(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年2月2日(02.02.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/007779 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A61K 31/5377* (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01) *A61P 25/02* (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/005504

(22) 国際出願日： 2022年2月10日(10.02.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-126207 2021年7月30日(30.07.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: 角家 健(**KADOYA Ken**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 山本 康弘(**YAMAMOTO Yasuhiro**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

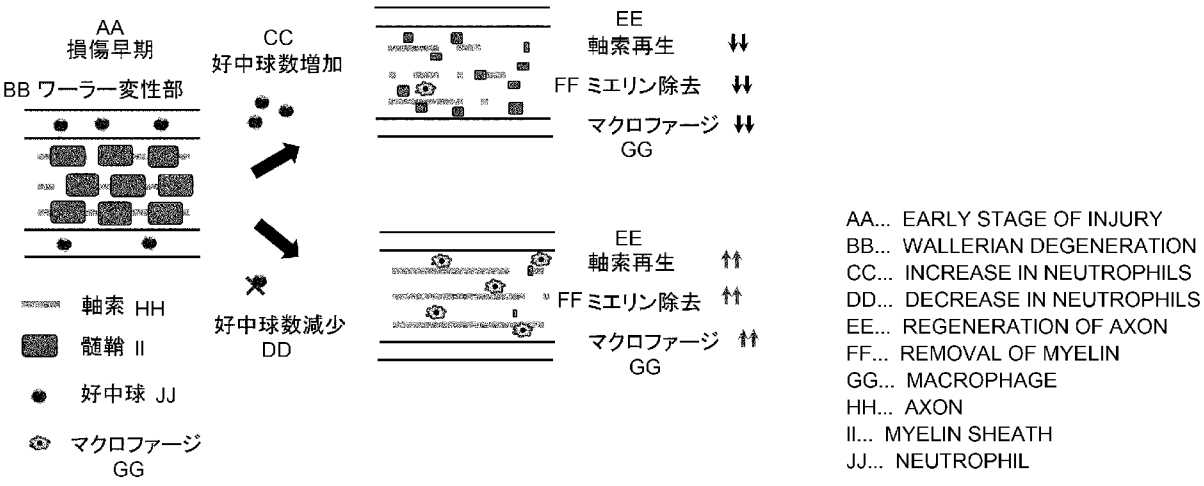
(74) 代理人: 特許業務法人ＩＰアシスト特許事務所(**IP-ASSIST PATENT OFFICE**); 〒0600002 北海道札幌市中央区北２条西３丁目１番地 太陽生命札幌ビル７階 Hokkaido (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PERIPHERAL NERVE INJURY

(54) 発明の名称： 末梢神経損傷の治療のための医薬組成物

[図23]



(57) **Abstract:** The present invention provides a pharmaceutical composition for treating peripheral nerve injury, said pharmaceutical composition comprising a substance that inhibits the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) outside the parenchyma of injured peripheral nerves, for example, a substance that inhibits the accumulation of neutrophils in injured peripheral nerves, a substance that suppresses the expression or inhibits the function of macrophage migration inhibitory factor (MIF), etc. The present invention further provides a method for evaluating the peripheral nerve regeneration-promoting activity of a test substance using, as an indicator, the activity to inhibit the formation of NETs outside the parenchyma of injured peripheral nerves, for example, the activity to inhibit the accumulation of neutrophils in injured peripheral nerves, the activity to suppress the expression of MIF or the activity to inhibit the function thereof, etc.

WO 2023/007779 A1

[続葉有]

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約:本発明は、損傷末梢神経の実質外における好中球細胞外トラップ(Neurophil Extracellular Traps; NETs)の形成を抑制する物質、例えば損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質、マクロファージ遊走阻止因子(Macrophage migration inhibitory factor; MIF)の発現を抑制する又は機能を阻害する物質等を含む、末梢神経損傷の治療のための医薬組成物を提供する。本発明はまた、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性、例えば損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する活性、MIFの発現を抑制する活性又は機能を阻害する活性等を指標とした被験物質の末梢神経再生促進活性を評価する方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 末梢神経損傷の治療のための医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、損傷末梢神経の実質外における好中球細胞外トラップ（Neutrophil Extracellular Traps; NETs）の形成を抑制する物質を含む、末梢神経損傷の治療のための医薬組成物に関する。本発明はまた、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性を指標とした、被験物質の末梢神経再生促進活性を評価する方法に関する。

背景技術

[0002] 外傷その他の原因によって末梢神経を損傷した場合、現在行われている治療は、経過観察、縫合、及び自家神経又は神経再生誘導チューブ（人工神経）を用いた再建である。自家神経移植は、末梢神経再建のゴールドスタンダードであるが、移植のために損傷部位以外の健常な自家神経の採取を要するという問題を伴うため、自家神経を犠牲にしない新規の末梢神経再生方法の開発が望まれている。

[0003] 末梢神経の再生は、中枢神経と比較すると旺盛ではあるものの、近位部損傷、重度損傷及び再建例における臨床成績は良好ではない。筋肉は神経支配喪失から3～6ヶ月を過ぎると神経再支配の感受性を失う傾向にあるため、末梢神経損傷の治療においてはできる限り早期に軸索を再生して筋肉に到達させて神経再支配を成立させることが重要となる。しかしながら、軸索再生速度は通常1～2 mm/日程度であることを考慮すると、一般に30 cm～90 cm程度の長距離の軸索再生が必要とされる近位部損傷では、再生軸索が筋肉に到達する頃には神経再支配の感受性は失われてしまう。また、重度損傷及び再建例においては、より多くの軸索を再生させる必要がある。

[0004] 末梢神経損傷から再生までの過程は次のとおりである。末梢神経が損傷して軸索が断裂すると、断裂部の遠位でワーラー変性を生じ、軸索や髄鞘（ミエリン）の断片化が起こる。断片化した軸索やミエリンはシュワン細胞及び

マクロファージの食作用によって除去される。次いで活性化したシュワン細胞が断裂部遠位に整列して軸索再生の足場となることで、軸索の発芽及び伸長が促される。その後、軸索の再髄鞘化と標的器官とのシナプスが再形成されることで神経再生は完了する。

[0005] 末梢神経損傷の治療、特に臨床成績が良好でない近位部損傷、重度損傷及び再建例の治療においては、上記の神経再生過程の制御を通じて軸索再生の速度及び量を向上させることが求められる。損傷した末梢神経の再生を促進する手段は複数報告されているが（例えば、特許文献１及び２）、未だ臨床応用に至ったものは存在しない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO2018/056412

特許文献2：WO2005/074655

発明の開示

[0007] 本発明は、損傷した末梢神経の再生治療に利用可能な、軸索再生を促進するための新たな手段を提供する。

[0008] 本発明者らは、好中球がNETsを介して損傷末梢神経の再生過程を遅延していることを見出した。

[0009] 本開示は、以下を提供する。

項１． 損傷末梢神経の実質外における好中球細胞外トラップ（Neurophil Extracellular Traps; NETs）の形成を抑制する物質を含む、末梢神経損傷の治療のための医薬組成物。

項２． 損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質が、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質、好中球のNETs産生を阻害する物質、又はNETsを分解する物質である、項１に記載の医薬組成物。

項３． 損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質が、好中球に対する抗体及びその抗原結合性断片、好中球に対するアプタマー、好中球遊走刺激因子に対する阻害剤、並びに好中球遊走阻害因子よりなる群から選択される

、項２に記載の医薬組成物。

項４．　好中球のNETs産生を阻害する物質が、マクロファージ遊走阻止因子（Macrophage migration inhibitory factor; MIF）の発現を抑制する又は機能を阻害する物質、CXCモチーフ型ケモカイン受容体4（CXCR4）の発現を抑制する又は機能を阻害する物質、及びペプチジルアルギニンデイミナーゼ4（Peptidylarginine deiminase; PAD4）の発現を抑制する又は機能を阻害する物質よりなる群から選択される、項２に記載の医薬組成物。

項５．　MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する物質が、MIFの発現を抑制する核酸、MIFに対する抗体及びその抗原結合性断片、MIFに対するアプタマー、並びにMIF阻害剤よりなる群から選択される、項４に記載の医薬組成物。

項６．　MIF阻害剤がISO-1 ((S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid) 又は(±)-CPSI 1306 (2-[3-(3-(2,4-Difluorophenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl]-1-(4-morpholinyl)ethanone) である、項５に記載の医薬組成物。

項７．　CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質が、CXCR4の発現を抑制する核酸、CXCR4に対する抗体及びその抗原結合性断片、CXCR4に対するアプタマー、並びにCXCR4阻害剤よりなる群から選択される、項４に記載の医薬組成物。

項８．　CXCR4阻害剤がプレリキサホルである、項７に記載の医薬組成物。

項９．　PAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質が、PAD4の発現を抑制する核酸、PAD4に対する抗体及びその抗原結合性断片、PAD4に対するアプタマー、並びにPAD4阻害剤よりなる群から選択される、項４に記載の医薬組成物。

項１０．　PAD4阻害剤がCl-アミジンである、項９に記載の医薬組成物。

項１１．　NETsを分解する物質がDNase Iである、項２に記載の医薬組成物。

項１２．　末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いるための、項１～１１のいずれか一項に記載の医薬組成物。

項１３．　損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性を指標

とした、被験物質の末梢神経再生促進活性を評価する方法。

項１４．　損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性が、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する活性、好中球のNETs産生を阻害する活性、又はNETsを分解する活性である、項１３に記載の方法。

項１５．　好中球のNETs産生を阻害する活性が、MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する活性、CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する活性、及びPAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質よりなる群から選択される、項１４に記載の方法。

[0010]　本開示はまた、以下を提供する。

項１Ａ．　損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質、又はMIFの発現を抑制する若しくは機能を阻害する物質を含む、末梢神経損傷の治療のための医薬組成物。

項２Ａ．　損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質が、好中球に対する抗体及びその抗原結合性断片、好中球遊走刺激因子に対する阻害剤、並びに好中球遊走阻害因子よりなる群から選択される少なくとも1種の物質である、項１に記載の医薬組成物。

項３Ａ．　MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する物質が、MIFの発現を抑制する核酸、MIFに対する抗体及びその抗原結合性断片、並びにMIF阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種の物質である、項１に記載の医薬組成物。

項４Ａ．　MIF阻害剤がISO-1 ((S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid) 又は(±)-CPSI 1306 (2-[3-(3-(2,4-Difluorophenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl]-1-(4-morpholinyl)ethanone) である、項３に記載の医薬組成物。

項５Ａ．　末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いるための、項１～項４のいずれか一項に記載の医薬組成物。

項６Ａ．　損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する活性を指標とした、被験物質の末梢神経再生促進活性を評価する方法。

項７Ａ．　MIFの発現を抑制する活性又は機能を阻害する活性を指標とした、被験物質の末梢神経再生促進活性を評価する方法。

[0011]　本開示によると、軸索再生の促進を通じて、効果的な末梢神経損傷の治療を実現することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]圧挫損傷作成12時間後のラット坐骨神経縦断切片の代表的なHE染色画像である。上段は弱拡大像、中段は神経上膜に相当する領域（弱拡大像の*の領域）の強拡大像、下段は神経実質に相当する領域（弱拡大像の**の領域）の強拡大像である。矢印は好中球を示す。

[図2]圧挫損傷作成12時間後のラット坐骨神経損傷部から20 mm遠位における縦断切片の代表的な免疫染色画像である。左側及び中央の３つの画像はいずれもLy-6G免疫染色、I型コラーゲン免疫染色及びDAPI染色の画像をマージしたものであり、左は弱拡大像、中央上は神経上膜に相当する領域（左画像の上側四角枠内）の強拡大像、中央下は神経実質に相当する領域（左画像の下側四角枠内）の強拡大像である。右側の２つの画像はいずれもNeutrophil elastase（NE）免疫染色及びDAPI染色の画像をマージしたものであり、右上は神経上膜に相当する領域の強拡大像、右下は神経実質に相当する領域の強拡大像である。画像内の破線は神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を、矢印は好中球を示す。

[図3]圧挫損傷作成12時間後のラット坐骨神経において検出された神経単位面積あたりの好中球数を、損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図4]圧挫損傷作成後のラット坐骨神経において検出された神経単位面積あたりの好中球数を、損傷部からの距離及び損傷作成からの経過時間ごとに表したグラフである。

[図5]圧挫損傷作成7日後のラット坐骨神経縦断切片の代表的なCD68（マクロファージのマーカー）免疫染色画像である。画像内の破線は、神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を示す。

[図6]圧挫損傷作成後のラット坐骨神経において検出された神経実質単位面積あたりのマクロファージ数を、損傷部からの距離及び損傷作成からの経過時間ごとに表したグラフである。

[図7]圧挫損傷作成1時間後から7日後までのラット坐骨神経の、損傷部から20 mm遠位における縦断切片の代表的なCD68免疫染色画像である。画像内の破線は、神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を示す。

[図8]圧挫損傷作成直後に抗好中球抗体又はコントロール抗体を腹腔内投与したラット（図中、それぞれ、anti-PMN antibody及びCtrl antibody）及び圧挫損傷作成のみを行ったラット（図中、injury alone）における血中好中球数の経時変化を示すグラフである。

[図9]圧挫損傷作成直後に抗好中球抗体又はコントロール抗体を腹腔内投与したラット、及び圧挫損傷作成のみを行ったラットの、圧挫損傷作成12時間後の坐骨神経損傷部から5 mm遠位における縦断切片の代表的なHE染色画像である。

[図10]圧挫損傷作成直後に抗好中球抗体又はコントロール抗体を腹腔内投与したラット、及び圧挫損傷作成のみを行ったラットの、圧挫損傷作成12時間後の坐骨神経において検出された神経単位面積あたりの好中球数を、損傷部からの距離ごとに表したグラフである。

[図11]圧挫損傷作成直後に抗好中球抗体又はコントロール抗体を腹腔内投与したラット、及び圧挫損傷作成のみを行ったラットの、圧挫損傷作成12時間後（上段）及び7日後（下段）の坐骨神経において検出された神経実質単位面積あたりのマクロファージ数を、損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図12]圧挫損傷作成直後に抗好中球抗体又はコントロール抗体を腹腔内投与したラット、及び圧挫損傷作成のみを行ったラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なβ3 tubulin免疫染色画像である。

[図13]圧挫損傷作成直後に抗好中球抗体又はコントロール抗体を腹腔内投与したラット、及び圧挫損傷作成のみを行ったラットの、圧挫損傷作成7日後の

坐骨神経の軸索再生率を、損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図14]圧挫損傷作成直後に抗好中球抗体又はコントロール抗体を腹腔内投与したラット、及び圧挫損傷作成のみを行ったラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なMBP（Myelin Basic Protein）免疫染色画像（損傷部から25 mm遠位、上段）、及びMBP陽性率のグラフ（下段）である。

[図15]好中球又はPBSを静脈内投与したマウス（図中、それぞれ、Neutrophil infusion及びPBS infusion）、及び圧挫損傷作成のみを行ったマウス（図中、injury alone）における、圧挫損傷作成12時間後の血中好中球数を示すグラフである。

[図16]好中球又はPBSを静脈内投与したマウスの、圧挫損傷作成12時間後の坐骨神経損傷部から4 mm遠位における横断切片の代表的なHE染色画像及び免疫染色画像である。左側の２つは好中球投与マウスのHE染色画像、中央の２つは好中球投与マウスの免疫染色画像、右側の２つはPBS投与マウスの免疫染色画像である。いずれも下段は神経上膜に相当する領域（対応する上段画像の四角枠内）の強拡大像である。画像内の破線は神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を、破線で囲まれた領域は神経実質を表し、矢印は好中球を示す。

[図17]好中球又はPBSを静脈内投与したマウス、及び圧挫損傷作成のみを行ったマウスの、圧挫損傷作成12時間後の坐骨神経において検出された神経単位面積あたりの好中球数を、損傷部からの距離ごとに表したグラフである。

[図18]好中球又はPBSを静脈内投与したマウス、及び圧挫損傷作成のみを行ったマウスの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経において検出された神経実質単位面積あたりのマクロファージ数を、損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図19]好中球又はPBSを静脈内投与したマウス、及び圧挫損傷作成のみを行ったマウスの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経横断切片の代表的なβ3 tubulin免疫染色画像である。

[図20]好中球又はPBSを静脈内投与したマウス、及び圧挫損傷作成のみを行ったマウスの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経の軸索密度を、損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図21]好中球又はPBSを静脈内投与したマウス、及び圧挫損傷作成のみを行ったマウスの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なMBP免疫染色画像である。

[図22]好中球又はPBSを静脈内投与したマウス、及び圧挫損傷作成のみを行ったマウスの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経のMBP陽性率を、損傷部からの距離ごとに表したグラフである。

[図23]好中球による軸索再生過程制御の概念図である。

[図24]未処置の正常なラット坐骨神経縦断切片、及び圧挫損傷作成12時間後のラット坐骨神経の損傷部から20 mm遠位における縦断切片の代表的な免疫染色画像である。それぞれCitH3免疫染色、Ly6G免疫染色、CD68免疫染色、DAPI染色の画像又はこれらの複数をマージした画像である。中央上段及び右側上段の画像は弱拡大像（スケールバー100μm）で、それぞれの四角枠内の強拡大像が中央下段及び右側下段の各々３つの画像（スケールバー10μm）である。画像内の破線は神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を、矢印はNETsと好中球の共局在を示す。

[図25]PAD4阻害剤のCl-アミジンを含有するシート、DNase Iを含有するシート又は対照シートのいずれかを用いて損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成12時間後の、損傷部位から20 mm遠位における坐骨神経縦断切片の代表的なCitH3及びLy-6G免疫染色画像とCitH3陽性面積のグラフである。各群とも左側の画像は弱拡大像（スケールバー100μm）で、それぞれの四角枠内の強拡大像が右側の画像（スケールバー10μm）である。画像内の破線は神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を示す。

[図26]PAD4阻害剤のCl-アミジンを含有するシート、DNase Iを含有するシート又は対照シートのいずれかを用いて損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成12時間後の、損傷部位から20 mm遠位に

おける坐骨神経縦断切片の代表的なCD68免疫染色画像（スケールバー50μm）と、神経実質単位面積あたりのマクロファージ数のグラフである。

[図27]DNase Iを含有するシートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なβ3 tubulin免疫染色画像（上段）、及び坐骨神経の軸索再生率を損傷部からの距離ごとに表したグラフ（下段）である。

[図28]DNase Iを含有するシートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経において検出された神経実質単位面積あたりのマクロファージ数を、損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図29]未処置の正常なラット坐骨神経縦断切片（上段）、及び圧挫損傷作成12時間後のラット坐骨神経の損傷部から10 mm遠位における縦断切片（下段）の代表的なMIF免疫染色画像である。上段の２つ及び下段左側の画像は弱拡大像であり、下段右側３つの画像は、下段左画像内の四角枠で示される神経上膜に相当する領域の強拡大像である。また、右下の「Merge」の表示がある画像は、MIF免疫染色、Ly-6G免疫染色及びDAPI染色の画像をマージしたものである。画像内の破線は、神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を示す。

[図30]MIF阻害剤iso-1を含有するシート又は対照シートで損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成12時間後の坐骨神経損傷部から5 mm遠位における縦断切片の代表的なCD68免疫染色画像、及び神経実質単位面積あたりのマクロファージ数のグラフである。

[図31]iso-1を含有するシート又は対照シートで損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成12時間後の坐骨神経損傷部から20 mm遠位における縦断切片の代表的なCD68免疫染色画像、及び神経実質単位面積あたりのマクロファージ数のグラフである。

[図32]iso-1を含有するシート又は対照シートで損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成12時間後の損傷部から20 mm遠

位における坐骨神経縦断切片の代表的な免疫染色画像とCitH3陽性面積のグラフである。各群とも左側の画像は弱拡大像（スケールバー100μm）で、それぞれの四角枠内の強拡大像が右側の画像（スケールバー10μm）である。画像内の破線は神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を示す。

[図33]iso-1を含有するシート又は対照シートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なCD68免疫染色画像、及び神経実質単位面積あたりのマクロファージ数のグラフである。

[図34]iso-1を含有するシート又は対照シートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なCD163免疫染色画像、及び神経実質単位面積あたりのM2マクロファージ数のグラフである。

[図35]iso-1を含有するシート又は対照シートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なβ3 tubulin免疫染色画像、及び坐骨神経の軸索再生率を損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図36]iso-1を含有するシート、MIF阻害剤CPSI-1306を含有するシート又は対照シートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なβ3 tubulin免疫染色画像である。

[図37]iso-1を含有するシート、MIF阻害剤CPSI-1306を含有するシート又は対照シートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経の軸索再生率を損傷部からの距離に対してプロットしたグラフ（左図）、及び最長軸索長のグラフ（右図）である。

[図38]未処置の正常なラット坐骨神経縦断切片、及び圧挫損傷作成12時間後のラット坐骨神経の損傷部から20 mm遠位における縦断切片の代表的な免疫染色画像である。左から2番目の画像はCXCR4免疫染色、左から3番目の画像はLy-6G免疫染色、その他の画像はCitH3免疫染色、Ly-6G免疫染色及びDAPI染色の

画像をマージしたものである。左側４つの画像は弱拡大像（スケールバー20μm）で、四角枠内の強拡大像が右側の画像（スケールバー10μm）である。画像内の破線は神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を、矢印はCXCR4と好中球の共局在を示す。

[図39]AMD3100を含有するシート又は対照シートで損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成12時間後の損傷部から20 mm遠位における坐骨神経縦断切片の代表的な免疫染色画像とCitH3陽性面積のグラフである。各群とも左側の画像は弱拡大像（スケールバー100μm）で、それぞれの四角枠内の強拡大像が右側の画像（スケールバー10μm）である。画像内の破線は、神経実質と神経実質外（神経上膜）の境界線を示す。

[図40]AMD3100を含有するシート又は対照シートで損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成12時間後の、損傷部位から20 mm遠位における坐骨神経縦断切片の代表的なCD68免疫染色画像（スケールバー50μm）と、神経実質単位面積あたりのマクロファージ数のグラフである。

[図41]AMD3100を含有するシートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経縦断切片の代表的なβ3 tubulin免疫染色画像（上段）、及び坐骨神経の軸索再生率を損傷部からの距離ごとに表したグラフ（下段）である。

[図42]AMD3100を含有するシートで損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を処理したラットの、圧挫損傷作成7日後の坐骨神経において検出された神経実質単位面積あたりのマクロファージ数を、損傷部からの距離に対してプロットしたグラフである。

[図43]好中球によるNETsを介した軸索再生過程制御の概念図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下に示す説明は、代表的な実施形態又は具体例に基づくことがあるが、本発明はそのような実施形態又は具体例に限定されるものではない。また、タンパク質及び遺伝子に関する説明は、特に断らない限り、ヒト由来のタン

パク質及び遺伝子を例として行うが、本発明において利用されるタンパク質及び遺伝子はヒト由来のものに限定されず、また本発明の適用対象はヒトに限定されない。

[0014] 本明細書において示される各数値範囲の上限値及び下限値は、任意に組み合わせることができる。また、本明細書において「～」又は「-」を用いて表される数値範囲は、特に断りがない場合、その両端の数値を上限値及び下限値として含む範囲を意味する。

[0015] 本発明は、一態様において、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質を含む、末梢神経損傷の治療のための医薬組成物を提供する。

[0016] 好中球は、顆粒球の１種であり、骨髄で分化成熟した後、通常は骨髄（貯留プール）、末梢血（循環プール）、及び血管壁や組織等（辺縁プール）に貯蔵されている。組織損傷によって炎症が起こると、好中球は、炎症部位で産生される炎症性サイトカインやケモカイン等の好中球遊走刺激因子に反応して損傷部に集積し、組織の修復や再生に関与することが知られている。

[0017] NETsは、好中球によって放出される、シトルリン化されたヒストンタンパク質を含むクロマチン及び細胞内抗菌タンパク質から構成される網目状の構造物である。NETsは、宿主防御や自己免疫疾患に関与することが知られている（Kely Campos Navegantes et al., Journal of Translational Medicine, 2017, vol. 15, no. 36, DOI 10.1186/s12967-017-1141-8）。

[0018] 本発明者らは、末梢神経損傷部の遠位では、最初に神経実質外に好中球が集積し、その後、好中球の消失と共に神経実質内にマクロファージが集積すること、好中球の集積を阻害するとマクロファージが早期かつ多量に神経実質内に集積し、軸索再生が促進され、ミエリンクリアランスも促進されること、逆に集積する好中球の数を増加させるとマクロファージの集積は抑制され、軸索再生及びミエリンクリアランスも抑制されることを見出した。

[0019] 本発明者らはさらに、末梢神経の損傷部遠位では、NETsが神経実質外に存在し、好中球と局在が重なること、神経実質外におけるNETsの形成を抑制するとマクロファージが早期かつ多量に神経実質内に集積し、軸索再生が促進

されることを見出した。NETsの形成を抑制する物質は、末梢神経損傷の治療に有用である。

[0020] 末梢神経における神経の実質とは、神経上膜に囲まれた末梢神経の内部領域を意味し、実質には軸索が神経周膜に包まれて形成される神経束が含まれる。神経の実質外とは、神経上膜及びその周辺領域を意味し、特に神経上膜を意味する。損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質としては、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質、好中球のNETs産生を阻害する物質、及びNETsを分解する物質を挙げることができる。

[0021] 損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質

本開示において用いられる損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質は、好中球が損傷末梢神経に集積することを阻害する能力を有する任意の物質であり、好ましくは、好中球に対する抗体及びその抗原結合性断片、好中球に対するアプタマー、好中球遊走刺激因子に対する阻害剤、並びに好中球遊走阻害因子よりなる群から選択される少なくとも1種の物質である。

[0022] 損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質の1つの例は、好中球に対する抗体又はその抗原結合性断片である。好中球に対する抗体は、好中球に、例えば、好中球の細胞表面に存在するタンパク質に結合して、好中球の数を減少させる、又は好中球の機能を阻害することができる抗体であればよく、好中球に対する特異抗体であることが好ましい。好中球に対する特異抗体としては、例えば、Ly-6ファミリーのGPIアンカー型タンパク質であるLy-6G（骨髄細胞分化抗原Gr-1とも呼ばれる）に対する抗体、抗PMN（polymorphonuclear neutrophil)抗体、抗RP3抗体などが挙げられる。

