

明 細 書

発明の名称：

制御性T細胞の誘導促進剤、自己免疫性疾患の治療または予防剤、アレルギー疾患の治療または予防剤、自己免疫性疾患の予防用食品組成物、アレルギー性疾患の予防用食品組成物、アレルギー状態の改善用食品組成物、健康な免疫機能の維持のための食品組成物、自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法、および、制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本出願における開示は、制御性T細胞の誘導促進剤、自己免疫性疾患の治療または予防剤、アレルギー性疾患の治療または予防剤、自己免疫性疾患の予防用食品組成物、アレルギー性疾患の予防用食品組成物、アレルギー状態の改善用食品組成物、健康な免疫機能の維持のための食品組成物、自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法、および、制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] T細胞は血液中を流れている白血球のうちリンパ球と呼ばれる細胞の一種で、生体を異物から守る機構（免疫応答）の司令塔ともいえるべき大切な細胞集団である。免疫応答は有害な病原体を排除するために重要であるが、炎症反応を伴うので適切な時期に終息しないと、自分自身の体を攻撃することになる。そのために、免疫系には免疫応答を抑制制御する様々なしくみが備わっている。

[0003] 例えば、免疫応答が終わる際には大部分の抗原特異的免疫細胞はアポトーシスと呼ばれるプログラムされた細胞死が誘導されたり、制御性T細胞（regulatory T cell；「Treg」と記載されることがある。）と呼ばれる免疫反応を抑制する免疫細胞が働いたりする。制御性T細胞

は、また、自分自身の蛋白質（自己抗原）を認識する免疫細胞を不活性な状態（免疫寛容）のままに維持する重要な役割も果たしている。T細胞の分化および機能は、細胞内エネルギー代謝により制御されている。中でも解糖系は、エフェクターT細胞または制御性T細胞の運命選択に重要である。

[0004] 糖の機能的最小単位である単糖は、自然界において糖鎖や糖タンパク質、核酸など様々な状態で存在しており、生命活動の根幹を担っている。これに対し、希少糖とは、自然界に存在量が少ない単糖とその誘導体として定義され、種類は約50種類存在する一方で、自然界の糖に対する割合は0.1%程度であると考えられている。これら希少糖は、共通して甘みを有するものの、エネルギーとして利用されにくいという性質をもつことから、「落ちこぼれの糖」と呼ばれてきた。

[0005] しかしながら、近年、希少糖を含む単糖が生理学的作用を持つことが報告され始めている。例えば、単糖であるD-マンノースが、抑制性サイトカインであるIL-10やTGF- β の分泌、CTLA-4を介した細胞間相互作用による樹状細胞の成熟抑制により免疫応答を抑制することで知られる制御性T細胞の誘導を介して（非特許文献1参照）、自己免疫性疾患を抑制することが報告されている（非特許文献2参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Sakaguchi S. et al., "Regulatory T cells and immune tolerance", Cell. 2008;133:775-787.

非特許文献2: Zhang D. et al., "D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology", Nat Med. 2017;23:1036-1045.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 上記のとおり、D－マンノースが制御性T細胞の誘導を介して自己免疫性疾患を抑制することが報告されている。ところで、生体に投与された物質が細胞等に影響を与える機序は様々である。そのため、制御性T細胞を誘導する物質においても、D－マンノース以外の物質の探索が望まれる。
- [0008] 本出願における開示は、上記問題を解決するためになされたものである。本発明者らは鋭意研究を行ったところ、希少糖であるD－ソルボースおよびD－アロースが、制御性T細胞の誘導を促進することを見出した。
- [0009] すなわち、本出願の開示の目的は、D－ソルボースおよび／またはD－アロースを有効成分として含有する、制御性T細胞の誘導促進剤を提供することである。また、本出願の開示の目的は、自己免疫性疾患の治療または予防剤、アレルギー疾患の治療または予防剤、自己免疫性疾患の予防用食品組成物、アレルギー性疾患の予防用食品組成物、アレルギー状態の改善用食品組成物、健康な免疫機能の維持のための食品組成物、自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法、および、制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0010] (1) D－ソルボースおよび／またはD－アロースを有効成分として含有する
制御性T細胞の誘導促進剤。
- (2) 前記有効成分の内、D－ソルボースのみを含む
上記(1)に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- (3) 前記有効成分の内、D－アロースのみを含む
上記(1)に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- (4) 前記D－ソルボースが、D－ソルボース誘導体であり、
前記D－アロースが、D－アロース誘導体である
上記(1)に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- (5) 制御性T細胞の誘導を介した自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患

に対する治療または予防に用いられる

上記（１）～（４）のいずれか一つに記載の制御性Ｔ細胞の誘導促進剤。

（６）細胞内糖代謝経路であるヘキサミン経路の阻害により制御性Ｔ細胞が誘導される

上記（１）～（４）のいずれか一つに記載の制御性Ｔ細胞の誘導促進剤。

（７）医薬組成物の成分として使用される

上記（１）～（４）のいずれか一つに記載の制御性Ｔ細胞の誘導促進剤。

（８）食品組成物の成分として使用される

上記（１）～（４）のいずれか一つに記載の制御性Ｔ細胞の誘導促進剤。

（９）Ｄ－ソルボース、Ｄ－ソルボース誘導体、Ｄ－アロースおよびＤ－アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

自己免疫性疾患の治療または予防剤。

（１０）前記自己免疫性疾患が、１型糖尿病である

上記（９）に記載の自己免疫性疾患の治療または予防剤。

（１１）Ｄ－ソルボース、Ｄ－ソルボース誘導体、Ｄ－アロースおよびＤ－アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

アレルギー性疾患の治療または予防剤。

（１２）Ｄ－ソルボース、Ｄ－ソルボース誘導体、Ｄ－アロースおよびＤ－アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

自己免疫性疾患の予防用食品組成物。

（１３）Ｄ－ソルボース、Ｄ－ソルボース誘導体、Ｄ－アロースおよびＤ－アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

アレルギー性疾患の予防用食品組成物。

（１４）Ｄ－ソルボース、Ｄ－ソルボース誘導体、Ｄ－アロースおよびＤ－

アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

アレルギー状態の改善用食品組成物。

(15) D-ソルボース、D-ソルボース誘導体、D-アロースおよびD-アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

健康な免疫機能の維持のための食品組成物。

(16) 制御性T細胞の誘導促進作用を有するD-ソルボース、D-ソルボース誘導体、D-アロースおよびD-アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つの有効量を、動物（ただし、ヒトを除く。）に投与する工程を含む

自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法。

(17) 制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法であって、

(a) 被験物質と制御性T細胞を接触させる工程と、

(b) 被験物質を接触させた制御性T細胞の誘導率を測定し、被験物質を接触させない対照群の制御性T細胞の誘導率と比較する工程と、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、制御性T細胞の誘導を促進させる被験物質を選択する工程と、

を含む、スクリーニング方法。

発明の効果

[0011] 本出願で開示するD-ソルボースおよび／またはD-アロースを有効成分として含有する制御性T細胞の誘導促進剤により、制御性T細胞の誘導が促進される。D-ソルボースおよび／またはD-アロースは、自己免疫性疾患の治療または予防剤、アレルギー疾患の治療または予防剤、自己免疫性疾患の予防用食品組成物、アレルギー性疾患の予防用食品組成物、アレルギー状態の改善用食品組成物、健康な免疫機能の維持のための食品組成物、自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法にも使用することが

できる。また、本出願で開示する制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法により、D-ソルボースおよび／またはD-アロース以外の制御性T細胞の誘導を促進する物質の探索が期待される。

図面の簡単な説明

[0012] [図1] 図1は、各種希少糖のTreg誘導能の*ex vivo*での評価結果を示す図である。

[図2] 図2は、D-ソルボースの長期持続的経口投与による生体への影響を調べた結果を示す図である。

[図3] 図3は、D-ソルボースのTreg誘導能を定常状態のC57BL/6Jマウスを用いて評価した結果を示す図である。

[図4] 図4は、免疫活性化状態を模倣するために、あらかじめD-ソルボースを投与したマウス由来の脾細胞を回収し、PMA/ionomycinで刺激した結果を示す図である。

[図5] 図5は、自己免疫性糖尿病の自然発症モデルであるNOD/ShiJc1マウスを用いて、生体内におけるTreg誘導能とその影響について評価した図である。

[図6] 図6は、D-ソルボースが自己免疫性糖尿病の発症を予防することを示す図である。

[図7] 図7は、D-ソルボースによる糖尿病の発症予防効果を免疫学的に確かめるため、各組織におけるTregの割合を解析した図である。

[図8] 図8は、D-ソルボースによる糖尿病の発症予防効果を免疫学的に確かめるため、各組織におけるTregの割合を解析した図である。

[図9] 図9は、Tregとそれ以外のT細胞でD-ソルボースへの感受性の違いを細胞生存率で評価した結果を示す図である

[図10] 図10は、D-ソルボースが細胞内糖代謝を阻害することでTregを誘導することを示す図である。

[図11] 図11は、糖代謝のうちグルコース-6-リン酸から分岐する代謝経路を触媒する酵素の阻害剤を用いて、Treg誘導能を評価した結果を示す

図である。

[図12]図12は、D-アロースの長期持続的経口投与による生体への影響を調べた結果を示す図である。

[図13]図13は、D-ソルボースがOVA誘導性アレルギー気管支炎の発症を予防することを確認するため、縦郭リンパ節内のTregの割合を解析した図である。

[図14]図14は、D-ソルボースがOVA誘導性アレルギー気管支炎の発症を予防することを確認するため、肺臓を評価した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

