

(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
2023年9月21日(21.09.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/176806 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/0784 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 35/15 (2015.01) C12N 5/07 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/009757

(22) 国際出願日: 2023年3月14日(14.03.2023)

(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 2022-043701 2022年3月18日(18.03.2022) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1-3-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 熊谷 雄太郎 (KUMAGAI, Yutaro); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目17番 7号 赤坂溜池タワー1 1階 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

(54) Title: METHOD FOR REPROGRAMMING FIBROBLAST OR FIBROBLAST-LIKE CELL TO CONVENTIONAL TYPE-2 DENDRITIC CELL

(54) 発明の名称: 線維芽細胞または線維芽細胞様細胞を従来型2型樹状細胞にリプログラミングするための方法

(57) Abstract: Provided is a method for producing a conventional type-2 dendritic cell (cDC2)-like cell from a fibroblast or a fibroblast-like cell, the method including a step for introducing a nucleic acid encoding PU.1, a nucleic acid encoding KLF4, a nucleic acid encoding IRF4 and a nucleic acid encoding C/EBP into the fibroblast or the fibroblast-like cell.

(57) 要約: 線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から従来型2型樹状細胞(cDC2)様細胞を生成するための方法であって、PU.1をコードする核酸、KLF4をコードする核酸、IRF4をコードする核酸およびC/EBPをコードする核酸を前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞に導入するステップを含む方法を提供する。



WO 2023/176806 A1

明 細 書

発明の名称：

線維芽細胞または線維芽細胞様細胞を従来型 2 型樹状細胞にリプログラミングするための方法

技術分野

[0001] 本発明は、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から従来型 2 型樹状細胞をダイレクトリプログラミングにより調製するための方法および組成物に関する。

背景技術

[0002] 膵がんは 5 年相対生存率が 10%未満であり、他のがんに比べて極めて予後が不良な難治がんとして知られる。膵がんなどの難治がんの特徴の一つは、非常に多くの間質ががん細胞を取り巻いていることである。間質は、血管新生やがん細胞の増殖・浸潤を促進する細胞を多く含んでおり、その中でも量的に主体となる細胞が、がん関連線維芽細胞（CAF）である。CAFは、増殖因子を産生してがん細胞の増殖を促進するだけでなく、コラーゲンなどの細胞外基質を過剰に産生することによりがん組織を硬くする。その結果、難治がんは、従来一般的な化学療法や放射線療法に対して強い抵抗性を示す。

[0003] 難治がんに対する治療方法として、抗腫瘍免疫応答を活性化する免疫療法が試みられている。中でも、自家性の樹状細胞をインビトロでがん抗原により感作して患者の体内に戻すことにより抗腫瘍免疫応答を活性化する、いわゆる DC ワクチン療法は、安全性も高いことから注目されている。しかし、樹状細胞およびその前駆細胞である単球は末梢血中に極めて少量しか存在せず、培養により増殖させることもできないため、治療に有効な量の DC ワクチンを調製することには困難が存在する。この問題を解決するために、現在、リプログラミングにより樹状細胞を調製する手法の開発が進められている。体細胞から誘導多能性幹細胞（iPSC）を調製し、樹状細胞へと誘導す

る技術がすでに臨床でも試験されつつある。しかし、iPSCの調製には時間と費用がかかり、技術的難易度も高いことから、iPSC由来DCの臨床応用は実現されていない。

[0004] そこで、分化細胞をiPSCを経由せずに別の種類の分化細胞へと直接誘導するダイレクトリプログラミング技術に期待が高まっている。特に、線維芽細胞から樹状細胞を直接誘導できれば、容易かつ短時間・低コストでDCワクチンを調製できる。現在、マウス胎児線維芽細胞(MEF)から樹状細胞へとダイレクトリプログラミングできることが実証されている(特許文献1および2、非特許文献1)。しかし、ヒト成体の線維芽細胞を高効率で樹状細胞へと直接誘導できるには至っていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2018/185709号

特許文献2：国際公開第2021/105234号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Rosa FF et al., Sci. Immunol., 2018 Dec 7;3(30):eaau4292

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、難治がんに対する新たな治療戦略、および、容易かつ効率的なDCワクチンの調製方法を提供することを目的としてなされたものである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意研究の結果、特定の4つの転写因子を組み合わせることで、種々の線維芽細胞または線維芽細胞様細胞を従来型2型樹状細胞(cDC2)様細胞へと分化転換することに成功した。

[0009] すなわち、本発明は、一実施形態によれば、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から従来型2型樹状細胞(cDC2)様細胞を生成するための方法であって、PU.1をコードする核酸、KLF4をコードする核酸、IRF4

をコードする核酸およびC/E B Pをコードする核酸を前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞に導入するステップを含む方法を提供するものである。

[0010] 前記C/E B Pは、C/E B PアルファまたはC/E B Pベータであることが好ましい。

[0011] 前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞は、がん関連線維芽細胞であることが好ましい。

[0012] 前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞は、間葉系幹細胞であることが好ましい。

[0013] また、本発明は、一実施形態によれば、上記方法により調製された従来型2型樹状細胞(c D C 2)様細胞を含んでなる、対象におけるがんを予防または治療するための医薬組成物を提供するものである。

[0014] 前記c D C 2様細胞は、がん抗原を負荷されていることが好ましい。

[0015] 前記c D C 2様細胞は、前記対象に対して自家性であることが好ましい。

[0016] 前記c D C 2様細胞は、不死化されたものであってよい。

[0017] また、本発明は、一実施形態によれば、P U. 1をコードする核酸、K L F 4をコードする核酸、I R F 4をコードする核酸およびC/E B Pをコードする核酸を含んでなる、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞を従来型2型樹状細胞様細胞へと分化転換するための組成物を提供するものである。

発明の効果

[0018] 本発明に係る方法によれば、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞をc D C 2様細胞へと直接分化転換することができる。そのため、本発明に係る方法によれば、D Cワクチンを容易かつ効率的に調製することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、C D 4 5、C D 1 1 b、C D 1 1 cおよびM H CクラスIIの発現に基づいて、マウス4転写因子を導入したM E Fをフローサイトメトリーによりゲーティングした結果を示す図である。

[図2]図2は、C D 4 5 + C D 1 1 b + M H C - II + C D 1 1 c + 細胞におけるc D C 2特異的マーカー(C L E C 1 0 A、S I R P α およびC C R 7

)の発現を示す図である。

[図3]図3は、CD45+CD11b+MHC-ⅠⅠ+CD11c+細胞におけるC型レクチン(SIGNR1およびDC-SIGN)の発現を示す図である。

[図4]図4は、CD45+CD11b+MHC-ⅠⅠ+CD11c+細胞におけるマクロファージ特異的マーカー(CD115およびF4/80)および単球特異的マーカー(Ly6C)の発現を示す図である。

[図5]図5は、i cDC2におけるcDC特異的転写因子Zbtb46の発現をRT-qPCRにより定量した結果を示すグラフである。

[図6]図6は、i cDC2におけるマクロファージ特異的チロシンキナーゼMerTKの発現をRT-qPCRにより定量した結果を示すグラフである。

[図7]図7は、マウス4転写因子を導入した不死化MEFのcDC2様細胞への分化転換の経時変化を示すグラフである。

[図8]図8は、不死化MEFから誘導されたcDC2様細胞の増殖を示すグラフである。

[図9]図9は、マウスPU.1と、マウスKLF4、IRF4およびC/EBPアルファから選択される1以上の転写因子とを組み合わせ導入したMEFからi cDC2への分化転換効率を示すグラフである。

[図10]図10は、TREプロモーター制御下にマウス4転写因子を発現するポリシストロニックベクターの構成を示す概略図である。

[図11]図11は、CD45、CD11b、CD11cおよびMHCクラスⅠⅠの発現に基づいて、それぞれ個別のベクターによりマウス4転写因子を導入したMEFをフローサイトメトリーによりゲーティングした結果を示す図である。

[図12]図12は、CD45、CD11b、CD11cおよびMHCクラスⅠⅠの発現に基づいて、単一のポリシストロニックベクターにより4転写因子を導入したMEFをフローサイトメトリーによりゲーティングした結果を示す図である。

[図13]図13は、CD45およびCD11bの発現に基づいて、ヒト4転写因子を導入したMRC-5をフローサイトメトリーによりゲーティングした結果を示す図である。

[図14]図14は、CD45+CD11b+細胞におけるHLA-DRの発現の亢進を示す図である。

[図15]図15は、CD45+CD11b+細胞におけるCD11cの発現の亢進を示す図である。

[図16]図16は、マウス4転写因子を導入したMEF、MSC、3T3およびCD4陽性T細胞を混合した細胞集団におけるCD3イプシロン陽性細胞数の増加を示すプロットである。

[図17]図17は、マウス4転写因子を導入したMEFと混合されたCD4陽性T細胞におけるCD69の発現の亢進を示す図である。

[図18]図18は、マウス4転写因子を導入したMEFを投与されたまたは投与されていないモデルマウスにおける腫瘍サイズを比較したグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

[0021] 本発明は、第一の実施形態によれば、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から従来型2型樹状細胞(cDC2)様細胞を生成するための方法であって、PU.1をコードする核酸、KLF4をコードする核酸、IRF4をコードする核酸およびC/EBPをコードする核酸を前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞に導入するステップを含む方法である。

[0022] 「線維芽細胞」とは、間質に存在する紡錘形の細胞であって、細胞外基質構成タンパク質およびその分解酵素を産生する細胞をいう。一方、「線維芽細胞様細胞」とは、線維芽細胞と類似した紡錘形のみにより定義され、分化能などの機能は特定されていない細胞をいう。形態学的には、線維芽細胞と線維芽細胞様細胞とは区別することができない。本実施形態の方法は、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞のいずれも使用することができる。

- [0023] 本実施形態における線維芽細胞または線維芽細胞様細胞は、任意の脊椎動物由来のものであってよいが、好ましくは、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来であり、特に好ましくはヒト由来である。また、本実施形態における線維芽細胞または線維芽細胞様細胞は、胎児または成体の任意の組織に由来するものであってよく、組織は正常組織またはがん組織のいずれであってもよい。
- [0024] したがって、本実施形態における線維芽細胞または線維芽細胞様細胞には、例えば、マウス胎児線維芽細胞（MEF）、不死化したマウス胎児線維芽細胞（3T3）、成体マウス尾端線維芽細胞（TTF）、ヒト胎児線維芽細胞（HEF）、がん関連線維芽細胞（CAF）、脂肪由来間葉系幹細胞（AD-MS C）、骨髄間葉系幹細胞（BM-MS C）などが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0025] 線維芽細胞または線維芽細胞様細胞の調製方法は十分に確立されており、当分野において公知の方法にしたがって調製することができる。あるいは、すでに樹立された線維芽細胞株または線維芽細胞様細胞株を、例えば、理研バイオリソースセンター（RIKEN BRC）、ATCC（American Type Culture Collection）などから入手してもよい。
- [0026] 本実施形態の方法では、PU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPをコードする核酸を線維芽細胞または線維芽細胞様細胞に導入する。
- [0027] 「PU. 1」、「KLF4」、「IRF4」および「C/EBP」は、いずれも転写因子である。C/EBPファミリーは、C/EBPアルファ、C/EBPベータ、C/EBPガンマ、C/EBPデルタ、C/EBPイプシロンおよびCHOP（C/EBPゼータ）からなり、本実施形態におけるC/EBPは、そのいずれであってもよいが、好ましくはC/EBPアルファまたはC/EBPベータである。本実施形態におけるPU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPは、任意の脊椎動物由来のものであってよいが、

