

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6474082号
(P6474082)

(45) 発行日 平成31年2月27日 (2019. 2. 27)

(24) 登録日 平成31年2月8日 (2019. 2. 8)

(51) Int. Cl.			F I		
A 6 1 K	35/15	(2015. 01)	A 6 1 K	35/15	A
A 6 1 P	27/02	(2006. 01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/06	(2006. 01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	43/00	(2006. 01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	5/0786	(2010. 01)	C 1 2 N	5/0786	

請求項の数 4 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-514532 (P2016-514532)	(73) 特許権者	500018608
(86) (22) 出願日	平成26年5月22日 (2014. 5. 22)		イエダ リサーチ アンド ディベロッ メント カンパニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-522830 (P2016-522830A)		イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホボト
(43) 公表日	平成28年8月4日 (2016. 8. 4)		, ピーオー ボックス 95 アット
(86) 国際出願番号	PCT/IL2014/050463		ワイツマン インスティテュート オブ
(87) 国際公開番号	W02014/188436		サイエンス
(87) 国際公開日	平成26年11月27日 (2014. 11. 27)		at the Weizmann Ins titute of Science, P
審査請求日	平成29年5月18日 (2017. 5. 18)		O Box 95, 7 6 1 0 0 0 2 Re hovot, Israel
(31) 優先権主張番号	61/826, 159	(74) 代理人	100077012
(32) 優先日	平成25年5月22日 (2013. 5. 22)		弁理士 岩谷 龍
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/915, 069		
(32) 優先日	平成25年12月12日 (2013. 12. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 眼疾患および眼障害の治療のためのヒト単球亜集団

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

加齢黄斑変性および網膜色素変性から選択される網膜変性障害；前部虚血性視神経症；緑内障；ならびにぶどう膜炎を治療するための、医薬組成物を調製するための、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来単球亜集団の使用であって、
該単球亜集団が、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を、該単球亜集団の総細胞数の5%を超えない量含むことを特徴とするヒトPBMC由来単球亜集団の使用。

【請求項 2】

前記ヒトPBMC由来単球亜集団は、CD14⁺細胞を、該単球亜集団の総細胞数の60%を超える量含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記ヒトPBMC由来単球亜集団は、眼内注射用製剤である、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

硝子体内注射用製剤である、請求項 3 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して、炎症性成分を伴うまたは伴わない網膜変性および視神経変性の治療ならびに炎症性眼疾患、炎症性眼障害または炎症性眼病態の治療に有用なヒト単球亜集団に

関する。

【背景技術】

【0002】

中枢神経系（CNS）組織が損傷を受けて神経細胞が死ぬと、神経毒性症状の悪循環に陥り、ホメオスタシスが迅速に回復されない限り損傷が広がる（Doble, 1999）。この際に誘導される防御・修復機構が十分でない場合には、神経細胞死がさらに進む。この現象は、病因や損傷の主因にかかわらず多くのCNS病態に関連しており、CNSの一部である網膜神経細胞や視神経でも見られる。ホメオスタシスからの逸脱が生じると、常在免疫細胞が活性化される。CNSでは常在ミクログリアがこのような免疫細胞に相当する。これらの免疫細胞の活性化が十分でない場合や、活性化されても活性化の収束までに時間を要した場合には、局所炎症の悪循環に陥ることがある。このような局所炎症は疾患の主因とはならないが、疾患の進行の一因となる可能性がある。免疫活性の収束までに時間を要する不十分な局所免疫活性を終わらせるには、消炎作用を有する細胞の働きが必要となる。このような消炎作用を有する細胞として、血中単球が挙げられ、血中単球は血流から新たに動員され、局所で教育を受けて消炎作用を有する細胞へと分化することができる。免疫細胞が関連する眼疾患について以下にまとめた。

10

【0003】

加齢黄斑変性（AMD）は、視力が鋭敏な網膜領域である眼の黄斑部が障害される疾患であり、網膜下の網膜色素上皮層の萎縮および光受容体（桿体および錐体）の消失として現れる。AMD患者の約10%は、異常血管の増殖により生じた網膜中心部の変性によって引き起こされる新生血管型黄斑変性または滲出型黄斑変性に罹患している。AMDの病態形成には多様な細胞プロセスが関連しており、例えば炎症、酸化ストレス、コレステロール代謝異常、および/または網膜色素上皮の機能障害が挙げられる。網膜における異常血管の増殖は、血管内皮増殖因子（VEGF）により刺激される。

20

【0004】

ぶどう膜炎は、関節リウマチや強直性脊椎炎などの自己免疫疾患、感染症、または毒素暴露によって引き起こされると考えられている。しかし多く場合、原因不明である。ぶどう膜炎で最も一般的に見られるのは前部ぶどう膜炎であり、前眼部の炎症を伴う。この炎症は自己免疫疾患と関連している場合もあるが、多くの場合、健常者において発症する。後部ぶどう膜炎は、眼の脈絡膜および神経網膜が障害される炎症性眼病態であり、失明に至る可能性がある。ヒト後部ぶどう膜炎のモデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）を用いた多くの研究から、主にこの疾患の誘導相および効果相においてマクロファージが重要な役割を果たしていることが分かっている。これに反して、収束段階におけるマクロファージの存在を示す報告もある。しかし、これらの研究のほとんどにおいて、常在ミクログリアの機能と浸潤マクロファージの機能との識別はなされていない。また、単球由来マクロファージの種々のサブセットの特徴や、in vivoでの上記疾患の様々な相におけるそれらの機能については現在のところ報告されていない。

30

【0005】

網膜色素変性（RP）は網膜ジストロフィーの一種であり、また、周辺視力の進行性喪失および夜間視力の低下（夜盲症）を特徴とする一連の遺伝障害であり、中心視力の喪失に至る可能性がある。RPは、光受容体（桿体および錐体）または網膜の網膜色素上皮（RPE）の異常によって引き起こされ、視力が徐々に失われる。RPにおける持続性慢性炎症反応の存在を示す臨床的根拠が報告されており、炎症によりRPが生じている可能性が示唆されている（Yoshida et al., 2013）。

40

【0006】

糖尿病性網膜症は、糖尿病の合併症として生じる網膜症であり、最終的には失明に至る可能性がある。糖尿病は、網膜において様々な代謝異常および生理的異常を引き起こすが、こうした異常のうちのいずれが、明らかとなっている糖尿病性網膜症（DR）の特徴に関わっているのかはあまり分かっていない。糖尿病患者の網膜で発症することが分かっている分子的異常および生理的異常の多くは、炎症と一致して見られた。また、様々な抗炎

50

症療法が、動物モデルにおいてDRの種々の特性の発現を大幅に抑制することが見出されている (Tang et al., 2011)。

【0007】

緑内障はゆっくりと進行する視神経障害であり、高齢者において発病率が高い(約1%)。緑内障は近年まで眼圧(IOP)の上昇に関連するとされてきたため、降圧薬によって疾患の進行を遅らせる試みが集中的になされてきた。しかし、緑内障は一疾患群であり、そのすべてが眼圧と関連しているわけではないことがここ何年かで明らかとなった。また、疾患が眼圧と関連していても、眼圧が正常値まで低下し、さらには正常値よりも低い値となり、それでも変性が進行し続ける可能性があることも分かった。臨床医の間では、IOP値が正常であるにも関わらず緑内障患者の変性が持続するのは、眼圧の他にも危険因子があることの現れであるのか、あるいは残存神経細胞や神経線維の脆弱性が増加しているためIOPを正常値よりも低下させる必要があることの現れであるのかという議論が続けられている。緑内障によって、特に網膜神経節細胞(RGC)の神経変性が引き起こされ、視野が徐々に狭くなって視力喪失に至る。

【0008】

病因

成熟神経細胞は増殖能力や失われた神経細胞を補填する能力が非常に低いため、成人CNSにおいて急性かつ/または慢性的に神経細胞が失われると、不可逆的な機能喪失につながる。したがって、機能を維持するためには、神経細胞の喪失を緩和するか抑制することが必須である。神経変性疾患の多くでは、その病因が明らかになっていないため治療することができない。しかし、一次的な危険因子や二次的な危険因子がいくつかあり、これらの危険因子を標的として、神経細胞喪失の進行を抑制または緩和するための治療的介入がなされており、このような治療的介入を神経保護療法と総称している。危険因子のいくつかは疾患特異的であるが、例えば興奮性アミノ酸、フリーラジカル、および一酸化窒素などは神経変性障害すべてに共通する危険因子である。これらの危険因子は健全なCNSの構成に必須の自己成分であるが、変性組織中において過剰に蓄積すると細胞毒となり、神経細胞死が生じた領域からさらに損傷が広がる。

【0009】

グルタミン酸塩は、急性および慢性の変性障害において最も一般的に見られる毒性メディエーターの1つである(Pitt et al., 2000)。グルタミン酸塩はヒトCNSにおける主要な興奮性神経伝達物質である。L-グルタミン酸塩はシナプスの大部分に存在し、2種の機能を発揮することができる。すなわち、機能が正常である場合には必須の神経伝達物質として中心的な役割を果たす一方、生理的レベルを超えた場合には毒性を示す。

【0010】

現在の疾患管理

神経変性疾患の治療方法は現在のところ存在せず、症状の緩和または管理に焦点を当てた治療が行われている。現在までになされた臨床研究のほとんどにおいて、神経保護療法の有効性は示されていない。AMDについては、抗血管新生剤または抗VEGF剤を眼の硝子体液中に直接注射することにより異常血管を退縮させて視力を改善できる可能性が示されている。

【0011】

再生医療および防御自己免疫

再生医療は、これまで回復不能とされていた臓器を刺激して自己治癒を促すことにより損傷した組織および臓器を修復、置換および/または再生させることを目的とした新たに台頭しつつある分野であり、組織工学、生体材料、細胞療法などが含まれる。細胞の再生は、末梢組織において一般的に見られる治癒プロセスであるが、成人の神経網膜でもそれ以外のCNSでも限定的にしか起こらない。しかし、網膜前駆細胞(RPC)の静止期細胞集団は、成人期を通して網膜毛様体(CB)に存在し、様々な網膜細胞に分化できる可能性を有しており、恐らく免疫調節物質や神経向性物質を産生できると考えられる。この静止期の前駆細胞集団は網膜損傷によって刺激を受けることが報告されたが、そのメカニズ

