

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7122002号

(P7122002)

(45)発行日 令和4年8月19日(2022.8.19)

(24)登録日 令和4年8月10日(2022.8.10)

(51)国際特許分類

F I

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

A 0 1 K 67/027

Z N A

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/15

Z

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

Z

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P 1/04

請求項の数 5 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-503129(P2019-503129)

(86)(22)出願日 平成30年3月1日(2018.3.1)

(86)国際出願番号 PCT/JP2018/007901

(87)国際公開番号 WO2018/159787

(87)国際公開日 平成30年9月7日(2018.9.7)

審査請求日 令和3年2月25日(2021.2.25)

(31)優先権主張番号 特願2017-38115(P2017-38115)

(32)優先日 平成29年3月1日(2017.3.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(73)特許権者 504173471

国立大学法人北海道大学

北海道札幌市北区北8条西5丁目

(74)代理人 110002480

特許業務法人I P アシスト特許事務所

(72)発明者 村上 正晃

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

(72)発明者 上村 大輔

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

(72)発明者 有馬 康伸

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

審査官 藤澤 雅樹

最終頁に続く

(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)【特許請求の範囲】

【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であって、前記工程が、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反応性のCD4陽性T細胞を移入する工程、又は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して中枢神経組織由来抗原反応性のCD4陽性T細胞を誘導する工程である、前記製造方法。

【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】

(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

(i i i) 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であって、

工程 (i) が、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反応性の C D 4 陽性 T 細胞を移入する工程、又は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して中枢神経組織由来抗原反応性の C D 4 陽性 T 細胞を誘導する工程である、前記スクリーニング方法。

10

【請求項5】

(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 C D 4 陽性 T 細胞を存在させる工程、

(i i) 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

(i i i) 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、被験物質の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の疾患又は症状に対する予防的及び/又は治療的效果を評価する方法であって、

20

工程 (i) が、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反応性の C D 4 陽性 T 細胞を移入する工程、又は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して中枢神経組織由来抗原反応性の C D 4 陽性 T 細胞を誘導する工程である、前記評価方法。

【発明の詳細な説明】

【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 G A B A 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。

30

【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す得る。

【0003】

40

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

50

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】

【文献】Caso, J. R. et al., Current molecular medicine, 2008, Vol. 8, pp. 299 - 312

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

10

20

30

40

50

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 C D 4 陽性 T 細胞を存在させる工程、

(i i) 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

(i i i) 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。

10

(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。

20

(8) C C ケモカインリガンド 5 (C C L 5) 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) G A B A 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。

(1 0) A T P 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。

(1 1) 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。

30

(1 2) l y m p h o c y t e a n t i g e n 6 f a m i l y m e m b e r G 5 C (L Y 6 G 6 C) 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。

(1 3) 2 C 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。

(1 4) 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 (1 3) のいずれか一項に記載の医薬。

40

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

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

50

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】

【 0 0 1 3 】

【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 (E A E) 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウス (S D + T c e l l s +)、睡眠障害を誘導せずに E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウス (S D - T c e l l s +)、睡眠障害誘導のみを行ったマウス (S D + T c e l l s -)、いずれの処置も行わないマウス (S D - T c e l l s -) の病態を示すグラフである。図 1 A は E A E 臨床スコアの経時変化を、図 1 B は E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 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 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウス (W S + T c e l l s +)、湿潤床敷ストレスを負荷せずに E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウス (W S - T c e l l s +)、湿潤床敷ストレス負荷のみを行ったマウス (W S + T c e l l s -)、いずれの処置も行わないマウス (W S - T c e l l s -) の病態を示すグラフである。図 2 A は E A E 臨床スコアの経時変化を、図 2 B は E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 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、 E A E 病原性 C D 4 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 4 A は潜血便スコアを、図 4 B 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 5 A は消化管各部位における血液含量を、図 5 B は胃の写真を、図 5 C 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 E A E 病原性 C D 4 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 6 A は E A E 臨床スコアの経時変化を、図 6 B は E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 日後の致死率を、図 6 C 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、 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 9 日後の血清トリポニン 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、 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 9 日後の血清クレアチンキナーゼ M B 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 9 A は心臓上部 (心房、血管及び弁を含む領域)、図 9 B は心臓下部 (心室) を示す。

【図 1 0】睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 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 C D 3 1 抗体、抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体 (T H)、抗コリントランスポーター 1 抗体 (C H T 1) で免疫染色した写真である。

【図 1 1】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、 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウスの第 5 腰髄を、抗 M H C クラス I I 抗体又は抗 C D 4 抗体で免疫染色した写真 (図 1 1 A) 及び染色された細胞数を示すグラフ (図 1 1 B) である。

【図 1 2】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、 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウスの第三脳室領域を、抗 M H C クラス I I 抗体又は抗 C D 4 抗体で免疫染色した写真 (図 1 2 A) 及び染色された細胞数を示すグラフ (図 1 2 B) である。

【図 1 3】実施例 1 (1) で作製した各マウスの脳の各部位における C D 1 1 b 陽性 M H C クラス I I 高発現細胞及び C D 4 陽性 T 細胞の数を示すグラフである。

【図 1 4】睡眠障害を誘導した C X 3 C R 1 C r e E R R O S A 2 6 - T d T o m a t o マウスに E A E 病原性 C D 4 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 1 5】睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウスに抗 C C L 5 抗体又は対照のラット I g G 抗体を投与した際の、海馬及び間脳における C D 4 陽性

10

20

30

40

50

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、HPR T 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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c-fos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。

40

【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。

50

【図 2 8】睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウスの D M H に、F I T C - C T B 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 2 9】睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 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 2 9 A は E A E 臨床スコアの経時変化を、図 2 9 B は E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 日後の致死率を、図 2 9 C は潜血便スコアを示す。

【図 3 0】睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞 + M O G をパルスした骨髄由来樹状細胞 (T + D C)、I F N - γ + I L - 1 7 A、A T P 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 c f o s 抗体で免疫染色した写真 (図 3 0 A) 及び染色された細胞数を示すグラフ (図 3 0 B) である。図 3 0 A において、各写真中央上部の白色線枠内に P V N を、左右一対の白色線枠内に D M H を示す。

10

【図 3 1】睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行った P V N 一極性除去マウス (d e g e n e r a t i o n) の第三脳室領域を、抗 C D 4 抗体又は抗 M H C クラス I I 抗体で免疫染色した写真 (図 3 1 A) 及び染色された細胞数を示すグラフ (図 3 1 B) である。

