

(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
2020年9月10日(10.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/179700 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/00 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) A61P 17/04 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
A61P 11/06 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/008427

(22) 国際出願日: 2020年2月28日(28.02.2020)

(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 2019-037353 2019年3月1日(01.03.2019) JP
特願 2019-086233 2019年4月26日(26.04.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人筑波大学(UNIVERSITY OF TSUKUBA) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 渋谷 彰(SHIBUYA Akira); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 金丸 和正(KANEMARU Kazumasa); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP).

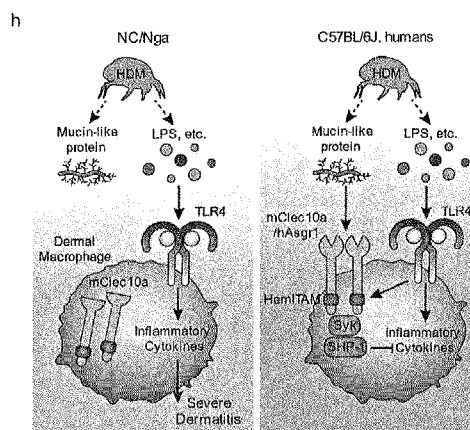
(74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) Title: COMPOSITION FOR USE IN TREATMENT OF ALLERGIC DISEASES

(54) 発明の名称: アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物

〔図4〕



(57) Abstract: The present invention provides a composition for use in treatment of allergic diseases. This composition for use in treatment of allergic diseases contains a ligand for asialoglycoprotein receptor 1 (Asgr1).

(57) 要約: 本発明は、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物を提供する。本発明によれば、アシアロ糖タンパク質受容体1 (Asgr1) のリガンドを含む、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物が提供される。

〔続葉有〕

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

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

明 細 書

発明の名称：

アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物

技術分野

[0001] 本発明は、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物に関する。

背景技術

[0002] チリダニ（HDM）は、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー疾患の主なアレルゲンである（非特許文献1および2）。NC/NgaマウスはHDMに対して感受性を有するマウス系統であり、HDMに対して他の系統と比較してより重度の皮膚炎を発症する（非特許文献3）。しかしながら、その発症機序についてはほとんど明らかにされていない。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Bieber, T. N. Engl. J. Med., 358: 1483-1494, 2008

非特許文献2：Jacquet, A., Trends Mol. Med., 17: 604-611, 2011

非特許文献3：Yamamoto, M. et al., Arch. Dermatol. Res., 301: 739-746, 2009

発明の概要

[0004] 本発明は、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物を提供する。

[0005] 本発明者らは、チリダニによる皮膚炎の発症や悪化に、マウスでは、Clec10aが関与することを明らかにした。本発明者らはまた、ヒトでは、Clec10aの構造的機能的カウンターパートがAsg1であることを明らかにし、また、チリダニによる皮膚炎の発症や悪化に、ヒトでは、Asg

g r 1 が関与することを明らかにした。発明者らはさらに、チリダニには、マウス C l e c 1 0 a およびヒト A s g r 1 に結合する物質であって、かつ、アレルギー発生を抑制する物質（例えば、C l e c 1 0 a リガンドまたは A s g r 1 リガンド）が含まれていることを明らかにした。発明者らはさらに、C l e c 1 0 a のリガンドが、O 結合型糖鎖、特に、T 抗原（G a l β (1-3) G a l N A c）、T n 抗原（ α G a l N A c）を含み、A S G R 1 がこれらのいずれにも結合することを明らかにした。本発明はこれらの知見に基づくものである。

[0006] すなわち、本発明によれば、例えば以下に示される発明が提供される。

(1) アシアロ糖タンパク質受容体 1 (A s g r 1) のリガンドを含む、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物。

(2) アレルギー疾患が、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、じんましん、アレルギー性喘息、アレルギー性結膜炎、アレルギー性胃腸炎およびアナフィラキシーショックからなる群から選択される 1 以上である、上記 (1) に記載の組成物。

(3) アレルギー疾患が、チリダニを原因とするものである、上記 (1) または (2) に記載の組成物。

(4) リガンドが、T 抗原および T n 抗原のいずれか、または両方を含む、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の組成物。

(5) リガンドが、T 抗原および T n 抗原からなる群から選択される糖鎖である、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の組成物。

(6) リガンドが、ムチン様タンパク質またはムチンである、上記 (1) ~ (4) のいずれかに記載の組成物。

(7) リガンドが、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドである、上記 (1) ~ (6) のに記載の組成物。

本発明によればまた、以下の発明が提供される。

(1 A) アシアロ糖タンパク質受容体 1 (A s g r 1) のリガンドを含む、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物。

(2 A) アレルギー疾患が、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、じんましん、アレルギー性喘息、アレルギー性結膜炎、アレルギー性胃腸炎およびアナフィラキシーショックからなる群から選択される1以上である、上記(1 A)に記載の組成物。

(3 A) アレルギー疾患が、チリダニを原因とするものである、上記(1 A)または(2 A)に記載の組成物。

(4 A) リガンドが、T抗原、T_n抗原、LeA、およびLexからなる群から選択される少なくとも1種の糖鎖を含む、上記(1 A)～(3 A)のいずれかに記載の組成物。

(5 A) リガンドが、T抗原、T_n抗原、LeA、およびLexからなる群から選択される少なくとも1種の糖鎖を提示するポリマー性の足場を含む、上記(1 A)～(3 A)のいずれかに記載の組成物。

(6 A) リガンドが、ムチン様タンパク質またはムチンである、上記(1 A)～(4 A)のいずれかに記載の組成物。

(7 A) リガンドが、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体1のリガンドである、上記(1 A)～(6 A)のいずれかに記載の組成物。

(8 A) ヒトアシアロ糖タンパク質受容体1の細胞外領域と膜貫通領域とCD3ζの細胞内領域を含む融合タンパク質を発現する動物細胞であって、CD3ζシグナルで活性化するプロモーターと作動可能に連結したレポーターをコードする遺伝子を有する動物細胞。

(9 A) 被検化合物が、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体1を活性化する化合物であることを検査する方法であって、

上記(8 A)に記載の細胞と被検化合物とを接触させることと、

レポーターの発現レベルが増強した場合に、当該被検化合物がヒトアシアロ糖タンパク質受容体1に結合する化合物であると決定することを含む、方法。

図面の簡単な説明

[0007] [図1] 図1は、NC/NgaマウスにおけるClec10aのナンセンス変異

がHDM誘発性皮膚炎を引き起こすことを示す図である。パネルaは、Clec10a遺伝子と、C57BL/6JのClec10a (NM_010796)、NC/Nga-Clec10a^{c.706T/T} (c.706T/T)、およびNC/Nga-Clec10a^{c.706T/C} (c.706T/C) マウスにおけるナンセンス変異部位 (c.706) のDNA配列とを示す。Clec10aの全長が複数の白抜きの四角とそれを貫く線によって表され、白抜きの四角は遺伝子のコード領域を表し、線はイントロンを示す。CTLDは、c型レクチン様ドメインを表す。パネルbは、C57BL/6JマウスおよびNC/NgaマウスのそれぞれのClec10aの模式図を示す。TMは、膜貫通ドメインを表す。パネルcは、C57BL/6Jマウス、NC/Nga-Clec10a^{c.706T/T}マウス、NC/Nga-Clec10a^{c.706T/C}マウスの背側皮膚のPI-CD45+MHCII+Lineage (CD3, CD19, NK1.1, およびLy-6G)-EpCAM-細胞における、マクロファージ (MP) (CD64+MerTK+)、従来型DC (cDC) (CD64-MerTK-)、および単球由来樹状細胞 (CD64-MerTK^{low}) の細胞表面のClec10aの発現を示す。影付きのヒストグラムは、アイソタイプコントロール抗体 (Ab) を用いた染色を示す。パネルdは、抗Clec10aモノクローナル抗体 (mAb) および4', 6-ジアミジノー2-フェニリンドール (DAPI) で染色された、C57BL/6Jマウス、NC/Nga-Clec10a^{c.706T/T}マウス、NC/Nga-Clec10a^{c.706T/C}マウスの背側の皮膚の組織切片の蛍光顕微鏡像を示す。Eは、表皮、Dは、真皮を表す。スケールバーは、100μmである。パネルe~iは、NC/Nga-Clec10a^{c.706T/T}マウス、NC/Nga-Clec10a^{c.706T/C}マウスの背側皮膚に週2回、HDM軟膏を適用した結果を示す。パネルeは、皮膚炎スコアを示し、パネルfは、14日目における外観を示し、パネルgおよびhは、組織切片 (ヘマトキシリン・エオシン染色) と上皮厚をそれぞれ示す。パネルiは、好中球 (CD11b⁺Ly-6G⁺)、好酸球 (CD11b⁺Siglec-F⁺)

、および $Ly-6C^{hi}$ 単球 ($CD11b^{+}Ly-6G^{-}Siglec-F^{-}Ly-6C^{hi}$) の個体総数を示す。*は、 $p < 0.05$ を表し、**は $p < 0.01$ を表し、***は、 $p < 0.001$ を表す（独立両側 Student's t-検定）。データは、平均値 $\pm$ SEMを示す。

[図2] 図2は、 $Clec10a$ がHDM誘発性の免疫応答を阻害することを示す。パネルa～fは、 $C57BL/6J$ 野生型マウスと $Clec10a^{-/-}$ マウスの背側皮膚に週2回、HDM軟膏を適用した結果を示す。パネルaおよびbは、特定時点における組織と上皮厚をそれぞれ示す ($n=3, 6, 5$)。パネルcおよびdは、野生型マウスと $Clec10a^{-/-}$ マウス間での比較を示す。パネルeは、特定時点における野生型マウスと $Clec10a^{-/-}$ マウスの皮膚 $CD45^{+}$ 細胞中の好中球 ($CD11b^{+}Ly-6G^{+}$) を同定するフローサイトメトリを示す。パネルfは、HDMの局所適用の3時間後における皮膚のWTおよび $Clec10a^{-/-}$ の $MHCII^{+}$ のMPおよびDCから得られたmRNAの定量的RT-PCRの結果である。パネルgは、HDMで刺激した野生型または $Clec10a^{-/-}$ の $CD115^{+}$ で濃縮したBMMPからの培養上清のcytometric bead array (CBA) 分析の結果を示す ($n=3$)。パネルhは、野生型、 $Tlr4^{-/-}$ 、および $Clec10a^{-/-}$ のBMMPをHDMで指定した時間刺激し、その後、その溶解物を $Clec10a$ 抗体を用いた免疫沈降 (IP) に供した結果を示す。イムノブロット分析 (IB) は、リン酸化チロシン (pTy) または $Clec10a$ に対する抗体を用いて行った。パネルiは、 $0.5 \mu M$ のTAK-242で事前処理し、HDMで6時間刺激した野生型または $Clec10a^{-/-}$ の $CD115^{+}$ で濃縮したBMMPからの培養上清のcytometric bead array (CBA) 分析の結果を示す ($n=3$)。パネルjは、野生型または $Clec10a^{-/-}$ の $CD115^{+}$ で濃縮したBMMPをHDMで指定した時間刺激し、その後、リン酸化Syk (pSyk; $Y^{519/520}$) またはSykに対するモノクローナル抗体 (mAb) を用いてイムノブロット (IB) した結果を示す。パネルkは

、野生型もしくはY3FのClec10aで、または空のベクター（EV）でトランスフェクションしたBMMPをHDMで刺激し、細胞溶解物をClec10aに対するmAbで免疫沈降し、Syk、SHP-1またはClec10aに対する抗体でイムノブロットした結果を示す。パネルIは、野生型とClec10a-/-のBMMPをSyk阻害剤IVで前処理し、指定した時間HDMで刺激して、細胞溶解物をClec10aの抗体でIPし、pSHP-1、SHP-1またはClec10aに対する抗体でイムノブロットした結果を示す。矢尻は、目的の分子（黒）、またはIP-Ab（白）の重鎖を示す。*は $p < 0.05$ を表し、**は $P < 0.01$ を表し、***は $p < 0.001$ を表す（独立両側Student's t-検定）。データは、平均値±SEMを示す。

[図3]図3は、Clec10aがHDMのムチン様タンパク質を認識することを示す。パネルa～dは、マウスClec10a-CD3ζレポーター細胞または親レポーター細胞における、ラットIgG2aもしくは抗Clec10a mAb（パネルaおよびb）、もしくは、ガラクトース（Gal）、グルコース（Glc）もしくはマンノース（Man）（パネルc）の存在下もしくは非存在下におけるHDMコートプレートで刺激した後の；またはガラクトシダーゼ（GALase）もしくはグルコシダーゼ（GLCase）で処理したまたは未処理のHDMコートプレート（パネルd）で刺激した後のGFPの発現を示す。パネルe～iは、Clec10a-Fcまたはコントロールヒト抗体でプルダウン（PD）したHDM中のClec10aリガンド（Clec10a-L）（パネルe）、Clec10a-Lのサイズに基づく各分画（パネルf）、またはPNGase FもしくはNaOHの処理前後のClec10a-L（パネルi）で刺激した後のマウスClec10a-CD3ζレポーター細胞またはコントロールレポーター細胞におけるGFPの発現を示す。統計学的分析は、コントロールとして用いたPBS刺激サンプルを用いて実施した（パネルf）。Clec10a-Lは、PNGase FもしくはNaOHでの処理前（パネルf～h）または処理後（パ

ネルh)にC l e c 1 0 a - F cを用いてイムノブロットするか、または、アルシアンブルー有りもしくは無しで銀染色（パネルg）した。パネルjは、C l e c 1 0 a - Lのレクチンマイクロアレイ分析を示す。黒の棒は、G a l β (1-3) G a l N A c (T抗原)に結合するレクチンを示す。G a l N A cは、N-アセチルガラクトサミンを意味し、G l c N A cは、N-アセチルグルコサミンを意味する。パネルkは、HDMのC l e c 1 0 a - Lの模式図を示す。Tは、T抗原(G a l β (1-3) G a l N A c)を意味し、T nは、T n抗原(α G a l N A c)を意味し、L a c N A cは、N-アセチル-D-ラクトサミン(G a l β (1-4) G l c N A c)を意味する。*は $p < 0.05$ を表し、**は $P < 0.01$ を表し、***は $p < 0.001$ を表す（片側ANOVA検定（パネルcおよびf）または独立両側S t u d e n t ' s t -検定（パネルb、dおよびi））。データは、平均値 $\pm$ SEMを示す（ $n = 3$ ）。

[図4]図4は、ヒトA s g r 1がマウスC l e c 1 0 aの構造的かつ機能的カウンターパートであることを示す。パネルaおよびbは、ガラクトース、グルコースもしくはマンノースの非存在下（パネルa）または存在下（パネルb）におけるHDMコートプレートで刺激した後のヒトA s g r 1 - C D 3 ζ レポーター細胞におけるG F Pの発現を示す（ $n = 3$ ）。パネルcは、マウスC l e c 1 0 a、ヒトA s g r 1、およびヒトC l e c 1 0 aの細胞内領域のアミノ酸配列を示す。推定されるh e m I T A M配列を下線で示す。パネルdは、マウスC l e c 1 0 a - F cでHDMからプルダウンして得られたC l e c 1 0 aリガンドでコートされたプレートで刺激したヒトA s g r 1 - C D 3 ζ レポーター細胞におけるG F P発現を示す。パネルeは、ヒト皮膚の組織切片を抗A s g r 1抗体、抗C D 6 8 m A bおよびD A P Iで染色した結果を示す。Eは、表皮を意味し、Dは、真皮を意味する。スケールバーは、 $100 \mu\text{m}$ である。パネルfは、A S G R 1に特異的なs i R N Aまたはコントロールs i R N Aで処理し、 $100 \mu\text{g/mL}$ のHDMで6時間刺激したヒトC D 1 4 +単球由来MPの培養上清のc y t o m e t r

i c b e a d a r r a y (CBA) 分析の結果を示す ($n=3$)。パネル g は、健常者、乾癬患者、およびアトピー性皮膚炎患者の皮膚における A S G R 1 の発現 (G S E 5 6 6 7) と血清 I g E 価との関連を示す。パネル h は、マウスおよびヒトにおける H D M への暴露に際しての皮膚の恒常性維持における C 型レクチン受容体の働きについての仮説モデルを示す。* は $p < 0.05$ を表し、** は $P < 0.01$ を表し、*** は $p < 0.001$ を表す (片側 A N O V A 検定 (パネル b)、独立両側 S t u d e n t ' s t - 検定 (パネル f) または両側ピアソン相関検定 (パネル g))。データは、平均値 $\pm$ S E M を示す。

[図5] 図5は、C 5 7 B L / 6 J マウスと N C / N g a マウスにおける C l e c 1 0 a の特徴分析の結果を示す。パネル a は、B i o G P S 分析に基づく C 5 7 B L / 6 J マウスの造血細胞と組織における遺伝子発現の結果を示す。これらの遺伝子は、N C / N g a マウスにおいてのみナンセンス変異またはフレームシフト変異を示すが、他の 19 のマウス系統ではそのような変異は認められないことが明らかとなった。パネル b ~ e および i は、C 5 7 B L / 6 J マウス、N C / N g a マウス、N C / N g a - C l e c 1 0 a ^{c. 706} T / C マウスの背側の皮膚 (パネル b、c、および d) または腹腔 (パネル e および i) から単離された細胞のフローサイトメトリ分析の結果を示す。細胞は、プロピジウムイオダイド (P I)、指定されたマーカーに対する抗体、および抗 C l e c 1 0 a 抗体またはコントロール抗体で染色された。L i n e a g e は、C D 3、C D 1 9、N K 1. 1、および L y - 6 G を示す。影付きのヒストグラムは、アイソタイプコントロール抗体による染色を示す。パネル f および g は、F l a g タグ付きの C l e c 1 0 a ^{c. 706} C - I R E S - G F P または F l a g タグ付きの C l e c 1 0 a ^{c. 706} T - I R E S - G F P を発現する R A W 2 6 4. 7 の形質転換体について表面分析した結果 (パネル f) およびフローサイトメトリによる F l a g タグの細胞内発現 (パネル g) を示す。パネル h は、N C / N g a C l e c 1 0 a ^{c. 706} T / T (T / T)、C l e c 1 0 a ^{c. 706} T / C (T / C)、および C l e c 1 0 a ^{c. 706} C /

○ (C/C) マウスの皮膚における *Clec10a* の mRNA の発現を示す。パネル j は、指定された時点における血清 IgE 価を、*Clec10a*^{c.706T/T} (T/T)、*Clec10a*^{c.706T/C} (T/C) とで比較した結果を示す。* は $p < 0.05$ を表し、** は $P < 0.01$ を表し、*** は $p < 0.001$ を表す (片側 ANOVA 検定)。データは、平均値 $\pm$ SEM を示す。

[図6] 図6は、*Clec10a* 欠損マウスにおける HDM 誘発性の皮膚炎の表現型を示す。チリダニ (HDM) 軟膏を野生型 C57BL/6J マウスおよび *Clec10a*^{-/-} マウスの背側皮膚に週に2回適用した。パネル a は、指定された時点において回収された皮膚細胞を PI、抗 CD45 抗体、またはマーカー分子に対する抗体で染色した後の、それぞれの細胞集団のフローサイトメトリによる分析結果を示す。各細胞のマーカーは以下の通りであった：好酸球 ($CD11b^{+}Siglec-F^{+}$)、および $Ly-6C^{hi}$ 単球 ($CD11b^{+}Ly-6G^{-}Siglec-F^{-}Ly-6C^{hi}$)、 $CD3^{+}CD4^{+}$ T 細胞 ($CD3^{+}CD4^{+}$)、 $CD8^{+}$ T 細胞 ($CD3^{+}CD8^{+}$)、上皮 $\gamma\delta$ T 細胞 ($CD3^{hi}TCR\gamma\delta^{hi}$)、真皮 $\gamma\delta$ T 細胞 ($CD3^{mid}TCR\gamma\delta^{mid}$)、 $CD11b^{+}$ の従来型樹状細胞 (cDC) ($CD11b^{+}MHCII^{+}CD11c^{+}CD64^{-}$)、 $MHCII^{+}$ マクロファージ (MP)、モノサイト由来 DC ($CD11b^{+}MHCII^{+}CD11c^{-}CD64^{+}$)。パネル b は、指定した時点における血清 IgE 価の ELISA である ($n=5$)。パネル c は、6 日目の腋窩リンパ節および鼠径リンパ節からソートされた野生型および *Clec10a*^{-/-} 型の $CD4^{+}$ T 細胞 ($CD3^{+}CD4^{+}$) における指定された分子の mRNA の発現レベルの定量的 RT-PCR の結果を示す。** は $P < 0.01$ を表し、*** は $p < 0.001$ を表す (独立両側 Student's t 検定)。データは、平均値 $\pm$ SEM を示す。

[図7] 図7は、野生型および *Clec10a*^{-/-} 型 MP の特性分析の結果を示す。パネル a は、HDM の局所適用の3時間後のマウス皮膚から得られた

MP (P I-CD45⁺MHC I I+Lineage (CD3, CD19, NK1.1, およびLy-6G)-EpCAM-CD64⁺) およびDC (P I-CD45⁺MHC I I+Lineage-EpCAM-CD64⁻) のソーティングのゲート戦略を示す。パネルbは、野生型およびClec10a^{-/-}型マウスに由来するCD115⁺のBMMPのソーティングに関するゲート戦略を示す。パネルcは、野生型およびClec10a^{-/-}型マウスに由来するBMMPをCD115、Clec10a、指定されたMPマーカー、およびTLR4に対する抗体で染色した結果を示す。CD115⁺細胞をゲートし、各分子の発現をフローサイトメトリで分析した。影付きのヒストグラムは、アイソタイプコントロール抗体による染色である。パネルdは、HDM刺激後のClec10a^{c.706T/T} (T/T)、およびClec10a^{c.706T/C} (T/C) マウスに由来するBMMPの培養上清のcytometric bead array (CBA) 分析の結果を示す (n=3)。パネルeは、野生型およびY3F変異型のClec10aの細胞内領域のアミノ酸配列を示す。推定hemITAM配列は下線を付されている。パネルfおよびgは、野生型およびY3F変異型のClec10aをコードするcDNAまたは空ベクターをトランスフェクトしたBMMPの細胞表面におけるClec10aの発現を示す。影付きのヒストグラムは、アイソタイプコントロール抗体による染色を示す (パネルf)。トランスフェクトされた細胞は、HDMで刺激され、溶解され、抗Clec10a抗体で免疫沈降 (IP) され、抗リン酸化チロシン (pTyr) 抗体や抗Clec10a抗体を用いてイムノブロットされた (パネルg)。矢尻は、目的の分子 (黒) およびIPに用いた抗体 (IP-Ab) (白) を示す。パネルhは、1 ng/mL LPSまたは200 pg/mLのPam2CSK4で6時間刺激した後に0.5 μMのTAK-242またはDMSOで処理されたCD115⁺のBMMPから細胞上清のCBA分析の結果を示す。**はP<0.01を表し、***はp<0.001を表す (独立両側Student's t-検定)。データは、平均値±SEMを示す (n=3)。

