(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11月7日(07.11.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/228384 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/545 (2015.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/016734

(22) 国際出願日： 2024年4月30日(30.04.2024)

(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 2023-075353 2023年4月30日(30.04.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP). 住友ファーマ株式会社 (**SUMITOMO PHARMA CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町二丁目６番８号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 清野 研一郎 (**SEINO Ken-ichro**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 鎌谷 智紀(**KAMATANI Tomoki**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

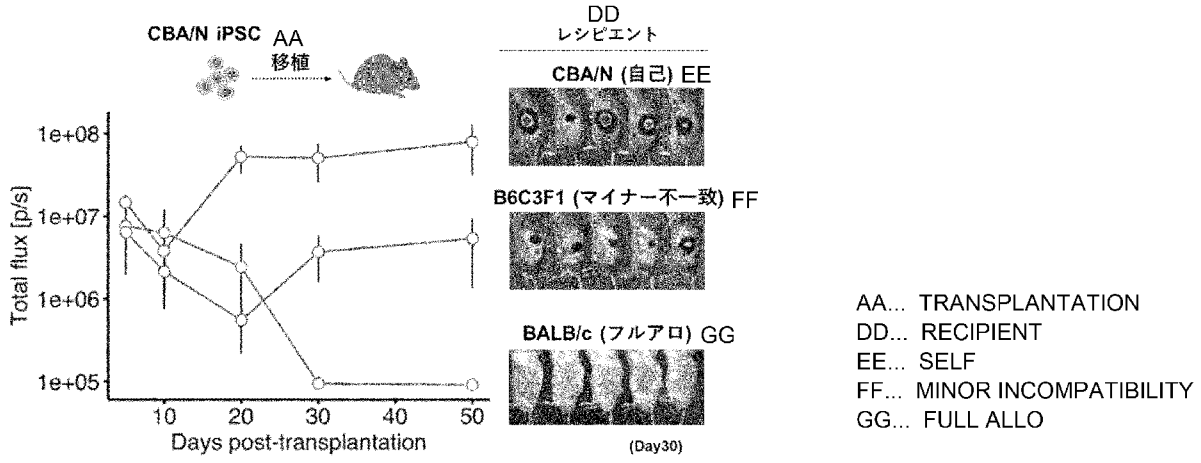
(74) 代理人: 弁理士法人ＩＰアシスト(**IP-ASSIST PATENT PARTNERS**); 〒0600002 北海道札幌市中央区北２条西３丁目１番地 太陽生命札幌ビル７階 Hokkaido (JP).

(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,

(54) **Title:** COMPOSITION FOR INDUCING IMMUNE TOLERANCE

(54) 発明の名称： 免疫寛容誘導用組成物

[図1]



(57) **Abstract:** The present invention provides a composition for inducing immune tolerance, the composition containing: pluripotent stem cells that have the ability to form teratoma cells; or teratoma cells derived from the pluripotent stem cells. The present invention also provides a method for inducing immune tolerance in a mammalian individual, the method including administering an effective amount of the pluripotent stem cells or the teratoma cells to a mammal individual for which immune tolerance is desired. By inducing immune tolerance in a mammalian individual by an immune-tolerance-inducing composition and an immune tolerance inducer, autoimmune diseases can be treated and allogeneic transplantation can be performed under a condition in which a reduced amount of an immunosuppressant is used compared to the amount conventionally used, or under a condition in which no immunosuppressant is used.

WO 2024/228384 A1

[続葉有]

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

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

添付公開書類:

— 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:本発明は、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマ細胞を含有する免疫寛容誘導用組成物を提供する。本発明はまた、前記多能性幹細胞又は前記テラトーマ細胞の有効量を免疫寛容が望まれる哺乳動物個体に投与することを含む哺乳動物個体において免疫寛容を誘導する方法を提供する。免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤によって哺乳動物個体に免疫寛容を誘導することで、従来よりも免疫抑制剤を低減した条件又は免疫抑制剤を不使用な条件で、同種異系移植を行うことができ、また、自己免疫疾患を治療することができる。

明　細　書

発明の名称 ： 免疫寛容誘導用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、免疫寛容を誘導するための組成物及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 同種移植において、レシピエントの免疫機構がドナー由来の移植物を異物と認識することによって生じる拒絶反応の制御は、治療の成否を左右する重要な課題である。誘導多能性幹細胞（iPS細胞）及び胚性幹細胞（ES細胞）といった多能性幹細胞を利用した移植医療においても、多能性幹細胞又は多能性幹細胞由来の細胞を同種異系のレシピエントに移植した場合、主要組織適合性抗原（MHC）ハプロタイプが全く一致しないレシピエントのみならず、MHCハプロタイプが完全に一致するレシピエントにおいても免疫学的に拒絶されることが報告されている（例えば非特許文献１～３）。

[0003] 拒絶反応を制御するための主なアプローチは、シクロスポリン、タクロリムス等の薬剤投与によるレシピエントの免疫応答抑制である。しかしながら、免疫抑制剤は、免疫抑制によって感染症や悪性腫瘍を発生させたり、さらには長期服用によって腎毒性、高血圧、高脂血症、糖尿病等の合併症を引き起こしたりすることがあるため、免疫抑制剤によらない、又は免疫抑制剤の使用量を低減した、新たな拒絶反応制御手段が求められている。

[0004] 同種移植においてレシピエントの拒絶反応を制御し得る手段として、免疫寛容誘導が注目されており、例えば、制御性T細胞（regulatory T cells, Tregとも称される）を有効成分として含有する免疫寛容誘導用の免疫調節剤（特許文献１）、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれらの混合物を寛容原有効成分とする免疫寛容誘導剤（特許文献２）、ドナー由来のB細胞又は樹状細胞を移植前のレシピエントに投与することで、同種移植における組織定着率が改善されること（非特許文献４及び５）等が報告されている。また、多能性幹細胞から分化させた免疫制御能を持つ細胞を免疫寛容誘導に利用しようと

するアプローチも報告されている（非特許文献６）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2006/107101

特許文献2：特開平11-180892号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Mizukami Y et al., PLOS One, 2014, 9(6): e98319.

非特許文献2：Kawamura A. et al., Scientific Reports, 2016, 6:19464.

非特許文献3：Ishigaki H et al., Cell Transplant., 2021, 30: 0963689721992066.

非特許文献4：Gao J. et al., PLOS One, 2013, 8 (10): e77761.

非特許文献5：Yamano T. et al., blood, 2011, 117 (9): 2640-2648.

非特許文献6：Sasaki H. et al, Transplantation, 2015, 99(11): 2301-2310.

発明の概要

[0007] 本発明者らは、多能性幹細胞との間でMHC適合性がある同種異系レシピエントにおいて、免疫抑制剤を使用しなくても、移植された多能性幹細胞は拒絶されずにテラトーマを形成すること、及び多能性幹細胞の移植によって免疫寛容が誘導されることを見出した。

[0008] 本開示は以下の発明を提供する。

項１．テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマを含有する、免疫寛容誘導用組成物。

項２．多能性幹細胞が、CD24を発現する、項１に記載の組成物。

項３．テラトーマが、CD24を発現する、項１又は２に記載の組成物。

項４．テラトーマが、エリスロポエチン産生能を有する、項１～３のいずれか一項に記載の組成物。

項５．テラトーマが、制御性T細胞を集積又は浸潤させる能力を有する、項１

～４のいずれか一項に記載の組成物。

項６．多能性幹細胞が、胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞である、項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

項７．多能性幹細胞との間でMHC適合性がある哺乳動物個体に対して用いるための、項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

項８．ドナー由来細胞、組織又は臓器の移植を受けるレシピエントに対して用いるための、項１～７のいずれか一項に記載の組成物。

項９．多能性幹細胞が、ドナーに由来する、項８に記載の組成物。

項１０．レシピエントが、ドナーとの間でMHC適合性がある、項８又は９に記載の組成物。

項１０Ａ．自己免疫疾患を有する哺乳動物個体に対して用いるための、項１～７のいずれか一項に記載の組成物。

項１１．テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、免疫寛容が望まれる哺乳動物個体に投与することを含む、哺乳動物個体において免疫寛容を誘導する方法。

項１１Ａ．多能性幹細胞が、CD24を発現する、項１１に記載の方法。

項１１Ｂ．テラトーマが、CD24を発現する、項１１又は１１Ａに記載の方法。

項１１Ｃ．テラトーマが、エリスロポエチン産生能を有する、項１１、１１Ａ又は１１Ｂに記載の方法。

項１１Ｄ．テラトーマが、制御性T細胞を集積又は浸潤させる能力を有する、項１１、１１Ａ～１１Ｃのいずれか一項に記載の方法。

項１１Ｅ．多能性幹細胞が、胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞である、項１１、１１Ａ～１１Ｄのいずれか一項に記載の方法。

項１１Ｆ．多能性幹細胞との間でMHC適合性がある哺乳動物個体に対して用いるための、項１１、１１Ａ～１１Ｅのいずれか一項に記載の方法。

項１１Ｇ．ドナー由来細胞、組織又は臓器の移植を受けるレシピエントに対して用いるための、項１１、１１Ａ～１１Ｆのいずれか一項に記載の方法。

項１１Ｈ．多能性幹細胞が、ドナーに由来する、項１１Ｇに記載の方法。

項１１Ｉ．レシピエントが、ドナーとの間でMHC適合性がある、項１１Ｇ又は１１Ｈに記載の方法。

項１２．テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、レシピエントに投与すること、及びレシピエントにドナー由来細胞、組織又は臓器を移植することを含む、レシピエントにおけるドナー由来細胞、組織又は臓器の生着率を向上させる方法。

項１２Ａ．多能性幹細胞が、CD24を発現する、項１２に記載の方法。

項１２Ｂ．テラトーマが、CD24を発現する、項１２又は１２Ａに記載の方法。

項１２Ｃ．テラトーマが、エリスロポエチン産生能を有する、項１２、１２Ａ又は１２Ｂに記載の方法。

項１２Ｄ．テラトーマが、制御性T細胞を集積又は浸潤させる能力を有する、項１２、１２Ａ～１２Ｃのいずれか一項に記載の方法。

項１２Ｅ．多能性幹細胞が、胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞である、項１２、１２Ａ～１２Ｄのいずれか一項に記載の方法。

項１２Ｆ．レシピエントが、多能性幹細胞との間でMHC適合性がある、項１２、１２Ａ～１２Ｅのいずれか一項に記載の方法。

項１２Ｇ． 多能性幹細胞が、ドナーに由来する、項１２、１２Ａ～１２Ｆのいずれか一項に記載の方法。

項１２Ｈ．レシピエントが、ドナーとの間でMHC適合性がある、項１２、１２Ａ～１２Ｇのいずれか一項に記載の方法。

項１２Ｉ．多能性幹細胞又はテラトーマの投与と、ドナー由来細胞、組織又は臓器の移植が、同時に、又は1日以内の間隔を空けて行われる、項１２、１２Ａ～１２Ｈのいずれか一項に記載の方法。

項１２Ｊ．多能性幹細胞又はテラトーマの投与の後、1日超の間隔を空けてドナー由来細胞、組織又は臓器の移植が行われる、項１２、１２Ａ～１２Ｈのいずれか一項に記載の方法。

項１３．テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、自己免疫疾患を有する哺乳動物個体に投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法。

項１３Ａ．多能性幹細胞が、CD24を発現する、項１３に記載の方法。

項１３Ｂ．テラトーマが、CD24を発現する、項１３又は１３Ａに記載の方法。

項１３Ｃ．テラトーマが、エリスロポエチン産生能を有する、項１３、１３Ａ又は１３Ｂに記載の方法。

項１３Ｄ．テラトーマが、制御性T細胞を集積又は浸潤させる能力を有する、項１３、１３Ａ～１３Ｃのいずれか一項に記載の方法。

項１３Ｅ．多能性幹細胞が、胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞である、項１３、１３Ａ～１３Ｄのいずれか一項に記載の方法。

項１３Ｆ．自己免疫疾患を有する哺乳動物個体が、多能性幹細胞との間でMHC適合性がある、項１３、１３Ａ～１３Ｅのいずれか一項に記載の方法。

項１４．テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量と、ドナー由来の細胞、組織又は臓器とを含む、移植医療用キット。

[0009] 本発明によれば、免疫寛容の誘導が望まれる哺乳動物個体において免疫寛容を誘導することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ルシフェラーゼ発現CBA/Nマウス由来iPS細胞（Luc-CBA-iPS）を皮下接種したレシピエントマウス（CBA/N、B6C3F1、BALB/c）の接種部位におけるルシフェラーゼの発光量を示すグラフである。グラフは平均値±標準誤差を示している。

[図2]CBA/Nマウス由来iPS細胞（CBA-iPS）を皮下接種したレシピエントマウス（B6C3F1）の移植部位に形成された腫瘤の外観及び組織染色画像である。

[図3]CBA-iPSを皮下接種したレシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（B6C3F1、CBA/N、BALB/c）皮膚片の生着期間を示すグラフである

。グラフの横軸は、皮膚移植日から拒絶日までの期間を表す（皮膚片の生着期間を示す全てのグラフにおいても同様）。

[図4]CBA/Nマウス由来ES細胞（CBA-ES）を皮下接種したレシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（B6C3F1、BALB/c、129X1、CBA/N）皮膚片の生着期間を示すグラフである。

[図5]レシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（B6C3F1、BALB/c、CBA/N）皮膚片の生着期間を示すグラフである。図５のAは無処置のレシピエントマウス、B～Cはそれぞれ皮膚移植の同日、10日前にCBA-iPSを皮下接種したレシピエントマウスの結果を示す。

[図6]レシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（B6C3F1、BALB/c、CBA/N）皮膚片の生着期間を示すグラフである。図６のA～Cはそれぞれ皮膚移植の20日前、30日前、40日前にCBA-iPSを皮下接種したレシピエントマウスの結果を示す。

[図7]レシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（B6C3F1、BALB/c、CBA/N）皮膚片の生着期間を示すグラフである。図７Aは皮膚移植の40日前にCBA-iPSを皮下接種し、皮膚移植の20日前に形成されたテラトーマを切除したレシピエントマウス、図７Bは皮膚移植の40日前にCBA-iPSを皮下接種し、皮膚移植の20日後に形成されたテラトーマを切除したレシピエントマウスの結果を示す。

[図8]Luc-CBA-iPSを皮下接種したB6C3F1マウスから採取したテラトーマ、脾臓、テラトーマの流入領域リンパ節、テラトーマの遠隔リンパ節におけるルシフェラーゼの発光を示す画像である。

[図9]CBA-iPS（図９右）、及びCBA-iPSを皮下接種したB6C3F1マウスにおいて形成されたテラトーマ細胞集団（図９左）のフローサイトメトリー解析結果を示すドットプロットである。各プロット右上の数字は、CD24陽性細胞の割合（CD45陰性の生細胞集団に占める四角枠内に含まれる細胞数の割合）を示す。

[図10]レシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（BALB/c、C

BA/N、B6C3F1）皮膚片の生着期間を示すグラフである。図１０Aは無処置のレシピエントマウス、図１０Bは皮膚移植の前にCBA-iPSを皮下接種したレシピエントマウス、図１０Cは皮膚移植の前にCd24aをノックアウトしたCBA-iPSを皮下接種したレシピエントマウスの結果を示す。

[図11]CBA-iPS、B6C3F1マウスの卵巣、CBA-iPSを皮下接種したB6C3F1マウスに形成されたテラトーマ（皮下接種20日後、40日後）におけるエリスロポエチンの遺伝子発現量を示すグラフである。グラフは平均値±標準誤差を示している。

[図12]B6C3F1マウスの腎臓、CBA-iPSを皮下接種したB6C3F1マウスにおいて形成されたテラトーマ（皮下接種20日後、40日後）の、抗エリスロポエチン抗体を用いた免疫組織染色画像（上段）及び光学顕微鏡観察画像（下段）である。

[図13]レシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（CBA/N）皮膚片の、エリスロポエチン投与下での生着期間を示すグラフである。

[図14]CBA-iPSを皮下接種したC3H/lprマウスの血中抗dsDNA-IgG濃度（図１４A）及びリンパ節重量（図１４B）を示すグラフである。プロットは各個体の実測値を、グラフは平均値±標準誤差を示している。TukeyのHSD検定により統計解析を行った。*p<0.05、**p<0.01を表す。

