

(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
2011年4月7日(07.04.2011)



PCT



(10) 国際公開番号

WO 2011/040428 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/066890
- (22) 国際出願日: 2010年9月29日(29.09.2010)
- (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 2009-225034 2009年9月29日(29.09.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 工藤 千恵 (KUDO, Chie) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人(ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 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))



WO 2011/040428 A1

(54) Title: ANTI-TUMOR AGENT AND METHOD FOR SCREENING FOR SAME

(54) 発明の名称: 抗腫瘍剤およびそのスクリーニング方法

(57) Abstract: Disclosed are: an anti-tumor agent; and a method for screening for the anti-tumor agent. The anti-tumor agent comprises an inhibitory substance capable of inhibiting the function of CCL19 or CCL21. The anti-tumor agent can be identified by determining whether or not a candidate compound for the anti-tumor agent inhibits the function of CCL19 or CCL21.

(57) 要約: 本発明の目的は、抗腫瘍剤およびそのスクリーニング方法を提供することである。抗腫瘍剤は、CCL19またはCCL21の機能を阻害する阻害物質を含有することとする。また、抗腫瘍剤の候補となる化合物が、CCL19またはCCL21の機能を阻害するかどうかを調べることにより、抗腫瘍剤を同定する。

明 細 書

発明の名称：抗腫瘍剤およびそのスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、抗腫瘍剤およびそのスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] ケモカインであるCCL19やCCL21は、リンパ節などに存在するストローマ細胞に特異的に発現し（Seminar of Immunology, 2003, 15: 271-276 参照）、その受容体であるCCR7やCCR10（The Journal of Immunology, 2000, 164: 2851-2856 参照）を発現した成熟樹状細胞やT細胞を呼び寄せ（Nature Review Immunology, 2005, 5: 617-628 参照）、増殖させたり活性化させたりする機能を有する。そこで、この機能を利用して、CCL19やCCL21を腫瘍内で発現させ、成熟樹状細胞やT細胞を呼び寄せることによって、抗腫瘍効果を得ようとする試みがなされてきた（British Journal of Cancer, 2006, 94: 1029-1034 参照）。しかしながら、その効果については、専門家の間でも議論が分かれていた（JNCI, 2008, 100: 502-512 参照）。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明は、CCL19やCCL21の阻害物質を含有する抗腫瘍剤およびそのスクリーニング方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者らは、CCL19やCCL21の機能を抑制する中和抗体が、マウス腫瘍モデルにおいて、腫瘍転移を抑制したり、腫瘍細胞による免疫抑制を緩和したりすることにより、抗腫瘍作用を有することを見出し、本発明の完成に至った。

[0005] 本発明の一実施形態は抗腫瘍剤であって、この抗腫瘍剤は、CCL19またはCCL21の機能を阻害する阻害物質を含有する。また、本発明の一実施形態は、抗腫瘍剤の製造における、CCL19またはCCL21の機能を阻害する阻害物質の使用

方法である。また、本発明の一実施形態は、腫瘍患者の治療方法であって、前記患者に、CCL19またはCCL21の機能を阻害する阻害物質を投与する。これらいずれの実施形態においても、前記阻害物質が、抗CCL19抗体またはその部分抗体、抗CCL21抗体またはその部分抗体、CCL19のドミナント・ネガティブ変異体、またはCCL21のドミナント・ネガティブ変異体であってもよい。

[0006] さらに、本発明の一実施形態は、抗腫瘍剤を同定するためのスクリーニング方法であって、候補となる化合物が、CCL19またはCCL21の機能を阻害するかどうかを調べる工程を含有する。

[0007] ==クロスリファレンス==

本出願は、2009年9月29日付で出願した日本国特許出願2009-225034に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本発明の一実施例において、腫瘍細胞の培養上清による免疫抑制と、CCL19またはCCL21の阻害による回復、また、リコンビナントタンパク質CCL19またはCCL21による免疫抑制を調べた結果を示す図である。

[図2]本発明の一実施例において、リコンビナントタンパク質CCL19、CCL21、または、その組み合わせによる免疫抑制を調べた結果を示す図である。

[図3]本発明の一実施例において、CCL19またはCCL21の阻害による腫瘍体積増加抑制効果と、そのときの抗腫瘍免疫抑制の解除効果を調べた結果を示す図である。

[図4]本発明の一実施例において、マウスの腫瘍塊にsiRNA-CCL19を注入することによってCCL19の発現を抑制した場合の、腫瘍体積増加抑制効果を示す図である。

[図5]本発明の一実施例において、マウスの腫瘍塊にsiRNA-CCL19を注入することによってCCL19の発現を抑制した場合の、抗腫瘍免疫抑制の解除効果を示す図である。

[図6]本発明の一実施例において、マウスの腫瘍塊にsiRNA-CCL19を注入する

ことによってCCL19の発現を抑制した場合の、リンパ節における抗腫瘍免疫抑制の解除効果を示す図である。

[図7]本発明の一実施例において、マウスの腫瘍塊にsiRNA-CCL19を注入することによってCCL19の発現を抑制した場合の、脾臓における抗腫瘍免疫抑制の解除効果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、実施例を挙げながら、本発明の実施形態を詳細に述べる。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0010] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0011] ==抗腫瘍剤==

本発明にかかる抗腫瘍剤は、CCL19 (MIP-3 β (マクロファージ炎症性タンパク質-3 β))、またはELCとも呼ばれる)、CCL21 (MIP-2 (マクロファージ炎症性タンパク質-2、S L C (二次リンパケモカイン)、6Ckine、またはエク

