(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
2018年9月7日(07.09.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/159787 A1

(51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/007901

(22) 国際出願日: 2018年3月1日(01.03.2018)

(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 2017-038115 2017年3月1日(01.03.2017) JP

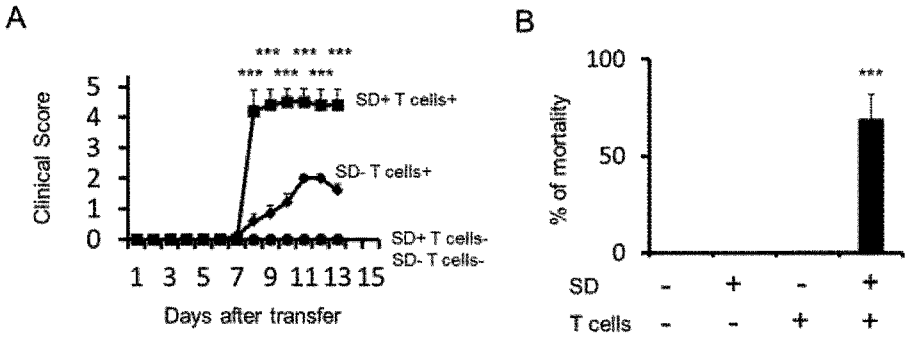
(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: 村上 正晃 (MURAKAMI Masaaki); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 上村 大輔 (KAMIMURA Daisuke); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 有馬 康伸 (ARIMA Yasunobu); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人ＩＰアシスト特許事務所(IP-ASSIST PATENT OFFICE); 〒0600002

(54) **Title:** PRODUCTION METHOD FOR DISEASE MODEL NON-HUMAN ANIMAL, DISEASE MODEL NON-HUMAN ANIMAL, DRUG SCREENING METHOD USING DISEASE MODEL NON-HUMAN ANIMAL, AND DISEASE RISK DETERMINATION METHOD

(54) 発明の名称: 疾患モデル非ヒト動物の製造方法、疾患モデル非ヒト動物、該動物を用いた薬剤のスクリーニング方法及び疾患リスク判定方法



(57) **Abstract:** [Problem] The purpose of the present invention is to provide: a method for making an animal that has been stressed, and, in particular, chronically stressed, contract or present a specific disease or symptoms; and a tool that, by elucidating the process by which the stress leads to contracting or presenting the disease or symptoms, is useful for research and development related to the prevention or treatment of the disease or symptoms. [Solution] The present invention relates to: a production method for a disease model non-human animal that has inflamed intracerebral blood vessels; the disease model non-human animal; a drug screening method that uses the disease model non-human animal; a disease risk determination method that uses the presence of inflamed blood vessels as an indicator; and a pharmaceutical for preventing and/or treating progressive multiple sclerosis or the like. The present invention makes it possible to develop a pharmaceutical for the abovementioned disease or the like and to perform research to elucidate mechanisms of pathogenesis. The present invention also makes it possible to determine the risk of contracting or presenting progressive

WO 2018/159787 A1

[続葉有]

北海道札幌市中央区北２条西３丁目１番地
太陽生命札幌ビル７階 Hokkaido (JP).

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

multiple sclerosis or the like and to prevent and/or treat progressive multiple sclerosis or the like.

(57) 要約：【課題】 本発明は、ストレス、特に慢性的なストレスを受けた動物に特定の疾患又は症状を罹患又は発症させる方法、そのストレスと疾患又は症状の罹患又は症状に至る過程の解明を通じて、当該疾患又は症状に対する予防又は治療等の研究開発に有用なツールを提供することを目的とする。【解決手段】本発明は、脳内血管に炎症を有する疾患モデル非ヒト動物の製造方法、当該モデル非ヒト動物、当該モデル非ヒト動物を用いた薬剤のスクリーニング方法、脳内血管の炎症の有無を指標とする疾患リスクの判定方法、並びに進行性多発性硬化症等を予防及び／又は治療するための医薬に関する。本発明によると、前記疾患等に対する医薬の開発や、発症機序解明のための研究が可能になる。また、進行性多発性硬化症等の罹患又は発症リスクの判定、並びに進行性多発性硬化症等の予防及び／又は治療が可能になる。

明　細　書

発明の名称 ：

疾患モデル非ヒト動物の製造方法、疾患モデル非ヒト動物、該動物を用いた薬剤のスクリーニング方法及び疾患リスク判定方法

技術分野

[0001] 本発明は、脳内血管に炎症を有する疾患モデル非ヒト動物の製造方法、当該モデル非ヒト動物、当該モデル非ヒト動物を用いて行う薬剤のスクリーニング方法、脳内血管の炎症の有無を指標とする疾患リスクの判定方法、並びにＧＡＢＡ受容体アゴニストその他を有効成分とする進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害又は突然死を予防及び／又は治療するための医薬に関する。

背景技術

[0002] 騒音、寒冷、薬物、細菌感染、さらには人間関係や業務上の責任等の様々な外的な因子は一般にストレスと呼ばれ、非特異的な変調を人体に引き起こすことが、経験的にも知られている。例えば、ストレスは心身の恒常性維持機能を損なわせ、喘息、円形脱毛症、頻尿、耳鳴り、めまい等の比較的軽度の疾患又は症状をもたらし得る。

[0003] またストレスは、さらにうつ病、パニック障害、不安障害等の神経症、消化管の潰瘍、過敏性腸症候群、虚血性心疾患等の重度な疾患又は症状を、ときに生命を直接的に脅かす症状、例えば突然死を誘発することもあり得る。突然死は、発症から２４時間以内に死亡する自然死であり、心疾患に起因する心臓突然死がその代表例である。

[0004] ストレスに起因する各種疾患に対する有効な予防法又は治療法を探るべく、ストレスと各種疾患又は症状との関連性に関する医学的研究が進められている。例えば、モデル動物を利用した研究によって、神経構成要素間の相互作用、例えば、自律神経系、中枢神経系や、視床下部－脳下垂体－副腎系及び副腎皮質刺激ホルモン放出因子系等のストレス系、並びに腸管バリア、管

腔の微生物叢及び腸管免疫応答等の腸管因子に、脳腸相関が関与することが報告されている（非特許文献１）。

[0005] また、ストレスと各種疾患又は症状との関連性に関する分子生物学的な研究により、ストレスに対する生体反応に、コルチコトロピン放出ホルモン（ＣＲＨ）を代表とするストレスホルモン、ノルアドレナリン、セロトニン、ドーパミン等の神経伝達物質、その他様々な神経ペプチド等が関与していることも解明されつつある。

[0006] 本発明者らは、多発性硬化症の動物モデル（実験的自己免疫性脳脊髄炎、ＥＡＥモデル）を使用して、「痛み」というストレス負荷から多発性硬化症の症状発症に至るまでの過程を研究した結果、痛みによる感覚神経の活性化、交感神経の活性化、第５腰髄腹側血管への免疫細胞の浸潤、及び当該浸潤による炎症回路の活性化というステップ（ゲートウェイ反射）を経て多発性硬化症の症状が発症することを見出した（非特許文献２）。この研究成果は、痛みを起点とする神経ネットワークの抑制、例えば鎮痛薬の投与が、痛みの除去に留まらず多発性硬化症の再発を防ぐ新たな手段になる、という可能性を提唱するものである。

[0007] このように、ストレス負荷から特定の疾患又は症状の罹患又は発症に至るまでの過程の解明は、当該疾患又は症状に対する予防又は治療等に関する新たなアプローチの提案、新たな創薬ターゲットの発見等に至る可能性を有する。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ｃａｓｏ，Ｊ．Ｒ． ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２００８，Ｖｏｌ．８，ｐｐ．２９９－３１２

非特許文献2：Ａｒｉｍａ，Ｙ． ｅｔ ａｌ．，ｅＬｉｆｅ，２０１５，４，０８７３３

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、ストレス、特に慢性的なストレスを受けた動物に特定の疾患又は症状を罹患又は発症させる方法、そのストレスと疾患又は症状の罹患又は発症に至る過程の解明を通じて、当該疾患又は症状に対する予防又は治療等の研究開発に有用なツール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

[0010] 本発明者らは、ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させると、当該動物は脳内血管に炎症を生じ、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害又は突然死といった様々な疾患又は症状を呈することを見いだし、以下の発明を完成させた。

[0011] （１）ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程を含む、脳内血管に炎症を有する疾患モデル非ヒト動物の製造方法。

（２）脳内血管が第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管である、（１）に記載の製造方法。

（３）疾患モデル非ヒト動物が進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を有する動物である、（１）又は（２）に記載の製造方法。

（４）ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程が、ストレス負荷後の非ヒト動物に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入する工程である、（１）～（３）のいずれか一項に記載の製造方法。

（５）第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管に炎症があり、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を有する、疾患モデル非ヒト動物。

（６）（ｉ）ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程、

（ｉｉ）工程（ｉ）の開始前から終了後のいずれかの時点で非ヒト動物に被

験物質を投与する工程、並びに

（ｉｉｉ）被験物質を投与した非ヒト動物において、脳内血管の炎症、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状の発症、進行又は発生を観察し、被験物質を投与しない非ヒト動物のそれと比較する工程

を含む、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための薬剤のスクリーニング方法。

（７）（ａ）第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管における炎症の有無を検出する工程、並びに

（ｂ）炎症が検出された場合に進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を罹患又は発症するリスクが高いと判定する工程

を含む、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を罹患又は発症するリスクを判定する方法。

（８）ＣＣケモカインリガンド５（ＣＣＬ５）に対する抗体を有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

（９）ＧＡＢＡ受容体アゴニストを有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

（１０）ＡＴＰ受容体アンタゴニストを有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

（１１）プロトンポンプ阻害剤を有効成分とする、進行性多発性硬化症、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

（１２）ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ ６ ｆａｍｉｌｙ ｍｅｍｂｅｒ Ｇ５Ｃ（ＬＹ６Ｇ６Ｃ）に対する抗体を有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

（１３）α２Ｃアドレナリン受容体に対する抗体を有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

（１４）疾患又は症状が、ストレス負荷に起因する疾患又は症状である、（８）から（１３）のいずれか一項に記載の医薬。

発明の効果

[0012] 本発明の疾患モデル動物の製造方法により作製された非ヒト動物は、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死の病態を反映しており、これらの疾患又は症状の予防又は治療のための医薬の開発や、発症機序解明のための研究に有用である。また、本発明によると、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死の罹患又は発症リスクを判定することもでき、これにより、これらの疾患又は症状の罹患又は発症リスクの高い対象に対して、罹患又は発症の前に予防的な処置を行うことが可能になる。さらに、本発明の医薬によると、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例１（１）で睡眠障害誘導後に実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウス（ＳＤ＋ Ｔｃｅｌｌｓ＋）、睡眠障害を誘導せずにＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウス（ＳＤ－ Ｔｃｅｌｌｓ＋）、睡眠障害誘導のみを行ったマウス（ＳＤ＋ Ｔｃｅｌｌｓ－）、いずれの処置も行わないマウス（ＳＤ－ Ｔｃｅｌｌｓ－）の病態を示すグラフである。図１ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図１ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を示す。

[図2]実施例１（２）で湿潤床敷ストレス負荷後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウス（ＷＳ＋　Ｔｃｅｌｌｓ＋）、湿潤床敷ストレスを負荷せずにＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウス（ＷＳ　－　Ｔｃｅｌｌｓ＋）、湿潤床敷ストレス負荷のみを行ったマウス（ＷＳ＋　Ｔｃｅｌｌｓ－）、いずれの処置も行わないマウス（ＷＳ－　Ｔｃｅｌｌｓ－）の病態を示すグラフである。図２ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図２ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を示す。

[図3]実施例１（１）で作製した各マウスの、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から９日後の血清アルドステロン濃度を示すグラフである。

[図4]実施例１（１）で作製した各マウスの胃腸炎の病態を示すグラフである。図４Ａは潜血便スコアを、図４Ｂはヘマトクリット値を示す。

[図5]実施例１（１）で作製した各マウスの胃腸炎の病態を示すグラフである。図５Ａは消化管各部位における血液含量を、図５Ｂは胃の写真を、図５Ｃは胃、十二指腸、空腸及び回腸組織のヘマトキシリン・エオジン染色像を示す。

[図6]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスにランソプラゾールを投与した際の病態を示すグラフである。図６ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図６ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を、図６Ｃは潜血便スコアを示す。

[図7]実施例１（１）で作製した各マウスの、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から９日後の血清トロポニンＩ濃度を示すグラフである。

[図8]実施例１（１）で作製した各マウスの、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から９日後の血清クレアチンキナーゼＭＢ濃度を示すグラフである。

[図9]実施例１（１）で作製した各マウスの心臓を、抗活性化カスパーゼ３抗体で免疫染色した写真である。図９Ａは心臓上部（心房、血管及び弁を含む領域）、図９Ｂは心臓下部（心室）を示す。

[図10]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスの心臓上部を、抗活性化カスパーゼ３抗体、抗ＣＤ３１抗体、抗チロシンヒ

ドロキシラーゼ抗体（ＴＨ）、抗コリントランスポーター１抗体（ＣＨＴ１）で免疫染色した写真である。

[図11]睡眠障害を誘導していない場合と誘導した場合において、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスの第５腰髄を、抗ＭＨＣクラスＩＩ抗体又は抗ＣＤ４抗体で免疫染色した写真（図１１Ａ）及び染色された細胞数を示すグラフ（図１１Ｂ）である。

[図12]睡眠障害を誘導していない場合と誘導した場合において、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスの第三脳室領域を、抗ＭＨＣクラスＩＩ抗体又は抗ＣＤ４抗体で免疫染色した写真（図１２Ａ）及び染色された細胞数を示すグラフ（図１２Ｂ）である。

[図13]実施例１（１）で作製した各マウスの脳の各部位におけるＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞の数を示すグラフである。

[図14]睡眠障害を誘導したＣＸ３ＣＲ１^{CreER}　ＲＯＳＡ２６－ＴｄＴｏｍａｔｏマウスにＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入した場合の海馬及び間脳におけるミクログリア細胞及び単球の数を示すグラフである。

[図15]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスに抗ＣＣＬ５抗体又は対照のラットＩｇＧ抗体を投与した際の、海馬及び間脳におけるＣＤ４陽性Ｔ細胞（図１５Ａ）及びＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞（図１５Ｂ）の数を示すグラフである。

[図16]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスに抗ＣＣＬ５抗体又は対照のラットＩｇＧ抗体を投与した際の病態を示すグラフである。図１６ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図１６ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を示す。

[図17]実施例１（１）で作製した各マウスの第三脳室領域血管周辺組織における、ＨＰＲＴ　ｍＲＮＡの発現量を１としたときのＣＣＬ５　ｍＲＮＡの相対的発現量を示すグラフである。

[図18]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウス

に抗ＩＦＮ－γ抗体、抗ＩＬ１７Ａ抗体又は対照のラットＩｇＧ抗体を投与した際の、海馬及び間脳におけるＣＤ４陽性Ｔ細胞（図１８Ａ）及びＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞（図１８Ｂ）の数を示すグラフである。

[図19]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスに抗ＩＦＮ－γ抗体＋抗ＩＬ１７Ａ抗体、又は対照のラットＩｇＧ抗体を投与した際の病態を示すグラフである。図１９ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図１９ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を示す。

[図20]睡眠障害を誘導したマウスの第三脳室、視床及び歯状回の境界領域にある特定の血管（以下、本明細書全体にわたって単に「特定血管」とも呼ぶ）に、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞＋ＭＯＧをパルスした骨髄由来樹状細胞（Ｔ＋ＤＣ）、ＩＦＮ－γ＋ＩＬ－１７Ａ又はＩＬ－６＋ＩＬ－１７Ａをマイクロインジェクションした際の病態を示すグラフである。図２０Ａはマイクロインジェクションから２日後の致死率を、図２０Ｂは潜血便スコアを示す。

[図21]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った化学的交感神経除去マウスの第三脳室領域を、抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体（ＴＨ）又は抗リン酸化ＣＲＥＢ抗体で免疫染色した写真である。白色点線の枠内に特定血管を示す。

[図22]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った化学的交感神経除去マウスの第三脳室領域を、抗ＣＤ４抗体又は抗ＭＨＣクラスＩＩ抗体で免疫染色した写真（図２２Ａ）及び染色された細胞数を示すグラフ（図２２Ｂ）である。図２２Ａの白色点線の枠内に特定血管を示す。

[図23]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った化学的交感神経除去マウスの病態を示すグラフである。図２３ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図２３ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を示す。

[図24]実施例１（１）で作製した各マウスの脳視床下部を、抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体（ＴＨ）又は抗リン酸化ｃｆｏｓ抗体で免疫染色した写真（図２４Ａ）及び染色された細胞数を示すグラフ（図２４Ｂ）である。図２４Ａにおいて、各写真中央上部の白色線枠内に室傍核（ＰＶＮ）を、左右一対の白色線枠内に背内側核（ＤＭＨ）を示す。

[図25]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスの特定血管に、ＦＩＴＣコンジュゲートコレラ毒素Ｂ（ＦＩＴＣ－ＣＴＢ）又は溶媒の生理食塩水をマイクロインジェクションし、視床下部を蛍光観察した写真（図２５Ａ）及び蛍光細胞数を示すグラフ（図２５Ｂ）である。図２５Ａにおいて、各写真中央上部の白色線枠内にＰＶＮを、左右一対の白色線枠内にＤＭＨを示す。

[図26]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスのＰＶＮを、抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体（ＴＨ）、抗ノルアドレナリントランスポーター抗体（ＮＡＴ）及び抗ドーパミントランスポーター抗体（ＤＡＴ）で免疫染色した写真である。

[図27]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスの特定血管に、ＰＨＡ－Ｌ又は溶媒の生理食塩水をマイクロインジェクションし、視床下部を蛍光観察した写真（図２７Ａ）及び蛍光細胞数を示すグラフ（図２７Ｂ）である。図２７Ａにおいて、各写真中央上部の白色線枠内にＰＶＮを、左右一対の白色線枠内にＤＭＨを示す。

[図28]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスのＤＭＨに、ＦＩＴＣ－ＣＴＢ又は溶媒の生理食塩水を投与し、第三脳室領域を蛍光観察した写真である。白色点線の枠内に特定血管を示す。

[図29]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスにムシモールを投与した際の病態を示すグラフである。図２９ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図２９ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を、図２９Ｃは潜血便スコアを示す。

[図30]睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ

細胞＋ＭＯＧをパルスした骨髄由来樹状細胞（Ｔ＋ＤＣ）、ＩＦＮ－γ＋ＩＬ－１７Ａ、ＡＴＰ又は溶媒の生理食塩水をマイクロインジェクションし、視床下部を抗リン酸化ｃｆｏｓ抗体で免疫染色した写真（図３０Ａ）及び染色された細胞数を示すグラフ（図３０Ｂ）である。図３０Ａにおいて、各写真中央上部の白色線枠内にＰＶＮを、左右一対の白色線枠内にＤＭＨを示す。

[図31]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったＰＶＮ一極性除去マウス（ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）の第三脳室領域を、抗ＣＤ４抗体又は抗ＭＨＣクラスＩＩ抗体で免疫染色した写真（図３１Ａ）及び染色された細胞数を示すグラフ（図３１Ｂ）である。

[図32]睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったＰＶＮ一極性除去マウスの病態を示すグラフである。図３２ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図３２ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を、図３２Ｃは潜血便スコアを示す。

[図33]ＩＬ－６及びＩＬ－１７Ａ存在下で培養したＢＣ１細胞のＡＴＰ産生量を示すグラフである。

[図34]睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、Ａ４３８０７９又は溶媒の生理食塩水を、ＩＬ－６及びＩＬ－１７Ａと共にマイクロインジェクションし、その２日後の視床下部を抗リン酸化ｃｆｏｓ抗体で免疫染色した写真（図３４Ａ）及び染色された細胞数を示すグラフ（図３４Ｂ）である。図３４Ａにおいて、各写真中央上部の白色線枠内にＰＶＮを、左右一対の白色線枠内にＤＭＨを示す。

[図35]睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、Ａ４３８０７９又は溶媒の生理食塩水を、ＩＬ－６及びＩＬ－１７Ａと共にマイクロインジェクションした際の病態を示すグラフである。図３５ＡはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を、図３５Ｂは潜血便スコアを示す。

[図36]睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞＋ＭＯＧをパルスした骨髄由来樹状細胞（Ｔ＋ＤＣ）をマイクロインジ

ェクションし、その２日後の延髄を抗リン酸化ｃｆｏｓ抗体で免疫染色した写真である。各写真中央上部の白色線枠内に孤束核（ＮＴＳ）を、左右一対の白色線枠内に迷走神経背側核（ＤＭＸ）を示す。

[図37]睡眠障害を誘導した後、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入した迷走神経切離マウスの病態を示すグラフである。図３７ＡはＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図３７ＢはＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を、図３７Ｃは潜血便スコアを示す。

[図38]睡眠障害を誘導したマウスの特定血管におけるＬＹ６Ｇ６Ｃ遺伝子及びα２Ｃアドレナリン受容体遺伝子の発現量を示すグラフである。

[図39]睡眠障害を誘導した後、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入したマウスに抗ＬＹ６Ｇ６Ｃ抗体又は抗α２Ｃアドレナリン受容体抗体をマイクロインジェクションした際の病態を示すグラフである。図３９Ａは抗ＬＹ６Ｇ６Ｃ抗体を投与したマウスのＥＡＥ臨床スコアの経時変化を、図３９Ｂは抗α２Ｃアドレナリン受容体抗体を投与したマウスのＥＡＥ臨床スコアの経時変化を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 疾患モデル動物の製造方法及び疾患モデル動物

本発明の第一の態様は、ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程を含む、脳内血管に炎症を有する疾患モデル非ヒト動物の製造方法に関する。

[0015] 医学用語としての「ストレス」は、体外から加えられた有害因子（ストレス作因、ストレッサー）とそれによって生じた防御反応の両方を指す語であるが（南山堂医学大辞典第１９版）、本明細書においては前者の有害因子をストレスと、有害因子に曝露されることをストレスを受ける又はストレス負荷を受けると呼び、また後者の防御反応をストレス反応と呼ぶ。いわゆるストレス学説によると、ストレス反応は、生体がストレスから自身を防御するために起こす適応症候群と呼ばれる一連の反応であり、ストレスを受けてからストレスに対する適応反応を起こすまでの警告反応期、適応反応によりス

トレスに対する抵抗力を発揮する抵抗期、及び長期にわたるストレス負荷により抵抗力を失っていく疲憊期の３期に分けられる。本明細書においては、かかるストレス反応のいずれかの期にある状態を、ストレス状態にあるという。

[0016] 本発明において用いられる非ヒト動物は、実験動物として用いることができるヒト以外の動物であるかぎり制限はない。非ヒト動物は、好ましくは、中枢神経組織由来抗原の投与又は同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の投与により実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）を発症することが知られている非ヒト動物であり、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、霊長類等である。

