

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/182121

発行日 平成29年4月27日 (2017. 4. 27)

(43) 国際公開日 **平成27年12月3日 (2015. 12. 3)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	2 G O 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 86 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2016-523145 (P2016-523145)	(71) 出願人	505314022 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/002648		
(22) 国際出願日	平成27年5月26日 (2015. 5. 26)		
(31) 優先権主張番号	特願2014-111576 (P2014-111576)		大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号
(32) 優先日	平成26年5月29日 (2014. 5. 29)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100118371 弁理士 ▲胸▼谷 剛志
		(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アレルギー誘発性物質の検査、アレルギーの診断および治療

(57) 【要約】

本発明は、アレルギー誘発性を簡便に検査することに関する。詳細には、本発明は、被験物質のアレルギー誘発性を検査するための方法であって、該方法は：A) 試験系における肺胞マクロファージに被験物質を曝露する工程；およびB) 該試験系においてインターロイキン1 (IL-1) を測定する工程、を包含し、ここで、該IL-1 は該被験物質のアレルギー誘発性の指標であり、該IL-1 の値が該被験物質による曝露前の値に比べて上昇することは、該被験物質がアレルギー誘発性を有することを示す、方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験物質のアレルギー誘発性を検査するための方法であって、該方法は：

- A) 試験系における肺胞マクロファージに被験物質を曝露する工程；および
 - B) 該試験系においてインターロイキン 1 (IL-1) を測定する工程、
- を包含し、ここで、該 IL-1 は該被験物質のアレルギー誘発性の指標であり、該 IL-1 の値が該被験物質による曝露前の値に比べて上昇することは、該被験物質がアレルギー誘発性を有することを示す、方法。

【請求項 2】

前記方法はインビトロで行われる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記方法は、非ヒト動物を用いてなされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記曝露は、前記被験物質とは異なる物質である抗原とともになされ、前記 IL-1 は、該被験物質が、該抗原のアレルギー反応を増強するかどうかの指標である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

被験物質のアレルギー誘発性を検査するためのキットであって、該キットは、

- A) 肺胞マクロファージ、および
- B) IL-1 を測定する手段

20

を含み、該 IL-1 は該被験物質のアレルギー誘発性の指標であり、該 IL-1 の値が該被験物質による曝露前の値に比べて上昇することは、該被験物質がアレルギー誘発性を有することを示す、キット。

【請求項 6】

前記キットは、試験するための容器をさらに含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 7】

前記 IL-1 を測定する手段は、IL-1 に対する特異的な抗体またはその誘導体および免疫反応試験手段を含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 8】

前記免疫反応試験手段は、ELISA を含み、および / または前記肺胞マクロファージは、培養装置とともに提供される、請求項 7 に記載のキット。

30

【請求項 9】

前記肺胞マクロファージに対してアレルゲンであることが知られる物質をさらに含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 10】

インターロイキン 1 (IL-1) の阻害剤を含む、アレルギーを治療または予防するための組成物。

【請求項 11】

前記阻害剤は、IL-1 特異的である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記阻害剤は、IL-1 を阻害しない、請求項 10 に記載の組成物。

40

【請求項 13】

前記阻害剤は、IL-1 に特異的な抗体またはその抗原結合性断片、IL-1 に特異的なアンチセンス、IL-1 に特異的な siRNA、低分子化合物およびそれらの組合せから選択される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記低分子化合物は、ポリビニルピリジン-N-オキシド (PVNO)、wedelo 1 a c t o n e (1, 8, 9-トリヒドロキシ-3-メトキシ-6H-[1]ベンゾフロ[3, 2-c]クロメン-6-オン) および SB203580 (4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル

50

〕ピリジン)からなる群より選択される少なくとも1つの物質を含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記アレルギーは微粒子誘発性のものである、請求項10に記載の組成物。

【請求項16】

前記アレルギーは、I型アレルギーである、請求項10に記載の組成物。

【請求項17】

前記アレルギーは、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、花粉症、アレルギー性炎症、アレルギー性胃腸炎、じんましん、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、血清病、食物アレルギーおよび薬物アレルギーからなる群より選択される少なくとも1つの疾患、障害または症状を含む、請求項10に記載の組成物。

10

【請求項18】

アレルギーを治療または予防するための、インターロイキン1 (IL-1) の阻害剤。

【請求項19】

その治療または予防を必要とする被験体におけるアレルギーを治療または予防するための方法であって、インターロイキン1 (IL-1) の阻害剤の有効量を該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、アレルギーの診断および治療、ならびにその検査方法およびスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アレルギー性疾患増加は社会問題の一つとなっており、その原因の解明と効果的な治療法の開発が急務とされている。アレルギー性疾患の増加の要因としては、アレルゲンの増加、感染症の減少(衛生仮説)、食生活の変化、生活環境における化学物質の増加などが考えられている。化学物質の増加に関しては、産業の発達とともに産出されてきた様々な微粒子状物質(工場からの煤塵、ディーゼル粒子、砂塵、ナノ粒子、粒子状物質(Particulate Matter) 2.5(いわゆるPM2.5)等)のアレルギー性疾患への関与が示唆されている(非特許文献1)。

30

【0003】

特に近年、喘息や鼻炎といったアレルギー性疾患に罹患する患者の数が、特に先進国において増大している。その理由は不明であるが、多くの研究が、ディーゼル排気や砂塵などの粒子状汚染物質および環境粒子がアレルギー反応を悪化させ得ることを実証している(非特許文献2~9)。さらに、直径2.5μm未満の粒子状物質2.5(PM2.5)のようなくつつかのnm~μmサイズの非常に小さい粒子状物は、気道内に入り、肺の深部に定着して、喘息のような慢性の肺炎を引き起こし得る(非特許文献1)。実際、疫学研究は、空気中の粒子状物質の増加が、喘息による入院加療の増加と有意に関係していたことを報告した(非特許文献10)。アレルギー反応は、2型免疫反応によって媒介される(非特許文献11)。粒子状物質および結晶は免疫系を刺激して炎症性反応を誘導し、特に、アルミニウム塩(アラムと称する)およびシリカ結晶は、インビボでの投与部位における好酸球の蓄積と抗原特異的な血清IgEおよびIgG1レベルの上昇によって特徴づけられる2型反応を誘導する(非特許文献12~17)。粒子状汚染物質および環境粒子を含む粒子状物の多くは、免疫アジュバントとして機能して、肺炎およびIgE産生を増強するものと考えられる。しかしながら、これらの粒子状物質のアジュバント効果と、これらが免疫反応を誘発する機構については明らかにされていない。

40

【0004】

このように、粒子状物質の多くがIgE誘導や好酸球の活性化等のアレルギー性反応の原

50

因となるTh2型免疫反応を誘導することが知られているが、どのような機構で免疫反応を活性化し、Th2型免疫反応を誘導するかについては明らかにされていない。

【0005】

マウスのモデルとして、現在まで種々の粒子状物質を気管内に注入することで、IgEや好酸球の活性化が誘導されることが示されている（非特許文献2）が、その分子機構については明らかにされないままである。

【0006】

また、非特許文献18-19では、アレルギーの治療の試みがなされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0007】

【非特許文献1】Granum B and Lovik M., TOXICOLOGICAL SCIENCES 65, 7-17 (2002)

【非特許文献2】Hiyoshi K et al., Environmental research. 2005;99(3):361-8

【非特許文献3】Inoue K et al., Toxicology and applied pharmacology. 2009;237(3):306-16.

【非特許文献4】Nygaard UC et al., Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2009;109(1):113-23.

【非特許文献5】Honda A et al., JAT. 2014;34(3):250-7.

20

【非特許文献6】Granum B et al., Toxicology letters. 2001;118(3):171-81.

【非特許文献7】Ichinose T et al., Toxicology. 1997;122(3):183-92.

【非特許文献8】Lovik M et al., Toxicology. 1997;121(2):165-78.

【非特許文献9】Bartra J et al., Journal of investigational allergology & clinical immunology. 2007;17 Suppl 2:3-8.

【非特許文献10】Ueda K et al., Environmental health and preventive medicine. 2010;15(6):350-7.

【非特許文献11】Pulendran B and Artis D, Science. 2012;337(6093):431-5.

【非特許文献12】Mancino D et al., International archives of allergy and applied immunology. 1983;71(3):279-81.

30

【非特許文献13】Reese TA et al., Nature. 2007;447(7140):92-6.

【非特許文献14】Kuroda E et al., International reviews of immunology. 2013;32(2):209-20.

【非特許文献15】Kuroda E et al., Immunity. 2011;34(4):514-26.

【非特許文献16】Kool M et al., Immunity. 2011;34(4):527-40.

【非特許文献17】Marichal T et al., Nature medicine. 2011;17(8):996-1002.

【非特許文献18】Experimental and Toxicologic Pathology Volume 54, Issue 2, 2002, Pages 109-126

【非特許文献19】Int Archs Allergy Appl. Immun. 71:279-281 (1983) Mancino et al.

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは鋭意検討した結果、粒子状物質によるアレルギー誘導の分子機構を解明することで、粒子状物質によるアレルギー性炎症等に対する新たな治療法、粒子自体が持つアレルギー感作性を調べるための検査法へとつなげる知見を見出し本発明を完成させた。したがって、本発明は従来存在しなかった、粒子状物質によるアレルギー感作性を調べる簡便な検査技術、方法、キット、システム、装置等、および粒子によって引き起こされるアレルギー性炎症の新規治療技術、方法、医薬、組成物、キット、システム等を提供する。本発明は肺胞マクロファージ(M)ならびに肺胞上皮細胞に対する細胞傷害活性や液

50

性因子（例えば、インターロイキン1）を誘導するシグナル伝達系の因子またはその発現産物もしくはそのフラグメントもしくは誘導體等、粒子状物質により誘導されるアレルギー性炎症を識別するためのマーカー、検出剤、阻害剤、および粒子状物質によって誘導されるアレルギー性炎症を予防または治療するための組成物に関する。

【0009】

一例として、本発明は以下を提供する。

<検査法>

(1) 被験物質のアレルギー誘発性を検査するための方法であって、該方法は：

A) 試験系における肺胞マクロファージに被験物質を曝露する工程；および

B) 該試験系においてインターロイキン1 (IL-1) を測定する工程、

を包含し、ここで、該IL-1は該被験物質のアレルギー誘発性の指標であり、該IL-1の値が該被験物質による曝露前の値に比べて上昇することは、該被験物質がアレルギー誘発性を有することを示す、方法。

(2) 前記方法はインビトロで行われる、項目1に記載の方法。

(3) 前記方法は、非ヒト動物を用いてなされる、項目1に記載の方法。

(4) 前記曝露は、前記被験物質とは異なる物質である抗原とともになされ、前記IL-1は、該被験物質が、該抗原のアレルギー反応を増強するかどうかの指標である、項目1~3のいずれか1項に記載の方法。

(4A) 前記抗原は、前記肺胞マクロファージに対してアレルゲンであることが知られる物質である、項目4に記載の方法。

(4B) 前記アレルゲンは、卵白アルブミン、ダニアレルゲンまたは花粉である、項目34Aに記載の方法。

(5) 被験物質のアレルギー誘発性を検査するためのキットであって、該キットは、

A) 肺胞マクロファージ、および

B) IL-1を測定する手段

を含み、該IL-1は該被験物質のアレルギー誘発性の指標であり、該IL-1の値が該被験物質による曝露前の値に比べて上昇することは、該被験物質がアレルギー誘発性を有することを示す、キット。

(6) 前記キットは、試験するための容器をさらに含む、項目5に記載のキット。

(7) 前記IL-1を測定する手段は、IL-1に対する特異的な抗体またはその誘導體および免疫反応試験手段を含む、項目5または6に記載のキット。

(8) 前記免疫反応試験手段は、ELISAを実施するための手段を含み、および/または前記肺胞マクロファージは、培養装置とともに提供される、項目7に記載のキット。

(9) 前記肺胞マクロファージに対してアレルゲンであることが知られる物質をさらに含む、項目5~8のいずれか1項に記載のキット。

<治療剤または予防剤>

(10) インターロイキン1 (IL-1) の阻害剤を含む、アレルギーを治療または予防するための組成物。

(11) 前記阻害剤は、IL-1特異的である、項目10に記載の組成物。

(12) 前記阻害剤は、IL-1を阻害しない、項目10または11に記載の組成物。

(13) 前記阻害剤は、IL-1に特異的な抗体またはその抗原結合性断片、IL-1に特異的なアンチセンス、IL-1に特異的なsiRNA、低分子化合物およびそれらの組合せから選択される、項目10~12のいずれか1項に記載の組成物。

(14) 前記低分子化合物は、ポリビニルピリジン-N-オキシド(PVNO)、wedelolactone(1,8,9-トリヒドロキシ-3-メトキシ-6H-[1]ベンゾフロ[3,2-c]クロメン-6-オン)およびSB203580(4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)からなる群より選択される少なくとも1つの物質を含む、項目13に記載の組成物。

(15) 前記アレルギーは微粒子誘発性のものである、項目10~14のいずれか1項に

10

20

30

40

50

記載の組成物。

(16) 前記アレルギーは、I型アレルギーである、項目10～15のいずれか1項に記載の組成物。

(17) 前記アレルギーは、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、花粉症、アレルギー性炎症、アレルギー性胃腸炎、じんましん、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、血清病、食物アレルギーおよび薬物アレルギーからなる群より選択される少なくとも1つの疾患、障害または症状を含む、項目10～16のいずれか1項に記載の組成物。

(18) アレルギーを治療または予防するための、インターロイキン1 (IL-1) の阻害剤。

(18A) 前記阻害剤は、IL-1 特異的である、項目18に記載の阻害剤。

(18B) 前記阻害剤は、IL-1 を阻害しない、項目18または18Aに記載の阻害剤。

(18C) 前記阻害剤は、IL-1 に特異的な抗体またはその抗原結合性断片、IL-1 に特異的なアンチセンス、IL-1 に特異的なsiRNA、低分子化合物およびそれらの組合せから選択される、項目18、18Aまたは18Bのいずれか1項に記載の阻害剤。

(18D) 前記低分子化合物は、ポリビニルピリジン-N-オキシド(PVNO)、wedelolactone(1,8,9-トリヒドロキシ-3-メトキシ-6H-[1]ベンゾフロ[3,2-c]クロメン-6-オン)およびSB203580(4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)からなる群より選択される少なくとも1つの物質を含む、項目18Cに記載の阻害剤。

(18E) 前記アレルギーは微粒子誘発性のものである、項目18、18A、18B、18C、18Dまたは18Eのいずれか1項に記載の阻害剤。

(18G) 前記アレルギーは、I型アレルギーである、項目18、18A、18B、18C、18D、18Eまたは18Fのいずれか1項に記載の阻害剤。

(18H) 前記アレルギーは、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、花粉症、アレルギー性炎症、アレルギー性胃腸炎、じんましん、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、血清病、食物アレルギーおよび薬物アレルギーからなる群より選択される少なくとも1つの疾患、障害または症状を含む、項目18、18A、18B、18C、18D、18E、18Fまたは18Gのいずれか1項に記載の阻害剤。

(19) その治療または予防を必要とする被験体におけるアレルギーを治療または予防するための方法であって、インターロイキン1 (IL-1) の阻害剤の有効量を該被験体に投与する工程を包含する、方法。

(19A) 前記阻害剤は、IL-1 特異的である、項目19に記載の方法。

(19B) 前記阻害剤は、IL-1 を阻害しない、項目19または19Aに記載の方法。

(19C) 前記阻害剤は、IL-1 に特異的な抗体またはその抗原結合性断片、IL-1 に特異的なアンチセンス、IL-1 に特異的なsiRNA、低分子化合物およびそれらの組合せから選択される、項目19、19Aまたは19Bのいずれか1項に記載の方法。

(19D) 前記低分子化合物は、ポリビニルピリジン-N-オキシド(PVNO)、wedelolactone(19,9-トリヒドロキシ-3-メトキシ-6H-[1]ベンゾフロ[3,2-c]クロメン-6-オン)およびSB203580(4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)からなる群より選択される少なくとも1つの物質を含む、項目19Cに記載の方法。

(19E) 前記アレルギーは微粒子誘発性のものである、項目19、19A、19B、19C、19Dまたは19Eのいずれか1項に記載の方法。

(19G) 前記アレルギーは、I型アレルギーである、項目19、19A、19B、19

10

20

30

40

50

C、19D、19Eまたは19Fのいずれか1項に記載の方法。

(19H)前記アレルギーは、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、花粉症、アレルギー性炎症、アレルギー性胃腸炎、じんましん、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、血清病、食物アレルギーおよび薬物アレルギーからなる群より選択される少なくとも1つの疾患、障害または症状を含む、項目19、19A、19B、19C、19D、19E、19Fまたは19Gのいずれか1項に記載の方法。

【0010】

本発明において、上述した1または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。

【0011】

簡潔に説明すると、本発明の原理は以下のとおりである。

【0012】

免疫反応は、自然免疫および適応免疫の2つのタイプに分類される。自然免疫は、外来の抗原および病原体に対する防御の最前線として機能するマクロファージおよび樹状細胞(DC)によって媒介される。これに対し、適応免疫は、T細胞、B細胞および記憶細胞によって媒介される、抗原特異的な応答を伴う。自然免疫反応は、適応免疫反応が誘発されるまでの一時的な防御系として機能するものと長く考えられていたが、最近の研究は、自然免疫が、適応免疫の効率的な誘導に必須であることを実証した(Akira S, Phil Trans R Soc B. 2011;366:2748-55.; Iwasaki A et al., Science. 2010;327:291-5.; Coquerelle C and Moser M, Immunol Rev. 2010;234:317-34.)。一般に、病原体由来の因子(病原体関連分子パターン:PAMP)が、パターン認識受容体(PRR)を介して自然免疫細胞によって認識され、このPRRが、細胞に活性化シグナルを伝達して適応免疫を誘導する(Kawai T and Akira S, Immunity. 2011;34:637-50.; Elinaf E et al., Immunity. 2011;34:665-79.; Loo Y-M and Gale M, Immunity. 2011;34:680-92.; Osorio F and Reis e Sousa C, Nat Rev Immunol. 2012;12:479-91.)。加えて、死細胞またはストレスを加えられた細胞から放出される因子であるダメージ関連分子パターン(DAMP)もまた、様々な炎症細胞の遊走および活性化を介して炎症の誘発に寄与する。DAMPとして、脂質、糖、代謝産物、核酸およびサイトカインが挙げられ、これらは自然免疫担当細胞上に発現したPRRまたはサイトカイン受容体によって認識される。DAMPは、アジュバント活性および無菌性炎症の誘発にとって重要である(Desmet CJ and Ishii KJ, Nat Rev Immunol. 2012;12:479-91.; Said-Sadier N and Ojcius DM, Biomedical journal. 2012;35(6):437-49.; Jounai N and Ishii KJ, Frontiers in cellular and infection microbiology. 2012;2:168.; Willart MA and Lambrecht BN, Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2009;39(1):12-9.; Shen H et al., Journal of immunology. 2013;191(6):2857-63.; Ghaemi-Oskouie F, and Shi Y, Current rheumatology reports. 2011;13(2):160-6.; Kono H et al., The Journal of clinical investigation. 2010;120(6):1939-49.)。いくつかの報告から、アラムおよびシリカのような粒子状物質が、自然免疫担当細胞を刺激して、DAMPを放出させ、そして、DAMP依存性の自然免疫反応が獲得免疫反応の誘導に必要とされることが実証されている(Kool M et al., Immunity. 2011;34(4):527-40.; Marichal T et al., Nature medicine. 2011;17(8):996-1002.; Kool M et al., J Exp Med. 2008;205:869-82.; McKee AS et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(12):E1122-31.)。加えて、一部の低分子の細胞傷害性化学薬剤が、抗原特異的なIgG1やIgEの産生を誘導するためのアジュバントとして機能し得る(Jacobson LS et al., The Journal of biological chemistry. 2013;288(11):7481-91.; Tonti E et al., Cell reports. 2013;5(2):323-30.)。このように、粒子状物質により誘発されたDAMPは、アレルギー反応の誘導と悪化に関与し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

砂塵のような一部の環境粒子は、ケイ素およびアルミニウムのような無機元素から構成される (Ichinose T et al., Inhalation Toxicology, 2008;20(7):685-94.)。本願では、本発明者らは、粒子状物質であるアラムおよびシリカの気管内注入による粒子状物質誘発性の肺炎モデルを確立した。粒子状物質の気管内注入は、抗原特異的な I g G 1、I g E 抗体および B A L 細胞を誘導した。驚くべきことに、粒子状物質の気管内注入から 2 週間後の抗原曝露は、抗原特異的な抗体応答を誘導した。周知のアレルギー促進性サイトカイン I L - 3 3 および胸腺間質性リンホポエチン (T S L P) は、粒子状物質による肺炎には関与しない。本発明者らは、粒子状物質の気管内注入後の肺において D A M P としての宿主 D N A および I L - 1 を検出し、そして、各 D A M P は、異なる機構によって肺炎に関与していた。粒子状物質は肺胞マクロファージからを刺激し、I L - 1 を誘導したが、他の組織マクロファージでは誘導されなかった。このように、粒子状物質の曝露によって引き起こされる I L - 1 および宿主 D N A のような D A M P の放出は、全身性 I g E の誘導とアレルギー反応の悪化させるアジュバントとして機能し得る。

10

【 0 0 1 4 】

上記のように、本発明者らは、粒子状物質によって誘導されるアレルギー性炎症、特にアレルギー疾患において最も重要とされる I g E の誘導に関して解析を進めた。

【 0 0 1 5 】

本発明者らは、種々の遺伝子改変マウスを用い、粒子の気管内への投与によって誘導されるアレルギー性炎症を I g E の誘導を指標に解析を行い、粒子の気管内への投与によって細胞傷害が引き起こされ、核酸やインターロイキン I (I L - 1) が誘導されること、さらに、I L - 1 に反応しない M y D 8 8 欠損マウスや I L - 1 受容体欠損マウスでは、細胞傷害を引き起こすことが確認された粒子の投与による I g E の誘導が生じないことが見出された。興味深いことに、粒子の腹腔内や皮下への投与では、同様の現象は見られなかった。したがって、この現象が肺において特異的に認められる現象であることが明らかになった。

20

【 0 0 1 6 】

さらに、肺において I L - 1 が誘導される機構について研究を行ったところ、肺に常在する肺胞マクロファージが粒子に反応して I L - 1 を産生することが明らかになった。また、この現象に関しても腹腔または骨髄由来のマクロファージを用いた際には認められず、肺胞マクロファージの活性化パターンが粒子に対する組織特異的な反応を誘導する一因であることが示唆された。

30

【 0 0 1 7 】

これらの結果から、肺胞マクロファージの特性を利用した粒子状物質の性質の解析、すなわち粒子で刺激された肺胞マクロファージが I L - 1 を産生するか否かを評価することによって、その粒子がアレルギー性炎症を引き起こすか否かを評価する評価法への応用が可能であることが示唆される。さらに、肺胞マクロファージの機能を制御することによってアレルギー性炎症を引き起こす I g E の誘導をコントロールできる可能性が提供される。

40

【 0 0 1 8 】

上述したように、粒子状汚染物質は、アレルギー反応を悪化させると考えられている。砂塵のような粒子状物質は、ケイ素およびアルミニウムのような無機元素から構成される。これらは、肺炎および全身性 I g E を誘導することが知られているが、これまでの知見では、肺炎における粒子状物の作用機構はあまり理解されていなかった。本発明では、本発明者らは、粒子状物質が細胞死を誘導し、宿主の D N A および I L - 1 を放出させ、これらがその後、肺炎および I g E の誘導のためのアジュバントとして機能することを実証した。粒子状物質の気管内注入は、抗原特異的な I g E 応答を誘導した。粒子状物の気管内注入から 2 週間後の抗原曝露は、I g E および肺炎を誘発し、そして、宿主 D N A および I L - 1 は、気管内注入後 2 週間まで、肺内に放出された。粒子状物質に

50

よるこの遅延型かつ持続性のアジュバント効果は、気管内注入に特有であり、腹腔内投与では見られず、さらにMyD88依存性のIL-1シグナル伝達経路によって制御されている。しかしながら、インフラマソームおよびアレルギー促進性サイトカインIL-33および胸腺間質性リンポエチン(TSLP)は、粒子状物誘発性の肺炎症に関与しなかった。粒子状物質によるIL-1放出は、肺胞マクロファージでは見られたが、他の組織マクロファージおよびII型肺胞細胞では見られなかった。本発明者らの結果から、粒子状物質曝露により放出される宿主DNAおよびIL-1が肺炎症および全身性IgEの誘導において重要な役割を果たすものと理解される。

【0019】

本発明のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解することにより、当業者に認識される。

【発明の効果】

【0020】

本発明は、従来存在しなかった吸入性粒子状物質のアレルギー性感作性に関する*in vitro*評価法および粒子によって引き起こされるアレルギー性炎症の新規治療法を提供する。これまでは、アレルギー性炎症を誘導する疑いがある粒子に関しては、マウスまたはラットを用いた吸入曝露実験もしくは気管内注入実験を行い、血清IgEの上昇や好酸球の浸潤をマーカーとして検査または解析を行っていた。しかし、この方法では、クリーンな状態で動物を飼育する施設、曝露や気管内注入を行うための基材や特殊技術を必要とし、さらに結果が得られるまでに約1か月以上、通常2か月程度の時間を要するのが欠点であった。本発明では、*in vitro*の検査法であるため、細胞の培養をする設備を有しさえすれば、どの施設でも実施することができ、さらに、結果を2日以内で得ることができる点も有利である。また、動物を飼育する費用も不要であるため、比較的安価で行うことが可能である。このように迅速、安価かつ簡便な吸入性粒子状物質のアレルギー感作成の検査法は従来存在しなかった。また、簡便さから、毒性またはアレルギー性感作成のある種々の粒子または今後新たに生成される粒子状物質のマスキング、安全性検査等も可能になる。加えて、粒子によって引き起こされるアレルギー性炎症は、これまでその発症機序が不明であったため、効果的かつ根本的な治療法が存在しなかった。この点、本発明は、粒子によって引き起こされるアレルギー性炎症の一因である肺胞マクロファージの活性化を制御する物質(例えば、ポリ-2-ビニルピリジン-N-オキシド:PVNO)あるいは、IL-1の抑制剤を用いてアレルギー性炎症の治療を可能にしたという点で画期的であるといえる。

【0021】

これまでの研究では、IL-1を介してI型アレルギー反応の検査、予防または治療を行うことができることは知られていないため、本発明における知見は、予想外の知見であるといえI型アレルギー反応の今後の検査、予防および治療において重要な知見であるといえる。マクロファージに関して言えば、IV型アレルギーとの関連が知られるところであるが、このIV型アレルギーはT細胞によるマクロファージの活性化によって、マクロファージ自体が組織損傷に関与し炎症を引き起こすメカニズムであり、I型アレルギーとは異なるため、相互に関連があるとは考えられていない。そして、本発明で判明した知見によれば、はマクロファージが損傷されることがアレルギー反応に関与するため、全く異なった(むしろ正反対の)メカニズムであるといえ、アレルギーに関して予想以上に複雑な現象があることが示されたといえる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1A】図1は、粒子状物質が肺炎症および抗体産生を誘導することを示す。(図1A)生理食塩水、OVA、または、OVA(10 μ g)と混合したアラム(100 μ g)を、気管内注入によりマウスに投与した(上パネル参照)。投与から10日後に、マウスを1日おきに3回OVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、BAL細胞数(下右パネル)と、ELISAによるOVA特異的Ig

10

20

30

40

50

E および I g G 1 抗体 (それぞれ下中パネルおよび下左パネル) について分析した。グラフ中 s a l i n e は生理食塩水のみ、O V A はオボアルブミンのみ、O V A + a l u m はオボアルブミンと混合したアラムを示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す (* p < 0 . 0 5) 。

【図1B】生理食塩水またはアラムを、気管内注入により投与した。投与後1日目、3日目、7日目または14日目に、マウスを1日おきに3回O V A エアロゾルに曝露した。7日間の間隔を空けた後、マウスを再度1日おきに3回O V A エアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびB A L F を回収した (上パネル参照)。最後の曝露から24時間後に、血清およびB A L F を回収し、B A L 細胞数 (下右パネル) と、E L I S A によるO V A 特異的 I g E および I g G 1 抗体 (それぞれ下中パネルおよび下左パネル) について分析した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す (* p < 0 . 0 5) 。

【図1C】生理食塩水、アラム、シリカ (2 5 0 μ g) または N i O (1 0 0 μ g) を、気管内注入により投与した (プロトコルは、上パネル参照)。投与から7日後、マウスを (B) と同様にO V A エアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびB A L F を回収した (上パネル参照)。最後の曝露から24時間後に、血清およびB A L F を回収し、B A L 細胞数 (下右パネル) と、E L I S A によるO V A 特異的 I g E および I g G 1 抗体 (それぞれ下中パネルおよび下左パネル) について分析した。各グラフにおいて、左から、データは、生理食塩水、アラム、シリカまたはN i O の気管内注入を示す。少なくとも2回の独立した実験を表す (* p < 0 . 0 5) 。

【図1D】アラムを - 7日目に腹腔内投与し、0日目および7日目にO V A を腹腔内投与した (アラム O V A O V A) 。 O V A のみ (O V A O V A) またはO V A と混合したアラム (アラム + O V A O V A) の注射をコントロールとして用いた (プロトコルは左に示す。グラフ中左からO V A O V A 、アラム + O V A O V A 、アラム O V A O V A を示す。) 。 E L I S A によるO V A 特異的 I g E および I g G 1 抗体 (それぞれ右グラフおよび左グラフ) について分析した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す (* p < 0 . 0 5) 。

【図1E】M y d 8 8 + / - またはM y d 8 8 - / - マウスをO V A + アラムの腹腔内投与によって2回免疫した (0日目および7日目)。最後の注射から10日後に、血清を回収した。E L I S A によるO V A 特異的 I g E および I g G 1 抗体 (それぞれ右グラフおよび左グラフ) について分析した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す (n . s . は統計学的に優位ではないことを示す。) 。

【図1F】M y d 8 8 + / - またはM y d 8 8 - / - マウスにアラムを気管内注入により投与した。投与から7日後、マウスを (B) と同様にO V A エアロゾルに曝露した。E L I S A によるO V A 特異的 I g E および I g G 1 抗体 (それぞれ右グラフおよび左グラフ) について分析した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す (* p < 0 . 0 5) 。