[0023] 本開示において、特異抗体は、非標的タンパク質よりも標的タンパク質に優先的に結合することができる抗体、又は標的タンパク質に高い結合親和性を有する抗体と表すこともできる。特異抗体は、非標的タンパク質との結合よりも少なくとも5倍強い、好ましくは少なくとも10倍強い、より好ましくは少なくとも100倍強い、最も好ましくは少なくとも1000倍強い親和性を有して標的タンパク質に結合する抗体であり得る。特異抗体はまた、10^{-7} M、好まし

くは10^{-8} M、より好ましくは10^{-9} Mの解離定数を有して標的タンパク質に結合する抗体であってもよい。

[0024] 本開示において用いられる抗体は、例えばマウス、ラット、サメ、ウサギ、ブタ、ハムスター、ラクダ、ラマ、ヤギ又はヒトを包含する任意の種を起源とすることができる。また抗体は、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例としてIgG、IgE、IgM、IgD又はIgA）及びサブクラスのものであることができるが、IgGであることが好ましい。

[0025] 本開示において用いられる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体であり得る。

[0026] 本開示において、抗体の抗原結合性断片は、標的タンパク質と結合する能力を保持した、抗体の部分断片として定義される。抗体の抗原結合性断片は、好ましくは標的タンパク質と特異的に結合する能力を保持した、特異抗体の部分断片であり、例えばFab（fragment of antigen binding）、Fab'、F(ab')2、一本鎖抗体（single chain Fv)、ジスルフィド安定化抗体（disulfide stabilized Fv）及びCDRを含むペプチド等であり得るが、これらには限定されない。

[0027] 抗体及びその抗原結合性断片は、当業者に公知の方法を用いて作製することができる。例えば、標的タンパク質のアミノ酸配列又はこれをコードするDNAの塩基配列に基づいて遺伝子組み換え手法により標的タンパク質を作製し、これを抗原として適当な動物に免疫することで、さらに当該動物のB細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを得ることで作製することができる。ハイブリドーマ法については、例えばMeyaard et al. (1997) Immunity 7:283-290; Wright et al. (2000) Immunity 13:233-242; Kaithamana et al. (1999) J.Immunol. 163:5157-5164等を参照されたい。抗体又はその抗原結合性断片は、さらに他の薬物と結合した抗体薬物複合体であってもよい。

[0028] 損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質の別の例は、好中球に対するアプタマーである。好中球に対するアプタマーは、好中球に、例えば、好

中球の細胞表面に存在するタンパク質に結合して、好中球の数を減少させる、又は好中球の機能を阻害することができる。好中球に対するアプタマーの例は、Ly-6Gに対するアプタマーである。

[0029] アプタマーは、その立体構造によって標的物質と特異的に結合する能力を有する分子である。核酸から構成されるアプタマーは核酸アプタマーと、アミノ酸から構成されるアプタマーはペプチドアプタマーと呼ばれる。本開示においては、核酸アプタマー、ペプチドアプタマーのいずれも用いることができる。

[0030] 本開示において用いられる核酸アプタマーは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、又はデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの両方を構成単位として含むキメラ核酸であり得る。核酸アプタマーは、当業者に公知の方法、例えばSELEX（systematic evolution of ligands by exponential enrichment）法により作製することができる。ペプチドアプタマーは、当業者に公知の方法、例えばファージディスプレイ法や細胞表層ディスプレイ法等により作製することができる。

[0031] 損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質のまた別の例は、インターロイキン8（IL-8）、IL-17、Gro α（Growth-related gene products α）、NAP-2（Neutrophil Activating Protein-2）、MIP-2（Macrophage Inflammatory Protein-2）等のサイトカイン、ロイコトリエンB4等の脂質メディエーター、fMLP（ N-formyl-methionyl-leucyl-phenylanine ）、C5a等の補体成分といった、好中球の遊走を促す因子（好中球遊走刺激因子、好中球遊走因子又は好中球遊走活性化因子とも呼ばれる）に対して阻害活性を示す物質であり、本明細書中では好中球遊走刺激因子に対する阻害剤と呼ぶ。このような阻害剤の例としては、好中球遊走刺激因子に対する抗体、好中球遊走刺激因子の受容体に対するアンタゴニスト等を挙げることができる。

[0032] 損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質のさらなる別の例は、コルヒチン、レゾルビン、プロテクチン、17βエストラジオールといった好中球の遊走を阻害する因子（好中球遊走阻害因子とも呼ばれる）である。

[0033] 好中球のNETs産生を阻害する物質

NETsは、好中球核内でのペプチジルアルギニンデイミナーゼ4（Protein Arginine Deiminase 4; PAD4）によるヒストンタンパク質のシトルリン化、クロマチンの脱凝集、核膜の破綻に伴う核内クロマチンの細胞質への流入、その後のクロマチンと顆粒中の抗菌タンパク質との結合によって細胞質内で形成され、好中球の細胞膜破綻に伴って細胞外に放出される。NETsを放出した好中球は、NETosisと呼ばれる細胞死に至る。

[0034] 本開示において用いられる好中球のNETs産生を阻害する物質は、MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する物質、CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質、及びPAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質よりなる群から、すなわち、MIFの発現を抑制する物質、MIFの機能を阻害する物質、CXCR4の発現を抑制する物質、CXCR4の機能を阻害する物質、PAD4の発現を抑制する物質、及びPAD4の機能を阻害する物質よりなる群から選択することができる。

[0035] MIF（Glycosylation-Inhibiting Factor; GIF、L-dopachrome isomerase、Phenylpyruvate tautomeraseとも呼ばれる）は、T細胞、単球、好中球、マクロファージ等の免疫細胞のほか、脳下垂体細胞、上皮細胞といった多くの細胞で発現する炎症誘発性サイトカインの一種であり、自然免疫及び獲得免疫の両方に関与し、炎症性分子の産生を誘導することが知られている。ヒトMIF遺伝子の塩基配列はNCBI Reference SequenceにNC_000022.11として、mRNAの塩基配列はNM_002415.2として、アミノ酸配列はNP_002406.1として登録されている（いずれも2021年7月19日検索）。

[0036] 本発明者らは、損傷12時間後の末梢神経損傷部遠位では、MIFは神経実質外にのみ存在し、好中球と局在が重なること、MIFを阻害すると損傷末梢神経の実質外における好中球のNETs産生が阻害されること、またMIFを阻害するとマクロファージが早期かつ多量に神経実質内に集積し、軸索再生が促進されることを見出した。本発明は、このような知見に基づいて、一態様において、MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する物質を、末梢神経損傷の治療のため

の医薬組成物に利用するものである。

[0037] 本開示において用いられるMIFの発現を抑制する又は機能を阻害する物質は、MIFの遺伝子又はタンパク質レベルでの発現を抑制する能力を有する、又はMIFの機能を阻害する能力を有する任意の物質であり、好ましくは、MIFの発現を抑制する核酸、MIFに対する抗体及びその抗原結合性断片、MIFに対するアプタマー、並びにMIF阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種の物質である。

[0038] MIFの発現を抑制する物質の１つの例は、MIFの発現を抑制する核酸である。MIFの発現を抑制する核酸は、MIF遺伝子からのmRNA（MIF mRNA）の転写を抑制することができる核酸、MIF mRNAを分解することができる核酸、及びMIF mRNAからのタンパク質翻訳を抑制することができる核酸を包含し、これらの例としては、MIF遺伝子の塩基配列又はMIF mRNAの塩基配列を基にして当業者が設計、作製することができる、アンチセンス核酸、又はRNA干渉を引き起こす核酸、例えばsiRNA、shRNA若しくはmiRNAを挙げることができる。

[0039] MIFの機能を阻害する物質の１つの例は、MIFに対する抗体、好ましくはMIFに対する特異抗体、又はMIFに対する抗体の抗原結合性断片である。MIFの機能を阻害する物質の別の例は、MIFに対するアプタマーである。抗体、特異抗体、抗原結合性断片及びアプタマーの定義その他の説明は、上で述べたとおりである。

[0040] MIFの機能を阻害する物質の別の例は、MIF阻害剤である。MIF阻害剤は、MIFの機能を阻害する能力を有する任意の物質である。MIF阻害剤の例としては、ISO-1 (CAS No.478336-92-4、(S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid) 、(±)-CPSI 1306 (CAS No.1309793-47-2、2-[3-(3-(2,4-Difluorophenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl]-1-(4-morpholinyl)ethanone) 、4-IPP (CAS No.41270-96-6、4-Iodo-6-phenylpyrimidine) 、イブジラスト (Ibudilast、CAS No.50847-11-5、1-[2-(1-Methylethyl)pyrazolo[1,5-a]pyridin-3-yl]-2-methylpropan-1-one) 、BTZO-1 (CAS No.99420-15-2、2-Pyridin-2-yl-4H-1,3-benzothiazin-4-one) 、Chicago Sky Blue 6B (CAS

No.2610-05-1、6,6'-[(3,3-Dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-napthalenedisulphonic acid] tetrasodium salt)、p425 (CAS No.259444、 Tetrasodium 6,6'-[(3,3'-dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxynaphthalene-1,3- disulphonate]) 等を挙げることができる。

[0041] 好ましい実施形態において、MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する物質はMIF阻害剤、特にISO-1又は(±)-CPSI 1306である。

[0042] CXCR4は、CXCモチーフ型ケモカイン受容体ファミリーに属するGタンパク質共役型受容体であり、CXCモチーフ型ケモカインリガンド12 (CXCL12) 及び間質細胞由来因子1 (SDF-1) をリガンドとし、免疫細胞の遊走を誘導することが知られている。ヒトCXCR4遺伝子の塩基配列はNCBI Reference SequenceにNC_000002.12として、mRNAの塩基配列はNM_001008540.2、NM_001348056.2、NM_001348059.2、NM_001348060.2、NM_003467.3として、アミノ酸配列はNP_001008540.1、NP_001334985.1、NP_001334988.1、NP_001334989.1、NP_003458.1として登録されている (いずれも2021年12月20日検索)。

[0043] 本発明者らは、末梢神経の損傷部遠位では、CXCR4が神経実質外に存在し、好中球と局在が重なること、CXCR4を阻害すると神経実質外における好中球のNETs産生が阻害されること、またCXCR4を阻害するとマクロファージが早期かつ多量に神経実質内に集積し、軸索再生が促進されることを見出した。CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質は、末梢神経損傷の治療に有用である。

[0044] CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質は、CXCR4の遺伝子又はタンパク質レベルでの発現を抑制する能力を有する、又はCXCR4の機能を阻害する能力を有する任意の物質であり、好ましくは、CXCR4の発現を抑制する核酸、CXCR4に対する抗体及びその抗原結合性断片、CXCR4に対するアプタマー、並びにCXCR4阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種の物質である。

[0045] CXCR4の発現を抑制する物質の1つの例は、CXCR4の発現を抑制する核酸である。CXCR4の発現を抑制する核酸は、CXCR4遺伝子からのmRNA (CXCR4 mRNA

）の転写を抑制することができる核酸、CXCR4 mRNAを分解することができる核酸、及びCXCR4 mRNAからのタンパク質翻訳を抑制することができる核酸を包含し、これらの例としては、CXCR4遺伝子の塩基配列又はCXCR4 mRNAの塩基配列を基にして当業者が設計、作製することができる、アンチセンス核酸、又はRNA干渉を引き起こす核酸、例えばsiRNA、shRNA若しくはmiRNAを挙げることができる。

[0046] CXCR4の機能を阻害する物質の１つの例は、CXCR4に対する抗体、好ましくはCXCR4に対する特異抗体、又はCXCR4に対する抗体の抗原結合性断片である。CXCR4の機能を阻害する物質の別の例は、CXCR4に対するアプタマーである。抗体、特異抗体、抗原結合性断片及びアプタマーの定義その他の説明は、上で述べたとおりである。

[0047] CXCR4の機能を阻害する物質の別の例は、CXCR4阻害剤である。CXCR4阻害剤は、CXCR4の機能を阻害する能力を有する任意の物質である。CXCR4阻害剤の例としては、プレリキサホル（Plerixafor、AMD3100とも呼ばれる。一般式1,4-Bis[(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1-yl)methyl]benzene）、WZ811（CAS No. 55778-02-4、一般式1,4-Benzenedimethanamine, N1,N4-di-2-pyridinyl-）、Motixafortide（BL-8040、CAS No.664334-36-5 、一般式L-Arginamide, N2-(4-fluorobenzoyl)-L-arginyl-L-arginyl-3-(2-naphthalenyl)-L-alanyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-N5-(aminocarbonyl)-L-ornithyl-L-lysyl-D-lysyl-L-prolyl-L-tyrosyl-L-arginyl-N5-(aminocarbonyl)-L-ornithyl-L-cysteinyl-, cyclic (4→13)-disulfide）等を挙げることができる。

[0048] PAD4は、ヒストンタンパク質（H3、H4等）の特定のアルギニン残基をシトルリン残基に返還することでNETs形成を誘導する酵素である。ヒトPAD4遺伝子の塩基配列はNCBI Reference SequenceにNC_000001.11として、mRNAの塩基配列はNM_012387.3として、アミノ酸配列はNP_036519.2として登録されている（いずれも2021年12月20日検索）。

[0049] 本発明者らは、PAD4を阻害すると損傷末梢神経の実質外における好中球のNETs産生が阻害されること、またPAD4を阻害するとマクロファージが早期かつ

多量に神経実質内に集積することを見出した。マクロファージの神経実質内への集積は、軸索再生の促進をもたらし得ることから、PAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質は、末梢神経損傷の治療に有用である。

[0050] 本開示において用いられるPAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質は、PAD4の遺伝子又はタンパク質レベルでの発現を抑制する能力を有する、又はPAD4の機能を阻害する能力を有する任意の物質であり、好ましくは、PAD4の発現を抑制する核酸、PAD4に対する抗体及びその抗原結合性断片、PAD4に対するアプタマー、並びにPAD4阻害剤よりなる群から選択される少なくとも1種の物質である。

[0051] PAD4の発現を抑制する物質の１つの例は、PAD4の発現を抑制する核酸である。PAD4の発現を抑制する核酸は、PAD4遺伝子からのmRNA（PAD4 mRNA）の転写を抑制することができる核酸、PAD4 mRNAを分解することができる核酸、及びPAD4 mRNAからのタンパク質翻訳を抑制することができる核酸を包含し、これらの例としては、PAD4遺伝子の塩基配列又はPAD4 mRNAの塩基配列を基にして当業者が設計、作製することができる、アンチセンス核酸、又はRNA干渉を引き起こす核酸、例えばsiRNA、shRNA若しくはmiRNAを挙げることができる。

[0052] PAD4の機能を阻害する物質の１つの例は、PAD4に対する抗体、好ましくはPAD4に対する特異抗体、又はPAD4に対する抗体の抗原結合性断片である。PAD4の機能を阻害する物質の別の例は、PAD4に対するアプタマーである。抗体、特異抗体、抗原結合性断片及びアプタマーの定義その他の説明は、上で述べたとおりである。

[0053] PAD4の機能を阻害する物質の別の例は、PAD4阻害剤である。PAD4阻害剤は、PAD4の機能を阻害する能力を有する任意の物質である。PAD4阻害剤の例としては、Cl-アミジン（N^2-Benzoyl-N^5-(1-imino-2-chloroethyl)-L-ornithinamide・trifluoroacetic acid）、BMS-P5(一般名なし、Cas #, 1550371-22-6)、GSK121 trifluoroacetate（一般名なし、Cas #, 1652591-80-4）等を挙げることができる。

[0054] また、適当な発現プロモーターの制御下に置かれることで上述のMIF、CXCR

4及びPAD4のいずれかに対するアンチセンス核酸又はRNA干渉を引き起こす核酸を転写誘導することのできるDNA、及びこれらのアンチセンス核酸又はRNA干渉を引き起こす核酸を構成するヌクレオチド残基の一部が修飾された核酸も、アンチセンス核酸又はRNA干渉を引き起こす核酸と機能的に等価な核酸として、本開示にいう発現を抑制する核酸に包含される。ヌクレオチド残基の修飾としては、2'O-メチル化、2'-F化、4'-チオ化等を挙げることができる。

[0055] さらに、発現を抑制するRNAのリボヌクレオチドの一部が、対応するデオキシリボヌクレオチド又はヌクレオチド類似体に置き換えられたキメラRNAもまた、本開示にいう発現を抑制する核酸に包含される。ヌクレオチド類似体としては、例えば、5位修飾ウリジン又はシチジン、例えば5-（2-アミノ）プロピルウリジン、5-ブロモウリジン等；8位修飾アデノシン又はグアノシン、例えば8-ブロモグアノシン等；デアザヌクレオチド、例えば7-デアザ-アデノシン等；O-又はN-アルキル化ヌクレオチド、例えばN6-メチルアデノシン等を挙げることができる。修飾される又は置換される塩基の種類又は個数は、ターゲット分子の発現を抑制する能力を失わない限り、特に制限はない。

[0056] 発現を抑制する核酸は、遺伝子組み換え技術又は化学合成技術を利用して人工的に合成することができる。遺伝子組み換え方法、核酸の化学合成方法、また非天然型の塩基の合成手法又はこれを含む核酸の合成手法は、当業者に周知である。

[0057] 好中球のNETs産生を阻害する物質の他の例としては、WO2014/168253に記載のラクトフェリン；WO2018/131724に記載のトロンビン様酵素、例えばバトロキソビン、アンクロッド、クロタラーゼ等；WO2019/208805に記載のBtk阻害活性を有する化合物、例えばチラブルチニブ、イブルチニブ、スペブルチニブ、アカラブルチニブ、エヴォブルチニブ、ポセルチニブ、フェネブルチニブ、ヴェカブルチニブ、ザヌブルチニブ、PRN-1008、BMS-986142、免疫グロブリン大量療法（High dose immunoglobulin therapy）において用いられる用量の、例えばスルホ化人免疫グロブリンG等の免疫グロブリン（Uozumi et al., Modern Rheumatology, 2020, 30(3):544-550. doi: 10.1080/14397595.

2019.1602292.）、PA-dPEG24(ペプチド：IALILEPICCQERAAのC末端に24merのPEG部分が付加されたPEG修飾ペプチド)（Hair et al.PLoS One. 2019, 14(12):e0226875. doi: 10.1371/journal.pone.0226875.）、Prostaglandin E2 (inhibition of NETosis through cAMP-PKA) (Shishikura et al., British Journal of Pharmacology, 2016, 173(2):319-31. doi: 10.1111/bph.13373.)等を挙げることができる。

[0058] NETsを分解する物質

本発明者らは、NETsを分解すると、マクロファージが早期かつ多量に損傷末梢神経実質内に集積し、軸索再生が促進されることを見出した。NETsを分解する物質は、末梢神経損傷の治療に有用である。

[0059] NETsを分解する物質は、NETsを構成するクロマチン又は抗菌タンパク質を、とりわけクロマチンを分解する能力を有する任意の物質であり、その例としては、DNA分解酵素、例えばDNase I、Staphylokinase (Thammavongsa et al., Science. 2013. 342(6160): 863-866. doi: 10.1126/science.1242255)等を挙げることができる。

[0060] 医薬組成物

本開示において、医薬組成物は、末梢神経損傷の治療に有効な量の、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質を含む。医薬組成物は、一例として、末梢神経損傷の治療に有効な量の、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質又はMIFの発現を抑制する若しくは機能を阻害する物質を含む。ここで有効量は、用法、対象の年齢、性別、体重、末梢神経損傷の部位及び程度その他の要因に応じて適宜決定される。

[0061] 医薬組成物は、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質、MIFの発現を抑制する物質及びMIFの機能を阻害する物質よりなる群から選択される少なくとも1種の物質を含み得る。すなわち、医薬組成物は、1又は複数種の損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質を含んでもよく、1又は複数種のMIFの発現を抑制する物質を含んでもよく、1又は複数種のMIFの機能を阻害する物質を含んでもよい。

[0062] 同様に、医薬組成物は、1又は複数種のCXCR4の発現を抑制する物質を含んでもよく、1又は複数種のCXCR4の機能を阻害する物質を含んでもよく、1又は複数種のPAD4の発現を抑制する物質を含んでもよく、1又は複数種のPAD4の機能を阻害する物質を含んでもよく、1又は複数種のNETsを分解する物質を含んでもよい。

[0063] 医薬組成物は、末梢神経損傷の治療のための他の薬剤、又は薬学的に許容される添加剤、例えば緩衝剤、安定剤、保存剤、賦形剤等を含むことができる。薬学的に許容される添加剤は当業者に周知であり、当業者が通常の実施能力の範囲内で、適宜選択して使用することができる。

[0064] 本明細書において用いられる用語「治療」は、疾患又は状態の治癒、一時的寛解等を目的とする医学的に許容される全てのタイプの治療的介入を包含する。したがって、末梢神経損傷の治療とは、損傷した末梢神経の再生促進、末梢神経損傷による機能障害の改善、機能障害の進行の遅延又は停止、発症の予防等を含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。

[0065] 医薬組成物は、軸索断裂が生じた末梢神経損傷に対して用いることができ、特に、自然回復が見込めない重度の末梢神経損傷に対して好ましく用いられる。医薬組成物によって治療することができる末梢神経損傷の好ましい例は、外傷性末梢神経損傷（創傷、圧迫、牽引、切断、欠損、医原性等）である。

[0066] 医薬組成物は、末梢神経損傷を有する対象、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモットを含むげっ歯類、ヒト、チンパンジー、アカゲザルを含む霊長類、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジを含む家畜、イヌ、ネコを含む愛玩動物といった哺乳動物に適用される。好ましい対象はヒトである。

[0067] 医薬組成物は、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制することができるかぎり、例えば損傷末梢神経への好中球の集積を阻害することができるかぎり、又は損傷末梢神経におけるMIFの発現を抑制すること若しくは機能を阻害することができるかぎり、その剤形及び投与方法に制限はない。

[0068] 例えば、医薬組成物を溶液剤の形態に調製し、これを静脈内又は腹腔内に

投与することによって用いることができる。あるいは、医薬組成物を溶液剤の形態に調製し、これをそのまま、あるいは生体適合性医療材料に含浸させた状態で、末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置することによって用いることもできる。ここで配置は、例えば、末梢神経の損傷部遠位側周辺への溶液剤の注射によって行われてもよく、溶液剤を生体適合性医療材料に含浸させ、これを末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置することによって行われてもよい。

[0069] また、医薬組成物を、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質を保持した、例えば損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質又はMIFの発現を抑制する若しくは機能を阻害する物質を保持した生体適合性医療材料の形態に調製し、この生体適合性医療材料を末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置することによって用いることもできる。ここで前記物質の生体適合性医療材料への保持方法は任意であり、例えば、前記物質を生体適合性医療材料に直接固定してもよく、適当なリンカー分子又はアダプター分子を介して固定してもよく、またバインダー又はコーティング剤を用いて固定してもよい。前記物質は、非特異的吸着によって生体適合性医療材料に保持されてもよい。また、生体適合性医療材料が吸水性材料である場合、前記物質を含む液体を生体適合性医療材料に含浸させることによって、前記物質を生体適合性医療材料に保持させてもよい。さらに、生体適合性医療材料がゲル状材料である場合、ゲルの作製過程で原料溶液に前記物質を含ませることによって、前記物質を生体適合性医療材料に保持させてもよい。

[0070] 損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質を保持した生体適合性医療材料の形態に調製された、例えば損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質又はMIFの発現を抑制する若しくは機能を阻害する物質を保持した生体適合性医療材料の形態に調製された医薬組成物は、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質を保持した、例えば損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質又はMIFの発現を抑制する若しくは機能を阻害する物質を保持した、末梢神経損傷の治療のための医療材料と表すことも

できる。

[0071] 生体適合性医療材料の例としては、ポリフッ化エチレン、ポリスチレン等のポリマー化合物、シリカ等の無機化合物、生分解性ポリマー等を挙げることができ、生分解性ポリマーが好ましい。生分解性ポリマーとしては、例えば合成高分子材料ではポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリエチレングリコール、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン、その他乳酸－グリコール酸共重合体等の上記の共重合体；無機材料ではβ－りん酸三カルシウム、炭酸カルシウム等；天然高分子材料ではコラーゲン、ゼラチン、アルギン酸、ヒアルロン酸、アガロース、キトサン、フィブリン、フィブロイン、キチン、セルロース、シルク等が挙げられる。

[0072] 生体適合性医療材料の形状は、末梢神経の損傷部遠位側周辺への配置に適した形状であればよく、例えばシート状又はゲル状である。シート状の医療材料は、末梢神経損傷部の遠位を被覆することで用いることができる。ゲル状の医療材料、例えばフィブリン糊、アルギン酸等は、末梢神経の損傷部遠位側周辺に噴霧又は塗布する、あるいは損傷部遠位側に留置することで用いることができる。

[0073] 後述の実施例に示されるように、医薬組成物は、末梢神経の損傷直後から損傷部遠位の神経実質外に好中球が集積してその後消失するまでの期間内のどこかで、比較的短時間、ワーラー変性を生じる末梢神経の損傷部遠位側周辺に作用させることで、軸索再生を促進することができる。したがって、医薬組成物は、損傷を有する末梢神経の全体に存在させる必要はなく、また末梢神経損傷の直後から軸索再生が完了するまでの期間の全体にわたって存在させる必要はない。好ましい実施形態において、医薬組成物は、末梢神経損傷後、損傷部遠位の神経実質外に好中球が集積している期間内のどこかで、例えば、末梢神経の損傷直後から損傷部遠位の神経実質外に好中球が集積してその後消失するまでの期間内のどこかで、比較的短い時間、例えば30分から7日間程度の長さの時間、末梢神経の損傷部遠位側周辺、特に損傷部遠位側近傍の周辺に配置して用いることができる。

