

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02010/050167**

発行日 平成24年3月29日 (2012.3.29)

(43) 国際公開日 **平成22年5月6日 (2010.5.6)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/0783 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/00 2 0 2 L	2 G 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 45 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2010-535650 (P2010-535650)	(71) 出願人	506208908 学校法人兵庫医科大学 兵庫県西宮市武庫川町1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/005625	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成21年10月26日 (2009.10.26)	(72) 発明者	中西 憲司 日本国兵庫県西宮市武庫川町1番1号 学 校法人兵庫医科大学内
(31) 優先権主張番号	特願2008-281930 (P2008-281930)	(72) 発明者	善本 知広 日本国兵庫県西宮市武庫川町1番1号 学 校法人兵庫医科大学内
(32) 優先日	平成20年10月31日 (2008.10.31)	Fターム(参考)	2G045 AA40 BB20 CB01 DA36 DA37 FA11 FB01 FB03
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Th2細胞誘導用組成物およびTh2型疾患の治療組成物、ならびにこれらの利用

## (57) 【要約】

本発明は、抗原と該抗原に結合するIgEとからなる複合体、抗原および該抗原に結合するIgEを含有している組成物、および該複合体または該組成物を用いる方法を提供する。本発明によって、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導することができる。また、本発明によって、Th2型の免疫応答の作用メカニズム、特に初期IL-4の産生機序が明らかになったので、本発明を用いれば、Th2型疾患を治療/予防する技術を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗原と該抗原に結合する I g E とからなる、複合体。

## 【請求項 2】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導するための組成物。

## 【請求項 3】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導するためのキット。

## 【請求項 4】

ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導する方法であって、  
 抗原と該抗原に結合する I g E とからなる複合体を形成させる第 1 工程、  
 該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、および  
 ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程  
 を包含する、方法。

10

## 【請求項 5】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、I L - 4 を生成するための組成物。

## 【請求項 6】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、I L - 4 を生成するためのキット。

20

## 【請求項 7】

I L - 4 を生成する方法であって、  
 抗原と該抗原に結合する I g E とからなる複合体を形成させる第 1 工程、および  
 該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程  
 を包含する、生成方法。

## 【請求項 8】

ナイーブ T 細胞を、上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程をさらに包含する、請求項 7 に記載の生成方法。

## 【請求項 9】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、I g E を生成するための組成物。

30

## 【請求項 10】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、I g E を生成するためのキット。

## 【請求項 11】

I g E を生成する方法であって、  
 抗原と該抗原に結合する I g E とからなる複合体を形成させる第 1 工程、  
 該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、  
 ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程、な  
 らびに

40

B 細胞を、該抗原および抗原提示細胞の存在下で、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養する第 4 工程  
 を包含する、生成方法。

## 【請求項 12】

上記第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、上記抗原、上記 T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程  
 をさらに包含する、請求項 11 に記載の生成方法。

## 【請求項 13】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、T h 2 型疾患に対する治療剤を

50

スクリーニングするための組成物。

【請求項 14】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングするためのキット。

【請求項 16】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

T h 2 型疾患に対する治療剤のスクリーニング方法であって、  
抗原と該抗原に結合する I g E とからなる複合体を形成させる第 1 工程、および  
該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程  
を包含する、方法。

【請求項 18】

上記第 2 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 2 工程後の好塩基球の細胞表面上に提示されている M H C クラス I I 分子または C D 8 0 分子の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

ナイーブ T 細胞を、上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程をさらに包含し、

第 2 工程または第 3 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

B 細胞を、上記抗原および抗原提示細胞の存在下で、上記第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養して I g E を生成する第 4 工程をさらに包含し、

上記第 2 工程～第 4 工程の少なくとも 1 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 4 工程において生成された I g E の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

上記第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、上記抗原、T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程をさらに包含し、

上記第 2 工程～第 5 工程の少なくとも 1 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 5 工程において生成された I g E の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

T h 2 型疾患に対する治療剤のスクリーニング方法であって、

上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球を動物に投与してモデル動物を作製する工程、  
該モデル動物に候補物質を投与する工程、および

該候補物質を投与した後のモデル動物における、T h 2 型疾患に対する改善効果の有無を測定する工程

をさらに包含する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項 17～22 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 24】

T h 2 型疾患のモデル動物を作製する方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなる複合体を形成させる第 1 工程、

10

20

30

40

50

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、および  
該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を、動物に投与する工程  
を包含する、作製方法。

【請求項25】

前記疾患が気管支喘息であり、前記遊離複合体の存在下での培養後の好塩基球を経鼻投与することを包含する、請求項24に記載の作製方法。

【請求項26】

好塩基球を枯渇させる物質またはFc R1の機能を阻害する物質を含有している、Th2型疾患を処置するための組成物。

【請求項27】

Fc R1に対する抗体を含有している、請求項26に記載の組成物。

【請求項28】

Th2型疾患を処置する方法であって、  
被験体から好塩基球を枯渇させる工程、または  
被験体にFc R1の機能を阻害する物質を投与する工程  
を包含する、方法。

【請求項29】

被験体に、Fc R1に対する抗体を投与する工程を包含する、請求項28に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Th2細胞を誘導するための組成物およびその利用に関するものであって、特に、Th2型の免疫応答を惹起する初期IL-4を産生するための組成物およびその利用に関するものである。また、本発明は、Th2型疾患を治療するための組成物およびその利用に関するものであり、特に、Th2型免疫応答を惹起する初期IL-4の産生をブロックするための組成物およびその利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

マクロファージや樹状細胞は、細菌の侵入の際に、Toll-likeレセプター(TLR)を介して樹状細胞(DC)が細菌を認識し、刺激補助分子を発現するように成熟し、Th1型の免疫応答を誘導するIL-12およびIL-18などを産生する。これらの分子を介してマクロファージや樹状細胞と結合するとともにIL-12が作用することによって、ナイーブT細胞はTh1細胞に分化する。このTh1細胞から分泌されるIFN- $\gamma$ がマクロファージを活性化し、貪食、殺菌などの作用が活性化される。

【0003】

ナイーブT細胞は、IL-12によってTh1細胞に分化し、IL-4によってTh2細胞に分化する。Th2細胞はTh1細胞とともに適応免疫系において重要な細胞といえる。しかし、Th2型の免疫応答の発達における先天性免疫細胞の役割はほとんど理解されていない。

【0004】

好塩基球および肥満細胞は、IgE媒介性のアレルギー性炎症における重要なエフェクター細胞である(非特許文献1~4参照)。また、寄生虫が感染した宿主マウスにおいて、Th2細胞、ならびに脾臓および肝臓での好塩基球の増殖が強く誘導される(非特許文献5参照)。このことは、好塩基球が、Th2応答の誘導および/または増加に寄与することを示唆する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Galli, S. J. Curr Opin Hematol 7: 32-9 (2000)

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Galli, S. J. et al. Annu Rev Immunol 23: 749-86 (2005)

【非特許文献3】Kawakami, T. & Galli, S. J. Nat Rev Immunol 2: 773-86 (2002)

【非特許文献4】Mukai, K. et al. Immunity 23: 191-202 (2005)

【非特許文献5】Min, B. et al. J Exp Med 200: 507-17 (2004)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をTh2細胞に分化させるのに必要な初期IL-4を産生する細胞の性質はまだ知られておらず、また、初期IL-4を産生させるための初期刺激が、いかなる物質によって行われるのかも知られておらず、自然免疫担当細胞がTh2細胞を分化誘導するメカニズムは未だ明かされていない。

10

【0007】

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、Th2型の免疫応答の作用メカニズム、特に初期IL-4の産生機序を明らかにすることによって、Th2型疾患を治療/予防する技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともにIL-4を産生し、そのIL-4存在下で好塩基球の表面に提示された抗原ペプチド/MHCクラスII分子複合体を認識したナイーブT細胞がTh2細胞に誘導されることを見出した。そして、Th2細胞が誘導されると、刺激を受けたB細胞を活性化して、抗原に対するIgEが産生されることを確認し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導するために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合するIgEをさらに含有していることがより好ましい。

20

【0009】

本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るTh2細胞誘導方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、およびナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程を包含

30

【0010】

本発明に係る組成物は、IL-4を生成するために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合するIgEをさらに含有していることがより好ましい。

【0011】

本発明に係る組成物は、IL-4を生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るIL-4産生方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、IL-4、特に初期IL-4(primary IL-4)を産生し得る。また、本発明に係るIL-4産生方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、およびナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、IL-4、特に二次的IL-4(secondary IL-4)を産生し得る。

40

【0012】

本発明に係る組成物は、IgEを生成するために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合するIgEをさらに含有していることがより好ましい。

【0013】

50

本発明に係る組成物は、I g Eを生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るI g E生成方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、ならびにB細胞を、該抗原および抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh 2細胞とともに培養する第4工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I g E、特に初期I g E (primary IgE)を産生し得る。また、本発明に係るI g E生成方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、B細胞を、該抗原および抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh 2細胞とともに培養してI g Eを生成する第4工程、ならびに第4工程にて生成されたI g Eの存在下で、該抗原、該Th 2細胞およびB細胞を培養する第5工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I g E、特に二次的I g E (secondary IgE)を産生し得る。

10

**【0014】**

本発明に係る組成物は、Th 2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、好塩基球を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、抗原をさらに含有していることが好ましく、該抗原に結合するI g Eをさらに含有していることがより好ましい。なお、上記Th 2型疾患は、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択されることが好ましい。

20

**【0015】**

本発明に係る組成物は、Th 2型疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程を包含することを特徴としている。本発明に係るスクリーニング方法において、第2工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第2工程後の好塩基球の細胞表面上に提示されているMHCクラスII分子またはCD80分子の量を測定することが好ましい。

30

**【0016】**

また、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程をさらに包含し、第2工程または第3工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第3工程において誘導されたTh 2細胞の量を測定してもよい。

**【0017】**

さらに、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程B細胞を、上記抗原および抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh 2細胞とともに培養してI g Eを生成する第4工程をさらに包含し、第2工程～第4工程の少なくとも1工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第4工程において生成されたI g Eの量を測定してもよい。

40

**【0018】**

なおさらに、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程第4工程にて生成されたI g Eの存在下で、上記抗原、Th 2細胞およびB細胞を培養する第5工程を包含し、第2工程～第5工程の少なくとも1工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第5工程において生成されたI g Eの量を測定してもよい。

**【0019】**

本発明に係るモデル動物作製方法は、Th 2型疾患のモデル動物を作製するために、抗原と該抗原に結合するI g Eとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、および該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を、動物に

50

投与する工程を包含することを特徴としている。なお、上記Th2型疾患は、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択されることが好ましい。本発明に係る作製方法によって作製されるモデル動物は、気管支喘息のモデル動物であってもよく、この場合、上記複合体の存在下での培養後の好塩基球を静脈内投与した後に、当該抗原を経鼻投与することが好ましい。

**【0020】**

このような作製方法によって作製されたモデル動物は、Th2型疾患に対する治療剤のスクリーニングに用いられ得る。すなわち、本発明に係るスクリーニング方法は、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、第2工程にて培養した後の好塩基球を動物に投与してモデル動物を作製する工程、該モデル動物に候補物質を投与する工程、および該候補物質を投与した後のモデル動物における、Th2型疾患に対する改善効果の有無を測定する工程を包含することを特徴としている。

10

**【0021】**

本発明に係る組成物は、Th2型疾患を処置するために、好塩基球を枯渇させる物質またはFcγR1の機能を阻害する物質を含有していることを特徴としている。本発明に係る組成物は、FcγR1に対する抗体を含有していることが好ましい。

**【0022】**

本発明に係る方法は、Th2型疾患を処置するために、被験体から好塩基球を枯渇させる工程、または被験体にFcγR1の機能を阻害する物質を投与する工程を包含することを特徴としている。本発明に係る方法は、被験体に、FcγR1に対する抗体を投与する工程を包含することが好ましい。

20

**【0023】**

また、本発明者らは、抗原-IgE複合体によってパルスした好塩基球を用いることが好ましいこと、さらには、正常なマウスに移入した抗原-IgE複合体が内因性の好塩基球に起因するTh2応答を誘導することを見出した。すなわち、本発明に係る複合体は、抗原と該抗原に結合するIgEとからなることを特徴としている。本発明を用いれば、末梢血、脾臓、骨髄等に存在する好塩基球を用いてIL-4の産生を誘導し得る。このような好塩基球は脾臓等においてTh2応答を誘導することができる。また、本発明に係る組成物は、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。このような組成物を用いれば、本発明に係る複合体を生成することができるので、Th2応答を誘導することができる。さらに、本発明に係るキットは、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。このようなキットを用いれば、本発明に係る複合体を生成することができるので、Th2応答を誘導することができる。

30

**【0024】**

本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導する技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導するために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導するために、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

40

**【0025】**

本発明に係る組成物は、IL-4を生成する技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、IL-4を生成するために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、二次的IL-4を生成するために、抗原、該抗原に結合するIgE、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

**【0026】**

本発明に係る組成物は、IgEを生成する技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、IgEを生成するために、抗原、および該抗原に結合するIgEを含有し

50

ていることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、I g Eを生成するために、抗原、該抗原に結合するI g E、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

【0027】

本発明に係る組成物は、Th 2型疾患に対する治療剤をスクリーニングする技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、Th 2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、抗原、および該抗原に結合するI g Eを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、Th 2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、抗原、該抗原に結合するI g E、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

【0028】

本発明に係る組成物は、Th 2型疾患のモデル動物を作製する技術に利用可能である。すなわち、本発明に係る組成物は、Th 2型疾患のモデル動物を作製するために、抗原、および該抗原に結合するI g Eを含有していることを特徴としている。また、本発明に係るキットは、Th 2型疾患のモデル動物を作製するために、抗原、該抗原に結合するI g E、および好塩基球を備えていることを特徴としている。

10

【発明の効果】

【0029】

本発明によれば、Th 2型の免疫応答の作用メカニズム、特に初期IL - 4の産生機序を明らかにすることができる。また、本発明を用いれば、Th 2細胞誘導、IL - 4生成、I g E生成、Th 2疾患治療剤のスクリーニングが可能になる。さらに、本発明を用いれば、Th 2型疾患モデル動物を作製し得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1(a)】正常マウスまたは寄生虫感染マウスから調製した脾臓の非B非T細胞におけるFc R 1およびc - k i tの発現を、フローサイトメトリーによって解析した結果、ならびにFc R 1<sup>+</sup> / c - k i t<sup>-</sup>細胞(好塩基球)を分離した結果を示す図である。

