

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 2 月 15 日 (15.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/018320 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 31/7032 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/316196
- (22) 国際出願日: 2006 年 8 月 11 日 (11.08.2006)
- (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2005-233250 2005 年 8 月 11 日 (11.08.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 学校法人福岡大学 (FUKUOKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈 8 丁目 1 9 番 1 号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 香城 諭 (KOJO, Satoshi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7-2 2 独立行政法人理化学研究所横浜研究所内 Kanagawa (JP). 谷口 克 (TANIGUCHI, Masaru) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7-2 2 独立行政法人理化学研究所横浜研究所内 Kanagawa (JP). 安波 洋一 (YASUNAMI, Yohichi) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈 8 丁目 1 9 番 1 号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGENT FOR PREVENTION OF GRAFT LOSS, AND SCREENING METHOD FOR THE AGENT

(54) 発明の名称: 移植片喪失の予防剤、及びそのスクリーニング方法

(57) Abstract: Disclosed is an agent for prevention of graft loss comprising an NKT cell ligand such as α -galactosylceramide. The agent can prevent the graft loss in clinical islet transplantation or the like, and therefore can contribute to the improvement in transplantation efficiency. Also disclosed is a method for screening a compound for use in the prevention/treatment of graft loss, which comprises selecting a compound capable of inhibiting the activation of an NKT cell, the production of IFN- γ in a CD11b⁺ cell or the like. By using the method, it becomes possible to produce an agent for preventing/treating premature graft loss by a novel mechanism.

(57) 要約: 本発明は、 α -ガラクトシルセラミド等の NKT 細胞リガンドを含有してなる、移植片喪失の予防剤を提供する。本発明の予防剤を用いれば、臨床における膵島移植等における移植片喪失を予防することが可能であるので、移植効率の向上に寄与し得る。また、NKT 細胞の活性化、CD11b⁺ 細胞の IFN- γ 産生等を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法が提供される。本発明のスクリーニング方法を用いれば、新たなメカニズムによる早期移植片喪失の予防・治療薬を創出することができる。



WO 2007/018320 A1

明細書

移植片喪失の予防剤、及びそのスクリーニング方法

技術分野

- 5 本発明は、膵島移植時等における移植片喪失の予防剤に関する。更に、本発明は該移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法等に関する。

背景技術

膵臓の膵島移植は、インスリン依存性糖尿病 (i n s u l i n - d e p e n d
10 e n t d i a b e t e s m e l l i t u s : I D D M) の治療のための非常に有望なアプローチである。しかしながら、その手法は多くの理由、特に、移植された膵島の早期移植片拒絶のためのその低効率により、試験的なものに留まっている。I D D M の患者は、早期移植片喪失のために、単独のドナー膵臓からの膵島の移植後には、インスリン非依存性を達成することができない (Ricordi, C.,
15 et. al., 2004, Nat. Rev. Immunol., 4:259-268 / Shapiro, A. M., 2000, N. Engl. J. Med., 343:230-238)。早期膵島喪失は、移植された膵島量の 50% にまで起こると見積もられていて (Ryan, E. A., et. al., 2002, Diabetes, 51:2148-2157)、現在、2 - 3 ドナー膵臓からの繰り返しの移植が、単独の糖尿病のレシピエントの良好な処置のために必要とされる (Ricordi, C., et. al., 2004, Na
20 t. Rev. Immunol., 4:259-268 / Shapiro, A. M., 2000, N. Engl. J. Med., 343:230-238)。レシピエント肝臓内への移植に引き続き、膵島移植片は門脈の末梢中で塞栓 (e m b o l i) として互いにつかえて、対応する領域の虚血性変性を生じる。これが、膵島移植片に対して有害な炎症性サイトカインの放出を生じる自然免疫反応を引き起こし得る。インスリン分泌 β 細胞は、I F N - γ 、T N F -
25 α 及び I L - 1 β の様な炎症誘発性 (p r o - i n f l a m m a t o r y) のサイトカインへの暴露に対して、インビトロで影響を受けやすい (Rabinovitch, A., 1993., Diabetes Rev., 1: 215-240)。

しかしながら、早期移植片喪失の発症メカニズムは十分には理解されておらず、このメカニズムを解明し、それに基づく早期移植片喪失の有効な予防薬を開発し、脾臓移植の効率を上昇させることが切望されている。

ナチュラルキラーT細胞（NK T細胞）は、T細胞受容体（TCR）とNK受容体の2つの抗原レセプターを発現しているリンパ球の一つである。NK T細胞は、当該細胞上のT細胞受容体がCD1（例えばCD1d）分子上に提示された α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）やイソグロボトリヘキシシルセラミドなどの糖脂質を認識することを特徴とする（Science, 278, p.1626-1629, 1997/J. Exp. Med., 188, p.1521-1528, 1998/Science, 306, p.1786-1789, 2004）。通常のT細胞とは異なり、NK T細胞上のT細胞受容体のレパートリーは非常に限られている。例えばマウスNK T細胞（ $V\alpha 14$ NK T細胞という場合がある）上のT細胞受容体の α 鎖は、非多型性の $V\alpha 14$ 及び $J\alpha 281$ 遺伝子セグメントによりコードされており（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, p.8708-8712, 1986/Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, p.7518-7522, 1991/J. Exp. Med., 180, p.1097-1106, 1994）、 β 鎖の90%以上は $V\beta 8$ であり、他に $V\beta 7$ や $V\beta 2$ という限られたレパートリーが含まれ得る。また、ヒトNK T細胞上のT細胞受容体は、マウスの $V\alpha 14$ と相同性の高い非多型性の $V\alpha 24$ 、及び $V\beta 8$ 、2に近縁の $V\beta 11$ の組み合わせであることが知られている。

ナチュラルキラーT細胞（NK T細胞）は、自然及び獲得免疫系の橋渡しをするリンパ球の異なるサブセットに属し、急性反応において重要な役割を果たす。NK T細胞は、活性化後すぐに大量の $INF-\gamma$ を産生し、それが今度は自然免疫系におけるNK細胞及び他の細胞、並びに獲得免疫系におけるCD4 Th1細胞及びCD8細胞障害性T細胞を活性化する（Brigl, M., et. al., 2003, Nat. Immunol., 4: 1230-1237/Taniguchi, M., 2003, Ann. Rev. Immunol., 21: 483-513/Taniguchi, M., et al., 2003, Nat. Immunol., 4:1164-1165/Wilson, S. B., et. al., 2003, Nat. Rev. Immunol, 3: 211-222/Cui, J., et. al., 1997, Science, 278: 1623-1626）。即ち、 $V\alpha 14$ NK T細胞は、多様なバクテリア、

ウイルス、カビ、及び細胞内寄生虫に対する最前線防御として役割を果たしている (Taniguchi, M., 2003, Ann. Rev. Immunol., 21: 483-513/Wilson, S. B., et. al., 2003, Nat. Rev. Immunol, 3: 211-222)。

5 α -GalCer 処理によるNK T細胞の活性化により、IL-4等のTh2 サイトカイン産生が起こり、自己免疫性I型糖尿病の発症及び再発を防ぎ得ることが報告されている (Nature Medicine, vol.7, number 9, 1057-1062, 2001)。また、繰り返しの α -GalCer曝露により脾臓T細胞からのIFN- γ 分泌レベルが減少することが報告されている (Burdin, N., 1999, Eur. J. Immunol, 29: 2014-2025)。

10 一方、水酸化アルミニウム (アラム) により沈降させた抗原を免疫のために用いたときに、アラムにより誘導されたIL-4産生Gr-1⁺CD11b⁺細胞が液性応答におけるB細胞抗原プライミングに重要な役割を果たしていることが報告されている (Jordan, M. B., 2004, Science, 304: 1808-1810)。

15 しかし、移植片拒絶へのNK T細胞やGr-1⁺CD11b⁺細胞の寄与に関しては知られていない。

上記事情に鑑み、本発明は、新たなメカニズムに基づく移植片喪失の予防剤、及びそのスクリーニング方法を提供することを目的とする。

発明の開示

20 上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、本発明者らは、マウス膵島移植モデルにおいて、V α 14NK T細胞によって移植後に創生されるIFN- γ 産生Gr-1⁺CD11b⁺細胞が、膵臓膵島移植における早期移植片喪失の、必須の構成要素であり、且つ、主要な原因であることを立証した。V α 14NK T欠損 (J α 281^{-/-}) マウスは、IFN- γ 産生Gr-1⁺CD11b⁺細胞を創生せず
25 に、移植された膵島の早期移植片喪失を生じなかった。V α 14NK T細胞のための特異的リガンドである α -GalCerの繰り返し投与により、早期移植片

拒絶は首尾よく予防され、 $Gr-1^+CD11b^+$ 細胞による $IFN-\gamma$ 産生の劇的な減少を起こした。

以上の知見に基づき、本発明が完成された。

即ち、本発明は以下に関する。

- 5 [1] NKT細胞リガンドを含有してなる、移植片喪失の予防剤。
- [2] NKT細胞リガンドは α -ガラクトシルセラミドである、上記[1]記載の剤。
- [3] 移植片喪失は膵島移植に伴うものである、上記[1]記載の剤。
- [4] 移植片喪失は肝臓内への移植に伴うものである、上記[1]記載の剤。
- 10 [5] 移植前に2回以上投与されることを特徴とする、上記[1]記載の剤。
- [6] NKT細胞の活性化を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法。
- [7] $CD11b^+$ 細胞の $IFN-\gamma$ 産生を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法。
- 15 [8] 以下の工程を含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法：
- (A) 被検化合物の存在中でNKT細胞及び $CD11b^+$ 細胞を共培養する工程；
- (B) 共培養物中のNKT細胞を刺激したときの $CD11b^+$ 細胞からの $IFN-\gamma$ 産生を抑制し得る化合物を選択する工程。
- 20 [9] 移植部位における $CD11b^+$ 細胞数の上昇を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法。
- [10] 移植片喪失の予防剤を製造するための、NKT細胞リガンドの使用。
- [11] NKT細胞リガンドは α -ガラクトシルセラミドである、上記[10]記載の使用。
- 25 [12] 移植片喪失は膵島移植に伴うものである、上記[10]記載の使用。
- [13] 移植片喪失は肝臓内への移植に伴うものである、上記[10]記載の使用。

〔14〕移植前に2回以上投与されることを特徴とする、上記〔10〕記載の使用。

〔15〕哺乳動物に、NK T細胞リガンドの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における移植片喪失の予防方法。

5 〔16〕NK T細胞リガンドは α -ガラクトシルセラミドである、上記〔15〕記載の方法。

〔17〕移植片喪失は膵島移植に伴うものである、上記〔15〕記載の方法。

〔18〕移植片喪失は肝臓内への移植に伴うものである、上記〔15〕記載の方法。

10 〔19〕移植前に2回以上投与されることを特徴とする、上記〔15〕記載の方法。

本発明の予防剤を用いれば、臨床における膵島移植等における移植片喪失を予防することが可能であるので、移植効率の向上に寄与し得る。例えば、膵島移植においては、従来、早期移植片喪失のため、一人のレシピエントに対して2～3
15 人分のドナー膵島を繰り返し移植しなければ、十分な治療効果を達成することができなかったが、本発明の予防剤を用いれば、より少ない数のドナー膵島により同等の治療効果を挙げることができる。

また、本発明のスクリーニング方法を用いれば、新たなメカニズムによる早期移植片喪失の予防・治療薬を創出することができる。

20

図面の簡単な説明

図1は、 $V\alpha 14$ NK T細胞が同種同系膵島移植片の早期喪失に重要な役割を果たしていることを示す図である。左パネルにおいて、個々の線は、それぞれの動物の非絶食血漿グルコースレベルを表す。＊重篤な糖尿病のため動物が死亡したことを示す。右パネルは、移植から60日後において試験された肝臓中の膵島移植片の顕微鏡写真を示す。HE：ヘマトキシリン-エオシン。AF：アルデヒド-フクシン。原倍率： $\times 100$ 。(A) STZの静脈内注入後のC57BL/6
25

マウスにおける高血糖。(B) 400個の膵島を移植されたSTZ誘導糖尿病マウスにおける正常血糖。(C) 200個の膵島を移植されたSTZ誘導糖尿病マウスにおける高血糖。(D, E) 200個 (D) 又は100個 (E) の膵島を移植されたSTZ誘導糖尿病 $J\alpha 281^{-/-}$ マウスにおける正常血糖。(F, G, H) 200個の膵島が移植されたSTZ誘導糖尿病 $J\alpha 281^{-/-}$ マウスへ、野生型(F)、 $J\alpha 281^{-/-}$ (G)、IFN- γ 欠損(H) マウスからの肝臓単核球細胞 (5×10^6 個) を門脈内注入した。

図2は、膵島移植後におけるIFN- γ 産生細胞の誘導のための $V\alpha 14$ NKT細胞の必要性を示す図である。図中の数字は、対応する領域中の細胞のパーセンテージを表す。中央のヒストグラムにおいて、ゲートされた $CD3^{+} \alpha-GalCer-CD11d$ テトラマー陽性細胞のIFN- γ 産生(実線)が、陰性コントロール(点線)と比較される。

