

(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
2024年1月18日(18.01.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/014137 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 38/16 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) C12N 5/0784 (2010.01)
A61P 9/12 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) C12Q 1/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/019186

(22) 国際出願日: 2023年5月23日(23.05.2023)

(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 2022-113357 2022年7月14日(14.07.2022) JP

(72) 発明者; および

(71) 出願人: 藤原 浩 (FUJIWARA, Hiroshi) [JP/JP];
〒6038158 京都府京都市北区紫野宮西町
3 4 - 6 0 1 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAO, Norihito et al.);
〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番
1 号 大阪梅田ツインタワーズ・ノース
青山特許事務所 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, 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, MU, 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).

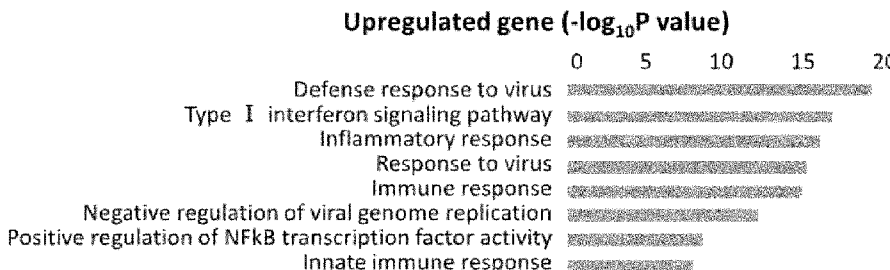
添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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: COMPOSITION FOR INDUCING IMMUNOTOLERANCE

(54) 発明の名称: 免疫寛容を誘導するための組成物

[図1A]



(57) Abstract: The present disclosure includes, inter alia, a composition for inducing immunotolerance, the composition containing laeverin.

(57) 要約: 本開示は、リーベリンを含む免疫寛容を誘導するための組成物などを含む。



WO 2024/014137 A1

明 細 書

発明の名称： 免疫寛容を誘導するための組成物

技術分野

[0001] 本出願は、日本国特許出願第2022-113357号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本開示は、免疫寛容を誘導するための組成物、免疫寛容を誘導する方法、細胞の処理方法、細胞移植治療用組成物、抗ウイルス剤、ウイルス性疾患を治療する方法、樹状細胞誘導用組成物、樹状細胞の調製方法、疾患またはその発症リスクを判定する方法、治療薬の効果を評価する方法などを含む。

背景技術

[0002] リーベリンは、胎盤の絨毛外栄養膜細胞（EVT）で発現されるユニークな糖タンパク質である。EVTは、母体の子宮内膜に浸潤していく細胞であり、母体免疫細胞から攻撃を受けることなく子宮筋層内まで浸潤することができ、免疫学的に寛容となっている。リーベリンはEVTの浸潤に関与することが報告されているが、EVTの免疫寛容成立の機構は明らかとなっていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2005-160473号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Fujiwara H, et. al., Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems. Int J Mol Sci. 2020 Mar 10;21(5):1885. doi: 10.3390/ijms21051885.

非特許文献2：Horie A, et. al., Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. Hum Reprod. 2012 Ma

y;27(5):1267-76. doi: 10.1093/humrep/des068.

非特許文献3: Fujiwara H, et. al., Human extravillous trophoblasts express laeverin, a novel protein that belongs to membrane-bound glutathione S-transferase in metalloproteinases. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 23;313(4):962-8.

非特許文献4: Maruyama M, et. al., Histidine 379 of human laeverin/aminopeptidase Q, a nonconserved residue within the exopeptidase motif, defines its distinctive enzymatic properties. J Biol Chem. 2009 Dec 11;284(50):34692-702. doi: 10.1074/jbc.M109.066712.

非特許文献5: Maruyama M, et. al., Laeverin/aminopeptidase Q, a novel bestatin-sensitive leucine aminopeptidase belonging to the M1 family of aminopeptidases. J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20088-96. doi: 10.1074/jbc.M702650200.

非特許文献6: Imakawa K, et. al., Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. Nature. 1987 Nov 26-Dec 2;330(6146):377-9. doi: 10.1038/330377a0.

発明の概要

- [0005] 本発明者らは、リーベリンが免疫寛容に関与するIDO1およびPD-L1を誘導すること、IFN- β およびこれにより誘導されるISG遺伝子群の発現を誘導することを見出した。さらに、正常妊娠女性と比較して妊娠高血圧症候群などの疾患を有する妊娠女性はリーベリン刺激による末梢血単核細胞におけるISG15発現レベル、IDO1発現レベル、およびIDO1/ISG15比が低いこと、末梢血単核細胞におけるリーベリン陽性T細胞の比率が高いことを見出した。これらの知見に基づき、本発明を完成した。
- [0006] 一態様において、本開示は、リーベリンを含む免疫寛容を誘導するための組成物に関する。
- [0007] 一態様において、本開示は、免疫寛容を誘導する方法であって、それを必要とする対象に有効量のリーベリンを投与することを含む方法に関する。

- [0008] 一態様において、本開示は、細胞の処理方法であって、リーベリンの存在下で免疫細胞またはこれを含む細胞集団を培養することを含む方法に関する。
- [0009] 一態様において、本開示は、リーベリンをコードする導入遺伝子を含むリーベリン発現細胞を含む細胞移植治療用組成物に関する。
- [0010] 一態様において、本開示は、リーベリンを含む抗ウイルス剤に関する。
- [0011] 一態様において、本開示は、ウイルス性疾患を治療する方法であって、それを必要とする対象に有効量のリーベリンを投与することを含む方法に関する。
- [0012] 一態様において、本開示は、リーベリンを含む樹状細胞誘導用組成物に関する。
- [0013] 一態様において、本開示は、樹状細胞の調製方法であって、リーベリンの存在下で単球またはこれを含む細胞集団を培養することを含む方法に関する。
- [0014] 一態様において、本開示は、疾患またはその発症リスクを判定する方法であって、
対象から採取された末梢血単核細胞をリーベリンの存在下で培養すること、および
培養後の末梢血単核細胞におけるISG15発現レベル、IDO1発現レベル、またはIDO1／ISG15比を基準値と比較することを含む方法に関する。
- [0015] 一態様において、本開示は、治療薬の効果を評価する方法であって、
疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血単核細胞をリーベリンの存在下で培養すること、および
培養後の末梢血単核細胞におけるISG15発現レベル、IDO1発現レベル、またはIDO1／ISG15比を基準値と比較することを含む方法に関する。
- [0016] 一態様において、本開示は、疾患またはその発症リスクを判定する方法で

あって、対象から採取された末梢血中のリーベリン陽性T細胞の量または比率を基準値と比較することを含む方法に関する。

[0017] 一態様において、本開示は、治療薬の効果を評価する方法であって、疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血中のリーベリン陽性T細胞の量または比率を基準値と比較することを含む方法に関する。

図面の簡単な説明

[0018] [図1A]図1Aは、末梢血単核細胞(PBMC)においてリコンビナントリーベリン(rLVRN)により誘導された遺伝子の遺伝子オントロジー解析の結果を示す。

[図1B]図1Bは、rLVRNにより刺激したPBMCにおける、インターフェロン誘導遺伝子(OAS2、IFIT1、IFIT3、およびISG15)、IDO1およびPD-L1の発現を示す。統計解析はWelch 2標本t-testを用いて行った。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。

[図1C]図1Cは、ビーズによるrLVRN吸収実験の結果を示す。統計解析はBonferroni補正を用いた多重比較検定で行った。 $**p<0.01$ 。

[図1D]図1Dは、LVRN強制発現Swan71細胞との直接または間接培養によるPBMCにおける遺伝子誘導を示す。統計解析はWelch 2標本t-testを用いて行った。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。

[図1E]図1Eは、酵素不活性rLVRNによるPBMCにおける遺伝子誘導を示す。統計解析はWelch 2標本t-testを用いて行った。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。

[図2A]図2Aは、rLVRNによるPBMCにおけるIFN発現誘導を示す。統計解析はWelch 2標本t-testを用いて行った。 $**p<0.01$ 。

[図2B]図2Bは、rLVRNのPBMCにおける遺伝子誘導作用の効果顕現時間を示す。統計解析はANOVAおよびDunnettの多重比較検定を用いて行った。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 。

[図2C]図2Cは、 $rLVN$ ($1.5 \mu g/mL$) に対応する $IFN-\beta$ の作用濃度を示す。

[図2D]図2Dは、 $IFN-\beta$ による遺伝子誘導に対する $IFN-\beta$ 中和抗体 ($aIFNb$) の効果を示す。統計解析は Bonferroni 補正を用いた多重比較検定で行った。 $**p < 0.01$ 。

[図2E]図2Eは、 $rLVN$ による遺伝子誘導に対する $IFN-\beta$ 中和抗体 ($aIFNb$) および I 型 IFN 受容体中和抗体 ($aIFNa bR$) の効果を示す。統計解析は Bonferroni 補正を用いた多重比較検定で行った。 $**p < 0.01$ 。

[図2F]図2Fは、 $rLVN$ による PBMC における遺伝子誘導に対する $AK1, 2$ 阻害剤 ($Ruxo$) の効果を示す。統計解析は Bonferroni 補正を用いた多重比較検定で行った。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。

[図2G]図2Gは、PBMC における $IFN-\beta$ および $rLVN$ の $ISG15$ および $IDO1$ 誘導作用の比較を示す。統計解析は Welch 2 標本 t -test を用いて行った。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。

[図3A]図3Aは、正常非妊娠 ($non\ preg$)、正常妊娠 ($normal\ preg$)、および妊娠高血圧症候群 (HDP) の女性の PBMC における $rLVN$ 刺激後の $ISG15$ および $IDO1$ の発現を示す。

[図3B]図3Bは、正常妊娠女性の PBMC における $IFN\beta$ または $rLVN$ による刺激後の $ISG15$ および $IDO1$ の発現を示す。統計解析は Welch 2 標本 t -test を用いて行った。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。

[図3C]図3Cは、胎児の成長と $IDO1/ISG15$ 比との関連性を示す。

[図3D]図3Dは、非妊娠、正常妊娠、妊娠高血圧症候群、および免疫疾患合併妊娠の女性における LVN 陽性 T 細胞の比率を示す。

[図4A]図4Aは、 $rLVN$ 刺激後の PBMC のリンパ球分画および単球分画における $ISG15$ タンパク質発現の FACS 解析を示す。

[図4B]図4 Bは、r L V R N刺激後のP B M C中のC D 1 4 陽性単球、C D 4 陽性Tリンパ球、C D 8 陽性Tリンパ球、およびC D 1 9 陽性Bリンパ球におけるI S G 1 5 タンパク質発現の細胞染色を示す。

[図4C]図4 Cは、P B M Cのリンパ球分画および単球分画への標識r L V R Nの結合または取り込みのF A C S解析を示す。

[図4D]図4 Dは、P B M Cの単球分画への標識r L V R Nの結合または取り込みの細胞染色による解析を示す。

[図4E]図4 Eは、r L V R N刺激後のC D 4 陽性Tリンパ球およびC D 8 陽性Tリンパ球における遺伝子誘導を示す。統計解析はW e l c h 2 標本t - t e s t を用いて行った。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 。

[図4F]図4 Fは、C D 1 4 陽性単球細胞におけるr L V R N誘導遺伝子群のマイクロアレイ解析を示す。

[図4G]図4 Gは、r L V R NによるC D 1 4 陽性単球細胞における遺伝子誘導を示す。統計解析はW e l c h 2 標本t - t e s t を用いて行った。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 。

[図4H]図4 Hは、r L V R NによるC D 1 4 陽性単球細胞の樹状細胞(D C)への分化誘導を示す。統計解析はW e l c h 2 標本t - t e s t を用いて行った。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 。

[図4I]図4 Iは、r L V R NによるC D 1 4 陽性単球細胞のC D 1 1 c 陽性／C D 1 2 3 陽性D Cへの分化誘導を示す。

[図5A]図5 Aは、P M A活性化または非活性化T H P - 1 細胞におけるr L V R N刺激後のI D O 1 の発現を示す。統計解析は、多重検定のためのボンフェローニ補正を伴うW e l c h 2 標本t 検定を用いて行った。 $* p < 0.05$ 。

[図5B]図5 Bは、r L V R N刺激後のP M A活性化T H P - 1 細胞におけるI D O 1 タンパク質のウェスタンブロット分析を示す。統計解析は、W e l c h 2 標本t - t e s t を用いて行った。 $* p < 0.05$ 。

[図5C]図5 Cは、P M A活性化T H P - 1 細胞におけるI D O 1 誘導に対す

る r L V R N の作用を示す。統計解析は、0 時間と比較した O n e - w a y A N O V A (分散分析) およびポストホックデネットの多重比較テストを用いて実施した。*** $p < 0.001$ 。

[図5D]図5Dは、r L V R N 刺激後の P M A 活性化 T H P - 1 細胞における I D O 1 タンパク質のウェスタンブロット分析を示す。

[図6]図6は、P M A 活性化 T H P - 1 細胞における r L V R N によるトリプトファンレベルおよびキヌレニン／トリプトファン比の変化を示す。統計解析は、多重検定のためのボンフェローニ補正を伴う W e l c h 2 標本検定を用いて行った。* $p < 0.05$ 。

発明を実施するための形態

[0019] 特に具体的な定めのない限り、本開示で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般に理解されたとおりの意味を有する。以下にいくつかの本開示で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本開示において、一般的な理解に優先する。

[0020] リーベリン (本明細書中、L V R N と記載する) は、胎盤の絨毛外栄養膜細胞 (E V T) の細胞表面抗原として同定された糖タンパク質である。リーベリンは、M1 ペプチダーゼ活性を有する細胞膜結合型タンパク質であり、N 末端側に膜結合部位を有する。リーベリンのアミノ酸配列は、公的機関が提供するデータベースのサイトから入手することができる。

[0021] ヒトリーベリンの代表的アミノ酸配列を配列番号1に、これをコードするヌクレオチド配列を配列番号2示す。配列番号1において、アミノ酸14-36が膜結合部位であり、アミノ酸415-438がZn結合部位である H E X X H (X)₁₈ E モチーフであり、これはグルジンシン (gluzincin) モチーフと呼ばれる酵素活性部位である。リーベリンには分泌型も存在することが知られており、配列番号1において64番目と65番目のアミノ酸の間が切断部位に相当する (非特許文献5)。本明細書において、リーベリンは、膜結合型であっても分泌型であってもよい。リーベリンはペプチダーゼ活性を

欠いていてもよく、例えば酵素活性部位に変異を有していてもよい。

[0022] 一実施形態において、リーベリンは、配列番号1のアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。一実施形態において、リーベリンは、配列番号1のアミノ酸配列において、1~200、1~150、1~100、1~90、1~80、1~70、1~60、1~50、1~40、1~30、1~20、1~10、1~5、1~3、または1~2個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。さらなる実施形態において、リーベリンは、配列番号1のアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。

[0023] 一実施形態において、リーベリンは、配列番号1の65~990番目のアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。一実施形態において、リーベリンは、配列番号1の65~990番目のアミノ酸配列において、1~200、1~150、1~100、1~90、1~80、1~70、1~60、1~50、1~40、1~30、1~20、1~10、1~5、1~3、または1~2個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。さらなる実施形態において、リーベリンは、配列番号1の65~990番目のアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。

[0024] 一実施形態において、リーベリンは、配列番号2のヌクレオチド配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。一実施形態において、リーベリンは、配列番号2のヌクレオ

チド配列において、1～600、1～500、1～400、1～300、1～200、1～100、1～90、1～80、1～70、1～60、1～50、1～40、1～30、1～20、1～10、1～5、1～3、または1～2個のヌクレオチドが改変されたヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。さらなる実施形態において、リーベリンは、配列番号2のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。

[0025] 一実施形態において、リーベリンは、配列番号2の193～2970番目のヌクレオチド配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。一実施形態において、リーベリンは、配列番号2の193～2970番目のヌクレオチド配列において、1～600、1～500、1～400、1～300、1～200、1～100、1～90、1～80、1～70、1～60、1～50、1～40、1～30、1～20、1～10、1～5、1～3、または1～2個のヌクレオチドが改変されたヌクレオチド配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。さらなる実施形態において、リーベリンは、配列番号2の193～2970番目のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである。

[0026] 一実施形態において、リーベリンのアミノ酸長は、700～1200、800～1100、または900～1000アミノ酸である。

[0027] 本明細書において、アミノ酸またはヌクレオチドの改変には、アミノ酸またはヌクレオチドの欠失、置換、挿入、および付加、並びにこれらの組み合わせが含まれる。アミノ酸またはヌクレオチドの改変は、いずれの位置で行われてもよい。

[0028] 本明細書において、配列同一性とは、比較対象の配列の全領域にわたって

最適な状態に（一致が最大となる状態に）アラインメントされた2つの配列間で一致するアミノ酸またはヌクレオチドの割合を意味する。2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加または欠失（例えばギャップ）が存在してもよい。配列同一性は、公共のデータベース（例えば、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)）で提供されるFASTA、BLAST、CLUSTAL W等のプログラムを用いて算出することができる。あるいは、市販の配列解析ソフトウェア（例えば、Vector NTI（登録商標）ソフトウェア、GENETYX（登録商標）ver. 12）を用いて求めることもできる。

[0029] 一実施形態において、リーベリンは、配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号1の65～990番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドである。配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号1の65～990番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に同等であるとは、前記ポリペプチドと同質の活性を有することを意味する。一実施形態において、配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号1の65～990番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドは、免疫寛容誘導活性、抗ウイルス活性、および樹状細胞誘導活性から選択される1以上の活性を有する。

[0030] リーベリンは、遺伝子組み換えや化学合成など、ポリペプチドの製造に用いられる常套的な方法により製造することができる。例えば、遺伝子組み換えによる場合、リーベリンをコードする配列を含むベクターを宿主細胞に導入し、リーベリンを発現する形質転換体を得ることにより、リーベリンを製造することができる。ベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクターなどが挙げられる。ウイルスベクターには、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、バキュロウイルスベクターなどが含まれる。宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、および植物細胞な

どが挙げられる。ベクターは、通常、リーベリンをコードする配列に加え、その発現を調節するプロモーターなどの調節配列を含む。調節配列は、宿主細胞での発現に適するように選択される。ベクターはさらに、形質転換体の選択のための選択マーカーをコードする配列、ヒスチジン（His）タグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）タグなどのタグをコードする配列など、他の要素を含んでもよい。ベクターは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法などにより、宿主細胞に導入することができる。得られた形質転換体またはその培養液からリーベリンを取得することができる。リーベリンは、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなど、ポリペプチドの単離精製に一般的に用いられる方法により単離精製することができる。

[0031] リーベリンは、タグその他の配列を付加した融合ポリペプチドであってもよく、ビーズなどの担体に結合されていてもよい。また、リーベリンは、人工的な脂質二重膜に組み込まれていてもよい (<https://bio-med.jp/projects/hanayama/>; Drug Delivery System 35-1, p35-46, 2020)。

[0032] リーベリンは、末梢血単核細胞において免疫寛容に関与するIDO1 (Indoleamine 2,3-dioxygenase 1) およびPD-L1 (Programmed death-ligand 1) を誘導すること、また、胚または胎児に対する免疫寛容が必要とされる妊娠対象において非妊娠対象と比較して強くIDO1を誘導することが示された。IDO1は、細胞の生存に必須のアミノ酸であるトリプトファンを代謝し、免疫抑制的な作用をもつ代謝産物であるキヌレニン等に変換する。したがって免疫細胞においてIDO1発現が増加すると免疫抑制が誘導される。また、活性化T細胞上に発現するPD-1ががん細胞や抗原提示細胞に発現するPD-L1やPD-L2と結合すると、T細胞活性化は抑制され、がん細胞の免疫逃避を引き起こす (Song X, Si Q, Qi R, Liu W, Li M, Guo M, Wei L, Yao Z. Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1: A Promising Therapeutic Target in Malignant Tumor. Front Immunol. 2021 Dec 23;12:800630. doi

: 10.3389/fimmu.2021.800630, PMID: 35003126; PMCID: PMC8733291; Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. PD-L1. J Clin Pathol. 2018 Mar;71(3):189-194. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204853. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29097600)。よって、IDO1およびPD-Lを誘導することができるリーベリンは、免疫寛容の誘導に用いることができる。

[0033] 本明細書において、免疫寛容とは、特定の抗原に対する特異的免疫応答が起こらない、または低下した状態を意味する。一実施形態において、リーベリンは、対象における免疫寛容の誘導に用いられる。別の実施形態において、リーベリンは、細胞における免疫寛容の誘導に用いられる。例えば、リーベリンは、免疫寛容の誘導が必要とされる対象の処置または免疫寛容の誘導が必要とされる細胞の処理に用いることができる。

[0034] 一実施形態において、リーベリンは、自己免疫疾患患者に投与される。自己免疫疾患としては、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ、シェーグレン症候群、橋本病、1型糖尿病、自己免疫性筋炎、全身性強皮症、糸球体腎炎、バセドウ病などが挙げられる。一態様において、本開示は、リーベリンを含む自己免疫疾患を治療するための組成物を提供する。

[0035] 一実施形態において、リーベリンは、臓器移植のレシピエントに投与される。臓器移植ではレシピエントの免疫機能による移植臓器の拒絶を抑制するために免疫抑制剤が使用されるが、生体の恒常性維持に必要な免疫機能も抑制されることから、感染症のリスクが高まったり、癌免疫が抑制されることでがん発症のリスクが高まったりすることが懸念される。臓器移植のレシピエントにおいて免疫寛容を誘導することで、免疫抑制剤からの離脱が期待できる。

[0036] 一実施形態において、リーベリンは、体外受精後の胚移植に先立ち、子宮内に投与される。リーベリンは胎児による免疫寛容の誘導に関与する分子であり、リーベリンを投与することで子宮内膜の免疫環境を着床に適した状態とすることができ、胚移植の着床率を改善することができる。

[0037] 一実施形態において、リーベリンは、免疫細胞またはこれを含む細胞集団

の処理に用いられる。免疫細胞としては、T細胞（CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞を含む）、B細胞、NK細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞またはこれらの組み合わせが挙げられるが、好ましくは単球である。免疫細胞を含む細胞集団としては、末梢血単核細胞が挙げられる。末梢血単核細胞は末梢血から常法により単離することができ、例えば、密度勾配遠心分離により単離することができる。免疫細胞またはこれを含む細胞集団は、免疫寛容の誘導が必要とされる対象から採取された免疫細胞またはこれを含む細胞集団でありうる。例えば、免疫寛容の誘導が必要とされる対象から免疫細胞またはこれを含む細胞集団を採取し、リーベリンで処理し、前記対象に戻すことができる。免疫寛容の誘導が必要とされる対象としては、自己免疫疾患患者および臓器移植のレシピエントが挙げられる。体外受精に関し、体外に取り出した自己免疫細胞を胚シグナルであるヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）で賦活して子宮内に投与した後に胚移植をする自己免疫移植療法において着床率が改善することが報告され、多くの追試により治療効果が認められている（Yoshioka et al., Hum Reproduction, vol. 21, No. 12, p p. 3290-3294, 2006 ; ）。リーベリンは、この自己免疫移植療法においてHCGに代わる胚シグナルとして利用することができる。それゆえ、免疫寛容の誘導が必要とされる対象には、胚移植のレシピエントも含まれる。