[0017] 本発明において用いられるストレス状態にある非ヒト動物は、非ヒト動物にストレスを負荷することにより作製することができる。かかるストレスは、非ヒト動物をストレス状態にする、すなわち非ヒト動物にストレス反応を生じさせるものであれば制限はなく、ストレス反応が長期にわたって持続される慢性ストレスが好適に利用される。慢性ストレスとしては、例えば、睡眠障害を引き起こすＰＡＷＷ（Ｐｅｒｐｅｔｕａｌ Ａｖｏｉｄａｎｃｅ ｆｒｏｍ Ｗａｔｅｒ ｏｎ ａ Ｗｈｅｅｌ）ストレス（Ｍｉｙａｚａｋｉ，Ｋ． ｅｔ ａｌ．，ＰｌｏＳ ｏｎｅ，２０１３，８，ｅ５５４５２）、湿潤床敷、社会的挫折ストレス、母子分離ストレス等を挙げることができる。

[0018] 非ヒト動物におけるストレス状態は、ストレス反応の有無を検出することにより、例えばストレスに応答して分泌が亢進することが知られているコルチゾール、アルドステロン、アンドロゲン等の副腎皮質ホルモンの血中濃度を測定することにより確認することができる。後述の実施例に示すように、本発明者らは、ストレスが第三脳室と視床と歯状回との境界領域に存在する血管周辺組織におけるＣＣＬ５の発現を増加させ、また室傍核（ＰＶＮ）における交感神経の活性化を引き起こすことを明らかにした。したがって、前記血管周辺組織におけるＣＣＬ５の発現量の増加、ＰＶＮにおける交感神経

活性化に伴うｃｆｏｓやＣＲＥＢのリン酸化の亢進もまた、ストレス状態にあることを確認するための指標として利用することができる。

[0019] 中枢神経組織由来抗原は、多発性硬化症の病態を模した自己免疫モデルであるＥＡＥを誘導する際に用いられる抗原である。本発明において利用される中枢神経組織由来抗原は、ＥＡＥ誘導能を有するものであればよく、抗原を投与される動物個体と同種又は異種の他の個体から調製した中枢神経組織の破砕物をそのまま用いることも可能であるが、好ましくは、髄鞘（ミエリン）に含まれるタンパク質、特にプロテオリピドタンパク質（ＰＬＰ）、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（ＭＯＧ）又はミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）のインタクトなタンパク質又はその部分ペプチドが用いられる。かかるタンパク質又はその部分ペプチドの例は、ＥＡＥに関する公知文献、例えばＭｉｌｌｅｒ，Ｓ． ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０１０，Ｕｎｉｔ １５．１等に記載されている。上記文献は参照により本明細書中に組み込まれる。

[0020] 本発明における中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞は、中枢神経組織由来抗原に応答した免疫反応を起こす能力を持つＣＤ４陽性Ｔ細胞である。この細胞は、生体への中枢神経組織由来抗原の投与により体内で誘導されてＥＡＥを引き起こすことが知られており、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞とも呼ばれる。動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる手段としては、動物に中枢神経組織由来抗原を投与することで内因性の同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を生じさせる方法、又は中枢神経組織由来抗原を投与した他の動物から同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を回収し、これを非ヒト動物に移入する方法が知られている。前者により誘導されるＥＡＥは能動的ＥＡＥモデルと、後者により誘導されるＥＡＥは受動的ＥＡＥモデルと呼ばれる。

[0021] 本発明の疾患モデル動物製造方法における、ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程は、前述の能動的ＥＡＥモデル又は受動的ＥＡＥモデルの誘導方法に準じ、

ストレス状態にある非ヒト動物に中枢神経組織由来抗原を投与することで内因性の同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を生じさせるか、又は中枢神経組織由来抗原を投与した動物から同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を回収し、これをストレス状態にある非ヒト動物に移入することにより達成される。

[0022] この工程における、中枢神経組織由来抗原の投与量及び投与期間、中枢神経組織由来抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の調製等の詳細は、能動的ＥＡＥ又は受動的ＥＡＥの誘発において用いられる公知の方法、例えばＭｉｌｌｅｒ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０１０，Ｕｎｉｔ １５．１等の記載を参照して適宜条件設定し、実施することができる。また、中枢神経組織由来抗原は、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントといったアジュバント及び／又は百日咳毒と組み合わせて用いることもでき、これにより疾患モデル動物の作製効率を向上させることができる。

[0023] 非ヒト動物への中枢神経組織由来抗原又は同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の投与とストレス負荷の順番は、動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞が存在している時点でその動物がストレス状態にあるかぎり制限はなく、動物にストレスを負荷した後に中枢神経組織由来抗原又は同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を投与することで動物体内に同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させてもよく、逆に中枢神経組織由来抗原又は同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を投与することで動物体内に同抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させた後、これらの細胞が体内で有効に存在している間にストレスを負荷してもよい。

[0024] 本発明の疾患モデル非ヒト動物の製造方法における、ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程は、ストレス負荷後の非ヒト動物に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入する工程であることが好ましい。

[0025] 上記の第一の態様の疾患モデル非ヒト動物の製造方法により、脳内血管、特に第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管に炎症を有する疾患モデル

非ヒト動物が得られる。ＥＡＥは中枢神経系組織が自己免疫により攻撃されて脳や脊髄の各所に炎症を生じる疾患であるが、上記疾患モデル動物は、脳内血管、特に第三脳室と視床と歯状回との境界領域に存在する特定の血管に炎症が生じることにより、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害又は突然死といった様々な疾患又は症状を呈することが、本発明者らによって明らかにされた。本発明の別の態様は、かかる疾患モデル動物、すなわち第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管に炎症があり、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を有する、疾患モデル非ヒト動物に関する。

[0026] 多発性硬化症は、再発寛解型、再発寛解型の後期である二次進行型、一次進行型及び再発進行型の４つのサブグループに分けることができる。上記疾患モデル非ヒト動物は、ＥＡＥ病態の持続的な増悪を呈し、これは多発性硬化症の再発寛解型以外のサブグループにおいて見られる進行性の多発性硬化症の病態を反映している。また、上記疾患モデル非ヒト動物は、ＥＡＥの病態を何ら呈していない状態から数日以内に死に至るという突然死、胃及び小腸上部における出血や炎症といった胃腸炎、並びに心筋細胞の細胞死又は心不全といった心筋障害の病態を呈する。

[0027] スクリーニング方法

本発明のさらなる態様は、（ｉ）ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程、

（ｉｉ）工程（ｉ）の開始前から終了後のいずれかの時点で非ヒト動物に被験物質を投与する工程、並びに

（ｉｉｉ）被験物質を投与した非ヒト動物において、脳内血管の炎症、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状の発症、進行又は発生を観察し、被験物質を投与しない非ヒト動物のそれと比較する工程

を含む、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための薬

剤のスクリーニング方法に関する。

[0028] 工程（ｉ）は、ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程であり、これは、第一の態様の疾患モデル動物製造方法と同様にして実施することができる。

[0029] 工程（ｉｉ）は、工程（ｉ）の開始前から終了後のいずれかの時点で非ヒト動物に被験物質を投与する工程である。被験物質の投与のタイミングは、スクリーニングによりどのような効果を持つ薬剤を得ることを期待するかによって決定することができる。具体的には、予防効果又は予防治療効果を持つ薬剤を所望であれば、被験物質の投与は、脳内血管に炎症を誘発する前、例えば中枢神経組織由来抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞をストレス状態にある非ヒト動物体内に存在させる前に行われる。一方、治療効果を持つ薬剤を所望の場合、被験物質の投与は、脳内血管に炎症を誘発した後、例えば中枢神経組織由来抗原反応性ＣＤ４陽性Ｔ細胞をストレス状態にある非ヒト動物体内に存在させた後、又はその後に当該動物が何らかの疾患又は症状を示した後に行われる。

[0030] 被験物質の投与経路は、腹腔内、静脈内、経口、経皮その他の経路のいずれであってもよく、被験物質の性質やターゲットの疾患又は症状等に応じて適宜選択すればよい。また、被験物質の投与用量や使用する媒体は、被験物質の性質や投与経路等を考慮して、当業者により適宜設定され、選択される。

[0031] 工程（ｉｉｉ）は、被験物質を投与した非ヒト動物において、脳内血管の炎症、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状の発症、進行又は発生を観察し、被験物質を投与しない非ヒト動物のそれと比較する工程である。この工程において、被験物質を投与した非ヒト動物における脳内血管の炎症、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害又は突然死といった疾患又は症状の発症、進行又は発生が、投与しない対照動物のそれと比べて減少又は抑制されることが観察された場合、その被験物質は、その疾患又は症状について予防的及び／又

は治療的効果を有するものと判断することができる。

[0032] 疾患リスク判定方法

本発明のさらなる別の態様は、（ａ）第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管における炎症の有無を検出する工程、並びに

（ｂ）炎症が検出された場合に進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患に罹患する又は症状を発症するリスクが高いと判定する工程

を含む、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患に罹患する又は症状を発症するリスクを判定する方法に関する。

[0033] 工程（ａ）は、第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管における炎症の有無を検出する工程である。炎症の検出は、ＭＲＩ、ＰＥＴ又はＣＴ等の従来の脳画像取得手段により非侵襲的に対象の脳画像を取得し、前記血管における炎症の所見の有無を確認することによって行うことができる。

[0034] 工程（ｂ）は、炎症が検出された場合に進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を罹患又は発症するリスクが高いと判定する工程である。本発明者らは、ストレス状態にあるマウスの体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させると、脳内血管、特に第三脳室と視床と歯状回との境界領域に存在する特定の血管に炎症が生じ、この炎症が引き金となって進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害又は突然死といった様々な疾患又は症状が誘発されることを明らかにした。したがって、前記特定血管における炎症の有無は、これらの疾患又は症状を罹患又は発症するリスク判定の指標として利用することができる。

[0035] 本態様の方法においてリスクが判定される対象は、これらの疾患又は症状への罹患又は発症が問題となっている動物であればよく、典型的にはヒト、及びイヌやネコ等の愛玩動物を挙げることができる。

[0036] 疾患又は症状の予防及び／又は治療のための医薬及び方法

本発明はまた、ＣＣＬ５に対する抗体、ＧＡＢＡ受容体アゴニスト、ＡＴＰ受容体アンタゴニスト、プロトンポンプ阻害剤、ＬＹ６Ｇ６Ｃに対する抗体又はα２Ｃアドレナリン受容体に対する抗体を有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬を別の態様として提供する。

[0037] 本発明者らは、脳内血管の炎症が疾患等を誘発する上記の現象について、本発明の疾患モデル動物を用いて研究を進め、その結果、以下の作用機序を見出した。ストレスを受けてストレス状態に陥った生体は、その視床下部ＰＶＮにおいて交感神経が活性化され、第三脳室、視床及び歯状回の境界領域に存在する血管からノルアドレナリンが分泌される。次いで、前記血管においてＣＣＬ５等の産生が亢進し、ＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞が集積し、炎症性サイトカインの産生や増強が亢進することで、炎症が誘発される。この血管の炎症はＡＴＰを介して背内側核（ＤＭＨ）の神経を活性化し、これがさらに迷走神経背側核（ＤＭＸ）及び孤束核（ＮＴＳ）の迷走神経の活性化を介して、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死という疾患モデル動物の各種病態を誘発する。

[0038] 本発明者らはさらに、ストレス負荷により第三脳室、視床及び歯状回の境界領域に存在する特定血管においてＬＹ６Ｇ６Ｃ及びα２Ｃアドレナリン受容体の発現が亢進すること、これらに対する抗体を前記血管に投与することで疾患モデル動物の病態の発生又は進行が抑制されることを見出した。理論に拘束されるものではないが、これらの抗体は、前記血管への直接投与により作用を発揮することから、ストレス負荷から特定血管の炎症誘発を介して病態発生に至る一連の反応の中でも特定血管において起こる反応を阻害しているものと推測される。

[0039] 以上の機序に基づくと、ＰＶＮ－前記血管－ＤＭＨ－ＤＭＸ・ＮＴＳという一連の神経路の遮断、ノルアドレナリン及びＡＴＰ等の神経伝達物質の分泌抑制又は機能阻害、前記血管におけるＣＣＬ５又は炎症性サイトカインの

分泌抑制又は機能阻害、並びにＬＹ６Ｇ６Ｃ又はα２Ｃアドレナリン受容体の機能阻害は、疾患モデル動物が呈する様々な疾患又は症状に対して予防的及び／又は治療的に働くと考えられる。したがって、上記神経路の遮断、神経伝達物質の分泌抑制又は機能阻害、ＣＣＬ５又は炎症性サイトカインの分泌抑制又は機能阻害、並びにＬＹ６Ｇ６Ｃ又はα２Ｃアドレナリン受容体の機能阻害をもたらす物質及び方法は、特にストレス負荷に起因する進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死の予防及び／又は治療に有効であるものと期待される。

[0040] また、上記研究の結果、本発明の疾患モデル非ヒト動物が呈する様々な疾患又は症状は相互に関係しており、一の疾患又は症状の予防及び／又は治療は、他の疾患又は症状の予防及び／又は治療に寄与することも明らかにされた。したがって、脳内血管に炎症を有する対象において進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療する物質又は方法は、前記群に含まれる他の疾患又は症状の予防及び／又は治療にも有効であることが期待される。

[0041] 本発明において用いられるＣＣＬ５に対する抗体は、ＣＣＬ５の生理的機能を阻害できる抗体であればよく、好ましくはＣＣＬ５に特異的に結合する中和抗体である。また、ＬＹ６Ｇ６Ｃに対する抗体及びα２Ｃアドレナリン受容体に対する抗体も、これらの分子の生理的機能を阻害できる抗体であればよく、好ましくはそれぞれＬＹ６Ｇ６Ｃ及びα２Ｃアドレナリン受容体に特異的に結合する中和抗体である。これらの抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であればよく、さらにＦａｂ、Ｆａｂ’又はＦ（ａｂ’）２等の抗体断片も利用することができる。これらの抗体は、好ましくは遺伝子組換え手法で作製された組換えＣＣＬ５、ＬＹ６Ｇ６Ｃ又はα２Ｃアドレナリン受容体を抗原としてウサギ、マウス、ラット等の適当な実験動物を免疫することを含む、一般的な抗体作製方法によって調製することができる。あるいは、市販されている抗ＣＣＬ５抗体、抗ＬＹ６Ｇ６Ｃ抗体及び抗α２Ｃアドレナリン受容体抗体を使用することも可能である

。

[0042] 本発明において用いられるＧＡＢＡ受容体アゴニストは、ＧＡＢＡ受容体の生理的機能を増強する物質である。ＧＡＢＡ受容体には、イオンチャネル型のＧＡＢＡ$_A$受容体と代謝型のＧＡＢＡ$_B$受容体とがあるが、本発明において使用されるＧＡＢＡ受容体アゴニストはいずれの受容体に対するものであってもよい。好ましくは、ＧＡＢＡ受容体アゴニストは、ＧＡＢＡ$_A$受容体アゴニストである。

[0043] ＧＡＢＡ$_A$受容体アゴニストとしては、例えば、ジアゼパム、ミダゾラム、フルニトラゼパム等のベンゾジアゼピン系薬剤；ゾルピデム、ゾピクロン、エスゾピクロン等の非ベンゾジアゼピン系薬剤；フェノバルビタール、ペントバルビタール、チオペンタール等のバルビツール酸系薬剤；メタクアロン、エタクアロン、クロロクアロン等のキナゾリノン系薬剤；プロポフォール等のフェノール系薬剤；エタノール等のアルコール；アロプレグナノロン等の神経刺激性ステロイド；ピペリジンジオン系薬剤：ムシモール、ガボキサドール等を挙げることができる。また、ＧＡＢＡ$_B$受容体アゴニストの例としては、例えば、バクロフェンを挙げることができる。さらに、ＧＡＢＡ、γヒドロキシ酪酸、１，４－ブタンジオール等も、ＧＡＢＡ受容体アゴニストとして用いることができる。

[0044] 本発明において用いられるＡＴＰ受容体アンタゴニストは、ＡＴＰ受容体の生理的機能を阻害する物質である。ＡＴＰ受容体は、イオンチャネル内蔵型受容体（Ｐ２Ｘ受容体）とＧタンパク質共役型受容体（Ｐ２Ｙ受容体）の２つに大きく分けられるが、本発明において使用されるＡＴＰ受容体アンタゴニストはいずれの受容体に対するものであってもよい。好ましくは、ＡＴＰ受容体アンタゴニストはＰ２Ｘ受容体に対するアンタゴニストであり、その例としては、ＰＰＡＤＳ、デカバナジン酸、Ａ８０４５９８、ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　ｂｌｕｅ　Ｇ、Ａ８３９９７７、Ａ７４０００３、Ａ４３８０７９等を挙げることができる。

[0045] 本発明において用いられるプロトンポンプ阻害剤は、プロトンポンプ（水

素イオン輸送体）の機能を阻害する物質である。プロトンポンプ阻害剤の例としては、オメプラゾール、ランソプラゾール、ラベプラゾールナトリウム、エソメプラゾール等を挙げることができる。

[0046] 本発明の医薬の有効成分である上記の各物質は、そのまま医薬として使用してもよく、薬学的に許容される緩衝剤、安定剤、保存剤、賦形剤その他の成分及び／又は他の有効成分を含む医薬組成物の形態で使用してもよい。かかる医薬組成物もまた本発明にいう医薬に包含される。薬学的に許容される成分は当業者において周知であり、当業者が通常の実施能力の範囲内で、例えば第十七改正日本薬局方その他の規格書に記載された成分から製剤の形態に応じて適宜選択して使用することができる。

[0047] 本発明の医薬は、それぞれに適した公知の形態を取ることができる。例えば、注射剤、点滴剤等の非経口製剤であっても、又は任意選択で適当なコーティングを施した経口投与剤であってもよい。非経口製剤に用いることができる担体としては、例えば、生理食塩水や、ブドウ糖又はＤ－ソルビトール等を含む等張液といった水性担体が挙げられる。

[0048] 本発明の医薬の投与方法は、特に制限されないが、非経口製剤である場合は、例えば血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、脳内投与、髄腔内投与、腸管内投与、皮下投与等を挙げることができる。

[0049] 本発明の医薬の投与量は、用法、患者の年齢、疾患の状態、その他の条件等に応じて適宜選択される。また、本発明の医薬又は医薬組成物は、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害又は突然死の予防及び／又は治療に有益なその他の医薬と組み合わせて使用してもよい。

[0050] このように、本発明の医薬は、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状の予防及び／又は治療に用いることができる。したがって、本発明は、その必要がある対象に有効量のＣＣＬ５に対する抗体、ＧＡＢＡ受容体アゴニスト、ＡＴＰ受容体アンタゴニスト、プロトンポンプ阻害剤、ＬＹ６Ｇ６Ｃに対する抗体又はα２Ｃアドレナリン受容体に対する抗体を投与することを含む、進行性

多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療する方法も包含する。ここで有効量は、上記疾患又は症状の予防及び／又は治療に有効な量を意味し、用法、患者の年齢、疾患の状態、その他の条件等に応じて適宜決定される。

[0051] 本明細書において用いられる予防及び／又は治療は、疾患又は症状の治癒、一時的寛解、予防等を目的とする医学的に許容される全てのタイプの予防的及び／又は治療的介入を包含する。すなわち、疾患又は症状の予防及び／又は治療は、疾患又は症状の進行の遅延又は停止、病変の退縮又は消失、発症の予防又は再発の防止等を含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

[0052] 本発明はさらに、その必要がある対象に迷走神経切離術を施すことを含む、進行性多発性硬化症、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療する方法を別の態様として提供する。

[0053] 上に述べた通り、脳内血管の炎症が疾患等を誘発する作用機序において、ＤＭＸ及びＮＴＳの迷走神経の関与が本発明者らによって明らかになっている。したがって、疾患発症に至る神経路の迷走神経切離による遮断は、進行性多発性硬化症、心筋障害及び突然死の予防及び／又は治療をもたらすものである。

[0054] 迷走神経切離術は、胃潰瘍や十二指腸潰瘍に対する外科的処置であり、横隔膜直下で迷走神経前枝及び後枝を切離する全幹迷走神経切離術、肝枝、幽門枝及び腹腔枝を温存し胃枝のみ切離する選択的迷走神経切離術、肝枝、幽門枝、腹腔枝及び前後幽門洞枝を温存し胃体部枝のみ切離する選択的近位迷走神経切離術等が知られている。本発明における迷走神経切離術は上記のいずれであってもよく、患者の年齢、疾患の状態、その他の条件等に応じて適宜選択される。

[0055] 本発明の医薬又は予防及び／又は治療方法が施される対象となる動物は、これらの疾患又は症状への罹患又は発症が問題となっている動物であり、典

型的にはヒト、イヌやネコ等の愛玩動物及びウシやブタ等の家畜動物を挙げることができる。

[0056] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0057] 動物及び試薬

Ｃ５７ＢＬ／６マウスは日本ＳＬＣから、Ｃ５７ＢＬ／６－ＰＬマウスはＴａｃｏｎｉｃから購入し、ＣＸ３ＣＲ１^{CreER} ＲＯＳＡ２６－ＴｄＴｏｍａｔｏマウスはフライブルク大学Ｍａｒｃｏ Ｐｒｉｎｚ教授から分与を受け、ＳＰＦ条件下で飼育した。全ての動物実験は、北海道大学実験動物委員会の承認の下で行った。

[0058] フローサイトメトリー解析において、以下の抗体を用いた。

ＦＩＴＣコンジュゲート抗ＣＤ１９抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗ＣＤ１１ｂ抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗ＣＤ４４抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗ＣＤ４抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＰＥコンジュゲート抗ＣＤ４４抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗ＴＣＲ抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＰＥ－Ｃｙ７コンジュゲート抗ＣＤ９０．２抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＡＰＣコンジュゲート抗ＣＤ４抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗Ｉ－Ａ／Ｉ－Ｅ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ビオチンコンジュゲート抗ＣＤ１１ｂ抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗ＣＤ１９抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗ＮＫ１．１抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗ＣＤ１１ｃ抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）及び抗ＴＣＲ抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）。

[0059] 免疫組織染色において、以下の抗体を用いた。

ＦＩＴＣコンジュゲート抗Ｉ－Ａ／Ｉ－Ｅ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗ドーパミントランスポーター抗体（Ａｂｃａｍ）、抗ノルアドレナリントランスポーター抗体（Ａｂｃａｍ）、抗リン酸化ＣＲＥＢ抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体（Ａｂｃａｍ）、抗

リン酸化ｃ－Ｆｏｓ（Ｓｅｒ３２）（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、対照ウサギＩｇＧ（ＤＡ１Ｅ）（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、ビオチンコンジュゲート抗ＣＤ４抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗ＣＤ１１ｂ抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗Ｉ－Ａ／Ｉ－Ｅ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗ファセオルス・ブルガリス（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ・ｖｕｌｇａｒｉｓ）アグルチニン抗体（ＶＥＣＴＯＲ）、抗ＣＤ３１抗体（Ａｂｃａｍ）、抗活性化ｃａｓｐａｓｅ３抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、抗ＣＨＴ１抗体（北海道大学医学系研究科解剖学講座解剖発生学分野作出）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５４６ロバ抗ヤギＩｇＧ抗体（Ｈ＋Ｌ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（Ｈ＋Ｌ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５４６ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（Ｈ＋Ｌ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（Ｈ＋Ｌ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７ヤギ抗ニワトリＩｇＧ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及びストレプトアビジンＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５４６コンジュゲート（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）。

