

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年3月23日 (23.03.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/030802 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) A61K 31/341 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/016888
- (22) 国際出願日: 2005年9月14日 (14.09.2005)
- (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:
60/609,826 2004年9月15日 (15.09.2004) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 興和株式会社 (KOWA COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒4608625 愛知県名古屋市中区錦三丁目6番29号 Aichi (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 竹内 勤 (TAKEUCHI, Tsutomu) [JP/JP]; 〒1560044 東京都世田谷区赤堤2-20-7 Tokyo (JP).
津坂 憲政 (TSUSAKA, Kensei) [JP/JP]; 〒1680072 東京都杉並区高井戸東3-9-10-736 Tokyo (JP).
吉本 桂子 (YOSHIMOTO, Keiko) [JP/JP]; 〒1850034 東京都国分寺市光町3-6-1-3-M Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目15番8号アミノ酸会館ビル4階 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING BAFF SUPPRESSOR OR INHIBITOR

(54) 発明の名称: B A F F 抑制剤又は阻害剤のスクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a novel BAFF suppressor or inhibitor. More specifically speaking, a method which comprises adding a combination of TPA with ionomycin and/or an anti-CD3 antibody to a cultured human cell to thereby induce the production of BAFF by the cell; a method of screening a substance capable of suppressing the expression or activity of BAFF which comprises adding a test substance to a BAFF-production system prepared by adding a combination of TPA with ionomycin and/or an anti-CD3 antibody to a cultured human cell and measuring the expression amount and/or the activity of BAFF in the BAFF-production system; and a BAFF production inducer for a BAFF-producing cell which contains a combination of TPA with ionomycin and/or an anti-CD3 antibody.

(57) 要約: 本発明は、新規なB A F F抑制剤又は阻害剤のスクリーニング方法に関する。詳細には、本発明は、培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して、当該細胞のB A F Fの産生を誘発する方法、及び培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したB A F Fの産生系に、被検物質を添加して、当該B A F F産生系におけるB A F Fの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、B A F Fの発現又は活性を制御することができる物質をスクリーニングする方法、並びにTPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を含有してなるB A F F産生細胞に対するB A F Fの産生誘発剤に関する。

WO 2006/030802 A1

明 細 書

BAFF抑制剤又は阻害剤のスクリーニング方法

技術分野

- [0001] 本発明は、新規なBAFF抑制剤又は阻害剤のスクリーニング方法に関する。詳細には、本発明は、市販の細胞株に対して適切な刺激条件を加え、細胞外に検出可能な充分量のBAFFを安定して遊離する系を構築することにより、BAFFの発現又は産生を抑制又は阻害する物質をスクリーニングする方法に関する。さらに詳細には、本発明は、培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して、当該細胞のBAFFの産生を誘発する方法、及び培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFF産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、BAFFの発現又は活性を制御することができる物質をスクリーニングする方法、並びにTPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を含有してなるBAFF産生細胞に対するBAFFの産生誘発剤に関する。

背景技術

- [0002] BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)は、T細胞、単球／マクロファージ、樹状細胞等から産生・分泌され、B細胞上の3種の受容体を介してB細胞の分化、活性化、生存等を制御することが知られている (Mooreら Science(1999)285,260-263)。
- [0003] ヒトBAFFは、285個のアミノ酸からなる膜貫通型の蛋白質である。そのアミノ酸配列中には、46個のアミノ酸からなる細胞質ドメインと218個のアミノ酸からなる細胞外ドメインが存在し、また、Nグリコシル化部位が2ヶ所有り、3量体を形成するといった構造的な特徴を有する。さらにC末端から152アミノ酸の細胞外ドメインは、Furinファミリーのプロテアーゼによって切断され、可溶型として遊離される。ヒトBAFFのアミノ酸配列は当初、Neutrokin α との名称で、国際特許出願公開WO98/18921号公報中の配列番号1又は2として開示された。この他別名称として、Kay、TNFSF13B

、Blys、TALL-1、THANK、zTNF4等も知られている。

[0004] BAFFの受容体としては、BAFF-R、TACI(transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor)及びBCMA(B cell maturation antigen)が知られている。BAFF-R及びBCMAは主にB細胞に発現しており、TACIはB細胞と活性化T細胞に発現している。

[0005] BAFFの生理的作用は、上述のようにB細胞の分化、活性化、生存等の制御であるが、近年、病態との関わりも次第に明らかとなった。即ち、BAFFを過剰に発現するマウスでは、末梢血B細胞の増多、リンパ節や脾臓の肥大、血清中IgG濃度上昇、抗核抗体産生、腎内に免疫複合体の沈着、蛋白尿、腎炎等の、SLE様の症状を示すことが報告されている(Mackayら J.Exp.Med.,(1999)190,1697-1710、Khareら Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2000)97,3370-3375)。さらにこのマウスは、加齢とともに唾液腺炎、唾液腺破壊等の、SS様の症状を示すことも判明した(Groomら J.Clin.Invest.(2002)109,59-68)。またSLE、RA、SSの患者において、血清中BAFF濃度が増加していることも報告されており(Zhangら J.Immunol.(2001)166,6-10、Cheemaら Arthritis Rheum.(2001)44,1313-1319、Groomら J.Clin.Invest.(2002)109,59-68)、さらにはRA患者の滑液中のBAFFレベルが血清中に比べて高いこと(Cheemaら Arthritis Rheum.(2001)44,1313-1319)や、SS患者の唾液腺浸潤白血球におけるBAFFの発現(Groomら J.Clin.Invest.(2002)109,59-68)、SLE患者における血清BAFFレベルとイムノグロブリンや抗dsDNA抗体との相関性(Zhangら J.Immunol.(2001)166,6-10)、RA患者におけるBAFFとリウマトイド因子との相関性(Cheemaら Arthritis Rheum.(2001)44,1313-1319)等、数多くの報告がある。

[0006] これらの事実から、BAFFの発現又は産生を抑制又は阻害することはSLE、RA、SS等の自己免疫疾患の予防・治療に繋がるものということができるため、BAFFの発現又は産生の抑制又は阻害を的確にスクリーニングする系の確立が望まれている。

そのようなスクリーニング系の確立には、例えば、遺伝子組換え技術により、BAFFを発現するよう構築した遺伝子ベクターを培養細胞に導入することにより、安定してBAFFを発現する細胞を得る方法が考えられる。しかし、BAFFが発現したとしても、分泌型として細胞外に遊離されるとは限らないし、またBAFF発現、産生において安