好ましくは、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来であり、特に好ましくはヒト由来である。

[0028] PU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPをコードする遺伝子はすでにクローニングされており、それらの核酸配列情報は、所定のデータベースから入手することができる。例えば、ヒトPU. 1であればNM_003120、マウスPU. 1であればNM_011355、ヒトKLF4であればNM_004235、マウスKLF4であればNM_010637、ヒトIRF4であればNM_002460、マウスIRF4であればNM_013674、ヒトC/EBPアルファであればNM_004364、マウスC/EBPアルファであればNM_007678、ヒトC/EBPベータであればNM_005194、マウスC/EBPベータであればNM_009883（いずれもNCBI Nucleotideデータベース）が利用可能である。

[0029] 本実施形態におけるPU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPには、同等の転写調節活性を有するそれらのバリエーションやホモログなども含まれてよい。言い換えれば、本実施形態におけるPU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPには、その転写調節活性が維持されていることを限度として、データベースに登録されているアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質が包含され得る。アミノ酸配列の同一性は、配列解析ソフトウェアを用いて、または、当分野で慣用のプログラム（FASTA、BLASTなど）を用いて算出することができる。また、本実施形態におけるPU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPには、その転写調節活性が維持されていることを限度として、データベースに登録されているアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質が包含され得る。ここで、「1～数個」とは、例えば「1～30個」、好ましくは「1～10個」、特に好ましく

は「1～5個」である。

[0030] PU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPをコードする核酸は、当分野において周知の方法により線維芽細胞または線維芽細胞様細胞に導入することができる。例えば、それらの核酸を発現ベクターにクローニングして、細胞に導入すればよい。発現ベクターの種類は、対象とする線維芽細胞または線維芽細胞様細胞に応じて適切な発現ベクターを選択して用いることができる。例えば、以下に限定されないが、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターや、pCMVなどのプラスミドベクターなどを用いることができる。また、PU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPをコードする核酸は、それぞれ個別のベクターから発現されてもよいし、単一のポリシストロニックベクターから発現されてもよい。

[0031] 本実施形態の方法において、発現ベクターは、その種類に応じて当分野において周知の方法により細胞に導入され得る。非ウイルスベクターであれば、例えば、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクションなどにより導入することができる。ウイルスベクターであれば、適切な力価または多重感染度（MOI）において細胞に感染させることにより導入することができる。

[0032] PU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPが発現されると、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞は従来型2型樹状細胞（cDC2）様細胞へと分化転換される。ここで、「分化転換（またはダイレクトリプログラミング）」とは、ある成熟（分化）細胞型が、多能性細胞状態を経ることなく、別の成熟（分化）細胞型へと直接的に変換されることをいう。

[0033] 本実施形態において「従来型2型樹状細胞（cDC2）様細胞」とは、cDC2特異的マーカーを発現し、抗原提示能を有する細胞をいう。樹状細胞（DC）は、従来型1型樹状細胞（cDC1）、従来型2型樹状細胞（cDC2）および形質細胞様樹状細胞（pDC）の3つの主要なサブセットに分類され、各サブセットを特徴づけるマーカーが周知である。本実施形態にお

けるcDC2様細胞は、周知の血球マーカー、ミエロイド系細胞マーカーおよびcDC2特異的マーカーの任意の組み合わせによって定義されてよいが、例えば、CD45+、CD11b+、CD11c+、かつMHCクラスII（HLA-DR）+として定義されることが好ましい。MHCクラスII（HLA-DR）の顕著な発現により、本実施形態のcDC2様細胞が抗原提示能を有することが示され得る。本実施形態におけるcDC2様細胞は、上記マーカーに加え、CLEC10A、SIRP α 、および/またはCCR7をさらに発現していることが好ましく、SIGNR1やDC-SIGNなどのC型レクチンをさらに発現していることがより好ましい。本実施形態におけるcDC2様細胞は、cDC2特異的マーカーのみならず、CD115などのマクロファージ特異的マーカーやLy6Cなどの単球特異的マーカーをさらに発現していてもよい。マーカーの発現は、RT-PCR、ウェスタンブロット、フローサイトメトリーなどの公知の手法により解析することができる。

[0034] 本実施形態の方法によれば、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から、多能性細胞状態を経ることなく、直接的にcDC2様細胞を生成することができる。線維芽細胞は容易に取得でき増殖させることができることから、本実施形態の方法は、DCワクチンの調製に有用である。

[0035] 本発明は、第二の実施形態によれば、上記方法により調製されたcDC2様細胞を含んでなる、対象におけるがんを予防または治療するための医薬組成物である。

[0036] 本実施形態において、「予防する」とは、がんを発症するおそれのある対象において、その発症を未然に防ぐことのみならず、その発症リスクを低減することや、発症する前の対象に処置することにより、対象ががんを発症した場合の症状の進行を遅延または重症度を軽減することをも含む。「治療する」とは、がんを完全に治癒することのみならず、がんの症状を寛解または緩和すること、がんの進行を遅延または停止させること、および、がんの予後を改善することをも含む。

- [0037] 本実施形態における「対象」は、任意の脊椎動物であってよいが、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒトなどの哺乳動物であり、特に好ましくはヒトである。対象は、乳幼児、若年、青年、成人および老人対象を含めた任意の年齢であり得る。
- [0038] 本実施形態におけるcDC2様細胞は、第一の実施形態において定義したものと同様であり、任意の脊椎動物の任意の組織由来の線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から調製されたものであってよい。本実施形態におけるcDC2様細胞は、対象に対して好ましくは同種または自家、より好ましくは自家の線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から調製され得る。
- [0039] 本実施形態におけるcDC2様細胞は、任意で、不死化されていてもよい。ここで、細胞が「不死化されている」とは、細胞が、一定回数の分裂を繰り返した後もなお増殖可能な状態を維持する、すなわち、細胞が無限増殖能を有することを意味する。細胞を不死化する方法はすでに確立されており、公知の手法を採用することができる。例えば、SV40T抗原遺伝子やテロメラーゼ逆転写酵素（TERT）遺伝子などの不死化遺伝子をレトロウイルスベクターにより細胞に導入することにより、細胞を不死化することができる。
- [0040] 本実施形態におけるcDC2様細胞は、がん抗原を負荷されていることが好ましい。樹状細胞にがん抗原を負荷する方法は十分に確立されており、当分野において公知の方法にしたがって本実施形態におけるcDC2様細胞にがん抗原を負荷することができる。例えば、がん抗原ペプチドの全長もしくは部分断片または腫瘍ライセートを含む培地中でcDC2様細胞を12時間～数日間培養すればよい。または、がん抗原ペプチドの全長または部分断片をコードする核酸を、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを用いて細胞に導入してもよい。
- [0041] 本実施形態において使用できるがん抗原は、特に限定されないが、例えば、HER2/NEU、TERT、WT1、MAGE-A3、NY-ESO-1、PAP、PSAなどであってよい。

[0042] 本実施形態の医薬組成物は、上記cDC2様細胞を有効成分として含有する。本実施形態の医薬組成物は、有効成分のみから構成されていてもよいが、さらに任意の成分として、薬学的に許容される公知の担体、緩衝剤、その他の成分（例えばCpGDNAのようなToll様受容体リガンド、合成サイクリックヌクレオチドのようなSTINGアゴニスト、GM-CSF、CCL19、FLT3Lのようなサイトカイン/ケモカイン）などを含んでもよい。例えば、本実施形態の医薬組成物は、有効成分である細胞の生存を維持できるリン酸緩衝生理食塩水などの担体を用いて、注射剤型として調製することができる。この場合、cDC2様細胞は、例えば $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mLの濃度で上記担体に懸濁されてよい。

[0043] 本実施形態の医薬組成物は、例えば、注射、注入、移植などの適切な方法により投与することができる。好ましくは、本実施形態の医薬組成物は、静脈内、皮下、皮内、リンパ節内に注入されてよい。本実施形態の医薬組成物の投与量は、対象の年齢、体重、がんの重症度などに応じて異なってよいが、例えば $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/kg（体重）であってよい。前記投与量は、1回で投与されてもよいし、複数回にわたって投与されてもよい。

[0044] 本実施形態の医薬組成物は、安全かつ効果的に抗腫瘍免疫応答を活性化することができる。そのため、従来の化学療法や放射線療法によっては治療が困難であった難治がんの治療に有用である。

[0045] 本発明は、第三の実施形態によれば、PU.1をコードする核酸、KLF4をコードする核酸、IRF4をコードする核酸およびC/EBPをコードする核酸を含んでなる、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞を従来型2型樹状細胞様細胞へと分化転換するための組成物である。本実施形態におけるcDC2様細胞、線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、PU.1、KLF4、IRF4およびC/EBPをコードする核酸は、第一の実施形態で定義したものと同様であり、第一の実施形態に記載されたように調製かつ使用され得る。

実施例

[0046] 以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本

発明を何ら限定するものではない。

[0047] <1. 4 転写因子によるMEFの樹状細胞への分化転換>

マウスPU. 1 遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_011355、配列番号1)、KLF4 遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_010637、配列番号2)、IRF4 遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_013674、配列番号3) およびC/EBPアルファ遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_007678、配列番号4) をPCRにより増幅し、pMXsベクター (Kitamura et al., Exp. Hematol., 2003) にサブクローニングした。これらのベクターをVSV-Gプラスミドおよびgag/polプラスミド (Addgene) とともにHEK293細胞にトランスフェクションし、レトロウイルス粒子を産生させた。培養上清を回収し、4℃、6,000×gで20分間超遠心分離を行った。不溶性画分を除去した上清に、1/4量の40% (w/v) PEG-8000、1.2M NaCl/PBS溶液を混和し、4℃で一晩インキュベートした。その後、4℃、1,600×gで60分間超遠心分離を行い、上清を除去した。元の培養上清1mLにつき50μLのDMEMを加えてペレットを懸濁し、-80℃で保存した。

[0048] マウス胚性線維芽細胞 (MEF) は、常法に従い、13.5日胚から取得した。MEFを24ウェルプレートに播種し (1ウェルあたり 4×10^4 細胞)、翌日に1ウェルあたり100μLのウイルス懸濁液を加えた。翌日 (1日目とする)、1ウェル中の細胞を3ウェルに継代培養し、測定まで維持した。培養には10%FCS含有DMEMを用いた。13日後、細胞を回収し、マーカートンパク質の免疫染色を行った。マーカートンパク質を染色するためには、トリプシン処理して回収した細胞を抗体溶液に懸濁し、37℃で20分間インキュベートした後、4℃で15分間インキュベートした。染色後の細胞を、FACS Verse (BD Biosciences) により観測した。

