(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
2014 年 10 月 16 日(16.10.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/168253 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) *A23J 3/08* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C07K 14/79* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/060561

(22) 国際出願日: 2014 年 4 月 8 日(08.04.2014)

(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 2013-081243 2013 年 4 月 9 日(09.04.2013) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP). 株式会社ＮＲＬファーマ(NRL PHARMA, INC.) [JP/JP]; 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸３丁目２番１号 かながわサイエンスパーク Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 平橋 淳一(HIRAHASHI, Junichi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 浦野 泰照(URANO, Yasuteru); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 大久保 光修(OKUBO, Koushu); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 神谷 真子(KAMIYA, Mako); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 加賀谷 伸治(KAGAYA, Shinji); 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸３丁目２番１号 かながわサイエンスパーク 株式会社ＮＲＬファーマ内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号 福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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)）

WO 2014/168253 A1

(54) **Title**: INHIBITOR OF EXTRACELLULAR TRAP FORMATION IN LEUKOCYTES

(54) 発明の名称 : 白血球の細胞外トラップ形成の阻害剤

(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to provide a novel drug for inhibiting extracellular trap formation in leukocytes. The invention provides an inhibitor of extracellular trap formation in leukocytes which contain lactoferrin, and a composition for treating disorders related to extracellular trap formation in leukocytes which contain lactoferrin.

(57) 要約: 本発明は白血球の細胞外トラップ形成を阻害する新規な薬剤を提供することを目的とする。本発明は、ラクトフェリンを含む白血球の細胞外トラップ形成阻害剤及びラクトフェリンを含む白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を治療するための組成物を提供する。

明 細 書

発明の名称

白血球の細胞外トラップ形成の阻害剤

技術分野

［０００１］

本発明は、ラクトフェリンを有効成分とする白血球の細胞外トラップ形成阻害剤及び白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を治療するための組成物に関する。また、本発明は、前記阻害剤又は組成物を用いた血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を治療する方法に関する。

背景技術

［０００２］

NETs（好中球細胞外トラップ：neutrophil extracellular traps）は、細菌感染により好中球が活性化され、分葉核の形態やクロマチンの分布が不明になり、ついで核膜が消失し、クロマチン構造に細胞質や顆粒成分が混在し、細胞膜が破れた際に網状の構造物を放出し、細菌や真菌、寄生虫、ウイルスを捕獲し、抗菌作用を発揮する細胞外構造物である。NETs はDNA を中心とし、ヒストン３（H3）やエラスターゼがその作用に重要な役割を果たす。NETs 形成は微生物を効率的に殺す抗菌分子を局所に集めることになる。NETs が生じることで好中球は細胞死（ネトーシス）を迎えるが、その分子メカニズムはあまり分かっておらず、TNF-α、PMA、LPS、IL-8等の刺激により生じ、その際に生じる細胞死は古典的なネクローシスや、カスパーゼの活性化や DNA の断片化といったことが起きるアポトーシスとは異なった形態を示す。LPS やPMA により好中球が刺激されると、オートファジーが生じ、同時に活性酸素が生じる。これによって核膜の崩壊、クロマチンの脱凝縮、ヒストンのシトルリン化が生じ、ネトーシスが起こる(非特許文献１及び2)。

［０００３］

NETs の形成に伴い、好中球から多くのタンパク質、特にアズール顆粒や第２顆

粒に含まれる抗菌タンパク質が脱顆粒により分泌され、細胞構造に関わるタンパク質なども分泌されることが報告されている(非特許文献2)。それらのタンパク質はNETs 構成タンパク質ともいわれ、好中球エラスターゼ、ヒストン、ミエロペルオキシダーゼ、F-アクチン、ラクトフェリン、マトリックスメタロプロテアーゼ 9、LL37、カテプシンG、BPI、プロテナーゼ3、カルプロテクチン、アズロシジン、ライソザイムC、ディフェンシン、カタラーゼ等が報告されている(非特許文献3)。

［０００４］

ラクトフェリンは好中球の第2顆粒に含まれ、好中球がNETsを形成し、最終的に脱顆粒し、周囲に放出される（非特許参考文献1)。

ラクトフェリンは哺乳動物において良く保存され、その機能に種差はあまりみられない。また、現在は牛乳成分のタンパク質としてその生理活性が注目され、市販されている。ただし、牛乳は、ウシの好中球のNETs形成に対し阻害効果を示さないことが報告されている(非特許文献4)。

［０００５］

NETsは血栓の増大・成長にも関与し、NETsを放出すると、その中に含まれるヒストンは血小板を凝縮させる作用があり、NETsを基に血小板血栓が形成される。またNETs に含まれる好中球エラスターゼやカテプシンGは、組織因子経路抑制因子を分解し、血液凝固反応を促進する。それらの作用によって微生物などを局所にとどめる役割も示す(非特許文献5)。

［０００６］

NETsの本来の作用はグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌等の外来微生物を補足し、局所に閉じ込め殺菌することである。このような作用を持つことから感染症において多くみられるが、感染症などが慢性化するにつれて、外来微生物の非存在下においてもNETsの形成が見られるという報告もある。慢性かつ難治性の自己免疫疾患の一つである全身性エリトマトーデス（SLE）は、自己DNAや関連タンパク質に対する自己抗体が形成され、それにより組織や臓器に炎症を起こすことが知られている。SLEの特徴的所見は好中球が障害部位に多数存在することである。SLE患者の血清中には抗菌ペプチドLL37とNETs中のDNAが存在することが知られている(非特許文献6及び7)。これらが自己抗原としてB細胞に認識され自己抗体が産生

される。また、SLE患者の好中球は健常人の好中球に比べてNETosisを起こしやすい(非特許文献6)。これらの要因が慢性炎症を誘導すると考えられている。また、自己抗体による疾患として抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎においても患者血清中のIgG分画が健常人のIgG分画よりも好中球のNETs形成能が約2倍高いことが報告されている(非特許文献8及び9)。

NETs形成と疾患との関連が注目されるようになったのは、2004年のBrinkmanらによる報告（非特許文献1）以来、最近のことであり、今後、NETs形成が原因となる新たな疾患が明らかにされるであろう。このように、NETs形成は、生体の感染防御において重要な役割を果たすものであるが、病態によっては、NETs形成を阻害することが病態の改善に必要な場合も考えられる。

［０００７］

NETs形成 を阻害する物質として、放出されたDNA網を分解するために肺炎連鎖球菌や黄色ブドウ球菌などのグラム陽性球菌の連鎖球菌は菌体外にDNaseを発現させることが報告されている。また、ヒストンに対する抗体や、スーパーオキシドの産生を抑制するような物質としてジフェニレンヨードニウムクロリド（DPI）やカタラーゼが報告されている（非特許文献10)。

その他、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性がネトーシスに影響すること（非特許文献11)、好中球がNETsを形成して細胞死する現象、すなわちネトーシス、はアポトーシスやネクローシスとは異なるプロセスであること（非特許文献10）などが知られている。

［０００８］

乳由来の塩基性タンパク質画分を有効成分としてＩ型糖尿病や関節リウマチの自己免疫疾患を予防するという先行技術があるが（特許文献1)、リンパ球を中心とした免疫細胞の調節や炎症性サイトカインの抑制などに特化した内容であり、NETs形成阻害作用に関するものではない。

これまでのところ、NETs形成に起因する疾患を治療する薬剤は報告されていない。

[０００９]

[特許文献]

特許文献１：特開 2008-189637

[００１０]

[非特許文献]

非特許文献１： Volker Brinkmann ら, 2004 Science, 303 : 1532-1535

非特許文献２： Q Remijsen ら, 2011, Cell Death and Differentiation, 18 : 581-588

非特許文献 3： Maren von Koeckritz-Blickwede ら, 2008, Blood, 111 : 3070-3080

非特許文献４： John D. Lippolis ら, 2006, Veterinary Immunology and Immunopathology, 113 : 248-255

非特許文献５: Fuchs TA ら, 2010, Proc Natl Acad Sci USA, 107：15880-15885

非特許文献６： Garcia-Romo GS ら, 2011 Sci Transl Med, 3 : 73ra20.

非特許文献７： Lande R ら, 2011 Sci Transl Med, 3 : 73ra19.

非特許文献８： Kessenbrock K ら, 2009, Nat Med, 6 : 623-625

非特許文献９： Bosch X, 2009, J Am Soc Nephrol, 8 : 1654-1656

非特許文献 10： Tobias A. Fuchs ら, 2007, J Cell Biol, 176 : 231-241

非特許文献 11： K. Akong-Moore ら, 2012, PLOS ONE, 7 : e42984

非特許文献 12： 内藤 眞ら, 2010, 生物試料分析, 33 : 329-338

発明の開示

[００１１]

本発明の目的は、白血球の細胞外トラップ形成によって発症する疾患の根本的な治療薬、特に、長期的に行われる寛解維持(再発抑制)に適する安全かつ有効な治療薬及び治療方法を提供することである。

[００１２]

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、ラクトフェリンが NETs 形成の抑制効果を顕著に発揮し、NETs 関連疾患の根本的な治療が可能となる

ことを見出した。またNETs形成疾患のANCA関連血管炎モデル動物、局所シュワルツマン反応モデル動物及び播種性血管内凝固（DIC））モデル動物においても顕著な生存率の改善をもたらすことが分かった。

［００１３］

すなわち、本発明は以下を提供する。

［１］　ラクトフェリンを含む、白血球の細胞外トラップ形成阻害剤。

［２］　ラクトフェリンが0.001～10 g/kg/日の量になるように調製された、前記［1］に記載の阻害剤。

［３］　前記ラクトフェリンはヒト由来のものである、前記［1］に記載の阻害剤。

［４］　前記ラクトフェリンが以下の（a）～（c）よりなる群より選ばれるいずれかに記載のタンパク質である、前記［1］に記載の阻害剤。

(a) 配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列からなるタンパク質；

(b) 配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列において、1～66個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質

［５］　前記白血球は、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ及び肥満細胞からなる群から選択されるいずれか1つのものである、前記［1］～［5］のいずれか1つに記載の阻害剤。

［６］　前記白血球が好中球である、前記［5］に記載の阻害剤。

［７］　ラクトフェリンを含む、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を治療するための組成物。

［８］　ラクトフェリンが0.001～10 g/kg/日の量になるように調製された、前記［7］に記載の組成物。

［９］　前記ラクトフェリンはヒト由来のものである、前記［7］に記載の組成物。

［１０］　前記ラクトフェリンが以下の（a）～（c）よりなる群より選ばれるいずれか１つに記載のタンパク質である、前記［7］に記載の組成物。

（a）配列番号1～5のいずれか１つのアミノ酸配列からなるタンパク質；

（b）配列番号1～5のいずれか１つのアミノ酸配列において、1～66個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質；

（c）配列番号1～5のいずれか１つのアミノ酸配列に対して、90％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質

［１１］　前記白血球は、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ及び肥満細胞からなる群から選択されるいずれか１つのものである、前記［7］～［10］のいずれか１つに記載の組成物。

［１２］　前記疾患は、ANCA関連血管炎、全身性エリテマトーデス、局所シュワルツマン反応、虚血再灌流障害を伴う急性腎障害（AKI）及び播種性血管内凝固からなる群より選択されるいずれか１つである、前記［7］～［11］のいずれか１つに記載の組成物。

［１３］　食品の形態にある、前記［7］～［12］のいずれか１つに記載の組成物。

［１４］　注射剤の形態にある、前記［7］～［12］のいずれか１つに記載の組成物。

［１５］　経口投与されるものである、前記［7］～［13］のいずれか１つに記載の組成物。

［１６］　ラクトフェリンを患者に投与することを含む、白血球の細胞外トラップ形成の阻害方法。

［１７］　ラクトフェリンを患者に投与することを含む、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患の治療方法。

［００１４］

本発明は、白血球の細胞外トラップ形成により生じる疾患に対し、副作用の少ない治療方法を提供することができる。また、副作用の少なさがゆえに、広範囲の患

者及び患者予備軍に安心して使用できるという利点を有する。

本発明の阻害剤及び組成物は、高齢者、担癌患者など免疫の低下した被験者、感染症合併症例、結核既往のある被験者など幅広い被験者層に広く使用できる。また、長期間使用しても副作用の少ない、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患の治療薬及び治療方法が提供される。特に、前記疾患に治療において長期的な薬剤の使用が必要な場合、急性期症状が寛解した後の被験者の再発抑制剤として、また、前記疾患が慢性化した場合の治療薬として有用である。

［００１５］

図面の簡単な説明

図 1-A： ウシラクトフェリンによる NETs 形成阻害能を示すグラフである。

図 1-B： ヒトラクトフェリンによる NETs 形成阻害能を示すグラフである。

図 1-C： ヒトラクトフェリンが NETs 形成を阻害する様子を示す蛍光顕微鏡写真である。

図 1-D: NETs に伴う DNA 放出がヒトラクトフェリンにより抑制される効果を示すグラフである。

図 1-E: NETs に伴う DNA 放出がヒトラクトフェリンにより抑制される様子を示す電子顕微鏡写真である。

図 2: NETs に伴う DNA 放出がヒトラクトフェリンにより抑制される効果を示すグラフである。

図 3： ウシラクトフェリンの経口投与により ANCA 関連血管炎モデル動物の生存率が上昇する効果を示すグラフである。

図 4-A： ウシラクトフェリンの経口投与により ANCA 関連血管炎モデル動物の血中 MPO-ANCA 抗体価が低下する効果を示すグラフである。

図 4-B： ウシラクトフェリンの経口投与により ANCA 関連血管炎モデル動物中の血中 DNA 濃度が低下する効果を示すグラフである。

図 4-C： ウシラクトフェリンの経口投与により ANCA 関連血管炎モデル動物の腎組織の病態が改善する様子を示す顕微鏡写真である。

図 5-A： ウシラクトフェリンの経口投与により LSR モデル動物の皮下出血が改

善する様子を示す写真である。

図5-B： ウシラクトフェリンの経口投与によるLSRモデル動物の皮下出血の改善をスコア化したグラフである。

図5-C： ウシラクトフェリンの経口投与によりLSRモデル動物の皮膚組織が改善する様子を示す顕微鏡写真である。

図6-A： ウシラクトフェリンの経口投与によりLSRモデル動物のエアパウチ内のDNA濃度が低下する効果を示すグラフである。

図6-B： ウシラクトフェリンの経口投与によるLSRモデル動物のエアパウチ内のDNA放出が抑制される様子を示す顕微鏡写真である。

図 7： ヒストン投与後からの生存率・生存延長の評価の結果を示すグラフである。

図 8： ラクトフェリン尾静脈投与によるヒストン血栓モデルマウスに対する止血効果を示すグラフである。

図 9： ヒストン血栓モデルに対するラクトフェリンの肺組織出血抑制効果を示す写真である。

図10： NETs形成阻害がラクトフェリンに特異的な活性であることを示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

［００１６］

以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2013年 4 月 9 日に出願された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願（特願2013-081243号）の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

[００１７]

1. 白血球の細胞外トラップ形成阻害剤

本発明は、第 1 の態様として、ラクトフェリンを含む、白血球の細胞外トラップ形成阻害剤（以下、「本発明の阻害剤」という）を提供する。

細胞外トラップは、様々な白血球で形成されることが報告されており、例えば、好中球（Brinkmann, V., et al., Science 2004; 303: 1532-1535.）、好塩基球（Yousefi, S., et al., Nat Med 2008; 14: 949-953.）、肥満細胞（von Koeckritz-Blickwede M, et al., Blood 2008; 111: 3070-3080.）、単球（Webster SJ, et al., J Immunol 2010; 185: 2968-2979）：例えば、マクロファージ（Chow, O.A., et al., Cell Host & Microbe, Volume 8, Issue 5, 445-454, 18 November 2010））などで生じることが報告されている。

