抑制されることが判った。これらの作用は抗体産生の本体であるB細胞へ安定化ガレクチン9が作用している可能性を示唆するものである。

【0124】

図23にはB細胞解析方法を示す。脾臓細胞のCD19とGL-7を染色してフローサイトメトリ法で展開すると、Germinal center B細胞 (CD19⁺GL-7⁺) とそれ以外のB細胞 (CD19⁺GL-7⁻) に分かれる。更にGerminal center B細胞をFSC値に従って細胞の大きさによって分離すると比較的大きな細胞のCentroblastと比較的小さな細胞のCentrocyteに分離できる。このFSCによるCentroblastとCentrocyteの分離はそれぞれがCXCR4高発現、低発現である報告と良く一致しており、以降の解析に採用した。

10

【0125】

図24は図22のマウスより摘出した脾臓細胞を経時的に調べたものである。安定化ガレクチン9投与後4日目にGerminal center B細胞が減少しており、CentroblastとCentrocyteが共に減少していることが判った (a,b)。またガレクチン9ノックアウトマウスにSRBCを投与し、4日目に脾臓細胞を解析すると、Germinal center B細胞、Centroblast及びCentrocyteの両者とも野生型と比較して多かった。これは安定化ガレクチン9投与から想定される生体内におけるガレクチン9の作用に矛盾しない。つまりガレクチン9は生体内においてもB細胞および抗体産生を抑制している因子であることが示唆された。よってB細胞及び抗体産生を負に制御するためにガレクチン9を分泌する細胞が存在するはずである。

20

【0126】

図25では先ずB細胞の細胞表面ガレクチン9発現を調べた。その結果B細胞はGerminal center B細胞も、それ以外のB細胞も全て細胞表面にガレクチン9を発現しており、Germinal center B細胞においてその発現が高いことが判った (a)。またGerminal center B細胞の中ではCentroblastの方が細胞表面ガレクチン9発現が高いことが判った (b)。一方、Germinal center B細胞で調べる限り、安定化ガレクチン9投与は細胞表面のガレクチン9発現に影響を与えないが、SRBCによる感作によっては細胞表面ガレクチン9発現細胞の割合が上昇することが判った。

30

【0127】

B細胞の成熟にはCD4⁺T細胞が深く関わっており、特にFollicular B helper T cells (TFH) と呼ばれるCD4陽性細胞の役割が大きいと言われている。そこで、図26ではSRBC投与7日目のマウス脾臓細胞をCD4及びTFHのマーカーと言われているCXCR5及びICOSで染色し、それぞれの細胞集団の細胞表面ガレクチン9発現をフローサイトメトリ法により調べた。(a~d)に示されたようにこれらのCD4⁺T細胞の細胞表面ガレクチン9発現レベルは様々である。特に高い発現を示したのはICOS⁻CXCR5⁺のCD4陽性細胞とICOS⁺CXCR5⁻のCD4陽性細胞である。これらの細胞がガレクチン9を分泌して抗体産生を制御している可能性が示された。

40

【0128】

これら細胞表面にガレクチン9を発現している細胞群は全身性エリテマトーデスを含む自己免疫疾患治療や診断に有用である可能性が示された。

【0129】

図27では、ヒト安定化ガレクチン9投与による作用を模式的に例示してまとめた。図1に示したように、ヒト安定化ガレクチン9を皮下投与するとその薬理効果は持続する。しかし、図2に示したように投与後に血中に現れる濃度は非常に低く、少なくとも免疫制御において薬効を持たない可能性が高い。皮下投与した投与部位及びリンパ管・リンパ節の経由時にはより高い濃度で存在していると考えられ、その際に免疫細胞に作用を与えて

50

いる可能性が考えられる。ところが、図2に示したように、投与したヒト安定化ガレクチン9は速やかに体内より排出されるため、高濃度のガレクチン9に作用を受けた免疫細胞が安定化ガレクチン9の排出後にそれに代わって免疫制御を行っている可能性が考えられる。本発明において、発明者らはガレクチン9を細胞表面に発現し、更にそれを分泌して T_H17 /Tregバランスを調整する新規細胞 T_H GAL9を発見した。更に T_H GAL9はヒト安定化ガレクチン9添加によって増加することも発見した。すなわち投与されたヒト安定化ガレクチン9は、その直接作用の他に T_H GAL9を誘導し、その誘導された T_H GAL9が局所でガレクチン9を必要な用量分泌して各種の細胞に作用すると考えられる。これは安定化ガレクチン9の免疫制御活性が持続することを矛盾無く説明する。発明者らは細胞表面ガレクチン9は分泌の中間状態であると考え、細胞表面ガレクチン9発現を指標として、 T_H GAL9以外のガレクチン9を分泌する(可能性がある)様々な細胞集団を発見した。それらの細胞は T_H GAL9のようにガレクチン9を分泌することで免疫を調整していると考えられる。

10

【0130】

〔ガレクチン9投与はLLC担癌マウスの生存を延長し、その際にpDC様マクロファージが増加する〕

図19(c)に示したように、発明者らは古典的樹状細胞(cDC)、形質細胞用樹状細胞(pDC)、及びpDC様マクロファージが細胞表面にガレクチン9を発現していることをMeth A 担癌マウスモデルで得られた細胞を用いて示した。さらに、本実施例では、別の癌種での検討例を示す。すなわち、図29に示す通り、ガレクチン9投与が担癌マウスの生存を延長し、その際にpDC様マクロファージが増加した。

20

(a) C57BL/6(、7~10週齢)にマウス肺癌由来腫瘍細胞株LLCを 5×10^5 細胞腹腔へ接種し(Day0)、当日よりヒト安定化ガレクチン9を30 μ g、3回/週で腹腔内投与(コントロールはPBS)した時の生存率変化を経時的に調べた結果を示す。横軸(Days after tumor inoculation)はLLC接種後の日数を、縦軸(Percent survival)は生存率をパーセントで表している。統計解析はログランク検定によって行った。

(b) (a)の7日目の腹腔細胞をCD11c、PDCA-1、Ly-6C及びF4/80の抗体で染色し、フローサイトメトリー法で解析した結果を示す。ガレクチン9投与群ではpDCマーカーであるCD11cとPDCA-1を発現しており、且つマクロファージマーカーであるLy-6CまたはF4/80を発現している細胞、つまりpDC様マクロファージの割合が優位に上昇していた。pDC様マクロファージがガレクチン9による生存延長に関与していることが想像される。各グループ5匹のマウスを用いてMean \pm SEMで表している。***P<0.001。

30

【0131】

〔ガレクチン9は試験管内においてM-CSFによるCD11c陽性細胞の分化をTim-3非依存的に促進する〕

図30に示す通り、本実施例において、ガレクチン9は、試験管内においてM-CSFによるCD11c陽性細胞の分化をTim-3非依存的に促進した。

(a) マウスの大腿骨及び脛骨から骨髓細胞を洗い出し、10%のウシ胎児血清と抗生物質を含むRPMI-1640培地中で2時間培養して接着細胞(成熟マクロファージ)を除去した。残った骨髓細胞をGM-CSF(Peprotech、20ng/ml)またはM-CSF(R & D systems、20ng/ml)を含む培地中で7日間培養し、今度は非接着細胞を洗浄して除き、接着細胞をフローサイトメトリーで解析した。接着細胞の>95%はF4/80とCD11b二重陽性であることから、成熟したマクロファージだと判定された。その細胞におけるCD11cの発現が、分化中に与えたヒト安定化ガレクチン9(30nM)によってどのように影響されるかを調べた結果を示す。ガレクチン9はGM-CSFで分化したマクロファージのCD11c発現には影響を与えなかったが、M-CSFで分化させたマクロファージのCD11c発現を上昇させた。

40

(b) (a)のM-CSFによる分化アッセイをガレクチン9の阻害剤であるラクトース(30mM)またはコントロールとしてスクロース(30mM)の存在下で行った結果と、Tim-3中和抗体(eBiosciences、RMT-3-23、10 μ g/ml)またはアイソタイプコントロール抗体(eBiosciences、10 μ g/ml)中に行った結果を示す。ラクトースはガレクチン9によるCD11c発現上昇を阻害したが、Tim-3の中和抗体はCD11c発現上昇に影響を与えなかった。Tim-3はガ

50

レクチン9のターゲットとして最もよく知られた分子であるが、本実験のガレクチン9によるCD11c発現上昇においては関与が無いことが示唆された。

【0132】

〔ガレクチン9とM-CSFで分化したCD11c陽性細胞はpDC様マクロファージの前駆体細胞である〕

図30で、ガレクチン9はM-CSFで分化するマクロファージのCD11c発現を上昇させることより、マクロファージを樹状細胞へ分化させている可能性が示された。既報のようにガレクチン9はヒト末梢血単核球の古典的樹状細胞への分化を促進する(Dai, S.Y. et al, J Immunol, 2005 175:2974-81)。そこで、本実施例では、得られた細胞の表現型を詳細に調べた。その結果を、図31に示す。

(a) フローサイトメトリー法による解析ではガレクチン9によってB220、I-A/I-E発現が上昇し、一方でCD14発現が減少することが判った。一方マクロファージのマーカースとして汎用されるF4/80はガレクチン9の添加によらず高発現しており、マクロファージの表現系を維持している。

(b) 転写因子mRNAをリアルタイムRT-PCRで解析したところ、樹状細胞の分化に必要とされるIRF4及びIRF8がガレクチン9によって上昇していた。またpDCの前駆細胞に発現しているとされるSpiBがガレクチン9によって上昇しており、成熟pDCの転写因子E2-2を抑制するとされるId2もガレクチン9添加によって上昇した。

(c) さらにTLR7、TLR8及びTLR9のmRNAもガレクチン9添加によって上昇した。

(d) M-CSFとガレクチン9存在下で7日間分化させたマクロファージに表示のTLRアゴニストを添加し、6時間培養した後でIFN- α とIFN- β mRNA発現をリアルタイムRT-PCRで測定した結果を示す。用いたアゴニストはそれぞれLPS(100ng/ml、Sigma):TLR4アゴニスト、R848(5 μ g/ml、Imgenex):TLR7/8アゴニスト、CpG(TypeA CpG ODN1585、10 μ g/ml、Invivogen):TLR9アゴニストである。成熟したpDCであればこれらTLRアゴニスト刺激によってタイプ1インターフェロンを高発現するはずであるが、高い上昇は見られなかった。これらの結果、M-CSFとヒト安定化ガレクチン9によって分化したマクロファージはpDCに近い表現型を示すが成熟したpDCには達しておらず、よってpDC様マクロファージの前駆体と考えられる。ガレクチン9はマクロファージをpDC様マクロファージへと分化誘導することが示唆された。

【0133】

〔ガレクチン9とM-CSFで分化したCD11c陽性細胞はLPS刺激によってpDC様マクロファージに成熟する〕

図32に示すように、ガレクチン9とM-CSFで分化したCD11c陽性細胞は、LPS刺激によってpDC様マクロファージに成熟した。

(a) これまでの結果よりガレクチン9はM-CSFで分化したマクロファージをpDC様マクロファージの前駆体と思われる表現系の細胞に分化させることが示された。その細胞にLPS刺激を与えることでpDC様マクロファージへと分化が進むかどうかを検討した。図30の方法でM-CSFとガレクチン9により分化したマクロファージを100ng/mlのLPS(コントロールはPBS)中で24時間培養しCD11c、Ly-6C及びF4/80の発現をフローサイトメトリー法で解析した結果を示す。サンプル数はそれぞれ4で統計解析している。LPS刺激によってpDCの表現型であるCD11cとPDCA-1二重陽性細胞の割合が上昇し、一方でマクロファージの表現型であるLy-6C及びF4/80の発現も上昇した。これはLPS刺激によって前駆体から成熟度の高いpDC様マクロファージへと分化が進んだ結果と考えられる。

(b) 図30の方法でM-CSFとガレクチン9により分化したマクロファージを100ng/mlのLPS(コントロールはPBS)中で6時間または24時間培養し、表示のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで測定した結果を示す。mRNA発現量は2マイクログロブリンまたはグリセロールデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼのmRNA発現で標準化し、縦軸に表した。サンプル数はそれぞれ4で統計解析している。**P<0.01、***P<0.001。pDCを特徴付けるタイプ1型インターフェロンの発現に必須な転写因子であるIRF7がLPS刺激によって顕著に上昇している。また成熟したpDCに高発現しているとされるE2-2はLPSを6時間処理することによって著明に上

10

20

30

40

50

昇し、24時間後は逆に低下した。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

(c) 図30の方法でM-CSFとガレクチン9で分化させたマクロファージを100ng/mlのLPSで24時間培養し(コントロールはPBS)、I-A/I-Eの発現をフローサイトメトリー法で解析した結果の一例を示す。グレーのヒストグラムはアイソタイプコントロール、破線のヒストグラムがPBSコントロール、実線のヒストグラムがLPS刺激。LPS処理群とコントロールPBS群(それぞれn=4)で、I-A/I-E陽性細胞の割合を棒グラフに表し、統計解析した結果を示す。I-A/I-Eの発現はLPS刺激によって上昇した。*P<0.05。

これらの結果、ガレクチン9によってpDC様マクロファージの前駆体と考えられる細胞に分化したマクロファージはLPS刺激によってより成熟したpDC様マクロファージの表現型を示すことが確認された。

【0134】

図32では、ガレクチン9によって分化したpDC様マクロファージ前駆体がLPS刺激によって成熟したpDC様マクロファージの表現型になることを示した。さらに、その成熟型pDC様マクロファージの機能を調べた。その結果を、図33に示す。

(a) pDCはタイプ1型インターフェロンを高発現することが知られているので、*In vitro*で成熟させたpDC様マクロファージがタイプ1型インターフェロンの代表であるIFN- γ とIFN- β を分泌するか否かをELISAで検討した。図32の方法でLPS刺激を24時間加えたpDC様マクロファージに横軸に表示したTLRアゴニスト(コントロールはPBS)を添加し、18時間培養した培養上清中のIFN- γ とIFN- β の濃度をPBL Interferon Sourceより購入した特異的ELISAキットにより定量し、濃度を縦軸に示した。サンプル数はそれぞれ4で統計解析した。***P<0.001。用いたTRLアゴニスト濃度はLPS: 100 ng/ml、R848: 5 μ g/ml、CpG: 10 μ g/mlである。この結果IFN- γ の産生は確認され、その発現がR848(TLR7/8アゴニスト)によってコントロールより上昇することが示された。

(b) *In vitro*で成熟させたpDC様マクロファージが抗癌作用を示すことを調べた結果を示す。癌細胞としてマウスリンパ腫YAC-1細胞を用いた。この細胞を細胞膜を染色する色素DIOC₁₈₍₃₎(3,39-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate, Sigma)で染色し、これに30倍の細胞数のナイーブNK細胞を共培養した場合、及びナイーブNK細胞に加えてその2倍細胞数の*In vitro*で分化させた成熟pDC様マクロファージを加えて共培養した場合でYac-1細胞の細胞死を調べた。ナイーブNK細胞はマウス脾臓細胞よりMACS Anti-DX5 beads(Miltenyi Biotech)を用いて精製した。共培養は5時間行い、その後ヨウ化プロピジウムで死細胞を染色し、DIOC₁₈₍₃₎陽性細胞(全Yac-1細胞)の内何パーセントが細胞死しているかをフローサイトメトリー法によって解析した。コントロールとしてYac-1単独培養も行った(横軸(-)のサンプル)。各サンプル数は4で統計解析している。***P<0.001。この結果*In vitro*で成熟させたpDC様マクロファージはNK細胞による抗癌活性を有為にし上昇させた。NK細胞による抗癌活性はそれが内包し放出する細胞障害性タンパク質であるGranzyme BとPerforinの働きが大きい。そこで*In vitro*で成熟させたpDC様マクロファージとNK細胞を前述の比率で5時間共培養し、細胞をCytotfix/Cytoperm溶液(BD Biosciences)を用いて固定化・浸透化し、抗Granzyme B抗体(Clone 16G6, eBiosciences)と抗Perforin抗体(Clone eBioMAK-D, eBiosciences)で染色し、フローサイトメトリー法で解析した結果を示す。コントロールはNK細胞単独培養(図中横軸 - と表示)。サンプル数はそれぞれ4で統計解析している。その結果*In vitro*で成熟させたpDC様マクロファージはNK細胞のGranzyme BおよびPerforin発現を上昇させることが判った。これらの結果より、ガレクチン9はpDC様マクロファージへの分化を促進することが*In vitro*で確認され、その細胞をLPSで成熟させると、NK細胞の活性化を介した抗癌作用を促進することが示された。図29に示したようにガレクチン9を投与すると坦癌マウスの生存を延長し、その際にはpDC様マクロファージが増加する。pDC様マクロファージは図33に示したようなNK細胞の活性化等を介して生体の抗癌作用を高めていると考えられ、それが坦癌マウスの生存延長の一因だと考えられる。

