

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-518345

(P2021-518345A)

(43) 公表日 令和3年8月2日(2021.8.2)

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)

F 1

A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 27/16
A 6 1 P 11/02

テーマコード (参考)

4 C 0 8 4
4 C 0 8 5
4 C 0 8 6
4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-549027 (P2020-549027)
(86) (22) 出願日 平成31年3月15日 (2019.3.15)
(85) 翻訳文提出日 令和2年10月28日 (2020.10.28)
(86) 國際出願番号 PCT/US2019/022493
(87) 國際公開番号 WO2019/178488
(87) 國際公開日 令和1年9月19日 (2019.9.19)
(31) 優先権主張番号 62/643,476
(32) 優先日 平成30年3月15日 (2018.3.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/652,630
(32) 優先日 平成30年4月4日 (2018.4.4)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 596115687
ザ チルドレンズ メディカル センター
コーポレーション
アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
15, ボストン, シャタック・ストリート
55
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法

(57) 【要約】

喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法および組成物が、本明細書に記載されている。本発明の局面は、Notch4を標的とする作用物質を対象に投与することに関する。一態様において、作用物質は抗Notch4抗体である。

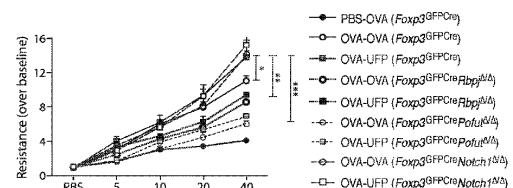
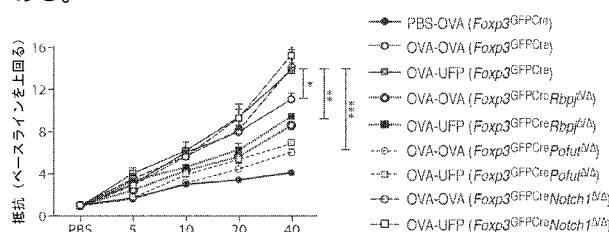


FIG. 23

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法であって、喘息またはアレルギー性疾患を有する対象に、有効量の、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法であって、
a. 喘息またはアレルギー性疾患を有する対象を特定する工程; および
b. 喘息またはアレルギー性疾患を有する対象に、有効量の、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程
を含む、方法。

10

【請求項 3】

喘息が、アレルギー性喘息、アレルギーのない喘息、アスピリン喘息、運動誘発性喘息、咳喘息および職業性喘息からなるリストから選択される、請求項1および2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4】

アレルギー性疾患が、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、中耳炎、アトピー性皮膚炎、じんましん、血管浮腫およびアナフィラキシーからなるリストから選択される、請求項1および2のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 5】

Notch4を阻害する作用物質が、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集系、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAiからなる群から選択される、請求項1および2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

抗体がヒト化抗体である、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

RNAiが、マイクロRNA、siRNAまたはshRNAである、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

Notch4を阻害することが、Notch4の発現レベルおよび/または活性を阻害することである、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 9】

Notch4の発現レベルおよび/または活性が、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれを上回って阻害される、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

Notch4が制御性T細胞上で阻害される、請求項1または2記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも1つのさらなる抗喘息治療薬を投与する工程をさらに含む、請求項1および2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも1つのさらなる抗アレルギー性疾患治療薬を投与する工程をさらに含む、請求項1および2のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 13】

喘息またはアレルギー性疾患を予防するための方法であって、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む、方法。

【請求項 14】

投与する工程の前に、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を特定する工程をさらに含む、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

50

喘息またはアレルギー性疾患の処置のための組成物であって、Notch4を阻害する作用物質と薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 1 6】

Notch4を阻害する作用物質が、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集系、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAiからなる群から選択される、請求項15記載の組成物。

【請求項 1 7】

抗体がヒト化抗体である、請求項15記載の組成物。

【請求項 1 8】

RNAiが、マイクロRNA、siRNAまたはshRNAである、請求項15記載の組成物。

【請求項 1 9】

吸入投与のために製剤化されている、請求項15記載の組成物。

【請求項 2 0】

喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を処置するための方法であって、

a. 対象から生物学的試料を取得する工程；

b. 候補細胞の集団中のNotch4のレベルを測定する工程であって、基準レベルと比較してNotchのレベルが増加されれば、対象は、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある、該測定する工程；および

c. 危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程

を含む、方法。

【請求項 2 1】

Notch4のレベルが、基準レベルと比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍またはそれを上回って増加される、請求項20記載の方法。

【請求項 2 2】

喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象の処置における治療薬の有効性を決定する方法であって、

d) 治療薬の投与前に、喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象によって提供された試料中のNotch4発現または活性の第一のレベルを決定する工程；

e) 治療薬の投与後に、患者によって提供された試料中のNotch4発現または活性の第二のレベルを決定する工程；ならびに

f) Notch4発現または活性の該第一および第二のレベルを比較する工程であって、Notch4発現または活性の該第二のレベルが該第一のレベルより低ければ、治療薬は有効であると考えられ、Notch4発現の該第二のレベルが該第一のレベルと同一であるかまたは該第一のレベルより高ければ、(b)で投与された治療薬は有効でない、該比較する工程を含む、方法。

【請求項 2 3】

治療薬が、Notch4を阻害する作用物質である、請求項22記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本国際出願は、米国特許法第119条(e)項に基づき、2018年3月15日に出願された米国仮出願第62/643,476号、2018年4月4日に出願された同第62/652,630号および2018年4月18日に出願された同第62/659,379号の恩典を主張し、これらの各々の内容は、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

【0 0 0 2】

政府の支援

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号2R01AI065617およびR01AI115699に基づく政府の支援を受けて為された。政府は、本発明に一定の権利を有する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0003】

背景

交通に関連する粒子状物質（PM）への曝露は、喘息およびアレルギー性疾患を促進する。しかしながら、これらの作用を媒介するためにPM曝露が挙動する正確な細胞的および分子的機序は不明なままである。環境の超微粒子（UFP）によって誘発されるアレルギー性気道炎症の増強にとって重要である細胞の標的およびシグナル伝達経路の理解は、喘息およびアレルギー性疾患を処置または予防するための治療薬を開発するために不可欠である。

【発明の概要】

【0004】

概要

本明細書に記載されている発明は、肺胞マクロファージとアレルゲン特異的T細胞間のJag1-Notch4依存性相互作用を促進し、増大されたTh細胞分化をもたらすことによって、超微粒子がアレルギー性気道炎症を増悪させるという発見に一部関連する。したがって、本明細書に記載されている本発明の一局面は、喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法であって、喘息またはアレルギー性疾患を有する対象に、有効量の、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む方法を提供する。

【0005】

本明細書に記載されている本発明の別の局面は、喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法であって、(a)喘息またはアレルギー性疾患を有する対象を特定する工程；および(b)対象に、有効量の、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む方法を提供する。

【0006】

本明細書に記載されている本発明の別の局面は、喘息またはアレルギー性疾患の処置のための組成物であって、Notch4を阻害する作用物質と薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。任意の局面の一態様において、組成物は、吸入投与のために製剤化される。

【0007】

任意の局面の一態様において、喘息は、アレルギー性喘息、アレルギーのない喘息、アスピリン喘息、運動誘発性喘息、咳喘息および職業性喘息からなるリストから選択される。

【0008】

任意の局面の一態様において、アレルギー性疾患は、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、中耳炎、アトピー性皮膚炎、じんましん、血管浮腫およびアナフィラキシーからなるリストから選択される。

【0009】

任意の局面の一態様において、Notch4を阻害する作用物質は、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集系、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAiからなる群から選択される。

【0010】

任意の局面の一態様において、抗体はヒト化抗体である。

【0011】

任意の局面の一態様において、RNAiはマイクロRNA、siRNAまたはshRNAである。

【0012】

任意の局面の一態様において、Notch4を阻害することは、Notch4の発現レベルおよび/または活性を阻害することである。任意の局面の一態様において、Notch4の発現レベルおよび/または活性は、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれを上回って阻害される。

【0013】

10

20

30

40

50

任意の局面の一態様において、Notch4は、制御性T細胞上において阻害される。

【0014】

任意の局面の一態様において、方法は、少なくとも1つのさらなる抗喘息治療薬を投与する工程をさらに含む。任意の局面の一態様において、方法は、少なくとも1つのさらなる抗アレルギー性疾患治療薬を投与する工程をさらに含む。

【0015】

本明細書に記載されている本発明の一局面は、喘息またはアレルギー性疾患を予防するための方法であって、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む方法を提供する。任意の局面の一態様において、方法は、投与する前に、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を特定する工程をさらに含む。

10

【0016】

本明細書に記載されている本発明の別の局面は、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を特定するための方法であって、(a)対象から生物学的試料を取得する工程；(b)生物学的試料中のNotch4のレベルを測定する工程であって、基準レベルと比較してNotchのレベルが増加されれば、対象は、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある、該測定する工程；および(c)危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む方法を提供する。

20

【0017】

任意の局面の一態様において、Notch4のレベルは、基準レベルと比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍またはそれを上回って増加される。

【0018】

本明細書に記載されている本発明の一局面は、喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象の処置における治療薬の有効性を決定する方法であって、(a)治療薬の投与前に、喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象によって提供された試料中のNotch4発現または活性の第一のレベルを決定する工程；(b)治療薬の投与後に、患者によって提供された試料中のNotch4発現または活性の第二のレベルを決定する工程；ならびに(c)Notch4発現または活性の第一および第二のレベルを比較する工程であって、Notch4発現または活性の第二のレベルが第一のレベルより低ければ、治療薬は有効であると考えられ、Notch4発現の第二のレベルが第一のレベルと同一であるかまたは第一のレベルより高ければ、(b)で投与された治療薬は有効でない、該比較する工程を含む方法を提供する。一態様において、治療薬は、Notch4を阻害する作用物質である。

30

【0019】

定義

便宜のため、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において使用されるいくつかの用語および語句の意味が、以下に提供されている。別段の記載がなければ、または文脈上默示されていなければ、以下の用語および語句は、以下に提供される意味を含む。定義は、特定の態様を記載することを補助するために提供されており、技術の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるので、特許請求の範囲に記載された技術を限定することは意図されていない。別段の定義がなければ、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本技術が属する分野において通常の技術を有する者によって一般に理解されているものと同一の意味を有する。本分野における用語の用法と本明細書に提供されるその定義との間に明らかな齟齬が存在する場合には、本明細書内に提供された定義が優越するものとする。

40

【0020】

本明細書において使用される「処置する」、「処置」、「処置している」または「軽減」という用語は、その目的が、喘息またはアレルギー性疾患と関連する症状の進行または重症度を反転させ、緩和し、軽減し、抑制し、遅くし、または停止させることである治療的処置を表す。「処置する」という用語は、喘息またはアレルギー性疾患（例えば、炎症

50

性気道)の少なくとも1つの有害な作用または症候を低減または緩和することを含む。1つまたはそれを上回る症候または臨床マーカーが低減されれば、処置は一般に「有効」である。または、疾患の進行が低減され、または停止されれば、処置は「有効」である。すなわち、「処置」は、症候またはマーカーの改善だけではなく、処置の不存在下において予想されるものと比較して、症候の進行または悪化の停止または少なくとも減速も含む。有益なまたは所望される臨床的結果としては、1つもしくはそれを上回る症候の緩和、疾患の程度の減弱、疾患の安定化された(すなわち、悪化しない)状態、疾患の進行の遅延もしくは減速、疾患状態の軽減もしくは軽快、寛解(部分的かまたは完全かを問わない)および/または減少した死亡率が挙げられるが、これらに限定されず、検出可能かまたは検出不能かを問わない。疾患の「処置」という用語は、疾患の症候または副作用からの緩和(対症的処置を含む)を与えることも含む。

10

【0021】

本明細書において使用される「予防すること」または「予防」は、当方法(例えば、Notch4を阻害する作用物質または本明細書に記載されている組成物の投与など)の作用によって、疾患状態または障害(例えば、喘息またはアレルギー性疾患)が起こらない任意の方法を表す。一局面において、予防は、処置されていない対照において起こる程度まで疾患が確立されないことも意味し得ることが理解される。例えば、処置されていない対照と比べて、疾患の確立頻度の5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の低下が存在し得る。したがって、疾患の予防は、処置されていない対象(例えば、本明細書に記載されているとおりの複合微生物系を含む組成物で処置されていない対象)と比べて、対象が疾患を発症する可能性の低下を包含する。

20

【0022】

本明細書において使用される「投与すること」という用語は、対象への作用物質の少なくとも部分的な送達をもたらす方法または経路による、本明細書に開示されている治療薬(例えば、Notch4を阻害する作用物質)または薬学的組成物の対象中への配置を表す。本明細書に開示されている作用物質を含む薬学的組成物は、対象において有効な処置をもたらす任意の適切な経路によって投与することができる。

【0023】

本明細書において使用される「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長類、げっ歯類、家畜または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、例えば、チンパンジー、カニクイザル(cynomologous monkeys)、クモザルおよびマカク、例えば、アカゲザルが挙げられる。げっ歯類としては、例えば、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが挙げられる。家畜および狩猟動物としては、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えば、家ネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、トリ種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚、例えば、マス、ナマズおよびサケが挙げられる。いくつかの態様において、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。「個体」、「患者」および「対象」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

30

【0024】

好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、疾患、例えば、喘息またはアレルギー性疾患の動物モデルに相当する対象として有利に使用することができる。対象は、雄または雌であり得る。対象は、子供(例えば、18歳未満)または成体(例えば、18歳より大きい)であり得る。

40

【0025】

対象は、処置を必要とする疾患もしくは障害(例えば、喘息またはアレルギー性疾患)またはこのような疾患もしくは障害に関連する1つもしくはそれを上回る合併症に罹患しているもしくは有すると以前に診断されたもしくは特定された対象であって、必要に応じて、疾患もしくは障害または疾患もしくは障害に関連する1つもしくはそれを上回る合併

50

症に対する処置をすでに受けた対象であり得る。または、対象は、このような疾患もしくは障害（例えば、喘息またはアレルギー性疾患）または関連する合併症を有すると以前に診断されていない対象でもあり得る。例えば、対象は、疾患もしくは障害、もしくは疾患もしくは障害に関連する1つもしくはそれを上回る合併症に対する1つもしくはそれを上回るリスク因子を呈する対象またはリスク因子を呈しない対象であり得る。

【0026】

本明細書において使用される「作用物質」は、例えば、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの発現を阻害し、またはポリペプチドもしくはポリヌクレオチドに結合し、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの刺激を部分的にもしくは完全に遮断し、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性化を減少し、抑制し、遅延させ、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性を不活性化し、脱感作し、もしくは下方制御する、分子、タンパク質、ペプチド、抗体または核酸を表す。Notch4を阻害する作用物質は、例えば、ポリペプチドの発現、例えば、翻訳、翻訳後修飾、安定性、分解、もしくは核もしくは細胞質局在化、またはポリヌクレオチドの転写、転写後修飾、安定性もしくは分解を阻害し、またはポリペプチドもしくはポリヌクレオチドに結合し、部分的にまたは完全に、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの、刺激、DNA結合、転写因子活性もしくは酵素活性を遮断し、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性化を減少させ、抑制し、遅延し、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性を不活性化し、脱感作しもしくは下方制御する。作用物質は、直接的にまたは間接的に作用することができる。

10

【0027】

本明細書において使用される「作用物質」という用語は、小分子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、薬物、イオンなどの、ただしこれらに限定されない任意の化合物または物質を意味する。「作用物質」は、任意の化学物質、実体(entity)または部分(moiety)であり得、合成のおよび天然に存在するタンパク質性および非タンパク質性実体を含むが、これらに限定されない。いくつかの態様において、作用物質は、核酸、核酸類縁体、タンパク質、抗体、ペプチド、アブタマー、タンパク質、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、siRNA、リポタンパク質、アブタマーを含むがこれらに限定されない核酸、アミノ酸または炭水化物のオリゴマー、ならびにこれらの修飾および組み合わせなどである。ある態様において、作用物質は、化学的部分を有する小分子である。例えば、化学的部分としては、置換されていないまたは置換された、アルキル、芳香族またはヘテロシクリル部分が挙げられ、マクロライド、レプトマイシンならびにこれらの関連する天然生成物または類縁体が含まれる。化合物は、所望の活性および/もしくは特性を有することが公知であり得、または多様な化合物のライブラリーから選択することができる。

20

【0028】

作用物質は、1つまたはそれを上回る化学的クラスからの分子、例えば、有機金属分子が含まれ得る有機分子、無機分子、遺伝子配列などであり得る。作用物質は、1つもしくはそれを上回るタンパク質からの融合タンパク質、キメラタンパク質（例えば、関連する分子または異なる分子の機能的に重要な領域のドメイン交換または相同的組換え）、合成タンパク質または置換、欠失、挿入およびその他の変異を含むその他のタンパク質変異形でもあり得る。

30

【0029】

本明細書において使用される「小分子」という用語は、約10,000g/モル未満の分子量を有する、ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸類縁体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類縁体、アブタマー、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体、有機または無機化合物（例えば、複素有機化合物および有機金属化合物を含む）、約5,000g/モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、約1,000g/モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、約500g/モル未満の分子量を有する有機または無機化合物、ならびにこのような化合物の塩、エステルおよびその他の薬学的に許容される形態が含まれ得るが、これらに限定されない化学的作用物質を表す。

40

50

【0030】

本明細書において使用される「RNAi」という用語は、干渉RNAまたはRNA干渉を表す。RNAiは、mRNAを結合し、mRNAのプロセシングを阻害する、例えば、mRNA翻訳を阻害する、またはmRNA分解をもたらす分子による特異的なmRNAの破壊による選択的転写後遺伝子発現抑制の手段を表す。本明細書において使用される、「RNAi」という用語は、siRNA、shRNA、内在性マイクロRNAおよび人工マイクロRNAを含むがこれらに限定されない、任意の種類の干渉RNAを表す。例えば、RNAiは、そのRNAの下流プロセシングの機序に関わらず、siRNAとして以前に同定された配列を含む（すなわち、siRNAは、mRNAの切断をもたらすインビボプロセシングの特異的な方法を有すると考えられるが、このような配列は、本明細書に記載されている隣接配列と関連して、ベクター中に組み込まれることができる）。

10

【0031】

本明細書に記載されている方法および組成物は、Notch4のレベルおよび/または活性が阻害されることを必要とする。本明細書において使用される、「Notch4」とも称される神経原性遺伝子座ノッチホモログ4は、複数の上皮増殖因子様（EGF）反復からなる細胞外ドメインと複数の異なるドメインからなる細胞内ドメインとを含む、構造的な特徴を共有するファミリーのメンバーであるI型膜貫通タンパク質を表す。Notch4配列は、多数の種、例えば、ヒトNotch4（NCBI Gene ID:4855）ポリペプチド（例えば、NCBI Ref Seq NP_004548.3）およびmRNA（例えば、NCBI Ref Seq NM_004557.3）に対して公知である。Notch4は、天然に存在する変異形を含むヒトNotch4分子およびそれらの対立遺伝子を表すことができる。Notch4は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタなどのNotch4を表す。SEQ ID NO:1の核酸配列は、Notch4をコードする核酸配列を含む。

20

【0032】

「減少する」、「低下した」、「低下」または「阻害する」という用語は全て、本明細書において、統計学的に有意な量の減少を意味するために使用される。いくつかの態様において、「減少」、「低下した」、「低下」または「阻害する」は、典型的には、適切な対照（例えば、所定の処置の不存在）と比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%またはそれを上回る減少を含むことができる。本明細書において使用される「低下」または「阻害」は、基準レベルと比較して完全な阻害または低下を含しない。「完全な阻害」は、適切な対照と比較して100%の阻害である。

30

【0033】

「増加する」、「増大する」または「活性化する」という用語は全て、本明細書において、再現可能な統計学的に有意な量の増加を意味するために使用される。いくつかの態様において、「増加する」、「増大する」または「活性化する」という用語は、基準レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば、基準レベルと比較して、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%の増加もしくは最大100%および100%を含む増加、もしくは10~100%の間の任意の増加、または適切な対照と比較して、少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、20倍の増加、30倍の増加、40倍の増加、50倍の増加、6倍の増加、75倍の増加、100倍の増加など、もしくは2倍と10倍の間もしくはそれを上回る任意の増加を意味することができる。マーカーという文脈において、「増加」は、再現可能な統計学的に有意なこののようなレベルの増加である。

40

【0034】

本明細書において使用される「基準レベル」は、正常な、その他影響を受けていない細

50

胞集団または組織（例えば、健康な対象から得られた生物学的試料または事前の時点で対象から得られた生物学的試料、例えば、喘息もしくはアレルギー性疾患と診断される前の患者から得られた生物学的試料、または本明細書に開示された作用物質と接触されていない生物学的試料）を表す。

【0035】

本明細書において使用される「適切な対照」は、処置されていない、その他は同一の細胞または集団（例えば、非対照細胞と比較される、本明細書に記載されている作用物質を投与されなかった患者、または本明細書に記載された作用物質の一部のみによって投与された患者）を表す。

【0036】

「統計学的に有意な」または「有意に」という用語は、統計学的有意性を表し、一般的には、2標準偏差（2SD）またはそれより大きい差を意味する。

【0037】

本明細書において使用される「含んでいる」または「含む」という用語は、組成物、方法およびこの方法または組成物にとって不可欠である方法または組成物の各構成要素に関して使用されるが、不可欠であるか否かを問わない指定されていない要素の包含に対してなお開かれている。

【0038】

単数形の用語「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に反対を表さなければ、複数表記を含む。同様に、「または」という用語は、文脈が明確に反対を表さなければ、「および」を含むものとする。本開示の実施または検査において、本明細書に記載されたものと類似のまたは均等な方法および材料を使用することができるが、適切な方法および材料が以下に記載されている。「e.g.」という略号は、ラテン語の *exempli gratia* に由来し、本明細書において、非限定的な例を表すために使用される。したがって、「e.g.」という略号は、「例えば」という用語と同義である。

【0039】

本出願書類は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含有する。カラー図面を有する本特許出願公開の写しは、請求および必要な手数料の支払いに応じて、特許庁によって提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】図1A～1Gは、AMがナノ粒子を差異的に取り込み、UFPに応答してJag1を高度に発現することを示すデータを表す。図1Aおよび図1B：OVA + UFPによって誘発されたアレルギー性気道炎症に供されたマウス中の異なる肺細胞集団による蛍光ナノ粒子の取り込みのフローサイトメトリー分析。図1C：肺マクロファージ（AMおよびIM）、樹状細胞（DC）および好中球（Neu）間でのナノ粒子の分布の棒グラフ表示。図1Dおよび図1E：I14ra^{R576}またはI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Ahr^{+/+}マウスのいずれかから精製され、PBSまたはUFP（10 μg/ml）で処理された肺APCにおける、RT-PCRによって定量されたJag1転写物の相対的变化倍率（図1D）、およびJag1発現（図1E）のフローサイトメトリー分析。1Fおよび1G：図1、DおよびEに対して記載されたように、I14ra^{R576}またはI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/+}マウスのいずれかから精製され、PBSまたはUFPで処理された、肺APCにおける、Jag1転写物の相対的变化倍率（図1D）およびJag1発現（図1E）。結果は、2つの独立した実験の代表である。N=3マウス/群。事後テスト解析による片側分散分析（パネル図1C、図1Dおよび図1F）またはスチューデントの対応のない両側t検定（パネル図1F、CD11c⁺ DC群比較）によって、*p < .05; **p < .01; ***p < .001、****p < .0001。

【図2】図2A～2Bは、AMがJag1依存性様式で、アレルゲン特異的なCD4⁺T細胞によるTh細胞サイトカイン産生のUFP依存性上方制御を支えることを示すデータを表す。図2A：UFP（10 μg/mL）の存在下でOVA_{323～339}ペプチドを用いてパルスされたI14ra^{R576}またはI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/+}マウスから単離されたFACS精製されたAMとともに同時培養されたナイーブI14ra^{R576}CD4⁺D011.10⁺Rag2^{-/-}T細胞によるIL-4、IL-13、IL-17およびIFN-γ

10

20

30

40

50

トカイン産生の代表的なフローサイトメトリー分析。サイトカイン発現は、ゲートされた CD4⁺ Foxp3⁻ T細胞において分析した。図2B：単独でまたはUFPの存在下で、偽処理された（PBS）またはOVA_{323～339}ペプチドを用いてパルスされたAMとともに同時培養した際に、各サイトカインを発現するCD4⁺ Foxp3⁻ T細胞の頻度。結果は、3つの独立した実験の代表である。*P<.05、**P<.01、***P<.001および****P<.0001、事後テスト解析での両側分散分析。

【図3-1】図3A～3Jは、Jag1依存性様式で、UFPが、AM依存性のiTreg細胞分化をTh2/17細胞様表現型の方向に傾向させることを示すデータを表す。図3A：UFPの存在下で、OVA_{323～339}ペプチドを用いてパルスされた、I14ra^{R576}またはI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/−}マウスから単離されたFACS精製されたAMとともに、ナイーブI14ra^{R576}CD4⁺D011.10⁺Rag2^{−/−}T細胞を同時培養した際の、CD4⁺ Foxp3⁺ iTreg細胞の頻度ならびにそのIL-4、IL-13、IL-17およびIFN-[−]の発現の代表的なフローサイトメトリー分析。図3B：単独でまたはUFPの存在下で、偽処理された（PBS）またはOVA_{323～339}ペプチドを用いてパルスされたFoxp3⁺ iTreg細胞および各サイトカインを発現するその亜群の頻度。結果は、3つの独立した実験の代表である。**P<.01、***P<.001および****P<.0001、事後テスト解析での両側分散分析。

【図3-2】図3-1の説明を参照のこと。

【図3-3】図3-1の説明を参照のこと。

【図4-1】図4A～40は、Jag1の骨髄系列特異的な欠失がアレルギー性気道炎症のUFP誘発性増悪に対する保護を与えることを示すデータを表す。図4A：PBS、OVAまたはOVA+UFP群中のI14ra^{R576}またはI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/−}マウスから単離された肺の代表的なPAS染色切片（200倍拡大）。図4B：図4Aに記載されているマウス群から単離された肺組織における炎症スコア。図4C～4G：メタコリンに応答した気道応答性亢進（図4C）、気管支肺胞洗浄液中の好酸球（図4D）およびT細胞（図4E）の絶対数、図4Aに記載されているマウス群の血清中の総（図4F）およびOVA特異的（図4G）レベル。4H～4K：図4Aに記載されているマウス群中の、IL-4（図4H）、IL13（図4I）、IL-17（図4J）およびIFN-[−]（図4K）を分泌する肺Foxp3[−]CD4⁺T細胞の絶対数。4L～4O：パネル図4Aに記載されているマウス群中の、IL-4（図4L）、IL13（図4M）、IL-17（図4N）およびIFN-[−]（図4O）を分泌する肺Foxp3⁺CD4⁺Treg細胞の絶対数。結果は、2つの独立した実験の代表である。N=5マウス/群。事後テスト解析での両側分散分析によって、*p<0.05、**<0.01、***<0.001、****<0.0001。

【図4-2】図4-1の説明を参照のこと。

【図4-3】図4-1の説明を参照のこと。

【図5-1】図5A～5Oは、I14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/−}マウスにおいて、Jag1が十分なAMが、UFP媒介性アレルギー性気道炎症をレスキューすることを示すデータを表す。図5A：偽処理された（PBS）またはOVA323～339ペプチド（OVA）を単独もしくはUFPと一緒に（OVA+UFP）負荷されたI14ra^{R576}またはI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/−}マウスから単離されたAMを気管内に補充されたI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/−}マウスの肺組織の代表的なPAS染色切片。図5B：図5Aに記載されているマウスの肺組織の炎症スコア。C～G：気道応答性亢進（図5C）、気管支肺胞洗浄液中の好酸球（図5D）およびT細胞（図5E）の数、図5Aに記載されているマウスの血清中の総（図5F）およびOVA特異的（図5G）レベル。5H～5K：図5Aに記載されているマウスの気管支肺胞洗浄液中の、IL-4（図5H）、IL13（図5I）、IL-17（図5J）およびIFN-[−]（図5K）を分泌する肺Foxp3[−]CD4⁺T細胞の数。5L～5O：図5Aに記載されているマウスの気管支肺胞洗浄液中の、IL-4（図5L）、IL13（図5M）、IL-17（図5N）およびIFN-[−]（図5O）を分泌する肺Foxp3⁺CD4⁺Treg細胞の数。結果は、3つの独立した実験の代表である。N=7～12マウス/群。ボンフェローニ事後テスト解析での両側分散分析によって、*p<0.05、**<0.01、***<0.001および****<0.0001。n.s.：有意でない。

【図5-2】図5-1の説明を参照のこと。

【図5-3】図5-1の説明を参照のこと。

10

20

30

40

50

【図6】図6A～6Bは、AMがNotch4依存性様式で、アレルゲン特異的なCD4⁺T細胞によるTh細胞サイトカイン産生のUFP依存性上方制御を支えることを示すデータを表す。図6A：UFP(10 μg/mL)の存在下でOVA_{323～339}ペプチドを用いてパルスされたI4ra^{R576}またはI14ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/−}マウスから単離されたFACS精製されたAMとともに同時培養されたナイーブI14ra^{R576}CD4⁺D011.10⁺Rag2^{−/−}T細胞によるIL-4、IL-13およびIL-17サイトカイン産生の代表的なフローサイトメトリー分析。示されているように、アイソタイプ対照(Iso)Abまたは抗Notch4 mAbのいずれかで同時培養物を処理し、ゲートされたCD4⁺Foxp3[−]T細胞に対して、サイトカイン分析を行った。図6B：偽処理された(PBS)またはOVA_{323～339}ペプチドを単独でもしくはUFP(10 μg/mL)と組み合わせて用いてパルスされたAMとともに同時培養した際に、各サイトカインを発現するT細胞の頻度。示されているように、抗Notch4 mAbまたはアイソタイプ対照Abを添加した。結果は、3つの独立した実験の代表である。*P < .05、**P < .01、***P < .001および****P < .0001、事後テスト解析での両側分散分析。