【図1G】A l ₂ O ₃ およびヒドロキシアパタイトは、肺において炎症性反応を誘導しないことを示す。生理食塩水または示される粒子状物をマウスに気管内注入した。注入から7日後、マウスを図1BのようにO V A エアロゾルに曝露した、最後の曝露から24時間後に、血清を回収し、O V A 特異的な I g E および I g G 1 抗体をE L I S A によって (それぞれ右グラフおよび左グラフ) 分析した。グラフ中左から生理食塩水、A l ₂ O ₃ 、ヒドロキシアパタイトおよびアラムを示す。

【図2A】図2はI L - 1 Rシグナルが肺炎症および抗体応答に必要とされることを示す。アラム (A 、 B 、 D 、 E および F) またはシリカ (C) をI l 1 r - / - マウス (A 、 B および C) 、 A s c - / - マウス (D) 、 T s 1 p r - / - マウス (E) またはI l 3 3 - / - マウス (F) に投与した。気管内注入から7日後、マウスを図1BのようにO V A エアロゾルに曝露した、最後の曝露から24時間後に、血清およびB A L F を回収し、O V A 特異的な I g E 、 I g G 1 および I g G 2 c 抗体をE L I S A によって分析した (それぞれ、左グラフ、右グラフ、中央グラフ)。 * p < 0 . 0 5 。

10

20

30

40

50

【図2B】アラム(A、B、D、EおよびF)またはシリカ(C)をI11r-/-マウス(A、BおよびC)、Asc-/-マウス(D)、Tslpr-/-マウス(E)またはI133-/-マウス(F)に投与した。気管内注入から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した、最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した(それぞれ、左グラフ、右グラフ、中央グラフ)。*p<0.05。

【図2C】アラム(A、B、D、EおよびF)またはシリカ(C)をI11r-/-マウス(A、BおよびC)、Asc-/-マウス(D)、Tslpr-/-マウス(E)またはI133-/-マウス(F)に投与した。気管内注入から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した、最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した(それぞれ、左グラフ、右グラフ、中央グラフ)。*p<0.05。

【図2D】アラム(A、B、D、EおよびF)またはシリカ(C)をI11r-/-マウス(A、BおよびC)、Asc-/-マウス(D)、Tslpr-/-マウス(E)またはI133-/-マウス(F)に投与した。気管内注入から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した、最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgEおよびIgG1抗体をELISAによって分析した(それぞれ、左グラフ、右グラフ)。n.s.は統計学的に優位ではないことを示す。

【図2E】アラム(A、B、D、EおよびF)またはシリカ(C)をI11r-/-マウス(A、BおよびC)、Asc-/-マウス(D)、Tslpr-/-マウス(E)またはI133-/-マウス(F)に投与した。気管内注入から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した、最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgEおよびIgG1抗体をELISAによって分析した。n.s.は統計学的に優位ではないことを示す。

【図2F】アラム(A、B、D、EおよびF)またはシリカ(C)をI11r-/-マウス(A、BおよびC)、Asc-/-マウス(D)、Tslpr-/-マウス(E)またはI133-/-マウス(F)に投与した。気管内注入から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した、最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgEおよびIgG1抗体をELISAによって分析した。n.s.は統計学的に優位ではないことを示す。

【図2G】生理食塩水または100μgのアラムを気管内注入により投与した。投与後1日目、3日目、7日目または14日目(グラフ中左から示す)に、BALFを回収し、BALF内のIL-1(G)およびIL-1(H)をELISAにより分析した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*p<0.05)。

【図2H】生理食塩水または100μgのアラムを気管内注入により投与した。投与後1日目、3日目、7日目または14日目(グラフ中左から示す)に、BALFを回収し、BALF内のIL-1(G)およびIL-1(H)をELISAにより分析した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*p<0.05)。

【図2AA】アラム(AA、BB、CC、EEおよびFF)またはシリカ(DD)をTlr2/4-/-マウス(AA)、Tlr7/9-/-マウス(BB)、I118-/-マウス(CC)、I11r-/-マウス(DD)、カスパーゼ-1-/-マウス(EE)またはNlrp3-/-マウス(FF)に気管内注入により投与した。投与から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した。IgEのものを右に、IgG1のものを左に示す。AA~FFはIL-18、TLR2、TLR4、TLR7またはTLR9欠損マウスを用いたインビボ実験を示す。

【図2BB】アラム(AA、BB、CC、EEおよびFF)またはシリカ(DD)をTlr2/4-/-マウス(AA)、Tlr7/9-/-マウス(BB)、I118-/-マウス(CC)、I11r-/-マウス(DD)、カスパーゼ-1-/-マウス(EE)ま

10

20

30

40

50

たはN1rp3 - / - マウス (FF) に気管内注入により投与した。投与から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した。IgEのものを右に、IgG1のものを左に示す。AA~FFはIL-18、TLR2、TLR4、TLR7またはTLR9欠損マウスを用いたインビボ実験を示す。

【図2CC】アラム (AA、BB、CC、EEおよびFF) またはシリカ (DD) をTlr2/4 - / - マウス (AA)、Tlr7/9 - / - マウス (BB)、Il18 - / - マウス (CC)、Il1r - / - マウス (DD)、カスパーゼ-1 - / - マウス (EE) またはN1rp3 - / - マウス (FF) に気管内注入により投与した。投与から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した。IgEのものを右に、IgG1のものを左に示す。AA~FFはIL-18、TLR2、TLR4、TLR7またはTLR9欠損マウスを用いたインビボ実験を示す。

10

【図2DD】アラム (AA、BB、CC、EEおよびFF) またはシリカ (DD) をTlr2/4 - / - マウス (AA)、Tlr7/9 - / - マウス (BB)、Il18 - / - マウス (CC)、Il1r - / - マウス (DD)、カスパーゼ-1 - / - マウス (EE) またはN1rp3 - / - マウス (FF) に気管内注入により投与した。投与から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した。IgEのものを右に、IgG1のものを左に示す。AA~FFはIL-18、TLR2、TLR4、TLR7またはTLR9欠損マウスを用いたインビボ実験を示す。

20

【図2EE】アラム (AA、BB、CC、EEおよびFF) またはシリカ (DD) をTlr2/4 - / - マウス (AA)、Tlr7/9 - / - マウス (BB)、Il18 - / - マウス (CC)、Il1r - / - マウス (DD)、カスパーゼ-1 - / - マウス (EE) またはN1rp3 - / - マウス (FF) に気管内注入により投与した。投与から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した。IgEのものを右に、IgG1のものを左に示す。AA~FFはIL-18、TLR2、TLR4、TLR7またはTLR9欠損マウスを用いたインビボ実験を示す。

30

【図2FF】アラム (AA、BB、CC、EEおよびFF) またはシリカ (DD) をTlr2/4 - / - マウス (AA)、Tlr7/9 - / - マウス (BB)、Il18 - / - マウス (CC)、Il1r - / - マウス (DD)、カスパーゼ-1 - / - マウス (EE) またはN1rp3 - / - マウス (FF) に気管内注入により投与した。投与から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収し、OVA特異的なIgE、IgG1およびIgG2c抗体をELISAによって分析した。IgEのものを右に、IgG1のものを左に示す。AA~FFはIL-18、TLR2、TLR4、TLR7またはTLR9欠損マウスを用いたインビボ実験を示す。

40

【図3A】図3は、粒子状物質により放出される宿主DNAは、肺炎症および抗体応答に部分的に関与することを示す。(図3A)生理食塩水または100μgのアラムを気管内注入により投与した。投与後1日目、3日目、7日目または14日目に、BALFを回収し、DNA含量について分析した(グラフ中左から示す。)*p<0.05。

【図3B】示される粒子状物質(1mg)を10分間DNA(2μg)と混合した。水相中のDNAの残量を測定することにより、粒子状物上に吸着されたDNAを推定した。グラフ中左からアラム、シリカ、NiO、Al₂O₃およびTiO₂を示す。*p<0.05。

50

【図3C】生理食塩水、OVA、 Al_2O_3 または Al_2O_3 -DNA複合体（各グラフ中左からそれぞれ示される）を、気管内注入により投与し、その翌日に、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収した。左グラフはOVA-IgG1を示し、右グラフはOVA-IgEを示す。
* $p < 0.05$ 。n.s.は統計学的に優位ではないことを示す。

【図3D】アラムを気管内注入によりマウスに投与し、投与から6日後に、2mgのDNaseを気管内注入した。DNase投与から24時間後に、BALFを回収した。各グラフ中左は生理食塩水を示し、右はDNase投与を示す。左グラフはBALF中のDNA量を示し、右グラフはBAL細胞を示す。
* $p < 0.05$ 。

【図3E】アラムを気管内注入によりマウスに投与し、2mgのDNaseを、実施例においても記載したように気管内注入により2回投与した。OVA曝露の後に血清を回収した。各グラフ中左は生理食塩水を示し、右はDNase投与を示す。左グラフはOVA-IgG1を示し、右グラフはOVA-IgEを示す。
* $p < 0.05$ 。n.s.は統計学的に優位ではないことを示す。

【図3F】アラムを気管内注入によりマウスに投与した。投与から7日後、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す。左グラフはOVA-IgG1を示し、右グラフはOVA-IgEを示す。n.s.は統計学的に優位ではないことを示す。

【図3AA】図3AA~EEにおいては、宿主DNAは、粒子状物質による抗体応答に部分的に関与することを示す。（図3AA）生理食塩水または示された粒子状物 $100\mu g$ を気管内注入により投与した。投与後1日目、3日目、7日目または14日目（各グラフ中左から示す。）に、BALFを回収し、BALF内のDNA含量を分析した。左上はシリカ、右上はNiO、左下はヒドロキシアパタイトおよび右下は TiO_2 を示す。
* $p < 0.05$ 。

【図3BB】アラム腹腔内投与後の腹腔における宿主DNA放出。マウスにPBSまたは1mgのアラムを、注射した。腹腔内投与後の示される日に、腹腔液を回収し、DNA含量を測定した。グラフ中横軸はPBS1日目、アラム1日目、2日目、3日目、4日目および5日目を示す。

【図3CC】OVA、または、OVAと混合したDNA（それぞれ左、右に示す）を気管内注入によりマウスに投与し、その翌日に、マウスを図3CのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清を回収し、ELISAに用いた。

【図3DD】アラムを、Irf3 $^{-/-}$ マウス（DD）またはStinggt/gt変異マウス（EE）に気管内注入により投与した。投与から7日後に、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清を回収し、OVA特異的なIgEおよびIgG1（それぞれ右グラフ、左グラフ）をELISAによって分析した。

【図3EE】アラムを、Irf3 $^{-/-}$ マウス（DD）またはStinggt/gt変異マウス（EE）に気管内注入により投与した。投与から7日後に、マウスを図1BのようにOVAエアロゾルに曝露した。最後の曝露から24時間後に、血清を回収し、OVA特異的なIgEおよびIgG1（それぞれ右グラフ、左グラフ）をELISAによって分析した。

【図4A】図4は、肺胞マクロファージは、粒子状アジュバントにตอบสนองしてIL-1を放出することを示す。肺より直接単離した肺胞マクロファージ（A）または培養の肺胞マクロファージ（BおよびE）をLPS（ $1\mu g$ ）または示される粒子状物質（ $100\mu g$ ）で6時間刺激した。上清を回収し、サイトカインELISAまたはLDH放出について分析した。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す（* $P < 0.05$ ）。

【図4B】肺より直接単離した肺胞マクロファージ（A）または培養の肺胞マクロファージ（BおよびE）をLPS（ $1\mu g$ ）または示される粒子状物質（ $100\mu g$ ）で6時間刺激した。上清を回収し、サイトカインELISAまたはLDH放出について分析した。

10

20

30

40

50

左グラフはIL-1生成を示し、右グラフは細胞傷害性を示す。各グラフでは、それぞれ、左からPBS、LPS、アラム、シリカ、Al₂O₃、およびヒドロキシアパタイトを示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P<0.05)。

【図4C】MyD88欠損(C)またはASC欠損(D)の培養肺胞マクロファージを、LPSまたはアラムで6時間刺激した。グラフはIL-1生成を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P<0.05)。

【図4D】MyD88欠損(C)またはASC欠損(D)の培養肺胞マクロファージを、LPSまたはアラムで6時間刺激した。グラフはIL-1生成を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P<0.05)。

【図4E】肺より直接単離した肺胞マクロファージ(A)または培養の肺胞マクロファージ(BおよびE)をLPS(1μg)または示される粒子状物質(100μg)で6時間刺激した。上清を回収し、サイトカインELISAまたはLDH放出について分析した。グラフは、左から、IL-1生成、IL-1、IL-6、TNF-およびPGE₂を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P<0.05)。

【図4F】チオグリコール酸誘導の腹腔マクロファージまたは培養肺胞マクロファージをPBS、LPS、アラムまたはシリカ(グラフ中左から示す)で6時間刺激した。グラフはIL-1生成を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P<0.05)。

【図4G】培養肺胞マクロファージを、ATPまたはLLOMeで6時間処理するか、または、細胞を、3回の凍結-融解サイクル(F/Tサイクル)により溶解させた。左グラフはIL-1生成を示し、右グラフは細胞傷害性を示す。各グラフでは、それぞれ、左からPBS、アラム、ATP、LLOMe、およびF/Tサイクルを示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P<0.05)。

【図4H】培養肺胞マクロファージを、シグナル阻害剤であるサイトカラシンD(CytD)、Wortmannin(WM)、LY294002(LY)、SB203580(SB)またはWedelolactone(Wed)の存在下、シリカまたはアラムで刺激した。6時間後、上清を回収した。左グラフはIL-1生成を示し、右グラフは細胞傷害性を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P<0.05)。

【図4AA】図4AA~FFでは肺胞マクロファージは、粒子状物質に応答してIL-1を産生することが示される。(AA)インビトロ由来のII型肺胞細胞を抗肺サーファクタントタンパク質A抗体で染色し、共焦点顕微鏡により検出した。左はコントロール抗体を示し、右は抗肺サーファクタントタンパク質A抗体を示す。

【図4BB】MyD88/ASC/IPS-1三重KO由来の培養肺胞マクロファージをアラムまたはシリカで6時間刺激した。培養上清中のIL-1をELISAによって分析した。左は野生型を示し、右はMyD88/ASC/IPS-1三重KO由来の培養肺胞マクロファージを示す。グラフはIL-1生成を示す。

【図4CC】野生型、MARCO KOまたはSR-A KO(それぞれ左、中央および右)の肺胞マクロファージを、アラムまたはシリカで6時間刺激した。培養上清中のIL-1をELISAによって分析した。グラフはIL-1生成を示す。

【図4DD】GM-CSF由来の骨髄マクロファージ(GM-M)(DD)またはII型肺胞細胞(EE)を100μgのアラムまたは1μgのLPSで6時間刺激した。培養上清を回収し、LDHアッセイおよびIL-1 ELISAに用いた。左グラフはIL-1生成を示し、右グラフは細胞傷害性を示す。

【図4EE】GM-CSF由来の骨髄マクロファージ(GM-M)(DD)またはII型肺胞細胞(EE)を100μgのアラムまたは1μgのLPSで6時間刺激した。培養上清を回収し、LDHアッセイおよびIL-1 ELISAに用いた。左グラフはIL-1生成を示し、右グラフは細胞傷害性を示す。

【図4FF】培養肺胞マクロファージを、U0126、SP600125、Syk阻害剤(Merck社より購入、#574711)またはネクロスタチン-1(Santa Cruz社より購入、#SC-200142)の存在下または不在下で、アラムを用いて6時間刺激した。左からPBS、アラムのみ、アラ

10

20

30

40

50

ム + U0126、アラム + SP600125、アラム + Syk阻害剤、およびアラム + ネクロスタチン - 1を示す。

【図5A】図5はIL-1の放出はインピボで細胞死によって媒介されることを示す。(図5A)培養肺胞マクロファージを、20 μgのPVNOの存在下でシリカを用いて刺激した。6時間後、上清を回収し、サイトカインELISAまたはLDH放出について分析した。左グラフはIL-1生成を示し、右グラフは細胞傷害性を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P < 0.05)。

【図5B】シリカ、材料および方法に記載したようにまたは100 μgのPVNOを添加したシリカを気管内注入により投与した。1日おきに3回PVNOを気管内注入によりマウスに投与した。粒子状物質の投与から7日後にBALFを回収した。グラフは左からBAL細胞、BALD中のDNA量およびIL-1生成を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験を表す(*P < 0.05)。

【図6】図6は、本発明に基づくIL-1を経由したアレルギーの発症メカニズム模式図を示す。このようなIL-1および肺胞マクロファージの関与は本発明において初めて見出されたものである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本発明を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞(例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など)は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書(定義を含めて)が優先する。

【0024】

以下に本明細書において特に使用される用語の定義および/または基本的技術内容を適宜説明する。

【0025】

1つの局面において、本発明は、インターロイキン1(IL-1)の反応性を指標として被験物質のアレルギー誘発性を検査するための方法を提供する。別の局面において、インターロイキン1(IL-1)の作用を阻害することによってアレルギーを治療または予防する方法、医薬、組成物等を提供する。そこで、インターロイキン1(IL-1)についてまず説明する。

【0026】

インターロイキン-1(IL-1)としては、歴史的な経緯および現象的な経緯から、IL-1のほか、IL-1とは構造が顕著に相違するIL-1が存在し、いずれもマクロファージ、単球および樹状細胞により産生される。これらは感染に対する生体の炎症応答の重要な部分を形成する。大半の場合、IL-1およびIL-1は同一の細胞受容体と結合する。この受容体は所定の他の受容体とほぼ共通の経路を介して細胞内シグナルを伝達する、同一ではないが近縁の2つのサブユニットから構成される。これらはTollファミリーの先天性免疫受容体とIL-18受容体である。IL-1およびIL-1は類似した生物学的性質をさらに有しており、そのような性質としては、発熱、徐波睡眠および好中球増加症の誘導、Tリンパ球およびBリンパ球活性化、線維芽細胞増殖、所定細胞に対する細胞傷害性、コラゲナーゼの誘導、肝臓における急性期タンパク質の合成、ならびにコロニー刺激因子およびコラーゲンの産生亢進が挙げられる。

【0027】

IL-1については、以下のように、IL-1とは異なる機能が知られており、IL-1Rを阻害すると、IL-1および1の両方が阻害されるため、1の阻害によ

10

20

30

40

50

る副作用が問題となる。

【0028】

すなわち、IL-1 と は同一の受容体に結合することから同一の機能を有していると考えられていたが、最近、両者の機能的な違いが報告されている (Rider P. et al J. Immunol. 2011;187:4835 - 43.)。この報告では、炎症部位ではIL-1 は主に好中球の遊走に關与し、IL-1 は単球やマクロファージの遊走に關与することが示されている。また、Y a z d i ら (Yazdi A.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:19449 - 54.) によって、肺の急性炎症におけるIL-1 と の役割が報告されており、急性炎症時の好中球の浸潤にはIL-1 が重要であることが示されている。このような機能的な差異が生じるメカニズムは明らかにされていないが、 と の炎症における役割が異なりうることから、両方を作用を阻害するIL-1 Rの阻害剤は思わぬ副作用を引き起こす可能性があるため、IL-1 のみを特異的に阻害する方法が望ましい。

10

【0029】

IL-1 およびIL-1 をコードするcDNAはいずれも単離・発現されており、これらのcDNAはIL-1 (Lomedico et al. (1984) Nature 312:458) およびIL-1 (Auron et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7909) と呼ばれる2種類の異なる遺伝子産物に相当する。8種類のインターロイキン1ファミリー遺伝子が染色体2上にサイトカイン遺伝子クラスターを形成する。IL-1 はmRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方でヒト単球により産生される主要な形態である。これらの2種類のヒトIL-1はアミノ酸相同度が26%に過ぎない。これらの2種類のIL-1はポリペプチド配列が異なるが、構造類似性があり (Auron et al. (1985) J. Mol. Cell Immunol. 2:169)、アミノ酸相同性はIL-1分子の不連続領域に限定される。

20

【0030】

IL-1 およびIL-1 は前駆体ペプチドとして産生される。換言するならば、これらは長いタンパク質として産生された後、プロセッシングされ、成熟タンパク質と呼ばれる短い活性分子を放出する。IL-1 はプロタンパク質として産生され、カルパインによりタンパク質分解プロセッシングされ、未だ十分に研究されていないメカニズムで放出される。例えば成熟型IL-1 はカスパーゼ1又はインターロイキン1変換酵素 (ICE) と呼ばれるカスパーゼファミリータンパク質の所定のメンバーによる開裂後にPro-IL-1 から放出される。ヒトIL-1スーパーファミリーの各メンバーの成熟形態の三次元構造は樽型タンパク質を産生する12~14本の鎖から構成される。

30

【0031】

IL-1 は軟骨吸収の亢進に効果があることから当初は「カタボリン」と呼ばれたが、滑膜細胞でコラゲナーゼとプロスタグランジンに刺激作用を与えることから「単核球細胞因子」(MCF)とも呼ばれ、急性期反応に刺激作用を与える「白血球内因性因子」(LEM)とも呼ばれる。IL-1 は単球、マクロファージ、線維芽細胞、内皮細胞およびリンパ球等の多数の種類の細胞により合成され、多くの細胞はIL-1 に特異的な受容体を有することから、IL-1 は広範な生物学的活性を有する。IL-1 はIL-2放出、B細胞成熟および増殖、ならびに線維芽細胞増殖因子活性を誘導することにより胸腺細胞増殖を刺激する。IL-1 タンパク質は内因性発熱物質とみなされ、滑膜細胞からのプロスタグランジンとコラゲナーゼの放出を刺激すると報告されている。従って、IL-1 は各種障害および障害の症状の誘因として中心的な位置を占める。これらの障害は治療法が殆ど又は全く存在しない重度の障害が大半である。これらの遺伝子の多型は関節リウマチとアルツハイマー病に關係があることが示唆されている。IL-1全般は関節炎、肺線維症、中枢神経系疾患、糖尿病および所定の心血管疾患を含む多数のヒト疾患に關係があるとされている。

40

【0032】

IL-1 は、IL1A、IL-1A、IL1、IL1-ALPHA、IL1F1等とも表示されることがあり、そのヒトアミノ酸配列については、アクセッション番号が、N

50

P__000566、mRNA配列については、アクセッション番号が、NM__000575である。IL-1のアミノ酸配列は、例えば、配列番号1である。IL-1 mRNAの塩基配列は、例えば、配列番号2である。IL-1は、IL-1の活性を有していれば、そのアミノ酸配列は限定されない。したがって、本発明の具体的な目的に合致する限り、特定の配列番号またはアクセッション番号に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク質（あるいはそれをコードする核酸）のみならず、機能的に活性なその類似体もしくは誘導体、または機能的に活性なそのフラグメント、またはその相同体、または高ストリンジェンシー条件または低ストリンジェンシー条件下で、このタンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする核酸にコードされる変異体もまた、本発明において用いることができることが理解される。

10

【0033】

本明細書で使用される「誘導体」、「類似体」または「変異体」は、好ましくは、限定を意図するものではないが、対象となるタンパク質（例えば、IL-1）に実質的に相同な領域を含む分子を含み、このような分子は、種々の実施形態において、同一サイズのアミノ酸配列にわたり、または当該分野で公知のコンピュータ相同性プログラムによってアラインメントを行ってアラインされる配列と比較した際、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%同一であるか、あるいはこのような分子をコードする核酸は、（高度に）ストリンジェントな条件、中程度にストリンジェントな条件、またはストリンジェントでない条件下で、構成要素タンパク質をコードする配列にハイブリダイズ可能である。これは、それぞれ、アミノ酸置換、欠失および付加によって、天然存在タンパク質を改変した産物であり、その誘導体がなお天然存在タンパク質の生物学的機能を、必ずしも同じ度合いでなくてもよいが示すタンパク質を意味する。例えば、本明細書において記載されあるいは当該分野で公知の適切で利用可能なin vitroアッセイによって、このようなタンパク質の生物学的機能を調べることも可能である。本明細書で使用される「機能的に活性な」は、本明細書において、本発明のポリペプチド、すなわちフラグメントまたは誘導体が関連する態様に従って、生物学的活性などの、タンパク質の構造的機能、制御機能、または生化学的機能を有する、ポリペプチド、すなわちフラグメントまたは誘導体を指す。本発明では、IL-1についてヒトが主に論じられるが、ヒト以外の多くの動物がIL-1を発現していることが知られているため、これらの動物、特に哺乳動物についても、本発明の範囲内に入ることが理解される。

20

30

【0034】

したがって、IL-1の代表的なヌクレオチド配列は、

(a) 配列番号1記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される1つの変異を有する改変体ポリペプチドまたはそのフラグメントであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

40

(d) 配列番号1に記載の塩基配列のスプライズ変異体もしくは対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である塩基

50

配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであり得る。ここで、生物学的活性とは、代表的に、IL-1 の有する活性またはマーカーとして同じ生物内に存在する他のタンパク質から識別し得ることをいう。

IL-1 のアミノ酸配列としては、

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号1に記載の塩基配列のサプライズ変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号2に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a) ~ (d) のいずれか1つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、であり得る。ここで、生物学的活性とは、代表的に、IL-1 の有する活性またはマーカーとして同じ生物内に存在する他のタンパク質から識別し得ること（例えば、抗原として用いられる場合特異的エピトープとして機能し得る領域を含むこと）をいう。

【0035】

本発明の関連において、「IL-1 に結合する物質」、「IL-1 (の) 結合剤」または「IL-1 相互作用分子」は、少なくとも一時的にIL-1 に結合する分子または物質である。検出目的では好ましくは、結合したことを表示しうる（例えば標識されるか標識可能な状態である）ことが有利であり、治療目的では、さらに治療用薬剤が結合していることが有利である。IL-1 に結合する物質は、例としては、抗体、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、siRNA、低分子量分子(LMW)、結合性ペプチド、アプタマー、リボザイムおよびペプチド模倣体(peptidomimetic)等を挙げることができる。IL-1 に結合する物質または「IL-1 相互作用分子」は、IL-1 の阻害剤であってもよく、例えばIL-1 に対して向けられる、特にIL-1 の活性部位に対して向けられる、結合性タンパク質または結合性ペプチド、並びにIL-1 遺伝子に対して向けられる核酸も含まれる。IL-1 に対する核酸は、例えばIL-1 遺伝子の発現またはIL-1 の活性を阻害する、二本鎖または一本鎖DNAまたはRNA、あるいはその修飾物または誘導体を指し、そしてアンチセンス核酸、アプタマー、siRNA(低分子干渉RNA)およびリボザイムを含むがこれらに限定されない。本明細書において、IL-1 について「結合タンパク質」または「結合ペプチド」とは、IL-1 に結合する任意のタンパク質またはペプチドを指し、そしてIL-1 に対して指向される抗体(例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体)、抗体フラグメントおよび機能的等価物を含むがこれらに限定されない。

【0036】

本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変(例えば、標識成分との結合体化)が包含される。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド(例えば、非天然アミノ酸などを含む)、ペプチド様化合物(例えば、ペプトイド)および当該分野において公知の他の改変が包含される。本明細書において、

「アミノ酸」は、アミノ基とカルボキシル基を持つ有機化合物の総称である。本発明の実施形態に係る抗体が「特定のアミノ酸配列」を含むとき、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が化学修飾を受けていてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が塩、または溶媒和物を形成していてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸がL型、またはD型であってもよい。それらのような場合でも、本発明の実施形態に係る蛋白質は、上記「特定のアミノ酸配列」を含むといえる。蛋白質に含まれるアミノ酸が生体内で受ける化学修飾としては、例えば、N末端修飾（例えば、アセチル化、ミリスチル化等）、C末端修飾（例えば、アミド化、グリコシルホスファチジルイノシール付加等）、または側鎖修飾（例えば、リン酸化、糖鎖付加等）等が知られている。本発明の目的を満す限り、天然のものでも非天然のものでもよい。

10

【0037】

本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*19:5081(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*260:2605-2608(1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994)）。本明細書において「核酸」はまた、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。

20

30

【0038】

本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいい、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」をさすことがある。

40

【0039】

本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいい、一般に「相同性」を有するとは、同一性または類似性の程度が高いことをいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少

50

なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。従って本明細書において「相同体」または「相同遺伝子産物」は、本明細書にさらに記載する複合体のタンパク質構成要素と同じ生物学的機能を発揮する、別の種、好ましくは哺乳動物におけるタンパク質を意味する。このような相同体はまた、「オルソログ遺伝子産物」とも称されることもある。本発明の目的に合致する限り、このような相同体、相同遺伝子産物、オルソログ遺伝子産物等も用いることができることが理解される。

【0040】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.2.28 (2013.4.2発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。類似性は、同一性に加え、類似のアミノ酸についても計算に入れた数値である。

10

【0041】

本発明の一実施形態において「数個」は、例えば、10、8、6、5、4、3、または2個であってもよく、それらいずれかの値以下であってもよい。1または数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入、または他のアミノ酸による置換を受けたポリペプチドが、その生物学的活性を維持することは知られている (Mark et al., Proc Natl Acad Sci U S A .1984 Sep;81(18):5662-5666., Zoller et al., Nucleic Acids Res. 1982 Oct 25;10(20):6487-6500., Wang et al., Science. 1984 Jun 29;224(4656):1431-1433.)。欠失等がなされた抗体は、例えば、部位特異的変異導入法、ランダム変異導入法、または抗体ファージライブラリを用いたバイオパニング等によって作製できる。部位特異的変異導入法としては、例えばKOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO CO., LTD.)を使用できる。欠失等を導入した変異型抗体から、野生型と同様の活性のある抗体を選択することは、FACS解析やELISA等の各種キャラクタリゼーションを行うことで可能である。

20

30

【0042】

本発明の一実施形態において「90%以上」は、例えば、90、95、96、97、98、99、または100%以上であってもよく、それらいずれかの2つの値の範囲内であってもよい。上記「相同性」は、2つもしくは複数間のアミノ酸配列において相同なアミノ酸数の割合を、当該技術分野で公知の方法に従って算定してもよい。割合を算定する前には、比較するアミノ酸配列群のアミノ酸配列を整列させ、同一アミノ酸の割合を最大にするために必要である場合はアミノ酸配列の一部に間隙を導入する。整列のための方法、割合の算定方法、比較方法、およびそれらに関連するコンピュータプログラムは、当該技術分野で従来からよく知られている(例えば、BLAST、GENETYX等)。本明細書において「相同性」は、特に断りのない限りNCBIのBLASTによって測定された値で表すことができる。BLASTでアミノ酸配列を比較するときのアルゴリズムには、Blastpをデフォルト設定で使用できる。測定結果はPositivesまたはIdentitiesとして数値化される。

