

(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
2012 年 1 月 5 日 (05.01.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/001889 A1

(51) 国際特許分類：

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) C12R 1/91 (2006.01)

(21) 国際出願番号：

PCT/JP201 1/003329

(22) 国際出願日：

201 1 年 6 月 13 日 (13.06.201 1)

(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 2010-146262 2010 年 6 月 28 日 (28.06.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について)：国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY)

[JP/JP]：〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 Miyagi (JP).

(72) 発明者：および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)：平澤 典保

(HIRASAWA, Norivasu) [JP/JP]：〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 秀 道広 (HIDE, Michihiro) [JP/JP]：〒7348553 広島県広島市南区霞

一丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (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 1 丁目 6 番 5 号丸の内北口ビル 2 1 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)：

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可)：

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(1) 及び 48.2(a)(viii))

(54) Title: CELL CAPABLE OF EXPRESSING TSLP CONSTANTLY AND AT HIGH LEVEL, AND METHOD FOR SCREENING FOR TSLP MODULATOR UTILIZING THE CELL

(5) 発明の名称：TSLP を恒常的に高発現する細胞、及び前記細胞を利用した TSLP 調節剤のスクリーニング方法

(57) Abstract: Disclosed is are: a mouse epithelial cell line capable of producing TSLP constantly; and use of the cell. More specifically disclosed are: a method for screening for a TSLP modulator using a mouse epithelial cell line (KCHM-1) that can produce TSLP constantly; and a process for producing natural TSLP using the cell line.

(57) 要約：本発明は、TSLP を恒常的に産生するマウス上皮細胞株とその利用に関する。より詳細には、本発明は、TSLP を恒常的に産生するマウス上皮細胞株 (KCHM-1) を用いた TSLP 調節剤のスクリーニング方法、及び前記細胞株を用いた天然型 TSLP の製造方法に関する。



WO 2012/001889 A1

明 細 書

発 明 の 名 称 :

TSLPを恒常的に高発現する細胞、及び前記細胞を利用したTSLP調節剤のスクリーニング方法

技 術 分 野

[0001] 本発明は、TSLPを恒常的に産生するマウス上皮細胞株とその利用に関する。より詳細には、本発明は、TSLPを恒常的に産生するマウス上皮細胞株（KGM-1）を用いたTSLP調節剤のスクリーニング方法、及び前記細胞株を用いた天然型TSLPの製造方法に関する。

背 景 技 術

[0002] Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は、胸腺ストローマ細胞の培養上清から単離されたIL-7様のサイトカインである。TSLPはアレルギー発症のマスタースイッチとして注目されており、TSLPが肺や皮膚などの局所で発現するとTh2タイプの免疫反応が惹起され、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性炎症を発症する。

[0003] これまで、*in vitro*の実験系において、気道上皮細胞、皮膚ケラチノサイト、線維芽細胞、マスト細胞をTNF- α 、IL-4、LPS、dsRNAなどで刺激するとTSLPの産生が誘導されることが報告されている（非特許文献1～3）。

[0004] TSLPのアレルギー誘発作用は、樹状細胞の活性化を介したTh2細胞の分化誘導等に起因することが*in vitro*で明らかにされている（非特許文献4）。しかしながら、アレルギー疾患を含む炎症の機構は複雑で、TSLPの作用メカニズムについても未知の部分が多い。

[0005] アトピー性皮膚炎患者の多くでは、その皮膚病変部のケラチノサイトにおいて、TSLPが高発現していることが報告されており、TSLPをアレルギー疾患の予防あるいは治療の新たな標的とした特許出願もなされている。

[0006] たとえば、TSLPのアゴニストやアンタゴニストを使用して、樹状細胞活性を調節し、免疫障害を処置する方法や、プロテアーゼ抵抗性を付与した組換

えTSLPを用いた医薬組成物に関する特許出願がある（特許文献1及び2）。

- [0007] TSLPの作用メカニズムの解析やTSLP調節剤の探索は、アレルギー疾患の新たな予防あるいは治療方法の提供にとって極めて有用と思われる。しかしながら、TSLPはin vivoでは容易に検出されるが、in vitroでケラチノサイトのTSLP産生を誘導することは困難で、公知の哺乳動物細胞株におけるTSLP発現量も非常に少ない。TSLPの組換え発現系も構築されているが、TSLPの産生機構が異なるため、TSLPの正確な産生制御機構をみることができない。また、現在市販されているTSLPは糖鎖の付かない組換えTSLPであるため、哺乳動物細胞が産生するTSLPと生化学的性質が異なる可能性がある。

- [0008] そのため、TSLP作用メカニズムの解析や、TSLP標的薬の探索に有用なネイティブなTSLPを高発現する細胞系の構築が望まれていた。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特表2005—516606号

特許文献2：特表2005—505293号

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Bogiatzi S. I. et al., J. Immunol. (2007) 178 : 3373-3377,

非特許文献2：Kato A. et al., J. Immunol. (2007) 179 : 1080-1087,

非特許文献3：Allakhverdiz Z et al., J. Exp. Med. (2007) 204 : 253-258

非特許文献4：Soumelis V., Nat. Immunol. (2002) 3 : 673-680

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 本発明の課題は、TSLPを介した炎症やアレルギーの制御機構に基づき、TSLPを標的とした抗炎症剤や抗アレルギー剤を開発するための新規なツールを提

供することにある。

課題を解決するための手段

- [001 2] 発明者らは、広島大学医学部 秀教授によって樹立されたマウス皮膚上皮細胞株 KGMH-1 株が、無刺激下においても大量に TSLP を産生することを見出した。TSLP は *in vivo* では容易に検出されるが、*in vitro* でのケラチノサイトの TSLP 産生を誘導することは難しく、公知の哺乳類上皮細胞株を用いた TSLP 産生系はこれまで存在しなかった。
- [001 3] TSLP はアレルギーや炎症の発症と密接な関連を有することが知られており、本細胞株は、この TSLP を介したアレルギーや炎症の病態解明や、TSLP を標的とした薬剤の *in vitro* 評価系として極めて有用である。
- [001 4] すなわち、本発明は、受託番号 FERM BP-1 1368 で特定される KGMH-1 細胞株又はこれと実質的に同等の TSLP 産生能を有するその変異株に被験物質を作用させ、得られる TSLP 産生量を測定することを特徴とする、TSLP 調節剤のスクリーニング方法に関する。
- [001 5] 本発明のスクリーニング方法は、例えば、以下の工程を含む：
- 1) 被験物質の存在下及び非存在下において、KGMH-1 細胞株又はこれと実質的に同等の TSLP 産生能を有するその変異株を培養する工程、
 - 2) 被験物質の存在下及び非存在下における TSLP 産生量を比較する工程。
- [001 6] 前記方法において、TSLP 産生量は、TSLP と特異的に結合する抗 TSLP 抗体を用いて測定できる。例えば、ウェスタンブロット法、ドットブロット法、スポットブロット法、ELISA 法、RIA 法、又はフロービーズアレイ法等の免疫学的方法を用いることができる。
- [001 7] TSLP 産生量は遺伝子 (mRNA) レベルで評価してもよい。そのような方法も、上記した「TSLP 産生量を測定すること」に含まれる。遺伝子の発現量は、遺伝子チップ、アレイ等の固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーション法、RT-PGR 法、リアルタイム PGR 法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、ならびにクロスハイブリダイゼーション法など公知の方法を用いて測定するこ