[0074] 例えば、医薬組成物は、末梢神経損傷の直後、3時間後、6時間後又は9時間後を始期として、末梢神経損傷の12時間後、15時間後、18時間後、21時間後又は24時間後を終期とする期間内の、比較的短い時間、末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いることができる。また、医薬組成物は、末梢神経損傷の直後から24時間後までの期間、3時間後から18時間後までの期間、6時間後から15時間後までの期間、又は9時間後から12時間後までの期間内の、比較的短い時間、末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いることができる。

[0075] また、末梢神経再建術、縫合術などを損傷後しばらく時間が経過した後に実施する場合、その手術侵襲によって、末梢神経損傷直後と同様に好中球が浸潤する可能性がある。このように末梢神経損傷から時間が経過していたとしても、損傷直後と同様に神経実質外への好中球の集積が認められる場合には医薬組成物による末梢神経損傷の治療は可能である。好ましい実施形態において、医薬組成物は、末梢神経損傷後、損傷部遠位の神経実質外に好中球が集積している期間内のどこかで、例えば手術侵襲の直後から損傷部遠位の神経実質外に好中球が集積してその後消失するまでの期間内のどこかで、比較的短い時間、例えば30分から7日間程度の長さの時間、末梢神経の損傷部遠位側周辺、特に損傷部遠位側近傍の周辺に配置して用いることができる。

[0076] 例えば、医薬組成物は、手術侵襲の直後、3時間後、6時間後又は9時間後を始期として、手術侵襲の12時間後、15時間後、18時間後、21時間後又は24時間後を終期とする期間内の、比較的短い時間、末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いることができる。また、医薬組成物は、手術侵襲の直後から24時間後までの期間、3時間後から18時間後までの期間、6時間後から15時間後までの期間、又は9時間後から12時間後までの期間内の、比較的短い時間、末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いることができる。

[0077] 医薬組成物を末梢神経損傷部遠位側周辺に配置する時間は、例えば、30分間以上、60分間以上、又は90分間以上であり得て、7日間以下、24時間以下、12時間以下、6時間以下、4時間以下、又は3時間以下であり得る。

[0078] 例示的な実施形態において、医薬組成物は、末梢神経損傷の9時間後から12

時間後までの期間内に、30分間～3時間、末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いられ得る。

[0079] 医薬組成物はこのように時間的及び空間的に限定された処置によっても効果を発揮し得ることから、例えば末梢神経損傷の症例において神経縫合術を行う際、末梢神経の損傷部遠位側近傍の周辺に医薬組成物を配置して神経縫合を行い、配置から数十分から数時間程度、例えば30分から3時間程度が経過した後に医薬組成物を取り除くこともできる。

[0080] 本発明は、一態様において、末梢神経損傷を有する対象に、有効量の損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質を含む医薬組成物を、例えば損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質又はMIFの発現を抑制する若しくは機能を阻害する物質を含む医薬組成物を適用することを含む、末梢神経損傷を治療する方法を提供する。ある実施形態において、適用は、好ましくは、末梢神経の損傷部遠位側周辺、特に損傷部遠位側近傍の周辺への医薬組成物の配置によって行われる。本発明はまた、一態様において、末梢神経損傷の治療における使用のための、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質を提供する。本発明はさらに、一態様において、医薬組成物の製造における、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質の使用を提供する。ここで各用語の定義その他の説明は、上で述べたとおりである。

[0081] 評価方法

本発明は、一態様において、損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性を指標とした、被験物質の末梢神経再生促進活性を評価する方法を提供する。損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性としては、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する活性；好中球のNETs産生を阻害する活性、例えばMIFの発現を抑制する又は機能を阻害する活性、CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する活性、及びPAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する活性；並びにNETsを分解する活性を挙げることができる。

[0082] ある実施形態において、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する活性を

指標とした評価方法は、in vitroで、被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおける好中球の生存率又は遊走能を比較することで、被験物質の末梢神経再生促進活性を判定することを含む。この実施形態において、好中球の生存率又は遊走能を低下させた被験物質は、末梢神経再生促進活性を有すると判定することができる。

[0083] 別の実施形態において、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する活性を指標とした評価方法は、in vivoで、被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおける血中好中球数又は末梢神経損傷部に集積した好中球数を比較することで、被験物質の末梢神経再生促進活性を判定することを含む。この実施形態において、血中好中球数又は末梢神経損傷部に集積した好中球数を減少させた被験物質は、末梢神経再生促進活性を有すると判定することができる。

[0084] ある実施形態において、好中球のNETs産生を阻害する活性を指標とした評価方法は、in vitroで、被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおけるMIF、CXCR4又はPAD4のいずれかの遺伝子（以下、指標遺伝子と呼ぶ）のプロモーター活性を比較することで、被験物質の末梢神経再生促進活性を判定することを含む。この実施形態において、評価方法は、例えば、被験物質を、指標遺伝子の発現を制御するプロモーター領域の制御下にマーカー遺伝子を有する核酸を含む細胞と共に、当該プロモーターによるマーカー遺伝子の発現が誘導される条件下でインキュベートするステップ；前記細胞におけるマーカー遺伝子由来シグナルの強度を測定するステップ；測定されたマーカー遺伝子由来シグナルの強度を、被験物質非存在下でのマーカー遺伝子由来シグナルの強度と比較するステップ；及びマーカー遺伝子由来シグナルの強度を減少させた被験物質を、末梢神経再生促進活性を有すると判定するステップを含み得る。

[0085] マーカー遺伝子は、当該遺伝子の発現誘導を検出し得るものであれば特に制限はなく、例えばGFP等の蛍光タンパク質やルシフェラーゼ等の化学発光タンパク質をコードする遺伝子、又は薬剤耐性遺伝子や細胞の栄養要求性を補

完することができる遺伝子といった、細胞にフェノタイプ変化を与える遺伝子等を利用することができる。

[0086] 指標遺伝子のプロモーター領域の制御下にマーカー遺伝子を有する核酸を含む細胞は、例えば、元来、指標遺伝子を有する細胞中の指標遺伝子のオープンリーディングフレーム領域の塩基配列を、マーカー遺伝子をコードする塩基配列に組み換えることで作製することができる。また、ヒトゲノム塩基配列情報を元にして、ヒトの指標遺伝子のプロモーター領域とその制御下に組み換えたマーカー遺伝子とを含む発現ベクターを構築し、適当な細胞に当該発現ベクターを導入することで作製することもできる。

[0087] インキュベーションは、適当な容器内の培地又は緩衝液中で、前記細胞と被験物質とを共存させることにより行うことができる。インキュベーションの温度、時間等の条件は、細胞がマーカー遺伝子を発現することができる条件であればよい。また、マーカー遺伝子由来シグナルの測定は、用いられるマーカー遺伝子に適した方法によって行うことができる。

[0088] さらなる実施形態において、評価方法は、被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおける指標遺伝子の発現又はMIF、CXCR4又はPAD4のいずれかのタンパク質（以下、指標タンパク質と呼ぶ）の発現を比較することで、被験物質の末梢神経再生促進活性を判定することを含む。この実施形態において、評価方法は、例えば、被験物質を、指標遺伝子又は指標タンパク質を発現することができる細胞と共にインキュベートするステップ；インキュベート後の前記細胞における指標遺伝子又は指標タンパク質由来シグナルの強度を測定するステップ；測定された指標遺伝子又は指標タンパク質由来シグナルの強度を被験物質非存在下での指標遺伝子又は指標タンパク質由来シグナルの強度と比較するステップ；及び指標遺伝子又は指標タンパク質由来シグナルの強度を低減させた被験物質を、末梢神経再生促進活性を有すると判定するステップを含み得る。

[0089] 指標遺伝子又は指標タンパク質を発現することができる細胞は、ヒトの指標遺伝子又は指標タンパク質を発現することが好ましく、例えばヒト指標遺

伝子、例としてヒトMIF遺伝子を組み込んだ培養細胞株を用いることができる。

[0090] インキュベーションは、適当な容器内の培地又は緩衝液中で、前記細胞と被験物質とを共存させることにより行うことができる。インキュベーションの温度、時間等の条件は、細胞が指標遺伝子又は指標タンパク質を発現することができる条件であればよい。

[0091] 指標遺伝子由来シグナルの測定は、指標遺伝子の塩基配列情報を利用したハイブリダイゼーション、定量的PCR、RNA-Seqといった、特定の遺伝子発現を検出し定量することのできる一般的な方法によって行うことができる。また、指標タンパク質由来シグナルの測定は、指標タンパク質に対する特異抗体を用いたELISA、ウェスタンブロッティング等の免疫学的検出法といった、特定のタンパク質発現を検出し定量することができる一般的な方法によって行うことができる。

[0092] 指標遺伝子又は指標タンパク質の発現が誘導される条件下で、被験物質とインキュベートしていない細胞と比べて、被験物質とインキュベートした細胞において指標遺伝子又は指標タンパク質由来シグナルの強度を低減させた被験物質は、末梢神経再生促進活性を有すると判定することができる。

[0093] また別の実施形態において、好中球のNETs産生を阻害する活性を指標とした評価方法は、被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおけるMIFの機能、CXCR4の機能又はPAD4の機能を比較することで、被験物質の末梢神経再生促進活性を判定することを含む。例えば、好中球のNETs産生を阻害する活性を指標とした評価方法は、被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおけるMIFのマクロファージ遊走阻止活性を比較することで、被験物質の末梢神経再生促進活性を判定することを含む。この実施形態において、MIFの機能を阻害する活性があると判定された被験物質は、末梢神経再生促進活性を有すると評価することができる。被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおけるMIFの活性比較は、公知のMIF阻害剤の阻害作用の評価又はスクリーニングにおいて採用されている方法を利用して行うことができる。

[0094] さらに別の実施形態において、NETsを分解する活性を指標とした評価方法は、被験物質の存在下及び非存在下のそれぞれにおけるNETsの分解を比較することで、被験物質の末梢神経再生促進活性を判定することを含む。この実施形態において、評価方法は、例えば、被験物質を、好中球に産生させたNETsと共にインキュベートするステップ；インキュベート後のNETs由来シグナルの強度を測定するステップ；測定されたNETs由来シグナルの強度を被験物質非存在下でのNETs由来シグナルの強度と比較するステップ；及びNETs由来シグナルの強度を低減させた被験物質を、末梢神経再生促進活性を有すると判定するステップを含み得る。NETs由来シグナルは、例えば、シトルリン化ヒストンH3等の公知のNETsマーカー分子に由来するシグナルであり、免疫学的検出法等の当該分子に適した方法で測定することができる。この実施形態において、NETsを分解する活性があると判定された被験物質は、末梢神経再生促進活性を有すると評価することができる。

[0095] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0096] 材料と方法

（１）動物実験

麻酔下のLewisラット（雄、12-16週齢）又はC57BL/6マウス（雄 8-10週齢）を腹臥位に置き、左臀部から左大腿遠位部まで縦方向の皮膚切開を行い、坐骨神経全体を露出させた。マイクロモスキート鉗子（Fine Science Tools, No.13010-12）で圧挫損傷を作成した。圧挫部の神経上膜に8-0Nylon糸をかけ、マーキングした後、閉創した。試験例２、実施例１～４では圧挫損傷作成後の動物に所定の処置を行った。

[0097] 圧挫損傷作成から所定時間が経過した後、麻酔下で動物の右心耳を切開して放血を行うとともに左心にPBS溶液を流して脱血を行った。4%パラホルムアルデヒド添加PBSを灌流して経心的に灌流固定を行った後、坐骨神経を摘出した。

[0098] （２）GFP標識好中球の調製

試験例２で使用したGFP標識された好中球は、以下のようにして調製した。C57BL/6 GFPマウス(8-10週齢) の大腿骨と下腿骨の骨髄細胞をPBSを用いて排出させて採取した。骨髄細胞に含有している赤血球をRBC lysis buffer (フナコシ)で溶解し骨髄細胞を精製させた。Neutrophil isolation kit, mouse (Miltenyi Biotec)を用いて骨髄細胞から好中球を単離させた。

[0099] （３）免疫組織化学染色

動物から摘出した坐骨神経は、4% PFA中に4℃で一晩固定した後、30% Sucrose/PB 溶液に移して24時間以上静置した。クライオスタットを用いて10μm厚の坐骨神経縦断切片を、又はマウスの場合は所定位置での横断切片を作成した。切片を5% Normal horse serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 及び0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含有したTBS (pH 8.4) で1時間ブロッキングした後、一次抗体含有TBSに4℃で一晩、さらに二次抗体含有TBSに室温で1時間浸し染色を行った。TBSで洗浄後、DAPIで対比染色を行った。染色後、組織を、蛍光顕微鏡BZ-X710 (KEYENCE) を用いて観察した。画像解析はImage J (Schneider et al., 2012) を用いて行った。

使用した一次抗体

好中球マーカー：Ly-6G (rat 抗Ly6G抗体, Gentex Cat# GTX40913) 、Neutrophil elastase (NE) (rabbit, 抗neutrophil elastase抗体, Abcam, Cat# ab68672)

マクロファージマーカー：CD68 (mouse, 抗CD68抗体, Bio-rad, Cat# MCA341R)

髄鞘マーカー：MBP (chicken Anti-MBP抗体, Aves lab, Cat# AB_2313550)

軸索マーカー：β3 tubulin (rabbit, 抗 β3tubulin抗体, Covance, Cat# PRB-435P)

NETsマーカー：シトルリン化ヒストンH3 (CitH3) (rabbit, 抗CitH3抗体, Abcam #ab5103)

I型コラーゲン（rabbit, 抗type1 collagen抗体, Southernbiotech, Cat# 1310-01）

MIF（rabbit, 抗MIF抗体, Thermo Scientific, Cat# PA527343）

CXCR4（rabbit, 抗CXCR4抗体, Novus #NB100-56437）

二次抗体は、一次抗体の宿主動物種及び分子種に応じて、多重染色を考慮して適宜選択したものを使用した。

[0100] （４）軸索再生

坐骨神経縦断切片のβ3 tubulin免疫染色画像において、損傷部遠位方向に5 mm間隔で垂直線を設定し、各々の線を横切る軸索数を当該線の長さで割って軸索密度を算出した。各位置における軸索密度を、損傷部から1.5 mm近位にある無損傷部位における軸索密度で割って、軸索再生率を算出した。また試験例２においては、坐骨神経横断切片のβ3 tubulin免疫染色画像に含まれる軸索数を、切片の面積で割ることで、軸索密度を算出した。

[0101] 統計処理

実験データは、平均値±標準誤差で表した。統計解析は統計解析ソフトJMP Pro 11.0（SAS Institute）を用いて行った。2群間の比較にはStudentのt検定を用いた。多群間の比較にはTukey検定を用いた。p値0.05未満を有意とした。

[0102] 試験例１　末梢神経損傷部における好中球及びマクロファージの時空間的分布解析

（１）好中球

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成し、12時間後に坐骨神経を摘出し、縦断切片のHE染色及び免疫組織化学染色を行った。損傷部から5 mm近位（-5 mm）～25mm遠位までの代表的なHE染色画像を図１に、免疫染色画像を図２に示す。好中球は、損傷部及びその5 mm遠位では神経実質及び神経実質外（以下、「神経実質外」は「神経上膜」と同義で用いる）の両方で観察された一方、15 mm及び25 mm遠位のワーラー変性部では神経実質には存在せず、実質外にのみ存在していた。

[0103] また、HE染色画像から神経内（実質及び実質外の両方を含む）の好中球数をカウントし、好中球の空間的分布を調べた（n＝3）。好中球は、損傷部遠位のワーラー変性を生じている部位に多く分布していることが確認された（図３）。

[0104] さらに、好中球の時間的分布を調べるため、圧挫損傷を作成したラットから、損傷作成の1時間後、6時間後、12時間後、1日後、3日後又は7日後に坐骨神経を摘出し、上記と同様にして免疫組織化学染色を行い、神経内の好中球数をカウントした（n＝3）。損傷部遠位における好中球数の増加は、損傷から12時間後にピークとなり、3日後にはほぼ消失していた（図４）。

[0105] （２）マクロファージ

圧挫損傷作成の7日後にラットから摘出した坐骨神経の縦断切片について、マクロファージマーカーであるCD68に対する免疫組織化学染色を行った。損傷部から5 mm～30 mm遠位までの代表的免疫染色画像を図５に示す。CD68陽性細胞は、ワーラー変性を生じた神経実質内に一様に分布していることが確認された。

[0106] また、マクロファージの時間的分布を調べるため、圧挫損傷を作成したラットから、損傷作成の1時間後、6時間後、12時間後、1日後、3日後又は7日後に坐骨神経を摘出し、上記と同様にして坐骨神経の免疫組織化学染色を行い、神経実質内に存在するCD68陽性細胞をマクロファージとしてカウントした。損傷部遠位におけるマクロファージ数は、損傷3日後から増加し、7日後にピークとなった（図６）。マクロファージは、損傷12時間後には、好中球同様に神経上膜に集積していた（図７）。

[0107] 実施例１　抗好中球抗体が神経再生過程に及ぼす影響の評価

１ml/kgの抗Polymorphonuclear（PMN）抗体（rabbit 抗rat PMN抗体 , CEDARLANE, Cat AIAD51140）又はコントロール抗体を0.1 ml/ 100g体重の用量でラットに腹腔内投与し（n＝3）、3時間後、坐骨神経に圧挫損傷を作成した。また、圧挫損傷の作成のみを行った群を対照として用意した（n＝3）。腹腔内投与後、経時的に採血してギムザ染色を行い、染色された有核細胞の総数

に対する多形核細胞の割合を血中好中球数（%）として算出した。また、損傷作成の12時間後又は7日後に坐骨神経を摘出し、縦断切片のHE染色及び免疫組織化学染色を行った。染色画像から神経内の好中球数及び神経実質内のマクロファージ数をカウントし、軸索再生率を算出した。また、MBP免疫染色画像中のMBP陽性領域の面積を全体の面積で割って、軸索デブリス量の指標となるMBP陽性率を算出した。

[0108] 血中好中球数の経時変化を図８に示す。injury alone群及びコントロール抗体投与群では、損傷12時間後をピークとして血中好中球数が増加しており、循環プールへの好中球の動員が認められた。一方、抗好中球抗体投与群では、損傷後も血中好中球数は大きく変動しなかった。

[0109] 損傷12時間後の損傷部から5 mm遠位の代表的なHE染色画像を図９に、損傷部遠位における好中球の分布を図１０に示す。抗好中球抗体投与群の損傷部遠位で観察された好中球数は、injury alone群及びコントロール抗体投与群と比較して少なかった。これらの結果から、抗好中球抗体は血中及びワーラー変性部のいずれにおいても好中球数を減少させることが確認された。

[0110] 損傷12時間後及び7日後の坐骨神経損傷部遠位におけるマクロファージの分布を図１１に示す。抗好中球抗体投与群では、injury alone群及びコントロール抗体投与群と比較して、より早い時期に多くのマクロファージの集積が認められた。

[0111] 損傷7日後の損傷部から5 mm～30 mm遠位までの代表的なβ3 tubulin免疫染色画像を図１２に、軸索再生率を図１３に示す。抗好中球抗体投与群では、injury alone群及びコントロール抗体投与群と比較して高い軸索再生率を示した。

[0112] 損傷7日後の代表的なMBP免疫染色画像及びMBP陽性率を図１４に示す。抗好中球抗体投与群では、injury alone群及びコントロール抗体投与群と比較してMBP陽性率が低く、髄鞘デブリスの量が減少していた。

[0113] 本実施例から、抗好中球抗体によってワーラー変性部に集積する好中球数を減少させることで、マクロファージの集積が増加し、軸索再生が促進され

、ミエリンのクリアランスが促進されることが確認された。

[0114] 試験例２　好中球数の増加が神経再生過程に及ぼす影響の評価

マウスの坐骨神経に圧挫損傷を作成し、11時間後にPBSに懸濁したGFP標識好中球を1匹あたり2×10^6個、又は同容量のPBSのみを静脈内投与した（n＝3）。また、圧挫損傷の作成のみを行った群を対照として用意した（n＝3）。損傷作成の12時間後に採血し、ギムザ染色を行って血中好中球数を算出した。また、損傷作成の12時間後又は7日後に坐骨神経を摘出し、損傷部から4 mm、6 mm、8 mm及び10 mm遠位での横断切片のHE染色及び免疫組織化学染色を行って、神経内の好中球数及び神経実質内のマクロファージ数をカウントし、軸索密度及びMBP陽性率を算出した。

[0115] 損傷12時間後の血中好中球数を図１５に、損傷部から4mm遠位の代表的なHE染色画像及び免疫染色画像を図１６に、好中球の空間的分布を図１７に示す。好中球投与群ではinjury alone群及びPBS投与群と比較して血中好中球数が増加しており、損傷部遠位の好中球数も増加していた。また好中球は、静脈内投与されたGFP陽性好中球も含めて、損傷部遠位の神経実質外に集積していた。

[0116] 損傷7日後の坐骨神経損傷部遠位におけるマクロファージの分布を図１８に示す。好中球投与群では、injury alone群及びPBS投与群と比較して、損傷部遠位のマクロファージ数は少なかった。

[0117] 損傷7日後の代表的なβ3 tubulin免疫染色画像を図１９に、軸索密度を図２０に示す。injury alone群及びPBS投与群では損傷部に近いほど軸索密度が高くなったが、好中球投与群では全体的に軸索密度が低かった。

[0118] 損傷7日後の代表的なMBP免疫染色画像を図２１に、MBP陽性率を図２２に示す。好中球投与群では、injury alone群及びPBS投与群と比較して、MBP陽性率が高く、髄鞘デブリスの量が増加していた。

[0119] 本試験例から、好中球を投与するとワーラー変性部に集積する好中球数が増加し、それに伴ってマクロファージの集積、軸索再生、ミエリンクリアランスのいずれも抑制されることが確認された。

[0120] 試験例１及び２並びに実施例１から推測される、好中球による軸索再生過程制御の概念図を図２３に示す。

[0121] 実施例２　ワーラー変性部の神経上膜におけるNETs形成と、NETs形成抑制が神経再生過程に及ぼす影響の評価

（１）NETsの分布

未処置のラットから摘出した坐骨神経（正常坐骨神経）、及び圧挫損傷作成の12時間後にラットから摘出した坐骨神経（損傷神経）の損傷部位から20 mm遠位における縦断切片について、CitH3、Ly-6G及びCD68に対する免疫組織化学染色を行った。正常坐骨神経ではNETsは検出されなかった一方（図２４左）、損傷神経ワーラー変性部の神経上膜では多量のNETsが検出された（図２４中央及び右）。また、神経上膜のNETsは、好中球と共局在していた。このことから、ワーラー変性部の神経上膜に集積した好中球によってNETsが形成されたものと考えられた。

[0122] （２）NETs産生阻害剤又はNETs分解酵素を含有するシートを用いた神経損傷部遠位（15 mm～25 mm遠位）の被覆試験

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成した。損傷作成の10時間後、損傷部位から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を、0.3 mgのPAD4阻害剤Cl-アミジン（Cayman CHEMICAL #10599）を含む50μlのPBS、200 UのDNase I（ニッポンジーン #314-08071）を含む50μlのPBS、又は50μlのPBS（コントロール）のいずれかを含浸させたコラーゲン使用人工皮膚PELNAC（登録商標）（Smith & Nephew；以下、シート又はコラーゲンシートとも呼ぶ）で包み、シートを8-0ナイロンで縫合固定して2時間置いた（各群n＝3）。損傷作成の12時間後、坐骨神経を摘出し、損傷部位から20 mm遠位の縦断切片を作成して、CitH3、Ly-6G及びCD68に対する免疫組織化学染色を行った。神経上膜部分を観察し、観察視野全体の面積に占めるCitH3の染色性のある面積の割合を算出した。また、神経実質内のマクロファージ数の単位面積辺りの数を定量した。

[0123] 代表的なCitH3及びLy-6Gの免疫染色画像とCitH3陽性面積を図２５に、代表的なCD68免疫染色画像とマクロファージ数を図２６に示す。対照シート群で

は神経上膜に多量のNETsの存在が認められたが、Cl-アミジン含有シート群及びDNase I含有シート群ではNETsはわずかにしか検出されなかった。また、Cl-アミジン含有シート群及びDNase I含有シート群においては、対照シート群と比較して多くのマクロファージの集積が神経実質内に認められた。

[0124] （３）NETs分解酵素を含有するシートを用いた神経損傷部遠位（5 mm～25 mm遠位）の被覆試験

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成した。損傷作成の10時間後、損傷部位から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を、400 UのDNase I（ニッポンジーン #314-08071）を含む100μlのPBS、又は100μlのPBS（コントロール）のいずれかを含浸させたコラーゲンシートで包み、シートを8-0ナイロンで縫合固定して2時間置いた（各群n＝1）。損傷作成の7日後に坐骨神経を摘出し、縦断切片の免疫組織化学染色を行って神経実質内のマクロファージ数をカウントし、軸索再生率を算出した。

[0125] 代表的なβ3 tubulin免疫染色画像を図２７上段に、軸索再生率を図２７下段に、マクロファージ数を図２８に示す。DNase I含有シート群では、評価した損傷部遠位のほぼ全体にわたって、対照シート群と比較して高い軸索再生率を示し、また、より多くのマクロファージの集積が神経実質内に認められた。

[0126] これらの結果から、損傷神経ワーラー変性部の神経上膜においてNETsの形成を抑制することで、軸索再生が促進されることが確認された。

[0127] 実施例３　MIFの阻害が神経再生過程に及ぼす影響の評価

（１）MIFの分布

未処置のラットから摘出した坐骨神経、及び圧挫損傷作成の12時間後にラットから摘出した坐骨神経の縦断切片について、MIF及びLy-6Gに対する免疫組織化学染色を行った。正常坐骨神経ではMIFの発現は確認されなかった一方（図２９上段）、損傷作成12時間後の坐骨神経では実質外でMIFの発現が観察され、またMIFは好中球と二重染色された（図２９下段）。このことから、損傷12時間後のワーラー変性部の神経実質外では、集積した好中球によってMIF