[0049] 表1. マーカーの染色に用いた抗体

[表1]

Antigen	Species	Clone	Source
CD45	Mouse	30-F11	Tonbo Biosciences
CD11b	Mouse	M1/70	BD Pharmingen
MHC-II	Mouse	M5/114.15.2	Tonbo Biosciences
CD11c	Mouse	N418	BD Pharmingen
CD80	Mouse	16-10A1	Biolegend
CD86	Mouse	GL1	Tonbo Biosciences
CD3epsilon	Mouse	145-2C11	Biolegend
CD44	Mouse	IM7	BD Pharmingen
CLEC10A	Mouse	7H11	Biolegend
CD69	Mouse	H1.2F3	Biolegend
SIRPalpha	Mouse	P84	Biolegend
CCR7	Mouse	4B12	Biolegend
DC-SIGN	Mouse	LWC06	eBioscience
SIGNR1	Mouse	22D1	eBioscience
CD115	Mouse	AFS98	Biolegend
F4/80	Mouse	BM8	Biolegend
Ly6C	Mouse	AL-21	BD Pharmingen
CD45	Human	HI30	Tonbo Biosciences
CD11b	Human	ICRF44	Biolegend
HLA-DR	Human	L243	Tonbo Biosciences
CD11c	Human	Bu15	Biolegend

[0050] 血球マーカーCD45、ミエロイド系細胞マーカーCD11b、樹状細胞マーカーCD11cおよび抗原提示細胞マーカーMHCクラスII（MHC-II）の発現に基づく、フローサイトメトリーによる細胞のゲーティングの結果を図1に示す。図中、「4TF」は、PU.1、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファの4転写因子を導入した細胞を、「mock」は導入処理を行っていない細胞を示す。4転写因子を導入した細胞から、血球マーカーCD45、ミエロイド系細胞マーカーCD11b、樹状細胞マーカー

—CD11cおよび抗原提示細胞マーカーMHCクラスIIを発現する樹状細胞様細胞が得られたことが確認された。

[0051] cDC2特異的マーカーおよびその他の単球系細胞マーカーの発現について、CD45+CD11b+MHC-II+CD11c+細胞とCD45-細胞とを比較した結果を図2~4に示す。CD45+CD11b+MHC-II+CD11c+細胞は、cDC2特異的マーカーであるCLEC10A、SIRP α およびCCR7を発現していることが判明した(図2)。また、CD45+CD11b+MHC-II+CD11c+細胞は、樹状細胞に発現するC型レクチンであるSIGNR1およびDC-SIGNを発現していた(図3)。その一方で、CD45+CD11b+MHC-II+CD11c+細胞は、マクロファージ特異的マーカー(CD115およびF4/80)や単球特異的マーカーLy6Cを発現している点で、cDC2とは異なっていた。これらの結果から、PU.1、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファの4転写因子を導入して得られた細胞はcDC2様細胞であると結論し、「induced cDC2 (icDC2)」と名付けた。

[0052] 続いて、icDC2におけるcDC特異的転写因子Zbtb46とマクロファージ特異的チロシンキナーゼMerTKの発現をRT-qPCRにより評価した。以下の手順によりGM-CSF誘導骨髄由来樹状細胞(GM-DC)を調製し、陽性対照として用いた。マウス大腿骨から骨髄細胞を採取し、1匹分の骨髄細胞を24mLのGM-CSF培地(10ng/mL GM-CSF (Peprotech)、3.5 μ L 2-メルカプトエタノール(ナカライテスク)、10%FCSを含むRPMI1640培地)に懸濁し、1ウェルあたり1mLで24ウェルプレートに播種した。培養上清を2日ごとに新しい培地により半量交換した。培養開始から6日後に浮遊細胞を回収し、GM-DCとして用いた。

[0053] TRI reagent (Molecular Research Center) を用いて説明書にしたがって細胞からRNAを抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with g

DNA Remover (Toyobo) を用いて説明書にしたがってcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) およびLightCycler 96 (Roche) を用いてqPCRを行った。使用したプライマーを以下に示す。モック細胞における発現量を1として発現誘導の倍率変化を算出した。

[0054] 表2. qPCRに用いたプライマー

[表2]

プライマー名	配列 (5' → 3')	配列番号
Zbtb46_Fw	cagcagccgagactcaaatg	9
Zbtb46_Rv	gtaggcctcatcgatgtga	10
Mertk_Fw	atggaaaggaattgctcggg	11
Mertk_Rv	cacactggctatgctgaaca	12

[0055] 結果を図5および6に示す。i c D C 2においてZ b t b 4 6遺伝子およびM e r t k遺伝子の発現が亢進していた。以上の結果から、i c D C 2は、c D C 2の特徴を有しつつc D C 2とは異なる特徴も有する新規なc D C 2様細胞であることが示された。

[0056] <2. 4転写因子によるMEFのcDC2様細胞への分化転換時系列>

SV40T抗原を発現するプラスミドpBSSVD2005 (Addgene, plasmid #21826) をトランスフェクションして不死化したMEFに、上記1と同様の手順により4転写因子を導入し、マーカーの発現を観測した。CD45+CD11b+MHC-II+CD11c+細胞画分の割合に基づいて分化転換の経時変化を分析した。

[0057] 結果を図7に示す。4転写因子の導入から3日後頃から分化転換が開始され、7日後にピークを迎え、その後は減少することが確認された。

[0058] <3. 不死化MEF由来i c D C 2の増殖能>

引き続き、上記2の細胞を7日ごとに継代培養し、CD45+CD11b+MHC-II+CD11c+細胞数を計測した。結果を図8に示す。培養

日数を重ねるにしたがってCD45+CD11b+MHC-11+CD11c+細胞数が増加しており、この細胞自体が増殖していることが判明した。この結果は、不死化された細胞由来のi c DC 2は増殖維持することができることを示しており、創薬への応用の可能性を示すものである。

[0059] <4. MEFのcDC2様細胞への分化転換に必要な転写因子の組み合わせ>

MEFのcDC2様細胞への分化転換に、PU.1、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファのいずれが必要であるかを検討した。PU.1を欠く場合には、他のどの転写因子の組み合わせによってもCD45陽性細胞が誘導されなかったため（データは省略）、PU.1と、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファから選択される1以上の転写因子とを組み合わせ、MEFに導入し、上記1と同様の手順によりi c DC 2への分化転換効率を評価した。

[0060] 結果を図9に示す。図中、「P」はPU.1のみ、「PC」はPU.1およびC/EBPアルファ、「PK」はPU.1およびKLF4、「PI」はPU.1およびIRF4、「PCK」はPU.1、C/EBPアルファおよびKLF4、「PCI」はPU.1、C/EBPアルファおよびIRF4、「PIK」はPU.1、IRF4およびKLF4、「PICK」はPU.1、IRF4、C/EBPアルファおよびKLF4の組み合わせの導入を示す。IRF4を欠く場合には、i c DC 2への分化転換がほとんど誘導されなかった。KLF4またはC/EBPアルファを欠く場合には、i c DC 2への分化転換は誘導されたものの、4転写因子すべてを導入した場合と比較して、その効率は著しく低下した。この結果から、MEFのcDC2様細胞への分化転換には、PU.1、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファの4転写因子すべてを組み合わせる必要があることが示された。

[0061] 次いで、C/EBPの他のファミリー：C/EBPベータ（RefSeq ID：NM_009883、配列番号13）、C/EBPデルタ（Ref

Seq ID: NM_007679、配列番号14) およびC/EBPイプシロン (RefSeq ID: NM_207131、配列番号15) による分化転換効率を比較した。上記1と同様の手順により、各C/EBPファミリーを発現するレトロウイルスベクターを調製し、PU. 1、KLF4およびIRF4と組み合わせてMEFに導入し、分化転換効率を評価した。その結果、C/EBPベータはC/EBPアルファと同等の分化転換効率を示したが、C/EBPデルタまたはC/EBPイプシロンでは分化転換効率が低下した(データは省略)。これらの結果から、MEFのcDC2様細胞への分化転換には、PU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファまたはC/EBPベータの組み合わせが最適であることが結論づけられた。

[0062] <5. 4転写因子のレンチウイルスベクターからのポリシストロニック発現によるMEFのcDC2様細胞への分化転換>

PU. 1、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファの4転写因子を2Aペプチドにより接続した融合遺伝子をFUW-tetO-MCSベクター(Hockemeyer et al., Cell Stem Cell, 2008)にサブクローニングし、テトラサイクリン応答因子(TRE)プロモーター制御下に4転写因子をポリシストロニックに発現するベクター構築物を作製した(図10)。作製したベクターを、pMD2.G(Addgene, plasmid #12259)およびpsPAX2(Addgene, plasmid #12260)とともにHEK293細胞に導入し、レンチウイルス粒子を作製した。上記1と同様の手順によりウイルス濃縮液を調製し、-80°Cで保存した。また、上記融合遺伝子に代えて、PU. 1、KLF4、IRF4またはC/EBPアルファの各遺伝子を用いて、同様の手順により、各転写因子についてのレンチウイルス粒子を作製した。MEFを24ウェルプレートに播種し(1ウェルあたり 4×10^4 細胞)、翌日に1ウェルあたり100 μ Lのウイルス懸濁液を加えた。翌日、1 μ g/mLのドキシサイクリン(シグマアルドリッチ)を加え、1日おきに培地を交換した。13日後、上記1と同様の手順により、マーカーの発現を観測し

た。

[0063] 4 転写因子を個別のベクターにより導入した結果を図 1 1 に、ポリシストロニックベクターにより導入した結果を図 1 2 に示す。いずれの場合にも、ドキシサイクリンの添加 (Dox+) により i c D C 2 が得られたことが確認された。

[0064] <6. 4 転写因子により c D C 2 様細胞へと分化転換される出発細胞の検討 >

4 転写因子の導入により c D C 2 様細胞へと分化転換され得る出発細胞の種類を調べるために、M E F に代えて、マウスメラノーマ細胞株 B 1 6 F 1 (理研)、マウス肺がん細胞株 3 L L (医薬基盤研)、マウス乳がん細胞株 e 0 7 7 1 (C H 3 B i o S y s t e m s)、マウスリンパ腫細胞株 E L 4 (理研)、成体マウス尾端線維芽細胞 (T T F) およびマウス脂肪由来間葉系幹細胞 (A D - M S C) を用いて、上記 1 と同様に解析した。T T F は、常法 (T a k a h a s h i e t a l., N a t. P r o t o c o l, 2 0 0 7) により、C 5 7 B L / 6 マウスから調製した。A D - M S C は、C 5 7 B L / 6 マウスから単離された白色脂肪組織をコラゲナーゼ溶液 (1 0 0 U / m L コラゲナーゼ (W a k o) および 5 % F C S を含む R P M I 1 6 4 0 培地) により消化し、その中から接着細胞を取得することにより調製した。いずれの細胞も、1 0 % F C S 含有 D M E M 中で培養した。

[0065] その結果、T T F および A D - M S C は、c D C 2 様細胞へと分化転換された一方、B 1 6 F 1、3 L L、e 0 7 7 1 および E L 4 は、c D C 2 様細胞へと分化転換されなかった (データは省略)。この結果から、4 転写因子の導入による c D C 2 様細胞の生成には線維芽細胞および線維芽細胞様細胞を使用し得ることが示された。