とができる。

[0018] 1つの実施態様において、TSLP調節剤はTSLP産生抑制剤である。TSLP産生抑制剤をスクリーニングする場合においては、被験物質の存在下におけるTSLP産生量が非存在下におけるTSLP産生量に比較して有意に低い場合に、当該被験物質をTSLP産生抑制剤候補として選択する。

[0019] TSLP産生抑制剤としては、たとえば抗アレルギー剤又は抗炎症剤を挙げることができる。

[0020] 本発明はまた、KGMH-1細胞株又はこれと実質的に同等のTSLP産生能を有するその変異株を含む、TSLP調節剤のスクリーニング用キットを提供する。

前記キットは、さらに抗TSLP抗体、あるいは抗TSLP抗体と抗TSLP抗体に特異的に結合しうる二次抗体を含んでいてもよい。

[0021] 本発明はさらに、受託番号FERM BP-1 1368で特定されるKGMH-1細胞株、又はこれと実質的に同等のTSLP産生能を有するその変異株を培養することを特徴とする、TSLPの製造方法も提供する。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、簡便に天然型のTSLPを得ることができる。

また、本発明によれば、培養細胞系により、被験物質のTSLP調節活性を簡便に評価することができる。TSLP調節活性を有する物質は、抗アレルギー薬あるいは抗炎症薬として利用できる可能性があるため、本発明はそのような薬剤の簡便で安価なスクリーニング系として利用することができる。とくに、本発明で用いられるKGMH-1細胞株はケラチノサイト由来であるため、皮膚アレルギーの治療・予防薬のスクリーニング、あるいはそのメカニズムの探索に有用である。

図面の簡単な説明

[0023] [図1] 図1は、KGMH-1細胞、PAM212細胞、HaGaT細胞のTSLP産生量を比較した結果を示す（図中、左より、KGMH-1細胞、PAM212細胞、HaGaT細胞）。

[図2] 図2は、デキサメタゾンとFK506刺激後のKGMH-1細胞のTSLP産生量を示す（図中、左より、無添加（contro l）、デキサメタゾン0.1リM、デキサメタ

ゾン1.0 μ M、FK506 0.1 μ M、FK506 1.0 μ M)。

[図3] 図3は、KGMH-1細胞のTSLP産生に対するRXRアゴニストHX-600の効果を示す(右:HX-600 1 μ M 添加、左:無添加)。

[図4] 図4は、KGMH-1細胞のTSLP産生に対する各種チロシンキナーゼ阻害薬の効果を比較した結果を示す(図中、左より、DMSO (control) Herbimycin A 3 μ M、PP2 (3 μ M)、Piceatannol 100 μ M、AG490 100 μ M、WHI-P154 30 μ M)。

[図5] 図5は、KGMH-1細胞のTSLP産生に対する各種セリンスレオニンキナーゼ阻害薬の効果を比較した結果を示す(図中、左より、DMSO、U0126 1 μ M、SB203580 10 μ M、SP600125 30 μ M、wortmannin 100nM、BAY11-7082 10 μ M、Go-6976 3 μ M)。

[0024] 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2010-146262号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための形態

[0025] 1. KGMH-1細胞株

本発明で用いられる「KGMH-1細胞株」は、後述する参考例に記載するように、広島大学医学部 秀教授によって、マウス皮膚がん細胞から樹立されたケラチノサイト細胞株で、受託番号FERM P-21965として、2010年5月21日付にて、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1 つくばセンター 中央第6）に国内寄託され、その後2011年4月25日付にて国際寄託への移管がなされ、同センターに受託番号FERM BP-11368として国際寄託されている。

[0026] 発明者らは、このKGMH-1細胞株が、恒常的にTSLPを産生すること、産生されるTSLP量は他のケラチノサイトにおいて刺激によって誘導される量に比べてはるかに高いことを見出した。

[0027] 前述したように、TSLPはin vivoでは容易に検出されるが、in vitroでのケラチノサイトのTSLP産生を誘導することは難しく、公知の哺乳類上皮細胞株を用いたTSLP産生系はこれまで知られていない。TSLP遺伝子を導入するこ

とにより強制的に TSLP を高発現させることも可能であるが、TSLP 遺伝子導入細胞は、TSLP 産生制御機構がインタクトな細胞とは異なるため、生体内での TSLP を介したアレルギーや炎症の病態を正確に反映するものではない。

[0028] 本発明の KGMH-1 細胞株には、上記したような問題はなく、生体における TSLP 産生機構の解明やその調節剤を探索するための培養細胞系として極めて有用である。

[0029] 本発明では、上記した KGMH-1 細胞株やその子孫に加えて、実質的に同等の TSLP 発現能を有する限り、その変異株（以下、「KGMH-1 細胞変異株」という）も用いることができる。「KGMH-1 細胞変異株」としては、例えば、その栄養要求性変異株や薬剤耐性変異株、遺伝子導入株等を挙げることができる。

[0030] 2. TSLP

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は、胸腺ストローマ細胞の培養上清から単離された 121 個のアミノ酸からなる IL-7 様のサイトカインである。TSLP はアレルギー発症のマスタースイッチとして注目されており、TSLP が肺や皮膚などの局所で発現すると Th2 タイプの免疫反応が惹起され、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性炎症を発症する。TSLP のアレルギー誘発作用は、樹状細胞の活性化を介した Th2 細胞の分化誘導等に起因することが *in vitro* で明らかにされている。

[0031] これまで、*in vitro* の実験系において、気道上皮細胞、皮膚ケラチノサイト、線維芽細胞、マスト細胞を TNF- α 、IL-4、LPS、dsRNA などで刺激すると TSLP の産生が誘導されることが報告されている。一方、デキサメタゾン は TSLP の産生を抑制するが、シクロスポリン A および FK506 は TSLP の産生を抑制しないことが報告されている。

[0032] 例えば Kato らは、48 時間培養したヒト正常気道上皮細胞 3×10^4 個に、IL-4 (100 ng/ml)、IL-13 (100 ng/ml)、インターフェロン- γ (100 ng/ml)、インターフェロン- β (1000 U/ml)、Toll like receptor 3 リガンド dsRNA (25 μ g/ml) ならびに TNF- α (100 ng/ml) を加え、TSLP mRNA の発現量及び培養液中の TSLP 量を経時的に解析し、dsRNA、TNF- α + IL-4、あるいは