【0135】

[参考例]

10

20

30

40

50

下記表 2 は、ヒト安定化ガレクチン 9 の血中動態 (図 1) の結果に基づき、モーメント解析法で各種薬物動態パラメーターを解析した結果を示す。下記表 2 中、「Model Independent Pharmacokinetic Analysis」は、「独立した薬物動態解析モデル」を意味する。「Dose」は、ヒト安定化ガレクチン 9 の用量を意味する。「Cmax」は、最高血中濃度を意味する。「Tmax」は、最高血中濃度到達時間を意味する。「AUC」は、血中濃度曲線下面積を意味する。「t1/2」は、半減期を意味する。「MRT」は、平均滞留時間を意味する。「CLtot」は、全身クリアランスを意味する。

【 0 1 3 6 】

【表 2】

Model Independent Pharmacokinetic Analysis (Moment)

Dose (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	Tmax (hr)	AUC (∞) (ng*hr/mL)	t1/2 (hr)	MRT (hr)	CLtot (L/hr)
0.02	0.019	4	0.24	9.9	16	12.7
0.06	0.063	4	0.61	3.9	5	16.4
0.2	0.446	1	9.52	5.2	12.2	3.2
0.6	0.943	2	16.86	7.6	12.5	5.9
2	2.552	4	43.73	13.2	16.2	6.9

【産業上の利用可能性】

【 0 1 3 7 】

以上、説明したとおり、本発明の細胞 (例えば、T_HGAL9細胞等) は、例えば、生体内でガレクチン 9 の分泌を介した免疫制御を行うことにより、自己免疫疾患、アレルギー疾患、腫瘍その他の疾患の治療又は前記疾患に由来する症状の軽減等に用いることができる。また、本発明の細胞は、例えば、細胞表面ガレクチン 9 がガレクチン 9 と IL-10 を分泌するタイプ 1 制御性 T 細胞 (Tr1 細胞) を同定する優れたマーカーであることにより、当該マーカーを使用して Tr1 細胞を分離するなどに応用できる。

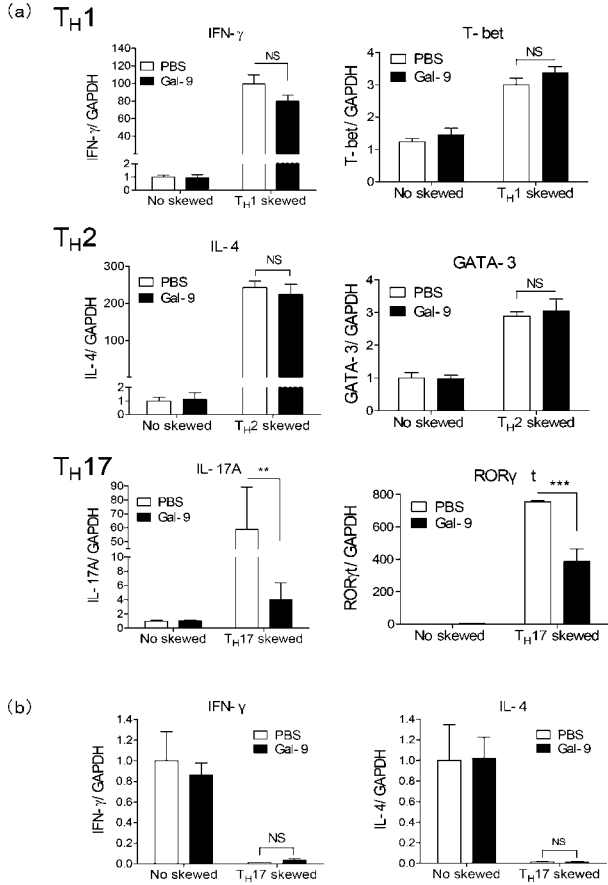
さらに、本発明は、上記説明並びに前述の実施形態及び実施例の記載に限定されず、特許請求の範囲から逸脱しない限りにおいて、任意の改変及び変形が可能である。

10

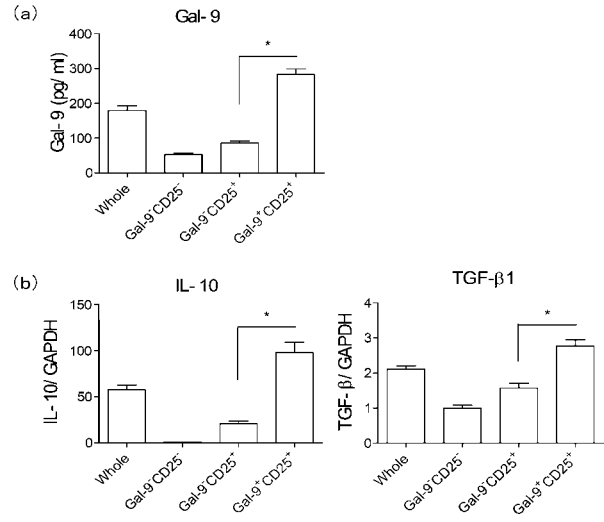
20

30

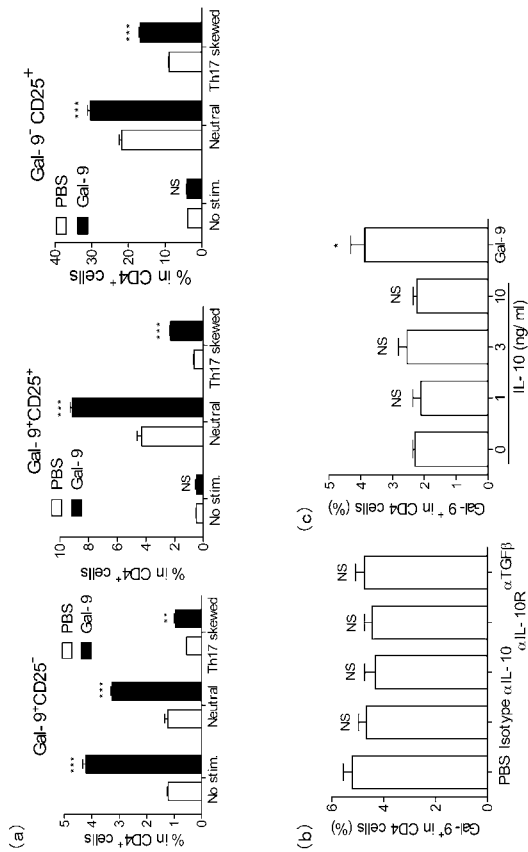
【 図 6 】



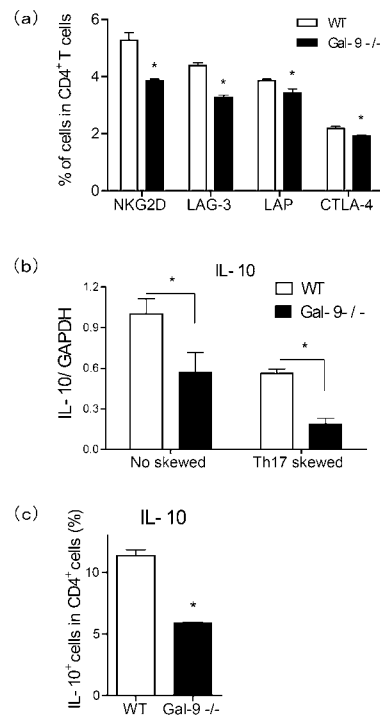
【 図 1 0 】



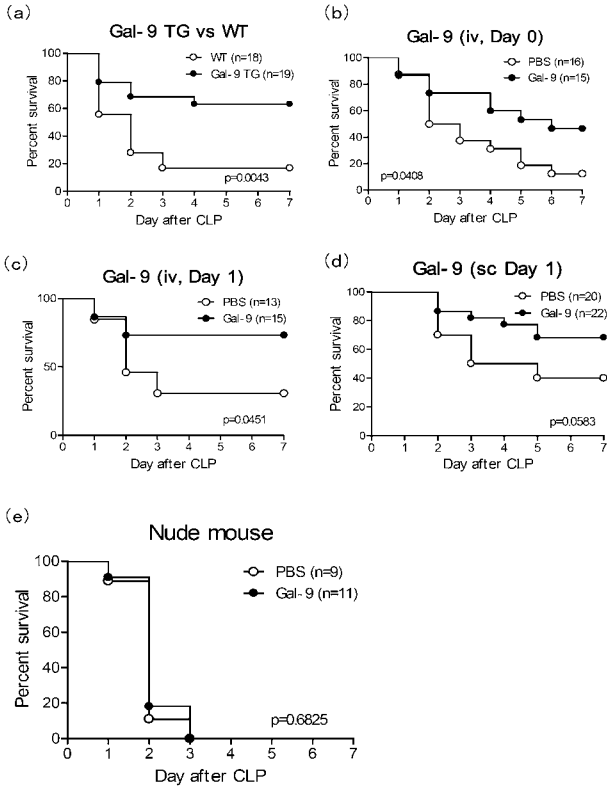
【 図 1 1 】



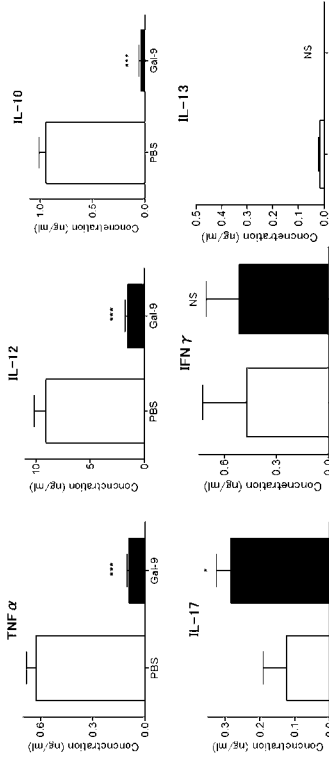
【 図 1 3 】



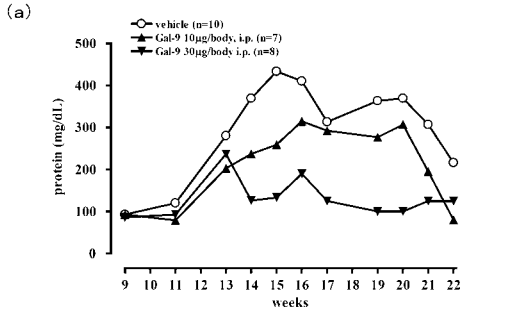
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

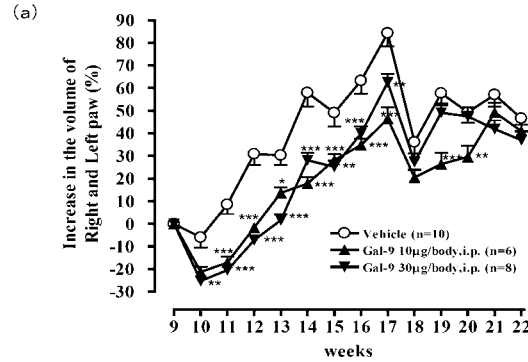


【 図 2 0 】

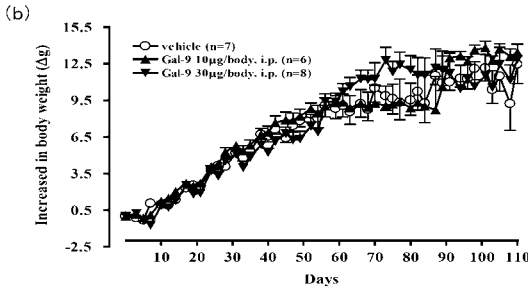


All data represent mean values of n=7-10 animals at each given time point. Statistical differences were analyzed by using Two-way ANOVA, and differences between groups were assessed using Bonferroni posttests. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

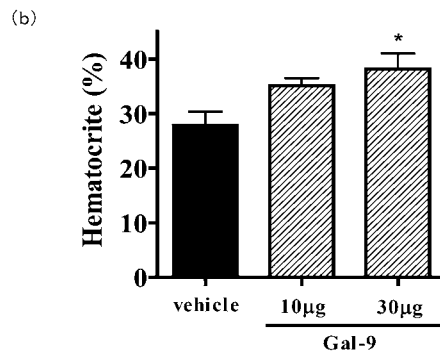
【 図 2 1 】



All data represent mean values \pm SEM of n=6-10 animals at each given time point. Statistical differences were analyzed by using Two-way ANOVA, and differences between groups were assessed using Bonferroni posttests. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

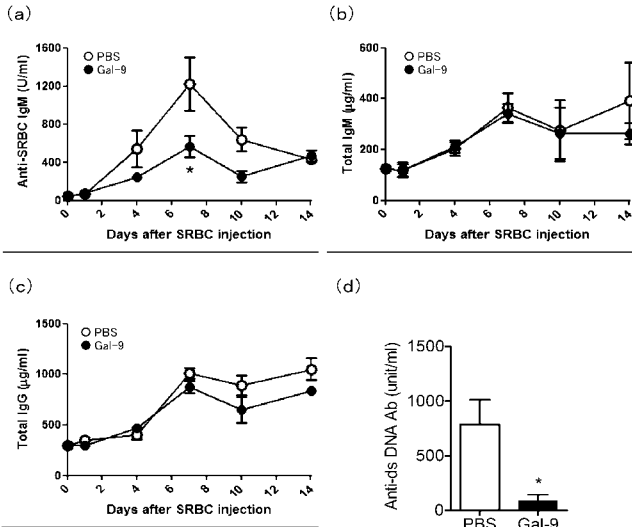


All data represent mean values \pm SEM of n=6-8 animals at each given time point. Statistical differences were analyzed by using Two-way ANOVA, and differences between groups were assessed using Bonferroni posttests. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

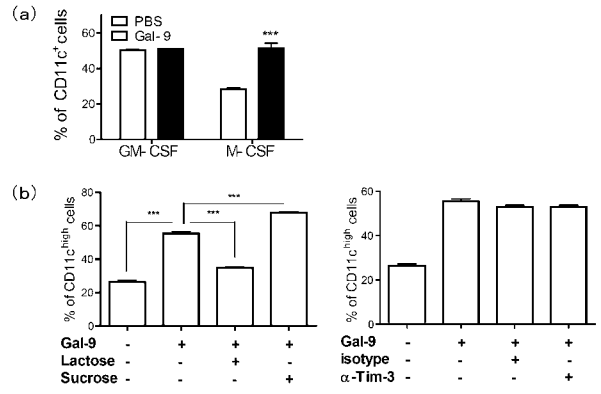


All data represent mean values \pm SEM of n=6-8 animals at each given time point. Statistical differences were analyzed by using One-way ANOVA, and differences between groups were assessed using Dunnett's Multiple Comparison Test. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