図3は、膵臓移植後6時間におけるIFN- γ 産生 $Gr-1^{+}CD11b^{+}$ 細胞の誘導を示す図である。図中の数字は、対応する領域中の細胞のパーセンテージを表す。

図4は、 $Gr-1^{+}CD11b^{+}$ 細胞の表面表現型を示す図である。表面発現(実線)がコントロール(点線)と比較された。

図5は、移植後6時間の肝臓から単離された $Gr-1^{+}CD11b^{+}$ 細胞の組織学的知見を示す写真である。(i) May-Grunwald-Giemsa染色。原拡大率： $\times 500$ 。(ii, iii, iv) インシュリン(ii)、 $Gr-1$ (iii)、及びF4/80(iv)の免疫組織学的染色。矢頭は膵島内へ移植した侵入した $Gr-1^{+}$ 細胞を示す。原拡大率： $\times 400$ 。

図6は、200個の膵島移植及び抗 $Gr-1$ 又は抗 $CD11b$ 抗体処理による糖尿病の予防を示す図である。(A) 対照抗体 (B) 抗 $Gr-1$ 抗体 (C) 抗体 $CD11b$ 抗体。

図7は、繰り返しの $\alpha-GalCer$ 処理後のNKT細胞のサイトカインプロファイルの変化を示す図である。 $\alpha-GalCer$ 又はビヒクルを単回(黒カラ

ム)、又は3回(白カラム)腹腔内に注入されたマウスから精製された肝臓V α 14 NKT細胞が、 α -GalCer (100 ng/ml) 又はビヒクルによりパルスされた樹状細胞とともに培養され、サイトカイン産生がELISAにより測定された。

5 図8は、繰り返しの α -GalCer処理による同種同系膵島移植片不全の予防効果を示す図である。個々の線は、それぞれの動物の非絶食血漿グルコースレベルを表す。*重篤な糖尿病による動物の死。(A、B)単回 α -GalCer刺激による膵島移植片の拒絶。400個の同種同系膵島が、膵島移植の時にビヒクル(A)又は α -GalCer (100 μ g/kg) (B)の単回腹腔内注入で処理されたSTZ-誘導糖尿病C57BL/6マウス内へ移植された。(C、D)繰り返しの α -GalCer刺激による膵島移植片不全の予防。200個の同種同系膵島が移植されたマウスが、移植の3日前のSTZを注入される前のday 15、11及び7に、ビヒクル(C)又は α -GalCer (100 μ g/kg)で3回処理された。

15 図9は、Gr-1⁺CD11b⁺細胞によるIFN- γ の産生に対する α -GalCer処理の効果を示す図である。図中の数字は対応する領域中の細胞のパーセントを表す。400個又は200個の同種同系膵島の移植6時間後に単離されたナীবマウス(A)、野生型(B及びD-F)又はJ α 281^{-/-}(C)の移植レシピエントからの肝臓単核球が解析された。400個の膵島が移植されたマウスへ1回、ビヒクル(B、C)又は α -GalCer (100 μ g/kg) (D)が注入された。同様に、200個の膵島が移植されたマウスへ、3回、ビヒクル(E)又は α -GalCer (100 μ g/kg) (F)が、移植の3日前のSTZを静脈内へ注入する前のday 15、11、及び7に注入された。

25 図10は、膵島移植後の肝臓V α 14 NKT細胞におけるmRNA発現を示す図である。(A) affimetrix 遺伝子チップによるmRNA発現解析結果が示される。ナীবV α 14 NKT細胞よりも6倍以上アップレギュレートされた遺伝子が示される。a、b、cは、それぞれ、膵島移植後1時間、2時間、6時間の

時点で細胞を単離したことを示す。(B) 肝臓V α 14NK T細胞におけるIL-1 β mRNAレベルがリアルタイムRT-PCRにより測定された。IL-1 β のための結果は、それぞれのHPRT発現により標準化されている。

5

発明の詳細な説明

(1. 移植片喪失の予防剤)

本発明はNK T細胞リガンドを含有してなる、移植片喪失の予防剤を提供するものである。理論には束縛されないが、移植に先立って予めレシピエントにNK T細胞リガンドを投与することにより、レシピエント内のNK T細胞の機能改変
10 (IFN- γ 産生能の低下等) が起こり、移植片周囲においてNK T細胞により誘導され得るCD11b⁺細胞 (Gr-1⁺CD11b⁺細胞等) 等からのIFN- γ 放出が強力に抑制され、IFN- γ による移植片の障害が防止される。

NK T細胞は、T細胞受容体 (TCR) とNK受容体の2つの抗原レセプターを発現しているリンパ球の一つである。NK T細胞は、当該細胞上のT細胞受容
15 体がCD1 (例えばCD1d) 分子上に提示された下記の「NK T細胞リガンド」を認識する。通常のT細胞とは異なり、NK T細胞上のT細胞受容体のレパートリーは非常に限られている。例えばマウスNK T細胞 (V α 14NK T細胞という場合がある) 上のT細胞受容体の α 鎖は、非多型性のV α 14及びJ α 281遺伝子セグメントによりコードされており (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83,
20 p.8708-8712, 1986; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, p.7518-7522, 1991; J. Exp. Med., 180, p.1097-1106, 1994)、 β 鎖の90%以上はV β 8であり、他にV β 7やV β 2という限られたレパートリーが含まれ得る。また、ヒトNK T細胞上のT細胞受容体は、マウスのV α 14と相同性の高い非多型性のV α 24、及びV β 8.2に近縁のV β 11の組み合わせであることが知られている。

25 「NK T細胞リガンド」とは、CD1分子上に提示されたときに、NK T細胞上のT細胞受容体により特異的に認識され、NK T細胞を特異的に活性化させ得る化合物をいう。本発明において使用される「NK T細胞リガンド」としては、

例えば、 α -グリコシルセラミド、イソグロボトリヘキソシルセラミド (Science, 306, p.1786-1789, 2004)、OCH (Nature, 413:531, 2001) 等を挙げることができる。 α -グリコシルセラミドは、ガラクトース、グルコースなどの糖類とセラミドとが α 配位にて結合したスフィンゴ糖脂質であり、WO 93/05055、WO 94/02168、WO 94/09020、WO 94/24142、およびWO 98/44928、Science, 278, p.1626-1629, 1997 等に開示されているものを挙げることができる。中でも、(2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-ガラクトピラノシル)-2-ヘキサコサノイルアミノ-1, 3, 4-オクタデカントリオール (本明細書中、 α -ガラクトシルセラミド又は α -GalCerと称する) が好ましい。

本明細書中、「NK細胞リガンド」は、その塩をも含む意味として用いられる。NK細胞リガンドの塩としては生理学的に許容される酸 (例：無機酸、有機酸) や塩基 (例：アルカリ金属塩) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが挙げられる。

また、本明細書中、「NK細胞リガンド」は、その溶媒和物 (水和物等) をも含む意味として用いられる。

本明細書中「移植片喪失」とは、移植後に移植片の一部又は全部が機能喪失又は破壊に陥ることをいう。また、本明細書中「移植片喪失」は、特に移植時の組織の侵傷や梗塞による虚血性変性の結果生じる自然免疫反応や炎症による移植片の機能喪失又は破壊、例えば炎症誘発性サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 等) による移植片の機能喪失又は破壊をいい、獲得免疫反応による移植片の拒絶を含まない。自然免疫反応とは、個体に生来備わる生態防御反応をいう。獲得免疫反応とは、抗原受容体 (T細胞受容体 (TCR)、B細胞受容体 (BCR)、

抗体等) により特異的に認識される抗原を排除する反応をいい、獲得免疫反応による拒絶には、同種異系 (allogenic) 拒絶、異種異系 (xenogenic) 拒絶、及び自己免疫疾患における自己組織の拒絶が含まれる。

本明細書における「移植片喪失」は、「早期移植片喪失」であり得る。「早期」
5 とは、移植直後、例えば、移植後約 3 日以内、好ましくは移植後約 24 時間以内の期間のことをいう。

移植片喪失は、任意の組織の移植に伴うものであってよい。該組織としては、例えば、膵島、膵臓、肝臓、心臓、腎臓、骨髄、皮膚、肺、消化管 (例: 大腸、小腸)、筋肉等を挙げることができる。本発明の予防剤は、NK T 細胞や CD 11
10 b^+ 細胞からの IFN- γ 産生を強力に抑制するが、膵島 (β 細胞等を含む) は IFN- γ に対する感受性が特に高いので、本発明の予防剤は膵島移植に伴う移植片喪失の予防に極めて有効である。

移植に供される組織は、生体から摘出されたままの組織のみならず、該組織を構成し得る細胞、再生医療技術により生体外で幹細胞等から製造された組織 (該
15 組織を構成し得る細胞を含む) 等をも含み得る。例えば、膵島 β 細胞は ES 細胞等からインビトロで製造され得る (Science, 292, 1389-1394, 2001)。

移植に供される組織の遺伝子型は、特に限定されないが、通常、同種同系、同種異系又は異種異系であり、好ましくは同種同系又は同種異系である。

また、移植片喪失は、生体内の任意の部位への移植に伴うものであってよい。
20 該部位は、移植される組織の種類等を考慮して適宜選択することが可能である。移植片喪失は、例えば、肝臓内、皮下、皮内、腹腔内、静脈内、動脈内、腎被膜下等への移植に伴うものであり得る。特に、肝臓内には NK T 細胞が高頻度に存在しているため、本発明の予防剤は肝臓内への移植に伴う移植片喪失の予防に極めて有効であり得る。

25 本発明の剤は、活性成分として NK T リガンド単独で、あるいは任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。また、本発明の剤は、有効量の活性成分を薬理学的に許容される一種もしくはそれ以上の担体と一

緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口または、例えば静脈内等の非経口を挙げることができる。投与形態としては、錠剤、
5 散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤等がある。経口投与に適当な、例えばシロップ剤のような液体調製物は、水、蔗糖、ソルビット、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造できる。また、錠剤、
10 散剤および顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニット等の賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤は、好ましくは受容者の血液と等張である活性化化合物
15 を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体等を用いて注射用の溶液を調製する。また、これら非経口剤においても、経口剤で例示した希釈剤、防腐剤、フレーバー類、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等から選択される1種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

20 本発明の予防剤は、移植に先立ちレシピエントに投与される。レシピエントは、任意の哺乳動物であり得る。哺乳動物としては、特に限定されないが、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物；ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の家畜；イヌ、ネコ等のペット；ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。

25 本発明の予防剤のレシピエントへの投与回数は、移植片喪失を予防し得る限り特に限定されないが、より強力にNK T細胞の機能改変（IFN- γ 産生能の低下等）を誘導し、移植片喪失をより確実に防ぐため、本発明の予防剤は移植前に2

回以上、例えば2～10回、好ましくは2～5回、レシピエントに投与され得る。
本発明の予防剤を移植前に2回以上投与するときの投与間隔は、移植片喪失を予
防し得る限り特に限定されないが、例えば1～30日間隔、好ましくは1～14
日間隔、より好ましくは1～7日間隔である。投与間隔は一定であることが好ま
5 しいが、特に限定されない。また、移植直前の投与から移植時までの期間は、移
植片喪失を予防し得る限り特に限定されないが、例えば1～30日、好ましくは
1～14日である。

本発明の予防剤の投与量は、投与形態、患者の年齢、体重、移植する組織の種
類、もしくは移植部位等により異なるが、通常経口の場合、1回の投与につき、
10 活性成分量として、 $5 \mu\text{g}/\text{m}^2 \sim 1000 \text{g}/\text{m}^2$ 、好ましくは $50 \mu\text{g}/\text{m}^2$
 $\sim 100 \text{g}/\text{m}^2$ を投与する。静脈内投与等の非経口投与の場合、1回の投与に
つき、活性成分量として、 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2 \sim 100 \text{g}/\text{m}^2$ 、好ましくは $10 \mu\text{g}/$
 $\text{m}^2 \sim 10 \text{g}/\text{m}^2$ を投与する。しかしながら、これら投与量に関しては、前述の
種々の条件により変動する。

15

(2. 移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法)

後述の実施例に示されるように、本発明者らは、移植後にNK T細胞によって
誘導されるIFN- γ 産生CD11b⁺細胞(Gr-1⁺CD11b⁺細胞等)が
移植片喪失の必須の構成要素であり、且つ、主要な原因であることを立証した。
20 また、移植後に移植部位におけるCD11b⁺細胞の数が急増すること等が見出
された。これらの知見に基づき、本発明は、以下の移植片喪失の予防・治療用化
合物のスクリーニング方法を提供するものである。

(スクリーニング方法I)

後述の実施例に示されるように、移植によりNK T細胞が活性化し、炎症性サ
25 イトカイン等の多様な遺伝子発現が亢進する。また、V α 14NK T欠損(J α
281^{-/-})マウスにおいては、野生型マウスと比較して移植片喪失が有意に抑
制されている。更に、NK T細胞リガンドの1つである α -GalCerの繰り

返し投与により、NK T細胞からのIFN- γ 産生のダウンレギュレーションが
起こり、移植片喪失が有意に抑制される。以上のような知見から、NK T細胞の
活性化を抑制し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用であ
ることが理解される。従って、本発明はNK T細胞の活性化を抑制し得る化合物
5 を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法
(スクリーニング方法I)を提供するものである。

