

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月19日(19.09.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/190329 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 5/078* (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/006140
- (22) 国際出願日: 2024年2月21日(21.02.2024)
- (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 2023-038193 2023年3月13日(13.03.2023) JP
- (71) 出願人: 東亜合成株式会社 (TOAGOSEI CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒1058419 東京都港区西新橋1丁目14番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: ベイリー 小林 菜穂子 (BAILEYKOBAYASHI, Nahoko); 〒3002611 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社内 Ibaraki (JP). 吉田 徹彦 (YOSHIDA, Tetsuhiko); 〒3002611 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社内 Ibaraki (JP). ベイリー エリック ネルソン (BAILEY, Eric Nelson); 〒3050032 茨城県つくば市竹園3丁目27番地23 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 安部 誠 (ABE, Makoto); 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目20番3号 BPRプレイス久屋大通 弁理士法人協働特許事務所 Aichi (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 組成物およびその利用

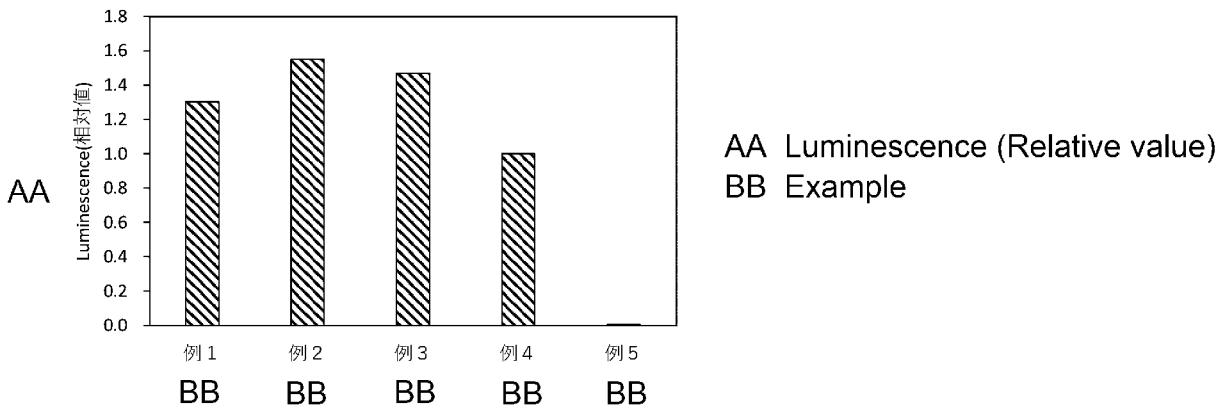


FIG.2

(57) Abstract: Disclosed is a composition comprising a double-stranded RNA composed of a sense strand and an antisense strand. The sense strand is composed of a main sequence consisting of 19-23 bases, the base at the 5'-end being guanine (G) or cytosine (C), and an additional sequence which is added to the 3'-end of the main sequence and consists of 2-4 bases. The antisense strand is composed of a sequence complementary to the main sequence, and an additional sequence which is added to the 3'-end of the complementary sequence and consists of 2-4 bases. The main sequence is a portion of a base sequence encoding follistatin like 1 (FSTL-1), and is composed of a sequence containing at least a portion of a base sequence encoding the signal peptide region of FSTL-1.



WO 2024/190329 A1

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

添付公開書類:

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

(57) 要約: ここで開示される組成物は、センス鎖と、アンチセンス鎖とから構成される二本鎖 RNAを含む。前記センス鎖は、5'末端の塩基がグアニン (G) またはシトシン (C) である19~23塩基からなるメイン配列と、前記メイン配列の3'末端側に付加された2~4塩基からなる付加配列とから構成される。前記アンチセンス鎖は、前記メイン配列と相補的な配列と、該相補的な配列の3'末端側に付加された2~4塩基からなる付加配列とから構成される。ここで、前記メイン配列が、FSTL-1 (follistatin like 1) をコードする塩基配列の一部であって、FSTL-1のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の少なくとも一部を含む配列から構成される。

明 細 書

発明の名称：組成物およびその利用

技術分野

[0001] 本開示は、組成物および該組成物を利用する方法に関する。具体的には、免疫細胞を活性化するために用いられる二本鎖RNAを備える組成物に関する。なお、本出願は2023年3月13日に出願された日本国特許出願第2023-038193号に基づく優先権を主張しており、その出願の全内容は本明細書中の参照として組み入れられている。

背景技術

[0002] がんの免疫療法の一つとして、免疫チェックポイント阻害療法が知られている。この療法は、生体内において過剰な免疫反応を抑制する機能に関与するタンパク質として知られているPD-1 (Programmed cell death-1) 等のいわゆる「免疫チェックポイントタンパク質」をターゲットとした療法である。かかる療法では、免疫チェックポイントタンパク質が関与する免疫反応抑制メカニズムを阻害する阻害薬を使用することで、がん細胞が関与している「免疫系の攻撃を回避する機構（免疫逃避機構ともいう。）」を遮断し、がん細胞に対する免疫系の攻撃を促進することができ得る。

[0003] 例えば、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質であるPD-1に対する抗体（抗PD-1抗体）、或いは、腫瘍細胞を含む種々の細胞に発現しているPD-L1 (Programmed cell death-1 ligand-1: B7-H1ともいう。) と呼ばれるPD-1のリガンドに対する抗体（抗PD-L1抗体）を、免疫チェックポイント阻害薬として患者に投与することにより、免疫逃避機構を遮断して免疫細胞による抗腫瘍免疫活性を向上させ得ることが一部の腫瘍に対して確認されている（例えば国際公開第2004/004771号参照）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2004/004771号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ところで、抗体医薬品は生産コストが高く、品質の均一性を保つのが難しい。そこで、本発明者は、核酸に注目し、免疫細胞を活性化させる新たなアプローチを検討している。核酸医薬品は、有機合成による大量生産が可能であり、品質の均一性を管理し易い。

[0006] 本開示は、免疫細胞を活性化する技術を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] ここで開示される組成物は、免疫細胞を活性化するために該免疫細胞に供給される組成物である。該組成物は、センス鎖と、アンチセンス鎖とから構成される二本鎖RNAを含む。上記センス鎖は、5'末端の塩基がグアニン（G）またはシトシン（C）である19～23塩基からなるメイン配列と、上記メイン配列の3'末端側に付加された2～4塩基からなる付加配列とから構成される。上記アンチセンス鎖は、上記メイン配列と相補的な配列と、該相補的な配列の3'末端側に付加された2～4塩基からなる付加配列とから構成される。ここで、前記メイン配列が、FSTL-1（follistatin like 1）をコードする塩基配列の一部であって、FSTL-1のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の少なくとも一部を含む配列から成る。