[図15]CBA-iPSを皮下接種したB6C3F1マウスにおいて形成されたテラトーマに浸潤する制御性T細胞（Treg）のシングルセルRNA解析結果を示す。図１５Aは、Tregを遺伝子発現情報に基づいてクラスタリングしたプロット図である。図１５Bは、Tregの各クラスターのマーカー遺伝子を示すヒートマップである。図１５Cは、Tregにおける免疫抑制因子（Il10, Il2ra, Clta4, Entpd1, Nt5e）の遺伝子発現を示す。図１５Dは、テラトーマにおけるTregの各クラスターの存在比率を経時的に示したバーグラフである。

[図16]レシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（CBA/N）皮膚片の、抗CD25抗体又はControl IgG投与下での生着期間を示すグラフである。

[図17]レシピエントマウス（B6C3F1）に移植されたドナーマウス（CBA/N）皮膚片の生着期間を示すグラフである。図１７に示される全ての試行において、CBA-iPSの皮下接種と皮膚移植は同日に実施した。

発明を実施するための形態

[0011] 以下に示す説明は、代表的な実施形態又は具体例に基づくことがあるが、本発明はそのような実施形態又は具体例に限定されるものではない。本明細書において示される各数値範囲の上限値及び下限値は、任意に組み合わせることができる。また、本明細書において「～」又は「-」を用いて表される数値範囲は、特に断りがない場合、その両端の数値を上限値及び下限値として含む範囲を意味する。

[0012] 本開示は、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマを含有する免疫寛容誘導用組成物を提供する。本開示はまた、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマを含有する免疫寛容誘導剤を提供する。

[0013] 本開示において、多能性幹細胞とは、自己複製能と、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に属する細胞系列すべてに分化し得る能力である多能性（pluripotency）とを有する細胞をいう。多能性幹細胞としては、iPS細胞、ES細胞、胚性生殖幹細胞（EG細胞）等を挙げることができる。本開示において用いられる多能性幹細胞は、好ましくはiPS細胞又はES細胞であり、より好ましくはiPS細胞である。

[0014] 本開示において用いられる多能性幹細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞であり、免疫寛容の誘導が望まれる個体と同種の哺乳動物個体に由来する多能性幹細胞であることが好ましい。

[0015] 本開示における哺乳動物は、ヒト及び非ヒト哺乳動物であり、非ヒト哺乳動物の例としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモットを含むげっ歯類、サル、チンパンジーを含む霊長類、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジを含む家畜、イヌ、ネコを含む愛玩動物等を挙げることができる。好ましい哺乳動物はマウス又はヒトであり、より好ましくはヒトである。

[0016] iPS細胞は、当業者に知られた初期化方法によって作製することができる。初期化方法の一例は、体細胞、例えば線維芽細胞、血球系細胞（例えば末梢血由来単核細胞）等に、初期化因子と称される遺伝子又はそれにコードされるタンパク質、例えばOct 3/4、Sox 2、Klf 4及びMyc（c-Myc、N-Myc、L-Myc）の4種の遺伝子を導入し、適切な条件下で培養することで多能性を有する細胞を誘導する方法である。初期化方法の別の例は、上記遺伝子を低分子化合物等の薬剤で代用する方法（例えば、Hou P. et al., 2013, Science, 9; 341(6146), 651-4）や、マイクロRNAを用いる方法（Miyoshi N. et al., Cell Stem Cell, 2011, 8, 633-638）である。

[0017] ES細胞は、例えば、着床前の胚盤胞期胚に存在する内部細胞塊を、フィーダー細胞上で、又はLIF若しくはFGF2を含む培地中で培養することによって作製することができる。なお、ヒト胚性幹細胞としては、受精１４日以内のヒト胚から樹立されたものが挙げられる。

[0018] 本開示においては、細胞バンクから分譲されている多能性幹細胞、市販されている多能性幹細胞を用いることもできる。例えば、京都大学で樹立された201B7細胞、201B7-Ff細胞、253G1細胞、253G4細胞、1201C1細胞、1205D1細胞、1210B2細胞、1231A3細胞等のヒト誘導多能性幹細胞株が、京都大学及びｉＰＳアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。

[0019] 多能性幹細胞は、フィーダー細胞の存在下で作製し、維持培養し、拡大培養することができる。フィーダー細胞は、多能性幹細胞の未分化維持培養の際に用いられる、当該多能性幹細胞以外の細胞であり、例えばマウス線維芽細胞（MEF）、ヒト線維芽細胞、SNL細胞等を挙げることができる。フィーダー細胞は、例えばマイトマイシンC等の増殖抑制剤、ガンマ線照射等の増殖抑制処理を施してから使用することが好ましい。

[0020] 多能性幹細胞はまた、フィーダー細胞の非存在下（フィーダーフリー）で作製し、維持培養し、拡大培養することもできる。フィーダーフリーは、フィーダー細胞を添加しない、又はフィーダー細胞が実質的に含まれない条件である。フィーダーフリー培養のための培地としては、例えばEssential 8培

地、Essential 6培地、TeSR培地、mTeSR培地、mTeSR-E8培地、Stabilized Essential 8培地、StemFit（登録商標）等を挙げることができる。

[0021] また、特に指示がないかぎり、本開示における細胞の培養は、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、αMEM培地、DMEM培地、F-12培地、DMEM/F12培地、IMDM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer’s培地又はこれらの混合培地等を用いて行うことができる。

[0022] 本開示において用いられる多能性幹細胞は、未分化性を維持しており、かつテラトーマ形成能を有する。

[0023] 多能性幹細胞の未分化性は、未分化マーカーの発現を検出することで、確認することができる。未分化マーカーとしては、例えば、Oct3/4、Nanog、TRA-1-60、SSEA1、SSEA4、TRA-1-81、TRA-2-49、Rex-1等を挙げることができ、これらのうち1つ以上、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上のマーカーの発現が検出された場合、多能性幹細胞は未分化性を維持していると判定することができる。

[0024] 本開示において、マーカーの発現は、マーカー遺伝子又はマーカータンパク質の発現を検出又は測定することで確認することができる。遺伝子発現は、対象遺伝子の塩基配列情報を利用したハイブリダイゼーション、PCR、RNA-Seqといった一般的な方法によって検出し、測定することができる。また、タンパク質発現は、対象タンパク質に対する特異抗体を用いたELISA、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリーといった一般的な方法によって検出し、測定することができる。

[0025] 多能性幹細胞の未分化性は、三胚葉（内胚葉・中胚葉・外胚葉）への分化能の評価によって確認することもできる。例えば、in vitroで多能性幹細胞から形成させた胚様体（Embryoid Body; EB）に内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞が含まれる場合、多能性幹細胞は三胚葉への分化能を有しており、したがって未分化性を維持していると判定することができる。また例えば、in vitroで多能性幹細胞を内胚葉分化用培地、中胚葉分化用培地、外胚葉分化用培

地の各々に播種し、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞への分化が認められた場合、多能性幹細胞は三胚葉への分化能を有しており、したがって未分化性を維持していると判定することができる。各胚葉の細胞の存在は、細胞形態の観察や、外胚葉マーカー（B-III tubulin、PAX6, MAP2、TUJ1、NESTIN等）、中胚葉マーカー（Brachyury、MSX1、αSMA、NCAM等）、内胚葉マーカー（SOX17、AFP、FOXA2等）の検出によって、確認することができる。

[0026] 多能性幹細胞のテラトーマ形成能は、多能性幹細胞を、NOD-Scidマウス、Scidマウス等の免疫不全動物に、あるいは当該多能性幹細胞とMHC適合性のある動物に移植し、形成された腫瘤に内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞が含まれるかを評価することで、確認することができる。多能性幹細胞は、移植された動物に三胚葉の細胞を含む腫瘤を形成させた場合、テラトーマ形成能を有すると判定することができる。

[0027] 免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、未分化性を維持しかつテラトーマ形成能を有する多能性幹細胞から形成されたテラトーマを含有することもできる。含有されるテラトーマは、多能性幹細胞から形成されたテラトーマ細胞塊そのままの形態で、又は当該テラトーマ細胞塊から採取されたテラトーマ細胞塊の一部の形態で、又は当該テラトーマ細胞塊から分離された組織若しくは細胞の形態であり得る。

[0028] ある実施形態において、多能性幹細胞はCD24を発現している、すなわちCD24陽性である。ある実施形態において、テラトーマはCD24を発現している、すなわちCD24陽性である。免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、CD24陽性の多能性幹細胞集団を含み得て、またCD24陽性のテラトーマ細胞集団を含み得る。CD24陽性の細胞集団は、CD24陽性細胞を細胞集団全体の70％以上、好ましくは80％以上、より好ましくは90％以上含む。細胞集団全体に占めるCD24陽性細胞の比率は、細胞集団をフローサイトメトリーで解析することで決定することができる。

[0029] CD24は、Heat-stable antigen (HSA) や Nectadrin としても知られる細胞接着タンパク質であり、主に免疫細胞、上皮細胞、神経細胞、筋肉細胞に発

現している。ヒトのCD24は、アイソフォームaのプレプロタンパク質のアミノ酸配列がNational Center for Biotechnology Information (NCBI) にNP_001278666.1、NP_001278667.1、NP_001346013.1及びNP_037362.1として、mRNAの塩基配列がNM_001291737.1、NM_001291738.1、NM_001359084.1及びNM_013230.3として登録されている。ヒトCD24アイソフォームbのアミノ酸配列はNCBIにNP_001278668.1として、mRNAの塩基配列はNM_001291739.1として登録されている。また、マウスのCD24（Cd24aと呼ばれる）は、アミノ酸配列がNCBIにNP_033976.1として、mRNAの塩基配列がNM_009846.2として登録されている（いずれも2023年4月26日に検索）。

[0030] ある実施形態において、テラトーマはエリスロポエチン産生能を有する。テラトーマのエリスロポエチン産生能は、テラトーマにおけるエリスロポエチン遺伝子又はタンパク質の発現を検出又は測定することで確認することができる。テラトーマにおけるエリスロポエチン遺伝子又はタンパク質の発現量が、エリスロポエチンを産生しないことが知られている陰性対照の細胞、組織又は臓器における発現量よりも多い場合、あるいはエリスロポエチンを産生することが知られている陽性対照の細胞、組織又は臓器、例えば腎臓、卵巣等における発現量と同程度である場合、当該テラトーマはエリスロポエチン産生能を有すると判定することができる。

[0031] エリスロポエチンは、赤血球の産生とヘモグロビンの生合成を制御する糖タンパク質ホルモンである。エリスロポエチンは、同種異系ドナー由来の移植物に対する免疫寛容を誘導することが知られている（Purroy C. et al., 2017, J. Am. Soc. Nephrol, 28(8):2377-2392.）。ヒトのエリスロポエチンは、その前駆体のアミノ酸配列がNCBIに NP_000790.2として、mRNAの塩基配列がNM_000799.4として登録されている。また、マウスのエリスロポエチンは、その前駆体のアミノ酸配列がNCBIにNP_001299804.1及びNP_031968.1として、mRNAの塩基配列がNM_001312875.1及びNM_007942.2として登録されている（いずれも2023年4月27日に検索）。

[0032] ある実施形態において、テラトーマは免疫寛容誘導において重要な制御性T

細胞（CD4陽性ヘルパーT細胞の一種で、免疫抑制能を持つ細胞集団）をテラトーマの周辺に集積させる又はテラトーマの内部に浸潤させる能力（「制御性T細胞を集積又は浸潤させる能力」とも呼ぶ）を持つ。この能力は、MHC適合性がある哺乳動物個体に多能性幹細胞を投与してテラトーマを形成させ、あるいはMHC適合性がある哺乳動物個体にテラトーマを移植して生着させ、次いで当該テラトーマの周辺又は内部において制御性T細胞を検出することで、確認することができる。制御性T細胞を検出するための公知の手段としては、例えば、制御性T細胞の公知の細胞マーカー（例としてCD25等）と結合する抗体を利用した免疫組織学的染色又はフローサイトメトリー解析、RNA-seq等による制御性T細胞の公知の細胞マーカーの遺伝子発現解析を挙げることができる。

[0033] 多能性幹細胞を含有する免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、含有される多能性幹細胞との間でMHC適合性がある哺乳動物個体において、テラトーマを形成し、又はテラトーマを形成せずに、免疫寛容を誘導することができる。また、テラトーマを含有する免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、含有されるテラトーマとの間でMHC適合性がある哺乳動物個体において、免疫寛容を誘導することができる。

[0034] 免疫寛容とは、免疫応答を起こす可能性のある抗原に対する免疫系の不応答状態を意味する。免疫寛容には、自己抗原に対する免疫不応答である自己寛容と、非自己抗原に対する免疫不応答である獲得寛容（誘導免疫寛容とも呼ばれる）がある。獲得寛容は、所定の条件下で非自己抗原を投与することによって誘導されることが知られており、制御性T細胞による非自己抗原に対する免疫応答抑制が関与するものと考えられている。また、自己免疫疾患及びアレルギー性疾患は、それぞれ自己、非自己に対する免疫寛容が破綻することにより引き起こされるものと考えられている。

[0035] 本開示において、免疫寛容の誘導とは、特定抗原に対する免疫不応答状態を誘導することをいい、例えば、免疫応答の発生又は進行を遅らせること、免疫応答の強度を弱めること等を包含する。本開示において、免疫寛容は自

己抗原、非自己抗原のいずれに対するものでもよい。

[0036] 本開示における免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、免疫寛容の誘導が望まれる哺乳動物個体に対して用いられる。免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、例えば、細胞、組織又は臓器移植を受けるレシピエントとなる哺乳動物個体に対して、非自己抗原であるドナー由来移植物に対する免疫寛容を誘導するために用いることができ、また、例えば、自己免疫疾患を有する哺乳動物個体に対して、自己抗原に対する免疫応答を制御するために、好ましくは抑制するために用いることができる。免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤が使用される哺乳動物個体は、免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤に含有される多能性幹細胞との間で、又は含有されるテラトーマの由来となる多能性幹細胞との間で、MHC適合性があることが好ましい。

[0037] 本開示において、MHC適合性がある（MHC compatible）とは、ドナーとなる哺乳動物個体、及びドナー由来移植物が、主要なMHC遺伝子座の一部又は全部において、レシピエントとなる哺乳動物個体と異なるアレルを持たないことを意味する。例えば、多能性幹細胞が、主要なMHC遺伝子座の一部又は全部において、免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤が使用される哺乳動物個体（レシピエント）と異なるアレルを持たないとき、哺乳動物個体は、多能性幹細胞との間でMHC適合性がある。

[0038] また例えば、多能性幹細胞のMHCハプロタイプの両方が哺乳動物個体（レシピエント）のMHCハプロタイプに含まれる場合、すなわち、多能性幹細胞がMHCホモ接合体であり、レシピエントが多能性幹細胞と同じMHCハプロタイプを有する場合、あるいは、多能性幹細胞のMHCデュプロタイプがレシピエントのMHCデュプロタイプと同一である場合、哺乳動物個体は、多能性幹細胞との間でMHC適合性がある。

[0039] 本開示において、MHC適合性のない（MHC incompatible）とは、ドナーとなる哺乳動物個体が、主要なMHC遺伝子座の全部において、レシピエントとなる哺乳動物個体と異なるアレルを持つことを意味する。

[0040] ヒトにおける臨床応用では、免疫抑制剤では抑制できない拒絶反応により重篤な予後をもたらす可能性があるため、ドナーは、主要なMHC遺伝子座（HLA遺伝子座）の一部であっても、レシピエントと異なるアレルを持たないことが望ましい。

[0041] MHCの適合性は、慣用的な方法として、ドナーとレシピエントの相性をみるHLAタイピング、リンパ球クロスマッチなどの、組織適合性検査によって確認することができる。

[0042] マウスにおける主要なMHC遺伝子座としては、H-2K、H-2D、H-2L、I-A及びI-Eを挙げることができ、さらに、これらに加えて、Qa-2及びQa-1のうちのいずれか１つ、好ましくは全てを含んでもよい。なお、マウスのMHCハプロタイプは、主要な遺伝子座における特定のアレルのセットに応じた呼称を有する。例えば、MHCハプロタイプb（H-2bとも呼ぶ）はH-2K^{b}、H-2D^{b}、H-2L^{null}、I-A^{b}、I-E^{null}というアレルセットを有するハプロタイプに、MHCハプロタイプd（H-2dとも呼ぶ）はH-2K^{d}、H-2D^{d}、H-2L^{d}、I-A^{d}、I-E^{d}というアレルセットを有するハプロタイプに、MHCハプロタイプk（H-2kとも呼ぶ）は、遺伝子型がH-2K^{k}、H-2D^{k}、H-2L^{null}、I-A^{k}、I-E^{k}というアレルセットを有するハプロタイプに相当する。