スクリーニング方法Iにおいては、通常、まず被検化合物及びNK T細胞が提
供される。被検化合物は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、
例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナト
10 リアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やフ
ァージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるい
は微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

NK T細胞は自体公知の方法によって、NK T細胞を含有する上述の哺乳動物
の組織(例えば、肝臓、リンパ節、脾臓、末梢血、胸腺、肺等)から、NK T細
15 胞の形質に基づいて単離することが可能である。NK T細胞は、T細胞受容体(T
CR)とNK受容体の2つの抗原レセプターを発現しているので、これらの受容
体に対する抗体を用いて、T細胞受容体とNK受容体の二重陽性細胞をセルソー
ター、抗体磁気ビーズ法等により単離することで、NK T細胞を得ることができ
る。例えばマウスにおいては、NK T細胞はTCR β^+ NK1.1 $^+$ 細胞、CD3
20 $^+$ NK1.1 $^+$ 細胞であり得る。また、NK T細胞は、当該細胞上のT細胞受容体
がCD1(例えばCD1d)分子上に提示された α -ガラクトシルセラミド(α -
GalCer)やイソグロボトリヘキソシルセラミドなどの糖脂質を認識する
ので、当該糖脂質がロードされた可溶性のCD1多量体(例えば四量体)が特異
的に結合する細胞をセルソーター等により単離することで、NK T細胞を得るこ
25 とができる(J. Exp. Med., 192, p.741-754, 2000; J. Exp. Med., 191, p.189
5-1903, 2000)。更に、NK T細胞上のT細胞受容体のレパートリーは非常に限ら
れているので、NK T細胞に特異的なT細胞受容体のレパートリーを特異的に認

識する抗体を用いて、セルソーター等により単離することで、NK T細胞を得ることもできる。例えば、ヒトにおいては、NK T細胞は $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ 細胞であり得る。

NK T細胞は、生体中の組織から単離された後に、インビトロで増殖された細胞や、株化された細胞をも含む。NK T細胞は、自体公知の方法によりインビトロで増殖させることが可能であり、例えば、 α -ガラクトシルセラミドがパルスされた樹状細胞の存在下で培養されることにより、NK T細胞は増殖する。また、NK T細胞の株化は、自体公知の方法 (J. Exp. Med., 191, p.105-114, 2000) を用いて行うことが可能である。また、NK T細胞は他の細胞 (リンパ球等) と混合された状態 (単核球画分など) で培養に供されてもよい。

次に、被検化合物の存在中で、NK T細胞が活性化される。NK T細胞の活性化は、適切な培養培地中で、NK T細胞の活性化を誘導し得るような物質で刺激することにより行われ得る。該物質としては、上述のNK T細胞リガンド、TLRリガンド (LPS、非メチル化CpG DNA、ペプチドグリカン、マイコバクテリウムボビス、二本鎖RNA、 β グルカン等) 等を挙げることができる。培養培地としては、例えば、約5~20%のウシ胎仔血清を含む最少必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、RPMI1640 培地、199 培地などを挙げることが出来る。培養条件としては、培地のpHは約6~8であり、培養温度は通常約30~40℃であり、培養時間は約1~96時間である。

また、被検化合物の存在中でNK T細胞を活性化する代わりに、予め被検化合物で処理されたNK T細胞を活性化してもよい。被検化合物でNK T細胞を処理する際の培養培地、培地のpH、培養温度は上述と同様であるが、培養時間は約1~30日が好ましい。予め被検化合物で処理されたNK T細胞を活性化させる際の活性化方法、培養培地、培養条件は、被検化合物の存在中でNK T細胞を活性化させる場合と同様である。

被検化合物によるNK T細胞の処理は、被検化合物の動物への投与により行われてもよい。動物としては、例えば、上述の非ヒト哺乳動物が挙げられる。被検

化合物の投与回数は1回であっても複数回であってもよい。次に、被検化合物が投与された動物から単離されたNK T細胞がインビトロで活性化される。NK T細胞を活性化させる際の活性化方法、培養培地、培養条件は、被検化合物の存在中でNK T細胞を活性化させる場合と同様である。

- 5 次に、被検化合物の存在中でのNK T細胞の活性化の程度（又は予め被検化合物で処理されたNK T細胞の活性化の程度）が評価される。NK T細胞の活性化の程度は、IFN- γ 等のサイトカイン産生、活性化に伴い発現量が変動し得る遺伝子の発現、細胞傷害性等を指標に評価することができる。IFN- γ 等のサイトカイン産生は、サイトカインの転写産物（mRNA等）又は翻訳産物（ポリペプチド、タンパク質等）を対象として自体公知の方法により定量できる。例えば、
- 10 転写産物の発現量は、細胞からtotal RNAを調製し、RT-PCR、ノザンブロッティング等により測定され得る。また、翻訳産物の産生量は、種々の免疫学的手法により測定され得る。例えば、培養上清や細胞からの抽出物中の翻訳産物の量は、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（Methods in Enzymol., 70: 419
- 15 -439（1980））、ウェスタンブロッティング法などにより測定することが出来る。また、細胞中の翻訳産物をフローサイトメトリー等により直接測定することも出来る。

- NK T細胞の活性化に伴い発現量が変動し得る遺伝子としては、移植により活性化されたNK T細胞において発現量が増大する遺伝子を用いることが好ましい。
- 20 該遺伝子としては、例えば、AIF1, CXCL2, CXCL7, CXCL9, IL-1 β , IL-1ra, リンホトキシン α 等の分泌タンパク質関連遺伝子、CCR1, CD244, Fc γ rIIb, IL-13R α , MGL1, PIR-B等の受容体関連遺伝子、Hck, MARCKS, PTPRO, RASSF4等のシグナル伝達関連遺伝子、IRF-7, MafB, Runx2, ZFX1B等の転写調節因子関連遺伝子等を挙げることができる。これらの遺伝子発現は、上述のサイトカイン産生の評価と同様に、遺伝子の転写産物（mRNA等）又は翻訳産物（ポリペプチド、タンパク質等）を対象として自体公知の方法により定量できる。また、複数の遺伝子の発現を網羅的に測定するためにマイクロアレー等を用いることもできる。
- 25

そして、被検化合物の存在中でのNK T細胞の活性化の程度（又は予め被検化合物で処理されたNK T細胞の活性化の程度）が、被検化合物の不在中でのNK T細胞の活性化の程度（又は被検化合物で処理されていないNK T細胞の活性化の程度）と比較される。活性化の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被検化合物の不在中でのNK T細胞の活性化の程度（又は被検化合物で処理されていないNK T細胞の活性化の程度）の値は、被検化合物の存在中でのNK T細胞の活性化の程度（又は予め被検化合物で処理されたNK T細胞の活性化の程度）の測定に対し、事前に測定した値であっても、同時に測定した値であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した値であることが好ましい。

最後に、比較結果に基づいて、NK T細胞の活性化を抑制し得る化合物が選択される。NK T細胞の活性化を抑制し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用である。従って、NK T細胞における活性化を指標として、移植片喪失の予防・治療用の医薬、又は研究用試薬のための候補化合物を選択することが可能となる。

（スクリーニング方法 I I）

後述の実施例に示されるように、移植部位においてCD11b⁺細胞（Gr-1⁺CD11b⁺細胞等）が高レベルのIFN- γ を産生しており、かつ主要なIFN- γ 細胞である。また、IFN- γ マウス^{-/-}においては、野生型マウスと比較して移植片喪失が有意に抑制されている。更に、 α -GalCerの繰り返し投与によりCD11b⁺細胞からのIFN- γ 産生が抑制され、移植片喪失が予防される。以上のような知見から、CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を抑制し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用であることが理解される。従って、本発明はCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法（スクリーニング方法 I I）を提供するものである。

スクリーニング方法 I I においては、まず被検化合物及び CD 1 1 b⁺細胞が提供される。被検化合物は、上述のスクリーニング方法 I と同様のものが用いられる。

本発明に用いられる CD 1 1 b⁺ (CD 1 1 b 陽性) 細胞は、更に Gr - 1⁺ (Gr - 1 陽性) の表現型を有し得る。また、CD 1 1 b⁺細胞は、更に、CD 1 1 c⁻ (CD 1 1 c 陰性)、CD 8 6⁻ (CD 8 6 陰性)、MHC クラス I I⁻ (MHC クラス I I 陰性)、F 4 / 8 0^{+/ -} (F 4 / 8 0 弱陽性)、及び CD 6 8^{+/ -} (CD 6 8 弱陽性) からなる群から選択される少なくとも 1 つ、好ましくは全ての表現型を更に有し得る。CD 1 1 b⁺細胞は好中球であり得る。尚、動物種が生来的に保有していないマーカー分子により CD 1 1 b⁺細胞の表現型が定義される場合には、当該表現型は解析から除外されるなど、種差が考慮され得る。

本明細書において、細胞の表現型をマーカー分子 (細胞表面抗原) 発現の有無や強弱で表す場合、特に断りのない限り、当該マーカー分子に対する抗体による特異的結合の有無や強弱で細胞の表現型が表記される。マーカー分子の発現の有無や強弱による細胞の表現型の決定は、通常、当該マーカー分子に対する特異的抗体等を用いたフローサイトメトリー解析等により行われる。マーカー分子の発現が「陽性」とは、該マーカー分子が細胞表面上 (或いは細胞内) に発現しており、当該マーカー分子に対する抗体による特異的結合が確認できることをいう。このうち「強陽性」とは、比較対照である他の細胞 (又は細胞集団) と比べて、マーカー分子の発現量が相対的に高い、マーカー分子の発現量の高い細胞集団が相対的に多い、マーカー分子を発現している細胞集団の割合が相対的に多いこと等をいう。「弱陽性」とは、比較対照である他の細胞 (又は細胞集団) と比べて、マーカー分子の発現量が相対的に低い、マーカー分子の発現量の低い細胞集団が相対的に多い、マーカー分子を発現している細胞集団の割合が相対的に少ないこと等をいう。

CD 1 1 b⁺細胞の表現型について F 4 / 8 0^{+/ -}、CD 6 8^{+/ -}と表される場合、比較対照の細胞としてマクロファージが意図される。

CD11b⁺細胞は自体公知の方法によって、CD11b⁺細胞を含有する上述の哺乳動物の組織（例えば、肝臓、脾臓、リンパ節、末梢血、胸腺等）から、CD11b⁺細胞の表現型に基づいて単離することが可能である。例えば、上述のCD11b⁺細胞の表現型に対応する細胞表面抗原を認識する抗体を用いて、セルソーター、抗体磁気ビーズ法等により単離することができる。

CD11b⁺細胞は、生体中の組織から単離された後に、インビトロで増殖された細胞や、株化された細胞をも含む。また、CD11b⁺細胞は他の細胞（リンパ球、NK細胞等）と混合された状態（単核球画分など）で培養に供されてもよい。

次に被検化合物の存在中で、CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生が誘導される。CD11b⁺細胞からのIFN- γ 産生の誘導は、適切な培養培地中で、CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を誘導し得るような物質で刺激することにより行われ得る。該物質としては、上述のNKTリガンド、TLRリガンド（LPS、非メチル化CpG DNA、ペプチドグリカン、マイコバクテリウムボビス、二本鎖RNA、 β グルカン等）等を挙げることができる。培養培地としては、例えば、約5～20%のウシ胎仔血清を含む最少必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地などを挙げることが出来る。培養条件としては、培地のpHは約6～8であり、培養温度は通常約30～40℃であり、培養時間は約1～96時間である。

次に、被検化合物の存在中でのCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生が定量される。IFN- γ 産生は、スクリーニング方法Iと同様の方法により測定することができる。

そして、被検化合物の存在中でのCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生量が、被検化合物の不在中でのCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生量と比較される。産生量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被検化合物の不在中でのCD11b⁺細胞におけるIFN- γ 産生量は、被検化合物の存在中でのCD11b⁺細胞におけるIFN- γ 産生量の測定に対し、事前に測定した産

生量であっても、同時に測定した産生量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した産生量であることが好ましい。

最後に、比較結果に基づいて、CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を抑制し得る化合物が選択される。上述の様に、CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を抑制し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用である。従って、CD11b⁺細胞におけるIFN- γ 産生を指標として、移植片喪失の予防・治療用の医薬、又は研究用試薬のための候補化合物を選択することが可能となる。

尚、本スクリーニング方法はまた、被検化合物の動物への投与により行われ得る。動物としては、例えば、上述の非ヒト哺乳動物が挙げられる。動物を用いて本発明のスクリーニング方法が行われる場合、例えば、インビボで動物中のCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を誘導し、該動物へ被験化合物が投与される。動物への被検化合物の投与は、IFN- γ 産生誘導の前でも後でもよい。インビボでCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を誘導する方法としては、特に限定されないが、例えば、上述のCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を誘導し得るような物質の投与や、任意の移植モデル等を挙げることができる。好ましくは、移植モデルが用いられる。移植モデルとしては、自体公知のモデルのいずれをも使用することが可能であり、所望の組織が、非ヒト哺乳動物レシピエントの生体内の任意の部位へ移植される。本スクリーニング方法において選択される「組織」、「生体内の部位」は上述と同様である。好ましくは、脾臓が非ヒト哺乳動物レシピエントの肝臓内へ移植される。ここで、移植に供される「組織」はレシピエントと同種同系であることが好ましい。同種異系又は異種異系の組織を移植すると、移植片喪失に係る反応と同時に獲得免疫反応が生じるため、移植片喪失に対する化合物の効果を評価することが困難となる場合があるからである。