【図1(b)】分離した好塩基球の培養上清中のサイトカイン含量を示す図である。

【図1(c)】T細胞枯渴マウス脾細胞(T脾臓)、または寄生虫感染マウスからの好塩基球の存在下にて、ナイーブT細胞を、OVA<sub>323-339</sub>で刺激し、生成したCD 4<sup>+</sup>T細胞上における細胞質IL - 4およびIFN - についてFACSによって解析した結果を示す図である。

30

【図1(d)】T細胞枯渴マウス脾細胞(T脾臓)、または寄生虫感染マウスからの好塩基球の存在下にて、ナイーブT細胞を、OVA<sub>323-339</sub>で刺激し、生成したCD 4<sup>+</sup>T細胞上のIL - 33R 鎖の発現を示す図である。

【図2(a)】骨髓由来の、FACSソートされた、好塩基球および肥満細胞、ならびにT細胞枯渴脾細胞(T脾臓)を、種々の表面マーカーによって染色した結果を示す図である。

【図2(b)】骨髓由来の、FACSソートされた、好塩基球および肥満細胞を、MHCクラスII(I - A)およびFc R 1の発現について、フローサイトメトリーで解析した結果を示す図である。

40

【図2(c)】ヒトIL - 3の存在下にて培養したCD 34<sup>+</sup>臍帯血細胞を、c - k i tおよびCD 203c(左)、ならびにCD 203c<sup>+</sup> c - k i t<sup>-</sup>である細胞中のHLA - DR(右)の発現について、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

【図3(a)】ナイーブT細胞を、T細胞枯渴マウス脾細胞(T脾臓)、骨髓由来の精製好塩基球または肥満細胞の存在下で、OVA<sub>323-339</sub>で刺激し、生成したCD 4<sup>+</sup>T細胞におけるIL - 4およびIFN - の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。Th 2細胞の誘導のために、IL - 4(1000 U / m L)を培養物にさらに添加した(Th 2条件)。

50

【図3(b)】ナイーブT細胞を、骨髄由来の精製好塩基球(WT;野生型マウス、G4/G4;IL-4欠損マウス)、または脾臓DCの存在下で、OVA<sub>323-339</sub>で刺激し、生成したCD4<sup>+</sup>T細胞におけるIL-4およびIFN- $\gamma$ の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。

【図3(c)】ナイーブT細胞を、T細胞枯渇マウス脾細胞(T脾臓)、骨髄由来の精製好塩基球の存在下で、DNP-OVAで刺激し、生成したCD4<sup>+</sup>T細胞におけるIL-4およびIFN- $\gamma$ の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。

【図3(d)】ナイーブT細胞を、T細胞枯渇マウス脾細胞(T脾臓)、骨髄由来の精製好塩基球の存在下で、抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVA(6.25~100 $\mu$ g/mL)で刺激し、生成したCD4<sup>+</sup>T細胞におけるIL-4およびIFN- $\gamma$ の発現をFACSによって解析した結果を示す図である。

【図4(a)】DNP-OVA/抗DNP IgEとともに培養した好塩基球または肥満細胞を用いて正常マウスを免疫し、4日後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの2日後にこのマウスから調製した脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞を、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- $\gamma$ の量をELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(b)】DNP-OVA/抗DNP IgEとともに培養した好塩基球を用いて正常マウスを免疫し、1週間後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの日にこのマウスから回収した血清中のOVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体を、ELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(c)】DNP-OVA/抗DNP IgEとともに培養した好塩基球を用いて正常マウスを免疫し、1週間後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの2週間後にこのマウスから調製した脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞を、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- $\gamma$ の量をELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(d)】DNP-OVA/抗DNP IgEとともに培養した好塩基球を用いて正常マウスを免疫し、1週間後にインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスを静脈内チャレンジし、チャレンジの2週間後にこのマウスから調製した脾臓中のCD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>IL33R<sup>+</sup>Th2細胞の割合を測定した結果を示す図である。

【図4(e)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEの注入の前後のマウス末梢血、脾臓、骨髄におけるIL-4の産生を、IL-4のレポーターとしてのGFPの発現によって確認した結果を示す図である。

【図4(f)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEの注入の前後に抗FcR1(MAR-1)を腹腔内投与したマウスから、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後に調製した脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞を、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- $\gamma$ の量をELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(g)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEの注入の前後に抗FcR1(MAR-1)を腹腔内投与したマウスから、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後に調製した脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞を、OVAでパルスしたAPC(T脾臓)で5日間刺激し、培養上清中のIL-4、IL-13およびIFN- $\gamma$ の量をELISAによって測定した結果を示す図である。

【図4(h)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEを注入したマウスを、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後にインタクトなOVAタンパク質を用いて静脈内チャレンジし、チャレンジの日にこのマウスから回収した血清中のOVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体を、ELISAによって測定した結果を示す図である。なお、好塩基球の数の枯渇または増加のために、マウスに、抗FcR1(MAR-1)を注入している。

【図4(i)】図中に示した用量のDNP-OVA/抗DNP IgEを注入したマウス

10

20

30

40

50

を、DNP-OVA/抗DNP IgEの注入4日後にインタクトなOVAタンパク質を用いて静脈内チャレンジし、チャレンジの日にこのマウスから回収した血清中のOVA特異的IgE抗体およびIgG1抗体を、ELISAによって測定した結果を示す図である。

なお、好塩基球の数の枯渇または増加のために、マウスに、IL-3を注入している。  
【図5】好塩基球によって駆動されたTh2細胞からのサイトカイン産生を示す図であり、T細胞枯渇マウス脾細胞（T脾臓）、または寄生虫感染マウスからの好塩基球の存在下にて、ナイーブT細胞を、OVA<sub>323-339</sub>で7日間刺激し、生成したCD4<sup>+</sup>T細胞を、照射したT細胞枯渇マウス脾細胞の存在下にて、IL-3ありまたはなしでOVA<sub>323-339</sub>を用いて48時間チャレンジし、回収した上清における種々のサイトカイン産生を試験した結果を示す。

【図6(a)】マウス骨髄細胞をIL-3とともに10日間培養し、FcR1およびc-kitの発現について、フローサイトメトリーで解析し、次いで、FACS AriaによってFcR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>（好塩基球）の細胞集団とFcR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>（肥満細胞）の細胞集団とにソートした結果を示す図である。

【図6(b)】ソートしたFcR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>（好塩基球）およびFcR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>（肥満細胞）の細胞集団を、電子顕微鏡観察した結果を示す図である。

【図6(c)】陰性選別によって濃縮したヒト末梢血単核細胞の、選別後すぐ（左）またはヒトIL-3存在下で24時間培養した後（右）の、HLA-DRとCD203cの発現を測定した結果を示す図である。

【図6(d)】ソートしたCD203c<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>細胞集団の、ギムザ染色（左；100×）および電子顕微鏡観察（右）の結果を示す図である。

【図7】好塩基球誘導性の抗原特異的T細胞増殖を示す図であり、ナイーブT細胞を、OVA<sub>323-339</sub>（1μM）、あるいは抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVAで、照射したT脾臓または好塩基球の存在下にて4日間刺激し、最終16時間の間のDNA合成を測定した結果を示す図である。

【図8(a)】ナイーブT細胞を、OVA<sub>323-339</sub>、あるいは抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVAで、照射したT脾臓または好塩基球の存在下にて24時間刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4の産生を試験した結果を示す図である。

【図8(b)】骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞を、抗DNP IgE mAbの存在下または非存在下でのDNP-OVAで16時間刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4またはIL-13の産生を試験した結果を示す図である。

【図8(c)】骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞から抽出したmRNAを、TLR遺伝子およびアクチンの発現についてRT-PCRによって解析した結果を示す図である。

【図8(d)】骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞を、IL-3、およびIL-18、IL-33、LPSまたはPGNで24時間刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4、IL-6またはIL-13の産生を試験した結果を示す図である。

【図9(a)】抗マウスFcγ1（MAR-1（+））またはPBS（MAR-1（-））を腹腔内投与されたマウスから最終投与の2日後に調製した脾臓における好塩基球の数をフローサイトメトリーによって定量した結果を示す図である。

【図9(b)】抗マウスFcγ1（MAR-1（+））またはPBS（MAR-1（-））を腹腔内投与されたマウスから最終投与の2日後に調製した肝臓における好塩基球の数をフローサイトメトリーによって定量した結果を示す図である。

【図9(c)】抗マウスFcγ1（MAR-1（+））またはPBS（MAR-1（-））を腹腔内投与されたマウスにDNP-OVA/抗DNP IgEをさらに3日間、MAR-1またはPBSとともに注入し、OVAでの腹腔内チャレンジの後に、MAR-1またはPBSでさらに処理し、調製した血液における好塩基球の数を定量した結果を示す

10

20

30

40

50

図である。

【図9(d)】抗マウスFcγR1(MAR-1(+))またはPBS(MAR-1(-))を腹腔内投与されたマウスにDNP-OVA/抗DNP IgEをさらに3日間、MAR-1またはPBSとともに注入し、OVAでの腹腔内チャレンジの後に、MAR-1またはPBSでさらに処理し、調製した脾臓における好塩基球の数を定量した結果を示す図である。

【図9(e)】IL-3を注入したマウスからの好塩基球の頻度について、脾臓の非B非T細胞に対するFcγR1+/DX5+細胞の割合を示す図である。

【図10】抗原でパルスされた好塩基球またはIgE複合体によるインビボでのTh2/IgE誘導の機序を示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

〔1：好塩基球およびその利用〕

好塩基球および肥満細胞はアレルギー性炎症の効果細胞であることが、これまでによく知られている。今回、本発明者らは、好塩基球が主要組織適合性抗原クラスII分子およびCD80分子を発現することを見出し、好塩基球が抗原を細胞内に取り込み、さらに抗原由来のペプチド断片をクラスII分子に結合させた態様で細胞表面に発現するとともに、IL-4を産生することを見出した。さらに、このような好塩基球を正常なマウスに移入すると、抗原特異的Th2細胞が誘導され、さらに、OVA溶液を経静脈投与するとOVA特異的なIgE産生が誘導され、経鼻投与すると気管支喘息が誘導されることを見出した。このように、本発明は、当業者に容易に予測し得ない新規知見に基づいて完成された。

【0032】

本発明に係る組成物は、好塩基球を含有していることを特徴としている。上述したように、本発明者らは、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともにIL-4を産生し、そのIL-4存在下で好塩基球の表面に提示された抗原ペプチド/MHCクラスII分子複合体を認識したナイーブT細胞がTh2細胞に分化することを見出した。そして、Th2細胞が誘導されると、B細胞を活性化して、抗原に対するIgEが産生されることを確認し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞からTh2細胞への誘導、IL-4の生成、IgEの生成などに好適に用いられ得る。

【0033】

抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるために、本発明に係る組成物は、好塩基球を含有していればよいといえるが、目的の抗原をさらに含有していてもよく、目的の抗原の取り込みをより促進するためには、該抗原に結合するIgEをさらに含有していることがより好ましい。さらに、好塩基球に取り込ませるべき抗原-IgE複合体の形成を促進するために、抗原にハプテンを連結していてもよい。この場合、IgEは抗ハプテンIgEであってもよく、本明細書中で使用される場合、抗ハプテンIgEもまた、該抗原に結合するIgEの範疇に含まれる。

【0034】

本発明に用いられるに好ましい好塩基球は、種々の組織から調製され得るが、脾臓、脊髄などの組織由来の好塩基球が好ましい。生体内に存在する好塩基球の割合は非常に小さいので、組織から取得された好塩基球をインビトロで培養して増殖させて用いることがより好ましい。本発明に用いられるに好ましい抗原は、種々の疾患に関連する抗原(すなわち免疫原)となり得るタンパク質(ペプチドを含む)であれば特に限定されない。当業者は、Th2型疾患を惹起する抗原を十分認識しているので、本発明に用いられるに好ましい抗原を周知技術に基づいて容易に取得し得る。また、標的とする抗原(免疫原)を取得した当業者は、本発明に用いられるに好ましいIgEを周知技術に基づいて容易に取得し得る。なお、本明細書中で使用される場合、「Th2型疾患」は、Th2細胞が誘導されたことに起因するアレルギー疾患が意図され、「Th2型アレルギー疾患」と交換可能

10

20

30

40

50

に用いられ得る。Th2型疾患としては、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0035】

「組成物」は各種成分が一物質中に含有されている形態であり、「キット」は各種成分の少なくとも1つが別物質中に含有されている形態であることが意図されるが、本明細書中で使用される場合、キットもまた組成物の一態様であることが意図される。なお、用語「キット」は、特定の材料を内包する容器（例えば、ボトル、プレート、チューブ、ディッシュなど）を備えた包装が意図される。好ましくは各材料を使用するための指示書を備える。本明細書中においてキットの局面において使用される場合、「備えた（備えている）」は、キットを構成する個々の容器のいずれかの中に内包されている状態が意図されるが、複数の成分を同一の容器に混合して備えていても別々の容器に備えていてもよい。「指示書」は、紙またはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、あるいは磁気テープ、コンピューター読み取り可能ディスクまたはテープ、CD-ROMなどのような電子媒体に付されてもよい。本発明に係るキットはまた、希釈剤、溶媒、洗浄液またはその他の試薬を内包した容器を備え得る。さらに、本発明に係るキットは、適用に必要な器具をあわせて備えていてもよい。

10

#### 【0036】

すなわち、一実施形態において、本発明に係る組成物は、好塩基球を備えているキットであることを特徴としている。本実施形態に係るキットは、抗原をさらに備えていることが好ましく、該抗原に結合するIgEをさらに備えていることがより好ましい。

20

#### 【0037】

上述したように、本発明に係る組成物は、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るTh2細胞誘導方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、およびナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程を包含することを特徴としている。

#### 【0038】

また、本発明に係る組成物は、IL-4を生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るIL-4産生方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、IL-4、特に初期IL-4 (primary IL-4) を産生し得る。また、本発明に係るIL-4産生方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、およびナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、IL-4、特に二次的IL-4 (secondary IL-4) を産生し得る。

30

#### 【0039】

さらに、本発明に係る組成物は、IgEを生成する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るIgE生成方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、ならびにB細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh2細胞とともに培養する第4工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、IgE、特に初期IgE (primary IgE) を産生し得る。また、本発明に係るIgE生成方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、B細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh2細胞とともに培養してIgEを生成する第4工程、ならびに第4工程にて生成されたIgEの存在下で、該抗原、該Th2細胞お

40

50

よび B 細胞を培養する第 5 工程を包含することを特徴としている。本方法を用いれば、I g E、特に二次的 I g E (secondary IgE) を産生し得る。