は TNF- α + IL-1 β 刺激によって TSLP が誘導されることを報告している (Kato, A. et al., J. Immunol. (2007) 179: 1080-1087)。

[0033] Allakhverdov らは、ヒト初代気道上皮細胞を IL-1 β (10 ng/ml)、TNF- α (25 ng/ml)、PGN (100 μ g/ml)、Poly I:C (50 μ g/ml)、LPS (1 μ g/ml)、CpG (5 μ M) で 48 時間刺激し、その培養液上清中の TSLP 量を測定するとともに、各細胞における toll like receptor mRNA の発現を測定している。ヒト初代気道上皮細胞には主に TLR2 および TLR3 が発現しており、それぞれのリガンド PGN および Poly I:C により TSLP の産生が上昇することを示している。さらに肺泡洗浄液中の細胞に TSLP 受容体を発現させた細胞を、刺激されたヒト初代気道上皮細胞の培養上清 (SNT) を、TSLP 中和抗体の存在下、非存在下で 3 日間培養し、その細胞増殖を解析するとともに、同様に刺激後 24 時間後の培養液上清中の IL-1 β を測定し、TSLP は細胞増殖活性と IL-1 β 産生誘導活性があることを示している。このように TSLP は感染による呼吸器系でのアレルギー・炎症の増悪にも関与している可能性が高く、TSLP は感染を伴う呼吸器疾患の標的分子になる (Allakhverdov, Z. et al., J. Exp. Med. (2007) 204: 253-258)。

[0034] 一方、Le らは、IL-4 (100 ng/ml)、IL-1 β (100 ng/ml)、TNF- α (20 ng/ml) 存在下 poly I:C で刺激したヒト正常ケラチノサイト、デキサメタゾン、シクロスポリン A、FK506 及びその溶剤である DMSO を刺激と同時に添加したヒト正常ケラチノサイトにおける、24 時間培養後の培養液上清中の TSLP を測定し、デキサメタゾンによって TSLP 産生が抑制され、シクロスポリン A および FK506 では抑制されないことを報告している (Allergy 2009, 64, 1231-1232)。

[0035] また、アトピー性皮膚炎やリウマチなど、アレルギー関連疾患患者において、TSLP が高発現していることが報告されている。

[0036] 例えば Ozawa らは、リウマチ患者 (RA) 及び骨関節症患者 (OA) 由来滑膜線維芽細胞において TSLP 産生量が亢進していることを報告している (Mod. Rheumatol 2007, 17, 459-463)。彼らは、リウマチ患者 (RA) 及び骨関節症患者 (O

A) から得られた滑膜線維芽細胞 (2.5×10^7 cell/well) を、IMD-0354 (IMD, I κ B kinase 阻害薬、 $10 \mu\text{M}$) あるいはデキサメタゾン (0.1 nM) 存在下 LPS (1 pg/ml) あるいは polyI:G (10 pg/ml) で刺激して24時間培養後、培養上清中の TSLP量を測定している。また、LPSあるいはpolyI:Gで刺激し、I κ B α レベルの変化を経時的に解析している。これらからTLRリガンドによりTSLPが産生されること、そしてTSLPはアレルギー性疾患だけでなく、関節リウマチの標的分子でもあることを報告している。

[0037] 以上の知見は、TSLPが呼吸器疾患、アトピー性皮膚炎やリウマチを含む炎症・アレルギー治療の標的として極めて有用であることを示唆する。すなわち、TSLP産生の調節・制御を評価するための培養細胞系として利用可能な本発明のKGMH-1細胞株は、炎症・アレルギー治療薬を含むTSLP調節剤の *in vitro* スクリーニング系として有用であることを示している。

[0038] 3. TSLP調節剤のスクリーニング方法

3. 1 TSLP調節剤

上記した知見に基づき、本発明はKGMH-1細胞株を用いたTSLP調節剤のスクリーニング方法を提供する。

[0039] ここで、「TSLP調節剤」とは、TSLP産生量を直接あるいは間接的に調節・制御することにより、TSLPを介した炎症、アレルギー等の症状を調節、予防、治療する物質（化合物、組成物等）を意味する。換言すれば、「TSLP調節剤」とは、TSLP活性制御剤あるいはTSLP標的薬である。TSLP調節剤は、TSLP産生量を抑制するものと促進するものの双方を含む。TSLPは一般に炎症やアレルギーのメディエーターであるため、TSLP産生量を抑制する「TSLP産生抑制剤」は抗アレルギー剤や抗炎症剤として有用である。後述する実施例において、発明者らは、デキサメタゾンがKGMH-1細胞株のTSLP産生量を顕著に抑制することを確認している。

[0040] 本発明においては、KGMH-1細胞株に加えて、これと実質的に同等のTSLP産生能を有するその変異株も用いることができる。すなわち、KGMH-1細胞株又はこれと実質的に同等のTSLP産生能を有するその変異株に被験物質を作用さ

せ、得られるTSLP産生量を測定することにより、被験物質がTSLP調節剤として利用可能かどうかを評価する。

[0041] 3. 2 KGMH-1細胞の培養

KGMH-1細胞又はこれと実質的に同等のTSLP産生能を有するその変異株は、動物細胞の培養に通常用いられる基本培地を用いて接着培養を行う。基本培地としては、例えば、DMEM培地、BME培地、BGJb培地、GMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、MEMひ培地、Dulbecco MEM培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、McGoy's培地、ウィリアムスE培地、およびこれらの混合培地などを用いることができる。

[0042] 上記基本培地には、細胞の維持増殖に必要な各種栄養源や分化誘導に必要な各成分を添加してもよい。

[0043] 例えば、栄養源としては、グリセロール、グルコース、果糖、ショ糖、乳糖、ハチミツ、デンプン、デキストリン等の炭素源、また、脂肪酸、油脂、レシチン、アルコール類等の炭化水素類、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム等の窒素源、食塩、カリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等の無機塩類、リン酸一カリウム、リン酸ニカリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、モリブデン酸ナトリウム、タングステン酸ナトリウムおよび硫酸マンガン、各種ビタミン類、アミノ酸類等を含むことができる。

[0044] その他必要に応じて、ピルビン酸、ピルビン酸、 β メルカプトエタノール等のアミノ酸還元剤、血清あるいは血清代替物等を挙げることができる。なお血清代替物としては、例えば、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、 β メルカプトエタノール又は3' チオールグリセロール、市販のKnockout Serum Replacement (KSR)、Chemically-defined Lipid concentrate (Gibco社製)、Glutamax (Gibco社製)が挙げられる。