次に被検化合物が投与された動物におけるCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生が測定される。移植モデルにおいては、好ましくは、移植部位におけるCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生が測定される。「移植部位」は、移植された組織自体及びその定着部位を含む。例えば、脾臓を肝臓に移植した場合は、「移植部位」は移

植された脾臓及び肝臓を含む。CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を測定する時期は、特に限定されないが、移植後の早い時期（例えば移植の30分～48時間後）が好ましい。CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生は、例えば、動物から単核球画分を単離し、該単核球画分中に含まれるCD11b⁺細胞におけるIFN- γ 産生をフローサイトメーターなどで測定することにより評価することができる。

IFN- γ 産生量は、IFN- γ ⁺CD11b⁺細胞の数（又は割合）や、CD11b⁺細胞への抗IFN- γ ⁺抗体の結合量（蛍光強度であり得る）等として決定される。

そして、被検化合物が投与された動物におけるCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生が、被検化合物を投与されていない対照動物におけるCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生と比較され、比較結果に基づいて、CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を抑制し得る化合物が選択される。動物を用いたスクリーニング方法は、インビボにおいて所望の効果を奏する化合物を得ることが出来る点で優れている。

（スクリーニング方法III）

後述の実施例に示されるように、移植によりNKT細胞が活性化し、炎症性サイトカイン等の多様な遺伝子発現が亢進する。また、V α 14NKT欠損（J α 281^{-/-}）マウス及びIFN- γ マウス^{-/-}においては、野生型マウスと比較して移植片喪失が有意に抑制されている。野生型マウスにおいては、移植部位においてCD11b⁺細胞（Gr-1⁺CD11b⁺細胞等）が高レベルのIFN- γ を産生しているが、V α 14NKT欠損（J α 281^{-/-}）マウスにおいては、CD11b⁺細胞からのIFN- γ 産生が抑制されている。更に、NKT細胞リガンドの1つである α -GalCerの繰り返し投与により、NKT細胞の機能を改変することにより、CD11b⁺細胞からのIFN- γ 産生が抑制され、移植片喪失が予防される。これらの知見から、移植時に活性化されたNKT細胞がCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を誘導し、これが移植片喪失の主要原因であり、この誘導を阻害し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用であることが理解される。従って、本発明は、以下の工程を含む、移植片喪失

の予防・治療用化合物のスクリーニング方法（スクリーニング方法 I I I）を提供するものである：

（A）被検化合物の存在中でNK T細胞及びCD 1 1 b⁺細胞を共培養する工程；

（B）共培養物中のNK T細胞を刺激したときのCD 1 1 b⁺細胞からのIFN- γ 産生を抑制し得る化合物を選択する工程。

工程（A）では、被検化合物の存在中でNK T細胞及びCD 1 1 b⁺細胞を共培養する。被検化合物、NK T細胞及びCD 1 1 b⁺細胞は、上述のスクリーニング方法 I、I Iと同様のものが用いられる。培養培地としては、例えば、約5～20%のウシ胎仔血清を含む最少必須培地（MEM）、ダルベッコ改変最少必須培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地などを挙げる事が出来る。培養条件としては、培地のpHは約6～8であり、培養温度は通常約30～40℃である。

工程（B）では、まず、共培養物中のNK T細胞が刺激される。刺激は、上述のNK Tリガンド、TLRリガンド（LPS、非メチル化CpG DNA、ペプチドグリカン、マイコバクテリウムボビス、二本鎖RNA、 β グルカン等）等を共培養物に添加することにより行われる。この刺激により、NK T細胞が活性化し、更に活性化されたNK T細胞がCD 1 1 b⁺細胞からのIFN- γ 産生を誘導する。刺激後の培養時間は約1～約96時間である。

次に、被検化合物の存在中でのCD 1 1 b⁺細胞のIFN- γ 産生が定量される。IFN- γ 産生は、スクリーニング方法 Iと同様の方法により測定することができる。

そして、被検化合物の存在中でのCD 1 1 b⁺細胞のIFN- γ 産生量が、被検化合物の不在中でのCD 1 1 b⁺細胞のIFN- γ 産生量と比較される。産生量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被検化合物の不在中でのCD 1 1 b⁺細胞におけるIFN- γ 産生量は、被検化合物の存在中でのCD 1 1 b⁺細胞におけるIFN- γ 産生量の測定に対し、事前に測定した産生量であっても、同時に測定した産生量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した産生量であることが好ましい。

最後に、比較結果に基づいて、CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を抑制し得る化合物が選択される。活性化されたNK細胞により誘導されるCD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を阻害し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用である。

5 (スクリーニング方法IV)

後述の実施例に示されるように、移植を行った後に、移植部位におけるCD11b⁺細胞の数が劇的に上昇する。そして、このCD11b⁺細胞が移植部位における主要なIFN- γ 産生である。このような知見から、移植部位におけるCD11b⁺細胞の数の上昇を抑制し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用であることが理解される。従って、本発明は、移植部位におけるCD11b⁺細胞数の上昇を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法(スクリーニング方法IV)を提供するものである。

本スクリーニング方法は、上述の非ヒト哺乳動物を用いた移植モデルを使用し
15 て行われる。移植モデルとしては、自体公知のモデルのいずれをも使用することが可能であり、所望の組織が、非ヒト哺乳動物レシピエントの生体内の任意の部位へ移植される。本スクリーニング方法において選択される「組織」、「生体内の部位」は上述と同様である。好ましくは、脾臓が非ヒト哺乳動物レシピエントの肝臓内へ移植される。ここで、移植に供される「組織」はレシピエントと同種同
20 系であることが好ましい。同種異系又は異種異系の組織を移植すると、移植片喪失に係る反応と同時に獲得免疫反応が生じるため、移植片喪失に対する化合物の効果を評価することが困難となる場合があるからである。

被検化合物はレシピエント動物へ投与される。投与時期は移植の前後いずれであってもよい。被検化合物は、スクリーニング方法Iに記載されたものと同様の
25 ものを使用することができる。

次に被検化合物が投与されたレシピエントの移植部位におけるCD11b⁺細胞数が測定される。CD11b⁺細胞数を測定する時期は、特に限定されないが、

移植後の早い時期（例えば移植の30分～48時間後）が好ましい。CD11b⁺細胞数は、例えば、移植部位から単核球画分を単離し、該単核球画分中に含まれるCD11b⁺細胞数（或いは割合）をフローサイトメーター等で測定することにより評価することができる。

- 5 そして、被検化合物が投与されたレシピエントの移植部位におけるCD11b⁺細胞数が、被検化合物を投与されていない対照レシピエントの移植部位におけるCD11b⁺細胞数と比較される。細胞数の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。対照レシピエントの移植部位におけるCD11b⁺細胞数は、被検化合物が投与されたレシピエントの移植部位におけるCD11b⁺細胞数の測定に対し、事前に測定した値であっても、同時に測定した値であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した値であることが好ましい。

- 15 最後に、比較結果に基づいて、移植部位におけるCD11b⁺細胞数の上昇を抑制し得る化合物が選択される。上述の様に、移植部位におけるCD11b⁺細胞数の上昇を抑制し得る化合物は、移植片喪失の予防・治療用化合物として有用である。従って、移植部位におけるCD11b⁺細胞数を指標として、移植片喪失の予防・治療用の医薬、又は研究用試薬のための候補化合物を選択することが可能となる。

- 20 本発明のスクリーニング方法I～IVにより得られた化合物は、移植片喪失を予防・治療し得るので、上記本発明の予防剤と同様に、医薬として製剤化することによって、移植片喪失の予防・治療剤とすることができる。

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実験材料及び方法

（動物）

マウスはCharles River Japan (神奈川、日本) より購入され、本発明者らの動物施設にて維持された。雄C57BL/6 (H-2^b) マウス及びC57BL/6バックグラウンドのV α 14NKT細胞欠損 (J α 281^{-/-}) マウス (10-15週齢) が使用された。C57BL/6バックグラウンドのIFN- γ 欠損マウスは、東京大学医学部のY. Iwakuma博士より供与された (Tagawa, Y., et. al., 1997, J. Immunol., 159: 1418-1428)。動物保護は、本発明者らの施設のガイドラインに従った。

(糖尿病誘導)

糖尿病は、ストレプトゾトシンの静脈内注入によってレシピエントマウス中に誘導された (STZ、180mg/kg、Sigma、St. Louis, MO) (Schein, P.S., et. al., 1968, Diabetes, 17:760-765)。血漿グルコースレベルは、Beckman glucose analyzer (Beckman Instruments Japan, Tokyo, Japan) により測定された。STZ注入後、非絶食血漿グルコースレベルはday 2までに400mg/dlを超え、膵島移植の時にはマウスは高血糖のままであった。

(膵島単離及び移植)

膵島は、静的なコラゲナーゼ消化と、それに引続くFicoll-ConrayグラデIENT中での遠心分離により単離され (Sutton, R., 1986, Transplantation, 42:689-691/Ohtsuka, K., et. al., 1997, Transplantation, 64: 633-639)、門脈を介してSTZ誘導糖尿病マウスの肝臓中へ移植された (Kemp, C. B., et. al., 1973, Nature, 244:447)。非絶食時血漿グルコースレベル及び体重が、移植の前後において、週3回モニターされた。正常血糖は、移植後における、2回連続した200mg/dlより低い非絶食グルコースレベルとして定義された。

(α -ガラクトシルセラミド処理)

α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) は、RIKEN RCAIの実験室において合成され、キリンビール株式会社からも供与された (Kawano, T.,

et. al., 1997, Science, 278: 1626-1629)。マウスへ、 α -GalCer (100 μ g/kg) 又はビヒクル (1% (v/v) DMSO、0.025% (w/v) Tween 80) を、腹腔内に、1回又は3回 (4日インターバルで) 注入した。最後の注入から4日後、脾臓細胞が α -GalCer (100 ng/ml) 又はビヒクルの存在中で培養された。3日間培養上清中の IFN- γ 及び IL-4 のレベルが ELISA により測定された。

(細胞移入)

Percol 11 グラディエント遠心分離により獲得された肝臓単核球が既述のように調製された (Ohtsuka, K., et. al., 1997, Transplantation, 64: 633-639)。

(フローサイトメトリー)

フローサイトメトリーのために使用されたモノクローナル抗体 (mAbs)、抗マウス FcR γ II/III (2.4G2), フルオレッセインイソチオシアネート (FITC) 接合抗 CD3 ϵ (145-2C11), FITC-抗 CD11b (M1/70), アロフィコシアニン (APC) -接合抗 IFN- γ (XMG1.2), APC-抗 IL-4 (11B11), PerCP-接合抗 Gr-1 (Rb6-8c5), PerCP-Cy5.5-抗 Gr-1 (86-8C5), FITC-抗 CD11b (M1/70), FITC-抗 CD11c (HL3), FITC-抗 CD86 (GL-1), FITC-抗 I-A^b (AF6-120.1), FITC-抗 IgG1 (A85-1), フィコエリスリン (PE) -接合抗 CD11b (M1/70), 及びそれらのアイソタイプ適合コントロールは、PharMingen (San Diego, CA) から購入された。FITC-抗 F4/80 (A3-1) 及び FITC-抗 CD68 (FA-11) は SEROTEC (Oxford, UK) から獲得された。PE-接合 α -GalCer ロード CD1d (α -GalCer-CD1d) テトラマーは既述のように調製された (Matsuda, J. L., et. al., 2000, J. Exp. Med. 192:741-753)。細胞内染色のために、細胞は抗 FcR γ II/III 及び neutravidin (Molecular Probe

s, Inc., Eugene, OR) と共にインキュベートされ、そして表面染色された。細胞は固定され、Cytotfix/Cytoperm溶液 (PharMingen) 中で浸透化され、抗IFN- γ 及び抗IL-4 mAbsにより、製造者の指示書に従い染色された。染色された細胞は、FACSCalibur
5 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 上で解析され、データはCELLQuest software (Becton Dickinson) により処理された。10000個の生細胞が解析された。

(セルソーティング及び移入)

肝単核球が既述の様に調製された (Transplantation, 64, 633-639, 1997)。G
10 r-1⁺CD11b⁺細胞及びV α 14 NKT細胞がMoflo™ (Dako Cytomation, Glostrup) により、それぞれ、純度 $\geq 99\%$ 及び $\geq 98\%$ でソートされた。脾臓樹状細胞 (DCs) が、抗CD11c結合磁性ビーズ (Myltenyi Biotec) を用いてMACS^Rにより、純度 $\geq 95\%$ で精製された。

(抗体処理)

15 G r-1又はCD11bに対するモノクローナル抗体が、200個の膵島を受けたSTZ糖尿病マウス内へ、移植時に、腹腔内注入された。

(組織学)

移植レシピエントからの肝臓及び膵臓がBouin's溶液中で固定され、光学顕微鏡試験のためにパラフィン中へ処理され、包埋された。切片はヘマトキシ
20 リン-エオシン及びアルデヒド-フクシンにより染色された。免疫組織化学解析が、ストレプトアビジン-ビオチン-パーオキシダーゼ複合体法により行われた (Int. J. Cancer., 83, 732-737, 1999)。