が産生されているものと考えられた。

[0128] （２）MIF阻害剤含有シートを用いた神経損傷部遠位（15 mm～25 mm遠位）の被覆試験

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成した。損傷作成の10時間後、損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を、500μgのMIF阻害剤iso-1（Abcam, Cat ab 142140）を含む1% DMSO 50μlを含浸させた又は1% DMSO 50μlを含浸させたコラーゲンシートで包み、シートを8-0ナイロンで縫合固定して2時間置いた（各群n＝3）。損傷作成の12時間後、坐骨神経を摘出し、縦断切片を作成して、CitH3、Ly-6G及びCD68に対する免疫組織化学染色を行った。神経上膜部分を観察し、観察視野全体の面積に占めるCitH3の染色性のある面積の割合を算出した。また、神経実質内のマクロファージ数の単位面積辺りの数を定量した。

[0129] 損傷12時間後の坐骨神経損傷部5 mm遠位におけるCD68免疫染色画像及びマクロファージ数を図３０に、坐骨神経損傷部20 mm遠位におけるCD68免疫染色画像及びマクロファージ数を図３１に、坐骨神経損傷部20 mm遠位におけるCitH3及びLy-6Gの免疫染色画像とCitH3陽性面積を図３２に示す。シート処理を受けていない損傷部5 mm遠位ではiso-1含有シート群と対照シート群とでマクロファージの集積に差は認められなかった。一方、シート処理を受けた損傷部20 mm遠位では、iso-1含有シート群において対照シート群と比較して多くのマクロファージの集積が神経実質内に認められた。また、iso-1含有シート群では、損傷部20 mm遠位の神経上膜にNETsはわずかにしか検出されなかった。

[0130] （３）MIF阻害剤含有シートを用いた神経損傷部遠位（5 mm～25 mm遠位）の被覆試験

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成した。損傷作成の10時間後、損傷部から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を、1000μgのiso-1を含む1% DMSO 100μlを含浸させた又は1% DMSO 100μlを含浸させたPELNAC（登録商標）で包み、シートを縫合固定して2時間置いた（各群n＝3）。損傷作成の12時間後にシートを

外し、洗浄後に閉創した。損傷作成の7日後に坐骨神経を摘出し、縦断切片の免疫組織化学染色を行って神経実質内のマクロファージ数をカウントし、軸索再生率を算出した。

[0131] 代表的なCD68免疫染色画像及びマクロファージ数を図３３に、CD163免疫染色画像及びM2マクロファージ数を図３４に示す。評価した損傷部遠位の全体にわたって、iso-1含有シート群において対照シート群と比較して多くのマクロファージの集積が神経実質内に認められた。

[0132] 代表的なβ3 tubulin免疫染色画像及び軸索再生率を図３５に示す。iso-1含有シート群では、評価した損傷部遠位のほぼ全体にわたって、対照シート群と比較して高い軸索再生率を示した。

（４）MIF阻害剤含有シートを用いた神経損傷部遠位（5 mm～15 mm遠位）の被覆試験

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成した。損傷作成の10時間後、損傷部から5 mm～15 mm遠位の坐骨神経を、500μgのiso-1を含む1% DMSO 50μl、500μgのMIF阻害剤CPSI-1306（MCH, Cat# HY110095）を含む1% DMSO 50μl、又は1% DMSO 50μlを含浸させたPELNAC（登録商標）で包み、シートを縫合固定して2時間置いた（各群n＝1）。損傷作成の12時間後にシートを外し、洗浄後に閉創した。損傷作成の7日後に坐骨神経を摘出し、縦断切片の免疫組織化学染色を行って軸索再生率を算出した。

[0133] 代表的なβ3 tubulin免疫染色画像を図３６に、軸索再生率及び最長軸索長を図３７に示す。iso-1含有シート群及びCPSI-1306含有シート群では、評価した損傷部遠位のほぼ全体にわたって、対照シート群と比較して高い軸索再生率を示し、また最長軸索長も大きかった。

[0134] これらの結果から、ワーラー変性部の神経実質外でMIFを阻害することで、軸索再生が促進されることが確認された。

[0135] 実施例４　CXCR4の阻害が神経再生過程に及ぼす影響の評価

（１）CXCR4の分布

未処置のラットから摘出した坐骨神経、及び圧挫損傷作成の12時間後にラ

ットから摘出した坐骨神経の縦断切片について、CXCR4及びLy-6Gに対する免疫組織化学染色を行った。正常坐骨神経ではCXCR4の発現は確認されなかったが、損傷作成12時間後の坐骨神経では実質外でCXCR4の発現が観察され、またCXCR4は好中球と二重染色された（図３８）。このことから、損傷12時間後のワーラー変性部の神経実質外では、集積した好中球によってCXCR4が産生されているものと考えられた。

[0136] （２）CXCR4阻害剤含有シートを用いた神経損傷部遠位（15 mm～25 mm遠位）の被覆試験

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成した。損傷作成の10時間後、損傷部から15 mm～25 mm遠位の坐骨神経を、500μgのCXCR4阻害剤AMD3100（Abcam #10599）を含む50μlのPBSを含浸させた又は50μlのPBSを含浸させたコラーゲンシートで包み、シートを8-0ナイロンで縫合固定して2時間置いた（各群n＝3）。損傷作成の12時間後、坐骨神経を摘出し、損傷部位から20 mm遠位の縦断切片を作成して、CitH3、Ly-6G及びCD68に対する免疫組織化学染色を行った。神経上膜部分を観察し、観察視野全体の面積に占めるCitH3の染色性のある面積の割合を算出した。また、神経実質内のマクロファージ数の単位面積辺りの数を定量した。

[0137] 代表的なCitH3及びLy-6Gの免疫染色画像とCitH3陽性面積を図３９に、代表的なCD68免疫染色画像とマクロファージ数を図４０に示す。AMD3100含有シート群では、神経上膜にNETsはわずかにしか検出されず、また対照シート群と比較して多くのマクロファージの集積が神経実質内に認められた。

[0138] （３）CXCR4阻害剤含有シートを用いた神経損傷部遠位（5 mm～25 mm遠位）の被覆試験

ラットの坐骨神経に圧挫損傷を作成した。損傷作成の10時間後、損傷部位から5 mm～25 mm遠位の坐骨神経を、1 mgのCXCR4阻害剤AMD3100（Abcam #10599）を含む100μlのPBSを含浸させた又は100μlのPBSを含浸させたコラーゲンシートで包み、シートを8-0ナイロンで縫合固定して2時間置いた（各群n＝1）。損傷作成の7日後に坐骨神経を摘出し、縦断切片の免疫組織化学染色を

行って神経実質内のマクロファージ数をカウントし、軸索再生率を算出した。

[0139] 代表的なβ3 tubulin免疫染色画像を図４１上段に、軸索再生率を図４１下段に、マクロファージ数を図４２に示す。CXCR4含有シート群では、評価した損傷部遠位のほぼ全体にわたって、対照シート群と比較して高い軸索再生率を示し、また、より多くのマクロファージの集積が神経実質内に認められた。

[0140] 試験例１及び２並びに実施例１～４から推測される、好中球による軸索再生過程制御の概念図を図４３に示す。

配列表フリーテキスト

[0141] 配列番号１ PA-dPEG24のペプチド部分のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 損傷末梢神経の実質外における好中球細胞外トラップ（Neurophil Extracellular Traps; NETs）の形成を抑制する物質を含む、末梢神経損傷の治療のための医薬組成物。

[請求項2] 損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する物質が、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質、好中球のNETs産生を阻害する物質、又はNETsを分解する物質である、請求項１に記載の医薬組成物。

[請求項3] 損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する物質が、好中球に対する抗体及びその抗原結合性断片、好中球に対するアプタマー、好中球遊走刺激因子に対する阻害剤、並びに好中球遊走阻害因子よりなる群から選択される、請求項２に記載の医薬組成物。

[請求項4] 好中球のNETs産生を阻害する物質が、マクロファージ遊走阻止因子（Macrophage migration inhibitory factor; MIF）の発現を抑制する又は機能を阻害する物質、CXCモチーフ型ケモカイン受容体4（CXCR4）の発現を抑制する又は機能を阻害する物質、及びペプチジルアルギニンデイミナーゼ4（Peptidylarginine deiminase; PAD4）の発現を抑制する又は機能を阻害する物質よりなる群から選択される、請求項２に記載の医薬組成物。

[請求項5] MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する物質が、MIFの発現を抑制する核酸、MIFに対する抗体及びその抗原結合性断片、MIFに対するアプタマー、並びにMIF阻害剤よりなる群から選択される、請求項４に記載の医薬組成物。

[請求項6] MIF阻害剤がISO-1 ((S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid) 又は(±)-CPSI 1306 (2-[3-(3-(2,4-Difluorophenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl]-1-(4-morpholinyl)ethanone) である、請求項５に記載の医薬組成物。

[請求項7] CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質が、CXCR4の発現を

抑制する核酸、CXCR4に対する抗体及びその抗原結合性断片、CXCR4に対するアプタマー、並びにCXCR4阻害剤よりなる群から選択される、請求項４に記載の医薬組成物。

[請求項8] CXCR4阻害剤がプレリキサホルである、請求項７に記載の医薬組成物。

[請求項9] PAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質が、PAD4の発現を抑制する核酸、PAD4に対する抗体及びその抗原結合性断片、PAD4に対するアプタマー、並びにPAD4阻害剤よりなる群から選択される、請求項４に記載の医薬組成物。

[請求項10] PAD4阻害剤がCl-アミジンである、請求項９に記載の医薬組成物。

[請求項11] NETsを分解する物質がDNase Iである、請求項２に記載の医薬組成物。

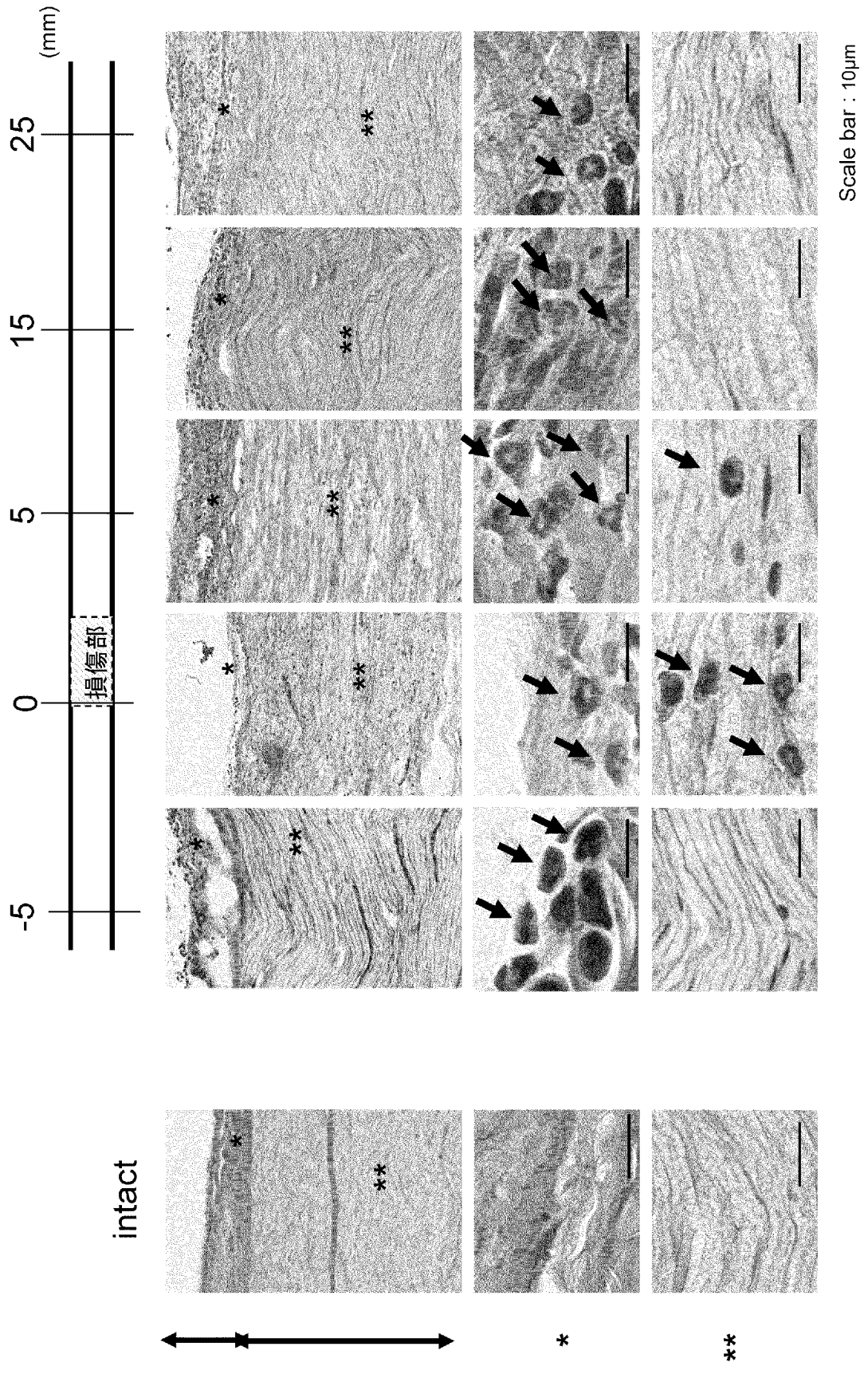
[請求項12] 末梢神経の損傷部遠位側周辺に配置して用いるための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項13] 損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性を指標とした、被験物質の末梢神経再生促進活性を評価する方法。

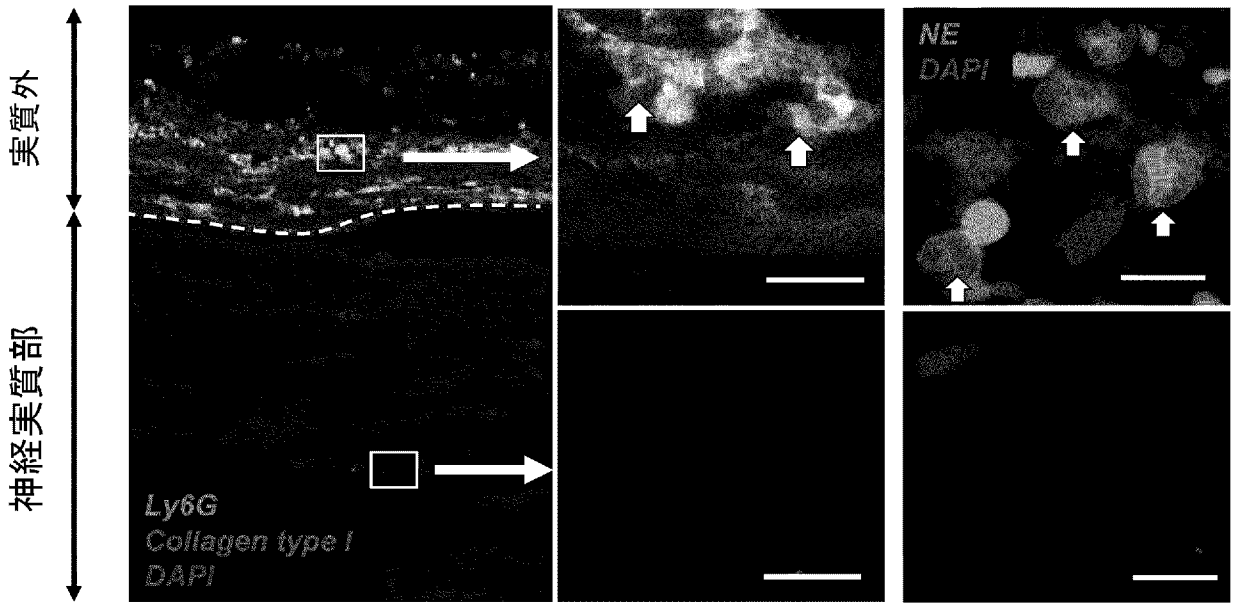
[請求項14] 損傷末梢神経の実質外におけるNETsの形成を抑制する活性が、損傷末梢神経への好中球の集積を阻害する活性、好中球のNETs産生を阻害する活性、又はNETsを分解する活性である、請求項１３に記載の方法。

[請求項15] 好中球のNETs産生を阻害する活性が、MIFの発現を抑制する又は機能を阻害する活性、CXCR4の発現を抑制する又は機能を阻害する活性、及びPAD4の発現を抑制する又は機能を阻害する物質よりなる群から選択される、請求項１４に記載の方法。

[図1]

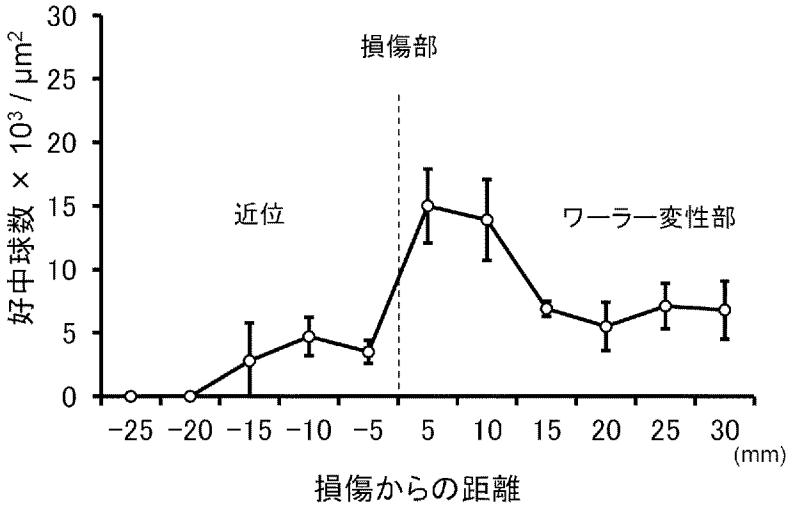

intact
Membrane tissue
Parenchyma
*
**
Scale bar : 10μm
(mm)
-5
0
5
15
25
損傷部

[図2]

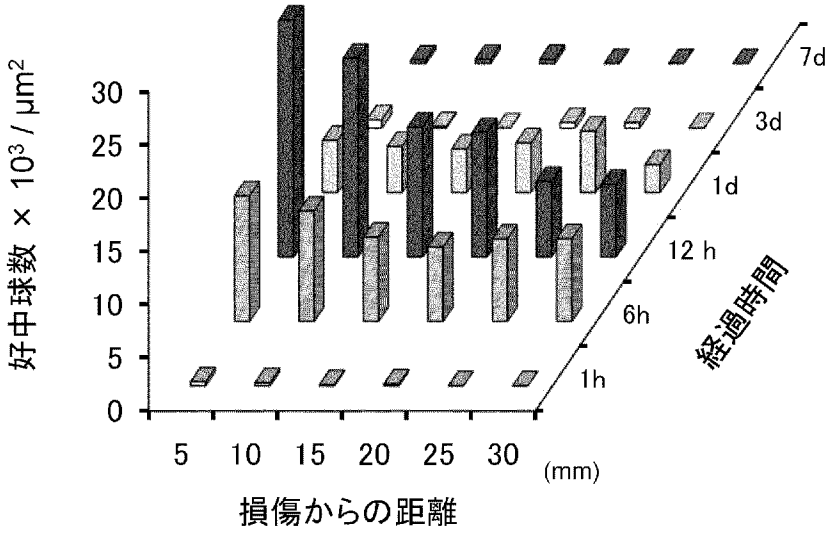


Scale bar : 10μm

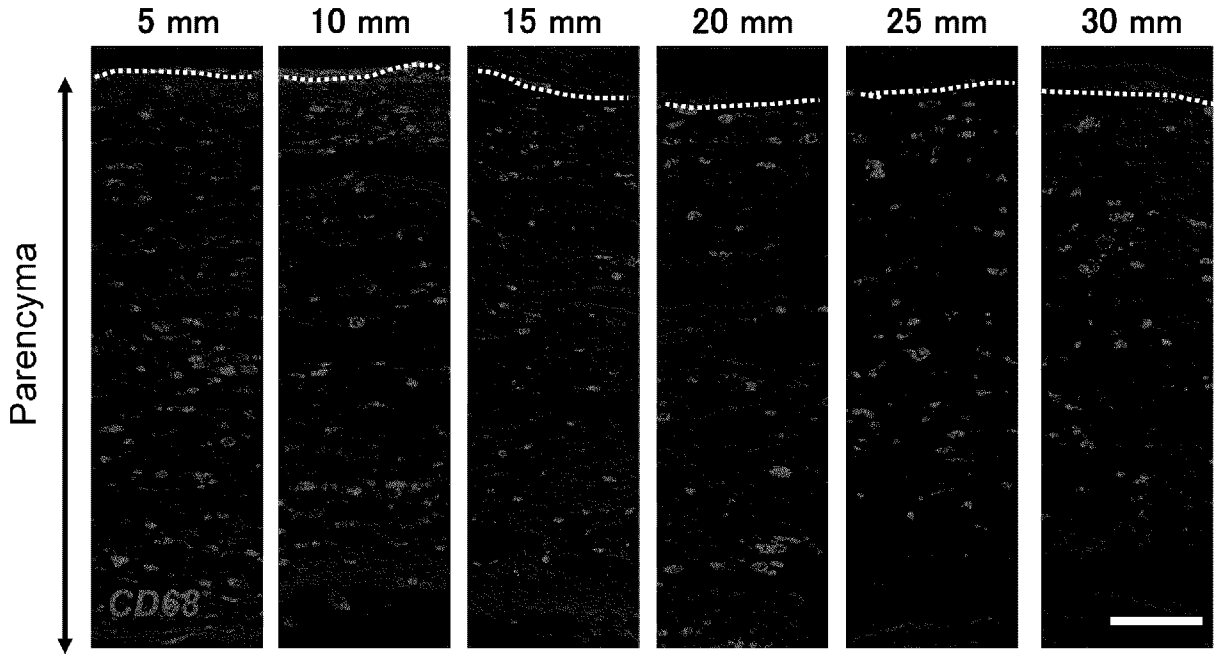
[図3]



[図4]

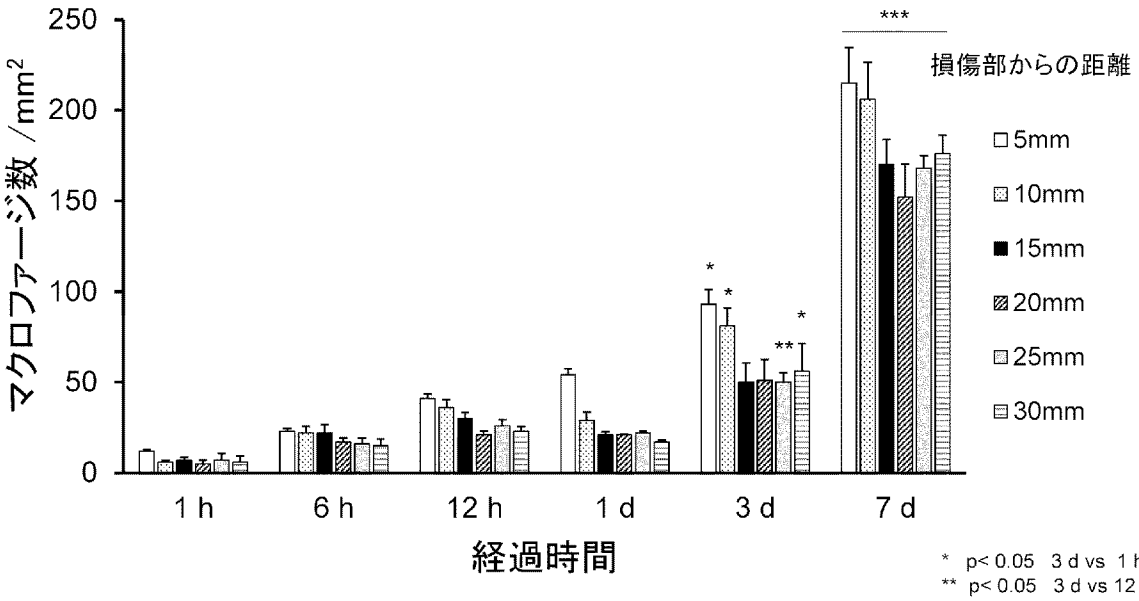


[図5]



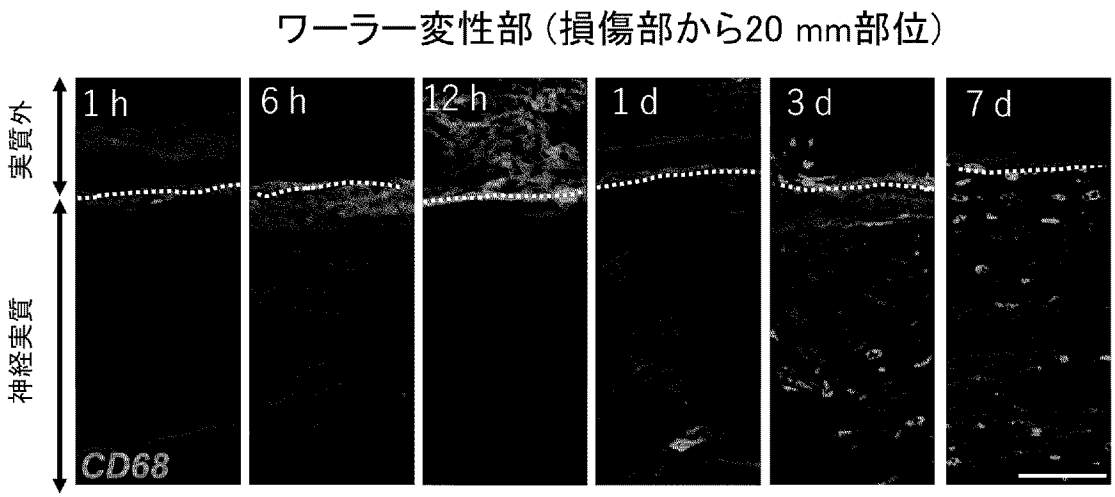
Scale bar: 100 μm

[図6]