[0045] これらの成分を配合して得られる培地のpHは5.5〜9.0、好ましくは6.0〜8.0、より好ましくは6.5〜7.5の範囲である。

[0046] 培養は、36℃〜38℃、好ましくは36.5℃〜37.5℃で、1%〜25% O_2 、1%〜15% CO_2 の条件下で行われる。

[0047] 3.3 TSLP 産生量の測定

本発明において、指標とする「TSLP産生量」とはTSLPの物理的な量に限定されず、これを間接的に示す活性、力価（抗体価等）も含む。また、TSLP産生量の測定はタンパクレベルのみに限定されず、遺伝子（mRNA）レベルでの測定も含まれる。

[0048] タンパクレベルでのTSLP産生の測定

タンパクレベルでのSLP産生量は、たとえば抗原抗体反応を利用した免疫学的方法を用いて測定することができる。免疫学的方法としては、たとえば、免疫沈降法や、ウェスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA法、およびRIA法を含む固相免疫法あるいはこれらに改変を加えた公知の変法（サンドイッチELISA、US Patent No. 4202875 記載の方法、Meagerらの方法（Meager A., Clin Exp Immunol. 2003 Apr, 132(1), p128-36）等）を挙げることができる。すなわち、これらの方法に基づき、TSLPと特異的に結合する抗TSLP抗体を用いてTSLP産生量を測定する。

[0049] 上記した免疫学的方法で用いられる抗体は、公知の方法にしたがって調製できるし、市販のものを用いてもよい。抗体は、常法により、抗原となるTSLP、あるいはその一部を用いて動物を免疫し、該動物生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p.365-367, 1980, Plenum Press, N.Y.）にしたがって、特異的抗体を産生する抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合させることによりハイブリドマを樹立し、これよりモノクローナル抗体を得ることもできる。

[0050] 検出に用いられる抗体作製用の抗原は、抗原であるTSLP又はその一部（エ

ピトープ部分)、あるいはこれらに任意の担体(例えば、N末端付加するキーホールリンペットヘモシアニン)が付加された誘導体を挙げることもできる。

[0051] 抗TSLP抗体は、それを直接標識するか、又は該抗体を一次抗体とし、該一次抗体を特異的に認識する(抗体を作製した動物由来の抗体を認識する)標識二次抗体と協同で検出に用いられる。

[0052] 前記標識の種類として好ましいものは、酵素(アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ)又はビオチン(ただし二次抗体のビオチンにさらに酵素標識ストレプトアビジンを結合させる操作が加わる)であるが、これらに限定されない。標識二次抗体(又は標識ストレプトアビジン)としては、予め標識された抗体(又はストレプトアビジン)が各種市販されている。なお、RIAの場合は ^{125}I 等の放射性同位元素で標識された抗体を用い、測定は液体シンチレーションカウンタ等を用いて行う。

[0053] これら標識された酵素の活性を検出することにより、抗原の発現量が測定される。アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼで標識する場合、これら酵素の触媒により発色する基質や発光する基質が市販されている。

[0054] 発色する基質を用いた場合、ウェスタンブロット法やドット/スロットブロット法を利用すれば、目視で検出できる。ELISA法では、市販のマイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度(測定波長は基質により異なる)を測定し、定量することが好ましい。また上述の抗体作製に使用した抗原の希釈系列を調製し、これを標準抗原試料として他の試料と同時に検出操作を行い、標準抗原濃度と測定値をプロットした標準曲線を作成することにより、他の試料中の抗原濃度を定量することも可能である。

[0055] 一方、発光する基質を使用した場合は、ウェスタンブロット法やドット/スロットブロット法においては、X線フィルム又はイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィーや、インスタントカメラを用いた写真撮影により検出することができる。また、デンシトメトリーやモレキュラー・イメ

ージャー F x システム (バイオラット社製) 等を利用した定量も可能である。さらに、ELISA法で発光基質を用いる場合は、発光マイクロプレートリーダー (例えば、バイオラット社製等) を用いて酵素活性を測定する。

[0056] 遺伝子レベルでのTSLP産生の測定

TSLP遺伝子発現量は、回収した細胞からまず全RNAを抽出し、この全RNA中におけるTSLP遺伝子 (mRNA) の発現量を後述するいずれかの方法を用いて測定する。

[0057] 全RNAの抽出方法は特に限定されず、たとえば、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法 (Ghomczynski, P. and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159) 等を採用することができる。抽出された全RNAは、必要に応じてさらにmRNAのみに精製して用いてもよい。

[0058] 遺伝子の発現量は、遺伝子チップ、アレイ等の固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーション法、RT-PGR法、リアルタイムPGR法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、ならびにクロスハイブリダイゼーション法など公知の方法を用いて測定することができる。

[0059] 3. 4 被験物質の評価

評価は、被験物質の存在下でのTSLP産生量と非存在下でのTSLP量を比較して行ってもよいし、基準とするTSLP産生の基準値が決定されれば、その基準値と被験物質存在下におけるTSLP産生量を比較することにより行ってもよい。

[0060] 標準的には、本発明の方法は、1) 被験物質の存在下及び非存在下において、KGMH-1細胞株又はこれと実質的に同等のTSLP産生能を有するその変異株を培養する工程と、2) 被験物質の存在下及び非存在下におけるTSLP産生量を比較する工程とを含む。

[0061] 具体的には、被験物質存在下におけるTSLP産生量が前記した基準値あるい

は非存在下におけるTSLP産生量に比較して有意に異なる場合、当該被験物質をTSLP調節剤候補として選択する。ここで、有意とは、当該分野で通常用いられる統計的有意、たとえば p 値 <0.05 であることを意味する。

[0062] 抗アレルギー剤又は抗炎症剤等のTSLP産生抑制剤をスクリーニングする場合は、被験物質の存在下におけるTSLP産生量が上記基準値あるいは非存在下におけるTSLP産生量に比較して有意に低い場合に、当該被験物質をTSLP産生抑制剤候補として選択する。

[0063] 本発明のスクリーニング方法は、無刺激下で恒常的に高い TSLP産生を示す細胞株を利用するため、高精度で再現性の高い結果が得られる。また、KGMH-1はTSLP産生量が極めて大きいため、スケールダウンによるハイスループットなスクリーニング法が構築できる。さらに、本発明のスクリーニング方法は、TSLP産生阻害をターゲットとした新たな抗アレルギー剤の開発に利用でさる。

選択された候補物質は、上皮細胞のTSLP産生能を標的とするため、外用薬、吸入薬として使用可能である。また、TSLPを標的とするため、感染に対する免疫低下を起こす可能性が低く、アレルギー予防あるいは軽症の段階で使用できる。さらに、低分子化合物であるため、抗体や可溶性受容体に比べて安価で長期的使用が可能である。