ソダス-2とも呼ばれる)の機能を阻害する阻害物質を含有し、CCL19またはCCL21の機能を阻害することにより効果を発揮する。

- [0012] CCL19及びCCL21は、CCケモカイン・ファミリーに属するケモカインであって、例えば、ヒトCCL19タンパク質の場合、Swiss-Prot Q99731などに記載され、ヒトCCL21タンパク質の場合、Swiss-Prot 000585などに記載されているが、本明細書では、CCL19及びCCL21の由来は特に限定されず、ヒト以外の動物のホモログでもオーソログでもよいが、抗腫瘍剤を投与する対象の動物種と同じ動物種であることが好ましい。
- [0013] CCL19またはCCL21の機能を阻害する阻害物質は、それらの機能を阻害することができれば特に限定されないが、細胞外でCCR7やCCR10などの受容体との結合機能を阻害するか、細胞内でのCCL19遺伝子またはCCL21遺伝子の発現を抑制することによって機能を阻害することが効率的である。前者の場合、機能阻害物質として、ポリクローナル抗体・モノクローナル抗体等の中和抗体、低分子化合物、アンタゴニスト、ドミナント・ネガティブ変異体、核酸アプタマー・ペプチドアプタマー等のアプタマー等が例示できる。中和抗体は、機能阻害ができれば特に限定されず、キメラ抗体・ヒト化抗体等の人工抗体や、抗原結合部位が含まれる部分抗体であってもよく、例えばF(ab')₂フラグメントやFabフラグメントでもよい。また、後者の場合、アンチセンスRNA、shRNA、siRNA、miRNA、リボザイムなどを例示できる。なお、これらの核酸の配列は、公知の方法に従って決定すればよい。
- [0014] 抗腫瘍剤の形状、成分、投与方法等は、有効成分に適した公知のものまたは方法を用いればよく、特に限定されない。例えば、CCL19またはCCL21の機能を阻害する抗腫瘍剤は、細胞外で機能するものであっても、細胞内で機能するものであっても、全身投与することができるが、注入などによって、直接腫瘍に投与するのが好ましい。
- [0015] 本発明の抗腫瘍剤は、腫瘍細胞の増殖を抑制するだけでなく、腫瘍細胞による宿主免疫抑制を解除することができるので、腫瘍増殖抑制剤、宿主免疫抑制解除剤としても用いることができ、増殖能の強い腫瘍だけでなく、宿主

免疫抑制能の強い腫瘍に対しても、好適に用いることができる。

[0016] 治療対象となる腫瘍の種類は特に限定されず、神経腫、腎癌、肝癌、膵癌、肉腫、大腸癌、メラノーマ、肺癌、食道癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫など、固形癌でも血液のがんでもかまわないが、CCL19またはCCL21を発現している腫瘍であることが好ましく、特に、大腸癌や膵臓癌が好ましい。

[0017] ==抗腫瘍剤のスクリーニング方法==

本発明にかかる、抗腫瘍剤を同定するためのスクリーニング方法は、候補となる化合物が、CCL19またはCCL21の機能を阻害するかどうかを調べる工程を含有する。

[0018] 候補化合物がCCL19またはCCL21の機能を阻害するかどうかを調べる工程は特に限定されないが、例えば、その化合物が細胞外でCCR7やCCR10などの受容体との結合機能を阻害するかどうかを公知の方法で調べればよく、具体的には米国特許6,153,441に記載の方法を利用できる。また、細胞内でのCCL19遺伝子またはCCL21遺伝子の発現を抑制するかどうかを調べてもよく、その場合、RT-PCRでは遺伝子発現を、抗体を用いたELISA法やウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリー法などではタンパク発現を調べることができる。

[0019] その後、CCL19またはCCL21の機能を阻害する化合物を選択し、抗腫瘍剤としての薬理活性や安全性を調べる。例えば、*in vitro*において、細胞増殖抑制活性や細胞障害活性を調べる。

実施例

[0020] (1) 腫瘍細胞の培養上清による免疫抑制と、CCL19またはCCL21の阻害による回復

本実施例では、MIAPaca腫瘍細胞の培養上清が、免疫細胞に対して機能抑制することと、CCL19タンパク質またはCCL21タンパク質の作用を抑制することによって、腫瘍細胞による免疫抑制を阻害することができることを示す。

[0021] まず、健常人から採取した血液に1/10量の4%クエン酸ナトリウムを加え、F

icoll-Paque (Amersham社)に重層して遠心(1500rpm、20分、室温)して、その中間層に分離された単核球分画(PBMC)を単離した。一方、MIAPaca腫瘍細胞を底面積25 cm²の培養フラスコに1x10⁵個播種して10mLの10%牛胎児血清含有D-MEM培地 (Invitrogen社)で5日間培養した後の培養上清を回収し、この培養上清0.5mL (最終的に2倍希釈)と各抗体(抗CCL19抗体、抗CCL21抗体、対照抗体としてのGoat IgGは全てR&D社製、最終濃度は5 μg/mL)を含むPBMC浮遊液0.5mL (1x10⁶個)を1:1で混合して24穴プレート (FALCON社)を用いて5日間共培養した。

[0022] その後、PBMCを回収し、抗CD4抗体、抗NKG2D抗体、抗DNAM1抗体、抗FOXP3抗体(全てBD Pharmingen社製)と反応させ、FACSで細胞群の解析を行ったところ、CD4の発現に関し、CD4高発現群とCD4低発現群の2群が出現し、そのうちCD4低発現群は、MIAPaca腫瘍細胞の上清を加えない細胞(図ではNo stimulantと示す)では6%であるのに対し、MIAPaca腫瘍細胞の上清で培養した細胞(図ではGoat IgGと示す)では24%となり、MIAPaca腫瘍細胞の上清で培養することにより、顕著に増加した(図1A: No stimulantでは6%、Goat IgGは24%)。このCD4低発現群の細胞は、活性化NK細胞マーカーであるNKG2DやDNAM1および強い免疫抑制活性を示すことで知られる制御性T細胞のマスタ分子であるFOXP3を共発現していた(図1A)。(なお、図中では、右上の数字が、それぞれのマーカーを発現するCD4低発現細胞群の割合(%)を示す。)