【図 3 2】睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行った P V N 一極性除去マウスの病態を示すグラフである。図 3 2 A は E A E 臨床スコアの経時変化を、図 3 2 B は E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 日後の致死率を、図 3 2 C は潜血便スコアを示す。

20

【図 3 3】I L - 6 及び I L - 1 7 A 存在下で培養した B C 1 細胞の A T P 産生量を示すグラフである。

【図 3 4】睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、A 4 3 8 0 7 9 又は溶媒の生理食塩水を、I L - 6 及び I L - 1 7 A 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 c f o s 抗体で免疫染色した写真 (図 3 4 A) 及び染色された細胞数を示すグラフ (図 3 4 B) である。図 3 4 A において、各写真中央上部の白色線枠内に P V N を、左右一対の白色線枠内に D M H を示す。

【図 3 5】睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、A 4 3 8 0 7 9 又は溶媒の生理食塩水を、I L - 6 及び I L - 1 7 A 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 3 5 A は E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 日後の致死率を、図 3 5 B は潜血便スコアを示す。

30

【図 3 6】睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞 + M O G をパルスした骨髄由来樹状細胞 (T + D C) 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 c f o s 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 (N T S) を、左右一対の白色線枠内に迷走神経背側核 (D M X) を示す。

【図 3 7】睡眠障害を誘導した後、E A E 病原性 C D 4 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 3 7 A は E A E 臨床スコアの経時変化を、図 3 7 B は E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 日後の致死率を、図 3 7 C は潜血便スコアを示す。

40

【図 3 8】睡眠障害を誘導したマウスの特定血管における L Y 6 G 6 C 遺伝子及び β 2 C 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 3 9】睡眠障害を誘導した後、E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞を移入したマウスに抗 L Y 6 G 6 C 抗体又は抗 β 2 C 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 3 9 A は抗 L Y 6 G 6 C 抗体を投与したマウスの E A E 臨床スコアの経時変化を、図 3 9 B は抗 β 2 C アドレナリン受容体抗体を投与したマウスの E A E 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】

【 0 0 1 4 】

疾患モデル動物の製造方法及び疾患モデル動物

50

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、ストレスラー）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c-fos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。

【 0 0 2 0 】

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。

10

【 0 0 2 1 】

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。

【 0 0 2 2 】

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。

20

【 0 0 2 3 】

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。

30

【 0 0 2 4 】

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。

40

【 0 0 2 5 】

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

50

する。

【 0 0 2 6 】

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。

【 0 0 2 7 】

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。

【 0 0 2 8 】

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。

【 0 0 2 9 】

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。

【 0 0 3 0 】

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。

【 0 0 3 1 】

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/又は治療的效果を有するものと判断することができる。

【 0 0 3 2 】

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2C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2C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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 3 9 】

以上の機序に基づくと、P V N - 前記血管 - D M H - D M X ・ N T S という一連の神経路の遮断、ノルアドレナリン及びA T P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C C L 5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L Y 6 G 6 C又は 2 C 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、C C L 5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L Y 6 G 6 C又は 2 C 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。

10

【 0 0 4 0 】

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。

【 0 0 4 1 】

20

本発明において用いられるC C L 5に対する抗体は、C C L 5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C C L 5に特異的に結合する中和抗体である。また、L Y 6 G 6 Cに対する抗体及び 2 C 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L Y 6 G 6 C及び 2 C 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F a b、F a b'又はF (a b') 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C C L 5、L Y 6 G 6 C又は 2 C 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C C L 5抗体、抗L Y 6 G 6 C抗体及び抗 2 C アドレナリン受容体抗体を使用することも可能である。

30

【 0 0 4 2 】

本発明において用いられるG A B A受容体アゴニストは、G A B A受容体の生理的機能を増強する物質である。G A B A受容体には、イオンチャネル型のG A B A_A受容体と代謝型のG A B A_B受容体とがあるが、本発明において使用されるG A B A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、G A B A受容体アゴニストは、G A B A_A受容体アゴニストである。

【 0 0 4 3 】

G A B A_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、G A B A_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、G A B A、ヒドロキシ酪酸、1, 4 - ブタンジオール等も、G A B A受容体アゴニストとして用いることができる。

40

【 0 0 4 4 】

本発明において用いられるA T P受容体アンタゴニストは、A T P受容体の生理的機能を阻害する物質である。A T P受容体は、イオンチャネル内蔵型受容体（P 2 X受容体）

50

と G タンパク質共役型受容体 (P 2 Y 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 A T P 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、A T P 受容体アンタゴニストは P 2 X 受容体に対するアンタゴニストであり、その例としては、P P A D S、デカパナジン酸、A 8 0 4 5 9 8、b r i l l i a n t b l u e G、A 8 3 9 9 7 7、A 7 4 0 0 0 3、A 4 3 8 0 7 9 等を挙げることができる。

【 0 0 4 5 】

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。

10

【 0 0 4 6 】

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。

【 0 0 4 7 】

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。

20

【 0 0 4 8 】

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。

【 0 0 4 9 】

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。

30

【 0 0 5 0 】

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 C C L 5 に対する抗体、G A B A 受容体アゴニスト、A T P 受容体アンタゴニスト、プロトンポンプ阻害剤、L Y 6 G 6 C に対する抗体又は 2 C 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。

40

【 0 0 5 1 】

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。

【 0 0 5 2 】

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

50

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、CX3CR1CreER 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 Si

10

20

30

40

50

g n a l i n g)、抗 C H T 1 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)、A l e x a F l u o r 5 4 6 口バ抗ヤギ I g G 抗体 (H + L)、A l e x a F l u o r 4 8 8 ヤギ抗ウサギ I g G 抗体 (H + L)、A l e x a F l u o r 5 4 6 ヤギ抗ウサギ I g G 抗体 (H + L)、A l e x a F l u o r 6 4 7 ヤギ抗ウサギ I g G 抗体 (H + L)、A l e x a F l u o r 6 4 7 ヤギ抗ニワトリ I g G 抗体 (I n v i t r o g e n) 及びストレプトアビジン A l e x a F l u o r 5 4 6 コンジュゲート (I n v i t r o g e n)。

【 0 0 6 0 】

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 I L - 1 7 抗体及び抗 C C L 5 抗体 (いずれも R & D S y s t e m s)、抗 I F N - 抗体 (U e d a e t a l . (2 0 0 6) I n t . I m m u n o l . 1 8 , 1 3 9 7 - 1 4 0 4 に従って精製)。