[0064] 4. TSLP調節剤スクリーニング用キット

本発明はまた、TSLP調節剤スクリーニング用キットを提供する。本発明のキットは、必須の構成要素としてKGMH-1細胞株又はこれと実質的に同等のTSLP産生能を有するその変異株を含む。

[0065] さらに、本発明のキットは、抗TSLP抗体、あるいは抗TSLP抗体と抗TSLP抗体に特異的に結合しうる二次抗体を含む。

[0066] 前記TSLP抗体の由来は、ヒトTSLP検出に利用可能であれば特に限定されないが、抗ヒトTSLP抗体が望ましい。抗体は、適当な標識によりラベル（例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等）されていてもよいし、ビオチン等により適当に修飾されていてもよい。また、適当な支持体に固相化されてい

てもよいし、あるいは固相化可能なように別個に支持体がキットに含まれていてもよい。そのような支持体としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド等の蛋白を付着可能な合成樹脂、ガラス、ニトロセルロース、セルロース、およびアガロース製の支持体、あるいはゲル型支持体を使用することができる。支持体の形態は特に限定されないが、極小球あるいはビーズ（例えば"ラテックス"ビーズ）などの微粒子、微量遠心チューブなどのチューブ（内壁）、マイクロタイタープレート（ウエル）等の形態で提供される。

[0067] 本発明のキットは、上記した構成要素のほか、必要に応じて、ラベル体の検出のための試薬、反应用緩衝液、酵素、基質等、本発明の実施に必要な他の要素を含んでいてもよい。

[0068] 5. 天然型TSLPの製造方法

本発明におけるTSLPは、上述したKGMH-1細胞株あるいはその変異株によって産生される天然型TSLPである。現在市販されているTSLPは糖鎖がついていない組換えTSLPであるため、哺乳動物細胞によって産生されるTSLPとは生化学的性質が異なる可能性がある。本発明のTSLPは、ヒトTSLPにより近い糖鎖を有するマウスTSLPであり、本発明にかかるKGMH-1細胞株やその変異株を培養することにより、簡便に得ることができる。

[0069] KGMH-1細胞株あるいはその変異株の培養は、上記3. 1の方法にしたがって実施することができる。

[0070] 本発明は、KGMH-1細胞株やその変異株を用いた天然型TSLPの製造方法も提供する。本発明のKGMH-1細胞株は無刺激でも恒常的にTSLPを産生するが、各種サイトカインの添加によってその産生量はさらに高まる可能性がある。したがって、本発明の目的を損なわない範囲において、そのようなTSLP産生刺激剤を添加して培養してもよい。

[0071] TSLPはKGMH-1細胞株あるいはその変異株の培養上清に分泌される。分泌された、TSLPは公知の方法にしたがって、その培養上清から回収することができる。とくに単離する必要がない場合は、培養上清のまま次の目的に供して

もよい。

[0072] TSLPの単離は、Simsらの方法に従い、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、逆相HPLGなどを用いて行うことができる (Sims, J.E. et al. J . Exp. Med. (2000) 192 : 671-680) 。

[0073] こうして調製されたTSLPあるいはTSLP含有培養上清もまた、TSLPを介したアレルギーや炎症の病態解明、TSLPを標的とした薬剤のin vitro 評価に利用することができる。

[0074] 上記のほか、本発明にかかるKGMH-1細胞株やこれを用いたスクリーニング方法及びスクリーニングキットは、後述する実施例に示されるように、シグナル伝達阻害薬の効果を解析でき、TSLP産生誘導機構の解明にも活用できる。

実施例

[0075] 以下、実施例及び参考例を用いて、本発明について具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0076] 参考例 1 :KGMH-1細胞の調製

KGMH-1細胞は、広島大学医学部 秀教授らにより、以下に説明する方法にしたがって樹立された (Arch Dermatol Res (1994) 287 :91-96 参照) 。

[0077] GBA/Jマウス (7週令、タ)の背部皮膚に週2回ずつ3週間 3-methylcholanthrene アセトン溶液 (3 mg/ml) 0.2 mlを塗布した。8週間後、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate アセトン溶液 (12 µg/ml) 0.2 mlを同部位に塗布した。形成された皮膚がん組織を採取し、その1 國角片を他のGBA/Jマウス的大腿筋内に移植した。移植を10回繰り返したのち得られたがん組織をRPM 11640培地中で分散させ、100µmのステンレス製ふるいで組織片を除き、10% FBS-RPM 11640 (100IU ペニシリンG及び100 µg/ml ストレプトマイシン含む) 中で培養した。5回継代したのち、96 wellマルチウエルプレートに 0.5 細胞/wellとなるように播種し、クローン化した。

[0078] 樹立されたKGMH-1細胞は、受託番号FERM P-21 965として、2010年5月21日付にて、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

(茨城県つくば市東1-1-1 つくばセンター 中央第6) に国内寄託され、その後2011年4月25日付にて国際寄託への移管がなされ、受託番号FERM BP-1 1368として国際寄託されている。

[0079] 実施例1 :各ケラチノサイト由来細胞におけるTSLP産生量の比較

KGMH-U マウスケラチノサイト様細胞株PAM212細胞、及びヒトケラチノサイト様細胞株HaGaT細胞を10% FBS含有MEMひ中に $1 \times 10^5/\text{ml}$ となるように懸濁し、24 wellクラスターディッシュの各wellに0.5 mlずつ播種した。24時間後、培養液を回収し、その上清中のTSLPをELISA (R&D社)により定量した (図1)。

[0080] 以上の結果から明らかなように、KGMH-1細胞株は他のケラチノサイト由来の細胞株に比較して、有意に高いTSLPを発現している。

[0081] 実施例2 :デキサメタゾン及びFK506によるKGMH-1細胞のTSLP産生抑制効果

KGMH-1細胞を10% FBS含有MEMひ中に $1 \times 10^5/\text{ml}$ となるように懸濁し、24 wellクラスターディッシュの各wellに0.5 mlずつ播種した。24時間後、培地を除去し、phosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、各濃度のデキサメタゾン 0.1あるいは $1 \mu\text{M}$ 、FK506 0.1あるいは $1 \mu\text{M}$ を含む10% FBS含有MEMひを0.5 ml加えた。24時間後、培養液を回収し、その上清中のTSLPをELISA法により定量した (図2)。

[0082] ヒト正常ケラチノサイトについて報告されているのと同様に、KGMH-1細胞株においてもTSLP産生量はデキサメタゾンの添加によって明確に抑制されること、FK506によっては抑制されないことが確認された。

[0083] 上記の結果は、正常ケラチノサイトで報告されている結果 (Le et al., Allergy 2009, 64, 1231-1232)と一致し、本発明のKGMH-1細胞株は、既知の抗炎症剤に応答して、そのTSLP産生抑制効果を明瞭に示唆する培養細胞系として有用であることが実証された。

[0084] 実施例3 :KGMH-1細胞の選択的TSLP産生能

KGMH-1、マウスケラチノサイト様細胞株PAM212細胞を10% FBS含有MEMひ中に $1 \times 10^5/\text{ml}$ となるように懸濁し、24 wellクラスターディッシュの各wellに0.