詳細なメカニズムは不明だが、本発明者の検討により、かかる構成の組成物は、免疫細胞を活性化することができることを見出された。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]試験1および試験2における免疫細胞の活性の評価方法のメカニズムの概略を示す模式図である。

[図2]例1～5における、測定された発光シグナルの強度の相対値を示すグラフである。

[図3]例6～10における、測定された発光シグナルの強度の相対値を示すグ

ラフである。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、ここで開示される技術について詳細に説明する。本明細書において特に言及している事項（例えば二本鎖RNAの構成）以外の事柄であって、本技術の実施に必要な事柄（例えばポリヌクレオチドの合成方法等に関するような一般的事項等）は、細胞工学、生理学、医学、薬学、有機化学、生化学、遺伝子工学、タンパク質工学、分子生物学、遺伝学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。ここに開示される技術は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。

[0010] なお、本明細書において、「ポリヌクレオチド」とは、複数（2以上）のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合で結ばれたポリマーを指す用語であり、ヌクレオチドの数によって限定されない。例えば、ヌクレオチドとしてデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの両者を含むものも本明細書における「ポリヌクレオチド」に包含される。

また、本明細書において「人為的に設計されたポリヌクレオチド」とは、そのヌクレオチド鎖（全長）がそれ単独で自然界に存在するものではなく、化学合成或いは生合成（即ち遺伝子工学に基づく生産）によって人為的に合成されたポリヌクレオチドをいう。

[0011] 本明細書において「アミノ酸残基」とは、特に言及する場合を除いて、ペプチド鎖のN末端アミノ酸およびC末端アミノ酸を包含する用語である。

本明細書中に記載されるアミノ酸配列は、常に左側がN末端側であり右側がC末端側である。

[0012] 本明細書において「腫瘍」とは、広義に解釈される用語であり、癌腫及び肉腫或いは血液や造血組織の病変（白血病、リンパ腫等）を含む腫瘍一般（典型的には悪性腫瘍）をいう。また、「腫瘍細胞」とは、「がん細胞」と同義であり、そのような腫瘍を形成する細胞であって、典型的には周辺の正常組織とは無関係に異常に増殖を行うに至った細胞（所謂がん化した細胞）を

いう。従って、特別に規定しない限り、正常細胞ではなく腫瘍細胞（がん細胞）に区分される細胞であれば、該細胞の起源や性状に関わりなく腫瘍細胞と呼称される。

[0013] 本明細書において、「免疫細胞」とは、自然免疫に関与する免疫細胞と、獲得免疫に関与する免疫細胞とを包含し得る。自然免疫に関与する免疫細胞としては、例えば、好中球、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、マスト細胞等が挙げられる。獲得免疫に関与する免疫細胞として、例えば、T細胞、B細胞等が挙げられる。T細胞は、ヘルパーT細胞と、キラーT細胞とを含む。

[0014] また、本明細書において、塩基配列は「5'」および「3'」の記載が付されていない限り、常に左側が5'末端側であり、右側が3'末端側を示す。

また、本明細書において、数値範囲をA～B（ここでA、Bは任意の数値）と記載している場合は、一般的な解釈と同様であり、A以上B以下（Aを上回り且つBを下回る範囲を含む）を意味するものである。

[0015] ここで開示される組成物は、二本鎖RNAを含む。該二本鎖RNAは、センス鎖と、アンチセンス鎖とから構成されている。センス鎖は、メイン配列を備え、さらに付加配列を備え得る。アンチセンス鎖は、センス鎖のメイン配列と相補的な配列を含む。センス鎖とアンチセンス鎖はメイン配列部分でハイブリダイズされており、二本鎖を形成している。なお、センス鎖およびアンチセンス鎖は人為的に合成されたポリヌクレオチドであり得る。

[0016] ここで開示される二本鎖RNAのセンス鎖のメイン配列は、例えば、19塩基以上23塩基以下、または、19塩基以上21塩基以下であってよく、19塩基から構成されていてもよい。

[0017] センス鎖のメイン配列は、FSTL-1をコードする塩基配列の一部の塩基配列であって、FSTL-1のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列（本明細書において「FSTL-1-SP塩基配列」ともいう）の少なくとも一部を含み得る。これにより、メイン配列は、FSTL-1のmRNA

の一部の配列と同一の配列となるため、二本鎖RNAはFSTL-1をターゲットしたsiRNAとして機能し得る。また、後述の試験例で示すが、詳細なメカニズムは明らかではないが、ここで開示される二本鎖RNAはsiRNAとしての機能ではなく、免疫細胞の細胞膜表面と接触することで免疫細胞を活性化する機能を有し得る。

[0018] 本明細書において、「FSTL-1」の由来となる動物種は特に限定されないが、ここで開示される組成物を供給する対象となる免疫細胞の動物種と同じであることが好ましい。例えば、ヒト由来の免疫細胞にここで開示される組成物を供給する場合には、ヒトFSTL-1の塩基配列に基づいた塩基配列をメイン配列とするとよい。ここでは、ヒト由来のFSTL-1を好適例として説明するが、他の動物種由来のFSTL-1であっても本技術は適用され得る。

[0019] FSTL-1の塩基配列は、国際的なデータベース、例えば、NCBI (National Center for Biotechnology Information)、UniProt、Ensembl等のデータベースから入手することができる。また、FSTL-1のシグナルペプチド領域の情報についても、上述のような国際的なデータベースから入手することができる。

[0020] ヒトFSTL-1は、309アミノ酸残基から成る。ヒトFSTL-1のシグナルペプチドは、配列番号3に示される20アミノ酸残基から成るアミノ酸配列である。かかるアミノ酸配列は、ヒトFSTL-1を構成するアミノ酸配列の1~20番目のアミノ酸配列である。ヒトFSTL-1-SP塩基配列は、配列番号4に示される60塩基から構成される。

[0021] メイン配列においてFSTL-1-SP塩基配列が占める割合は、メイン配列全体を100%としたとき、例えば、30%以上であることが好ましく、50%以上、75%以上、90%以上、または100%であってよい。FSTL-1-SP塩基配列はmRNAの上流側に存在するため、二本鎖RNAがsiRNAとして機能する際に、効果的にFSTL-1の発現を抑制す

ることができ得る。

[0022] メイン配列は、典型的には、リボヌクレオチドのポリマーであるポリヌクレオチドで構成される。換言すれば、メイン配列はRNAで構成される。即ち、メイン配列の塩基配列は、典型的には、A（アデニン）、U（ウラシル）、G（グアニン）、C（シトシン）の4文字、またはa、u、g、cの4文字で表記される。ただし、添付の配列表では、ウラシルがチミンで表示され得る。