[0043] ヒトにおける主要なMHC遺伝子座としては、HLA-A、HLA-B及びHLA-DRを挙げることができ、さらに、これらに加えてHLA-C、HLA-DQ及びHLA-DPのうちのいずれか１つ、好ましくは全てを含んでもよい。

[0044] MHC適合性のヒトにおける例として、ヒトのHLAタイプにおいて、HLA-A, HLA-B, HLA-DRの３遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である移植物を、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該遺伝子座におけるアレルと一致した組み合わせを有するレシピエントに移植する場合が該当するが、３遺伝子座に限られない。具体的にはHLA半合致移植があり、ドナーのHLA-A, HLA-B, HLA-DR が、*24:02-*52:01-*15:02、*33:03-*44:03-*13:02、*24:02-*07:02-*01:01、又は*24:02-*54:01-*04:05のホモ接合体である末梢血あるいは臍帯血に含まれる細胞から作製したiPS細胞から作製した細

胞、組織又は臓器を、HLA-A, HLA-B, HLA-DRが、*24:02-*52:01-*15:02、*33:03-*44:03-*13:02、*24:02-*07:02-*01:01、又は*24:02-*54:01-*04:05のレシピエントに移植する場合である。なお、HLA-A, HLA-B, HLA-DRが、*24:02-*52:01-*15:02、*33:03-*44:03-*13:02、*24:02-*07:02-*01:01、又は*24:02-*54:01-*04:05は、日本国内で頻度の高いHLAとして知られている（WO2015/125941、およびiPS細胞ストックの細胞（HLAホモドナー） 公益財団法人 京都大学iPS細胞研究財団(https://www.cira-foundation.or.jp/j/research-institution/ips-stock-project/homozygous.html)参照）。

[0045] 免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤が、細胞、組織又は臓器移植を受ける哺乳動物個体に対して用いられる場合、多能性幹細胞は、移植ドナーから採取した細胞を用いて調製してもよく、又はレシピエント及び移植ドナーと同じ生物種であるがいずれとも異なる個体から採取した細胞を用いて調製してもよい。後者の場合、多能性幹細胞は、そのMHCハプロタイプが移植ドナーのそれと完全に一致すること、あるいはそのMHCデュプロタイプが移植ドナーのそれと完全一致することが好ましい。

[0046] 免疫寛容誘導用組成物は、多能性幹細胞又はテラトーマと、これらが生存可能な液体とを含む組成物であれば限定はなく、例えば細胞懸濁液の形態であり得る。多能性幹細胞及びテラトーマが生存可能な液体は、細胞製剤において通常使用される液体であればよく、例えば、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、細胞培養培地等を挙げることができる。免疫寛容誘導用組成物は、多能性幹細胞及びテラトーマ以外の細胞を含んでもよく、またアジュバント、緩衝剤、抗酸化剤、保存剤、賦形剤、担体等の薬学的に許容される成分、及び他の医薬有効成分を含んでもよい。薬学的に許容される成分は当業者に周知であり、当業者が通常の実施能力の範囲内で、適宜選択して使用することができる。

[0047] 免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、免疫寛容の誘導が望まれる哺乳動物個体に対して、当該個体において免疫寛容を誘導するのに有効な量で投与することができ、また、免疫寛容が望まれる期間、免疫寛容状態を維

持できるように１又は複数回、投与することができる。ある実施形態において、免疫寛容の誘導に有効な量とは、テラトーマを形成又は生着させるのに有効な量を意味する。ある実施形態において、免疫寛容状態の維持は、形成されたテラトーマが維持されているかを指標として評価することができる。免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤の投与は、例えば、皮下接種又は皮内接種によって行うことができる。

[0048] 好ましい実施形態において、免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、同種異系移植においてドナー由来移植物に対する免疫寛容をレシピエントに誘導するために、レシピエントに投与される。同種異系移植は、MHC適合性があることが好ましい。好ましい実施形態において、同種異系移植のドナーは、主要なMHC遺伝子座（HLA遺伝子座）の全てにおいてレシピエントと異なるアレルを持たない。免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、MHC適合性はあるがマイナー組織適合性抗原の不一致の程度が大きい移植であっても、レシピエントに免疫寛容を誘導可能であることから、同種異系移植において、マイナー組織適合性抗原の一致は求められない。また、移植物は、細胞（例えば、網膜色素上皮、ドパミン神経前駆細胞、グリア細胞等であるが、これらに限られない）、組織（例えば、皮膚、骨、膵島、心臓弁、血管、角膜、網膜等であるが、これらに限られない）、臓器（例えば、心臓、腎臓、肝臓等であるが、これらに限られない）のいずれであってもよい。免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤の使用によって、従来よりも免疫抑制剤を低減した条件又は免疫抑制剤を不使用な条件で、同種異系移植を行うことが可能となると期待される。

[0049] 好ましい実施形態において、免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、自己抗原に対する免疫寛容を誘導するために、自己免疫疾患患者に投与される。好ましい実施形態において、免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、自己免疫疾患のための治療剤となり得る。ここで治療とは、自己免疫疾患の進行の遅延又は停止、病変の退縮又は消失、症状の緩和又は治癒のための全ての医学的介入を包含する。

[0050] 自己免疫疾患の例としては、リンパ増殖性疾患、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、関節リウマチ、多発性筋炎、皮膚筋炎、強皮症、甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、自己免疫性副腎機能障害、真正赤血球性貧血、多発性硬化症、自己免疫性肝炎、1型糖尿病等を挙げることができる。

[0051] 免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、免疫系を抑制するための処置と組み合わせて用いることができ、そのような処置の例としては、免疫抑制剤の投与、放射線照射、T細胞除去処置等を挙げることができる。

[0052] 免疫抑制剤の例としては、シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、ステロイド（例えばメチルプレドニゾロン等）、T細胞活性化阻害薬等を挙げることができる。T細胞活性化阻害薬の例としては、T細胞上の共刺激分子CD28と抗原提示細胞上のCD80/CD86との結合を阻害する薬剤、例えばCTLA-4の細胞外部分とIgGのFc部分との融合タンパク質であるCTLA-4Ig（例としてアバタセプト）；T細胞上の共刺激分子CD40L8と抗原提示細胞上のCD40との結合を阻害する薬剤、例えば抗CD40L（CD154）抗体；T 細胞上のIL-2受容体α鎖（CD25）とIL-2との結合を阻害する薬剤、例えば抗CD25モノクローナル抗体（例としてバシリキシマブ）等を挙げることができる。T細胞活性化阻害薬は、共刺激遮断薬（Co-stimulatory blockade; CB）とも呼ばれる。免疫系の抑制のため、一種類の免疫抑制剤を単独で、又は複数種類の免疫抑制剤を組み合わせて用いることができる。

[0053] 放射線照射は、移植治療を行う際にレシピエントに施される前処置の一つとして通常行われる放射線照射であればよく、レシピエントへの全身照射（Total Body Irradiation）又は胸腺への照射が好ましい。照射量は、例えばヒトへの全身照射の場合は１回の照射線量として1Gy以上、胸腺への照射の場合は3Gy以上で、かつ致死量に至らない量を目安として、適宜調節することができる。

[0054] T細胞除去処置は、移植治療を行う際にレシピエントに施される前処置の一つとして通常行われる処置であればよく、抗T細胞抗体やステロイドの投与が

挙げられる。抗T細胞抗体の例は、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD3抗体、抗TCR抗体及び抗胸腺細胞グロブリン（ATG）を包含し、これらの１種又は複数を組み合わせてレシピエントに投与することが好ましい。好ましい実施形態において、抗T細胞抗体は、抗CD4抗体及び抗CD8抗体の組み合わせであり、これらを同時に又は連続してレシピエントに静脈内投与又は腹腔内投与することが好ましい。投与量は、レシピエントの体内においてT細胞を除去するのに十分な量であればよい。

[0055] ある実施形態において、レシピエントは、免疫寛容誘導用組成物又は免疫寛容誘導剤が投与される前に、放射線照射又はT細胞除去処置を受けることが好ましく、放射線照射とT細胞除去処置の両方を受けることがより好ましい。免疫寛容誘導用組成物又は免疫寛容誘導剤をこれらの免疫系抑制処置と組み合わせることで、ドナー由来移植物に対する免疫寛容をレシピエントにおいて効率的に誘導することができ、これによりレシピエントにおけるドナー由来移植物の生着率を向上させることができる。また、レシピエントへの免疫抑制剤の投与を回避する又は投与量を減らすことも可能になる。

[0056] 放射線照射及びT細胞除去処置は、移植実施前に免疫寛容を誘導することが望まれる場合は移植の直前までに、移植実施後に免疫寛容を誘導すること、すなわち遅延型免疫寛容（Delayed Tolerance Induction）の誘導が望まれる場合は寛容を誘導したい所望のタイミングで、１回又は複数回繰り返して行うことができる。また、放射線照射及びT細胞除去処置の順序に特に制限はないが、T細胞除去処置を放射線照射に先行して行うことが好ましい。

[0057] 本開示は、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、免疫寛容が望まれる哺乳動物個体に投与することを含む、哺乳動物個体において免疫寛容を誘導する方法を提供する。

[0058] 本開示はまた、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、レシピエントに投与（例えば、皮下接種又は皮内接種）すること、及びレシピエントにドナー由来移植物を移植することを含む、レシピエントにおけるドナー由来移植物の生着率を向上させ

る方法を提供する。かかる方法において、多能性幹細胞は、ドナーに由来する又はレシピエント及びドナーと同じ生物種であるがいずれとも異なる哺乳動物個体に由来する多能性幹細胞であることが好ましく、またレシピエントがドナーとの間でMHC適合性があることが好ましい。多能性幹細胞又はテラトーマの投与と、ドナー由来移植物の移植は、同時に行ってもよく、時間間隔を空けて行ってもよい。多能性幹細胞又はテラトーマの投与とドナー由来移植物の移植は、1日以内、例えば12時間以内、6時間以内、4時間以内、3時間以内、2時間以内、1時間以内、30分以内、15分以内、10分以内、又は5分以内の間隔を空けて行うことができる。また、多能性幹細胞又はテラトーマの投与の後、１日超、例えば3日以上、5日以上、7日以上、10日以上、20日以上、30日以上、又は40日以上の間隔を空けてドナー由来移植物の移植を行うこともできる。

[0059] さらに本開示は、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、自己免疫疾患を有する哺乳動物個体に投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

[0060] 加えて本開示は、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量と、ドナー由来移植物とを含む、移植医療用キットを提供する。かかるキットは、上述のドナー由来移植物の生着率を向上させる方法において好適に用いることができる。

[0061] 本開示は、免疫寛容誘導用組成物、特に免疫寛容誘導用の医薬組成物の製造のための、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの使用を提供する。本開示は、免疫寛容誘導のための、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの使用を提供する。本開示は、移植医療のための、特に移植医療においてレシピエントにおけるドナー由来移植物の生着率を向上させるための、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの使用を提供する。本開示は、自己免疫疾患又はアレルギー性疾患の治療又は予防のための、テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記

多能性幹細胞由来のテラトーマの使用を提供する。

[0062] 本開示の各方法、キット及び使用における用語の説明及び好ましい実施形態は、免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤との関連で説明されたとおりである。

[0063] 以下、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の理解を助けるためのものであって、本発明の技術的範囲を限定するものではない。

実施例

[0064] ［材料及び方法］

（１）マウス

C57BL/6J（B6、MHCハプロタイプH-2b/b）、CBA/N（MHCハプロタイプH-2k/k）、129X1/SvJ Jms Slc（129、MHCハプロタイプH-2b/b）、C3H/He（C3H、MHCハプロタイプH-2k/k）、BALB/c（MHCハプロタイプH-2d/d）は、日本SLC株式会社より購入した。C3129F1（MHCハプロタイプH-2k/b）マウスはC3H雌と129雄の交配によって得た。B6C3F1（MHCハプロタイプH-2b/k）マウスはB6雌とC3H雄の交配によって得た。移植実験にはすべて雄マウスを用いた。また、本研究における動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規定」に基づいて取り扱った。なお、MHC遺伝子型の表記について、H-2b/bはマウスMHCのH2ハプロタイプbのホモ接合、H-2d/dはH2ハプロタイプdのホモ接合、H-2k/kはH2ハプロタイプkのホモ接合、H-2k/b及びH-2b/kはH2ハプロタイプkとbのヘテロ接合であることを示す。

[0065] （２）iPS細胞

成獣B6マウス、CBA/Nマウス、129マウスの耳介皮膚組織から常法に従って線維芽細胞を分離し、Oct4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入することで、B6マウス由来iPS細胞、CBA/Nマウス由来iPS細胞、129マウス由来iPS細胞を樹立した（Takahashi et al., Cell, 2006, Vol. 126, pp. 663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024）。

[0066] マウスiPS細胞は、ラミニンコートした培養ディッシュ上で、0.5×Neuro B

rew-21 (Miltenyi)、0.5×N2サプリメント (Wako)、10 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Nacalai)、0.03% L-グルタミン (Gibco)、3 μM CHIR99021 (Adooq)、1 μM PD0325901 (Tocris) 及び組み換えヒト白血病抑制因子 (in house) を補充したadvanced-DMEM/F-12 (1：1混合、Thermo、SIGMA) (以下、維持培地と呼ぶ) を用いて維持した。

[0067] iPS細胞の継代は以下の通りに行った。維持培地で培養した培養液から培養上清を除去し、残存培養液をPBSで洗浄した後、トリプシン (0.5g/lトリプシン/0.53mmol/l-EDTA溶液、ナカライテスク) を1000 μl添加し、インキュベーター内に静置した。5分経過後、維持培地を5 ml添加し、トリプシンを中和した。培地を吹き付けて単細胞懸濁液化し、40 μmのフィルターを通じてチューブに回収し、1500 rpm、4℃、5分で遠心した。遠心後に上清を除去し、維持培地で再懸濁した。懸濁液の細胞濃度を計測し、必要な細胞数をラミニンでコートされたdishに播き直し、再び維持培地を用いて培養した。

[0068] (３) ES細胞

成獣CBA/Nマウスを同系統と交配し、交配後3.5日目に子宮より胚盤胞を得た。ハッチアウトした胚盤胞より内部細胞塊様細胞塊のみを掻き取り、ラミニンでコートされたdishに播種し培養を行なった。多能性幹細胞マーカーであるSSEA1陽性細胞を分取し、ヌードマウスへのteratoma formation assayによってteratoma形性能を確認した (Marta Vila-Cejudo et al., J. Vis. Exp., 2017, 20;(126):56171. DOI: doi:10.3791/56171)。ES細胞はiPS細胞と同様の方法で継代を行なった。また、培地も同じもの (維持培地) を使用した。

[0069] なお、本実施例で使用したすべての多能性幹細胞 (iPS細胞、ES細胞) について、未分化マーカーであるSSEA1を発現していることを確認した。また、多能性幹細胞をヌードマウス (BALB/c nu/nu) に移植し、形成されたテラトーマを採取し、当該テラトーマが三胚葉に分化していることを確認した。

[0070] (４) ルシフェラーゼ発現iPS細胞の作製

Kamatani, T. et al. (Inflammation and Regeneration, (2022) 42:4. DOI 10.1186/s41232-021-00190-7) に記載されるように、CBA/Nマウス胎児から常法に従って線維芽細胞を分離し、Oct4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入して樹立したiPS細胞に、さらにレンチウイルスベクター（pHIV-Luc-ZsGreen (Addgene)）を用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入することで、ルシフェラーゼ発現CBA/Nマウス由来iPS細胞（Luc-CBA-iPS）を作製した。

[0071] （５）多能性幹細胞の皮下接種

メデトミジン（Domitor Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.）、ミダゾラム（midazolam injection, TEVA, Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.）、ブトルファノール（Vetorphale, Meiji Seika）の3剤混合液を腹腔内注射してレシピエントマウスを麻酔し、2.5×10^6個のiPS細胞又はES細胞を50 μLのマトリゲルに懸濁し、レシピエントマウスの皮下に接種した。また、iPS細胞又はES細胞に代えて同容量の生理食塩水を50 μLのマトリゲルに懸濁し、レシピエントマウスの皮下に接種し、無処置の対照とした。

[0072] （６）皮膚片の移植

メデトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの3剤混合液を腹腔内注射してレシピエントマウスを麻酔し、背部皮膚を円形状に切除して移植床を形成し、ドナーマウスの耳介皮膚片を移植した。皮膚移植から7日間、移植皮膚片を保護した後に、移植皮膚片のサイズを経時的に計測した。移植当日の移植皮膚片のサイズ（長径の長さ）の30%未満に移植皮膚片が退縮した日を拒絶日とし、移植日から拒絶日までの期間を移植皮膚片の生着期間とした。移植片の生着率（Overall Survival）は、式：（移植皮膚片の総数－拒絶された皮膚片の数）／移植皮膚片の総数×100から算出した。

