

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-115532

(P2004-115532A)

(43) 公開日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/22	A 6 1 K 37/24	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	

審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2003-384121 (P2003-384121)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(22) 出願日	平成15年11月13日(2003.11.13)	(71) 出願人	503375854 オークランド・ユニサービシズ・リミテ ッド ニュー・ジーランド国オークランド1、プ ライベート・バッグ92019、レベル6 、シモンズ・ストリート20番
(62) 分割の表示	特願平5-509515の分割	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稔
原出願日	平成4年11月20日(1992.11.20)		
(31) 優先権主張番号	240696		
(32) 優先日	平成3年11月22日(1991.11.22)		
(33) 優先権主張国	ニュー・ジーランド(NZ)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経損傷を改善する TGF-β の使用

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、中枢神経系に対する傷害もしくは中枢神経系の疾患の処置に関する。

【解決手段】 本発明は、トランスホーミング成長因子ベータ1 (TGF-β₁) の活性化濃度を、患者の中枢神経系において増加させることを特徴とする。本発明は、TGF-β₁ 投与がなければ傷害後に続いて起こる可能性のある中枢神経系への損傷を最小限に抑えるのに有効である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中枢神経系障害を処置し、神経細胞損傷を減少させる医薬を製造するための、TGF- β 1 の使用。

【請求項 2】

中枢神経系障害を処置し、神経細胞損傷を減少させる医薬を製造するための、TGF- β 1 の同族体の使用。

【請求項 3】

中枢神経系傷害が低酸素性傷害である請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 4】

中枢神経系傷害が虚血性傷害である請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 5】

中枢神経系傷害が外傷性傷害である請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 6】

中枢神経系傷害が非コリン作動性神経細胞に対する傷害を含む請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 7】

中枢神経系傷害がグリア細胞に対する傷害を含む請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 8】

中枢神経系傷害がパーキンソン病の結果である請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 9】

中枢神経系傷害が多発性硬化症の結果である請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 10】

中枢神経系傷害が脱ミエリン化異常の結果である請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 11】

中枢神経系傷害が卒中の結果である請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 12】

哺乳動物の脳室に外科的に挿入したシャントを介して医薬が哺乳動物に投与される、請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 13】

脳の側脳室内への輸送のために末梢的に医薬が哺乳動物に投与される、請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 14】

処置される傷害が中枢神経発作に由来し、医薬が傷害の時から中枢神経発作の 100 時間後までに投与される、請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 15】

処置される傷害が中枢神経発作に由来し、医薬が中枢神経発作の 0.5 時間から 100 時間後までに投与される、請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 16】

TGF- β 1 が、処置される哺乳動物の体重 100 グラムあたり約 0.0029 μ g から 0.2 μ g の量である、請求項 1 から 15 までのいずれか記載の使用。

【請求項 17】

TGF- β 1 が、処置される哺乳動物の体重 100 グラムあたり約 0.0033 μ g から 0.15 μ g の量である、請求項 1 から 15 までのいずれか記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は中枢神経系 (CNS) 損傷の処置と予防のための方法と医薬組成物に関するものであり、具体的には、CNS 細胞の損傷をもたらす障害や疾患を処置する目的で、患者の中枢神経系におけるトランスフォーミング成長因子ベータ 1 (TGF- β 1) および / またはそ

10

20

30

40

50

の同族体の濃度を増加させることからなる治療方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

人間の中樞神経系への無酸素性、外傷性、毒性、感染性、変性、代謝性、虚血性、低酸素性障害の後には、ある程度の神経損傷が起こり得る。例えば、上記の神経損傷は、次のような場合、つまり、流産を引き起こすような分娩中の胎児の苦痛、脊索閉塞、または子宮内での胎児の成長遅延と関係する周産期の無酸素；十分な蘇生の不全や無呼吸と関係した周産期の無酸素；溺死の危機、一酸化炭素吸入、アンモニアを含む他の気体の中毒、心停止、虚脱、昏睡、髄膜炎、低血糖、またはてんかん重積持続状態と関係する重篤な神経障害；冠状動脈のバイパス手術と関係する大脳の無酸素症状；脳卒中、低血圧症状、高血圧発作と関係する大脳の低酸素症または虚血；大脳の外傷；またはアルツハイマー病や多発性硬化症のような大脳の変性疾患の場合に起こり得る。