これら白血球が形成する細胞外トラップは、DNA と顆粒タンパク質（granule protein）を主成分とする線維成分が放出されるという共通の特徴を有していることが報告されている（Simon, D., et al, Allergy 68 (2013) 409-416）。

これに対し、本発明の阻害剤は、前記線維成分を凝縮及び/又は縮合させ、これによって同線維成分の放出を抑制することができる（図 1-E 参照）。従って、本発明の阻害剤を用いれば、実施例で用いた好中球だけではなく、他の白血球（例えば、好塩基球、肥満細胞、単球（例えば、マクロファージ）から細胞外トラップ形成時に放出される線維成分も凝縮及び/又は縮合させ、それによって、これらの白血球の細胞外トラップ形成を阻害できることが分かる。

本発明の阻害剤の有効成分であるラクトフェリンは、哺乳動物乳由来のものである限り特に限定されないが、好ましくは、ヒトが摂取可能な哺乳動物乳（例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ヒトの乳）であり、より好ましくは、ヒトの乳由来である。あるいは、ラクトフェリンは、前記哺乳動物の好中球に由来するものであってもよい。

種々の哺乳動物に由来するラクトフェリンのアミノ酸配列が公知である（下記表 1 参照）。

表1

ラクトフェリンの由来	Genbank Accession No.	配列番号
ヒト	NP_001186078.1	1
ウシ	NP_851341.1	2
ヒツジ	ACT76166.1	3
ヤギ	AAA97958.1	4
ウマ	CAA09407.1	5

ある実施形態では、本発明の阻害剤に使用するラクトフェリンは、以下の（a）～（c）よりなる群より選ばれるいずれか1つに記載のタンパク質である。

（a）配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列からなるタンパク質；

（b）配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列において、1～66個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質；及び

（c）配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質

［００１８］

上記（b）又は（c）に記載のタンパク質は、代表的には、天然に存在する配列番号1～5のいずれか1つのポリペプチドの変異体であるが、例えば、"Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001"、"Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997"、"Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)"、"Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)"、"Gene, 34, 315 (1985)"、"Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)"、"Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)"等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、人為的に取得することができるものも含まれる。

［００１９］

本明細書中、「配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列において、1～66個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質」としては、配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列において、例えば、1～66個、1～65個、1～60個、1～55個、1～50個、1～49個、1～48個、1～47個、1～46個、1～45個、1～44個、1～43個、1～42個、1～41個、1～40個、1～39個、1～38個、1～37個、1～36個、1～35個、1～34個、1～33個、1～32個、1～31個、1～30個、1～29個、1～28個、1～27個、1～26個、1～25個、1～24個、1～23個、1～22個、1～21個、1～20個、1～19個、1～18個、1～17個、1～16個、1～15個、1～14個、1～13個、1～12個、1～11個、1～10個、1～9個（1～数個）、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、又は1個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質が挙げられる。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び／又は付加の数は、一般的には小さい程好ましい。

［００２０］

また、このようなタンパク質としては、配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列と 90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、又は 99.9%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質が挙げられる。上記配列同一性の数値は一般的に大きい程好ましい。

［００２１］

ここで、「白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性」において、白血球は、白血球の細胞外トラップを形成する生物に由来するものであり、好ましくは脊椎動物に由来するものであり、さらに好ましくは哺乳動物由来のものである。哺乳動物の例としては、ヒト、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌ及びネコが挙げられ、さらに好ましくは、ヒトである。

また、白血球は、上記由来のものであると同時に、好ましくは、好中球、好酸

球、好塩基球、単球、マクロファージ及び肥満細胞からなる群から選択されるいずれか１つのものであり、より好ましくは、好中球、好塩基球、単球、マクロファージ及び肥満細胞からなる群から選択されるいずれか１つのものであり、さらに好ましくは、好中球である。

［００２２］

上記ラクトフェリンの存在下及び非存在下で上記白血球を培養して、前記培養系の顕微鏡観察により、ラクトフェリン存在下で細胞外トラップ形成が減少していることを確認することで、白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を確認することができる。

上記白血球は、ラクトフェリン添加前に、細胞外トラップ形成促進剤（パラメトキシアンフェタミン(PMA)、リポポリサッカライド（LPS）等）で処理されていることが好ましい。

［００２３］

あるいは、上記培養系の培養上清を回収し、同上清中のDNA濃度を測定することで白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を確認することができる。このようなDNA濃度は、主として細胞外トラップ形成時に培養上清中に放出されたDNAによるものである。

ラクトフェリンによって細胞外トラップの形成が阻害された場合、上清中のDNA濃度は、ラクトフェリン非存在下の条件と比べて低下する。

この場合も、上記白血球は、ラクトフェリン添加前に、細胞外トラップ形成促進剤（パラメトキシアンフェタミン(PMA)、リポポリサッカライド（LPS 等）で処理されていることが好ましい。

DNA の濃度は、市販のキット（Picogreen dsDNA assay reagent（P11496 Invitrogen））を用いて簡便に測定することができる。

［００２４］

各白血球の培養条件、細胞外トラップの確認方法については、以下を参照することができる：好中球（Brinkmann, V., et al., Science 2004;303:1532-1535.）、A.K Gupta. FEBS letters 2010; 584: 3193-3197, D J Novo. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(4):827-34.）、好塩基球（Yousefi, S., et al., Nat Med 2008;

14: 949-953.)、肥満細胞 (von Köckritz-Blickwede M, et al., Blood 2008; 111: 3070-3080.)、単球 (Webster SJ, et al., J Immunol 2010; 185: 2968-2979) : 例えば、マクロファージ (Chow, O.A., et al., Cell Host & Microbe, Volume 8, Issue 5, 445-454, 18 November 2010))。

[００２５]

本発明のタンパク質のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個 (例えば、2～9個) のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたとは、同一配列中の任意かつ1若しくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1若しくは複数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び／又は付加があることを意味し、欠失、置換、挿入及び付加のうち2種以上が同時に生じてもよい。

[００２６]

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2－アミノブタン酸、メチオニン、o－メチルセリン、t－ブチルグリシン、t－ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン；B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2－アミノアジピン酸、2－アミノスベリン酸；C群：アスパラギン、グルタミン；D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4－ジアミノブタン酸、2, 3－ジアミノプロピオン酸；E群：プロリン、3－ヒドロキシプロリン、4－ヒドロキシプロリン；F群：セリン、スレオニン、ホモセリン；G群：フェニルアラニン、チロシン。

[００２７]

また、本発明で使用するラクトフェリンは、化合物で修飾されたものでもよい。例えば、ラクトフェリンは、ポリエチレングリコールを結合させた修飾タンパク質 (特許第 4195486 号、特許第 4261531 号、国際公開公報 WO2009/113743)や、別のタンパク質又はその断片(例えば、血中安定タンパク質 IgG やアルブミン又はその断片等)を融合させた融合タンパク質 (特願 2012-98085 号)であってもよい。

[００２８]

2. 治療方法

本発明の阻害剤を用いることにより、効果的に、白血球の細胞外トラップ形成

を阻害することが可能である。つまり、本発明の阻害剤を用いることにより、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を治療することができる（以下、「本発明の治療方法」という）。

本明細書において用いる「治療」なる用語は、一般的には、ヒト及びヒト以外の哺乳動物の症状を改善させることを意味する。また「改善」なる用語は、例えば、ラクトフェリンを投与しない場合と比較して、疾患の程度が軽減する場合及び悪化しない場合を指し、予防という意味をも包含する。

この場合、治療対象（患者）は、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を患う生物又は患うリスクのある生物であり、好ましくは脊椎動物であり、さらに好ましくは哺乳動物である。哺乳動物の例としては、ヒト、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、イヌ及びネコからなる群より選択される哺乳動物が挙げられ、さらに好ましくは、ヒトである。

本発明の治療方法において、「白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患」とは、患者体内で白血球の細胞外トラップ形成の増加が観察される疾患であれば特に限定されない。

このような疾患としては、例えば、ANCA関連血管炎（ウェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎等）、虚血再灌流障害を伴う急性腎障害（AKI）、全身性エリテマトーデス（SLE）、虫垂炎、アスペルギルス感染症、肺炎、肺炎双球菌感染症、壊死性筋膜炎、連鎖球菌感染、敗血症、子癇前症、クローン病、住血吸虫症、歯周炎、結核、乳房炎、マラリア、嚢胞性線維症、並びに深部静脈血栓症（von Bruhl, M. L., et al., J Exp Med. 2012 Apr 9;209(4):819-35）、心筋梗塞（de Boer, O. J., Thromb Haemost. 2013 Feb;109(2):290-7）、腫瘍関連血栓症塞（Demers, M., Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Aug 7;109(32):13076-81）及び播種性血管内凝固（disseminated intravascular coagulation : DIC）（Tobias A. et al., blood, 29 September 2011, vol. 118, no. 13, p. 3708-3714）などの血栓性疾患等が挙げられる（非特許文献2及び12）。血管炎症候群はその発症血管のサイズにより、大型血管炎、中型血管炎、小型血管炎と分類されている。上述したANCA関連血管炎、SLEなどのNETs関連疾患は、小型血管炎に分類されるが、中型血管炎である結節性多発動脈炎の重症化（循環器病の診断と治療に

関するガイドライン（2006－2007 年度合同研究班報告））や敗血症や固形癌においてもDICを合併することが頻繁にある。これらの疾患は、白血球の細胞外トラップ（例えばNETs）形成による細胞毒性が血管内皮障害をもたらし、このため臓器の機能不全が生じる。また上記の血栓性疾患においては白血球の細胞外トラップ（例えばNETs）形成が引き金となって、血栓形成のカスケードが促進される。ラクトフェリンは白血球の細胞外トラップ（例えばNETs）の形成および放出・拡散を抑制することにより血管内皮障害を予防し、さらには血栓形成のカスケードを抑制することにより臓器保護的作用を示し、上記疾患に治療効果を奏するものと考えられる。

好ましくは、本発明の治療方法の対象となる疾患は、ANCA関連血管炎（ウェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎等）全身性エリテマトーデス、局所シュワルツマン反応及び虚血再灌流障害を伴う急性腎障害（AKI）であり、さらに好ましくは、血中 MPO-ANCA（myeloperoxidase specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody） 抗体価の増加を伴う顕微鏡的多発血管炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎又は播種性血管内凝固（DIC）である。

なお、ラクトフェリンを用いてI型糖尿病や関節リウマチの自己免疫疾患を治療することも報告されているが（特許文献1）、I型糖尿病や関節リウマチなどの自己免疫疾患では、白血球の細胞外トラップの形成が主たる病因としては考えられていないことから、前記報告に係る治療において、ラクトフェリンは、細胞外トラップ形成を介さずに作用している可能性が高いといえる。

すなわち、本発明において、ラクトフェリンは、全く新規なメカニズム、つまり、白血球の細胞外トラップの形成を阻害するメカニズムにより上記疾患に対する治療作用を示すものといえる。

SLE治療やANCAに起因する疾患の治療はステロイドや免疫抑制剤等が使用されているが、これらの治療方法には患者の肉体的負担を伴い（副作用等）、苦痛を強いるほか、他の疾患（感染症）を誘発するリスクが高いという問題がある。

これに対し、本発明では、食品に含まれるラクトフェリンを有効成分として用いるため、副作用も少なく、患者に苦痛を強いることもなく、他の疾患を誘発するリスクも少ないという利点を有する。

［００２９］

3. 組成物

本発明は別の態様として、ラクトフェリンを含む、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を治療するための組成物（以下、「本発明の組成物」）を提供する。

ここで、「組成物」なる用語は、本発明において有用な活性成分（ラクトフェリン等）の調製において用いられる担体等の添加物を含有するものを意味する。

本発明の組成物において、「ラクトフェリン」及び「白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患」は、上述の通りである。

［００３０］

本発明の組成物の投与経路は、一般的に採用されている経路であれば、特に限定はされないが、具体例としては、経口、舌下、経鼻、経肺、経消化管、経皮、点眼、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、局所注射、外科的移植が挙げられ、好ましくは経口投与及び静脈投与である。

［００３１］

本発明の組成物は、カプセル、錠剤、粉末等の固形剤であってもよく、溶液、懸濁液若しくは乳液等の液剤、又は軟膏、クリーム若しくはペースト等の半液体製剤であってもよい。

本発明の経口投与の場合、組成物は、好ましくは固形剤である。また、注射剤の場合は凍結乾燥手法等を含めた固形剤、もしくは液剤である。

［００３２］

さらに好ましくは、本発明の組成物は、経口投与の場合は腸溶製剤として調製される。経口的に摂取されたラクトフェリンは、胃内でペプシン消化を受けやすいことが知られており、腸溶製剤とすることにより、体内移行率を高めることができる（Takeuchi et al., Exp Physiol. 2006 Nov;91(6):1033-40. ）。この場合、ラクトフェリンは、水分があると熱に不安定であるため、乾燥状態でラクトフェリン粉末を打錠し、腸溶性被覆材でコーティングすることが望ましい（NRL 製剤特許文献：顆粒剤特許第 4050784 号、錠剤特許第 4592041 号）。

ラクトフェリンは、食品や飼料中に添加して、食品または飼料としてヒトまたはヒト以外の対象動物に摂取させることもできる。このような食品または飼料の製造方法も当業者には公知である。また、溶液製剤として注射剤として製剤化も可能である。

さらには、これらのラクトフェリンやラクトフェリン分解物をそのまま、あるいは製剤化した後、これを栄養剤や飲食品等に添加してもよい。

[００３３]

ラクトフェリンは、単独で使用してもよく、又は薬理学的に許容可能な他の成分と共に調合してもよい。

例えば、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等の経口投与用組成物として調製する場合、澱粉、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を用いて常法によって製剤化される。この種の組成物には、前記賦形剤の他に、コーティング剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、着色料、香料等を適宜使用することができる。

[００３４]

本発明の組成物は、有効成分であるラクトフェリンを治療上有効量で含み得る。ここで、「治療上有効量」とは、その量の有効成分を対象に投与することにより、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患の症状が、ラクトフェリンを投与しない場合と比較して、軽減する場合及び悪化しない量を指し、予防において有効な量という意味をも包含する。

例えば、経口投与の場合、治療上有効量は、0.001～10 g/kg/日、0.005～10 g/kg/日、0.01～10 g/kg/日、0.01～5 g/kg/日とすることができる。ヒトに投与する場合、一般的には、治療上有効量として、一日あたり10 mg～15,000 mg、10 mg～12,000 mg、10 mg～10,000 mg、20 mg～10,000 mg、20 mg～8,000 mg、30 mg～8,000 mg、30 mg～6,000 mgの量である。このような一日あたりの用量を一度にまたは分割して、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患の治療を必要とする患者に投与することができる。

なお、本発明の組成物の投与量及び投与頻度は、対象の種、体重、性別、年齢、腫瘍疾患の進行度、投与経路といった種々の要因に依存して変化するが、医師、獣

医師、歯科医師又は薬剤師等の当業者であれば、それぞれの要因を考慮して投与量を決定することができる。

上記の治療上有効量、投与量及び投与頻度は、典型的な数値を列挙したものであり、これを超える数値又は下回る数値であっても治療効果を奏する場合も十分に考えられる。従って、上記の治療上有効量、投与量及び投与頻度を超える数値又は下回る数値であっても、本発明の組成物の治療上有効量、投与量及び投与頻度として包含される。