定な細胞株とすることができるかという問題を有する。このため、従来、上記のような系は全く報告されていない。例えば市販の細胞株に対して適切な刺激条件を加えることにより、細胞内におけるBAFF発現の誘導と細胞外に検出可能な充分量のBAFF遊離が認められる系を構築できれば、上記のような問題も解決するといえる。

発明の開示

- [0007] 本発明の目的は、市販の細胞株に対して適切な刺激条件を加え、細胞外に検出可能な充分量のBAFFを安定して遊離する系を構築することにより、BAFFの発現又は産生を抑制又は阻害する物質をスクリーニングする方法を提供することにある。またそのような系を構築することにより、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法をも提供できる。
- [0008] そこで本発明者らは、細胞株の選定や刺激の方法などについて鋭意検討した結果、CD3を高発現している市販のヒトT細胞株であるLoucy細胞又はJurkat細胞に対し、抗CD3抗体及び／又はTPA(12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate、又はPhorbol 12-myristate 13-acetate:PMAと表記することもある)とアイオノマイシン (ionomycin)を組み合わせて刺激することにより、細胞において安定したBAFF発現誘導が認められ、且つ、培養液中に検出可能な充分量のBAFFが安定して遊離されることを見出し、本発明を完成した。
- [0009] 即ち、本発明は、培養ヒトT細胞にTPAとアイオノマイシン (ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して刺激することによる、BAFFの産生系を提供するものである。より詳細には、本発明は、Loucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞にTPAとアイオノマイシン (ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して刺激することによる、BAFFの産生系を提供するものである。
- [0010] また、本発明は、培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して、当該細胞のBAFFの産生を誘発する方法に関する。より詳細には、本発明は、Loucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体

を添加して、当該細胞のBAFFの産生を誘発する方法に関する。

[0011] さらに、本発明は、培養ヒトT細胞にTPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して刺激したBAFFの産生系における、BAFFの発現又は活性を制御することができる物質をスクリーニングする方法を提供するものである。より詳細には、本発明は、培養ヒトT細胞にTPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して刺激したBAFFの産生系における、BAFFの発現又は活性を抑制又は阻害することができる物質をスクリーニングする方法を提供するものである。さらに詳細には、本発明は、Loucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞にTPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して刺激したBAFFの産生系における、BAFFの発現又は活性を制御、好ましくは抑制又は阻害することができる物質をスクリーニングする方法を提供するものである。

[0012] また、本発明のスクリーニング方法は、詳細には、培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFF産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、BAFFの発現又は活性を制御することができる物質をスクリーニングする方法に関する。より詳細には、本発明は、Loucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFF産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、BAFFの発現又は活性を制御することができる物質をスクリーニングする方法に関する。さらに詳細には、本発明は、Loucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFF産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、BAFFの発現又は活性を抑制又は阻害することができる物質をスクリーニングする方法。

[0013] さらに、本発明は、培養ヒトT細胞にTPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して刺激したBAFFの産生系における、全身性

エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法を提供するものである。より詳細には、本発明は、Loucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞に抗CD3抗体及び／又はTPAとアイオノマイシン(ionomycin)を組み合わせさせて刺激したBAFFの産生系における、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法を提供するものである。さらに詳細には、本発明は、Loucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFF産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法に関する。

[0014] また、本発明は、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を含有してなるBAFF産生細胞に対するBAFFの産生誘発剤に関する。より詳細には、本発明は、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を含有してなる培養ヒトT細胞に対するBAFFの産生誘発剤に関する。さらに詳細には、本発明は、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を含有してなるLoucy細胞、又はJurkat細胞などの培養ヒトT細胞に対するBAFFの産生誘発剤に関する。

[0015] 本発明によれば、培養細胞株を用いたBAFFの産生を抑制又は阻害する物質をスクリーニングする方法、さらには、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等におけるBAFFの産生や活性に関与している疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、Loucy細胞又はJurkat細胞を抗CD3抗体、又はTPAとアイオノマイシン

(ionomycin)により刺激した時の、BAFFの発現を示す図である。

[図2]図2は、Loucy細胞を抗CD3抗体、又はTPAとアイオノマイシン (ionomycin)により刺激した時の、BAFF蛋白質の発現を示す図である。

[図3]図3は、抗ヒトBAFFモノクローナル抗体(4H4)及び対照としてChemicon製ウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(Chem)を用い、常法のウエスタンブロッティング法にてリコンビナントのヒトBAFF(Chemicon製)を検出した図である。

[図4]図4は、Loucy細胞をTPAとアイオノマイシン (ionomycin)により刺激した時の、BAFFの産生を示す図である。

[図5]図5は、Jurkat細胞をTPAとアイオノマイシン (ionomycin)により刺激した時の、BAFFの産生を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 本発明者らは、Loucy細胞又はJurkat細胞を各種の物質で刺激したときのBAFFの発現を調べた。その結果、後記実施例に示すように、Loucy細胞又はJurkat細胞を抗CD3抗体、又はTPAとアイオノマイシン (ionomycin)を組み合わせて刺激することにより、細胞において安定したBAFF発現誘導が認められ、且つ、培養液中に検出可能な充分量のBAFFが安定して遊離されることを見出した。

[0018] 従って、本発明のBAFFの発現又は活性を制御、好ましくは抑制又は阻害することができる物質のスクリーニング方法は、以下のごとく構築することができる。

即ち、市販のヒトT細胞を適切な培地に適切な濃度で懸濁し、培養プレート等に播種し、TPA(終濃度として $0.001 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $0.005 \sim 0.1 \mu\text{g/mL}$)及びアイオノマイシン (ionomycin) (終濃度として $0.01 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $0.05 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$)を添加して刺激し、さらに必要に応じて被験物質(終濃度 $10^{-15} \sim 10^{-3} \text{M}$ における、任意の濃度勾配列)を添加し、培養を開始する。培養開始後1時間～7日後、好ましくは3時間～5日後に培養上清を回収し、上清中のBAFF濃度を測定し、これを対照と比較することで、本スクリーニング系における被験物質のBAFF抑制又は阻害活性を調べることができる。また、上述の系を実施するにあたり、予め培養プレート等をPBS等で希釈した抗CD3抗体(終濃度として $0.01 \sim 1000 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $0.1 \sim 100 \mu\text{g/mL}$)にてコーティングしたものを用

