(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
2010 年 9 月 23 日(23.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/107083 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) *A61K 35/14* (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/054663

(22) 国際出願日: 2010 年 3 月 18 日(18.03.2010)

(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 2009-067198 2009 年 3 月 19 日(19.03.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 丸共バイオフーズ株式会社 (**MARUKYOU BIO FOODS Co., Ltd.**) [JP/JP]; 〒0970022 北海道稚内市中央４丁目１８番１８号 Hokkaido (JP). 国立大学法人　北海道大学 (**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮本　宜之 (**MIYAMOTO Nobuyuki**) [JP/JP]; 〒0970017 北海道稚内市栄１丁目１１番１９号 Hokkaido (JP). 西村　孝司 (**NISHIMURA Takashi**).

(74) 代理人: 大家　邦久, 外 (**OHIE Kunihisa** et al.); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町二丁目１４番６号　セルバ人形町６階　大家特許事務所 Tokyo (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, 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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2010/107083 A1

(54) **Title**: PROLIFERATION PROMOTER FOR ANTIGEN-SPECIFIC T CELL

(54) 発明の名称 : 抗原特異的Ｔ細胞の増殖促進剤

(57) **Abstract**: Disclosed is a proliferation promoter which is specific to antigen-specific T cells that have been cultured *in vitro*, and which comprises mucin as an active ingredient. The proliferation promoter can selectively promote the proliferation of T cells having a specificity to an antigen when immunocytes collected from a patient are cultured *in vitro* in the presence of the proliferation promoter while stimulating the immunocytes with the antigen. As a result, it becomes possible to prepare a large amount of antigen-specific T cells, which are cells needed for the immunotherapy for intractable diseases such as malignant tumor, within a short period.

(57) 要約:　本発明は、ムチンを有効成分とする、インビトロで培養される抗原特異的Ｔ細胞特異的な増殖促進剤を提供する。本発明の増殖促進剤は、その存在下で患者から採取された免疫細胞を抗原で刺激しながらインビトロ培養することにより、当該抗原に対して特異性を示すＴ細胞の増殖を選択的に促進させることができ、その結果、悪性腫瘍等の難治性疾患の免疫治療に必要とされる大量の抗原特異的Ｔ細胞を短時間のうちに調製することが可能となる。

明　細　書

発明の名称 ： 抗原特異的Ｔ細胞の増殖促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、腫瘍の免疫療法などに利用される抗原特異的Ｔ細胞をインビトロ培養する際に利用される前記抗原特異的Ｔ細胞の増殖促進剤に関する。

背景技術

[0002] インフルエンザウイルスや肝炎ウイルスなどによる感染症、ＨＩＶ感染による免疫不全症や悪性腫瘍を代表例とする難治性疾患に対する治療法の一つに、患者個体の持つ免疫系を強化あるいは刺激して、これによって腫瘍細胞やウイルス等を攻撃させる、いわゆる免疫療法が挙げられる。この方法は、患者自身の免疫系に腫瘍細胞や感染源を異物として的確に認識させること、及び腫瘍細胞や感染源に対して特異的な攻撃性を有するＴ細胞を調製することが必要である。

[0003] このような悪性腫瘍やウイルス等の感染源に対して特異的な攻撃性を有するＴ細胞の代表例としては、細胞表面蛋白質であるＣＤ８を発現している細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＤ８＋Ｔ細胞）や、細胞表面蛋白質であるＣＤ４を発現しているＴ細胞（ＣＤ４＋Ｔ細胞）を挙げることができる。ＣＤ８＋Ｔ細胞は、活性化された場合、ＨＬＡクラスＩ分子に結合する抗原を提示している細胞を溶解するＴ細胞である。またＣＤ４＋Ｔ細胞は、サイトカインを分泌するＴｈ細胞であって、ＨＬＡクラスII分子により抗原を提示するマクロファージ及び／または樹状細胞などにより活性化され、ＣＤ８＋Ｔ細胞の誘導及び維持のためのヘルパー機能を発揮する。