実施例

［００３５］

以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例に記載された態様に限定されるものではない。

［００３６］

[実施例 1] ラクトフェリン前処理による健常人末梢血好中球の NETs 形成刺激の阻害効果

1. ヒト好中球の単離方法

健常人から EDTA 含有注射器(針 18～22G)で 1 回の実験用に 15ml～20ml の末梢血を採血した。採血後、3ml の Mono-Poly Resolving Medium (CatNo.DSBN100, DS ファーマバイオケミカル株式会社) を入れている 15ml のコニカルチューブの中に、下層の Mono-Poly Resolving Medium と全血 3.5ml を静かに重層する。15ml のコニカルチューブを室温 (15 ～ 30℃) でスイング式の遠心分離機で 400×g、20 分間遠心し、コニカルチューブを静かに取り出す。アスピレータ等で最上部の 褐色のプラズマ層とその直ぐ下層のリンパ球・単球層を除去する。また、リンパ球・単球層の下層の透明層を可能な限り除く。透明層の下層にある薄いピンク色層をパスツールピペットで取り、好中球を洗浄するためにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)；塩化ナトリウム 137mM、塩化カリウム 2.7mM、リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物 8.1mM、リン酸 2 水素カリウム 1.47mM) の入った試験管に移す。好中球の入った試験管を室温 (15 ～ 30℃) で 200×g、 10 分間遠心する。試験管を取り出し、上清を捨

てる。試験管に4℃の滅菌水を好中球に加え、30秒間氷上に静置して、混ざっている赤血球を溶血させる。溶血後、45mlのPBS(-)を加えて200×g、10分間遠心する。試験管を取り出し、上清を捨て、沈殿物を培地DMEM+2%ヒト血清Alb (Serum human albumin ;Product No. A9080 Sigma+4mM L-glutamine) に懸濁させ、使用する直前まで8℃で保存した。分離できた好中球数は1×10^6個/ml～1×10^7個/mlであり、純度に関してはcytospin後の検体をGiemsa染色処置し目視でカウントし、95～98%であった。

[００３７]

2. 好中球の前処置方(NETs形成阻害)とNetosis (NETs形成) 誘導方法

[実施例1]の「1. ヒト好中球の単離方法」に記載の好中球単離後から約1時間後に好中球の前処置を行った。8well-μスライド(Cat. No.ib 80826 Ibidi (登録商標))に好中球を400μlの培地DMEM+2%ヒト血清Alb (Serum human albumin ;Product No. A9080 Sigma+4mM L-glutamine) に約1.0×10^5cells/wellで撒き、(i) ～ (v) の各薬剤を添加し30分間室温で前処置を行った。(i) ウシラクトフェリン (bovine lactoferrin, Product No 123-04124 Lot;KWG6332 WAKO (登録商標))(stock; 100mg/ml)を1/500、1/5000、1/50000倍希釈し最終濃度200μg/ml、20μg/ml、2μg/ml、(ii) ヒトラクトフェリン (stock;100mg/ml,200μl;Cat.No. SIGL6793, SIGMA) を1/500、1/5000、 1/50000倍希釈し最終濃度200μg/ml、20μg/ml、 2μg/ml、(iii) DPI(stock 25mM, Product No.D2926 Sigma;添付文書 溶媒はDMSO)を1/2500希釈し、最終濃度は10μM、(iv) Deferoxamine (Product No.D9533 Sigma) (stock ; 200mM)を1/100倍に希釈し最終濃度2mM、(v) Trientine ; Triethylenetetramine dihydrochloride(Sigma Product No;T5033 Lot;1354380V , stock 100mM; 100μl)最終濃度は125μM、 12.5μM、1.25μMを各試薬、濃度毎に前処置を行った。前処置した後にPMA (最終濃度25nM, stock:10mM in DMSO, Sigma Prod No.P8139) による好中球刺激をした。

[００３８]

3. NETs形成に伴う細胞死 (Netosis) の観察方法と結果

NETs形成の観察には共焦点顕微鏡 (Leica DMI 6000B, Leica (登録商標)) を使用した。顕微鏡下に好中球細胞数を目視でカウント(すべての実験でHySOx (最終

濃度500nM stock;10mM,東京大学大学院医学系研究科　生体物理医学専攻　医用生体工学講座生体情報学　浦野泰照教授より提供)のプローブ(Kenmoku, S., et al., 2007. J Am Chem Soc 129:7313-7318: Setsukinai, K., et al., 2003. J Biol Chem 278:3170-3175)を使用しており、これによる赤色蛍光細胞をカウント)した。NETsの定量はA.K Gupta. FEBS letters 2010; 584: 3193-3197, D J Novo. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(4):827-34.を参考にSytoxgreen(最終濃度500nM, stock:5mM,5μl Product No;S7020)、TO-PRO-3(最終濃度1μM, stock;1mM,Cat No;T3605 Invitrogen(登録商標))に染色される好中球外へ放出された網状構造物を目視でカウントした[図1-C]。試薬を注入後、乾燥対策として酸素を通すことで長時間生細胞を37℃で観察させるため、シリコンオイル(silicone oil AR200 Lot;BCBF0602V ALDRICH Chemistry(登録商標) 85419)を100μl注入し油層を作成した。観察時間1～8時間(時間経過をNETs形成平衡状態まで追わない場合は4時間)とし、観察中の検体は顕微鏡設置の保温箱により37℃に一定に保った。NETs形成率はNETsの放出がみられた細胞数を1視野中の全細胞数で除したもので表した。PMA単独で刺激を行うと、NETs形成は2～3時間でピークに達し、4時間以降はプラトーに達する。無刺激の場合は血液中の好中球の寿命が10～12時間なのでNETsの観測も4～5時間でピークに達し、6時間以降はプラトーに達する。また、無刺激はPMA刺激と比べてもNETs形成が1/8～1/7と少ない。PMA刺激前に前項「2. 好中球の前処置方(NETs形成阻害)とNetosis(NETs形成)誘導方法」の各処置を行うと、PMA単独刺激のものと比べ、ウシラクトフェリンとヒト好中球由来ラクトフェリン(SIGMA　型番　SIGL6793)は2μg/ml、20μg/mlの濃度ではプラトーに達した時のNETsの割合は半減し、200μg/mlに関しては1/4までNETs形成が抑制されていた[図1-A、B]。DPIは1/3までNETs形成が抑制されたが、DeferoxamineとTrientineについてはNETs形成が抑制されなかった。

走査型電子顕微鏡の観察方法は、細胞培養用カバーガラスかガラスボトムディッシュに好酸球を1×10^6個で200μg/mlヒトラクトフェリン添加、無添加の前処理後にNETs刺激を行い、3時間後に、2%グルタルアルデヒドを含む0.1Mのリン酸緩衝液(pH=7.4)を4℃で1時間、前固定した。次に、1%　4酸化オスミウムを含む0.1Mのリン酸緩衝液(pH=7.4)を4℃で1時間、後固定した。固定終了後、60%、

70%、80%、95%エタノールと5～10分間軽く揺すりながら洗浄し、100%エタノール5～10分間、2回浸し、脱水処理を行う。酢酸イソアミルに10～15分置換し、臨界点乾燥を行う。オスミウム・プラズマコーティング機（OPC80N、フィルジェン株式会社）を用いてサンプルを昇華させた4酸化オスミウム層で被膜し、走査型電子顕微鏡（JSM-6320F、日本電子株式会社）によって観察した。無刺激の好中球は球形が保たれ細胞外線維は認められないが、PMA刺激により細胞は崩れ線維成分が多数形成された。一方でラクトフェリン投与を行った好中球ではこの線維成分が束状にみられ、ラクトフェリンがNETsの線維を縮合させていた[図1-D]。

[００３９]

4. 培養上清中DNA濃度測定方法

培養上清中を回収し、200×g、 10 分間遠心し、上精を新しい微小遠心チューブに移す。DNA量の測定はPicogreen dsDNA assay reagent (P11496 Invitrogen) を用い、付随のプロトコルに沿って行った。ヒトラクトフェリンを前処理すると、濃度依存的に培養上清中のDNA濃度が減少し、NETsによるDNAの放出を抑制された[図1-D]。

[００４０]

[実施例2] 健常人末梢血好中球のNETs形成刺激後のラクトフェリンによる阻害効果

1. ヒト好中球の単離方法

健常人からEDTA含有注射器(針18～22G)で1回の実験用に15ml～20mlの末梢血を採血した。採血後、3mlのMono-Poly Resolving Medium (CatNo.DSBN100, DSファーマバイオケミカル株式会社) を入れている15mlのコニカルチューブの中に、下層のMono-Poly Resolving Mediumと全血3.5mlを静かに重層する。15mlのコニカルチューブを室温（15 ～ 30℃）でスイング式の遠心分離機で400×g、20 分間遠心し、コニカルチューブを静かに取り出す。アスピレータ等で最上部の 褐色のプラズマ層とその直ぐ下層のリンパ球・単球層を除去する。また、リンパ球・単球層の下層の透明層を可能な限り除く。透明層の下層にある薄いピンク色層をパスツールピペットで取り、好中球を洗浄するためにリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)；塩化ナトリウム137mM、塩化カリウム2.7mM、リン酸水素2ナトリウム12水和物8.1mM、

リン酸２水素カリウム 1.47mM）の入った試験管に移す。好中球の入った試験管を室温（15 ～ 30℃）で200×g，10分間遠心する。試験管を取り出し、上清を捨てる。試験管に4℃の滅菌水を好中球に加え、30秒間氷上に静置して、混ざっている赤血球を溶血させる。溶血後、45mlのPBS(-)を加えて200×g、10分間遠心する。試験管を取り出し、上清を捨て、沈殿物を培地DMEM+2%ヒト血清Alb（Serum human albumin ;Product No. A9080 Sigma＋4mM L-glutamine）に懸濁させ、使用する直前まで8℃で保存した。分離できた好中球数は1×10^6個/ml～1×10^7個/mlであり、純度に関してはcytospin後の検体をGiemsa染色処置し目視でカウントし、95～98%であった。

［００４１］

2. 好中球のNetosis（NETs形成）誘導と阻害方法

[実施例2]の「1. ヒト好中球の単離方法」に記載の好中球単離後から約1時間後には、好中球の前処置を行った。8 well-マイクロスライド(Cat. No.ib 80826 Ibidi（登録商標））に好中球を400μlの培地DMEM+2%ヒト血清Alb（Serum human albumin ;Product No. A9080 Sigma＋4mM L-glutamine）約1.0×10^5 cells/wellで撒き、PMA（最終濃度25nM, stock:10mM in DMSO, Sigma Prod No.P8139）による刺激を行った。刺激30分前処理と刺激後1、2時間ごとにヒトラクトフェリン（stock;100mg/ml,200μl;Cat.No. SIGL6793, SIGMA）を 200μg/ml添加し、阻害を行った。

［００４２］

4. 培養上清中DNA濃度測定方法

培養上清中を回収し、200×g、10 分間遠心し、上精を新しい微小遠心チューブに移す。DNA量の測定はPicogreen dsDNA assay reagent（P11496 Invitrogen）を用い、付随のプロトコルにそって行った。ヒトラクトフェリンを前処理と同様に刺激後1、2時間共に培養上清中のDNA濃度が減少し、NETsによるDNAの放出を抑制された[図2]。

［００４３］

[実施例3] ラクトフェリン経口投与によるANCA関連血管炎モデルSCG/Kjマウスに対する生存率・生存延長の改善効果(自己免疫疾患モデル動物)

1. LF含有マウス飼育餌の製造と摂取方法

標準飼育餌とラクトフェリン含有飼育餌の製造はオリエンタル酵母株式会社に依頼した。

標準飼育餌は米国国立栄養研究所（American Institute of Nutrition)から1993年に発表されたマウス・ラット用の栄養研究のための標準精製AIN-93M（カゼイン14.0%，Ｌ－シスチン0.18%、コーンスターチ46.5692%、α－コーンスターチ15.5%、シュークロース10.0%、大豆油4.0%、セルロースパウダー 5.0%、AIN-93Mミネラル混合3. %5、AIN-93ビタミン混合1.0%酒石酸コリン0.25%、第三ブチルヒドロキノン0.0008%）をペレッターで固形にし、自由摂取させた。ラクトフェリン含有飼育餌はAIN-93Mにウシラクトフェリンを最終濃度2%になるように混ぜ、ペレッターで固形にし、自由摂取させた。

［００４４］

2. SCG/Kj((Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-forming mouse/Kinjoh))の生存率・生存延長の改善効果

半月体形成性糸球体腎炎及びANCA 関連血管炎を発症する6～7週齢の雌SCG/Kjマウスを独立行政法人 理化学研究所・筑波研究所・バイオリソースセンターから購入し、1～2週間慣らした後に使用した。8週齢目からラクトフェリン含有飼育餌群（n=16)、標準飼育餌群（n=16）で飼育を行った。生存率・生存延長の評価はカプラン・マイヤー法を用いて評価した。標準飼育餌群では、9週齢から徐々に死に始め、18週齢には2匹が生存していた。ラクトフェリン含有飼育餌群では14週齢から死に始め、18週齢には11匹生存しており、生存率と生存延長の効果が顕著に見られた(統計的有意差p=0.0111)[図3]。

［００４５］

[実施例4] ラクトフェリン投与がANCA関連血管炎モデルSCG/Kjマウスの血中MPO-ANCA (myeloperoxidase specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody)抗体価と血中DNAに与える影響(自己免疫疾患モデル動物)

1. LF含有マウス飼育餌の製造と摂取方法

標準飼育餌とラクトフェリン含有飼育餌の製造はオリエンタル酵母株式会社に依頼した。

標準飼育餌は米国国立栄養研究所（American Institute of Nutrition)から1993年に発表されたマウス・ラット用の栄養研究のための標準精製AIN-93M（カゼイン14.0%，Ｌ－シスチン0.18%、コーンスターチ46.5692%、α－コーンスターチ15.5%、シュークロース10.0%、大豆油4.0%、セルロースパウダー　5.0%、AIN-93Mミネラル混合3. %5、AIN-93ビタミン混合1.0%酒石酸コリン0.25%、第三ブチルヒドロキノン0.0008%）をペレッターで固形にし、自由摂取させた。ラクトフェリン含有飼育餌はAIN-93Mにウシラクトフェリンを最終濃度2%になるように混ぜ、ペレッターで固形にし、自由摂取させた。

［００４６］

2. ANCA関連血管炎モデルSCG/Kjマウスの血中MPO-ANCA抗体価と血中DNAへの効果実験

6週齢以降の雌SCG/Kjマウスを独立行政法人 理化学研究所・筑波研究所・バイオリソースセンターから購入し、8週齢から使用した。ラクトフェリン含有飼育餌群（n=8)、標準飼育餌群（n=8）で飼育を行った。8～17週齢までのSCG/Kjにジエチルエーテルによる吸入麻酔を行い、ヘパリン採血を行った。採血した血液は1.5mlの微小遠心チューブに移し、4℃で1000g、 10分間遠心を行い、上精を回収し、血漿とした。

［００４７］

3. 血漿中MPO-ANCA抗体価測定方法

MPO-ANCA抗体価の測定は、旧千葉大学　医学研究院　免疫発生・炎症制御学　鈴木和男教授から分与されたELISA（Ishida-Okawara, A., et al, Nephrol Dial Transplant 2004; 19: 1708-1715）を用いて行った。遺伝子組換え型マウスMPOを一定濃度で96well　ELISAプレート（TOYOSHIMA）に撒き、4℃に16時間放置する。放置後、上清を捨て、各ウェルに300～400μlのPBS(-)を入れ、洗浄する（2～3回操作する)。洗浄後、各ウェルに1%ウシ血清アルブミンPBS(-)溶液を300～400μl入れ、室温に2時間放置し、300～400μlのPBS(-)を入れ、洗浄する（3～4回操作する)。放置後、PBS(-)で50倍に希釈したマウス血清をウェルに入れ、室温に90分間反応させる。反応後、各ウェルに300～400μlのPBS(-)を入れ、洗浄する（3～4回操作する)。

