

(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
2019年3月28日(28.03.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/059267 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/53 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/034769

(22) 国際出願日: 2018年9月20日(20.09.2018)

(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 2017-181524 2017年9月21日(21.09.2017) JP

(71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人 京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 平原 一樹 (HIRAHARA, Kazuki); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 久徳 真梨子(KYUTOKU, Mariko); 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). ▲濱▼西潤三(HAMANISHI, Junzo); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 堀川 直城(HORIKAWA, Naoki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 小野 新次郎, 外(ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

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

(54) Title: IMMUNOSUPPRESSIVE MYELOID CELL MARKER

(54) 発明の名称: 免疫抑制性ミエロイド細胞マーカー

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a technique for identifying immunosuppressive myeloid cells. In the present invention, immunosuppressive myeloid cells can be identified by recognizing CD206 in myeloid cells.

(57) 要約: 本発明の課題は、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する技術を提供することである。ミエロイド細胞におけるCD206を認識することによって免疫抑制性ミエロイド細胞を同定することができる。



WO 2019/059267 A1

明 細 書

発明の名称：免疫抑制性ミエロイド細胞マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する技術に関する。特に本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞のマーカーに関しており、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定するための薬剤や方法、免疫抑制性ミエロイド細胞を標的とした物質のスクリーニング方法、および免疫抑制性ミエロイド細胞を標的としたがん治療などにも関する。

背景技術

[0002] 骨髓由来免疫抑制性細胞（MDSC, myeloid-derived suppressor cells）は、T細胞増殖抑制を主たる作用とするミエロイド細胞である。MDSCは抗腫瘍免疫反応を強力に抑制することで腫瘍増殖に対して促進的に作用すると考えられている（非特許文献1）。予後不良がん患者や、免疫チェックポイント阻害剤などを用いた免疫療法が奏効しにくいがん患者では末梢血中MDSCが多いと報告されており、MDSCはがんに対する免疫療法の標的として重要な細胞群と考えられている。すなわち、MDSCを特異的に除去する医薬品やMDSCの免疫抑制機能を阻害する医薬品が開発できれば、抗腫瘍免疫が賦活化してがんに対する治療効果をもたらすことが期待される。

[0003] MDSCは、アルギナーゼ、活性酸素、一酸化窒素、TGF- β 、IL-10などの産生を介して、T細胞を不活性化したり制御性T細胞（Treg）を誘導したりすることで、免疫抑制機能を発現すると考えられている（非特許文献1）。

[0004] MDSCは多様な細胞集団であり、単球系のMDSC（M-MDSC, Monocytic-MDSC）と顆粒球系のMDSC（G-MDSC, Granulocytic-MDSC）が存在するとされる（非特許文献1）。MDSCを識別する明確なマーカーは定まっていないものの、非特許文献1

では、ヒトおよびマウスにおいて、特定の細胞表面分子を発現している細胞群をM-MDSCおよびG-MDSCとみなすことが提唱されている。ヒトMDSCについては、M-MDSC及びG-MDSCに共通する形質として、Lineageマーカー（CD3、CD14、CD19、CD56）陰性、HLA-DR陰性、CD11b陽性、CD33陽性細胞をMDSCとみなすことが可能である。

[0005] M-MDSCは、さらに分化段階が進むとマクロファージに分化する。腫瘍に浸潤、集積し腫瘍微小環境の影響を受けたマクロファージは腫瘍関連マクロファージ（TAM, tumor-associated macrophage）と呼ばれ、血管新生因子や細胞増殖因子の産生、抗腫瘍免疫の抑制を介して、腫瘍促進的に作用すると考えられている（非特許文献2）。マクロファージは、主に活性化様式の違いからM1マクロファージとM2マクロファージに大別され、TAMはM2マクロファージに偏向しているとの仮説が提唱された。しかし現在においては、TAMはヘテロな細胞集団であり、生体内のマクロファージをM1/M2に単純分類化して解釈することはできないと認識されている（非特許文献3）。TAMのうち特に直接的にT細胞増殖抑制作用を示すマクロファージとMDSCは機能的にもマーカー分子も共通性が高く、厳密に識別することは困難であると考えられる。このため、本明細書ではそれらの細胞群を総称して「免疫抑制性ミエロイド細胞」と称することとする。

[0006] 免疫抑制性ミエロイド細胞を治療標的とする上での課題は、特異的なマーカーが無いことである。ヒトCD11bは好中球上にも発現し、ヒトCD33もミエロイド細胞に広く発現する分子であるため、例えばこれらに特異的な抗体医薬を開発した場合には、好中球減少症などの副作用を生じる可能性がある。ヒト免疫抑制性ミエロイド細胞に特異性の高いマーカー分子が見出すことができれば、治療実用化において有用性が高い。

[0007] CD206は、マンノース受容体としても知られる。1回膜貫通構造を有するC型レクチン受容体である。マクロファージ、樹状細胞などの細胞に発

現し、外来病原体などが有する糖鎖のうち、マンノース、N-アセチルグルコサミン、フコースと結合し、エンドサイトーシスやファゴサイトーシスを介して抗原を細胞内に取り込み、抗原提示に関与することで、自然免疫と獲得免疫の両方に寄与して宿主の感染防御を担う（非特許文献4）。CD206はM2マクロファージに発現することが知られている（非特許文献1）。しかしCD206発現と免疫抑制作用が相関するかについての情報はない。

[0008] CD206を標的とした診断薬として、乳癌やメラノーマ患者における転移リンパ節を検出するイメージング試薬（商品名：L y m p h o s e e k）がある。このイメージング試薬は、マンノース受容体への結合活性を有するマンノース結合デキストランをアイソトープ標識したものであるが、抗腫瘍効果を示すか否かは不明である。

[0009] また樹状細胞に発現するマンノース受容体に結合する抗CD206抗体と β ヒト絨毛性腺刺激ホルモン（ β hCG）を結合させた複合体が報告されている。樹状細胞による抗原提示効率を促進することで、 β hCGに対する抗原特異的細胞傷害性T細胞を誘導しやすくさせる効果が示されている（特許文献1）。しかしながら、当該抗体が免疫抑制性ミエロイド細胞に対して免疫調節機能を示すか否かは不明である。

[0010] その他、CD206を標的として開発されている医薬品の中で、免疫抑制性ミエロイド細胞を標的としているものは報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：国際公開WO2006/073493号

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Nature Reviews Immunology、12、p. 253-268（2012）

非特許文献2：Journal of Clinical Investigation、125（9）、p. 3365-3376（2015）

非特許文献3：Cancer Research、76、p. 6439-64

42 (2016)

非特許文献4: Journal of Leukocyte Biology
、92 (6)、p. 1177-1186 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の目的は、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する技術を提供することに関する。特に本発明の目的は、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定するための薬剤、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する方法、免疫抑制性ミエロイド細胞を標的とした医薬品をスクリーニングする方法、および免疫抑制性ミエロイド細胞を標的としたT細胞増殖剤やがんに対する治療技術などを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 上記課題について鋭意検討したところ、本発明者らは、CD206を有するミエロイド細胞がT細胞増殖を抑制することを見出し、これに基づいて本発明を完成させるに至った。

[0015] 本発明は、これに限定されるものではないが、以下の発明を包含する。

(1) CD206を認識する物質を含んでなる、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定するための薬剤。