[0060] インビボの中和試験において、以下の抗体を用いた。

抗マウスＩＬ－１７抗体及び抗ＣＣＬ５抗体（いずれもＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、抗ＩＦＮ－γ抗体（Ｕｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）　Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１８，１３９７－１４０４に従って精製）。

[0061] ６－ヒドロキシドーパミン塩酸塩（６－ＯＨＤＡ）、ランソプラゾール、コレラ毒素ＢサブユニットのＦＩＴＣコンジュゲート（ＦＩＴＣ－ＣＴＢ）、タモキシフェン及びＡＴＰはＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。ＰＨＡ－ＬはＶＥＣＴＯＲから購入した。Ａ４３８０７９はＴＯＣＲＩＳ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから購入した。

[0062] 試験データ及び統計解析

実施例に含まれる全ての実験は少なくとも３回行い、代表的データを結果として示した。各グラフは平均値±標準誤差を示す。また、２群間の差の統計解析にはＳｔｕｄｅｎｔのｔ検定（両側）を、３群以上の差の統計解析に

は分散分析をそれぞれ用いた。ｐ値０．０５未満を統計的に有意とし、グラフ中で＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１で表した。

[0063] 実施例１　疾患モデルマウスの作製

（１）睡眠障害誘導による疾患モデルマウス

（ｉ）ストレス負荷

ＰＡＷＷストレスの負荷及びこれによる睡眠障害の誘導は、既法の通りに実施した（Ｍｉｙａｚａｋｉ，Ｋ．　ｅｔ　ａｌ．，ＰｌｏＳ　ｏｎｅ，２０１３，８，ｅ５５４５２）。６～８週齢のＣ５７ＢＬ／６マウスを、回転輪を備えたプラスチックケージ内で個別に順化飼育した。その後、ケージ内の木製床敷を深さ１．５ｃｍの水に置き換え、回転輪上で継続的に運動させるＰＡＷＷストレスを２日間マウスに負荷することで睡眠障害を誘導した。

[0064] （ｉｉ）ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の調製

ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の調製及び移入は、既報の通りに実施した（Ａｒｉｍａ，Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２０１２，１４８，４４７－４５７；Ａｒｉｍａ，Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．，ｅＬｉｆｅ，２０１５，４，ｅ０８７３３；Ｏｇｕｒａ，Ｈ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，２００８，２９，６２８－６３６）。簡潔には、Ｃ５７ＢＬ／６マウスの尾基部にＭＯＧ（３５－５５）ペプチド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を完全フロイントアジュバント（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）と共に皮下注射し、さらに百日咳毒素（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）をＭＯＧペプチド投与後０、２及び７日目に静脈内注射した。ＭＯＧペプチド投与から９日後、マウス脾臓からリンパ球を回収し、抗ＣＤ４マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてソートすることでＣＤ４陽性Ｔ細胞に富む細胞集団を得た。この細胞集団（４×１０^{6}個）を、ＭＯＧペプチドをパルスした放射線照射脾臓細胞（１×１０^{7}個）と共に、ｒＩＬ－２３（１０ｎｇ／ｍｌ；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）の存在下で２日間、共培養した。培養液から細胞を回収し、抗ＣＤ４マイクロビーズを用いてＣＤ４陽性Ｔ細胞を濃縮するこ

とでＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を調製した。

[0065] （ｉｉｉ）ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の移入

上記（ｉ）のストレス負荷を開始してから２日後、上記（ｉｉ）で調製したＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞（１．５×10^7個）を静脈内注射によりマウスに移入することで疾患モデルマウスを作製した。また、ストレスを負荷せずにＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウス、ストレス負荷後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行わないマウス、いずれの処置も行わないマウスを対照として用意した。

[0066] （２）湿潤床敷ストレスによる疾患モデルマウス

睡眠障害誘導に代えて湿潤床敷によりストレス負荷を与えること以外は上記（１）と同様の方法で、疾患モデルマウスを作製した。木製床敷を入れた飼育ケージ内に３５０ｍＬ／ケージの水を入れて床敷を湿らせ、このケージ内で６～８週齢のＣ５７ＢＬ／６マウスを２日間飼育することで湿潤床敷ストレスを負荷した。湿潤床敷は毎日交換した。

それぞれの群あたり３～５匹のマウスを用いて、以下の試験を行った。

[0067] 実施例２　疾患モデルマウスの病態解析

（１）ＥＡＥ

実施例１で作製したマウスについて、ＥＡＥの病態を臨床スコアにより評価した。臨床スコアは既報の通りに測定した（Ａｒｉｍａ，Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２０１２，１４８，４４７－４５７；Ａｒｉｍａ，Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．，ｅＬｉｆｅ，２０１５，４，ｅ０８７３３；Ｏｇｕｒａ，Ｈ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，２００８，２９，６２８－６３６）。臨床スコアは数字が大きくなるほど脳脊髄炎の症状が深刻であることを表し、０は異常症状が観察されない正常状態に、５は死亡に相当する。

[0068] 実施例１（１）で睡眠障害を誘導したマウスの臨床スコアの経時変化を図１Ａに、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率を図１Ｂに示す。未処置群（ＳＤ－　Ｔｃｅｌｌｓ－）、及び睡眠障害誘導されたがＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を受けていない群（ＳＤ＋　Ｔｃｅｌｌ

ｓ－）は臨床スコアが０のまま上がらなかったのに対し、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った群（ＳＤ＋　Ｔｃｅｌｌｓ＋）の臨床スコアは移入後７日目に急激に上昇し、高い致死率を示した。一方、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入のみを受けた群（ＳＤ－　Ｔｃｅｌｌｓ＋）の臨床スコアは緩やかな上昇を示し、また死亡例も観察されなかった。

[0069] 実施例１（２）で湿潤床敷ストレスを負荷したマウスの臨床スコア及び致死率は、睡眠障害の場合と同傾向にあった（図２Ａ及びＢ、ＷＳ＋　Ｔｃｅｌｌｓ＋）。また、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞に代えて、オボアルブミン等の中枢神経組織由来でない抗原に反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞をストレス負荷後に移入した場合、急激な臨床スコア上昇は認められなかった（データを図示せず）。

[0070] 以上から、ストレス状態下でＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の移入を受けたマウスは、臨床スコアの急上昇を特徴とする進行性多発性硬化症及び突然死の病態を有することが確認された。

[0071] また、実施例１（１）で作製したマウスからＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入の９日後に血液を採取し、ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（ＥＮＤＯＣＲＩＮＥ）を用いて血中アルドステロン濃度を測定した。睡眠障害はＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入の有無にかかわらずマウスの血中アルドステロン濃度を上昇させたことから（図３）、ストレス負荷による視床下部－脳下垂体－副腎系の活性化が示唆された。

[0072] （２）胃腸炎

実施例１（１）で作製したマウスについて、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後に胃腸炎の病態を評価した。各マウスから採取した便を生理食塩水（便１ｇあたり２０ｍＬ）に懸濁し、遠心分離（８０００ｒｐｍ、５分間）により回収した上清を生理食塩水で１０倍希釈し、Ｈｅｍａｓｔｉｘ（ＳＩＥＭＥＮＳ）により潜血便試験を行った。潜血便スコアはＨｅｍａｓｔｉｘの容器に記載されているスコアリング法に従って算出した。

[0073] 結果を図４に示す。睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入

を行った群（ＳＤ＋　Ｔｃｅｌｌｓ＋）においてのみ潜血便が認められ、これと対応してヘマトクリット値が低下していた。

[0074] また、消化管各部位（胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸）を１ｍＬの生理食塩水で洗浄し、洗浄液について潜血便試験と同様にして血液含量を調べたところ、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った群において胃及び腸の上部から出血が生じていることが確認された（図５Ａ）。この群のマウスの胃において限局性出血病変が認められ（図５Ｂ、黒い点）、胃及び十二指腸の上皮組織で炎症が生じていた（図５Ｃ）。

[0075] 次に、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスに、プロトンポンプ阻害剤であるランソプラゾール又は対照のカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）をＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入後毎日、３０ｍｇ／ｋｇ体重の用量で経口投与した。ランソプラゾールは、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスの臨床スコア、移入から１０日後の致死率及び潜血便スコアのいずれも顕著に低減させた（図６）。

[0076] 以上から、ストレス状態下でＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の移入を受けたマウスは、胃、消化管上部における炎症及び出血を特徴とする胃腸炎の病態を有することが確認された。また、プロトンポンプ阻害剤であるランソプラゾールは、臨床スコア及び胃腸炎の病態を改善し、また致死率を低減させることが確認された。

[0077] （３）心筋障害

実施例１（１）で作製したマウスについて、心筋障害の病態を評価した。ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入の９日後に血液を採取し、ＥＬＩＳＡｋｉｔ（Ｌｉｆｅ　ｄｉａｇｎｏｔｉｃｓ）を用いて血中トロポニンＩ濃度を、及びＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（Ｌｉｆｅｓｐａｎ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて血中クレアチンキナーゼＭＢ濃度を測定した。ストレス状態下でＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の移入を受けたマウスは、血中トロポニンＩ濃度（図７）及び血中クレアチンキナーゼＭＢ濃度（図８）のいずれも上昇

しており、心臓における細胞死を特徴とする心筋障害の病態を有することが示唆された。この群のマウスの心電を測定したところ、心不全の兆候が検出された（データを図示せず）。

[0078] また、活性化カスパーゼ３に対する抗体を用いた免疫化学染色の結果、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った群のマウスの心臓においてアポトーシスの増加が観察され、その傾向は心臓上部でより顕著であった（図９、矢印）。

[0079] アポトーシスのマーカーである活性化カスパーゼ３、血管マーカーであるＣＤ３１、交感神経マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ、迷走神経マーカーであるコリントランスポーター１の各々に対する抗体を用いた、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った疾患モデルマウスの心臓上部の免疫化学染色像を図１０に示す。抗活性化カスパーゼ３抗体で強く染色された部分（図１０左上写真の上の矢印）は、構造的に弁であると推定された。また、抗ＣＤ３１抗体で染色された部分（図１０右上写真の矢印）は抗活性化カスパーゼ３抗体でも染色されており（図１０左上写真の下の矢印）、血管でもアポトーシスが生じているものと考えられた。また、抗活性化カスパーゼ３抗体で染色された部分の周囲は抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体、抗コリントランスポーター１抗体で染色されていたことから、心臓細胞のアポトーシスに神経活動が関与していることが示唆された。

[0080] 以上から、ストレス状態下でＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の移入を受けたマウスは、心臓における細胞死を特徴とする心筋障害の病態を有することが確認された。

[0081] （４）脳内の特定血管における局所炎症

実施例１（１）で作製したマウスについて、ＭＨＣクラスＩＩ陽性細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞の集積を調べた。ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後のマウスから摘出した第５腰髄及び脳をＳＣＥＭ（ＳＥＣＴＩＯＮ－ＬＡＢ）中に包埋し、マイクロトーム装置ＣＭ３０５０（Ｌｅｉｃａ Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて１０μｍ厚の切片とした。切片はＣｒ

ｙｏｆｉｌｍタイプＩＩＩＣ（１６ＵＦ）（ＳＥＣＴＩＯＮ－ＬＡＢ）を用いて回収し、ヘマトキシリン／エオジン染色、又は抗ＭＨＣクラスＩＩ抗体若しくは抗ＣＤ４抗体を用いて免疫組織化学的に染色し、ＢＺ－９０００顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ）で解析した。解析はＢＺ－ＩＩアナライザー（ＫＥＹＥＮＣＥ）のＨＳ　ＡＬＬソフトウェアにより実施した。

[0082] ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入のみを受けた群（ＳＤ－）においては、既に報告されている通り（Ａｒｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）　Ｃｅｌｌ　１４８，４４７－４５７）、第５腰髄背側血管にＭＨＣクラスＩＩ陽性細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞が集積していた（図１１）。一方、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った群（ＳＤ＋）においては、第三脳室、視床及び歯状回の境界領域に存在する特定の血管に両細胞の集積が認められた（図１２）。ＣＤ８陽性Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞及び好中球等の様々な免疫細胞もまたこの血管に集積することが見出された（データを図示せず）。

[0083] また、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入の９日後に摘出した脳を小脳及び脳幹（Ｃｅｒｅｂｅｌｌｕｍ　ａｎｄ　Ｂｒａｉｎ　ｓｔｅｍ）、大脳皮質（Ｃｏｒｔｅｘ）、海馬及び間脳（Ｈｉｐｐｏｃａｍｐｕｓ　ａｎｄ　Ｉｎｔｅｒｂｒａｉｎ）の各部位に解剖し、Ｎｅｕｒａｌ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を用いて酵素消化することで単一細胞懸濁液を調製した。懸濁液中の10^6個の細胞を蛍光コンジュゲート抗体と共に氷上で３０分間インキュベートし、細胞表面を標識した。次いで細胞をシアンフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で解析し、Ｓｕｍｍｉｔソフトウェア（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）又はＦｌｏｗｊｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ）を用いてデータ解析した。

[0084] 脳の各部位に存在するＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞のフローサイトメトリー解析結果を図１３に示す。睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った群（ＳＤ＋　Ｔｃｅｌ

Ｉｓ＋）において、特定血管が位置する海馬及び間脳へのＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞の顕著な集積が生じていた。

[0085] 次に、海馬及び間脳に集積したＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞の由来を調べるため、Ｃ５７ＢＬ／６マウスの代わりにＣＸ３ＣＲ１^{CreER} ＲＯＳＡ２６－ＴｄＴｏｍａｔｏマウスを用いて、実施例１（１）と同様の方法で、睡眠障害誘導による疾患モデルマウスを作製した。タモキシフェンを２ｍｇ／マウスの用量で二日連続経口投与してＴｄ－ｔｏｍａｔｏを発現させた後、投与後６週間のマウスにＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入し、移入の１０日後に海馬及び間脳を摘出し、ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞におけるＴｄ－ｔｏｍａｔｏの発現をフローサイトメトリーで解析した。

[0086] 結果を図１４に示す。睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った群（ＳＤ＋ Ｔｃｅｌｌｓ＋）のマウスの海馬及び間脳には、Ｔｄ－ｔｏｍａｔｏ陰性、すなわち末梢由来のＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞（単球）が多く集積しており、Ｔｄ－ｔｏｍａｔｏ陽性、すなわち中枢由来のＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞（ミクログリア細胞）の集積は少量しか認められなかった。

[0087] 以上から、ストレス状態下でＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞の移入を受けたマウスは、第三脳室、視床及び歯状回の境界領域の特定血管におけるＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞、ＣＤ４陽性Ｔ細胞等の免疫細胞の集積を特徴とする炎症の病態を有することが確認された。

[0088] 実施例３ 疾患モデルマウスにおけるＣＣＬ５及び炎症性サイトカインの機能解析

（１）ＣＣＬ５

実施例１（１）で作製した睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスに、抗ＣＣＬ５抗体又は対照のラットＩｇＧ抗体（いずれも１００μｇ／マウス）をＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入後毎日腹腔内注射し、ＥＡＥ病態を実施例２（１）と同様に評価した。また、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後のマウスを用いて、特定血管にお

ける細胞の集積を実施例２（４）と同様に調べた。

[0089] 抗ＣＣＬ５抗体は、特定血管におけるＣＤ４陽性Ｔ細胞及びＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞の集積を抑制し（図１５）、臨床スコア及び致死率を低減させた（図１６）。一方、ＣＣＬ２又はＣＸ３ＣＬ１等の他のケモカインに対する抗体はかかる効果を示さなかった（データを図示せず）。

[0090] 次いで、特定血管におけるケモカインＣＣＬ５の発現量を以下のように測定した。ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から４日後のマウスより実施例２（４）と同様の方法で約１００個の凍結切片（１５μｍ厚）を調製し、ＰＡＸｇｅｎｅ（ＱＩＡＧＥＮ）で１５分間固定し、次いで１００％ ＥｔＯＨで１０分間固定した。切片中の第三脳室領域血管周辺の組織をレーザーマイクロダイセクションデバイスＤＭ６０００Ｂ（Ｌｅｉｃａ Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ）により回収し、全ＲＮＡをＲＮｅａｓｙマイクロキット（ＱＩＡＧＥＮ）により抽出し、ＤＮａｓｅ及び逆転写反応を行ってｃＤＮＡを得た。

[0091] 得られたｃＤＮＡを、ＧｅｎｅＡｍｐ ５７００シーケンス検出システム（ＡＢＩ）及びＫＡＰＡ ＰＲＯＢＥ ＦＡＳＴ ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ ｑＰＣＲキット（Ｋａｐａ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いたリアルタイムｑＰＣＲ解析に供し、ＣＣＬ５及び内在性コントロールのＨＰＲＴの発現量を測定した。使用したＰＣＲプライマーペア及びプライマーは、

マウスＨＰＲＴプライマー：

５’－ＡＧＣＣＣＣＡＡＡＴＧＧＴＴＡＡＧＧＴＴＧ－３’（配列番号１）及び

５’－ＣＡＡＧＧＧＣＡＴＡＴＣＣＡＡＣＡＡＣＡＡＡＣ－３’（配列番号２）

マウスＨＰＲＴプローブ：

５’－ＡＴＣＣＡＡＣＡＡＡＧＴＣＴＧＧＣＣＴＧＴＡＴＣＣＡＡＣＡＣ－３’（配列番号３）

マウスＣＣＬ５プライマー：

５’－ＣＴＣＣＣＴＧＣＴＧＣＴＴＴＧＣＣＴＡＣ－３’（配列番号４）及び

５’－ＣＧＧＴＴＣＣＴＴＣＧＡＧＴＧＡＣＡＡＡＣＡ－３’（配列番号５）

マウスＣＣＬ５プローブ：５’－ＴＧＣＣＴＣＧＴＧＣＣＣＡＣＧＴＣＡＡＧＧＡＧＴＡＴＴ－３’（配列番号６）

であった。リアルタイムＰＣＲ条件は、５０℃　２分間、９５℃　３分間の後、９５℃　３秒間、６０℃　３０秒間を４０サイクルであった。

[0092] 第三脳室領域血管周辺組織におけるＣＣＬ５の相対的発現量を図１７に示す。ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入の有無にかかわらず、睡眠障害誘導を行った群においてＣＣＬ５の発現量が増加していた。

[0093] （２）炎症性サイトカイン

実施例１（１）で作製した睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスに、抗ＩＦＮ－γ抗体、抗ＩＬ１７Ａ抗体又は対照のラットＩｇＧ抗体（いずれも１００μｇ／マウス）をＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入後毎日腹腔内注射し、ＥＡＥ病態を実施例２（１）と同様に評価した。また、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後のマウスを用いて、特定血管における細胞の集積を実施例２（４）と同様に調べた。

[0094] 抗ＩＦＮ－γ抗体、抗ＩＬ１７Ａ抗体はそれぞれ特定血管におけるＣＤ４陽性Ｔ細胞及びＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞の集積を抑制した（図１８）。これらの抗体の併用は、臨床スコア及び致死率を著しく低減させた（図１９）。

[0095] 次に、特定血管に炎症性サイトカインを直接的に注射することにより、局所脳炎が疾患を誘導するかを調べた。睡眠障害を誘導したＣ５７ＢＬ／６マウス又は対照マウスの頭部を麻酔下で定位装置に固定し、頭蓋骨上の毛をそり、皮膚を７０％エタノールで拭いた。３０ゲージの針を特定血管（座標ＡＰ　－１．０６ｍｍ；ＭＬ　１ｍｍ；ＤＶ　２．２５ｍｍ）に向けて下げ入

れ、いずれも液量０．２μｌのＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞（１×１０^{6}個）＋ＭＯＧをパルスした骨髄由来樹状細胞（５×１０^{5}個）、ＩＦＮ－γ（５０ｎｇ；ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）＋ＩＬ－１７Ａ（５０ｎｇ；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）又はＩＬ－６（５０ｎｇ；Ｔｏｒａｙ）＋ＩＬ－１７Ａ（５０ｎｇ）を９０秒かけて既報の通りにマイクロインジェクションにより投与した（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）　Ｍｏｌ．Ｂｒａｉｎ　１９，４－６）。

[0096] マイクロインジェクションから２日後のマウスの致死率を図２０Ａに、潜血便スコアを図２０Ｂに示す。睡眠障害を誘導したマウスにおいては、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞＋樹状細胞、ＩＦＮ－γ＋ＩＬ－１７Ａ及びＩＬ－６＋ＩＬ－１７Ａいずれの投与も胃腸炎を発症させ、致死率を大きく向上させた。

[0097] 以上から、ストレス状態下、第三脳室、視床及び歯状回の境界領域の特定血管内で生じるＣＣＬ５がＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を集積させて炎症性サイトカインを産生させ、局所脳炎を確立することが示唆された。さらに、抗ＣＣＬ５抗体及び抗炎症性サイトカイン抗体は、ＥＡＥ及び胃腸炎の病態を改善し、致死率を低減させることが確認された。

[0098] 実施例４　疾患モデルマウスの病態誘導に関与する神経路の解析

（１）ＰＶＮの交感神経と特定血管との連絡

Ｃ５７ＢＬ／６マウスに対して、実施例３（２）と同様の方法で、ドーパミン／ノルアドレナリン作動性ニューロンを変性させる神経毒である６－ヒドロキシドーパミン（６－ＯＨＤＡ）塩酸塩（２ｍｇ／ｍｌ）又は溶媒の０．０２％アスコルビン酸それぞれ０．２μｌをＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入の四日前（ストレス負荷の二日前）に特定血管にマイクロインジェクションした。その後、実施例１（１）と同様に、睡眠障害誘導及びＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った。

[0099] ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の化学的交感神経除去マウスの第三脳室領域を抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体及び抗リン酸化ＣＲ

ＥＢ抗体で免疫染色した写真を図２１に示す。６－ＯＨＤＡは、チロシンヒドロキシラーゼ陽性の交感神経ニューロンを減少させ、ノルアドレナリン作動性受容体シグナル伝達により誘導されるＣＲＥＢのリン酸化を抑制した。

[0100] また、抗ＭＨＣクラスＩＩ抗体及び抗ＣＤ４抗体を用いた第三脳室領域の免疫染色写真及び染色細胞数のグラフを図２２に、マウスの臨床スコア及び致死率を図２３に示す。特定血管におけるＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞の集積は６－ＯＨＤＡの投与により抑制され、臨床スコア、致死率共に改善が認められた。

[0101] 次に、実施例１（１）で作製した各マウスを用いて、ＰＶＮ及びＤＭＨにおける神経の活性化を調べた。ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後に摘出した脳の切片を抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体及び抗リン酸化ｃｆｏｓ抗体で免疫染色した写真及び染色細胞数のグラフを図２４に示す。睡眠障害誘導はＰＶＮの交感神経ニューロンを活性化し、その程度はＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入により増強された。また睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った場合、ＤＭＨにおけるチロシンヒドロキシラーゼ陰性ニューロンの活性化が観察された。

[0102] さらに、逆行性トレーサーを用いて、特定血管とつながる神経路を調べた。ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から５日後に、逆行性トレーサーであるコレラ毒素ＢサブユニットのＦＩＴＣコンジュゲート（ＦＩＴＣ－ＣＴＢ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、１ｍｇ／ｍｌ）又は溶媒の生理食塩水を、睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスの特定血管にマイクロインジェクションした。ＰＶＮ及びＤＭＨの蛍光写真及び染色細胞数のグラフを図２５に示す。ＦＩＴＣ－ＣＴＢはＤＭＨよりもＰＶＮにおいて多く観察された。また、抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体、抗ノルアドレナリントランスポーター及び抗ドーパミントランスポーター抗体を用いたＰＶＮの免疫染色写真を図２６に示す。ＰＶＮのチロシンヒドロキシラーゼ陽性ニューロンはノルアドレナリントランスポーターを共発現するがドーパミントランスポーターを共発現していなかった。