【図7-1】図7A～7Pは、Notch4依存性様式で、UFPがアレルギー性気道炎症を増強することを示すデータを表す。図7A：アイソタイプ対照(Iso)Abまたは抗Notch4 mAbの存在下で、OVAを単独でまたはUFPと一緒に用いて感作および攻撃誘発されたI14ra^{R576}マウスから単離された肺組織の代表的なPAS染色。図7B：図7Aに記載されているマウス群の肺組織における炎症スコア。図7C～7H：メタコリンに応答した気道応答性亢進(図7C)、気管支肺胞洗浄液中の好酸球(図7D)、T細胞(図7E)および好中球(図7F)の絶対数、図7Aに記載されているマウス群の血清中の総(図7G)およびOVA特異的(図7H)レベル。図7I～7L：図7Aに記載されているマウス群中の、IL-4(図7I)、IL13(図7J)、IL-17(図7K)およびIFN-γ(図7L)を分泌する肺Foxp3⁺CD4⁺T細胞の絶対数。図7M～7P：パネル図7Aに記載されているマウス群中の、IL-4(図7L)、IL13(図7M)、IL-17(図7N)およびIFN-γ(図7O)を分泌する肺Foxp3⁺CD4⁺Treg細胞の絶対数。結果は、2つの独立した実験の代表である。N=5マウス/群。事後テスト解析での両側分散分析によって、*p < 0.05、** < 0.01、*** < 0.001、**** < 0.0001。

【図7-2】図7-1の説明を参照のこと。

【図7-3】図7-1の説明を参照のこと。

【図8】図8A～8Gは、偽処理(PBS)、OVAまたはOVA+UFPによって誘発されたアレルギー性気道炎症に供されたマウス中の異なる肺細胞部分集団における蛍光ナノビーズ(「Fluoresbrite YG」)の配置を示すデータを表す。OVAでマウスを感作し、次いで、PBS(偽処理)、OVAまたはOVA+UFPで攻撃誘発した。全ての攻撃誘発群において、蛍光ナノビーズは、鼻腔内滴下注入によって導入された。図8Aおよび8B：アレルギー性気道炎症に供されたマウスにおける、CD45⁺肺細胞集団(図E1、A)による蛍光ナノ粒子の取り込みおよびマーカーF4/80とCD11c(図E1、A)によって、続いて、CD11bとCD11c(図E1、B)によって分離された肺マクロファージ集団における蛍光ナノ粒子の取り込みのフローサイトメトリー分析。図8C～8G：表記マーカーおよび各ゲートによって順次分離されたCD45⁺F4/80[−]細胞画分中のナノビーズの分布。結果は、2つの独立した実験の代表である。N=3マウス/群/実験。

【図9】図9A～9Dは、Fluoresbrite YGナノビーズが、AMにおいてJag1発現を誘導しないこと、またはマウス中のアレルギー性気道炎症に影響を及ぼさないことを示すデータを表す。図9A：24時間インビトロで培養され、PBS(偽処理)、Fluoresbrite YGナノビーズまたはUFP(それぞれ、10 μg/mLで)のいずれかで処理された、細胞分別されたAMにおけるJag1発現のフローサイトメトリー分析。図9B～9D：アレルギー性気道炎症のOVAモデルにおける、蛍光ナノビーズ「Fluoresbrite YG」の配置および効果。マウスをOVAで感作し、次いで、PBS(偽処理)またはOVAで攻撃誘発した。別個のOVA感作および攻撃誘発された群における鼻腔内滴下注入によって、Fluoresbrite YGナノビーズを導入した。図9B：アレルギー性気道炎症に供されたマウスにおける、CD45⁺肺細胞集団によるFluoresbrite YGナノビーズの取り込み、およびマーカーF4/80とCD11c(続いて、CD11bとCD11c)によって分離された肺マクロファージ集団におけるFluoresbrite YGナノビーズの取り込みの、フ

10

20

30

40

50

ローサイトメトリー分析。図9C、9D：各マウス群における、気道応答性亢進（RI）ならびに肺好酸球およびリンパ球数。N = 5マウス/群。

【図10-1】図10A～10Cは、OVA + UFPによって誘発されたアレルギー性気道炎症に供されたマウスから得た、蛍光ナノ粒子を取り込む肺マクロファージの性質決定を示すデータを表す。図10Aおよび10B：示されているように、マーカーCD64、CD38、Egr2およびMHCクラスII I-A^dに対して、CD45⁺ F4/80⁺ CD11b^{Int}CD11c^{Hi}AM細胞（図E2、A）およびCD45⁺ F4/80⁺ CD11b^{Hi}CD11c^{Int}IM細胞（図9B）を染色した。結果は、2つの独立した実験の代表であり、N = 3/群/実験である。図10C：10 μg/mlのUFPで、48時間、インビトロで処理された、細胞分別されたAMによる、IL-6、IL-10、IL-12 p40サブユニット、TNF およびCCL17の产生。N = 5の独立した培養物/サイトカインアッセイ。スチューデントの両側t検定によって、p < * * * * < 0.0001。

10

【図10-2】図10-1の説明を参照のこと。

【図11】図11A～11Bは、その他は非炎症性の条件下で（アレルギー性感作なし）の鼻腔内滴下注入後のマウス中の異なる肺細胞部分集団における蛍光微粒子の配置を示すデータを表す。図11A：CD45⁺ 肺細胞集団による蛍光微粒子の取り込み、およびマーカーF4/80とCD11cによって、続いて、CD11bとCD11cによって分離された肺マクロファージ集団における蛍光微粒子の取り込みの、フローサイトメトリー分析。図11B：表記マーカーおよび各ゲートによって順次分離されたCD45⁺ F4/80⁻細胞画分中の微粒子の取り込みのフローサイトメトリー分析。結果は、2つの独立した実験の代表である。N = 3マウス/群/実験。

【図12】図12A～12Bは、BM由来のマクロファージにおいて、UFPがJag1発現を上方制御することを示すデータを表す。図12A：II4ra^{R576}またはII4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Ahr1^{-/-}マウスのいずれかから調製されPBS、UFP（10 μg/ml）、6-FICZ（300nM）またはCB（10 μg/ml）のいずれかでインビトロで処置されたBM由来マクロファージにおけるJag1発現のフローサイトメトリー分析。図12B：PBSまたはOVAのいずれかで感作されOVAまたはOVA + UFPで攻撃誘発されたII4ra^{R576}またはII4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Ahr1^{-/-}マウスの肺中の、AM、IMおよびDCにおけるJag1発現のフローサイトメトリー分析。

20

【図13】図13A～13Dは、Jag1依存性様式で、AMがアレルゲン特異的なCD4⁺ T細胞によるTh細胞サイトカイン産生のUFP依存性上方制御を支えることを示すデータを表す。図13A～13D：偽パルスされた（PBS）またはOVA_{323～339}ペプチドを単独（OVA）でもしくはUFPの存在下（OVA + UFP）で用いてパルスされたII4ra^{R576}またはII4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{-/-}マウスから単離されたFACS精製されたAMとともに同時に培養されたナイーブII4ra^{R576}CD4⁺DO11.10⁺Rag2^{-/-}T細胞によるIL-4（図12A）、IL-13（図12B）、IL-17（図12C）およびIFN-（図12D）サイトカイン産生の代表的なフローサイトメトリー分析。

30

【図14-1】図14A～14Mは、Jag1の骨髄系列特異的な欠失は、DMによって誘発されたアレルギー性気道炎症のUFPによる増悪に対する保護を付与することを示すデータを表す。図14A：PBS、DMまたはDM + UFP群中のII4ra^{R576}またはII4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{-/-}マウスから単離された肺の代表的な過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色された切片。図14B：図E6、Aに記載されているマウス群から単離された肺組織中の炎症スコア。図14C～14E：図13Aに記載されているマウス群における、気管支肺胞洗浄液中の好酸球（図E6、C）およびT細胞（図E6、D）の絶対数ならびに血清総IgE濃度（図E6、E）。図14F～14I：図13Aに記載されているマウス群中の、IL-4（図13F）、IL13（図13G）、IL-17（図13H）およびIFN-（図13I）を分泌する肺Foxp3⁻CD4⁺T細胞の絶対数。図14J～14M：パネル図3Aに記載されているマウス群中の、IL-4（図13J）、IL13（図13K）、IL-17（図13L）およびIFN-（図13M）を分泌する肺Foxp3⁺CD4⁺Treg細胞の絶対数。結果は、2つの独立した実験の代表である。N = 5マウス/群。事後テスト解析での両側分散分析によって、* p < 0.05、** < 0.01、*** < 0.001、**** < 0.0001。

40

【図14-2】図14-1の説明を参照のこと。

【図15-1】図15A～15Nは、Ahrの骨髄系列特異的な欠失は、アレルギー性気道炎症のUFP誘発性増悪に対する保護を与えることを示すデータを表す。図15A：PBS、OVAまたはOVA + UFP群中のII4ra^{R576}またはII4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Ahr1^{-/-}マウスから単離された肺の代表

50

的な過ヨウ素酸シップ (PAS) 染色された切片。図15B：図14Aに記載されているマウス群から単離された肺組織中の炎症スコア。図15C～15F：図14Aに記載されているマウス群における、気管支肺胞洗浄液中の好酸球 (図14C) およびT細胞 (図14D) の絶対数、ならびに血清総 (図14E) およびOVA特異的 (図14F) IgE濃度。図15G～15J：図14Aに記載されているマウス群における、IL-4 (図14G)、IL13 (図14H)、IL-17 (図14I) およびIFN- γ (図14J) を分泌する肺Foxp3 $^{-}$ CD4 $^{+}$ T細胞の絶対数。図15K～15N：パネル図14Aに記載されているマウス群中の、IL-4 (図14K)、IL13 (図14L)、IL-17 (図14M) およびIFN- γ (図14N) を分泌する肺Foxp3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Treg細胞の絶対数。結果は、2つの独立した実験の代表である。N=5マウス/群。事後テスト解析での両側分散分析によって、*p<0.05、**<0.01、***<0.001、****<0.0001。

10

【図15-2】図15-1の説明を参照のこと。

【図16】図16A～16Fは、CD11c Cre によって媒介されるJag1の欠失は、DMによって誘発されたアレルギー性気道炎症のUFPによる増悪を防がないことを示すデータを表す。図16A：PBS、OVAまたはOVA+UFP群中のI14ra R^{576} またはI14ra R^{576} CD11c Cre Jag1 $^{+/+}$ マウスから単離された肺の代表的な過ヨウ素酸シップ (PAS) 染色された切片。図16B：図15Aに記載されているマウス群から単離された肺組織における炎症スコア。図16C～16F：図15Aに記載されているマウス群における、気管支肺胞洗浄液中の好酸球 (図15C) およびT細胞 (図15D) の絶対数ならびに血清総IgEおよびOVA特異的IgE濃度 (図15Eおよび15F)。結果は、2つの独立した実験の代表である。N=5マウス/群。事後テスト解析での両側分散分析によって、*p<0.05、**<0.01、***<0.001、****<0.0001。

20

【図17-1】図17A～17Lは、I14ra R^{576} Lyz2 Cre Jag1 $^{+/+}$ マウスにおいて、jag1が十分なIMおよびDCが、UFP媒介性アレルギー性気道炎症をレスキューできないことを示すデータを表す。図17A～17F：IM移植；図17G～17L：DC移植。メタコリンに応答した気道応答性亢進 (図16Aおよび16G)、好酸球の絶対数 (図16Bおよび16H)、OVA特異的血清IgE抗体濃度 (図5Cおよび5I)、ならびに肺組織CD4 $^{+}$ T細胞 (図5Dおよび5J)、IL13およびIL-17を分泌する肺CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{-}$ T細胞の絶対数 (図5Eおよび5K)、IL13およびIL-17を分泌するFoxp3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ Treg細胞の絶対数 (図5Fおよび5L)。N=4マウス/群。ポンフェローニ事後テスト解析での両側分散分析によって、*p<0.05、**<0.01、***<0.001、****<0.0001。

20

【図17-2】図17-1の説明を参照のこと。

30

【図18】図18は、アレルギー性気道炎症中のCD4 $^{+}$ T細胞上でのNotch受容体発現のフローサイトメトリー分析を示すデータを表す。左パネル：PBS (偽処理) もしくはOVAで感作され、次いで、OVAで攻撃誘発された、またはOVAで感作され、OVAおよびUFP (OVA+UFP) で攻撃誘発されたマウスの肺中のCD4 $^{+}$ T細胞上でのNotch1～4染色の代表的なフローサイトメトリー分析。右パネル：各Notch受容体を発現するCD4 $^{+}$ T細胞の頻度。結果は、2つの独立した実験の代表である；n=4マウス/群。***P<.001および****P<.0001、事後テスト解析での片側分散分析。

【図19】図19A～19Dは、OVA_{323～339}+UFP処理されたAMによって誘導されたアレルゲン特異的CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{-}$ T細胞によるTh細胞サイトカイン産生の上方制御に対する、中和抗Notch1～4mAb処理の効果を示すデータを表す。図19A～19D：表記のとおり、偽パルスされた (PBS) またはOVA_{323～339}ペプチドを単独 (OVA) でもしくはUFPの存在下 (OVA+UFP) で用いてパルスされたI14ra R^{576} またはI14ra R^{576} Lyz2 Cre Jag1 $^{+/+}$ マウスから単離されたFACS精製されたAMとともに同時培養されたナイーブI14ra R^{576} CD4 $^{+}$ D011.10 $^{+}$ Rag2 $^{-/-}$ T細胞によるIL-4 (図16A)、IL-13 (図16B)、IL-17 (図16C) およびIFN- γ (図16D) サイトカイン産生の棒グラフ分布。示されているように、対照または抗Notch Abを添加した。結果は、2つの独立した実験から得られた6つの反復の平均+平均値の標準誤差を表す。事後テスト解析での片側分散分析によって、**<0.01、***<0.001、****<0.0001。

40

【図20】図20A～20Bは、アレルゲン+UFPを用いてパルスされたAMとの同時培養の際に誘導されたアレルゲン特異的CD4 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ Treg細胞によるTh細胞サイトカイン産生の上方制御に対する、中和抗Notch4 mAb処理の効果を示すデータを表す。図20A：I14ra R^{576} また

50

は $Il4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{-/-}$ マウスから単離され $OVA_{323-339}$ および UFP (10 μ g/mL) を用いてパルスされた FACS 精製された AM との、 $Il4ra^{R576}CD4^+D011.10^+Rag2^{-/-}$ ナイーブ T 細胞の同時培養の際に誘導された $CD4^+Foxp3^+Treg$ 細胞による IL-4、IL-13 および IL-17 サイトカイン産生の代表的フローサイトメトリー分析。示されているように、アイソタイプ対照 Ab (Iso Ab) または抗 Notch4 mAb のいずれかで同時培養物を処理し、ゲートされた $CD4^+Foxp3^+$ T 細胞に対して、サイトカイン分析を行った。図 20B：偽処理された (PBS) または $OVA_{323-339}$ ペプチドを単独でもしくは UFP (10 μ g/mL) と組み合わせて用いてパルスされた AM とともに同時培養した際に、各サイトカインを発現する Treg 細胞の頻度。示されているとおり、抗 Notch4 mAb またはアイソタイプ対照 Ab を添加した。結果は、3 つの独立した実験の代表である。* $P < .05$ 、** $P < .01$ 、*** $P < .001$ および **** $P < .0001$ 10 、事後テスト解析での両側分散分析。

【図 21】図 21A～21C は、中和抗 Notch4 mAb での処理による、アレルゲン + UFP で刺激された T 細胞における Notch 標的遺伝子発現の阻害を示すデータを表す。D011.10⁺ T 細胞を、偽処理 (PBS + 対照 Ab; 白い棒) するか、または対照 Ab (黒い棒) もしくは抗 Notch4 mAb (灰色の棒) のいずれかの存在下で $OVA_{323-339}$ ペプチド + UFP を用いてパルスされた AM と同時培養し、次いで、各標的遺伝子の転写物の発現について、リアルタイム PCR によってアッセイを行った。図 21A : Hes1 発現。図 21B : Hey1 発現。図 21C : Nrarp 発現 $N = 4$ 培養 / 群。事後テスト解析での片側分散分析によって、* < 0.05 、*** < 0.001 。

【図 22-1】図 22A～22H は、Treg 細胞における Notch シグナル伝達の妨害は、アレルギー性気道炎症を防ぐことを示すデータを表す。図 22A : $Foxp3^{GFP Cre}$ (対照) マウスと Treg 細胞特異的な表記 Notch 成分の欠失を有するマウスの肺切片の PAS 染色を比較。図 22B : PBS / OVA または OVA / OVA で免疫された / 攻撃誘発された表記マウス系統中の AHR。22C : 総 IgE および OVA 特異的 IgE。図 22D : 肺組織好酸球および好中球。22E～22H : 各マウス群の肺組織における、 $Foxp3^+Treg$ 細胞 (図 22E) 、ならびに $IL4^+$ および $IL-13^+$ (図 22F) 、 $IL-17^+$ (図 22G) および $IFN-\gamma^+CD4^+T$ 細胞の頻度。 $N = 6 \sim 12$ 反復 / 群 (3 つの実験から得られた)。両側 ANOVA およびボンフェローニ事後テスト解析によって、* $p < 0.05$ 、** < 0.01 、*** < 0.001 、**** < 0.0001 。 20

【図 22-2】図 22-1 の説明を参照のこと。

【図 23】図 23 は、Treg 細胞における Notch シグナル伝達の能力を奪うことは、UFP によって誘発されたアレルギー性気道炎症の増悪を防ぐことを示すデータを表す。明記されているように PBS-OVA、OVA-OVA または OVA-OVA + UFP で感作および攻撃誘発された表記マウス群中の AHR。2 つの独立した実験から得られた 5～6 匹のマウスを代表する結果。両側分散分析およびボンフェローニ事後テスト解析によって、* $p < 0.05$ 、** < 0.01 、*** < 0.001 。

【図 24】図 24A～24C は、アレルギー性気道炎症において、アレルゲンおよび UFP によって、Notch4 発現が肺 Treg 細胞上で大幅に上方制御されることを示すデータを表す。図 24A : 肺 $CD4^+Tconv$ および Treg 細胞における Notch1～4 mRNA 発現。PBS (偽処理) または OVA のいずれかで感作され、次いで、1% の噴霧された OVA を単独でまたは UFP の鼻腔内滴下注入 (10 μ g / 日 $\times 3$) と一緒に用いて 1 日 1 回 3 日間攻撃誘発された $Foxp3^{YFP Cre}$ マウスの肺からの細胞分別によって、 $CD4^+Foxp3^+ (YFP^+)$ および $CD4^+Foxp3^- (YFP^-)$ 細胞を単離した。リアルタイム PCR によって、Notch1/4 mRNA 転写物の発現を分析し、アクチン転写物に対して標準化した。図 24B は、偽処理 (PBS) 、OVA または OVA + UFP によって誘発されたアレルギー性気道炎症に供されたマウス中の肺 Treg および Tconv 細胞 (それぞれ、上列および下例) 上での Notch4 発現のフローサイトメトリー分析を示すデータを表す。図 24C : 図 24B に示されている異なる細胞群における Notch4 発現のグラフ表示。事後テスト解析での片側分散分析によって、*** $P < 0.001$ および **** $P < 0.0001$ 。 40

【図 25-1】図 25A～25H は、Treg 細胞特異的 Notch4 の欠失がアレルゲンおよび UFP によって誘発されたアレルギー性気道炎症に対する防御を与えることを示すデータを表す。25A : PBS、OVA または OVA + UFP 群中の $Foxp3^{YFP Cre}$ または $Foxp3^{YFP Cre}Notch4^{-/-}$ マウスから単離された肺の代表的な PAS 染色切片 (200 倍拡大)。図 25B : パネル A に記載されているマ

ウス群から単離された肺組織における炎症スコア。25C～25G：メタコリンに応答した気道応答性亢進（図25C）、好酸球の絶対数（図25D）、血清OVA特異的IgEレベル（図25E）、肺Foxp3⁻CD4⁺T細胞（図25F）、IL-13（図25G）およびIL-17（図25H）を分泌する肺Foxp3⁻CD4⁺T細胞の絶対数。結果は、2つの独立した実験の代表である。N=5マウス/群。事後テスト解析での両側分散分析によって、p^{**} < 0.01、^{***} < 0.001、^{****} < 0.0001。

【図25-2】図25-1の説明を参照のこと。

【図26-1】図26A～26Dは、喘息の対象の循環制御性T細胞において増加したNotch4発現が疾患重症度のバイオマーカーであることを示すデータを表す。図26A～26B：対照対象における、ならびに軽度持続性、中度持続性および重度の喘息を有する対象における、循環CD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞およびCD4⁺Foxp3-Tエフェクター細胞におけるNotch4発現。図26C～26D：Notch4を発現する細胞の細胞頻度ならびにそれぞれの対象群中のCD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞およびCD4⁺Foxp3-Tエフェクター細胞におけるNotch4発現の平均蛍光強度（MFI）。N=6～10対象/群。事後テスト解析での片側分散分析によって、*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001。

10

【図26-2】図26-1の説明を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0041】

詳細な説明

本明細書に記載されている本発明は、Notch4シグナル伝達経路の活性化が、喘息を引き起こすTヘルパー（Th）細胞に分化するように細胞を誘導するのに十分であったという発見に一部基づいている。肺由来の抗原提示細胞およびアレルゲン特異的T細胞を使用するインビトロ細胞培養アッセイならびにアレルギー性気道炎症のマウスモデルを用いて、肺の肺胞マクロファージ（AM）が、気道炎症を促進する上でUFPの主要な細胞標的として見出された。

20

【0042】

AMにおけるJagged1（Jag1）発現のアリール炭化水素受容体（AhR）依存性誘導は、UFPによるアレルギー性気道炎症の増強にとって必要かつ十分であった。UFPは、Jag1およびNotch4依存性様式で、アレルゲン特異的T細胞のTh2およびTh17細胞分化を促進した。本明細書に提示されているデータは、抗Notch4抗体でのマウスの処置が、Th細胞の分化を抑えることによって、UFPによって誘発されるアレルギー性気道炎症の増悪を抑止することを具体的に示す。本明細書では、抗Notch4抗体が、喘息およびアレルギー性疾患などの、環境的刺激物質（例えば、超微粒子）への曝露によって引き起こされる疾患を処置およびまたは予防する上で有用であることが具体的に想定される。

30

【0043】

さらに、（1）喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を特定するため、および（2）喘息またはアレルギー性疾患についての有効性を測定するための方法が本明細書に開示されている。これらの方法は、Notch4発現および/または活性の豊富さは疾患または障害の有病率と対応するという発見を一部基礎とする。様々な方法における、喘息またはアレルギー性疾患に対する指標としてのNotch4発現または活性の使用が、本明細書において具体的に想定される。

40

【0044】

Notch4

Notchシグナル伝達経路は、物理的に隣接する細胞間の相互作用を制御する進化的に保存された細胞間シグナル伝達経路である。Notchシグナル伝達は、複数の細胞運命の決定を制御する；各Notchファミリーメンバーは、様々な発達の過程において役割を果たす。哺乳動物において、Notchファミリーは、4つのNotch受容体（Notch1～Notch4）および5つのリガンド [デルタ様リガンド1 (DLL1) 、 DLL3、 DLL4、 Jagged (Jag) 1およびJag2] から構成される。隣接する細胞上でJaggedまたはデルタ様リガンドに結合すると、2つの連続するタンパク質分解現象がNotchの細胞内ドメイン（NICD）を放出し、核へのその転位を

50

可能にする。そこで、NICDは、MAML1-MAML3結合を通じて、DNA結合因子RBP-Jを転写抑制因子から転写活性化因子へと転換する¹。

【0045】

notchタンパク質は、トランス-ゴルジネットワークにおいて切断され、次いで、ヘテロ二量体として、細胞表面上に提示される。このタンパク質は、膜結合されたリガンドに対する受容体として機能し、血管、腎臓および肝臓の発育において役割を果たし得る。

【0046】

SEQ ID NO:1は、Notch4をコードする核酸配列を含有する。

a tgcaaaaaa ttcaactgctg ctgctgctgc tgctgctgct
 gctgtatgt gtctcagtgg tcagacccag aaggctgctg tgtggagtt tcccagaacc
 ctgtgccaat ggaggcacct gcctgagcct gtctctggga caagggacct gccagtgtgc
 ccctggcttc ctgggtgaga cgtccagtt tcctgacccc tgccagaacg cccagctctg
 caaaaatgga ggcagctgcc aagccctgct tcccgcctccc cttagggctcc ccagctctcc
 ctctccattg acacccagct tcttgcac ttgcctccct ggcttcactg gtgagagatg
 ccaggccaag cttgaagacc cttgtccctcc ctccctctgt tccaaaaggg gcccgtgcca
 catccaggcc tcgggcccggcc cacagtgtc ctgcattgcct ggatggacag gtgagcagtg
 ccagcttcgg gacttctgtt cagccaaaccc atgtgttaat ggaggggtgt gtctggccac
 ataccccccag atccagtgcc actgcccacc gggcttcgag ggccatgcct gtgaacgtga
 tgtcaacgag tgcttccagg aaccaggacc ctgccccaaa ggacacccctt gccataacac
 cctgggctcc ttccagtgcc tctgcctctgt ggggcaggag ggtccacggtt gtgagctg
 ggcaggaccc tgccctccta gggctgttc gaatgggggc acctgccagc tgatgccaga
 gaaagactcc acctttcacc tctgcctctg tcccccaggt ttcataggcc cagactgtga
 ggtgaatcca gacaactgtg tcagccacca gtgtcagaat gggggcactt gccaggatgg
 gctggacacc tacacctgcc tctgcccaga aacctggaca ggctggact gctccgaaga
 tgtggatgag tgtgagaccc agggcccccc tcactgcaga aacggggca cctgcccaga
 ctctgcttgt agctttcact gcgtgtgtgt gagtggctgg ggcggcacaa gctgtgagga
 gaacctggat gactgttattg ctgcacccctg tgccccggga tccacctgca ttgaccgggt
 gggcttttc tcctgcctct gcccacccctgg acgcacagaga ctccctgtgcc acttggaaaga
 catgtgtctg agccagccgt gccatggggta tgcccaatgc agcaccaacc ccctcacagg
 ctccacactc tgcctgtgtc agcctggcta ttggggccccc acctgccacc aggacctg
 cgagtgctg atggcccagc aaggcccaag tccctgtgaa catggcggtt cctgcctcaa
 cactoctggc tccttcaact gcctctgtcc acctggctac acaggctccc gttgtgaggc
 tgatcacaat gagtgcctct cccagccctg ccacccagga agcacctgtc tggacctact
 tgccaccccttc cactgcctct gcccggcagg cttagaaggg cagctctgtg aggtggagac
 caacgagtgt gcctcagctc cctgcctgaa ccacgcggat tgccatgacc tgctcaacgg
 ctcccaactgc atctgcctgc ctggattctc cggcacccga tgtgaggagg atatcgatga
 gtgcagaagc tctccctgtg ccaatggggc gcaatggccag gaccacccctg gagccttcca
 ctgcaagtgt ctcccaggct ttgaaggccc acgctgtcaa acagagggtgg atgagtgct
 gagtgaccca tgtccctgtg gagccagctg cttgtatctt ccaggagccct tctttgcct
 ctgccccctt gtttcacag gccagctctg tgagggtccc ctgtgtgtc ccaacccctg
 ccagcccaag cagatatgta aggaccagaa agacaaggcc aactgcctct gtcctgtatgg
 aaggccctggc tgtccccac ctgaggacaa ctgcacccctgc caccacggc actgccagag
 atccctatgt gtgtgtgacg tgggtggac gggccagag tgtgaggcag agctaggggg
 ctgcacccctgc cccatggggg gacccctgc acacaggacc cacctgttagt gaggagatga
 ctcaggccca tgtctcaatg gcggctctg caacccttagc cctggaggct actactgcac
 ctgcctccca agccacacag ggcccccagtg ccaaaccagc actgactact gtgtgtctgc

10

20

30

40

cccgtgcttc aatgggggta cctgtgtgaa caggcctggc accttctcct gcctctgtgc
 catgggcttc cagggcccgcc gctgtgaggg aaagctccgc cccagctgtg cagacagccc
 ctgttaggaat agggcaacct gccaggacag ccctcagggc ccccgctgcc tctgccccac
 tggctacacc ggaggcagct gccagactct gatggactta tgtgcccaga agccctgccc
 acgcaattcc cactgcctcc agactggcc ctcctccac tgcttgcctc tccagggatg
 gaccgggcct ctctgcaacc ttccactgtc ctccgtccag aaggctgcac tgagccaagg
 catagacgtc tcttccctt gccacaatgg aggccctctgt gtcgacagcg gcccctcccta
 tttctgccac tgcccccctg gattccaagg cagcctgtgc caggatcacg tgaacccatg
 tgagtccagg ctttgccaga acggggccac ctgcatggcc cagcccaatg ggtatctctg
 ccagtggtgcc ccaggctacg atggacagaa ctgctcaaag gaactcgatg cttgtcagtc
 ccaaccctgt cacaaccatg gaacctgtac tcccaaacct ggaggattcc actgtgcctg
 ccctccaggc tttgtggggc tacgctgtga gggagacgtg gacgagtgtc tggaccagcc
 ctgccacccc acaggcactg cagcctgccca ctctctggcc aatgccttct actgcccagt
 tctgcctgga cacacaggcc agtgggtgtga ggtggagata gaccctgcc acagccaacc
 ctgcttcat ggagggaccc gtgaggccac agcaggatca cccctgggtt tcatctgcc
 ctgccccaaag gttttgaag gccccacctg cagccacagg gccccttct gcggcttcca
 tcactgcccac cacggaggcc tggctctgcc ctccccctaag ccaggcttcc caccacgctg
 tgcctgcctc agtggctatg ggggtccctga ctgcctgacc ccaccagctc ctaaaggctg
 tggccctccc tccccatgcc tatacatgg cagctgctca gagaccacgg gcttgggggg
 cccaggctt ctagtgcctt gcccctcacag ctctccaggc ccccggtgtc agaaacccgg
 agccaagggg tggagggca gaagtggaga tggggcctgc gatgctggct gcagtggccc
 gggagggaaac tgggatggag gggactgctc tctggagatc ccagaccctt ggaaggggctg
 cccctccac tctcggtgtc ggcttctt ccgggacggg cagtgcacc cacaatgtga
 ctctgaagag tggctgtttt atggctacga ctgtgagacc cctccagccct gcactccagc
 ctatgaccag tactgccatg atcaacttcca caacgggcac tggagaaag gctgcaacac
 tgcagagtgt ggctggatg gaggtgactg caggcctgaa gatggggacc cagagtgggg
 gcccctccctg gcccctgctgg tggactgag ccccccagcc ctagaccgc agctgtttgc
 cctggccccc gtgctgtccc tgactctgag ggtaggactc tgggttaagga aggatcgatg
 tggcagggac atgggttacc cctatcctgg ggcccgggct gaagaaaagc taggaggaac
 tcgggacccc acctatcagg agagagcagc ccctcaaaccg cagcccctgg gcaaggagac
 cgactccctc agtgcgtgggt ttgtgggtt catgggtgtg gatggctccc gctgtggccc
 tgaccaccccg gcatcccgt gtcctggga ccctgggctt ctactccgtc tccctgctgc
 gatggctgca gtgggagccc tggagccctt gtcgcctgaa ccactgctgg ctgtccaccc
 tcatgcaggc accgcacccc ctgccaacca gttccctgg cctgtgtgt gctcccaatg
 ggccgggggtg attctccctgg ccctaggggc tcttctcgatc ctccagctca tccggcgtcg
 acgcccagag catggagctc tctggctgcc ccctgggttc actcgacggc ctggactca
 gtcagctccc caccgacgcc ggccccactt agggagggac agcattggtc tcaaggcact
 gaagccaaag gcagaagttt atgaggatgg agttgtgtg tgctcaggcc ctgaggaggg