[0038] リーベリンによる細胞または細胞集団の処理は、リーベリンの存在下で当該細胞または細胞集団を培養することにより行うことができる。培地は、動物細胞の培養に通常用いる培地を用いることができ、例えば、RPMI 1640、MEM、IMDM、DMEMなどを用いることができる。リーベリンは、例えば最終濃度1 ng/mL～10 μg/mL、5 ng/mL～5 μg/mL、10 ng/mL～1 μg/mL、20 ng/mL～500 ng/mL、または100 ng/mL～500 ng/mL、例えば1.5 μg/mLで培地に添加されうる。培地は、リーベリンに加え、血清、血清代替物、抗生物質、アミノ酸、2-メルカプトエタノール、成長因子などの物質を含んでもよい。培地は無血清培地であってもよい。培養期間は、限定はされないが

、例えば、1～30日、1～20日、1～14日、1～10日、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10日である。

[0039] 膜結合型リーベリンも有効であることから、免疫細胞またはこれを含む細胞集団をリーベリン発現細胞とともに培養してもよい。本明細書におけるリーベリン処理細胞なる用語には、リーベリン発現細胞と共培養した細胞も包含される。リーベリン発現細胞は、リーベリンをコードする配列を導入した、すなわちリーベリンをコードする導入遺伝子を含む細胞でありうる。かかるリーベリン発現細胞は、本明細書に記載のリーベリンコード配列を含むベクターを細胞に導入することにより、製造することができる。前記ベクターを導入する細胞は当業者が適宜選択することができ、例えばSwan71細胞を用いることができる。

[0040] リーベリン発現細胞とPBMCを共培養するとPBMCにおいてIDO1の発現が亢進することが示され、リーベリン発現細胞は免疫を回避しうることが示された。それゆえ、細胞移植治療において移植する細胞にリーベリンコード配列を導入し発現させることにより、宿主による拒絶に対する回避能を高めることができる。よって、リーベリンをコードする導入遺伝子を含むリーベリン発現細胞は、細胞移植治療に用いることができる。導入遺伝子は、本明細書に記載のいずれかのリーベリンをコードしうる。リーベリンコード配列を導入する細胞としては、iPS細胞またはiPS細胞から誘導された移植用細胞が挙げられる。他家iPS細胞を治療に用いる際に特に有用である。

[0041] リーベリンは、末梢血単核細胞において、IFN- β およびこれにより誘導されるISG遺伝子群の発現を誘導すること、APOBEC3ファミリーを誘導することが示された。インターフェロンはウイルス感染に際して生体内で免疫細胞から産生されるサイトカインであり、抗ウイルス活性を有する。IFN- β は、B型肝炎やC型肝炎などのウイルス性肝炎の治療薬として臨床応用され、広く用いられている。また、APOBEC3ファミリーはシチジンデアミナーゼであり、ウイルス複製を阻害し抗ウイルス活性を有する

ことが知られている。よって、リーベリンは、抗ウイルス剤として用いることができる。対象となるウイルスとしては、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）が挙げられる。対象となるウイルス性疾患としては、B型肝炎、C型肝炎、HIV感染症、HPV感染症が挙げられる。また、移植用細胞にリーベリンを発現させると細胞自体に免疫細胞に対するIFN- β の分泌促進作用が備わることから、リーベリンを発現させることにより感染症などに強い移植細胞を作成することができる。

[0042] リーベリンは、単球から樹状細胞を誘導することが示された。それゆえ、リーベリンは樹状細胞の調製に用いることができる。樹状細胞は、単球またはこれを含む細胞集団をリーベリンの存在下で培養することにより調製することができる。単球はCD14の発現により特定することができ、単球を含む細胞集団から単離することもできる。単球を含む細胞集団としては末梢血単核細胞が挙げられる。末梢血単核細胞は、調製された樹状細胞を投与される対象から採取された末梢血単核細胞でありうる。培地は、動物細胞の培養に通常用いる培地を用いることができ、例えば、RPMI 1640、MEM、IMDM、DMEMなどを用いることができる。リーベリンは、例えば最終濃度1 ng/mL~10 μ g/mL、5 ng/mL~5 μ g/mL、10 ng/mL~1 μ g/mL、20 ng/mL~500 ng/mL、または100 ng/mL~500 ng/mL、例えば1.5 μ g/mLで培地に添加されうる。培地は、リーベリンに加え、血清、血清代替物、抗生物質、アミノ酸、 β -メルカプトエタノール、成長因子などの物質を含んでいてもよい。培地は無血清培地であってもよい。培養期間は、限定はされないが、例えば、1~30日、1~20日、1~14日、1~10日、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10日である。樹状細胞が得られたことは、細胞表面マーカーを検出することで確認することができる。樹状細胞マーカーとしては、CD11b、CD11c、CD123、CD38、CD80、およびHLA-DRが挙げられ、これらから選択される1または複数のマー

カーを検出することにより樹状細胞の誘導を確認することができる。一実施形態において、樹状細胞は、CD11c/CD123ダブル陽性細胞である。このように、一態様において、本開示は、樹状細胞の調製方法であって、単球を含む細胞集団をリーベリンの存在下で培養することを含む方法を提供する。樹状細胞は、がん、自己免疫疾患、アレルギー疾患などの疾患に対する樹状細胞療法に用いることができる。

[0043] 組成物は、リーベリン、リーベリン処理細胞、またはリーベリン発現細胞を有効成分として含む。組成物は、リーベリンまたは細胞に加え、1以上の医薬上許容される担体を含んでもよい。本開示において、医薬上許容される担体とは、有効成分の効果を損なわず、かつ対象における安全性が高い、有効成分以外の任意の物質を意味する。医薬上許容される担体には、賦形剤、安定剤、緩衝剤、保存剤、懸濁剤、等張化剤などが含まれる。組成物が細胞を含む場合、医薬上許容される担体は、例えば、水、培地、生理食塩水、ブドウ糖などを含む等張液、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）でありうる。組成物は、リーベリンまたは細胞の効果を損なわない範囲で他の有効成分を含んでもよい。

[0044] 組成物は、固体形態または液体形態でありうる。剤型としては、カプセル剤、錠剤、粉剤、液剤、懸濁剤、注射剤、軟膏、クリーム剤、坐剤が挙げられるが、これらに限定されない。組成物は、公知の方法に従って調製することができる。一実施形態において組成物は、注射剤である。注射剤としては、水性注射剤、非水性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、使用時に溶解または懸濁する固形注射剤が挙げられる。

[0045] リーベリン、リーベリン処理細胞、若しくはリーベリン発現細胞またはこれを含む組成物は、公知の投与方法により対象に投与することができる。投与方法としては、経口投与および非経口投与が挙げられ、非経口投与としては、例えば、静脈内投与、子宮内投与、筋肉内投与、経皮投与、および皮下投与が挙げられる。

[0046] 対象は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物でありうる。非ヒト哺乳動物としては

、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどのげっ歯類；チンパンジーなどの非ヒト霊長類；牛、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄目；ウマなどの奇蹄目；ウサギ、イヌ、ネコなどの愛玩動物が挙げられる。一実施形態において、対象は、ヒトまたは非ヒト霊長類（例えば、チンパンジー、サル、ゴリラ、テナガザルおよびオラウータン）である。さらなる実施形態において、対象は、ヒトである。

[0047] リーベリンまたは細胞の投与量は、対象の年齢、体重、および状態、処置の目的などの因子に応じて適否決定される。リーベリンを対象に投与する場合、リーベリンの投与量は、例えば、成人1日あたり1mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、または50mg以上、10000mg、5000g、4500mg、4000mg、3500mg、3000mg、2500mg、2000mg、1500mg、または1000mg以下でありうる。一実施形態において、リーベリンの投与量は、15mg～4500mgである。リーベリン処理細胞またはリーベリン発現細胞を対象に投与する場合、投与細胞数は、例えば、成人1日あたり1～ 10^{10} 細胞、 10^1 ～ 10^9 細胞、 10^2 ～ 10^8 細胞、または 10^3 ～ 10^7 細胞でありうる。1日あたりの投与量は、1回で投与しても複数回に分けて投与してもよい。投与期間は、1日または数日（例えば2、3、4、5または6日）、1週間または数週間（例えば2、3、4、5または6週間）、1ヶ月または数ヶ月（例えば2、3、4、5または6ヶ月）、またはそれ以上でありうるが、これらに限定されない。投与は、連日であっても、数日（例えば2、3、4、5または6日）、1週間または数週間（例えば2、3、4、5または6週間）、1ヶ月または数ヶ月（例えば2、3、4、5または6ヶ月）に1回であってもよい。

[0048] 妊娠高血圧症候群の女性は正常妊娠女性と比較して末梢血単核細胞におけるリーベリン刺激によるISG15およびIDO1の発現並びにISG15とIDO1の発現レベルの比（IDO1／ISG15比という）が低いことが示され、これらと疾患との関連が示唆された。また、妊娠高血圧症候群や

全身性エリテマトーデス（SLE）合併妊娠の女性ではリーベリン陽性T細胞の比率が高いことが示され、リーベリン陽性T細胞と疾患との関連が示唆された。よって、対象の末梢血単核細胞におけるISG15発現レベル、IDO1発現レベル、もしくはIDO1／ISG15比、またはリーベリン陽性T細胞の量または比率に基づき、疾患またはその発症リスクの判定、または治療薬の治療効果の評価を行うことができる。疾患としては、妊娠高血圧症候群、およびSLEなどの免疫関連疾患が挙げられる。

[0049] 一実施形態において、本開示の方法は、対象から採取された末梢血単核細胞をリーベリン存在下で培養し、その後、末梢血単核細胞におけるISG15発現レベル、IDO1発現レベル、またはIDO1／ISG15比を、対応する基準値と比較する。培地は、動物細胞の培養に通常用いる培地を用いることができ、例えば、RPMI1640、MEM、IMDM、DMEMなどを用いることができる。リーベリンは、例えば最終濃度1 ng/mL～10 μg/mL、5 ng/mL～5 μg/mL、10 ng/mL～1 μg/mL、20 ng/mL～500 ng/mL、または100 ng/mL～500 ng/mL、例えば1.5 μg/mLで培地に添加されうる。培地は、リーベリンに加え、血清、血清代替物、抗生物質、アミノ酸、2-メルカプトエタノール、成長因子などの物質を含んでいてもよい。培地は無血清培地であってもよい。培養時間は、限定はされないが、例えば、4～24時間、6～24時間、8～24時間、10～24時間、または12～24時間である。対象からの末梢血単核細胞の採取およびISG15およびIDO1の発現レベルの測定は、一般的な方法で行うことができる。例えば、ISG15およびIDO1の発現レベルは、PCR（polymerase chain reaction）やマイクロアレイなどにより測定することができる。本開示の方法は、ISG15発現レベル、IDO1発現レベル、およびIDO1／ISG15比から選択される2以上を、それぞれ対応する基準値と比較することを含んでもよい。

[0050] 一実施形態において、本開示の方法は、対象から採取された末梢血中のリーベリン陽性T細胞の量または比率を基準値と比較することを含む。末梢血

中のリーベリン陽性T細胞の比率とは、末梢血に含まれる末梢血単核細胞におけるリーベリン陽性T細胞の比率を意味する。対象からの末梢血および末梢血単核細胞の採取、およびリーベリン陽性T細胞の測定は、一般的な方法で行うことができる。例えば、末梢血中のリーベリン陽性T細胞は、末梢血単核細胞に対する抗CD3抗体および抗リーベリン抗体を用いたフローサイトメトリーにより測定することができる。

[0051] 基準値は、疾患を有することが判明している対象群と疾患を有さない対象群（例えば健常人群）とを統計学的有意差をもって分けることができる、ISG15発現レベル、IDO1発現レベル、IDO1／ISG15比、またはリーベリン陽性T細胞の量または比率の値でありうる。統計的有意差は、カイ二乗検定、一般化Wilcoxon検定、Wilcoxonの符号順位検定、Mann-Whitney検定、ログランク検定、Cox比例ハザードなどの検定方法により解析することができる。基準値は、感度および／または特異度に基づいて設定してもよい。感度とは真の陽性率を意味し、特異度とは真の陰性率を意味する。例えば、疾患を有することが判明している対象群で高い陽性率を示し、疾患を有さない対象群で高い陰性率を示す値を基準値として設定してもよい。

[0052] 一実施形態において、対象から採取され、リーベリン存在下で培養された末梢血単核細胞におけるISG15発現レベル、IDO1発現レベル、またはIDO1／ISG15比が基準値より低い場合、または対象から採取された末梢血中のリーベリン陽性T細胞の量または比率が基準値より高い場合、その対象は疾患を有する、または疾患の発症リスクがあると判定される。

[0053] 疾患に対する治療薬の効果を評価する場合、疾患を有する対象から治療薬投与後に末梢血または末梢血単核細胞を採取する。一実施形態において、疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血単核細胞におけるISG15発現レベル、IDO1発現レベル、またはIDO1／ISG15比が基準値より高い場合、または疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血中のリーベリン陽性T細胞の量または比率が基準値より低い場合、当該治療薬が有効であると判定される。この場合、基準値は、上記のとおり

設定した基準値の他、同じ対象から治療薬投与前に採取された末梢血単核細胞における I S G 1 5 発現レベル、I D O 1 発現レベル、または I D O 1 / I S G 1 5 比、または同じ対象から治療薬投与前に採取された末梢血中のリーベリン陽性 T 細胞の量または比率であってもよい。

[0054] 本開示の例示的实施形態を以下に記載する。

[1]

リーベリンを含む、免疫寛容を誘導するための組成物。

[2]

自己免疫疾患患者に投与される、前記 1 に記載の組成物。

[3]

臓器移植のレシピエントに投与される、前記 1 に記載の組成物。

[4]

体外受精後の胚移植に先立ち子宮内に投与される、前記 1 に記載の組成物。

[5]

体外での免疫細胞またはこれを含む細胞集団の処理に用いられる、前記 1 に記載の組成物。

[6]

免疫細胞またはこれを含む細胞集団が、自己免疫疾患患者から採取された細胞である、前記 5 に記載の組成物。

[7]

免疫細胞またはこれを含む細胞集団が、臓器移植のレシピエントから採取された細胞である、前記 5 に記載の組成物。

[8]

免疫細胞またはこれを含む細胞集団が、胚移植のレシピエントから採取された細胞である、前記 5 に記載の組成物。

[9]

リーベリンが、配列番号 1 のアミノ酸配列と 80%以上、85%以上、9

0%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、前記1～8のいずれかに記載の組成物。

[10]

リーベリンが、配列番号1のアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、前記9に記載の組成物。

[11]

リーベリンが、配列番号1の65～990番目のアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、前記1～8のいずれかに記載の組成物。

[12]

リーベリンが、配列番号1の65～990番目のアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、前記11に記載の組成物。

[0055] [13]

免疫寛容を誘導する方法であって、それを必要とする対象に有効量のリーベリンを投与することを含む方法。

[14]

対象が、自己免疫疾患患者である、前記13に記載の方法。

[15]

対象が、臓器移植のレシピエントである、前記13に記載の方法。

[16]

対象が、胚移植のレシピエントである、前記13に記載の方法。

[0056] [17]

細胞の処理方法であって、リーベリンの存在下で免疫細胞またはこれを含む細胞集団を培養することを含む方法。

[1 8]

細胞集団が末梢血単核細胞である、前記 1 7 に記載の方法。

[0057] [1 9]

リーベリンをコードする導入遺伝子を含むリーベリン発現細胞を含む、細胞移植治療用組成物。

[0058] [2 0]

リーベリンを含む、抗ウイルス剤。

[0059] [2 1]

ウイルス性疾患を治療する方法であって、それを必要とする対象に有効量のリーベリンを投与することを含む方法。

[0060] [2 2]

リーベリンを含む、樹状細胞誘導用組成物。

[0061] [2 3]

樹状細胞の調製方法であって、リーベリンの存在下で単球またはこれを含む細胞集団を培養することを含む方法。

[2 4]

細胞集団が末梢血単核細胞である、前記 2 3 に記載の方法。

[0062] [2 5]

疾患またその発症リスクを判定する方法であって、
対象から採取された末梢血単核細胞をリーベリンの存在下で培養すること、および
培養後の末梢血単核細胞における I S G 1 5 発現レベル、I D O 1 発現レベル、または I D O 1 / I S G 1 5 比を基準値と比較すること
を含む、方法。

[2 6]

治療薬の効果を評価する方法であって、
疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血単核細胞をリーベリンの存在下で培養すること、および

培養後の末梢血単核細胞における I S G 1 5 発現レベル、I D O 1 発現レベル、または I D O 1 / I S G 1 5 比を基準値と比較することを含む、方法。

[2 7]

疾患が、妊娠高血圧症候群である、前記 2 5 または 2 6 に記載の方法。

[0063] [2 8]

疾患またはその発症リスクを判定する方法であって、対象から採取された末梢血中のリーベリン陽性 T 細胞の量または比率を基準値と比較することを含む、方法。

[2 9]

治療薬の効果を評価する方法であって、疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血中のリーベリン陽性 T 細胞の量または比率を基準値と比較することを含む、方法。

[3 0]

疾患が、妊娠高血圧症候群である、前記 2 8 または 2 9 に記載の方法。

[0064] 以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明は如何なる意味においてもこれら実施例に限定されるものではない。

実施例

[0065] I. 方法

1. リコンビナントリーベリン (r L V R N) の作製

C 末端にヘキサヒスチジン (H i s 6) タグを持つ完全長ヒトリーベリン (L V R N) (1 - 9 9 0) をコードする c D N A を P C R により作製した。増幅された c D N A はバキュロウイルストランスファーベクター p F a s t B a c 1 ベクター (I n v i t r o g e n) の E c o R I - X h o I 部位にクローニングした。次に、作製したトランスファーベクターをバキュロウイルスゲノム (バクミド) およびトランスポジションヘルパーベクター (I n v i t r o g e n) を保有する大腸菌 D H 1 0 B a c 細胞に導入し、L V R N c D N A を含むリコンビナントバクミド D N A を作製した。続いて、S

f 9 昆虫細胞に Cellfectin (登録商標) Reagent (Invitrogen) を用いてバクミド DNA を導入し、72 時間培養後、組換えバキュロウイルスを回収した。rLV RN の発現は、組換えバキュロウイルスを感染させた Sf 9 細胞 ($2.0 \times 10^6 / \text{ml}$) (感染倍率 = 約 1 - 3) を、8.0 ppm の O_2 を供給した 3 リットルの SFM-900 III 培地 (Invitrogen) で 27°C にて 72 時間培養して行った (Cellmaster-1700, WAKENYAKU CO., LTD., Kyoto, Japan)。可溶型の rLV RN を含む培地を遠心分離により回収し、50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム ($2.5 \times 10 \text{ cm}$, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) にアプライし、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で溶出した。溶出液を Ni^{2+} を予め担持したキレートセファロースカラム ($1.0 \times 10 \text{ cm}$) (GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ) にアプライし、200 mM イミダゾールで溶出した。C 末端に His 6 タグを持つ分泌型 LV RN (LV RN (65-990) + His 6) が回収された。

[0066] 2. 酵素不活性 rLV RN の作製

酵素不活性 rLV RN (E416Q rLV RN) は部位特異的変異導入により作製した。E416Q rLV RN をコードする cDNA は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて作製した。可溶型タンパク質として発現させるため、酵素の細胞質領域と膜貫通領域 (Met 1-Gln 64) のコード配列をヒトリプシン II のシグナルペプチド (MNL L L I L T F V A A V A A) (配列番号 3) に置換し、C 末端には His 6 タグを付加した。増幅された cDNA は、バキュロウイルストランスファクター pFastbac-1 (Invitrogen) の Bss H I I I -X h o I サイトにクローニングした。E416Q rLV RN の cDNA を含む組換えバクミド DNA を生成するために、作製したトラ

ンスファーベクターを、バキュロウイルスゲノム（バクミド）およびトランスポジションヘルパーベクター（Invitrogen）を保有する大腸菌DH10Bac細胞へ形質転換させた。Sf9昆虫細胞にCellfectin（登録商標） Reagent（Invitrogen）を用いてバクミドDNAを導入し、72時間培養後、組換えバキュロウイルスを回収した。E416Q rLVRNの発現は、組換えバキュロウイルスを感染させたSf9細胞（ $2.0 \times 10^6 / \text{ml}$ ）（感染倍率＝約1－3）を8.0 ppmの O_2 を供給した3リットルのSFM-900111培地（Invitrogen）で27℃にて72時間培養して行った（Cellmaster-1700, WAKENYAKU CO., LTD., Kyoto, Japan）。E416Q rLVRNを含む培地を遠心分離により回収し、50 mM Tris/HClバッファー（pH 7.5）で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム（ $2.5 \times 10 \text{ cm}$ ）（Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）にアプライし、100 mMリン酸ナトリウムバッファー（pH 7.5）で溶出した。溶出液を Ni^{2+} キレートセファロースカラム（ $1.0 \times 10 \text{ cm}$ ）（GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ）にアプライし、200 mMイミダゾールで溶出した。

[0067] 3. マイクロアレイ解析と遺伝子オントロジー解析

マイクロアレイに基づく遺伝子発現アレイ解析は、製造業者の説明書に従って実施した。具体的には、Low Input Quick Amp Labeling Kit（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）を用いて0.2 μg のRNAから標識cDNAを調製した。サンプルをSurePrint G3 Human GE microarray 8×60 K Ver. 3.0（G4845A#72363, Agilent Technologies）にハイブリダイズし、Agilent DNA Microarray Scanner（G2539A）で1×60k array slidesのone-

color scan設定でスキャンした (Agilent Technologies)。スキャンした画像は、Feature Extraction Software 11.0.1.1 (Agilent) を用いて解析した。データはGeneSpring software 12.1 (Agilent Technologies) で正規化し、3つのフィルターでフィルタリングした。正規化したマイクロアレイの強度データから、加重平均差 (WAD) ランキング法 (Kadota K, Nakai Y, Shimizu K., A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. Algorithms Mol Biol. 2008 Jun 26;3:8. doi: 10.1186/1748-7188-3-8. PMID: 18578891; PMCID: PMC2464587) を用いて、差次的発現遺伝子を抽出した。この方法は、遺伝子発現の差だけでなく、マイクロアレイのシグナル強度を利用した fold-change 法に基づく統計的アプローチである。同定された発現が亢進または低下した遺伝子について、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を用いて、P 値 < 0.05 を閾値として遺伝子オントロジー解析を行った。

[0068] 4. 末梢血単核細胞 (PBMC) の採取・分離

健常な男性および非妊娠女性、正常妊娠女性、および合併症を有する妊娠女性からヘパリン添加下に血液を採取した。Ficoll-Paque™ PLUS (cytiva, density 1.077 ± 0.001 g/mL) を用いて採取した血液から PBMC を単離した。単離した PBMC は CELL BANKER 1 で液体窒素タンクに冷凍保存した。実験では特に記載する場合を除き、健康な非妊娠女性の PBMC を使用した。

[0069] 5. 定量的 PCR

RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて製造者の説明書に従って細胞から Total RNA を抽出した。この RNA を PrimeScript™ RT-PCR Kit (

Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて cDNA に逆転写した。コントロールには β -アクチン (ACTB) を使用した。各遺伝子に特異的なフォワード (Fd) およびリバース (Rs) プライマー (表 1) を用いて cDNA を増幅した。PCR は 2 ステップ PCT プロトコルで行った。サイクリングの条件は、95℃ 30 秒で初期変性、95℃ 5 秒で変性および 60℃ 30 秒でアニーリング／伸長反応を 40-45 サイクルとした。定量的リアルタイム PCR 分析は、AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用いて、製造者の説明書に従って実施した。3-5 回の独立した実験の平均値 $\pm$ SD を示した。