[0004] Ｔｈ細胞は分泌するサイトカインの種類によってＴｈ１細胞（ＩＦＮ－γ等を産生する）、Ｔｈ２細胞（ＩＬ－４等を産生する）及びＴｈ０細胞（サイトカイン産生能は低いか、あるいはＩＦＮ－γ、ＩＬ－４等を共に産生する）に分類されることが知られており、各細胞の役割も解明されつつある。またＣＤ４＋Ｔ細胞は、例えば樹状細胞の活性化を介して、ＭＨＣクラスII

陽性抗原に対する直接的な機構によって、エフェクター機能を持つこともできる。

[0005] 免疫治療、特にヒトの腫瘍免疫治療に必要な腫瘍特異的Ｔ細胞は、かかるＴ細胞を誘導することのできる腫瘍抗原を患者に直接投与することによって患者の体内で増殖させてもよいが、腫瘍細胞に対して攻撃性を有するＴ細胞の治療に必要な量をより効率的に調製するためには、患者から採取したＴ細胞を腫瘍抗原で刺激しながらインビトロで培養することがより好ましい。実際の治療は、このようにしてインビトロで培養して増殖させた腫瘍特異的Ｔ細胞を患者に戻すことによって、当該腫瘍特異的Ｔ細胞に腫瘍細胞を攻撃させることで達成される。

[0006] 免疫治療では、これまでのところ、いかにして抗原特異的なＴ細胞を誘導するか、すなわちどの様な抗原物質を選択して使用するかに、多くの関心が寄せられてきた。しかし、患者から採取される血液ないし骨髄液等のサンプルに含まれる多種多様な免疫細胞群から特定の抗原特異的なＴ細胞を効率的にあるいは優先的に誘導、増殖させることができれば、その様な技術は免疫療法において有用である。

[0007] ムチンは、コアタンパクのセリン残基またはトレオニン残基にＮ－アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、シアル酸等の糖鎖がα－Ｏ－グリコシド結合（ムチン型結合）によって結合している糖タンパク質の総称であり、動物の上皮性細胞、唾液腺、顎下腺、胃粘膜、胃液、腸管粘膜等、魚類、植物またはそれらの粘性物質等に含まれている。

[0008] ムチンは、ゲル形成能、水素イオン浸透遅延能、水分保持等の物理化学的性質のほかに、種々の生理作用を有することも知られている。例えば、ヒトのムチンが腫瘍の転移抑制作用を有すること（特許文献１）、ムチンの一種であるエイ軟骨由来のコンドロイチン硫酸が抗腫瘍作用、免疫賦活作用、皮膚コラーゲンの減少抑制作用を示すこと（特許文献２）、植物由来のムチンがアトピー性皮膚炎を抑制すること（特許文献３）などが知られている。

[0009] しかしながら、ムチン、特にヒト以外のムチンが、抗原特異的Ｔ細胞のインビトロでの増殖を選択的に促進させる機能を有することは、未だ報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特開２００３－２６８００４号公報

特許文献2：特表２００４－５３４７２２号公報

特許文献3：特開２００８－１１０９５４号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、悪性腫瘍等の難治性疾患の免疫療法において必要な抗原特異的Ｔ細胞をインビトロで培養する際に、その増殖を選択的に促進させることのできる物質を提供することにある。

[0012] 本発明者らは、意外なことにムチン、特に魚類のエイから採取されるムチンが、インビトロにおいて腫瘍抗原に対して特異的に反応するＴ細胞の増殖を選択的に促進させる活性を示すことを見出し、下記の各発明を完成した。

[0013] （１）ムチンを有効成分とするインビトロで培養される抗原特異的Ｔ細胞の増殖促進剤。

（２）ムチンがエイの皮及び／または体表粘性物から採取されるムチンである（１）に記載の増殖促進剤。

（３）抗原特異的Ｔ細胞がヒト腫瘍抗原特異的Ｔ細胞である（１）または（２）に記載の増殖促進剤。

発明の効果

[0014] 本発明の増殖促進剤は、その存在下で患者から採取されたＴ細胞を特定の抗原で刺激しながらインビトロで培養することで、当該抗原に対して特異性を示す免疫細胞の増殖を選択的に促進させることができ、その結果、当該抗原特異的Ｔ細胞を短時間のうちに大量調製することが可能となる。