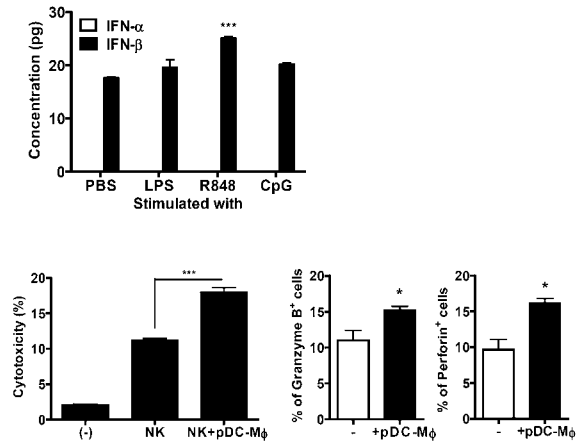
【 2 2 】



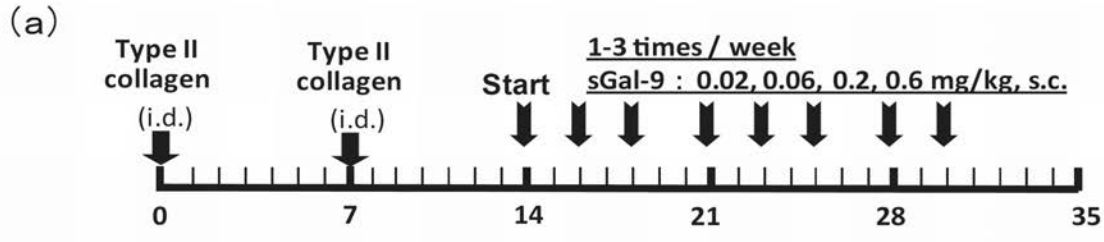
【 3 0 】



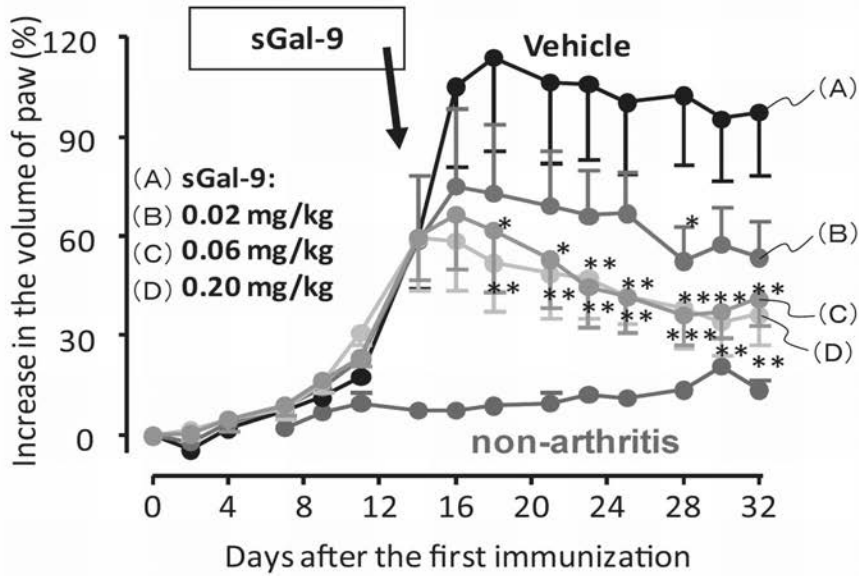
【 3 3 】



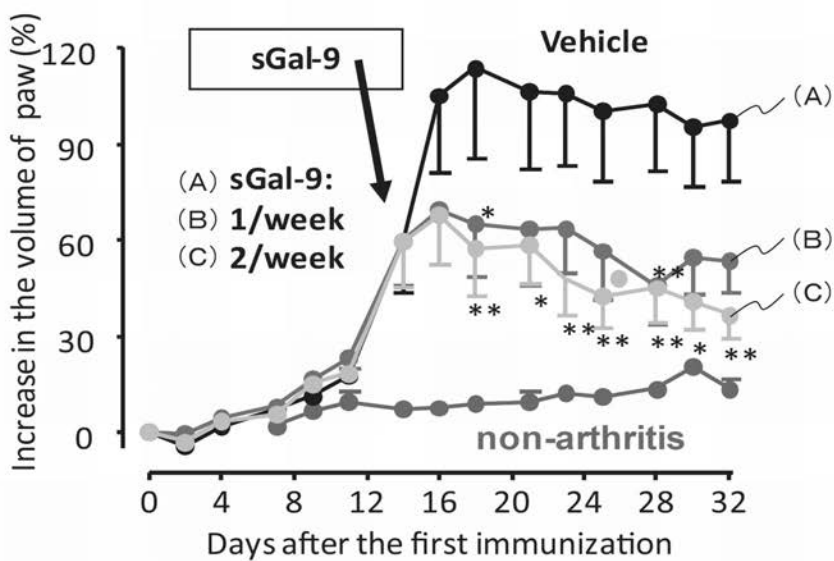
【 図 1 】



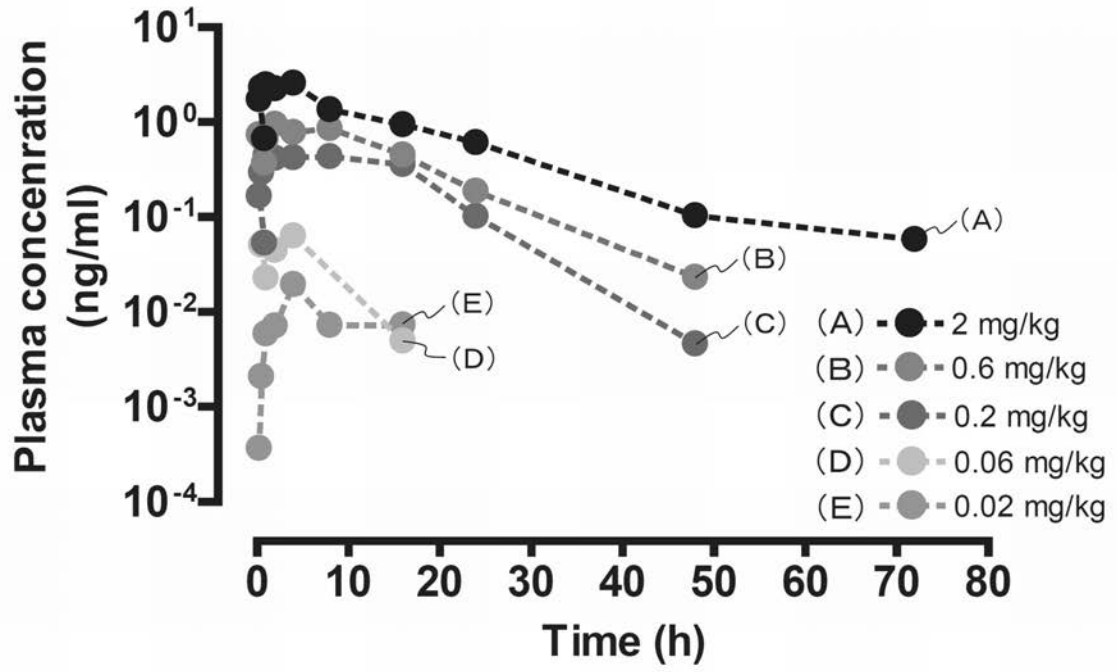
(b) 3 times/week, s.c.



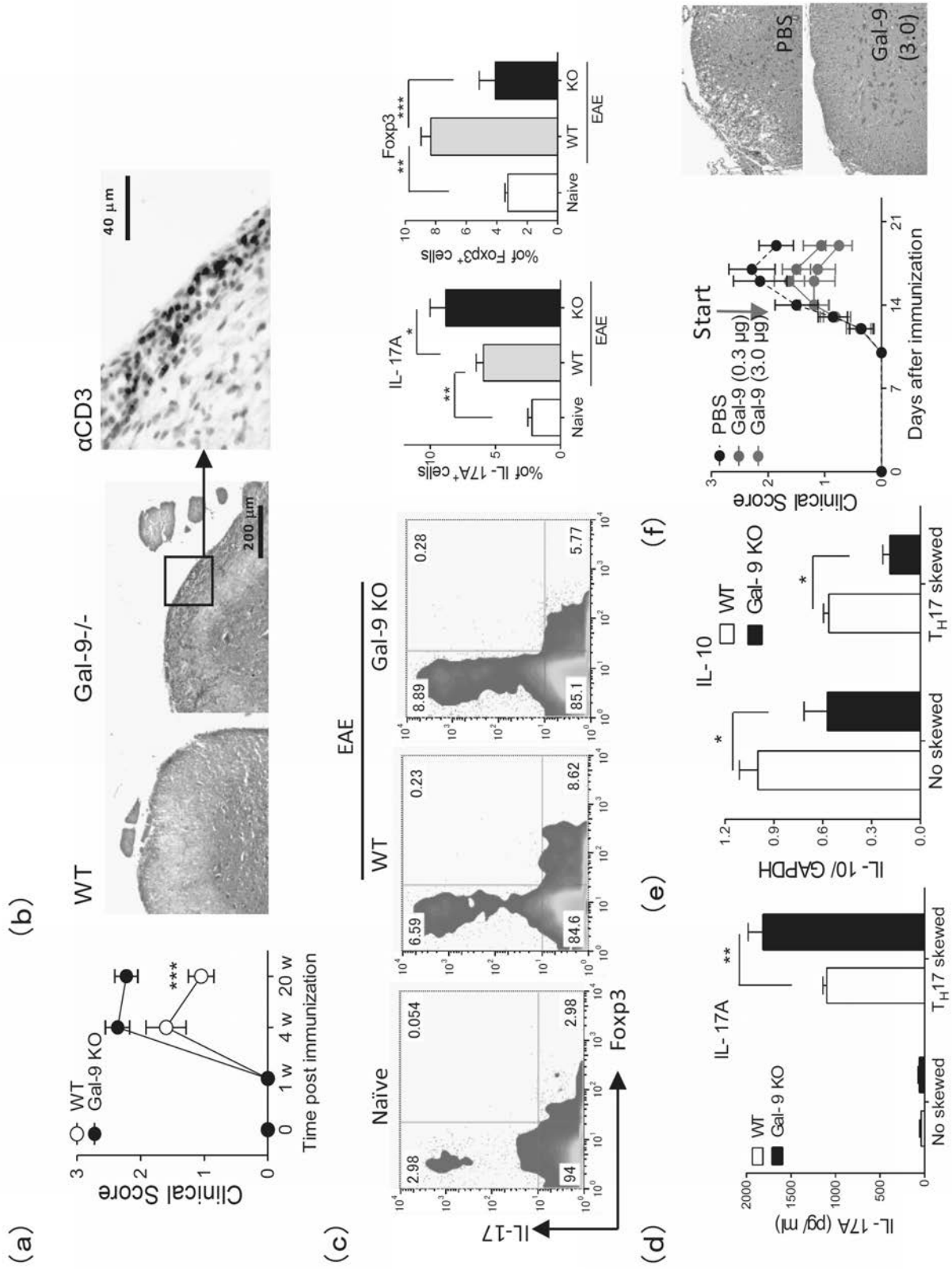
(c) 1/week or 2 /week at 0.6 mg/kg, s.c.