[図8]図8は、C l e c 1 0 a - C D 3 ζ レポーター細胞とC l e c 1 0 a - F C キメラタンパク質の確立を示す。パネルaおよびbは、指定された用量（パネルa）でL e w i s X でコートされたプレート、およびL e w i s X (1 0 μ g / m L) またはL e w i s Y (1 0 μ g / m L) でコートされたプレートで刺激した後のC l e c 1 0 a - C D 3 ζ レポーター細胞のG F P 発現をフローサイトメトリで分析した結果を示す。パネルcは、L e w i s X (L e X) またはL e w i s Y (L e Y) でコートされたプレートに結合したC l e c 1 0 a - F c をE L I S A で分析した結果を示す。データは、平均値±S E Mを示す (n = 3) 。

[図9]図9は、ヒトC l e c 1 0 a - C D 3 ζ レポーター細胞のH D M 刺激の結果とヒトA S G R 1 のノックダウン効率を示す。パネルaおよびbは、ガラクトース (G a l) 、グルコース (G l c) 、もしくはマンノース (M a n) の非存在下 (パネルa) または存在下 (パネルb) で、H D M でコートされたプレートで刺激した後のヒトC l e c 1 0 a - C D 3 ζ レポーター細胞のG F P 発現を示す。パネルcは、コントロールs i R N A またはA S G R 1 に特異的なs i R N A で処置したヒトC D 1 4 + 単球由来M P の細胞表面のA s g r 1 の発現を示す。影付きのヒストグラムはアイソタイプコントロール抗体による染色を示す。***はp < 0. 0 0 1を表す (片側A N O V A 検定) 。データは、平均値±S E Mを示す (n = 3) 。

[図10]図10は、C l e c 1 0 a リガンド (C l e c 1 0 a - L) がL P S 誘導性皮膚炎を改善することを示す図である。パネルaおよびbは、L P S をC l e c 1 0 a - L の存在下もしくは非存在下でC 5 7 B L / 6 J の野生型 (W T) マウス及びC l e c 1 0 a - / - マウスの背部皮膚に毎日塗布した後の、5日目における組織と表皮肥厚をそれぞれ示す。パネルcは、L P S をC l e c 1 0 a - L の存在下もしくは非存在下で背部皮膚に塗布した6時間後のW T マウスとC l e c 1 0 a - / - マウスの皮膚の好中球 (C D 4 5 + C D 1 1 b + L y - 6 G +) の数 (/ c m 2) を示す。*はp < 0. 0 5を表し、**はP < 0. 0 1を表す (独立両側S t u d e n t ' s t - 検定) 。デー

タは、平均値±SEMを示す。

[図11]図11は、Clecloa-Lを決定するためのスキームを示す。

[図12]図12は、表示された各種グリカンを提示するポリマー性足場で被覆されたプレートに対してClecloa-Fcが結合するかいなかを調べたELISAアッセイの結果を示す。

[図13]図13は、Clecloaレポーター細胞を用いて、表示された各種グリカンを提示するポリマー性足場がClecloaを活性化するか否かを調べたレポーターアッセイの結果を示す。

[図14]図14は、LPSによる表皮の炎症に対するT抗原を提示するポリマー性足場投与の効果を調べた治療実験の結果を示す。

発明の具体的な説明

[0008] 本明細書では、「対象」とは、哺乳動物であり得、例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット、およびリス等のペット；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、およびヤギ等の家畜；サル、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ、ボノボ、およびヒト等の霊長類を含む。

[0009] 本明細書では、「処置」とは、治療的処置および予防的処置が含まれる意味で用いられる。本明細書では、治療とは、疾患もしくは状態の悪化の抑制、疾患もしくは状態の悪化の遅延、疾患もしくは状態の改善、または疾患もしくは状態の治癒を含む意味で用いられ得る。本明細書では、予防とは、疾患もしくは状態の発症の抑制、または疾患もしくは状態の発症の遅延を含む意味で用いられ得る。

[0010] 本明細書では、「アレルギー」とは、免疫反応に基づく生体に対する全身的または局所的な障害を意味する。アレルギーは、血中抗体による液性免疫反応に基づくアレルギー（Ⅰ型、Ⅱ型、およびⅢ型）と感作リンパ球による細胞性免疫に基づくアレルギー（Ⅳ型）とに大別される。

[0011] Ⅰ型アレルギーは、即時型アレルギーまたはアナフィラキシー型とも呼ばれるアレルギーである。IgEが関与し、血中や組織中のマスト細胞や好塩基球が細胞表面に有するIgE受容体（FcεR1）とIgEが結合し、こ

れにアレルゲンが結合すると、マスト細胞や好塩気球からヒスタミン等の化学伝達物質が放出され、アレルギー反応（例えば、平滑筋収縮、血管透過性亢進、および腺分泌亢進）が引き起こされる。Ⅰ型アレルギーとしては、アトピー性気管支喘息、アレルギー性鼻炎、じんましん、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、およびアナフィラキシーショックが挙げられる。Ⅰ型アレルギーでは、ハウスダスト、ダニ等が、体内に侵入してアレルギー反応を起こすことが知られている（経口、吸入、経皮、および経静脈等の経路で侵入し得る）。

[0012] Ⅱ型アレルギーは、細胞および組織の抗原等とⅡgGまたはⅡgMとが反応し、ここに補体が結合することによって生じる細胞傷害に基づくものである。細胞膜の抗原に結合したⅡgGに対して、ⅡgG Fc受容体を有するマクロファージやキラー細胞などが結合してその細胞を傷害する抗体依存性細胞性障害（ADCC）もⅡ型アレルギーに含まれる。Ⅱ型アレルギーとしては、不適合輸血による溶血性貧血、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、薬剤性溶血性貧血、顆粒球減少症、血小板減少症、およびGoodpasture症候群が挙げられる。Ⅲ型アレルギーは、免疫複合体型またはArthus型とも呼ばれ、可溶性抗原とⅡgGまたはⅡgMとの免疫複合体（Immuno complex）による組織障害に基づく。Ⅲ型アレルギーとしては、血清病、全身性エリテマトーデスおよび関節性リウマチなどの自己免疫疾患、糸球体腎症、過敏性肺炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症が挙げられる。Ⅳ型アレルギーは、遅延型アレルギーとも呼ばれ、感作T細胞と抗原との反応により、感作T細胞からサイトカインが放出されて細胞傷害が生じることに基づく。また、キラーT細胞によるウイルス感染細胞、腫瘍細胞、移植片に対する障害にも基づくものである。Ⅳ型アレルギーとしては、アレルギー性接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、過敏性肺炎、結核性空洞、癰、サルコイドーシスの類上皮細胞性肉芽腫病変、天然痘発疹、および麻疹発疹が挙げられる。

[0013] 本明細書では、「アシアロ糖タンパク質受容体」とは、タンパク質の糖鎖

の最末端のシアル酸が除去され、その内側のガラクトース残基が末端基として露出した糖タンパク質、すなわち、アシアロ糖タンパク質（AGP）に結合する受容体である。アシアロ糖タンパク質受容体は、肝細胞表面に存在し、血液中のAGPと結合して血中からAGPを除去する。アシアロ糖タンパク質受容体1（ASGR1）は、C型レクチンドメインファミリーメンバーH1またはCLEC4H1とも呼ばれる。ヒトのASGR1タンパク質の代表例は、GenBankに登録番号CAG46849.1で登録されたアミノ酸配列を有するタンパク質で有り得る。本明細書では、「ASGR1」と述べる場合には、ヒトのASGR1のオーソログを含む意味で用いられる。

本明細書では、「Clec10a」は、C型レクチンドメインファミリー10、メンバーAとも呼ばれ、糖鎖を認識して宿主の生体防御システムとして機能する分子である。Clec10aは、ガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンと特異的に結合し得る。

[0014] 本明細書では、「チリダニ」（house dust mite）とは、ヒョウヒダニ属（Dermatophagoides属）のダニである。チリダニの主な種は、コナヒョウヒダニ（Dermatophagoides farinae）、ダーマトファゴイデス・ミクロセラス（Dermatophagoides microceras）、ヤケヒョウヒダニ（Dermatophagoides pteronyssinus）、およびユーログリファス・メイネイ（Euroglyphus maynei）である。

[0015] 本明細書では、「抗原」とは、抗体または糖の場合はレクチンが反応し得るエピトープを提供する物質を意味する。糖鎖の文脈において「抗原」は、通常の語義に従って、レクチンが反応し得るエピトープを提供する糖鎖を意味する。従って、糖鎖の文脈において「抗原」と述べた場合には、天然の糖鎖および糖タンパク質において認められるように、レクチンが反応し得るエピトープとして糖鎖を糖鎖の表層に提供することを意味する。

[0016] 本明細書では、「リガンド」とは、受容体が結合する相手の物質をいう。

リガンドは、受容体に結合することによって、受容体の下流シグナルを制御し得る。本明細書では、受容体の下流シグナルを正に制御する物質は、「アゴニスト」と呼ばれる。本明細書ではまた、受容体の下流シグナルを負に制御する物質は、「アンタゴニスト」と呼ばれる。

[0017] 本明細書では、「G a l N A c」とは、N-アセチルガラクトサミンを意味し、「G l c N A c」とは、N-アセチルグルコサミンを意味する。

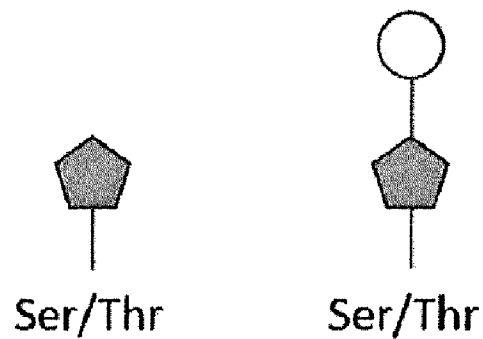
[0018] 本発明者らによれば、チリダニによる皮膚炎の発症や悪化に、マウスでは、C l e c 1 0 aが関与し、ヒトでは、A s g r 1が関与することを明らかにした。発明者らはまた、機能性解析および相同性解析の結果から、ヒトA s g r 1がマウスのC l e c 1 0 aの本来の構造的機能的カウンターパートであることを明らかにした。発明者らはまた、チリダニには、マウスC l e c 1 0 aおよびヒトA s g r 1に結合してこれを活性化し、アレルギー発生を抑制する物質（例えば、C l e c 1 0 aリガンドまたはA s g r 1リガンド）が含まれていることを明らかにした。発明者らはさらに、C l e c 1 0 aのリガンドが、O結合型糖鎖、特に、T抗原（G a l β （1-3）G a l N A c）、T n抗原（ α G a l N A c）を含み、A S G R 1がこれらのいずれにも結合することを明らかにした。本発明者らはまた、C l e c 1 0 aのリガンドがT L R 4シグナルを抑制することを明らかにした。

[0019] T抗原（G a l β （1-3）G a l N A c）、およびT n抗原（ α G a l N A c）はそれぞれ、以下式（I）に示される模式図の通りの構造を有する糖鎖である。A s g r 1が、T抗原およびT n抗原にそれぞれ結合することは、A s g r 1がガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンに対して親和性を有することと整合する。

[0020]

[化1]

Tn抗原 T抗原



 : GalNAc

 : ガラクトース

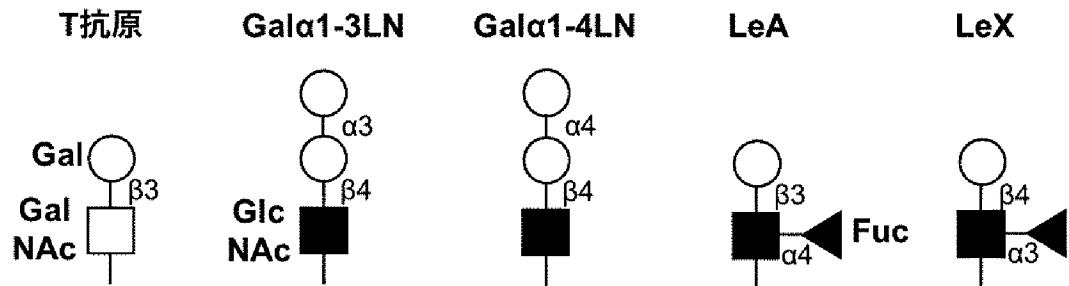
(I)

{式中、S e r / T h r は、セリンまたはトレオニン残基を表す。}

[0021] また、A s g r 1 は、T 抗原、L e A、およびL e Xからなる群から選択される糖鎖にも結合し、これによりシグナルを細胞内へ伝達する。

[0022]

[化2]



{ここで、T抗原は、 $\text{Gal} \beta 1-3 \text{GalNAc} \alpha 1$ を表し、 $\text{Gal} \alpha 1-3 \text{LN}$ は、 $\text{Gal} \alpha 1-3 \text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc} \beta 1$ を表し、 $\text{Gal} \alpha 1-4 \text{LN}$ は、 $\text{Gal} \alpha 1-4 \text{Gal} \beta 1-4 \text{GlcNAc} \beta 1$ を表し、LeAは、 $\text{Gal} \beta 1-3 (\text{Fuc} \alpha 1-4) \text{GlcNAc} \beta 1$ を表し、LeXは、 $\text{Gal} \beta 1-4 (\text{Fuc} \alpha 1-3) \text{GlcNAc} \beta 1$ を表す。}

[0023] 糖鎖は、ポリマー性の足場上に提示されていてもよい。例えば、糖鎖は、ポリ乳酸、ポリアクリルアミド、ポリビニル、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリルニトリル、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、ナイロン、コラーゲン、ヒドロキシエチルメタクリレート、キトサン、キチン、ポリエチレンオキシド、ポリエチレングリコール、ポリアミノ酸、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリカプロラクトン、およびこれらの共重合体などの生体適合性高分子をバックボーンとして有するポリマー性の足場の側鎖上に連結し、Clec10aに提示されてもよい。ポリマー性の足場上に提示された糖鎖が、Clec10aまたはAsg1を活性化させるか否かは、後述するCD3ζレポーター細胞を用いて確認することができる。上記においてそれぞれのポリマーは、投与可能な物性（例えば、粘度、浸透圧等）であれば特に限定されないが、例えば、1kDa～100kDa、5kDa～50kDa、10kDa～40kDa、または20～40kDの重量平均分子量を有する生体適合性高分子をバックボーンとして用いることができる。

[0024] 本発明によれば、アシアロ糖タンパク質受容体1（Asg1）のマウスカウンターパートであるClec10aにナンセンス変異またはフレームシフト変異を導入すると、HDMに対する応答が過剰になった。また、Clec

c 1 0 a のリガンドを含む抽出物（精製物）を調製し、ヒト A s g r 1 - C D 3 ζ レポーター細胞に接触させると、A s g r 1 は、濃度依存的に C l e c 1 0 a のリガンドに応答した。また、この活性化は、ガラクトースの系への添加によって濃度依存的に打ち消された。このことから、アジアロ糖タンパク質受容体 1（A s g r 1）のリガンド）は、チリダニにより誘発されるアレルギーなどの T L R 4 シグナルにより誘発される疾患または症状（例えば、炎症およびアレルギー疾患）の処置に用いることができると結論できる。

従って、本発明によれば、アジアロ糖タンパク質受容体 1（A s g r 1）のリガンドを含む、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物が提供される。本発明によれば、アジアロ糖タンパク質受容体 1（A s g r 1）のリガンドを含む、T L R 4 シグナルの活性化により誘発される疾患または症状（例えば、炎症およびアレルギー疾患）の処置に用いるための組成物が提供される。T L R シグナルは、T L R 4 リガンドにより活性化されうる。T L R 4 リガンドとしては、リボ多糖（L P S）およびリポテイコ酸並びにこれらのアナログであるアゴニストが挙げられる。したがって、これらの T L R 4 リガンドを含むアレルギーにより誘発される疾患または症状（例えば、炎症およびアレルギー疾患）の処置に、アジアロ糖タンパク質受容体 1（A s g r 1）のリガンドを用いることができる。したがって、本発明によれば、T L R 4 リガンドを含むアレルギーにより誘発される疾患または症状を処置することに用いるための組成物であって、アジアロ糖タンパク質受容体 1（A s g r 1）のリガンドを含む組成物が提供される。

[0025] アシアロ糖タンパク質受容体 1（A s g r 1）のリガンドとしては、シアル酸が離脱し、末端に L e w i s X を有する糖鎖、および当該糖鎖を有するタンパク質が挙げられる。アシアロ糖タンパク質受容体 1（A s g r 1）のリガンドとしては、シアル酸が離脱し、末端に T 抗原または T n 抗原を有する糖鎖、および当該糖鎖を有するタンパク質が挙げられる。T 抗原は、G a l β（1 - 3）G a l N A c を意味し、T n 抗原は、α G a l N A c を意味

する。アシアロ糖タンパク質受容体 1 (A s g r 1) のリガンドとしては、シアル酸が離脱し、末端に、L e w i s X 抗原、T 抗原、および T n 抗原からなる群から選択される 1、2 または全ての O 結合型糖鎖、または当該糖鎖を有するタンパク質であり得る。ムチン様タンパク質は、上記 O 結合型糖鎖を有し、L e w i s X 抗原、T 抗原、および T n 抗原からなる群から選択される糖鎖を有する。従って、アシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドは、ムチン様タンパク質またはムチンであり得る。アシアロ糖タンパク質受容体 1 (A s g r 1) のリガンドとしての前記タンパク質は、ムチン様タンパク質またはムチンであり得る。

[0026] 生体内においては、肝細胞に A s g r 1 が高発現しており、体内で脱シアリル化した老化したタンパク質（アシアロ糖タンパク質）を肝細胞内に取り込んで血中から除去する。従って、このような脱シアリル化した糖タンパク質は、全てアシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドとして用い得る。A s g r 1 は、T 抗原及び T n 抗原の少なくともいずれかまたは両方を有する糖鎖に結合し、反応する。従って、T 抗原及び T n 抗原の少なくともいずれかまたは両方を有する糖鎖またはこれを有するタンパク質は、全てアシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドとして用い得る。また、全てアシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドは、アレルゲンを含む物質（例えば、HDM 抽出物）を C l e c 1 0 a（例えば、マウス C l e c 1 0 a またはヒト A s g r 1）との結合親和性に基づくアフィニティー精製によっても得ることができる。C l e c 1 0 a からの C l e c 1 0 a リガンドの溶出は、例えば、ガラクトースを用いて行うことができる。C l e c 1 0 a リガンドの溶出物は生理食塩水で透析してもよい。

[0027] ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 〃 の細胞内領域を含む融合タンパク質は、アシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドの存在下で C D 3 〃 シグナルを下流に伝えた。従って、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 〃 の細胞内領域を含む融合タンパク質は、アレルギー疾患を処置することに用いるための物質

を確認することができる。例えば、ヒトアジアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 ζ の細胞内領域を含む融合タンパク質を発現する動物細胞であって、C D 3 ζ シグナルで活性化するプロモーター（例えば、N F A T プロモーター）と作動可能に連結したレポーターをコードする遺伝子を有する動物細胞と、化合物を接触させることによって、被検化合物が、ヒトアジアロ糖タンパク質受容体 1 に結合する化合物であることを確認することができる。また、抑制性 I T A M を介する制御性シグナリングを指標として、得られた物質がアレルギー疾患を処置することに用いるための物質であることを確認することができる。

また、化合物（ヒト A s g r 1 のリガンドの候補化合物）のアレルギー抑制効果については、例えば、L P S 誘導性の皮膚炎に対して、化合物を適用して皮膚炎の抑制効果を確認することができる。

このように、本発明では、ヒトアジアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 ζ の細胞内領域を含む融合タンパク質、および当該融合タンパク質を発現する動物細胞が提供される。本発明ではまた、当該動物細胞は、C D 3 ζ シグナルで活性化するプロモーターと作動可能に連結したレポーターをコードする遺伝子を有するものであってもよい。本発明ではさらに、ヒトアジアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 ζ の細胞内領域を含む融合タンパク質を発現する動物細胞であって、C D 3 ζ シグナルで活性化するプロモーターと作動可能に連結したレポーターをコードする遺伝子を有する動物細胞と、化合物を接触させることによって、被検化合物が、ヒトアジアロ糖タンパク質受容体 1 に結合する化合物であることを確認する方法が提供される。

本発明のある態様では、被検化合物は、アジアロ糖タンパク質受容体 1 （A s g r 1）のリガンドを含み得る。本発明のある態様では、被検化合物は、前記リガンドが、T 抗原および T n 抗原からなる群から選択される少なくとも 1 種の糖鎖であり得る。本発明のある態様では、前記リガンドが、ムチン様タンパク質またはムチンであり得る。本発明のある態様では、前記リガ

ンドが、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドであり得る。

本発明のヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 ζ の細胞内領域を含む融合タンパク質を発現する動物細胞であって、C D 3 ζ シグナルで活性化するプロモーターと作動可能に連結したレポーターをコードする遺伝子を有する動物細胞は、化合物のスクリーニングに用いることもできる。従って、本発明では、ヒト A s g r 1 リガンドまたはアゴニストのスクリーニング方法であって、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 ζ の細胞内領域を含む融合タンパク質を発現する動物細胞であって、C D 3 ζ シグナルで活性化するプロモーターと作動可能に連結したレポーターをコードする遺伝子を有する動物細胞と被検化合物とを接触させることを含む、方法が提供される。レポーター活性が認められた場合には、当該被検化合物は、ヒト A s g r 1 リガンドまたはアゴニストの候補であることが示される。