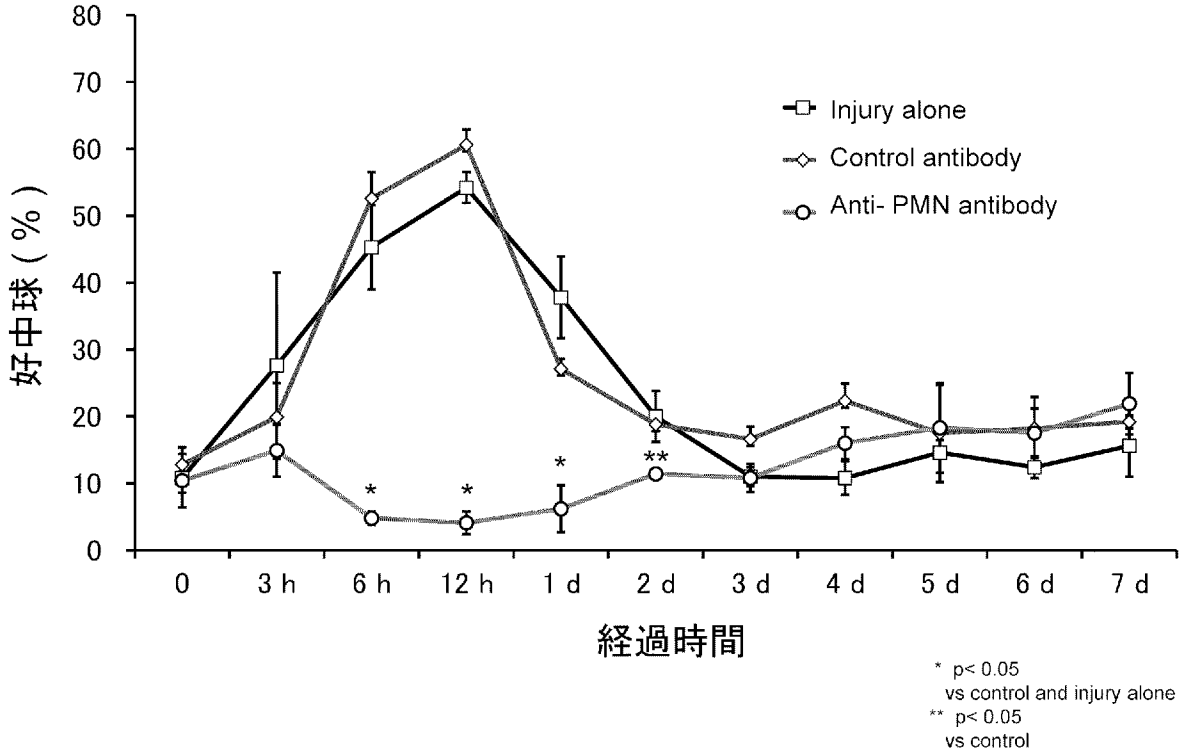
* p< 0.05 3 d vs 1 h 6 h
** p< 0.05 3 d vs 12 h
*** p< 0.001 7 d vs 7 d以外

[図7]

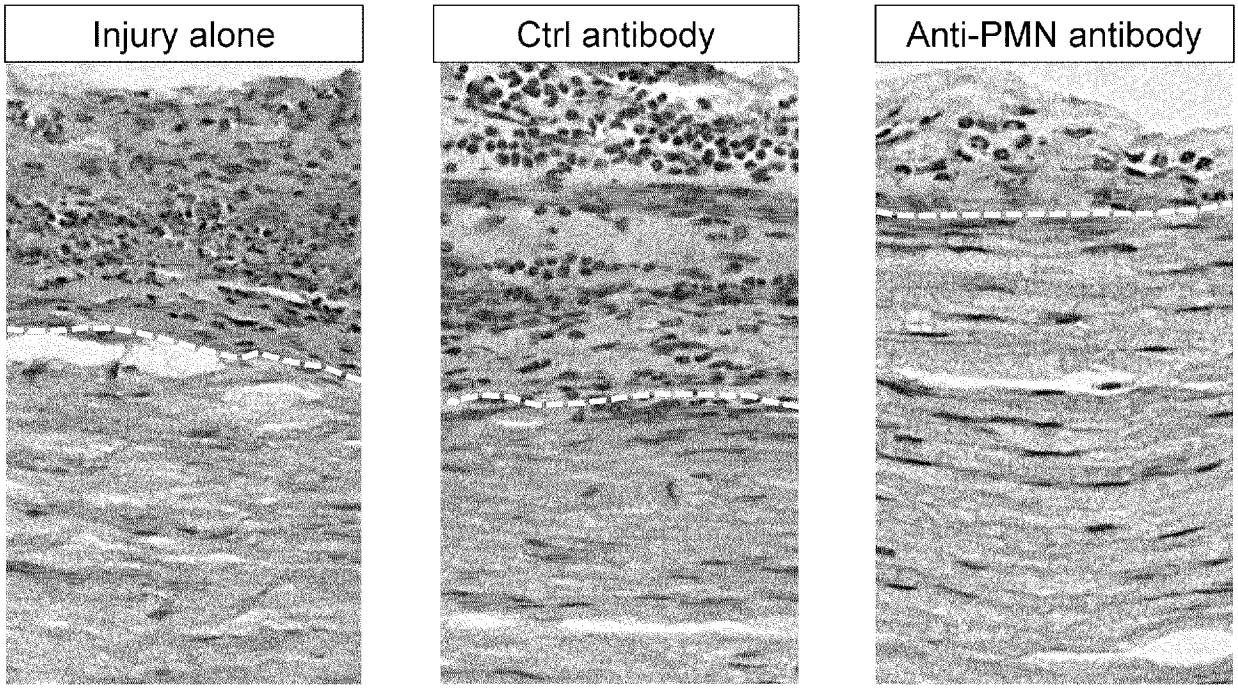


Scale bar: 100 μm

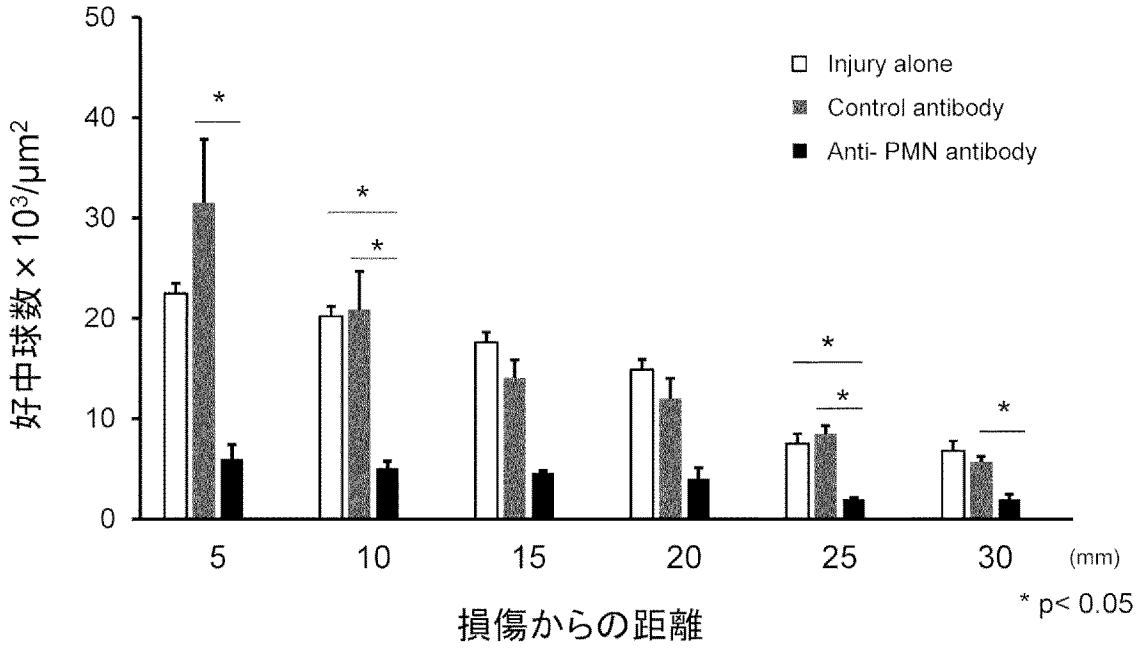
[図8]


好中球（%）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
3 h
6 h
12 h
1 d
2 d
3 d
4 d
5 d
6 d
7 d
経過時間
Injury alone
Control antibody
Anti- PMN antibody
*
*
*
**
* p< 0.05
vs control and injury alone
** p< 0.05
vs control

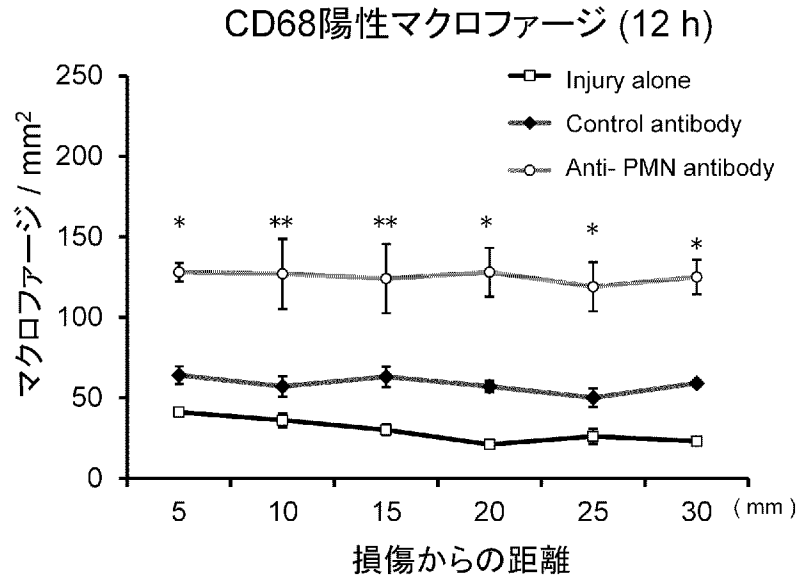
[図9]

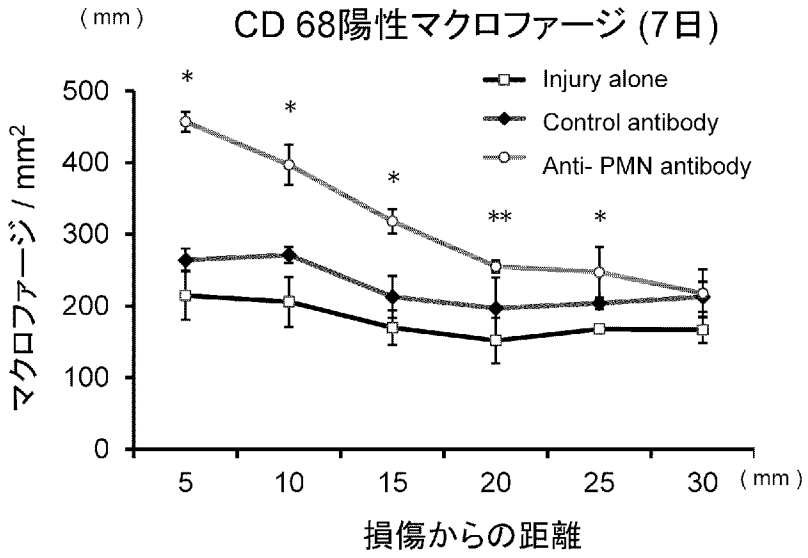

Injury alone
Ctrl antibody
Anti-PMN antibody

[図10]


50
40
30
20
10
0
好中球数 × 10³/μm²
Injury alone
Control antibody
Anti- PMN antibody
*
*
*
*
*
*
5
10
15
20
25
30
(mm)
損傷からの距離
* p< 0.05

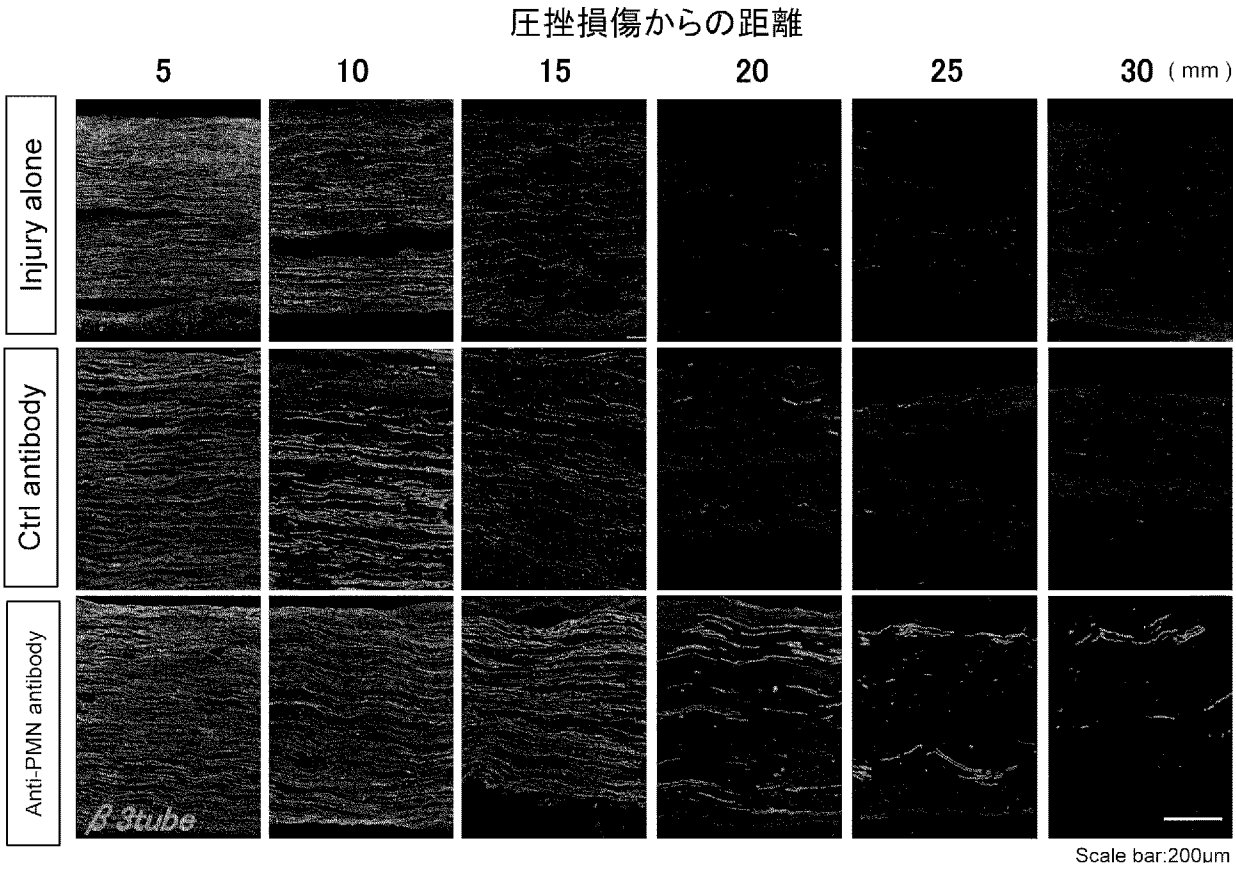
[図11]



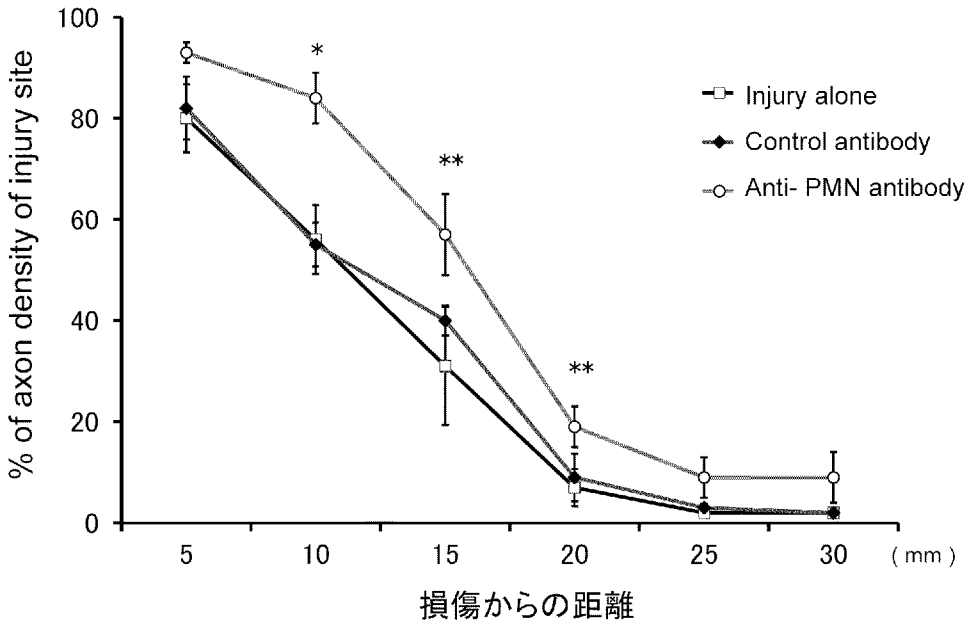


* p<0.05
PMN vs CR and Ctrl
** p<0.05
PMN vs CR

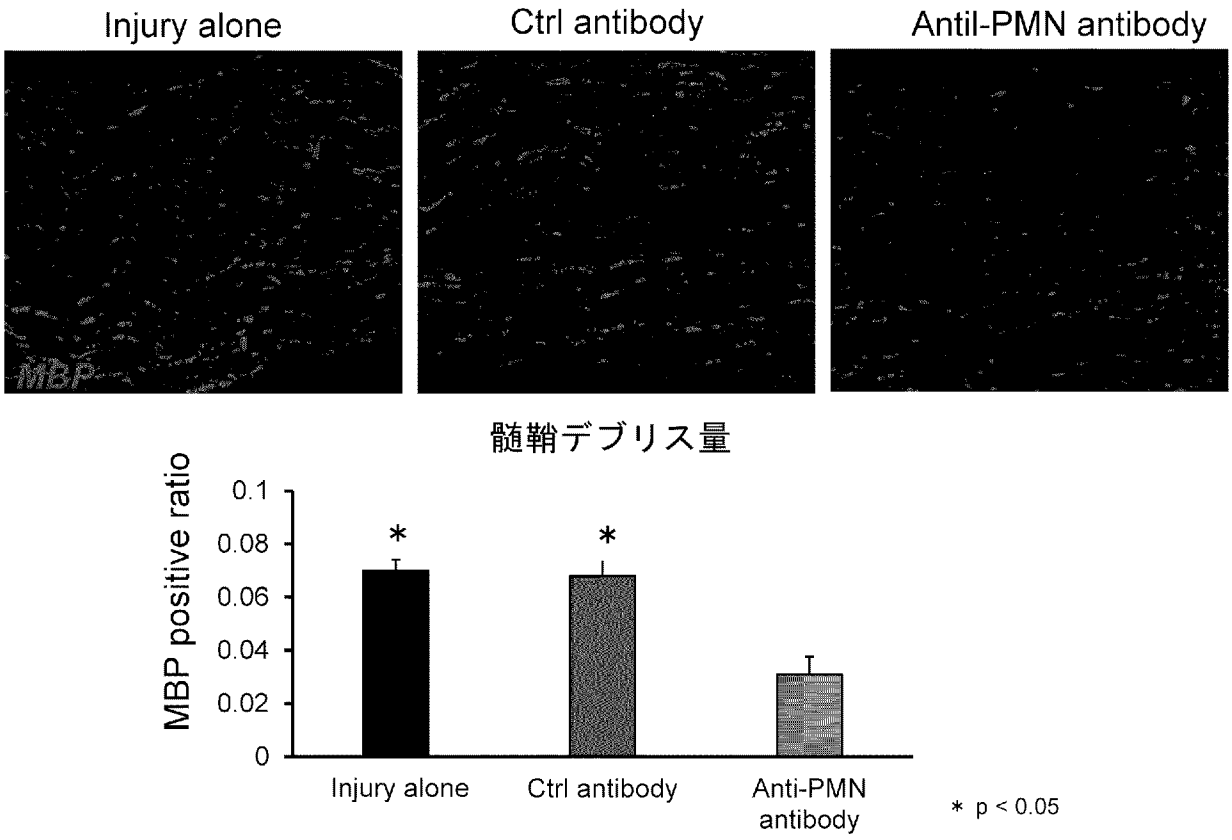
[図12]


圧挫損傷からの距離
5
10
15
20
25
30 (mm)
Injury alone
Ctrl antibody
Anti-PMN antibody
β-3tube
Scale bar:200um

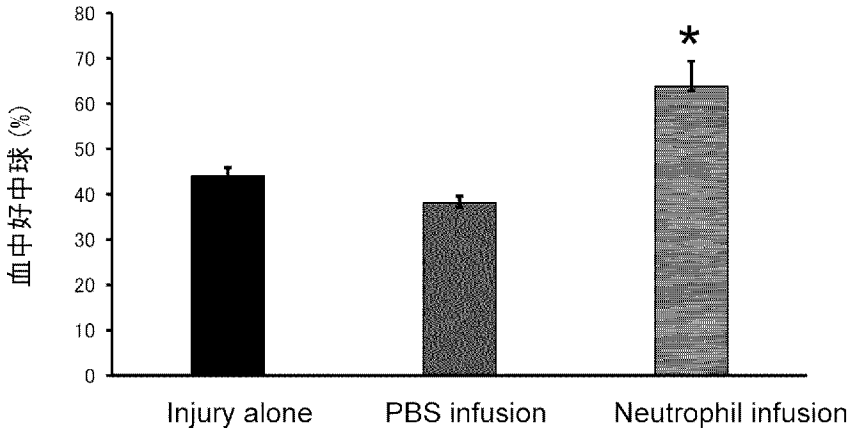
[図13]


100
80
60
40
20
0
% of axon density of injury site
*
**
**
Injury alone
Control antibody
Anti- PMN antibody
5
10
15
20
25
30
(mm)
損傷からの距離

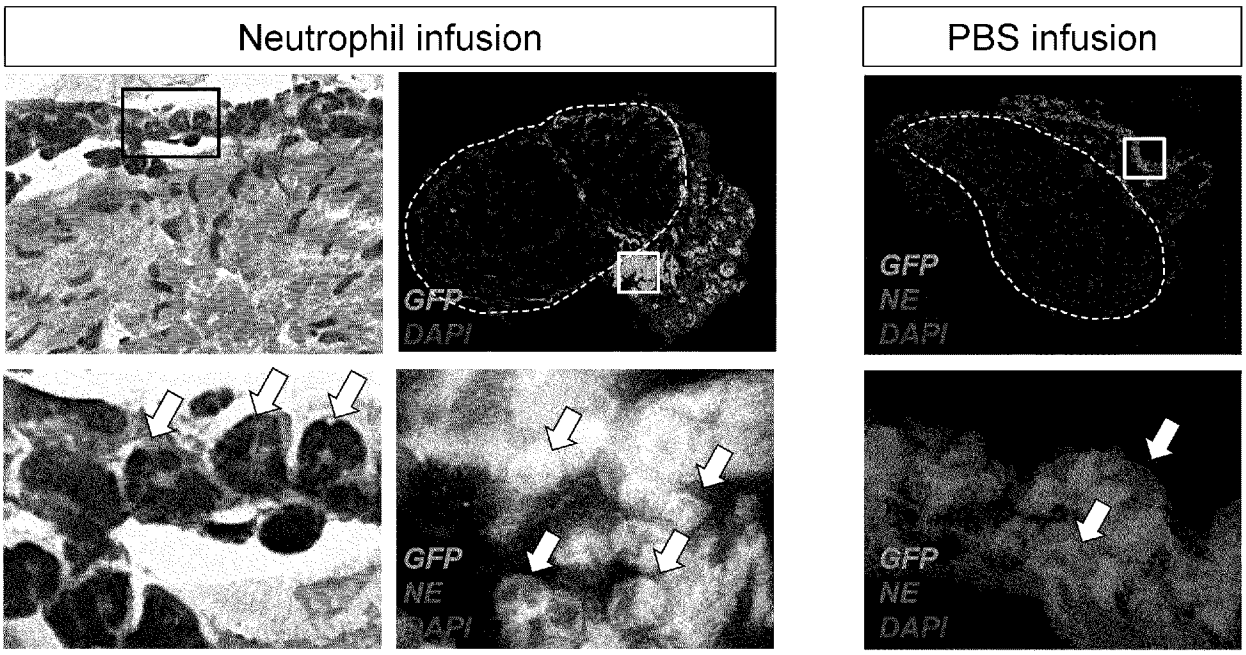
[図14]


Injury alone
Ctrl antibody
Antil-PMN antibody
MBP
髄鞘デブリス量
MBP positive ratio
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
*
*
Injury alone
Ctrl antibody
Anti-PMN antibody
* p < 0.05

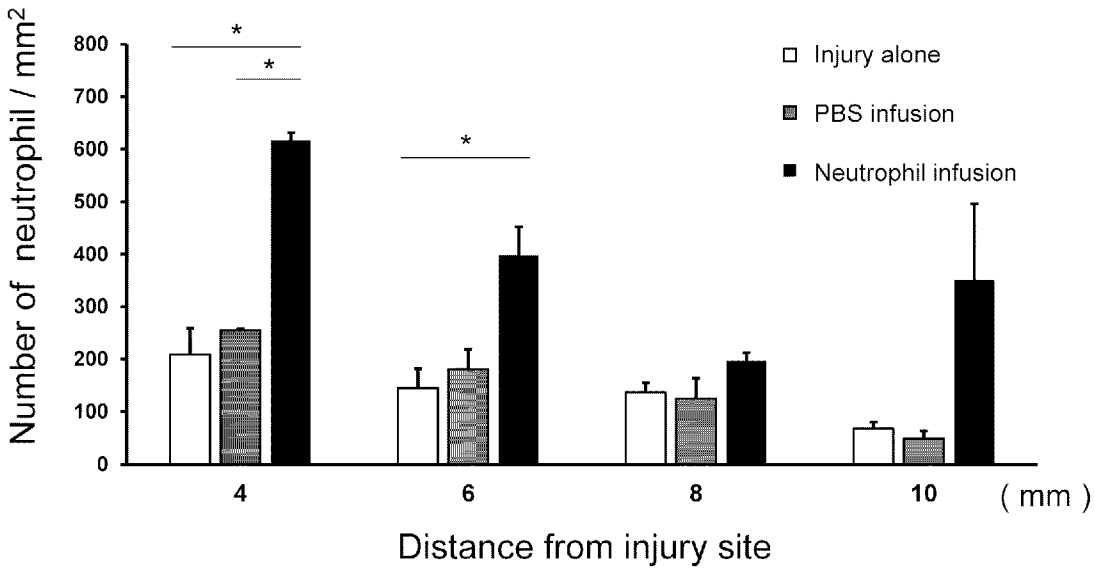
[図15]