上記の神経損傷は、CNSの様々な異なる型の細胞と関連している。例えば、脳室周囲稀突起神経膠芽細胞に影響する障害である脳室周囲白質軟化症は、一般に、発達中の前段階の脳に対する低酸素性虚血障害の結果として起こると考えられている。ベージェーら、*Am. J. Obstet. Gynecol.*, 159:357-363 (1988)；シーナら、*Arch. Dis. Child.*, 65:1017-1020 (1990)；ヤングら、*Ann. Neurol.*, 12:445-448 (1982)。さらに、コリン作動性の神経細胞体は、霊長類（メスラムら、*Neuro-sci.*, 12:669-686 (1984)）および、ラット（ブラウンスティーンら、*Handbook of Chemical Neuroanatomy, Classical Transmitters in the CNS*, pp.23-53 (Elsevier, 1984) 中)では、大脳皮質の大部分の領域には存在していない。外傷、無酸素、虚血、毒素、または感染による大脳皮質の損傷は頻繁に起こっており、そして、知覚、運動または認識の不全をもたらすことがある。CNSにおいて非神経細胞であるグリア細胞は、CNSの細胞が正常に機能するために不可欠である。梗塞は、低酸素性虚血が誘導する損傷の主要成分の1つであり、そして、グリア細胞の欠損は、梗塞形成のための必須成分である。多発性硬化症は、ミエリンと稀突起神経膠芽細胞の欠損と関係しており、同様に、パーキンソン病は、ドパミン作動性ニューロンの欠損と関係している。

脳での一時的な低酸素性虚血の後には、数種の成長因子が誘導されることが報告されている。無酸素後発作の後には、生き残った神経および梗塞部のグリア細胞において、原ガン遺伝子であるc-fosが誘導される。ガンら、*Brain Res.*, S31: 105-116 (1991)。神経成長因子(NGF)合成は、海馬と大脳皮質において、低酸素または発作の後に増加する。ロレッツら、*Neurosci. Lett.*, 98:339-344 (1989)；ガルら、*Science*, 245:758-761 (1989)。しかしながら、脳の損傷におけるサイトカインの役割については、ほとんど知られていない。グリア細胞は、インターロイキン3(IL-3)およびインターロイキン6(IL-6)などの多くのサイトカインを産生することが示されている。インターロイキン1(IL-1)は、ヒトが脳を損傷すると、脳脊髄液中で増加することが報告されている。マッククレインら、*J. Lab. Clin. Med.*, 110:48-54 (1987)

トランスホーミング成長因子-(TGF-)は、サイトカインの別の例の1つであり、これは、多くの機能を持ったポリペプチドであって、損傷やストレスに対する細胞または組織の応答調節に関与している。TGF-の一般的概観およびその作用に関しては、スポーンら、*Science*, 233:532-534 (1986)；スポーンら、*J. Cell Biol.*, 105:1039-1045 (1987)；スポーンら、*Nature*, 323:217-219 (1988)；および、スポーンら、*Peptide Growth Factors and Their Receptors*, pp419-472 (Springer-Verlag, 1990) 中、を参照していただきたい。TGF-は、骨、血小板、および胎盤のような様々な哺乳類の組織中に見いだされており、そして、そのポリペプチドを天然の供給源から精製する方法は、組み換え細胞培養中で該ポリペプチドを調製する方法と同様に、すでに記載されている。例としては、アソイアンら、*J. Biol. Chem.*, 258:7155-7160 (1983)；フロリックら、*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 80:3676-3680 (1983)；ハイマークら、*Science*, 233:1078-1080 (1986)；スポーンら、合衆国特許番号5,104,977；デリュンクら、*Nature*, 316:701-*** (1987)；デリュンクら、合衆国特許番号4,886,747を参照していただきたい。

TGF-には、一般的にTGF-1(デリュンクら、*Nature*, 316:701-*** (1987))、TGF-

10

20

30

40

50

2 (デマーティンら、EMBO J., 3673-**** (1987) ; マジソンら、DNA, 7:1-8 (1988))、TGF- β 3 (ジャコウリュウら、Mol. Endocrin., 2:747-755 (1988) ; テン ディッケら、Proc. Nat. Acad. Sci., 85:4715-4719 (1988) ; デリユンクラ、EMBO J., 7:3733-**** (1988))、TGF- β 4 (ジャコウリュウら、Mol. Endocrin., 2:1186-1195 (1988))、およびTGF- β 5 (コンダイアラ、J. Biol. Chem., 265:1089-*** (1990)) と呼ばれている形態など、様々な分子形態のものが存在している。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の目的は、CNSの障害や損傷を処置または予防するための方法と医薬組成物を提供することである。本発明は、発明者がCNSにおけるTGF- β の役割と効果に関して行った、見事な研究に基づくものである。 10

【解決手段】

【0004】

したがって、一面から見ると、本発明は本来、CNS障害の後にこむる神経損傷を処置する方法に関するものであり、その処置方法は、患者のCNSにおいて、TGF- β 1および/またはTGF- β 1同族体 (TGF- β の他の分子形態など) の活性化濃度を増加させる工程を含むものと特徴づけられる。好ましくは、患者のCNSにおいてTGF- β 1の濃度を増加させる。

