(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6683723号
(P6683723)

(45)発行日　令和2年4月22日(2020.4.22)　(24)登録日　令和2年3月30日(2020.3.30)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	ZNAD
A61P 9/00	(2006.01)	A61P	9/00	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111
		A61K	39/395	N

請求項の数 8　(全 48 頁)

(21)出願番号	特願2017-545680(P2017-545680)
(86)(22)出願日	平成28年2月19日(2016.2.19)
(65)公表番号	特表2018-512389(P2018-512389A)
(43)公表日	平成30年5月17日(2018.5.17)
(86)国際出願番号	PCT/GB2016/050413
(87)国際公開番号	WO2016/135456
(87)国際公開日	平成28年9月1日(2016.9.1)
審査請求日	平成30年12月13日(2018.12.13)
(31)優先権主張番号	1503139.6
(32)優先日	平成27年2月25日(2015.2.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)
(31)優先権主張番号	1513390.3
(32)優先日	平成27年7月30日(2015.7.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)

(73)特許権者　517298220
ユニバーシティ　オブ　レスター
英国，レスターシャー，レスター，フィールディング　ジョンソン　ビルディング
(74)代理人　110000671
八田国際特許業務法人
(72)発明者　鈴木　亨
英国，レスターシャー，レスター，グルービ　ロード，グレンフィールド　ホスピタル，ビーエイチエフ　カーディオバスキュラー　リサーチ　センター，ユニバーシティ　オブ　レスター，ケアオブ　デパートメント　オブ　カーディオバスキュラー　サイエンシーズ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】大動脈障害

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）抗体またはその抗原結合断片を含む、大動脈解離または大動脈壁内血腫の進行もしくは再発の治療、予防、または改善剤。

【請求項２】

前記抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片が、急性大動脈解離の一次修正手術を受けた対象における再発性大動脈解離を予防するために、または慢性大動脈解離を有する対象における大動脈解離の進行を予防するために使用される、請求項１に記載の治療、予防、または改善剤。

【請求項３】

前記抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片が、配列番号２、またはその変異型もしくは断片に特異的に結合する、請求項１または２に記載の治療、予防、または改善剤。

【請求項４】

前記抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片が、配列番号３、またはその変異型もしくは断片に特異的に結合する、請求項１～３のいずれか１項に記載の治療、予防、または改善剤。

【請求項５】

前記抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片が、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の治療、予防、または改善剤。

【請求項６】
前記抗体が、ヒトまたはヒト化抗体である、請求項１～５のいずれか１項に記載の治療、予防、または改善剤。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか１項に記載の抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）抗体またはその抗原結合断片、及び必要に応じて薬学的に許容されるビヒクルを含む、大動脈解離または大動脈壁内血腫の進行もしくは再発の治療の薬学的組成物。
【請求項８】
治療上有効な量の請求項１～６のいずれか１項に記載の抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片を、薬学的に許容されるビヒクルと複合することを含む、請求項７に記載の薬学的組成物の作製プロセス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、大動脈障害に関し、特に大動脈障害の診断及び治療のための組成物及び方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
大動脈障害は、大動脈の疾患に関する。大動脈解離及び壁内血腫は、大動脈壁（１～６）の分離を伴う、潜在的に生命を脅かす大動脈障害を含む。これら２つの病態は、大動脈壁中への血流をもたらす前者の古典的形態の大動脈解離において存在し、大動脈壁内に限られた出血を伴う後者の形態の壁内血腫においては不在である、大動脈内膜の断裂によって区別される。この大動脈障害は、現在、前者（７～９）の変異型及び前駆病態である後者との連続体であると理解されている。遺伝的基礎（例えば、ＡＣＴＡ２）（１０、１１）、臨床的／疫学的側面（例えば、ＩＲＡＤ）（４、５）、ならびに生化学的手法（例えば、平滑筋バイオマーカー）（５、６）に関する理解は、過去１０年で進歩してきたが、根底にある機序は、主に信頼できる動物モデルの不足に起因して不明瞭なままであった。
【０００３】
大動脈疾患の機序を理解することにおける最近の進歩は、遺伝的に虚弱なマルファン大動脈における特徴的な研究に由来し、これらは、ＴＧＦβ及びその下流細胞内キナーゼシグナル伝達経路が、発病における中心的役割を果たすことを示した（１２～１４）。対照的に、炎症経路は、典型的な高齢患者に見られるアテローム硬化性／変形性大動脈における大動脈病態の主要な構成要素であると考えられる（１５、１６）。機序における共通点及び相違点、ならびにこれらの異なる大動脈病態における根底にあるプロセスの相対寄与は、解明され始めたばかりである。
【０００４】
したがって、大動脈障害の診断及び治療のための、改善された組成物及び方法を提供する必要性がある。
【発明の概要】
【０００５】
本研究において、発明者らは、大動脈解離／壁内血腫の根底にある機序に取り組むこと、及びその病態を誘発する機序を理解することを求めた。クルッペル様因子６（ＫＬＦ６）は、マクロファージ内で頑強に発現されること（１７）、及び肝臓（１８）、腎臓（１９）、及び心臓（Ｄ．Ｓ．，未公開データ）を含む多臓器の炎症性線維性疾患を調節することが示された転写因子である。発明者らは、この因子が、大動脈疾患の根底にある発病機序を調節し得ると仮定し、マクロファージ内のＫＬＦ６が欠乏したマウスが、大動脈炎症を受けた場合に大動脈解離／壁内血腫を示すことを観察した。
【０００６】
驚くべきことに、発明者らは、炎症性サイトカイン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）が、この病態の発症における中心的役割を果たすことを見出した

。さらに、ＧＭ－ＣＳＦに対する中和抗体の投与は、驚くべきことに、これらのマウスにおいて、この病態を予防した。逆に、大動脈炎症との組み合わせで、サイトカインの、野生型マウスへの投与は、この病態を誘導するのに十分であり、一般的な効果を示唆している。臨床的に、大動脈解離を有する患者は、サイトカインの上昇した循環レベルを示し、これは解離された大動脈内でも発現された。したがって、ＧＭ－ＣＳＦは、大動脈解離／壁内血腫を引き起こす重要な調節分子であり、このサイトカインの拮抗作用は、治療的活用（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ拮抗薬を使用する大動脈安定化）をもたらすことになる。ＧＭ－ＣＳＦはまた、診断バイオマーカーとしても作用する。

【０００７】

したがって、本発明の第１の態様に従い、大動脈障害の治療、予防、または改善における使用のための、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）の負の調節因子が提供される。

【０００８】

第２の態様において、対象における大動脈障害の治療、予防、または改善方法であって、かかる治療を必要とする対象に、治療上有効な量の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）の負の調節因子を投与することを含む、方法が提供される。

【０００９】

好ましくは、ＧＭ－ＣＳＦの負の調節因子は、大動脈解離、大動脈壁内血腫の進行または再発、大動脈瘤の拡大、炎症、及び／または破裂、ならびに大動脈炎（すなわち、大動脈の炎症）からなる群から選択される大動脈障害の病態を治療、予防、または改善するためのものである。一実施形態において、ＧＭ－ＣＳＦの負の調節因子は、急性大動脈解離の一次修正手術を受けた対象における再発性大動脈解離を予防するための維持療法で使用され得る。別の実施形態において、ＧＭ－ＣＳＦの負の調節因子は、対麻痺の危険性が高いため、手術があまり好都合でない慢性大動脈解離、すなわち、腹部解離を有する対象における大動脈解離の進行を予防するための維持療法で使用され得る。

【００１０】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）またはコロニー刺激因子２（ＣＳＦ２）は、マクロファージ、Ｔ細胞、マスト細胞、ＮＫ細胞、内皮細胞、及び線維芽細胞によって分泌される単量体糖タンパク質であり、サイトカインとして機能する。それは白血球成長因子であり、ＧＭ－ＣＳＦは、シグナル伝達物質及び転写の活性因子、ＳＴＡＴ５及びＳＴＡＴ３を介してシグナル伝達する。ヒトＧＭ－ＣＳＦ（ＧｅｎＢａｎｋ番号：ＮＣ＿０００００５．１０）のＤＮＡ配列の一実施形態は、本明細書において、配列番号１として以下のように提供される。

【００１１】

【化１】

ACACAGAGAGAAAGGCTAAAGTTCTCTGGAGGATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGC
ATCTCTGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCG
TCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGGTAAGTGAGAGAATGTGGGCCTGTGCCTAGGCCACCCAGC
TGGCCCCTGACTGGCCACGCCTGTCAGCTTGATAACATGACATTTTCCTTTTCTACAGAATGAAACAGTAGAAGTCA
TCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGTAAGATGCTTCTCTCTGACATAGCTTTCCAGAAGCCCCTGCCCTGGGGTGGAG
GTGGGGACTCCATTTTAGATGGCACCACACAGGGTTGTCCACTTTCTCTCCAGTCAGCTGGCTGCAGGAGGAGGGGG
TAGCAACTGGGTGCTCAAGAGGCTGCTGGCCGTGCCCCTATGGCAGTCACATGAGCTCCTTTATCAGCTGAGCGGCC
ATGGGCAGACCTAGCATTCAATGGCCAGGAGTCACCAGGGGACAGGTGGTAAAGTGGGGGTCACTTCATGAGACAGG
AGCTGTGGGTTTGGGGCGCTCACTGTGCCCCGAGACCAAGTCCTGTTGAGACAGTGCTGACTACAGAGAGGCACAGA
GGGGTTTCAGGAACAACCCTTGCCCACCCAGCAGGTCCAGGTGAGGCCCCACCCCCCTCTCCCTGAATGATGGGGTG
AGAGTCACCTCCTTCCCTAAGGCTGGGCTCCTCTCCAGGTGCCGCTGAGGGTGGCCTGGGCGGGGCAGTGAGAAGGG
CAGGTTCGTGCCTGCCATGGACAGGGCAGGGTCTATGACTGGACCCAGCCTGTGCCCCTCCCAAGCCCTACTCCTGG
GGGCTGGGGGCAGCAGCAAAAAGGAGTGGTGGAGAGTTCTTGTACCACTGTGGGCACTTGGCCACTGCTCACCGACG
AACGACATTTTCCACAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTC
ACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGTGAGTGCCTA
CGGCAGGGCCTCCAGCAGGAATGTCTTAATCTAGGGGGTGGGGTCGACATGGGGAGAGATCTATGGCTGTGGCTGTT
CAGGACCCCAGGGGGTTTCTGTGCCAACAGTTATGTAATGATTAGCCCTCCAGAGAGGAGGCAGACAGCCCATTTCA
TCCCAAGGAGTCAGAGCCACAGAGCGCTGAAGCCCACAGTGCTCCCCAGCAGGAGCTGCTCCTATCCTGGTCATTAT
TGTCATTATGGTTAATGAGGTCAGAGGTGAGGGCAAACCCAAGGAAACTTGGGGCCTGCCCAAGGCCCAGAGGAAGT
GCCCAGGCCCAAGTGCCACCTTCTGGCAGGACTTTCCTCTGGCCCCACATGGGGTGCTTGAATTGCAGAGGATCAAG
GAAGGGAGGCTACTTGGAATGGACAAGGACCTCAGGCACTCCTTCCTGCGGGAAGGGAGCAAAGTTTGTGGCCTTGA
CTCCACTCCTTCTGGGTGCCCAGAGACGACCTCAGCCCAGCTGCCCTGCTCTGCCCTGGGACCAAAAAGGCAGGCGT
TTGACTGCCCAGAAGGCCAACCTCAGGCTGGCACTTAAGTCAGGCCCTTGACTCTGGCTGCCACTGGCAGAGCTATG
CACTCCTTGGGGAACACGTGGGTGGCAGCAGCGTCACCTGACCCAGGTCAGTGGGTGTGTCCTGGAGTGGGCCTCCT
GGCCTCTGAGTTCTAAGAGGCAGTAGAGAAACATGCTGGTGCTTCCTTCCCCCACGTTACCCACTTGCCTGGACTCA
AGTGTTTTTTATTTTTCTTTTTTTAAAGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGA
ACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGTGAGACCGGCCAGATGAGGCT
GGCCAAGCCGGGGAGCTGCTCTCTCATGAAACAAGAGCTAGAAACTCAGGATGGTCATCTTGGAGGGACCAAGGGGT
GGGCCACAGCCATGGTGGGAGTGGCCTGGACCTGCCCTGGGCCACACTGACCCTGATACAGGCATGGCAGAAGAATG
GGAATATTTTATACTGACAGAAATCAGTAATATTTATATATTTATATTTTTAAAATATTTATTTATTTATTTATTTA
AGTTCATATTCCATATTTATTCAAGATGTTTTACCGTAATAATTATTATTAAAAATATGCTTCTACTTG