10

20

30

40

50

ムは未だ明らかになっていない。損傷に応答して作動する治癒プロセスを解明し、このプロセスを増強できる方法を見出すことができれば、神経保護および細胞再生を促進するための新たな治療法の開発につながる可能性があり、これは当技術分野の研究目標の1つとなっている。

【0012】

CNS外における治癒プロセスでは、死細胞や細胞片の排除、および再増殖や細胞再生の促進に免疫系の助けを必要とする。このプロセスの一部には、治癒の過程で様々な表現型を獲得する種々のマクロファージサブセットが介在する。損傷に応答する過程での重要な段階として、単球由来のマクロファージの関与による局所免疫応答の終了が挙げられる。この単球由来マクロファージは、周囲環境全体の抗炎症性の獲得に寄与し、また再生に必要な増殖因子を産生する。

10

【0013】

病変部内部への末梢血の浸潤および動員は、病変部から誘起されたシグナルによって制御され、これは脳脊髄液(CSF)関門に影響を及ぼす。損傷を受けたCNSの自然回復が限定的であることは、病変部に自発的に動員される有効な単球サブセットが結果的に不十分であることに一部起因していると考えられる。以上の考察をもとに、本発明者らは、身体の秀でた治癒機構である免疫系を利用した新規の生理学的方法を使用して、CNS損傷によって生じる事象に対処し、さらには神経の保護および回復を試みた。

【0014】

本発明者らの研究室において、血液由来の単球を皮膚片と共にインキュベートすると、文献で報告されている抗炎症性M2単球の表現型に類似する非炎症性の表現型が得られることが示された。この単球をラットの損傷脊髄に注射したところ、脊髄損傷(SCI)からの回復が改善した(US 5,800,812、US 6,117,424およびUS 6,267,955)。この方法を、臨床研究において重篤な急性脊髄損傷の患者に対して試験したところ、有望な結果が得られた(WO 03/044037; Knoller et al., 2005)。本発明者らはまた、末梢血単球プールに骨髓由来CD115⁺細胞を加えて補強するとSCIからのマウスの機能回復が増強されることを示した(Shechter et al., 2009)。

20

【0015】

血中単球は、様々な特徴および活性を有する種々の細胞からなる集団である。血中単球を治療目的で利用するためには、有害な機能を持つ単球と有益な単球とを区別する必要がある。

30

【0016】

ヒトでは、単球のCD16の発現に基づいて、3種のサブセット、すなわちCD14⁺⁺CD16⁻(classical)単球、CD14⁺⁺CD16⁺⁺(intermediate)単球、およびCD14^{dim}CD16⁺⁺(non-classical)単球を区別できることが提案されているが、生理学的条件下および病理学的条件下におけるそれぞれの役割は十分には分かっていない。近年、本発明者らは、脊髄損傷を受けた動物のCSFにCD16⁺単球が濃縮された単球を注射すると、単球亜集団全体を注射した動物と比較して自然回復が遅延することを見出した。また、CD16発現細胞を含まない単球亜集団(CD16⁻)が脊髄損傷の回復に有益であることも見出した(PCT/IL2012/050522)。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

本開示は概して、網膜または視神経において、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護または神経再生の促進に使用するための末梢血単核細胞(PBMC)由来単球亜集団であって、該単球亜集団が、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないこと、またはCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないこと、ならびに上記網膜または視神経が、眼疾患、眼障害または眼病態による損傷を有することを特徴とするPBMC由来単球亜集団に

50

一部関する。

【0018】

本開示はまた、炎症性眼疾患、炎症性眼障害または炎症性眼病態の治療に使用するためのPBMC由来単球亜集団であって、該単球亜集団が、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないこと、またはCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないことを特徴とする、PBMC由来単球亜集団を提供する。

【0019】

本開示はさらに、網膜または視神経において、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護または神経再生の促進のための、PBMC由来単球亜集団を含む組成物であって、該PBMC由来単球亜集団が、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないこと、またはCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくは実質的に含んでいないこと、ならびに上記網膜または視神経が、眼疾患、眼障害または眼病態による損傷を有することを特徴とする組成物を提供する。

10

【0020】

また、本開示は概して、炎症性眼疾患、炎症性眼障害または炎症性眼病態の治療に使用するための、PBMC由来単球亜集団を含む組成物であって、該PBMC由来単球亜集団がCD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないこと、またはCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないことを特徴とする組成物に関する。

20

【0021】

本開示はさらに、網膜または視神経において、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護または神経再生の促進を行うための方法であって、該網膜または視神経が、眼疾患、眼障害または眼病態による損傷を有し、該方法が、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないPBMC由来単球亜集団、またはCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないPBMC由来単球亜集団を有効量で上記抑制、保護または促進を必要とする個体に投与することを含む方法を提供する。

30

【0022】

また、本開示は概して、炎症性眼疾患、炎症性眼障害または炎症性眼病態を治療するための方法であって、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないPBMC由来単球亜集団、またはCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、もしくはこれらの細胞を実質的に含んでいないPBMC由来単球亜集団を有効量で上記治療を必要とする個体に投与することを含む方法に関する。

【図面の簡単な説明】

40

【0023】

【図1】図1A～Eは、グルタミン酸塩の毒性に暴露させた後に同系の単球を硝子体内に注射すると神経保護効果が得られることを示す。グルタミン酸塩の毒性に暴露させてから7日後に、損傷を与えなかった網膜、損傷を与えた網膜、および単球で処置した網膜について、これらの切片中の網膜神経節細胞(RGC)数を定量した。各条件につき4つの切片でBrn3a⁺RGCを定量し、カウント数(A)および損傷を与えなかった網膜に対する生存率(%) (B)として示した。図1C～Eは、損傷を与えなかったマウス(C)の網膜、または損傷を与えた後にPBS(D)もしくはマウス単球(E)を硝子体内に注射したマウス(D～E)の網膜において、RGCマーカーであるBrn3a(赤色;スケールバー:100μm)で標識したRGCを示す代表的な顕微鏡写真である。矢印はBrn3a⁺RGCを示す。PBS処

50

置群で見られるように損傷後にRGCが減少したこと、さらに単球 (mouse mon) で処置した網膜ではRGCが補充されていることに注目されたい。図中のエラーバーは各群の平均値 ± S Eを示す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。GTはグルタミン酸塩、monは単球、RGCは網膜神経節細胞を示す。

【0024】

【図2】図2A～Hは、硝子体内に注射したマウス単球の局在および特徴を示す顕微鏡写真である。グルタミン酸塩の毒性に暴露後7日目の網膜の代表的な顕微鏡写真を示し、これらの写真から、注射したマウス単球 (CX3CR1-GFP、緑色) によって様々なサイトカインおよび神経栄養因子 (赤色) が発現されたことが分かる。(A) TGF、(B) IL-10、(C) CD38、(D) IGF-1、(E) BDNF、(F) Arg-1 (アルギナーゼ-1)、(G) TNF、(H) IL-1。細胞の非特異染色はヘキスト染色 (青色) により実施した。注射した細胞は、硝子体内、損傷を与えたRGCの近傍、および網膜下腔に確認された。矢印は二重標識した細胞を示す。挿入図は、代表的な細胞を高倍率で観察した写真である (スケールバーは $50 \mu\text{m}$ を示し、挿入図のスケールバーは $10 \mu\text{m}$ を示す)。GCLは神経節細胞層、RSは網膜下腔、vitは硝子体を示す。

10

【0025】

【図3】図3A～Cは、CNS由来自己免疫ワクチン予防接種によって、視神経挫滅 (ONC) 後の網膜において免疫応答が増強されることを示す。ONCを行った7日後のキメラマウスの網膜において、総白血球数 (CD45^+ ; A)、単球由来マクロファージの浸潤 ($\text{CD11b}^+\text{GFP}^+$; B)、およびT細胞の浸潤 (TCR^+ ; C) を定量した結果を示す。ONCの1週間前に、MOG由来の改変ペプチド (45D) を1群のマウスにワクチン接種した。ワクチン接種群のもう一方の網膜を、損傷を与えなかったコントロールとして用いた。グラフは各群の平均値 ± S Eを示す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明者らは、グルタミン酸塩の毒性にマウスの眼を暴露させると、損傷を受けた網膜に単球由来マクロファージが浸潤することを以前に報告している。この浸潤を抑制すると、網膜神経節細胞 (RGC) の生存率が低下し、毛様体における網膜前駆細胞 (RPC) の増殖細胞数が減少する。血中単球プールを増強すると、RGCの生存率およびRPCの再生率が上昇する。単球由来マクロファージが浸潤すると、損傷を受けた網膜の環境が抗炎症・神経保護状態へと変化し、他の免疫細胞の蓄積が抑制される。この結果、局所炎症が消散し、組織修復が増強される (London et al., 2011、この文献はその全体が本明細書に開示されたものとして本明細書に組み込まれる)。また、グルタミン酸塩は、生理的レベルを超えると、一次的な危険因子とは無関係に自己持続的な変性を起こす初期因子の1つとなる。

30

【0027】

また、本発明者らは近年、CD3発現細胞、CD19発現細胞およびCD56発現細胞 (および任意にCD16発現細胞) が相対的少量しか含まれていないか、これらの細胞がほとんど含まれていないか、あるいはこれらの細胞が全く含まれていないことを特徴とする血液由来ヒト単球亜集団が、脳脊髄液 (CSF) から脊髄中の損傷部位へと遊走して、組織修復を促進し、機能回復を改善することを見出した (PCT/IL2012/050522)。さらに、本発明者らは近年、損傷を受けた脊髄の治癒に有益な上記細胞のこのような効果は、上記細胞を皮膚片と共培養して活性化し、その細胞を脊髄中の病変部の辺縁に投与方法によって、あるいは上記細胞を活性化させずに損傷脊髄のCSFに投与方法によって達成されることを見出した。

40

【0028】

本発明により、骨髄由来マウスCD115⁺単球細胞を硝子体内に注射することによって、グルタミン酸塩の毒性の暴露を受けたマウスの網膜神経節細胞の生存率に対する保護効果が得られることが分かった (実施例4)。