[0023] この培養系に、CCL19またはCCL21に特異的な中和抗体(BD Pharmingen社)をそれぞれ添加すると(図ではそれぞれ、Anti-CCL19およびAnti-CCL21と示す)、どちらの場合もそれらCD4低発現細胞群の増加が抑制された(図1A)。

[0024] さらに、CD4低発現群の細胞の性質を調べるため、PBMCを上述のようにMIAPaca腫瘍細胞の培養上清で5日間培養した後、その培養系からCD4陽性(一部FOXP3陽性)、CD56陽性(一部FOXP3陽性)、または、CD4/CD56共陽性(ほとんどがFOXP3陽性)の細胞群を抗体結合MACS磁気ビーズ(Miltenyi社)で分離

し、その免疫抑制活性を調べた。すなわち、別途分離したPBMCから抗体結合MAGS磁気ビーズ (Miltenyi社) を用いて分離したCD4陽性またはCD8陽性のT細胞 (2×10^5 個) と、抗CD3抗体 ($1 \mu\text{g/mL}$, Biolegend社) と、抗原提示細胞としてPBMCをMMC処理で不活化した単核球 (1×10^5 個) とを加えた10%牛胎児血清含有RPMI培地 (Invitrogen社) を用いて培養するT細胞増殖反応系において、MMCで不活性化したCD4陽性、CD56陽性、または、CD4/CD56共陽性の細胞をそれぞれ 2×10^5 個加え、96穴プレートを用いて3日間培養し ($200 \mu\text{L/穴}$)、CD4陽性またはCD8陽性のT細胞の増殖率を調べた。その結果、腫瘍細胞の上清で培養しなかった場合 (図ではNoneと示す) に比較し、MIA Paca腫瘍細胞の培養上清で5日間培養したPBMCから分離したどの細胞群もT細胞の増殖を抑制し、特に、CD4/CD56共陽性細胞による抑制が最も強く検出された (図1B)。

[0025] 一方、リコンビナントタンパク質GCL19またはGCL21 (20 ng/mL , R&D社) で5日間刺激培養した場合 (図では、それぞれGCL19及びGCL21と示す) も、MIA Paca腫瘍細胞の培養上清の場合 (図では、Tumor supと示す) と同様、CD4低発現CD56陽性FOXP3陽性の細胞群の増加が観察された (図1C)。また、リコンビナントタンパク質GCL19とGCL21の両方を用いて同様に刺激培養した場合、GCL19およびGCL21単独よりもCD4低発現CD56陽性細胞群がさらに増加する傾向がみられた (図2 上段)。CD4陽性CD56陽性細胞におけるFOXP3発現については、リコンビナントタンパク質GCL19とGCL21の両方を用いて同様に刺激培養した場合、GCL19およびGCL21単独よりも増加する傾向がみられた (図2 下段、右のピーク)。つまり、リコンビナントタンパク質GCL19とGCL21の併用により、CD4低発現CD56陽性FOXP3陽性細胞群が増加する傾向がある。なお、図1CとDの解析は、異なる健常人から採取したPBMCを用いて行った。

[0026] このように、腫瘍細胞によって培養上清に産生されたGCL19及びGCL21が、制御性T細胞の増殖促進に寄与しており、腫瘍細胞が分泌するGCL19またはGCL21の機能を阻害することにより、腫瘍細胞による免疫抑制を阻害することができる。

[0027] (2) GCL19またはGCL21の阻害による抗腫瘍効果

本実施例では、MIAPaca細胞と同様にGCL19とGCL21を産生するマウス大腸癌細胞株CT26細胞をマウスに移植し、*in vivo*においてGCL19またはGCL21を阻害することによって抗腫瘍効果が得られることを示す。

[0028] すなわち、BALB/cマウス右腹側部皮下にCT26細胞 (1×10^6 個)を移植し、5日後に形成された移植細胞による腫瘍塊に、GCL19またはGCL21に特異的な中和抗体をそれぞれ10 μ g接種した。対照群には、アイソタイプであるgoat IgGを10 μ g接種した。移植2週間後に腫瘍体積を測定したところ、どちらの抗体も腫瘍増殖を抑制した(図3A)が、特に、抗GCL19抗体を投与した場合の方が強い治療効果が得られた。

[0029] また、各マウスから腫瘍組織を採取し、まずは外科用はさみでばらばらに破壊した後、RPMI培養液中でディスポ注射器ピストンを用いて押し潰すことで腫瘍内浸潤細胞を液内に漏出させ、この細胞についてBD Pharmingen社より購入した各抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。その結果、対照群(図ではControlと示す)ではMIAPaca細胞を用いた*in vitro*試験結果と同様に、マウスNK細胞のマーカーであるDX5陽性かつCD25陽性でCD4低発現の細胞群が検出されたが、抗GCL19抗体を投与した腫瘍内ではこの細胞群が減少していた(図3B)。従って、抗GCL19抗体が、腫瘍による抗腫瘍免疫抑制を解除したと考えられる。

[0030] また、CD4陽性分画に位置する細胞群にゲートを設定し、その細胞群が発現するFOXP3について解析したところ、抗GCL19抗体を投与した場合に、対照群と比較して、FOXP3を発現するCD4陽性細胞数が減少していた(図3B 下段)。つまり、抑制活性を示さない、CD8陽性細胞などの働きを補助するヘルパー系の抗腫瘍エフェクタータイプのCD4 T細胞が増加していると推測される。

[0031] このように、腫瘍細胞が分泌するGCL19またはGCL21の機能を阻害することにより、腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。