[0103] 以上から、特定血管はＰＶＮの交感神経と直接的な連絡があり、この交感神経ニューロンはストレス状態下で特定血管においてノルアドレナリンを分泌し、ケモカインを誘導することが示唆された。また、ストレス状態下でのＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入によりＤＭＨにおける神経の活性化が確認されたことから、以下にさらなる試験を行った。

[0104] （２）特定血管とＤＭＨとの連絡

実施例１（１）で作製した睡眠障害誘導後にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行ったマウスに対して、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から５日後に、順行性トレーサーであるＰＨＡ－Ｌ（２５ｍｇ／ｍｌ）又は溶媒の生理食塩水を特定血管にマイクロインジェクションした。ＰＨＡ－ＬはＰＶＮよりもＤＭＨにおいて多く観察された（図２７）。また、ＦＩＴＣ－ＣＴＢをＤＭＨ（座標ＡＰ －１．４６ｍｍ；ＭＬ ０．３７ｍｍ；ＤＶ ５ｍｍ）にマイクロインジェクションしたところ、特定血管においてＦＩＴＣの蛍光が観察された（図２８）。

[0105] また、神経活性化を抑制することが知られている$GABA_A$受容体アゴニストのムシモール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、０．２５ｍｇ／ｍｌ）又は溶媒の生理食塩水をＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入後５日目にＤＭＨにマイクロインジェクションし、臨床スコア、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入から１０日後の致死率及び潜血便を評価した。ムシモールは臨床スコア、致死率及び潜血便のいずれも顕著に改善した（図２９）。

[0106] 以上から、特定血管における局所脳炎はＤＭＨのニューロン、特にチロシンヒドロキシラーゼ陰性ニューロンを活性化することが示唆された。また、ＧＡＢＡ受容体アゴニストは、ＥＡＥ及び胃腸炎の病態を改善し、致死率を低減させることが確認された。

[0107] （３）ＰＶＮ、ＤＭＨ及び特定血管間の神経連絡と病態との関係

睡眠障害を誘導したＣ５７ＢＬ／６マウスの特定血管に、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞＋ＭＯＧ樹状細胞又はＩＦＮ－γ＋ＩＬ－１７Ａを実施例３（２）と同様にマイクロインジェクションした。マイクロインジェクション

から２日後のＰＶＮ及びＤＭＨにおいて、リン酸化ｃｆｏｓの増加、すなわち神経の活性化が観察された（図３０）。

[0108] また、麻酔下でマウスの頭蓋骨にドリルで穴を開け、頭蓋骨を通して電極（Ｂｒａｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｉｄｅａ）をＰＶＮ（座標ＡＰ －１．０６ｍｍ；ＭＬ ０．２５ｍｍ；ＤＶ ４．８ｍｍ）に挿入し、４００ｕＡの直流電流を５秒間負荷することで、ＰＶＮの一側性除去をストレス負荷の一週間前に行った。このマウスに対して、実施例１（１）と同様に睡眠障害誘導及びＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行った。ＰＶＮの一側性除去は、特定血管におけるＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞の集積を抑制し（図３１）、ＥＡＥ及び胃腸炎の病態を改善し、致死率を低減させた（図３２）。

[0109] 以上から、局所脳炎はＰＶＮ及びＤＭＨの神経を活性化し、疾患モデルマウスの各種病態を誘発することが示唆された。

[0110] 次に、ＰＶＮ、ＤＭＨ及び特定血管間の神経連絡における神経伝達物質ＡＴＰの機能、及び疾患モデルマウスの病態への寄与を調べた。血管内皮細胞株ＢＣ１細胞（大阪大学宮坂昌之教授より分与）をＤＭＥＭで２４時間、ヒトＩＬ－６（５０ｎｇ／ｍｌ）、ヒト可溶性ＩＬ－６受容体α（５０ｎｇ／ｍｌ）及びマウスＩＬ－１７Ａ（５０ｎｇ／ｍｌ）を加えてさらに２４時間培養した後、細胞内ＡＴＰ産生量をＡＴＰアッセイｋｉｔ（ＴＯＹＯ Ｉｎｋ）を用いて測定した。結果を図３３に示す。炎症性サイトカインＩＬ－１７Ａ＋ＩＬ－６刺激は、血管内皮細胞におけるＡＴＰ産生量を増加させた。

[0111] また、ＰＶＮ及びＤＭＨのニューロンは、睡眠誘導マウスの特定血管へのＡＴＰ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、２μｇ）のマイクロインジェクションにより活性化された（図３０）。

[0112] さらに、睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、ＩＬ－６及びＩＬ－１７Ａを、ＡＴＰ受容体であるＰ２Ｘ受容体の選択的アンタゴニストであるＡ４３８０７９（１μｇ）を伴って又は伴わずに、実施例３（２）と同様にしてマイクロインジェクションした。マイクロインジェクションから２日後の

第三脳室領域内のリン酸化ｃｆｏｓ、潜血便及び致死率を評価した結果を図３４及び図３５に示す。Ａ４３８０７９は、ＰＶＮ及びＤＭＨにおける神経活性化を抑制し、また胃腸炎及び致死率を改善した。

[0113] 以上から、局所脳炎部位で炎症性サイトカインにより誘導されたＡＴＰはＰＶＮ及びＤＭＨを活性化して疾患モデルマウスの病態を誘導することが示唆された。また、ＡＴＰ受容体アンタゴニストはＥＡＥ及び胃腸炎の病態を改善し、致死率を低減させることが確認された。

[0114] （４）ＤＭＸ（迷走神経背側核）及びＮＴＳ（孤束核）と病態との関係

上記（２）において特定血管にマイクロインジェクションされた順行性トレーサーＰＨＡ－ＬはＤＭＸに到達していた（結果を図示せず）。また、実施例３（２）と同様に、睡眠障害を誘導したマウスの特定血管にＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞＋ＭＯＧ樹状細胞をマイクロインジェクションしたところ、ＤＭＸ及び求心性迷走神経の主要な核であるＮＴＳにおけるリン酸化ｃｆｏｓの増加、すなわち神経の活性化が観察された（図３６）。

[0115] また、麻酔下のマウスを上部正中線に沿って開腹し、胃を横隔膜の下に引き込んで両迷走神経幹を露出させて視認可能な迷走神経を少なくとも１ｍｍ切離し、さらに横隔膜直下の食道周辺にある全ての神経組織及び結合組織を取り除いて小さな迷走神経分岐を全て切除することで、マウスに横隔下迷走神経切離術を施した。このマウスに対して、実施例１（１）と同様に睡眠障害誘導及びＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞移入を行って疾患モデルマウスを作製した。迷走神経切離術は、疾患モデルマウスのＥＡＥ及び胃腸炎の病態を改善し、致死率を低減させた（図３７）。

[0116] 以上から、局所脳炎はＤＭＸ及びＮＴＳの求心性迷走神経を活性化し、疾患モデルマウスの各種病態を誘発することが示唆された。

[0117] 実施例１～４の結果から、ストレス負荷はＰＶＮ交感神経を活性化し、第三脳室、視床及び歯状回の境界領域に存在する特定血管においてノルアドレナリンを分泌させ、これによるＣＣＬ５産生、ＣＤ１１ｂ陽性ＭＨＣクラスＩＩ高発現細胞及びＣＤ４陽性Ｔ細胞の集積並びに炎症性サイトカイン産生

を引き起こした。さらにこのＴ細胞集積性局所脳炎はＡＴＰを介してＤＭＨの神経を活性化し、これがさらにＤＭＸ及びＮＴＳの迷走神経の活性化を介して疾患モデルマウスの各種病態を誘発するという機序が推定された。

[0118] また、上記機序に関与する神経路又はＣＣＬ５若しくは炎症性サイトカインの抑制、遮断又は阻害は、疾患モデルマウスの病態の予防及び／又は治療に寄与することが確認された。

[0119] 実施例５　ストレス負荷により脳内特定血管における発現が変動する遺伝子の解析

睡眠障害誘導を行って２日後のＣ５７ＢＬ／６マウスから、約１００個の脳の凍結切片（１５μｍ厚）を調製し、ＰＡＸｇｅｎｅ（ＱＩＡＧＥＮ）で１５分間固定し、次いで１００％　ＥｔＯＨで１０分間固定した。切片中の第三脳室領域血管周辺の組織をレーザーマイクロダイセクションデバイスＤＭ６０００Ｂ（Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ）により回収し、全ＲＮＡをＲＮｅａｓｙマイクロキット（ＱＩＡＧＥＮ）により抽出し、かずさDNA研究所に委託してＲＮＡシークエンスを行い、全遺伝子を対象とした発現解析を実施した。

[0120] 解析の結果、ストレス負荷によりＬＹ６Ｇ６Ｃ遺伝子及びα２Ｃアドレナリン受容体遺伝子の発現が上昇することが確認され（図３８）、これらの因子が脳内特定血管における炎症及び疾患モデルマウスの病態に関与する可能性が示された。

[0121] 実施例６　抗ＬＹ６Ｇ６Ｃ抗体及び抗α２Ｃアドレナリン受容体抗体による疾患モデルマウスの病態改善

Ｃ５７ＢＬ／６マウスに睡眠障害誘導後、ＥＡＥ病原性ＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入した。５日後に当該マウスの頭部を麻酔下で定位装置に固定し、頭蓋骨上の毛をそり、皮膚を７０％エタノールで拭いた。３０ゲージの針を特定血管（座標ＡＰ　－１．０６ｍｍ；ＭＬ　１ｍｍ；ＤＶ　２．２５ｍｍ）に向けて下げ入れ、液量０．５μｌの抗Ｌｙ６Ｇ６Ｃ抗体（ｃｌｏｎｅ；ＮＩＭＰ－Ｒ１４）　０．１ｍｇ／ｍｌ（ＮＯＶＵＳ　ＢＩＯＬＯＧＩＣＡＬＳ

）、抗ａｌｐｈａ　２ｃ　Ａｄｒｅｎｅｒｇｉｃ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ抗体１ｍｇ／ｍｌ（ＧｅｎｅＴｅｘ）、又はそれぞれのコントロール抗体（ラットＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）若しくはウサギＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ））を９０秒かけて、マイクロインジェクションにより投与した。その後、経時的にマウスの病態観察を行った。

[0122] 抗ＬＹ６Ｇ６Ｃ抗体を投与したマウスのＥＡＥ臨床スコアの経時変化を図３９Ａに、抗α２Ｃアドレナリン受容体抗体を投与したマウスの臨床スコアの経時変化を図３９Ｂに示す。対照群では臨床スコアの急激な上昇が認められたのに対し、抗ＬＹ６Ｇ６Ｃ抗体処置群、抗α２Ｃアドレナリン受容体抗体処置群のいずれにおいても臨床スコアの上昇は認められず、病態の進行が有意に抑制された。このことから、ＬＹ６Ｇ６Ｃ又はα２Ｃアドレナリン受容体の抑制、遮断又は阻害は、疾患モデルマウスの病態の予防及び／又は治療に寄与することが確認された。

配列表フリーテキスト

[0123] 配列番号１　マウスＨＰＲＴフォワードプライマー

配列番号２　マウスＨＰＲＴリバースプライマー

配列番号３　マウスＨＰＲＴプローブ

配列番号４　マウスＣＣＬ５フォワードプライマー

配列番号５　マウスＣＣＬ５リバースプライマー

配列番号６　マウスＣＣＬ５プローブ

請求の範囲

[請求項1] ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程を含む、脳内血管に炎症を有する疾患モデル非ヒト動物の製造方法。

[請求項2] 脳内血管が第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管である、請求項１に記載の製造方法。

[請求項3] 疾患モデル非ヒト動物が進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を有する動物である、請求項１又は２に記載の製造方法。

[請求項4] ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程が、ストレス負荷後の非ヒト動物に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を移入する工程である、請求項１～３のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項5] 第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管に炎症があり、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を有する、疾患モデル非ヒト動物。

[請求項6] （ｉ）ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程、

（ｉｉ）工程（ｉ）の開始前から終了後のいずれかの時点で非ヒト動物に被験物質を投与する工程、並びに

（ｉｉｉ）被験物質を投与した非ヒト動物において、脳内血管の炎症、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状の発症、進行又は発生を観察し、被験物質を投与しない非ヒト動物のそれと比較する工程

を含む、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための薬剤のスクリーニング方法。

[請求項7] （ａ）第三脳室と視床と歯状回との境界領域の血管における炎症の有

無を検出する工程、並びに

（ｂ）炎症が検出された場合に進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を罹患又は発症するリスクが高いと判定する工程

を含む、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を罹患又は発症するリスクを判定する方法。

[請求項8] ＣＣケモカインリガンド５（ＣＣＬ５）に対する抗体を有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

[請求項9] ＧＡＢＡ受容体アゴニストを有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

[請求項10] ＡＴＰ受容体アンタゴニストを有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

[請求項11] プロトンポンプ阻害剤を有効成分とする、進行性多発性硬化症、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

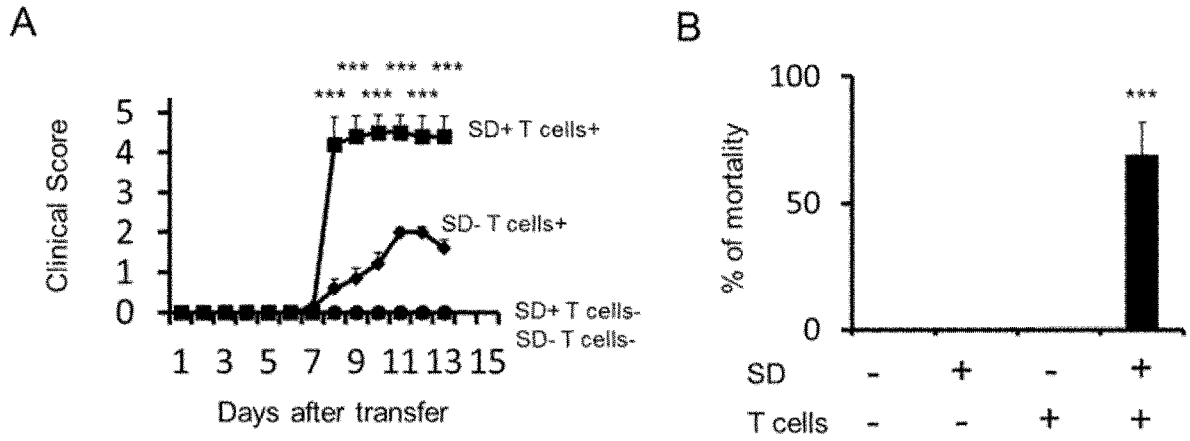
[請求項12] ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ ６ ｆａｍｉｌｙ ｍｅｍｂｅｒ Ｇ５Ｃ（ＬＹ６Ｇ６Ｃ）に対する抗体を有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬。

[請求項13] α２Ｃアドレナリン受容体に対する抗体を有効成分とする、進行性多発性硬化症、胃腸炎、心筋障害及び突然死よりなる群から選択される少なくとも１の疾患又は症状を予防及び／又は治療するための医薬

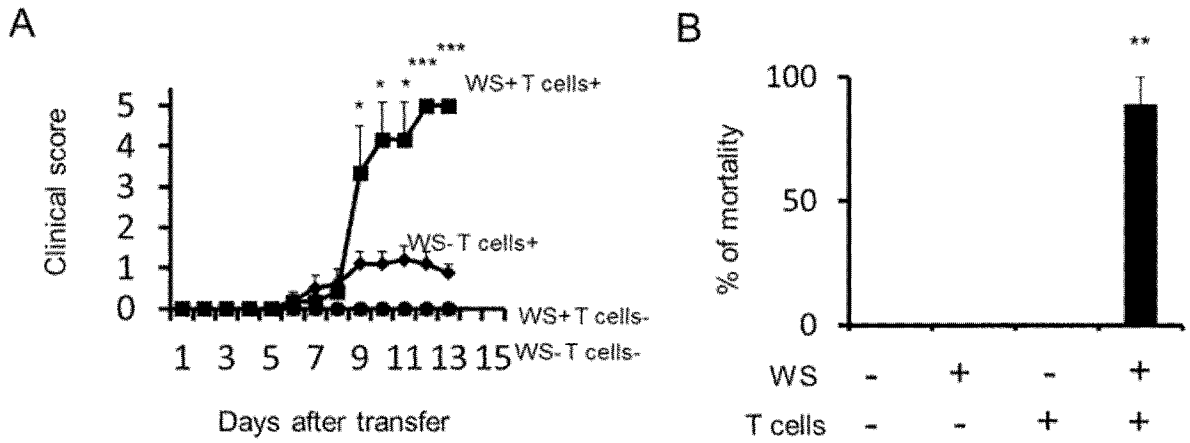
。

[請求項14] 疾患又は症状が、ストレス負荷に起因する疾患又は症状である、請求項８から１３のいずれか一項に記載の医薬。

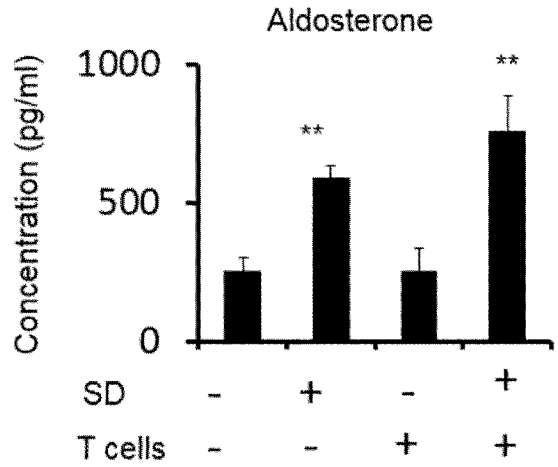
[図1]


A
Clinical Score
Days after transfer
SD+ T cells+
SD- T cells+
SD+ T cells-
SD- T cells-
B
% of mortality
SD
T cells

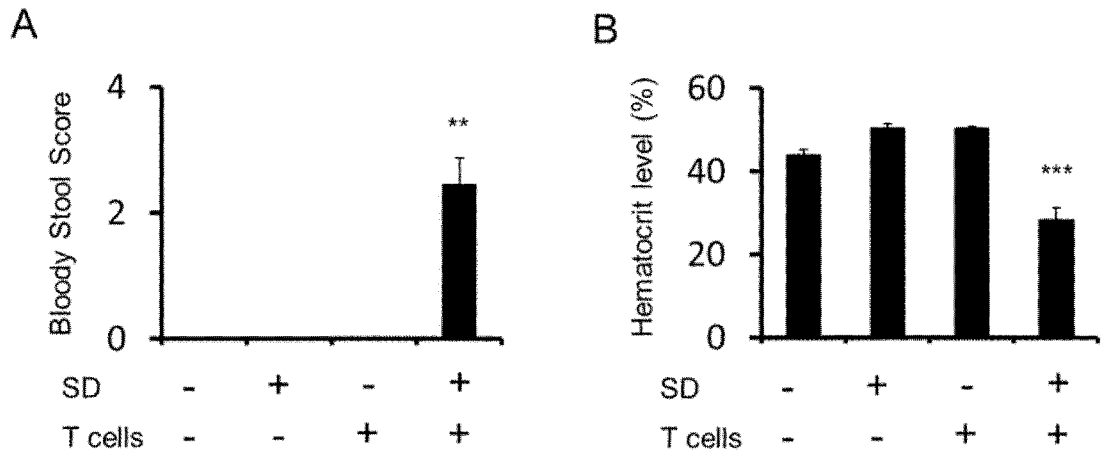
[図2]


A
Clinical score
Days after transfer
WS+T cells+
WS-T cells+
WS+T cells-
WS-T cells-
B
% of mortality
WS
T cells

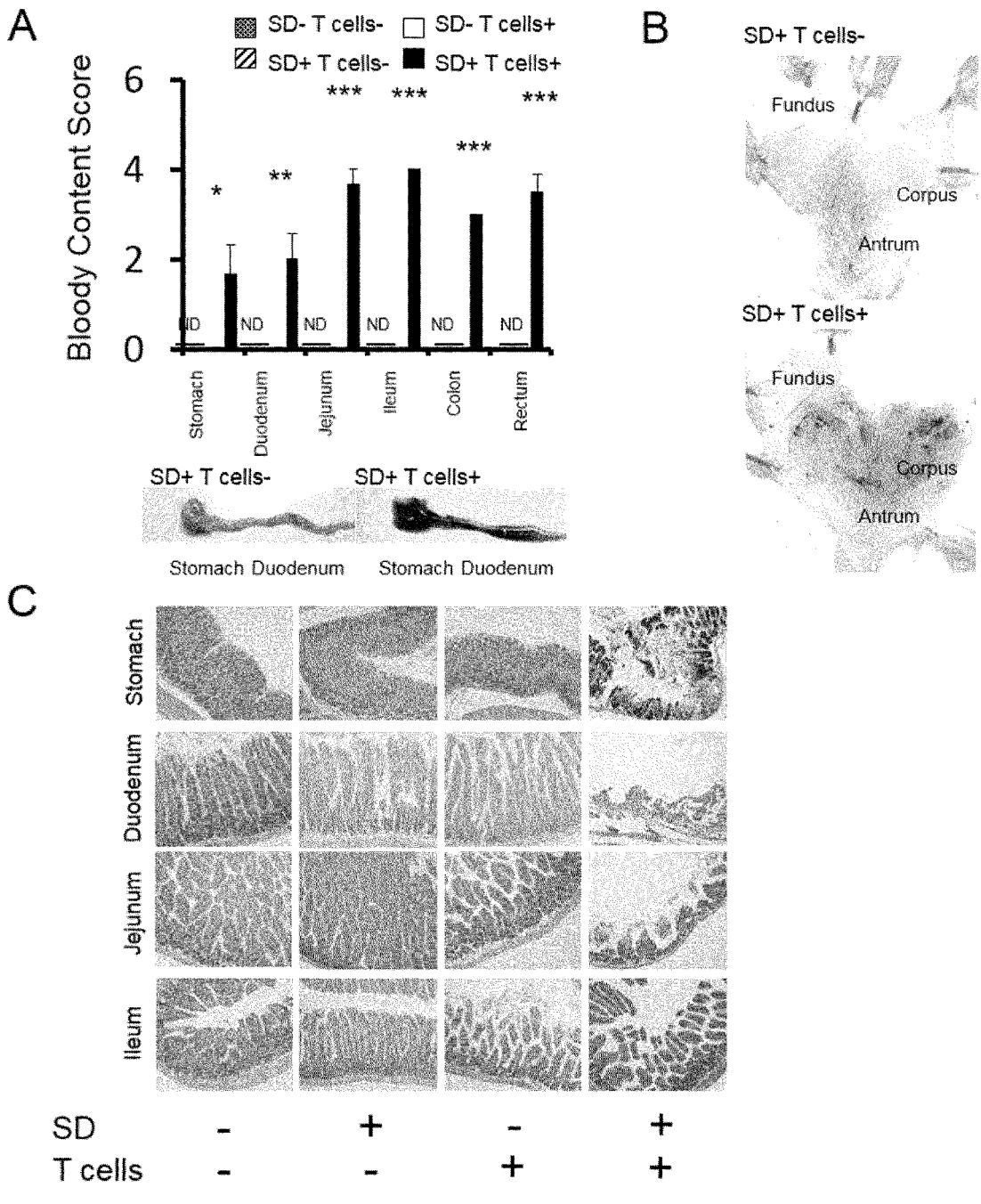
[図3]


