

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7675014号
(P7675014)

(45)発行日 令和7年5月12日(2025.5.12)

(24)登録日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 K	31/4152(2006.01)	A 6 1 K	31/4152
A 6 1 K	31/428(2006.01)	A 6 1 K	31/428
請求項の数 10 (全62頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-543207(P2021-543207)	(73)特許権者	592017633
(86)(22)出願日	令和2年1月23日(2020.1.23)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ ション
(65)公表番号	特表2022-523680(P2022-523680 A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ ストン フルーツ ストリート 5 5
(43)公表日	令和4年4月26日(2022.4.26)	(73)特許権者	522413526
(86)国際出願番号	PCT/US2020/014836		ホーリー クロス ホスピタル インコー ポレイテッド
(87)国際公開番号	WO2020/154534		アメリカ合衆国 3 3 3 0 8 フロリダ州 フォート ローダーデール ノース フェ デラル ハイウェイ 4 7 2 5
(87)国際公開日	令和2年7月30日(2020.7.30)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和5年1月23日(2023.1.23)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/965,032	(74)代理人	100160923
(32)優先日	令和2年1月23日(2020.1.23)		弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/837,765		
(32)優先日	平成31年4月24日(2019.4.24)		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 B細胞免疫療法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された成熟ナイーブB細胞を含む、その必要がある対象において神経変性疾患を処
置するための薬学的組成物であって、治療的有効量の単離された成熟ナイーブB細胞が対
象に投与される、前記薬学的組成物。

【請求項2】

神経変性疾患が筋萎縮性側索硬化症（ALS）から選択される、請求項1に記載の薬学的組
成物。

【請求項3】

第2の治療用組成物と組み合わせて使用される、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項4】

第2の治療用組成物がエダラボンまたはリルゾールまたは免疫調節性組成物である、請
求項3に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記成熟ナイーブB細胞が、同種B細胞、自家B細胞、または異種B細胞である、請求項1に
記載の薬学的組成物。

【請求項6】

前記成熟ナイーブB細胞が、局所投与されるように製剤化される、または
前記成熟ナイーブB細胞が、全身投与されるように製剤化される、
請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

前記成熟ナイーブB細胞が、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、髄腔内投与、または実質内投与されるように製剤化される、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

前記成熟ナイーブB細胞が、1日に1回、1週に1回、1週に2回、14日ごとに1回、1か月に1回、2か月ごとに1回、3か月ごとに1回、4か月ごとに1回、5か月ごとに1回、6か月ごとに1回、または1年に1回、投与される、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

治療的有効量の前記成熟ナイーブB細胞が、投与1回につき少なくとも 0.5×10^7 個のB細胞、投与1回につき少なくとも 1×10^8 個のB細胞、投与1回につき少なくとも 2×10^8 個のB細胞、または投与1回につき少なくとも 1×10^9 個のB細胞を含む、請求項1に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 10】

対象がヒトである、請求項1～9のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年1月23日に提出された米国特許仮出願第62/798,629号、2019年4月24日に提出された米国特許仮出願第62/837,765号、および2020年1月23日に提出された米国特許仮出願第62/965,032号の恩典を主張するものであり、該仮出願の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

【背景技術】

【0002】

本発明の背景

変性疾患は、細胞、組織、または器官を衰えさせる医学的状態である。中枢神経系の領域の変性を伴う多くの神経変性疾患には、たとえば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病（PD）、アルツハイマー病（AD）、およびハンチントン病（HD）が含まれる。外傷性脳損傷（TBI）もまた、変性脳疾患を、たとえばPDまたはADなどを発症するリスクを増大させ得る障害の例である。関節リウマチおよび変形性関節症は、炎症を伴う変性疾患のまた別の例である。これらの大半については有効な治療法がない。これらの疾患または障害のいくつかのための治療法は、研究途上である。しかしながら、提示されている治療法は多くの場合高価であり、かつ有意なリスクおよび合併症を伴う。したがって、たとえばALSおよびTBIなどの神経変性疾患を含む変性疾患を処置するための、より優れたアプローチに対する必要性が存在する。

30

【発明の概要】

【0003】

本発明の概要

本明細書において、B細胞（たとえば、単離されたB細胞、精製されたB細胞、もしくは改変されたB細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む組成物が提供され、かつ疾患（たとえば、本明細書に記載されるような、神経変性疾患、外傷性脳損傷（TBI）、脊髄損傷（SCI）、ならびに炎症性疾患および免疫性疾患）の処置のためのそれらの使用が提供される。

40

【0004】

最初の局面において、本発明は、その必要がある対象において神経変性疾患を処置する方法を特色とし、該方法は、治療的有効量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む。

【0005】

いくつかの態様において、神経変性疾患は、以下から選択される：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、慢性外傷性脳症（CTE）、前頭側頭型認

50

知症、ハンチントン病、乳児神経軸索ジストロフィー、進行性核上性麻痺、レビー小体型認知症、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、および運動ニューロン疾患。好ましい態様において、神経変性疾患はALS（たとえば、孤発性ALSまたは家族性ALS）である。さらに別の好ましい態様において、神経変性疾患はパーキンソン病である。

【0006】

別の局面において、本発明は、ALSを有する対象を処置する方法を特色とし、該方法は、治療的有効量のB細胞を対象に投与する段階を含み、ここで該治療的有効量は、ALSの1つまたは複数の症状を低減または改善するのに十分な量である。

【0007】

別の局面において、本発明は、ALSの1つまたは複数の症状を示す、ALSを有する対象を処置する方法を特色とし、該方法は以下の段階を含む：

治療的有効量のB細胞を対象に投与する段階であって、該治療的有効量が、ALSの1つまたは複数の症状の低減または改善をもたらす量である、段階；

対象における1つまたは複数の症状をモニタリングする段階；および

1つまたは複数の症状が悪化し始めた時に、B細胞の第2の用量を投与する段階。

【0008】

いくつかの態様において、ALSの1つまたは複数の症状は、以下を含む：足の前部を持ち上げることが困難；つま先を持ち上げることが困難；片方または両方の脚における脱力；片方または両方の足における脱力；片方または両方の足首における脱力；手の脱力；手先の拙劣さ；筋けいれん；片方もしくは両方の腕、片方もしくは両方の脚、片方もしくは両方の肩、または舌における線維束性収縮（筋肉の単収縮）；筋けいれん；痙縮（固くこわばった筋肉）；ならびに咀嚼することまたは嚥下することが困難（嚥下障害）、発話することまたは単語を構成することが困難（構音障害）、および呼吸することが困難（呼吸困難）。

【0009】

いくつかの態様において、方法は、投与後1～7日間か、投与後7～28日間か、投与後1～28週間か、投与後1～2か月か、投与後2～6か月か、投与後2～9か月か、または投与後6か月～1年かもしくはそれより長く、ALSの1つまたは複数の症状をモニタリングする段階を含む。

【0010】

いくつかの態様において、疾患進行の分子マーカーのレベルを決定することによって（たとえば、治療的有効量のB細胞での処置の前後の、神経変性疾患進行の分子マーカーのレベルを決定することによって）、神経変性疾患を有する患者の、治療的有効量の単離されたB細胞での処置への応答性をモニタリングするための方法を、本発明は特色とする。分子マーカーのレベルは、当業者に公知の手法にしたがって決定され得る。

【0011】

いくつかの態様において、処置を受ける対象由来の試料から、たとえば、処置を受ける対象の血漿または脳脊髄液（CSF）である試料から、分子マーカーのレベルは決定され得る。本明細書に記載される神経変性疾患の進行の、例示的な分子マーカーは、当技術分野において公知である。例示的なマーカーは、以下を含む：T-タウ（総タウ）、P-タウ（高リン酸化タウ）、A β 42（アミロイド β 42）、A β 42/A β 40の比率、YKL-40（キチナーゼ3様タンパク質1）、VLP-1（ビシニン様タンパク質1）、NFL（ニューロフィラメント軽鎖）、pNFH（リン酸化ニューロフィラメント重鎖サブユニット）、Ng（ニューログラニン）、およびUCH-L1（ユビキチンC末端ヒドロラーゼ）、TDP-43（TAR DNA結合タンパク質43）、 α -シヌクレインの減少、および／または3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸のレベルの低下（たとえば、その全体が参照により組み入れられる、Robey and Panegyres, Cerebrospinal fluid biomarkers in neurodegenerative disorders. Future Neurol. 14(1). (2019)を参照されたい）。

【0012】

別の局面において、本発明は、その必要がある対象において炎症性疾患または免疫性疾

10

20

30

40

50

患を処置する方法を特色とし、該方法は、治療的有効量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む。

【0013】

いくつかの態様において、炎症性疾患または免疫性疾患は、以下から選択される：嚢胞性線維症、心血管疾患（たとえば、冠動脈疾患または大動脈弁狭窄症）、円錐角膜、球状角膜、変形性関節症、骨粗鬆症、肺動脈性肺高血圧症、網膜色素変性症、および関節リウマチ。

【0014】

別の局面において、本発明は、中枢神経系（CNS）損傷を有する対象を処置する方法を特色とし、該方法は、治療的有効量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む。いくつかの態様において、CNS損傷は、外傷性脳損傷（TBI）または脊髄損傷（SCI）である。いくつかの態様において、CNS損傷は、TBIおよびSCIの両方を含む。

【0015】

別の局面において、本発明は、外傷性脳損傷（TBI）を有する対象を処置する方法を特色とし、該方法は、治療的有効量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む。

【0016】

別の局面において、本発明は、脊髄損傷（SCI）を有する対象を処置する方法を特色とし、該方法は、治療的有効量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む。

【0017】

いくつかの態様において、TBIは、外部からの機械的な力に起因する、脳へのダメージである。いくつかの態様において、SCIは、外部からの機械的な力に起因する、脊髄へのダメージに関連する。いくつかの態様において、TBIおよび／またはSCIは、頭部外傷または脳挫傷に起因する（たとえば、転倒に、射創に、スポーツ事故に、建設事故に、交通事故に、または対象の頭蓋骨もしくは脳を貫通する損傷に起因する）。いくつかの態様において、TBIおよび／またはSCIを有する対象は、いくつかの身体障害、認知障害、社会障害（social disorder）、情動障害、および／もしくは行動障害のうちの1つまたは複数をする。TBIおよびSCIは同時に生じ得、かつ同じ損傷に起因し得る。

【0018】

別の局面において、本発明は、TBIの1つまたは複数の症状を示す、TBIを有する対象を処置する方法を特色とし、該方法は以下の段階を含む：

治療的有効量のB細胞を対象に投与する段階であって、該治療的有効量が、TBIの1つまたは複数の症状の低減または改善をもたらす量である、段階；

対象における1つまたは複数の症状をモニタリングする段階；および

1つまたは複数の症状が悪化し始めた時に、B細胞の第2の用量を投与する段階。

【0019】

別の局面において、本発明は、SCIを有する対象（SCIの1つまたは複数の症状を示す）を処置する方法を特色とし、該方法は以下の段階を含む：

治療的有効量のB細胞を対象に投与する段階であって、該治療的有効量が、SCIの1つまたは複数の症状の低減または改善をもたらす量である、段階；

対象における1つまたは複数の症状をモニタリングする段階；および

1つまたは複数の症状が悪化し始めた時に、B細胞の第2の用量を投与する段階。

【0020】

いくつかの態様において、TBIおよび／またはSCIの1つまたは複数の症状は、以下を含む：外傷イベントを想起することが不可能、錯乱、新しい情報を学習および記憶することが困難、情動機能障害および遂行機能障害、筋の通った話ができない状態、不安定感、協調の欠如、ならびに視覚または聴覚の問題；認知上の問題（たとえば、健忘症、言語を発話もしくは理解することが不可能、精神錯乱、集中することが困難、思考および理解することが困難、新しいことを記憶することが不可能、またはありふれたものを認識することが不可能）；行動上の問題（たとえば、異常に笑うことおよび泣くこと、攻撃性、衝動性、過敏性、抑制の欠如（衝動的）、または言葉もしくは動作の持続性反復）；気分上の問

10

20

30

40

50

題（たとえば、怒り、不安、アパシー、または孤独感）；全身的な問題（たとえば、意識喪失、浮動性めまい、失神、または倦怠感）；目の問題（たとえば、散瞳、眼窩周囲の皮下出血（raccoon eyes）、または瞳孔不同）；筋肉の問題（たとえば、不安定性またはこわばった筋肉）；胃腸の問題（たとえば、悪心または嘔吐）；発話の問題（たとえば、発話することが困難、または不明瞭発語）；視覚の問題（たとえば、霧視または光過敏）；打撲傷、うつ、嗅覚の喪失、神経損傷、外傷後発作、耳鳴り、聴覚過敏、回転性めまい。

【0021】

いくつかの態様において、方法は、投与後1～7日間か、投与後7～28日間か、投与後1～28週間か、投与後1～2か月か、投与後2～6か月か、投与後2～9か月か、または投与後6か月～1年かもしくはそれより長く、TBIおよび／またはSCIの1つまたは複数の症状をモニタリングする段階を含む。

10

【0022】

いくつかの態様において、疾患進行の分子マーカーのレベルを決定することによって（たとえば、治療的有效量のB細胞での処置の前後の、神経変性疾患進行の分子マーカーのレベルを決定することによって）、TBIおよび／またはSCIを有する患者の、治療的有效量の単離されたB細胞での処置への応答性をモニタリングするための方法を、本発明は特色とする。分子マーカーのレベルは、当業者に公知の手法にしたがって決定され得る。

【0023】

いくつかの態様において、処置を受ける対象についての試料から、たとえば、処置を受ける対象の血漿または脳脊髄液（CSF）である試料から、TBIおよび／またはSCIの分子マーカーのレベルは決定され得る。本明細書に記載されるTBIの進行についての例示的な分子マーカーは、以下を含むが、これらに限定されない：神経細胞体損傷についてのタンパク質バイオマーカー（UCH-L1、NSE）、アストログリア損傷についてのタンパク質バイオマーカー（GFAP、S100B）、神経細胞死についてのタンパク質バイオマーカー（ α II-スเปクトリン分解産物）、軸索損傷についてのタンパク質バイオマーカー（NFタンパク質）、白質損傷についてのタンパク質バイオマーカー（MBP）、損傷後神経変性についてのタンパク質バイオマーカー（総タウおよびリン酸化タウ）、損傷後自己免疫応答についてのタンパク質バイオマーカー（脳抗原を標的とする自己抗体）（たとえば、その全体が参照により組み入れられる、Wang et al. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. Expert Rev Mol Diagn. 18(2): 165-180 (2018)を参照されたい）。

20

30

【0024】

いくつかの態様において、同種B細胞が投与される。いくつかの態様において、同種B細胞は、ハプロ一致同種B細胞か、HLA一致同種B細胞か、または遺伝的に改変されたB細胞（たとえば、B細胞の免疫原性を低下させるように、CRISPRなどによって遺伝的に改変されたB細胞など）である。

【0025】

いくつかの態様において、自家B細胞が投与される。

【0026】

いくつかの態様において、異種B細胞が投与される。

40

【0027】

いくつかの態様において、方法は、第2の治療用組成物を投与する段階を含む。

【0028】

疾患または障害がALSであるいくつかの態様において、第2の治療用組成物は、エダラボン、リルゾール、または免疫調節性組成物（たとえば、抗CD14抗体、抗CDL40抗体、もしくはTreg細胞を含む組成物）である。

【0029】

疾患または障害がTBIおよび／またはSCIであるいくつかの態様において、第2の治療用組成物は、抗生物質、またはコルチコステロイド（たとえばプレドニゾン）である。

【0030】

50

いくつかの態様において、B細胞は成熟ナイーブB細胞である。

【0031】

いくつかの態様において、B細胞はエクスピボで刺激される。

【0032】

いくつかの態様において、B細胞は、Toll様受容体（TLR）アゴニストを用いて、エクスピボで刺激される。

【0033】

いくつかの態様において、TLRアゴニストは、以下から選択される内因性リガンドである：熱ショックタンパク質、ネクロシス細胞またはその断片、酸素ラジカル、尿酸結晶、mRNA、 β -ディフェンシン、フィブリン、フィブリノゲン、Gp96、Hsp22、Hsp60、Hsp70、HMGB1、肺サーファクタントタンパク質A、低密度リポタンパク質（LDL）、隣エラスターゼ、ヘパラン硫酸の多糖断片、可溶性ヒアルロナン、 α A-クリスタリン、およびCpGクロマチン-IgG複合体。

【0034】

いくつかの態様において、TLRアゴニストは、以下から選択される外因性リガンドである：Pam3CSK4、トリアシル化リポペプチド、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型タンパク質、リポアラビノマンナン、外表面リポタンパク質、リポ多糖、サイトメガロウイルスのエンベロープタンパク質、グリコイノシトールリン脂質、糖脂質、GPIアンカー、単純ヘルペスウイルス1またはその断片、リポテイコ酸、マンヌロン酸ポリマー、細菌外膜のポリン、サイモサン、二本鎖RNA、一本鎖RNA、ポリ(I).ポリ(C)、タキソール、フラジェリン、モジュリン、イミダゾキノリン（たとえば、イミキモド、レシキモド、ロキソリピン、プロピリミン）、抗ウイルス性化合物、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド、およびプロフィリン。

【0035】

いくつかの態様において、B細胞は、免疫調節性サイトカイン（たとえば炎症誘発性（pro-inflammatory）サイトカイン、たとえば、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF α 、またはIFN γ から選択される炎症誘発性サイトカインなど）を用いて、エクスピボで刺激される。

【0036】

いくつかの態様において、B細胞はB_{reg}細胞である。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、以下から選択される、1つまたは複数のさらなる免疫調節性サイトカインをさらに発現する：IL-2、IL-4、IL-6、IL-35、TNF- α 、TGF β 、PD-L1 FasL、およびTIM1。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、以下から選択される、1つまたは複数の細胞表面マーカーを発現する：B220、CD1d、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD44、CD48、CD71、CD73、CD138、CD148、CD274、IgM、IgG、IgA、およびIgD。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、B220、CD19、CD20、CD24、CD138、IgM、およびIgDを発現する。いくつかの態様において、B_{reg}細胞はCD25およびCD71を発現する。いくつかの態様において、B_{reg}細胞はCD73を発現しない。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、少なくとも80%（たとえば、少なくとも85%、90%、95%、または98%）のCD19+ B細胞を含む。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、10%未満（たとえば5%未満）のCD138+形質B細胞を含む。

【0037】

いくつかの態様において、B細胞は、神経保護性、抗炎症性、および／または免疫調節性である。

【0038】

いくつかの態様において、B細胞は、局所投与または全身投与されるように製剤化される。いくつかの態様において、B細胞は、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、髄腔内投与、または実質内投与されるように製剤化される。いくつかの態様において、B細胞は、静脈内注入または静脈内ボラスによって投与されるように製剤化される。いくつかの態

10

20

30

40

50

様において、B細胞は、頭蓋内圧（ICP）モニタリングカテーテルを通じて投与されるように製剤化される。

【0039】

いくつかの態様において、B細胞は、1日に1回、1週に1回、1週に2回、14日ごとに1回、1か月に1回、2か月ごとに1回、3か月ごとに1回、4か月ごとに1回、5か月ごとに1回、6か月ごとに1回、または1年に1回、投与される。

【0040】

いくつかの態様において、B細胞は、少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回、投与される。

【0041】

いくつかの態様において、治療的有効量のB細胞は、投与1回につき少なくとも 0.5×10^6 個のB細胞か、投与1回につき 0.5×10^7 個のB細胞か、投与1回につき 1×10^8 個のB細胞か、投与1回につき少なくとも 2×10^8 個のB細胞か、または投与1回につき少なくとも 1×10^9 個のB細胞を含む。いくつかの態様において、治療的有効量のB細胞は、投与1回につき 1×10^8 個のB細胞～ 1×10^9 個のB細胞か、投与1回につき 1×10^8 個のB細胞～ 5×10^8 個のBか、または投与1回につき 2×10^8 個のB細胞～ 4×10^8 個のB細胞を含む。

【0042】

別の局面において、本発明は、改変されたB細胞、および1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物を特徴とし、ここで該改変されたB細胞は、Toll様受容体（TLR）アゴニスト、および／または免疫調節性サイトカインを用いて、エキスピボで刺激されている。

【0043】

いくつかの態様において、改変されたB細胞は初代細胞である。

【0044】

いくつかの態様において、薬学的に許容される賦形剤は、水溶液（たとえば生理食塩水）である。

【0045】

別の局面において、本発明は、その必要がある対象において疾患または異常を処置する方法を特徴とし、本方法は、改変されたB細胞および1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物を対象に投与する段階を含み、ここで該改変されたB細胞は、Toll様受容体（TLR）アゴニスト、および／または免疫調節性サイトカインを用いて、エキスピボで刺激されている。

【0046】

いくつかの態様において、疾患または異常は、異常な創傷治癒（たとえば、糖尿病性創傷治癒）、神経変性疾患、TBI、またはSCIから選択される。または、免疫性疾患または炎症性疾患である。

【0047】

いくつかの態様において、神経変性疾患は、以下から選択される：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、慢性外傷性脳症（CTE）、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、乳児神経軸索ジストロフィー、進行性核上性麻痺、レビー小体型認知症、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、および運動ニューロン疾患。

【0048】

いくつかの態様において、免疫性疾患または炎症性疾患は、以下から選択される：嚢胞性線維症、心血管疾患（たとえば、冠動脈疾患または大動脈弁狭窄症）、円錐角膜、球状角膜、変形性関節症、骨粗鬆症、肺動脈性肺高血圧症、網膜色素変性症、および関節リウマチ。

【0049】

いくつかの態様において、改変されたB細胞は、同種B細胞である。いくつかの態様において、同種B細胞は、ハプロ一致同種B細胞か、HLA一致同種B細胞か、または遺伝的に改変されたB細胞（たとえば、B細胞の免疫原性を低下させるように、CRISPRなどによって

10

20

30

40

50

遺伝的に改変されたB細胞など)である。

【0050】

いくつかの態様において、改変されたB細胞は、自家B細胞である。

【0051】

いくつかの態様において、改変されたB細胞は、異種B細胞である。

【0052】

別の局面において、本発明は、改変されたB細胞を作製する方法を特徴とし、本方法は、

i) 成熟ナীবB細胞を対象から単離する段階、ならびに

ii) Toll様受容体 (TLR) アゴニスト、および／または免疫調節性サイトカインを用いて、エキスピボでB細胞を刺激する段階
を含み、それにより、改変されたB細胞を作製する。

10

【0053】

いくつかの態様において、段階i)は、CD19+成熟ナীবB細胞の単離をさらに含む。いくつかの態様において、CD19+成熟ナীবB細胞の単離は、CD19抗体またはその抗原結合断片を用いる免疫沈降によって実施される。いくつかの態様において、CD19抗体またはその抗原結合断片は、改変されたB細胞に結合したままである。

【0054】

いくつかの態様において、TLRアゴニストは、以下から選択される内因性リガンドである：熱ショックタンパク質、ネクロシス細胞またはその断片、酸素ラジカル、尿酸結晶、mRNA、 β -ディフェンシン、フィブリン、フィブリノゲン、Gp96、Hsp22、Hsp60、Hsp70、HMGB1、肺サーファクタントタンパク質A、低密度リポタンパク質 (LDL)、膵エラスターゼ、ヘパラン硫酸の多糖断片、可溶性ヒアルロン、 α A-クリスタリン、およびCpGクロマチン-IgG複合体。

20

【0055】

いくつかの態様において、TLRアゴニストは、以下から選択される外因性リガンドである：Pam3CSK4、トリアシル化リポペプチド、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質、リポアラビノマンナン、外表面リポタンパク質、リポ多糖、サイトメガロウイルスのエンベロープタンパク質、グリコイノシトールリン脂質、糖脂質、GPIアンカー、単純ヘルペスウイルス1またはその断片、リポテイコ酸、マンヌロン酸ポリマー、細菌外膜のポリン、サイモサン、二本鎖RNA、一本鎖RNA、ポリ(I).ポリ(C)、タキソール、フラジェリン、モジュリン、イミダゾキノリン (たとえば、イミキモド、レシキモド、ロキソリピン、プロピリミン)、抗ウイルス性化合物、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド、およびプロフィリン。

30

【0056】

いくつかの態様において、免疫調節性サイトカインは、炎症誘発性サイトカイン (たとえば、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF α 、またはIFN γ から選択される炎症誘発性サイトカイン) である。

【0057】

いくつかの態様において、改変されたB細胞は、B_{reg}細胞である。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、以下から選択される、1つまたは複数のさらなる免疫調節性サイトカインをさらに発現する：IL-2、IL-4、IL-6、IL-35、TNF- α 、TGF β 、PD-L1 FasL、およびTIM1。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、以下から選択される、1つまたは複数の細胞表面マーカーを発現する：B220、CD1d、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD44、CD48、CD71、CD73、CD138、CD148、CD274、IgM、IgG、IgA、およびIgD。いくつかの態様において、B_{reg}細胞は、B220、CD19、CD20、CD24、CD138、IgM、およびIgDを発現する。いくつかの態様において、B_{reg}細胞はCD25およびCD71を発現する。いくつかの態様において、B_{reg}細胞はCD73を発現しない。

40

【0058】

50

いくつかの態様において、改変されたB細胞は、神経保護性、抗炎症性、および／または免疫調節性である。

【0059】

また別の態様において、本発明は多様な疾患の状況において、抗炎症性の、および再生促進性（pro-regenerative）の、細胞ベースの治療薬として直接的に使用され得るB細胞を特徴とし、ここで該疾患は以下を含む：皮膚の創傷および潰瘍、筋肉のおよび心臓の損傷、脳および脊髄の損傷、ならびにさまざまな内臓の損傷。遺伝的に改変された、自家細胞、同種細胞、もしくは異種細胞か、または損傷の微小環境からの因子によってプライムされた細胞は、増大した再生促進能力を有しているので有用である。これらの独特な条件下でB細胞から生じる因子、これは抗体、サイトカイン、および成長因子、ならびにマイクロRNAおよび他の小分子を含むが、該因子もまた精製され得、そして治癒を促進するために、損傷組織へと直接的に適用され得る。

【0060】

したがって、神経変性疾患、TBIもしくはSCI（たとえば脳挫傷に起因するもの）、炎症性障害、またはさまざまな免疫性疾患を有する患者のための治療戦略として、B細胞は使用され得る。他のいかなる既存の細胞ベースの治療法とも異なり、B細胞は、末梢血から、または他の血液バンク産物から容易に入手可能であり、これは、即効性のオフザシェルフ治療薬を開発するための、重要な利点である。実際、即効性であって、操作を最小限に抑えたB細胞療法（同種もしくは自家、または異種）は、臨床現場への高い応用能力を有する。これは、たとえばALSおよびPDなどの神経変性疾患の処置のみならず、重い脳損傷の事例においても特に真実であり、そのような脳損傷においては、血腫または刺さった骨断片を除去するためにしばしば手術が実施され、かつ実質内または脳室内のいずれかに、頭蓋内圧をモニターするためのカテーテルが設置されるので、損傷を受けた脳内へとB細胞を投与するのに都合の良い経路が提供される。

【0061】

治療に使用される他の細胞タイプ、たとえば幹細胞などとは異なり、Bリンパ球は、成熟し、最終分化した細胞であり、インビボで5～6週間という、限定された天然の寿命を有する。神経変性の状況において、および脳挫傷により妨害を受けた微小環境において、該細胞を適用すると、その後、移植された細胞はより短時間で消失すると予想される。この点は有益である、なぜならば、特に、中枢神経系の微小環境がいくつかのB細胞栄養因子（B cell-trophic factor）を含むことを考慮すれば、移植された細胞がより長く生存すると、安全性に対する著しい懸念を生じさせ得るからである。