[0066] <7. ヒト転写因子によるヒト線維芽細胞の c D C 2 様細胞への分化転換 >

マウス P U. 1 遺伝子のコード配列 (配列番号 1)、K L F 4 遺伝子のコード配列 (配列番号 2)、I R F 4 遺伝子のコード配列 (配列番号 3) および C / E B P アルファ遺伝子のコード配列 (配列番号 4) に代えて、ヒト P

U. 1 遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_003120、配列番号5)、KLF4 遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_004235、配列番号6)、IRF4 遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_002460、配列番号7) およびC/EBPアルファ遺伝子のコード配列 (RefSeq ID: NM_004364、配列番号8) を用いて、上記1と同様の手順によりレトロウイルスを調製した。MEFに代えてヒト線維芽細胞株MRC-5 (ATCC) を用いて、感染から13日後に、上記1と同様の手順によりマーカーの発現を観測した。

[0067] 結果を図13~15に示す。4転写因子の導入により、CD45+CD11b+細胞が得られた (図13、MRC-5+4TF)。また、CD45+CD11b+細胞では、CD45-CD11b-細胞と比べて、HLA-DRおよびCD11cの発現が亢進していた (図14、15)。同様に、MRC-5に代えてヒト不死化AD-MSC株SCRC-4000 (ATCC) を用いた場合にも、CD45+CD11b+HLA-DR+CD11c+細胞が観測された (データは省略)。これらの結果から、ヒトPU.1、KLF4、IRF4およびC/EBPアルファの4転写因子により、ヒト線維芽細胞または線維芽細胞様細胞からiDC2を生成できることが示された。

[0068] 一方、MRC-5に代えて、ヒト肺上皮細胞株A549 (理研)、ヒト膵がん細胞株Capan-1 (ATCC)、ヒト子宮頸部がん細胞株HeLa (ATCC) を用いて同様の解析を行ったところ、CD45+CD11b+HLA-DR+CD11c+細胞は観測されなかった (データは省略)。

[0069] <8. 4転写因子により分化転換されたcDC2様細胞による獲得免疫応答の誘導>

上記1の手順によりMEFに4転写因子を導入し、得られたcDC2様細胞の抗原提示能を調べた。O-T-I-Iマウス (ニワトリオバルブミン323-339エピトープ特異的T細胞受容体トランスジェニックマウス) から脾臓を回収し、コラゲナーゼバッファー中で消化後、スライドグラスですりつぶして脾細胞を回収した。CD4+ T Cell Isolation

Kit, mouse (Miltenyi Biotec Inc.) を用い、キットの説明書にしたがって脾細胞集団から CD4 陽性 T 細胞を単離した。4 転写因子を導入した MEF、AD-MS C、もしくは 3 T 3 法 (Todaro and Green, J. Cell Biol, 1962) により調製した不死化マウス胎児線維芽細胞 (以下、「3 T 3」と記載する) ; MEF (陰性対照) ; または GM-DC (陽性対照) (それぞれ 2×10^4 個) と、 2×10^4 個の CD4 陽性 T 細胞とを混合し、または何も混合せず (mock、陰性対照)、丸底 96 ウェルプレートに播種した。CD4 陽性 T 細胞に対しては $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のニワトリオバルブミン 323-339 ペプチドを添加し、または添加せずに、7 日間培養した。FACS Verse (BD Biosciences) により、全細胞数、CD3 イプシロン陽性細胞数、および CD69 の発現を観測した。

[0070] 結果を図 16 および 17 に示す。4 転写因子を導入した MEF (MEF + 4 TF) と T 細胞とを混合した細胞集団、4 転写因子を導入した MSC (MSC + 4 TF) と T 細胞とを混合した細胞集団、および、4 転写因子を導入した 3 T 3 (3 T 3 + 4 TF) と T 細胞とを混合した細胞集団では、CD3 イプシロン陽性細胞数が増加しており、T 細胞が増加していることが確認された (図 16)。また、4 転写因子を導入した MEF (MEF + 4 TF) と T 細胞とを混合した細胞集団において、活性化 T 細胞マーカー CD69 の発現が増加したことも確認された (図 17)。この結果から、4 転写因子により MEF から分化転換された cDC2 様細胞が抗原提示能を有するものであることが示された。

[0071] <9. 4 転写因子により分化転換された cDC2 様細胞によるがんマウスモデルにおける抗腫瘍免疫応答の誘導>

4 転写因子により分化転換された cDC2 様細胞をがん抗原によりパルスし、DC ワクチンとして使用することができるかどうかを、がんマウスモデルを用いて評価するための手順を以下に示す。

[0072] (9-1) 担がんモデルマウスの作製

B16F1メラノーマ細胞（ 1×10^6 個）をC57BL/6マウスの皮下に移植した。1週間後に腫瘍サイズを計測し、当該マウスを担がんモデルとして使用した。

[0073] (9-2) パルス cDC2 様細胞の調製および投与

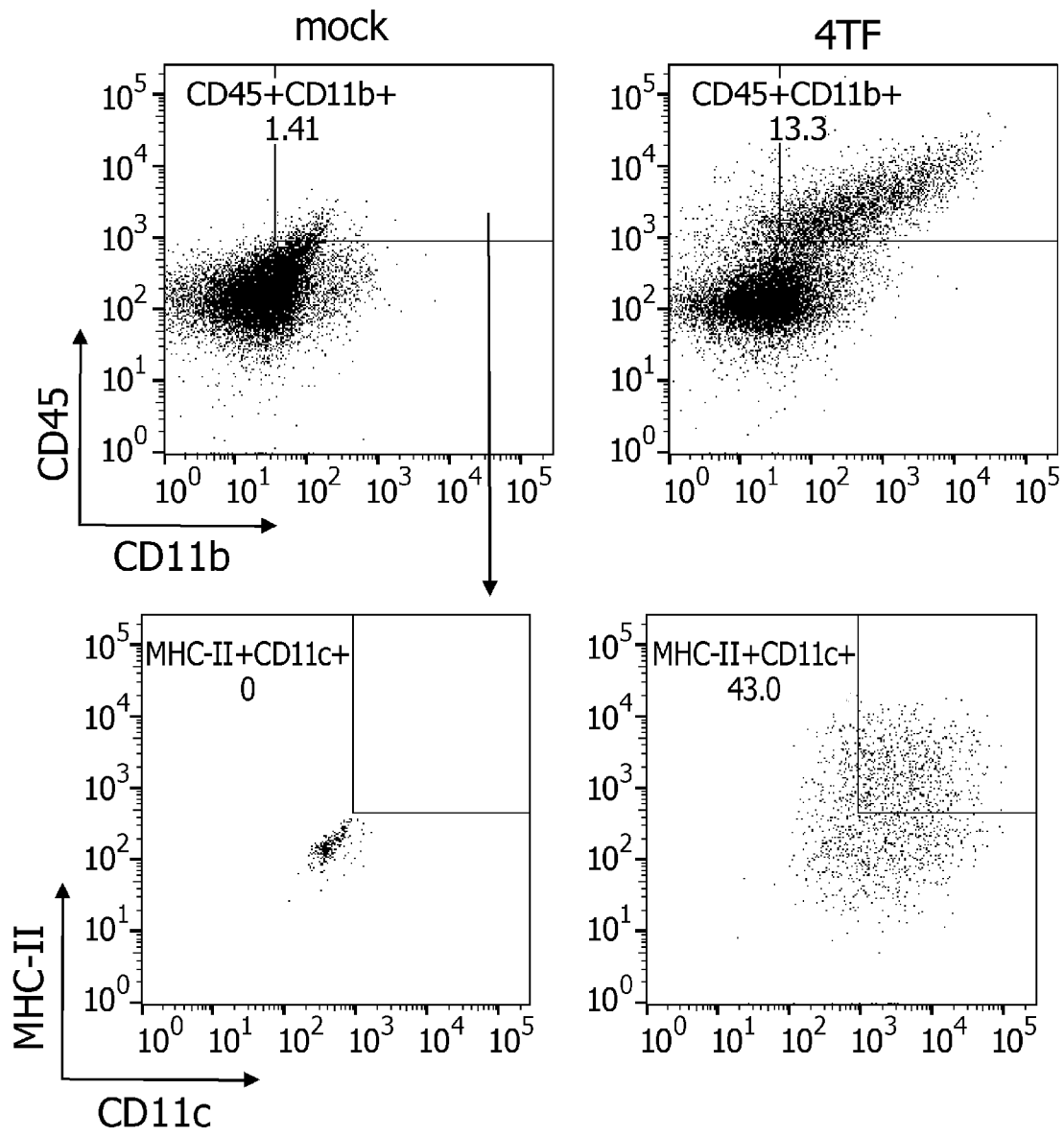
上記1と同様の手順にしたがって4転写因子を導入することにより、C57BL/6 CD45.1マウス由来の線維芽細胞からcDC2様細胞を誘導した。cDC2様細胞に対してB16F1メラノーマ細胞ライセートを負荷し、16時間培養した。その後、cDC2様細胞を、上記担がんモデルマウスに静脈内投与し、1週間ごとに腫瘍サイズを計測した。

[0074] 結果を図18に示す。図中、「days」は、B16F1メラノーマ細胞の皮下移植からの日数を示す。4転写因子を導入したMEF（MEF+4TF）を投与した群および何も投与していない群（mock、陰性対照）における腫瘍サイズを計測し比較したところ、皮下移植後21日（すなわち、MEF+4TF投与後14日）の時点で有意差が見られた（ $p < 0.05$ 、Studentのt検定）。この結果から、4転写因子によりMEFから分化転換されたcDC2様細胞が、がん縮小作用を有するものであることが示された。