【 0 0 6 1 】

6 - ヒドロキシドーパミン塩酸塩 (6 - O H D A)、ランソプラゾール、コレラ毒素 B サブユニットの F I T C コンジュゲート (F I T C - C T B)、タモキシフェン及び A T P は S i g m a - A l d r i c h から購入した。P H A - L は V E C T O R から購入した。A 4 3 8 0 7 9 は T O C R I S B i o s c i e n c e から購入した。

【 0 0 6 2 】

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 S t u d e n t 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 . 0 5 未満を統計的に有意とし、グラフ中で * p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1 で表した。

【 0 0 6 3 】

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

P A W W 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 (M i y a z a k i , K . e t a l . , P l o S o n e , 2 0 1 3 , 8 , e 5 5 4 5 2)。6 ~ 8 週齢の C 5 7 B L / 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 . 5 c m の水に置き換え、回転輪上で継続的に運動させる P A W W 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。

【 0 0 6 4 】

(i i) E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞の調製

E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞の調製及び移入は、既報の通りに実施した (A r i m a , Y . e t a l . , C e l l , 2 0 1 2 , 1 4 8 , 4 4 7 - 4 5 7 ; A r i m a , Y . e t a l . , e L i f e , 2 0 1 5 , 4 , e 0 8 7 3 3 ; O g u r a , H . e t a l . , I m m u n i t y , 2 0 0 8 , 2 9 , 6 2 8 - 6 3 6)。簡潔には、C 5 7 B L / 6 マウスの尾基部に M O G (3 5 - 5 5) ペプチド (S i g m a - A l d r i c h) を完全フロイントアジュバント (S i g m a - A l d r i c h) と共に皮下注射し、さらに百日咳毒素 (S i g m a - A l d r i c h) を M O G ペプチド投与後 0、2 及び 7 日目に静脈内注射した。M O G 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 C D 4 マイクロビーズ (M i l t e n y i B i o t e c) を用いてソートすることで C D 4 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、M O G 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、r I L - 2 3 (1 0 n g / m l ; R & D S y s t e m s) 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 C D 4 マイクロビーズを用いて C D 4 陽性 T 細胞を濃縮することで E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞を調製した。

10

20

30

40

50

【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350 mL/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-T cells-)、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+ T cells-)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+ T cells+)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-T cells+)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+ T cells+)。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

10

20

30

40

50

実施例 1 (1) で作製したマウスについて、E A E 病原性 C D 4 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 1 g あたり 20 m L) に懸濁し、遠心分離 (8000 r p m、5 分間) により回収した上清を生理食塩水で 10 倍希釈し、H e m a s t i x (S I E M E N S) により潜血便試験を行った。潜血便スコアは H e m a s t i x 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。

【 0 0 7 3 】

結果を図 4 に示す。睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行った群 (S D + T c e l l s +) 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。

10

【 0 0 7 4 】

また、消化管各部位 (胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸) を 1 m L 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 E A E 病原性 C D 4 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 5 A)。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 5 B、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 5 C)。

【 0 0 7 5 】

次に、睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 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 (C M C) を E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入後毎日、30 m g / k g 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 E A E 病原性 C D 4 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)。

20

【 0 0 7 6 】

以上から、ストレス状態下で E A E 病原性 C D 4 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。

【 0 0 7 7 】

(3) 心筋障害

30

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。E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入の 9 日後に血液を採取し、E L I S A k i t (L i f e d i a g n o t i c s) を用いて血中トロポニン I 濃度を、及び E L I S A k i t (L i f e s p a n B i o S c i e n c e s) を用いて血中クレアチンキナーゼ M B 濃度を測定した。ストレス状態下で E A E 病原性 C D 4 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 M B 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)。

【 0 0 7 8 】

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 E A E 病原性 C D 4 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)。

40

【 0 0 7 9 】

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 C D 31、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 E A E 病原性 C D 4 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 C D 31 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 左上写真の下矢印)、血管で

50

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、マイクローム装置CM3050(Leica Microsystems)を用いて10μm厚の切片とした。切片はCryofilmタイプIIC(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HSAALL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10⁶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+ T cells+)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CX3CR1CreER 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を発現をフローサイトメトリーで解析した。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

結果を図 1 4 に示す。睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行った群 (S D + T c e l l s +) のマウスの海馬及び間脳には、T d - t o m a t o 陰性、すなわち末梢由来の M H C クラス I I 高発現細胞 (単球) が多く集積しており、T d - t o m a t o 陽性、すなわち中枢由来の M H C クラス I I 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。

【 0 0 8 7 】

以上から、ストレス状態で E A E 病原性 C D 4 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 M H C クラス I I 高発現細胞、C D 4 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。

10

【 0 0 8 8 】

実施例 3 疾患モデルマウスにおける C C L 5 及び炎症性サイトカインの機能解析

(1) C C L 5

実施例 1 (1) で作製した睡眠障害誘導後に E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウスに、抗 C C L 5 抗体又は対照のラット I g G 抗体 (いずれも 1 0 0 μ g / マウス) を E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入後毎日腹腔内注射し、E A E 病態を実施例 2 (1) と同様に評価した。また、E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 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。

【 0 0 8 9 】

抗 C C L 5 抗体は、特定血管における C D 4 陽性 T 細胞及び C D 1 1 b 陽性 M H C クラス I I 高発現細胞の集積を抑制し (図 1 5)、臨床スコア及び致死率を低減させた (図 1 6)。一方、C C L 2 又は C X 3 C L 1 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)。

20

【 0 0 9 0 】

次いで、特定血管におけるケモカイン C C L 5 の発現量を以下のように測定した。E A E 病原性 C D 4 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 1 0 0 個の凍結切片 (1 5 μ m 厚) を調製し、P A X g e n e (Q I A G E N) で 1 5 分間固定し、次いで 1 0 0 % E t O H で 1 0 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 D M 6 0 0 0 B (L e i c a M i c r o s y s t e m s) により回収し、全 R N A を R N e a s y マイクロキット (Q I A G E N) により抽出し、D N a s e 及び逆転写反応を行って c D N A を得た。

30

【 0 0 9 1 】

得られた c D N A を、G e n e A m p 5 7 0 0 シーケンス検出システム (A B I) 及び K A P A P R O B E F A S T A B I P r i s m q P C R キット (K a p a B i o s y s t e m s) を用いたリアルタイム q P C R 解析に供し、C C L 5 及び内在性コントロールの H P R T の発現量を測定した。使用した P C R プライマーペア及びプライマーは、