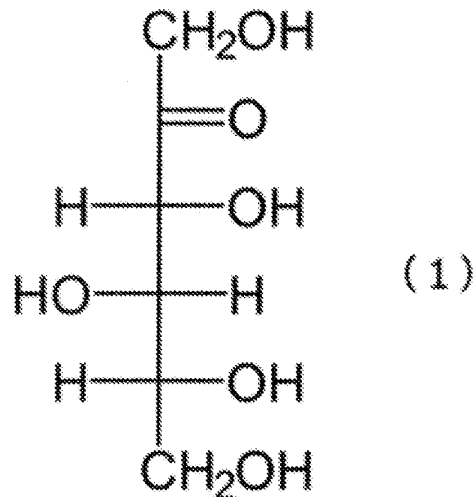
[0013] 以下に、本出願で開示する、制御性T細胞の誘導促進剤（以下、単に「誘導促進剤」と記載することがある。）について詳しく説明する。なお、本明細書において、数値、数値範囲、及び定性的な表現（例えば、「同一」、「同じ」等の表現）については、当該技術分野において一般的に許容される誤差を含む数値、数値範囲及び性質を示している、

[0014] （制御性T細胞の誘導促進剤の実施形態）

誘導促進剤は、D-ソルボースおよび／またはD-アロースを有効成分として含有する。

[0015] D-ソルボースは、D-フラクトースのC4位のエピマーであり、工業的には天然型単糖のD-ガラクトースが還元されることで生じるガラクトールを原料として、D-タガトースイソメラーゼによってD-タガトースを経て生成される。D-ソルボースの構造式を式（1）に示す。

[化1]

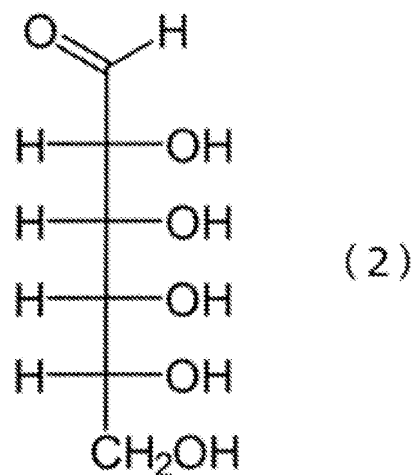


[0016] D-ソルボースの生理学的作用についての報告は少ないが、小腸においてスクラーゼ活性を阻害し、血糖上昇およびインスリン分泌を抑制する作用が報告されている (Oku T. et al., “D-sorbose inhibits disaccharidase activity and demonstrates suppressive action on postprandial blood levels of glucose and insulin in the rat”, Nutr Res. 2014; 34: 961-967.)。

[0017] D-ソルボースは、スクロース（一般的な砂糖）の約7割程度の甘さを持っている。経口的に摂取されたD-ソルボースは、25%が腸管吸収、24%が腸内細菌による発酵利用を受け、残りの51%が便中排泄されるが、腸管で吸収された25%もすべて尿中に排泄されることが報告されているため（北川真知子等、「健常成人におけるD-マンノース、D-ソルボース、D-アロースの吸収および発酵利用性の評価」、ルミナコイド研究：日本食物繊維学会会誌、2018; 22: 75-82）、エネルギーとしては利用されないと考えられる。

[0018] D-アロースは、グルコースの3位のエピマーである。D-アロースの構造式を式(2)に示す。

[化2]



[0019] D-アロースは、Thioredoxin interacting protein (TXNIP)を増加させ、Glucose transporter 1 (GLUT1)の発現を負に制御することで、腫瘍細胞で亢進した糖代謝を抑制することが知られている(Yamaguchi F. et al., “Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27kip1”, Int J Oncol. 2008; 32: 377-385)。

[0020] D-ソルボース、D-アロースは、市販品を用いることができる。

[0021] D-ソルボースおよびD-アロースは、誘導体であってもよい。なお、本明細書において「D-ソルボース誘導体」とは、生体内で代謝されることで「D-ソルボース」を遊離し得るものを意味する。また、「D-アロース誘導体」とは、生体内で代謝されることで「D-アロース」を遊離し得るもの

を意味する。「D-ソルボース誘導体」および「D-アロース誘導体」は生体内で代謝されることで、それぞれ、生体内で「D-ソルボース」および「D-アロース」となる。したがって、誘導促進剤に含まれる「D-ソルボース誘導体」および「D-アロース誘導体」は、それぞれ、「D-ソルボース」および「D-アロース」とは物質として異なるものの、生体に投与された後は「D-ソルボース」および「D-アロース」と同様の効果を奏する。

[0022] D-ソルボース誘導体は、生体内で代謝されてD-ソルボースを遊離し得るものであれば特に制限はない。また、D-アロース誘導体は、生体内で代謝されてD-アロースを遊離し得るものであれば特に制限はない。

[0023] 限定されるものではないが、D-ソルボース誘導体、D-アロース誘導体としては、以下の例が挙げられる。

(i) D-ソルボースが2個以上、好ましくは2～6個、より好ましくは2～4個重合したポリマー、または、D-アロースが2個以上、好ましくは2～6個、より好ましくは2～4個重合したポリマー。

(ii) D-ソルボースに1個以上、好ましくは1～6個、より好ましくは1～4個のグルコースが重合した糖付加体、または、D-アロースに1個以上、好ましくは1～6個、より好ましくは1～4個のグルコースが重合した糖付加体。

[0024] (i) のD-ソルボースが2個以上重合したポリマーまたはD-アロースが2個以上重合したポリマーは、それぞれ、構成単位がD-ソルボースまたはD-アロースを主成分として含めば他の成分を含んでもよいが、D-ソルボースのみまたはD-アロースのみを構成単位とするポリマーがより好ましい。

[0025] (ii) のD-ソルボース糖付加体の具体例としては、例えば、モノグルコシル- α -D-ソルボース、 α -マルトシル- α -D-ソルボース、 α -マルトトリオシル- α -D-ソルボース、 α -マルトテトラオシル- α -D-ソルボースが挙げられる。

(ii) のD-アロース糖付加体の具体例としては、例えば、モノグルコ

シルー α -D-アロース、 α -マルトシルー α -D-アロース、 α -マルトトリオシルー α -D-アロース、 α -マルトテトラオシルー α -D-アロースが挙げられる。

[0026] なお、以下の説明において、実施例を除き、特段の記載をしない限り「D-ソルボース」と記載した場合は「D-ソルボース」および「D-ソルボース誘導体」を意味する。同様に、特段の記載をしない限り「D-アロース」と記載した場合は「D-アロース」および「D-アロース誘導体」を意味する。実施例の「D-ソルボース」、「D-アロース」は、それぞれ単糖であるD-ソルボース、D-アロースを意味する。

[0027] 実施形態に係る誘導促進剤の剤型としては、例えば、錠剤、丸剤、粉剤、ロゼンジ、サシェ剤、カシェ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤、溶液剤、シロップ、エアロゾル剤(固形としてまたは液体媒質中)、軟膏剤、ゼラチン軟および硬カプセル剤、座剤、点眼剤、点鼻剤、貼付剤、滅菌注射用溶液および滅菌封入粉剤等が挙げられる。

[0028] また、実施形態に係る誘導促進剤は、担体、賦型剤、希釈剤を含んでもよい。例えば、ラクトース、デキストロース、シュクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ガムアカシア、リン酸カルシウム、アルギネート、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、シロップ、メチルセルロース、オキシ安息香酸メチルーおよびプロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウムおよび鉱油が挙げられる。更に、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、保存剤、甘味剤または着香剤を加えてもよい。また、実施形態に係る誘導促進剤を注射により投与する場合は、注射する部位に応じて、水溶性のヒアルロン酸、ステロイド、麻酔薬、抗炎症剤等、公知の薬剤と組み合わせてもよい。

[0029] 希少糖は、これまであまり多く研究がされてこなかった分野である。実施形態に係る誘導促進剤の投与量(D-ソルボースおよび/またはD-アロースの投与量)は、動物を用いた安全実験をとおして適切な量を設定すればよ