(2) 前記物質が、抗体又はその機能的断片である、(1)に記載の薬剤。

(3) 免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を含んでなる、がんを治療するための医薬。

(4) 前記物質が抗体又はその機能的断片である、(3)に記載の医薬。

(5) T細胞の増殖を促進するための、(3)又は(4)に記載の医薬。

(6) ADCC活性、CDC活性及び／又はADCP活性による免疫抑制性ミエロイド細胞に対する傷害作用を有する、(3)～(5)のいずれかに記載の医薬。

(7) 薬物をさらに含む、(3)～(6)のいずれかに記載の医薬。

- (8) 前記薬物が殺細胞薬である、(7)に記載の医薬。
- (9) 免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される、(3)～(8)のいずれか1項に記載の医薬。
- (10) T細胞の増殖を促進するための抗CD206抗体又はその機能的断片。
- (11) ADCC活性、CDC活性及び／又はADCP活性による免疫抑制性ミエロイド細胞に対する傷害作用を有する、(10)に記載の抗体又はその機能的断片。
- (12) 薬物と連結した、(10)又は(11)のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。
- (13) 前記薬物が殺細胞薬である、(12)に記載の抗体又はその機能的断片。
- (14) 免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を含んでなる、T細胞増殖促進剤。
- (15) 前記物質が抗体又はその機能的断片である、(14)に記載のT細胞増殖促進剤。
- (16) 前記抗体又はその機能的断片がADCC活性、CDC活性及び／又はADCP活性による免疫抑制性ミエロイド細胞に対する傷害作用を有する、(15)に記載のT細胞増殖促進剤。
- (17) 前記抗体又はその機能的断片が殺細胞薬と連結した、(15)又は(16)に記載のT細胞増殖促進剤。
- (18) 免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される、(14)～(17)のいずれかに記載のT細胞増殖促進剤。
- (19) ミエロイド細胞上のCD206を認識又は検出する工程を含む、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する方法。
- (20) 前記認識又は検出する工程が、CD206に対する抗体又はその機能的断片を用いて行われる、(17)に記載の方法。
- (21) ミエロイド細胞上のCD206を認識又は検出することによって

免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する工程と；同定した免疫抑制性ミエロイド細胞を選抜する工程と；を含む、免疫抑制性ミエロイド細胞の選抜方法。

(22) 免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を選抜する工程を含む、がん治療薬のスクリーニング方法。

(23) 免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を含んでなる、組織中における免疫抑制性ミエロイド細胞の存在を評価するための診断薬。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定することができる。また本発明によれば、免疫抑制性ミエロイド細胞を標的とした医薬品をスクリーニングすることが可能になる。さらに本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞を標的としたがんの治療に有効である。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、実施例2に係る実験結果を示すグラフであり、卵巣癌患者腹水由来のCD33陽性ミエロイド細胞におけるCD206発現を示す。

[図2]図2は、実施例3に係る実験結果を示すグラフであり、卵巣癌患者腹水由来のCD33陽性CD206陽性細胞がT細胞増殖を細胞数依存的に抑制することを示す。T細胞が分裂するごとに半減するCFSEの蛍光を検出することによってT細胞増殖反応を測定した。

[図3]図3は、実施例4に係る実験結果を示すグラフであり、PBMCから誘導したCD33陽性細胞が細胞数依存的にT細胞増殖を抑制することを示す。対照として、凍結PBMCを解凍した直後のCD33陽性細胞を分離して用いた。

[図4]図4は、実施例5に係る実験結果を示すグラフであり、PBMCから誘導したMDSCのCD206発現を示す。右端のヒストグラムは、実線が抗CD206抗体、グレーがアイソタイプコントロール抗体の結果を示している。

[図5]図5は、実施例6に係る実験結果を示すグラフであり、PBMCから誘

導したMDSCの中でCD206強陽性細胞がT細胞増殖を強く抑制することを示す。

[図6]図6は、実施例7に係る実験結果を示すグラフであり、腫瘍CT26.WT細胞を皮下移植したマウスモデルにおいて、サポリン結合抗CD206抗体の静脈内投与により、腫瘍増殖が阻害されたことを示す。

発明を実施するための形態

[0018] 本明細書において、CD206を認識する「物質」とは、CD206を認識するものであれば特に限定されず、例えば、CD206に対する抗体若しくはその機能的断片、リガンド又は化合物が挙げられる。

[0019] 本明細書において、CD206を認識する物質を含んでなる免疫抑制性ミエロイド細胞を同定するための「薬剤」とは、後述するように、CD206を認識する物質を含有する免疫抑制性ミエロイド細胞の同定に用いられる薬剤、例えば、細胞マーカーや試薬が挙げられる。当該薬剤は、CD206を認識する物質以外に別の成分を含んでいてもよい。

[0020] 本明細書において「薬物」とは、後述するように、免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質と共に用いられる殺細胞薬や抗癌剤などの薬物の意味で用いられる。免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質と薬物は結合させていても結合させていなくてもよい。

[0021] 一つの態様において、本発明は、ミエロイド細胞のCD206を認識する物質を含む、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定するための薬剤である。本発明者らは、T細胞の増殖を抑制するミエロイド細胞について鋭意検討したところ、ミエロイド細胞におけるCD206が免疫抑制性ミエロイド細胞のマーカーとなることを見出した。また、本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞上又は細胞中のCD206を認識することを含む、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する方法に関する。

[0022] 骨髄由来免疫抑制性細胞(MDSC)は、T細胞増殖抑制を主たる作用とするミエロイド細胞である。MDSCは多様な細胞集団であり、単球系のM-MDSCと顆粒球系のG-MDSCが存在するとされるが、これまで、M

D S Cを識別する明確なマーカーは見出されていない。上述の非特許文献1 (Nature Reviews Immunology、12、p. 253-268、2012) においては、ヒトおよびマウスに関して、表1に示される細胞表面分子の発現様式を示す細胞群をM-MDSCおよびG-MDSCとみなすことが提唱されている。ヒトMDSCについては、M-MDSC及びG-MDSCに共通する形質として、Lineage marker (CD3、CD14、CD19、CD56) 陰性、HLA-DR陰性、CD11b陽性、CD33陽性細胞をMDSCとみなすことが可能である。

[0023] [表1]

ヒト

MDSC	Lineage ⁻ HLA-DR ^{-/low} CD11b ⁺ CD33 ⁺
G-MDSC	Lineage ⁻ HLA-DR ^{-/low} CD11b ⁺ CD33 ⁺ CD15 ⁺ (CD66b ⁺)
M-MDSC	Lineage ⁻ HLA-DR ^{-/low} CD33 ⁺ CD14 ⁺

マウス

MDSC	CD11b ⁺ Gr1 ⁺ CD11c ⁻ F4/80 ^{+/+} CD124 ⁺
G-MDSC	CD11b ⁺ Gr1 ^{high} Ly6C ^{low} Ly6G ⁺ CD49d ⁻
M-MDSC	CD11b ⁺ Gr1 ^{mid} Ly6C ^{high} Ly6G ⁻ CD49d ⁺

[0024] M-MDSCは、さらに分化段階が進むとマクロファージに分化する。腫瘍に浸潤、集積し腫瘍微小環境の影響を受けたマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (TAM) と呼ばれ、血管新生因子や細胞増殖因子の産生、抗腫瘍免疫の抑制を介して、腫瘍促進的に作用すると考えられている。

[0025] 本発明者らは、卵巣癌患者腹水中のCD33陽性ミエロイド細胞と健常人末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells、以下PBMCという) 中のCD33陽性ミエロイド細胞の遺伝子発現差異をMicroarray解析による比較により、CD206のmRNAが、患者群において高発現していることを見出した。

[0026] ヒトCD206のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は、GenBank

アクセッション番号NP__002429、1及びNM__002438、3を参照することにより入手可能である（ヌクレオチド配列：配列番号1、アミノ酸配列：配列番号2）。

[0027] ヒトCD206は、マンノース受容体とも呼ばれており、マルチレクチンレセプタ構造を持つI型単鎖膜貫通糖タンパクである。一般にCD206は、糖鎖を含むタンパクの細胞内取り込みなどにおいて重要な役割を果たすと考えられており、CD206抗原は、マクロファージのみならず、未熟樹状細胞や内皮細胞など、様々な細胞に発現することが知られている。リンパ球と単球には発現しないものの、単球からマクロファージに分化する過程でCD206の発現が増強する。骨髓由来のミエロイド細胞には免疫を抑制する細胞があることが知られていたが、本発明者らの検討によって、ミエロイド細胞上のCD206などが、免疫抑制性ミエロイド細胞か否かの良好なマーカーとなることが見出された。すなわち、細胞表面にCD206を有するミエロイド細胞は、T細胞などの免疫細胞の増殖を抑制する活性を有することが確認された。

[0028] 一つの態様において本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識又は検出することを含む、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する方法に関する。