洗浄後、PBS(-)で1000倍に希釈したアルカリファオスファターゼ標識した抗マウスIgG抗体を各ウェルに入れ、室温で2時間反応をさせる。反応後、各ウェルに300～400μlのPBS(-)を入れ、洗浄する（3～4回操作する)。PBS(-)で希釈した1mg/mlのパラ-ニトロフェニルリン酸を150μl各ウェルに入れ、15～30分間反応させ、0.75M水酸化ナトリウム水溶液を等量入れ反応を停止させ、405nm波長で測定を行う。吸光度計にて測定した結果、標準飼育餌群は平均0.283875で、ラクトフェリン含有飼育餌群の平均値は0.15625であり、MPO-ANCA抗体価の減少が認められ、治療効果が認められた（統計的有意差p=0.0221)[図4-A]。

[００４８]

4. 血漿中DNA濃度測定方法

血漿中のDNA量の測定はPicogreen dsDNA assay reagent (P11496 Invitrogen)を用い、測定方法は付随のプロトコルに沿って行った。ラクトフェリン含有飼育餌群が非含有餌群と比べ血中DNA量が低く、NETsによるDNAの放出が顕著に抑制されていた(p＝0.046)[図4-B]。

[００４９]

5. 組織評価方法

SCG/Kjマウスを頚椎脱臼により安楽死させ、開腹により腎臓検体を採取し40%パラフィンブロックを作製し、組織切片をつくり、マッソントリクローム（Masson Trichrome）染色を行い、皮下出血を組織学的に評価した。10%ホルマリン液に24時間以上浸透させ固定させる。水道水で1時間以上ホルマリンを洗浄し、60%エタノール1時間、70%エタノール1時間、80%エタノール1時間、95%エタノール1時間、100%エタノール1時間を3回、キシレン1時間を2回、パラフィン(65℃に保温)1時間を3回浸し、その後包埋ザラで組織ブロックを作製する。組織ブロックを、ミクロトームを用いて厚さ20～50nmで切り、組織切片とする。切片はスライドガラスに張り付け、脱パラフィン処理を行う。脱パラフィン処理は完全に乾いた組織切片の載ったスライドガラスにキシレンに5分間を3回、100%エタノール1分間を2回、95%エタノールに軽く洗浄し、80%、70%、60%エタノール、水道水という順で同様に軽く洗浄し、イオン交換水に浸し、次にマッソントリクローム（Masson Trichrome）染色を行う。 媒染液（10%トリクロル酢酸水溶液、10%重クロム酸カリウム水溶液）

に10～15分浸し、水道水で5分間洗浄、 鉄ヘマトキシリン液（2gヘマトキシリン100%エタノール100ml溶液、0.5g硝酸第二鉄(III)・$9H_20$ 、25%塩酸100ml溶液）に5分浸し、軽く水洗いをする。１%塩酸70%エタノール溶液で分別を行う。水洗いを10分間行い色出しし、イオン交換水に浸す、Ｉ液（1%ビーブリッヒスカーレット90ｍｌ、1%酸性フクシン10ml、酢酸 1ml）に2～5分浸し、軽く水洗いを行う。Ⅱ液（5ｇリンモリブデン酸、5gリンタングステン酸　蒸留水200ml）30分以上浸し、軽く水洗いを行い、 Ⅲ液（2.5ｇアニリン青、2ml酢酸、蒸留水100ml）5分浸し、軽く水洗いを行う。1%酢酸水に5分浸し、素早く水洗いをする。60%、70%、80%、95%エタノールと軽く洗浄し、100%エタノール5分3回浸す。キシレン5分を3回浸し、封入液を用いてカバーガラスで組織を覆う。スライドガラスを乾燥させた後に顕微鏡で観察した。また、同様の組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色も行った。脱パラ処理後、水道水で流水洗浄を3～5分間行い、マイヤーヘマトキシリン液に5分間浸した。25～37℃の流水で洗浄を3～5分間行い、エオシン液に5分間浸した。60%、70%、80%、95%エタノールと軽く洗浄し、100%エタノール5分3回浸す。キシレン5分を3回浸し、封入液を用いてカバーガラスで組織を覆う。スライドガラスを乾燥させた後に顕微鏡で観察した。どちらの染色方法においても、ラクトフェリン含有飼育餌群の腎臓は非含有餌群と比べ組織の間質線維化、炎症細胞浸潤(upper)、半月体形成(lower)が非投与群よりも軽度であった[図4-C]。

［００５０］

[実施例5] 局所シュワルツマン反応（Local Shwartzman Reaction（LSR））モデルによるラクトフェリンの治療効果（非自己免疫疾患モデル）

1. LSRモデル1の作製と評価1

6週齢のC57BL/6jを2週間慣らし、8週齢からラクトフェリン含有食餌または対照餌を2週間与えた。10週齢目に大腸菌由来のリポポリサッカライド（LPS;Sigma）mg/mlになるようにPBS(-)に溶解し、マウス1匹当たり100μgを30G針により皮下注射し、1日目とした。マウス組換え体TNF-α（R&D Systems, Inc. 品番410-MT）を100μg/mlになるようにPBS(-)に溶解し、マウス1匹当たり0.3μgを同部位に皮下注射し、2日目とした。3日目に、同部位の出血を肉眼的に評価した。ラクトフェリン含有食餌群は対照群と比べ皮下出血の範囲を顕著に抑制した。

皮下出血の重症度を出血範囲と壊死所見から肉眼的に0，なし；1，軽症；2，中等症；3,重症；4，中心壊死に分類し点数化したところ[表2]、対照群に比較しラクトフェリン含有食餌群では有意に重症度が低下した（$p<0.0001$）[図5-A、B]。

表2　ウシラクトフェリン含有飼育餌群（n=16）と非含有餌群（n=15）の皮下出血を肉眼的な観察評価スコア

肉眼観察	なし	軽症	中症	重症	中心壊死
皮下出血スコア	0	1	2	3	4

[００５１]

2. 組織評価方法

[実施例5]の「1. LSRモデル1の作製と評価」で作製したマウスを頚椎脱臼により安楽死させ、皮膚検体を採取し40%パラフィンブロックを作製し、組織切片をつくり、マッソントリクローム（Masson Trichrome）染色を行い、皮下出血を組織学的に評価した。10%ホルマリン液に24時間以上浸透させ固定させる。水道水で1時間以上ホルマリンを洗浄し、60%エタノール1時間、70%エタノール1時間、80%エタノール1時間、95%エタノール1時間、100%エタノール1時間を3回、キシレン1時間を2回、パラフィン(65℃に保温)1時間を3回浸し、その後包埋ザラで組織ブロックを作製する。組織ブロックを、ミクロトームを用いて厚さ20～50nmで切り、組織切片とする。切片はスライドガラスに張り付け、脱パラフィン処理を行う。脱パラフィン処理は完全に乾いた組織切片の載ったスライドガラスにキシレン5分間を3回、100%エタノール1分間を2回、95%エタノールに軽く洗浄し、80%、70%、60%エタノール、水道水という順で同様に軽く洗浄し、イオン交換水に浸し、次にマッソントリクローム（Masson Trichrome）染色を行う。 媒染液（10%トリクロル酢酸水溶液、10%重クロム酸カリウム水溶液）に10～15分浸し、水道水で5分間洗浄、 鉄ヘマトキシリン液（2gヘマトキシリン100%エタノール100ml溶液、0.5g硝酸第二鉄(III)・$9H_2O$ 、25%塩酸100ml溶液）に5分浸し、軽く水洗

いをする。１％塩酸70%エタノール溶液で分別を行う。水洗いを10分間行い色出しし、イオン交換水に浸す、Ｉ液（1%ビーブリッヒスカーレット90ml、1%酸性フクシン10ml、酢酸 1ml）に２分～5分浸し、軽く水洗いを行う。Ⅱ液（5ｇリンモリブデン酸、5gリンタングステン酸　蒸留水200ml）30分以上浸し、軽く水洗いを行い、 Ⅲ液（2.5ｇアニリン青、2ml酢酸、蒸留水100ml）５分浸し、軽く水洗いを行う。1%酢酸水に５分浸し、素早く水洗いをする。60%、70%、80%、95%エタノールと軽く洗浄し、100%エタノールに５分間、３回浸す。キシレン５分間、３回浸し、封入液を用いてカバーガラスで組織を覆う。スライドガラスを乾燥させた後に顕微鏡で観察した。また、同様の組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色も行った。脱パラ処理後、水道水で流水洗浄を3～5分間行い、マイヤーヘマトキシリン液に５分間浸した。25～37℃の流水で洗浄を3～5分間行い、エオシン液に５分間浸した。60%、70%、80%、95%エタノールと軽く洗浄し、100%エタノール５分３回浸す。キシレン５分を３回浸し、封入液を用いてカバーガラスで組織を覆う。スライドガラスを乾燥させた後に顕微鏡で観察した。

［００５２］

どちらの染色方法においても、最後に、同様の組織切片顆粒球中のエストラーゼのみに染まる特異的エストラーゼ染色法（クロロアセテート エステラーゼ）を行った。脱パラ処理後、水道水で流水洗浄を3～5分間行い、蒸留水で３回洗浄する。組織を室温にて10～30分間乾燥させ、クロロアセテートエストラーゼ反応液に室温で15～30分間浸す。水道水で流水洗浄を3～5分間行い、マイヤーヘマトキシリン液に５分間浸した。25～37℃の流水で洗浄を3～5分間行い、エオシン液に５分間浸した。60%、70%、80%、95%エタノールと軽く洗浄し、100%エタノール５分３回浸す。キシレン５分を３回浸し、封入液を用いてカバーガラスで組織を覆う。スライドガラスを乾燥させた後に顕微鏡で観察した。非含有食餌群では筋層上部における皮下出血所見および血管内における血栓形成が著明であるのに対し、ラクトフェリン含有食餌群ではこれらの所見が軽度であり、皮下組織における好中球浸潤がラクトフェリン含有飼育餌群で抑制していることが観察された[図5-C]。

［００５３］

3. LSRモデル２の作製と評価２

背部皮下にエアパウチを作製しLSRを惹起させ、エアパウチ内のDNA濃度測定および好中球の観察を行った。まずに背部皮下に5ml用の注射器に30G針で勢いよく5mlの空気を皮下に注射し、3日後に一匹あたりLPS 100μgをエアパウチ内に注入した。その24時間後0.3μgのTNF-αをエアパウチ内へ注入しさらに6時間後に2mlの滅菌 PBS(-)で洗浄し、回収した。

[００５４]

4. エアパウチ(洗浄液)内DNA濃度測定

採取した洗浄液を1.5ml微小遠心チューブに移し、室温、6000gで5分間遠心し、上澄み中のDNA濃度をPicogreen dsDNA assay reagentを用い、測定方法は付随のプロトコルに沿って行った。ラクトフェリン含有色餌群が非含有色餌群と比べ血中DNA量が低く、NETsによるDNAの放出が顕著に抑制されていた(p＝0.0015)[図6-A]。

[００５５]

5. 好中球NETs形成観察

洗浄液中の好中球はサイトスピン 2(Shandon)を用いてスライドグラス上に固定し、5μM DRAQ5 で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。対照群と比較し、ラクトフェリン含有食餌群においてNETs形成が見られる好中球が減少した[図6-B] 。

[００５６]

[実施例6] ラクトフェリン尾静脈投与によるヒストン血栓（播種性血管内凝固(DIC)）モデルマウスに対する生存率・生存延長の改善効果

11週齢の雄C57BL/6マウスに、生理食塩水に溶解し37℃に保温したヒストン(sigma, H9250)を80 mg/kg尾静脈内投与することによりDICモデルマウスを作製した(Tobias A. et al., blood, 29 September 2011, vol. 118, no. 13, p. 3708-3714)。前処理としてウシラクトフェリン(n=8)を20mg/kg尾静脈内投与し、その30分後に、ヒストンを尾静脈内投与し、ラクトフェリン治療群とした。無治療対称群としてウシラクトフェリンが含まれていない生理食塩水(n=8) 100μlをヒストン投与30分前に尾静脈内投与した。ヒストン投与後からの生存率・生存延長の評価はカプラン・マイヤー法を用いて評価した。無治療対象群は、ヒストン投与の約20分後から徐々に死に始め、、2日後には2匹、4日後に1匹となったが、ウシラクトフェリン投与群は4日たっても、8匹全て生存し、生存率と生存延長の

効果が顕著に見られた(図7：統計的有意差p=0.0005)。

［００５７］

[実施例7]　ラクトフェリン尾静脈投与によるヒストン血栓モデルマウスに対する止血効果（出血時間）

11週齢の雄C57BL/6マウスに前処理としてウシラクトフェリン(n=5)を20mg/kg尾静脈内投与し、その30分後、生理食塩水に溶解し37℃に保温したヒストン(sigma, H9250）を60mg/kg尾静脈内投与することによりDICモデルマウスの止血効果を調べた（Tobias A, et al., Blood, 2011; 118: p. 3708-3714）（生存率・生存延長に使用したヒストンの75%量を採用)。無治療対称群としてウシラクトフェリンが含まれていない生理食塩水（n=5）100μlをヒストン投与30分前に尾静脈内投与した。健常コントロール群（n=5）としてウシラクトフェリンの前処理とヒストン処理の代わりに、各々、生理食塩水を用いた。ヒストン投与20分後に尾静脈を末端から3mmで切断して37℃の生理食塩水に浸し、30秒毎に濾紙で血液を拭い出血時間を測定した（出血時間が15分以上掛る場合は15分として止血処置を行った）(Fuchs TA, et al., Blood, 2011;118:3708-3714)。無治療対称群では著しい出血時間延長が見られたが（図8：無治療対称群対健常コントロール：P<0.0001)、ウシラクトフェリン投与群は有意に出血時間を短縮した（図8：ウシラクトフェリン投与群対無治療対称群：P<0.0001)。

［００５８］

[実施例8]　ヒストン血栓モデルに対するラクトフェリンの肺組織出血抑制効果

11週齢の雄C57BL/6マウスに前処理としてウシラクトフェリン(n=4)を20mg/kg尾静脈内投与し、その30分後、生理食塩水に溶解し37℃に保温したヒストン(sigma, H9250）を80 mg/kg尾静脈内投与することによりDICモデルマウスを作製した Tobias A., et al., Blood, 29 September 2011, ; vol. 118: no. 13, p. 3708-3714)。無治療対称群としてウシラクトフェリンが含まれていない生理食塩水（n=4）100μlをヒストン投与30分前に尾静脈内投与した。健常コントロール（n=4）としてウシラクトフェリンの前処理とヒストン処理の代わりに、各々、生理食塩水を用いた。ヒストン（2回目の生理食塩水）投与10分後にマウスを安楽死させ、肺組織を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを用いて肺組織を固定した。無治療対称群と比

べ、ウシラクトフェリン投与群は組織出血が殆ど見られず、肺組織はコントロール群と同じような色彩であった（図9）。無治療対称群は、肺組織色の赤みが増加し、組織出血が見られた（図9）。

［００５９］

［実施例9］　NETs形成阻害がラクトフェリンに特異的な活性であることの確認実験

ラクトフェリンは、そのN末端部分が正に帯電していることから、負の電荷を持つDNA分子と結合することができると報告されている（He J, and Furmanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature.* 1995;373(6516):721-4.）。そこで、ラクトフェリンに近い分子量（MW）及び等電点（pI）を有する別の種類のタンパク質により、NETs形成を阻害することができるかどうかを検討する実験を行った。実験には以下のタンパク質を用いた。

表3

タンパク質名（ウシ由来）	分子量（kDa）	等電点
ラクトフェリン	84.0	8.2-8.9
アンジオジェニン	14.6	9.5
ラクトペロキシダーゼ（LPO）	80.6	8.0