10

20

30

40

agaggagggtg ggccaggctg aagaaacagg cccaccctcc acgtgccagc tctggtctct
 gagttggggc tggggggcgc tccctcaggc agccatgcta actcctcccc aggaatctga
 gatggaagcc cctgacctgg acacccgtgg acctgatggg gtgacaccccg tggatgtcagc
 agtttgcgtgt ggggaagtac agtccgggac cttccaaggg gcatggttgg gatgtcctga
 gcccctggaa cctctgctgg atggaggggc ctgtccccag gctcacacccg tgggcactgg
 ggagacaccccg ctgcacactgg ctgcccatttgcatttgcaccgctgccc gcccctcct
 tgaggctgga gccaacccca accagccaga ccgggcaggg cgacacacccca ttcattgctgc
 tggatgtcgtgt gatgctcggg aggtctgcca gcttctgctc cgtagcagac aaactgcagt
 ggacgctcgc acagaggacg ggaccacacc cttgatgctg gctgccaggg tggcggtgg
 agacactggtt gaagaactga ttgcagccca agcagacgtg gggccagag ataaatgggg
 gaaaactgcg ctgcactggg ctgctccgt gaacaacgcg cggccgcggc gctcgcttct
 ccaggccggaa gcccataaag atgcccagga caacagggag cagacgcgcg tattcctggc
 ggccggggaa ggagcgggtgg aagtgcggc gctactgctg gggctggggg cagcccgaga
 gctgcgggac caggctgggc tagccggcggc ggacgtcgct caccaacgtg accactggg
 tctgtgacg ctgctggaaag gggctggggc accagaggcc cgtcacaaag ccacgcgggg
 ccgcgaggct gggcccttcc cgccgcgcacg gacgggtgtca gtaagcgtgc cccgcattgg
 gggccgggct ctgcgcgcgt gccggacgct gtcagccggc gcaggccctc gtggggccgg
 agcttgcgtcggc cttgggtccgt agacttggt ggcggggggg ggcggggcccta
 ttctcattgc cggagccctc cggggatggg agcaggagga ggcccgaccc ctcgcggccg
 taggtttct gcaggcatgc gcgggcctcg gcccacccct gcgataatgc gaggaagata
 cggagtggt gccgggcgcg gaggcagggt ctcaacggat gactggccct gtgattgggt
 ggcctggaa gcttgcgggtt ctgcctccaa cattccgatc ccgcctcctt g (SEQ ID NO: 1)

10

20

30

【0047】

喘息またはアレルギー性疾患を処置または予防する

本発明の一局面は、喘息またはアレルギー性疾患を有する対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与することによって、喘息またはアレルギー性疾患を処置する方法である。別の局面は、喘息またはアレルギー性疾患を有する対象を特定すること、および喘息またはアレルギー性疾患を有する対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与することによって喘息またはアレルギー性疾患を処置する方法を提供する。

【0048】

本明細書において使用される「喘息」は、肺の気道中の炎症、可逆的な軌道閉塞、気管支痙攣、喘鳴、咳嗽、胸部の圧迫感および息切れによって特徴づけられる疾患を表す。喘息は、空気汚染物質およびアレルゲンへの曝露、アスピリンおよび遮断薬ならびに喘息の家族歴が含まれるが、これらに限定されない環境因子および遺伝的因子によって引き起こされると考えられている。

【0049】

喘息は、症候の頻度、症候の重症度、1秒での強制呼気量 (FEV1) および最大呼気流量によって分類される。喘息は、対象の医薬に対する応答、例えば、アトピー性または非アトピー性に基づいてさらに分類することが可能であり、ここで、アトピー性は、1型過敏症を発症することに対する素因を表す。

40

【0050】

様々な態様において、喘息は、アレルギー性喘息（例えば、アレルゲンへの曝露によって誘発される）、アレルギーのない喘息（例えば、感冒、インフルエンザまたはライノウイルスなどの、上気道感染によって誘発される）、アスピリン喘息（例えば、アスピリンの服用によって誘発される）、運動誘発喘息、咳喘息（例えば、乾いた空咳を特徴とする）または職業性喘息（例えば、対象が仕事中に曝露される刺激物質によって誘発される、例えば、消防士は、自己の仕事を遂行する間に、煙に曝露され、煙の吸入を経験し得る）

50

である。熟練した臨床医は、標準的な技術を用いて、対象が有するまたは有する危険性がある（例えば、消防士は、職業性喘息を有する危険性があるであろう）喘息の種類を特定することができる。

【0051】

本明細書において使用される「アレルギー性疾患」は、それ以外の点では無害な環境中の物質への免疫系応答によって特徴づけられる疾患である。例えば、アレルギー性疾患有する対象が一般的な環境物質に曝露されると、対象のBリンパ球は、その物質に対する特異的な抗体を產生し、免疫応答をもたらす。例えば、アレルギー性疾患を引き起こすことができる例示的な物質としては、チリダニ (dust mite)、花粉（例えば、植物、木、花または草からの）、動物の鱗屑（例えば、家畜または畜産動物からの）、カビ、食品（例えば、木の実、落花生、甲殻類、魚、ミルク、卵または小麦）およびラテックスが挙げられる。その親または両親がアレルギーを有する子供は、アレルギー性疾患を発症する増加した危険性を有する。アレルギー性疾患の具体的な原因（例えば、何がアレルゲンであるか）は、一般的な技術、例えば、皮膚プリックテストおよび放射性アレルゲン吸着試験を用いて、熟練した臨床医によって特定することができる。

10

【0052】

一態様において、アレルギー性疾患は、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、中耳炎、アトピー性皮膚炎（例えば、湿疹）、じんましん、血管浮腫およびアナフィラキシーである。

【0053】

対象は、熟練した臨床医によって、例えば、喘息またはアレルギー性反応を有するとして特定されることができる。喘息またはアレルギー性疾患有する対象を特定する上で有用な診断試験は、本分野において公知であり、本明細書において以下でさらに記載されている。

20

【0054】

本発明の別局面は、喘息またはアレルギー性疾患を発症する危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与することによって、喘息またはアレルギー性疾患を予防する方法である。一態様において、方法は、作用物質を投与する前に、喘息またはアレルギー性反応を発症する危険性がある対象を特定する工程をさらに含む。

【0055】

本明細書において使用される「喘息を有する危険性がある」対象は、公知の喘息の誘因（例えば、喘息の開始をもたらすことができる因子）と接触しているまたは接觸している可能性がある対象を表す。例えば、喘息またはアレルギー性疾患の開始の引き金を引くことができる非限定的な因子としては、大気中の物質（例えば、花粉、チリダニ、カビの胞子、ペットの鱗屑またはゴキブリ排泄物の粒子）；呼吸器感染（例えば、普通感冒）；身体的活動（例えば、運動誘発喘息の引き金を引くことができる）；冷気；空気の汚染物質および刺激物質（例えば、煙およびタバコの煙）；ある種の医薬（例えば、遮断薬、アスピリン、イブプロフェン（Advil、Motrin IB、その他）およびナプロキセン（Aleve））；激しい感情またはストレス；亜硝酸塩および防腐剤が添加された食品および/または飲料（例えば、エビ、乾燥された果実、加工されたイモ、ビールおよびワイン中に見出される）；ならびに胃食道逆流症（GERD）が挙げられる。対象が喘息またはアレルギー性疾患の家族歴を有する場合（例えば、近親者が喘息またはアレルギー性疾患有したことがある場合）にも、対象は喘息またはアレルギー性疾患のリスクがあると考えられる。

30

【0056】

作用物質

一局面において、Notch4を阻害する作用物質は、喘息もしくはアレルギー性疾患有するまたは喘息もしくはアレルギー性疾患有する危険性がある対象に投与される。一態様において、Notch4を阻害する作用物質は、小分子、抗体または抗体断片、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ゲノム編集系またはRNAiである。

40

【0057】

例えば、投与に際して、細胞中のNotch4の存在、量、活性および/またはレベルを抑制

50

すれば、作用物質は、Notch4を阻害するのに有効であると考えられる。

【0058】

一態様において、Notch4を阻害することは、疾患を促進するTh細胞への、Notch4発現Treg細胞の分化を阻害する。

【0059】

作用物質は、例えば、細胞におけるNotch4の転写または翻訳を阻害することができる。作用物質は、（例えば、活性がもはや生じないように、または低下した割合で生じるように）細胞中のNotch4の活性（例えば、Notch4の発現）を阻害するか、または活性を変化させることができる。

【0060】

一態様において、Notch4を阻害する作用物質は、プログラム細胞死を促進する、例えば、Notch4を発現する細胞、例えばTreg細胞を死滅させる。作用物質がNotch4を阻害するのに有効であるかどうかを決定するために、それぞれ、RT-PCRおよびウェスタンブロッティングを用いて、所定の標的（例えば、Notch4）のmRNAおよびタンパク質レベルを評価することができる。プログラム細胞死が起こったかどうかを評価するために、Notch4（例えば、Notch受容体およびリガンドの結合を測定するNotchレポーター）の活性を検出する生物学的アッセイを使用することができる。または、作用物質の投与後に細胞死が起こったかどうかを決定するために、細胞死マーカー（例えば、カスパーゼ）と組み合わせてNotch4に特異的な抗体を使用する免疫蛍光検出を使用することができる。

10

【0061】

一態様において、適切な対照と比較して、Notch4のレベルおよび/または活性を、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%またはそれを上回って阻害する作用物質。本明細書において使用される「適切な対照」は、作用物質の投与前のNotch4のレベルおよび/もしくは活性、または作用物質と接触されなかつた細胞の集団中のNotch4のレベルおよび/もしくは活性を表す。

20

【0062】

作用物質は、作用物質が投与された形態で直接機能し得る。または、作用物質は、Notch4の核酸および/またはタンパク質阻害剤の產生をもたらす細胞中への核酸配列の導入ならびにその転写など、Notch4を阻害するものを產生するために、細胞内で修飾されるかまたは使用され得る。いくつかの態様において、作用物質は、任意の、化学物質、実体または部分であり得、合成のおよび天然に存在する非タンパク質性実体を含むが、これらに限定されない。ある態様において、作用物質は、化学的部分を有する小分子である。例えば、化学的部分としては、置換されていないまたは置換された、アルキル、芳香族またはヘテロシクリル部分が挙げられ、マクロライド、レプトマイシンならびにこれらの関連する天然生成物または類縁体が含まれる。作用物質は、所望の活性および/もしくは特性を有することが公知であり得、または多様な化合物のライブラリーから同定することができる。

30

【0063】

様々な態様において、作用物質は、Notch4を阻害する小分子である。小分子をスクリーニングするための方法は本分野において公知であり、例えば、所望の標的（例えば、Notch4）が与えられれば、病原性CD4細胞の細胞死を誘導するのに効率的である小分子を同定するために使用することができる。

40

【0064】

様々な態様において、Notch4を阻害する作用物質は、Notch4に対して特異的である、抗体もしくはその抗原結合断片、または抗体試薬である。本明細書において使用される「抗体試薬」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、所定の抗原を特異的に結合するポリペプチドを表す。抗体試薬は、抗体または抗体の抗原結合ドメインを含むポリペプチドを含むことができる。任意の局面のいくつかの態様において、抗体試薬は、モノクローナル抗体またはモノクロ-

50

ナル抗体の抗原結合ドメインを含むポリペプチドを含むことができる。例えば、抗体は、重（H）鎖可変領域（本明細書において、VHと略記される）および軽（L）鎖可変領域（本明細書において、VLと略記される）を含むことができる。別の例では、抗体は、2つの重（H）鎖可変領域と2つの軽（L）鎖可変領域を含む。「抗体試薬」という用語は、抗体の抗原結合断片（例えば、一本鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')2、Fd断片、Fv断片、scFv、CDRおよびドメイン抗体（dAb）断片（例えば、de Wildtら、Eur J Immunol. 1996;26 (3):629-39参照；その全体が、参照により本明細書に組み入れられる））ならびに完全な抗体を包含する。抗体は、IgA、IgG、IgE、IgDまたはIgM（ならびにそのサブタイプおよび組み合わせ）の構造的特徴を有することができる。抗体は、マウス、ウサギ、ブタ、ラットおよび靈長類（ヒトおよび非ヒト靈長類）ならびに靈長類化された抗体を含む任意の源から得ることができる。抗体としては、ミディボディ（midibodies）、ナノボディ、ヒト化抗体、キメラ抗体なども挙げられる。

10

20

【0065】

一態様において、Notch4を阻害する作用物質は、ヒト化、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または抗体試薬である。本明細書において使用される「ヒト化」は、ヒトにおいて自然に產生される抗体変種への類似性を増加するように、そのタンパク質配列が修飾されている、非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ヒツジなど）からの抗体を表す。一態様において、ヒト化抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。一態様において、ヒト化抗体は、ヒト化ポリクローナル抗体である。一態様において、ヒト化抗体は治療用である。

【0066】

一態様において、抗体または抗体試薬は、Notch4をコードするアミノ酸配列（SEQ ID N 0:2）に対応するアミノ酸配列に結合する。

MQPPSLLLLLCLSVVVRPRGLLCGSFPEPCANGTCLSL
 SLGQGTCQCAGFGLGETCQFPDPCQNAQLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFL
 CTCLPGFTGERCQAKLEDPCPPSFCSKGRCHIQASGRPQCSMPGWTGEQCQLRDFC
 SANPCVNGGVCLATYPQIQCHCPCPGFEGHACERDVNECFQDPGCPKGT SCHNTLGSF
 QCLCPVGQEGPRCELRA GPCPPRGCSNGTCQLMPEKDSTFHLCPPGFIGPDCEVN
 PDNCVSHQCQNGGTQDGLDTYCLCPETWTGWDCSEDVDECETQGPPHCRNGGTQCN
 SAGSFHCVCVSGWGGTSCEENLDDCIAATCAGSTCIDRVGSFSCLCPPRTGLLCHL
 EDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGPSPCEHGG
 SCLNTPGSFNCLCPGTYGSRCEADHNECLSQPCPGSTCLDLLATFHCLCPPLEQ
 LCEVETNECASAPCLNHA CHD DLLNGFQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGQC
 QDQPGAFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCPGASCLDLPGAFFCLCPGFTGQLC
 EVPLCAPNLCQPKQICKDQDKANCLCPDGSPGCAPPEDNCTHHGHCQRSSCVCVDVG
 WTGPECEAELGGCISAPCAHGGTCYQPQPSGYNCTCPTGTYGPTCSEEMTACHSGPCLN
 GGSCNPSPGGYYCTCPSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGTCVNRPGTFSCLCAMGFQ
 GPRCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDSPGPRLCPGTYGGSCQTLMDLCAQKPCPRN
 SHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSGPSY
 FCHCPCPGFQGSLCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGYDGQNCSEL DAC
 QSQPCHNHGTCPKPGGFHCACPPGFVGLREGDVDECLDQPCPTGTAACHSLANAF
 YCQCLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATAGSPLGFCHCPKGFEGPTCSHRA
 PSCGFHHCHHGGCLPSPKGPFPPRCACLSGYGGPDCLTPPAPKGCGPPSPCLYNGSC
 SETTGLGGPGFRCSCPHSSPGPRCQKPGAKGCEGRSGDGACDAGCSGP GGNWDGGDCS
 LGVPDPWKCPHSRCWLLFRDGQCHPQCDSEECLFDGYDCETPPACTPAYDQYCHDH
 FHNGHCEKGNTAECGWDGGDCRPEDGDPEWGPSIALLVVLSPALDQQLFALARVLS
 LTLRVGLWVRKDRDGRDMVYPYGPARAEEKLGGRDPTYQERAAPQTQPLGKETDSL
 AGFVVVMGVDLSRCGPDH PASRCPWDPGLLLRLAAMA AVG ALEPLLPGPPLLAVHPHA
 GTAPPANQLPWPVLCSPVAGVILLALGALLVLQLIRRRREHGALWLPPGFTRRPRTQ
 SAPHRRRPLGEDSIGLKALKPKAEVDEDGVVMCSGPEEGEEVGQAEETGPPSTCQLW
 SLGGCGALPQAAMLT PQQESEMEAPDLDTRGPDPGVTPMSAVCCGEVQSGTFQGA WL
 GCPEPWEPLLDGGACPQAHTVGTGETPLHLARFSRPTAARRLLEAGANPNQPDRA GR
 TPLHAAVADAREVCQQLLRSQTAVDARTEDGTTPLMLAARLAVEDLVEELIAAQAD
 VGARDKWKTKTALHAAVNARAARSLLQAGADKDAQDNREQTPLFLAAREGAVEVAQ
 LLLGLGAARELRDQAGLA PADVAHQRNHWDLLTLEGAGPPEARHKATPGREAGPFPR
 ARTVS VSVPPHGGALPRCRTLSAGAGPRGGACLQARTWSVDLAARGGGAYSHCRSL
 SGVGAGGGPTPRGRRFSAGMRGPRPNPAIMRGRYGVAAGRGGRVSTDDWPCDWVALGA
 CGSASNIPIPPPCLTPSPERGSQLDGPPALQEMPINQGEGKK (SEQ ID NO: 2)

【 0 0 6 7 】

別の態様において、抗Notch4抗体または抗体試薬は、SEQ ID NO:2の配列を含むアミノ酸配列に結合し、またはSEQ ID NO:2の配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する配列を含むアミノ酸配列に結合する。一態様において、抗Notch4抗体または抗体試薬は、SEQ ID NO:2の配列全体を含むアミノ酸配列に結合する。別の態様において、抗体または抗体試薬は、SEQ ID NO:2の配列の断片を含むアミノ酸配列に結合し、ここで、断片は、その標的、例えば、Notch4に結合し、Notch4発現Treg細胞の疾患促進Th細胞への分化を阻害するのに十分である。

【 0 0 6 8 】

一態様において、Notch4を阻害する作用物質はアンチセンスオリゴヌクレオチドである

10

20

30

40

50

。本明細書において使用される「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、マイクロRNAのものなど、DNAまたはmRNA配列に相補的である合成された核酸配列を表す。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、標的に結合し、転写、翻訳またはスプライシングのレベルで発現を停止させることによって、DNAまたはRNA標的の発現を遮断させるように設計される。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞条件下で、遺伝子、例えば、Notch4にハイブリダイズするように設計された相補的核酸配列である。したがって、所望の効果を与えるために、標的に対して十分に相補的であるオリゴヌクレオチド、すなわち、細胞環境という状況において十分に良好に、十分な特異性でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが選択される。例えば、Notch4を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトNotch4遺伝子のコード配列（例えば、SEQ ID NO:1）の一部に相補的な、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個またはそれを上回る塩基を含み得る。

10

【0069】

一態様において、Notch4は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALENS、メガヌクレアーゼおよびCRISPR/Cas系を含むがこれらに限定されない任意のゲノム編集系を用いて、細胞のゲノムから枯渇される。一態様において、細胞のゲノム中に1つまたはそれを上回るガイドRNAをコードする核酸を取り込むために使用されるゲノム編集系は、CRISPR/Cas系ではない；これは、少量のCas酵素/タンパク質を保持する細胞における望ましくない細胞死を防ぐことができる。Cas酵素またはsgRNAのいずれかが、異なる誘導性プロモーターの制御下で発現され、それにより、それぞれの時間的な発現がこのような干渉を抑制することを可能にすることも本明細書において想定される。

20

【0070】

1つまたはそれを上回るsgRNAをコードする核酸およびRNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸をそれぞれ投与することが必要な場合には、アデノウイルス隨伴ベクター（AAV）の使用が具体的に想定される。ゲノム編集/断片化系（例えば、sgRNA、RNA誘導型エンドヌクレアーゼ）の両成分に核酸を同時に送達するための他のベクターとしては、エプスタイン・バー、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）およびB型肝炎ウイルス（HBV）などのレンチウイルスベクターが挙げられる。RNA誘導型ゲノム編集系（例えば、sgRNAおよびエンドヌクレアーゼ）の成分の各々は、本分野において公知のように、または本明細書に記載されているように、別個のベクターに入れて送達することができる。

30

【0071】

一態様において、作用物質は、RNA阻害によってNotch4を阻害する。所定の遺伝子の発現の阻害剤は、阻害的核酸とすることができます。任意の局面のいくつかの態様において、阻害的核酸は、阻害的RNA（iRNA）である。RNAiは、一本鎖または二本鎖であり得る。

【0072】

iRNAは、siRNA、shRNA、内在性マイクロRNA（miRNA）または人工のmiRNAであり得る。一態様において、本明細書に記載されるiRNAは、標的、例えば、Notch4の発現および/または活性の阻害をもたらす。任意の局面のいくつかの態様において、作用物質は、Notch4を阻害するsiRNAである。任意の局面のいくつかの態様において、作用物質は、Notch4を阻害するshRNAである。

40

【0073】

当業者は、例えば、公に入手可能な設計ツールを用いて、Notch4を標的とするためにsiRNA、shRNAまたはmiRNAを設計することが可能であろう。siRNA、shRNAまたはmiRNAは、一般に、Dharmacon（Layfayette、CO）またはSigma Aldrich（St.Louis、MO）などの企業を用いて作られる。

【0074】

任意の局面のいくつかの態様において、iRNAは、dsRNAであり得る。dsRNAは、ハイブリダイズしてdsRNAが使用されるであろう条件下で二本鎖構造を形成するのに十分に相補的である、2つのRNA鎖を含む。dsRNA（アンチセンス鎖）の1つの鎖は、標的配列に対して実質的に相補的である、一般的には完全に相補的である相補性の領域を含む。標的配列は、

50

標的の発現の間に形成されるmRNAの配列に由来し得る。他方の鎖（センス鎖）は、適切な条件下で合わされた場合に、2つの鎖がハイブリダイズし、二本鎖構造を形成するようになんちセンス鎖に相補的である領域を含む。

【0075】

iRNAのRNAは、安定性またはその他の有益な特徴を強化するために化学的に修飾することができる。本発明において取り上げられる核酸は、参照により本明細書に組み入れられる "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. ら (Edrs.) , John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されているものなど、本分野において十分に確立された方法によって、合成および/または修飾され得る。

【0076】

一態様において、作用物質は、Notch4を阻害するmiRNAである。マイクロRNAは、22ヌクレオチドの平均長を有する小さな非コードRNAである。これらの分子は、mRNA分子内の、通常、3'非翻訳（3'UTR）領域中の相補的配列に結合し、これにより、標的mRNA分解を促進し、またはmRNA翻訳を阻害することによって作用する。マイクロRNAとmRNAの間の相互作用は、「シード配列」として知られる、不完全なワトソン・クリック塩基対合を通じて、mRNAへの配列特異的な結合を誘導するマイクロRNAの6~8ヌクレオチド領域によって媒介される。900を超えるマイクロRNAが、哺乳動物において発現されることが知られている。これらの多くは、そのシード配列に基づいてファミリーへグループ分けすることができ、これにより、類似のマイクロRNAの「クラスター」を特定する。miRNAは、例えば、裸のDNAとして、細胞において発現されることができる。miRNAは、例えば、裸のDNAとして、細胞において発現される核酸によってコードされることができ、またはベクター内に含有される核酸によってコードされ得る。

10

【0077】

作用物質は、例えば、RNAi分子（例えば、siRNAまたはmiRNA）によって、標的遺伝子（例えば、Notch4）の遺伝子発現抑制をもたらし得る。これは、作用物質の存在なしで細胞中に見出されるmRNAレベルの少なくとも約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%、標的のための細胞中のmRNAレベルの減少をもたらす。1つの好ましい態様において、mRNAレベルは、少なくとも約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%減少される。当業者は、例えば、siRNA、shRNAまたはmiRNAを細胞中に形質移入し、ウェスタンブロッティングを介して細胞内に見出される遺伝子（例えば、Notch4）のレベルを検出することによって、siRNA、shRNAまたはmiRNAが、標的を下方制御するために、例えば、Notch4を有効に標的とするかどうかを容易に評価することができるであろう。

20

【0078】

作用物質は、ベクター中に含有されてもよく、したがって、ベクターをさらに含み得る。標的哺乳動物細胞中へ外来遺伝子を導入するために有用な多くのこのようないベクターが入手可能である。ベクターは、エピソーム性、例えば、プラスミド、サイトメガロウイルス、アデノウイルスなどのウイルス由来ベクターであり得、または相同的組換えもしくは無作為の組み込み、例えば、MMLV、HIV-1、ALVなどのレトロウイルス由来ベクターを通じて、標的細胞ゲノム中に組み込まれ得る。いくつかの態様において、レトロウイルスと適切なパッケージング細胞株の組み合わせも利用され得、ここで、キャプシドタンパク質は、標的細胞を感染させるために機能するであろう。通常、細胞およびウイルスは、培地内で、少なくとも約24時間、インキュベートされるであろう。次いで、いくつかの用途では、分析の前に、短期間、例えば、24~73時間、もしくは少なくとも2週間、細胞を培地内で増殖させ、5週間もしくはそれより長く、増殖させ得る。一般的に使用されるレトロウイルスベクターは、「欠陥」がある、すなわち、増殖性感染のために必要とされるウイルスタンパク質を産生することができない。ベクターの複製には、パッケージング細胞株における増殖が必要である。

30

【0079】

本明細書において使用される「ベクター」という用語は、宿主細胞への送達のためにま

40

50

たは異なる宿主細胞間での転移のために設計された核酸構築物を表す。本明細書において使用される場合、ベクターは、ウイルス性または非ウイルス性とすることができます。「ベクター」という用語は、適切な調節要素と会合したときに複製することができ、遺伝子配列を細胞に導入することができる任意の遺伝的要素を包含する。ベクターとしては、クローニングベクター、発現ベクター、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、人工染色体、ウイルス、ビリオンなどを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0080】

本明細書において使用される「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写制御因子配列に連結されてその中に含有される核酸からのRNAまたはポリペプチド（例えば、Notch4阻害剤）の発現を誘導するベクターを表す。発現される配列は、多くの場合、細胞にとって異種性であるが、必ず異種性であるとは限らない。発現ベクターは追加の要素を含み得、例えば、発現ベクターは2つの複製系を有し得、これにより、発現ベクターは2つの生物において、例えば、発現のためにヒト細胞において、およびクローニングと増幅のために原核生物宿主において維持できるようになる。「発現」という用語は、RNAおよびタンパク質を產生すること、および適宜、タンパク質を分泌することに関与する細胞の過程を表し、適切な場合には、例えば、転写、転写物のプロセシング、翻訳ならびにタンパク質の折り畳み、修飾およびプロセシングを含むがこれらに限定されない。「発現生成物」には、遺伝子から転写されたRNAおよび遺伝子から転写されたmRNAの翻訳によって得られるポリペプチドが含まれる。「遺伝子」という用語は、適切な制御配列に機能的に連結された場合に、インビトロまたはインビボでRNAに転写される核酸配列（DNA）を意味する。遺伝子は、コード領域に先行するおよび後続する領域、例えば、5'非翻訳（5'UTR）または「リーダー」配列および3'UTRまたは「トレーラー」配列ならびに各コードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含んでもよく、または含まなくてもよい。

10

20

30

40

【0081】

組み込みベクターにおいては、その送達されるRNA/DNAは宿主細胞染色体中に恒常的に取り込まれる。非組み込みベクターは、エピソームのままであり、これは、その中に含有される核酸は宿主細胞染色体中に決して組み込まれないことを意味する。組み込みベクターの例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ハイブリッドアデノウイルスベクターおよび単純ヘルペスウイルスベクターが挙げられる。

【0082】

非組み込みベクターの一例は、非組み込みウイルスベクターである。非組み込みウイルスベクターは、そのゲノムを宿主DNA中に組み込まないので、組み込みレトロウイルスによってもたらされる危険性を排除する。一例は、エプスタイン・バー oriP/核内抗原-1（「EBNA1」）ベクターであり、これは、限られた自己複製をすることができ、哺乳動物細胞において機能することが公知である。エプスタイン・バーウイルス、oriPおよびEBNA1からの2つの要素を含有するので、ウイルスレプリコン領域oriPへのEBNA1タンパク質の結合は、哺乳動物細胞におけるプラスミドの比較的長期のエピソーム性存在を維持する。oriP/EBNA1ベクターのこの具体的な特徴のため、oriP/EBNA1ベクターは無組換えiPSCの作製にとって理想的なものとなる。別の非組み込みウイルスベクターは、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。

【0083】

別の非組み込みウイルスベクターは、RNAセンダイウイルスベクターであり、これは、感染された細胞の核内に入ることなくタンパク質を產生することができる。F欠失型センダイウイルスベクターは、数継代の間、感染された細胞の細胞質中に留まるが、急速に希釈され、数継代後（例えば、10継代）には完全に失われる。

【0084】

非組み込みベクターの別の例は、ミニサークルベクターである。ミニサークルベクターは、プラスミド骨格が放出されて、その中に、真核生物プロモーターおよび発現されるべきcDNAのみを残している環状化されたベクターである。

【0085】

50

本明細書において使用される「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、ウイルスベクター粒子中にパッケージされる能力を有する核酸ベクター構築物を表す。ウイルスベクターは、非必須のウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含有することができる。ベクターおよび/または粒子は、インビトロまたはインビボのいずれかで、核酸を細胞中に導入する目的で使用され得る。多数の形態のウイルスベクターが本分野において公知である。

【0086】

喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を特定する

本明細書に記載されている本発明の一局面は、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を特定するための方法であって、(a) 対象から生物学的試料を取得する工程；(b) 試料中のNotch4のレベルを測定する工程であって、基準レベルと比較してNotch4のレベルが増加されていれば、対象は、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある、該測定する工程；および(c) 危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む方法を提供する。

10

【0087】

一態様において、Notch4のレベルは、基準レベルと比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍もしくはそれを上回って増加され、または基準レベルと比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも99%もしくはそれを上回って増加される。基準レベルは、健康な対象、例えば、喘息またはアレルギー性反応の危険性がない対象から得られる試料中のNotch4のレベルであり得る。