[0029] 上記認識又は検出は、CD206に対する抗体又はその機能的断片を用いることができる。抗体又はその機能的断片を用いて目的分子を検出する方法は、当業者に周知の方法を用いて行うことができ、例えば、フローサイトメトリーや免疫組織化学的解析手法により検出される。ここで、抗体の機能的断片とは、その機能が維持された抗体断片を意味し、例えば、CD206に対する抗体の機能性断片とは、CD206を認識する機能が維持された抗体断片を意味する。

[0030] 免疫抑制性ミエロイド細胞を確認するにあたっては、CD206を認識する物質を用いることができる。このような物質としては、好ましい態様において、抗体やその機能的断片など、CD206に対するリガンドを用いるこ

とができる。ここで、リガンドとは、本明細書において細胞表面のマーカーに特異的に結合できる任意の分子を意味し、例えば、任意の化合物や抗体等が挙げられる。抗体である場合、抗体全体だけでなく、s c F vおよびドメイン抗体などの抗体フラグメントを含む。リガンドとして好ましくは、抗体又はその抗体フラグメントが挙げられる。

[0031] 本発明において、抗体は公知の方法によって準備すればよい。例えば、CD206に対する抗体は、非ヒト動物を目的抗原で免疫し、免疫成立後の動物からリンパ液、リンパ組織、血球試料又は骨髓由来の細胞を採取し、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)）に従って、CD206に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることができる。このような方法の具体的な例は、WO2009/48072（2009年4月16日公開）及びWO2010/117011（2010年10月14日公開）に記載されている。

[0032] 本発明の抗体には、モノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト化（Humanized）抗体、ヒト抗体なども含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0033] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984) 参照）。

[0034] ヒト化抗体としては、CDRのみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Nature (1986) 321, p. 522-525 参照）、CDR移植法

によって、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第WO90/07861号パンフレット）を挙げることができる。

[0035] 本発明の抗体としては、さらに、ヒト抗体を挙げることができる。例えば、抗CD206ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗CD206ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p. 722-727等を参照。）によって取得することができる。

[0036] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりにヒト人工染色体（Human artificial chromosome, HAC）ベクターやマウス人工染色体（Mouse artificial chromosome, MAC）ベクターなどのベクターを介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製、及びこれらの動物同士を掛け合わせるにより作り出すことができる。

[0037] また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは該cDNAを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転

換細胞を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる。ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0038] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et. al, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. et. al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et. al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), p. 427-431等参照。) も知られている。

[0039] 例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), p. 1105-1116) を用いることができる。抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる (WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388、*Annu. Rev. Immunol* (1994) 12, p. 433-455、*Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), p. 1105-1116)。

[0040] 免疫抑制性ミエロイド細胞上の特定のタンパク質を認識する物質としては、例えば、タンパク質に結合できる抗体またはその機能的断片などのリガンドが挙げられる。免疫抑制性ミエロイド細胞上の特定のタンパク質を認識す

る物質は、別のマーカー／受容体に対する複数のリガンドを含んでいてもよい。好ましい態様において、例えば、CD33に対するリガンドを含んでいてよい。

[0041] 一つの態様において、本発明によって免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する場合、ミエロイド細胞上のCD33を認識することをさらに行うことが好ましい。

[0042] 一つの態様において、本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞の存在を評価するための診断薬であり、これは、免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を含んでなる。

[0043] また、別の態様において本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞の選抜方法であり、この方法は、免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識することによって免疫抑制性ミエロイド細胞を同定することと、同定した免疫抑制性ミエロイド細胞を選抜することと、を含む。

[0044] 上述したように、免疫抑制性ミエロイド細胞は、免疫細胞であるT細胞の増殖抑制に関与するため、免疫抑制性ミエロイド細胞を制御することによってT細胞の増殖抑制を解除し、抗腫瘍免疫反応を賦活化することでがん細胞を殺傷することができる。本発明は、メラノーマや、前立腺、腸、乳房および肺におけるがんを含むがそれらに限定されない任意の腫瘍の治療において利用できる。本発明は、白血病およびリンパ腫の治療においても利用できる。

[0045] 本発明は、任意の哺乳類動物における腫瘍の治療に利用できるが、ヒトにおける腫瘍の治療に特に適している。なお、腫瘍という用語は、本明細書において良性および悪性の固形腫瘍ならびに固形癌および非固形癌を意味する。腫瘍またはがんの部位は特に制限されないが、例えば、卵巣、脳、乳房、子宮、子宮内膜、膵臓、腎臓、腹膜及び肺などを挙げることができる。

[0046] 一つの態様において本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を含んでなる、がんを治療するための医薬である。免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質としては、上述したように

、抗体やその機能的断片などをはじめとするリガンドを用いることができる。

[0047] 好ましい態様において本発明に係る医薬は、T細胞増殖促進作用を有しており、免疫抑制性ミエロイド細胞の働きを阻害することによって免疫細胞であるT細胞の増殖が促進される。

[0048] 好ましい態様において本発明に係る医薬は、免疫抑制性ミエロイド細胞に対する細胞傷害作用を有しており、例えば、抗体依存性細胞傷害（Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity、以下、ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity、以下、CDC活性）及び／又は抗体依存性細胞貪食（Antibody-dependent cellular phagocytosis、以下、ADCP）活性などによって免疫抑制性ミエロイド細胞を傷害することによって免疫細胞であるT細胞の増殖が促進される。抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性は、エフェクター活性を持つ免疫細胞、抗体および⁵¹Cr標識した標的細胞を接触させた場合に生じる細胞死を測定する⁵¹Crリリースアッセイの方法で測定することができる。補体依存性細胞傷害（CDC）活性は、血液に含まれる補体、抗体および標的細胞を接触させた場合に生じる細胞死を測定することで評価ができる。抗体依存性細胞貪食（ADCP）活性は、貪食作用を持つ免疫細胞、抗体および標的細胞を接触させることによって起こる貪食を2重蛍光標識法で測定することができる。

[0049] 好ましい態様において本発明に係る医薬は、免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質だけでなく、殺細胞薬や抗癌剤などの薬物をさらに含んでいてよい。CD206に対するリガンドと薬物は結合させていても結合させていなくてもよい。

[0050] CD206に対するリガンドが抗体である場合、当該抗体に薬物、例えば、細胞傷害作用を有する薬物を必要に応じてリンカーを通じて結合させ、抗体薬物複合体として用いてもよい。この場合、抗体は内在化活性を有する抗

体が好ましい。リンカーを通じて抗体と薬物を結合させる場合のリンカーは、抗CD206抗体と薬物の活性が維持される形態で結合させるリンカーであれば特に限定されない（Protein Cell、14 October 2016、Kyoji Tsuchikamaら（PROTEIN CELL、2018 Jan; 9（1）：33-46、Kyoji Tsuchikamaら））。

[0051] 抗体薬物複合体は、抗体と薬物がリンカーによって結合したものであり、ADC（Antibody-drug conjugates）とも称される。抗体に対して複数の薬物リンカーを結合させることができ、例えば、薬物リンカーが2個結合したADC、薬物リンカーが4個結合したADC、薬物リンカーが6個結合したADC、薬物リンカーが8個結合したADCなどを好適に使用することができ、これらの混合物を使用することもできる。ここで、薬物と抗体の比率はDAR（Drug to Antibody Ratio）とも呼ばれ、抗体1分子に対して結合する薬物の平均数を意味する。本発明においては、DARを、例えば、1～10とすることができ、2～9とすることが好ましく、3～8とすることがより好ましい。

[0052] ADCに用いる薬物は特に制限されないが、リンカー構造に結合できる置換基や部分構造を有していればよい。ADCの薬物は、リンカーの一部または全部が細胞内で切断されて細胞傷害作用などが発現する。ADCにおいて薬物はリンカーを介して抗体に結合しているが、この薬物とリンカー部分を含めた薬物リンカーを薬物と称することもある。

[0053] ADCに用いるリンカーは特に制限されず、開裂型リンカーおよび非開裂型リンカーのいずれも使用することができる。本発明においては、N置換マレイミジル基を有するリンカーを特に好ましい例として挙げることができる。開裂型リンカーとしては、例えば、リソソームプロテアーゼ、エンドソームプロテアーゼなどの細胞内プロテアーゼによって開裂するペプチドリンカーを挙げるができる。