【0062】

本発明者らの結果は、現存する神経学的アウトカムを改善する治療上の選択肢がない、本明細書において開示されるいくつかの障害（ALS、PD、TBI、およびSCIを含む）に対して、末梢から単離された成熟B細胞が、安全であり、即効性であり、かつ有効な細胞ベースの治療戦略であることの、最初の原理証明としての観察を示す。

【0063】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好ましい態様を示すものである一方で、単なる例証として提供されていることが理解されるべきである、なぜならば、本発明の範囲内および精神内のさまざまな変更および改変は、この詳細な説明から当業者に明らかとなるからである。

【0064】

[本発明1001]

その必要がある対象において神経変性疾患を処置する方法であって、治療的有効量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む、前記方法。

[本発明1002]

神経変性疾患が筋萎縮性側索硬化症（ALS）から選択される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

10

20

30

40

50

同種B細胞が投与される、本発明1001の方法。

[本発明1004]

自家B細胞が投与される、本発明1001の方法。

[本発明1005]

異種B細胞が投与される、本発明1001の方法。

[本発明1006]

第2の治療用組成物を投与する段階をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1007]

第2の治療用組成物がエダラボンまたはリルゾールである、本発明1005の方法。

[本発明1008]

第2の治療用組成物が免疫調節性組成物である、本発明1006の方法。

[本発明1009]

B細胞が成熟ナイーブB細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1010]

B細胞がエクスピボで刺激される、本発明1001の方法。

[本発明1011]

B細胞が、Toll様受容体（TLR）アゴニストを用いて刺激される、本発明1001の方法。

[本発明1012]

B細胞がB_{reg}細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1013]

B_{reg}細胞が、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する、本発明1011の方法。

[本発明1014]

B_{reg}細胞が、少なくとも80%のCD19+ B細胞を含む、本発明1011の方法。

[本発明1015]

B_{reg}細胞が、10%未満のCD138+形質B細胞を含む、本発明1011の方法。

[本発明1016]

B細胞が、局所投与されるように製剤化される、本発明1001の方法。

[本発明1017]

B細胞が、全身投与されるように製剤化される、本発明1001の方法。

[本発明1018]

B細胞が、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、髄腔内投与、または実質内投与されるように製剤化される、本発明1001の方法。

[本発明1019]

B細胞が、1日に1回、1週に1回、1週に2回、14日ごとに1回、1か月に1回、2か月ごとに1回、3か月ごとに1回、4か月ごとに1回、5か月ごとに1回、6か月ごとに1回、または1年に1回、投与される、本発明1001の方法。

[本発明1020]

治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 0.5×10^7 個のB細胞を含む、本発明1001の方法。

[本発明1021]

治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 1×10^8 個のB細胞を含む、本発明1001の方法。

[本発明1022]

治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 2×10^8 個のB細胞を含む、本発明1001の方法。

[本発明1023]

治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 1×10^9 個のB細胞を含む、本発明1001の方法。

[本発明1024]

外傷性脳損傷（TBI）を有する対象を処置する方法であって、治療的有效量の単離された

10

20

30

40

50

B細胞を対象に投与する段階を含む、前記方法。

[本発明1025]

TBIが頭部外傷または脳挫傷に起因する、本発明1022の方法。

[本発明1026]

対象が、いくつかの身体障害、認知障害、社会障害（social disorder）、情動障害、および／もしくは行動障害のうちの1つまたは複数を有する、本発明1022の方法。

[本発明1027]

同種B細胞が投与される、本発明1022の方法。

[本発明1028]

自家B細胞が投与される、本発明1022の方法。

[本発明1029]

異種B細胞が投与される、本発明1022の方法。

[本発明1030]

第2の治療用組成物を投与する段階をさらに含む、本発明1022の方法。

[本発明1031]

第2の治療用組成物が抗生物質またはコルチコステロイドである、本発明1022の方法。

[本発明1032]

B細胞が成熟ナイーブB細胞である、本発明1022の方法。

[本発明1033]

B細胞がエキスピボで刺激される、本発明1022の方法。

[本発明1034]

B細胞が、Toll様受容体（TLR）アゴニストを用いて刺激される、本発明1022の方法。

[本発明1035]

B細胞がB_{reg}細胞である、本発明1022の方法。

[本発明1036]

B_{reg}細胞が、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する、本発明1032の方法。

[本発明1037]

B_{reg}細胞が、少なくとも80%のCD19⁺ B細胞を含む、本発明1032の方法。

[本発明1038]

B細胞が、10%未満のCD138⁺形質B細胞を含む、本発明1032の方法。

[本発明1039]

B細胞が、局所投与されるように製剤化される、本発明1022の方法。

[本発明1040]

B細胞が、全身投与されるように製剤化される、本発明1022の方法。

[本発明1041]

B細胞が、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、髄腔内投与、または実質内投与されるように製剤化される、本発明1022の方法。

[本発明1042]

B細胞が、頭蓋内圧（ICP）モニタリングカテーテルを通じて投与されるように製剤化される、本発明1022の方法。

[本発明1043]

B細胞が、1日に1回、1週に1回、1週に2回、14日ごとに1回、1か月に1回、2か月ごとに1回、3か月ごとに1回、4か月ごとに1回、5か月ごとに1回、6か月ごとに1回、または1年に1回、投与される、本発明1022の方法。

[本発明1044]

治療的有効量が、投与1回につき少なくとも 0.5×10^7 個のB細胞を含む、本発明1022の方法。

[本発明1045]

治療的有効量が、投与1回につき少なくとも 1×10^8 個のB細胞を含む、本発明1022の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1046]

治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 2×10^8 個のB細胞を含む、本発明1022の方法。

[本発明1047]

治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 1×10^9 個のB細胞を含む、本発明1022の方法。

[本発明1048]

対象がヒトである、前記本発明のいずれかの方法。

本明細書に記載される技術および方法論のいくつかの態様は、以下に番号付けされた項目のいずれかによって定義される。

[0065]

1. その必要がある対象において神経変性疾患を処置する方法であって、治療的有效量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む、前記方法。

2. 神経変性疾患が以下から選択される、項目1に記載の方法：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、慢性外傷性脳症（CTE）、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、乳児神経軸索ジストロフィー、進行性核上性麻痺、レビー小体型認知症、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、および運動ニューロン疾患。

3. 同種B細胞が投与される、項目1に記載の方法。

4. 自家B細胞が投与される、項目1に記載の方法。

5. 第2の治療用組成物を投与する段階をさらに含む、項目1に記載の方法。

6. 第2の治療用組成物がエダラボンまたはリルゾールである、項目5に記載の方法。

7. 第2の治療用組成物が免疫調節性組成物である、項目6に記載の方法。

8. B細胞が成熟ナイーブB細胞である、項目1～7のいずれか1つに記載の方法。

9. B細胞がエキスピボで刺激される、項目1～8のいずれか1つに記載の方法。

10. B細胞が、Toll様受容体（TLR）アゴニストを用いて刺激される、項目1～9のいずれか1つに記載の方法。

11. TLRアゴニストが、以下から選択される内因性リガンドである、項目10に記載の方法：熱ショックタンパク質、ネクロシス細胞またはその断片、酸素ラジカル、尿酸結晶、mRNA、 β -ディフェンシン、フィブリン、フィブリノゲン、Gp96、Hsp22、Hsp60、Hsp70、HMGB1、肺サーファクタントタンパク質A、低密度リポタンパク質（LDL）、脾エラスターゼ、ヘパラン硫酸の多糖断片、可溶性ヒアルロン、 α A-クリスタリン、およびCpGクロマチン-IgG複合体。

12. TLRアゴニストが、以下から選択される外因性リガンドである、項目10に記載の方法：Pam3CSK4、トリアシル化リポペプチド、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型タンパク質、リポアラビノマンナン、外表面リポタンパク質、リポ多糖、サイトメガロウイルスのエンベロープタンパク質、グリコイノシトールリン脂質、糖脂質、GPIアンカー、単純ヘルペスウイルス1またはその断片、リポテイコ酸、マンノロン酸ポリマー、細菌外膜のポリン、サイモサン、二本鎖RNA、一本鎖RNA、ポリ(I).ポリ(C)、タキソール、フラジェリン、モジュリン、イミダゾキノリン、抗ウイルス性化合物、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド、およびプロフィリン。

13. B細胞がBreg細胞である、項目1～12のいずれか1つに記載の方法。

14. Breg細胞が、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する、項目13に記載の方法。

15. Breg細胞が、以下から選択される、1つまたは複数のさらなる免疫調節性サイトカインをさらに発現する、項目14に記載の方法：IL-2、IL-4、IL-6、IL-35、TNF- α 、TGF β 、PD-L1、FasL、およびTIM1。

16. Breg細胞が、以下から選択される1つまたは複数の細胞表面マーカーを発現する、項目13～15のいずれか1つに記載の方法：B220、CD1d、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD44、CD48、CD71、CD73、CD138、CD148、CD274、IgM、IgG、IgA、およびIgD。

17. Breg細胞が、B220、CD19、CD20、CD24、CD138、IgM、およびIgDを発現す

10

20

30

40

50

る、項目16に記載の方法。

18. B_{reg}細胞がCD25およびCD71を発現する、項目16に記載の方法。

19. B_{reg}細胞が、CD73を発現しない、項目13～18のいずれか1つに記載の方法。

20. B_{reg}細胞が、少なくとも80%のCD19+ B細胞を含む、項目13～15のいずれか1つに記載の方法。

21. B_{reg}細胞が、10%未満のCD138+形質B細胞を含む、項目13～15のいずれか1つかまたは項目20に記載の方法。

22. B細胞が神経保護性である、項目1～21のいずれか1つに記載の方法。

23. B細胞が抗炎症性である、項目1～22のいずれか1つに記載の方法。

24. B細胞が免疫調節性である、項目1～23のいずれか1つに記載の方法。

25. B細胞が、局所投与されるように製剤化される、項目1～24のいずれか1つに記載の方法。

26. B細胞が、全身投与されるように製剤化される、項目1～24のいずれか1つに記載の方法。

27. B細胞が、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、髄腔内投与、または実質内投与されるように製剤化される、項目1～24のいずれか1つに記載の方法。

28. B細胞が、静脈内注入または静脈内ボラスによって投与されるように製剤化される、項目27に記載の方法。

29. B細胞が、1日に1回、1週に1回、1週に2回、14日ごとに1回、1か月に1回、2か月ごとに1回、3か月ごとに1回、4か月ごとに1回、5か月ごとに1回、6か月ごとに1回、または1年に1回、投与される、項目1～28のいずれか1つに記載の方法。

30. B細胞が、少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回、投与される、項目1～29のいずれか1つに記載の方法。

31. 治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 1×10^8 個のB細胞を含む、項目1～30のいずれか1つに記載の方法。

32. 治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 2×10^8 個のB細胞を含む、項目1～30のいずれか1つに記載の方法。

33. 治療的有效量が、投与1回につき少なくとも 1×10^9 個のB細胞を含む、項目1～30のいずれか1つに記載の方法。

34. 外傷性脳損傷（TBI）を有する対象を処置する方法であって、治療的有效量の単離されたB細胞を対象に投与する段階を含む、前記方法。

35. TBIが頭部外傷または脳挫傷に起因する、項目34に記載の方法。

36. 対象が、いくつかの身体障害、認知障害、社会障害、情動障害、および／もしくは行動障害のうちの1つまたは複数を有する、項目34に記載の方法。

37. 同種B細胞が投与される、項目34に記載の方法。

38. 自家B細胞が投与される、項目34に記載の方法。

39. 第2の治療用組成物を投与する段階をさらに含む、項目34に記載の方法。

40. 第2の治療用組成物が抗生物質またはコルチコステロイドである、項目39に記載の方法。

41. B細胞が成熟ナイーブB細胞である、項目34～40のいずれか1つに記載の方法。

42. B細胞がエキスピボで刺激される、項目34～41のいずれか1つに記載の方法。

43. B細胞が、Toll様受容体（TLR）アゴニストを用いて刺激される、項目34～42のいずれか1つに記載の方法。

44. TLRアゴニストが、以下から選択される内因性リガンドである、項目43に記載の方法：熱ショックタンパク質、ネクローシス細胞またはその断片、酸素ラジカル、尿酸結晶、mRNA、 β -ディフェンシン、フィブリン、フィブリノゲン、Gp96、Hsp22、Hsp60、Hsp70、HMGB1、肺サーファクタントタンパク質A、低密度リポタンパク質（LDL）、隣エラスターゼ、ヘパラン硫酸の多糖断片、可溶性ヒアルロン、 α A-クリスタリン、およびCpGクロマチン-IgG複合体。

45. TLRアゴニストが、以下から選択される外因性リガンドである、項目43に記載の

10

20

30

40

50

方法：Pam3CSK4、トリアシル化リポペプチド、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型タンパク質、リポアラビノマンナン、外表面リポタンパク質、リポ多糖、サイトメガロウイルスのエンベロープタンパク質、グリコイノシトールリン脂質、糖脂質、GPIアンカー、単純ヘルペスウイルス1またはその断片、リポテイコ酸、マンヌロン酸ポリマー、細菌外膜のポリリン、サイモサン、二本鎖RNA、一本鎖RNA、ポリ(I).ポリ(C)、タキソール、フラジェリン、モジュリン、イミダゾキノリン、抗ウイルス性化合物、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド、およびプロフィリン。

46. B細胞がBreg細胞である、項目34～45のいずれか1つに記載の方法。

47. Breg細胞が、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する、項目46に記載の方法。

48. Breg細胞が、以下から選択される、1つまたは複数のさらなる免疫調節性サイトカインをさらに発現する、項目47に記載の方法：IL-2、IL-4、IL-6、IL-35、TNF- α 、TGF β 、PD-L1、FasL、およびTIM1。

49. Breg細胞が、以下から選択される1つまたは複数の細胞表面マーカーを発現する、項目46～48のいずれか1つに記載の方法：B220、CD1d、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD44、CD48、CD71、CD73、CD138、CD148、CD274、IgM、IgG、IgA、およびIgD。

50. Breg細胞が、B220、CD19、CD20、CD24、CD138、IgM、およびIgDを発現する、項目49に記載の方法。

51. Breg細胞が、CD25およびCD71を発現する、項目49に記載の方法。

52. Breg細胞が、CD73を発現しない、項目46～51のいずれか1つに記載の方法。

53. Breg細胞が、少なくとも80%のCD19+ B細胞を含む、項目46～48のいずれか1つに記載の方法。

54. B細胞が、10%未満のCD138+形質B細胞を含む、項目46～48のいずれか1つまたは項目53に記載の方法。

55. B細胞が神経保護性である、項目34～54のいずれか1つに記載の方法。

56. B細胞が抗炎症性である、項目34～55のいずれか1つに記載の方法。

57. B細胞が免疫調節性である、項目34～56のいずれか1つに記載の方法。

58. B細胞が、局所投与されるように製剤化される、項目34～57のいずれか1つに記載の方法。

59. B細胞が、全身投与されるように製剤化される、項目34～57のいずれか1つに記載の方法。

60. B細胞が、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、髄腔内投与、または実質内投与されるように製剤化される、項目34～57のいずれか1つに記載の方法。

61. B細胞が、静脈内注入または静脈内ボラスによって投与されるように製剤化される、項目60に記載の方法。

62. B細胞が、頭蓋内圧（ICP）モニタリングカテーテルを通じて投与されるように製剤化される、項目34～57のいずれか1つに記載の方法。

63. B細胞が、1日に1回、1週に1回、1週に2回、14日ごとに1回、1か月に1回、2か月ごとに1回、3か月ごとに1回、4か月ごとに1回、5か月ごとに1回、6か月ごとに1回、または1年に1回、投与される、項目34～62のいずれか1つに記載の方法。

64. B細胞が、少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回、投与される、項目34～63のいずれか1つに記載の方法。

65. 治療的有効量が、投与1回につき少なくとも 1×10^8 個のB細胞を含む、項目34～63のいずれか1つに記載の方法。

66. 治療的有効量が、投与1回につき少なくとも 2×10^8 個のB細胞を含む、項目34～63のいずれか1つに記載の方法。

67. 治療的有効量が、投与1回につき少なくとも 1×10^9 個のB細胞を含む、項目34～63のいずれか1つに記載の方法。

68. 改変されたB細胞、および1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物であって、該改変されたB細胞が、Toll様受容体（TLR）アゴニスト、および

／または免疫調節性サイトカインを用いて、エキスピボで刺激されている、薬学的組成物。

69. TLRアゴニストが、以下から選択される内因性リガンドである、項目68に記載の薬学的組成物：熱ショックタンパク質、ネクロシス細胞またはその断片、酸素ラジカル、尿酸結晶、mRNA、 β -ディフェンシン、フィブリン、フィブリノゲン、Gp96、Hsp22、Hsp60、Hsp70、HMGB1、肺サーファクタントタンパク質A、低密度リポタンパク質(LDL)、腓エラスターゼ、ヘパラン硫酸の多糖断片、可溶性ヒアルロン、 α A-クリスタリン、およびCpGクロマチン-IgG複合体。

70. TLRアゴニストが、以下から選択される外因性リガンドである、項目68に記載の薬学的組成物：Pam3CSK4、トリアシル化リポペプチド、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型タンパク質、リポアラビノマンナン、外表面リポタンパク質、リポ多糖、サイトメガロウイルスのエンベロープタンパク質、グリコイノシトールリン脂質、糖脂質、GPIアンカー、単純ヘルペスウイルス1またはその断片、リポテイコ酸、マンノロン酸ポリマー、細菌外膜のポリリン、ザイモサン、二本鎖RNA、一本鎖RNA、ポリ(I)、ポリ(C)、タキソール、フラジェリン、モジュリン、イミダゾキノリン、抗ウイルス性化合物、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド、およびプロフィリン。

71. 免疫調節性サイトカインが炎症誘発性サイトカインである、項目68に記載の薬学的組成物。

72. 炎症誘発性サイトカインが以下から選択される、項目71に記載の薬学的組成物：IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF α 、またはIFN γ 。

73. 改変されたB細胞が初代細胞である、項目68～72のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

74. 改変されたB細胞がB_{reg}細胞である、項目68～73のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

75. B_{reg}細胞が、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する、項目74に記載の薬学的組成物。

76. B_{reg}細胞が、以下から選択される、1つまたは複数のさらなる免疫調節性サイトカインをさらに発現する、項目75に記載の薬学的組成物：IL-2、IL-4、IL-6、IL-35、TNF- α 、TGF β 、PD-L1、FasL、およびTIM1。

77. B_{reg}細胞が、以下から選択される1つまたは複数の細胞表面マーカーを発現する、項目74～76のいずれか1つに記載の薬学的組成物：B220、CD1d、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD44、CD48、CD71、CD73、CD138、CD148、CD274、IgM、IgG、IgA、およびIgD。

78. B_{reg}細胞が、B220、CD19、CD20、CD24、CD138、IgM、およびIgDを発現する、項目77に記載の薬学的組成物。

79. B_{reg}細胞が、CD25およびCD71を発現する、項目77に記載の薬学的組成物。

80. B_{reg}細胞が、CD73を発現しない、項目74～79のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

81. 改変されたB細胞が神経保護性である、項目68～80のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

82. 改変されたB細胞が抗炎症性である、項目68～81のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

83. 修飾されたB細胞が免疫調節性である、項目68～82のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

84. 薬学的に許容される賦形剤が水溶液である、項目68～83のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

85. その必要がある対象において疾患または異常を処置する方法であって、項目68～84のいずれか1つに記載の薬学的組成物を対象に投与する段階を含む、前記方法。

86. 疾患または異常が異常な創傷治療である、項目85に記載の方法。

87. 疾患または異常が神経変性疾患である、項目85に記載の方法。

88. 神経変性疾患が以下から選択される、項目87に記載の方法：筋萎縮性側索硬化症

10

20

30

40

50

(ALS)、パーキンソン病、アルツハイマー病、慢性外傷性脳症 (CTE)、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、乳児神経軸索ジストロフィー、進行性核上性麻痺、レビー小体型認知症、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、および運動ニューロン疾患。

89. 疾患または異常が外傷性脳損傷 (TBI) である、項目85に記載の方法。

90. 疾患または異常が以下から選択される、項目85に記載の方法：囊胞性線維症、心血管疾患、円錐角膜、球状角膜、変形性関節症、骨粗鬆症、肺動脈性肺高血圧症、網膜色素変性症、および関節リウマチ。

91. 改変されたB細胞が同種B細胞である、項目85～90のいずれか1つに記載の方法。

92. 改変されたB細胞が自家B細胞である、項目85～91のいずれか1つに記載の方法。

93. 改変されたB細胞を作製する方法であって：

i) 成熟ナイーブB細胞を対象から単離する段階、ならびに

ii) Toll様受容体 (TLR) アゴニスト、および／または免疫調節性サイトカインを用いて、エクスピドでB細胞を刺激する段階

を含み、それにより改変されたB細胞を作製する、方法。

94. 段階i)が、CD19+成熟ナイーブB細胞の単離をさらに含む、項目93に記載の方法。

95. CD19+成熟ナイーブB細胞の単離が、CD19抗体またはその抗原結合断片を用いる免疫沈降によって実施される、項目94に記載の方法。

96. CD19抗体またはその抗原結合断片が、改変されたB細胞に結合したままである、項目95に記載の方法。

97. TLRアゴニストが、以下から選択される内因性リガンドである、項目93に記載の方法：熱ショックタンパク質、ネクロシス細胞またはその断片、酸素ラジカル、尿酸結晶、mRNA、 β -ディフェンシン、フィブリン、フィブリノゲン、Gp96、Hsp22、Hsp60、Hsp70、HMGB1、肺サーファクタントタンパク質A、低密度リポタンパク質 (LDL)、隣エラスターゼ、ヘパラン硫酸の多糖断片、可溶性ヒアルロン、 α A-クリスタリン、およびCpGクロマチン-IgG複合体。

98. TLRアゴニストが、以下から選択される外因性リガンドである、項目93に記載の方法：Pam3CSK4、トリアシル化リポペプチド、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質、リポアラビノマンナン、外表面リポタンパク質、リポ多糖、サイトメガロウイルスのエンベロープタンパク質、グリコイノシトールリン脂質、糖脂質、GPIアンカー、単純ヘルペスウイルス1またはその断片、リポテイコ酸、マンノロン酸ポリマー、細菌外膜のポリン、サイモサン、二本鎖RNA、一本鎖RNA、ポリ(I).ポリ(C)、タキソール、フラジェリン、モジュリン、イミダゾキノリン、抗ウイルス性化合物、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド、およびプロフィリン。

99. 免疫調節性サイトカインが炎症誘発性サイトカインである、項目93に記載の方法。

100. 炎症誘発性サイトカインが以下から選択される、項目99に記載の方法：IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、TNF α 、またはIFN γ 。

101. 改変されたB細胞がB_{reg}細胞である、項目93～100のいずれか1つに記載の方法。

102. B_{reg}細胞が、免疫調節性サイトカインIL-10を発現する、項目101に記載の方法。

103. B_{reg}細胞が、以下から選択される、1つまたは複数のさらなる免疫調節性サイトカインをさらに発現する、項目102に記載の方法：IL-2、IL-4、IL-6、IL-35、TNF- α 、TGF β 、PD-L1 FasL、およびTIM1。

104. B_{reg}細胞が、以下から選択される1つまたは複数の細胞表面マーカーを発現する、項目101～103のいずれか1つに記載の方法：B220、CD1d、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD44、CD48、CD71、CD73、CD138、CD148、CD274、IgM、IgG、IgA、およびIgD。

105. B_{reg}細胞が、B220、CD19、CD20、CD24、CD138、IgM、およびIgDを発現する、項目105に記載の方法。

106. B_{reg}細胞が、CD25およびCD71を発現する、項目105に記載の方法。

107. B_{reg}細胞が、CD73を発現しない、項目101～106のいずれか1つに記載の方法。

108. 改変されたB細胞が神経保護性である、項目93～107のいずれか1つに記載の方

10

20

30

40

50

法。

109. 改変されたB細胞が抗炎症性である、項目93～108のいずれか1つに記載の方法。

110. 修飾されたB細胞が免疫調節性である、項目93～109のいずれか1つに記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1A】B細胞の適用が、創の分子微小環境において複雑な変化を引き起こすことを示す。図1Aは、野生型マウス創傷モデルにおける、創傷治癒の主要なステージの平均継続期間の概略図である。

【図1B】B細胞の適用が、創の分子微小環境において複雑な変化を引き起こすことを示す。図1Bは、B細胞の適用に応答して発現が有意に変化したタンパク質における、経時的な発現ダイナミクスを集約したヒートマップを示す。B細胞での処置に関連して有意に変化したタンパク質 ($n = 111$; $p < 0.05$, 対応のないt検定)、および有意水準にかかわらず、各タイムポイントについて高い倍率変化を有するそのようなタンパク質 (上位20個の、上方制御または下方制御されたタンパク質) ($n = 112$) の集合体である、全213個のタンパク質は、創傷治癒に関するプロセスにしたがって分類された。ヒートマップは、損傷の0日後、1日後、4日後、10日後における、B細胞での処置後の発現の倍率変化を示す。赤色 = 上方制御; 緑色 = 下方制御。特に注目すべき点は、損傷の4日後における、炎症および炎症性細胞に関連する複数のタンパク質の下方制御、ならびに損傷の4～10日後における、細胞増殖、アポトーシス (細胞死) からのおよび酸化ストレスからの保護、ならびに組織リモデリング (毛包および筋肉の形成) に関連するタンパク質の実質的な上方制御であった。

【図2-1】図2A～図2Hは、生理食塩水で処置された創 (対照、通常の創傷治癒) における、またはB細胞での処置後の創における、機能的ファミリーごとのタンパク質の、経時的な平均的発現を示す。この解析は、タンパク質発現のインデューサーや阻害剤というよりは、ホメオスタティック作用物質としての、B細胞の全体的効果を示す。B細胞の適用は、損傷および治癒の過程で通常減少するかまたは増加するかいずれかであるタンパク質の発現を一定のレベルに維持すること、正常な治癒において観察される炎症ピークを有意に減少させること、抗アポトーシス因子 (矢印) の減少および酸化ストレス保護物質の減少を防ぐこと、ならびに増殖を増大させることと関連しており (図2A～図2B)、抗酸化ストレス保護物質の低下および細胞増殖の低下を減少させること、ならびに細胞遊走を低レベルに維持することと関連しており (図2C～図2D)、リモデリングおよび二次皮膚構造に関連するタンパク質を一定のレベルに維持することと関連しており (図2E～図2F)、対照において損傷の初期に観察される、タンパク質分解およびオートファジーのレベルを減少させること、ならびに治癒の後期における血管新生および神経再生に関連するタンパク質のレベルを増加させることと関連していた (図2G～図2H)。

【図2-2】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-3】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-4】図2-1の説明を参照のこと。

【図3】急性創傷治癒における、B細胞適用のインビボ評価についての実験パラダイムを示す。野生型C57Bl6マウスの背部皮膚に、全4か所の全層創が作製され、そしてアイソジェニック動物から精製された成熟ナイーブB細胞が、創面に直接的に適用された。対照動物は、生理食塩水の適用を受けた。損傷無しの同様の微小環境を作り出すために、内部対照としてB細胞または生理食塩水対照もまた、インタクトな皮膚の下へと皮下注入された。規定の生存期間後に、創、または未損傷の皮膚組織は採取され、解離され、そしてフローサイトメトリ解析のために処理された。右側の散布図は、それぞれの処置カテゴリ由来の細胞懸濁液の、典型的な分布を示す。創試料は、白血球の特徴的な流入 (中空の白色矢印) を示し、これは未損傷の組織においてはほとんど存在しない。B細胞は、典型的にはいずれの位置においてもほとんど存在しないが、実験的適用後には、該細胞を容易に多数検出することができる (赤色の矢印)。

