

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月1日(01.09.2022)



(10) 国際公開番号
WO 2022/181515 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61K 31/167 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(72) 発明者: 本庶 佑 (HONJO, Tasuku); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 和久 由佳 (WAKU, Yuka); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 茶本 健司 (CHAMOTO, Kenji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/006843

(22) 国際出願日: 2022年2月21日(21.02.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-031041 2021年2月26日(26.02.2021) JP

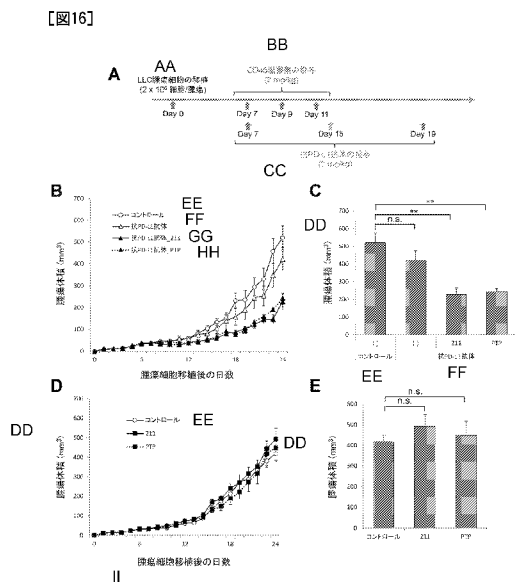
(74) 代理人: 間山 世津子, 外 (MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機会館4階 Kanagawa (JP).

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) Title: COMBINATION THERAPY WITH PD-1 SIGNAL INHIBITOR

(54) 発明の名称: PD-1シグナル阻害剤の併用療法



AA Transplantation of LLC tumor cells (2×10^6 cells/tumor)
 BB Administration of CD45 inhibitor (3 mg/kg)
 CC Administration of anti-PD-L1 antibody (2 mg/kg)
 DD Tumor volume (mm³)
 EE Control
 FF Anti-PD-L1 antibody
 GG Anti-PD-L1 antibody_211
 HH Anti-PD-L1 antibody_PTP
 II Number of days after tumor cell transplantation

(57) Abstract: Provided is a novel combination therapy with PD-1 signal inhibition therapy. A pharmaceutical composition of the present invention contains a substance that can enhance a T cell receptor (TCR) signal, and is administered before, after, or simultaneously with administration of a PD-1 signal inhibitor. An enhancer of PD-1 signal inhibitory activity of the present invention contains a CD45 inhibitor and/or cells. A TCR signal enhancer of the present invention contains a CD45 inhibitor and/or cells.



WO 2022/181515 A1

KN, KP, KR, KW, 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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))
-

(57) 要約: PD-1シグナル阻害治療との新たな併用療法を提供する。T細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質を含み、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与する、医薬組成物。CD45阻害剤及び/又は細胞を含む、PD-1シグナル阻害活性増強剤。CD45阻害剤及び/又は細胞を含む、TCRシグナル増強剤。

明 細 書

発明の名称 : PD-1シグナル阻害剤の併用療法

技術分野

[0001] 近年の臨床試験の結果より、PD-1シグナル阻害治療は、多くのがん種でこれまでの治療法よりも有効であることが明らかになってきた(1-4) (非特許文献1-4)。末期がん患者で抗PD-1抗体治療の奏成功率は20-30%と従来の抗がん剤に比べて劇的に向上した。しかしながら、不応答性を示す患者が半数程度存在することが問題になっている(5, 6) (非特許文献5, 6)。そのため、これらの患者に対して有効なPD-1シグナル阻害治療との併用療法の開発が急務となっている。

先行技術文献

非特許文献

[0002] 非特許文献1 : S. L. Topalian et al., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366, 2443-2454 (2012).

非特許文献2 : A. Ribas et al., Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* 315, 1600-1609 (2016).

非特許文献3 : M. Reck et al., Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 375, 1823-1833 (2016).

非特許文献4 : P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* 283, 110-120 (2018).

非特許文献5 : W. Zou, J. D. Wolchok, L. Chen, PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 8, 328rv324 (2016).

非特許文献6 : A. L. Shergold, R. Millar, R. J. B. Nibbs, Understanding and overcoming the resistance of cancer to PD-1/PD-L1 blockade. *Pharmacol Res* 145, 104258 (2019).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明は、PD-1シグナル阻害治療との新たな併用療法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0004] PD-1シグナル経路の阻害効果は、主にT細胞の活性化を介して引き起こされる(P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* 283, 110-120 (2018).; K. Chamoto et al., Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E761-E770 (2017).)。このT細胞の活性化はT細胞受容体 (TCR) シグナリングカスケードにより促進される。TCRシグナリング分子のリン酸化や脱リン酸化はシグナル複合体形成やTCRシグナルの伝達に影響を及ぼす。CD45は膜貫通型の脱リン酸化酵素であり、lymphocyte protein kinase (Lck) やその下流因子のチロシンのリン酸化レベルを制御することでTCRシグナルの調整において主要な役割を果たす(J. Rossy, D. J. Williamson, K. Gaus, How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol* 3, 167 (2012).) (R. J. Brownlie, R. Zamoyska, T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 13, 257-269 (2013).)。若いナイーブCD8陽性T細胞において、高いCD45発現はZAP-70やPLC γ の脱リン酸化を介してTCRシグナル伝達を阻害する(J. H. Cho et al., CD45-mediated control of TCR tuning in naive and memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 7, 13373 (2016).)。そのため、CD45の抑制によりTCRシグナル伝達を亢進させる

ことで、PD-1シグナル阻害により増強されたT細胞の活性化をさらに補強し、抗腫瘍効果が増強すると考えられる（図17）。

[0005] 本発明者らは、PD-1シグナル阻害と脱リン酸化酵素であるCD45の阻害剤を併用すると、相乗的に抗腫瘍効果が向上することを見出した。特にこの腫瘍抑制の効果は、PD-1シグナル阻害に対して耐性を示す加齢マウスや耐性がんに対して強く示された。以上の結果から、CD45阻害剤はPD-1シグナル阻害剤と併用することで抗腫瘍免疫をサポートし、相乗的にがん増殖を抑制する効果を保持し、PD-1シグナル阻害の単独治療に不応答性を示すがんに対しても効果を持つと考えられる。同様の効果が細胞移植（異種細胞、同種異系細胞）でも見られた。細胞移植によるTCRシグナル伝達の亢進も確認された。

[0006] 本発明の要旨は、以下の通りである。

(1) T細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質を含み、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与する、医薬組成物。

(2) TCRシグナルを増強させることができる物質が、CD45阻害剤及び/又は細胞である(1)記載の医薬組成物。

(3) CD45阻害剤が、2-(4-Acetylanilino)-3-chloronaphthoquinone、N-(9,10-Dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethylpropionamide及びそれらの類似物からなる群より選択される少なくとも1つの化合物である(2)記載の医薬組成物。

(4) 細胞が、ゼノ細胞、アロ細胞又はそれらの組み合わせである(2)記載の医薬組成物。

(5) PD-1シグナル阻害剤が抗体である(1)～(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) 抗体が、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体及び抗PD-L2抗体からなる群より選択される少なくとも1つの抗体である(5)記載の医薬組成物。

(7) 抗がん剤、感染症治療剤又はそれらの組み合わせとして使用される(1)～(6)のいずれかに記載の医薬組成物。

- (8) CD45阻害剤及び/又は細胞を含む、PD-1シグナル阻害活性増強剤。
- (9) CD45阻害剤及び/又は細胞を含む、TCRシグナル増強剤。
- (10) PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、T細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質を有効な量で被験者に投与することを含む、がん、感染症又はそれらの組み合わせを予防及び/又は治療する方法。
- (11) PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、T細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質を有効な量で被験者に投与することを含む、PD-1シグナル阻害活性を増強する方法。
- (12) CD45阻害剤及び/又は細胞を有効な量で被験者に投与することを含む、TCRシグナルを増強する方法。
- (13) がん、感染症又はそれらの組み合わせを予防及び/又は治療するために使用するためのT細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質であって、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与される前記物質。

発明の効果

[0007] TCRシグナルを増強させることができる物質をPD-1シグナル阻害剤と併用することで、相乗的に抗腫瘍効果が向上する。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2021 - 31041の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]加齢PD-1 K0マウスにおける抗腫瘍活性とP4細胞誘導の喪失。(AとB) MC38細胞は、若齢と加齢PD-1 K0マウスの皮中に接種された。(A) 若齢(3-4ヶ月齢)と加齢(15ヶ月齢)のPD-1 K0マウスにおけるMC38腫瘍サイズ。(B) MC38腫瘍担癌PD-1 K0マウスの生存率のカプラン・マイヤープロット。(CとD) MC38細胞の接種の有り又は無しの若齢(C、2から3ヶ月齢)又は加齢(D、15から21ヶ月齢)PD-1 K0マウスにおけるCD8陽性T細胞サブセットの解析。Day 9で染色した末梢リンパ節と所属リンパ節細胞。CD3陽性CD8陽

性細胞におけるCD44とCD62Lの発現を示す代表的なプロットとCD8陽性細胞サブセットのパーセンテージ；CD44^{low}/CD62L^{high}（ナイーブ；P1），CD44^{high}/CD62L^{high}（セントラルメモリー；P2），CD44^{high}/CD62L^{low}（エフェクター/メモリー；P3），CD44^{low}/CD62L^{low}（P4）。P値はlog-rankテスト又はStudent-T検定により計算した。 $*p < 0.05$ ； $**p < 0.01$ ；n.s.，有意差なし。データはマウスの平均値±標準誤差を示している（ $n = 8-10$ for A & B； $n = 5-6$ for C & D）。

[図2]P3細胞への分化を介したP4細胞の抗腫瘍活性。（AとB）OT-I P3とP4サブセットを得るために、MC38-OVA細胞は若齢OT-1マウスに尾静脈から注入され、それぞれのサブセットは脾細胞から単離された。MC38-OVA細胞の皮中移植から5日後にP3又はP4サブセット細胞はCD8 KOマウスに養子導入された。

（A）P3又はP4細胞の導入有り又は無しのMC38-OVA担癌CD8 KOマウスにおける腫瘍体積。（B）Day 11の末梢血における移植されたCD8陽性T細胞のFACS解析。（C）若齢PD-1 KOマウスの脾細胞からのCD8陽性T細胞サブセット単離のスキーム。（DからG）若齢（2から3ヶ月齢）又は加齢（16から18ヶ月齢）のPD-1 KOマウスから単離し、抗CD3/CD28抗体とIL-2で刺激後、2又は3日間培養したP4（D）、P1（E）、又はP2（F）細胞のFACS解析。示した培養細胞におけるCD44とCD62L発現やCD8陽性T細胞のパーセンテージを示す代表的なプロット。データはマウスの平均値±標準誤差を示している（ $n = 3-5$ ）。 $**p < 0.01$ （ANOVAによる評価の後Tukey'sテスト）。

[図3]P4細胞における1C代謝関係遺伝子の発現増加。（AからE）若齢PD-1 KOマウスから単離したP1、P2、P3、とP4細胞のマイクロアレイ解析（1から3ヶ月齢；9マウスの混合）。（A）全ての遺伝子の階層的なクラスタリングヒートマップ。（B）それぞれのプローブの正規化したlog強度を示す散布図。点線はlog 2-foldの差を示す。これまでにCD8陽性細胞の活性化や分化への関与が示された遺伝子が収載されている。（C）P4細胞において上方制御された遺伝子が関与する上位10の遺伝子オントロジー（GO）。1C代謝の関与するGO用語は赤で示されている。（D）1C代謝経路の模式図。THF, tetrahydrofolate。（E）CD8陽性T細胞サブセットにおける1C代謝関係遺伝子の発現を示すヒ

ートマップ。(F) 若齢PD-1 K0マウスの脾細胞由来のCD8陽性T細胞サブセットにおける1C代謝関係遺伝子のmRNA発現。(G) MC38腫瘍 (day 9) 有り又は無しの若性 (2ヶ月齢、3マウス混合) 又は加齢 (17ヶ月齢、6マウス混合) マウスの末梢又は所属リンパ節における野生型又はPD-1 K0 CD8陽性T細胞のマイクロアレイ解析。ヒートマップは図中で示す細胞における1C代謝関係遺伝子の発現を表す。(HとI) 若性 (2から3ヶ月齢) 又は加齢 (15から19ヶ月齢) マウスの所属リンパ節由来の野生型又はPD-1 K0 CD8陽性T細胞の酸素消費速度 (OCR) はSeahorse XFe96 分析器を用いて測定した。OCR trace (H)、基礎呼吸や予備呼吸能はOCR値から算出した (I)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Student-T検定)。データは平均値±標準誤差を示している ($n = 4$)。

[図4]加齢CD8陽性T細胞におけるP4細胞誘導はCD45RBの高発現を介したTCRシグナル抑制により減弱される。(AとB) MC38-OVA細胞の尾静脈からの注射有り又は無しの若性 (2から3ヶ月齢) (A) 又は加齢 (15から19ヶ月齢) (B) OT-1マウスの所属リンパ節におけるCD8陽性T細胞サブセットの解析。MC38-OVA移植から5日後の図に示すマウスにおけるCD8陽性T細胞上のCD44とCD62Lの発現とそれぞれのCD8陽性T細胞サブセットのパーセンテージを示す典型的な図。(C) MC38-OVA移植が有り又は無しの若性又は加齢OT-1マウス由来の末梢リンパ節におけるpZAP70陽性CD8陽性T細胞の割合。(D) 若齢 (2から3ヶ月齢) 又は加齢 (14から17ヶ月齢) のOT-1マウス由来のトータルCD8陽性T細胞又はそれぞれのサブセットにおけるCD45RB発現レベルの代表的なプロットと蛍光強度 (MFI)。(E) CD8陽性T細胞は若齢又は加齢OT-1マウスの末梢リンパ節から単離され、1日間、MMC処理したMC38-OVA細胞有り又は無しで培養された。培養の最後の1時間、溶媒又はCD45阻害剤 ($0.05 \mu\text{M}$) が添加された。データは平均値±標準誤差を示している ($n = 3-6$)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s., 有意差なし (ANOVAによる評価の後Tukey's テスト又はStudent-T検定)。

[図5]異種細胞移植による加齢マウスにおけるP4細胞と抗腫瘍活性の回復。(

A) 実験スケジュールの模式図。(BからD) 若齢(3から4ヶ月齢)と加齢(16から18ヶ月齢) PD-1 KOマウスはDaudi細胞を尾静脈から移植された。その移植から10日後(day 0)、それらのマウスの末梢リンパ節細胞はFACSやreal-time PCRにより解析された。(B) 末梢リンパ節のCD8陽性T細胞におけるP1からP4サブセットのパーセンテージ。(C) CD8陽性T細胞における1C代謝関連遺伝子の発現レベル。(D) 末梢リンパ節由来のP1細胞におけるCD45RB発現レベル。(EからI) 若齢(3から4ヶ月齢)と加齢(17から18ヶ月齢) PD-1 KOマウスはDaudi細胞を尾静脈から移植された(day -10)。その移植から10日後(day 0)、それらのマウスは皮中にMC38 (EからG) 又はMC38-OVA (HとI) 細胞を移植され、下記の実験に使用された。MC38腫瘍サイズ(E)と生存率(F)。(G) Day 6の所属リンパ節由来のCD8陽性T細胞におけるpZAP70陽性細胞のパーセンテージ。(HとI) Day 6の所属リンパ節又は腫瘍組織におけるOVAテトラマー陽性CD8陽性T細胞の割合。データは平均値±標準誤差を示している(n = 9-10 for B; n = 4-6 for C-I)。*p < 0.05; **p < 0.01 (ANOVAによる評価の後Tukey's テスト、log-rank検定又はStudent-T検定)

。

[図6]加齢野生型マウスにおける抗腫瘍活性とP4細胞誘導の喪失。(AとB) MC38細胞は、若齢(2ヶ月齢)と加齢(14ヶ月齢) C57BL/6野生型マウスの皮中に接種された。その後、それらのマウスはday 5、11、と17に抗PD-L1抗体を投与された。(A) 若齢と加齢の野生型マウスにおけるMC38腫瘍サイズ。(B) MC38腫瘍担癌野生型マウスの生存率のカプラン・マイヤープロット。P値はlog-rank検定により算出された。(CとD) MC38細胞の接種有り又は無し of 若齢(C、2ヶ月齢)又は加齢(D、15ヶ月齢)野生型マウスにおけるCD8陽性T細胞サブセットの解析。染色したday 9の末梢リンパ節と所属リンパ節細胞。CD3陽性CD8陽性T細胞におけるCD44とCD62Lの発現を示す代表的なプロットとCD8陽性T細胞サブセットのパーセンテージ; CD44^{low}/CD62L^{high} (ナイーブ; P1), CD44^{high}/CD62L^{high} (セントラルメモリー; P2), CD44^{high}/CD62L^{low} (エフェクター/メモリー; P3), CD44^{low}/CD62L^{low} (P4)。*p < 0.05; **p < 0.01; n.s.