マウス H P R T プライマー :

5 ' - A G C C C C A A A A T G G T T A A G G T T G - 3 ' (配列番号 1) 及び

5 ' - C A A G G G C A T A T C C A A C A A C A A A C - 3 ' (配列番号 2)

40

マウス H P R T プローブ :

5 ' - A T C C A A C A A A G T C T G G C C T G T A T C C A A C A C - 3 ' (配列番号 3)

マウス C C L 5 プライマー :

5 ' - C T C C C T G C T G C T T T G C C T A C - 3 ' (配列番号 4) 及び

5 ' - C G G T T C C T T C G A G T G A C A A A C A - 3 ' (配列番号 5)

マウス C C L 5 プローブ : 5 ' - T G C C T C G T G C C C A C G T C A A G G A G T A T T - 3 ' (配列番号 6)

であった。リアルタイム P C R 条件は、5 0 2 分間、9 5 3 分間の後、9 5 3 秒間、6 0 3 0 秒間を 4 0 サイクルであった。

50

【 0 0 9 2 】

第三脳室領域血管周辺組織における C C L 5 の相対的発現量を図 1 7 に示す。E A E 病原性 C D 4 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 C C L 5 の発現量が増加していた。

【 0 0 9 3 】

(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 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行ったマウスに、抗 I F N - γ 抗体、抗 I L 1 7 A 抗体又は対照のラット I g G 抗体 (いずれも 1 0 0 μ g / マウス) を E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入後毎日腹腔内注射し、E A E 病態を実施例 2 (1) と同様に評価した。また、E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 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。

10

【 0 0 9 4 】

抗 I F N - γ 抗体、抗 I L 1 7 A 抗体はそれぞれ特定血管における C D 4 陽性 T 細胞及び C D 1 1 b 陽性 M H C クラス II 高発現細胞の集積を抑制した (図 1 8)。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 1 9)。

【 0 0 9 5 】

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 C 5 7 B L / 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 7 0 % エタノールで拭いた。3 0 ゲージの針を特定血管 (座標 A P - 1 . 0 6 m m ; M L 1 m m ; D V 2 . 2 5 m m) に向けて下げ入れ、いずれも液量 0 . 2 μ l の E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞 (1×10^6 個) + M O G をパルスした骨髄由来樹状細胞 (5×10^5 個)、I F N - γ (5 0 n g ; P e p r o T e c h) + I L - 1 7 A (5 0 n g ; R & D S y s t e m s) 又は I L - 6 (5 0 n g ; T o r a y) + I L - 1 7 A (5 0 n g) を 9 0 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 (K i m e t a l . (2 0 1 1) M o l . B r a i n 1 9 , 4 - 6)。

20

【 0 0 9 6 】

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 2 0 A に、潜血便スコアを図 2 0 B に示す。睡眠障害を誘導したマウスにおいては、E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞 + 樹状細胞、I F N - γ + I L - 1 7 A 及び I L - 6 + I L - 1 7 A 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。

30

【 0 0 9 7 】

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 C C L 5 が E A E 病原性 C D 4 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 C C L 5 抗体及び抗炎症性サイトカイン抗体は、E A E 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。

【 0 0 9 8 】

実施例 4 疾患モデルマウスの病態誘導に関する神経路の解析(1) P V N の交感神経と特定血管との連絡

40

C 5 7 B L / 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 - O H D A) 塩酸塩 (2 m g / m l) 又は溶媒の 0 . 0 2 % アスコルビン酸それぞれ 0 . 2 μ l を E A E 病原性 C D 4 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 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行った。

【 0 0 9 9 】

E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入から 1 0 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ノ酸化 C R E B 抗体で免疫染色した写真を図 2 1 に示す。6 - O H D A は、チロシンヒドロキシラーゼ陽性の交感神経ニューロ

50

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c-fos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。

10

【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。

20

【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。

30

【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)。

40

【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_A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。

50

【 0 1 0 7 】

(3) P V N、D M H 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 C 5 7 B L / 6 マウスの特定血管に、E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞 + M O G 樹状細胞又は I F N - γ + I L - 1 7 A 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 P V N 及び D M H において、リン酸化 c f o s の増加、すなわち神経の活性化が観察された (図 3 0) 。

【 0 1 0 8 】

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 (B r a i n S c i e n c e I d e a) を P V N (座標 A P - 1 . 0 6 m m ; M L 0 . 2 5 m m ; D V 4 . 8 m m) に挿入し、4 0 0 μ A の直流電流を 5 秒間負荷することで、P V N 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 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞移入を行った。P V N の一側性除去は、特定血管における C D 1 1 b 陽性 M H C クラス II 高発現細胞及び C D 4 陽性 T 細胞の集積を抑制し (図 3 1)、E A E 及び胃腸炎の病態を改善し、致死率を低減させた (図 3 2) 。

【 0 1 0 9 】

以上から、局所脳炎は P V N 及び D M H 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。

【 0 1 1 0 】

次に、P V N、D M H 及び特定血管間の神経連絡における神経伝達物質 A T P 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 B C 1 細胞 (大阪大学宮坂昌之教授より分与) を D M E M で 2 4 時間、ヒト I L - 6 (5 0 n g / m l)、ヒト可溶性 I L - 6 受容体 (5 0 n g / m l) 及びマウス I L - 1 7 A (5 0 n g / m l) を加えてさらに 2 4 時間培養した後、細胞内 A T P 産生量を A T P アッセイ k i t (T O Y O I n k) を用いて測定した。結果を図 3 3 に示す。炎症性サイトカイン I L - 1 7 A + I L - 6 刺激は、血管内皮細胞における A T P 産生量を増加させた。

【 0 1 1 1 】

また、P V N 及び D M H のニューロンは、睡眠誘導マウスの特定血管への A T P (S i g m a - A l d r i c h、2 μ g) のマイクロインジェクションにより活性化された (図 3 0) 。

【 0 1 1 2 】

さらに、睡眠障害を誘導したマウスの特定血管に、I L - 6 及び I L - 1 7 A を、A T P 受容体である P 2 X 受容体の選択的アンタゴニストである A 4 3 8 0 7 9 (1 μ g) を伴って又は伴わずに、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 日後の第三脳室領域内のリン酸化 c f o s、潜血便及び致死率を評価した結果を図 3 4 及び図 3 5 に示す。A 4 3 8 0 7 9 は、P V N 及び D M H 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。