［配列番号１］

【００１２】

ヒトＧＭ－ＣＳＦのタンパク質配列（ＧｅｎＢａｎｋ番号：ＡＡＡ５２５７８．１、１４４アミノ酸）の一実施形態は、本明細書において、配列番号２として以下のように提供される。

【００１３】

【化２】

MWLQSLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLE
LYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

［配列番号２］

【００１４】

実施例３に記載の通り、また図３ａ、３ｂ、及び１０ａに示すように、ＧＭ－ＣＳＦレベルは、対照マクロファージと比較したとき、ＡｎｇＩＩ刺激に応答してＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの骨髄由来のマクロファージ内で最大増加を示した。ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈から入手されたマクロファージは、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射の実験条件下、これらのマウスの骨髄由来のマクロファージ内で、ＧＭ－ＣＳＦの顕著に増加した発現を示した。さらに、実施例４に記載の通り、また図４に示すように、ＧＭ－ＣＳＦの作用は、中和抗体を使用して遮断され、これが大動脈解離／壁内血腫（図４ａ、ｂ）、ならびにＩＬ－６の血清レベルに加えて、ＧＭ－ＣＳＦ受容体α、ＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６の発現を抑制した。したがって、ＧＭ－ＣＳＦは、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈表現型に必要とされる。表４に示すように、循環顆粒球及びリンパ球の数は、ＧＭ－ＣＳＦが抗体を中和することによって枯渇した場合に影響されなかった。したがって、これらの結果に基づいて、ＧＭ－ＣＳＦの操作は、少なくとも観察期間（１４日）の間、本モデルにおける循環白血球の数に影響しなかった。

【００１５】

故に、一実施形態において、ＧＭ－ＣＳＦの負の調節因子は、

（ｉ）例えば、そのマクロファージ受容体の活性立体構造を不安定にすること、及び／もしくは受容体をその不活性立体構造で維持し、それにより受容体がその天然リガンド、すなわち、ＧＭ－ＣＳＦに結合するのを防ぐことによって、ＧＭ－ＣＳＦシグナル伝達が達成されるＧＭ－ＣＳＦ受容体もしくはシグナル伝達分子の立体構造を変えること、

（ｉｉ）ＧＭ－ＣＳＦシグナル伝達が達成されるＧＭ－ＣＳＦ受容体に結合し、その受容体における伝達を防止、減少、もしくは減衰させること、

（ｉｉｉ）ＧＭ－ＣＳＦ受容体に、もしくはＧＭ－ＣＳＦ自体に結合した負の調節因子によって活性化された下流シグナル伝達経路を下方調節もしくは非活性化すること、

（ｉｖ）ＧＭ－ＣＳＦの転写、翻訳、もしくは発現を減少、防止、もしくは減衰させること、

（ｖ）ＧＭ－ＣＳＦの細胞内貯蔵からの合成もしくは放出を阻害すること、ならびに／または

（ｖｉ）ＧＭ－ＣＳＦの分解速度を増加させることを行うように構成され得る。

【００１６】

機序（ｉ）～（ｖｉ）の各々が、ＧＭ－ＣＳＦが配向される受容体／シグナル伝達分子における伝達、及びその活性の低減をもたらし、それによりＧＭ－ＣＳＦシグナル伝達を負に調節することが理解されるであろう。ＧＭ－ＣＳＦがシグナル伝達する受容体は、表面抗原分類１１６、すなわち、ＣＤ１１６としても知られている。それは、α鎖及びβ鎖で構成されるヘテロ二量体である。αサブユニットは、ＧＭ－ＣＳＦの結合部位を含有し、β鎖は、シグナル伝達に関与する。２つのサブユニットの会合は、受容体の活性化をもたらす。

【００１７】

好ましい実施形態において、負の調節因子は、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片を含む。抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体は、当業者に周知であり、例えば、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ またはＳａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．から商業的に入手可能であることが理解されるであろう。一実施形態において、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体（実施例において使用される）は、マウスＧＭ－ＣＳＦ抗体である（モノクローナルラットＩｇＧ２Ａクローン番号ＭＰ１２２Ｅ９、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから入手可能なカタログ番号：ＭＡＢ４１５）。別の実施形態において、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体は、カタログ番号：ｓｃ－３７７０３９（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．から）である。抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体は既知であり、関節リウマチの治療に使用されているが、かかる抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体が、大動脈障害及び本明細書に記載される関連疾患の治療においても実用性を有し得ることは、完全に予想外であった。

【００１８】

好ましくは、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片は、配列番号２、またはその変異型もしくは断片に特異的に結合する。

【００１９】

Ｒ＆Ｄ　ＳｙｓｔｅｍｓからのＧＭ－ＣＳＦ抗体によって認識されるエピトープは、不明である。しかしながら、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ（カタログ番号：ｓｃ－３７７０３９）からのＧＭ－ＣＳＦ抗体は、ヒト起源のＧＭ－ＣＳＦのＣ末端におけるアミノ酸１１５～１４４（ＴＱＩＩＴＦＥＳＦＫＥＮＬＫＤＦＬＬＶＩＰＦＤＣＷＥＰＶＱＥ－配列番号３）の間のエピトープマッピングに結合する。したがって、好ましくは抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその抗原結合断片は、配列番号３、またはその変異型もしくは断片に特異的に結合する。

【００２０】

抗体またはその抗原結合断片は、一価、二価、または多価であり得る。好ましくは、抗体またはその抗原結合断片は、単離されるか、または精製される。

【００２１】

好ましい一実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、ポリクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む。抗体またはその抗原結合断片は、ウサギ、マウス、または

ラットにおいて生成され得る。

【００２２】

別の好ましい実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。

【００２３】

本明細書で使用する場合、「ヒト抗体」という用語は、配列番号２、またはその変異型もしくは断片に対する免疫特異性を呈する特定のヒト抗体において見出される、実質的に同じ重鎖及び軽鎖ＣＤＲアミノ酸配列を含む、モノクローナル抗体等の抗体を意味し得る。重鎖または軽鎖ＣＤＲと実質的に同じであるアミノ酸配列は、基準配列と比較した場合、相当量の配列同一性を呈する。かかる同一性は、特定のヒト抗体のアミノ酸配列を表すものとして確定的に知られているか、または認識可能である。実質的に同じ重鎖及び軽鎖ＣＤＲアミノ酸配列は、例えば、アミノ酸のわずかな修正または保存的置換を有し得る。かかるヒト抗体は、配列番号２、またはその変異型もしくは断片に選択的に結合するその機能を維持する。

【００２４】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、例えば、ファージライブラリによるか、リンパ球によるか、またはハイブリドーマ細胞による産生等の組み換え方法によって産生される、実質的に、または全体的にヒトＣＤＲアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を含み得る。

【００２５】

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト種（例えば、マウスまたはウサギ）からの抗体を意味し得、それらのタンパク質配列は、ヒトにおいて天然に産生される抗体に対するそれらの類似性を増加するように修飾されている。

【００２６】

抗体は、組み換え抗体、すなわち、組み換えＤＮＡ技術を使用して産生されるヒト抗体であり得る。

【００２７】

「抗原結合領域」という用語は、その標的抗原、例えば、配列番号２、またはその変異型もしくは断片のペプチドに対する特異的結合親和性を有する抗体の領域を意味し得る。好ましくは、断片は、エピトープ、好ましくは配列番号３、またはその変異型もしくは断片である。結合領域は、超可変ＣＤＲまたはその機能的部分であり得る。ＣＤＲの「機能的部分」という用語は、標的抗原に対する特異的親和性を示すＣＤＲ内の配列を意味し得る。ＣＤＲの機能的部分は、配列番号２またはその断片に特異的に結合するリガンドを含み得る。

【００２８】

本発明に従う負の調節因子（本明細書では集合的に「薬剤」と称される）は、大動脈障害の治療、改善、または予防のための、単剤療法（例えば、抗体またはその抗原結合断片単独の使用）において使用され得る。代替として、本発明に従う薬剤は、降圧剤（β遮断剤）及び鎮痛剤等の、大動脈障害の治療、改善、または予防のための既知の療法に対する付加物として、またはそれらと組み合わせて使用されてもよい。

【００２９】

本発明に従う薬剤は、特に、組成物が使用される方法に応じて多くの異なる形態を有する組成物中に複合され得る。故に、例えば、組成物は、粉末、錠剤、カプセル、液体、軟膏、クリーム、ゲル、ヒドロゲル、エアロゾル、スプレー、ミセル溶液、経皮パッチ、リポソーム懸濁液の形態、または治療を必要とするヒトまたは動物に投与され得る任意の他の適した形態を取り得る。本発明に従うビヒクルまたは医薬品は、それが与えられる対象によって十分に耐えられる、好ましくは心臓への薬剤の送達を可能にするものであるべきであるということが理解されるであろう。

【００３０】

本発明の薬剤を含む医薬品は、多くの方法で使用され得る。例えば、経口投与が必要とされる場合があり、この場合、薬剤は、例えば、錠剤、カプセル、または液体の形態で経口的に摂取され得る組成物内に含有され得る。本発明の薬剤及び医薬品を含む組成物は、吸入によって（例えば、鼻腔内的に）投与されてもよい。組成物は、局所使用のために製剤化されてもよい。例えば、クリームまたは軟膏は、例えば、心臓に隣接した皮膚に適用され得る。

【００３１】

本発明に従う薬剤及び医薬品は、徐放または遅延放出デバイス内に組み込まれてもよい。かかるデバイスは、例えば、皮膚の上または下に挿入されてもよく、医薬品は、数週間またはさらには数ヶ月にわたって放出されてもよい。デバイスは、治療部位、すなわち心臓に少なくとも隣接して位置し得る。かかるデバイスは、本発明に従って使用される薬剤での長期治療が必要とされる場合、及び通常は頻繁な投与（例えば、少なくとも１日１回の注入）を必要とする場合に特に有利であり得る。

【００３２】

好ましい実施形態において、本発明に従う薬剤及び医薬品は、血流への注入、または治療を必要とする部位への直接注入によって対象に投与され得る。例えば、医薬品は、心臓に少なくとも隣接して注入され得る。注入は、静脈内（ボーラスもしくは注射）、または皮下（ボーラスもしくは注射）、または皮内（ボーラスもしくは注射）であってもよい。

【００３３】

必要とされる薬剤（例えば、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体）の量は、その生物活性及び生物学的利用能によって決定され、これは次に、投与形態、薬剤の生理化学的特性、及びそれが単剤療法として使用されるか、または複合療法において使用されるかに依存することが理解されるであろう。投与の頻度は、治療される対象における薬剤の半減期によっても影響されるであろう。投与される最適投薬量は、当業者によって決定され得、使用中の特定の薬剤、薬学的組成物の強度、投与形態、及び大動脈障害の進行により変動することになる。治療される特定の対象に依存する追加因子は、対象の年齢、体重、性別、食事、及び投与時間を含む、投薬量を調整する必要性をもたらすことになる。