5 mlずつ播種した。24時間後、培養液を回収し、その上清中の TSLP、IL-6、TNF- α 、IL-4、IFN- γ をELISA (R&D社、eBioscience社)により定量した。結果を表1に示す。

[0085] [表 1]

	Production (pg/ml)	
	KGMH-1	PAM2.12
TSLP	2671 $\pm$ 266	7 $\pm$ 5
IL-6	18 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2
TNF- α	16 $\pm$ 2	N.D.
IL-4	5 $\pm$ 1	N.D.
IFN- γ	4 $\pm$ 2	N.D.

N.D.: not determined

[0086] 以上の結果から明らかなように、KGMH-1細胞株は他のサイトカインに比較してTSLPを選択的に高産生しており、これは他のケラチノサイト由来細胞株にはみられない特徴であることが確認された。

[0087] 実施例4：RXRアゴニストによるKGMH-1細胞のTSLP産生抑制効果

レチノイドX受容体 (RXR) のアゴニストであるHX-600をKGMH-1に作用させ、そのTSLP産生に対する効果をみた。

[0088] KGMH-1細胞を10% FBS含有MEMひ中に 1×10^5 /mlとなるように懸濁し、24 well 1クラスターディッシュの各wellは0.5 mlずつ播種した。24時間後、培地を除去し、phosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、各濃度の HX-600 1 μ Mを含む10% FBS含有MEMひを0.5 ml加えた。24時間後、培養液を回収し、その上清中のTSLPをELISA法により定量した (図3)。

[0089] 核内受容体刺激薬については、RXRアゴニストである9-cis-retinoic acid (9-cis-RA)が、IL-1 β によるヒトTSLP mRNAの発現を抑制することがヒト気道上皮細胞株を用いた実験で報告されている (Lee et al. J. Immunol. 181: 5189-5193 (2008))。上記の結果は、ヒト気道上皮細胞株での報告と一致し、RXRアゴニストはKGMH-1細胞株においてもTSLP産生に抑制的に作

用することが確認された。

[0090] 実施例 5 : KGMH-1 細胞に対するシグナル伝達阻害薬の効果

KGMH-1 細胞に種々のチロシンキナーゼ阻害薬を作用させ、TSLP 産生に与える影響を比較した。チロシンキナーゼ阻害薬としては、Herbimycin A、PP2、Piceatannol、AG490、WHL-P154を用いた。Herbimycin Aは非特異的なチロシンキナーゼ阻害薬として知られているが、PP2はSrcファミリー、PiceatannolはSyk、AG490はJAK2、WHL-P154はJAK3をそれぞれ阻害することが知られている。

[0091] KGMH-1細胞を10% FBS含有MEMひ中に $1 \times 10^5/\text{ml}$ となるように懸濁し、24 well 1クラスターディッシュの各wellに0.5 mlずつ播種した。24時間後、培地を除去し、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、Herbimycin A (3 μM)、PP2 (3 μM)、Piceatannol (100 μM)、AG490 (100 μM)、WHL-P154 (30 μM)をそれぞれ括弧内の終濃度となるように含む10% FBS含有MEMひを0.5 ml加えた。24時間後、培養液を回収し、その上清中のTSLPをELISA法により定量した(図4)。

[0092] 次に、KGMH-1細胞に種々のセリンスレオニンキナーゼ阻害薬を作用させ、TSLP産生に与える影響を比較した。セリンスレオニン阻害薬としては、U0126、SB203580、SP600125、wortmannin、BAY11-7082、Go-6976を用いた。一般的に、U0126はp44/42 MAP kinaseの活性化阻害薬、Go-6976はprotein kinase Gの阻害薬で、様々なタンパク質の産生、放出を抑制することが知られている。一方、wortmanninはPI3 kinase阻害薬、SB203580はp38 MAP kinase阻害薬、SP600125はc-Jun N-terminal kinase阻害薬として知られている。また、BAY11-7082はIKK kinaseを阻害してNF- κ Bの活性化を抑制することが知られている。

[0093] KGMH-1細胞を10% FBS含有MEMひ中に $1 \times 10^5/\text{ml}$ となるように懸濁し、24 well 1クラスターディッシュの各wellに0.5 mlずつ播種した。24時間後、培地を除去し、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、U0126 (1 μM)、SB203580 (10 μM)、SP600125 (30 μM)、wortmannin (100nM)、BAY11-7082

(10 μ M)、Go-6976 (3 μ M) をそれぞれ括弧内の終濃度となるように含む10% FBS含有MEMひを0.5 ml加えた。24時間後、培養液を回収し、その上清中のTSLPをELISA法により定量した (図5)。

[0094] TSLP産生に関わる細胞内シグナル伝達としては、ヒト気道上皮細胞株において転写因子NF- κ Bが関与していることが報告されている (Lee and Ziegler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 : 914-919 (2007))。KGMH-1細胞においても、NF- κ B阻害薬 Bay11-7082 はTSLP産生を部分的に抑制することが確認された。さらに、未同定のチロシンキナーゼ、及びp44/42MAP kinaseがTSLP産生に寄与していることが新たに分かった。このようにKGMH-1細胞を用いることにより、TSLP産生に関わるシグナル伝達機構の解析が可能である。

[0095] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0096] 本発明によれば、被験物質のTSLP調節活性をin vitroで簡便に評価することができる。TSLP調節活性を有する物質は、抗アレルギー薬あるいは抗炎症薬として利用できる可能性があるため、本発明はそのような薬剤の簡便で安価なスクリーニング系として利用することができる。とくに、本発明で用いられるKGMH-1細胞株はケラチノサイト由来であるため、皮膚アレルギーの治療・予防薬のスクリーニング、あるいはそのメカニズムの探索に有用である。

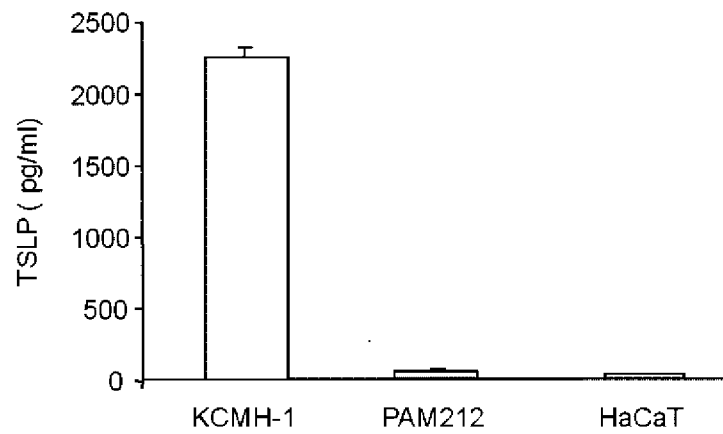
[0097] また、本発明によれば、簡便に天然型のTSLPを得ることができる。得られたTSLPもまたTSLPを介したアレルギーや炎症の病態解明、TSLP調節薬のスクリーニングに利用できる。