「処置」という用語は、本明細書で用いられるときには、梗塞形成および、CNS障害後にこむるグリア細胞、非コリン作動性神経細胞または他の神経細胞の喪失を低下させることによって、CNS損傷の重篤さを減少させることを意味している。「処置」という用語は、CNS障害に続いて起こる上記の損傷を最小にすることを含んでいる。 20

TGF- β 1および/またはその同族体は、患者に直接投与されることが好ましい。他の選択肢としては、患者に投与すると患者のCNSのTGF- β 1または天然に存在するTGF- β 1同族体の活性化濃度を上昇させる化合物を投与してもよい。例えば、TGF- β 1または天然に存在するTGF- β 1同族体の、正に調節する結合タンパク質を投与してもよい。

本明細書に記載している医薬組成物は、障害発生時からCNS障害後100時間の間に投与されることが好ましく、CNS障害後0.5時間から8時間の間がさらに好ましい。

本発明の具体例の1つでは、TGF- β 1および/またはそのTGF- β 1同族体 (群) を、CNS障害発生時からその後8時間までの期間内に、患者の脳内への側大脳脳室注入によって投与する。 30

他の具体例では、TGF- β 1および/またはそのTGF- β 1同族体 (群) を、CNS障害発生時からその後8時間までの期間内に、患者の大脳脳室に外科的に挿入されたバイパスを通して投与する。

また、他の具体例では、TGF- β 1および/またはそのTGF- β 1同族体 (群) を、CNS障害発生時からその後8時間までの期間内に、脳の側脳室に輸送するため、患者に末梢的に投与する。

側大脳脳室注入法によって投与したり、外科的に挿入されたバイパスを利用することによって投与するのは、TGF- β 1それ自身であることが好ましい。

投与される服用域は、TGF- β 1または上述の同族体または体重100グラムにつきそれらの濃度を上昇させる上述の化合物の、約0.0001 μ gから100 μ gの範囲であるのが好ましい。 40

TGF- β 1は、単独で用いるか、または、他の治療薬剤と同時に用いることができ、他の薬剤とは、グリア細胞および非コリン作動性ニューロンといったCNS細胞の損失を改善するように設計された他の成長因子などである。

「予防」という用語は、CNSの障害後に受けるCNS損傷の重篤さを減少させることを意味しており、また、CNS障害の症状を抑制することを含めてもよい。

また、他の面から見れば、本発明は、CNS損傷を処置する目的で医薬組成物を調製する場合における、TGF- β 1および/またはその同族体の用途に関する。

さらに、本発明は、CNS損傷を処置する目的で医薬組成物を調製する場合における、患者のCNSでのTGF- β 1および/または天然に存在するTGF- β 1同族体の活性化濃度を患者へ 50

の投与時に上昇させる化合物の用途をも含んでいる。

本発明はまた、CNS障害後にこうむるCNS損傷を処置するのに適した医薬組成物に関し、該組成物はTGF- 1および/またはその同族体を含有するとともに製薬的に許容し得る担体や希釈剤を含有することができる。

CNS損傷を処置するための医薬組成物は、また、CNS損傷をこうむった患者への投与時に、この患者のCNSにおけるIGF-1および/または天然に存在するIGF-1同族体の活性な濃度を上昇させる化合物をも含んでもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明は神経障害後にこうむるCNS損傷を処置する方法に関する。例えば、患者は、脳卒中または上述した神経障害の他の例（限定的でない）と関係する周産期の無酸素や大脳の無酸素や虚血をこうむっているかもしれない。このような場合には、神経損傷の徴候を減らすか、削除することが望ましい。

CNS損傷は、例えば永久的な神経欠損と認識機能の程度、および/または発作障害傾向によって、評価することができる。

神経損傷を処置するためには、患者の中樞神経系と、特に、患者の脳におけるTGF- 1および/またはその同族体の濃度を増加させることが望ましい。したがって、TGF- 1および/またはTGF- 1同族体は、患者に直接投与すればよい。TGF- 1という用語は、トランスホーミング成長因子ベータ1を意味している。TGF- 1の「同族体」という用語（または「生物学的に活性な同族体」）は、TGF- 1と同様の生物学的効果を発揮する化合物を意味し、天然に存在する同族体（例、TGF- 2、TGF- 3、TGF- 4、TGF- 5）または、TGF- 1のいずれの合成同族体をも含んでいる。これらの化合物はヒトや他の動物由来のものでよい。TGF- 1とその同族体は、天然供給源から精製することもできるし、組み換えDNA技術によって調製することもできる。

