

(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  
2014年6月26日(26.06.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/098249 A1

- (51) 国際特許分類:  
*A61K 31/737* (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)  
*A61K 45/00* (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)  
*A61P 1/16* (2006.01) *A61P 27/04* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)  
*A61P 11/00* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)  
*A61P 17/02* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/084523  
(22) 国際出願日: 2013年12月24日(24.12.2013)  
(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 2012-280022 2012年12月21日(21.12.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).

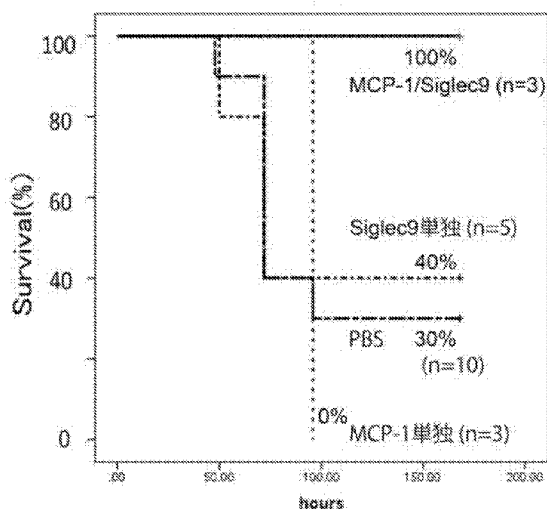
- (72) 発明者: 山本 朗仁 (YAMAMOTO Akihito); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 上田 実 (UEDA Minoru); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 松原 弘記 (MATSUBARA Kohki); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 錫村 明生 (SUZUMURA Akio); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 古川 鋼一 (FURUKAWA Koichi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 松下 嘉泰 (MATSUSHITA Yoshihiro); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 若山 博隆 (WAKAYAMA Hiroataka); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 高橋 伸典 (TAKAHASHI Nobunori); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 恒川 新 (TSUNEKAWA Shin); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 泉本 貴子 (IZUMOTO Takako); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION HAVING TISSUE REPAIRING ACTIVITY AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 組織修復活性組成物及びその利用

[図1]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a composition having a tissue repairing activity that is capable of promoting a reaction relating to tissue repairing. Disclosed is a composition having an activity of repairing a tissue, said composition comprising at least one component selected from the group consisting of: a first component that is a protein having a monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) activity; a second component that is a protein having the extracellular domain activity of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin-9 (Siglec-9); and a third component that is chondroitin sulfate or chondroitin sulfate proteoglycan.

(57) 要約: 本開示は、組織修復にかかわる反応を促進可能な組織修復活性組成物を提供することを目的とする。本開示は、この目的のため、組織の修復活性組成物に、単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分及びコンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンのいずれか1種である第3の成分からなる群から選択される

少なくとも1種を含めるようにする。



- (74) 代理人: 特許業務法人 快友国際特許事務所 (KAI-U PATENT LAW FIRM); 〒4516009 愛知県名古屋市西区牛島町6番1号 名古屋ルーセントタワー9階 Aichi (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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, 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))

## 明 細 書

発明の名称：組織修復活性組成物及びその利用

### 技術分野

[0001] 本明細書は、炎症性疾患における組織修復活性組成物及びその利用に関する。

### 背景技術

[0002] 炎症反応は、異物、病原体の排除、組織の防御や修復にかかわる一連の過程である。炎症反応のプロセスにおいては、同時に非自己を積極的に排除する免疫反応も並行して進行する。例えば、中枢神経系を除く組織においては、マクロファージが、生体内に侵入した細菌、ウイルス、又は死んだ細胞を捕食し消化する。また抗原提示を行い、B細胞による抗体の作成に貢献する。また、中枢神経系では、ミクログリアグリアが免疫担当細胞であり、マクロファージ類似の作用を担っているとされている。

[0003] ミクログリアやマクロファージには、組織破壊型と組織修復型の2種類があることが知られている（非特許文献1、非特許文献2）。炎症反応の病原体の排除や組織の防御のプロセスにおいては、組織破壊型のミクログリアやマクロファージが集積する。しかしながら、過剰な集積が生じると自己組織の損傷を生じさせたり、痛みを増悪させたりする。一方、組織修復プロセスでは、組織修復型のミクログリアやマクロファージが組織修復を促進する。

[0004] 損傷部の治療を目的として、歯髄幹細胞などの幹細胞の培養上清を含む組成物が有効であることが記載されている（特許文献1）。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第WO2011/118795号

#### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：David, S., & Kroner, A, Nature Reviews Neuroscience, 12 (7), 388-399

非特許文献2 : Popovich, P. G., & Longbrake, E. E., Nature Reviews Neuroscience, 9(6), 481-493.

## 発明の概要

[0007] 炎症反応が生じている組織においては、組織破壊型ミクログリアやマクロファージにおいて組織修復型のミクログリアやマクロファージの出現を積極的に促進することが、炎症の治療に有効であると考えられる。あるいは、組織修復型ミクログリアやマクロファージによって亢進される抗炎症性サイトカインが、炎症反応が生じている組織で亢進されることが有効であると考えられる。

[0008] しかしながら、現状において、組織修復型のミクログリアやマクロファージを誘導又は増殖を促進する因子や手法は未だ提供されていない。また、抗炎症性サイトカインを亢進する因子や手法も未だ提供されていない。

[0009] 本明細書は、炎症反応が生じている組織を含む、損傷を受けているあるいは受ける可能性のある組織においてその修復にかかわる反応を促進可能な組織修復剤及びその利用を提供する。また、本開示によれば、同時に以下の組織修復剤及びその利用も提供される。

[0010] 本発明者らは、歯髄幹細胞などの幹細胞の培養上清に含まれる種々の成分について検討していたところ、特定の3種成分が炎症組織において組織修復型のミクログリア/マクロファージを誘導し、あるいは抗炎症性サイトカインを亢進するという知見を得た。また、こうした成分のうち少なくとも一部を炎症反応が生じている組織に適用したところ、効果的に治癒するという知見を得た。本明細書は、これらの知見に基づき、以下の手段を提供する。

[0011] (1) 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質 (以下、ED-Siglec-9ともいう。) である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも

も一種である第3の成分、

からなる群から選択される少なくとも1種の成分を含む、組織修復活性組成物。

(2) 前記第1の成分と、前記第2の成分と、を含む(1)及び(2)に記載の組成物。

(3) 前記第1の成分は、配列番号2で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する(1)又は(2)に記載の組成物。

(4) 前記第2の成分は、配列番号4で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する、(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) さらに、コンドロイチン硫酸又はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを含む、(1)～(4)のいずれかに記載の組成物。

(6) 前記第1の成分及び前記第2の成分を、以下の(a)又は(b)に記載の活性を呈するのに有効量含有する、(1)～(5)のいずれかに記載の組成物。

(a) 炎症組織における組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導活性

(b) 抗炎症性サイトカインの産生促進活性

(7) (1)～(6)のいずれかに記載の組成物である、抗炎症剤組成物。

(8) 脊髄損傷、脳梗塞、新生児低酸素脳症、アルツハイマー症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症及びパーキンソン病からなる群から選択される中枢神経系疾患の治療用である、(7)に記載の組成物。

(9) 劇症肝炎、急性肝炎、慢性肝炎、急性および慢性間質性肺炎、I型およびII型糖尿病、シェーグレン病、ドライアイ、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚創傷治癒、心筋梗塞、骨髄移植に伴う免疫拒絶からなる群から選択される非中枢神経系疾患の治療用である、(7)に記載の組成物。

(10) 単球走化性促進因子-1(MCP-1)活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分、

からなる群から選択される少なくとも1種の成分を含む、組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導剤。

(11) 単球走化性促進因子-1 (M C P - 1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分、

からなる群から選択される少なくとも1種を含む、抗炎症性サイトカインの産生促進剤。

(12) 生体外で、単球走化性促進因子-1 (M C P - 1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分、の存在下で、ミクログリア又はマクロファージを培養する工程を備える、組織修復型ミクログリア又はマクロファージの生産方法。

(13) 単球走化性促進因子-1 (M C P - 1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸又はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を備える、ミクログリア及

び／又はマクロファージ用の試薬キット。

(14) 前記第1の成分及び前記第2の成分を含む、(13)に記載の試薬キット。

(15) 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分、

からなる群から選択される少なくとも1種を損傷組織又は炎症組織に送達して組織修復を促進する方法。

[0012] (16) 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有する第1の成分

、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有する第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、組織修復剤。

(17) 少なくとも前記第1の成分及び前記第2の成分のいずれか又は双方を含む、(16)に記載の組織修復剤。

(18) 前記第1の成分と前記第2の成分とを含む、(16)又は(17)に記載の組織修復剤。

(19) 前記第1の成分は、配列番号2で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する、(16)～(18)のいずれかに記載の組織修復剤。

(20) 前記第2の成分は、配列番号4で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する、(16)～(19)のいずれかに記載の組織修復剤。

(21) 前記第3の成分を含む、(16)～(20)のいずれかに記載の組織修復剤。

(22) 前記第1の成分、前記第2の成分及び第3の成分からなる群から選択される1種以上の成分を、以下の(a)又は(b)に記載の活性を呈するのに有効量含有する、(16)～(21)のいずれかに記載の組織修復剤。

(a) 炎症組織における組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導活性

(b) 抗炎症性サイトカインの産生促進活性

(22) (16)～(21)のいずれかに記載の組織修復剤を有効成分とする、抗炎症剤。

(23) (16)～(21)のいずれかに記載の組織修復剤を有効成分とする、脊髄損傷、脳梗塞、新生児低酸素脳症、アルツハイマー症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症及びパーキンソン病からなる群から選択される中枢神経系疾患の予防又は治療剤。

(24) (16)～(21)のいずれかに記載の組織修復剤を有効成分とする、劇症肝炎、急性肝炎、慢性肝炎、急性および慢性間質性肺炎、I型およびII型糖尿病、シェーグレン病、ドライアイ、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚創傷治癒、心筋梗塞、骨髄移植に伴う免疫拒絶からなる群から選択される非中枢神経系疾患の予防又は治療剤。

(25) 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導剤。

(26) 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、抗炎症性サイトカインの産生促進剤。

(27) 生体外で、単球走化性促進因子-1 (M C P - 1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種の存在下で、ミクログリア又はマクロファージを培養する工程、を備える、組織修復型ミクログリア又はマクロファージの生産方法。

(28) 単球走化性促進因子-1 (M C P - 1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、ミクログリア/マクロファージ用の試薬キット。

(29) 前記第1の成分と前記第2の成分とを含む、(28)に記載の試薬キット。

(30) 単球走化性促進因子-1 (M C P - 1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を損傷組

織又は炎症組織に送達して組織修復を促進する方法。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]劇症肝炎モデルラットにおける生存率を示す図である。

[図2]劇症肝炎モデルラットにおける血液検査による肝障害の評価結果を示す図である。

[図3]劇症肝炎モデルラットにおける肝細胞死（HE染色及びTUNEL染色）評価結果を示す図A及びBである。

[図4]劇症肝炎モデルラットにおける炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6）死細胞のセンサーであるマンノースレセプターCD206、抗炎症性サイトカイン（IL-10、TGF- $\beta$ ）の遺伝子発現の解析結果を示す図である。

[図5]劇症肝炎モデルラットにおけるマクロファージ染色結果を示す図である。

[図6]MCP-1、ED-Siglec-9及びCSPGの組織修復型ミクログリアの誘導に対する相乗効果を示す図a～fである。

[図7]MCP-1、ED-Siglec-9及びCSPGの組織修復型ミクログリアの誘導に対する相乗効果を示す図a～cである、aの上段写真は、GFAP及びH-E染色の結果を示し、下段は、SCI後8週での組織腔面積の定量結果を示し、bは、5-HT陽性神経線維の免疫組織学的画像を示し、cは、組織腔の中央から5mm頭部側及び5mm尾側における5-HT陽性神経線維の定量結果を示す。

[図8]脊髄損傷部位におけるサイトカインと細胞表面マーカーの遺伝子発現を、定量的RT-PCR分析により評価した結果を示す図である。

[図9]脊髄損傷から72時間後の部位を取り囲むミクログリア／マクロファージの典型的画像と定量結果を示す図である。

[図10]脊髄挫傷後の後肢の機能回復の時間経過を示す図である。

[図11] (A) は、THP-1溶解物をED-Siglec-9、CCR2で免疫沈降し、抗CCR2抗体又はMAH-レクチンでイムノブロットした結

果を示す。(B)は、CSPG処理が、ミクログリアのCCR2発言を増大させることを示す。(C)は、ED-Siglec-9がミクログリアにおいてCCR2と物理的に相互作用することを示す。

[図12]MCP-1とED-Siglec-9の投与群と非投与(PBS投与)群に関し、生存率及び体重の変化を示す図である。

[図13]肺組織における構造変化と膠原線維の増殖をHE染色およびマッソントリクローム(MT)染色にて評価した結果を示す図である。

[図14]肝硬変モデルマウスにおける肝組織のHE染色結果を示す図である。

[図15]肝硬変モデルマウスにおける肺組織のシリウスレッド染色(赤染色:線維素の染色)結果を示す図である。

[図16]ED-Siglec-9/MCP-1投与後3日の肝臓組織における炎症性サイトカインなどの遺伝子発現を定量的PCR法による解析結果を示す図である。

[図17]ED-Siglec-9/MCP-1投与後3日の肝臓組織における炎症性サイトカインなどの遺伝子発現を定量的PCR法による解析結果を示す図である。

[図18]ED-Siglec-9及びMCP-1投与群と非投与(PBS投与)群から採取した肝臓組織における $\alpha$ -SMAの染色結果を示す図である。

[図19]関節炎の重症度に関する関節炎スコアの評価基準を示す図である。

[図20]CIAマウスにおける、ED-Siglec-9投与による関節炎抑制効果の解析結果を示す図である。

[図21]ED-Siglec-9投与による長期間の関節炎抑制効果を示す図である。

[図22](A)は、ED-Siglec-9投与がLPS刺激によるTNF- $\alpha$ の発現亢進を抑制することを示し、(B)は、ED-Siglec-9投与がヒト関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞において、TNF- $\alpha$ 刺激によるMMP-3発現亢進に対して、明らかな抑制効果を示さないことを示す図である。

[図23] ED-Siglec-9/MCP-1をラット頭蓋骨欠損モデルに投与後、6週間での骨再生効果を示す図であり、H-E染色結果、マイクロCT結果及び新生骨%を示す。

[図24] MIN細胞を用いてインスリン分泌能の比較検討を行った結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0014] 本明細書は、単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分及びコンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む組織修復活性組成物 (組織修復剤、以下、単に本剤という。) 及びその利用に関する。本剤によれば、これらの成分中、少なくとも1種類を含むことにより、組織修復部位における残余の成分との相乗効果により、免疫担当細胞であるミクログリア/マクロファージを組織修復型へ分化ないし変換することを誘導することができる。このため、炎症反応部位に本剤を送達することにより、組織修復型ミクログリア/マクロファージを積極的に作用させて、炎症反応部位の組織の修復を活性化できる。

[0015] 第1の成分、第2の成分及び第3の成分は、炎症反応部位に存在しうる。いずれかが存在する場合には、当該炎症反応部位に存在する成分を本剤から排除することもできるし、当該成分を減量することができる。第1の成分は、炎症反応部位に存在することが知られている。また、第3の成分も炎症部位に普遍的に存在する成分である。なかでも、第1の成分は炎症反応部位、特に慢性の炎症反応部位に存在していることが知られている。また、第3の成分は、細胞膜ないし細胞間物質の構成成分である。第1の成分及び第3の成分が炎症反応部位に存在するときには、本剤は第2の成分を主体として又は第2の成分のみを含むことができる。

[0016] 本剤は、好ましくはこれらの成分のうち、2種以上を含む。2種以上の成

分を含むことで、より効果的にミクログリア／マクロファージの変換を促進できる。さらに、3種の成分を含むことがより好ましい。

[0017] 本剤は、前記3種の成分中、前記第1の成分と前記第2の成分とを含んでいることが好ましい。コンドロイチン硫酸やコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである第3の成分は炎症部位に常在する成分であり、第1の成分と第2の成分と協動して組織修復型ミクログリア／マクロファージファージを誘導する。したがって、本剤は、前記第1の成分と前記第2の成分とのみからなっているもよい。

[0018] 以下、本明細書の開示の各種実施形態について詳細に説明する。なお、本明細書において「修復」とは、標的組織における損傷によって失われた機能の一部又は全部が、損傷時における損傷部の機能と比較して維持又は拡張していることを意味している。機能が回復することのみならず、機能的な組織として再生することを包含している。機能が維持又は回復しているか否かの評価手法は損傷部位における損傷内容に応じて異なる。損傷部位の外観、対象となる機能の程度を評価するために通常用いられるアッセイが用いられる。

[0019] 本明細書において、「炎症」とは、異物の存在又は何らかの原因による組織損傷によって誘発される、身体を保護しようと働く哺乳動物における機構をいう。「炎症反応」とは、炎症において生じる一連のプロセスをいう。「炎症反応」には、炎症により誘発される組織破壊を含むことができる。「炎症性疾患」とは、身体組織の炎症により、又は炎症要素を有することにより特徴付けられる疾病、疾患又は症状を意味する。これらには局所的な炎症反応及び全身性の炎症反応が含まれる。

[0020] (修復活性組成物(組織修復剤))

本明細書に開示される組織修復剤が備えうるタンパク質である、第1の成分及び第2の成分は、動物などの生体から回収されるものであってもよいし、遺伝子工学的あるいは化学的に合成されたものであってもよい。第1の成分と第2の成分との総タンパク量が、修復剤全体のタンパク質成分として、

好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、一層好ましくは80%以上、より一層好ましくは90%以上、さらに一層好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、最も好ましくは99.5%以上であることが好ましい。本修復剤において第1の成分と第2の成分との総タンパク質量が組成物全体のタンパク質量において上記範囲を占めることで、より組織修復活性の高い修復剤となる。

[0021] (第1の成分)

第1の成分は、単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である。この種のタンパク質は、ヒトをはじめとして各種動物においてホモログが知られている。本剤においては、こうしたヒトなどの動物に由来する天然のMCP-1を天然の原料から回収したものであってもよいし、遺伝子工学的又は化学的に取得したものであってもよい。例えば、ヒトのMCP-1は配列番号2で表されるアミノ酸配列 (NCBIアクセッション番号: NP02973.1) を有している。また、ヒトのMCP-1は、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAによってコードされている。

[0022] 第1の成分は、MCP-1活性を有していれば足りる。すなわち、公知の天然のMCP-1他、新たに、本剤におけるMCP-1活性を有することが確認されたタンパク質であってもよい。また、天然のMCP-1に改変が加えられたものであって本剤におけるMCP-1活性を有しているものであってもよい。本剤におけるMCP-1活性としては、第2の成分及びコンドロイチン硫酸又はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンと協働してミクログリア/マクロファージを組織修復型に誘導できる活性、あるいは抗炎症性サイトカインの産生促進活性が挙げられる。こうした活性は、後述する実施例を参照すれば当業者であれば容易に評価することができる。

[0023] 例えば、ミクログリア/マクロファージを組織修復型に誘導できる活性は、マウス等からミクログリア/マクロファージを単離し培養し、この培養細胞に対して、確立した第2の成分及び必要に応じて後述するCS等の存在下

、可能性ある第1の成分を供給して、組織修復型ミクログリア／マクロファージの指標となるCD206、Arginase1のタンパク質あるいはmRNAの産生を確認することなどで評価することができる。

[0024] また、例えば、抗炎症性サイトカインの産生促進活性は、ミクログリア／マクロファージを組織修復型に誘導できる活性は、マウス等からミクログリア／マクロファージを単離し培養し、この培養細胞に対して、確立された第2の成分及び必要に応じてCS等の存在下に、可能性ある第1の成分を供給して、例えば、IL-10およびTGF- $\beta$ 1などの抗炎症性サイトカインの産生を確認することなどで評価することができる。