【0040】

本発明において培養される細胞は、好塩基球、ナイーブ T 細胞、T h 2 細胞、および B 細胞であり、これらの細胞の培養手順 (培養条件) は、当該分野において周知である。よって、当業者は、本発明を実行する際に、周知の培養手順を適宜設計し得る。

【0041】

本発明に係る組成物は、ナイーブ T 細胞から T h 2 細胞への誘導、I L - 4 の生成、I g E の生成などに好適に用いられ得る。よって、本発明に係る組成物を用いた際の、ナイーブ T 細胞から T h 2 細胞への誘導、I L - 4 の生成、I g E の生成が抑制または阻害されるか否かを指標にすれば、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングすることができる。また、本発明に係る組成物を用いれば、T h 2 型疾患のモデル動物を作製し得るとともに、該モデル動物を用いれば、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングすることができる。

【0042】

T h 2 サイトカインによって惹起される T h 2 型アレルギー性疾患の治療には、現在、I g E 抗体と T h 2 サイトカインとによって活性化されたエフェクター細胞 (肥満細胞など) から産生される様々な化学伝達物質を抑制することを目的としたものが用いられている。T h 2 サイトカイン自体の産生を抑制する T h 2 型アレルギー性疾患治療薬の開発はあまり進んでいない。

【0043】

T h 2 サイトカイン自体の産生を抑制する方法として、I L - 1 2 の大量投与や、I L - 1 2 と I L - 1 8 との組合せ投与が、現在知られている。I L - 1 2 と I L - 1 8 との生体内投与は様々な細胞に作用して I F N - の産生を誘導し、産生された I F N - は細胞内寄生性病原体の感染防御作用や抗アレルギー作用を発揮する。しかし、I L - 1 2 と I L - 1 8 との組合せ投与は、過剰な I F N - の産生を誘導するため、これによる過度の炎症反応を惹起することで、肝臓毒等の副作用が強く、実際の治療には不適切である。

【0044】

ナイーブ C D 4 + T 細胞から T h 2 細胞への分化誘導を抑制すること、誘導された T h 2 細胞からの T h 2 サイトカイン産生を抑制することによって、感染症やアレルギー性疾患といった T h 2 型疾患を治療 / 予防する技術は、有効かつ副作用がないことが大いに期待される。しかし、ナイーブ C D 4 + T 細胞を T h 2 細胞に発達させるに必要な初期 I L - 4 を産生する細胞の性質はまだ知られておらず、自然免疫担当細胞から T h 2 細胞への作用メカニズムは未だ明かされていない。

【0045】

本発明によって、T h 2 型の免疫応答を開始するメカニズムが明らかになった。これにより、ナイーブ C D 4 + T 細胞から T h 2 細胞への分化誘導を抑制するための医薬を得るための手段や、誘導された T h 2 細胞からの T h 2 サイトカイン産生を抑制するための医薬を得るための手段が明らかとなった。

【0046】

本発明は、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法を提供する。上述したように、好塩基球は抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させる。よって、候補物質を存在させることによって、好塩基球における表面提示が抑制または阻害された場合は、その候補物質が、T h 2 型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

【0047】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合する I g E との複合体を形成させる第 1 工程、および該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程を包含し、第 2 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 2 工程後の好塩基球の細胞表面上に提示されている M H C クラス I I 分子または C D 8 0 分

10

20

30

40

50

子の量を測定することを包含することを特徴としている。好塩基球の細胞表面上に提示されているMHCクラスII分子またはCD80分子の量は、これらのタンパク質に対する抗体を用いれば、容易に測定され得る。

【0048】

また、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともにIL-4を産生し、ナイーブT細胞は、そのIL-4存在下で好塩基球の表面に提示されたMHCクラスII分子/抗原ペプチド複合体を認識し、Th2細胞に誘導される。よって、候補物質を存在させることによって、Th2細胞の誘導が抑制または阻害された場合は、その候補物質が、Th2型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

【0049】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、およびナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程を包含し、第2工程または第3工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第3工程において誘導されたTh2細胞の量を測定することを包含することを特徴としている。誘導されたTh2細胞の量は、表面マーカーを用いたフローサイトメトリーなどによって、容易に測定され得る。

【0050】

さらに、好塩基球が抗原を取り込んで断片化し、表面に提示させるとともにIL-4を産生し、ナイーブT細胞が、そのIL-4存在下で好塩基球の表面に提示された複合体を認識し、Th2細胞に誘導され、Th2細胞が誘導されると、B細胞は、Th2細胞の作用を受けて、抗原に対するIgEを産生する。よって、候補物質を存在させることによって、IgEの産生が抑制または阻害された場合は、その候補物質が、Th2型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

【0051】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、ならびにB細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh2細胞とともに培養してIgEを生成する第4工程を包含し、第2工程～第4工程の少なくとも1工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第4工程において生成されたIgEの量を測定することを包含することを特徴としている。IgEの量は、抗IgE抗体などによって、容易に測定され得る。

【0052】

なお、上記実施形態において測定されるIgEはいわゆる初期IgEである。上述したように、本発明は二次的IgEを生成する方法もまた提供している。よって、候補物質を存在させることによって、二次的IgEの産生が抑制または阻害された場合は、その候補物質が、Th2型疾患に対する治療に有効であると判定し得る。

【0053】

すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体を形成させる第1工程、該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第2工程、ナイーブT細胞を、第2工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第3工程、B細胞を、該抗原およびプロフェッショナル抗原提示細胞の存在下で、第3工程において誘導されたTh2細胞とともに培養してIgEを生成する第4工程、ならびに第4工程にて生成されたIgEの存在下で、該抗原、該Th2細胞およびB細胞を培養する第5工程を包含し、第2工程～第5工程の少なくとも1工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第5工程において生成されたIgEの量を測定することを包含することを特徴としている。

【0054】

後述するTh2型疾患のモデル動物を用いて、疾患に対する改善効果の有無を測定すれ

10

20

30

40

50

ば、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングし得ることを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。すなわち、一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、Th2型疾患に対する治療剤をスクリーニングするために、好塩基球を、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体の存在下で培養する工程、該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を動物に投与してモデル動物を作製する工程、該モデル動物に候補物質を投与する工程、および該候補物質を投与した後のモデル動物における、Th2型疾患に対する改善効果の有無を測定する工程を包含することを特徴としている。

【0055】

上述したように、本発明に係る組成物は、Th2型疾患のモデル動物を作製する方法に利用可能である。すなわち、本発明に係るモデル動物作製方法は、Th2型疾患のモデル動物を作製するために、好塩基球を、抗原と該抗原に結合するIgEとの複合体の存在下で培養する工程、および該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を、動物に投与する工程を包含することを特徴としている。なお、上記Th2型疾患は、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択されることが好ましい。本発明に係る作製方法によって作製されるモデル動物は、気管支喘息のモデル動物であってもよく、この場合、上記複合体の存在下での培養後の好塩基球を経鼻投与することが好ましい。

10

【0056】

本発明に係るモデル動物の作製方法は、アジュバントを必要としない。Th2型疾患について、これまで多くのモデル動物が作製されているが、アジュバントを用いることなく作製された例はない。

20

【0057】

〔2：抗原-IgE複合体およびその利用〕

上述したように、今回、本発明者らは、好塩基球によるTh2応答の誘導を見出した。これと同時に、抗原-IgE複合体を正常なマウスに移入することによって同様のTh2応答が誘導されることを見出した。具体的には、後述する実施例に示すように、DNP-OVA/抗DNP IgE複合体とともに培養した好塩基球を用いて免疫したマウスの脾臓において、Th2細胞が迅速に誘導される。また、DNP-OVA/抗DNP IgE複合体を注入したナイーブマウスでは、末梢血、脾臓、骨髄において初期IL-4の産生が誘導され、IgE複合体を注入されたマウスの脾臓において、Th2細胞が迅速に誘導される。一方、DNP-OVA/抗DNP IgE複合体を注入した好塩基球枯渇マウス(MAR-1処理マウス)の脾臓においてはTh2細胞が誘導されない。これらのことは、好塩基球が初期IL-4を産生し、次いでTh2応答を誘導するというだけでなく、抗原と該抗原に結合するIgEとからなる複合体が、好塩基球による初期IL-4産生についての初期刺激物質であることを示している。より詳細には、本発明者らによる上記新規知見は、好塩基球によるTh2応答の誘導であるとともに、IgEとその抗原との複合体によるTh2応答の誘導でもある。このように、本発明は、当業者に容易に予測し得ない新規知見に基づいて完成された。

30

【0058】

すなわち、本発明は、抗原と該抗原に結合するIgEとからなる複合体を提供する。本発明に係る複合体を用いれば、好塩基球から初期IL-4を産生させることができ、その結果、ナイーブT細胞をTh2細胞に誘導すること、二次的IL-4を生成させること、抗原に対するIgEを生成させることができる。さらに、本発明に係る複合体を用いれば、Th2疾患治療剤のスクリーニング、およびTh2型疾患モデル動物の作製が可能になる。

40

【0059】

一般に、抗原とその抗体とからなる免疫複合体は、大量の抗体が存在する条件下において形成され得るので、生体内では血中濃度が非常に高いIgGまたはIgMについて観察され得る。IgEは、免疫グロブリンの一種とはいえ、IgGおよびIgMと比較すると、その血中濃度は極めて低い。よって、生体内にて抗原と結合するIgEは、そのFc領

50

域を介して好塩基球または肥満細胞とすでに結合している。すなわち、生体内では抗原 - I g E 複合体が血中に存在するのではなく、抗原 - I g E - 細胞の複合体として存在し、抗原 - I g E - 細胞の複合体がアレルギー反応に関与すると考えられている。

【 0 0 6 0 】

本発明に係る複合体は、抗原と該抗原に結合する I g E とからなり、その I g E の F c 領域は細胞（例えば、好塩基球および肥満細胞）に結合していない。この観点から、本発明に係る複合体は遊離複合体ともいえる。

【 0 0 6 1 】

このように、I g E とその抗原とからなる複合体は当該分野において認識されていない。さらには、そのような複合体が、好塩基球からの初期 I L - 4 の産生を担っているとい

10

【 0 0 6 2 】

なお、上述したように、好塩基球に取り込ませるべき抗原 - I g E 複合体の形成を促進するために、抗原はハプテンが連結されていてもよい。この場合、I g E は抗ハプテン I g E であり得、本明細書中で使用される場合、抗ハプテン I g E もまた、抗原に結合する I g E の範疇に含まれる。

【 0 0 6 3 】

さらに、本発明は、上記遊離複合体を形成させるための組成物およびキットを提供する。本発明に係る組成物およびキットは、上記遊離複合体を形成させることができるので、好塩基球から初期 I L - 4 を産生させることができ、その結果、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導すること、二次的 I L - 4 を生成させること、抗原に対する I g E を生成させることができる。さらに、本発明に係る組成物およびキットを用いれば、T h 2 疾患治療剤のスクリーニング、および T h 2 型疾患モデル動物の作製が可能になる。

20

【 0 0 6 4 】

すなわち、本発明に係る組成物およびキットは、好塩基球から初期 I L - 4 を産生させるための組成物およびキットであり得、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導するための組成物およびキットであり得、二次的 I L - 4 を生成させるための組成物およびキットであり得、抗原に対する I g E を生成させるための組成物およびキットであり得、T h 2 疾患治療剤をスクリーニングするための組成物およびキットであり得、そして T h 2 型疾患モデル動物を作製するための組成物およびキットであり得る。

30

【 0 0 6 5 】

本発明に係る組成物は、抗原および該抗原に結合する I g E を含有していることを特徴としている。抗原と該抗原に結合する I g E とからなる複合体を形成させることを目的としているので、本発明に係る組成物は、I g E の F c 領域と結合し得る細胞（例えば、好塩基球）を含有していないことが好ましい。本発明に係る組成物に含有されている抗原および I g E は複合体化していてもしていなくてもよい。複合体化していない状態であっても、組成物という限定された空間内に両者を存在させた状態で生体へ提供された際に、組成物中の I g E が生体内の細胞と結合する前に組成物中の抗原と結合する機会が非常に高く、その結果、本発明の効果が有意に導かれ得る。なお、本発明に係る組成物は、抗原と該抗原に結合する I g E とを独立して備えているキット形態であってもよく、限定された空間内に両者を存在させた状態で生体へ提供されればよい。すなわち、本発明に係る組成物は、生体内で I g E - 細胞の結合が生じるよりも前に抗原 - I g E 複合体を生じさせることができる態様であればよいといえる。

40

【 0 0 6 6 】

本発明に係るキットは、抗原、該抗原に結合する I g E および好塩基球を備えていることを特徴としている。なお、上記遊離複合体を形成させることを目的としているので、本発明に係るキットにおいて、I g E と細胞とが独立して備えられていればよく、抗原、該抗原に結合する I g E および好塩基球が独立して備えられている態様であっても、抗原および該抗原に結合する I g E を含有している組成物と好塩基球とが独立して備えられている態様であってもよい。なお、本発明に係るキットもまた、抗原と該抗原に結合する I g E

50

とを、限定された空間内に両者を存在させた状態で生体へ提供し得るものであればよく、生体内でI g E - 細胞の結合が生じるよりも前に抗原 - I g E 複合体を生じさせることができる態様であればよいといえる。

【0067】

なお、上記「好塩基球およびその利用」における記載に基づけば、本発明に係る遊離複合体（抗原 - I g E 複合体）を用いた、ナイーブT細胞をTh 2細胞に誘導する方法、IL - 4を生成させる方法、I g Eを生成させる方法、Th 2疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法、およびTh 2型疾患のモデル動物を作製する方法を実施し得るということを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解し得る。

【0068】

〔3：さらなる利用〕

上述したように、本発明者らは、内因性の好塩基球による抗原提示が初期Th 2応答の誘導に非常に重要であるということを示した。さらに、生体内の好塩基球を枯渇させることによりTh 2細胞の誘導が阻害されることも実証した。すなわち、本発明は、Th 2型疾患を処置する技術を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「処置」は、症状の軽減または排除が意図され、予防的（発症前）または治療的（発症後）に行われ得るもののいずれもが包含される。「Th 2型疾患を処置する」とは、Th 2細胞誘導を抑制または阻止することが意図される。Th 2細胞の誘導は、Th 2型疾患における症状の緩和が生じる程度まで抑制されることが好ましく、Th 2型疾患における症状が消滅する（すなわち疾患が治癒する）程度までTh 2細胞の誘導が抑制されることがより好ましい。