[0054] 本発明に係るADCは、薬物リンカー中間体を用いて製造することもでき

る。すなわち、例えば、リンカー化合物のカルボキシル基と薬物のアミノ基とを縮合剤を用いるなどして反応させて薬物リンカー中間体を得て、この中間体を、抗体の鎖間チオールなどと反応させて使用することができる。好ましい態様において、本発明に係る薬物リンカー中間体はN置換マレイミジル基を有するが、これに限定されず、抗体の鎖間チオールとの反応が進行する官能基を有していれば好適に使用することができる。本発明においてADCは、例えば、抗体のジスルフィドを還元してチオール基に変換した上で、チオール基を有する抗体に対して薬物リンカーを反応させて製造することができる。

[0055] 一般に、抗体には4つの鎖間ジスルフィドが存在し、ジスルフィドは2つのチオール基から構成されるため、チオール基を用いてADCを製造する場合、薬物抗体比(DAR)は2、4、6または8となる。本発明においては、重鎖-軽鎖間チオールに薬物リンカーを結合させてもよいし、また、重鎖-重鎖間チオールに薬物リンカーを結合させてもよい。ADCは、薬物の結合数が制御されるよう、反応させる原料・試薬の使用量などの反応条件を規定して製造されるが、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。したがって、特に記載しないかぎり、DARは、抗体1分子への薬物の結合数の平均値として記載される。

[0056] ADCは、単独での使用の他、アジュバント療法において他の療法と組み合わせる薬剤としても使用でき、外科手術や、放射線療法、ホルモン療法などと組み合わせることができる。さらにはネオアジュバント療法における薬物療法の薬剤として使用することもできる。また、本発明に係るADCは、患者に対しては全身療法として投与する他、局所的に投与してもよい。本発明の好ましい態様において、非経口で投与され得るが、非経口の投与経路として、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下の経路を挙げることができる。投与方法としては、例えば、注入、ボーラス注射などを挙げることができる。

[0057] 薬物としては、抗癌剤だけでなく、抗菌、抗原生動物、抗ウイルスまたは

抗真菌の活性を有する他の作用物質などを好適に使用しうる。好ましい態様において、薬物としては、殺細胞薬を含む細胞傷害剤である。具体的には、薬物として、例えば、ドキソルビン、エピルビン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、シクロフォスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、パクリタキセル、ドキシタキセル、タキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシン C、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシン D、VP-16、クロラムブシル及びメルファランなどを挙げることができる。薬物として殺細胞薬を用いる場合は、例えば、サポリン、クルシン、クロチン、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、トリコテセン、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、コレラ毒素、ボツリヌス毒素、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファールサルシン、アレウリテス・フォーディタンパク質、ジアンチンタンパク質、カリケアマイシン、メイタンシノイド、パリトキシン、CC1065などを挙げることができる。

[0058] 本発明の抗CD206抗体は、治療の目的によって、2、3あるいはそれ以上の他の治療剤を投与することもできるし、それらの他の治療剤は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することができる。他の治療剤と抗CD206抗体は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することもできる。また、抗CD206抗体と他の治療剤を別々の製剤に封入して同時に投与することもできる。さらに、他の薬物と抗CD206抗体を相前後して別々に投与することもできる。すなわち、他の治療剤を投与した後に抗CD206抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与するか、あるいは抗CD206抗体又は該抗体の抗原結合断片を有効成分として含有する治療剤を投与した後に他の治療剤を投与しても良い。

[0059] 他の治療剤として、例えば、抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体などの、免疫チェックポイント阻害剤などを挙げることができる。ここで、免疫チェックポイント阻害剤とは、免疫チェックポイントとそのリガンドとの結合を阻害することにより、当該免疫チェックポイントによるシグナル伝達を阻害する薬剤をいう。免疫チェックポイントおよびそのリガンドとしては、例えば、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM3、LAG3、BTLN2、B7-H3、B7-H4、CD48、CD80、BTLA、2B4、CD160、CD60、CD86、VISTAなどを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。免疫チェックポイント阻害剤の好適な例としては、例えば、Pembrolizumab（CAS番号：1374853-91-4）、Nivolumab（CAS番号：946414-94-4）などのPD-1抗体、Atezolizumab（CAS番号：1380723-44-3）、Avelumab（CAS番号：1537032-82-8）、Durvalumab（CAS番号：1428935-60-7）などのPD-L1抗体を挙げることができる。その他にも、本発明において併用しうる他の治療剤として、例えば、血管新生阻害剤、代謝拮抗剤、植物アルカロイド、プラチナ製剤などの化学療法剤を好適に使用することができる。

[0060] 本発明は、治療及び／又は予防に有効な量の抗CD206抗体と、薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤などの添加剤を含む医薬組成物も提供する。当該医薬組成物は、抗CD206抗体とは別の有効成分をさらにふくんでいてもよい。

[0061] 本発明の医薬組成物は、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。これらの製剤用の物質の添加量は、抗CD206抗体の重量に対して0.01～100倍とするのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

[0062] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担

体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはpH 7.0-8.5のTrisバッファー、pH 4.0-5.5の酢酸バッファー、pH 3.0-6.2のクエン酸バッファーを含むことができる。また、これらのバッファーにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。本発明の医薬組成物には抗CD206抗体を含む医薬組成物並びに、抗CD206抗体及び少なくとも一つの抗腫瘍治療剤を含む医薬組成物を挙げることができ、本発明の医薬組成物は選択された組成と必要な純度を持つ薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗CD206抗体を含む医薬組成物並びに、抗CD206抗体及び少なくとも一つの抗癌剤治療剤を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

[0063] 本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができる。本発明の抗体をヒトに対して投与する際には、約0.1~100mg/kgを1~180日間に1回又は複数回投与すればよい。しかし、投与量や投与回数は、一般に、患者の性別、体重、年齢、症状、重篤度、副作用などを考慮して決定されるべきものであるので、上記の用量や用法には限定されないものとする。

[0064] 本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などを挙げることができる。投与経路は、経口経路又は非経口経路であり、非経口経路には、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、直腸内、経粘膜内、皮内などの経路が挙げられる。

[0065] また、本発明に基づいて、がん治療薬のスクリーニングを行うこともできる。すなわち、一つの態様において本発明は、免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を選抜する工程を含む、がん治療薬のスクリーニング方法である。

[0066] スクリーニングに供する被検物質の種類は特に限定されず、有機化合物又は無機化合物のいずれであってもよい。有機化合物としては低分子有機化合物のほか、アミノ酸類、オリゴペプチド類、ポリペプチド類、糖類、脂質類、核酸類など任意の有機化合物を被検物質としてスクリーニングを行うことができる。

実施例

[0067] 具体的な実施例を挙げつつ本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。なお、本明細書において、特に記載しない限り、濃度などは重量基準であり、数値範囲はその端点を含むものとして記載される。

[0068] (実施例 1. 卵巣癌患者腹水中ミエロイド細胞の遺伝子発現解析)

卵巣癌患者腹水中の CD 3 3 陽性ミエロイド細胞と健常人末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells、以下 PBMC という) 中の CD 3 3 陽性ミエロイド細胞について、遺伝子発現差異を Microarray 解析により比較した。

[0069] 6 名の卵巣癌患者の腹水から回収した細胞より、CD 3 3 陽性細胞を MACS 法で分離した。また 10 名の健常人の新鮮末梢血からフィコール密度勾配遠心法により PBMC を分離し、さらに CD 3 3 陽性細胞を MACS 法で分離した。MACS 法には、CD 3 3 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec 社) および自動磁気細胞分離装置 (autoMACS、Miltenyi Biotec 社) を用いた。

[0070] 分離した CD 3 3 陽性細胞から RNA を抽出し、品質確認後に Total RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析 (Affymetrix Gene Chip (商標) Array 発現解析) を実施した。卵巣癌患者と健常人の遺伝子発現差を解析したところ、患者群において、CD 206 タンパク質をコードする遺伝子である MRC 1 の mRNA 発現が、健常群と比較して 24 倍も高かった。ここで、遺伝子発現差の数値 (24 倍) は、患者群 mRNA 発現量平均値を健常人群 mRNA 発現量平均値で除して算出した。