[0015] また、抗原特異的免疫細胞の培養時間を短縮させることによって培養中の雑菌汚染の危険性を低減することができるとともに、患者や医師からの需要にもより速やかに対応することができるようになる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]ムチンを培地に添加したサンプル１ロット（Ｌｏｔ３）及びムチンを添加しなかったコントロール（－）における培養細胞の光学顕微鏡写真である。上段が倍率１０倍、下段が倍率４０倍である。

[図2]３ロット（Ｌｏｔ３、Ｌｏｔ１０、Ｌｏｔ１１）のムチンをそれぞれ培地に添加したサンプルとムチンを添加しなかったコントロール（－）における、培養開始から１４日後に計測したＣＤ４陽性Ｔ細胞の全細胞数を表すグラフである。

[図3]３ロット（Ｌｏｔ３、Ｌｏｔ１０、Ｌｏｔ１１）のムチンをそれぞれ培地に添加したサンプルとムチンを添加しなかったコントロール（－）における、ＩＦＮ－γの産生量を示すグラフである。図中、ペアをなす棒グラフの左側は腫瘍抗原のみで再刺激を行ったときのＩＦＮ－γの産生量を、右側は腫瘍抗原とムチンで再刺激を行ったときのＩＦＮ－γの産生量をそれぞれ示す。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明は、ムチンを有効成分とする、インビトロで培養される抗原特異的Ｔ細胞の増殖促進剤に関する。

[0018] 本発明で使用されるムチンは、コアタンパクのセリン残基またはトレオニン残基にＮ－アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、マンノース、シアル酸、イズロン酸及び／またはグルクロン酸等の糖鎖が、主としてα－Ｏ－グリコシド結合（ムチン型結合）によって結合している糖タンパク質であればよく、動物の上皮性細胞、唾液腺、顎下腺、胃粘膜、胃液、腸管粘膜等、魚類の体表、植物の粘性物質等動物、魚類、植物等から調製されるいずれのムチンであってもよい。本発明においては、魚類から採取されるムチン、特に板鰓亜綱（Ｅｌａｓｍｏｂｒａｎｃ

ｈｉｉ）に属するエイから採取されるムチンの利用が好ましく、特に真カスベ（軟骨魚綱エイ目ガンギエイ科メガネカスベ、学名Ｒａｊａ ｐｕｌｃｈｒａ Ｌｉｕ）の皮及び／または体表粘性物から産生されるムチンの利用が好ましい。

[0019] ムチンは、上皮性細胞、唾液腺、顎下腺、胃粘膜、胃液、腸管粘膜等の動物組織、魚類の皮や粘性物、植物等をホモジナイズした後、適当な溶媒、例えば水や生理食塩水、リン酸緩衝液等を加えて撹拌、抽出し、遠心分離を行うことで調製することができる。さらに、ムチンクロット法、硫安分画による方法、Ba^{2+}やCa^{2+}の存在下でのアルコール分別による方法、セタブロン（セチルトリメチルアンモニウムブロマイド）や塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）などの四級アミンの陽性界面活性剤を使用する沈澱法などにより、ムチンを精製して用いてもよい。

[0020] 本発明では、エイの皮及び／または体表粘性物から上記のようにして調製される粗ムチンをパパイン及び／または天野エンザイム社から商品名「プロテアーゼＡアマノＧ」として市販されているプロテアーゼを用いて加水分解した水溶性ムチンを用いることが好ましい。また、必要に応じてメンブラン・フィルターを用いたろ過や透析等を行って、さらに精製度を高めて用いてもよい。

[0021] 本発明における抗原特異的Ｔ細胞とは、キラーＴ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、ヘルパーＴ細胞等のＴ細胞であって、悪性腫瘍、ウイルスその他の特定の抗原に対して特異性を獲得したＴ細胞を意味する。本発明において好ましいＴ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ４＋Ｔ細胞である。

[0022] 抗原特異的Ｔ細胞は、ヒトから採取された血液やリンパ液に含まれる免疫細胞群を、目的とする抗原を含む適当な培地で培養することで調製することができる。かかる免疫細胞の培養と抗原による刺激自体は、当業者に周知の方法である。