血中好中球（%）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
Injury alone
PBS infusion
Neutrophil infusion

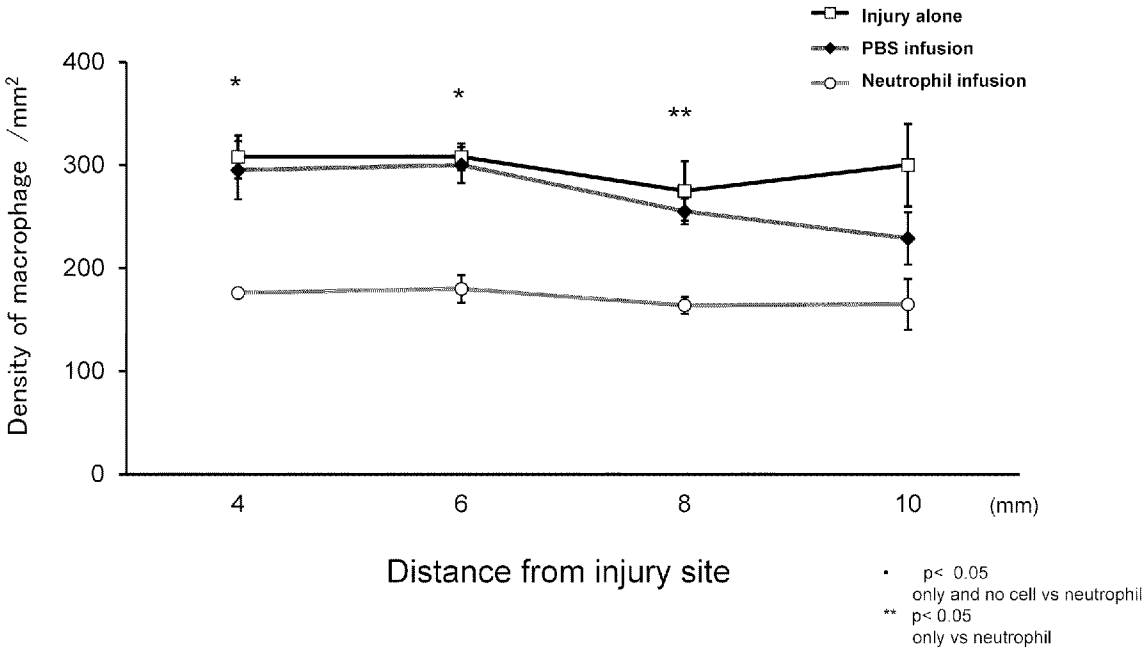
[図16]


Neutrophil infusion
PBS infusion
GFP
DAPI
GFP
NE
DAPI

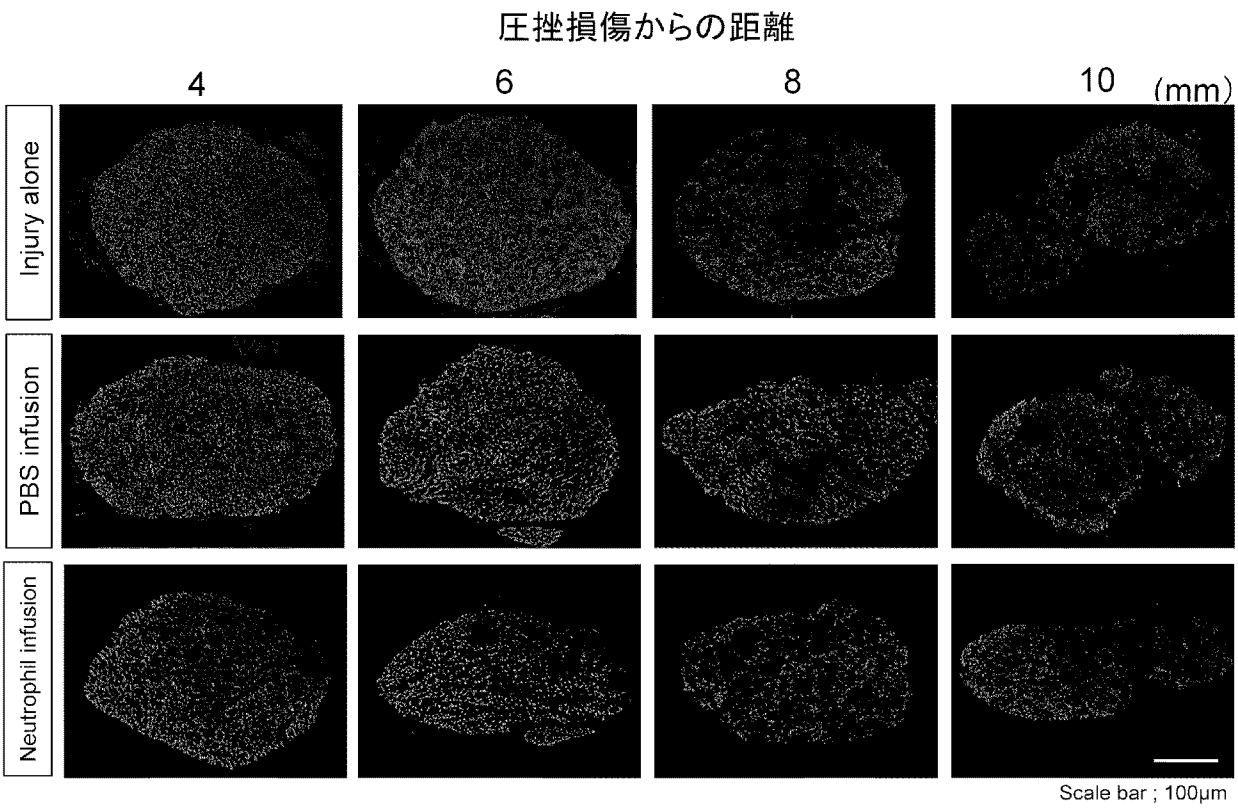
[図17]


Number of neutrophil / mm2
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
*
*
Injury alone
PBS infusion
Neutrophil infusion
4
6
8
10
(mm)
Distance from injury site

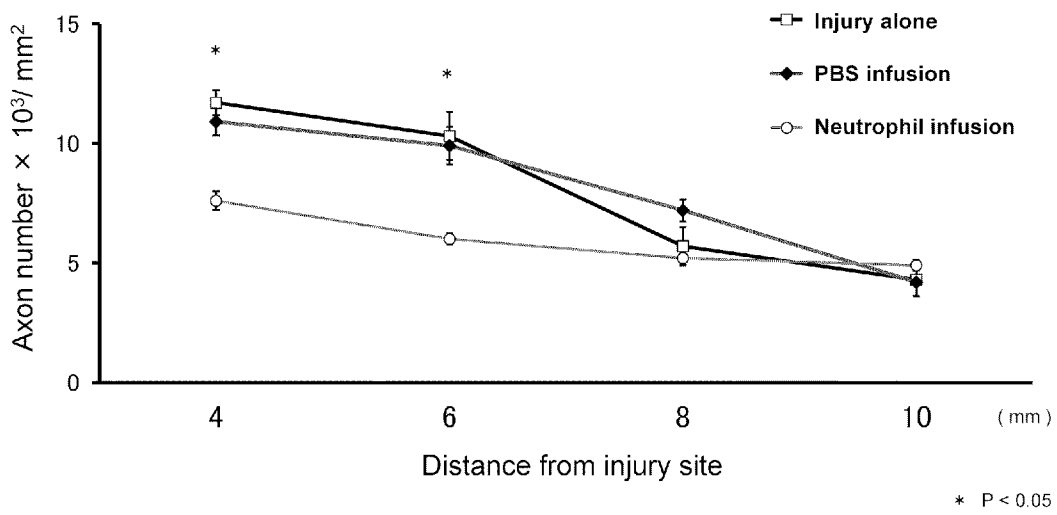
[図18]


Injury alone
PBS infusion
Neutrophil infusion
Density of macrophage /mm2
400
300
200
100
0
*
*
**
4
6
8
10
(mm)
Distance from injury site
* p< 0.05
only and no cell vs neutrophil
** p< 0.05
only vs neutrophil

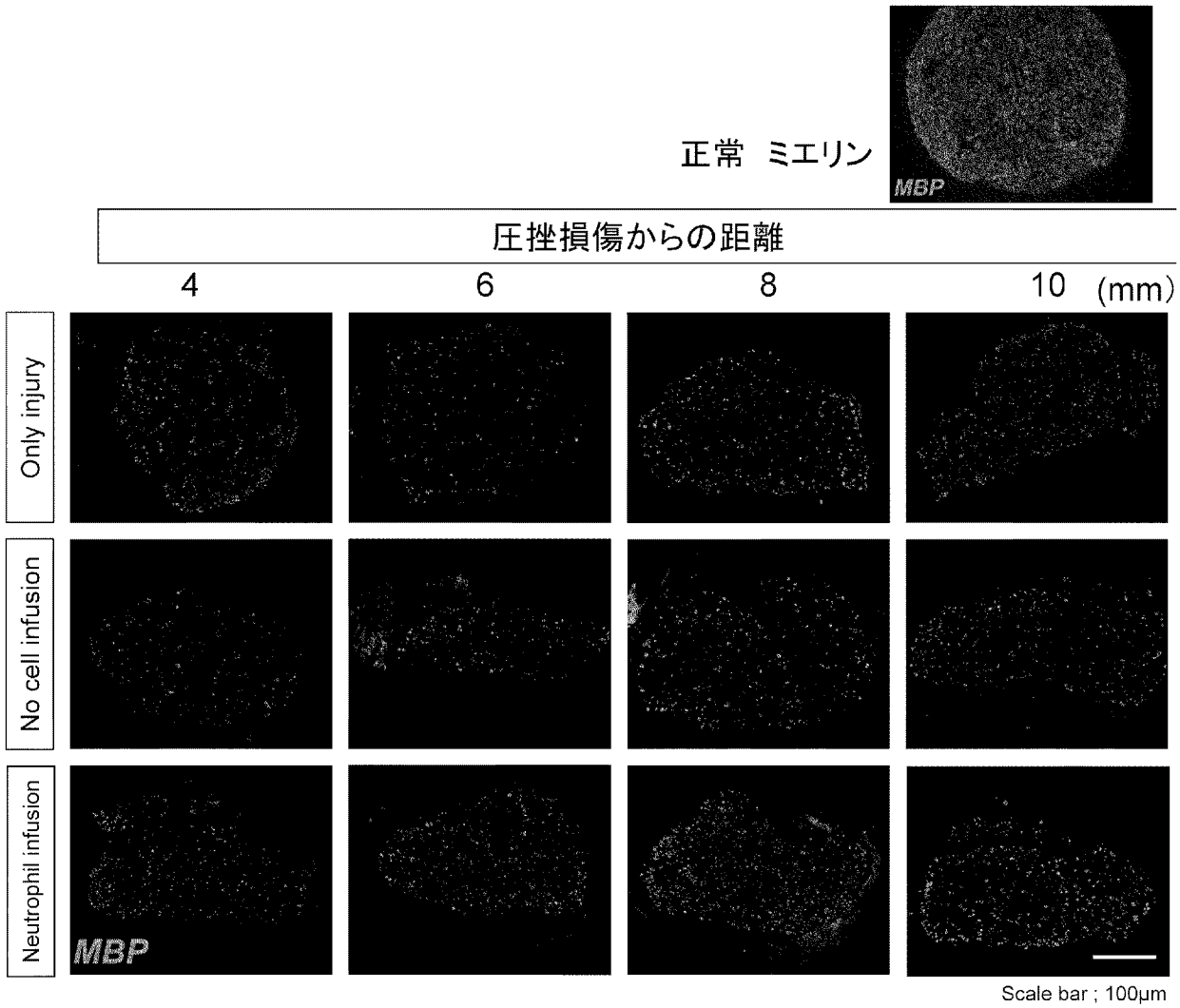
[図19]


圧挫損傷からの距離
4
6
8
10
(mm)
Injury alone
PBS infusion
Neutrophil infusion
Scale bar ; 100μm

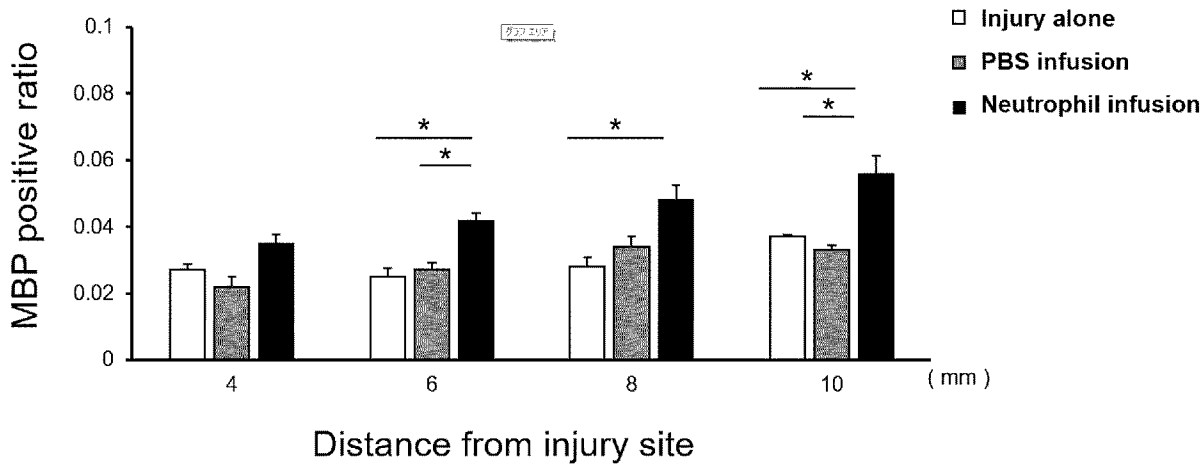
[図20]


Injury alone
PBS infusion
Neutrophil infusion
Axon number × 10³/ mm²
15
10
5
0
*
*
4
6
8
10
(mm)
Distance from injury site
* P < 0.05

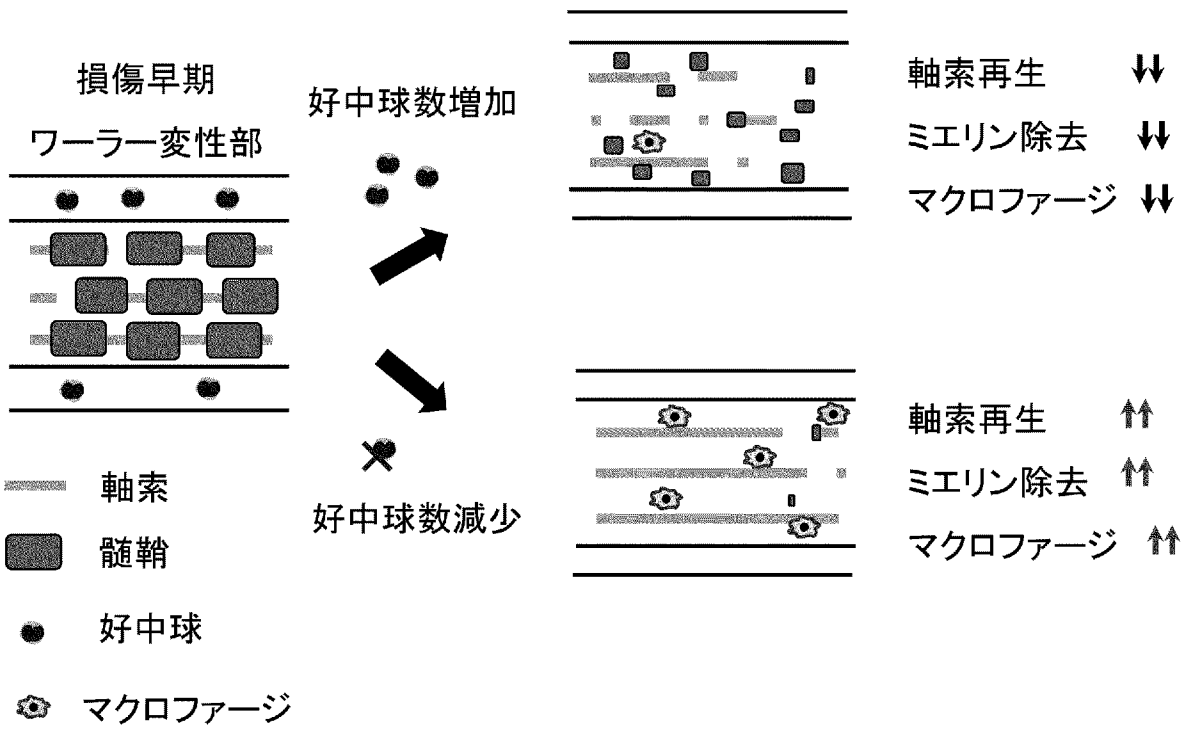
[図21]


正常 ミエリン
MBP
圧挫損傷からの距離
4
6
8
10 (mm)
Only injury
No cell infusion
Neutrophil infusion
MBP
Scale bar ; 100μm

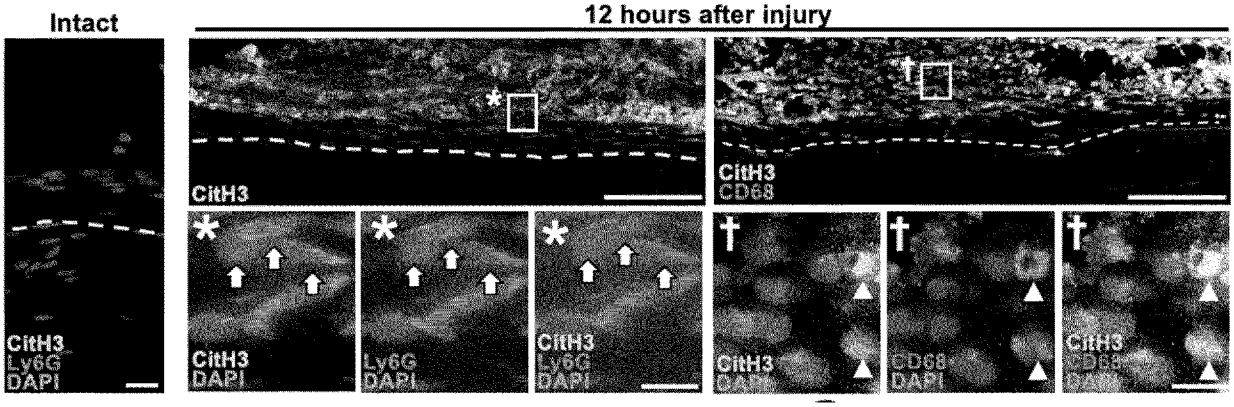
[図22]


MBP positive ratio
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
4
6
8
10
(mm)
Distance from injury site
Injury alone
PBS infusion
Neutrophil infusion
*
*
*
*
*

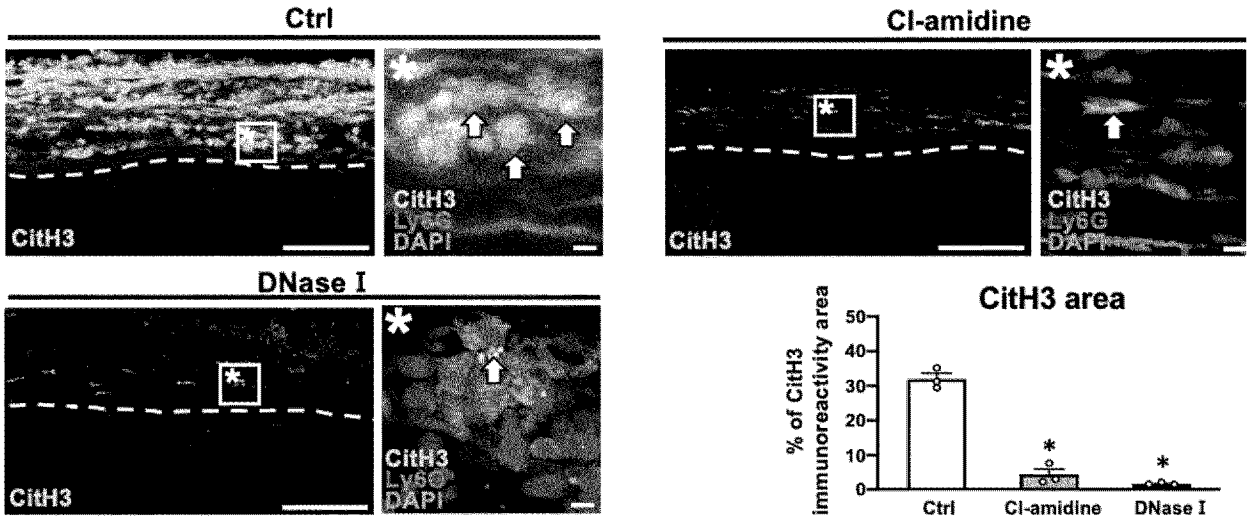
[図23]


損傷早期
ワーラー変性部
好中球数増加
好中球数減少
軸索
髄鞘
好中球
マクロファージ
軸索再生
ミエリン除去
マクロファージ
軸索再生
ミエリン除去
マクロファージ

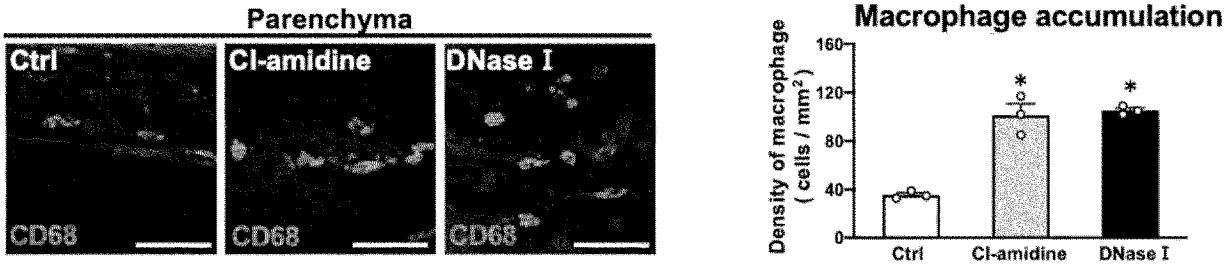
[図24]


Intact
12 hours after injury
CitH3
Ly6G
DAPI
CitH3
CD68
CitH3
DAPI
Ly6G
DAPI
CitH3
Ly6G
DAPI
CitH3
CD68
CitH3
CD68
DAPI

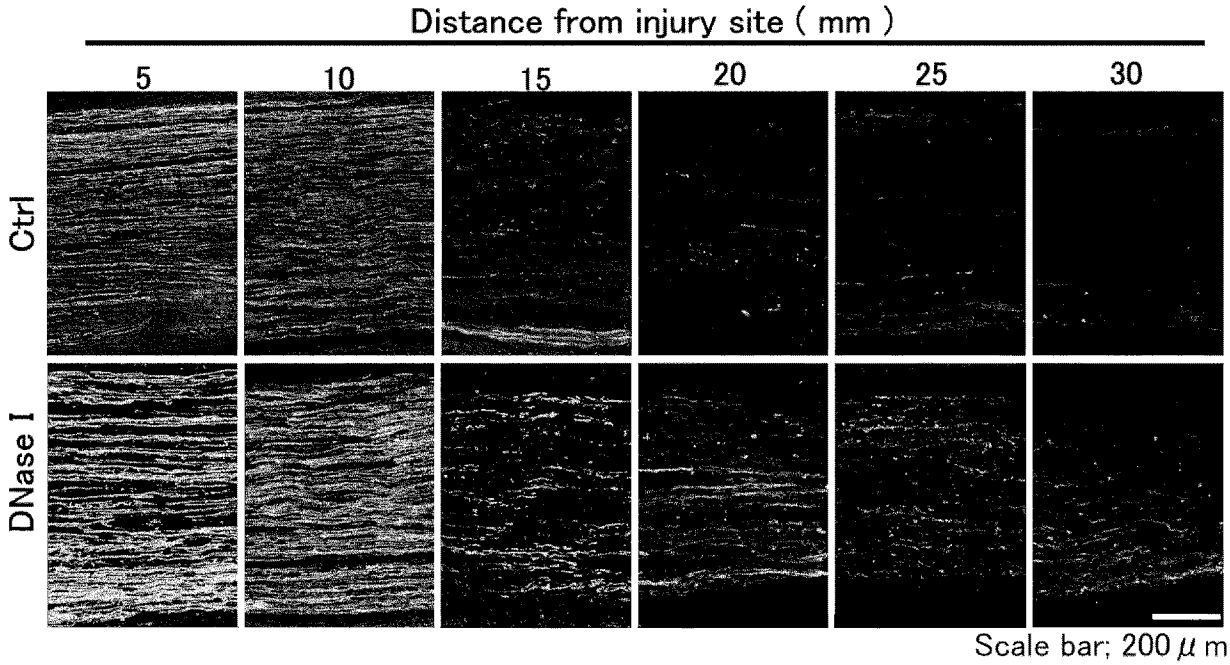
[図25]