い。限定されるものではないが、例えば、Dーソルボースの kg/day の下限は、 1 mg 以上、 2 mg 以上、 3 mg 以上、 4 mg 以上、 5 mg 以上、 6 mg 以上、 7 mg 以上、 8 mg 以上、 9 mg 以上、 10 mg 以上等が挙げられる。また、Dーソルボースの kg/day の上限は、例えば、 50 mg 以下、 45 mg 以下、 40 mg 以下、 35 mg 以下、 30 mg 以下、 25 mg 以下、 20 mg 以下、 15 mg 以下等が挙げられる。また、例示した任意の数値を組み合わせることで、例えば、 $1\text{ mg}\sim 50\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、 $3\text{ mg}\sim 40\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、 $5\text{ mg}\sim 30\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、 $7\text{ mg}\sim 20\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 等、投与量を所定の範囲で表してもよい。

[0030] Dーアロースの kg/day の下限は、例えば、 3 mg 以上、 4 mg 以上、 5 mg 以上、 6 mg 以上、 7 mg 以上、 8 mg 以上、 9 mg 以上、 10 mg 以上、 11 mg 以上、 12 mg 以上等が挙げられる。Dーアロースの kg/day の上限は、例えば、 50 mg 以下、 45 mg 以下、 40 mg 以下、 35 mg 以下、 30 mg 以下、 25 mg 以下、 20 mg 以下、 15 mg 以下等が挙げられる。また、例示した任意の数値を組み合わせることで、例えば、 $3\text{ mg}\sim 50\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、 $5\text{ mg}\sim 40\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、 $7\text{ mg}\sim 30\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、 $10\text{ mg}\sim 20\text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$ 等、投与量を所定の範囲で表してもよい。

[0031] 上記投与量において、「Dーソルボース誘導体」、「Dーアロース誘導体」の投与量は、それぞれの誘導体中のDーソルボース、Dーアロース部分の量に換算した量を意味する。

[0032] 後述する実施例で示すとおり、DーソルボースはTregへの分化誘導を介して自己免疫性糖尿病の発症を予防した。さらに、Dーソルボースは細胞内糖代謝を阻害し、それら代謝経路を既存の阻害剤によって阻害した場合もまた、Dーソルボースと同様にTregへの分化が誘導されることを示した。

[0033] 生体内の免疫系が過剰に活性化することにより生じる自己免疫性疾患やアレルギー性疾患は、年々増加傾向にある。しかしながら、それらに対する治

療は免疫抑制剤や抗ヒスタミン薬による対症療法が主であり、これらの治療に耐性を示す例が多いことから新規治療法の確立が望まれている。したがって、本出願で開示する誘導促進剤は本来生体に備わっている免疫寛容機構であるTregを誘導することから、これら免疫過剰疾患における新たな治療法として用いることができる。

[0034] 本出願で開示する誘導促進剤を用いることで治療または予防が可能な自己免疫性疾患としては、関節リウマチ（抗CCP抗体、MMP-3、リウマトイド因子）、全身性エリテマトーデス（抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体、抗核抗体、他）、全身性強皮症（抗セントロメア抗体、抗Scl-70/トポイソメラーゼI抗体、抗RNAポリメラーゼIII抗体、抗核抗体、他）、多発性筋炎／皮膚筋炎（抗Jo-1抗体、抗ARS抗体、他）、混合性結合組織病（抗U1-RNP抗体）、シェーグレン症候群（抗SS-A抗体、抗SS-B抗体、抗核抗体、他）、抗リン脂質抗体症候群（ループスアンチコアグラント、抗カルジオリピン抗体、他）、顕微鏡的多発血管炎（MPO-ANCA）、多発血管炎性肉芽腫症（PR3-ANCA）、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（MPO-ANCA）、半月体形成性糸球体腎炎（MPO-ANCA）が挙げられる。

[0035] また、臓器特異性自己免疫性疾患としては、バセドウ病（抗甲状腺レセプター抗体、他）、橋本病（抗サイログロブリン抗体、抗ペルオキシダーゼ抗体、抗甲状腺マイクロソーム抗体、他）、自己免疫性肝炎（抗平滑筋抗体、抗核抗体、他）、原発性胆汁性胆管炎（抗ミトコンドリア抗体、抗核抗体、IgM高値、他）、自己免疫性膵炎（抗核抗体、IgG高値、他）、I型糖尿病（抗ランゲルハンス島抗体、他）、重症筋無力症（抗アセチルコリン受容体抗体）、ギランバレー症候群（抗ガングリオシド抗体）、多発性硬化症（抗アクアポリン4抗体、他）、グッドパスチャー症候群（抗GBM抗体）、自己免疫性溶血性貧血（抗赤血球抗体、他）、巨赤芽球性貧血（抗内因子抗体、他）、特発性血小板減少性紫斑病（抗血小板抗体）等が挙げられる。

[0036] その他、原発性硬化性胆管炎、結節性多発動脈炎、高安動脈炎、巨細胞性

動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、成人スティル病、ベーチェット病、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、クローン病、なども特異的な自己抗体は発見されていないものの、何らかの自己免疫性疾患であると考えられている。

[0037] Tregが自己免疫性疾患全般に関与していることは、Tara Fiyouzi et. al., “Enhancing Regulatory T Cells to Treat Inflammatory and Autoimmune Diseases”, *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24 (9), 7797; <https://doi.org/10.3390/ijms24097797>に詳しく記載されている。したがって、Tregの誘導を促進するD-ソルボースおよび／またはD-アロースは、自己免疫性疾患全般に有用である。

[0038] また、本出願で開示する誘導促進剤を用いることで治療または予防が可能なアレルギー性疾患としては、気管支ぜん息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎等が挙げられる。

[0039] Tregが喘息や気道アレルギーに関与していることは、Jing Zhang et. al., “Regulatory T Cells, a Viable Target Against Airway Allergic Inflammatory Responses in Asthma”, *Front. Immunol.*, 10 June 2022, Sec. T Cell Biology, Volume 13-2022 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.902318>、に記載されている。

[0040] Tregが食物アレルギーに関与していることは、Guirong Liu, et. al., “The Role of Regulatory T Cells in Epicutaneous Immunotherapy for Food Allergy”, *Front. Immunol.*, 08 July 2021, Sec. T Cell Biology, Volume 12-2021 | <https://doi.org>

／10.3389／fimmu.2021.660974に記載されている。

[0041] Tregがアトピーに関与していることは、Masutaka Furu e, et. al., “Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis”, Int. J. Mol. Sci. 2019, 20 (21), 5424 ; <https://doi.org/10.3390/ijms20215424>、に記載されている。

[0042] Tregが花粉症に関与していることは、Iris Bellinghausen, et. al., “Current Strategies to Modulate Regulatory T Cell Activity in Allergic Inflammation”, Front. Immunol., 26 May 2022, Sec. Vaccines and Molecular Therapeutics, Volume 13–2022 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.912529>、に記載されている。

[0043] したがって、Tregの誘導を促進するD-ソルボースおよび／またはD-アロースは、アレルギー性疾患全般に有用である。

[0044] 本出願で開示する誘導促進剤は、例えば、免疫活性化状態にある局所（例えば、炎症の生じている局所）において制御性T細胞を誘導することができる。上記局所は、例えば、鼻、眼、喉、口腔、脾臓、呼吸器（気管、肺等）、皮膚、消化管（食道、胃、十二指腸、小腸、大腸）、脳、肝臓、胆のう、脾臓、腎臓、胸腺、甲状腺、副腎、筋肉、リンパ管、血管、心臓、精巣、子宮、卵巣、前立腺等が挙げられる。

[0045] 実施形態に係る誘導促進剤は、医薬組成物の成分または食品組成物の成分として使用することができる。

[0046] 先ず、実施形態に係る誘導促進剤が、食品組成物の成分として使用される場合について説明する。実施形態に係る誘導促進剤が食品組成物の成分とし

て含まれていれば、食品組成物のその他の成分は特に制限はない。

[0047] 食品組成物は、固形物、ゲル状物、液状物の何れの形態とすることができる。例えば、乳酸菌飲料等の発酵乳製品、各種加工飲食品、乾燥粉末、錠剤、カプセル剤、顆粒剤等が挙げられ、更には各種飲料、ヨーグルト、流動食、ゼリー、キャンディ、レトルト食品、錠菓、クッキー、カステラ、パン、ビスケット、チョコレート等とすることができる。また、食品組成物は、糖類、タンパク質、脂質、ビタミン、ミネラル、フレーバー、炭水化物、甘味料、香料、色素、テクスチャ改善剤等又はこれらの混合物等の添加物を添加し、栄養的バランスや風味等を改善してもよい。なお、食品組成物は、飲料水を含む概念である。

[0048] 食品組成物の摂取期間は特に制限はないが、予防または進行抑制との観点では、長期間摂取することが好ましい。限定されるものではないが、例えば、1週間以上、2週間以上、3週間以上、1カ月以上、3か月以上、6カ月以上、1年以上等が挙げられる。食品組成物中に含まれるD-ソルボース（質量%）の下限は、例えば、1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上等が挙げられる。一方、食品組成物中に含まれるD-ソルボース（質量%）の上限は、例えば、30%以下、29%以下、28%以下、27%以下、26%以下、25%以下、24%以下、23%以下、22%以下、21%以下、20%以下等が挙げられる。また、例示した任意の数値を組み合わせることで、例えば、1%~30%、3%~25%、5%~20%等、含有量を所定の範囲で表してもよい。