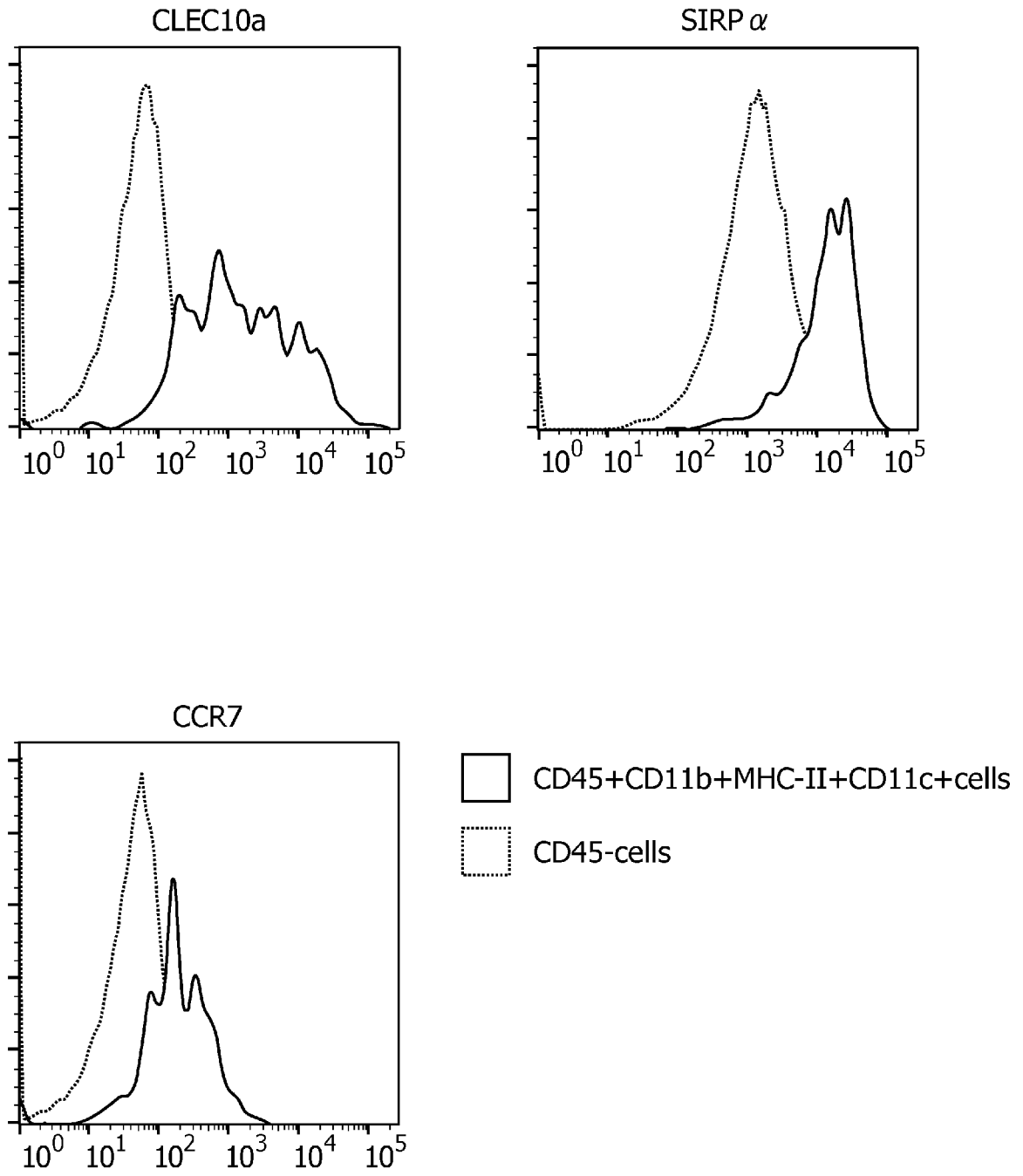
請求の範囲

- [請求項1] 線維芽細胞または線維芽細胞様細胞から従来型2型樹状細胞（cDC2）様細胞を生成するための方法であって、PU.1をコードする核酸、KLF4をコードする核酸、IRF4をコードする核酸およびC/EBPをコードする核酸を前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞に導入するステップを含む方法。
- [請求項2] 前記C/EBPが、C/EBPアルファまたはC/EBPベータである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞が、がん関連線維芽細胞である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記線維芽細胞または線維芽細胞様細胞が、間葉系幹細胞である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の方法により調製されたcDC2様細胞を含んでなる、対象におけるがんを予防または治療するための医薬組成物。
- [請求項6] 前記cDC2様細胞ががん抗原を負荷されている、請求項5に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 前記cDC2様細胞が前記対象に対して自家性である、請求項5または6に記載の医薬組成物。
- [請求項8] 前記cDC2様細胞が不死化されている、請求項5～7のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項9] PU.1をコードする核酸、KLF4をコードする核酸、IRF4をコードする核酸およびC/EBPをコードする核酸を含んでなる、線維芽細胞または線維芽細胞様細胞を従来型2型樹状細胞様細胞へと分化転換するための組成物。
- [請求項10] 前記C/EBPが、C/EBPアルファまたはC/EBPベータである、請求項9に記載の組成物。

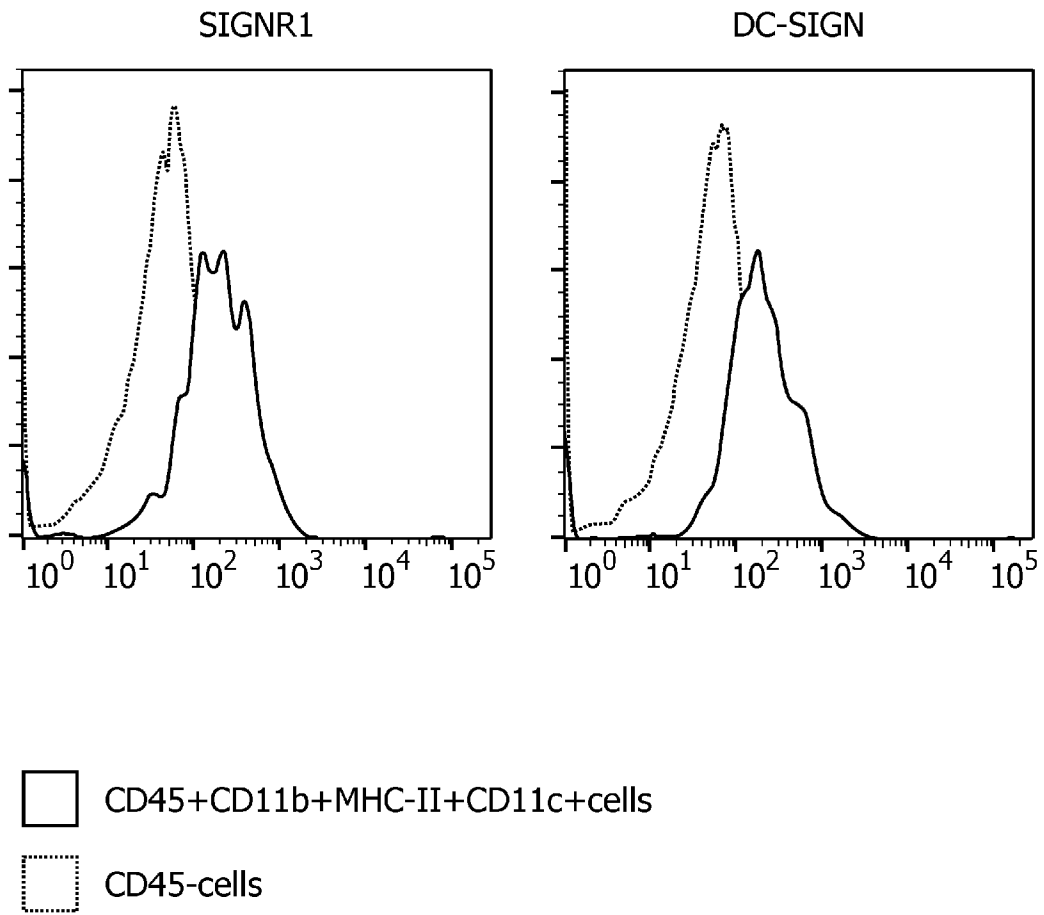
[図1]



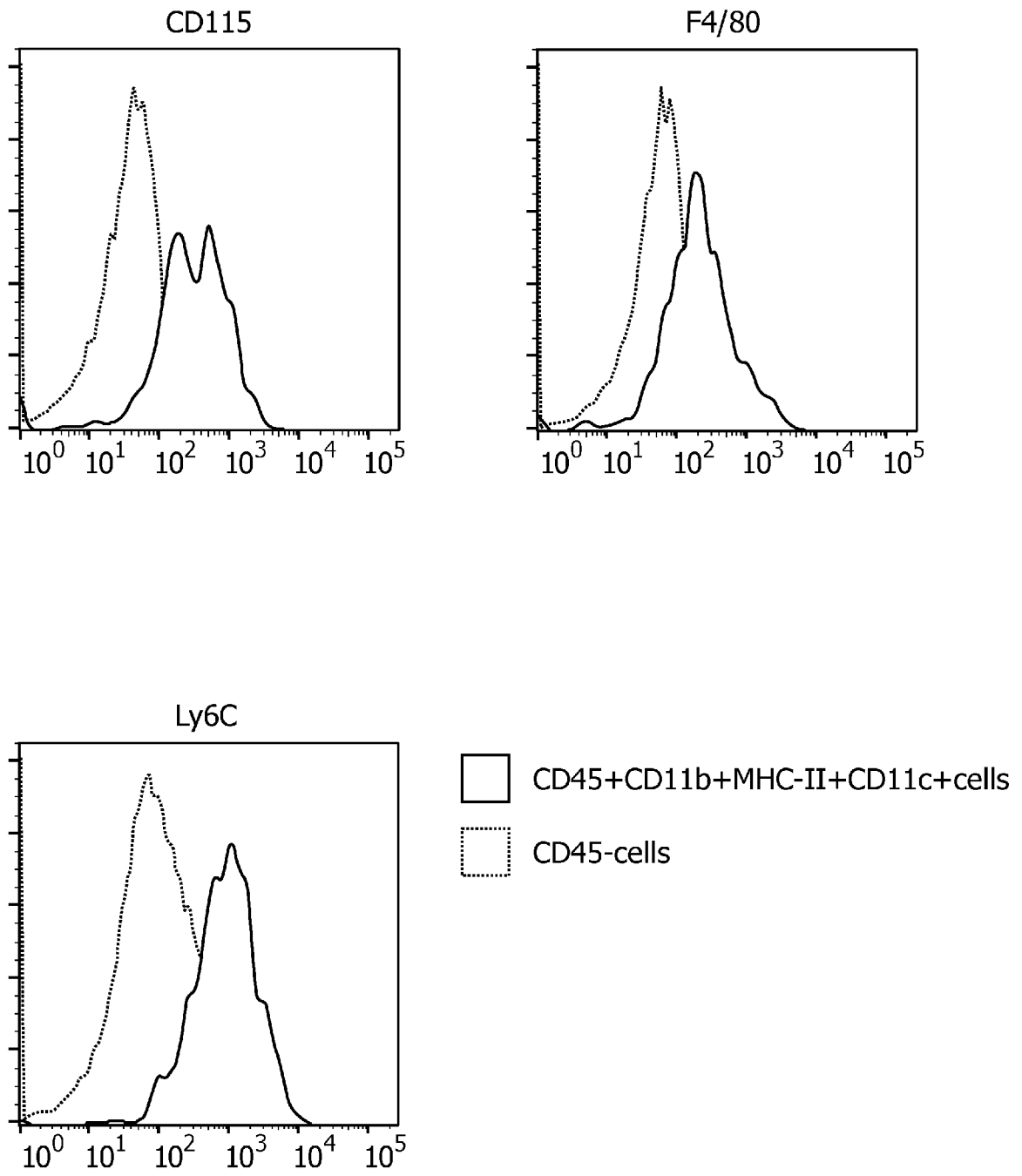
[図2]