Aldosterone
Concentration (pg/ml)
SD
T cells

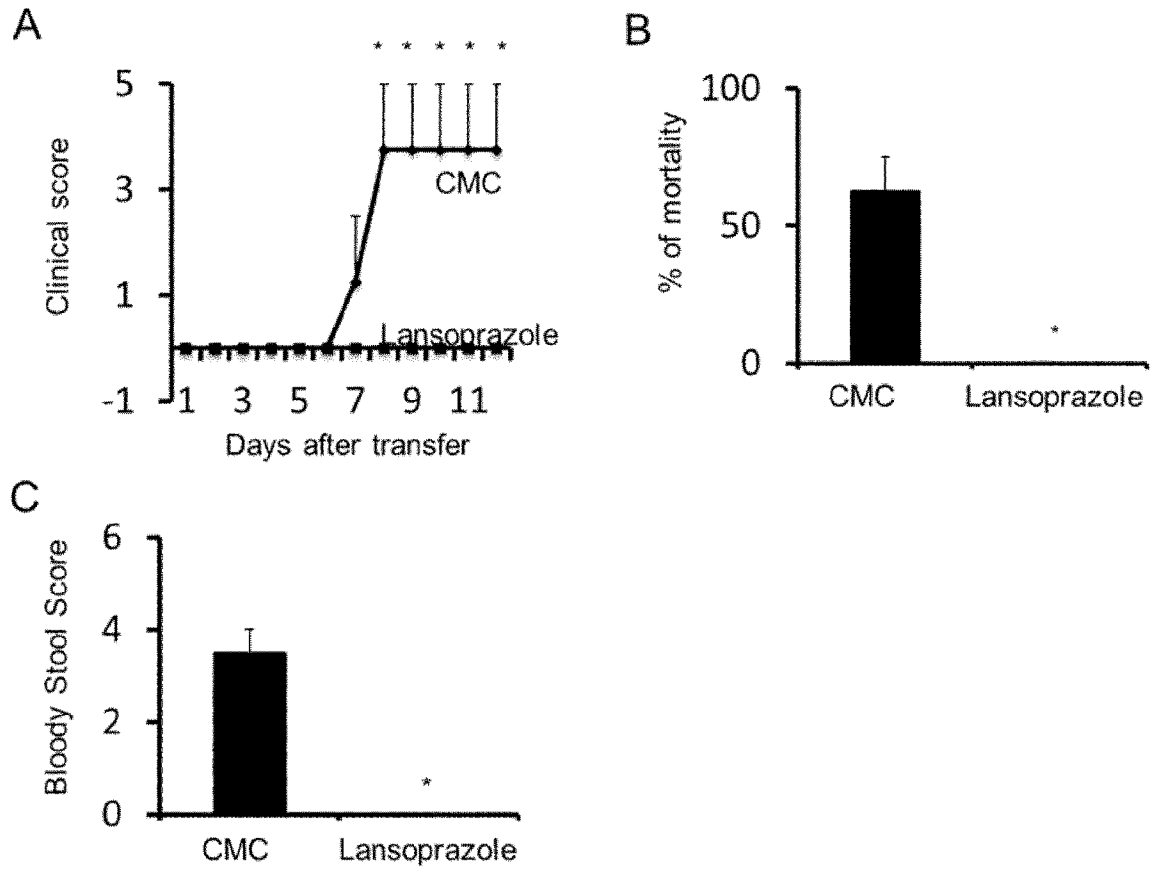
[図4]


A
Bloody Stool Score
4
2
0
**
SD - + - +
T cells - - + +
B
Hematocrit level (%)
60
40
20
0
***
SD - + - +
T cells - - + +

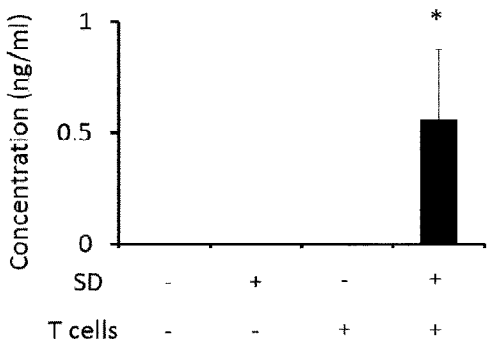
[図5]


A
SD- T cells-
SD- T cells+
SD+ T cells-
SD+ T cells+
Bloody Content Score
6
4
2
0
*
**
***
***
***
***
ND
Stomach
Duodenum
Jejunum
Ileum
Colon
Rectum
SD+ T cells-
SD+ T cells+
Stomach Duodenum
Stomach Duodenum
B
SD+ T cells-
Fundus
Corpus
Antrum
SD+ T cells+
Fundus
Corpus
Antrum
C
Stomach
Duodenum
Jejunum
Ileum
SD - + - +
T cells - - + +

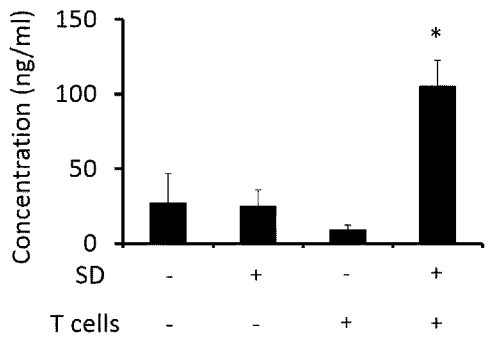
[図6]


A
Clinical score
5
3
1
-1
1 3 5 7 9 11
Days after transfer
CMC
Lansoprazole
B
% of mortality
100
50
0
CMC
Lansoprazole
C
Bloody Stool Score
6
4
2
0
CMC
Lansoprazole

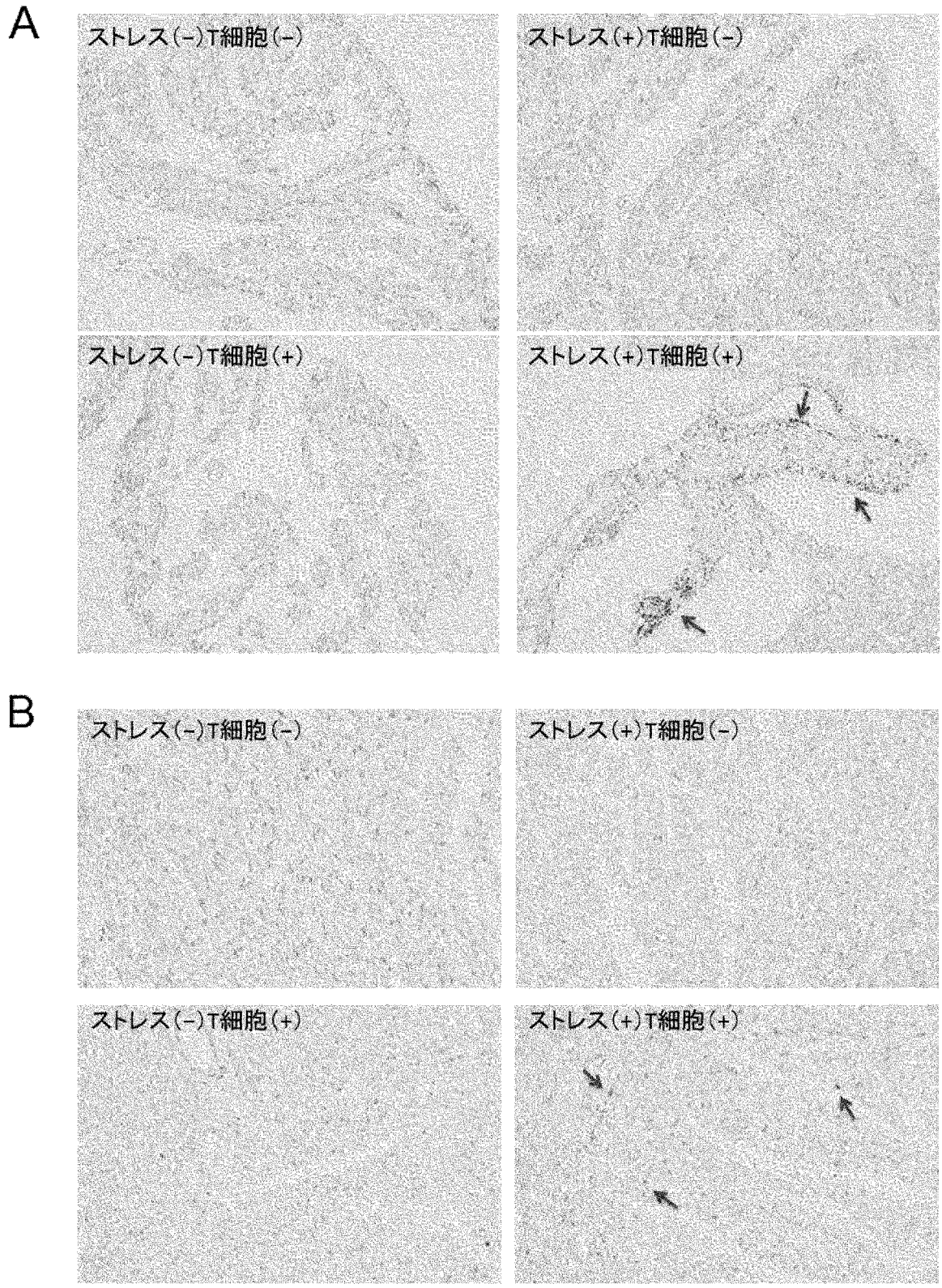
[図7]


Concentration (ng/ml)
1
0.5
0
SD - + - +
T cells - - + +

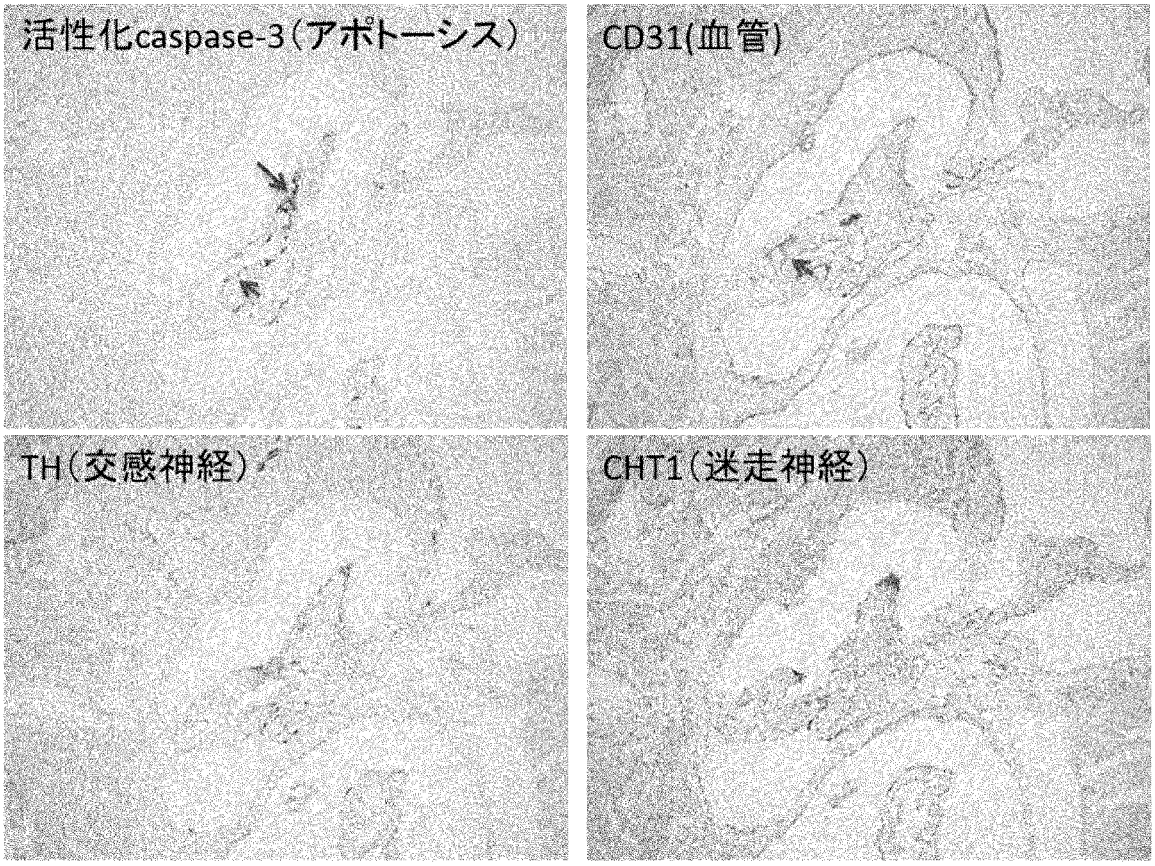
[図8]


Concentration (ng/ml)
150
100
50
0
SD - + - +
T cells - - + +

[図9]

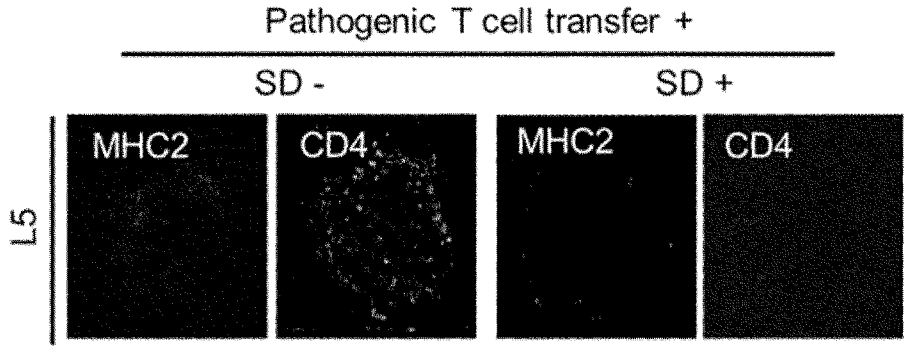

A
ストレス(−)T細胞(−)
ストレス(+)T細胞(−)
ストレス(−)T細胞(+)
ストレス(+)T細胞(+)
B
ストレス(−)T細胞(−)
ストレス(+)T細胞(−)
ストレス(−)T細胞(+)
ストレス(+)T細胞(+)

[図10]

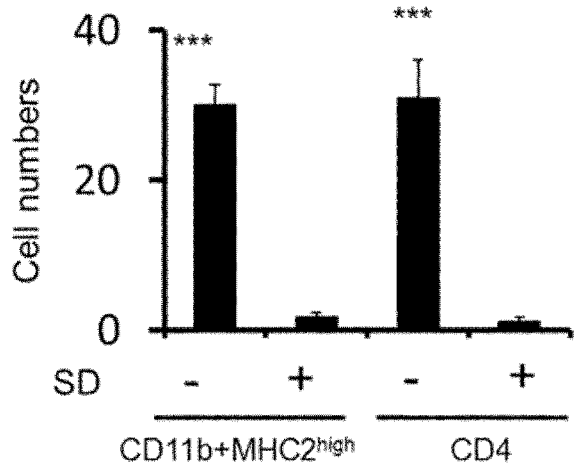


[図11]

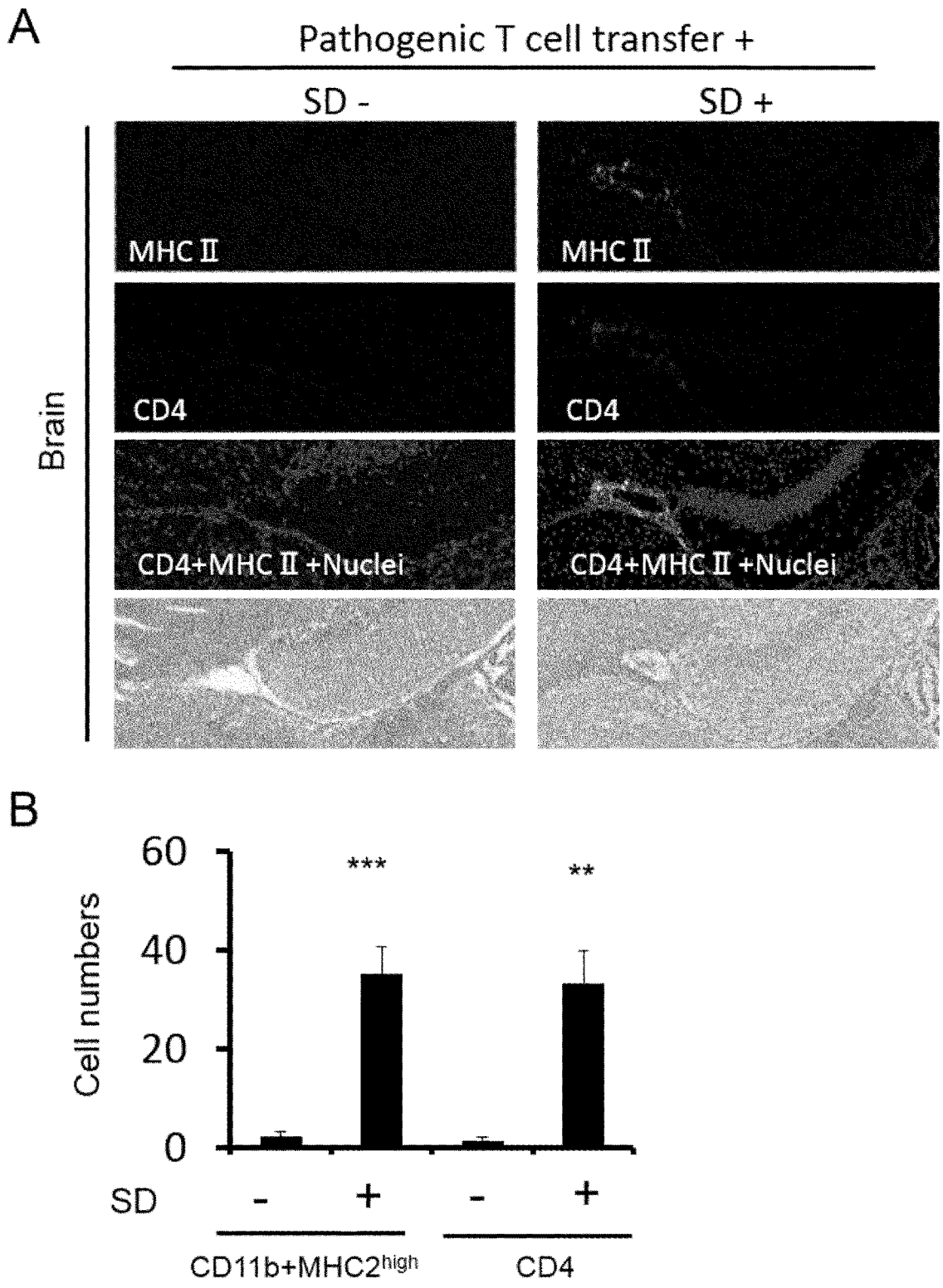
A


Pathogenic T cell transfer +
SD -
SD +
MHC2
CD4
MHC2
CD4
L5

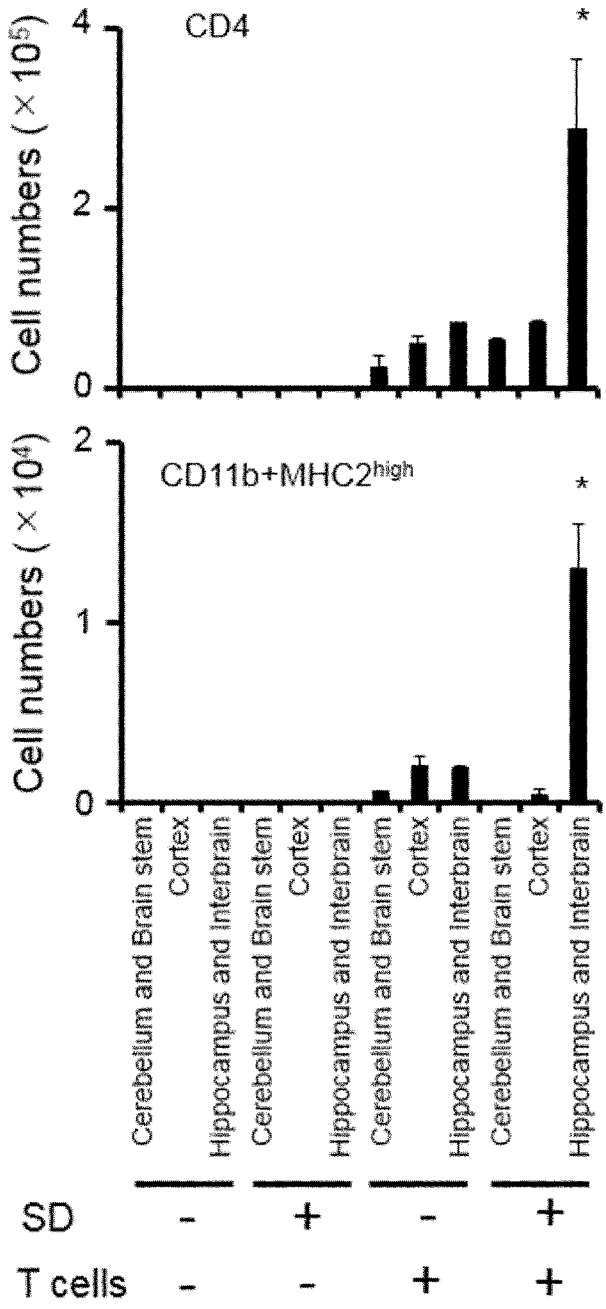
B


40
20
0
Cell numbers
***
***
SD
-
+
-
+
CD11b+MHC2high
CD4

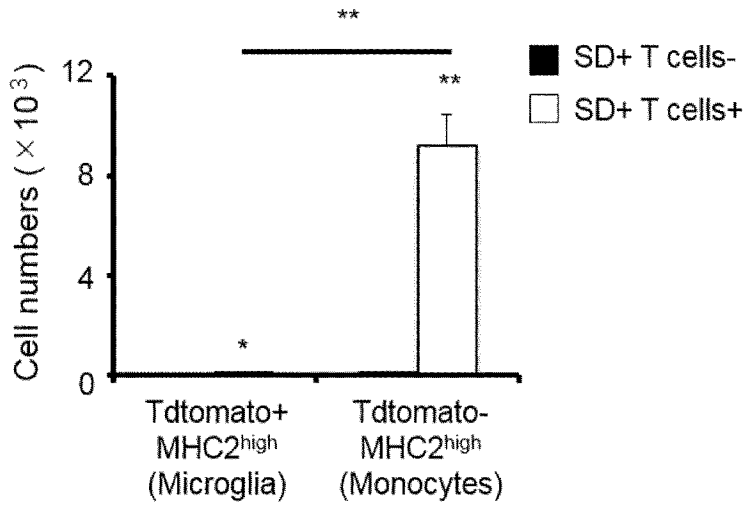
[図12]