[0049] 食品組成物中に含まれるD-アロース（質量%）の下限は、例えば、1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上等が挙げられる。一方、食品組成物中に含まれるD-アロース（質量%）の上限は、例えば、20%以下、19%以下、18%以下、17%以下、16%以下、15%以下、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下、10%以下等が挙げられる。また、例示した

任意の数値を組み合わせることで、例えば、１％～２０％、３％～１５％、５％～１０％等、含有量を所定の範囲で表してもよい。

- [0050] 次に、実施形態に係る誘導促進剤が、医薬組成物の成分として使用される場合について説明する。実施形態に係る誘導促進剤が医薬組成物の成分として含まれていれば、医薬組成物のその他の成分は特に制限はない。実施形態に係る誘導促進剤を含む医薬組成物は、制御性Ｔ細胞の誘導を介した自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患に対する治療または予防といった効能を有する医薬組成物、あるいは、当該効能を付加した医薬組成物として提供することができる。
- [0051] 医薬組成物は、局所投与または全身投与することができる。投与形態は特に限定されず、経口投与および非経口投与（例えば、点眼や経鼻等）の何れでもよい。また、医薬組成物は、有効成分であるラクトフェリンの他に、投与形態に応じて、薬理学的に許容しうる担体を含ませることができる。担体としては、例えば、賦形剤、崩壊剤若しくは崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤若しくは溶解補助剤、等張化剤、ｐＨ調節剤、安定化剤、噴射剤、および粘着剤等が挙げられる。
- [0052] 実施形態に係る誘導促進剤以外に医薬組成物に含まれる成分としては、例えば、免疫抑制剤、免疫チェックポイント阻害剤、アレルギー治療薬、抗体製剤等が挙げられる。免疫抑制剤の例としては、限定されるものではないが、シクロスポリン、ミゾリビン、シクロフォスファミド、アザチオプリン、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル等が挙げられる。また、免疫チェックポイント阻害剤としては、限定されるものではないが、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、アテゾリズマブ、セミプリマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ等が挙げられる。
- [0053] アレルギー治療薬としては、限定されるものではないが、アレジオンエピナスチン１９９４、エバステルエバスチン１９９６、ジルテックセチリジン１９９８、タリオンベポタスチン２０００、アレグラフェキソフェナジン２００１、アレロックオロパタジン２００１、クラリチンロラタジン２００２

、ザイザルレボセチリジン2010、ビラノアビラスチン2016、デザレックスデスロラタジン2016、ルパフィンルパタジン2017等が挙げられる。

[0054] 抗体製剤としては、限定されるものではないが、抗IgE抗体であるオマリズマブ、抗IL-5抗体であるメポリズマブ、抗IL-5受容体抗体であるベンラリズマブ、抗IL-4/13受容体抗体であるデュピルマブ、IL-31受容体抗体であるネモリズマブ、抗TSLP抗体であるテゼペルマブ等が挙げられる。

[0055] 医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢等に応じて変動するものである。特に限定するものではない。投与量は、医師が適宜設定すればよい。限定されるものではないが、例えば、医薬組成物に含まれる誘導促進剤の量が、上記した誘導促進剤の投与量（D-ソルボースおよび／またはD-アロースの投与量）と同じになるように設定すればよい。

[0056] （自己免疫性疾患の治療または予防剤の実施形態およびアレルギー性疾患の治療または予防剤の実施形態）

上記のとおり、本出願で開示する誘導促進剤は、制御性T細胞の誘導を介した自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患に対する治療または予防に用いることができる。換言すると、D-ソルボースおよび／またはD-アロースは、制御性T細胞の誘導を介した、自己免疫性疾患、または、アレルギー性疾患の治療または予防剤として用いることができる。なお、本明細書において、「治療」とは、自己免疫性疾患およびアレルギー性疾患、当該疾患に起因する障害、症状、またはこのような障害または症状の中の1つ以上の兆候の進行を、反転させ、軽減し、阻害し、またはそれを防止することをいう。また、症状の緩和、QOLの向上も含む。「予防」とは、症状の発症を抑制することを意味する。

[0057] 実施形態に係る自己免疫性疾患の治療または予防剤は、上記の「制御性T細胞の誘導促進剤の実施形態」に記載の「制御性T細胞の誘導促進剤」を「自己免疫性疾患の治療または予防剤」と読み替えればよい。同様に、実施形

態に係るアレルギー性疾患の治療または予防剤は、上記の「制御性T細胞の誘導促進剤の実施形態」の「制御性T細胞の誘導促進剤」を「アレルギー性疾患の治療または予防剤」と読み替えればよい。したがって、重複記載を避けるため、自己免疫性疾患の治療または予防剤の実施形態およびアレルギー性疾患の治療または予防剤の実施形態の詳しい記載は省略する。

- [0058] (自己免疫性疾患の予防用食品組成物の実施形態、アレルギー性疾患の予防用食品組成物の実施形態、アレルギー状態の改善用食品組成物の実施形態、および、健康な免疫機能の維持のための食品組成物の実施形態)

上記のとおり、本出願で開示する誘導促進剤は、制御性T細胞の誘導を介した自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患に対する予防に用いることができる。換言すると、D-ソルボースおよび／またはD-アロースは、食品に添加することで、自己免疫性疾患の予防用食品組成物、または、アレルギー性疾患の予防用食品組成物として用いることができる。なお、予防の意味は、上記「自己免疫性疾患の治療または予防剤の実施形態およびアレルギー性疾患の治療または予防剤の実施形態」における記載と同じである。

- [0059] 実施形態に係る自己免疫性疾患の予防用食品組成物およびアレルギー性疾患の予防用食品組成物は、上記の「制御性T細胞の誘導促進剤の実施形態」において記載した、「実施形態に係る誘導促進剤が、食品組成物の成分として使用される場合について説明する。」の記載部分と同じである。つまり、誘導促進剤が食品組成物の成分として含まれていることを説明している部分を、D-ソルボースおよび／またはD-アロースを有効成分として含有する自己免疫性疾患の予防用食品組成物またはアレルギー性疾患の予防用食品組成物と読み替えればよい。したがって、自己免疫性疾患の予防用食品組成物の実施形態およびアレルギー性疾患の予防用食品組成物の実施形態の詳しい記載は省略する。

- [0060] 実施形態に係るアレルギー状態の改善用食品組成物および実施形態に係る健康な免疫機能の維持のための食品組成物は、上記の「制御性T細胞の誘導促進剤の実施形態」において記載した、「実施形態に係る誘導促進剤が、食

品組成物の成分として使用される場合について説明する。」の記載部分と同じである。つまり、誘導促進剤が食品組成物の成分として含まれていることを説明している部分を、Dーソルボースおよび／またはDーアロースを有効成分として含有するアレルギー状態の改善用食品組成物または健康な免疫機能の維持のための食品組成物と読み替えればよい。したがって、アレルギー状態の改善用食品組成物の実施形態および健康な免疫機能の維持のための食品組成物の実施形態の詳しい記載は省略する。

[0061] なお、本明細書において「アレルギー状態」とは、アレルギーによって生じる身体の不調であれば特に制限はされず、疾患に該当しない状態（例えば疾患の手前の状態）を含むことを意味する。アレルギー状態のより具体的な例としては、アレルギーによる局所（例えば、鼻、眼、喉、皮膚、呼吸器又は消化管）の不快感、かゆみ若しくは荒れ、鼻づまり、くしゃみ、涙目、目の赤みの増加が挙げられる。

[0062] また、実施形態に係る食品組成物は、健康な免疫機能の維持のために用いることができる。本明細書において「健康な免疫機能の維持」とは、過剰な免疫応答（例えば、炎症の生じている局所において免疫が活性化された状態）を抑制して健康な状態に近づけることを意味する。

[0063] （自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法の実施形態）

次に、実施形態に係る自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法（以下、単に「治療・予防方法」と記載することがある。）について説明する。

[0064] 治療・予防方法は、制御性T細胞の誘導促進作用を有するDーソルボースおよび／またはDーアロースの有効量を、動物（ただし、ヒトを除く。）に投与する工程を含む。有効量は、治療・予防効果を奏する量であれば特に制限はないが、例えば、上記の（制御性T細胞の誘導促進剤の実施形態）において記載した誘導促進剤の投与量（Dーソルボースおよび／またはDーアロースの投与量）と同じになるように設定すればよい。

[0065] 動物は、ヒト（ただし、ヒトへの治療行為が特許保護の対象から除外されている国では人は除かれる。）や他の哺乳動物が含まれる。哺乳動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ヒツジ、サル、ブタ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマなどが挙げられる。また、被験物質を接触、摂取または投与する対象となる被験生物としては、ヒトまたは動物の個体、組織、細胞（培養細胞を含む）などが含まれる。細胞は、限定されるものではなく、ヒト、マウス、ラットなど哺乳動物由来の細胞株、またはこれらの細胞株から派生する細胞株、各種組織由来の初代細胞、幹細胞、ES細胞、iPS細胞を挙げることができる。