あるいは、患者に投与すると中樞神経系におけるTGF- 1および/または天然に存在するその同族体の活性な濃度を増加させる化合物を投与することができる。「活性な濃度」という用語は、患者の中樞神経系にて神経損傷に対して効果を発揮できるTGF- 1および/またはその同族体の生物学的濃度を意味している。

TGF- 1、その同族体および、それらの活性濃度を上昇させる化合物は、中樞または組織に投与することができる。その組成物は、患者のCNSに直接、そして、特に、最も大きな損傷が起こっている領域に直接投与するのが望ましい。したがって、本発明の組成物は、パーで空けた穴や前泉門を通した側脳室穿刺、腰椎穿刺、大槽穿刺などその他の同様の方法などの技術によって、脳や脳脊髄液に直接投与する。本発明の組成物はまた、静脈内、脳脊髄内、髄腔内、または滑液嚢内からも投与される。さらに、その組成物は、他の因子や、例えばインスリン様成長因子-1（IGF-1）のような成長因子と同時に投与してもよい。

TGF- 1またはその同族体の1つまたはTGF- 1の生理学的濃度を上昇することができる化合物の、CNS損傷の予防または処置のために適切な投与量は、上で定義したような処置されるべき障害の型、障害の重篤さと経過、上記のTGF- 1組成物の投与が予防目的であるか治療目的であるかということ、治療歴、患者の既往歴とTGF- 1組成物に対する応答、および、かかっている医師の判断、によって左右されるだろう。TGF- 1組成物は、1回きりか、または一連の処置を通して患者に好適に投与される。

前述の例は、神経障害後のTGF- 1の発現が特定の時間経過をたどり、そして、体の特定の領域で起こることが示されている。それゆえ、TGF- 1組成物は、最も望ましい結果が生み出されるように、CNS損傷と障害後の経過時間のパターンに応じて投与されるべきである。

TGF- 1組成物は、例えば、障害後およそ0.5から100時間に投与すればよい。あるいは、その組成物は、障害後にこうむるある程度の神経損傷を予防したり、減少したりするために、潜在的なCNS障害の前に（例えば、心臓のバイパス手術の前に）投与してもよい。

適切な投与域は、例えば、組成物を中枢に投与する場合、体重100グラムあたりおよそ0

.0001 μgから100 μgの範囲のTGF- 1および/または同族体またはそれらの濃度を上昇させる化合物、とすることができる。

本発明は、また、障害後にこうむる神経損傷を処置するための医薬組成物をも提供する。この医薬組成物は、TGF- 1および/またはその同族体またはCNSにおけるTGF- 1の濃度を上昇させる化合物を含んでいる。TGF- 1、その同族体、および、それらの濃度を上昇させる化合物は、米国特許番号4,886,747に記載されているような組み換えDNA技術によって、調製することができる。あるいは、上記の物質は、天然の供給源から分離することもできる。上記の医薬組成物は、本質的に毒性がなく、かつ、治療を目的としない製薬的に許容し得る担体や希釈剤とともに、任意に調製してもよい。上記の担体の例としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸などの緩衝剤、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、または、硫酸プロタミンなどの電解質、リン酸水素2ナトリウム、セルロースやメチルセルロースなどの多糖、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛の塩、コロイド状シリカ、3ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、および、ポリエチレングリコールが挙げられる。適当な希釈剤としては、1つまたはそれ以上の上述の担体を含む無菌の水性溶液などがある。TGF- 1は、典型的にはTGF- 1が生物学的に活性である酸性pHで処方される。

10

本発明は、次の実験データによって支持される。その研究は、次の実施例の中に記載しているが、その研究において次のことが見いだされた。

1) TGF- 1のmRNAは、特定の障害領域において、定められた時間経過を経た後に神経障害後に発現し、TGF- 1それ自体は免疫細胞化学によって検出することができる。

20

2) TGF- 1の中樞神経系における変化は、標準化された神経障害の結果として生じる神経の状態を改善することができる。

3) TGF- 1の投与量をより小さくすれば、神経損傷の処置効能が改善される。

しかしながら、これらの実施例は、例示としてのみ記載しているのであり、そして、いかなる意味においても本発明を制限するという意図はない。本明細書に引用されているすべての特許と参考文献は、明らかに本明細書に包含される。