20

【0088】

一態様において、Notch4のレベルは、インビトロまたはエクソビオで測定される。試料中のNotch4のレベルは、標準的な技術、例えば、FACS分析または免疫蛍光を用いて測定することができる。Notch4のタンパク質およびmRNAレベルは、本明細書に記載されているように、それぞれ、ウェスタンブロッティングまたはPCRを基礎とするアッセイを用いて評価することができる。

30

【0089】

一態様において、生物学的試料は、血液試料、末梢血液試料、痰試料、肺組織試料、肺生検試料または気管支洗浄試料である。一態様において、生物学的試料は、肺胞マクロファージを含有する任意の試料である。一態様において、生物学的試料は、喘息またはアレルギー性疾患と以前に診断されたことがある対象から採取される。一態様において、生物学的試料は、喘息またはアレルギー性疾患と以前に診断され、喘息またはアレルギー性疾患に対して処置されたことがある対象から採取される。一態様において、生物学的試料は、喘息またはアレルギー性疾患と以前に診断されたことがない対象から採取される。対象から試料を収集する方法は本分野において公知であり、当業者によって実施することができる。

40

【0090】

治療的有効性を測定する

本発明の一局面は、喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象の処置における治療薬の有効性を決定する方法であって、(a) 治療薬の投与前に、喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象によって提供された試料中のNotch4発現または活性の第一のレベルを決定する工程；(b) 治療薬の投与後に、患者によって提供された試料中のNotch4発現または活性の第二のレベルを決定する工程；ならびに(c) Notch4発現または活性の第一および第二のレベルを比較する工程であって、Notch4発現または活性の第二のレベルが第一のレベルより低ければ、治療薬は有効であると考えられ、Notch4発現の第二のレベルが第一

50

のレベルと同一であるかまたは第一のレベルより高ければ、(b)で投与された治療薬は有効でない、該比較する工程を含む方法を提供する。

【0091】

一態様において、Notch4発現または活性の第二のレベルが、Notch4または活性の第一のレベルと比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも99%または100%減少されれば、治療薬は有効であると考えられる。

【0092】

一態様において、生物学的試料は、血液試料、末梢血液試料、痰試料、肺組織試料、肺生検試料または気管支洗浄試料である。一態様において、生物学的試料は、肺胞マクロファージを含有する任意の試料である。対象から試料を収集する方法は本分野において公知であり、当業者によって実施することができる。

10

【0093】

一態様において、生物学的試料は、喘息またはアレルギー性疾患と以前に診断されたことがあるが、喘息またはアレルギー性疾患を処置するために治療薬を投与されたことがない対象から採取される。一態様において、生物学的試料は、喘息またはアレルギー性疾患と診断されたことがあるが、喘息またはアレルギー性疾患を処置するために治療薬を投与されたことがある対象から採取される。

【0094】

一態様において、治療薬は、Notch4を阻害する作用物質である。別の態様において、治療薬は、抗喘息または抗アレルギー性疾患治療薬である。例示的な抗喘息および抗アレルギー性疾患治療薬は、以下で本明細書中にさらに記載されている。

20

【0095】

投与

いくつかの態様において、本明細書に記載されている方法は、本明細書に記載されるNotch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む、喘息もしくはアレルギー性疾患有するまたは喘息もしくはアレルギー性疾患有すると診断された対象を処置することに関する。喘息またはアレルギー性疾患有する対象は、症状を診断する現行の方法を用いて、医師によって特定することができる。喘息またはアレルギー性疾患有特徴づけ、診断の助けとなる喘息またはアレルギー性疾患の症候および/または合併症は本分野において周知であり、持続性の咳、呼吸困難、喘鳴、息切れおよび皮疹が含まれるが、これらに限定されない。例えば、喘息の診断の助けとなり得る試験としては、メタコリン負荷、酸化窒素試験、アレルギー性試験および痰好酸球が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、喘息の家族歴も、対象が症状を有する可能性があるかどうかを判定する上で、または喘息もしくはアレルギー性疾患の診断をする上で助けになるであろう。

30

【0096】

本明細書に記載されている作用物質（例えば、Notch4を阻害する作用物質）は、喘息もしくはアレルギー性疾患有するまたは喘息もしくはアレルギー性疾患有すると診断された対象に投与することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、例えば、喘息の少なくとも1つの症候を緩和するために、有効量の作用物質を対象に投与する工程を含む。本明細書において使用される、「喘息またはアレルギー性疾患の少なくとも1つの症候を緩和すること」は、例えば、喘息（例えば、持続性の咳、呼吸困難、喘鳴、息切れおよび皮疹）と関連する任意の症状または症候を軽減することである。等価な処置されていない対照と比較した場合、このような低下は、任意の標準的な技術によって測定された場合、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%またはそれを上回る。本明細書に記載されている作用物質を対象に投与するための様々な手段が当業者に公知である。一態様において、作用物質は、全身的にまたは局所的に（例えば、肺に）投与される。一態様において、作用物質は静脈内に投与される。一態様において、作用物質は連続的に、間隔を置いて、または散発的に投与される。作用物

40

50

質の投与の経路は、送達されている作用物質の種類（例えば、抗体、小分子、RNAi）に対して最適化され得、熟練した医師によって決定することができる。

【0097】

一態様において、作用物質または作用物質を含む組成物は、吸入を通じて投与される。

【0098】

本明細書において使用される場合「有効量」という用語は、例えば、喘息の少なくとも1つまたはそれより多くの症候を緩和することが必要とされる喘息もしくはアレルギー性疾患を有するまたは喘息もしくはアレルギー性疾患を有すると診断された対象に投与することができる作用物質（例えば、Notch4を阻害する作用物質）の量を表す。したがって、「治療有効量」という用語は、典型的な対象に投与される場合、例えば、特定の抗喘息効果を与えるのに十分である作用物質の量を表す。様々な文脈において本明細書において使用される有効量は、例えば、喘息の症候の発症を遅延させ、例えば、喘息の症候の過程を変化させ（例えば、肺機能の喪失の進行、不適切な呼吸または喘鳴を遅らせ）、または例えば、症候を逆転させる（例えば、肺機能または呼吸を改善する）のに十分な作用物質の量も含むであろう。したがって、正確な「有効量」を明示することは一般的には実行可能でない。しかしながら、任意の与えられた症例に対しては、適切な「有効量」は、日常的な実験操作のみを用いて、当業者によって決定することができる。

10

【0099】

一態様において、作用物質は連続的に（例えば、ある期間にわたって一定のレベルで）投与される。作用物質の連続的な投与は、例えば、表皮パッチ、連続放出製剤または身体上注射器（on-body injectors）によって達成することができる。

20

【0100】

有効量、毒性および治療的有効性は、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって評価することができる。投薬量は、利用される剤形および使用される投与の経路に応じて変動することができる。毒性効果と治療効果間の用量比が治療指數であり、比率LD50/ED50として表すことができる。大きな治療指數を示す組成物および方法が好みしい。治療的有効用量は、最初に、細胞培養アッセイから推定することができる。また、細胞培養物においてまたは適切な動物モデルにおいて決定されたIC50（すなわち、症候の最大の半分の阻害を達成する作用物質の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するため、用量は動物モデルにおいて定めることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。任意の特定の投薬量の効果は、適切なバイオアッセイによって、例えば、とりわけ、神経学的な機能または血液検査を測定することによってモニターすることができる。投薬量は、医師によって決定することができ、必要に応じて、処置の観察された効果に適合するように調整することができる。

30

【0101】

投薬量

本明細書において使用される「単位投薬形態」という用語は、適切な1回投与用の投薬量を表す。例として、単位投薬形態は、送達器具、例えば、注射器または静脈内点滴袋中に配置される治療薬の量であり得る。一態様において、単位投薬形態は、単一の投与で投与される。別の態様において、複数の単位投薬形態を同時に投与することができる。

40

【0102】

本明細書に記載されている作用物質の投薬量は、医師によって決定することができ、必要に応じて、処置の観察された効果に適合するように調整することができる。処置の持続期間および頻度に関して、処置がいつ治療的な便益を与えているかを判定するために、およびさらなる細胞を投与し、処置を中断し、処置を再開し、または処置計画にその他の変化を加えるかどうかを判定するために、熟練した臨床医が対象をモニターすることが典型的である。投薬量は、サイトカイン放出症候群などの有害な副作用を引き起こすほど大きくすべきではない。一般に、投薬量は、患者の年齢、症状および性別とともに変動し、当業者によって決定することができる。何らかの合併症が生じた場合には、投薬量は、各医師によっても調整することができる。

50

【0103】

併用療法

一態様において、本明細書に記載されている作用物質は単独療法として使用される。一態様において、本明細書に記載されている作用物質は、喘息またはアレルギー性疾患に対する他の既知の作用物質および治療と併用することができる。本明細書において使用される「併用して」投与されるとは、対象が障害に罹患している間に、2つ（またはそれを上回る）異なる処置が対象に送達されること、例えば、対症が障害または疾患（喘息またはアレルギー性疾患）と診断された後に、および障害が治癒もしくは除去される前にまたはその他の理由のために処置が終わる前に、2つまたはそれを上回る処置が送達されることを意味する。いくつかの実施形態において、投与に関して重複が存在するように、第二の処置の送達が始まるときに、1つの処置の送達が未だ生じている。これは、本明細書において、「同時」または「同時送達」と称されることがある。他の態様において、他の処置の送達が始まる前に、1つの処置の送達が終了する。いずれかの事例のいくつかの態様において、併用された投与のために、処置はより効果的である。例えば、第二の処置はより効果的である、例えば、より少ない第二の処置で等価な効果が見られ、または第二の処置が第一の処置の不存在下で投与された場合に見られるより、第二の処置がより大きな程度で症候を低下させ、または第一の処置について類似の状況が見られる。いくつかの態様において、送達は、症候または障害に関連する他のパラメータの低下が、他方の不存在下で送達される1つの処置によって観察されるより大きいような送達である。2つの処置の効果は、部分的に相加的、完全に相加的または相加的より大きいことがあり得る。送達は、第二の処置が送達されたときに、送達される第一の処置の効果がなお検出可能であるような送達であり得る。本明細書に記載されている作用物質および少なくとも1つの追加の治療は同時に、同じ組成物に入れてもしくは別個の組成物に入れて、または順次に投与することができる。順次投与については、本明細書に記載されている作用物質を第一に投与することができ、追加の作用物質を第二に投与することができ、または投与の順序を逆にすることができる。作用物質および/または他の治療用作用物質、手順または様式は、活動状態の障害の期間の間に、または寛解もしくはより低い活動状態の疾患の期間の間に投与することができる。作用物質は、別の処置の前に、処置と同時に、処置後に、または障害の寛解の間に投与することができる。

【0104】

喘息を処置するために使用される例示的な治療薬としては、吸入コルチコステロイド（例えば、フルチカゾン（フロナーゼ（Flonase）、フロベント（Flovent）HFA）、ブデソニド（パルミコート・フレクスヘイラー（Pulmicort Flexhaler）、ライノコート（Rhino cort））、フルニソリド（エアロスパン（Aerospan）HFA）、シクレソニド（アルベスコ（Alvesco）、オムナリス（Omnaris）、ゼトンナ（Zetonna））、ベクロメタゾン（キュナスル（Qnasl）、キュバール（Qvar））、モメタゾン（アスマネクス（Asmanex））およびロイコトリエン修飾因子（例えば、モンテルカスト（シングレア（Singulair））、ザフィルルカスト（アコレート（Accolate））およびジロートン（ジフロ（Zyflo）））；長時間作用性 アゴニスト（例えば、サルメテロール（セレベント（Serevent））およびホルモテロール（フォラジル（Foradil）、ペルフォロミスト（Perforomist）））；併用吸入剤（例えば、フルチカゾン-サルメテロール（アドベア・ディスカス（Advair Diskus））、ブデソニド-ホルモテロール（シムビコート（Symbicort））およびホルモテロール-モメタゾン（デュレラ（Dulera）））；テオフィリン（例えば、テオフィリン（テオ-24（Theo-24）、エリクソフィリン（Elixophylline）））；短時間作用性 アゴニスト（例えば、アルブテロール（プロエア（ProAir）HFA、ベントリン（Ventolin）HFA、その他）およびレブアルブテロール（ゾペネックス（Xopenex）））；イプラトロピウム（例えば、アトロベント（Atrovent））；ならびに経口および静脈内コルチコステロイドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0105】

アレルギー性疾患を処置するために使用される例示的な治療薬としては、抗炎症治療薬

10

20

30

40

50

(例えば、コルチコステロイド、グルココルチコイドまたは鉱質コルチコイド) ; 抗ヒスタミン薬 (例えば、プロムフェニラミン (デミタン (Dimetane) 、セチリジン (ジルテック (Zyrtec)) 、クロルフェニラミン (クロール-トリメトン (Chlor-Trimeton)) 、クレマスチン (タビスト (Tavist)) 、ジフェニルヒドラミン (ベナドリル (Benadryl)) 、フェキソフェナジン (アレグラ (Allegra)) またはロラタジン (アラバート (Alavert)) 、クラリチン (Claritin)) ; およびアドレナリンが挙げられるが、これらに限定されない。)

【 0106 】

併用して投与される場合、作用物質と追加作用物質 (例えば、第二または第三の作用物質) または全部は、例えば、単独療法として、個別に使用される各作用物質の量または投薬量より多い、より少ないまたは同じである量または用量で投与することができる。ある態様において、作用物質、追加作用物質 (例えば、第二または第三の作用物質) または全部の投与される量または投薬量は、個別に使用される各作用物質の量または投薬量より少ない (例えば、少なくとも 20% 、少なくとも 30% 、少なくとも 40% または少なくとも 50%) 。他の態様において、所望の効果 (例えば、喘息またはアレルギー性疾患の処置) をもたらす作用物質、追加作用物質 (例えば、第二または第三の作用物質) または全部の量または投薬量は、同じ治療効果を達成するために個別に必要とされる各作用物質の量または投薬量より少ない (例えば、少なくとも 20% 、少なくとも 30% 、少なくとも 40% または少なくとも 50% 少ない) 。

【 0107 】

非経口投薬形態

本明細書に記載されている作用物質の非経口投薬形態は、皮下、静脈内 (大量瞬時注射を含む) 、筋肉内および動脈内を含むがこれらに限定されない様々な経路によって、対象に投与することができる。非経口投薬形態の投与は、典型的には、夾雑物に対する患者の自然の防御力を迂回するので、非経口投薬形態は好ましくは無菌であり、または患者への投与の前に無菌化することができる。非経口投薬形態の例としては、すぐに注射できる溶液、注射のために薬学的に許容されるビヒクル中にすぐに溶解または懸濁される乾燥製品、すぐに注射できる懸濁液、徐放性非経口投薬形態およびエマルジョンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0108 】

本開示の非経口投薬形態を与えるために使用することができる適切なビヒクルは、当業者に周知である。例としては、無菌水 ; 注射用水 USP ; 生理食塩水溶液 ; グルコース溶液 ; 塩化ナトリウム注射液、リングル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、および乳酸リングル注射液などの、ただしこれらに限定されない水性ビヒクル ; エチルアルコール、ポリエチレンギリコールおよびプロピレンギリコールなどの、ただしこれらに限定されない水混和性ビヒクル ; ならびにトウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピルおよび安息香酸ベンジルなどの、ただしこれらに限定されない非水性ビヒクルが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0109 】

エアロゾル製剤

Notch4を阻害する作用物質を含む組成物は、エアロゾルの形態または吸入投与によって、対象の気道に直接投与することができる。エアロゾルとして使用する場合、溶液または懸濁液中のNotch4を阻害する作用物質は、慣用の佐剤を加えた適切な噴霧剤、例えば、プロパン、ブタンまたはイソブタンのような炭化水素噴霧剤と一緒に、加圧されたエアロゾル容器中に詰めてよい。Notch4を阻害する作用物質は、噴霧吸入器または噴霧器などに入れて非加圧式形態で投与することもできる。

【 0110 】

「吸入投与」という用語は、液体を微細なスプレーに変換することを含むことが、本分野において周知である。好ましくは、このような吸入投与によって、均一な大きさの小さ

10

20

30

40

50

な液滴は、制御された様式で、液体のより大きな本体から生成される。吸入投与は、任意の適切な手段によって、したがって、公知の、現在市販されている多くの噴霧器を用いることなどによって達成することができる。例えば、Niles, IIIのInhalation Plastic, Inc. から入手可能なAEROMIST空気式噴霧器。活性成分が、噴霧器を介して、一緒にまたは個別に投与されるように適合されている場合には、活性成分は、適切なpHまたは浸透圧調整をしてまたは調整をせずに、単位用量または複数用量機器のいずれかとして、噴霧化された水性懸濁液または溶液の形態であり得る。

【0111】

周知のとおり、吸入投与の間に圧力をかけるために、任意の適切な気体を使用することができ、今まで好ましい気体は、Notch4を阻害する作用物質の調節物質に対して化学的に不活性である気体である。窒素、アルゴンまたはヘリウムを含むがこれらに限定されない例示的な気体は、高い利点で使用することができる。

10

【0112】

いくつかの態様において、Notch4を阻害する作用物質は、乾燥粉末の形態で気道に直接投与することもできる。乾燥粉末として使用するために、吸入器の使用によって、GHKトリペプチドを投与することができる。例示的な吸入器としては、定量噴霧式吸入器および乾燥粉末化吸入器が挙げられる。

20

【0113】

定量噴霧式吸入器または「MDI」は、液化された噴霧剤中に溶解されたまたは液化された噴霧剤中に懸濁された微粒子化された粒子中に溶解された薬学的組成物などの製品を充填された耐圧缶または容器である。使用することができる噴霧剤としては、クロロフルオロカーボン、炭化水素またはヒドロフルオロアルカンが挙げられる。特に好ましい噴霧剤は、P134a（テトラフルオロエタン）およびP227（ヘプタフルオロプロパン）であり、これらの各々は、単独でまたは組み合わせて使用され得る。これらは、必要に応じて、1つもしくはそれを上回る他の噴霧剤および/または1つもしくはそれを上回る界面活性剤および/または1つもしくはそれを上回る他の賦形剤、例えば、エタノール、潤滑剤、抗酸化剤および/または安定化剤と組み合わせて使用される。組成物の正しい投薬量が患者に送達される。

20

【0114】

乾燥粉末吸入器（すなわち、Turbuhaler（Astra AB））は、極めて小さな容量に圧縮された薬学的組成物の乾燥粉末粒子を產生するために、加圧された空気の源によって動作可能なシステムである。

30

【0115】

吸入治療用乾燥粉末エアロゾルは、一般的には、主に $<5\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の平均直径で產生される。粒子の直径が $3\text{ }\mu\text{m}$ を超えるにつれて、マクロファージによる食作用の存在が次第に少なくなる。しかしながら、中咽頭または鼻領域中に過剰に堆積するので、粒径を増加させることは、（標準的な質量密度を有する）粒子が気道および腺房に入る確率を最小限にすることも見出されている。

40

【0116】

適切な粉末組成物としては、例示として、ラクトースまたは気管支内投与のために許容され得るその他の不活性粉末と完全に混合されたNotch4を阻害する作用物質の粉末化された調製物が挙げられる。粉末組成物は、エアロゾル分配器を介して投与することができ、またはカプセルを破裂させ、吸入に適した定常的な流れの中に粉末を吹き出す機器中に、患者によって挿入され得る破れやすいカプセル中に封入することができる。組成物は、噴霧剤、界面活性剤および共溶媒を含むことができ、適切な定量弁によって閉じられる慣用のエアロゾル容器中に満たされ得る。

【0117】

気道へ送達するためのエアロゾルは、本分野において公知である。例えば、Adjei, A. and Garren, J. Pharm. Res., 1: 565-569 (1990); Zanen, P. and Lamm, J.-W. J. Int. J. Pharm., 114: 111-115 (1995); Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic ag

50

ents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990); Andersonら、Am. Rev. Respir. Dis., 140:1317-1324 (1989)) 、ペプチドおよびタンパク質の全身送達の可能性も有する (Patton and Platz, Advanced Drug Delivery Reviews, 8:179-196 (1992)) ;Timsinaら、Int. J. Pharm., 101:1-13 (1995) ; および Tansey, I. P., Spray Technol. Market, 4:26-29 (1994) ;French, D. L., Edwards, D. A. and Niven, R. W., Aerosol Sci., 27:769-783 (1996) ;Visser, J., Powder Technology 58: 1-10 (1989)) ;Rudt, S. and R. H. Muller, J. Controlled Release, 22:263-272 (1992) ;Tabata, Y. and Y. Ikada, Biomed. Mater. Res., 22:837-858 (1988) ;Wall, D. A., Drug Delivery, 2 :10 1-20 1995) ;Patton, J. and Platz, R., Adv. Drug Del. Rev., 8:179-196 (1992) ;Bryon, P., Adv. Drug. Del. Rev., 5:107-132 (1990) ;Patton, J. S. ら、Controlled Release, 28:15 7 9-85 (1994) ;Damms, B. and Bains, W., Nature Biotechnology (1996) ;Niven, R. W. ら、Pharm. Res., 12 (9) :1343-1349 (1995) ; および Kobayashi, S. ら、Pharm. Res., 13 (1) :80-83 (1996) 参照、これらの全ての内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。
。

10

20

30

40

50

【0118】

制御および遅延放出投薬形態

本明細書に記載された局面のいくつかの態様において、作用物質は、制御または遅延放出手段によって、対象に投与される。理想的には、医学的な処置における最適に設計された制御放出調製物の使用は、最小の時間で症状を治癒または調節するために利用されている最小の薬物物質によって特徴づけられる。制御放出製剤の利点としては、1) 薬物の延長した活性;2) 低下した投薬頻度;3) 増加した患者の服薬順守;4) より少ない総薬物の使用;5) 局所的または全身的副作用の低下;6) 薬物蓄積の最小化;7) 血中レベルの変動の低下;8) 処置の有効性の改善;9) 薬物活性の増強または減少の低下;および10) 疾患または症状の調節の速度の改善が挙げられる。(Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.:2000))。制御放出製剤は、式(I)の化合物の作用の開始、作用の持続期間、治療濃度域内の血漿レベルおよび最大血液レベルを調節するために使用することができる。特に、制御または延長放出投薬形態または製剤は、薬物を過小投薬すること(すなわち、最小の治療レベルを下回ること)および薬物に対する毒性レベルを超えることの両方から起こり得る潜在的な有害効果および安全上の懸念を最小限に抑えながら、作用物質の最大有効性が達成されることを確保するために使用することができる。

【0119】

様々な既知の制御または延長放出投薬形態、製剤および機器は、本明細書に記載されている任意の作用物質との使用のために適合され得る。例としては、その各々の全体が、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第3,845,770号;同第3,916,899号;同第3,536,809号;同第3,598,123号;同第4,008,719号;同第5674,533号;同第5,059,595号;同第5,591,767号;同第5,120,548号;同第5,073,543号;同第5,639,476号;同第5,354,556号;同第5,733,566号;および同第6,365,185号に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。これらの投薬形態は、様々な割合で所望の放出特性を与るために、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマー・マトリックス、ゲル、透過性膜、浸透圧システム (OROS (登録商標) (Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA) など)、多層コーティング、微粒子、リポソームもしくは小球体またはこれらの組み合わせを用いて1つまたはそれを上回る活性成分の遅い放出または制御放出を与えるために使用することができる。さらに、開示された化合物の固定された、吸着された塩形態を調製し、これにより、薬物の制御された送達をもたらすために、イオン交換材料を使用することができる。具体的な陰イオン交換体の例としては、DUOLITE (登録商標) A568およびDUOLITE (登録商標) AP143 (Rohm & Haas, Spring House, Pa. USA) が挙げられるが、これらに限定されない。
。

【0120】

有効性

例えば、喘息またはアレルギー性疾患の処置のための、本明細書に記載されている作用物質の有効性は、熟練した医師によって決定することができる。しかしながら、本用語が本明細書において使用される場合、例えば、喘息の徴候または症候の1つもしくはそれより多くが有益なように変化され、他の臨床的に認められた症候が改善され、もしくは軽減され、または本明細書に記載されている方法にしたがう処置後に、所望の応答が例えば少なくとも10%誘導されれば、処置は、「有効な処置」と考えられる。有効性は、例えば、マーカー、指標、症候および/または本明細書に記載されている方法にしたがって処置された症状の発生または任意の他の測定可能な適切なパラメータ、例えば、減少した気道炎症、増加した肺機能、回復された正常な呼吸を測定することによって評価することができる。有効性は、入院または医学的介入に対する必要性（すなわち、減弱した肺機能の進行、呼吸に伴う合併症、喘息発作頻度）によって評価される、個体の悪化の不発生によって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は当業者に公知であり、および/または本明細書に記載されている。

10

【0121】

有効性は、本明細書に記載されている症状の動物モデル、例えば、場合によって、喘息またはアレルギー性疾患のマウスモデルまたは適切な動物モデルにおいて評価することができる。実験動物モデルを使用する場合、マーカーの統計学的に有意な変化、例えば、減少した気道炎症、増加した肺機能、回復された正常な呼吸が観察されたときに、処置の有効性が証明される。

20

【0122】

Notch4を阻害する作用物質の有効性は、さらに、本明細書に記載されている方法を用いて評価することができる。

【0123】

本明細書に開示されている本発明の代替的要素または態様の群分けは、限定と解釈してはならない。各群の構成要素は、個別的にまたは群の他の構成要素もしくは本明細書に見出される他の要素との任意の組み合わせで参照され、権利請求され得る。便宜および/または特許性を理由として、群の1つまたはそれを上回る構成要素を群内に含めることができ、または群から削除することができる。何らかのこのようないくつかの要素または削除が起きる場合、本明細書は、修飾されたものとして群を含有するものとみなされ、したがって、添付の特許請求の範囲において使用される全てのマーカッシュ群の書かれた記述を充足する。

30

【0124】

本明細書中に別段の定義がなければ、本願と関連して使用される科学用語および技術用語は、本開示が属する分野において通常の技術を有する者によって一般的に理解される意味を有するものとする。本発明は、本明細書に記載されている具体的な方法、プロトコルおよび試薬などに限定されるものではなく、したがって、変化し得ることを理解すべきである。本明細書に使用されている術語は、特定の態様を記載するためのものにすぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものではなく、本発明の範囲は専ら特許請求の範囲によって定義される免疫学および分子生物学における一般的な用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,20th Edition,Merck Sharp & Dohme Corp.出版,2018 (ISBN 0911910190,978-0911910421);Robert S.Porter et al. (eds.),The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,Blackwell Science Ltd.出版,1999-2012 (ISBN 9783527600908);およびRobert A.Meyers (ed.),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995 (ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,Elsevier出版,2006;Janeway's Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver (eds.),W.W.Norton & Company,2016 (ISBN 0815345054,978-0815345053);Lewin's Genes XI,Jones & Bartlett Publishers出版,2014 (ISBN-1449659055);Michael Richard Green and Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA (2012) (ISBN 1936113414);Davis et al.,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA (2012) (ISBN 0444

40

50

60149X) ; *Laboratory Methods in Enzymology:DNA*, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542) ; *Current Protocols in Molecular Biology (CPMB)*, Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385) , *Current Protocols in Protein Science (CPPS)*, John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; および *Current Protocols in Immunology (CPI)* (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737) に見出すことができ、これらの内容は全て、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

【0125】

その他の用語が、本明細書において、本発明の様々な局面の記述内で定義されている。

10

【0126】

本願を通じて引用されている、参考文献、発行された特許、公開された特許出願および同時係属の特許出願を含む全ての特許およびその他の刊行物は、例えば、本明細書に記載されている技術と関連して使用され得る、このような刊行物中で記載されている方法を記載および開示する目的で、参考により、明示的に本明細書に組み入れられる。これらの刊行物は、専ら、本出願の出願日より前に開示するために提供されている。これに関するいずれも、先行発明を理由としてまたは何らかの他の理由のために、本発明者らがこのような開示の日付に先行する資格を有していないことを認めたものと解釈すべきではない。日付に関する全ての記述またはこれらの文書の内容についての表明は、出願人が入手可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確性についての何らかの自認を構成するものではない。

20

【0127】

本開示の態様の記述は、網羅的であることを意図したものではなく、または開示されている正確な形態に本開示を限定することを意図したものではない。本開示の具体的な態様および本開示に対する実施例が、例示の目的で本明細書に記載されているが、当業者が認識するとおり、様々な均等な改変が本開示の範囲内において可能である。例えば、方法の工程および機能が所定の順序で提示されているが、別の態様は異なる順序で機能を発揮し得、または機能は実質的に同時に発揮され得る。本明細書に提供されている本開示の教示は、適宜、他の手順または方法に対して適用することができる。本明細書に記載されている様々な態様は、さらなる態様を提供するために組み合わせることができる。必要であれば、上記参考文献および出願の組成物、機能および概念を利用して、本開示のさらなる態様を与えるために、本開示の局面は改変することができる。さらに、生物学的機能の同等性の考慮のために、種類または量において生物学的または化学的作用に影響を与えることなく、いくつかの変化をタンパク質構造中に施すことができる。これらのおよびその他の変化は、詳細な説明に照らして、本開示に対して施すことができる。このような改変の全てが、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

30

【0128】

先述の態様のいずれの具体的な要素も、他の態様中の要素と組み合わせまたは置き換えることができる。さらに、本開示のある態様と関連する利点はこれらの態様に関して記載されているが、他の態様がこのような利点を呈することもあり得、本開示の範囲に属するために、全ての態様がこのような利点を呈することを必ずしも必要としない。

40

【0129】

本明細書に記載されている技術は、以下の実施例によってさらに例示されているが、以下の実施例は、決してさらなる限定と解釈するべきではない。

【0130】

本明細書に記載されている技術のいくつかの態様は、以下の付番された項のいずれかに従って定義されることができる。

1) 喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法であって、喘息またはアレルギー性疾患を有する対象に、有効量の、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む、方法。