いてもよい。また抗CD3抗体にてコーティングした培養プレート等を用いる場合は、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)を用いなくても充分量のBAFFを検出することができ、より簡便なスクリーニング系として有用である。

- [0019] 本発明で用いるヒトT細胞株は、市販のものが好ましく、例えば、Loucy細胞(ATCC Cat. No. CRL-2629)、Jurkat細胞(ATCC Cat. No. TIB-152)、TALL-1細胞(JCRB 0086)が挙げられ、このうちT細胞受容体を介した細胞活性化が予想できる、CD3を高発現しているLoucy細胞(ATCC Cat. No. CRL-2629)、Jurkat細胞(ATCC Cat. No. TIB-152)がさらに好ましい。
- [0020] また、本発明で用いる抗CD3抗体としては、当業者に公知の方法で作製された抗ヒトCD3モノクローナル抗体、抗ヒトCD3ポリクローナル抗体が挙げられるが、このうち抗ヒトCD3モノクローナル抗体が好ましく、マウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体(BD Pharmingen Cat No. 555336、等)がさらに好ましい。
- [0021] また、本発明で用いるTPAは、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetateの略称であり、別名称としてPhorbol 12-myristate 13-acetate(PMAと表記することもある)として知られているホルボールエステルであるが、本発明で使用するものとしてはいずれの表記による化合物でもよく、また立体異性体をも包含する。好ましい市販のTPAとしては、例えば4- α -Phorbol 12-myristate 13-acetate(SIGMA Cat. No. P-148)が挙げられる。
- [0022] さらに、本発明で用いるアイオノマイシン(ionomycin)は、*Streptomyces conglobatus*由来のポリエーテル系抗生物質であり、カルシウムイオノホアとしての作用が知られているが、本発明で使用するアイオノマイシン(ionomycin)としては、製薬的に許容される塩も含まれる。好ましい市販品のアイオノマイシン(ionomycin)としては、例えばIonomycin, calcium salt (SIGMA Cat. No. IO634)が挙げられる。
- [0023] 本発明のBAFFの産生誘発剤は、BAFFの産生を誘発する活性成分として、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を含有してなることを特徴とするものである。本発明のBAFFの産生誘発剤は、前記した活性成分のほかに緩衝液などの細胞系に添加可能な担体を含有することができ、このような細胞系に添加可能な担体と共にBAFFの産生誘発用組成物とすることができる。

- [0024] 本発明のBAFFの産生誘発剤は、BAFFを産生する細胞、好ましくは培養細胞に適用することができ、好ましい細胞としては、培養ヒトT細胞、より具体的にはLoucy細胞やJurkat細胞が挙げられる。
- [0025] 本発明のBAFFの産生誘発剤は、活性成分としてTPAとアイオノマイシン (ionomycin) との組み合わせを用いる場合には、それぞれの活性成分が、TPAは終濃度として $0.001 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $0.005 \sim 0.1 \mu\text{g/mL}$ になるような量を、アイオノマイシン (ionomycin) は終濃度として $0.01 \mu\text{g/mL} \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $0.05 \mu\text{g/mL} \sim 1 \mu\text{g/mL}$ になるような量を、細胞系に添加して使用することができる。また、活性成分が、抗CD3抗体の場合には、活性成分の濃度が $0.1 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $1 \mu\text{g/mL} \sim 30 \mu\text{g/mL}$ の緩衝液溶液を培養プレートに敷いて使用することができる。
- [0026] 以上のごとく得られる本発明のBAFFの産生系は、後記の実施例に示すように、培養液中に検出可能な充分量のBAFFが安定して遊離されるという驚くべき特徴を有するので、BAFFの発現又は活性を制御することができる物質、好ましくは抑制又は阻害することができる物質のスクリーニング方法はもとより、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法を実現することができる。

[0027] 実施例

以下に、実施例を挙げてこの発明をさらに具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

- [0028] Loucy細胞又はJurkat細胞を抗CD3抗体又はTPAとアイオノマイシン (ionomycin) により刺激した時のBAFFの発現

(a) TPAとアイオノマイシン (ionomycin) による刺激培養

ATCC (American Type Culture Collection) より購入したLoucy細胞又はJurkat細胞を10%FBS (Fetal bovine serum)、0.45%D-glucose、1mMピルビン酸ナトリウム、1mMHEPESを含むRPMI1640培地に懸濁し、 1×10^6 cells/wellになるよう

に、6 well培養プレートに播種した。これと同時にTPAとアイオノマイシン (ionomycin) を最終濃度がそれぞれ $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 又は $0.1 \mu\text{g/mL}$ となるように添加し、培養開始後5時間、24時間、48時間、72時間 (Loucy細胞) 又は48時間、120時間、168時間 (Jurkat細胞) で細胞を回収した。これら回収した細胞からtotal RNAを抽出し、次の条件下においてRT-PCR法によりBAFFのmRNAの解析を行った。ReverTra Dashキット (TOYOBO Cat. No. PCR-401) を用い、 30°C 10分、 42°C 20分、 99°C 5分の反応過程を経て、逆転写反応を行い、cDNAを得た。このcDNAを、Advantage 2 PCR Enzyme system (BD Biosciences Cat. No. PT3281-1) を用い、 94°C で1分反応後、 94°C 30秒、 66°C 1.5分を35サイクル反応させ、 66°C 5分の過程を経て、獲得したDNAを1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、975bpの位置に目的のバンドが認められた。PCR反応に使用したヒトBAFFのプライマー配列は次の通りである。

Forward : 5' aggccccaaccttcaaagttcaag (配列番号1)

Reverse : 5' cttagaggtacagagaaaggagg (配列番号2)