[0023] メイン配列の5'末端は、グアニンまたはシトシンであることが好ましい。グアニンおよびシトシンは相補鎖との結合力がアデニンおよびウラシルよりも高いため、センス鎖の5'末端側（即ち、アンチセンス鎖の3'末端側）の安定性が高くなる。換言すれば、アンチセンス鎖の5'末端側の安定性が相対的に低くなる。メカニズムの詳細は明らかではないが、RNAi関連タンパク質であるRISC（RNA-induced silencing complex）はセンス鎖、アンチセンス鎖のうち、5'末端側がよりエネルギー的に不安定な鎖を優先的に取り込む傾向がある。そのため、メイン配列の5'末端がグアニンまたはシトシンであることで、アンチセンス鎖がRISCに取り込まれ易くなり、RNAiをより好適に誘導し得る。これにより、二本鎖RNAがsiRNAとして好適に機能し得る。

[0024] メイン配列の3'末端側の5塩基において、アデニン及び／又はウラシルが60%以上（即ち3塩基以上）含まれることが好ましく、80%以上（即ち4塩基以上）含まれてもよく、100%（即ち5塩基）であってもよい。これにより、アンチセンス鎖の5'末端側の安定性が3'末端側よりも相対的に低くなる。その結果、アンチセンス鎖がRISCに取り込まれ易くなり、RNAiをより好適に誘導し得る。

[0025] メイン配列全体のGC含量（メイン配列を構成する塩基配列全体に占めるGおよびCの合計割合）は、特に限定されるものではないが、例えば、20%以上60%以下であるとよく、30%以上50%以下が好ましく、30%以上45%以下であってよい。GC含量は、RISCに取り込まれるアンチ

センス鎖と、メイン配列を有するRNAとの結合力や、RNAの切断容易性等に関わるパラメータである。上記GC含量であれば、RNAiの効果を好適に発揮することができる。

[0026] メイン配列は、例えば、以下の塩基配列：

GGGUCCGCGCCGAGGAAGA（配列番号1）；

CGCGCCGAGGAAGAGCUAA（配列番号2）；

のいずれかであり得る。配列番号1および2に示す塩基配列はいずれもRNAで構成されている。

[0027] 配列番号1に示す塩基配列は、ヒトFSTL-1をコードする塩基配列（即ち開始コドンから終始コドンまでの配列）の50～68番目の塩基配列である。配列番号1に示す塩基配列のうち、1～11番目の塩基配列はFSTL-1-SP塩基配列の一部であり、12～19番目の塩基配列は、FSTL-1-SP塩基配列に含まれない配列である。

配列番号2に示す塩基配列は、ヒトFSTL-1をコードする塩基配列の55～73番目の塩基配列である。配列番号2に示す塩基配列のうち、1～6番目の塩基配列はFSTL-1-SP塩基配列の一部であり、7～19番目の塩基配列は、FSTL-1-SP塩基配列に含まれない配列である。

[0028] 配列番号1または2に示すメイン配列で構成される二本鎖RNAは、免疫細胞（例えば、T細胞）に供給することで当該免疫細胞を活性化することができる。例えば、免疫細胞（例えばT細胞）のNFATシグナルを増強することができる。

[0029] メイン配列は、好ましくはFSTL-1をコードする塩基配列の中から選択されるが、本技術の効果を奏する範囲において、1塩基または複数の塩基（例えば2塩基）が他の塩基に置換、欠失及び／又は付加（挿入）されていてもよい。

[0030] ここで開示される二本鎖RNAのセンス鎖は、メイン配列の5'末端側または3'末端側に付加される付加配列を備え得る。好ましくは、付加配列はメイン配列の3'末端側に付加される。付加配列が付加されることにより、

RNA_i がより効果的に誘導され得る。

[0031] 付加配列は、2～4塩基からなる塩基配列で構成され、好ましくは2塩基からなる塩基配列で構成される。付加配列を構成する塩基配列は特に限定されるものではないが、好適な一例としては、TT（チミン・チミン）、UU（ウラシル・ウラシル）等が挙げられる。なお、付加配列がTTである場合には、付加配列はDNAで構成される。

[0032] 付加配列は、ポリヌクレオチド（ダイマー、トリマー、もしくはテトラマー）で構成される。付加配列を構成するポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドのみ、デオキシヌクレオチドのみ、またはデオキシヌクレオチドとリボヌクレオチドとの両方を含んで構成されていてもよい。即ち、センス鎖およびアンチセンス鎖は、全体がRNAであってよく、RNAとDNAとのキメラポリヌクレオチドであってよい。また、付加配列は修飾デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、その他の公知のヌクレオチド類似体等を含み得る。

[0033] センス鎖は、例えば、21塩基以上27塩基以下の塩基配列で構成され、21塩基以上25塩基以下、または21塩基以上23塩基以下で構成され得る。好適な一例では、メイン配列19塩基と、付加配列2塩基とからなる21塩基で構成される。かかる例では、RNA_i が効果的に誘導され得る。

[0034] アンチセンス鎖は、センス鎖のメイン配列と相補的な塩基配列を有する。これにより、アンチセンス鎖はセンス鎖とハイブリダイズされ、二本鎖構造が形成される。なお、上記相補的な塩基配列の部分は、典型的には、リボヌクレオチドのポリマー（RNA）で構成されている。

[0035] アンチセンス鎖は、センス鎖と同様、付加配列を有する。付加配列は、上記相補的な塩基配列の5'末端側若しくは3'末端側に付加されている。好ましい一例では、センス鎖の付加配列がメイン配列の3'末端側に付加されているとき、アンチセンス鎖の付加配列は上記相補的な塩基配列の3'末端側に付加されている。

なお、アンチセンス鎖における付加配列の構成は上述したセンス鎖の付加

配列の構成と同様であってよい。典型的には、アンチセンス鎖の付加配列の塩基配列は、ハイブリダイズするセンス鎖の付加配列と同じであるが、異なる塩基配列であってもよい。

[0036] アンチセンス鎖は、例えば、21塩基以上27塩基以下の塩基配列で構成され、21塩基以上25塩基以下、または21塩基以上23塩基以下で構成され得る。好適な一例では、アンチセンス鎖はセンス鎖と同じ長さの塩基配列で構成され、付加配列を除く塩基配列が全てセンス鎖のメイン配列と相補的な塩基配列で構成される。

[0037] ここで開示される二本鎖RNAを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖は、一般的な化学合成法に準じて製造することができる。例えば、市販のDNA/RNA自動合成機を使用して合成することができる。また、インビトロまたはインビボにおいて、遺伝子工学的手法に基づいてセンス鎖およびアンチセンス鎖を合成してもよい。なお、合成されたセンス鎖およびアンチセンス鎖は精製されていることが好ましく、例えばHPLC等により精製することができる。