(遺伝子発現解析)

膵島移植後1時間、2時間、6時間の時点での肝臓V α 14 NKT細胞におけ
25 るmRNA発現がaffimetrix遺伝子チップにより解析された。また、肝臓V α 14 NKT細胞におけるIL-1 β mRNAレベルがリアルタイムRT-PCR

により測定された。IL-1 β のための結果は、それぞれのHPRT発現により標準化された。

(統計学的解析)

Fisher's exact testが、膵島移植後のストレプトゾ
5 トシン誘導糖尿病マウスにおける正常血糖 (euglycemia) の割合の統計学的有意性を決定するために使用された。

結果及び考察

(V α 14NK T細胞は早期膵島移植片喪失の原因である)

V α 14NK T細胞が膵島移植片不全に関わっている可能性を調べるために、
10 本発明者らは膵島移植の試験系を確立することを試みた。本発明者らは、ストレプトゾトシン (STZ) 誘導糖尿病マウスにおける高血糖を改善するために必要とされるドナー膵島の最低限数を試験した。C57BL/6マウスはSTZの静脈内注入の後すぐに高血糖性及び糖尿病性となった (図1A)。STZ誘導糖尿病マウスでは、肝臓内に移植された400個の同種同系膵島が正常血糖を達成する
15 ために十分であることが見出された (図1B、左)。一方、正常血糖は、単独のマウス膵臓から単離することのできる膵島の数である、200個の同種同系膵島の移植では達成することができなかった (図1C、左)。400個の膵島 (n=6) 又は200個の膵島 (n=10) の移植後の糖尿病野生型マウスにおける正常血糖 (euglycemia) の割合の差異は、統計学的に有意であった (P<0.
20 001)。生化学的データに合致して、400個の膵島を受けたマウスにおいて、よく顆粒化された (well-granulated) β 細胞を有するそのままの膵島が組織学的にみられたが、一方200個のみの膵島を受けたマウスにおいては、脱顆粒化された (de-granulated) β 細胞を有する傷害された膵島が観察された (図1B及びC、右)。

25 本発明者らは、V α 14NK T細胞が早期膵島移植片喪失に関与するかどうか試験した。全ての糖尿病性J α 281^{-/-}マウスは、200個又はたった100個の膵島の移植後11日までに正常血糖となった (図1D及びE、左)。組織学的

試験もまた、よく顆粒化された (well-granulated) β 細胞を有するそのままの膵島の存在を明瞭に立証し (図 1 D、右)、 $V\alpha 14$ NK T 細胞が移植片拒絶 (及び移植された膵島の早期移植片喪失) に重要な役割を果たしていることが示唆された。

- 5 移植された膵島に対する $V\alpha 14$ NK T 細胞の有害な効果を証明するために、ナイーブな野生型、 $J\alpha 281^{-/-}$ 、又は IFN- γ 欠損マウスから単離された肝臓単核球 (5×10^6 個) が、200 個の同種同系膵島を受ける糖尿病性の $J\alpha 281^{-/-}$ マウスの門脈中に、移植のときに注入された。野生型マウスからの細胞を注入された糖尿病の $J\alpha 281^{-/-}$ マウスは、移植後 60 日間、高血糖の
10 ままであった (図 1 F、左)。一方、 $J\alpha 281^{-/-}$ 、又は IFN- γ 欠損マウスからの細胞を注入された糖尿病の $J\alpha 281^{-/-}$ マウスは、正常血糖となった (図 1 G 及び H、左)。組織学的試験もまた、 $J\alpha 281^{-/-}$ 、又は IFN- γ 欠損マウスからの細胞のレシピエントにおいてそのままの膵島が存在し、野生型マウスからの細胞のレシピエントにおいてそうではないことを証明した (図 1 F、G、
15 H、右)。該結果から、 $V\alpha 14$ NK T 細胞及び IFN- γ が、早期移植片不全 (喪失) のための必須の構成要素であることが示唆された。

(移植により誘導された $Gr-1^+CD11b^+$ 細胞は早期移植片喪失のエフェクター細胞である)

- 膵島移植片不全に関連した細胞変化を明らかにするために、肝単核球が膵島移植後に定期的に単離され、 α -GalCer がロードされた CD1d (α -GalCer-CD1d) テトラマーを用いた FACS により試験された。FACS 解析は、 α -GalCer-CD1d テトラマー $^+$ $V\alpha 14$ NK T 細胞のパーセンテージは、はじめ、0 hr での 10.3% から 6 hrs での約 5% へ減少したが、しかし膵島移植後 24 時間では 19.2% に急上昇したことを示した (図
20 2、左パネル)。この知見は、報告されているように (Int. Immunol., 16, 241-247, 2004; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 10913-10918, 2003; J. Immunol., 171, 4020-4027, 2003)、 $V\alpha 14$ NK T 細胞の活性化により受容体発現がダ
25

ウンレギュレートされ、その結果 α -GalCer-CD1d テトラマーによってV α 14NK T細胞が検出されなくなったことを示唆する。更に、移植後2～6時間において採取されたV α 14NK T細胞は、IFN- γ やIL-1 β の様な炎症性サイトカインを産生したことから（図2及び図10）、V α 14NK T細胞が移植により活性化されることが示唆された。V α 14NK T細胞の消失に引き続き、V α 14NK T細胞は、既報のように（Int. Immunol., 16, 241-247, 2004: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 10913-10918, 2003: J. Immunol., 171, 4020-4027, 2003）、図2（24hrs）に示すように、早急に増殖した。興味深いことに、高レベルのIFN- γ を産生する α -GalCer-CD1d テトラマー⁺細胞の割合が、脾臓移植後6時間で0.5%から14.3%へ著しく増加した（図2、左パネル）。 α -GalCer-CD1d テトラマー⁺細胞が更にゲートされ、Gr-1及びCD11b発現がIFN- γ 産生と関連して解析され、Gr-1⁺CD11b⁺細胞であると決定された（図3）。Gr-1⁺CD11b⁺細胞は、CD11c⁻、CD86⁻、MHCクラスII⁻、F4/80^{+/-}、及びCD68^{+/-}であり（図4）、形態学的に好中球であったことから（図5）、これらの細胞は好中球であることが示唆された。移植された脾臓の中へ侵入した好中球（図5）は、エフェクター細胞のようであった。なぜなら、Gr-1又はCD11bに対する抗体の注入により、脾臓移植片の拒絶が予防されたからである（図6）。

野生型マウスと著しく対照的に、J α 281^{-/-}マウスにおいてはIFN- γ 産生Gr-1⁺CD11b⁺細胞の増加がみられず（図2、左パネル）、脾臓移植に引続くV α 14NK T細胞の活性化がIFN- γ 産生Gr-1⁺CD11b⁺細胞の誘導を引き起こすことが示唆された。V α 14NK T細胞の存在又は不在に関わらず、IL-4産生細胞の有意な増加は認められなかった（図2、右パネル）。

α -GalCerの単回注入がGr-1⁺CD11b⁺細胞におけるIFN- γ 産生を劇的に増進し（図7）、V α 14NK T細胞がGr-1⁺CD11b⁺細胞

胞を活性化し、 $\text{IFN-}\gamma$ を産生させることが示唆された。即ち、 $\text{Gr-1}^+\text{CD11b}^+$ 細胞による増加した $\text{IFN-}\gamma$ 産生は、膵島移植により誘導された $\text{V}\alpha 1.4\text{NKT}$ 細胞の直接的な結果であるようであった。

$\text{IFN-}\gamma$ 産生 $\text{Gr-1}^+\text{CD11b}^+$ 細胞と同様に、水酸化アルミニウム（アラム）により沈降させた抗原を免疫のために用いたときに、アラムにより誘導された IL-4 産生 $\text{Gr-1}^+\text{CD11b}^+$ 細胞がB細胞活性化に重要な役割を果たしている（Jordan, M. B., 2004, Science, 304: 1808-1810）。これらの2つの集団の、抗原非依存性及び免疫反応における重要性に関する類似性にもかかわらず、 IL-4 産生 $\text{Gr-1}^+\text{CD11b}^+$ 細胞は免疫後6日ではっきり現れるが、一方 $\text{IFN-}\gamma$ 産生 $\text{Gr-1}^+\text{CD11b}^+$ 細胞は移植後すぐ（6hr）に現れるという事実のような、多くの明らかな差異が言及される。該知見は $\text{Gr-1}^+\text{CD11b}^+$ 細胞の機能的多様性を示唆する。

（ $\text{V}\alpha 1.4\text{NKT}$ 細胞機能の改変による早期移植片喪失の予防）

$\text{V}\alpha 1.4\text{NKT}$ 細胞は、 $\alpha\text{-GalCer}$ により刺激された後すぐに著量の $\text{IFN-}\gamma$ を分泌するが、繰り返しの $\alpha\text{-GalCer}$ 刺激後では $\text{IFN-}\gamma$ を産生することを停止した（図7）。本発明者らは、繰り返しの $\alpha\text{-GalCer}$ 注入が、 $\text{V}\alpha 1.4\text{NKT}$ 細胞による $\text{IFN-}\gamma$ 産生を改変し、移植片生存性に影響を与え得る可能性をテストするために、膵島移植に対する繰り返しの $\alpha\text{-GalCer}$ 刺激の効果を調べた。400個の膵島を受けたSTZ誘導糖尿病野生型マウスが、移植の際にビヒクルにより1回処理されたときに、全てのマウスは正常血糖となった（図8A）。400個の膵島を受けた糖尿病野生型マウスが、 $\alpha\text{-GalCer}$ の単回注入（ $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ）により処理されたときに、移植後60日でも正常血糖になったマウスはいなかった（図8B）。対照的に、野生型マウスが、膵島移植より前の糖尿病の誘導の前のday15、11、及び7に、 $\alpha\text{-GalCer}$ （ $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ）により3回処理されていたときには、200個の同種同系膵島のみの移植が、10日以内に、全てのレシピエントマウスにおいて正常血糖を復活させた（図8D）。 $\alpha\text{-GalCer}$ の代わりにビヒクルで処理

されたマウスは、移植60日後、高血糖のままであった(図8C)。これらの結果は、膵島移植より前の繰り返しの α -GalCer注入によりIFN- γ 産生のダウンレギュレーションが起こり、これが膵島移植に陽性に影響を与えたことを立証した。

- 5 (V α 14NK T細胞により引き起こされたGr-1⁺CD11b⁺細胞によるIFN- γ 産生)

そこで、本発明者らは、 α -GalCerのGr-1⁺CD11b⁺細胞によるIFN- γ の産生への効果を調べた。FACS解析は、膵島移植後直ちにGr-1⁺CD11b⁺細胞が、非移植対照と比較して、増加したことを明らかにした(図9B)。Gr-1⁺CD11b⁺細胞の流入はV α 14NK T細胞とは独立であった。なぜなら、Gr-1⁺CD11b⁺細胞の増加は、移植後のJ α 281^{-/-}マウスにおいても検出されたからである(図9C)。このことは、Gr-1⁺CD11b⁺細胞数が移植により上昇したことを示唆する。しかしながら、Gr-1⁺CD11b⁺細胞によるIFN- γ 産生が α -GalCerの単回注入によって劇的に増進されたが(図9D)、 α -GalCerの繰り返し注入が与えられたときは、ビビクル処理コントロール(図9E)と同等のレベルにまで減少した(図9F)。従って、Gr-1⁺CD11b⁺細胞によるIFN- γ 産生は、全体としては、V α 14NK T細胞の活性化状態に依存していることが示唆された。

以上より、インビボでの繰り返しの α -GalCer刺激によるV α 14NK T細胞機能の改変は、Gr-1⁺CD11b⁺細胞によるIFN- γ 産生を操作し、
20 即時の移植片不全及び膵島移植片の早期の喪失を予防し、そして良好な膵島膵臓移植に寄与し得ることが示唆された。

マウスにおけるV α 14NK T細胞と同様に、ヒトV α 24NK T細胞も活性化により大量のIFN- γ を放出する(J. Exp. Med., 186, 109-120, 1997) こと
25 から、ヒトにおける膵島の早期移植片拒絶もV α 24NK T細胞により調節されることが示唆される。従って、ヒトV α 24NK T細胞によるIFN- γ 産生のダ

ウンレギュレーションを標的とした治療法は、臨床における膵島移植片の早期喪失を予防することを助長し、膵臓膵島移植の効率の向上することを助長し得る。

産業上の利用可能性

- 5 本発明の予防剤を用いれば、臨床における膵島移植等における移植片喪失を予防することが可能であるので、移植効率の向上に寄与し得る。例えば、膵島移植においては、従来、早期移植片喪失のため、一人のレシピエントに対して2～3人分のドナー膵島を繰り返し移植しなければ、十分な治療効果を達成することができなかったが、本発明の予防剤を用いれば、より少ない数のドナー膵島により
- 10 同等の治療効果を挙げることができる。

また、本発明のスクリーニング方法を用いれば、新たなメカニズムによる早期移植片喪失の予防・治療薬を創出することができる。

- 本出願は日本で出願された特願2005-233250（出願日：2005年
- 15 8月11日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. NK T細胞リガンドを含有してなる、移植片喪失の予防剤。