［００６０］

アンジオジェニンは腫瘍血管新生因子として知られ（Strydom DJ, Fett JW, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, and Vallee BL. Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. *Biochemistry.* 1985;24:5486-94.）、ラクトペロシキダーゼはラクトフェリンと同様、哺乳動物の乳に高濃度で含まれるヘムペロキシダーゼである（Sharma S, Singh AK, Kaushik S, Sinha M, Singh RP, Sharma P, Sirohi H, Kaur P, and Singh TP. Lactoperoxidase: structural insights into

the function, ligand binding and inhibition. *Int J Biochem Mol Biol.* 2013;4:108-28.)。

[００６１]

1. ラクトペロキシダーゼ、アンジオジェニン及びラクトフェリンの調製

ウシの乳から単離した粗タンパク質を 10 mM のリン酸ナトリウムバッファー（pH7.0）に溶解し、得られた溶液を同バッファーで平衡化した SP-セファロースカラム（GE Healthcare Life Sciences）にローディングした（流速毎分 3.0 ml）。カラムに結合したタンパク質を前記バッファーで洗浄し、同バッファー中の塩化ナトリウム直線濃度勾配（0.3～1.0 M）によってラクトペロキシダーゼ、アンジオジェニン及びラクトフェリンを溶出した。

[００６２]

2. NETs 形成阻害

NETs 形成阻害は、[実施例 2] と同様の手法で培養上清中の DNA 濃度を測定することにより行った。実験は、3 つの独立した系で重複して行った（n = 3）。

[００６３]

3. 結果

ラクトペロキシダーゼ及びアンジオジェニンは NETs 形成を阻害することはできなかった（図 10： $p < 0.01$）。これは、ラクトフェリンによる NETs 形成阻害が、単にラクトフェリン分子の正電荷のみにより生じているものではなく、ラクトフェリンに固有の活性によるものであることを示している。

[００６４]

[図のデータの説明]

[図 1] 健常人末梢血好中球を NETs 形成刺激の 30 分前にラクトフェリンを添加し、NETs 形成阻害効果の試験結果を示す。(A) ウシラクトフェリン（今後全図面中「bLF」と表記）を 2、20、200 μg/ml で前処理を行うと、濃度依存的に NETs 形成阻害効果が見られ、NETs 形成刺激 対 ウシラクトフェリン 20 μg/ml の前処理では $p < 0.01$、NETs 形成刺激 対 ウシラクトフェリン 200 μg/ml の前処理では $p < 0.001$ と統計的有意差が得られた。10 μM DPI はポジティブコントロールとして使用。(B) ヒトラクトフェリン（今後前図面中「hLF」と表記）を 2、20、200 μg/ml で前処

理を行うと、ウシラクトフェリンと同様にNETs形成阻害効果が見られ、$p<0.001$と統計的有意差が得られた。(C) ヒトラクトフェリン200 μg/mlの前処理画像を示す。細胞外のDNAは500nM SYTOX greenで染色した。ヒトラクトフェリン前処理により細胞外にDNAの放出が阻害されていることが観察できる。(D) ヒトラクトフェリンで前処理を行い、NETs刺激3時間後の培養上清中のDNA濃度を測定した。NETs刺激により細胞外に分泌されたDNA濃度がウシラクトフェリンの濃度依存的に抑制され、NETs形成刺激 対 ヒトラクトフェリン20 μg/mlの前処理では$p<0.05$、NETs形成刺激 対 ヒトラクトフェリン200 μg/mlの前処理では$p<0.001$と統計的有意差が得られた。(E) ヒトラクトフェリン200 μg/mlで前処理を行い、NETs刺激3時間後の好中球を電子顕微鏡により分析した走査型電子顕微鏡の画像を示す。無刺激の好中球は球形が保たれDNAの放出がみられないが、PMA刺激により細胞は崩れ線維成分が形成された。一方でヒトラクトフェリン前処理を行った好中球ではこの線維成分が束状になり、NETsの線維を縮合させている。

［００６５］

[図2] 健常人末梢血好中球をNETs形成刺激後にラクトフェリンを添加し、NETs形成阻害効果の試験結果を示す。200 μg/ml ヒトラクトフェリン30分前処理をおこなったものをコントロールとした。NETs刺激後、1時間、2時間後に200 μg/mlヒトラクトフェリンを添加したところ、NETs形成阻害が認められた（測定は培養上清中のDNA濃度を用いた)。NETs形成刺激 対 刺激1時間後ラクトフェリンを添加したものと、NETs形成刺激 対 刺激2時間後ラクトフェリンを添加したものと、各々 $p<0.001$と統計的有意差が得られた。

［００６６］

[図3] 自己免疫疾患モデルであるANCAモデルSCG/kjマウスの生存率に及ぼすラクトフェリンの影響についての試験結果を示す。生後8週齢からウシラクトフェリン含有飼育餌群（n=16）とウシラクトフェリン非含有飼育餌群（n=16）に分け、18週齢までのカプラン・マイヤー生存曲線を示す。ラクトフェリン含有飼育餌群が顕著に生存率の改善が見られ、$p<0.05$と統計的有意差が得られた。

［００６７］

[図4] SCG/kjマウスに対するラクトフェリン投与が血中MPO-ANCA

(myeloperoxidase specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody) 抗体価と血中DNA、腎臓組織に与える影響についての試験結果を示す。(A) NETs形成疾患の一つであるANCA血管炎モデル動物 SCG/kjマウスは疾患発症に関わるMPO-ANCAを生産する。12週齢でのSCG/kjのMPO-ANCA抗体価をELISAにより測定するとウシラクトフェリン含有飼育餌群 (n=8)ではウシラクトフェリン非含有飼育餌群(n=8)よりも低値であり、$p<0.05$と統計的有意差が得られた。(B) NETs形成により好中球から放出されるDNAを含んだ血液中のDNA含量を評価した。13週齢でのSCG/kjの血漿中DNA濃度はラクトフェリン含有飼育餌群 (n=8)ではウシラクトフェリン非含有飼育餌群(n=7)よりも低値であり$p<0.05$と統計的有意差が得られた。(C) ウシラクトフェリンによるSCG/kjマウスの腎臓に与える影響をマッソントリクローム染色を用いて評価した。ウシラクトフェリン含有飼育餌群の腎臓は非含有餌群と比べ組織の間質線維化、炎症細胞浸潤(upper)、半月体形成(lower)が非含有餌群よりも軽度であった。

[００６８]

[図5] 非自己免疫疾患モデルであるLSRモデル１マウスに対するラクトフェリン投与が皮下組織に与える影響についての試験結果を示す。(A) 8週齢のC57BL/6jにウシラクトフェリン含有飼育餌群 (n=16) と非含有餌群 (n=15) に分け、2週間後の10週例目にLPS(100 μg/mouse)およびTNFα (0.3μg/mouse)を皮下注射し、皮膚の発赤 (皮下出血) を惹起したマウスの一部の画像。ウシラクトフェリン含有飼育餌群は非含有餌群に比較し皮膚発赤が著明に抑制されている。(B) 表2に示す皮下出血の評価スコアを用いて定量したグラフである。ウシラクトフェリン含有飼育餌群は非含有餌群と比べ皮下出血スコアが低値であり、$p<0.001$と統計的有意差が得られた。(C) LSRを惹起したマウス皮膚組織のマッソントリクローム染色とエストラーゼ染色による評価。ウシラクトフェリン含有飼育餌群において皮下出血および血栓形成が抑制されている。エステラーゼ染色により好中球浸潤がウシラクトフェリン含有飼育餌群で抑制されている。

[００６９]

[図6] 非自己免疫疾患モデルであるLSRモデル2マウスに対するウシラクトフェリン投与が背部皮下エアパウチ内に与える影響についての試験結果を示す。

(A) マウスの背部皮下にエアパウチを作製し、炎症刺激なし群（n=12：100μg/匹のLPS：0.3μg/匹のTNF-α）、非含有飼育餌群（n=12：100μg/匹のLPS：0.3μg/匹のTNF-α）、及びラクトフェリン含有飼育餌群（n=12）に分け、エアパウチ内を洗浄し、洗浄液中のDNA濃度を測定した。非含有飼育餌群と比べウシラクトフェリン含有飼育餌群は無刺激群近くまで洗浄液中のDNA濃度が減少し、$p<0.01$と統計的有意差が得られた。(B) エアパウチ洗浄液中の好中球のDNAをDRAQ5により染色した図。ウシラクトフェリン含有飼育餌群は非含有飼育餌と比べ、DNAの放出が殆ど見られず、NETs形成が阻害されている。

［００７０］

[図 7] ヒストン投与後からの生存率・生存延長の評価の結果を示す。無治療対象群は、ヒストン投与の約20分後から徐々に死に始め、2日後には2匹、4日後に1匹となったが、ウシラクトフェリン投与群は4日たっても、8匹全て生存し、生存率と生存延長の効果が顕著に見られた(統計的有意差 $p=0.0005$)。

［００７１］

[図 8] ラクトフェリン尾静脈投与によるヒストン血栓モデルマウスに対する止血効果を示す。無治療対称群では著しい出血時間延長が見られたが（無治療対称群対健常コントロール：$P<0.0001$)、ウシラクトフェリン投与群は有意に出血時間を短縮した（ウシラクトフェリン投与群対無治療対称群：$P<0.0001$)。

［００７２］

[図 9] ヒストン血栓モデルに対するラクトフェリンの肺組織出血抑制効果を示す。無治療対称群と比べ、ウシラクトフェリン投与群は組織出血が殆ど見られず、肺組織はコントロール群と同じような色彩であった。無治療対称群は、肺組織色の赤みが増加し、組織出血が見られた。

［００７３］

[図 10] NETs 形成阻害がラクトフェリンに特異的な活性であることを示す。NETs形成はラクトフェリンだけが阻害することができ、ラクトペロキシダーゼ及びアンジオジェニンはNETs 形成を阻害することはできなかった(図 10:$n=3$, $p<0.01$)。

［００７４］

[産業上の利用可能性]

本発明は、白血球の細胞外トラップ形成により生じる疾患に対し、副作用の少ない治療方法を提供することができる。また、副作用の低さがゆえに、広範囲の患者及び患者予備軍に安心して使用できるという利点を有する。

また、非自己免疫疾患モデルにおいて本発明による白血球の細胞外トラップ形成阻害能が確認されたことから、本発明において、ラクトフェリンは、過去に報告された作用機序（特許文献1）とは異なる、全く新規な作用機序により治療作用を示すといえる。

［００７５］

配列表

請 求 の 範 囲

1. ラクトフェリンを含む、白血球の細胞外トラップ形成阻害剤。

2. ラクトフェリンが 0.001～10 g/kg/日の量になるように調製された、請求項 1 に記載の阻害剤。

3. 前記ラクトフェリンはヒト由来のものである、請求項 1 に記載の阻害剤。

4. 前記ラクトフェリンが以下の (a) ～ (c) よりなる群より選ばれるいずれかに記載のタンパク質である、請求項 1 に記載の阻害剤。

(a) 配列番号 1～5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列からなるタンパク質；

(b) 配列番号 1～5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列において、1～66 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 1～5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質

5. 前記白血球は、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ及び肥満細胞からなる群から選択されるいずれか 1 つのものである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の阻害剤。

6. 前記白血球が好中球である、請求項 5 に記載の阻害剤。

7. ラクトフェリンを含む、白血球の細胞外トラップ形成に関連する疾患を治療するための組成物。

8. ラクトフェリンが 0.001～10 g/kg/日の量になるように調製された、請求項 7 に記載の組成物。

9. 前記ラクトフェリンはヒト由来のものである、請求項 7 に記載の組成物。

10. 前記ラクトフェリンが以下の (a) ～ (c) よりなる群より選ばれるいずれか 1 つに記載のタンパク質である、請求項 7 に記載の組成物。

(a) 配列番号 1～5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列からなるタンパク質；

(b) 配列番号 1～5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列において、1～66 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 1～5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して、90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ白血球の細胞外トラップ形成を阻害する活性を有するタンパク質

１１． 前記白血球は、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ及び肥満細胞からなる群から選択されるいずれか 1 つのものである、請求項 7～10 のいずれか一項に記載の組成物。

１２． 前記疾患は、ANCA 関連血管炎、全身性エリテマトーデス、局所シュワルツマン反応、虚血再灌流障害を伴う急性腎障害（AKI）及び播種性血管内凝固からなる群より選択されるいずれか 1 つである、請求項 7～11 のいずれか一項に記載の組成物。