[0025] なお、改変MCP-1など第1の成分のMCP-1活性は、上記の活性を有していれば足り、その程度は問わない。好ましくは配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質のMCP-1活性の50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、より一層好ましくは80%以上、さらに一層好ましくは90%以上、最も好ましくは100%以上である。

[0026] 公知のMCP-1以外の第1の成分としては、データベース等において開示されるMCP-1の配列情報と一定の関係を有するタンパク質であってもよい。こうした一態様としては、開示されたアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、MCP-1活性を有するタンパク質が挙げられる。開示されるアミノ酸配列に対するアミノ酸の変異は、すなわち、欠失、置換若しくは付加は、いずれか1種類であってもよいし、2種類以上が組み合わせられていてもよい。また、これらの変異の総数は、特に限定されないが、好ましくは、1個以上10個以下程度である。より好ましくは、1個以上5個以下である。アミノ酸置換の例としては、保存的置換が好ましく、具体的には以下のグループ内での置換が挙げられる。(グリシン、アラニン) (バリン、イソロイシン、ロイシン) (アスパラギン酸、グルタミン酸) (アスパラギン、グルタミン) (セリン、トレオニン) (リジン、アルギニン) (フェニルアラニン、チロシン)

。

[0027] また、他の一態様としては、開示されるMCP-1のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつMCP-1活性を有するタンパク質が挙げられる。同一性は、より好ましくは65%以上であり、さらに好ましくは70%以上であり、さらにまた好ましくは80%以上であり、より好ましくは85%以上であり、さらに好ましくは90%以上であり、より一層好ましくは95%以上であり、さらに一層好ましくは98%以上であり、最も好ましくは99%以上である。

[0028] 本明細書において同一性又は類似性とは、当該技術分野で知られているとおり、配列を比較することにより決定される、2以上のタンパク質あるいは2以上のポリヌクレオチド間の関係である。当該技術で”同一性”とは、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間のアラインメントによって、あるいは場合によっては、一続きのそのような配列間のアラインメントによって決定されるような、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間の配列不変性の程度を意味する。また、類似性とは、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間のアラインメントによって、あるいは場合によっては、一続きの部分的な配列間のアラインメントによって決定されるような、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間の相関性の程度を意味する。より具体的には、配列の同一性と保存性（配列中の特定アミノ酸又は配列における物理化学特性を維持する置換）によって決定される。なお、類似性は、後述するBLASTの配列相同性検索結果においてSimilarityと称される。同一性及び類似性を決定する方法は、対比する配列間で最も長くアラインメントするように設計される方法であることが好ましい。同一性及び類似性を決定するための方法は、公衆に利用可能なプログラムとして提供されている。例えば、AltschulらによるBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラム（たとえば、Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ., J. Mol. Biol., 215: p403-410 (1990), Altschyl SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ., Nucleic Acids Res. 25: p3389-3402 (1997))

を利用し決定することができる。BLASTのようなソフトウェアを用いる場合の条件は、特に限定するものではないが、デフォルト値を用いるのが好ましい。

[0029] 第1の成分として使用できる各種のタンパク質は、MCP-1の公知のアミノ酸配列や塩基配列のほか、MCP-1の公知のアミノ酸や塩基配列と一定の関係を有するタンパク質であって本明細書におけるMCP-1活性を有するタンパク質が挙げられる。例えば、ケモカインリガンド(CCL)ファミリーが挙げられる。典型的には、CCL13、同7、同8、同11等が挙げられる。

[0030] 例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列との関係において、同一性が60%以上のタンパク質としては、以下の4種が挙げられる。

(1) ヒトC-Cモチーフケモカイン13プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_005399.1、配列番号2で表されるアミノ酸配列との同一性は65%、類似性は82%)

(2) ヒトC-Cモチーフケモカイン7プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_6264.2、同同一性73%、同類似性78%)

(3) ヒトC-Cモチーフケモカイン8プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_005614.2、同同一性69%、同類似性84%)

(4) ヒトエオタキシンプレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_002977.1、同同一性70%、同類似性84%)

[0031] さらに他の一態様として、開示されるMCP-1をコードする塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件でハイブリダイズするDNAによってコードされ、MCP-1活性を有するタンパク質が挙げられる。ストリンジентな条件とは、たとえば、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、塩基配列の同一性が高い核酸、すなわち開示される塩基配列と70%以上、より好ましくは80%以上、さらにまた好ましくは85%以上であり、さらに好ましくは90%以上であり、より一層好ましく

は95%以上であり、さらに一層好ましくは98%以上であり、最も好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAの相補鎖がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム塩濃度が15~750mM、好ましくは50~750mM、より好ましくは300~750mM、温度が25~70℃、好ましくは50~70℃、より好ましくは55~65℃、ホルムアミド濃度が0~50%、好ましくは20~50%、より好ましくは35~45%での条件をいう。さらに、ストリンジエントな条件では、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄条件が、通常はナトリウム塩濃度が15~600mM、好ましくは50~600mM、より好ましくは300~600mM、温度が50~70℃、好ましくは55~70℃、より好ましくは60~65℃である。なお、以上のことから、さらなる他の一態様として、開示される塩基配列と80%以上、より好ましくは85%以上であり、さらに好ましくは90%以上であり、より一層好ましくは95%以上であり、さらに好ましくは97%以上であり、さらに一層好ましくは98%以上であり、最も好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を有するDNAによってコードされ、MCP-1活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0032] このようなタンパク質やそれをコードするDNAは、例えば、開示される塩基配列等に基づいて設計したプライマーを用いて、各種生物から抽出したDNA、各種cDNAライブラリー又はゲノムDNAライブラリー等由来の核酸を鋳型としたPCR増幅を行うことにより、核酸断片として得ることができる。また、上記ライブラリー等由来の核酸を鋳型とし、MCP-1をコードする遺伝子の一部であるDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸断片として得ることができる。あるいは遺伝子は、化学合成法等の当技術分野で公知の各種の核酸配列合成法によって、核酸断片として合成してもよい。

[0033] また、タンパク質やそれをコードするDNAは、例えば、開示されるアミノ酸の配列をコードするDNAを、慣用の突然変異誘発法、部位特異的変異

法、エラープローンPCRを用いた分子進化的手法等によって改変することによって取得することができる。このような手法としては、Kunkel法又は Gapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法が挙げられ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製) )などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

[0034] (第2の成分)

第2の成分は、シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (S i g l e c - 9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である。この種のタンパク質及びその全長タンパク質は、ヒトをはじめとして各種動物においてホモログが知られている。S i g l e c - 9は、単球、顆粒球及びマクロファージファージにおいて発現する膜貫通タンパク質であって、細胞外ドメインと膜貫通ドメインと細胞質ドメインとを備えている。本明細書においては、S i g l e c - 9の細胞外ドメインを好ましく用いることができる。細胞外ドメインは、免疫グロブリン様ドメインを含んでいることも知られている。

[0035] 本剤においては、こうしたヒトなどの動物に由来する天然のS i g l e c - 9を天然の原料から回収したものであってもよいし、遺伝子工学的又は化学的に取得したものであってもよい。例えば、ヒトのS i g l e c - 9は配列番号4で表されるアミノ酸配列を有している。また、配列番号3で表される塩基配列からなるDNAによってコードされている。

[0036] 第2の成分は、S i g l e c - 9の細胞外ドメイン活性を有していれば足りる。すなわち、公知の天然のS i g l e c - 9の他、新たに本剤におけるS i g l e c - 9の細胞外ドメインとして機能することが確認されたタンパク質であってもよい。また、天然のS i g l e c - 9に上述した改変が加えられたものであってもよい。本剤におけるS i g l e c - 9の細胞外ドメイン活性としては、例えば、第1の成分及びコンドロイチン硫酸又はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンと協働してミクログリアを組織修復型に誘導できる活性、あるいは抗炎症性サイトカインの亢進活性を有しているタンパク

質が挙げられる。

- [0037] ヒトの *Siglec-9* は、配列番号 37 で表される 463 アミノ酸のアミノ酸配列からなる。このうち、第 1 位から第 17 位までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドである。本開示の第 2 の成分としては、例えば、このアミノ酸配列の第 18 位から第 348 位のアミノ酸配列（配列番号 4）であってもよいし、このアミノ酸配列の全長アミノ酸を有していてもよいし、同第 18 位～第 463 位までのアミノ酸配列を有していてもよい。
- [0038] こうした活性は、既述したように、後述する実施例を参照すれば当業者であれば容易に評価することができる。なお、改変 *Siglec-9* の細胞外ドメインにおける *Siglec-9* 細胞外ドメイン活性は、上記の誘導活性や産生促進活性を有していれば足り、その程度は問わない。
- [0039] 例えば、ミクログリア／マクロファージを組織修復型に誘導できる活性は、マウス等からミクログリア／マクロファージを単離し培養し、この培養細胞に対して、確立した第 1 の成分と必要に応じて CS 等の存在下に、可能性ある第 2 の成分を供給して、組織修復型ミクログリア／マクロファージの指標となる CD206、*Arginase 1* のタンパク質あるいは mRNA の産生を確認することなどで評価することができる。
- [0040] また、例えば、抗炎症性サイトカインの産生促進活性は、ミクログリア／マクロファージを組織修復型に誘導できる活性は、マウス等からミクログリア／マクロファージを単離し培養し、この培養細胞に対して、確立された第 1 の成分及び必要に応じて CS 等の存在下に、可能性ある第 2 の成分を供給して、例えば、*IL-10* および *TGF- $\beta$ 1* などの抗炎症性サイトカインの産生を確認することなどで評価することができる。
- [0041] 好ましくは配列番号 4 で表されるアミノ酸からなるタンパク質の *Siglec-9* 細胞外ドメイン活性の 50% 以上、より好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 70% 以上、より一層好ましくは 80% 以上、さらに一層好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 100% 以上である。
- [0042] 第 2 の成分として使用できる各種のタンパク質は、*Siglec-9* の細

胞外ドメインの公知のアミノ酸配列や塩基配列のほか、Siglec-9の細胞外ドメインとして知られている公知のアミノ酸や塩基配列と一定の関係を有するタンパク質であって本明細書におけるSiglec-9の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質が挙げられる。例えば、Siglecファミリータンパク質が挙げられる。典型的には、Siglec-9、Siglec-7、Siglec-12、Siglec-8、CD33等が挙げられる。

[0043] 例えば、配列番号4で表されるアミノ酸配列との関係において、同一性が60%以上のタンパク質としては、以下の10種が挙げられる。

(1) ヒトシアル酸結合イムノグロブリン様レクチン9同位体2プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_055256.1、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は100%、類似性は100%、塩基配列は配列番号5で表され、アミノ酸配列は配列番号6で表される。)

(2) ヒトシアル酸結合イムノグロブリン様レクチン9同位体1プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_001185487.1、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は100%、類似性は100%)

(3) ヒトシアル酸結合イムノグロブリン様レクチン7同位体1プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_00055220.1、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は81%、類似性は85%)

(4) ヒトシアル酸結合イムノグロブリン様レクチン12同位体bプレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_2015856.1、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は68%、類似性は79%)

(5) ヒトシアル酸結合イムノグロブリン様レクチン12同位体aプレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_443729.1、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は68%、類似性は79%)

(6) ヒトシアル酸結合イムノグロブリン様レクチン8プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_055257.2、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は70%、類似性は78%)

(7) ヒトミエロイド細胞表層抗原CD33同位体3プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_001171079.1、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は63%、類似性は74%)

(8) ヒトミエロイド細胞表層抗原CD33同位体1プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP055257.2、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は63%、類似性は74%)

(9) ヒトシアル酸結合イムノグロブリン様レクチン7同位体2プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_057627.2、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は78%、類似性は82%)

(10) ヒトミエロイド細胞表層抗原CD33同位体2プレカーサー (NCBIアクセッション番号: NP\_001076087.1、配列番号4で表されるアミノ酸配列との同一性は65%、類似性は77%)

[0044] (第3の成分)

第3の成分は、コンドロイチン硫酸 (CS) 又はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) である。本発明者らによれば、炎症反応部位など組織損傷部位における組織修復活性は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分の共存下において発揮される。しかしながら、CS等は、炎症組織においては常在する多糖類であるため、特に、有効成分として含めなくとも、本剤が組織において作用することができる。もっとも、本剤が第3の成分を含むことでより確実にあるいはより広い範囲に適用できる組成物となる。一方、生体外において本剤を炎症部位やミクログリア/マクロファージに適用するときには、第3の成分であるCS等を添加することが好ましい。

[0045] 第3の成分は、天然から回収したものであってもよいし、人工的に合成したものであってもよい。コンドロイチン硫酸における糖の結合形態も特に限定しない。また、コンドロイチン硫酸は、複数種類の混合物であってもよい。

[0046] (本剤における有効成分の配合)

本剤は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分から選択される少なくとも

も1種を含むことにより、炎症組織に送達されるとき、残余の成分の存在下、組織修復活性を呈することができる。したがって、本剤は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分からなる群から選択される1種の成分を有効成分としてもよいし、2種の成分を有効成分としてもよいし、3種の成分を有効成分としてもよい。本剤に含まれる有効成分は、疾患の種類、組織障害部位やその特性、さらには、本剤の投与形態に応じて決定される。好ましくは、本剤は、第1の成分及び／又は第2の成分を含んでいる。さらに好ましくは、第1の成分及び／又は第2の成分に加えて、第3の成分を含んでいる。

[0047] 本剤が第1の成分及び／又は第2の成分を含むとき、第1の成分及び／又は第2の成分の濃度（含有量）は特に限定しない。本剤が組織修復活性を呈する有効量が含まれていればよい。より具体的には、例えば、第1の成分及び／又は前記第2の成分を、本剤中のあるいは組織修復部位における第3の成分と協働して、以下の（a）又は（b）に記載の活性を呈するのに有効量含有していればよい。これらの活性は、必要に応じて第3の成分の共存下で、生体において確認されるものであってもよいし、生体外で確認されるものであってもよい。

（a）組織修復型ミクログリア又はマクロファージの誘導活性

（b）抗炎症性サイトカインの産生促進活性

[0048] 本剤が第1の成分及び第2の成分を含むとき、第1の成分及び第2の成分の配合比は、必要に応じて、設定される。例えば、質量比で第1の成分：第2の成分＝100：1～1：100の範囲で適宜設定できる。好ましくは、第1の成分：第2の成分＝1：10～10：1である。例えば、第1の成分：第2の成分＝5：1～1：5や、2：1～1：2等で含んでいてもよい。

[0049] 本剤が第3の成分を含む場合には、その濃度は特に限定しない。本剤が組織修復活性を呈する有効量が含まれていればよい。また、本剤がさらに第1の成分及び／又は第2の成分を含むとき、第3の成分の第1の成分及び／又は第2の成分に対する濃度等も特に限定しない。組織修復活性を呈する有効量が含まれていればよい。いずれにおいても、より具体的には、例えば、本

剤中のあるいは組織修復部位における第1の成分及び／又は前記第2の成分と協働して、以下の(a)又は(b)に記載の活性を呈するのに有効量含有していればよい。これらの活性は、生体内／生体外のいずれで確認されるものであってもよい。

(a) 組織修復型ミクログリア／マクロファージの誘導活性

(b) 抗炎症性サイトカインの産生促進活性

[0050] 例えば、CS等の配合比は、必要に応じて、設定される。例えば、質量比で第1の成分及び第2の成分の総量：CS等＝1000：1～1：1000の範囲で適宜設定できる。好ましくは、第1の成分及び第2の成分の総量：CS等＝100：1～1：100であり、より好ましくは、1：10～10：1である。例えば、第1の成分及び第2の成分の総量：CS等＝5：1～1：5や、2：1～1：2等で含んでいてもよい。

[0051] 本剤は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分から選択される1種又は2種以上を配合し混合することで製造することができる。すなわち、それぞれ取得（天然原料からの抽出、遺伝子組換え、化学合成等による製造）され、必要に応じて精製された各成分を配合し混合して製造することができる。また、これらの成分を同時に含む原料がある場合には、アフィニティクロマトグラフィー等などで選択的にこれらの成分を抽出してもよい。また、第1の成分及び第2の成分の本剤全体あるいは本剤中の総タンパク質に対する濃度（純度）や配合比は適宜調製することができる。

[0052] 本剤は、組織修復活性を有することから、種々の原因による組織の修復を活性化し、修復する、損傷組織の修復用組成物として用いることができる。また、各種の炎症に対する予防、治療、緩和する抗炎症剤組成物として利用できる。組織損傷を生じているあるいは生じる可能性のある疾患を、中枢神経系疾患と非中枢神経系疾患とに分類すると、中枢神経系疾患としては、特に限定されないで、中枢神経系における神経細胞の変性・脱落を生じる全ての病態を含むことができる。例えば、脊髄損傷、脳梗塞、新生児低酸素脳症、神経変性疾患（筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病、

パーキンソン病、進行性各上性麻痺、ハンチントン病、多系統萎縮症、脊髄小脳変性症等)、ウイルス性又は自己免疫性脳炎、脳虚血や脳内出血等に伴う脳梗塞による神経変性の変性・脱落、神経細胞の障害を伴う網膜疾患が挙げられる。網膜疾患としては、外傷性網膜剥離、網膜裂孔、網膜震盪症、視神経管骨折、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性、網膜色素変性症、緑内障、コレイデミア、レーベル先天盲、錐体ジストロフィ、家族性ドルーセン、中心性輪紋状絡膜ジストロフィ、常染色体優性視神経萎縮等が挙げられる。なかでも、本剤は、急性及び亜急性の疾患や病態に好ましく適用される。例えば、脊髄損傷や脳梗塞等が挙げられる。さらに、末梢神経損傷による運動機能障害や知覚感覚異常が挙げられる。

[0053] また、非中枢神経系疾患としては、特に限定されないで、中枢神経系以外の組織における細胞の変性・脱落を生じる全ての病態を含むことができる。例えば、I型およびII型糖尿病、シェーグレン病、ドライアイ、皮膚創傷治癒、心筋梗塞、骨髄移植に伴う免疫拒絶、関節炎、関節リウマチ、変形性関節症及び骨吸収増加に関連した骨疾患などの慢性炎症性関節疾患、回腸炎、潰瘍性大腸炎、バレット症候群及びクローン病などの炎症性腸疾患、喘息、急性および慢性間質性肺炎、成人呼吸窮迫症候群及び慢性閉塞性気道疾患などの炎症性肺疾患、トラコーマ、オンコセルカ症、ブドウ膜炎、交感性眼炎及び眼内炎などの炎症性眼疾患、歯肉炎及び歯周炎などの慢性炎症性歯周疾患、結核、ハンセン病、尿毒症合併症、糸球体腎炎及びネフローゼなどの炎症性腎疾患、硬化性皮膚炎、乾癬及び湿疹などの炎症性皮膚疾患、自己免疫疾患、免疫複合体血管炎、全身性狼瘡及び紅斑症、全身性エリトマトーデス (SLE)、心筋症、虚血性心疾患、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症などの炎症性心疾患、並びに子癩前症、慢性肝不全、急性肝炎、劇症肝炎、脳、癌などの重大な炎症要素を有する他の様々な疾患が挙げられる。あるいはグラム陽性又はグラム陰性細菌ショック、出血性若しくはアナフィラキシーショック、又は前炎症性サイトカインに応答する癌化学療法によって誘発されたショック (例えば前炎症性サイトカイン関連ショック) な

どの全身性の炎症も挙げられる。かかるショックは、例えば癌化学療法に用いられる化学療法剤によって誘発されうる。さらに、皮膚移植拒絶反応などの移植片拒絶反応も挙げられる。なかでも、本剤は、急性及び亜急性の疾患や病態に好ましく適用される。例えば、急性肝炎や劇症肝炎が挙げられる。同時に、各種の肝障害の終末形態である肝硬変においても好ましく適用される。さらに、急性及び慢性の骨髄炎症疾患が挙げられる。かかる疾患としては、ビスホスホネート系薬剤関連顎骨壊死、外傷や感染に起因する急性及び慢性骨髄炎が挙げられる。また、歯周病や外傷などによる骨変形・骨損傷が挙げられる。こうした損傷等により本剤を投与すると新生骨の形成を促進することができる。