[0073] （７）in vivoイメージング

Luc-CBA-iPSを皮下接種したマウスにおける移植細胞の生存は、IVIS Spectrum Imaging Systems (Spectrum-FL-TKHD; Caliper Life Sciences Ltd.) を用いてモニターした。D-ルシフェリン（Cayman）を120 mg/kg体重の用量でマ

ウスの腹腔内に投与し、投与から20分後、ルシフェラーゼ発現細胞から放出される光子を積分時間20秒で収集して、1秒あたりの最大光子数（photon/second）を定量した。

[0074] （８）統計解析

統計学的解析は、特に断らない限り、JMP 16（SAS Institute Inc.）を用いて行った。本研究における有意水準は5%とし、p値が5%を下回る場合に統計学的に有意差ありと判断した。各図内には、$p<0.05$の場合にアスタリスク1つ（*）、$p<0.01$の場合にアスタリスク2つ（**）を付与した。

[0075] ［実施例１．シンジェニックレシピエント及びアロジェニックレシピエントにおけるiPS細胞生着］

Luc-CBA-iPSを、レシピエントマウス（CBA/N、B6C3F1、BALB/c）の皮下に接種し（n＝5）、細胞の生着をin vivoイメージングにより解析した。CBA/Nマウス及びB6C3F1マウスの全個体で、iPS細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に（手で触って）確認した。

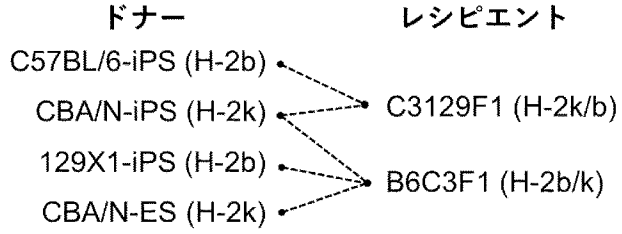
[0076] なお、移植したLuc-CBA-iPS（H-2k/k）に対して、CBA/Nマウス（H-2k/k）はシンジェニックレシピエントに、B6C3F1マウス（H-2b/k）はMHC半合致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに、BALB/cマウス（H-2d/d）はMHC不一致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに相当する。したがって、CBA/NマウスおよびB6C3F1マウスへのLuc-CBA-iPSの移植はMHC適合性があり、BALB/cへのLuc-CBA-iPSの移植はMHC適合性がない。

[0077] レシピエントマウスのLuc-CBA-iPS接種部位からのルシフェリン発光量の経時変化を図１に示す。シンジェニックのCBA/Nマウスでは接種後20日の時点で強い発光が検出され、アロジェニックレシピエントのうち、MHC半合致のB6C3F1マウスでは接種後30日の時点でCBA/Nマウスより弱いものの発光が検出され、MHC不一致のBALB/cマウスでは接種後30日の時点で発光はわずかにしか検出されなかった。この結果から、移植されたiPS細胞は、シンジェニックマウスでは生着し、MHC半合致マイナー不一致のアロジェニックマウスでは弱く生着

し、MHC不一致マイナー不一致のアロジェニックマウスでは生着しないことが確認された。

[0078] 実施例１に示されるiPS細胞とレシピエントマウスの組み合わせのほか、実施例１と同様の手法で、CBA/N-iPS、C57BL/6マウス由来iPS細胞（C57BL/6-iPS）、129X1マウス由来iPS細胞（129X1-iPS）及びCBA/Nマウス由来ES細胞（CBA-ES）の各々をC3129F1マウス及びB6C3F1マウスに皮下接種し、細胞の生着と腫瘤形成を評価した。移植細胞の生着と腫瘤形成が確認されたiPS細胞とレシピエントマウスの組み合わせを以下に示す。

[表1]



[0079] ［実施例２．iPS細胞移植によるテラトーマ形成］

CBA/Nマウス由来iPS細胞（CBA-iPS）をB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種から60日以上経過後、接種部位に形成された腫瘤を採取した。腫瘤のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色により染色して、病理学的解析を行った。腫瘤の内部に三胚葉系の構造物（外胚葉系のKeratin pearl、中胚葉系のstriated muscle、内胚葉系のCiliated epithelium）が観察されたことから（図２）、形成された腫瘤はテラトーマであることが確認された。

[0080] ［実施例３．iPS細胞移植による免疫寛容誘導（皮膚移植）］

CBA-iPSを、B6C3F1マウスの皮下に接種し、接種から40日後にドナーマウス（B6C3F1、CBA/N、BALB/c）の皮膚片を移植した（CBA-iPS移植（n = 4, B6C3F1; n = 4, CBA/N; n = 4, BALB/c）、無処置（n = 10, B6C3F1; n = 10, CBA/N; n = 10, BALB/c））。iPS細胞を皮下接種した全個体で、iPS細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及

び触覚的に（手で触って）確認した。

[0081] なお、レシピエントのB6C3F1マウス（H-2b/k）は、移植したCBA-iPS（H-2k/k）に対してMHC半合致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに相当する。したがって、B6C3F1マウスへのCBA-iPSの移植はMHC適合性がある。

[0082] また、レシピエントのB6C3F1マウス（H-2b/k）は、B6C3F1皮膚片（H-2b/k）に対してシンジェニックレシピエントに、CBA/N皮膚片（H-2k/k）に対してMHC半合致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに、BALB/c皮膚片（H-2d/d）に対してMHC不一致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに相当する。

[0083] 移植皮膚片の生着期間を図３に示す。B6C3F1皮膚片は、CBA-iPS移植群、無処置対照群（生理食塩水投与）のいずれにおいても完全に生着した。CBA/N皮膚片は、無処置対照群では皮膚移植後40日程度で完全に拒絶されたが、CBA-iPS移植群では皮膚片の完全生着が確認された。BALB/c皮膚片は、CBA-iPS移植群、無処置対照群のいずれにおいても皮膚移植後20日以内に完全に拒絶された。この結果から、ドナー由来iPS細胞の移植によって、MHC半合致マイナー不一致のアロジェニックレシピエントにおいてドナー特異的な免疫寛容が誘導されることが確認された。

[0084] ［実施例４．ES細胞移植による免疫寛容誘導（皮膚移植）］

CBA-ESを、B6C3F1マウスの皮下に接種し、接種から40日後にドナーマウス（B6C3F1、BALB/c、129X1、CBA/N）の皮膚片を移植した（n = 3, B6C3F1; n = 3, BALB/c; n = 3, 129X1; n = 3, CBA/N）。ES細胞を皮下接種した全個体で、ES細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に（手で触って）確認した。

[0085] なお、レシピエントのB6C3F1マウス（H-2b/k）は、移植したCBA-ES（H-2k/k）に対してMHC半合致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに相当する。したがって、B6C3F1マウスへのCBA-ESの移植はMHC適合性がある。

[0086] また、レシピエントのB6C3F1マウス（H-2b/k）は、B6C3F1皮膚片（H-2b/k

）に対してシンジェニックレシピエントに、CBA/N皮膚片（H-2k/k）及び129X1皮膚片（H-2b/b）に対してMHC半合致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに、BALB/c皮膚片（H-2d/d）に対してMHC不一致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに相当する。

[0087] CBA-ESを皮下接種したレシピエントマウスにおける移植皮膚片の生着期間を図４に示す。B6C3F1皮膚片及びCBA/N皮膚片は完全に生着した一方、129X1皮膚片及びBALB/c皮膚片は皮膚移植後30日までに完全に拒絶された。この結果から、ドナー由来ES細胞の移植によって、MHC半合致マイナー不一致のアロジェニックレシピエントにおいてドナー特異的な免疫寛容が誘導されることが確認された。

[0088] 実施例３及び４と同様の手法で、CBA/N-iPS、C57BL/6-iPS及び129X1-iPSの各々をC3129F1マウス及びB6C3F1マウスに皮下接種し、細胞の生着と腫瘤形成を評価した。表１に示されたものと同じ組み合わせにおいて、iPS細胞接種から10日後の時点での接種部位におけるテラトーマの形成と、移植皮膚片の生着期間延長を認め、MHC半合致マイナー不一致のアロジェニックレシピエントにおけるドナー特異的な免疫寛容の誘導を確認した。

[0089] ［実施例５．iPS細胞の移植タイミングが免疫寛容誘導に及ぼす影響（皮膚移植）］

CBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種と同日（具体的には、接種後４時間以内）、接種から10日後、20日後、30日後、40日後にドナーマウス（B6C3F1、CBA/N、BALB/c）の皮膚片を移植した（10日目（n = 4, B6C3F1; n = 5, CBA/N; n = 5, BALB/c）、20日目（n = 5, B6C3F1; n = 5, CBA/N; n = 5, BALB/c）30日目（n = 5, B6C3F1; n = 5, CBA/N; n = 5, BALB/c）、40日目（n = 11, B6C3F1; n = 13, CBA/N; n = 14, BALB/c））。iPS細胞を皮下接種した全個体で、iPS細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に（手で触って）確認した。

[0090] 移植皮膚片の生着期間を図５及び図６に示す。CBA-iPS接種と同日にCBA/N皮膚片を移植した場合は、無処置対照と同程度の期間しか生着しなかったが

（図５A及びB）、CBA-iPS接種の10日後以降にCBA/N皮膚片を移植した場合には、CBA-iPS接種から皮膚移植までの期間が長くなるほど、生着期間は延長した（図５C、図６A～C）。この結果から、iPS細胞の移植によってテラトーマが形成されて免疫寛容が誘導されるまでに、少なくとも10日以上、好ましくは20日以上の期間が必要であることが確認された。

[0091] ［実施例６．テラトーマの切除が免疫寛容誘導に及ぼす影響］

CBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種した。iPS細胞を皮下接種した全個体で、iPS細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に（手で触って）確認した。半数のマウスは、接種から20日後にテラトーマを切除し、接種から40日後にドナーマウス（B6C3F1、CBA/N、BALB/c）の皮膚片を移植した（n = 5, B6C3F1; n = 5, CBA/N; n = 5, BALB/c）。また、残り半数のマウスは、接種から40日後にドナーマウス（B6C3F1、CBA/N、BALB/c）の皮膚片を移植し（n = 4, B6C3F1; n = 4, CBA/N; n = 4, BALB/c）、皮膚移植から20日後にテラトーマを切除した。

[0092] 移植皮膚片の生着期間を図７に示す。CBA/N皮膚移植の20日前にテラトーマを切除した場合、接種したCBA-iPSによる生着期間の延長は認められなかった（図７A）。CBA/N皮膚移植から20日後にテラトーマを切除した場合、接種したCBA-iPSによる生着期間の延長が認められたものの（図７B）、テラトーマを切除しなかった場合（図３、図６C）と比較すると延長された期間は短かった。この結果から、移植されたiPS細胞から形成されたテラトーマの存在が免疫寛容を誘導するために必要であることが確認され、また効果的な免疫寛容の誘導のためにテラトーマの維持が重要であることが示された。

[0093] ［実施例７． iPS細胞由来細胞の追跡］

Luc-CBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種から200日後、形成されたテラトーマ、脾臓、テラトーマの流入領域リンパ節（dLN）、テラトーマの遠隔リンパ節（non-dLN）を採取して、Luc-CBA-iPS由来細胞の存在をin vivoイメージングにより解析した。

[0094] 各器官からのルシフェリン発光量を図８に示す。テラトーマで強い発光が

、テラトーマの流入領域リンパ節で弱い発光が検出されたが、遠隔リンパ節では発光は検出されなかった。この結果から、移植されたiPS細胞に由来する細胞の存在範囲は流入領域リンパ節までに留まり、血液キメラは形成されていない可能性が高いこと、及びiPS細胞移植による免疫寛容誘導のメカニズムに血液キメラ形成が関与している可能性は低いことが示唆された。

[0095] ［実施例８． iPS細胞及びテラトーマの細胞表面抗原解析］

CBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種から40日後、形成されたテラトーマを採取した。テラトーマからHorizon™ Dri Tumor and Tissue Dissociation Reagent (BD Biosciences)を用いて調製した単細胞懸濁液と、CBA-iPSの単細胞懸濁液を、フローサイトメトリーに供した。フローサイトメトリーはBD FACSCelesta (Becton dickinson) を、解析ソフトウェアはFlowjoソフトウェア (Tree Star) を用いて行い、Forward scatter、Side Scatter及び4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) の取り込みによって生細胞と死細胞を判別した。使用した蛍光色素結合モノクローナル抗体を表２に示す。コントロールとしては、アイソタイプ・コントロール抗体又はFluorescence minus one (FMO) を用いた。

[表2]

マーカー	コンジュゲート	クローン	アイソタイプ	供給会社
CD24	PE	M1/69	Rat IgG2b, κ	Biolegend
CD45	FITC	30-F11	Rat IgG2b, κ	Biolegend

[0096] テラトーマから調整した単細胞懸濁液とCBA-iPSの単細胞懸濁液における、CD45陰性の生細胞集団中のCD24陽性細胞率を算出した。フローサイトメトリー解析結果を図９に示す。CBA-iPS、CBA-iPSから形成されたテラトーマ細胞のいずれにおいても、CD24の発現が確認された。

[0097] ［実施例９． iPS細胞のCd24aノックアウトが免疫寛容誘導に及ぼす影響］

マウスCd24a遺伝子をノックアウトするためのガイドRNAを組み込んだCD24 CRISPR Plasmids mouse (SantaCruz) を、製造元のプロトコールに従ってCBA-iPSに導入し、Cd24a遺伝子がノックアウトされたCBA-iPS (CD24^{ko}CBA-iPS) を作製した。

[0098] CBA-iPS又はCD24koCBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種から40日後にドナーマウス（B6C3F1、BALB/c、CBA/N）の皮膚片を移植した（n = 8, B6C3F1; n = 8, CBA/N; n = 8, BALB/c）。iPS細胞を皮下接種した全個体で、iPS細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に（手で触って）確認した。

[0099] 移植皮膚片の生着期間を図１０に示す。CBA/N皮膚片は、CBA-iPSを皮下接種した場合に本実験では75%の確率で生着したのに対し、CD24koCBA-iPSを皮下接種した場合には生着率は50%に留まった。CD24koCBA-iPSを皮下接種したマウスのうち、CBA/N皮膚片が拒絶された個体では、皮膚片拒絶の時点でテラトーマも消失していた。この結果から、iPS細胞移植による免疫寛容誘導に対するCD24の寄与が示唆された。

[0100] ［実施例１０．iPS細胞及びテラトーマにおけるエリスロポエチン（EPO）の発現解析］

CBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種から20日後に形成されたテラトーマを採取し、さらに接種から40日後にテラトーマ、卵巣及び腎臓を採取した。なお、卵巣及び腎臓はエリスロポエチンを産生することが知られており、本実施例においてポジティブコントロールとして用いた。

[0101] CBA-iPS、卵巣及びテラトーマからTripure Isolation Reagent (Roche Life Science) を用いてRNAを抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いてcDNAを合成し、KAPA SYBR Fast qPCR Kitを用いて以下のプライマーでRT-PCRを行った。

マウスEpo

フォワードプライマー 5'-TCGTGACATTTTCTGCCTCC-3'（配列番号１）

リバースプライマー 5'-TCCCACCCTGCTGCTTTTAC-3'（配列番号２）

マウスGapdh

フォワードプライマー 5'-TCAAGTGGGGCGATGCTGGC-3'（配列番号３）

リバースプライマー 5'-TTGCTGATGATCTTGAGGCT-3'（配列番号４）

また、腎臓及びテラトーマのホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、

抗EPO抗体（6E5、Sigma-Aldrich）を用いて免疫染色を行った。

[0102] エリスロポエチン遺伝子発現量を図１１に、免疫染色画像を図１２に示す。テラトーマは、卵巣及び腎臓と同様に、エリスロポエチンを産生することが確認された。

[0103] ［実施例１１．エリスロポエチンが免疫寛容誘導に及ぼす影響］

B6C3F1マウスにCBA/Nマウスの皮膚片を移植した（n = 3, B6C3F1; n = 3, CBA/N; n = 3, BALB/c）。B6C3F1マウスには、皮膚移植の前日（Day -1）、同日（Day 0）、及び皮膚移植の翌日（Day 1）に5000U/kg体重のエリスロポエチン（エスポー注射液750、協和キリン）を腹腔内投与し、その後は週に３回、1000U/kg体重のエリスロポエチンを腹腔内投与した。エリスロポエチンに代えて同容量の生理食塩水を腹腔内投与したマウスを対照とした。