[0038] ここで開示される二本鎖RNAは、例えば、センス鎖およびアンチセンス鎖をアニーリング（ハイブリダイズ）することで製造することができる。アニーリング方法は従来公知の方法に従えばよく、メイン配列を構成する塩基配列に応じてアニーリング温度、冷却速度等を調整すればよい。一例では、センス鎖とアンチセンス鎖とを溶媒中で等量混合し、90℃で1分～5分間加熱後、4℃～室温まで冷却することで、アニーリングを行うことができる。かかる溶媒としては、例えば、蒸留水、純水、超純水、バッファー（例えば、pH7.4のHEPES-KOHバッファー、PBS等）等を使用できる。なお、活性のあるRNase（RNA分解酵素）が溶媒に混入することを防ぐため、溶媒は、例えばDEPC処理、オートクレーブ処理等がされたものが好ましく用いられる。

[0039] ここで開示される組成物は、上述した二本鎖RNAに加え、使用形態に応じて医薬（薬学）上許容され得る種々の担体を含み得る。担体としては、例

例えば、希釈剤、賦形剤等として医薬において一般的に使用される担体が好ましい。かかる担体としては、組成物の用途や形態に応じて適宜異なり得るが、典型的には、水、生理学的緩衝液、種々の有機溶媒が挙げられる。また、かかる担体は、適当な濃度のアルコール（エタノール等）水溶液、グリセロール、オリーブ油のような不乾性油であり得、或いはリポソーム等であってもよい。また、医薬用組成物に含有させ得る副次的成分としては、種々の充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、表面活性剤、色素、香料、トランスフェクション試薬等が挙げられる。また、従来公知のドラッグデリバリーシステムに利用される担体を含み得る。

[0040] 組成物の形態は、特に限定されない。例えば、典型的な形態として、液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル、泡沫剤、顆粒剤、粉末剤、錠剤、カプセル、軟膏が挙げられる。また、注射等に用いるため、使用直前に生理食塩水または適当な緩衝液（例えばPBS）等に溶解して薬液を調製するための凍結乾燥物、造粒物とすることもできる。

二本鎖RNA（主成分）および種々の担体（副成分）を材料にして種々の形態の薬剤（組成物）を調製するプロセス自体は従来公知の方法に準じればよく、かかる製剤方法自体は本開示を特徴付けるものでもないため詳細な説明は省略する。処方に関する詳細な情報源として、例えばComprehensive Medicinal Chemistry, Corwin Hansch監修, Pergamon Press刊（1990）が挙げられる。

[0041] ここで開示される組成物は所定の塩基配列で構成された二本鎖RNAを1種単独で含んでいてもよく、互いに異なる塩基配列で構成された複数種（2種以上）の二本鎖RNAを含んでもよい。

[0042] ここで開示される組成物は、例えば、免疫細胞を活性化させる免疫増強剤として使用され得る。また、免疫細胞を活性化することで腫瘍細胞への攻撃を促すことができるため、例えば、抗腫瘍剤（抗がん剤）としても好適に使用され得る。

- [0043] また、本開示により、ここで開示される組成物を用いて免疫細胞を活性化させる方法が提供される。ここで開示される方法は、ここで開示される組成物を用意する用意工程と、当該組成物を免疫細胞に供給する工程とを含む。
- [0044] 用意工程では、例えば、上述したように、従来公知の方法によりここで開示される組成物を準備すればよい。
- [0045] 供給工程では、ここで開示される組成物を生体内（インビボ）または生体外（インビトロ）において免疫細胞に供給する。当該免疫細胞の動物種は特に限定されず、例えば、哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類、魚類等であってよい。好ましくは、組成物に含まれる二本鎖RNAのメイン配列の基となるFSTL-1の由来となる動物種と、免疫細胞の動物種とが同じである。免疫細胞の種類も特に限定されないが、好ましくは、T細胞である。なお、組成物の供給先に免疫細胞以外の細胞が存在していてもよいが、免疫細胞のみに組成物を供給してもよい。
- [0046] 組成物の投与方法は、従来動物の治療に使用されている方法に準じればよく、特に限定されない。組成物は、生体内（インビボ）において、その形態および目的に応じた方法や用量で使用され得る。例えば、液剤として、静脈内、リンパ管内、筋肉内、皮下、皮内若しくは腹腔内への注射によって患者または動物個体（即ち生体）の患部（例えば悪性腫瘍組織、ウイルス感染組織、炎症組織等）に所望する量だけ投与することができる。あるいは、錠剤等の固体形態のものや軟膏等のゲル状若しくは水性ゼリー状のものを、直接所定の組織（即ち、例えば腫瘍細胞、炎症細胞等を含む組織や器官等の患部）に投与することができる。あるいは、錠剤等の固体形態のものは経口投与することができる。経口投与の場合は、消化管内での消化酵素分解を抑止すべくカプセル化や保護（コーティング）材の適用が好ましい。
- [0047] インビボにおいて供給する組成物の量は、特に限定されないが、例えば、動物個体1kgあたりに対する二本鎖RNAの量は0.01mg以上、0.05mg以上、または0.1mg以上であり得る。また、動物個体1kgあたりに対する二本鎖RNAの量は、例えば、10mg以下、5mg以下、2

mg以下、1mg以下であり得る。

[0048] また、ここで開示される組成物は、生体外（インビトロ）において、真核細胞に対して使用することができる。インビトロにおける真核細胞は、例えば、生体から摘出された種々の細胞塊、組織、臓器、器官、血液、およびリンパ液、ならびにセルライン等を包含する。インビトロにおいても二本鎖RNA濃度は特に限定されるものではないが、例えば、免疫細胞を含む供給対象物の培養液中において、二本鎖RNA濃度は、1nM以上、5nM以上、または10nM以上であり得る。また、かかる培養液中の二本鎖RNA濃度は、例えば、10 μ M以下であるとよく、5 μ M以下、2 μ M以下、1 μ M以下、または100nM以下であり得る。

[0049] ここで開示される方法では、二本鎖RNAを公知のトランスフェクション方法により免疫細胞の内部に供給してもよいが、公知のトランスフェクション方法を用いることなく、二本鎖RNAを免疫細胞に供給してもよい。換言すれば、二本鎖RNAが免疫細胞の表面（表面は、表面に露出する膜タンパク質、糖鎖等も含み得る）に接触するように供給してもよい。例えば、トランスフェクション試薬を含まない組成物を免疫細胞に供給し、人工的に免疫細胞の細胞膜に孔を形成せず、インキュベートする。なお、二本鎖RNAを免疫細胞の表面に接触させるには、免疫細胞の培養液中に二本鎖RNAを混合すればよい。二本鎖RNAは、トランスフェクション試薬等の担体を介して免疫細胞の表面に間接的に接触するのではなく、担体などを介さず直接的に接触することが好ましい。ここで開示される二本鎖RNAは、細胞内に導入されることなく（即ち、siRNAとして機能することなく）、免疫細胞を活性化することができ得る。