【図4】B細胞で処置された創および対照の創の細胞懸濁液の、フローサイトメトリーによるゲーティング戦略および解析を示す。生細胞は、以下の3つの主要なカテゴリーへとゲーティングされた：B細胞（CD19+/B220+リンパ球）と、好中球、単球およびマクロファージ、樹状細胞、ならびにT細胞の混合物を含む非B細胞白血球（CD140a-/B220-白血球）と、線維芽細胞（CD140a+/B220-）。これらの細胞カテゴリーは、活性化のマーカー、およびサイトカイン産生に関して評価された。

【図5】創の微小環境への規定の曝露期間後に創面から回収されたB細胞における、活性化マーカーのおよび重要なサイトカインのダイナミクスを示す。B細胞は、インビボで創ニッチに曝露されたか、または未損傷の皮膚下に注入された（同等の位置における対照）。同じ継続期間にわたり、単離直後から氷上で維持された対照B細胞は、比較のために示される。18時間、2日、4日、および10日を含む期間の後に、サイトカインの細胞内での滞留を誘導するため、創は、4時間にわたってブレフェルジンAで処置された。B細胞はその後、組織を切除および解離することによって回収され、そして、表面マーカーおよび細胞内サイトカインの両方について、フローサイトメトリーによってさらに特徴付けされた。創の微小環境に曝露されたB細胞は、複数の免疫調節性サイトカインを一過性に上方制御し、ピークは適用の2日後である。TGFβおよびIL-6を含むいくつかの免疫調節性サイトカインは、第4日において上昇したままであり、かつIL-10は、第10日まで上昇したままである。N = 動物3〜6匹 / 群。

【図6】創の微小環境に曝露されたB細胞、皮下対照に曝露されたB細胞、または氷上で維持されたB細胞（曝露無し）における、各マーカーについての平均値の集約としてのヒートマップである。

【図7】創に存在する浸潤非B細胞白血球の凝集体における、活性化マーカーのおよび重要なサイトカインのダイナミクスを示す。全体的に見て、B細胞が創に存在する場合、浸潤白血球では、抗炎症性サイトカインであるIL-10、TGFβ、およびIL-35の産生はより多く、かつ炎症誘発性サイトカインであるTNFαおよびIL-2の産生はより少なかった。この影響は、損傷およびB細胞適用の4日後に最も強く現れ、かつ10日後まで持続した。N = 動物3〜6匹 / 群。

【図8】創の微小環境にある浸潤非B細胞白血球における、各マーカーについての平均値の集約としてのヒートマップであって、B細胞の存在下で増加した抗炎症性サイトカイン（IL-10およびTGFβ）の産生のパターンを示すヒートマップである。

【図9】創および皮下組織のCD140a+線維芽細胞集団における、活性化マーカーのおよび重要なサイトカインのダイナミクスを示す。創がB細胞に曝露された場合、創に存在する線維芽細胞は、損傷の10日後に、IL-10およびTGFβを有意により多く産生した。さらに、B細胞が適用された場合、創の線維芽細胞では、損傷の4日後および10日後の両方で、炎症誘発性サイトカインであるTNFαの産生がより低下する。

【図10】B細胞または生理食塩水のいずれかで処置された、創および皮下組織の線維芽細胞における、各マーカーについての平均値の集約としてのヒートマップである。線維芽細胞は、創傷治癒において、抗炎症性因子および再生促進性因子の最も重要な供給源であり、かつ高レベルのIL-10およびTGFβを、処置とは無関係に産生する。それにもかかわらず、B細胞で処置された創由来の線維芽細胞は、損傷の4日後および10日後に、IL-10およびTGFβの両方をより高レベルで産生し続けており、一方で生理食塩水で処置された創においては、これらの抗炎症性サイトカインのレベルは低下した。興味深いことに、創の線維芽細胞における、IL-6およびTNFαを含む炎症誘発性サイトカインの減少において、B細胞適用の有意な効果が観察された。

【図11】創傷治癒における、再生に関する外来B細胞の機能には、機能的なTLRシグナル伝達、およびIL-10産生が必須の要素であることを示す。全層切除創（治癒の第6日のものがここに示される）は、共通のTLRシグナル伝達アダプターであるミエロイド系分化因子88（myeloid differentiation factor 88）（MyD88）を欠くB細胞か、IL-10を欠くB細胞か、または対照としてWT B細胞を用いて、第0日に処置された。生理食塩水もまた、内部対照として試験動物それぞれに包含させた。WT B細胞は、WT動物において第2

10

20

30

40

50

～3日まで創閉鎖を一貫して促進した一方で、MyD88-/- B細胞と、IL-10-/- B細胞は、生理食塩水の適用と同様に、創閉鎖に関する恩恵を示さなかった。

【図12】皮膚の創試料において発現した、同定されたタンパク質の、教師なし階層クラスター分析を示す。すべての試料にわたって一貫して存在することが見出された、同定されたタンパク質のみを、分析に含有させた。(A) B細胞で処置された創および生理食塩水で処置された創の両方で、損傷後の4つの異なるタイムポイント（列）において、全動物において一貫して発現した3809個のタンパク質（行）の、完全連結法を用いた階層クラスタリング。擬似色スケールは、各タンパク質について、正規化され、対数変換された、発現の倍率変化の値を示す。デンドログラムは、この分析に由来する15個のタンパク質クラスターを示し、(A)における各セルの色は、それぞれのタイムポイントにおける、クラスターの発現の平均値に対応している。タンパク質は、経時的なその発現パターンによってクラスター化する。(B) 全3809個のタンパク質を示す(A)からの、階層クラスターのヒートマップ。(C) 15個の階層クラスターの遺伝子オントロジー解析。QuickGOからの、マウスGOslim遺伝子リスト (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO> においてアクセス可能) は、15個の階層クラスターを調べるために使用された。棒グラフは、各クラスターに関して最上位の、生物学的機能カテゴリーを示す。

10

【図13】評価された、創傷治癒の間の各タイムポイントにおいて、B細胞による処置に応答して有意に変化したタンパク質の分布を示す。

【図14】挫傷TBI後の機能的（行動的）回復および組織学的回復に対するB細胞適用の効果を評価するための実験パラダイムを示す。成体雄C57BL/6Jマウスは麻酔され、そして左の頭頂・側頭皮質の上で5 mmの円形の開頭が実施され、そして骨弁が除去された。損傷の直前に、 2×10^6 個のB細胞の単回注入が、同側の半球へと実質内送達された。マウスはその後、CCIを受けたか、または偽損傷とされた。回復後、運動機能、運動学習および空間学習ならびに記憶能力、不安、ならびにうつ様行動が、複数種のアッセイを用いて評価された。行動試験の終了時（第35日）に動物は安楽死させ、そして総損傷体積を評価するために脳が採取された。

20

【図15】前庭関連の運動機能、および線条体関連の学習に対する、B細胞での急性処置の効果を示す。(A) ローターロッド評価は、CCI時に投与されたB細胞の、有意な保護効果を示した。特に、トライアルが反復される間に、落下までの潜時は、B細胞で処置されたマウスにおいて、偽損傷動物と同様に増加し、これは運動学習の要素を示唆する。T細胞でまたは生理食塩水で処置された対照においては、そのような改善は観察されなかった。2回目のトライアル後は、B細胞処置を受けたCCI損傷マウスと、B細胞で処置された偽損傷動物との間に、有意な差異は観察されなかった。(B) ワイヤグリップアッセイを用いた、損傷後の前庭関連の運動能力の回復の評価は、偽損傷対照と比較して、損傷の有意な影響を示したが、損傷マウスにおいて、処置条件の間では、統計学的に有意な差異は観察されなかった。データは、平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 。CCI + B細胞、 $n =$ マウス12匹；CCI + T細胞、 $n =$ マウス12匹；CCI + 生理食塩水、 $n =$ マウス12匹；偽損傷 + B細胞、 $n =$ マウス10匹；偽損傷 + 生理食塩水、 $n =$ マウス10匹。

30

【図16】学習および記憶に対する、B細胞の単回急性適用の効果を示す。(A)～(D) モリス水迷路による評価。学習曲線は、生理食塩水で処置されたCCI動物と比較して、B細胞で処置されたCCIマウスにおける、有意な改善を示した ($p < 0.05$)。3回目のトライアル後は、B細胞で処置された損傷動物と、いずれかの偽損傷条件との間で、有意な差異は観察されなかった ($p > 0.98$) (A)。可視プラットフォームトライアルは、損傷有りの処置条件と損傷無しの処置条件との間で、差異が無いことを示した(B)。(C) プローブトライアルは、B細胞で処置されたCCI損傷動物が、標的クォードラントにおいてチャンスレベルを上回る時間を過ごし、偽損傷マウスと比べて有意な差異は無いことを示した。対照的に、T細胞または生理食塩水のいずれかで処置された対照CCI損傷マウスは、標的クォードラントの探索にチャンスレベルの時間しか費やさず、かつ偽損傷動物と比べて有意に異なっていた ($p < 0.05$)。破線は、チャンスレベルを示す。(D) プローブトライアル中の代表

40

50

的な水泳経路トレースは、両方の偽損傷群と同様に、CCI-B細胞マウスにおける空間型の探索パターンを示す一方で、T細胞群および生理食塩水群のCCIマウスは、非空間型の戦略をとっていた。(E) 短期学習および短期記憶の、Y字迷路による評価。B細胞で処置されたCCIマウスは、T細胞または生理食塩水で処置された損傷群よりも、有意に高い交替行動スコアを有し、偽損傷群と同様のパフォーマンスを示した。すべてのデータは、平均 ± SEMとして示される。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 。CCI + B細胞、 $n =$ マウス12匹; CCI + T細胞、 $n =$ マウス12匹; CCI + 生理食塩水、 $n =$ マウス12匹; 偽損傷 + B細胞、 $n =$ マウス10匹; 偽損傷 + 生理食塩水、 $n =$ マウス10匹。

【図17】CCI後の不安およびうつ様行動に対する、B細胞での処置の効果を示す。(A) 不安様行動の高架式十字迷路によるアッセイ。損傷時にB細胞の投与を受けたCCI損傷マウスと、損傷時に同数のT細胞の投与を受けた動物との間で、クローズドアームにおいて過ごした時間に若干の差異があった点を除いて、処置群の間で、有意な全体的差異は観察されなかった(* $p < 0.05$)。(B) うつ様行動についての強制水泳アッセイ。このアッセイにおいては、損傷による影響も処置による影響も観察されなかった。すべてのデータは、平均 ± SEMとして示される。* $p < 0.05$ 。CCI + B細胞、 $n =$ マウス12匹; CCI + T細胞、 $n =$ マウス12匹; CCI + 生理食塩水、 $n =$ マウス12匹; 偽損傷 + B細胞、 $n =$ マウス10匹; 偽損傷 + 生理食塩水、 $n =$ マウス10匹。

【図18】CCI後の組織学的アウトカムに対する、B細胞での処置の効果を示す。(A) 損傷の35日後における、損傷部位を通る冠状断の代表例。B細胞で処置された動物においては、海馬の一部分が、損傷を受けた半球をしばしば補填していた(矢印)。示される切片は、ブレグマからおよそ-2.2 mmに位置する。(B) B細胞で処置されたマウスにおける、脳損傷の総体積は、TBIの35日後に、生理食塩水対照およびT細胞対照と比較して有意に40~60%減少した。(C) 脳の前後軸に沿った脳の横断切片における、損傷面積。結果は、B細胞での処置を受けた損傷脳における、損傷サイズの一貫した減少を示す。(D) 損傷を受けた半球における、補填された海馬の総体積は、CCI対照のいずれと比較しても、B細胞で処置された動物において有意に多かった。すべてのデータは、平均 ± SEMとして示される。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 。CCI + B細胞、 $n =$ マウス12匹; CCI + T細胞、 $n =$ マウス12匹; CCI + 生理食塩水、 $n =$ マウス12匹; 偽損傷 + B細胞、 $n =$ マウス10匹; 偽損傷 + 生理食塩水、 $n =$ マウス10匹。

【図19】グリオーシスおよびミクログリア活性化に対する、B細胞での処置の効果を示す。(A)~(D) CCIと、生理食塩水(A)、B細胞(B)、T細胞(C)のいずれかでの処置から35日後の損傷の内側面の全体像における、または生理食塩水で処置された偽損傷対照(D)における、GFAPおよびCD68についての免疫標識を示す共焦点画像。(E) GFAP免疫染色によって占められた面積の定量分析は、生理食塩水で処置されたCCI対照、またはT細胞で処置されたCCI対照のいずれと比較しても、B細胞で処置された損傷動物における、反応性アストログリオーシスの有意な減少を示した。(F) CD68免疫染色の定量分析は、生理食塩水で処置されたCCI対照と比較して、CCI後にT細胞またはB細胞のいずれかで処置された動物における、CD68の存在の有意な減少を示した。動物1匹につき、 $n =$ イメージングフィールド4枚。すべてのデータは、平均 ± SEMとして示される。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 。

【図20】脳におけるB細胞の生存性および持続性を示す。(A) CCI、および 5×10^6 個の B^{luc} 細胞の実質内適用後の複数のタイムポイントにおける、WT C57Bl6/Jマウスの生体内イメージングの代表例。(B) CCI創傷部位の位置における、頭部からの光の放出($n =$ マウス6匹)は、細胞が適用のおよそ14日後までインサイチューで生存し、生存細胞の数は7日後に著しく減少することを示す。[p/s] = 1秒あたりの光子数。

【図21】CCI後の損傷部位における、B細胞の局在性を示す。(A) 実質内注入およびCCIの直後に、事前に標識されたB細胞は、損傷部位において視認可能である。黒色の四角形は、(B)においてイメージングされたエリアを示す。(B) 注入部位(矢印)においてクラスター化した $B220^+$ B細胞を示す、損傷部位を通る冠状断の共焦点顕微鏡画像。Ki67免疫標識によって示される細胞増殖は、損傷直後には観察されなかった。(C) B細胞の注入およ

びCCIの4日後、標識されたB細胞は、損傷部位において依然として観察可能であるが、生体染色による着色の強度は、注入直後と比較して、このタイムポイントまでに減少した。黒色の四角形は、(D)においてイメージングされたエリアを示す。(D) 損傷およびB細胞投与の4日後の、注入部位を通る冠状断の共焦点画像。B220+ B細胞は、損傷部位においてクラスター化し、多数を依然として見出すことができる。該領域全体において、さかんな細胞増殖を観察可能であるが、B220およびKi67の共染色は観察されなかった。(E) (D)において四角形で囲まれたエリアの拡大版。(F) 偽損傷動物においては、皮質を通る針の痕跡は、アストログリア瘢痕形成により縁どられており、処置の35日後に依然として観察可能である。このタイムポイントにおいては、元の注入部位において、B220+ B細胞を観察することができない。(G) (F)において四角形で囲まれたエリアの高倍率共焦点画像。すべての共焦点画像において、細胞核はDAPIを用いて対比染色されている。タイムポイント1つにつき、n = 動物4匹。

10

【図22】実験計画の概要を示す。体重およびニューロスコア (Neuroscore) の評価は、週に2回、1日の同じ時間に、処置条件について知らされていない実験者によって実施された。

【図23】B細胞で処置された群および生理食塩水で処置された群における、週に2回測定された、経時的な、正規化された体重（個々の動物それぞれについて、第76日の値に対するパーセンテージ）を示す。グラフは、死亡した個体は体重について0という値の判定を受けるといふ、正規化された体重と生存性との複合指標を示す。それぞれの処置群において、ノンキャリア対照動物とSOD1トランスジェニック動物との間の、体重における予想されたとおりの相違を、本発明者らは観察した。ノンキャリアの対照動物においては、処置とは無関係に、試験期間にわたって漸進的な体重増加が観察された。結果はまた、B細胞の投与を受けたトランスジェニックSOD1動物について、減少の遅延を示した（矢印）。処置条件1つにつき、N = 32。

20

【図24】SOD1-G93A動物における、ピーク体重の解析を示す。A. 生存期間プロットは、動物がそのピーク体重に到達したタイムポイントを示す。B. ピーク体重に到達する期間によって示されるように、B細胞での処置は、完全麻痺症状の発症を有意に遅延させた。統計学：A：ゲーハーン-ブレスロウ-ウィルコクソン検定 (Gehan-Breslow-Wilcoxon test) ; B：対応のないt検定。群1つにつき、N = 動物32匹。

【図25】ニューロスコアの値を経時的に示す。神経学的スコアと生存性との複合グラフにおいては、死亡した個体はニューロスコア4にすでに到達しているが、試験の残りの期間においても、4の値がさらに割り当てられた。トランスジェニックSOD1動物において典型的に観察されたニューロスコアの値の増加は、B細胞で処置された動物において遅く、特に、疾患進行の初期のステージにおいて遅かった（オレンジ色の四角形）。統計学：多重比較のためのテューキー事後補正を伴う2元配置分散分析。

30

【図26】トランスジェニックSOD1-G93A動物の生存時間分析を示す。4のニューロスコア（完全麻痺）に到達した動物は、ALSにより死亡したものとみなされた。生理食塩水での対照処置と比較して、ナীবB細胞での処置は、生存期間を有意に延長させた（群1つにつき、N = 動物32匹）。統計学：（左）：ゲーハーン-ブレスロウ-ウィルコクソン検定；（右）：1元配置分散分析。群1つにつき、N = 動物32匹。

40

【図27】腰髄の運動ニューロンの、エンドポイントにおける評価を示す。A、B：腰髄の切片はH&Eを用いて染色され、そしてすべての運動ニューロン（大きな細胞体、少なくとも1つの核小体）とともに、損傷／変性の形態学的特徴を示す病的で異常なニューロン（矢印）が、処置について知らされていない実験者によって計数された。C：運動ニューロンの総数はトランスジェニック動物において有意に減少していたが、この群内においては処置による差異は無かった。D：変性し、核濃縮した運動ニューロンのパーセンテージが特異的に解析された際に、B細胞での処置の有意な恩恵が明らかとなった。統計学：（左）：2元配置分散分析；（右）：対応のないt検定。群1つにつき、N = 動物19～24匹。組織試料の採取は、試験されたすべての動物において可能であったわけではないことに、注意されたい。

50

【発明を実施するための形態】

【0067】

詳細な説明

本発明はこれより、以下の定義および実施例を参照のためにのみ用いて、詳細に説明される。本明細書において参照されているすべての特許および刊行物は、参照により明示的に組み入れられる。本明細書において別途定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるものと、同じ意味を有する。本発明の実施または試験においては、本明細書において記載されるものと同様のまたは同等の、任意の方法および材料を使用することが可能であるが、好ましい方法および材料が記載される。数値を用いた範囲は、範囲を定義する数値を含む。

10

【0068】

本明細書において提供される見出しは、本明細書全体を参照することによって本発明が有することのできる、本発明のさまざまな局面または態様を限定するものではない。したがって、この直後に定義される用語は、本明細書全体を参照することによって、より完全に定義される。

【0069】

定義

本明細書において使用される場合、「神経変性疾患」との用語は、神経学的な疾患、障害、または異常であって、たとえば中枢神経系（CNS）における、ニューロンの死を含むニューロンの構造または機能の進行性の喪失によって特徴付けられるものを指す。細胞以下のレベルで、これらの疾患において互いに関連する多くの類似性が見受けられる。さらに、異なる神経変性障害の間には、異常なタンパク質の集合、および誘導される細胞死を含む、多くの類似点が存在する。神経変性は、分子から全身までの範囲にわたる、神経回路の多くの異なるレベルにおいて見出され得る。神経変性は、疾患進行の分子マーカーによって特徴付けられ得、これはたとえば、T-タウ（総タウ）、P-タウ（高リン酸化タウ）、A β 42（アミロイド β 42）、A β 42/A β 40の比率、YKL-40（キチナーゼ3様タンパク質1）、VLP-1（ビシニン様タンパク質1）、NFL（ニューロフィラメント軽鎖）、pNFH（リン酸化ニューロフィラメント重鎖サブユニット）、Ng（ニューログラニン）、およびUCH-L1（ユビキチンC末端ヒドロラーゼ）、TDP-43（TAR DNA結合タンパク質43）、 α -シヌクレインの減少、および／または3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸のレベルの低下などである（たとえば、その全体が参照により組み入れられる、Robey and Panegyres, Cerebrospinal fluid biomarkers in neurodegenerative disorders, Future Neurol. 14(1), (2019)を参照されたい）。例示的な神経変性障害は、以下を含む：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、慢性外傷性脳症（CTE）、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、乳児神経軸索ジストロフィー、進行性核上性麻痺、レビー小体型認知症、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、および運動ニューロン疾患。

20

30

【0070】

本明細書において使用される場合、「中枢神経系（CNS）損傷」との用語は、脳および／または脊髄の正常な機能を妨害する損傷を指す。CNS損傷は、本明細書において記載されるような、外部からの機械的な力に起因し得る。CNS損傷は、外傷性脳損傷（TBI）、および／または脊髄損傷（SCI）を含む。

40

【0071】

本明細書において使用される場合、「外傷性脳損傷（TBI）」との用語は、外部からの機械的な力に起因する、脳の正常な機能への妨害を指す。たとえば、TBIは、頭部外傷または脳挫傷に起因し得る（たとえば、転倒に、射創に、スポーツ事故に、建設事故に、交通事故に、または対象の頭蓋骨もしくは脳を貫通する損傷に起因し得る）。TBIは、当業者に公知の臨床ガイドラインにしたがって診断される。TBIは、疾患進行の分子マーカーによって、さらに特徴付けられ得、これはたとえば、神経細胞体損傷についてのタンパク質バイオマーカー（UCH-L1、NSE）、アストログリア損傷についてのタンパク質バイオ

50

マーカー（GFAP、S100B）、神経細胞死についてのタンパク質バイオマーカー（ α II-スベクトリン分解産物）、軸索損傷についてのタンパク質バイオマーカー（NFタンパク質）、白質損傷についてのタンパク質バイオマーカー（MBP）、損傷後神経変性についてのタンパク質バイオマーカー（総タウおよびリン酸化タウ）、損傷後自己免疫応答についてのタンパク質バイオマーカー（脳抗原を標的とする自己抗体）などである（たとえば、その全体が参照により組み入れられる、Wang et al. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. Expert Rev Mol Diagn. 18(2): 165-180 (2018)を参照されたい）。TBIはSCIと同時に生じ得、かつ同じ損傷または同じ事故に起因し得る。

【0072】

本明細書において使用される場合、「脊髄損傷（SCI）」との用語は、外部からの機械的な力に起因する、脊髄への損傷を指す。たとえば、SCIは、脊髄外傷または脊髄挫傷に起因し得る（たとえば、転倒に、射創に、スポーツ事故に、建設事故に、交通事故に、または対象の脊髄を貫通する損傷に起因し得る）。SCIは、当業者に公知の臨床ガイドラインにしたがって診断される。SCIはTBIと同時に生じ得、かつ同じ損傷または同じ事故に起因し得る。

【0073】

本明細書において使用される場合、「炎症性疾患」または「免疫性疾患」との用語は、疾患の、病因、発病、進行、または総体的症状について、炎症性のまたは免疫性の要素を有する、疾患、障害、または異常を指す。たとえば、炎症性障害または免疫性障害は、炎症経路もしくは免疫経路の調節不全、および／または刺激に対する異常な炎症応答もしくは免疫応答を含み得る。例示的な、炎症性障害または免疫性障害は、以下を含む：嚢胞性線維症、心血管疾患、円錐角膜、球状角膜、変形性関節症、骨粗鬆症、肺動脈性肺高血圧症、網膜色素変性症、および関節リウマチ。

【0074】

本明細書において使用される場合、「神経保護性」との用語は、神経細胞死を予防する、阻害する、または低減させる特性を指す。たとえば、神経保護性である組成物または方法は、神経変性障害、TBI、またはSCIに関連する症状における変化（たとえば低減）によって特徴付けられ得る。代わりに、神経保護性である組成物または方法は、疾患の分子マーカーに対する、たとえば、神経変性障害、TBI、またはSCIに関して本明細書に記載される分子マーカーなどに対する、該組成物または方法の影響によっても、特徴付けられ得る。

【0075】

本明細書において使用される場合、「抗炎症性」との用語は、炎症を予防する、阻害する、または低減させる特性を指す。たとえば、抗炎症性である組成物または方法は、炎症性障害に関連する症状における変化（たとえば低減）によって特徴付けられ得る。代わりに、抗炎症性である組成物または方法は、炎症性マーカーの減少（たとえば炎症誘発性サイトカインの減少）によっても、または抗炎症性マーカーの増加（たとえば抗炎症性サイトカインの増加）によっても、特徴付けられ得る。

【0076】

本明細書において使用される場合、「免疫調節性」との用語は、免疫応答に関連する細胞の活性を開始させるか、または変化させる（たとえば、増大させるか、もしくは低下させる）特性を指す。免疫調節性の組成物または方法は、たとえば、炎症誘発性マーカーを、たとえばサイトカインなどを増大させることによって、免疫応答に関連する細胞の活性を増大させ得、および／または、たとえば、炎症誘発性マーカーを、たとえばサイトカインなどを低下させることによって、免疫応答に関連する細胞の活性を低下させ得る。

【0077】

本明細書において使用される場合、本明細書において互換性をもって使用される「B細胞」または「Bリンパ球」との用語は、白血球の1タイプである、リンパ球の小サブタイプを指す。T細胞およびナチュラルキラー細胞という他の2つのクラスのリンパ球とは異なり、B細胞は、それらの細胞膜上にB細胞受容体（BCR）を発現する。BCRは、それに対して

10

20

30

40

50

B細胞が抗体応答を開始する特定の抗原と、B細胞が結合することを可能にする。B細胞は、抗体を分泌することによって、適応免疫系の液性免疫要素として機能する。加えて、B細胞は抗原を提示し（該細胞はまた、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）としても分類される）、かつサイトカインを分泌する。哺乳動物においては、B細胞は骨髄で成熟する。本明細書において使用される場合、「成熟B細胞」との用語は、B細胞成熟のプロセスを、たとえば哺乳動物の骨髄において完了した、B細胞を指す。成熟B細胞は、骨髄を出て、そして二次リンパ組織に移動し、ここで該細胞は、外来抗原、および／またはTヘルパー細胞と相互作用し得る。B細胞成熟のステージは、科学文献においてよく特徴付けられており、かつ当業者に公知である。

【0078】

本明細書において使用される場合、「ナイーブB細胞」との用語は、抗原に曝露されていないB細胞を指す。

【0079】

本明細書において使用される場合、「Breg細胞」または「制御性B細胞」との用語は、免疫調節に、および免疫応答の抑制に関与する、B細胞の1タイプを指す。本開示のBreg細胞は、成熟したナイーブB細胞であり、これは特徴的な細胞表面マーカーを発現する。Breg細胞は、以下のうちの1つまたは複数を発現し得る：B220、CD1d、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD44、CD48、CD71、CD73、CD138、CD148、CD274、IgM、IgG、IgA、およびIgD。特に、Breg細胞は、以下を含むが、これらに限定されない細胞表面マーカーを発現し得る：B220、CD19、CD20、CD24、IgM、IgD、およびCD138。損傷環境に導入されると、Breg細胞は、以下を含むが、これらに限定されない免疫調節性サイトカインを産生し得る：IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-35、TNF- α 、TGF- β 、インターフェロン- γ 。特に、Breg細胞は、IL-10の産生によって特徴付けられる。

【0080】

本明細書において使用される場合、「サイトカイン」との用語は、細胞のシグナル伝達に関与する、小タンパク質を指す。サイトカインは、免疫細胞によって、たとえば、T細胞、B細胞、マクロファージ、およびマスト細胞などによって、産生および分泌され得、かつ、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンフォカイン、および腫瘍壊死因子を含み得る。本明細書において使用される場合、「炎症誘発性サイトカイン」との用語は、免疫細胞から分泌されるサイトカインであって、炎症を促進するサイトカインを指す。炎症誘発性サイトカインを産生および分泌する免疫細胞は、T細胞（たとえばTh細胞）マクロファージ、B細胞、およびマスト細胞を含む。炎症誘発性サイトカインは、以下を含む：インターロイキン-1（IL-1、たとえばIL-1 β ）、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-18、腫瘍壊死因子（TNF、たとえばTNF α ）、インターフェロン γ （IFN γ ）、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）。