[0023] 抗原特異的Ｔ細胞を誘導するために培地に添加される抗原は、悪性腫瘍等の各種疾患に対する免疫療法を有効なものとし得る特異的な抗原であれば、

ポリペプチド、核酸、糖鎖、糖脂質その他いずれの物質であってもよい。特に本発明において好ましい抗原はポリペプチドである。

[0024] 例えば、ヒト腫瘍抗原の例としては、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ１、ＴＲＰ１、ＴＲＰ２及びチロシナーゼ（メラノーマ）、ＣＥＡ（大腸癌）、ＰＳＡ（前立腺癌）等の組織特異的タンパク質、β－カテニン、ＣＤＫ４及びＭＵＭ－１（メラノーマ）、ＣＡＳＰ８（扁平上皮癌）、ＫＩＡＡ０２０５（膀胱癌）等の腫瘍特異的変異ペプチド、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＢＡＧＥ、ＧＡＧＥ－１、－２及びＮＹ－ＥＳＯ－１（メラノーマ、各種上皮性癌）等のＣ－Ｔ（Ｃａｎｃｅｒ－ｔｅｓｔｉｓ）抗原、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ（乳癌、卵巣癌、肺癌）、ｐ５３（扁平上皮癌）、ｒａｓ（大腸癌、甲状腺癌）等の癌遺伝子または癌抑制遺伝子産物、ＨＰＶ１６－Ｅ７（子宮頸癌）、ＥＢＶ－ＥＢＮＡ－２、－３、－４、－６、ＥＢＶ－ＬＭＰ２（Ｂ細胞リンパ腫）等のウイルスタンパク質、ＨＬＡ－Ａ２変異（腎臓癌）等の変異ＨＬＡ、その他Ｓｕｒｖｉｖｉｎ（各種上皮性癌）、ＧｎＴ－Ｖ（メラノーマ）、ＰＲＡＭＥ（メラノーマ、各種癌、白血病）、ＳＡＲＴ－１（食道癌、肺腺癌）、ＭＵＣ１（乳癌、卵巣癌、膵臓癌）、ＲＡＧＥ（腎臓癌）などを挙げることができる。

[0025] また、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）やヒトＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）等のヒト肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、インフルエンザウイルスその他の感染性ウイルスにおいて報告されているｇａｇ、ｐｏｌ等のその他の各種抗原性ポリペプチドも、本発明において利用することができる。

[0026] 本発明の増殖促進剤は、上記のあるいはその他の腫瘍抗原に対して特異性を示すＴ細胞に対して、その増殖を選択的に促進することができる。

[0027] 後の実施例に示されるように、生体から採取された免疫細胞群を腫瘍抗原及び本発明の増殖促進剤であるムチンを含む培地で培養し、さらに腫瘍抗原で再刺激を与えると、腫瘍抗原は含むが本発明の増殖促進剤であるムチンを

含まない培地で培養した免疫細胞の場合と比較して、より多量の細胞傷害性サイトカインであるＩＦＮ－γの産生が観察される。かかるＩＦＮ－γ産生の有意な差をもたらす機構の詳細は不明であるが、上記の結果は、本発明の増殖促進剤であるムチンが、生体から採取されたＴ細胞を含む免疫細胞群を抗原で刺激しながらインビトロで培養する際に、典型的には本発明の増殖促進剤を細胞培養用の培地に添加されることにより、前記抗原に対して特異性を示すＴ細胞の増殖を選択的に促進させたことによる結果であると推察される。

[0028] 本発明の増殖促進剤は、上記のように生体から採取された免疫細胞群のインビトロでの培養において使用されるものである。その形態としては前記したような一般的な方法によって調製されたムチンあるいはさらに精製されたムチンそのままであってもよく、また免疫細胞の増殖に好適な一成分として予め混合した増殖用培地の形態にあってもよい。

[0029] また本発明の増殖促進剤は、例えば無機または有機栄養源、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＴＮＦ、ＬＰＳその他の成長因子、ＦＢＳ等の血清、インシュリン、トランスフェリン、フェツイン、カタラーゼ、Ｏ－フォスホリルエタノールアミン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、２－メルカプトエタノール、コルチコステロンその他の、細胞培養に一般的に用いられる各種添加剤とムチンとの混合物の形態であってもよい。また、細胞培養に使用される容器に化学的あるいは物理的にムチンをコートして使用してもよい。