[0071] (実施例 2. 卵巣癌患者腹水中ミエロイド細胞におけるタンパク質発現解析)

実施例 1 において見出した MRC 1 遺伝子について、卵巣癌患者腹水 CD 33 陽性ミエロイド細胞にてタンパクレベルで発現しているかをフローサイトメトリー法により解析した。

[0072] 卵巣癌患者より採取した腹水細胞について、APC-Cy 7 標識抗 CD 33 抗体及び APC 標識抗 CD 206 抗体で染色し、さらに 7-AAD で死細胞を染色した。フローサイトメーター (MACS Quant) を用いて、生細胞での CD 33 及び CD 206 発現を解析した。

[0073] 結果を図 1 に示す。卵巣癌患者腹水中 CD 33 陽性ミエロイド細胞における CD 206 発現を確認した。また CD 206 を発現する細胞は全て CD 33 を同時に発現していることが示された。

[0074] (実施例 3. 卵巣癌患者腹水中ミエロイド細胞の CD 206 陽性細胞による免疫抑制機能)

卵巣癌患者腹水中 CD 33 陽性ミエロイド細胞の免疫抑制活性と CD 206 の発現に関係性があるか、T 細胞増殖に対する抑制活性を指標として検討した。

[0075] 卵巣癌患者腹水中 CD 33 陽性ミエロイド細胞を、CD 206 陽性画分と CD 206 陰性画分に分離した。卵巣癌患者腹水より回収した細胞を実施例 2 と同様にして染色後、細胞懸濁液をセルソーター (FACS ARIA IIu、ベクトン・ディッキンソン社) を用いて、CD 33 陽性 CD 206 陽性細胞と CD 33 陽性 CD 206 陰性細胞を分離した。また、健常人末梢血 PBMC から CD 3 陽性 T 細胞を MACS 法で分離し、分離後の T 細胞を蛍光色素 CFSE で標識した。細胞が分裂するごとに半減する CFSE の蛍光をフローサイトメトリー法により検出することで、T 細胞増殖反応を測定できる。

[0076] 96 ウェル丸底プレートに、CD 33 陽性 CD 206 陽性細胞もしくは CD 33 陽性 CD 206 陰性細胞を、 2×10^4 細胞/ウェル、 4×10^4 細胞/

ウェル、または 8×10^4 細胞／ウェルとなるように播種した。そこに、CFSE標識CD3陽性T細胞を 1.6×10^5 細胞／ウェルとなるように加えた。さらに、Dynabeads Human T-Activator CD3／CD28 (ThermoFisher Scientific社)を 4×10^4 ビーズ／ウェルとなるように添加した。培地は、RPMI 1640に5%ヒトAB型血清、Penicillin／Streptomycin、1X MEM NEAA、1 mM Sodium Pyruvate、5 mM HEPESとなるように調整したもの（以下、共培養培地とする）を用いた。

[0077] 37℃、5%CO₂条件下でプレートを72時間培養後、細胞を回収した。回収した細胞を、PE標識抗CD3抗体、核染色試薬DAPIで染色した。フローサイトメーター (MACSQuant) を用いて測定し、FlowJo (Tree Star社) を用いて解析した。生細胞としてDAPI陰性細胞をゲートし、CD3陽性T細胞中のCFSE (FITC) のヒストグラムピークのうち、分裂ピークの割合を数値化して、T細胞増殖反応に対する抑制活性を比較した。

[0078] 結果を図2に示す。CD33陽性CD206陰性細胞 (CD33⁺CD206⁻) と比較して、CD33陽性CD206陽性細胞 (CD33⁺CD206⁺) はT細胞の増殖反応を強く抑制し、その抑制作用は共培養するCD33陽性CD206陽性細胞数に依存していた (分裂細胞の割合が、T細胞：CD33陽性CD206陽性細胞の比が8：1で45.3%、4：1で27.7%、2：1で8.67%)。この結果は、CD33陽性CD206陽性細胞がT細胞抑制に関与しており、CD33陽性CD206陽性細胞を除去することにより、T細胞抑制解除が可能となることを示している。

[0079] (実施例4. PBMCからの誘導によるMDSC調製)

凍結PBMC (Cellular Technology Limited社) を解凍し、CD3陽性細胞とCD3陰性細胞をMACS法で分離した。CD3陽性細胞はセルバンカー (日本全薬工業社) を用いて再び-80℃

で凍結保存した。CD3陰性細胞は、ヒト腎細胞癌株786-O (ATCC社CRL-1932)の培養上清20%およびhuman GM-CSF 10 ng/mLを添加した共培養培地（以下、誘導培地とする）を用いて、37℃、5%CO₂条件下で6～8日間培養した。培養後、接着細胞は細胞分散試薬Detachin (Genlantis社)を用いて剥離し、浮遊細胞と共に回収した。洗浄後細胞の一部は表面マーカーの発現解析に使用し、残りは実施例3と同様の方法でCD33陽性細胞を分離した。

[0080] 表面マーカーの発現解析は、LineageマーカーとしてFITC標識抗CD3抗体、FITC標識抗CD19抗体及びFITC標識抗CD56抗体を用いた。またPerCP-Cy5.5標識抗HLA-DR抗体、Pacific Blue標識抗CD11b抗体及びPE標識抗CD33抗体を用いた。細胞をこれら抗体で染色し、更にLIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (ThermoFisher Scientific社)を用いて死細胞染色を行った。染色した細胞はフローサイトメーター (FACS Canto II、ベクトン・ディッキンソン社)を用いて測定し、FlowJoを用いて解析した。誘導培養後の細胞には、Lineage陰性HLA-DR陰性及び弱陽性CD11b陽性CD33陽性のMDSCマーカーを発現する細胞が存在することを確認した。

[0081] 次に、誘導培養後の細胞に含まれるCD33陽性細胞にT細胞増殖反応への抑制活性があるか検討した。誘導後CD33陽性細胞の対照細胞として、凍結PBMCを解凍後すぐにMACS法で分離したCD3陰性CD33陽性細胞を用いた（無処理CD33陽性細胞とする）。セルバンカーで保存したCD3陽性T細胞を解凍し、CFSE標識した。96ウェル丸底プレートに、CD33陽性細胞を4×10⁴細胞/ウェル、8×10⁴細胞/ウェル、または1.6×10⁵細胞/ウェルとなるように播種した。そこに、CFSE標識CD3陽性T細胞1.6×10⁵細胞/ウェルとなるように加えた。更に、Dynabeads human T-Activator CD3/CD28を

3.2 × 10⁴ビーズ／ウェルとなるように添加した。37℃、5%CO₂条件下でプレートを72時間培養後、細胞を回収した。LIVE／DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kitを用いて死細胞を染色した。生細胞としてAqua (Amcyan) 陰性細胞をゲートし、CFSE標識CD3陽性T細胞のヒストグラムピークのうち、分裂ピークの割合を数値化して、T細胞増殖反応に対する抑制活性を比較した。

[0082] 図3に示した結果から明らかなように、無処理CD33陽性細胞と比較して、誘導後のCD33陽性細胞は、T細胞の増殖を抑制し、その抑制活性は共培養するCD33陽性ミエロイド細胞数に依存的であった（分裂細胞の割合が、T細胞：誘導後CD33陽性の比が8：1で81.0%、4：1で66.5%、2：1で39.0%）。これより、PBMCから癌培養上清とGM-CSF存在下誘導培養して得られたCD33陽性ミエロイド細胞にはMDSCマーカーを発現する細胞が含まれ、かつ、T細胞増殖抑制活性を有することから、免疫抑制機能を有するMDSCが誘導できたことが示された。