【実施例】

【0006】

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

30

実施例 1

本研究の目的は、神経障害後の中樞神経系におけるTGF- 1の発現に関するものであった。

生後21日のラットに一側性の頸動脈結紮を施し、続いて、結紮側で軽度もしくは重篤な神経損失を生じるように、定められた条件下で、無酸素吸入処理を行った。

軽度もしくは重篤な神経損失を、次のようにして、生後21日のラットに誘導させた：右頸動脈を軽いハロタン麻酔のもとで、結紮した。ラットを、それから、34℃、湿度85%のインキュベーター内に入れた。吸入するガスを15分間（軽度）または90分間（重篤）、窒素中に酸素を8%含有するガスと置き換え、それから、空気に戻した。低酸素後の様々な時間（1時間、5時間、3日、5日）に、ペントバルビタール（ネムブタール）で動物を麻酔し、脳を取り出し、それをインサイツ（in situ）ハイブリダイゼーションに利用するため即座にドライアイス上で凍結した。組織検査のために、ラットを低酸素処理後5日で殺し、次いで、まず、0.1%生理的食塩水で、続いてホルムアルデヒド - 酢酸 - メタノール（1:1:8）溶液中で灌流した。

40

無酸素処理後の定められた時間に、ラットを組織検査のために殺した。90分間の無酸素（重篤）の後、神経の損失を、結紮された皮質内にいきわたるチオニン/酸 フクシン染色によって評価した。外側皮質、海馬、線条および視床を含めた中大脳動脈領域において、重篤な神経損失が存在した。インサイツハイブリダイゼーション組織化学を、R.デリュック博士により提供された、TGF- 1のコード領域のほとんど全長を含むTGF- 1cDNAプロ

50

ープを用いて行った。ハイブリダイゼーション組織化学は、マックケイブラ、J.Histochem.Cytochem.,34:45-50(1986)およびスミスら、Ann.Neurophathol.,64:319-332(1984)中に記されている方法に実質的に従って行った。

ハイブリダイゼーション後、10mM -メルカプトールエタノールを加えた2×SSCで4回、それぞれ室温で10分間、2×SSCで4回、それぞれ室温で10分間、2×SSCで2回、それぞれ50で10分間、切片を洗浄した。

対照実験は、RNaseA(37の40μg/ml 0.5M NaCl/20mM Tris, pH7.5/1mM EDTA)を用いて行った。RNaseA前処理は、予想上2.5kbの主要なバンドを表す、個々のプローブのノーザンプロットシグナルをほとんど完全に消してしまった。

インサイツハイブリダイゼーションによって測定されたように、TGF-1 mRNAに対するシグナルは、神経損傷の領域に局限してTGF-1 mRNAの誘導がかかったことを示した。軽度の無酸素(15分間)の後には、TGF-1 mRNAの誘導は、結紮された脳部位において大脳皮質の第3層、歯状回と海馬錐体層のCA1とCA2領域に観察された。

重篤な無酸素(90分間)の後には、TGF-1 mRNAは、海馬歯状回、CA1とCA2領域および脈絡叢において、傷害後1時間で検出可能であった。傷害後5時間では、TGF-1 mRNAは、結紮側の大脳皮質と線条において検出可能であった。傷害後72時間では、結紮側の大脳皮質と梨状皮質全体、線条、視床および海馬を通じて顕著な発現が観察されたが、細胞死が見られない非結紮側では、発現は観察されなかった(図1)。

結紮側における際立った一側性の発現、受けた傷害がより少なかった動物における比較的低い誘導、およびRNaseAを用いたネガティブ対照実験、によって誘導の特異性が証明された。さらに、プローブを、ラット肝臓ポリ(A)RNA試料のノーザンプロットのハイブリダイゼーションに使用した。TGF-1プローブへのハイブリダイゼーション後のバンドは、文献中に報告されているデータと一致している。

免疫組織化学実験を、抗-hウサギTGF-1ポリクローナル抗血清を用いて行った。TGF-1に対する細胞染色が、結紮した半球の損傷領域において同定することができた。この染色は、マクロファージ様外観をもつ細胞で見られた。

このデータは、低酸素性虚血性傷害後に、TGF-1が、マクロファージにおいて、特に、損傷領域において誘導されることを示唆するものである。

【0007】

実施例 2

本研究の目的は、神経傷害後のTGF-1投与の効果を評価することであった。

成熟ラット(250-350グラム)を使用した。本実験は、神経傷害後にTGF-1でラットを処置することに関するものであった。これらのラットは、一方の大脳半球に対して、標準的な方法で誘導された低酸素性虚血性傷害を受けている。一方の頸動脈を結紮し、その動物に対し、2時間後に、定まった期間の低酸素吸入を行った。程度、低酸素の長さ、周囲の温度と湿度を規定し、損傷の程度を標準化(規格化)した。その条件とは、吸入酸素(6%)、周囲の温度31、湿度85%で、10分間の低酸素であった。動物は、1時間の間、インキュベーター内で保育し、それから、標準的なケージの中へ戻した。動物は5日後に殺し、壊死細胞に特異的な染色(酸-フクシン)を用いて組織学的に分析した。