, 有意差なし (Student-T検定)。データはマウスの平均値±標準誤差を示している (n = 5 for A, C & D; n = 9-11 for B)。

[図7]若齢と加齢OT-I CD8陽性細胞間での似通ったTCRのOVA抗原に対する結合能力。若齢又は加齢OT-1マウスにおけるOVA特異的なMHCテトラマーの平均蛍光強度 (MFI) の代表的なプロット (A) とグラフ (B)。データはマウスの平均値±標準誤差を示している (n = 4-6)。n. s., 有意差なし (Student-T検定)

。

[図8]加齢野生型又はPD-1 KOマウス由来のCD8陽性T細胞におけるCD45RB高発現。野生型 (A) 又はPD-1 KO (B) マウスの末梢リンパ節由来のCD8陽性T細胞におけるCD45RB発現レベルは抗CD45RB抗体を用いたFACS解析により測定された。データはマウスの平均値±標準誤差を示している (n = 3-6)。*p < 0.05; **p < 0.01; n. s., 有意差なし (Student-T検定)。

[図9]異種細胞移植による野生型マウスにおける加齢に伴うPD-1阻害治療に対する不応答性の回復。若齢 (1ヶ月齢) と加齢 (17から19ヶ月齢) C57BL/6 野生型マウスはDaudi細胞を静脈から移植された。細胞移植無しをコントロール (Ctrl) とする。その移植から10日後、それらのマウスはMC38細胞を皮中に移植された。PD-L1抗体の投与はday 5からはじめられ、6日毎に3回行われた。(A) 実験スケジュールの模式図。(BとC) 若齢 (B) と加齢 (C) 野生型マウスにおけるMC38腫瘍サイズ。(DとE) MC38腫瘍担癌若齢 (D) と加齢 (E) 野生型マウスの生存率。データはマウスの平均値±標準誤差を示している (n = 5-6)。*p < 0.05; **p < 0.01; n. s., 有意差なし (ANOVAによる評価の後Tukey's テスト又はlog-rank検定)。

[図10]異種細胞移植による加齢に伴うミトコンドリア障害の回復。MC38-OVA細胞は10日前にPBS (Ctrl) 又はDaudi細胞を移植された若齢 (3から4ヶ月齢) と加齢 (17から18ヶ月齢) PD-1 KOマウスの皮中に移植された。その移植から6日後、図中に示すマウスの所属リンパ節から単離されたCD8陽性T細胞のOCRはSeahorse XFe96分析器を用いて計測された。OCR trace (A)、基礎呼吸 (B) や予備呼吸能はOCR値から算出した (C)。データは平均値±標

準誤差を示している ($n = 3$)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (ANOVAによる評価の後 Tukey' s テスト)。

[図11]同種異系細胞の移植による加齢に伴うPD-1阻害治療耐性の回復。C57BL/6 (Ctrl)又はBalb/c (Allo) マウス由来のMMC処理した脾細胞は若齢 (1ヶ月齢) と加齢 (14から18ヶ月齢) のC57BL/6野生型マウスに尾静脈注射により移植された。以降の実験条件は図9Aと同じである。若齢 (A) と加齢 (B) C57BL/6野生型マウスにおけるMC38腫瘍サイズ。データは平均値±標準誤差を示している ($n = 3$)。* $p < 0.05$; n. s., 有意差なし (ANOVAによる評価の後 Tukey' s テスト)。(CとD) MC38腫瘍担癌若齢 (C) と加齢 (D) C57BL/6野生型マウスの生存率。P値はlog-rank検定により算出された ($n = 5-6$)。

[図12]CD45阻害剤の名称とその構造式。A) 2-(4-Acetylanilino)-3-chloronaphthoquinone、以下「211」ともいう。B) N-(9,10-Dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethylpropionamide、以下「PTP」ともいう。

[図13]実験の方法と流れ。

[図14]CD45阻害によるPD-1シグナル阻害効果の向上。前投与：PD-1 ノックアウト (KO) マウスに溶媒 (コントロール) 又は211を投与し、3日後にMC38細胞 (1×10^6) を移植した。後投与：PD-1 KOマウスへのMC38細胞移植から5日後のDay 5から2日ごとに211を合計3回投与した。A)腫瘍体積増加曲線、B)MC38細胞移植から17日後の腫瘍体積。データは5匹のマウスの平均値±標準誤差を示している。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n. s., 有意差なし。

[図15]CD45阻害による加齢に伴うPD-1シグナル阻害耐性に対する効果の向上。幼若 (1~2ヶ月齢) 又は加齢 (14~16ヶ月齢) PD-1 KOマウスに211を投与し、3日後にMC38細胞を移植した。A)腫瘍体積増加曲線、B)MC38細胞移植から28日後の腫瘍体積。データは6匹のマウスの平均値±標準誤差を示している。** $p < 0.01$ 。

[図16]CD45阻害によるPD-1シグナル阻害耐性がんに対する効果の向上。A) 実験の方法と流れ。幼若 (1~2ヶ月齢) 野生型マウスに211又はPTPを免疫治療に耐性を示すLLC細胞移植から7日後のDay 7から2日ごとに合計3回投与

した。抗PD-L1抗体は、Day 7から6日毎に合計3回投与した。BとD)腫瘍体積増加曲線、CとE)MC38細胞移植から24日後の腫瘍体積。データは5~7匹のマウスの平均値±標準誤差を示している。**p < 0.01; n.s., 有意差なし。

[図17]TCRシグナル伝達のモデル図。

[図18]同種異系細胞の投与による免疫チェックポイント阻害剤の効果が増強する。若齢(6週齢)のC57BL/6マウスにMC38がん細胞を皮内注射した(5x10⁵個)。9、16、23日後に抗PD-L1抗体(clone 1-111A.4)(1.5 mg/kg)を腹腔内投与し、それに加え、マイトマイシンCで処理したBalb/cの(同種異系)脾臓細胞(5x10⁵個/マウス or 2x10⁶個/マウス)を(A)6日後に1回のみ、(B)9日後に1回のみ、または(C)9、16、23日後に計3回、静注し腫瘍サイズの経時的変化を測定した。各折れ線グラフにおける点は5ないし6マウスの平均値であり、エラーバーは標準誤差である。*はp値が0.05未満、n.s.は有意差が無いことを意味する(one-way ANOVA後のTukey検定による比較)。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0010] 本発明は、T細胞受容体(TCR)シグナルを増強させることができる物質を含み、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与する、医薬組成物を提供する。

[0011] T細胞受容体(TCR)とは、T細胞の細胞膜上に発現している抗原受容体分子である。TCRに抗原が結合すると、下流因子であるLckやZAP-70などのリン酸化を介して細胞内にシグナルが伝達されるため、T細胞の活性化が引き起こされる。

[0012] TCRシグナルの増強は、抗原刺激下でのCD8陽性T細胞におけるZAP-70のリン酸化を評価することにより確認できる。ZAP-70のリン酸化レベルが高ければ、TCRシグナルが増強していると言える。ZAP-70のリン酸化は、抗p-ZAP-70抗体を用いて、フローサイトメトリー解析により検出することができる。

[0013] TCRシグナルを増強することで、CD8陽性T細胞による抗腫瘍免疫効果を増強することができる。よって、TCRシグナルの増強により、PD-1阻害治療の抗腫

瘍効果を亢進させることができ、PD-1シグナル阻害に対して耐性を示す加齢動物や人、また耐性がんに対しても治療効果が生じうる。

- [0014] TCRシグナルを増強させることができる物質としては、CD45阻害剤及び/又は細胞を例示することができる。これらの物質は、P4細胞を誘導する効果も奏しうる。P4細胞とは、CD44^{low}CD62L^{low} CD8陽性T細胞サブセットである。マウスでは表面マーカーであるCD44やCD62L (L-selectin) を用いて3つの主要なCD8陽性T細胞を区別する：ナイーブ (P1とも呼ばれる；CD44^{low}CD62L^{high}) やセントラルメモリー (P2；CD44^{high}CD62L^{high})、エフェクター/メモリー (P3；CD44^{high}CD62L^{low})。残るCD44^{low}CD62L^{low} (P4) CD8陽性T細胞サブセットはとてもマイナーな集団である。
- [0015] CD45阻害剤としては、2-(4-Acetylanilino)-3-chloronaphthoquinone、N-(9,10-Dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethylpropionamide及びそれらの類似物を例示することができる。
- [0016] 本明細書において、「類似物」とは、化合物の塩、化合物の誘導体、活性代謝物に対するプロドラッグ、プロドラッグに対する活性代謝物、それらの溶媒和物などを含む概念である。
- [0017] 化合物の塩は、化合物がアミノ基（置換アミノ基も含む）やアミド基を有する場合には、塩酸、メシル酸（メタンスルホン酸）、フマル酸、リン酸などの酸と形成する塩などを例示することができる。
- [0018] 化合物の誘導体は、官能基の導入や置換、酸化、還元、原子の置き換えなど、母体の構造や性質を大幅に変えない程度の改変がなされた化合物であり、2-(4-Acetylanilino)-3-chloronaphthoquinoneの誘導体としては、クロロ (-Cl) 基を他のハロゲン基（例えば、フルオロ (-F) 基、ブromo (-Br) 基など）に置換したもの、アセチル (CH₃CO-) 基を他の官能基（例えば、ヒドロキシ基（水酸基）、アミノ (-NH₂) 基、ピバロイル基、ベンゾイル基など）に置換したものなどを例示ことができ、N-(9,10-Dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethylpropionamideの誘導体としては、ジメチルプロピオニル基を他のアルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ベ

ンジル基など)に置換したものなどを例示することができる。

[0019] プロドラッグとしては、活性な化合物のアミノ基がアシル化、アルキル化、リン酸化された化合物(例えば、活性な化合物のアミノ基がエイコサノイル化、アラニル化、ペンチルアミノカルボニル化、(5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキサレン-4-イル)メトキシカルボニル化、テトラヒドロフラニル化、ピロリジルメチル化、ピバロイルオキシメチル化、t-ブチル化された化合物等)、活性な化合物のアミド基がアルキル化(例えば、メチル化、エチル化、プロピル化など)されたものなどを例示することができる。

[0020] 溶媒和物としては、水、メタノール、エタノール、アセトニトリルなどの溶媒との溶媒和物を例示することができる。溶媒は、単一の溶媒であっても、複数種の混合物であってもよい。

[0021] TCRシグナルを増強させることができる細胞は、医薬組成物を投与する対象のヒトや動物に対して、ゼノ細胞(異種細胞)であってもよいし、アロ細胞(同種異系細胞)であってもよく、あるいは、それらの組み合わせであってもよい。後述の実施例では、異種Daudi細胞、同種異系脾細胞をマウスに移植した。本明細書において、ゼノ細胞とは、異種細胞であり、アロ細胞とは、HLA(Human leukocyte antigen)又はMHC(major histocompatibility complex)が異なる同種細胞である。

[0022] 疾患の予防又は治療のために、生体に投与する種々の細胞(ゼノ細胞、アロ細胞)や組織が知られており、本発明でも、それらの細胞を用いるとよい。例えば、乳癌細胞株、慢性骨髄性白血病細胞株、肺がん細胞、非小細胞肺癌細胞株、黒色腫細胞株、単球、膀胱癌細胞株、前立腺癌細胞株、腎がん細胞株などの同種異系細胞が種々の癌の治療に用いられている(Human Vaccines & Immunotherapeutics 10:1, 52-63; January 2014)。これらの細胞は、増殖を防止するために放射線処理がなされるとよく、GM-CSFなどの免疫活性化因子を分泌するように遺伝子改変がなされてもよい。また、マウス黒色腫B16やルイス肺がん(LLC)細胞のような異種細胞を用いて、黒色腫患者に投与

する臨床試験も行われている(Eur J Dermatol 2016 Apr 1;26(2):138-43)。その他、輸血用血液製剤(赤血球製剤、血小板製剤、全血製剤)に用いられる細胞やその製剤そのもの、骨髄移植に用いられる造血幹細胞なども使用しうる。これらの細胞は、アロ細胞又はゼノ細胞のいずれであってもよい。

[0023] 本明細書において、「PD-1シグナル」とは、PD-1が担う情報伝達機構をいい、その一つとして、PD-1がそのリガンドであるPD-L1、PD-L2と共同して、T細胞の活性化を抑制する情報伝達機構を例示することができる。PD-1 (Programmed cell death-1) は、活性化したT細胞やB細胞に発現する膜タンパク質であり、そのリガンドであるPD-L1とPD-L2は、単球や樹状細胞などの抗原提示細胞、がん等様々な細胞に発現する。PD-1、PD-L1及びPD-L2は、T細胞の活性化を抑制する抑制因子として働く。ある種の癌細胞やウイルス感染細胞は、PD-1のリガンドを発現することにより、T細胞の活性化を抑制し、宿主の免疫監視から逃避している。

[0024] PD-1シグナル阻害剤としては、PD-1、PD-L1又はPD-L2に特異的に結合する物質が挙げられ、そのような物質としては、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、核酸(天然型核酸、人工核酸を含む)、低分子有機化合物、無機化合物、細胞抽出物、動植物や土壌などからの抽出物などがありうる。物質は、天然物であっても、合成物であってもよい。好ましいPD-1シグナル阻害剤は、抗体であり、より好ましくは、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体などの抗体である。抗体は、PD-1シグナルを阻害できるものであればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、ヒト型抗体のいずれであってもよい。それらの抗体の製造方法は公知である。抗体は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、モルモットなど、いずれの生物に由来するものであってもよい。また、本明細書において、抗体とは、Fab、F(ab)'₂、ScFv、Diabody、VH、VL、Sc(Fv)₂、Bispecific sc(Fv)₂、Minibody、scFv-Fc monomer、scFv-Fc dimerなどの低分子化されたものも含む概念である。PD-1シグナル阻害剤としては、PD-1を標的とするnivolumab (Bristol-Myers Squibb)、pembrolizumab (Merck)、cemiplimab

(Regeneron/Sanofi)、camrelizumab (Jiangsu Hengrui)、sintilimab (Innovent Biologics/Lilly)、toripalimab (Shanghai Junshi Bioscience)、PD-L1を標的とするatezolizumab (Genetech/Roche)、durvalumab (AstraZeneca)、avelumab (Merck/Pfizer)が世界各国で承認されており、また、PD-1を標的とするtislelizumab (BeiGene)、dostarlimab (AnaptysBio/Tesaro)、HLX-04 (Shanghai Henlius Biotech)、AK-105 (Akeso Biopharma)、spartalizumab (Novartis)、BCD-100 (Biocad)、MGA-012 (Incyte)、genolimzumab (Genor Biopharma)、HX-008 (Taizhou Hanzhong BioMedical)、BAT-1306 (Bio-Thera Solutions/Sun Yat-sen University (SYSU))、AMP-224 (National Cancer Institute (NCI))、BI-754091 (Boehringer Ingelheim)、sasanlimab (Pfizer)、ABBV-181 (AbbVie)、AB-122 (Arcus Biosciences)、Sym-021 (Symphogen)、MGD-013 (MacroGenics)、GLS-010 (Harbin Gloria Pharmaceuticals/WuXi PharmaTech)、F-520 (Shandong New Time Pharmaceutical)、PD-L1を標的とするenvafolimab (Jiangsu Alphamab Biopharmaceuticals)、bintrafusp alfa (Merck KGaA)、SL-279252 (Shattuck Labs)、FS-118 (F-star)、CA-170 (Aurigene/Curis)が臨床開発中であり、これらのPD-1シグナル阻害剤を使用する。

[0025] 本発明の医薬組成物は、抗がん剤、感染症治療剤又はそれらの組み合わせとして使用することができる。

[0026] 本発明の医薬組成物を抗がん剤として投与する場合、対象となる癌又は腫瘍としては、白血病、リンパ腫（ホジキン病、非ホジキンリンパ腫など）、多発性骨髄腫、脳腫瘍、乳がん、子宮体がん、子宮頸がん、卵巣がん、食道癌、胃癌、虫垂癌、大腸癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、膵臓がん、副腎癌、消化管間質腫瘍、中皮腫、頭頸部癌（喉頭癌など）、口腔癌（口腔底癌など）、歯肉癌、舌癌、頬粘膜癌、唾液腺癌、副鼻腔癌（上顎洞癌、前頭洞癌、篩骨洞癌、蝶型骨洞癌など）、甲状腺癌、腎臓がん、肺癌、骨肉腫、前立腺癌、精巣腫瘍（睾丸がん）、腎細胞癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、皮膚癌（基底細胞がん、有棘細胞がん、悪性黒色腫（メラノーマ）、日光角化症、ボーエン病

、パージェット病など)、肛門癌などが例示される。

[0027] 本発明の医薬組成物を感染症治療剤として投与する場合、対象となる感染症としては、細菌感染症(レンサ球菌(A群β溶連菌、肺炎球菌など)、黄色ブドウ球菌(MSSA、MRSA)、表皮ブドウ球菌、腸球菌、リステリア、髄膜炎球菌、淋菌、病原性大腸菌(0157:H7など)、クレブシエラ(肺炎桿菌)、プロテウス菌、百日咳菌、緑膿菌、セラチア菌、シトロバクター、アシネトバクター、エンテロバクター、マイコプラズマ、クロストリジウムなどによる各種感染症、結核、コレラ、ペスト、ジフテリア、赤痢、猩紅熱、炭疽、梅毒、破傷風、ハンセン病、レジオネラ肺炎(在郷軍人病)、レプトスピラ症、ライム病、野兔病、Q熱など)、リケッチア感染症(発疹チフス、ツツガムシ病、日本紅斑熱など)、クラミジア感染症(トラコーマ、性器クラミジア感染症、オウム病など)、真菌感染症(アスペルギルス症、カンジダ症、クリプトコッカス症、白癬菌症、ヒストプラズマ症、ニューモシスチス肺炎など)、寄生性原虫感染症(アメーバ赤痢、マラリア、トキソプラズマ症、リーシュマニア症、クリプトスポリジウムなど)、寄生性蠕虫感染症(エキノコックス症、日本住血吸虫症、フィラリア症、回虫症、広節裂頭条虫症など)、ウイルス感染症(インフルエンザ、ウイルス性肝炎、ウイルス性髄膜炎、後天性免疫不全症候群(AIDS)、成人T細胞性白血病、エボラ出血熱、黄熱、風邪症候群、狂犬病、サイトメガロウイルス感染症、重症急性呼吸器症候群(SARS)、進行性多巣性白質脳症、水痘、带状疱疹、手足口病、デング熱、伝染性紅斑、伝染性単核球症、天然痘、風疹、急性灰白髄炎(ポリオ)、麻疹、咽頭結膜熱(プール熱)、マールブルグ出血熱、ハンタウイルス腎出血熱、ラッサ熱、流行性耳下腺炎、ウエストナイル熱、ヘルパンギーナ、チクングニア熱など)などが例示される。

[0028] 本発明の医薬組成物は、TCRシグナルを増強させることができる物質を含み、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与される。

[0029] 本発明の医薬組成物において、PD-1シグナル阻害剤と、TCRシグナルを増強

させることができる物質とは、異なる時期または同じ時期に別々に投与されてもよいし、同時に一緒に投与されてもよい。PD-1シグナル阻害剤と、TCRシグナルを増強させることができる物質とが、同時に一緒に投与される場合には、PD-1シグナル阻害剤と、TCRシグナルを増強させることができる物質とを含む配合剤とするとよい。

[0030] 本発明の医薬組成物は、全身又は局所的に、経口又は非経口で被験者に投与される。被験者は、ヒト及びヒト以外の動物を含む。

[0031] PD-1シグナル阻害剤（例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体）は、PBSなどの緩衝液、生理食塩水、滅菌水などに溶解し、必要に応じてフィルターなどで濾過滅菌した後、注射又は点滴により被験者に投与するとよい。また、この溶液には、添加剤（例えば、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、安定化剤、保存剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤など）などを添加してもよい。投与経路としては、静脈、筋肉、腹腔、皮下、皮内投与などが可能である。

[0032] PD-1シグナル阻害剤（例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体）の製剤中における含量は、製剤の種類により異なるが、通常1~100重量%、好ましくは50~100重量%である。製剤は、単位投与製剤に製剤化するとよい。

[0033] PD-1シグナル阻害剤（例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体）の投与量、投与の回数及び頻度は、被験者の症状、年齢、体重、投与方法、投与形態などにより異なるが、例えば、通常、成人一人当たり、有効成分の量に換算して、0.1~100 mg/kg体重、好ましくは、1~10mg/kg体重を、少なくとも1回、所望の効果が確認できる頻度で投与するとよい。

[0034] TCRシグナルを増強させることができる物質は、PD-1シグナル阻害剤を含む製剤に含有させてもよいが、単独で、あるいは賦形剤または担体と混合し、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、シロップ、エアロゾル、坐剤、注射剤等に製剤化してもよい。賦形剤または担体は、当分野で常套的に使用され、医薬的に許容されるものであればよく、その種類及び組成は適宜変更さ

れる。例えば、液状担体としては水、植物油などが用いられる。固体担体としては、乳糖、白糖、ブドウ糖などの糖類、バレイショデンプン、トウモロコシデンプンなどのデンプン、結晶セルロースなどのセルロース誘導体などが使用される。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースなどの崩壊剤等を添加してもよい。その他、抗酸化剤、着色剤、矯味剤、保存剤等を添加してもよい。

- [0035] TCRシグナルを増強させることができる物質は、経口、経鼻、直腸、経皮、皮下、静脈内、筋肉内などの種々の経路によって投与できる。
- [0036] TCRシグナルを増強させることができる物質の製剤中における含量は、製剤の種類により異なるが、通常1~100重量%、好ましくは50~100重量%である。例えば、液剤の場合には、TCRシグナルを増強させることができる物質の製剤中における含量は、1~100重量%が好ましい。カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤の場合には、TCRシグナルを増強させることができる物質の製剤中における含量は、通常約10~100重量%、好ましくは50~100重量%であり、残部は担体である。製剤は、単位投与製剤に製剤化するとよい。
- [0037] TCRシグナルを増強させることができる物質の投与量、投与の回数及び頻度は、TCRシグナルを増強させることができる物質の種類、被験者の症状、年齢、体重、投与方法、投与形態などにより異なるが、例えば、TCRシグナルを増強させることができる物質がCD45阻害剤である場合には、通常、成人一人当たり、有効成分の量に換算して、0.005 μg (又は μl) ~25000 mg (又はml) /kg体重程度、好ましくは0.05 μg (又は μl) ~12500 mg (又はml) /kg体重程度を少なくとも1回、所望の効果が確認できる頻度で投与するとよい。TCRシグナルを増強させることができる物質が細胞である場合には、通常、成人一人当たり、 1×10^6 個/人~ 1×10^{11} 個/人程度、好ましくは 5×10^6 個/人~ 2×10^{10} 個/人程度を少なくとも1回、所望の効果が確認できる頻度で投与するとよい。
- [0038] PD-1シグナル阻害剤 (例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体)