[0054] なかでも、関節リウマチ（RA）などの慢性炎症性関節疾患が挙げられる。関節リウマチは、慢性多発性滑膜炎を本体とする原因不明の炎症性自己免疫性疾患であり、遷延する滑膜炎は、骨・軟骨破壊と永続的な機能障害へとつながる。

[0055] 慢性的に組織損傷を生じている疾患（炎症性疾患）では、継続的に生体側からMCP-1の供給が可能であるため、第2の成分の単独投与が有効な場合がある。したがって、慢性的に組織損傷が生じている疾患として、2型糖尿病、慢性肝炎及び肝硬変のほか、既述したような慢性及び自己免疫疾患において第2の成分の単独投与が有効である場合がある。一方、急性的に組織損傷が生じている疾患では、生体側からのMCP-1の供給が必ずしも十分でないため、第1の成分と第2の成分とを少なくとも投与することが好適である。

[0056] また、特発性肺線維症（IPF）を含む間質性肺炎が挙げられる。間質性肺炎は肺胞と肺胞の間の隔壁を主座とする炎症性疾患である。IPFの病態の特徴は、肺胞壁における線維化と肺胞構造の変化（蜂巢肺形成）であり、肺活量・肺コンプライアンス・肺拡散能が低下し、それに伴い患者のQOLは低下する。慢性かつ進行性の経過をたどり、急性転化した場合の致命率は80%ともいわれる。

- [0057] 本剤は、追加的に第1の成分、第2の成分及び第3の成分以外の成分を含むことができる。また、後述するように投与方法に応じた各種の製剤形態を取ることができる。
- [0058] 本剤は、ヒアルロン酸、コラーゲン、フィブリノーゲン、血小板血漿等の生体吸収性材料を含むことができる。また、本剤は、ヒアルロン酸、コラーゲン、フィブリン糊などのゲル化材料を含んでいてもよい。本剤は、公知の製剤上許容される成分を含むことができる。例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩液などを含むことができる。これらの各種の添加剤としては、いずれも公知の各種の成分を適宜用いることができる。
- [0059] 本剤の製剤形態は特に限定されない。公知の各種の製剤形態を採ることができる。錠剤、粉剤、粒剤、顆粒剤、細粒剤、カプセル剤、用時溶解する固形の注射剤、坐剤などの固形性剤、液状の注射剤（静注／筋注）、注入剤、点滴用剤などの液状性剤、点眼剤、スプレー剤、ローション剤、クリーム剤、貼付剤などの局所外用剤等が挙げられる。また、体内留置型の医療器具等に担持される形態を採ることもできる。そのほか、本剤は、公知の薬学上許容される塩を含むことができる。
- [0060] 本剤が2種類以上の成分を含むとき、予めこれら2種以上の成分を含む製剤（合剤）として提供されてもよいし、用時に2種以上の成分を使用可能に、これらの単剤の組み合わせ（キット）や単剤と2種成分の合剤との組み合わせ（キット）として提供されてもよい。あるいは、これらを用時に混合可能な一体の容器に収容されていてもよい。
- [0061] 本剤の投与形態は特に限定されない。適用部位や対象とする疾患に応じて公知の各種投与形態を採用できる。たとえば、非経口投与は、全身投与であってもよいし局所投与であってもよい。より具体的には、炎症部位への注入、塗布又は噴霧が挙げられる。また、静脈内投与、動脈内投与、門脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、口腔内投与等が挙げられる。炎症部位が脳である場合には、鼻腔内投与が好ましい。

[0062] また、本剤の投与にあたり、組織修復を要する部位に第1の成分、第2の成分及び第3の成分が共存する形態であればよい。したがって、その具体的投与形態は特に限定されない。例えば、製剤として投与する有効成分を同時に投与してもよいし、順次（有効成分の種類と順序は任意である。）投与されてもよい。

[0063] 本剤の用法用量は特に限定されない。被験対象の年齢、体重、病態等を勘案して設定することができる。

[0064] 本剤が適用される被検対象としては、ヒトを含む哺乳動物（ペット、家畜、実験動物等）が挙げられる。例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、サル、モルモット、ラット及びマウス等が挙げられる。

[0065] （組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導剤）

本明細書に開示される組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導剤は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分からなる群から選択される1種以上を含有する。本誘導剤は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分によって発揮される組織誘導型のミクログリア／マクロファージの誘導活性に基づくものである。第1の成分、第2の成分及び第3の成分については既に説明した通りであり、本誘導剤は、上記した本剤と同様の各種態様が構成することでできた製造できる。

[0066] （抗炎症性サイトカインの産生促進剤）

本明細書に開示される抗炎症性サイトカインの産生促進剤は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分からなる群から選択される1種以上を含有する。本産生促進剤は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分によって発揮される抗炎症性サイトカインの産生促進活性に基づくものである。本誘導剤と同様、本産生促進剤についても、本剤についての各種態様が適用される。

[0067] （組織修復型ミクログリア又はマクロファージの生産方法）

本明細書に開示される組織修復型ミクログリア又はマクロファージの生産方法は、生体外で、第1の成分、第2の成分及び第3の成分の存在下で、ミ

クログリア又はマクロファージを培養する工程、を備えることができる。この生産方法によれば、生体外で組織修復型ミクログリア又はマクロファージを製造することができる。こうした組織修復型は、例えば、ミクログリア／マクロファージをヒトなどの哺乳動物から採取したうえ、生体外で組織修復型に誘導（変換）して、当該哺乳動物に戻すことなどにより、組織修復を活性化し、炎症性反応を抑制し、炎症を予防、緩和又は治療できる。こうしたミクログリア／マクロファージの生産にあたっては、本誘導剤を上記各種形態で使用できる。

[0068] （試薬キット）

本明細書に開示される試薬キットは、第1の成分と、第2の成分及び第3の成分からなる群から選択される1種以上を備えることができる。2種以上の成分を含むとき、予め混合されていてもよいし、用時に混合するように別々に備えられていてもよい。また、固形であってもよいし、液状であってもよく、用時溶解するものであってもよい。必要に応じて溶解液を別途備えることもできる。さらに、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、を、第1の成分及び第2の成分と予め混合し、あるいは別々に備えられていてもよい。

[0069] （組織修復の促進方法）

本明細書に開示される組織修復の促進方法は、第1の成分、第2の成分及び第3の成分からなる群から選択される1種以上を炎症組織又は損傷組織に送達する工程を備えることができる。本法によれば、炎症組織又は損傷組織において第1の成分～第3の成分の存在下、組織修復を効果的に促進し、あるいは組織障害を予防し緩和できる。本促進方法は、また、炎症疾患における予防、治療又は緩和方法として実施することができる。こうした第1の成分及、第2の成分及び第3の成分については、既に説明した本剤の各種態様を適用でき、対象に対する投与形態（送達形態）等も本剤に関して記載した各種態様を適用できる。

## 実施例

[0070] 以下、本発明を、実施例を挙げて具体的に説明するが、以下の実施例は本

発明を限定するものではない。なお、以下の実施例において、%は、いずれも質量%を意味する。なお、以下の実施例において言及する図面において、ED-Siglec-9を、ED-Siglec-9と表記するほか、単にSiglec-9又はSiglecと表記することがある。

## 実施例 1

[0071] (劇症肝炎モデルを用いた歯髄幹細胞の治療有用性の解析)

(1) 劇症肝炎モデルラットの作製

著しい肝障害を誘発する、D-ガラクトサミン (D-galactosamine) 溶液をPBS/NaOH溶液に溶解し作製した。この溶液をSprague-Dawleyラット(200~250g)に、D-ガラクトサミン1.2g/kg(ラット体重)となるように腹腔内投与した。投与から24時間後に採血を行ってAST及びALTを測定し、著しい肝障害が誘発(劇症肝炎)されていることを確認した。

[0072] (2) 薬剤の調製

ED-Siglec-9(組換えヒトSiglec-9Fcキメラ、R&Dシステムズ、ヒトSiglec-9のGln18~Gly348を含むキメラタンパク質である。)単独1 $\mu$ g/ml PBS溶液、MCP-1リコンビナントタンパク質(組換えヒトMCP-1/CCL2 (Peprrotech社))単独1 $\mu$ g/ml PBS溶液、ED-Siglec-9及びMCP-1リコンビナントタンパク質各1 $\mu$ g/ml含有PBS溶液をそれぞれ調製した。

[0073] (3) 投与

(2)で調製した3種の薬剤液各1mlを、劇症肝炎の発症後24時間(D-ガラクトサミン投与から48時間)のラットに頸静脈から静注した。また、対照としてPBS 1mlを劇症肝炎の発症後24時間のラットに頸静脈から静注した。

[0074] (4) 1週間生存率の判定、血液検査による肝障害の評価

1週間生存率の判定、血液検査による肝障害の評価をそれぞれ図1及び図

2に示す。Sprague-Dawley rat (200~250g) 腹腔内に、著しい肝障害を誘発するD-galactosamine溶液を1.2g/kgの割合で投与した。図1に示すように、PBS投与群では一週間生存率が30%以下に低下した。これに対して、ED-Siglec-9/MCP-1混合液の静注群においては劇的に病態が改善され、1週間生存率は100%であった。一方、ED-Siglec-9やMCP-1の各単独投与群では病態改善効果が得られなかった。ED-Siglec-9単独投与群の生存率は40%、MCP-1単独投与群の生存率は0%であった。

[0075] また、図2に示すように、対照群では、血中AST及びALTがそれぞれ8000U/L及び8300U/Lであったのに対し、混合投与群では、いずれも2000U/L以下、ED-Siglec-9単独投与群では6000/4000U/L、MCP-1単独投与群では7000/5500U/Lであった。これらの結果は、図1に示す生存率の結果を支持するものであった。なお、細胞傷害の示標値はAST=6000U/L、ALT=4000U/Lとした。

[0076] (5) 劇症肝炎モデルにおける病理学的解析

劇症肝炎患者の肝臓では、一般に、広範な肝細胞死と肝細胞再生不全が認められる。本モデルラットにおいても、これらの発現を解析することにより、病態を評価した。肝細胞死は、HE染色及びTUNEL染色により評価を行った。結果を図3に示す。

[0077] 図3のA及びBに示すように、対照群では激しい空砲変性や、多くのTunel陽性細胞(全肝臓細胞中20%)を検出した。これに対して、ED-Siglec-9/MCP-1混合投与後12時間の組織像は正常肝組織様であった。

[0078] (6) 劇症肝炎モデルにおける遺伝子解析

劇症性炎症反応では、炎症性組織破壊型M1マクロファージと抗炎症・組織再生型M2マクロファージが肝臓組織損傷に重要な役割を果たす。M1は、前炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)の遺伝子発現

を亢進する。M2は、死細胞のセンサー：マンノースレセプターCD206、抗炎症性サイトカイン（IL-10、TGF- $\beta$ ）を大量に発現する。本モデルラットにおいても、これらの因子の産生量を定量的RT-PCRで解析することにより、病態を評価した。結果を図4に示す。定量的RT-PCRに用いたプライマーは、表1に示す。

[0079] 図4に示すように、対照群では、各種の炎症性サイトカインの発現が上昇することがわかった。これに対して、ED-Siglec-9/MCP-1混合投与群では炎症性サイトカインの発現が抑制され、抗炎症性サイトカインの発現が亢進することがわかった。

[0080] (7) 劇症肝炎モデルにおけるCD206免疫染色結果

図5には、ED-Siglec-9/MCP-1混合投与群及び対照群の劇症肝炎モデルの組織におけるCD206染色結果を示す。図5に示すように、ED-Siglec-9/MCP-1混合投与群では、CD206の発現が顕著であり、組織修復型マクロファージへ変換が明らかに認められた。

## 実施例 2

[0081] 本実施例では、マウスミクログリア及び脊髄損傷ラットを用いて、MCP-1、ED-Siglec-9及びCSPGの効果を確認した。以下、実験方法を示し、次いで結果を示す。

[0082] (1) マウスミクログリアの単離と細胞培養

初代神経細胞は、新生児のC57BL/6マウスから単離した。14日培養後、ミクログリアは、“振り切り”法(“shaking off” method)によって細胞混合物から単離した。Fc受容体の免疫染色によって決定された培養細胞の純度は97~100%であった。培養物は、10%ウシ胎児血清、5 $\mu$ g/mlのウシインスリンおよび0.2%グルコースを添加したDMEM中で維持した。

[0083] (2) ミクログリアCSPG活性化アッセイ

48個のウェルの組織培養プレートは1 $\mu$ g/mlのポリ-L-リジン(PLL; Sigma)又は100ng/mlの細胞外コンドロイチン硫酸プ

ロテオグリカン混合物（CSPG；ミリポア）とともにコーティングした。ミクログリアは、PLLまたはPLL/CSPG上の無血清DMEM中に $2.0 \times 10^5$ 個の細胞/ウェルで播種した。無血清DMEM中には、組換えヒトMCP-1/CCL2（Peprotech社）と組換えヒトED-Signlec-9（R&D Systems）を含んでいた。24時間培養後、CD206タンパク質とmRNAの発現を、免疫組織化学的分析及びリアルタイム定量的PCRでそれぞれ分析した。48時間培養後には、培養上清のIL-10濃度をELISAキット（Quantikine ELISA Mouse IL-10, R&D Systems）で測定した。

[0084] (3) リアルタイムQ-PCR

全RNAは、分光光度計によって定量し、RNAの状態を1%アガロースゲルで確認した。RT反応は、スーパースクリプトIII逆転写酵素（Invitrogen）を用いて行った。25 $\mu$ lの合計反応体積中全RNA 0.5 $\mu$ gで使用した。リアルタイムQ-PCRは、THUNDERBIRD SYBR定量PCRミックス（東洋紡）を用い、StepOnePlus装置リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）を稼働させて行った。ラット及びマウス用のプライマーは、以下のとおりとした。

[0085] [表1]

Origin	Primer	Sequence (forward 5'--3')	Sequence (reverse 5'--3')
rat	GAPDH	AACTTTGGCAICGTGGAAGG	CGGATACATGGGGGTAGGA
rat	IL-6	TTGCCTTCTTGGACTGATG	ACTGGTCTGTTGTGGGTGGT
rat	IL-1 $\beta$	CAGGATGAGGACCAAGCAC	TCAGACAGCACGAGGCATTT
rat	TNF- $\alpha$	CTCGAGTGACAAGCCGTAG	CCTTGAAGAGAACCTGGGAGTAG
rat	iNOS	GGCAGGATGAGAAGCTGAGG	CCGCATTAGCACAGAAGCAA
rat	IL-10	GCCTGCTCTTACTGGCTGGA	TCTGGCTGACTGGGAAGTGG
rat	TGF- $\beta$ 1	CCGCAACAACGCAATCTATG	GCACTGCTTCCC GAATGTCT
rat	VEGF	ACCAAAGCCAGCACATAGGA	GGGGCATTAACTGCATCTGG
rat	CD206	GCAGGTGGTTTATGGGATGTTT	TTTGGGTT CAGGAGTTGTTGTG
rat	Arginase1	CACCTGAGTTTIGATGTTGATGG	TCCTGAAAGTAGCCCTGTCTTGT
mouse	GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT
mouse	IL-6	CCAAGAACGATAGTCAATCCAGA	CATCAGTCCCAAGAAGGCAAC
mouse	IL-1 $\beta$	CAGGATGAGGACCAAGCAC	TCAGACAGCACGAGGCATTT
mouse	TNF- $\alpha$	CCCTTTACTCTGACCCCTTATGTT	TGTCCAGCATCTTGTGTTTCT
mouse	CD206	TCTCCCGGAACCGACTCTTC	AACTGGTCCCCTAGTGTACGA

[0086] (4) ラット挫傷モデルと外科的処置

200～230グラムの重量の成体雌Sprague-Dawleyラットを用いた。ラットは、ケタミン（60～90mg/kg）およびキシラジン（100～150mg/kg）の腹腔内注射により麻酔した。Th9腰椎椎弓切除後、硬膜を露出させ、市販されている脊髄損傷装置（Infinite Horizon Impactor, Precision Systems & Instrumentation）によって200kdynの外傷力を付与した。脊髄挫傷後すぐに、Th12部分椎弓切除術を行い、髄腔内にSMP-200モデル（プライムテック株式会社）：iPRECIOと接続した薄いシリコンチューブを手術用顕微鏡下で挿入した。管はそれを固定する棘突起に縫合して配置し、ポンプは動物の腋窩の皮膚の下に置かれた。術後、膀胱は1日2回手動腹圧によって圧縮して排尿させた。術後翌日に完全な麻痺（BBBスコア=0）を示す動物を評価に用いた。後肢を動かすことができた動物、即死した動物は評価から除外した。

[0087] (5) BBBのオープンフィールド運動スコア

後肢神経行動試験はBBBの運動評価尺度を用いて行った。22点（0～21）BBBスケールは、関節の動き、ステップング能力、調整、体幹の安定性を含む後肢運動のリカバリを評価するために使用した。21のスコアは、無傷のラットにおける損なわれていない運動を意味している。動物の治療内容に関して盲検化された二人の審査官が評価を行った。各セッションの継続時間は、ラットあたり4分であった。スコアは各時点において、Tukeyの多重比較検定による反復測定分散分析により解析した。

[0088] (6) 免疫組織化学的分析

処理された脊髄の組織学的検査のために、動物を麻酔し、挫傷後72時間後及び8週間後に、経心臓的に4%PFAの0.1MPBS溶液で灌流した。脊髄をOCTコンパウンド（サクラファイン）に埋め込んで、区画されたクライオスタット（ライカ）に20μmで矢状又は横平面で切片とした。組織切片とミクログリアは、0.1%（v/v）TritonX-100のPBS溶液で5分間浸透処理した。ヤギ血清10%（v/v）で30分間ブロ

ッキング後、一次抗体：5-HT（ウサギIgG、1：500、Sigma-Aldrich）、GFAP（マウスIgG、1：500、ミリポア）、Iba1（ヤギIgG、1：500、アブカム）、CD206（ウサギIgG、1：1000、アブカム）、IL-10（マウスIgG、1：250、アブカム）とインキュベートした。二次抗体は、抗マウスIgG-のAlexa Fluor 488、抗ヤギIgG-Alexa Fluor 546及び抗ウサギIgG-のAlexa Fluor 647とした。DAPI（Sigma-Aldrich）で対比染色後、組織像は、ユニバーサル蛍光顕微鏡（BZ9000、キーエンス）で観察した。

[0089] (7) 免疫沈降、レクチンブロット及びウェスタンブロット

THP-1細胞の溶解物を、ED-Siglec-9またはCCR2に対する抗体を用いて免疫沈降させ、沈殿物を抗CCR2抗体またはMAH-レクチンでイムノブロットした。レクチンブロットは、THP-1（理研セルバンク、日本）溶解物（溶解緩衝液：1%トリトンX、150mMのNaCl、20mMのトリス-HCl、2mMの塩化カルシウム）から抗CCR2抗体（ウサギIgGと、1：50、Abcam）で免疫沈降させたCCR2タンパク質をSDS-PAGEで分離し、イモビロン-PのPVDF膜上にエレクトロブロットした。ブロッティング後、その膜を、MAL緩衝液（10mMのHEPES、pH7.5、150mMのNaCl、0.2%BSA、0.2%Tween-20）で、12時間、4℃でブロックした。その後、MAL緩衝液中、12時間、4℃で、5mg/mlのビオチン化MAL（Vector Laboratories社）でプローブした。MALは、アビジン-HRP（Vector Laboratories社）およびECL（GE Healthcare）を用いて検出し、LAS-4000ミニルミノイメージアナライザー（GE Healthcare社）により分析した。

[0090] ED-Siglec-9とCCR2との間の物理的相互作用を分析するために、THP-1またはネイティブマウスミクログリア溶解物を0.15nMのED-Siglec-9-FcまたはFcを用いて4℃で一晩インキュ

ベートした後、プロテインAセファロース（GEヘルスケア）で免疫沈降した。全細胞溶解物および再懸濁沈殿物は、マウスCCR2に対する抗体（ウサギIgG、1：500、Abcam）を用いてイムノブロットした。

[0091] (8) 統計

Turkeyの事後検定（SPSS19.0）による反復測定分散分析を用いた。P値が0.05未満を有意とした。

[0092] (結果)