40

【0043】

本明細書において「ストリンジェント(な)条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、

50

コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。「ストリンジেন্টな条件」は、例えば、以下の条件を採用することができる。(1)洗浄のために低イオン強度および高温を用いる(例えば、50℃で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム)、(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる(例えば、42℃で、50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、および750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム)、または(3)20%ホルムアミド、5×SSC、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、および20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中で、37℃で一晩インキュベーションし、次に約37-50℃で1×SSCでフィルターを洗浄する。なお、ホルムアミド濃度は50%またはそれ以上であってもよい。洗浄時間は、5、15、30、60、もしくは120分、またはそれら以上であってもよい。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーに影響する要素としては温度、塩濃度など複数の要素が考えられ、詳細はAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照することができる。「高度にストリンジেন্টな条件」の例は、0.0015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、65~68℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミド、42℃である。ハイブリダイゼーション、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38, DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。中程度のストリンジেন্টな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、当業者によって、容易に決定することができ、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Vol. 1、7.42-7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0)の前洗浄溶液、約40-50℃での、約50%ホルムアミド、2×SSC-6×SSC (または約42℃での約50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液)のハイブリダイゼーション条件、および約60℃、0.5×SSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。従って、本発明において使用されるポリペプチドには、本発明で特に記載されたポリペプチドをコードする核酸分子に対して、高度または中程度でストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるポリペプチドも包含される。

【0044】

本明細書において「精製された」物質または生物学的因子(例えば、核酸またはタンパク質など)とは、その物質または生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。従って、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い(すなわち濃縮されている)。本明細書中で使用される用語「精製された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。本発明で用いられる物質または生物学的因子は、好ましくは「精製された」物質である。本明細書で使用される「単離された」物質または生物学的因子(例えば、核酸またはタンパク質など)とは、その物質または生物学的因子に天然に随伴する因子が実質的に除去されたものをいう。本明細書中で使用される用語「単離された」は、その目的に応じて変動す

10

20

30

40

50

るため、必ずしも純度で表示される必要はないが、必要な場合、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。本発明で用いられる物質は、好ましくは「単離された」物質または生物学的因子である。

【0045】

本明細書において「対応する」アミノ酸または核酸あるいは部分とは、あるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子（例えば、IL-1）において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸またはヌクレオチドあるいは部分と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸またはヌクレオチドをいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいい、複合分子にあっては対応する部分（例えば、膜貫通ドメイン等）をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。対応するアミノ酸は、例えば、システイン化、グルタチオン化、S-S結合形成、酸化（例えば、メチオニン側鎖の酸化）、ホルミル化、アセチル化、リン酸化、糖鎖付加、ミリスチル化などがされる特定のアミノ酸であり得る。あるいは、対応するアミノ酸は、二量体化を担うアミノ酸であり得る。このような「対応する」アミノ酸または核酸は、一定範囲にわたる領域またはドメインであってもよい。従って、そのような場合、本明細書において「対応する」領域またはドメインと称される。このような対応する領域またはドメインは、本発明において複合分子を設計する場合に有用である。

10

20

【0046】

本明細書において「対応する」遺伝子（例えば、ポリヌクレオチド配列または分子）とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子（例えば、ポリヌクレオチド配列または分子）をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子に対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。従って、ヒトのIL-1は、それぞれ、他の動物（特に哺乳動物）において、対応するIL-1を見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。従って、例えば、ある動物（例えば、マウス）における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、IL-1等）は、配列番号1または配列番号2等の配列をクエリ配列として用いてその動物の配列を含むデータベースを検索することによって見出すことができる。

30

40

【0047】

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さがn）に対して、1~n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、このようなフラグメントは、例えば、全長のものがマーカー、治療剤または標的分子として機能する場合、そのフラグメント自体もまたマーカー、治療剤または標的分子としての機能を有する限り、本発明の範囲内に入ることが理解される。

【0048】

本発明に従って、用語「活性」は、本明細書において、最も広い意味での分子の機能を指す。活性は、限定を意図するものではないが、概して、分子の生物学的機能、生化学的機能、物理的機能または化学的機能を含む。活性は、例えば、酵素活性、他の分子と相

50

相互作用する能力、および他の分子の機能を活性化するか、促進するか、安定化するか、阻害するか、抑制するか、または不安定化する能力、安定性、特定の細胞内位置に局在する能力を含む。適用可能な場合、この用語はまた、最も広い意味でのタンパク質複合体の機能にも関する。

【0049】

本明細書において「生物学的機能」とは、ある遺伝子またはそれに関する核酸分子もしくはポリペプチドについて言及するとき、その遺伝子、核酸分子またはポリペプチドが生体内において有し得る特定の機能をいい、これには、例えば、特異的な抗体の生成、酵素活性、抵抗性の付与等を挙げることができるがそれらに限定されない。本発明においては、IL-1は、肺胞マクロファージの機能との関連および/またはアレルギー誘発性との関連で機能することが提示されているため、その関連性を挙げることができるがそれらに限定されない。本明細書において、生物学的機能は、「生物学的活性」によって発揮され得る。本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含され、例えば、ある分子との相互作用によって別の分子が活性化または不活性化される活性も包含される。2つの因子が相互作用する場合、その生物学的活性は、その二分子の間の結合およびそれによって生じる生物学的変化であり得、そして、例えば、一つの分子を抗体を用いて沈降させたときに他の分子も共沈するとき、2分子は結合していると考えられる。従って、そのような共沈を見るのが一つの判断手法として挙げられる。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。従って、「活性」は、結合（直接的または間接的のいずれか）を示すかまたは明らかにするか；応答に影響する（すなわち、いくらかの曝露または刺激に応答する測定可能な影響を有する）、種々の測定可能な指標をいい、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接結合する化合物の親和性、または例えば、いくつかの刺激後または事象後の上流または下流のタンパク質の量あるいは他の類似の機能の尺度が挙げられる。

10

20

【0050】

本明細書においてインターロイキン1（IL-1）の「値」とは、インターロイキン1（IL-1）のタンパク質の量、mRNAの発現量、酵素活性等、インターロイキン1（IL-1）に関する何らかの値であればよい。この「値」はアレルギー誘発性の指標として本発明において用いることができる。

30

【0051】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」とは、その遺伝子などがインピボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一態様である。したがって、本明細書において「発現産物」とは、このようなポリペプチドもしくはタンパク質、またはmRNAを含む。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。例えば、IL-1の発現レベルは、任意の方法によって決定することができる。具体的には、IL-1のmRNAの量、IL-1タンパク質の量、そしてIL-1タンパク質の生物学的な活性を評価することによって、IL-1の発現レベルを知ることができる。このような測定値はコンパニオン診断において使用し得る。IL-1のmRNAやタンパク質の量は、本明細書の他の箇所に詳述したような方法あるいは他の当該分野において公知の方法によって決定することができる。

40

【0052】

本明細書において「機能的等価物」とは、対象となるもとの実体に対して、目的となる機能が同じであるが構造が異なる任意のものをいう。従って、「IL-1」またはその抗体の機能的等価物は、IL-1またはその抗体自体ではないが、IL-1またはそ

50

の抗体の変異体または改変体（例えば、アミノ酸配列改変体等）であって、IL-1の持つ生物学的作用を有するもの、ならびに、作用する時点において、IL-1またはその抗体自体またはこのIL-1またはその抗体の変異体もしくは改変体に変化することができるもの（例えば、IL-1またはその抗体自体またはIL-1またはその抗体の変異体もしくは改変体をコードする核酸、およびその核酸を含むベクター、細胞等を含む）が包含されることが理解される。本発明において、IL-1またはその抗体の機能的等価物は、格別に言及していなくても、IL-1またはその抗体と同様に用いられることが理解される。機能的等価物は、データベース等を検索することによって、見出すことができる。本明細書において「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および/または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 2444-2448(1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197(1981))、およびNeedleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453(1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ（マイクロアレイアッセイ）、PCRおよびin situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明において使用される遺伝子には、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

10

20

【0053】

本発明の機能的等価物としては、アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加されたものを用いることができる。本明細書において、「アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、あるいは天然の変異により、天然に生じ得る程度の複数個の数のアミノ酸の置換等により改変がなされていることを意味する。改変アミノ酸配列は、例えば1~30個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~9個、さらに好ましくは1~5個、特に好ましくは1~2個のアミノ酸の挿入、置換、もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加がなされたものであることができる。改変アミノ酸配列は、好ましくは、そのアミノ酸配列が、IL-1のアミノ酸配列において1または複数個（好ましくは1もしくは複数個または1、2、3、もしくは4個）の保存的置換を有するアミノ酸配列であってもよい。ここで「保存的置換」とは、タンパク質の機能を実質的に改変しないように、1または複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該分野において公知である。具体例を挙げると、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ（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。

30

40

【0054】

本明細書において「阻害剤」または「抑制剤」または「インヒビター」（いずれも英文では、inhibitorに該当する）とは、対象となる実体（例えば、レセプターまたは細胞）に対してそのレセプターまたは細胞の生物学的作用を阻害する物質または因子をいう。本発明のIL-1の阻害剤としては、対象となるIL-1またはIL-1を

50

発現する細胞等の作用または機能を一時的または永久に低下または消失させることができる因子が挙げられる。このような因子には、抗体、その抗原結合フラグメント、それらの誘導体、機能的等価物、アンチセンス、siRNA等のRNAi因子等の核酸の形態のもの等を挙げることができるがこれらに限定されない。

【0055】

本明細書において「アゴニスト」とは、対象となる実体（例えば、レセプター）に対してそのレセプターの生物学的作用を発現またはそれを増強する物質をいう。天然のアゴニスト（リガンドとも称される）のほか、合成されたものや改変されたもの等を挙げることができる。本明細書において「アンタゴニスト」とは、対象となる実体（例えば、レセプター）に対してそのレセプターの生物学的作用の発現を抑制または阻害する物質をいう。天然のアンタゴニストのほか、合成されたものや改変されたもの等を挙げることができる。アゴニスト（またはリガンド）と競合的に抑制または阻害するもののほか、非競合的に抑制または阻害するもの等がある。アゴニストを改変することによっても得られうる。生理現象を抑制または阻害することから、アンタゴニストは阻害剤（阻害剤）または抑制（する）因子の概念に包含されうる。したがって、本明細書においては実質的にアンタゴニストは「阻害剤」と同義で用いられる。

10

【0056】

本明細書において「抗体」は、広義にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらのフラグメント、例えばFvフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂およびFabフラグメント、ならびにその他の組換えにより生産された結合体または機能的等価物（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、多機能抗体、二重特異性またはオリゴ特異性（oligospecific）抗体、単鎖抗体、scFv、ダイアボディー（diabody）、sc(Fv)₂（single chain（Fv）₂）、scFv-Fc）を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。本発明で用いられる抗IL-1抗体は、IL-1のタンパク質に結合すればよく、その由来、種類、形状などは問われない。具体的には、非ヒト動物の抗体（例えば、マウス抗体、ラット抗体、ラクダ抗体）、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などの公知の抗体が使用できる。本発明においては、モノクローナル、あるいはポリクローナルを抗体として利用することができるが好ましくはモノクローナル抗体である。抗体のIL-1タンパク質への結合は特異的な結合であることが好ましい。また抗体は、抗体修飾物または抗体非修飾物を含む。抗体修飾物は、抗体と、例えばポリエチレングリコール等の各種分子が結合していてもよい。抗体修飾物は、抗体に公知の手法を用いて化学的な修飾を施すことによって得ることができる。

20

30

【0057】

本発明の一実施形態において「抗IL-1抗体」は、IL-1に結合性を有する抗体を含む。この抗IL-1抗体の生産方法は特に限定されないが、例えば、IL-1を哺乳類または鳥類に免疫することによって生産してもよい。

【0058】

また、「IL-1に対する抗体（抗IL-1抗体）、または、そのフラグメント」の「機能的等価物」は、例えば、抗体の場合、IL-1の結合活性、必要であれば抑制活性を有する抗体自体およびそのフラグメント自体のほか、キメラ抗体、ヒト化抗体、多機能抗体、二重特異性またはオリゴ特異性（oligospecific）抗体、単鎖抗体、scFv、ダイアボディー、sc(Fv)₂（single chain（Fv）₂）、scFv-Fcなども包含されることが理解される。

40

【0059】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、悪性腫瘍の増殖が特に強く抑制される観点からは、IL-1の特定のエピトープに特異的に結合する抗IL-1抗体であることが好ましい。

【0060】

50

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体であれば、ポリクローナル抗体に比べて、効率的にIL-1に対して作用させることができる。抗IL-1モノクローナル抗体を効率的に生産する観点からは、IL-1をニワトリに免疫することが好ましい。

【0061】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体の抗体クラスは特に限定されないが、例えばIgM、IgD、IgG、IgA、IgE、またはIgYであってもよい。

【0062】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、抗原結合活性を有する抗体断片（以下、「抗原結合性断片」と称することもある）であっても良い。この場合、安定性または抗体の生産効率が上昇する等の効果がある。

【0063】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、融合蛋白質であってもよい。この融合蛋白質は、抗IL-1抗体のNまたはC末端に、ポリペプチドまたはオリゴペプチドが結合したものであってもよい。ここで、オリゴペプチドは、Hisタグであってもよい。また融合蛋白質は、マウス、ヒト、またはニワトリの抗体部分配列を融合したものであってもよい。それらのような融合蛋白質も、本実施形態に係る抗IL-1抗体の一形態に含まれる。

【0064】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、例えば、精製IL-1、IL-1発現細胞、またはIL-1含有脂質膜で生物を免疫する工程を経て得られる抗体であってもよい。IL-1陽性悪性腫瘍に対する治療効果を高める観点からは、IL-1発現細胞を免疫に使用することが好ましい。

【0065】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、精製IL-1、IL-1発現細胞またはIL-1含有脂質膜で生物を免疫する工程を経て得られる抗体の、CDRセットを有する抗体であってもよい。IL-1陽性悪性腫瘍に対する治療効果を高める観点からは、IL-1発現細胞を免疫に使用することが好ましい。CDRセットとは、重鎖CDR1、2、および3、並びに、軽鎖CDR1、2、および3のセットである。

【0066】

本発明の一実施形態において「IL-1発現細胞」は、例えば、IL-1をコードするポリヌクレオチドを細胞に導入後、IL-1を発現させることによって得てもよい。ここでIL-1は、IL-1断片を含む。また本発明の一実施形態において「IL-1含有脂質膜」は、例えば、IL-1と脂質二重膜を混合することによって得てもよい。ここでIL-1は、IL-1断片を含む。また本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、IL-1陽性悪性腫瘍に対する治療効果を高める観点からは、抗原をニワトリに免疫する工程を経て得られる抗体、またはその抗体のCDRセットを有する抗体が好ましい。

【0067】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、目的を達成する限り、どのような結合力を有していてもよく、例えば、少なくとも 1.0×10^6 以上、 2.0×10^6 以上、 5.0×10^6 以上、 1.0×10^7 以上を挙げることができるがこれらに限定されず、通常は、KD値が、 1.0×10^7 以上であってもよい。

【0068】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、ADCCまたはCDC活性を有していてもよい。

【0069】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、IL-1の野生型または変異型に結合する抗体であってもよい。変異型とは、個体間のDNA配列の差異に起因するものを含む。野生型または変異型のIL-1のアミノ酸配列は、配列番号8に示すアミノ酸配列

10

20

30

40

50

に対し、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有している。

【0070】

本発明の一実施形態において「抗体」は、抗原上の特定のエピトープに特異的に結合することができる分子またはその集団を含む抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。抗体は、様々な形態で存在することができ、例えば、全長抗体（Fab領域とFc領域を有する抗体）、Fv抗体、Fab抗体、F(ab')₂抗体、Fab'抗体、diabody、一本鎖抗体（例えば、scFv）、dsFv、多価特異的抗体（例えば、二価特異的抗体）、抗原結合性を有するペプチドまたはポリペプチド、キメラ抗体（例えば、マウス-ヒトキメラ抗体、ニワトリ-ヒトキメラ抗体等）、マウス抗体、ニワトリ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、またはそれらの同等物（または等価物）からなる群から選ばれる1種以上の形態であってもよい。また抗体は、抗体修飾物または抗体非修飾物を含む。抗体修飾物は、抗体と、例えばポリエチレングリコール等の各種分子が結合していてもよい。抗体修飾物は、抗体に公知の手法を用いて化学的な修飾を施すことによって得ることができる。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。本発明で用いられる抗IL-1抗体は、IL-1のタンパク質に結合すればよく、その由来、種類、形状などは問われない。具体的には、非ヒト動物の抗体（例えば、マウス抗体、ラット抗体、ラクダ抗体）、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などの公知の抗体が使用できる。本発明においては、モノクローナル、あるいはポリクローナルを抗体として利用することができるが好ましくはモノクローナル抗体である。抗体のIL-1タンパク質への結合は特異的な結合であることが好ましい。また抗体は、抗体修飾物または抗体非修飾物を含む。抗体修飾物は、抗体と、例えばポリエチレングリコール等の各種分子が結合していてもよい。抗体修飾物は、抗体に公知の手法を用いて化学的な修飾を施すことによって得ることができる。

10

20

30

【0071】

本発明の一実施形態において「ポリクローナル抗体」は、例えば、抗原に特異的なポリクローナル抗体の産生を誘導するために、哺乳類（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、サル等）、鳥類等に、目的の抗原を含む免疫原を投与することによって生成することが可能である。免疫原の投与は、1つ以上の免疫剤、および所望の場合にはアジュバントの注入をしてもよい。アジュバントは、免疫応答を増加させるために使用されることもあり、フロイントアジュバント（完全または不完全）、ミネラルゲル（水酸化アルミニウム等）、または界面活性物質（リゾレシチン等）等を含んでいてもよい。免疫プロトコールは、当該技術分野で公知であり、選択する宿主生物に合わせて、免疫応答を誘発する任意の方法によって実施される場合がある（タンパク質実験ハンドブック、羊土社(2003):86-91.）。

【0072】

本発明の一実施形態において「モノクローナル抗体」は、集団を構成する個々の抗体が、少量自然に生じることが可能な突然変異を有する抗体を除いて、実質的に単一のエピトープに対応する抗体である場合を含む。または、集団を構成する個々の抗体が、少量自然に生じることが可能な突然変異を有する抗体を除いて、実質的に同一である抗体であってもよい。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、異なるエピトープに対応する異なる抗体を典型的に含むような、通常のポリクローナル抗体とは異なる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養から合成できる点で有用である。「モノクローナル」という形容は、実質的に均一な抗体集団から得られるという特徴を示していてもよいが、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、モノクローナル抗体は、"Kohler G, Milstein C., Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-497."に掲載されているようなハイブリドーマ法と同様の方法によって作製してもよい。あるいは、モノクローナル抗体は、米国特許第4816567号に記載されているような組換え法と同様の方法によって

40

50

作製してもよい。または、モノクローナル抗体は、"Clackson et al., Nature, 1991 Aug 15;352(6336):624-628."、または"Marks et al., J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-597."に記載されているような技術と同様の方法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。または、"タンパク質実験ハンドブック、羊土社(2003):92-96."に掲載されている方法によって作製してもよい。

【0073】

抗体の大量生産については、当該分野で公知の任意の手法を用いることができるが、例えば、代表的な抗体の大量生産系の構築および抗体製造としては、以下を例示することができる。すなわち、CHO細胞にH鎖抗体発現ベクターおよびL鎖抗体発現ベクターをトランスフェクションし、選択試薬であるG418およびZeocinを用いて培養を行い、限界希釈法によるクローニングを行う。クローニング後、安定的に抗体を発現しているクローンをELISA法により選択する。選択したCHO細胞を用いて拡大培養し、抗体を含む培養上清を回収する。回収した培養上清からProtein AもしくはProtein G精製により抗体を精製することができる。

10

【0074】

本発明の一実施形態において「Fv抗体」は、抗原認識部位を含む抗体である。この領域は、非共有結合による1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体を含む。この構成において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してVH-VL二量体の表面に抗原結合部位を形成することができる。

20

【0075】

本発明の一実施形態において「Fab抗体」は、例えば、Fab領域およびFc領域を含む抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体が一部のジスルフィド結合を介して結合した抗体である。Fabは、例えば、Fab領域およびFc領域を含む本発明の実施形態に係る抗IL-1抗体を、蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。

【0076】

本発明の一実施形態において「F(ab')₂抗体」は、例えば、Fab領域およびFc領域を含む抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち、Fabに相当する部位を2つ含む抗体である。F(ab')₂は、例えば、Fab領域およびFc領域を含む本発明の実施形態に係る抗IL-1抗体を、蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。また、例えば、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させることで、作製することができる。

30

【0077】

本発明の一実施形態において「Fab'抗体」は、例えば、F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断して得られる抗体である。例えば、F(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。

【0078】

本発明の一実施形態において「scFv抗体」は、VHとVLとが適当なペプチドリンカーを介して連結した抗体である。scFv抗体は、例えば、本発明の実施形態に係る抗IL-1抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、VH-ペプチドリンカー-VLをコードするポリヌクレオチドを構築し、そのポリヌクレオチドをベクターに組み込み、発現用の細胞を用いて生産できる。

40

【0079】

本発明の一実施形態において「diabody」は、二価の抗原結合活性を有する抗体である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。diabodyは、例えば、scFvをコードするポリヌクレオチドをペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、得られたポリヌクレオチドをベクターに組み込み、発現用の細胞を用いて生産できる。

【0080】

本発明の一実施形態において「dsFv」は、VHおよびVL中にシステイン残基を導入したポ

50

リペプチドを、上記システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させた抗体である。システイン残基に導入する位置はReiterらにより示された方法(Reiter et al., Protein Eng. 1994 May;7(5):697-704.)に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

【0081】

上記のFv抗体、Fab抗体、F(ab')₂抗体、Fab'抗体、scFv抗体、diabody、dsFv抗体、抗原結合性を有するペプチドまたはポリペプチド(以下、「Fv抗体等」と称することもある)の生産方法は特に限定しない。例えば、本発明の実施形態に係る抗IL-1抗体におけるFv抗体等の領域をコードするDNAを発現用ベクターに組み込み、発現用細胞を用いて生産できる。または、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBOC法(t-ブチルオキシカルボニル法)などの化学合成法によって生産してもよい。なお本発明の一実施形態に係る抗原結合性断片は、上記Fv抗体等の1種以上であってもよい。

10

【0082】

本発明の一実施形態において「キメラ抗体」は、例えば、異種生物間における抗体の可変領域と、抗体の定常領域とを連結したもので、遺伝子組換え技術によって構築できる。マウス-ヒトキメラ抗体は、例えば、"Roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):969-973."に記載の方法で作製できる。マウス-ヒトキメラ抗体を作製するための基本的な方法は、例えば、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列および可変領域配列を、哺乳類細胞の発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体定常領域をコードする配列に連結する。または、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列および可変領域配列をヒト抗体定常領域をコードする配列に連結した後、哺乳類細胞発現ベクターに連結してもよい。ヒト抗体定常領域の断片は、任意のヒト抗体のH鎖定常領域およびヒト抗体のL鎖定常領域のものとすることができ、例えばヒトH鎖のものについてはC₁、C₂、C₃またはC₄を、L鎖のものについてはC₁またはC₂を各々挙げることができる。

20

【0083】

本発明の一実施形態において「ヒト化抗体」は、例えば、非ヒト種由来の1つ以上のCDR、およびヒト免疫グロブリン由来のフレームワーク領域(FR)、さらにヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有し、所望の抗原に結合する抗体である。抗体のヒト化は、当該技術分野で既知の種々の手法を使用して実施可能である(Almagro et al., Front Biosci. 2008 Jan 1;13:1619-1633.)。例えば、CDRグラフィティング(Ozaki et al., Blood. 1999 Jun 1;93(11):3922-3930.)、Re-surfacing (roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):969-973.)、またはFRシャッフル(Damschroder et al., Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):3049-3060. Epub 2007 Jan 22.)などが挙げられる。抗原結合を改変するために(好ましくは改善するために)、ヒトFR領域のアミノ酸残基は、CDRドナー抗体からの対応する残基と置換してもよい。このFR置換は、当該技術分野で周知の方法によって実施可能である(Riechmann et al., Nature. 1988 Mar 24;332(6162):323-327.)。例えば、CDRとFR残基の相互作用のモデリングによって抗原結合に重要なFR残基を同定してもよい。または、配列比較によって、特定の位置で異常なFR残基を同定してもよい。

30

40

【0084】

本発明の一実施形態において「ヒト抗体」は、例えば、抗体を構成する重鎖の可変領域および定常領域、軽鎖の可変領域および定常領域を含む領域が、ヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来する抗体である。主な作製方法としてはヒト抗体作製用トランスジェニックマウス法、ファージディスプレイ法などがある。ヒト抗体作製用トランスジェニックマウス法では、内因性Igをノックアウトしたマウスに機能的なヒトのIg遺伝子を導入すれば、マウス抗体の代わりに多様な抗原結合能を持つヒト抗体が産生される。さらにこのマウスを免疫すればヒトモノクローナル抗体を従来のハイブリドーマ法で得ることが可能である。例えば、"Lonberg et al., Int Rev Immunol. 1995;13(1):65-93."に記載の方法で作製できる。ファージディスプレイ法は、典型的には大腸菌ウイルスの一つ

50

であるM13やT7などの繊維状ファージのコート蛋白質（g3p、g10p等）のN末端側にファージの感染性を失わないよう外来遺伝子を融合蛋白質として発現させるシステムである。例えば、"Vaughan et al., Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):309-314."に記載の方法で作製できる。

【0085】

また抗体は、CDR-grafting (Ozaki et al., Blood. 1999 Jun 1;93(11):3922-3930.)によって任意の抗体に本発明の実施形態に係る抗IL-1抗体の重鎖CDRまたは軽鎖CDRをグラフティングすることで作製してもよい。または、本発明の実施形態に係る抗IL-1抗体の重鎖CDRまたは軽鎖CDRをコードするDNAと、公知のヒトまたはヒト以外の生物由来の抗体の、重鎖CDRまたは軽鎖CDRを除く領域をコードするDNAとを、当該技術分野で公知の方法に従ってベクターに連結後、公知の細胞を使用して発現させることによって得ることができる。このとき、抗IL-1抗体の標的抗原への作用効率を上げるために、当該分野で公知の方法（例えば、抗体のアミノ酸残基をランダムに変異させ、反応性の高いものをスクリーニングする方法、またはファージディスプレイ法等）を用いて、重鎖CDRまたは軽鎖CDRを除く領域を最適化してもよい。また、例えば、FRシャッフル (Damschroder et al., Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):3049-3060. Epub 2007 Jan 22.)、またはパーニヤゾンのアミノ酸残基またはパッケージング残基を置換する方法（特開2006-241026、またはFoote et al., J Mol Biol.1992 Mar 20;224(2):487-499.）を用いて、FR領域を最適化してもよい。

10

【0086】

本発明の一実施形態において「重鎖」は、典型的には、全長抗体の主な構成要素である。重鎖は、通常、軽鎖とジスルフィド結合および非共有結合によって結合している。重鎖のN末端側のドメインには、同種の同一クラスの抗体でもアミノ酸配列が一定しない可変領域（VH）と呼ばれる領域が存在し、一般的に、VHが抗原に対する特異性、親和性に大きく寄与していることが知られている。例えば、"Reiter et al., J Mol Biol. 1999 Jul 16;290(3):685-98."にはVHのみの分子を作製したところ、抗原と特異的に、高い親和性で結合したことが記載されている。さらに、"Wolfson W, Chem Biol. 2006 Dec;13(12):1243-1244."には、ラクダの抗体の中には、軽鎖を持たない重鎖のみの抗体が存在していることが記載されている。

20

【0087】

本発明の一実施形態において「CDR（相補性決定領域）」は、抗体において、実際に抗原に接触して結合部位を形成している領域である。一般的にCDRは、抗体のFv（可変領域：重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含む）上に位置している。また一般的にCDRは、5～30アミノ酸残基程度からなるCDR1、CDR2、CDR3が存在する。そして、特に重鎖のCDRが抗体の抗原への結合に寄与していることが知られている。またCDRの中でも、CDR3が抗体の抗原への結合における寄与が最も高いことが知られている。例えば、"Willy et al., Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 356, Issue 1, 27 April 2007, Pages 124-128"には、重鎖CDR3を改変させることで抗体の結合能を上昇させたことが記載されている。CDR以外のFv領域はフレームワーク領域（FR）と呼ばれ、FR1、FR2、FR3およびFR4からなり、抗体間で比較的よく保存されている（Kabat et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983.）。即ち、抗体の反応性を特徴付ける要因はCDRにあり、特に重鎖CDRにあるといえる。

30

40

【0088】

CDRの定義およびその位置を決定する方法は複数報告されている。例えば、Kabatの定義 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))、またはChothiaの定義(Chothia et al., J. Mol. Biol.,1987;196:901-917)を採用してもよい。本発明の一実施形態においては、Kabatの定義を好適な例として採用するが、必ずしもこれに限定されない。また、場合によっては、Kabatの定義とChothiaの定義の両方を考

50

慮して決定しても良く、例えば、各々の定義によるCDRの重複部分を、または各々の定義によるCDRの両方を含んだ部分をCDRとすることもできる。そのような方法の具体例としては、Kabatの定義とChothiaの定義の折衷案である、Oxford Molecular's AbM antibody modeling softwareを用いたMartinらの方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1989;86:9268-9272)がある。このようなCDRの情報を用いて、本発明に使用されうる変異体を生産することができる。このような抗体の変異体では、もとの抗体のフレームワークに1または数個(例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個)の置換、付加もしくは欠失を含むが、該CDRには変異を含まないように生産することができる。

【0089】

本明細書において「抗原」(antigen)とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(immunogen)とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。本明細書において「エピトープ」または「抗原決定基」とは、抗体またはリンパ球レセプターが結合する抗原分子中の部位をいう。エピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。本発明の抗体は、エピトープが同じであれば、他の配列を有する抗体であっても同様に利用することができることが理解される。

【0090】

本明細書において使用される抗体は、擬陽性が減じられる限り、どのような特異性の抗体を用いても良いことが理解される。従って、本発明において用いられる抗体は、ポリクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体であってもよい。

【0091】

本明細書において「手段」とは、ある目的(例えば、検出、診断、治療)を達成する任意の道具となり得るものをいい、特に、本明細書では、「測定する手段」とは、ある対象を何らかの方法で測定することができる手段をいう。