【 0 1 1 3 】

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 A T P は P V N 及び D M H 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、A T P 受容体アンタゴニストは E A E 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。

【 0 1 1 4 】

(4) D M X (迷走神経背側核) 及び N T S (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 P H A - L は D M X 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 E A E 病原性 C D 4 陽性 T 細胞 + M O G 樹状細胞をマイクロインジェクションしたところ、D M X 及び求心性迷走神経の主要な核である N T S におけるリン酸化 c f o s の増加、すなわち神経の活性化が観察された (図 3 6) 。

【 0 1 1 5 】

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シーケンスを行い、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2C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2C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2C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

10

20

30

40

50

群、抗 2 C 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、LY 6 G 6 C 又は 2 C 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】

【 0 1 2 3 】

配列番号 1 マウス H P R T フォワードプライマー
配列番号 2 マウス H P R T リバースプライマー
配列番号 3 マウス H P R T プローブ
配列番号 4 マウス C C L 5 フォワードプライマー
配列番号 5 マウス C C L 5 リバースプライマー
配列番号 6 マウス C C L 5 プローブ

10

20

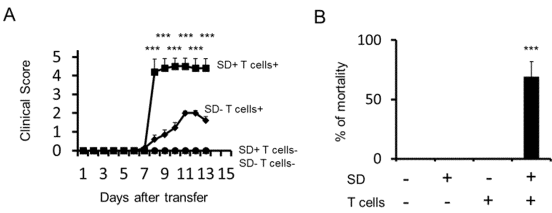
30

40

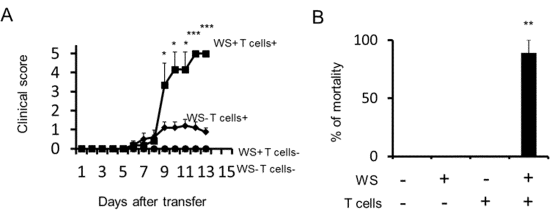
50

【図面】

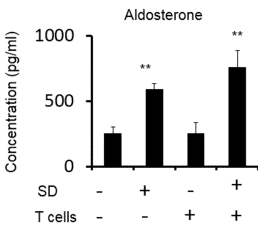
【図 1】



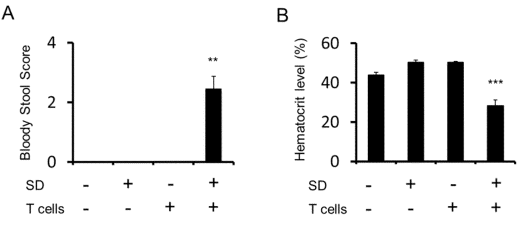
【図 2】



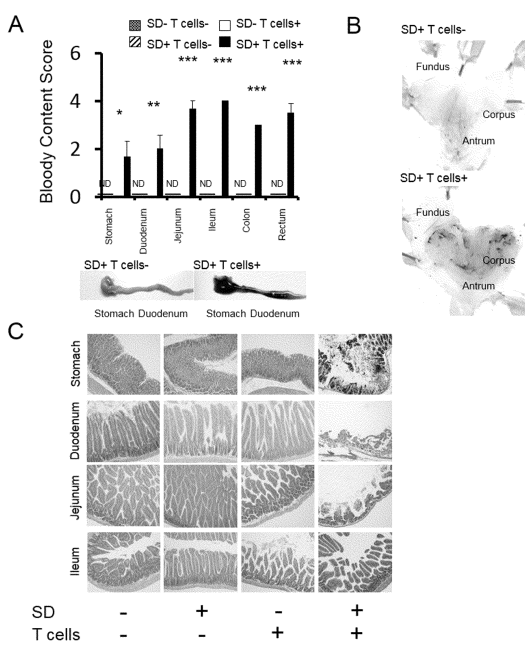
【図 3】



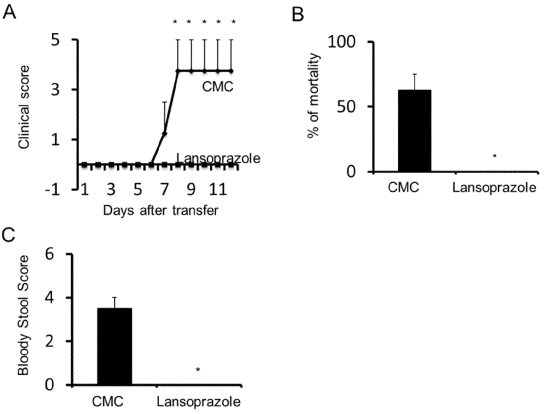
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

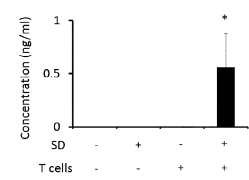
20

30

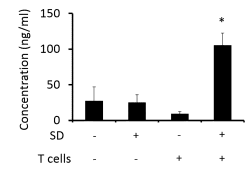
40

50

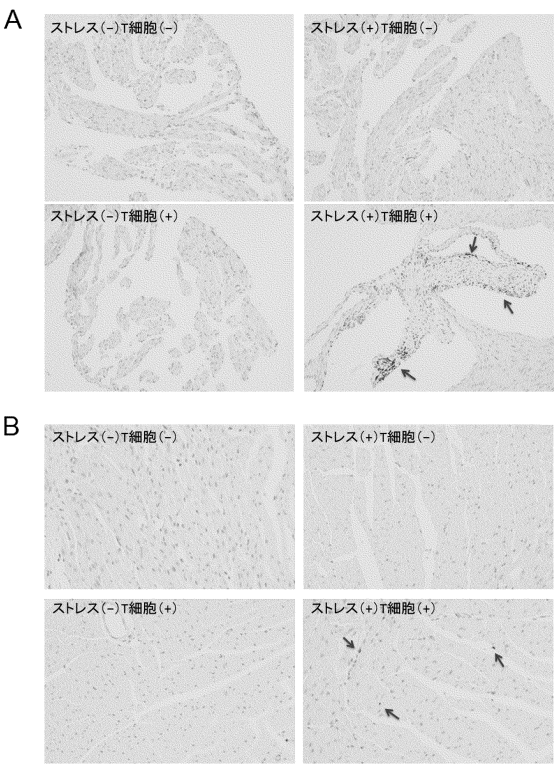
【図 7】



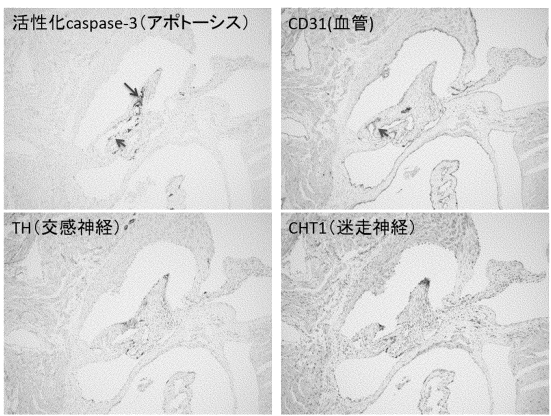
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