A
Pathogenic T cell transfer +
SD -
SD +
Brain
MHC Ⅱ
MHC Ⅱ
CD4
CD4
CD4+MHC Ⅱ +Nuclei
CD4+MHC Ⅱ +Nuclei
B
Cell numbers
60
40
20
0
***
**
SD
-
+
-
+
CD11b+MHC2high
CD4

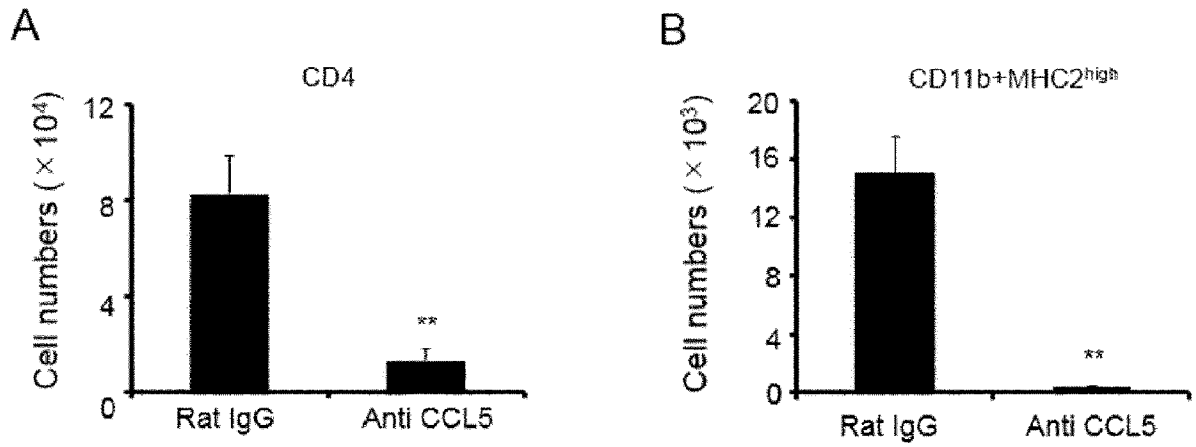
[図13]


CD4
Cell numbers (×10^5)
4
2
0
*
CD11b+MHC2high
Cell numbers (×10^4)
2
1
0
*
Cerebellum and Brain stem
Cortex
Hippocampus and Interbrain
Cerebellum and Brain stem
Cortex
Hippocampus and Interbrain
Cerebellum and Brain stem
Cortex
Hippocampus and Interbrain
Cerebellum and Brain stem
Cortex
Hippocampus and Interbrain
SD - + - +
T cells - - + +

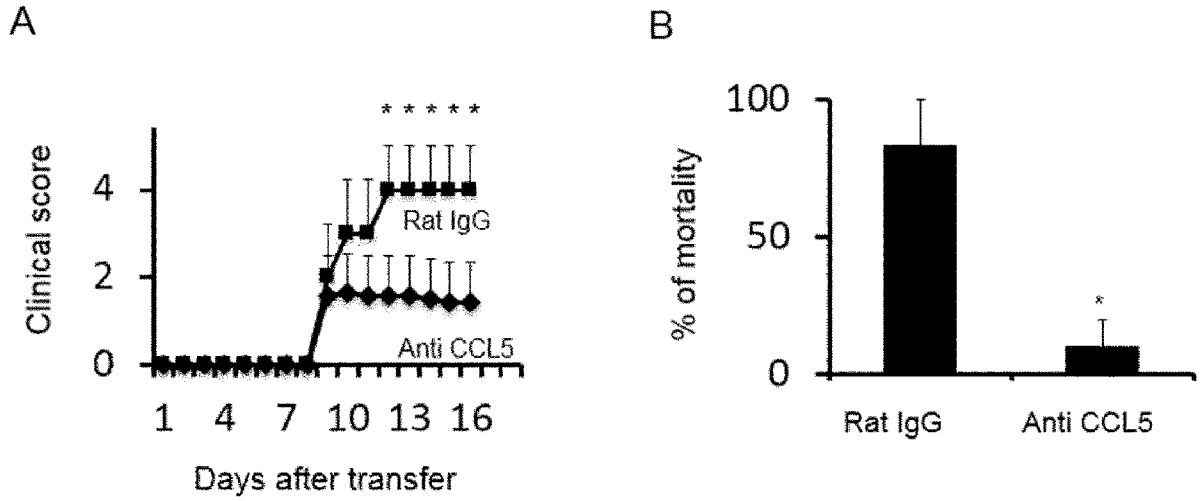
[図14]


**
**
*
SD+ T cells-
SD+ T cells+
Cell numbers (×10^3)
12
8
4
0
Tdtomato+ MHC2high (Microglia)
Tdtomato- MHC2high (Monocytes)

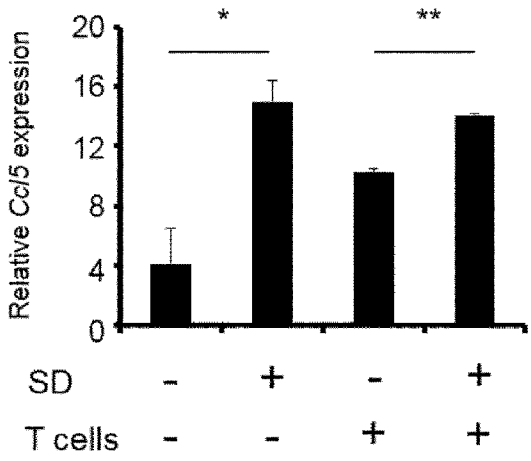
[図15]


A
CD4
Cell numbers (× 10⁴)
12
8
4
0
**
Rat IgG
Anti CCL5
B
CD11b+MHC2high
Cell numbers (× 10³)
20
16
12
8
4
0
**
Rat IgG
Anti CCL5

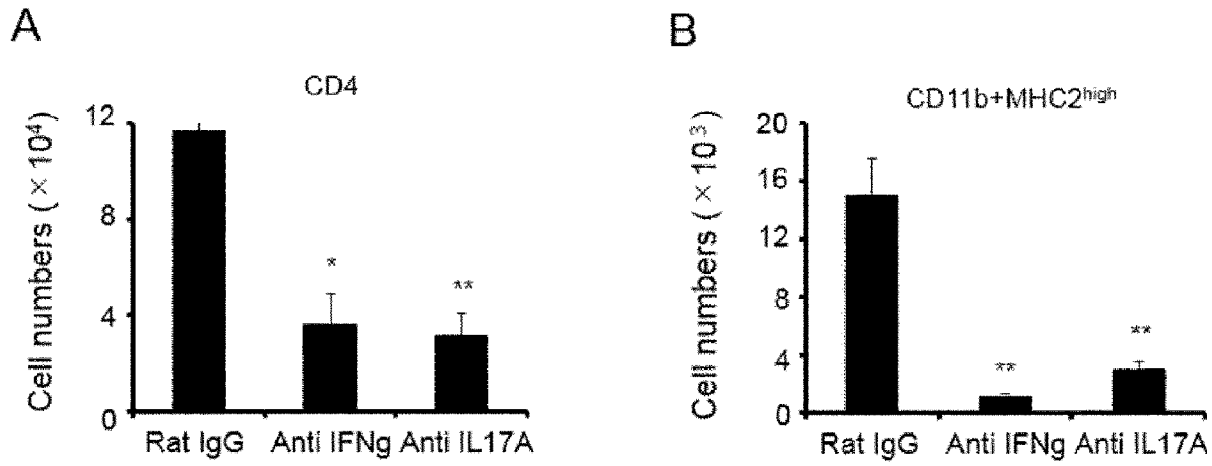
[図16]


A
Clinical score
4
2
0
* * * * *
Rat IgG
Anti CCL5
1 4 7 10 13 16
Days after transfer
B
% of mortality
100
50
0
*
Rat IgG
Anti CCL5

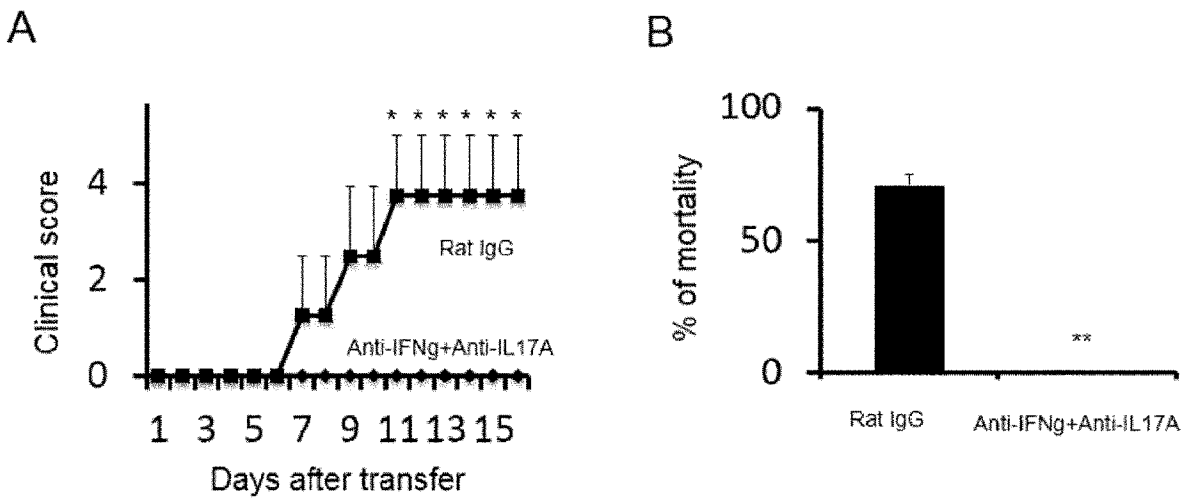
[図17]


Relative Ccl5 expression
20
16
12
8
4
0
*
**
SD - + - +
T cells - - + +

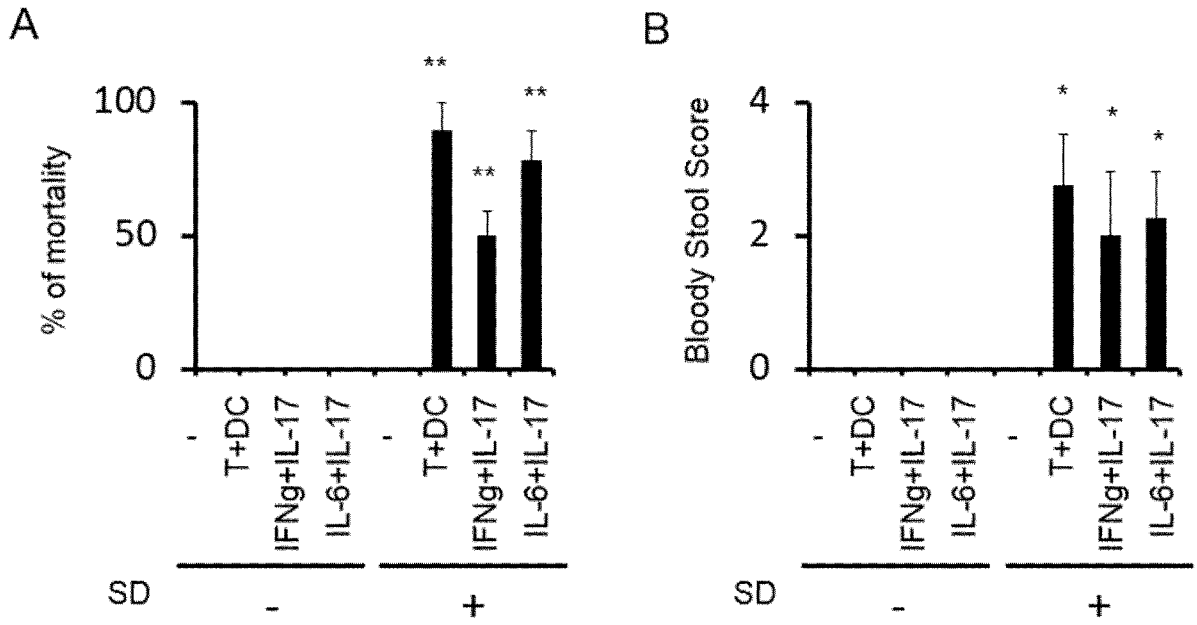
[図18]


A
CD4
Cell numbers (×10⁴)
12
8
4
0
*
**
Rat IgG
Anti IFNg
Anti IL17A
B
CD11b+MHC2high
Cell numbers (×10³)
20
16
12
8
4
0
**
**
Rat IgG
Anti IFNg
Anti IL17A

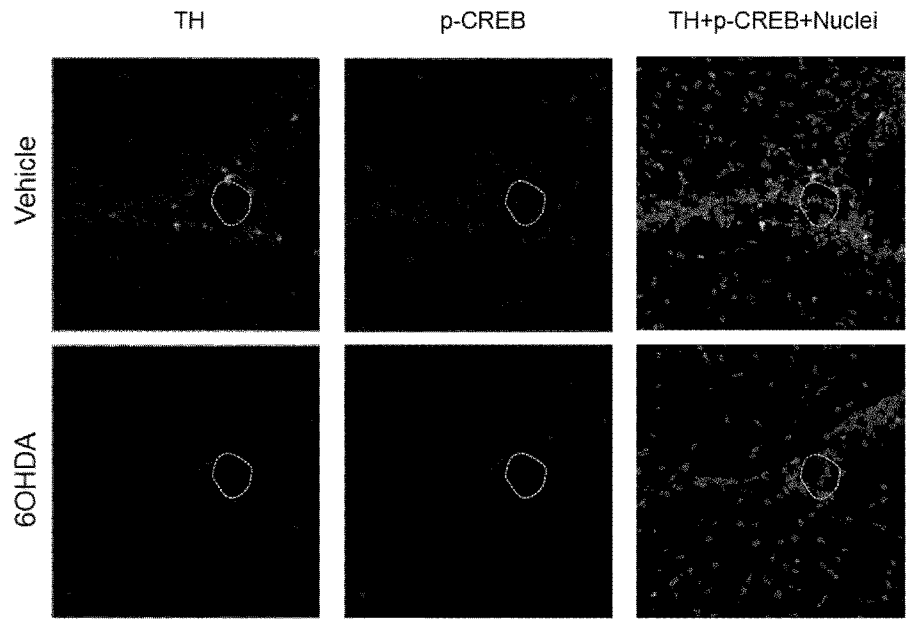
[図19]


A
Clinical score
4
2
0
* * * * * *
Rat IgG
Anti-IFNg+Anti-IL17A
1 3 5 7 9 11 13 15
Days after transfer
B
% of mortality
100
50
0
**
Rat IgG
Anti-IFNg+Anti-IL17A

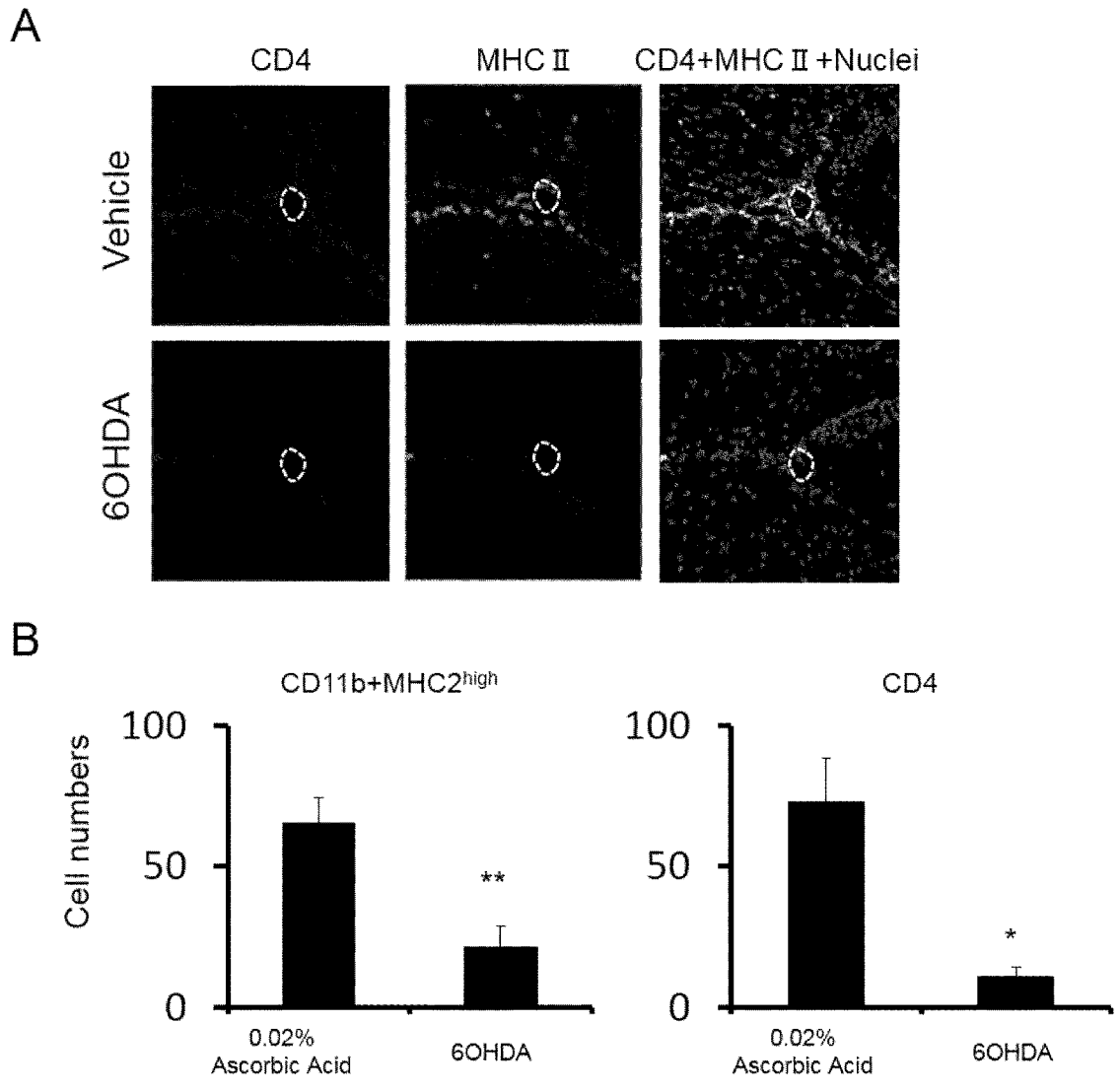
[図20]


A
% of mortality
100
50
0
**
**
**
-
T+DC
IFNg+IL-17
IL-6+IL-17
-
T+DC
IFNg+IL-17
IL-6+IL-17
SD
-
+
B
Bloody Stool Score
4
2
0
*
*
*
-
T+DC
IFNg+IL-17
IL-6+IL-17
-
T+DC
IFNg+IL-17
IL-6+IL-17
SD
-
+

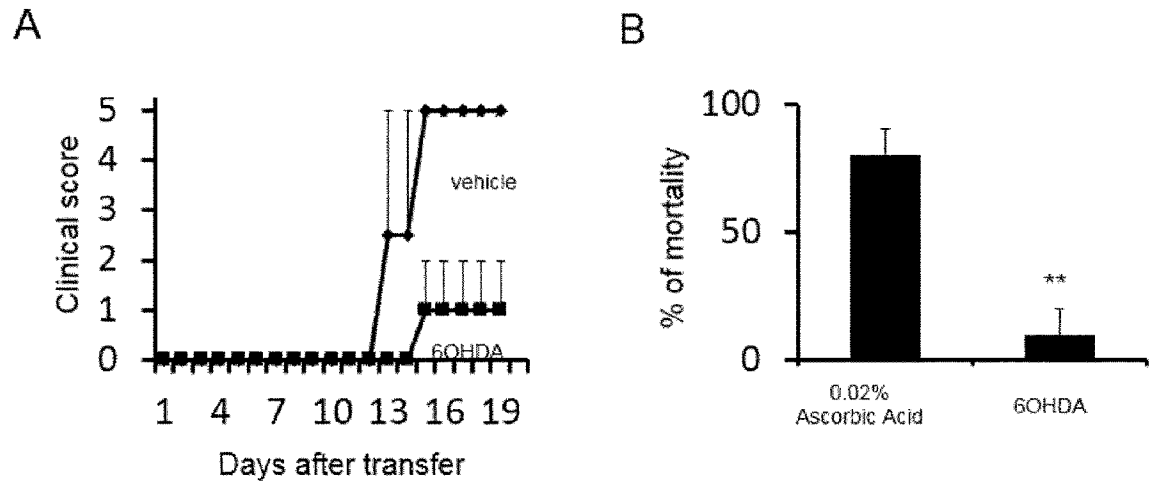
[図21]


TH
p-CREB
TH+p-CREB+Nuclei
Vehicle
6OHDA

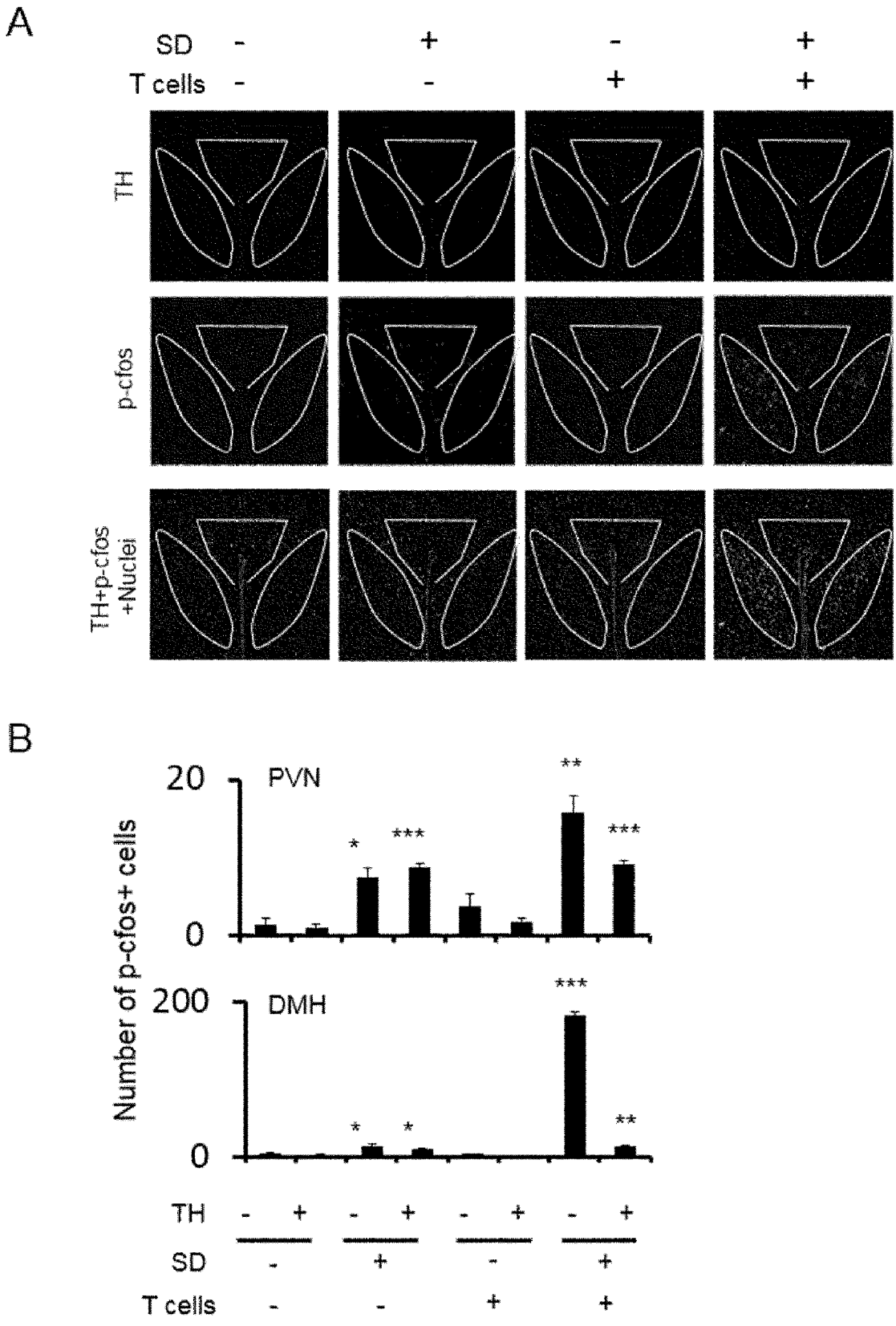
[図22]