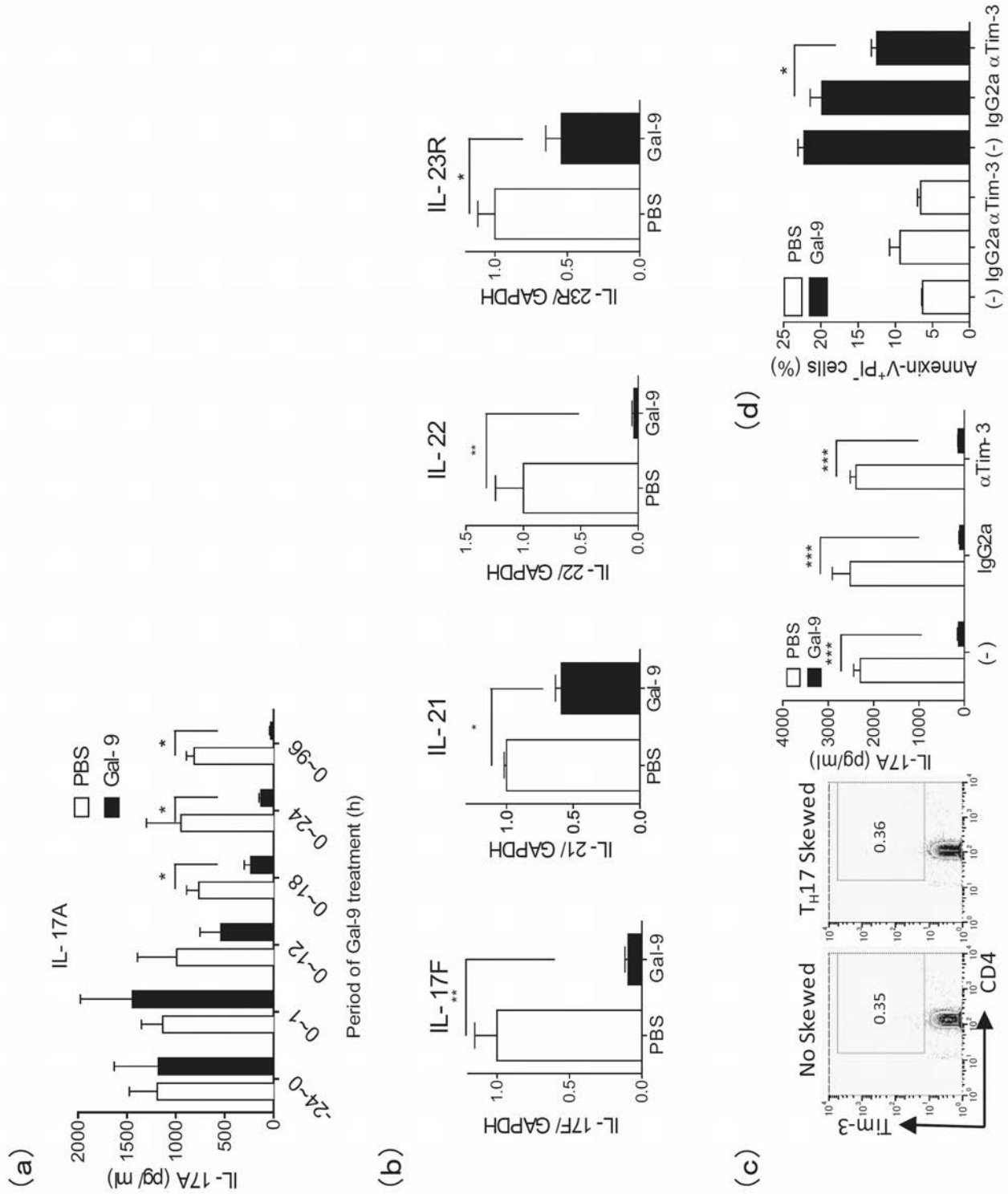
【 図 2 】



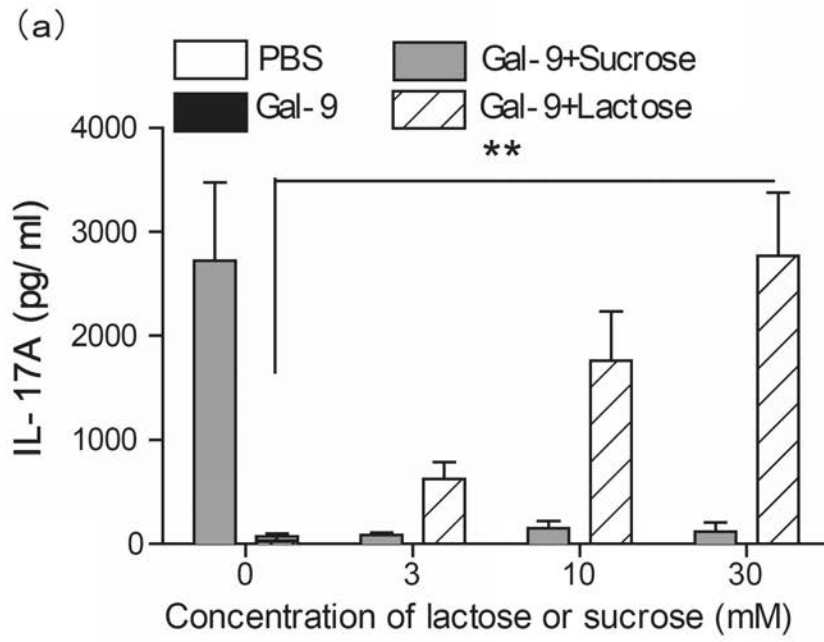
【 図 3 】



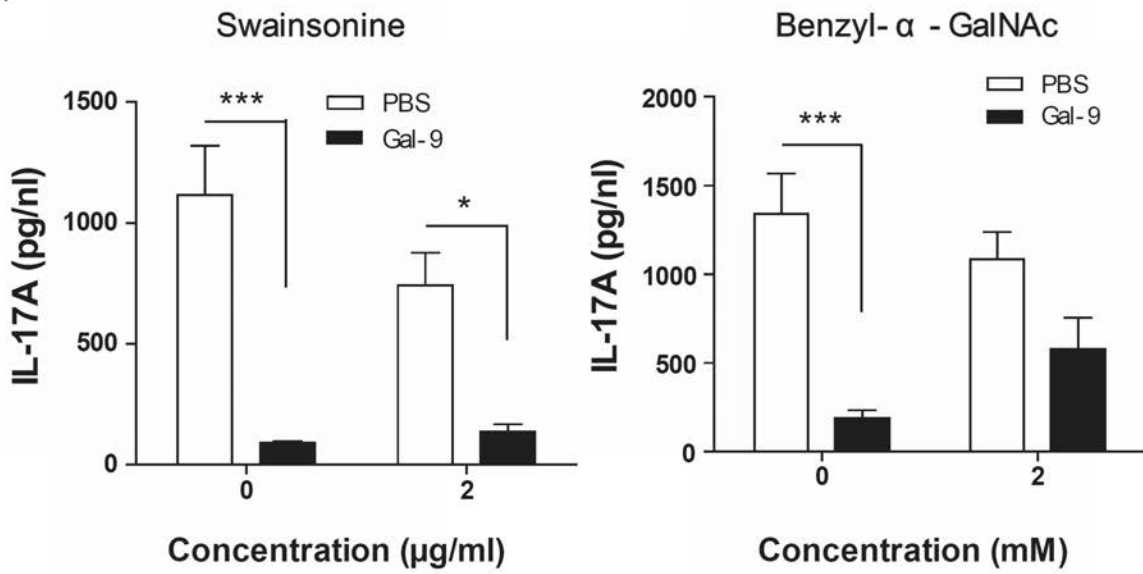
【 図 4 】



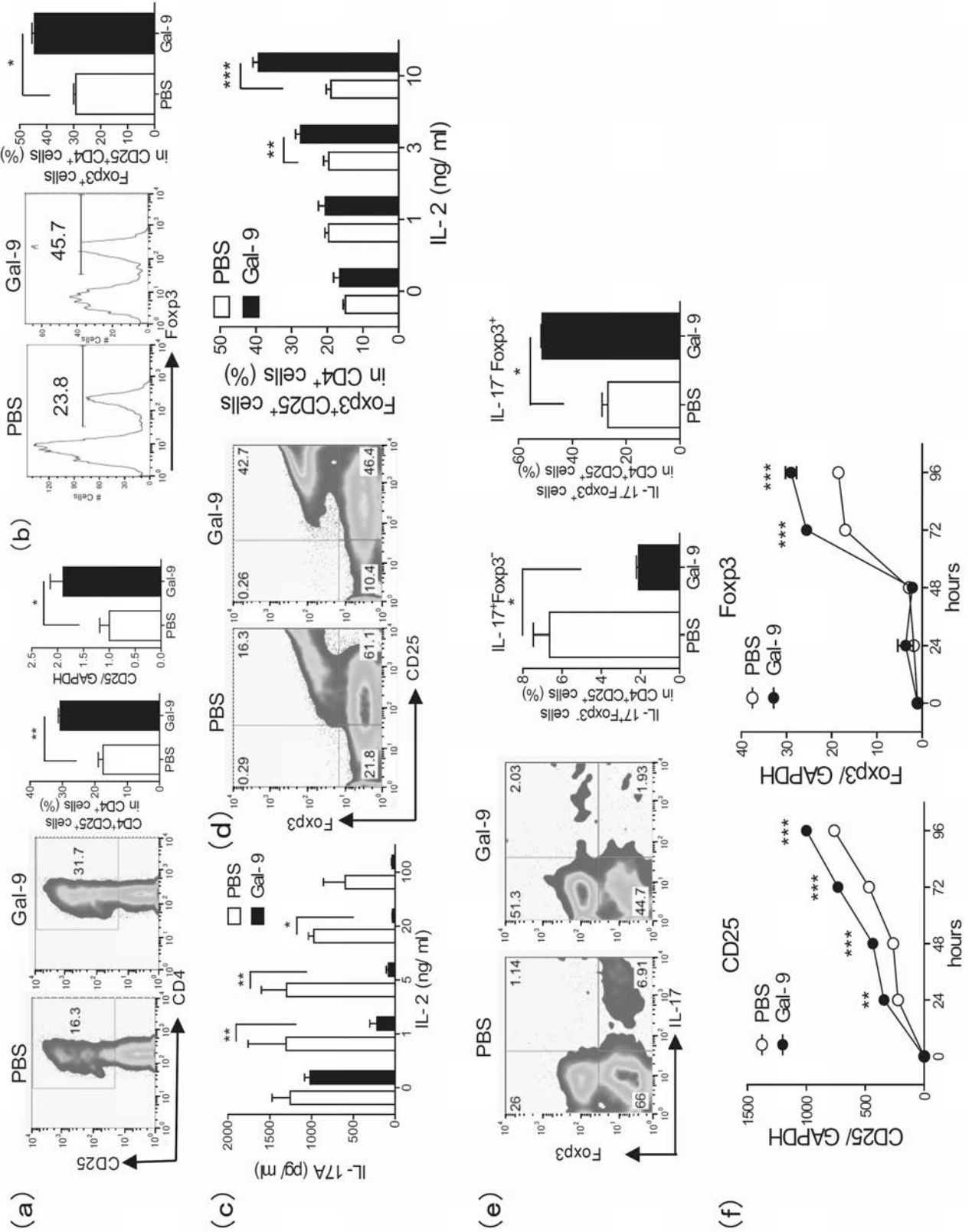
【 図 5 】



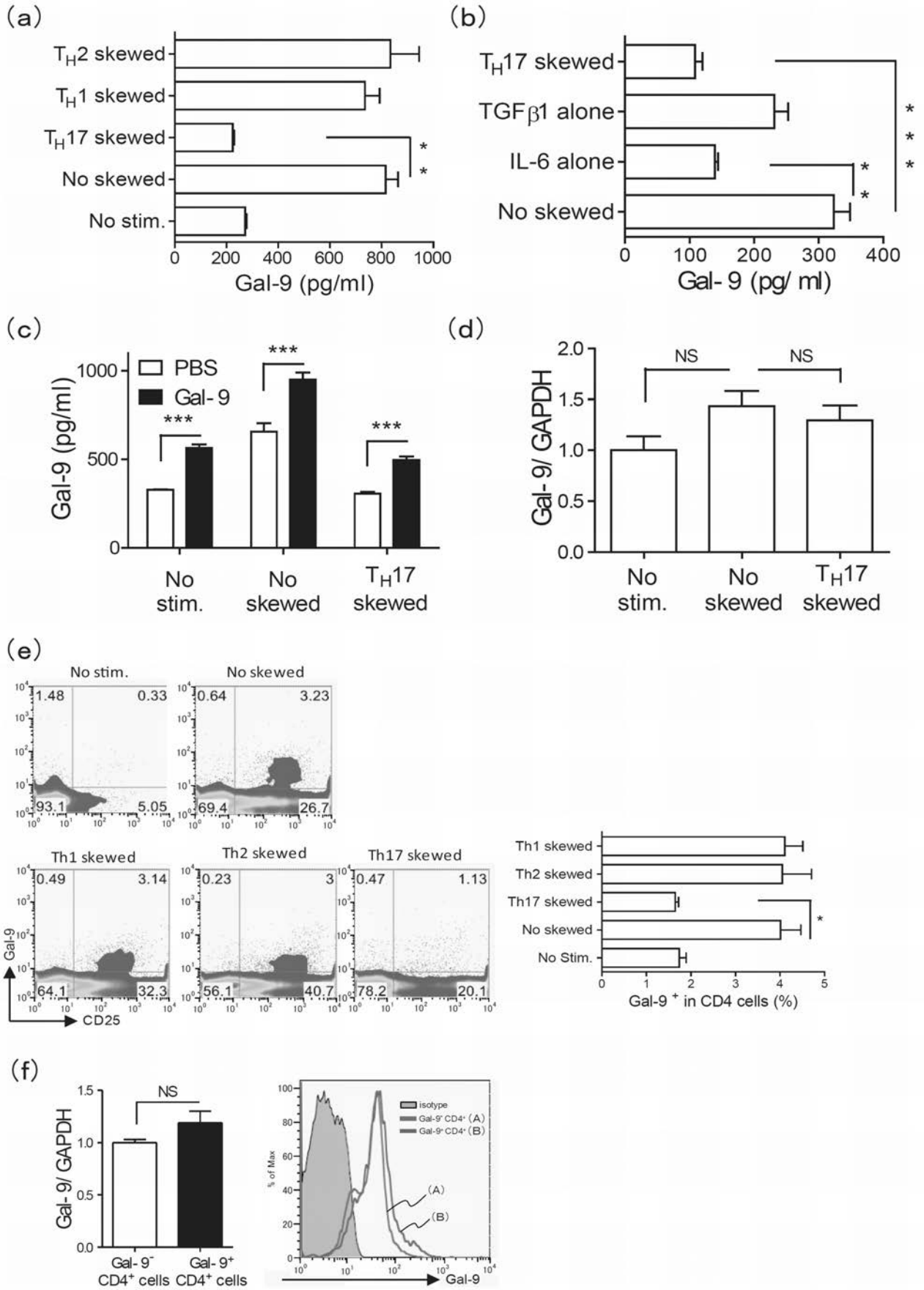
(b)



【 図 7 】

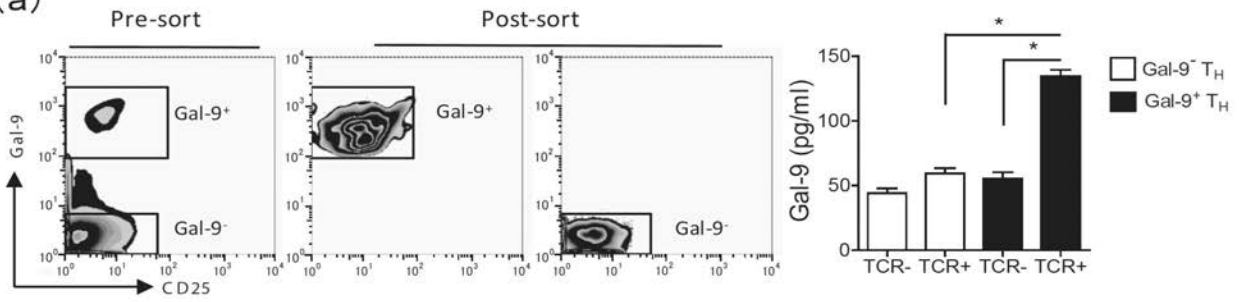


【 図 8 】

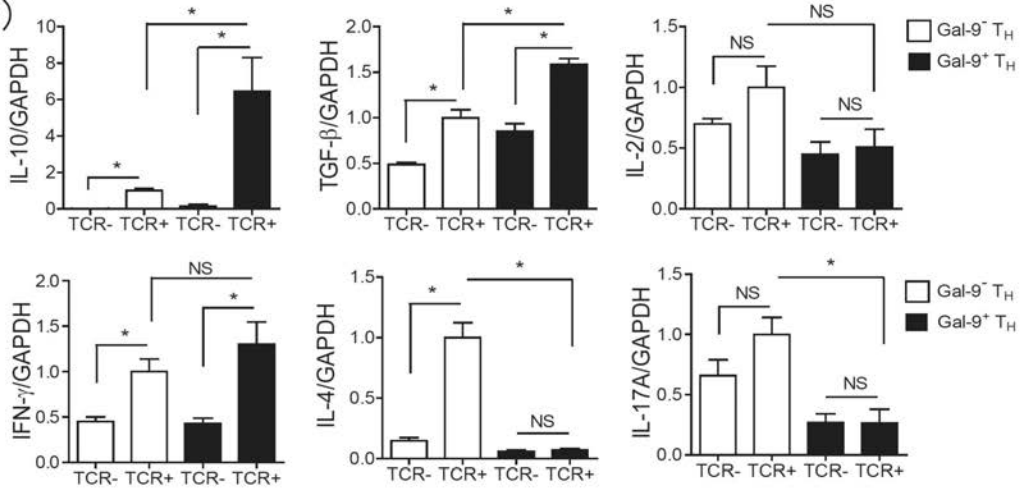


【 図 9 】

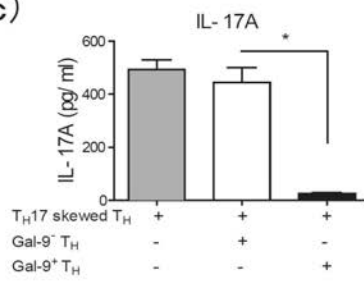
(a)



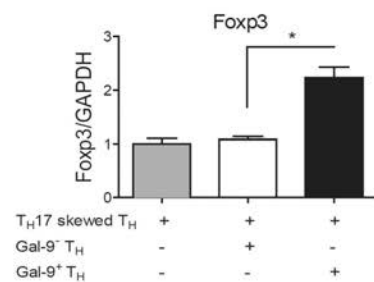
(b)



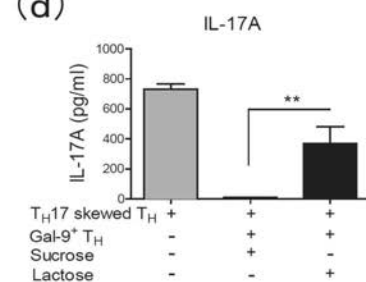
(c)



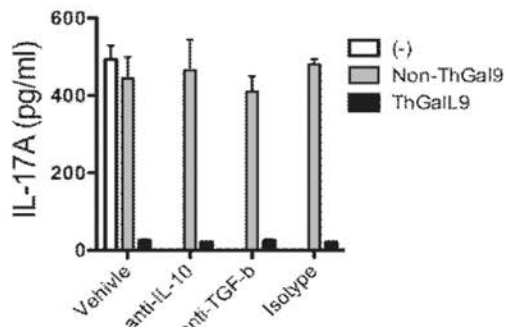
(d)



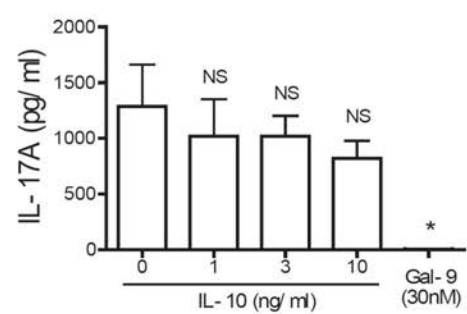
(e)



(e)

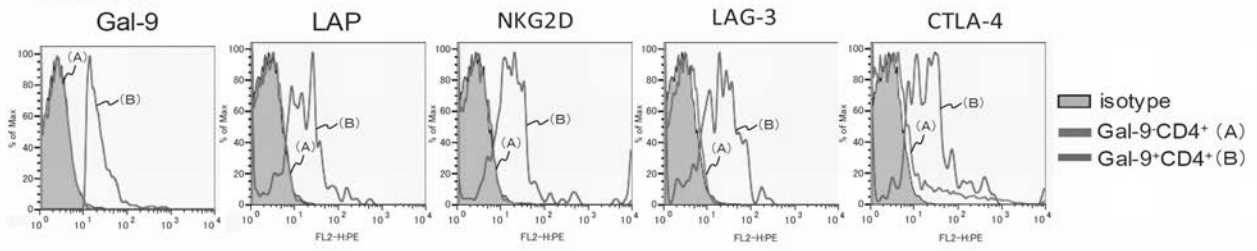


(f)