なお、公知のトランスフェクション方法とは、例えば、カチオン性分子（市販のトランスフェクション試薬等）を利用した化学的遺伝子導入方法、マイクロインジェクション、電圧ポレーション等の物理的導入方法、ウイルスを利用した生物学的遺伝子導入方法等を含み得る。

[0050] なお、ここで開示される組成物（若しくは二本鎖RNA）による「免疫細

胞の活性化」とは、組成物が免疫細胞を活性化させるシグナルのトリガーとなるような直接的な活性化（例えば、NFATシグナルの増強）だけでなく、免疫細胞を活性化させるシグナルを抑制する機構を阻害するような間接的な活性化（例えば、NFATシグナルの抑制機構の阻害）の意味も含み得る。「免疫細胞の活性化」としては、例えば、T細胞のNFATシグナルの増強が挙げられる。

[0051] 以上のとおり、ここに開示される技術の具体的な態様として、以下の各項に記載のものが挙げられる。

項1：

免疫細胞を活性化するために該免疫細胞に供給される組成物であって、センス鎖と、アンチセンス鎖とから構成される二本鎖RNAを含み、上記センス鎖は、

5'末端の塩基がグアニン（G）またはシトシン（C）である19～23塩基からなるメイン配列と、

上記メイン配列の3'末端側に付加された2～4塩基からなる付加配列とから構成され、

上記アンチセンス鎖は、

上記メイン配列と相補的な配列と、

該相補的な配列の3'末端側に付加された2～4塩基からなる付加配列とから構成されており、

ここで、前記メイン配列が、FSTL-1（follistatin like 1）をコードする塩基配列の一部であって、FSTL-1のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の少なくとも一部を含む配列から成る、組成物。

項2：

前記メイン配列が、以下の塩基配列：

GGGUCCGCGCCGAGGAAGA (配列番号1) ;

CGCGCCGAGGAAGAGCUAA (配列番号2) ;

のいずれかから成る、項1に記載の組成物。

項3 :

上記メイン配列の3'末端側の5塩基のうち少なくとも3塩基はアデニン(A)及び/又はウラシル(U)である、項1または2に記載の組成物。

項4 :

上記付加配列を構成する塩基配列がチミン・チミン(TT)である、項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

項5 :

免疫細胞を活性化させる方法であって、
項1~4のいずれか一項に記載の組成物を用意する用意工程と、
上記組成物をインビトロにおいて上記免疫細胞に供給する供給工程とを含む方法。

項6 :

上記免疫細胞の動物種と、前記FSTL-1の動物種とが同じである、項5に記載の方法。

項7 :

上記供給工程において、上記二本鎖RNAを上記免疫細胞の表面に接触させること、を含む項5または6に記載の方法。

[0052] 以下、ここに開示される技術に関するいくつかの試験例を説明する。ただし、ここに開示される技術は試験例に示すものに限定されるものではない。

[0053] <二本鎖RNAの調製>

ユーロフィンジェノミクス株式会社にポリヌクレオチドの合成を依頼し、配列番号5~8に示す塩基配列のポリヌクレオチドを得た。各ポリヌクレオチドの塩基配列を表1に示す。なお、各ポリヌクレオチドにおいて、3'末端側の「TT」(付加配列)はDNAであり、その他の配列(メイン配列)部分はRNAで構成されている。得られたポリヌクレオチドは、相補的な配

列を有するセンス鎖とアンチセンス鎖とをアニーリングさせることで、表1に示すNo. 1～3に用いる二本鎖RNAをそれぞれ調製した。No. 1～2に示す二本鎖RNAをそれぞれPBSに溶解し、RNA溶液を調製した。

[0054] [表1]

表1

No.	二本鎖RNAの構成
1	センス鎖： 5' GGGUCCGCGCCGAGGAAGATT 3' (配列番号5) アンチセンス鎖： 3' TTCCCAGGCGCGGCUCUUCU 5' (配列番号6)
2	センス鎖： 5' CGCGCCGAGGAAGAGCUAATT 3' (配列番号7) アンチセンス鎖： 3' TTGCGCGGCUCUUCUCGAUU 5' (配列番号8)

[0055] 表1に示すように、No. 1の二本鎖RNAのセンス鎖は、配列番号1から成るメイン配列（FSTL-1のシグナルペプチドをコードする塩基配列の一部を含む配列）と、該メイン配列の3'末端側に付加されたTTから成る付加配列とから構成されている。No. 2の二本鎖RNAのセンス鎖は、配列番号2から成るメイン配列（FSTL-1のシグナルペプチドをコードする塩基配列の一部を含む配列）と、該メイン配列の3'末端側に付加されたTTから成る付加配列とから構成されている。各例のアンチセンス鎖は、メイン配列と相補的な配列と、当該配列の3'末端側にTTから成る付加配列とから構成されている。

[0056] <免疫細胞の活性評価方法のメカニズム>

図1は、後述する試験1および試験2における免疫細胞の活性の評価方法のメカニズムの概略を示す模式図である。試験1および試験2では、Jurkat細胞（ヒトTリンパ球細胞）と、腫瘍細胞としてのHEK293細胞（ヒト胎児腎細胞）とを用いた。Jurkat細胞（BPS Bioscience社から購入）は、PD-1を安定発現し、かつ、NFATシグナル経路によりルシフェラーゼが発現するように構成されている。また、Jurkat細胞は、内在的にTCR（T-cell receptor）を恒常的に発現している。HEK293細胞は、TCRアクチベータと、PD-L1とが発現するように構成されている。

[0057] 一般的に、PD-1とPD-L1とが結合することで、TCRとTCRア

クチベータとが結合して誘導されるNFATシグナルが抑制されることが知られている。NFATシグナルは、Jurkat細胞を活性化させるシグナルである。即ち、Jurkat細胞は、近くの細胞がPD-1を発現している場合にPD-1とPD-L1とが結合し、自らの活性化を抑制する機構を有する。

[0058] 試験1および試験2では、Jurkat細胞は、Jurkat細胞に発現するTCRがHEK293細胞に発現するTCRアクチベータと結合することにより、NFATシグナル経路を介してルシフェラーゼを発現する。発現したルシフェラーゼは細胞外（培養培地）へ分泌される。分泌されたルシフェラーゼは、培養培地に混合された基質（ルシフェリン）を発光物質でありオキシルシフェリンへと変換する。そして、培養培地の発光シグナルの強度を検出する。これにより、Jurkat細胞の活性化の指標とすることができる。発光シグナルの強度が高いほど活性が強いことを示す。