[0066] （制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法）

後述する実施例において、D-ソルボースおよびD-アロースは、制御性T細胞の誘導を促進することを確認したが、当該実験系を用いることで制御性T細胞の誘導を促進する物質をスクリーニングすることもできる。実施形態に係る制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法は、

（a）被験物質と制御性T細胞を接触させる工程と、

（b）被験物質を接触させた制御性T細胞の誘導率を測定し、被験物質を接触させない対照群の制御性T細胞の誘導率と比較する工程と、

（c）上記（b）の比較結果に基づいて、制御性T細胞の誘導を促進させる被験物質を選択する工程と、
を含む。

[0067] 被験物質は、制御性T細胞の誘導を促進する可能性がある物質であれば特に制限はない。限定されるものではないが、核酸、抗体、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、細胞培養上清、植物抽出液、哺乳動物の組織抽出液、血漿等が挙げられる。被験物質は、新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。これら被験物質は塩を形成してもよく、被験物質の塩としては生理学的に許容される酸や塩基との塩が用いられる。

[0068] 被験物質を選択する際には、必要に応じて対照群の誘導率に対する閾値を

決め、閾値以上の誘導率を示す物質を選択すればよい。

- [0069] 以下に実施例を掲げ、本出願で開示する実施形態を具体的に説明するが、この実施例は単に実施形態の説明のためのものである。本出願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。

実施例

- [0070] <実施例 1>

本出願の実施例 1 で用いた材料と実験方法を以下に記載する。

(1) 実験動物

C57BL/6J または C57BL/6N 野生型雄マウスは日本チャールズ・リバー社、NOD/ShiJcl 雌マウスは日本クレア社よりそれぞれ購入した。すべてのマウスは少なくとも 1 週間、飼育環境下で馴化させ、生後 6–11 週齢で実験に使用した。マウスは特定の病原体が存在しない環境で飼育され、専用飼育ケージ（3 匹／ケージ）内の移動、飼料および飲用水の摂取は自由な状態とした。飼育室内は温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ に保ち、12 時間ごとの明暗サイクル（AM8:00 照明 ON）として飼育した。

- [0071] (2) 試薬

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640 培地) は富士フィルム和光純薬 (Osaka, Japan) より購入し、10% FBS (HyClone; Cytiva, Tokyo, Japan)、100 U/mL ペニシリンおよび 100 mg/mL ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を添加して完全 RPMI 培地とした。

- [0072] 以下の表 1 に示す単糖のうち、D-グルコースは Nacal Tesque (Kyoto, Japan) から購入し、D-マンノース、D-アロース、D-プシコース、D-タガトース、D-ソルボースは松谷化学工業 (Hyogo, Japan) より提供された。

- [0073]

[表1]

Monosaccharide	Category	M.W.
D-Glucose	Aldohexose	180.16
D-Mannose	Aldohexose	180.16
D-Allose	Aldohexose	180.16
D- Psicose	Ketohexose	180.16
D-Tagatose	Ketohexose	180.16
D-Sorbose	Ketohexose	180.16

[0074] D-グルコース、D-マンノース、D-アロース、D-プシコース、D-タガトース、D-ソルボースは、完全RPMI培地に溶解し、500mMに調整した。マウス経口投与用D-ソルボースは、蒸留水に1.1Mまたは0.28Mとなるように溶解した。

[0075] 糖代謝産物である、グルコース-6-リン酸1ナトリウム、リボース-5-リン酸ナトリウム、乳酸はNacalai Tesqueから、DL-リンゴ酸、ホスホエノールピルビン酸1カリウムは富士フィルム和光純薬から、DL-グリセルアルデヒド-3-リン酸はCayman Chemical (Ann Arbor, MI) から、UDP-N-Acetyl-D-Glucosamine, Disodium SaltはCalbiotech (El Cajon, CA) からそれぞれ購入した。すべての代謝産物は、蒸留水に溶解し、細胞内代謝産物測定の標準溶液として使用した。

[0076] グルコース代謝阻害剤であるKAN0438757 (KAN) はSelleck Biotech (Tokyo, Japan) から、6-Aminonicotinamide (6-AN) はCayman Chemical から、6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) は富士フィルム和光純薬から、それぞれ購入した。

[0077] 阻害剤は、Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) に溶解した後、完全RPMI培地で希釈して使用した。細胞培養におけるDMSOの終濃度は0.033%以下になるように調整

した。

[0078] (3) マウス組織からの細胞分離

マウスから採取した組織は下記の通りに処理し、リンパ球を分離した。脾臓はすりつぶした後、pH 7.3 溶血 buffer (NH_4Cl : 8.26 g、 NaHCO_3 : 1.19 g、 EDTA-2Na : 37.8 mg in 100 mL milli-Q water) を加え、3 分間氷中にて反応させて溶血処理を行った。その後、70 mm フィルターでろ過することで脾細胞懸濁液とした。末梢血は ethylenediamine-N, N, N', N' -tetraacetic acid-2Na (EDTA-2Na ; 0.5 mg, 同仁化学研究所, Kumamoto, Japan) 入りチューブに採取し、pH 7.3 溶血 buffer で脾臓と同様に溶血処理を行った。リンパ節はすりつぶした後、70 mm フィルターでろ過した。

[0079] (4) マウス Treg の分化培養

$\text{CD}3^+$ T 細胞は、生後 8 週齢の C57BL/6J 雄マウスの脾細胞から Magnetic cell sorting (MACS; Pan T Cell Isolation Kit II mouse, Miltenyi Biotec, Tokyo, Japan) によって単離された。単離した $\text{CD}3^+$ T 細胞を、96-well plate flat bottom に播種 (2×10^5 個/well) し、25 mM 各種単糖の存在下で、抗 $\text{CD}3/\text{CD}28$ (beads: cells = 1:5, Dynabeads[®] Mouse T-Activator $\text{CD}3/\text{CD}28$, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) と rIL-2 (30 IU/mL , Recombinant Human IL-2, Bio-technie, Minneapolis, MN) で刺激し、 37°C 、5% CO_2 条件で細胞を培養した。コントロール群には単糖の代わりに完全 RPMI 培地を添加した。培養後 3 日目に細胞を再刺激し、培養後 6 日目に回収した細胞を fluorescence-activated cell sorting (FACS) にて解析した。

[0080] (5) フローサイトメトリー分析 (FACS)

Foxp3核内染色は、製造元の指示に従って、固定／透過化バッファー溶液 (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, eBioscience; Affymetrix, Santa Clara, CA) を使用して行った。簡単に説明すると、細胞を抗CD16/CD32抗体 (Clone: 93, BioLegend, San Diego, CA) でFC receptorをブロックし、Ethidium Bromide (Sigma-Aldrich) で死細胞染色と、抗CD3抗体 (PE, Clone: 17A2, BioLegend) と抗CD4抗体 (FITC, Clone: GK1.5, BioLegend) で細胞表面染色を行った後、細胞を固定／透過し、抗Foxp3ビオチン抗体 (Clone: FJL-16s, BioLegend) とストレプトアビジン (APC, BioLegend) で核内染色を行った。また、CD8細胞表面染色も同様に行った。簡単に説明すると、細胞を抗CD16/CD32抗体でFC receptorをブロックし、抗CD8a抗体 (FITC, Clone: 53-6.7, BioLegend) で細胞表面を染色した後、7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend) で死細胞を染色した。染色された細胞は、FACS-Calibur (BD, Franklin Lakes, NJ) またはGalios (Beckman Coulter, Brea, CA) で分析した。データはFlowJo ver. 9.9.5またはKaluzaver. 1.1で解析された。

[0081] (6a) D-ソルボース安全性試験

生後6週齢のC57BL/6J雄マウスに、1.1M、0.28M D-ソルボース溶液を飲料水の代わりに自由飲水投与した。コントロール群には蒸留水を投与した。投与期間中は、2-3日毎に体重、飲水量および摂餌量を計測し、投与開始4週後に脾臓と末梢血を採取した。末梢血は遠心 (1400×g, 24℃, 10min) し、上清を採取することで血清を得た。血

清は生化学分析まで -80°C で保存した。

[0082] (6b) D-アロースの安全性試験

生後6週齢のC57BL/6J雄マウスに、0.28M、0.56M D-アロース溶液を飲料水の代わりに自由飲水投与した。コントロール群には蒸留水を投与した。投与期間中は、2-3日毎に体重、飲水量および摂餌量を計測した。

[0083] (7) マウス血清成分の生化学分析

血清中の総蛋白(TP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、クレアチニン(Cre)、グルコース(Glu)は、生化学自動分析装置(JCA-BM9130, JEOL, Tokyo, Japan)を用いて測定した。

[0084] (8) IL-10産生能の評価

脾細胞の刺激は次の手順で行った。生後6週齢から0.28M D-ソルボース溶液を6週間自由飲水投与したC57BL/6Jマウスの脾臓から分離した脾細胞を96-well plate flat bottomに播種(5×10^5 個/well)し、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 50ng/mL, Sigma-Aldrich) およびionomycin (500ng/mL, Sigma-Aldrich)で刺激し、 37°C 、5% CO_2 条件で培養した。コントロール群には蒸留水を投与したマウスの脾細胞を用いた。刺激72時間後に、細胞の増殖形態を撮影し、培養上清を回収した。培養上清中のIL-10産生量はMouse IL-10 ELISA kit (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific)にて測定された。