[表1]

gene	Forward 5→3	SEQ ID NO.	Reverse 3→5	SEQ ID NO.	Length
IFIT1	TCTCAGAGGAGCCTGGCTAA	4	CCAGACTATCCTTGACCTGATGA	5	102
IFIT3	CAGAACTGCAGGGAAACAGC	6	TGAATAAGTTCCAGGTGAAATGGC	7	100
ISG15	GAGAGGCAGCGAACTCATCT	8	CTTCAGCTCTGACACCGACA	9	157
OAS2	AGGTGGCTCCTATGGACGGAA	10	GGCTTCTCTTCTGATCCTGGAATTG	11	104
ACTB	TGGCACCCAGCACAAATGAA	12	CTAAGTCATAGCCGCCTAGAAGCA	13	186
IDO1	GGCACACGCTATGGAAAACT	14	CGGACATCTCCATGACCTTT	15	297
IFN α	TGGGCTGTGATCTGCCTCAAAC	16	CAGCCTTTTGGAAGTGGTTGCC	17	156
IFN β	ACCATCTGAAGACAGTCCTGG	18	CCTTGGCCTTCAGGTAATGC	19	123
IFN γ	GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG	20	TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC	21	124
LAG3	GCAGTGTACTTCACAGAGCTGTC	22	AAGCCAAAGGCTCCAGTCACCA	23	143
CD14	CTGGAACAGGTGCCTAAAGGAC	24	GTCCAGTGTGAGGTTATCCACC	25	120
CD11c	CACTCATCACAGCGGTACTGTACA	26	TCCATTTGCCTCCTCCATC	27	77
CD123	TTAAGCAGGCACCTCTGTCC	28	CTGAGCCTTTGCTTTTCATCC	29	154
CD80	CTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTT	30	GCCAGTAGATGCGAGTTTGTGC	31	136
CD86	CCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCC	32	GCTGTAATCCAAGGAATGTGGTC	33	154
PDL1	AAACAATTAGACCTGGCTG	34	TCTTACCACTCAGGACTTG	35	400

PBMCまたはSwan71細胞を、FITC結合抗LVRN抗体（クローン5-23）またはコントロールとしてFITC結合マウスIgG抗体（clone: P3.6.2.8.1 LOT: 2067148 Invitrogen）とともに、4℃で30分間インキュベートした。細胞表面の標識をBD FACS Aria™ Fusionセルソーターを用いた蛍光検出により解析した。

[0071] rLVRNによる免疫細胞におけるISG15発現のFACS解析は、以下の通り行った。PBMCにrLVRN 1.5 µg/mLを添加して24時間培養後にPBMCを回収したのち、BD Pharmingen™ Human BD Fc block™ (Cat #564220, LOT: 9049805) を用いて4℃で30分間ブロッキングを行った。FITC結合CD14（単球系マーカー）抗体（FITC mouse IgG1k anti-human CD14 Clone: HCD14 Cat #325604 LOT: B268830 Biolegend）、APC結合抗CD19（B細胞マーカー）抗体（APC mouse IgG1k anti-human CD19 Cat #555415 LOT: 8296813 BD pharmingen）、およびBV421結合CD3（T細胞マーカー）抗体（BV421 mouse IgG1k anti-human CD3 Clone: UCHT1 Cat #562426 LOT: 9113553）を4℃で1時間作用させた。続いて、抗体を数回洗浄したのちに1%PFAで10分間固定し、さらに0.1%triton/PBSで10分間膜透過処理を行った。最後にPE結合抗ISG15抗体（anti-hISG15/UCRP PE conjugated Rat IgG2A Cat #IC8044P LOT: ADRU0219021 R&D systems）を4℃で1時間反応させ、BD FACS Aria™ Fusionセルソーターを用いた蛍光検出により解析した。

[0072] 母体血におけるLVRN発現陽性T細胞に関する解析は、以下の通り行った。採血したPBMCを分離したのち、BD Pharmingen™ H

uman BD Fc block™ (Cat #564220, LOT: 9049805) を用いて4℃で30分間ブロッキングを行った。数回洗浄したのちにFITC結合抗LVRN抗体 (クローン5-23) およびBV421結合CD3 (T細胞マーカー) 抗体 (BV421 mouse IgG1k anti-human CD3 Clone: UCHT1 Cat #562426 LOT: 9113553) を4℃で1時間作用させ二重染色した。続いて、抗体を数回洗浄したのちにBD FACS Aria™ Fusionセルソーターを用いた蛍光検出により解析した。

[0073] rLVRNによるCD14細胞の分化に関する解析は、以下の通り行った。PBMCにrLVRN 1.5 μg/mLを添加して24時間培養後にPBMCを回収し、BD Pharmingen™ Human BD Fc block™ (Cat #564220, LOT: 9049805) を用いて4℃で30分間ブロッキングを行った。1%PFAで10分間固定した後、FITC結合CD14 (単球系マーカー) 抗体 (FITC mouse IgG1k anti-human CD14 Clone: HCD14 Cat #325604 LOT: B268830 Biolegend)、PE結合抗HLA-DR (抗原提示細胞マーカー) 抗体 (PE mouse IgG2ak anti-human HLA-DR Cat #555812 LOT: 9248092 BD Pharmingen)、APC結合抗CD11c (樹状細胞マーカー (主にmoDC)) 抗体 (APC mouse IgG1k anti-human CD11c Clone: 3.9 Cat #301614 LOT: B276681 Biolegend)、およびBV421結合抗CD123 (樹状細胞マーカー (主にpDC)) 抗体 (BV421 mouse IgG2ak anti-human CD123 Clone: 7G3 Cat #563362 LOT: 0279696 BD Horizon) を4℃で1時間作用させ、BD FACS Aria™ Fusion セルソーターを用いた蛍光検出により解析した。

[0074] 7. 蛍光標識 rLVRN の作製と蛍光標識 rLVRN の結合および細胞取り込みの解析

rLVRN への蛍光標識は AnaTag HyLite Fluor 488 Microscale Protein Labelling Kit (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA) を用いてマニュアル通りに実施した。蛍光標識した rLVRN $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ を添加して 4 時間と 24 時間培養後に PBMC を回収して 4% PFA で 10 分間固定し、BD FACS Aria™ Fusion セルソーターを用いて PBMC における単球分画およびリンパ球分画に分けてそれらの蛍光強度を解析した。

[0075] 8. ビーズによる rLVRN 吸収実験

rLVRN のもつヒスチジンタグを認識するビーズを用いた rLVRN 抑制実験を行なった。PBS $400 \mu\text{L}$ に Bc Mag™ His-Ni magnetic Beads (Cat #MHN-102, LOT: 0119) $1 \mu\text{L}$ と rLVRN $4.5 \mu\text{g}$ を添加し、 4°C で攪拌した。30 分後に磁石 (6-Tube Magnetic Separation Rack #7017S LOT: 0001 Cell Signaling) を用いてビーズおよびビーズと反応した rLVRN を回収し、上清のみを PBMC へ添加した。 37°C で 24 時間インキュベートして PBMC を回収して RNA を抽出した。

[0076] 9. LVRN-Swan71 細胞の作製

LVRN を発現する Swan71 細胞株の樹立では、C 末端に His6 タグを持つ完全長ヒトリーベリン (hLVRN-His) の cDNA を pTarget ベクター (Promega) に挿入し、得られた rLVRN-His/pTarget (500 ng) を Psp1406I で切断して線状化し、FuGeneHD (Promega) を用いて Swan71 細胞に導入した。遺伝子導入 48 時間後、 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ の G418 を含む培地を用いて安定発現株を樹立してこれを単離した。NEO-Swan71 細胞の樹立

では、 $rLV RN-His/pTarget$ にかえて $pTarget$ ベクターを導入した。

[0077] 10. $LV RN-Swan71$ 細胞との直接培養

事前にマイトマイシン $2\mu g/mL$ で4時間処理した $LV RN-Swan71$ 細胞および $NEO-Swan71$ 細胞を、12ウェルの接着細胞用プレートを用いて $1.5 \times 10^5 cells/well$ の濃度で $RPMI$ $1mL/well$ の条件で培養した。細胞接着を確認後、 $RPMI$ で $1.5 \times 10^5 cells$ の濃度に調製した $PBMC$ $1mL$ を $LV RN-Swan71$ 細胞および $NEO-Swan71$ 細胞の培養液と置換して $37^\circ C$ で24時間インキュベートした後、培養プレートを10分間振盪機で攪拌した。上清中の細胞を回収し、 $35\mu m$ ポアのセルストレイナーで2回フィルタリングした。さらに $CD45 MicroBeads$ (Order No: 130-045-801 LOT: 5151027008 Miltenyi Biotec) を反応させ、 $autoMACS$ (登録商標) $Pro Separator$ (Miltenyi Biotec) の $Possel program$ で $CD45$ 陽性細胞を選択的に分離してこれを回収した。

[0078] 11. $LV RN-Swan71$ 細胞との間接培養

事前にマイトマイシン $2\mu g/mL$ で4時間処理した $LV RN-Swan71$ 細胞および $NEO-Swan71$ 細胞を、6ウェルの接着細胞用プレートに $3.0 \times 10^5 cells/well$ の濃度に $RPMI$ を用いて調整して $3mL/well$ で培養した。細胞の接着を確認したところで、 $PBMC$ ($1.0 \times 10^5 cells/well$) の入った $0.4\mu m$ トランスウェル (Greiner Bio-One (登録商標)) を乗せ、 $37^\circ C$ で24時間インキュベートした後に、トランスウェル内の $PBMC$ を回収した。

[0079] 12. $IFN-\beta$ 中和抗体、I型 IFN 受容体中和抗体による阻害実験

$7 \times 10^5 cells/mL$ の濃度に $RPMI$ を用いて調整した $PBMC$ $1mL$ を12ウェルの浮遊細胞用プレートで培養し、I型 IFN 受容体中和抗体 ($Interferon\alpha/\beta\ Receptor\ Ch$

ain 2 Cat #MAB1155 LOT:3766724 EMD Millipore corporation) $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、およびIFN- β 中和抗体 (anti-hIFN- β Cat #AF814, LOT: BTT0818121) $1\mu\text{g}/\text{mL}$ をそれぞれ添加した。37℃、10分間インキュベートしたのちに、rLVRN $1.5\mu\text{g}/\text{mL}$ またはIFN β 100IU/mL (Interferon Beta 第一三共)を添加してさらに37℃、24時間インキュベートしたのちに細胞を回収した。

[0080] 13. JAK1, 2阻害剤ルキソリチニブによる阻害実験

PBMCを $1.5 \times 10^5 \text{ cell}/\text{mL}$ の濃度にRPMIを用いて調整し、その1mLを12ウェルの浮遊細胞用プレートで培養してJAK阻害剤であるルキソリチニブ (Ruxolitinib INCB18424, Cat #S1378, LOT: S137815, Selleckchem) $1\mu\text{M}$ を添加し、37℃、10分間インキュベートした後にrLVRN $1.5\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、さらに37℃、24時間インキュベートしたのちに細胞を回収してRNAを抽出した。

[0081] 14. CD14陽性単球分画、CD4陽性分画、またはCD8陽性分画の分離方法

CD14陽性単球の分離／回収にはCD14マイクロビーズ (CD14 MicroBeads, human, Order no:130-050-201, Lot no:5210205621, Miltenyi Biotec)を反応させ、autoMACS (登録商標) Pro Separator (Miltenyi Biotec)のPossel programでCD45陽性細胞を選択的に分離してこれを回収した。CD4陽性およびCD8陽性細胞の分離および回収は、CD4マイクロビーズ (CD4 MicroBeads, human, Order no:130-045-101, Lot no:5210401362, Miltenyi Biotec)またはCD8マイクロビーズ (CD8 MicroBeads, human, Order no:130-045-201, Lot no:

5210401341, Miltenyi Biotec) を用いて同様に行った。

[0082] 15. 細胞染色

Swan 71 細胞の細胞染色は、4% PFA で 10 分固定後に抗 LVRN 抗体クローン (5-23) を作用させた後、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (REF: A11001 LOT: 2220848 Invitrogen) を作用させ、その後包埋し、蛍光顕微鏡 (Olympus BX50 microscope) で観察してカメラ (DP72 Olympus digital camera) で撮影した。

[0083] rLVRN による免疫細胞における ISG15 発現の観察は、以下の通り行った。PBMC に rLVRN ($1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して 24 時間培養後に PBMC を回収したのち、4% PFA で 10 分間固定し、さらに 0.1% triton/PBS で 10 分間膜透過処理を行い、1% FBS/PBS で 30 分間ブロッキングを行った。抗 CD14 (単球系マーカー) 抗体 (CD14 (UCH-M1) mouse mAb sc-1182 LOT: K1308 Santa Cruz)、抗 CD19 (B 細胞マーカー) 抗体 (CD19 (EPR5906) rabbit Ab ab134114 LOT: GR3252252-1)、抗 CD4 抗体 (CD4 (BC/1F6) mouse mAb ab846 LOT: GR235014-1) および抗 CD8 抗体 (CD8 Clone C8/144B mouse mAb anti-human REF: M7103 LOT: 20024879 DAKO)、PE 結合抗 ISG15 抗体 (anti-hISG15/UCRP PE conjugated Rat IgG2A Cat# IC8044P LOT: ADRU0219021 R&D systems) を室温で 2 時間作用させた。続いて、抗体を数回洗浄したのち、2 次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (REF: A11034 LOT: 2286890

Invitrogen) または Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (REF: A11001 LOT: 2220848 Invitrogen) を室温で1時間作用させた。数回洗浄したのち、最後に $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の Hoechst (登録商標) 33342 で核酸染色し、抗体を数回洗浄したのち、遠沈させた細胞を $20\mu\text{L}$ の PBS に浮遊させ、 $20\mu\text{L}$ をスライドガラスに滴下してカバーガラスを重ねて包埋し、蛍光顕微鏡 (Olympus BX50 microscope) で観察してカメラ (DP72 Olympus digital camera) で撮影した。

[0084] CD14細胞による rLVRN の細胞内取り込みの確認は以下の通り行った。PBMC に HiLyte Fluor™ 555 色素を標識した rLVRN ($1.5\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して24時間培養後に PBMC を回収し、BD Pharmingen™ Human BD Fc block™ (Cat # 564220, LOT: 9049805) を用いて 4°C で30分間ブロッキングを行った。 1% PFA で10分間固定した後、抗CD14抗体 (CD14 (UCH-M1) mouse mAb sc-1182 LOT: K1308 Santa Cruz) を 4°C で1時間作用させた。続いて、抗体を数回洗浄したのち、第2抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (REF: A11001 LOT: 2220848 Invitrogen) を、また核酸染色として Hoechst (登録商標) 33342 を室温で2時間作用させた。数回洗浄後、遠沈させた細胞を $200\mu\text{L}$ の PBS に浮遊させ、 $50\mu\text{L}$ をスライドガラスに滴下してカバーガラスを重ねて包埋し、蛍光顕微鏡 (Olympus BX50 microscope) で観察してカメラ (DP72 Olympus digital camera) で撮影した。

[0085] 16. THP-1細胞の活性化

単球の性質を有するヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 (RRID: CVCL_0006) は ATCC から購入した。THP-1細胞は、 10%

FBS (Sigma-Aldrich)、100 g/mLストレプトマイシン、100 IU/mLペニシリンを添加したRPMI (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 中で5%CO₂下37℃にて培養した。THP-1細胞を活性化するために、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich) を添加し、48時間培養を行った。

[0086] 17. ウェスタンブロット分析

PBSまたはrLVRN (1.5または7.5 μg/mL) で12時間または24時間処理した活性化THP-1細胞におけるIDO1タンパク質およびACTBタンパク質の発現をウェスタンブロット分析により調べた。ウェスタンブロット分析は、文献 (Matsumoto, T., Iizuka, T., Nakamura, M., Suzuki, T., Yamamoto, M., Ono, M., Kagami, K., Kasama, H., Wakae, K., Muramatsu, M., et al. (2022). FOXP4 inhibits squamous differentiation of atypical cells in cervical intraepithelial neoplasia via an EL F3-dependent pathway. *Cancer Sci.* 10.1111/cas.15489.) に記載のように行った。タンパク質溶解液をRIPA Buffer (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) で抽出し、10% SDS-PAGEゲルで電気泳動した後、ニトロセルロース膜に移した。転写した膜を、IDO (1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 86630, RRID: AB_2636818) またはActin (1:5,000, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-1615, RRID: AB_630835) に対する1次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。二次抗体であるホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗体を室温で1時間塗布した。ブロットは、ECL TM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire) を用いた強化化学発光システムで可視化した。IDO1タンパク質レベルは

、ImageJで定量したIDO1タンパク質とACTBタンパク質のバンドの密度の比を計算し、ACTBタンパク質に対して正規化した。一部の実験では陽性対照として10 ng/mLのIFN- γ で24時間処理したHEL細胞のIDO1タンパク質を用いた。

[0087] 18. 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (HPLC-MS)

培養液中のトリプトファンとキヌレニンのレベルは、高速液体クロマトグラフィーと高分解能質量分析計とタンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS) により定量した。PBS処理とrLVRN処理の違いを評価するために、PMA活性化THP-1細胞を1.5または7.5 μ g/mLのrLVRNで48時間処理した。その後、培養液中の代謝物量を金沢大学遺伝子研究所でHPLC-MSにより文献 (Dochi, H., Kondo, S., Murata, T., Fukuyo, M., Nanbo, A., Wakae, K., Jiang, W.P., Hamabe-Horiike, T., Tanaka, M., Nishiuchi, T., et al. (2022). Estrogen induces the expression of EBV lytic protein ZEBRA, a marker of poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Sci* 113, 2862-2877. 10.1111/cas.15440.) に記載のように測定した。キヌレニン/トリプトファン比を算出し、IDO1の活性を評価した。

[0088] 11. 結果

1. リーベリンによるPBMCにおけるISGs、IDO1およびPD-L1遺伝子誘導

1A: マイクロアレイによる遺伝子オントロジー解析

PBMCにrLVRN (1.5 μ g/mL) を添加して24時間培養後にPBMCで発現変化した遺伝子群を無添加のコントロール群とマイクロアレイで比較解析した。図1Aに発現誘導が観察された遺伝子の遺伝子オントロジー解析の結果を示す。I型インターフェロンシグナル伝達経路 (Type I interferon signaling pathway) を含む免疫反応が誘導されていた。

[0089] 1B: OAS2、IFIT1、IFIT3、ISG15、IDO1、およびPD-L1の定量的PCR解析

マイクロアレイの解析で上位を占めていたインターフェロン誘導遺伝子 (interferon stimulated genes) (ISGs) であるOAS2、IFIT1、IFIT3、およびISG15と、免疫寛容誘導に関連するIDO1 (indoleamine 2,3-dioxygenase-1) およびPD-L1 (Programmed death-ligand 1) について、rLVRN (1.5 μ g/mL) 存在下で24時間培養後したPBMCにおける発現上昇を定量的PCRで確認した。その結果、rLVRNによるこれら遺伝子の発現上昇が観察された (図1B)。

[0090] 1C: ビーズによるrLVRN吸収実験

rLVRNの産生過程で混入した夾雑物の作用を否定する目的で、Hisタグタンパク質を吸着する抗Hisタグ抗体結合ビーズでrLVRNを吸収してPBMCに対するISGsおよびIDO1の発現誘導実験を実施した。その結果、ビーズによる吸収によりrLVRNの誘導作用が抑制され、夾雑物でなくrLVRNにISGsやIDO1の発現誘導作用があることが示された (図1C)。

[0091] 1D: LVRN強制発現Swan71細胞との直接または間接培養によるPBMCにおける遺伝子誘導

Swan71細胞はLVRNを細胞膜に発現しているヒト絨毛外栄養膜細胞から樹立された細胞株であるが、通常の単層培養条件ではLVRNの発現を消失している。そこでまず、その細胞膜にLVRNを強制発現させたLVRN強制発現Swan71細胞株 (LVRN-Swan71) を作成し、LVRNの発現を細胞染色により、また細胞表面への発現をフローサイトメトリにより確認した (図1D上)。このLVRN-Swan71細胞とPBMCとの直接培養、またはチャンバーメンブレンを用いた間接培養を24時間行い、LVRNのPBMCへの遺伝子発現誘導作用について検討し、mock発現細胞株 (Neo-Swan71) との培養のそれと比較した。直接培養では、PBMCの回収にあたってSwan71細胞の混入を排除するため、抗CD45抗体結合ビーズを用いてPBMCを選別して解析した。その結果、直接培養では間接培養以上に遺伝子発現誘導作用が強いことが示され

、細胞膜結合型LVRNもPBMCに同様の作用をすることが確認された（図1D下）。

[0092] 1E：酵素不活性rLVRNのPBMCにおける遺伝子誘導作用の検討

LVRNはM1ペプチダーゼに分類される細胞膜結合型のペプチダーゼである。そこで、この酵素活性が遺伝子発現作用に関与しているかを検討する目的で、グルジンシン（gluzincin）モチーフであるZn結合酵素活性部位のHEXXH（X）18Eモチーフ（配列番号1の415-438番目）を変異させ酵素活性を不活性化させたE416Q rLVRNを作成し、PBMCに対する作用を観察した。その結果、酵素不活性型LVRNは酵素活性型LVRNと同様に、IFIT1、IFIT3、ISG15、OAS2、およびIDO1遺伝子の発現誘導傾向があることが確認された（図1E）。

[0093] 2. 免疫細胞におけるISGs遺伝子誘導機構

2A：rLVRNのIFN産生誘導能

マイクロアレイの解析においてISGsの誘導が確認されたことから、rLVRNのPBMCにおけるIFN産生誘導を定量的PCRで検討した。その結果、rLVRN（1.5 μ g/mL）によりPBMCにおいてIFN- β の産生が誘導されたが、IFN- α およびIFN- γ の産生は誘導されなかった（図2A）。

[0094] 2B：rLVRNのPBMCにおける遺伝子誘導作用の効果顕現時間の検討

PBMCをrLVRN（1.5 μ g/mL）存在下で30分、1時間、または4時間培養後のIFIT1、IFIT3、ISG15、OAS2、およびIFN- β の発現を定量的PCRにより解析した。その結果、4時間培養後にこれら遺伝子のmRNAが観察された（図2B）。

[0095] 2C：タイトレーションによるrLVRN（1.5 μ g/mL）に対応するIFN- β の作用濃度の決定

IFN- β によりPBMCを刺激し、濃度依存性のISGsの誘導作用を観察した。この結果をrLVRN（1.5 μ g/mL）のISGs誘導作用と比較し、対応するIFN- β の濃度を10U/mLと設定した（図2C）

。

[0096] 2D: IFN- β の作用に対するIFN- β 中和抗体の効果

IFN- β (100 IU/mL) によるPBMCにおける遺伝子発現誘導がIFN- β 中和抗体によりブロックされるかを検討した。その結果、IFN- β によるPBMCのISGs、IDO1およびPD-L1の発現上昇は、IFN- β に対する中和抗体で完全にブロックされた(図2D)。