[0059] [[試験1]

試験1では、トランスフェクション試薬を用いて上記準備した二本鎖RNAを免疫細胞であるJurkat細胞へと供給し、Jurkat細胞の活性を測定した。実験は全て3連（n=3、各例3ウェルずつ）で行った。試験1では、トランスフェクション試薬を用いることで、二本鎖RNAはsiRNAとして機能し得る。

[0060] (例1)

1日目にコラーゲンIコートした96ウェルプレートにHEK293細胞を培養培地であるDMEM（富士フィルム和光純薬社製）+10%FBS（Hyclone社製）+0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン（Invitrogen社製）に懸濁し、 3.5×10^4 cells/100 μ L/wellとなるように播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で一晩インキュベートした。

[0061] 2日目に、BPS Bioscience社製のTCR activator/PD-L1 Mammalian Expression kitの

Component A (TCRアクチベータ及びPD-L1を過剰発現させるベクターを含む試薬) 22 μ Lと、Opti-MEM (商標) 220 μ Lとを混合し、溶液Aを調製した。また、Lipofectamine (商標) 2000を4.4 μ Lと、Opti-MEM (商標) 220 μ Lとを混合し、溶液Bを調製した。次に、溶液Aと溶液Bとを混合して溶液Cを調製し、室温で5分間インキュベートした。調製した溶液Cを20 μ L/wellとなるように、HEK293細胞が培養されているウェルに添加した。その後、37°C、5%CO₂下で一晩インキュベートした。

また、Jurkat細胞を培養培地 (RPMI-1640 (富士フィルム和光純薬) +10%FBS (Hyclone社製) +0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen社製)) に懸濁し、 2.8×10^5 cells/400 μ L/wellとなるように、浮遊細胞用の48ウェルプレートの1ウェルにJurkat細胞を播種した。次に、Lipofectamine (商標) RNAiMAXを用いて、表1に示すNo. 1の二本鎖RNAをJurkat細胞にトランスフェクションした。このとき、培養培地中の二本鎖RNA濃度は4 μ Mとした。

[0062] 3日目に、上記準備したJurkat細胞を培養培地ごと回収し、懸濁液を調製した。上記準備したHEK293細胞と、上記準備したJurkat細胞との細胞数が同等 (HEK293細胞: Jurkat細胞=1:1) となるように上記懸濁液をHEK293細胞が培養された96ウェルプレートの各ウェルに添加した。そして、37°C、5%CO₂下で16~24時間インキュベートした。

[0063] 4日目に、BPS Bioscience社製のルシフェラーゼレポーター細胞活性測定用試薬であるOne-Step Luciferase Assay Systemを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。各ウェルのルシフェラーゼの発光シグナルは、Promega社製のマイクロプレート用のルミノメータを用いて測定した。図2に、測定された発光シグナルの強度を示す。なお、発光シグナルの強度は3ウェルの平均値とし、後述す

る例4の発光シグナルの強度の値を「1」としたときの相対値を示す。また、HEK293細胞およびJurkat細胞を入れていないウェル（培養培地及びルシフェラーゼアッセイの試薬のみ）をブランクのウェルとして設けた。ブランクにおける発光シグナル強度の値を他のウェルの発光シグナル強度から引いて図2に示している。

[0064] (例2)

例2では、例1におけるNo. 1の二本鎖RNAを表1に示すNo. 2の二本鎖RNAに変更した以外は、例1と同様にした。

[0065] (例3)

No. 1の二本鎖RNA溶液の代わりに、anti-PD-1抗体（BPS Bioscience社製）を添加した。このとき、Jurkat細胞を含むチューブにおけるanti-PD-1抗体の濃度が $1\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにした。これ以外は例1と同様にした。

[0066] (例4)

Jurkat細胞含有チューブへ二本鎖RNAもanti-PD-1抗体も添加しなかった以外は例1と同様にした。即ち、例4はJurkat細胞に添加物を供給していない例（Untreatment）であり、Jurkat細胞の活性評価の基準となる例である。例4よりも発光シグナルの強度が高い場合Jurkat細胞が活性化されたことを示す。

[0067] (例5)

HEK293細胞にTCRアクチベータ及びPD-L1のベクターを導入しなかった以外は、例4と同様にした。

[0068] 図2に示すように、例1～2が例4よりも発光シグナル強度が高かったことから、No. 1またはNo. 2の二本鎖RNAをJurkat細胞にトランスフェクションすることで、Jurkat細胞が活性化された（詳細には、NFATシグナルが増強された）ことがわかる。

[0069] [試験2]

試験2では、トランスフェクション試薬を用いることなく、上記準備した

二本鎖RNAを免疫細胞であるJurkat細胞へと供給した場合のJurkat細胞の活性を測定した。実験は全て3連（ $n=3$ 、各例3ウェルずつ）で行った。

[0070] (例6)

例6では、試験1の例1と同様にして1日目および2日目のHEK293細胞の準備を行った。ただし、2日目にJurkat細胞の播種は行わなかった。3日目にJurkat細胞を上記Jurkat細胞に用いた培養培地に懸濁し、 $1.4 \times 10^5 \text{ cells} / 200 \mu\text{L} / \text{tube}$ となるようにチューブに分注した。当該チューブに、表1のNo. 1の二本鎖RNAの2mMのRNA溶液を混合し、終濃度が $40 \mu\text{M}$ となるようにした。当該チューブを 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で1時間インキュベートした。その後、上記準備したHEK293細胞と、上記準備したJurkat細胞との細胞数が同等（HEK293細胞：Jurkat細胞=1：1）となるように上記Jurkat細胞の懸濁液をHEK293細胞が培養された96ウェルプレートの各ウェルに添加した。そして、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で16～24時間インキュベートした。その後、4日目に、例1と同様にして発光シグナル強度を測定した。図3に、測定された発光シグナルの強度を示す。なお、発光シグナルの強度は3ウェルの平均値とし、後述する例9の発光シグナルの強度の値を「1」としたときの相対値を示す。また、HEK293細胞およびJurkat細胞を入れていないウェル（培養培地及びルシフェラーゼアッセイの試薬のみ）をブランクのウェルとして設けた。ブランクにおける発光シグナル強度の値を他のウェルの発光シグナル強度から引いて図3に示している。

[0071] (例7)

例7では、例6におけるNo. 1の二本鎖RNAを表1に示すNo. 2の二本鎖RNAに変更した以外は、例7と同様にした。

[0072] (例8)

No. 1の二本鎖RNA溶液の代わりに、anti-PD-1抗体（BPS Bioscience社製）を添加し、Jurkat細胞を含むチュー

ブにおける anti-PD-1 抗体の濃度が $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにした
以外は例 6 と同様にした。

[0073] (例 9)