【0092】

本明細書において「マーカー(物質または遺伝子)」とは、ある状態(例えば、疾患状態、障害状態、あるいは悪性状態のレベル、有無等)にあるかまたはその危険性があるかどうかを追跡する示標となる物質をいう。このようなマーカーとしては、遺伝子、遺伝子産物、代謝物質、酵素などを挙げるができる。本発明において、ある状態(例えば、癌等の疾患の状態)についての検出、診断、予備的検出、予測または事前診断は、その状態に関連するマーカーに特異的な薬剤、剤、因子または手段、あるいはそれらを含む組成物、キットまたはシステム等を用いて実現することができる。本明細書において、「発現産物」(遺伝子産物ともいう)とは、遺伝子によってコードされるタンパク質またはmRNAをいう。本明細書では、アレルギー誘発性、特にI型アレルギーとの関連が示されていない、IL-1がアレルギー誘発性の指標として使用可能であることが見出された。

【0093】

本明細書において「被験体(者)」とは、本発明の診断または検出、あるいは治療等の対象となる対象(例えば、ヒト等の生物または生物から取り出した細胞、血液、血清等)をいう。

【0094】

本明細書において「試料」とは、被験体等から得られた任意の物質をいい、例えば、血清等が含まれる。当業者は本明細書の記載をもとに適宜好ましい試料を選択することができる。

【0095】

本明細書において「薬剤」、「剤」または「因子」(いずれも英語ではagentに相当する)は、広義には、交換可能に使用され、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素(例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー)でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸(例えば、

10

20

30

40

50

cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む)、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子(例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子(例えば、低分子リガンドなど)など)、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を(例えば、70%以上の配列同一性)もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物(例えば、単鎖抗体)、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

10

【0096】

本明細書において「診断」とは、被験体における疾患、障害、状態(例えば、アレルギー)などに関連する種々のパラメータを同定し、そのような疾患、障害、状態の現状または未来を判定することをいう。本発明の方法、装置、システムを用いることによって、体内の状態を調べることができ、そのような情報を用いて、被験体における疾患、障害、状態、投与すべき処置または予防のための処方物または方法などの種々のパラメータを選定することができる。本明細書において、狭義には、「診断」は、現状を診断することをいうが、広義には「早期診断」、「予測診断」、「事前診断」等を含む。本発明の診断方法は、原則として、身体から出たものを利用することができ、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることから、産業上有用である。本明細書において、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることを明確にするために、特に「予測診断、事前診断もしくは診断」を「支援」と称することがある。

20

【0097】

本明細書において「検出薬(剤)」または「検査薬(剤)」とは、広義には、目的の対象を検出または検査することができるあらゆる薬剤をいう。

【0098】

本明細書において「診断薬(剤)」とは、広義には、目的の状態(例えば、アレルギー等の疾患など)を診断できるあらゆる薬剤をいう。

30

【0099】

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害(例えば、アレルギー)について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消退させることをいい、患者の疾患、もしくは疾患に伴う1つ以上の症状の、症状改善効果あるいは予防効果を発揮しうることを含む。事前に診断を行って適切な治療を行うことは「コンパニオン治療」といい、そのための診断薬を「コンパニオン診断薬」ということがある。

【0100】

本明細書において「治療薬(剤)」とは、広義には、目的の状態(例えば、アレルギー等の疾患など)を治療できるあらゆる薬剤をいう。本発明の一実施形態において「治療薬」は、有効成分と、薬理的に許容される1つもしくはそれ以上の担体とを含む医薬組成物であってもよい。医薬組成物は、例えば有効成分と上記担体とを混合し、製剤学の技術分野において知られる任意の方法により製造できる。また治療薬は、治療のために用いられる物であれば使用形態は限定されず、有効成分単独であってもよいし、有効成分と任意の成分との混合物であってもよい。また上記担体の形状は特に限定されず、例えば、固体または液体(例えば、緩衝液)であってもよい。なおアレルギーの治療薬は、アレルギーの予防のために用いられる薬物(予防薬)、またはアレルギー抑制剤を含む。

40

【0101】

本明細書において「予防」とは、ある疾患または障害(例えば、アレルギー)について、そのような状態になる前に、そのような状態にならないようにすることをいう。本発明

50

の薬剤を用いて、診断を行い、必要に応じて本発明の薬剤を用いて例えば、アレルギー等の予防をするか、あるいは予防のための対策を講じることができる。

【0102】

本明細書において「予防薬(剤)」とは、広義には、目的の状態(例えば、アレルギー等の疾患など)を予防できるあらゆる薬剤をいう。

【0103】

本明細書において「曝露」とは、ある物質を別の物質と相互作用し得る状態に置くことをいう。本明細書において「相互作用」とは、2つの物質についていうとき、一方の物質と他方の物質との間で力(例えば、分子間力(ファンデルワールス力)、水素結合、疎水性相互作用など)を及ぼしあうこという。通常、相互作用をした2つの物質は、会合または結合している状態にある。本発明の検出、検査および診断は、このような相互作用を利用して実現することができる。

10

【0104】

本明細書中で使用される用語「結合」は、2つの物質の間、あるいはそれらの組み合わせの間での、物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的相互作用(結合)は、直接的または間接的であり得、間接的なものは、別のタンパク質または化合物の効果を介するかまたは起因する。直接的な結合とは、別のタンパク質または化合物の効果を介してもまたはそれらに起因しても起こらず、他の実質的な化学中間体を伴わない、相互作用をいう。

20

【0105】

従って、本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの生物学的因子に対して「特異的に」相互作用する(または結合する)「因子」(または、薬剤、検出剤等)とは、そのポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドなどの生物学的因子に対する親和性が、他の無関連の(特に、同一性が30%未満の)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する親和性よりも、代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に(例えば、統計学的に有意に)高いものを包含する。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。

【0106】

本明細書において第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に」相互作用する(または結合する)とは、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して、第二の物質または因子以外の物質または因子(特に、第二の物質または因子を含む試料中に存在する他の物質または因子)に対するよりも高い親和性で相互作用する(または結合する)ことをいう。物質または因子について特異的な相互作用(または結合)としては、例えば、核酸におけるハイブリダイゼーション、タンパク質における抗原抗体反応、酵素-基質反応など、核酸およびタンパク質の反応、タンパク質-脂質相互作用、核酸-脂質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、物質または因子がともに核酸である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して少なくとも一部に相補性を有することが包含される。また例えば、物質または因子がともにタンパク質である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に」相互作用する(または結合する)こととしては、例えば、抗原抗体反応による相互作用、レセプター-リガンド反応による相互作用、酵素-基質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。2種類の物質または因子がタンパク質および核酸を含む場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に」相互作用する(または結合する)ことには、抗体と、その抗原との間の相互作用(または結合)が包含される。このような特異的な相互作用または結合の反応を利用することにより、試料中の対象物の検出または定量を行うことができる。

30

40

【0107】

本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチド発現の「検出」または「定量」

50

は、例えば、検出剤、検査剤または診断剤への結合または相互作用を含む、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、発光イムノアッセイ(LIA)、免疫沈降法(IP)、免疫拡散法(SRID)、免疫比濁法(TIA)、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ(例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ)を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、(秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」)に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec;32 Suppl: 526 - 532に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、in vitro翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔羊土社(2002)などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

10

20

30

40

50

【0108】

本明細書において「発現量」とは、目的の細胞、組織などにおいて、ポリペプチドまたはmRNA等が発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明において使用されるポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明において使用されるポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。あるマーカーの発現量を測定することによって、マーカーに基づく種々の検出または診断を行うことができる。

【0109】

本明細書において、活性、発現産物(例えば、タンパク質、転写物(RNAなど))の「減少」または「抑制」あるいはその類義語は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における減少、または減少させる活性をいう。減少のうち「消失」した場合は、活性、発現産物等が検出限界未満になることをいい、特に「消失」ということがある。本明細書では、「消失」は「減少」または「抑制」に包含される。

【0110】

本明細書において、活性、発現産物(例えば、タンパク質、転写物(RNAなど))の「増加」または「活性化」あるいはその類義語は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における増加または増加させる活性をいう。

【0111】

本明細書において「(核酸)プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子(例えば、DNAまたはRNAなど)が用いられ得る。本明細書においてプライマーはマーカー検出手段として使用され得る。

【0112】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび/またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の手段となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチド、特異的抗体またはそのフラグメントなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書においてプローブは、マーカー検出、検査または診断の手段としてもちいられる。

【0113】

本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存

在（例えば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、RI（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。本発明のマーカ―またはそれを捕捉する因子または手段を複数、蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10nm以上であることが好ましい。リガンドを標識する場合、機能に影響を与えないものならば何れも用いることができるが、蛍光物質としては、AlexaTMFluorが望ましい。AlexaTMFluorは、クマリン、ローダミン、フルオレセイン、シアニンなどを修飾して得られた水溶性の蛍光色素であり、広範囲の蛍光波長に対応したシリーズであり、他の該当波長の蛍光色素に比べ、非常に安定で、明るく、またpH感受性が低い。蛍光極大波長が10nm以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、AlexaTM555とAlexaTM633の組み合わせ、AlexaTM488とAlexaTM555の組み合わせ等を挙げることができる。核酸を標識する場合は、その塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、CyDyeTMシリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、2-アセチルアミノフルオレン（AAF）、AAIF（AAFのヨウ素誘導体）等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が10nm以上である蛍光物質としては、例えば、Cy5とローダミン6G試薬との組み合わせ、Cy3とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン6G試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を挙げることができる。本発明では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

10

20

【0114】

本明細書において使用される場合、「タグ」とは、受容体-リガンドのような特異的認識機構により分子を選別するための物質、より具体的には、特定の物質を結合するための結合パートナーの役割を果たす物質（例えば、ビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジンのような関係を有する）をいい、「標識」の範疇に含まれる。よって、例えば、タグが結合した特定の物質は、タグ配列の結合パートナーを結合させた基材を接触させることで、この特定の物質を選別することができる。このようなタグまたは標識は、当該分野で周知である。代表的なタグ配列としては、mycタグ、Hisタグ、HA、Aviタグなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のマーカ―またはマーカ―の検出剤、検査剤、診断剤（プライマーまたはプローブ等であり得る）にはこのようなタグを結合させてもよい。

30

【0115】

本明細書において「インビボ」（in vivo）とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする物質が配置されるべき位置をいう。

【0116】

本明細書において「インビトロ」（in vitro）とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」（例えば、試験管内に）摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

【0117】

本明細書において「エキソビボ」とは、ある処置について、体外で行われるがその後体内に戻されることが意図される場合、一連の動作をエキソビボという。本発明においても、生体内にある細胞を本発明の薬剤で処置して再度患者に戻すような実施形態を想定することができる。

40

【0118】

本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分（例えば、検査薬、診断薬、治療薬、抗体、標識、説明書など）が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分（例えば、検査薬、診断薬、治療薬をどのように使用するか、あるいは、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書また

50

は説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、検査薬、診断薬、治療薬、抗体等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

【0119】

本明細書において「指示書」は、本発明を使用する方法を医師または他の使用者に対する説明を記載したものである。この指示書は、本発明の検出方法、診断薬の使い方、または医薬などを投与することを指示する文言が記載されている。また、指示書には、投与部位として、経口、食道への投与（例えば、注射などによる）することを指示する文言が記載されていてもよい。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

10

【0120】

（好ましい実施形態）

以下に本発明の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本発明の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

20

【0121】

<アレルギー誘発性の検査技術>

1つの局面において、本発明は、被験物質のアレルギー誘発性を検査するための方法を提供する。この方法は：A）試験系における肺胞マクロファージに被験物質を曝露する工程；およびB）該試験系においてインターロイキン1（IL-1）を測定する工程、を包含する。この方法では、このIL-1は該被験物質のアレルギー誘発性の指標である。このIL-1の値が該被験物質による曝露前の値に比べて上昇することは、該被験物質がアレルギー誘発性を有することを示す。1つの応用例として、都心部に多く存在する微粒子が呼吸器系を介して免疫を異常に活性化させるアジュバントとして働き、アレルギー性炎症を引き起こされるといわれているが、本発明の方法では、このようなアジュバントとしての活性を有する粒子を検査することができる。例えば、本発明によって検査したところ、水酸化アルミニウム（粒子径100～500nm）、シリカ（粒子径0.5～5μm）、酸化ニッケル（粒子径10～100μm）等はアレルギーを引き起こしやすい粒子であることがわかり、二酸化チタン（粒子径1.5μm）、酸化アルミニウム（粒子径50～100nm）、ヒドロキシapatite（粒子径60nm）等は、アレルギーを引き起こしにくい粒子であることが分かった。これらの実験結果から、アレルギーを引き起こしやすい微粒子はアレルギーとともに肺内の肺胞マクロファージに作用し、IL-1が放出され、これがB細胞に作用してIgEが生成され、アレルギー性炎症になると考えられる（図6を参照）。

30

40

【0122】

本発明の方法は、インビトロで肺胞マクロファージを用いて実施されてもよく、あるいは、本発明の方法は、肺胞マクロファージを含む非ヒト動物を用いてなされてもよい。好ましくは、肺胞マクロファージを用いて行ってもよい。

【0123】

インビトロで行う方法は以下のとおりである。

【0124】

すなわち、肺胞マクロファージを入手し、これを通常の培養条件で培養する。培養条件としては、通常使用される任意の条件を用いることができ、当業者が適宜調節し得ること

50

が理解される。次に、この肺胞マクロファージに被験物質を曝露させ、さらに培養を続ける。曝露時間は、特に限定されないが、例えば、約1時間以上、約2時間以上、約3時間以上、約4時間以上、約5時間以上、約6時間以上、約8時間以上、約10時間以上、約12時間以上、約18時間以上、約24時間以上等を挙げることができ、好ましくは、約1時間から約12時間、1例としては約6時間を挙げることができるがそれに限定されない。好ましくは、対照（コントロール）として、陰性対照（無刺激のもの）、および陽性対照（陽性対照）を同様の実験系で実施する。対照は、定型化したならば省略してもよいが、好ましくは並行して実施する。

【0125】

非ヒト動物を用いて行う場合の一般的な動物モデルの方法を以下に記載する。

10

【0126】

マウス等のモデル動物にアレルギーを増強される可能性がある被験物質（例えば、粒子（対象粒子））を抗原（例えば、タンパク抗原（卵白アルブミンやダニ抗原等））をミックスしたものを点鼻もしくは気管内注入によりこの動物（例えば、マウス）に投与する。投与量は被験物質（例えば、粒子）について例えば、50～100 μ g、抗原（例えば、タンパク抗原）について例えば10～100 μ gで、例えば、50 μ lの液量で投与する。対照群として生食のみの投与、抗原（例えば、同様のタンパク抗原）のみの投与、および陰性対照群（例えば、アレルギーを引き起こしにくいことが判明している物質（例えば、二酸化チタン粒子またはヒドロキシアパタイト粒子）と抗原（例えば、タンパク抗原）とを混ぜたもの）も必要に応じて並行して実施する。統計学的な観点から、通常、一群5匹以上の動物が必要であるため、対照群と合わせて最低20匹が必要となる。

20

【0127】

典型的な投与の例としては、投与をday 0およびday 7に行い、その後day 14からタンパク抗原のみ（粒子無し）を2日に一回の頻度で4～5回投与する。

【0128】

本発明の場合は、適宜の時期に、肺胞マクロファージを取り出し、肺胞マクロファージにおけるIL-1の量を測定することで、被験物質のアレルギー誘発性を判断することができる。すなわち、マウス等の動物の肺に試験物質を気管内注入し、3～7日後に肺胞洗浄液を回収し、IL-1を測定すれば、25日はかからないことから、動物モデルとしても期間を短縮することができる。他方、従来技術では、おおよそ25日程度でマウスの血清を回収し、血清中のIgEを測定し、必要に応じて、マウスの肺の標本を作成し、炎症具合を検討することが必要であるとされている。

30

【0129】

このように、本発明を用いた場合、結果を得るまでの時間が短縮できる。また本発明の好ましい実施形態として、インピトロの系で行う場合は、培養以外の技術が不要となり、動物に粒子を曝露する機材および技術が不要となるため検査が簡便となること、結果を得るまでの時間がさらに短縮され検査期間がさらに短縮される、通常2日以内程度で結果が得られること、動物の使用を減らすこと（いわゆる3Rの理念）にもかなった実験系が提供される等、種々の利点が提供される。このように、インピトロのスクリーニングにはアレルギーは必要なく、粒子自体がアレルギー反応を増強するか否かの評価法になります。言い換えると、アレルギーとしての危険性が少ない物質（抗原）でも、粒子が存在することで、その抗原に対してアレルギーを誘発するようになるか否かを評価する方法になる。他方で、動物モデルの実験では、アレルギーを設定する必要がある。

40

【0130】

本発明の方法において、1つの実施形態では、被験物質の曝露は、この被験物質とは異なる物質である抗原とともになされる。ここで、前記IL-1は、この被験物質が、該抗原のアレルギー反応を増強するかどうかの指標である。ここで、1つの好ましい実施形態では、前記抗原は、前記肺胞マクロファージに対してアレルギーであることが知られる物質である。このようなアレルギーとしては、一般的には、例えば、吸入性アレルギー（室内塵（ハウスダスト、ヒョウヒダニの虫体、糞等）、皮膚（例えば、ペット類等のフケ

50

)、花粉(スギ花粉、ヒノキ花粉、ブタクサ花粉、ヤシヤブシ花粉、イネ科花粉、キク科花粉等)、真菌(カビ、例えば、アルテルナリア)、昆虫(ユスリカ、ゴキブリ等)、刺咬性アレルゲン(ハチ毒等)、食餌性アレルゲン(大豆、卵、牛乳等)、薬剤性アレルゲン(注射、内服用のもの、例えば、ペニシリン等)、その他動物の体成分、排泄物、植物誌微細物質等を挙げることができるが、これらに限定されない。代表的には、アレルゲンであることが著明である、卵白アルブミン、ダニアレルゲンまたは花粉等が簡易に用いられる。

【0131】

別の局面において、本発明は、被験物質のアレルギー誘発性を検査するためのキットを提供する。このキットは、A)肺胞マクロファージ、およびB)IL-1を測定する手段を含む。ここで、このキットで測定されるように、該IL-1は該被験物質のアレルギー誘発性の指標であり、該IL-1の値が該被験物質による曝露前の値に比べて上昇することは、該被験物質がアレルギー誘発性を有することを示す。

10

【0132】

1つの実施形態では、本発明のキットは、試験するための容器をさらに含んでもよい。このような容器は、肺胞マクロファージの培養が可能であり、また、被験物質の肺胞マクロファージの曝露を許容するものであればどのような形状、材質、サイズのものであってもよいことが理解される。特定の実施形態では、前記IL-1を測定する手段は、IL-1に対する特異的な抗体またはその誘導体(例えば、抗原結合性フラグメント等)および免疫反応試験手段を含む。特定の実施形態では、この免疫反応試験手段は、任意の免疫学的測定方法を実現手段を用いることができ、そのような免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、発光イムノアッセイ(LIA)、免疫沈降法(IP)、免疫拡散法(SRID)、免疫比濁法(TIA)、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。好ましい実施形態では、使用される肺胞マクロファージは、培養装置とともに提供されてもよい。

20

【0133】

別の実施形態では、本発明のキットは、肺胞マクロファージに対してアレルゲンであることが知られる物質をさらに含む。含まれ得るアレルゲンとしては、どのようなものでもよく、本明細書において他の箇所において記載した任意のものが例示され、代表的には、アレルゲンであることが著明である、卵白アルブミン、ダニアレルゲンまたは花粉等が簡易に用いられる。

30

【0134】

IL-1の測定は当該分野において公知の技術を用いて実施することができる。例えば、IL-1に結合または相互作用する物質を用いることができる。このような検出、検査または診断のためには、物質の結合は、特異的であることが好ましい。

【0135】

このような検出剤、検査剤または診断剤は、IL-1に結合または相互作用することができる限り、どのような物質を利用してもよいが、例えば、その代表的な例として、これらの因子の抗体またはそのフラグメントもしくは機能的等価物、あるいはこれらの因子をコードする核酸、特にIL-1を増幅し得る核酸プライマーもしくはIL-1に結合もしくは相互作用し得るプローブを挙げることができるが、それらに限定されない。

40

【0136】

本発明の検出剤、検査剤または診断剤は、検出キット、検査キットまたは診断キットとして利用することができる。

【0137】

1つの実施形態では、本発明の検出剤、検査剤または診断剤は、検出、検査または診断可能とする部分(例えば、抗体等)に他の物質(例えば、標識等)を結合させた複合体または複合分子であってもよい。本明細書において使用される場合、「複合体」または「複合分子」とは、2以上の部分を含む任意の構成体を意味する。例えば、一方の部分がポリ

50

ペプチドである場合は、他方の部分は、ポリペプチドであってもよく、それ以外の物質（例えば、糖、脂質、核酸、他の炭化水素等）であってもよい。本明細書において複合体を構成する2以上の部分は、共有結合で結合されていてもよくそれ以外の結合（例えば、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力等）で結合されていてもよい。2以上の部分がポリペプチドの場合は、キメラポリペプチドとも称しうる。従って、本明細書において「複合体」は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子を含む。

【0138】

本発明の検出剤、検査剤または診断剤は、プローブおよびプライマーの形態を採ることができる。本発明のプローブおよびプライマーは、IL-1 と特異的にハイブリダイズすることができる。本明細書に記載されるように、IL-1 の発現は脳マラリアの指標であり、指標として有用である。従って、本発明によるプローブおよびプライマーは、脳マラリアを識別するために用いることができる。本発明のプローブおよびプライマーは、1つの実施形態では、IL-1 の発現を検出することができればよく、複数のデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）等の塩基または塩基対からなる重合体を指す。二本鎖cDNAも組織 insituハイブリダイゼーションにおいて利用可能であることが知られており、本発明のプローブおよびプライマーにはそのような二本鎖cDNAも含まれる。組織中のRNAの検出において特に好ましいプローブおよびプライマーとしては、RNAプローブ（リボプローブ）を挙げることができる。

10

【0139】

特定の実施形態において、本発明はプライマーの形態をとることができる。通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列（例えば、配列番号1）と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも16の連続するヌクレオチド長の、少なくとも17の連続するヌクレオチド長の、少なくとも18の連続するヌクレオチド長の、少なくとも19の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASERGENE, PrimerSelect, DNASTar）を用いて行ってもよい。

20

30

【0140】

特定の実施形態において、本発明によるプライマーは、二種以上の該プライマーからなる、プライマーセットとしても使用することができる。特定の実施形態において、本発明によるプライマーおよびプライマーセットは、PCR法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、in situ PCR法、LAMP法等の核酸増幅法を利用して目的遺伝子を検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーおよびプライマーセットとして利用することができる。

40

【0141】

本発明によるプライマーセットはIL-1 等目的のタンパク質のヌクレオチド配列をPCR法等の核酸増幅法により増幅できるように選択することができる。核酸増幅法は周知であり、核酸増幅法におけるプライマーペアの選択は当業者に自明である。例えば、PCR法においては、二つのプライマー（プライマーペア）の一方がIL-1 等目的のタンバ

50

ク質の二本鎖DNAのプラス鎖に対合し、他方のプライマーが二本鎖DNAのマイナス鎖に対合し、かつ一方のプライマーにより伸長された伸長鎖にもう一方のプライマーが対合するようにプライマーを選択できる。また、LAMP法(W000/28082号公報)においては、標的遺伝子に対して3'末端側からF3c、F2c、F1cという3つの領域を、5'末端側からB1、B2、B3という3つの領域を、それぞれ規定し、この6つの領域を用いて4種類のプライマーを設計することができる。本発明のプライマーは、本明細書に開示したヌクレオチド配列に基づき、化学合成できる。プライマーの調製は周知であり、例えば、"Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed." (Cold Spring Harbor Press (1989))、"Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987-1997)) に従って実施することができる。

10

【0142】

特定の実施形態において、本発明は「プローブ」の形態をとることができる。通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列(例えば、配列番号1)と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも16の連続するヌクレオチド長の、少なくとも17の連続するヌクレオチド長の、少なくとも18の連続するヌクレオチド長の、少なくとも19の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。

20

【0143】

1つの実施形態において、本発明の検出剤、検査剤または診断剤は、標識されたものでありうる。あるいは、本発明の検出剤、検査剤または診断剤は、タグを結合させたものであってもよい。本発明で使用される標識またはタグは、本明細書において説明された任意の形態をとることができる。

30

【0144】

1つの局面において、本発明は、IL-1を、アレルギー誘発性の指標とするための方法、あるいはアレルギー誘発性を検出、検査または診断する方法を提供する。

【0145】

1つの実施形態では、本発明の方法では、IL-1を、アレルギー誘発性を識別する指標とするために、例えば、IL-1の発現産物、例えば、タンパク質またはmRNAを生体内で検出する工程を行って実施することができる。例えば、その際に、IL-1の発現産物、例えば、タンパク質またはmRNAに結合する物質を含む検出剤、検査剤または診断剤を用いることができる。そのような検出剤、検査剤または診断剤は、本明細書において記載されており、その記載を元に、必要に応じて当該分野で公知の技術を用いて当業者が本発明の方法を実施することができることが理解される。

40

【0146】

本発明の方法は、本発明の検出剤、検査剤または診断剤を目的とする試料に接触させ、その試料中に目的とする対象であるIL-1の発現産物、例えば、タンパク質またはmRNAがあるかどうか、あるいはそのレベルまたは量を測定する。

【0147】

本発明において「接触」は、複数の物質の間の相互作用または結合が生じるようにその複数の物質を配置することであり、本発明では、検出剤、検査剤、診断剤として機能し得る物質(たとえば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド)を、直接的または間接的のい

50

ずれかで、本発明のマーカ―またはそれを含む試料に対して物理的に近接させることによって達成することができる。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、多くの緩衝液、塩、溶液などに存在させることができる。接触とは、核酸分子またはそのフラグメントをコードするポリペプチドを含む、例えば、ピーカー、マイクロタイタープレート、細胞培養フラスコまたはマイクロアレイ（例えば、遺伝子チップ）などに化合物を置くことが挙げられる。具体的なIL-1の発現産物、例えば、タンパク質またはmRNAを検出する方法は、試料（例えば、血清等）におけるIL-1の発現産物、例えば、タンパク質またはmRNAを検出できる方法であれば特に限定されず、例えば、ハイブリダイゼーション法、核酸増幅法、抗原抗体反応法が挙げられる。ここで、試料として使用されるものとしては、発現産物を含むと考えられる試料であればよく、例えば、肺胞マクロファージ自体、またはその細胞調製物を用いることができる。細胞調製物は慣用の方法により取得することができる。

10

【0148】

特定の実施形態では、本発明による検出、検査または診断は、本発明によるプローブを核酸試料（mRNA、またはそれから転写された相補的DNA（cDNA）等）とハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション複合体、すなわちヌクレオチド二本鎖、を直接または間接的に検出することにより細胞試料におけるIL-1の発現を検出することができる。ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、“Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.”（Cold Spring Harbor Press(1989)、特にSection 9.47-9.58）“Current Protocols in Molecular Biology”（John Wiley & Sons(1987-1997)、特にSection 6.3-6.4）、“DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.”（Oxford University(1995)、条件については特にSection 2.10）を参照しうる。

20

【0149】

ハイブリダイゼーション法を利用したIL-1の発現産物、例えば、mRNAの検出は、例えば、：（a）被験試料由来のポリヌクレオチドと、本発明によるプローブとを接触させる工程；および（b）ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程により実施することができる。工程（a）において、目的の被験試料から調製されたmRNAまたはそのmRNAから転写された相補的DNA（cDNA）を、被験細胞試料由来のポリヌクレオチドとして、プローブと接触させることができる。プローブを用いた検出法においては、プローブを標識して用いることができる。標識としては例えば、放射能活性（例えば、³²P、¹⁴C、および³⁵S）、蛍光（例えば、FITC、ユーロピウム）、化学発色のような酵素反応（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ）等を利用した標識が挙げられる。ハイブリダイゼーション産物の検出は、ノーザンハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等の周知の方法を用いて実施できる。ハイブリダイゼーション複合体が検出された試料は、IL-1を発現していることを示すので、該試料について、アレルギー誘発性の可能性が高いと判定することができる。

30

【0150】

本発明による検出、検査または診断の別の実施形態によれば、本発明によるプライマーまたはプライマーセットを用いて核酸増幅法により核酸試料（mRNAまたはその転写産物）を増幅させ、増幅産物を検出することにより、試料におけるIL-1の発現を検出、検査またはこれを用いて診断することができる。

40

【0151】

核酸増幅法を利用したIL-1の発現の検出は、例えば、（i）被験試料由来のポリヌクレオチドを鋳型とし、本発明によるプライマーまたはプライマーセットを用いて核酸増幅法を実施する工程；および（ii）形成された増幅産物を検出する工程により実施することができる。

【0152】

工程（i）において、目的の被験試料から調製されたmRNAまたはそのmRNAから転写された相補的DNA（cDNA）を鋳型として用いることができる。増幅産物の検出は、PCR法、RT-

50

PCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法等の核酸増幅法を用いて実施できる。この試料中に増幅産物が検出されることは、被験者の組織がIL-1を発現していることを示すので、該試料が由来する被験者について、脳マラリアの可能性が高いと判定することができる。

【0153】

本発明による検出の別の実施形態によれば、本発明による抗体と試料とを接触させ、抗原抗体反応を検出することにより試料におけるIL-1の発現を検出、検査またはこれを用いて診断することができる。

【0154】

抗原抗体反応を利用したIL-1の発現の検出は、例えば、(I)被験細胞試料由来のタンパク質と、本発明による抗体とを接触させる工程；および(II)抗原抗体複合体を測定する工程により実施することができる。抗原抗体反応の検出方法は当業者に周知であり、例えば、免疫学的方法により、血清中のIL-1を検出することができる。免疫学的方法としては、細胞試料を必要に応じて適切な処理、例えば、細胞の分離、抽出操作などを行った試料について、免疫組織染色法、酵素免疫測定法、ウェスタンブロット法、凝集法、競合法、サンドイッチ法など既知の方法を適用することができる。免疫組織染色法は、例えば標識化抗体を用いる直接法、該抗体に対する抗体の標識化されたものを用いる間接法などにより行うことができる。標識化剤としては蛍光物質、放射性物質、酵素、金属、色素など公知の標識物質を使用することができる。抗原抗体複合体が検出される試料は、IL-1を高く発現しているので、アレルギー誘発性の可能性が高いと判定することができる。

【0155】

前記の各検出工程は1回のみならず、同工程を繰り返しあるいは組み合わせて行うことにより、アレルギー誘発性の診断精度を高めていくことができる。従って、このような実施形態を採用した場合、本発明による検出、検査または診断方法によれば、前記の工程を2回以上行うことにより、アレルギー誘発性の判断をより高精度に行うことができる。