[0030] 本発明において利用可能な培地としては、免疫細胞の増殖用に用いられる一般的な基本培地であればいずれも利用可能であり、例えば最小基本培地（ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ１６４０、ハムＦ１２、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、イスコフ改変イーグル培地（ＩＭＤＭ）などを単独または混合して使用することができる。

[0031] また、これらの基本培地に適当な抗生物質や動物血清等を添加して培養してもよい。例えば、上記培地に対して、その細胞増殖能をさらに向上させるために、種々の公知成分を添加することもできる。その具体例としては、無

機または有機栄養源、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＴＮＦ、ＬＰＳその他の成長因子、ＦＢＳ等の血清、インシュリン、トランスフェリン、フェツイン、カタラーゼ、Ｏ－フォスホリルエタノールアミン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、２－メルカプトエタノール、コルチコステロン等を挙げることができる。また、培養に使用される容器には特に限定はなく、必要な培養規模に応じて市販のプレート、ディッシュ、フラスコを適宜選択して用いればよい。

[0032] 以下、実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はかかる実施例に限定して解されるべきものではない。

実施例

[0033] 実施例１：

真カスベ（軟骨魚網エイ目ガンギエイ科メガネカスベ）から、体表に付着している粘性物とともに表皮を剥ぎ取った。剥ぎ取った表皮６００ｋｇを、５０℃に保つよう加熱及び撹拌しながら斜軸ニーダー中へ徐々に投入した。つぎに原料の温度が５０℃に保たれていることを確認した後、最終濃度０．１ｗｔ％となるようタンパク質分解酵素（天野エンザイム社，プロテアーゼＡアマノＧ）を加え、５０℃で４時間インキュベートした。その後、９０℃で１０分間加熱処理し、酵素を失活させた。

[0034] 加熱処理後の溶液を５０℃に冷却した後、珪藻土（昭和化学工業社，ラジオライト＃１００）を１０ｗｔ％となるよう加え、よく混合撹拌した。混合物をフィルタープレス（薮田機械社，ＦＲ－６６）にて清澄ろ過を行い、４００Ｌの淡褐色透明な抽出液を得た。この抽出液を限外ろ過膜（旭化成ケミカルズ社，マイクローザＡＣＰ－３０１３）によって内部保持液が４０Ｌ以下となるよう濃縮して、抽出液を調製した。抽出液が白濁する場合には、再度上記フィルタープレス処理を行った。

[0035] このように調製した抽出液を９０℃で１０分間加熱殺菌したのち、スプレードライヤー（坂本技研社，ＤＡ２２０－１０Ｓ）にて噴霧乾燥し、粗ムチン粉末１．２ｋｇを得た。

[0036] 実施例２：

１）全Ｔ細胞数の増加

健常者の血液からファイコール（Ａｍｅｒｃｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ社）を用いて末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を分離した。２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌのＰＢＭＣを２４穴プレートに播き、最終濃度２０ｎｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ社）を添加したＡＩＭ－Ｖ １ｍＬにて、３７℃、CO_2インキュベーター内で培養した。２時間後、マイトマイシンＣ（ＭＭＣ）にて４５分間処理し、ＰＢＭＣを不活化させた。

[0037] ＭＭＣを洗浄後、付着性細胞と単離した２×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌのＣＤ４陽性Ｔ細胞を、最終濃度１０μｇ／ｍＬの癌抗原ペプチド（グライナージャパン社）と５％ヒト血清（北海道赤十字血液センター）と実施例１で調製した最終濃度１０μｇ／ｍＬのムチンを含む培地１ｍＬにて、３７℃、CO_2インキュベーター内で共培養を行った。ムチンは実施例１に記載の方法によって３ロット用意し、上記の実験において用いた。また、上記の培養条件において、ムチン無添加をコントロールとした。

[0038] 培養開始から７日後に、初日と同様にＩＦＮ－γ処理した付着性細胞と最終濃度１０μｇ／ｍＬの癌抗原ペプチドを加え、さらに最終濃度１０μｇ／ｍＬのムチンを加えてＣＤ４陽性Ｔ細胞を再刺激した。コントロールについてはムチンを添加しなかった。再刺激の２日後に、最終濃度１０Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（シオノギ製薬社）を添加した。