5 2. NK T細胞リガンドは α -ガラクトシルセラミドである、請求項1記載の剤。

3. 移植片喪失は臍島移植に伴うものである、請求項1記載の剤。

4. 移植片喪失は肝臓内への移植に伴うものである、請求項1記載の剤。

10

5. 移植前に2回以上投与されることを特徴とする、請求項1記載の剤。

6. NK T細胞の活性化を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法。

15

7. CD11b⁺細胞のIFN- γ 産生を抑制し得る化合物を選択することを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法。

8. 以下の工程を含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法：

20 (A) 被検化合物の存在中でNK T細胞及びCD11b⁺細胞を共培養する工程；

(B) 共培養物中のNK T細胞を刺激したときのCD11b⁺細胞からのIFN- γ 産生を抑制し得る化合物を選択する工程。

9. 移植部位におけるCD11b⁺細胞数の上昇を抑制し得る化合物を選択する

25 ことを含む、移植片喪失の予防・治療用化合物のスクリーニング方法。

10. 移植片喪失の予防剤を製造するための、NK T細胞リガンドの使用。

1 1 . 哺乳動物に、N K T細胞リガンドの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における移植片喪失の予防方法。

図 1

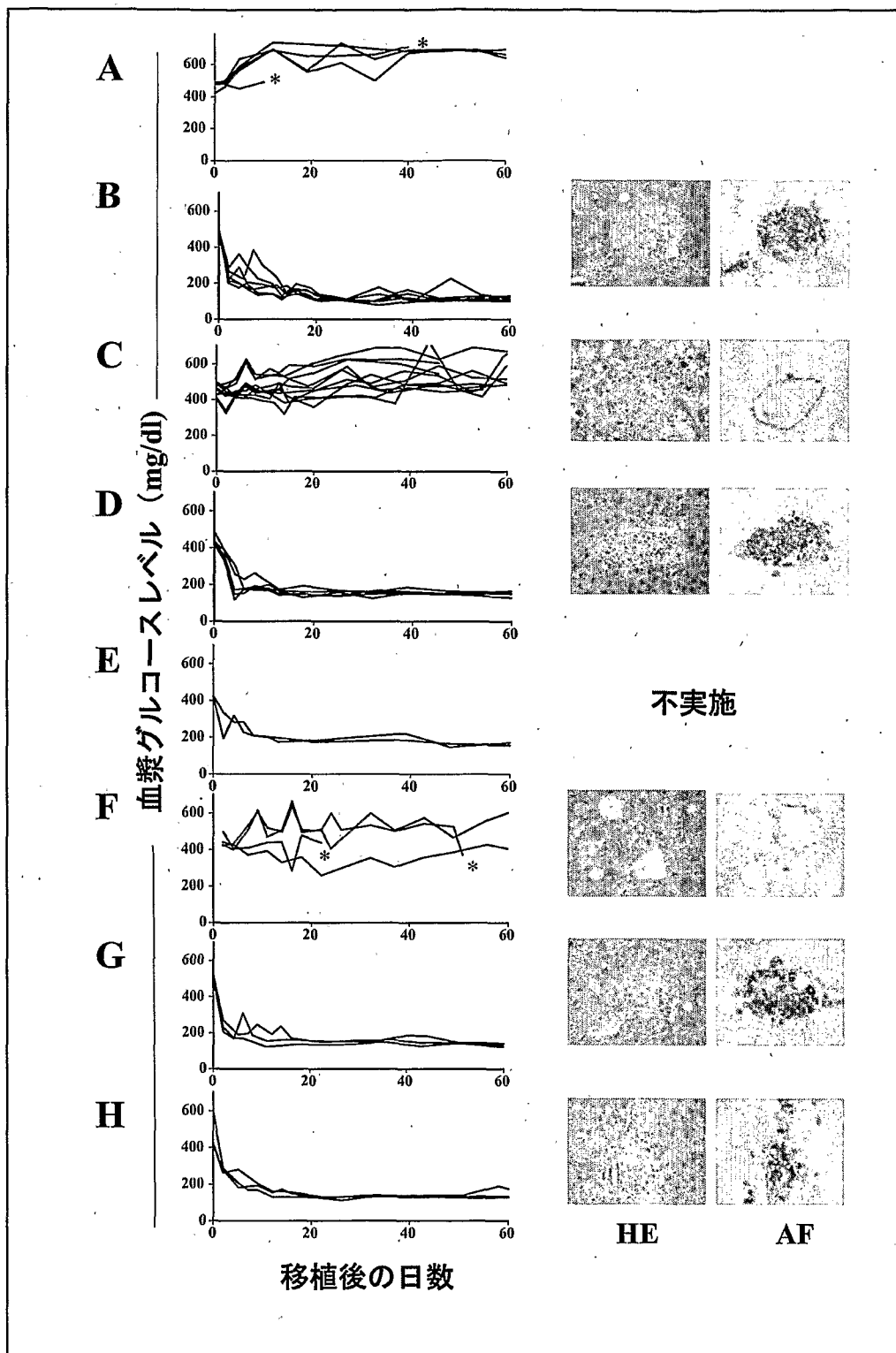
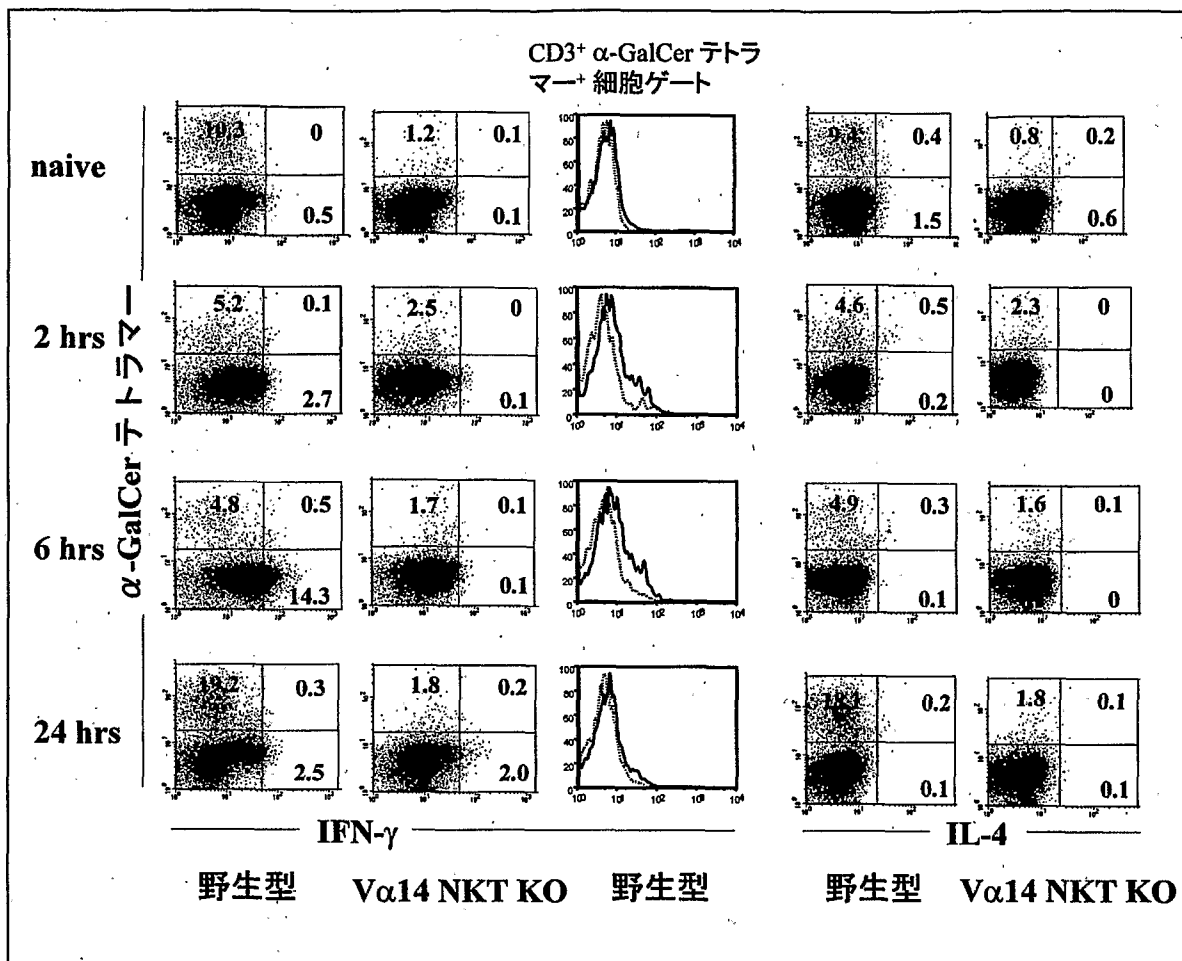


図 2



3/8

図 3

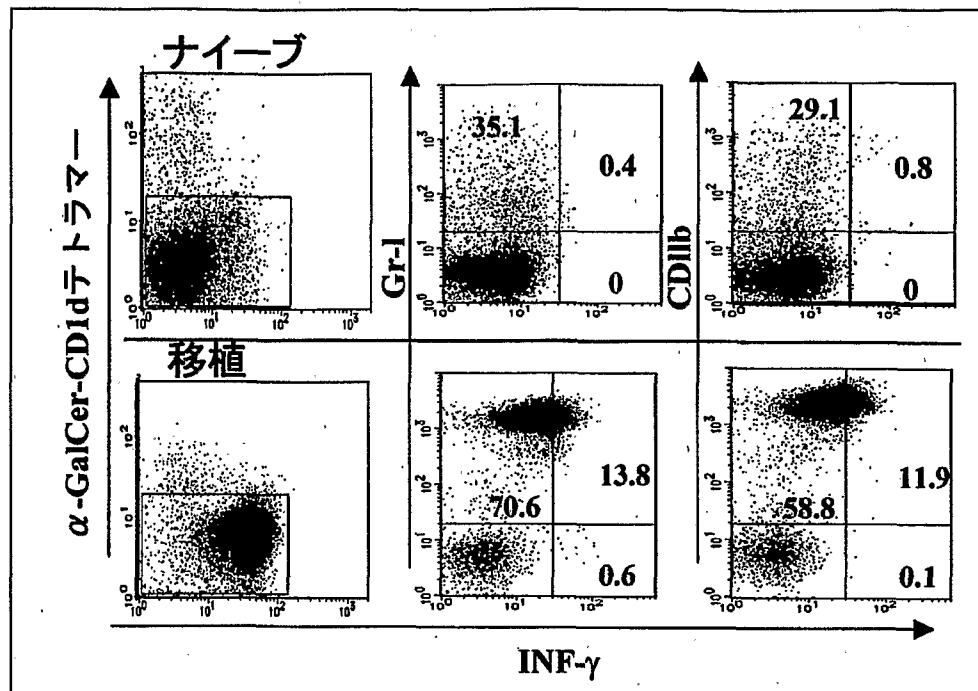
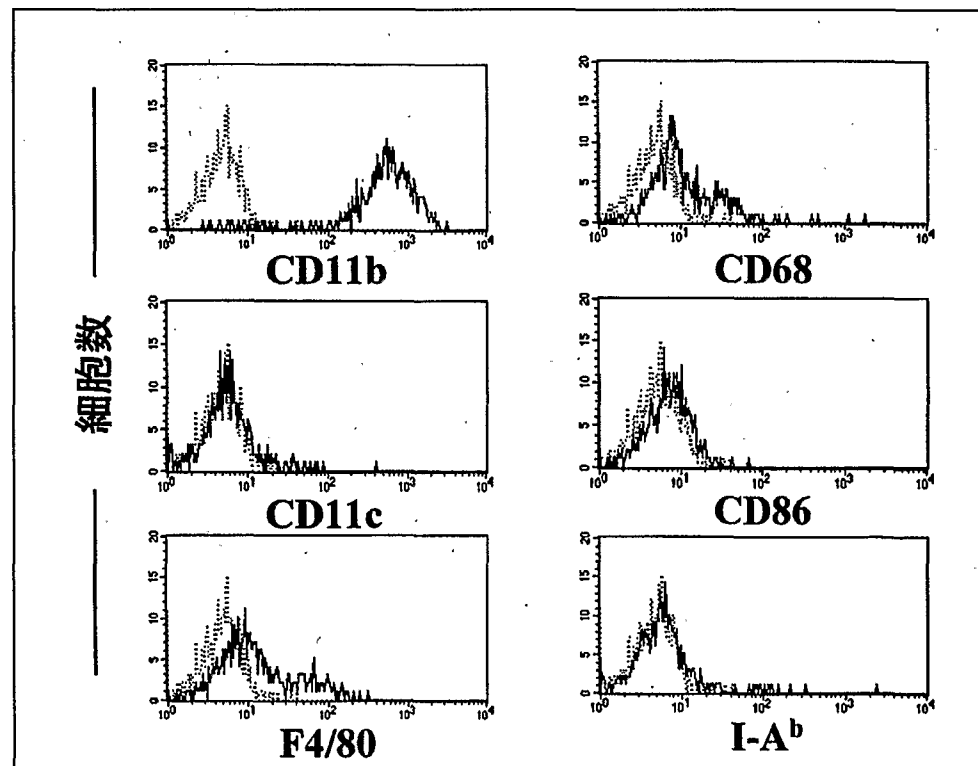