A
CD4
MHC Ⅱ
CD4+MHC Ⅱ+Nuclei
Vehicle
6OHDA
B
CD11b+MHC2high
CD4
Cell numbers
100
50
0
**
*
0.02%
Ascorbic Acid
6OHDA

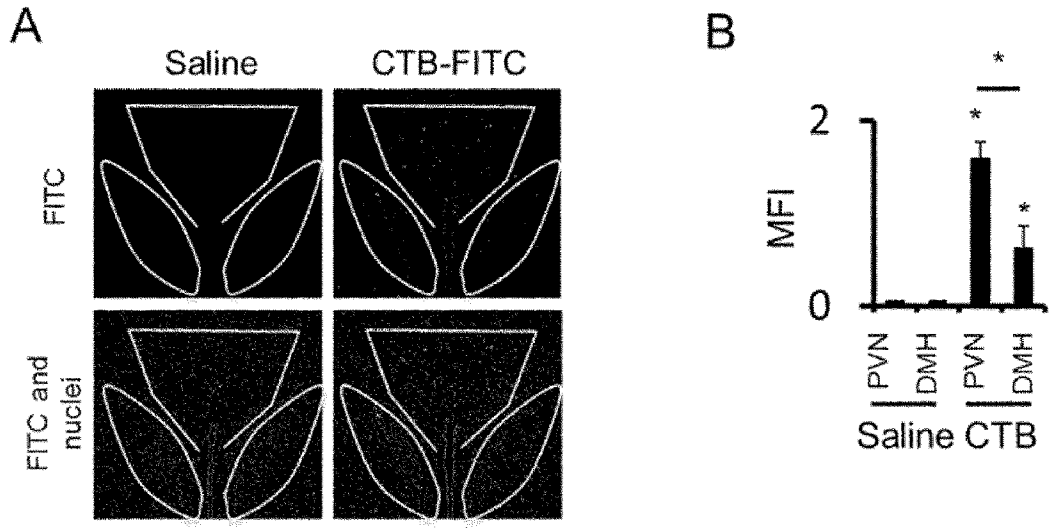
[図23]


A
Clinical score
5
4
3
2
1
0
vehicle
6OHDA
1 4 7 10 13 16 19
Days after transfer
B
% of mortality
100
50
0
**
0.02%
Ascorbic Acid
6OHDA

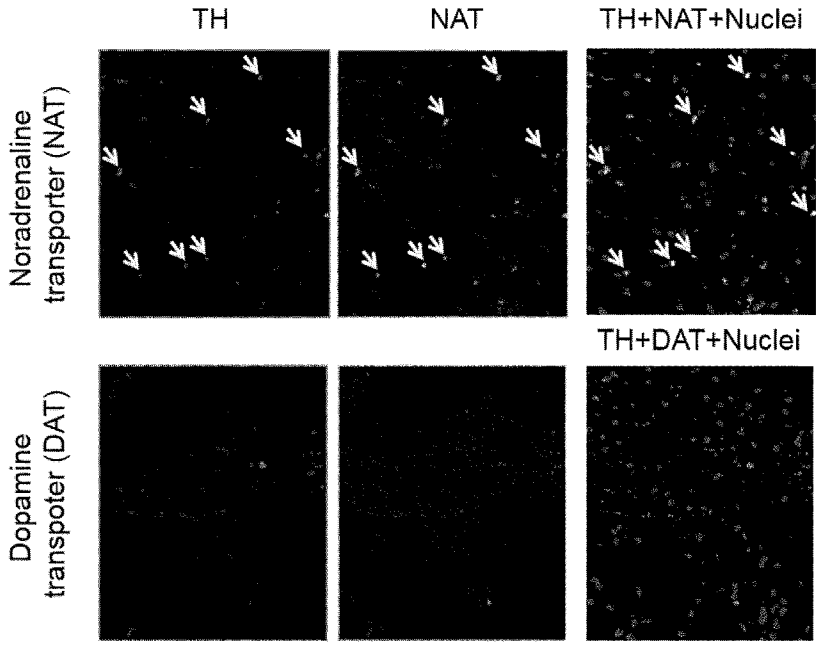
[図24]


A
SD - + - +
T cells - - + +
TH
p-cfos
TH+p-cfos +Nuclei
B
Number of p-cfos+ cells
PVN
DMH
20
0
200
0
TH - + - + - + - +
SD - + - +
T cells - - + +

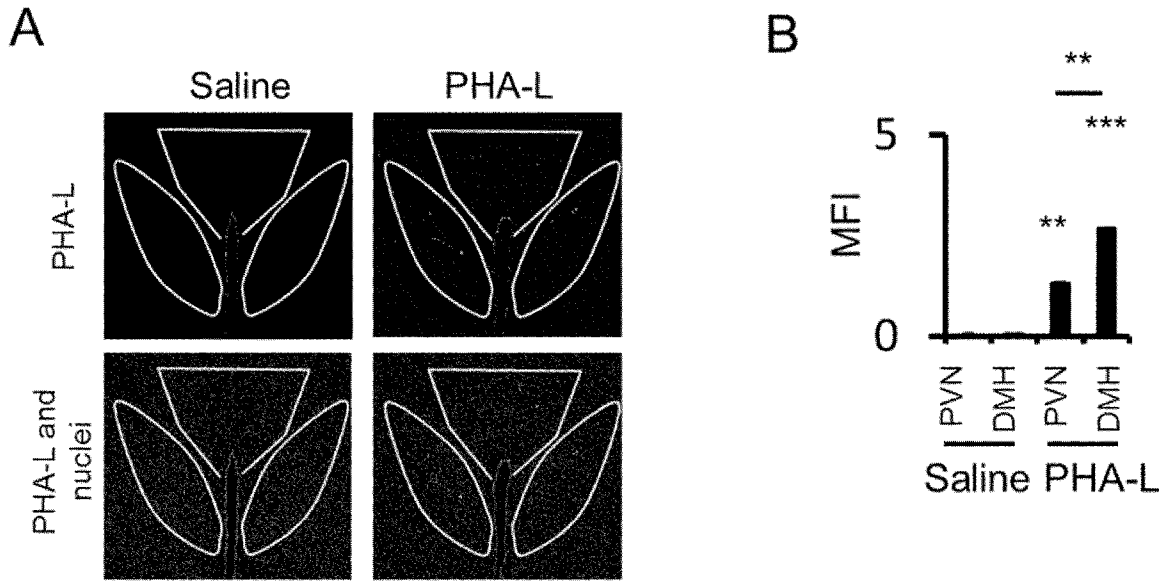
[図25]


A
Saline
CTB-FITC
FITC
FITC and nuclei
B
MFI
2
0
*
*
*
PVN
DMH
PVN
DMH
Saline CTB

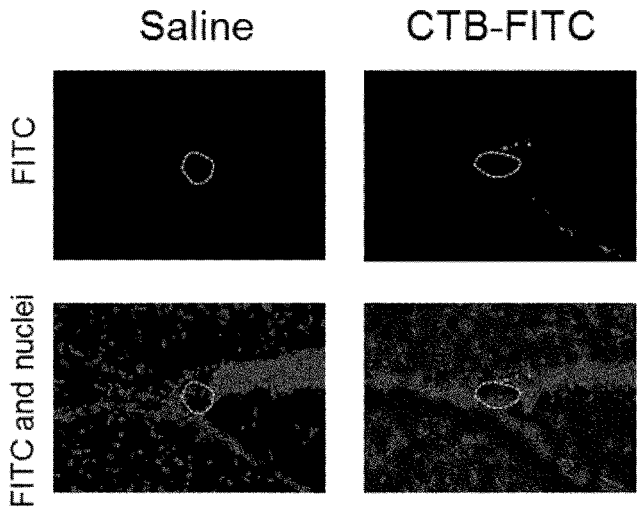
[図26]


TH
NAT
TH+NAT+Nuclei
Noradrenaline transporter (NAT)
TH+DAT+Nuclei
Dopamine transpoter (DAT)

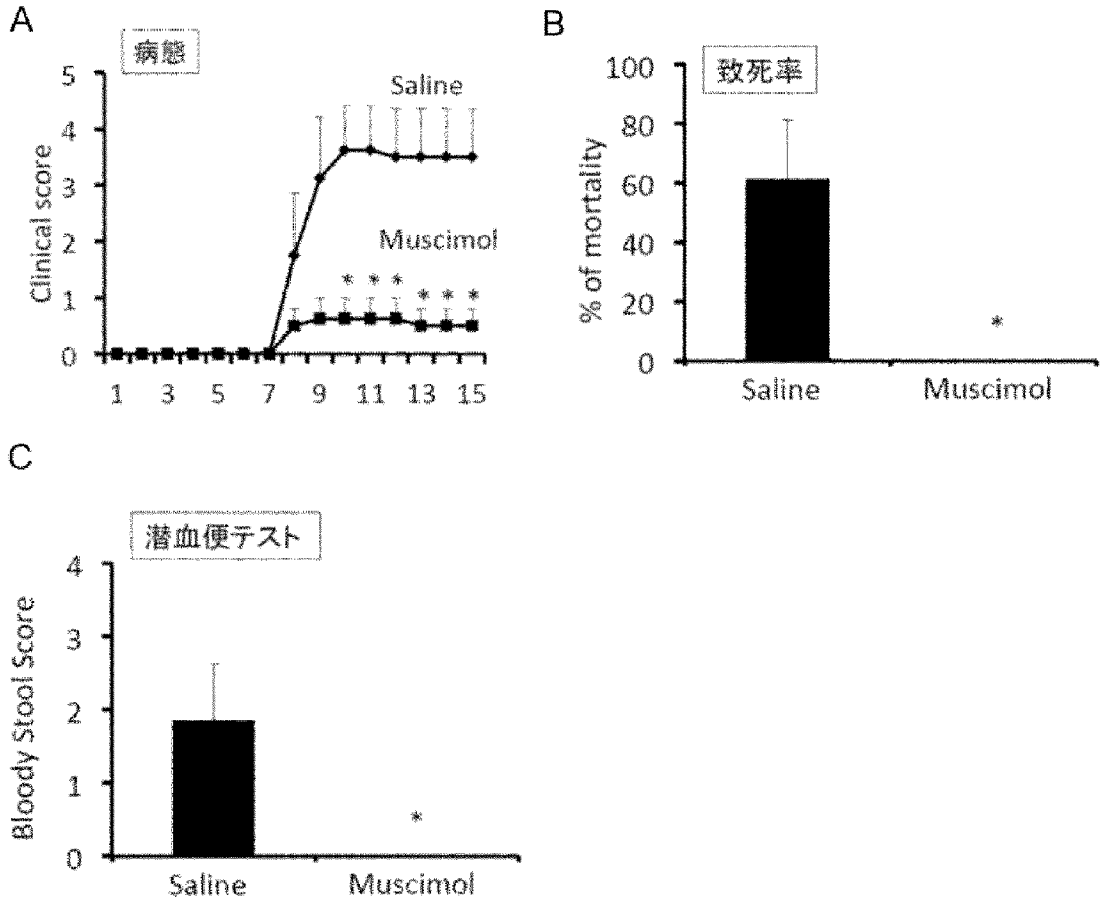
[図27]


A
Saline
PHA-L
PHA-L
PHA-L and nuclei
B
**
***
**
5
MFI
0
PVN
DMH
PVN
DMH
Saline PHA-L

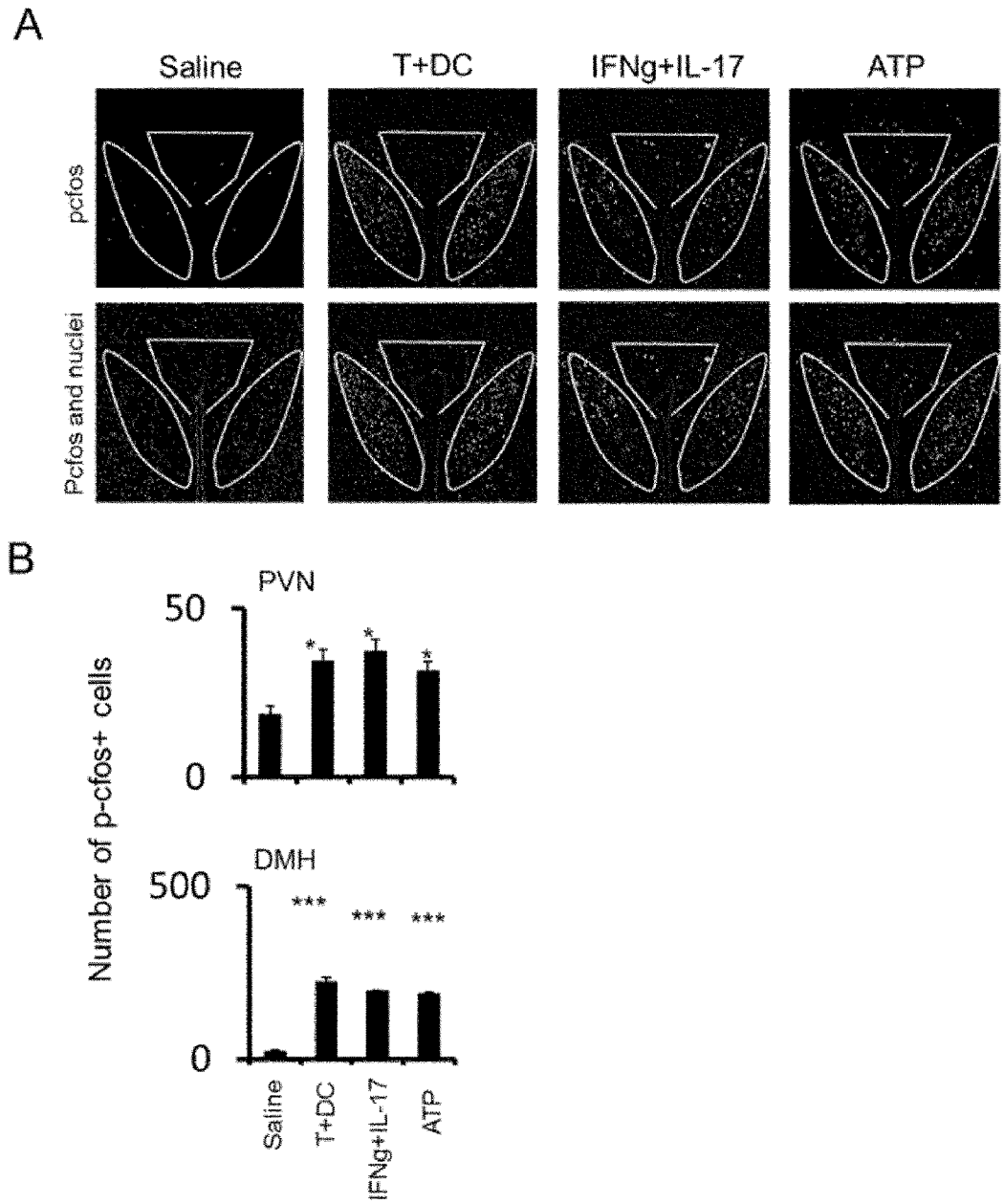
[図28]


Saline
CTB-FITC
FITC
FITC and nuclei

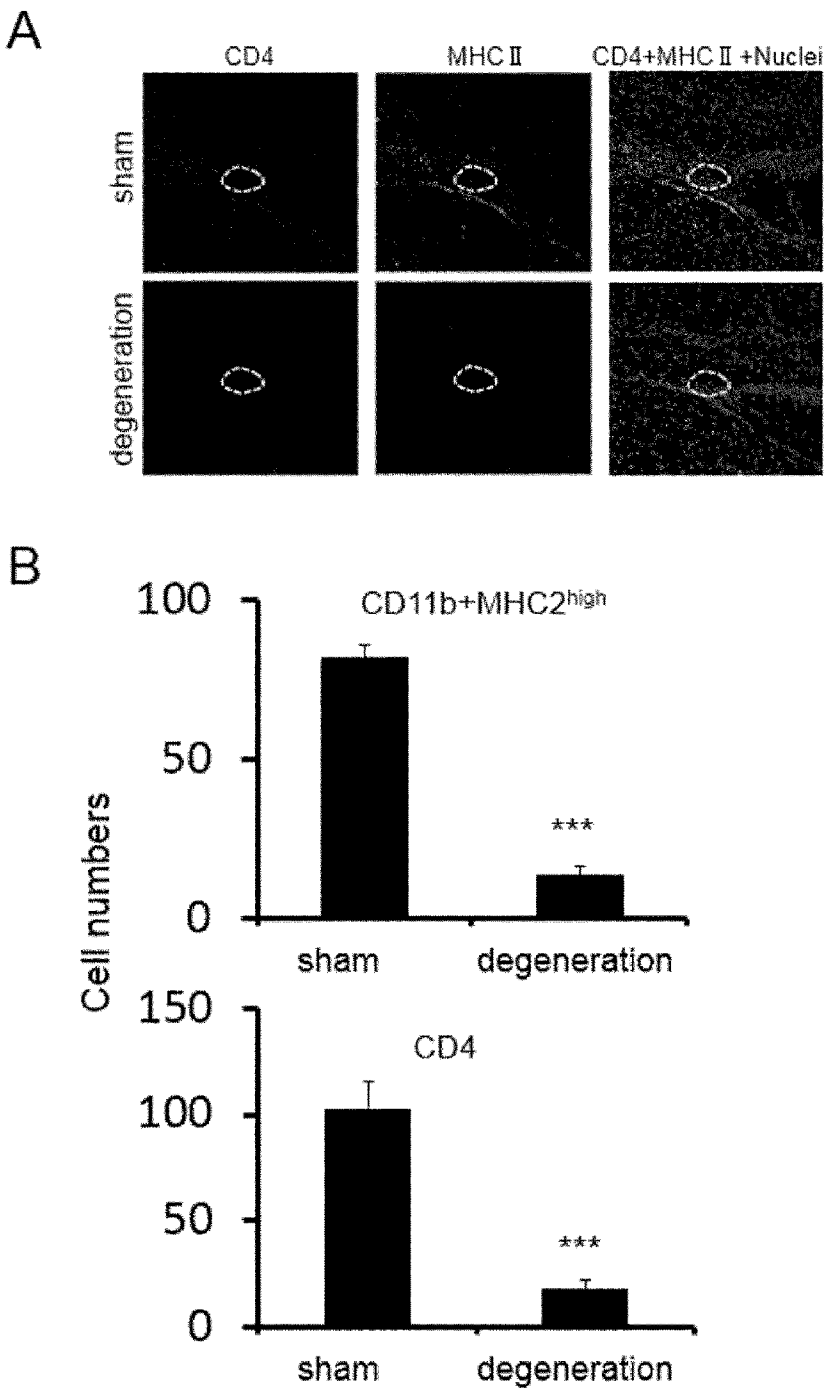
[図29]


A
病態
Saline
Muscimol
Clinical score
0
1
2
3
4
5
1
3
5
7
9
11
13
15
B
致死率
% of mortality
0
20
40
60
80
100
Saline
Muscimol
C
潜血便テスト
Bloody Stool Score
0
1
2
3
4
Saline
Muscimol

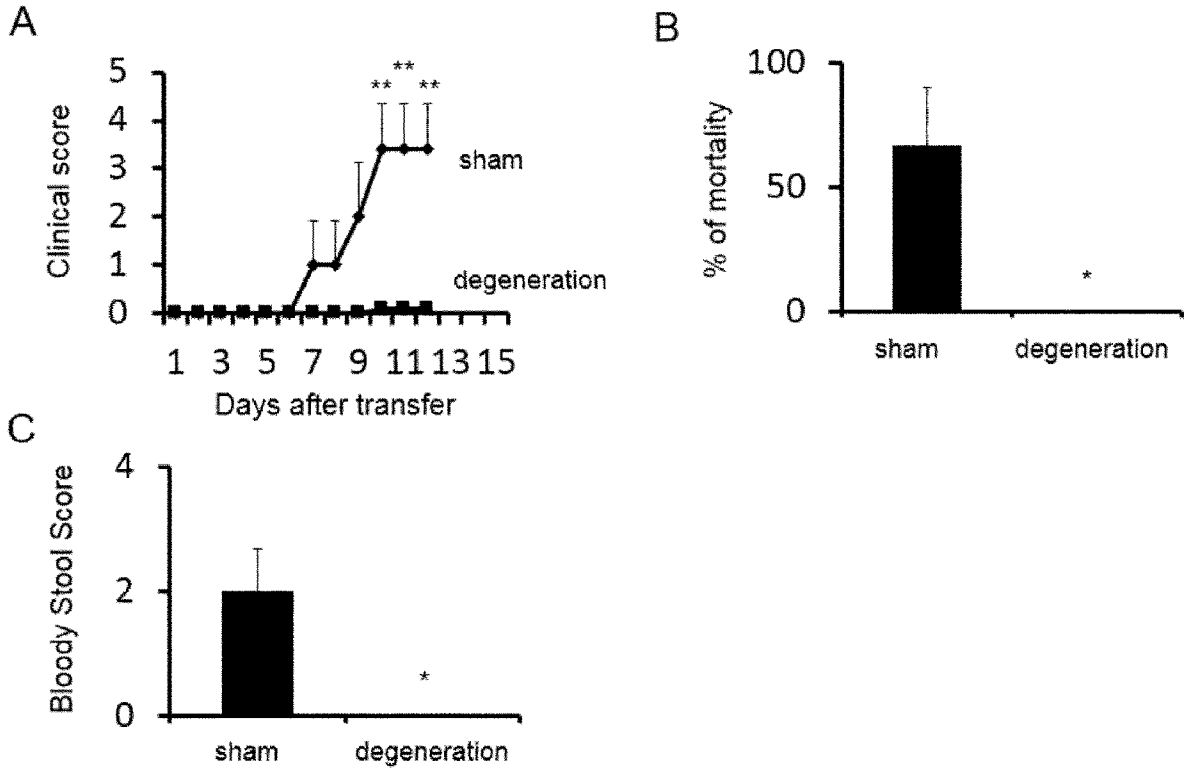
[図30]