【0069】

本発明は、Th 2型疾患を処置するための組成物を提供する。上述したように、被験体から好塩基球を枯渇させることによってTh 2型疾患を処置することができる。すなわち、本発明に係る組成物は、好塩基球を枯渇させる物質を含んでいればよいといえる。このような物質としては、Fc R 1に対する抗体が好ましい。また、Fc R 1に対する抗体は、Fc R 1の機能を阻害する（例えば、Fc R 1による結合を阻害する）物質であるといえる。すなわち、本発明に係る組成物は、Fc R 1の機能を阻害する物質を含んでいてもよいといえる。本発明に係る組成物の形態は、血中または末梢組織にて好塩基球を枯渇し得る形態、すなわち、注入可能な形態であることが好ましいがこれに限定されない。なお、本発明に係る組成物は、上述したようなキット形態で提供されてもよい。すなわち、本発明は、Th 2型疾患を処置するためのキットを提供する。組成物の態様であってもキットの態様であっても、当業者は、本発明における有効成分以外の成分を、適宜選択し得る。

【0070】

本発明はまた、Th 2型疾患を処置する方法を提供する。本発明に係る方法は、上述した組成物を用いる方法であり得、すなわち、被験体から好塩基球を枯渇させる工程、または被験体にFc R 1の機能を阻害する物質を投与する工程を包含すればよいといえる。本発明に係る方法もまた、予防的に用いられても治療的に用いられてもよい。また、投与形態や投与経路についても特に限定されない。

【0071】

本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【0072】

また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

【実施例】

【0073】

〔1．材料および方法〕

〔マウス〕

BALB/cマウスをJackson Laboratoryから購入した。OVA<sub>323-339</sub> (DO11.10)を認識するTCRについてのトランスジェニックマウス、およびBALB/c G4ホモ接合性(IL-4欠損)マウスを、兵庫医科大学の動物施設にてSPF条件下で交配させた。全ての動物実験を、the Institutional Animal Care Committee of Hyogo College of Medicineのガイドラインに従って行った。

【0074】

〔細胞精製〕

以前の報告(Kondo, Y. et al. Int Immunol 20, 791-800 (2008)およびYoshimoto, T. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 13962-6 (1999))に従って、マウス骨髄由来の好塩基球および肥満細胞を調製した。精製した集団の純度は96%を超えた。ヒト好塩基球およびマウスCD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>休止T細胞についてのさらなる情報および精製については後述する。

10

【0075】

〔インビトロでの培養〕

DO11.10マウスからのナイーブ脾臓CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞(1×10<sup>5</sup>個/mL)を、5×10<sup>5</sup>個/mLの慣用的なAPC(照射されたT細胞枯渇BALB/c脾細胞)、照射された脾臓樹状細胞、照射された精製好塩基球または精製肥満細胞の存在下にて、IL-2(100pM)、IL-3(20U/mL)およびOVA<sub>323-339</sub>(1μM)またはDNP-OVA(6.25~100μg/mL)で、48ウェルプレート中で7日間刺激した。Th2細胞の誘導のために、IL-4(1000U/mL)を培養物にさらに添加した。プライム開始後に、細胞を洗浄し、PMA(50ng/mL)およびイオノマイシン(500ng/mL)とともにさらに4時間培養し、サイトゾルのIL-4およびIFN- $\gamma$ についてFACS解析を行った。いくつかの実験において、プライム開始後に、CD4<sup>+</sup>T細胞(1×10<sup>5</sup>個/0.2mLウェル)を、照射した慣用的なAPC(1×10<sup>5</sup>個)の存在下にて、IL-2(100pM)、OVA<sub>323-339</sub>(1μM)で、96ウェルプレート中で48時間再度刺激した。上清を回収し、サイトカイン産生についてELISA kits (R&D Systems)またはBio-Plex system (BioRad)によって試験した。

20

【0076】

〔寄生虫〕

BALB/cマウスに*S. venezuelensis*の3期幼虫(5000匹)を皮下摂取して完全な感染を開始させた。

30

【0077】

〔統計〕

データは、平均±SEMとして示した。2つの実験群の統計学的比較を、GraphPad Instat Softwareによって実施した対応スチューデントt検定によって決定した。P値(<0.05)を顕著に差異があるとみなした。

【0078】

〔抗体および試薬〕

抗マウスIL-4(11B11)を、本発明者らの研究室にて精製した。PE-抗マウスCD4、FITC-抗マウスCD62L、FITC-抗マウスI-A<sup>d</sup>、FITC-抗マウスCD40、FITC-抗マウスCD80、FITC-抗マウスCD86、FITC-抗マウスCD11c、PE-抗マウスc-kit、FITC-抗マウスc-kit、FITC-抗マウスDX5、FITC-抗ヒトHLA-DR、およびAPC-抗ヒトCD203aを、BD Biosciencesから購入した。FITC-抗マウスT1/ST2(DJ8)、ビオチン抗マウスFc $\gamma$ 1(MAR1)、ストレプトアビジンPE、およびストレプトアビジンAPCを、eBioscienceから購入した。以下の、PE標識化抗ヒトmAbを、BD Biosciencesから購入した：抗CD3、抗CD7、抗CD14、抗CD15、抗CD16、抗CD19、抗CD36、抗CD45RAおよび抗CD235a。リコンビナントマウスIL-2、IL-3、IL-4およびヒトIL-3を、R&D Systemsから購入した

40

50

。IL-18をMBLから購入した。リコンビナントヒトIL-33を、本発明者らの研究室にて精製した。抗DNP IgE mAb、OVA(クレードV)、Salmonella minnesota Re-595またはE.coli 055:B5からのLPS、およびStaphylococcus aureusからのPGNを、Sigmaから購入した。OVA-DNPを、Eisen, H. N. et al. J Immunol 73, 296-308 (1954)の方法に従って調製した。

#### 【0079】

〔フローサイトメトリーおよび細胞精製〕

骨髄由来の好塩基球を調製するために、骨髄細胞を、10%FBS、2-ME(50μM)、L-グルタミン(2mM)、ペニシリン(100U/mL)およびストレプトマイシン(100μg/mL)を補充したRPMI1640中でIL-3(10U/mL)とともに14日間培養し、2回洗浄した。細胞を、先ず、抗FcγRII/III(10μg/mL)を用いて、4度で30分間刺激し、ビオチン抗マウスFcγR1(5μg/mL)を用いて、染色緩衝液(PBS、1%FBS)中にて4℃で1時間処理した。2回洗浄した後、細胞を、ストレプトアビジンAPCおよびPE-抗マウスc-kitで30分間染色した。サンプルを、FACS Calibur (BD Biosciences)で解析し、蛍光セルソーター(FACS Aria; BD Biosciences)によってFcγR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞(好塩基球)とFcγR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞(肥満細胞)とに分離した。各集団の残りを、表面マーカーの分析のためにFITC標識化抗体でさらに染色した。脾臓好塩基球の調製のために、BALB/cマウスからの脾細胞を、先ず、MACS system (MiltenyiBiotec)によってThy1.2<sup>+</sup>T細胞およびB220<sup>+</sup>細胞を枯渇させ、次いで、残りの細胞をさらに染色し、FACS AriaによってFcγR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞とFcγR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞とに分離した。各集団の純度は96%を超えた。脾臓CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>休止T細胞の調製のため、および細胞内サイトカイン染色のために、以下の手順を行った。

10

20

#### 【0080】

インフォームドコンセントの後に、正常ボランティアからのヒト末梢血、および臨月の正常人の臍帯血を取得し、プロセスした。研究所の倫理委員会は、この実験プランを承認している。Ficoll密度勾配遠心分離によって、末梢血および臍帯血から単核細胞を単離した。末梢血の単核細胞について、CD3、CD7、CD14、CD15、CD16、CD19、CD36、CD45RAおよびCD235aに対する、PE標識した抗ヒトモノクローナル抗体のカクテル、ならびに抗PEマイクロビーズ(MiltenyiBiotec)を用いて、T細胞、単球、好酸球、ナチュラルキラー細胞、B細胞、血小板、樹状細胞および赤血球をさらに枯渇させた。マイクロビーズを用いて、臍帯血の単核細胞をさらにCD34<sup>+</sup>細胞に富化させた。これらのCD34<sup>+</sup>前駆細胞を、5×10<sup>5</sup>個/mLの細胞密度で、12ウェルプレートに播種し、10%FBS、2-ME(50μM)、L-グルタミン(0.5mM)、ペニシリン(50U/mL)およびストレプトマイシン(50μg/mL)ならびにヒトIL-3(10ng/mL)を補充したSTEM PRO-34 SFM medium (GIBCO)中で7日間培養した。

30

#### 【0081】

〔電子顕微鏡〕

ソートした、マウス骨髄由来細胞(FcγR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞およびFcγR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>細胞)およびヒト細胞(CD203c<sup>+</sup>HLA-DR細胞)を、2%パラホルムアルデヒドおよび1.25%グルタルアルデヒドで固定し、1%OsO<sub>4</sub>で後固定し、Epon中に包埋した。超薄切片を、ウラニル酢酸およびクエン酸鉛で二重染色し、JEM 1220 transmission electron microscopy (JEOL)で観察した。

40

#### 【0082】

〔増殖アッセイ〕

DO11.10マウスからのナイーブ脾細胞CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞(5×10<sup>4</sup>個/0.2mLウェル)を、2.5×10<sup>5</sup>個/mLの慣用的なAPCまたは精製された好塩基球の存在下にて、DNP IgEに対するモノクローナル抗体(10μg/mL)

50

の存在下または非存在下にて、IL - 2 ( 1 0 0 p M )、IL - 3 ( 2 0 U / m L ) および O V A <sub>3 2 3 - 3 3 9</sub> ( 1 μ M ) または D N P - O V A ( 6 . 2 5 ~ 1 0 0 μ g / m L ) で、9 6 ウェルプレート中において4日間刺激した。最後の16時間の間、DNA合成を、1 μ C i の [ <sup>3</sup> H ] チミジンの添加によって測定した。

#### 【 0 0 8 3 】

〔 E L I S A アッセイ 〕

O V A 特異的血清 I g E を、Mouse OVA-IgE ELISA kit (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) によって測定した。O V A 特異的血清 I g G 1 を、Mouse OVA-IgG1 ELISA kit (AKRIE-04, Shibayagi) によって測定した。

#### 【 0 0 8 4 】

〔 マウスのインビボ処理 〕

骨髄由来のまたは F A C S ソートした、好塩基球および肥満細胞 ( 各  $5 \times 10^5$  個 / m L ) を、IL - 3 ( 2 0 U / m L )、D N P - O V A ( 1 0 0 μ g / m L ) および抗 D N P I g E m A b ( 1 0 μ g / m L ) とともに、4 8 ウェルプレート中で16時間培養した。プライムした後、好塩基球または肥満細胞 (  $2.5 \sim 5 \times 10^5$  個 / マウス ) を、尾静脈を介して B A L B / c マウスに移した ( 1 群あたり 5 匹 )。再構築の4日後または1週間後に、マウスを、P B S 中の O V A タンパク質 ( 1 0 0 μ g ) で、静脈内にチャレンジした。いくつかの実験において、B A L B / c マウス ( 1 群あたり 5 匹 ) について、D N P - O V A ( 1 0 0 μ g / マウス ) および抗 D N P I g E m A b ( 2 0 0 μ g / マウス ) の混合物を、静脈内注入した。注入後、IL - 4 のレポーターとしての G F P の発現を、F A C S を用いて経時的に測定することによって、好塩基球における IL - 4 の発現を測定した。好塩基球のインビボ枯渇については、D e n z e l らの方法に従った。 $5 \mu g$  の抗マウス F c R 1 ( M A R - 1 ) またはコントロールハムスター I g G ( e B i o s c i e n c e ) を、腹腔内投与にて1日2回で3日間注入した。マウスを2日間休息させて、次いで、D N P - O V A および抗 D N P I g E m A b の混合物をマウスに注入し、続いて、これらのマウスに M A R - 1 またはハムスター I g G を1日2回でさらに3日間注入した。D N P - O V A および抗 D N P I g E の注入の4日後に、脾臓 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞 (  $1 \times 10^5$  細胞 / 0 . 2 m L ウェル ) を、照射した慣用的な A P C (  $1 \times 10^5$  個 ) の存在下で、IL - 2 ( 1 0 0 p M )、O V A ( 1 0 0 μ g / m L ) で、9 6 ウェルプレート中にて5日間刺激した。脾臓 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を、P V A でパルスした A P C で5日間刺激した。

#### 【 0 0 8 5 】

〔 T L R m R N A の発現解析 〕

ソートした好塩基球および肥満細胞から、T r i z o l 試薬を用いて総 R N A を抽出し、D N a s e I で処理し、Superscript II RT および oligo ( d T ) <sub>12-18</sub> primer (Invitrogen) を用いて逆転写した。全ての T L R のポジティブコントロールとして、総脾臓細胞から抽出した R N A を用いた。T L R m R N A の発現解析のために、m R N A を、標準的な R T - P C R 増幅手順を改変して用いることにより、増幅した。特異的 T L R プライマー配列およびそれぞれのアニーリング温度を設計した。c D N A を、1 サイクルあたり、9 5 ° C で 3 0 秒間、5 5 ° C で 3 0 秒間、7 2 ° C で 3 0 秒間、さらに 7 2 ° C で 1 0 分間伸長させ、3 5 サイクル増幅した。3 5 サイクルの後、分析するまでサンプルを 4 ° C で保存した。増幅後に、P C R 産物を、1 . 7 % アガロースゲルにて電気泳動し、U V 光照射によって可視化した。

#### 【 0 0 8 6 】

〔 2 . 結果および考察 〕

本発明者らは、今回、IL - 4 の産生、およびナイーブ C D 4 <sup>+</sup> 細胞への M H C クラス II / ペプチド複合体の提示によって、インビトロおよびインビボでの T h 2 / I g E 応答に対する好塩基球の寄与を示した。

#### 【 0 0 8 7 】

先ず、T h 2 サイトカインを産生し、インビトロでナイーブ C D 4 <sup>+</sup> T 細胞が T h 2 細

10

20

30

40

50

胞に発達することについての、脾臓好塩基球の能力を試験した。ナイーブマウスからの非 T 細胞機能および非 B 細胞機能は、0.20%の Fc R1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞を含んでいたが、*Strongyloides venezuelensis* (*S. venezuelensis*) が感染したマウスでは、寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) が感染したマウスでの報告と同様に、この割合が顕著に増加していた (5.84%; 図 1 (a))。Fc R1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞 (好塩基球) を、ナイーブマウスおよび感染マウスの脾臓から精製した。IL-3 存在下で 24 時間培養した、感染マウスからの脾臓好塩基球は、多量の IL-4、IL-6 および IL-13 を産生したが、IL-12 を産生しなかった。一方、ナイーブマウスからの脾臓好塩基球は、IL-3 に応答して少量の IL-4、IL-6 および IL-13 を産生した。これらのことは、感染マウスの脾臓好塩基球は、IL-2 を含む培養において IL-4、IL-6 および IL-13 を強く産生する能力を獲得したということを示唆する (図 1 (b))。