とTCRシグナルを増強させることができる物質の比率は、TCRシグナルを増強させることができる物質がCD45阻害剤である場合には、1:0.1~1:100（質量の比率）が適当であり、好ましくは1:1~1:50であり、TCRシグナルを増強させることができる物質が細胞である場合には、PD-1シグナル阻害剤 240 mgに対して、細胞 1×10^6 ~ 1×10^{10} 個が適当であり、好ましくは 5×10^6 ~ 2×10^9 個である。

[0039] 本発明は、また、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、TCRシグナルを増強させることができる物質を医薬的に有効な量で被験者に投与することを含む、がん、感染症又はそれらの組み合わせを予防及び/又は治療する方法も提供する。さらに、本発明は、がん、感染症又はそれらの組み合わせの治療のための、TCRシグナルを増強させることができる物質の使用であって、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、TCRシグナルを増強させることができる物質が投与される前記使用を提供する。さらにまた、本発明は、がん、感染症又はそれらの組み合わせを治療する方法に使用するための、TCRシグナルを増強させることができる物質の使用であって、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、TCRシグナルを増強させることができる物質が投与される前記使用も提供する。本発明は、がん、感染症又はそれらの組み合わせを予防及び/又は治療することに使用するためのT細胞受容体（TCR）シグナルを増強させることができる物質であって、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与される前記物質も提供する。

[0040] また、本発明は、TCRシグナルを増強させることができる物質を含む、PD-1シグナル阻害活性を増強する薬剤を提供する。本発明は、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、T細胞受容体（TCR）シグナルを増強させることができる物質を有効な量で被験者に投与することを含む、PD-1シグナル阻害活性を増強する方法も提供する。

[0041] 本発明の薬剤は、PD-1シグナル阻害剤との併用薬又は配合剤として用いることができる。PD-1シグナル阻害剤と、TCRシグナルを増強させることができ

る物質との併用及び合剤化については、上述した。本発明の薬剤は、医薬としての用途の他、実験試薬としても利用できる。

[0042] さらにまた、本発明は、CD45阻害剤及び/又は細胞を含む、TCRシグナル増強剤を提供する。本発明は、CD45阻害剤及び/又は細胞を有効な量で被験者に投与することを含む、TCRシグナルを増強する方法も提供する。CD45阻害剤や細胞については上述した。本発明の薬剤は、医薬としての用途の他、実験試薬としても利用できる。TCRシグナルを増強することで、PD-1シグナル阻害剤の抗腫瘍効果が向上する他、感染症に対する治療効果の亢進などの効果が得られうる。

実施例

[0043] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

[実施例1]

[要旨]

CD8陽性細胞は、抗腫瘍反応において主要な役割を果たし、がん細胞を直接殺傷する。高齢者におけるCD8陽性細胞免疫の強い抑制は、がんや他の加齢性疾患に関係する。本研究は、加齢に伴うPD-1阻害治療耐性におけるT細胞機能の役割を検討した。我々は、高齢担癌マウスの所属リンパ節において、CD44^{low}CD62L^{low} CD8陽性T細胞の形成が低下することを見出した。はじめに、P4細胞は *in vitro* 刺激によりナイーブCD8陽性T細胞から誘導され、次に、エフェクター/メモリー細胞へと分化した。P4細胞では、抗原特異的なT細胞の活性化やミトコンドリアの機能に重要な、1炭素(1C)代謝に関連する遺伝子の発現が特異的に高かった。この知見と一致して、1C代謝関連遺伝子の発現やミトコンドリア呼吸が若齢CD8陽性T細胞に比べて、高齢CD8陽性T細胞では低下していた。オブアルブミン(OVA)特異的なT細胞受容体(TCR)遺伝子を導入した高齢マウスでは、OVAを発現する腫瘍細胞の移植によるZAP-70の活性化は誘導されなかった。このTCRシグナル抑制は高齢CD8陽性細胞におけるCD45RB脱リン酸化酵素の発現上昇が原因であることが示唆された。驚くべき事に、非自己細胞の加齢PD-1欠損マウスへの移植による強い刺激は、CD45RB発現を正

常レベルへと減少させ、P4細胞の誘導やCD8陽性T細胞における1炭素代謝酵素の発現、抗腫瘍活性を回復させた。これらの知見は、P4サブセットの誘導不全が加齢に伴うPD-1阻害耐性に関与することを示唆し、それらが、強いTCR刺激により回復可能なことを示す。

[0044] [Significant Statement]

加齢は抗腫瘍免疫を抑制することが知られているにも関わらず、詳細なメカニズムはほとんど分かっていなかった。ここで我々は、前エフェクター様のT細胞であるCD44^{low}CD62L^{low} CD8陽性T細胞サブセット (P4) の形成抑制により加齢マウスにおけるPD-1阻害抗腫瘍治療に対する耐性が説明出来ることを見出した。加齢ナイーブCD8陽性T細胞におけるCD45RB発現の増加はTCRシグナルを抑制し、その結果、1C代謝遺伝子を高発現するサブセットであるP4細胞が減少する。このP4細胞の減少や抗腫瘍活性の抑制は、非自己細胞による強い免疫刺激により回復した。これらの知見は加齢に伴う抗腫瘍免疫の抑制メカニズムについての有用な洞察を提供し、高齢がん患者のための治療戦略開発のための基礎となるであろう。

[0045] [緒言]

加齢は多くの生理機能に影響し、その結果、多様な疾病の発症に関与する。ゲノムにおける変異の蓄積やがん細胞に対する免疫監視の低下などにより、がんの危険性は加齢に伴い増加する (1, 2)。抑制された免疫機能を再活性化する免疫治療は、がん治療のために効果的な方法として登場した。様々ながん免疫治療のうちで、PD-1/PD-L1経路を遮断する抗体は様々ながん種の患者において非常に高い有効性を示した (3-6)。しかしながら、臨床試験により多くのがん患者がPD-1阻害治療に対して反応しないことが示された (7, 8)。そのような治療は、加齢マウスモデルにおいて効果が示されず、また、同様の傾向がいくつかの臨床試験で示されている (9-12)。

[0046] 免疫老化は免疫細胞における量的・質的变化により生じる。T細胞における主要な量的変化の一つは胸腺の退縮によるTCRレパトアの多様性の減少であり、末梢でのナイーブ細胞を減少させる (13-15)。加えてTCRシグナル障害、

エフェクターやメモリー細胞への分化能の抑制、サイトカイン産生の減少などの機能的な障害が高齢者において末梢のT細胞において蓄積する(16, 17)。実際に、加齢に伴う変化は明確に定義されたCD8陽性T細胞サブセットの割合に大きく影響する(18-20)。マウスでは表面マーカーであるCD44やCD62L (L-selectin) を用いて3つの主要なCD8陽性T細胞を区別する: ナイーブ (P1とも呼ばれる; CD44^{low}CD62L^{high}) やセントラルメモリー (P2; CD44^{high}CD62L^{high})、エフェクター/メモリー (P3; CD44^{high}CD62L^{low})。ナイーブマウスにおいて残るCD44^{low}CD62L^{low} (P4) CD8陽性T細胞サブセットはとてもマイナーな集団である。ナイーブT細胞は抗原刺激によりエフェクターT細胞へと分化する(14, 21)。いくつかのエフェクター細胞はメモリー細胞へと分化し、同じ抗原刺激に対して素早く反応しエフェクター細胞への分化が可能である。高齢のヒトやマウスは、胸腺からのT細胞の産生が減少するため、T細胞を維持するために自己抗原依存的な増殖(恒常性増殖)が必要とされる(22, 23)。高齢者において、この恒常性増殖は徐々にナイーブT細胞の分化を促進し、その結果、エフェクターやメモリー細胞を含む分化したT細胞の割合を増加させる。

[0047] T細胞の増殖や分化はT細胞受容体(TCR)シグナリングカスケードにより促進される。TCRシグナリング分子のリン酸化や脱リン酸化はシグナル複合体形成やTCRシグナルの伝播に影響を及ぼす。CD45は膜貫通型の脱リン酸化酵素であり、lymphocyte protein kinase (Lck) のチロシンのリン酸化レベルを制御することでTCRシグナルの調整において主要な役割を果たす。このLckはTCRシグナルの下流因子であるTCR ζ や ζ -chain-associated protein (ZAP)-70、the linker of activated T cells (LAT)の活性化因子として働く(24, 25)。若いナイーブCD8陽性T細胞において、高いCD45発現はZAP-70やPLC γ の脱リン酸化を介してTCRシグナル伝達が阻害される(26)。しかしながら、加齢はTCRシグナルを変動させることが知られているにも関わらず、その分子機構はほとんど明らかになっていない(27, 28)。

[0048] 活性化や増殖している細胞では、1C代謝が一般的に亢進し、プリンやチミジンの生合成やアミノ酸生産、エピジェネティック制御や酸化還元制御を

介して生存や分化を支えている (29, 30)。近年の報告により、1C代謝は初期のCD4陽性又はCD8陽性T細胞の活性化の間に、最も良く誘導される代謝経路の一つであることが示されている (31, 32)。T細胞の活性化の後、1C代謝の亢進は1Cユニット由来の新たな核酸の生合成に必要なセリンのプロセッシングを促進し、それは、抗原特異的なT細胞の増殖や分化、そしてエフェクター機能に必要である。この1C代謝経路はまたミトコンドリアのtRNAメチル化によるミトコンドリアのタンパク質合成制御を介してエネルギー産生に関与している (33, 34)。ミトコンドリアの機能や1C代謝は加齢CD4陽性T細胞において若齢CD4陽性T細胞よりも低いため (35)、T細胞の加齢が1C代謝の不活性化に関与している可能性が考えられる。

[0049] 加齢に伴うPD-1阻害による抗腫瘍効果の減弱の機構を解明するために、我々は若齢と高齢のPD-1ノックアウト (KO) 又は野生型 (WT) 由来のCD8陽性T細胞を用いて腫瘍移植あり無しでの比較を行った。我々は、高齢マウスにおけるPD-1欠損又は阻害抗腫瘍治療に対する抵抗性はP4サブセットの誘導阻害によるものであることを見出し、P4細胞がナイーブとエフェクター細胞の中間体であり1C代謝関連遺伝子を強く発現していることを明らかにした。加齢マウスにおけるこの抑制はCD45RB発現の上昇を介したTCRシグナルの抑制によるものであり、強い免疫刺激により回復可能である。これらの知見は、代謝変動や抗腫瘍活性に関係するCD8陽性T細胞サブセットにおける加齢依存的な変化に関する機構を理解する上での新たな手がかりとなるだろう。

[0050] [結果]

加齢マウスにおけるCD44^{low}CD62L^{low} (P4) CD8陽性T細胞誘導の抑制

若齢PD-1 KOマウスは強く腫瘍増殖を抑制する一方で、加齢PD-1 KOマウスでは腫瘍増殖の拒絶は見られなかった (図1A&B)。我々はまた高齢の野生型マウスがPD-1阻害腫瘍治療に対して耐性を示すことを観察した (図6A&B)。担がん有り無しのPD-1 KOマウス由来の末梢リンパ節と所属リンパ節の細胞におけるCD8陽性T細胞サブセットの比較解析によりマイナーCD8陽性T細胞サブセットであるP4のパーセンテージが若齢マウスにおいて腫瘍移植により増加

し、高齢マウスにおいては増加しないことが示された（図1C&D）。他のCD8陽性T細胞における腫瘍移植による変化は若齢と高齢PD-1K0の両マウスにおいてP4サブセットの変化よりも小さかった（図1C&D）。同様の結果が野生型のマウスにおいても観察された（図6C&D）。これらの結果は、P4サブセットは腫瘍拒絶の間に誘導され、PD-1阻害又は欠損で見られる抗腫瘍活性に必要である可能性が示唆された。

[0051] P4細胞はP1とP3細胞との間の中間体であり、抗腫瘍活性の潜在能力を保持する。

P4細胞誘導の抑制が高齢マウスにおけるPD-1阻害治療耐性に関与するかどうかを調べるために、CD8陽性P4サブセットの機能的な特徴を調べた。我々ははじめに、P4細胞の抗腫瘍活性を若齢の担がんCD8 K0マウスに単離したP4細胞を移植することで検討した。TCRレパトアの偏りを防ぐために、我々はOVAペプチドに対して特異的に反応するTCRを発現するCD8陽性T細胞を保持するTCR遺伝子導入OT-1マウスを使用した。CD8陽性T細胞のP3とP4サブセットはOVAを発現するMC38腫瘍細胞（MC38-OVA）をOT-1マウスの尾静脈内に投与することにより誘導し、その5日後に脾臓から単離した。同じ数のP3又はP4細胞はMC38-OVAを移植した若齢CD8 K0マウスに養子導入された。MC38-OVA増殖はP3又はP4細胞を導入したマウスにおいて強く抑制された（図2A）。注目すべきことに、移植から6日後の末梢血において移植された全てのP4細胞はP3細胞へと分化していた（図2B）。これらの結果は、P4細胞はP3細胞へと分化することで腫瘍を拒絶する能力を保持することを示唆する。

[0052] P1やP2細胞は活性化の間にP3細胞へと分化することが知られているが、P4細胞はその数が少ないためほとんどその特徴が明らかにされていない。どのサブセットがP4細胞の起源なのかやどのサブセットに分化するかを調べるために、P1やP2、P4細胞は若齢のPD-1 K0マウスから単離され、*in vitro*で抗CD3/CD28抗体とIL-2により刺激された（図2C）。*in vivo*の結果と一致し、単離したP4細胞はこれらの条件下では主にP3細胞へと分化した（図2D）。次に、我々はP4細胞がP1又はP2細胞から形成されるかどうかを検討した。図2Eと2F

に示すように、P4細胞はin vitro 刺激から2日後にP1細胞から形成されたが、P2細胞からは形成されなかった。これらの結果は、刺激を受けたナイーブP1 CD8陽性T細胞はP4細胞を形成し、さらにP3細胞へと分化することを示した。in vivo実験により、P4細胞は加齢マウスにおいて誘導されないことが示されているため(図1C&D)、我々はin vitroにおける加齢P1細胞のP4細胞を生産する能力を検討した。驚くべき事に、P4とP3細胞は抗CD3/CD28抗体とIL-2との培養の後で若齢のP1細胞と同様に高齢のP1細胞から誘導された(図2G)。これらの知見は、高齢マウス由来のP1細胞は抗CD3/CD28抗体のような強いin vitro TCR刺激によりP4細胞へと分化することが可能であるが、通常の抗原刺激では誘導されないことが示唆された。

[0053] P4細胞における1炭素代謝関連遺伝子に発現亢進

加齢マウスにおけるP4細胞の抗腫瘍活性における役割を理解するために、我々は若齢PD-1KOマウスにおけるCD8陽性T細胞サブセット間(P1, P2, P3とP4)の遺伝子発現プロファイルを比較した。グローバルな遺伝子発現の階層的なクラスタリングはCD8陽性T細胞のそれぞれのサブセットが異なる遺伝子発現特性を持つことを示した(図3A)。活性化T細胞で発現する遺伝子は(Ctll4, Prdm1やIl2rbのような)、P1細胞よりもP4細胞でより高い発現を示した(図3B)。一方、分化したT細胞で発現する遺伝子は(Il7r, IfngやTbx21のような)、P2やP3細胞よりもP4細胞において低い発現を示した(図3B)。これらの結果は、P4細胞は、活性化しているが成熟前の状態でありP2やP3細胞のようなより分化したCD8陽性T細胞のサブセットとは異なることを示唆し、P4細胞はP1細胞由来の前エフェクター様の細胞であるという我々の仮説を支持している。

[0054] 次に、どの生物学的過程がこれらのCD8陽性T細胞において上方制御されているかどうかをしらべるために、遺伝子オントロジーエンリッチメント解析を行った。P4細胞において、最も有意に上方制御されている過程はセリン、グリシンや葉酸類似体の転換に関与する1C代謝経路に関係していた(図3C&D)。1C代謝関係遺伝子の発現は、マイクロアレイ解析やqPCRにより示すよう

にP4細胞において最も高かった（図3E&F）。これらの結果は、1C代謝経路はCD8陽性T細胞の分化の間にP4細胞において選択的に発現上昇していることを示す。

[0055] 若齢の野生型やPD-1 K0マウスのトータルCD8陽性T細胞において、腫瘍の接種は1C代謝関係遺伝子の発現を増加させ（図3G）、そのことはP4細胞の形成により説明可能であろう（図1C と図 6 C）。PD-1 K0マウスにおけるP4細胞誘導の高い効率と一致して（図1C と図 6 C）、若齢PD-1 K0マウスのCD8陽性T細胞は野生型マウスに比べて、ほとんどの1C代謝関連遺伝子はMC38腫瘍細胞接種に応答して高いレベルで発現した（図3G）。対照的に、加齢マウス由来のトータルCD8陽性T細胞におけるこれらの遺伝子発現は、マウスの遺伝子型に関係なく、腫瘍接種による明らかな変動を示さなかった。

[0056] 免疫反応の間、ミトコンドリア機能の亢進はCD8陽性T細胞の活性化に非常に強く関与する（38, 39）。P4細胞はミトコンドリアtRNA修飾の制御因子であるShmt2の高い発現を示すため、我々は1C代謝の活性化は一部、ミトコンドリアの機能を亢進させることにより抗腫瘍活性を促進させるだろうと考えた。若齢や加齢マウスにおけるミトコンドリアの活性を調べるために、我々はトータルCD8陽性T細胞における酸素消費速度（OCR）を担がん若齢と加齢マウスでの比較を行った。野生型又はPD-1 K0マウス由来の加齢CD8陽性T細胞は基礎呼吸や予備呼吸能のかなりの減少を伴うOCRの明らかな異常を示した（図3H & I）。合わせて考えると、これらの結果は加齢マウスにおけるP4細胞誘導の欠如はCD8陽性T細胞におけるミトコンドリア機能の減少に繋がり、おそらくそれは1C代謝の活性化の抑制を介することを示唆する。

[0057] 加齢マウスにおけるCD45RB発現亢進

P4細胞はin vitro 刺激によりP1細胞から形成されることが示されたため、我々は高齢マウスで見られた腫瘍移植に伴うP4細胞誘導の低下は高齢P1細胞におけるTCRシグナルの非効率的な伝達により引き起こされうると考えた。TCRシグナルとP4細胞形成との間の関係を検討するために、我々はOT-1マウスにMC38-OVAを注射した。末梢リンパ節におけるP4細胞のパーセンテージは若齢