[0032] (3) siRNAを用いたGCL19発現の阻害による抗腫瘍効果

本実施例では、マウス大腸癌細胞株CT26細胞をマウスに移植することで形成された腫瘍塊に対してsiRNAを投与し、GCL19の発現を阻害することによっ

て、in vivoで腫瘍増殖抑制効果が得られることを示す。

[0033] まず、BALB/cマウス右腹側部皮下にCT26細胞 (1×10^6 個)を移植した。そして、以下に示す配列を有するオリゴヌクレオチドをアニーリングさせたCCL19特異的siRNA (siRNA-CCL19)あるいは対照siRNA (Invitrogen社)に対し、poly ethylenimine (Polyplus Transfection 社)を用いて脂質複合体を形成し、細胞の移植5日後に形成された移植細胞による腫瘍塊に、個体あたり3 μ gのsiRNAを注入した(非投与、対照、siRNA投与各群においてN=3)。細胞の移植から7、11、15日目に腫瘍体積を測定した。

siRNA-CCL19s (センス) : GGAACATCGTGAAAGCCTT (配列番号1)

siRNA-CCL19as (アンチセンス) : AAGGCUUUCACGAUGUUCCTT (配列番号2)

対照siRNAs (センス) : CCAGAAGUACUACCGCAAU (配列番号3)

対照siRNAas (アンチセンス) : AUUGCGGUAGUACUUCUGG (配列番号4)

[0034] その結果、siRNA-CCL19投与群では、非投与群(図ではNo treatment)および対照群(図ではControl)と比較して、細胞移植後10日目以降の腫瘍体積が有意に小さかった($P < 0.01$ 、図4A)。

[0035] この結果は、腫瘍細胞が分泌するCCL19の発現を特異的に抑制することにより、腫瘍細胞の増殖を抑制できることを示している。このように、siRNA-CCL19をはじめとするCCL19機能阻害物質は、腫瘍増殖抑制作用、すなわち抗腫瘍作用を有している。

[0036] (4) siRNAを用いた抗腫瘍免疫抑制の解除効果

本実施例では、(3)で示したように腫瘍細胞によるCCL19の発現を特異的に抑制することにより、抗腫瘍免疫抑制を解除する効果が得られることを示す。

[0037] (3)の記載と同様にして、マウス右腹側部皮下にCT26細胞株を移植し、腫瘍塊にsiRNA-CCL19を注入した。細胞の移植15日後に腫瘍組織と鼠径リンパ節を摘出し、それぞれRPMI培養液中でディスポ注射器ピストンを用いて押し潰すことで、腫瘍内浸潤細胞あるいはリンパ球を液内に漏出させた。これらの細胞について抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した。なお、抗CD2

5抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗FOXP3抗体、抗CD11c抗体、抗I-A(d)抗体はBD Pharmingen社、抗NKG2DBD抗体はeBioscience社から購入し、H-2L(d)拘束性AH1テトラマー（CT26腫瘍抗原、ペプチド配列：SPSYVYHQF）はMBL社から購入した。

[0038] その結果、siRNA-CCL19を腫瘍塊に投与した個体から採取した腫瘍内浸潤細胞では、非投与群（13.38%）および対照群（14.35%）に比較して、抑制性T細胞マーカーであるCD25陰性、かつCD4陽性の細胞数が顕著に多かった（10.45%、図5A上段）。活性化NK細胞マーカーであるNKG2D陽性かつCD4陽性細胞数はsiRNA-CCL19投与群では、非投与群（15.38%）および対照群（14.82%）と比較して顕著に少なかった（6.21%、図5A下段）。また、CD4陽性分画に位置する細胞群にゲートを設定し、その細胞群が発現するFOXP3について解析したところ、制御性T細胞のマスター分子であるFOXP3を発現するCD4陽性細胞数は、siRNA-CCL19を投与した腫瘍内浸潤細胞において対照群（41.15%）と比較して顕著に少なかった（35.26%、図5B）。すなわち、siRNA-CCL19の投与により、免疫抑制に関与する制御性T細胞が減少し、CD4陰性細胞が減少し、そしてCD4陽性細胞が増加した。さらに、siRNA-CCL19投与群の腫瘍浸潤細胞では、CT26腫瘍抗原であるAH1テトラマー（図ではTetramer）に結合するCD3陽性成熟T細胞数が、非投与群（4.61%）および対照群（3.39%）と比較して顕著に多かった（14.87%、図5C）。

[0039] 鼠径リンパ節から採取したリンパ球については、細胞傷害性T細胞のマーカーであるCD8陽性かつCD4陽性の細胞数が、非投与群（21.13%）および対照群（20.96%）と比較してsiRNA-CCL19投与群で顕著に多く（30.56%、図6A）、また、CD11cおよびI-A(d) (MHCクラスII)陽性細胞数が非投与群（2.59%）、対照群（1.90%）比較して顕著に多かった（14.85%、図6B）。

[0040] このように、siRNA-CCL19をマウス腫瘍組織に投与することで、腫瘍組織およびリンパ節においてCD4低発現細胞の減少、FOXP3陽性細胞の減少、CD8陽性細胞の増加、といった、抗腫瘍免疫抑制の解除の効果が得られる。従って、siRNA-CCL19をはじめとするCCL19機能阻害物質は、抗腫瘍効果を有してい

る。

[0041] (5) siRNAを用いた脾臓CD8陽性T細胞の活性化

本実施例では、(3)で示したようにCCL19の発現を特異的に阻害することにより、脾臓におけるCD8陽性T細胞(CTL)による腫瘍細胞傷害活性の増強、および、インターフェロン・ガンマ産生量増加の効果が得られることを示す。

[0042] (3)の記載に従い、マウス右腹側部皮下にCT26細胞を移植し、siRNA-CCL19を腫瘍に注入した。細胞の移植15日後に脾臓を摘出し、RPMI培養液中でデイスポ注射器ピストンを用いて押し潰すことで、脾臓細胞を採取した。