この結果を図1に示す。図1の(a)はLoucy細胞の場合を示し、図1の(b)はJurkat細胞の場合を示す。また、T+IはTPAとアイオノマイシン (ionomycin) による刺激を示し((a)においてはそれぞれ $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ であり、(b)においてはそれぞれ $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ (向かって右側) 又は $0.1 \mu\text{g/mL}$ (向かって左側) である)、(ー)は無刺激を示す。さらに、各々の図におけるG3PDHは陽性コントロールを示す。図1(a)、(b)に示されるように、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) 刺激を受けたLoucy細胞、及びJurkat細胞において、刺激後5時間、及び2日においてBAFF mRNAの発現が認められ、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) によるBAFF mRNAの明らかな発現誘導は培養開始72時間、及び7日 (168時間) 後まで継続して認められた。従って、Loucy細胞又はJurkat細胞をTPAとアイオノマイシン (ionomycin) によって刺激培養することにより、安定したBAFFの発現誘導が認められることから、この培養系を用いて、BAFF発現抑制、あるいは阻害物質のスクリーニングが可能となることがわかった。

[0029] (b) 抗CD3抗体による刺激培養

PBSにより $10 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗CD3抗体を6ウェル培養プレートにしき、 4°C 一晩で底面吸着させた後、(a)と同様に懸濁したLoucy細胞を 1×10^6 cells/wellになるように播種した。培養開始後5時間、24時間、48時間、72時間で細胞を回収した。これら回収した細胞からtotal RNAを抽出し、次の条件下においてRT-PCR法によりBAFFのmRNAの解析を行った。ReverTra Dashキット(TOYOBO Cat. No. PCR-401)を用い、 30°C 10分、 42°C 20分、 99°C 5分の反応過程を経て、逆転写反応を行い、cDNAを得た。このcDNAを、Advantage 2 PCR Enzyme system(BD Biosciences Cat. No. PT3281-1)を用い、 94°C で1分反応後、 94°C 30秒、 66°C 1.5分を35サイクル反応させ、 66°C 5分の過程を経て、獲得したDNAを1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、975bpの位置に目的のバンドが認められた。この結果、図1の(a)の右側にanti-CD3として示されるように、刺激後5時間からBAFF mRNAの発現が認められ、その後減衰し、培養開始72時間後に再度発現する2相性を示すことが明らかとなった。このような発現様式はそれぞれに生物学的意義が異なる可能性があると考えられ、Loucy細胞を抗CD3抗体によって刺激培養することにより誘導されたBAFF発現を用いて、さらにユニークなBAFF発現の抑制、あるいは阻害物質のスクリーニングが可能となると考えられる。

実施例 2

[0030] Loucy細胞を抗CD3抗体又はTPAとアイオノマイシン(ionomycin)により刺激した時のBAFF蛋白質の発現

PBSにより $10 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗CD3抗体を6ウェル培養プレートにしき、 4°C 一晩で底面吸着させた後、実施例1と同様に懸濁したLoucy細胞を 1×10^6 cells/wellになるように播種した。培養開始後24時間、48時間、72時間、96時間で細胞を回収した。これら回収した細胞を用いて、定法のウェスタンブロット法にてBAFF蛋白質の発現を検討した。なお、BAFF蛋白質検出抗体として、ウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(AB16530、Chemicon社製)を用いた。この結果を図2に示す。図2の左側の(一)は刺激を行わなかった場合をコントロールとして示し、図2のCD3 stimulationは抗CD3抗体で刺激した場合を示し、TPA+IonomycinはTPAとアイオノマイシン(ionomycin)とで刺激した場合を示す。図2の下段の β -actinは陽性コントロールを示

す。図2に示されるように、抗CD3抗体による刺激を受けたLoucy細胞において、刺激後24時間からヒトBAFFに該当する34kDaのバンドが確認され、この明らかな発現誘導は、培養開始96時間まで継続して認められた。一方、Loucy細胞を10%FBS (Fetal bovine serum)、0.45%D-glucose、1mMピルビン酸ナトリウム、1mMHEPESを含むRPMI1640培地に懸濁し、 1×10^6 cells/wellになるように、6 well培養プレートに播種し、これと同時にTPAとアイオノマイシン (ionomycin) を最終濃度がそれぞれ0.05 μ g/mL、0.5 μ g/mLとなるように添加し、培養開始後24時間、48時間、72時間、96時間において細胞を回収した。これら回収した細胞を用いて、定法のウェスタンブロット法にてBAFF蛋白質の発現を検討した。この結果、図2に示されるように、TPAとアイオノマイシン (ionomycin) による刺激を受けたLoucy細胞において、刺激後24時間からヒトBAFFに該当する34kDaのバンドが確認され、この明らかな発現誘導は、培養開始96時間まで継続して認められた。これらの結果より、Loucy細胞を抗CD3抗体又はTPAとアイオノマイシン (ionomycin) によって刺激培養することにより、安定したBAFF蛋白質の発現誘導が培養開始96時間後まで認められ、この培養系を用いて、BAFF蛋白質発現抑制、あるいは阻害物質のスクリーニングが可能となることがわかった。

[0031] 参考例1

抗ヒトBAFFモノクローナル抗体(4H4)の作製

実施例3に用いる抗ヒトBAFFモノクローナル抗体(4H4)は、以下のようにして作製した。即ち、配列表の配列番号3に示したBAFFの285個のアミノ酸から細胞外ドメインの膜近傍に該当する13アミノ酸(配列番号4)を選択し、MBS法を用いてKLHとコンジュゲートし、抗原とした。100 μ lの1mg/mL抗原ペプチド生理食塩水溶液を、フロイント完全アジュバントでエマルジョン化し、マウス(Balb/c, 6週齢)腹腔内に免疫した。2週間後に100 μ lの1mg/mL抗原ペプチド生理食塩水溶液、フロイント完全アジュバントを超音波処理によってエマルジョン化したものを追加免疫し、以降2週間毎に追加免疫を2回行った。初回免疫後2ヶ月目に脾臓を摘出し、RPMI 1640培地(ペニシリン、ストレプトマイシン入り)中でリンパ球を分離した。分離したリンパ球をポリエチレングリコール(PEG)法によりマウス骨髓腫由来のミエローマ細胞P3U1

株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。ハイブリドーマ細胞をフィーダー細胞入りのHAT培地に懸濁し96穴プレート(Greiner)に分注し15日間培養した。ハイブリドーマ細胞を培養したウェルから培養上清を回収し、ELISA法(enzyme-linked immunosorbent assay)によって抗原ペプチドと反応がある抗体産生細胞を選択した。即ち、まず96穴プレートに50 μ lの10 μ g/mL抗原ペプチドをしき、4°C、一晩底面に吸着させた後、100 μ lの2%BSA/PBSで37°C、2時間ブロッキングさせた。ハイブリドーマ細胞の上清100 μ lを4°C、1晩反応させた後、HRP標識抗マウスIgGを1000倍希釈して37°C、1時間反応させ、オルトフェニレンジアミンを基質に用いて発色させた。50 μ lの2N硫酸で反応を停止させた後、492nmの吸光度を測定して1.0以上の値が得られたハイブリドーマを選択し、限界希釈法によるクローニングを行った。