マウスにおいて著しく増加したが、加齢マウスでは増加しなかった（図4A&B）。TCRシグナル伝達を評価するために、我々は若齢と加齢OT-1マウス由来のCD8陽性T細胞全体におけるTCRシグナリングに重要なZAP-70のリン酸化（40）を調べた。MC38-OVA注入は若齢マウスにおけるリン酸化ZAP-70を発現するCD8陽性T細胞の割合を増加させた（図4C）。このことは抗原刺激によるTCRシグナルの活性化は高齢OT-1マウスにおいて阻害されていることを示唆している。注目すべきことに、顕著な違いがOVA特異的なMHCテトラマーの強度において見られなかったため（図7A&B）、若齢や高齢マウスのOT-I T細胞のTCR発現レベル・結合力に違いが無い事が示された。そのため、加齢マウスで見られた抗原刺激によるTCRシグナルの活性化の阻害はTCRとMHC/抗原との相互作用以外の機構が関与するだろうと考えられる。

[0058] ナイーブCD8陽性T細胞のTCR刺激に対する反応は細胞表面のCD45の密度が高い細胞において弱くなることから（26）、我々はマウスのナイーブやメモリーT細胞において主に発現するCD45のアイソフォームであるCD45RBの発現レベルを解析した。CD8陽性T細胞全体におけるCD45RB発現は加齢OT-1マウスで若齢OT-1マウスよりも著しく高かった（図4D）。CD45RB発現における加齢の影響は、P1やP4細胞においてP2やP3細胞よりも大きかった（図4D）。同様に、最も高いCD45RB発現の増加が加齢の野生型やPD-1 KOマウスのP1細胞において観察され（図8A&B）、P4細胞誘導の阻害はP1細胞におけるCD45RB発現上昇による可能性が示唆された。CD45RB発現がTCRシグナル伝達によるCD8陽性T細胞の活性化を抑制するかどうかを調べるために、我々はCD45特異的な阻害剤処理後のOT-I CD8陽性T細胞におけるZAP-70のリン酸化を評価した。in vivoの結果と同様に、p-ZAP-70陽性CD8陽性T細胞に割合は若齢CD8陽性細胞において増加したが加齢CD8陽性T細胞では増加しなかった（図4E）。この条件下で、CD45阻害剤の添加は加齢CD8陽性細胞において若齢と同様にp-ZAP-70陽性細胞の誘導を増加させた。これらのデータは加齢に伴う腫瘍拒絶抑制は加齢CD8陽性T細胞におけるCD45RBの発現増加が原因である可能性を示す。

[0059] 異種細胞治療は加齢マウスにおけるP4細胞誘導を促進させ、CD8陽性T細胞の

抗腫瘍能を回復させる。

上記に示すように、加齢マウスにおけるP1からP4への移行の抑制が強い *in vitro* 刺激により回復することから、我々は異種細胞（ヒトバーキットリンパ腫、Daudi細胞）を用いた強い刺激が加齢PD-1 KOマウスにおけるP4 CD8陽性T細胞の誘導を回復させることができるかどうかを調べた（図5A）。Daudi細胞の尾静脈注射から10日後（day 0: MC38腫瘍細胞移植前）、P4細胞の割合は若齢と加齢PD-1 KOマウスの末梢リンパ節において強く増加したが、P1からP3細胞の割合は有意には増加しなかった（図5B）。予想通りに、加齢PD-1 KOマウス由来のCD8陽性T細胞において、1C代謝関連遺伝子の発現レベルはDaudi細胞の注入により増加した（図5C）。これらの知見と一致して、Daudi細胞注入は加齢PD-1 KOマウス由来のP1細胞におけるCD45RBの発現を減少させた（図5D）。

[0060] Daudi細胞注入は加齢マウスにおけるMC38腫瘍増殖を強く抑制し、生存期間を延長させた（図5E&F）。野生型マウスにおける加齢に伴う抗PD-L1抗体に対する不応答性もまたDaudi細胞注入により回復した（図9A-E）。腫瘍移植から6日後、p-ZAP-70陽性細胞の割合は、Daudi細胞を注入したPD-1 KOマウスにおいて増加したことから（図5G）、異種刺激は腫瘍抗原に対するTCRシグナルを増強させることが示唆された。我々はさらに、Daudi細胞治療が腫瘍抗原反応性のCD8陽性T細胞の増殖を亢進させるかどうかを調べた。MC38-OVA細胞はDaudi細胞注入から10日後にPD-1 KOマウスに移植し、OVAテトラマー陽性CD8陽性T細胞の出現をモニターした。OVAテトラマー陽性CD8陽性T細胞の割合は、加齢PD-1 KOマウスの所属リンパ節や腫瘍組織においてDaudi細胞の注入により増加したことから（図5H&I）、この治療は結果として抗原特異的なCD8陽性T細胞の誘導を増加させることが示された。Daudi細胞による前刺激が加齢マウスのCD8陽性T細胞におけるP4細胞誘導や1C代謝を亢進させると仮定するならば、Daudi細胞注入が基礎呼吸や予備呼吸能の両方を増加させたことは妥当な結果だろう（図10A-C）。また、アロ抗原としてBalb/cマウス由来の脾細胞の注入も加齢野生型マウスにおけるPD-1阻害治療の抗腫瘍効果を亢進

させた (図 1 1 A-D)。これらのデータは異種又はアロ細胞治療による強い免疫刺激は加齢マウスにおいて阻害されたCD8陽性T細胞の抗腫瘍反応を回復させ、PD-1欠損又は阻害の抗腫瘍効果を改善させることを示唆する。まとめると、これらの知見は、非自己の細胞による強い免疫刺激はTCRシグナル伝達の回復やP4サブセットの誘導を介して加齢マウスにおける不十分な抗腫瘍反応を回復させ、それは、PD-1欠如や阻害治療の効果を亢進させることを示す。

[0061] [考察]

高齢者や加齢動物は加齢に伴うCD8陽性T細胞反応の抑制により免疫治療に対して不応答性を示すことが知られている (9-11)。CD8陽性T細胞の腫瘍抗原に対する反応抑制のメカニズムはほとんど分かっていない。我々は、高齢担がんマウスがCD45RB発現の増加によりTCRシグナルが減弱させられているため、P4細胞が少ないことを見出した。このP4細胞の特徴はこれまでに分かっていなかった。P4サブセットはナイーブP1サブセットから分化し、そして、抗腫瘍活性に重要なエフェクター/メモリーサブセット (P3) へと成熟する (42, 43)。P4サブセットは発達や増殖細胞の生存と関係する10代謝関連遺伝子の発現が高いという特徴を示す (29, 32, 44, 45)。これらの加齢に伴うCD8陽性T細胞の分化やPD-1阻害治療効果の阻害は非自己の細胞を用いた強い免疫刺激により回復する。

[0062] 加齢に伴うナイーブT細胞レパトアの偏向は高齢者におけるT細胞反応の抑制の主な原因であると提唱されてきた (46, 47)。しかしながら、我々は全てのCD8陽性T細胞がOVA特異的なTCRを持つOT-1遺伝子導入マウスが、加齢に伴い腫瘍細胞に発現する特異的な抗原に対して非感受性を示すことを見出した。我々の研究はさらに、インビトロ又はインビボでの異種細胞治療による強いTCR刺激がP4細胞誘導を回復させることを明らかにした。同様に、OVA特異的なTCRを発現する加齢OT-II CD4陽性T細胞において見られる抗腫瘍反応の障害が加齢に伴うIL-6増化によるTh1分化阻害により引き起こされる (48)。これらの結果は、レパトア制限は高齢動物におけるT細胞反応抑制の主な原因ではない可能性を示した。

[0063] これまでに、TCRシグナリングが加齢に伴い抑制され、細胞応障害を引き起こされることが報告されている (49, 50)。T細胞活性化によるp-ZAP-70レベルの増加は高齢者や加齢マウスにおいて減少する (51, 52)。これらの報告と一致して、我々はまたZAP-70のリン酸化が腫瘍細胞を移植した加齢マウスにおいて低いことを見出した。我々のデータはこの変化は加齢P1細胞におけるCD45RB発現の増加によって起きることを示した。CD45はチロシンリン酸化酵素であるLckの394番目のチロシンの脱リン酸化することでTCRシグナリングを負に制御し、ZAP-70の活性化の抑制を引き起こす (53)。実際に、p-ZAP-70陽性CD8陽性T細胞の誘導はCD45阻害剤の処理により回復した。これらの結果は、加齢動物におけるCD8陽性T細胞反応の阻害はCD45RBの発現増加を介したナイーブT細胞におけるTCRシグナリング欠損によって引き起こされるという仮説を強く支持する。

[0064] 多くのT細胞はアロ又は異種MHC分子により直接的 (例、ドナーMHCが提示するドナーペプチド) 又は間接的に (例、レシピエントMHCが提示するドナーペプチド) 活性化される (54-56)。我々は、加齢マウスにおけるP4細胞の回復は非自己抗原のTCR認識によると推測する。TCRは本来、広い範囲の異なるペプチドを認識するため (57, 58)、非自己抗原により回復したP4細胞又はプレ活性化P1細胞は腫瘍抗原に交差反応し、抗腫瘍反応の増加に繋がる。我々のデータはまた異種細胞治療は加齢マウスのCD8陽性T細胞におけるCD45RB発現を減少させるポテンシャルを保持することを示唆する。CD45RB発現が加齢や非自己細胞により制御される分子メカニズムを明らかにするために更なる研究が必要とされる。

[0065] [材料及び方法]

マウスと細胞

全てのマウスは京都大学大学院医学部動物実験施設又は理化学研究所生命科学センターにおいて、実験の障害になるような特定の病原体が存在しないSPF環境下で飼育され、適切な実験ガイドラインのもとで使用された。PD-1^{-/-} (PD-1K0) マウスは相同組換えにより当研究室で作製したものを使用し

た (59)。C57BL/6野生型マウスはCharles River Laboratories Japanより入手した。OT-1 TCR遺伝子導入やCD8^{-/-} (CD8 KO) マウスはThe Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA) から購入した (ワシントンメディカルセンターのM. B. Bevan又はトロント大学のT. Makにより寄託された)。マウス大腸がん (MC38) 細胞系はJ. P. Allison、Memorial Sloan-Kettering Cancer (New York, NY) により譲渡され、オブアルブミン (OVA) 発現MC38細胞はpMXs-based OVA-F2A-EGF0レトロウイルスによるMC38の形質転換により作製された。細胞は10%の非動化したウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Nacalai Tesque; 26253-84) を含むRPMI 1640 (Gibco; 11875-093) を用いて、マイコバクテリア感染の無い状況下で培養を行った。

[0066] マウス治療モデル

MC38細胞は (5×10^5 又は 2×10^6)、マウスの右腹部の皮内に移植された (day 0)。MC38細胞移植から5日後 (day 5)、それらのマウスは抗PD-L1抗体(clone 1-111A.4, 京都大学大学院医学研究科免疫ゲノム医学研究室にて作製・保管 (Immunology Letters 84(2002) 57-62) (6 mg/kg)を腹腔内に投与された。この抗PD-L1抗体投与は、6日毎に3回繰り返された (day 5, 11, and 17)。抗PD-L1抗体のアイソタイプ (Rat IgG2a) はコントロールとして使用された。腫瘍増殖は測径器を使用した腫瘍サイズの計測によりモニターされ、体積は、 π (縦 × 横 × 高さ)/6の式により算出した。非自己細胞の移入は腫瘍細胞移植10日前にバーキットリンパ腫Daudi細胞又はマイトマイシンC (MMC) 処理をしたBALB/c又はコントロールとしてのC57BL/6N由来の脾細胞 (2×10^6 細胞/マウス) の尾静脈からの注射により行った

[0067] 解析や培養のための細胞単離

末梢や所属リンパ節細胞や腫瘍浸潤リンパ球は以前記述したように単離した (39)。脾細胞解析のために、脾臓は手早くほぐされ、赤血球を溶解させるために塩化アンモニウムカリウム溶液に懸濁された。脾細胞は洗浄され、10% ウシ胎児血清、L-グルタミン、 $55 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール、ペニシリン-ストレプトマイシン、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco)、1% MEM

非必須アミノ酸溶液 (Gibco) を含むPRMI 1640内溶液 (T細胞培養液) に再懸濁された。我々はさらに、CD8陽性T細胞のサブセットをCD8a (Ly-2) マイクロビーズ (Miltenyi Biotec; 130-117-044) とFACSAria (BD Biosciences) により単離した。末梢血細胞の解析のために、集めた末梢血細胞は塩化アンモニウムカリウム溶液で処理され、T細胞培養液により洗浄された。精製された細胞は、抗CD3/28 Dynabeads (Gibco) とリコンビナントヒトIL-2 (20 U/mL; PeptoTech) を加えたT細胞培養液で刺激された。MC38-OVA細胞を用いてCD8陽性T細胞を刺激するために、OT-1マウスのリンパ節から単離されたCD8陽性T細胞はT細胞培養液中でMMC処理をしたMC38-OVA細胞と共培養された。刺激から1日後に、その細胞は0.05 μ M CD45阻害剤VI (EDM Millipore) で1時間、処理された。

[0068] フローサイトメトリー解析

解析のために以下の抗体を使用した。CD3 (クローン145-2C11) とCD8 (クローン53-6.7) (Invitrogen) ; phospho-ZAP70/Syk (クローンn3koku5) (Invitrogen) 、CD45.1 (クローンA20) 、CD45.2 (クローン104) 、CD44 (クローンIM7) とCD62L (クローンMEL-14) (TONBO biosciences又はBioLegend) ; CD8 (クローンKT15、MBL Life Science); CD45RB (クローン16A、BD Pharmingen)。H2Kb Negative (SIY) Tetramer-SIRYYGL-APCとH-2Kb OVA Tetramer-SINFELK-APC (TS-M008-2) はMBL Life Scienceフローサイトメトリー解析は、FACSCant II (BD Biosciences) とFlowJo software (FlowJo LLC)を用いて行った。

[0069] CD8 KOとOT-1マウスモデル

P3とP4細胞を誘導するために、MC38-OVA細胞 ($1-2 \times 10^6$) はOT-1マウスに尾静脈注射により移入された。その5日後にP3とP4細胞はそれらのマウスから単離された。それぞれの単離されたCD8陽性T細胞は5日前に 2×10^5 のMC38-OVA細胞を皮内移植されたCD8 KOマウスの尾静脈より注入された。末梢血はそれから6日後に移植した細胞の分化を解析するために取得された。

[0070] マイクロアレイ解析

トータルRNAは3から6匹を統合したトータルCD8陽性T細胞又は9匹を統合したCD8陽性T細胞サブセットからNucleospin RNA (Macherey-Nagel) を使用して生産者のプロトコールに従い抽出した。マイクロアレイ解析はマクロジェン株式会社によりマウス 8×60K v2マイクロアレイを使用して行われた。データはthe GEO repositoryに関連番号GSE161659とGSE161660として登録された (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。Gene ontology enrichment解析は、Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) のためのデータベースを用いて行われた。遺伝子発現変動はR3.1.2又はRStudio version 1.1.383を用いて可視化された。

[0071] リアルタイムPCR

トータルRNAは細胞からNucleospin RNA (Macherey-Nagel) を使用して抽出し、製造者のマニュアルに沿ってRevatracAce逆転写酵素 (Toyobo) とランダムプライマーを用いたcDNA合成のために使用された。リアルタイムPCRはthe Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCT system (ABI) とPowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて示したmRNAを増幅するために行った。それぞれの遺伝子の発現レベルは β -actinのmRNAレベルでノーマライズした。プライマー配列は以下の通りである：Shmt1 forward (Fw), 5' -CCAGAGTGCTGTGGCAACTC-3' (配列番号1) ; Shmt1 reverse (Rv), 5' -GCAAACACAGGCTGTTCCCTG-3' (配列番号2) ; Shmt2 Fw, 5' -GACAGTTGAGGACACCTGGC-3' (配列番号3) ; Shmt2 Rv, 5' -CCAGAGAGGAGTGACATCTC-3' (配列番号4) ; Phgdh Fw, 5' -TGGCCTCGGCAGAAATTGGAAG-3' (配列番号5) ; Phgdh Rv, 5' -TGTCATTGCAAGCCTGTGGT-3' (配列番号6) ; Psat1 Fw, 5' -GATGAACATCCCATTTCGCATTGG-3' (配列番号7) ; Psat1 Rv, 5' -GCATTATACAGAGAGGCACGAATG-3' (配列番号8) ; β -actin Fw, 5' -TAAGGCCAACCGTGAAG-3' (配列番号9) ; and β -actin Rv, 5' -GAGGCATACAGGGACAGCAC-3' (配列番号10)。

[0072] 酸素消費速度 (OCR) 解析

OCRアッセイは若干の改良をし、以前の記述に従い行った (39)。所属リン

パ節から単離したCD8陽性T細胞の酸素消費速度はthe Seahorse XFe96 Extracellular Flux assay kit and Seahorse XF Cell Mito Stress test kit (Agilent Technologies) を使用してXFe96 Extracellular Flux analyzer (Agilent Technologies) で解析された。CD8陽性T細胞は (3×10^5 /ウェル) Cell-Tak (Corning) でコートしたXFe96プレートに播種された。予備呼吸能はOCRグラフから以前に記述したように算出された (60)。基礎呼吸は非ミトコンドリア呼吸との引き算によって (オリゴマイシン添加前の値からロテノン/アンチマイシンA添加後の値) 算出された (61)。

[0073] 統計解析

データはPrism 7 (Graph pad)を用いて解析し、結果は平均値±標準誤差として表される。二つの群を比較する場合は、スチューデントの検定 (独立2群の両側検定) を行った。二つ以上の群を比較する場合、統計的有意性は一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて複数群について評価し、次に多重比較 (Tukey' s post hoc test) により差を評価した。生存率は Kaplan-Meier 法により評価し、統計的有意性はログ・ランク検定により決定された。

[0074] データ利用可能性

全てのシーケンスデータはNCBI GEOにアクセッションID GSE161659 and GSE161660として登録されている。

[0075] 参考文献

1. T. Finkel, M. Serrano, M. A. Blasco, The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774 (2007).
2. K. Tomihara, T. J. Curiel, B. Zhang, Optimization of immunotherapy in elderly cancer patients. *Crit Rev Oncog* 18, 573-583 (2013).
3. S. L. Topalian et al., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366, 2443-2454 (2012).
4. A. Ribas et al., Association of Pembrolizumab With Tumo

- r Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* 315, 1600–1609 (2016).
5. M. Reck et al., Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 375, 1823–1833 (2016).
 6. P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* 283, 110–120 (2018).
 7. W. Zou, J. D. Wolchok, L. Chen, PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 8, 328rv324 (2016).
 8. A. L. Shergold, R. Millar, R. J. B. Nibbs, Understanding and overcoming the resistance of cancer to PD-1/PD-L1 blockade. *Pharmacol Res* 145, 104258 (2019).
 9. J. Brahmer et al., Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373, 123–135 (2015).
 10. C. Helissey, C. Viciier, S. Champiat, The development of immunotherapy in older adults: New treatments, new toxicities? *J Geriatr Oncol* 7, 325–333 (2016).
 11. A. Padron et al., Age effects of distinct immune checkpoint blockade treatments in a mouse melanoma model. *Exp Gerontol* 105, 146–154 (2018).
 12. J. Sceneay et al., Interferon Signaling Is Diminished with Age and Is Associated with Immune Checkpoint Blockade Efficacy in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Discov* 9, 1208–1227 (2019).
 13. K. Naylor et al., The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 174, 7446–7452 (2005).