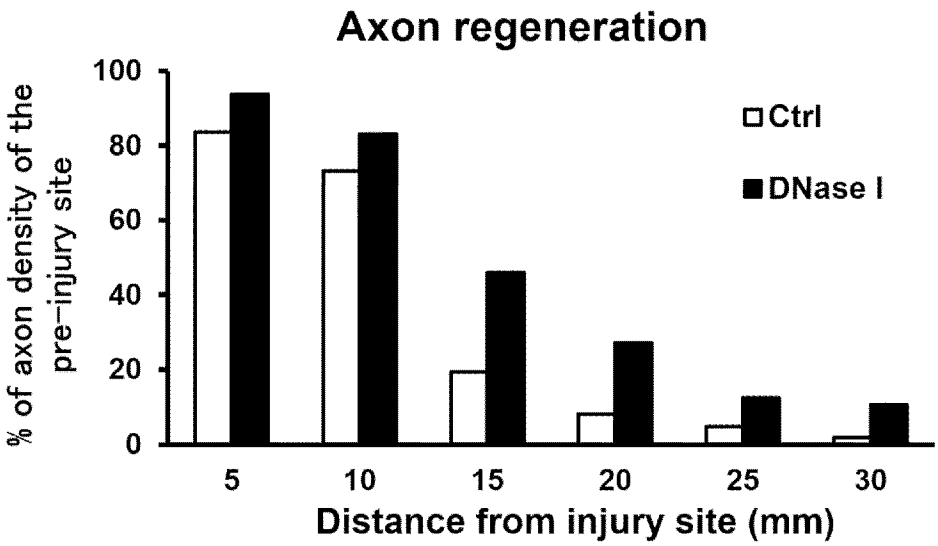

Ctrl
Cl-amidine
DNase I
CitH3
CitH3
Ly6G
DAPI
CitH3 area
% of CitH3 immunoreactivity area
50
40
30
20
10
0
Ctrl
Cl-amidine
DNase I

[図26]

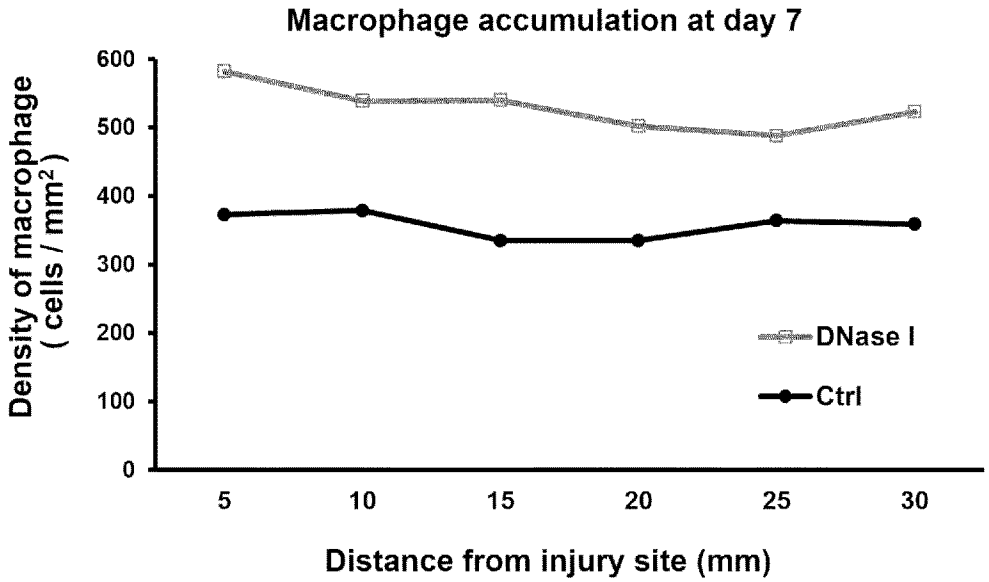

Parenchyma
Ctrl
Cl-amidine
DNase I
CD68
CD68
CD68
Macrophage accumulation
Density of macrophage (cells / mm2)
160
120
80
40
0
Ctrl
Cl-amidine
DNase I

[図27]


Distance from injury site (mm)
5
10
15
20
25
30
Ctrl
DNase I
Scale bar; 200 μ m

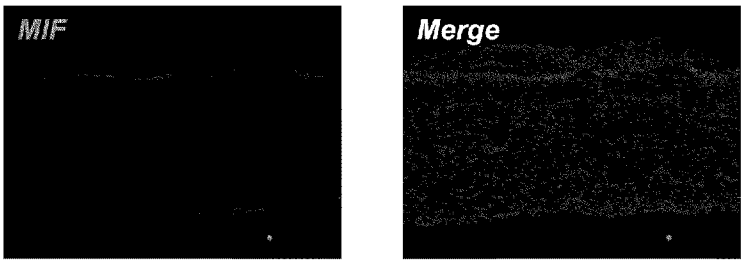

Axon regeneration
% of axon density of the pre-injury site
100
80
60
40
20
0
Ctrl
DNase I
5
10
15
20
25
30
Distance from injury site (mm)

[図28]

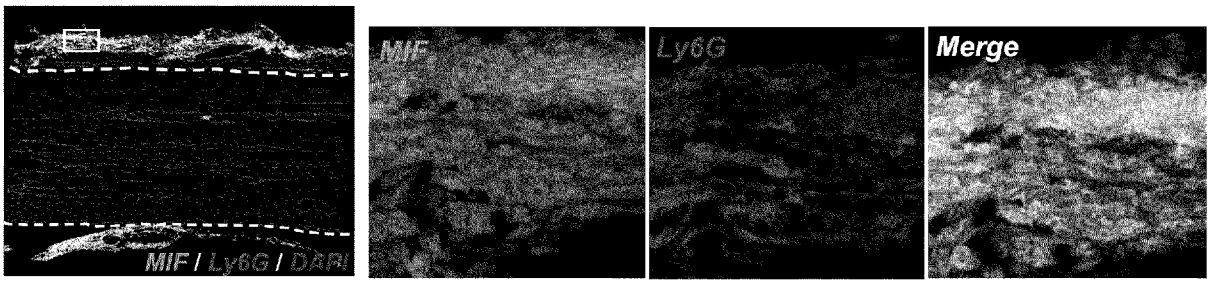


[図29]

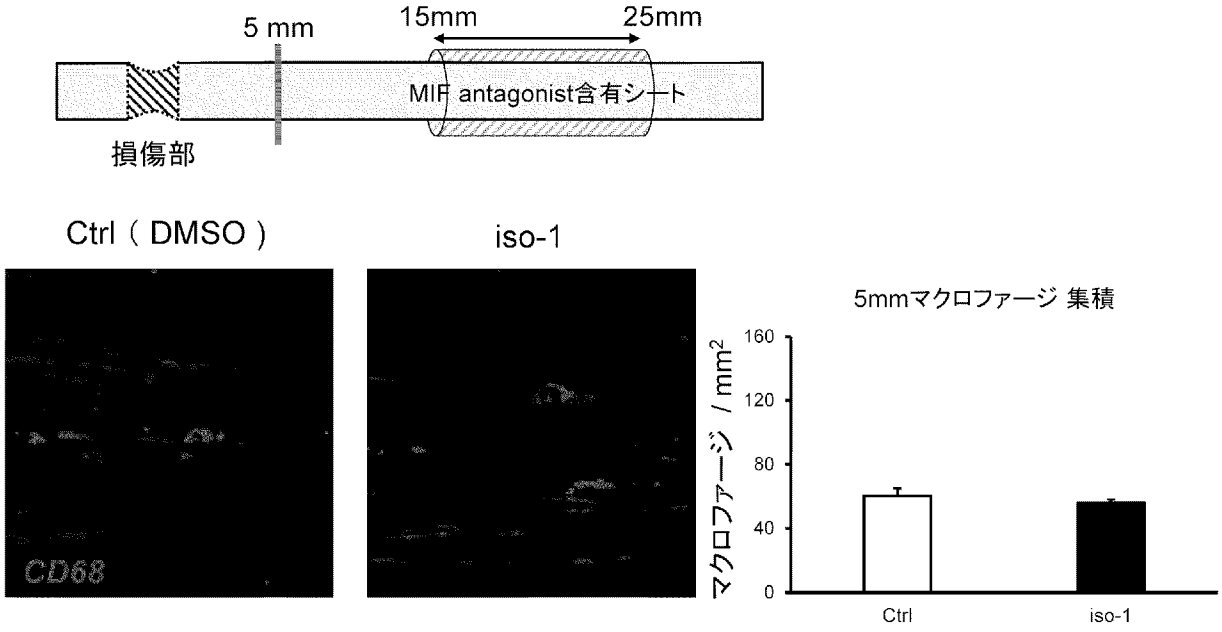
✓ 正常坐骨神経（negative control）



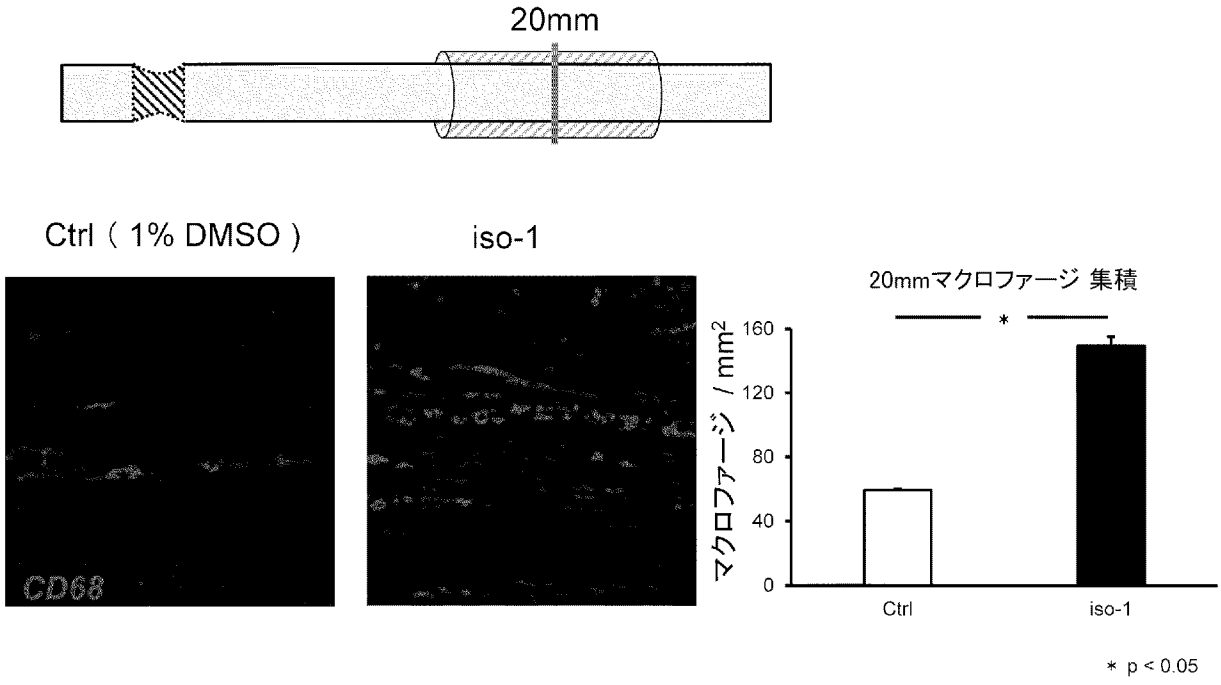
✓ CR 12 h 損傷遠位 10mm



[図30]

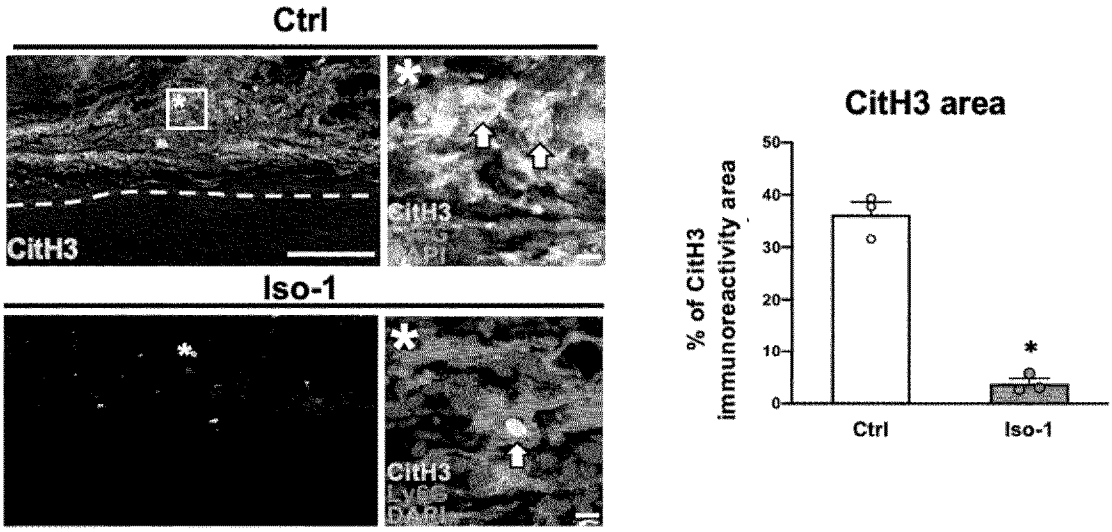

5 mm
15mm
25mm
MIF antagonist含有シート
損傷部
Ctrl（DMSO）
iso-1
CD68
5mmマクロファージ 集積
マクロファージ / mm2
160
120
80
40
0
Ctrl
iso-1

[図31]

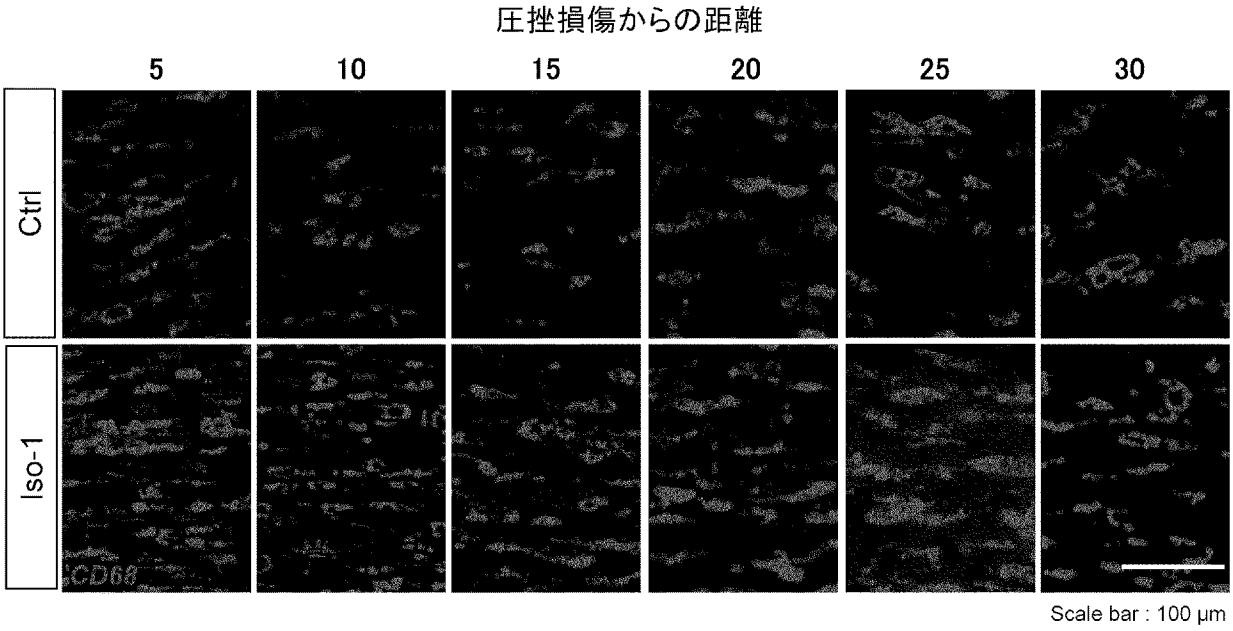

20mm
Ctrl（1% DMSO）
iso-1
CD68
20mmマクロファージ 集積
*
マクロファージ / mm2
160
120
80
40
0
Ctrl
iso-1

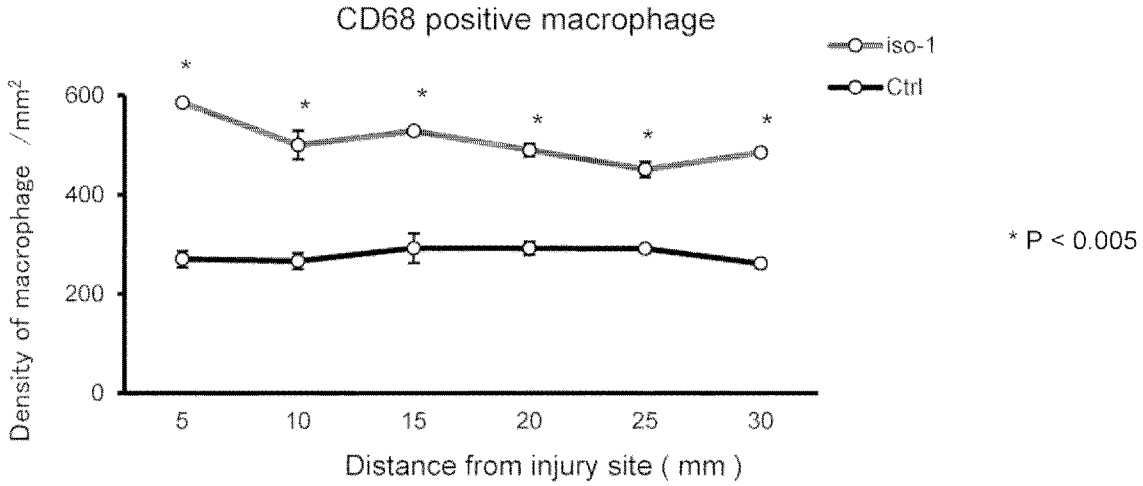
* p < 0.05

[図32]

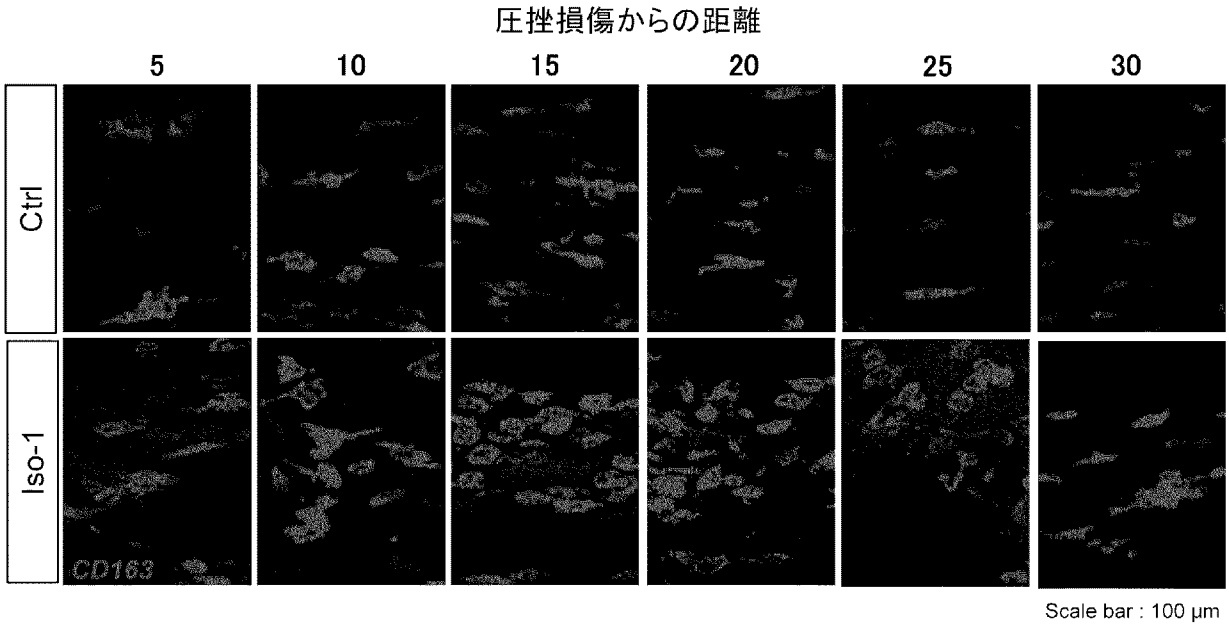

Ctrl
CitH3
Iso-1
CitH3
CitH3 area
% of CitH3 immunoreactivity area
50
40
30
20
10
0
Ctrl
Iso-1

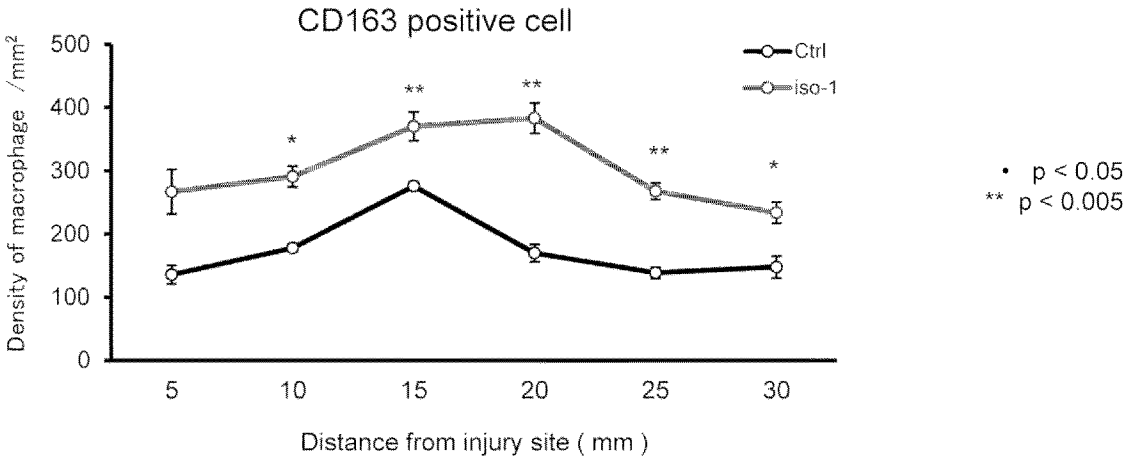
[図33]


圧挫損傷からの距離
5
10
15
20
25
30
Ctrl
Iso-1
CD68
Scale bar : 100 μm

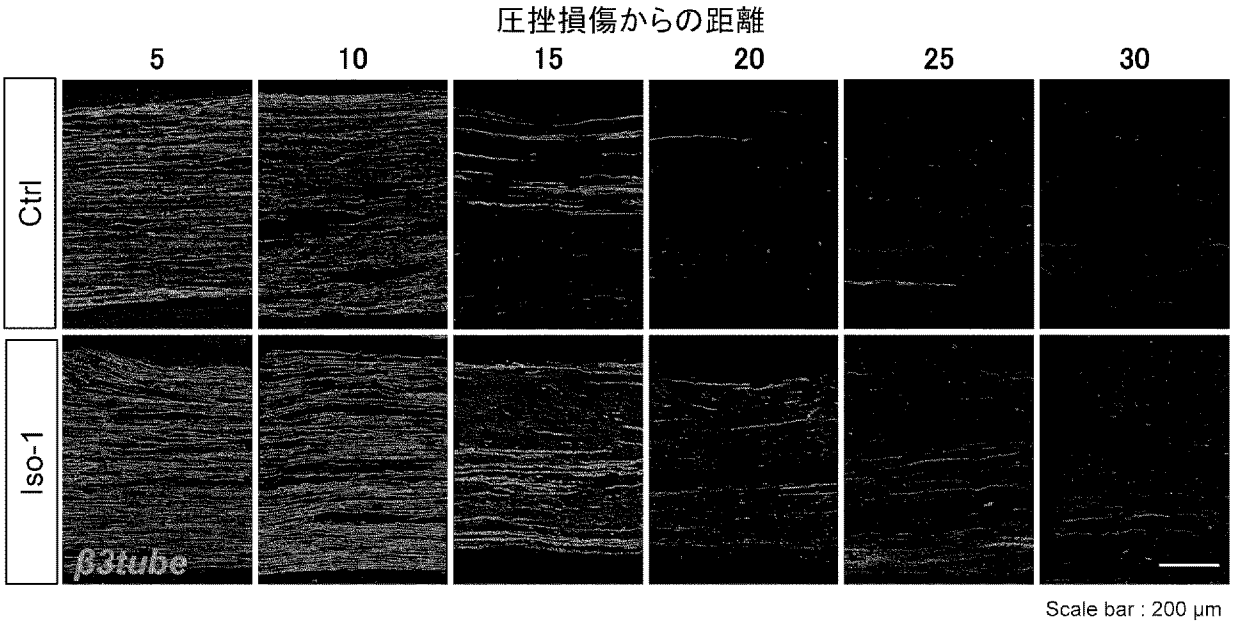

CD68 positive macrophage
iso-1
Ctrl
Density of macrophage /mm2
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
Distance from injury site (mm)
* P < 0.005

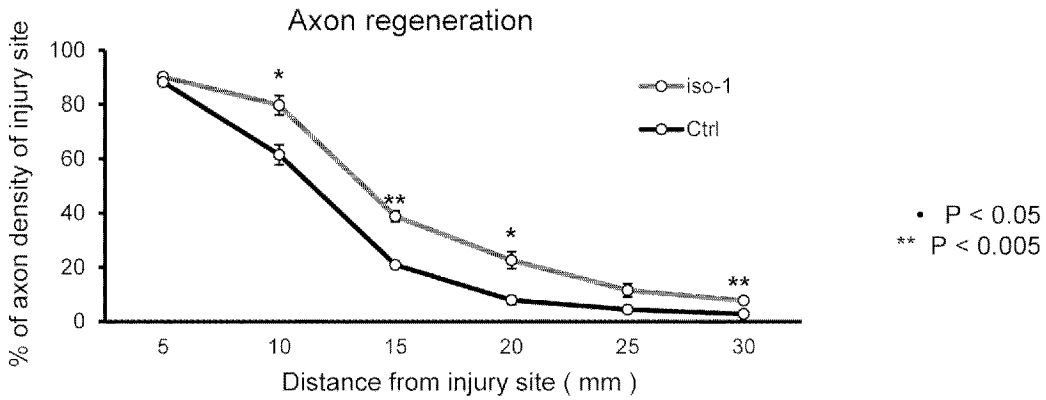
[図34]