【００３４】

一般に、どの薬剤が使用されるかに応じて、体重の０．００１μｇ／ｋｇ～体重の１０ｍｇ／ｋｇの日用量の本発明に従う薬剤が、大動脈障害の治療、改善、または予防のために使用され得る。より好ましくは、薬剤の日用量は、体重の０．０１μｇ／ｋｇ～体重の１ｍｇ／ｋｇであり、より好ましくは体重の０．１μｇ／ｋｇ～１００μｇ／ｋｇ、最も好ましくは体重のおよそ０．１μｇ／ｋｇ～１０μｇ／ｋｇである。

【００３５】

薬剤は、大動脈障害の発症前、発症中、または発症後に投与され得る。日用量は、単回投与（例えば、１日１回の注入）として与えられてもよい。代替として、薬剤は、１日の間に２回以上の投与を必要とする場合がある。例として、薬剤は、０．０７μｇ～７００ｍｇ（すなわち、体重７０ｋｇを想定して）の２つ（または治療される大動脈障害の重症度に応じてそれ以上）の日用量として投与され得る。治療を受ける患者は、起床時に第１の用量を摂取し、次いで午後に（２用量計画の場合）、またはその後３時間もしくは４時間間隔で摂取することができる。代替として、反復用量を投与する必要なく、本発明に従う薬剤の最適用量を患者に提供するために、徐放デバイスが使用されてもよい。

【００３６】

マウスに使用される投薬量は、腹腔内注入によって２週間１日おきに、１匹のマウス当たり３００マイクログラム、または１２ｍｇ／ｋｇであった。静脈内ＭＯＲ１０３（１．０または１．５ｍｇ／ｋｇ）を週１回、４週間にわたって用いて、及び皮下マブリリムマブ（１００ｍｇ）を隔週で１２週間にわたって用いて、ヒトにおいて行われた成功研究に基づき、７５ｍｇ～１００ｍｇの週１回または隔週の静脈内または皮下投与が好ましい。

【００３７】

製薬産業によって従来用いられるもの等の既知の手順（例えば、生体内実験、臨床治験

等）を使用して、本発明に従う薬剤の特定の製剤、及び精密な治療計画（薬剤の日用量及び投与の頻度等）を形成することができる。

【００３８】

故に、本発明の第３の態様において、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）の負の調節因子、及び必要に応じて薬学的に許容されるビヒクルを含む、大動脈障害治療の薬学的組成物が提供される。

【００３９】

本発明はまた、第４の態様において、第３の態様に従う薬学的組成物の作成プロセスであって、治療上有効な量のＧＭ－ＣＳＦの負の調節因子を、薬学的に許容されるビヒクルと複合することを含む、プロセスを提供する。

【００４０】

負の調節因子は、好ましくは抗体またはその抗原結合断片、好ましくは抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体である。

【００４１】

「対象」は、脊椎動物、哺乳動物、または飼育動物であり得る。したがって、本発明に従う医薬品は、任意の哺乳動物、例えば、家畜（例えば、ウマ）、ペットを治療するために使用され得るか、または他の獣医用途において使用され得る。最も好ましくは、対象は、ヒトである。

【００４２】

負の調節因子の「治療上有効な量」は、対象に投与される場合、大動脈障害疾患を治療するために必要とされるか、または所望の効果をもたらす薬剤の量である、任意の量である。

【００４３】

例えば、使用される治療上有効な量の負の調節因子は、約０．００１ｎｇ～約１ｍｇ、好ましくは約０．０１ｎｇ～約１００ｎｇであり得る。負の調節因子の量は、約０．１ｎｇ～約１０ｎｇ、最も好ましくは約０．５ｎｇ～約５ｎｇの量であることが好ましい。

【００４４】

「薬学的に許容されるビヒクル」は、本明細書で言及する場合、薬学的組成物の製剤化に有用であることが当業者に知られている、任意の既知の化合物または既知の化合物の組み合わせである。

【００４５】

一実施形態において、薬学的に許容されるビヒクルは、固体であってもよく、組成物は、粉末または錠剤の形態を取り得る。固体の薬学的に許容されるビヒクルは、香味剤、潤滑剤、可溶化剤、懸濁剤、染料、充填剤、滑剤、圧縮助剤、不活性結合剤、甘味剤、保存剤、染料、コーティング、または錠剤崩壊剤としても作用し得る、１つ以上の基質を含み得る。ビヒクルはまた、封入材料であってもよい。粉末において、ビヒクルは、本発明に従う細分された活性剤との混和物中の、細分された固体である。錠剤において、活性剤は、適した比率で必須の圧縮特性を有し、所望の形状及びサイズに圧密されたビヒクルと混合され得る。粉末及び錠剤は、好ましくは、活性剤の９９％までを含油する。適した固体ビヒクルには、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリドン、低融点蝋、及び鉄交換樹脂が含まれる。別の実施形態において、薬学的ビヒクルは、ゲルであってもよく、組成物は、クリーム等の形態を取り得る。

【００４６】

しかしながら、薬学的ビヒクルは、液体であってもよく、薬学的組成物は、溶液の形態を取る。液体ビヒクルは、溶液、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エリキシル、及び加圧組成物を調製する際に使用される。本発明に従う活性剤は、水、有機溶媒、薬学的に許容される油もしくは脂肪、または両方の混合物等の薬学的に許容される液体ビヒクル中に溶解または懸濁され得る。液体ビヒクルは、可溶化剤、乳化剤、緩衝剤、保存剤、甘味剤、香味剤、懸濁剤、増粘剤、着色剤、粘度調節剤、安定剤、または浸透圧調節剤等の他の

適した薬学的添加剤を含有し得る。経口及び非経口投与のための液体ビヒクルの適した例には、水（上記のような添加剤、例えば、セルロース誘導体を部分的に含有する、好ましくは、カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液）、アルコール（一価アルコール及び多価アルコール、例えば、グリコールを含む）及びそれらの誘導体、ならびに油（例えば、分留ココナッツ油及び落花生油）が含まれる。非経口投与の場合、ビヒクルは、オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピル等の油性エステルでもあり得る。無菌液体ビヒクルは、非経口投与のための無菌液体形態の組成物において有用である。加圧組成物のための液体ビヒクルは、ハロゲン化炭化水素または他の薬学的に許容される推進剤であり得る。

【００４７】

無菌溶液または懸濁液である液体薬学的組成物は、例えば、筋肉内注入、髄腔内注入、硬膜外注入、腹腔内注入、静脈内注入、及び特に皮下注入によって用いられ得る。この薬剤は、無菌水、生理食塩水、または他の適切な無菌注入用媒質を使用して、投与時に溶解または懸濁され得る、無菌固体組成物として調製されてもよい。

【００４８】

本発明の薬剤及び組成物は、他の溶質または懸濁剤（例えば、溶液を等張させるのに十分な生理食塩水またはグルコース）、胆汁塩、アカシア、ゼラチン、モノオレイン酸ソルビタン、ポリソルベート８０（ソルビトールのオレイン酸エステル及び酸化エチレンと共重合されたその無水物）等を含有する無菌溶液または懸濁液の形態で経口的に投与され得る。本発明に従って使用される薬剤はまた、液体または個体組成物形態のいずれかで経口的に投与され得る。経口投与に適した組成物には、ピル、カプセル、顆粒、錠剤、及び粉末等の固体形態、ならびに溶液、シロップ、エリキシル、及び懸濁液等の液体形態が含まれる。非経口投与に有用な形態には、無菌溶液、エマルジョン、及び懸濁液が含まれる。

【００４９】

本明細書で論じられる場合、ＧＭ－ＣＳＦは、大動脈障害の病態に罹患している対象において上昇する。これらの発見は、それが診断ツールまたはバイオマーカーとして使用され得ることを示唆する。

【００５０】

したがって、第５の態様において、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはその変異型もしくは断片の、大動脈障害を検出または診断するためのバイオマーカーとしての使用が提供される。

【００５１】

好ましくは、配列番号２、またはその変異型もしくは断片は、適したバイオマーカーとして作用し、これらが検出され得る。好ましくは、配列番号２、またはその変異型もしくは断片は、抗体または抗原結合断片、好ましくは第１の態様に従って使用される抗体または抗原結合断片によって結合され得るエピトープとして作用する。

【００５２】

本発明はまた、大動脈障害に罹患している患者の診断キットも提供する。

【００５３】

したがって、本発明の第６の態様に従い、大動脈障害に罹患している対象、またはそれに対する素因を診断するため、または対象の病態の予後を提供するためのキットが提供され、このキットは、

（ｉ）試験対象から入手した試料中の、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはその変異型もしくは断片の濃度を検出するための検出手段と、

（ｉｉ）大動脈障害に罹患していない個体からの試料中の、ＧＭ－ＣＳＦの濃度に関する基準と、を含み、

このキットは、基準と比較して、試験対象からの身体試料中のＧＭ－ＣＳＦの濃度の差を特定し、それにより試験対象が、大動脈障害に罹患している、もしくはそれに対する素因を有していることを示唆するか、または対象の病態の陰性予後を提供するように構成される。

【００５４】
第７の態様に従い、大動脈障害に罹患している対象、もしくはそれに対する素因の診断、または対象の病態の予後の提供方法が提供され、この方法は、対象から入手した身体試料中の、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはその変異型もしくは断片の濃度を分析することと、この濃度を、大動脈障害に罹患していない個体におけるＧＭ－ＣＳＦの濃度に関する基準と比較することとを含み、基準と比較した試験対象からの身体試料中のＧＭ－ＣＳＦの濃度が、対象が、大動脈障害に罹患している、もしくはそれに対する素因を有していることを示唆するか、または対象の病態の陰性予後を提供する。
【００５５】
対象は、獣医的関心対象の任意の動物、例えば、ネコ、イヌ、ウマ等であり得る。しかしながら、対象は、ヒト等の哺乳動物の雄または雌のいずれかであることが好ましい。
【００５６】
好ましくは、試料は、対象から採取され、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、またはその変異型もしくは断片の濃度は、アッセイにおいて測定され得る。キットは、試験対象から試料を入手するための試料抽出手段を含み得る。この試料抽出手段は、針または注射器等を含み得る。
【００５７】
ＧＭ－ＣＳＦは、体液及び臓器液中で起こることが示された。しかしながら、試料は、ＧＭ－ＣＳＦが中に分泌される任意の身体試料であり得、例えば、リンパ液または間質液であり得る。この試料は、尿試料または血液試料であり得る。血液試料は、静脈血または動脈血であり得る。
【００５８】
このキットは、抽出された試料を受容するための試料収集容器を含み得る。血液等の「新鮮な」身体試料は、それらが対象から採取された後、即時にＧＭ－ＣＳＦレベルについて分析され得ることが理解されるであろう。代替として、血液は、例えば、冷蔵庫内で低温で貯蔵され得るか、またはさらには、ＧＭ－ＣＳＦアッセイが行われる前に冷凍される。次いで試料を解凍し、後日分析することができる。
【００５９】
ＧＭ－ＣＳＦの測定は、全血に関して行われ得る。しかしながら、血液は、アッセイが行われる前にさらに処理され得る。例えば、クエン酸塩（クエン酸ナトリウム等）、ヒルジン、ヘパリン、ＰＰＡＣＫ、またはフッ化ナトリウム等の抗凝固剤が付加されてもよい。故に、試料収集容器は、血液試料が凝固するのを防ぐために、抗凝固剤を含有してもよい。代替として、血液試料は、血漿または血清分留を調製するために遠心分離または濾過され得、これが分析に使用され得る。したがって、ＧＭ－ＣＳＦまたは変異型もしくは断片は、血漿または血清試料中で分析またはアッセイされることが好ましい。ＧＭ－ＣＳＦ濃度は、対象から採取された血清試料または血漿試料から生体外で測定されることが好ましい。
【００６０】
実施例に記載されるように、発明者らは、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける ＧＭ－ＣＳＦの濃度を、大動脈炎症を誘導するＡｎｇＩＩ注射下で監視し、それを対照マクロファージにおけるＧＭ－ＣＳＦ濃度と比較した。それらは、ＡｎｇＩＩ注射によって誘導された大動脈障害に罹患しているマウスにおいて、ＧＭ－ＣＳＦの濃度に統計的に有意な増加があったことを示した。故に、濃度の差は、好ましくは、基準対照値と比較した増加であり、これが大動脈障害を示す。
【００６１】
大動脈障害患者におけるＧＭ－ＣＳＦの濃度は、多くの因子、例えば、疾患がどれだけ進行したか、ならびに対象の年齢及び性別に高度に依存することが理解されるであろう。大動脈障害に罹患していない個体におけるＧＭ－ＣＳＦの濃度は、ある程度変動し得るが、平均して所与の期間にわたって、この濃度は、実質的に一定である傾向があることも理