14. M. Ahmed et al., Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naive CD8 T cell repertoire of aged mice. *J Immunol* 182, 784–792 (2009).
15. Q. Qi et al., Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13139–13144 (2014).
16. J. Nikolich-Zugich, G. Li, J. L. Uhrlaub, K. R. Renkema, M. J. Smithey, Age-related changes in CD8 T cell homeostasis and immunity to infection. *Semin Immunol* 24, 356–364 (2012).
17. M. T. Ventura, M. Casciaro, S. Gangemi, R. Buquicchio, Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clin Mol Allergy* 15, 21 (2017).
18. E. J. Wherry, R. Ahmed, Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 78, 5535–5545 (2004).
19. J. C. Nolz, G. R. Starbeck-Miller, J. T. Harty, Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions. *Immunotherapy* 3, 1223–1233 (2011).
20. J. Nikolich-Zugich, The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat Immunol* 19, 10–19 (2018).
21. B. Youngblood, J. S. Hale, R. Ahmed, T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology* 139, 277–284 (2013).
22. D. Sauce et al., Lymphopenia-driven homeostatic regulation of naive T cells in elderly and thymectomized young adults. *J Immunol* 189, 5541–5548 (2012).
23. N. Minato, M. Hattori, Y. Hamazaki, Physiology and pathology of T-cell aging. *Int Immunol* 32, 223–231 (2020).

24. J. Rossy, D. J. Williamson, K. Gaus, How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol* 3, 167 (2012).
25. R. J. Brownlie, R. Zamoyska, T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 13, 257-269 (2013).
26. J. H. Cho et al., CD45-mediated control of TCR tuning in naive and memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 7, 13373 (2016).
27. A. C. Maue et al., T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol* 30, 301-305 (2009).
28. J. Nikolich-Zugich, Aging of the T cell compartment in mice and humans: from no naive expectations to foggy memories. *J Immunol* 193, 2622-2629 (2014).
29. M. Yang, K. H. Vousden, Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 650-662 (2016).
30. G. S. Ducker, J. D. Rabinowitz, One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* 25, 27-42 (2017).
31. N. Ron-Harel et al., Mitochondrial Biogenesis and Proteome Remodeling Promote One-Carbon Metabolism for T Cell Activation. *Cell Metab* 24, 104-117 (2016).
32. E. H. Ma et al., Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metab* 25, 345-357 (2017).
33. R. J. Morscher et al., Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature* 554, 128-132 (2018).
34. D. R. Minton et al., Serine Catabolism by SHMT2 Is Required for Proper Mitochondrial Translation Initiation and Maintenance of Formylmethionyl-tRNAs. *Mol Cell* 69, 610-621 e615 (2018).
35. N. Ron-Harel et al., Defective respiration and one-car

bon metabolism contribute to impaired naive T cell activation in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 13347–13352 (2018).

36. C. H. June, Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117, 1204–1212 (2007).

37. N. S. Joshi, S. M. Kaech, Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol* 180, 1309–1315 (2008).

38. N. E. Scharping et al., The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* 45, 701–703 (2016).

39. K. Chamoto et al., Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E761–E770 (2017).

40. H. Wang et al., ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002279 (2010).

41. M. Perron, H. U. Saragovi, Inhibition of CD45 Phosphatase Activity Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis of CD45(+) Lymphoid Tumors Ex Vivo and In Vivo. *Mol Pharmacol* 93, 575–580 (2018).

42. M. Sharpe, N. Mount, Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech* 8, 337–350 (2015).

43. R. W. Jenkins, D. A. Barbie, K. T. Flaherty, Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 118, 9–16 (2018).

44. R. J. DeBerardinis, N. S. Chandel, Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2, e1600200 (2016).

45. N. M. Chapman, M. R. Boothby, H. Chi, Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat Rev Immunol* 20, 55–70

- (2020).
46. E. S. Egorov et al., The Changing Landscape of Naive T Cell Receptor Repertoire With Human Aging. *Front Immunol* 9, 1618 (2018).
 47. C. S. Palmer et al., Emerging Role and Characterization of Immunometabolism: Relevance to HIV Pathogenesis, Serious Non-AIDS Events, and a Cure. *J Immunol* 196, 4437-4444 (2016).
 48. H. Tsukamoto, S. Senju, K. Matsumura, S. L. Swain, Y. Nishimura, IL-6-mediated environmental conditioning of defective Th1 differentiation dampens antitumour immune responses in old age. *Nat Commun* 6, 6702 (2015).
 49. R. A. Miller, Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine* 18, 1654-1660 (2000).
 50. G. Pawelec, K. Hirokawa, T. Fulop, Altered T cell signalling in ageing. *Mech Ageing Dev* 122, 1613-1637 (2001).
 51. R. L. Whisler, M. Chen, B. Liu, Y. G. Newhouse, Age-related impairments in TCR/CD3 activation of ZAP-70 are associated with reduced tyrosine phosphorylations of zeta-chains and p59fyn/p56lck in human T cells. *Mech Ageing Dev* 111, 49-66 (1999).
 52. T. Fulop, Jr., A. Larbi, G. Dupuis, G. Pawelec, Ageing, autoimmunity and arthritis: Perturbations of TCR signal transduction pathways with ageing - a biochemical paradigm for the ageing immune system. *Arthritis Res Ther* 5, 290-302 (2003).
 53. T. Furukawa, M. Itoh, N. X. Krueger, M. Streuli, H. Saito, Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 zeta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10928-10932 (1994).
 54. K. F. Lindahl, D. B. Wilson, Histocompatibility antigen

n-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J Exp Med* 145, 508-522 (1977).

55. M. Cascalho, J. L. Platt, Xenotransplantation and other means of organ replacement. *Nat Rev Immunol* 1, 154-160 (2001).

56. N. Degauque, S. Brouard, J. P. Soulillou, Cross-Reactivity of TCR Repertoire: Current Concepts, Challenges, and Implication for Allograft Transplantation. *Front Immunol* 7, 89 (2016).

57. L. J. D'Orsogna, D. L. Roelen, Doxiadis, II, F. H. Claas, TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. *Immunogenetics* 64, 77-85 (2012).

58. M. Hebeisen et al., Molecular insights for optimizing T cell receptor specificity against cancer. *Front Immunol* 4, 154 (2013).

59. H. Nishimura, N. Minato, T. Nakano, T. Honjo, Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10, 1563-1572 (1998).

60. P. S. Chowdhury, K. Chamoto, A. Kumar, T. Honjo, PPAR-Induced Fatty Acid Oxidation in T Cells Increases the Number of Tumor-Reactive CD8(+) T Cells and Facilitates Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunol Res* 6, 1375-1387 (2018).

61. M. D. Brand, D. G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435, 297-312 (2011).

[0076] [実施例2]

[材料及び方法]

マウスと細胞

全てのマウスは京都大学大学院医学部動物実験施設において、実験の障害になるような特定の病原体が存在しないSPF環境下で飼育され、適切な実験ガイドラインのもとで使用された。C57BL/6はCharles River Laboratories Jap

anより入手した。PD-1^{-/-} (PD-1K0) マウスは相同組換えにより当研究室で作製したものを使用した (西村らの文献参照) (11)。マウス大腸がん由来のMC38細胞はJ. P. Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer (New York, NY) から譲り受けた。ルイス肺癌由来のLLC細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。細胞は10%の非動化したウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Nacalai Tesque; 26253-84) を含むRPMI 1640 (Gibco; 11875-093) を用いて、マイコバクテリア感染の無い状況下で培養を行った。

[0077] マウス治療モデル

CD45阻害 (図 1 2) : 2-(4-Acetylanilino)-3-chloronaphthoquinone (211) (530197, EDM Millipore) (12) (3 mg/kg)又はN-(9,10-Dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethylpropionamide (PTP) (540215, Sigma-Aldrich) (13) (3 mg/kg)は腫瘍細胞移植の前又は後 (5 又は 7 日後) にマウスの腹腔内に投与された。MC38細胞 (5×10^5 又は 1×10^6) 又はLLC細胞 (2×10^6) は、マウスの右腹部の皮内に移植された (day 0)。LLC細胞移植から7日後 (day 7)、それらのマウスは抗PD-L1抗体(clone 1-11A.4) (2 mg/kg)を腹腔内に投与された。この抗PD-L1抗体投与は、6日毎に3回繰り返された (day 7, 13, and 19)。腫瘍体積は測径器により計測し、 π (縦 × 横 × 高さ)/6の式により算出した。

[0078] 統計解析

データはPrism 7 (Graph pad)を用いて解析した。二つ以上の群を比較する場合、統計的有意性は一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて複数群について評価し、次に多重比較 (Tukey' s post hoc test) により差を評価した。二つの群を比較する場合は、Student-T検定を行った。

[0079] CD45阻害剤のPD-1シグナル阻害による抗腫瘍効果の亢進効果の検討

本実施例では、CD45阻害剤として2-(4-Acetylanilino)-3-chloronaphthoquinone (211) 又はN-(9,10-Dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethylpropionamide (PTP) を用い、PD-1シグナル阻害との併用による腫瘍増殖

抑制効果を検討した（図12）。

[0080] PD-1 K0マウス（2ヶ月齢）の腹腔内にMC38マウス大腸がん細胞の移植3日前に一度（前投与）又は移植から5日後に3回（後投与）CD45阻害剤211を3 mg/kgの割合で投与した（図13A & B）。MC38細胞は 1×10^6 /腫瘍の割合でマウスの右腹側に皮内移植した。その結果、溶媒のみを投与したコントロール群に比べて、211をMC38移植の前又は後に投与した群では、有意に腫瘍体積が減少していた（図14A & B）。これらの結果から、CD45阻害はPD-1シグナル阻害による抗腫瘍効果を亢進させることが示唆された。

[0081] CD45阻害剤の加齢に伴うPD-1シグナル阻害耐性に対する改善効果の検討

若齢（1～2ヶ月齢）又は高齢（14～16ヶ月齢）のPD-1 K0マウスの腹腔内にCD45阻害剤211を3 mg/kgの割合で投与した。211の投与から3日後に、MC38細胞を 5×10^5 /腫瘍の割合でマウスの右腹側に皮内移植し、腫瘍増殖を検討した。その結果、若齢PD-1 K0マウスで見られた腫瘍増殖の抑制は、高齢PD-1 K0マウスでは全く見られず、PD-1シグナル阻害耐性を示すことが明らかになった（図15A & B）。一方で、加齢マウスに211を投与した場合は、強く腫瘍増殖が抑えられた（図15A & B）。これらの結果から、CD45阻害は加齢に伴うPD-1シグナル阻害耐性を示す腫瘍の増殖を抑制させることが示された。

[0082] CD45阻害剤のPD-1シグナル阻害耐性を示すがんに対する改善効果の検討

若齢（1～2ヶ月齢）の野生型マウスの皮内にLLC細胞を 2×10^6 /腫瘍の割合でマウスの右腹側に移植した（図16A）。その7日後から、抗PD-L1抗体単独又はCD45阻害剤（211又はPTP）との併用治療を行い、腫瘍増殖を検討した（図16A）。その結果、抗PD-L1単独治療ではほとんどみられなかった腫瘍抑制効果が、CD45阻害剤との併用治療により腫瘍増殖が有意に抑制された（図16B & C）。これら2種類のCD45阻害剤のどちらも、同様に抗PD-L1抗体との併用治療により腫瘍増殖に対する抑制効果を示した（図16B & C）。さらに、CD45阻害剤の単独治療効果を同様の条件下で検討した結果、LLC腫瘍増殖に対して有為な抑制効果を示さなかった（図16D & E）。これらの結果か

ら、CD45阻害はPD-1シグナル阻害治療の効果を亢進させることで不応答性を示すがんの進行を抑制させる可能性が示された。

〔実施例3〕

若齢(6週齢)のC57BL/6マウスにMC38がん細胞を皮内注射した (5×10^5 個)。9、16、23日後に抗PD-L1抗体 (clone 1-111A.4) (1.5 mg/kg) を腹腔内投与し、それに加え、マイトマイシンCで処理したBalb/cの(同種異系)脾臓細胞 (5×10^5 個/マウス or 2×10^6 個/マウス) を(A) 6日後に1回のみ、(B) 9日後に1回のみ、または(C) 9、16、23日後に計3回、静注し腫瘍サイズの経時的変化を測定した (図18)。各折れ線グラフにおける点は5ないし6マウスの平均値であり、エラーバーは標準誤差である。*はp値が0.05未満、n.s.は有意差が無いことを意味する(one-way ANOVA後のTukey検定による比較)。この結果、同種異系細胞を3回投与した方が1回よりも免疫チェックポイント阻害剤との併用効果が高いことがわかった。

[0083] 参考文献

1. S. L. Topalian et al., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366, 2443-2454 (2012).
2. A. Ribas et al., Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* 315, 1600-1609 (2016).
3. M. Reck et al., Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 375, 1823-1833 (2016).
4. P. S. Chowdhury, K. Chamoto, T. Honjo, Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *J Intern Med* 283, 110-120 (2018).
5. W. Zou, J. D. Wolchok, L. Chen, PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers,

- and combinations. *Sci Transl Med* 8, 328rv324 (2016).
6. A. L. Shergold, R. Millar, R. J. B. Nibbs, Understanding and overcoming the resistance of cancer to PD-1/PD-L1 blockade. *Pharmacol Res* 145, 104258 (2019).
 7. K. Chamoto et al., Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E761-E770 (2017).
 8. J. Rossy, D. J. Williamson, K. Gaus, How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol* 3, 167 (2012).
 9. R. J. Brownlie, R. Zamoyska, T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 13, 257-269 (2013).
 10. J. H. Cho et al., CD45-mediated control of TCR tuning in naive and memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 7, 13373 (2016).
 11. H. Nishimura, N. Minato, T. Nakano, T. Honjo, Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10, 1563-1572 (1998).
 12. M. D. Perron et al., Allosteric noncompetitive small molecule selective inhibitors of CD45 tyrosine phosphatase suppress T-cell receptor signals and inflammation in vivo. *Mol Pharmacol* 85, 553-563 (2014).
 13. B. Y. Ma et al., The lectin Jacalin induces human B-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45. *Immunology* 127, 477-488 (2009).
 14. S. M. Krummey et al., CD45RB Status of CD8(+) T Cell Memory Defines T Cell Receptor Affinity and Persistence. *Cell Rep* 30, 1282-1291 e1285 (2020).

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明の医薬組成物は、抗がん剤、感染症治療剤又はそれらの組み合わせとして利用できる。