[0032] 7日前、3日前にそれぞれ0.5mlのプリスタンを腹腔内投与したマウス(Balb/c)に、選択したハイブリドーマ細胞を腹腔内注射し、約10日後に腹水を採取した。採取した腹水は室温で30分おいた後、4°Cで一晩静置し、15Krpm、10分間遠心して上清を回収し、マウスIgG画分をプロテインA-Sepharoseカラムにて分離精製した。

以上の方法にて、抗ヒトBAFF抗体(4H4、アイソタイプはIgG1)を産生するハイブリドーマ細胞株、並びに該抗体(4H4)を得た。得られた4H4、及び対照としてChemicon製ウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(AB16530:図3中、Chemと表記)を、常法のウェスタンブロッティング法にてリコンビナントのヒトBAFF(Chemicon製)の検出に用いた結果、図3に示すように可溶性ヒトBAFFに該当する17KDaのバンドが確認された。

実施例 3

[0033] Loucy細胞又はJurkat細胞をTPAとアイオノマイシン(ionomycin)により刺激した時のBAFFの産生

実施例1と同様に、懸濁したLoucy細胞又はJurkat細胞を 1×10^6 cells/wellになるように、6 well培養プレートに播種した。これと同時にTPAとアイオノマイシン(ionomycin)を最終濃度がそれぞれ0.05 μ g/mL、0.5 μ g/mLとなるように添加し、培養開始後5時間、24時間、48時間、72時間(Loucy細胞)又は1、4、7日(Jurkat細胞)で培養上清を回収した。これらの培養上清中に含有される細胞から産生されたBAF

Fを、市販のウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(Chemicon社 Cat. No. AB16530)と上記参考例1で作製したマウス抗ヒトBAFFモノクローナル抗体(4H4)を用いたELISA法にて測定した。ELISA法は次に記載した方法で行った。即ち、1次抗体としてウサギ抗ヒトBAFFポリクローナル抗体(Chemicon社 Cat. No. AB16530)を用い、96穴プレートに1 μ g/wellで4℃一晩コーティングした。0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄後BlockAce(大日本製薬社)を150 μ L/well加え、37℃、2時間反応させた。0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄後、検体50 μ L及びビオチン標識した4H4を50 μ L(8ng/mL)加え、室温にて2時間反応させた。0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄後、0.05%Tween20を含むPBSで1000倍に希釈したstreptavidin標識HRP(Horse RADish peroxidase)を50 μ L添加し、室温にて30分反応させた。0.05%Tween20を含むPBSで5回洗浄後TMB One Solution(Clontech社)を50 μ L加え、5分間室温にて反応させた後、1N HCl 50 μ Lを添加後プレートリーダー(PerkinElmer製)で450nmの吸光度を測定した。標準物質としてリコンビナントのヒトBAFF(Chemicon社 Cat. No. GF119)を用い、標準曲線から検体中のBAFF濃度を測定した。

- [0034] Loucy細胞を用いた場合の結果をグラフ化して図4に示し、Jurkat細胞を用いた場合の結果を同様にグラフ化して図5に示す。それぞれのグラフにおける縦軸はBAFF濃度(ng/mL)を示し、それぞれの棒グラフの左側はTPAとアイオノマイシン(ionomycin)による刺激を行わなかった場合のBAFF濃度をコントロールとして示している。この結果、図4及び図5に示されるように、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)刺激を受けたLoucy細胞又はJurkat細胞において、刺激後5時間又は1日から培養上清中のBAFFが検出でき、培養開始72時間又は7日まで継続して認められた。これらの結果より、Loucy細胞又はJurkat細胞をTPAとアイオノマイシン(ionomycin)によって刺激培養することにより、安定したBAFF産生誘導が認められ、この培養系を用いて、BAFF産生抑制物質、あるいは阻害物質のスクリーニングが可能となることが判明した。

産業上の利用可能性

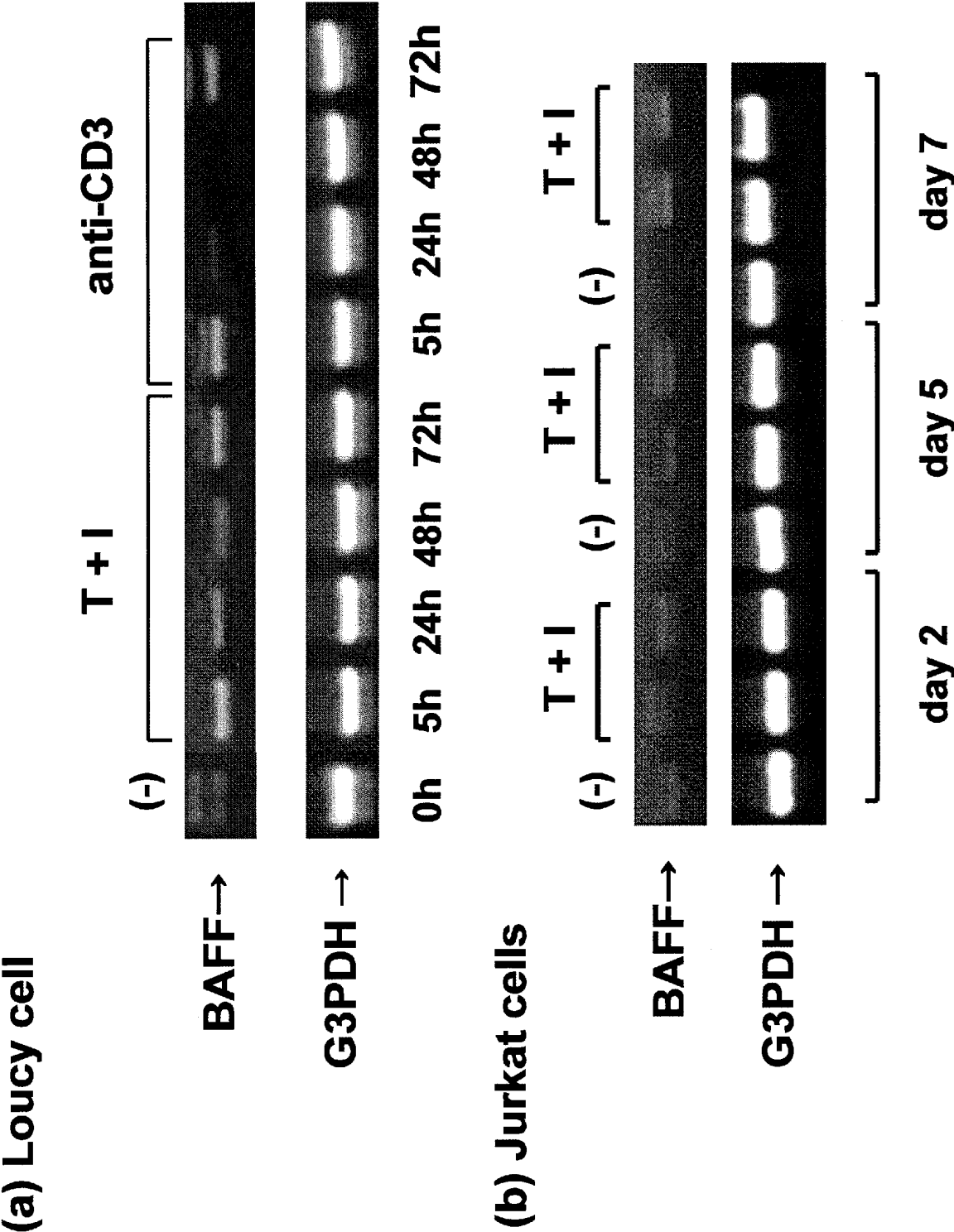
- [0035] 本発明は、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症