図 4



4/8

図 5

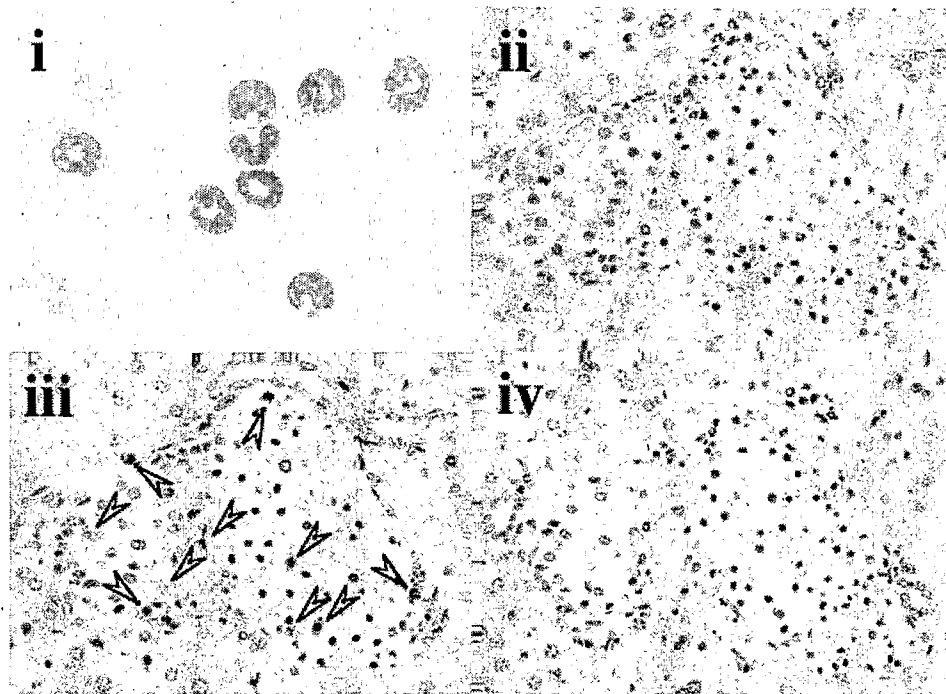
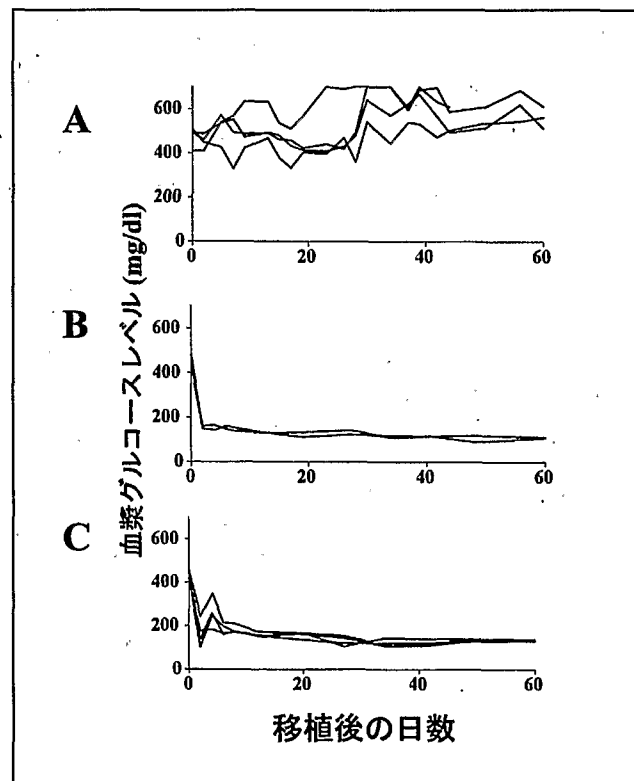
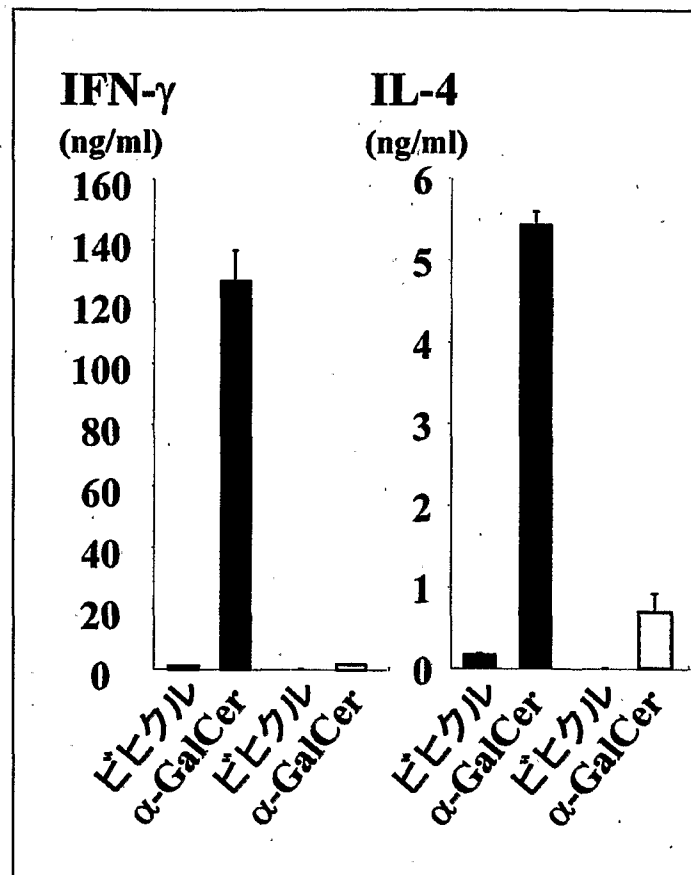