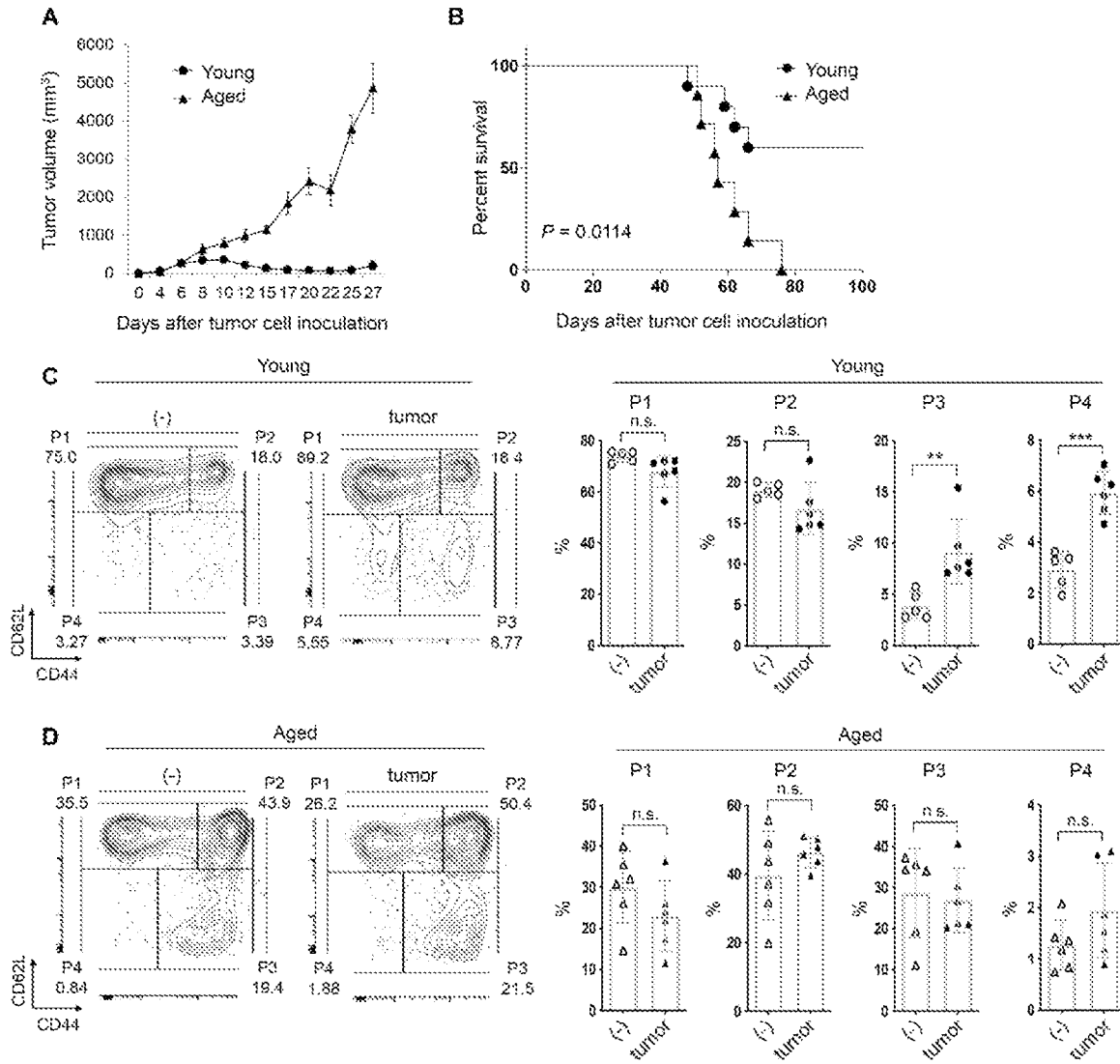
配列表フリーテキスト

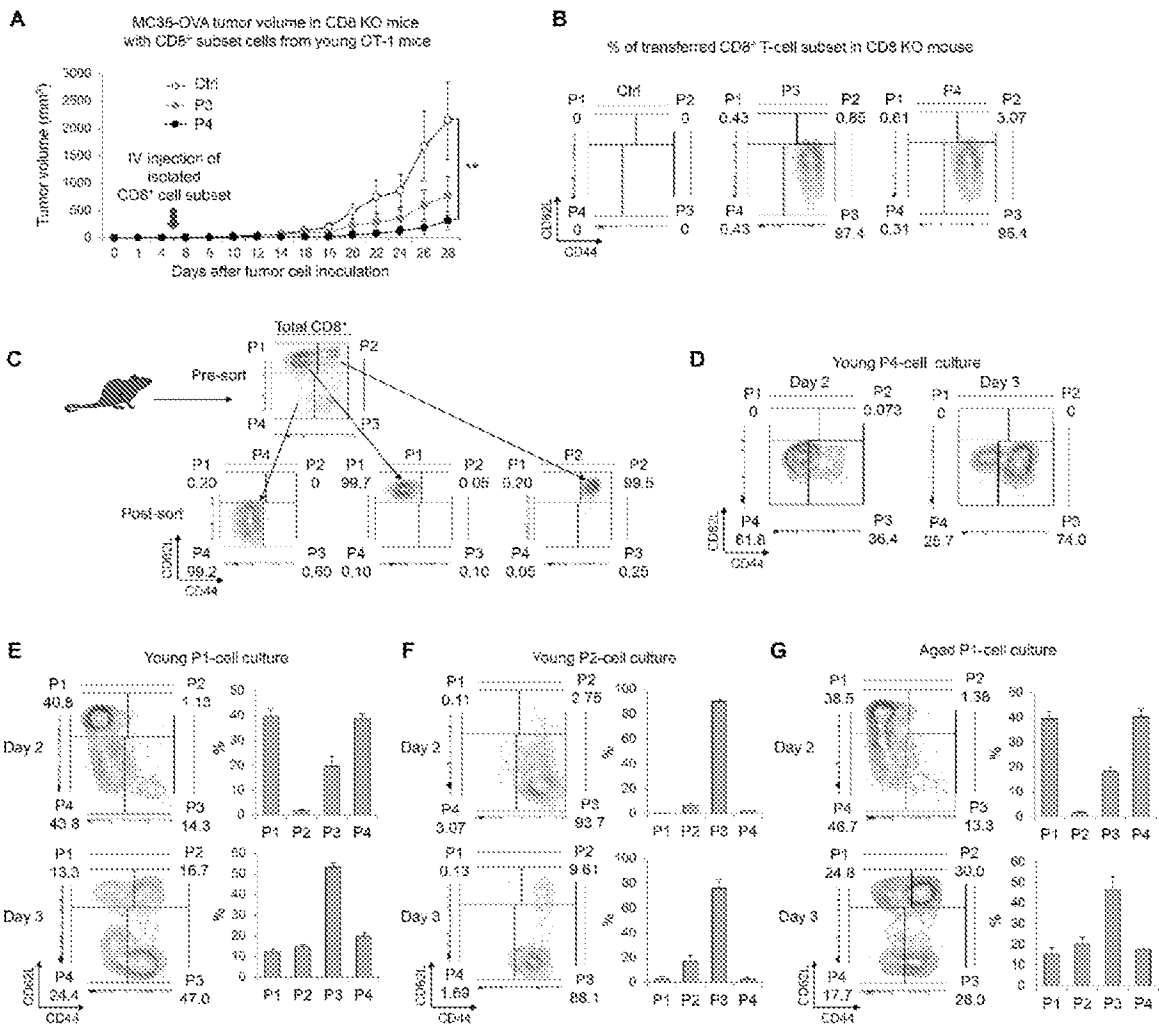
[0085] <配列番号 1 ~ 10>
プライマーの塩基配列を示す。

請求の範囲

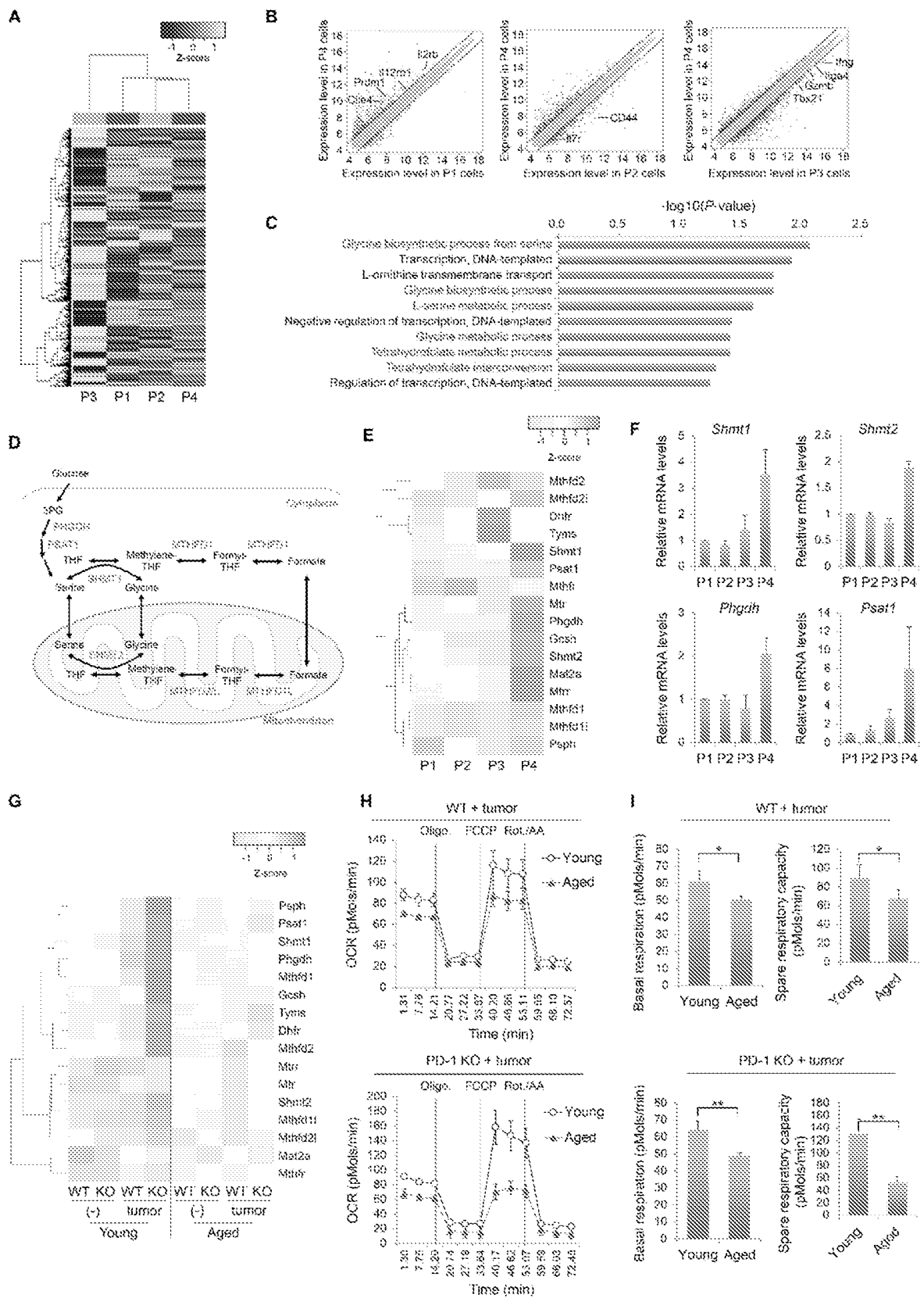
- [請求項1] T細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質を含み、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与する、医薬組成物。
- [請求項2] TCRシグナルを増強させることができる物質が、CD45阻害剤及び/又は細胞である請求項1記載の医薬組成物。
- [請求項3] CD45阻害剤が、2-(4-Acetylanilino)-3-chloronaphthoquinone、N-(9,10-Dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethylpropionamide及びそれらの類似物からなる群より選択される少なくとも1つの化合物である請求項2記載の医薬組成物。
- [請求項4] 細胞が、ゼノ細胞、アロ細胞又はそれらの組み合わせである請求項2記載の医薬組成物。
- [請求項5] PD-1シグナル阻害剤が抗体である請求項1～4のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項6] 抗体が、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体及び抗PD-L2抗体からなる群より選択される少なくとも1つの抗体である請求項5記載の医薬組成物。
- [請求項7] 抗がん剤、感染症治療剤又はそれらの組み合わせとして使用される請求項1～6のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項8] CD45阻害剤及び/又は細胞を含む、PD-1シグナル阻害活性増強剤。
- [請求項9] CD45阻害剤及び/又は細胞を含む、TCRシグナル増強剤。
- [請求項10] PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、T細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質を有効な量で被験者に投与することを含む、がん、感染症又はそれらの組み合わせを予防及び/又は治療する方法。
- [請求項11] PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に、T細胞受容体 (TCR) シグナルを増強させることができる物質を有効な量で被験者に投与することを含む、PD-1シグナル阻害活性を増強する方法。

- [請求項12] CD45阻害剤及び/又は細胞を有効な量で被験者に投与することを含む、TCRシグナルを増強する方法。
- [請求項13] がん、感染症又はそれらの組み合わせを予防及び/又は治療するために使用するためのT細胞受容体（TCR）シグナルを増強させることができる物質であって、PD-1シグナル阻害剤を投与する前、後又は同時のいずれかの時期に投与される前記物質。

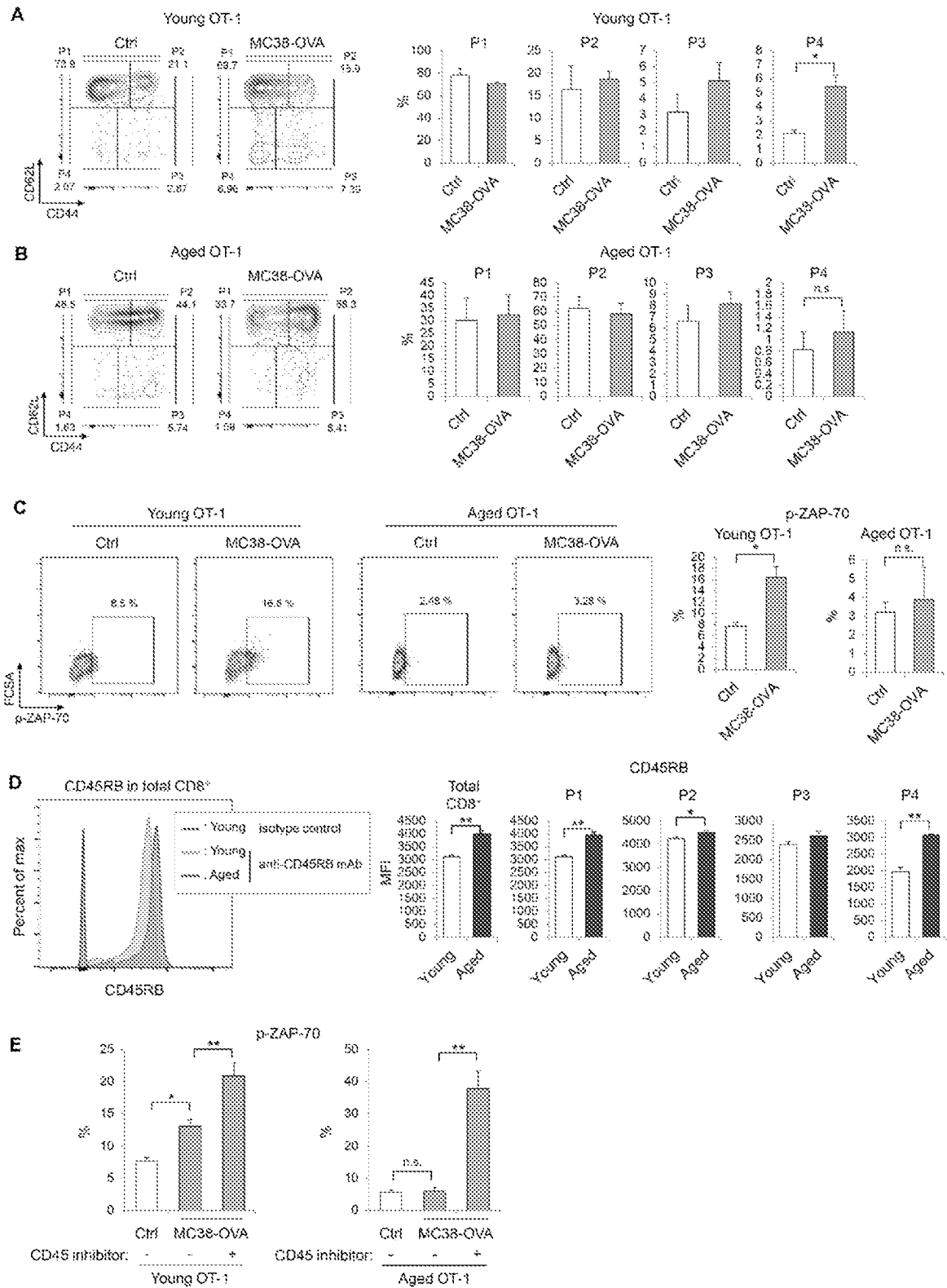




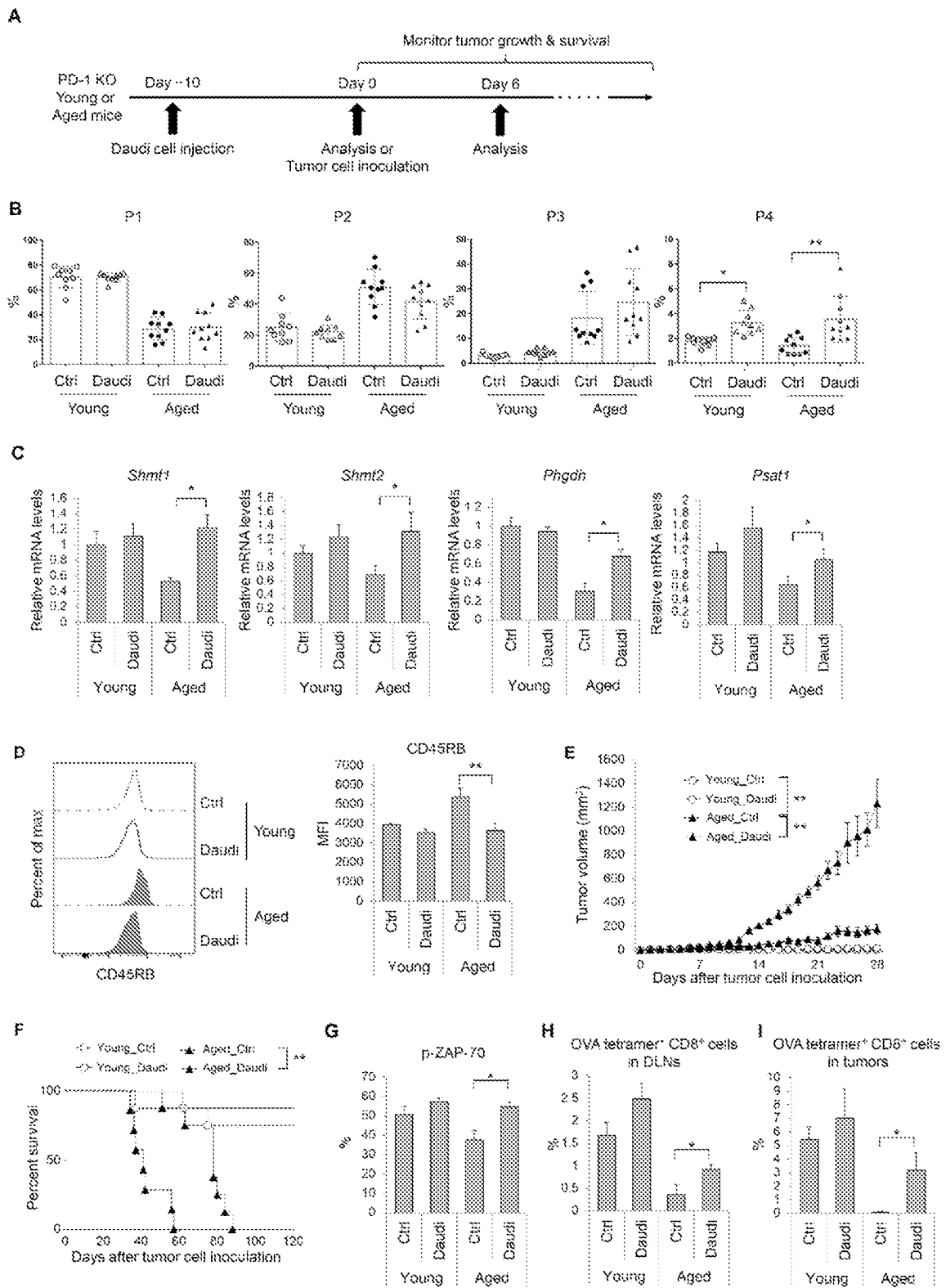
[图3]



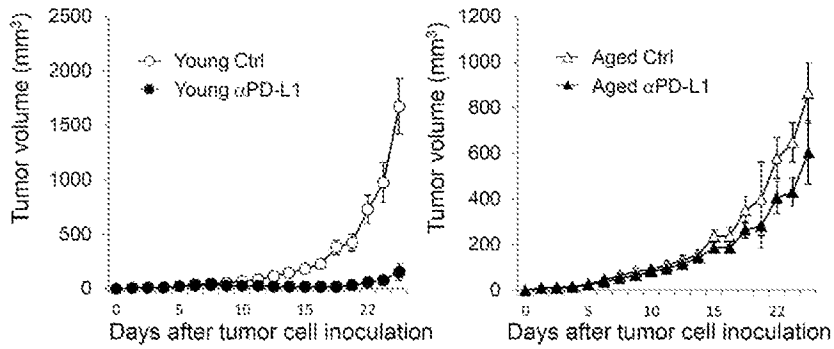
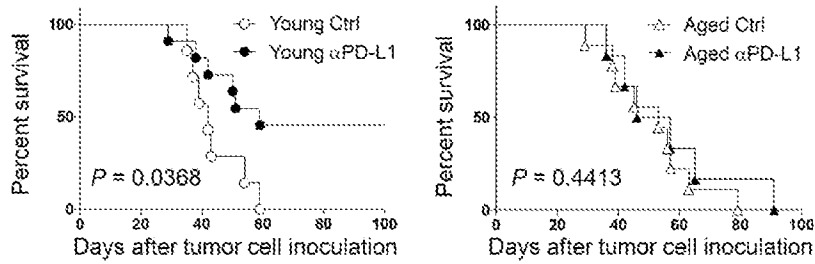
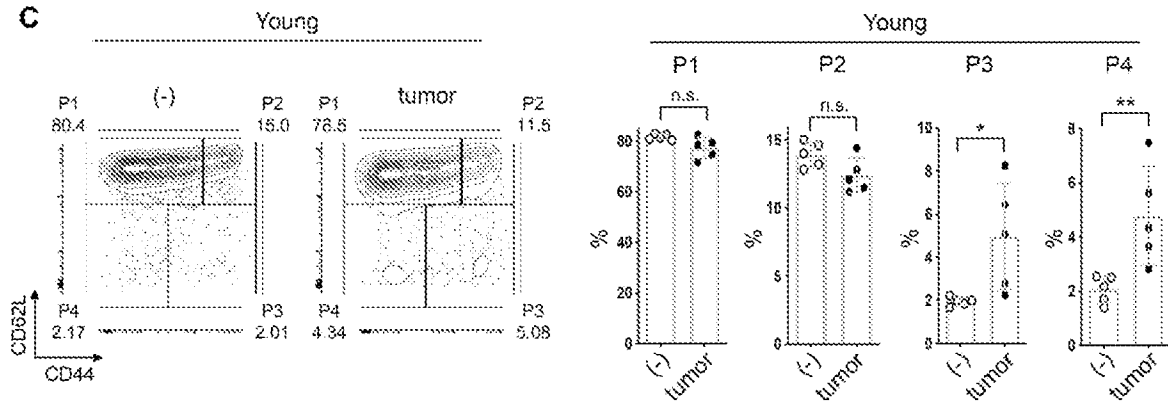
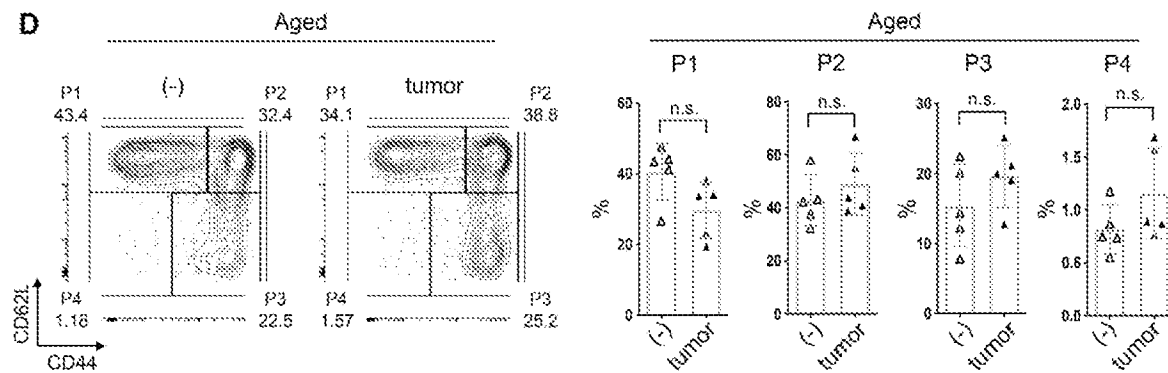
[Figure 4]