１３． 食品の形態にある、請求項 7～12 のいずれか一項に記載の組成物。

１４． 注射剤の形態にある、請求項 7～12 のいずれか一項に記載の組成物。

１５． 経口投与されるものである、請求項 7～13 のいずれか一項に記載の組成物。

図 1-A

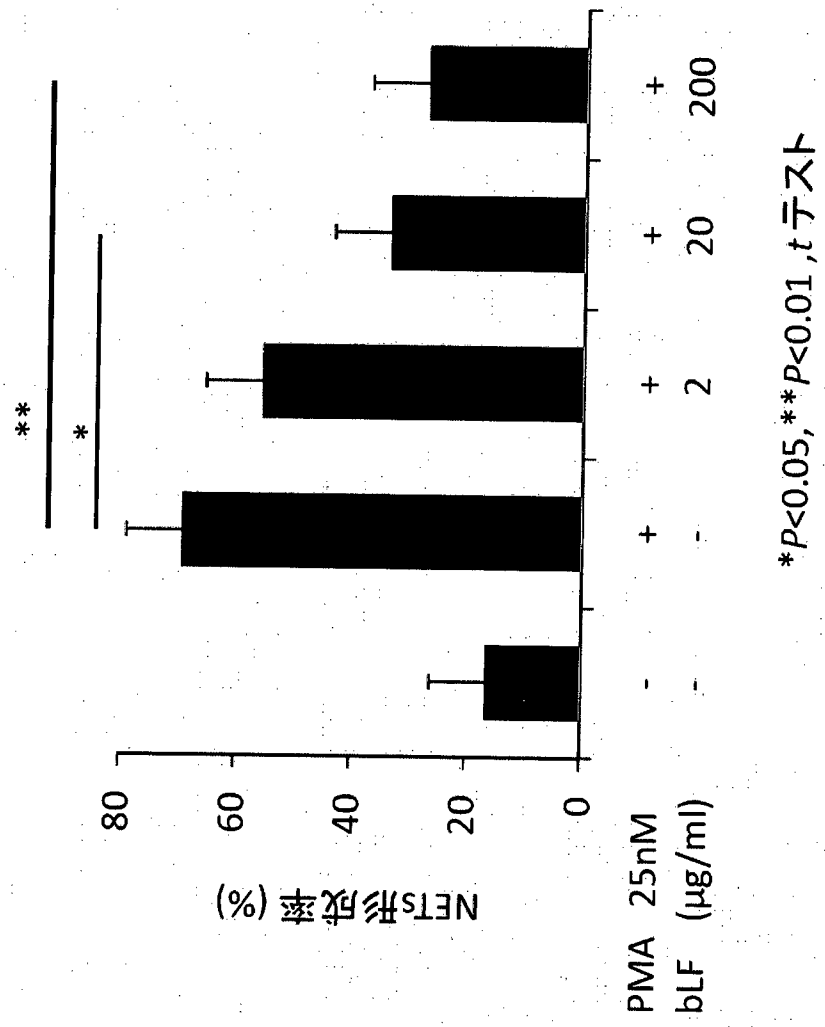


図 1-B

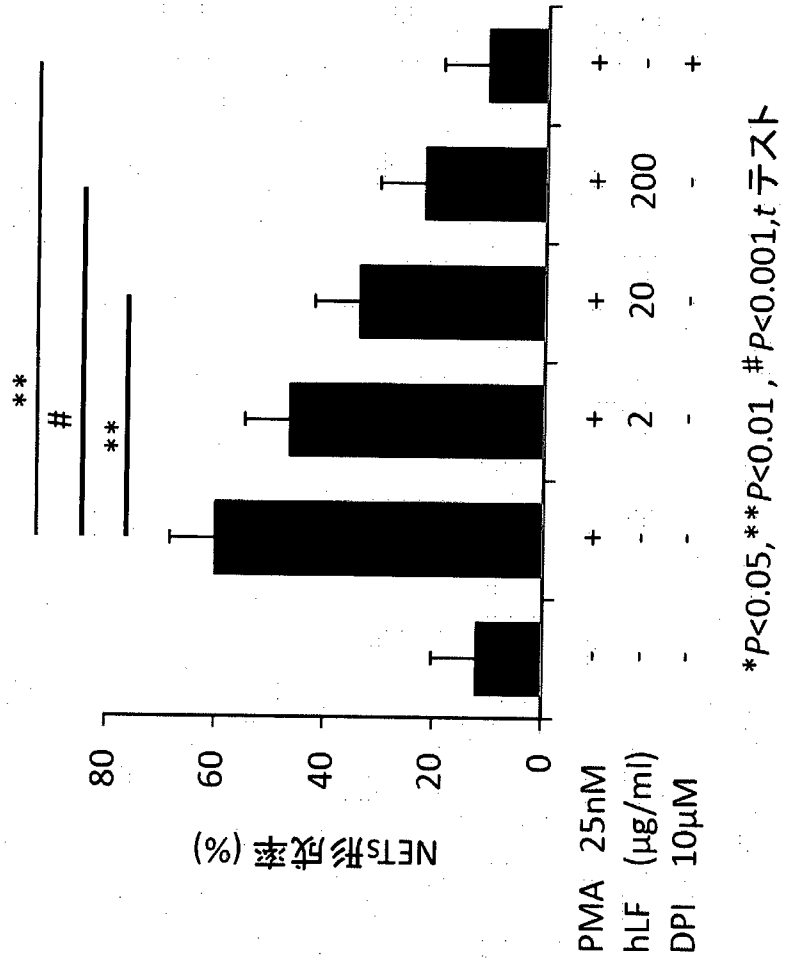

NETs形成率 (%)
0
20
40
60
80
PMA 25nM - + + + + -
hLF (μg/ml) - - 2 20 200 -
DPI 10μM - - - - - +
**
#
**
*P<0.05, **P<0.01, #P<0.001, tテスト

図 1-C

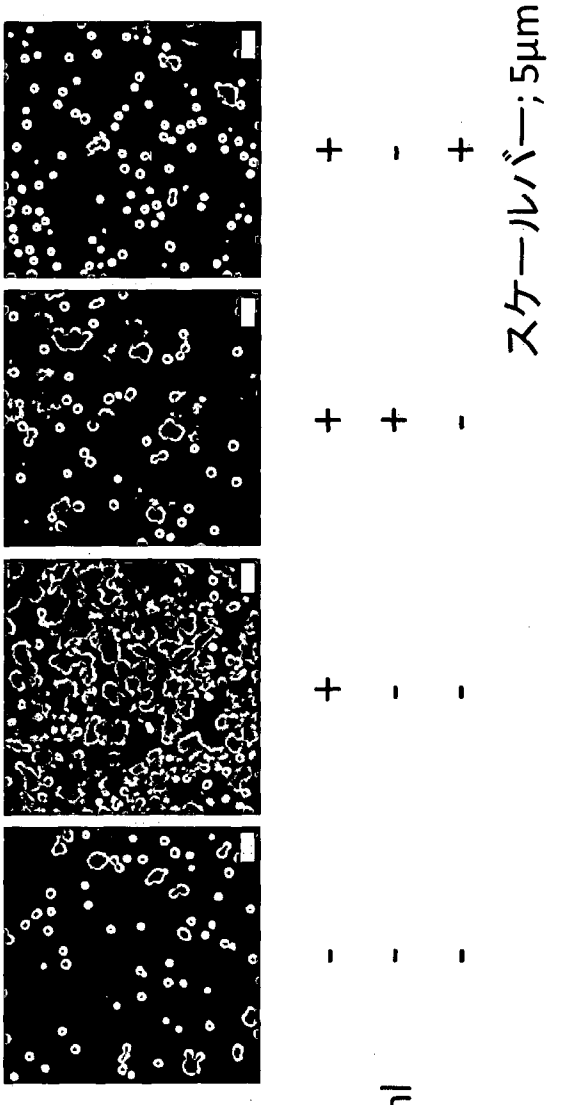


図 1-D

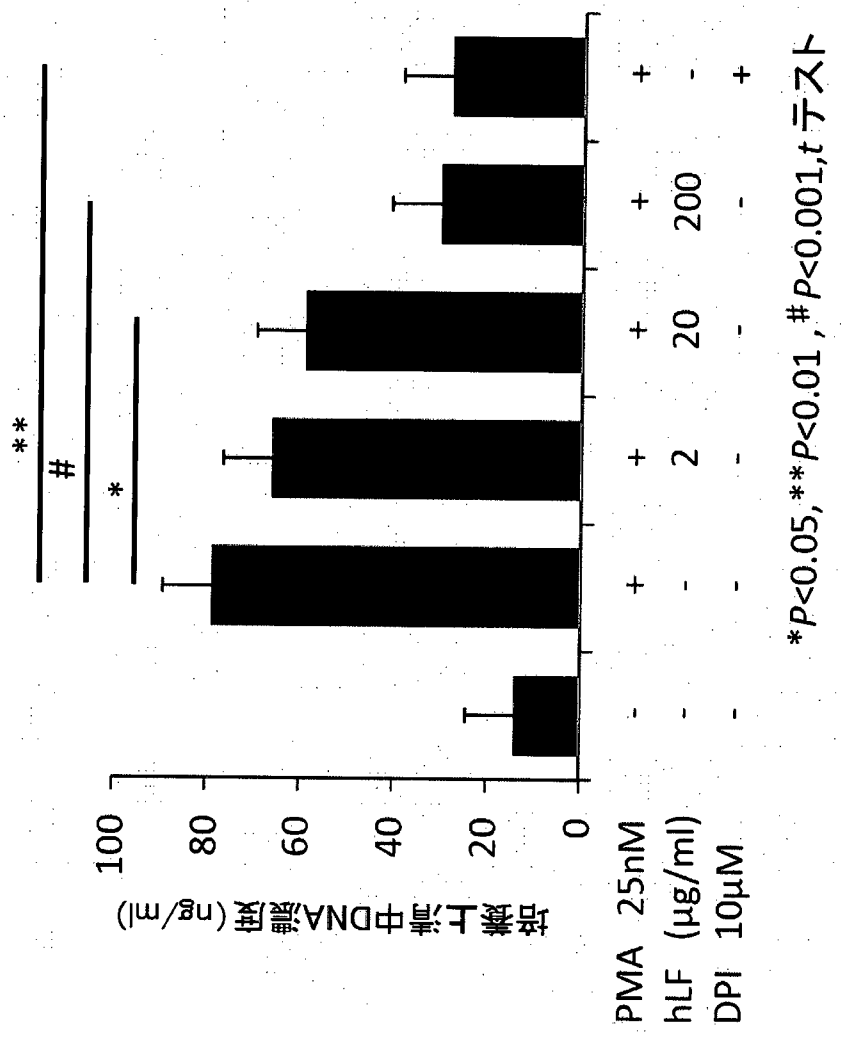

培養上清中DNA濃度 (ng/ml)
100
80
60
40
20
0
**
#
*
PMA 25nM - + + + + +
hLF (μg/ml) - - 2 20 200 -
DPI 10μM - - - - - +
*P<0.05, **P<0.01, #P<0.001, tテスト

図 1-E



図 2

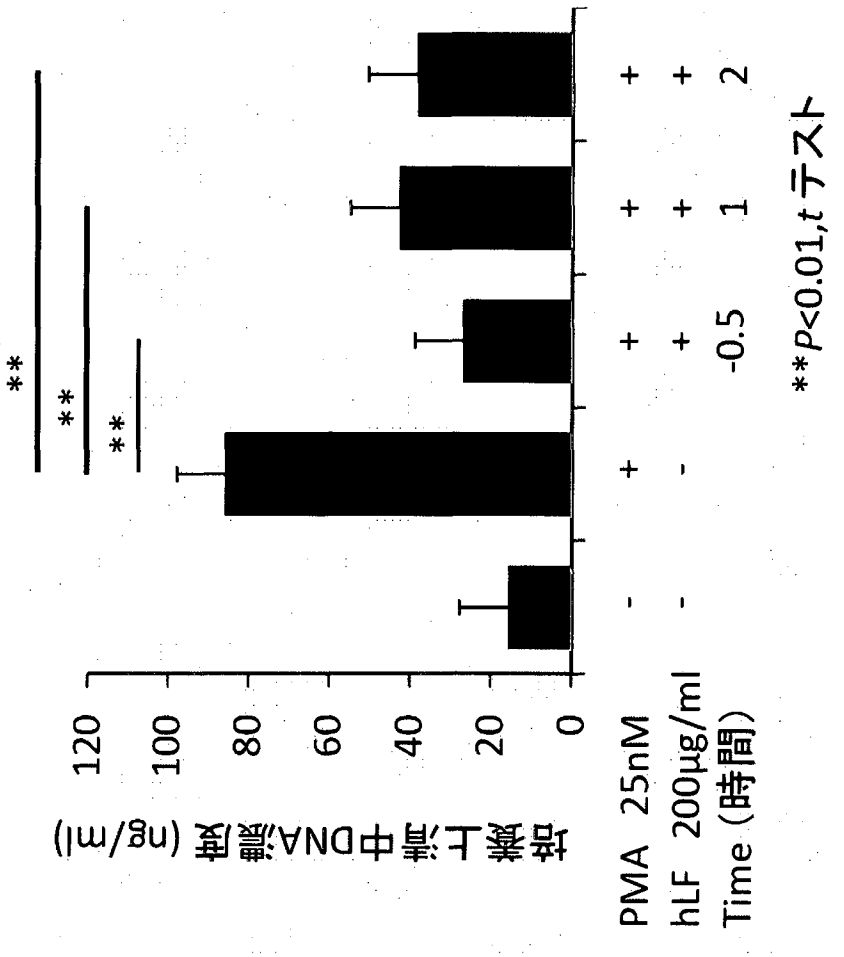

培養上清中DNA濃度 (ng/ml)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
PMA 25nM - + + + +
hLF 200μg/ml - - + + +
Time (時間) -0.5 1 2
**P<0.01,tテスト

図 3

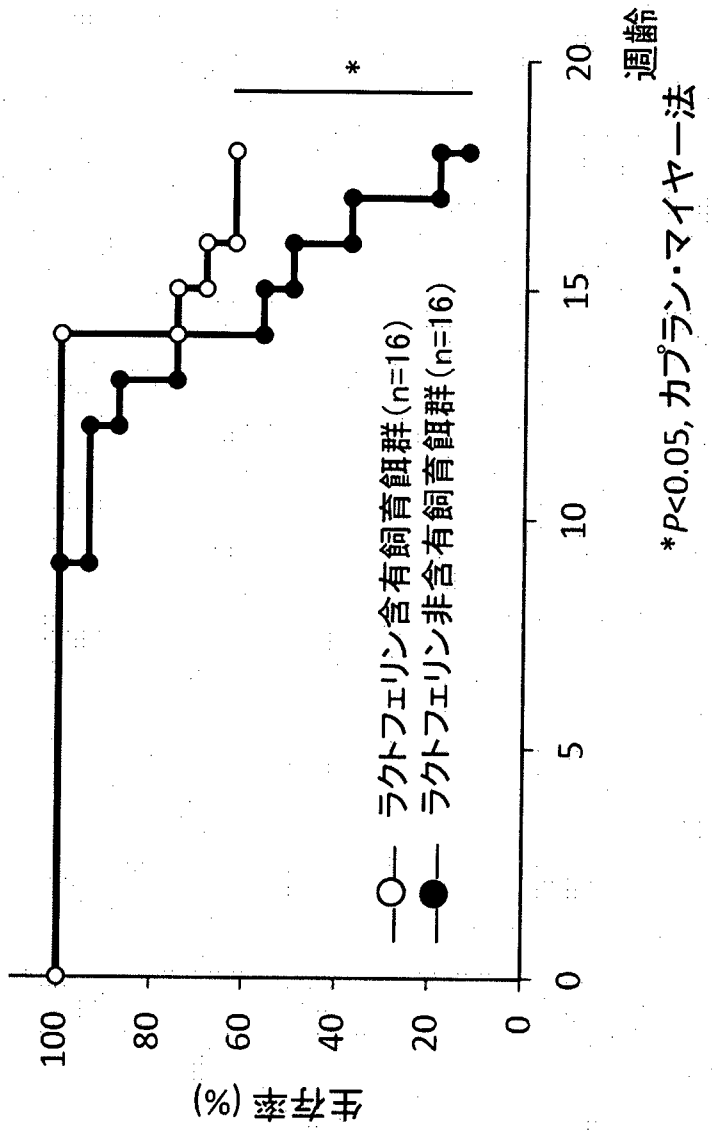

生存率 (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
週齢
*
ラクトフェリン含有飼育餌群 (n=16)
ラクトフェリン非含有飼育餌群 (n=16)
*P<0.05, カプラン・マイヤー法

図 4-A

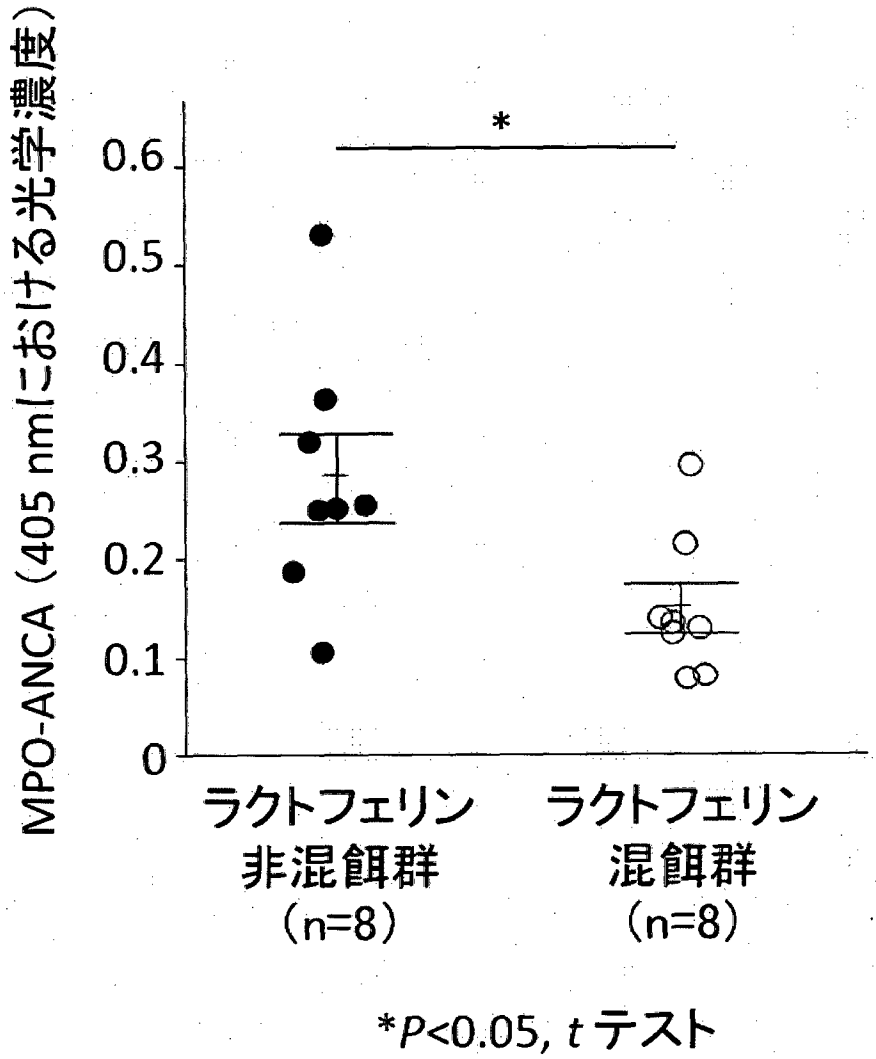

MPO-ANCA（405 nmにおける光学濃度）
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
*
ラクトフェリン
非混餌群
（n=8）
ラクトフェリン
混餌群
（n=8）
*P<0.05, t テスト