[0104] 移植皮膚片の生着期間を図１３に示す。エリスロポエチンの投与によって、CBA/N皮膚片の生着期間延長が認められた。この結果から、エリスロポエチンは、MHC半合致マイナー不一致のアロジェニックレシピエントにおける免疫制御に寄与することが示唆された。

[0105] ［実施例１２．iPS細胞移植による免疫寛容誘導（自己免疫疾患）］

自己免疫疾患モデルであるC3H/lprマウスを用いて、iPS細胞移植による免疫寛容誘導を評価した。C3H/lprマウスは、リンパ節腫脹を自然発症し、抗dsDNA抗体等の自己抗体を産生することが知られている。

[0106] ５週齢の雄性C3H/lprマウス（日本SLC株式会社）を、メデトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの3剤混合液を腹腔内注射して麻酔し、50 μLのマトリゲルに懸濁した2.5×10^{6}個のCBA-iPSを皮下接種した（n＝4）。また、CBA-iPSに代えて同容量の生理食塩水を50 μLのマトリゲルに懸濁し、皮下接種したC3H/lprマウスを無治療の対照とした（n＝5）。iPS細胞を皮下接種した全個体で、iPS細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に（手で触って）確認した。CBA-iPS接種の7週後、血液を採取し、血清中の抗dsDNA IgGをレビスR 抗dsDNA-マウスELISAキット（富士フイルムワコーシバヤギ（株））を用いて測定した。また、CBA-

iPS接種の10週後、テラトーマの流入領域リンパ節を採取し、重量を測定した。

[0107] なお、移植したCBA-iPS（H-2k/k）に対して、C3H/lprマウス（H-2k/k）はMHC合致かつマイナー不一致のアロジェニックレシピエントに相当する。したがって、C3H/lprマウスへのCBA-iPSの移植はMHC適合性がある。

[0108] 抗dsDNA IgG及びリンパ節重量を図１４に示す。図１４には、比較のため、同週齢の雄性C3Hマウスのデータも示した。抗dsDNA IgG、リンパ節重量はいずれも、無治療の対照では高値であったが、CBA-iPSを接種したC3H/lprマウスでは低下していた。この結果から、iPS細胞の移植によって、自己免疫疾患においても免疫寛容が誘導されることが確認された。なお、CBA-iPSを接種したC3H/lprマウスでは、体重減少は認められず、また外見及び行動面で健康状態に異常は認められなかった。

[0109] [実施例１３．テラトーマに浸潤する免疫細胞の経時的変化に関するシングルセルRNA解析]

B6C3F1に形成されたCBA-iPS由来テラトーマに浸潤する免疫細胞について、シングルセルRNA解析を用いて経時的に比較した。B6C3F1マウスに CBA-iPS細胞を皮下接種した。形成後10日目（n=33）、20日目（n=20）、40日目（n=20）のテラトーマを同日に回収し、各タイムポイント毎にまとめて以降の処理を行った。3つのタイムポイントから得られたテラトーマをBD Horizon™ Dri Tumor & Tissue Dissociation Reagent（BD Biosciences社製）を用いて単細胞懸濁液にし、FACSAria II（BD Biosciences社製）を用いてCD45陽性細胞を分画した。Next GEM Single Cell 3′ Gene Expression v3.1 (CG000315 Rev C)の10x Genomicsプロトコルに従い、相補的DNAを作製し、scRNA-seqライブラリーを調製した。ライブラリーは、タカラバイオ株式会社（日本）のIllumina NovaSeq Xでシーケンスした。生のシーケンスデータはLoupe Cell Browser（10x Genomics）を用いて処理し、さらにRパッケージSeurat（v4.0.1）を用いて処理し、低品質細胞をフィルタリングした。SeuratのSCTransform関数を用いてNormalization、Scaling、 Variable gene selectionを行い、得ら

れた遺伝子発現行列に対して主成分分析（PCA）を行った。次に、Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)により、細胞を13のクラスターに割り当てた。細胞タイプは、既知の細胞マーカーと遺伝子発現差解析に基づいて注釈付けされた。結果はR（v4.0.1）とSeurat、ggplot2、dplyr、dittoSeq、nebulosaを用いて可視化した。

[0110] テラトーマ内に浸潤する制御性T細胞(Treg)は、遺伝子発現情報に基づいて、3つのクラスターTreg-1、Treg-2、Treg-3に区分された（図１５A）。Treg-1のマーカー遺伝子は、trp53inp1、Lrig1、Zfp260、Itgae及びMyo3b、Treg-2のマーカー遺伝子は、Slamf8、Ifi205、Mgl2、Cd209a及びHtr7、Treg-3のマーカー遺伝子は、Pbk、Pclaf、Cenph、Neil3及びKif14である（図１５B）。Treg-1のマーカー遺伝子であるLrig1及びItgaeは、高い免疫抑制能の有するTregのマーカー遺伝子として知られている。Treg-1はまた、既知の免疫抑制因子であるIl10、Il2ra、Clta4、Entpd1及びNt5eを強く発現していた（図１５C）。

[0111] テラトーマにおけるTregの各クラスターの存在比率をタイムポイント毎に比較したところ、Treg全体に占めるTreg-1の割合が経時的に増加する傾向が認められ、免疫寛容誘導とTreg-1との関連性が示唆された（図１５D）。

[0112] [実施例１４．制御性T細胞が免疫寛容誘導に及ぼす影響]

CBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種日から60日間、3日に1回Anti-CD25 抗体（clone:PC61)またはアイソタイプコントロールであるControl IgGを30μg/mouseで腹腔内投与した。CD25抗体は、Tregの除去のために用いた。iPS細胞接種から10日後の時点で、全個体において接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に確認した。iPS細胞接種から40日後にCBA/Nマウス由来皮膚片を移植した。

[0113] 移植皮膚片の生着期間を図１６に示す。Anti-CD25抗体の投与によって、CBA/N皮膚移植片の生着率はControl IgG投与と比較して有意に低下したことから、テラトーマの形成を伴う免疫寛容誘導におけるTregの寄与が示唆された。

[0114] [実施例１５．iPS細胞移植後初期段階での免疫寛容誘導（皮膚移植）]

実施例５で行ったiPS細胞と皮膚片の同日移植試験と同じ試験を３回繰り返して実施した。具体的には、CBA-iPSをB6C3F1マウスの皮下に接種し、接種後４時間以内にCBA/Nマウス由来皮膚片を移植した。iPS細胞を皮下接種した全個体で、iPS細胞接種から10日後の時点で、接種部位にテラトーマが形成されていることを肉眼的及び触覚的に確認した。

[0115] 移植皮膚片の生着期間を図１７に示す。実施例５で行った試験を試行１回目とし、本実施例で追加で行った試験を試行２～４回目として表示した。試行２～４回目では、試行１回目とは異なり、iPS細胞と皮膚片を同日に移植した場合でも皮膚片の長期生着が認められた。この結果から、iPS細胞と皮膚片の同日移植によって、即座に免疫寛容が誘導されることが確認された。理論に拘束されるものではないが、本実施例で確認されたiPS移植後初期段階での免疫寛容は、他の実施例で確認された免疫寛容とは異なって事前のテラトーマの形成を必要としないものであり、別の作用機序の存在が推測される。

[0116] すなわち、多能性幹細胞を含有する免疫寛容誘導用組成物及び免疫寛容誘導剤は、含有される多能性幹細胞との間でMHC適合性がある哺乳動物個体に多能性幹細胞を移植することで、テラトーマを形成しなくても、免疫寛容を誘導することができる。これは、（１）移植した多能性幹細胞自体、（２）移植した多能性幹細胞から非テラトーマへの分化が進行した任意の細胞、（３）移植した多能性幹細胞からテラトーマへの分化の途中にある細胞、のいずれかによりMHC適合性がある哺乳動物個体において免疫寛容を獲得することができたと推測される。

請求の範囲

[請求項1] テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマを含有する、免疫寛容誘導用組成物。

[請求項2] 多能性幹細胞が、CD24を発現する、請求項１に記載の組成物。

[請求項3] テラトーマが、CD24を発現する、請求項１に記載の組成物。

[請求項4] テラトーマが、エリスロポエチン産生能を有する、請求項１に記載の組成物。

[請求項5] テラトーマが、制御性T細胞を集積又は浸潤させる能力を有する、請求項１に記載の組成物。

[請求項6] 多能性幹細胞が、胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞である、請求項１に記載の組成物。

[請求項7] 多能性幹細胞との間でMHC適合性がある哺乳動物個体に対して用いるための、請求項１に記載の組成物。

[請求項8] ドナー由来細胞、組織又は臓器の移植を受けるレシピエントに対して用いるための、請求項１に記載の組成物。

[請求項9] 多能性幹細胞が、ドナーに由来する、請求項８に記載の組成物。

[請求項10] レシピエントが、ドナーとの間でMHC適合性がある、請求項８に記載の組成物。

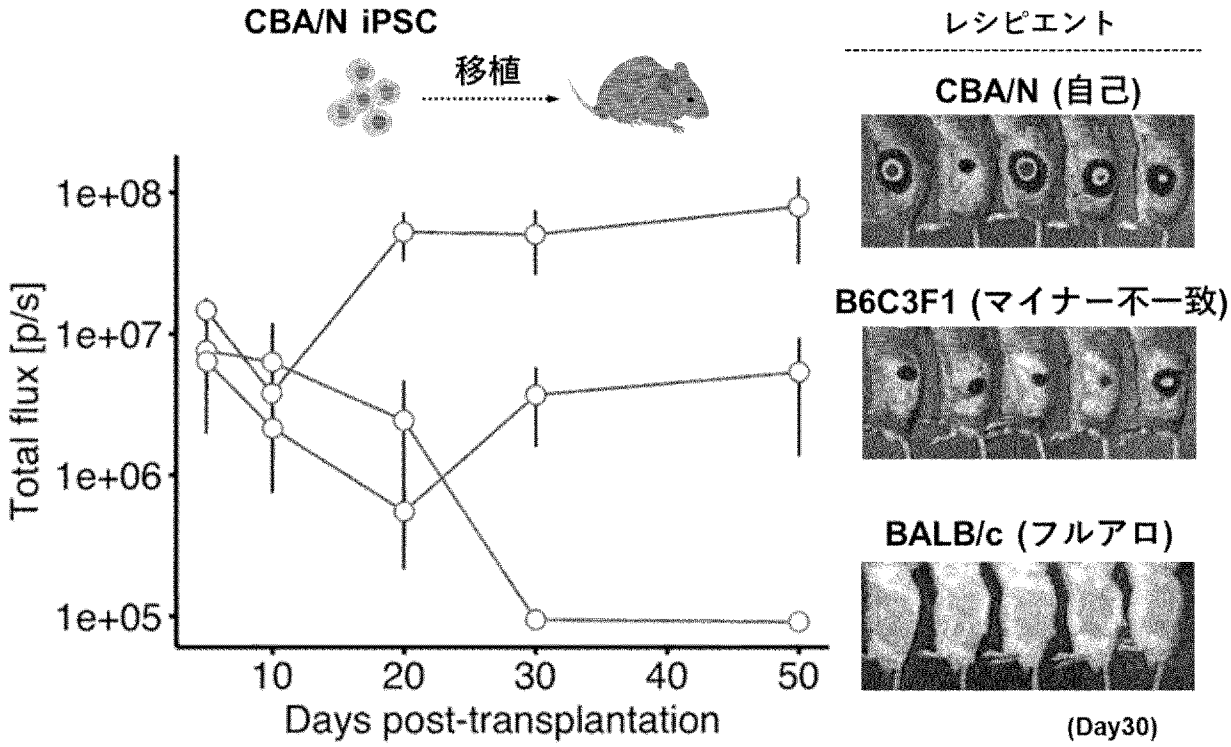
[請求項11] テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、免疫寛容が望まれる哺乳動物個体に投与することを含む、哺乳動物個体において免疫寛容を誘導する方法。

[請求項12] テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、レシピエントに投与すること、及びレシピエントにドナー由来細胞、組織又は臓器を移植することを含む、レシピエントにおけるドナー由来細胞、組織又は臓器の生着率を向上させる方法。

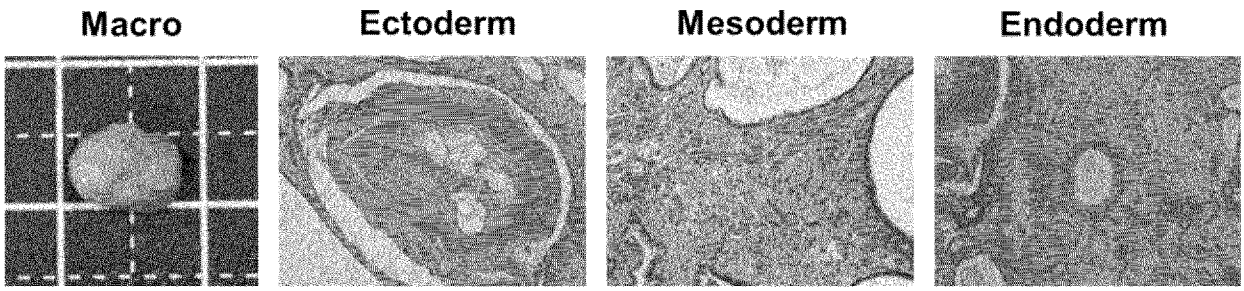
[請求項13] テラトーマ形成能を有する多能性幹細胞、又は前記多能性幹細胞由来のテラトーマの有効量を、自己免疫疾患を有する哺乳動物個体に投

与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法。

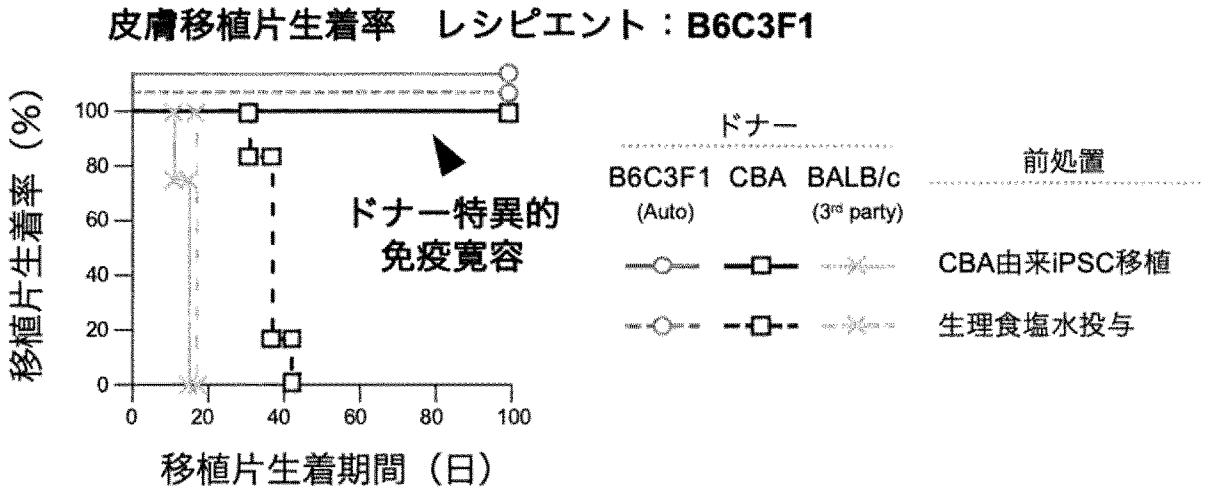
[図1]


CBA/N iPSC
移植
レシピエント
CBA/N (自己)
B6C3F1 (マイナー不一致)
BALB/c (フルアロ)
(Day30)
Total flux [p/s]
1e+08
1e+07
1e+06
1e+05
10
20
30
40
50
Days post-transplantation