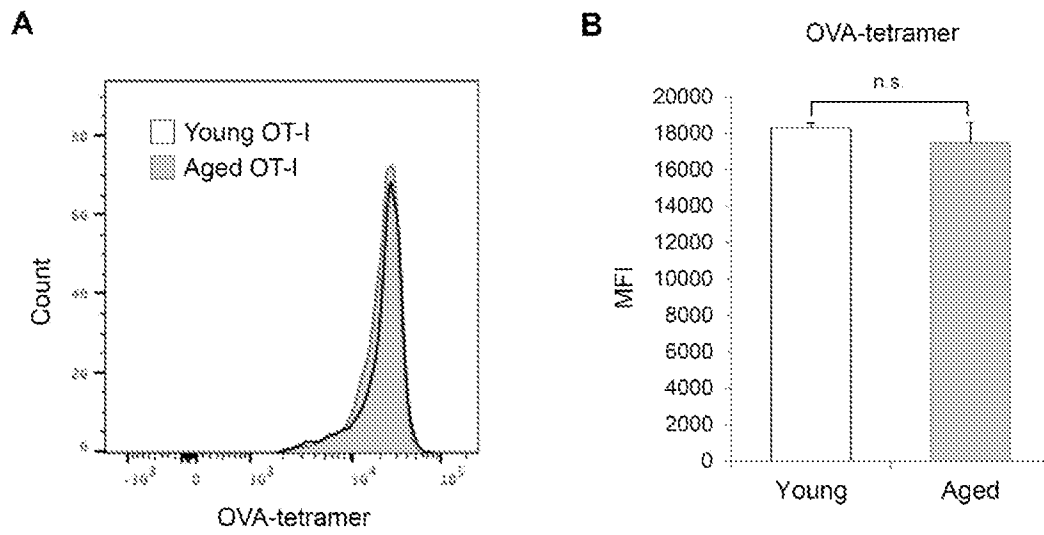
[5]



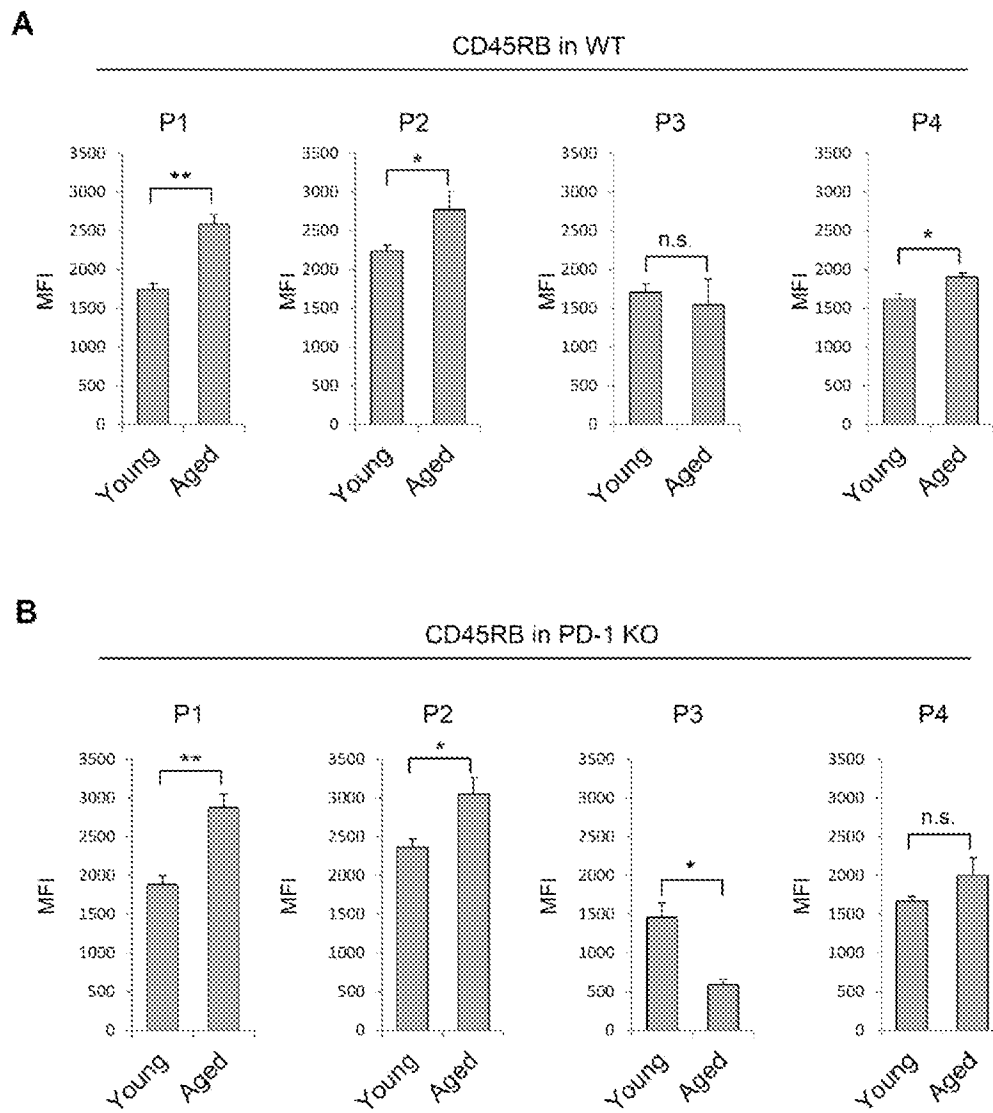
[圖6]

A**B****C****D**

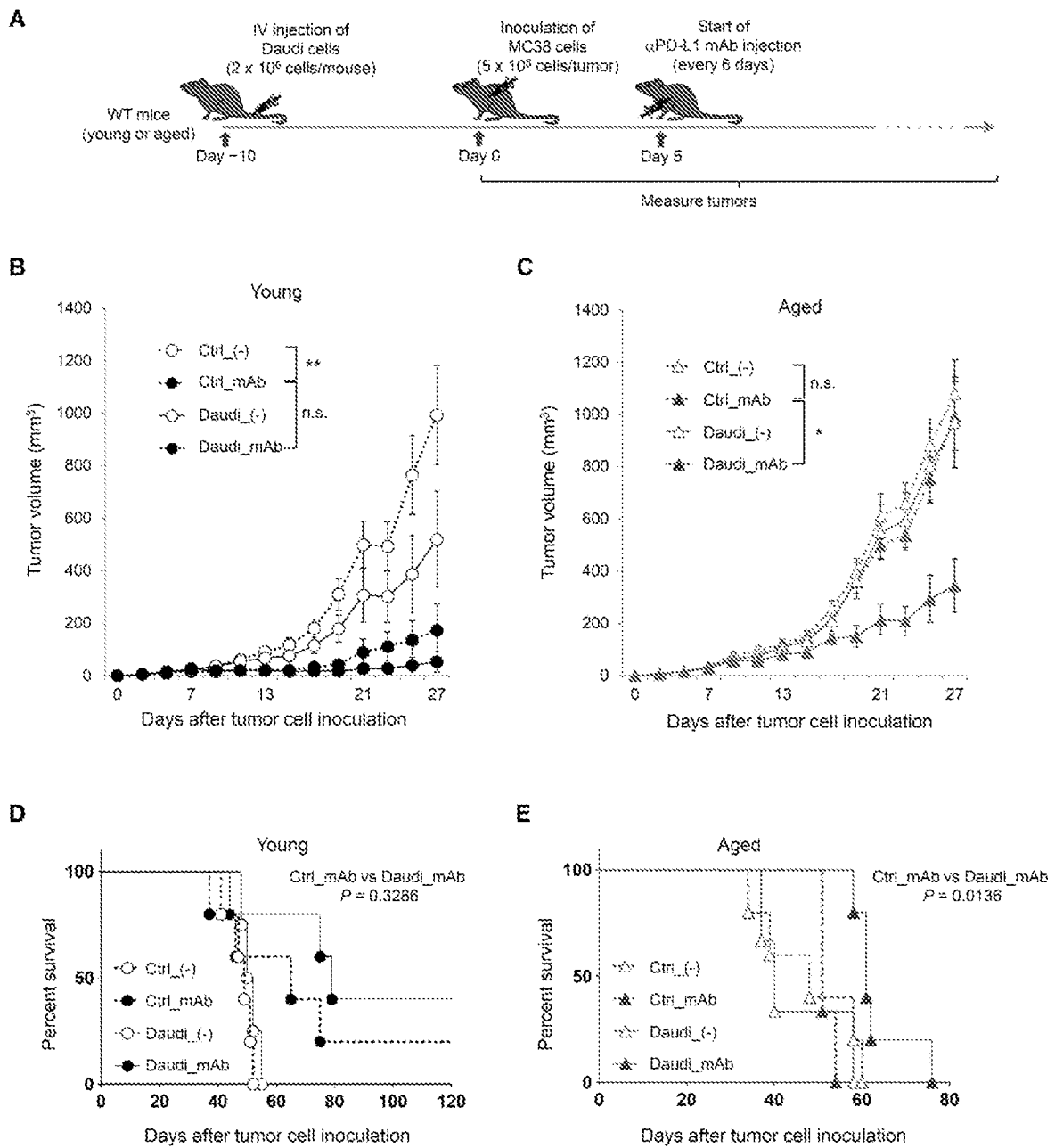
[圖7]



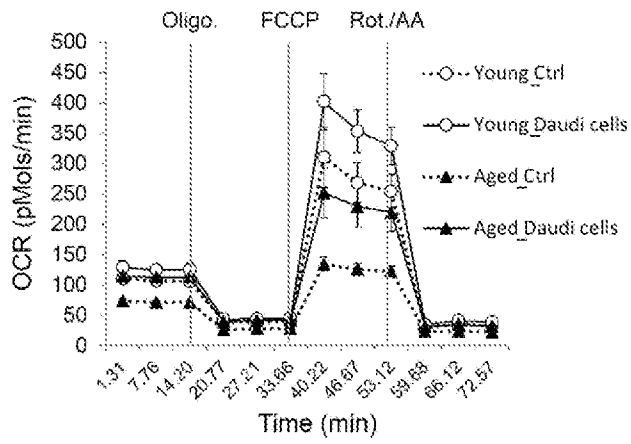
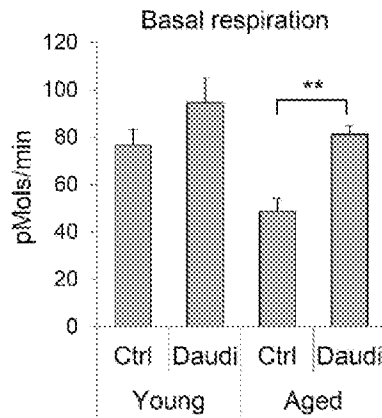
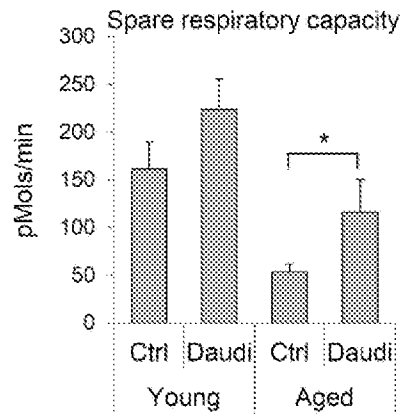
[圖8]



[9]

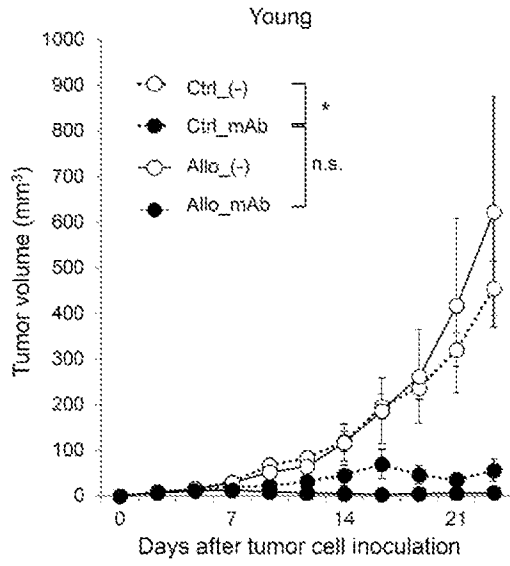


[10]

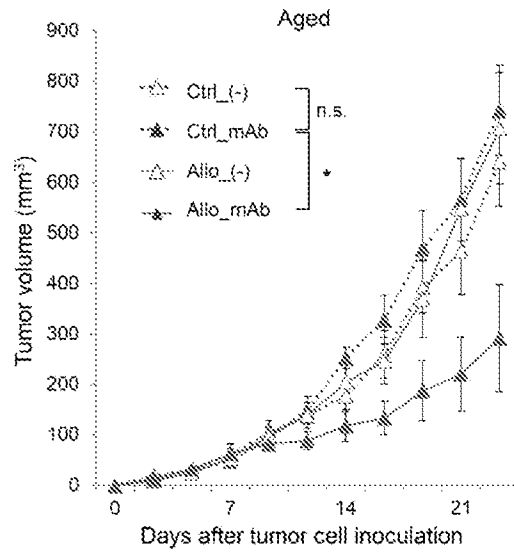
A**B****C**

[11]

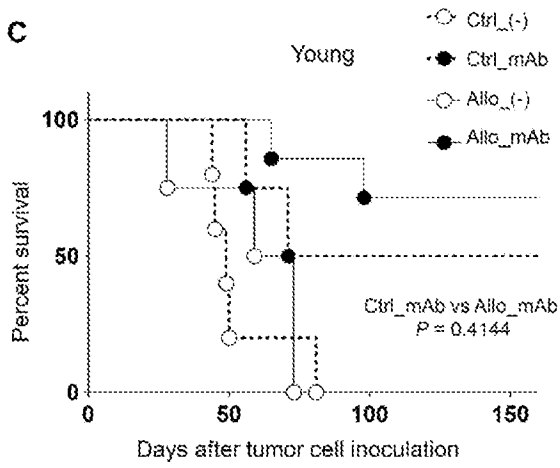
A



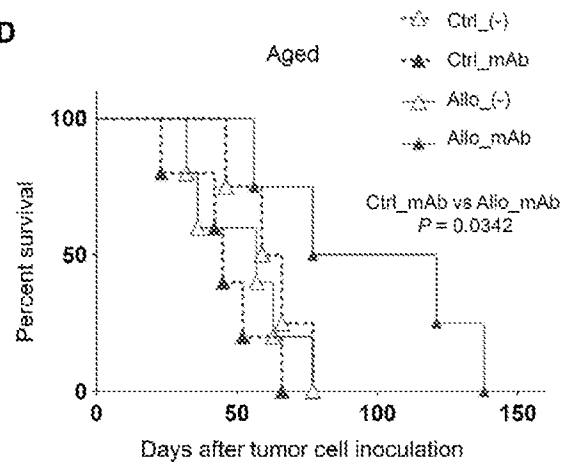
B



C



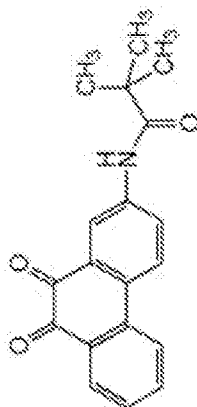
D



[図12]

B

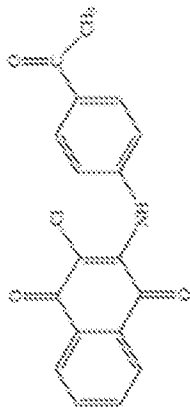
CD45阻害剤_PTP CD45 inhibitor
N-(9,10-Dioxo-9,10-dihydro-
phenanthren-2-yl)-2,2-
dimethylpropionamide



$$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3$$

A

CD45阻害剤_Compound 211
2-(4-Acetylamino)-3-
chloronaphthoquinone

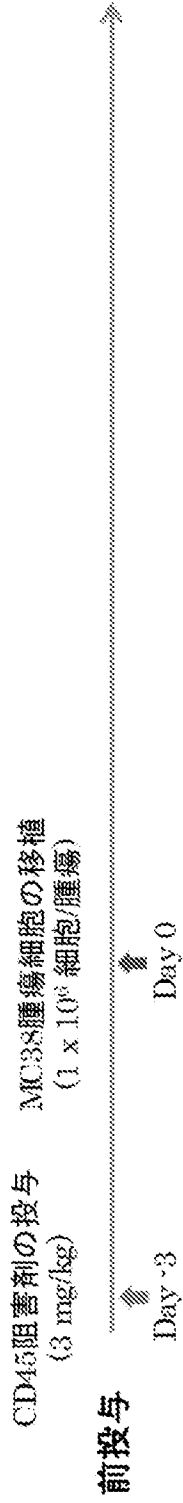


$$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$$

[図13]

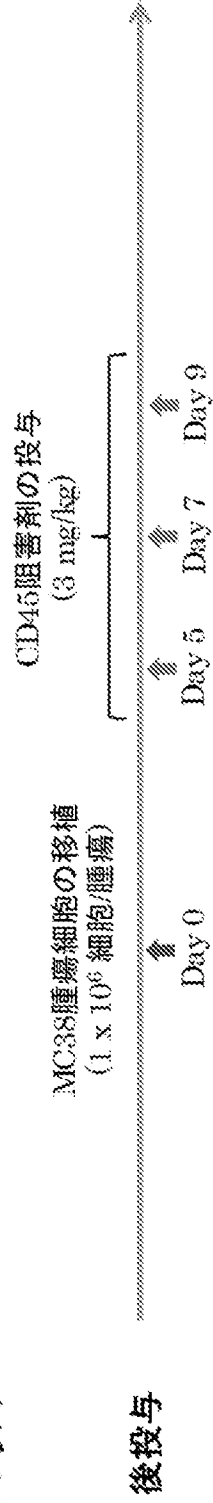
A

PD-1 KOMマウス



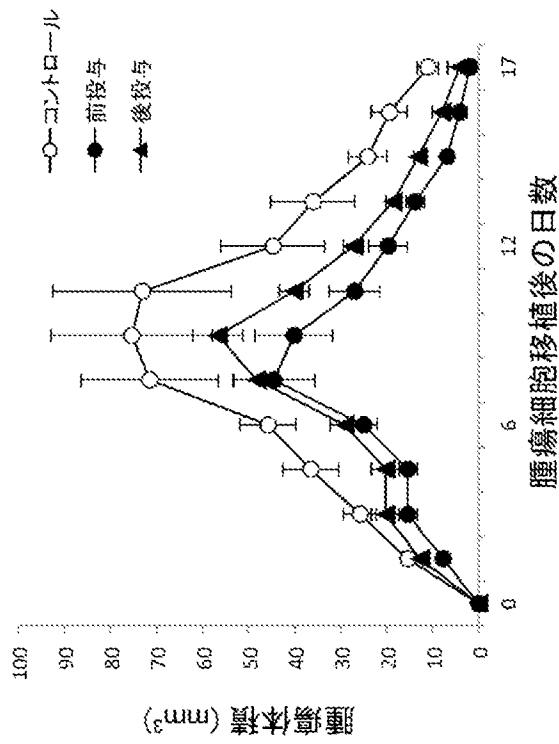
B

PD-1 KOMマウス

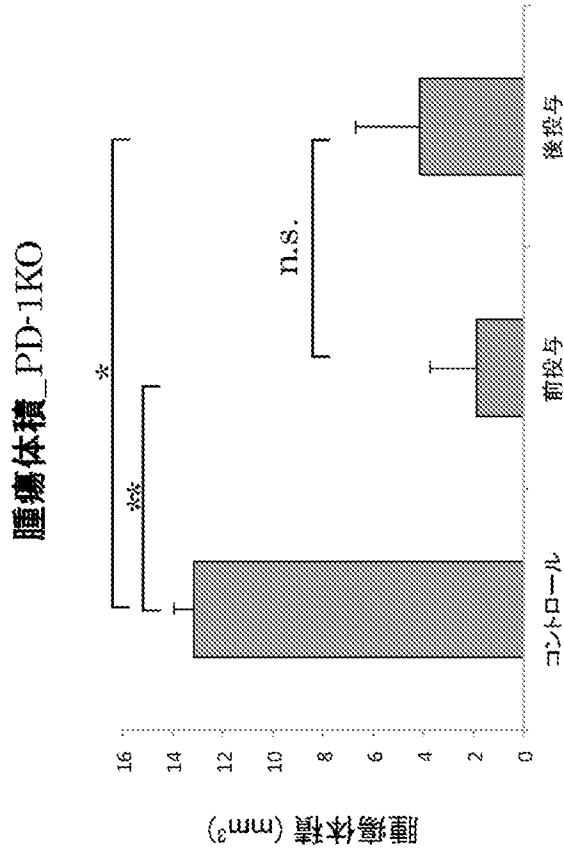


[図14]