【0029】

50

Cluster of Differentiation (CD) 分子Xなどの同定可能な特定のマーカーを表面に発現している細胞を本明細書においてCDX⁺と称する。例えば、CD3分子を表面に発現している細胞を本明細書においてCD3⁺と称する。細胞表面に発現されているCD分子の相対量は、「+」を付加することにより示し、例えばCD3⁺⁺はCD分子が多量に発現されていることを示す。また、「dim」を付加することによって、CD分子が相対的に低レベルであることを示す。特定のCDの発現により定義される細胞種を含む細胞集団をCD⁺と称し、これらの細胞が濃縮されている細胞集団をCD⁺⁺と称し、これらの細胞を含まない細胞集団をCD⁻と称する。

【0030】

したがって、一実施形態において、上記ヒトPBMC由来単球亜集団は、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、またはこれらの細胞を実質的に含んでいない。例えば、本発明のPBMCは、CD3⁺細胞を相対的少量しか含んでおらず、かつCD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を実質的に含んでいないものであってもよい。

10

【0031】

一実施形態では、上記PBMC亜集団からCD16⁺細胞をさらに除去することによって、さらにCD16⁺細胞が実質的に取り除かれたPBMC由来単球亜集団、すなわちCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、またはこれらの細胞を実質的に含んでいない単球亜集団が提供される。例えば、本発明のPBMCは、CD3⁺細胞を相対的少量しか含んでおらず、かつCD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を実質的に含んでいないものであってもよい。

20

【0032】

様々な単球亜集団を区別するために用いられる代表的な抗原は、非ヒト動物とヒトとで異なる。したがって、特定のマウス細胞集団の同定に用いられるマーカーは、これに対応するヒト細胞集団の同定に用いられるマーカーと異なってもよい。例えば、本明細書の実施例4において用いられているマウスCD115⁺単球はGR1⁺とGR1⁻の2つの亜集団に分けられるが、これに対応するヒト単球集団は、細胞膜マーカーCD14およびCD16の発現に基づいて3つの亜集団に分けられる (Geissman et al. (2008) Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. Immunology and Cell Biology (2008) 86, 398-408)。

【0033】

本明細書において「末梢血単核細胞 (PBMC)」は、円形の核を有するあらゆる血液細胞、例えばリンパ球、単球、またはマクロファージを指す。当業者であれば、血液からPBMCを単離する方法を容易に理解できるであろう。血液からのPBMCの単離方法としては、例えば、血液を各層に分離する親水性多糖であるフィコールを用いて、単球およびリンパ球からなるパフィーコートを血漿層の下に形成させることにより全血からPBMCを抽出する方法、ならびに白血球濃縮物を調製して、白血球をほとんど含まない血漿と赤血球とをドナーに戻すことにより全血からPBMCを抽出する方法 (白血球除去法) が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0034】

本明細書において、「(特定の細胞)を実質的に含まない細胞集団」という用語は、「(特定の細胞が)ほとんど存在しない」という用語と同じ意味で用いられ、好ましくは、特定の細胞種を全く含まない細胞集団、あるいは、細胞集団の総細胞数に対する特定の細胞種の相対量が約0.05%、約0.1%、約0.5%、約1%、約2%、約3%、約4%、または約5%を超えない細胞集団を包含する。「(特定の細胞)を相対的少量しか含んでいない細胞集団」は、特定の細胞種の相対量が、新たに単離された処理前のヒトPBMC集団における同種の細胞の相対量よりも少ないが、この細胞種を「実質的に含まない」集団よりも相対量が多い細胞集団を指す。

40

【0035】

したがって、一実施形態において、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞それぞれの相対量は、PBMC集団の総細胞数の約0.05%、約0.1%、約0.5%、約1%、約2%、約3%、

50

約4%、または約5%を超えない。特定の実施形態において、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を実質的に含まない単球亜集団におけるCD16⁺細胞の相対量は、総細胞数の約0.05%、約0.1%、約0.5%、約1%、約2%、約3%、約4%、または約5%を超えない。

【0036】

正常ヒトPBMC細胞集団では、特に、CD3⁺細胞の含量が70%を超え、単球は約10~15%を占める。したがって、「CD3⁺細胞を相対的少量しか含んでいない細胞集団」においては、70%を超えていたCD3⁺細胞の相対量が、PBMC集団の総細胞数の約10%、約15%、約20%、または約25%まで低減されている。しかし、細胞分離技術が向上していることから、本発明のPBMC集団にはCD3⁺細胞がほとんど存在しないことも考えられ、すなわちその相対量が、PBMC集団の総細胞数の約0.05%、約0.1%、約0.5%、約1%、約2%、約3%、約4%、または約5%となることも考えられる。

10

【0037】

一実施形態において、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、またはこれらの細胞を実質的に含まない（さらにCD16⁺細胞を実質的に含んでいなくてもよい）単球亜集団は、CD14⁺細胞が実質的に濃縮されている。

【0038】

「~が実質的に濃縮されている細胞集団」は、該細胞集団の総細胞数に対する特定の細胞種の相対量が約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、または約99%を超えている細胞集団を指す。

20

【0039】

一実施形態において、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を相対的少量しか含んでいないか、またはこれらの細胞を実質的に含まないPBMC由来単球亜集団は、CD14⁺細胞を少なくとも約60%含んでおり、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を実質的に含まない単球亜集団は、CD14⁺細胞を少なくとも約80%含む。したがって、本明細書において定義される単球亜集団は、本明細書においてCD14⁺CD16⁻集団とも称される。

【0040】

いくつかの実施形態において、本発明の単球亜集団は、眼疾患、眼障害または眼病態による損傷を有する網膜または視神経における、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護または神経再生の促進に有用である。

30

【0041】

例えば、一実施形態において、眼の神経細胞変性を引き起こしグルタミン酸塩の毒性により増悪する上記疾患、障害または病態は、加齢黄斑変性または網膜色素変性から選択される網膜変性障害；前部虚血性視神経症；緑内障；およびぶどう膜炎から選択される。これらの疾患は神経組織の損傷を引き起こし、特定の実施形態においては、本発明の単球亜集団の投与によって神経再生が促進される。本発明はまた、慢性または急性の網膜症、糖尿病や高血圧などの全身性疾患の結果生じた網膜症、放射線網膜症、および日光網膜症の治療を包含する。

【0042】

急性損傷、加齢、毒素、代謝異常、血流の変化または変性遺伝子疾患によって二次的に生じた網膜ホメオスタシスの変化は、眼内において様々な炎症性カスケードを開始させる場合がある。こうした状態のいずれにおいても、免疫応答が長期間にわたって調節異常を起こすと、それ自体が疾患となり、網膜疾患の病因となったり、視力を脅かす合併症を引き起こしたりする場合がある。血液由来の単球は、炎症を消散してホメオスタシスを回復させるように作用し、それによって組織の自然治癒を促す。したがって、本発明はさらに、眼の神経変性を必ずしも引き起こさない炎症性眼疾患の治療に関する。いくつかの実施形態において、本発明において使用される単球亜集団は、強膜炎（強膜の炎症）、角膜炎（角膜の炎症）、角膜潰瘍（眼の角膜の表面上皮層の喪失）、雪眼炎（眼を保護せずに明るい光に暴露させたことにより痛みが生じた病態）、タイゲソン点状表層角膜炎、角膜血管新生、フックスジストロフィー（cloudy morning vision）、円錐角膜（角膜の厚みお

40

50

よび形状の変化)、乾性角結膜炎(ドライアイ)、または虹彩炎(虹彩の炎症)などの炎症性眼疾患の治療に有効である。特定の実施形態において、本発明のPBMCは、炎症性眼疾患、炎症性眼障害または炎症性眼病態による損傷を有する網膜または視神経における、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護または神経再生の促進に有用である。

【0043】

一実施形態において、本発明の態様のいずれかにおいて用いられるPBMC由来単球亜集団はヒトPBMCを含む。

【0044】

上記ヒトPBMC由来単球亜集団は自己由来のPBMCから単離したものであってもよい。すなわち、眼疾患の治療を必要とする患者から血液を採取し、本発明によるPBMC由来単球亜集団を下記で定義する通りに調製し、上記患者に投与して戻す。

【0045】

あるいは、上記ヒトPBMC由来単球亜集団は同種異系由来のPBMCから単離したものであってもよい。すなわち、遺伝的に類似するが同一ではないドナーから血液を採取し、本発明によるPBMC由来単球亜集団を下記で定義する通りに調製し、必要に応じて細胞バンクに保管した後、上記患者に投与する。

【0046】

一実施形態において、PBMC由来単球亜集団は注射用製剤、例えば眼内注射用製剤として調製される。

【0047】

また、眼疾患、眼障害もしくは眼病態による損傷を有する網膜または視神経における、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護もしくは神経再生の促進のための組成物、または炎症性眼疾患、炎症性眼障害もしくは炎症性眼病態を治療するための組成物であって、上記で定義したPBMC由来単球亜集団を含む組成物が提供される。これらの組成物では、PBMC由来単球亜集団の細胞が、薬学的に許容される注射用担体、例えば眼内投与用担体中に懸濁されていてもよい。

【0048】

本発明に従って使用される医薬組成物は、生理学的に許容される1種以上の担体または賦形剤を用いて従来の手法で調製されたものであってもよい。担体は、本発明の組成物の他の成分と適合性があり、かつレシipientに害を及ぼさないという点において「許容される」ものでなければならない。

【0049】

以下に示す担体、投与方法、剤形などは、本発明と共に使用してもよい担体、投与方法、剤形などとして選択可能な公知のものを示したものである。ただし、当業者であれば、選択した任意の配合および投与方法によって所望の結果が得られるかどうかを確認するために、まず試験を行う必要があることを容易に理解できるであろう。

【0050】

「担体」は、上記細胞と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。上記医薬組成物中の担体は、結晶セルロース、ポリビニルピロリドン(ポリピドンまたはポピドン)、トラガカントガム、ゼラチン、デンプン、ラクトース、ラクトース一水和物などの結合剤;アルギン酸、トウモロコシデンプンなどの崩壊剤;ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムなどの滑沢剤または界面活性剤;およびコロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤を含んでもよい。

【0051】

上記組成物は、例えば、ポーラス注射や持続点滴などの注射によって非経口投与するための製剤として調製されたものであってもよい。注射用製剤は、防腐剤を添加して、アンプルなどの単位剤形としてまたは複数回用量容器に入れた形態で提供されてもよい。上記組成物は、油性または水性ビヒクルを用いた懸濁剤、溶剤または乳剤の形態であってもよく、懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤などの調製用剤を含有していてもよい。