候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患との関係が明らかにされてきているBAFFの産生を培養ヒトT細胞において誘発する方法を提供し、自己免疫疾患の治療や予防に有効な新しい物質をスクリーニングするための手法を提供するものであり、産業上の利用可能性がある。

請求の範囲

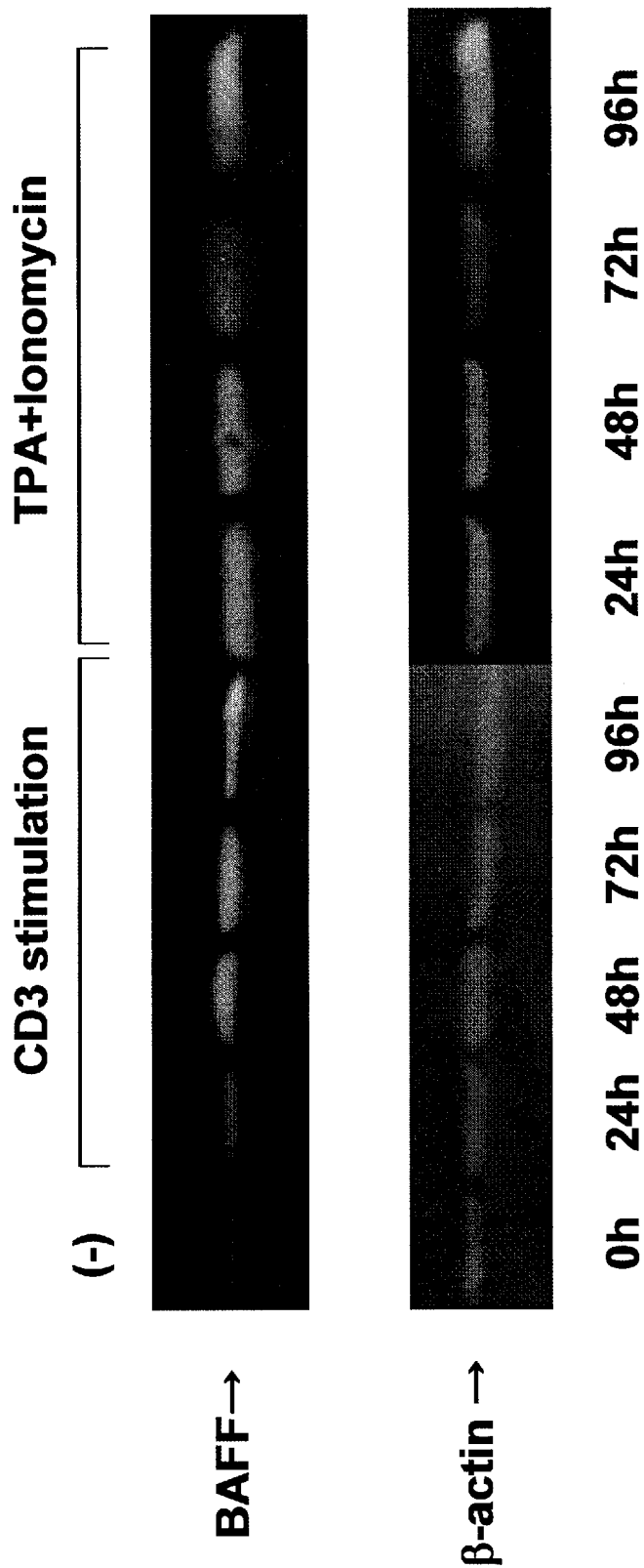
- [1] 培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加して、当該細胞のBAFFの産生を誘発する方法。
- [2] 培養ヒトT細胞が、Loucy細胞である請求項1に記載の方法。
- [3] 培養ヒトT細胞が、Jurkat細胞である請求項1に記載の方法。
- [4] 培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFF産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、BAFFの発現又は活性を制御することができる物質をスクリーニングする方法。
- [5] BAFFの発現又は活性の制御が、BAFFの発現又は活性の抑制又は阻害である請求項4に記載の方法。
- [6] 培養ヒトT細胞が、Loucy細胞である請求項4に記載の方法。
- [7] 培養ヒトT細胞が、Jurkat細胞である請求項4に記載の方法。
- [8] 培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFF産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群(SS)、自己免疫性糖尿病、AIDS又はB細胞の活性化を伴う自己免疫疾患等の自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。
- [9] 培養ヒトT細胞が、Loucy細胞である請求項8に記載の方法。
- [10] 培養ヒトT細胞が、Jurkat細胞である請求項8に記載の方法。
- [11] TPAとアイオノマイシン(ionomycin)との組み合わせ及び／又は抗CD3抗体を含有してなるBAFF産生細胞に対するBAFFの産生誘発剤。
- [12] BAFF産生細胞が、培養ヒトT細胞である請求項11に記載のBAFF産生誘発剤。
- [13] 培養ヒトT細胞が、Loucy細胞である請求項12に記載の産生誘発剤。
- [14] 培養ヒトT細胞が、Jurkat細胞である請求項12に記載の産生誘発剤。