上述の実験において、典型的な神経死は動脈結紮側に局限しており、主として、結紮した半球の海馬、歯状回および外側皮質に局限している。

一側性の低酸素性虚血性傷害を、成体(300±10グラム)のオスのウィスター系ラットにおいて誘導させた。ラットに、軽度のハロタン麻酔のもとで、一側性の頸動脈結紮を施した。麻酔がさめた1時間後に、ラットを、傷害前1時間の間、31、湿度85%のインキュベーター内に入れた。ラットに10分間の無酸素吸入(FiO₂ 6.0%)を行い、無酸素処理後1時間の間、先のインキュベーター内で保育した。吸入傷害の終了後2時間に、組み換えTGF-1 0.05μgまたは、人工脳脊髄液(CSF)を、一回の定位に制御された側脳室注入により与えた。

組み換えTGF-1または希釈剤は次のようにして調製し、体重が一致した組に投与した。無酸素処理後2時間で、ラットに軽度のハロタン麻酔をかけ、そして、CSF 20μl(n=6

) または、TGF- β 1 0.05 μ g を加えた CSF 20 μ l (n=6) を一回の ICV 注入により与えた。組み換え TGF- β 1 (ジェネテック, インコーポレイテッド, South San Francisco, California 94080 USA) を、CSF の希釈剤中で 2.5 μ g/ml の濃度に溶解した。この溶液は、pH7.0 を示す 0.15M PBS (リン酸緩衝食塩水) で 9 倍に希釈した。

次いで動物を 120 時間保育し、麻酔をかけ、そして、組織検査のため、ホルムアルデヒド - 酢酸 - メタノール (1:1:8) の溶液を用いて脳をインサイツで固定した。

生き残ったニューロンと死んだニューロンとを、チオニン / 酸 フクシン 染色技術を用いて区別した。ウィリアムら、Ped. Res., 27:561-565 (1990); ブラウンら、J. Neurol. Sci., 16:59-84 (1971)。

こうむった神経損傷の程度を、ニューロン損失率を測ることにより定量化した。ニューロン損失率は、海馬と大脳皮質のうち、ニューロン損失を受けた領域の平均値である (100% はニューロン全体の損失と等しく、0% は損失 0 と等しい)。

死んだニューロンのパーセントは、2 人のうち 1 人は実験について何も知らないという、2 人の独立した観察者によって評価した。2 人の観察者によって得られたニューロン損失率のあいだの相関は、 $r=0.92$ 、 $p, 0.0001$ であった。処置の効果は、まず、MANOVA で、次にフィッシャーの最下位差分方式を用いて、各領域を 2 組比較することによって評価した。

得られた結果を図 2 に示す。TGF- β 1 治療は、CSF 処理対照群 ($P < 0.01$) と比較すると、結紮された半球で、ニューロン死の程度を減少させた。成熟ラットにおける無酸素傷害後に、TGF- β 1 を中枢に一回で注入すると、組織学的に評価されたように、症状が顕著に改善された (表 1 参照)。

【0008】

【表 1】

低酸素性虚血性傷害後のニューロン損失パーセントに及ぼす TGF- β 1 処置の効果
(6 グループ; 平均 \pm sem)

領域 (0.05 μ g)	処置後のニューロン損失パーセント%	
	CSF (対照)	TGF- β 1
海馬 CA1-2	98.4 \pm 4	7.6 \pm 5
海馬 CA3	100.0	4.0 \pm 4
海馬 CA4	100.00	0.0
歯状回	97.2 \pm 3	0.0
梨状皮質	93.2 \pm 7	0.0
外側皮質	98.0 \pm 2	5.0 \pm 5

【0009】

実施例 3

本研究の目的は、実施例 2 の観察結果を確認し、最も効果的な投与域を確立することであった。

本実験は、さらに 2 群のラットをより高い投与量の TGF- β 1 で処置するという点を除いては、実施例 2 の実験と同じであった。

低酸素性虚血傷害を、実施例 2 で論じられた方法で、ラットに誘導した。ラット (各処置について n=6) に対し、吸入による傷害後 2 時間に、CSF、CSF + 0.05 μ g TGF- β 1、CSF + 0.5 μ g TGF- β 1、または、CSF + 5 μ g TGF- β 1 のいずれかを投与した。各処置からのラット (n=1) を同時に処置した。傷害の程度を測定するための技術としては、実施例 2 で論じたものと同じ技術を採用した。

得られた結果を図 3 に示す。図から分かるように、5 μ g の TGF- β 1 は、ニューロン損傷に対して有意な効果を全く示さなかった。一方で、0.5 μ g の TGF- β 1 は、大脳皮質においてニューロン欠損を減少させた ($p < 0.05$) が、0.05 μ g の TGF- β 1 は、有意にさらに効果的であった ($p < 0.05$)。さらなる実験で、0.01 μ g から 0.05 μ g の範囲の投与量が最も効果的であることが示された。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