10

20

30

40

50

【0052】

上記細胞または上記組成物の眼内投与は、硝子体内注射または網膜下注射により実施してもよい。

【0053】

本発明者らは近年、上記PBMC由来単球亜集団が、皮膚片との共培養によりあらかじめ活性化されたものであるか（すなわち皮膚により活性化された細胞であるか）、あるいは活性化されていないものであるかにかかわらず、脊髄中の損傷部位の辺縁へと遊走して、損傷を緩和し機能回復を改善することを見出した（PCT/IL2012/050522）。

【0054】

したがって、例えば、眼内に注射される本発明のPBMC由来単球亜集団の細胞は、皮膚により活性化された細胞であってもよい。

10

【0055】

あるいは、眼内に注射される本発明のPBMC由来単球亜集団の細胞は、活性化されていない細胞であってもよい。

【0056】

上記に開示したように、本明細書において定義されたPBMC由来単球亜集団およびこれを含有する上記組成物は、神経変性眼疾患、神経変性眼障害または神経変性眼病態の治療に有用である。具体的には、上記治療は神経組織修復の促進を含み、これには、例えば、神経細胞変性の予防もしくは抑制；神経細胞生存、軸索再生および／もしくは発芽の促進；損傷を受けた網膜もしくは視神経組織における神経発生；ならびに／または機能回復の促進が含まれる。本明細書においては、神経細胞に対するこうした有益な効果が、本明細書において定義された特定のPBMC由来単球亜集団によって炎症反応が調節されることに少なくともある程度起因することが示されている。

20

【0057】

したがって、本発明はさらに、眼疾患、眼障害もしくは眼病態による損傷を有する網膜もしくは視神経において、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護もしくは神経再生の促進を行うための方法、または炎症性眼疾患、炎症性眼障害もしくは炎症性眼病態を治療するための方法であって、該方法が、上記の抑制、保護、促進もしくは治療を必要とする個体に本明細書において定義されたPBMC由来単球亜集団を有効量で投与することを含む方法を提供する。

30

【0058】

同出願人によるPCT/IL2012/050522は、本明細書に記載の、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を実質的に含まないヒトPBMC由来単球亜集団を血液から単離するための方法であって、(i)血液から単核細胞を単離する工程、および(ii)(i)の単核細胞からCD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を除去する工程を含み、工程(ii)において、マイクロビーズにそれぞれ結合させた抗CD3⁺抗体、抗CD19⁺抗体および抗CD56⁺抗体と上記単核細胞とを接触させてマイクロビーズに単核細胞を結合させ、マイクロビーズを除去することによって、CD3⁺細胞を相対的少量しか含まずCD19⁺細胞およびCD56⁺細胞が実質的に含まれないヒト末梢血単核細胞(PBMC)由来単球亜集団を血液から取得することを特徴とする方法を提供している。

40

【0059】

PCT/IL2012/050522はさらに、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を実質的に含まないPBMC由来単球亜集団を血液から単離するための方法であって、(iii)血液から単核細胞を単離する工程、および(iv)(iii)の単核細胞からCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を除去する工程を含み、工程(iii)において、マイクロビーズにそれぞれ結合させた抗CD3⁺抗体、抗CD19⁺抗体、抗CD56⁺抗体および抗CD16⁺抗体と上記単核細胞を接触させてマイクロビーズに単核細胞を結合させ、マイクロビーズを除去することによって、CD3⁺細胞を少量しか含まずCD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞が実質的に含まれないヒトPBMC由来単球亜集団を血液から取得することを特徴とする方法を提供している。

50

【 0 0 6 0 】

－実施形態において、工程（iv）、すなわちCD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を除去する工程は、（v）CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を（iii）の単核細胞から除去し、これによって、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞およびCD56⁺細胞を実質的に含まないヒトPBMC由来単球亜集団を血液から取得する副工程、ならびに（vi）CD16⁺細胞を（v）のPBMC集団から除去し、これによって、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞およびCD16⁺細胞を実質的に含まないヒトPBMC由来単球亜集団を血液から取得する副工程を含む。

【 0 0 6 1 】

－実施形態において、工程（iv）は単一の工程で実施される。

【 0 0 6 2 】

CD3、CD19、CD56および/またはCD16などの所望の抗原を表面に発現している単核細胞を捕捉する上記抗体は、まずビオチン化し、次いで、アビジンもしくはストレプトアビジンまたはこれらと同等なビオチン結合タンパク質を含むマイクロビーズに結合させてもよい。あるいは、先に単核細胞とマイクロビーズとを結合させてから、ここに上記抗体を加えてもよい。マイクロビーズは磁性でも非磁性でもよい。マイクロビーズが非磁性である場合、遠心分離によってマイクロビーズに結合した単核細胞を単核細胞懸濁液中から除去してもよく、マイクロビーズが磁性である場合、磁石の磁場に暴露させることによって、マイクロビーズに結合した単核細胞を単核細胞懸濁液中から除去してもよい。

【 0 0 6 3 】

－実施形態においては、上記抗体を磁気マイクロビーズに結合させてから該抗体を単核細胞と接触させ、単核細胞が結合したマイクロビーズを磁石で引き寄せて溶液中からマイクロビーズを除去することによって単核細胞を除去する。

【 0 0 6 4 】

上記に開示した方法は、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞、CD56⁺細胞および/またはCD16⁺細胞を相対的少量含しか含まないか、またはこれらの細胞を実質的に含まないヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来単球亜集団を血液から単離するために用いてもよく、このPBMC由来単球亜集団は本明細書において、眼疾患、眼障害もしくは眼病態による損傷を有する網膜もしくは視神経において、神経細胞変性の抑制、グルタミン酸塩の毒性からの神経細胞の保護もしくは神経再生の促進を行うため、または炎症性眼疾患、炎症性眼障害もしくは炎症性眼病態を治療するために使用される。

【 0 0 6 5 】

本発明を以下の実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【実施例】

【 0 0 6 6 】

材料および方法動物

成体雄（8～10週齢）C57BL/6Jマウスおよびヘテロ変異Cx3cr1GFP/+マウス（B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J、CX3CR1ケモカイン受容体対立遺伝子の一方が、GFPをコードする遺伝子で置換されたマウス；Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M. J. Sunshine, G. W. Kreutzberg, A. Sher, and D. R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4106-4114）を用いる。さらに、単球およびBMのドナーとして、C57BL/6Jマウス、ヘテロ変異Cx3cr1GFP/+マウス、MHC-II欠損マウス（B6.129S-H2dIAb1-Ea/J）、およびIL-10欠損マウス（B6.129P2-II10tm1Cgn/J；Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 75:263-274）を用いる。CD11cの検出には、マウスCD11cプロモーターの制御下でGFPレポーターをコードする導入遺伝子を有するCD11cGFP/+トランスジェニックマウス（B6.FVB-Tg Itgax-DTR/GFP 57Lan/J；Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, et al. 2002. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates

10

20

30

40

50

priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 17:211-220) を用いる。FoxP3GFPマウスは、Memorial Sloan-Kettering Cancer CenterのAlexander Rudensky博士の厚意により入手した。ハンチンチンをコードするヒト遺伝子を過剰発現するトランスジェニックR6/2マウスは、ジャクソン研究所から入手した。

【 0 0 6 7 】

特に記載がない限り、動物は、ワイツマン科学研究所の動物飼育センターより提供を受けた。本明細書に詳細に記載された実験はいずれも、ワイツマン科学研究所の動物実験委員会 (the Institutional Animal Care and Use Committee) により策定された規程に準ずる。

【 0 0 6 8 】

BMキメラ

過去の報告 (Rolls, A., R. Shechter, A. London, Y. Segev, J. Jacob-Hirsch, N. A. Mariglio, G. Rechavi, and M. Schwartz. 2008. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation. *PLoS Med.* 5:e171.; Shechter et al., 2009) に従って、[Cx3cr1^{GFP/+}>WT]BMキメラを作製する。すなわち、WTレシピエントマウスの頭部を遮蔽して全身に致死量の放射線 (950 rad) を照射する。頭部を遮蔽することによって、網膜への直接的な損傷と、グルタミン酸塩の毒性暴露により誘導される骨髄系細胞以外の骨髄系細胞による浸潤を防ぐ。翌日、過去に報告されたプロトコル (Shechter et al., 2009) に従い、BM細胞 5×10^6 個を用いてマウスを新たに作製する。BM移植の 8 ~ 12 週間後、キメラマウスをグルタミン酸塩による毒性暴露またはEAU誘導プロトコルに供する。

【 0 0 6 9 】

MC-21の投与

MC-21 (CCR2に対する抗体; Mack, M., J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, et al. 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* 166:4697-4704) の腹腔内注射を損傷形成直後から開始し、実験期間を通して継続する。EAU誘導の場合、注射はEAUのピークの前後に行い、1日おきに合計5回行った (注射1回につき8 µg投与)。

【 0 0 7 0 】

養子単球移入

過去の報告 (Varol, C., L. Landsman, D. K. Fogg, L. Greenshtein, B. Gildor, R. Margalit, V. Kalchenko, F. Geissmann, and S. Jung. 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204:171-180) に従って、CD115⁺単球を単離する。すなわち、マウスの大腿骨および脛骨からBM細胞を採取し、フィコール密度勾配により単核細胞を濃縮する。製造元のプロトコルに従ってピオチン化抗CD115抗体およびストレプトアビジン結合磁気ビーズ (ミルテニーバイオテック) を用いたMACSで濃縮することによってCD115⁺BM単球集団を単離する。次いで、損傷形成後1日目に単球 (WT、Cx₃cr1^{GFP/+}、IL-10欠損、またはMHC-II欠損) を静脈内注射する (マウス1匹につき $4 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞を投与)。

【 0 0 7 1 】

BrdUの投与レジメン

Zhao et al., 2005 (Growth factor responsive progenitors in the postnatal mammalian retina. *Dev. Dyn.* 232:349-358) に記載の方法を一部変更したプロトコルを用いて、BrdU (シグマアルドリッチ) をPBS中に溶解し、該溶液の硝子体内注射 (眼球1つあたり1 µg投与) を損傷形成直後から開始し、3日間継続して行う。この反復注射は、組織の他の部分を穿孔することなく、同じ孔から行う。これによって、網膜は、注射を1回しか受けていない場合と同等な形態を維持すると考えられる。最後の注射から1日後に動物を屠殺して増殖前駆細胞数の測定を行う。あるいは、最後の注射から1週間後に動物を屠殺して細胞の分化を検出する。コントロール動物には、グルタミン酸塩による毒性暴露