(MCP-1、ED-Siglec-9及びCSPGの組織修復型ミクログリアの誘導に対する相乗効果)

マウスミクログリアについての結果を図6に示す。図6のa～dに示すように、CSPG上においてMCP-1（50ng/ml）及びED-Siglec-9（50ng/ml）で処理したミクログリアは、有意にCD-206のタンパク質レベルでの発現及び遺伝子レベルでの発現を増大させるとともに、IL-10の産生を増大させた。また、免疫染色により、CSPG上においてMCP-1（50ng/ml）及びED-Siglec-9（50ng/ml）で処理したミクログリアに関し、組織修復型ミクログリアの発現をCD206で確認することができた。また、図6のe及びfに示すように、MCP-1/ED-Siglec-9/CSPGの濃度に依存して組織修復型ミクログリアのマーカーであるCD206及び抗炎症性サイトカインIL-10の産生が増大した。

[0093] また、処置切片では、図7aに示すように、GAPF及びH-E染色により、SCI後8週で、GAPF陽性アストロサイトの活性の減少を示すとともに、組織損失面積が減ったことがわかった。また、図7bに示すように、5-HTにより、SCI後8週で、陽性神経線維の修復が進行していることがわかった。さらに、図7cに示すように、5-HT染色により、損傷中心から頭側及び尾側においても神経線維の修復が進行していることがわかった。

[0094] (MCP-1及びED-Siglec-9の髄腔内投与による炎症性の脊髄

損傷の抗炎症状態／組織再生状態への変換)

MCP-1及びED-Siglec-9を各濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ でSCI部位にiPRECIO注入ポンプによって液 $3\mu\text{l}/\text{h}$ を送達した。シリコンチューブはくも膜下腔に挿入した。脊髄損傷部位におけるサイトカインと細胞表面マーカーの遺伝子発現を、定量的RT-PCR分析により評価した。総RNAは、SCIから72時間後に病変部位から採取した。結果を図8に示す。Y軸は、SHAMモデル(偽手術モデル)での数値に対する比率を表す。

[0095] 図8に示すように、炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )および誘導型一酸化窒素合成(iNOS)は、コントロールで亢進されたが、MCP-1及びED-Siglec-9の併用投与で顕著に抑制された。これに対して、MCP-1/ED-Siglec-9の投与は抗炎症性サイトカインの発現(IL-10およびTGF- $\beta$ 1)およびM2ミクログリア/マクロファージのマーカー(CD206、Arginase1)を増大させた。なお、実験は3回繰り返して行い、いずれも同様の結果が得られた。図8中のデータは平均 $\pm$ SEMを表す(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )。

[0096] (MCP-1/ED-Siglec-9による脊髄損傷後のミクログリア/マクロファージの組織修復型への分化促進)

脊髄損傷から72時間後の損傷部位を取り囲むミクログリア/マクロファージの典型的画像と定量結果を図9に示す。図9の上段に示すように、コントロール群では、Iba1+ミクログリアが観察されたが、CD206+細胞が全く観察されなかった。これに対して、図9の中段に示すように、MCP-1/ED-Siglec-9処理ラットにおいては、脊髄損傷から72時間後、損傷部位に多数のIba+細胞が移動し、これらIba1+細胞のほとんどは、CD206を共発現していた。また、図9の下段に示すように、コントロールラットでは、損傷部位におけるCD206+細胞は、IL-10も同時に発現することは観察されなかったのに対し、MCP-1/ED

—S i g l e c — 9 処理された損傷部位におけるCD206+細胞は、IL-10も同時に発現していた。図中のデータは、平均±SDを表す (\*P<0.05、\*\*P<0.01、PBS処理に対するMCP-1/ED-S i g l e c — 9 処理した脊髄損傷モデル)。

[0097] (脊髄損傷におけるMCP-1/ED-S i g l e c — 9 の治療上の利点)

脊髄挫傷後の後肢の機能回復の時間経過を図10に示す。MCP-1/ED-S i g l e c — 9 投与ラットは、コントロールと異なり早期から明らかな機能回復傾向を呈した。図中のデータは、平均±SDを表す。

[0098] (ED-S i g l e c — 9 とMCP-1レセプターであるCCR2との相互作用)

免疫沈降、レクチンブロット及びウェスタンブロットの結果を図11に示す。ED-S i g l e c — 9 は、物理的に、THP-1細胞溶解液中のシアリ化CCR2と相互作用し、CSPG処理は、ミクログリアのCCR2発現を増加させ、ED-S i g l e c — 9 は物理的にミクログリアのCCR2と相互作用した。

[0099] 豊富に内因性CCR2を発現するヒト単球細胞株THP-1を用いて、MCP-1受容体、CCR2およびED-S i g l e c — 9 の物理的相互作用を分析した。図11(A)に示すように、SDS-PAGE分析により、THP-1は、異なる分子量(図11(A) Total lysate)で複数のCCR2タンパク質を発現した。また、抗CCR2抗体を用いたTHP-1溶解物の免疫沈降によって、55および42kDaでのCCR2タンパク質の2つの主要な種が検出された(図11(A) anti-CCR2)。MAHブロットでは、特にS i g l e c -9 の主要な標的である $\alpha 2-3$ 結合シアリ酸を含む糖鎖を認識した。さらに、分子量が大きいCCR2タンパク質のみがMAHによって検出され、シアリダーゼ処理によりMAHは強く減少した(図11(A) MAH-blot)。分子量の大きいシアリ化CCR2は、ED-S i g l e c -9 -FcとのTHP-1溶解沈殿物にのみ検出された(図11(A) CCR2-blot)。また、シアリダーゼを用いたTHP-1溶解

液の前処理は、CCR2およびED-Siglec-9間の物理的相互作用を阻害した(図11(A) CCR2-blot (シアリダーゼ+))。ED-Siglec-9及びCCR2の物理的な相互作用は、 $\alpha 2-3$ 結合シアル酸を含むシアル化されたCCR2に依存していた。

[0100] CSPG処理したネイティブマイクログリアでは、異なる分子量のCCR2の発現を増加させた(図11(B))。CSPGがCCR2の発現の増大によって少なくとも部分的にM2の誘導に寄与していた。さらに、ネイティブマイクログリアにおいても、分子量がより大きいシアル化CCR2がED-Siglec-9とマイクログリア溶解沈殿物中において見出された。ED-Siglec-9が物理的にマウスマイクログリアシアル化CCR2と相互作用すること示した(図11(C))。

### 実施例 3

[0101] (急性肺傷害(間質性肺炎)への適用)

本実施例では、MCP-1とED-Siglec-9の投与によって急性肺傷害で生じる炎症および線維化が抑制されることを見出した。

[0102] (急性肺傷害モデルマウス)

肺胞上皮細胞に障害をもたらすBleomycin (BLM)を3mg/mlの割合でPBSに溶解しBLMのPBS溶液を調製した。この溶液をC57Bl/6Jマウス(7~9週齢)に6U/kgの量気管内投与を行い、24時間後にペロクロラ音を聴取して肺傷害が起こっていることを確認した。

[0103] MCP-1とED-Siglec-9のリコンビナントタンパク質の各1 $\mu$ g/ml濃度のPBS溶液を肺傷害発生後24時間のモデルマウスに対して頸静脈から静脈内投与し、その後の病態を観察した。MCP-1とED-Siglec-9の投与群と非投与(PBS投与)群に関し、生存率及び体重の変化を図12に示す。

[0104] (9日間の体重率および14日間の生存率評価)

図12に示すように、PBS投与群では、BLM溶液(6U/kg)が気

管内投与されて肺傷害が引き起こされたC57BL/6Jマウスは、9日間の体重率は70% (n=10) に低下し、14日間の生存率は約40% (n=10) に低下することを確認した。

[0105] 一方、MCP-1とED-Siglec-9の投与群では、9日間の体重率は約80% (n=15) に留まり、14日間の生存率は約80% (n=15) であり、肺傷害が軽減されていることを確認した。

[0106] (肺傷害モデルにおける病理学的解析)

肺傷害患者の肺では線維化の進行と、肺胞構造の破壊を認める。BLMにより傷害されたモデルマウスの肺も同様の構造変化を示すため、その構造変化と膠原線維の増殖をHE染色およびマッソントリクローム (MT) 染色にて評価した。結果を図13に示す。

[0107] 図13に示すように、BLM投与後7日目の非投与群では著しい線維化と肺胞構造の破壊を認めたが、それと比較して、MCP-1とED-Siglec-9の投与群では線維化が抑制され、より正常像に近い肺胞構造を示していた (n=5)。

[0108] 以上の結果から、MCP-1とED-Siglec-9との投与は、肺における炎症性疾患に起因する組織障害に対しても修復活性を有し、その結果、肺線維症などの肺炎症性疾患や急性の肺疾患の治療や予防に有効であることがわかった。

#### 実施例 4

[0109] (肝硬変 (慢性肝炎) への適用)

本実施例では、MCP-1とED-Siglec-9の投与によって肝硬変、慢性肝炎が寛解することを見いだした。

[0110] (肝硬変モデルマウスの作製)

四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を1.0 ml/kgの割合でオリーブオイルに溶解し肝障害を誘発する薬剤を作製した。この溶液をC57BL6 mice (20~25 g) に、1週間に2回、4週連続腹腔内投与し、肝硬変モデルマウスを作製した。このモデルマウスに対して、リコンビナントタンパクED-

Siglec-9及びMCP-1をPBSに $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶解し、混合溶液を調製した。この混合溶液を最終の $\text{CCl}_4$ 溶液を投与（ $\text{CCl}_4$ 投与開始から1ヶ月）してから24時間後に、 $500\mu\text{l}$ を1回静脈内投与し、病態改善を検証した。

[0111]（肝硬変モデルにおける病理学的解析）

肝硬変、慢性肝炎患者の肝臓では、肝細胞死、炎症性細胞浸潤及び広範に不可逆性の線維性組織の増殖が認められる。ED-Siglec-9及びMCP-1投与群と非投与（PBS投与）群について組織解析（ED-Siglec-9及びMCP-1投与から3日後）を行った。HE染色結果及びシリウスレッド染色（赤染色：コラーゲンIの染色）結果をそれぞれ図14及び図15に示す。

[0112] 図14に示すように、Shamは正常肝臓組織を呈しているが、Pre-treatment（ED-Siglec-9/MCP-1投与直前）の組織においては、多くの肝臓細胞死及びディッセ腔における線維化の亢進が観察された。一方、PBS投与群においては、激しい細胞浸潤と著しい線維化が観察されたが、ED-Siglec-9/MCP-1投与群は正常肝像に近い組織像を呈していた。

[0113] また、図15に示すように、シリウスレッド染色の結果からは、Pre-treatmentとPBS投与群で激しい線維化を確認した。一方、ED-Siglec-9/MCP-1投与群ではほとんど線維化が確認できなかった。

[0114]（肝硬変及び慢性肝炎モデルにおける遺伝子解析）

ED-Siglec-9/MCP-1投与後3日の肝臓組織からRNAを採取し、炎症性サイトカインなどの遺伝子発現を定量的PCR法にて解析した。結果を図16及び図17に示す。

[0115] 図16に示すように、PBS投与群では炎症促進型M1マクロファージが産生する $\text{TNF-}\alpha$ の発現が上昇していたのに対して、ED-Siglec-9/MCP-1投与群で $\text{TNF-}\alpha$ の発現は抑制されている。一方、抗炎症

性M2マクロファージマーカーYm-1, CD206, Arginase-1の発現が上昇していた。

[0116] また、図17に示すように、PBS投与群では活性化した肝星状細胞hepatic stellate cellsが産生する $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), Collagen  $\alpha$ 1の発現が上昇していた。これに対して、ED-Siglec-9/MCP-1投与群では、 $\alpha$ -SMAの発現が抑制された。一方、線維化溶解に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) やIGF-1, HGFなどの肝再生に関わる因子の発現レベルの上昇が観察できた。

[0117] (活性化hepatic stellate cellsのマーカーである $\alpha$ -SMAの染色)

ED-Siglec-9及びMCP-1投与群と非投与(PBS投与)群から採取した肝臓組織に関し $\alpha$ -SMAの染色を行った。結果を図18に示す。

[0118] 図18に示すように、ED-Siglec-9/MCP-1投与群では、 $\alpha$ -SMA陽性細胞数が激減していた。

[0119] 以上のことから、ED-Siglec-9及びMCP-1を肝硬変に至る肝臓に投与することで、肝硬変に特徴的な肝細胞死、炎症性細胞浸潤及び不可逆性の線維性組織の増殖を抑制できることがわかった。

## 実施例 5

[0120] 本実施例では、ED-Siglec-9の静注により自己免疫性関節炎が劇的に改善されることを見だし、その作用点は自己免疫系そのものにあることが考えられた。

[0121] (コラーゲン誘発関節炎モデルマウスを用いた治療有用性の解析)

(コラーゲン誘発関節炎モデルマウスの作製)

コラーゲン誘発関節炎マウスは、関節リウマチの主要な動物モデルとして用いられている。DBA/1Jマウスの尾底部に、異種動物である牛由来の2型コラーゲンを皮下注射、更に21日後に再注射することにより、コラーゲン誘発性関節炎を発症させた。関節炎の重症度は関節炎スコアを用いて評価した。図19に示すスコアリングシステムを用いて、各群の平均関節炎スコアを算

出した。また各マウスで関節炎スコア1以上を、関節炎発症と定義した。

[0122] (1) コラーゲン誘発性関節炎 (CIA) マウスにおける、ED-Siglec-9 投与による関節炎抑制効果の解析

まず、最適なED-Siglec-9 投与量を決定するために、コントロール群 (生食) とED-Siglec-9 群 (0.1  $\mu$ g、1  $\mu$ g、10  $\mu$ g /マウス) の4群 (各n=7) で検討を行った。2回目コラーゲン投与の2日後、頸静脈より生食または各濃度のED-Siglec-9 を投与し、その7日後の関節炎スコアを評価した。結果を図20に示す。

[0123] 図20に示すように、ED-Siglec-9の0.1および10  $\mu$ g 群では、コントロール群と有意な違いを認めなかったのに対して、1  $\mu$ g 投与群では、コントロール群と比較して有意に関節炎スコアが抑制された。同時に、関節リウマチにおける主要な炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ の血清中濃度を測定したところ、1  $\mu$ g 群ではコントロール群と比較して有意に抑制されていた。

[0124] 次にED-Siglec-9の繰り返し投与による、長期間の関節炎抑制効果について検討した。ED-Siglec-9の投与量は、1  $\mu$ gとした。2回目コラーゲン投与の2日後から、7日に1回の頻度で、頸静脈より生食またはED-Siglec-9 を投与した。関節炎スコアの評価結果を図21に示す。

[0125] 図21に示すように、最終評価時において、コントロール群では関節炎発症率が100%に達していたのに対して、ED-Siglec-9 投与群では発症率40%と有意に抑制されていた。また関節炎スコアについても、コントロール群では平均4.33であったのに対して、ED-Siglec-9 群では1.4と有意に抑制されていた。同時に、ED-Siglec-9 投与群及びコントロール群について、血清TNF- $\alpha$ 濃度と関節炎スコアの相関を検討したところ、相関係数 (R) が0.837と非常に強い有意な正の相関関係を示した。

[0126] (マウス・マクロファージ、ヒト関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞における

ED-Siglec-9による遺伝子発現変化)

ED-Siglec-9の*in vivo* (CIAマウス)における関節炎抑制効果の作用機序を、*in vitro*で検討した。関節リウマチでは、活性化された免疫細胞(マクロファージなど)により分泌される炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 等)が滑膜細胞を刺激し、活性化された滑膜細胞が蛋白分解酵素(MMP-3等)を分泌して最終的に骨軟骨破壊を引き起こす。ED-Siglec-9の作用点が免疫系にあるのか、それとも炎症の主座である滑膜にあるのかを探るため、マクロファージ(自己免疫疾患における中心的免疫細胞の一つ)と、関節炎の主座である滑膜細胞を用いて実験を行った。

- [0127] DBA/1Jマウスの腹腔内よりマクロファージを単離( $n=4$ )した。ED-Siglec-9(5-20ng/ml)で1時間前処置、LPS(0.2 $\mu$ g/ml)で12時間刺激後、mRNAを抽出し*real-time*PCR法にて遺伝子発現を測定した。結果を図22(A)に示す。
- [0128] 図22(A)に示すように、ED-Siglec-9は、LPS刺激によるTNF- $\alpha$ (関節リウマチにおける代表的な炎症性サイトカイン)の発現亢進を、用量依存的に抑制する傾向を示した。
- [0129] 次いで、関節リウマチ患者の、人工膝関節置換術施行時に採取した滑膜組織から酵素的に単離した、滑膜線維芽細胞(FLS)を用いて実験を行った( $n=3$ )。滑膜線維芽細胞を48時間前培養、ED-Siglec-9(50ng/ml)の存在/非存在下において、TNF- $\alpha$ (10mg/ml)で12時間刺激後、mRNAを抽出し*real-time*PCR法にて遺伝子発現を測定した。結果を図22(B)に示す。
- [0130] 図22(B)に示すように、ED-Siglec-9はヒト関節リウマチ由来滑膜線維芽細胞において、TNF- $\alpha$ 刺激によるMMP-3(滑膜炎で産生される代表的蛋白分解酵素)発現亢進に対して、明らかな抑制効果を示さなかった。
- [0131] 以上の結果からED-Siglec-9のCIAマウスに対する作用点は

、滑膜炎局所に対する抗炎症作用ではなく、自己免疫性関節炎の発症と進展の本体である、自己免疫系そのものであることが示唆された。

## 実施例 6

[0132] 炎症性／組織破壊型M1ーマクロファージおよび抗炎症性／組織再生型M2ーマクロファージのバランスが組織再生環境の構築に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。急性および慢性炎症では無秩序なM1ーマクロファージの活性化が組織損傷の拡大や線維化を促進し組織修復を妨げる。一方、抗炎症性M2ーマクロファージは血管再生を促進、死細胞の貪食、生体内幹細胞の増殖や集積を促すことで組織修復を促す。しかしながら、生体のM2誘導能は限られており、ほとんどの組織破壊環境がM1優位である。ED-Siglec-9及びMCP-1がM1優位な組織破壊的炎症環境を抗炎症・組織再生環境に変換することを見出した。

[0133] (ラット頭蓋骨欠損モデル：形態学的解析)

全身および局所麻酔下にて7週齢SDラットの頭頂部皮膚を骨膜とともに剥離し、直径5mmの骨採取用トレフィンバーにて注水下で頭蓋骨を削除し、骨欠損を形成した。このとき骨膜は温存した。ED-Siglec-9及びMCP-1各100ng)をPBSに溶解し、アテロコラーゲンをスキャフォールドとして骨欠損部に留置し、皮膚を復位して縫合、閉創した。術後6週で、 $\mu$ CT、組織学的評価(H-E染色)を行った。結果を図23に示す。

[0134] 図23に示すように、ED-Siglec-9/MCP-1をラット頭蓋骨欠損モデルに投与し、術後6週間で著明な骨再生効果を、組織学的にもCT上でも確認できた。以上の結果から、ED-Siglec-9/MCP-1は骨再生促進因子製剤として臨床応用が可能であることが明らかとなった。

## 実施例 7

[0135] 本実施例では、グルコース応答性インスリン分泌実験を行った。MIN6(1×10<sup>6</sup>/well)を90%コンフルエントになるまで培養し、DME

M（無血清の培養液）で3回洗浄した。培養液をそれぞれSHED-CM, SHED-CM+各種抗体の添加（抗ヒトIgG：1/500, 抗ヒトED-Siglec-9抗体：1/500, 抗MCP-1抗体1/500, 抗ヒトED-Siglec-9抗体：1/500+抗MCP-1抗体：1/500）に交換し、6時間培養を行った。その後、低グルコースKRB緩衝液（2.5mM）で30分間スタベーションを行った後、低グルコースKRB緩衝液2.5mM）および高グルコースKRB緩衝液（16.7mM）で30分間刺激を行った。刺激後の上清を回収し、上清を回収した後、acid ethanol法にてインスリン含有量を回収した。HTRF（商標）法を用いて、上清中のインスリン量(release)および上清回収後のインスリン含有量(content)を測定し、release/content(%)にてインスリン分泌能の比較検討を行った。結果を図24に示す。