[0039] 培養開始から１０日目にムチンを添加したサンプル１ロット及びムチンを添加しなかったコントロールにおける培養細胞の状態を光学顕微鏡（倍率１０倍と４０倍）で観察した。その結果を図１に示す。

[0040] さらに培養開始から１４日後に、３ロットのムチンを添加したサンプルとムチンを添加しなかったコントロールにおけるＣＤ４陽性Ｔ細胞の全細胞数を計測した。その結果を図２に示す。

[0041] その結果、ムチンを添加しなかったコントロールでは、細胞の外観は培養開始時と変わらない形態であったのに対して、ムチンを添加したサンプルで

は細胞が大きくなり、細胞同士が結合した細胞塊が多数見られるようになった。このことは、細胞が幼若化し活性化状態であることを意味する。また、ムチンを添加しても、全Ｔ細胞数は２～３倍程度しか増加しないことが確認された。

[0042] ２）腫瘍抗原の添加によるＩＦＮ－γ産生の誘導

１）に記載された培養を開始してから１４日後にＣＤ４陽性Ｔ細胞を回収、洗浄し、ＰＢＭＣと最終濃度１０μｇ／ｍＬの癌抗原ペプチドの存在下で９６穴Ｕプレート（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）にて培養した。コントロールとして、癌抗原ペプチド無添加を用意した。２４時間後に培養上清を回収し、上清中のＩＦＮ－γの濃度をＢＤ ＯｐｔｉＥＩＡ ｓｅｔ Ｈｕｍａｎ ＩＦＮ－γ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）にて測定した。その結果を図３に示す。

[0043] １）においてムチンを添加しなかったコントロールでは、癌抗原ペプチド及びムチンを添加してもＩＦＮ－γはほとんど産生されない。一方、１）においてムチンを添加したサンプルでは、癌抗原ペプチドを添加することによってコントロールと比較して有意にＩＦＮ－γの産生が誘導されるが、さらにムチンを同時に添加することによってＩＦＮ－γの産生量は増大した。