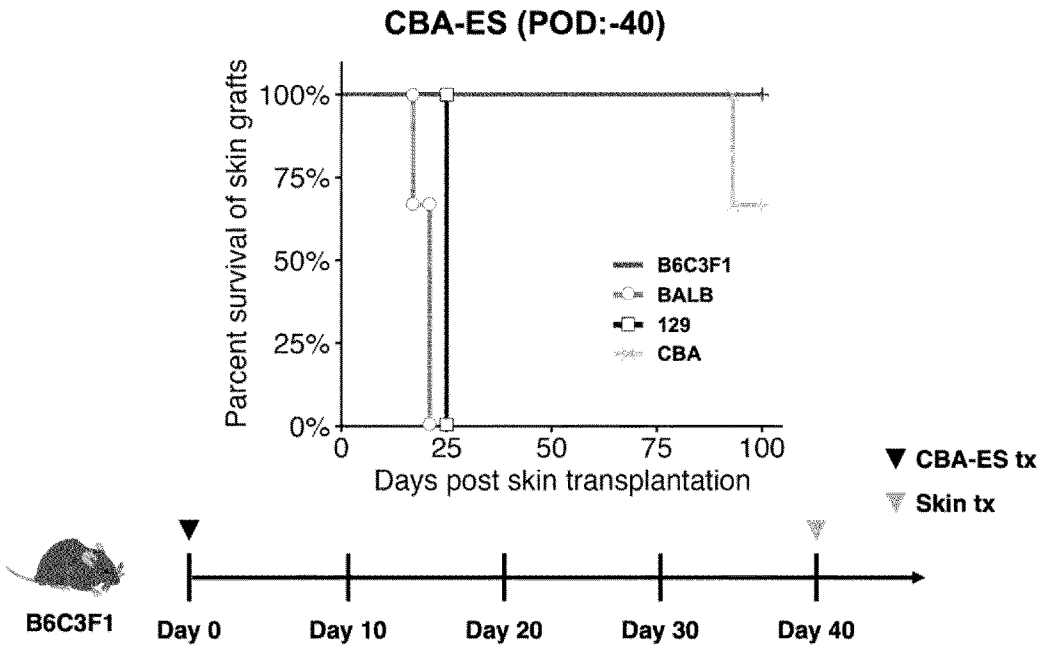
[図2]


Macro
Ectoderm
Mesoderm
Endoderm

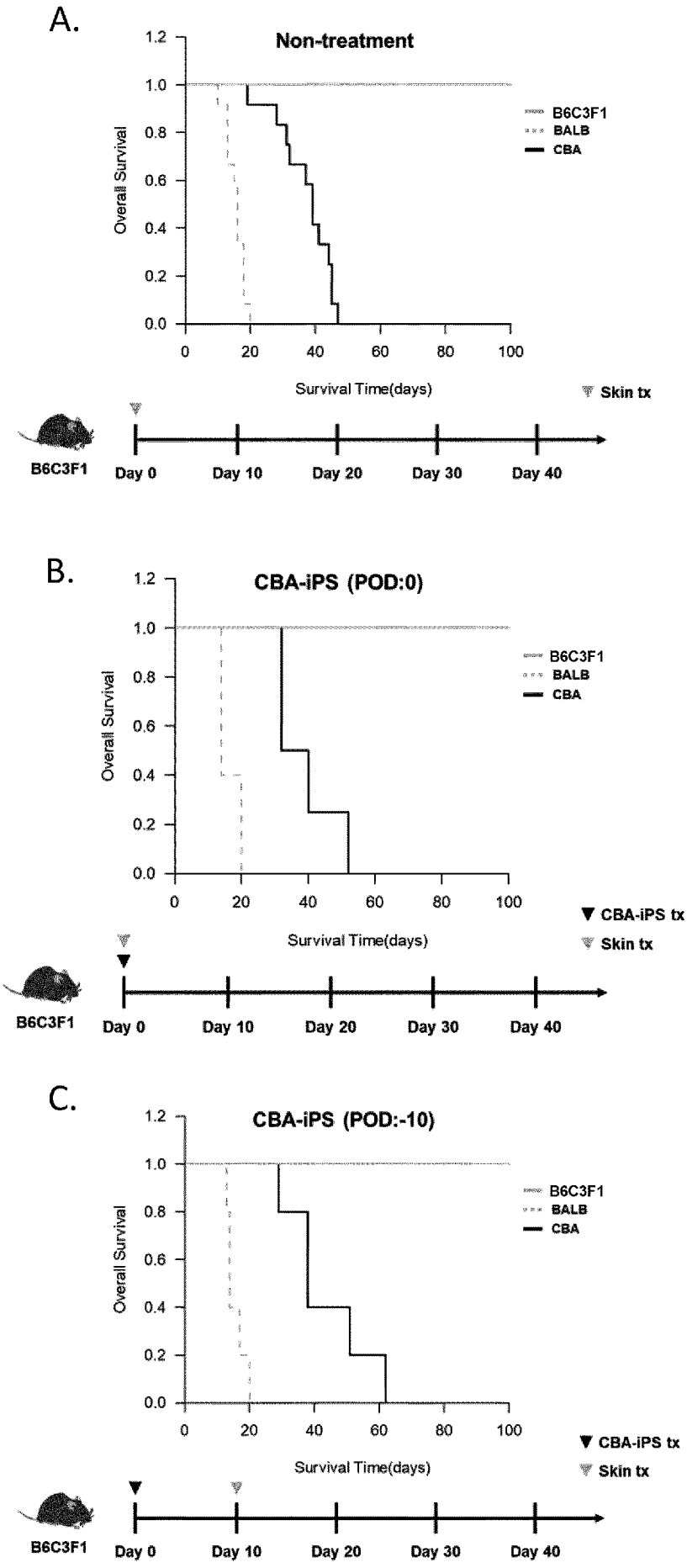
[図3]


皮膚移植片生着率　レシピエント：B6C3F1
移植片生着率（%）
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
移植片生着期間（日）
ドナー特異的
免疫寛容
ドナー
B6C3F1
(Auto)
CBA
BALB/c
(3rd party)
前処置
CBA由来iPSC移植
生理食塩水投与

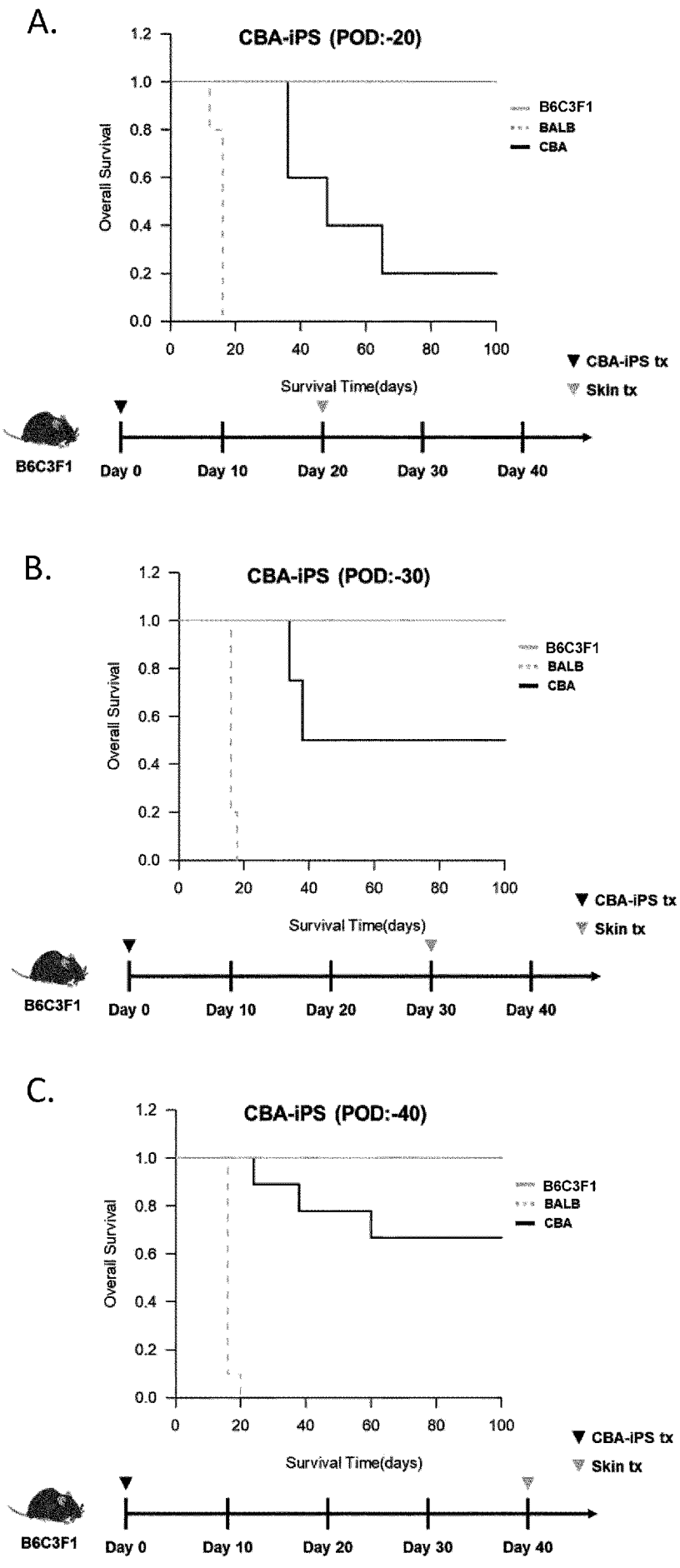
[図4]


CBA-ES (POD:-40)
Parcent survival of skin grafts
100%
75%
50%
25%
0%
0
25
50
75
100
Days post skin transplantation
B6C3F1
BALB
129
CBA
▼ CBA-ES tx
▼ Skin tx
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40

[図5]

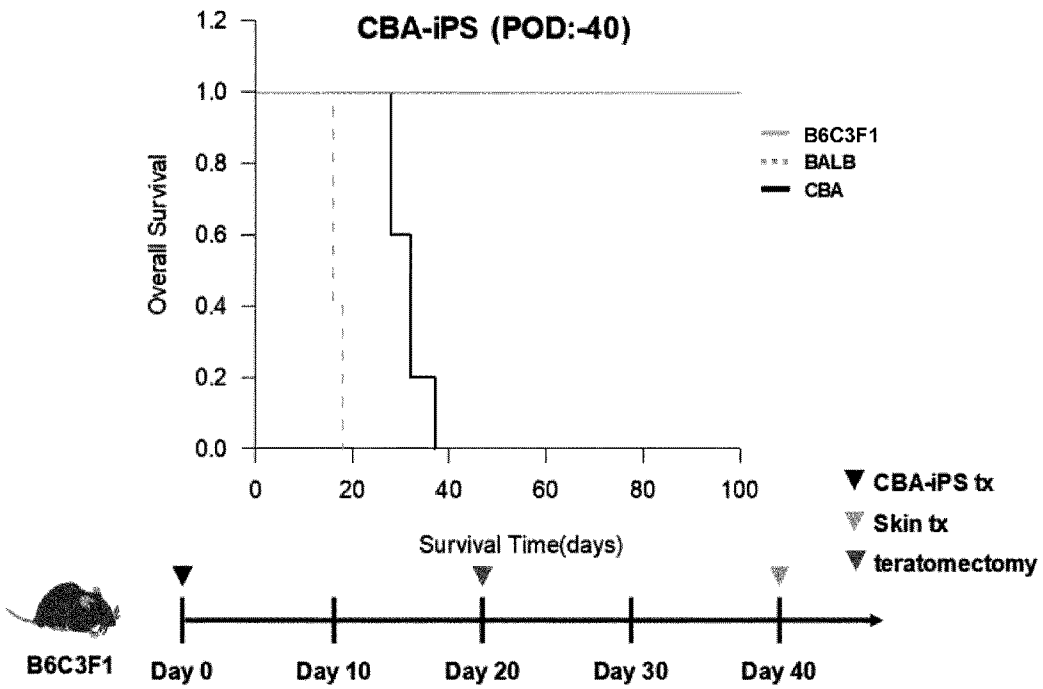

A.
Non-treatment
Overall Survival
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
Skin tx
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40
B.
CBA-iPS (POD:0)
Overall Survival
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
CBA-iPS tx
Skin tx
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40
C.
CBA-iPS (POD:-10)
Overall Survival
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
CBA-iPS tx
Skin tx
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40

[図6]

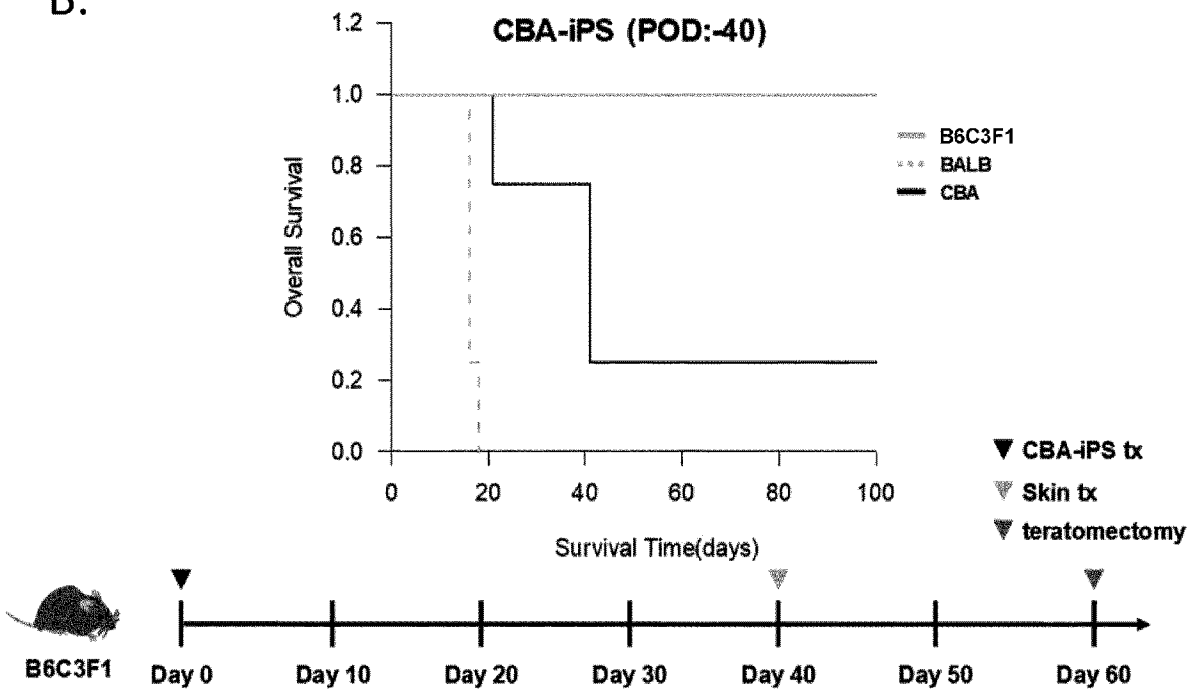

A.
CBA-iPS (POD:-20)
Overall Survival
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
CBA-iPS tx
Skin tx
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40
B.
CBA-iPS (POD:-30)
Overall Survival
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
CBA-iPS tx
Skin tx
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40
C.
CBA-iPS (POD:-40)
Overall Survival
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
CBA-iPS tx
Skin tx
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40

[図7]

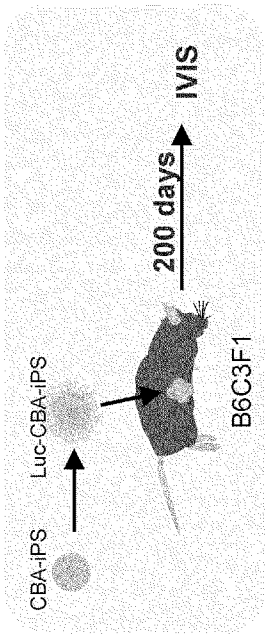
A.


CBA-iPS (POD:-40)
Overall Survival
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
20
40
60
80
100
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
CBA-iPS tx
Skin tx
teratomectomy
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40

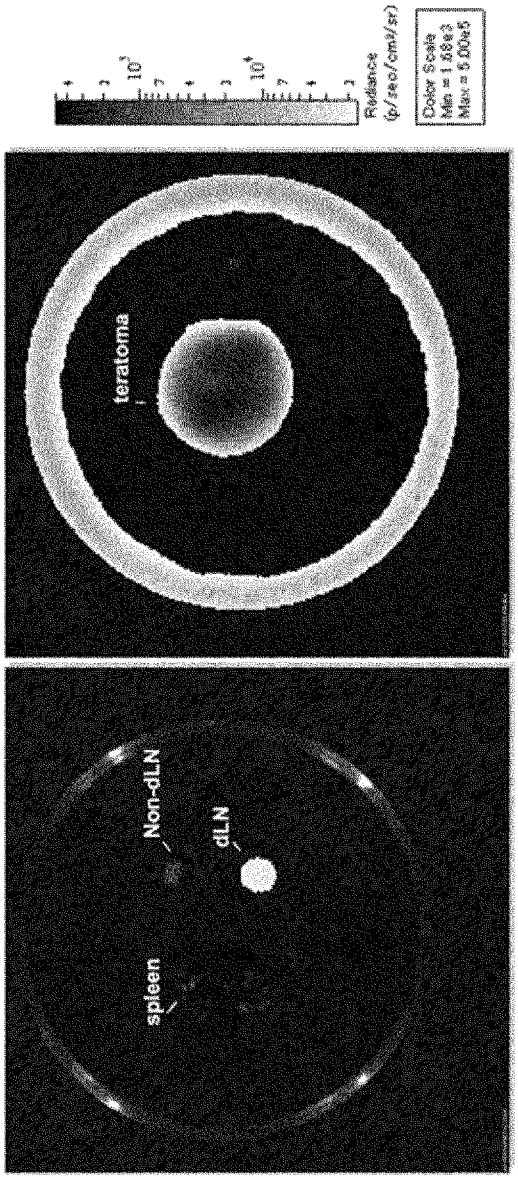
B.