[0136] 図24に示すように、中和抗体にて因子をブロックしたところ、抗ED-Siglec-9、抗MCP-1及び抗MIX（ED-Siglec-9+MCP-1）では、SHED-CMに比べ、有意にインスリン分泌能が低下していた。コントロールであるIgGでは、インスリン分泌能が低下していないことから、ED-Siglec-9及びMCP-1は膵β細胞に対してインスリン分泌に関与していることがわかった。

#### 配列表フリーテキスト

[0137] 配列番号7～36：プライマー

## 請求の範囲

- [請求項1] 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有する第1の成分、シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有する第2の成分、及びコンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、組織修復剤。
- [請求項2] 少なくとも前記第1の成分及び前記第2の成分のいずれか又は双方を含む、請求項1に記載の組織修復剤。
- [請求項3] 前記第1の成分と前記第2の成分とを含む、請求項1又は2に記載の組織修復剤。
- [請求項4] 前記第1の成分は、配列番号2で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項1～3のいずれかに記載の組織修復剤。
- [請求項5] 前記第2の成分は、配列番号4で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項1～4のいずれかに記載の組織修復剤。
- [請求項6] 前記第3の成分を含む、請求項1～5のいずれかに記載の組織修復剤。
- [請求項7] 前記第1の成分、前記第2の成分及び第3の成分からなる群から選択される1種以上の成分を、以下の(a)又は(b)に記載の活性を呈するのに有効量含有する、請求項1～6のいずれかに記載の組織修復剤。
- (a) 炎症組織における組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導活性
  - (b) 抗炎症性サイトカインの産生促進活性
- [請求項8] 請求項1～7のいずれかに記載の組織修復剤を有効成分とする、抗炎症剤。

- [請求項9] 請求項1～7のいずれかに記載の組織修復剤を有効成分とする、脊髄損傷、脳梗塞、新生児低酸素脳症、アルツハイマー症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症及びパーキンソン病からなる群から選択される中枢神経系疾患の予防又は治療剤。
- [請求項10] 請求項1～7のいずれかに記載の組織修復剤を有効成分とする、劇症肝炎、急性肝炎、慢性肝炎、急性および慢性間質性肺炎、I型およびII型糖尿病、シェーグレン病、ドライアイ、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚創傷治癒、心筋梗塞、骨髄移植に伴う免疫拒絶からなる群から選択される非中枢神経系疾患の予防又は治療剤。
- [請求項11] 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、  
シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び  
コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、組織修復型マクロファージ及び／又はミクログリアの誘導剤。
- [請求項12] 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、  
シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び  
コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、抗炎症性サイトカインの産生促進剤。
- [請求項13] 生体外で、球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、  
シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及び

コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種の存在下でと、ミクログリア又はマクロファージを培養する工程、を備える、組織修復型ミクログリア又はマクロファージの生産方法。

[請求項14] 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

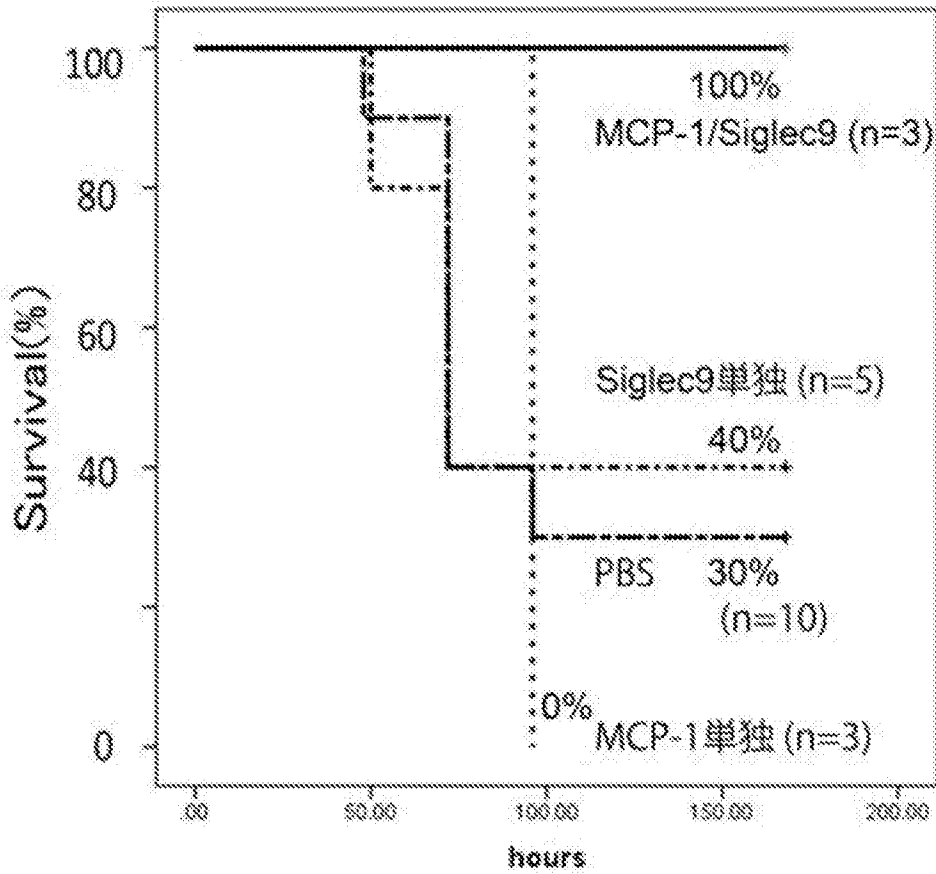
シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及びコンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を含む、ミクログリア/マクロファージ用の試薬キット。

[請求項15] 前記第1の成分と前記第2の成分とを含む、請求項14に記載の試薬キット。

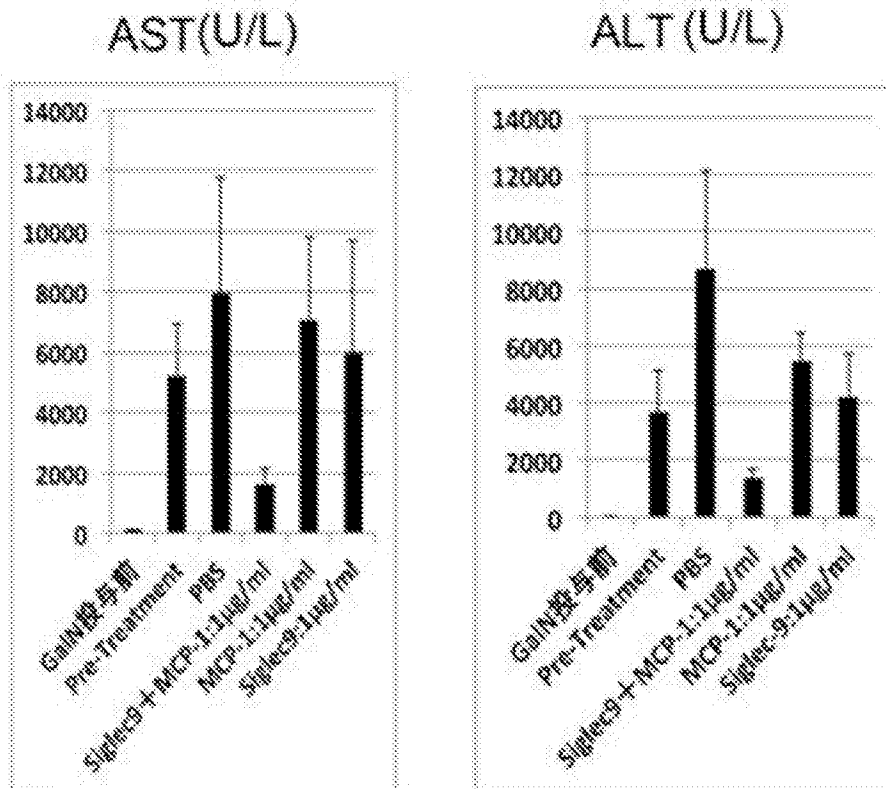
[請求項16] 単球走化性促進因子-1 (MCP-1) 活性を有するタンパク質である第1の成分、

シアル酸結合イムノグロブリン様レクチン-9 (Siglec-9) の細胞外ドメイン活性を有するタンパク質である第2の成分、及びコンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分からなる群から選択される少なくとも1種を損傷組織又は炎症組織に送達して組織修復を促進する方法。

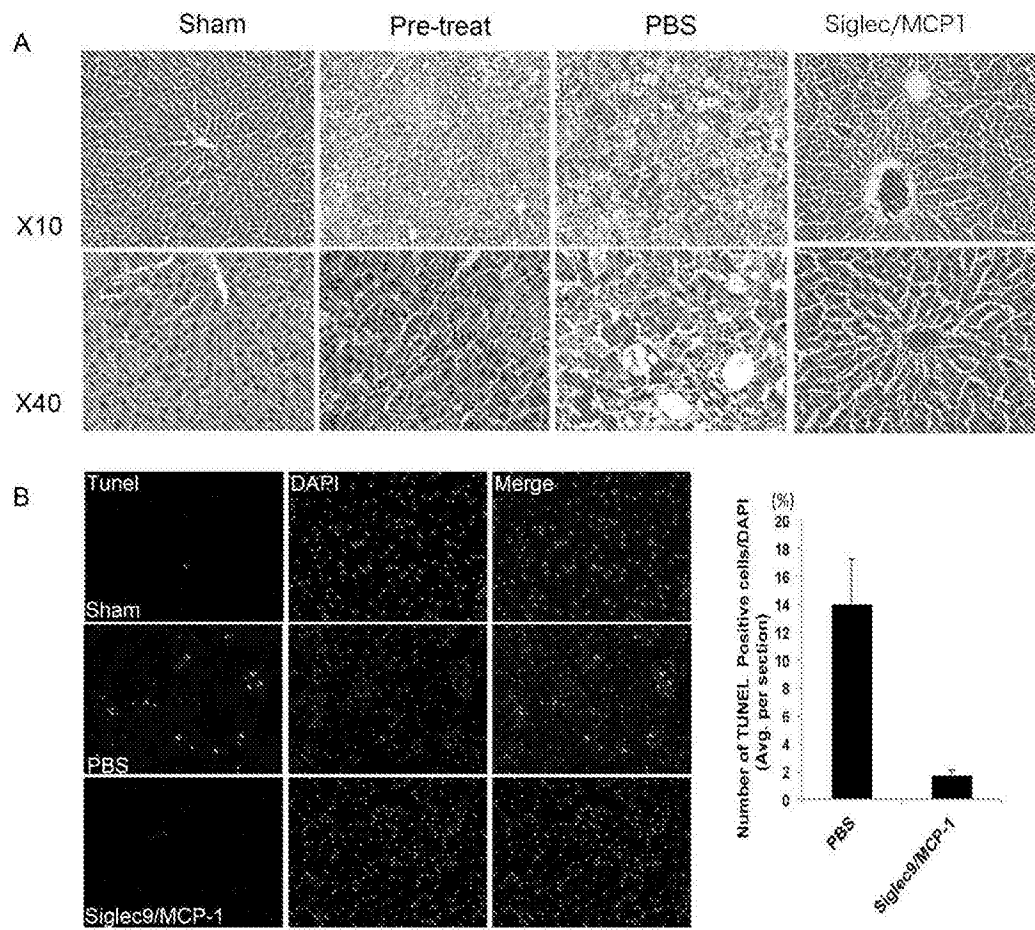
[図1]



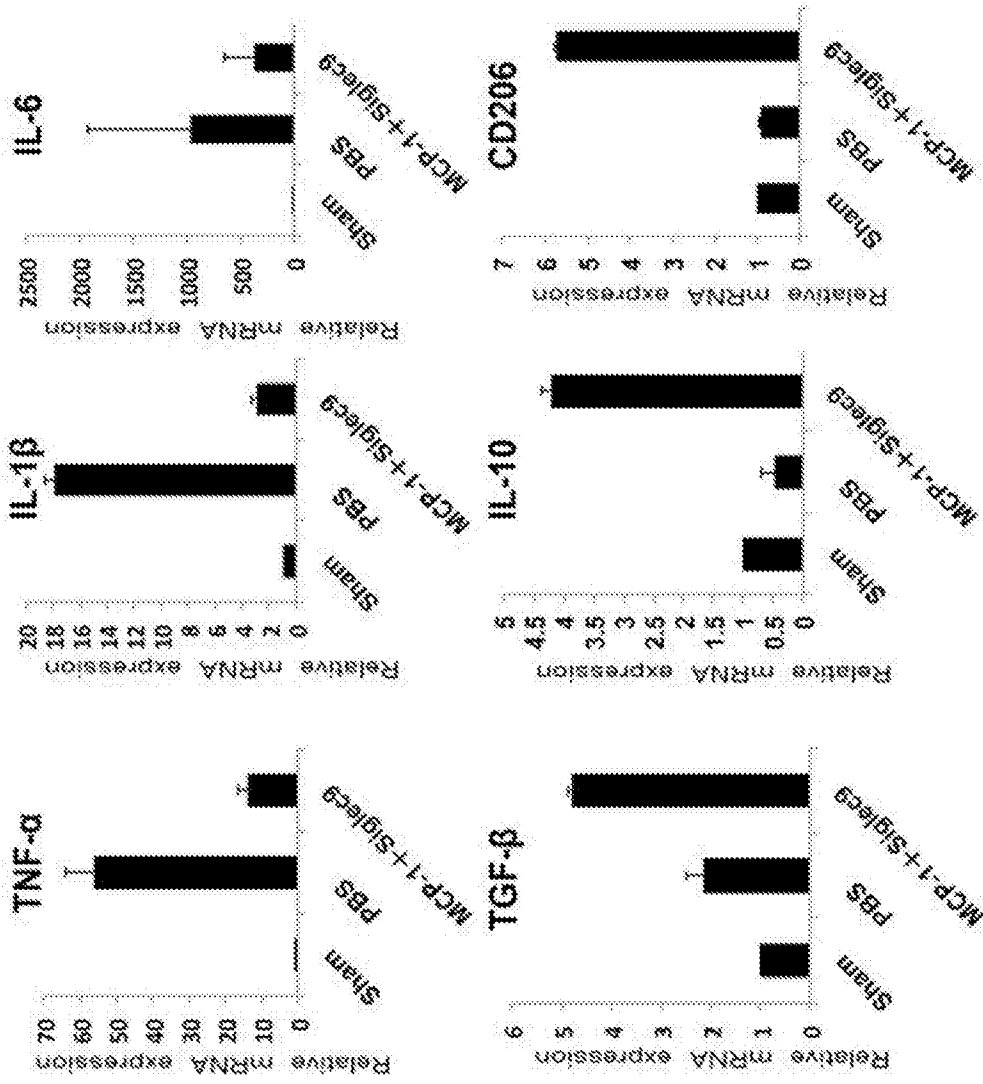
[図2]



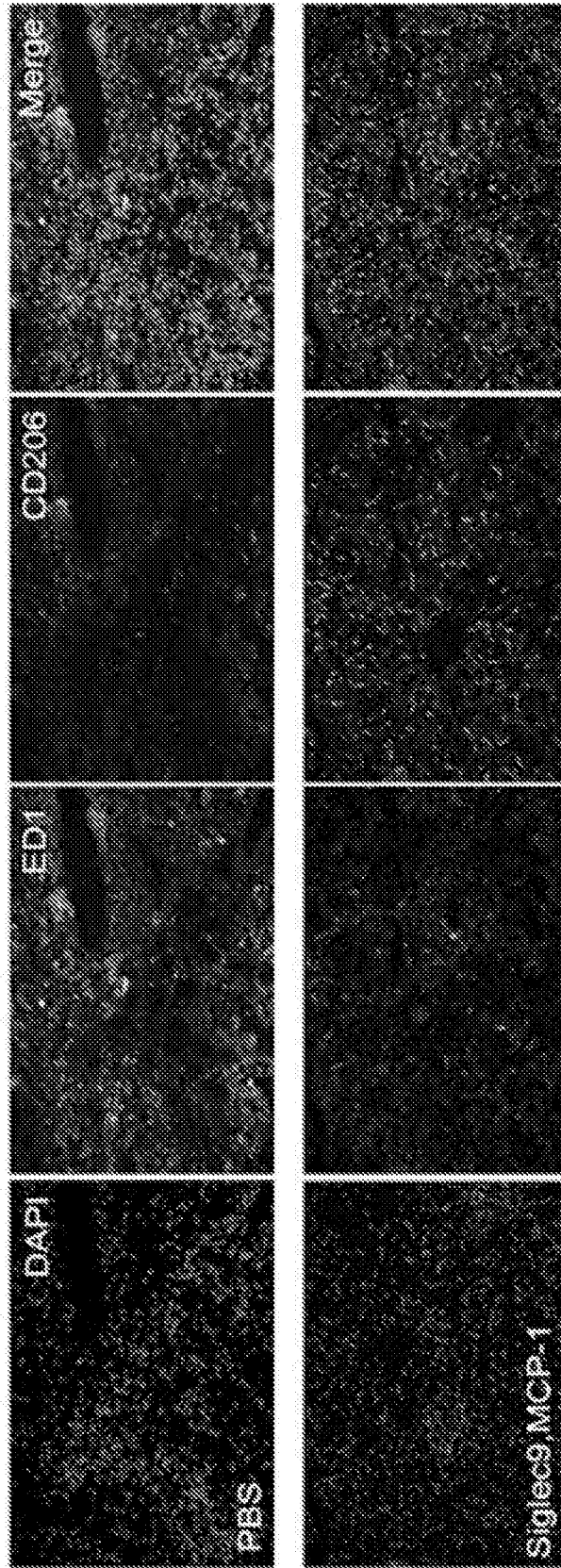
[図3]



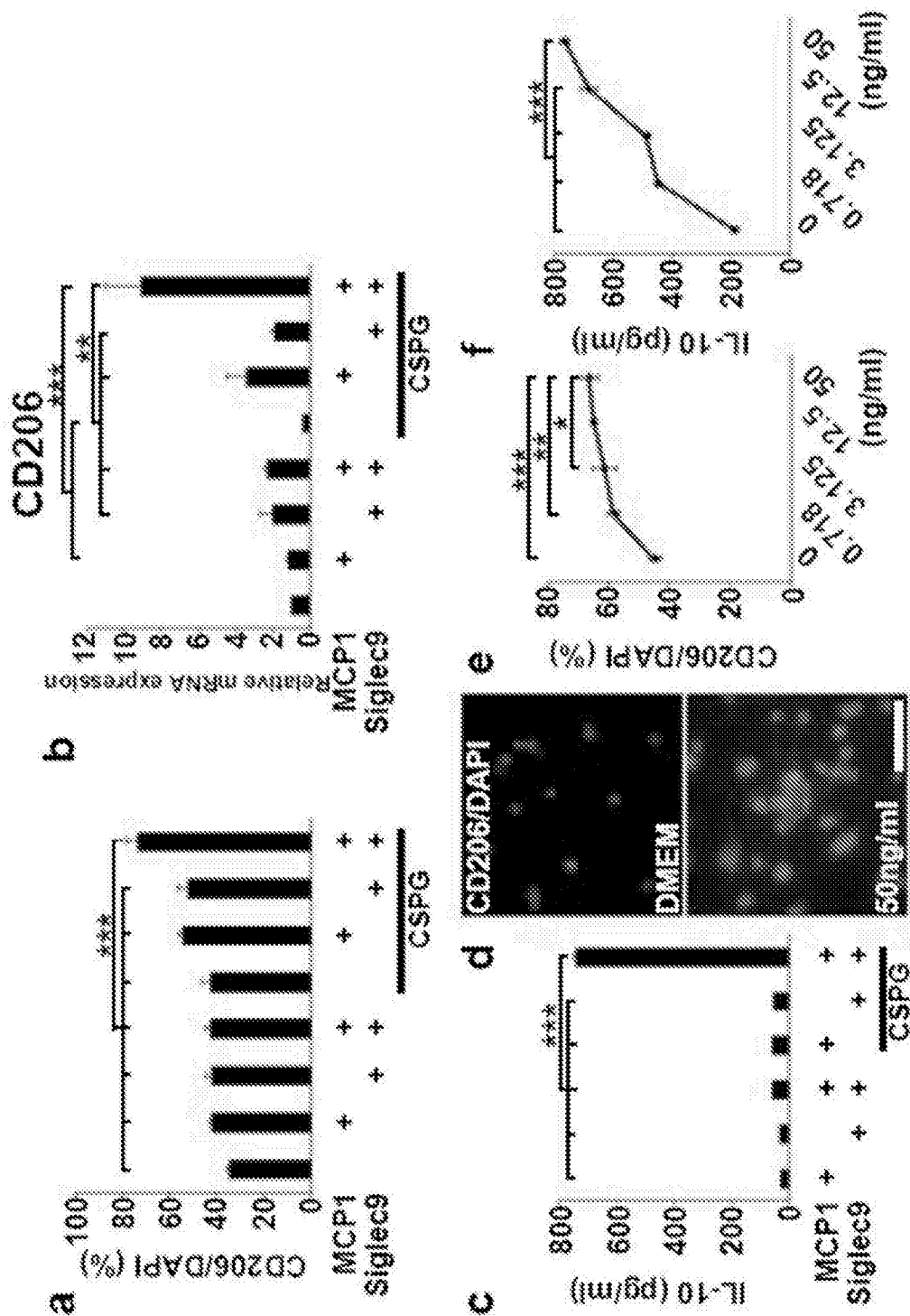
[Figure 4]