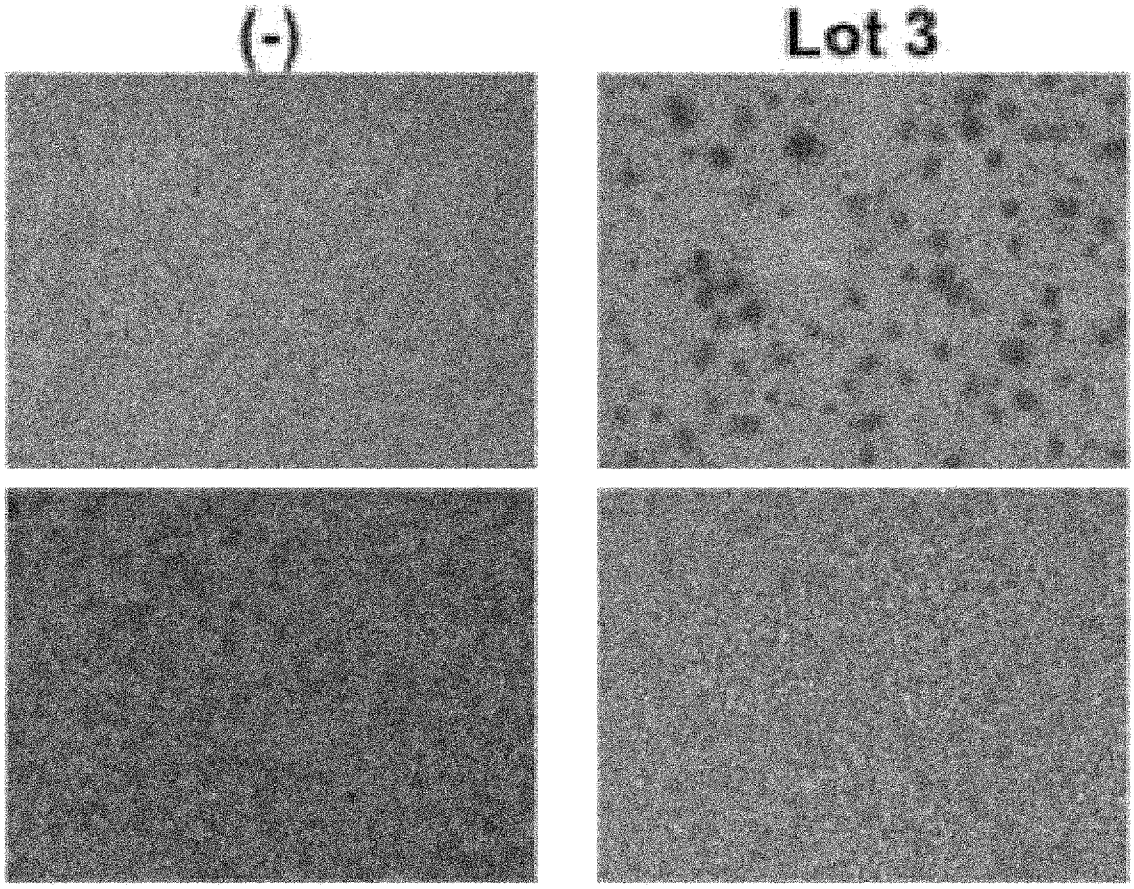
請求の範囲

[請求項1] ムチンを有効成分とするインビトロで培養される抗原特異的Ｔ細胞の増殖促進剤。

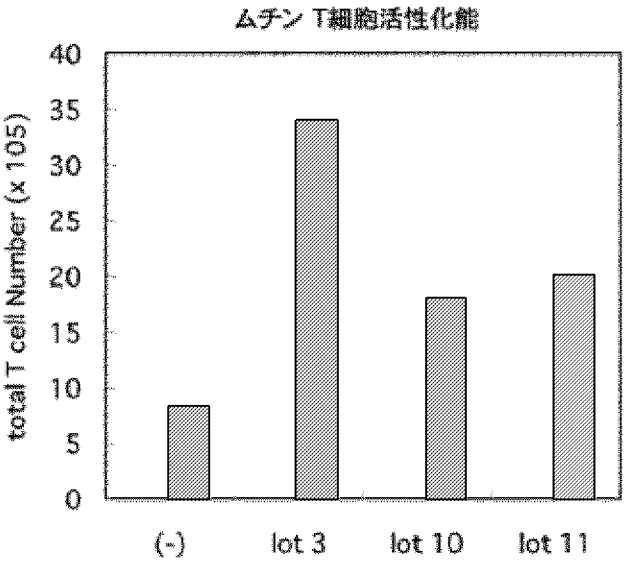
[請求項2] ムチンがエイの皮及び／または体表粘性物から採取されるムチンである請求項１に記載の増殖促進剤。