図 4-B

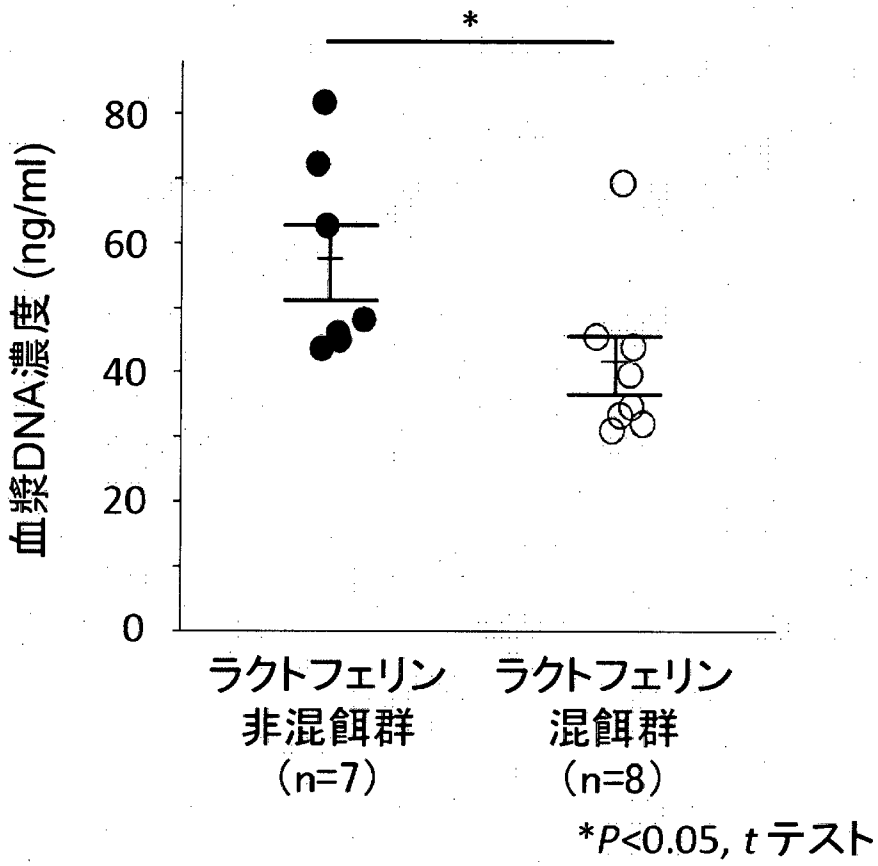

*
80
60
40
20
0
血漿DNA濃度 (ng/ml)
ラクトフェリン
非混餌群
(n=7)
ラクトフェリン
混餌群
(n=8)
*P<0.05, t テスト

図 4-C

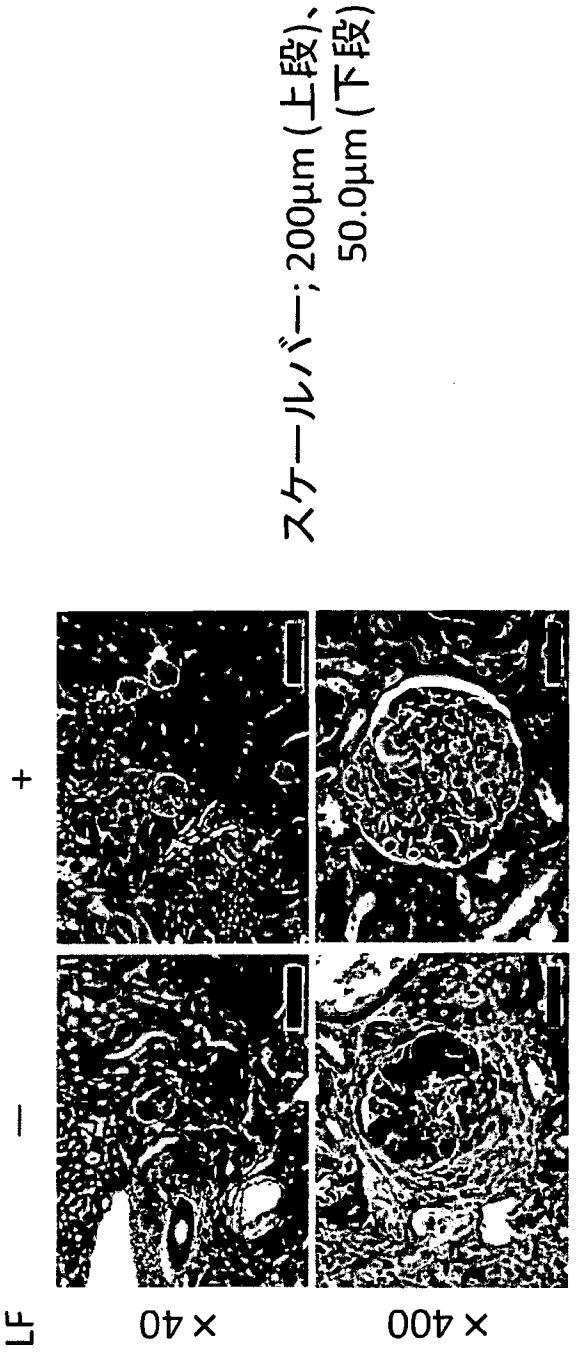


図 5-A

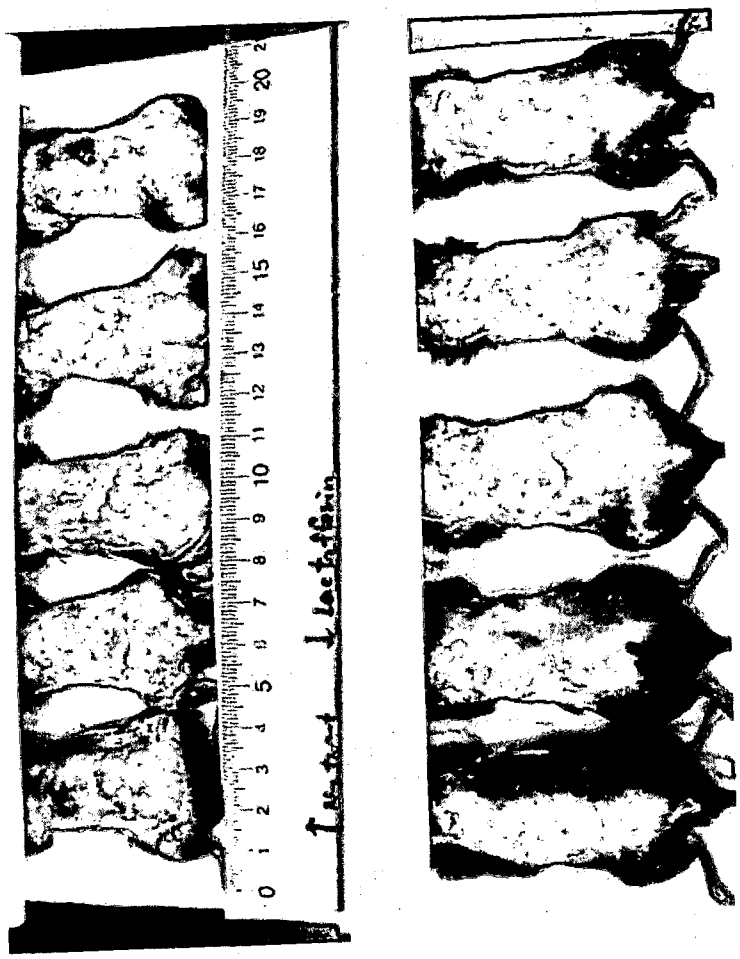


図 5-B

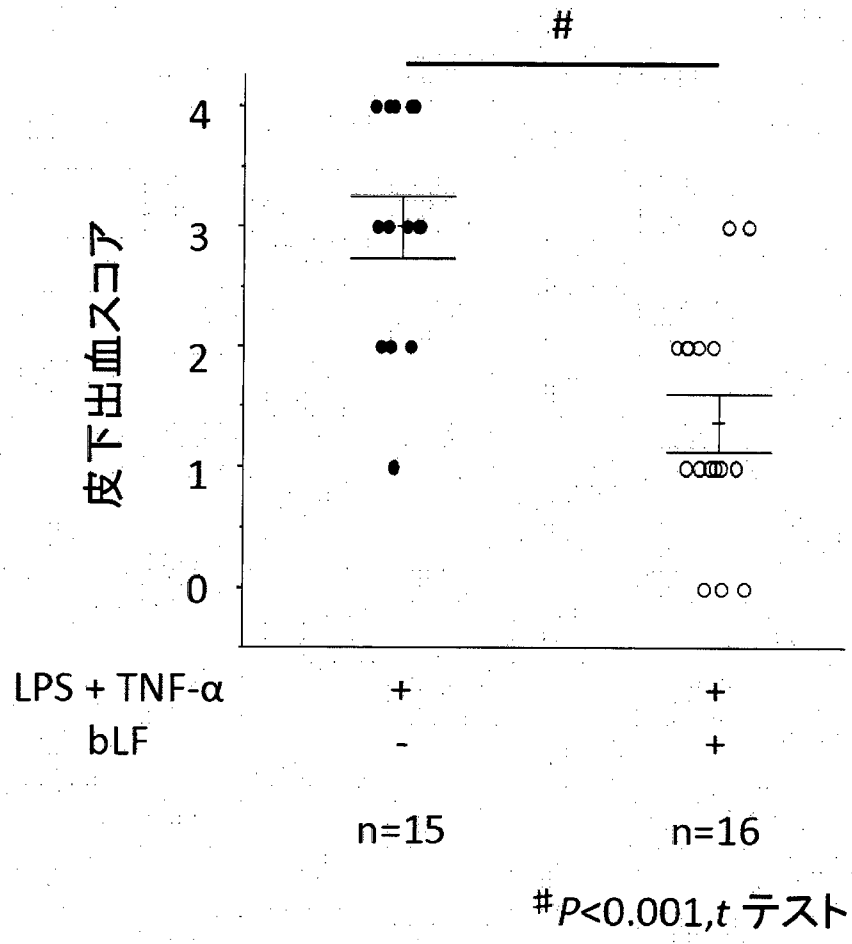


図 5-C

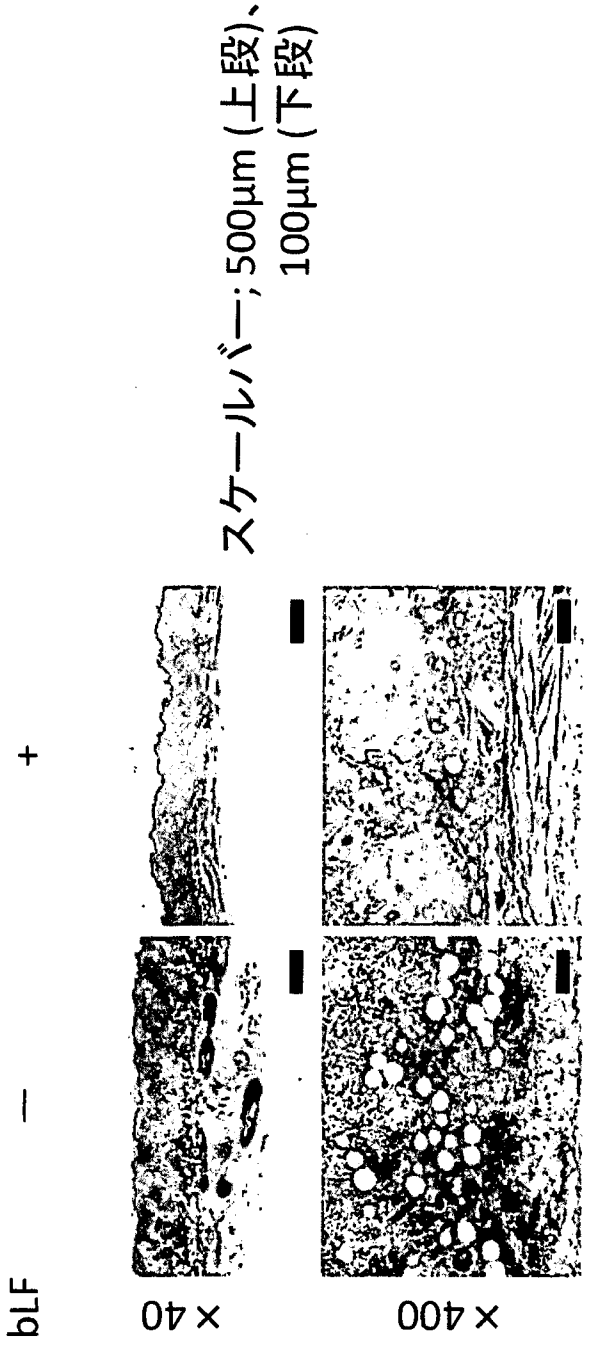


図 6-A

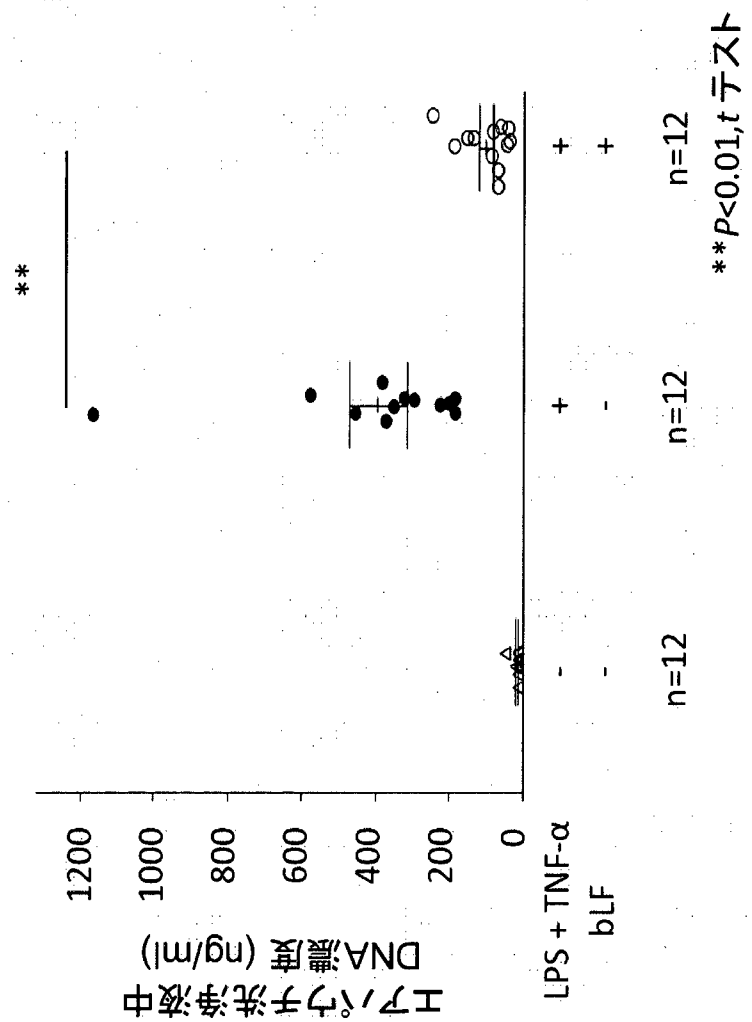

エアリフト洗浄液中
DNA濃度 (ng/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
**
LPS + TNF-α
bLF
-
-
+
-
+
+
n=12
n=12
n=12
**P<0.01, t テスト