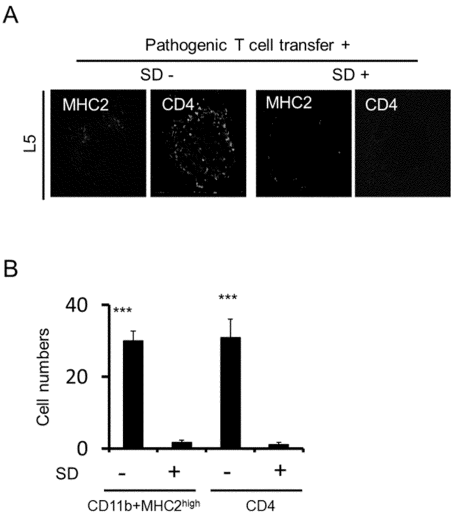
20

30

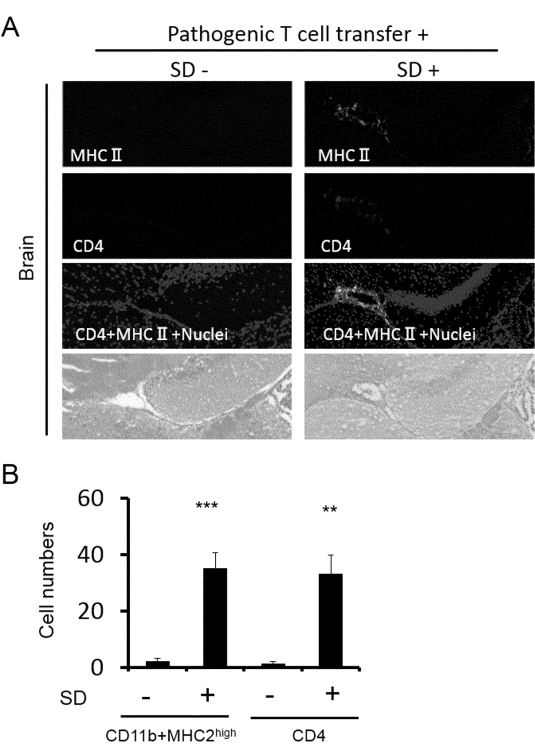
40

50

【 1 1 】



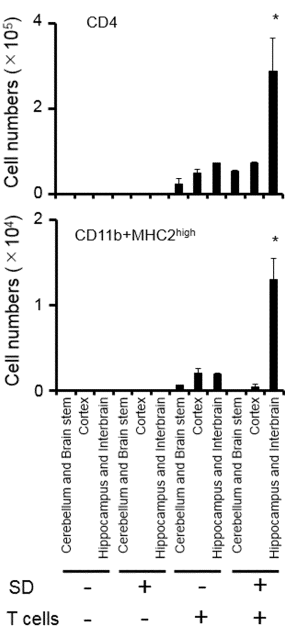
【 1 2 】



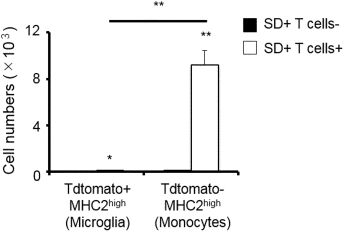
10

20

【 1 3 】



【 1 4 】

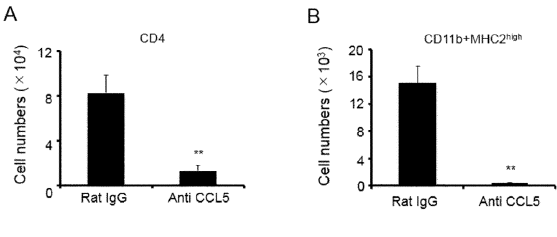


30

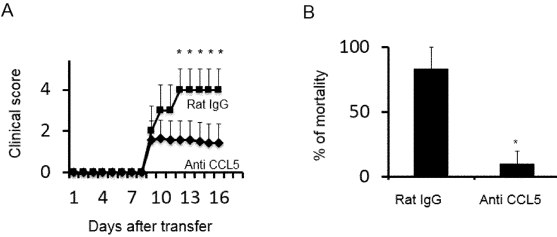
40

50

【 図 1 5 】

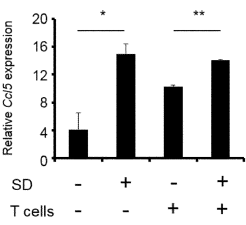


【 図 1 6 】

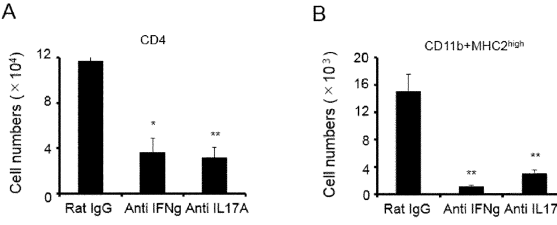


10

【 図 1 7 】

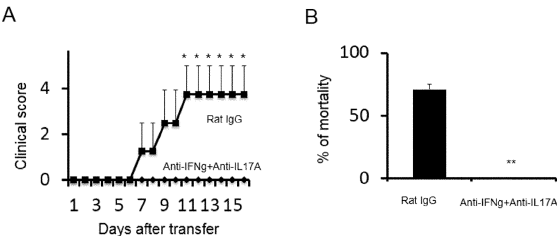


【 図 1 8 】

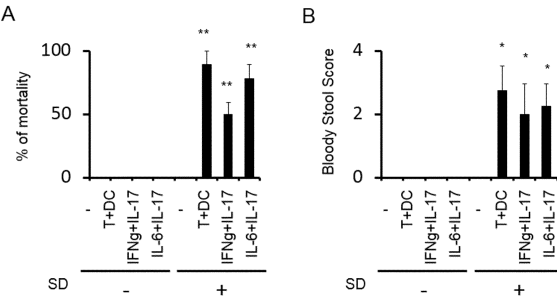


20

【 図 1 9 】



【 図 2 0 】

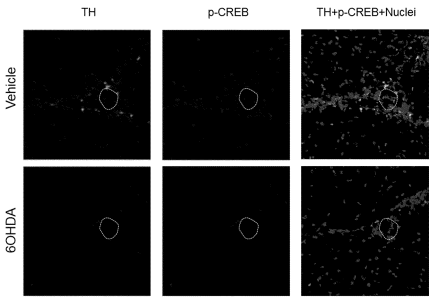


30

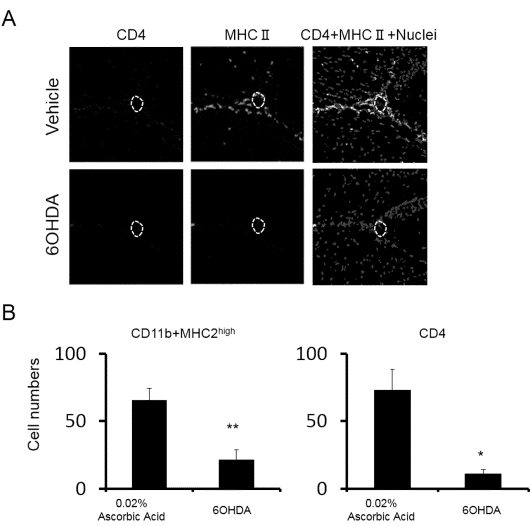
40

50

【 2 1 】