【0081】

本明細書において使用される場合、「Toll様受容体（TLR）アゴニスト」との用語は、Toll様受容体（TLR）に結合し、そしてそれを活性化させて、下流のTLR細胞シグナル伝達を引き起こす、リガンドを指す。TLRアゴニストは当業者に公知であり、かつ内因性リガンドおよび外因性リガンドを含む。TLRアゴニストである、例示的な内因性リガンドは、以下を含む：熱ショックタンパク質、ネクロシス細胞またはその断片、酸素ラジカル、尿酸結晶、mRNA、 β -ディフェンシン、フィブリン、フィブリノゲン、Gp96、Hsp22、Hsp60、Hsp70、HMGB1、肺サーファクタントタンパク質A、低密度リポタンパク質（LDL）、アスファルターゼ、ヘパラン硫酸の多糖断片、可溶性ヒアルロン酸、 α -A-クリスタリン、およびCpGクロマチン-IgG複合体。TLRアゴニストである、例示的な外因性リガンドは、以下を含む：Pam3CSK4、トリアシル化リポペプチド、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型タンパク質、リポアラビノマンナン、外表面リポタンパク質、リポ多糖、サイトメガロウイルスのエンベロープタンパク質、グリコイノシトールリン脂質、糖脂質、GPIアンカー、単純ヘルペスウイルス1またはその断片、リポテイ

10

20

30

40

50

コ酸、マンヌロン酸ポリマー、細菌外膜のポリン、ザイモサン、二本鎖RNA、一本鎖RNA、ポリ(I).ポリ(C)、タキソール、フラジェリン、モジュリン、イミダゾキノリン、抗ウイルス性化合物、非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド、およびプロフィリン。

【0082】

本明細書において使用される場合、「処置」との用語（およびその変化形、たとえば「処置する（treat）」または「処置する（treating）」など）は、処置を受ける個体の自然経過を変化させる試みにおける臨床的介入を指し、かつこれは、予防のためか、または臨床病理の過程中的かのいずれかで、実施することができる。処置の望ましい効果は、以下を含むが、これらに限定されない：疾患もしくは障害（たとえば、本明細書に記載されるものなど）の発生または再発の予防、そのような疾患の症状の緩和、該疾患からもたらされる、任意の直接的もしくは間接的な病的結果の軽減、および免疫応答の変化。加えて、処置とは、本明細書に記載される疾患または異常の任意のものに関連する臨床的介入を指す。

10

【0083】

本明細書において使用される場合、「投与する」との用語により、対象に投薬を施す方法が意図される。本明細書に記載される方法において利用される組成物は、たとえば、（たとえば硝子体内注入により）硝子体内投与され得、点眼剤によって投与され得、筋肉内投与され得、静脈内投与され得、皮内投与され得、経皮投与され得、動脈内投与され得、腹腔内投与され得、損傷内投与され得、頭蓋内投与され得、関節内投与され得、実質内投与され得、前立腺内投与され得、胸腔内投与され得、気管内投与され得、髄腔内投与され得、鼻腔内投与され得、腔内投与され得、直腸内投与され得、局所投与され得、腫瘍内投与され得、腹腔投与され得、皮下投与され得、結膜下投与され得、膀胱内（intravesicularly）投与され得、粘膜投与され得、心膜内投与され得、臍内投与され得、眼内投与され得、眼窩内投与され得、経口投与され得、局所投与され得、経皮投与され得、吸入によって投与され得、注射によって投与され得、埋め込みによって投与され得、注入によって投与され得、持続注入によって投与され得、標的細胞を直接的に局所灌流浴させることによって投与され得、カテーテルによって投与され得、灌流によって投与され得、クリームとして投与され得、または脂質組成物として投与され得る。本明細書に記載される方法において利用される組成物はまた、全身投与または局所投与され得る。局所投与に関し、投薬は、ローション、クリーム、軟膏、またはゲルとして施される。投与方法は、さまざまな要因（たとえば、投与される組成物、および処置される、免疫調節不全性の異常、疾患、または障害の重篤性）によって変化し得る。

20

30

【0084】

本発明にしたがって処置される対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、たとえば、霊長類（たとえばヒト）、齧歯類（たとえば、ラットもしくはマウス）、または別の種の哺乳動物（たとえば、家畜、もしくは他の飼いならされた動物）であり得る。上述の方法のそれぞれにおいて、哺乳動物は、本明細書において開示される疾患または障害のいずれかを有するものであり得る。好ましい態様において、対象はヒトである。

【0085】

処置を「必要とする」哺乳動物は、以下を含み得るが、これらに限定されない：神経変性障害、TBI、SCI、免疫学的障害を有する哺乳動物、免疫学的障害を有していたことのある哺乳動物、または免疫学的障害の症状を有する哺乳動物または炎症性障害もしくは疾患を有する哺乳動物。例示的な障害は、本明細書において開示されている。

40

【0086】

作用物質の、たとえば薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的もしくは予防的結果を達成するために、またはある特定の定められた目的を達成するために必要な投薬量および期間において、有効な量を指す。「有効量」は、実験によって決定され得、かつ、規定された目的に関連する、公知の手法によっても決定され得る。

【0087】

「単離する」または「単離」との用語は、細胞培養物かまたは生物学的試料からの、細

50

胞かまたは細胞集団の、物理的な同定、および単離の両方を指す。単離は、細胞培養物の調査に基づくもの、ならびに基準に合致する細胞の特徴付け（および、可能であって望ましい場合には、物理的な分離）に基づくものか、または、たとえば、抗原の存在／非存在、ならびに／もしくは細胞サイズなどの特徴による、細胞の自動ソーティング（たとえばFACSなどによる）に基づくもののいずれかの、適した細胞生物学的技術を適用することによって、実施することができる。いくつかの態様において、「単離する」または「単離」との用語は、特にフローサイトメトリーを実施することによる、細胞の物理的な分離、および／または定量の、さらなる段階を含み得る。物理的な分離はまた、特定の特徴の細胞または細胞集団の富化を含む。「単離された」細胞または「単離された」細胞集団とは、上述のように同定および／または分離された、細胞または細胞集団である。

【0088】

「細胞集団」または「細胞の集団」との用語は、一般的には、細胞の群を指す。別途指定されない限り、該用語は、本明細書において定義される細胞から本質的になる細胞群か、または該細胞を含む細胞群を指す。細胞集団は、共通の表現型を有する細胞から本質的になり得、または共通の表現型を有する細胞の画分を少なくとも含み得る。1つまたは複数の実証可能な特徴において、細胞が実質的に同様または同一である場合、細胞は共通の表現型を有する、と言われ、ここで該特徴は以下を含むが、これらに限定されない：形態上の外観、特定の細胞成分もしくは産物（たとえば、RNAもしくはタンパク質）の発現レベル、特定の生化学経路の活性、増殖能力および／もしくは増殖キネティクス、分化の潜在能力および／もしくは分化シグナルへの応答、またはインビトロ培養の間の挙動。したがって、そのような実証可能な特徴によって、細胞集団、またはその画分を定義し得る。細胞集団は、実質的に大多数の細胞が共通の表現型を有する場合に、「実質的に均一」であり得る。「実質的に均一」な細胞集団は、少なくとも60%の、たとえば、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはさらに、少なくとも99%の、共通の表現型を有する細胞を含み得、これはたとえば、B細胞（たとえば、B_{reg}細胞）に特異的な表現型などである。さらに、集団中に存在する任意の他の細胞が、細胞集団の全体的な特性を変化させないか、または該特性に対して実体的な影響を有さず、かつしたがって、該細胞集団を細胞株として定義可能である場合、細胞集団は、共通の表現型を、たとえば、B細胞（たとえば、B_{reg}細胞）の表現型などを有する細胞から本質的になるものであり得る。したがって、単離された細胞集団（または、たとえば単離されたB細胞）は、典型的には、少なくとも60%の、もしくは60%～99%の、もしくは70%～90%の、B細胞（またはB細胞のサブ集団、たとえばB_{reg}細胞など）を含む。

【0089】

B細胞の採取および単離

Bリンパ球としても知られるB細胞の、任意の供給源が、採取目的のために使用され得る。当業者に公知であるように、そのようなB細胞は、骨髓、脾臓、リンパ節、血液、または、B細胞の供給源である他の同種組織に由来し得る。B細胞の好ましい供給源は、骨髓および血液である。好ましくは、自家B細胞か、または同種B細胞か、または異種B細胞が採取される。

【0090】

無菌技術を用いて、1つの態様において骨髓は、好ましくは上後腸骨（posterior superior ilium）から入手される。得られたB細胞は、単離および相対的な精製の後、すぐに使用され得、その後の使用のために保管され得、または使用前のある期間にわたり、培養され得る。骨髓中のB細胞集団は、プレプロB細胞、プロB細胞、プレB細胞、未成熟B細胞、およびいくつかの成熟B細胞を含む。

【0091】

本出願において、B細胞との用語は、プレプロB細胞、プロB細胞、プレB細胞、未成熟B細胞、および成熟B細胞を包含する。当業者に公知の標準的な技術を用いて、血液または他の組織からB細胞を単離することができる。

【0092】

不均一な細胞集団から、B細胞を、またはたとえば前駆B細胞を得る方法は、公知である。これらの技術の多くは、所望のB細胞または前駆B細胞の表面上の分子を認識する一次抗体を利用し、そして、これらの細胞を正に選択し、そして該細胞を不要の細胞から分離するために、該抗体を使用する。この技術は、正の選択として公知である。

【0093】

一般に利用される他の技術は、所望のB細胞または前駆B細胞から分離されようとする細胞の、表面上の分子を認識する一次抗体を使用する。この様式においては、該不要な細胞上の分子は、これらの抗血清に結合し、そして該細胞は、不均一な細胞集団から除去される。この技術は、負の選択として公知である。

【0094】

正のおよび負の選択技術の組み合わせは、B細胞の、または前駆B細胞の、比較的純粋な集団を得るために利用され得る。そのような集団は、単離されたB細胞と称される。本明細書において使用される場合、比較的純粋とは、少なくとも60%純粋、65%純粋、70%純粋、75%純粋、80%純粋、85%純粋、88%純粋、またはより高度な純度を、たとえば、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも97%純粋、もしくは少なくとも98%~99%純粋などを、意味する。

【0095】

細胞に結合した抗体を分離するための多数の技術が、当業者に利用可能である。抗体は、分離を容易にする標識またはタグを提供するさまざまな分子と、連結され得る。1つの態様において、一次抗体は、磁場において分離を可能にする磁気ビーズと、連結され得る。別の態様において、一次抗体は、蛍光活性化セルソーターにおいて分離を可能にする蛍光分子と、連結され得る。蛍光標識および磁気標識は、分離を達成するために、一次抗体および／または二次抗体において一般的に使用されている。一次抗体に結合する二次抗体は、蛍光活性化セルソーターにおいて細胞の分離を可能にする蛍光分子を用いて、標識され得る。あるいは、金属マイクロビーズが、一次抗体または二次抗体に連結され得る。この場合、磁石が、これらの抗体、および該抗体に結合した細胞を単離するために使用され得る。

【0096】

正のまたは負の選択を達成するために、不均一な細胞集団は、細胞表面上の抗原への抗体の結合を達成するのに十分な時間にわたり、一次抗体とインキュベートされる。一次抗体が標識されている場合には、分離はこの段階で行われ得る。二次抗体が利用される場合、その後二次（抗一次）抗体は、一次抗体への二次抗体の結合を達成するのに十分な時間にわたり、一次抗体に結合した細胞とインキュベートされる。二次抗体が蛍光標識を有する場合、その後細胞は、所望の細胞に結合した、標識された抗血清を単離するために、蛍光活性化セルソーターに送られる。二次抗体が磁気標識を有する場合、その後、一次抗体を有する選択された細胞と、二次抗体で標識されたマイクロビーズは複合体を形成し、磁石を適用した際に該複合体は残され、一方で他の未標識の細胞は、細胞培地とともに除去される。その後、正に標識された細胞は溶出され、そしてさらなる処理が可能な状態となる。負の選択は、磁場を通過した、未標識の細胞の収集である。

【0097】

Miltenyi Biotecは、B細胞、および異なるB細胞サブセットを直接的に磁気分離するための、多数の製品を開発している。B細胞は、密度勾配遠心分離や赤血球溶解を行うこと無しに、全血もしくはパフィーコートから直接か、または密度勾配遠心分離後に末梢血単核細胞（PBMC）からの、いずれかで単離することができる。正の選択および枯渇戦略は両方とも、B細胞の直接単離のために、および標準的な方法によるB細胞の単離のために、進めることができる。

【0098】

したがって、実用的な態様において、患者、および潜在的ドナーは、たとえば米国赤十字社（American Red Cross）によって、HLA（A、B、およびDR-B1）について試験される。レシピエントに対してハプロ一致であることが見出された潜在的ドナーは、同種ド

10

20

30

40

50

ナーとして有効である。ドナーはその後、B細胞を分離および採取するためにアフエレーシスを受ける。その後、注入のためのB細胞産物が調製される。

【0099】

ドナーの同種単核細胞細胞 - MNC (A)を受領したら、アフエレーシス産物は、Miltenyi BiotecのCliniMACS（登録商標）CD19選択を用いて、B細胞について富化される。血小板を洗浄除去した後、産物（CD19 CliniMACS試薬のバイアル1本につき、最大で 4×10^{10} 個の総数の細胞であって、かつ最大で 5×10^9 個のCD19+細胞）は、CD19+細胞の富化のため、LSカラムで分離されたCD19マイクロビーズを用いて処理される。標的画分は洗浄され、そしてその後、注入媒体は、25% HSAを添加された（最終濃度は1%）Plasma-Lyte Aとなる。

10

【0100】

方法は、一般的には以下を含む：

第1日

a. ドナーのアフエレーシス産物が受領され、そして無菌性判定、細胞の計数、生存性判定、およびフローサイトメトリーのためにサンプリングされる。

b. 産物は、低温で一晩保管される。

第2日

a. 産物は、冷却装置から取り出され、十分に攪拌され、そして周囲の温度と平衡化するため30分間放置される。試料は、無菌性判定、細胞の計数、生存性判定、およびフローサイトメトリー（CD20を有するDuraCloneパネル）のために取り出される。

20

b. 標準的なCliniMacs手順にしたがって、血小板の洗浄除去が実施される。

c. ビーズが添加され、そしてインキュベーションが4度で実施される点を除いて標準的なCliniMacs手順にしたがって、振とう機上で30分間インキュベートされる。

d. ビーズとのインキュベーション後、冷却された（4度）媒体を用いて、1回の抗体洗浄が実施され、そして産物は、標準的なCliniMacs手順にしたがって、CliniMacs LSカラムにロードされる：

e. CliniMacsエンリッチメント1.1プログラムを用いて、分離が実施される。

f. CD19が富化された標的画分は、細胞の計数、フローサイトメトリー、安定性判定、および無菌性判定のためにサンプリングされる。

g. CD19が枯渇した（非標的画分）は、細胞の計数およびフローサイトメトリーのためにサンプリングされる。

30

【0101】

不均一な細胞集団からの、および幹細胞集団からの、B細胞の単離はまた、低張の緩衝液中に骨髓を入れることにより、骨髓において赤血球溶解を最初に行い、そして緩衝液から赤血球を遠心分離するという、負の選択プロセスを伴い得る。赤血球の破片は上清に残り、該上清は試験管から除去される。骨髓に由来する細胞はその後、抗体の結合のために適切な条件を有する緩衝液中に、再懸濁される。あるいは、骨髓について密度勾配遠心分離を実施することもできる。骨髓に由来する細胞を含むバフィーコート層は、遠心分離後に勾配から取り出される。細胞は、洗浄され、そして抗体結合緩衝液中に再懸濁され、そしてその後、幹細胞、T細胞、顆粒球、および単球／マクロファージを指向する一次抗体とインキュベートされ（系列の枯渇（lineage depletion）と呼ばれる）、その後、B細胞に対する抗体を用いる正の選択が続く。

40

【0102】

B細胞の異なるサブ集団は、さまざまな表面マーカーの、差異のある発現に基づいて区別することができ、そしてそれにしたがって収集することができる。

【0103】

エキスピボでのB細胞の刺激

単離されたら、本明細書に記載されるようなTLRアゴニストかもしくは免疫調節性サイトカインの1種または複数種へと、B細胞を曝露することによって、該B細胞は処理または刺激され得る。そのようなエキスピボでの刺激を用いる、IL-10産生Breg細胞の産生は、

50

本明細書に記載される方法および治療戦略に有用である。

【0104】

投与

投与される細胞の数は、処置される患部の面積または体積に関連し得、かつ送達方法に関連し得る。

【0105】

投与のためのB細胞の数の、非限定的な範囲の1つは、 $10^4 \sim 10^{14}$ 個のB細胞であり、これは処置される組織または器官の体積によって変わる。他の範囲は、 $10^5 \sim 10^{12}$ 個のB細胞、および $10^6 \sim 10^{10}$ 個のB細胞を含む。B細胞（たとえば B_{reg} 細胞）を含む薬学的組成物は、一回量において、 $10^4 \sim 10^{14}$ 個のB細胞、 $10^5 \sim 10^{12}$ 個のB細胞、または $10^6 \sim 10^{10}$ 個のB細胞を含み得る。

10

【0106】

個々の注入量は、 $1 \mu\text{l} \sim 1000 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{l} \sim 500 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{l} \sim 250 \mu\text{l}$ 、または $20 \mu\text{l} \sim 150 \mu\text{l}$ という、非限定的な範囲を含み得る。1動物あたりの総注入量は、 $10 \mu\text{l} \sim 10 \text{ ml}$ の範囲にわたり、これは、種、送達の方法、および処置される組織または器官の体積によって変わる。

【0107】

薬学的組成物

本明細書に記載されるB細胞は、患者への、たとえば本明細書に記載される疾患または異常を有するヒト患者などへの投与のために、ビヒクル中に組み込まれ得る。B細胞を含む薬学的組成物は、当技術分野において公知の手法を用いて調製することができる。たとえば、そのような組成物は、たとえば、生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤（Remington: The Science and Practice of Pharmacology 22nd edition, Allen, L. Ed. (2013)；参照により本明細書に組み入れられる）を用いて、かつ所望の形態において、たとえば水溶液の形態において、調製され得る。

20

【0108】

本明細書に記載されるB細胞は、生理学的に適合性である任意の担体中において投与され得、これはたとえば、緩衝生理食塩水か、または1種もしくは複数種の電解質（たとえば、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、グルコン酸ナトリウム、もしくは酢酸ナトリウム三水和物のうちの1種もしくは複数種）を含む溶液などである。たとえば、B細胞は、PlasmaLyte注入緩衝液中において投与され得る。PlasmaLyteは、複数の異なる調合物を有している、調整晶質液の一群であり、地域の臨床上の慣行および優先傾向に応じて、世界中で利用可能である。これは、その電解質の含有量、浸透圧、およびpHにおいて、ヒト血漿を厳密に再現している。PlasmaLyte溶液はまた、追加の緩衝能を有し、かつアニオンを、たとえば、重炭酸塩、 CO_2 、および水に変換される、酢酸塩、グルコン酸塩、ならびに特に乳酸塩などを含む。PlasmaLyteの利点は、体積および電解質の不足の補正を含み、その一方でアシドーシスに対応している点である。好ましい態様において、注入緩衝液はPlasmaLyte Aである。PlasmaLyte Aは、注入（たとえば静脈内）投与用の、無菌でピロジェン非含有の等張液である。100 mLのPlasmaLyte Aはそれぞれ、以下を含む：526 mgの塩化ナトリウム（NaCl）；502 mgのグルコン酸ナトリウム（ $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NaO}_7$ ）；368 mgの酢酸ナトリウム三水和物（ $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ）；37 mgの塩化カリウム（KCl）；および30 mgの塩化マグネシウム（ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）。これは、抗微生物剤を含まない。pHは、水酸化ナトリウムを用いて調整される。pHは、約7.4（たとえば6.5～8.0）である。

30

40

【0109】

他の薬学的に許容される担体および希釈剤は、生理食塩水、緩衝水溶液、溶媒、および／または分散媒を含む。そのような担体および希釈剤の使用は、当技術分野において周知である。他の例は、液体の媒体を含み、これはたとえば、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、滅菌生理食塩水、滅菌リン酸緩衝生理食塩水、ライボビッツ培地（Leibovitz's medium）（L15, Invitrogen, Carlsbad, Calif.）、デキストロース滅菌水溶液、およ

50

び任意の他の生理学的に許容される液体である。

【0110】

分散剤もまた、グリセロール、液体のポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中において、ならびに油中において、調製され得る。担体は、溶媒または分散媒であり得、これらはたとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコール等）、それらの適切な混合物、および／またはならびに植物油を含む。適切な流動性は、たとえば、コーティング剤、たとえばレシチンなどの使用によって、分散剤の場合には必要とされる粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤の使用によって、維持され得る。多くの場合、等張剤を含有させることが好ましい可能性があり、これはたとえば、糖または塩化ナトリウムである。溶液は、好ましくは無菌であり、かつ易通針性が存在する範囲で流体である。好ましくは、溶液は、製造および保管の条件下で安定であり、かつたとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等の使用によって、微生物の、たとえば細菌および真菌類などの混入作用から保護される。本発明の溶液は、薬学的に許容される担体または希釈剤、および必要に応じて、上に列挙された他の成分を用いて調製され得、その次に濾過滅菌が続き、そしてその後、本明細書に記載されるB細胞が組み込まれる。

10

【0111】

たとえば、本明細書に記載される薬学的組成物を含む溶液は、適切に緩衝されてよく、かつ必要であれば液体の希釈剤は、最初に、十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張とされる。これらの特定の水溶液は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、および腹腔内投与に、特に適している。これに関連して、本開示に関して利用可能な無菌の水性媒体は、当業者に公知である。いずれにしても、投与の担当者は、個々の対象にとって適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与に関して、調製物は、FDA当局の生物学的製剤の基準において要求される、無菌性、パイロジェン規定、一般的安全性、および純度の基準を満たし得る。

20

【0112】

薬学的組成物はまた、細胞膜の安定性を増進する賦形剤をも含み得る。注入媒体には、たとえば、高溶解性の浸透圧調節タンパク質が、たとえば、高分子量を有する、高溶解性の浸透圧調節タンパク質などが、添加され得る。細胞膜の安定性を維持するための媒体サプリメントとして、血清タンパク質を、たとえばヒト血清アルブミン（HSA）などを、本明細書に記載される薬学的組成物中に含有させてよい。HSAは組み換えアルブミンを含む。代わりに、ヒト血清が、細胞を含む薬学的組成物を安定化させるために使用され得る。

30

【実施例】

【0113】

本発明は、以下の実施例においてさらに詳細に説明されるが、実施例は、特許請求の範囲に記載される発明の範囲を限定することを意図するものではない。添付の図面は、本明細書を構成する不可分の要素として、かつ本発明の説明としてみなされることを意図する。引用されるすべての参考文献は、それらに記載される全体に関して、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。以下の実施例は、例示のために提供するものであるが、特許請求の範囲に記載される発明を限定するために提供するものではない。

40

【0114】

実施例1：外来B細胞は、免疫浸潤および応答を調節する

この実施例は、アイソバリック標識多重化プロテオミクスを用いた、創傷治癒に対するB細胞の分子レベルでの効果の、大規模な解析を示す。

【0115】

本発明者らのデータは、B細胞の適用は、創の微小環境に対する有意なホメオスタティック効果を有しており、炎症性応答に関連するタンパク質の大幅な減少、および組織の増殖およびリモデリングに関連するタンパク質の増加を伴うことを示した。適用された外来B細胞を、適用後のさまざまなタイムポイントで創ニッチから回収し、そして多色フロー

50

サイトメトリーを用いて細胞集団を検査することにより、本発明者らは、創に適用された成熟ナイーブB細胞が、CD138の発現、ならびに免疫制御性サイトカインであるIL-10、IL-35、およびTGF- β によって特徴付けられる、制御性表現型へと移行することを決定した。このBreg様の表現型は一過性に出現し、適用の2日後におけるピークを有していた。さらに、創の環境における単球およびマクロファージの表現型は、B細胞適用の結果として顕著に変化し、IL-2、IL-4、IL-6、およびIFN- γ を含む、炎症誘発性サイトカインの発現の減少を伴っていた。したがって、損傷部位に配置されたナイーブB細胞は、TLR依存性経路およびB細胞受容体（BCR）依存性経路によって、現地の、炎症性シグナルおよびダメージ関連分子パターン（DAMP）を検出し、そして抗炎症性サイトカインの、好ましくはIL-10であるが、IL-4、IL-35、およびTGF- β であってもよい抗炎症性サイトカインの産生に関連する、制御性表現型をとり、これは、近接する免疫細胞および線維芽細胞に作用して、そしてそれらの表現型を、抗炎症性で再生促進性のものに偏らせる。実際、創傷治癒試験は、共通のTLRシグナル伝達アダプターであるミエロイド系分化因子88（MyD88）を欠損した、またはIL-10を欠損したB細胞は、その再生促進能力を失うことを示した。

【0116】

材料および方法

以下の材料および方法が、この試験に利用された。

【0117】

動物

創傷治癒試験は、7～9週齢の雄の野生型C57Bl6/Jマウス（Jackson Laboratories）において実施された。雄のWT C57Bl6/Jは、B細胞単離のためのアイソジェニックなドナーとして使用された。動物は、実験室での標準的な管理条件下で、20～23度の範囲の温度、12時間：12時間の明：暗周期において、餌および酸性化水を自由にとれるようにして維持された。すべての動物の取り扱い、実験動物の人的管理に関する公衆衛生局の規範（Public Health Service Policy on Humane Care of Laboratory Animals）にしたがって実施され、かつマサチューセッツ総合病院（Massachusetts General Hospital）の施設内動物実験委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）によって承認を受けた。使用する動物の数を減少させるための、および動物の苦痛を最小限にするための、あらゆる取り組みがなされた。

【0118】

細胞の単離

マウスの脾臓は、氷冷EasySep（商標）緩衝液（STEMCELL Technologies）中に採取され、該緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に2% ウシ胎児血清（FBS）および1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含んでいた。脾臓は、40 μ mのセルストレーナーを通過させて機械的に解離させ、そして脾細胞懸濁液は、市販の細胞単離キット（STEMCELL Technologies）を製造者の使用説明書にしたがって用いた免疫磁気分離により、B細胞またはT細胞の負の選択に関して処理された。

【0119】

創傷モデル、および組織サンプリング

背部皮膚を通る全層切除創が、以前に記述されたように作製された（Wang et al. (2013) Nat Protoc. 8(2):302-9.）。手短に述べると、マウスは、ケタミン（100 mg/kg）およびキシラジン（10 mg/kg）の混合物を用いて麻酔され、そして背部皮膚は、剃毛および除毛された。鎮痛は、皮下注入された0.08 mg/kg ブプレノルフィンを用いて、術前に施された。背部皮膚を広げ、そして5 mmのバイオブシーパンチを折り曲げた皮膚に貫通させて、背中の両側に、2つの対称な創を作製した。それぞれの創は、およそ20 mm²の当初面積を有していた。7 mmの内径を有するシリコンスプリント（Sigma-Aldrich）が、Vetbond組織接着剤（3M）を用いて、創の周囲に取り付けられた。スプリントが取り付けられた創はその後、Tegaderm（商標）透明被覆材（3M）を用いて覆われた。細胞懸濁液含有PBSか、または等量のPBS溶液単独（生理食塩水対照）は、手動ピペットを用