[0097] 2E: rLVRNの作用に対するIFN- β 中和抗体およびI型IFN受容体中和抗体の効果

rLVRN (1.5 μ g/mL) によるPBMCにおける遺伝子誘導がIFN- β 中和抗体またはI型IFN受容体中和抗体によるブロックされるかを検討した。その結果、IFN- β (10 IU/mL) に対応するrLVRN (1.5 μ g/mL) で誘導されたISGsの発現上昇はI型IFN受容体に対する中和抗体またはIFN- β に対する中和抗体により完全にブロックされたが、IDO1およびPD-L1の発現上昇はブロックされなかった(図2E)。これらの結果から、LVRNのISGs発現誘導はIFN- β 産生誘導とI型IFN受容体を介する作用であるが、IDO1発現誘導作用はIFN/IFN受容体以外の経路によることが示唆された。

[0098] 2F: rLVRNの作用に対するJAK1, 2阻害剤ルキシソリチニブの効果

rLVRNによるPBMCにおける遺伝子誘導に対するJAK1, 2阻害剤の効果を検討した。PBMCに、rLVRN (1.5 μ g/mL)、ルキシソリチニブ (1 μ M)、またはrLVRN (1.5 μ g/mL) およびルキシソリチニブ (1 μ M) を添加し、24時間培養後、IFIT1、IFIT3、ISG15、OAS2、IDO1、およびPD-L1の発現を定量的PCRにより確認した。その結果、rLVRNによるこれら遺伝子の発現誘導はルキシソリチニブによりいずれも阻害された(図2F)。LVRNの受容体は明らかでないが、この結果から、その活性化にJAK1または2が関与していると推察された。

[0099] 2G: IFN- β およびrLVRNによるISG15およびIDO1誘導作

用の比較

正常非妊娠の対象（女性）（12例）のPBMCをIFN- β （10 IU/mL）またはrLVRN（1.5 μ g/mL）の存在下で24時間培養し、ISG15およびIDO1の誘導作用を検討した。その結果、IFN- β とrLVRNでは特にIDO1の誘導作用が相違し、IDO1/ISG15比の比較から、rLVRNはIFN- β よりもIDO1誘導作用が強いことが示された（図2G）。

[0100] 3. 正常妊娠、妊娠高血圧症候群、および免疫疾患合併妊娠の臨床検体の解析

3A：妊娠女性のPBMCにおけるISG15およびIDO1の発現解析

正常非妊娠（9例）、正常妊娠（6例）、および妊娠高血圧症候群（HDP）（5例）の女性のPBMCをrLVRN（1.5 μ g/mL）の存在下で24時間培養し、ISG15およびIDO1の発現を定量的PCRにより検討した。その結果、妊娠女性では非妊娠女性に比べ、ISG15は約5-6倍、IDO1は約100倍に上昇し、IDO1/ISG15比も有意に高く、妊娠によりIDO1の反応がより上昇することが示された（図3A）。また、HDPの女性では正常妊娠女性に比べ、ISG15は1/2倍、IDO1は1/6倍と反応が低下しており、IDO1/ISG15比も一例を除き低かった（図3A）。

[0101] 3B：正常妊娠女性PBMCにおけるIFN β およびrLVRNの作用

正常妊娠女性（29例）のPBMCをIFN- β （10 IU/mL）またはrLVRN（1.5 μ g/mL）の存在下で24時間培養後、ISG15およびIDO1の発現を定量的PCRにより検討した。その結果、IDO1はIFN- β よりもrLVRNにより強く誘導され、rLVRN刺激後のIDO1/ISG15比はIFN- β 刺激後のIDO1/ISG15比よりも有意に高かった（図3B）。

[0102] 3C：胎児の成長とIDO1/ISG15比との関連性

胎児の成長の指標として、妊娠年齢に対する出生体重の標準偏差スコア（

Zスコア) (Itabashi K, Miura F, Uehara R, Nakamura Y. New Japanese neonatal anthropometric charts for gestational age at birth. *Pediatr Int.* 2014;56(5):702-8.) を使用し、ピアソン相関係数 (r) を用いて、IDO1 および ISG15 の mRNA レベルの Fold 変化と出生体重の Zスコアとの間の線形相関を解析した。その結果、IDO1 / ISG15 比が高いと胎児の体重が増加し、反対に IDO1 / ISG15 比が低いと胎児の体重が減少し、IDO1 / ISG15 比と胎児の体重が相関することが示された (図 3 C)。これより、IDO1 / ISG15 比が低い症例は LVRN の免疫寛容作用が低く、胎盤機能が低いことが推察された。

[0103] 3 D : 非妊娠、正常妊娠、妊娠高血圧症候群、および免疫疾患合併妊娠の女性における LVRN 陽性 T 細胞

非妊娠、正常妊娠、妊娠高血圧症候群、および免疫疾患合併妊娠の女性における LVRN 陽性 T 細胞をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、LVRN 陽性 T 細胞は妊娠で増加し、妊娠高血圧症候群や全身性エリテマトーデス (SLE) 合併妊娠で高いことが観察された (図 3 D)。

[0104] 4. r LVRN に反応する PBMC 中の細胞の解析

4 A : r LVRN 刺激後の PBMC の ISG15 タンパク質発現の FACS による解析

PBMC を r LVRN ($1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) の存在下で 24 時間培養後、リンパ球分画および単球分画における ISG15 発現細胞を FACS により解析した。

その結果、ISG15 の発現はリンパ球分画および単球分画のほとんどで上昇していた (図 4 A)。

[0105] 4 B : r LVRN 刺激後の PBMC における ISG15 タンパク質発現の細胞染色による解析

r LVRN ($1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) と 24 時間培養後の PBMC における ISG15 タンパク質の発現を細胞染色により解析した。その結果、ISG15 タンパク質の発現は、CD14 陽性単球、CD4 陽性 T リンパ球、CD8

陽性Tリンパ球、およびCD19陽性Bリンパ球の細胞内に観察された（図4B）。

[0106] 4C：標識rLV RNのPBMCへの結合または取り込みのFACSによる解析

HiLyte555を結合して蛍光標識したrLV RN（ $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の存在下でPBMCを4時間または24時間培養し、FACSにより解析した。その結果、rLV RNの結合または細胞内への取り込みが単球分画で観察され、その検出は4時間から24時間にかけて増加し、24時間後には96%以上の単球分画細胞が陽性となった（図4C）。リンパ球分画ではrLV RNの結合または細胞内への取り込みは観察されなかった（図4C）。

[0107] 4D：蛍光標識rLV RNの単球細胞内への取り込みの細胞染色による解析

蛍光標識rLV RN（ $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と24時間培養後のPBMCの単球分画細胞へのrLV RNの取り込みを細胞染色により解析した。その結果、細胞染色像にて蛍光標識rLV RNが単球細胞内へ取り込まれている像が観察された（図4D）。

[0108] 4E：CD4陽性Tリンパ球およびCD8陽性Tリンパ球に対するrLV RNの直接作用

正常非妊娠女性（1例）および男性（1例）のPBMCよりCD4陽性分画およびCD8陽性分画を分離し、rLV RN（ $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の存在下でPBMCを24時間培養した。その結果、これらリンパ球におけるISGs発現の上昇は低く、有意差は検体によるバラツキがあり、個人差が大きいと考えられた（図4E）。ISG15タンパク質の発現がリンパ球分画のほとんどの細胞に観察されることを考慮すると、まずPBMC中のCD14陽性の単球がrLV RNに反応し、次に二次反応としてリンパ球に波及している過程が主であると推察された。

[0109] 4F：CD14陽性単球細胞におけるrLV RN誘導遺伝子群のマイクロアレイ解析

PBMCからCD14陽性単球細胞を分離し、rLVRN (1.5 μ g/mL) の存在下で24時間培養後、マイクロアレイにより発現遺伝子を解析した。その結果、ISGsは70倍、IDO1は177倍と、PBMCより強い反応性が示された。特に以下の遺伝子の発現変化が観察された。

[表2]

CD38	増加 (100倍)	ヒト単球由来樹状細胞 (MDDC) の成熟マーカー 骨髄由来抑制細胞 (MDSC) で発現
CD14	減少	単球のマーカー
CD80	75倍増加 (75倍)	成熟樹状細胞 (DC) のマーカー
IL27	増加	免疫抑制サイトカイン
LAG3	増加	免疫抑制分子
CD274/ PD-L1	増加 (10倍)	
CD9	減少	DCのMHCIIのリサイクルに必要
LILRB1	増加	免疫抑制分子
APOBEC3A APOBEC3B	増加 (いずれも200倍以上)	遺伝子編集分子であり、抗ウイルス効果が予想されている

[0110] 4G: CD14陽性単球細胞におけるrLVRNの遺伝子誘導作用の検証

PBMCからCD14陽性単球細胞を分離し、rLVRN (1.5 μ g/mL) の存在下で24時間培養後、IFIT1、IFIT3、ISG15、OAS2、IDO1、およびPD-L1の発現を定量的PCRにより確認した。その結果、CD4陽性細胞やCD8陽性細胞 (図4E) と比較して明らかに強い遺伝子発現誘導作用が確認された (図4G)。

[0111] 4H: rLVRNによるCD14陽性単球細胞の分化誘導 (1)

PBMCから分離したCD14陽性単球細胞をrLVRN (1.5 μ g/mL) の存在下で24時間培養後、CD14、CD11c、CD123、CD80、およびCD86の発現を定量的PCRにより解析した。その結果、単球マーカーのCD14は減少、DCマーカーのCD123は上昇、DCの成熟マーカーのCD80は特に大きく上昇し、CD11cは不変であった (図4H)。この結果からrLVRNがDCの分化を誘導することが示された。

[0112] 4 I : r L V R NによるCD 1 4陽性単球細胞の分化誘導 (2)

P B M Cをr L V R N (1. 5 μ g / m L) の存在下で2 4時間培養後、H L A - D R、C D 1 4、C D 1 1 c、C D 1 2 3の発現をF A C Sにより解析した。その結果、C D 1 4陽性細胞においてC D 1 1 c陽性 / C D 1 2 3陽性のD Cが分化誘導されることが示された (図4 I)。

[0113] 5. T H P - 1細胞におけるr L V R Nの作用

5 A : P M A活性化または非活性化T H P - 1細胞におけるr L V R N刺激後のI D O 1の発現

C D 1 4陽性単球のr L V R Nに対する反応性は2 4時間培養中に上昇したため、次に単球系細胞株であるT H P - 1細胞を用いて、活性化単球がr L V R Nに対する反応性を高めるか否かを評価した。P B Sまたはr L V R N (1. 5 μ g / m L) で2 4時間処理した非活性化および活性化T H P - 1細胞におけるI D O 1 m R N A発現レベルを定量的P C Rで検討した。r L V R N処理は、非活性化T H P - 1細胞のI D O 1遺伝子誘導にほとんど影響を与えなかった (図5 A)。一方、P M Aで活性化させたT H P - 1細胞では、I D O 1遺伝子の発現がわずかに誘導され、r L V R N処理はI D O 1発現をさらに増強した (図5 A)。

[0114] 5 B : r L V R N刺激後のP M A活性化T H P - 1細胞における用量依存的なI D O 1タンパク質の発現

P B Sまたはr L V R N (1. 5または7. 5 μ g / m L) で4 8時間処理したP M A活性化T H P - 1細胞のウェスタンブロット分析により、r L V R N処理によるI D O 1タンパク質の用量依存的な増加が検証された (図5 B)。

[0115] 5 C : P M A活性化T H P - 1細胞におけるI D O 1誘導に対するr L V R Nの作用

r L V R N (1. 5 μ g / m L) で0、4、8、または1 2時間処理したP M A活性化T H P - 1細胞におけるI D O 1 m R N A発現レベル定量的P C Rで検討した。r L V R Nは、活性化T H P - 1細胞において、1 2時

間の処理後にIDO1遺伝子発現を増加させた（図5C）。

[0116] 5D：rLVRN刺激後のPMA活性化THP-1細胞における時間依存的なIDO1タンパク質の発現

PBSまたはrLVRN（1.5または7.5 μ g/mL）で12時間または24時間処理したPMA活性化THP-1細胞のウェスタンブロット分析により、rLVRN処理によるIDO1タンパク質の時間依存的な増加が確認された（図5D）。

[0117] 6：PMA活性化THP-1細胞におけるrLVRNによるトリプトファンレベルおよびキヌレニン／トリプトファン比の変化

rLVRNによるIDO1産生がトリプトファンのキヌレニンへの変換に及ぼす影響を調べるため、PBSまたはrLVRN（1.5または7.5 μ g/mL）で48時間処理したPMA活性化THP-1細胞の培地におけるトリプトファンレベルおよびキヌレニン／トリプトファン比をHPLC-MSにより評価した。HPLC-MSの結果、rLVRN処理により、rLVRN非処理のコントロールと比較して、活性化THP-1細胞由来の培養液中のトリプトファンレベルは減少し（図6左）、一方でキヌレニン／トリプトファンの比率（図6右）は増加した。この結果は、rLVRNがトリプトファンの代謝を促進し、免疫抑制的な作用をもつキヌレニンを増加させることを示す。

[0118] 配列番号1

Met Gly Pro Pro Ser Ser Ser Gly Phe Tyr Val Ser His Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Leu Tyr Gly His Cys Glu Arg Val Pro Pro Ser Glu Leu Pro Gly Leu Arg Asp Ser Glu Ala Glu Ser Ser Pro Pro Leu Arg Gln Lys Pro Thr Pro Thr Pro Lys Pro Ser Ser Ala Arg Glu Leu Ala Val Thr Thr Thr Pro Ser Asn Trp Arg Pro Pro Gly Pro Trp Asp Gln Leu Arg Leu Pro Pro Trp Leu Val Pro Leu His Tyr Asp Leu Glu Leu Trp Pro Gln Leu Arg Pro Asp Glu Leu Pro Ala Gly Ser Leu Pro Phe Thr Gly Arg Val Asn Ile Thr Val Arg Cys Thr

Val Ala Thr Ser Arg Leu Leu Leu His Ser Leu Phe Gln Asp Cys Glu Arg A
la Glu Val Arg Gly Pro Leu Ser Pro Gly Thr Gly Asn Ala Thr Val Gly Ar
g Val Pro Val Asp Asp Val Trp Phe Ala Leu Asp Thr Glu Tyr Met Val Leu
Glu Leu Ser Glu Pro Leu Lys Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Leu Ser
Phe Ser Gly Leu Val Lys Glu Asp Leu Arg Glu Gly Leu Phe Leu Asn Val T
yr Thr Asp Gln Gly Glu Arg Arg Ala Leu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Pro Th
r Phe Ala Arg Tyr Val Phe Pro Cys Phe Asp Glu Pro Ala Leu Lys Ala Thr
Phe Asn Ile Thr Met Ile His His Pro Ser Tyr Val Ala Leu Ser Asn Met
Pro Lys Leu Gly Gln Ser Glu Lys Glu Asp Val Asn Gly Ser Lys Trp Thr V
al Thr Thr Phe Ser Thr Thr Pro His Met Pro Thr Tyr Leu Val Ala Phe Va
l Ile Cys Asp Tyr Asp His Val Asn Arg Thr Glu Arg Gly Lys Glu Ile Arg
Ile Trp Ala Arg Lys Asp Ala Ile Ala Asn Gly Ser Ala Asp Phe Ala Leu
Asn Ile Thr Gly Pro Ile Phe Ser Phe Leu Glu Asp Leu Phe Asn Ile Ser T
yr Ser Leu Pro Lys Thr Asp Ile Ile Ala Leu Ser Ser Phe Asp Asn His Al
a Met Glu Asn Trp Gly Leu Met Ile Phe Asp Glu Ser Gly Leu Leu Leu Glu
Pro Lys Asp Gln Leu Thr Glu Lys Lys Thr Leu Ile Ser Tyr Val Val Ser
His Glu Ile Gly His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Asn Trp Trp A
sn Asn Ile Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Ser Tyr Phe Glu Phe Glu Val Il
e Asn Tyr Phe Asn Pro Lys Leu Pro Arg Asn Glu Ile Phe Phe Ser Asn Ile
Leu His Asn Ile Leu Arg Glu Asp His Ala Leu Val Thr Arg Ala Val Ala
Met Lys Val Glu Asn Phe Lys Thr Ser Glu Ile Gln Glu Leu Phe Asp Ile P
he Thr Tyr Ser Lys Gly Ala Ser Met Ala Arg Met Leu Ser Cys Phe Leu As
n Glu His Leu Phe Val Ser Ala Leu Lys Ser Tyr Leu Lys Thr Phe Ser Tyr
Ser Asn Ala Glu Gln Asp Asp Leu Trp Arg His Phe Gln Met Ala Ile Asp
Asp Gln Ser Thr Val Ile Leu Pro Ala Thr Ile Lys Asn Ile Met Asp Ser T
rp Thr His Gln Ser Gly Phe Pro Val Ile Thr Leu Asn Val Ser Thr Gly Va
l Met Lys Gln Glu Pro Phe Tyr Leu Glu Asn Ile Lys Asn Arg Thr Leu Leu
Thr Ser Asn Asp Thr Trp Ile Val Pro Ile Leu Trp Ile Lys Asn Gly Thr

Thr Gln Pro Leu Val Trp Leu Asp Gln Ser Ser Lys Val Phe Pro Glu Met G
ln Val Ser Asp Ser Asp His Asp Trp Val Ile Leu Asn Leu Asn Met Thr Gl
y Tyr Tyr Arg Val Asn Tyr Asp Lys Leu Gly Trp Lys Lys Leu Asn Gln Gln
Leu Glu Lys Asp Pro Lys Ala Ile Pro Val Ile His Arg Leu Gln Leu Ile
Asp Asp Ala Phe Ser Leu Ser Lys Asn Asn Tyr Ile Glu Ile Glu Thr Ala L
eu Glu Leu Thr Lys Tyr Leu Ala Glu Glu Asp Glu Ile Ile Val Trp His Th
r Val Leu Val Asn Leu Val Thr Arg Asp Leu Val Ser Glu Val Asn Ile Tyr
Asp Ile Tyr Ser Leu Leu Lys Arg Tyr Leu Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ile
Trp Asn Ile Tyr Ser Thr Ile Ile Arg Glu Asn Val Leu Ala Leu Gln Asp A
sp Tyr Leu Ala Leu Ile Ser Leu Glu Lys Leu Phe Val Thr Ala Cys Trp Le
u Gly Leu Glu Asp Cys Leu Gln Leu Ser Lys Glu Leu Phe Ala Lys Trp Val
Asp His Pro Glu Asn Glu Ile Pro Tyr Pro Ile Lys Asp Val Val Leu Cys
Tyr Gly Ile Ala Leu Gly Ser Asp Lys Glu Trp Asp Ile Leu Leu Asn Thr T
yr Thr Asn Thr Thr Asn Lys Glu Glu Lys Ile Gln Leu Ala Tyr Ala Met Se
r Cys Ser Lys Asp Pro Trp Ile Leu Asn Arg Tyr Met Glu Tyr Ala Ile Ser
Thr Ser Pro Phe Thr Ser Asn Glu Thr Asn Ile Ile Glu Val Val Ala Ser
Ser Glu Val Gly Arg Tyr Val Ala Lys Asp Phe Leu Val Asn Asn Trp Gln A
la Val Ser Lys Arg Tyr Gly Thr Gln Ser Leu Ile Asn Leu Ile Tyr Thr Il
e Gly Arg Thr Val Thr Thr Asp Leu Gln Ile Val Glu Leu Gln Gln Phe Phe
Ser Asn Met Leu Glu Glu His Gln Arg Ile Arg Val His Ala Asn Leu Gln
Thr Ile Lys Asn Glu Asn Leu Lys Asn Lys Lys Leu Ser Ala Arg Ile Ala A
la Trp Leu Arg Arg Asn Thr

[0119] 配列番号 2

atggggcc cccttcacgc tcaggcttct atgtgagcca cgcagtggcc ctgctgctgg ctggg
ttgggt agccgccctc ctgctggcgc tggccgtact cgccgccttg tacggtcact gcgagcgc
gt cccaccgtcg gagctgcctg gactcagga ctcggaagcc gagtcttccc ctcccctcag
gcagaagccg acgccgaccc cgaaaccag cagtgcacgc gagctagcgg tgacgaccac ccc
gagcaac tggcgacccc cggggccctg ggaccagcta cgcctgccgc cctggctcgt gccgct

gcac tacgatctgg agctgtggcc gcagctgagg cccgacgagc ttccggccgg gtctttgcc
c ttacttggcc gcgtgaacat cacgggtgcg tgcacgggtg ccacctctcg actgctgctg c
atagcctct tccaggactg cgagcgcgcc gaggtgcggg gacccctttc cccgggcact ggga
acgcca cagtggggcg cgtgcccgtg gacgacgtgt ggttcgcgct ggacacggaa tacatgg
tgc tggagctcag tgagccccgt aaacctggta gcagctacga gctgcagctt agcttctcgg
gcctggtgaa ggaagacctc agggagggac tcttcctcaa cgtctacacc gaccagggcg ag
cgcagggc cctgttagcg tcccagctgg aaccaacatt tgccagggtat gtttccctt gttt
gatga gccagctctg aaggcaactt ttaatatattac aatgattcat catccaagtt atgtggcc
ct ttccaacatg ccaaagctag gtcagctcga aaaagaagat gtgaatggaa gcaaatggac
tgttacaacc ttttccacta cgccccacat gccaaacttac ttagtcgcat ttgttatatg tga
ctatgac cacgtcaaca gaacagaaaag gggcaaggag atacgcatct gggcccggaa agatgc
aatc gcaaatggaa gtgcagactt tgctttgaac atcacaggtc ccatcttctc ttttctgga
g gatttgitta atatcagtta ctctcttcca aaaacagata taattgcctt gtctagtttt g
acaaccatg caatggaaaa ctggggacta atgatatttg atgaatcagg attgttggtg gaac
caaaag atcaactgac agaaaaaaag actctgatct cctatgttgt ctcccacgag attggac
acc agtggtttgg aaacttgggt accatgaatt ggtggaacaa tatctggctc aacgagggtt
ttgcatctta ttttgagttt gaagtaatta actactttaa tcctaaactc ccaagaaatg ag
atcttttt ttctaacatt ttacataata tcctcagaga agatcacgcc ctggtgacta gagct
gtggc catgaagggt gaaaatttca aaacaagtga aatacaggaa ctctttgaca tatttact
ta cagcaaggga gcgtctatgg cccggatgct ttcttggttc ttgaatgagc atttatttgt
cagtgactc aagtcataatt tgaagacatt ttctactca aacgctgagc aagatgatct atg
gaggcat tticaaatgg ccatagatga ccagagtaca gttattttgc cagcaacaat aaaaaa
cata atggacagtt ggacacacca gagtggtttt ccagtgatca cttaaatgt gtctactgg
c gtcatgaaac aggagccatt ttatcttgaa aacattaaaa atcggactct tctaaccagc a
atgacacat ggattgtccc tattctttgg ataaaaaatg gaactacaca accttagtc tggc
tagatc aaagcagcaa agtattccca gaaatgcaag tticagattc tgaccatgac tgggtga
ttt tgaatttgaa tatgactgga tattatagag ttaattatga taaattaggt tggaagaaac
taaatacaaca acttgaaaag gatcctaagg cgattcctgt tattcacaga ctgcagttga tt

gatgatgc cttttccttg tctaaaaaca atttatattga gattgaaaca gcacttgagt taacc
aagta ccttgctgaa gaagatgaaa ttatagtatg gcatacagtc ttggtaaact tggtaacc
ag ggatcttggt tctgaggiga acatctatga tatatactca ttattaaaga ggtacctatt
aaagagactt aatttaatat ggaatatatta ttcaactata attcgtgaaa atgtgttggc att
acaagat gactacttag ctctaataatc actggaaaaa ctttttgtaa ctgcgtgttg gttggg
cctt gaagactgcc ttcagctgic aaaagaactt ttcgcaaaat ggggtggatca tccagaaaa
t gaaatacctt atccaattaa agatgtgggt ttatgttatg gcattgcctt gggaagtga a
aagagtggg acatcttggt aaatacttac actaatacaa caaacaaga agaaaagatt caac
ttgctt atgcaatgag ctgcagcaaa gacccatgga tacttaacag atatatggag tatgcc
tca gcacatctcc attcacttct aatgaaacaa atataattga ggttgtggct tcatctgaag
ttggccggta tgtcgcaaaa gacttcttag tcaacaactg gcaagctgtg agtaaaaggt at
ggaacaca atcattgatt aatctaatat atacaatagg gagaaccgta actacagatt tacag
attgt ggagctgcag cagttttica gtaacatgtt ggaggaacac cagaggatca gagttcat
gc caacttacag acaataaaga atgaaaatct gaaaaacaag aagctaagt ccaggatagc
tgcgtggcta aggagaaaca ca