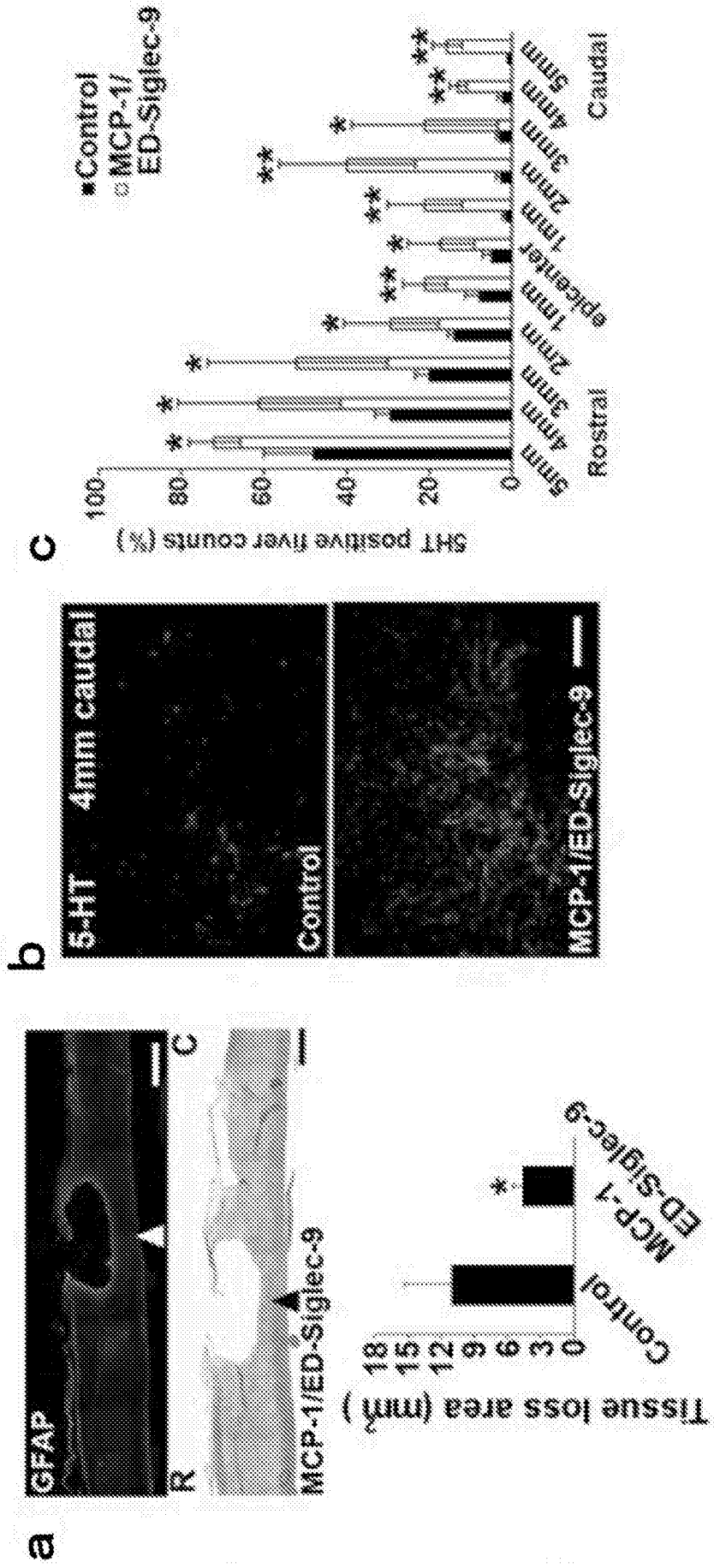
[5]



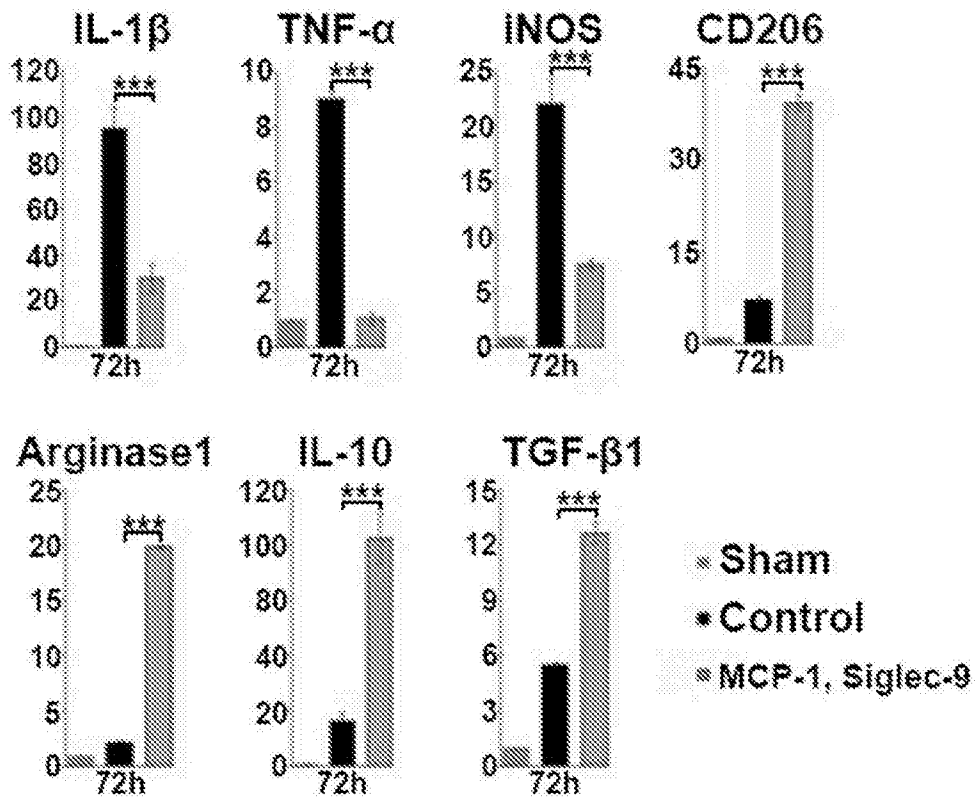
[6]



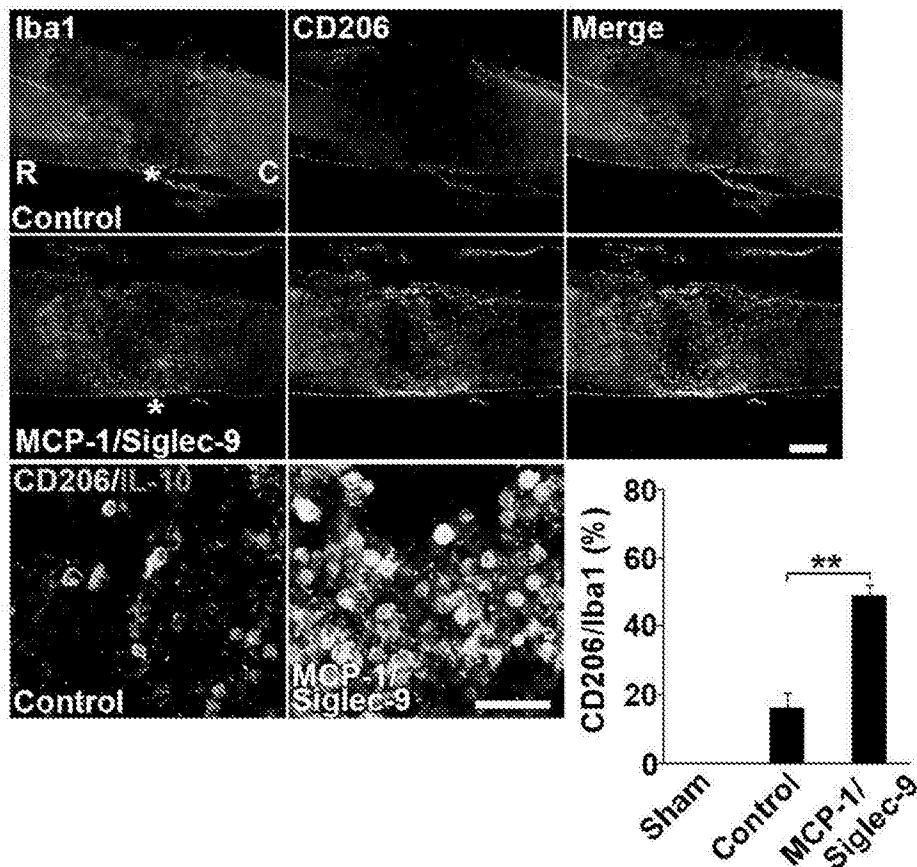
[7]



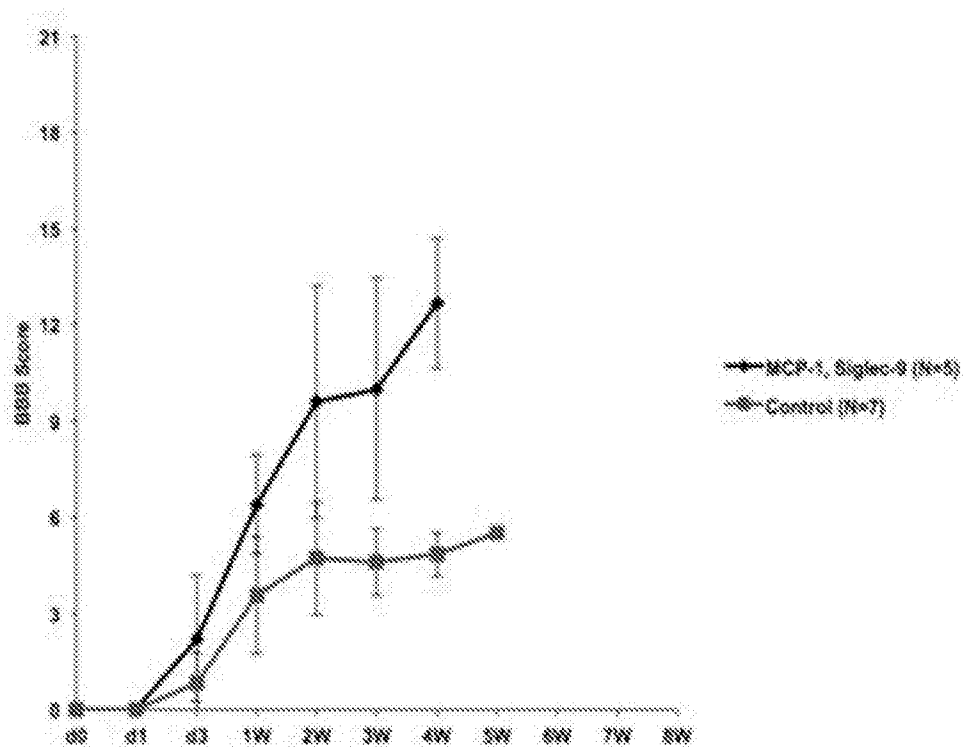
[図8]



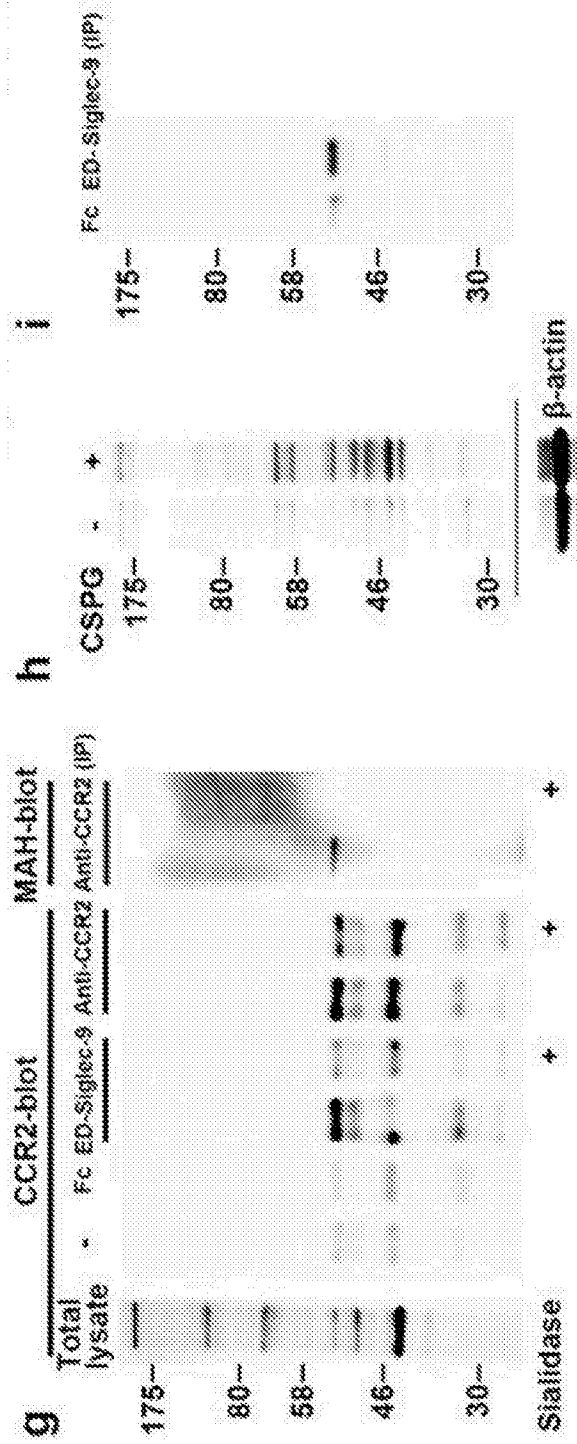
[図9]



[図10]

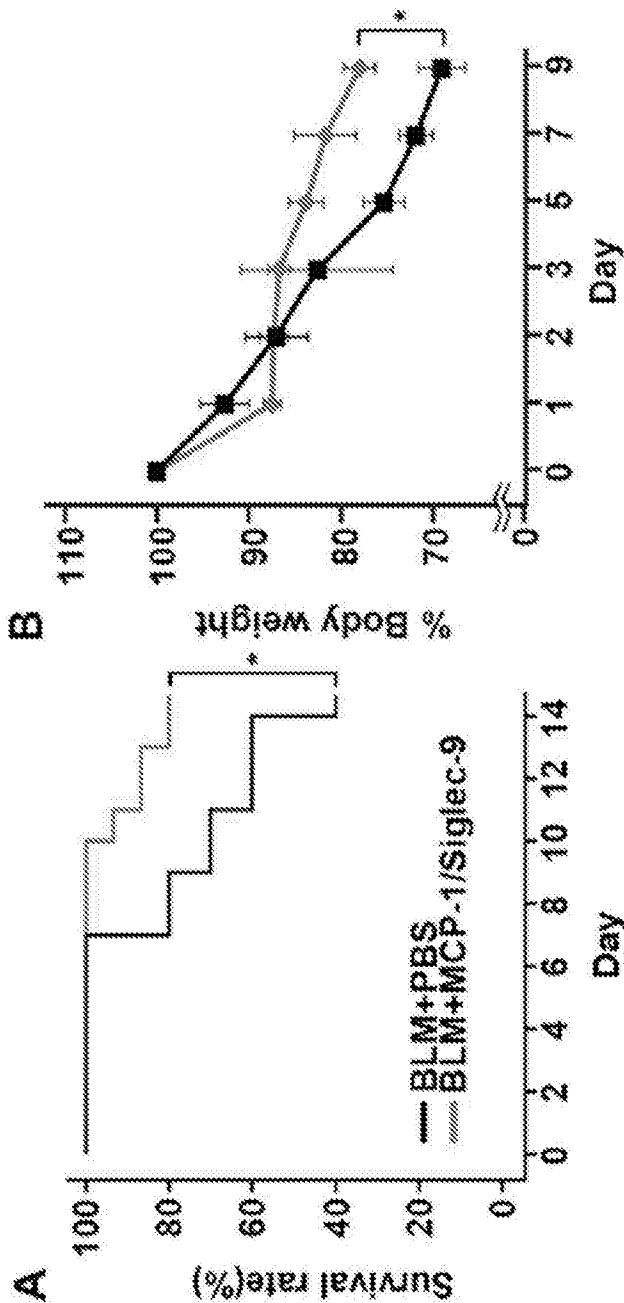


[11]



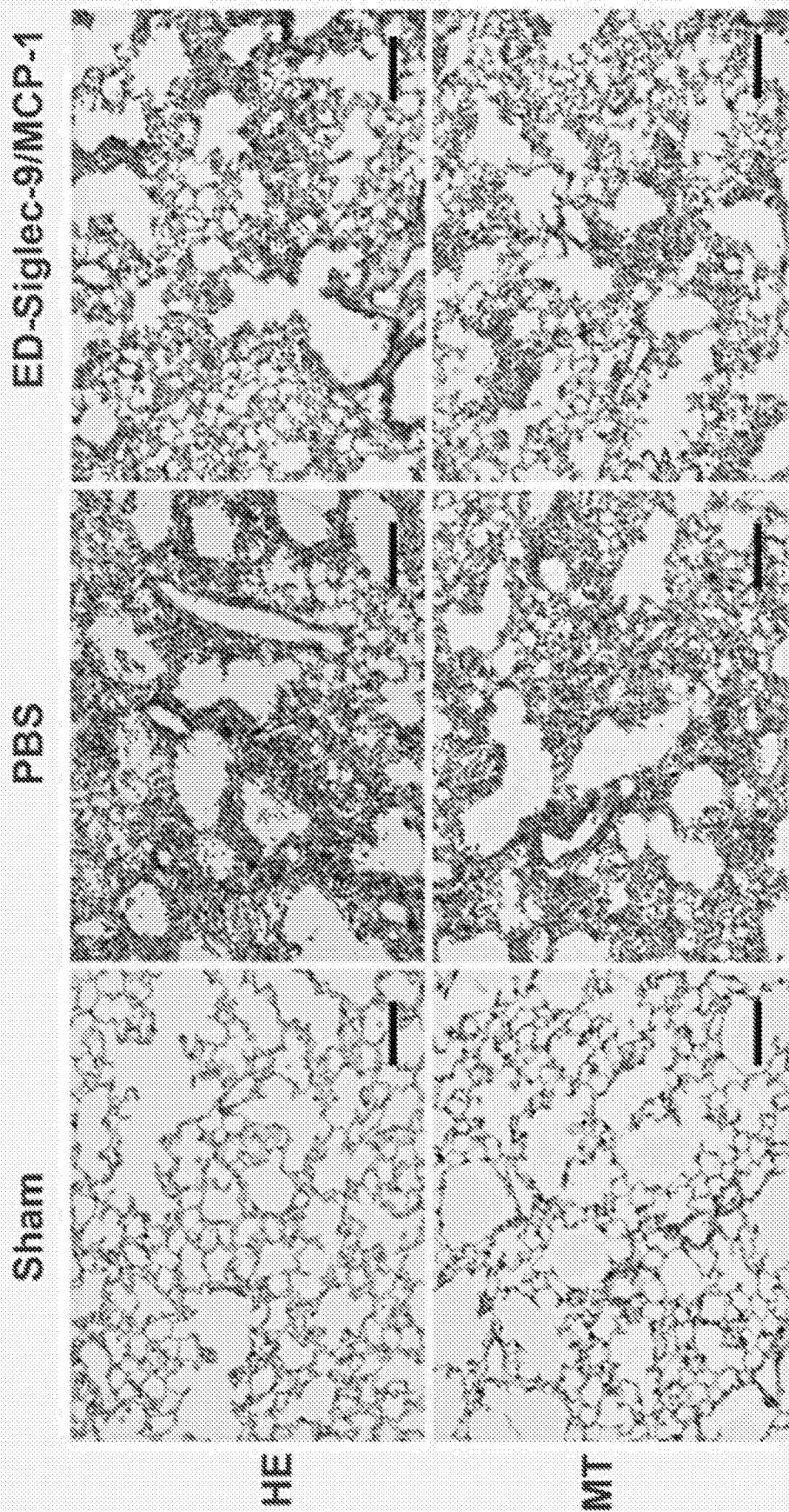
[図12]