動物細胞は、好ましくは、ヒト細胞であり得る。

[0028] 本発明の組成物は、パーソナルケア組成物および医薬組成物などの組成物であり得る。

[0029] 医薬組成物としては、例えば、局所投与用の医薬組成物が挙げられ、本発明に用いることができる。局所投与用の医薬組成物は、粘膜適用または体表適用のための医薬組成物であり得、例えば、点眼剤、眼軟膏剤、舌下錠、バツカル錠、トローチ剤、含そう剤、スプレー剤、エアロゾル剤、および吸入剤；液剤、灌注剤、グリセリン剤、酒精剤、水剤、および塗布剤などの溶液製剤；乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション、スプレー剤、およびリポソーム剤などの分散製剤；軟膏剤、硬膏剤、貼付剤、粘着テープ剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、およびスティック剤などの半固形製剤；並びに、エキス剤（軟エキス剤、乾燥エキス剤）、およびチンキ剤などの浸出製剤が挙げられる。

[0030] 本発明によれば、医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤を含んでいてもよい。薬学的に許容可能な賦形剤としては、溶剤、基剤、希釈剤、増量剤

、充填剤、および補形剤；溶解補助剤、可溶化剤、緩衝剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、徐放化剤、および噴射剤；抗酸化剤、保存剤、保湿剤、遮光剤、帯電防止剤、芳香剤、着香剤、着色剤、および緩和剤が挙げられる。

[0031] パーソナルケア組成物としては、例えば、スキンケア、制汗剤、脱臭剤、美容品、化粧品、およびヘアケア製品が挙げられる。パーソナルケア組成物としては、保湿剤、コンディショナー、老化防止剤、美白剤、日焼け止め剤、制汗剤、ひげそり用組成物、ひげそり後用組成物、ファンデーション、リップスティック、口紅、整髪料、シャンプー、洗浄剤、および潤滑剤が挙げられる。パーソナルケア組成物は、パーソナルケア製品に用いられ得る。パーソナルケア製品としては、下着、おむつ、ティッシュ、拭き取り布、マスク、パッチ等が挙げられる。組成物は、有効成分に加えて賦形剤を含んでもよい。組成物は、例えば、静脈投与、経皮投与、経口投与、経腸投与、および腹腔内投与などの投与形態に適した剤形にすることができる。皮膚炎の予防および／または治療に関しては、経皮投与により本発明の組成物を投与してもよく、例えば、ゲル、エマルション、クリーム、液体、ペースト、ローション、リポソームクリーム等の形態（例えば、皮膚科学的組成物）であり得る。ある態様では、組成物は、軟膏であり得る。経皮投与の場合には、賦形剤としては、皮膚科学的に許容可能な賦形剤を用いることができ、これに適した剤形を用いることができる。経粘膜投与の場合には、賦形剤としては、粘膜適用上許容可能な賦形剤を用いることができ、これに適した剤形を用いることができる。

[0032] 本発明によれば、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物の製造における、A s g r 1 リガンドの使用が提供される。

[0033] 本発明によれば、アレルギー疾患をその必要のある対象において処置する方法であって、当該対象にA s g r 1 リガンドの有効量を投与することを含む、方法が提供される。

[0034] 本発明によれば、アレルギー疾患を予防する、またはその発生を抑制する

方法であって、

当該対象に A s g r 1 リガンドの有効量を投与することを含む、方法が提供される。

実施例

[0035] 方法

(1) 皮膚細胞の調製

皮膚細胞は、薄く削った背側皮膚サンプルを挟みでミンチにし、200 U/mLのコラゲナーゼⅠ、50 U/mLのDNaseおよび10%ウシ胎児血清(FBS)を含有するRPMI-1640培地中で60分間インキュベートした。gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)を用いて更なる解離とホモジェナイズを行った。得られた細胞は、55 μ mナイロンメッシュでろ過し、単一細胞懸濁液として得た。

[0036] (2) フローサイトメトリ

フローサイトメトリとセルソーティングはそれぞれ、FACS LSRFortessaおよびFACS Aria (BD Biosciences)を用いて実施した。FlowJo software (Tree Star)をデータの分析に用いた。死細胞は、ヨウ化プロピジウム溶液(シグマアルドリッチ、P4864)を用いて染色し、除去した。

[0037] (3) 組織学および免疫組織化学染色

組織学的分析に関しては、マウスから採取した背側皮膚サンプルをホルマリン固定し、パラフィン包埋して、4 μ m厚切片を作製した。切片をヘマトキシリン-エオシン染色して光学顕微鏡で分析した。上皮の厚みは、マウス1匹につき5領域で、領域1つにつき5箇所で測定した。

免疫組織化学染色に関しては、マウスから採取した皮膚サンプルをTissueTek Optimal Cutting Temperature Compound (Sakura Finetek Japan)中に包埋し、-80℃で保存した。免疫組織化学染色においても4 μ m厚の切片を

用いた。0.05%のTween-20を含むPBS (PBS-T, pH 7.4) で洗浄し、染みこませて、Blocking One Histo (Nacalai) を用いて室温で10分間インキュベートした。その後、切片をPBS-Tで洗浄し、抗Clec10a mAbを用いて4℃で一晩インキュベートし、PBS-Tで洗浄し、Alexa Fluor 546 標識抗ラットIgG ポリクローナル抗体を用いて1時間インキュベートした。PBS-Tを用いた洗浄の後に、切片は、DAPIを用いて核を染色した。

ヒトの健常皮膚組織は、患者の腫瘍領域の周辺から採取し、ホルマリン固定し、パラフィン包埋して4 μ m厚の切片にした。切片をキシレンで脱パラフィン処理し、エタノールで再水和させて、メタノールを用いて内在性のペルオキシダーゼを遮断した。Opal 4-Color Automation IHC Kit (PerkinElmer, NEL820001KIT) の製造者マニュアルに従って、切片を抗CD69抗体および抗Asg r1抗体を用いて染色した。簡単には、切片を95℃で15分間インキュベートし、0.05%のTween-20を含むTBS (TBS-T) (Takara Bio, T9142) で洗浄し、ブロッキング溶液を用いて室温で10分間処理した。切片を抗CD68抗体またはマウスIgG1抗体を用いて4℃で一晩インキュベートし、TBS-Tを用いて洗浄し、湿式チャンバー内でOpal polymer HRPを用いて室温で30分間処理した。TBS-Tを用いた洗浄の後で、切片をOpal Fluorophore Working Solutionを用いて湿式チャンバー内で室温で10分間インキュベートし、TBS-Tで洗浄した。1回目の染色のための抗体は、95℃で加熱することにより切片から除去した。切片は、その後、1回目の染色と同様に抗Asg r1抗体またはウサギIgG抗体で染色した。切片は、spectral DAPI溶液を用いて核染色した。

[0038] (4) チリダニ (HDM) 誘発皮膚炎

最初の誘発 (0日目) において、麻酔したマウスの背中の皮膚を電子バリ

カンを用いて除毛し、残存した毛を毛髪除去クリームを用いて脱毛した。剃った背中中の皮膚に対して100mgのHDM (*Dermatophagoides farinae*) の軟膏 (Biostir, Japan) を局所投与した。2回目の誘発からは、HDM軟膏投与の2時間前に背側皮膚に対して150 μ Lの4%のドデシル硫酸ナトリウムを適用することにより、皮膚のバリア機能を破壊した。これらの手順は、週2回繰り返された。いくつかの因子 (紅斑/出血および瘢痕/乾燥) は、3日目、6日目、14日目、および21日目において、製造者指示書 (Biostir) に従い、0 (無し)、1 (軽度)、2 (中度) または3 (重度) の評価基準に従ってスコアリングした。このスコアの合計を全体の皮膚炎スコアとした。

[0039] (5) RAW264.7の形質転換体の樹立

C57BL/6JマウスまたはNC/NgaマウスからClec10aのcDNAを作製して、Flagタグをコードする配列で標識して、pMXs-ires-GFPレトロウイルスベクターにサブクローニングした。C57BL/6J型またはNC/Nga型のClec10aを安定的に発現するRAW264.7の形質転換体は、常法に基づいて樹立した。

[0040] (6) ELISAアッセイ

血清IgE抗体は、マウスIgE (R35-72) に対する捕捉抗体とビオチン化抗マウスIgE (R35-118) と、その後のHRP標識ストレプトアビジン (GE Healthcare, RPN1231V) を用いて測定した。精製マウスIgE (C38-2, BD Biosciences) を標準として用いた。血清IgG1をマウスIgG1 (A85-3) に対する捕捉抗体とマウスIgG1に対するHRP標識抗体とを用いて測定した。精製マウスIgG1 (107.3, BD Biosciences) を標準として用いた。血清IgG2cは、マウスELISA Quantitation Set (Bethyl, E90-136) によって検出した。

[0041] (7) 骨髄マクロファージ (BMMP) の調製

骨髄細胞を培養皿 (Corning, 430166または430167)

上で、 10 ng/mL のGM-CSF (R&D Systems) および 7 ng/mL のIL-4 (Wako) の存在下で、10% FBSを含むRPMI 1640完全培地中で培養した。2日目に70%の非接着細胞を除去し、GM-CSFとIL-4を含む新鮮な培地を添加した。5日目に、100%の非接着細胞をPBSで洗浄することによって除去し、GM-CSFとIL-4を含む新鮮な培地を添加した。7日目に、全ての非接着細胞をPBS洗浄により除去して、接着細胞を後の実験に用いた。サイトカインの分泌とSykのリン酸化の分析に関しては、CD115⁺のBMMPを抗CD115抗体 (BioLegend) および抗ラットIgGマイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて濃縮した。

[0042] (8) サイトカイン分泌の分析

CD115⁺のBMMPを $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ のTAK-242 (Merck) 存在下または非存在下で、 $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ のHDM抽出物 (*Dermatophagoides farinae*) (COSMO BIO)、 1 ng/mL のリポポリサッカライド、または 200 pg/mL Pam2CSK4で15分間刺激した。6時間の刺激後に、培養上清を回収し、サイトカインそれぞれの濃度をcytometric bead array analysis (BD Biosciences) を用いて決定した。

[0043] (9) cDNAの合成とリアルタイムPCR (RT-PCR)

全RNAを皮膚組織またはフローサイトメトリによってソートされた細胞からIsogen reagent (Nippon Gene) を用いて抽出した。皮膚MPはCD45⁺MHCII⁺CD3⁻CD19⁻NK1.1⁻Ly-6G⁻EpCAM⁻CD64⁺でソートし、DCは、CD45⁺MHCII⁺CD3⁻CD19⁻NK1.1⁻Ly-6G⁻EpCAM⁻CD64⁻でソートした。CD3⁺CD4⁺細胞も取得した。cDNAは、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて合成した。Clec10aと炎症性サイトカインの遺伝子発現は、定量的RT-PCR法によってSYBR Green Master

Mix (Applied Biosystems) および特異的プライマーを用いて測定した。Gapdhの発現レベルを標準化データの内部参照として用いた。用いたプライマー配列は以下表1の通りであった。

[表1]

Gene name	Forward	Reverse
Clec10a	5' - ACCCAAGAGCCTGGTAAAGC -3'	5' - GATCCAATCACGGAGACGAC -3'
Tnf	5' - GGGCCACCACGCTCTTC -3'	5' - GGTCTGGGCCATAGAAGTATG -3'
I16	5' - GAGGATACCACTCCCAACAGACC -3' ,	5' - AAGTGCATCATCGTTGTCATACA -3'
Cxcl1	5' - ACTCAAGAATGGTCGCGAGG -3'	5' - GTGCCATCAGAGCAGTCTGT -3'
Cxcl2	5' - AAGTTTGCCTTGACCCTGAA -3'	5' - AGGCACATCAGGTACCATGC -3'
Ifng	5' - ACAGCAAGGCGAAAAAGGATG -3'	5' - TGGTGGACCACTCGGATGA -3'
I14	5' - ATCATCGGCATTTTGAACGAGG -3'	5' - TGCAGCTCCATGAGAACTA -3'
I117	5' - TTAACTCCCTTGGCGAAAA -3'	5' - CTTTCCCTCCGCATTGACAC -3'
I110	5' - GCTGGACAACATACTGCTAACC -3'	5' - ATTTCCGATAAGGCTTGGCAA -3'
Tbx21	5' - AGCAAGGACGGCGAATGTT -3'	5' - GGGTGGACATATAAGCGGTC -3'
Gata3	5' - TTATCAAGCCCAAGCGAAGG -3' ,	5' - CATTAGCGTTCTCTCCAGAG -3'
Rorc	5' - GGAGGACAGGGAGCCAAGTT -3'	5' - CCGTAGTGGATCCAGATGACT -3'
Foxp3	5' - CCCATCCCCAGGAGTCTTG -3'	5' - ACCATGACTAGGGGCACTGTA -3'
Gapdh	5' - TGGTGAAGGTGGGTGTGAAC -3'	5' -ATGAAGGGGTGGTGTGATGGC -3'

[0044] (10) レトロウイルスによる遺伝子導入

野生型Clec10aのcDNAをpMXs-puro retroviral vector (Cell Biolabs) にサブクローニングした。部位特異的Clec10a変異体を作製するため、センス鎖のPCRプライマーをフェニルアラニン (TTC) をチロシン (TAC) の代わりに含むように設計した。得られた変異型cDNAは、シーケンシングにより確認した。レトロウイルスは、293GPパッケージング細胞を野生型または変異体Y3FのcDNA、またはVSV-G発現ベクターpCMV-VSV-Gを用いてトランスフェクションすることによって得られた。BMMPを、2日目および4日目に、ポリブレン (8 μ g/mL, Sigma-Aldrich) を添加したウイルス上清を用いて感染させた。遠心後、ウイルスを含む上清を除去して、新鮮なBMMP培地に置き換えた。5日目に培地を新鮮なBMMP培地に置き換え、7日目に非接着細胞をPBS洗浄によ

って除去して、接着細胞を実験に用いた。

[0045] (11) Clec10a-Fcキメラの調製

マウスClec10aキメラ構築物(Clec10a-Fc)は、ヒトIgG1のFc領域を含むpME18S発現ベクター中にマウスClec10aの細胞外領域を連結させるようにクローニングすることによって作製した。Clec10a-FcをLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いてHEK293T細胞にトランスフェクションし、その後、培地をGIT medium (KOHJIN BIO)に置き換えた。Clec10a-Fcは、protein A agarose (Bio-Rad Laboratories)を用いて培養上清から精製した。

[0046] (12) Clec10aリガンドの単離

150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1mM CaCl₂, および0.01% Tween 20を含む緩衝液に溶解させたHDM抽出物をClec10a-Fcを用いてプルダウンアッセイに供した。Clec10a-Fcに結合したリガンドは、30 mM EDTAまたは200 mM ガラクトースを用いて溶出させた。溶出物は、PBSを外液として用い、centrifugal filter unit (Merck, UFC503024)を用いて透析し、Clec10a-Lと命名し、Clec10aリガンドの一つとして用いた。

[0047] (13) アルシアンブルー染色と銀染色

Clec10aリガンドは、SDS-PAGEによって展開させた。電気泳動直後にゲルを脱イオン水と10%酢酸緩衝液(10%酢酸および30%エタノールを含む脱イオン水)で洗浄し、アルシアンブルー溶液(pH2.5)(Wako、013-13801)を用いて、または用いずに、室温で2時間染色し、その後、3%酢酸緩衝液および10%酢酸緩衝液で脱染した。ゲルを製造者指示書に従って銀染色した(Pierce Silver Stain Kit, Thermo Fisher Scientific)

c)。

[0048] (14) C l e c 1 0 a リガンドの分画

C l e c 1 0 a リガンドを SDS-PAGE によって展開させ、サイズにしたがって分離する方式でゲルを切り出した。切り出されたゲルを機械的に粉碎し、攪拌しながら PBS 中で一晩インキュベートした。17,400g で10分間の遠心後に上清を回収して、PBSを外液として用い、centrifugal filter unit (Merck, UFC503024)を用いて透析した。

[0049] (15) イムノブロット

Sy k のリン酸化を分析するために、BMMPをHDM抽出物(100 μ g/mL)で37℃で0分、10分、または30分間刺激した。刺激したBMMPを1% NP-40溶解緩衝液で溶解させ、SDS-PAGEによって分離した。PVDF膜上に電気ブロットによって転写して、抗リン酸化Sy k 抗体および抗Sy k 抗体を用いてイムノブロットし、HRP標識抗ウサギIgG抗体を用いて検出した。

C l e c 1 0 a のチロシンリン酸化を分析するために、BMMPをHDM抽出物(100 μ g/mL)で37℃で0分、10分、または30分間刺激した。刺激したBMMPを1% NP-40溶解緩衝液で溶解させ、抗C l e c 1 0 a mAbを用いた免疫沈降に供した。免疫沈降物は、SDS-PAGEによって展開し、PVDF膜上に転写され、HRP標識抗リン酸化チロシン抗体、または抗C l e c 1 0 a 抗体とHRP標識抗ウサギIgG抗体を用いて、イムノブロットした。

C l e c 1 0 a とSy k またはSHP-1との会合を分析するため、BMMPを5 mMのSy k inhibitor IV (Merck, 574714)の存在下、または非存在下で37℃で30分間、前処理し、HDM抽出物(100 μ g/mL)で37℃で0分、10分、または30分間刺激した。0.2%ジギトニン緩衝液で溶解して、抗C l e c 1 0 a mAbを用いて免疫沈降した。免疫沈降物は、先に記載したようにPVDF膜上に

転写し、抗S y k抗体、抗S H P - 1抗体、または抗C l e c 1 0 a抗体を用いてイムノブロットし、その後、H R P標識抗ウサギI g G抗体またはヤギI g G抗体で検出した。タンパク質は全て、e n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n c e (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)を用いて検出した。

C l e c 1 0 aリガンドは、ペプチドN-グリコシダーゼF (P N G a s e F P R I M T M, N Z S 1, N - Z y m e S c i e n t i f i c)の存在下もしくは非存在下での37℃で16時間の前処理、95℃で5分間の熱変成の後に0.05 MのN a O Hの存在下もしくは非存在下での40℃で16時間の前処理をして、その後、S D S - P A G Eによって分離し、P V D F膜状に転写して、ビオチン化C l e c 1 0 a - F cとH R P標識ストレプトアビジンを用いてイムノブロットした。

[0050] (16) レポーター細胞の樹立と刺激

ヒトC D 3 ζの細胞内領域は、L L L a n i e r (U n i v e r s i t y o f C a l i f o r n i a, S a n F r a n c i s c o)から提供されたベクターから取得した。マウスもしくはヒトC l e c 1 0 aの細胞外領域またはヒトA s g r 1の細胞外領域は、p M X s - p u r o r e t r o v i r a l v e c t o r中にサブクローニングした。2 B 4 - N F A T - G F Pレポーター細胞は、H. A r a s e博士(U n i v e r s i t y o f O s a k a)から提供された。マウスまたはヒトC l e c 1 0 aを安定発現する2 B 4 - N F A T - G F Pレポーター細胞は、以前記載された通りに作製した。レポーター細胞は、抗C l e c 1 0 a m A b、L e w i s X (G l y c o T e c h)、L e w e s Y (G l y c o T e c h)、ガラクトース(S i g m a - A l d r i c h)、グルコース(S i g m a - A l d r i c h)もしくはマンノース(S i g m a - A l d r i c h)の存在下または非存在下で18時間インキュベートした。レポーター細胞はまた、ガラクトシダーゼ(R & D S y s t e m s、5704-GHまたは5549-GH)、もしくはグルコシダーゼ(R & D S y s t e m s、83

29-GH)、Clec10aリガンド被覆プレート、またはサイズ分画されたClec10aリガンドで処理された、または未処理のHDM抽出物被覆プレート上で、培養された。NFAT-GFPの活性化は、フローサイトメトリによってモニターされた。

[0051] (17) レクチンマイクロアレイ分析

レクチンマイクロアレイは、従前の方法に従い、非接触マイクロアレイブリントロボット (MicroSys 4000; Genomic Solutions) を用いて作製した。サンプルをCy3 Mono-Reactive dye (GE) で蛍光標識し、過剰なCy3をSephadex G-25の脱塩カラム (GE) を用いて除去した。2.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, および1% Triton X-100を含むプローブ溶液 (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl) (TBS) で10倍に希釈した後に、Cy3標識サンプルをレクチンマイクロアレイに適用し、20℃で一晩インキュベートした。プローブ溶液で洗浄し、蛍光像をevanescent-field activated fluorescence scanner (Bio-Rad scan 200, Rexam Co. Ltd.) を用いて取得した。3連スポットのレクチンシグナルを各タンパク質サンプルについて平均して、96のレクチンの平均値に対して正規化した。レクチンのリストは、表2に示される通りであった。

[0052]

[表2]