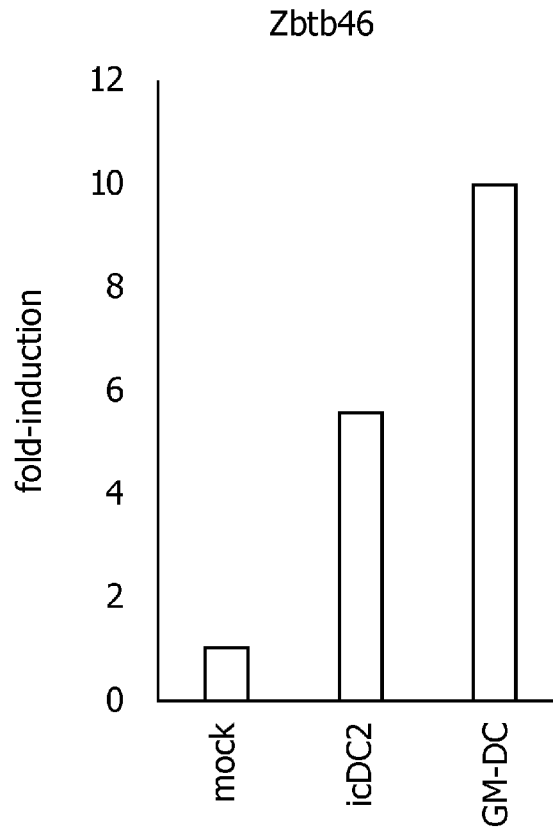
[図3]



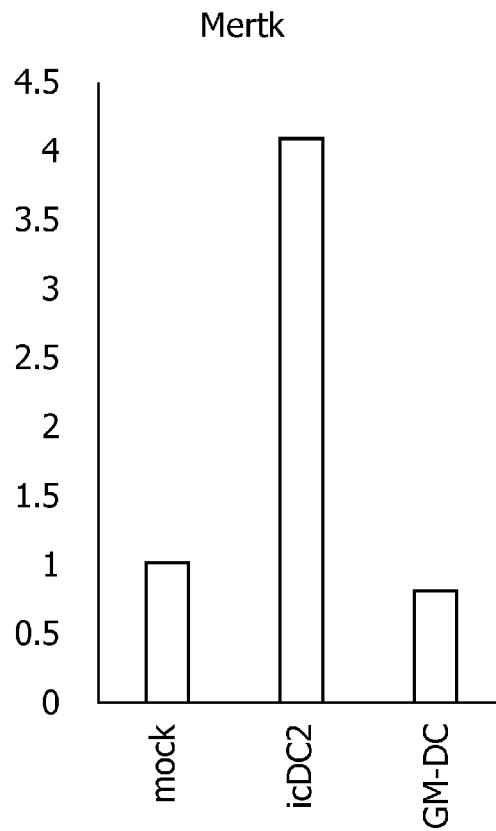
[図4]



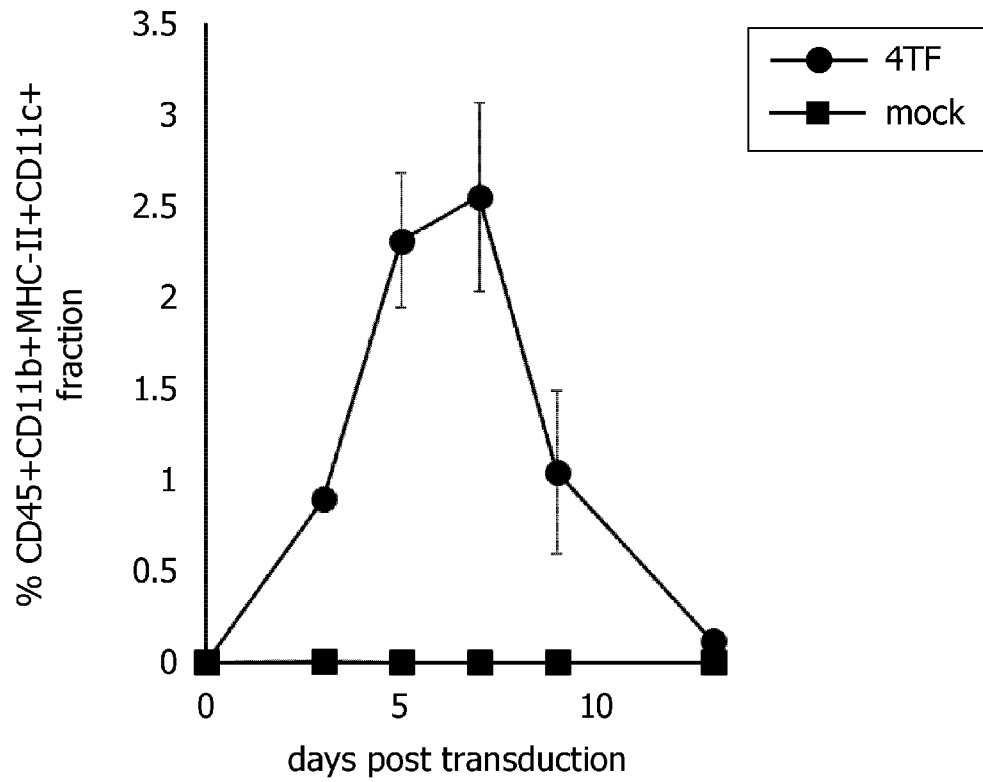
[圖5]



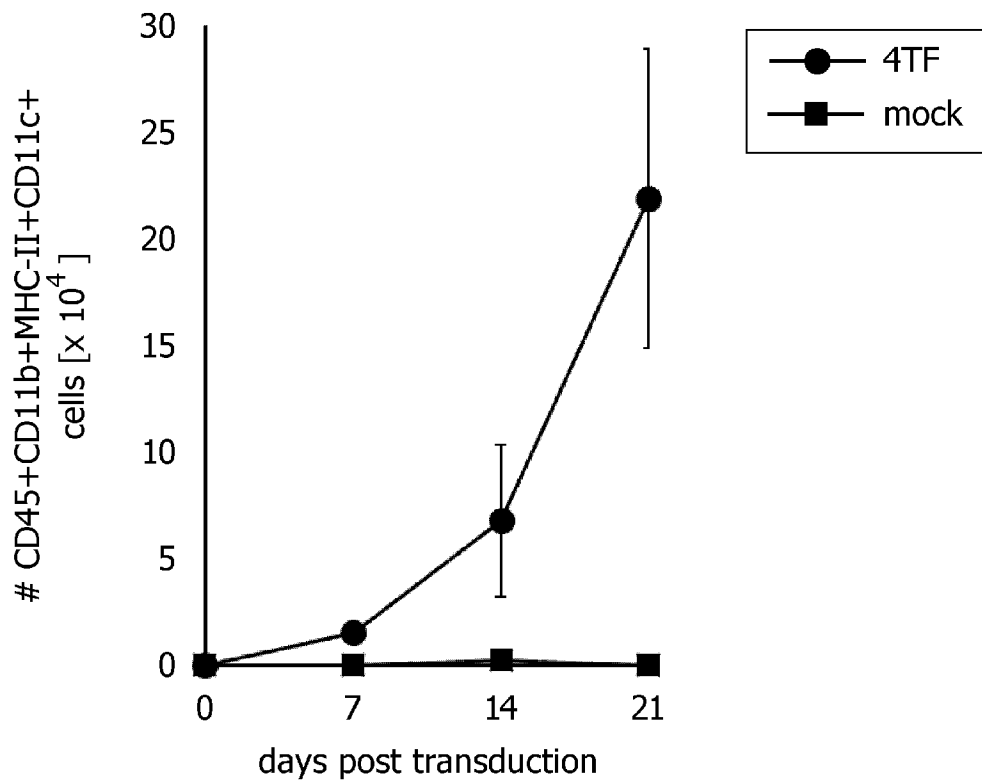
[圖6]



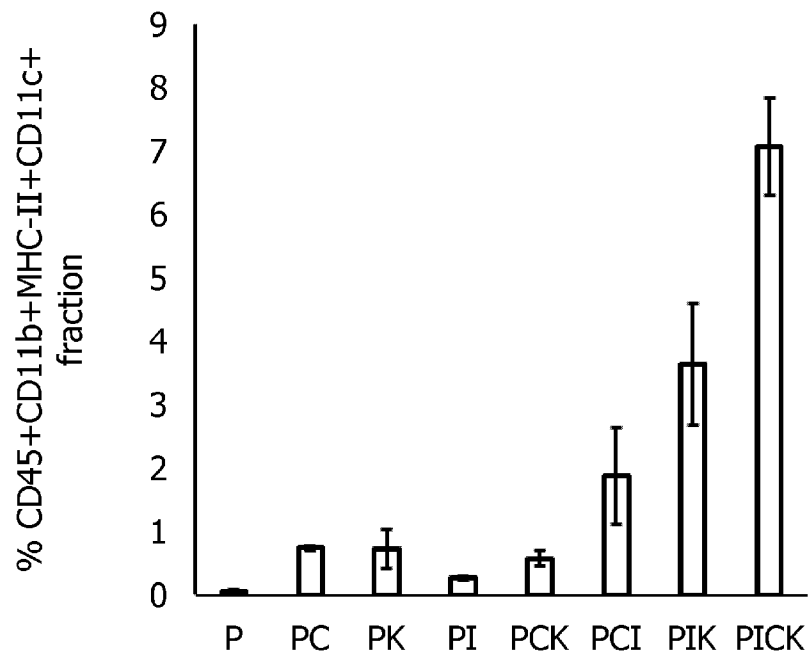
[図7]



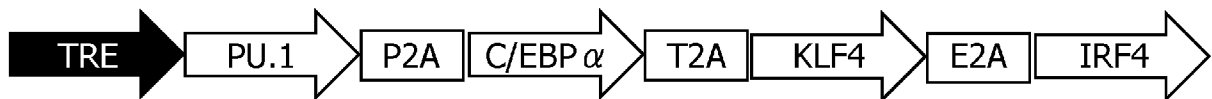
[図8]