急性肺傷害モデル 2因子投与 体重・生存率グラフ



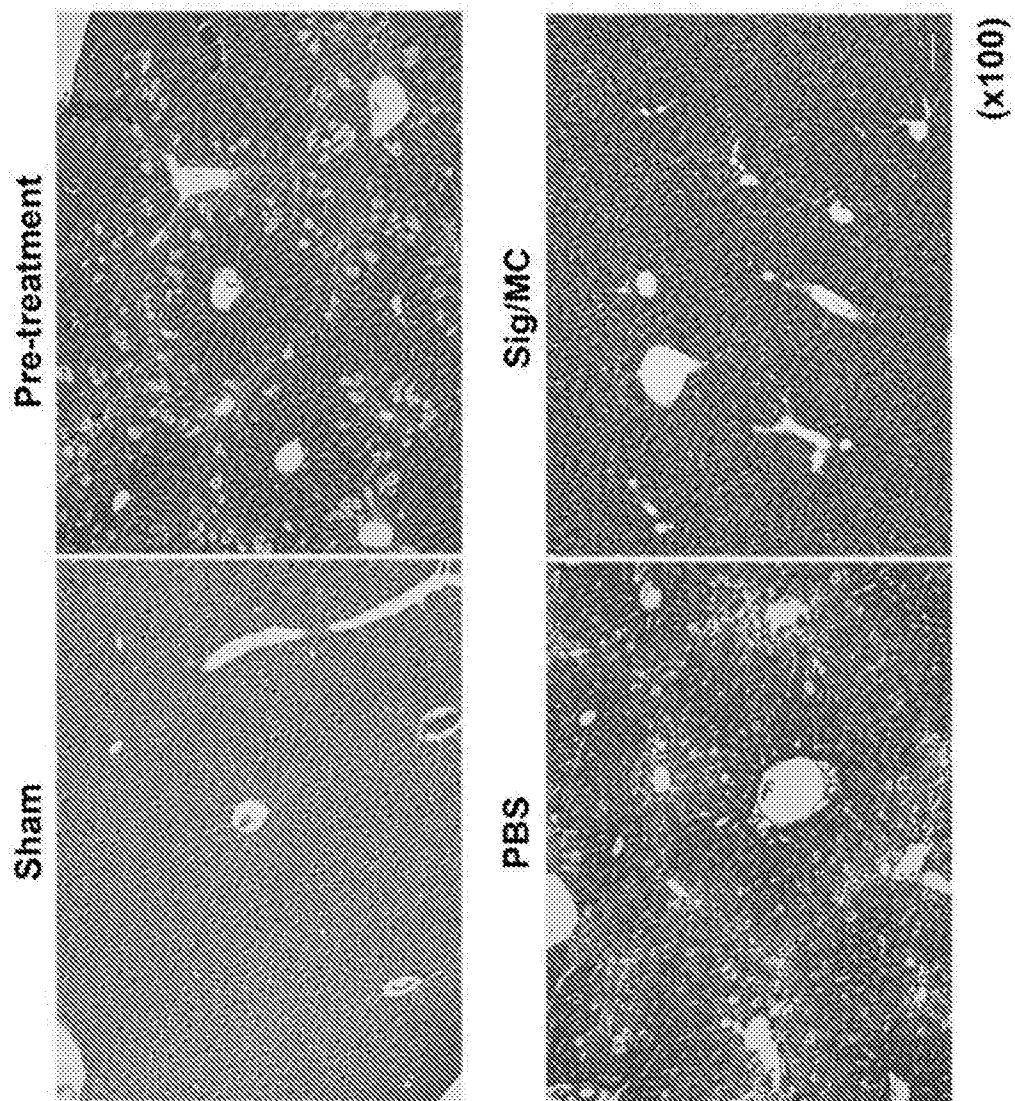
因子投与群がn =15,コントロールがn =10

[13]

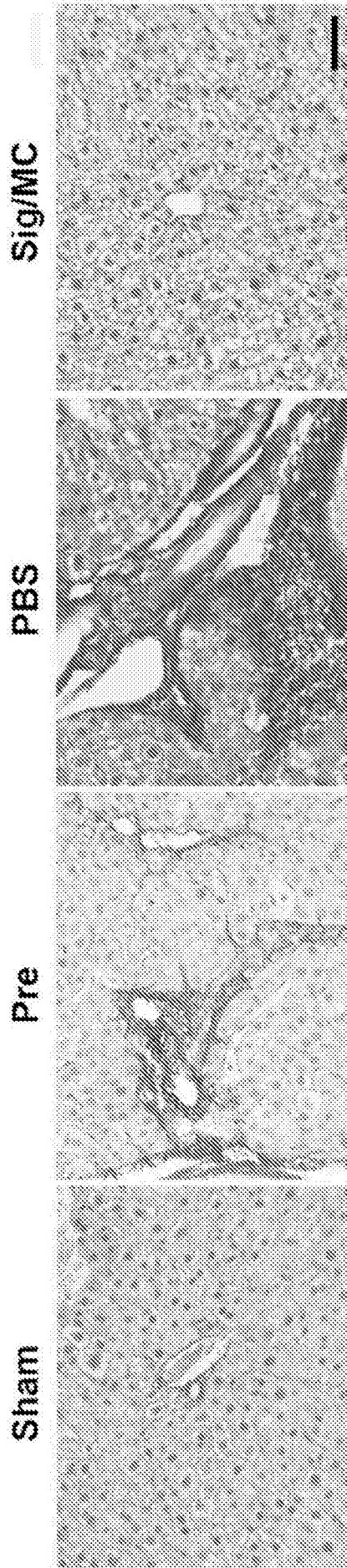


— 100μm

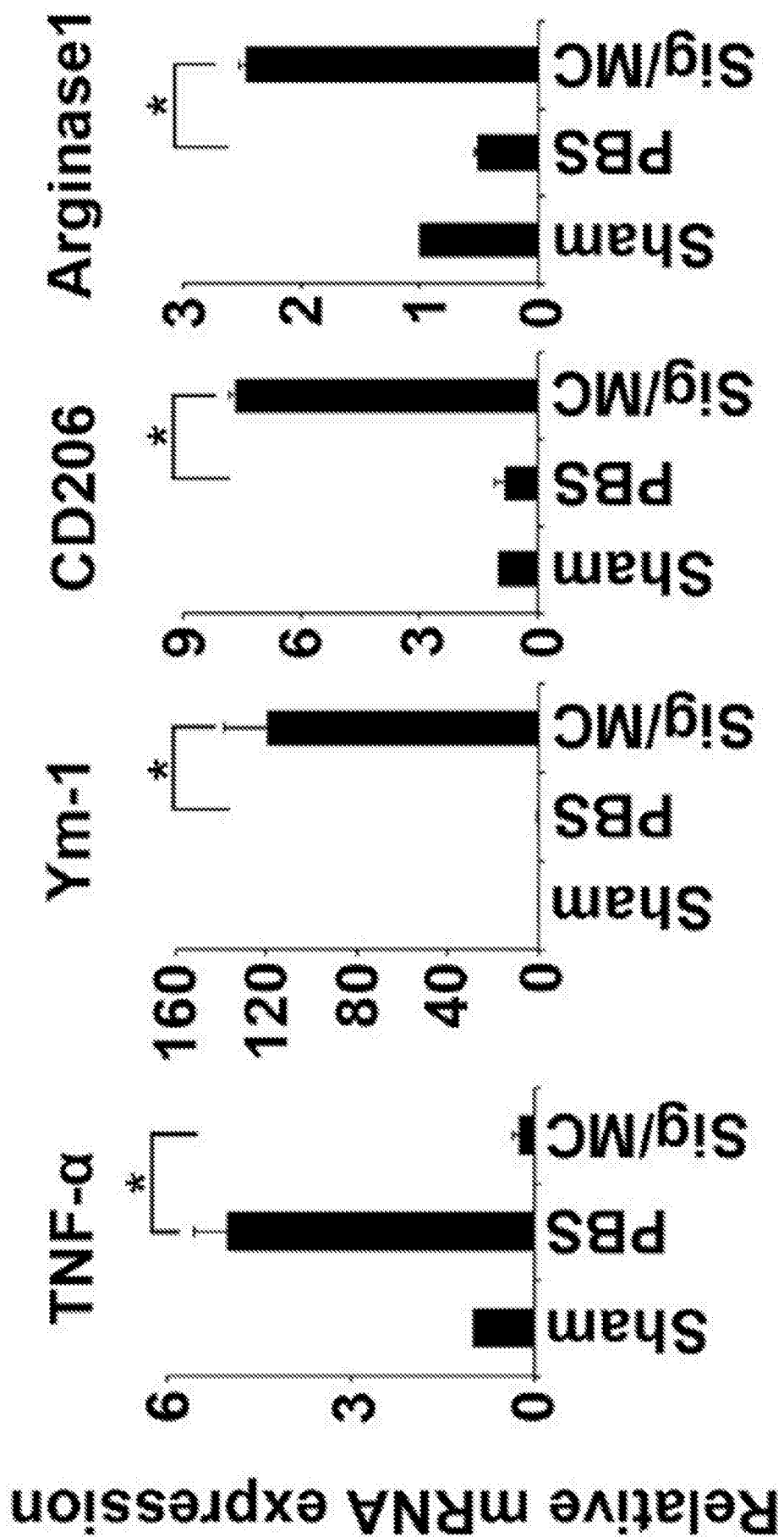
[14]



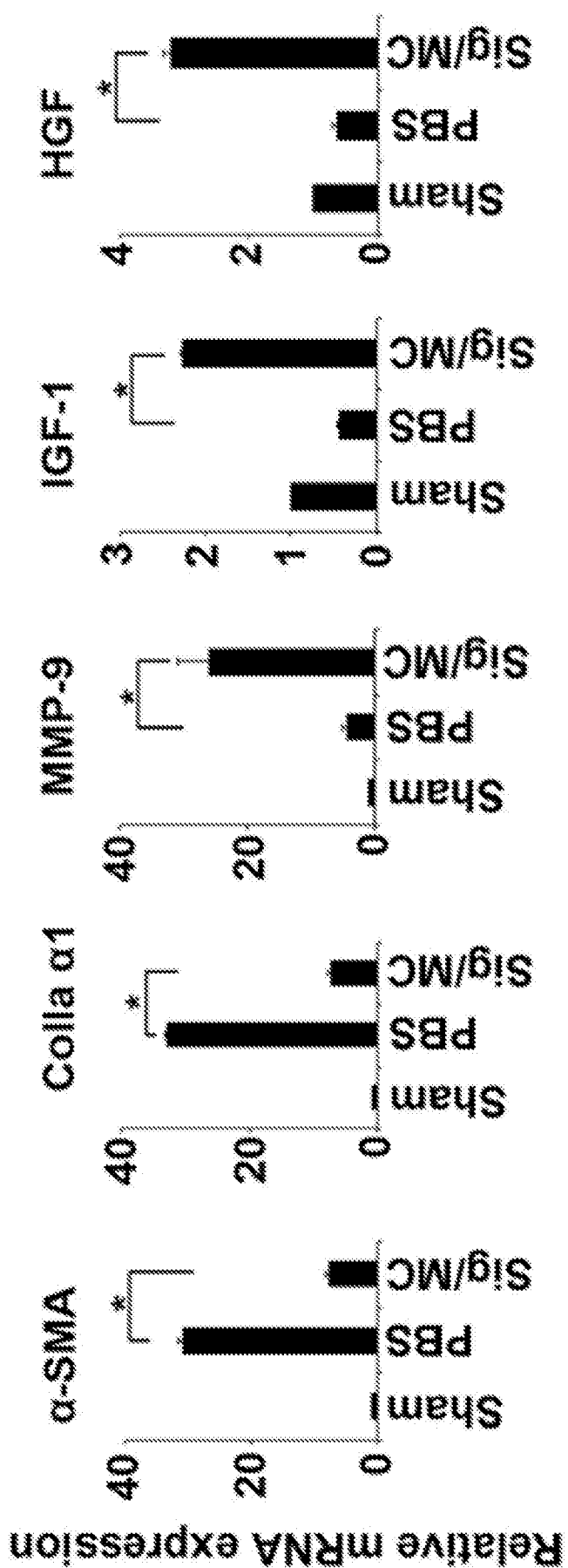
[15]



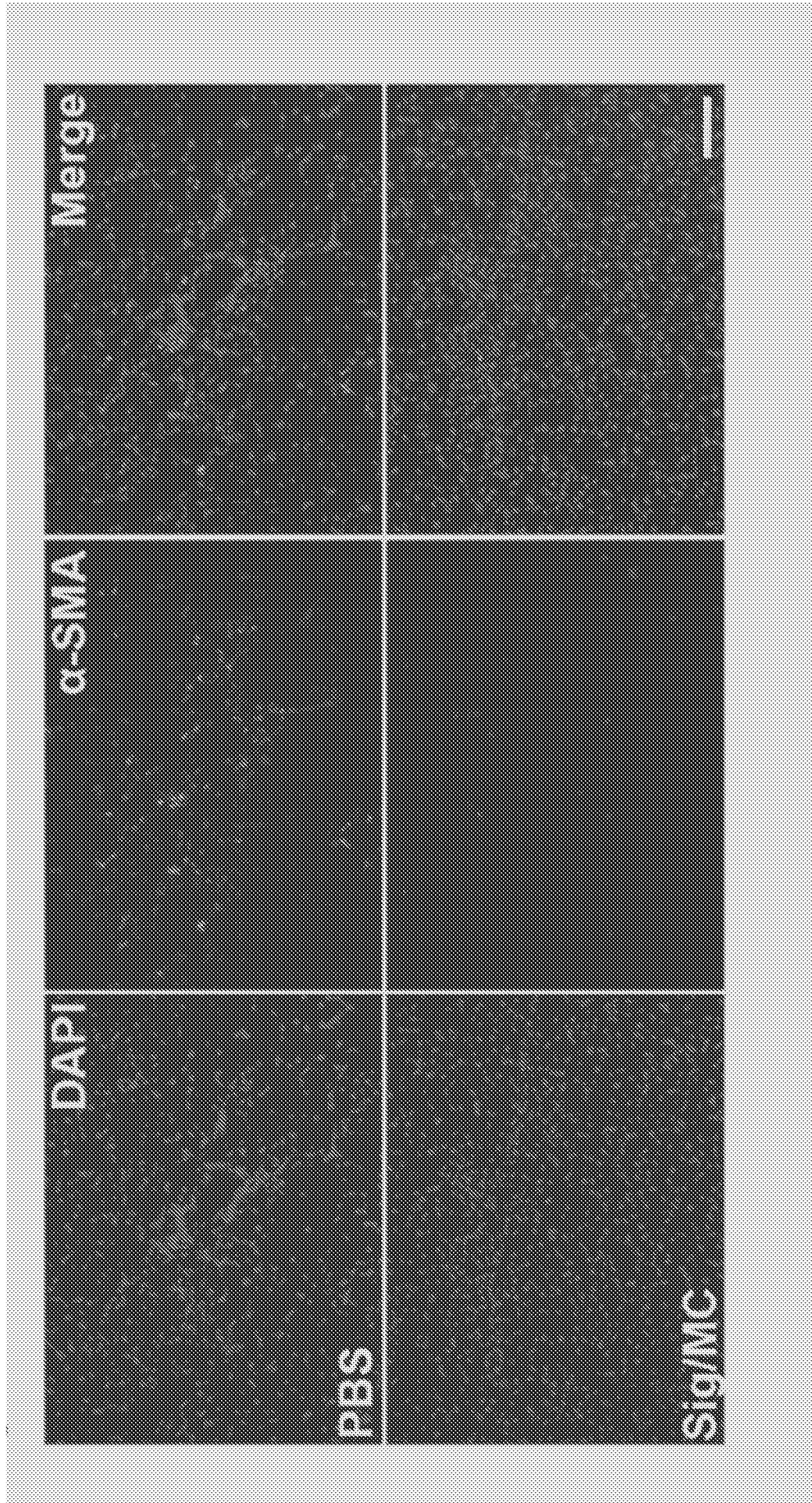
[図16]



[図17]



[18]

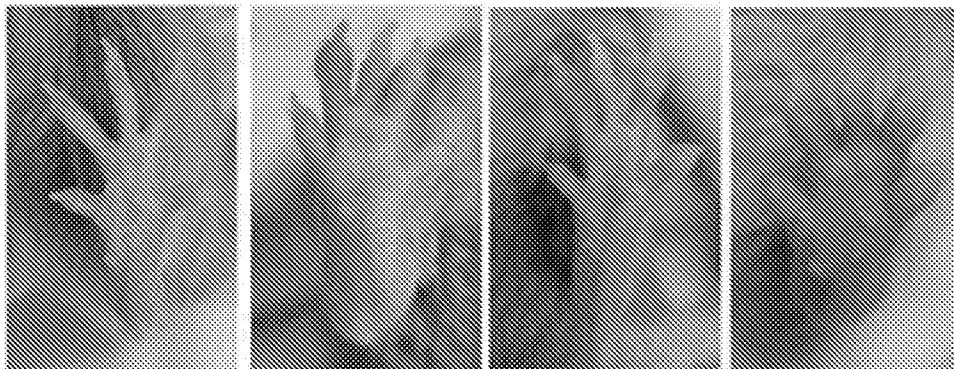


[図19]

## 関節炎スコア

---

- Grade separately on a scale of 0-3  
(maximum score of 12 per mouse)