いて、創面に直接的に適用された。各マウスはまた、背部皮膚の下に、等用量のB細胞または生理食塩水を用いた2か所の局所皮下注入を受けた。処置を受けた、創および皮下部位のそれぞれは、 $15 \sim 20 \times 10^6$ 個のB細胞含有20 μ l PBSの投与を受けた。

【0120】

18時間、2日、または4日という規定の期間後に、3% イソフルラン混合O₂を用いてマウスは軽麻酔され、そして細胞内でのサイトカインの蓄積を促進するために、プレフェルジンA (GolgiPlug (商標)、BD Pharmingen) 含有PBSの、10~20 μ lの作業溶液が、処置を受けた創および皮下部位のそれぞれに適用された。4時間のインキュベーション後、マウスを安楽死させ、そして創、および皮下注入部位を含む、組織バイオプシーが採取された。組織バイオプシーは、以下を含むRPMI培地中において、30分間にわたり37度でゆるやかに振とうしながら、酵素により解離させた：5% FBS、0.5% L-グルタミン、0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン、1.5 mg/ml、0.25 U/mg コラゲナーゼD (Roche)、1.5 mg/ml、 > 400 U/mg ウシ精巢由来ヒアルロニダーゼ (Millipore Sigma)、0.4 mg/ml、400 U/mg DNAアーゼI (Roche)、0.025 mg/ml、 > 10 U/mg ディスパーゼI (Millipore Sigma)。組織はその後、より小さな断片へと機械的に細断され、その後に、同じ溶液中においてさらなる30分間にわたり37度でゆるやかに振とうしながら、酵素によるさらなる解離が続いた。個々の創および皮下試料由来の、消化された組織はその後、各マウスごとにプールされ、そして100 μ mのセルストレーナー、それに続いて40 μ mのセルストレーナーを通過させて、単一細胞懸濁液を得た。

【0121】

プロテオミクス

組織のサンプリング。全層切除創は、上述のように、マウスの背部皮膚に作製された。20 μ lの生理食塩水中に懸濁された 2×10^6 個の細胞とした、精製B細胞の溶液か、または生理食塩水対照のいずれかで、創は処置された。0日（およそ10分）、1日、4日、および10日という規定の期間後に、マウス（条件1つにつき、 $n = 3 \sim 5$ 匹）を安楽死させ、そして創縁および皮下層を含む創領域が切除され、そして液体窒素中で急速凍結され、その後、溶解まで-80度で保管された。

【0122】

タンパク質消化、およびタンデムマスタグ (TMT) 標識。試料の処理は、以前に記述されたように実施された (Lapek et al. (2017) Nat Biotechnol. 35(10):983-989)。細胞溶解物のタンパク質濃度は、BCAアッセイ (Thermo Scientific) を用いて決定された。タンパク質はその後、以前に記述されたように、DTTを用いて還元され、そしてヨードアセトアミドを用いてアルキル化された。還元されそしてアルキル化されたタンパク質は、メタノール・クロロホルム沈殿によって沈殿させた。沈殿させたタンパク質は、300 μ Lの、1 M尿素含有50 mM HEPES、pH 8.5において再構成させた。ボルテックス、超音波処理、および手動での破碎が、可溶度を高めるために使用された。3 μ gのLys-C (Wako) を用いる室温での一晩の消化で開始され、その後に3 μ gのトリプシン (配列決定グレード、Promega) を用いる37度での6時間の消化が続くという、2段階のプロセスにおいて、可溶化されたタンパク質は消化された。消化物は、トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて酸性化された。消化されたペプチドは、C18固相抽出 (SPE) (Sep-Pak, Waters) を用いて脱塩された。脱塩されたペプチド溶液の濃度は、BCAアッセイを用いて測定され、そしてペプチドは、50 μ gのアリコートとして真空乾燥されて、それらがTMT試薬を用いて標識されるまで、-80度において保管された。TMT試薬 (Thermo Scientific) は、20 μ g/ μ Lの濃度で、脱水アセトニトリル (ACN) 中に懸濁された。乾燥させたペプチド (50 μ g) は、30% ACN含有200 mM HEPES、pH 8.5中に再懸濁され、そして5 μ Lの適切なTMT試薬が、試料に添加された。ペプチドは、1時間にわたり室温で、試薬とインキュベートされた。標識反応は、6 μ Lの5% ヒドロキシルアミンを添加することにより、終了させた。標識された試料はその後、50 μ Lの1% TFAを添加することにより酸性化され、そしてペプチド混合物は、ten-plex TMT試料としてプールされた。プールされた試料は、上述のようにSep-PakカートリッジにおけるC18 SPEにより脱塩された。

【0123】

塩基性pH逆相液体クロマトグラフィー (bRPLC) による試料の分画。試料の分画はbRPLC39によって実施され、そして画分は、質量分析法による分析のため、プールされた。手短に述べると、試料は、5% ギ酸および5% ACN含有溶液中に再懸濁され、そして、フラクションコレクター、デガッサー、および可変波長検出器が取り付けられたAgilent 1260 HPLCシステムにおいて、4.6 mm x 250 mmのZORBAX Extend C18カラム (5 μ m, 80 Å, Agilent Technologies) を通して分離された。分離は、60分間、0.5 mL/分の流速で、22%から35%へと増す勾配のACNを含有する10 mM 重炭酸アンモニウムを適用することによって、実施された。全96個の画分は、以前に記述されたように組み合わせられた (Edwards et al. (2016) *Methods Mol Biol.* 1394:1-13)。組み合わせられた画分は、真空乾燥され、5% ギ酸および5% ACNの溶液を用いて再構成され、そしてその後、同定および定量のため、LC-MS2/MS3によって分析された。

10

【0124】

質量分析と連結させた液体クロマトグラフィー。すべてのLC-MS2/MS3実験は、冷却オートサンプラーを有するEasy-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) と連結された、Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific) において実施された。ペプチドは、自社で引き伸ばされ、自社で充填されたマイクロキャピラリーカラム (内径100 μ m; 外径360 μ m) において分離された。カラムには、最初に約0.5 cmのMagic C4樹脂 (5 μ m, 100 Å, Michrom Bioresources) が充填され、それに続いて約0.5 cmのMaccel C18 AQ樹脂 (3 μ m, 200 Å; Nest Group) が充填され、そしてその後、最終的に30 cmの長さまで、GP-C18 (1.8 μ m, 120 Å; Sepax Technologies) が充填された。ペプチドは、カラムを60度に加熱しながら、165分間にわたり、300 nL/分の流速で、11%から30%への直線勾配のACNを含有する0.125% ギ酸を用いて溶出された。エレクトロスプレーイオン化は、マイクロキャピラリーカラムの入口において、PEEK Tジャンクションを経由して1,800 Vを印加することによって達成された。

20

【0125】

Orbitrap Fusionはデータ依存性モードで操作され、これは、Orbitrapにおいて、500~1,200のm/zレンジにわたり、 6×10^4 の分解能において実施されるサーベイスキャンを有していた。MS1サーベイスキャンに関し、自動ゲインコントロール (AGC) は 5×10^5 にセットされ、最大インジェクション時間は100ミリ秒にセットされ、かつS-レンズの高周波 (RF) 設定は60であった。サーベイスキャンにおいて検出された、最も多いイオンは、「トップスピード」設定を用いたMS2およびMS3実験の対象とされ、該設定は、別のサーベiful MSスキャンを用いて次のサイクルが開始される前に、5秒の実験サイクルにおいて最大数のスペクトルを取得することを可能にする。MS2分析に関し、荷電状態およびm/zレンジに基づいて選択されたプリカーサーを用いる、決定木オプションが利用可能であった。3個イオンおよび4個イオンを500~1,200のm/zレンジにおいて検出しなければならなかったため、2個イオンは600~1,200のm/zレンジから選択された。イオン強度の閾値は、 5×10^5 にセットされた。MS2スペクトルを取得する場合、イオンは、四重極を用いて0.5 m/zのウィンドウを適用することによって単離され、そして30%の正規化衝突エネルギー (normalized collision energy) において衝突誘起解離 (CID) を用いてフラグメント化された。フラグメントイオンは、高速スキャン速度で、イオントラップにおいて検出された。AGCターゲットは 1×10^4 にセットされ、かつイオンの最大インジェクション時間は35ミリ秒にセットされた。

30

40

【0126】

TMTレポーターイオンの定量のための感度を最大にすることを可能にする、同時プリカーサー選択 (synchronous precursor selection) (MultiNotch MS3) を用いて、MS3分析は実施された。最大で10個のMS2プリカーサーが同時に単離され、そしてMS3分析のためにフラグメント化された。単離ウィンドウは2.5 m/zにセットされ、そしてフラグメント化は、50%の正規化衝突エネルギーにおいて、HCDによって実施された。MS3スペクトル中のフラグメントイオンは、Orbitrapにおいて、60,000の分解能、 ≥ 110 のm/

50

zで検出された。AGCターゲットはイオン 5×10^4 個にセットされ、かつイオンの最大インジェクション時間は250ミリ秒にセットされた。MS2スペクトル中のフラグメントイオンであって、プリカーサーのm/zを40 m/z下回るm/zを有するもの、および15 m/z上回るm/zを有するものは、MS3分析のための選択から除外された。

【0127】

データ処理および分析。データは、自社開発したソフトウェアスイート (Huttlin et al. (2010) Cell. 143(7):1174-89) を用いて処理された。RAWファイルは、ReAdW.exe (http://www.ionsource.com/functional_reviews/readw/t2x_update_readw.htm) の改変バージョンを用いて、mzXMLフォーマットへと変換された。MS2データのスペクトル帰属は、トリプシン等の既知の混入物を含む、マウスのタンパク質配列のUniprotデータベースを検索するための、Sequestアルゴリズムを用いてなされた。

【0128】

データベースは、逆順である全タンパク質配列からなる、デコイデータベースを含んでいた。検索は、50 p.p.m.のプリカーサーマストレランスを用いて実施された。静的な修飾は、リジン残基およびペプチドN末端におけるten-plex TMTタグ (+229.162932 Da)、ならびにシステインのカルバミドメチル化 (+57.02146 Da) を含んでいた。メチオニンの酸化 (+15.99492 Da) は、可変の修飾 (variable modification) として含有させた。ターゲット・デコイ検索戦略を用いて、ペプチドおよびタンパク質の〈1%の偽発見率 (FDR) に対して、データはフィルタリングされた (Elias et al. (2010) Methods Mol Biol 604: 55-71) 。これは、ペプチドおよびスペクトルの以下の特性から組み合わせられたスコアを用いて、ペプチドのアノテーション (ペプチドースペクトルマッチ) をフィルタリングするために、線形判別分析を最初に適用することによって達成された: XCorr、 ΔCn 、トリプシンでの未切断、ペプチドの質量精度、およびペプチドの長さ。ペプチドースペクトルマッチが正確である確率は、事後誤差ヒストグラムを用いて算定され、1つの特定のタンパク質に帰属したすべてのペプチドの確率は、乗算によって組み合わせられ、そして、分析された試料のすべてにわたって同定された全タンパク質の全データセットについて、タンパク質帰属の〈1%のFDRに対して、データセットは再フィルタリングされた。1個より多いタンパク質にマッチしたペプチドは、節約の法則にしたがって、マッチした冗長ペプチド配列のうちの最大数を含むタンパク質に帰属させた。

【0129】

定量分析に関し、各レポーターイオンについて、予測されたm/z値を中心に置いた0.003 m/zのウィンドウ内で、最も強度の高いイオンを選択することによって、TMTレポーターイオンの強度はMS3スペクトルから抽出され、そしてシグナル対ノイズ (S/N) 値は、RAWファイルから抽出された。すべてのレポーターイオンのS/N値の合計が ≥ 386 であって、かつプリカーサーイオンについて単離の特異性が ≥ 0.75 であった場合に、スペクトルは定量に使用された。1つのタンパク質に帰属するすべてのペプチドについてのTMTレポーターイオンを合計することによって、タンパク質の強度は算定された。

【0130】

フローサイトメトリー

組織消化物から回収された後の細胞生存性を評価するため、細胞懸濁液は洗浄され、そしてPBS中に再懸濁され、そしてZombie UV固定可能生存性キット (Zombie UV fixable viability kit) (Biolegend, Inc.) を用いて、暗所で30分間にわたり4度でゆるやかに振とうしながら染色された。染色された細胞はその後洗浄され、そして暗所で10分間にわたり4度で、以下を含むPBSに再懸濁された: 1% FBS、0.01% アジ化ナトリウム (RICA Chemical, Arlington, TX)、および5% FcRブロッキング試薬 (Miltenyi Biotec, Inc)。ブロッキングされた細胞は、以下のフルオロフォアコンジュゲート一次表面抗体と、4度で30分間、暗所でインキュベートされた: ブリリアントバイオレット785コンジュゲートラット抗マウスCD19 (クローン6D5)、Alexa Fluor (登録商標) 700コンジュゲートラット抗マウス/ヒトCD45R/B220 (クローンRA3-6B2)、APC/Cy7コンジュゲートラット抗マウスCD138 (クローン281-2) (以上はすべてBiolegend Inc.より)、

ブリリアントウルトラバイオレット395コンジュゲートハムスター抗マウスCD69（クローンH1.2F3）、PE-CF594コンジュゲートラット抗マウスCD140a（クローンAPA5）（以上2つはいずれもBD Biosciences, San Jose, CAより）。表面染色された細胞は洗浄され、そして固定緩衝液（Biolegend, Inc.）中へと、30分間にわたり4度で再懸濁され、それに続いて透徹洗浄緩衝液（1X）（Biolegend, Inc.）中へと再懸濁された。透徹された細胞はその後、以下のフルオロフォアコンジュゲート一次細胞内抗体と、4度で30分間、暗所でインキュベートされた：ブリリアントバイオレット421コンジュゲートマウス抗マウスTGF- β 1（クローンTW7-16B4）、ブリリアントバイオレット510コンジュゲートラット抗マウスIFN- γ （クローンXMG1.2）、ブリリアントバイオレット605コンジュゲートラット抗マウスIL-4（クローン11B11）、ブリリアントバイオレット711コンジュゲートラット抗マウスTNF- α （クローンMP6-XT22）、PerCP/Cy5.5コンジュゲートラット抗マウスIL-2（クローンJES6-5H4）、PE/Cy7コンジュゲートラット抗マウスIL-10（クローンJES5-16E3）、APCコンジュゲートラット抗マウスIL-6（クローンMP5-20F3）（以上はすべてBiolegend, Inc.より）、フルオレセインコンジュゲートラット抗マウスIFN- β （クローンRMMB-1）、PEコンジュゲートラット抗マウスIL-27/IL-35 EBI3サブユニット（クローン355022）（以上2つはいずれもR&D Systems, Minneapolis, MNより）。BD FACSDIVA（商標）ソフトウェアを備え、かつ355 nm、405 nm、488 nm、561 nm、および640 nmのレーザーを備えるLSRFortessa X-20フローサイトメーター（BD Biosciences, San Jose, CA）において、細胞は解析された。少なくとも100,000個のイベントが、解析のために各試料から収集された。データは、FlowJoソフトウェア、バージョン10.3（TreeStar, Inc., Ashland, OR）を用いて解析された。

【0131】

免疫組織化学

損傷の0日後（インタクト）、1日後、4日後、10日後、および16日後に採取された創バイオプシーは、4% 緩衝パラホルムアルデヒド中において、24~48時間にわたり4度で固定され、その後1M スクロース溶液中で、さらに24~48時間にわたり4度で凍結保護処理され、そして組織凍結メディウム（tissue freezing medium）（Electron Microscopy Sciences）中に包埋された。創面を通る横断切片は、クリオスタット（Leica Biosystems）を用いて10 μ mの厚さで切断され、そしてSuperFrost Plus Goldスライド（Fisher Scientific）上に解凍マウント（thaw-mount）された。抗原の免疫組織化学的検出のため、切片は、トリス緩衝生理食塩水（TBS）、pH 7.4を3回交換することによって洗浄され、その後透徹され、そして、5% ウシ血清アルブミン、5% FBS、および0.3% トリトンX-100を含むTBSを用いて、室温で1時間インキュベーションすることにより、ブロッキングされた。切片はその後、ブロッキング溶液中で希釈された以下の一次抗体と、4度で一晩インキュベートされた：APCコンジュゲートラット抗マウスCD45R/B220（クローンRA3-6B2; BioLegend, Inc.）、PEコンジュゲートラット抗マウスCD31（クローンMEC 13.3; BD Biosciences）、Alexa Fluor（登録商標）488コンジュゲートマウス抗チューブリン β 3（クローンTUJ1; BioLegend, Inc.）、Alexa Fluor（登録商標）488コンジュゲートラット抗マウスF4/80（クローンBM8; BioLegend, Inc.）、PEコンジュゲートラット抗マウスCD11b（クローンM1/70; BioLegend, Inc.）、ウサギポリクローナル抗Ki67（Abcam）、およびウサギモノクローナル抗活性型カスパーゼ3（クローンC92-605; BD Pharmingen）。未結合の一次抗体は、TBS中で、それぞれ5分ずつ3回リンスすることによって除去された。コンジュゲート型でない一次抗体が使用された場合には、抗原性部位は、ブロッキング溶液中で1:200に希釈されたAlexa Fluor 488（登録商標）コンジュゲートF(ab')₂ヤギ抗ウサギIgG（Thermo Fisher Scientific）と、切片を2時間にわたり室温でインキュベートすることにより、可視化された。切片は、室温で3分間の、2 μ g/mlの4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩（DAPI; Sigma Aldrich）含有PBSとのインキュベーションによって、対比染色された。切片は、TBS中で7分間、3回洗浄され、そしてフルオロマウント（Novus Biologicals）を用いて包埋された。抗体対照は、組織切片とアイソタイプ抗体とのインキュベーション、および二次抗体が

10

20

30

40

50

可視化に使用された場合には一次抗体の省略を、含んでいた。対照試料においては、非特異的なシグナルは検出されなかった。染色された組織切片は、20x、40x、および63xの対物レンズを備えるZeiss LSM 710レーザー走査型顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いてイメージングされた。共焦点画像は、Zenソフトウェア (Carl Zeiss) を用いて、0.1~0.7 μm /ピクセルの解像度、および0.5~2.2 μm の光学的厚さにおいて取得された。

【0132】

組織学

創傷治癒の経時変化のエンドポイントにおける創バイオプシーは、10 mmのバイオプシーパンチを用いて採取され、そして4% パラホルムアルデヒド含有PBS中で24~48時間にわたり4度で固定されて、その後試料は、濃度勾配をつけたエタノールおよびキシレンでの洗浄によって脱水され、そしてパラフィン中に包埋された。創面を通る横断切片は、5 μm の厚さで切断され、そして顕微鏡スライド上にマウントされた。連続切片は、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色され、そしてコラーゲン繊維を可視化するためにマッソン・トリクローム染色法で染色された。染色されたスライドは、Aperio CS2スキャナー (Leica Biosystems) を用いて、0.25 μm /ピクセルの解像度でデジタル化された。デジタル化されたスライドは、処置条件について知らされていない実験者による、組織再生のスコア付けのために使用された。

【0133】

統計学

関心対象の細胞マーカーの発現に対する、B細胞適用の時間依存性の効果は、検査された細胞集団それぞれに分けて、SPSS 23 (IBM Corporation) における線形混合効果モデリングを用いて評価された。分散安定化のため、各試料および検査された各マーカーについての、ゲーティングされた細胞の割合は、解析の前に、ロジット (オッズの対数) 変換された。3元配置 (または、あてはまる場合には4元配置) 完全実施要因計画を用いて、生存時間 (18、45、または93時間)、環境 (創、皮下、またはB細胞のみ氷上)、マーカー、および、あてはまる場合には、条件 (B細胞での処置または生理食塩水) を固定因子として含有させた。技術的反復物 (technical replicate) (実施日) および生物学的反復物 (biological replicate) (マウス/試料ID) は、ランダム効果として含有させた。固定因子のレベル間の事後対比は、ダンーシダック法を用いて、多重比較に関して調整された。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 。

【0134】

結果

B細胞の適用は、創の分子微小環境において複雑な変化を引き起こす

創全体の溶解物のプロテオミクス解析により、全試料および全処置にわたって、最大で9125個のタンパク質が同定された。処理条件間であつてかつ全タイムポイントにわたる解析に関し、全試料 ($n =$ 動物30匹) 中に存在するタンパク質のみが検討された。これは、全部で3809個のタンパク質をもたらした (図12)。

【0135】

野生型マウス創傷モデルにおける、創傷治癒の主要なステージの平均継続期間の概略図が、図1Aに示される。B細胞の適用に応答して、発現が有意に変化したタンパク質における、経時的な発現ダイナミクスを集約したヒートマップは、図1Bに示される。B細胞での処置に関連して有意に変化したタンパク質 ($n = 111$; $p < 0.05$, 対応のないt検定)、および有意水準にかかわらず、各タイムポイントについて高い倍率変化を有するそのようなタンパク質 (上位20個の、上方制御または下方制御されたタンパク質) ($n = 112$) の集合体である、全213個のタンパク質は、創傷治癒に関するプロセスにしたがって分類された。ヒートマップは、損傷の0日後、1日後、4日後、10日後における、B細胞での処置後の発現の倍率変化を示す。赤色 = 上方制御; 緑色 = 下方制御。特に注目すべき点は、損傷の4日後における、炎症および炎症性細胞に関連する複数のタンパク質の下方制御、ならびに損傷の4~10日後における、細胞増殖、アポトーシス (細胞死) からのおよび酸化ストレスからの保護、ならびに組織リモデリング (毛包および筋肉の形成) に関連するタ

ンパク質の実質的な上方制御であった。

【0136】

機能的ファミリーごとのタンパク質の発現

生理食塩水で処置された創（対照、通常の創傷治癒）における、またはB細胞での処置後の創における、機能的ファミリーごとのタンパク質の、経時的な平均的発現は、図2A～2Hに示される。この解析は、タンパク質発現のインデューサーや阻害剤というよりは、ホメオスタティック作用物質としての、B細胞の全体的効果を示す。B細胞の適用は、損傷および治癒の過程で通常減少するかまたは増加するかいずれかであるタンパク質の発現を一定のレベルに維持すること、正常な治癒において観察される炎症ピークを有意に減少させること、抗アポトーシス因子（矢印）の減少および酸化ストレス保護物質の減少を防ぐこと、ならびに増殖を増大させることと関連しており（図2A～図2B）、抗酸化ストレス保護物質の低下および細胞増殖の低下を減少させること、ならびに細胞遊走を低レベルに維持することと関連しており（図2C～図2D）、リモデリングおよび二次皮膚構造に関連するタンパク質を一定のレベルに維持することと関連しており（図2E～図2F）、対照において損傷の初期に観察される、タンパク質分解およびオートファジーのレベルを減少させること、ならびに治癒の後期における血管新生および神経再生に関連するタンパク質のレベルを増加させることと関連していた（図2G～図2H）。

【0137】

皮膚の創試料において発現した、同定されたタンパク質の、教師なし階層クラスター分析は、図12に示される。すべての試料にわたって一貫して存在することが見出された、同定されたタンパク質のみを、分析に含有させた。B細胞で処置された創および生理食塩水で処置された創の両方で、損傷後の4つの異なるタイムポイント（列）において、全動物において一貫して発現した3809個のタンパク質（行）の、完全連結法を用いた階層クラスタリングは、図12Aに示される。擬似色スケールは、各タンパク質について、正規化され、対数変換された、発現の倍率変化の値を示す。デンドログラムは、この分析に由来する15個のタンパク質クラスターを示し、（図12A）における各セルの色は、それぞれのタイムポイントにおける、クラスターの発現の平均値に対応している。タンパク質は、経時的なその発現パターンによってクラスター化する。図12Bにおいて、全部で3809個のタンパク質を示す（図12A）からの、階層クラスターのヒートマップが示される。15個の階層クラスターの遺伝子オントロジー解析が、図12Cに示される。QuickGOからの、マウスGOSlim遺伝子リスト（<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO> においてアクセス可能）は、15個の階層クラスターを調べるために使用された。棒グラフは、各クラスターに関して最上位の、生物学的機能カテゴリーを示す。

【0138】

評価された、創傷治癒の間の各タイムポイントにおいて、B細胞による処置に応答して有意に変化したタンパク質の分布が決定された、そしてこれは図13に示される。

【0139】

急性創傷治癒における、B細胞適用のインビボ評価

急性創傷治癒における、B細胞適用のインビボ評価についての実験パラダイムは、図3に示される。野生型C57Bl6マウスの背部皮膚に、全4か所的全層創が作製され、そしてアイソジェニック動物から精製された成熟ナイーブB細胞が、創面に直接的に適用された。対照動物は、生理食塩水の適用を受けた。損傷無しの同様の微小環境を作り出すために、内部対照としてB細胞または生理食塩水対照もまた、インタクトな皮膚の下へと皮下注入された。規定の生存期間後に、創、または未損傷の皮膚組織は採取され、解離され、そしてフローサイトメトリー解析のために処理された。右側の散布図は、それぞれの処置カテゴリー由来の細胞懸濁液の、典型的な分布を示す。創試料は、白血球の特徴的な流入（中空の白色矢印）を示し、これは未損傷の組織においてはほとんど存在しない。B細胞は、典型的にはいずれの位置においてもほとんど存在しないが、実験的適用後には、該細胞を容易に多数検出することができる（赤色の塗りつぶされた矢印）。

【0140】

B細胞で処置された創の、および対照の創の細胞懸濁液の、フローサイトメトリーによる解析

さまざまな条件間、およびさまざまなタイムポイント間での、B細胞と、創環境の細胞との両方の変化を評価するため、試料はフローサイトメトリーを用いて解析された。B細胞で処置された創および対照の創の細胞懸濁液の、フローサイトメトリーによる本発明者らのゲーティング戦略および解析は、図4に示される。生細胞は、以下の3つの主要なカテゴリーへとゲーティングされた：B細胞（CD19+/B220+リンパ球）と、好中球、単球およびマクロファージ、樹状細胞、ならびにT細胞の混合物を含む非B細胞白血球（CD140a-/B220-白血球）と、線維芽細胞（CD140a+/B220-）。これらの細胞カテゴリーは、活性化のマーカー、およびサイトカイン産生に関して評価された。

10

【0141】

創面から回収されたB細胞における、活性化マーカーのおよび重要なサイトカインのダイナミクス

創の微小環境への規定の曝露期間後に創面から回収されたB細胞における、活性化マーカーのおよび重要なサイトカインのダイナミクスは、図5に示される。B細胞は、インビオで創ニッチに曝露されたか、または未損傷の皮膚下に注入された（同等の位置における対照）。同じ継続期間にわたり、単離直後から氷上で維持された対照B細胞は、比較のために示される。18時間、2日、4日、および10日を含む期間の後に、サイトカインの細胞内での滞留を誘導するため、創は、4時間にわたってプレフェルジンAで処置された。B細胞はその後、組織を切除および解離することによって回収され、そして、表面マーカーおよび細胞内サイトカインの両方について、フローサイトメトリーによってさらに特徴付けされた。創の微小環境に曝露されたB細胞は、複数の免疫調節性サイトカインを一過性に上方制御し、ピークは適用の2日後である。TGFβおよびIL-6を含むいくつかの免疫調節性サイトカインは、第4日において上昇したままであり、かつIL-10は、第10日まで上昇したままである。N = 動物3〜6匹 / 群。