[0043] まず脾臓組織から得られた全脾臓細胞を、AH1ペプチド(1 μg/ml)を添加した20mlの10%ウシ胎児血清含有RPMI培地(Invitrogen社)において6日間培養した(N=3)。その後、MACSビーズ法(Miltenyl Biotec社)で単離したCD8陽性T細胞を用いて細胞傷害活性試験を行った。具体的には、CT26腫瘍細胞と、単離したCD8陽性T細胞とを1:40、1:20、1:10、1:5、1:2.5、1:1.25の比で10%ウシ胎児血清含有RPMI培地に播種し、4時間、37°Cで培養し、その後、Immunocyto Cytotoxicity Detection Kit(MBL社)を用いて、CD8陽性T細胞により殺傷されたCT26腫瘍細胞を検出した。腫瘍特異的殺傷率は、キットに添付のプロトコールに従って算出した。

[0044] その結果、図7Aに示すように、siRNA-CCL19投与群では、非投与群および対照群に比較して、CT26腫瘍細胞対CD8陽性T細胞比1:10~1:40の各試験群でCD8陽性T細胞の割合の増加に伴って有意に腫瘍細胞傷害率が上昇した(p<0.05)。

[0045] また、CD8陽性T細胞(2×10⁵個)に、AH1ペプチド(1 μg/ml)、および、マイトマイシンCで不活性化(10 μg/ml、37°C、2時間)した脾臓細胞(2×10⁶個)を抗原提示細胞として加え、10%ウシ胎児血清含有RPMI培地において37°Cで24時間培養した。その後、培養上清に含まれるインターフェロン・ガンマ値をCytometric Bead Arrayキット(BD Biosciences社)を用い、添付プロトコールに従って測定した。

[0046] その結果、図7Bに示すように、非投与群および対照群のマウスから得られたCD8陽性T細胞より、siRNA-CCL19投与群のマウスから得られたCD8陽性T細胞は、有意に多量のインターフェロン・ガンマを産生した ($p < 0.01$)。

[0047] このように、腫瘍細胞が分泌するCCL19の発現を特異的に阻害することにより、脾臓由来CD8陽性T細胞の腫瘍細胞傷害活性の増強、および、インターフェロン・ガンマ産生活性増強、という効果が得られる。従って、siRNA-CCL19をはじめとするCCL19の機能阻害物質は抗腫瘍作用を有している。