解されるであろう。さらに、大動脈障害に罹患していない個体の一群におけるＧＭ－ＣＳＦの濃度は、この疾患に罹患していない個体の別の群におけるＧＭ－ＣＳＦの濃度とは異なり得ることを理解すべきである。しかしながら、熟練した技術者であれば、大動脈障害に罹患していない個体におけるＧＭ－ＣＳＦの平均濃度の決定方法がわかり、これがＧＭ－ＣＳＦの「正常」濃度と称される。この正常濃度は、上述の基準値に対応する。

【００６２】

ＧＭ－ＣＳＦは、様々な技法によって身体試料から抽出され得、次いで検出され得る。検出は、イムノアッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ）によって、例えば、マイクロプレート等の基板の上にプレコーティングされたＧＭ－ＣＳＦに特異的なモノクローナル抗体を使用して達成されてもよい。標準物質及び試料が、ウェルに適用されてもよく、存在する任意のＧＭ－ＣＳＦが、固定化抗体によって結合され得る。任意の未結合基質を洗い流した後、ヒトＧＭ－ＣＳＦのための酵素結合したモノクローナル抗体が、次いでウェルに適用され得る。任意の未結合抗体酵素試薬を除去するための洗浄に続いて、基質溶液がウェルに適用されてもよく、初期工程において結合されたＧＭ－ＣＳＦの量に比例して発色する。次いで、発色を停止させ、色の強度を測定することができる。ＧＭ－ＣＳＦの検出に適したアッセイは、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓによって供給される通りであり得る。

【００６３】

本発明に従うキットは、身体試料におけるＧＭ－ＣＳＦの濃度を決定するための手段を含む。このキットは、試験対象からの試料中のＧＭ－ＣＳＦの濃度を決定するための手段が含有され得る容器を含み得る。このキットはまた、使用説明書を含んでもよい。

【００６４】

故に、このキットは、一旦試料が対象から入手されると、試料中のＧＭ－ＣＳＦの濃度を検出するための検出手段を含み得る。

【００６５】

基準値は、統計的に有意な数の対照試料（すなわち、大動脈障害に罹患していない対象からの試料）をアッセイすることによって得ることができる。したがって、本発明のキットに従う基準は、アッセイの目的のための対照試料であり得る。

【００６６】

検出手段は、試料中のＧＭ－ＣＳＦの濃度を決定するために適合されたアッセイを含み得る。このキットまたは方法は、アッセイが比較され得る、陽性対照及び／または陰性対照の使用を含み得る。例えば、このキットは、大動脈障害に罹患している個体（すなわち、陽性対照）または罹患していない個体（すなわち、陰性対照）からの試料中のＧＭ－ＣＳＦの濃度に関する基準を含み得る。

【００６７】

このキットは、標識をさらに含んでもよく、これが検出され得る。「標識」という用語は、抗体またはその抗原結合断片に結合され得る部分を意味し得る。部分は、例えば、治療手順または診断手順に使用され得る。標識には、例えば、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体またはその断片に結合され、ＧＭ－ＣＳＦまたはその断片への抗体の結合を監視するために使用され得る部分が含まれる。本明細書に記載の通り、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号２、またはその変異型もしくは断片に特異的に結合する。

【００６８】

診断的標識には、例えば、分析方法によって検出され得る部分が含まれる。分析方法には、例えば、定性的手順及び定量的手順が含まれる。定性的分析方法には、例えば、免疫組織化学及び間接的免疫蛍光が含まれる。定量的分析方法には、例えば、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ、またはＦＡＣＳ分析等の免疫親和性手順が含まれる。分析方法には、生体外及び生体内撮像手順の両方も含まれる。分析手段によって検出され得る診断標識の特定の例には、酵素、放射性同位体、蛍光色素、化学発光マーカー、及びビオチンが含まれる。

【００６９】

標識は、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体、またはその抗原結合断片に直接結合され得るか、または

本発明の分子に特異的に結合する二次結合剤に結合され得る。かかる二次結合剤は、例えば、二次抗体であり得る。二次抗体は、ヒト、齧歯類、またはキメラ起源のポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかであり得る。

【００７０】

さらなる態様において、大動脈解離に罹患している患者の治療における使用のための、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体が提供され、該抗体は、該患者の血液中に治療上有効な抗体レベルを達成するような方法で該患者に投与される。

【００７１】

別の態様において、正常値と比較して増加したレベルの血中ＧＭ－ＣＳＦの存在を測定し、次いで抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を有する患者を治療することによる、該患者における大動脈解離の治療方法が提供される。

【００７２】

患者は、大動脈解離と診断されている場合があり、疾患のさらなる進行を防ぐために、継続的な治療を必要とする。患者は、大動脈解離のための外科的治療を受けている場合があり、疾患の再発を防ぐために、継続的な治療を必要とする。

【００７３】

さらなる態様において、大動脈解離に罹患しているか、または罹患する危険性のある患者の診断方法が提供され、この方法は、患者試料中のＧＭ－ＣＳＦの濃度を分析することと、この濃度を、大動脈解離の上昇した危険性を表すことが知られているＧＭ－ＣＳＦの基準濃度と比較することとを含む。

【００７４】

患者は、大動脈解離と診断されている場合があり、疾患のさらなる進行を防ぐために、継続的な治療を必要とする。患者は、大動脈解離のための外科的治療を受けている場合があり、疾患の再発を防ぐために、継続的な治療を必要とする。患者試料は、血液試料を含み得る。

【００７５】

本発明は、本明細書で言及される配列のうちのいずれかのアミノ酸または核酸配列（その変異型もしくは断片を含む）を含むか、または実質的にそれからなる、任意の核酸もしくはペプチド、またはその変異型、誘導体、もしくは類似体にまで及ぶことが理解されるであろう。「実質的にアミノ酸／ヌクレオチド／ペプチド配列」、「変異型」、及び「断片」という用語は、本明細書で言及される配列のうちのいずれか１つのアミノ酸／ヌクレオチド／ペプチド配列と少なくとも４０％の配列同一性、例えば、配列番号２として特定される配列（すなわち、ＧＭ－ＣＳＦタンパク質）と４０％の同一性を有する配列であり得る。

【００７６】

言及される配列のうちのいずれかに対する５０％を超える配列同一性、より好ましくは６５％、７０％、７５％を超える、さらにより好ましくは８０％を超える配列同一性を有するアミノ酸／ポリヌクレオチド／ポリペプチド配列も想到される。好ましくは、アミノ酸／ポリヌクレオチド／ポリペプチド配列は、言及される配列のうちのいずれかと少なくとも８５％の同一性、より好ましくは９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、最も好ましくは、本明細書で言及される配列のうちのいずれかと少なくとも９９％の同一性を有する。

【００７７】

熟練した技術者であれば、２つのアミノ酸／ポリヌクレオチド／ポリペプチド配列間の同一性パーセントを計算する方法を理解するであろう。２つのアミノ酸／ポリヌクレオチド／ポリペプチド配列間の同一性パーセントを計算するために、２つの配列のアラインメントを最初に調製しなければならず、続いて配列同一性の値を計算する。２つの配列の同一性パーセントは、（ｉ）配列を整列させるために使用される方法、例えば、ＣｌｕｓｔａｌＷ、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ（異なるプログラムで実施される）、または３Ｄ比較からの構造アラインメント、及び（ｉｉ）アラインメント

方法によって使用されるパラメータ、例えば、ローカル対グローバルアラインメント、使用されるペアスコアマトリックス（例えば、ｂｌｏｓｕｍ６２、ｐａｍ２５０、ｇｏｎｎｅｔ等）、及びギャップペナルティ、例えば、機能的形態及び定数に応じて異なる値を取り得る。

【００７８】

アラインメントを作製して、２つの配列間の同一性パーセントを計算する多くの異なる方法が存在する。例えば、同一性の数値を、（ｉ）最短配列の長さ、（ｉｉ）アラインメントの長さ、（ｉｉｉ）配列の平均長さ、（ｉｖ）非ギャップ位置の数、または（ｉｖ）オーバーハングを除く等価位置の数で割ることができる。さらに、同一性パーセントはまた、長さに強く依存することが理解されるであろう。したがって、配列の対が短いほど、偶然に起こると予想され得る配列同一性は高くなる。

【００７９】

したがって、タンパク質またはＤＮＡ配列の正確なアラインメントは、複雑なプロセスであることが理解されるであろう。人気のある多重アラインメントプログラムＣｌｕｓｔａｌＷ（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２２，４６７３－４６８０、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２４，４８７６－４８８２）は、本発明に従うタンパク質またはＤＮＡの多重アラインメントを生成するための好ましい方法である。ＣｌｕｓｔａｌＷに適したパラメータは、以下のとおりであり得る。ＤＮＡアラインメントの場合、ギャップオープンペナルティ＝１５．０、ギャップエクステンションペナルティ＝６．６６、及びマトリックス＝同一性。タンパク質アラインメントの場合、ギャップオープンペナルティ＝１０．０、ギャップエクステンションペナルティ＝０．２、及びマトリックス＝Ｇｏｎｎｅｔ。ＤＮＡ及びタンパク質アラインメントの場合、ＥＮＤＧＡＰ＝－１、ＧＡＰＤＩＳＴ＝４。当業者であれば、最適配列アラインメントのためのこれらのパラメータ及び他のパラメータを変動させる必要があり得ることに気付くであろう。

【００８０】

好ましくは、２つのアミノ酸／ポリヌクレオチド／ポリペプチド配列間の同一性パーセントの計算は、次いで、（Ｎ／Ｔ）＊１００等のアラインメントから計算され得、式中、Ｎは、配列が同一残基を共有する位置の数であり、Ｔは、ギャップを含むが、オーバーハングは除外して比較される位置の総数である。したがって、２つの配列間の同一性パーセントを計算するための最も好ましい方法は、（ｉ）例えば、上記のような適したパラメータのセットを使用するｃｌｕｓｔａｌｗプログラムを使用して、配列アラインメントを調製することと、（ｉｉ）ｎ及びｔの値を、以下の式、配列同一性＝（Ｎ／Ｔ）＊１００に挿入することとを含む。

【００８１】

同様の配列を特定するための代替方法は、当業者に既知となるであろう。例えば、実質的に同様のヌクレオチド配列は、本明細書に示される核酸配列のうちのいずれか、またはそれらの相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列によってコードされることになる。ストリンジェントな条件とは、ヌクレオチドが、３×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中、およそ４５℃でフィルター結合ＤＮＡまたはＲＮＡにハイブリダイズし、続いて０．２×　ｓｓｃ／０．１％ＳＤＳ中、およそ２０～６５℃で少なくとも１回洗浄することを意味する。代替として、実質的に同様のポリペプチドは、本明細書に示される配列とは、少なくとも１個であるが、５、１０、２０、５０、または１００個未満のアミノ酸が異なり得る。