CBA-iPS (POD:-40)
Overall Survival
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
20
40
60
80
100
Survival Time(days)
B6C3F1
BALB
CBA
CBA-iPS tx
Skin tx
teratomectomy
B6C3F1
Day 0
Day 10
Day 20
Day 30
Day 40
Day 50
Day 60

[図8]

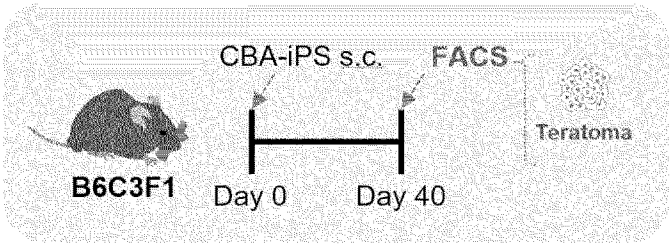


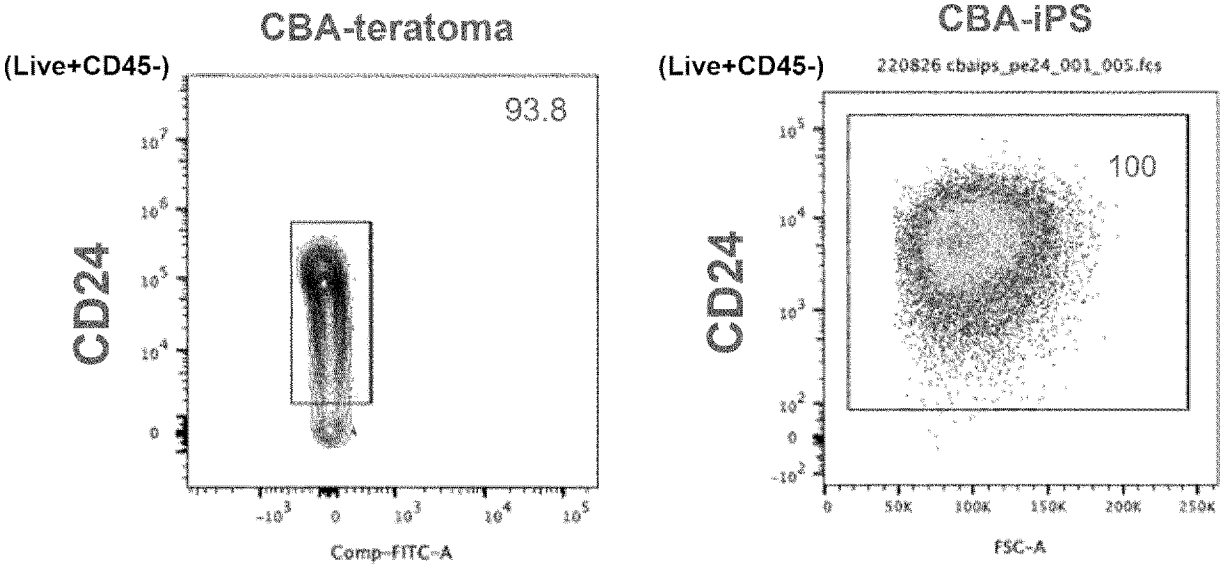
dLN: draining lymph node
Non- dLN: 遠隔のlymph node



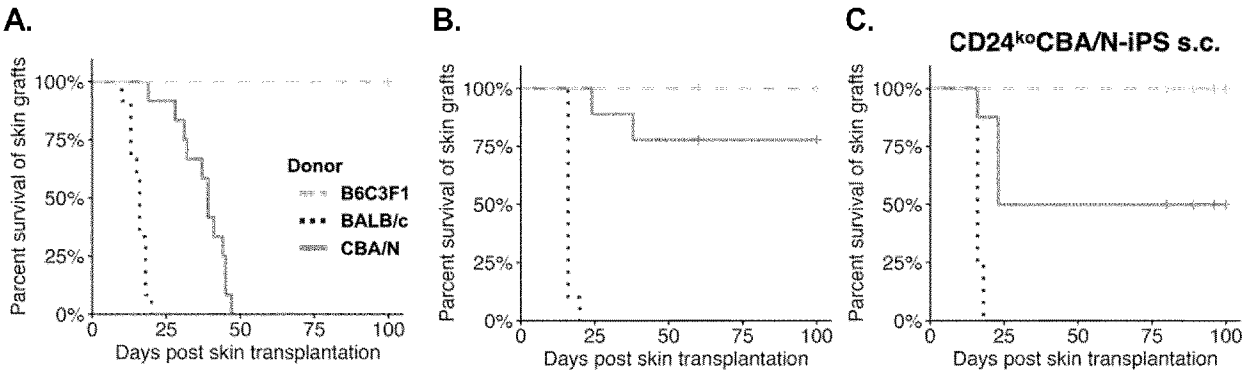
	Background	spleen	LN	dLN	Teratoma
Total flux[p/s]	2500	2500	2500	9254	3748000

[図9]

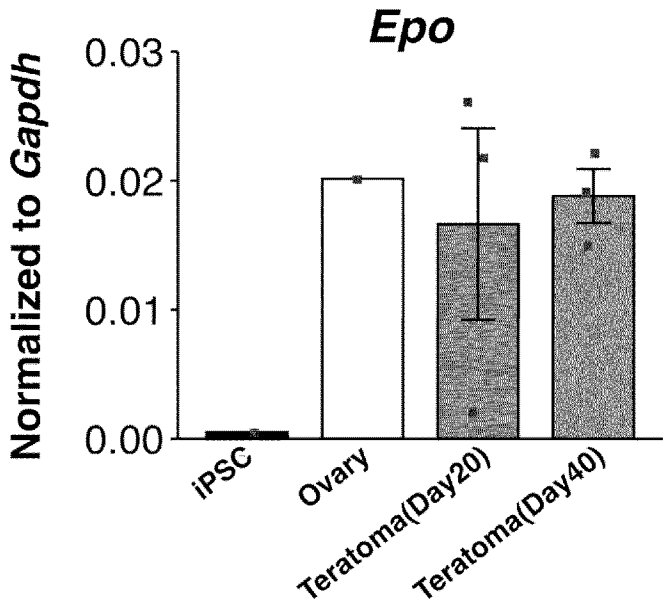

CBA-iPS s.c.
FACS
Teratoma
B6C3F1
Day 0
Day 40


CBA-teratoma
(Live+CD45-)
93.8
CD24
Comp-FITC-A
CBA-iPS
(Live+CD45-)
220826 cbaips_pe24_001_005.fcs
100
CD24
FSC-A

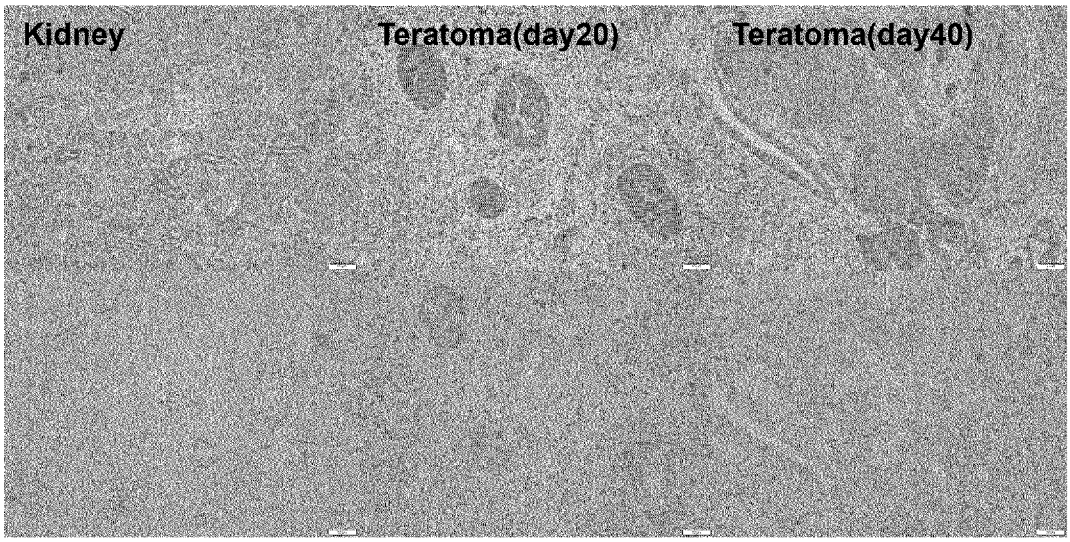
[図10]


A.
B.
C.
CD24koCBA/N-iPS s.c.
Parcent survival of skin grafts
Days post skin transplantation
Donor
B6C3F1
BALB/c
CBA/N

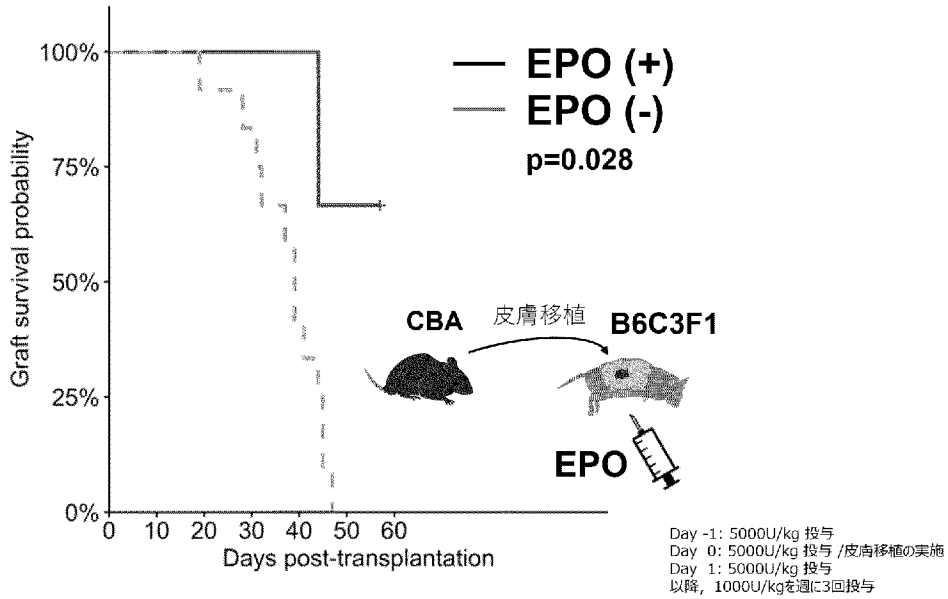
[図11]


Epo
Normalized to Gapdh
0.03
0.02
0.01
0.00
iPSC
Ovary
Teratoma(Day20)
Teratoma(Day40)

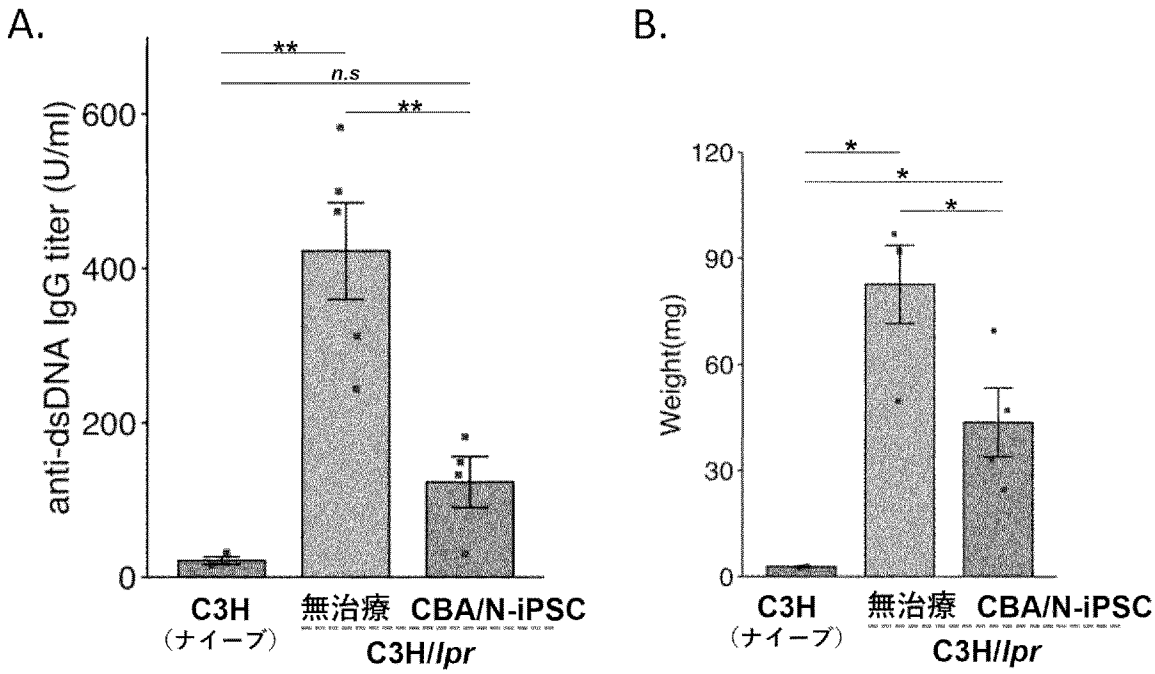
[図12]


Kidney
Teratoma(day20)
Teratoma(day40)

[図13]

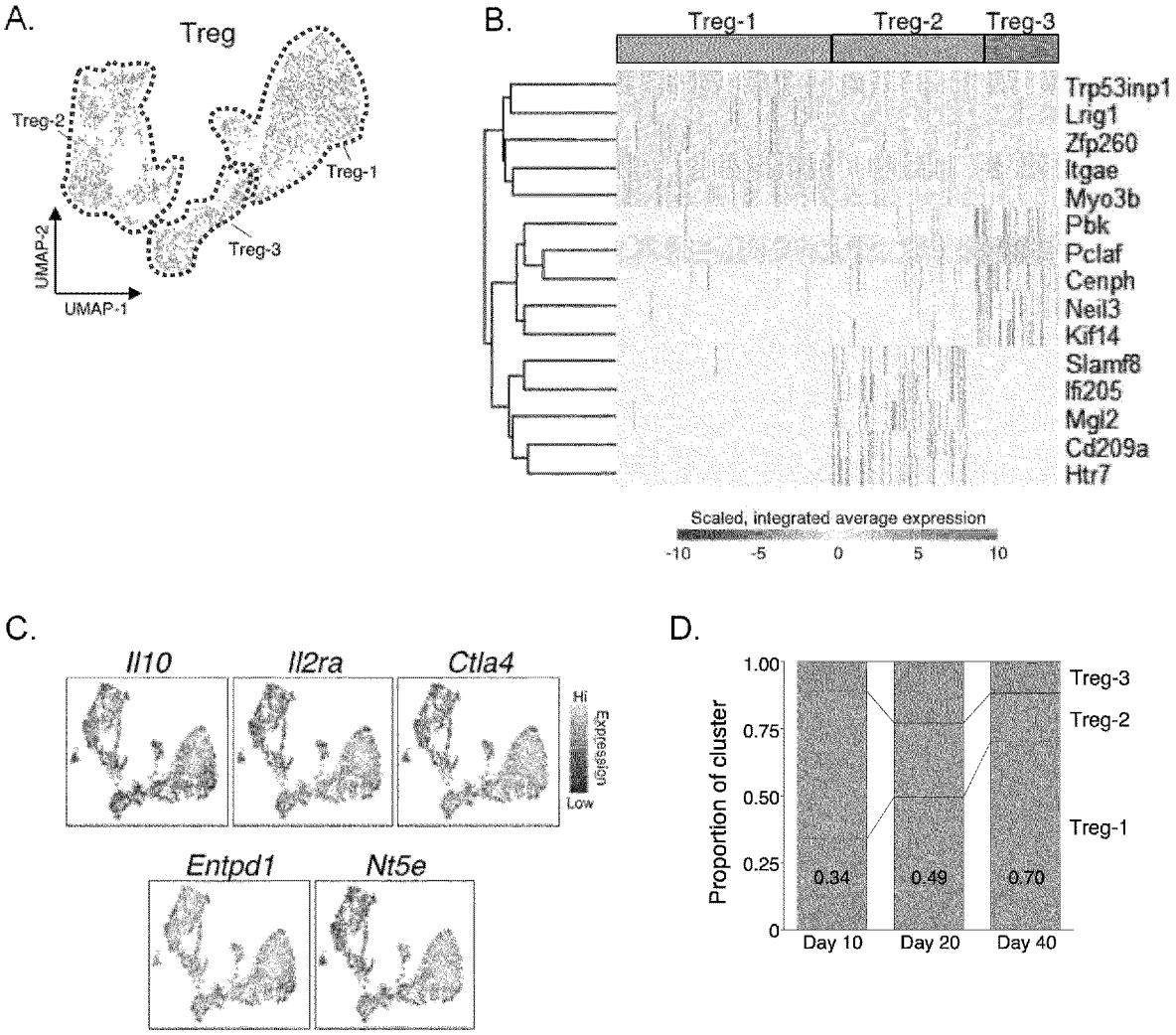


[図14]