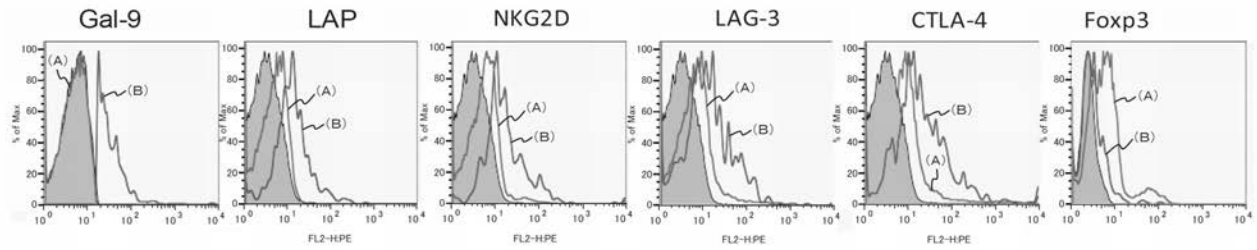


【 図 1 2 】

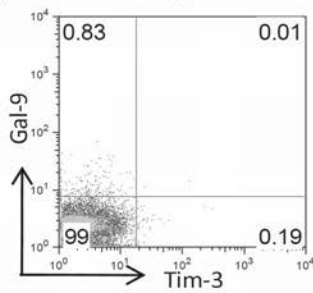
(a) CD25⁻ CD4⁺



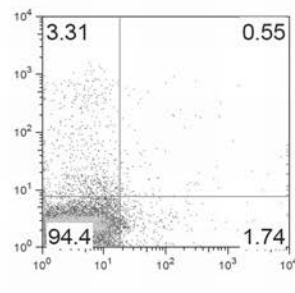
(b) CD25⁺ CD4⁺



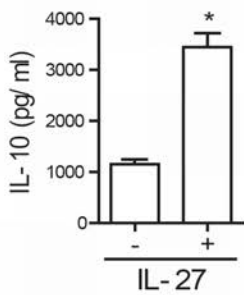
(c) Isotype



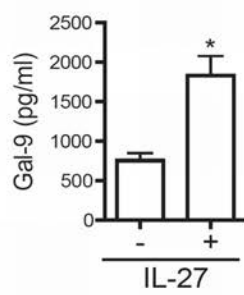
CD25⁺ CD4⁺



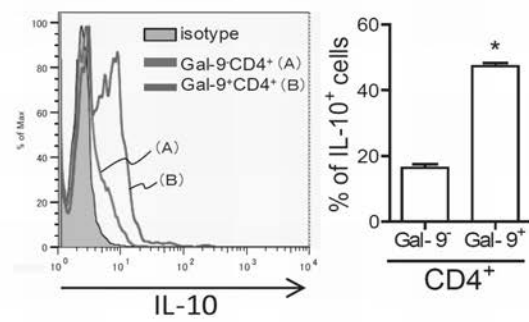
(d)



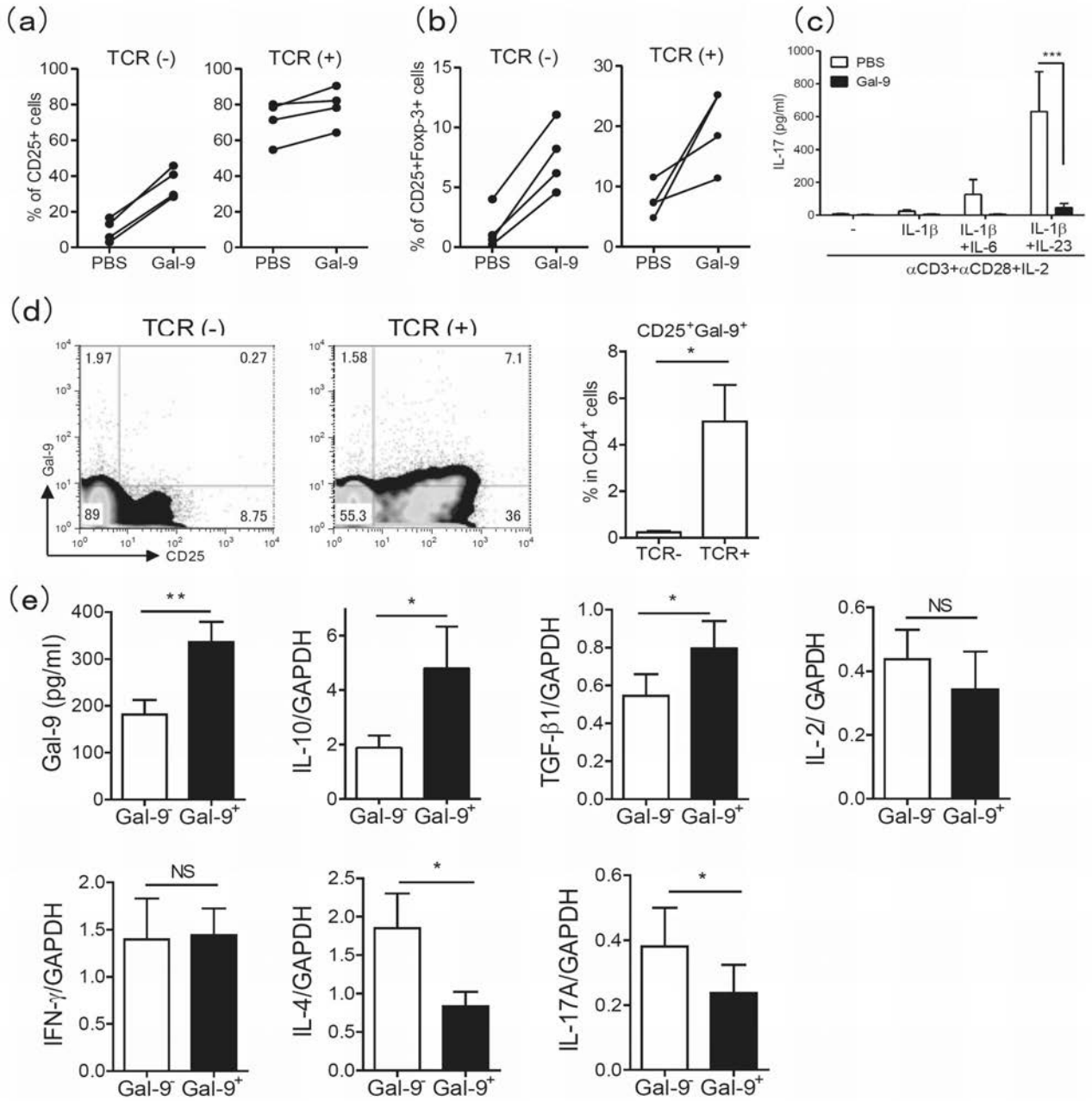
(e)



(f)



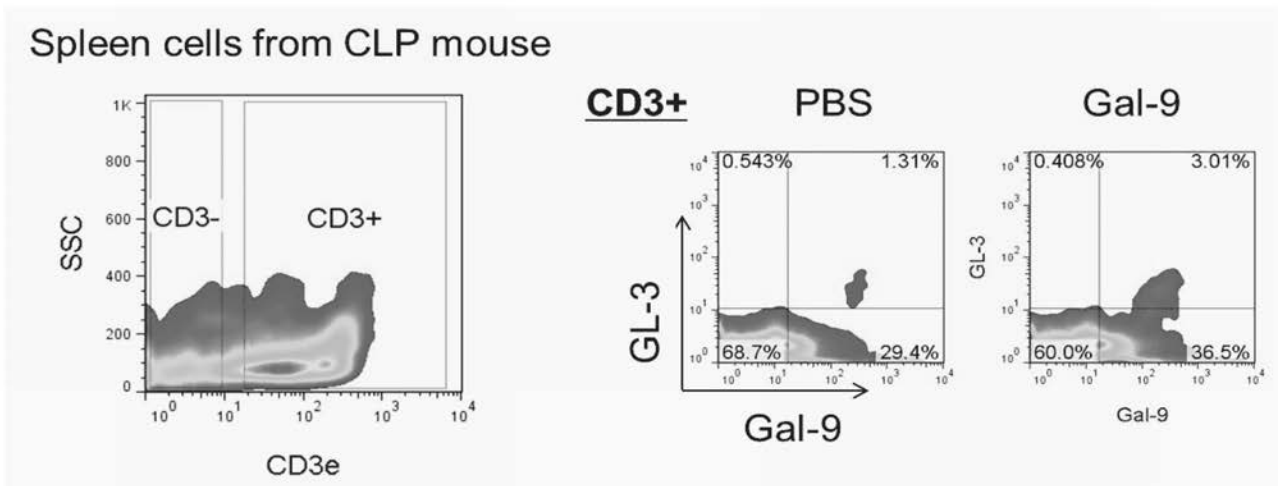
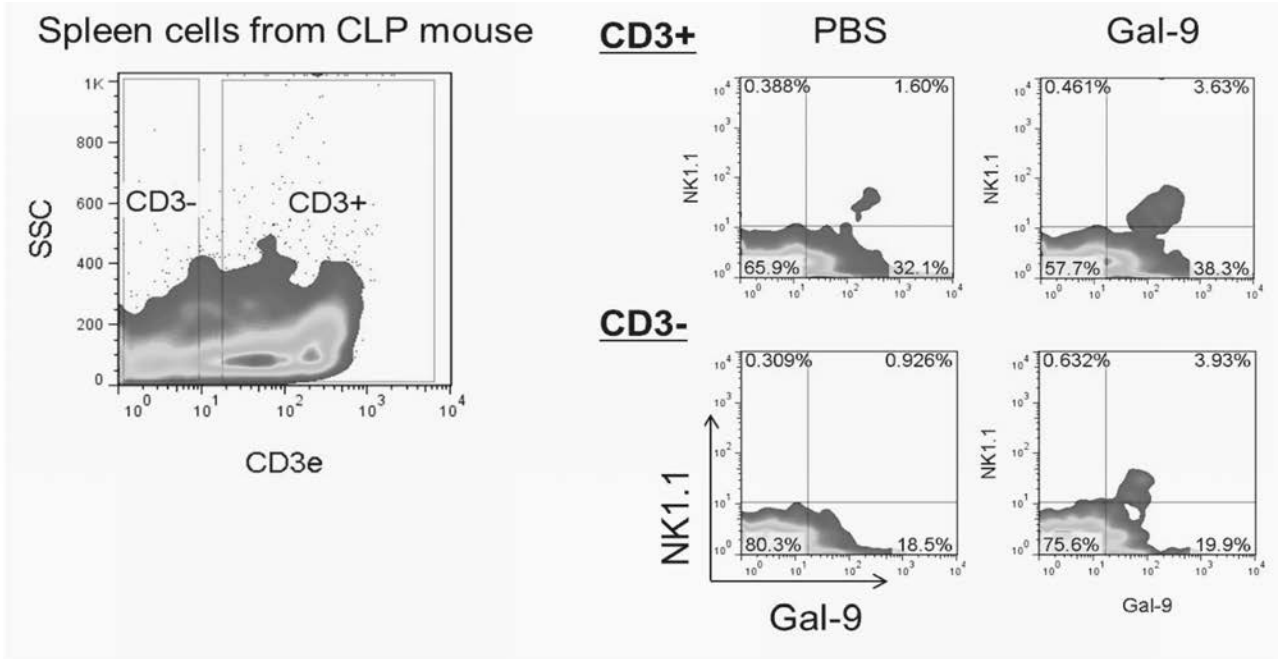
【 図 1 4 】



【 図 15 】

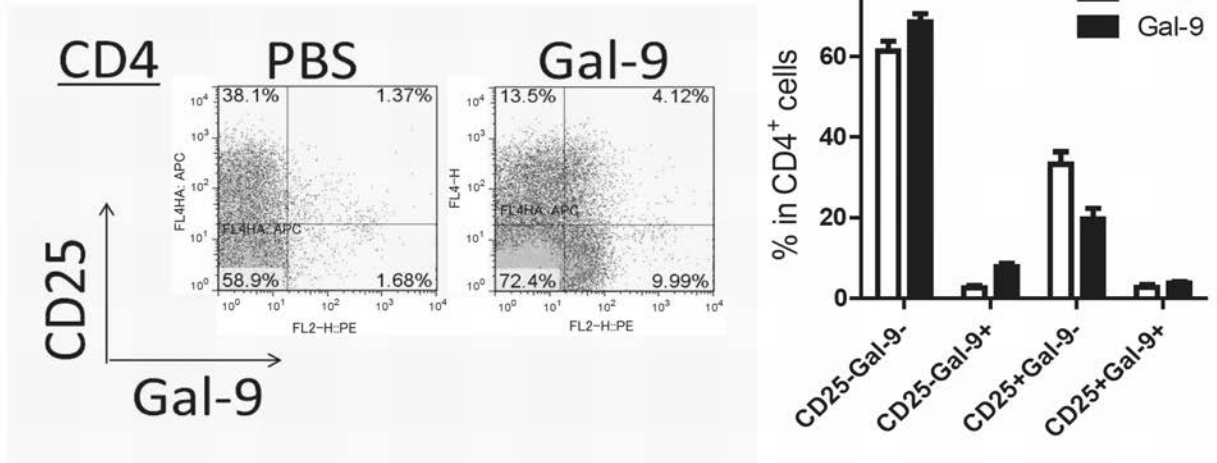


【 図 1 8 】

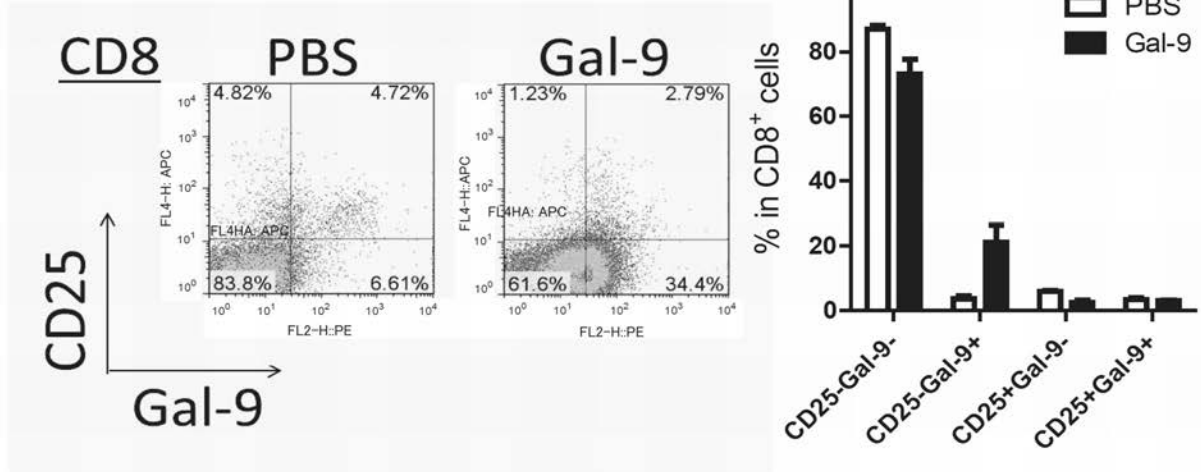


【 図 19 】

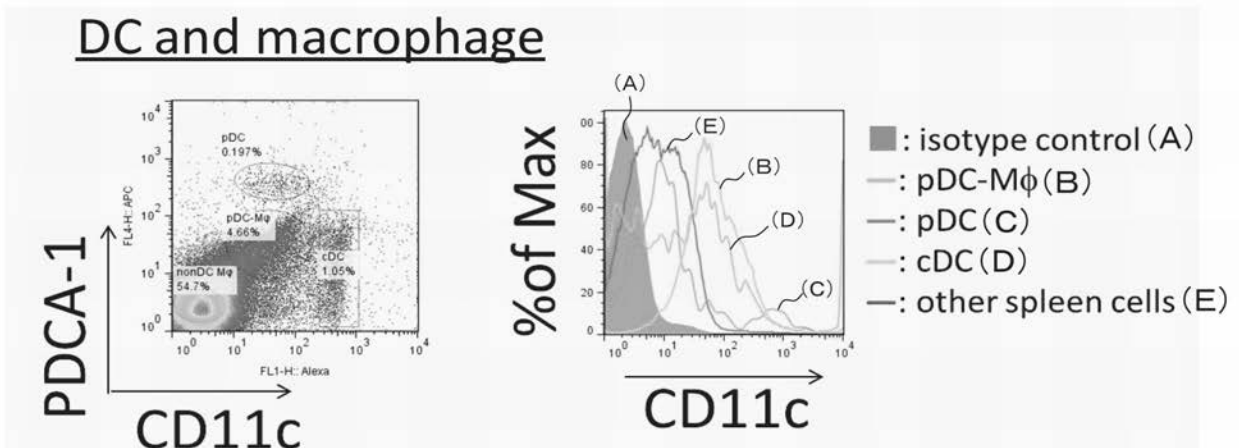
(a)