[0083] （実施例5. PBMCから誘導したMDSCにおけるCD206発現解析）

PBMCから誘導したMDSCにおけるCD206発現を解析した。実施例4と同様の方法にて、市販凍結PBMCから分離したCD3陰性細胞を、癌細胞培養上清及びGM-CSFの存在下で培養することによって得られる細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーにより解析した。FITC標識抗CD3抗体、FITC標識抗CD19抗体、FITC標識抗CD56抗体、PerCP-Cy5.5標識抗HLA-DR抗体、Pacific Blue標識抗CD11b抗体及びPE標識抗CD33抗体に加え、APC標識抗CD206抗体を用いて染色した。またLIVE／DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kitを用いて死細胞染色した。

[0084] 解析の結果、癌細胞培養上清及びGM-CSFの存在下で培養することによって得られるLineage陰性HLA-DR陰性及び弱陽性CD11b

陽性CD3⁺陽性MDSC (Lineage⁻HLA-DR^{-/low}CD11b⁺CD33⁺-gated fraction) に、CD206の発現が認められた(図4の下段右)。一方、免疫抑制活性の無い無処理CD3⁺陽性細胞にはCD206の発現は認められなかった。

[0085] (実施例6. PBMCから誘導したMDSCを含むミエロイド細胞のCD206発現と免疫抑制機能の関係)

PBMCから誘導したMDSCを含むCD3⁺陽性ミエロイド細胞の免疫抑制活性とCD206の発現に関係性があるかについて、T細胞増殖に対する抑制活性を指標として検討した。

[0086] 実施例4に記載した方法にて誘導した細胞を、PE標識抗CD3⁺抗体及びAPC標識抗CD206抗体で染色し、セルソーター(FACS Aria IIu)を用いて、CD3⁺陽性CD206⁺強陽性細胞、CD3⁺陽性CD206⁺弱陽性細胞及びCD3⁺陽性CD206⁻陰性細胞を分離した。実施例3及び実施例4と同様の方法にて、CD3⁺陽性T細胞をCFSE標識した。96ウェル丸底プレートに、CD3⁺陽性CD206⁺強陽性細胞、CD3⁺陽性CD206⁺弱陽性細胞もしくはCD3⁺陽性CD206⁻陰性細胞を 8×10^4 細胞/ウェルとなるように播種した。そこに、CFSE標識CD3⁺陽性T細胞 1.6×10^5 細胞/ウェルとなるように加えた。さらに、Dyna beads human T-Activator CD3/CD28を 3.2×10^4 ビーズ/ウェルとなるように添加した。37℃、5%CO₂条件下でプレートを72時間共培養した。細胞を回収し、LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kitを用いて死細胞染色を行った。生細胞としてAqua (Amcyan) 陰性細胞をゲートし、CFSE (FITC) 陽性のCD3⁺陽性T細胞ヒストグラムピークのうち、分裂ピークの割合を数値化して、T細胞増殖に対する抑制活性を比較した。

[0087] その結果を図5に示すが、CD3⁺陽性CD206⁻陰性細胞(CD3⁺CD206⁻、分裂細胞の割合86.4%)と比較して、CD3⁺陽性CD206⁺

6強陽性細胞（CD33⁺CD206^{high}、分裂細胞の割合9.19%）は、T細胞の増殖を非常に強く抑制した。CD33陽性CD206弱陽性細胞（CD33⁺CD206^{low}、分裂細胞の割合64.6%）は、T細胞増殖抑制活性を示したものの、CD33陽性CD206強陽性細胞と比較すると、T細胞増殖抑制活性は弱かった。

[0088] 以上より、CD33陽性MDSCにおけるCD206発現強度は免疫抑制活性と相関することが示唆され、CD206は抑制性ミエロイド細胞の優れた表面マーカーとなり得ることが示された。

[0089] これは、実施例3にて得られた知見と同様に、CD33陽性CD206陽性細胞がT細胞抑制に関与し、CD33陽性CD206陽性細胞を除去することにより、T細胞抑制を解除可能であることを示している。

[0090] （実施例7. CD206を標的とした抗体医薬による抗腫瘍効果）

実施例1～実施例6において得られた知見より、CD206を標的とした薬剤が、免疫抑制状態を解除し、病態改善に寄与する可能性が示唆された。そこで、抗CD206抗体を用いてその抗腫瘍効果を検討した。

[0091] CD206陽性細胞を選択的に除去可能な抗体モデルとして、抗CD206抗体に殺細胞薬を結合した抗体薬物複合体を作製した。殺細胞薬はどのような化合物でも良いが、サポリンを使用した。サポリンは*Saponaria officinalis*の種子に含まれる毒素で、直接リボソームを不活性化することにより、細胞死を引き起こす。そのため、抗体とサポリンを結合した複合体は、標的細胞膜上の抗原を介して細胞内に取り込まれ、細胞死を誘導できる。

[0092] この抗体薬物複合体を担がんマウスモデルに投与することで薬効評価ができる。マウス大腸がん細胞株CT26.WT（ATCC CRL-2638）をBALB/cマウスに皮下移植したモデルにおいて、評価を実施した。CT26.WT担がんマウスにおける腫瘍では、CD206陽性G-MDSC、CD206陽性M-MDSCが存在することを確認した。BALB/cマウス（雌11例/群）の右腋窩部に1匹あたり 5×10^5 個のCT26.WT

細胞を皮下移植した。移植後4日目より4日間、さらに移植後10日目より4日間、マウス1匹あたり10 μ gのサポリン結合抗CD206抗体を静脈内投与した。対照群には媒体（リン酸緩衝生理食塩水）を投与した。経時的に腫瘍径を測定して腫瘍体積を算出し、群毎に腫瘍体積の平均値および標準誤差を算出した。その結果、移植後13日目、抗体投与の最終日において、抗体投与群では対照群と比較して腫瘍体積が小さく、サポリン結合抗CD206抗体の投与により腫瘍増殖阻害効果が認められた（図6）。CD206陽性MDSCに細胞死が誘導されることでMDSCによる免疫抑制が解除されて、抗腫瘍効果が認められたと考えられる。

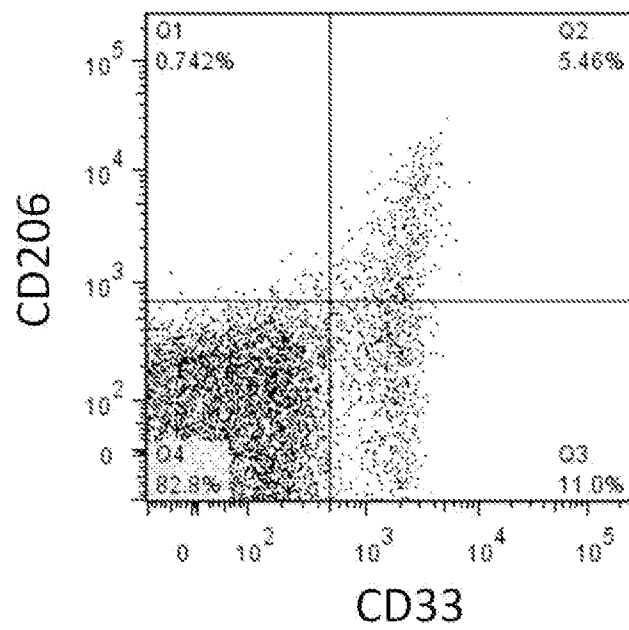
[0093] このように、MDSCを含むCD206陽性の抑制性ミエロイド細胞を、選択的にターゲティングして死滅させたり、その抑制機能を変化させたりすることができれば、MDSCを含む抑制性ミエロイド細胞による免疫抑制が解除されて、腫瘍内浸潤T細胞や抗腫瘍性マクロファージが増加するなどして腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫が賦活化し、腫瘍増殖阻害や延命効果などの抗腫瘍効果につながると考えられる。