表2：レクチンマイクロアレイで用いたレクチン

	Name	Species	Origin	Source ¹	Rough specificity ²
1	LFA	<i>Limax flavus</i>	Natural	EYLab.	Sia
2	WGA	<i>Triticum vulgare</i>	Natural	EYLab.	(GlcNAc) _n polySia
3	PVL	<i>Psathyrella velutina</i>	Natural	Wako	Sia, GlcNAc
4	MAL	<i>Maackia amurensis</i>	Natural	Seikagaku	α 2-3Sia
5	MAH	<i>Maackia amurensis</i>	Natural	Vector	α 2-3Sia
6	ACG	<i>Agrocyste cylindracea</i>	Natural	JOM	α 2-3Sia
7	rACG	<i>Agrocyste cylindracea</i>	E.coli	AIST	α 2-3Sia
8	rGal8N	<i>Homo sapiens</i>	E.coli	AIST	α 2-3Sia
9	SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Natural	Seikagaku	α 2-6Sia
10	SSA	<i>Sambucus sieboldiana</i>	Natural	Vector	α 2-6Sia
11	TJAI	<i>Trichosanthes japonica</i>	Natural	Vector	α 2-6Sia
12	rPSL1a	<i>Polyporus squamosus</i>	E.coli	AIST	α 2-6Sia
13	PHAL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Natural	Seikagaku	GlcNAc β 1-6Man (Tetraantenna)
14	DSA	<i>Datura stramonium</i>	Natural	Seikagaku	GlcNAc β 1-6Man (Tetraantenna)
15	TxLcl	<i>Tulipa gesneriana</i>	Natural	JOM	Galactosylated N-glycans up to triantenna
16	ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	Natural	Seikagaku	β Gal
17	RCA120	<i>Ricinus communis</i>	Natural	Vector	β Gal
18	rGal7	<i>Homo sapiens</i>	E.coli	AIST	Type1 LacNAc, chondroitin polymer
19	rGal9N	<i>Homo sapiens</i>	E.coli	AIST	GalNAc α 1-4Gal (A), PolyLacNAc
20	rGal9C	<i>Homo sapiens</i>	E.coli	AIST	PolyLacNAc, Branched LacNAc
21	rC14	<i>Gallus gallus domesticus</i>	E.coli	AIST	Branched LacNAc
22	rDiscoidin II	<i>Dictyostellum discoideum</i>	E.coli	AIST	LacNAc, Gal β 1-3GalNAc (T), GalNAc (Tn)
23	BPL	<i>Bauhinia purpurea alba</i>	Natural	Vector	Gal β 1-3GlcNAc (GalNAc), α / β GalNAc
24	rCGL2	<i>Homo sapiens</i>	E.coli	AIST	GalNAc α 1-3Gal (A), PolyLacNAc
25	PHAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Natural	Vector	bisecting GlcNAc
26	GSII	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Natural	Vector	GlcNAc β 1-4Man
27	rSRL	<i>Sclerotium rolfsii</i>	E.coli	AIST	Core1,3, agalacto N-glycan
28	UDA	<i>Urtica dioica</i>	Natural	Vector	(GlcNAc) _n
29	PWM	<i>Phytolacca americana</i>	Natural	Vector	(GlcNAc) _n
30	rF17AG	<i>Escherichia coli</i>	E.coli	AIST	GlcNAc
31	rGRFT	<i>Griffithia sp.</i>	E.coli	AIST	Man
32	NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Natural	Seikagaku	Man α 1-3Man
33	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Natural	Vector	M3, Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man, GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man
34	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	Natural	Vector	Man α 1-3Man, Man α 1-6Man
35	HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i>	Natural	Vector	Man α 1-3Man, Man α 1-6Man
36	ASA	<i>Allium sativum</i>	Natural	JOM	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man
37	DBAI	<i>Dioscorea batatas</i>	Natural	JOM	High-man
38	CCA	<i>Castanea crenata</i>	Natural	JOM	Galactosylated N-glycans up to triantenna
39	Hel tuba	<i>Helianthus tuberosus</i>	Natural	JOM	Man α 1-3Man
40	rHel tuba	<i>Helianthus tuberosus</i>	E.coli	AIST	Man α 1-3Man
41	ADA	<i>Allomyrina dichotoma</i>	Natural	JOM	α 2-6Sia, Forssman, A, B
42	VWAI	<i>Vicia villosa</i>	Natural	JOM	Man, Agalacto
43	rOryzata	<i>Oryza sativa</i>	E.coli	AIST	Man α 1-3Man, Highman, biantenna
44	rPALa	<i>Phlebotomus aureum</i>	E.coli	AIST	Man5, biantenna
45	rBanana	<i>Musa acuminata</i>	E.coli	AIST	Man α 1-2Man α 1-3(6)Man
46	rCalsepa	<i>Calystegia sepium</i>	E.coli	AIST	Biantenna with bisecting GlcNAc
47	rRSL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	E.coli	AIST	α Man, α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)
48	rBC2LA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	E.coli	AIST	α Man, High-man
49	AOL	<i>Aspergillus oryzae</i>	Natural	Vector	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
50	AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Natural	Vector	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)

51	rAAL	Aleuria aurantia	E.coli	AIST	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
52	rPAIIL	Pseudomonas aeruginosa	E.coli	AIST	α Man, α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)
53	rRSIIL	Ralstonia solanacearum	E.coli	AIST	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
54	rPTL	Pholiota terrestris	E.coli	AIST	α 1-6Fuc
55	PSA	Pisum sativum	Natural	Seikagaku	α 1-6Fuc up to biantenna
56	LCA	Lens culinaris	Natural	Vector	α 1-6Fuc up to biantenna
57	rAOL	Aspergillus oryzae	E.coli	AIST	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
58	rBC2LCN	Burkholderia cenocepacia	E.coli	AIST	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc (GalNAc)
59	LTL	Lotus tetragonolobus	Natural	Seikagaku	Lex, Ley
60	UEAI	Ulex europaeus	Natural	Vector	α 1-2Fuc
61	TJAI	Trichosanthes japonica	Natural	Vector	α 1-2Fuc
62	MCA	Momordica charantia	Natural	JOM	α 1-2Fuc
63	GSLI	Griffonia simplicifolia	Natural	Seikagaku	α GalNAc (A, Tn), α Gal (B)
64	PTU	Psophocarpus tetragonolobus	Natural	Tokyo Kasei	α GalNAc (A, Tn)
65	GSLIA4	Griffonia simplicifolia	Natural	EY Lab.	α GalNAc (A, Tn)
66	rGC2	Geodia cydonium	E.coli	AIST	α 1-2Fuc (H), α GalNAc (A), α Gal (B)
67	GSLIB4	Griffonia simplicifolia	Natural	Vector	α Gal (B)
68	rMOA	Marasmius oreades	E.coli	AIST	α Gal (B)
69	EEL	Euonymus europaeus	Natural	Vector	α Gal (B)
70	rPAIL	Pseudomonas aeruginosa	E.coli	AIST	α , β Gal, α GalNAc (Tn)
71	LEL	Lycopersicon esculentum	Natural	Vector	Polylactosamine, (GlcNAc)n
72	STL	Solanum tuberosum	Natural	Seikagaku	Polylactosamine, (GlcNAc)n
73	rGal3C	Homo sapiens	E.coli	AIST	LacNAc, polylactosamine
74	rLSLN	Lactiporus sulphureus	E.coli	AIST	LacNAc, polylactosamine
75	rCGL3	Coprinopsis cinerea	E.coli	AIST	LacDiNAc
76	PNA	Arachis hypogaea	Natural	Vector	Gal β 1-3GalNAc (T)
77	ACA	Amaranthus caudatus	Natural	Vector	Gal β 1-3GalNAc (T)
78	HEA	Hericium erinaceum	Natural	JOM	Gal β 1-3GalNAc (T)
79	ABA	Agaricus bisporus	Natural	Vector	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc
80	Jacalin	Artocarpus integrifolia	Natural	Seikagaku	Gal β 1-3GalNAc (T), GalNAc α (Tn)
81	MPA	Maclura pomifera	Natural	Seikagaku	Gal β 1-3GalNAc (T), GalNAc α (Tn)
82	HPA	Helix pomatia	Natural	Seikagaku	α GalNAc (A, Tn)
83	VVA	Vicia villosa	Natural	Vector	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
84	DBA	Dolichos biflorus	Natural	Vector	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
85	SBA	Glycine max	Natural	EY Lab.	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
86	rPPL	Pleurocybella porrigens	E.coli	AIST	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
87	rCNL	Clitocybe nebularis	E.coli	AIST	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
88	rXCL	Xerocomus chrysenteron	E.coli	AIST	Core1,3, agalacto N-glycan
89	VVA !	Vicia villosa	Natural	JOM	GalNAc β 1-3(4)Gal
90	WFA	Wisteria floribunda	Natural	Vector	Terminal GalNAc, LacDiNAc
91	rABA	Agaricus bisporus	E.coli	AIST	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc
92	rDiscoidin I	Dictyostelium Discoideum	E.coli	AIST	Gal
93	DBAIII	Dioscorea batatas	Natural	JOM	Maltose
94	rMalectin	Homo sapiens	E.coli	AIST	Glc α 1-2Glc
95	CSA	Oncorhynchus keta	Natural	JOM	Rhamnose, Gal α 1-4Gal
96	FLAG-EW29Ch-E20K	Lumbricus terrestris	E.coli	AIST	G-sulfo-Gal

略語 : Gal (D-galactose)、GalNAc (N-acetyl-galactosamine)、GlcNAc (N-acetyl-glucosamine)、Fuc (L-fucose)、Sia (Sialic acid)、LacNAc (N-acetyl-lactosamine)。

² 特異性のデータは、フロンタルアフィニティークロマトグラフィーおよび糖コンジュゲートマイクロアレイによって得られた。

³ 略語 : JOM (J-OIL MILLS, INC)、Vector (V

ECTOR LABORATORIES)、Seikagaku (SEIKAGAKU CORPORATION)、EY (EY LABORATORIES, INC)、AIST (産業技術総合研究所)

[0053] (18) 糖コンジュゲートマイクロアレイ分析

98種の糖コンジュゲートを含む糖コンジュゲートマイクロアレイ (表3) を従前の方法に従い、非接触マイクロアレイプリントロボット (MicroSys4000; Genomic Solutions) を用いて作製した。Clec10a-Fc ($10 \mu\text{g/mL}$) をCy3標識ヤギ抗ヒトIgG, Fc (Jackson, 109-165-098) ($1 \mu\text{g/mL}$) を事前に複合体形成をさせ、糖コンジュゲートマイクロアレイ ($80 \mu\text{L}$ /ウェル) と 20°C で一晩インキュベートした。

[0054]

[表3]

表3：糖コンジュゲートマイクロアレイで用いたグリカン

Trivial name	Presentation	Glycans	Source	Cat#
α Fuc	PAA	Fuc α 1-PAA	Glycotech	01-007
Fuc α 2Gal	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-PAA	Glycotech	01-019
Fuc α 3GlcNAc	PAA	Fuc α 1-3GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-024
Fuc α 4GlcNAc	PAA	Fuc α 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-025
H type1	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-037
H type2	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	08-034
H type3	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA	Glycotech	08-060
A	PAA	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	08-091
B	PAA	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	08-092
Le ^a	PAA	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-035
[3S]Le ^a	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-040
Le ^b	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	08-042
Le ^x	PAA	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-036
Le ^y	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	08-043
α Neu5Ac	PAA	Neu5Ac α 2-PAA	Glycotech	01-012
α Neu5Gc	PAA	Neu5Gc α 2-PAA	Glycotech	01-051
Sia2	PAA	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-PAA	Glycotech	08-064
Sia3	PAA	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-PAA	Glycotech	01-081
3'SiaLe ^c	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-078
3'SL	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-PAA	Glycotech	01-038
3'SLN	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-077
sLe ^a	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	08-044
sLe ^x	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-045
6'SL	PAA	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β 1-PAA	Glycotech	01-039
β Gal	PAA	Gal β 1-PAA	Glycotech	01-004
[3S] β Gal	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-PAA	Glycotech	01-015
A-di	PAA	GalNAc α 1-3Gal β 1-PAA	Glycotech	01-017
Lac	PAA	Gal β 1-4Glc β 1-PAA	Glycotech	01-021
Le ^c	PAA	Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-020
[3'S]Le ^c	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-062
LN	PAA	Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-022
[3'S]LN	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-061
[6S]LN	PAA	Gal β 1-4(6OSO ₃)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-066
[6'S]LN	PAA	(6OSO ₃)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-068
β GalNAc	PAA	GalNAc β 1-PAA	Glycotech	01-011

di-GalNAc β	PAA	GalNAc β 1-3GalNAc β 1-PAA	Glycotech	01-070
LDN	PAA	GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-057
GA2	PAA	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-PAA	Glycotech	08-074
β GlcNAc	PAA	GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-009
[6S] β GlcNAc	PAA	(6OSO ₃)GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-016
α Man	PAA	Man α 1-PAA	Glycotech	01-005
β Man	PAA	Man β 1-PAA	Glycotech	01-050
[6P]Man	PAA	(6OPO ₄)Man α 1-PAA	Glycotech	01-006
Tn	PAA	GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-010
Core1	PAA	Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA	Glycotech	08-023
Core2	PAA	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-083
Core3	PAA	GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-071
Core4	PAA	GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-089
Forssman	PAA	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-PAA	Glycotech	01-026
Core6	PAA	GlcNAc β 1-6GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-072
Core8	PAA	Gal α 1-3GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-028
[3'S]Core1	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA	Glycotech	08-069
Gal β -Core3	PAA	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-116
STn	PAA	Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-059
STn (Gc)	PAA	Neu5Gc α 2-6GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-107
ST	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-088
Sia α 2-6Core1	PAA	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α 1-PAA	Glycotech	01-113
α Gal	PAA	Gal α 1-PAA	Glycotech	01-003
Gal α 1-2Gal	PAA	Gal α 1-2Gal β 1-PAA	Glycotech	01-056
Gal α 1-3Gal	PAA	Gal α 1-3Gal β 1-PAA	Glycotech	01-018
Gal α 1-3Lac	PAA	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-PAA	Glycotech	01-075
Gal α 1-3LN	PAA	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-079
Gal α 1-4LN	PAA	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	01-110
Melibiose	PAA	Gal α 1-6Glc β 1-PAA	Glycotech	01-063
α Glc	PAA	Glc α 1-PAA	Glycotech	01-001
β Glc	PAA	Glc β 1-PAA	Glycotech	01-002
Maltose	PAA	Glc α 1-4Glc β 1-PAA	Glycotech	01-054
α Rha	PAA	Rhamnose α 1-PAA	Glycotech	01-008
Chitobiose	PAA	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-PAA	Glycotech	08-057
Negative PAA	PAA	-	Glycotech	01-000

[0055] (19) ヒトASGR1のノックダウン

CD14⁺の単球を抗CD14マイクロビーズ (Miltenyi Biotec、130-050-201) を用いて末梢血単核球から濃縮し、GM-CSF存在下で2日間培養した。ASGR1に対して特異的なsiRNA (SMARTpool Accell siRNA, Dharmacon) または対照siRNAとsiRNA送達剤との混合物で処理した。その後

、 $100\mu\text{g/mL}$ のHDM抽出物で単球を6時間刺激した。培養上清中の各種サイトカインの濃度をcytometric bead array analysis (BD Biosciences) を用いて決定した。

[0056] (20) ヒト皮膚遺伝子発現のデータ

ヒトの皮膚およびアトピー性皮膚炎の病理学的状態におけるヒトASGR1の発現を分析するために、公開されたマイクロアレイデータ (GSE5667) を用いた。

[0057] (21) 統計学的解析

統計学的解析は、両側Student's t-検定 (GraphPad Prism 5)、事後テューキー・クラマー検定とANOVA検定 (GraphPad Prism 5)、またはピアソン相関検定 (両側、GraphPad Prism 5) を用いて行った。

[0058] 実施例1：アトピー性皮膚炎モデルマウスのエクソーム解析

本実施例では、アトピー性皮膚炎のモデルマウスであるNC/Ngaマウスのエクソーム解析を実施して、アトピー性皮膚炎の原因遺伝子を特定した。

[0059] NC/Ngaマウスは、チャールズリバー、ジャパンから購入した。QIAamp DNA blood Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて、マウスDNAの抽出に適した条件下でNC/Ngaマウスから得られた血液からDNAを抽出した。得られたDNAのエクソーム解析は、以下の通り実施した。SureSelect Library prep kit (post-pool version 4; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) とSureSelect Mouse All Exon Kit (Agilent Technologies) を用いて、その製造者マニュアルにしたがってDNAライブラリを得た。得られたDNAライブラリをエマルジョンPCR (SOLiD EZ Bead Emulsifier kit; Thermo Fisher Sci

entific, Waltham, MA) に供して、ビーズ上にクローン性のDNA断片を生成させ、その後、ビーズエンリッチメントに供した (SOLiD EZ Bead Enrichment kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。得られたビーズは、SOLiD 5500xl シークエンサー上で、単一末端の60bpのリードとしてシークエンスした。得られたリードは、マウス参照ゲノム (NCBI 37/mm9) に対してLifeScope version 2.5.1 (Life Technologies) を用いてアラインメントして、BAMファイルを得た。バリエーションコールをGenome Analysis Toolkit, Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard>) に記載されたプロトコルに従ってSAMtoolsを用いて実施し、参照ゲノム上で固有の位置にマップされたリードのみを分析に用いた。変異箇所は、ANNOVERソフトウェアを用いてアノテーションした。NC/Nga以外の近交系マウスにおける遺伝的変動は、NCBI m37 アセンブリに従って付番されたリリースREL-1211 (<http://www.sanger.ac.uk/science/data/mouse-genomes-project>) およびMouse Genome Informatics website (<http://www.informatics.jax.org/>) から取得された。シークエンスは、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) 上で、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。用いたプライマーは表4の通りであった。

[0060]

[表4]

表4: NC/Nga マウスにおけるナンセンス変異またはフレームシフト変異のサンガーシーケンスによる確認のために用いたプライマー

Gene		Primer sequence
Cdh20	Forward	TCGGACTCAGAGCAGAGCTT
	Reverse	CTCTGCTGGGTCCACTCACT
Tlr5	Forward	GCCATTCTTCCTTGAACCCAC
	Reverse	ATGGCCGTGTGGGAGTATAA
Tmem141	Forward	GATCAGGGACTCCAAAACCA
	Reverse	TGCTGAGGTAGGAGGGACTG
Qsox2	Forward	AGACTCAGCCACGTGAACCT
	Reverse	TCGGGCTCAGACATTTCACT
Hc	Forward	TCGTGTTTTTAAATATTTTGCTTCC
	Reverse	CCCCACCCTCTTCTGGTACT
Tdpoz2	Forward	GGTGAAGTCAATGGTGGAG
	Reverse	TTGTCTCTGGGACTCAAAGGA
Gm572	Forward	GTTTCGGCGCTTTTGTTTTA
	Reverse	CTTCAGAGGCCAGGACAAAG
Cyp3a57	Forward	TGATGTTCTTCTTTGACCTTCC
	Reverse	TCCCTCTCTGAGTACCATCCA
Try4	Forward	GAGGGCTCCACCTAACACAA
	Reverse	GTACAGACAGGGCCCATCAC
Klri2	Forward	TGATGAGCACTCATTTACACA
	Reverse	TCCCAGTGCCAACAGTTACA
Klra7	Forward	AAAGTTAAAGAGTTGCCCTTG
	Reverse	TGAATTATTCAGGAAACAAATG
Tlc23	Forward	GAAGTGCTCTAACGCTGTGG
	Reverse	ACAGTGCCATCCAGGGTTC
Olfml1	Forward	GGGCATTCATGGAAGATAGC
	Reverse	CATCCACAGCAAGGTCAATG
Foxr1	Forward	CGCAGTTTCCCTTCTCAT
	Reverse	TGGAGGTACAAGGTTCTGTGC
Cilp	Forward	AAGAGCAATGTGGGAGTTGC
	Reverse	AGCATCATGAGGCAGAGACA
Slc22a21	Forward	GCTTGTTTTGCAACTGATGG
	Reverse	AGCACTGTTGTCCGTCCTG
Clec10a	Forward	TGAGGGAGAGGTAACCATGC
	Reverse	GGGCAAATGTACAGCACACA
Serpina3i	Forward	GCTGTCAGGACTCAGCAGTG
	Reverse	GGTCAGGGAGAATGAACAGG
Zkscan4	Forward	AATCCACACGGGTGAGAAAC
	Reverse	CAGTGTGTATTGCCACACC
Zfp957	Forward	TGCAGAGCAAAGTCAAGGTT
	Reverse	CTTAGCGGCTGCGTTTTT
Timm8a2	Forward	CATCCACCACATGACAGAGC
	Reverse	GTCCATTTCACCTACCT
Pdzd2	Forward	ATGCATGCTCGCTTTTCTT
	Reverse	GAGGGATGGGGGAAGAGTTA
Cyp2d11	Forward	AGGCAGAGTCCAACAGGAAA
	Reverse	CCTACCTTGGTGACGAGGAA
Kcnk7	Forward	CCCCAGCCTCAGTATCAGAA
	Reverse	ATTAGCCCAGAGTCGCTTG

[0061] NC/Nga マウスのゲノムのエキソン領域には、参照ゲノムに対して 70, 772 個の変異が同定された。GATK 出力により得られた低品質の値を伴う変異を取り除き、64, 518 個の変異を得た。ANNOVER ソフ

トウェアを用いてナンセンス変異およびフレームシフト変異を含む機能喪失変異を選択した。そして、35のナンセンス変異と48のフレームシフト変異（ストップコドンが誘発される）が同定された。これらの83遺伝子のそれぞれについて43遺伝子中の46の変異について更なるシーケンスバリデーションのために選択した。

[0062] また、46の変異のうち、24がシーケンスによって確認された。結果は表5に示される通りであった。

[0063]

[表5]

表5：サンガーシークエンスによって確認されたNC/Ngaマウスにおけるナンセンス変異とフレームシフト変異NC/Ngaマウスに特異的に存在する7遺伝子の変異が太字によって示されている。「Last Exon」は、対応する転写物の最後のエキソンに変異が位置する。rs262301704は、c.1157_1158insCCCAに対応し、rs262301704を有するマウスは*で示されている。

Gene	Chromosome	Start	End	Function	Last exon	RefSeq number	Nucleotide substitution	Amino acid substitution
Cdh20	1	10690969	10690959	stopgain SNV	yes	NM_011800	c.52403A	p.W801X
Th5	1	184902583	184902584	frameshift substitution	no	NM_018928	c.18_19delCT	
Tmem141	2	25476035	25476038	frameshift deletion	yes	NM_001109993	c.603_606del	
Oso2	2	26965186	26965186	frameshift deletion	yes	NM_153559	c.1845delC	
Hc	2	3489728	3489729	frameshift deletion	no	NM_010408	c.646_647del	
Tgfb2	3	93455335	93455335	frameshift insertion	no	NM_0107222	c.1051_1058delAG	
Gnt2	4	14804309	14804315	frameshift deletion	yes	NM_001085505	c.1172_1178del	
Cyp3a57	5	146138201	146138205	frameshift deletion	yes	NM_001100180	c.957_961del	
Try4	6	41233368	41233368	frameshift deletion	no	NM_011646	c.114delG	
Klf2	6	129683766	129683766	stopgain SNV	no	NM_177155	c.G407A	p.W136X
Klf7	6	130169025	130169029	frameshift deletion	yes	NM_014194	c.693_697del	
Tlec2	7	74637804	74637804	frameshift deletion	no	NM_025935	c.783delT	
Clm1	7	11473919	11473919	frameshift deletion	yes	NM_172607	c.67delT	
Foxl1	9	44243294	44243294	frameshift deletion	yes	NM_001033499	c.636_639delAA	
Cfb	9	65127938	65127938	frameshift deletion	yes	NM_173385	c.3507delG	
Sic2a21	11	53764775	53764775	frameshift insertion	yes	NM_019723	c.1978_1979insC	
Clec10a	11	69883716	69883716	stopgain SNV	no	NM_010762	c.C706T	p.D239X
Serpina3	12	105504794	105504794	frameshift deletion	no	NM_001199940	c.747delC	
Zscan4	13	21576578	21576578	frameshift insertion	yes	NM_001039115	c.1416_1417insA	
Zfp57	14	79613286	79613286	frameshift insertion	yes	NM_001033215	c.879_880insG	
Tmm6a2	14	122434145	122434145	frameshift deletion	no	NM_001037744	c.237_246del	
Pdcd2	15	13375345	13375345	stopgain SNV	no	NM_001081064.1	c.C1054T	
Cyp2d11	15	82204453	82204453	frameshift substitution	no	NM_001104631	c.1156_1156insCACCC	
Kcna7	19	5705888	5705888	frameshift insertion	yes	NM_010609	c.1004_1005delT	