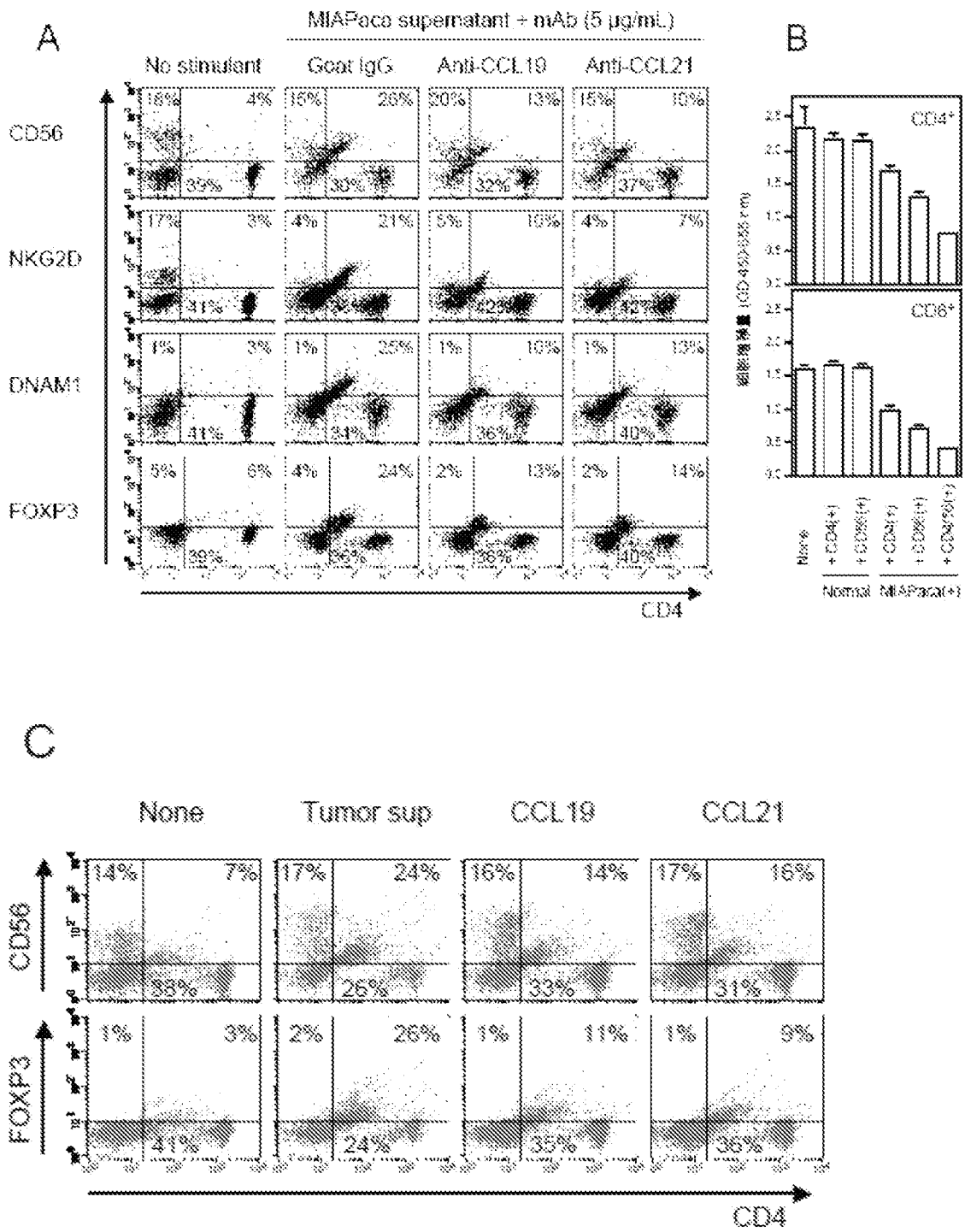
産業上の利用可能性

[0048] 本発明によって、CCL19やCCL21の機能阻害物質を含有する抗腫瘍剤およびそのスクリーニング方法を提供することができる。

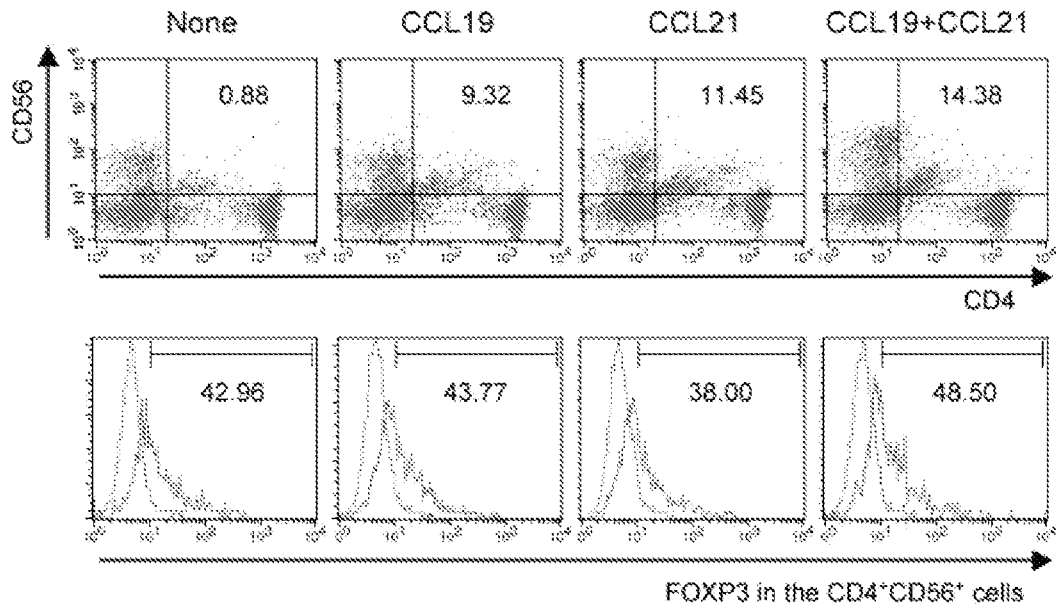
請求の範囲

- [請求項1] CCL19またはCCL21の機能を阻害する阻害物質を含有する抗腫瘍剤であって、
前記阻害物質が、抗CCL19抗体またはその部分抗体、抗CCL21抗体またはその部分抗体、またはsiRNAであることを特徴とする抗腫瘍剤。
- [請求項2] 抗腫瘍剤の製造における、CCL19またはCCL21の機能を阻害する阻害物質の使用方法であって、
前記阻害物質が、抗CCL19抗体またはその部分抗体、またはsiRNAであることを特徴とする、使用方法。
- [請求項3] 抗腫瘍剤を同定するためのスクリーニング方法であって、
候補となる化合物が、CCL19またはCCL21の機能を阻害するかどうかを調べる工程を含有する方法。

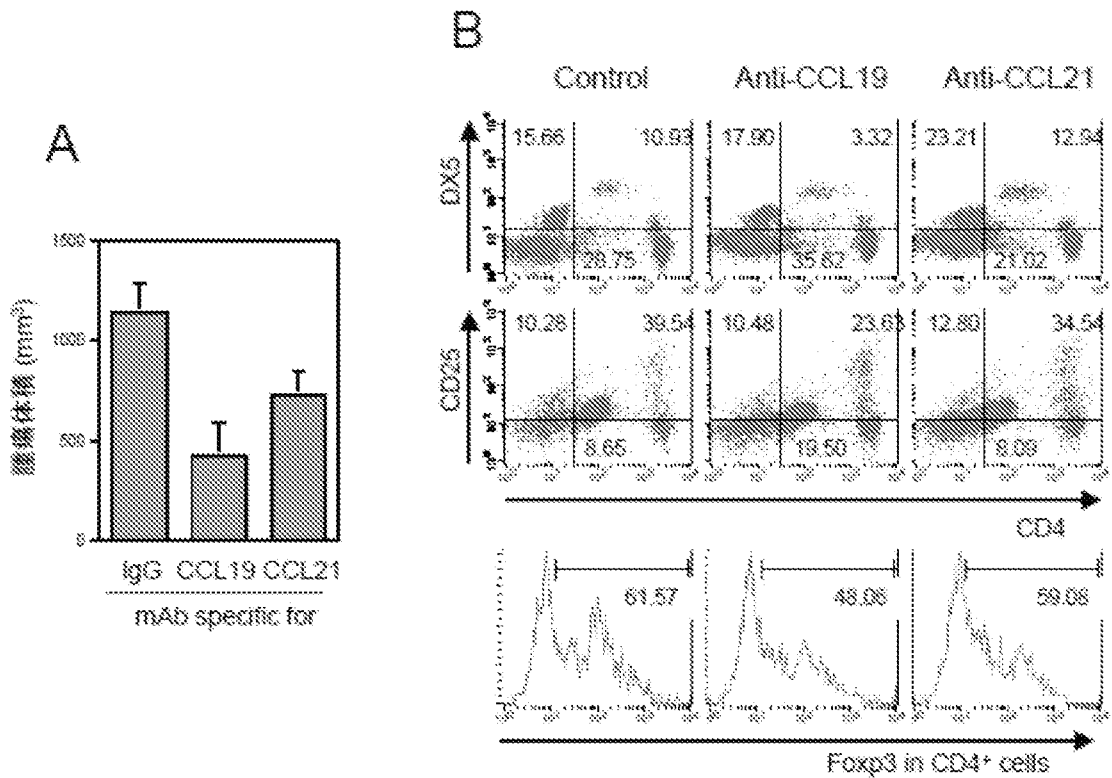
[図1]