10

20

30

40

50

やIOPの上昇を行うことなく、同じ投与レジメンに従って硝子体にBrdUを投与する。様々な単球操作を行った動物の網膜や毛様体を比較する際にこれと同じプロトコルが用いられることから、損傷とそれに次ぐBrdUの反復注射による増殖RPC数に対する相乗効果を否定することはできないが、こうした操作の後に見られる増殖前駆細胞数の変化は単球を介した効果に起因する可能性が高いと考えられることには注目されたい。

【0072】

フルオロゴールドによるRGCの標識

解剖学的に無傷の神経細胞を検出するため、損傷形成後3日目に、5%フルオロゴールド(蛍光色素)の生理食塩水溶液1 μ lをマウスの両側上丘に注射する。両側上丘における注射位置は、ブレグマの後方2.92mm、正中線の側方0.5mm、および頭蓋からの深さ2mmとする。72時間後にマウスを屠殺して眼球を取り出し、網膜を平坦にしながらPBS中4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて全載標本とする。視神経円板からの距離がほぼ同じとなるように(0.3mm)視野を選択して、視神経円板からの距離に応じたRGC密度の変動を除外した。マウスに施した処置についての情報を持たない観察者によって蛍光顕微鏡(倍率800倍)下で視野をカウントした。各網膜について、1視野あたりの平均RGC数を算出した。詳細については、Schori et al., 2001 (Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:3398-3403) およびSchwartz and Kipnis, 2007 (Model of acute injury to study neuroprotection. Methods Mol. Biol. 399:41-53) を参照されたい。

【0073】

免疫組織化学的検査

過去の報告(Shechter, R., Y. Ziv, and M. Schwartz. 2007. New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. Stem Cells 25:2277-2282)に従って、PBS灌流固定後に眼球を取り出し、2.5%PFA中で24時間かけて後固定して、70%エタノール中に移し、続いてパラフィン包埋した。病理組織学的検査を行うため、切片をいくつか選択してヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。免疫標識に用いた抗体は、ウサギ抗GFP(1:100、MBL)およびマウス抗Brn3a(1:50、サンタクルーズバイオテクノロジー社)であった。M.O.M. Immunodetection Kit(ベクターラボラトリーズ)を使用して、マウス一次モノクローナル抗体の局在を特定した。活性化した骨髄系細胞を標識するため、FITC標識Bandeiraea simplicifolia イソレクチンB4(IB-4; 1:50; シグマアルドリッチ)を二次抗体溶液に加え、1時間インキュベートした。使用した二次抗体は、Cy2/Cy3標識ロバ抗マウス抗体またはCy2/Cy3標識ロバ抗ウサギ抗体(1:150~1:200、いずれもJackson ImmunoResearch Laboratories社より入手)を含んでいた。スライドをヘキスト(1:2,000; インピトロジェン)で1分間染色した。顕微鏡分析には蛍光顕微鏡(E800、ニコン)を使用した。この蛍光顕微鏡は、デジタルカメラ(DXM 1200F; ニコン)、および20 \times 、NA0.50の対物レンズまたは40 \times 、NA0.75の対物レンズ(Plan Fluor; ニコン)を備えていた。画像取得ソフトウェアNIS-Elements F3(ニコン)を使用して、後固定後の組織の撮影を24で行った。撮影した画像は、フォトショップ9.0(アドビ)を使用してコントラストを微調整してトリミング、結合および最適化し、Canvas X(Deneba Software)を使用してレイアウトした。

【0074】

網膜の単離およびフローサイトメトリー分析

過去の報告(Kerr, E.C., B. J. Raveney, D. A. Copland, A. D. Dick, and L. B. Nicholson. 2008. Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations. J Autoimmun 31:354-361, Luger, D., P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E. P. Bowman, N. M. Sgambellone, C. C. Chan, and R. R. Caspi. 2008. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect

dominant effector category. J Exp Med 205:799-810) に従って、P B S で心臓内灌流を行い、解剖により網膜を取り出し、単一細胞懸濁液を調製した。蛍光色素標識モノクローナル抗体 (mAb) をBD社、BioLegend社、eBioscience社またはAbDSerotec社から購入し、製造元のプロトコルに従って使用した。使用した蛍光色素標識モノクローナル抗体は、PEで標識した抗CD11b抗体、抗CD206 (MMR) 抗体および抗IL-4R 抗体 ; PerCP-cy5.5で標識した抗Ly6C抗体および抗CD11b抗体 ; アロフィコシアニン (APC) で標識した抗CD115抗体、抗TCR 抗体、抗FoxP3抗体および抗CD204抗体 ; Alexa647で標識した抗デクテン - 1抗体 ; ならびにPacific Blue/Brilliant Violetで標識した抗TCR 抗体、抗CD4抗体および抗CD45.2抗体であった。製造元のプロトコルに従ってFoxp3染色パツファーセット (eBioscience) を使用してFoxP3染色を行った。FACSDivaソフトウェアを使用してFACS LSRII 10
サイトメーター (いずれもBD社) により細胞を分析した。FlowJoソフトウェア (Tree Star社) で分析を行った。いずれの実験においても、関連する陰性コントロール群および陽性コントロール群を用いて、目的とする集団を決定し、それ以外の集団は除外した。

【 0 0 7 5 】

in vivo蛍光イメージング

マウスを麻酔し、プラスチック器具を使用して軽く固定する。網膜を可視化するため、0.5%トロピカミド (Dr. Fischer) を1滴滴下して瞳孔を広げ、眼用潤滑剤 (Cellusan; Dr. Fischer) を1滴滴下して眼球上にガラス製カバースリップを載せる。マウスにローダミンデキストラン (マウス1匹につき1mg ; シグマアルドリッチ) を静脈内注射して血管を可視化した。蛍光照明装置およびPixelfly QE電荷結合素子カメラ (PC0) を備えたZoom Stereo Microscope SZX-RFL-2 (オリンパス) の観察野にマウスを置く。赤色フィルターセットの励起波長は510~550nmであり、発光波長は590nmである (ロングパス)。緑色フィルターセットの励起波長は460~490nmであり、発光波長は510~550nmである。蛍光露光時間は50ミリ秒とする。画像の取得はCamwareカメラ制御ソフトウェアプログラム (PC0) を使用して行う。画像分析はImageJ 1.43ソフトウェア (W. Rasband、アメリカ国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ) を使用して行う。 20

【 0 0 7 6 】

統計的分析

データ分析では、スチューデントの t 検定を用いて2群を比較する。複数の群の比較には一元配置分散分析を用いる。帰無仮説が否定された場合、フィッシャーのLSD検定により各群を一对比較して追跡を行う ($F < 0.05$)。結果は平均値 \pm SEで示す。グラフ中、y軸のエラーバーはSEを表す。ぶどう膜炎に関する研究では、Levene検定により等分散性を調べた。等分散であった場合、2群の比較にはスチューデントの t 検定を用い、複数の群の比較には一元配置分散分析を用いてデータの分析を行った。帰無仮説が否定された場合、TukeyのHSD検定により各群を一对比較して追跡を行った ($p < 0.05$)。不等分散であった場合、データを対数変換して可能であれば等分散とし、等分散とすることができなかった場合、Kruskal-Wallis検定を用いて複数の群を比較し、続いてDunn検定を行った。結果は平均値 \pm SEで示す。グラフ中、y軸のエラーバーはSEを表す。 30

【 0 0 7 7 】

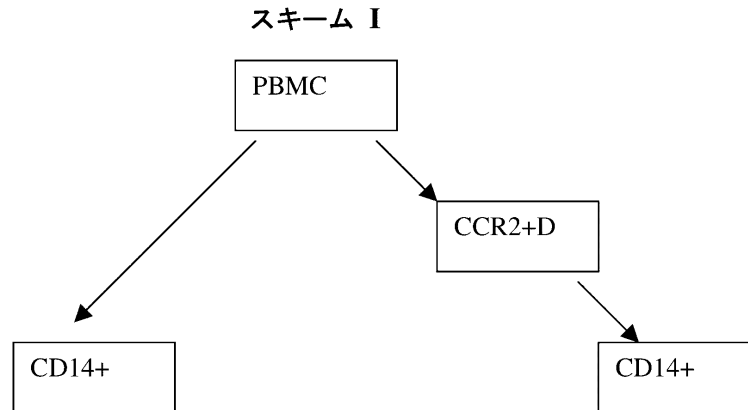
実施例1 : CX₃CR1の高レベル発現およびCCR2の低レベル発現を示すヒト単核細胞のPBMCからの単離

ヒト単球は、CD14およびCD16の発現に基づいて3つの集団、すなわち、CD14⁺CD16⁻単球集団、CD14⁺CD16⁺単球集団、およびCD14^{dim}CD16⁺単球集団に分けられる。CD14⁺CD16⁻単球は血中単球の80%~90%を占め、ケモカイン受容体CCR2を高レベルで発現し、ケモカイン受容体CX₃CR1 (フラクタルカインの受容体) を低レベルで発現する。この主要なサブセットとは対照的に、ヒトCD16⁺単球はCX₃CR1を高レベルで発現し、CCR2を低レベルで発現する (Cros et al., 2010)。Crosら (2010) によれば、遺伝子発現分析により、ヒトCD14^{dim}CD16⁺単球とマウスパトロールGr1^{dim}単球との類似性が示された。CD14^{dim}CD16⁺細胞は局所組織の自然免疫監視および自己免疫疾患の病態形成に關与する真性単球であ 40 50

る。

【 0 0 7 8 】

CX₃CR1の高レベル発現およびCCR2の低レベル発現を示すCD14^{dim}CD16⁺細胞をPBMCから単離するため、スキーム I に示す通り、PBMCからのCD14⁺の単離をコントロールとして、CCR2のネガティブ選択 (CCR2⁺除去) とCD14⁺ (CD14⁺) のポジティブ選択とを組み合わせた方法を用いた。