[図1]



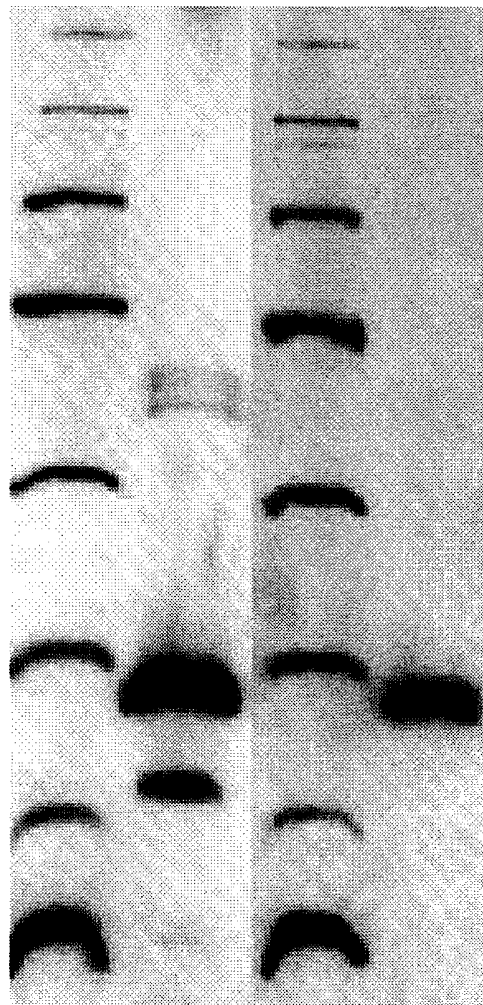
[図2]

Induction of BAFF in Loucy upon stimulation



[図3]

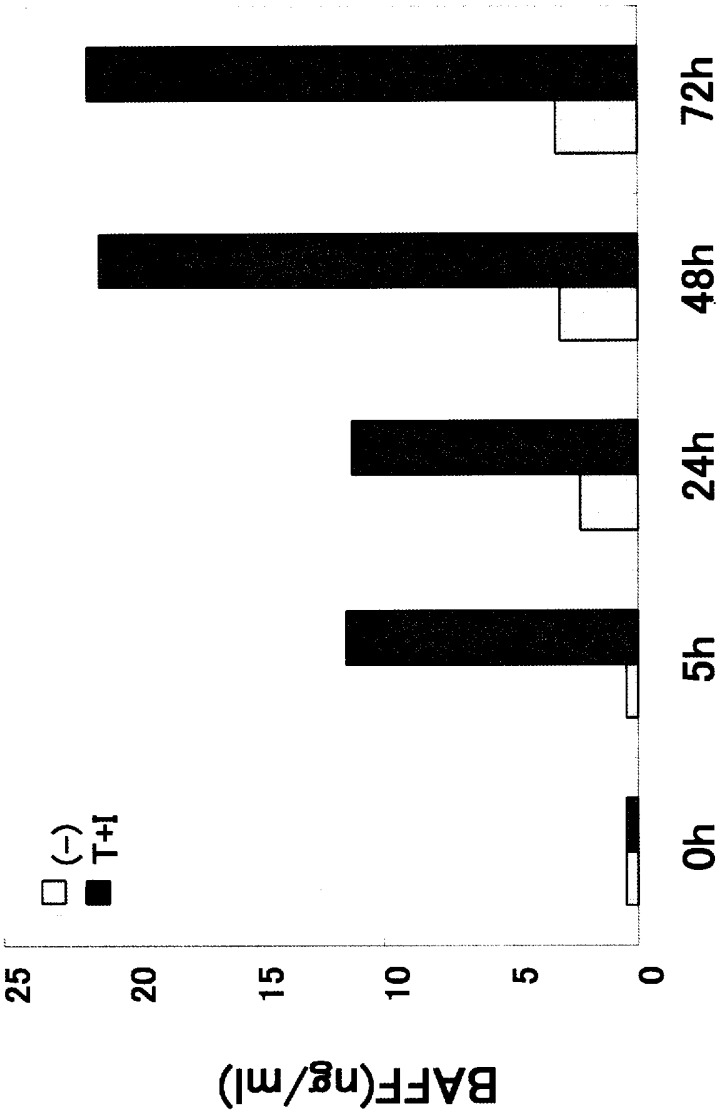
BAFF→



Chem 4H4

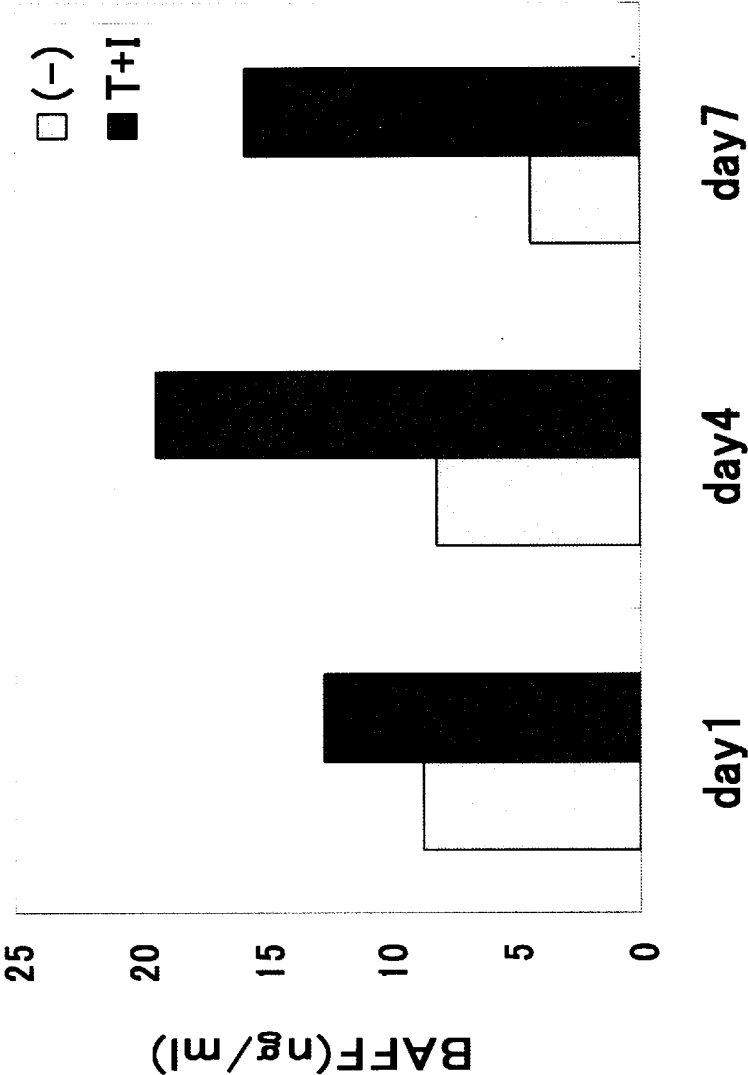
[図4]