Gene	is number	human homolog	Other mouse strains
Cdh20	+		
Th5	+	MSMMs, JF1Ms	
Tmem141	+	MSMMs, JF1Ms	
Oso2	+	NZOHLL, PWKPNJ	
Hc	+	AJ, AKR/J, DBA/2J, FVB/NJ, NOD/ShiLtJ	
Tgfb2	+	MSMMs, JF1Ms	
Gnt2	+	129S1/SvMtl, AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, NOD/ShiLtJ, PWKPNJ, VBS/HeJ	
Cyp3a57	+	129S1/SvMtl, AKR/J, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Try4	+	129S1/SvMtl, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Klf2	-		
Klf7	-		
Tlec2	+	129S1/SvMtl, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Foxl1	+	129S1/SvMtl, CAST/EiJ, LPJ, PWKPNJ, MSMMs, JF1Ms	
Cfb	+	129S1/SvMtl, AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Sic2a21	+	129S1/SvMtl, AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Clec10a	+	129S1/SvMtl, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Serpina3	+	AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Zscan4	+	129S1/SvMtl, AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Zfp57	+	129S1/SvMtl	
Tmm6a2	+	129S1/SvMtl	
Pdcd2	+	129S1/SvMtl, AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Cyp2d11	+	129S1/SvMtl, AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, CAST/EiJ, CBA/J, DBA/2J, FVB/NJ, LPJ, NOD/ShiLtJ, VBS/HeJ	
Kcna7	+	AJ, AKR/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, NOD/ShiLtJ, PWKPNJ, SPRET/EiJ, MSMMs, JF1Ms	

[0064] 17の近交系マウス系統と2の日本のペットマウスに存在する変異を除外し、7遺伝子中の7つの変異に着目した。(表5の太字参照)。造血細胞における発現の観点から、BioGPSデータベースの情報に基づいて、7つの遺伝子からClec10aを選択した(図5のパネルa参照)。NC/NgaマウスのClec10aは、NM_010769の塩基配列における7

06番目のCがTになるナンセンス変異（すなわち、Q236X）であった。

[0065] 実施例2：Clec10aの発現解析と機能解析

Clec10aは、II型のC型レクチン受容体ファミリーの一員であり、外来および内在性抗原の末端のガラクトース部分を検知する。NC/NgaマウスにおけるClec10aのc. 706C>Tは、C型レクチン様ドメインのコード領域に存在する（図1のパネルaおよびb）。フローサイトメトリによる分析から、Clec10aが、皮膚CD45⁺MHCII⁺リネエージ⁻EpCAM⁻細胞においては、マクロファージ（MP）（CD64⁺MerTK⁺）、従来型の樹状細胞（cDC）（CD64⁻MerTK⁻）、および単核球由来DC（CD64⁻MerTK⁺）の細胞表面、並びにC57BL/6Jの腹腔のマクロファージ上に発現していることが明らかとなった（NC/Ngaマウスの腹腔には発現していなかった）（図1のパネルc、図5のパネルb, e参照）。C57BL/6Jマウスの皮膚の非造血細胞（CD45⁻）、CD45⁺MHCII⁻細胞、CD45⁺MHCII⁺（Lin⁻, EpCAM⁺）細胞、および好中球（CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁺）では、Clec10aの発現は認められなかった（図5のパネルc, d参照）。免疫組織化学染色によっても同様の結果が得られ、C57BL/6Jマウスの皮膚細胞においてはClec10aの発現が認められたが、NC/Ngaマウスではその発現は認められなかった（図1のパネルd）。

[0066] NC/NgaマウスにおけるClec10aの発現の特徴を更に分析した。具体的には、3'末端にFlagタグとIRES-GFPをコードする配列を有するClec10a（C57BL/6Jマウス由来およびNC/Ngaマウス由来）のcDNAをRAW264.7マクロファージにトランスフェクションした。Flagタグは、C57BL/6Jマウス由来のClec10aを発現するマクロファージの細胞表面に発現したが、NC/Ngaマウス由来のClec10aを発現するマクロファージの細胞表面には発現しなかった。（図5のパネルf参照）。しかしながら、NC/Ngaマウス由

来のClec10aを発現するマクロファージにおいては、Flagの細胞内における発現が認められた（図5のパネルg参照）。これらの結果は、Clec10aにおける変異が、細胞表面へのClec10aの輸送に負の影響を与えたことを示唆するものである。

[0067] 次に、このClec10aの変異が、チリダニ（House dust mite, HDM）による皮膚炎に関与しているか否かを確認した。そこで、天然の配列（Clec10a^{c.706T}）の代わりに、Clec10a^{c.706C}を有する変異体マウス（以下、「NC/NgaマウスClec10a^{c.706T>C}」ということがある）を、CRISPR/Cas9システムを用いて常法に従って作製した（図1のパネルa参照）。Clec10a^{c.706C}を有する変異体マウスの皮膚においては、Clec10aのmRNA発現が、Clec10a^{c.706T}を有するマウスと比較して、有意に増加していた（図5のパネルh参照）。Clec10a^{c.706T}とClec10a^{c.706C}をヘテロで有する変異体マウス（Clec10a^{c.706T/C}）では、皮膚および腹腔におけるマクロファージの表面上でのClec10aの発現が回復した（図1のパネルc、d、図5のパネルi参照）。加えて、紅斑、乾燥、および皮膚厚の増大などのHDM誘発皮膚炎の症状が変異体マウス（Clec10a^{c.706T/C}）において軽減した（図1のパネルe～h）。更に、HDM処理6日後における皮膚への好中球の浸潤が、野生型Clec10a（Clec10a^{c.706T/T}）を有するNC/Ngaマウスと比較して、変異体マウス（Clec10a^{c.706T/C}）において減少していた（図1のパネルi）。これに対して、IgEの血清レベルは、両者間で同等であった。これらの結果は、Clec10a変異体（Clec10a^{c.706T>C}）は、HDM誘発皮膚炎の原因となること、およびNC/NgaマウスにおいてはTh2応答を増加させないことを示唆する。

[0068] HDM誘発皮膚炎におけるClec10aの細胞表面発現の関与を調べるため、C57BL/6Jマウスを背景としてClec10a欠損マウス（Clec10a^{-/-}マウス）を作製した。野生型C57BL/6JマウスとClec10a^{-/-}マウスとを比較して、HDM誘発皮膚炎の症状を評価した。野生型C57BL/6Jマウスは、HDM誘発皮膚炎の症状を示す。一方、Clec10a^{-/-}マウスは、HDM誘発皮膚炎の症状を示さなかった。これらの結果は、Clec10aがHDM誘発皮膚炎の発症に必要であることを示唆する。

ec10a 欠損マウス (*Clec10a*^{-/-}) の背側の皮膚にHDMを局所で適用した。*NC/Nga* マウスの皮膚において認められたように、*Clec10a*^{-/-} マウスは、HDM処理後5～6日目において、野生型マウスと比較して、紅斑、乾燥および皮膚の増強などの皮膚炎の増悪を示した (図2のパネルa～d参照)。加えて、HDM処理後1～3日目には野生型マウスと比較して、*Clec10a*^{-/-} マウスでは、皮膚における好中球の浸潤が増加した (図2のパネルe参照)。これに対して、他の骨髄およびリンパ球系列の細胞の数は、野生型と*Clec10a*^{-/-} マウスとで同等であった (図6のパネルa参照)。

[0069] HDM処理後2週間では、野生型におけるよりも*Clec10a*^{-/-} マウスにおいて血清IgG1レベルが高く、IgE価およびIgG2c価は野生型と*Clec10a*^{-/-} マウスとで同等であった (図6のパネルb参照)。加えて、HDM処理した皮膚の流入領域リンパ節 (draining lymph node) におけるIL4およびGata3のCD4⁺T細胞による発現は、野生型と*Clec10a*^{-/-} マウスとで同等であった (図6のパネルc参照)。従って、*Clec10a* は、Th2応答を縮小させるというよりもむしろ、好中球の浸潤を減少させることによって皮膚炎を抑制すると考えられる。

[0070] *Clec10a* は、皮膚のMHCII⁺のマクロファージ (MP) および樹状細胞 (DC) に発現するため、HDMで局所処置した野生型マウスおよび*Clec10a*^{-/-} マウスの皮膚細胞サンプルからこれらの細胞をソーティングした (図7のパネルa参照)。IL6、*Cxcl1*、および*Cxcl2*の遺伝子発現レベルは、野生型MPよりも*Clec10a*^{-/-} MPにおいて高かったが、DCにおいては野生型と*Clec10a*^{-/-} とでこれらの遺伝子発現レベルは同等であった (図2のパネルf参照)。これらの結果は、DCよりもMPにおける*Clec10a* がHDM誘発皮膚炎の抑制に関与していることを示唆するものである。骨髄マクロファージ (BMMP) を野生型マウスおよび*Clec10a*^{-/-} C57BL/6Jマウスからそ

れぞれ調製して特性解析をした（図7のパネルb参照）。CD115+BMPにおけるMPマーカおよびTLR4の発現レベルは、野生型マウスおよびClec10a^{-/-}マウスとで同等であった。インビトロにおけるHDM刺激の後で、Clec10a^{-/-}BMMPは、IL-6、CXCL1、CCL3およびTNF- α などの好中球の化学走性物質を野生型BMMPよりも大量に分泌した（図2のパネルg参照）。同様に、Clec10a^{c.706T/T}のNC/NgaマウスのBMMPは、Clec10a^{c.706T/C}のBMMPよりも大量のサイトカイン産生を示した（図7のパネルd参照）。これらの結果から、Clec10aの細胞表面での発現がHDMによる刺激の後における皮膚MPからの炎症性サイトカインの産生を阻害することが実証された。

[0071] HDM刺激は、野生型のBMMPにおいて脾臓チロシンキナーゼ（Syk）の活性化を引き起こすが、Clec10a^{-/-}のBMMPではSykの活性化は認められなかった（図2のパネルj参照）。更に、HDM刺激はSykとタンパク質チロシンホスファターゼSHP-1のClec10aへのリクルートを引き起し、このリクルートはClec10aのチロシン残基に依存した（図2のパネルk参照）。Syk阻害剤によるBMMP処理は、HDMで誘発されるSHP-1のClec10aへのリクルートを抑制したが（図2のパネルl）、このことは、当該イベントがSykの活性化に依存していることを示唆する。抑制性ITAMを介する制御性シグナリングとも一貫する結果である。

[0072] 実施例3：Clec10aリガンドの解析

Clec10aがHDM中に含まれるグリコシル化タンパク質を認識するかを試験するために、CD3 ζ の細胞質部分に融合したClec10aの細胞外部分と膜貫通部分を含むキメラ融合タンパク質を発現するNFAT-GFPレポーター細胞（Clec10aレポーター細胞）を作製した。マウスClec10aレポーター細胞はLewis X（Clec10aのオリゴ糖リガンド）に応答してGFPを発現させたが、Lewis Yには応答を

示さなかった（図8のパネルaおよびb参照）。また、マウスClec10aレポーター細胞は、用量依存的にHDM被覆プレートに応答してGFPを発現させた（図3のパネルa）。加えて、抗Clec10aモノクローナル抗体（mAb）またはガラクトースを用いたレポーター細胞の前処理は、GFPの発現を抑制したが、グルコースやマンノースの前処理は、GFPの発現を抑制しなかった（図3のパネルbおよびc）。更にまた、ガラクトシダーゼを用いたHDMの処理は、レポーター細胞におけるGFP発現を引き起こすその能力を低下させたが、グルコシダーゼでは、そのような低下は認められなかった（図3のパネルd）。これらの結果は、Clec10aが直接的にHDMのガラクトシル化部分に結合することを示すものである。

[0073] HDMにおけるClec10aのリガンド（Clec10a-L）の分析のため、ヒトIgG1のFc部分と融合したマウスClec10aの細胞外部分（Clec10a-Fc）を含むキメラ融合タンパク質を作製したが、この融合タンパク質は、Lewis Yには結合せずLewis Xに結合した（図8のパネルc）。Clec10a-Fcを用いてHDMからのプルダウンアッセイによって、分子量約225kDaのClec10a-Lが単離されたが、Clec10a-Lは、マウスClec10aレポーター細胞におけるGFPの発現を誘導することができた（図3のパネルeおよびf参照）。Clec10a-Lはアルシアンブルーと銀により染色されたが、銀単独では染色されず（図3のパネルg参照）、このことは、Clec10a-Lが高度に糖修飾されたタンパク質であることを示す。O結合型グリカン分解するNaOHでの処理は、Clec10a-Fcがエピトープに結合することを阻害し（図3のパネルh参照）、また、マウスClec10aレポーター細胞におけるGFPの発現の誘導を阻害した（図3のパネルi参照）。これに対して、N結合型グリカン分解するPNGase FはClec10a-Lに対して何らの効果も示さなかった（図3のパネルhおよびi参照）。これらの結果は、Clec10aがClec10a-LのO結合型グリカンを認識することを示唆するものである。また、レクチンマイクロア

レイによる分析では、Clec10a-LがT抗原 (Gal β (1-3)GalNAc) およびTn抗原 (α GalNAc) を含むこと、およびムチン型Oグリカンに結合するLacNAcエпитープ (Gal β (1-4)GlcNAc) を有することが示された (図3のパネルj、および表6)。

[0074] [表6]

表6: HDM中のClec10a リガンドのレクチンマイクロアレイ分析

Rank	Lectin	Rough specificity	Signal value		
			Target ¹	Control ^{1,2}	Control ^{2,3}
1	MPA	Gal β 1-3GalNAc (T), α GalNAc (Tn)	20283	0	0
2	BPL	Gal β 1-3GalNAc (T), terminal GalNAc	19440	0	0
3	WFA	Terminal GalNAc, LacDiNAc	18081	0	0
4	rSRL	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc β 1-3GalNAc, agalacto N-glycan	17794	0	0
5	rABA	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc	17018	0	0
6	rXCL	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc β 1-3GalNAc, α Galacto N-glycan	16918	0	0
7	rCNL	Terminal GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)	16900	0	0
8	Jacalin	Gal β 1-3GalNAc (T), α GalNAc (Tn)	15697	0	0
9	UDA	(GlcNAc) _n	15228	0	0
10	rGC2	α 1-2Fuc (H), α GalNAc (A), α Gal (B)	15049	0	0
11	RCA120	β Gal	14050	0	0
12	rPSL1a	α 2-6Sia	13311	0	0
13	SBA	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)	12337	0	0
14	ABA	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc	11636	0	0
15	rCGL2	GalNAc α 1-3Gal (A), PolyLacNAc	10999	1370	0
16	PNA	Gal β 1-3GalNAc (T)	10699	0	0
17	TJAH	α 1-2Fuc	10518	0	0
18	VVA1	GalNAc β 1-3(4)Gal	10377	0	0
19	HEA	Gal β 1-3GalNAc (T)	9936	0	0
20	rGal9N	GalNAc α 1-4Gal (A), PolyLacNAc	9093	0	0
21	rLSLN	LacNAc, polylactosamine	8962	0	0
22	MCA	α 1-2Fuc	8239	0	0
23	ACA	Gal β 1-3GalNAc (T)	8057	0	0
24	rGal9C	PolyLacNAc, Branched LacNAc	7990	0	0
25	rAAL	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)	7764	0	0
26	AAL	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)	7508	0	0
27	VVA	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)	6765	0	0
28	rACG	α 2-3Sia	6442	0	0
29	rBC2CN	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc (GalNAc)	5909	0	0
30	HPA	α GalNAc (A, Tn)	5471	0	0
31	GNA	Man α 1-3Man, Man α 1-6Man	4458	0	0
32	NPA	Man α 1-3Man	3993	0	0
33	ECA	β Gal	3871	0	0
34	DBAI	High-man	3793	0	0
35	rBC2LA	α Man, High-man	3766	0	0
36	PVL	Sia, GlcNAc	3729	0	0
37	rRSII	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)	3678	0	0
38	rMOA	α Gal (B)	3656	0	0
39	rGRFT	Man	3502	0	0
40	rAOL	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)	3194	0	0
41	CCA	Galactosylated N-glycans up to triantenna	3093	0	0
42	LEL	Polylactosamine, (GlcNAc) _n	3054	0	0
43	STL	Polylactosamine, (GlcNAc) _n	2611	0	0
44	rPPL	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)	2579	0	0
45	rPALa	Man5, biantenna	2493	0	0
46	GSLIA4	α GalNAc (A, Tn)	2181	0	0
47	HHL	Man α 1-3Man, Man α 1-7Man	1731	0	0
48	rDiscodin II	LacNAc, Gal β 1-3GalNAc (T), GalNAc (Tn)	1306	0	0
49	DSA	GlcNAc β 1-6Man (Tetraantenna)	1095	0	0
50	SSA	α 2-6Sia	1013	0	0

¹ Target: Clec10a-Fcを用いたHDMからのプルダウンアッセイサンプル

² Control 1: Clec10a-Fcを用いた緩衝液からのプルダウンアッセイサンプル

³ Control 2 : ヒト IgG1 を用いた HDM から の プルダウンアッセイ サンプル

[0075] Clec10a は、高密度の多価 T および Tn 抗原を認識するマクルラ・ポミフェラ (MacLura pomifera (MPA)) のレクチンに最も強く結合した。他方で、T および Tn 抗原に Clec10a-Fc が結合することがグリカンマイクロアレイによる分析で明らかとなり (表 7 参照)、また、Clec10a-L がムチン様タンパク質であることが示唆された (図 3 のパネル k 参照)。

[0076]

[表7]

表7 : Clec10a-Fc のグリカンマイクロアレイによる分析

Rank	Glycan	Structure	Signal value		
			Clec10a-Fc	human IgG1	Clec10a-Fc with EDTA
1	α Gal	Gal α 1	11934	0	0
2	Lea	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1	5532	0	0
3	Lac	Gal β 1-4Glc β 1	4850	0	0
4	Core2	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1	4824	0	0
5	Gal α 1-3LN	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1	4342	0	0
6	Lex	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1	2535	0	0
7	T (Core1)	Gal β 1-3GalNAc α 1	2504	0	0
8	Lec	Gal β 1-3GlcNAc β 1	2414	0	0
9	β Gal	Gal β 1	1867	0	0
10	Gal α 1-4LN	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1	1679	0	0
11	A-di	GalNAc α 1-3Gal β 1	1137	0	0
12	Tn	GalNAc α 1	682	0	0
13	Gal α 1-3Lac	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1	444	0	0
14	Gal α 1-3Gal	Gal α 1-3Gal β 1	144	0	0
15	di-GalNAc β	GalNAc β 1-3GalNAc β 1	65	0	0
16	Melibiose	Gal α 1-6Glc β 1	45	0	0
17	Sia3	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2	19	0	3
18	3'SLN	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1	7	0	0
18	LN	Gal β 1-4GlcNAc β 1	7	0	0
20	β GalNAc	GalNAc β 1	6	0	0
21	3'SL	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β 1	5	0	0
22	3'SiaLec	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1	4	0	0
23	α Fuc	Fuca1	3	0	0
23	[3S] β Gal	(3OSO3)Gal β 1	3	0	0
23	Gal α 1-2Gal	Gal α 1-2Gal β 1	3	0	0
26	H type1	Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1	1	0	0
26	sLex	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1	1	0	0
26	6'SL	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β 1	1	0	0
26	STn	Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1	1	0	0
30	Fuca2Gal	Fuca1-2Gal β 1	0	0	0
30	Fuca3GlcNAc	Fuca1-3GlcNAc β 1	0	0	0
30	Fuca4GlcNAc	Fuca1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	H type2	Fuca1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	H type3	Fuca1-2Gal β 1-3GalNAc α 1	0	0	0
30	A	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	B	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	[3S]Lea	(3OSO3)Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1	0	0	0
30	Leb	Fuca1-2Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1	0	0	0
30	Ley	Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1	0	0	0
30	α Neu5Ac	Neu5Ac α 2	0	0	0
30	α Neu5Gc	Neu5Gc α 2	0	0	0
30	Sia2	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2	0	0	0
30	sLea	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc β 1	0	0	0
30	[3'S]Lec	(3OSO3)Gal β 1-3GlcNAc β 1	0	0	0
30	[3'S]LN	(3OSO3)Gal β 1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	[6S]LN	Gal β 1-4(6OSO3)GlcNAc β 1	0	0	0
30	[6'S]LN	(6OSO3)Gal β 1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	LDN	GalNAc β 1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	Gn2	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1	0	0	0
30	β GlcNAc	GlcNAc β 1	0	205	0
30	[6S] β GlcNAc	(6OSO3)GlcNAc β 1	0	318	0
30	α Man	Man α 1	0	0	0
30	β Man	Man β 1	0	0	0
30	[6P]Man	(6OPO4)Man α 1	0	0	0
30	Core3	GlcNAc β 1-3GalNAc α 1	0	0	0
30	Core4	GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1	0	0	0
30	Forssman disaccharide	GalNAc α 1-3GalNAc β 1	0	0	0
30	Core6	GlcNAc β 1-6GalNAc α 1	0	0	0
30	Core8	Gal α 1-3GalNAc α 1	0	0	0
30	[3'S]Core1	(3OSO3)Gal β 1-3GalNAc α 1	0	0	0
30	Gal β -Core3	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α 1	0	0	0
30	STn (Gc)	Neu5Gc α 2-6GalNAc α 1	0	0	0
30	ST	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1	0	0	0
30	Sia α 2-6Core 1	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α 1	0	0	0
30	α Glc	Glc α 1	0	0	0
30	β Glc	Glc β 1	0	0	0
30	Maltose	Glc α 1-4Glc β 1	0	0	1
30	α Rha	Rhamnose α 1	0	0	0
30	Chitobiose	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1	0	0	0
30	Negative PAA	-	0	0	0