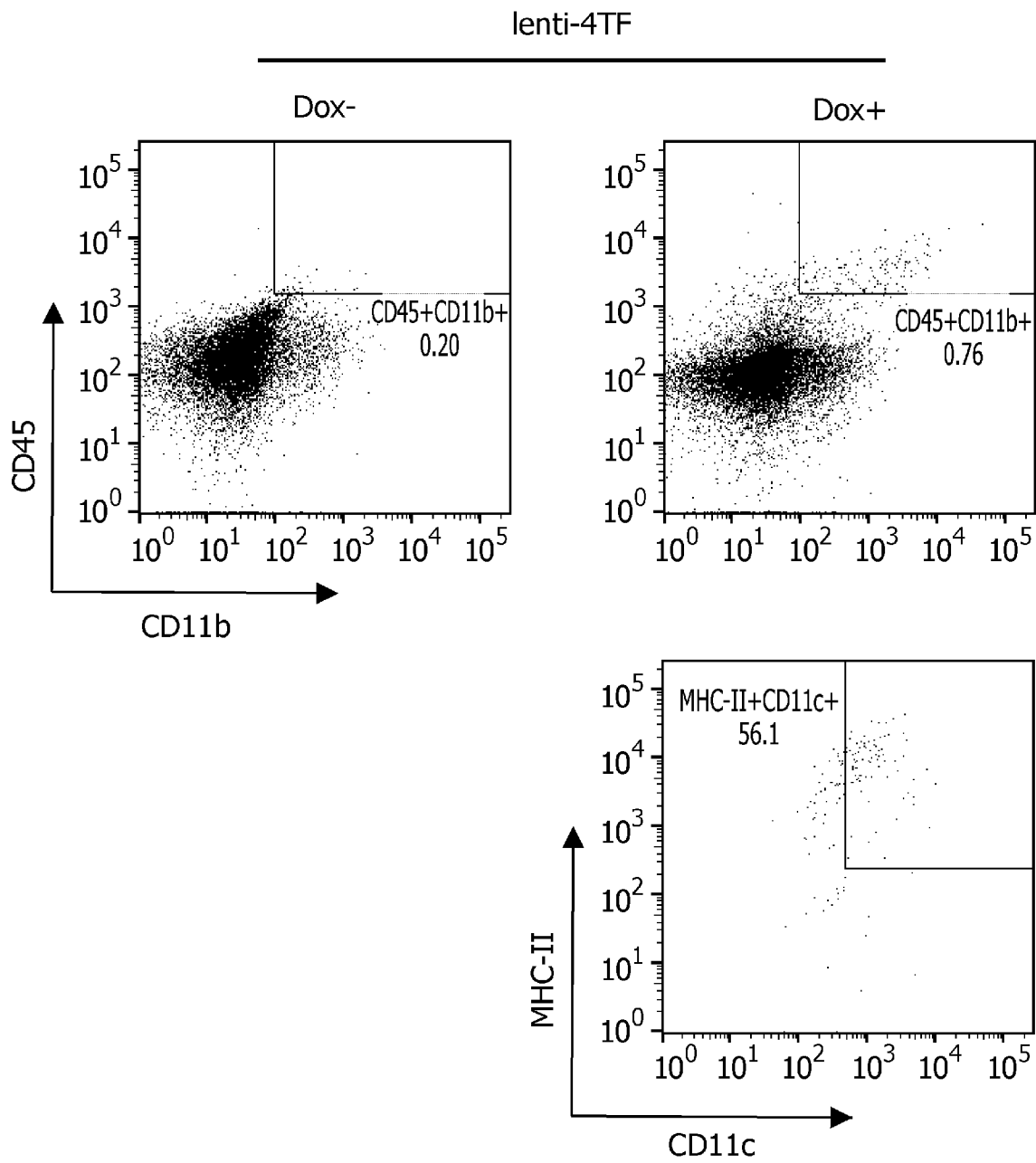
[図9]



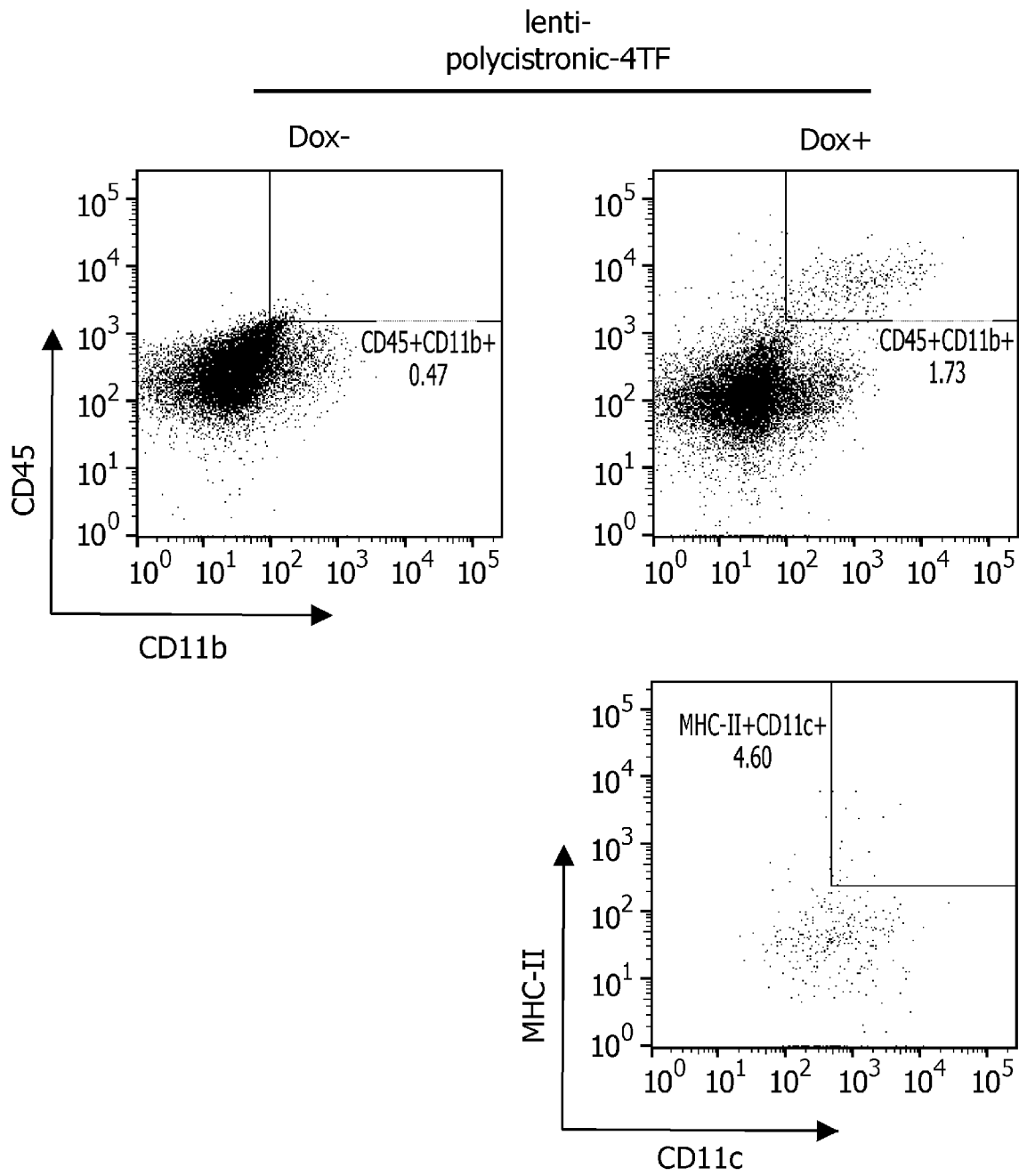
[図10]



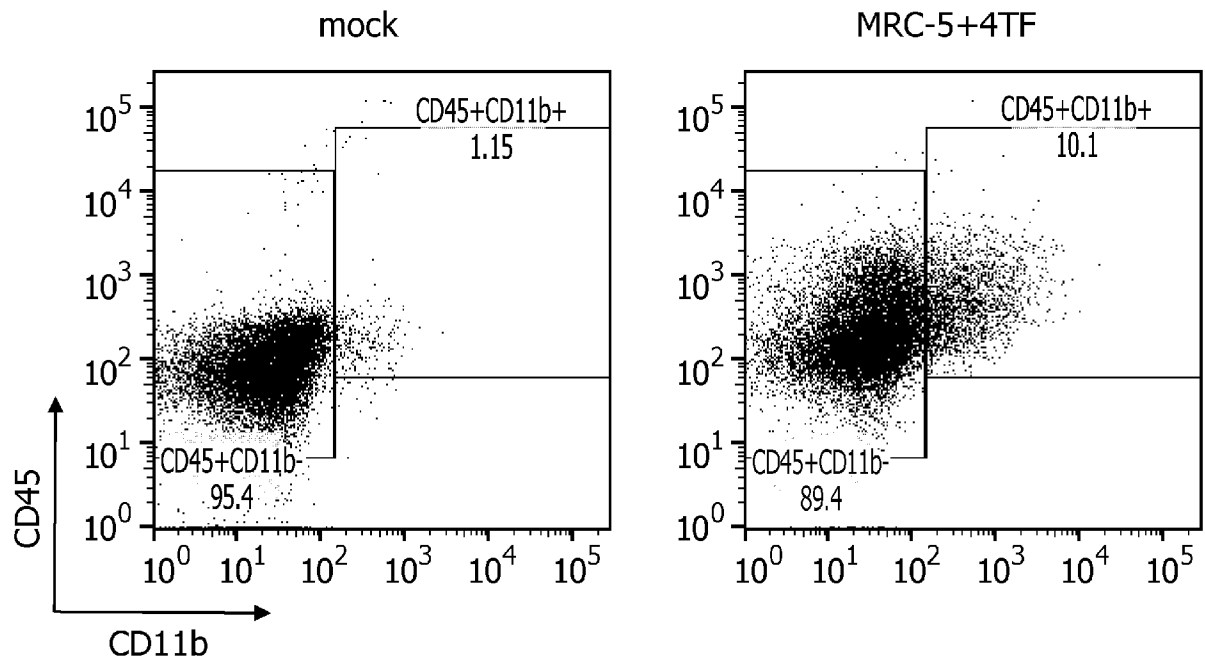
[図11]



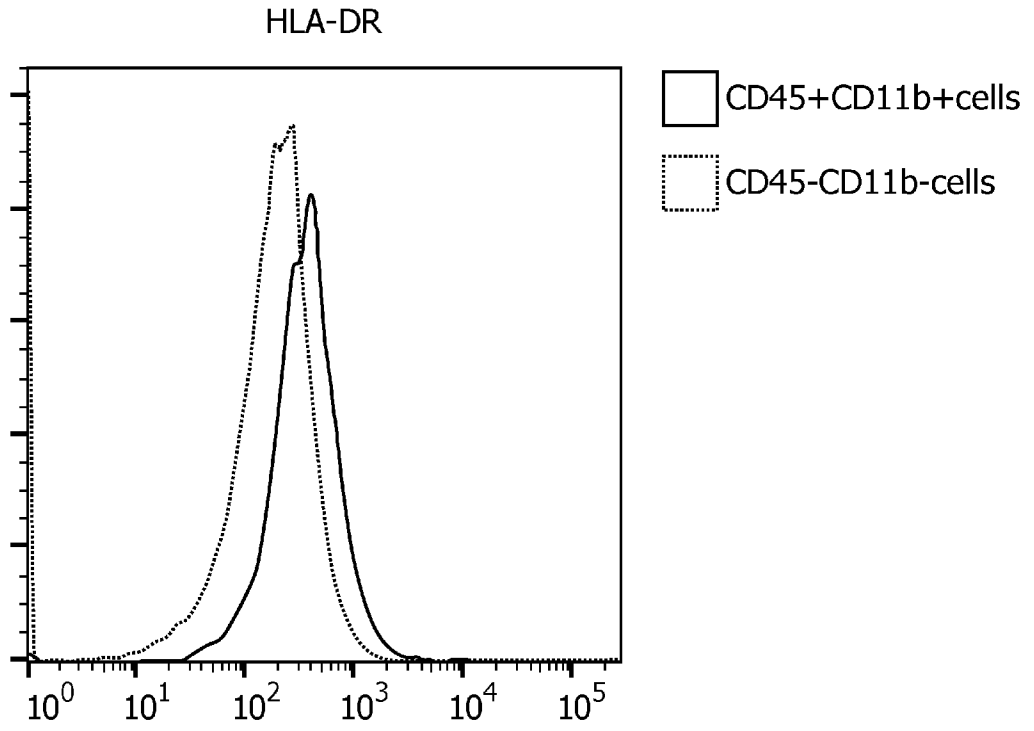
[図12]