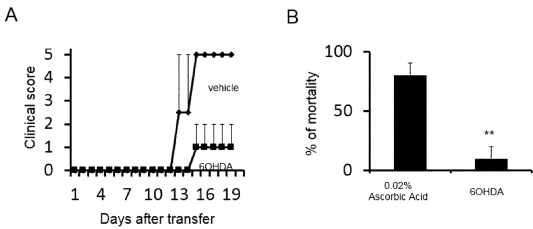


【 2 2 】

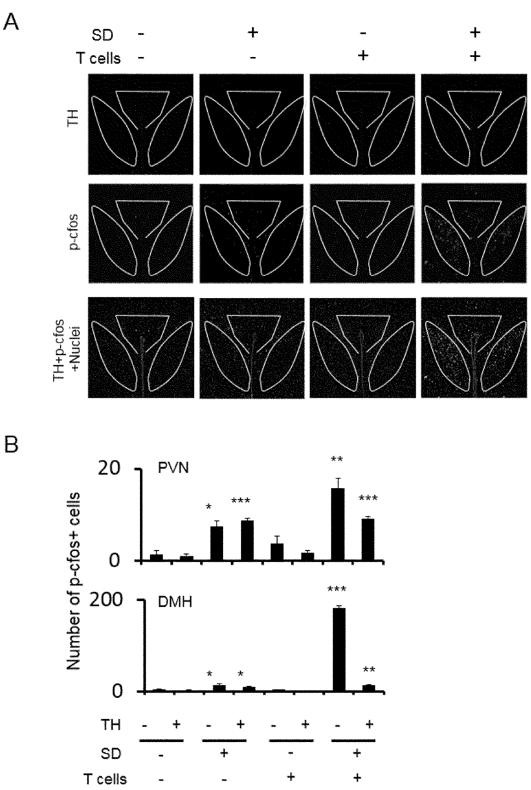


10

【 2 3 】



【 2 4 】



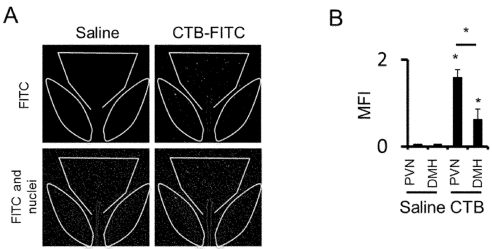
20

30

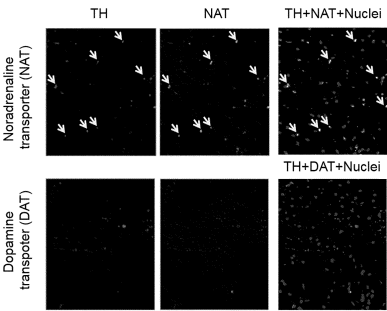
40

50

【図 2 5】

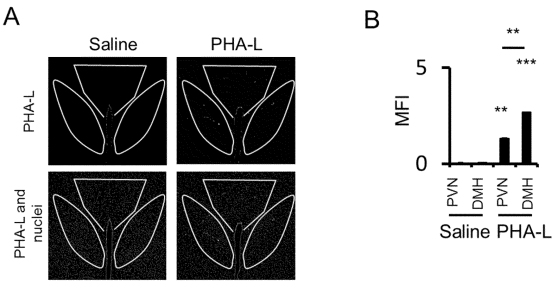


【図 2 6】

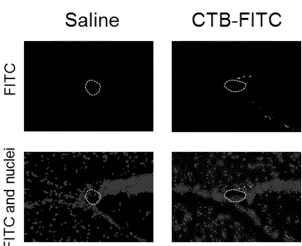


10

【図 2 7】

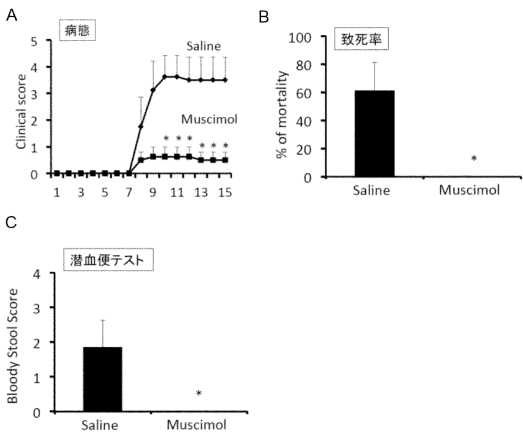


【図 2 8】

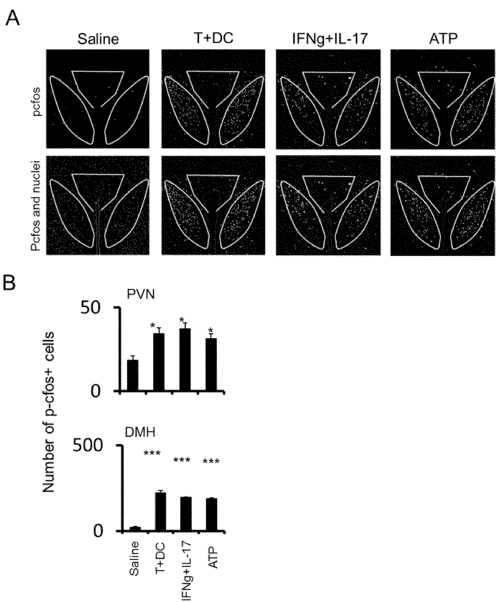


20

【図 2 9】



【図 3 0】

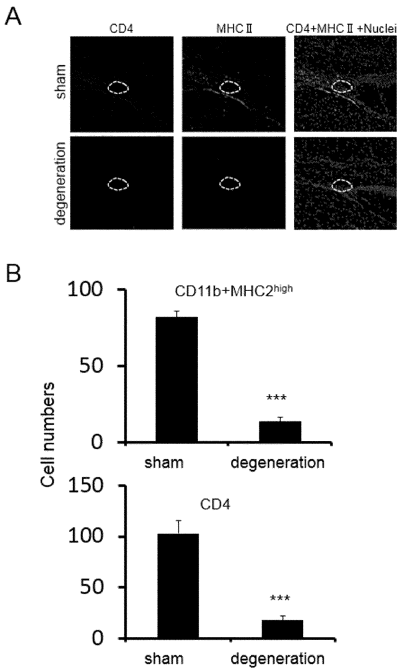


30

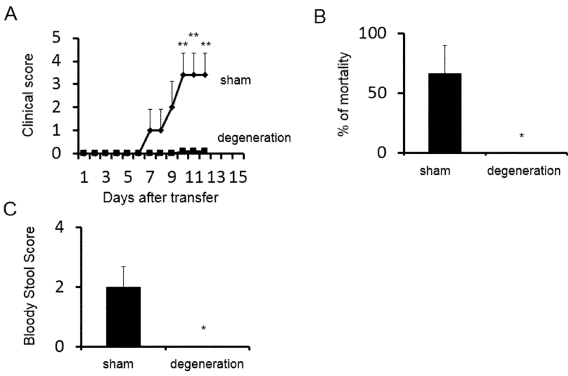
40

50

【 3 1 】



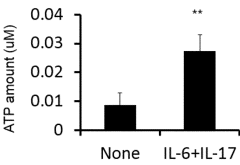
【 3 2 】



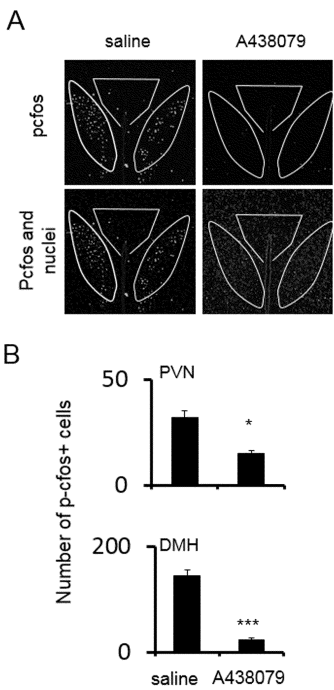
10

20

【 3 3 】



【 3 4 】