【0156】

本発明の診断薬、検査薬等の医薬等としての製剤化手順は、当該分野において公知であり、例えば、日本薬局方、米国薬局方、他の国の薬局方などに記載されている。従って、当業者は、本明細書の記載があれば、過度な実験を行うことなく、使用すべき量等の実施形態を決定することができる。

【0157】

1つの局面において、本発明によれば、本発明による検出、検査および/または診断のための方法を実施するための検出、検査および/または診断のためのキットが提供される。このキットは、本発明の検出剤、検査剤および/または診断剤を含む。その実施形態としては、本明細書において記載された任意の実施形態を単独または組み合わせ用いることができる。

【0158】

1つの実施形態では、本発明による検出、検査または診断キットとしては、本発明による実施形態の検出、検査または診断を実施するための検出キットが挙げられ、具体的には、IL-1の発現を検出するためのキットであって、本発明によるプローブを少なくとも含んでなるキットが挙げられる。このプローブは、標識したものであってもよい。この検出用キットはハイブリッド形成法によりIL-1の発現を検出する。従って第一の態様の検出方法は、所望により、ハイブリッド形成法を実施するための種々の試薬、例えば標識の検出に用いられる基質化合物、ハイブリダイゼーション緩衝液、説明書、および/または器具などを更に含むことができる。

【0159】

別の実施形態において、本発明による検出用キットとしては、本発明による別の実施形態の検出を実施するための検出キットが挙げられ、具体的には、IL-1の発現を検出するためのキットであって、本発明によるプライマーまたは本発明によるプライマーセットを少なくとも含んでなるキットが挙げられる。この検出用キットは核酸増幅法によりI

10

20

30

40

50

IL - 1 の発現を検出する。従って第二の態様の検出方法は、所望により、核酸増幅法を実施するための種々の試薬、例えば緩衝液、PCRが正常に進行し得ることを示す内部標準、説明書、および/または器具などを更に含むことができる。

【0160】

さらなる実施形態において、本発明による検出、検査または診断キットとしては、本発明によるさらなる実施形態の検出を実施するための検出キットが挙げられ、具体的には、IL - 1 のタンパク質を検出するためのキットであって、本発明による抗体を少なくとも含んでなるキットが挙げられる。この抗体は、標識したものであってもよい。この検出用キットは抗原抗体反応を検出することによりIL - 1 の発現を検出する。この実施形態の検出方法は、所望により、抗原抗体反応を実施するための種々の試薬、例えばELISA法等に用いる2次抗体、発色試薬、緩衝液、説明書、および/または器具などを更に含むことができる。

10

【0161】

これらのキット、組成物またはシステムは、IL - 1 を同定することができる限り、任意の被験体由来の試料中のマーカー、該マーカーに特異的に相互作用する因子、または該マーカーを選択的に認識する手段を用いることができることが理解され得る。従って、本明細書において具体的に記載された因子または手段のみならず、当該分野において公知の任意の等価の因子または手段を用いることができることが理解される。

【0162】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択され、好ましくは、因子は、タンパク質または複合分子（例えば、糖タンパク質、脂質タンパク質など）である。好ましくは、因子は、抗体（例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体）である。このような因子は、標識されるか、または標識可能であることが好ましい。なぜなら、診断することが容易となるからである。

20

【0163】

本発明の好ましい実施形態では、本発明のシステムまたはキットは、さらに、マーカーの標準を含む。このような標準は、マーカーの検出手段（該マーカーに特異的に相互作用する因子、または該マーカーを選択的に認識する手段など）が正常に機能しているかどうかを確認するために用いることが好ましい。

30

【0164】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、本発明のマーカーの定量をする能力を有する。このような定量は、標準曲線を描いたときに、検量線がきちんと描ける手段または因子であるものがよい。好ましくは、例えば、抗体、質量分析、クロマトグラフィー分析などを挙げることができる。従って、ある実施形態では、本発明のシステムは、マーカーの定量を行うための定量手段をさらに備える。

【0165】

1つの実施形態では、定量手段は、標準曲線と測定結果とを比較して前記マーカーが正常値の範囲内かどうかを判定する判定手段を含む。このような判定手段は、コンピュータを用いて実現することができる。

40

【0166】

（アレルギーの治療剤・予防剤）

1つの局面において、本発明は、インターロイキン1（IL - 1）の阻害剤を含む、アレルギーを治療または予防するための組成物を提供する。本発明では、従来関与するとは知られていなかったIL - 1 がアレルギー、特にI型アレルギーに関与することが見いだされ、その作用を阻害することによって、アレルギー、特にI型アレルギーを治療または予防することができることが明らかになった。

【0167】

別の局面では、本発明は、アレルギーを治療または予防するための、IL - 1 の阻害剤を提供する。

50

【0168】

別の局面では、本発明は、その治療または予防を必要とする被験体におけるアレルギーを治療または予防するための方法であって、インターロイキン1 (IL-1) の阻害剤の有効量を該被験体に投与する工程を包含する、方法を提供する。有効量は、本明細書の記載に照らし、当業者が適宜決定することができる。

【0169】

1つの特定の実施形態では、本発明が対象とするアレルギーは、I型アレルギーである。

【0170】

さらなる実施形態では、本発明が対象とするアレルギーは、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、花粉症、アレルギー性炎症、アレルギー性胃腸炎、じんましん、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、血清病、食物アレルギーおよび薬物アレルギーからなる群より選択される少なくとも1つの疾患、障害または症状を挙げることができ、それらに限定されない。

10

【0171】

本発明において使用される阻害剤は、IL-1 特異的であることが好ましい。本発明で示される抗アレルギー効果は、IL-1 を経由するものであり、IL-1 は経由しないことが明らかになった。ところで、IL-1 およびIL-1 は共通の受容体に反応することもあるとされており、このような共通の受容体およびそれに基づくシグナル伝達経路の存在に起因して、両方のIL-1に共通の阻害剤もよく使用されている。したがって、このような共通の阻害剤を使用した場合、IL-1 が阻害されることによる弊害、有害作用も危惧される。この点、本発明では、肺胞マクロファージを経由したIgEの生成およびアレルギー反応がIL-1 特異的であることが判明したことから、IL-1 を特異的に阻害するものが好ましいといえる。あるいは、IL-1 を阻害すると本明細書でも説明したように、IL-1 の阻害による副作用がありこれが有害であり得ることが予想されることから、本発明の阻害剤は、好ましくはIL-1 を阻害しないものでありうる。活性化T細胞(Th17細胞)はIL-1 やIL-23がその増殖や生存に重要な役割を果たしていることが知られており、このような活性を阻害せずにアレルギーを治療し得ることが考えられる。

20

【0172】

1つの特定の実施形態では、本発明で用いられる阻害剤は、IL-1 に特異的な抗体またはその抗原結合性断片、IL-1 に特異的なアンチセンス、IL-1 に特異的なsiRNA、低分子化合物およびそれらの組合せから選択される。このような低分子化合物としては、ポリビニルピリジン-N-オキシド(PVNO)、NF-kBの阻害剤としても知られるwedelolactone(1,8,9-トリヒドロキシ-3-メトキシ-6H-[1]ベンゾフロ[3,2-c]クロメン-6-オン)、p38MAP kinaseの阻害剤としても知られるSB203580(4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)が、IL-1 の阻害剤として挙げることができる。

30

【0173】

特定した実施形態では、本発明の阻害剤は、低分子化合物、抗体またはその断片もしくは機能的等価物、siRNA、shRNA、アンチセンス核酸、アプタマー、それらの薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物を少なくとも1種含む。これらは、2種以上使用してもよい。

40

【0174】

好ましい実施形態では、本発明で使用される阻害剤は、抗IL-1 抗体、またはその断片もしくは機能的等価物を含む。

【0175】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1 抗体は、重鎖CDR1、2、および3、ならびに軽鎖CDR1、2および3のアミノ酸配列のセットを含み、さらに、重鎖FR1、2、3、4、軽鎖FR1

50

、2、3、および4のうち少なくとも1つ、好ましくは2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、あるいはすべてのフレームワークが特定されたもののいずれかのものと同一または実質的に同一あるいは保存的置換を除き同一であるものであり得る。1種以上の抗体であってもよい。また本発明の別の実施形態は、上に列挙した重鎖FR1、2、3、および4のアミノ酸配列のセットのうち、少なくとも1つのセットを含む抗IL-1抗体等である。

【0176】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体は、scFvの形態であってもよく、その場合、重鎖と軽鎖間のリンカーは、重鎖と軽鎖との間のアミノ酸配列を有していてもよい。上に列挙したアミノ酸配列は、抗IL-1抗体が所望の効果を有する限り、(i)上記のアミノ酸配列において、1または数個の塩基配列が欠失、置換、挿入、もしくは付加しているアミノ酸配列、(ii)上記のアミノ酸配列に対して、90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、および(iii)上記のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドがコードするアミノ酸配列、からなる群から選ばれる1つ以上のアミノ酸配列であってもよい。

10

【0177】

本発明の一実施形態に係る抗IL-1抗体をコードするポリヌクレオチドまたはベクターを細胞に導入することによって、形質転換体を作成できる。この形質転換体を用いれば、本発明の実施形態に係る抗IL-1抗体を作製できる。形質転換体は、ヒトまたはヒトを除く哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ウシ、サル等）の細胞であってもよい。哺乳動物細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、サル細胞COS-7などが挙げられる。または、形質転換体はEscherichia属菌、酵母等であってもよい。

20

【0178】

上記のベクターとしては、例えば大腸菌由来のプラスミド（例えばpET-Blue）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110）、酵母由来プラスミド（例えばpSH19）、動物細胞発現プラスミド（例えばpA1-11、pcDNA3.1-V5/His-TOPO）、ファージなどのバクテリオファージ、ウイルス由来のベクターなどを用いることができる。これらのベクターは、プロモーター、複製開始点、または抗生物質耐性遺伝子など、タンパク質発現に必要な構成要素を含んでいてもよい。ベクターは発現ベクターであってもよい。

30

【0179】

上記のポリヌクレオチドまたはベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルスによる方法、レトロウイルスによる方法、またはマイクロインジェクションなどを使用できる（改訂第4版新遺伝子工学ハンドブック、羊土社(2003):152-179.）。抗体の細胞を用いた生産方法としては、例えば、"タンパク質実験ハンドブック,羊土社(2003):128-142."に記載の方法を使用できる。抗体の精製においては、例えば、硫酸アンモニウム、エタノール沈殿、プロテインA、プロテインG、ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオン、陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、またはレクチンクロマトグラフィーなどを用いることができる（タンパク質実験ハンドブック,羊土社(2003):27-52.）。

40

【0180】

本発明を実施するために、本発明の核酸形態の抑制剤としてはアンチセンス活性を指標に核酸を選択することができる。ここで、「アンチセンス活性」とは、標的となる遺伝子の発現を特異的に抑制または減少させることができる活性をいう。より具体的には細胞内に導入したあるヌクレオチド配列に依存して、その配列と相補的なヌクレオチド配列領域をもつ遺伝子のmRNA量を特異的に低下させることで、タンパク質発現量を減少させ得る活性をいう。手法としては、標的となる遺伝子からつくられるmRNAに相補的なRNA分子を直接的に細胞に導入する方法と、細胞内に目的遺伝子と相補的なRNAを発現させ

50

得る構築ベクターを導入する方法に大別される。

【0181】

アンチセンス活性は、通常、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列によって達成される。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、16の連続するヌクレオチド長の、17の連続するヌクレオチド長の、18の連続するヌクレオチド長の、19の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、21の連続するヌクレオチド長の、22の連続するヌクレオチド長の、23の連続するヌクレオチド長の、24の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。そのような核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。そのようなアンチセンス活性は、目的とする遺伝子の核酸配列の5'末端の配列に対して相補的であることが好ましい。そのようなアンチセンスの核酸配列には、上述の配列に対して、1つまたは数個あるいは1つ以上のヌクレオチドの置換、付加および/または欠失を有するものもまた含まれる。したがって、本明細書において、アンチセンス活性には、遺伝子の発現量の減少が含まれるがそれらに限定されない。

10

20

【0182】

一般的なアンチセンス技術については、教科書に記載されている(Murray, JAH eds., *Antisense RNA and DNA*, Wiley-Liss Inc., 1992)。さらに最新の研究でRNA干渉(RNA interference; RNAi)と呼ばれる現象が明らかになり、アンチセンス技術の発展をもたらした。

【0183】

本明細書において「RNA干渉」または「RNAi」とは、RNA interferenceの略称で、当該分野で一般に知られており、RNAiを引き起こす因子によって媒介される、細胞における遺伝子発現を阻害または下方制御する生物学的プロセスである。例えば、二本鎖RNA(dsRNAともいう)のようなRNAiを引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なmRNAが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書において「RNAi」はまた、場合によっては、「RNAiを引き起こす因子」、「RNAiを起こす因子」、「RNAi因子」などと同義に用いられ得る。RNAiについては、例えば、Zamore and Haley, 2005, *Science*, 309, 1519 - 1524; Vaughn and Martienssen, 2005, *Science*, 309, 1525 - 1526; Zamore et al., 2000, *Cell*, 101, 25 - 33; Bass, 2001, *Nature*, 411, 428 - 429; Elbashiri et al., 2001, *Nature*, 411, 494 - 498; 及び Kreutzer 他、国際公開第00/44895号; Zernicka-Goetz 他、国際公開第01/36646号; Fire、国際公開第99/32619号; Plaetinck 他、国際公開第00/01846号; Melloおよび Fire、国際公開第01/29058号; Deschamps - Depailllette、国際公開第99/07409号および Li 他、国際公開第00/44914号; Allshire, 2002, *Science*, 297, 1818 - 1819; Volpe et al., 2002, *Science*, 297, 1833 - 1837; Jenuwein, 2002, *Science*, 297, 2215 - 2218; 及び Hall et al., 2002, *Science*, 297, 2232 - 2237; Hutvagner and Zamore, 2002, *Science*, 297, 2056 - 60; McManus et al., 2002, *RNA*, 8, 842 - 850; Reinhart et al., 2002, *gene & Dev.*, 16, 1616 - 1626; および Reinhart & Bartel, 2002, *Science*, 297, 1831を参照。)。また、本明細書では、RNAiという用語は、転写後遺伝子サイレンシング、翻訳阻害、転写阻害、エピジェネティクスなどの配列特異的RNA干渉の記述に用いられる他の用語と同義のものを示すものとして理解される。本明細書では、「RNAiを起こす因子」は「RNAi」を起こす限りどのようなものであってもよい。

30

40

【0184】

本明細書では「RNAiを起こす因子」としては、「低分子干渉核酸」、「siNA」、「

50

低分子干渉RNA」、「siRNA」、「低分子干渉核酸分子」、「低分子干渉オリゴヌクレオチド分子」または「化学修飾低分子干渉核酸分子」等が挙げられ、これらの用語は、RNA干渉「RNAi」または遺伝子サイレンシングを配列特異的に媒介することによって、遺伝子発現またはウイルス複製を阻害または下方制御することができる任意の核酸分子を指す。これらの用語は、個々の核酸分子、複数のかかる核酸分子、またはかかる核酸分子のプールも表し得る。これらの分子は、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む二本鎖核酸分子であり得る。

【0185】

本発明で代表的に用いられる「siRNA」は、短い長さ、通常、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAである。このようなsiRNAは、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、そのsiRNAの標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。本発明において用いられるsiRNAは、RNAiを引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

【0186】

本発明において、siRNA等のRNAiを起こす因子では、アンチセンス領域は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列、および標的核酸配列に対応するヌクレオチド配列またはその一部を有するセンス領域を含む。これらの分子は、一方の鎖がセンス鎖であり、他方がアンチセンス鎖である、2個の別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができる。ここで、アンチセンス鎖とセンス鎖は自己相補的である（すなわち、アンチセンス鎖とセンス鎖が二本鎖または二本鎖構造を形成するなど、各鎖は、他方の鎖中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。ここで、例えば、二本鎖領域は、約15から約30、例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30塩基対でありうるが、これらより長くてもよい。アンチセンス鎖は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を含む（例えば、その分子の約15から約25個またはそれを超えるヌクレオチドは、標的核酸またはその一部に相補的である）。あるいは、これらの分子は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ、これらの分子の自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域は、核酸リンカーまたは非核酸リンカーによって連結されている。これらの分子は、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む、二本鎖、非対称二本鎖、ヘアピンまたは非対称ヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであり得る。ここで、アンチセンス領域は、別個の標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列、および標的核酸配列に対応するヌクレオチド配列またはその一部を有するセンス領域を含む。これらの分子は、2個以上のループ構造と、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む軸（stem）とを有する、環状一本鎖ポリヌクレオチドであり得る。ここで、アンチセンス領域は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列、および標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有するセンス領域を含み、環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロでプロセッシングを受けて、RNAiを媒介し得る活性な分子を生成し得る。これらの因子は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列またはその一部に相補的であるヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドも含み得る（例えば、これらの因子は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列がこれらの因子内に存在する必要がない。）。一本鎖ポリヌクレオチドは、5'リン酸（例えば、Martinez et al., 2002, Cell., 110, 563 - 574およびSchwarz et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537 - 568参照）、5', 3'-二リン酸などの末端リン酸基を更にも含み得る。ある実施形態においては、本発明のインターロイキン1（IL-1）等の抑制剤は、別々のセンスおよびアンチセンス配列または領域を含む。ここで、センス領域とアンチセンス領域は、当該分野で公知のヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリンカー分子によって共有結合しており、またはイオン相互作用、水素結合、ファンデルワール

10

20

30

40

50

ルス相互作用、疎水的相互作用および/またはスタッキング相互作用によって交互に非共有結合している。

【0187】

ある実施形態においては、本発明のインターロイキン1 (IL-1)等の抑制剤は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。別の実施形態においては、本発明のインターロイキン1 (IL-1)等の抑制剤は、標的遺伝子の発現を阻害するように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書では、インターロイキン1 (IL-1)等の抑制剤は、RNAのみを含む分子に必ずしも限定されず、化学修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドも包含する。ある実施形態においては、本発明が低分子干渉核酸分子である場合は、2'ヒドロキシ(2'-OH)含有ヌクレオチドを欠いていてもよい。ある実施形態において、本発明はRNAiを媒介するのに2'ヒドロキシル基を有するヌクレオチドの存在が不要である低分子干渉核酸でありうる。したがって、本発明が低分子干渉核酸分子である場合は、リボヌクレオチド(例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド)を含まなくてもよい。しかし、RNAiを維持するのにインターロイキン1 (IL-1)等の抑制剤内のリボヌクレオチドの存在が不要である場合は、2'-OH基を有する1個以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカー、または他の結合若しくは会合した基、部分若しくは鎖を有し得る。場合によっては、本発明のインターロイキン1 (IL-1)等を阻害する因子は、ヌクレオチド位置の約5、10、20、30、40または50%においてリボヌクレオチドを含み得る。本明細書ではインターロイキン1 (IL-1)等の抑制剤は、配列特異的RNAiを媒介し得る核酸分子、例えば、低分子干渉RNA (siRNA)、二本鎖RNA (dsRNA)、ミクロRNA (miRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、低分子干渉オリゴヌクレオチド、低分子干渉核酸、低分子干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学修飾siRNA、転写後遺伝子サイレンシングRNA (ptgsRNA)であってもよい。

10

20

【0188】

本明細書においてRNAiを引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約70%の相同性を有する配列またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも10ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むRNAまたはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3'突出末端を含み、より好ましくは、3'突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA(例えば、2~4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

30

【0189】

あるいは、本発明において用いられるRNAiとしては、例えば、短い逆向きの相補的配列(例えば、15bp以上であり、例えば、24bpなど)のペアが挙げられるがそれらに限定されない。

【0190】

理論に束縛されないが、RNAiが働く機構として考えられるものの一つとして、dsRNAのようなRNAiを引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い(例えば、40塩基対以上)RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー(Dicer)と呼ばれるRNase III様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3'末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖dsRNA (siRNAとも呼ばれる)を生じる。本明細書において「siRNA」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC (RNA-induced silencing complex)が形成される。この複合体は、siRNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNase III様の酵素活性によってsiRNAの中央部でmRNAを切断する。siRNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100%一致することが好ましい。しかし、siRNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、

40

50

完全にRNAiによる切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、siRNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNAiによるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したsiRNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、siRNAそのものを、RNAiを引き起こす因子として用いることができるし、siRNAを生成するような因子（例えば、代表的に約40塩基以上のdsRNA）をそのような因子として用いることができる。

【0191】

また、理論に束縛されることを希望しないが、siRNAは、上記経路とは別に、siRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRP）のプライマーとして作用し、dsRNAが合成され、このdsRNAが再びダイサーの基質となり、新たなsiRNAを生じて作用を増幅することも企図される。従って、本発明では、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば35分子のdsRNA分子が、1,000コピー以上ある細胞内のmRNAをほぼ完全に分解することから、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子が有用であることが理解される。

10

【0192】

別の実施形態において、本発明のRNAiを引き起こす因子は、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造（shRNA；short hairpin RNA）であり得る。本明細書において「shRNA」とは、一本鎖RNAで部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約20塩基対以上の分子をいう。そのようなshRNAは、人工的に化学合成される。あるいは、そのようなshRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖のDNA配列を逆向きに連結したヘアピン構造のDNAをT7RNAポリメラーゼによりインビトロでRNAを合成することによって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのようなshRNAは、細胞内に導入された後、細胞内で約20塩基（代表的には例えば、21塩基、22塩基、23塩基）の長さで分解され、siRNAと同様にRNAiを引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、shRNAは、siRNAと同様にRNAiを引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。shRNAはまた、好ましくは、3'突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3'突出末端は、好ましくはDNAであり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上のDNAであり得、さらに好ましくは2~4ヌクレオチド長のDNAであり得る。本発明において用いられるRNAiを引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

20

30

【0193】

本発明において用いられるRNAiを引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、T7RNAポリメラーゼおよびT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンスおよびセンスのRNAを合成する。これらをインビトロでアニリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じてRNAiが引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法等の任意の適切な方法でそのようなRNAを細胞内に導入することができる。本発明のRNAiを引き起こす因子としてはまた、mRNAとハイブリダイズし得る一本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明において有用である。

40

【0194】

本発明の一実施形態は、IL-1をコードする核酸に対するRNAi分子、またはそのRN

50

Ai分子をコードするポリヌクレオチドを含む、アレルギーの治療または予防薬である。このRNAi分子、またはそのRNAi分子をコードするポリヌクレオチドを用いれば、アレルギーを抑制することができる。本発明の一実施形態において「ポリヌクレオチド」は、10以上のヌクレオチドを有する、ヌクレオチドが直鎖状に重合した高分子化合物であってもよい。

【0195】

本発明の一実施形態において「RNAi分子」は、RNAi作用を有するRNA鎖であり、例えば、siRNA、shRNA、miRNA、またはRNAi作用を有するsmallRNA等を挙げることができる。

【0196】

本発明の一実施形態において「RNAi」は、siRNA、shRNA、miRNA、短鎖もしくは長鎖の1もしくは2本鎖RNA、またはそれらの修飾物等の1つ以上によって、標的遺伝子もしくはmRNA等の機能が抑制、またはサイレンシングされる現象を含む。

10

【0197】

RNAi分子のデザインには、例えば、siDirect2.0 (Naito et al., BMC Bioinformatics, 2009 Nov 30;10:392.)等を使用できる。また、受託会社(例えば、タカラバイオ(株)等)に委託してもよい。RNAi作用の確認は、リアルタイムRT-PCRによるRNA鎖発現量の定量によって行なうことができる。または、ノーザンブロットによるRNA鎖発現量の解析や、ウェスタンブロットによる蛋白量の解析・表現型の観察等の方法でも行うことができる。また、特定の遺伝子に対するsiRNAまたはshRNAを生成するプラスミドは、例えば、受託会社(例えば、タカラバイオ(株)等)から購入することができる。

20

【0198】

本発明の一実施形態において「siRNA」は、RNAiを誘導可能なRNA鎖を含む。一般的にsiRNAの2本鎖はガイド鎖とパッセンジャー鎖に分けることができ、ガイド鎖がRISCに取り込まれる。RISCに取り込まれたガイド鎖は、標的RNAを認識するために使われる。RNAi研究では主に人工的に作成したものが使用されるが、生体内において内在的に存在するものも知られている。上記ガイド鎖は15塩基以上のRNAから構成されていてもよい。15塩基以上であれば、標的のポリヌクレオチドに対して精度よく結合できる可能性が高まる。また、そのガイド鎖は40塩基以下のRNAから構成されていてもよい。40塩基以下であれば、インターフェロン応答等の不利益な現象が生じるリスクがより低くなる。

30

【0199】

本発明の一実施形態において「shRNA」は、RNAiを誘導可能で、且つヘアピン状に折りたたまれた構造(ヘアピン様構造)を形成可能な1本鎖のRNA鎖を含む。典型的には、shRNAは細胞内でDicerによって切断され、siRNAが切り出される。このsiRNAによって標的RNAの切断が生じることが知られている。上記shRNAは35以上のヌクレオチドから構成されていてもよい。35以上であれば、shRNAに特有のヘアピン様構造を精度よく形成できる可能性が高まる。また、上記shRNAは100塩基以下のRNAから構成されていてもよい。100塩基以下であれば、インターフェロン応答等の不利益な現象が生じるリスクが低くなる。但し、一般的にshRNAと構造および機能が類似しているpre-miRNAの多くが、100ヌクレオチド程度またはそれ以上の長さを有していることから、shRNAの長さは必ずしも100塩基以下でなくとも、shRNAとして機能できると考えられる。

40

【0200】

本発明の一実施形態において「miRNA」は、siRNAと類似の機能を有しているRNA鎖を含み、標的RNA鎖の翻訳抑制や分解をすることが知られている。miRNAとsiRNAとの違いは、一般的に生成経路と、詳細なメカニズムにある。

【0201】

本発明の一実施形態において「small RNA」とは、比較的小さいRNA鎖をいい、例えば、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、1または2本鎖の低分子RNAなどを挙げることができる。

【0202】

上記RNAi分子は、5'末端または3'末端に1~5塩基からなるオーバーハングを含んでい

50

てもよい。この場合、RNAiの効率が上昇すると考えられる。この数は、例えば、5、4、3、2、または1塩基であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。また上記RNAi分子が2本鎖のとき、各RNA鎖間にミスマッチRNAが存在していてもよい。その数は、例えば、1、2、3、4、5、または10個以下であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。また上記RNAi分子は、ヘアピンループを含んでいてもよい、ヘアピンループの塩基数は、例えば、10、8、6、5、4、または3塩基であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。塩基配列は、所望の効果を有する限り、1または複数個の塩基配列が欠失、置換、挿入、もしくは付加していてもよい。なお、各塩基配列の表記は、左側が5'末端、右側が3'末端である。

【0203】

上記RNAi分子の長さは、例えば、15、18、20、25、30、40、50、60、80、100、200、または400塩基であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この数は、アレルギーに対する治療または予防効果を高める観点からは、15以上、または100以下が好ましい。

【0204】

本発明の一実施形態において「RNA鎖」は、RNAまたはその等価物が、複数結合した形態で構成されているものを含む。また本発明の一実施形態において「DNA鎖」は、DNAまたはその等価物が、複数結合した形態で構成されているものを含む。このRNA鎖またはDNA鎖は、1本鎖または複数本鎖（例えば、2本鎖）の形態のRNA鎖またはDNA鎖を含む。RNA鎖またはDNA鎖は、細胞取込促進物質（例えば、PEGまたはその誘導体）、標識タグ（例えば、蛍光標識タグ等）、またはリンカー（例えば、ヌクレオチドリンカー等）等と結合していてもよい。RNA鎖またはDNA鎖は、核酸合成装置を用いて合成可能である。その他、受託会社（例えば、インビトロジェン社等）から購入することもできる。生体内のRNA鎖またはDNA鎖は、塩または溶媒和物を形成することがある。また、生体内のRNA鎖またはDNA鎖は、化学修飾を受けることがある。RNA鎖またはDNA鎖の用語は、例えば、塩もしくは溶媒和物を形成しているRNA鎖もしくはDNA鎖、または化学修飾を受けているRNA鎖もしくはDNA鎖等を含む。またRNA鎖またはDNA鎖は、RNA鎖のアナログ、またはDNA鎖のアナログであってもよい。

【0205】

上記RNAi分子は、安定的にRNAi作用を発揮する観点からは、IL-1のmRNAの塩基配列の一部に対して、相補的な塩基配列を含むことが好ましい。上記「一部」は、例えば、5、10、15、18、20、22、24、26、28、30、35、40、または50塩基以上であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。

【0206】

本発明の一実施形態において「タンパク質の発現を阻害すること」は、例えば、遺伝子からmRNAへの転写機構を阻害、またはmRNAからタンパク質への翻訳機構を阻害することを含む。また、例えば、遺伝子、mRNA、またはタンパク質の分解を誘導することによって、結果的にタンパク質量を減少させることを含む。本発明の一実施形態において「タンパク質の機能を阻害すること」は、タンパク質に構造変化を生じさせ、タンパク質の活性を低下させることを含む。また、例えば、遺伝子の発現を阻害した結果、mRNAまたはタンパク質の生成量が低下することを含む。

【0207】

本発明の一実施形態において「発現が阻害されている状態」は、発現量が、正常時に比べて有意に減少している状態を含む。発現量はmRNA量、またはタンパク質量を指標としてもよい。本発明の一実施形態において「有意に」は、例えば統計学的有意差をスチューデントのt検定（片側または両側）を使用して評価し、 $p < 0.05$ であるときを含んでいてもよい。または、実質的に差異が生じている状態を含む。本発明の一実施形態において「機能が阻害されている状態」は、活性が、正常時に比べて有意に減少している状態を含む。

【0208】

別の局面において、本発明は、有効量のIL-1の阻害剤またはこれを含む組成物ま

10

20

30

40

50

たは医薬（治療薬または予防薬）を、必要とする被験者に投与することを含む、該被験者のアレルギーを予防または治療するための方法を提供する。

【0209】

治療薬の投与経路は、治療に際して効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、または経口投与等であってもよい。投与形態としては、例えば、注射剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤等であってもよい。抗体またはポリヌクレオチドを投与する場合には、注射剤として用いることが効果的である。注射用の水溶液は、例えば、バイアル、またはステンレス容器で保存してもよい。また注射用の水溶液は、例えば生理食塩水、糖（例えばトレハロース）、NaCl、またはNaOH等を配合してもよい。また治療薬は、例えば、緩衝剤（例えばリン酸塩緩衝液）、安定剤等を配合してもよい。