10

## 【0088】

OVA 特異的ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞から Th2 細胞への発達を誘導する、感染マウスからの好塩基球の能力を、OVA ペプチド (OVA<sub>323-339</sub>)、IL-2 および IL-3 の存在下で試験した。また、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を慣用的な APC (T 細胞枯渇脾臓細胞) とともに、OVA<sub>323-339</sub> および IL-2 の存在下で培養した。*S. venezuelensis* 感染マウスからの脾臓好塩基球は、IL-4 非存在下でナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞から Th2 細胞への発達を誘導する著しい能力を有していた (図 1 (c))。対照的に、他でも報告されているように、慣用的な APC は Th0 条件 (OVA<sub>323-339</sub> および IL-2 のみ) の下では Th2 細胞の発達を誘導しなかった (図 1 (c))。発達した Th2 細胞は、Th2 マーカーである IL-33R を発現し (図 1 (d))、OVA チャレンジの際に Th2 サイトカインを産生し、抗原および IL-33 でのチャレンジの際に IL-4 以外の産生をさらに増加させた。

20

## 【0089】

脾臓好塩基球への DC の潜在的な夾雑を避けるために、高度に精製した骨髓好塩基球の、インビトロでの Th2 細胞の発達を誘導する能力を試験した (図 6 (a), 図 6 (b))。まず、MHC クラス II 分子および刺激補助分子 CD80 および CD86 の発現を試験した。さらに、肥満細胞および慣用的な APC によるこれらの発現を同時に試験した (図 2 (a))。骨髓由来の好塩基球および慣用的な APC は、クラス II 分子、CD80 および CD86 を明らかに発現したが、CD11c を発現しなかった。対照的に、肥満細胞は、これらの分子をごく軽度にしに発現しなかった (図 2 (a)、図 2 (b))。脾臓好塩基球は、CD62L (リンパ節ホーミング分子) を発現する。このことは、リンパ組織への侵入について優位であることが示唆される。臍帯血または末梢血由来のヒト好塩基球 (CD203c<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>) はまた、HLA-DR を発現している (図 2 (c)、図 6 (c)、図 6 (d))。

30

## 【0090】

予期したように、*S. venezuelensis* 感染マウスからの脾臓好塩基球と同様に、骨髓由来の好塩基球は、プロフェッショナル APC が完全に非存在であっても、Th0 条件 (OVA<sub>323-339</sub>、IL-2 および IL-3 の存在、かつ IL-4 非存在) の下でナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞から Th2 細胞への発達を誘導する能力を有している (20.7%) (図 3 (a))。

40

## 【0091】

どのように好塩基球が Th2 細胞の発達を誘導しているのかについてのメカニズムを調べた。ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を OVA<sub>323-339</sub>、慣用的な APC (T 脾臓)、IL-2 および IL-4 (Th2 条件下) で刺激した場合に、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞は Th2 細胞に発達した (19.1%) (図 3 (a))。同様に、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を OVA<sub>323-339</sub>、肥満細胞、IL-2、IL-3 および IL-4 (Th2 条件下) で刺激した場合に、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞は Th2 細胞に発達した (17.2%) (図 3 (a))。対照的に、さらなる IL-4 刺激 (Th2 条件下) は、この好塩基球依存

50

的Th2細胞の発達を中程度にのみ増強した(25.2%;図3(a))。さらに、IL-4枯渇マウスからの好塩基球は、このTh2発達がほぼ完全に排除され(3.1%)、野生型好塩基球は、Th0条件下で、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞をTh2細胞へ誘導したが、プロフェッショナルAPCは誘導しなかった(図3(b))。これらの結果は、好塩基球がIL-4を産生し、OVAペプチドを提示することを示すとともに、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞からTh2細胞への発達を誘導することを示す。

#### 【0092】

次いで、DNP-複合体化OVA(DNP-OVA)を抗原としてOVAペプチド(OVA<sub>323-339</sub>)の代わりに用いた。IL-3およびDNP-OVAの存在下でありかつIL-4の非存在下にて、OVA特異的ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞を好塩基球とともに培養することによって、OVA特異的Th2細胞を誘導し得た(図3(c))。これらの結果は、好塩基球がネイティブなOVAを取り込み、OVA<sub>323-339</sub>にプロセスし、MHCクラスIIと共同してペプチドフラグメントを提示し、IL-4を産生する能力を有していることを示唆する。次いで、抗DNP-IgEモノクローナル抗体の添加が、好塩基球のAPC能を上方制御するか否かを試験した(図3(d))。OVA特異的ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞を、100μg/ml、25μg/mlあるいは6.2μg/mlのDNP-結合OVAの存在下、かつ10μg/mlの抗DNP-IgEモノクローナル抗体の存在下で、好塩基球とともに7日間培養した。培養終了後、細胞を良く洗浄して、PMA+ionomycin存在下で4時間培養後、細胞質内のIL-4とIFN- $\gamma$ の発現をFACSで測定した。数字は、CD4<sup>+</sup>T細胞の中で細胞質内にIL-4あるいはIFN- $\gamma$ を有する細胞の割合である。低用量(6.2μg/ml)のDNP-OVAでパルスした好塩基球は、Th2細胞を中程度に誘導した(3.2%)。一方、高用量(100μg/ml)のDNP-OVAでパルスした好塩基球は、Th2細胞を顕著に誘導した(11.3%)。抗DNP-IgEモノクローナル抗体の添加は、Th2細胞を顕著に誘導した(抗IgEなしの場合の3.2%、4.2%、11.3%に対して、抗IgEありの場合の10.5%、12.5%、16.8%;図3(d))。よって、好塩基球誘導性のTh2発達に対する抗DNP-IgEモノクローナル抗体の増強効果は、最低濃度のDNP-OVAで好塩基球をパルスした場合に明らかである。さらに、プロフェッショナルAPCと比較して、少数の好塩基球が、抗DNP-IgEモノクローナル抗体を用いたTh2条件下でナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞からTh2細胞への発達を誘導する(図3(d))。

#### 【0093】

続いて、抗DNP-IgEモノクローナル抗体が上述した上方制御効果をどのように示したのかを試験した。抗DNP-IgEの存在下にてDNP-OVAでパルスした好塩基球は、特に、好塩基球が低濃度のDNP-OVAでパルスされた場合に、OVA特異的T細胞の増殖を誘導する能力を増加させた(図7)。対照的に、抗DNP-IgE抗体の存在下でパルスされた慣用的なAPCは、T細胞の増殖を誘導する能力を増加させなかった(図7)。さらに、これまでに報告されているように、好塩基球のみが、抗DNP-IgE抗体の存在下でDNP-OVAでパルスされた場合に、IL-4を産生する能力を顕著に増加させた(図8(a),図8(b))。DNP-OVA/抗DNP-IgEでパルスした肥満細胞は、IL-13を産生し得たがIL-4を産生しなかった(図8(b))。さらに、好塩基球のみが、IL-3、およびIL-18、IL-33、PGNまたはLPSで刺激した場合に、IL-4を産生した(図8(c)、図8(d))。

#### 【0094】

OVAでパルスした好塩基球がTh2応答をインビボで誘導し得るのか否かを試験するために、DNP-OVA/抗DNP-IgEとともに培養することによって、OVAペプチドでの強力なパルス为好塩基球に試みた。また、この抗原/抗体複合体で肥満細胞を同時に処理した。次いで、これらの好塩基球または肥満細胞を、尾静脈を介して正常マウスに移した。4日後、PBSに溶解したインタクトなOVAタンパク質を用いてマウスをチャレンジした。チャレンジの2日後、脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞を調製し、OVAでパルスした

10

20

30

40

50

A P C ( T 脾臓 ) でこれらの細胞を刺激し、培養上清中の I L - 4、I L - 13 および I F N - の含有量を測定した。この脾臓において、O V A でパルスした好塩基球のみが、迅速かつ強力に T h 2 細胞を誘導し、T h 1 細胞を中程度に誘導した ( 図 4 ( a ) )。次いで、O V A でパルスした好塩基球で免疫したマウスの、O V A の静脈内チャレンジの際に I g E および I g G 1 を産生する能力を試験した。アジュバントを用いないこの全身性の O V A 投与は、I g E 応答をナイーブなマウスにおいて誘導しなかった。対照的に、O V A でパルスした好塩基球でプライムしたマウスは、O V A チャレンジに应答して I g E および I g G 1 を産生した ( 図 4 ( b ) )。これらのマウスは、脾臓内において CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> IL33R<sup>+</sup> T h 2 細胞を発達させた ( 図 4 ( c ) , 図 4 ( d ) )。C D 6 2 L 分子は T h 2 細胞の再循環に必要なマーカーであるので、O V A でパルスした好塩基球はプロ

10

#### 【 0 0 9 5 】

最後に、内因性の好塩基球による抗原提示がインビボでの初期 T h 2 応答の誘導に非常に重要であるという直接的な証拠を示すために、D N P - O V A / 抗 D N P I g E 複合体をナイーブマウスまたは好塩基球枯渇マウスに注入した。好塩基球を枯渇させるために、D e n z e l らの方法に従って、F c R 1 に対する抗体 ( M A R - 1 ) をマウスに 1 日 2 回で 3 日間の腹腔内投与した。M A R - 1 ( コントロールのハムスター I g G では ない ) の最終投与の 2 日後に、脾臓および肝臓での好塩基球の完全な枯渇を達成した ( 図 9 )。I L - 4 のレポーターとしての G F P の発現を、D N P - O V A ( 1 0 0 μ g ) / 抗 D N P I g E ( 2 0 0 μ g ) の注入から経時的に F A C S を用いて測定することによって、好塩基球における I L - 4 の発現を測定したところ、注入から 1 2 時間後または 2 4 時間後の好塩基球において I L - 4 の顕著な産生が認められた。さらに、注入から 4 日後に、脾臓 C D 4<sup>+</sup> T 細胞を調製し、O V A パルスした A P C でこれらの細胞を刺激し、培養上清中の I L - 4、I L - 13 および I F N - の含有量を測定した。D N P - O V A / 抗 D N P I g E 複合体を、好塩基球枯渇マウスではなくナイーブマウスに注入した場合に、脾臓にて T h 2 細胞が迅速に誘導されることを見出した ( 図 4 ( c ) )。

20

#### 【 0 0 9 6 】

独特なプロフェッショナル A P C が、T h 2 細胞をインビトロおよびインビボの両方で優先的に誘導することを実証した。慣用的な A P C と同様に、好塩基球は M H C クラス I I、C D 8 0 および C D 8 6 を発現し、抗原タンパク質の取り込みおよびプロセッシングを行い、ペプチドを M N H C クラス I I とともに発現する ( 図 2 ( a )、図 3 )。対照的に、肥満細胞はこれらの分子の発現が極めて軽度である ( 図 2 ( a ) )。さらに、O V A ペプチドで強くパルスした好塩基球は、ナイーブ C D 4<sup>+</sup> T 細胞から T h 2 細胞への発達を強く誘導し、O V A でパルスした肥満細胞は、ナイーブ C D 4<sup>+</sup> T 細胞から T h 2 細胞への発達を誘導しなかった。このことは、インビボでの T h 2 応答の誘導に大きな差異があることを示唆する ( 図 4 ( a ) )。これまでに報告されているように、T h 2 細胞は、脾臓およびリンパ節での好塩基球の数を顕著に増加させ、好塩基球のレベルと T h 2 細胞のレベルとの間でポジティブフィードバック制御があるようである。

30

40

#### 【 0 0 9 7 】

従って、好塩基球の下方制御は、T h 2 / I g E 応答の制御的処置に重要なストラテジーである。I g E はまた、重要な標的分子である。なぜなら、I g E は好塩基球と T h 2 細胞との間のポジティブフィードバック制御を開始させるからである。好塩基球は、一般に、I L - 4 を生成し、抗原を、実際の抗原提示を行う樹状細胞に移すだけの細胞であると認識されている。好塩基球自身による潜在的 A P C 機能の認識は、単一のアレルゲンに対する陽性反応を有する患者が同一の抗原によりどのようにして強く陽性になるのか、どのように複数のアレルゲンに対する陽性反応を発達させるのかについてのメカニズムを理解するために重要と思われる。ポリクローナル抗体で感作された好塩基球が対応アレルゲンを取り込み、複数の T 細胞エピトープを提示することによって複数の T h 2 細胞クロー

50

ンを誘導することが予想された。ヒト臍帯血細胞も、IL-3含有培地中で増殖させた後にヒトに輸血されると、好塩基球がコン有しており、これらがMHCクラスII分子を発現するため、臍帯血細胞輸血を受けた患者においてTh2/IgE応答が誘導される危険性があることを示唆する。

【0098】

以上のように、好塩基球がTh2優位な免疫応答を誘導する抗原提示細胞であることを、本発明において示した。また、好塩基球を種々の方法で制御することでアレルギー疾患を制御し得る可能性を示した。

【0099】

本発明者らは、好塩基球がMHCクラスII分子およびCD80/86を発現しており、種々の刺激の下でIL-4を産生することを示した。このことは、プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)の非存在下でのナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞からTh2細胞への発達を、好塩基球が誘導することを示唆する。

10

【0100】

好塩基球、OVAペプチドまたはDNP-OVAとともに、IL-3存在下でIL-4非存在下にて培養したオブアルブミン(OVA)特異的ナイーブCD4<sup>+</sup>細胞が、Th2細胞に発達した。このような好塩基球によるTh2誘導作用はIL-4欠損好塩基球では全く認められなかった。このことは、OVAでパルスされた好塩基球によって放出されたIL-4が、Th2細胞の発達に不可欠であることを示唆する。さらに、DNP-OVAおよび抗DNP-IgEとともに培養した好塩基球は、DNP-OVA単独とともに培養された好塩基球よりも多くOVAを取り込み、より多くプロセッシングするため、DNP-OVA単独とともに培養した好塩基球よりも強力なAPC活性を示した。

20

【0101】

さらに、OVAで強くパルスした好塩基球の静脈内投与は、強くかつ迅速にTh2細胞を誘導したが、OVAでパルスした肥満細胞ではTh2細胞の誘導は起こらなかった。好塩基球によるTh2細胞の誘導に続いて、OVAで刺激されたB細胞はOVA特異的IgE抗体を産生するようになるが、Th2細胞がこの過程を強力に促進している。このことは、好塩基球によるIgE依存的な抗原の取り込みによってTh2/IgE応答のポジティブフィードバックが制御されていることを示唆する。