10

【 0 0 7 9 】

CD14^{dim}CD16⁺細胞集団の濃縮：

(i) ヒト末梢血からの単核細胞の単離：

健常なドナーから採取した新鮮血 (8 m l) を P B S 中 2 . 5 % F C S で 1 : 1 に希釈し、フィコール勾配 (Ficoll-Paque plus、アマシャムバイオサイエンス) 上に重層した。チューブを 1 0 0 0 g、2 0 で 2 0 分間遠心分離した。単核細胞相を採取し、P B S で 2 回洗浄した。

20

【 0 0 8 0 】

(ii) CCR2⁺の除去：

F c R ブロッキング試薬 (細胞 1 0 ⁶ 個あたり 2 . 5 μ l) (130-059-901、ミルテニーバイオテック) を使用して、単核細胞を室温で 1 5 分間処理することにより、F c 受容体をブロッキングした。次いで、洗浄せずに、抗ヒトCCR2モノクローナル - ビオチン試薬 (FAB151B、R & D システムズ) (細胞 1 0 ⁶ 個あたり 1 0 μ l) を添加し、2 ~ 8 で 3 5 分間インキュベートした。細胞を冷MACS (登録商標) バッファー (P B S 中、1 m M E D T A および 2 % F C S) で洗浄し、ストレプトアビジンマイクロビーズ (130-048-101、ミルテニーバイオテック) (細胞 1 0 ⁷ 個あたり 2 0 μ l) を添加し、2 ~ 8 で 2 0 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、MACS バッファー 0 . 5 m l 中に再懸濁した。製造元のプロトコルに従って L D カラム (130-042-901、ミルテニーバイオテック) を使用し、CCR2⁺細胞を除去した。

30

【 0 0 8 1 】

(iii) CD14⁺細胞の単離：

上記細胞をMACSバッファー (細胞 1 0 ⁷ 個あたり 8 0 μ l) 中に再懸濁し、CD14⁺ マイクロビーズ (130-050-201、ミルテニーバイオテック) (細胞 1 0 ⁷ 個あたり 2 0 μ l) を添加し、2 ~ 8 で 1 5 分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、MACS バッファー 0 . 5 m l 中に再懸濁した。製造元のプロトコルに従って、L S カラム (130-042-401、ミルテニーバイオテック) を使用した磁気分離を行い、CD14⁺細胞をポジティブ選択した。

40

【 0 0 8 2 】

(iv) 蛍光活性化セルソーティング (FACS (登録商標)) によるヒト単核細胞の染色

各試料を製造元のプロトコルに従って以下のように染色した。各試料を 7 0 μ m ナイロンメッシュに通し、F C R ブロッキング試薬 (細胞 1 0 ⁶ 個あたり 3 0 μ l) (130-059-901、ミルテニーバイオテック) を用いて室温で 1 5 分間ブロッキングした。製造元のプロトコルに従って蛍光色素標識抗ヒトモノクローナル抗体を使用した。使用した抗体は、Pe

50

rCP標識抗CD45抗体 (345809、B D)、FITC標識抗CD115抗体 (FAB329F、R & Dシステムズ)、Pacific Blue (登録商標) 標識抗CD14抗体 (BLG-325616)、Alexa Fluor (登録商標) 700標識抗CD16抗体 (BLG-302026)、PE標識抗CX₃CR1抗体 (MBL-D070-5)、およびPerCP標識抗CCR2抗体 (BLG-335303) であった。

【0083】

実施例2：網膜における神経細胞変性の抑制

いくつかの網膜変性モデルを選択して使用する。使用する網膜変性モデルは、神経変性条件下において一般的に見られる毒性メディエーターであるグルタミン酸塩を用いて網膜を毒性暴露させたEAU誘導；視神経挫滅；高IOPモデル；および色素上皮変性病態を最もよく模倣するトランスジェニックマウスである。

10

【0084】

EAU誘導

EAU誘導はヒト後部ぶどう膜炎のモデルである。ぶどう膜炎は網膜変性を生じることが多いため、このモデルをCNS神経変性のモデルとみなす。2.5 mg/mlの濃度 (最終濃度：1.25 mg/ml) の結核菌H37.RA株を含有するフロイントの完全アジュバント (CFA) との1:1エマルジョンとして、ヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質 (IRBP) に由来するペプチド (1~20番目の残基) (22) (AnaSpec社、GL Biochem (Shanghai) 社、またはワイツマン研究所のペプチド合成ユニット) 500 µgをマウスに皮下注射する。これと同時に、マウスの腹腔内に百日咳毒素 (シグマ) 1 µgを注射する。

20

【0085】

上記の投与により、免疫してから14日後までに80~100%のマウスにおいて疾患が誘導される。疾患のピークは免疫後22日目~29日目に見られる。特異的RGCマーカーであるBrn3aの免疫染色 (Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, P. Sobrado-Calvo, L. Nieto-Lopez, I. Canovas-Martinez, M. Salinas-Navarro, M. Vidal-Sanz, and M. Agudo. 2009. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:3860-3868)、および解剖学的に無傷な軸索を有する細胞の標識に広く用いられている方法であるフルオロゴールドを用いたRGCの逆行性標識 (上掲のSchori et al., 2002; 上掲のSchwartz and Kipnis, 2007) を使用して、グルタミン酸塩による毒性暴露後7日目、またはEAU疾患のピークの前後およびEAU疾患のピーク期に生存しているRGCを評価する。

30

【0086】

硝子体内グルタミン酸塩毒性モデル

CNS障害の多くにおいてグルタミン酸塩の上昇が報告されている。グルタミン酸塩は、興奮毒性化合物として、急性および慢性の変性障害 (緑内障の視神経変性を含む) において最も一般的に見られる毒性メディエーターの一つである (Doble, 1999)。したがって、グルタミン酸塩は、中枢神経系神経の神経変性の全般的なモデルとなる。このモデルにグルタミン酸塩を眼内注射すると、網膜変性障害 (加齢黄斑変性、網膜色素変性など)、前部虚血性視神経症、緑内障、またはぶどう膜炎といった様々な眼疾患において生じるような網膜神経節細胞の神経変性を特に典型的に示す。過去の報告 (Yoles E, Friedmann I, Barouch R, Shani Y, Schwartz M. Self-Protective mechanism awakened by glutamate in retinal ganglion cells. *J Neurotrauma.* 2001, Mar; 18(3):339-4; Schori, H., E. Yoles, L. A. Wheeler, T. Raveh, A. Kimchi, and M. Schwartz. 2002. Immune-related mechanisms participating in resistance and susceptibility to glutamate toxicity. *Eur. J. Neurosci.* 16:557-564) に従って、マウスを麻酔し、局所麻酔 (Localin; Dr. Fischer) を眼に直接投与することにより処置し、1-グルタミン酸塩 (シグマアルドリッチ) 400 nmolを含有する生理食塩水を総量1 µlで硝子体内注射する。

40

【0087】

N-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) 毒性モデル

50

様々な動物種において、MNUを単回全身投与すると網膜変性が引き起こされる。この網膜変性は再現性が高く、また、ヒト網膜色素変性と類似したアポトーシスを介して、MNU投与後7日以内に光受容体細胞の喪失が起こる (Tsubura A, Yoshizawa K, Kuwata M, Uehara N. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials. *Histol Histopathol.* 2010 Jul;25(7):933-44. Review)。

【0088】

マウスにおける視神経挫滅

適切に設定された視神経挫滅により、軸索損傷の逆行性シグナル伝達が生じて進行性の神経節細胞死が誘導される (Levkovitch-Verbin H, Harris-Cerruti C, Groner Y, Wheeler LA, Schwartz M, Yoles E. RGC death in mice after optic nerve crush injury: oxidative stress and neuroprotection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Dec;41(13):4169-74)。すなわち、マウスを麻酔し、以下のようにして眼球から1~2mmの視神経眼窩内部位に重篤な挫滅創を形成させる。手術用双眼顕微鏡を用いて結膜を切開し、視神経を露出させる。調整されたクロスアクション鉗子を使用し、血液供給を妨げないように十分注意しながら、神経を2秒間挫滅させる。

10

【0089】

高IOPモデル

眼圧 (IOP) は緑内障の危険因子であり、網膜や視神経の変性を引き起こすことがあるため、一般に神経変性モデルとして、特に緑内障モデルとして使用される。過去の報告 (Da, T., and A. S. Verkman. 2004. Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:4477-4483; Ben Simon, G. J., S. Bakalash, E. Aloni, and M. Rosner. 2006. A rat model for acute rise in intraocular pressure: immune modulation as a therapeutic strategy. *Am. J. Ophthalmol.* 141:1105-1111) に従って虚血性損傷を作製する。すなわち、麻酔を行った後、等張食塩溶液 (生理食塩水) を入れた容器と連結したマイクロピペットを前房内に挿入することによって眼圧 (IOP) を上昇させる。この容器を適切な高さに配置することにより、120mmHgの眼圧を60分間にわたって誘導する。

20

【0090】

トランスジェニックマウスモデル

適切なトランスジェニックマウスとして、例えば、コロイデレミア (CHM) ノックアウトマウス (Tanya Tolmachova, Silene T. Wavre-Shapton, Alun R. Barnard, Robert E. MacLaren, Clare E. Futter, and Miguel C. Seabra. Retinal Pigment Epithelium Defects Accelerate Photoreceptor Degeneration in Cell Type-Specific Knockout Mouse Models of Choroideremia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 October; 51(10): 4913-4920.) や、ロドプシン変異 (Pro23His) を有するトランスジェニックマウス (Jane E. Olsson, Jon W. Gordon, Basil S. Pawlyk, Dorothy Roof, Annmarie Hayes, Robert S. Molday, Shizuo Mukai, Glenn S. Cowley, Eliot L. Berson, Thaddeus P. Dryja. Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): A mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron* (1992) 9:815-830) が挙げられる。

30

40

【0091】

プロトコル

移植用の単球を同系マウスの骨髄から単離した。抗CD3抗体、抗CD19抗体および抗CD56抗体を結合させたマイクロビーズでPBMCを標識し、T細胞、B細胞およびNK細胞を除去した。磁気カラムを通過した非標識細胞を採取した。この画分を抗CD16マイクロビーズで標識し、再び上記磁気カラムに載せた。カラムを通過した細胞を採取し、CD14蛍光抗体およびCD16蛍光抗体で染色してFACS分析を行った。PBMCのうち、生細胞全体の19%は単球 (CD14⁺) である。これらの単球のうち約10%はCD16⁺である。最終生成物中、生細胞の約90%は単球であり、そのうちCD16⁺は0.1%未満である。