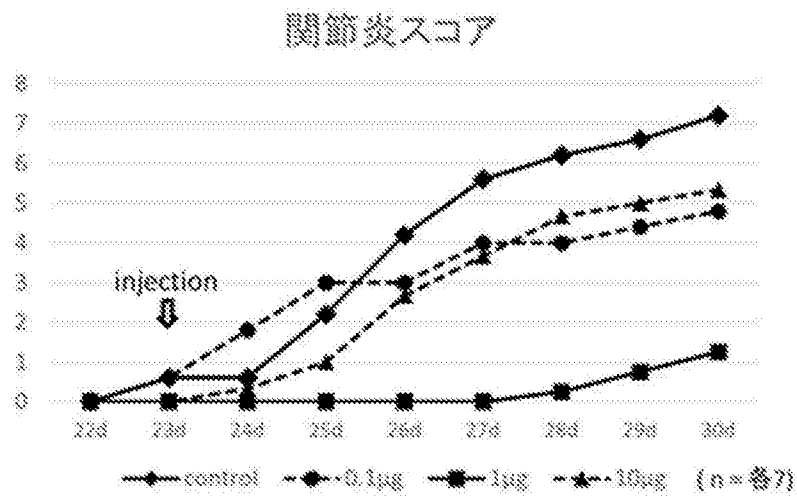


0 : normal

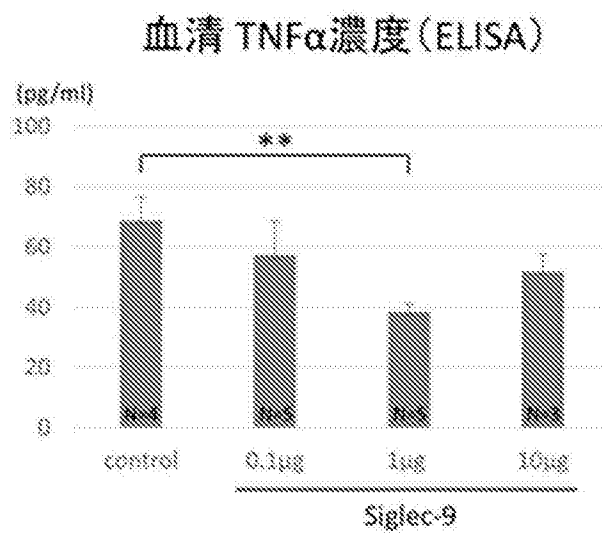
1:swelling  
of one digit2:swelling of  
two digit or more3:swelling of  
the entire paw

[図20]

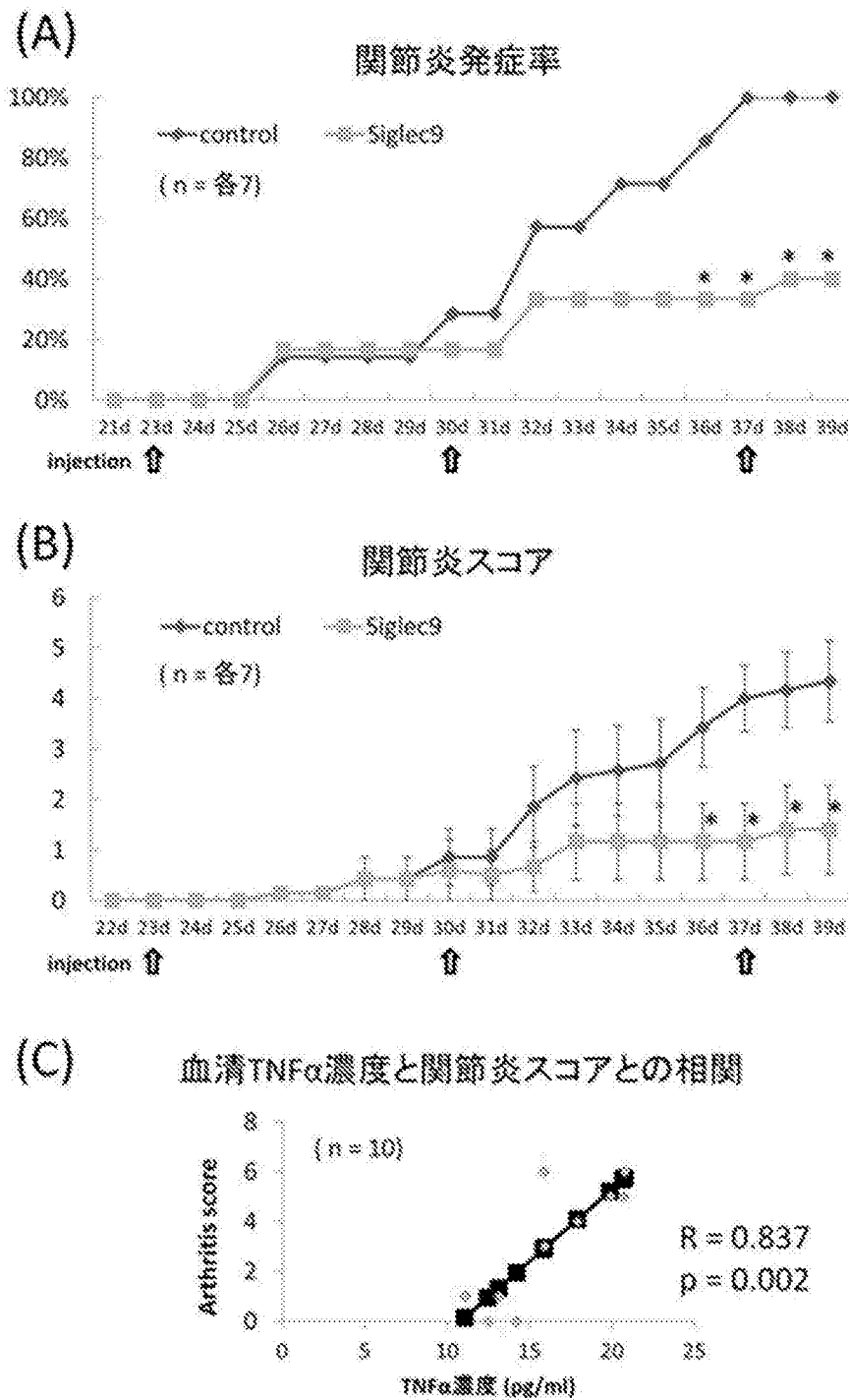
(A)



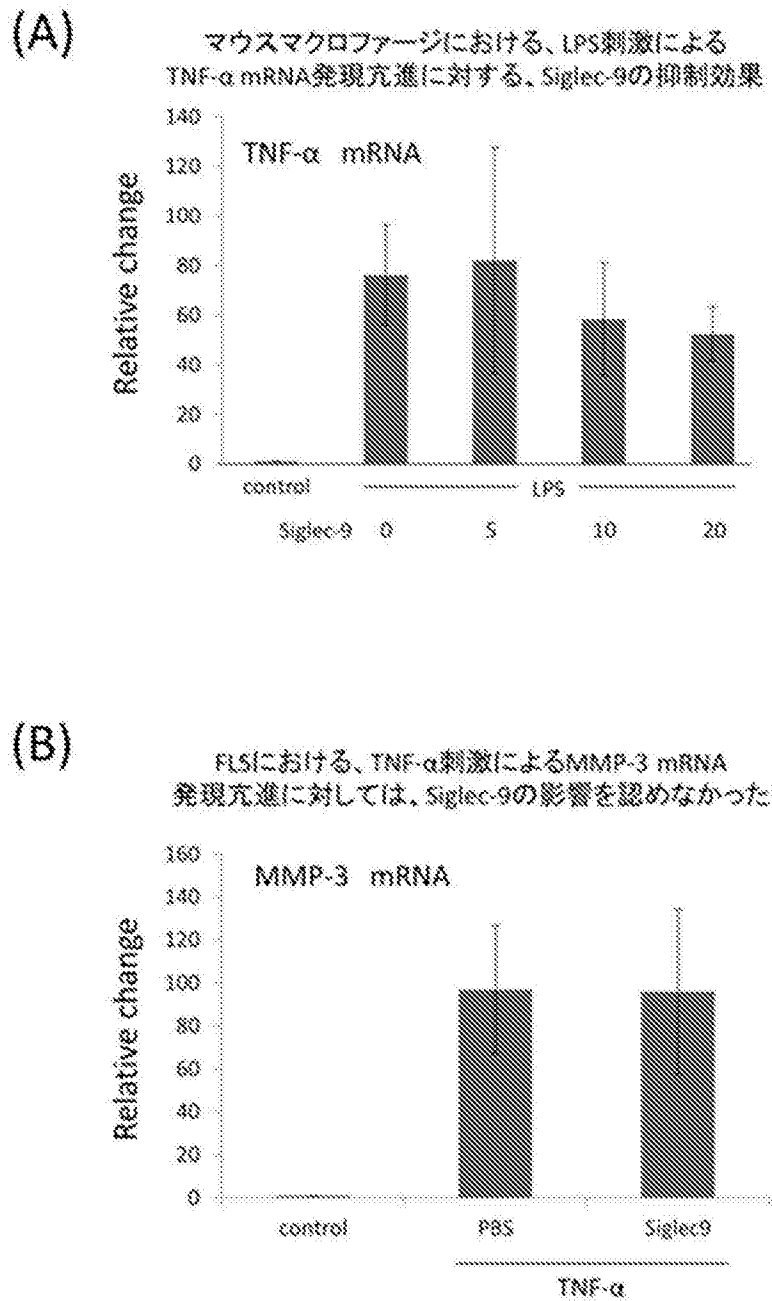
(B)



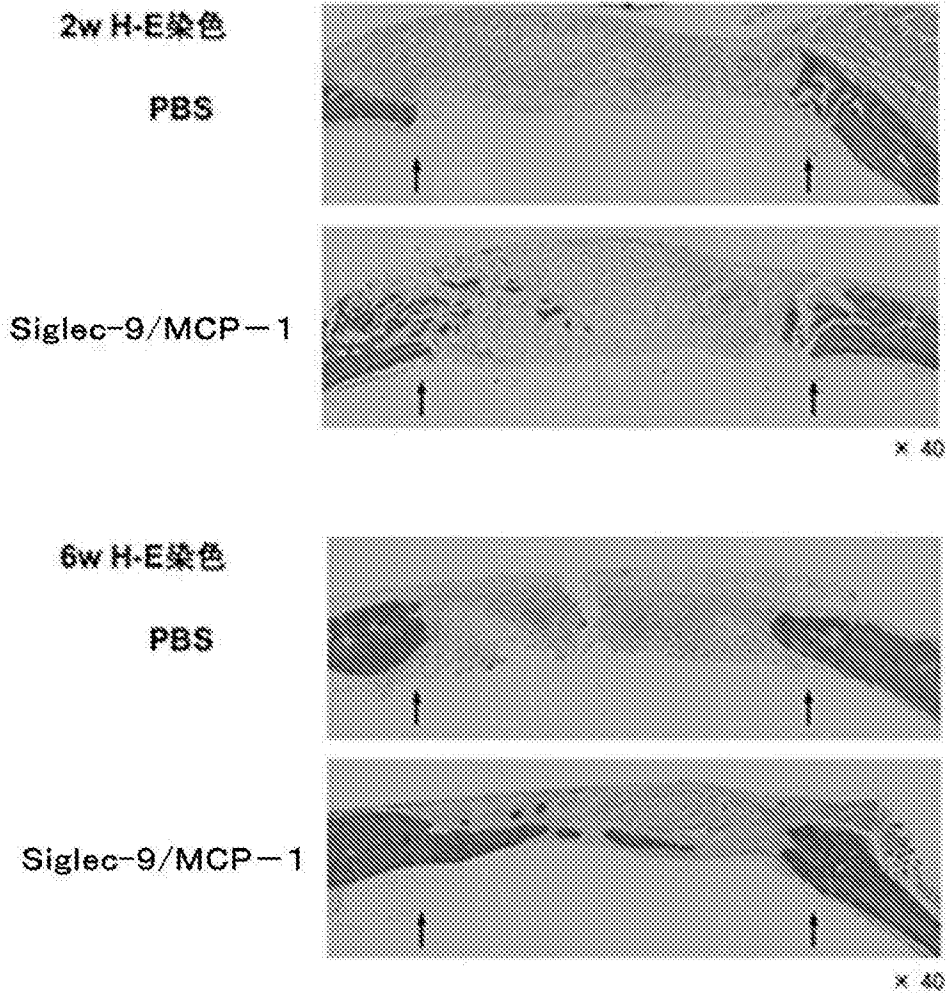
[図21]



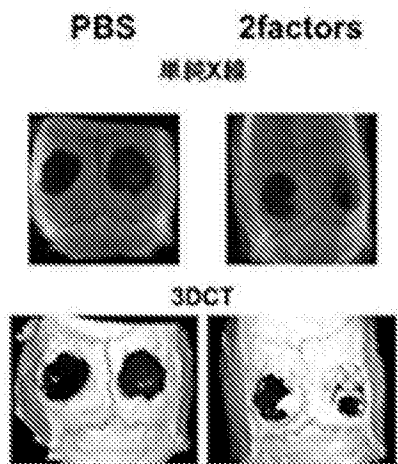
[図22]



[図23]

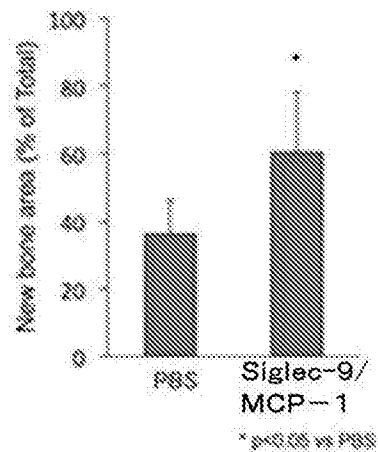


6w X線学的評価

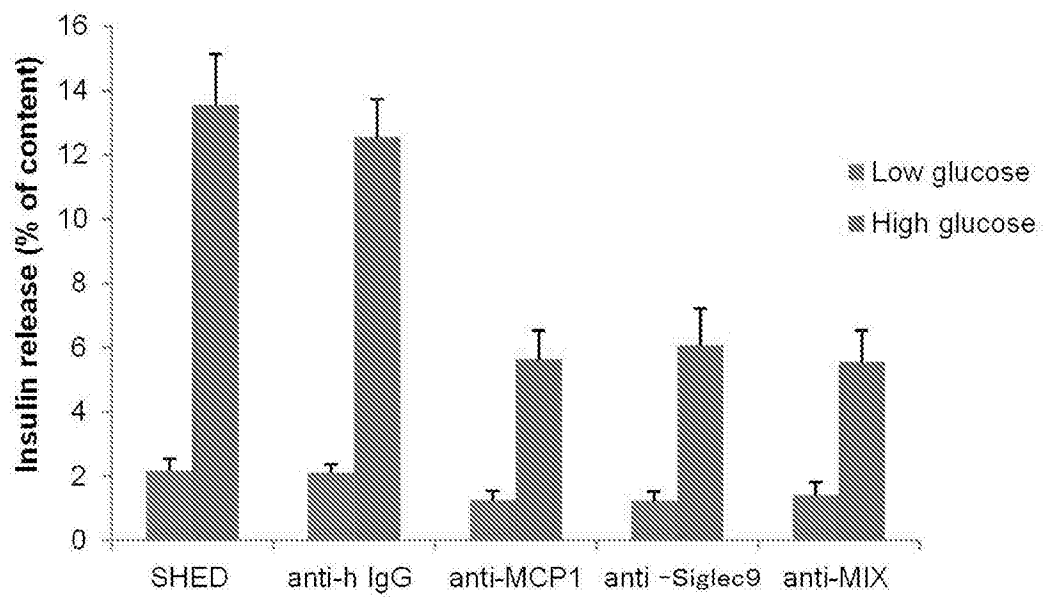


New bone area (% of Total) 6w

新生骨(%) =  
 新生骨面積 / 直径5mmの欠損面積



[24]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/084523

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See extra sheet.

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)

A61K31/737, A61K38/00, A61K45/00, A61K45/06, A61P1/16, A61P3/10, A61P9/00, A61P9/10, A61P11/00, A61P17/02, A61P19/02, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P27/04, A61P29/00, A61P37/02,

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tomoji ANDO et al., "Jiko Soshiki Shinsei Saisei ni Okeru CCR2 Izongata - Seitainai Kansaibo Shuseki no Yakuwari", Regenerative Medicine, 2011, vol.10, special extra issue, page 212	1, 2, 4, 6
Y	SZYMCZAK WA et al., The CCL7-CCL2-CCR2 axis regulates IL-4 production in lungs and fungal immunity, J Immunol, 2009, vol.183, no.3, p.1964-1974	1, 2, 4, 6
X	MUZZARELLI R A.A et al., Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review, Carbohydrate Polymers, 2012.07, Vol.89, no.3, p.723-739	1, 6

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  
25 March, 2014 (25.03.14)

Date of mailing of the international search report  
01 April, 2014 (01.04.14)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/084523

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ichiro TSUJI, "Physical Properties and Tissue Response of Canal Sealer Pastes Containing Tetracalcium Phosphate-Chondroitin Sulfate A", Nihon Shika Hozongaku Zasshi, 1993, vol.36, no.3, pages 31 to 32	1, 6
X	Introduction to the Glycoscience Dai 5 Kai -Saibogai Matrix 2- Kenko na Karada o Sasaeru Urakata - Chondroitin Ryusan, Seikagaku Corp., < <a href="http://www.glycoforum.gr.jp/glyco/05.html">http://www.glycoforum.gr.jp/glyco/05.html</a> >, 2007	1, 6
A	ZHANG JQ et al, Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes, J Biol Chem, 2000, vol.275, no.29, p.22121-22126	1-15
A	WO 2011/118795 A1 (Nagoya University), 29 September 2011 (29.09.2011), & US 2013/0195991 A1 & EP 2554175 A1 & CN 103037872 A	1-15
T	ANDO Y et al, Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms, Bone, 2014, vol.61, p.82-90	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/084523

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

A61K31/737(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i,  
A61K45/06(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i,  
A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i,  
A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i,  
A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i,  
A61P27/04(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i,  
A61P37/06(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national  
classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61P37/06, A61P43/00, C12N15/09

Minimum documentation searched (classification system followed by  
classification symbols)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/084523

**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.: 16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
(See extra sheet)
  
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:

(Invention 1) A tissue repairing agent that contains a first component having an MCP-1 activity.

(Invention 2) A tissue repairing agent that contains a second component having the extracellular domain activity of Siglec-9.

(Invention 3) A tissue repairing agent that contains a third component which is chondroitin sulfate and/or chondroitin sulfate proteoglycan.

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.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/084523

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claim 16 pertains to "method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy" and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. 特別ページ参照		
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. A61K31/737, A61K38/00, A61K45/00, A61K45/06, A61P1/16, A61P3/10, A61P9/00, A61P9/10, A61P11/00, A61P17/02, A61P19/02, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P27/04, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/06, A61P43/00, C12N15/09		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
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
Y	安藤 友二他, 自己組織新生・再生における CCR2 依存型一生物体内幹細胞集積の役割, 再生医療, 2011, vol.10、増刊号, p.212	1, 2, 4, 6
Y	SZYMCZAK WA et al., The CCL7-CCL2-CCR2 axis regulates IL-4 production in lungs and fungal immunity, J Immunol, 2009, vol.183, no.3, p.1964-1974	1, 2, 4, 6
X	MUZZARELLI R A.A et al., Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A	1,6
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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	25.03.2014	国際調査報告の発送日
		01.04.2014
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 光本 美奈子	4 C 9 3 5 9
	電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

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
	review, Carbohydrate Polymers, 2012. 07, Vol. 89, no. 3, p. 723-739	
X	辻一郎, リン酸4カルシウム-コンドロイチン硫酸A合剤の根管充填剤としての物性と組織刺激性, 日本歯科保存学雑誌, 1993, vol. 36, no. 3, p. 31-32	1, 6
X	糖質科学へのイントロダクション 第5回-細胞外マトリックス2-健康な体を支える裏方-コンドロイチン硫酸、生化学工業株式会社, < <a href="http://www.glycoforum.gr.jp/glyco/05.html">http://www.glycoforum.gr.jp/glyco/05.html</a> >, 2007	1, 6
A	ZHANG JQ et al, Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes, J Biol Chem, 2000, vol. 275, no. 29, p. 22121-22126	1-15
A	WO 2011/118795 A1 (国立大学法人名古屋大学) 2011. 09. 29, & US 2013/0195991 A1 & EP 2554175 A1 & CN 103037872 A	1-15
T	ANDO Y et al, Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms, Bone, 2014, vol. 61, p. 82-90	1-15

## 発明の属する分野の分類

A61K31/737(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i,  
A61P1/16(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i,  
A61P11/00(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i,  
A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P27/04(2006.01)i,  
A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,  
C12N15/09(2006.01)n

## 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 16 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、請求項 16 は [手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法] に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及び [PCT規則39.1(iv)] の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
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ろの国際調査機関は認めた。

(発明1) MCP-1 活性を有する第1の成分を含む組織修復剤

(発明2) Siglec-9の細胞外ドメイン活性を有する第2の成分を含む組織修復剤

(発明3) コンドロイチン硫酸及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの少なくとも一種である第3の成分を含む組織修復剤

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ため、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ため、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。