[請求項3] 抗原特異的Ｔ細胞がヒト腫瘍抗原特異的Ｔ細胞である請求項１または２に記載の増殖促進剤。

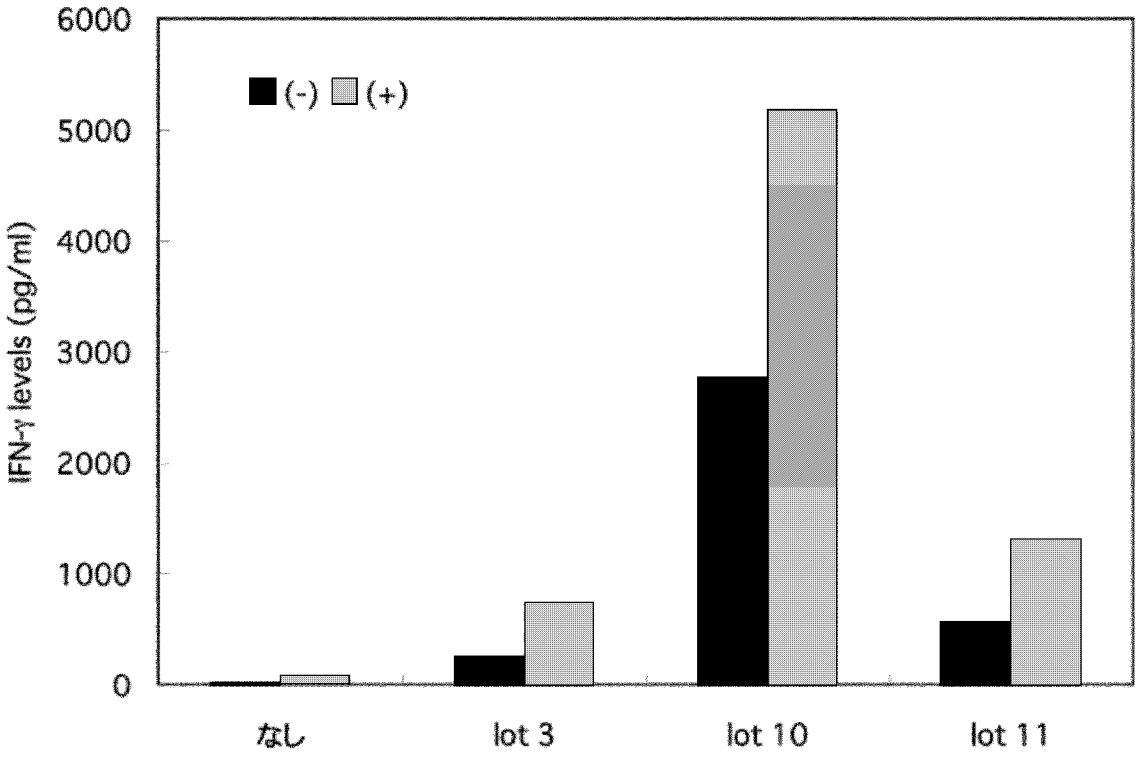
[図1]


(-)
Lot 3

[図2]


ムチン T細胞活性化能
total T cell Number (x 105)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
(-)
lot 3
lot 10
lot 11

[図3]


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IFN-γ levels (pg/ml)
(-)
(+)
なし
lot 3
lot 10
lot 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/054663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/00(2006.01)i, *C12N5/07*(2010.01)i, *A61K35/14*(2006.01)n, *A61P35/00*(2006.01)n

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)
C12N5/00, C12N5/07, A61K35/14, A61P35/00

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AGRAWAL,B et al., MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells. Int Immunol. 2005 Apr, vol.17(4), pp.391-399	1-3
A	ALCAIDE,P et al., The Trypanosoma cruzi membrane mucin AgC10 inhibits T cell activation and IL-2 transcription through L-selectin. Int Immunol. 2004 Oct, vol.16(10), pp.1365-1375	1-3
A	CHAN,AK et al., Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. Int J Cancer. 1999 Aug 27, vol.82(5), vol.721-726	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 May, 2010 (14.05.10)	25 May, 2010 (25.05.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/054663

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIZUI,M et al., Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. Int Immunol. 2008 May, vol.20(5), pp.695-708	1-3
A	MESRI,M et al., Inhibition of in vitro and in vivo T cell responses by recombinant human Tim-1 extracellular domain proteins. Int Immunol. 2006 Mar, vol.18(3), pp.473-484	1-3

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５４６６３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i, A61K35/14(2006.01)n, A61P35/00(2006.01)n

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.　C12N5/00, C12N5/07, A61K35/14, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)医学・薬学予稿集全文データベース JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

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	AGRAWAL,B et al., MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells. Int Immunol. 2005 Apr, vol.17(4), pp.391-399	1-3
A	ALCAIDE,P et al., The Trypanosoma cruzi membrane mucin AgC10 inhibits T cell activation and IL-2 transcription through L-selectin. Int Immunol. 2004 Oct, vol.16(10), pp.1365-1375	1-3

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　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 １４．０５．２０１０	国際調査報告の発送日 ２５．０５．２０１０
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）　４Ｂ　９１２３ 長井　啓子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	CHAN,AK et al., Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. Int J Cancer. 1999 Aug 27, vol.82(5), vol.721-726	1-3
A	MIZUI,M et al., Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. Int Immunol. 2008 May, vol.20(5), pp.695-708	1-3
A	MESRI,M et al., Inhibition of in vitro and in vivo T cell responses by recombinant human Tim-1 extracellular domain proteins. Int Immunol. 2006 Mar, vol.18(3), pp.473-484	1-3