請求の範囲

- [請求項1] リーベリンを含む、免疫寛容を誘導するための組成物。
- [請求項2] 自己免疫疾患患者に投与される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 臓器移植のレシピエントに投与される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項4] 体外受精後の胚移植に先立ち子宮内に投与される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項5] 体外での免疫細胞またはこれを含む細胞集団の処理に用いられる、請求項1に記載の組成物。
- [請求項6] 免疫細胞またはこれを含む細胞集団が、自己免疫疾患患者から採取された細胞である、請求項5に記載の組成物。
- [請求項7] 免疫細胞またはこれを含む細胞集団が、臓器移植のレシピエントから採取された細胞である、請求項5に記載の組成物。
- [請求項8] 免疫細胞またはこれを含む細胞集団が、胚移植のレシピエントから採取された細胞である、請求項5に記載の組成物。
- [請求項9] リーベリンが、配列番号1のアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1～8のいずれかに記載の組成物。
- [請求項10] リーベリンが、配列番号1のアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項9に記載の組成物。
- [請求項11] リーベリンが、配列番号1の65～990番目のアミノ酸配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1～8のいずれかに記載の組成物。
- [請求項12] リーベリンが、配列番号1の65～990番目のアミノ酸配列を含む、または前記アミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1

1 に記載の組成物。

[請求項13] 細胞の処理方法であって、リーベリンの存在下で免疫細胞またはこれを含む細胞集団を培養することを含む方法。

[請求項14] 細胞集団が末梢血単核細胞である、請求項 13 に記載の方法。

[請求項15] リーベリンをコードする導入遺伝子を含むリーベリン発現細胞を含む、細胞移植治療用組成物。

[請求項16] リーベリンを含む、抗ウイルス剤。

[請求項17] リーベリンを含む、樹状細胞誘導用組成物。

[請求項18] 樹状細胞の調製方法であって、リーベリンの存在下で単球またはこれを含む細胞集団を培養することを含む方法。

[請求項19] 細胞集団が末梢血単核細胞である、請求項 18 に記載の方法。

[請求項20] 疾患またはその発症リスクを判定する方法であって、
対象から採取された末梢血単核細胞をリーベリンの存在下で培養すること、および
培養後の末梢血単核細胞における ISG15 発現レベル、IDO1 発現レベル、または IDO1 / ISG15 比を基準値と比較することを含む、方法。

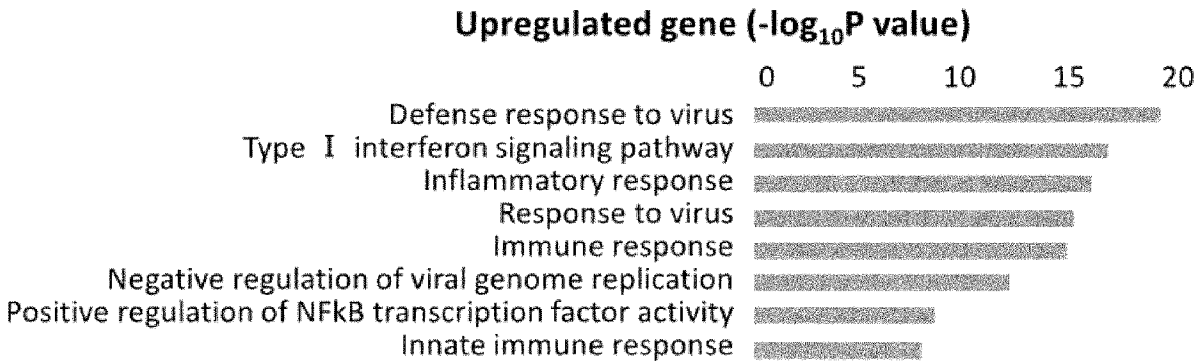
[請求項21] 治療薬の効果を評価する方法であって、
疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血単核細胞をリーベリンの存在下で培養すること、および
培養後の末梢血単核細胞における ISG15 発現レベル、IDO1 発現レベル、または IDO1 / ISG15 比を基準値と比較することを含む、方法。

[請求項22] 疾患が、妊娠高血圧症候群である、請求項 20 または 21 に記載の方法。

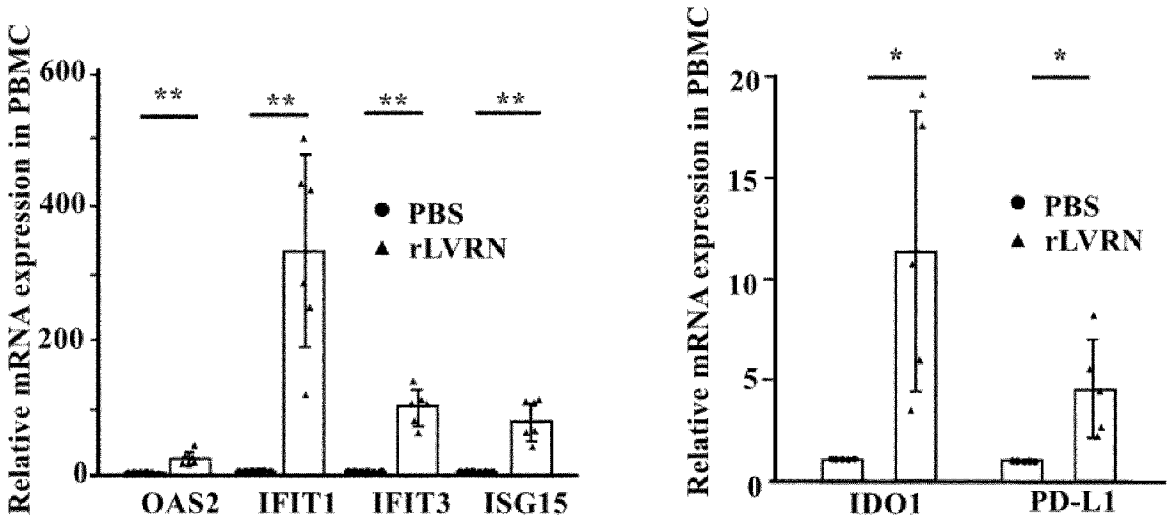
[請求項23] 疾患またはその発症リスクを判定する方法であって、対象から採取された末梢血中のリーベリン陽性 T 細胞の量または比率を基準値と比較することを含む、方法。

- [請求項24] 治療薬の効果を評価する方法であって、疾患を有する対象から治療薬投与後に採取された末梢血中のリーベリン陽性T細胞の量または比率を基準値と比較することを含む、方法。
- [請求項25] 疾患が、妊娠高血圧症候群である、請求項23または24に記載の方法。

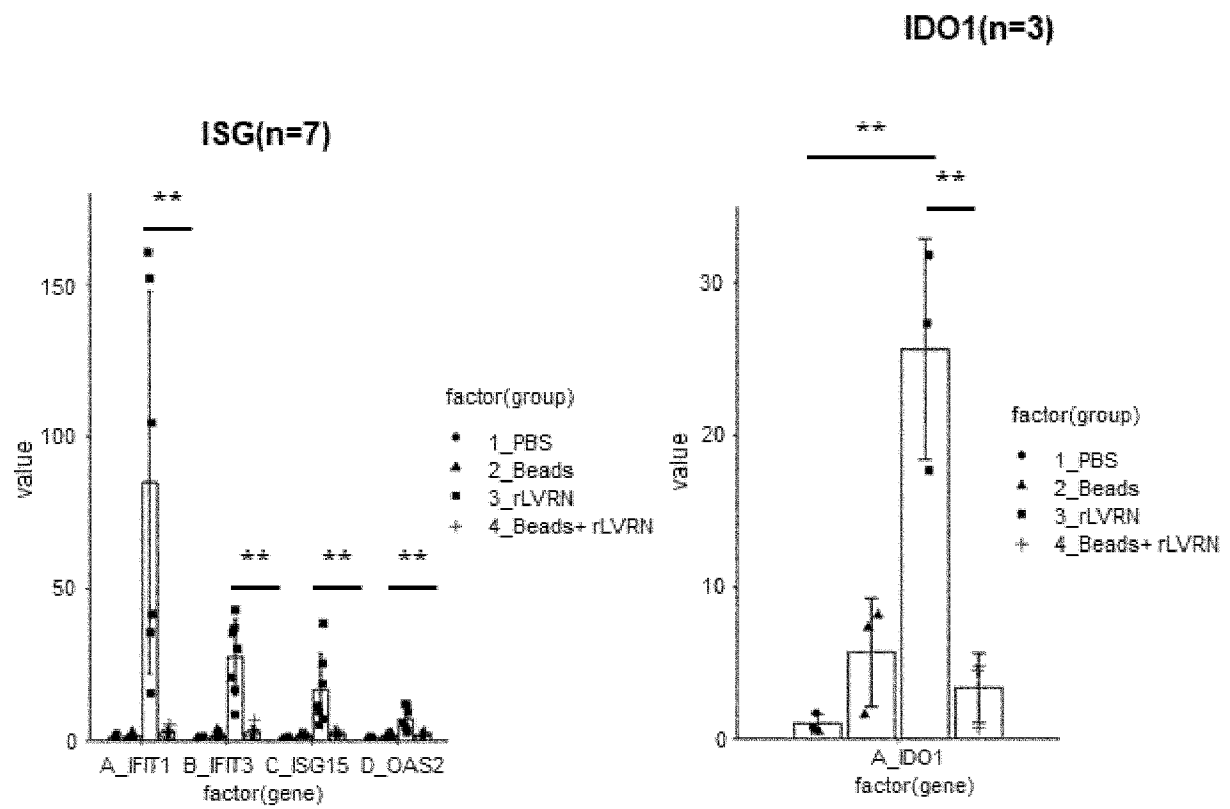
[図1A]



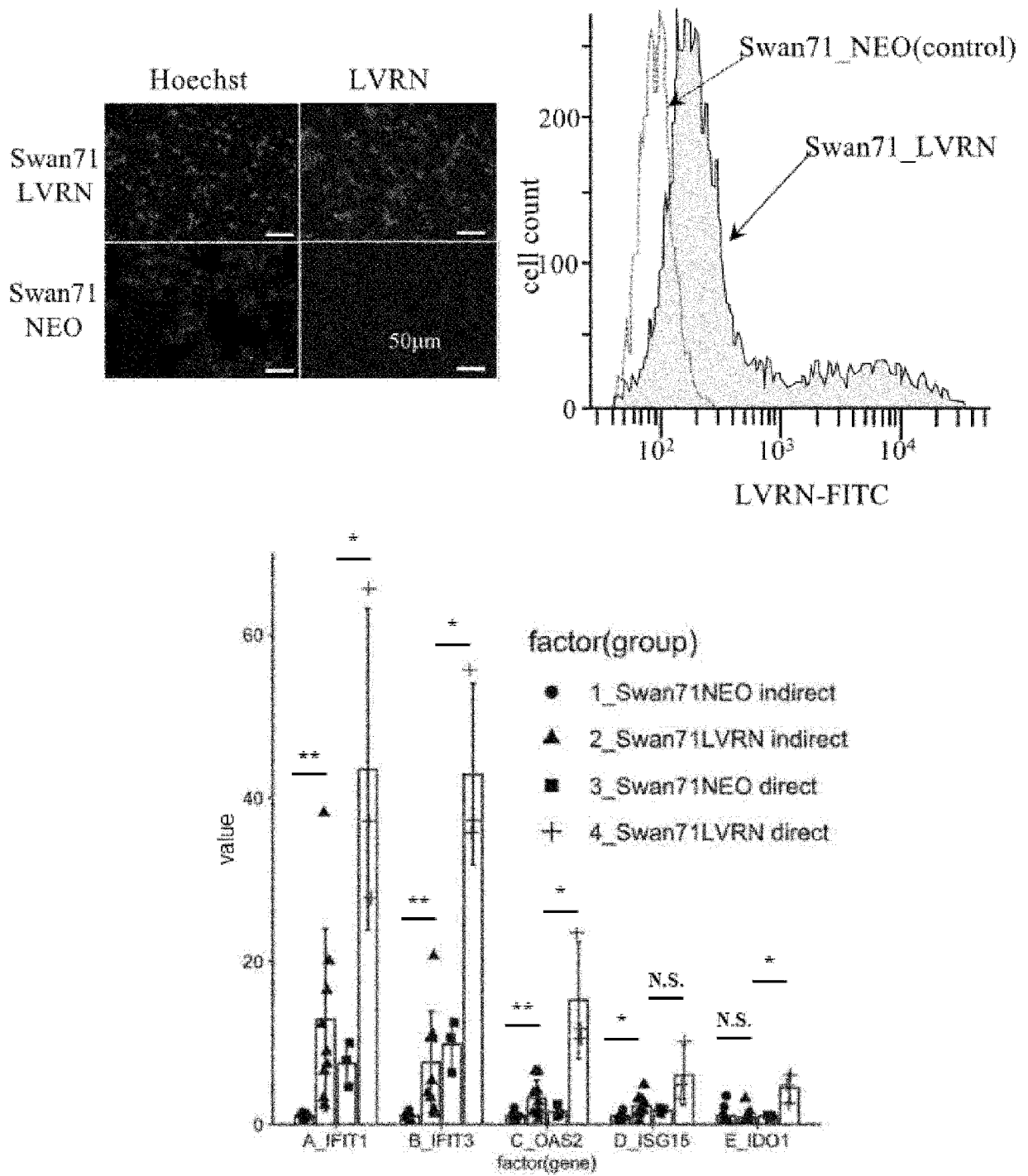
[図1B]



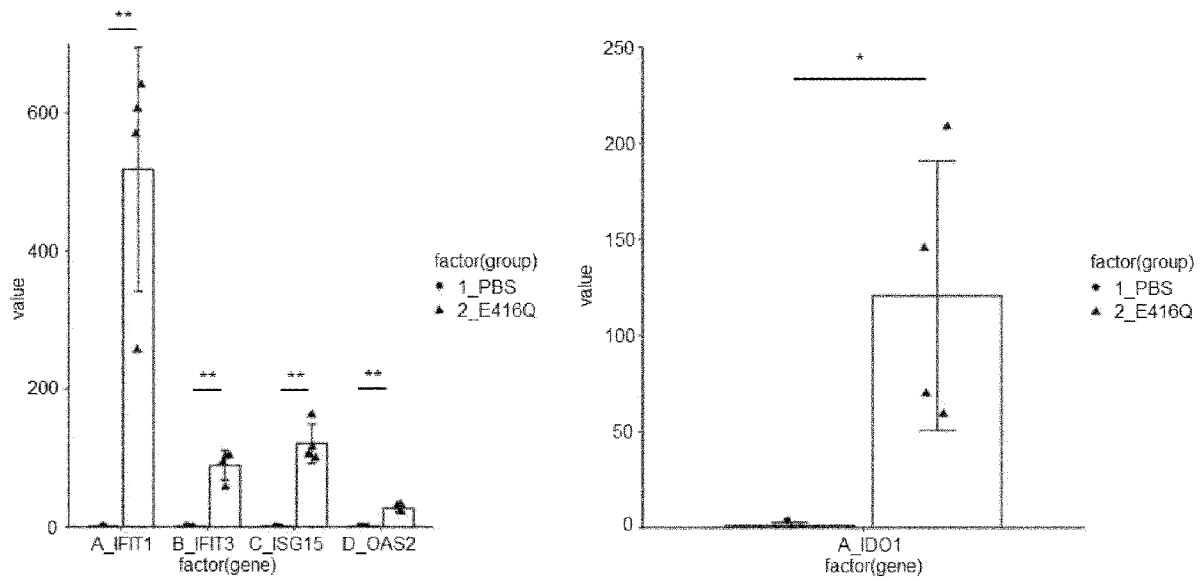
[図1C]



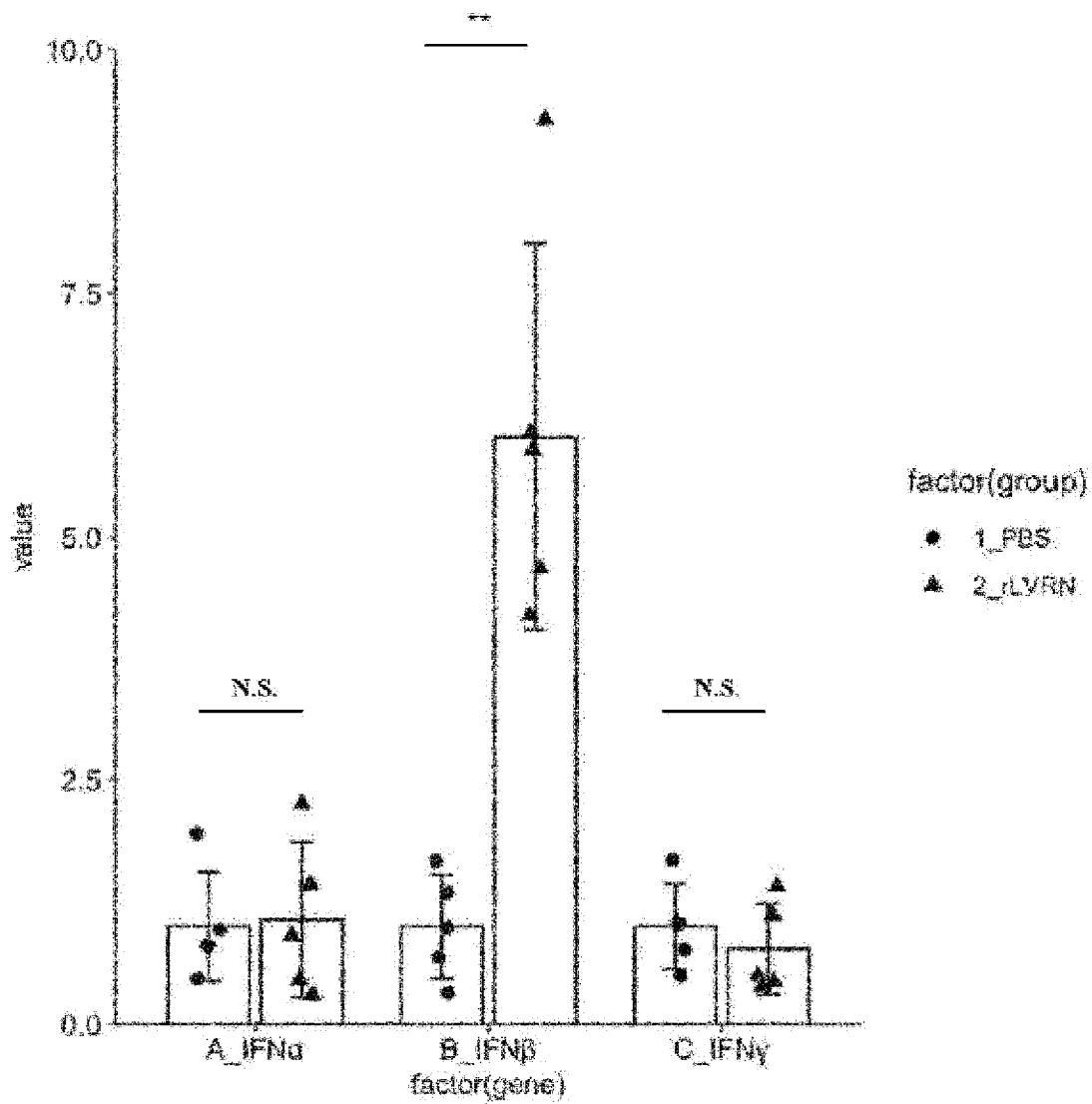
[図1D]



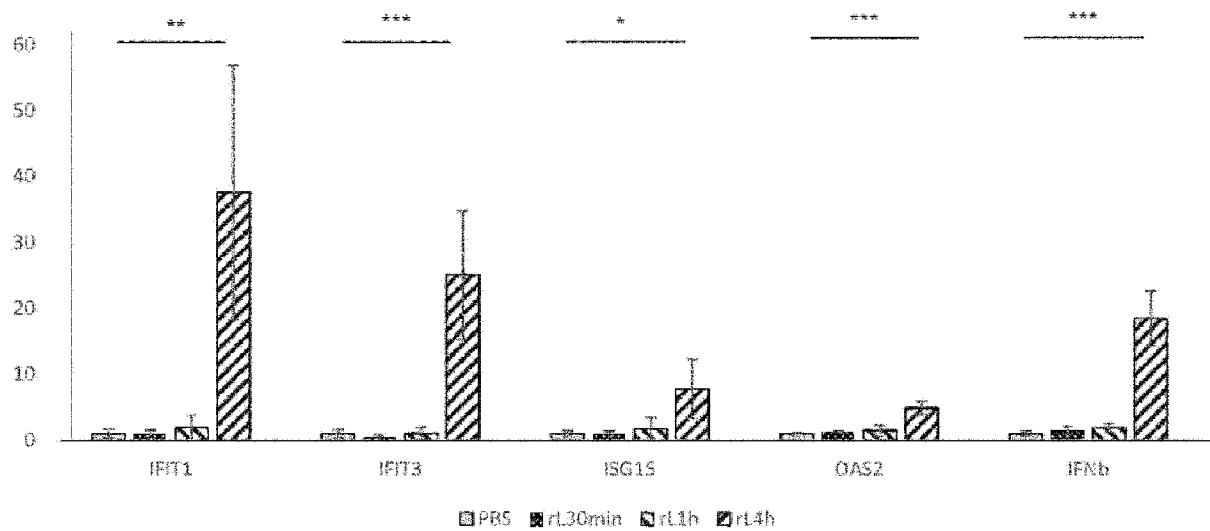
[図1E]