[0085] (9) 非肥満性自己免疫性糖尿病(NOD)モデル

NOD/ShiJclは、MHC-IIの変異による胸腺における負の選択障害等の多彩な原因により、T細胞依存性の膵島炎を引き起こし、高血糖および高尿糖を特徴とする自己免疫性糖尿病自然発症モデルである。その発

症時期は18週齢ごろから始まり、35週齢までに累計60%発症するため（日本クレア社より提供）、発症初期である17週齢と、病態末期である30週齢を、実験エンドポイントとして設定した。生後7.5週齢から、1.1M D-ソルボース溶液を自由飲水投与し、コントロール群には蒸留水を投与した。投与期間中は、3日毎に採血および体重、飲水量、および摂餌量の計測を行った。上記（6）に記載の手順で末梢血から血清を分離し、グルコースキット（GLU Reagent L, Sysmex, Hyogo, Japan）を用いたマイクロプレートアッセイにて血糖値を測定した。持続性高血糖（200mg/dL以上の血糖値が6日以上連続して記録された場合）を自己免疫性糖尿病の発症として評価した。生後15週齢で末梢血をEDTA-2Na入りチューブに採取し、17週齢と30週齢で末梢血、脾臓、膵臓、膵臓リンパ節を採取した。

[0086] （10）病理組織標本の作製

マウスの膵臓は胃葉、脾葉、十二指腸葉に分類されており、各部位毎に膵臓を採取した。そのうち膵島が最も多く分布する十二指腸葉を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、100μmメッシュに包んでパラフィンに浸透・包埋した。

[0087] （11）組織学的評価

マウス膵臓の十二指腸葉から、厚さ3mmの切片を50μmの間隔をあけて複数枚作製した。作成した切片をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色し、膵臓ランゲルハンス島へのリンパ球浸潤を以下のとおりスコアリングした。

- 0：リンパ球を認めない。
- 1：リンパ球が膵島周囲を取り囲むが浸潤はしていない。
- 2：膵島の25%未満に浸潤を認める。
- 3：膵島の25－50%に浸潤を認める。
- 4：膵島の50%以上に浸潤を認める。
- 5：膵島の100%に浸潤を認めるもしくは膵島が消失し残骸のみになる。

各個体30個の脾臓をスコアリングし、各グレードが占める割合を解析した。

[0088] (12) 免疫組織化学染色

マウス脾臓の十二指腸葉から、厚さ1 μm のパラフィン切片を作製し、Foxp3の免疫組織化学染色を行った。一次抗体には、ウサギ抗Foxp3抗体(ab215206, Abcam, Cambridge, England)を用いた。脱パラフィンおよび脱水後、Histofine抗原賦活液(pH9.0)(ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan)で切片を121℃、20分間加熱処理した。内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために、切片を0.3%過酸化水素含有メタノール溶液の中に30分間浸漬した。非特異的結合を1%BSAでブロックした後、切片を一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。ペルオキシダーゼポリマーと結合した二次抗体(ImmPRESS Reagent anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, Newark, CA)を室温で30分間インキュベートし、その後、基質溶液3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB; Dako, Santa Clara, CA)で反応させた。その後、切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色した。

[0089] (13) 細胞生存率の測定

生後11週齢のC57BL/6N雄マウスの脾臓からMACS(Pan T Cell Isolation Kit II mouse, CD4+CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse, Miltenyi Biotec)を用いてTreg(CD4+CD25⁺)とnon-Treg(CD4+CD25⁻)を単離した。それぞれの細胞を96-well plate flat bottomに播種(1×10^5 個/well)し、25mM単糖の存在下で、抗CD3/CD28(beads:cells=1:5)とrIL-2(30IU/mL)で刺激し、37℃、5%CO₂条件で培養した。刺激24時間後および72時

間後に細胞を回収し、トリパンブルー染色液（富士フィルム和光純薬）にて死細胞を染色し、細胞生存率を計測した。

[0090] (14) 細胞内糖代謝産物の測定

マウスTリンパ腫細胞（EL-4細胞）はJCRB細胞バンク（NIBIOHN；国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所）より購入し、完全RPMI培地を用いて、37℃、5%CO₂条件で浮遊培養した。細胞の継代は、細胞を古い培地とともに回収し、トリパンブルー染色液を用いて細胞数を算定後、 1×10^6 個の細胞を再度播種し、新たな培地を添加した。細胞の増殖速度が安定したのちに実験に使用した。細胞からの代謝産物の抽出は、次のとおり行った。EL-4細胞を96-well plate flat bottomに播種（ 4×10^5 個/well）し、37℃、5%CO₂条件で培養した。代謝を安定化させるために24時間の前培養後、D-ソルボースを終濃度25mMになるように添加し、37℃、5%CO₂条件で再度培養した。コントロール群にはD-ソルボースの代わりに完全RPMI培地を添加した。添加6時間後に細胞を回収し、細胞をPBSで3度洗浄（800×g, 4℃, 5min）することで、完全に培地を除去した。細胞ペレットに蒸留水を加えてよく混和し、超音波ホモジナイザー（VP-050N, タイテック, Aichi, Japan）で細胞を破砕した。メタノールを蒸留水と等量添加し、遠心（20000×g, 4℃, 10min）後上清を回収した。上清は分析まで-80℃で保存された。10μM 2-morpholinoethanesulfonic acid 30μLと氷上で溶解した上清200μLを混合し、減圧乾固、30μLの水で再溶解した後、Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry（LC-MS/MS）で分析した。

[0091] (15) 高速液体クロマトグラフィー タンデム質量分析（LC-MS/MS）

グルコース代謝の動態を広範に調査するため、各種の分岐代謝経路を考慮した計7種の代謝産物（上記（2）参照）を測定した。測定にはLCMS-

8060質量分析計（島津製作所，Kyoto，Japan）をNexce
ra HPLCシステムとともに使用した。HPLCは、Inert Su
stain PFP カラム（150mm×2.1mm，1.9mm，GL
サイエンス，Tokyo，Japan）を40℃で使用し、0.1%ギ酸水
溶液を初期移動相とした。細胞抽出物（1μL）を注入し、流速300μL
／min、0.1%ギ酸含有アセトニトリル（富士フィルム和光純薬）を2
5%に上昇させる3分間の移動相勾配で代謝産物を分離した。総分析時間は
6分であった。データはLabSolutions software v
er. 2.2）で取得され、代謝物のピーク面積を決定した。代謝産物の定
量値から、変換効率を算出し、代謝酵素活性として利用した。

[0092] （16）糖代謝阻害によるTreg分化誘導

細胞内代謝のTreg分化への影響を調べるために、糖代謝阻害剤を用い
てTreg分化培養を行った。CD3⁺T細胞は、生後9週齢のC57BL／
6N雄マウスの脾臓からMACSによって単離された。単離したCD3⁺T細
胞を96-well plate flat bottomに播種（2×1
0⁵個／well）し、各種阻害剤の存在下で、抗CD3／CD28（bea
ds：cells=1：2）とrIL-2（30IU／mL）で刺激し、3
7℃、5%CO₂条件で細胞を培養した。阻害剤の終濃度は、各阻害剤のIC
50の約10倍に設定し、それぞれKAN（2μM）、6-AT（5μM）
、DON（2μM）で使用した。阻害剤未添加群には、阻害剤の溶媒と同じ
濃度のDMSOを含む完全RPMI培地を添加した。培養後3日目に細胞を
再刺激し、培養後6日目に回収した細胞をFACSにて解析した。

[0093] （17）統計処理

統計解析にはGraphPad Prism software ver
. 6を用いた。全てのデータは平均値±標準偏差で表記し、2群間の有意差
検定には対応のないStudent-t testを用い、3群以上の有意
差検定には、One-way ANOVAまたはTwo-way ANOV
AとSaidak's-multiple comparison te

stまたはDunnett's-multiple comparison testを用いた。P<0.05を統計学的有意と判定した。

[0094] 以下に、上記実験方法により実施した実施例1の実験結果について説明する。

[0095] (1) 各種希少糖のTreg誘導能のex vivoでの評価

図1に、フローサイトメトリー法で解析した結果を示す。T細胞は、リンパ球の一種で、骨髄で産生された前駆細胞が胸腺での選択を経て分化成熟したものである。T細胞(CD3+細胞)は、細胞表面に特異的に発現しているCD4、CD8等のタンパク質を指標として複数の種類に分類される。例えば、CD4+T細胞は免疫反応を補助する役割があり、ヘルパーT細胞とも呼ばれている。CD8+T細胞は、ウイルスなどに感染した細胞及び腫瘍細胞を殺傷する能力があり、キラーT細胞と呼ばれている。本出願では、CD3+CD4+Foxp3+細胞をTregと定義した(Hori S. et al., "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3", Science, 2003; 299: 1057-1061、参照)。