50

【0092】

次いで、網膜神経節細胞に損傷を与える前または与えた後に上記亜集団を眼内注射することによって、網膜損傷発症後に該亜集団が網膜神経節細胞を保護する能力を調べる。

【0093】

損傷発症後の様々な時点において、自己由来単球の単回注射によりマウスを処置する。各動物モデルにつき、(i)硝子体内注射および(ii)網膜下注射の2種の投与経路について調査する。この研究は、形態学的評価基準または網膜断面の生存細胞成分のカウント数に基づいた網膜神経細胞の生存の評価をエンドポイントとする。

【0094】

単球亜集団の網膜下注射は、例えばWarfinge et al., 2011の記載に従って実施できるが、網膜下に単球を注射できる技術であればどのようなものを用いてもよい。過去の報告(K. Warfvinge, J. F. Kiilgaard, E. B. Lavik et al., "Retinal progenitor cell xenografts to the pig retina: morphologic integration and cytochemical differentiation," Archives of Ophthalmology, vol. 123, no. 10, pp. 1385-1393, 2005)に従って、動物を全身麻酔し、硝子体網膜手術を実施する。すなわち、ミダゾラム、ゾラゼラム、チレタミン、キシラジン、ケタミンおよびメサドンからなる筋肉内注射によりブタを前麻酔する。次いで挿管し、人工呼吸器につなぎ、イソフルラン/酸素で麻酔する。手術中、フェニレフリン、トロピカミドおよびアトロピンを局所投与することによって瞳孔を広げる。手術野を準備し、通常の滅菌手法によりドレーブをかけてから手術を開始する。局所的3ポート経毛様体扁平部硝子体切除術を行い、緑色アルゴンレーザーを用いて網膜の中心領域を格子状に焼き付ける。網膜切開術を準備し、レーザーで焼き付けた領域の下の網膜下腔に上記単球を適切な注射針で注入する。移植組織が正確な位置に注入されたかどうかは、注射の際に直接可視化することによって確認する。感染予防のため、手術終了時にクロラムフェニコールを予防的に投与する。

【0095】

実施例3：単球亜集団による加齢黄斑変性の治療

12時間の周期で明期と暗期とを繰り返す3000ルクスの光にアルビノラットを暴露させ、これを1ヶ月間、3ヶ月間または6ヶ月間継続する。安楽死させる前に、眼底検査、眼底写真撮影、フルオレセインおよびインドシアニングリーンによる血管造影、ならびに光コヒーレンストモグラフィーを行う。光暴露させたラットを1ヶ月後、3ヶ月後または6ヶ月後に安楽死させ、病理組織学的評価を行う。4-ヒドロキシ-2-ノネナール修飾タンパク質およびニトロチロシン修飾タンパク質の存在について、免疫蛍光染色により網膜を調べる(Daniel M. Albert et al., 2010. Development of choroidal neovascularization in rats with advanced intense cyclic light-induced retinal degeneration. Arch Ophthalmol. 2010;128(2):212-222)。また、損傷発症後の様々な時点において、光暴露させたラットを自己由来単球の単回注射により上記と同様に処置する。各動物モデルにつき、(i)硝子体内注射および(ii)網膜下注射の2種の投与経路について調査する。この研究は、形態学的評価基準または網膜断面の生存細胞成分のカウント数に基づいた網膜神経細胞の生存の評価をエンドポイントとする。

【0096】

AMDおよびアルツハイマー病の類似点

AMDおよびアルツハイマー病はいずれも、かなりの割合の高齢者が罹患する慢性神経変性疾患である。これらの疾患は不可逆的な機能喪失を特徴とし、これに対する治療法は存在しない。AMDおよびアルツハイマー病において生じる変性の病態形成にはある程度の共通点がある(Klaver et al., 1999. Is age-related maculopathy associated with Alzheimer's disease? The Rotterdam study. Am J Epidemiol;150:963-8)。AMDおよびアルツハイマー病の病因はほとんど分かっていないが、これらの疾患の病態形成は驚くほど類似している。AMDの初期における組織病理学的所見は細胞外におけるドルーゼンの沈着および基底膜沈着である(Hageman, GS. & Mullins, RF. Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. Mol Vis 5, 28 (1999))。これら

10

20

30

40

50

の病変は、脂質、糖タンパク質およびグリコサミノグリカンを含有し、変性しつつある神経網膜に由来すると考えられる。ドルーゼン沈着物の蓄積は、光受容体の喪失およびそれに続く黄斑機能の低下と関連している (Holz et al., Bilateral macular drusen in age-related macular degeneration. Prognosis and risk factors. Ophthalmology 101, 15 22-8 (1994))。上述したように、アルツハイマー病の初期における病理学的特徴は、細胞外老人斑の存在である (Selkoe, 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron 6, 487-98)。老人斑は様々な成分から構成されており、そのなかには、アミロイド前駆体タンパク質として知られる膜貫通型ポリペプチドファミリーのタンパク質分解切断により生じる小さなペプチドが含まれる。2種のペプチドがアルツハイマー病の病態形成の主因として広く認められており、これらはアミロイド - (A) ペプチドとして知られている。アミロイド沈着物とドルーゼンとでいくつかの成分が共通しており、このような成分として例えばピトロネクチン、アミロイドP、アポリポタンパク質Eなどのタンパク質が挙げられ、さらには、アルツハイマー病のアミロイド斑に関連するAペプチドおよびアミロイドオリゴマーもこのような成分に含まれる (Luibl et al., 2006. Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers. J Clin Invest 116, 378-85; Mullins et al., 2000. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. Faseb J 14, 835-46; Yoshida et al., 2005. The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration. J Clin Invest 115, 2793-800)。

【 0 0 9 7 】

アルツハイマー病において見られるAペプチドはミクログリア細胞を活性化して、反応性酸素種、反応性窒素種、炎症性サイトカイン、補体タンパク質、神経変性変化を引き起こす他の炎症性メディエーターなどの、神経毒性を持つ可能性のある物質を産生させる。アルツハイマー病に関連する炎症反応においては、CNSでの自然免疫を担うCD11b⁺活性化ミクログリアが見られる場合が多い。CD11b⁺ミクログリアは高齢者の正常脳と関連していることが報告されており (Streit, 2004. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. J Neurosci Res 77, 1-8)、このミクログリアは加齢性認知障害と神経発生障害の両方を引き起こしている可能性がある (Monje et al., 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. Science 302, 1760-5)。また、CD11bはアルツハイマー病患者においても確認されている (Akiyama & McGeer, 1990. Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. J Neuroimmunol 30, 81-93)。さらに、炎症性メディエーターはアミロイド沈着物とドルーゼンの両方に存在することから、AMDおよびアルツハイマー病の炎症経路において共通の役割を果たしていることが示唆される (Hageman et al., 2001. Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. Mol Vis 5, 28)。ドルーゼンの生合成において局所炎症が果たしている役割から、アルツハイマー病において生じるプロセスとの類似性が示唆され、アルツハイマー病では、細胞外プラークや沈着物の蓄積によって慢性的な局所炎症反応が誘導され、これによって一次的な病原性刺激作用が増強される (Akiyama et al., 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 21, 383-421)。

【 0 0 9 8 】

上記を考慮すれば、上記で定義された単球亜集団のAMD治療に対する有効性を、凝集Aに暴露させた神経細胞を利用したモデルを用いて評価することもできる。

【 0 0 9 9 】

実施例4：マウス単球の硝子体内注射 - グルタミン酸塩の毒性に暴露させた後の網膜神経節細胞の生存率に対する効果および注射した細胞の特徴分析

プロトコル：

マウスを麻酔し、L-グルタミン酸塩 (GT) (生理食塩水 1 μl 中) 400 nmol を右眼に硝子体内注射した。翌日、マウス由来のCD115⁺骨髄単核細胞 (BMNC) を硝子体内注

10

20

30

40

50

射用細胞として精製した。すなわち、(cx₃cr1骨髄プロモーターの制御下にGFPレポーターを有する)ドナーマウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞を採取し、フィコール密度勾配により単核細胞を濃縮した。目的の集団をポジティブ選択するためのビオチン化抗CD115抗体およびストレプトアビジン結合磁気ビーズ(ミルテニーバイオテック)を使用した磁気細胞分離(MACS)システムにより、CD115⁺BM単球集団を単離した。GTの毒性に暴露させた眼にマウス1匹につき(PBS 1 μl中)10⁵個の単球を(前日にGTを注入した孔から)硝子体内注射した。コントロール群にはPBSを注射した。

【0100】

GT注射後7日目に、マウスを灌流固定し、眼球を採取して2.5%PFA中に一晩おいた。次いでこの溶液を1%PFAに交換し、さらに3~4日間にわたって眼球を浸漬した後、RGCマーカーであるBrn3aで免疫組織染色した。1試料につき、眼の深さ方向の様々な位置から切片を4つ採取し、それぞれの切片について測定を行った。網膜の神経節細胞層において、Brn3a⁺、IB-4⁺およびHoechst⁺の細胞をカウントした。PBSを注射した眼を陰性コントロールとして使用し、同一マウスの損傷を与えなかった反対側の眼をRGC生存率の陽性コントロールとして使用した。

10

【0101】

GFPで染色することにより、注射したマウス細胞を眼内で追跡し、さらに、いくつかの免疫マーカー(サイトカイン、増殖因子、食作用マーカー)を染色してこの細胞の表現型の特徴を分析した。

【0102】

結果:

硝子体内に注射したマウス単球はRGCに対して保護効果を示した(図1A~C)。単球は、注射した眼の硝子体内と神経節細胞層(損傷を与えたRGCが存在する部位)の近傍に検出された。また、いくつかの単球は網膜下腔でも検出できた(図2)。

20

【0103】

GFPと様々な免疫マーカーとを二重免疫染色したところ、CX₃CR1-GFP⁺マウス単球において、IL-10、TGF-β、IGF-1、BDNF、CD36およびArg-1(アルギナーゼ-1)の発現が見られ、さらにTNF-αおよびIL-1βが発現していることも分かった(図2)。この分析は定性分析であることから、注射した細胞におけるこれらの様々なマーカーの発現頻度は測定できていないことには注意されたい。