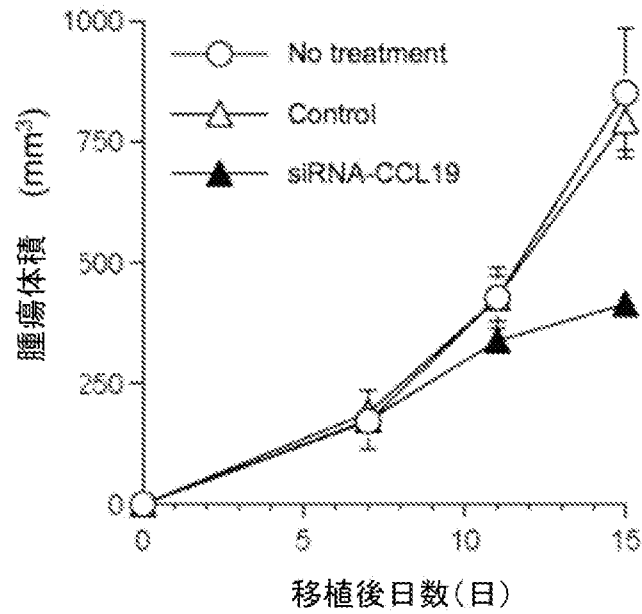
[圖2]



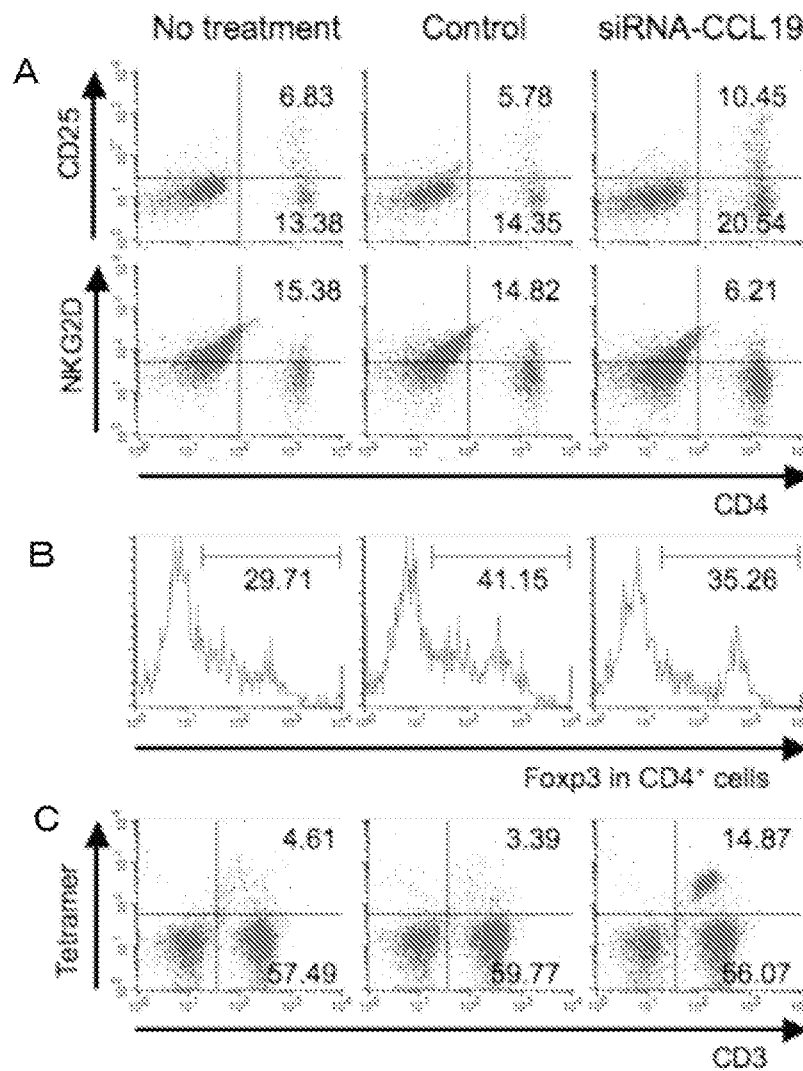
[圖3]



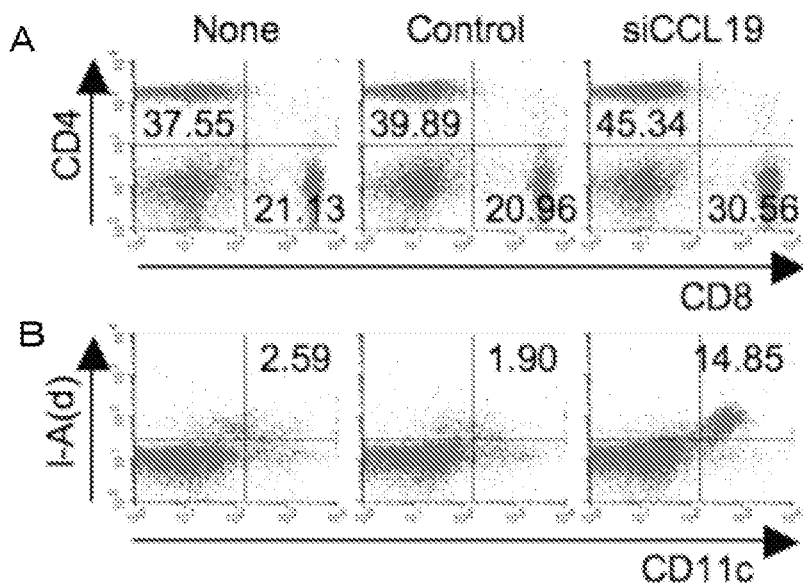
[図4]