請求の範囲

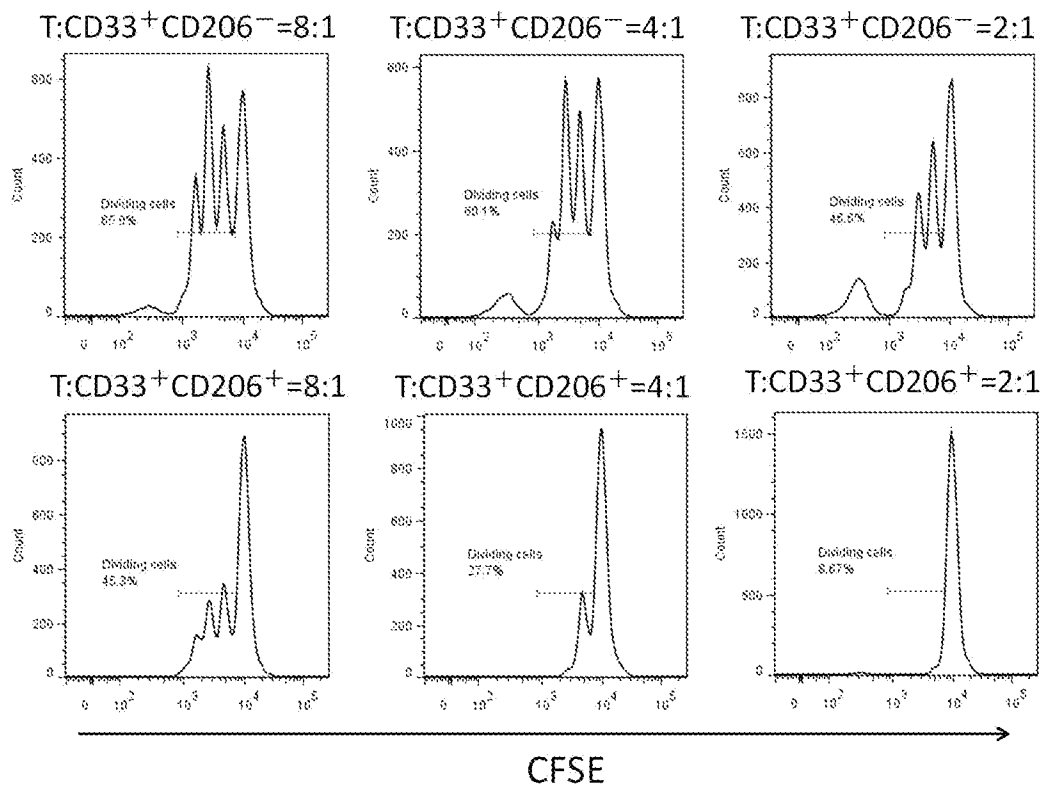
- [請求項1] C D 2 0 6 を認識する物質を含んでなる、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定するための薬剤。
- [請求項2] 前記物質が、抗体又はその機能的断片である、請求項 1 に記載の薬剤。
- [請求項3] 免疫抑制性ミエロイド細胞上のC D 2 0 6 を認識する物質を含んでなる、がんを治療するための医薬。
- [請求項4] 前記物質が抗体又はその機能的断片である、請求項 3 に記載の医薬。
- [請求項5] T細胞の増殖を促進するための、請求項 3 又は 4 に記載の医薬。
- [請求項6] A D C C 活性、C D C 活性及び／又はA D C P 活性による免疫抑制性ミエロイド細胞に対する傷害作用を有する、請求項 3 ～ 5 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項7] 薬物をさらに含む、請求項 3 ～ 6 のいずれかに記載の医薬。
- [請求項8] 前記薬物が殺細胞薬である、請求項 7 に記載の医薬。
- [請求項9] 免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される、請求項 3 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬。
- [請求項10] T細胞の増殖を促進するための抗C D 2 0 6 抗体又はその機能的断片。
- [請求項11] A D C C 活性、C D C 活性及び／又はA D C P 活性による免疫抑制性ミエロイド細胞に対する傷害作用を有する、請求項 1 0 に記載の抗体又はその機能的断片。
- [請求項12] 薬物と連結した、請求項 1 0 又は 1 1 のいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。
- [請求項13] 前記薬物が殺細胞薬である、請求項 1 2 に記載の抗体又はその機能的断片。
- [請求項14] 免疫抑制性ミエロイド細胞上のC D 2 0 6 を認識する物質を含んでなる、T細胞増殖促進剤。

- [請求項15] 前記物質が抗体又はその機能的断片である、請求項14に記載のT細胞増殖促進剤。
- [請求項16] 前記抗体又はその機能的断片がADCC活性、CDC活性及び／又はADCP活性による免疫抑制性ミエロイド細胞に対する傷害作用を有する、請求項15に記載のT細胞増殖促進剤。
- [請求項17] 前記抗体又はその機能的断片が殺細胞薬と連結した、請求項15又は16に記載のT細胞増殖促進剤。
- [請求項18] 免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される、請求項14～17のいずれかに記載のT細胞増殖促進剤。
- [請求項19] ミエロイド細胞上のCD206を認識又は検出する工程を含む、免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する方法。
- [請求項20] 前記認識又は検出する工程が、CD206に対する抗体又はその機能的断片を用いて行われる、請求項19に記載の方法。
- [請求項21] ミエロイド細胞上のCD206を認識又は検出することによって免疫抑制性ミエロイド細胞を同定する工程と、
同定した免疫抑制性ミエロイド細胞を選抜する工程と、
を含む、免疫抑制性ミエロイド細胞の選抜方法。
- [請求項22] 免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を選抜する工程を含む、がん治療薬のスクリーニング方法。
- [請求項23] 免疫抑制性ミエロイド細胞上のCD206を認識する物質を含んでなる、組織中における免疫抑制性ミエロイド細胞の存在を評価するための診断薬。

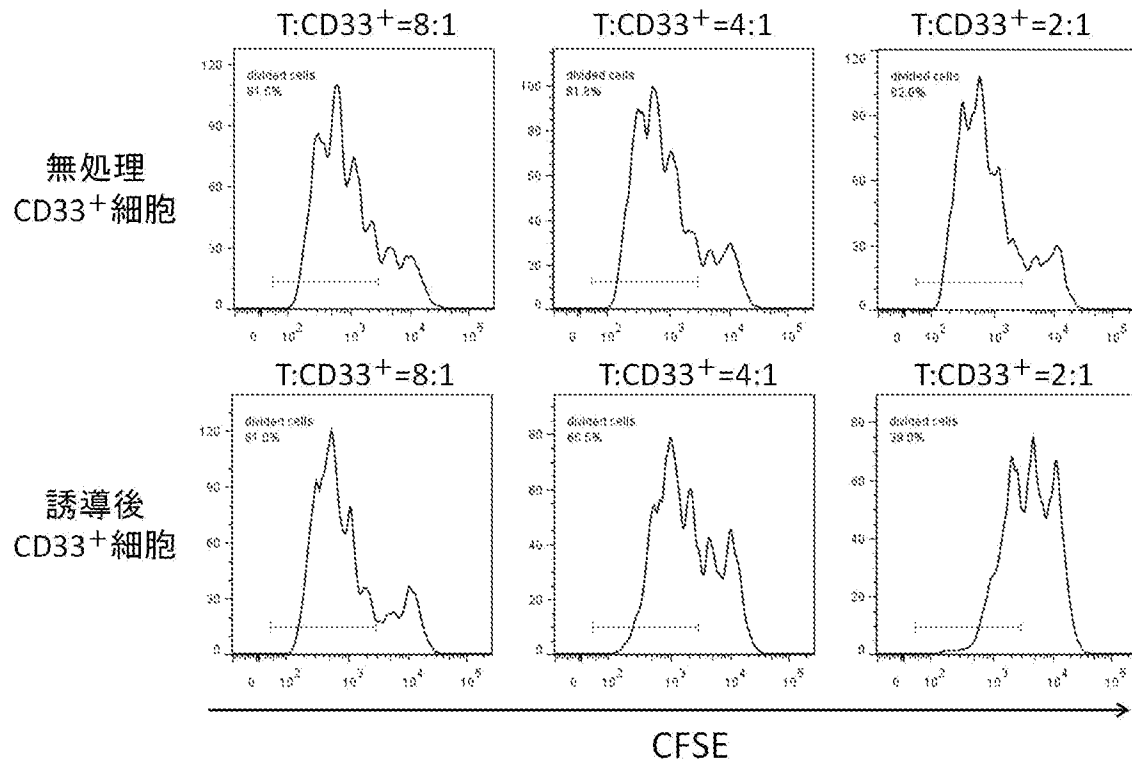
[図1]