[0096] 図1AおよびBから明らかなように、D-グルコース群と比較し、希少糖のD-ソルボースおよびD-アロース群はCD4+細胞に対するFoxp3+Tregの割合が増加傾向を示した。Tregは、転写因子のFoxP3がマスターレギュレーターであることが知られている。つまり、CD4+細胞に対するFoxp3+Tregの割合が大きくなるほど、Tregへ分化が誘導されることを意味する。図1AおよびBに示す結果は、Treg誘導能を有することが既に知られているD-マンノース群と同等であった。この結果は、希少糖のD-ソルボースおよびD-アロースが、D-マンノースと同様に、直接的にT細胞に作用し、Tregへの分化を誘導したことを示している。

[0097] 一方、図1CおよびDから明らかなように、D-マンノース群は、D-グ

ルコース群と比較して、 $CD8^+T$ 細胞が著しく減少したが、D-ソルボースおよびD-アロース群では有意な変化を認めなかった。 $CD8^+T$ 細胞（キラーT細胞）は、抗ウイルス応答や抗腫瘍活性に重要な役割を果たすとともに、自己抗原に対する過剰免疫応答の主要な細胞である。従って、D-マンノースによるTregの増加並びに $CD8^+T$ 細胞の枯渇は、自己免疫性疾患等の過剰免疫応答に相乗的な抑制活性が期待できる一方で、長期間の投与はウイルス感染および腫瘍増殖に対する脆弱性をきたす可能性がある。つまり、D-ソルボースおよびD-アロースは、Tregへの分化を誘導する点でD-マンノースと同様の効果を奏するが、 $CD8^+T$ 細胞を枯渇させない点でD-マンノースとは異なる効果を奏する。なお、本実施例で使用した系を用い、D-ソルボースおよびD-アロースに代え被験物質を投与することで、制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニングを実施することができる。

[0098] (2) D-ソルボースの長期持続的経口投与による生体への影響

ex vivoでTregの分化を誘導したD-ソルボースの安全性をin vivoで評価した。図2に結果を示す。図2Aに示すように、1.1 M D-ソルボース溶液の投与群は、投与開始数日でマウスの体重が急激に減少したが、その後徐々に回復し、投与開始2週後には蒸留水投与群（コントロール群）と同等まで回復した。投与期間中、D-ソルボース群では下痢などの身体所見は観察されず（図示せず）、摂水および摂餌量は持続的に減少しているものの、直接的な体重減少の要因は認められなかった。これら体重、飲水量および摂餌量の減少は、D-ソルボースの投与濃度を0.28 Mに下げることにより改善された。

[0099] また、図2Bに示すように、D-ソルボース群は、コントロール群と比較して、血清中の総蛋白（TP）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、クレアチニン（Cre）およびグルコース（Glu）値に病的かつ有意な変化を示さなかったが、血清グルコース値は増加傾向がみられた。以上の結果から、D-ソルボース投与は、初期の体重減少はあるものの、肝機能

、腎機能、および栄養状態における基本的安全性を担保することを確認した。

[0100] (3) D-ソルボースによるTregの誘導には、免疫活性化状態が必要であることについて

D-ソルボースのTreg誘導能を定常状態のC57BL/6Jマウスを用いて評価した。図3に結果を示す。図3から明らかなように、D-ソルボース群は、コントロール群と比較して、脾臓内のTregの割合に有意な変化を認めなかった。この結果は、*ex vivo*におけるD-ソルボースの作用と反しており、定常状態においてD-ソルボースによるTreg誘導は非常に感受性が低いことが示唆された。

[0101] 次に、免疫活性化状態を模倣するために、あらかじめD-ソルボースを投与したマウス由来の脾細胞を回収し、PMA/ionomycinで刺激した。図4に結果を示す。図4A（スケールバーは100μm）から明らかなように、コントロール群と比較し、D-ソルボース群では、刺激72時間後に小型で多数の細胞コロニー形成が観察された。さらに、図4Bに示すように、D-ソルボース群におけるIL-10の産生量は、コントロール群と比較して、増加傾向がみられた。

[0102] 以上の結果から、D-ソルボースによるTregの誘導は、定常状態では感受性が低い、免疫活性化状態（炎症背景）なら影響を与える可能性がある。特に、炎症性サイトカインであるIL-2は、Tregの分化・成熟等に重要であり内在性Treg（nTreg）よりも誘導性Treg（iTreg）で重要である。したがって、炎症性背景によって供給されるIL-2が、D-ソルボースによるTreg誘導に必要であることを示唆するとともに、D-ソルボースはiTregへの分化誘導を促すことができる。また、IL-2は免疫暴走しそうな時に多量に産生されることから、保健機能食品（特定保健用食品、機能性表示食品など）として毎日摂取していても、異常が発生した時のみに機能することから、副作用が少ないことが期待される。

[0103] (4) D-ソルボースは自己免疫性糖尿病の発症を予防することについて

D-ソルボースのTreg誘導には、炎症背景が重要であることが示唆されたため、自己免疫性糖尿病の自然発症モデルであるNOD/ShiJclマウスを用いて、生体内におけるTreg誘導能とその影響について評価した。まず、図5に示すように、投与期間中、体重(図5A)や摂食状態(図5B、C)、血清中の総蛋白、ALTおよびクレアチニン値(図5D)は、定常状態のC57BL/6Jにおける変化と同様の結果を示したことから、NOD/ShiJclにおいてもD-ソルボースは安全に投与可能であることが確認された。

[0104] そして、図6Aに示すように、コントロール群は一部の個体で糖尿病性の高血糖を発症したが、D-ソルボース群は病態末期まで血糖値を正常に維持していた。これを裏付けるように、図6BおよびCに示すように、D-ソルボース群は、コントロール群と比較して、病態末期における膵島(図6Cの黒色矢印部分。図6Cのスケールバーは100μm。)へのリンパ球浸潤が低下し、正常な膵島が多く残存していた。

[0105] 次に、D-ソルボースによる糖尿病の発症予防効果を免疫学的に確かめるため、各組織におけるTregの割合を解析した。図7AおよびBに示すように、コントロール群と比較し、D-ソルボース群は、発症初期(17週齢。D-ソルボース投与後10週)において、膵臓リンパ節内のCD3⁺T細胞の減少傾向を示し、図7C~Fに示すように、末梢血のTregの割合(図7C、D)および膵臓リンパ節内のTregの割合(図7E、F)が有意に増加した。一方、図8AおよびBに示すとおり、脾臓内のTregの割合には有意な変化を認めなかった。

[0106] また、図8C(スケールバーは100μm)に示すように、D-ソルボース群では、発症初期(17週齢。D-ソルボース投与後10週)において膵島浸潤リンパ球集団に、Foxp3⁺Tregの局所浸潤が確認された。これらの結果は、D-ソルボースが、発症初期の段階で、T細胞分化の場である局所リンパ節内のTreg分化を誘導し、炎症局所で機能的に抑制効果を発揮

することを示唆している。

- [0107] (5) D-ソルボースはT細胞のサブセット間で生存率に影響を与えないことについて

図7EおよびFに示すようにD-ソルボースは炎症局所でTregの割合を増加させる一方で、図7AおよびBに示すようにCD3⁺T細胞を減少させる傾向がみられた。この結果は、D-ソルボースによるTregの誘導によるものではなく、単にTregを除くT細胞の減少により相対的にTregの割合が増加した可能性がある。そこで、Tregとそれ以外のT細胞でD-ソルボースへの感受性の違いを細胞生存率で評価した。図9に結果を示す。D-ソルボース群は、培養時間およびT細胞集団によらず、D-グルコース群と同程度の細胞生存率を示した。これらの結果はD-ソルボースによるTregの増加は、相対的な増加ではなく、ナイーブT細胞からの分化誘導によるものであることを示唆している。

- [0108] (6) D-ソルボースは細胞内糖代謝を阻害することでTregを誘導することについて

D-ソルボースによる細胞内糖代謝への影響を明らかにするため、細胞内代謝産物を測定した。図10AおよびBに示すように、D-ソルボース群は、単糖未添加群（コントロール群）と比較し、解糖系初動のヘキソース-6-リン酸が著しく増加する一方で、そこから分岐する解糖系のグリセルアルデヒド-3-リン酸、ペントースリン酸経路（PPP）のリボース-5-リン酸、ヘキソサミン経路（HP）のUDP-GlcNAcへの代謝酵素活性が有意に減少した。

- [0109] 次に、図10Bに示すように、糖代謝のうちグルコース-6-リン酸から分岐する代謝経路を触媒する酵素の阻害剤を用いて、Treg誘導能を評価した。図11AおよびBに示すように、阻害剤未添加群（Vehicle群）と比較して、KANによる解糖系の6-ホスホフルクト-2-キナーゼ／フルクトース-2, 6-ビスホスファターゼ3（PFKFB3）の阻害、および6-ANによるPPPのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6