【００８２】

遺伝情報の退化に起因して、本明細書に記載の任意の核酸配列が、それによってコードされるタンパク質の配列に実質的に影響することなく、その機能的変異型を提供するように変動または変化し得ることは明らかである。適したヌクレオチド変異型は、配列内の同じアミノ酸をコードする異なるコドンの置換によって変更された配列を有し、故にサイレ

ントな変化をもたらすものである。他の適した変異型は、相同ヌクレオチド配列を有するが、同様の生物物理学的特性の側鎖を有するアミノ酸をコードする異なるコドンの、それが置換するアミノ酸への置換によって変更され、保存的変更をもたらす配列の全てまたは部分を含むものである。例えば、小さい非極性の疎水性アミノ酸には、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、及びメチオニンが含まれる。大きい非極性の疎水性アミノ酸には、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンが含まれる。極性中性アミノ酸には、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれる。正電荷（塩基性）アミノ酸には、リシン、アルギニン、及びヒスチジンが含まれる。負電荷（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。したがって、どのアミノ酸が、同様の生物物理学的特性を有するアミノ酸で置換され得るかが理解されるであろう。また当業者であれば、これらのアミノ酸をコードするヌクレオチド配列がわかるであろう。

【００８３】

本明細書に記載の特徴の全て（任意の添付の特許請求の範囲、要約、及び図面を含む）、及び／またはそこで開示される任意の方法またはプロセスの工程の全ては、かかる特徴及び／または工程のうちの少なくともいくつかが相互に排他的である組み合わせを除く任意の組み合わせで、上記の態様のうちのいずれかと組み合わされてもよい。

【００８４】

本発明のより良い理解のため、及びその実施形態がどのように実行され得るかを示すために、ここで例として、添付の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

【００８５】

【図１Ａ】ＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスにおける大動脈瘤及び炎症を示す。（ａ）野生型（ＷＴ）同腹仔（ｎ＝１１）及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（ＫＬＦ６＋／－、ｎ＝１０）マウスにおいて、ＣａＣｌ２適用と共に、２週間のＡｎｇＩＩ注射によって誘導された代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による腎臓下大動脈（ｂ）及び副腎大動脈（ｃ）の組織病理学的分析。（ｄ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ＷＴ；ｎ＝１０、Ｋ６＋／－；ｎ＝８）の野生型（ＷＴ）同腹仔とＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスとの間の腎臓下大動脈直径の定量。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。（ｅ）野生型同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスのＥＶＧ染色された大動脈（ｂ）の囲まれた領域内のマクロファージの免疫蛍光染色（緑色；Ｍａｃ３、青色；ＤＡＰＩ）。（ｆ）リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した、ＣａＣｌ２適用を伴うＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の、野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスからの大動脈内のＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定。（ｇ）ＥＶＧ（左パネル、ａ及びｂ）、Ｈ＆Ｅ（中央パネル、ｃ及びｄ）、ならびにＦ４／８０染色（右パネル、ｅ及びｆ、免疫組織化学）による、ＰＢＳ－リポソームを投与したマウス（ｎ＝５）と比較した、大動脈表現型（ｎ＝４）に対するクロドロネート－リポソームの阻害効果。（ｈ）クロドロネート－リポソームまたはＰＢＳ－リポソームを投与したマウスからの腎臓下大動脈直径の定量（＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定、ｎ＝４または５マウス／群）。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１Ｂ】ＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスにおける大動脈瘤及び炎症を示す。（ａ）野生型（ＷＴ）同腹仔（ｎ＝１１）及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（ＫＬＦ６＋／－、ｎ＝１０）マウスにおいて、ＣａＣｌ２適用と共に、２週間のＡｎｇＩＩ注射によって誘導された代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）によ

る腎臓下大動脈（ｂ）及び副腎大動脈（ｃ）の組織病理学的分析。（ｄ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ＷＴ；ｎ＝１０、Ｋ６＋／－；ｎ＝８）の野生型（ＷＴ）同腹仔とＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスとの間の腎臓下大動脈直径の定量。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。（ｅ）野生型同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスのＥＶＧ染色された大動脈（ｂ）の囲まれた領域内のマクロファージの免疫蛍光染色（緑色；Ｍａｃ３、青色；ＤＡＰＩ）。（ｆ）リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した、ＣａＣｌ２適用を伴うＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の、野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスからの大動脈内のＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定。（ｇ）ＥＶＧ（左パネル、ａ及びｂ）、Ｈ＆Ｅ（中央パネル、ｃ及びｄ）、ならびにＦ４／８０染色（右パネル、ｅ及びｆ、免疫組織化学）による、ＰＢＳ－リポソームを投与したマウス（ｎ＝５）と比較した、大動脈表現型（ｎ＝４）に対するクロドロネート－リポソームの阻害効果。（ｈ）クロドロネート－リポソームまたはＰＢＳ－リポソームを投与したマウスからの腎臓下大動脈直径の定量（＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定、ｎ＝４または５マウス／群）。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１Ｃ】ＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスにおける大動脈瘤及び炎症を示す。（ａ）野生型（ＷＴ）同腹仔（ｎ＝１１）及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（ＫＬＦ６＋／－、ｎ＝１０）マウスにおいて、ＣａＣｌ２適用と共に、２週間のＡｎｇＩＩ注射によって誘導された代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による腎臓下大動脈（ｂ）及び副腎大動脈（ｃ）の組織病理学的分析。（ｄ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ＷＴ；ｎ＝１０、Ｋ６＋／－；ｎ＝８）の野生型（ＷＴ）同腹仔とＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスとの間の腎臓下大動脈直径の定量。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。（ｅ）野生型同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスのＥＶＧ染色された大動脈（ｂ）の囲まれた領域内のマクロファージの免疫蛍光染色（緑色；Ｍａｃ３、青色；ＤＡＰＩ）。（ｆ）リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した、ＣａＣｌ２適用を伴うＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の、野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスからの大動脈内のＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定。（ｇ）ＥＶＧ（左パネル、ａ及びｂ）、Ｈ＆Ｅ（中央パネル、ｃ及びｄ）、ならびにＦ４／８０染色（右パネル、ｅ及びｆ、免疫組織化学）による、ＰＢＳ－リポソームを投与したマウス（ｎ＝５）と比較した、大動脈表現型（ｎ＝４）に対するクロドロネート－リポソームの阻害効果。（ｈ）クロドロネート－リポソームまたはＰＢＳ－リポソームを投与したマウスからの腎臓下大動脈直径の定量（＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定、ｎ＝４または５マウス／群）。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１Ｄ】ＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスにおける大動脈瘤及び炎症を示す。（ａ）野生型（ＷＴ）同腹仔（ｎ＝１１）及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（ＫＬＦ６＋／－、ｎ＝１０）マウスにおいて、ＣａＣｌ２適用と共に、２週間のＡｎｇＩＩ注射によって誘導された代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による腎臓下大動脈（ｂ）及び副腎大動脈（ｃ）の組織病理学的分析。（ｄ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ＷＴ；ｎ＝１０、Ｋ６＋／－；ｎ＝８）の野生型（ＷＴ）同腹仔とＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスとの間の腎臓下大動脈直径の定量。＊Ｐ＜０．０

５、スチューデントｔ検定。（ｅ）野生型同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスのＥＶＧ染色された大動脈（ｂ）の囲まれた領域内のマクロファージの免疫蛍光染色（緑色；Ｍａｃ３、青色；ＤＡＰＩ）。（ｆ）リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した、ＣａＣｌ２適用を伴うＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の、野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウト（Ｋ６＋／－）マウスからの大動脈内のＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定。（ｇ）ＥＶＧ（左パネル、ａ及びｂ）、Ｈ＆Ｅ（中央パネル、ｃ及びｄ）、ならびにＦ４／８０染色（右パネル、ｅ及びｆ、免疫組織化学）による、ＰＢＳ－リポソームを投与したマウス（ｎ＝５）と比較した、大動脈表現型（ｎ＝４）に対するクロドロネート－リポソームの阻害効果。（ｈ）クロドロネート－リポソームまたはＰＢＳ－リポソームを投与したマウスからの腎臓下大動脈直径の定量（＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定、ｎ＝４または５マウス／群）。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図２Ａ】ＫＬＦ６の脊髄性欠乏が、大動脈解離／壁内血腫及び炎症の表現型を示すことを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ｎ＝１９）とＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝２２）との間の生存曲線。（ｂ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後のＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ａ）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｂ）の代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウスと比較した、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおいて観察された腎臓下（ｃ）及び副腎大動脈（ｄ）の代表的な組織病理学的分析。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の腎臓下大動脈直径の定量。（ｆ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝７）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝９）におけるＩＬ－６の血漿濃度。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定（ｅ、ｇ）（ｇ）ＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの大動脈において、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）に、リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した。（ｈ）ＩＬ－６、ＣＣＲ２、ＴＮＦα、ＩＬ－１β、ｉＮＯＳ、及びＭＣＰ－１のＲＮＡレベルの発現は、ＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を３時間にわたって受けた骨髄由来マクロファージにおいて調べた（ｎ＝３マウス／群）。（ｉ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈、末梢血、脾臓、及び骨髄中のＣＤ１１ｂ＋Ｌｙ６Ｃｈｉ細胞の集合。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｇ、ｈ）

【図２Ｂ】ＫＬＦ６の脊髄性欠乏が、大動脈解離／壁内血腫及び炎症の表現型を示すことを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ｎ＝１９）とＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝２２）との間の生存曲線。（ｂ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後のＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ａ）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｂ）の代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウスと比較した、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおいて観察された腎臓下（ｃ）及び副腎大動脈（ｄ）の代表的な組織病理学的分析。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の腎臓下大動脈直径の定量。（

ｆ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝７）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝９）におけるＩＬ－６の血漿濃度。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定（ｅ、ｇ）（ｇ）ＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの大動脈において、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）に、リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した。（ｈ）ＩＬ－６、ＣＣＲ２、ＴＮＦα、ＩＬ－１β、ｉＮＯＳ、及びＭＣＰ－１のＲＮＡレベルの発現は、ＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を３時間にわたって受けた骨髄由来マクロファージにおいて調べた（ｎ＝３マウス／群）。（ｉ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈、末梢血、脾臓、及び骨髄中のＣＤ１１ｂ＋Ｌｙ６Ｃｈｉ細胞の集合。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｇ、ｈ）

【図２Ｃ】ＫＬＦ６の脊髄性欠乏が、大動脈解離／壁内血腫及び炎症の表現型を示すことを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ｎ＝１９）とＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝２２）との間の生存曲線。（ｂ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後のＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ａ）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｂ）の代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウスと比較した、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおいて観察された腎臓下（ｃ）及び副腎大動脈（ｄ）の代表的な組織病理学的分析。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の腎臓下大動脈直径の定量。（ｆ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝７）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝９）におけるＩＬ－６の血漿濃度。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定（ｅ、ｇ）（ｇ）ＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの大動脈において、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）に、リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した。（ｈ）ＩＬ－６、ＣＣＲ２、ＴＮＦα、ＩＬ－１β、ｉＮＯＳ、及びＭＣＰ－１のＲＮＡレベルの発現は、ＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を３時間にわたって受けた骨髄由来マクロファージにおいて調べた（ｎ＝３マウス／群）。（ｉ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈、末梢血、脾臓、及び骨髄中のＣＤ１１ｂ＋Ｌｙ６Ｃｈｉ細胞の集合。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｇ、ｈ）