Jurkat 細胞含有チューブへ二本鎖 RNA も anti-PD-1 抗体も添加しなかった以外は例 6 と同様にした。即ち、例 9 は Jurkat 細胞に添加物を供給していない例 (Untreatment) であり、Jurkat 細胞の活性評価の基準となる例である。例 9 よりも発光シグナルの強度が高い場合 Jurkat 細胞が活性化されたことを示す。

[0074] (例 10)

HEK293 細胞に TCR アクチベータ及び PD-L1 のベクターを導入しなかった以外は、例 9 と同様にした。

[0075] 図 3 に示すように、例 6～7 が例 9 よりも発光シグナル強度が高かったことから、Jurkat 細胞が活性化されたことがわかる。一般的に、二本鎖 RNA は負の電荷を有しているため、細胞膜を透過することができない。そのため、例 6～7 では、トランスフェクション試薬を用いていないため、No. 1 または 2 の二本鎖 RNA が Jurkat 細胞の内部に取り込まれて siRNA として機能したとは考え難い。即ち、詳細なメカニズムは不明だが、No. 1 または 2 の二本鎖 RNA は、免疫細胞の内部に取り込まれずとも、免疫細胞表面に接触することで免疫細胞を活性化させる機能を有していると考えられる。

[0076] 以上、ここに開示される技術の具体例を詳細に示したが、これらは例示にすぎず、請求の範囲を限定するものではない。請求の範囲に記載の技術には、以上に例示した具体例を様々に変形、変更したものが含まれる。

請求の範囲

- [請求項1] 免疫細胞を活性化するために該免疫細胞に供給される組成物であつて、
- センス鎖と、アンチセンス鎖とから構成される二本鎖RNAを含み、
- 前記センス鎖は、
- 5'末端の塩基がグアニン（G）またはシトシン（C）である19～23塩基からなるメイン配列と、
- 前記メイン配列の3'末端側に付加された2～4塩基からなる付加配列と
- から構成され、
- 前記アンチセンス鎖は、
- 前記メイン配列と相補的な配列と、
- 該相補的な配列の3'末端側に付加された2～4塩基からなる付加配列と
- から構成されており、
- ここで、前記メイン配列が、FSTL-1（follistatin like 1）をコードする塩基配列の一部であつて、FSTL-1のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の少なくとも一部を含む配列から成る、組成物。
- [請求項2] 前記メイン配列が、以下の塩基配列：
- GGGUCCGCGCCGAGGAAGA（配列番号1）；
- CGCGCCGAGGAAGAGCUAA（配列番号2）；
- のいずれかから成る、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記メイン配列の3'末端側の5塩基のうち少なくとも3塩基はアデニン（A）及び／又はウラシル（U）である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項4] 前記付加配列を構成する塩基配列がチミン・チミン（TT）である

、請求項 1 に記載の組成物。

[請求項5]

免疫細胞を活性化させる方法であって、

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物を用意する用意工程と

、

前記組成物をインビトロにおいて上記免疫細胞に供給する供給工程

と

を含む方法。

[請求項6]

前記免疫細胞の動物種と、前記 F S T L - 1 の動物種とが同じである、請求項 5 に記載の方法。

[請求項7]

前記供給工程において、前記二本鎖 R N A を前記免疫細胞の表面に接触させること、を含む請求項 5 に記載の方法。

[図1]

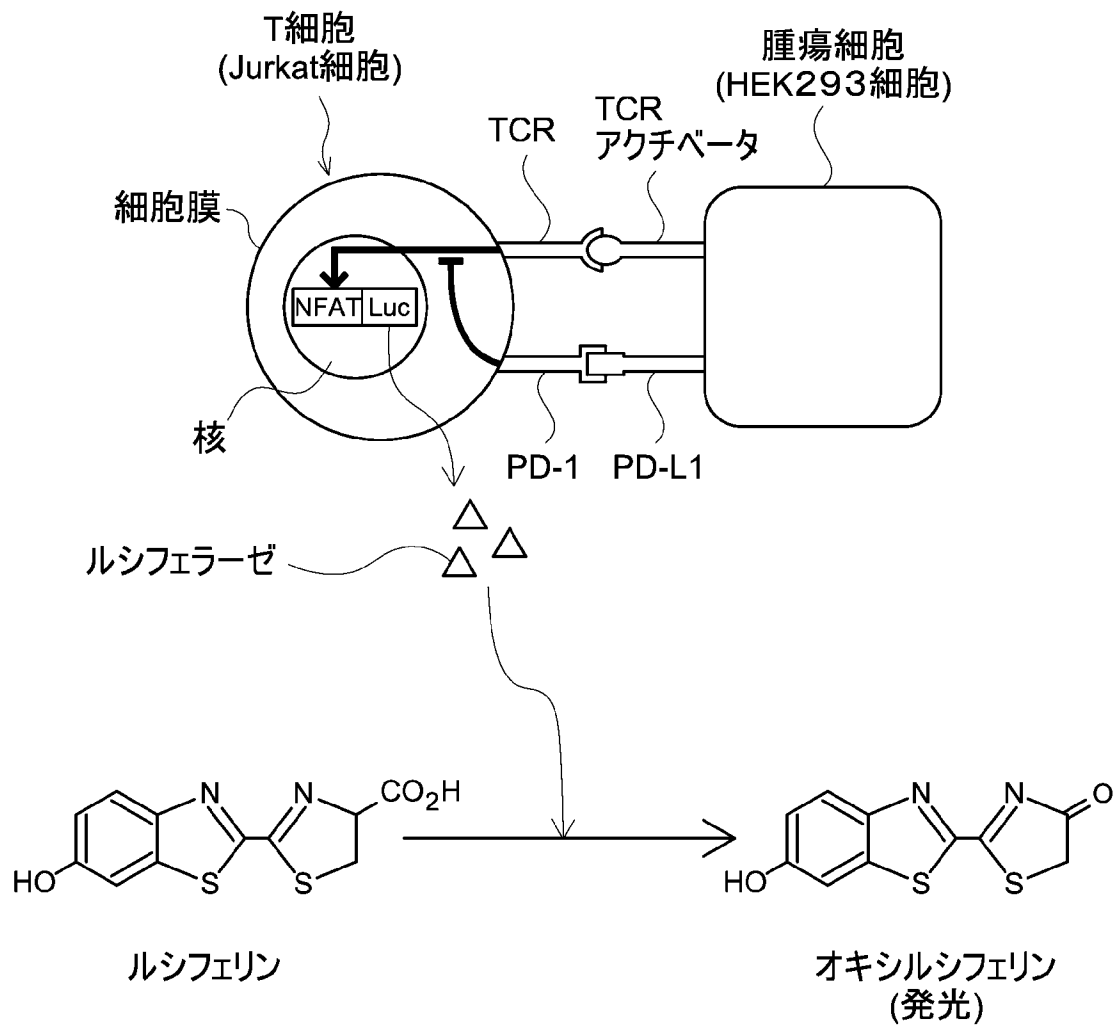


FIG.1

[圖2]