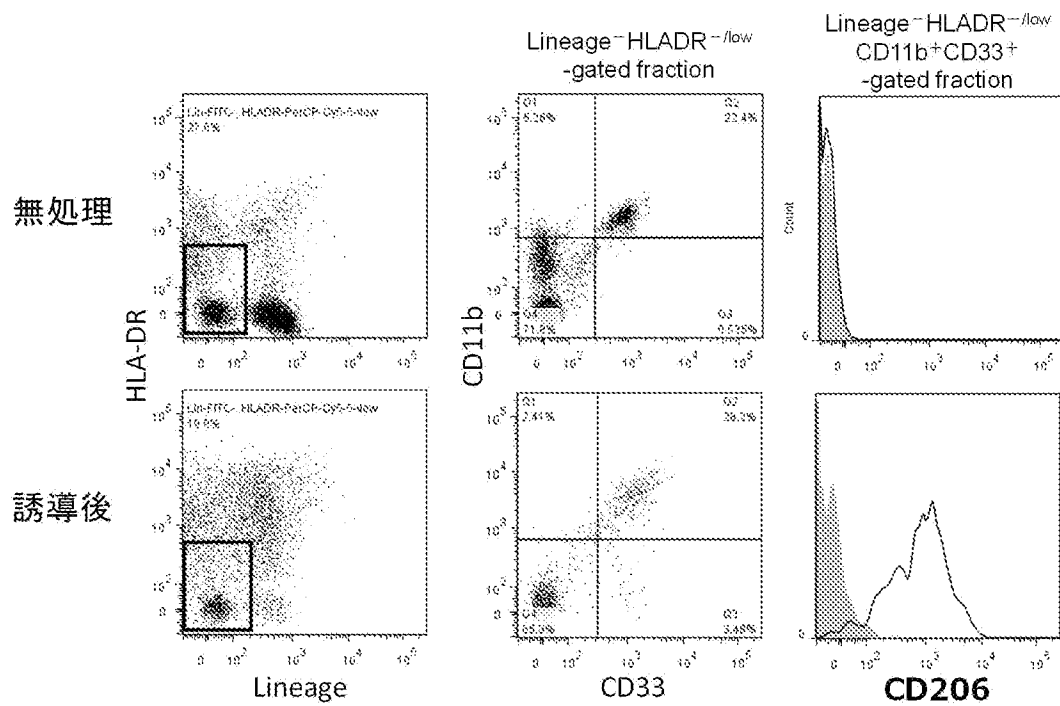
[図2]



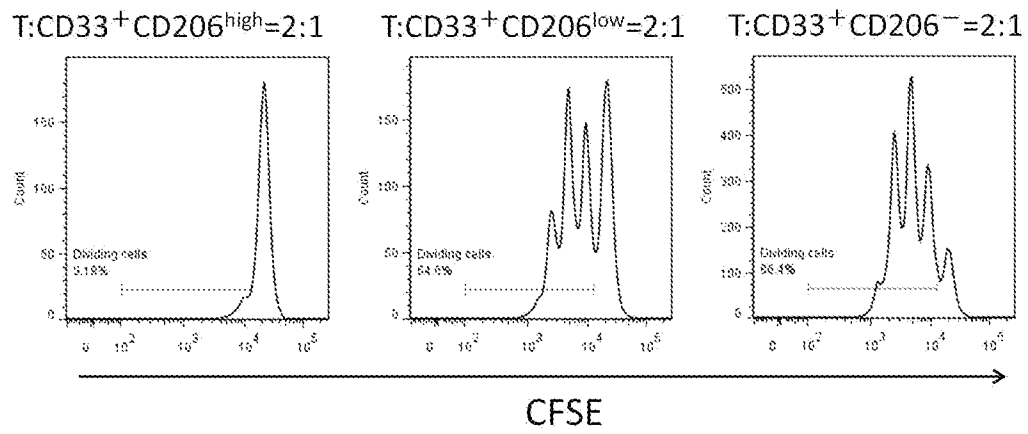
[図3]



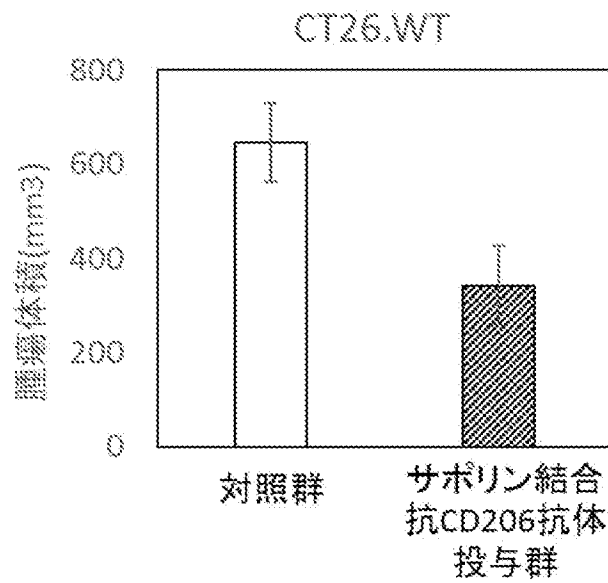
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/034769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, A61K38/16(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K45/00(2006.01)i, A61K47/68(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

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)

Int.Cl. G01N33/53, A61K38/16, A61K39/395, A61K45/00, A61K47/68,
A61P35/00, A61P43/00, C07K16/28, C12N5/071

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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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	WO 2017/027247 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 16 February 2017, claims 1-4, specification, page 18, line 16 to page 19, line 3, table 1, specification, page 44, line 6 to page 45, line 2, example 6 & JP 2018-522055 A & US 2018/0236076 A1 & EP 3331909 A1	3-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 November 2018 (21.11.2018)

Date of mailing of the international search report
04 December 2018 (04.12.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/034769

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DONG, P. et al., "CD86 ⁺ /CD206 ⁺ diametrically polarized tumor-associated macrophages, predict hepatocellular carcinoma patient prognosis", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, March 2016, vol. 17, no. 3, ijms17030320	1-2,19-23
X	OCHANDO, JC et al., "Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer", Immunol Res, 26 April 2012	1-2,19-23
A	WO 2016/201388 A2 (ALECTOR LLC) 15 December 2016, claims & JP 2018-518176 A & EP 3307771 A2	1-23
A	JP 2017-507990 A (INFINITY PHARMACEUTICALS, INC.) 23 March 2017, example 274 & US 2015/0290207 A1 (example 274) & WO 2015/143012 A1 & EP 3119397 A1	1-23

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, A61K38/16(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i,
A61K47/68(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i,
C12N5/071(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53, A61K38/16, A61K39/395, A61K45/00, A61K47/68, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/28, C12N5/071

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 8 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), CPlus/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	WO 2017/027247 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2017.02.16, 請求項 1-4、明細書第 18 頁第 16 行-第 19 頁第 3 行、テーブル 1、明細書第 44 頁第 6 行-第 45 頁第 2 行、実施例 6 & JP 2018-522055 A & US 2018/0236076 A1 & EP 3331909 A1	3-18

☒ 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

2 1 . 1 1 . 2 0 1 8

国際調査報告の発送日

0 4 . 1 2 . 2 0 1 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

赤坂 祐樹

2 J

3 3 1 6

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	DONG, P et al., CD86 ⁺ /CD206 ⁺ , diametrically polarized tumor-associated macrophages, predict hepatocellular carcinoma patient prognosis, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2016.03, Vol. 17, No. 3, ijms17030320	1-2, 19-23
X	OCHANDO, JC et al., Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer, Immunol Res, 2012.04.26	1-2, 19-23
A	WO 2016/201388 A2 (ALECTOR LLC) 2016.12.15, 特許請求の範囲 & JP 2018-518176 A & EP 3307771 A2	1-23
A	JP 2017-507990 A (インフィニティー ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 2017.03.23, 実施例 274 & US 2015/0290207 A1(実施例 274) & WO 2015/143012 A1 & EP 3119397 A1	1-23