50

- 2) 喘息またはアレルギー性疾患を処置するための方法であって、
a. 喘息またはアレルギー性疾患を有する対象を特定する工程; および
b. 喘息またはアレルギー性疾患を有する対象に、有効量の、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程
を含む、方法。
- 3) 喘息が、アレルギー性喘息、アレルギーのない喘息、アスピリン喘息、運動誘発性喘息、咳喘息および職業性喘息からなるリストから選択される、項1および2の方法。
- 4) アレルギー性疾患が、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、中耳炎、アトピー性皮膚炎、じんましん、血管浮腫およびアナフィラキシーからなるリストから選択される、項1および2の方法。
- 5) Notch4を阻害する作用物質が、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集系、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAiからなる群から選択される、項1および2の方法。
- 6) 抗体がヒト化抗体である、項5の方法。
- 7) RNAiが、マイクロRNA、siRNAまたはshRNAである、項5の方法。
- 8) Notch4を阻害することが、Notch4の発現レベルおよび/または活性を阻害することである、項1~7の方法。
- 9) Notch4の発現レベルおよび/または活性が、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれを上回って阻害される、項8の方法。
- 10) Notch4が制御性T細胞上で阻害される、項1または2の方法。
- 11) 少なくとも1つのさらなる抗喘息治療薬を投与する工程をさらに含む、項1および2の方法。
- 12) 少なくとも1つのさらなる抗アレルギー性疾患治療薬を投与する工程をさらに含む、項1および2の方法。
- 13) 喘息またはアレルギー性疾患を予防するための方法であって、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程を含む、方法。
- 14) 投与する工程の前に、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を特定する工程をさらに含む、項13の方法。
- 15) 喘息またはアレルギー性疾患の処置のための組成物であって、Notch4を阻害する作用物質と薬学的に許容される担体とを含む、組成物。
- 16) Notch4を阻害する作用物質が、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集系、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAiからなる群から選択される、項15の組成物。
- 17) 抗体がヒト化抗体である、項15の組成物。
- 18) RNAiが、マイクロRNA、siRNAまたはshRNAである、項15の組成物。
- 19) 吸入投与のために製剤化されている、項15の組成物。
- 20) 喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある対象を処置するための方法であって、
a. 対象から生物学的試料を取得する工程;
b. 候補細胞の集団中のNotch4のレベルを測定する工程であって、基準レベルと比較してNotchのレベルが増加されていれば、対象は、喘息またはアレルギー性疾患を有する危険性がある、該測定する工程; および
c. 危険性がある対象に、Notch4を阻害する作用物質を投与する工程
を含む、方法。
- 21) Notch4のレベルが、基準レベルと比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍またはそれを上回って増加される、項20の方法。
- 22) 喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象の処置における治療薬の有効性を決定する方法であって、
a) 治療薬の投与前に、喘息またはアレルギー性疾患と診断された対象によって提供さ

10

20

30

40

50

れた試料中のNotch4発現または活性の第一のレベルを決定する工程；

b) 治療薬の投与後に、患者によって提供された試料中のNotch4発現または活性の第二のレベルを決定する工程；ならびに

c) Notch4発現または活性の該第一および第二のレベルを比較する工程であって、Notch4発現または活性の該第二のレベルが該第一のレベルより低ければ、治療薬は有効であると考えられ、Notch4発現の該第二のレベルが該第一のレベルと同一であるかまたは該第一のレベルより高ければ、(b)で投与された治療薬は有効でない、該比較する工程を含む、方法。

23) 治療薬が、Notch4を阻害する作用物質である、項22の方法。

【実施例】

【0131】

実施例1

序論

空気汚染、特に燃焼源によって発せられる粒子状物質 (PM) への曝露が、ここ数十年における喘息の増加した発生率および有病率において重要な役割を果たしていることは十分に理解されている^{1~6}。空気汚染物質の中でも、PMへの曝露が有害な呼吸器健康影響と最も強い相関を示す^{7~10}。これらの粒子は、Th2およびTh17細胞応答を促進し、曝露された宿主においてIgE産生を上方制御することが示されている^{11~15}。吸入されたPMは、サイズにしたがって階層化する差異的な気道浸透度を示す。鼻咽頭領域中に捕捉される粗い粒子 (CP; 直径 2.5 μm) とは異なり、微粒子 (FP; 直径 2.5 μm) および超微粒子 (UFP; 直径 0.2 μm) は、下気道中に浸透することができ、そこで、抗原提示細胞 (APC) によって取り込まれて、局所的および全身的な炎症を媒介する¹⁶。APC機能のPM調節は、アレルゲンに対する免疫応答を促進する上で、PMのアジュバント様効果に特に関連している可能性がある^{13, 17}。最近の研究は、APC上のNotch受容体リガンドJagged1 (Jag1) のUFPとFPによる誘導を含む、UFPとFPがアレルギー応答を増強するUFPとFPの両方に共通する鍵となる機序を特定した¹⁵。この誘導は、PMが会合した多環式芳香族炭化水素 (PAH) によるアリール炭化水素受容体 (AhR) の活性化によって媒介され、次いで、Jag1の転写の活性化を媒介する。Jag1は、アレルゲン特異的なT細胞上のNotch受容体に結合し、アレルゲン特異的なT細胞の、疾患を促進するTh細胞への増強された分化をもたらす。これらの研究は、この過程に関与する関連したAPC種を正確には同定せず、PMによって誘発されるJag1に対する応答を媒介する標的Notch受容体も同定しなかった。

【0132】

肺マクロファージは、PMの取り込みおよびPMへの応答に以前から関連付けられてきた^{18~20}。肺マクロファージは、2つの主要なサブセット:高レベルの 2インテグリンCD11c (CD11c^{hi}) を発現する肺胞マクロファージ (AM) および中間レベルのCD11c (CD11c^{int}) を発現する間質性マクロファージ (IM) を含む^{21, 22}。研究は、ナイーブT細胞をTreg細胞分化へと誘導することによって、両集団が定常状態において免疫寛容を促進することを示してきた^{23, 24}。しかしながら、アレルゲンおよびエンドトキシンを含む炎症性刺激は、共刺激分子の発現を調節し、抗原提示細胞としての肺マクロファージの効力を変化させる^{25, 26}。同じように、PMへのAMの曝露はAMの機能を変化させ、AMを炎症促進性とする²⁷。肺マクロファージを標的とすることに加えて、PMは、肺樹状細胞 (DC) の抗原提示機能を高めることができている²⁸。PMによって誘発されるアレルギー性気道炎症応答への各APC種の相対的な寄与は、未だ完全には解明されていない。

【0133】

PM曝露が肺APCを標的としてアレルギー性疾患を促進し得る機序を調査するために、多様な遺伝学的、免疫学的および動物個体アプローチが利用された。Notch4依存性のアレルゲン特異的Tヘルパー細胞分化を伴う過程によってアレルギー性気道炎症を促進する上で、PMによって媒介されるAhR依存性のAMにおけるJag1誘導に対する、重大な役割の証拠が、本明細書に提供されている。

【0134】

10

20

30

40

50

方法および材料

マウス

$Il4ra^{R576}$ および $Foxp3^{EGFP}$ マウスは以前に記載された^{15, 29, 30}。以下のマウス:BLAB/c (WT)、 $Ahr^{fl/fl}$ ($Ahr^{tm3.1Bra}$)³¹、 $Lyz2^{Cre}$ ($CreB6.129P2-Lyz2^{tm1(Cre)1f0}$ /J) および $CD11c^{Cre}$ ($B6.Cg-Tg(1tgax-cre)1-1Reiz/J$) は、Jax Lab から入手した³²。D011.10 $Rag2^{-/-}$ マウスは、Taconic 農場から入手した。D011.10 $Rag2^{-/-}Il4ra^{R576}Foxp3^{EGFP}$ マウスを作製するために、D011.10 $Rag2^{-/-}$ マウスを $Il4ra^{R576}$ マウスと交配した³⁰。 $Jag1^{fl/fl}$ マウスは、ご厚意により、Freddy Radtke 博士からいただいた³³。

【0135】

粒子

以前に報告したとおり、ロサンゼルス都心部の市街地域において、UFP (0.18 μm) を集めた¹⁵。粒子の構成成分は、記載されたように分析した³⁴。各粒子を水溶液中に懸濁すると、親水性成分は溶液の一部となつたが、固体の不溶性UFPコアは懸濁状態に留まる。以下に示されているように、混合物全体を鼻腔内投与した。

10

【0136】

肺マクロファージおよびDCとのT細胞同時培養物

フルオレセイン標示式細胞分取 (FACS) によって、 $CD4^+ D011.10^+ RAG2^{-/-} Il4ra^{R576} Foxp3^{EGFP}$ マウスの脾臓から、ナイーブ $CD4^+ D011.10^+$ T細胞を単離した。AM および IM を FACS によって単離し、48 ウェルプレート中に、 2×10^4 細胞で分割し、次いで、偽処理するか、または 10 $\mu g/ml$ の UFP で一晩処理した。UFP 処置は、アネクシン V 染色によって評価したところ、偽処理と比較して増加したアポトーシスを誘導しなかつた (データは図示せず)。残存する UFP を除去するために APC を PBS で 2 回洗浄し、次いで、最終容量 0.5 ml の 10% ウシ胎児血清/RPMI 培地中に、 4×10^5 細胞/ウェルで T細胞を添加した。示されているように、1 μM の OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドで培養物を処理した。示されているように、それぞれ 10 $\mu g/ml$ で 抗マウス Notch Ab を添加した。

20

【0137】

アレルギー感作および攻撃誘発

100 μl PBS 中の 100 μg OVA の腹腔内 (i.p.) 注射によって、マウスを OVA に対して感作し、次いで、2 週後に、PBS 中の OVA の第 2 回の腹腔内注射で追加免疫を行った。対照マウスは、PBS のみで偽感作し、追加免疫した。29 日目に開始して、OVA および偽感作されたマウスの両方を、3 日間、毎日 30 分間、1% のエアロゾル化された OVA で攻撃誘発した。各 OVA エアロゾル曝露の 2 時間前に、マウスの部分群に、PBS または 10 $\mu g/100 \mu l$ PBS/滴下注入での UFP のいずれかを鼻腔内 (i.n.) に付与した。抗 Notch4 抗体 ブロッキングのために、150 μg のアルメニアムスター抗マウス Notch4 IgG mAb (クローン HMN4-14; Bio X Cell)³ または対照アルメニアムスター IgG ポリクローナル抗体 (Ab) (Bio X cell) を 100 μl の PBS 緩衝液中に懸濁し、OVA エアロゾル攻撃誘発の間に、3 日間連続して、毎日投与した。感作後 32 日目にマウスを安樂死させ、分析した。チリダニ誘発性アレルギー性気道炎症のために、マウスは、プロトコールの開始時に 3 日間、100 μl の PBS 中の 5 μg の凍結乾燥されたディー・ブテロニシヌス (*D. Pteronyssinus*) 抽出物 (Greer) を鼻腔内に受け、次いで、UFP ありまたはなしで、15 日目 ~ 17 日目に、同じ用量のディー・ブテロニシヌス抽出物で攻撃誘発した。18 日目にマウスを安樂死させ、気道炎症の指標に関して分析した。気管支肺胞洗浄 (BAL) 液および肺組織を取得し、以前に公表された方法にしたがって、細胞成分および T細胞サイトカイン発現に関して分析した^{15, 30}。

30

【0138】

AM、IM および DC 細胞導入研究のために、FACS によって、 $Il4ra^{R576}$ または $Il4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{-/-}$ ドナーマウスのいずれかから細胞を単離した。細胞を一晩培養し、偽処理するか、または 5 nM ペプチド濃度の OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドを単独でもしくは 10 $\mu g/ml$ の UFP と一緒に負荷した。2 日にわたって、2 回繰り返して、 10^5 細胞/マウスで、OVA 感作された $Il4ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{-/-}$ レシピエントマウスの気管内に細胞を導入した。第 3 日目にマウスを安樂死させ、アレルギー性気道炎症の異なるパラメータに対して分析した。

40

50

【0139】

肺組織病理染色

記載されたように、ヘムトキシリン (hemtoxylin) およびエオシン (H&E) でパラフィン包埋された肺切片を染色した³⁶。盲検の操作者によって、肺病態をスコア付けした。血管および気道周囲の細胞浸潤に関して、別途、炎症をスコア付けした;0、浸潤物なし;1、ごくわずかな炎症性細胞;2、1細胞層の深さの炎症性細胞の輪;3、2~4細胞の深さの炎症性細胞の輪;4、>4細胞の深さの炎症性細胞の輪³⁷。血管および気道の両方に対して炎症性スコアを加算することによって、複合スコアを求めた。ムチン顆粒の過ヨウ素酸シップ (PAS) 染色によって、ゴブレット細胞の数および分布を評価した。以下のスケールにしたがって、ゴブレット細胞過形成に対して、各気道 (気管支/細気管支) をスコア付けした:0、PAS陽性細胞なし;1、<5% PAS陽性細胞;2、5~10% PAS陽性細胞;3、10~25% PAS陽性細胞;および4、>25% PAS陽性細胞³⁸。

10

【0140】

統計解析

示されているように、試験群を比較するために、群のスチューデントの両側t検定、片側および両側分散分析、ならびにポンフェローニ事後テスト解析を用いる反復測定両側分散分析を使用した。p値 < 0.05を統計学的に有意と考えた。

【0141】

研究の承認

全ての動物研究は、動物管理リソーシズ (Animal Care Resources) のボストン小児病院事務局によって審査され、承認を受けた。

20

【0142】

他の方法

情報リアルタイムPCR分析、フローサイトメトリー (Fluoresbrite (登録小胞) 黄色緑色 (YG) 小球体およびナノビーズを含む)、細胞内染色試薬、Abおよび方法、IgE ELISA よび気道応答性亢進の測定は、例えば、www.jacionline.orgで、ワールド・ワイド・ウェブ上に見出すことができるこの文献のオンライン所蔵庫中の方法の部に掲載されている。

20

【0143】

結果

基底状態および炎症状態下において、肺マクロファージは、肺におけるUFPの主要な細胞標的である。UFPによる気道炎症の促進におけるJag1-AhR-Notch経路の役割をさらに解明するために、まず、基底状態下および特にアレルギー性炎症条件下の両方で、本明細書に提示されている研究モデルにおいて、PMによって標的とされるAPCの詳細な免疫表現型上の特徴を確定しようと試みた。深い浸透性、大きな表面積対サイズ比、PAHの質量当たりのより高い含量および酸化的ストレスを誘導する能力がより大きいために特に毒性であるUFPに関する研究に、主として焦点を当てた39、40。114raR576マウスを使用するOVA誘発性アレルギー性気道炎症モデルを使用した。これらのマウスは、IL-4R依存性混合型Th2/Th17細胞炎症を媒介することによって、単独でまたはUFPとともにアレルゲンに対する亢進されたアレルギー性気道炎症を媒介するIL-4受容体鎖 (IL-4R-R576) 変種を保有する15、30。OVAの腹腔内注射によって、マウスを感作し、次いで、PBS (偽攻撃誘発) または1%エアロゾル化OVAの反復吸入によって攻撃誘発した。OVAエアロゾル攻撃誘発の2時間前に、Fluoresbrite (登録商標) YGナノビーズ (0.05 μmの有効径) または小球体 (1 μmの有効径) と組み合わせて、UFPでマウスの部分群を鼻腔内処置した41。フローサイトメトリーによって、ナノビーズ蛍光陽性細胞集団を分析した (図1Aおよび1B)。炎症の不存在下では (PBS感作、OVA処置群)、95%以上のナノビーズ取り込み細胞は、CD45 + F4/80 + CD64 + MHCII + CD11bIntCD11cHi肺胞マクロファージであったのに対して、CD45 + F4/80 + CD64 + MHCII + CD11bHiCD11cInt間質性マクロファージは、総小球体陽性細胞の2~3%に相当した (図8A~8G、9A~9Dおよび10A~10C) 42。OVAによって、および特にOVA + UFPによって誘発されたアレルギー性気道炎症においては、ナノビーズ取り込み細胞の約85%はマクロファージであり、AM (ゲートG3) とIM (ゲートG4) の間で、70:30の比で分布した

30

40

50

(図1A～1C)。粒子を取り込むAM集団は、CD38IntEgr2Hi (M2様) であったのに対して、IM集団はCD38HiEgr2Int (M1様) であった(図10Aおよび10B)43。それらのM2様表現型と一致して、細胞分別されたAMのUFPでのインビトロ処理は、サイトカインIL-10、CCL17、IL-6およびTNF- のAMの産生を大幅に上方制御したが、IL-12のベースライン産生には、ほとんど変化を誘導しなかった(図10C)44、45。残りのビーズ(15%)のうち、約2/3は、CD11chiCD11bintCD8⁺CD103+B220-PDCA1-クラシカル(c)DC46によって取り込まれ、残りはGr1+SiglecFlow好中球によって取り込まれた(図1B、1Cおよび8A～8G)。これらの結果は、アレルギー性気道炎症との関連において、肺胞および間質性マクロファージが吸入されたUFPの排除に関与する主要な細胞のサブセットであることを示した。ナノビーズの代わりに、Fluoresbrite(登録商標)YG小球体ビーズを使用した場合にも、同様の細胞局在性結果が得られ、FPおよびUFPが、アレルギー性気道炎症を促進する上で同一のAhR-Notch-Jag1作用機序を共有することを示す以前に公表されたデータと一致した(図11A～11B)。

10

20

30

40

50

【0144】

UFPは、肺AMにおいてJag1発現を差異的に誘導する。UFPは、骨髓由来の樹状細胞においてIMおよびマクロファージにおいて(図12A)、AhR依存性様式でJag1発現を誘導する。II4raR576マウスの肺から単離され、偽処理されたまたはUFPでインビトロ処理された異なるAPC集団において、Jag1転写物の発現を調べた。Jag1発現は、ベースラインでは、IMおよびDCと比較して、AMにおいて最も高かった(図1D)。UFPでのインビトロ処理は、AMにおけるJag1転写物発現を著しく誘導したのに対して、IMおよびDCでは、同じ処理に穩やかな増加が伴った(図1D)。これに対して、Fluoresbrite(登録商標)YGナノビーズでの処理は、AM上でのJag1発現を誘導することができなかった(図9A)。鼻腔内に投与されたときに、Fluoresbrite(登録商標)YGナノビーズはAMに局在化しているにも関わらず、Fluoresbrite(登録商標)YGでの処理は、OVAによって誘発された気道炎症にも影響を及ぼすことができなかった(図9B～9D)。骨髓系列細胞において活性を有する、リゾチーム2遺伝子プロモーターによって駆動されるCreリコンビナーゼ(Lyz2Cre)を用いて、LoxPを導入したAhr対立遺伝子を欠失すると、II4raR576Lyz2CreAhr/マウスのAMにおけるJag1転写物のベースライン発現を大幅に低下させ、UFPによるその著しい誘導を失わせた。他の細胞種においても類似の傾向が認められたが、DCにおいては、Jag1発現の部分的な温存が存在した。フローサイトメトリー分析によって、他の細胞種と比較した場合のAMにおけるJag1の顕著な発現およびAhr欠失時のJag1の下方制御が確認された(図1E)。骨髓由来のマクロファージにおけるUFP誘導性Jag1発現は、Lyz2Creによって駆動されるAhr欠失によって同じように影響を受けた(図12A～12B)。さらに、OVAでのマウスの感作に続く、OVAおよびUFPでの攻撃誘発によって、IMおよびDCと比較して、AM上でJag1の優先的な誘導がもたらされ、この誘導は、Lyz2Creによって駆動されるAhr欠失によって元に戻された(図12B)。

【0145】

これらの結果は、Lyz2Creを用いて、骨髓系列中のLoxPが導入されたJag1遺伝子を欠失させることによって、さらに確認された(II4raR576Lyz2CreJag1/)(図1Fおよび1G)。Jag1転写物発現およびJag1表面染色は、ベースラインおよびUFP処理後の両方で、AMにおいて完全に抑制された。低下したJag1転写物発現およびJag1タンパク質染色はIMにおいて持続したが、DCにおいては、それらのレベルは影響を受けなかった。これらの知見は、ベースラインおよびUFP処理後の両方で、Jag1を発現する主なAPC細胞種としてAMを確認し、この発現がAhR依存性機序によって開始することを確認する。これらの知見は、Lyz2Creがマクロファージ、特にAMにおいてはJag1を優先的に標的とするのに対して、DCにおいては、Jag1を標的とすることはほとんど温存し、マクロファージと樹状細胞におけるLyz2Creの活性を比較した以前の系列追跡分析と合致した47。

【0146】

UFP処理されたAMは、Jag1依存性機序で、Th細胞分化を促進する。UFPによるAMにおけるJag1発現の誘導がアレルゲン誘導性Th細胞分化を強化するかどうかを調べるために、D011

.10 + Rag2-/-マウスに由来するナイーブII4raR576D011.10 + CD4 + T細胞を含むインビトロTh細胞分化系を利用した。II4R576またはII4raR576Lyz2CreJag1 / マウスから単離された、FACS精製されたAMとともに、ナイーブD011.10 + CD4 + T細胞をインキュベートした。AMに、PBSを偽パルスするか、またはOVAペプチドOVA323 ~ 339を単独でもしくはUFPと一緒に用いてパルスした。インキュベーション期間の終わりに、ゲートされたCD4 + Foxp3- (非制御性) T細胞においてTh細胞サイトカイン発現を分析した。OVA323 ~ 339ペプチドをパルスしたIL4RR576AMとの同時培養は、フローサイトメトリー染色によって明らかにされたところによると、D011.10 + CD4 + Foxp3-T細胞によるIL-17、IL-13およびIL-4の増加した産生をもたらし、ずっと少ない程度で、IFN- の増加した産生をもたらした (図2A、2Bおよび13A ~ 13D)。最初の3つのサイトカインの発現は、UFP (10 μg/ml) の添加によって顕著に上方制御されたのに対して、IFN- の発現は下方制御され、過度のTh2/Th17傾向と一致した30。これに対して、II4raR576Lyz2CreJag1 / AM細胞をAPCとして使用すると、OVA323 ~ 339によって、D011.10 + CD4 + T細胞におけるIL-17、IL-13およびIL-4発現の誘導は、穏やかに阻害され、UFPによるこれらの著しい誘導は完全に消失した。それらの同時培養物におけるIFN- 発現も非常に低下した (図2Aおよび2B)。

10

20

40

50

【0147】

誘導されたTreg細胞へのナイーブアレルゲン特異的T細胞の分化を支えるAMの能力に対するUFP処理の影響を調べるために、D011.10細胞インビトロTh細胞分化系も使用した。UFPの不存在下では、UFP、OVA323 ~ 339を負荷されたAMは、ナイーブII4raR576D011.10 + CD4 + T細胞のうちの最大40%の、Foxp3+ の誘導された制御性T (iTreg) 細胞への分化を駆動した。UFPでの処理は、Jag1発現とは無関係に、iTreg細胞分化を部分的に阻害した (図3Aおよび3B)。しかしながら、重要なことには、OVA323 ~ 339ペプチドを提示するAMのUFP処理は、IL-4、IL-13およびIL-17を含むTh2/17細胞サイトカインを分泌するが、Th1サイトカインであるIFN- を分泌しないように、形成されたiTreg細胞を傾向させた。この傾向は、AMにおけるJag1の欠失によって、大部分は元に戻された (図3Cおよび3D)。これらの結果は、部分的には、新たに形成されたiTreg細胞をJag1依存性様式でTh2/17細胞分化の方向に不安定化させることによって、UFPがアレルゲン特異的iTreg細胞分化に悪影響を及ぼすことを示した。

【0148】

骨髄系列におけるJag1の欠失は、UFPによるアレルギー性気道炎症の増強を消失させる。インビオでUFPによるアレルギー性気道炎症の上方制御を支える上で、AM上のJag1発現の役割を決定するために、まず、Lyz2Creを利用して、骨髄系列細胞中のAhr-Jag1遺伝子回路の成分遺伝子を欠失させた。したがって、OVAの腹腔内注射によって、II4raR576Lyz2CreJag1 / マウスおよびII4raR576マウスを感作し、次いで、1%エアロゾル化OVAの吸入によって攻撃誘発した。対照マウスは、PBSで偽感作し、エアロゾル化OVAで攻撃誘発した。OVAエアロゾル攻撃誘発の2時間前に、UFP (10 μg/滴下注入) またはPBSでマウスの部分群を鼻腔内処置した41。OVAでのII4raR576マウスの感作および攻撃誘発は、気道炎症および応答性亢進、気管支肺胞洗浄液中への好酸球およびT細胞浸潤、上昇した総IgE応答およびOVA特異的血清IgE応答ならびに増強されたTh2およびTh17細胞応答によって特徴づけられる強固な気道炎症応答をもたらした (図4A ~ 4K)。これらのパラメータは全て、OVA攻撃誘発期の間に、UFP曝露によって著しく増大された。II4raR576Lyz2CreJag1 / マウスのOVA感作および攻撃誘発は、OVA感作および攻撃誘発されたII4raR576マウスにおいて認められたのと同様の強固なアレルギー性気道炎症応答ももたらした。しかしながら、アレルギー性気道炎症の全ての先述したパラメータのUFPによる増大は、II4raR576Lyz2CreJag1 / マウスでは完全に消失し、UFPが気道においてその炎症促進性効果を発揮するためには、骨髄系列におけるJag1発現が必要不可欠であることを示唆している (図4A ~ 4I)。

【0149】

一般的かつ強力なヒトアレルゲンであるイエダニ (D. プテロニシヌス) の抽出物を用いて、II4raR576マウスの鼻腔内処置の際に誘発されるアレルギー性気道炎症のUFPによる増

強を媒介するための骨髄系列細胞におけるJag1発現の役割も調べた。結果は、OVA感作および攻撃誘発によって観察されたものと一致した。UFPは、低用量のD. プテロニシヌス (5 μ g) でのII4raR576マウスの処置によって誘発された気道炎症を増強したのに対して、II4raR576Lyz2CreJag1 / マウスでは、この作用は消失された (図14A ~ 14M)。II4raR576マウスにおけるAhrの骨髄系列特異的な欠失 (II4raR576Lyz2CreAhr /) も、OVAによって誘発されたアレルギー性気道炎症の様々なパラメータを増大させるUFPの能力を失わせ、UFPによってJag1発現を誘導するためのAhRシグナル伝達の必要性と合致していた (図15A ~ 15N)。これに対して、CD11cCreを用いた全てのCD11c + APC系列におけるJag1の欠失は、UFPによる気道炎症の促進を阻害せず、実際には、それを悪化させたので、AMによる炎症促進性機能の獲得のための、AMにおけるUFPによるJag1誘導の固有かつ特異的な必要性が示唆される (図16A ~ 16F)。

10

【0150】

AMにおけるJag1発現は、アレルギー性気道炎症のUFPによる上方制御を媒介するのに十分である。UFPによる、アレルゲン誘発性気道炎症の増悪における、AMにおけるJag1発現の役割を具体的に確定するために、II4raR576Lyz2CreJag1 / マウス中に導入された場合にUFP作用をレスキューするAMの能力を調べた。したがって、偽処理されたまたはUFPの不存在下もしくは存在下においてOVA323 ~ 339ペプチドを負荷されたII4raR576またはII4raR576Lyz2CreJag1 / マウスのいずれかからAMを単離した。OVAで感作されたII4raR576Lyz2CreJag1 / マウスの気道中に細胞を導入し、次いで、アレルギー性気道炎症の誘発に関して調べた。結果は、Jag1が十分な、OVA323 ~ 339ペプチドがパルスされかつUFP処理されたII4raR576 AMの、OVA感作されたII4raR576Lyz2CreJag1 / マウス中への導入は、増強された組織炎症、増大された気道応答性亢進、血清総IgEおよびOVA特異的IgEならびに気管支肺胞洗浄液CD4 + T細胞浸潤および好酸球増加症などの、UFPによって誘発された増悪したアレルギー性気道炎症の全ての徴候を再現することを明らかにした (図5A ~ 5G)。この導入は、Th細胞サイトカイン産生およびTh細胞様表現型へのTreg細胞の不安定化も増強した (図5H ~ 5O)。これに対して、同様に処理されたJag1欠失II4raR576Lyz2CreJag1 / AMの導入は、それをすることができず、アレルゲン誘発性気道炎症を増強するUFPの能力を回復させるのに、AMのJag1発現が十分であることを示している。

20

【0151】

偽処理されたまたはOVA323 ~ 339もしくはOVA323 ~ 339 + UFPを負荷された、II4raR576またはII4raR576Lyz2CreJag1 / マウスの肺から単離されたIMおよびDCが、OVA感作されたII4raR576Lyz2CreJag1 / マウス中に気管内導入された場合に、気道炎症を促進する能力も調べた。しかしながら、Jag1が十分なAMの場合とは異なり、導入されたIMは、その処理の様式に関わらず、アレルギー性気道炎症を促進することができなかった (図17A ~ 17F)。導入されたDCも、気道応答性亢進を誘発することができなかった。OVA323 ~ 339を負荷されたDCは、AMと比較して、好酸球およびTh細胞による最適に満たない組織浸潤を誘導し、これは、UFP処理によって増強されなかった。これらの結果は、気道炎症を促進する上での、およびUFPによるその著しい誘導でのJag1が十分なAMの特有な役割と合致する (図17G ~ 17L)。

30

【0152】

アレルゲン誘導性Th細胞分化のUFPによる促進には、Jag1-Notch4相互作用が関与する。UFP処理の際に、AMによって発現されるJag1の炎症促進性効果を媒介する上での、各Notch受容体の役割を次に決定した。したがって、まず、II4raR576Foxp3EGFPマウスから単離された、FACS精製されたCD4 + EGFP-T通常細胞およびCD4 + EGFP + Treg細胞において、異なるNotch受容体のエクソビオ発現を分析した。操作されていないマウスの脾臓から、およびUFP同時処置ありまたはなしで、アレルギー性気道炎症に供されたマウスの肺から細胞を単離した。脾臓のCD4 + T細胞は、主に、Notch1およびNotch2を発現し (データは示さず)、以前の結果と合致していた⁴⁸。これに対して、OVAで感作され、OVA + UFPで攻撃誘発されたマウスの肺から単離されたCD4 + T細胞においては、Notch4発現が上方制御されて、4つのNotch受容体の中で最高となった (図18)。Notch1およびNotch2発現も上方制御された