考察

上述の実験の結果は、統計的にかなり有意なものであった。TGF- β 1を無酸素処理後に与えた実施例2および実施例3では、ラットあたり0.5 μ gより少ない投与量か、もしくははより低い投与量でのTGF- β 1治療が、CSF処置対照群と比較して、著しく損傷状態を改善した。それゆえ、我々は、傷害後、直接的に、もしくは間接的に、脳脊髄液におけるTGF- β 1を治療的に上昇させることが損傷に有効である、と結論した。実施例3の結果は、最大の効能が、低投与量のTGF- β 1で観察されることをさらに示している。

それゆえ、本発明は、TGF- β 1投与がなければ、傷害後に続いて起こる可能性のある他の続発的な損傷を予防することでCNS障害が最小に抑えられる、という重大な結果を伴う、CNS傷害前、傷害と同時、または傷害後の患者に対するTGF- β 1および/または同様の効果をもつ他の化合物投与の役割を認識するものである。本発明は、神経損傷を処置または予防するための方法および医薬組成物を提供するものである。神経損傷は、無酸素、低酸素、毒素、虚血、または外傷と関係している可能性がある。本発明は主としてヒトに応用されるものと理解されるだろうが、本発明の有用性はヒトに限られるものではなく、従ってヒト以外の動物（特に哺乳動物）の処置もまた、本発明の範囲に含まれている。

10

【 発明の他の態様 】

【 0 0 1 1 】

(1) TGF- β 1を含む、神経細胞損傷を減少させる医薬組成物であって、非コリン作動性神経細胞に影響を及ぼす哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物

20

(2) TGF- β 1を含む、神経細胞損傷を減少させる医薬組成物であって、グリア細胞に影響を及ぼす哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物。

(3) TGF- β 1を含む、神経細胞損傷を減少させる医薬組成物であって、パーキンソン病の結果である哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物。

(4) TGF- β 1を含む、神経細胞損傷を減少させる医薬組成物であって、多発性硬化症の結果である哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物。

(5) TGF- β 1を含む、神経細胞損傷を減少させる医薬組成物であって、脱ミエリン化異常の結果である哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物。

(6) TGF- β 1を含む、神経細胞損傷を減少させる医薬組成物であって、哺乳動物にお

30

ける中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物。

(7) 中枢神経系傷害が低酸素性傷害、虚血性傷害または外傷性傷害である上記(6)記載の医薬組成物。

(8) 哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0033 μ gから0.15 μ gの投与量のTGF- β 1を含む、上記(1)から(7)までのいずれか記載の医薬組成物。

(9) 中枢神経系傷害における神経細胞生存性を増大させるための、上記(10)から(17)までのいずれか記載の医薬組成物。

(10) 非コリン作動性神経細胞に影響を及ぼす哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物であって、哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0029 μ gから0.2 μ gの投与量のTGF- β 1を含み、中枢神経系傷害時から傷害後約8時間の期間に該哺乳動物

40

の中枢神経系に投与され、該投与により神経細胞損傷を減少させる該医薬組成物。

(11) グリア細胞に影響を及ぼす哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物であって、哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0029 μ gから0.2 μ gの投与量のTGF- β 1を含み、中枢神経系傷害時から傷害後約8時間の期間に該哺乳動物の中枢神経系に投与され、該投与により神経細胞損傷を減少させる該医薬組成物。

(12) パーキンソン病の結果である哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物であって、哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0029 μ gから0.2 μ gの投与量のTGF- β 1を含み、中枢神経系傷害時から傷害後約8時間の期間に該哺乳動物の中枢神経系に投与され、該投与により神経細胞損傷を減少させる該医薬組成物。

(13) 多発性硬化症の結果である哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための

50

医薬組成物であって、哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0029 μ gから0.2 μ gの投与量のTGF- β 1を含み、中枢神経系傷害時から傷害後約8時間の期間に該哺乳動物の中枢神経系に投与され、該投与により神経細胞損傷を減少させる該医薬組成物。

(14) 脱ミエリン化異常の結果である哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物であって、哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0029 μ gから0.2 μ gの投与量のTGF- β 1を含み、中枢神経系傷害時から傷害後約8時間の期間に該哺乳動物の中枢神経系に投与され、該投与により神経細胞損傷を減少させる該医薬組成物。

(15) 哺乳動物における中枢神経系傷害を処置するための医薬組成物であって、哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0029 μ gから0.2 μ gの投与量のTGF- β 1を含み、中枢神経系傷害時から傷害後約8時間の期間に該哺乳動物の中枢神経系に投与され、脳の側脳室内への輸送のために末梢的に哺乳動物に投与される、該投与により神経細胞損傷を減少させる該医薬組成物。