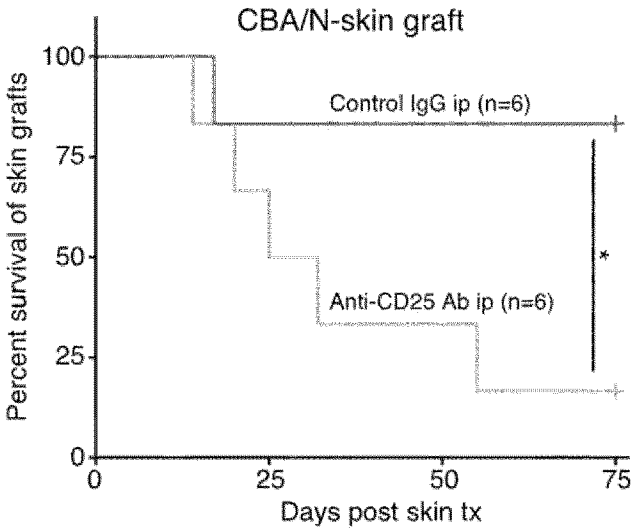


*$p < 0.05$, **$p < 0.01$
Tukey's HSD test

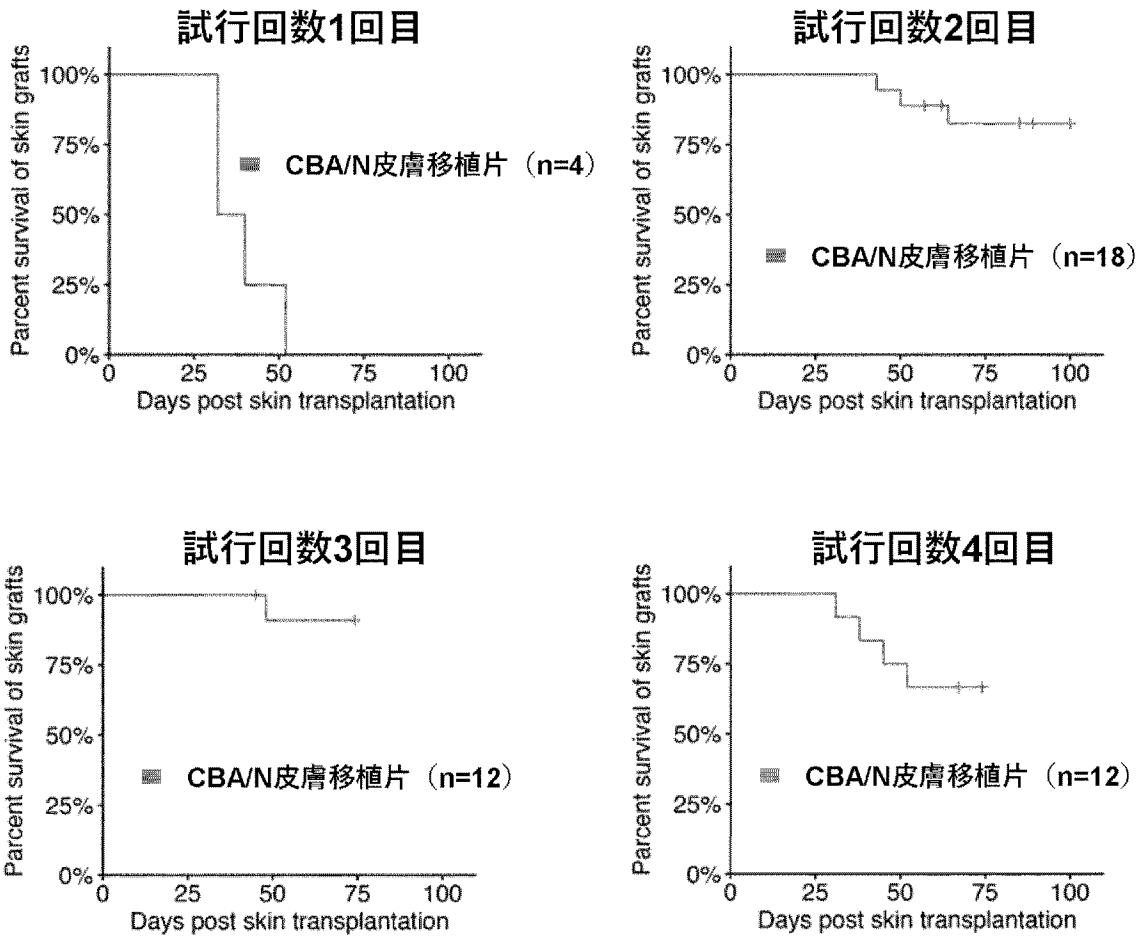
[図15]


A.
Treg
Treg-2
Treg-1
Treg-3
UMAP-2
UMAP-1
B.
Treg-1
Treg-2
Treg-3
Trp53inp1
Lrig1
Zfp260
Itgae
Myo3b
Pbk
Pclaf
Cenph
Neil3
Kif14
Slamf8
Ifi205
Mgl2
Cd209a
Htr7
Scaled, integrated average expression
-10
-5
0
5
10
C.
Il10
Il2ra
Ctla4
Hi
Expression
Low
Entpd1
Nt5e
D.
Proportion of cluster
1.00
0.75
0.50
0.25
0
0.34
0.49
0.70
Day 10
Day 20
Day 40
Treg-3
Treg-2
Treg-1

[図16]


CBA/N-skin graft
Percent survival of skin grafts
100
75
50
25
0
Control IgG ip (n=6)
Anti-CD25 Ab ip (n=6)
*
0
25
50
75
Days post skin tx

[図17]


試行回数1回目
Parcent survival of skin grafts
100%
75%
50%
25%
0%
0
25
50
75
100
Days post skin transplantation
CBA/N皮膚移植片（n=4）
試行回数2回目
Parcent survival of skin grafts
100%
75%
50%
25%
0%
0
25
50
75
100
Days post skin transplantation
CBA/N皮膚移植片（n=18）
試行回数3回目
Parcent survival of skin grafts
100%
75%
50%
25%
0%
0
25
50
75
100
Days post skin transplantation
CBA/N皮膚移植片（n=12）
試行回数4回目
Parcent survival of skin grafts
100%
75%
50%
25%
0%
0
25
50
75
100
Days post skin transplantation
CBA/N皮膚移植片（n=12）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/016734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/545(2015.01)i; ***A61P 37/06***(2006.01)i; ***C12N 5/09***(2010.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 5/0735***(2010.01)i
FI: A61K35/545 ZNA; A61P37/06; C12N5/0735; C12N5/10; C12N5/09

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)

A61K35/545; A61P37/06; C12N5/09; C12N5/10; C12N5/0735

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); CAplus/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.
X	JP 2016-187354 A (ASTERIAS BIOTHERAPEUTICS, INC.) 04 November 2016 (2016-11-04) paragraphs [0017], [0030], [0031], [0100], example 7	1-6, 11-12
Y		1-13
Y	JP 2015-502747 A (THE NEW YORK STEM CELL FOUNDATION) 29 January 2015 (2015-01-29) paragraphs [0046], [0091]	1-13
Y	JP 2013-507974 A (MCMASTER UNIVERSITY) 07 March 2013 (2013-03-07) paragraph [0019]	1-13
Y	US 2015/0038371 A1 (MCMASTER UNIVERSITY) 05 February 2015 (2015-02-05) paragraph [0016]	1-13

☑ 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
"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	Date of mailing of the international search report
13 June 2024	**25 June 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/JP2024/016734

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-532989 A (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO) 22 August 2013 (2013-08-22) claims 1, 9-11, paragraphs [0002], [0013], [0049], example 3	1-6, 11-13
Y		1-13
A	JP 2016-504324 A (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY) 12 February 2016 (2016-02-12)	1-13
A	KR 10-2280509 B1 (KONKUK UNIVERSITY GLOCAL INDUSTRY to ACADEMIC COLLABORATION FOUNDATION et al.) 22 July 2021 (2021-07-22)	1-13
A	ROUX, Clemence. et al. Immunosuppressive mesenchymal stromal cells derived from human-induced pluripotent stem cells induce human regulatory T cells in vitro and in vivo. Frontiers in Immunology. 2018, vol. 8, Article 1991, pp. 1-14, DOI:10.3389/fimmu.2017.01991	1-13
A	大塚亮他. 多能性幹細胞を用いた免疫寛容誘導. 移植. 2017, vol. 52, no. 6, pp. 489-494, (OTSUKA, Ryo et al. Immune tolerance induction through using pluripotent stem cells. Japanese Journal of Transplantation.)	1-13
P, X	木村礼子他. 多能性幹細胞による移植免疫寛容誘導に赤芽球は寄与するか. Organ Biology. October 2023, vol. 30, no. 3, p. 106, O2-2, non-official translation (KIMURA, Reiko et al. Do Erythroblasts Contribute to Pluripotent Stem Cell-Based Transplantation Tolerance Induction?)	1-13
P, X	鎌谷智紀他. iPS細胞が誘導する移植免疫寛容のメカニズム解明. Organ Biology. October 2023, vol. 30, no. 3, p. 81, S7-2, non-official translation (KAMATANI, Tomoki et al. Elucidating the Mechanisms of Transplantation Tolerance Induced by iPS Cells.)	1-13
P, A	LO, Tzu-Chi et al. Priming of macrophage by glycosphingolipids from extracellular vesicles facilitates immune tolerance for embryo-maternal crosstalk. Developmental cell. November 2023, vol. 58, no. 22, pp. 2447-2459, e1-e5, http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2023.09.012	1-13
P, A	WO 2023/176986 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 21 September 2023 (2023-09-21)	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/016734

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 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/016734

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2016-187354 A	04 November 2016	WO 2003/050251 A2 p. 4, paragraph 1, p. 7, paragraphs 5, 6, p. 20, paragraph 2, example 7 US 2003/0153082 A1 EP 2292734 A1 CA 2469483 A1 CN 1630716 A KR 10-2004-0081741 A AU 2002366603 A1 JP 2005-511084 A	
JP 2015-502747 A	29 January 2015	WO 2013/082509 A1 paragraphs [0054], [0099] US 2013/0345094 A1 EP 2785829 A1 AU 2012345676 A1 CA 2857295 A1 CN 104080906 A KR 10-2014-0101393 A	
JP 2013-507974 A	07 March 2013	US 2012/0214236 A1 paragraph [0029] WO 2011/050470 A1 EP 2494032 A1 CA 2779039 A1 AU 2010312291 A1	
US 2015/0038371 A1	05 February 2015	WO 2011/026222 A1 CA 2688760 A1	
JP 2013-532989 A	22 August 2013	WO 2012/014247 A1 p. 1, lines 10-13, p. 6, lines 2-6, p. 16, lines 31-37, example 3 EP 2598632 A1	
JP 2016-504324 A	12 February 2016	US 2015/0313946 A1 WO 2014/093948 A1 EP 2931877 A1 CA 2895148 A1 AU 2013358904 A1 CN 105008521 A KR 10-2015-0118100 A	
KR 10-2280509 B1	22 July 2021	(Family: none)	
WO 2023/176986 A1	21 September 2023	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/016734

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 35/545(2015.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; C12N 5/09(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/0735(2010.01)i
FI: A61K35/545 ZNA; A61P37/06; C12N5/0735; C12N5/10; C12N5/09

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））

A61K35/545; A61P37/06; C12N5/09; C12N5/10; C12N5/0735

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 (JDreamIII); CAplus/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
X	JP 2016-187354 A (アステリアス バイオセラピューティクス インコーポレイテッド) 04.11.2016 (2016-11-04) 段落0017,0030,0031,0100,実施例7	1-6,11-12
Y		1-13
Y	JP 2015-502747 A (ザ ニューヨーク ステム セル ファウンデーション) 29.01.2015 (2015-01-29) 段落0046, 0091	1-13
Y	JP 2013-507974 A (マックマスター ユニバーシティー) 07.03.2013 (2013-03-07) 段落0019	1-13
Y	US 2015/0038371 A1 (MCMASTER UNIVERSITY) 05.02.2015 (2015-02-05) [0016]	1-13

☑ 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
“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	国際調査報告の発送日
13.06.2024	25.06.2024

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）
六笠　紀子 4U 9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2013-532989 A (ウニヴェルシタ・デッリ・ストゥーディ・ディ・ペルージャ) 22.08.2013 (2013-08-22) 特許請求の範囲請求項1,9-11, 段落0002,0013,0049, 例3	1-6,11-13
Y		1-13
A	JP 2016-504324 A (ラトガース, ザ ステート ユニバーシティ オブ ニュー ジャージー) 12.02.2016 (2016-02-12)	1-13
A	KR 10-2280509 B1 (KONKUK UNIVERSITY GLOCAL INDUSTRY-ACADEMIC COLLABORATION FOUNDATION et al.) 22.07.2021 (2021-07-22)	1-13
A	ROUX, Clemence. et al. , Immunosuppressive mesenchymal stromal cells derived from human-induced pluripotent stem cells induce human regulatory T cells in vitro and in vivo., Frontiers in Immunology, 2018, Vol. 8, Article 1991,page 1-14, DOI:10.3389/fimmu.2017.01991	1-13
A	大塚亮他, 多能性幹細胞を用いた免疫寛容誘導, 移植, 2017, Vol.52, No.6, pp.489-494	1-13
P, X	木村礼子他, 多能性幹細胞による移植免疫寛容誘導に赤芽球は寄与するか, Organ Biology, 2023.10, Vol.30 No.3, Page.106,02-2	1-13
P, X	鎌谷智紀他, iPS細胞が誘導する移植免疫寛容のメカニズム解明, Organ Biology, 2023.10, Vol.30, No.3, Page.81,S7-2	1-13
P, A	LO, Tzu-Chi et al., Priming of macrophage by glycosphingolipids from extracellular vesicles facilitates immune tolerance for embryo-maternal crosstalk. , Developmental cell, 2023.11, Vol. 58, No. 22, pp. 2447-2459,e1-e5, http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2023.09.012	1-13
P, A	WO 2023/176986 A1 (国立大学法人北海道大学) 21.09.2023 (2023-09-21)	1-13

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/016734

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:

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/JP2024/016734

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-187354 A	04.11.2016	WO 2003/050251 A2 第4頁第1段落，第7頁第5段落～第6段落，第20頁第2段落，Example 7 US 2003/0153082 A1 EP 2292734 A1 CA 2469483 A1 CN 1630716 A KR 10-2004-0081741 A AU 2002366603 A1 JP 2005-511084 A	
JP 2015-502747 A	29.01.2015	WO 2013/082509 A1 [0054], [0099] US 2013/0345094 A1 EP 2785829 A1 AU 2012345676 A1 CA 2857295 A1 CN 104080906 A KR 10-2014-0101393 A	
JP 2013-507974 A	07.03.2013	US 2012/0214236 A1 [0029] WO 2011/050470 A1 EP 2494032 A1 CA 2779039 A1 AU 2010312291 A1	
US 2015/0038371 A1	05.02.2015	WO 2011/026222 A1 CA 2688760 A1	
JP 2013-532989 A	22.08.2013	WO 2012/014247 A1 page 1 lines 10-13, page 6 lines 2-6, page 16 lines 31-37, Example 3 EP 2598632 A1	
JP 2016-504324 A	12.02.2016	US 2015/0313946 A1 WO 2014/093948 A1 EP 2931877 A1 CA 2895148 A1 AU 2013358904 A1 CN 105008521 A KR 10-2015-0118100 A	
KR 10-2280509 B1	22.07.2021	（ファミリーなし）	
WO 2023/176986 A1	21.09.2023	（ファミリーなし）	