【図２Ｄ】ＫＬＦ６の脊髄性欠乏が、大動脈解離／壁内血腫及び炎症の表現型を示すことを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ｎ＝１９）とＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝２２）との間の生存曲線。（ｂ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後のＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ａ）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｂ）の代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウスと比較した、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおいて観察された腎臓下（ｃ）及び副腎大動脈（ｄ）の代表的な組織病理学的分析。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の腎臓下大動脈直径の定量。（

ｆ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝７）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝９）におけるＩＬ－６の血漿濃度。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定（ｅ、ｇ）（ｇ）ＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの大動脈において、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）に、リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した。（ｈ）ＩＬ－６、ＣＣＲ２、ＴＮＦα、ＩＬ－１β、ｉＮＯＳ、及びＭＣＰ－１のＲＮＡレベルの発現は、ＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を３時間にわたって受けた骨髄由来マクロファージにおいて調べた（ｎ＝３マウス／群）。（ｉ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈、末梢血、脾臓、及び骨髄中のＣＤ１１ｂ＋Ｌｙ６Ｃｈｉ細胞の集合。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｇ、ｈ）

【図２Ｅ】ＫＬＦ６の脊髄性欠乏が、大動脈解離／壁内血腫及び炎症の表現型を示すことを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ｎ＝１９）とＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝２２）との間の生存曲線。（ｂ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後のＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウス（ａ）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｂ）の代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ対照マウスと比較した、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＥＶＧ（上パネル、ａ及びｃ）ならびにＨ＆Ｅ染色（下パネル、ｂ及びｄ）による、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおいて観察された腎臓下（ｃ）及び副腎大動脈（ｄ）の代表的な組織病理学的分析。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）の腎臓下大動脈直径の定量。（ｆ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝７）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝９）におけるＩＬ－６の血漿濃度。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定（ｅ、ｇ）（ｇ）ＩＬ－６のＲＮＡレベルの発現は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの大動脈において、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前［（－）、ｎ＝３］及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５）に、リアルタイムＰＣＲを使用して調べ、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した。（ｈ）ＩＬ－６、ＣＣＲ２、ＴＮＦα、ＩＬ－１β、ｉＮＯＳ、及びＭＣＰ－１のＲＮＡレベルの発現は、ＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を３時間にわたって受けた骨髄由来マクロファージにおいて調べた（ｎ＝３マウス／群）。（ｉ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈、末梢血、脾臓、及び骨髄中のＣＤ１１ｂ＋Ｌｙ６Ｃｈｉ細胞の集合。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｇ、ｈ）

【図３Ａ】ＧＭ－ＣＳＦは、マクロファージ内のＫＬＦ６の直接標的である。（ａ）３時間のＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの骨髄（ＢＭ）由来マクロファージ間のＩＬ－６／ＳＴＡＴ３炎症経路に関連する遺伝子のＲＴ２プロファイラーＰＣＲアレイ分析。矢印は、ＧＭ－ＣＳＦを示す。ＡｎｇＩＩ（１０μＭ）で３時間刺激されたＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　ＣｒｅマウスからのＢＭ由来マクロファージ間で一貫した変化を示した遺伝子の一覧。（ｂ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス［疑似；（－）、ｎ＝３；ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝３］及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス［疑似；（－）、ｎ＝３；ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝６］から入手された大動脈マクロファージ内のＧＭ－ＣＳＦのｍＲＮＡ発現。Ｎ．Ｄ．は、検出されなかったことを示す。（ｃ）０（ｎ＝３）、３（ｎ＝３）、７（ｎ＝３）、及び１４（ｎ＝４）日目

の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈におけるＧＭ－ＣＳＦのｍＲＮＡ発現。（ｄ）ＥＶＧ染色した腎臓下大動脈（ａ）を有するＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈におけるマクロファージ（赤色；Ｆ４／８０、ｂ）、ＧＭ－ＣＳＦ（緑色、ｃ）、及び核（青色；ＤＡＰＩ、ｄ）の免疫組織化学。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝８）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝４）の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定。

【図３Ｂ】ＧＭ－ＣＳＦは、マクロファージ内のＫＬＦ６の直接標的である。（ａ）３時間のＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの骨髄（ＢＭ）由来マクロファージ間のＩＬ－６／ＳＴＡＴ３炎症経路に関連する遺伝子のＲＴ２プロファイラーＰＣＲアレイ分析。矢印は、ＧＭ－ＣＳＦを示す。ＡｎｇＩＩ（１０μＭ）で３時間刺激されたＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの ＢＭ由来マクロファージ間で一貫した変化を示した遺伝子の一覧。（ｂ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス［疑似；（－）、ｎ＝３；ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝３］及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス［疑似；（－）、ｎ＝３；ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝６］から入手された大動脈マクロファージ内のＧＭ－ＣＳＦのｍＲＮＡ発現。Ｎ．Ｄ．は、検出されなかったことを示す。（ｃ）０（ｎ＝３）、３（ｎ＝３）、７（ｎ＝３）、及び１４（ｎ＝４）日目の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈におけるＧＭ－ＣＳＦのｍＲＮＡ発現。（ｄ）ＥＶＧ染色した腎臓下大動脈（ａ）を有するＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈におけるマクロファージ（赤色；Ｆ４／８０、ｂ）、ＧＭ－ＣＳＦ（緑色、ｃ）、及び核（青色；ＤＡＰＩ、ｄ）の免疫組織化学。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝８）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝４）の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定。

【図３Ｃ】ＧＭ－ＣＳＦは、マクロファージ内のＫＬＦ６の直接標的である。（ａ）３時間のＡｎｇＩＩ刺激（１０μＭ）を伴う、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの骨髄（ＢＭ）由来マクロファージ間のＩＬ－６／ＳＴＡＴ３炎症経路に関連する遺伝子のＲＴ２プロファイラーＰＣＲアレイ分析。矢印は、ＧＭ－ＣＳＦを示す。ＡｎｇＩＩ（１０μＭ）で３時間刺激されたＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスからの ＢＭ由来マクロファージ間で一貫した変化を示した遺伝子の一覧。（ｂ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス［疑似；（－）、ｎ＝３；ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝３］及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス［疑似；（－）、ｎ＝３；ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝６］から入手された大動脈マクロファージ内のＧＭ－ＣＳＦのｍＲＮＡ発現。Ｎ．Ｄ．は、検出されなかったことを示す。（ｃ）０（ｎ＝３）、３（ｎ＝３）、７（ｎ＝３）、及び１４（ｎ＝４）日目の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈におけるＧＭ－ＣＳＦのｍＲＮＡ発現。（ｄ）ＥＶＧ染色した腎臓下大動脈（ａ）を有するＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈におけるマクロファージ（赤色；Ｆ４／８０、ｂ）、ＧＭ－ＣＳＦ（緑色、ｃ）、及び核（青色；ＤＡＰＩ、ｄ）の免疫組織化学。（ｅ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝８）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝４）の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定。

【図４Ａ】ＧＭ－ＣＳＦが、大動脈解離／壁内血腫に必要とされることを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、抗ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体（ｂ、抗ＧＭ－ＣＳＦ、ｎ＝８）または対照ＩｇＧ抗体（ａ、ｎ＝１０）を投与したＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの代表的な大動脈。抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスと

抗対照ＩｇＧを投与したマウスとの間の、腎臓下大動脈直径（ｂ、抗ＧＭ－ＣＳＦ；ｎ＝７、抗対照ＩｇＧ；ｎ＝９）及びＩＬ－６の血漿濃度（ｃ、ｎ＝５または６）の定量。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。（ｄ）ＧＭ－ＣＳＦＲα、ＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスまたは抗対照ＩｇＧを投与したマウスの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した（ｎ＝５マウス／群）。（ｅ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｎ＝２６）またはＰＢＳ（ｎ＝１９）を投与したマウスの生存曲線。（ｆ）４週間のＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｂ）またはＰＢＳ（ａ）を投与した野生型マウスの代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。（ｇ）ＥＶＧ染色による腎臓下大動脈（上パネル、ａ及びｃ）ならびに副腎大動脈（下パネル、ｂ及びｄ）の組織病理学的分析。（ｈ）組み換えＧＭ－ＣＳＦを投与したマウスまたはＰＢＳを投与したマウス［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝５］の腎臓下大動脈の直径の定量。（ｉ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴うか、または伴わない、２週間の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳ注射後の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度（ｎ＝３～５マウス／群）。（ｊ）Ｆ４／８０及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳを投与したマウスからの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５］。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｄ、ｈ、ｊ）及びダンポスト検定を伴う一元配置分散分析（ｉ）。

【図４Ｂ】ＧＭ－ＣＳＦが、大動脈解離／壁内血腫に必要とされることを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、抗ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体（ｂ、抗ＧＭ－ＣＳＦ、ｎ＝８）または対照ＩｇＧ抗体（ａ、ｎ＝１０）を投与したＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの代表的な大動脈。抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスと抗対照ＩｇＧを投与したマウスとの間の、腎臓下大動脈直径（ｂ、抗ＧＭ－ＣＳＦ；ｎ＝７、抗対照ＩｇＧ；ｎ＝９）及びＩＬ－６の血漿濃度（ｃ、ｎ＝５または６）の定量。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。（ｄ）ＧＭ－ＣＳＦＲα、ＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスまたは抗対照ＩｇＧを投与したマウスの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した（ｎ＝５マウス／群）。（ｅ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｎ＝２６）またはＰＢＳ（ｎ＝１９）を投与したマウスの生存曲線。（ｆ）４週間のＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｂ）またはＰＢＳ（ａ）を投与した野生型マウスの代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。（ｇ）ＥＶＧ染色による腎臓下大動脈（上パネル、ａ及びｃ）ならびに副腎大動脈（下パネル、ｂ及びｄ）の組織病理学的分析。（ｈ）組み換えＧＭ－ＣＳＦを投与したマウスまたはＰＢＳを投与したマウス［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝５］の腎臓下大動脈の直径の定量。（ｉ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴うか、または伴わない、２週間の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳ注射後の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度（ｎ＝３～５マウス／群）。（ｊ）Ｆ４／８０及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳを投与したマウスからの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５］。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｄ、ｈ、ｊ）及びダンポスト検定を伴う一元配置分散分析（ｉ）。

【図４Ｃ】ＧＭ－ＣＳＦが、大動脈解離／壁内血腫に必要とされることを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、抗ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体（ｂ、抗ＧＭ

－ＣＳＦ、ｎ＝８）または対照ＩｇＧ抗体（ａ、ｎ＝１０）を投与したＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの代表的な大動脈。抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスと抗対照ＩｇＧを投与したマウスとの間の、腎臓下大動脈直径（ｂ、抗ＧＭ－ＳＣＦ；ｎ＝７、抗対照ＩｇＧ；ｎ＝９）及びＩＬ－６の血漿濃度（ｃ、ｎ＝５または６）の定量。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。（ｄ）ＧＭ－ＣＳＦＲα、ＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスまたは抗対照ＩｇＧを投与したマウスの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した（ｎ＝５マウス／群）。（ｅ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｎ＝２６）またはＰＢＳ（ｎ＝１９）を投与したマウスの生存曲線。（ｆ）４週間のＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｂ）またはＰＢＳ（ａ）を投与した野生型マウスの代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。（ｇ）ＥＶＧ染色による腎臓下大動脈（上パネル、ａ及びｃ）ならびに副腎大動脈（下パネル、ｂ及びｄ）の組織病理学的分析。（ｈ）組み換えＧＭ－ＣＳＦを投与したマウスまたはＰＢＳを投与したマウス［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝５］の腎臓下大動脈の直径の定量。（ｉ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴うか、または伴わない、２週間の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳ注射後の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度（ｎ＝３～５マウス／群）。（ｊ）Ｆ４／８０及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳを投与したマウスからの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５］。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｄ、ｈ、ｊ）及びダンポスト検定を伴う一元配置分散分析（ｉ）。