30

【0102】

〔3. 図面について〕

図1(a)~図1(d)には、寄生虫によって誘導される脾臓好塩基球による抗原提示を示した。図1(a)には、BALB/cマウス、または*S. venezuelensis*の3期幼虫を10日間感染させたBALB/cマウスから、脾臓の非B非T細胞を新鮮に調製し、FCR1およびc-kitの発現を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す。*S. venezuelensis*の感染ありまたはなしのマウスからの脾臓の非B非T細胞を、FACS AriaによってFCR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞にさらに分離した。FCR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞の割合を数字で示した。

【0103】

図1(b)には、図1(a)に示した、ソートした好塩基球(1×10<sup>5</sup>個/0.2 mLウェル)を、IL-3(20 U/mL)とともに96ウェルプレート中で24時間培養し、その上清を回収し、Bio-Plexシステムによってサイトカイン含量を試験した結果を、1群あたり3匹のマウスからの好塩基球の、2回の独立した実験によって得た平均+SEMで示した。

40

【0104】

図1(c)には、DO11.10からのナイーブCD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞(1×10<sup>5</sup>個/mL)を、5×10<sup>5</sup>個/mLの、照射したT細胞枯渇BALB/c脾細胞(T脾臓)、または照射した、*S. venezuelensis*感染マウスからの脾臓好塩基球(寄生虫誘導性好塩基球)(IL-4なし(Th0条件))の存在下にて、IL-2(100 pM)、IL-3(20 U/mL)およびOVA<sub>323-339</sub>(1 μM)で、48ウェルプレ

50

ート中にて7日間刺激し、プライム開始後に、細胞を洗浄し、PMA (50 ng/mL) およびイオノマイシン (500 ng/mL) とともに4時間再度培養し、細胞質IL-4 およびIFN- $\gamma$  についてFACSによって解析した結果を示した。CD4<sup>+</sup>T細胞について、IL-4<sup>+</sup>細胞またはIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞の割合を数字で示した。

#### 【0105】

図1(d)は、図1(c)でフローサイトメトリーによって示した、T脾臓または寄生虫誘導性好塩基球とともに7日間培養したCD4<sup>+</sup>T細胞上のIL-33R鎖の発現を示した。CD4<sup>+</sup>細胞におけるIL-33R鎖<sup>+</sup>細胞の割合を、パーセントで示した。

#### 【0106】

図2(a)~図2(c)には、好塩基球上でのMHCクラスII分子の発現を示した。図2(a)には、骨髓由来の、FACSソートされた、好塩基球および肥満細胞(図6に示す)、ならびにT細胞枯渇脾細胞(T脾臓)を、図中に示した表面マーカーで染色した結果を示した。図中の陰影領域はマーカー染色したものを示し、白抜き領域は未染色のものを示す。

#### 【0107】

図2(b)には、骨髓由来の、FACSソートされた、好塩基球および肥満細胞を、MHCクラスII(I-A)およびFc $\gamma$ R1の発現について、フローサイトメトリーで解析した結果を示した。Fc $\gamma$ R1<sup>+</sup>I-A<sup>+</sup>細胞の割合をパーセントで示した。4回の独立した実験の代表的な結果を示す。

#### 【0108】

図2(c)には、ヒトIL-3(10 ng/mL)とともに7日間培養したCD34<sup>+</sup>臍帯血細胞を、c-kitおよびCD203c(左)、ならびにCD203c<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>である細胞中のHLA-DR(右)の発現について、フローサイトメトリーによって解析した結果を示した。3回の独立した実験の代表的な結果を示す。

#### 【0109】

図3(a)~図3(d)には、骨髓由来の好塩基球による抗原提示の結果を示した。DO11.10マウスからのナイーブ脾臓CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞(1×10<sup>5</sup>個/mL)を、照射したT細胞枯渇BALB/c脾細胞(T脾臓)(5×10<sup>5</sup>個/mL)、照射された、骨髓由来の精製好塩基球(WT;野生型マウス、G4/G4;IL-4欠損マウス)、肥満細胞または脾臓DCの存在下で、48ウェルプレートにて総容量1mLの培地中で7日間刺激した(Th0条件)。刺激には、IL-2(100 pM)、IL-3(20 U/mL)およびOVA<sub>323-339</sub>(1 μM)(図3(a)および図3(b))、DNP-OVA(100 μg/mL)(図3(c))、ならびに抗DNP IgE mAb(10 μg/mL)の存在下または非存在下でのDNP-OVA(6.25~100 μg/mL)(図3(d))を用いた。Th2細胞の誘導のために、IL-4(100 U/mL)を培養物にさらに添加した(Th2条件)。プライム開始後に、細胞を洗浄し、PMA(50 ng/mL)およびイオノマイシン(500 ng/mL)とともに4時間再度培養し、細胞質内のIL-4およびIFN- $\gamma$ の発現をFACSによって解析した。CD4<sup>+</sup>T細胞について、IL-4<sup>+</sup>細胞またはIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞の割合を数字で示した。3回の独立した実験の代表的な結果を示す。

#### 【0110】

図4(a)~図4(i)には、好塩基球に誘導された、インビボでの抗原特異的Th2応答を示した。図4(a)~図4(d)について、骨髓由来の、FACSソートされた好塩基球または肥満細胞(各5×10<sup>5</sup>個/mL)を、IL-3(20 U/mL)、DNP-OVA(100 μg/mL)および抗DNP IgE mAb(10 μg/mL)とともに、48ウェルプレート中にて16時間培養した。プライム後に、好塩基球または肥満細胞を、各2.5×10<sup>5</sup>個/マウスで、BALB/cマウス(1群あたり5匹)に尾静脈を介して移した。移入の4日後(図4(a))または1週間後(図4(b)~図4(d))のマウスを、OVAタンパク質(100 μg/マウス)で静脈内にチャレンジした。

10

20

30

40

50

コントロールマウスに、O V A タンパク質 ( 1 0 0  $\mu$  g ) のみを注入した。チャレンジ ( 0 日目 ) の後、血清を回収し、O V A 特異的 I g E 抗体および I g G 1 抗体を、E L I S A によって決定した ( 図 4 ( b ) ) 。チャレンジの 2 日後 ( 図 4 ( a ) ) または 2 週間後 ( 図 4 ( c ) ) に、各マウスからの脾臓 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞 ( 2  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / 0 . 2 m L ウェル ) を、照射した T 脾臓 ( 2  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / 0 . 2 m L ウェル ) の存在下にて、9 6 ウェルプレート中にて O V A タンパク質 ( 1 0 0  $\mu$  g / m L ) で再度刺激した。

【 0 1 1 1 】

図 4 ( e ) ~ 図 4 ( g ) について、B A L B / c マウス ( 1 群あたり 5 匹 ) に、O V A - D N P および抗 D N P I g E 抗体の混合物 ( 免疫複合体 I . C ) を、図中に示した濃度で注入した。好塩基球の枯渇のために、マウスに 5  $\mu$  g の抗 F c R 1 ( M A R - 1 ) を 1 日 2 回で 3 日連続して、I . C 投与の前後に腹腔内に投与した。I . C 投与の 4 日後に、各マウスからの脾臓 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞 ( 2  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / 0 . 2 m L ウェル ) を、照射した T 脾臓 ( 2  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / 0 . 2 m L ウェル ) の存在下にて、O V A タンパク質 ( 1 0 0  $\mu$  g / m L ) で再度刺激した。インビトロ刺激の 5 日後に、上清を回収し、I L - 4 、 I L - 1 3 および I F N -  $\gamma$  の産生を E L I S A によって試験した ( 図 4 ( a ) 、 図 4 ( c ) 、 図 4 ( f ) 、 図 4 ( g ) ) 。結果は、1 群あたり 5 匹の平均 + S E M であり、2 つの独立した実験の代表例を示す。

10

【 0 1 1 2 】

図 4 ( a ) において、\* \* は、肥満細胞を移し O V A を注入したマウスと比較したスチューデント t 検定での結果が P < 0 . 0 0 0 1 であることを示す。図 4 ( b ) ~ 図 4 ( d ) において、\* は P < 0 . 0 1 であり、† は P < 0 . 0 5 であり、‡ は P < 0 . 0 0 5 であることを示す ( いずれも O V A のみを注入したコントロール群と比較した ) 。図 4 ( b ) において、好塩基球を枯渇させた群と比較したスチューデント t 検定での結果として、\* は P = 0 . 1 9 1 であり、† は P < 0 . 0 0 5 であることを示す。

20

【 0 1 1 3 】

図 4 ( h ) ~ 図 4 ( i ) について、B A L B / c マウス ( 1 群あたり 5 匹 ) に、O V A - D N P および抗 D N P I g E 抗体の混合物 ( I . C ) を図中に示した用量で注入した。I . C 投与の 4 日後のマウスを、O V A タンパク質 ( 1 0 0  $\mu$  g / マウス ) で静脈内にチャレンジし、血清を回収し、O V A 特異的 I g E 抗体および I g G 1 抗体を E L I S A によって決定した。好塩基球の数の枯渇または増加のために、マウスに、抗 F c R 1 ( M A R - 1 ) または I L - 3 を注入した。コントロール群と比較したスチューデント t 検定の結果として、\* は P < 0 . 0 0 1 であり、† は P < 0 . 0 5 であることを示す。

30

【 0 1 1 4 】

図 5 には、好塩基球によって駆動された T h 2 細胞からのサイトカイン産生を示した。D O 1 1 . 1 0 からのナイーブ C D 4 <sup>+</sup> C D 6 2 L <sup>+</sup> T 細胞 ( 1  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / m L ) を、5  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / m L の、照射した T 細胞枯渇 B A L B / c 脾細胞 ( T 脾臓 ) 、または照射した、S . venezuelensis 感染マウスからの脾臓好塩基球 ( 寄生虫誘導性好塩基球 ) ( I L - 4 なし ( T h 0 条件 ) ) の存在下にて、I L - 2 ( 1 0 0 p M ) 、 I L - 3 ( 2 0 U / m L ) および O V A <sub>323-339</sub> ( 1  $\mu$  M ) で、4 8 ウェルプレート中にて 7 日間刺激した。プライム開始後に、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞 ( 1  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / 0 . 2 m L ウェル ) を、照射した T 細胞枯渇 B A L B / c 脾細胞 ( 1  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 ) の存在下で、I L - 3 3 ( 1 0 0 n g / m L ) ありまたはなしで、9 6 ウェルプレート中にて I L - 2 ( 1 0 0 p M ) 、 O V A <sub>323-339</sub> ( 1  $\mu$  M ) で 4 8 時間再度刺激した。上清を回収し、B i o - P l e x システムによってサイトカイン産生を試験した。3 回の独立した実験の代表的な結果を示す。

40

【 0 1 1 5 】

図 6 ( a ) ~ 図 6 ( d ) には、マウス骨髄由来好塩基球およびヒト末梢血好塩基球の精製および免疫学的試験の結果を示した。図 6 ( a ) には、B A L B / c マウスからの骨髄細胞を I L - 3 ( 1 0 U / m L ) とともに 1 0 日間培養し、F c R 1 および c - k i t の発現について、フローサイトメトリーで解析し、次いで、F A C S A r i a によって

50

Fc $\epsilon$ R1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup> (好塩基球) の細胞集団とFc $\epsilon$ R1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> (肥満細胞) の細胞集団とにソートした結果を示した。選別された集団における細胞のパーセントを示した。

【0116】

図6(b)には、ソートしたFc $\epsilon$ R1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup> (好塩基球) およびFc $\epsilon$ R1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> (肥満細胞) の細胞集団を、電子顕微鏡観察した結果を示した。スケールバーは1 $\mu$ mである。

【0117】

図6(c)は、陰性選別によって濃縮したヒト末梢血単核細胞(CD3<sup>-</sup>、CD7<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD15<sup>-</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD36<sup>-</sup>、CD45RA<sup>-</sup>およびCD235a<sup>-</sup>)の、HLA-DRとCD203cの発現を選別後すぐに測定した結果(左)と、ヒトIL-3(10ng/mL)存在下で24時間培養した後のHLA-DRとCD203cの発現を測定した結果(右)である。CD203c<sup>+</sup>細胞に対するHLA-DR<sup>+</sup>細胞の細胞集団のパーセントを示す。

10

【0118】

図6(d)には、ソートしたCD203c<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>細胞集団の、ギムザ染色(左; 100 $\times$ )、電子顕微鏡観察(右)の結果を示した。スケールバーは1 $\mu$ mである。

【0119】

図7には、好酸球誘導性の抗原特異的T細胞増殖を示した。DO11.10マウスからのナイーブ脾臓CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞(5 $\times$ 10<sup>4</sup>個/mL)を、IL-2(100pM)、IL-3(20U/mL)およびOVA<sub>323-339</sub>(1 $\mu$ M)、あるいは抗DNP IgE mAb(10 $\mu$ g/mL)の存在下または非存在下でのDNP-OVA(6.25~100 $\mu$ g/mL)で、照射したT脾臓または精製した好塩基球(2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mL)の存在下で、96ウェルプレートにて4日間刺激した。1 $\mu$ Ciの[<sup>3</sup>H]を添加することによって、最終16時間の間のDNA合成を測定した。

20

【0120】

図8(a)~図8(d)には、骨髄由来の好塩基球および肥満細胞からのTh2サイトカイン産生を示した。図8(a)には、DO11.10マウスからのナイーブ脾臓CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞(1 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mL)を、OVA<sub>323-339</sub>(1 $\mu$ M)、あるいは抗DNP IgE mAb(10 $\mu$ g/mL)の存在下または非存在下でのDNP-OVA(100 $\mu$ g/mL)で、照射したT脾臓または精製した好塩基球(5 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mL)の存在下で、48ウェルプレートにて24時間刺激した結果を示した。

30

【0121】

図8(b)には、骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞(各1 $\times$ 10<sup>5</sup>個/0.2mLウェル)を、IL-3(20U/mL)、あるいは抗DNP IgE mAb(10 $\mu$ g/mL)の存在下または非存在下でのDNP-OVA(100 $\mu$ g/mL)で、96ウェルプレート中にて16時間再度刺激し、上清を回収し、ELISAによってIL-4またはIL-13の産生を試験した結果を、平均+SEMで示した。5回の独立した実験の代表例を示す。ndは検出し得なかったことを示す。

40

【0122】

図8(c)には、骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞から抽出したmRNAを、TLR遺伝子および $\beta$ アクチンの発現についてRT-PCRによって解析した結果を示した。TLR mRNAについてのポジティブコントロール(posi.)として、マウス脾臓細胞から抽出したmRNAを使用した。