10

【0210】

一般的に、本発明の組成物、医薬、治療剤、予防剤等は、治療有効量の治療剤または有効成分、および薬学的に許容しうるキャリアもしくは賦形剤を含む。本明細書において「薬学的に許容しうる」は、動物、そしてより詳細にはヒトにおける使用のため、政府の監督官庁に認可されたか、あるいは薬局方または他の一般的に認められる薬局方に列挙されていることを意味する。本明細書において使用される「キャリア」は、治療剤と一緒に投与する、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。このようなキャリアは、無菌液体、例えば水および油であることも可能であり、石油、動物、植物または合成起源のものが含まれ、限定されるわけではないが、ピーナツ油、ダイズ油、ミネラルオイル、ゴマ油等が含まれる。医薬を経口投与する場合は、水が好ましいキャリアである。医薬組成物を静脈内投与する場合は、生理食塩水および水性デキストロースが好ましいキャリアである。好ましくは、生理食塩水溶液、並びに水性デキストロースおよびグリセロール溶液が、注射可能溶液の液体キャリアとして使用される。適切な賦形剤には、軽質無水ケイ酸、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が含まれる。組成物は、望ましい場合、少量の湿潤剤または乳化剤、あるいはpH緩衝剤もまた含有することも可能である。これらの組成物は、溶液、懸濁物、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、粉末、持続放出配合物等の形をとることも可能である。伝統的な結合剤およびキャリア、例えばトリグリセリドを用いて、組成物を座薬として配合することも可能である。経口配合物は、医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的キャリアを含むことも可能である。適切なキャリアの例は、E. W. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mark Publishing Company, Easton, U.S.A) に記載される。このような組成物は、患者に適切に投与する形を提供するように、適切な量のキャリアと一緒に、治療有効量の療法剤、好ましくは精製型のものを含有する。配合物は、投与様式に適していなければならない。これらのほか、例えば、界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含んでいてもよい。

20

30

40

【0211】

本発明の一実施形態において「塩」は、例えば、任意の酸性（例えばカルボキシル）基で形成されるアニオン塩、または任意の塩基性（例えばアミノ）基で形成されるカチオン塩を含む。塩類には無機塩または有機塩を含み、例えば、Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19に記載されている塩が含まれる。また例えば、金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩等が挙げられる。本発明の一実施形態において「溶媒和物」は、溶質および溶媒によって形成される化合物である。溶媒和物に

50

については例えば、J. Honiget al., The Van Nostrand Chemist's Dictionary P 650 (1953)を参照できる。溶媒が水であれば形成される溶媒和物は水和物である。この溶媒は、溶質の生物活性を妨げないものが好ましい。そのような好ましい溶媒の例として、特に限定するものではないが、水、または各種バッファーが挙げられる。本発明の一実施形態において「化学修飾」は、例えば、PEGもしくはその誘導体による修飾、フルオレセイン修飾、またはビオチン修飾等が挙げられる。

【0212】

本発明を医薬として投与する場合、種々の送達（デリバリー）系が知られ、そしてこのような系を用いて、本発明の治療剤を適切な部位（例えば、食道）に投与することも可能であり、このような系には、例えばリポソーム、微小粒子、および微小カプセル中の被包：治療剤（例えば、ポリペプチド）を発現可能な組換え細胞の使用、受容体が仲介するエンドサイトーシスの使用；レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての療法核酸の構築などがある。導入法には、限定されるわけではないが、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外、および経口経路が含まれる。好適な経路いずれによって、例えば注入によって、ボラス（bolus）注射によって、上皮または皮膚粘膜裏打ち（例えば口腔、直腸および腸粘膜など）を通じた吸収によって、医薬を投与することも可能であるし、必要に応じてエアロゾル化剤を用いて吸入器または噴霧器を使用し、そして他の生物学的活性剤と一緒に投与することも可能である。投与は全身性または局所であることも可能である。本発明が肺で使用される場合、さらに、肺に直接注入する等、適切な経路いずれかによって投与されうる。

【0213】

治療剤が核酸である特定の態様において、適切な核酸発現ベクターの一部として該核酸を構築し、そして細胞内に存在するように投与することによって、核酸を *in vivo* 投与して、コードされるタンパク質の発現を促進することも可能であり、これは、例えばレトロウイルスベクターの使用によって、または直接注射によって、または微小粒子銃の使用によって、または核酸を脂質、細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤でコーティングすることによって、または核に進入することが知られるタグ配列に連結した核酸を投与することによって、実行可能である。あるいは、核酸治療剤を細胞内に導入し、そして発現のため、宿主細胞DNA内に相同組換えによって取り込ませることも可能である。

【0214】

好ましい実施形態において、公知の方法に従って、ヒトへの投与に適応させた医薬組成物として、組成物を配合することができる。このような組成物は注射により投与することができる。代表的には、注射投与のための組成物は、無菌等張水性緩衝剤中の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射部位での疼痛を和らげるリドカインなどの局所麻酔剤も含むことも可能である。一般的に、成分を別個に供給するか、または単位投薬型中で一緒に混合して供給し、例えば活性剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封容器中、凍結乾燥粉末または水不含濃縮物として供給することができる。組成物を注入によって投与しようとする場合、無菌薬剤等級の水または生理食塩水を含有する注入ピンを用いて、分配することも可能である。組成物を注射によって投与しようとする場合、投与前に、成分を混合可能であるように、注射用の無菌水または生理食塩水のアンプルを提供することも可能である。

【0215】

本発明の組成物、医薬、治療剤、予防剤を中性型または塩型あるいは他のプロドラッグ（例えば、エステル等）で配合することも可能である。薬学的に許容しうる塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来する遊離型のカルボキシル基とともに形成されるもの、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどの遊離型のアミン基とともに形成されるもの、並びにナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、および水酸化第二鉄などに由来するものが含まれる。

【0216】

特定の障害または状態の治療に有効な本発明の治療剤の量は、障害または状態の性質によって変動しうるが、当業者は本明細書の記載に基づき標準的臨床技術によって決定可能である。さらに、場合によって、*in vitro*アッセイを使用して、最適投薬量範囲を同定するのを補助することも可能である。配合物に使用しようとする正確な用量はまた、投与経路、および疾患または障害の重大性によっても変動しうるため、担当医の判断および各患者の状況に従って、決定すべきである。しかし、投与量は特に限定されないが、例えば、1回あたり0.001、1、5、10、15、100、または1000mg/kg体重であってもよく、それらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。投与間隔は特に限定されないが、例えば、1、7、14、21、または28日あたりに1または2回投与してもよく、それらいずれか2つの値の範囲あたりに1または2回投与してもよい。投与量、投与間隔、投与方法は、患者の年齢や体重、症状、対象臓器等により、適宜選択してもよい。また治療薬は、治療有効量、または所望の作用を発揮する有効量の有効成分を含むことが好ましい。悪性腫瘍マーカーが、投与後に有意に減少した場合に、治療効果があったと判断してもよい。有効用量は、*in vitro*または動物モデル試験系から得られる用量 - 反応曲線から推定可能である。

10

20

30

40

50

【0217】

本発明の一実施形態において「患者」または「被験体」は、ヒト、またはヒトを除く哺乳動物（例えば、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ネズミ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、マーモセット、サル、またはチンパンジー等の1種以上）を含む。また患者または被験体は、IL-1の発現が異常であると判断または診断された患者または被験体であってもよい。このとき、判断または診断は、IL-1のタンパク質レベルを検出することにより行われることが好ましい。

【0218】

本発明の医薬組成物または治療剤もしくは予防剤はキットとして提供することができる。

【0219】

特定の実施形態では、本発明は、本発明の組成物または医薬の1以上の成分が充填された、1以上の容器を含む、薬剤パックまたはキットを提供する。場合によって、このような容器に付随して、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形で、政府機関による、ヒト投与のための製造、使用または販売の認可を示す情報を示すことも可能である。

【0220】

本発明のキットはまた、本発明の組成物、治療剤、予防剤または医薬として使用するタンパク質をコードする発現ベクターも含有することも可能であり、このタンパク質は、発現された後、生物学的に活性な複合体を形成するため、再構成されることも可能である。このようなキットは、好ましくはまた、必要な緩衝剤および試薬も含有する。場合によって、このような容器に付随して、キット使用のための指示書（添付文書）、並びに/あるいは医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形で、政府機関による、ヒト投与のための製造、使用または販売の認可を示す情報を示すことも可能である。

【0221】

特定の実施形態において、本発明の核酸を含む医薬組成物を、リボソーム、微小粒子、または微小カプセルを介して投与することができる。本発明の多様な態様において、このような組成物を用いて、核酸の持続放出を達成することが有用である可能性もある。

【0222】

1つの実施形態では、前記アレルギーは微粒子誘発性のものである。そのような微粒子誘発性のものとしては、代表的には、PM_{2.5}によるもの、砂塵（黄砂等）、工場等からの煤塵、ディーゼル粒子、ハウスダストによるもの等を挙げることができるがそれらに限定されない。

【0223】

（一般技術）

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al.(1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed.(2001); Ausubel, F.M.(1987).*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F.M.(1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M.A.(1990).*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F.M.(1992). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Ausubel, F.M. (1995).*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Innis, M.A. et al.(1995). *PCR Strategies*, Academic Press; Ausubel, F.M.(1999).*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, and annual updates; Sninsky, J.J. et al.(1999). *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分(全部であり得る)が参考として援用される。

10

20

30

40

50

【0224】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M.J.(1985). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Gait, M.J.(1990). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F.(1991). *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. et al.(1992). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al.(1994). *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Weinheim; Blackburn, G. M. et al.(1996). *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press; Hermanson, G.T. (1996). *Bioconjugate Techniques*, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

【0225】

例えば、本明細書において、当該分野に知られる標準法によって、例えば自動化DNA合成装置(Biosearch, Applied Biosystems等から市販されるものなど)の使用によって、本発明のオリゴヌクレオチドを合成することも可能である。例えば、Steinら(Stein et al., 1988, *Nucl. Acids Res.* 16:3209)の方法によって、ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドを合成することも可能であるし、調節孔ガラスポリマー支持体(Sarinet al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7448-7451)等の使用によって、メチルホスホネート・オリゴヌクレオチドを調製することも可能である。

【0226】

本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値の範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

【0227】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0228】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は

、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0229】

以下に実施例を記載する。必要な場合、以下の実施例で用いる動物の取り扱いは、必要な場合、医薬基盤研究所および/または大阪大学において規定される基準を遵守し、ヘルシンキ宣言に基づいて行った。試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他メーカー（Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライ、R&D Systems、USCN Life Science INC等）の同等品でも代用可能である。

【0230】

（実施例1：肺胞マクロファージおよびIL-1のアレルギー誘発性との関与）

本実施例では、肺胞マクロファージおよびIL-1のアレルギー誘発性との関与を調べた。以下に詳述する。

【0231】

（材料および方法）

（動物）

雌性C57BL/6マウスは日本クレア株式会社（大阪）から購入した。Tnf- α /Tbk- α -マウスは、以前に記載されたとおりのものを使用した（Ishii Kら、Nature. 2008;451(7179):725-9.）。Il18- α -マウスは、兵庫医科大学の中西憲司先生から寄贈された。Il33- α -マウスは、以前に記載されたようにして得た（Haenuki Yら、The Journal of allergy and clinical immunology. 2012;130(1):184-94 e11.; Yasuda Kら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012; 109(9):3451-6.）。Tslpr- α -マウスは、Dr. Zieglerから寄贈された（Zhou Bら、Nat Immunol. 2005;6(10):1047-53.）。Myd88- α -、Tlr2/4- α -およびTlr7/9- α -マウスは、株式会社オリエンタルバイオサービス（京都）から入手した。Il1r- α -およびSTING変異マウス（Stinggt/gt）は、Jackson Laboratories（Bar Harbor, ME, USA）から入手した。Asc- α -、Nlrp3- α -およびCaspase1- α -マウスは、以前に記載されたようにして得た（Mariathasan Sら、Nature. 2004;430(6996):213-8.; Mariathasan Sら、Nature. 2006;440(7081):228-32.）。Irf3/7- α -マウスは、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトを通じてRIKEN BRC（茨城）により提供されたIrf3- α -（Tang CKら、PloS one. 2013;8(3):e60038.）およびIrf7- α -に由来した（Honda Kら、Nature. 2005;434(7034):772-7.）。Marco- α -およびSra- α -マウスは、Dr. Tryggvason（Karolinska Institute, Stockholm, Sweden）から寄贈された（Suzuki Hら、Nature. 1997;386(6622):292-6.; Chen Yら、Journal of immunology. 2005;175(12):8173-80.）。Myd88- α -Asc- α -IPS-1- α -マウスは、奈良先端科学技術大学院大学の河合太郎先生から寄贈されたMyd88- α -Asc- α -およびIPS-1- α -マウスに由来した（Kawai Tら、Nat Immunol. 2005;6(10):981-8.）。Tnf- α -Tbk- α -マウス（129/Ola \times C57BL/6バックグラウンド）を除く全てのマウスは、C57BL/6バックグラウンドであった。Tnf(+/-)Tbk1(-/-)同腹仔をコントロールとして用いた。全ての動物実験は、大阪大学および独立行政法人 医薬基盤研究所により承認された実験動物の管理および使用に関するガイドラインに従って行った。

【0232】

（試薬）

Alhydrogel（アラム）は、Invivogen（San Diego, CA, USA）から購入した。シリカ結晶（Min-usil 5シリカ）は、U.S. Silica（Berkeley Springs, WV, USA）から購入した。NiOは、真空冶金株式会社（千葉）から購入した。Al₂O₃（粒径：40~50nm）、TiO₂およびATPは、和光純薬工業株式会社（大阪）から購入し

10

20

30

40

50

た。ヒドロキシアパタイト（粒径：59 nm）は、株式会社ソフセラ（東京）から購入した。インビボ実験に使用した粒子状物は全て、エンドトキシンフリー（1 EU/ml（10 mg）未満）で調製した。OVAは、関東化学株式会社（大阪）から購入した。エンドトキシンレベルは、トキシカラー（登録商標）（生化学工業株式会社、東京）によって測定すると1 EU/mg未満であった。PI3キナーゼ阻害剤Wortmanninは、Sigma Aldrichから購入した。P38 MAPキナーゼ阻害剤（SB203580）、MEK1/2（Erk）阻害剤（U0126）、JNK阻害剤（SP600125）、NF- κ B阻害剤（Wedelolactone）は、Calbiochem（Merck;Darmstadt, Germany）から購入した。サイトカラシンDは、Enzo Life Science（Plymouth Meeting, PA）から購入した。Leu-Leu-OMe（LLOMe）は、Chem-Impex International（Wood Dale, IL）から購入した。ポリ-2-ビニルピリジン-N-オキシド（PVNO）は、Polysciences（Warrington, PA）から購入した。ネクロスタチン-1はSanta Cruz社より購入した（#SC-200142）。Syk阻害剤はMerck社より購入した（#574711）。LY294002はCayman Chemical社より購入した（#70920）。

10

【0233】

（インビボ実験）

粒子状物質を、気管内注入により投与した。簡単に述べると、マウスに麻酔をかけ、その門歯によりボード上に引っ掛けた。プラスチック製の細い針を取り付けた1 mlシリンジを気管内に挿入し、50 μ lの粒子状物溶液を肺内に直接注入した。

【0234】

本発明者らは、以下のとおりにいくつかの粒子状物誘発性実験的肺炎モデルを設計した。

20

【0235】

実験1では、50 μ lの生理食塩水、OVA（10 μ g）またはアラム（100 μ g）に吸着させたOVA（10 μ g）を、-10日目に気管内注入により投与した。0日目開始して、マウスを2日おきに3回10分間にわたってOVAエアロゾル（H₂O中1% OVA）に曝露させた。OVAエアロゾルは、ネブライザー（コンフォート2000、新鋭工業株式会社、埼玉）により生成させた。マウスには、チャンバボックス（25 × 25 × 30 cm）内で曝露させた。最後の曝露から24時間後に、血清および気管支肺胞洗浄液（BALF）を回収し、そして、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によるOVA特異的抗体、または、BAL細胞数について分析した。簡単な実験設計を図1Aに示す。

30

【0236】

実験2（本研究における標準的なプロトコール）では、50 μ lの粒子状物を気管内注入により投与した。本発明者らは、アラム（100 μ g）、シリカ（250 μ g）、NiO（100 μ g）、Al₂O₃（100 μ g）またはヒドロキシアパタイト（100 μ g）を使用し、生理食塩水をネガティブコントロールとして使用した。一部の実験では、ゲノムDNA（100 μ g）またはAl₂O₃とDNAの複合体を投与した。気管内注入から7日後（滴下注入の7日後を0日目とカウントする）、0日目、2日目および4日目に（1日おきに3回）OVAエアロゾルにマウスを曝露させた。さらに7日後、マウスを再度、1日おきに3回（11日目、13日目および15日目）OVAに曝露させた。最後の曝露から24時間後に、血清およびBALFを回収した。一部の実験では、OVAへの曝露は、アラムの気管内注入から1日後、3日後または14日後に開始した。簡単な実験設計を図1Bに示す。

40

【0237】

実験3では、50 μ lの粒子状物を気管内注入により投与した。粒子状物の気管内注入から1日後、3日後、7日後または14日後にBALFを回収した。BALFは、DNAまたはサイトカインELISAの測定に使用した。

【0238】

実験4（DNase処理）では、50 μ lのアラムを気管内注入により投与した（-1日目）。気管内注入から6日後、2000 UのDNaseを肺内に注入し、その24時間

50

後、実験2と同様にマウスをOVAに曝露させた(0日目)。DNaseを1日目に再度注入した。一部の実験では、BALFを0日目に回収し(OVA曝露なし)、DNA測定またはBAL細胞数について分析した。

【0239】

実験4(PVNO処理)では、50 μ lのシリカまたはPVNO(100 μ g)と混合したシリカを気管内注入により投与した。次いで、PVNOを1日おきに3回注入し、気管内注入から7日後に、BALFを回収し、DNA測定およびIL-1もしくはBAL細胞数について分析した。

【0240】

BALFは、肺を洗浄することにより回収した。簡単に述べると、プラスチックカニューレ(テルモ株式会社、東京)を、切開した気管に挿管し、550 μ lのPBSで2回肺を洗浄した。回収した合計容量は約1mlであった。得られたBALFを1500rpmにて10分間遠心分離し、細胞と液体とを分離した。

10

【0241】

(宿主DNAの測定、ゲノムDNAの調製および粒子状物上へのDNA吸着の分析)

BALFまたは腹水中の二本鎖DNAを、Quant-iTTM Picogreen(登録商標) dsDNAアッセイキット(Invitrogen, San Diego, CA, USA)により測定した。ゲノムDNAは、Wizard(登録商標)SVゲノムDNA精製システム(Promega, Madison, WI)を用いてマウスの脾細胞から単離した。粒子状物上へのDNA吸着の分析について、粒子状物(1mg)を室温で5分間DNA(2 μ g)と混合した。サンプルを10000rpmにて1分間遠心分離して、粒子状物を沈殿させ、粒子状物を含まない上清を回収した。上清中のDNA含量を、Quant-iTTM Picogreen(登録商標) dsDNAアッセイキットにより測定した。粒子状物上へのDNA吸着は、上清中のDNAの残量によって推定した。

20

【0242】

(細胞の調製)

新たに単離した肺胞マクロファージを、BAL細胞から粘着細胞として調製した。腹膜マクロファージおよびGM-CSF由来骨髄マクロファージの調製は、以前に記載されたとおりに行った(Kuroda Eら、Immunity. 2011;34(4):514-26.)。培養肺胞マクロファージは、以前に記載されたとおりの、ミクログリアおよびクッパー細胞の調製方法に従って調製した(Kitani Hら、Journal of immunological methods. 2010;360(1-2):47-55.; Suzumura Aら、Journal of neuroimmunology. 1987;15(3):263-78.)。肺を単離し、200 μ g/mlのDNase Iおよび1.5U/mlのLiberase DL Research

30

Grade(Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN, USA)を含む5mlのRPMI中に懸濁させた。肺をハサミでさいの目状に刻み、37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。次いで、サンプルをgentle MACSTM Dissociator(プログラムB.01)(Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany)によりホモジェナイズした。細胞懸濁液をPBSで2回洗浄し、30 μ mのPre-Separation Filter(Miltenyi Biotech)を通した。細胞を、10%胎仔ウシ血清(FCS)、5 μ g/mlインスリンを補充した、抗生物質を含まないDMEMに再懸濁させ、175cm²培養フラスコ(Corning, NY, USA)に播種した。培地を、24時間後に、次いで1日おきに交換した。線維芽細胞が増殖し、そして、7日間の培養の後に、細胞シート上にマクロファージが増殖した。マクロファージは、37 $^{\circ}$ Cにおける2時間の往復振盪(170ストローク/分)により簡単に剥がれた。浮遊細胞をPBSで洗浄し、10%FCSと抗生物質を補充したRPMI 1640に再懸濁させた。培養マクロファージは、95%超がフローサイトメトリーによりF4/80+と判定された。付着細胞は、免疫組織化学により肺サーファクタントタンパク質A陽性細胞と判定され、これをII型肺胞細胞として使用した(図4AA~FF)。

40

【0243】

(インビトロでの刺激)

50

すべての実験において、細胞は、48ウェルまたは96ウェルプレート(BD Biosciences; Franklin Lake, NJ)内で $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の密度にて培養した。細胞を、6時間にわたり、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ LPS、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ 粒子状物(シリカ、アラム、 Al_2O_3 またはヒドロキシアパタイト)、 2.5 mM ATPまたは 1 mM LLOMeにより刺激した。一部の实验では、シリカおよびアラムと一緒に阻害剤を肺胞マクロファージに添加した。阻害剤の使用濃度は以下の通りである：サイトカラシンD $2 \mu\text{M}$ 、SB203580 $10 \mu\text{M}$ 、Wortmannin 100 nM 、Wedelolactone $20 \mu\text{M}$ 、PVNO $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、および、Syk阻害剤(Merck社より購入、#574711) $1 \mu\text{M}$ 。刺激後、細胞を含まない上清を回収し、ELISAに用いた。

【0244】

(ELISAおよび細胞傷害性アッセイ)

サイトカインは、サイトカインELISAキット(R&D systems, Minneapolis, MN, USAまたはBiolegend, San Diego, CA, USA)を、製造業者の説明書に従って用いて測定した。血清OVA-IgEレベルは、DSマウスIgE ELISA(OVA)キット(DSファーマバイオメディカル株式会社、大阪)により決定した。OVA-IgG1の分析については、血清の段階希釈を、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ OVAでコーティングした96ウェルプレート内に調製した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG1またはIgG2c(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)を二次抗体として使用した。 0.5 の吸光度(OD 450 nm)を持つ血清希釈物の逆数の値を、抗原特異的な血清IgG1およびIgG2cの力価として規定した。細胞傷害性は、Promega製のCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイを用いて乳酸脱水素酵素(LDH)の放出を定量することによって測定した。

【0245】

(インビボ試験)

シリカまたは $100 \mu\text{g}$ のPVNOを添加したシリカを気管内注入により投与した。1日おきに3回PVNOを気管内注入によりマウスに投与した。粒子状物質の投与から7日後にBALFを回収した。

【0246】

(統計分析)

全ての実験を少なくとも2回繰り返し、代表的な結果を示す。統計分析は、Studentのt検定またはMann-WhitneyのU検定を用いて行った。群間での 0.05 未満のP値を統計的に有意とみなし、アスタリスク(*)で示した。

【0247】

(共焦点顕微鏡分析)

チャンバースライド(松浪硝子工業株式会社、大阪)上で培養した細胞を、BD Cytotfix/CytopermTMPlus固定/透過キット(BD Biosciences)を用いて、製造業者の指示に従い、固定および透過化した。細胞を、4にて $1 \times \text{Perm} / \text{Wash}$ バッファー中の抗肺サーファクタントタンパク質A抗体(Santa Cruz Biotechnology)で一晩染色した。一次抗体での染色の後、細胞を、室温にて2時間、 $1 \times \text{Perm} / \text{Wash}$ バッファー中のAlexa fluor 488結合抗ウサギIgG(Cell signaling technology)で染色した。Fluoview(FV10i)共焦点顕微鏡(オリンパス株式会社、東京)により像を記録した。

【0248】

(結果)

(粒子状物曝露の遅延型かつ持続性のアジュバント効果は気道に特有である)

以前の報告では、アラムに吸着させたOVAの腹腔内投与後にOVAタンパク質を曝露することで確立されたマウス喘息モデルを使用していた。しかしながら、自然に生じる感作は、腹腔内投与によって生じないので、この実験方法は生理学的に適切ではない可能性がある。より生理学的に適切な様式においてマウス喘息モデルを検討するために、本発明者らは、気道に対する粒子状物質および抗原の直接的な曝露によってマウスを感作させた

10

20

30

40

50

。マウスに、気管内注入により、生理食塩水、O V A、または、アラムに吸着させたO V Aを投与し、次いで、ネブライザーを用いてO V Aのエアロゾルに曝露させた。O V Aと混合させたアラムの気道投与は、O V A特異的な血清I g G 1およびI g Eを誘導し、B A L細胞の浸潤を増大させた(図1 A)。生理食塩水またはO V A単独の気道投与は、検出可能な免疫反応を示さなかった。

【0249】

アラムの気管内注入は、肺炎症とI g E産生を誘導した。これは、抗原(アレルゲン)および粒子状物の同時曝露のモデルである。しかしながら、一部の場合において、抗原と粒子状物質は、別々に曝露され得る。粒子状物質の投与後の抗原の曝露が、肺炎症およびI g E応答に何らかの影響をおよぼすどうかを調べるために、マウスにアラムを気管内注入し、その後、14日後、7日後、3日後または1日後に、エアロゾルO V Aに曝露させる。ラグタイムにかかわらず、アラム気管内注入後のエアロゾルO V A曝露は、高いO V A特異的な血清I g G 1およびI g Eレベルを誘導し、そして、B A L細胞の浸潤を増大させた(図1 B)。抗体応答は、アラム投与から14日後にO V Aを曝露したマウスにおいて検出され、抗原およびアジュバントが別々に投与された場合でも免疫反応が活性化されることを示唆した。それゆえ、アラムのアジュバント効果は肺内で長く継続し、アラムへの抗原の吸着や抗原のデポ効果を必要としない。

10

【0250】

本発明者らはこれまでに、結晶シリカと酸化ニッケルナノ粒子(N i O)もまた強力なアジュバント活性を有し、I g E応答を誘導すると報告した(Kuroda Eら、Immunity, 2011;34(4):514-26.)。マウスに、アラム、シリカまたはN i Oを気管内注入し、その7日後に、マウスをO V Aエアロゾルに曝露させた。シリカおよびN i Oの気管内注入は、O V A特異的な血清I g G 1およびI g Eと、B A L細胞の有意な増加を示した(図1 C)。したがって、一度肺の中に投与されると、アラム、シリカおよびN i Oは、I g G 1およびI g Eの誘導について強力な長く続くアジュバント活性を有する。酸化アルミニウムおよびヒドロキシアパタイトのような他の非炎症性粒子状物質を用いた同様の実験は、免疫反応を誘導しなかった(図1 G)。これは、これらの非炎症性粒子状物が弱いアジュバント活性しか有さないからである。このように、気管内注入された粒子状物質の全てが肺炎症およびI g E産生を誘導するわけではない。- 7日目にアラムを腹腔内投与し、次いで、O V Aを2回腹腔内投与した別の実験では、O V A特異的な血清抗体応答は検出されなかった(図1 D)。したがって、肺は、粒子状物質誘発性の肺炎症に対してより感受性である。

20

30

【0251】

アラムの気管内注入により誘導した抗体応答の誘導機構は、腹腔内投与または皮下注射とは異なる可能性がある。以前の報告は、M y D 8 8 - / - マウスでは、アラムを用いたのO V Aの感作によって、通常レベルのO V A特異的I g GおよびI G Eを産生することを実証した(Gavin ALら、Science, 2006;314:1936-8.; Schnare Mら、Nat Immunol. 2001;2:947-50.)。これと一致して、O V A + アラムにより腹腔内にて免疫した野生型(W T)およびM y D 8 8 - / - マウスからのO V A - I g G 1およびI g Eレベルは同等であった(図1 E)。極めて対照的に、アラムの気管内注入の7日後にO V Aに曝露させたM y D 8 8 - / - マウスでは、O V A - I g G 1およびI g Eレベルが低下した(図1 F)。このように、肺内での粒子状物質によるI g E産生誘導は、投与経路に依存して異なる機構によって調節された。

40

【0252】

(M y D 8 8依存性のI L - 1シグナル伝達が粒子状物質誘発性の肺炎症に必要とされる)

M y D 8 8は、T L R、ならびに、I L - 1、I L - 1 8およびI L - 3 3などのサイトカイン受容体と関連している。次に、本発明者らは、どの受容体がアラムによって誘発される肺炎症に関与するかを決定しようとした。I L - 1 8、T L R 2、T L R 4、T L R 7またはT L R 9欠損マウスを用いたインビボ実験は、すべてのマウスからの血清にお

50

いて、同様のOVA特異的IgG1およびIgEレベルを示した(図2AA~FF)。これに対し、IL1r-/-マウスは、OVA特異的IgG1レベルが低下し、OVA-IgEは検出されなかった(図2A)。本発明者らはまた、BALFにおけるOVA特異的抗体レベルを測定したが、IL1r-/-マウスのBALF内には、IgG1もIgEも検出されなかった(図2B)。アラムの気管内注入と同様に、シリカの気管内注入は、IL1r-/-マウスにおいて、OVA特異的なIgG1およびIgEレベルの有意な減少を示した(図2Cおよび図2AA~FF)。加えて、Th1型抗体に分類されるOVA-IgG2c応答は、IL1r-/-マウスの血清およびBALFにおいて有意に減少していた(図2A、2B、2Cおよび図2AA~FF)。これらの結果は、粒子状物によって誘導されるIL-1が、MyD88シグナル伝達経路を介してインビボでのOVA特異的な抗体産生に寄与することを示す。