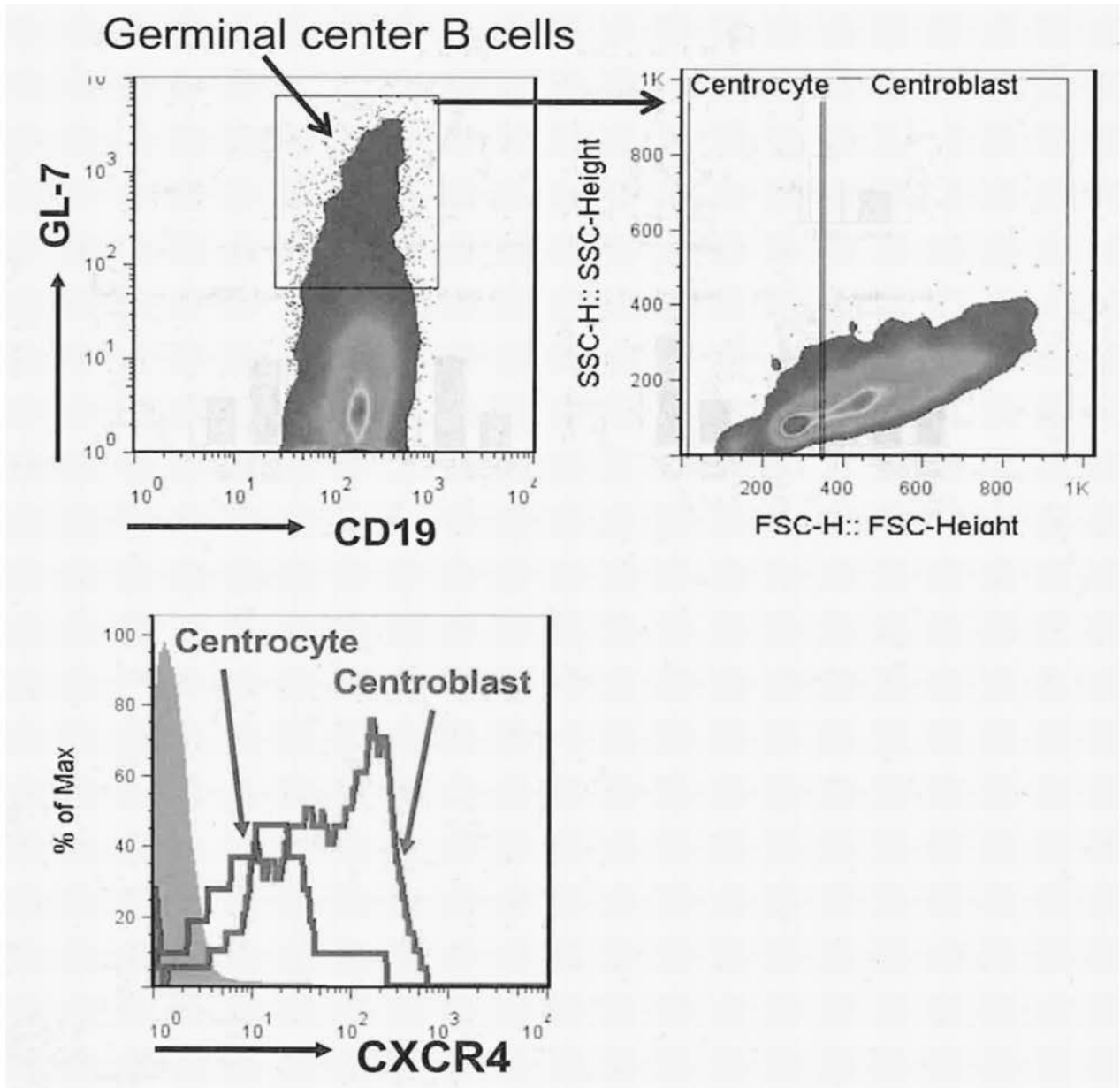
(b)



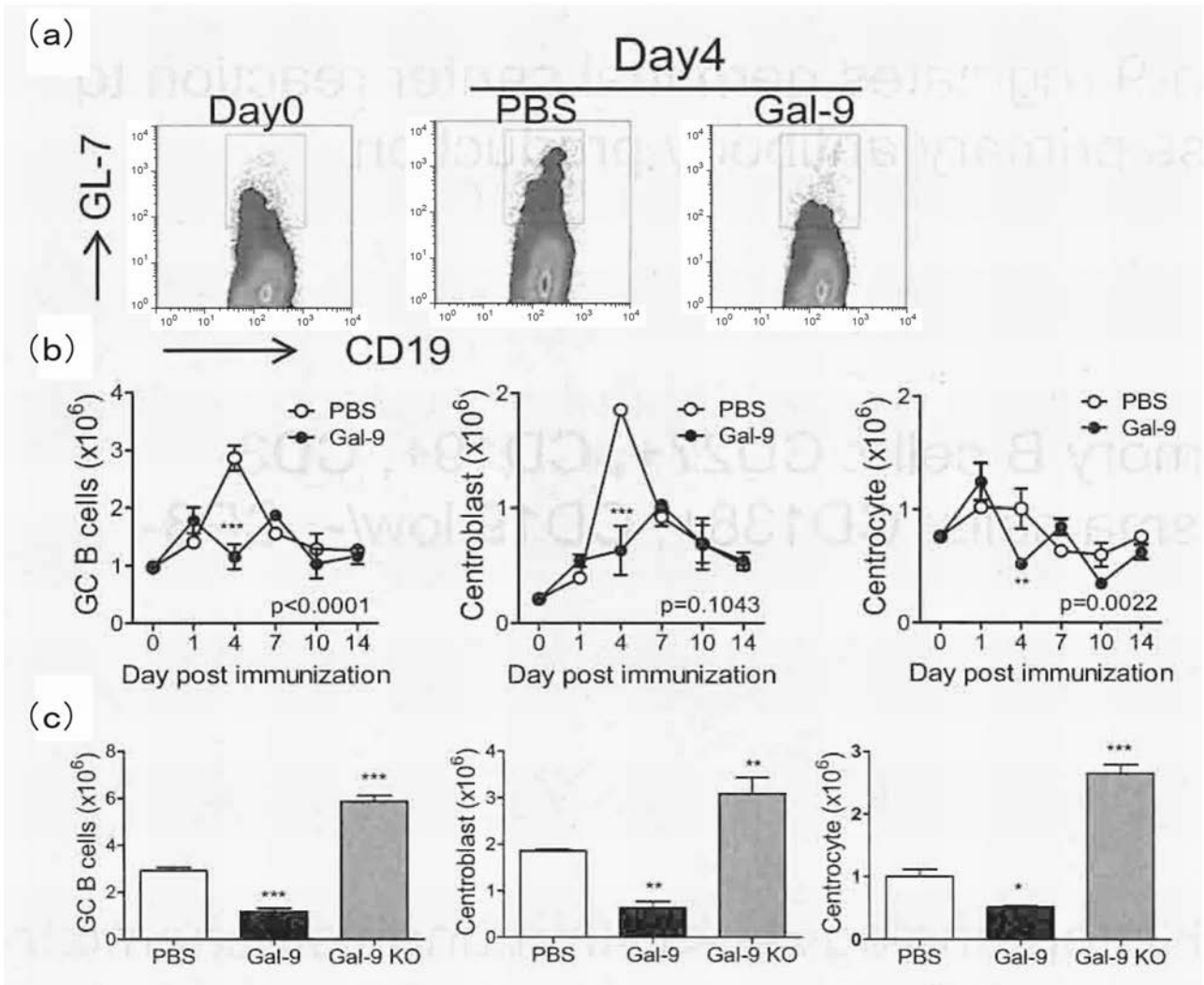
(c)



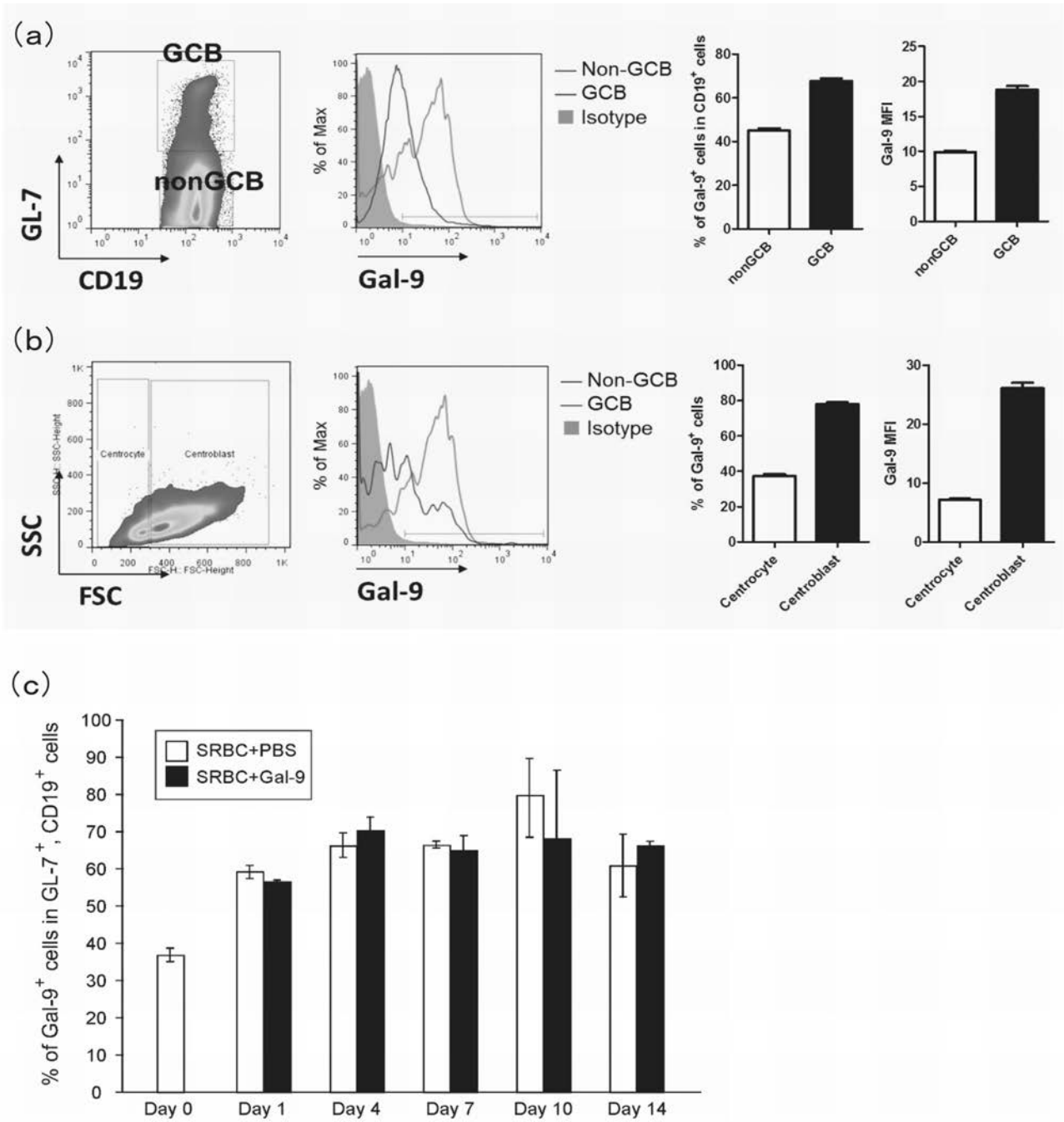
【 2 3 】



【 図 2 4 】

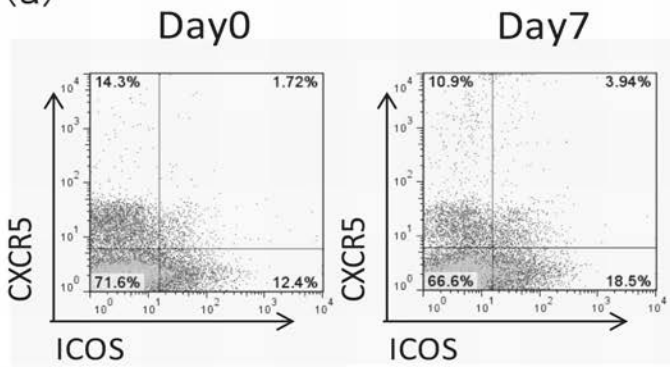


【 2 5 】

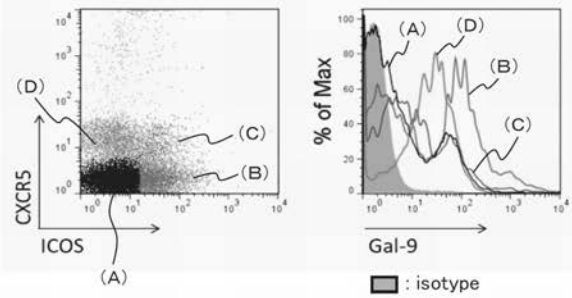


【 図 2 6 】

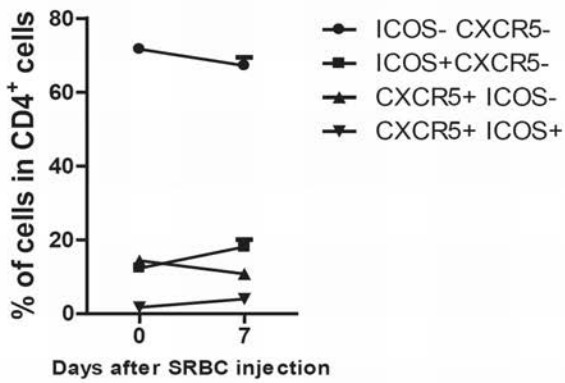
(a)



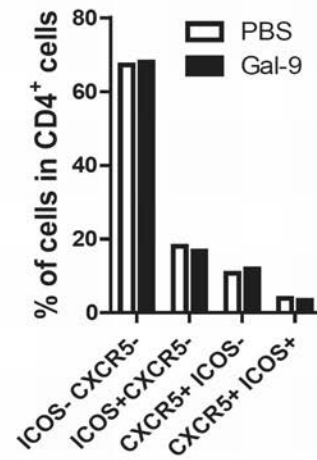
Gal-9 expression in each subset of quadrant (Day7)



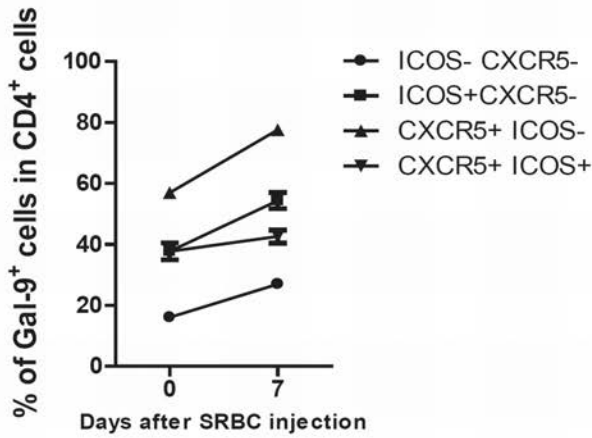
(b)



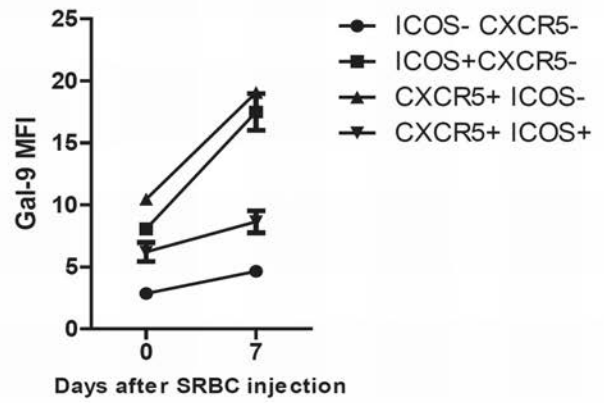
(c)