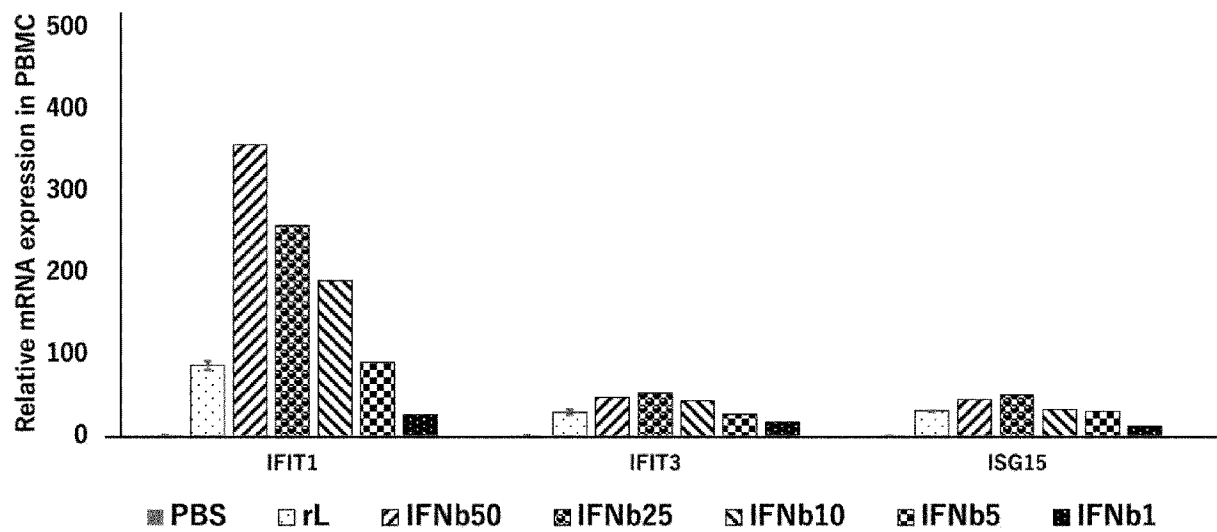
[図2A]



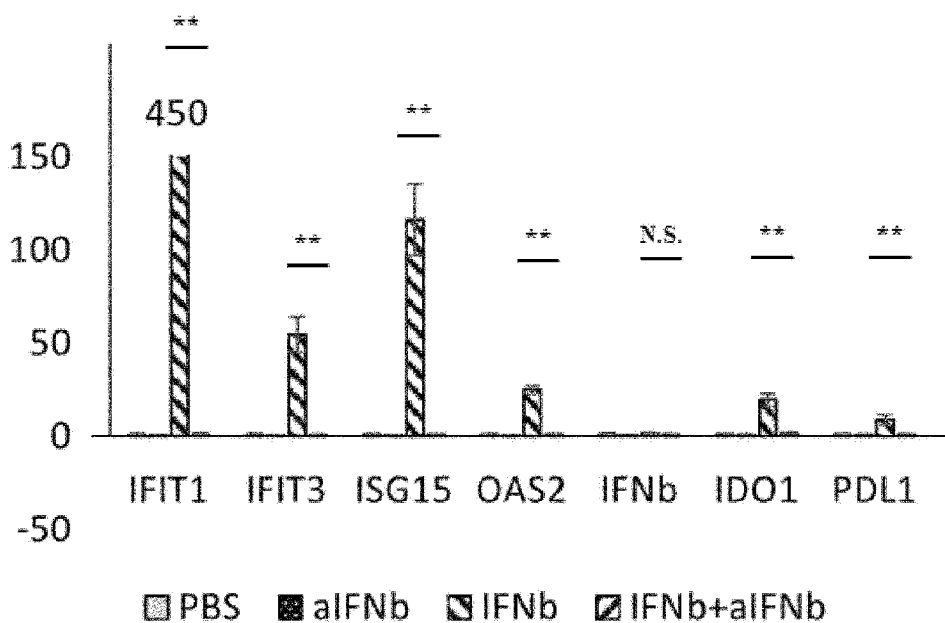
[図2B]



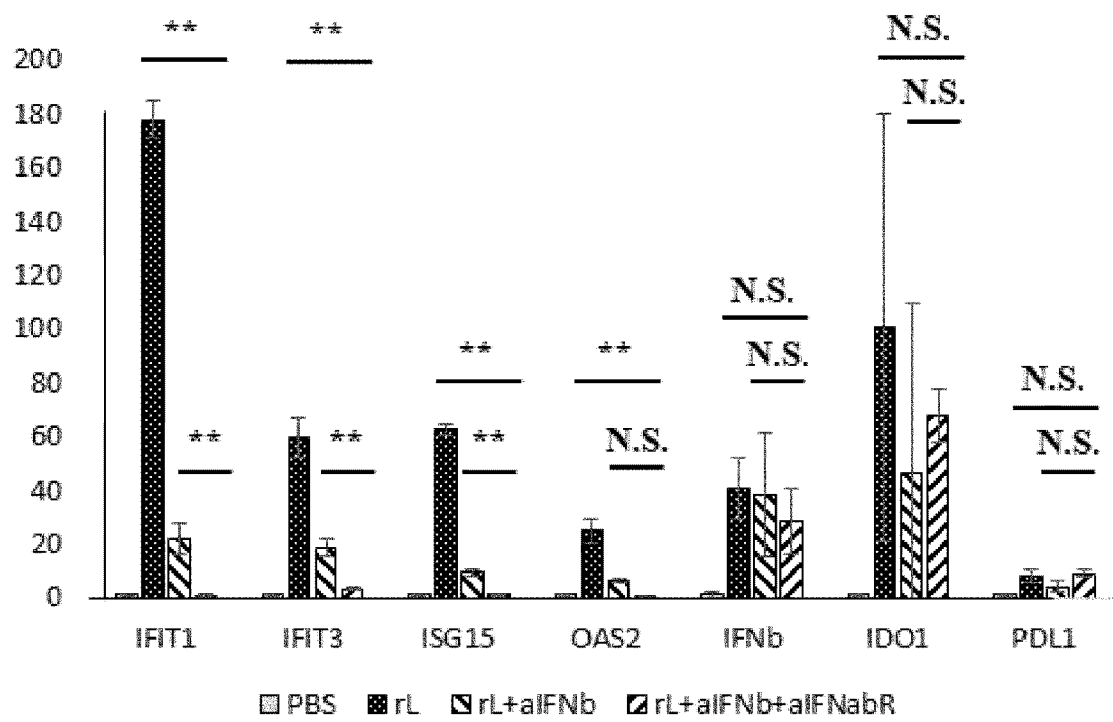
[図2C]



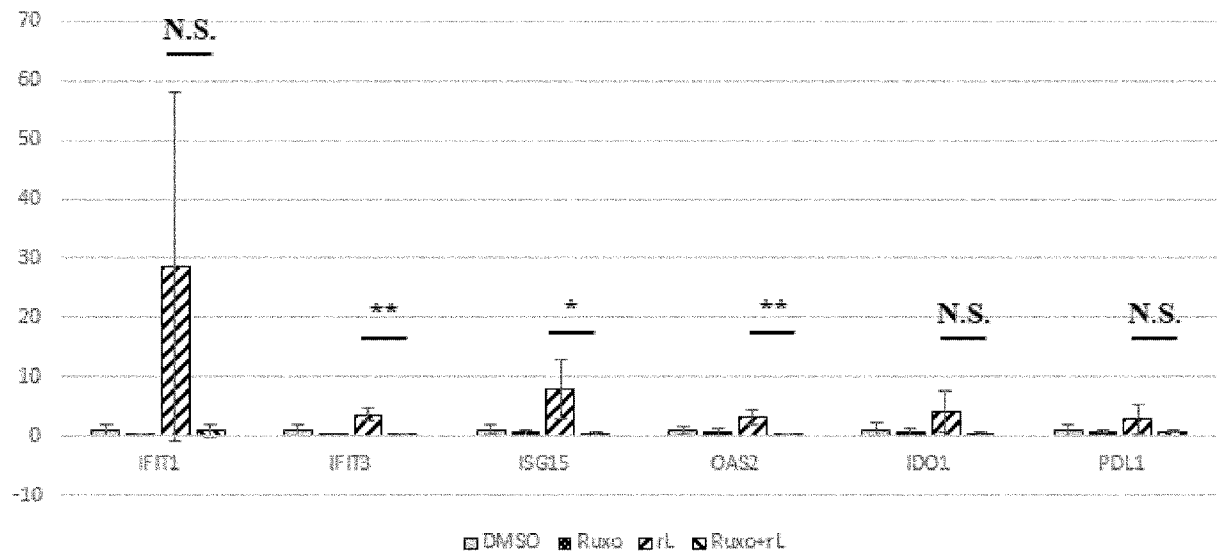
[図2D]



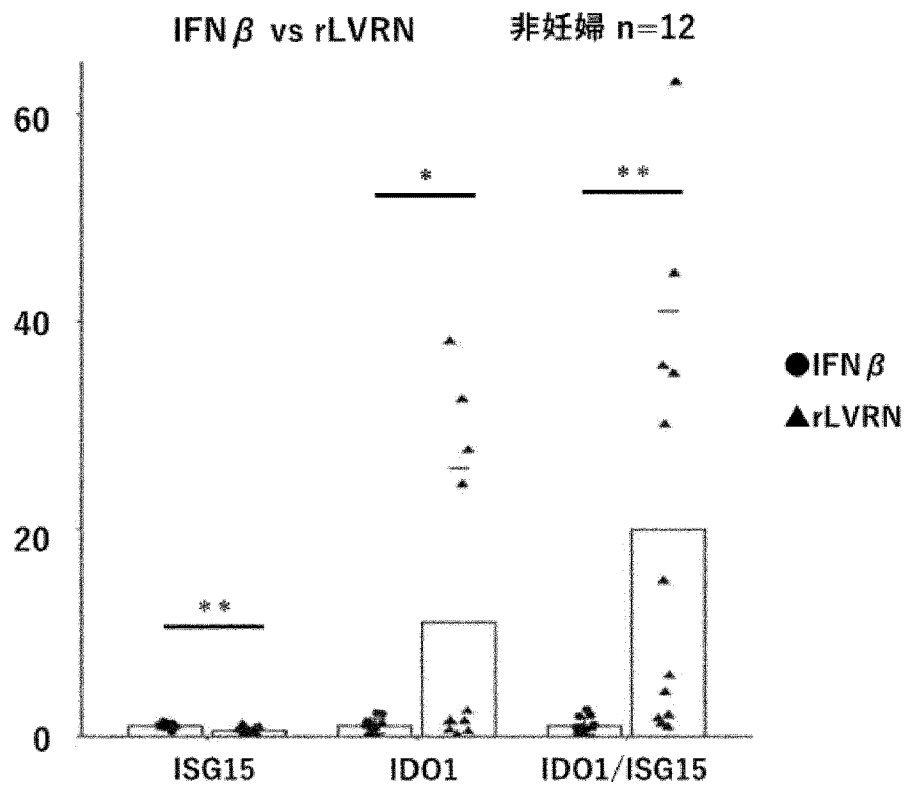
[図2E]



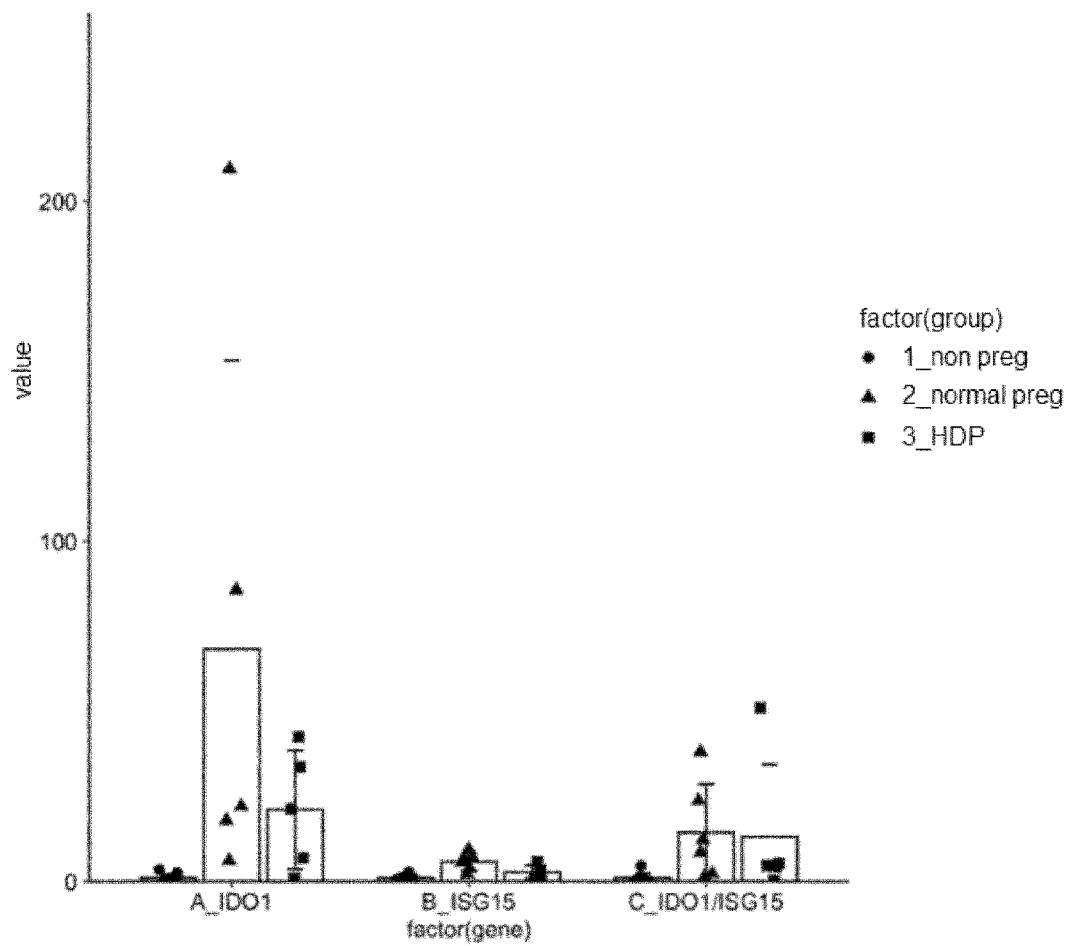
[図2F]



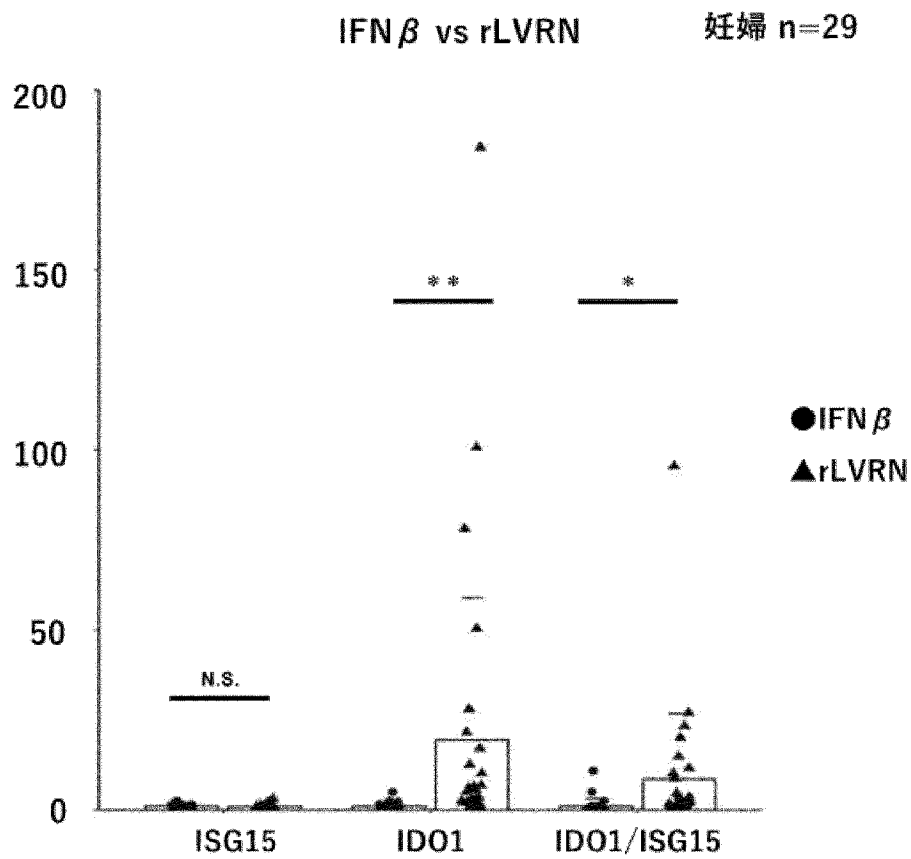
[図2G]



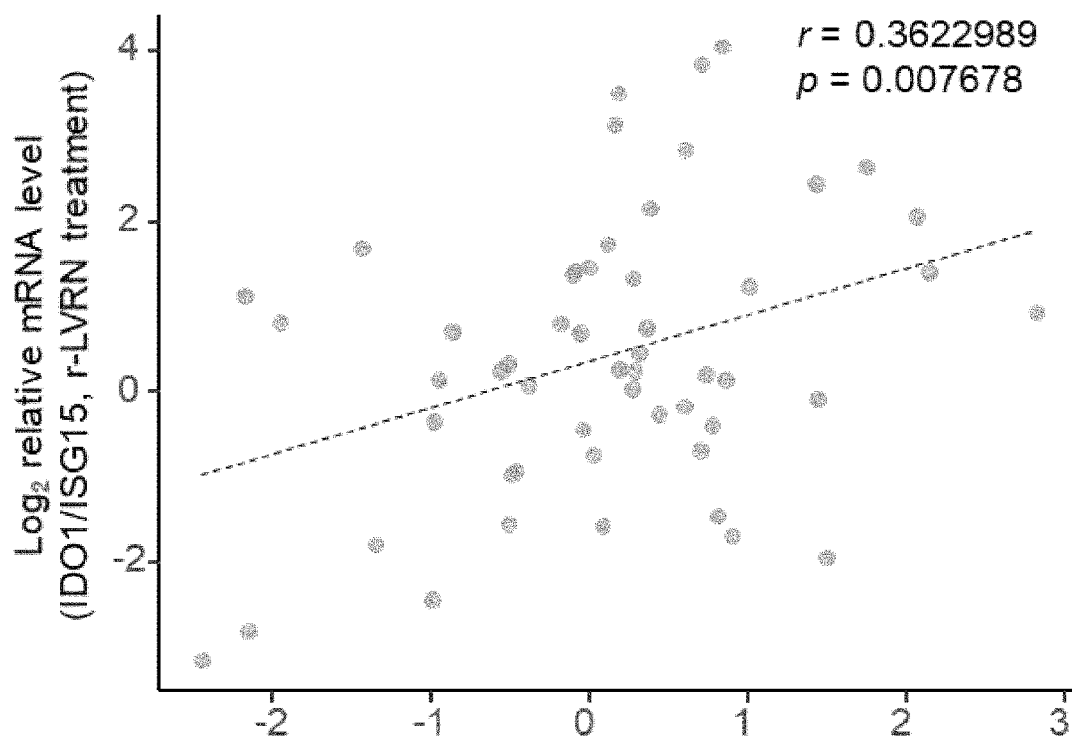
[図3A]



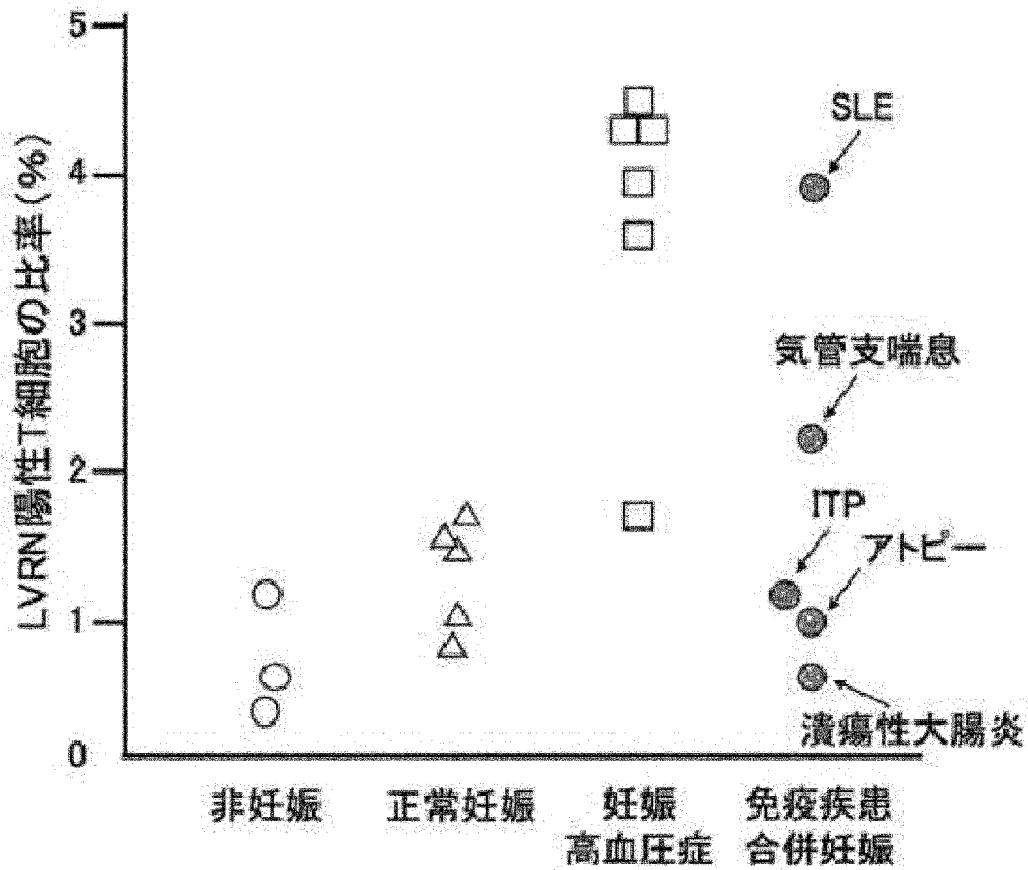
[図3B]



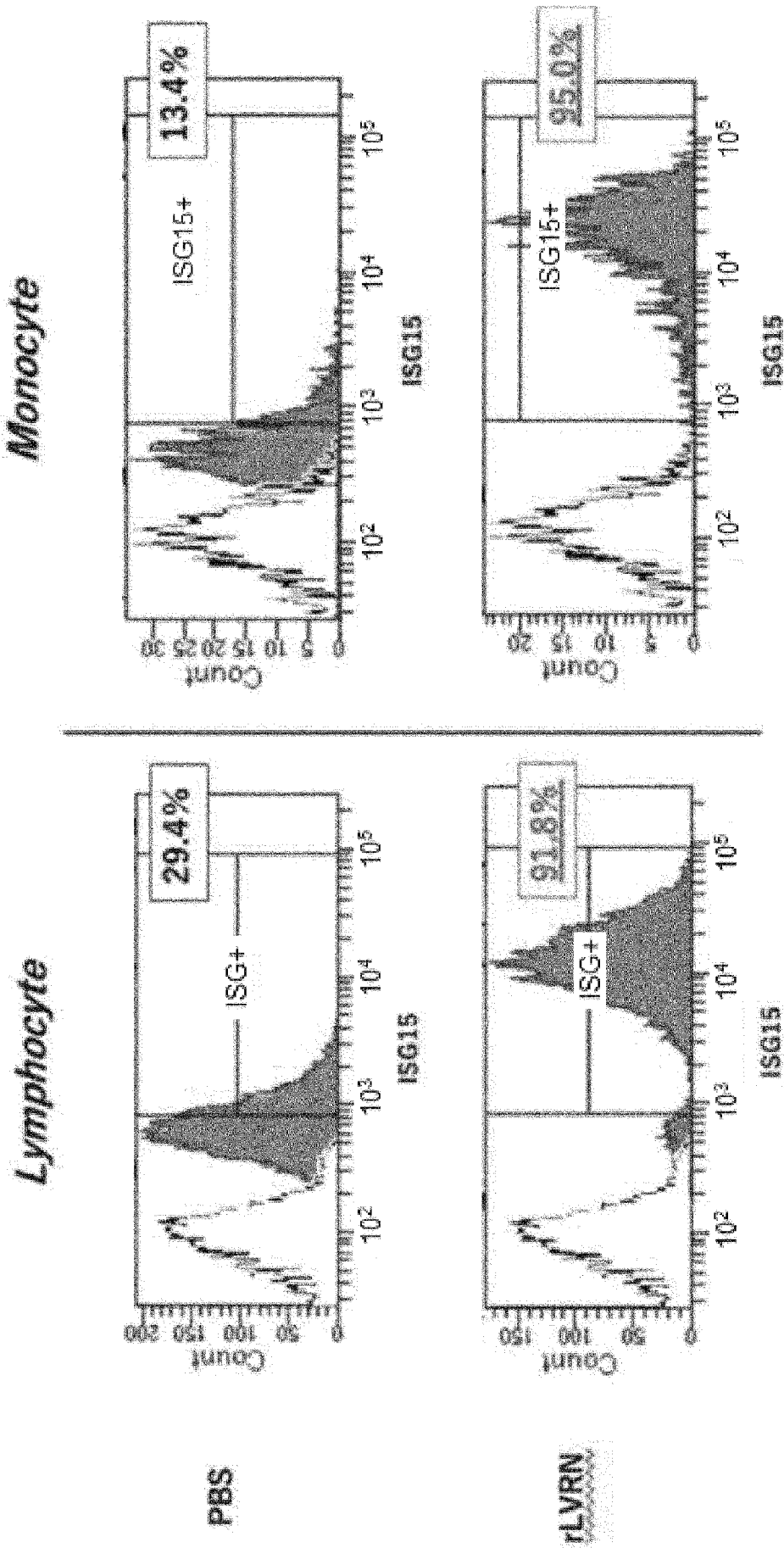
[図3C]