40

50

が、より低い程度であり、Notch3の発現は減少した。

【0153】

上記結果を得て、次に、応答性D011.10T細胞によって、OVA323～339ペプチド提示AMのUFP処理によるTh細胞サイトカイン産生の増強を元に戻す中和Notch1、2および4Abの能力を決定するために、図2Aおよび2Bに記載されているインビトロ同時培養系を利用した。FACS精製された、Jag1が十分な(114raR576)またはJag1が欠失した(114raR576Lyz2CreJag1 /)AMを、偽処理するか、またはOVA323～339ペプチド単独でもしくはUFPと合わせた該ペプチドで処理した。アイソタイプ対照mAbまたは各Notch受容体に対して特異的な中和mAbのいずれかの存在下で、それらをナイーブ114raR576D011.10 + CD4 + T細胞とともに同時培養し、Th細胞サイトカイン発現に関してT細胞を調べた。予想されたとおり、OVA323～339ペプチドがパルスされた114raR576AMのUFP処理は、D011.10 + CD4 + Foxp3-T細胞によるIL-17、IL-13およびIL-4の産生を上方制御し、これよりずっと低い程度で、IFN-産生を上方制御したのに対して、APCとして、114raR576Lyz2CreJag1 / AMを使用すると、この効果は失われた。重要なことに、IL-4、IL-13およびIL-17を含む、UFPによるTh細胞サイトカイン発現の上方制御は、高度に特異的な中和抗Notch4 mAbとの同時処理によって、一様に阻害された(図6Aおよび6Bならびに19A～19D)49。抗Notch4 mAbは、単独およびUFPとともに、OVAによって誘導された残存IFN-産生も阻害した。これに対して、他のNotch受容体に対して特異的な中和mAbでの処理は、部分的なおよび/または選択的な阻害的結果を与えた(図19A～19D)。抗Notch4 mAbは、UFPで処理されたOVA323～339ペプチド提示AMと培養されたときに、D011.10 + CD4 + Foxp3 + iTreg細胞によるTh細胞サイトカインの産生も抑制した(図20A～20B)。注目すべきことに、抗Notch4での処理は、Jag1活性化によって説明可能な抑制を超えて、残存Th細胞サイトカイン産生(例えば、IL-4産生)を時折抑制し、これらのTh細胞応答を支える上で、Notch4を介して作用する他のNotchリガンドによる追加的寄与を示唆する。

【0154】

アレルゲン特異的T細胞におけるNotchシグナル伝達を遮断する上での抗Notch4 mAbの特異性および有効性は、114raR576CD4 + D011.10 + Rag2-/-T細胞とのOVA323～339およびUFP処理されたAMのインビトロ同時培養においてさらに確認され、そこでは、抗Notch4 mAbでの処理が、Notch標的遺伝子Hes1、Hey1およびNrarpの転写の上方制御を遮断した(図21A～21C)。総合すると、本明細書に提示されたこれらの知見は、Notch4を、鍵となるNotch受容体として示した。この受容体を通して、Jag1は、Th細胞分化を促進することによってUFPに対する炎症性応答を媒介する。

【0155】

Notch4阻害は、UFPによるアレルギー性気道炎症の増悪を抑制する。アレルゲンペプチド提示AMのUFP処理によって誘導されるアレルゲン特異的Th細胞の増強されたインビトロでの分化を元に戻す上での、中和抗Notch4 mAbの有効性に鑑みて、UFPによって誘発されるアレルギー性気道炎症応答の増悪に対する、Notch4阻害の影響を調べた。したがって、OVAを単独またはUFPと一緒に用いて感作および攻撃誘発された114raR576マウスを、攻撃誘発期の間に抗Notch4またはアイソタイプ対照mAbのいずれかで処置し、次いで、気道アレルギー性炎症応答の様々なパラメータに関して分析した。組織炎症、気道応答性亢進、気管支肺胞洗浄液好酸球増加症、血清総IgEおよびOVA特異的IgE応答ならびに気道Th2およびTh17細胞応答の観点で、抗Notch4 mAbでの処理は、OVAによって誘発されたアレルギー性気道炎症に対してほとんどまたは全く効果を有しなかった。これに対して、抗Notch4 mAbでの処理は、UFPによって誘導された先述のパラメータの強化を完全に阻害し、したがって、Notch4がアレルギー性気道炎症に対するUFPの強化効果を媒介していることが示唆される(図7A～7G)。

【0156】

考察

UFPおよびFPを含む交通に関連するPMは、AhR依存性様式でAPC上にJag1発現を誘導し、次いで、これがNotchシグナル伝達を活性化して、アレルゲン特異的T細胞によるThサイト

10

20

30

40

50

カイン発現を増強することによって、アレルギー性気道炎症を促進することが以前の研究によって実証されている¹⁵。しかしながら、これらの研究は、気道炎症を弱めるための潜在的な治療上の標的としてNotch4を教示していない。本明細書に提示されたデータは、ナノ粒子およびミクロ粒子のその貪欲な取り込みによって、ならびに他の肺APCと比較した場合の、PM取り込みの際のJag1発現の著しい誘導によって、AMをPMの主要な標的として同定した。さらに、アレルゲン特異的Th細胞分化およびiTreg細胞不安定化のUFP処理されたAMによるJag1依存性上方制御の、主要な媒介物質としてのT細胞上のNotch4の同定が、本明細書に提示されている。中和抗Notch4 mAbによるNotch4阻害は、アレルギー性気道炎症のUFPによる上方制御を完全に失わせた。これらの研究は、このように、アレルギー性気道炎症におけるPM活性化AhR-Jag1-Notch回路の炎症促進性作用を媒介することに関与する、AMおよびアレルゲン特異的CD4⁺ ThおよびTreg細胞を含む細胞要素、ならびにJag1およびNotch4を含む分子エフェクターを確定した。

10

20

【0157】 AMは、DCの抗原提示能を下方制御することによって気道中の恒常的な寛容を維持し⁵⁰、およびiTreg細胞分化を促進する²³ことが示されてきた。AMは、DCと比較して、抗原を提示する上でより有効でなく、これは、CD28またはIL-2でのT細胞の共刺激などの付属シグナルを与えることによって克服され得る欠点である^{51,52}。PMによって媒介されるAhRの活性化によるAMにおけるJag1発現の上方制御は、Jag1-NotchがTh細胞サイトカイン産生を増幅する共受容体対として作用して、効率的な抗原提示を可能にし得る⁵³。本明細書に提示されている結果は、その骨髄系列中にJag1を欠如するマウスにおいて、UFPによる、アレルギー性気道炎症の増強をレスキューするために、Jag1が十分なAMが果たす、必要かつ十分な役割を、明確に実証する。炎症条件下では、IMによるナノ粒子の増加した取り込みが認められ、おそらく、炎症した肺組織における後者の細胞の存在量の増加および/またはこれらの粒子に対する該細胞の亢進した結合力を一部反映している。それにも関わらず、IMまたはDCのいずれかでの¹¹⁴ra^{R576}Lyz2^{Cre}Jag1^{+/−}マウスの再構成は、UFPに対する炎症応答をレスキューすることができなかつたので、Jag1が十分なAMの、この過程における不可欠な役割を示唆している。

20

30

【0158】

AM上のJag1の欠失は、アレルギー性気道炎症のUFP誘導性増強を元に戻す一方で、UFPの不存在下で、肺組織におけるCD4⁺ T細胞の動員などのアレルゲン誘発性気道炎症の数個のパラメータも弱めた（図4A～40および5A～50）。これらの知見は、UFP処置の不存在下では、AM上の残存するJag1発現がアレルゲン誘発性気道炎症に寄与し得ること、およびUFPはこの過程を大幅に増幅するように作用することを示している。

30

【0159】

驚くべきことに、本明細書に提示されている知見は、鍵となるNotch受容体としてNotch4を同定した。この受容体を通して、UFPは、その効果を、アレルギー性気道炎症の上方制御において媒介する。Notch4阻害は、異なるTh細胞サブセットへのアレルゲン特異的T細胞のUFP依存性およびAM依存性インビトロ分化を、効果的かつ一様に抑制した。これに対して、Notch1およびNotch2を含む他のNotch受容体の阻害は、Th細胞サイトカイン発現の選択的なおよび/または部分的な阻害を与えた。Notch4阻害は、マウスにおけるアレルギー性気道炎症のUFPによる増悪も抑制した。NOTCH4遺伝子座は重度の喘息と以前に関連付けられており⁵⁴、特にUFPなどの環境的曝露に関連している場合に、この経路が疾患の重症度を調節し得ることを示唆している。

40

【0160】

AM上で発現されたJag1は、他のNotch受容体と比較して、Notch4と優先的に相互作用し得る。代わりにまたは並行して、Notch4は、Notchカノニカルおよび非カノニカルシグナル伝達機構によって、他のNotch受容体と比較して、Th細胞サイトカインの産生を差異的に増幅するように作用することができ、またはその特異的な産生を指示することができる^{53,55}。Notch4シグナル伝達は、iTreg細胞の分化も不安定化させ、iTreg細胞によるTh細胞サイトカインの産生をもたらす。このようなiTreg細胞表現型は、減少した抑制機能お

50

よび系列の不安定性を伴い、Th細胞系列へのTreg細胞の最終分化をもたらす可能性がある^{30, 56}。アレルギー性気道炎症におけるThおよびTreg細胞集団における異なるNotch受容体の特徴的な特化した機能は、標的化された治療的介入の機会を与える。最後に、T細胞を標的化することに加えて、中和Notch4 mAbは、血管内皮などの、気道炎症応答を動員することに関与するさらなる細胞要素を調節するように作用することができる^{57, 58}。

【0161】

参考文献

1. Brandt EB, Myers JM, Ryan PH, Hershey GK. Air pollution and allergic diseases. *Curr Opin Pediatr* 2015; 27:724-35.
2. Bowatte G, Lodge C, Lowe AJ, Erbas B, Perret J, Abramson MJ, et al. The influence of childhood traffic-related air pollution exposure on asthma, allergy and sensitization: a systematic review and a meta-analysis of birth cohort studies. *Allergy* 2015; 70:245-56.
3. Gehring U, Wijga AH, Hoek G, Bellander T, Berdel D, Bruske I, et al. Exposure to air pollution and development of asthma and rhinoconjunctivitis throughout childhood and adolescence: a population-based birth cohort study. *Lancet Respir Med* 2015; 3:933-42.
4. Adar SD, Filigrana PA, Clements N, Peel JL. Ambient Coarse Particulate Matter and Human Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Environ Health Rep* 2014; 1:258-74.
5. Khreis H, Kelly C, Tate J, Parslow R, Lucas K, Nieuwenhuijsen M. Exposure to traffic-related air pollution and risk of development of childhood asthma: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int* 2017; 100:1-31.
6. Brunst KJ, Ryan PH, Brokamp C, Bernstein D, Reponen T, Lockey J, et al. Timing and Duration of Traffic-related Air Pollution Exposure and the Risk for Childhood Wheeze and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192:421-7.
7. Dockery DW, Pope CA, 3rd. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 1994; 15:107-32.
8. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002; 360:1233-42.
9. Saxon A, Diaz-Sanchez D. Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat Immunol* 2005; 6:223-6.
10. Nel A. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. *Science* 2005; 308:804-6.
11. Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 1994; 94:1417-25.
12. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal

10

20

30

40

50

ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997; 158:2406-13.

13. Li N, Harkema JR, Lewandowski RP, Wang M, Bramble LA, Gookin GR, et al. Ambient ultrafine particles provide a strong adjuvant effect in the secondary immune response: implication for traffic-related asthma flares. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299:L374-83.

14. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:1194-204 e2.

15. Xia M, Viera-Hutchins L, Garcia-Lloret M, Noval Rivas M, Wise P, McGhee SA, et al. Vehicular exhaust particles promote allergic airway inflammation through an aryl hydrocarbon receptor-notch signaling cascade. *J Allergy Clin Immunol* 2015.

16. Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74:1-8.

17. Brandt EB, Biagini Myers JM, Acciani TH, Ryan PH, Sivaprasad U, Ruff B, et al. Exposure to allergen and diesel exhaust particles potentiates secondary allergen-specific memory responses, promoting asthma susceptibility. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136:295-303 e7.

18. Hiraiwa K, van Eeden SF. Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:619523.

19. Hardy CL, Lemasurier JS, Mohamud R, Yao J, Xiang SD, Rolland JM, et al. Differential uptake of nanoparticles and microparticles by pulmonary APC subsets induces discrete immunological imprints. *J Immunol* 2013; 191:5278-90.

20. Blank F, Stumbles PA, Seydoux E, Holt PG, Fink A, Rothen-Rutishauser B, et al. Size-dependent uptake of particles by pulmonary antigen-presenting cell populations and trafficking to regional lymph nodes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49:67-77.

21. Garbi N, Lambrecht BN. Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflugers Arch* 2017; 469:561-72.

22. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol* 2015; 16:36-44.

10

20

30

40

23. Coleman MM, Ruane D, Moran B, Dunne PJ, Keane J, Mills KH. Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48:773-80.
24. Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, et al. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3⁺ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med* 2013; 210:775-88.
25. Duan W, So T, Croft M. Antagonism of airway tolerance by endotoxin/lipopolysaccharide through promoting OX40L and suppressing antigen-specific Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2008; 181:8650-9. 10
26. Moon KA, Kim SY, Kim TB, Yun ES, Park CS, Cho YS, et al. Allergen-induced CD11b⁺ CD11c(int) CCR3⁺ macrophages in the lung promote eosinophilic airway inflammation in a mouse asthma model. *Int Immunopharmacol* 2007; 19:1371-81.
27. Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 257:209-26. 20
28. de Haar C, Kool M, Hassing I, Bol M, Lambrecht BN, Pieters R. Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1246-54.
29. Tachdjian R, Mathias C, Al Khatib S, Bryce PJ, Kim HS, Blaeser F, et al. Pathogenicity of a disease-associated human IL-4 receptor allele in experimental asthma. *J Exp Med* 2009; 206:2191-204.
30. Massoud AH, Charbonnier LM, Lopez D, Pellegrini M, Phipatanakul W, Chatila TA. An asthma-associated IL4R variant exacerbates airway inflammation by promoting conversion of regulatory T cells to TH17-like cells. *Nat Med* 2016; 22:1013-22. 30
31. Walisser JA, Glover E, Pande K, Liss AL, Bradfield CA. Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:17858-63.
32. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 1999; 8:265-77. 40

33. Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 2005; 105:2340-2.
34. Shirmohammadi F, Hasheminassab S, Saffari A, Schauer JJ, Delfino RJ, Sioutas C. Fine and ultrafine particulate organic carbon in the Los Angeles basin: Trends in sources and composition. *Sci Total Environ* 2016; 541:1083-96. 10
35. Murata A, Yoshino M, Hikosaka M, Okuyama K, Zhou L, Sakano S, et al. An evolutionary-conserved function of mammalian notch family members as cell adhesion molecules. *PLoS One* 2014; 9:e108535.
36. Blaeser F, Bryce PJ, Ho N, Raman V, Dedeoglu F, Donaldson DD, et al. Targeted inactivation of the IL-4 receptor alpha chain I4R motif promotes allergic airway inflammation. *J Exp Med* 2003; 198:1189-200.
37. Ford JG, Rennick D, Donaldson DD, Venkayya R, McArthur C, Hansell E, et al. IL-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation. *J Immunol* 2001; 167:1769-77.
38. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol* 2005; 174:5774-80. 20
39. Li N, Wang M, Bramble LA, Schmitz DA, Schauer JJ, Sioutas C, et al. The adjuvant effect of ambient particulate matter is closely reflected by the particulate oxidant potential. *Environ Health Perspect* 2009; 117:1116-23.
40. Li N, Georas S, Alexis N, Fritz P, Xia T, Williams MA, et al. A work group report on ultrafine particles (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why ambient ultrafine and engineered nanoparticles should receive special attention for possible adverse health outcomes in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138:386-96. 30
41. Whitekus MJ, Li N, Zhang M, Wang M, Horwitz MA, Nelson SK, et al. Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in a murine model for ovalbumin sensitization. *J Immunol* 2002; 168:2560-7.
42. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49:503-10. 40

43. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* 2015; 10:e0145342.
44. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25:677-86.
45. Katakura T, Miyazaki M, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *J Immunol* 2004; 172:1407-13.
46. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:563-604.
47. Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods* 2014; 408:89-100.
48. Charbonnier LM, Wang S, Georgiev P, Sefik E, Chatila TA. Control of peripheral tolerance by regulatory T cell-intrinsic Notch signaling. *Nat Immunol* 2015; 16:1162-73.
49. Moriyama Y, Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, Ogata H, Chiba S, et al. Delta-like 1 is essential for the maintenance of marginal zone B cells in normal mice but not in autoimmune mice. *Int Immunol* 2008; 20:763-73.
50. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin PG, Kraal G, et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993; 177:397-407.
51. Blumenthal RL, Campbell DE, Hwang P, DeKruyff RH, Frankel LR, Umetsu DT. Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:258-64.
52. Chelen CJ, Fang Y, Freeman GJ, Sechrist H, Marshall JD, Hwang PT, et al. Human alveolar macrophages present antigen ineffectively due to defective expression of B7 costimulatory cell surface molecules. *J Clin Invest* 1995; 95:1415-21.

10

20

30

53. Bailis W, Yashiro-Ohtani Y, Fang TC, Hatton RD, Weaver CT, Artis D, et al. Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals. *Immunity* 2013; 39:148-59.
54. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Doi S, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet* 2011; 43:893-6.
55. Tindemans I, Peeters MJW, Hendriks RW. Notch Signaling in T Helper Cell Subsets: Instructor or Unbiased Amplifier? *Front Immunol* 2017; 8:419. 10
56. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014; 20:62-8.
57. Uyttendaele H, Closson V, Wu G, Roux F, Weinmaster G, Kitajewski J. Notch4 and Jagged-1 induce microvessel differentiation of rat brain endothelial cells. *Microvasc Res* 2000; 60:91-103.
58. Miniati D, Jelin EB, Ng J, Wu J, Carlson TR, Wu X, et al. Constitutively active endothelial Notch4 causes lung arteriovenous shunts in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298:L169-77. 20

【0162】

実施例2

Tヘルパー細胞分化におけるNotchシグナル伝達

免疫細胞において、Notchは、様々なT細胞系列の発達および分化の多くの段階で活性化される^{2,3}。例えば、ナイーブCD8⁺ T細胞の活性化は、Notch1またはNotch2による抗原提示細胞上 DLL1の結合を必要とし、エオメス (Eomes)、グランザイムBおよびIFN の発現をもたらす。Notchシグナル伝達は、Tヘルパー (Th) 細胞サブセットの分化も誘導する^{2,3}。ナイーブCD4⁺ T細胞において、DLL1およびDLL4はNotchシグナル伝達およびTh1細胞転写制御因子T-betをコードするTbx21の転写を活性化する。Th2細胞の分化の間に、Jagged1およびJagged2によるNotch1およびNotch2の活性化は、GATA3およびIL-4の発現に有利である。Notch1シグナル伝達は、ROR_tおよびIL-9の発現を促進することによって、ヘルパーT細胞のTh17およびTh9の分化において重要であることが報告されている^{4,5}。 30

【0163】

マウスでの研究は、-セクレターゼ阻害剤でのNotchプロセシングの阻害またはドミナントネガティブMAML1でのCD4⁺ T細胞におけるNotch機能は、胃腸の蠕虫、トリチュリス・ムリス (Trichuris muris) およびアレルゲン攻撃誘発に対する肺のアレルギー性応答に対する防御Th2免疫を低下させるのみならず、Th1媒介性炎症を抑制する⁶。さらに、最近の研究は、Tregの分化および機能におけるNotchシグナル伝達の役割に焦点を当ててきた。Treg細胞におけるNotchシグナル伝達の抑制は、超制御性表現型 (super regulatory phenotype) を駆動するようであり、Foxp3⁺ T細胞中のRBPJまたはNotch1またはPofut1を標的化されて喪失したマウスは、致死的なGvHDから保護される。これに対して、Notch1の構成的に活性な形態N1cを過剰発現するTreg細胞は、Treg細胞をよりTh1様の表現型に傾向させるようであり、自己免疫表現型を駆動する。アレルギー性気道炎症を負に制御する上のNotchシグナル伝達の役割は、ほとんど知られていない。以下に記載されているように、本発明者らの研究は、気道炎症を促進する上での、誘導性Treg細胞特異的発現に関するNotch4の重大な役割を明らかにした。この経路の特徴および治療的介入の標的としてのその可能性は、本提案の主題である。 40 50

【0164】

技術革新

気道炎症におけるNotch4シグナル伝達の役割の発見は、喘息における治療的介入の標的として有望である、疾病の発症におけるこれまでに理解されていなかった新規経路を規定する。さらに、本明細書に提示されているデータによる、この経路が気道炎症中のTreg細胞機能を無効にするように主に作用するという実証は、この経路を標的とすることによって、有効なアレルゲン特異的Treg細胞応答およびおそらくは長期免疫寛容原性効果が可能になることを示唆する。ヒト喘息におけるNotch4の役割の範囲に関する詳細、およびこの経路が如何にしてTreg細胞亜集団を標的としてその機能を無効にするかに関する詳細が、本明細書に記載されている。

10

【0165】

Treg細胞中のNotchシグナル伝達は、気道炎症に悪影響を及ぼす

末梢性免疫寛容を調節する上でのTreg細胞内在性Notchシグナル伝達の負の機能は、以前に記載されている⁸。気道炎症におけるTreg細胞中のNotchシグナル伝達の役割を決定するために、Foxp3遺伝子駆動Creリコンビナーゼを用いた酵素Pofut1をコードする遺伝子の細胞系列特異的な欠失 (Foxp3^{GFP Cre}Pofut1^{-/-}) によってTreg細胞においてNotchシグナル伝達が特異的に不活性化されたマウスを利用した⁸。Pofut1は、Notch受容体のグリコシル化において必要な事象であり、およびNotch受容体の機能にとって不可欠であるNotch受容体のo-フコシル化を媒介する⁹。Pofut1の欠乏は、全てのNotch受容体を介するシグナル伝達を消失させる¹⁰。OVAで感作および攻撃誘発されたFoxp3^{GFP Cre}Pofut1^{-/-}マウスは、同様に感作および攻撃誘発されたPofut1が十分な対照Foxp3^{GFP Cre}マウスと比較して、顕著に減少した組織炎症および気道応答性亢進 (AHR)、肺組織好酸球増加症および好中球増加症、総IgEおよびOVA特異的IgE応答、ならびに肺組織Th2およびTh17細胞浸潤を呈した (図22A～22H)。別のFoxp3によって駆動されるCreリコンビナーゼ (Foxp3^{YFP Cre}; データは示さず) を用いて、類似の結果が見出された。

20

【0166】

気道炎症において、Treg細胞に対するNotchシグナル伝達の作用を媒介する上でのカノニカル経路と非カノニカル経路の役割を比較して決定するために、Treg細胞中のカノニカルNotch因子RBPJをコードするRbpjを欠失させることの気道応答に対する影響を調べた^{8, 11}。結果は、RbpjのTreg細胞特異的欠失を有するマウス (Foxp3^{YFP Cre}Rbpj^{-/-}) は、Foxp3^{Cre}Pofut1^{-/-}とFoxp3^{YFP Cre}マウスの間に位置する、減少したAHRおよび組織好酸球増加症の中間表現型を呈した (図22A～22H)。重要なことには、RBPJ欠失Treg細胞は気道好酸球増加症を抑制したが、好中球増加症を抑制せず、Th2細胞応答を抑制したが、Th17細胞応答を抑制せず、気道Th17細胞応答を調節するために、Treg細胞特異的なカノニカル (RBPJ依存性) Notchシグナル伝達を必要とすることを示唆する。気道炎症においてTreg細胞機能を調節する上での各Notch受容体の役割を調べた。Treg細胞中のNotch1の欠失はTreg細胞のTh1応答の制御を可能にすることが以前から見出されてきたのに対して⁸、IoxPが導入されたNotch1またはNotch2対立遺伝子のTreg細胞特異的欠失はアレルギー性気道炎症に対して全く影響を与えるなかった (図22A～22H)。したがって、Treg細胞中のNotchカノニカル経路と非カノニカル経路はいずれも、Notch3および/またはNotch4シグナル伝達を介して、アレルギー性気道炎症を促進する可能性が最も高い (図23も参照)。

30

【0167】

最後に、Treg細胞特異的なPofut1欠失は、UFPによるOVA誘発性アレルギー性気道炎症の増悪をOVA単独のものと同様に大きく抑制した (図23)。同様に、Treg細胞特異的なRbpj欠失は中間表現型を与えたが、Notch1欠失は効果を有しなかった。各マウス系統におけるTh細胞サイトカイン発現は、図22A～22Hで観察されたものと同様であった。これらの結果は、Treg細胞におけるNotchシグナル伝達の活性化は、アレルゲンおよびPMによって共有される気道炎症を促進するための共通の機序であることを示した (図23)。

40

【0168】

Notch4は、気道炎症においてTreg細胞応答を調節する

50

Notch1/Notch2は、T細胞上に発現される主要な受容体であるように見受けられるが、Notch1またはNotch2 KO動物の表現型およびg-セクレターゼ阻害剤の観察された毒性が、炎症性疾患に対するこれらの系の臨床的介入を制約してきた。これに対して、Notch4 KOマウスの表現型は著しく無害であり、いくつかのデータが発達および生理におけるこの受容体の有力な役割を裏付けている。Chatila研究室から最近発表されたデータは、単独での、または車の燃焼機関によって生成された環境の超微細粒子状物質(UFP)と協調した(OVA/UFP攻撃誘発)気道におけるアレルゲン攻撃誘発に応答して、Notch4発現は、肺常在性Treg細胞上で優先的に上昇するように見受けられ、気道炎症において不可欠な役割を果たすGATA3発現およびTreg細胞のTh2細胞様表現型を駆動することを示した。

【0169】

10

燃焼機関によって生成された超微粒子(UFP)(およびこれより粗い微粒子も)は、肺中の抗原提示細胞上でのJagged1(Jag1)発現を誘導することによって、アレルギー性気道炎症を促進することが以前に示された¹²。Jag1は、次いで、アレルゲン特異的T細胞上のNotch受容体と相互作用して、アレルギー性気道炎症を増悪させる。

【0170】

20

肺胞マクロファージは気道においてアレルゲン特異的Treg細胞の誘導を媒介するので、UFPの作用部位として肺胞マクロファージを同定したことは、特に興味深かった¹³。この知見は、UFPによる炎症応答の増悪の基礎を成す機序として、Treg細胞の望ましくない変化を示唆した。Treg細胞上のNotch1またはNotch2の欠失は、単独でのまたはUFPとのアレルゲン、オボアルブミン(OVA)による感作および攻撃誘発によって誘発される気道炎症に影響を与えないのに対して、Notchシグナル伝達機能に不可欠であるNotchフコシル化酵素Pofut1の欠失は、アレルゲン誘発性気道炎症とUFP誘発性気道炎症の両方をほぼ完全に消失することが示された。偽感作されたものと比較して、OVAで感作され、OVAまたはOVA+UFPで攻撃誘発されたマウスの細胞分別された肺常在性CD4⁺Foxp3⁺Treg細胞およびCD4⁺Foxp3⁻Tconv細胞中のNotch1~4転写物を調べるために、気道炎症のOVAモデルを利用した。結果は、OVA感作されかつOVAまたは特にOVA+UFPのいずれかで攻撃誘発されたマウスにおいて、Notch4転写物が肺常在性CD4⁺Foxp3⁺Treg細胞において顕著に上方制御されるが、CD4⁺Foxp3⁻Tconv細胞においては上方制御されないことを明らかにした(図24A)。これに対して、他のNotch受容体の転写物は、Notch4の転写物と比較して、変化しないか、またはわずかに増加した(データは図示せず)。抗Notch4 mAbでの染色は、Treg細胞でのNotch4発現が、常在性Treg細胞において同様に上方制御されるが、OVAおよびOVA+UFP処置されたマウスの常在性Tconv細胞においてはわずかに上方制御されるに過ぎないことを明らかにした(図24B~24C)。

30

【0171】

LoxPが導入されたNotch4対立遺伝子がFoxp3によって駆動されるCreリコンビナーゼ(Foxp3^{YFP}Cre)を用いてTreg細胞において特異的に欠失された遺伝学的マウスモデルを用いて、気道炎症におけるTreg細胞におけるNotch4上方制御の機能的重要性を調べた。そのTreg細胞においてNotch4が欠失されているOVA感作されたマウス(Foxp3^{YFP}CreNotch4^{-/-})は、OVAで感作され、次いで、OVAまたはOVA/UFPのいずれかで攻撃誘発されたときに、顕著に弱まった気道炎症応答を示し、Notch4が十分なTreg細胞を有するマウスと比較して、気道抵抗、組織炎症、好酸球増加症およびOVA特異的IgE応答が減少していた(図23)。Foxp3^{YFP}CreNotch4^{-/-}マウス中の弱まった気道炎症応答は、フコシル化酵素Pofut1の欠損故に、Treg細胞中のそのNotchシグナル伝達が抑制されたFoxp3^{YFP}CrePofut1^{-/-}マウスに対して、本発明者らが助成金申請において示したものと類似しており、Notch4を介したシグナル伝達が、気道炎症におけるTreg細胞中のNotchシグナル伝達の免疫調節異常作用の全てではないとしても、ほとんどを占めたことを示している。重要なことには、Treg細胞中のNotch4を欠失すると、OVAまたはOVA/UFPによって誘発された気道炎症が同じレベルまで低下し、Notch4シグナル伝達がアレルゲン媒介性およびUFP媒介性気道炎症の両方に関連する共通の経路であることを示唆する。肺胞マクロファージにおけるJag1欠失は、UFPによる気道炎症の増強を抑制したが、アレルゲンによって誘発された気道炎症に対し

40

50

ては極めて穏やかな効果を有し、一つはOVAによって誘導されその正体が現在調査されているリガンド、もう一つはUFPによって誘導されるJag1であるリガンドという、異なるNotchリガンドが、Treg細胞上のNotch4と相互作用して、気道炎症を媒介することを示唆する。

【0172】

総合すると、本明細書に提示されたこれらの結果は、Notch4が、アレルゲンおよび環境粒子状汚染物質の両方に共通である、アレルギー性炎症を駆動するための極めて重要な経路であること、ならびにNotch4が組織Treg細胞に対する可塑的変化をもたらすことによって作用して、アレルゲンへの寛容の喪失をもたらすことを示す。さらに、小児重度喘息患者に関する予備的データは、正常な健康対照と比較して、Notch4発現が患者の末梢血Treg細胞上で上昇したことを示し、疾患のバイオマーカーとして、および治療目的のために、喘息患者においてモニターすることができる漏出効果 (spill-over effect) を示している。まとめると、これらのデータは、Notch4を標的化することは、喘息を有する患者に正常な気道恒常性を回復するためのアプローチであり得、おそらく、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの他の疾患に拡張するためのアプローチであり得ることを示唆する。

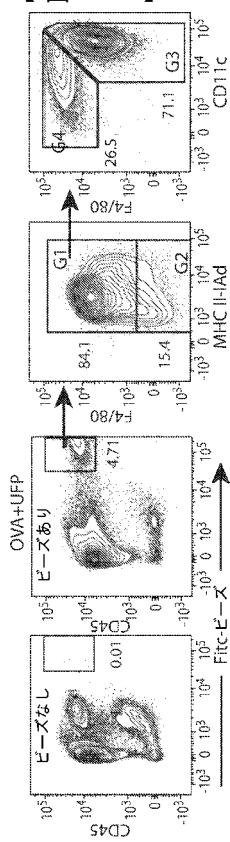
10

【0173】

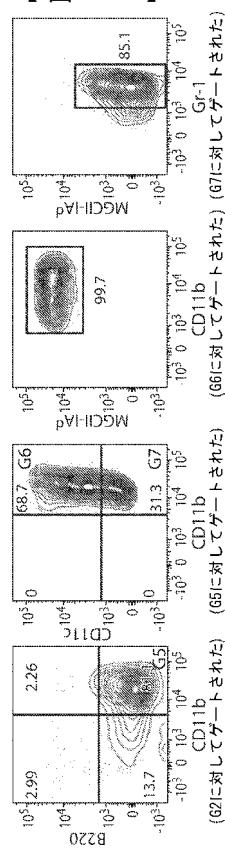
参考文献

1. Siebel, C. & Lendahl, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* 97, 1235-1294 (2017).
2. Amsen, D., Helbig, C. & Backer, R.A. Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered. *Trends Immunol* 36, 802-814 (2015).
3. Tindemans, I., Peeters, M.J.W. & Hendriks, R.W. Notch Signaling in T Helper Cell Subsets: Instructor or Unbiased Amplifier? *Frontiers in immunology* 8, 419 (2017).
4. Meyer Zu Horste, G., et al. RBPJ Controls Development of Pathogenic Th17 Cells by Regulating IL-23 Receptor Expression. *Cell reports* 16, 392-404 (2016). 10
5. Elyaman, W., et al. Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity* 36, 623-634 (2012).
6. Tu, L., et al. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* 202, 1037-1042 (2005).
7. Hirota, T., et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet* 43, 893-896 (2011).
8. Charbonnier, L.M., Wang, S., Georgiev, P., Sefik, E. & Chatila, T.A. Control of peripheral tolerance by regulatory T cell-intrinsic Notch signaling. *Nat Immunol* 16, 1162-1173 (2015). 20
9. Stanley, P. & Guidos, C.J. Regulation of Notch signaling during T- and B-cell development by O-fucose glycans. *Immunol Rev* 230, 201-215 (2009).
10. Shi, S. & Stanley, P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5234-5239 (2003).
11. Han, H., et al. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14, 637-645 (2002). 30
12. Xia, M., et al. Vehicular exhaust particles promote allergic airway inflammation through an aryl hydrocarbon receptor-notch signaling cascade. *J Allergy Clin Immunol* (2015).
13. Soroosh, P., et al. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3⁺ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med* 210, 775-788 (2013).