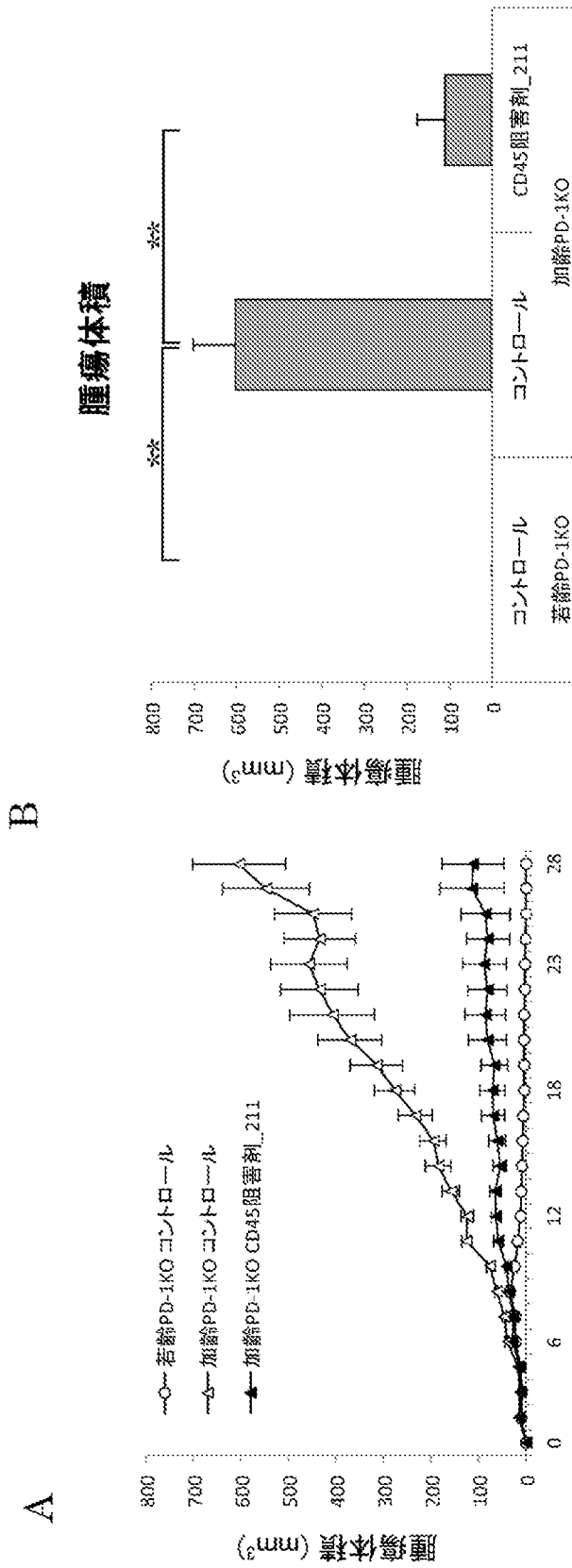
A



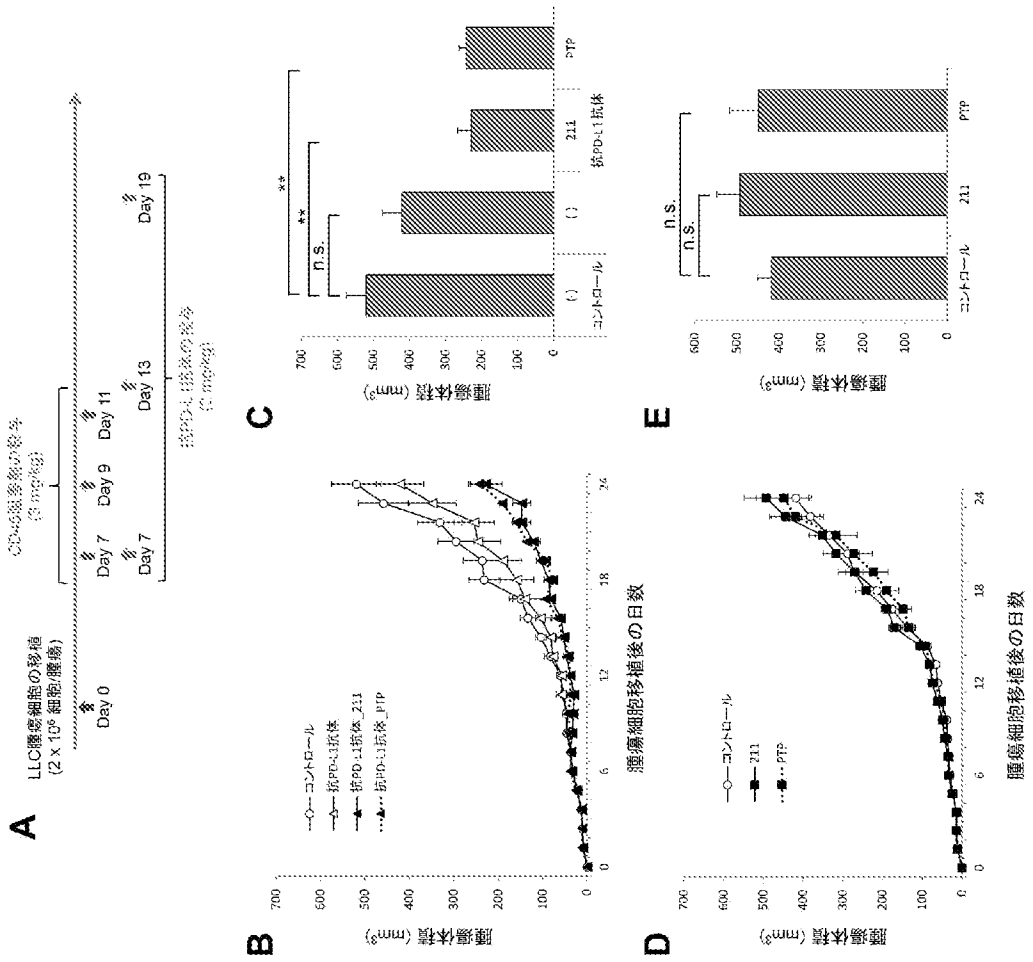
B



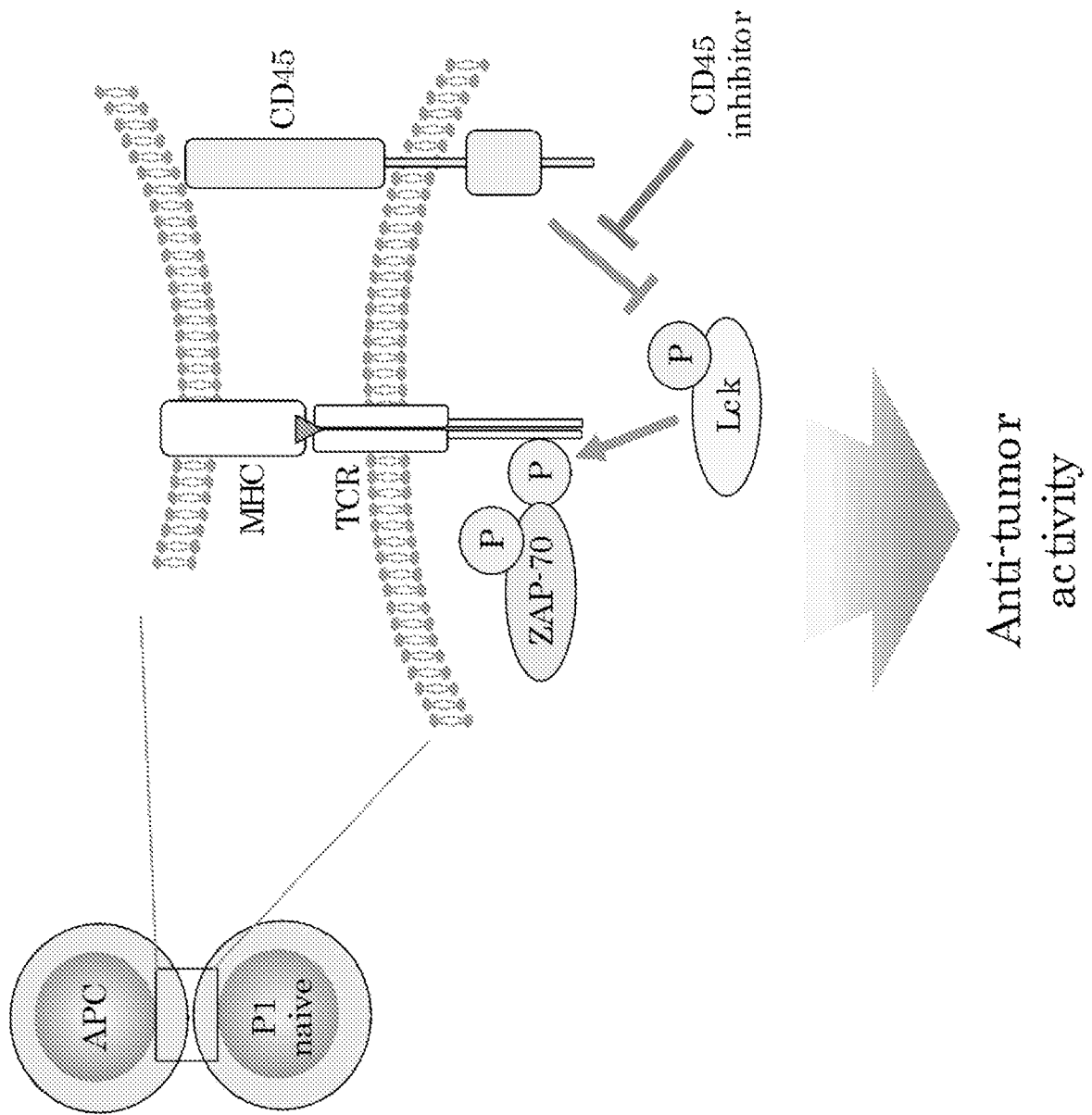
[図15]



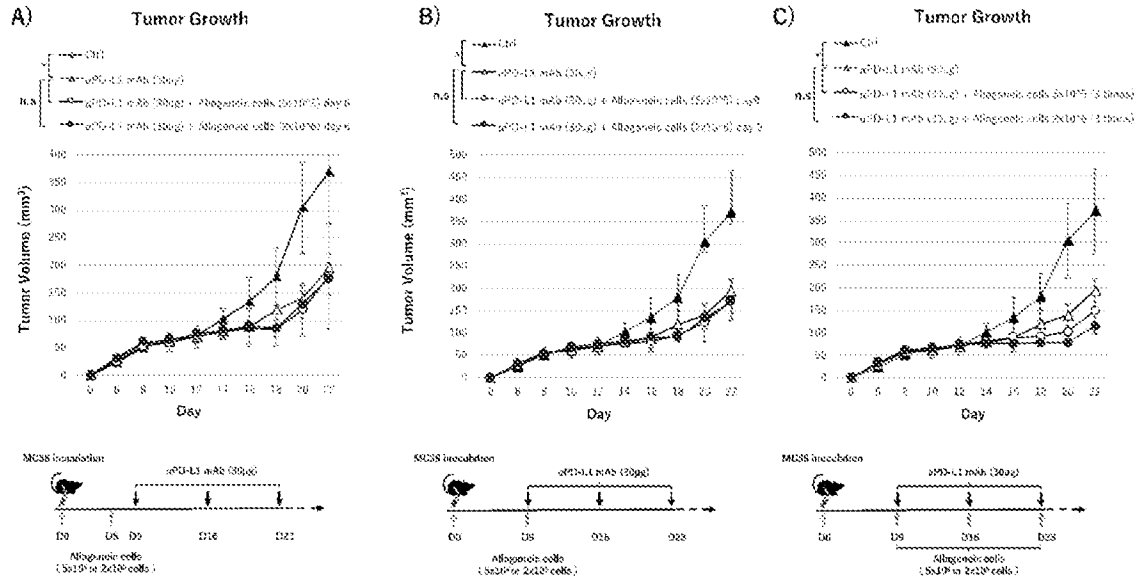
[図16]



[図17]



[圖18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/006843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 45/06(2006.01)i; A61K 31/167(2006.01)i; A61K 31/195(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i FI: A61K45/06; A61K31/167; A61K31/195; A61K35/12; A61K39/395 D; A61P31/00; A61P35/00; A61P43/00 111; A61P43/00 121; C07K16/28 ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K45/06; A61K31/167; A61K31/195; A61K35/12; A61K39/395; A61P31/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K16/28		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/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.
X	池田裕明ほか, かん治療ワクチンの可能性, 薬剤学, 2016, vol. 76, no. 1, pp. 32-38 p. 36, right column, lines 3-13, table 2, (IKEDA, Hiroaki et al. Expectations for Therapeutic Cancer Vaccine. Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Japan.)	1, 2, 4-13
A		3
X	WO 2017/004167 A1 (AUGUSTA UNIVERSITY RESEARCH INSTITUTE, INC.) 05 January 2017 (2017-01-05) claims 1, 13, paragraph [0075]	1-3, 5-13
A		4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 14 April 2022		Date of mailing of the international search report 26 April 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	仲島由佳ほか, 特定のCD8陽性T細胞のサブポピュレーションの減少を介した加齢に伴うPD-1阻害治療耐性メカニズム, 第78回日本癌学会学術総会抄録集, 2019, p. 806, E-2031 1st paragraph to 2nd paragraph, (NAKAJIMA, Yuka et al. Age-related resistance to PD-1 blockade therapy through reduction of a specific CD8+ T-cell subpopulation.), (Abstracts of the 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association)	1, 5-7, 10, 11, 13
A		2-4, 8, 9, 12
A	WO 2004/072286 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 26 August 2004 (2004-08-26) entire text	1-13
A	FERNANDES, RA. et al. Immune receptor inhibition through enforced phosphatase recruitment. Nature. 2020, vol. 586, pp. 779-784 entire text	1-13
P, X	NAKAJIMA, Y. et al. Critical role of the CD44 ^{low} CD62L ^{low} CD8+ T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice. PNAS. 08 June 2021, vol. 118, no. 23, e2103730118, pp. 1-10 p. 7, left column, 2nd paragraph to right column, 1st paragraph	1-13

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/006843

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017/004167 A1	05 January 2017	(Family: none)	
WO 2004/072286 A1	26 August 2004	US 2008/0025979 A1 entire text EP 1591527 A1 KR 10-2005-0107399 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/06(2006.01)i; A61K 31/167(2006.01)i; A61K 31/195(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i FI: A61K45/06; A61K31/167; A61K31/195; A61K35/12; A61K39/395 D; A61P31/00; A61P35/00; A61P43/00 111; A61P43/00 121; C07K16/28 ZNA</p>																										
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K45/06; A61K31/167; A61K31/195; A61K35/12; A61K39/395; A61P31/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K16/28</p> <p>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</p> <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>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年																
日本国実用新案公報	1922-1996年																									
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																									
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																									
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																									
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>池田裕明ほか, がん治療ワクチンの可能性, 薬剤学, 2016, Vol.76, No.1, pp.32-38 第36頁右欄第3~13行、表2</td> <td>1,2,4-13 3</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>WO 2017/004167 A1 (AUGUSTA UNIVERSITY RESEARCH INSTITUTE, INC.) 05.01.2017 (2017-01-05) 請求項1、13、[0075]</td> <td>1-3,5-13 4</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>仲島由佳ほか, 特定のCD8陽性T細胞のサブポピュレーションの減少を介した加齢に伴うPD-1阻害治療耐性メカニズム, 第78回日本癌学会学術総会抄録集, 2019, p.806, E-2031 第1~2段落</td> <td>1,5-7,10,11,13 2-4,8,9,12</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			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 A	池田裕明ほか, がん治療ワクチンの可能性, 薬剤学, 2016, Vol.76, No.1, pp.32-38 第36頁右欄第3~13行、表2	1,2,4-13 3	X A	WO 2017/004167 A1 (AUGUSTA UNIVERSITY RESEARCH INSTITUTE, INC.) 05.01.2017 (2017-01-05) 請求項1、13、[0075]	1-3,5-13 4	X A	仲島由佳ほか, 特定のCD8陽性T細胞のサブポピュレーションの減少を介した加齢に伴うPD-1阻害治療耐性メカニズム, 第78回日本癌学会学術総会抄録集, 2019, p.806, E-2031 第1~2段落	1,5-7,10,11,13 2-4,8,9,12	* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“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	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
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 A	池田裕明ほか, がん治療ワクチンの可能性, 薬剤学, 2016, Vol.76, No.1, pp.32-38 第36頁右欄第3~13行、表2	1,2,4-13 3																								
X A	WO 2017/004167 A1 (AUGUSTA UNIVERSITY RESEARCH INSTITUTE, INC.) 05.01.2017 (2017-01-05) 請求項1、13、[0075]	1-3,5-13 4																								
X A	仲島由佳ほか, 特定のCD8陽性T細胞のサブポピュレーションの減少を介した加齢に伴うPD-1阻害治療耐性メカニズム, 第78回日本癌学会学術総会抄録集, 2019, p.806, E-2031 第1~2段落	1,5-7,10,11,13 2-4,8,9,12																								
* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																									
“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	“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																									
“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	“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																									
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																									
“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																										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																									
14.04.2022	26.04.2022																									
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）																									
日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	長谷川 茜 4C 3228 電話番号 03-3581-1101 内線 3452																									

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	WO 2004/072286 A1 (小野薬品工業株式会社) 26.08.2004 (2004 - 08 - 26) 全文	1-13
A	FERNANDES RA. et al., Immune receptor inhibition through enforced phosphatase recruitment, Nature, 2020, Vol.586, pp.779-784 全文	1-13
P, X	NAKAJIMA Y. et al., Critical role of the CD44 ^{low} CD62L ^{low} CD8 ⁺ T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice, PNAS, 2021.06.08, Vol.118, No.23, e2103730118, pp.1-10 第7頁左欄第2段落～右欄第1段落	1-13

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/006843

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2017/004167 A1	05.01.2017	(ファミリーなし)	
WO 2004/072286 A1	26.08.2004	US 2008/0025979 A1 全文 EP 1591527 A1 KR 10-2005-0107399 A	