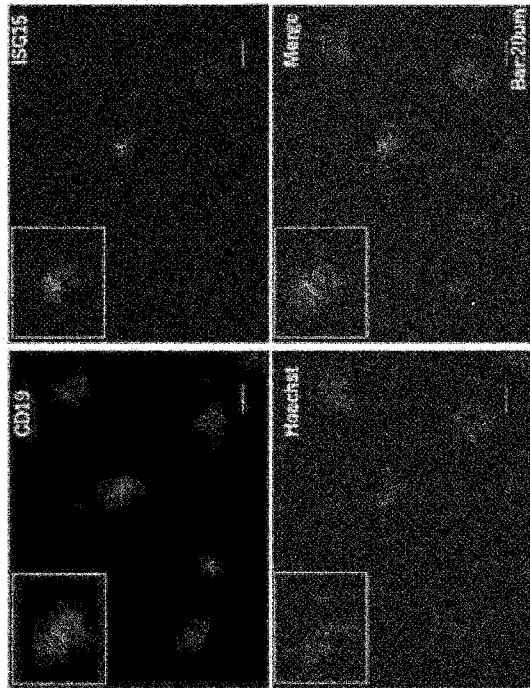


[図3D]

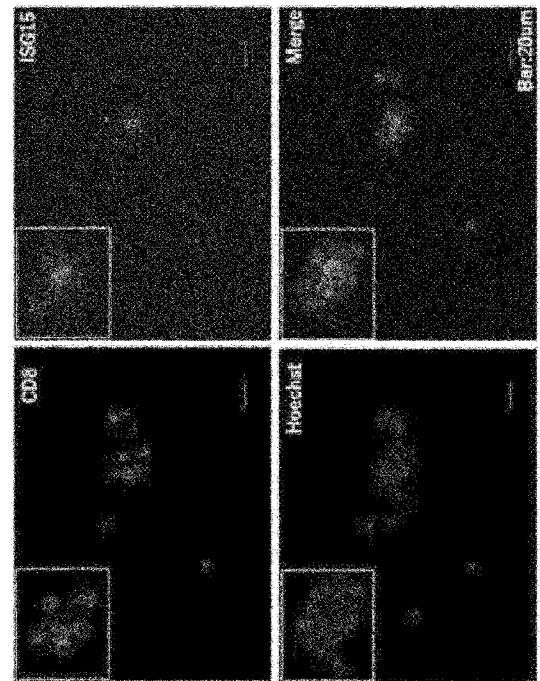


[図4A]

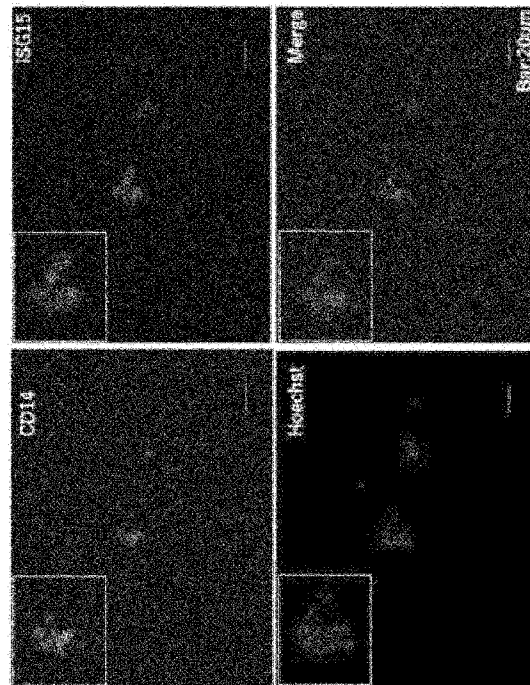


[4B]

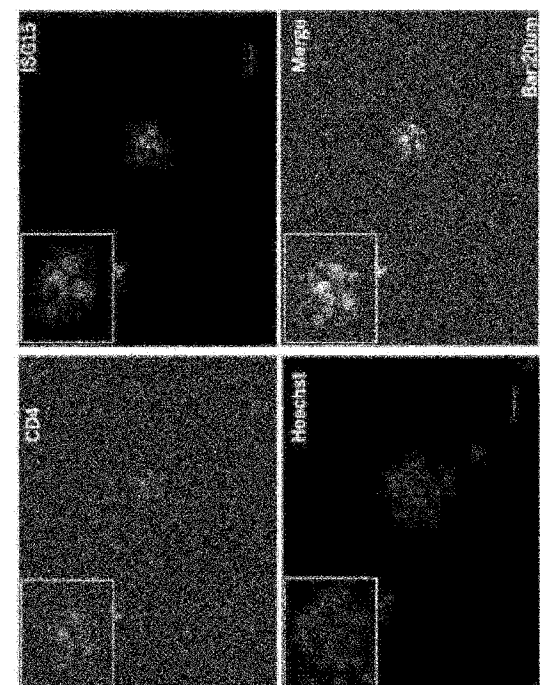
CD19



CD8

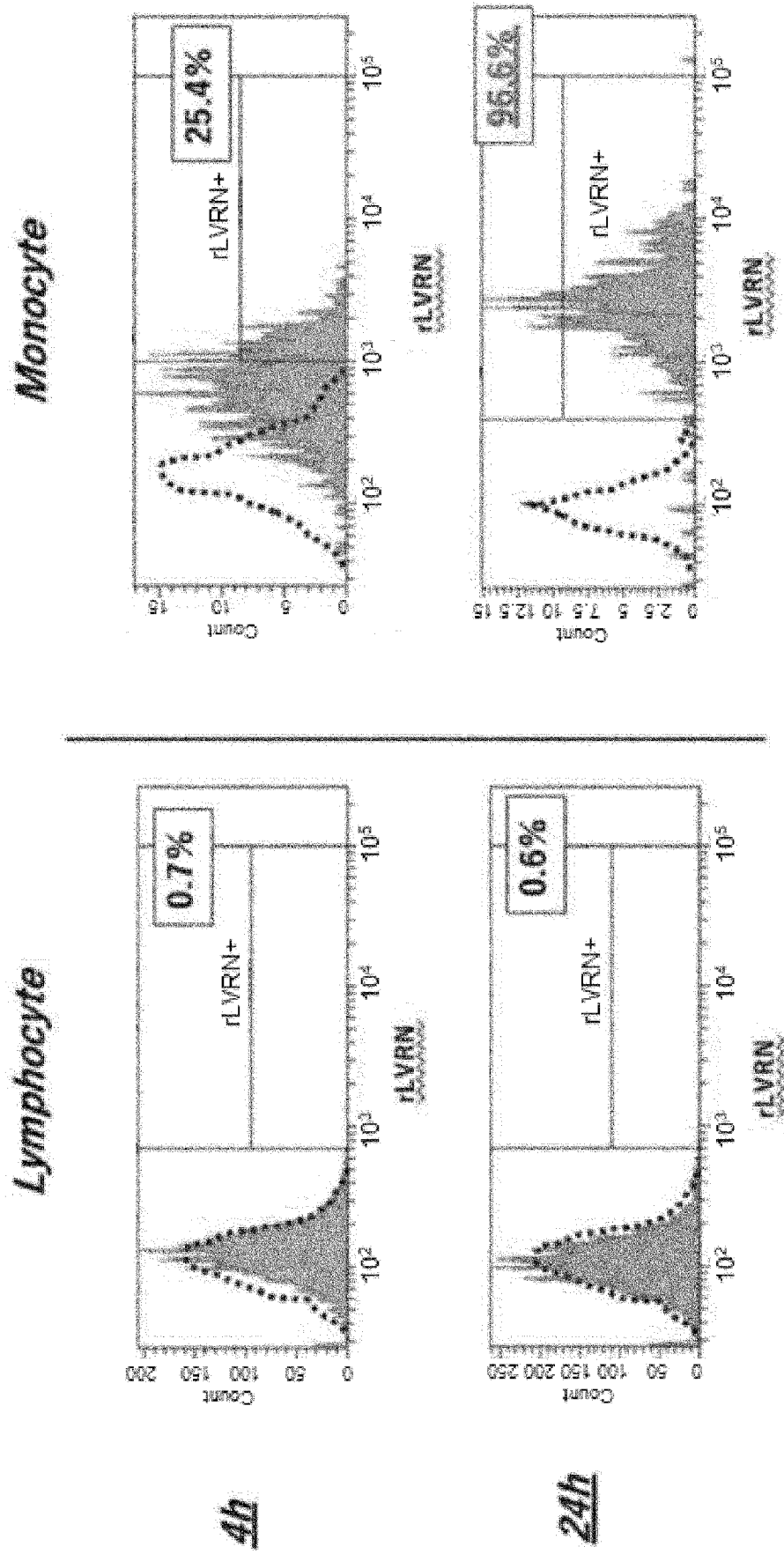


CD14

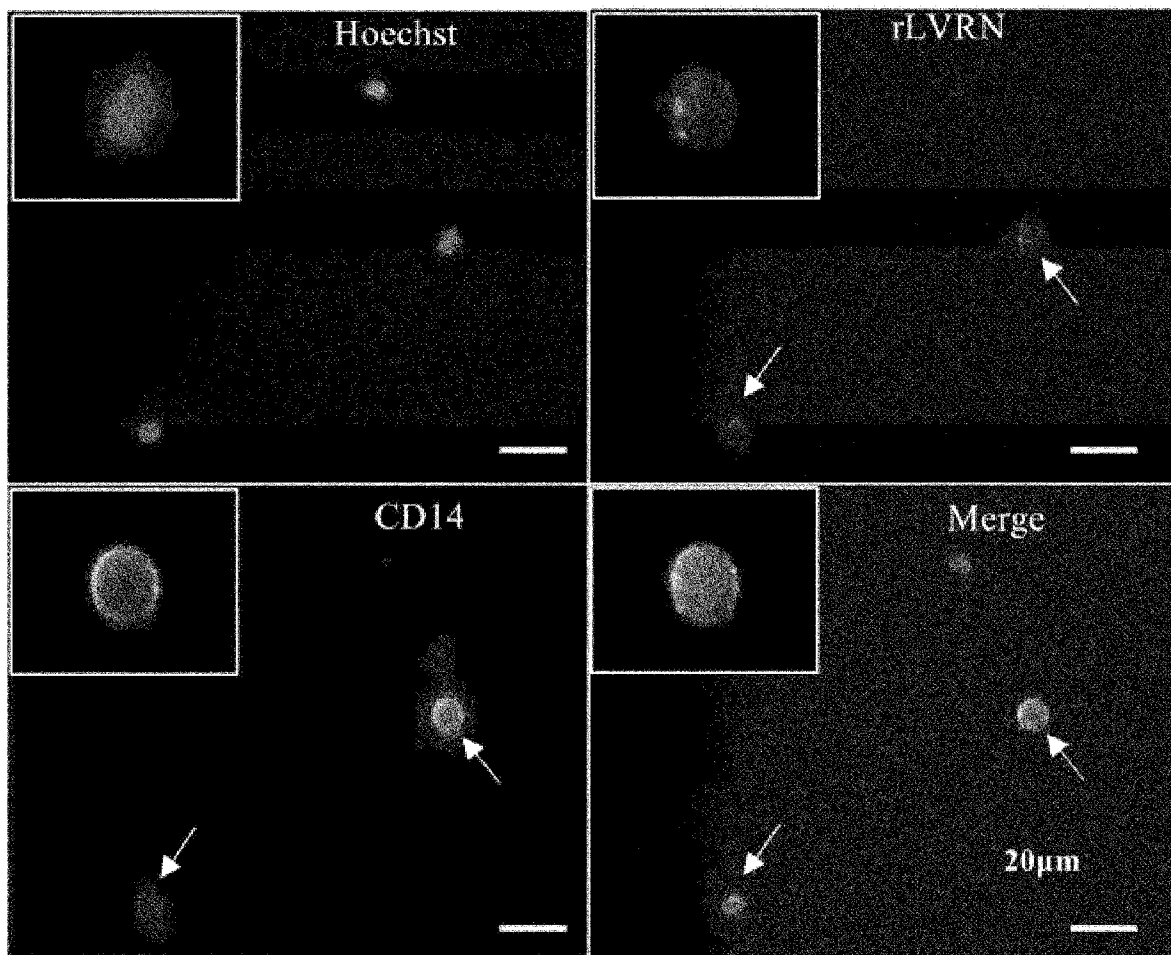


CD4

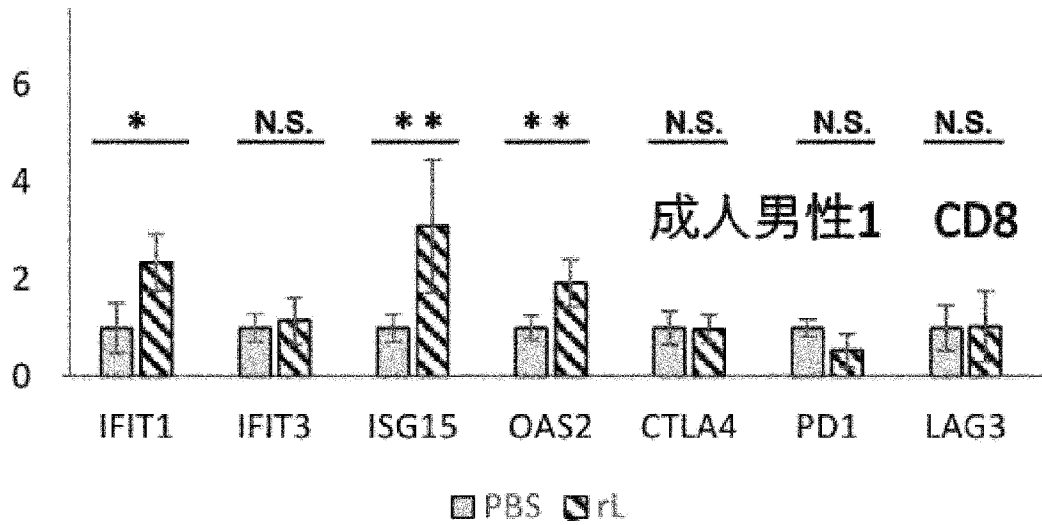
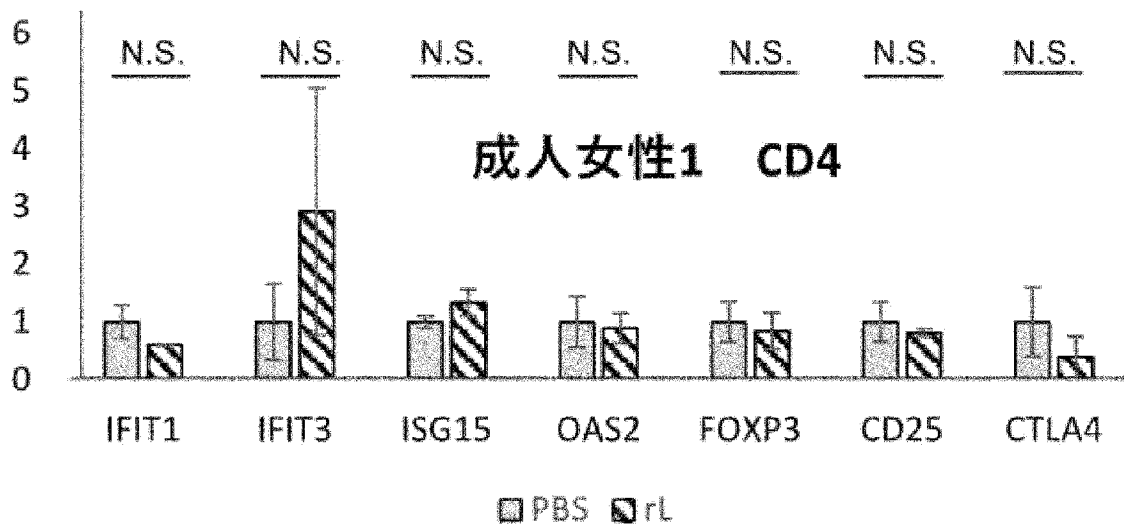
[図4C]



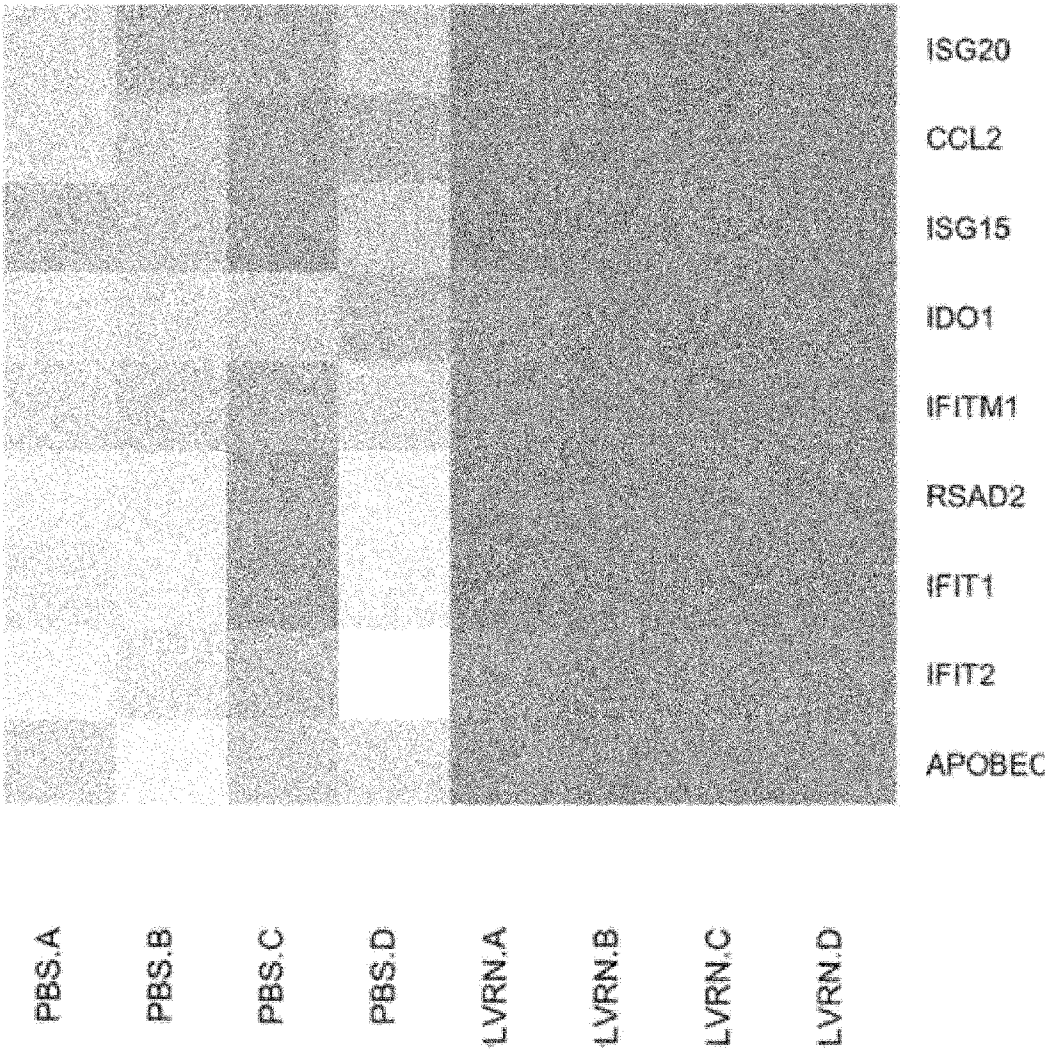
[図4D]



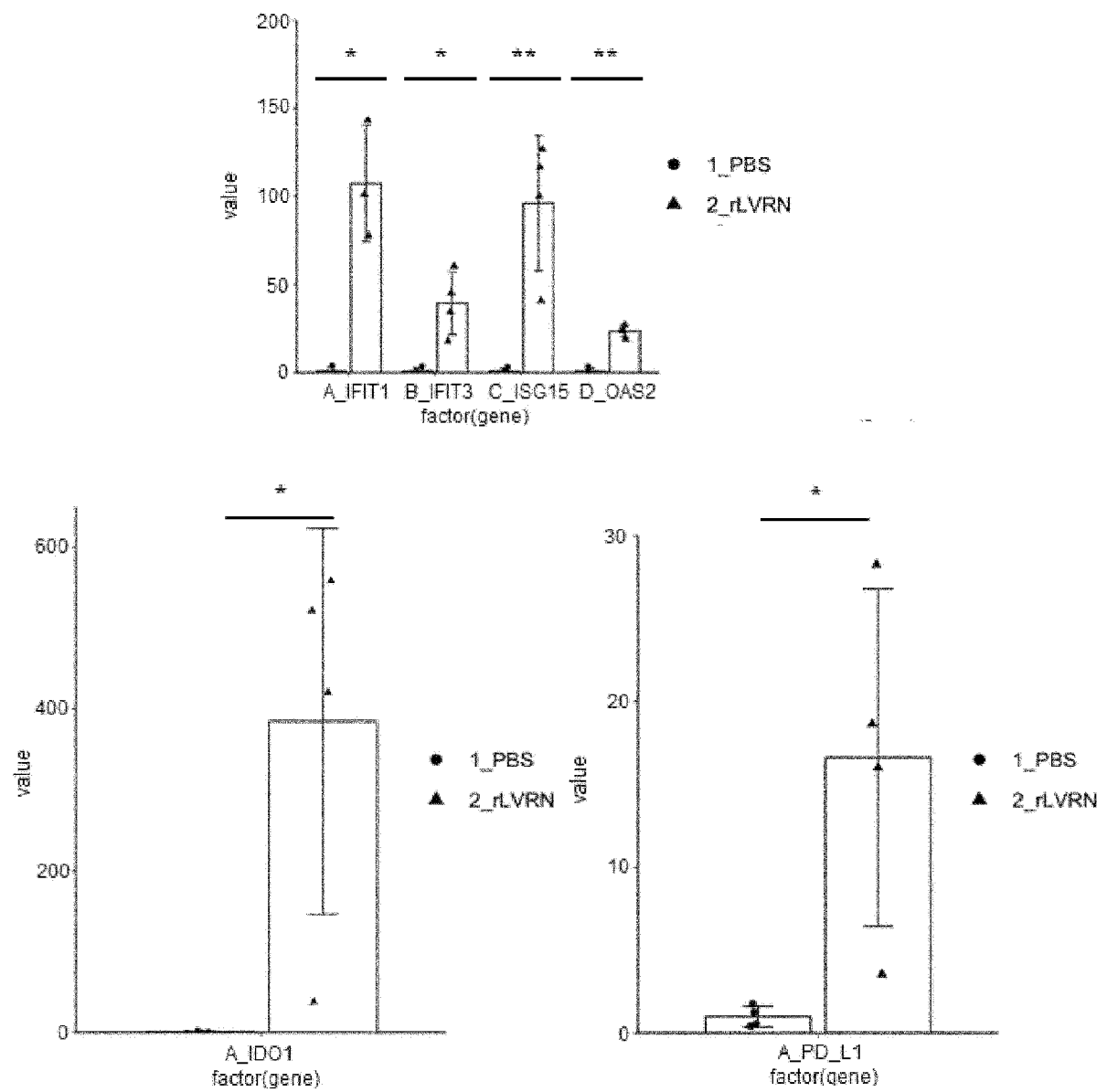
[図4E]