請求の範囲

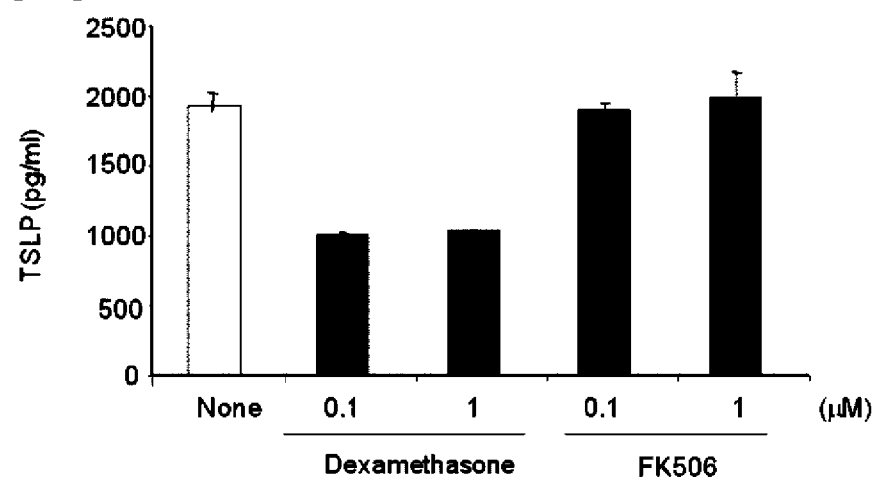
- [請求項1] 受託番号 FERM BP-1 1368 で特定される KGMH-1 細胞株又はこれと実質的に同等の TSLP 産生能を有するその変異株に被験物質を作用させ、得られる TSLP 産生量を測定することを特徴とする、TSLP 調節剤のスクリーニング方法。
- [請求項2] 以下の工程を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法：
1) 被験物質の存在下及び非存在下において、KGMH-1 細胞株又はこれと実質的に同等の TSLP 産生能を有するその変異株を培養する工程、
2) 被験物質の存在下及び非存在下における TSLP 産生量を比較する工程。
- [請求項3] TSLP 産生量が、TSLP と特異的に結合する抗 TSLP 抗体を用いて測定されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- [請求項4] TSLP 産生量が、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA 法、RIA 法、又はフロービーズアレイ法で測定される、請求項 3 に記載の方法。
- [請求項5] TSLP 調節剤が TSLP 産生抑制剤である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項6] 被験物質の存在下における TSLP 産生量が非存在下における TSLP 産生量に比較して有意に低い場合に、当該被験物質を TSLP 産生抑制剤候補として選択することを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。
- [請求項7] TSLP 産生抑制剤が抗アレルギー剤又は抗炎症剤である、請求項 5 又は 6 に記載の方法。
- [請求項8] KGMH-1 細胞株又はこれと実質的に同等の TSLP 産生能を有するその変異株を含む、TSLP 調節剤のスクリーニング用キット。
- [請求項9] さらに抗 TSLP 抗体、あるいは抗 TSLP 抗体と抗 TSLP 抗体に特異的に結合しうる二次抗体を含む、請求項 8 に記載のキット
- [請求項10] 受託番号 FERM BP-1 1368 で特定される KGMH-1 細胞株、又はこれと実質的に同等の TSLP 産生能を有するその変異株を培養することを特徴と

する、TSLPの製造方法。

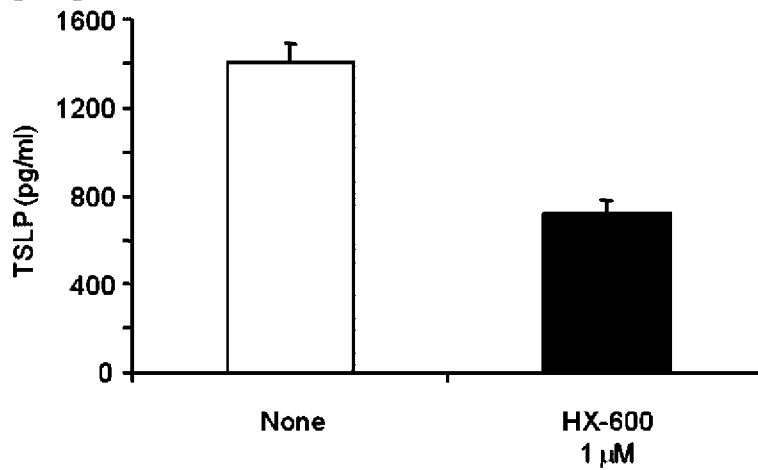
[図1]



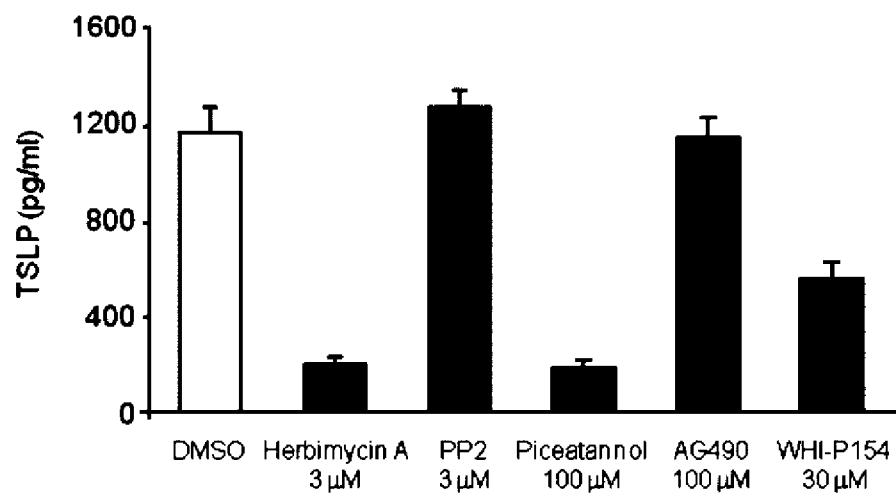
[図2]