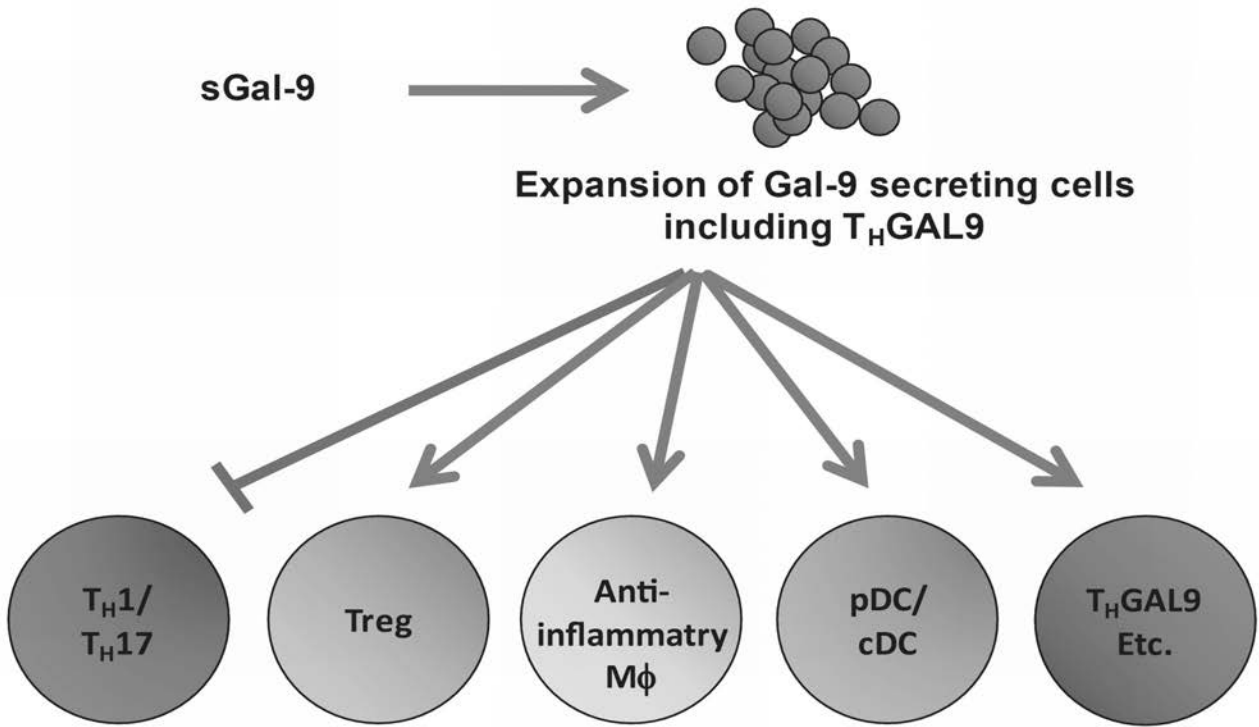
(d)



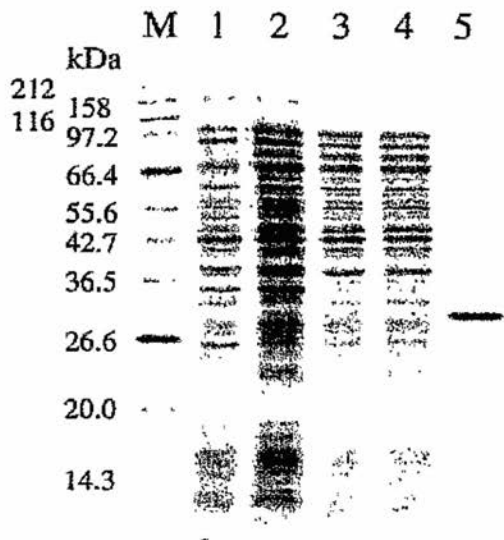
(e)



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



M: 分子量マーカー

1: 大腸菌ライセート (発現誘導前)

2: 大腸菌ライセート (発現誘導後)

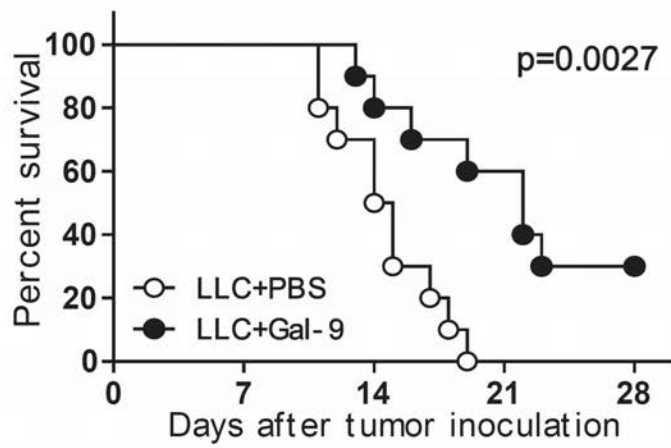
3: 大腸菌抽出液

4: 大腸菌抽出液のラクトースカラム
非吸着画分

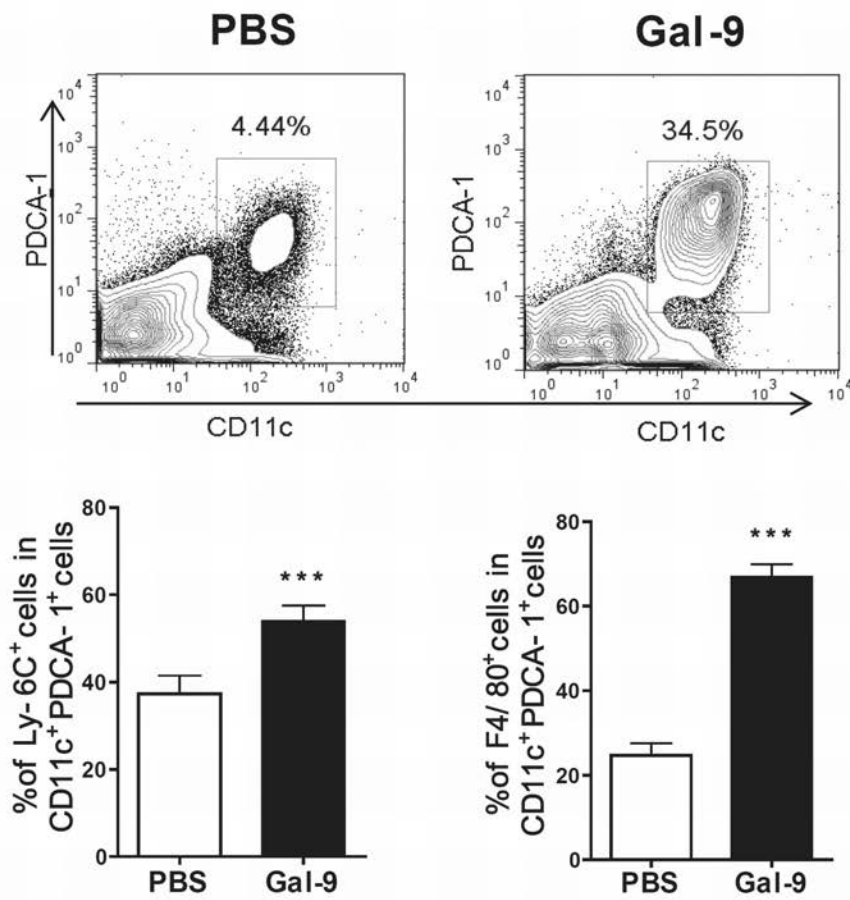
5: ラクトースカラム溶出画分
精製G9NC(null)

【 図 2 9 】

(a)

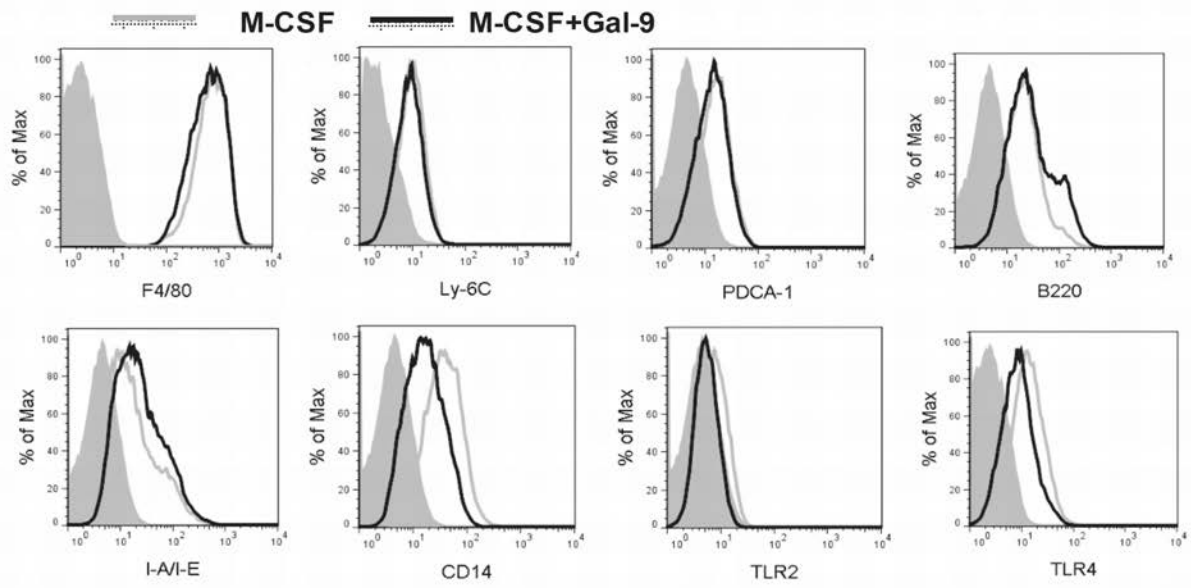


(b)

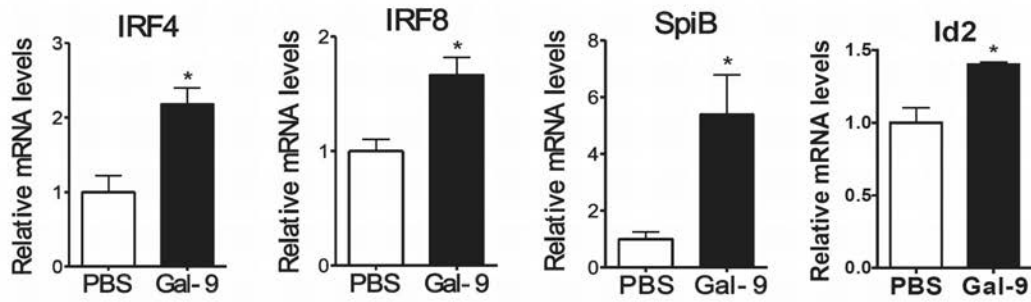


【 図 3 1 】

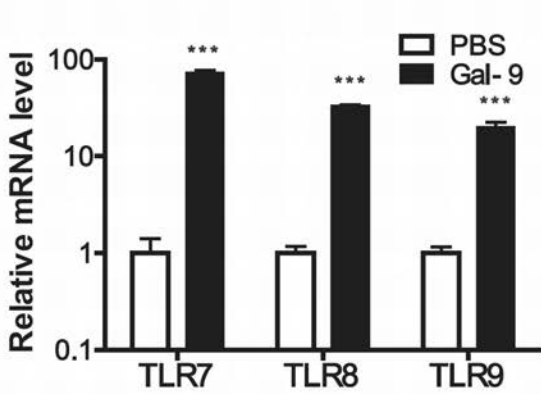
(a)



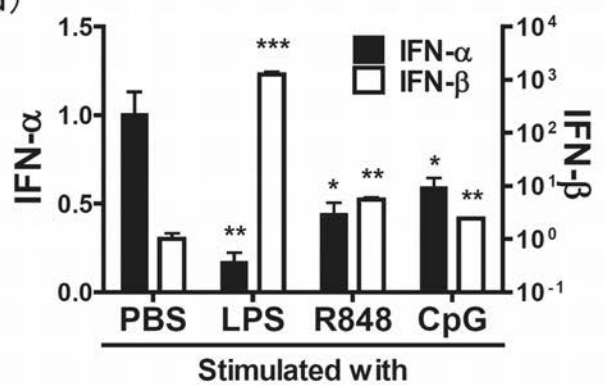
(b)



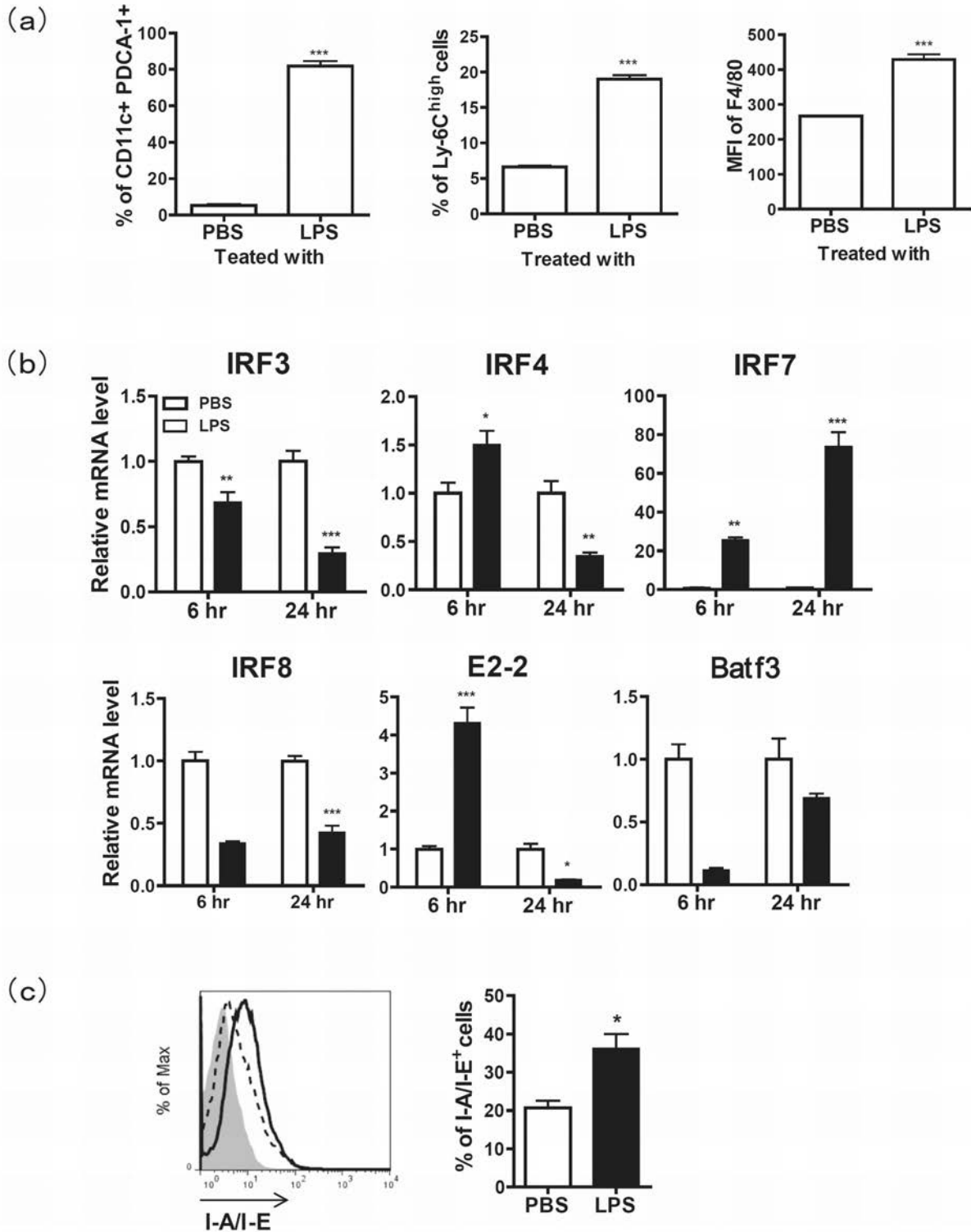
(c)