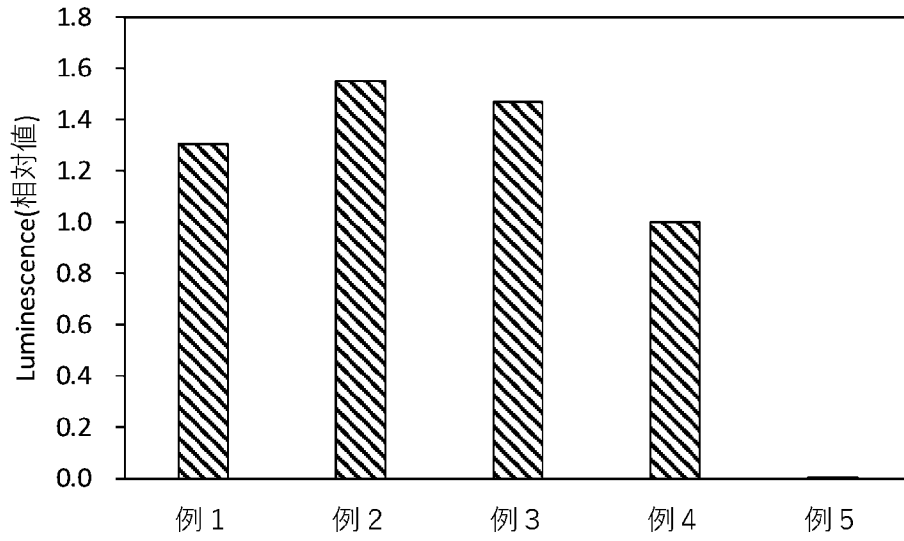


FIG.2

[圖3]

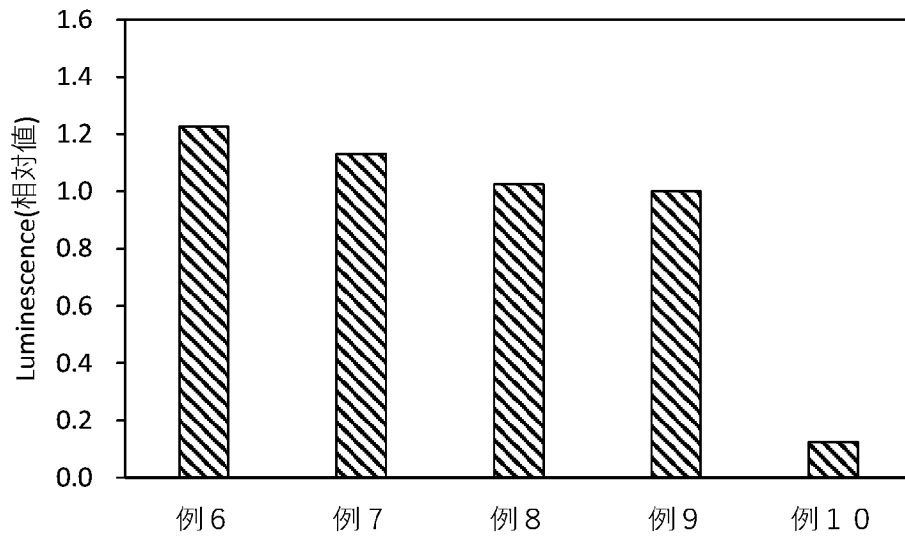


FIG.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/006140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/113</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/078</i> (2010.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)i FI: C12N15/113 Z ZNA; C12N15/12; C12N5/078; C12N5/10		
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) C12N15/113; C12N5/10; C12N5/078; C12N15/12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DENG, Qun et al., Circ_0001490/miR-579-3p/FSTL1 axis modulates the survival of mycobacteria and the viability, apoptosis and inflammatory response in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, Tuberculosis, 03 September 2021, vol. 131, 102123 (pp. 1-12), https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102123 particularly, abstract, fig. 7	1-7
A	RAO, Jianhua, FSTL1 promotes liver fibrosis by reprogramming macrophage function through modulating the intracellular function of PKM2, Gut, 09 February 2022, vol. 71, pp. 2539-2550, doi:10.1136/gutjnl-2021-325150 particularly, abstract	1-7
A	MATTIOTTI, Andrea et al., Follistatin-like 1 in development and human diseases, Cellular and Molecular Life Sciences, 29 March 2018, vol. 75, pp. 2339-2354, https://doi.org/10.1007/s00018-018-2805-0 particularly, abstract, drawings	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 May 2024		Date of mailing of the international search report 14 May 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/006140

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JELINEK, Ivett et al., TLR3-Specific Double-Stranded RNA Oligonucleotide Adjuvants Induce Dendritic Cell Cross-Presentation, CTL Responses, and Antiviral Protection, The Journal of Immunology, 2011, vol. 186, no. 4, pp. 2422-2429, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002845 particularly, abstract, fig. 4, 5	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/006140

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/113(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/078(2010.01)i; C12N 15/12(2006.01)i FI: C12N15/113 Z ZNA; C12N15/12; C12N5/078; C12N5/10		
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）） C12N15/113; C12N5/10; C12N5/078; C12N15/12 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 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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	DENG, Qun et al., Circ_0001490/miR-579-3p/FSTL1 axis modulates the survival of mycobacteria and the viability, apoptosis and inflammatory response in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, Tuberculosis, 2021.09.03, Vol.131, 102123 (pp.1-12), https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102123 特に要旨, 図7	1-7
A	RAO, Jianhua, FSTL1 promotes liver fibrosis by reprogramming macrophage function through modulating the intracellular function of PKM2, Gut, 2022.02.09, Vol.71, pp.2539-2550, doi:10.1136/gutjnl-2021-325150 特に要旨	1-7
A	MATTIOTTI, Andrea et al., Follistatin-like 1 in development and human diseases, Cellular and Molecular Life Sciences, 2018.03.29, Vol.75, pp.2339-2354, https://doi.org/10.1007/s00018-018-2805-0 特に要旨, 図	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	02.05.2024	国際調査報告の発送日 14.05.2024
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） 田ノ上 拓自 4B 6115 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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	JELINEK, Ivett et al., TLR3-Specific Double-Stranded RNA Oligonucleotide Adjuvants Induce Dendritic Cell Cross-Presentation, CTL Responses, and Antiviral Protection, The Journal of Immunology, 2011, Vol.186, No.4, pp.2422-2429, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002845 特に要旨, 図4-5	1-7

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a))
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：