10

【0253】

アラムおよびシリカのような粒子状物質が樹状細胞およびマクロファージを刺激して、NLRP3インフラマソームの活性化によりIL-1を産生させることを多数の報告が示している(Hornung Vら、*Nat Immunol.* 2008;9:847-56.; Eisenbarth SCら、*Nature.* 2008;453:1122-6.; Coban Cら、*Allergol Int.* 2010;59:115-24.; McKee ASら、*Journal of immunology.* 2009;183:4403-14.; Franchi LおよびNunez G、*European journal of immunology.* 2008;38:2085-9.; Kool Mら、*Journal of immunology.* 2008;181:3755-9.)。インフラマソームが粒子状物質誘発性の肺炎症に關与するかどうかを調べるために、本発明者らは、NLRP3、カスパーゼ-1およびアポトーシス関連スベック様CARDタンパク質(ASC)欠損マウスを用い、上記のものと同様の実験を行った。予期せぬことに、血清中のIgG1およびIgEレベルはWTマウスと遺伝子欠損マウスで同等であった(図2Dおよび図2AA~FF)。TSLPおよびIL-33は、アレルギー性炎症における重要な分子である(Haenuki Yら、*The Journal of allergy and clinical immunology.* 2012;130(1):184-94 e11.; Imai Yら、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(34):13921-6.; Nakajima Sら、*The Journal of allergy and clinical immunology.* 2012;129(4):1048-55 e6.; Al-Shami Aら、*J Exp Med.* 2005;202(6):829-39.; Zhou Bら、*Nat Immunol.* 2005;6(10):1047-53.; Chen ZGら、*PLoS one.* 2013;8(1):e51268.)。しかしながら、Tslpr-/-またはIl-33-/-マウスを用いた実験は、WTマウスと同等のOVA-IgG1およびIgEを示した(図2Eおよび2F)。

20

30

【0254】

ASC-カスパーゼ1の欠損、すなわちインフラマソームが關与していない(図2Dおよび図2AA~FF)ことを考慮すると、IL-1ではなく、インフラマソームとは独立して制御されるIL-1が、粒子状物質の気管内注入によって誘導される免疫反応の生成に關与する可能性がある。IL-1がアラム誘発性の肺炎症に關与し得るといふこのような仮説に基づき、本発明者らは実際に、アラムの気管内注入後の様々な時間にBALF内でIL-1を検出した(図2G)。興味深いことに、肺内のアラムのアジュバント活性と同様に、アラムの気管内注入後14日目にもIL-1が検出された(図1B)。IL-1は、いずれの時点においてもBALFにおいて検出されなかった(図2H)。

40

【0255】

(粒子状物質誘導性の宿主DNA放出が肺炎症に部分的に關与する)

近年、多数の報告が、尿酸、ATPおよび脂質メディエーターのようなDAMPが、内因性アジュバントとして機能することを示しており、さらに、死細胞から放出されたDNAが粒子状物質によるアジュバント活性において重要な役割を有することも報告されている(Marichal Tら、*Nature medicine.* 2011;17(8):996-1002.; Desmet CJおよびIshii KJ、*Nat Rev Immunol.* 2012;12:479-91.; Jounai NおよびIshii KJ、*Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2012;2:168.; Willart MAおよびLam

50

brecht BN, *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(1):12-9.; Ghaemi-Oskouie F, and Shi Y, *Current rheumatology reports*. 2011;13(2):160-6.; Kono Hら、*The Journal of clinical investigation*. 2010;120(6):1939-49.)。興味深いことに、アラムは、BALF内のDNA放出を誘導し、そして、IL-1放出(図2G)と同様に、アラムの気管内注入後14日目までDNAが検出された(図3A)。シリカとNiOも肺内でDNA放出を誘導したが、生理食塩水または非炎症性粒子状物質はDNAを誘導しなかった(図3AA~EE)。DNA放出は、アラムの腹腔内投与後4日目の腹腔洗浄液においては検出されなかった(図3AA~EE)。

【0256】

OVA、または、脾細胞由来のゲノムDNAと混合したOVAの気管内注入とOVAの曝露は、抗原特異的な応答を誘導しなかった、この結果からDNA自体はアジュバント活性と直接関係しないかもしれない(図3AA~EE)。それゆえ、本発明者らは、放出されるDNAのある種の修飾が、アジュバント活性を調節し得るという仮説を立てた。放出された宿主DNAは、アラムに速やかに吸着し、その複合体がアジュバント活性にとって重要であることが示されている(McKee ASら、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(12):E1122-31.)。粒子状物質へのDNA吸着量を推定するために、粒子状物質とDNAの混合物の水相内の残留DNAを測定した。アジュバント活性を持つ粒子状物は、強力なDNA吸着力を有した(図3B)。酸化アルミニウム(Al_2O_3)のアジュバント活性はひくい、これは低い細胞傷害活性と弱いDNA放出性に起因する。しかしながら、 Al_2O_3 は、強力なDNA吸着力を有した(図3B)。そこで、酸化アルミニウムを用いて粒子状物-DNA複合体がインビボの免疫反応の調節において役割を有するかどうかを検討した。生理食塩水、DNA、 Al_2O_3 または Al_2O_3 -DNA複合体を気管内注入し、翌日に、マウスをOVAに曝露した。粒子状物-DNA複合体は、OVA特異的な血清IgG1濃度の有意な増加を誘導した(図3C)。これに対し、生理食塩水、DNA、または Al_2O_3 単独の気管内注入は、より弱い抗体応答しか誘導しなかった(図3C)。このように、放出されたDNAは、粒子状物上に吸着され、この複合体が肺内で免疫反応を誘導し得る。

【0257】

次に、本発明者らは、死細胞から放出されたDNAがどのように肺炎症に關与するかを調べた。肺内のDNAを分解するためにDNaseで処理したマウスは、BALF中のDNA放出の低下と、アラムの気管内注入によって誘導されるBAL細胞数の有意な減少を有した(図3D)。本発明者らはまた、アラムおよびDNaseの気管内注入により、アジュバント活性に対するDNase処理の効果を調べた。OVA-IgG1レベルは、DNase処理マウスにおいてコントロールよりも幾分(約5倍)低かった。一方、DNase処理マウスのIgEレベルは同等であった(図3E)。ここでは、アラムを気管内注入によりマウスに投与し、2mgのDNaseを、気管内注入により2回投与した。OVA曝露の後に血清を回収した。(DNA活性化シグナル伝達経路の大部分は、TANK結合キナーゼ(TBK1)を活性化する(Ishii KJら、*Nature*. 2008;451(7179):725-9.)。加えて、抗原特異的IgEは、Irf3-/-およびTnf-/-Tbk-/-マウスにおいて有意に低下しているが、IgG1応答は低下しない(Marichal Tら、*Nature medicine*. 2011;17(8):996-1002.)。しかしながら、OVA特異的IgEレベルは、Tnf-/-Tbk-/-マウスとTnf-/-Tbk+/-マウスの間で同等であった(図3F)。OVA-IgG1レベルはまた、Tnf-/-Tbk-/-マウスにおいてコントロールよりも幾分(約3倍)低かったが、有意ではなかった。IRF3およびSTINGは、宿主DNAにより活性化されたシグナル伝達経路に關連する分子としてアラムのアジュバント活性に關与する(McKee ASら、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(12):E1122-31.)。しかしながら、IRF-3もSTINGも、アラムの気管内注入によって誘導されたO

10

20

30

40

50

V A 特異的 I g G 1 および I g E 応答には関与しなかった (図 3 A A ~ E E)。まとめると、死細胞由来の宿主 D N A は、粒子状物上に吸着され得、そして、B A L 細胞の早期浸潤と I g G 1 産生に部分的に関与する。

【 0 2 5 8 】

(肺胞マクロファージは粒子状物に反応して I L - 1 を特異的に誘導する)

肺に曝露された粒子状物は、肺胞マクロファージのような食細胞によって貪食され得る。本発明者らは、肺胞マクロファージに対するアラムの効果を調べた。マウスの肺から単離した肺胞マクロファージを、アラムで刺激すると I L - 1 が産生された (図 4 A)。さらに、インビトロで培養した肺胞マクロファージもまた、アラムおよびシリカに反応して I L - 1 を産生した (図 4 B)。しかしながら、I g E 応答を誘導しない A l₂O₃ およびヒドロキシアパタイトは、肺胞マクロファージ内で I L - 1 産生および細胞死を誘導しなかった。G r o s s ら (Gross Oら、Immunity. 2012;36(3):388-400.) は、アラムおよび尿酸ナトリウム結晶のような粒子状物質が、リポ多糖 (L P S) プライミングされた樹状細胞を誘導して、I L - 1 と同様に I L - 1 を産生させることを示した。本発明者らのインビトロ実験は、L P S プライミングなしの肺胞マクロファージを用いた。加えて、M y D 8 8 - / - の培養肺胞マクロファージは、アラムでの刺激により I L - 1 を放出したが、L P S 刺激では放出しなかったことから、M y D 8 8 シグナル伝達は、I L - 1 誘導に不必要であった (図 4 C)。以前の報告は、I L - 1 産生が、A S C 活性化と密接に関係していることを示した (Yazdi A Sら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.2010;107(45):19449-54.)。しかしながら、粒子状物質は、W T と A s c - / - の肺胞マクロファージにおいて、同等の I L - 1 レベルを誘導した (図 4 D)。これらの結果は、インフラマソームが粒子状物誘導性の I g E 産生に不必要であることを示す本発明者らのインビボデータ (図 2 B および図 2 A A ~ F F) と一致する。加えて、M y D 8 8 / A S C / I F N - プロモーター刺激因子 (I P S) - 1 三重ノックアウト (K O) マウス由来の培養肺胞マクロファージが、アラムまたはシリカに反応して I L - 1 を放出したことから、T L R、インフラマソームおよび R I G 様受容体 (R L R) が I L - 1 放出に関与しないことを示している (図 4 A A ~ F F)。コラーゲン性の構造を持つマクロファージ受容体 (M A R C O) のようなスカベンジャー受容体は、環境粒子の結合にとって重要な役割を果たす (Palecanda Aら、J Exp Med. 1999;189(9):1497-506.)。しかしながら、M A R C O も、マクロファージスカベンジャー受容体クラス A (S R - A) も、アラムまたはシリカにより誘導される I L - 1 放出に関与していなかった (図 4 A A ~ F F)。アラムで刺激した培養肺胞マクロファージにおいて、他の炎症性サイトカインまたは脂質メディエーターの誘導を測定したが、いずれも検出されなかった (図 4 E)。他の組織マクロファージがアラムに反応して I L - 1 を放出するかどうかを調べるために、腹膜マクロファージ、G M - C S F 由来骨髄マクロファージ (G M - M a c) および I I 型肺胞細胞を用いたインビトロ実験を行った。全ての細胞型が、アラムおよびシリカに反応して I L - 1 を産生しなかった (図 4 F および図 4 A A ~ F F)。したがって、粒子状物質誘導性の特異的な I L - 1 放出は、肺胞マクロファージのみで観察され、他の組織マクロファージにおいては観察されなかった。

【 0 2 5 9 】

I L - 1 は、死細胞から放出され、D A M P のように機能する (Kim Bら、Frontiers in immunology. 2013;4:391.; Werman Aら、Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(8):2434-9.; Cohen Iら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(6):2574-9.; Rider Pら、Journal of immunology. 2011;187(9):4835-43.; Eigenbrod Tら、Journal of immunology. 2008;181(12):8194-8.)。本発明者らの結果は、アラムに反応した I L - 1 放出が、死細胞と密接に関連していたことを示唆する。培養肺胞マクロファージを、細胞死を誘導するいくつかの因子、A T P (ピロトーシス誘導因子)、L L O M e (アポトーシス誘導因子) でインキュベート、または凍結融解誘導性の壞

10

20

30

40

50

死 (F / T サイクル) を行った。全ての処理が細胞死を誘導したが、アラムのみが I L - 1 放出を誘導した (図 4 G)。このように、肺胞マクロファージにおける I L - 1 放出には、死シグナル以外の追加のシグナルが必要とされる。粒子状物質が肺胞マクロファージで I L - 1 放出を誘導する機構やシグナル伝達経路は不明である。本発明者らは、様々なシグナル伝達阻害剤の存在下で、アラムを用いて培養肺胞マクロファージを刺激した。ファゴサイトーシス阻害剤である Wortmannin、LY294002 (Cayman Chemichal 社より購入、#70920) および サイトカラシン D は、I L - 1 放出と細胞死の両方を有意に抑制した (図 4 H)。SB203580 (P 3 8 M A P キナーゼ阻害剤) と Wedelolactone (I K K 阻害剤) も、I L - 1 放出と細胞死を有意に抑制した。R I P - 1 は I L - 1 放出に 10 関与する (Lukens JR ら、Nature. 2013;498(7453):224-7.) が、ネクロスタチン - 1 (Santa Cruz 社より購入、#SC-200142) は効果は弱く (図 4 A A ~ F F)、ネクロプトーシスが、アラム誘導性の細胞死と関連していないことが示された。同様に、U0126 (E R K 阻害剤)、SP600125 (J N K 阻害剤) および S y k 阻害剤 (Merck 社より購入、#574711) も効果がなかった (図 4 A A ~ F F)。このように、ファゴサイトーシス、P I 3 K および N F - B 経路は、細胞死と I L - 1 放出に関与する。

【 0 2 6 0 】

(細胞死からのレスキューはインビボでの宿主 D N A および I L - 1 の放出と B A L 細胞の補充を抑制する)

本発明者らおよび他のグループはこれまでに、ポリ - 2 - ビニルピリジン - N - オキシド (P V N O) がリソソーム安定化剤であり、マクロファージの P V N O 処理が、シリカ 20 誘導性の細胞死を抑制することを報告した (Mancino D ら、International archives of allergy and applied immunology. 1983;71(3):279-81. ; Kuroda E ら、Immunity . 2011;34(4):514-26.)。P V N O での処理は、肺胞マクロファージを細胞死からレスキューし、シリカに 20 応答して I L - 1 放出を減少させた (図 5 A)。同様に、P V N O でのインビボ処理は、シリカの気管内注入後の肺において、粒子状物質誘導性の B A L 細胞浸潤を有意に抑制した (図 5 B)。加えて、B A L F における宿主 D N A および I L - 1 放出はまた、P V N O 処理によって有意に減少された。これらの結果は、粒子状物質誘導性の I L - 1 が、本発明者らのインビトロ分析と同様に細胞死によって媒介されることを示し、そして、細胞死のレスキューが、肺炎症の抑制のための有望な戦略である 30 ことを示唆する。

【 0 2 6 1 】

(考察)

粒子状汚染物質および環境粒子を含む粒子状物質は、アレルギー性炎症のリスクを増加させる。しかしながら、粒子状物質がアレルギー反応を悪化させる機構はあまり理解されていないままである。本明細書において、発明者らは、肺炎症の分子機構と、粒子状物質曝露により誘導される I g E の誘導を検討し、そして、粒子状物質によって誘導される宿主 D N A および I L - 1 のような D A M P が肺炎症を誘発することを見出した。

【 0 2 6 2 】

本発明は、後天的免疫反応および I g E 誘導の活性化に関する、M y D 8 8 および I L - 1 R シグナル伝達経路の重要性を示した。以前の研究は、M y D 8 8 シグナル伝達がアラムの作用に関与せず、I g E の負の調節因子として機能し得ることが示された (Gavin AL ら、Science. 2006;314:1936-8. ; Schnare M ら、Nat Immunol. 2001;2:947-50.)。本発明者らはまた、気管内注入とは対照的に、アラムを腹腔内投与した場合、M y D 8 8 - / - マウスにおいて W T コントロールよりもわずかに高い O V A - I g E レベルが 40 観察された (図 1 E)。I L - 3 3 および T S L P はアレルギー性炎症における I g E 誘導にとって決定的な因子である (Haenuki Y ら、The Journal of allergy and clinical immunology. 2012;130(1):184-94 e11. ; Imai Y ら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(34):13921-6. ; Nakajima S ら、The Journal of allergy and clinical immunology . 2012;129(4):1048-55 e6. ; Al-Shami A ら、J Exp Med. 2005;202(6):829-39. ; Z 50

hou Bら、*Nat Immunol.* 2005;6(10):1047-53.; Chen ZGら、*PLoS one.* 2013;8(1):e51268.; Yasuda Kら、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(9):3451-6.)が、いずれのサイトカインも、粒子状物質誘発性肺炎症におけるI g E産生には関与していなかった(図2 Eおよび2 F)。したがって、肺特異的な免疫反応は、粒子状物質の気管内注入によって誘導されるのであろう。IL - 1は、マウスアレルギー性喘息モデルにおける重要なサイトカインであり、最近の研究は、IL - 1 およびIL - 33が、抗原の鼻腔内(i . n .)投与によるTh 2応答とI g E産生の誘導のためのアジュバントとして機能することを報告した(Nakae S、*Immunology.* 2003;15(4):483-90.; Besnard AGら、*Allergy.* 2011;66(8):1047-57.; Gasse Pら、*The Journal of clinical investigation.* 2007;117(12):3786-99.; Nambu AおよびNakae S. *IL-1 and Allergy.* *Allergol Int.* 2010;59(2):125-35.; Schmitz Nら、*European journal of immunology.* 2003;33(4):991-1000.; Kobayashi Tら、*Nat Rev Immunol.* 2014;14(2):81-93.)。本願は、粒子状物質誘発性肺炎症におけるIL - 1 Rシグナル伝達の重要性を実証した。今日までに、大部分の研究が、IL - 1 およびIL - 1 が同等の効果があること、あるいは、インフラマソーム(およびIL - 1)の作用が、肺のアレルギー性炎症における重要なメディエーターであることを報告している。しかしながら、IL - 1産生の供給源および分子機構は不明である。本願において、発明者らは、DAMPとして放出されたIL - 1 が、肺炎症の悪化およびI g E産生において重要な役割を有することを示し、インフラマソーム(そして、おそらくはIL - 1)は関与していないことを示唆する(図2 Dおよび図2 A A ~ F F)。興味深いことに、IL - 1 は、アラムの気管内注入により2週間にわたって放出され続け(図2 G)、そして、本発明者らのインビトロでの観察は、マクロファージがIL - 1 の供給源であり得ることを示唆する(図4)。IL - 1とは異なり、プロIL - 1は生物活性であり、最近の論文は、無菌の炎症におけるIL - 1 およびIL - 1の異なる役割を実証した(Cohen Iら、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(6):2574-9.; Eigenbrod Tら、*Journal of immunology.* 2008;181(12):8194-8.)。さらに、死細胞からのIL - 1が好中球の補充に関与しているのに対し、IL - 1はマクロファージの浸潤を誘導する(Rider Pら、*Journal of immunology.* 2011;187(9):4835-43.)。損傷を受けた細胞由来の物質(他のDAMP)が、IL - 1との異なる細胞活性に寄与し得る。Yazdi ASら(*Yazdi ASら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(45):19449-54.)は、IL - 1が、粒子状物質誘発性の急性肺炎症および好中球の補充にとって、IL - 1よりも重要であると報告した。本発明者らは、粒子状物質曝露により誘導されたIL - 1が、急性の反応、後天的な免疫反応およびI g E産生の活性化において機能することを見出した。アラムの気管内注入後の肺においてIL - 1が放出される傾向は、宿主DNAの放出の傾向と似ていた。加えて、インビトロ実験は、細胞死が、アラムまたはシリカに反応したマクロファージからのIL - 1放出と密接に関連していることを明らかにし、粒子状物質の気管内注入後のDAMPの放出が、アレルギーの悪化と関連することを示した。シリカにより誘導された細胞死をレスキューするインビボPVNO処理は、宿主DNAおよびIL - 1レベル、そして、シリカの気管内注入後のBALF内の炎症性細胞を減少させた(図5)。このように、IL - 1は宿主DNAと共同で炎症性反応を調節し、死細胞またはDAMP放出の制御が、アレルギー性炎症の治療のための新たな可能性を開き得ることを示唆した。

【0263】

IL - 1はインフラマソームの活性化によって誘導されるが、IL - 1誘導の機構は不明である。本願において、本発明者らは、肺胞マクロファージが、アジュバント活性を持つ粒子状物に反応してIL - 1を特異的に放出することを実証した(図4)。Gross Oら(*Gross Oら、Immunity.* 2012;36(3):388-400.)は、樹状細胞が粒子状物に反応してIL - 1を誘導すると報告した。プライミングしていない肺胞マクロファージを

10

20

30

40

50

用いた本発明者らの研究とは対照的に、Grossらは、LPSでプライミングした樹状細胞を用い、IL-1の放出には以下の2つの独立したシグナルが必要とされることを実証した：細胞内発現の誘導のためのプライミングシグナルと、IL-1放出と同様の分泌のための第二シグナル。加えて、Grossらは、プライミングされていない細胞が、粒子状物に反応してIL-1を誘導しないことも示しており、これは、本発明者らの腹膜マクロファージおよび骨髄マクロファージでの実験結果と一致している。本発明者らは、MyD88-/-肺胞マクロファージがアラムに反応してIL-1を放出することを観察し、肺胞マクロファージからのIL-1放出にLPSでのプライミングが必要とされないことを示した(図4C)。さらに、MyD88/ASC/IPS-1三重KOマウス由来の肺胞マクロファージを用いて、主なPRRが粒子状物質によるIL-1放出 10
に
関
与
し
な
い
こ
と
を
明
ら
か
に
し
た
(
図
4
A
A
~
F
F
)
。
こ
の
よ
う
に
、
粒
子
状
物
質
に
反
答
し
た
特
異
的
な
I
L
-
1
放
出
は
、
肺
胞
マ
ク
ロ
フ
ァ
ー
ジ
で
の
み
見
ら
れ
る
特
別
な
特
徴
で
あ
り
、
他
の
組
織
マ
ク
ロ
フ
ァ
ー
ジ
で
は
見
ら
れ
な
い
。
近
年
、
肺
胞
マ
ク
ロ
フ
ァ
ー
ジ
の
特
異
性
お
よ
び
適
応
性
、
そ
し
て
、
肺
の
感
染
お
よ
び
炎
症
に
対
す
る
ユ
ニ
ー
ク
な
見
張
り
役
と
し
て
の
そ
の
機
能
が
報
告
さ
れ
た
(
Hussell TおよびBell TJ、Nat Rev Immunol. 2014;14(2):81-93.)。ま
と
め
る
と
、
本
発
明
者
ら
は
、
組
織
マ
ク
ロ
フ
ァ
ー
ジ
の
特
異
性
は
そ
の
組
織
特
異
的
な
反
答
を
反
映
し
得
る
こ
と
、
そ
し
て
、
こ
の
特
異
性
が
、
ア
レ
ル
ギ
ー
性
炎
症
に
と
つ
て
の
原
因
因
子
と
な
り
得
る
こ
と
を
示
唆
す
る
。
実
際
、
腹
腔
内
へ
の
ア
ラ
ム
ま
た
は
シ
リ
カ
の
投
与
は
、
M
y
D
8
8
(
お
よ
び
I
L
-
1
R
)
経
路
と
は
無
関
係
に
免
疫
反
応
(
I
g
E
誘
導
)
を
活
性
化
し
た
。

【0264】

IL-1放出は、ファゴサイトーシスおよび細胞死と関連しているようである。PI3-キナーゼ阻害剤またはサイトカラシンDを用いたファゴサイトーシスの阻害は、アラム活性化肺胞マクロファージにおける細胞死およびIL-1産生を抑制した(図4H)。興味深いことに、気管内注入によってIgEを誘導しない非炎症性の粒子状物質であるヒドロキシアパタイトまたはAl₂O₃は、細胞死またはIL-1放出を誘導しなかつた(図4B)。このように、マクロファージに対する粒子状物質の細胞傷害性と、その後のIL-1放出は、粒子状物質がアレルギー性炎症を誘発するかどうかの評価において重要である。しかしながら、ATP、LLoMeおよびE/Tサイクルにより誘導された細胞死は、細胞死を誘導するにもかかわらず、IL-1を誘導しなかつた。また、NF- κ Bまたはp38 MAPK阻害剤は、IL-1放出を有意に抑制した(図4Gおよび4H)。このように、肺胞マクロファージにおけるIL-1誘導には、細胞死に対する追加のシグナルが必要とされるが、他の組織マクロファージでは必要とされない。本発明者らは現在、どの細胞内因子または事象が、粒子状物質により刺激されたマクロファージにおけるIL-1放出と関連するかを調査中である。

【0265】

重要な知見は、アジュバント(粒子状物質)と抗原(OVA)が肺に別々に投与されるとしても免疫反応が活性化され得たということである。従来、アジュバントは、抗原と同時に投与された場合に、抗原特異的な免疫反応を増強すると考えられていた。しかしながら、粒子状物質の気管内注入後の抗原吸入が、抗原特異的なIgEを増強した(図1Bおよび1C)。さらに、宿主DNAおよびIL-1のようなDAMPは、アラムの気管内注入により少なくとも2週間放出され続けた(図2Gおよび図3A)。このように、抗原特異的なIgEは、肺におけるDAMP放出の間に抗原に曝露されると誘導され得る。Granamら(Granum Bら、Toxicology. 2001;156(2-3):149-59.)は、抗原特異的なIgEが、ポリスチレン粒子の腹腔内投与から3日後のOVA投与によって誘導されることを示した。しかしながら、本発明者らは、宿主DNAの放出が、アラムの腹腔内投与から4日後に腹腔において検出されなかつたことから、アラム接種から7日後のOVA注射による抗体応答を検出しなかつた(図3AA~EE)。本発明者らは、肺が他の臓器よりも粒子状物質誘発性の炎症に対して感受性であることを示唆する。一部の
場
合
に
お
い
て
、
粒
子
状
物
と
抗
原
に
対
す
る
曝
露
は
、
同
時
に
は
生
じ
な
い
可
能
性
が
あ
る
。
本
発
明
者
ら
は
、
別
々
に
暴
露
す
る
本
願
の
モ
デ
ル
が
、
ア
レ
ル
ゲ
ン
感
作
に
対
す
る
粒
子
状
ア
ジュ
バ
ン
ト
の
後
発
効
果
の
機
構 40
50

の理解にとって有用であることを示唆する。すなわち、ひとたび粒子状物質または環境粒子に曝露されると、アレルギー感作のリスクは、2週間まで持続し得る。

【0266】

まとめると、本発明者らは、粒子状物質誘発性の肺炎症を調べ、DAMP、IL-1およびMyD88シグナル伝達のような肺特異的な応答がIgEの誘導に重要であることを見出した。IgG1およびIgEに加え、OVA-IgG2cの量の減少がIL1r-/-マウスにおいて見られ、肺における抗原特異的な抗体応答が、IL1r-/-マウスにおいて完全に減少していることを示した(図2)。これらのデータは、肺において粒子状物質によって誘導されたIL-1が、B細胞活性化のアジュバントとして機能することを示唆する。Matsushitaらは、MyD88のシグナル伝達が、B細胞活性化に必要とされること、そして、IL-1ファミリーサイトカインのシグナル伝達がIgE誘導に関与することを報告した。肺炎症についての新規治療を開発するために、本発明者らは、粒子状物質アジュバントの作用様式、組織特異的な免疫反応、そして、粒子状物質自体の特徴を理解しなければならない。

10

【0267】

(実施例2:スクリーニング法)

本実施例では、本発明のスクリーニング法の模式的プロトコルを開発する。

【0268】

実施例1では、2種類のものを使用しており、これらはいずれも使用することができる。一つはマウスから直接単離した肺胞マクロファージで、本文中では新鮮に単離した肺胞マクロファージ(Freshly isolated alveolar macrophages)と示しています。このマクロファージの使用が一番いいのですが、一匹のマウスから取れる細胞数が少ないため、多くの粒子状物質を一度に評価したい場合には、以下の培養肺胞マクロファージを用いることもできる。この方法ですと、マウス2~3匹から大量のマクロファージが回収でき、その性質はほぼ新鮮に単離した肺胞マクロファージと変わらないことがわかっている。実施例1では培養肺胞マクロファージ(Cultured alveolar macrophages)と示しているものであり、いずれも、実施例1に調製方法が記載されている。いずれの場合でもスクリーニング法として成功裏に実施することができる。

20

【0269】

(材料および方法)

- ・上述のように調製した肺胞マクロファージ(新鮮に単離したものか、培養したもの)
- ・被験物質(水酸化アルミニウム、シリカ、酸化アルミニウム、ヒドロキシアパタイト、他の物質、粒子状物質等)
- ・IL-1測定キット

30

(方法)

- (1)肺胞マクロファージを上述のように調製する。
- (2)培養した肺胞マクロファージに被験物質を上記容器に入れる。
- (3)適宜の時間(例えば、3時間~9時間、通常6時間程度)培養を継続する。
- (4)培養後上清から培地を一部取り出し、IL-1の量を市販のキット(例えば、Biolegend社から入手可能なもの(San Diego, CA, USA, #433402))というキットで製造者のマニュアルに従い測定する。

40

【0270】

このスクリーニング手法により、被験物質のアレルギー誘発性が検査することができる。そして、粒子状物質によるインビトロアレルギー感作の評価法は培養肺胞マクロファージを使う方が簡便であると考えられる。

【0271】

(実施例3:アレルギーの治療(低分子))

本実施例では、PVNO等の低分子を用いた場合のアレルギーの治療の試験を記載する。

【0272】

50

(方法)

マウスおよび他の試薬は、実施例1に記載されるのと同様のものを利用することができる。

- 1) マウスにシリカを250 μg / マウスで気管内注入する。
- 2) マウスにPVNO (生理食塩水にて作成) 10 ~ 100 μg 気管内注入する。
- 3) PVNOは1日おき3回投与する。
- 4) ネブライザーを用いてOVA曝露する(1日おき3回)。
- 5) OVA曝露後、再びPVNOを1日おき3回投与する。
- 6) ネブライザーを用いてOVA曝露(1日おき3回)する。
- 7) マウスの血清IgE抗体価の測定およびBALF細胞浸潤の評価をする。

10

【0273】

以上を実施することにより、例えば、PVNOの投与により、血清IgE抗体価の低下とBALF細胞浸潤の低下が予想される

(実施例4: アレルギーの治療(抗体または核酸))

本実施例では、抗体またはsiRNA等を用いた場合のアレルギーの治療の試験を記載する。

【0274】

(方法)

- 1) マウスにシリカ(250 μg / マウス)、またはアラム(100 μg / マウス)で気管内注入する。
- 2) マウスに抗IL-1抗体(0.5 mg / マウス)を静注により投与またはIL-1のsiRNA(投与量は適宜設定することができる。)を気管内注入により投与する。
- 3) siRNAは1日おき3回投与、抗体は1週間おきに3回投与する。
- 4) ネブライザーを用いてOVA曝露(1日おき3回)する。
- 5) OVA曝露後、再びsiRNAを1日おき3回投与(抗体は1週間おきに3回)する。
- 6) ネブライザーを用いてOVA曝露(1日おき3回)する。
- 7) マウスの血清IgE抗体価の測定およびBALF細胞浸潤の評価をする。

20

【0275】

上述の試験を行うことにより、例えば、抗体またはsiRNAの投与により、血清IgE抗体価の低下とBALF細胞浸潤の低下が予想される。

30

【0276】

(実施例5: 製剤)