圧挫損傷からの距離
5
10
15
20
25
30
Ctrl
Iso-1
CD163
Scale bar : 100 μm

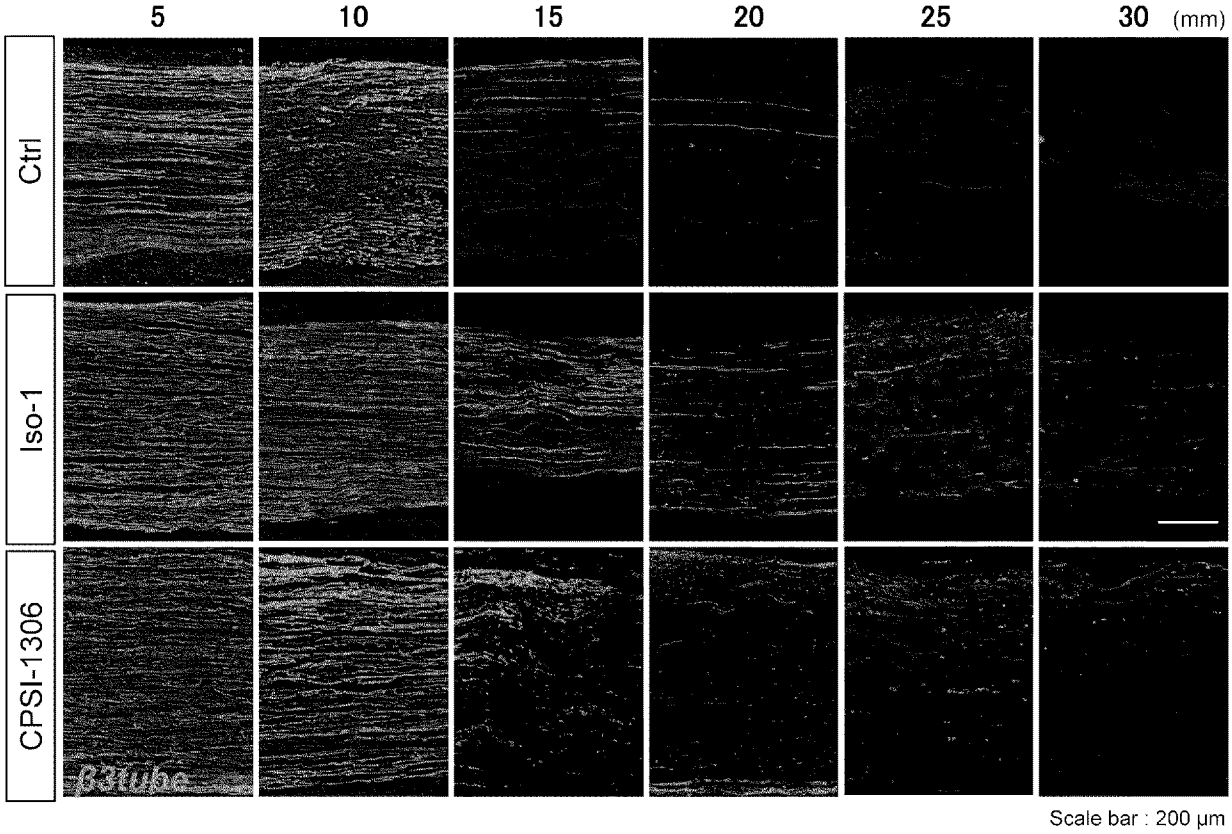

CD163 positive cell
Density of macrophage /mm²
500
400
300
200
100
0
Ctrl
iso-1
*
**
**
**
*
5
10
15
20
25
30
Distance from injury site (mm)
• p < 0.05
** p < 0.005

[図35]

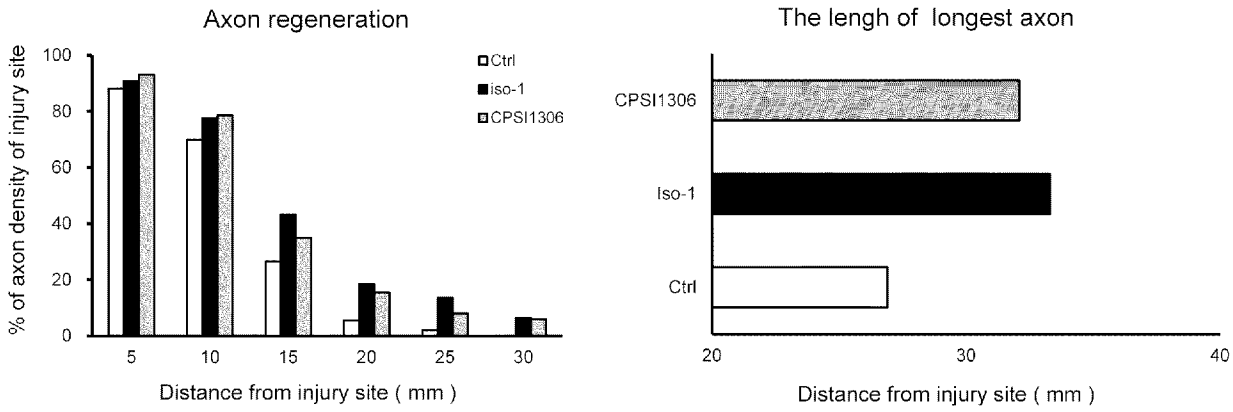

圧挫損傷からの距離
5
10
15
20
25
30
Ctrl
Iso-1
β3tube
Scale bar : 200 μm


Axon regeneration
% of axon density of injury site
100
80
60
40
20
0
5
10
15
20
25
30
Distance from injury site (mm)
Iso-1
Ctrl
*
**
*
**
• P < 0.05
** P < 0.005

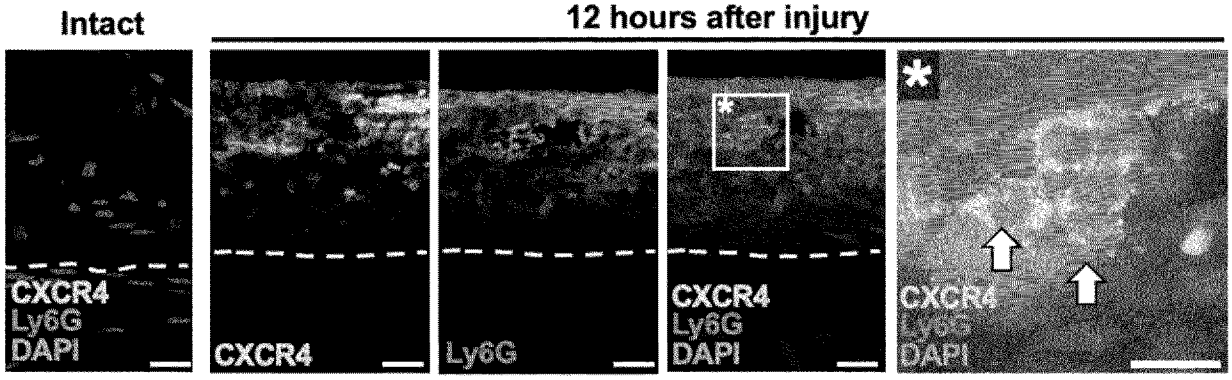
[図36]


5
10
15
20
25
30 (mm)
Ctrl
Iso-1
CPSI-1306
β3tube
Scale bar : 200 μm

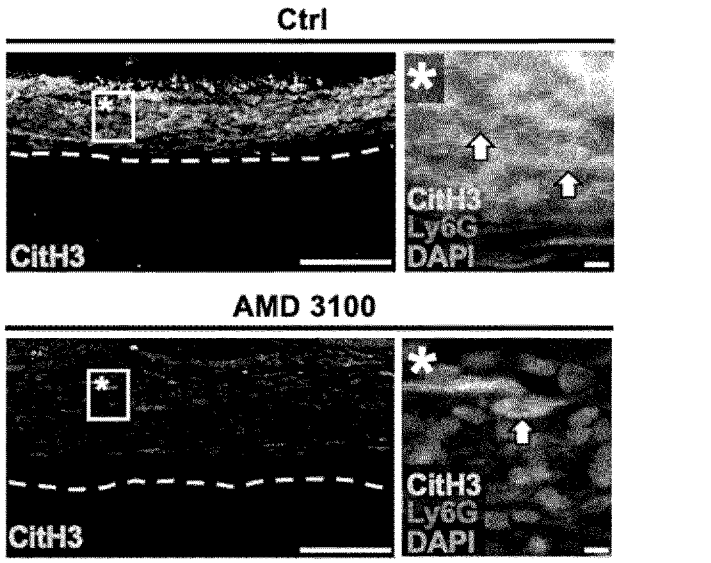
[図37]

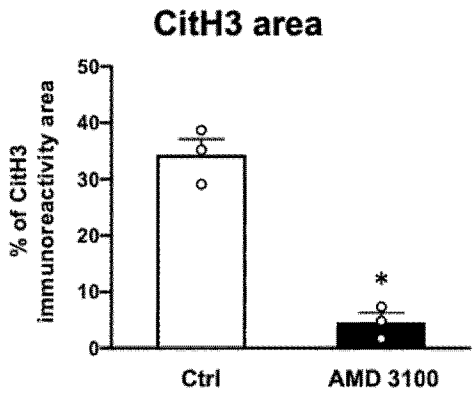

Axon regeneration
% of axon density of injury site
100
80
60
40
20
0
Ctrl
iso-1
CPSI1306
5
10
15
20
25
30
Distance from injury site (mm)
The lengh of longest axon
CPSI1306
Iso-1
Ctrl
20
30
40
Distance from injury site (mm)

[図38]

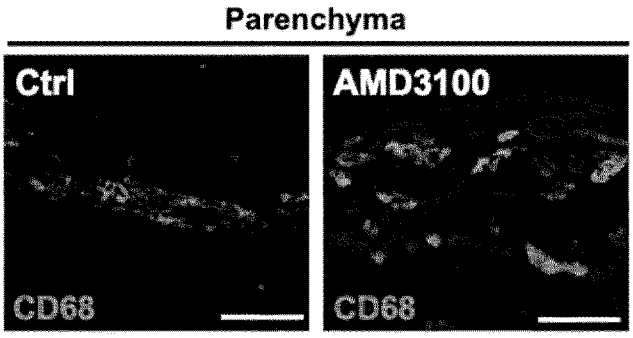

Intact
12 hours after injury
CXCR4
Ly6G
DAPI
CXCR4
Ly6G
CXCR4
Ly6G
DAPI
CXCR4
DAPI

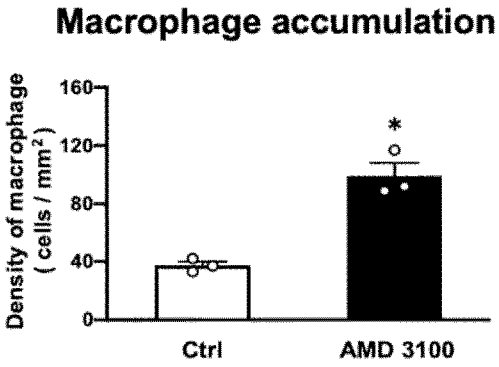
[図39]


Ctrl
CitH3
CitH3
Ly6G
DAPI
AMD 3100
CitH3
CitH3
Ly6G
DAPI

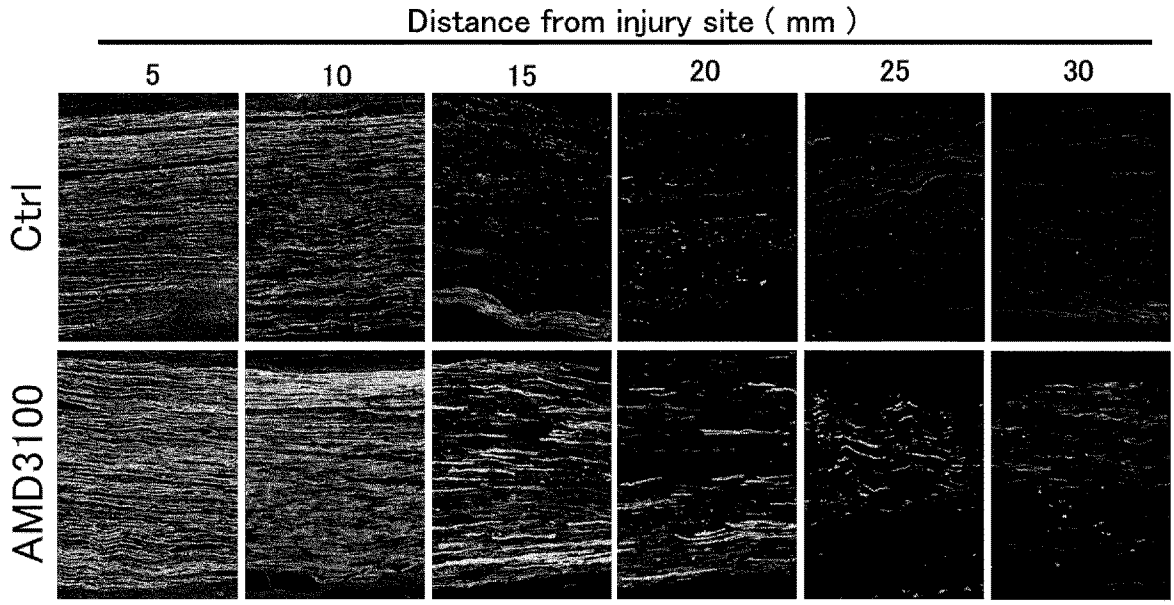

CitH3 area
% of CitH3 immunoreactivity area
50
40
30
20
10
0
Ctrl
AMD 3100

[図40]

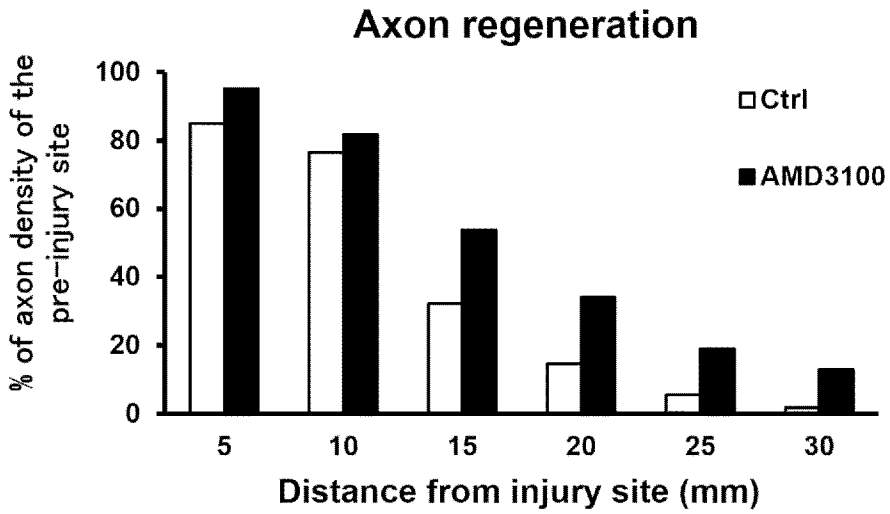

Parenchyma
Ctrl
CD68
AMD3100
CD68


Macrophage accumulation
Density of macrophage (cells / mm2)
160
120
80
40
0
Ctrl
AMD 3100

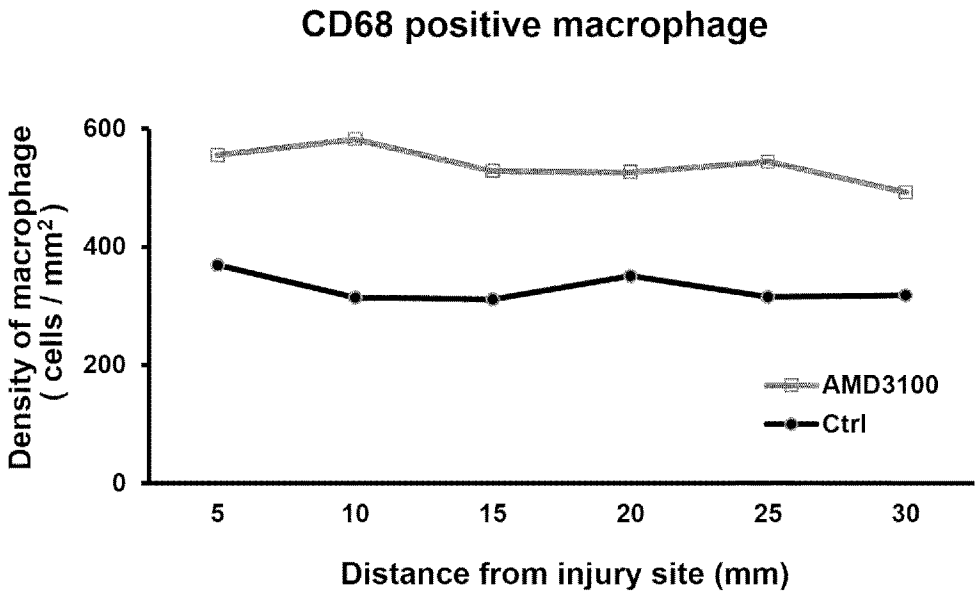
[図41]



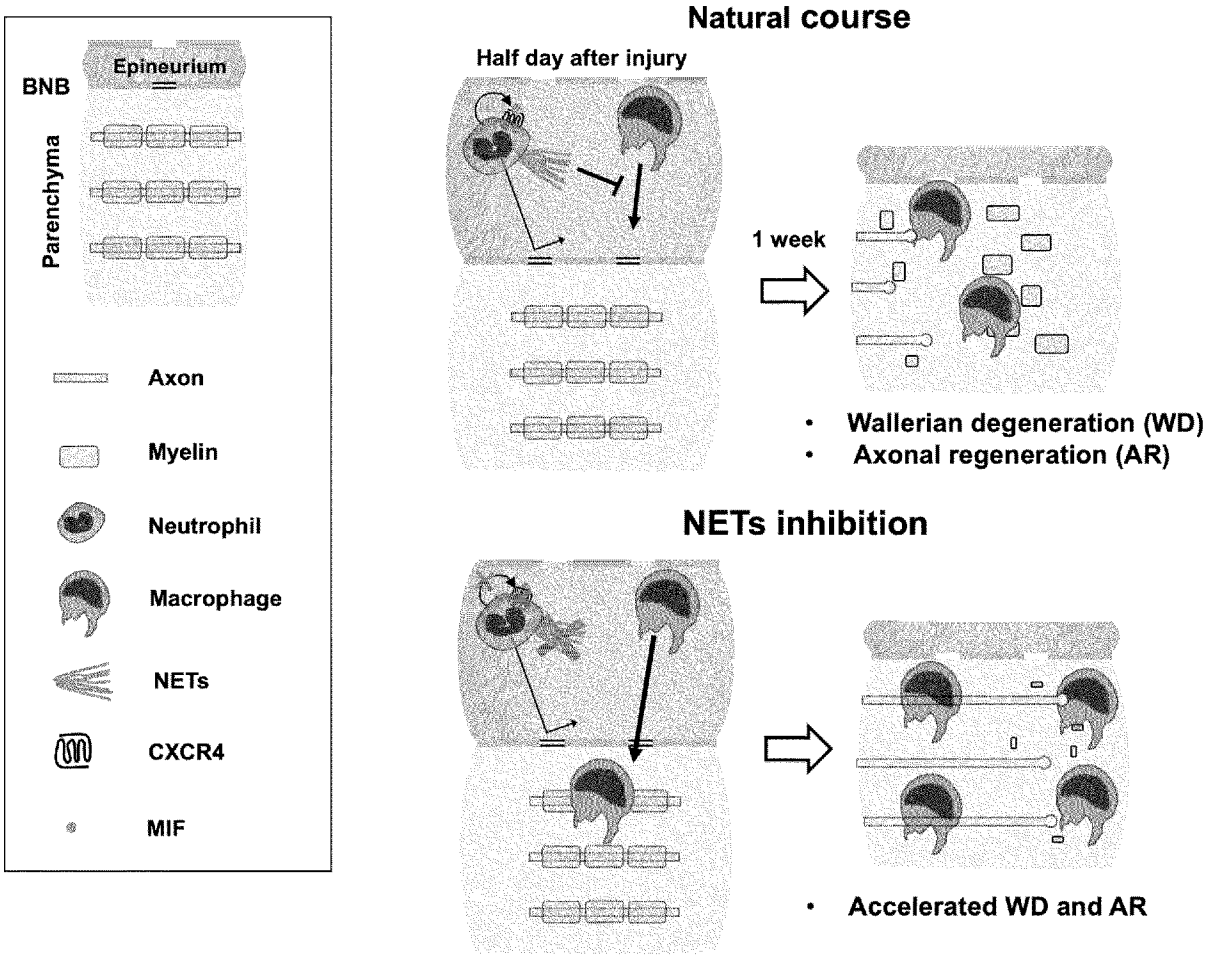
Scale bar; 200 μm



[図42]


CD68 positive macrophage
Density of macrophage (cells / mm2)
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
Distance from injury site (mm)
AMD3100
Ctrl

[図43]


BNB
Epineurium
Parenchyma
Axon
Myelin
Neutrophil
Macrophage
NETs
CXCR4
MIF
Natural course
Half day after injury
1 week
• Wallerian degeneration (WD)
• Axonal regeneration (AR)
NETs inhibition
• Accelerated WD and AR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/005504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; ***A61K 31/155***(2006.01)i; ***A61K 31/395***(2006.01)i; ***A61K 31/42***(2006.01)i; ***A61K 31/5377***(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61P 25/02***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i
FI: A61K45/00 ZNA; A61K31/155; A61K31/395; A61K31/42; A61K31/5377; A61K39/395 D; A61P25/02; A61P43/00 105; A61P43/00 111

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00; A61K31/155; A61K31/395; A61K31/42; A61K31/5377; A61K39/395; A61P25/02; A61P43/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021/0023264 A1 (KEEFER, Edward) 28 January 2021 (2021-01-28) claims 1, 17-18, paragraphs [0045], [0069]	1-2, 4, 7-8, 12-15
A		3, 5-6, 9-11
A	ZIVKOVIC, S. et al. For Better or for Worse: A Look Into Neutrophils in Traumatic Spinal Cord Injury. Frontiers in Cellular Neuroscience. April 2021, vol. 15, Article 648076 p. 5, left column, lines 45-49	1-15
A	VAIBHAV, K. et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. SCIENCE ADVANCES. 2020, vol. 6, eaax8847 abstract, p. 2, "NET formation correlates with elevated ICP and worse neurological function in patients with TBI", pp. 4-5, "Degradation of NETs improves cerebrovascular function in mice after TBI", p. 4, left column, line 3 to right column, line 2	1-15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 March 2022	**29 March 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/005504

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHAO, Y. et al. Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor Protects against Inflammation through a Toll-like Receptor-Related Pathway after Diffuse Axonal Injury in Rats. BioMed Research International. 2020, Article ID 5946205, objective	1-15
A	SONG, H. et al. MIF/CD74 axis participates in inflammatory activation of Schwann cells following sciatic nerve injury. Journal of Molecular Histology. 2019, 50, 355-367 abstract	1-15
P, X	山本康弘　他, 末梢神経損傷後早期免疫反応の詳細：好中球由来MIFによる修復機転の阻害, 日本末梢神経学会学術集会プログラム・抄録集, 20 August 2021, 32nd, p. 90, O-35 entire text, (YAMAMOTO, Yasuhiro et al.), non-official translation (Details of early immune responses after peripheral nerve injuries: Inhibition of healing process by neutrophil-derived MIF. Programs and abstracts of the Annual Meeting of the Japanese Peripheral Nerve Society.)	1-5, 12-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/005504

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/005504

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2021/0023264 A1	28 January 2021	WO 2021/007192 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/005504

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/155(2006.01)i; A61K 31/395(2006.01)i; A61K 31/42(2006.01)i; A61K 31/5377(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 25/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: A61K45/00 ZNA; A61K31/155; A61K31/395; A61K31/42; A61K31/5377; A61K39/395 D; A61P25/02; A61P43/00 105; A61P43/00 111

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K45/00; A61K31/155; A61K31/395; A61K31/42; A61K31/5377; A61K39/395; A61P25/02; A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	US 2021/0023264 A1 (KEEFER Edward) 28.01.2021 (2021-01-28) クレーム１，１７－１８，[0045]，[0069]	１－２，４，７－８，１２－１５
A		３，５－６，９－１１
A	ZIVKOVIC S. et al., For Better or for Worse: A Look Into Neutrophils in Traumatic Spinal Cord Injury, Frontiers in Cellular Neuroscience , 2021.04, Volume 15, Article 648076 ５ページ左欄４５－４９行	１－１５
A	VAIBHAV k. et al., Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury, SCIENCE ADVANCES, 2020, Vol.6, eaax8847 Abstract，２ページ「NET formation correlates with elevated ICP and worse neurological function in patients with TBI」，４－５ページ「Degradation of NETs improves cerebrovascular function in mice after TBI」，４ページ左欄３行－右欄２行	１－１５

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
09.03.2022	29.03.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
山村　祥子 4U 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	ZHAO Y. et al., Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor Protects against Inflammation through a Toll-like Receptor-Related Pathway after Diffuse Axonal Injury in Rats, BioMed Research International, 2020, Article ID 5946205, Objective	１－１５
A	SONG H. et al., MIF/CD74 axis participates in inflammatory activation of Schwann cells following sciatic nerve injury, Journal of Molecular Histology, 2019, 50, 355-367 Abstract	１－１５
P, X	山本康弘　他，末梢神経損傷後早期免疫反応の詳細：好中球由来MIFによる修復機転の阻害，日本末梢神経学会学術集会プログラム・抄録集，2021.08.20, 32nd, 90ページ　O-35 全文	１－５，１２－１５

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/005504

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2021/0023264 A1	28.01.2021	WO 2021/007192 A1	