【図 1 A】



【図 1 B】



G7

G6

G5

G4

G3

G2

G1

G0

G9

G10

G11

G12

G13

G14

G15

G16

G17

G18

G19

G20

G21

G22

G23

G24

G25

G26

G27

G28

G29

G30

G31

G32

G33

G34

G35

G36

G37

G38

G39

G40

G41

G42

G43

G44

G45

G46

G47

G48

G49

G50

G51

G52

G53

G54

G55

G56

G57

G58

G59

G60

G61

G62

G63

G64

G65

G66

G67

G68

G69

G70

G71

G72

G73

G74

G75

G76

G77

G78

G79

G80

G81

G82

G83

G84

G85

G86

G87

G88

G89

G90

G91

G92

G93

G94

G95

G96

G97

G98

G99

G100

G101

G102

G103

G104

G105

G106

G107

G108

G109

G110

G111

G112

G113

G114

G115

G116

G117

G118

G119

G120

G121

G122

G123

G124

G125

G126

G127

G128

G129

G130

G131

G132

G133

G134

G135

G136

G137

G138

G139

G140

G141

G142

G143

G144

G145

G146

G147

G148

G149

G150

G151

G152

G153

G154

G155

G156

G157

G158

G159

G160

G161

G162

G163

G164

G165

G166

G167

G168

G169

G170

G171

G172

G173

G174

G175

G176

G177

G178

G179

G180

G181

G182

G183

G184

G185

G186

G187

G188

G189

G190

G191

G192

G193

G194

G195

G196

G197

G198

G199

G200

G201

G202

G203

G204

G205

G206

G207

G208

G209

G210

G211

G212

G213

G214

G215

G216

G217

G218

G219

G220

G221

G222

G223

G224

G225

G226

G227

G228

G229

G230

G231

G232

G233

G234

G235

G236

G237

G238

G239

G240

G241

G242

G243

G244

G245

G249

G250

G251

G252

G253

G254

G255

G256

G257

G258

G259

G260

G261

G262

G263

G264

G265

G266

G267

G268

G269

G270

G271

G272

G273

G274

G275

G276

G277

G278

G279

G280

G281

G282

G283

G284

G285

G287

G288

G289

G290

G291

G292

G293

G294

G295

G296

G297

G298

G299

G300

G301

G302

G303

G304

G305

G306

G307

G308

G309

G310

G311

G312

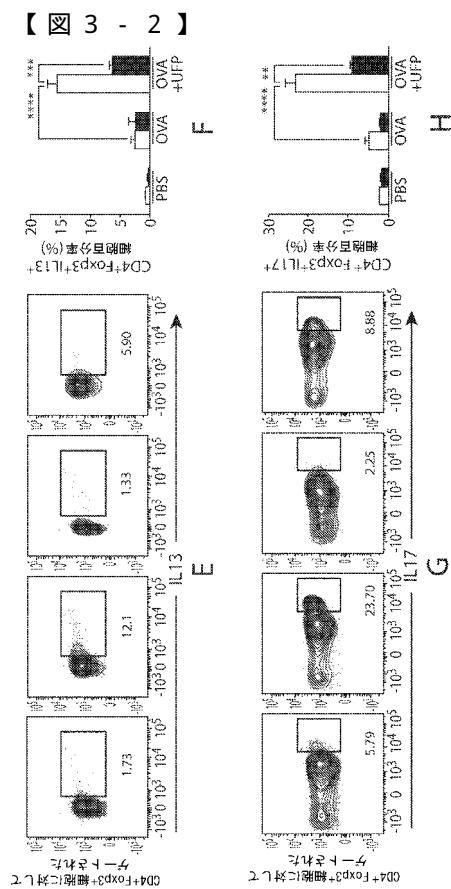
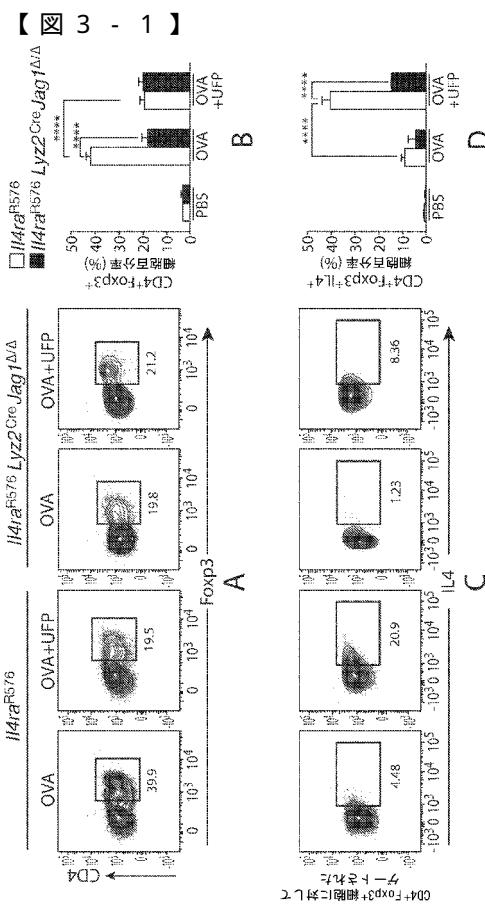
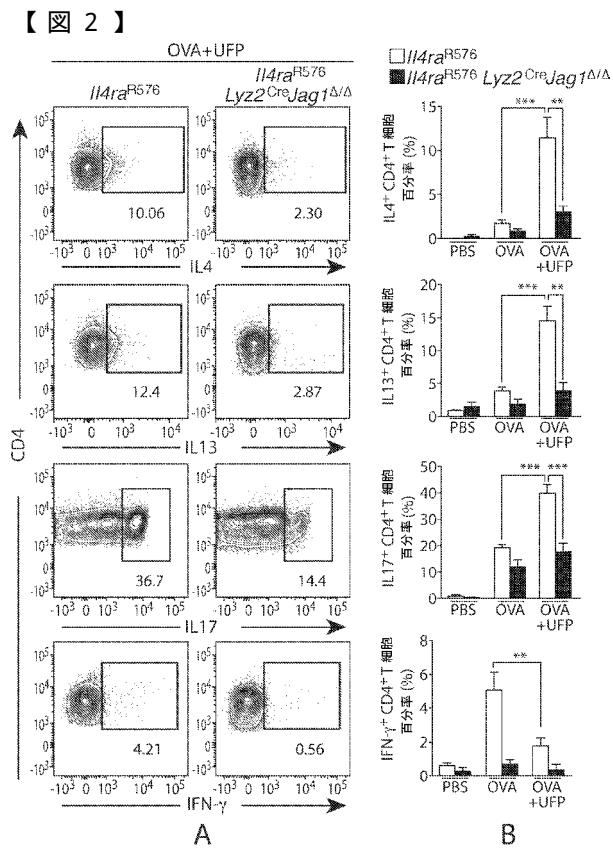
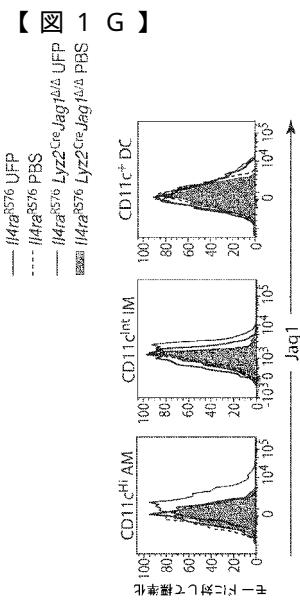
G313

G314

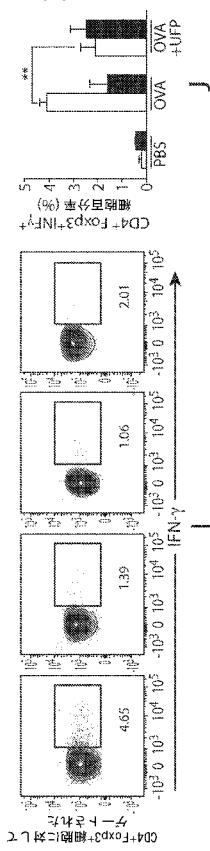
G315

G316

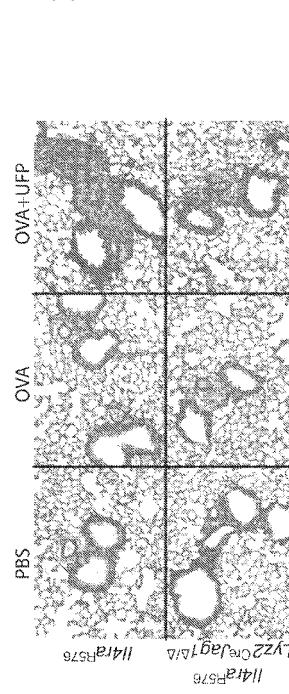
G317



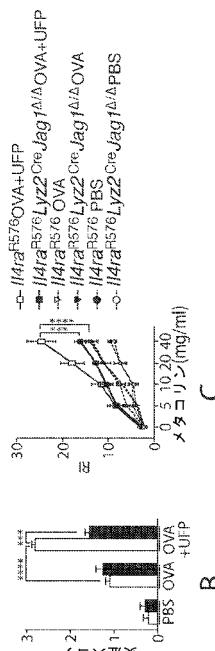
【図 3 - 3】



【図 4 - 1】

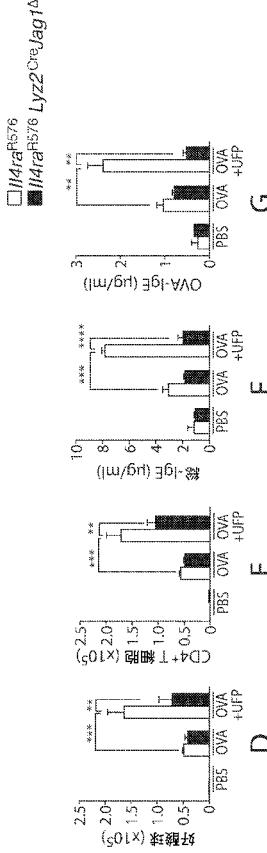


A

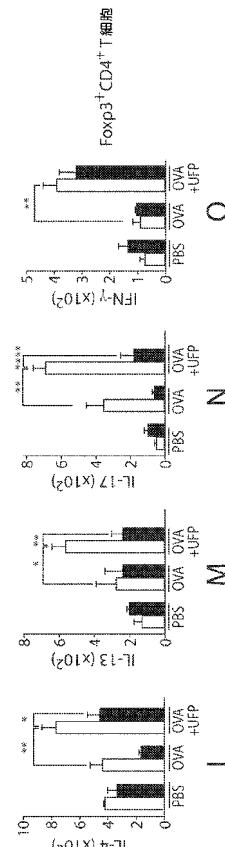


C

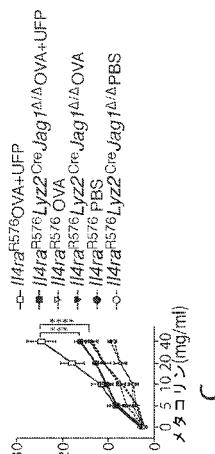
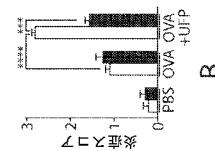
【図 4 - 2】



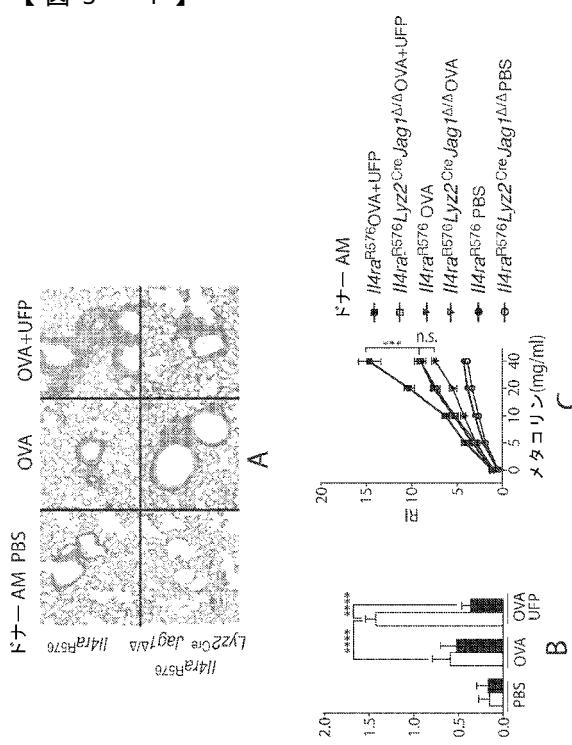
【図 4 - 3】



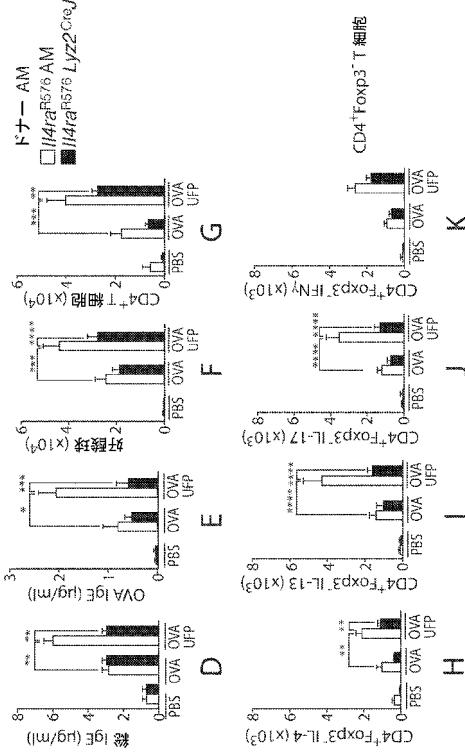
B



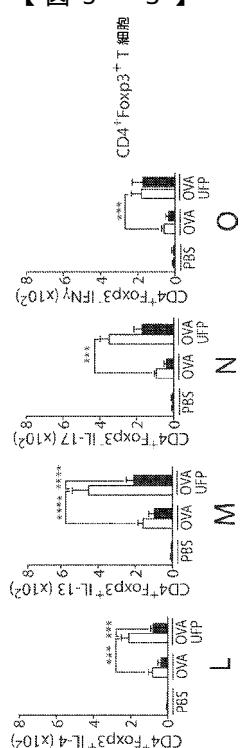
【図 5 - 1】



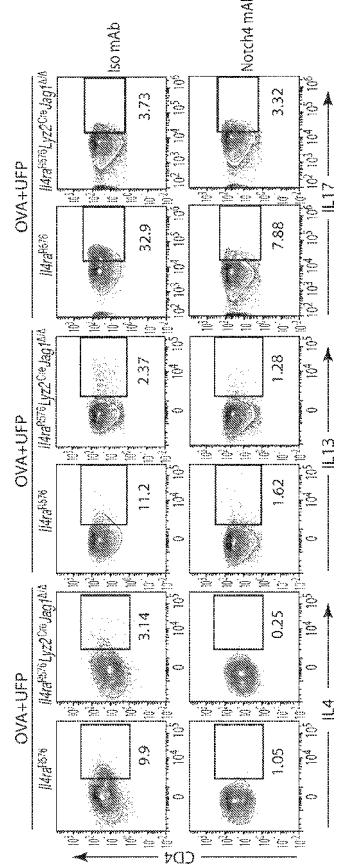
【図 5 - 2】



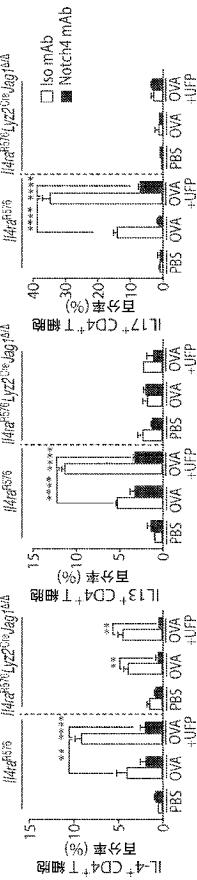
【図 5 - 3】



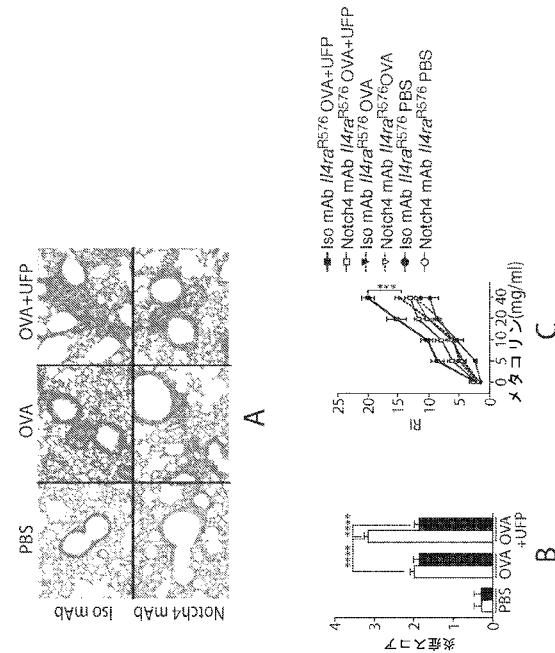
【図 6 A】



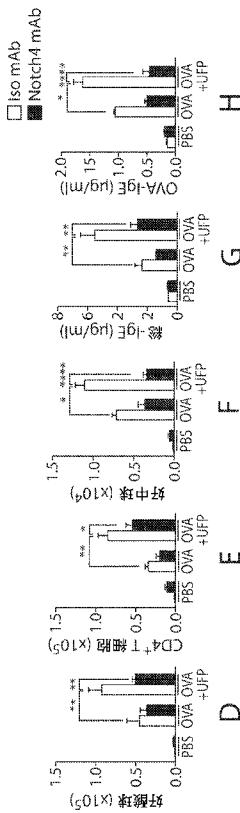
【図 6 B】



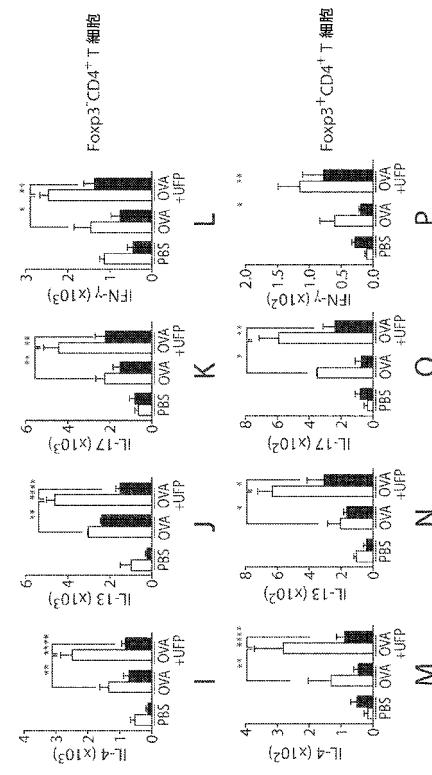
【図 7 - 1】

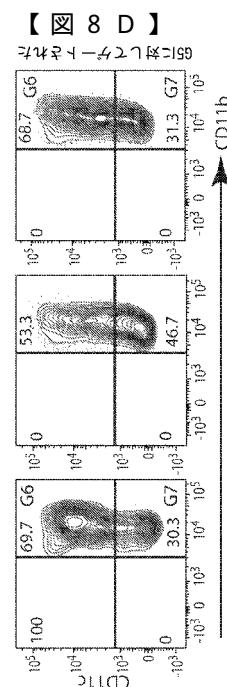
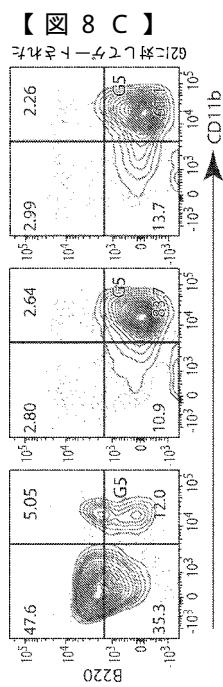
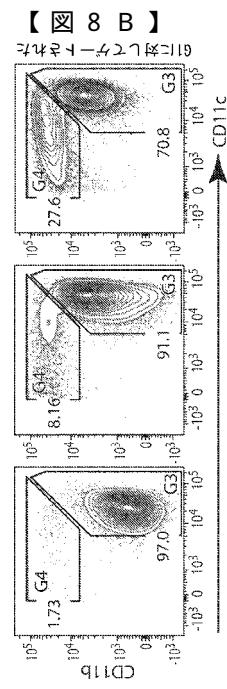
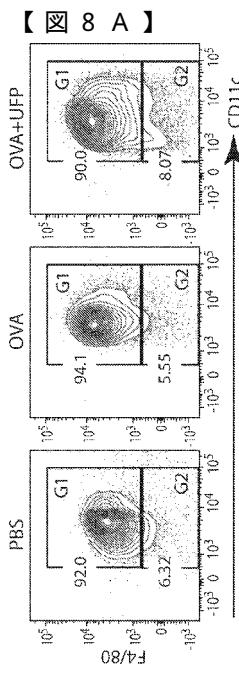


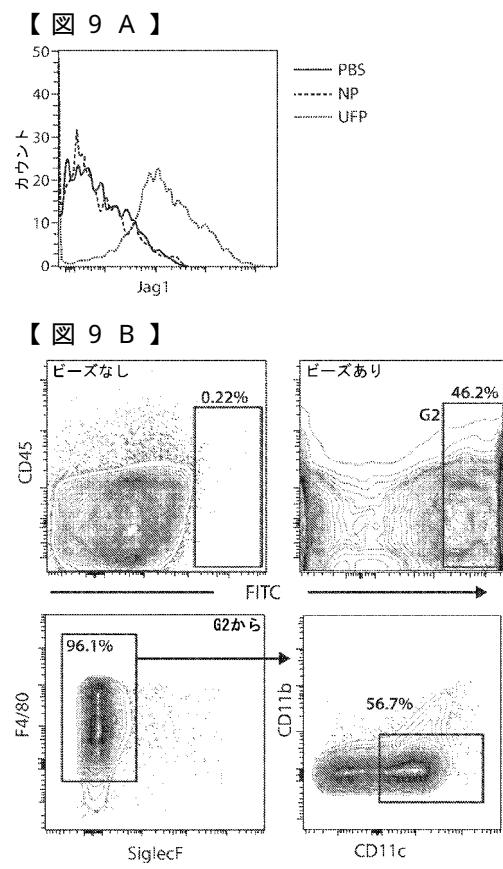
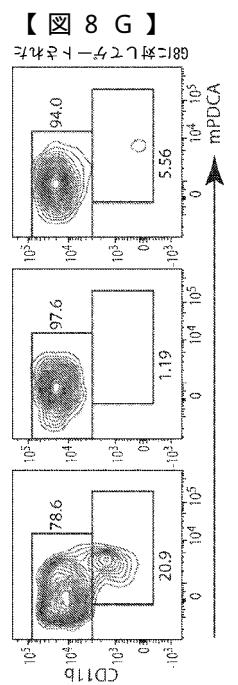
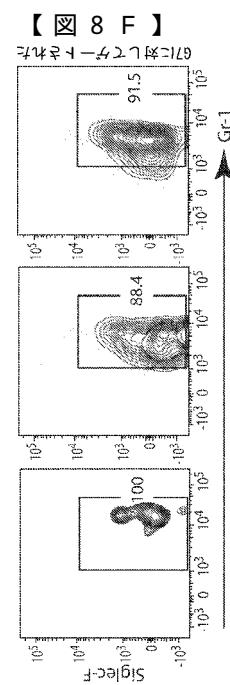
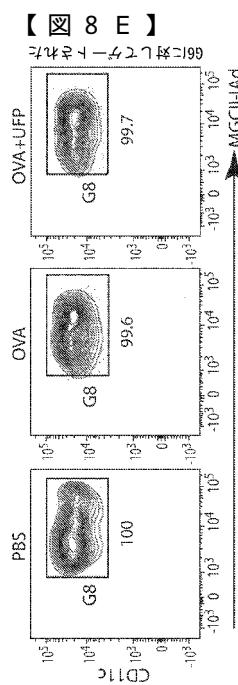
【図 7 - 2】

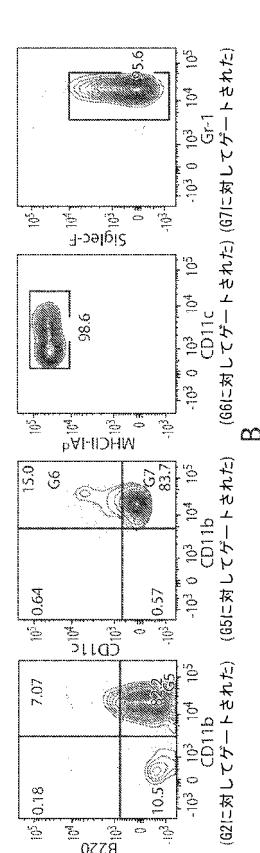
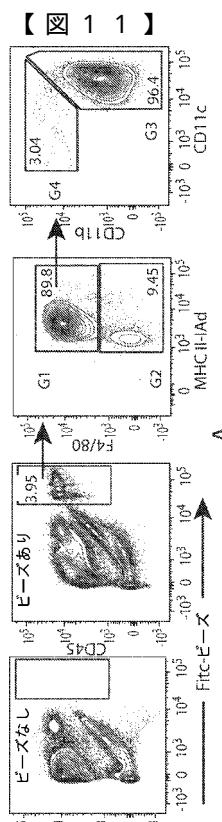
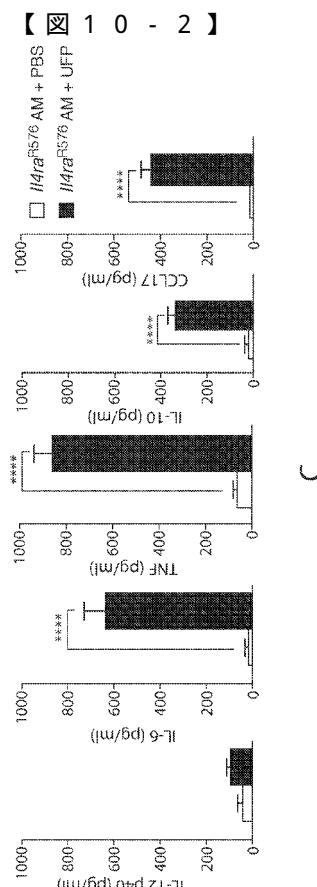
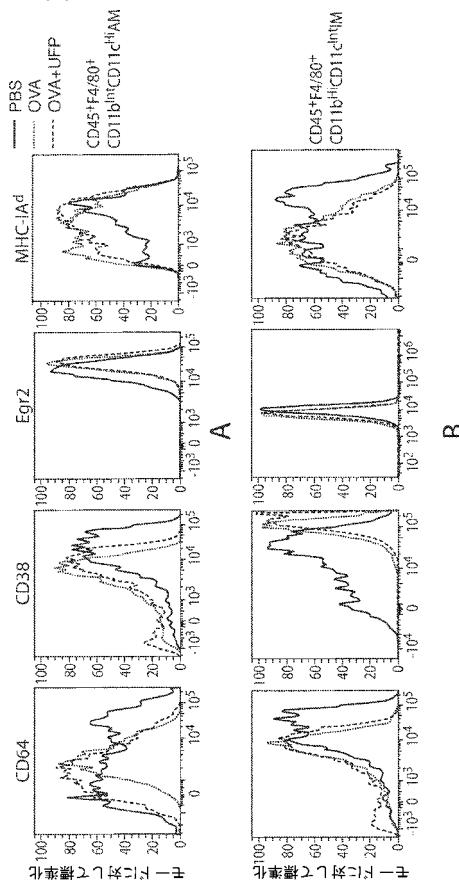
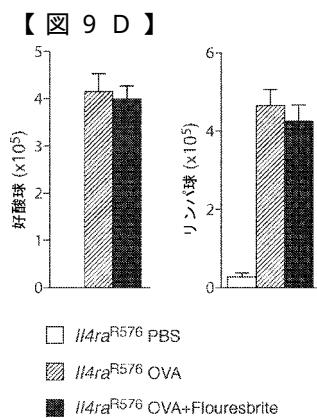
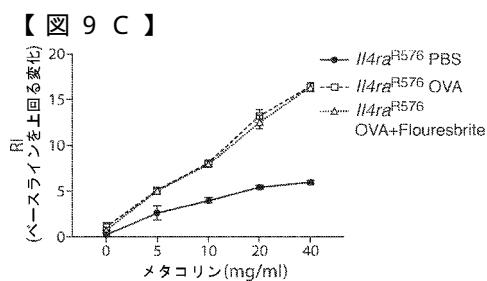