30

【0104】

実施例5: CNS由来自己免疫ワクチン接種による、視神経挫滅後の網膜へのマクロファージおよびT細胞の浸潤の増強

損傷神経系部位への単球の動員を増強する方法が重要ではないこと、および網膜の損傷だけでなく視神経の損傷も治療できる可能性があることを示すため、CNS特異的抗原を用いた免疫化により内在性細胞の視神経損傷部位への遊走を促した。

【0105】

プロトコル:

[Cx3cr1^{GFP/+} WT]BMキメラを以下のようにして作製した。WTレシピエントマウスの全身に致死量の放射線(950rad)を照射した。この際、頭部を遮蔽して、網膜への直接的な損傷と、視神経挫滅(ONC)により誘導される骨髄系細胞以外の骨髄系細胞による浸潤を防いだ。翌日、Cx3cr1^{GFP/+}トランスジェニックマウスに由来する骨髄細胞5×10⁶個を尾静脈に注射することによって、マウスを新たに作製した。得られたマウスにおいては、血液から浸潤した単球のみがGFP標識を有する。

40

【0106】

次いで、2.5mg/mlのフロイントの完全アジュバント(Difco)にMOG改変ペプチド(45D;配列:MEVGWYRSPFDRVHLYRNGK)100μgを乳化させたエマルジョン100μlを1群のマウスに皮下注射した。

【0107】

ワクチン接種から1週間後、マウス(ワクチン接種群およびワクチン非接種群)を麻酔

50

し、手術用双眼顕微鏡下でクロスアクション鉗子を使用して右視神経に重篤な挫滅創を形成した。反対側の神経には挫滅創を形成しなかった。

【0108】

ONCから7日目にマウスを灌流固定し、網膜を採取し、単一細胞懸濁液を作製してフローサイトメトリー分析を行った。

【0109】

結果：

ONCにより網膜中の総白血球数(CD45⁺)が増加し、この白血球の増加は、45Dをワクチン接種した損傷マウスにおいて増強された(図3A)。

【0110】

ワクチン非接種の損傷マウスの網膜と比較して、ONCを行う前に45Dをワクチン接種したマウスの網膜では、マクロファージおよびT細胞も増加した(図3Bおよび図3C)。

【0111】

実施例6：CNS由来自己免疫ワクチン接種によってもたらされる、視神経挫滅後の網膜神経節細胞に対する神経保護効果の評価

プロトコル：

損傷網膜における末梢単球数の増加に対するワクチン接種の効果と、視神経挫滅損傷後のRGCの生存率との相関関係を以下の実験により証明することができる。2.5mg/mlのフロイントの完全アジュバント(Difco)にMOG改変ペプチド45D(45番目のセリンがアスパラギン酸に改変されたミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)₃₅₋₅₅)100μgを乳化させたエマルジョン100μlを1群のマウスに皮下注射する。

【0112】

ワクチン接種から1週間後、マウス(ワクチン接種群およびワクチン非接種群)を麻酔し、手術用双眼顕微鏡下でクロスアクション鉗子を使用して右視神経に重篤な挫滅創を形成する。反対側の神経には挫滅創を形成しない。

【0113】

ONCから7日後にマウスを灌流固定し、眼球を採取して固定液(2.5%PFA 1%PFA)に入れ、RGCマーカーであるBrn3aを用いた免疫組織染色を行う。1試料につき、眼の深さ方向の様々な位置から切片を4つ採取し、それぞれの切片について測定を行う。網膜の神経節細胞層において、Brn3a⁺、IB-4⁻およびHoechst⁺の細胞をカウントする。ワクチン非接種マウスの損傷を与えなかった方の眼をRGC生存率の陽性コントロール(100%)として使用する。

【0114】

参考文献

【0115】

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas S K, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F (2010). Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 33(3):375-86

【0116】

Doble (1999). "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy", *PharmacolTher*, 81:163-221.

【0117】

Knoller N, Auerbach G, Fulga V, Zelig G, Attias J, Bakimer R, Marder J.B., Yolles E, Belkin M, Schwartz M, and Hadani M (2005) Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: Phase I study results *J Neurosurg Spine* 3:173-181.

【0118】

10

20

30

40

50

London, A, Elena Itskovich, Inbal Benhar, Vyacheslav Kalchenko, Matthias Mack, Steffen Jung, and Michal Schwartz (2011). Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*;208(1):23-39.

【 0 1 1 9 】

Pitt et al. (2000). "Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis", *Nat Med*, 6:67-70.

【 0 1 2 0 】

Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M (2009). Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med* 6(7): e1000113.

10

【 0 1 2 1 】

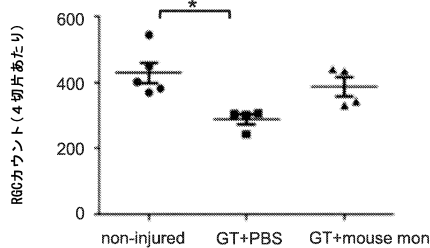
Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2011 Sep;30(5):343-58. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.05.002. Epub 2011 May 25. Review

【 0 1 2 2 】

Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, Ishikawa K, Murakami Y, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T. Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 2013 Jan;120(1):100-5.

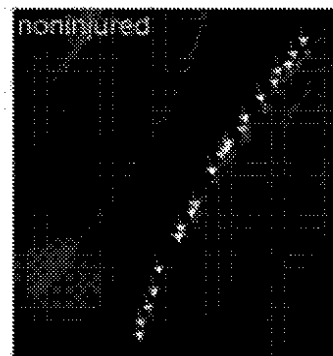
20

【 図 1 A 】

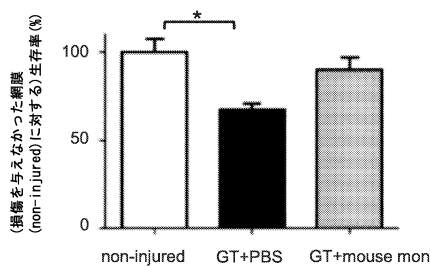


【 図 1 C 】

Fig. 1C

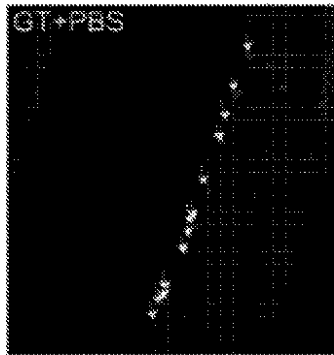


【 図 1 B 】



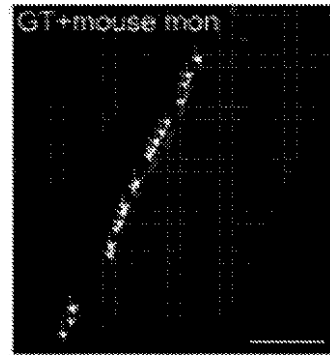
【 図 1 D 】

Fig. 1D

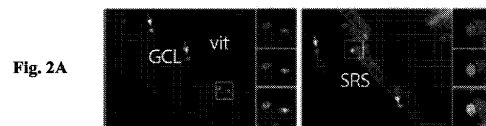


【 図 1 E 】

Fig. 1E



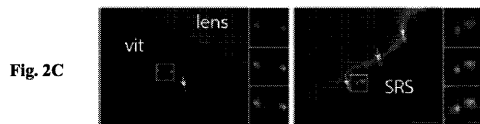
【 図 2 A 】



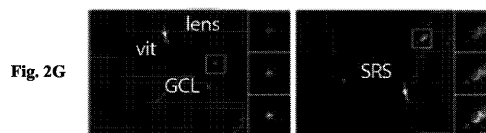
【 図 2 B 】



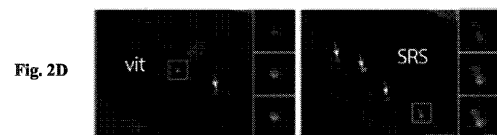
【 図 2 C 】



【 図 2 G 】



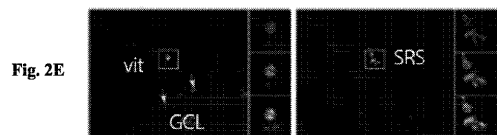
【 図 2 D 】



【 図 2 H 】

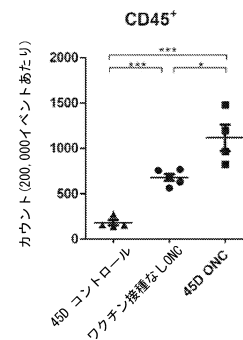


【 図 2 E 】

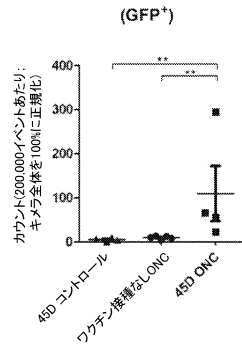


【 図 3 A 】

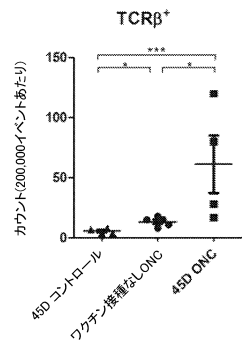
【 図 2 F 】



【 図 3 B 】



【 図 3 C 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

(72)発明者 アイゼンバッハ シュワルツ、ミハエル
イスラエル国 7610002 レホボト、ザ ウイズマン インスティテュート オブ サイエ
ンス、シムタ ハイ #4、ウィルナー レジデンシーズ

(72)発明者 ヨレス、エスター
イスラエル国 ディー . エヌ . ナハル ソーレック 7688000、94 モシャブ ベイト
ガムリエル

(72)発明者 ベンハー バー オン、インバル
イスラエル国 7610002 レホボト、ピー . オー . ボックス 95、アット ザ ウイズマ
ン インスティテュート オブ サイエンス、イエダ リサーチ アンド ディベロップメント
カンパニー リミテッド内

審査官 茅根 文子

(56)参考文献 特表2012-518407(JP,A)
国際公開第2013/088441(WO,A1)
J. Exp. Med., 2011年, Vol. 208, No. 1, pp. 23-39
Cell Biol. Int., 2011年, Vol. 35, pp. 631-638
Immunol. Cell Biol., 2006年, Vol. 84, pp. 209-217
J. Neurosci., 2011年, Vol. 31, No. 27, pp. 9910-9922

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8 ; 3 6 / 0 6 - 3 6 / 0 6 8

A 6 1 P 2 7 / 0 2

A 6 1 P 2 7 / 0 6

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 6

C 1 2 Q 1 / 0 2

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)