図 6



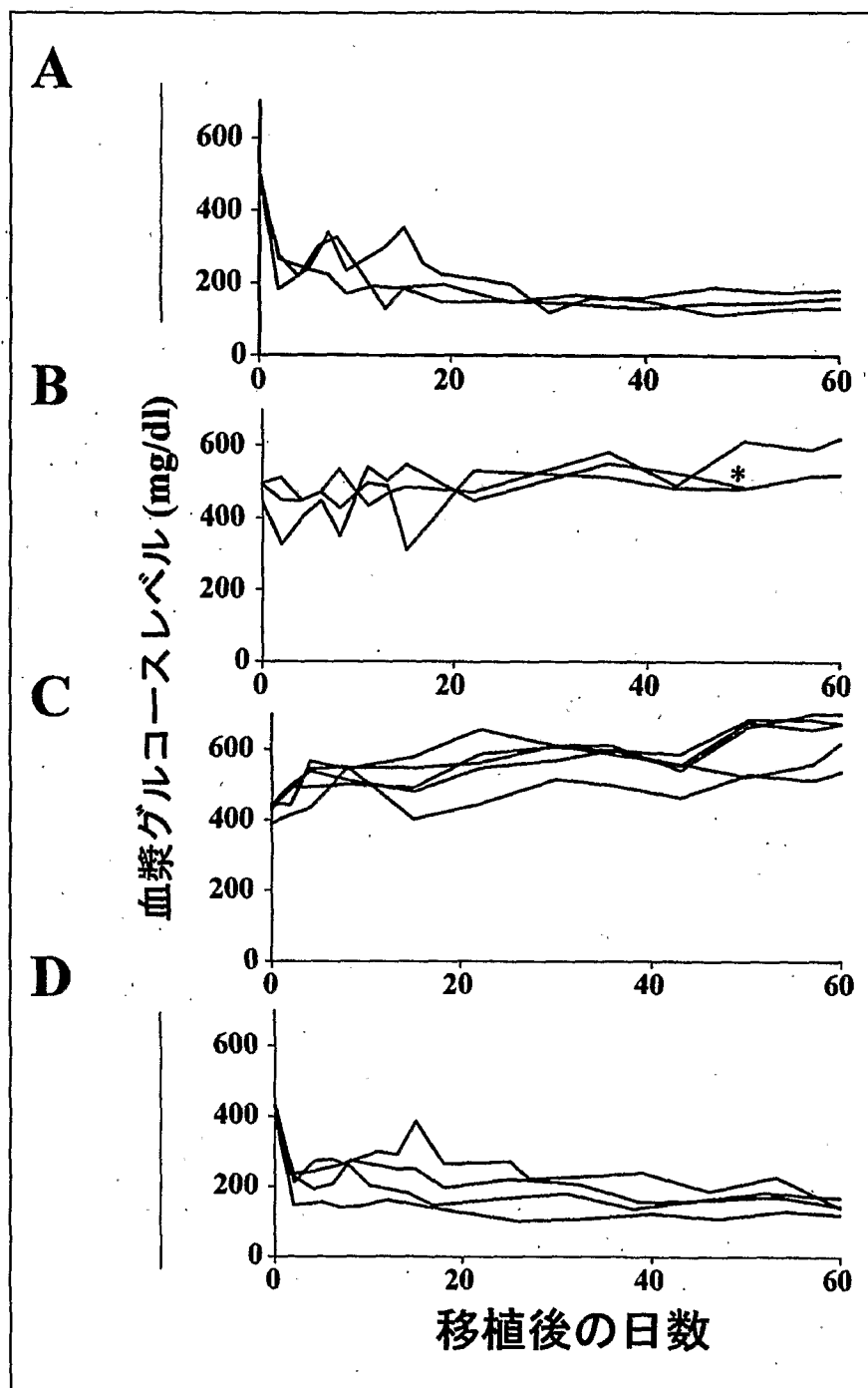
5/8

図 7



6/8

図 8



☒ 9

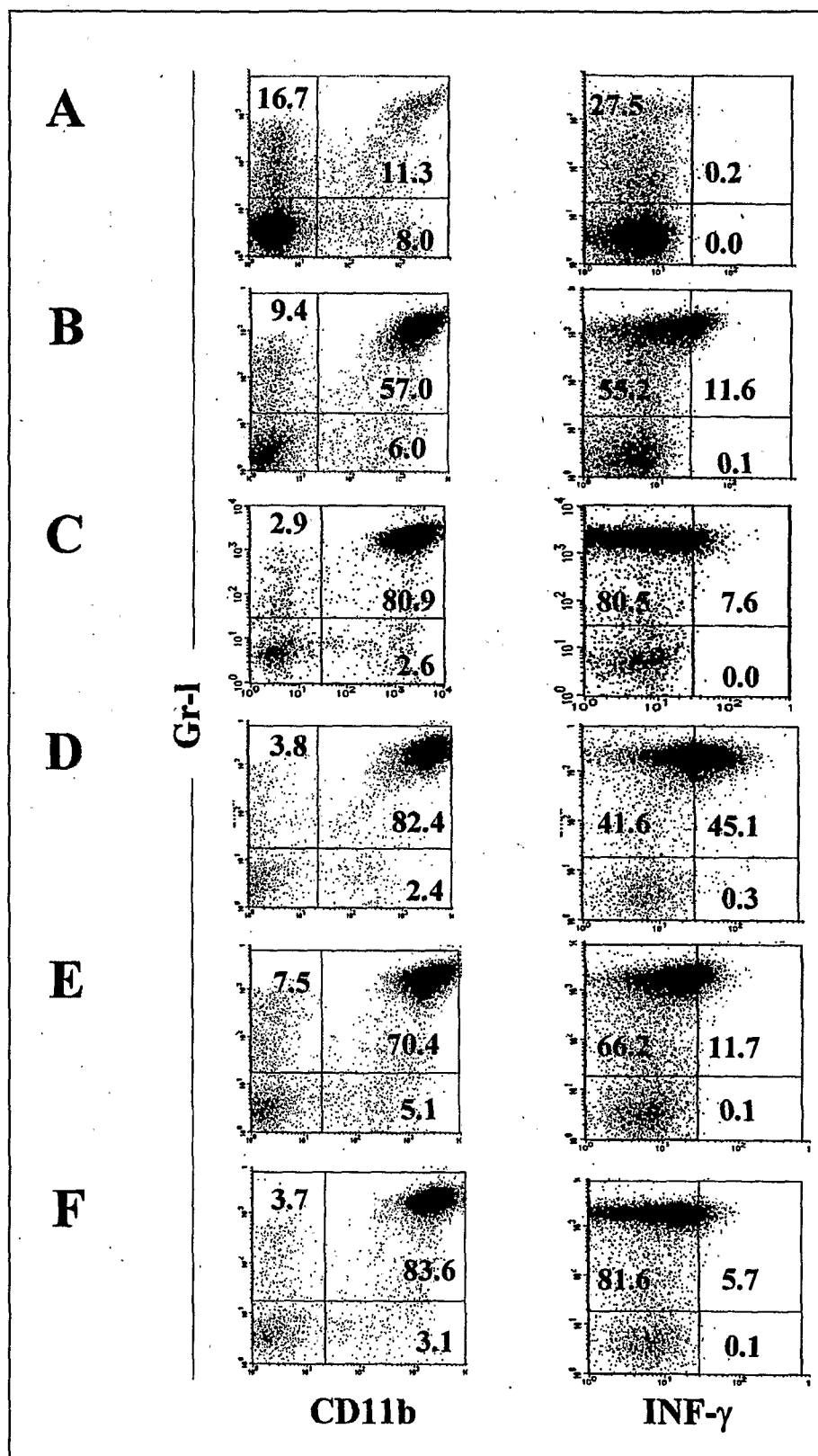
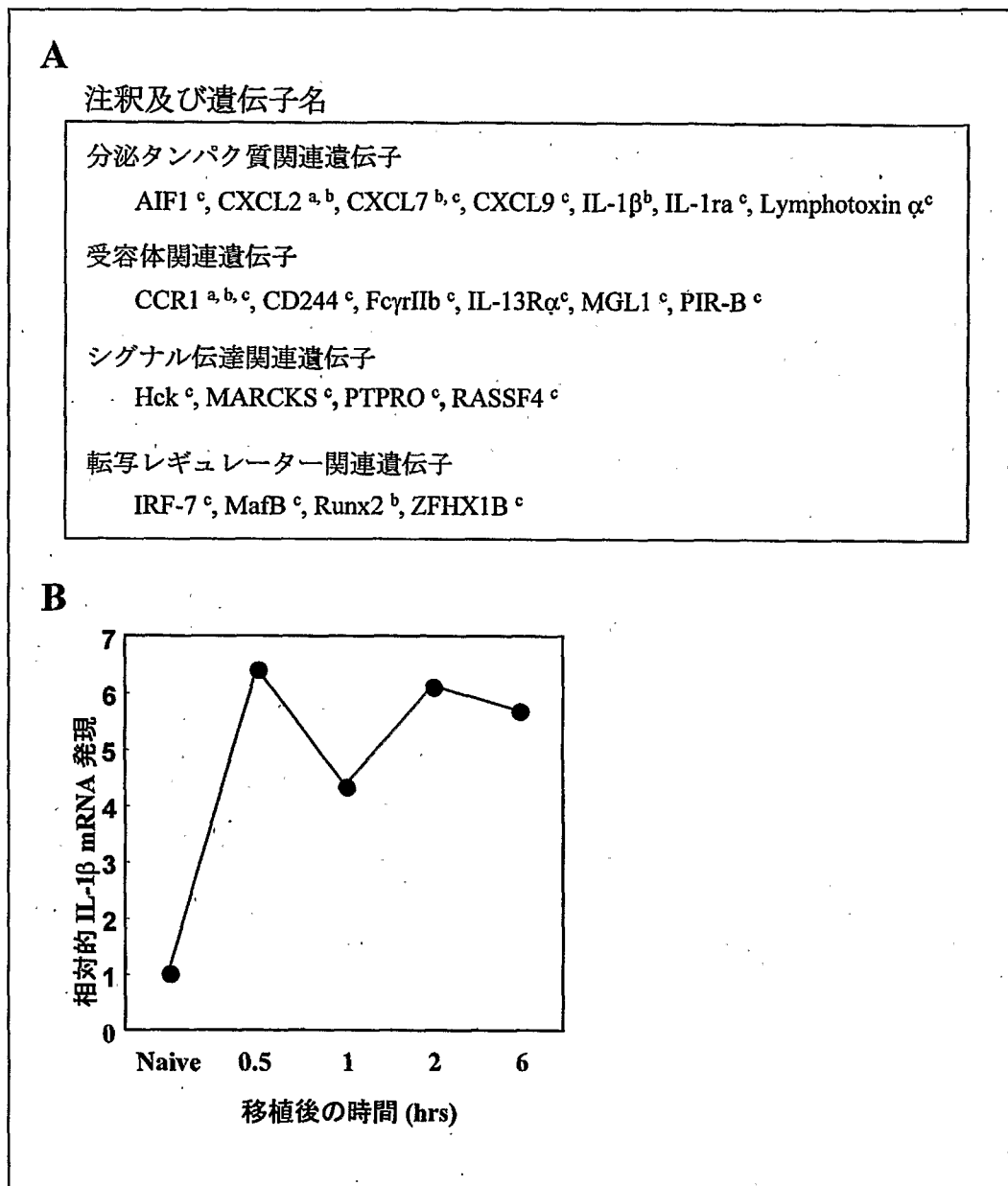


図 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7032(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i,
G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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)

A61K45/00, A61K31/7032, A61P37/06, G01N33/15, G01N33/50

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSIS (STN), CA (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2),
JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-284692 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 03 October, 2002 (03.10.02), Examples (Family: none)	1, 2, 5, 10 3, 4, 6
X A	MORECKI, S. <i>et.al.</i> , Effect of KRN7000 on induced graft-vs-host disease, Experimental Hematology, 2004, Vol.32, p.630-637, Figure 1-4, Table 1-4	1, 2, 5, 10 3, 4, 6
X A	HASHIMOTO, D. <i>et.al.</i> , Stimulation of Host NKT Cells by Synthetic Glycolipid Regulates Acute Graft-versus-Host Disease by Inducing Th2 Polarization of Donor T Cells, The Journal of Immunology, 2005, Vol.174, p.551-556, Figure 1-6	1, 2, 5, 10 3, 4, 6

☒ 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
02 November, 2006 (02.11.06)

Date of mailing of the international search report
14 November, 2006 (14.11.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316196

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	HARAGUCHI, K., <i>et.al.</i> , Host-Residual Invariant NK T Cells Attenuate Graft-versus-Host Immunity, The Journal of Immunology, 2005, Vol.175, p.1320-1328	1,2,5,10 3,4,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316196

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to methods for treatment of the human body by therapy. Thus, claim 11 relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6 and 10

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316196

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Claim 11 of the present international application relates to a method for treatment of the human body by therapy, and therefore relates to a subject matter which this international searching authority is not required, under the provisions of and PCT Rule 39.1(iv), to search.

With this situation in mind, it is examined whether claims 1-10, which are subject matters which are required to be searched by this international searching authority, comply with the requirement of unity of invention.

These claims include the following groups of inventions (1) and (2).

(1) A group of inventions relating to an agent for prevention of graft loss comprising an NKT cell ligand as an active ingredient claimed in claims 1-5, a method for screening a compound for use in the prevention/treatment of graft loss, comprising selecting a compound capable of inhibiting the activation of an NKT cell claimed in claim 6 and a method for producing an agent for prevention of graft loss claimed in claim 10.

(2) A group of inventions relating to a method for screening a compound for use in the prevention/treatment of graft loss, comprising reacting a compound with a CD11b⁺ cell claimed in claims 7-9.

The group of inventions (1) relate to the prevention of graft loss by using a compound capable of acting on an NKT cell. The group of inventions (2) relate to the prevention of graft loss by using a compound capable of acting on a CD11b⁺ cell.

The groups of inventions (1) and (2) are different from each other in the species of a cell on which the compound acts, and cannot be considered to share a common special technical feature.

Thus, the inventions of these claims cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, and the number of inventions included in the scope of the claims is two.

<Subject of search>

In claims 1-5 and 10, the active ingredient of the agent for prevention of graft loss is specified by the words "an NKT cell ligand" (claim 1). In claims 6 and 8, the active ingredient is specified by the words "a compound capable of inhibiting the activation of an NKT cell" (claim 6).

The description discloses α -glycosylceramide, isoglobotritrihexosylceramide, OCH, α -galactosylceramide and (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-garactopyranosyl)-2-hexacosanoylamino-1,3,4-oc tadecantriol as specific examples of the active ingredient of the claimed inventions (p.8, line 25 to p.9, line 20). However, there is found no explanation about the specific scopes of the "NKT cell ligand" and the "compound capable of inhibiting the activation of an NKT cell". Even though the common technical knowledge at the time of the filing of the present application is taken into the consideration, it appears that the scopes of the ligand and the compound cannot be specified. Thus, these claims do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6, too.

In the inventions of these claims, those that are disclosed in the meaning within PCT Article 5 and supported in the meaning within PCT Article 6 are limited to embodiments wherein (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-garactopyranosyl)-2-hexacosanoylamino-1,3,4-oc tadecantriol is used.

Such being the case, in the present international application, the search through prior art documents was made only on α -glycosylceramide, isoglobotritrihexosylceramide, OCH, α -galactosylceramide and (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-garactopyranosyl)-2-hexacosanoylamino-1,3,4-oc tadecantriol, with taking the description into the consideration.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7032(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7032, A61P37/06, G01N33/15, G01N33/50

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 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)

WPI, BIOSIS(STN), CA(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

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 請求の範囲の番号
X	JP 2002-284692 A (麒麟麦酒株式会社) 2002. 10. 03	1, 2, 5, 10
A	ファミリー無し、実施例参照	3, 4, 6
X	MORECKI, S. <i>et. al.</i> , Effect of KRN7000 on induced graft-vs-host disease, Experimental Hematology, 2004, Vol.32, p.630-637,	1, 2, 5, 10
A	Figure 1-4 及び Table 1-4 参照	3, 4, 6

☒ 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

0 2 . 1 1 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

1 4 . 1 1 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

齋藤 恵

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 0

4 C

3 7 6 9

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 請求の範囲の番号
X A	HASHIMOTO, D. <i>et.al.</i> , Stimulation of Host NKT Cells by Synthetic Glycolipid Regulates Acute Graft-versus-Host Disease by Inducing Th2 Polarization of Donor T Cells, The Journal of Immunology, 2005, Vol.174, p.551-556, Figure 1-6 参照	1, 2, 5, 10 3, 4, 6
X A	HARAGUCHI, K., <i>et.al.</i> , Host-Residual Invariant NK T Cells Attenuate Graft-versus-Host Immunity, The Journal of Immunology, 2005, Vol.175, p.1320-1328	1, 2, 5, 10 3, 4, 6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1 1 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 1 1 は治療による人体の処置方法に関するものである。したがって、請求の範囲 1 1 は、P C T 規則 3 9 . 1 (i v) の規定により、国際調査を要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
（特別ページを参照）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1 - 6 及び 1 0

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

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

本件国際出願の請求の範囲 1 1 は、治療による人体の処置方法に関するものである。したがって、請求の範囲 1 1 は、P C T 規則 3 9 . 1 (i v) の規定により、国際調査を要しない対象にかかるものである。

上記を踏まえ、国際調査を要する対象となる請求の範囲 1 - 1 0 について、単一性の要件を検討する。

請求の範囲には、次の発明群 (1) 及び (2) が記載されている。

(1) 請求の範囲 1 - 5 に記載された N K T 細胞リガンドを有効成分とする移植片喪失の予防剤、請求の範囲 6 に記載された N K T 細胞の活性化を抑制し得る化合物を選択するという工程を含む移植片喪失の予防・治療をする化合物のスクリーニング方法、及び請求の範囲 1 0 に記載された移植片喪失の予防剤の製造方法の発明。

(2) 請求の範囲 7 - 9 に記載された、化合物が C D 1 1 b ⁺ 細胞に作用する工程を含む、移植片喪失の予防・治療をする化合物のスクリーニング方法の発明。

発明群 (1) は、N K T 細胞に作用する化合物を利用して移植片喪失を防止するものである。一方、発明群 (2) は、C D 1 1 b ⁺ 細胞に作用する化合物を利用して移植片喪失を防止するものである。

上記発明群 (1) 及び (2) は化合物を作用させる細胞種が異なっており、共通する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

したがって、請求の範囲に記載された発明は P C T 規則 1 3 . 1 に規定する一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲に記載された発明の数は 2 である。

＜調査の対象について＞

請求の範囲1－5及び10には、移植片喪失の予防剤の有効成分を「NK T細胞リガンド」（請求の範囲1）という表現にて特定する記載がある。また、請求の範囲6及び8には、移植片喪失の予防・治療用化合物の有効成分を「NK T細胞の活性化を抑制し得る化合物」（請求の範囲6）という表現にて特定する記載がある。

上記請求の範囲に係る発明の有効成分として、明細書第8ページ第25行－第9ページ第20行には、 α －グリコシルセラミド、イソグロボトリヘキソシルセラミド、OCH、 α －ガラクトシルセラミド及び(2S, 3S, 4R)－1－O－(α －D－ガラクトピラノシル)－2－ヘキサコサノイルアミノ－1, 3, 4－オクタデカントリオールが記載されている。しかし、明細書には「NK T細胞リガンド」及び「NK T細胞の活性化を抑制し得る化合物」が具体的にどのようなものまでを包含するかを説明する記載はなく、出願時の技術常識を勘案しても、そのようなものの範囲を特定することができないから、上記請求の範囲の記載はPCT第6条に規定する明確性を欠いている。

また、PCT第5条の意味において開示され、PCT第6条の意味で裏づけられているのは、上記請求の範囲で規定するもののうち、(2S, 3S, 4R)－1－O－(α －D－ガラクトピラノシル)－2－ヘキサコサノイルアミノ－1, 3, 4－オクタデカントリオールである場合のみである。

よって、本国際出願の先行技術文献調査は、請求の範囲1－6及び10については、明細書の記載も考慮して、有効成分が α －グリコシルセラミド、イソグロボトリヘキソシルセラミド、OCH、 α －ガラクトシルセラミド及び(2S, 3S, 4R)－1－O－(α －D－ガラクトピラノシル)－2－ヘキサコサノイルアミノ－1, 3, 4－オクタデカントリオールの場合に限定して行っている。