本実施例では、製剤例として、本発明の抗IL-1剤を含有する治療液を以下のようにして製造する。

【0277】

常法により下に示す液を調製する。

PVNO	適量(気管内注入で10 ~ 100 μg / マウス)
適宜の緩衝液	適量
全量	100 mL

40

PVNOはPolysciences(Warrington, PA)から入手され得る。

【0278】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本出願は、日本国出願特願2014-111576(2014年5月29日出願)に対して優先権主張をするものであって、その内容は、すべて本願において参考として援用される。

【産業上の利用可能性】

50

【 0 2 7 9 】

アレルギー誘発性のスクリーニングおよびアレルギー誘発性の制御技術が提供され、アレルギーの診断、治療および予防に関連する技術に關与する産業（試薬、製薬等）において利用可能な技術が提供される。

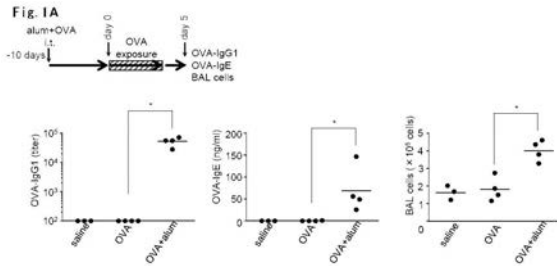
【 配列表フリーテキスト 】

【 0 2 8 0 】

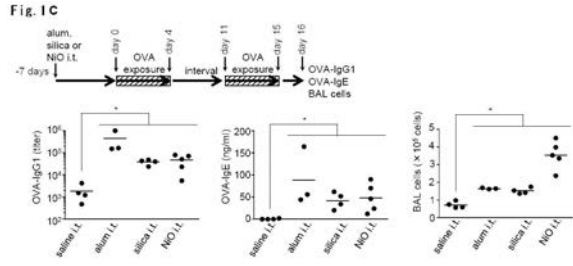
配列番号 1 : I 1 - 1 の核酸配列

配列番号 2 : I 1 - 1 のアミノ酸配列

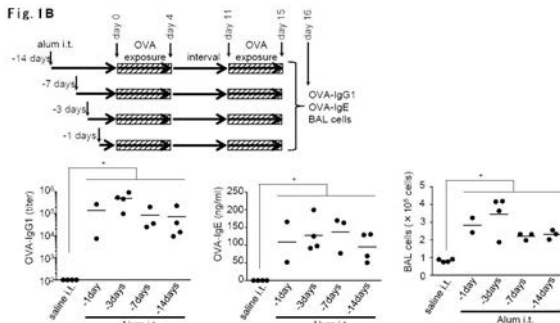
【 図 1 A 】



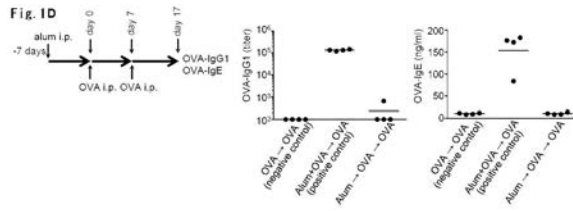
【 図 1 C 】



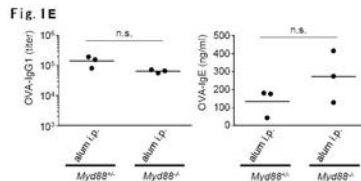
【 図 1 B 】



【 図 1 D 】

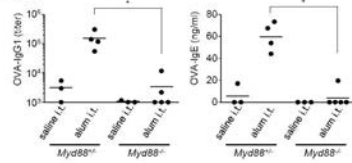


【 図 1 E 】



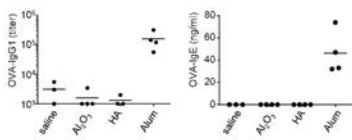
【 図 1 F 】

Fig. 1F



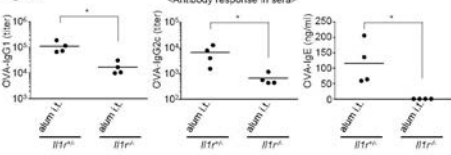
【 図 1 G 】

Fig. 1G



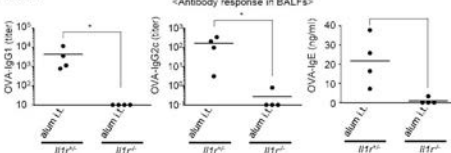
【 図 2 A 】

Fig. 2A



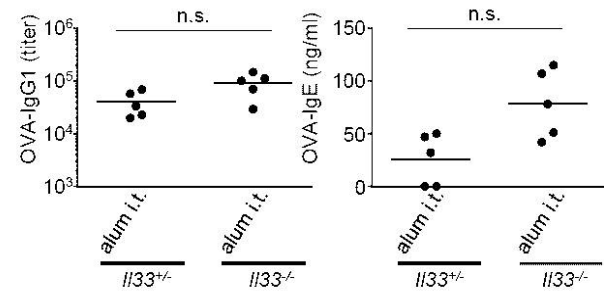
【 図 2 B 】

Fig. 2B



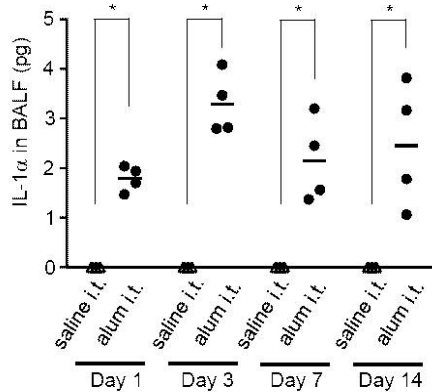
【 図 2 F 】

Fig. 2F



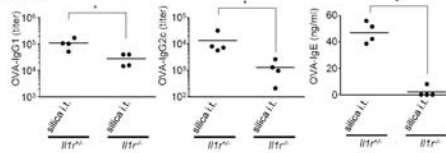
【 図 2 G 】

Fig. 2G



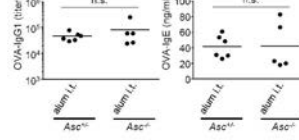
【 図 2 C 】

Fig. 2C



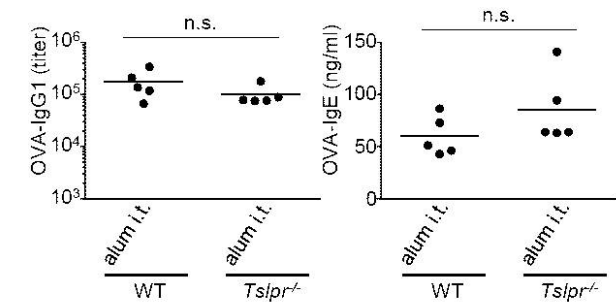
【 図 2 D 】

Fig. 2D



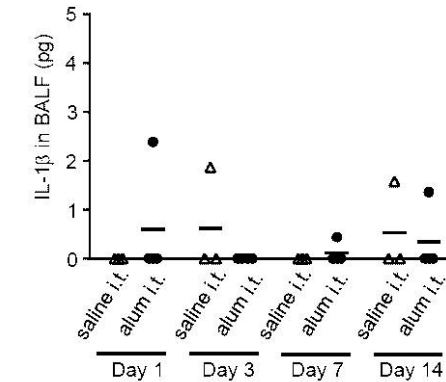
【 図 2 E 】

Fig. 2E



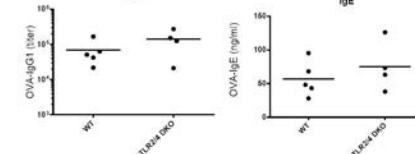
【 図 2 H 】

Fig. 2H



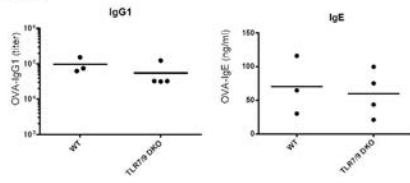
【 図 2 A A 】

Fig. 2AA



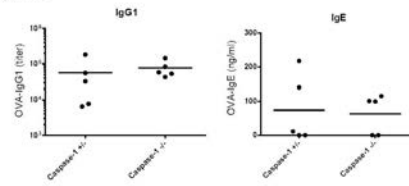
【 2 B B 】

Fig. 2BB



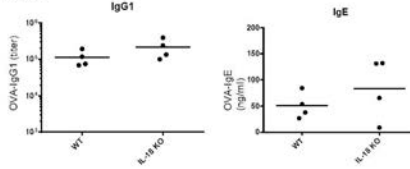
【 2 E E 】

Fig. 2EE



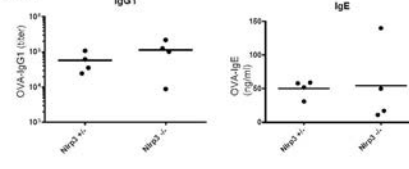
【 2 C C 】

Fig. 2CC



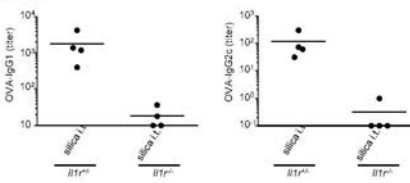
【 2 F F 】

Fig. 2FF



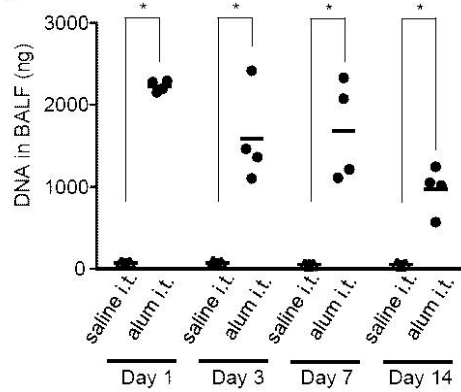
【 2 D D 】

Fig. 2DD



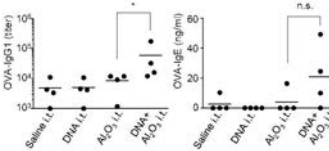
【 3 A 】

Fig. 3A



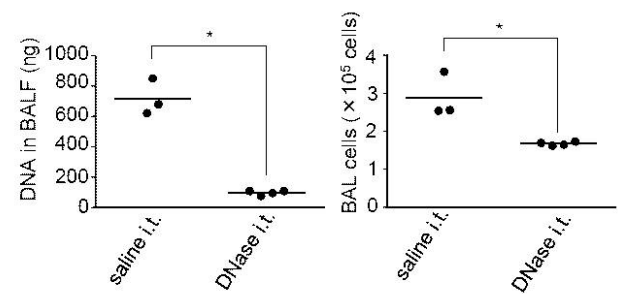
【 3 C 】

Fig. 3C



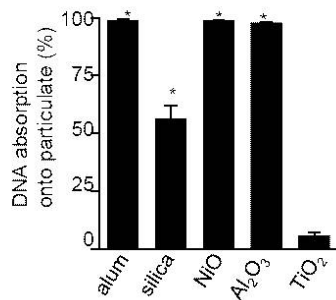
【 3 D 】

Fig. 3D



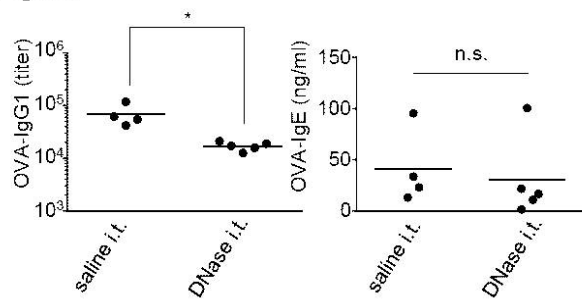
【 3 B 】

Fig. 3B



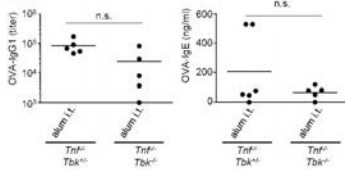
【 3 E 】

Fig. 3E



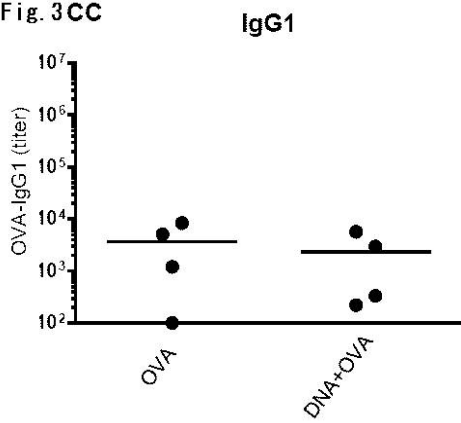
【 3 F 】

Fig. 3F



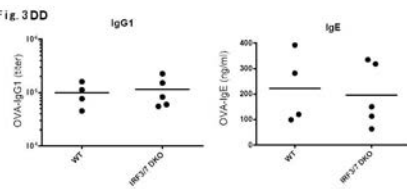
【 3 C C 】

Fig. 3CC



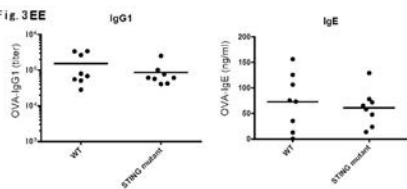
【 3 D D 】

Fig. 3DD



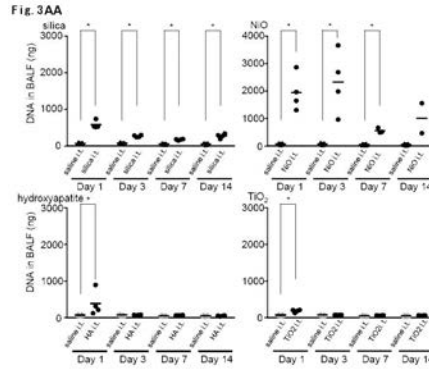
【 3 E E 】

Fig. 3EE



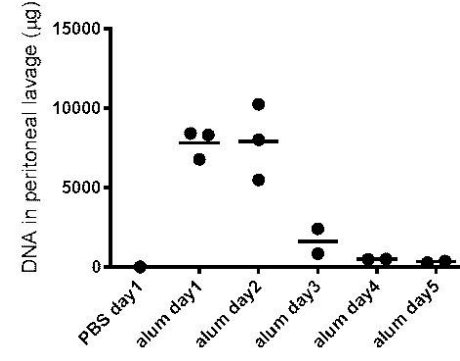
【 3 A A 】

Fig. 3AA



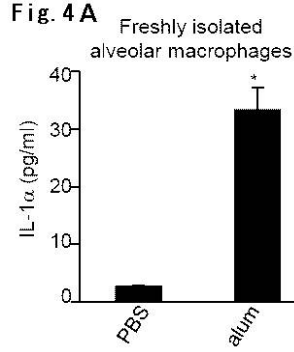
【 3 B B 】

Fig. 3BB



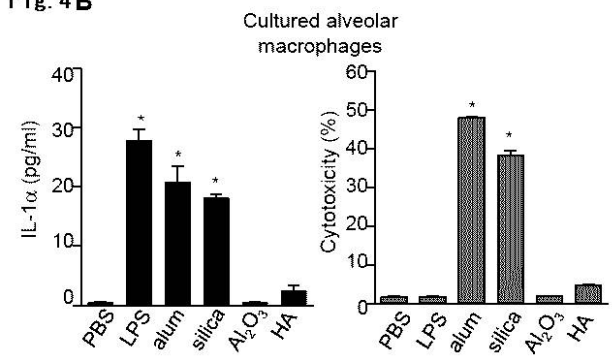
【 4 A 】

Fig. 4A



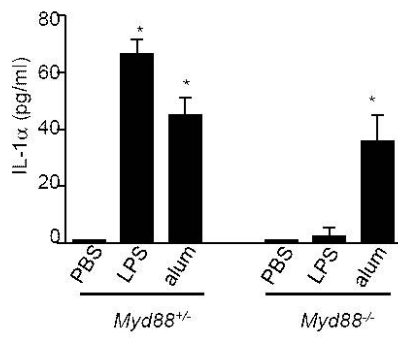
【 4 B 】

Fig. 4B



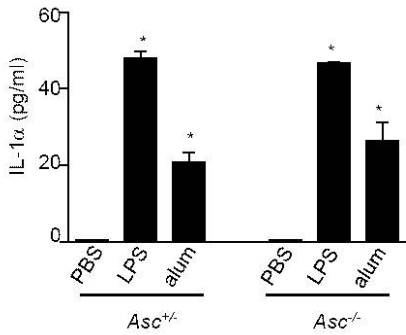
【 4 C 】

Fig. 4C



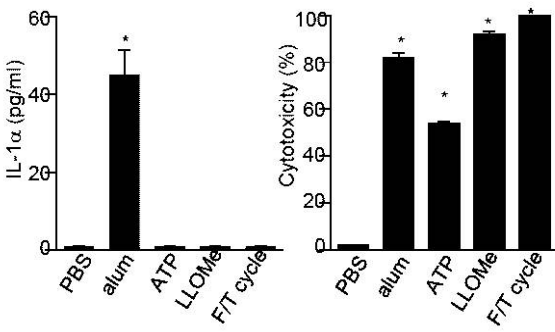
【 4 D 】

Fig. 4D



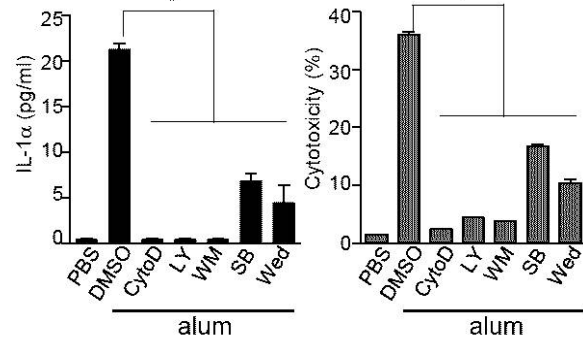
【 4 G 】

Fig. 4G



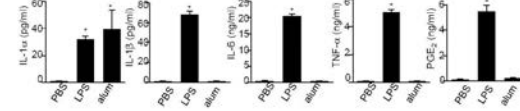
【 4 H 】

Fig. 4H



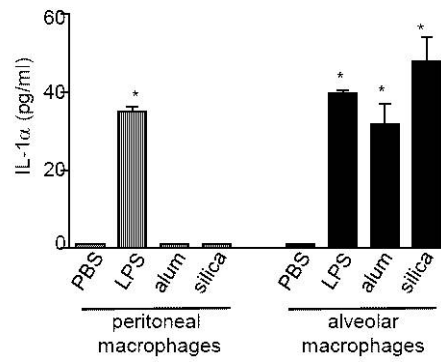
【 4 E 】

Fig. 4E

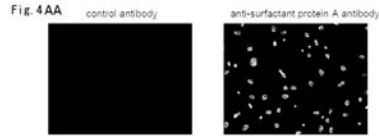


【 4 F 】

Fig. 4F

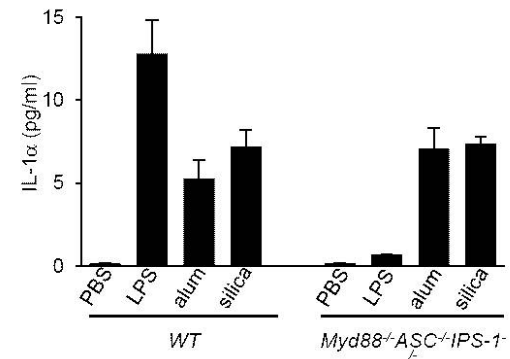


【 4 A A 】



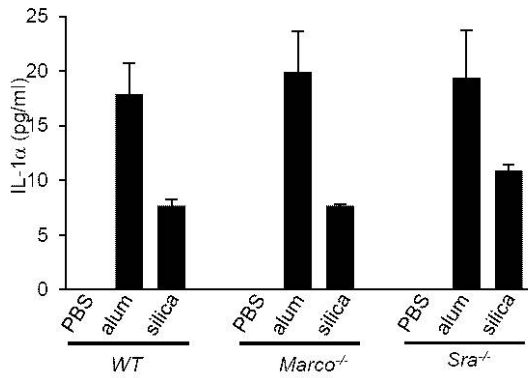
【 4 B B 】

Fig. 4BB



【 図 4 C C 】

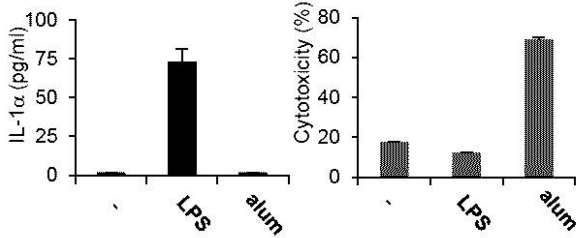
Fig. 4CC



【 図 4 D D 】

Fig. 4DD

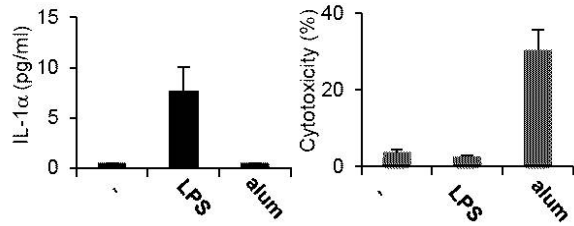
GM-Mφs



【 図 4 E E 】

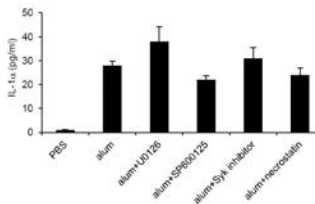
Fig. 4EE

Type II alveolar cells



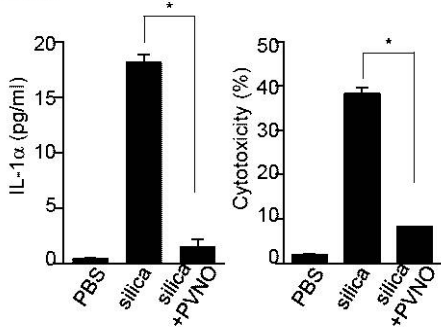
【 図 4 F F 】

Fig. 4FF



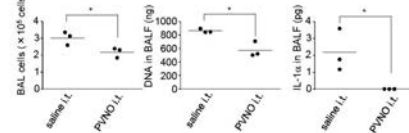
【 図 5 A 】

Fig. 5A



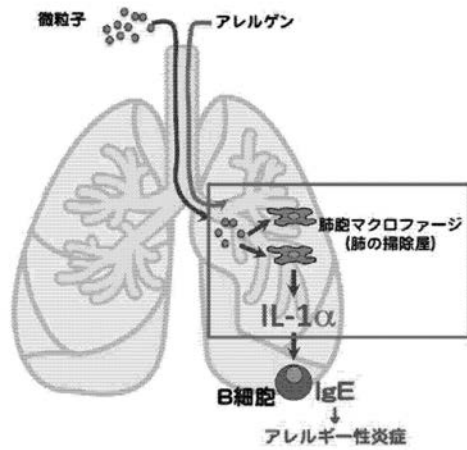
【 図 5 B 】

Fig 5B



【 図 6 】

Fig. 6



【配列表】

2015182121000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/002648
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
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) G01N33/53, A61K31/366, A61K31/4439, A61K31/713, A61K31/787, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/04, A61P7/00, A61P11/02, A61P11/06, A61P17/00, A61P17/04, A61P27/02, A61P29/00, A61P37/08, C12Q1/06, G01N33/543		
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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY (STN), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Willart MA et al., Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33, J Exp Med, 2012.07.30, 209(8), 1505-1517	1-9
A	JP 2013-525310 A (Medimmune, Ltd.), 20 June 2013 (20.06.2013), paragraphs [0194] to [0196] & US 2013/0149312 A1 & WO 2011/130745 A1 & EP 2558112 A1 & AU 2011239402 A & CA 2796083 A & CN 102985100 A & MX 2012012063 A & KR 10-2013-0086141 A & RU 2012148721 A	1-9
A	Hussell T et al., Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context, Nat Rev Immunol, 2014.02, 14(2), 81-93	1-9
<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:		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"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)		"&" document member of the same patent family
"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 17 July 2015 (17.07.15)	Date of mailing of the international search report 04 August 2015 (04.08.15)	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002648

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/069342 A1 (National Agriculture and Food Research Organization), 12 June 2008 (12.06.2008), page 12, line 15 to page 14, line 15 (Family: none)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002648

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

G01N33/53(2006.01)i, A61K31/366(2006.01)i, A61K31/4439(2006.01)i,
A61K31/713(2006.01)i, A61K31/787(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i,
A61P7/00(2006.01)i, A61P11/02(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i,
A61P17/00(2006.01)i, A61P17/04(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i,
A61P29/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i,
G01N33/543(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002648

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 10-19 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: See extra sheet.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002648

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

The inventions claimed in claims 10 to 19 relate to an allergy treatment agent that comprises an IL-1 α inhibitor as an active ingredient. However, the description (Examples 3 to 5, etc.) states nothing about a pharmacological test method, pharmacological data, etc. supporting the fact that IL-1 α inhibitors have an allergy treatment effect.

Moreover, it has never been known by a person skilled in the art that IL-1 α inhibitors are broadly efficacious as an allergy treatment agent. Thus, it is a common technical knowledge that the efficacy of IL-1 α inhibitors as an allergy treatment agent cannot be confirmed unless examinations are conducted in practice.

Consequently, claims 10-19 are not fully supported by the description.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2015/002648	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, A61K31/366, A61K31/4439, A61K31/713, A61K31/787, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/04, A61P7/00, A61P11/02, A61P11/06, A61P17/00, A61P17/04, A61P27/02, A61P29/00, A61P37/08, C12Q1/06, G01N33/543			
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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) CAplus/REGISTRY (STN), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
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	
A	Willart MA et al., Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33, J Exp Med, 2012.07.30, 209(8), 1505-1517	1-9	
<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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 17.07.2015		国際調査報告の発送日 04.08.2015	
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) 赤坂 祐樹	2 J 3316
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 2 6 4 8
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
A	JP 2013-525310 A (メディミューン リミテッド) 2013.06.20, 段落【0194】 - 【0196】 & US 2013/0149312 A1 & WO 2011/130745 A1 & EP 2558112 A1 & AU 2011239402 A & CA 2796083 A & CN 102985100 A & MX 2012012063 A & KR 10-2013-0086141 A & RU 2012148721 A	1-9
A	Hussell T et al., Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context, Nat Rev Immunol, 2014.02, 14(2), 81-93	1-9
A	WO 2008/069342 A1 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 2008.06.12, 第12頁第15行-第14頁第15行 (ファミリーなし)	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 2 6 4 8

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 _____ 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、
2. 請求項 10-19 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、
下記特別ページを参照
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。

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)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2015/002648

第II欄2. の続き

請求項10-19には、IL-1 α 阻害剤を有効成分として含有するアレルギー治療剤が特許請求されているが、明細書(実施例3-5等)には、IL-1 α 阻害剤がアレルギー治療作用を有することを裏付ける薬理試験方法、薬理データ等についての記載がない。しかも、IL-1 α 阻害剤が広くアレルギー治療剤として有効であることは当業者に知られておらず、有効か否かは、実際に試験を行わないと確認することができないのが技術常識である。よって、請求項10-19は、明細書による十分な裏付けを欠いている。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 2 6 4 8

発明の属する分野の分類

G01N33/53(2006.01)i, A61K31/366(2006.01)i, A61K31/4439(2006.01)i,
A61K31/713(2006.01)i, A61K31/787(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i,
A61P11/02(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/04(2006.01)i,
A61P27/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i,
G01N33/543(2006.01)i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	F 4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	A
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 31/7088	
	A 6 1 K 31/713	
	G 0 1 N 33/50	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 石井 健

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内

(72)発明者 黒田 悦史

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA25 BB20 DA36 FB03
 4B029 AA07 BB11 BB15 BB17 CC01 FA15
 4B063 QA05 QA07 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33 QS36 QX01
 4C084 AA17 NA14 ZA331 ZA341 ZA511 ZA621 ZA681 ZA891 ZB111 ZB131
 ZC412
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 CC23 EE01 GG01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA34 ZA51 ZA62
 ZA68 ZA89 ZB11 ZB13 ZC41
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA75 EA22

(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)	测试过敏原物质，诊断和治疗过敏		
公开(公告)号	JPWO2015182121A1	公开(公告)日	2017-04-27
申请号	JP2016523145	申请日	2015-05-26
申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人医葯基盤·健康·营养研究所		
[标]发明人	石井健 黒田悦史		
发明人	石井 健 黒田 悦史		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/02 C12N15/113 C07K16/24 C12M1/34 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P1/04 A61P17/04 A61P17/00 A61P7/00 A61P43/00 A61K45/00 A61K39/395 A61K31/7088 A61K31/713 G01N33/50		
CPC分类号	A61K31/366 A61K31/4439 A61K31/713 A61K31/787 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 C12Q1/06 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/68.ZNA G01N33/53.Q C12Q1/02 C12N15/00.G C07K16/24 C12M1/34.F C12M1/34.A A61P37/08 A61P11/06 A61P11/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P1/04 A61P17/04 A61P17/00 A61P7/00 A61P43/00.111 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K31/7088 A61K31/713 G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BB20 2G045/DA36 2G045/FB03 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/FA15 4B063/QA05 4B063/QA07 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA511 4C084/ZA621 4C084/ZA681 4C084/ZA891 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA34 4C086/ZA51 4C086/ZA62 4C086/ZA68 4C086/ZA89 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZC41 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA75 4H045/EA22		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	2014111576 2014-05-29 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种变应原性的简单测试。特别地，本发明是用于测试测试物质的致敏性的方法，该方法包括：A) 将测试物质暴露于测试系统中的肺泡巨噬细胞；和B) 测试系统。测量其中的白介素1 α (IL-1 α)，其中IL-1 α 是测试物质的变应原性指标，并且IL-1 α 的值被测试物质暴露。与以前的值相比，升高提供了一种指示被测物质是致敏物质的方法。

発行日 平成29年4月27日 (2017. 4. 27)

(43) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015. 12. 3)

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 P	2 G O 4 5
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68 Z N A	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Q	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/113 (2010. 01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
CO 7 K 16/24 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 G	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 86 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2016-523145 (P2016-523145)	(71) 出願人 505314022
(2) 国際出願番号 PCT/JP2015/002648	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
(2) 国際出願日 平成27年5月26日 (2015. 5. 26)	大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号
(3) 優先権主張番号 特願2014-111576 (P2014-111576)	(74) 代理人 100078282
(3) 優先日 平成26年5月29日 (2014. 5. 29)	弁理士 山本 秀栄
(3) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100113413
	弁理士 森下 夏樹
	(74) 代理人 100118371
	弁理士 ▲駒▼谷 剛志
	(74) 代理人 100181674
	弁理士 飯田 貴敏
	(74) 代理人 100181641
	弁理士 石川 大輔
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー誘発性物質の検査、アレルギーの診断および治療