A
Saline
T+DC
IFNg+IL-17
ATP
pcfos
Pcfos and nuclei
B
PVN
50
0
DMH
500
0
Number of p-cfos+ cells
*
***
Saline
T+DC
IFNg+IL-17
ATP

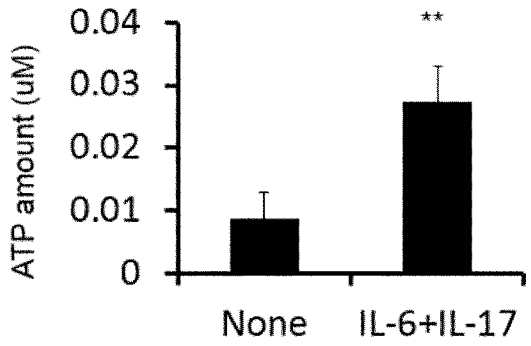
[図31]


A
CD4
MHC Ⅱ
CD4+MHC Ⅱ +Nuclei
sham
degeneration
B
CD11b+MHC2high
Cell numbers
100
50
0
***
sham
degeneration
CD4
150
100
50
0
***
sham
degeneration

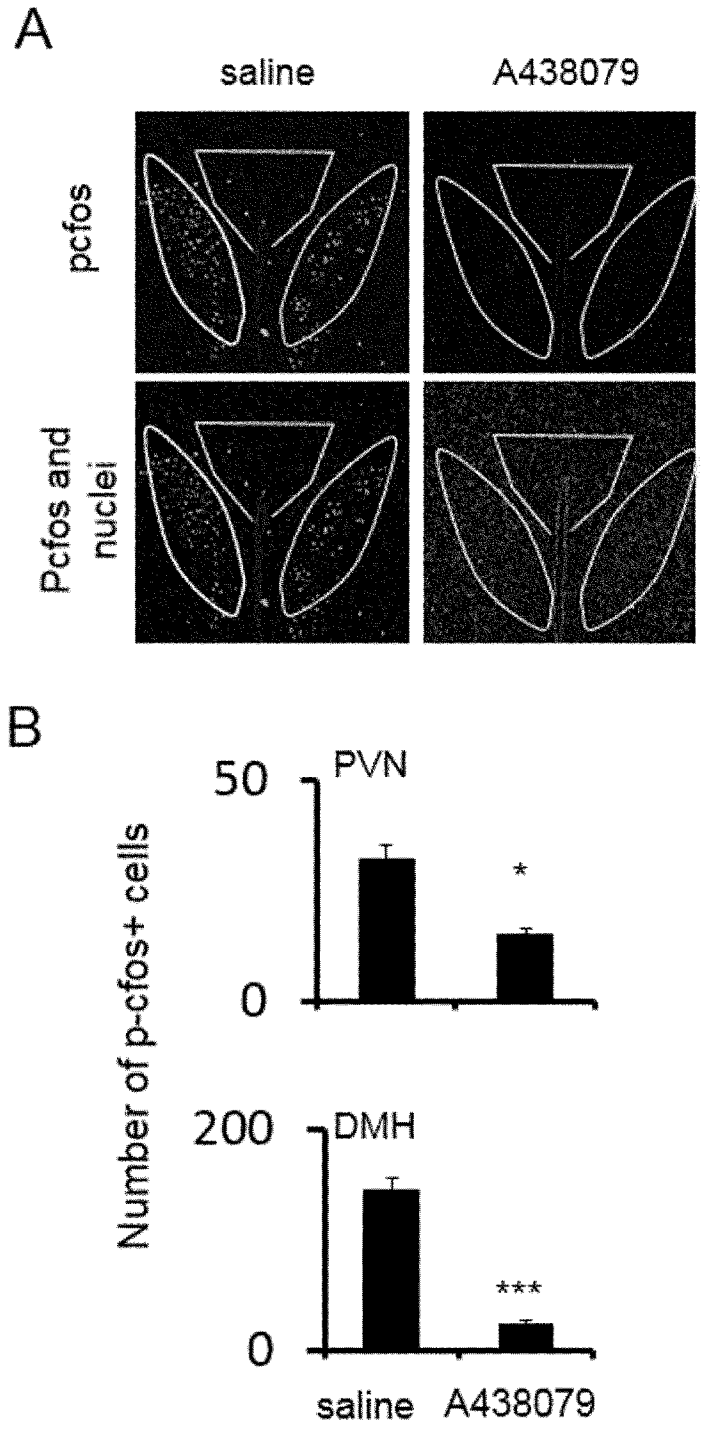
[図32]


A
Clinical score
5
4
3
2
1
0
**
**
**
sham
degeneration
1 3 5 7 9 11 13 15
Days after transfer
B
% of mortality
100
50
0
*
sham
degeneration
C
Bloody Stool Score
4
2
0
*
sham
degeneration

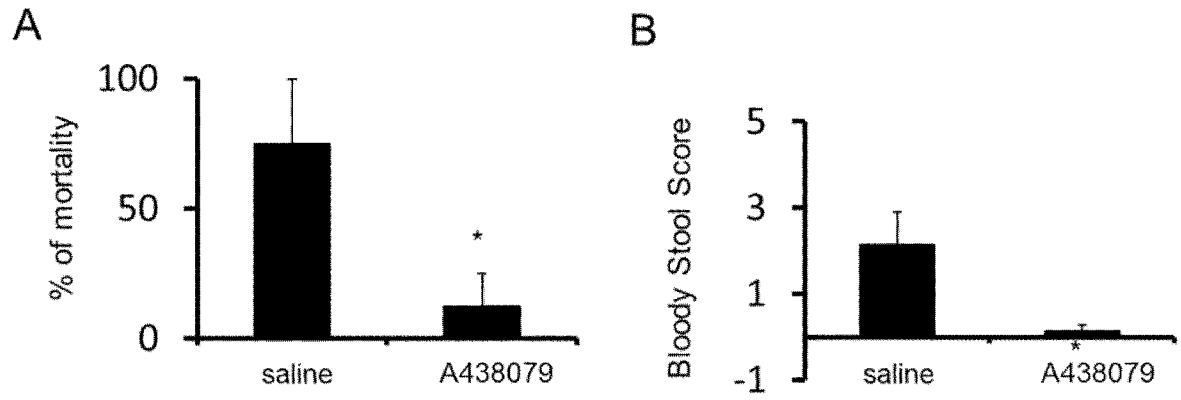
[図33]


ATP amount (uM)
0.04
0.03
0.02
0.01
0
**
None
IL-6+IL-17

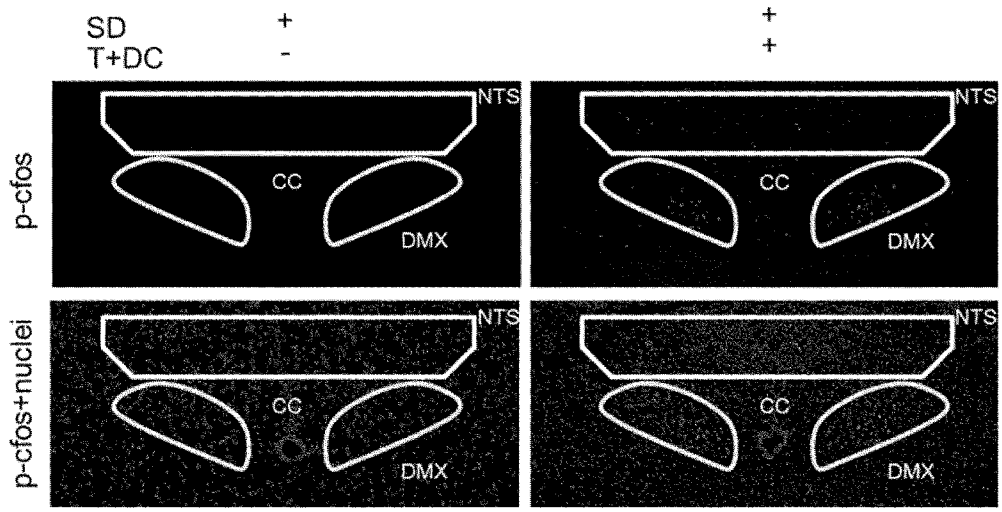
[図34]


A
saline
A438079
pcfos
Pcfos and nuclei
B
Number of p-cfos+ cells
50
PVN
*
0
200
DMH
***
0
saline
A438079

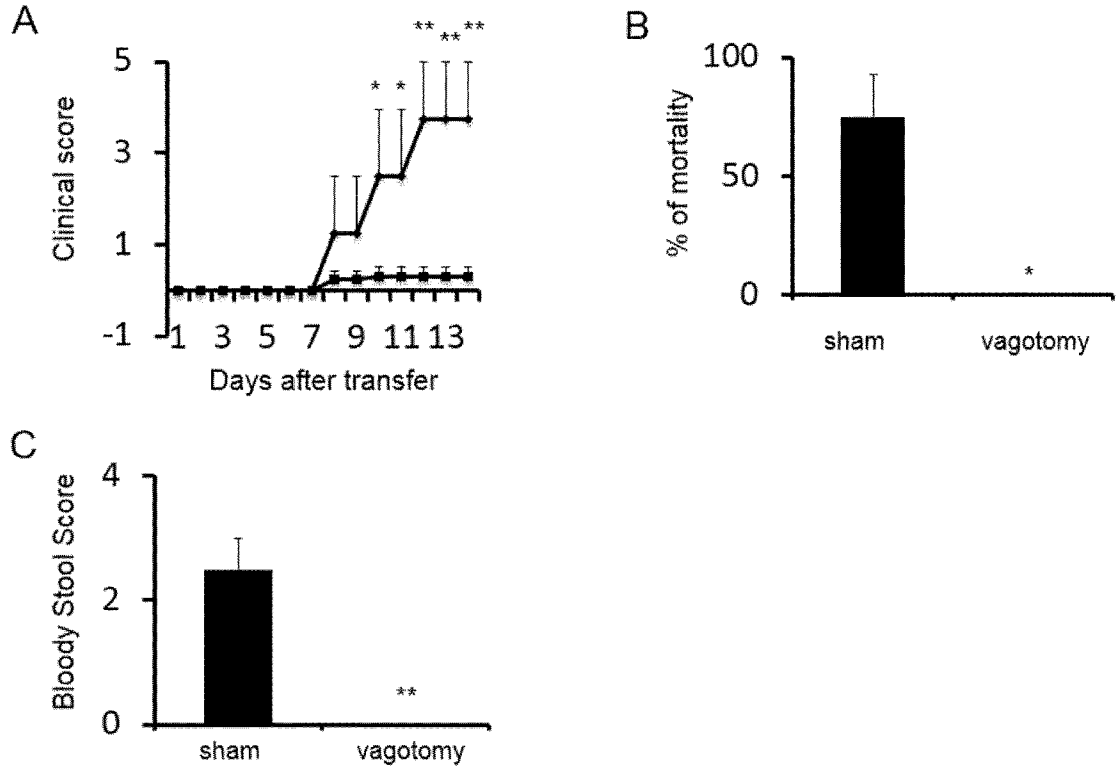
[図35]


A
100
50
0
% of mortality
*
saline
A438079
B
5
3
1
-1
Bloody Stool Score
*
saline
A438079

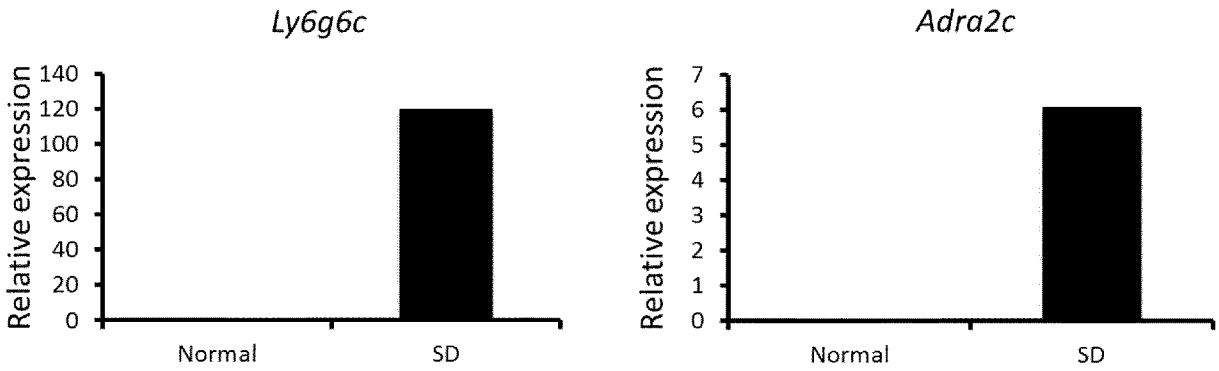
[図36]


SD
T+DC
+
-
+
+
p-cfos
p-cfos+nuclei
NTS
CC
DMX

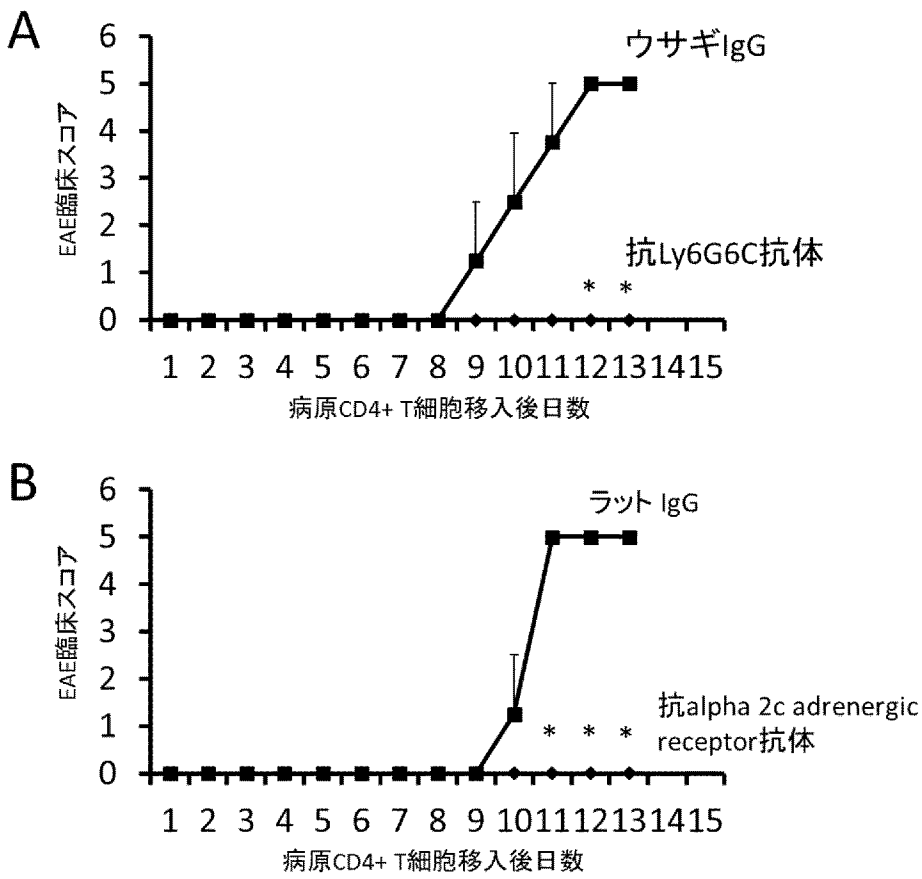
[図37]


A
5
3
1
-1
Clinical score
** ** **
* *
1 3 5 7 9 11 13
Days after transfer
B
100
50
0
% of mortality
*
sham
vagotomy
C
4
2
0
Bloody Stool Score
**
sham
vagotomy

[図38]


Ly6g6c
Relative expression
140
120
100
80
60
40
20
0
Normal
SD
Adra2c
Relative expression
7
6
5
4
3
2
1
0
Normal
SD

[図39]


A
EAE臨床スコア
ウサギIgG
抗Ly6G6C抗体
* *
病原CD4+ T細胞移入後日数
B
EAE臨床スコア
ラット IgG
抗alpha 2c adrenergic receptor抗体
* * *
病原CD4+ T細胞移入後日数

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/007901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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)
Int.Cl. A01K67/027, A61K45/00, A61P1/04, A61P9/04, A61P25/00, G01N33/15, G01N33/50

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), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	ARIMA, T., et al., "A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model", eLife (2015) vol. 4, e08733, pp. 1-23 ISSN:2050-084X, page 1, abstract, page 3, paragraphs [0003]-[0005], fig. 1	5 8-11, 14 1-4, 6-7, 12-13

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 May 2018 (21.05.2018)	05 June 2018 (05.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/007901

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 A	JP 2009-526786 A (H. LUNDBECK A/S) 23 July 2009, claims, paragraphs [0020]-[0021] & US 2007/0203216 A1, claims, paragraphs [0018]-[0019] & EP 1986627 A1 & WO 2007/093183 A2	9, 14 9, 14 1-8, 10-13
X A	JP 2013-503192 A (VLST CORPORATION) 31 January 2013, claims, paragraphs [0012], [0186] & US 2011/0059107 A1, claims, paragraphs [0017], [0230] & EP 2470671 A1 & WO 2011/025962 A1	8, 14 1-7, 9-13
Y A	BENAMAR, K., et al., "Elevated level of the proinflammatory chemokine, RANTES/CCL5, in the periaqueductal grey causes hyperalgesia in rats", European Journal of Pharmacology (2008) vol. 592, pp. 93-95 ISSN:0014-2999, page 93, abstract, page 94, fig. 2	8, 14 1-7, 9-13
Y A	JP 2011-502149 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 20 January 2011, paragraph [0008] & US 2011/0003822 A1, paragraph [0008] & EP 2215048 A1 & WO 2009/058299 A1	10, 14 1-9, 11-13
Y A	JP 2012-107021 A (TAKEDA PHARMACEUTICALS USA INC.) 07 June 2012, claims & US 2004/0121004 A1, claims & EP 1594499 A1 & WO 2004/060372 A1	11, 14 1-10, 12-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/007901

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

(i) Number of inventions included in the claims
8

(ii) Claim numbers of claims classified into respective inventions
Invention 1: Claims 1-6
Invention 2: Claim 7
Invention 3: Claim 8 and (parts of) claim 14
Invention 4: Claim 9 and (parts of) claim 14
Invention 5: Claim 10 and (parts of) claim 14
Invention 6: Claim 11 and (parts of) claim 14
Invention 7: Claim 12 and (parts of) claim 14
Invention 8: Claim 13 and (parts of) claim 14

(iii) Reason for being judged not to comply with the requirements of unity of invention
(Invention 1) Claims 1-6

The invention in claims 1-4 have the special technical feature of a "method of producing a disease model non-human animal having an inflammation in a cerebral blood vessel, the method comprising the step of causing antigen-reactive CD4 positive T cells derived from central nervous tissue to be present in a body of a non-human animal in a stressed state", and thus are classified as invention 1. The invention in claims 5-6 is the same or closely related to the invention in claim 1 in terms of the technical significance of the invention over the prior art, and has a corresponding special technical feature with the invention in claim 1, and thus is classified as invention 1.

(Invention 2) Claim 7

The invention in claim 7 has said special technical feature of the invention in claim 1 or a corresponding special technical feature with the invention in claim 1, and thus is classified as invention 2.

(Inventions 3-8) Claims 8-14

The invention in claims 8-13, and parts referring to each of claims 8-13 in claim 14 do not have the special technical features of the inventions in claims 1-7 or corresponding special technical features, and do not share special technical features with each other or have corresponding special technical features, and thus are classified as inventions 3-8, respectively.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００７９０１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A01K67/027(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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.　A01K67/027, A61K45/00, A61P1/04, A61P9/04, A61P25/00, G01N33/15, G01N33/50

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	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (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 Y A	ARIMA T., et al., “A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model”, eLife (2015) Vol.4, e08733, pp.1-23 ISSN:2050-084X 第１頁要約，第３頁第３－５段落，図１	5 8-11,14 1-4,6-7,12-13

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「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	国際調査報告の発送日
２１．０５．２０１８	０５．０６．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　５８０２
藤澤　雅樹
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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 Y A	JP 2009-526786 A (ハー・ルンドベック・アクチエゼルスカベット) 2009.07.23, 特許請求の範囲,【００２０】－【００２１】 & US 2007/0203216 A1, 特許請求の範囲, [0018-[0019] & EP 1986627 A1 & WO 2007/093183 A2	9,14 9,14 1-8,10-13
X A	JP 2013-503192 A (ブイエルエスティー、コーポレイション) 2013.01.31, 特許請求の範囲,【００１２】,【０１８６】 & US 2011/0059107 A1, 特許請求の範囲, [0017], [0230] & EP 2470671 A1 & WO 2011/025962 A1	8,14 1-7,9-13
Y A	BENAMAR K., et al., “Elevated level of the proinflammatory chemokine, RANTES/CCL5, in the periaqueductal grey causes hyperalgesia in rats”, European Journal of Pharmacology (2008) Vol.592, pp.93-95 ISSN:0014-2999 第９３頁要約, 第９４頁図２	8,14 1-7,9-13
Y A	JP 2011-502149 A (メルク・シャープ・エンド・ドーム・コーポレイション) 2011.01.20, 【０００８】 & US 2011/0003822 A1, [0008] & EP 2215048 A1 & WO 2009/058299 A1	10,14 1-9,11-13
Y A	JP 2012-107021 A (タケダ　ファーマシューティカルズ　ユー．エス．エー．　インコーポレイティド) 2012.06.07, 特許請求の範囲 & US 2004/0121004 A1, 特許請求の範囲 & EP 1594499 A1 & WO 2004/060372 A1	11,14 1-10,12-13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００７９０１

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

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

１．☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(i) 請求の範囲に含まれる発明の数
８

(ii) 各発明に区分した請求項の番号
発明１：請求項１－６
発明２：請求項７
発明３：請求項８、１４（部分）
発明４：請求項９、１４（部分）
発明５：請求項１０、１４（部分）
発明６：請求項１１、１４（部分）
発明７：請求項１２、１４（部分）
発明８：請求項１３、１４（部分）

(iii) 発明の単一性を満たさないと判断した理由
（発明１）請求項１－６
請求項１－４に係る発明は、「ストレス状態にある非ヒト動物の体内に中枢神経組織由来抗原反応性のＣＤ４陽性Ｔ細胞を存在させる工程を含む、脳内血管に炎症を有する疾患モデル非ヒト動物の製造方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明１に区分する。請求項５－６に係る発明は、請求項１に係る発明と先行技術に対して発明が有する技術上の意義が共通又は密接に関連しており、請求項１に係る発明と対応する特別な技術的特徴を有するので、発明１に区分する。

（発明２）請求項７
請求項７に係る発明は、請求項１に係る発明の上記特別な技術的特徴又は請求項１に係る発明と対応する特別な技術的特徴を有していないので、発明２に区分する。

（発明３－８）請求項８－１４
請求項８－１３に係る発明及び請求項１４に係る発明の請求項８－１３それぞれを引用する部分は、請求項１－７に係る発明の特別な技術的特徴又は対応する特別な技術的特徴を有しておらず、互い特別な技術的特徴又は対応する特別な技術的特徴も有していないので、それぞれ、発明３－８に区分する。