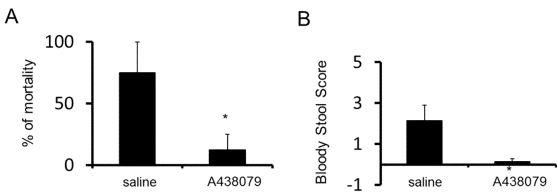


30

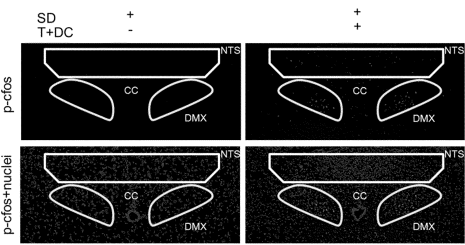
40

50

【図 3 5】

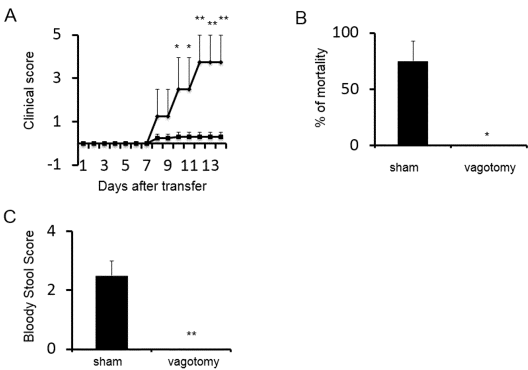


【図 3 6】

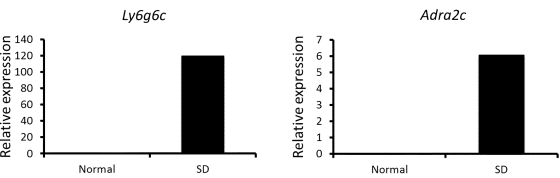


10

【図 3 7】

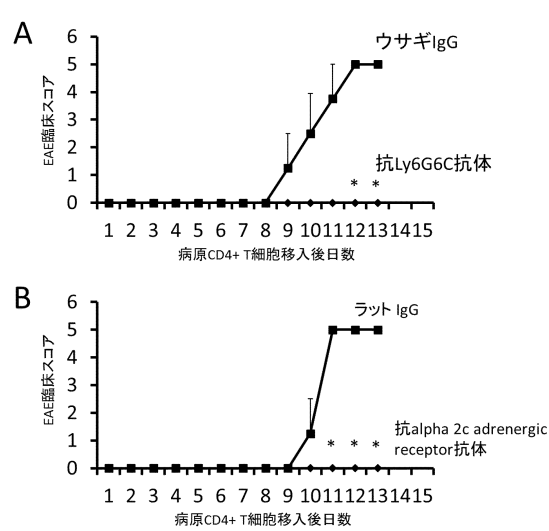


【図 3 8】



20

【図 3 9】



30

【配列表】

0007122002000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
		A 6 1 K	45/00	

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 1 2 6 2 (W O , A 1)

特開 2 0 1 5 - 1 4 2 5 7 8 (J P , A)

特表 2 0 1 1 - 5 0 0 6 4 5 (J P , A)

eLife (2015) Vol.4, e08733, pp.1-23

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 0 1 K 6 7 / 0 2 7

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / W P I X (S T N)