20

【0142】

ヒートマップ解析

創の微小環境に曝露されたB細胞、皮下対照に曝露されたB細胞、または氷上で維持されたB細胞（曝露無し）における、各マーカーについての平均値の集約としてのヒートマップは、図6に見出される。創に存在する浸潤非B細胞白血球の凝集体における、活性化マーカーのおよび重要なサイトカインのダイナミクスは、図7に示される。全体的に見て、B細胞が創に存在する場合、浸潤白血球では、抗炎症性サイトカインであるIL-10、TGFβ、およびIL-35の産生はより多く、かつ炎症誘発性サイトカインであるTNFαおよびIL-2の産生はより少なかった。この影響は、損傷およびB細胞適用の4日後に最も強く現れ、かつ10日後まで持続した。N = 動物3〜6匹 / 群。

30

【0143】

創の微小環境にある浸潤非B細胞白血球における、各マーカーについての平均値の集約としてのヒートマップであって、B細胞の存在下で増加した抗炎症性サイトカイン（IL-10およびTGFβ）の産生のパターンを示すヒートマップは、図8に示される。

【0144】

創および皮下組織のCD140a+線維芽細胞集団における、活性化マーカーのおよび重要なサイトカインのダイナミクスは、図9に示される。創がB細胞に曝露された場合、創に存在する線維芽細胞は、損傷の10日後に、IL-10およびTGFβを有意により多く産生した。さらに、B細胞が適用された場合、創の線維芽細胞では、損傷の4日後および10日後の両方で、炎症誘発性サイトカインであるTNFαの産生がより低下する。

40

【0145】

B細胞または生理食塩水のいずれかで処置された、創および皮下組織の線維芽細胞における、各マーカーについての平均値の集約としての追加のヒートマップは、図10に示される。線維芽細胞は、創傷治癒において、抗炎症性因子および再生促進性因子の最も重要な供給源であり、かつ高レベルのIL-10およびTGFβを、処置とは無関係に産生する。それ

50

にもかかわらず、B細胞で処置された創由来の線維芽細胞は、損傷の4日後および10日後に、IL-10およびTGF β の両方をより高レベルで産生し続けており、一方で生理食塩水で処置された創においては、これらの抗炎症性サイトカインのレベルは低下した。興味深いことに、創の線維芽細胞における、IL-6およびTNF α を含む炎症誘発性サイトカインの減少において、B細胞適用の有意な効果が観察された。

【0146】

創傷治癒における、再生に関する外来B細胞の機能には、TLRシグナル伝達、およびIL-10産生が必須の要素である

図11に示されるように、創傷治癒における、再生に関する外来B細胞の機能には、機能的なTLRシグナル伝達、およびIL-10産生が必須の要素である。全層切除創（治癒の第6日のものがここに示される）は、共通のTLRシグナル伝達アダプターであるミエロイド系分化因子88（myeloid differentiation factor 88）（MyD88）を欠くB細胞か、IL-10を欠くB細胞か、または対照としてWT B細胞を用いて、第0日に処置された。生理食塩水もまた、内部対照として試験動物それぞれに包含させた。WT B細胞は、WT動物において第2～3日まで創閉鎖を一貫して促進した一方で、MyD88 $^{-/-}$ B細胞と、IL-10 $^{-/-}$ B細胞は、生理食塩水の適用と同様に、創閉鎖に関する恩恵を示さなかった。

【0147】

実施例2：B細胞での処置は、TBI後のアウトカムを改善する

この実施例は、マウスTBIモデルにおいて、外部より適用されたB細胞が、損傷後のパフォーマンスを有意に改善したことを示す。

【0148】

脳挫傷は、損傷に対する炎症性応答がその一部を介在する、神経機能障害を引き起こす。Bリンパ球は免疫系の動的な調節因子であるが、それについて、TBIにおいて体系的に研究されてきているわけではない。マウスの制御皮質衝撃（controlled cortical impact）（CCI）モデルを用いて、本発明者らは、TBI後の組織病理学および機能的アウトカムに対して、外部より適用されたB細胞が有する見込みのある、有益な役割を評価した。マウスは、損傷部位において、 2×10^6 個の成熟ナイーブシンジェニック脾臓B細胞を実質内注入され、その後CCIを受けた。対照CCIマウスは、同数のT細胞か、または生理食塩水の投与を受け、そして偽損傷マウス（開頭のみ）は、B細胞か、または生理食塩水を投与された。偽損傷群は、運動試験および学習試験において同様のパフォーマンスを示した。生理食塩水か、またはT細胞で処置されたCCI群と比較して、B細胞を投与された損傷マウスは、ローターロッド、Y字迷路、およびモリス水迷路（MWM）において、損傷後のパフォーマンスの有意な改善を示した。さらに、B細胞で処置されたマウスにおける損傷体積は、TBIの35日後に、生理食塩水対照およびT細胞対照と比較して有意に40%減少し、かつ、アストログリオシスおよびミクログリア活性化が減少した。外来B細胞のインビボ追跡は、該細胞がインサイチューでおよそ14日間という限定された寿命を有すること、および増殖しないようであることを示した。データは、脳挫傷の処置について、特に、損傷部位に接近することを可能にする手順を臨床管理が伴う場合の処置について、Bリンパ球の局所投与が治療上の選択肢であることの原理証明を示唆する。

【0149】

したがって、後述する試験においては、マウスCCI TBIモデルにおける、認知障害、および組織病理学的障害からの保護についての、成熟ナイーブB細胞の潜在能力が調査された。脾臓T細胞または生理食塩水の投与と比較して、損傷時に、実質内注入によって送達されたB細胞の単回投与は、海馬依存性の行動タスクおよび線条体依存性の行動タスクにおける有意な改善と関連していた。観察された、行動上の改善は、B細胞で処置された動物における、損傷体積の有意な減少と関連しており、これは、海馬構造の補填を伴っていた。外部より適用されたB細胞の、実質内注入後のインビボ追跡は、該細胞がインサイチューでおよそ2週間という限定された生存性を有することを示し、これは該細胞が、急性のおよび亜急性の挫傷TBIの処置のための安全で実行可能な選択肢であり得ることを示す。

【0150】

材料および方法

以下の材料および方法が、この試験において利用された。

【0151】

動物：すべての動物の取り扱い、実験動物の管理および使用に関するNIHガイド（NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals）、および実験動物の人道的管理に関する公衆衛生局の規範にしたがって実施された。すべてのプロトコルは、マサチューセッツ総合病院の施設内動物実験委員会によって承認を受けた。試験は、12～14週齢であって25～32 gの体重である、雄のC57Bl6/J成体マウス（Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）において実施された。雄のC57Bl6/J、およびFVB-Tg(CAG-luc-GFP) L2G85Chco/J（すべてJackson Laboratories, Bar Harbor, MEより）は、B細胞およびT細胞の単離のためのアイソジェニックドナーとして使用された。動物は社会的に飼育され（1ケージにつき4～5個体）、かつ、実験室での標準的な管理条件下で、20～23度の範囲の温度、12時間の明：暗周期において、餌および酸性化水を自由にとれるようにして維持された。動物は、年齢を一致させ、そして実験条件に対し無作為に割り当てた。偏りを避けるため、異なる処置アームからの動物を同居させた。

【0152】

リンパ球の単離：細胞の単離は、以前に記述されたように、負の免疫磁気選択を用いて実施された。¹⁶手短に述べると、2% ウシ胎児血清（FBS）および1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に含む氷冷緩衝液中に、マウスの脾臓は採取された。脾臓は、40 μ mのセルストレーナーを通過させて機械的に解離させ、そして脾細胞懸濁液は、市販の細胞単離キット（STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, Canada）を製造者の使用説明書にしたがって用いた、非標的細胞の免疫磁気分離および保持により、B細胞またはT細胞の負の選択に関して処理された。B細胞の単離手順は、フローサイトメトリー解析によって検証され、かつ典型的には、いくらかの残存赤血球が存在し得るものの、> 98%純粋な、成熟ナイーブCD45R⁺/CD19⁺ Bリンパ球の集団であって、1%未満の他の白血球の混入を有する集団が取得された。¹⁶精製されたリンパ球は、4 x 10⁵ 細胞/ μ lの濃度で、滅菌PBS中に再懸濁された。

【0153】

制御皮質衝撃（CCI）：損傷、および細胞または生理食塩水の適用を含む、すべての外科手技は、処置条件について知らされていない実験者によって実施され、該実験者は、注入用の処置用量の調製には参加しなかった。マウスは、Fluotec3気化器（Colonial Medical, Windham, NH）を用いて、90秒間にわたり、4.5% イソフルラン（Baxter, Deerfield, IL）を含有する70% N₂Oおよび30% O₂の混合物により麻酔され、そして定位固定フレームに取り付けられた。麻酔は、4.5% イソフルランを用いて維持された。頭皮の正中切開後、ポータブルドリル、および5 mmのトレフィンを用いて、左の頭頂・側頭皮質の上で開頭が行われ、そして骨弁は破棄された。同側の実質内注入は、前後軸上においてブレグマからおよそ-1 mm、内外軸上においてブレグマからおよそ+2 mmで、左の頭頂皮質を通る3 mmの深さに送達された。200万個のB細胞を含むか、200万個のT細胞を含むか、または細胞を含まないもののいずれかの、全量5 μ lの生理食塩水が、26sゲージ鈍針を取り付けた10 μ lのハミルトンシリンジ（Hamilton Company, Franklin, MA）を用いて注入された。選択された細胞用量は、同様の損傷体積を示す皮膚損傷モデルにおいて、以前に最適化されたものである。¹⁶脳構造がインタクトであるうちに、正確かつ一貫性のある細胞の注入を確実にを行うために、細胞の適用は、CCIの直前に実施された。その直後に、3 mmの先平型インパウンダー（impounder）を取り付けた空圧シリンダーを用いて、6 m/sの速度、0.6 mmの深さ、および100ミリ秒の衝撃持続時間において、マウスはCCIを受けた。偽損傷マウスは、麻酔、開頭、および同数のB細胞または生理食塩水の実質内注入を受けたが、CCI損傷は受けなかった。開頭部は開いたままとし、そして皮膚は、6-0ナイロン縫合糸（Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いて、頭蓋骨上で縫合した。

【0154】

行動試験のスケジュール：行動試験は、処置条件について知らされていない実験者によって、概日サイクルの明期の間に実施された。各試験の前に、マウスは少なくとも30分間、試験空間に順応させた。図14に記載されるスケジュールにしたがって、アッセイのバッテリーにおいてマウスは試験された。前庭関連の運動能力は、損傷の1日後、3日後、および7日後に、ワイヤーグリップアッセイによって評価された。ローターロッド試験は、損傷の7日後、9日後、10日後、13日後、および14日後に実施された。損傷の17日後に、動物は、高架式十字迷路アッセイを用いた不安の評価を受けた。モリス水迷路（MWM）試験は、損傷の20日後、21日後、22日、23日後、および24日後に行われ、27日後にプローブ試験が行われた。マウスは、損傷の29日後に、うつ様行動をアッセイするための強制水泳試験を受け、そして30日後に、海馬依存性の作業記憶についてのアッセイである、Y字迷路試験を受けた。

10

【0155】

ワイヤーグリップ試験：前庭関連の運動機能は、ワイヤーグリップ試験を用いて評価された（Bermphohl et al. (2007) J Cereb Blood Flow Metab 27, 1806-1818）。地面から45 cmの高さに吊るされた、45 cmの長さの金属ワイヤー上にマウスを置き、そして60秒間にわたりワイヤーを渡らせた。60秒の間の落下までの潜時が測定され、そしてワイヤーグリップスコアは、5ポイントのスケールを用いて定量化された。試験は3連で実施され、そして各試験日における各マウスに関して、平均値が計算された。

【0156】

ローターロッド：マウスは、60秒で4回転／分から40回転／分に加速する自動化ローターロッド装置（Harvard Apparatus, Holliston, MA）上に置かれた。トライアルの最大継続時間は、300秒か、またはマウスがローターロッドから落下するまでであった。各マウスは、5分間の休息間隔をとって、1日につき5回評価された。5回のトライアルにわたって得られた、落下までの平均潜時、および回転／分の平均スピードは、試験のそれぞれの日ごとに記録された。

20

【0157】

MWM：MWMは、以前に記述されたものをわずかに改変して実施された（Mannix et al. (2013) Ann Neurol 74, 65-75）。空間学習は、1日のほぼ同じ時間に評価された。各マウスは、4つのクォードラントのいずれか1つに出発位置がある、無作為なセットを用いて、不可視プラットフォームのトライアルを7回受けた（1日につきトライアル1～2回）。1回のトライアルは、4つの出発位置のそれぞれからの、平均潜時からなっていた。マウスが、90秒以内にプラットフォームを発見できなかった場合、マウスは、約10秒間プラットフォーム上に置かれた。プローブトライアルは、不可視プラットフォームの最後のトライアルから24時間後に、プラットフォームが無い水槽中でマウスを30秒間泳がせ、そして標的クォードラントにおいて過ごした時間を記録することによって、実施された。

30

【0158】

ポーソルト強制水泳試験：マウスは、20 cmの高さまで水（25度）を入れた、30 cm（高さ） x 20 cm（直径）の円柱型の透明なガラス水槽中に入れられた。3面の目隠しのために、白色のスタイロフォームの箱を設置した。マウスは、6分間にわたり水に入れられ、そして水泳動作が記録された。活発である総時間（泳ぐ、水をかく／ビーカー壁を登る）対 不活発な時間（無抵抗で浮いている）が、試験の最後の4分間について定量された。

40

【0159】

Y字迷路による自発的交替行動試験：Y字迷路試験は、白色の不透明なアクリル製の、40 cmの長さの3本のアームからなる装置であって、該アームが、120度の角度で連結されており、15 cmの高さの壁を有する装置において、実施された。各アームには、対照的に異なる視覚的表示（白地に黒色の、四角、円、星）が付けられた。マウスを装置の中央に置き、そして10分間にわたり迷路を探索させた。マウスの動作は、真上に取り付けたウェブカメラ、およびPhoto Boothソフトウェア（ANY-maze）を用いて記録された。齧歯類における正常な探索行動は、迷路の、直前に入ったほうではないアームへの進入を優先する

50

傾向を伴う（自発的交替行動）。交替行動スコアは、各アーム1回ずつを含む3連続の選択の回数を、アームに進出した全回数（すなわち、交替行動の機会）で割ることによって算定した。装置は、トライアルとトライアルの間に70%エタノールを用いて消毒された。

【0160】

高架式十字迷路：該装置は、地面から60 cmの高さにあり、その交点に8 cm x 8 cmの四角形のエリアを有する、130 cm x 8 cmの2つのプラットフォームからなっていた。プラットフォームのクローズドアームは10 cmの壁を有し、一方でオープンアームは壁を有していなかった。各マウスは、迷路の中央エリアに置かれ、そして5分間ビデオ録画された。装置は、トライアルとトライアルの間に70%エタノールを用いて消毒された。ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL) ソフトウェアにより、クローズドアームおよびオープンアームにおける平均スピードおよびパーセント時間について、ビデオ録画を解析した。

10

【0161】

IVISイメージング：脾臓B細胞は、CAG-luc-eGFP L2G85導入遺伝子に関してホモ接合性であるマウスから単離されたものであり、該導入遺伝子は、CAGプロモーター下でホタルルシフェラーゼおよび強化型緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescence protein) の広範な発現を示す (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)。5 μ l PBS 中の、およそ500万個のルシフェラーゼ発現B細胞が、上述のように、レシピエントWT C57Bl6/Jマウスの左半球へと注入された。マウスは、IVIS Lumina IIシステム (Caliper Life Sciences, Waltham, MA) を用いて、手術の当日にイメージングされ、そしてその後の全4週間において一定の間隔でイメージングされた。各イメージングセッションのため、3% イソフルラン含有酸素を用いて麻酔が導入され、そしてイメージングセッションの間中、1 l/分の2~3% イソフルランを用いて維持された。ルシフェラーゼ活性を可視化するため、イメージングの少なくとも6分前に、100 μ lの30 mg/ml D-ルシフェリン水溶液 (Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL) が、損傷部位の近くに皮下注入された。マウスは10分間イメージングされ、そして反復してイメージングするたびに、同一のパラメーターが維持された。

20

【0162】

組織のサンプリング：CCIおよび処置の35日後に、マウスは、ケタミン (100 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) を用いて深麻酔され、血液を除去するため、10~15 mlのヘパリン加PBSを用いて経心腔的灌流され、そして断頭された。脳は氷上で速やかに摘出され、気相の液体窒素中で凍結され、そして-80度で保管された。凍結薄切法に関し、脳は、M-1包埋マトリックス (M-1 embedding matrix) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 中に包埋され、そしてクリオスタットを用いて、16 μ mの厚さで冠状に薄切された。切片は、前後軸に沿って500 μ mの間隔で採取され、そしてSuperFrost Plus Goldスライド (Fisher Scientific, Waltham, MA) 上に解凍マウントされた。

30

【0163】

免疫組織化学：免疫組織化学的解析のための組織の処理は、以前に記述されたように実施された (Sirbulescu et al. (2017) Wound Repair Regen 25, 774-791)。手短に述べると、切片は、PBSを用いて洗浄され、その後透徹され、そして、5% ウシ血清アルブミン、5% ウシ胎児血清、および0.3% トリトンX-100を含むPBSを用いる、1時間にわたる室温でのインキュベーションにより、ブロッキングされた。切片はその後、ブロッキング溶液中で希釈された以下の一次抗体と、4度で一晩インキュベートされた：Alexa Fluor (登録商標) 594コンジュゲートラット抗マウスCD45R/B220 (クローンRA3-6B2; BioLegend, Inc., San Diego, CA)、Alexa Fluor (登録商標) 488コンジュゲートマウス抗マウスCD45.1 (クローンA20; BioLegend, Inc., San Diego, CA)、Alexa Fluor (登録商標) 488コンジュゲートマウス抗グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) (クローン2E1.E9; BioLegend, Inc., San Diego, CA)、Alexa Fluor (登録商標) 647コンジュゲートラット抗マウスCD68 (クローンFA-11; BioLegend, Inc., San Diego, CA)、およびウサギポリクローナル抗Ki67 (Abcam, Cambridge, MA)。未結合の一次抗体

40

50

は、PBS中で3回リンスすることによって除去された。コンジュゲート型でない一次抗体が使用された場合には、抗原性部位は、ブロッキング溶液中で1:200に希釈されたAlexa Fluor 488（登録商標）コンジュゲートF(ab')₂ヤギ抗ウサギIgG（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）と、切片を2時間にわたり室温でインキュベートすることにより、可視化された。切片は、2 µg/mlの4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩（DAPI; Sigma Aldrich）とのインキュベーションによって、対比染色された。抗体対照は、組織切片とアイソタイプ抗体とのインキュベーション、および二次抗体が可視化に使用された場合には一次抗体の省略を、含んでいた。対照試料においては、非特異的なシグナルは検出されなかった。染色された組織切片は、Zeiss LSM 710レーザー走査型顕微鏡（Carl Zeiss）を用いてイメージングされ、そして共焦点画像が、Zenソフトウェア（Carl Zeiss）を用いて収集された。

10

【0164】

損傷体積の測定：切片はヘマトキシリンを用いて染色され、そしてスライドの高解像度全体写真が取得された。ImageJ（NIH, Bethesda, MD）における形態計測学的画像解析は、各半球の面積を決定するために使用された。各切片に関し、損傷を受けた半球（左）の面積を、未損傷の半球の面積から差し引き、そしてその差に0.5を掛けて脳組織の喪失体積を出し、mm³で表した。

【0165】

画像解析：GFAPおよびCD68の免疫標識の、偏りのない定量化に関し、損傷エリアの内側面および外側面の両方を含む、損傷部位の周辺から収集された共焦点画像（動物1匹につき、n = 1400 x 1400 µmのフィールド4枚）は、MATLAB（The MathWorks, Inc., Natick, MA）の標準的な機能を用いて解析された。各画像に関し、イメージングされたすべてのチャンネルにわたって、強度の最小の閾値である10を最大値投影処理に適用することによって生成された2値マスクの、モルフォロジークローニング、モルフォロジオープンニング、およびインタラクティブフィリングによって、解析の対象となる領域は半自動的に定義された。バックグラウンドレベルは、3 x 3ピクセルの移動平均を用いる画像の平滑化と、それに続く、10ピクセルの半径の構造要素を各チャンネルごとに別々に用いるモルフォロジオープンニングによって、決定された。フォアグラウンドのオブジェクトは、対応するバックグラウンドレベルを、GFAP免疫標識については25超、CD68免疫標識については50超、それぞれ上回る強度を有するピクセルのセットとして同定された。解析された各マーカーに関し、標識された相対面積は、フォアグラウンドとしてマークされた、対象となる領域内のピクセルの割合として算定され、一方で平均標識強度は、対象となる領域内に見出されたすべてのフォアグラウンドピクセルの平均強度として算定された。すべての画像解析は、処置条件について知らされていない実験者によって実施された。

20

30

【0166】

統計学的分析：統計学的試験の前に、すべてのデータセットは、ダゴスティノーピアソン正規性検定を用いて、正規分布に関して評価され、そしてパスすることが見出された（p > 0.2）。ワイヤグリッパッセイ、ローターロード、MWM不可視および可視プラットフォーム、ならびに高架式十字迷路を含む、反復して実施された行動試験についての、実験群間の差異の統計学的有意性は、マッチさせた対象を用いる2元配置（処置 x 回数）反復測定分散分析（トライアル／タイムポイントを反復測定因子として用いる）を用いて評価され、その後、チューキー法またはシダック法を用いた事後多重比較が続いた。MWMプローブ、Y字迷路、強制水泳を含む、単一タイムポイントの測定、および組織学的比較は、1元配置分散分析と、それに続くチューキーの多重比較検定を用いて評価された。報告されるすべての記述統計は、推定周辺平均±標本平均の標準誤差（SEM）である。すべての統計学的分析は、GraphPad Prism 7（GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA）を用いて実施された。P < 0.05が、統計学的に有意とみなされた。

40

【0167】

結果

損傷時のBリンパ球の適用により、CCI後の認知機能の回復が改善する

50

全部で63匹のマウスが試験を完了し、1匹は死亡した。ローターロッドアッセイにおいて、Bリンパ球を用いた実質内処置は、有意な保護効果を有していた（図15A）。すべての損傷群は、偽損傷動物よりも劣るパフォーマンスを示した一方で、B細胞で処置された損傷マウスは、T細胞または生理食塩水で処置された損傷群よりも優れたパフォーマンスを示し（群に関して、 $p < 0.01$ ）、かつそれらのパフォーマンスは、B細胞で処置された偽損傷のものとは比べて差異は無かった。興味深いことに、連続したトライアルにより、CCI + B細胞群におけるパフォーマンスが、偽損傷対照群の両方と同じく、持続的に改善することが示され、これは、これらの群において手続き学習が生じたことを示唆する。B細胞で処置された偽損傷マウスが、より優れたパフォーマンスを示した（ $p < 0.01$ ）トライアル3を除き、B細胞で処置されたCCI群と、偽損傷マウスとの間で、有意な差異は存在しなかった。対照的に、損傷時に、生理食塩水かまたは200万個のT細胞のいずれかで実質内処置を受けたCCIマウスは、B細胞で処置されたCCI損傷動物、または偽損傷動物のいずれと比較しても、パフォーマンスの日ごとの改善が最小であることを示し、かつ、落下までの潜時は有意に短いものであった（ $p < 0.0001$ ）。T細胞の投与を受けたCCI損傷群と、生理食塩水の投与を受けたCCI損傷群との間で、統計学的に有意な差異は存在しなかった。

【0168】

ワイヤーグリップ試験において、すべての損傷群は、偽損傷のものよりも劣るパフォーマンスを示したが、B細胞で処置されたCCI群と、生理食塩水で処置されたCCI群と、T細胞で処置されたCCI群の間で、群としての差異は観察されなかった（図15B）。

【0169】

MWM（図16A～16D）では、不可視プラットフォームトライアルにおいて、偽損傷マウスは、すべてのCCI群よりも有意に優れたパフォーマンスを示し、これはCCIの堅固な影響（群に関して、 $p < 0.001$ ）を示すものであって、偽損傷群の間では差異は認められない。損傷群の間では、トライアル7でのB細胞で処置されたマウス 対 生理食塩水で処置されたマウスにおいて（ $p = 0.016$ ）、処置 x トライアルの有意な交互作用（ $p = 0.02$ ）を伴う、処置の高度に有意な効果（ $p < 0.0001$ ）が存在した（図16A）。プラットフォームにたどりつくまでの平均時間における、トライアル1とトライアル7との差として評価された、7回の不可視プラットフォームトライアルの間のパフォーマンス改善の速度は、生理食塩水対照と比較して、B細胞の投与を受けた損傷動物において、有意に上昇していた（ $p < 0.01$ ）。可視プラットフォームトライアルにおいては、いずれの群の間においても、有意な差異は観察されなかった（図16B）。プローブトライアルにおいて、B細胞で処置された損傷マウスは、偽損傷群と同様のパフォーマンスを示した（図16C）。対照的に、T細胞かまたは生理食塩水いずれかの投与を受けた、CCI損傷マウスは、偽損傷のものよりも劣るパフォーマンスを示した（ $p < 0.05$ ）。B細胞で処置された損傷マウスの水泳パターンは、偽損傷群のものと同様に、空間型の探索戦略であることの証拠を示したが、一方でT細胞で処置された損傷群、および生理食塩水で処置された損傷群においては、探索戦略は非空間型であった（図16D）。

【0170】

Y迷路試験（図16E）において、B細胞の実質内投与を受けたCCI損傷マウスは、 76.65 ± 2.46 の交替行動スコアを有しており、これは、T細胞で処置された損傷動物（ 46.86 ± 2.41 ）、または生理食塩水で処置された損傷動物（ 38.92 ± 2.56 ; $p < 0.0001$ ）のいずれよりも有意に高く、かつ、B細胞で処置された偽損傷マウスと同様であった。迷路のアームへの進入の全回数に関して（ $p > 0.13$ ）、または総移動距離（ $p > 0.07$ ）に関して、いずれの損傷群と処置群の間においても、有意な差異は存在しなかった。

【0171】

高架式十字迷路（図17A）において、オープンアームで過ごした時間（ $p > 0.84$ ）、または出発点の中央エリアで過ごした時間（ $p > 0.94$ ）に関し、いずれの処置群の間でも、有意な差異は存在しなかった。処置 x 位置の、有意な交互作用が存在していた（ $p < 0.05$ ）。損傷群の中で、B細胞の投与を受けたマウスは、同数のT細胞の投与を受けた動

物と比較して、迷路のクローズドアームにおいて、有意により長い時間を過ごした ($p < 0.05$)。

【0172】

強制水泳試験において、偽損傷群および損傷群は互いに差異は無かった、これは、本試験で採用された損傷パラダイムが、本アッセイにおいて測定されるうつ様行動に影響を与えないことを示唆する (図17B)。

【0173】

損傷時のBリンパ球の適用は、CCIの35日後における、損傷体積の減少、およびグリア瘢痕形成の減少と関連する

B細胞での処置と関連して観察された、行動上の改善が、神経病理学的相関を有するかどうかを評価することを目的として、行動評価を受けたすべての動物の脳が、組織学的検査のために、損傷の35日後に採取された (図18)。CCI群における、脳組織へのダメージの解析は、CCIを受けた全マウスにおいて、損傷エリアのキャビテーションを示した一方で、偽損傷群は、脳組織の喪失を示さなかった (図18A)。すべての群にわたる、損傷体積の定量分析 (図18B) は、予想されたように、CCIの有意な影響を示した ($p < 0.0001$)。生理食塩水で処置された損傷群 ($p < 0.001$)、またはT細胞で処置された損傷群 ($p < 0.0001$) と比較して、B細胞で処置されたCCIマウスでは、脳組織の喪失は有意に低下していた。T細胞の投与を受けたCCI損傷群と、生理食塩水の投与を受けたCCI損傷群との間で、損傷体積において有意な差異は存在しなかった。脳全体の連続切片における、損傷面積の分布の解析 (図18C) は、処置条件の間における最も著しい差異が、主に海馬を含むレベルである、損傷の後部2/3において観察されたことを示した。実際、標的を絞った体積測定は、生理食塩水で処置されたCCI対照、またはT細胞で処置されたCCI対照のいずれと比較しても、B細胞で処置されたCCIマウスは、損傷を受けた半球において、有意に大きい割合の補填された海馬組織を有していたことを示した ($p < 0.0001$; 図18D)。