10

(16) 中枢神経系傷害が低酸素性傷害、虚血性傷害または外傷性傷害である上記(15)記載の医薬組成物。

(17) 哺乳動物の体重100グラムあたり約0.0033 μ gから0.15 μ gの投与量のTGF- β 1を含む、上記(10)から(16)までのいずれか記載の医薬組成物。

(18) 中枢神経系傷害における神経細胞生存性を増大させるための、上記(10)から(17)までのいずれか記載の医薬組成物。

【図面の簡単な説明】

【0012】

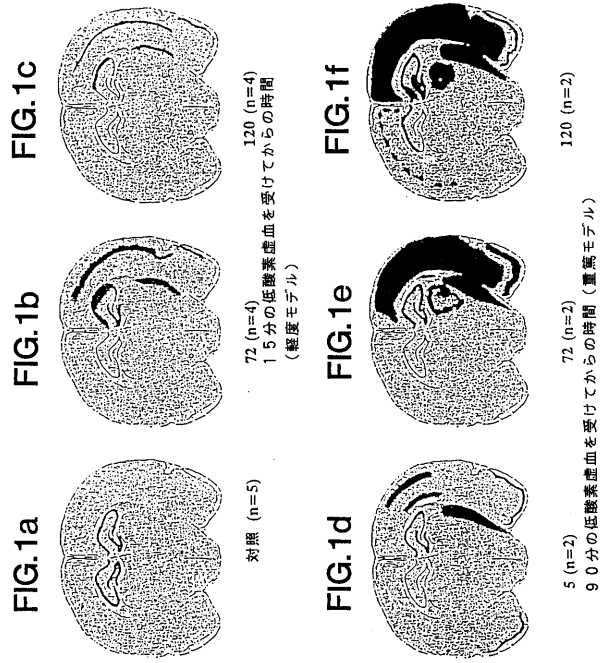
20

【図1】実施例1の虚血性低酸素後のTGF- β 1 mRNAの分布を示す多段階の様子を表している。

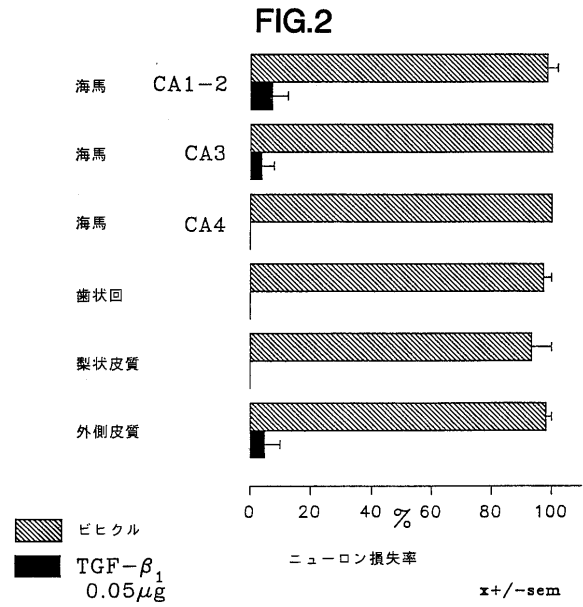
【図2】実施例2でTGF- β 1処理されたラットと対照群のラットの神経損失を示すヒストグラムである。

【図3】実施例3でTGF- β 1処理されたラットと対照群のラットの神経損失を示すヒストグラムである。

【 図 1 】

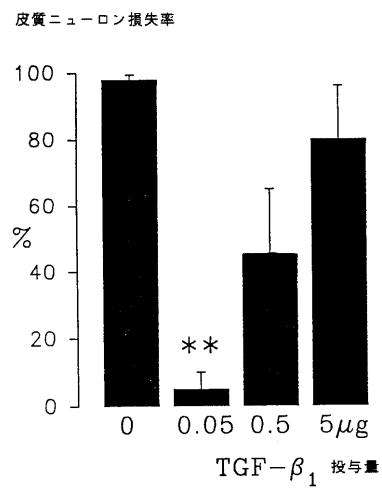


【 図 2 】



【 図 3 】

FIG.3



フロントページの続き

(74)代理人 100068526

弁理士 田村 恭生

(72)発明者 ピーター・グルックマン

ニュー・ジーランド国オークランド1、レムーラ、ルサーヌ・ロード78番

(72)発明者 カロリー・ニコリックス

アメリカ合衆国カリフォルニア94002、ベルモント、サウス・ロード450番

(72)発明者 クリストファー・ウィリアムズ

ニュー・ジーランド国オークランド1、グラフトン、ボイル・クレスト5ディー番

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA44 DB59 NA14 ZA022 ZA162