【0123】

図8(d)には、骨髄由来の、FACSソートした好塩基球または肥満細胞(各1 $\times$ 10<sup>5</sup>個/0.2mLウェル)を、IL-3(20U/mL)、およびIL-18(50ng/mL)、IL-33(100ng/mL)、LPS(1 $\mu$ g/mL)またはPGN(10 $\mu$ g/mL)で、それぞれ96ウェルプレート中にて24時間再度刺激し、上清を回収

50

し、ELISAによってIL-4、IL-6またはIL-13の産生を試験した結果を、平均+SEMで示した。5回の独立した実験の代表例を示す。

【0124】

図9(a)~図9(e)には、抗FcR1を有する好塩基球の枯渇を示した。図9(a)~図9(d)について、5 $\mu$ gの抗マウスFc $\gamma$ 1(MAR-1(+))またはPBS(MAR-1(-))を1日2回で3日間腹腔内投与されたBALB/cマウスにおける、好塩基球(FcR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞またはFcR1<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup>細胞)のフローサイトメトリーおよび頻度を示す。最終投与の2日後に、好塩基球の数を定量した(図9(a):脾臓、図9(b):肝臓)。次いで、マウスにDNP-OVAおよび抗DNP IgEの混合物を1日2回でさらなる3日間、MAR-1またはPBSとともに注入した。OVAでの腹腔内チャレンジの後、I.C投与の4日後に、マウスを、週に連続5日間で2週間にわたって、MAR-1またはPBSでさらに処理した。OVAチャレンジの1週間または2週間の後、血液(図9(c))または脾臓(図9(d))における好塩基球の数を定量した。

10

【0125】

図9(e)には、IL-3(0~10 $\mu$ g/体重/2週間)を浸透圧ポンプを用いて注入したBALB/cマウスからの好塩基球(FcR1<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup>細胞)の頻度についての、代表的な実験データを示した。5回の独立した実験の代表例を示す。脾臓の非B非T細胞に対するFcR1<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>細胞またはFcR1<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup>細胞の割合をパーセントで示す。

20

【0126】

図10には、抗原でパルスされた好塩基球によるインビボでのTh2/IgE誘導の概略図を示した。抗原A(例えば、OVA)を正常な動物に投与すると、先ず、抗原Aが好塩基球に取り込まれる(図中1)。OVAでパルスされた好塩基球が末梢リンパ器官(例えば、脾臓)に循環され、そこでOVA特異的ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞に対してIL-4刺激と抗原ペプチド/MHCクラスII刺激とを与える。次いで、DCからの補助作用を必要とすることなく、好塩基球からの抗原刺激およびIL-4刺激のみによって、OVA特異的ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞はTh2細胞に分化する(すなわち、好塩基球依存性のTh2細胞誘導フェーズ;図中2)。同時に、生体に投与されたOVAもまた末梢リンパ器官に循環されている。ここで、OVAがOVA特異的B細胞の抗原受容体に結合する。OVAでパルスされたB細胞はOVA特異的Th2細胞を刺激するので、刺激されたTh2細胞はCD40リガンドおよびIL-4を産生する。産生されたCD40リガンドおよびIL-4は、OVAでパルスされたB細胞を刺激してOVA特異的IgE産生を誘導する(すなわち、Th2依存型のB細胞活性化フェーズ;図中3)。一旦、OVA特異的IgEが産生されると、OVAと抗OVA特異的IgE抗体とによって構成されるIgE免疫複合体が好塩基球上のFcR1に結合する(すなわち、好塩基球がIgEに感作される;図中4)。感作された好塩基球の刺激によって、メモリーTh2細胞は刺激されて増殖する(図中5)。さらに、OVAで刺激されたメモリーB細胞は、メモリーTh2細胞の刺激を受けて、OVAに対する結合親和性が高いIgE抗体を産生する(図中6)。

30

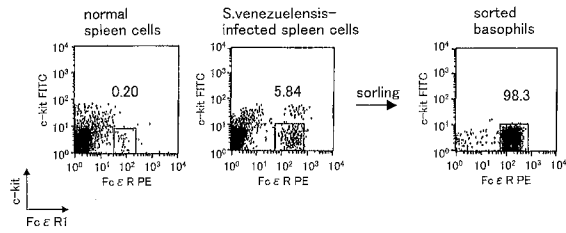
【産業上の利用可能性】

40

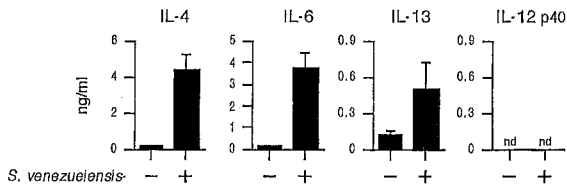
【0127】

本発明は、これまで不明であったTh2型免疫応答、特に初期IL-4産生の作用メカニズムを明らかにしたので、Th2型疾患に対する新規治療薬・治療方法の開発などに好適に用いることができる。すなわち、本発明は、医療分野、医薬品分野をはじめ、幅広い分野に利用可能である。