51	TxLcl	Galactosylated N-glycans up to triantenna	973	0	0
52	rDiscoidin I	Gal	737	0	0
53	rCalsepa	Biantenna with bisecting GlcNAc	651	0	0
54	rGal3C	LacNAc, polyactosamine	630	0	0
55	WGA	(GlcNAc) _n , polySia	624	0	0
56	PSA	α 1-6Fuc up to biantenna	481	0	0
57	AOL	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)	309	0	0
58	LCA	α 1-6Fuc up to biantenna	228	0	0
59	rPAIIL	α Man, α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)	131	0	0
60	TJAI	α 2-6Sia	113	0	0
61	rBanana	Man α 1-2Man α 1-3(6)Man	10	0	0
62	ASA	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man	2	0	0
62	rCGL3	LacDiNAc	2	0	0
64	LFA	Sia	0	0	0
64	MAL	α 2-3Sia	0	0	0
64	MAH	α 2-3Sia	0	0	0
64	ACG	α 2-3Sia	0	0	0
64	rGal8N	α 2-3Sia	0	0	0
64	SNA	α 2-6Sia	0	0	0
64	ADA	α 2-6Sia, Forssman, A, B	0	0	0
64	PHAL	GlcNAc β 1-6Man (Tetraantenna)	0	0	0
64	rGal7	Type1 LacNAc, chondroitin polymer	0	0	0
64	rC14	Branched LacNAc	0	0	0
64	PHAE	bisecting GlcNAc	0	0	0
64	GSLII	GlcNAc β 1-4Man	0	0	0
64	PWM	(GlcNAc) _n	0	0	0
64	rF17AG	GlcNAc	0	0	0
64	ConA	M3, Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man, GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man	0	0	0
64	Helluba	Man α 1-3Man	0	0	0
64	rHelluba	Man α 1-3Man	0	0	0
64	VVAII	Man, agalacto	0	0	0
64	rOryzala	Man α 1-3Man, Highman, biantenna	0	0	0
64	rRSL	α Man, α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)	0	0	0
64	rPTL	α 1-6Fuc	0	0	0
64	LTL	Lex, Ley	0	0	0
64	UEAI	α 1-2Fuc	0	0	0
64	FLAG-EW29Ch	Gal	0	0	0
64	PTLI	α GalNAc (A, Tn)	0	0	0
64	GSLIB4	α Gal (B)	0	0	0
64	EEL	α Gal (B)	0	0	0
64	rPAIL	α , β Gal, α GalNAc (Tn)	0	0	0
64	DBA	α , β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)	0	0	0
64	DBAIII	Maltose	0	0	0
64	rMalectin	Glc α 1-2Glc	0	0	0
64	CSA	Rhamnose, Gal α 1-4Gal	0	0	0
64	FLAG-EW29Ch-E20K	6-sulfo-Gal	0	0	0

[0077] 実施例4：ヒトAsgr1とマウスClec10aの関係

ところで、アミノ酸配列の相同性を解析するツールであり、米国生物工学情報センター（NCBI）から提供されるBasic Local Alignment Search Tool（BLAST）によると、マウスClec10aとC型レクチン様ドメイン（CTLD）のアミノ酸配列において、最も高い相同性を示したヒトタンパク質は、ヒトAsgr1およびClec10aであった（それぞれ、Gene ID：432および10462によりコードされる）。ヒトAsgr1レポーター細胞とヒトClec10aレポーター細胞は、HDM刺激に応答してGFPを発現したが（図4のパネルaおよび図9のパネルa参照）、ガラクトースの追加は、Asgr1レポーター細胞においてのみ、HDMに誘発されるGFPの発現を阻害した（図4のパネルbおよび図9のパネルb参照）。また、hemITAM配列（YxxL）は、ヒトClec10aでは見出されず、ヒトAsgr1で見出すことができなかった（図4のパネルc参照）。これらの結果は、

マウスにおけるClec10aの機能的構造的なカウンターパートは、ヒトClec10aではなく、むしろヒトAsg r 1であることを示すものである。ヒトAsg r 1レポーター細胞は、HDMにおけるマウスClec10aのリガンド(Clec10a-L)に応答してGFPを発現した(図4のパネルd参照)。タンパク質の発現を確認すると、マウスの皮膚におけるClec10aの発現と同様に、ヒトAsg r 1はヒトの皮膚においてMPに発現した(図4のパネルe参照)。s i RNAによるヒト単核球由来培養MPにおけるAsg r 1のノックダウンは、HDMに対する応答において、炎症性サイトカインの分泌を増強した(図4のパネルfおよび図9参照)。このことは、ヒトにおいては、Asg r 1がHDM誘発皮膚炎を制御していることを示唆するものである。さらには、転写データ(GSE5667)によれば、アレルギー性皮膚炎の患者において皮膚のAsg r 1の発現と、HDMに対する感受性に関連する血清IgEレベルとに逆相関が認められた(図4のパネルg参照)。これらの結果から、ヒトにおけるAsg r 1とマウスにおけるClec10aなどのC型レクチン受容体がHDMにおけるムチン様タンパク質を認識し、HDMにより誘発される炎症に対する皮膚の恒常性維持において重要な役割を果たしていることが理解された(図4のパネルh参照)。

[0078] 実施例5：Clec10aリガンドによるアレルギー症状の処置

これまでの実施例の結果から、Clec10a(ヒトにおいてはAsg r 1)がHDM誘発アレルギー症状の制御に関わっており、Clec10a(ヒトにおいてはAsg r 1)に対するリガンド刺激がアレルギー症状の抑制に関与することが示された。本実施例では、Clec10aに対するリガンドでアレルギー症状を処置し、結果を観察した。

[0079] 最初の誘発(0日目)において、麻酔したマウス(C57BL/6JのWT)及びClec10a^{-/-}マウス)の背中の皮膚を電子バリカンを用いて除毛し、残存した毛を毛髪除去クリームを用いて脱毛した。剃った背中の皮膚に対してテープストリッピングした後、50 μ gのLPSをClec10a

ーLの存在下もしくは非存在下で局所投与した。C l e c 1 0 aリガンドは、上記（12）C l e c 1 0 aリガンドの単離に記載される通りの方法で取得した。テープストリッピング以降の手順は、毎日繰り返された。これにより、皮膚炎を誘発させた。表皮肥厚の解析は投与後5日目に行い、好中球浸潤の解析は投与後6時間後に行った。この系では、T L R 4誘導性の皮膚炎が誘発される。

誘発された皮膚炎を観察するため、常法により組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。その後、表皮肥厚と皮膚における好中球の数を計数した。

[0080] 結果は図10に示される通りであった。図10のパネルaに示されるようにL P Sで処置した皮膚では、皮膚炎が誘発され、表皮の肥厚が増大する傾向が認められた（中央上の写真）。これに対して、C l e c 1 0 aリガンドを投与した野生型マウスでは、表皮肥厚が顕著に低減し（右上の写真）、L P Sによる表皮肥厚増大の効果を抑制した。これに対して、C l e c 1 0 a^{-/-}マウスにおいては、L P Sによる表皮肥厚増大の効果は認められたが、C l e c 1 0 aリガンドの投与によっては表皮肥厚増大の効果を抑制することができなかった。図10のパネルbでは、表皮肥厚をグラフ化したものである。図10のパネルbにおいても、図10パネルaと同様の結果が示された。皮膚組織に対する好中球の浸潤を常法により観察した。結果は、図10のパネルcに示されるように、野生型（W T）マウスにおいてL P S処置群において好中球の浸潤が観察されたが、L P Sに加えてC l e c 1 0 aリガンドで処置した群においては好中球浸潤が抑制された。これに対してC l e c 1 0 a^{-/-}マウスにおいては、好中球浸潤をC l e c 1 0 aリガンドによっては抑制することができなかった。これらの結果から、C l e c 1 0 aリガンドは、皮膚炎の抑制効果を示すことが明らかとなった。

H D Mには、T L R 4リガンドが含まれることが知られており、これによって皮膚炎などの炎症症状やアレルギー症状が誘発されると考えられている。H D M刺激においても、C l e c 1 0 aにC l e c 1 0 aリガンドが結合

し（ヒトにおいてはその機能的カウンターパートである *Asgr1* に *Asgr1* リガンドが結合し）、*TLR4* シグナルを抑制することが炎症症状やアレルギー症状の軽減効果をもたらすと考えられる。

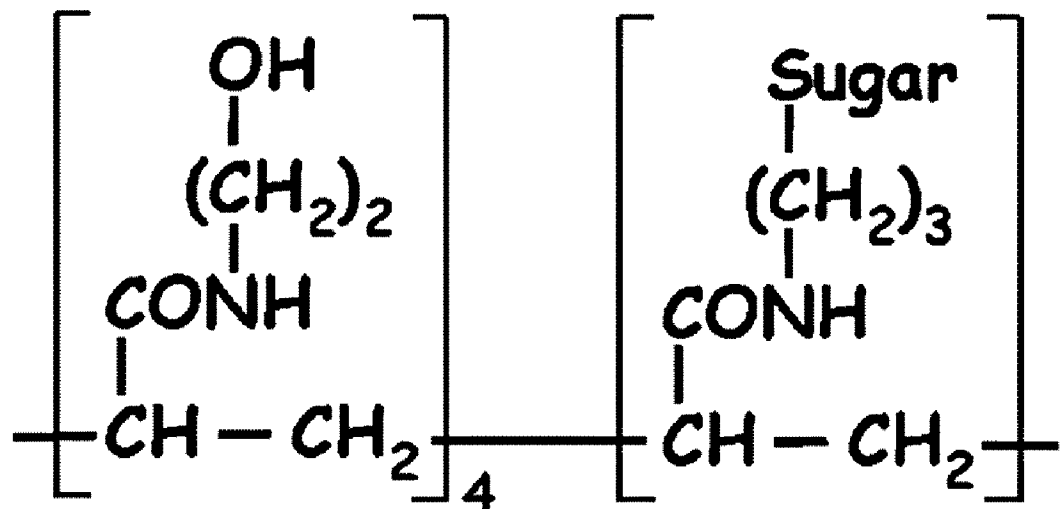
[0081] 実施例6：ヒト *Asgr1* リガンドの検出

図11では、*Clec10a*-Lのレクチンに対する結合プロファイルをレクチンアレイによって決定し、*Clec10a*-L中のグリカン構造を予測するスキーム（図11の左上パネル）、および、*Clec10a*に対するグリカンの結合プロファイルをグリカンアレイによって決定するスキーム（図11の右上パネル）が示されている。図11では、これらの結果を合わせて考察し、5つのグリカン（ α Gal、 β Gal、T抗原、LeA、およびLeX）を*Clec10a*のリガンド候補として特定できることを示している。図11では、Gal α 1-3LNとGal α 1-4LNを加えて7つの*Clec10a*のリガンド候補を特定した。

[0082] グリカン被覆プレートに対して*Clec10a*を適用するELISA系を常法により構築して、各グリカンと*Clec10a*との結合性を検討した。ELISA系においては、ポリマー性足場に複数のグリカンを結合させることによって多価効果が奏されることに期待し、ポリマー性足場にグリカン結合させ、*Clec10a*に提示させた。本実施例では、ポリマー性足場としては、ポリアクリルアミド（重量平均分子量：30kDa）を用いた。具体的には、以下のようにポリアクリルアミド側鎖のOH基に対してグリカン修飾し、これによってグリカンを*Clec10a*に提示した。以下式の通りである。

[0083]

[化3]



[0084] 上記のようにして上記式の「Sugar」の位置にグリカンを示すポリマー性足場（上記式の通り修飾率20%であった）を、 $1\mu\text{g}/\text{ウェル}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{ウェル}$ 、 $0.01\mu\text{g}/\text{ウェル}$ 含む、PBS溶液を96穴プレートに導入し、室温で一晩インキュベートすることによってウェルをグリカンで被覆した後に、非結合のポリマーを洗浄した。その後、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のClec10a-Fcを含む10%ウシ胎児血清含PBS溶液（ $50\mu\text{L}/\text{ウェル}$ ）をグリカン被覆ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後に、非結合のClec10a-Fcを洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗Fc抗体でプレート表面に結合したClec10a-Fcを定量した。陰性対象として、LeYを導入した上記ポリマーを用いた。

[0085] 結果は、図12に示される通りであった。図12に示されるように、リガンド候補の糖鎖すべてがClec10a-Fcと結合した。すなわち、すべてのリガンド候補が、リガンドであることが確認された。

[0086] 次いで、これらのリガンドが、Clec10aを活性化させるかをClec10a-CD3ζレポーター細胞を用いて確認した。すると、図13に示されるように、T抗原、LeA、およびLeXは、用量依存的にClec10aを活性化させ、NFATレポーターの発現を増強した。

[0087] 上記の実験からClec10aを活性化するグリカンが明らかになった。

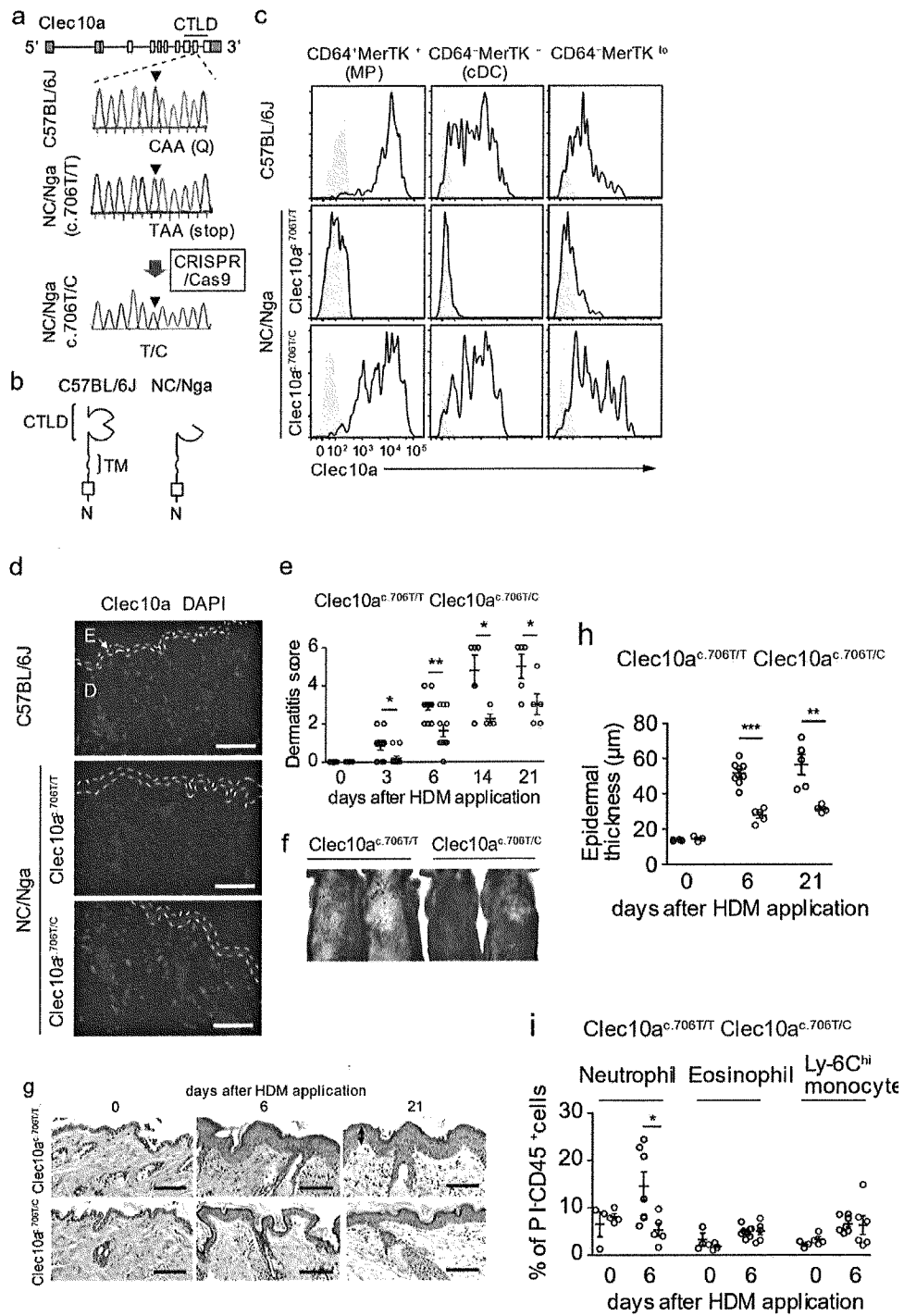
そのうちの一つであるT抗原がリポポリサッカライド（LPS）に対する皮膚炎症を抑制できるかを検討した。マウスの背中に50 μ gのLPSと20 μ gのT抗原を提示するポリマー性足場を毎日皮内注射し、5日目に表皮の厚みを観察した。結果は、図14に示される通りであった。図14に示されるように、LPSによる皮膚の厚みの増加は、T抗原によって抑制された。また、Clec10aノックアウトマウスでは、表皮の厚みはWTと同等以上であった。ここで、T抗原による表皮の厚みの抑制の効果はClec10aノックアウトマウスにおいては認められなかったことから、T抗原による炎症の抑制効果は、Clec10aを介するものであることが明らかとなった。

請求の範囲

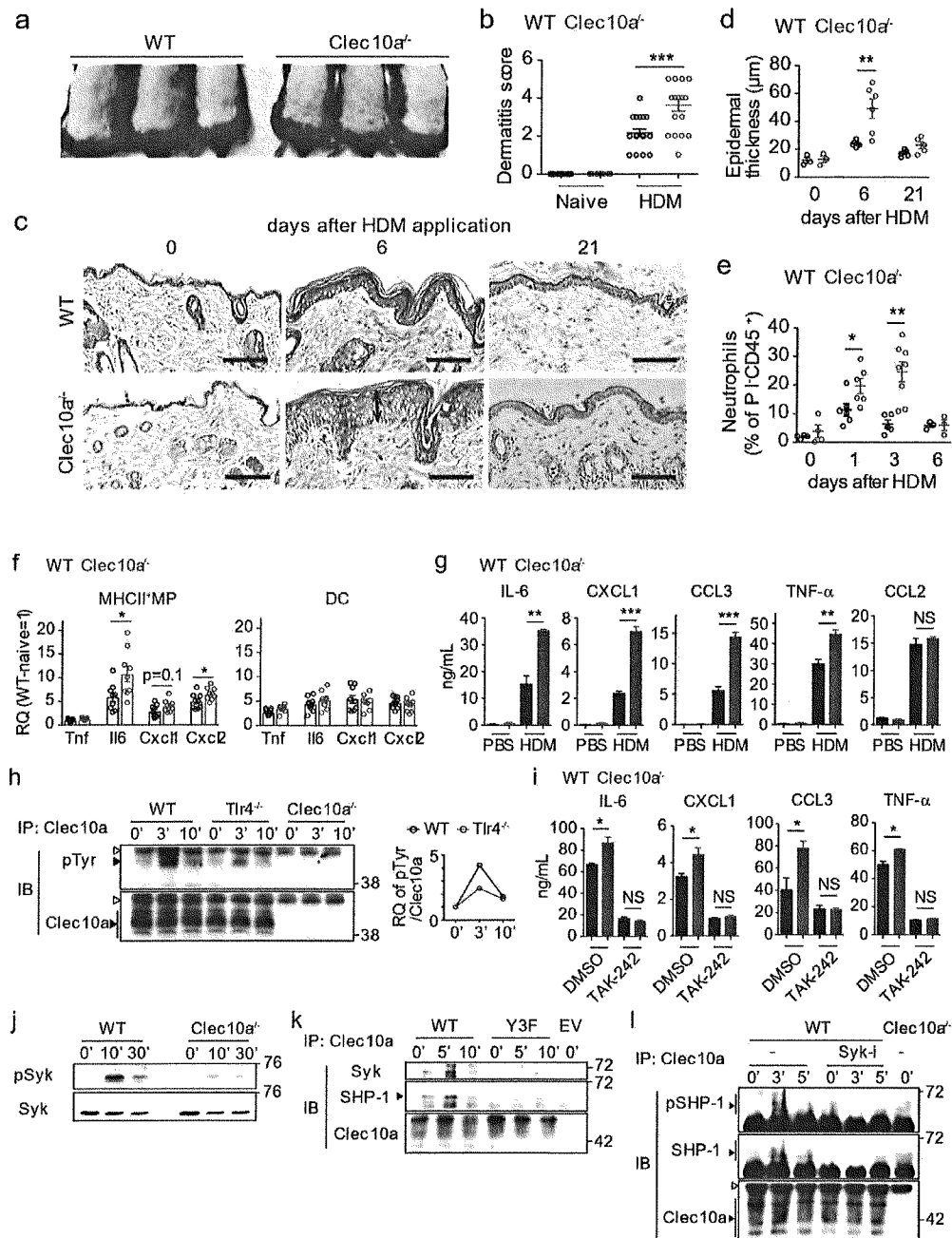
- [請求項1] アシアロ糖タンパク質受容体 1 (A s g r 1) のリガンドを含む、アレルギー疾患を処置することに用いるための組成物。
- [請求項2] アレルギー疾患が、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、じんましん、アレルギー性喘息、アレルギー性結膜炎、アレルギー性胃腸炎およびアナフィラキシーショックからなる群から選択される 1 以上である、請求項 1 に記載の組成物。
- [請求項3] アレルギー疾患が、チリダニを原因とするものである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。
- [請求項4] リガンドが、T 抗原、T n 抗原、L e A、およびL e x からなる群から選択される少なくとも 1 種の糖鎖を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項5] リガンドが、T 抗原、T n 抗原、L e A、およびL e x からなる群から選択される少なくとも 1 種の糖鎖を提示するポリマー性の足場を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項6] リガンドが、ムチン様タンパク質またはムチンである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項7] リガンドが、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 のリガンドである、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項8] ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 の細胞外領域と膜貫通領域と C D 3 ㇵの細胞内領域を含む融合タンパク質を発現する動物細胞であって、C D 3 ㇵシグナルで活性化するプロモーターと作動可能に連結したレポーターをコードする遺伝子を有する動物細胞。
- [請求項9] 被検化合物が、ヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 を活性化する化合物であることを検査する方法であって、
請求項 8 に記載の細胞と被検化合物とを接触させることと、
レポーターの発現レベルが増強した場合に、当該被検化合物がヒトアシアロ糖タンパク質受容体 1 に結合する化合物であると決定するこ