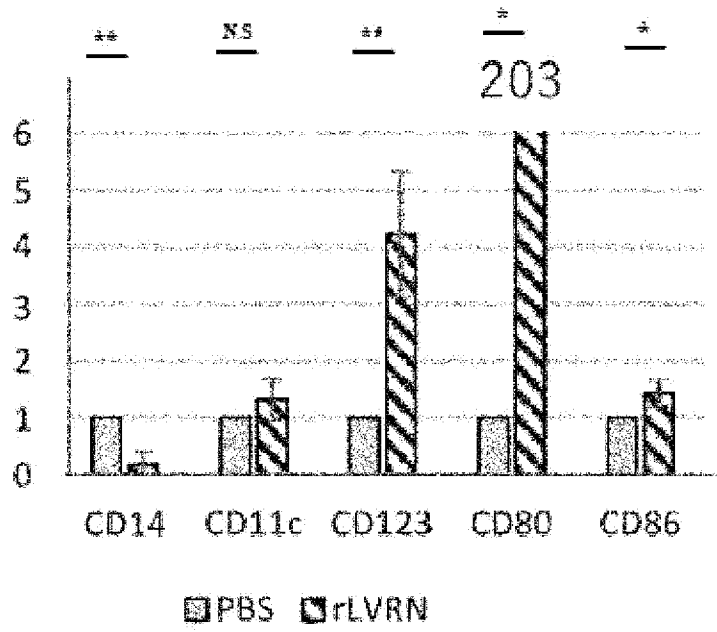
[図4F]



[図4G]

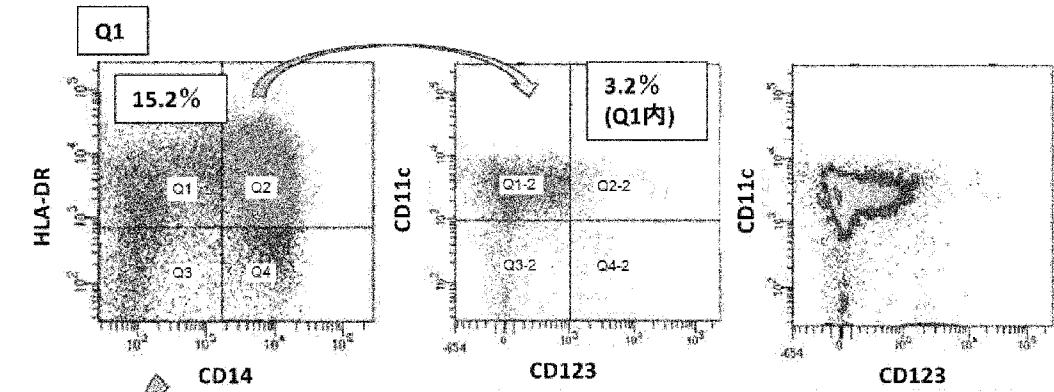


[図4H]

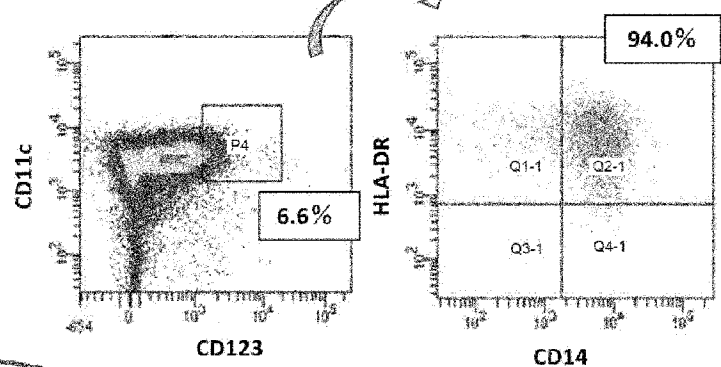


[図4I]

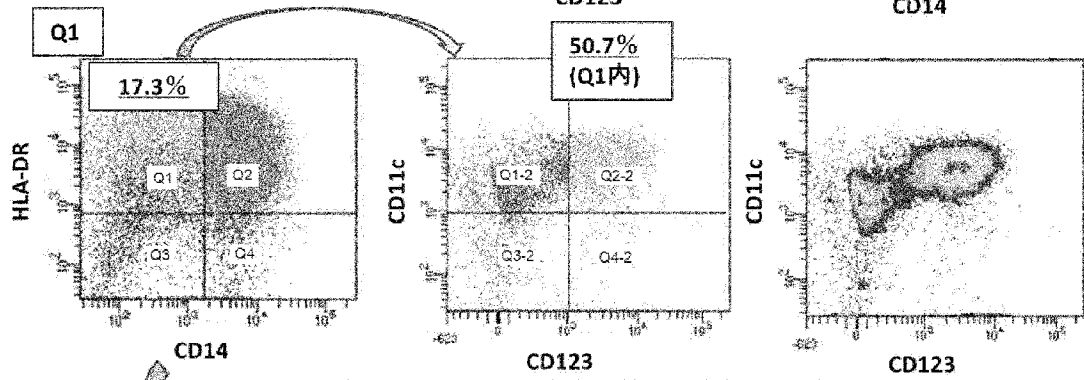
PBS



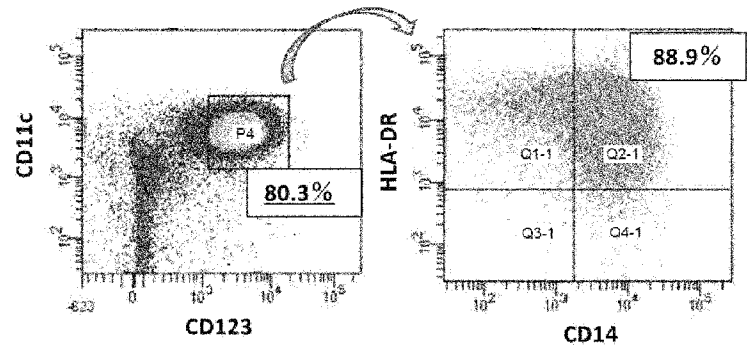
単球分画全体



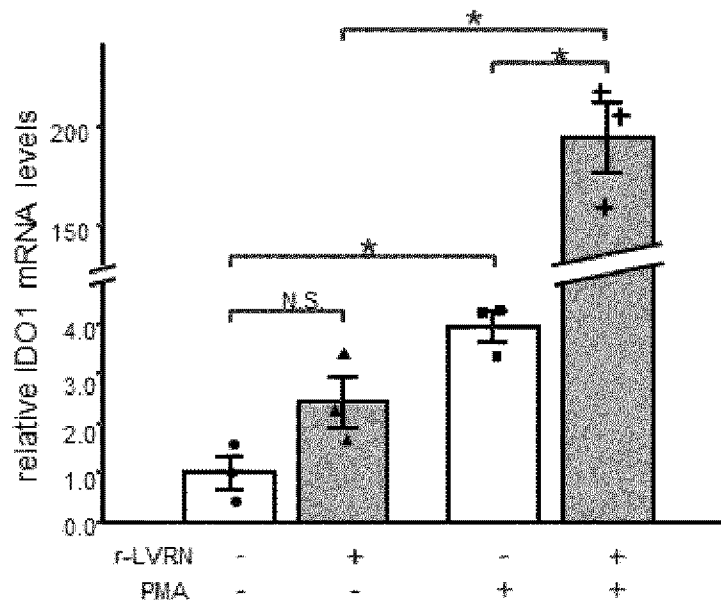
rLVRN



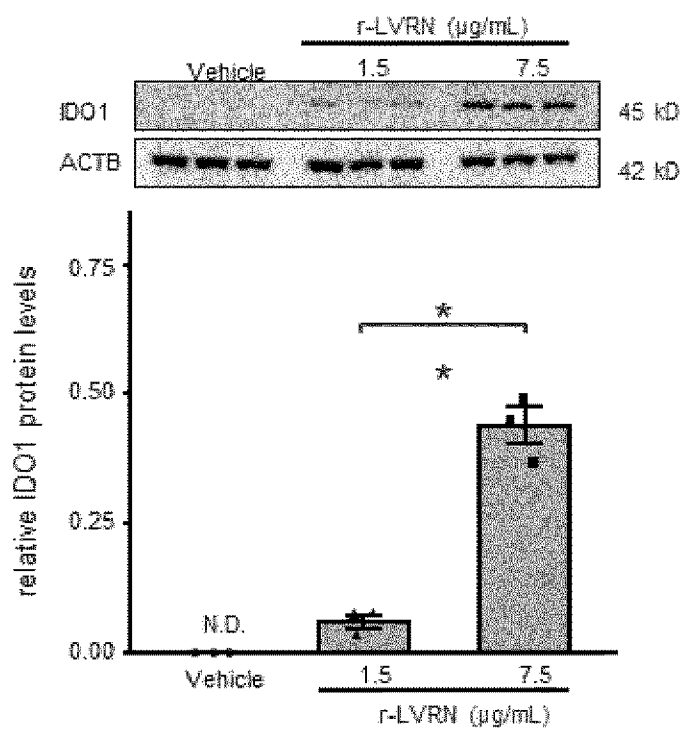
単球分画全体



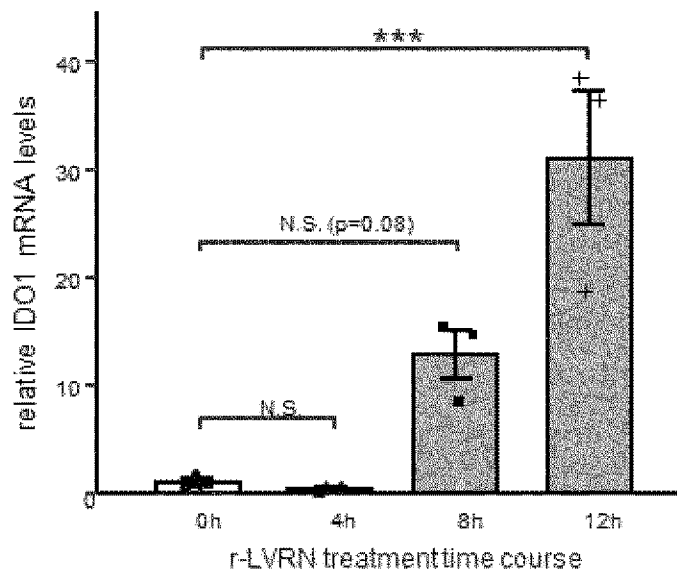
[図5A]



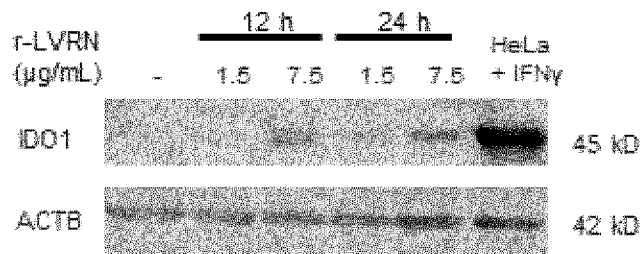
[図5B]



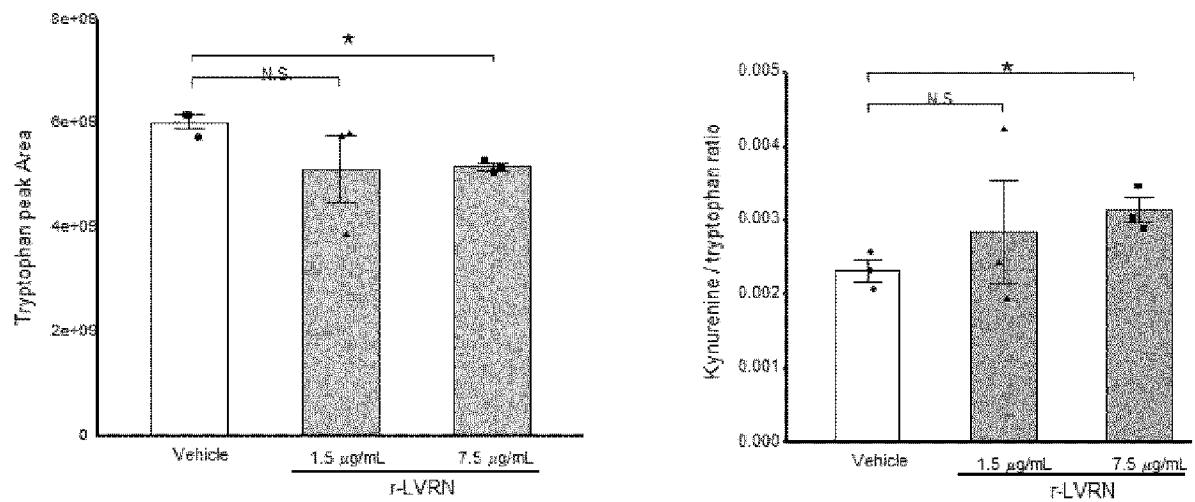
[図5C]



[図5D]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/019186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 38/16 (2006.01)i; A61K 35/12 (2015.01)i; A61P 9/12 (2006.01)i; A61P 31/12 (2006.01)i; A61P 37/02 (2006.01)i; A61P 37/06 (2006.01)i; C12N 5/0784 (2010.01)i; C12N 5/10 (2006.01)i; C12N 15/12 (2006.01)i; C12Q 1/06 (2006.01)i FI: A61K38/16; C12N5/0784; C12N5/10; A61P37/02; A61P37/06; A61K35/12; A61P31/12; A61P9/12; C12N15/12; C12Q1/06 ZNA 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) A61K38/16; A61K35/12; A61P9/12; A61P31/12; A61P37/02; A61P37/06; C12N5/0784; C12N5/10; C12N15/12; C12Q1/06 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 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2005-160473 A (KYOTO UNIV.) 23 June 2005 (2005-06-23) examples</td> <td>1-12, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>examples</td> <td>16, 20-25</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>FUJIWARA, Hiroshi et al. Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems. International Journal of Molecular Sciences. 10 March 2020, vol. 21, no. 1885, DOI:10.3390/ijms21051885 abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals</td> <td>1-12, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals</td> <td>16, 20-25</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	JP 2005-160473 A (KYOTO UNIV.) 23 June 2005 (2005-06-23) examples	1-12, 15	A	examples	16, 20-25	X	FUJIWARA, Hiroshi et al. Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems. International Journal of Molecular Sciences. 10 March 2020, vol. 21, no. 1885, DOI:10.3390/ijms21051885 abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	1-12, 15	A	abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	16, 20-25
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	JP 2005-160473 A (KYOTO UNIV.) 23 June 2005 (2005-06-23) examples	1-12, 15															
A	examples	16, 20-25															
X	FUJIWARA, Hiroshi et al. Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems. International Journal of Molecular Sciences. 10 March 2020, vol. 21, no. 1885, DOI:10.3390/ijms21051885 abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	1-12, 15															
A	abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	16, 20-25															
☒ 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 01 August 2023		Date of mailing of the international search report 15 August 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/JP2023/019186

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	松本多圭夫, Laeverinを指標とした胎児・胎盤循環幹細胞の機能解析, 科学研究費助成事業 研究成果報告書, subject number 18K16793, 19 February 2021, https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-18K16793/ , (MATSUMOTO, Takeo. Analysis of the role of laeverin expression in fetal-placental circulating stem cells derived from chorionic villi.), non-official translation (Grants-in-Aid for Scientific Research Fiscal Year Final Research Report.) whole document, particularly, 3. 研究の方法, 4. 研究成果, non-official translation (3. Research methods, 4. Research results)	1-15
A	whole document, particularly, 3. 研究の方法, 4. 研究成果, non-official translation (3. Research methods, 4. Research results)	16, 20-25
X	藤原浩, ヒト栄養膜細胞に特異的な新規液性因子laeverinによる免疫寛容誘導機構の解析, 科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書, subject number 24659730, 29 July 2019, https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-24659730/ , (FUJIWARA, Hiroshi. Induction of immune-tolerance by a novel human trophoblast-specific soluble factor, laeverin.), non-official translation (Grants-in-Aid for Scientific Research Final Research Report.) whole document, particularly, 3. (3) laeverinの機能解析, 4. 研究成果, non-official translation ((3) Functional analysis of laeverin, 4. Research results)	1-15, 17-19
A	whole document, particularly, 3. (3) laeverinの機能解析, 4. 研究成果, non-official translation ((3) Functional analysis of laeverin, 4. Research results)	16, 20-25
A	HORIE, A. et al. Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. Human Reproduction. 08 March 2012, vol. 27, no. 5, pp. 1267-1276, DOI:10.1093/humrep/des068 abstract	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/019186

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

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:

Document 1: JP 2005-160473 A (KYOTO UNIV.) 23 June 2005 (2005-06-23), examples

The claims are classified into the following five inventions.

(Invention 1) Claims 1-12 and 15

Claims 1-12 have the special technical feature of a "composition for inducing immunotolerance, comprising laeverin", and are therefore classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 13 and 14

Claims 13 and 14 and claim 1 classified as invention 1 share the technical feature of "laeverin". However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosures in document 1 (in particular, see the examples), and thus is not considered to be a special technical feature. Moreover, there are no other same or corresponding special technical features between claims 13 and 14 and claim 1.

Furthermore, claims 13 and 14 are not dependent on claim 1. In addition, claims 13 and 14 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Accordingly, claims 13 and 14 cannot be classified as invention 1.

Claims 13 and 14 have the special technical feature of a "method for treating cells, comprising culturing immune cells or cells including the same in the presence of laeverin", and thus are classified as invention 2.

For the same reason as above, claims 16-25 are classified as indicated below:

(Invention 3) Claim 16

(Invention 4) Claims 17-19

(Invention 5) Claims 20-25.

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/019186

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2005-160473	A	23 June 2005	JP	2009-31307	A	
examples							

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 38/16(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; C12N 5/0784(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i FI: A61K38/16; C12N5/0784; C12N5/10; A61P37/02; A61P37/06; A61K35/12; A61P31/12; A61P9/12; C12N15/12; C12Q1/06 ZNA																	
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）） A61K38/16; A61K35/12; A61P9/12; A61P31/12; A61P37/02; A61P37/06; C12N5/0784; C12N5/10; C12N15/12; C12Q1/06 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2023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> 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)			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																
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2005-160473 A（国立大学法人京都大学）23.06.2005（2005-06-23）</td> <td>1-12, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>実施例</td> <td>16, 20-25</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>FUJIWARA, Hiroshi et al., Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems, International Journal of Molecular Sciences, 2020.03.10, Vol. 21, No. 1885, doi: 10.3390/ijms21051885 abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals</td> <td>1-12, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals</td> <td>16, 20-25</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	JP 2005-160473 A（国立大学法人京都大学）23.06.2005（2005-06-23）	1-12, 15	A	実施例	16, 20-25	X	FUJIWARA, Hiroshi et al., Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems, International Journal of Molecular Sciences, 2020.03.10, Vol. 21, No. 1885, doi: 10.3390/ijms21051885 abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	1-12, 15	A	abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	16, 20-25
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
X	JP 2005-160473 A（国立大学法人京都大学）23.06.2005（2005-06-23）	1-12, 15															
A	実施例	16, 20-25															
X	FUJIWARA, Hiroshi et al., Promoting Roles of Embryonic Signals in Embryo Implantation and Placentation in Cooperation with Endocrine and Immune Systems, International Journal of Molecular Sciences, 2020.03.10, Vol. 21, No. 1885, doi: 10.3390/ijms21051885 abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	1-12, 15															
A	abstract, 3.2. regulation of Extravillous Trophoblast (EVT) Invasion by Embryonic Signals	16, 20-25															
☒ 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																	
国際調査を完了した日 01.08.2023		国際調査報告の発送日 15.08.2023															
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） 濱田 光浩 4U 3763 電話番号 03-3581-1101 内線 3439															

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	松本多圭夫, Laeverinを指標とした胎児・胎盤循環幹細胞の機能解析 Analysis of the role of laeverin expression expression in fetal-placental circulating stem cells derived from chorionic villi, 科学研究費助成事業 研究成果報告書, 課題番号18K16793, 2021.02.19, https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-18K16793/	1-15
A	全体、特に3. 研究の方法、4. 研究成果 全体、特に3. 研究の方法、4. 研究成果	16, 20-25
X	藤原浩, ヒト栄養膜細胞に特異的な新規液性因子laeverinによる免疫寛容誘導機構の解析 Induction of immune-tolerance by a novel human trophoblast-specific soluble factor, laeverin, 科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書, 課題番号24659730, 2019.07.29, https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-24659730/	1-15, 17-19
A	全体、特に3. (3) laeverinの機能解析、4. 研究成果 全体、特に3. (3) laeverinの機能解析、4. 研究成果	16, 20-25
A	HORIE A. et al., Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation., Human Reproduction, 2012.03.08, Vol. 27, No. 5, p. 1267-1276, doi:10.1093/humrep/des068 abstract	1-25

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。

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の国際調査機関は認めた。

文献1：JP 2005-160473 A（国立大学法人京都大学）23.06.2005(2005-06-23) 実施例

請求の範囲は、以下の5つの発明に区分される。

（発明1）請求項1-12、15

請求項1-12は、「リーベリンを含む、免疫寛容を誘導するための組成物」という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

（発明2）請求項13、14

請求項13、14は、発明1に区分された請求項1と、「リーベリン」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容（特に実施例参照）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項13、14と請求項1との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項13、14は請求項1の従属請求項ではない。また、請求項13、14は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項13、14は発明1に区分できない。

そして、請求項13、14は、「細胞の処理方法であって、リーベリンの存在下で免疫細胞またはこれを含む細胞集団を培養することを含む方法。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

上述したことと同様の理由により、請求項16-25はそれぞれ

（発明3）請求項16

（発明4）請求項17-19

（発明5）請求項20-25

に区分する。

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

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

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

PCT/JP2023/019186

様式 PCT/ISA/210 (パテントファミリー用別紙) (2015年1月)