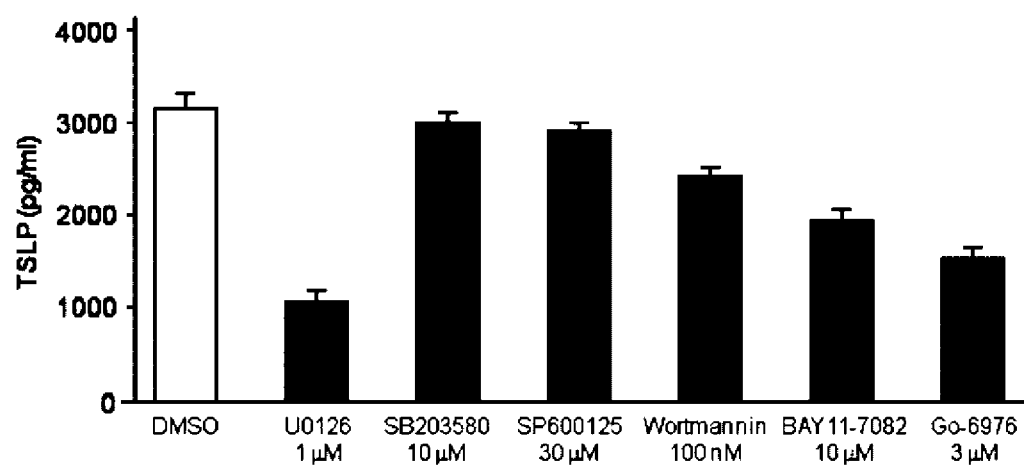
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/003329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53 (2006.01)i, C12P21/02 (2006.01)i, C12Q1/02 (2006.01)i, G01N33/15 (2006.01)i, G01N33/50 (2006.01)i, C12R1/91 (2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/53, C12P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, C12R1/91

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo	Shinan	Koho	1922-1	996	Jitsuyo	Shinan	Toroku	Koho	1996-2011
Kokai	Jitsuyo	Shinan	Koho	1971-2011	Toroku	Jitsuyo	Shinan	Koho	1994-2011

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

CA/ME DL INE / EMBASE / BIOSIS (STN), CiNi

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J P 2009-232812 A (Maruho Co., Ltd.), 15 October 2009 (15.10.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-10
A	J P 2004-519205 A (Amgen Inc.), 02 July 2004 (02.07.2004), entire text & EP 1294879 A & WO 2002/000724 A2 & DE 60137223 D & AU 7026601 A & CA 2413673 A & AT 419351 T & ES 2317917 T & AU 2001270266 B	1-10



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

"I" 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

15 August, 2011 (15.08.11)

Date of mailing of the international search report

30 August, 2011 (30.08.11)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/003329

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-544302 A (Assi at ion Pour la Reche rche a L jgbmc (Ari)), 17 December 2009 (17.12.2009), ent ire text ; all drawings & US 2010/0144683 A1 & EP 1891944 A1 & WO 2008/012645 A2 & DE 602007011273 D & AT 491440 T	1-1
A	JP 2005-516606 A (Sche ring Corp .), 09 June 2005 (09.06.2005), ent ire text & US 2003/0186875 A1 & EP 1487865 A & WO 2003/065985 A2 & CA 2474011 A & NZ 533987 A & AU 2003208888 A	1-1
A	JP 2007-314547 A (Sche ring Corp .), 06 December 2007 (06.12.2007), ent ire text & JP 2007-534623 A & US 2005/0048061 A1 & EP 1651247 A & WO 2005/007186 A1 & DE 602004016522 D & CA 2532595 A & AT 407691 T & DK 1651247 T & HR 20080617 T & ES 2313076 T & SI 1651247 T & PT 1651247 E & NZ 544456 A	1-1
A	JP 2010-096748 A (Saga Unive rsity), 30 April 2010 (30.04.2010), ent ire text ; all drawings (Family : none)	1-1
A	Yoo J et al., Spontaneous atopi c dermati tis in mice expre ssing an inducibl e thymi c stromal lymphopoi etin trans gene speci ficall y in the skin, J Exp Med, 2005.08.15, 202(4), 541-549	1-1 _o
A	Morimoto K et al., The ext ract of syngenei c kerat inocyte s enhance s IgE product ion from BALB/ c mous e spleni c lymphocyte s in vitro , [onl ine], 2006, [retrieval date 15 Augus t 2011 (15.08.2011)]	1-1

A . 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53 (2006. 01) i, C12P21/02 (2006. 01) i, C12Q1/02 (2006. 01) i, G01N33/15 (2006. 01) i;
G01N33/50 (2006. 01) i, C12R1/91 (2006. 01) n

B . 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53, C12P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, C12R1/91

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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)

CA/MEDLINE/EMBASE/Biosis(STN)
CiNii

C . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-232812 A (マルホ株式会社) 2009. 10. 15, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2004-519205 A (アムジェン インコーポレイテッド) 2004. 07. 02, 全文 & EP 1294879 A & WO 2002/000724 A2 & DE 60137223 D & AU 7026601 A & CA 2413673 A & AT 419351 T & ES 2317917 T & AU 2001270266 B	1-10

☒ 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

IA 「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」
IE 「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」
I 「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)」
Iθ 「口頭による開示、使用、展示等に言及する文献」
IP 「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

IT 「国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの」
IX 「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」
IY 「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」
I& 「同一パテントファミリー文献」

国際調査を完了した日

1 5 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

3 0 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

赤坂 祐樹

2 J

3 3 1 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続 き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-544302 A (アソシエーション プル ラ ルシエルシェ ア リグブムク (アリ)) 2009. 12. 17 , 全文、全図 & US 2010/0144683 A1 & EP 1891944 A1 & WO 2008/012645 A2 & DE 602007011273 D & AT 491440 T	1-10
A	JP 2005-516606 A (シェーリング コーポレイション) 2005. 06. 09 , 全文 & US 2003/0186875 A1 & EP 1487865 A & WO 2003/065985 A2 & CA 2474011 A & NZ 533987 A & AU 2003208888 A	1-10
A	JP 2007-314547 A (シェーリング コーポレイション) 2007. 12. 06, 全文 & JP 2007-534623 A & US 2005/0048061 A1 & EP 1651247 A & WO 2005/007186 A1 & DE 602004016522 D & CA 2532595 A & AT 407691 T & DK 1651247 T & HR 20080617 T & ES 2313076 T & SI 1651247 T & PT 1651247 E & NZ 544456 A	1-10
A	JP 2010-096748 A (国立大学法人佐賀大学) 2010. 04. 30, 全文、全図 (フアミリーなし)	1-10
A	Yoo J et al. , Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin, J Exp Med, 2005. 08. 15, 202 (4) , 541-549	1-10
A	Moriraoto K et al. , The extract of syngeneic keratinocytes enhances IgE production from BALB/ c mouse splenic lymphocytes in vitro, [online] , 2006 , [検索日 2011. 08. 15]	1-10