と
を含む、方法。

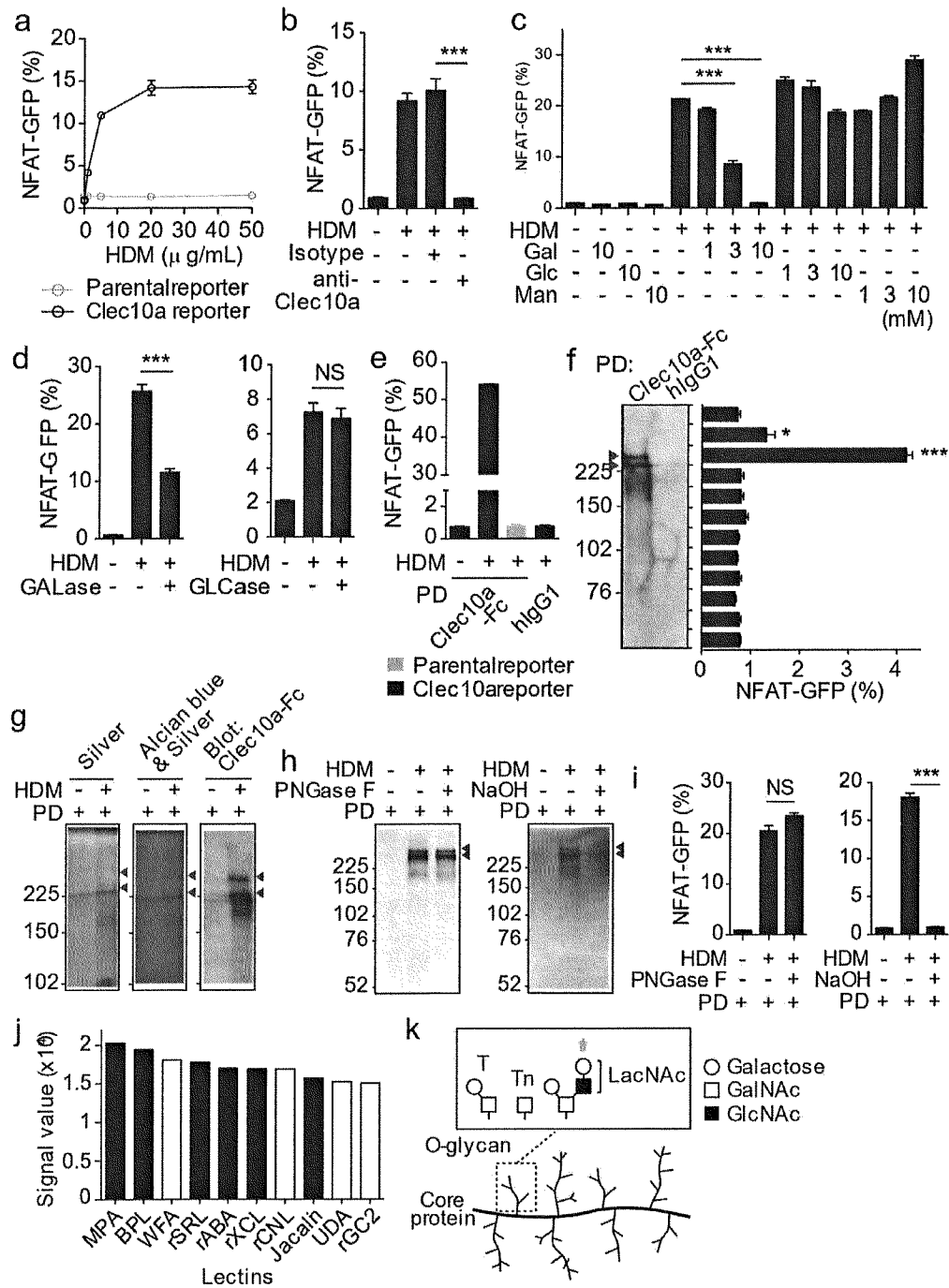
[1]



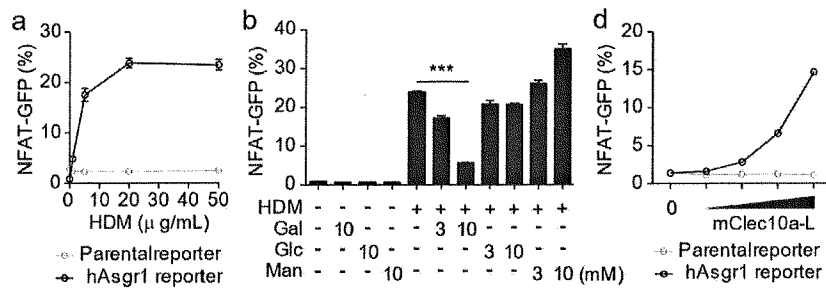
[図2]



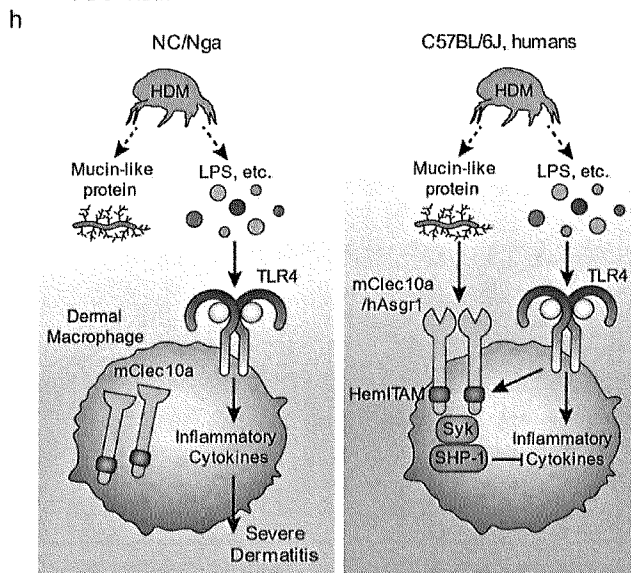
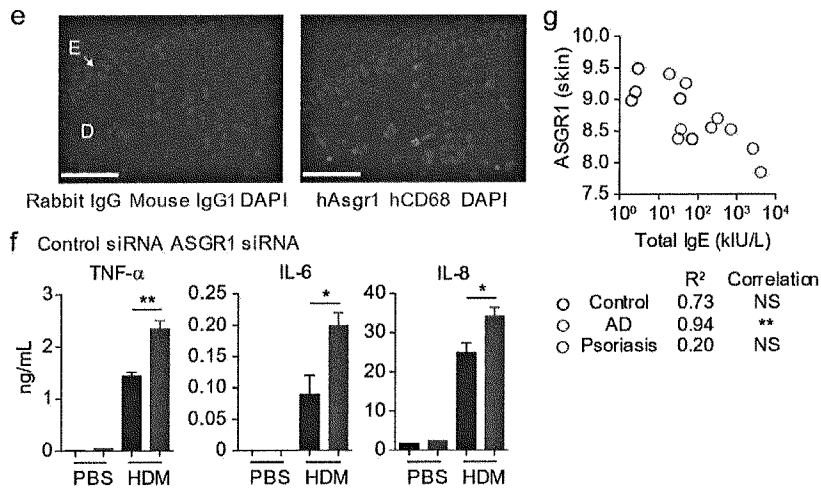
[図3]



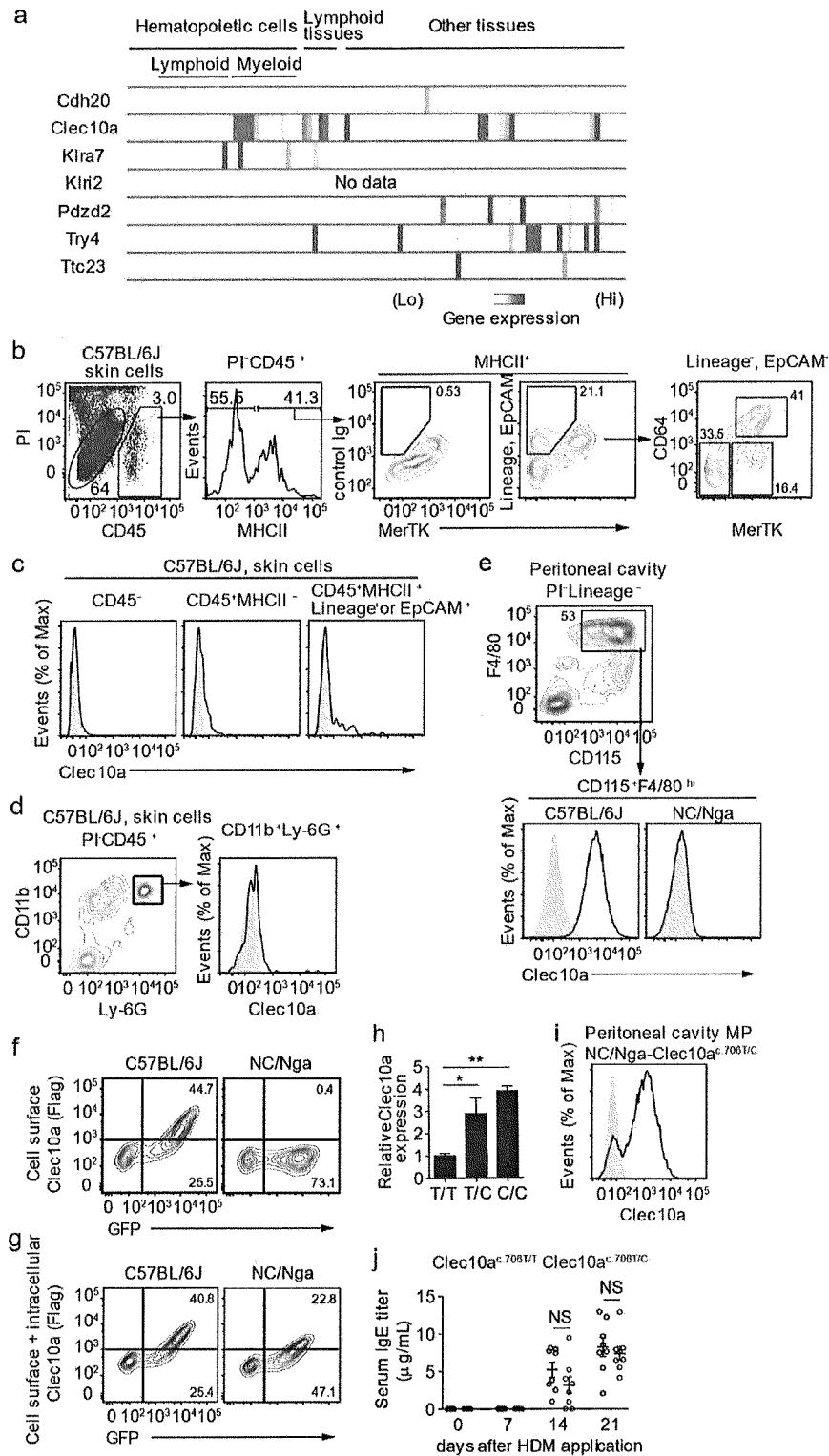
[4]



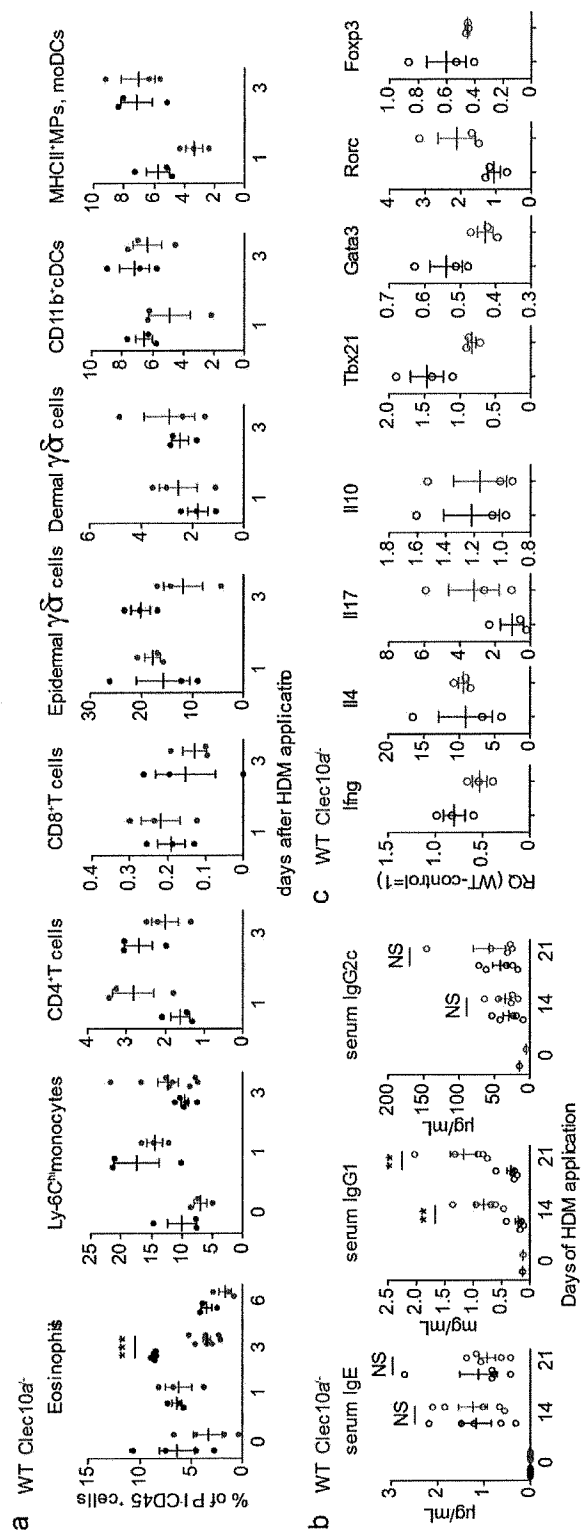
c mClec10a: 'MIYENLQNSRIEEKTQEPGKAPSQSFLWRILSWTH⁶⁵
hAsgr1: 'MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKGPQQPLLQRLCSGPR⁶⁰
hClec10a: 'MTRTYENFQYLENKVKVQGFKNGPLPLQSLQLRLCSGPC³⁸



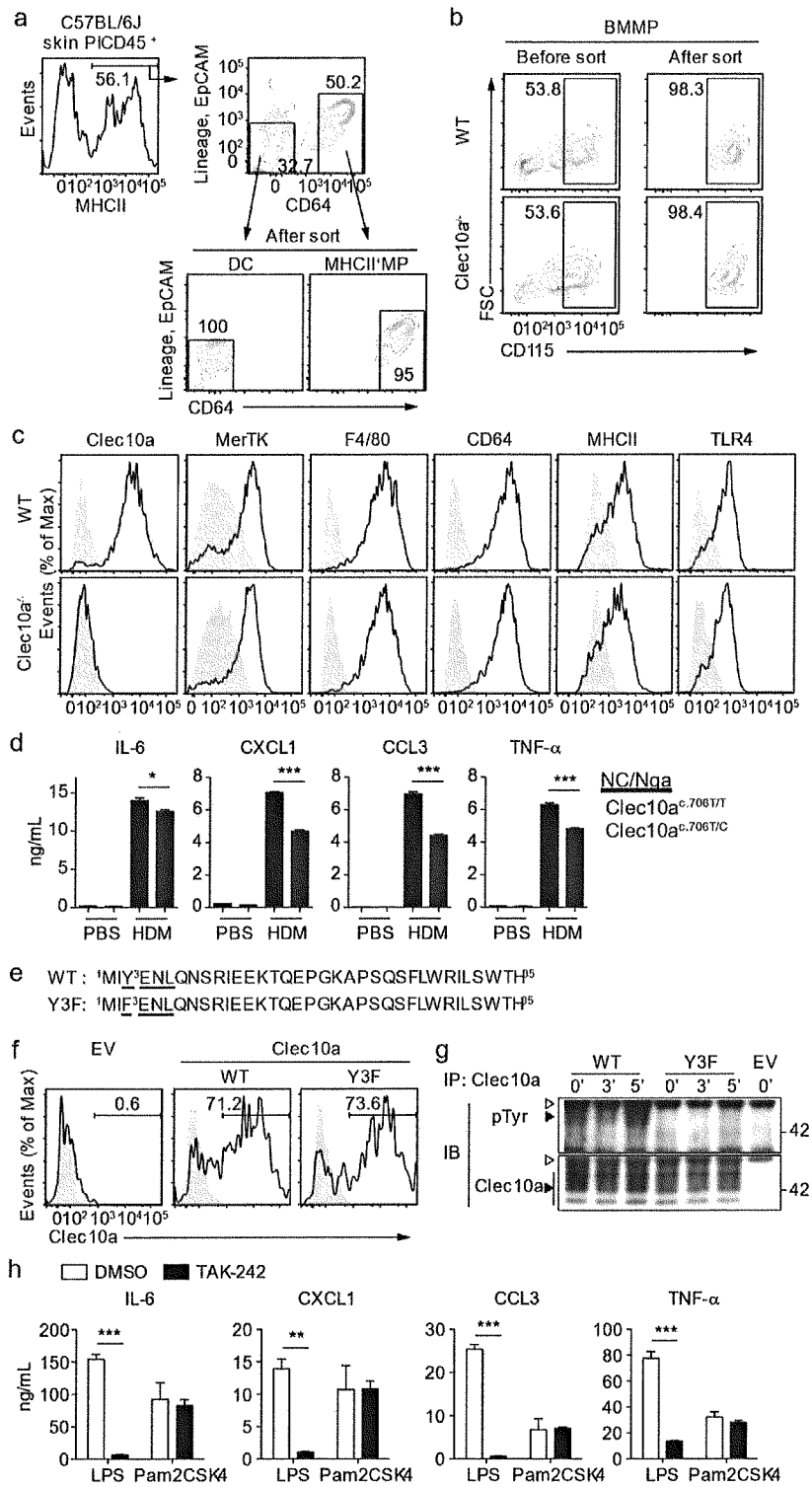
[5]



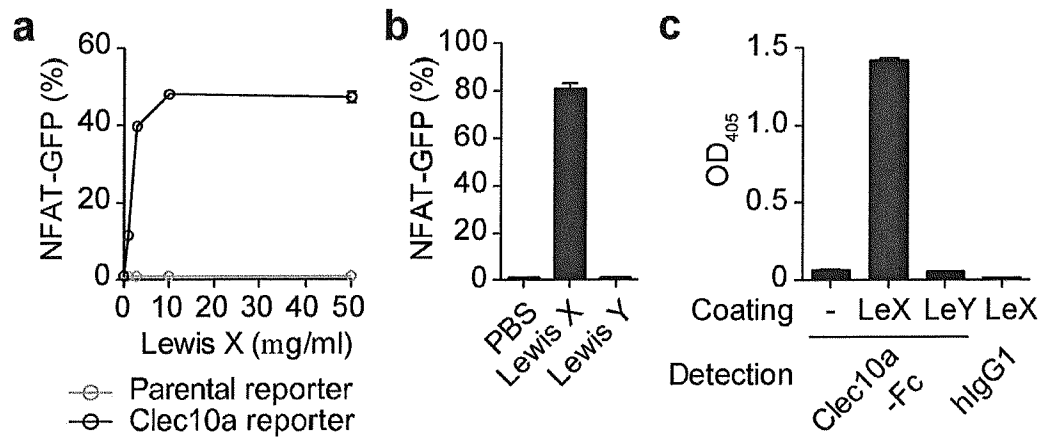
[Figure 6]



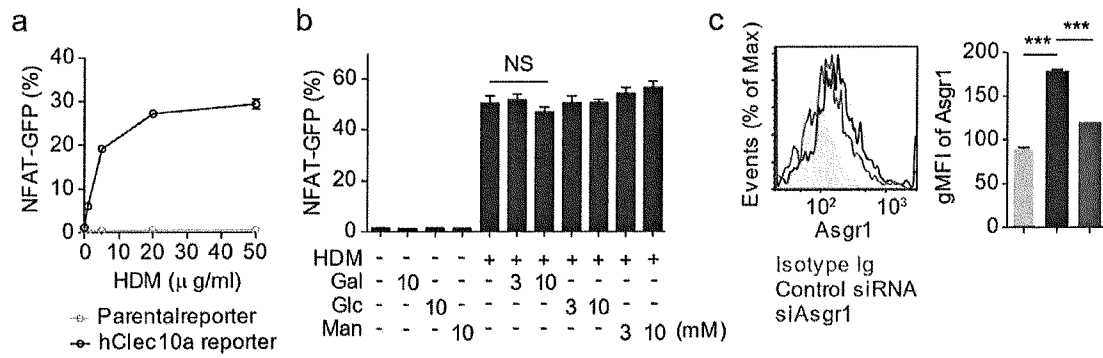
[7]



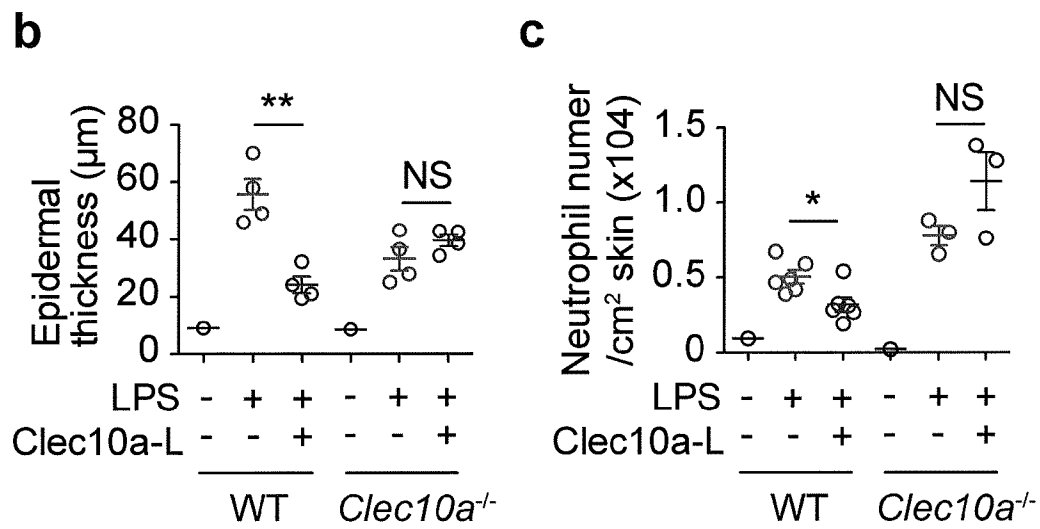
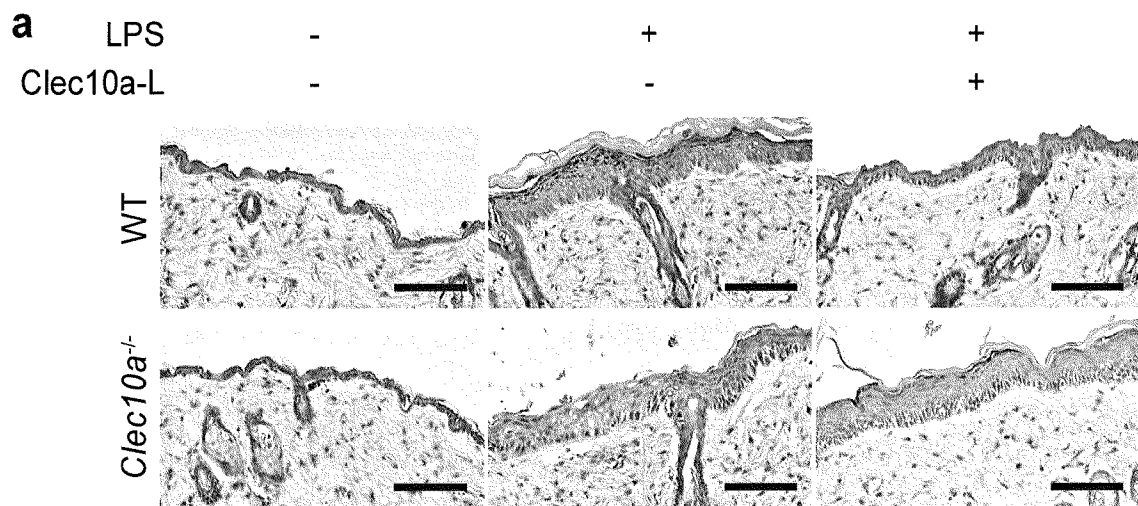
[図8]