(d)



【 図 3 2 】



【 配 列 表 】

[2012077811000001.app](#)

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 24 年 10 月 9 日 (2012.10.9)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シグナルペプチドを持つガレクチン 9 をコードする DNA を含まない細胞であって、ガレクチン 9 分泌能を有し、かつ、前記ガレクチン 9 を細胞表面に発現していることを特徴とする細胞。

【請求項 2】

T 細胞である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

CD 4 陽性 T 細胞である請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

濾胞性 B ヘルパー T 細胞 (Follicular B helper T cells : TFH) である請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】

T 細胞受容体 (TCR) で刺激することにより、CD 25 の発現量が上昇し、さらに、ガレクチン 9 及びインターロイキン 10 (IL - 10) の少なくとも一方を分泌する請求項 3 又は 4 に記載の細胞。

【請求項 6】

Fox p 3 を発現していない請求項 3 から 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7】

T 細胞である請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 8】

ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 9】

B 細胞である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 10】

NK T 細胞である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 11】

古典的樹状細胞 (cDC) である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 12】

形質細胞様樹状細胞 (pDC) である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 13】

pDC 様マクロファージ (pDC - M) である請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 14】

動物にガレクチン 9 を投与することにより、前記動物における少なくとも一部の細胞の細胞表面にガレクチン 9 を発現させる、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。

【請求項 15】

動物の細胞を、ガレクチン 9 の存在下で培養することにより、前記動物の細胞の細胞表面にガレクチン 9 を発現させる、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。

【請求項 16】

前記動物の細胞が、細胞表面にガレクチン 9 を発現している細胞を含み、前記動物の細胞を、ガレクチン 9 の存在下で培養することにより、細胞表面にガレクチン 9 を発現している細胞の割合を増加させる、請求項 15 に記載の細胞の製造方法。

【請求項 17】

前記動物が、哺乳類である請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 18】

前記哺乳類が、ヒトである請求項 17 に記載の製造方法。

【請求項 19】

請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から

選択される少なくとも一つを含む医薬。

【請求項 20】

ガレクチン9の生理活性又は生物活性の不足又は欠如に起因する疾患の治療又は症状の軽減に用いる請求項19に記載の医薬。

【請求項 21】

ガレクチン9又はガレクチン9結合性物質を含む細胞の有無の診断に用いる診断剤である、請求項19に記載の医薬。

【請求項 22】

免疫調節剤である、請求項19に記載の医薬。

【請求項 23】

抗腫瘍剤である、請求項19に記載の医薬。

【請求項 24】

前記腫瘍が、悪性腫瘍である請求項23に記載の医薬。

【請求項 25】

前記悪性腫瘍が、上皮性悪性腫瘍である請求項24に記載の医薬。

【請求項 26】

前記悪性腫瘍が、非上皮性悪性腫瘍である請求項24に記載の医薬。

【請求項 27】

前記非上皮性悪性腫瘍が、腫瘍形成性の非上皮性悪性腫瘍及び腫瘍非形成性の非上皮性悪性腫瘍の少なくとも一方である請求項26に記載の医薬。

【請求項 28】

前記悪性腫瘍が、皮膚ガン、メラノーマ、乳ガン、卵巣ガン、子宮ガン、睾丸悪性腫瘍、前立腺ガン、膀胱ガン、腎ガン、甲状腺ガン、咽頭・喉頭ガン、舌ガン、上顎ガン、食道ガン、胃ガン、結腸・直腸ガン、肺・気管支ガン、肝ガン、肝細胞癌、肝内胆管ガン、肝外胆管・胆嚢ガン、膵臓ガン、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、悪性血管腫、悪性血管内皮腫、脳腫瘍、メニンギオーマ、グリオーマ、及びアストロサイトーマからなる群から選択される少なくとも一つである請求項24に記載の医薬。

【請求項 29】

抗アレルギー剤である。請求項19に記載の医薬。

【請求項 30】

自己免疫疾患用剤である。請求項19に記載の医薬。

【請求項 31】

抗炎症剤である、請求項19に記載の医薬。

【請求項 32】

副腎皮質ステロイドホルモン代替用剤である、請求項19に記載の医薬。

【請求項 33】

細胞、組織、又は器官の移植に伴う拒絶反応の抑制剤である、請求項19に記載の医薬。

【請求項 34】

敗血症の治療又は症状の軽減に用いる、請求項19に記載の医薬。

【請求項 35】

感染症の治療又は症状の軽減に用いる、請求項19に記載の医薬。

【請求項 36】

請求項1から13のいずれか一項に記載の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを用いて、被検細胞におけるガレクチン9又はガレクチン9結合性物質の有無を診断する方法。

【請求項 37】

請求項1から13のいずれか一項に記載の細胞、その破砕物及び抽出物からなる群から選択される少なくとも一つを動物に投与する工程を含む、前記動物の疾患の治療又は前記

疾患に由来する症状の軽減方法。

【請求項 38】

前記動物が、哺乳類である請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記哺乳類が、ヒトである請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記疾患が、ガレクチン 9 の生理活性又は生物活性の不足又は欠如に起因する疾患である請求項 37 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記疾患が、免疫の異常に起因する疾患である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記疾患が、自己免疫性疾患である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記疾患が、腫瘍である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記腫瘍が、悪性腫瘍である請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記悪性腫瘍が、上皮性悪性腫瘍である請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記悪性腫瘍が、非上皮性悪性腫瘍である請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

前記非上皮性悪性腫瘍が、腫瘍形成性の非上皮性悪性腫瘍及び腫瘍非形成性の非上皮性悪性腫瘍の少なくとも一方である請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記悪性腫瘍が、皮膚ガン、メラノーマ、乳ガン、卵巣ガン、子宮ガン、睾丸悪性腫瘍、前立腺ガン、膀胱ガン、腎ガン、甲状腺ガン、咽頭・喉頭ガン、舌ガン、上顎ガン、食道ガン、胃ガン、結腸・直腸ガン、肺・気管支ガン、肝ガン、肝細胞癌、肝内胆管ガン、肝外胆管・胆嚢ガン、膵臓ガン、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、悪性血管腫、悪性血管内皮腫、脳腫瘍、メニンギオーマ、グリオーマ、及びアストロサイトーマからなる群から選択される少なくとも一つである請求項 44 に記載の方法。

【請求項 49】

前記疾患が、アレルギー性疾患である。請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記疾患が、細胞、組織、又は器官の移植に伴う拒絶反応である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記疾患が、敗血症である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記疾患が、感染症である、請求項 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記疾患に由来する症状が、炎症である、請求項 37 から 52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の細胞を動物に投与して、前記動物の免疫を制御する免疫制御方法。

【請求項 55】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞の細胞表面に発現されたガレクチン 9 をマーカーとして検出することにより、前記細胞を検出する方法。

【請求項 5 6】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞が、I L - 1 0 産生タイプ 1 制御性 T 細胞 (T r 1 細胞) である請求項 5 5 に記載の細胞検出方法。

【請求項 5 7】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞が、制御性免疫細胞である請求項 5 5 に記載の細胞検出方法。

【請求項 5 8】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を含むか又は含まない動物組織において、請求項 5 5 から 5 7 のいずれか一項に記載の細胞検出方法により、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を定性的又は定量的に検出する工程を含む、前記動物の疾患又は前記疾患に由来する症状の診断方法。

【請求項 5 9】

動物の疾患の治療効果の判定方法であって、
前記動物に対し、前記疾患の治療を行う工程と、
前記治療の前後において、それぞれ、請求項 5 8 に記載の診断方法により、前記疾患又は前記疾患に由来する症状を診断する工程と、
前記治療の前後における前記診断結果を対比する工程とを含むことを特徴とする、前記動物の疾患の治療効果の判定方法。

【請求項 6 0】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を含む動物組織において、請求項 5 5 から 5 7 のいずれか一項に記載の細胞検出方法により、前記細胞を検出し、検出された前記細胞を、前記動物組織中の他の細胞から分離する、細胞の分離方法。

【請求項 6 1】

請求項 6 0 に記載の細胞の分離方法により請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を前記動物組織から分離する工程を含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。

【請求項 6 2】

請求項 6 0 に記載の細胞の分離方法により請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の細胞を前記動物組織から分離する工程をさらに含む、請求項 1 4 から 1 6 のいずれか一項に記載の製造方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/0783(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/0783, A61K35/12, A61K49/00, A61P29/00, A61P31/00, A61P35/00, A61P37/06, A61P37/08, A61P43/00, C12Q1/02		
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 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, CiNii, GeneCards		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-209328 A (Galpharma Co., Ltd.), 23 August 2007 (23.08.2007), paragraphs [0017], [0032], [0034] to [0044], [0052], [0059], [0066]; fig. 14, 16, 17 (Family: none)	1, 15, 16, 19-36, 55 2-13, 56, 57
Y	Akira YAMAUCHI et al., "Galectin-9 Induces Maturation of Human Monocyte-derived Dendritic Cells", Japanese Journal of Clinical Immunology, 2005, vol.28, no.6, pages 381 to 388	1-7, 11, 12, 15 16, 19-28, 31 8-10, 13 29, 30, 32-35
Y	LEVINGS M.K. et al., Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL- 10 but not CD25+CD4+ Tr cells., Blood, 2005, Vol.105, No.3, p.1162-1169	56, 57
<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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 06 March, 2012 (06.03.12)		Date of mailing of the international search report 13 March, 2012 (13.03.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078623

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2006-124299 A (Galpharma Co., Ltd.), 18 May 2006 (18.05.2006), paragraph [0008] (Family: none)	1-7, 9, 11-13, <u>15, 16, 36, 55</u> 56, 57

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 8 6 2 3	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/0783(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61K49/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/02(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. C12N5/0783, A61K35/12, A61K49/00, A61P29/00, A61P31/00, A61P35/00, A61P37/06, A61P37/08, A61P43/00, C12Q1/02			
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 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii, GeneCards			
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 請求項の番号	
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2007-209328 A (株式会社ガルファーマ) 2007.08.23, 【0017】 , 【0032】 , 【0034】 ~ 【0044】 , 【0052】 , 【0059】 , 【0066】 段落、図 14, 16, 17 (ファミリーなし)	1, 15, <u>16, 19-36, 55</u> 2-13, 56, 57	
<u>X</u> <u>Y</u>	山内清明 他, 糖鎖結合蛋白ガレクチン9による樹状細胞成熟化, 日 本臨床免疫学会会誌, 2005, Vol. 28, No. 6, p. 381-388	1-7, 11, 12, 15 <u>16, 19-28, 31</u> 8-10, 13 29, 30, 32-35	
<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		の日の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 06.03.2012		国際調査報告の発送日 13.03.2012	
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) 上條 肇	4 B 9 4 5 3
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/078623
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 請求項の番号
Y	LEVINGS M.K. et al., Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells., Blood, 2005, Vol.105, No.3, p.1162-1169	56,57
X	JP 2006-124299 A (株式会社ガルファーマ) 2006.05.18, 【0008】段落	1-7, 9, 11-13, 15, 16, 36, 55
Y	(ファミリーなし)	56,57

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 8 6 2 3

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 14, 17, 18, 37-54, 58-62 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、動物にガレクチンを投与することを含む方法や疾患の診断方法、生体内の組織からの細胞分離法であって、動物としてはヒトを包含するので、人間の手術方法、治療方法又は診断方法に該当する。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

請求項1, 請求項2-7, 請求項8, 請求項9, 請求項10, 請求項11, 請求項12, 請求項13, 請求項15-16, 請求項19-35, 請求項36, 請求項55-57のそれぞれに係る発明群の相互または全てに共通する事項は「ガレクチン9を含む細胞であって、前記ガレクチン9を細胞表面に発現していることを特徴とする細胞」であることである。

しかしながら、文献1には、分泌型ヒト安定化ガレクチン発現プラスミドを導入した Cos 細胞及び B16/F10 細胞が記載されており、いずれの細胞からもガレクチン9が培養液中に分泌されることが確認されたことが記載されている (【0059】、【0066】段落、図14, 16, 17)。

また、文献2には、ガレクチン9は各種抗原刺激により T リンパ球から放出されること、上皮系細胞、繊維芽細胞、組織球、肥満細胞、好酸球、など各種細胞の細胞質と細胞膜上にガレクチン9は発現して、放射線照射や I F N- γ などのサイトカイン刺激で誘導されること、樹状細胞をガレクチン処理すること (第385頁左欄10-28行) も記載されている。

ここで、本願明細書【0030】には、「本発明の細胞がガレクチン9を細胞表面に発現していることは、本発明の細胞がガレクチン9を分泌する細胞であることを裏付けていると考えられる。すなわち、細胞内部のガレクチン9が分泌されて細胞外部に排出される過程で、細胞表面におけるガレクチン9発現が観察されると考えられる。ただし、この説明は、可能性のあるメカニズムの一つを示すものであり、本発明の細胞は、この説明により限定されない。」と記載されているから、ガレクチン9を分泌する細胞は、ガレクチン9を細胞表面に発現しているといえることができる。

それ故、「ガレクチン9を含む細胞であって、前記ガレクチン9を細胞表面に発現していることを特徴とする細胞」は文献1又は2に記載されているとおり新規性がない。

したがって、「ガレクチン9を含む細胞であって、前記ガレクチン9を細胞表面に発現していることを特徴とする細胞」であることを PCT 規則 13.2 における特別な技術的特徴とすることはできず、他に、PCT 規則 13.2 において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項は存在しない。

文献1 : JP 2007-209328 A (株式会社ガルファーマ) 2007.08.23

文献2 : 山内清明 他, 糖鎖結合蛋白ガレクチン9による樹状細胞成熟化, 日本臨床免疫学会誌, Vol.28, No.6, p.381-388

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
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	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P 5/38	(2006.01)	A 6 1 P	5/38	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
		G 0 1 N	33/53	D

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 仁木 敏朗

香川県高松市伏石町 8 8 4 番地 3 - 3 0 2 号 株式会社ガルファーマ内

(72) 発明者 有川 智博

石川県金沢市鞍月 4 丁目 5 4 スクエア鞍月 C 1 0 6

(72) 発明者 大水 総一

香川県木田郡三木町池戸 1 2 3 9 - 2 C - 2 0 5

(72) 発明者 門脇 健

香川県高松市前田東町 5 0 5 - 2 D - 1 0 3

F ターム(参考) 4B065 AA94X AC14 BA25 BB19 BD39 CA24 CA44 CA46

4C087 AA01 AA02 BB63 BB64 NA14 ZB07 ZB09 ZB11 ZB13 ZB26

ZB27 ZB31 ZB35 ZC06 ZC41

(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)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2012077811A5	公开(公告)日	2015-01-29
申请号	JP2012547938	申请日	2011-12-09
申请(专利权)人(译)	胆有限公司制药		
[标]发明人	平島光臣 仁木敏朗 有川智博 大水総一 門脇健		
发明人	平島 光臣 仁木 敏朗 有川 智博 大水 総一 門脇 健		
IPC分类号	C12N5/0783 A61K35/12 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 A61P37/02 A61P35/02 A61P5/38 G01N33/53		
CPC分类号	A61K35/17 A61K38/1732 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 C12N5/0637 C12N5/0645 C12N2501/59 G01N33/68 G01N2333/42 G01N2333/4724 A61K49/0004 C07K14/4726 C12N5/0635 C12N5/0636 C12N5/0639 C12N5/0646 G01N33/5094 G01N33/56972 G01N33/6893 G01N2333/705		
FI分类号	C12N5/00.202.L A61K35/12.ZNA A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P37/02 A61P35/02 A61P5/38 G01N33/53.Y G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B065/AA94X 4B065/AC14 4B065/BA25 4B065/BB19 4B065/BD39 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BB64 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB09 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB31 4C087/ZB35 4C087/ZC06 4C087/ZC41		
代理人(译)	Tsuji maru 一郎		
优先权	2010274467 2010-12-09 JP		
其他公开文献	JPWO2012077811A1		

摘要(译)

本发明的目的是提供基于半乳凝素-9可表现出生理活性的细胞，该细胞的生产方法以及该细胞的用途。为了实现上述目的，本发明的细胞含有半乳凝素9，并且半乳凝素9在细胞表面表达。