【0174】

損傷を受けた脳における長期的な反応性応答、これはアストログリオシスおよびミクログリア活性化を含むが、これに対するB細胞での処置の効果を評価するため、損傷の35日後に採取された組織切片は、GFAP、および活性化関連マーカーであるCD68のそれぞれについて免疫標識された。最初のCCI損傷の部位において形成されたキャビテーション損傷に近接する位置から収集された共焦点画像の、偏りのない解析は、生理食塩水で処置された対照およびT細胞で処置された対照と比較して、損傷時に送達されたB細胞処置の、有意な効果を示した (図19)。GFAPの強い免疫標識、およびアストロサイトの大幅な肥大によって示されるグリア瘢痕形成は、ミクログリア活性化マーカーであるCD68に対する免疫標識の減少によって示されるように、B細胞で処置された動物において有意に低減した (図19E、19F)。

【0175】

Bリンパ球はインサイチューで増殖せず、かつ適用後およそ2週間という限定された寿命を有する

外部より送達されたB細胞が、実質内注入後にインビボで持続するかどうかを決定するため、本発明者らは、CAGプロモーター下でホタルルシフェラーゼを構成的に発現する、精製されたB細胞を使用した。ルシフェラーゼは生物学的半減期が短いため、連続的に産生されていないと検出できない。ルシフェラーゼ発現細胞が死ぬと、シグナルは迅速に消失するので、このアッセイは、実験によって導入されたB細胞の、長期間の生存性を決定するために使用することができる (Zinn et al. (2008) ILAR J 49, 103-115)。外来の生存B細胞のみが光シグナルを生成するので、この方法は、細胞が数100個に減少するまで、細胞の経時的な生存性および持続性を非侵襲性に追跡することを可能にする。結果は、検査されたすべての動物において、注入されたB細胞が、適用後速やかに明確に検出可能であったことを示した (図20A)。頭部における全光量子束の定量分析は、適用された細胞内で活性な酵素活性が、当初ゆるやかに増加し、第3日～第7日にピークに達し、そしてその後、第7日の後で急速に減少し、注入の17日後までに検出不可能なレベルに達し

たことを示した（図20B）。これらの結果は、外来B細胞が、インサイチューでおよそ2週間という限定された寿命を有するとの見解を支持する。

【0176】

導入されたB細胞がインサイチューで増殖する可能性があって、それにより、より長寿命の集団を脳実質中で確立する潜在性を有するかどうかを調査するため、注入部位を通る脳の冠状断が採取され、そしてB細胞および増殖マーカーについて免疫標識された。注入の前に、トルイジンブルーを用いてエクスピボでB細胞を標識することにより、送達後、注入部位の周囲の半径およそ1 mm以内のみに細胞が分布することが示された（図21A）。共焦点イメージングは、注入されたB細胞が、送達の4日後まで、適用部位にほとんど局在化したままであり、損傷全体にいくらか分散することを確認した（図21D）。増殖マーカーであるKi67についての免疫標識により、B細胞は、第0日と第4日のタイムポイントにおいてこのマーカーを発現しなかった一方で、隣接する非B細胞は、検査されたすべての動物において、損傷の4日後に、高レベルのKi67免疫陽性を示したことが明らかとなった（タイムポイント1つにつき、n = 動物4匹；図21D、21E）。この発見は、損傷動物と偽損傷動物のいずれにおいても、CD45R（B220）およびCD45.1について免疫標識された組織切片において、適用の35日後にB細胞を観察できなかった、という事実と一致していた（データは示さない）。CCI損傷動物においては、第35日に、キャビテーションにより元の注入部位は破壊されるが、偽損傷対照においては、針により引き起こされた損傷の周囲のグリオーシスのために、容易に検出することができる（図21F）。第35日までに、B細胞で処置された偽損傷のものの注入部位において、B220陽性B細胞は見出されなくなった（図21F、21G）。

【0177】

結論

この試験は、損傷後の構造的および機能的アウトカムを調節するための、前臨床TBIモデルにおけるBリンパ球の直接適用の使用を説明するものであり、これは、本発明者らの知る限り初めてとなる。CCIの際に、精製された（> 95%）成熟ナイーブB細胞の単回の実質内送達を行うことで、損傷後の学習障害および記憶障害を有意に減少させることができ、かつ脳組織の喪失量を減少させることができることを、本発明者らは見出した。この結果は、これまで未知であった、脳挫傷モデルにおける内在B細胞の保護効果を示唆する。

【0178】

CCI損傷モデルは、再現性の高い損傷を作製し、かつ非常に低い死亡率を有する（Xiong et al., (2013) Nat Rev Neurosci 14, 128-142）。衝撃は、インタクトな硬膜を有する皮質表面に与えられるが、損傷の神経病理学帰結は、典型的には広範囲であり、かつ皮質の、海馬の、および視床の変性を含む（同上）。これらの病理は、長期の認知障害に、および情動行動における変化に関連する（同上）。このCCI損傷パラダイムにおいては、衝撃力は皮質に直接的に適用されたので、この領域は、処置条件にかかわらず、全動物において確実にかつ必ず変性するが、一方で処置条件間の差異が、皮質下の構造での、特に海馬での補填において、観察された。B細胞での処置の、観察された行動上の恩恵はまた、これらの構造が支えている機能と相関していた、これは、導入されたリンパ球の局在性と、注入部位周辺の組織の補填と、機能的な神経保護との間の関連性を示唆する。この仮説を支持して、本モデルにおいてはBリンパ球は、プレグマからおよそ1 mm後部に注入され、そしてほとんどが、尾状核被殻と海馬との間に局在化したままであった（Lein et al. (2007) Nature 445, 168-17）。

【0179】

本試験において、CCI部位から採取された組織切片の共焦点イメージングにより、B細胞が、当初の注入部位の周囲にクラスター化しており、損傷および適用の4日後まで、損傷組織全体に多少分布することが示された。これらの結果は、実質内注入されたB細胞が、インサイチューでのその寿命の間、損傷部位にとどまるようであることを示す。B細胞の観察された神経保護効果の根底にある分子メカニズムは、完全に理解されたわけではないが、該細胞から生じる拡散性の因子が関与していて、これが、適用された細胞の厳密な局

在性を乗り越えて、遠位の領域に到達する、という可能性がある。この仮説は、CCIの際にB細胞で処置された動物においては、対照と比較して、損傷体積が有意に減少し、かつ、アストログリオシスおよびミクログリア活性化を含む、潜在的に有害な反応現象が、損傷部位において有意に減少した、という観察によって支持される。

【0180】

このようにB細胞は、脳挫傷を有する患者のための治療戦略として使用され得る。他のいかなる既存の細胞ベースの治療法とも異なり、B細胞は、末梢血から、または他の血液バンク産物から容易に入手可能であり、これは、即効性のオフザシェルフ治療薬を開発するための、重要な利点である。実際、即効性であって、操作を最小限に抑えた自家B細胞療法は、臨床現場への高い応用能力を有し得る。これは、重い脳損傷の事例において特に真実であり、そのような脳損傷においては、血腫または刺さった骨断片を除去するためにしばしば手術が実施され、かつ実質内または脳室内のいずれかに、頭蓋内圧をモニターするためのカテーテルが設置されるので (Stocchetti et al. (2017) Lancet Neurol 16, 452-464; Galgano et al. (2017) Cell Transplant 26, 1118-1130)、損傷を受けた脳内へとB細胞を投与するのに都合の良い経路が提供される。

【0181】

治療に使用される他の細胞タイプ、たとえば幹細胞などとは異なり、Bリンパ球は、成熟し、最終分化した細胞であり、インビボで5~6週間という、限定された天然の寿命を有する。脳挫傷により妨害を受けた微小環境において該細胞を適用すると、その後、移植された細胞はより短時間で消失すると予想される。この点は有益である、なぜならば、特に、中枢神経系の微小環境がいくつかのB細胞栄養因子を含むことを考慮すれば、移植された細胞がより長く生存すると、安全性に対する著しい懸念を生じさせ得るからである。代謝上の活性を有する移植された細胞の存在および持続性を経時的にモニターするため、本発明者らは、ルシフェラーゼ発現B細胞のインビボ可視化を使用した。細胞シグナルは第7日の後に急速に低下し、第17日までに検出不可能なレベルに達したことを、本発明者らは観察した。CCIに関し、実質内注入の3~7日後に、ルシフェラーゼのシグナル強度は当初ゆるやかに増加し、これは、移植された細胞が、CCI損傷の現地の微小環境において順応および／または刺激の期間を過ごしたことを示す可能性がある。シグナル強度の増大が、インサイチューでの細胞増殖に起因する可能性は低い、なぜならば、B細胞の投与およびCCIの直後または4日後までのいずれかでの、注入部位の免疫組織化学的検査は、導入されたB細胞が、細胞増殖のマーカーを発現しないことを示したためである。実際、B細胞は、近接細胞の増殖を増進したが、創への適用後のB細胞の増殖は観察されなかった。

【0182】

この試験は、現存する神経学的アウトカムを改善する治療上の選択肢がない挫傷TBIの急性および亜急性処置に関して、末梢から単離された成熟B細胞が、安全であり、即効性であり、かつ有効な細胞ベースの治療戦略となり得ることの、最初の原理証明としての観察を記述する。

【0183】

実施例3: ALSのマウスモデルであるSOD1-G93Aにおける、B細胞免疫療法の評価

この実施例は、ALSの標準的なマウスモデルであるSOD1^{G93A}マウスにおける、B細胞の静脈内 (i.v.) 投与の安全性および有効性を例証する。

【0184】

雄および雌のトランスジェニックSOD1^{G93A}マウスは、性別を一致させたノンキャリアの同数の対照 (n = 32 / 条件) とともに、10週齢 (第72日) で開始された全10週間のスケジュールにおいて、5 x 10⁶個のB細胞含有生理食塩水で (または生理食塩水対照で)、週1回処置された。SOD1^{G93A}マウスにおける、ピーク体重への到達、および有意に延長された生存期間 (p < 0.05) によって示されるように、B細胞での処置は、症状の発症を遅延させる (p < 0.0001) ことを、本発明者らは見出した。運動ニューロンの総数は、処置によって変化することはなかったにも関わらず、B細胞での処置は、エンドポイントにおける腰髄での損傷／変性した運動ニューロンの相対数の有意な減少と、関連してい

た ($p < 0.05$)。同一の処置を受けた、非トランスジェニック対照である野生型同腹仔において、B細胞での処置は、観察可能な（行動上のおよび表現型の）いかなる有害作用にも関連せず、該対照では、反復された処置の継続期間にわたって体重が増加し続けた。総合すると、ALSにおいて神経炎症を軽減するための実行可能な方法をB細胞療法が提供し得ることを、これらの結果は証明する。

【0185】

ALSは、脳の運動皮質における上位運動ニューロン、ならびに脳幹および脊髄前角における下位運動ニューロンの両方の進行性の変性によって特徴付けられる、致死性の疾患である。現在までALSの治療法は存在せず、当技術分野においては、緊急であるがまだ対処されていない必要性が際立っている。

【0186】

試験計画

ALSにおける、B細胞免疫療法の有効性を評価するため、十分に確立された、ALSのB6.SOD1^{G93A}トランスジェニックマウスモデルを、計画および結果の解釈に関して発表されているガイドラインにしたがって、本発明者らは使用した (Galgano (2017) Cell Transplant 26, 1118-1130; Nordstrom et al. (2014) Ann Neurol 75, 374-381)。ヒトSOD1のG93A変異型のトランスジェニック発現を有するマウスは、ヒトにおけるALSに類似した表現型を示す。該マウスは、片方または両方の肢が進行性に麻痺していき、脊髄からの運動ニューロンの喪失に起因する完全麻痺を有することとなる。トランスジェニックマウスはまた、短命でもある。神経変性症状は、典型的には12~14週齢の頃に出現し始め、そしてマウスは、およそ20~24週齢で死亡する。したがって、このモデルは、急速で悪性である、該疾患の進行を示す。該モデルは非常に安定であってかつ再現性を有しており、この神経変性障害に関する治療上の選択肢の評価を可能にする。

【0187】

全15~17匹の雌および雄（当技術分野において推奨されるガイドラインによる（同上））は、性別を一致させた非同腹仔ノンキャリアの同数の対照とともに、試験全体を通して、各実験条件（処置）に使用された（表1）。10週齢（第72日）において開始され、後眼窩への注射により送達される、全10回のB細胞（または生理食塩水対照）の静脈内注入を、すべての動物は週1回受けた（図22）。フィジビリティに関し、試験は、表1（各コホートの遺伝子型、性別、および処置による、使用される動物の概観）に記載されるように、2つのオーバーラップするコホートにおいて実施された。

【0188】

【表1】

	トランスジェニック B6.SOD1 ^{G93A}				ノンキャリア対照 (Wt)			
	雄		雌		雄		雌	
	生理食塩水	B 細胞	生理食塩水	B 細胞	生理食塩水	B 細胞	生理食塩水	B 細胞
コホート 1	11	12	11	12	9	10	10	11
コホート 2	5	5	6	4	7	6	5	5
全数	16	17	17	16	16	16	15	16

【0189】

材料および方法

以下の材料および方法が、この試験において使用された。

【0190】

動物：B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J (SOD1-G93A) トランスジェニックマウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME; Stock No: 002726) より購入した。この樹立系統（しばしばG1Hと称される）は、高コピー数のSOD1導入遺伝子を有することが

、Jackson Laboratoryによって報告されている。すべての動物は、発送前に、Jackson Laboratoryによって個々に遺伝子型決定され、そして高コピー数のSOD1導入遺伝子を有する（分布の上位3分の1）ヘテロ接合性動物のみが販売される。対照動物は、SOD1導入遺伝子を有さない同腹仔（ノンキャリア）である。

【0191】

B細胞単離のためのドナー動物はC57BL/6Jマウスであった、これらもまた、Jackson Laboratoryから購入した（ストック番号：000664）。

【0192】

すべての動物の取り扱い、実験動物の管理および使用に関するNIHガイド、および実験動物の人的管理に関する公衆衛生局の規範にしたがって実施された。プロトコル番号：2019N000004として、すべてのプロトコルは、マサチューセッツ総合病院の施設内動物実験委員会によって承認を受けた。

【0193】

B細胞の単離：細胞単離の手順はすべて、無菌条件下で、クリーンバイオセーフティキャビネット内で実施され、そして得られた細胞懸濁液は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に送達された。細胞は、（同胞と同様に）レシピエントの遺伝学的バックグラウンドと半分が共通であるC57BL6野生型ドナー動物の脾臓から単離され、そして精製された。脾臓は、脾細胞懸濁液へと解離させ、そして市販のキット（Miltenyi B細胞単離キット、マウス用（Miltenyi B Cell Isolation Kit, mouse）；130-095-873, Miltenyi Biotec）が、負の免疫磁気選択によってすべてのB細胞を単離するために、本発明者らの以前に発表したプロトコル（DeKosky et al. (2013) Nat Rev Neurol 9, 192-200; Stocchetti et al. (2017) Lancet Neurol 16, 452-464）にあるように使用された。単離後にフローサイトメトリー解析によって確認されたように、結果的に得られた細胞は、>98%がCD19+ B細胞であり、かつ典型的には85~90%超がCD19+/B220+/IgM+/IgD+であり、およそ5%のCD138+形質細胞、および<1%の他の細胞集団を含む（DeKosky et al. (2013) Nat Rev Neurol 9, 192-200）。これは、ナイーブB細胞画分（処置用）とされ、そして単離後の同日に、動物に注入された。

【0194】

処置：10週齢（第72日）において開始され、すべての動物は、後眼窩への注射により送達される、全10回のB細胞（または生理食塩水対照）の静脈内注入を週1回受けた。動物は、3% イソフルラン混合酸素を用いて麻酔され、そして100 µlボラスの、500万個のナイーブB細胞を含む生理食塩水（処置）、または細胞を含まない生理食塩水（生理食塩水対照）が、後眼窩静脈洞内へと注入された。その後、処置を受けた目に、眼軟膏が適用された。この投与方法は、細胞移植のための尾静脈注入、特に反復投与を伴う場合の尾静脈注入と比較して、失敗するリスクがかなり低いために選択された。

【0195】

安全性評価：すべての動物の健康状態は、IACUCガイドラインにしたがって、処置の潜在的な有害作用に関して、1週間に3回評価された（体重減少、アパシー、体調不良、立毛、円背位）。

【0196】

有効性評価：体重および神経学的スコア（ニューロスコア）は、処置条件について知らされていない実験者によって、週に2回評価され、そして、たとえば、Hatzipetros, T. et al. (2015) J. Vis. Exp. (104), e53257, doi:10.3791/53257; Mashkouri et al. (2016) Neural Regen Res 11, 1379-1384に記載されるように、疾患の進行を評価するために使用された。

【0197】

ニューロスコア0（発症前）：マウスを尾から吊ると、後肢は正常な開脚を示す、すなわち、後肢は外側正中線から完全に開脚し、かつ2秒以上この位置にとどまる。マウスを歩行させると、正常な歩様が観察される。

【0198】

ニューロスコア1（初期症状）：マウスを尾から吊ると、後肢は異常な開脚を示す、すなわち、後肢が外側正中線に向かって折りたたまれているかもしくは部分的に折りたたまれているか、または尾から吊るされている間、後肢に振戦が認められるか、または後肢が収縮／屈曲している。マウスを歩行させると、正常な、またはわずかに遅い歩様が観察される。

【0199】

ニューロスコア2（不全麻痺の発症）：マウスを尾から吊ると、後肢は部分的にまたは完全に折りたたまれており、あまり開脚しない。（関節の動きは依然として認められる）。マウスを歩行させると、後肢は前進運動に使用されるが、90 cmの歩行の間に少なくとも2回つま先が下向きに丸まるか、または足の任意の部分を引きずる。マウスを、その左側を下にして置いた場合、および右側を下にして置いた場合に、どちら側からでも10秒以内にその正位置に戻ることができる。

10

【0200】

ニューロスコア3（完全麻痺）：マウスを尾から吊ると、後肢に強直性の完全麻痺が認められるか、または関節の最小限の動きが認められる。マウスを歩行させると、前進運動が認められるが、後肢は前進運動に使用されていない。マウスを、その左側を下にして置いた場合、および右側を下にして置いた場合に、どちら側からでも10秒以内にその正位置に戻ることができる。

【0201】

ニューロスコア4（人道的エンドポイント）：マウスを尾から吊ると、後肢に強直性の完全麻痺が認められる。マウスを歩行させようとしても、前進運動が認められない。マウスを、その左側を下にして置いた場合、および右側を下にして置いた場合に、どちらの側からも、10秒以内にその正位置に戻ることができない。すなわち、正向反射の非存在。

20

【0202】

体重は、信頼性が高くかつ偏りのない、疾患進行の評価として使用された。疾患発症の出現は、最大体重の年齢を用いて後ろ向きに決定された、これは、以前に記述されたように、筋肉の脱神経が発症したことの、信頼性が高くかつ客観的な基準である（Turner et al. (2014) Neurobiol Aging 35, 906-915.）。組織学：安楽死後、すべての動物から腰髄が採取され、該腰髄は固定液中で保存され、そして組織学的解析のために処理された。前角の運動ニューロンを可視化するため、脊髄は、10 μmの厚さで、水平面において縦方向に薄切され、そしてヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色された。運動ニューロンは、大きなサイズおよび独特の形態に基づいて容易に同定可能であり、これは、動物1匹につき2～3個の縦断切片から無作為に収集された、少なくとも500 x 500 μmの、関心対象の領域3～6個において計数された。本発明者らはまた、健全な運動ニューロン（大きく、丸みのある細胞体；単一ではっきりとした核小体を有する核；ニッスル物質が存在する；図27Aを参照されたい）と、損傷／変性した運動ニューロン（縮んだ細胞体、塩基性色素への高度な易染性（hyperbasophilia）、核クロマチンの強い凝集、濃縮した核；図27Bを参照されたい）とを、別々に定量した。すべての計数は、処置条件について知らされていない実験者によって実施された。

30

【0203】

結果

以下の結果は、すべての動物試験から収集されたデータを要約する。試験は、最後のトランスジェニックSOD1動物を安楽死させた、出生後第150日に終了した。

【0204】

安全性

観察可能な（行動上の、および表現型上の）有害作用（体重減少、アパシー、体調不良、立毛、円背位）は、ナイーブB細胞（細胞およそ2億個/kgの用量で）の投与を受けた対照ノンキャリア動物においては見出されなかった。対照動物は、B細胞での処置とは無関係に、試験期間を通して体重が増加し続けた（図23）。さらに、トランスジェニックSOD1-G93A動物においては、細胞の注入処置に起因し得るそのような有害作用は、症状の発

50

症（処置の第72～90日）前の期間においては観察されなかった。

【0205】

ALS進行の症状に対する、処置の有効性

a. ピーク体重（図24に示される）。ピーク体重は、個々の動物の測定された体重が、その後で連続的な減少を示したタイムポイントとして、定義された。この情報は、生存時間分析を実施するために使用されたものであり、該分析において、ピーク体重の時点は「生存」を表す。対照ノンキャリアマウスは体重減少を示さないため、トランスジェニックSOD1-G93A動物のみがこの分析に使用された。

【0206】

ピーク体重（すなわち症状の発症、体重減少と関連する）は、生理食塩水で処置された対照と比較して、ナイーブB細胞での処置条件において、平均でおよそ28日遅延した（ $p < 0.0001$ 、多重比較のためのシダック事後補正を伴う1元配置分散分析）（Turner et al., Neurobiol. Aging 35, 906-915 (2014)を参照されたい）。

【0207】

b. 神経学的スコアの評価（図25に示される）。この分析に関し、疾患の発症は、動物が、3回の連続した評価においてニューロスコア1の判定を受け、かつその後ニューロスコアが減少しなかったタイムポイントとして、定義される。神経学的スコアの経時的で漸進的な増加は、すべての動物において観察されたが、B細胞での処置は、ゆるやかな進行速度と関連していた（図25）。

【0208】

c. 生存時間分析（図26に示される）。上述のように、完全麻痺となっている動物であって、どちらの側を下にして置かれても、10秒以内にその正位置に戻ることができない動物は、ニューロスコア4を有するものとして分類され、そして人道的に安楽死させた。これらの動物は、ALSにより死亡したものとして計数される。疾患進行の帰結としての死の分析は、ナイーブB細胞の静脈内投与に関連する、全生存期間についての有意な恩恵を実証した（ $p = 0.0286$ 、多重比較のためのシダック事後補正を伴う1元配置分散分析；図26）。

【0209】

d. 脊髄運動ニューロンの組織学的解析（図27に示される）。すべての組織学的試料の処理および検査は、処置条件について知らされていない実験者によって実施された。予想されたように、WT対照と比較して、腰髄の前角における運動ニューロンの全体数の非常に有意な減少が、トランスジェニックSOD1動物において観察された。脊髄に見出されるニューロンの全数においては、B細胞で処置されたトランスジェニックSOD1動物と、対照トランスジェニックSOD1動物との間で、有意な差異は観察されなかったが、生理食塩水対照と比較して、B細胞で処置された動物において、死んだ、または死につつつあるこれら運動ニューロンのパーセンテージは、有意に低いことが見出された。

【0210】

結論

ALSのトランスジェニックSOD1-G93Aマウスモデルを用いたこの試験において、連続した10週間にわたりマウスへと週1回投与されたものである、精製された同種成熟ナイーブB細胞の静脈内注入は、以下と関連性を有していた：生理食塩水で処置された対照と比較して、(i) 症状の発症における、統計学的に有意な28日間の遅延、(ii) 生存期間の有意な延長、および(iii) 処置を受けた動物の腰髄に存在する、病的な、死んだ、または死につつつあるニューロンの、有意な減少。処置に関連する、観察可能な有害な副作用は、細胞200,000個/グラムの用量（またはB細胞200億個/Kgの用量）でB細胞の注入を受けた、野生型動物においてもトランスジェニック動物においても、示されなかった。

【0211】

実施例4. パーキンソン病を処置するためのB細胞の投与

治療的有効量のB細胞を含む組成物が、たとえば、本明細書に記載される組成物の任意のものなどが、パーキンソン病を有する対象に投与され得る。パーキンソン病の処置は、

10

20

30

40

50

治療的B細胞（たとえば、Breg細胞）を、パーキンソン病についての適切な動物モデル（たとえば、Bobela W. et al. Overview of mouse models of Parkinson's disease. Curr Protoc Mouse Biol. (2014)を参照されたい）に投与すること、および当業者に公知の手法にしたがって治療有効性をモニタリングすることによって、本明細書に記載される方法を用いて評価され得る。応答をモニタリングするための方法は、運動機能、疼痛、神経炎症、および黒質ニューロンの死の評価を含む（たとえば、Peng Q. et al. The Rodent Models of Dyskinesia and Their Behavioral Assessment. Front Neurol. (2019)を参照されたい）。

【0212】

処置への応答性は、疾患の進行速度の低下（たとえば、パーキンソン病に関連する症状の重篤性によって測定される、進行速度の低下）によってモニターされ得る。代わりに、処置への応答性は、神経変性疾患に関連する、疾患進行の分子マーカーのレベルを決定することによってもモニターされ得、これはたとえば、T-タウ（総タウ）、P-タウ（高リン酸化タウ）、A β 42（アミロイド β 42）、A β 42/A β 40の比率、YKL-40（キチナーゼ3様タンパク質1）、VLP-1（ビシニン様タンパク質1）、NFL（ニューロフィラメント軽鎖）、pNFH（リン酸化ニューロフィラメント重鎖サブユニット）、Ng（ニューログラニン）、およびUCH-L1（ユビキチンC末端ヒドロラーゼ）、TDP-43（TAR DNA結合タンパク質43）、 α -シヌクレインの減少、および／または3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸のレベルの低下などである（たとえば、Robey and Panegyres. Cerebrospinal fluid biomarkers in neurodegenerative disorders. Future Neurol. 14(1). (2019)を参照されたい）。

【0213】

実施例5. さらに神経変性疾患を処置するためのB細胞の投与

他の神経変性疾患は、B細胞（たとえばBreg細胞）を適切な動物モデルに投与することによって、本明細書に記載される方法を用いて評価され得る。さらなる神経変性疾患は、以下を含む：アルツハイマー病、慢性外傷性脳症（CTE）、前頭側頭型認知症、ハンチントン病、乳児神経軸索ジストロフィー、進行性核上性麻痺、レビー小体型認知症、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、および運動ニューロン疾患。

【0214】

そのような神経変性疾患の研究のための例示的な動物モデルは、当技術分野において、たとえば以下に、記述されている：

アルツハイマー病（たとえば、Esquerda-Canals G. et al. Mouse Models of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. (2017)を参照されたい）；

慢性外傷性脳症（CTE）（たとえば、Dapul HR, et al. Concussive injury before or after controlled cortical impact exacerbates histopathology and functional outcome in a mixed traumatic brain injury model in mice. J Neurotrauma. 30(5):382-91 (2013)を参照されたい）；および

ハンチントン病（たとえば、Farshim PP et al. Mouse Models of Huntington's Disease. Methods Mol Biol. (2018)を参照されたい）。

【0215】

処置への応答性は、疾患の進行速度の低下（たとえば、神経変性疾患に関連する症状の重篤性によって測定される、進行速度の低下）によって、モニターされ得る。代わりに、処置への応答性は、神経変性疾患に関連する、疾患進行の分子マーカーのレベルを決定することによってもモニターされ得、これはたとえば、実施例4に提供される、疾患進行の分子マーカーなどである。