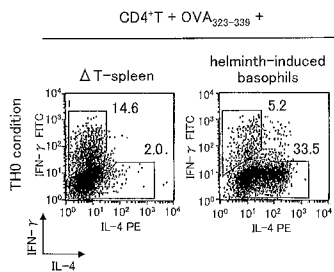
【 図 1 ( a ) 】



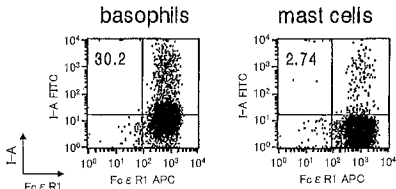
【 図 1 ( b ) 】



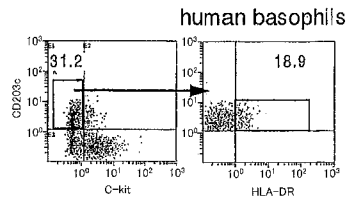
【 図 1 ( c ) 】



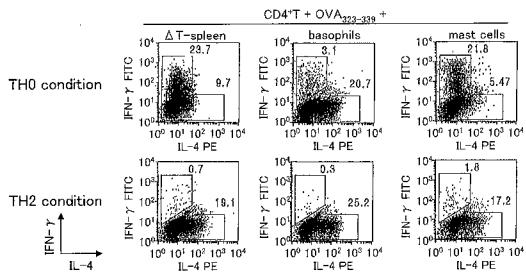
【 図 2 ( b ) 】



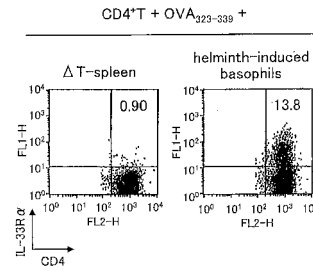
【 図 2 ( c ) 】



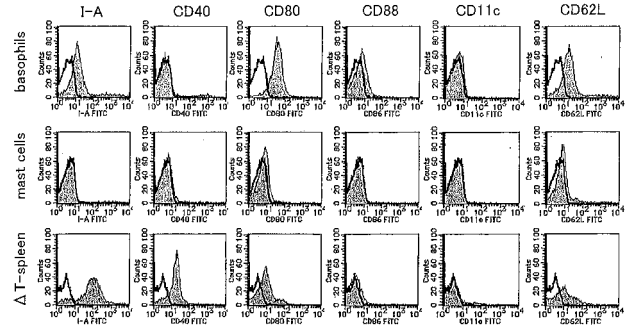
【 図 3 ( a ) 】



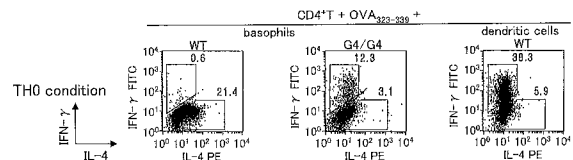
【 図 1 ( d ) 】



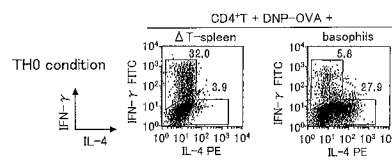
【 図 2 ( a ) 】



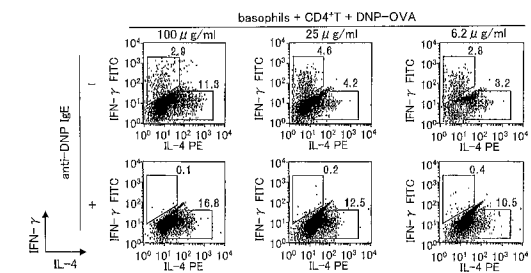
【 図 3 ( b ) 】



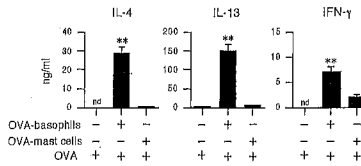
【 図 3 ( c ) 】



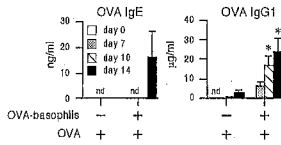
【 図 3 ( d ) 】



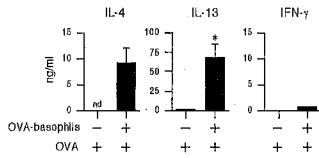
【 図 4 ( a ) 】



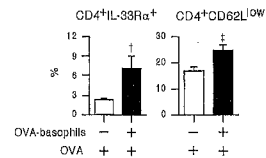
【 図 4 ( b ) 】



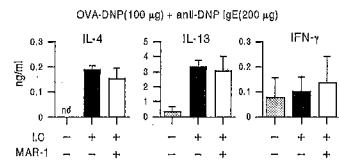
【 図 4 ( c ) 】



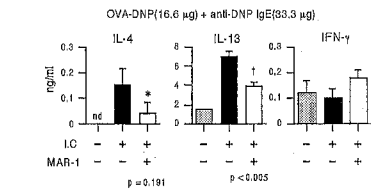
【 図 4 ( d ) 】



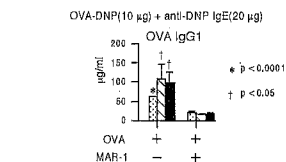
【 図 4 ( f ) 】



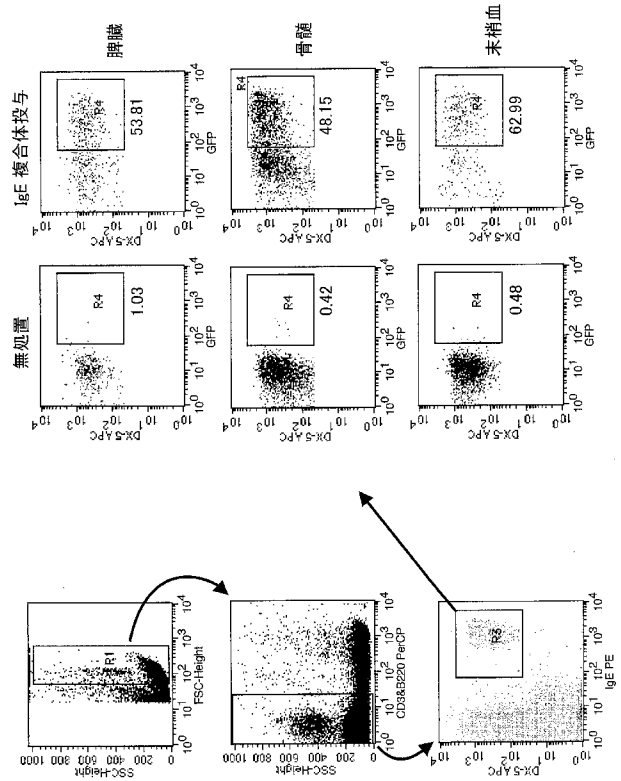
【 図 4 ( g ) 】



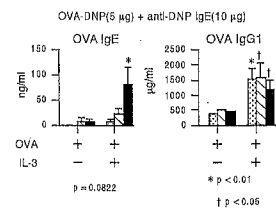
【 図 4 ( h ) 】



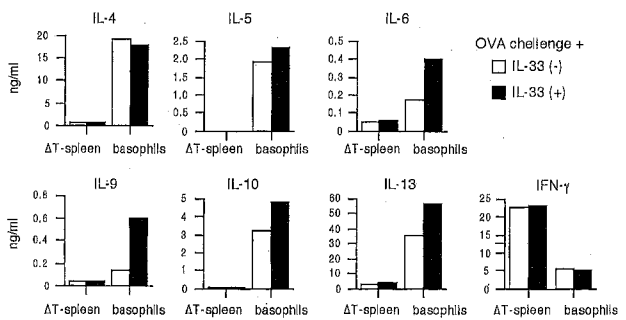
【 図 4 ( e ) 】



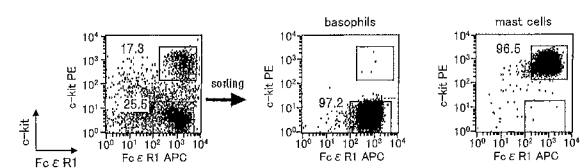
【 図 4 ( i ) 】



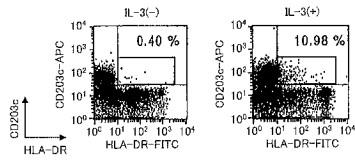
【 図 5 】



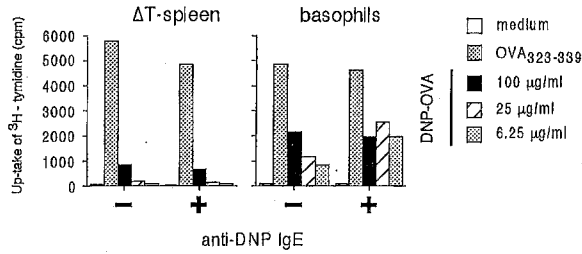
【 図 6 ( a ) 】



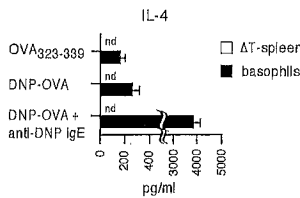
【 図 6 ( c ) 】



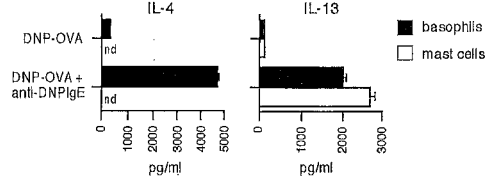
【 図 7 】



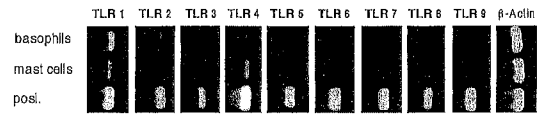
【 図 8 ( a ) 】



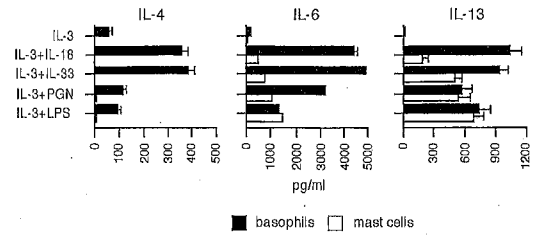
【 図 8 ( b ) 】



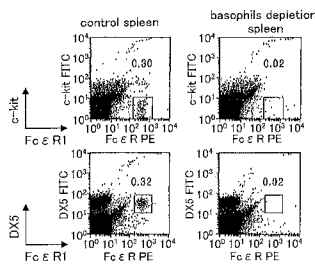
【 図 8 ( c ) 】



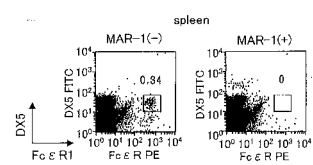
【 図 8 ( d ) 】



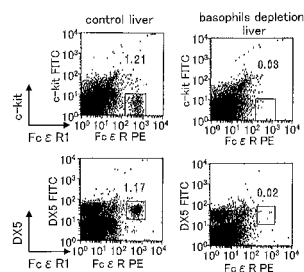
【 図 9 ( a ) 】



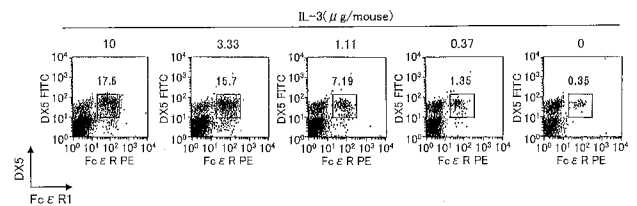
【 図 9 ( d ) 】



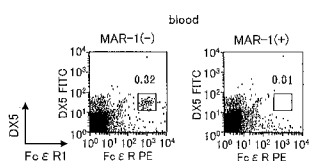
【 図 9 ( b ) 】



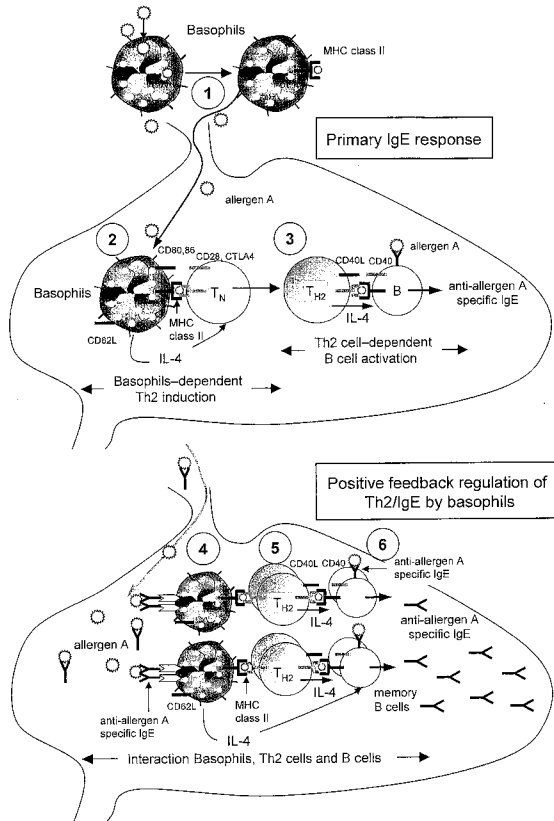
【 図 9 ( e ) 】



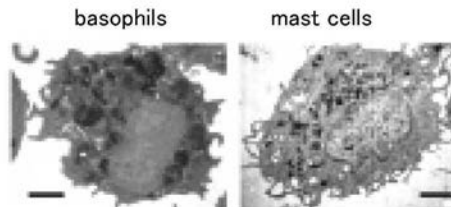
【 図 9 ( c ) 】



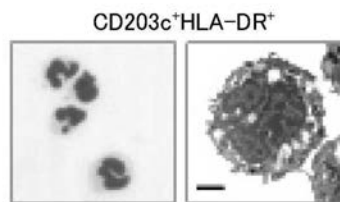
【 図 1 0 】



【 図 6 ( b ) 】



【 図 6 ( d ) 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成22年3月17日 (2010.3.17)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない、複合体。

【請求項 2】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導するための組成物。

【請求項 3】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導するためのキット。

【請求項 4】

ナイーブ T 細胞を T h 2 細胞に誘導する方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第 1 工程、

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、および

ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程を包含する、方法。

【請求項 5】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、I L - 4 を生成するための組成物。

【請求項 6】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、I L - 4 を生成するためのキット。

【請求項 7】

I L - 4 を生成する方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第 1 工程、および

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程を包含する、生成方法。

【請求項 8】

ナイーブ T 細胞を、上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程をさらに包含する、請求項 7 に記載の生成方法。

【請求項 9】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、I g E を生成するための組成物。

【請求項 10】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、I g E を生成するためのキット。

【請求項 11】

I g E を生成する方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第 1 工程、

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、

ナイーブ T 細胞を、第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程、ならびに

B 細胞を、該抗原および抗原提示細胞の存在下で、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養する第 4 工程

を包含する、生成方法。

【請求項 12】

上記第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、上記抗原、上記 T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程

をさらに包含する、請求項 11 に記載の生成方法。

【請求項 13】

抗原、および該抗原に結合する I g E を含有している、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングするための組成物。

【請求項 14】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

抗原、該抗原に結合する I g E、および好塩基球を備えている、T h 2 型疾患に対する治療剤をスクリーニングするためのキット。

【請求項 16】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

T h 2 型疾患に対する治療剤のスクリーニング方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体を形成させる第 1 工程、および

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程を包含する、方法。

【請求項 18】

上記第 2 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 2 工程後の好塩基球の細胞表面上に提示されている M H C クラス I I 分子または C D 80 分子の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

ナイーブ T 細胞を、上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球とともに培養する第 3 工程をさらに包含し、

第 2 工程または第 3 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 3 工程において誘導された T h 2 細胞の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

B 細胞を、上記抗原および抗原提示細胞の存在下で、上記第 3 工程において誘導された T h 2 細胞とともに培養して I g E を生成する第 4 工程をさらに包含し、

上記第 2 工程～第 4 工程の少なくとも 1 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 4 工程において生成された I g E の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

上記第 4 工程にて生成された I g E の存在下で、上記抗原、T h 2 細胞および B 細胞を培養する第 5 工程をさらに包含し、

上記第 2 工程～第 5 工程の少なくとも 1 工程を候補物質の存在下または非存在下で行い、第 5 工程において生成された I g E の量を測定する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

T h 2 型疾患に対する治療剤のスクリーニング方法であって、

上記第 2 工程にて培養した後の好塩基球を動物に投与してモデル動物を作製する工程、該モデル動物に候補物質を投与する工程、および

該候補物質を投与した後のモデル動物における、T h 2 型疾患に対する改善効果の有無を測定する工程

をさらに包含する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 23】

前記疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性腸炎、アレルギー性結膜炎およびアレルギー性鼻炎からなる群より選択される、請求項 17～22 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 24】

T h 2 型疾患のモデル動物を作製する方法であって、

抗原と該抗原に結合する I g E とからなりかつ細胞および基材に結合していない複合体

を形成させる第 1 工程、

該複合体の存在下で、好塩基球を培養する第 2 工程、および

該複合体の存在下で培養した後の好塩基球を、動物に投与する工程  
を包含する、作製方法。

【請求項 2 5】

前記疾患が気管支喘息であり、前記複合体の存在下での培養後の好塩基球を経鼻投与する  
ことを包含する、請求項 2 4 に記載の作製方法。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/005625
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) C12N5/06, A23K1/16, A61K39/395, A61K45/00, A61P1/00, A61P11/02, A61P11/06, A61P17/00, A61P27/02, A61P37/02, A61P37/08, A61P43/00, C07K14/54, C07K16/28, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, CiNii		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-164523 A (Kabushiki Kaisha Nippon Medikaru Soken), 17 July 2008 (17.07.2008), claim 17 (Family: none)	1
X	Yusuke TSUJIMURA et al., "Koenkikyuu no 21 Seiki Renaissance -Seitainai ni Okeru Koenkikyuu no Unique na Yakuwari ga Zokuzoku to Akiraka ni-", Rinsho Ketsueki, 30 July 2008 (30.07.2008), vol.49, no.7, pages 489 to 497, entire text	1-27
A	SOKOL, Caroline, L., et al., A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses, Nature Immunology, 2008.03, Vol. 9, No. 3, pp. 310-318	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 16 November, 2009 (16.11.09)		Date of mailing of the international search report 24 November, 2009 (24.11.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/005625

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOJIMA, T. , et al., Mast Cells and Basophils Are Selectively Activated In Vitro and In Vivo through CD200R3 in an IgE-Independent Manner <sup>1</sup> , The Journal of Immunology, 2007.11, Vol. 179, 7093-7100	1-27
A	OBATA, K., et al., Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation, BLOOD, 2007.08, Vol. 110, No. 3, pp. 913-920	1-27
A	Kenji NAKANISHI, "Interleukin 18 to Allergy-sei Ensho", Sogo Rinsho, 2007.05, vol.56, no.5, pages 1827 to 1833	1-27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/005625

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

C12N5/07(2010.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,  
A61K45/00(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, A61P11/02(2006.01)i,  
A61P11/06(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i,  
A61P37/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,  
C07K14/54(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i,  
G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/005625

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 28, 29

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 28 and 29 pertain to methods for treatment of a human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of  
(Continued to extra sheet)

2.  Claims Nos.:

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:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-25 relate to a complex composed of an antigen and an IgE capable of binding to the antigen and a method utilizing the complex.

The inventions of claims 26 and 27 relate to a composition for treating a Th2 type disease, which comprises a substance capable of depleting a basophil or a substance capable of inhibiting the function of FcεR1.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  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.:
4.  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.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/005625

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/005625									
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. C12N5/06, A23K1/16, A61K39/395, A61K45/00, A61P1/00, A61P11/02, A61P11/06, A61P17/00, A61P27/02, A61P37/02, A61P37/08, A61P43/00, C07K14/54, C07K16/28, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009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) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, CiNii											
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									
X	JP 2008-164523 A (株式会社日本メディカル総研) 2008.07.17, 請求項17 (ファミリーなし)	1									
X	辻村祐佑ら, 好塩基球の21世紀ルネサンスー生体内における好塩 基球のユニークな役割が続々と明らかにー, 臨床血液, 2008.07.30, Vol. 49, No. 7, pp. 489-497, 全文	1-27									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 16.11.2009		国際調査報告の発送日 24.11.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 太田 雄三	4B 3959								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 5 6 2 5
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	SOKOL, Caroline, L., et al., A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses, Nature Immunology, 2008.03, Vol. 9, No. 3, pp. 310-318	1-27
A	KOJIMA, T. , et al., Mast Cells and Basophils Are Selectively Activated In Vitro and In Vivo through CD200R3 in an IgE-Independent Manner, The Journal of Immunology, 2007.11, Vol. 179, 7093-7100	1-27
A	OBATA, K., et al., Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation, BLOOD, 2007.08, Vol. 110, No. 3, pp. 913-920	1-27
A	中西憲司, インターロイキン18とアレルギー性炎症, 総合臨床, 2007.05, Vol. 56, No. 5, pp. 1827-1833	1-27

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 5 6 2 5

## 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 28, 29 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 28, 29 に係る発明は、人間の治療方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求項 1-25に係る発明は、抗原と該抗原に結合する I g E からなる複合体、及び当該複合体を用いた方法である。

請求項 26, 27に係る発明は、好塩基球を枯渇させる物質または F c ε R 1 の機能を阻害する物質を含有している、T h 2 型疾患を処置するための組成物である。

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。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2009/005625

## 発明の属する分野の分類

C12N5/07(2010.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i,  
A61P1/00(2006.01)i, A61P11/02(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i,  
A61P27/02(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,  
C07K14/54(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i,  
G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(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)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	
	C 0 7 K 16/28	
	A 0 1 K 67/027	

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

Fターム(参考) 4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR56 QR69 QR77 QS24 QS33  
 QS36 QX01  
 4B065 AA90 AC12 AC14 BB19 BB40 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA17 NA14 ZA332 ZA342 ZA592 ZA612 ZA892 ZB012 ZB072 ZB132  
 4C085 AA13 AA14 CC23 DD88 EE01 GG01  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA30 DA75 EA22 EA50 FA71

(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)	诱导th2细胞的组合物, th2型疾病的治疗组合物及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2010050167A1</a>	公开(公告)日	2012-03-29
申请号	JP2010535650	申请日	2009-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学		
[标]发明人	中西憲司 善本知広		
发明人	中西 憲司 善本 知広		
IPC分类号	C12N5/0783 C12Q1/02 A61K45/00 A61P43/00 A61P37/02 A61K39/395 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/02 A61P27/02 A61P1/00 A61P17/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K14/54 C07K16/28 A01K67/027		
CPC分类号	A61K39/39583 A61K47/6901 A61K49/0008 A61K2039/5158 A61K2039/57 A61K2039/6056 A61P1/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C12N5/0636 C12N5/0642 C12N2502/11 G01N33/5047 G01N33/505 G01N33/5088 G01N2800/122 G01N2800/24 A61K2300/00		
FI分类号	C12N5/00.202.L C12Q1/02 A61K45/00 A61P43/00.111 A61P37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/08 A61P11/06 A61P11/02 A61P27/02 A61P1/00 A61P17/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/53.D C07K14/54 C07K16/28 A01K67/027		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4B065/AA90 4B065/AC12 4B065/AC14 4B065/BB19 4B065/BB40 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA592 4C084/ZA612 4C084/ZA892 4C084/ZB012 4C084/ZB072 4C084/ZB132 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	2008281930 2008-10-31 JP		
其他公开文献	JP5626990B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了抗原和与抗原结合的IgE的复合物, 包括抗原和与抗原结合的IgE的组合物, 以及使用该复合物或组合物的方法。利用本发明, 可以诱导幼稚T细胞发育成Th2细胞。此外, 本发明阐明了Th2型免疫应答的工作机制, 特别是早期IL-4的产生机制。利用本发明, 可以提供治疗和预防Th2型疾病的技术。