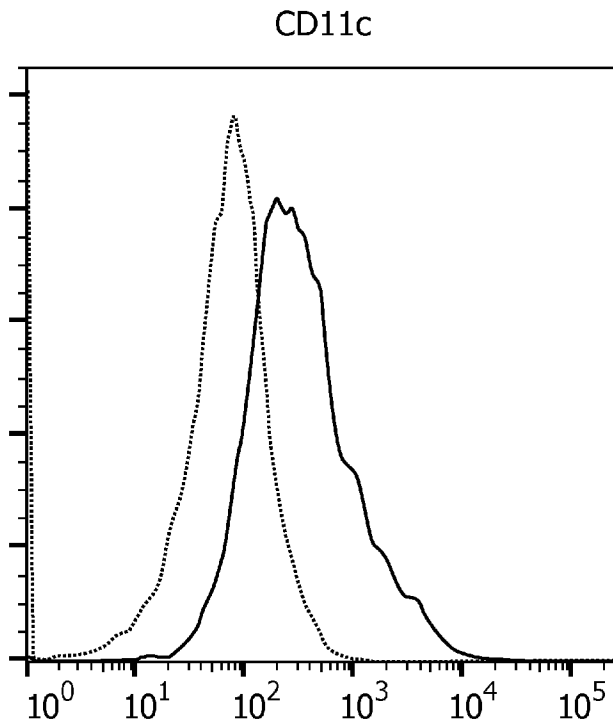
[圖13]



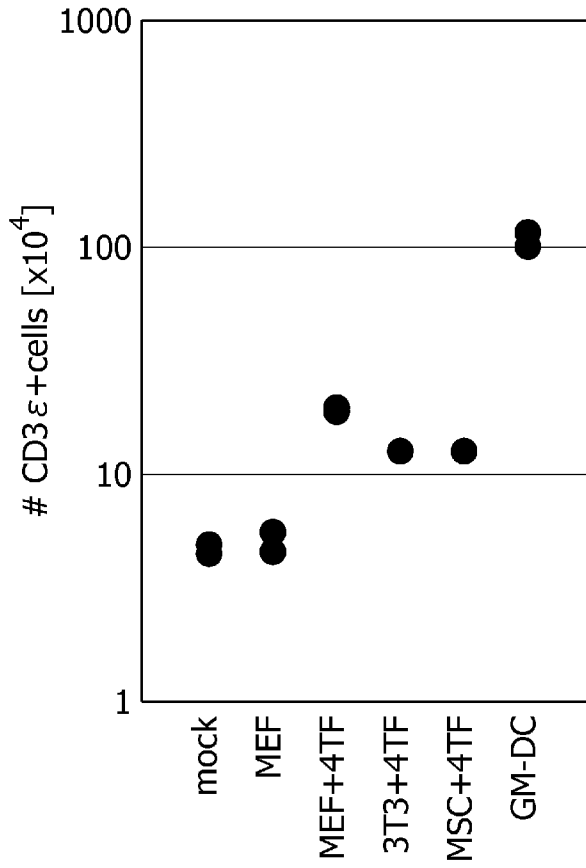
[圖14]



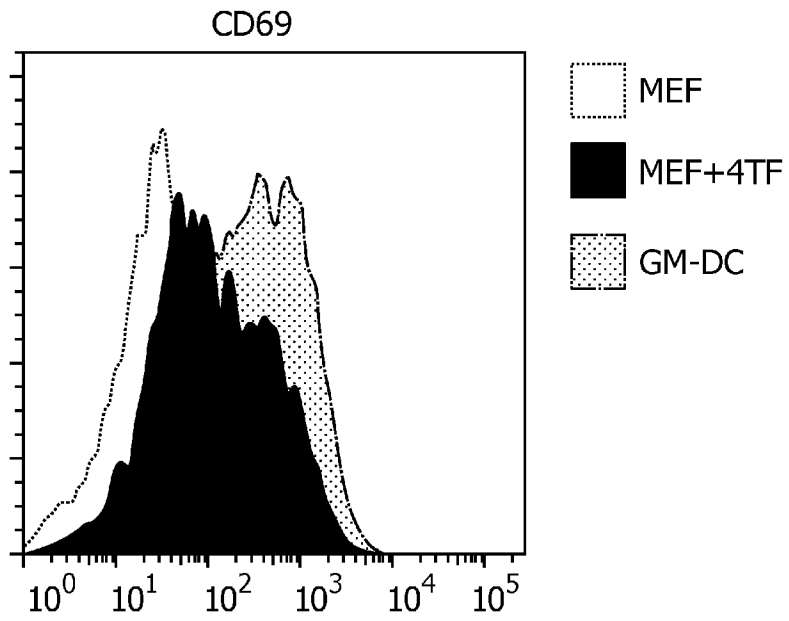
[圖15]



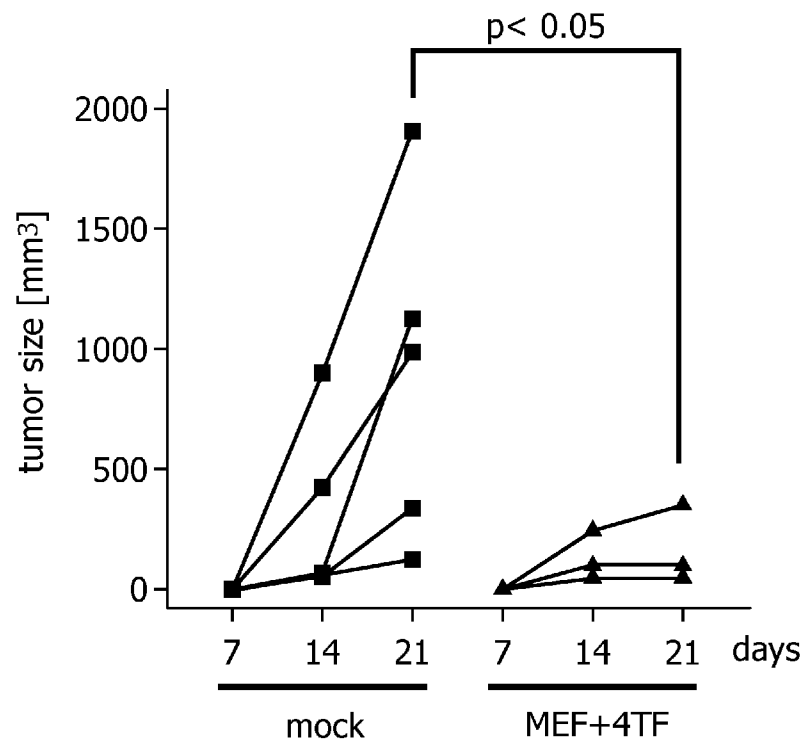
[圖16]



[圖17]



[圖18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/009757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/0784</i> (2010.01)i; <i>A61K 35/15</i> (2015.01)i; <i>A61K 39/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 35/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/07</i> (2010.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)i FI: C12N5/0784 ZNA; A61K35/15; A61K39/00 H; A61P35/00; C12N5/07; C12N15/12		
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) C12N5/0784; A61K35/15; A61K39/00; A61P35/00; C12N5/07; C12N15/12		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/105234 A1 (ASGARD THERAPEUTICS AB) 03 June 2021 (2021-06-03) in particular, claims, Mode for carrying out the invention	5-8
Y	in particular, claims, Mode for carrying out the invention	6-8
A	in particular, claims, Mode for carrying out the invention	1-4, 9, 10
X	VAN DER BORGHT K. et al. Myocarditis Elicits Dendritic Cell and Monocyte Infiltration in the Heart and Self-Antigen Presentation by Conventional Type 2 Dendritic Cells. <i>Frontiers in Immunology</i> , 2018, vol. 9, no. 2714, pp. 1-14 in particular, abstract, fig. 1	5
Y	in particular, abstract, fig. 1	6-8
A	in particular, abstract, fig. 1	1-4, 9, 10
A	WO 2021/133775 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 01 July 2021 (2021-07-01) entire text	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "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 27 April 2023		Date of mailing of the international search report 30 May 2023
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/009757

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/069672 A1 (ASGARD THERAPEUTICS AB) 15 April 2021 (2021-04-15) entire text	1-10
A	JP 2020-513191 A (ASGARD THERAPEUTICS AB) 07 May 2020 (2020-05-07) entire text	1-10

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:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/009757

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2021/105234	A1	03 June 2021	EP 4065697 A1 in particular, claims, Mode for carrying out the invention	
WO	2021/133775	A1	01 July 2021	EP 4081634 A1 entire text	
WO	2021/069672	A1	15 April 2021	EP 4041869 A1 entire text	
JP	2020-513191	A	07 May 2020	US 2020/0017832 A1 entire text	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/0784(2010.01)i; A61K 35/15(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 5/07(2010.01)i; C12N 15/12(2006.01)i FI: C12N5/0784 ZNA; A61K35/15; A61K39/00 H; A61P35/00; C12N5/07; C12N15/12</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）） C12N5/0784; A61K35/15; A61K39/00; A61P35/00; C12N5/07; C12N15/12</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 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023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 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023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 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年									
<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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
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	WO 2021/105234 A1 (ASGARD THERAPEUTICS AB) 03.06.2021 (2021 - 06 - 03) 特に、特許請求の範囲、発明を実施するための形態	5-8								
Y	特に、特許請求の範囲、発明を実施するための形態	6-8								
A	特に、特許請求の範囲、発明を実施するための形態	1-4, 9, 10								
X	VAN DER BORGHT K. et al., Myocarditis Elicits Dendritic Cell and Monocyte Infiltration in the Heart and Self-Antigen Presentation by Conventional Type 2 Dendritic Cells, Frontiers in Immunology, 2018, Vol.9, No.2714, pp.1-14 特に、要約、図1	5								
Y	特に、要約、図1	6-8								
A	特に、要約、図1	1-4, 9, 10								
A	WO 2021/133775 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INCORPORATED) 01.07.2021 (2021 - 07 - 01) 全文	1-10								
A	WO 2021/069672 A1 (ASGARD THERAPEUTICS AB) 15.04.2021 (2021 - 04 - 15) 全文	1-10								
<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>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な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 “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</p>										
国際調査を完了した日	27.04.2023	国際調査報告の発送日 30.05.2023								
名称及びあて先 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	権限のある職員（特許庁審査官） 伊達 利奈 4N 3960 電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

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	JP 2020-513191 A (アスガード セラピューティクス エービー) 07.05.2020 (2020 - 05 - 07) 全文	1-10
.....		

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:
- 上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

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/JP2023/009757

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2021/105234	A1	03.06.2021	EP	4065697	A1	
				特に、特許請求の範囲、発明を実施するための形態			
WO	2021/133775	A1	01.07.2021	EP	4081634	A1	
				全文			
WO	2021/069672	A1	15.04.2021	EP	4041869	A1	
				全文			
JP	2020-513191	A	07.05.2020	US	2020/0017832	A1	
				全文			