【0216】

実施例6. 炎症性疾患または免疫性疾患を処置するためのB細胞の投与

本明細書に記載されるB細胞は、炎症性障害または免疫性障害を処置するために投与され得、これはたとえば、嚢胞性線維症、心血管疾患（たとえば、冠動脈疾患または大動脈弁狭窄症）、円錐角膜、球状角膜、変形性関節症、骨粗鬆症、肺動脈性肺高血圧症、網膜

10

20

30

40

50

色素変性症、または関節リウマチなどである。これらの炎症性障害または免疫性障害の処置は、治療的B細胞（たとえば、Breg細胞）を適切な動物モデルに投与すること、および当業者に公知の方法にしたがって治療有効性をモニタリングすることによって、本明細書に記載される方法を用いて評価され得る。

【0217】

そのような炎症性疾患または免疫性疾患の研究のための例示的な動物モデルは、当技術分野において、たとえば以下に、記述されている：

嚢胞性線維症（たとえば、Dreano, E. et al. Characterization of two rat models of cystic fibrosis-KO and F508del CFTR-Generated by Crispr-Cas9. *Animal Model Exp Med*. 2(4):297-311 (2019)を参照されたい）；

10

心血管疾患（Goodchild, T.T. et al. Bone marrow-derived B cells preserve ventricular function after acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv*. 2(10):1005-16 (2009))；

円錐角膜（たとえば、Tachibana M. et al. Androgen-dependent hereditary mouse keratoconus: linkage to an MHC region. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43(1):51-7 (2002)を参照されたい）；

変形性関節症（たとえば、Kuyinu, E.L. et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res*. 11:19 (2016)を参照されたい）；

骨粗鬆症（たとえば、Komori T. Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol*. 759:287-94 (2015)を参照されたい）；

20

肺動脈性肺高血圧症（たとえば、Sztuka K. and Jasinska-Stroschein M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. *Pharmacol Res*. 125(Pt B):201-214 (2017)を参照されたい）；

網膜色素変性症（たとえば、Tsubura A. et al. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU: disease progression, mechanisms and therapeutic trials. *Histol Histopathol*. 25(7):933-44 (2010)を参照されたい）；および

関節リウマチ（たとえば、Asquith D.L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 39(8):2040-4 (2009)を参照されたい）。

30

【0218】

本明細書において言及されるすべての刊行物（米国特許仮出願第62/795,629号、同第62/837,765号、および同第62/965,032号を含む、特許ならびに特許出願を含む）は、個々の刊行物または特許がそれぞれ、参照により組み入れられるように具体的にかつ個々に示された場合と同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

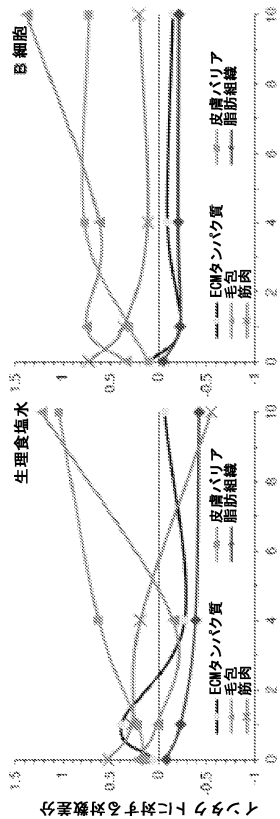
【0219】

他の態様

本明細書に記載される本発明をさまざまな用途および条件へと導入するために、本発明に対し変更および改変がなされ得ることは、上述の説明から明らかである。そのような態様もまた、添付の特許請求の範囲のうちにある。

40

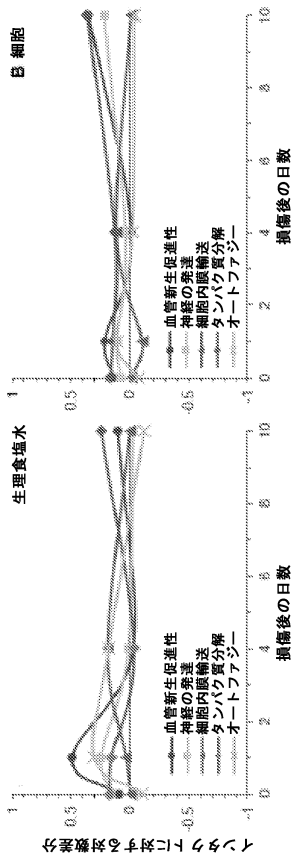
【図 2 - 3】



F

E

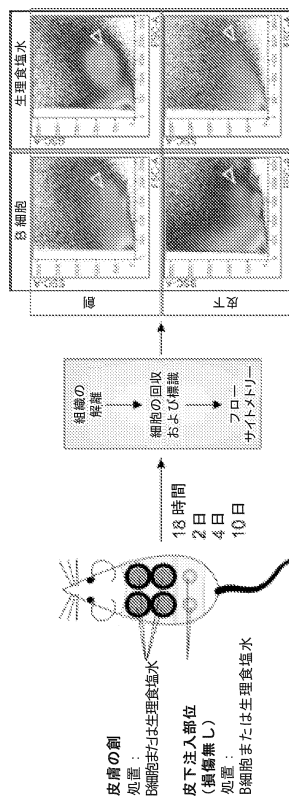
【図 2 - 4】



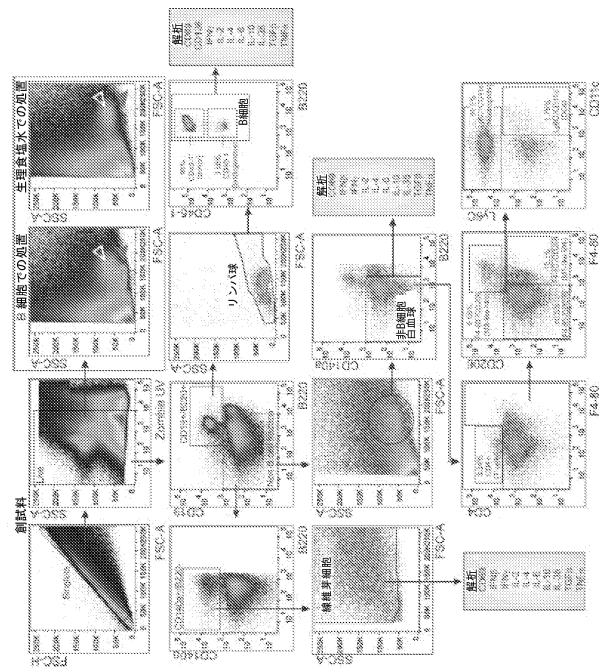
H

G

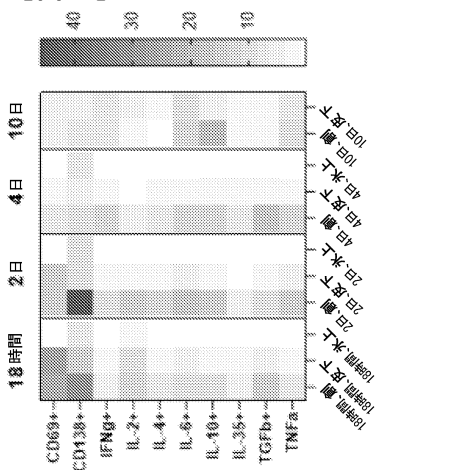
【図 3】



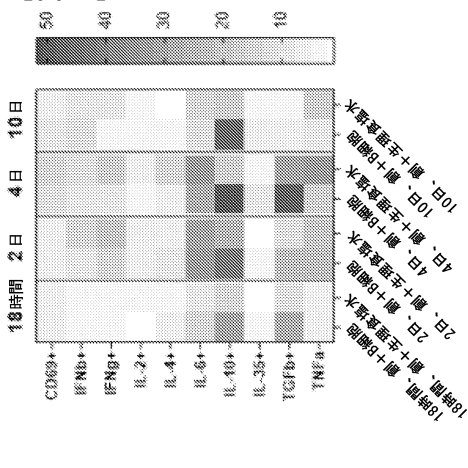
【図 4】



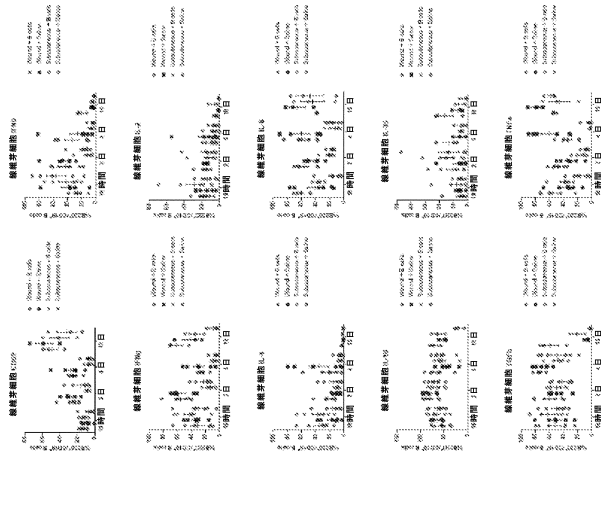
【圖 6】



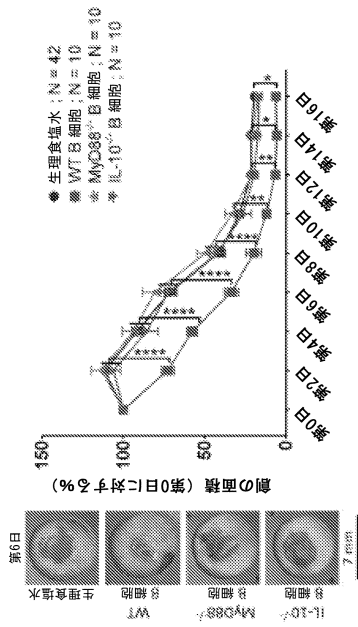
【圖 8】



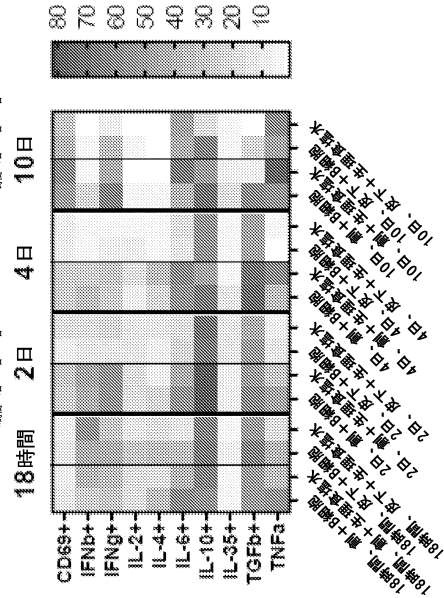
【図 9】



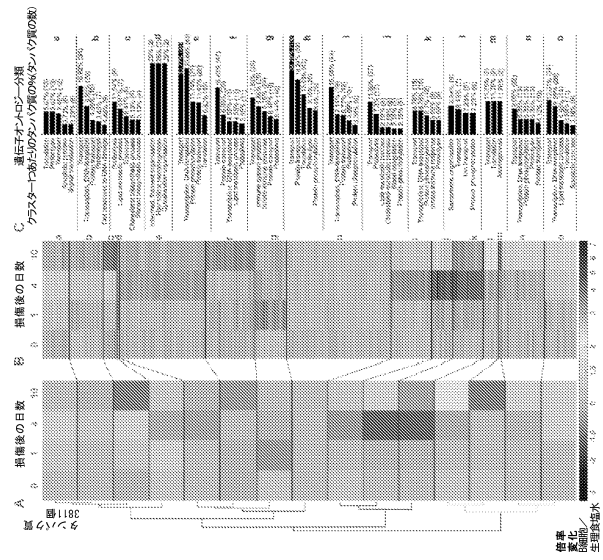
【図 11】



【図 10】



【図 12】



10

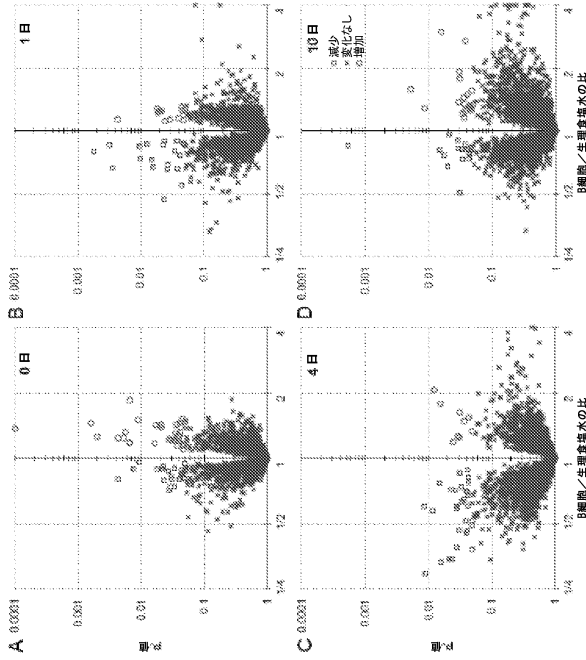
20

30

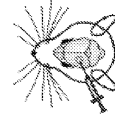
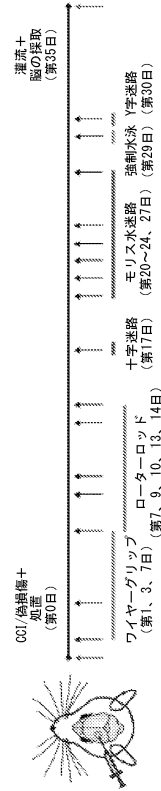
40

50

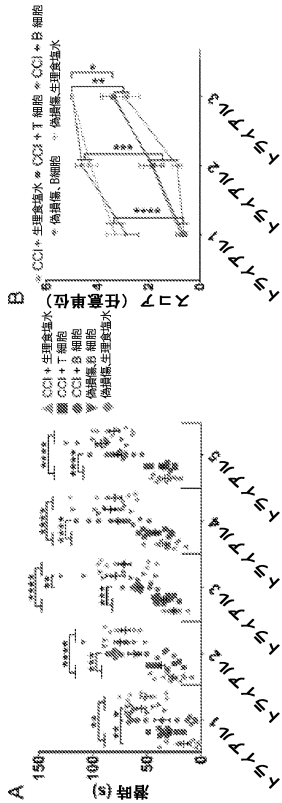
【図 13】



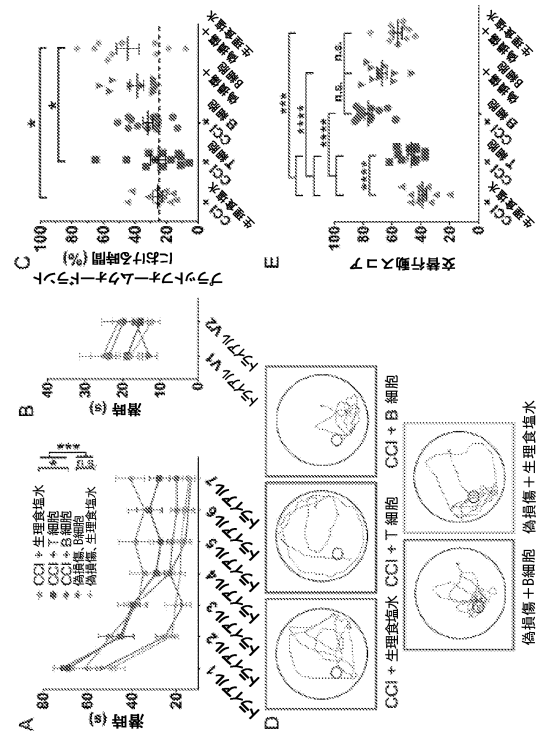
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

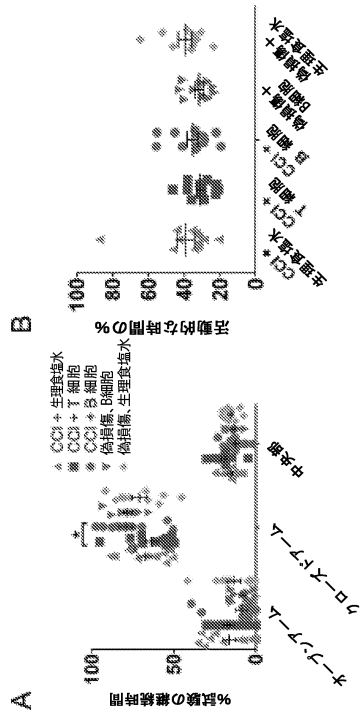
20

30

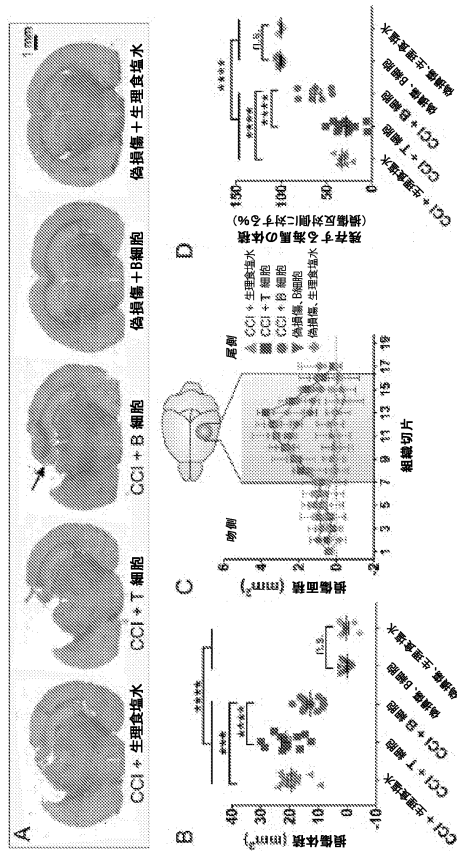
40

50

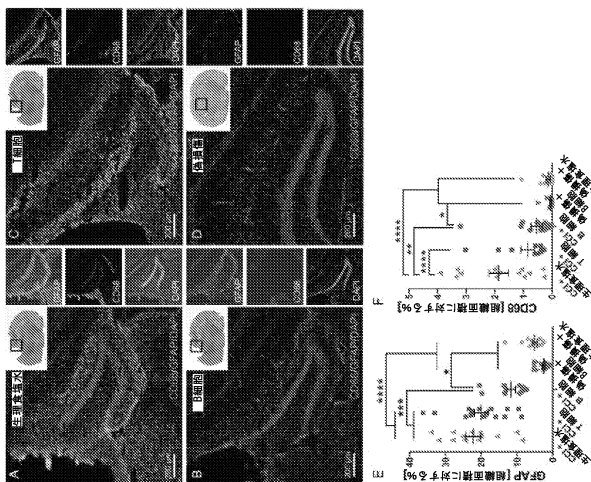
【図 17】



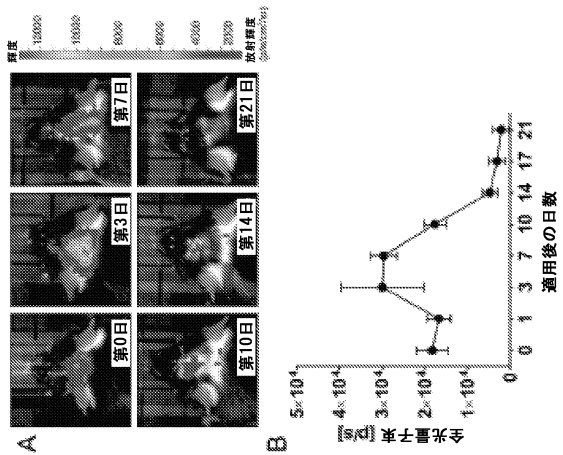
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

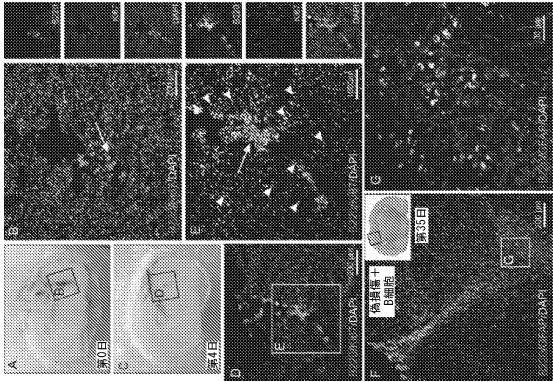
20

30

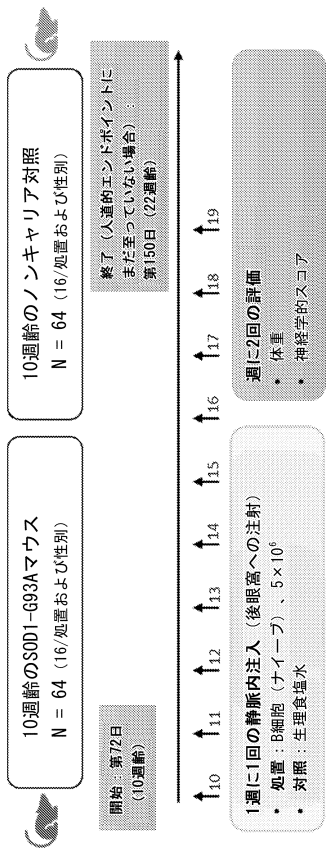
40

50

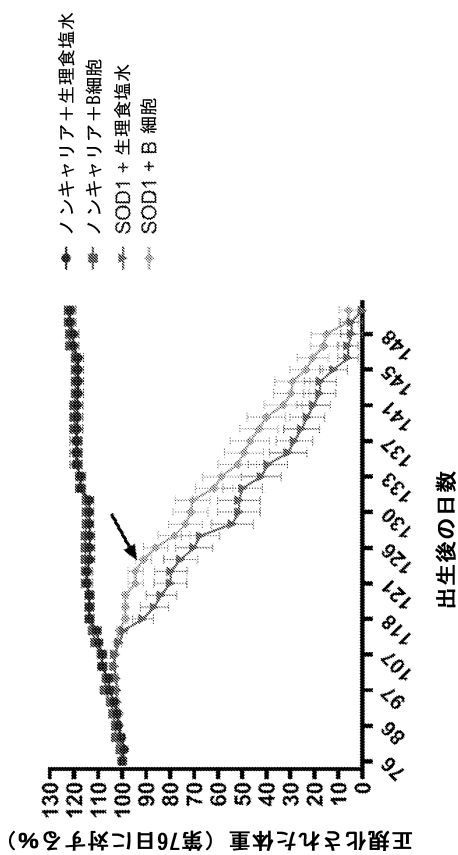
【図 2 1】



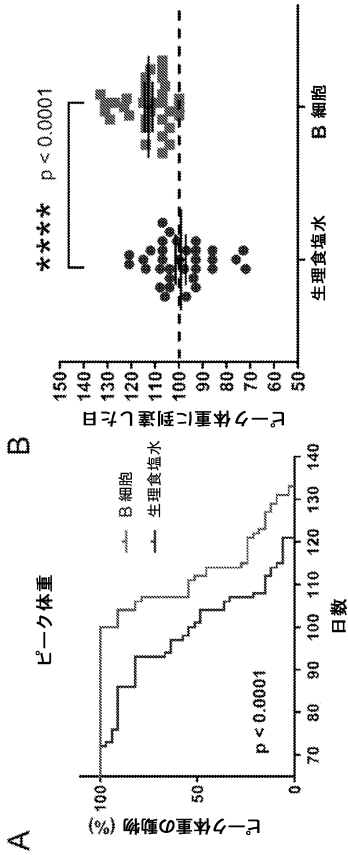
【図 2 2】



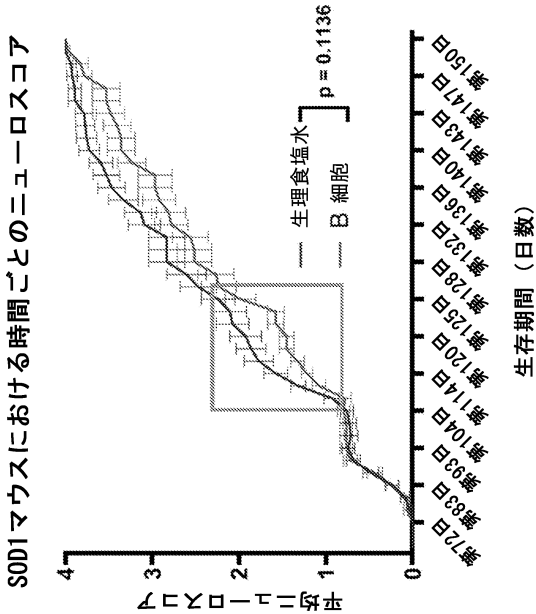
【図 2 3】



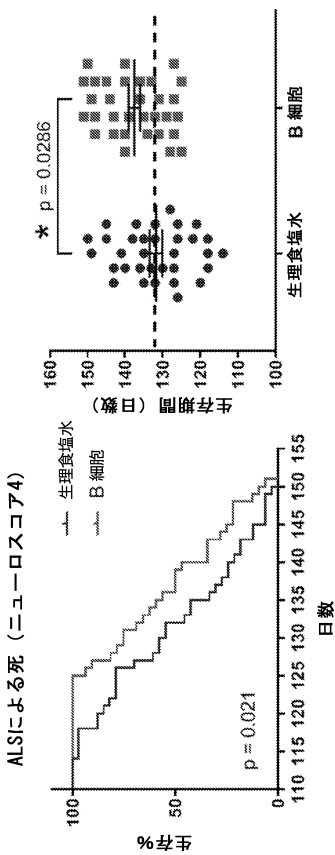
【図 2 4】



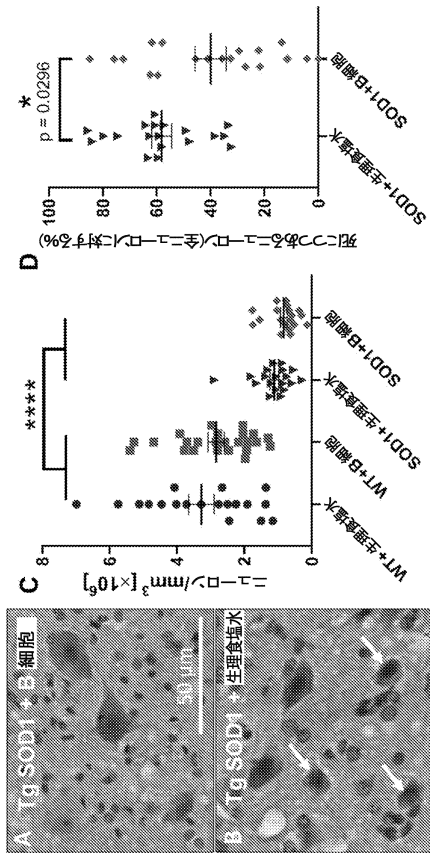
【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
C 1 2 N	5/0781(2010.01)	C 1 2 N	5/0781

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/795,629

(32)優先日 平成31年1月23日(2019.1.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ポズナンスキー マーク シー.

アメリカ合衆国 0 2 1 1 4 マサチューセッツ州 ボストン フルーツ ストリート 5 5 ザ ジェ
ネラル ホスピタル コーポレーション内

(72)発明者 シルブレスク ルクサンドラ エフ.

アメリカ合衆国 0 2 1 1 4 マサチューセッツ州 ボストン フルーツ ストリート 5 5 ザ ジェ
ネラル ホスピタル コーポレーション内

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 7 5 0 5 9 (US, A 1)

国際公開第 2 0 0 5 / 0 7 5 4 3 4 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 2 8 2 9 6 (US, A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 2 9 0 8 4 (JP, A)

Cellular and Molecular Immunology, 2018年01月08日, Vol. 15, pp. 727-730

J Immunol., 2012年, 188(7), 3188-3198

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K

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 (S T N)