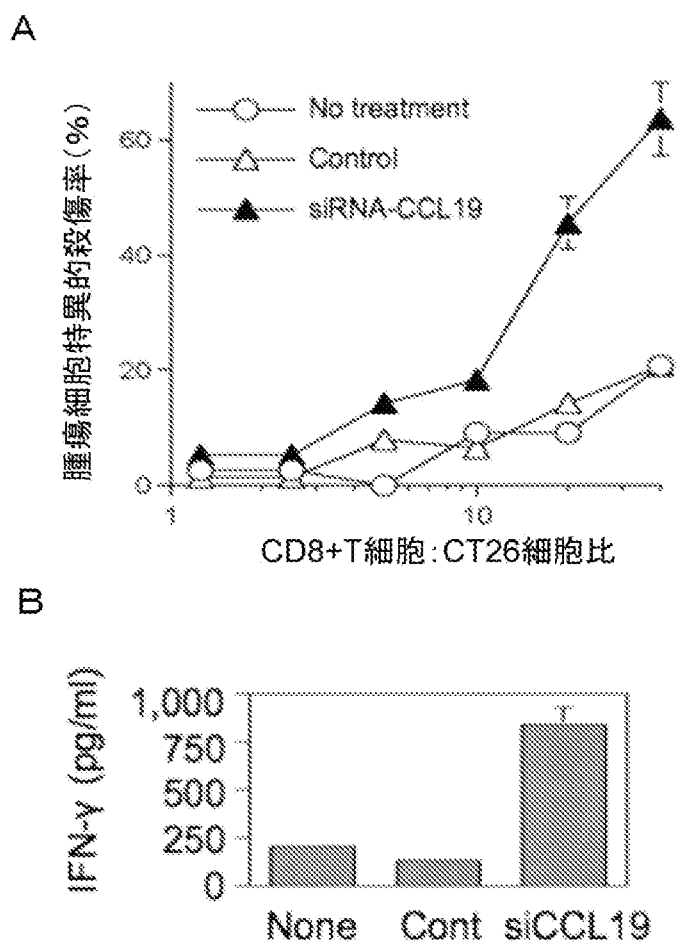
[図5]



[圖6]



[圖7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/066890

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)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)

A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILEY, H.E. et al., Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma, Journal of the National Cancer Institute, 2001, Vol.93, No.21, pp.1638-1643, Background, page 1641, column 1, 2nd paragraph to column 2	1-3
X	ZHAO, Z-J, et al., Effect of chemokine receptor 7 small interfering RNA on proliferation and invasion of squamous cell carcinoma of head and neck, Chin. J. Stomatol., 2009.01, Vol.44, No.1, pp.5-10, Abstract	1-3

 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
15 October, 2010 (15.10.10)Date of mailing of the international search report
26 October, 2010 (26.10.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/066890

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2007/003426 A1 (Universidad Autonoma de Madrid), 11 January 2007 (11.01.2007), claims; page 4, 3rd paragraph; page 8, 4th paragraph; page 18, 1st paragraph; examples & JP 2008-545000 A & US 2009/0123483 A1 & EP 1904102 A & CA 2614080 A & KR 10-2008-0030655 A & CN 101257923 A	3 1,2
Y	WO 2007/075592 A2 (The Regents of the University of Michigan), 05 July 2007 (05.07.2007), claims; page 16, 1st paragraph & JP 2009-528977 A & US 2007/0172856 A1 & EP 1963492 A & CA 2633641 A & NO 20082434 A & MX 2008008238 A & KR 10-2008-0081069 A & CN 101351545 A & ZA 200804294 A & RU 2008130410 A	1,2
A	WO 02/091996 A2 (Schering Corp.), 21 November 2002 (21.11.2002), & JP 2004-536055 A & EP 1256354 A1 & EP 1401377 A & CA 2446589 A	1-3
A	EP 1640018 A1 (Universitat Zurich), 29 March 2006 (29.03.2006), & WO 2006/032525 A2	1-3
A	WO 2004/045526 A2 (Morehouse School of Medicine), 03 June 2004 (03.06.2004), & US 2004/0170628 A1	1-3
A	DING, Y. et al., Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma, Clinical Cancer Research, 2003, Vol.9, pp.3406-3412	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K39/395 (2006.01) i, A61K48/00 (2006.01) i, A61P35/00 (2006.01) i, A61P35/02 (2006.01) 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 (IPC))
 Int.Cl. A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/02

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 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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)
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

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	WILEY, H.E. et al., Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma, Journal of the National Cancer Institute, 2001, Vol.93, No.21, pp.1638-1643 Background, 第1641頁第1欄第2段落-第2欄	1-3

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 15. 10. 2010	国際調査報告の発送日 26. 10. 2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 安居 拓哉 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C 3437

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	ZHAO, Z-J, et al., Effect of chemokine receptor 7 small interfering RNA on proliferation and invasion of squamous cell carcinoma of head and neck, Chin. J. Stomatol., 2009.01, Vol.44, No.1, pp.5-10 Abstract	1-3
X	WO 2007/003426 A1 (Universidad Autonoma de Madrid) 2007.01.11, Claims, 第4頁第3段落, 第8頁第4段落, 第18頁第1段落,	3
Y	Examples & JP 2008-545000 A & US 2009/0123483 A1 & EP 1904102 A & CA 2614080 A & KR 10-2008-0030655 A & CN 101257923 A	1,2
Y	WO 2007/075592 A2 (The Regents of the University of Michigan) 2007.07.05, Claims, 第16頁第1段落 & JP 2009-528977 A & US 2007/0172856 A1 & EP 1963492 A & CA 2633641 A & NO 20082434 A & MX 2008008238 A & KR 10-2008-0081069 A & CN 101351545 A & ZA 200804294 A & RU 2008130410 A	1,2
A	WO 02/091996 A2 (Schering Corporation) 2002.11.21, & JP 2004-536055 A & EP 1256354 A1 & EP 1401377 A & CA 2446589 A	1-3
A	EP 1640018 A1 (Universitat Zurich) 2006.03.29, & WO 2006/032525 A2	1-3
A	WO 2004/045526 A2 (Morehouse School of Medicine) 2004.06.03, & US 2004/0170628 A1	1-3
A	DING, Y. et al., Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma, Clinical Cancer Research, 2003, Vol.9, pp.3406-3412	1-3