【図 7 - 3】



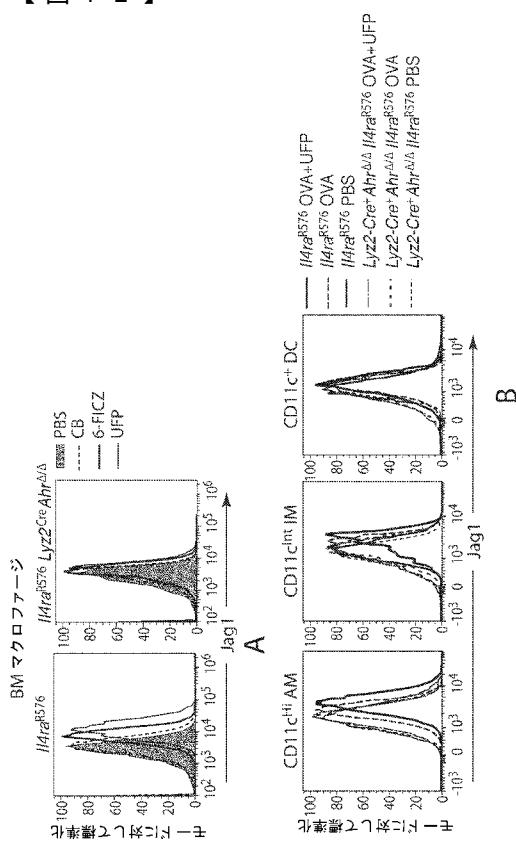




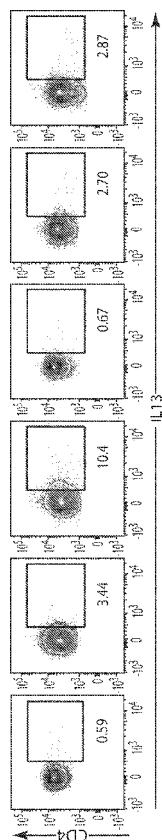


G2に対してゲートされた) (G5に対してゲートされた) (G6に対してゲートされた) (G7に対してゲートされた)

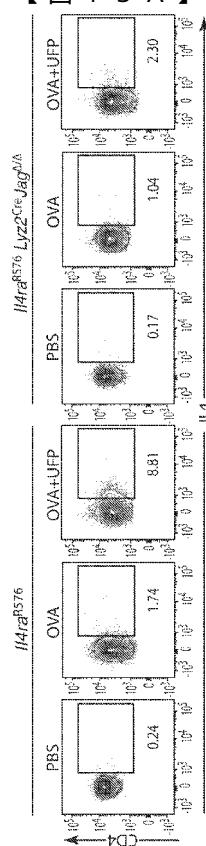
【 図 1 2 】



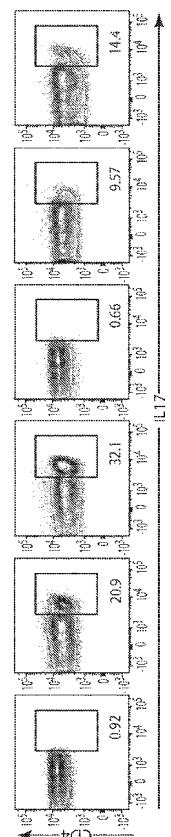
【図 1 3 B】



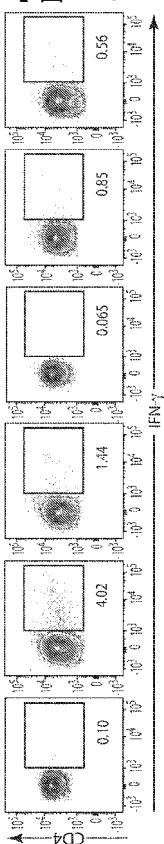
【図13A】



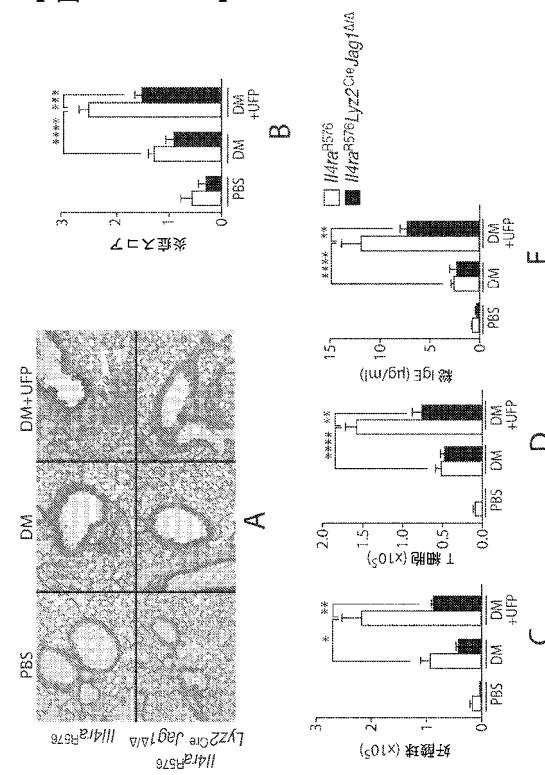
【 図 1 3 C 】



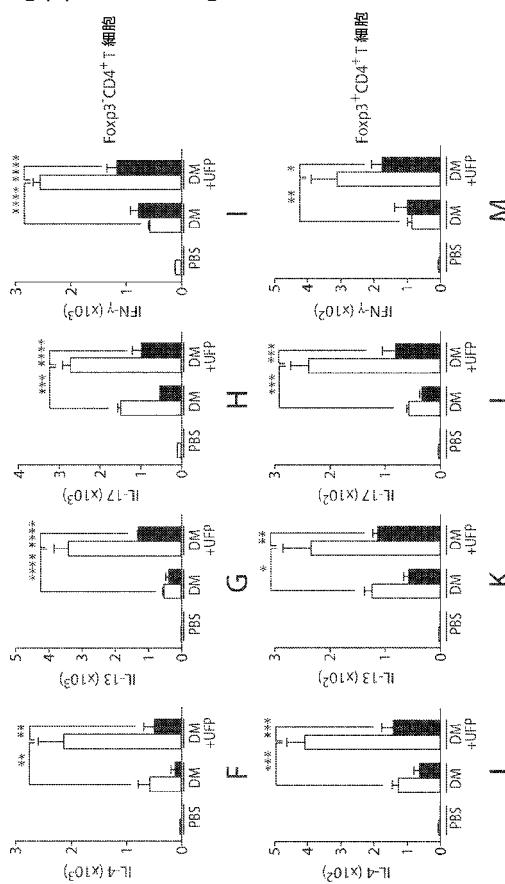
【図 1 3 D】



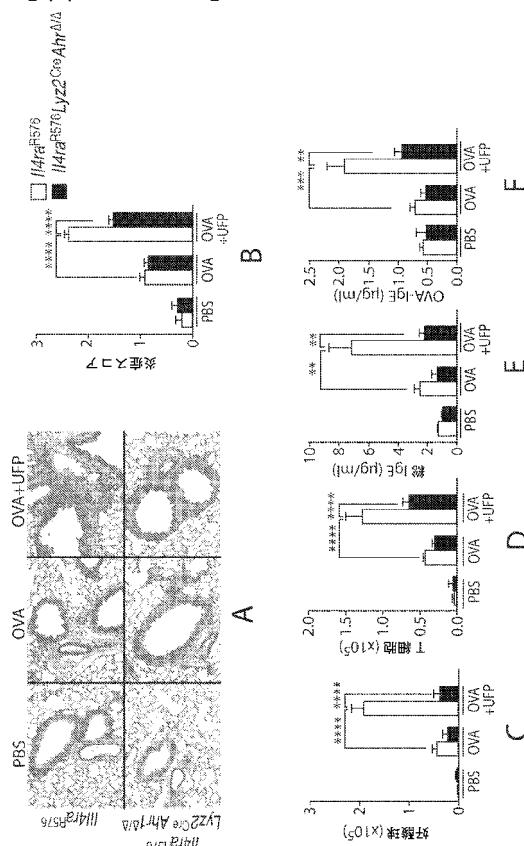
【図 1 4 - 1】



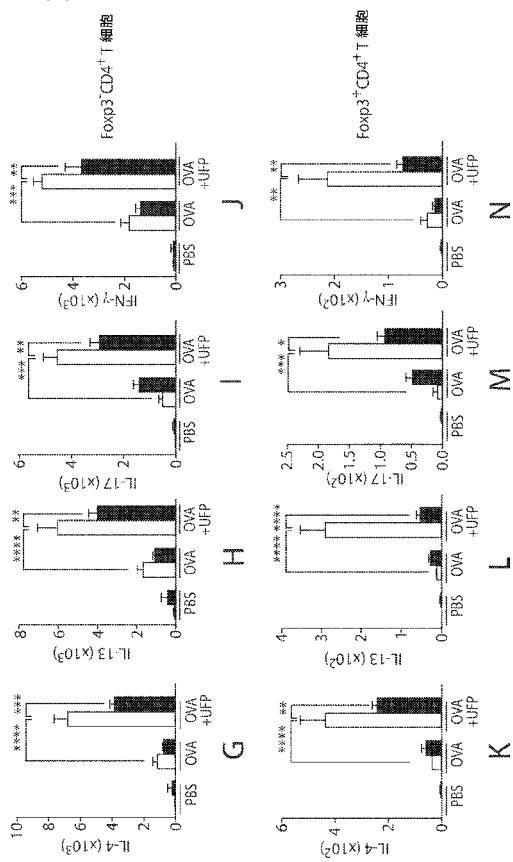
【図 1 4 - 2】



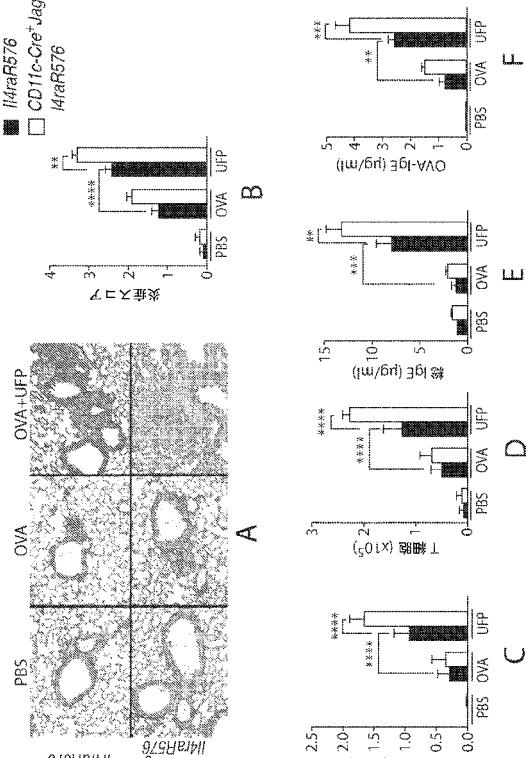
【図 1 5 - 1】



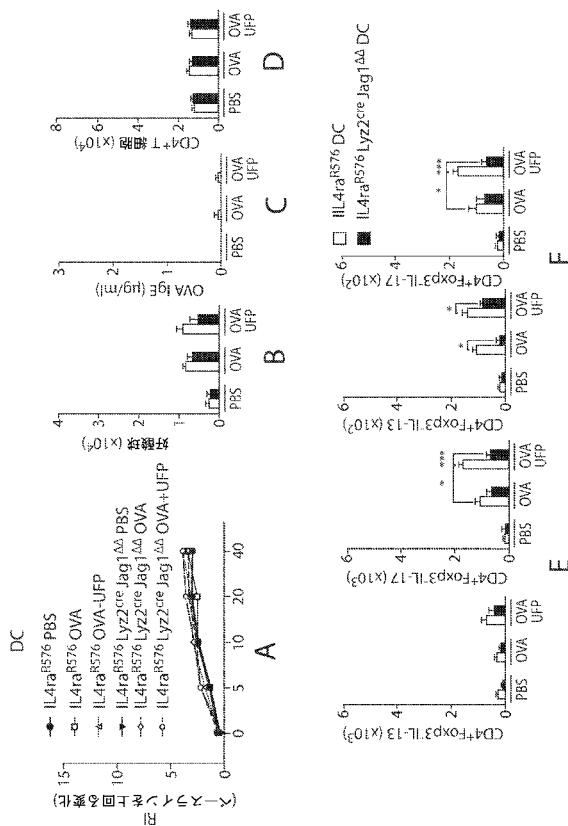
【図 15-2】



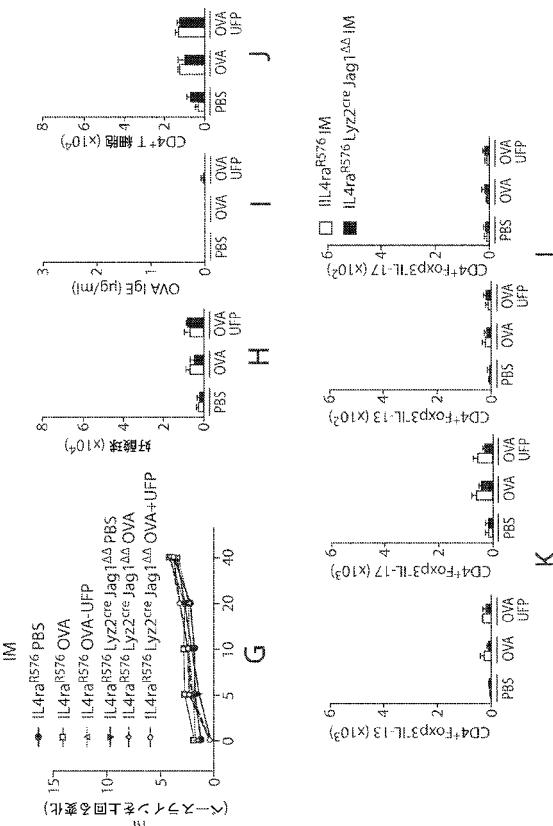
【図 16】



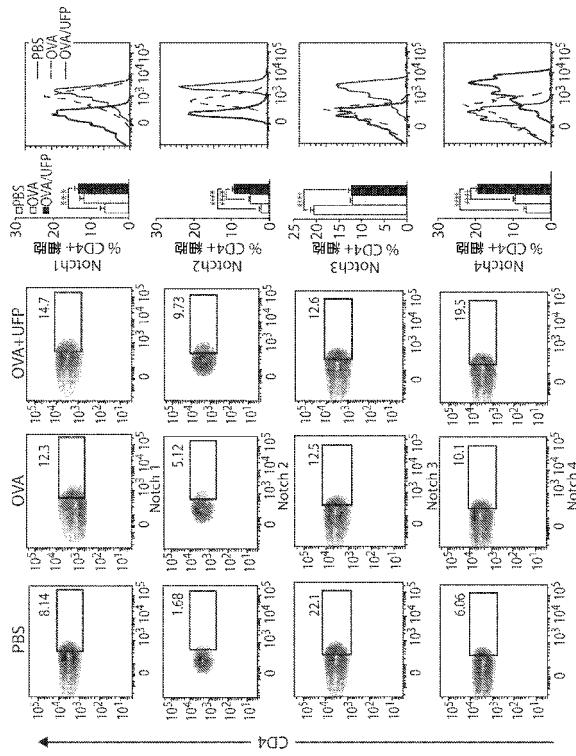
【図 17-1】



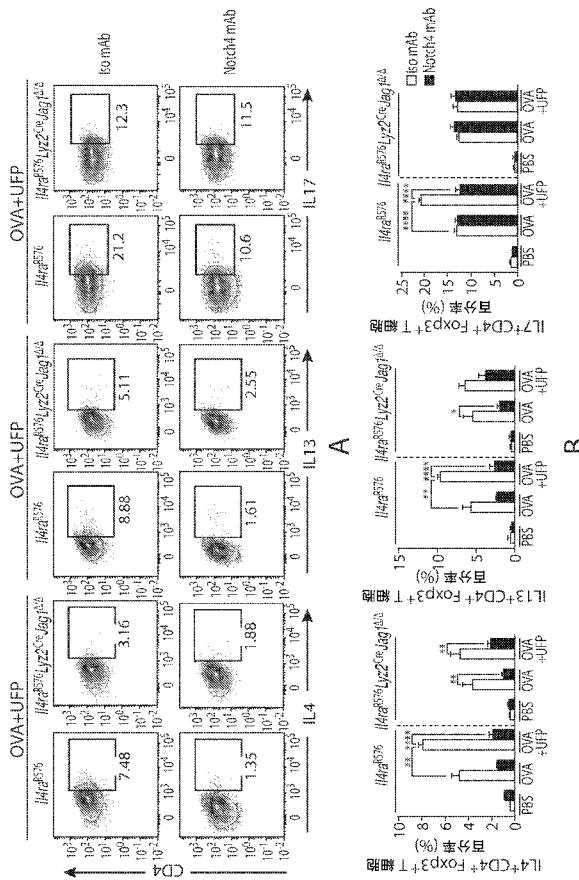
【図 17-2】



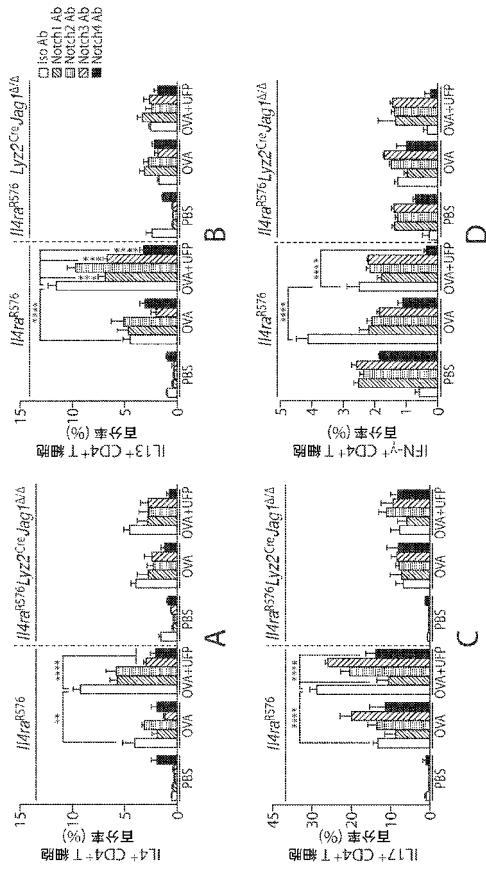
【 図 1 8 】



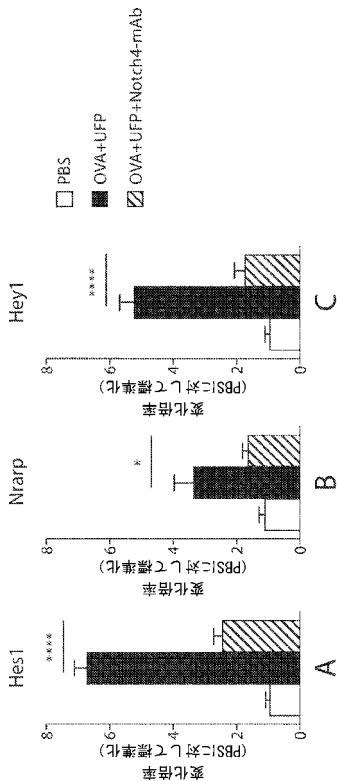
【 図 20 】



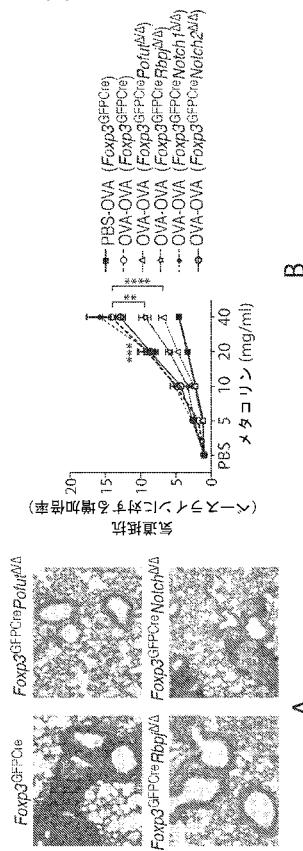
【図19】



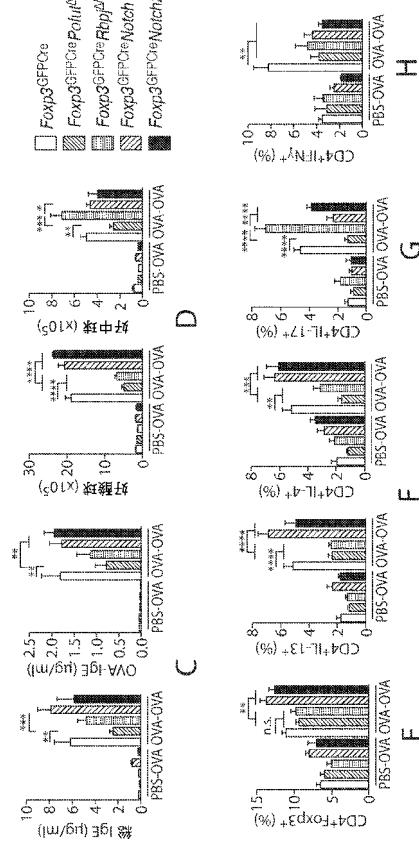
【 図 2 1 】



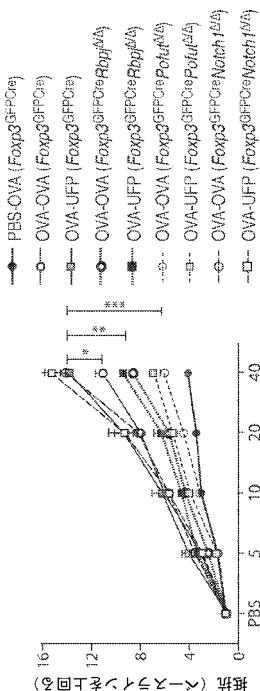
【図 2 2 - 1】



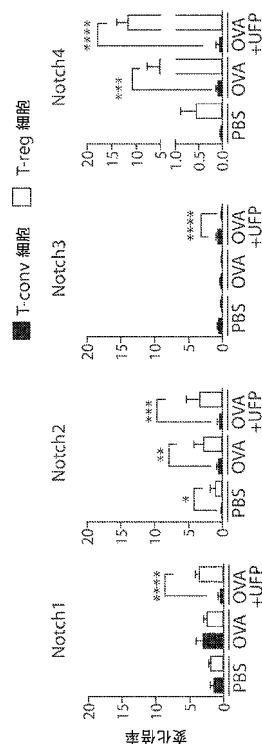
【図 2 2 - 2】

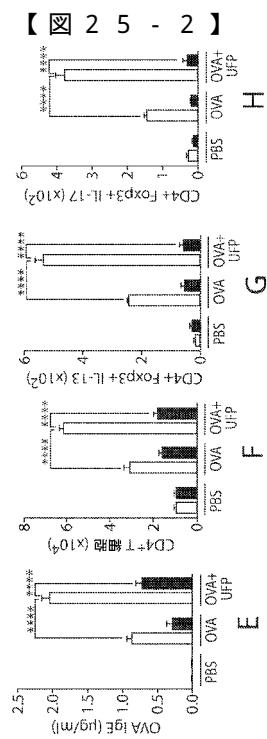
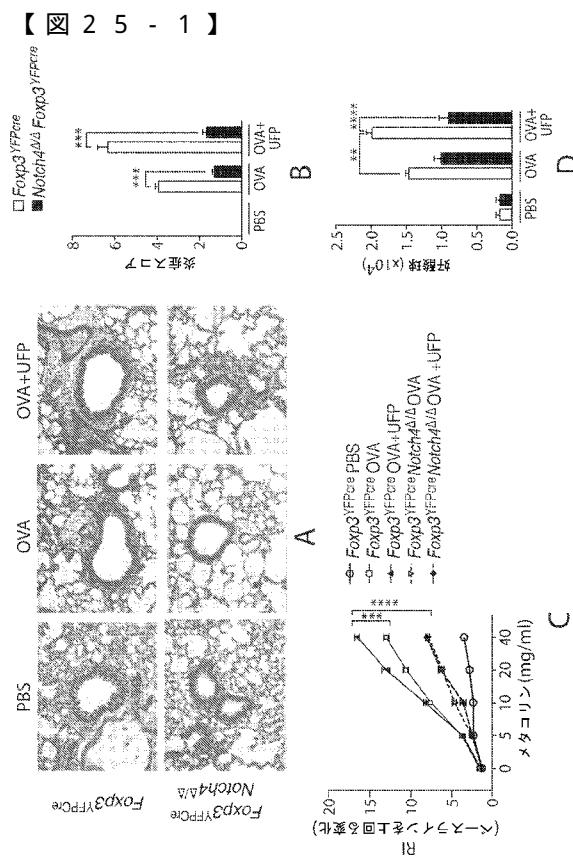
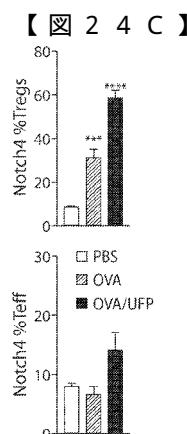
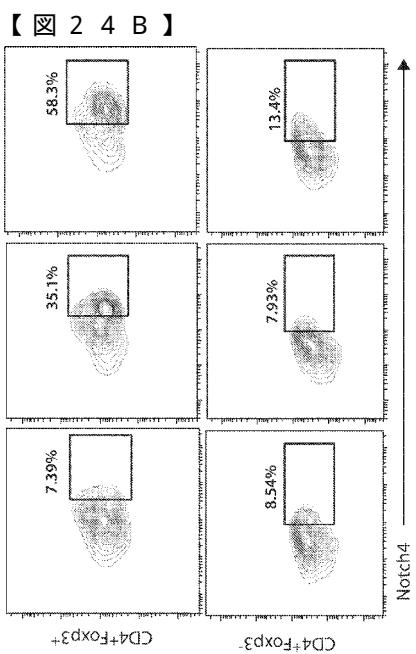


【図 2 3】

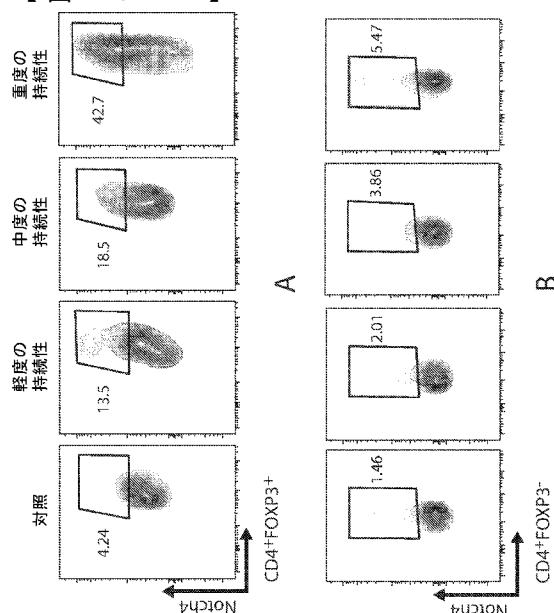


【図 2 4 A】





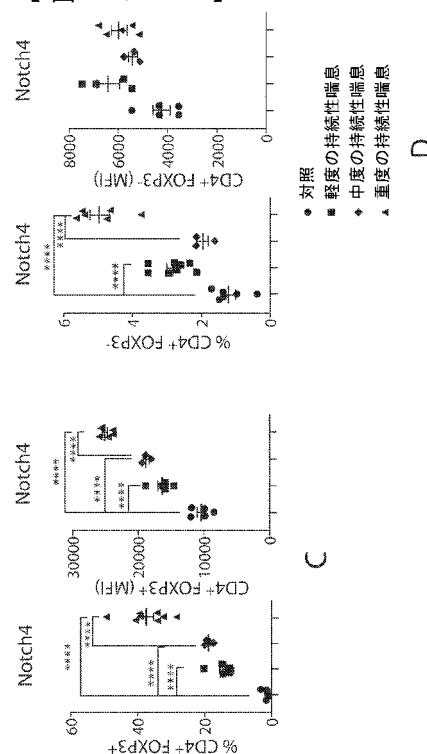
【図 26-1】



A

B

【図 26-2】



D

C

【手続補正書】

【提出日】令和2年11月17日(2020.11.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2021518345000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US19/22493
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 31/55, 31/5513; C07K 16/28; C12Q 1/68; G01N 33/50 (2019.01) CPC - A61K 31/55, 31/5513; C07K 16/28, C12Q 1/68, 1/6883, G01N 33/50, 33/5041		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0290844 A1 (GlaxoSmithKline Intellectual Property Development Limited) 12 October 2017; abstract; figure 13B; paragraphs [0011], [0032], [0039], [0041], [0043], [0052], [0058], [0111]; claim 1, 9	1-2, 10/1-2, 13-19 — 20-23
Y	US 2006/0211079 A1 (HAZEN et al.) 21 September 2006; abstract; paragraphs [0011], [0036]; claims 9, 17	20-23
Y	HUANG et al. 'Regulatory T Cells Negatively Regulate Neovascularization of Airway Remodeling via DLL4-Notch Signaling' The Journal of Immunology, 2009, 183: 4745-4754; page 4745, column 1, first paragraph. www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0804371	10/1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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		
Date of the actual completion of the international search 07 May 2019 (07.05.2019)		Date of mailing of the international search report 24 MAY 2019
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/22493

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 3-9 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/113	1 4 0 Z
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 0 0
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
	C 0 7 K 16/46	

(31) 優先権主張番号 62/659,379

(32) 優先日 平成30年4月18日(2018.4.18)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T, J, TM), EP(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, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 シャティーラ タラール アミン

アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州 ベルモント インディアン ヒル ロード

3

(72) 発明者 ハーブ ハニ

アメリカ合衆国 0 2 4 4 5 マサチューセッツ州 ブルックライン ワシントン ストリート
4 4 アパートメント 8 0 8

(72) 発明者 シャ ミンカン

アメリカ合衆国 0 2 1 1 5 マサチューセッツ州 ボストン シャタック ストリート 5 5
ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション内

(72)発明者 マスード アミル

イラン・イスラム共和国 1918814335 テヘラン ナフト ショマリ アベニュー タ
バン シャーギ 43

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA13 AA17 BA03 NA14 ZA341 ZA591 ZA891 ZB131

4C085 AA14 AA15 CC23 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA34 ZA59 ZA89 ZB13

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA22 FA74