PD) の阻害は、Treg の割合を変化させなかったが、DON による HP のグルタミンーフルクトースー6ーリン酸アミノトランスフェラーゼ (GFAT) の阻害は、Treg の割合を有意に増加させた。これらの結果は、Dーソルボースが阻害すると考えられる様々な代謝経路の中で、細胞内糖代謝経路である解糖系・ペントースリン酸経路・ヘキソサミン経路を阻害し、特にヘキソサミン合成経路の阻害が、Treg 誘導に関与することを示唆している。

[0110] また、Dーソルボースが阻害した代謝経路を既存の阻害剤によって阻害した場合もまた、Dーソルボースと同様に Treg への分化が誘導されることを示した。したがって、Dーソルボースは、解糖系・ペントースリン酸経路・ヘキソサミン経路の阻害剤、中でもヘキサミン経路の阻害剤として用いることができると共に、当該経路を阻害することで治療または予防が可能な疾患に対する医薬組成物として用いることができる。具体的な疾患は、(制御性 T 細胞の誘導促進剤の実施形態) で記載した自己免疫性疾患およびアレルギー性疾患が挙げられる。

[0111] (7) Dーアロースの長期持続的経口投与による生体への影響

Dーソルボースと同様、Dーアロースの安全性を *in vivo* で評価した。図 12 に結果を示す。図 12 A 乃至図 12 C に示すように、Dーアロースの濃度が高いほど飲水量および摂餌量が減少し、体重の減少が見られた。しかしながら、投与期間中、Dーアロース群では下痢などの身体所見は観察されず (図示せず)、健康上特に問題は見られなかった。

[0112] <実施例 2>

次に、Dーソルボースが、アレルギー疾患にも有用であるか否か確認をする実験を行った。上記実施例 1 の (1) ~ (17) に記載の材料と実験方法のうち、以下の手順について変更した以外は実施例 1 と同様の手順で実験を行った。なお、実施例 2 は Dーソルボースのアレルギー疾患への有用性を確認するための実験であることから、実施例 1 の (1) ~ (17) に記載の材料と実験方法の一部は実施していない。

(1) 実験動物

マウスには、B a l b / c 野生型雌マウス（日本チャールズ・リバー社より購入）を用い、生後5週齢で実験に使用した。

[0113] (2) 試薬

単糖には、D-ソルボースのみを用い、1. 1 Mとなるように蒸留水に溶解した。また、阻害剤にはO v a l b u m i n (O V A ; A 5 5 0 3 ; S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O , U S A) を用い、p H 7 . 4 P B S で溶解した。アジュバントとして、a l u m i n u m h y d r o x i d e (A l h y d r o g e l a d j u v a n t 2 % ; i n v i v o G e n , S a n D i e g o , C A , U S A) を使用した。O V A と a l u m i n u m h y d r o x i d e が、それぞれ25 μ g、2 mg / 200 μ Lとなるように混合した。

[0114] (9) 非肥満性自己免疫性糖尿病 (NOD) モデル

実施例1の「非肥満性自己免疫性糖尿病 (NOD) モデル」に代え、O V A 誘導性アレルギー (O V A) モデルマウスを以下の手順で作製した。

B a l b / c マウスは、生後5週齢から1. 1 M D-ソルボース溶液を自由飲水投与した群および蒸留水を投与したコントロール群の2群に分け、10週齢まで投与された。生後6、7および8週齢で、O V A (25 μ g) と a l u m i n u m h y d r o x i d e (2 mg) 混合液を200 μ L腹腔内投与した。その後、生後9週齢から1週間毎日O V A (100 μ g / 200 μ L) 鼻腔内投与をした。投与期間中は、3日毎に採血および体重、飲水量、および摂餌量の計測を行った。10週齢で末梢血、肺臓、縦郭リンパ節を採取した。

[0115] (10) 病理組織標本の作製

実施例1の脾臓に代え、肺臓を用いた以外は実施例1と同様の手順で病理組織標本を作製した。

[0116] (11) 組織学的評価

実施例1の脾臓炎の組織学定期評価に代え、O V A モデルマウスの肺臓か

ら厚さ 1 μm のパラフィン切片を作製し、H E 染色を行い、以下の所見を評価した。

- ・炎症細胞浸潤
- ・気管支上皮肥厚
- ・杯細胞増生
- ・気管支平滑筋肥厚
- ・血管・気管支周囲粘膜浮腫

[0117] 以下に、上記実験方法により実施した実施例 2 の実験結果について説明する。

(1) Dーソルボースは O V A 誘導性アレルギー気管支炎の発症を予防することについて

上記実施例 1 の「(4) Dーソルボースは自己免疫性糖尿病の発症を予防することについて」に記載のとおり、Dーソルボースの投与は生体内における T r e g 誘導能を有意に増加した。

図 1 3 A および B に示すように、O V A 誘導性アレルギー気管支炎モデルを用いた実験においても、コントロール群と比較し、Dーソルボース群は、縦郭リンパ節内の T r e g の割合が有意に増加した。また、図 1 3 C (スケールバーは 5 0 μm) に示すように、Dーソルボース群では、肺臓内浸潤リンパ球集団に、F o x p 3 + T r e g の局所浸潤が確認された。これらの結果は、Dーソルボースが T 細胞分化の場である局所リンパ節内の T r e g 分化を誘導し、炎症局所で機能的にアレルギー抑制効果を発揮することを示唆している。

[0118] さらにこれらを裏付けるように、図 1 4 A に示すように、Dーソルボース群は、コントロール群と比較して、肺臓 (スケールバーは 1 0 0 μm) への炎症細胞浸潤や気管支上皮肥厚、杯細胞増生、気管支平滑筋肥厚、血管・気管支周囲粘膜浮腫等が低下していた。これらの所見と一致するように、図 1 4 B に示すように、Dーソルボース群は、コントロール群と比較して肺臓／体重比が有意に低下していた。

[0119] アレルギー疾患は、T h 2 細胞が誘導されると発症することが知られている。実施例 2 で作製した O V A モデルマウスは、T h 2 細胞誘導型のモデルマウスである。したがって、実施例 2 の結果から、D - ソルボースはアレルギー疾患に有用であることを確認した。

産業上の利用可能性

[0120] 本出願で開示する制御性 T 細胞の誘導促進剤を用いることで、自己免疫性糖尿病等の自己免疫性疾患や、アレルギー性疾患等の治療や予防に用いることができる。したがって、医療機関や製薬企業、および、健康食品産業にとって有用である。

請求の範囲

- [請求項1] D－ソルボースおよび／またはD－アロースを有効成分として含有する
制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項2] 前記有効成分の内、D－ソルボースのみを含む
請求項1に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項3] 前記有効成分の内、D－アロースのみを含む
請求項1に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項4] 前記D－ソルボースが、D－ソルボース誘導体であり、
前記D－アロースが、D－アロース誘導体である
請求項1に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項5] 制御性T細胞の誘導を介した自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患に対する治療または予防に用いられる
請求項1～4のいずれか一項に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項6] 細胞内糖代謝経路であるヘキサミン経路の阻害により制御性T細胞が誘導される
請求項1～4のいずれか一項に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項7] 医薬組成物の成分として使用される
請求項1～4のいずれか一項に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項8] 食品組成物の成分として使用される
請求項1～4のいずれか一項に記載の制御性T細胞の誘導促進剤。
- [請求項9] D－ソルボース、D－ソルボース誘導体、D－アロースおよびD－アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する
自己免疫性疾患の治療または予防剤。
- [請求項10] 前記自己免疫性疾患が、1型糖尿病である
請求項9に記載の自己免疫性疾患の治療または予防剤。
- [請求項11] D－ソルボース、D－ソルボース誘導体、D－アロースおよびD－

アロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

アレルギー性疾患の治療または予防剤。

[請求項12] Dーソルボース、Dーソルボース誘導体、DーアロースおよびDーアロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

自己免疫性疾患の予防用食品組成物。

[請求項13] Dーソルボース、Dーソルボース誘導体、DーアロースおよびDーアロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

アレルギー性疾患の予防用食品組成物。

[請求項14] Dーソルボース、Dーソルボース誘導体、DーアロースおよびDーアロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

アレルギー状態の改善用食品組成物。

[請求項15] Dーソルボース、Dーソルボース誘導体、DーアロースおよびDーアロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つを有効成分として含有する

健康な免疫機能の維持のための食品組成物。

[請求項16] 制御性T細胞の誘導促進作用を有するDーソルボース、Dーソルボース誘導体、DーアロースおよびDーアロース誘導体からなる群から選択した少なくとも一つの有効量を、動物（ただし、ヒトを除く。）に投与する工程を含む

自己免疫性疾患またはアレルギー性疾患の治療または予防方法。

[請求項17] 制御性T細胞の誘導を促進する物質のスクリーニング方法であって、

（a）被験物質と制御性T細胞を接触させる工程と、

（b）被験物質を接触させた制御性T細胞の誘導率を測定し、被験

物質を接触させない対照群の制御性 T 細胞の誘導率と比較する工程と

、

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、制御性 T 細胞の誘導を促進させる被験物質を選択する工程と、

を含む、スクリーニング方法。