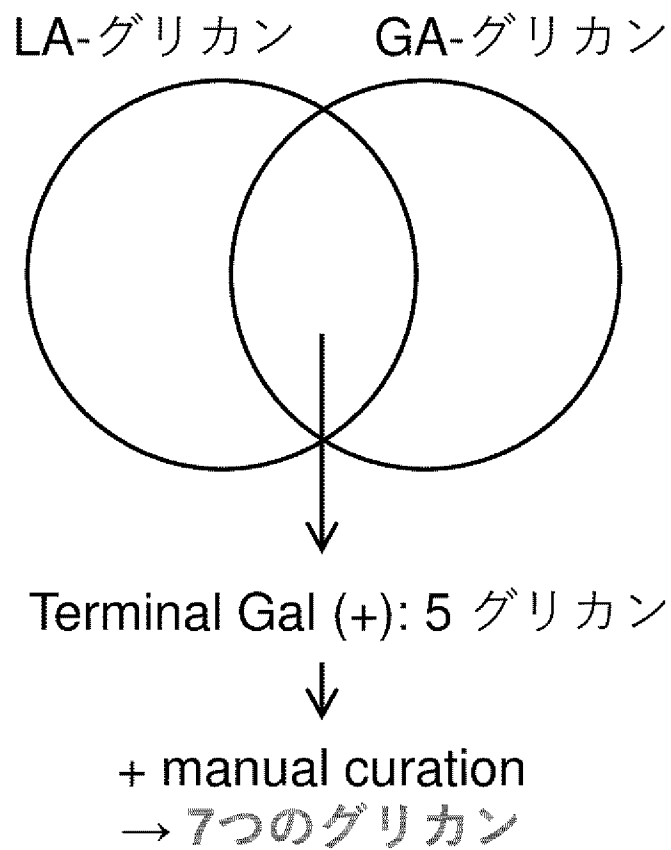
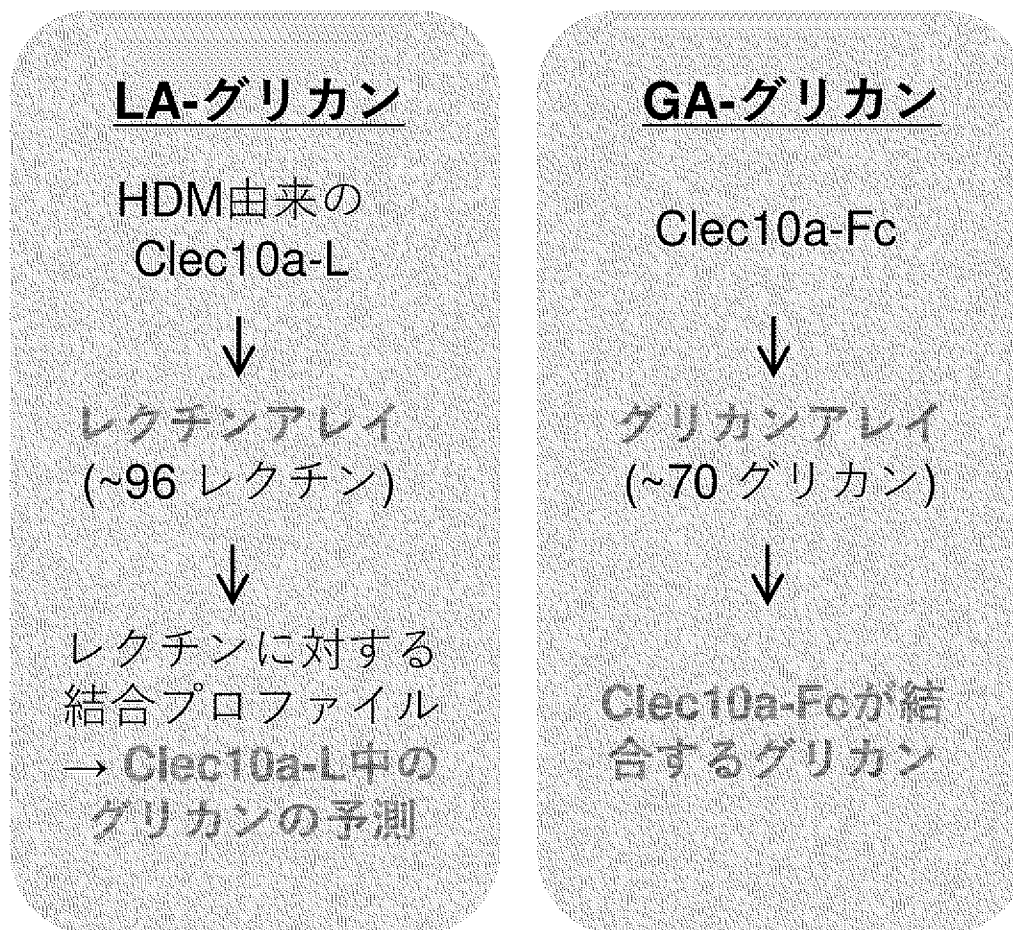
[図9]



[図10]

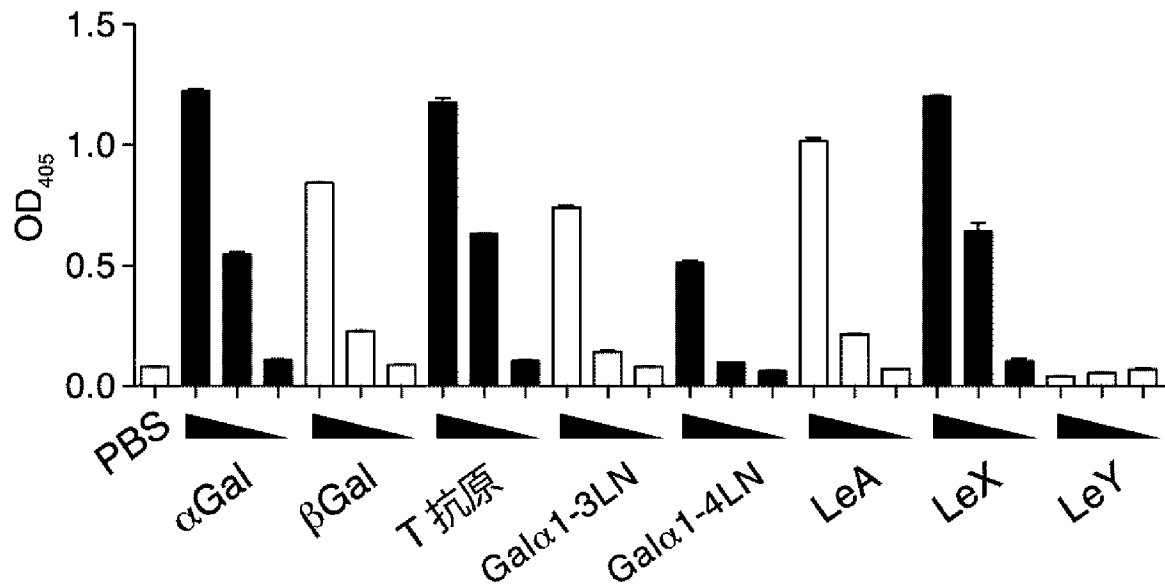


[図11]



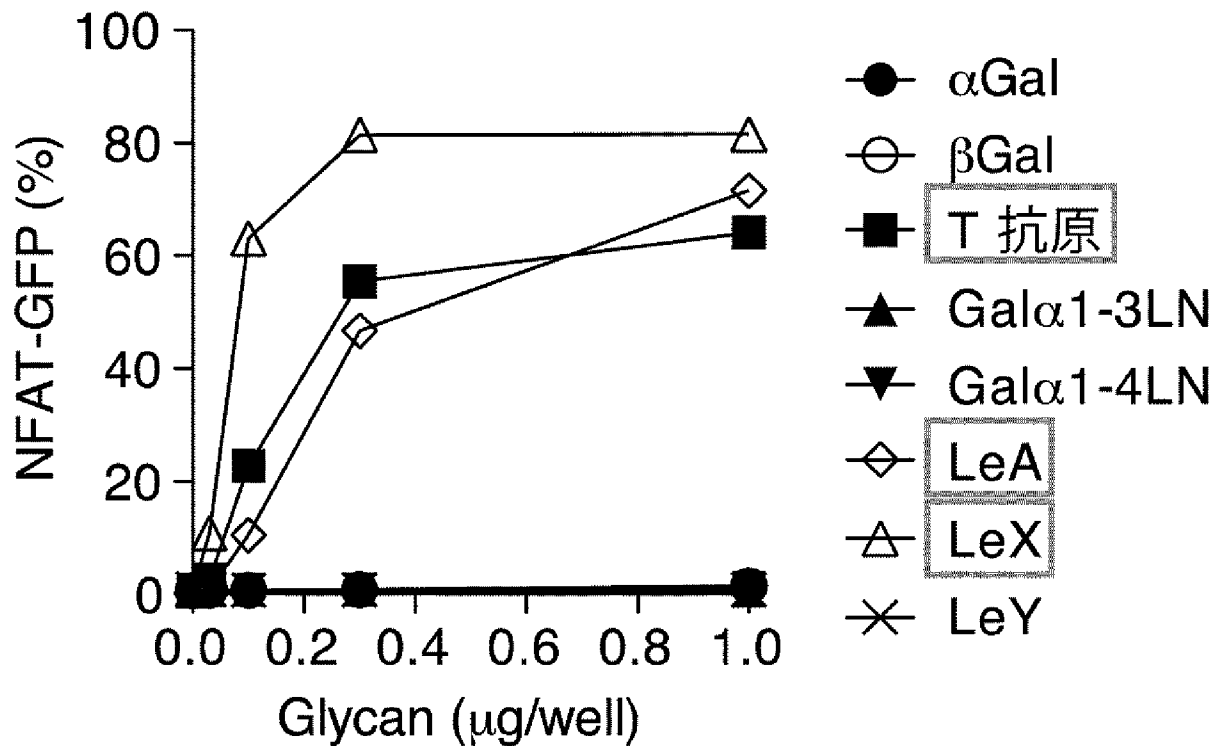
[図12]

ELISA：グリカン被覆プレート + Clec10a-Fc

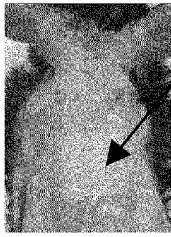


[図13]

Clec10aレポーター細胞



[図14]

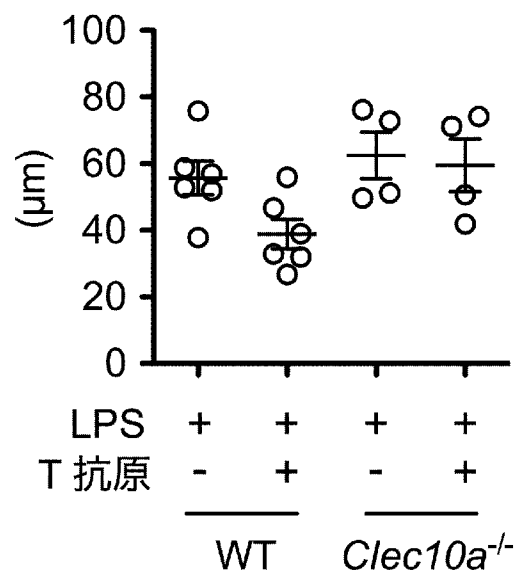


テープを剥がす+ 50 μ g LPSとグリカンの毎日の投与



5 日目に組織学的な分析

表皮の厚み



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/008427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/00(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i; A61P 11/06(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 27/14(2006.01)i; A61P 27/16(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 17/04(2006.01)i; C12N 5/07(2010.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i FI: A61K45/00 ZNA; A61K38/16; A61K39/00 H; A61P1/04; A61P11/02; A61P11/06; A61P17/00; A61P17/04; A61P27/02; A61P27/14; A61P27/16; A61P37/08; C12N5/07; C12N15/62 Z; G01N33/15 Z 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) A61K39/00; A61K45/00; A61P1/04; A61P11/02; A61P11/06; A61P27/02; A61P27/14; A61P27/16; A61P37/08; A61P17/00; A61P17/04; C12N5/07; C12N15/62; A61K38/16; G01N33/15 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 1971-2020 Registered utility model specifications of Japan 1996-2020 Published registered utility model applications of Japan 1994-2020 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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>加藤紀彦, シグレックとムチン糖鎖の相互作用を介した炎症抑制機構 ムチン糖鎖のアレルギ-性免疫応答における役割、化学と生物, 2016, vol. 54, no. 6, pp. 375-6, ISSN:1883-6852, entire text, non-official translation (KATOH, Toshihiko, "Inhibition mechanism of inflammation through the interaction between siglec and mucin sugar chains, Role of mucin sugar chains in allergic immune response", KAGAKU TO SEIBUTSU)</td> <td>1-3, 6, 7</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	加藤紀彦, シグレックとムチン糖鎖の相互作用を介した炎症抑制機構 ムチン糖鎖のアレルギ-性免疫応答における役割、化学と生物, 2016, vol. 54, no. 6, pp. 375-6, ISSN:1883-6852, entire text, non-official translation (KATOH, Toshihiko, "Inhibition mechanism of inflammation through the interaction between siglec and mucin sugar chains, Role of mucin sugar chains in allergic immune response", KAGAKU TO SEIBUTSU)	1-3, 6, 7
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	加藤紀彦, シグレックとムチン糖鎖の相互作用を介した炎症抑制機構 ムチン糖鎖のアレルギ-性免疫応答における役割、化学と生物, 2016, vol. 54, no. 6, pp. 375-6, ISSN:1883-6852, entire text, non-official translation (KATOH, Toshihiko, "Inhibition mechanism of inflammation through the interaction between siglec and mucin sugar chains, Role of mucin sugar chains in allergic immune response", KAGAKU TO SEIBUTSU)	1-3, 6, 7						
☒ 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 18 May 2020 (18.05.2020)		Date of mailing of the international search report 26 May 2020 (26.05.2020)						
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/008427

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	角田義弥, 外 3 名, 気道ムチン糖鎖は Siglec-F リガンドとして好酸球のアポトーシスを誘導する, 臨床免疫・アレルギー科, 2016, vol. 65, no. 5, pp. 468-71, ISSN: 1881-7930, entire text, (KAKUTA, Yoshiya et al., "Glycans carried by airway mucins are endogenous ligands for Siglec-F and induce eosinophil apoptosis", Clinical immunology & allergology	1-3, 6, 7
X	JP 2017-507945 A (ALLAKOS INC.) 23.03.2017 (2017-03-23) claims 117-134, paragraph [0090], examples, etc.	1-5, 7
Y	US 2013/0024961 A1 (CHRISTOPHER BURLAK) 24.01.2013 (2013-01-24) claims, paragraphs [0060], [0074], etc.	8, 9
Y	JP 2010-534828 A (BIOXELL SPA) 11.11.2010 (2010-11-11) examples 11, 14	8, 9
Y	JP 2010-534200 A (CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED) 04.11.2010 (2010-11-04) paragraphs [0234], [0235], [0241]	8, 9
P, X	KANEMARU, K. et al., "Clec10a regulates mite-induced dermatitis", Sci Immunol, vol. 4, no. 42, 06 December 2019, Article No. eaax6908, pp. 1-14, ISSN: 2470-9468, entire text	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/008427

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2017-507945 A	23 Mar. 2017	US 2017/0073413 A1 claims 117-134, paragraph [0091], examples WO 2015/131155 A1 EP 3110446 A1	
US 2013/0024961 A1	24 Jan. 2013	WO 2011/068798 A1 claims, paragraphs [0060], [0074], etc. EP 2507419 A1	
JP 2010-534828 A	11 Nov. 2010	US 2010/0306863 A1 examples 11, 14 WO 2009/013319 A1 EP 2174131 A1	
JP 2010-534200 A	04 Nov. 2010	US 2010/0221265 A1 paragraphs [0298]- [0302], [0312] WO 2009/013484 A1 EP 2185586 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 39/00(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i; A61P 11/06(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 27/14(2006.01)i; A61P 27/16(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 17/04(2006.01)i; C12N 5/07(2010.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i FI: A61K45/00 ZNA; A61K38/16; A61K39/00 H; A61P1/04; A61P11/02; A61P11/06; A61P17/00; A61P17/04; A61P27/02; A61P27/14; A61P27/16; A61P37/08; C12N5/07; C12N15/62 Z; G01N33/15 Z																	
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）） A61K39/00; A61K45/00; A61P1/04; A61P11/02; A61P11/06; A61P27/02; A61P27/14; A61P27/16; A61P37/08; A61P17/00; A61P17/04; C12N5/07; C12N15/62; A61K38/16; G01N33/15 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>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020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/WPIDS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2020年																
日本国実用新案登録公報	1996-2020年																
日本国登録実用新案公報	1994-2020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>加藤紀彦, シグレックとムチン糖鎖の相互作用を介した炎症抑制機構 ムチン糖鎖のアレルギー性免疫応答における役割, 化学と生物, 2016, Vol. 54, No. 6, pp. 375-6, ISSN: 1883-6852 全文</td> <td>1-3, 6, 7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>角田義弥, 外3名, 気道ムチン糖鎖はSiglec-Fリガンドとして好酸球のアポトーシスを誘導する, 臨床免疫・アレルギー科, 2016, Vol. 65, No. 5, pp. 468-71, ISSN: 1881-7930 全文</td> <td>1-3, 6, 7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2017-507945 A (アラコス インコーポレイテッド) 23.03.2017 (2017-03-23) 請求項117-134、段落0090、実施例、等</td> <td>1-5, 7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2013/0024961 A1 (CHRISTOPHER BURLAK) 24.01.2013 (2013-01-24) Claims, [0060]、[0074]、等</td> <td>8, 9</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	加藤紀彦, シグレックとムチン糖鎖の相互作用を介した炎症抑制機構 ムチン糖鎖のアレルギー性免疫応答における役割, 化学と生物, 2016, Vol. 54, No. 6, pp. 375-6, ISSN: 1883-6852 全文	1-3, 6, 7	X	角田義弥, 外3名, 気道ムチン糖鎖はSiglec-Fリガンドとして好酸球のアポトーシスを誘導する, 臨床免疫・アレルギー科, 2016, Vol. 65, No. 5, pp. 468-71, ISSN: 1881-7930 全文	1-3, 6, 7	X	JP 2017-507945 A (アラコス インコーポレイテッド) 23.03.2017 (2017-03-23) 請求項117-134、段落0090、実施例、等	1-5, 7	Y	US 2013/0024961 A1 (CHRISTOPHER BURLAK) 24.01.2013 (2013-01-24) Claims, [0060]、[0074]、等	8, 9
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	加藤紀彦, シグレックとムチン糖鎖の相互作用を介した炎症抑制機構 ムチン糖鎖のアレルギー性免疫応答における役割, 化学と生物, 2016, Vol. 54, No. 6, pp. 375-6, ISSN: 1883-6852 全文	1-3, 6, 7															
X	角田義弥, 外3名, 気道ムチン糖鎖はSiglec-Fリガンドとして好酸球のアポトーシスを誘導する, 臨床免疫・アレルギー科, 2016, Vol. 65, No. 5, pp. 468-71, ISSN: 1881-7930 全文	1-3, 6, 7															
X	JP 2017-507945 A (アラコス インコーポレイテッド) 23.03.2017 (2017-03-23) 請求項117-134、段落0090、実施例、等	1-5, 7															
Y	US 2013/0024961 A1 (CHRISTOPHER BURLAK) 24.01.2013 (2013-01-24) Claims, [0060]、[0074]、等	8, 9															
☒ 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。																	
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>“G” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“G” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献				
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“G” 同一パテントファミリー文献																
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																	
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																	
国際調査を完了した日 18.05.2020		国際調査報告の発送日 26.05.2020															
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 伊藤 基章 4U 4146 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
Y	JP 2010-534828 A (バイオエクセル エスピーエー) 11.11.2010 (2010 - 11 - 11) 実施例 1 1, 1 4	8, 9
Y	JP 2010-534200 A (がんサー・リサーチ・テクノロジー・リミテッド) 04.11.2010 (2010 - 11 - 04) 段落 0 2 3 4、0 2 3 5、0 2 4 1	8, 9
P, X	KANEMARU, K. et al., Clec10a regulates mite-induced dermatitis, Sci Immunol, Vol. 4, No. 42, 2019.12.06, Article No. eaax6908, pp. 1-14, ISSN: 2470-9468 全文	1-9

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2020/008427

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2017-507945 A	23.03.2017	US 2017/0073413 A1 Claim 117-134, [0091], Examples WO 2015/131155 A1 EP 3110446 A1	
US 2013/0024961 A1	24.01.2013	WO 2011/068798 A1 Claims, [0060], [0074], 等 EP 2507419 A1	
JP 2010-534828 A	11.11.2010	US 2010/0306863 A1 Example 11, 14 WO 2009/013319 A1 EP 2174131 A1	
JP 2010-534200 A	04.11.2010	US 2010/0221265 A1 [0298]-[0302], [0312] WO 2009/013484 A1 EP 2185586 A1	