図 6-B

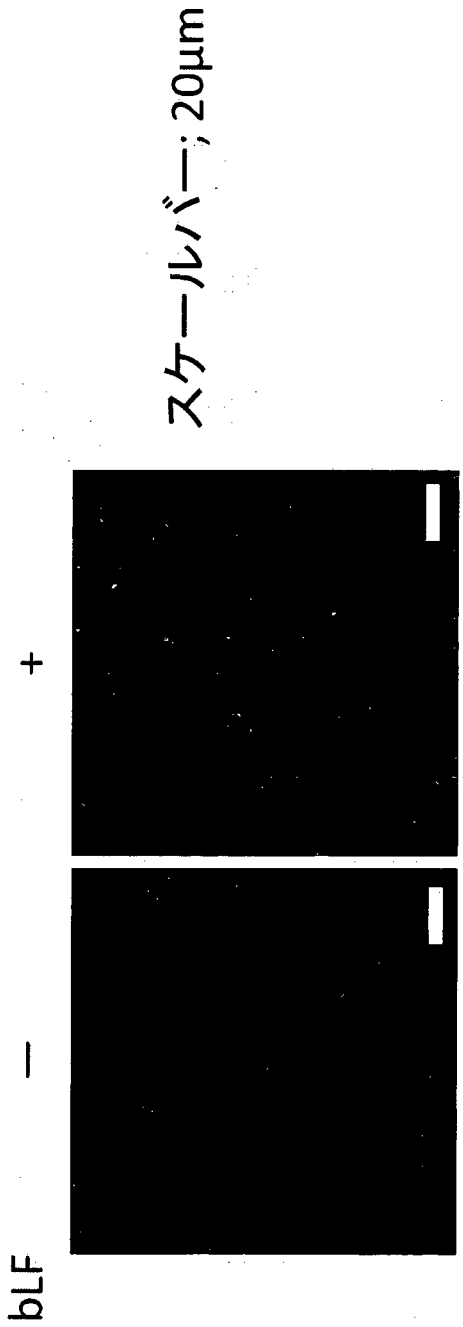


図 7

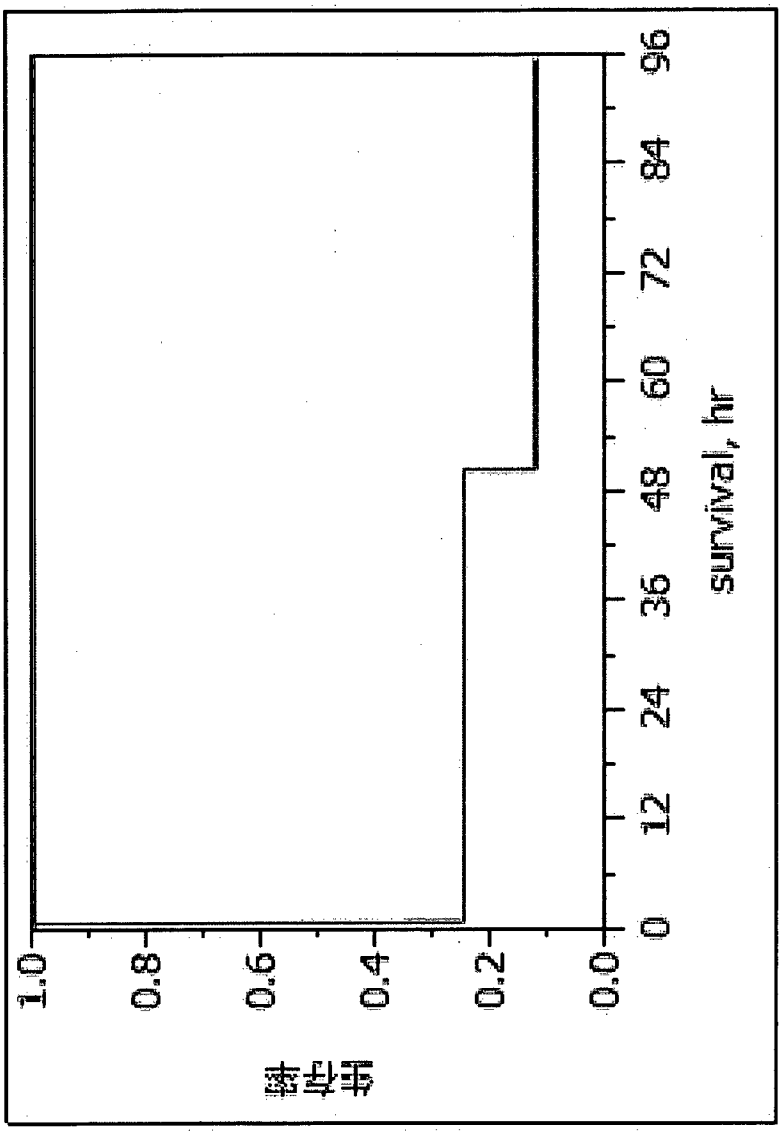

生存率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
12
24
36
48
60
72
84
96
survival, hr
Log-rank test, p=0.0005

図 8

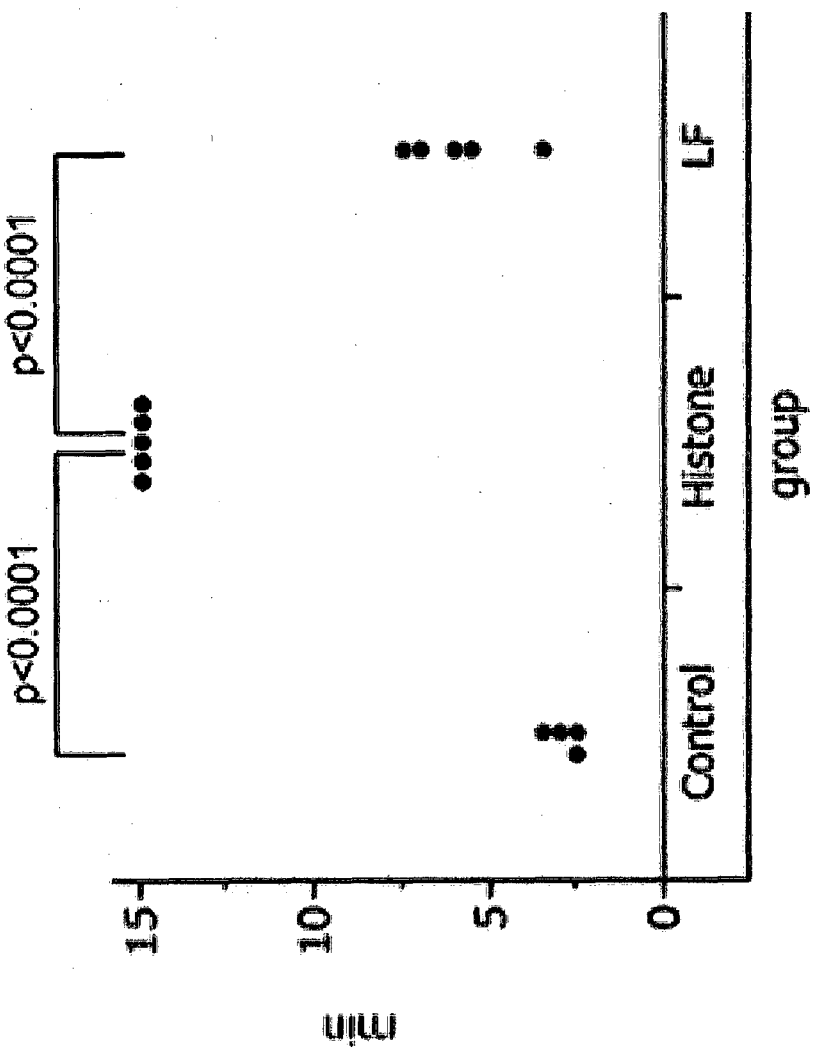
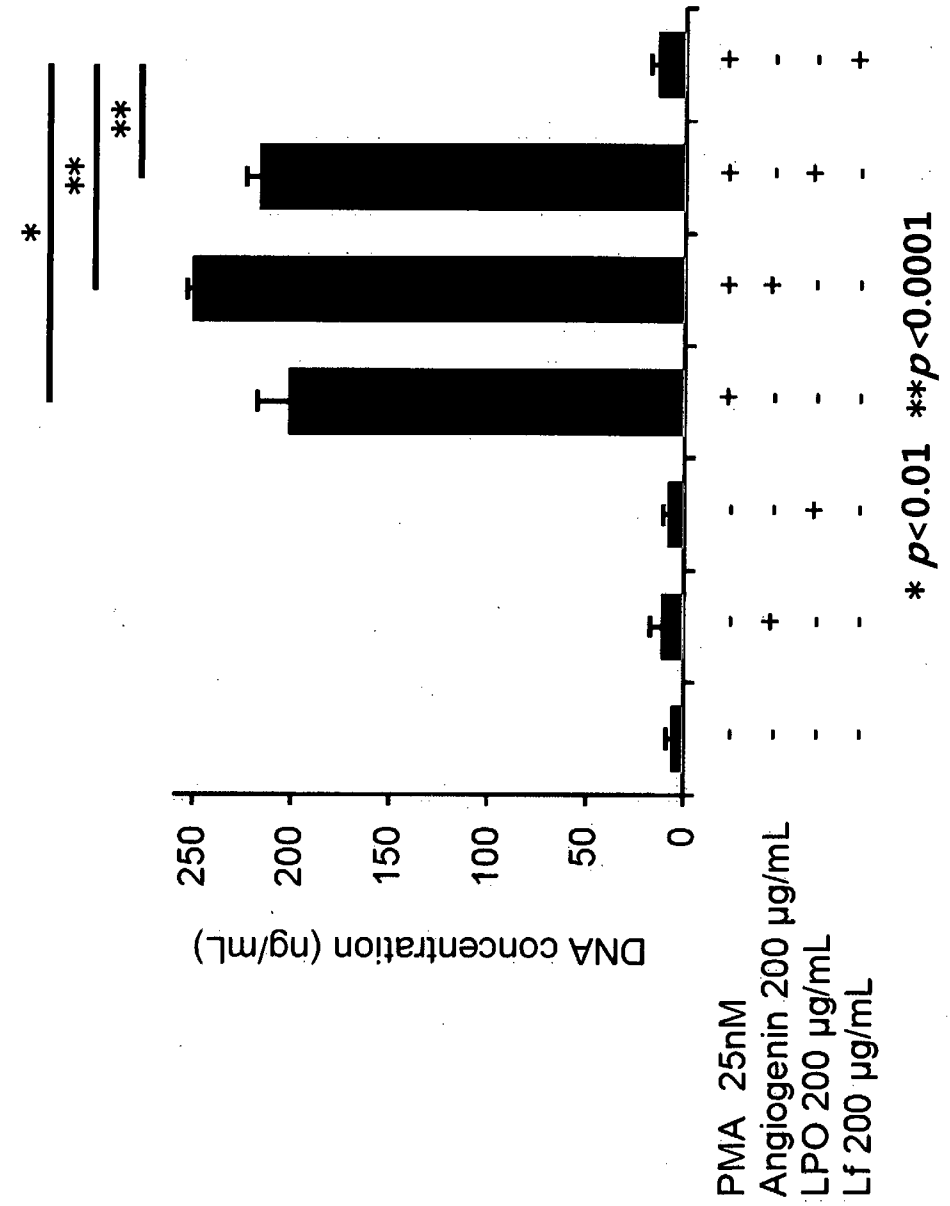


図 9



図 10


DNA concentration (ng/mL)
250
200
150
100
50
0
PMA 25nM
Angiogenin 200 μg/mL
LPO 200 μg/mL
Lf 200 μg/mL
* p<0.01 **p<0.0001
*
**
**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/060561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K38/16(2006.01)i, *A23L1/30*(2006.01)i, *A61K9/08*(2006.01)i, *A61P7/00*(2006.01)i, *A61P9/10*(2006.01)i, *A61P13/12*(2006.01)i, *A61P37/02*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *A23J3/08*(2006.01)n, *C07K14/79*(2006.01)n
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)
A61K38/16, A23L1/30, A61K9/08, A61P7/00, A61P9/10, A61P13/12, A61P37/02, A61P43/00, A23J3/08, C07K14/79

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

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), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-48804 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 20 February 2001 (20.02.2001), claim 6; paragraph [0016]; example 1 (Family: none)	7-13,15
X Y	JP 2011-524748 A (University Court of the University of Edinburgh), 08 September 2011 (08.09.2011), claims 4, 5, 8; paragraphs [0063], [0090] to [0093] & US 2011/0182914 A1 & GB 811250 D & GB 811250 D0 & EP 2307045 A & WO 2009/153573 A1 & CA 2728669 A	7-15 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
10 June, 2014 (10.06.14)	01 July, 2014 (01.07.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/060561

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BOURNAZOU, I. et al., Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin, The Journal of Clinical Investigation, 2009, Vol.119, No.1, p.20-32, page 23, left column, line 12 to page 26, right column, line 6, page 29, left column, 5th line from the bottom to right column, line 2	7-15 1-15
Y	CAIELLI, S. et al., Neutrophils come of age in chronic inflammation, Current Opinion in Immunology, 2012, Vol.24, No.6, p.671-677, page 671, right column, 14th line from the bottom to 7th line from the bottom, page 674, left column, 8th line from the bottom to right column, line 3, page 674, right column, 2nd line from the bottom to page 675, left column, line 6, page 675, left column, 11th line from the bottom to right column, line 5	1-15

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０６０５６１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K38/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K9/08(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A23J3/08(2006.01)n, C07K14/79(2006.01)n

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））

Int.Cl.　A61K38/16, A23L1/30, A61K9/08, A61P7/00, A61P9/10, A61P13/12, A61P37/02, A61P43/00, A23J3/08, C07K14/79

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	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４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），ＰｕｂＭｅｄ

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	JP 2001-48804 A（明治乳業株式会社）2001.02.20, 請求項６、【００１６】、実施例１ （ファミリーなし）	7-13,15
X Y	JP 2011-524748 A（ユニヴァーシティ　コート　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　エディンバラ）2011.09.08, 請求項４、５及び８、【００６３】、【００９０】～【００９３】 & US 2011/0182914 A1 & GB 811250 D & GB 811250 D0 & EP 2307045 A & WO 2009/153573 A1 & CA 2728669 A	7-15 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矛盾するものではなく、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
１０．０６．２０１４	０１．０７．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｕ　３４３６
鳥居　福代
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９

Ｃ（続き）．　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 Y	BOURNAZOU,I. et al., Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin, The Journal of Clinical Investigation, 2009, Vol.119, No.1, p.20-32 第２３頁左欄第１２行～第２６頁右欄第６行、第２９頁左欄下から５行目～同頁右欄第２行	7-15 1-15
Y	CAIELLI,S. et al., Neutrophils come of age in chronic inflammation, Current Opinion in Immunology, 2012, Vol.24, No.6, p.671-677 第６７１頁右欄下から１４行目～下から７行目、第６７４頁左欄下から８行目～同頁右欄第３行、第６７４頁右欄下から２行目～第６７５頁左欄第６行、第６７５頁左欄下から１１行目～同頁右欄第５行	1-15