**Production of BAFF from Loucy
stimulated with TPA and Ionomycin**



[図5]

Production of BAFF from Jurkat cells



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01),
A61K31/341 (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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)

C12Q1/02 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01),
A61K31/341 (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), C.Aplus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	SHU, H.B. et al., "TALL-i is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens", Journal of leukocyte biology, (1999), Vol.65, No.5, pages 680 to 683, full text	<u>1, 3, 4, 5, 7</u> <u>1-14</u>
Y	MOORE, P.A. et al., "BLyS: Member of the Tumor Necrosis Factor Family and B Lymphocyte Stimulator", SCIENCE, (1999), Vol.285, No.5425, pages 260 to 263, full text	4-10
Y	BEN-BASSAT, H. et al., "Establishment of a human T-Acute Lymphoblastic leukemia Cell Line with a (16:20) Chromosome Translocation", Cancer Genet.Cytogenet., (1990), Vol.49, No.2, pages 241 to 248, full text	2, 6, 9, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
 07 December, 2005 (07.12.05)

Date of mailing of the international search report
 20 December, 2005 (20.12.05)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016888

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUARD, B. et al., "BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation", Int.Immunol., (March, 2004), Vol.16, No.3, pages 467 to 475, full text	1-14
Y	KHARE, S.D. et al., "Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice", Proc.Natl.Acad.Sci., USA, (2000), Vol.97, No.7, pages 3370 to 3375, full text	8-10
A	WU, D. et al., "Expression of THANK in human PBMC activated with different stimulator", Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi, (2001), Vol.17, No.4, pages 304 to 306, full text	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016888

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as claimed in claims 1 to 14 are classified into four general inventive concepts, i.e., a general inventive concept relating to "a method of inducing BAFF production by a cultured human T cell by adding a combination of TPA with ionomycin to the cell"; a general inventive concept relating to "a method of inducing BAFF production by a cultured human T cell by adding an anti-CD3 antibody to the cell"; a general inventive concept relating to "a method of inducing BAFF production by a cell by adding an anti-CD3 antibody to a cultured human T cell which is a Jurkat cell"; and a general inventive concept relating to "a method of screening a preventive/remedy for an autoimmune disease which comprises adding a test substance (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

In claims 1 to 14, the parts relating to "the induction of BAFF production by a cultured human T cell by adding a combination of TPA with ionomycin to the cell".

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016888

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

to a BAFF-production system prepared by adding an anti-CD3 antibody to a cultured human T cell and measuring the expression amount and/or the activity of BAFF in the BAFF-production system".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. **C12Q1/02** (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01),
A61K31/341 (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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. **C12Q1/02** (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01),
A61K31/341 (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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

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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
 CAplus (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 請求の範囲の番号
X -----	SHU,H.B. et al., "TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens",	1,3,4,5,7 -----
Y	Journal of leukocyte biology, (1999), Vol.65, No.5, pp.680-683, 全文	1-14
Y	MOORE,P.A. et al., "BLyS: Member of the Tumor Necrosis Factor Family and B Lymphocyte Stimulator", SCIENCE, (1999), Vol.285, No.5425, pp.260-263, 全文	4-10

☒ 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

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 7 . 1 2 . 2 0 0 5

国際調査報告の発送日

2 0 . 1 2 . 2 0 0 5

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)

伏見 邦彦

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

4 B

3 3 3 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	BEN-BASSAT,H. et al., “Establishment of a human T-Acute Lymphoblastic leukemia Cell Line with a (16;20) Chromosome Translocation”, Cancer Genet.Cytogenet., (1990), Vol.49, No.2, pp.241-248, 全文	2,6,9,13
Y	HUARD,B. et al., “BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation”, Int.Immunol., (MAR,2004), Vol.16, No.3, pp.467-475, 全文	1-14
Y	KHARE,S.D. et al., “Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice”, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, (2000), Vol.97, No.7, pp.3370-3375, 全文	8-10
A	WU,D. et al., “Expression of THANK in human PBMC activated with different stimulator” Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi, (2001), Vol.17, No.4, pp.304-306, 全文	1-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-14に記載の発明は、「培養ヒトT細胞に、TPAとアイオノマイシンとの組合せを添加して、当該細胞のBAFFの産生を誘発する方法」に係る一般的発明概念、「培養ヒトT細胞に、抗CD3抗体を添加して、当該細胞のBAFFの産生を誘発する方法」に係る一般的発明概念、「抗CD3抗体を添加して、BAFFの産生を誘発する培養ヒトT細胞がJurkat細胞である、細胞のBAFFの産生を誘発する方法」に係る一般的発明概念、「培養ヒトT細胞に、抗CD3抗体を添加したBAFFの産生系に、被検物質を添加して、当該BAFFの産生系におけるBAFFの発現量及び／又はその活性量を測定することからなる、自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法」に係る一般的発明概念の4つに分類される。

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

請求の範囲 1-14 のうち、「培養ヒト T 細胞に、TPA とアイオノマイシンとの組合せを添加した、当該細胞の BAFF の産生の誘発」に関する部分。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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