【図４Ｄ】ＧＭ－ＣＳＦが、大動脈解離／壁内血腫に必要とされることを示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射後の、抗ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体（ｂ、抗ＧＭ－ＣＳＦ、ｎ＝８）または対照ＩｇＧ抗体（ａ、ｎ＝１０）を投与したＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの代表的な大動脈。抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスと抗対照ＩｇＧを投与したマウスとの間の、腎臓下大動脈直径（ｂ、抗ＧＭ－ＳＣＦ；ｎ＝７、抗対照ＩｇＧ；ｎ＝９）及びＩＬ－６の血漿濃度（ｃ、ｎ＝５または６）の定量。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。（ｄ）ＧＭ－ＣＳＦＲα、ＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、抗ＧＭ－ＣＳＦ抗体を投与したマウスまたは抗対照ＩｇＧを投与したマウスの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した（ｎ＝５マウス／群）。（ｅ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｎ＝２６）またはＰＢＳ（ｎ＝１９）を投与したマウスの生存曲線。（ｆ）４週間のＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射と共に、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（ｂ）またはＰＢＳ（ａ）を投与した野生型マウスの代表的な大動脈（腎臓下大動脈：ハッシュ、副腎大動脈：アスタリスク）。（ｇ）ＥＶＧ染色による腎臓下大動脈（上パネル、ａ及びｃ）ならびに副腎大動脈（下パネル、ｂ及びｄ）の組織病理学的分析。（ｈ）組み換えＧＭ－ＣＳＦを投与したマウスまたはＰＢＳを投与したマウス［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ；ｎ＝５］の腎臓下大動脈の直径の定量。（ｉ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴うか、または伴わない、２週間の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳ注射後の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度（ｎ＝３～５マウス／群）。（ｊ）Ｆ４／８０及びＩＬ－６のＲＮＡの発現レベルを、リアルタイムＰＣＲを使用して、組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳを投与したマウスからの大動脈において調べ、次いでＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化した［疑似；（－）ｎ＝３、ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ、ｎ＝５］。結果は、３つの独立した実験からのものである。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊Ｐ＜０．０５、マン・ホイットニー検定（ｄ、ｈ、ｊ）及びダンポスト検定を伴う一元配置分散分析（ｉ）。

【図５Ａ】急性大動脈解離を有する患者における増加したＧＭ－ＣＳＦを示す。（ａ）健康なボランティア（健康な対照、ｎ＝１２）及び大動脈瘤（ＡＡＡ、ｎ＝３）、冠動脈疾患（ＣＡＤ、ｎ＝１１）、または大動脈解離（ｎ＝１０）を有する患者における血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度。（ｂ）ＥＶＧ染色（ｂ）を用いる、下行解離大動脈（囲まれた領域、ａ）内のＣＤ６８（赤色、ｃ）、ＧＭ－ＣＳＦ（緑色、ｄ）、及びＤＡＰＩ（青色、ｅ）に関する免疫蛍光染色。

【図５Ｂ】急性大動脈解離を有する患者における増加したＧＭ－ＣＳＦを示す。（ａ）健康なボランティア（健康な対照、ｎ＝１２）及び大動脈瘤（ＡＡＡ、ｎ＝３）、冠動脈疾患（ＣＡＤ、ｎ＝１１）、または大動脈解離（ｎ＝１０）を有する患者における血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度。（ｂ）ＥＶＧ染色（ｂ）を用いる、下行解離大動脈（囲まれた領域、ａ）内のＣＤ６８（赤色、ｃ）、ＧＭ－ＣＳＦ（緑色、ｄ）、及びＤＡＰＩ（青色、ｅ）に関する免疫蛍光染色。

【図６Ａ】本モデルにおける動脈瘤上の大動脈解離／壁内血腫を示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を受けた切除胸腹部大動脈の外観。壁内血栓の形成は、副腎領域内に存在することに留意されたい。（ｂ）罹患した大動脈の概略図。（ｃ）Ｅｌａｓｔｉｃａ　ｖａｎ　Ｇｉｅｓｏｎによって染色された断面組織学的断片。ａ～ｅは、大動脈（ａ）の同じレベルに対応することに留意されたい。ａ、腎臓下腹部大動脈の断面（ＣａＣｌ２適用レベル）。ｂ、腎動脈のレベル。ｃ、内膜－中間層が断裂を示す副腎レベル。ｄ及びｅ、内膜－中間層断裂を越える副腎下行胸部大動脈。（ｄ）副腎レベル（ｃ）での高倍率断面。内膜－中間層断裂及び偽腔／壁血栓形成が存在する。

【図６Ｂ】本モデルにおける動脈瘤上の大動脈解離／壁内血腫を示す。（ａ）ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を受けた切除胸腹部大動脈の外観。壁内血栓の形成は、副腎領域内に存在することに留意されたい。（ｂ）罹患した大動脈の概略図。（ｃ）Ｅｌａｓｔｉｃａ　ｖａｎ　Ｇｉｅｓｏｎによって染色された断面組織学的断片。ａ～ｅは、大動脈（ａ）の同じレベルに対応することに留意されたい。ａ、腎臓下腹部大動脈の断面（ＣａＣｌ２適用レベル）。ｂ、腎動脈のレベル。ｃ、内膜－中間層が断裂を示す副腎レベル。ｄ及びｅ、内膜－中間層断裂を越える副腎下行胸部大動脈。（ｄ）副腎レベル（ｃ）での高倍率断面。内膜－中間層断裂及び偽腔／壁血栓形成が存在する。

【図７】動脈瘤性大動脈におけるマクロファージの顕著な浸潤を示す。（ａ）浸潤したマクロファージを、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（左パネル、ａ及びｂ）と比較して、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（右パネル、ｃ及びｄ）の大動脈において、免疫蛍光染色（点線、緑色、Ｍａｃ３）によって可視化した。（ｂ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの罹患した大動脈（ａ）におけるマクロファージ（ｂ、緑色、Ｍａｃ３）、ｐＳＴＡＴ３（ｃ、赤色）、及び核（ｄ、ＤＡＰＩ、青色）に関する免疫蛍光染色。

【図８Ａ】ＴＧＦβ媒介型経路の関与を示す。ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化したリアルタイムＰＣＲを使用する、野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬＦ６＋／－マウス（ａ）からの大動脈における、ならびにＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭＣｒｅマウス（ｃ）における、ｍＲＮＡレベルのＴＧＦβ１関連因子の発現。ｎ＝５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬＦ６＋／－マウス（ｂ）、ならびにＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｄ）におけるＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前（－）及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）の、大動脈におけるｐＳｍａｄ２、Ｓｍａｄ２、ｐＥＲＫ１／２、ＥＲＫ１／２、ｐＳＴＡＴ３、ＳＴＡＴ３、またはＧＡＰＤＨに関するウェスタンブロット分析。

【図８Ｂ】ＴＧＦβ媒介型経路の関与を示す。ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡによって正規化したリアルタイムＰＣＲを使用する、野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬＦ６＋／－マウス（ａ）からの大動脈における、ならびにＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭＣｒｅマウス（ｃ）における、ｍＲＮＡレベルのＴＧＦβ１関連因子の発現。ｎ＝５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。野生型（ＷＴ）同腹仔及びＫＬ

Ｆ６＋／－マウス（ｂ）、ならびにＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｄ）におけるＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射前（－）及び注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）の、大動脈におけるｐＳｍａｄ２、Ｓｍａｄ２、ｐＥＲＫ１／２、ＥＲＫ１／２、ｐＳＴＡＴ３、ＳＴＡＴ３、またはＧＡＰＤＨに関するウェスタンブロット分析。

【図９Ａ】末梢血中の好中球及び樹状細胞に対するＬｙｓＭ　Ｃｒｅの効果を示す。ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの末梢血中のＬｙ６Ｇ＋好中球（ａ、ｃ）及び系統ＣＤ１１ｃ＋樹状細胞（ＤＣ）（ｂ、ｄ）の集団及び定量。（ｅ）ＩＬ－１β、ＴＮＦα、ＩＬ－６、及びＩＬ－８のＲＮＡの発現レベルを、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）に、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの骨髄から単離された好中球において調べた。ｎ＝５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図９Ｂ】末梢血中の好中球及び樹状細胞に対するＬｙｓＭ　Ｃｒｅの効果を示す。ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの末梢血中のＬｙ６Ｇ＋好中球（ａ、ｃ）及び系統ＣＤ１１ｃ＋樹状細胞（ＤＣ）（ｂ、ｄ）の集団及び定量。（ｅ）ＩＬ－１β、ＴＮＦα、ＩＬ－６、及びＩＬ－８のＲＮＡの発現レベルを、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）に、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの骨髄から単離された好中球において調べた。ｎ＝５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図９Ｃ】末梢血中の好中球及び樹状細胞に対するＬｙｓＭ　Ｃｒｅの効果を示す。ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）の、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの末梢血中のＬｙ６Ｇ＋好中球（ａ、ｃ）及び系統ＣＤ１１ｃ＋樹状細胞（ＤＣ）（ｂ、ｄ）の集団及び定量。（ｅ）ＩＬ－１β、ＴＮＦα、ＩＬ－６、及びＩＬ－８のＲＮＡの発現レベルを、ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）に、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの骨髄から単離された好中球において調べた。ｎ＝５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１０Ａ】ＧＭ－ＣＳＦが、マクロファージ内のＫＬＦ６によって調節されることを示す。ＡｎｇＩＩ（１０ｍＭ）、ＴＮＦα（１０ｎｇ　ｍＬ－１）、及びＩＬ－１β（２０ｎｇ　ｍＬ－１）を用いて指示された期間にわたって刺激したＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝４）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝４）からの骨髄由来マクロファージのｍＲＮＡ発現（ａ）及び培地中のＧＭ－ＣＳＦ濃度（ｂ）。（ｃ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウスからのマクロファージに、空（Ｅ）またはＫＬＦ６（ＫＬＦ６）発現レトロウイルス構築体を感染させた。全ＲＮＡは、ＡｎｇＩＩ（１０ｍＭ）、ＴＮＦα（１０ｎｇ　ｍＬ－１）、及びＩＬ－１β（２０ｎｇ　ｍＬ－１）による刺激の３時間後に採取した。（ｄ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝３）からのマクロファージにおいて３時間、ＡｎｇＩＩ（１０ｍＭ）、ＴＮＦα（１０ｎｇ　ｍＬ－１）、及びＩＬ－１β（２０ｎｇ　ｍＬ－１）治療の有無にかかわらず、クロマチン抽出物と共に、ＫＬＦ６に対する抗体または対照（ＣＴＬ）ＩｇＧを使用して、ＣｈＩＰアッセイを行った。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊ｐ＜０．０５対ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス。Ｐ値は、マン・ホイットニー検定（ａ、ｂ、ｄ）及びダンポスト検定を伴う一元配置分散分析（ｃ）によって計算した。

【図１０Ｂ】ＧＭ－ＣＳＦが、マクロファージ内のＫＬＦ６によって調節されることを示す。ＡｎｇＩＩ（１０ｍＭ）、ＴＮＦα（１０ｎｇ　ｍＬ－１）、及びＩＬ－１β（２０ｎｇ　ｍＬ－１）を用いて指示された期間にわたって刺激したＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス

（ｎ＝４）及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス（ｎ＝４）からの骨髄由来マクロファージのｍＲＮＡ発現（ａ）及び培地中のＧＭ－ＣＳＦ濃度（ｂ）。（ｃ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウスからのマクロファージに、空（Ｅ）またはＫＬＦ６（ＫＬＦ６）発現レトロウイルス構築体を感染させた。全ＲＮＡは、ＡｎｇＩＩ（１０ｍＭ）、ＴＮＦα（１０ｎｇ　ｍＬ－１）、及びＩＬ－１β（２０ｎｇ　ｍＬ－１）による刺激の３時間後に採取した。（ｄ）ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（ｎ＝３）からのマクロファージにおいて３時間、ＡｎｇＩＩ（１０ｍＭ）、ＴＮＦα（１０ｎｇ　ｍＬ－１）、及びＩＬ－１β（２０ｎｇ　ｍＬ－１）治療の有無にかかわらず、クロマチン抽出物と共に、ＫＬＦ６に対する抗体または対照（ＣＴＬ）ＩｇＧを使用して、ＣｈＩＰアッセイを行った。結果は、３つの独立した実験を表す。全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。＊ｐ＜０．０５対ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス。Ｐ値は、マン・ホイットニー検定（ａ、ｂ、ｄ）及びダンポスト検定を伴う一元配置分散分析（ｃ）によって計算した。

【図１１Ａ】野生型マウスにおける大動脈解離に対するＧＭ－ＣＳＦ投与の濃度依存的効果を示す。（ａ）指示された濃度の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳの２週間の注射後の大動脈。（ｂ）指示された濃度の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳの２週間の注射後の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度。ｎ＝３～５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１１Ｂ】野生型マウスにおける大動脈解離に対するＧＭ－ＣＳＦ投与の濃度依存的効果を示す。（ａ）指示された濃度の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳの２週間の注射後の大動脈。（ｂ）指示された濃度の組み換えＧＭ－ＣＳＦまたはＰＢＳの２週間の注射後の血漿ＧＭ－ＣＳＦ濃度。ｎ＝３～５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１２Ａ】野生型マウスにおける大動脈解離に対するＧＭ－ＣＳＦ投与の長期効果を示す。（ａ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（１０ｍｇ　ｋｇ－１／日）またはＰＢＳを２週間または４週間投与した代表的な大動脈。（ｂ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（１０ｍｇ　ｋｇ－１／日）またはＰＢＳの２週間または４週間注射後の血漿ＧＭＣＳＦ濃度。ｎ＝４～５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１２Ｂ】野生型マウスにおける大動脈解離に対するＧＭ－ＣＳＦ投与の長期効果を示す。（ａ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（１０ｍｇ　ｋｇ－１／日）またはＰＢＳを２週間または４週間投与した代表的な大動脈。（ｂ）野生型マウスにおける、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射を伴う、組み換えＧＭ－ＣＳＦ（１０ｍｇ　ｋｇ－１／日）またはＰＢＳの２週間または４週間注射後の血漿ＧＭＣＳＦ濃度。ｎ＝４～５／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１３Ａ】大動脈内の好中球及び樹状細胞に対するＬｙｓＭ　Ｃｒｅの効果を示す。ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似後（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）のＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈内のＬｙ６Ｇ＋好中球（ａ、ｃ）及びＣＤ１１ｃ＋ＭＨＣ＋樹状細胞（ＤＣ）（ｂ、ｄ）の集団及び定量。ｎ＝３～４／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１３Ｂ】大動脈内の好中球及び樹状細胞に対するＬｙｓＭ　Ｃｒｅの効果を示す。ＣａＣｌ２適用を伴う２週間のＡｎｇＩＩ注射の疑似後（－）または注射後（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）のＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈内のＬｙ６Ｇ＋好中球（ａ、ｃ）及びＣＤ１１ｃ＋ＭＨＣ＋樹状細胞（ＤＣ）（ｂ、ｄ）の集団及び定量。ｎ＝３～４／群全ての値は、平均±平均値の標準誤差として表される。

【実施例】

【００８６】

材料及び方法

マウス

ヘテロ接合性ＫＬＦ６＋／－マウス（Ｃ５７ＢＬ／６）は、当初Ｔａｒｏｃｃｈｉら（５０）によって生成された。マクロファージ特異的ＫＬＦ６ノックアウトマウスを生成するために、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウス（Ｃ５７ＢＬ／６；１２９Ｓｖ）を、ＬｙｓＭ Ｃｒｅマウス（Ｃ５７ＢＬ／６、Ｊａｃｋｓｏｎ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）と交雑した（５１）。１０～１３週齢の雄のマウスのみ、及び野生型マウスとしてＣ５７ＢＬ／６（ＣＬＥＡ Ｊａｐａｎ）を使用した。全ての動物実験は、東京大学の動物実験委員会によって承認され、東京大学の動物実験に関するガイドラインを厳格に順守した。

【００８７】

マウス大動脈解離／壁内血腫モデル

大動脈解離／壁内血腫を誘導するために、ＣａＣｌ２の大動脈周囲適用を腹部大動脈に対して行い、続いてＡｎｇＩＩを２週間注射した（２０００ｎｇ ｋｇ－１ｍｉｎ－１）（４０）。詳細には、マウスに麻酔をかけ、１０～１３週齢で開腹術を行った。腎動脈と腸骨動脈の分岐との間の腹部大動脈を、周囲の後腹膜構造から単離し、０．５ＭのＣａＣｌ２を腎臓下動脈の外面に適用した。疑似対照マウスにおいて、ＮａＣｌ（０．９％）をＣａＣｌ２の代用とした。１５分後に大動脈を０．９％無菌生理食塩水で洗浄し、切開を閉じた。

【００８８】

マクロファージ枯渇及びＧＭ－ＣＳＦの操作

大動脈解離誘導の２日前、及び誘導の７日後、野生型マウスに、１１０ｍｇ ｋｇ－１のクロドロネートリポソームまたは等量のＰＢＳリポソームを腹腔内注入した。ＧＭ－ＣＳＦに対する中和抗体（３００μｇ、Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ）または対照抗ラットＩｇＧ抗体（Ｅｑｕｉｔｅｃｈ Ｂｉｏ）を、腹腔内注入によって１日おきに投与した。組み換えマウスＧＭ－ＣＳＦ（１０、５０、１００μｇ ｋｇ－１ ｄａｙ－１、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）を、大動脈解離の誘導後２週間または４週間にわたって投与した。

【００８９】

組織学的分析及び免疫組織化学

マウスからの大動脈を、パラフィンに埋め込み、次いで５μｍ厚の連続部分を、Ｅｌａｓｔｉｃ Ｖｏｎ Ｇｉｅｎｓｏｎ（ＥＶＧ）及びヘマトキシリン／エオシン（ＨＥ）染色のために調製した。基準スケールを有するＥＶＧ染色した大動脈のデジタル画像を、直径の絶対測定に使用した。ヒト大動脈組織は、東京大学病院研究倫理委員会によって承認されたプロトコルに基づき、インフォームドコンセントを得て、大動脈修正手術を受けた患者から入手した。パラフィンに埋め込まれた部分を、ＥＶＧ染色及び免疫組織化学のために大動脈から採取した。免疫組織化学の場合、脱パラフィン化及び遮断後、連続部分を以下の抗体を用いてインキュベートした。マウスにおけるマクロファージの場合、Ｍａｃ－３（希釈１：２００；ラット；ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）またはＦ４／８０（１：１００；ラット；Ｓｅｒｏｔｅｃ）及びヒトにおいてＣＤ６８（１：５０；マウス；ＤＡＫＯ）、ならびにＧＭ－ＣＳＦ（マウスの場合、１：１００、ウサギ；Ａｂｃａｍ、及びヒトの場合、１：５０、ウサギ；Ａｃｒｉｓ）またはｐ－ＳＴＡＴ３（１：２００；ウサギ；Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、次いで、ビオチニル化二次抗体（１：２００；ＤＡＫＯ）。検出のために、抗ストレプトアビジン複合ＡｌｅｘＦｌｕｏｒ ４８８またはＡｌｅｘＦｌｕｏｒ ５９４（１：２００；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用した。最終の連続洗浄後に、４′，６－ジアミジノ－２－フェニリンドール（１：５，０００；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で核を染色した。

【００９０】

大動脈、脾臓、骨髄、及び血液からの細胞調製

大動脈を３～４ｍｍの小片に刻み、Ａｃｃｕｍａｘ（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の基礎液中にコラゲナーゼＩＩ型（１．２５ｍｇ ｍＬ－１、Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ）及びブタ膵臓エラスターゼ（５０μｇ ｍＬ－１、Ｗｏｒ

ｔｈｉｎｇｔｏｎ）を含有する１ｍＬの消化液に入れた。大動脈組織を、１時間にわたって撹拌しながら室温で消化した。消化後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ中５％　ＦＣＳ）中、２０００ｒｐｍで５分間洗浄した。大動脈マクロファージを、製造者（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）の指示に従い、ＣＤ１１ｂマイクロビーズを使用して単離した。脾臓を均質化し、細胞濾し器を通して単一細胞懸濁液を得た。骨髄由来細胞は、５～６週齢マウスの大腿骨及び脛骨から採取した。血液を、ヘパリンコーティングしたバイアル瓶に採取し、次いで１．２％デキストランを４５分間にわたって室温で付加した。末梢白血球の計数は、自動血液分析装置（ＸＴ－２０００ｉ、Ｓｙｓｍｅｘ）によって行った。好中球を、製造者（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）の指示に従い、好中球単離キットを使用して骨髄から単離した。脾臓、骨髄、及び血液の単一細胞懸濁液から、ＡＣＫ溶解緩衝液を使用して、氷上でそれぞれ５分、３分、及び２分間にわたって赤血球を溶解した。細胞を、２０００ｒｐｍで５分間遠心分離してＡＣＫ溶解緩衝液を除去し、次いで単一細胞懸濁液を再懸濁し、ＦＡＣＳ緩衝液中で洗浄し、続いて２０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。

【００９１】

細胞培養物

骨髄由来細胞を、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌマウスまたはＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大腿骨及び脛骨から調製して、マクロファージにおけるＧＭ－ＣＳＦの役割を評価した。ＫＬＦ６過剰発現を、ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ（５μｇ／ｃｍ2、Ｔａｋａｒａ　Ｂｉｏ．）の存在下、ＫＬＦ６（ｐＭＸｓ－ＫＬＦ６）のためのレトロウイルス構築体によって誘導した。

【００９２】

フローサイトメトリー

マウスＦｃ受容体は、マウスＣＤ１６／３２抗原（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）に対する抗体を使用して、氷上で１５分間遮断し、その後に細胞を洗浄し、次いで１００　ＬのＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁した。ＡＰＣ－ＣＤ１１ｂ［Ｍ１／７０］、ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５－Ｌｙ－６ｃ［ＨＫ１．４］、ＡＰＣ－Ｃｙ７－Ｌｙ６Ｇ［１Ａ８］、またはＡＰＣ－ＣＤ１１ｃ［Ｎ４１８］に対する蛍光色素複合抗体（全てＢｉｏＬｅｇｅｎｄから）を、３０～４５分間にわたって室温で付加した。ＦＩＴＣ－ＣＤ３ｅ［１４５－２Ｃ１１］、ＦＩＴＣ－Ｌｙ６Ｇ［ＲＢ６－８Ｃ５］、ＦＩＴＣ－ＣＤ１１ｂ［Ｍ１／７０］、ＦＩＴＣ－ＣＤ４５Ｒ／Ｂ２２０［ＲＡ３－６Ｂ２］、及びＦＩＴＣ－Ｌｙ７６［Ｔｅｒ－１１９］（赤血球系統マーカー）を、系統マーカーとして使用した。対応するアイソタイプ対照抗体を、関心対象の抗体と同じ濃度で試料に付加した。インキュベーション後に、試料を３回洗浄し、ＦＡＣＳｖｅｒｓｅ（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）によって分析した。単色染色された大動脈マクロファージを含有する陽性試料を使用して、補償を行った。低い順方向散乱によって定義される残屑及び死細胞は、分析から除外した。データを、ＦｌｏｗＪｏ（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ）により分析した。

【００９３】

クロマチン免疫沈降

ＣｈＩＰ分析を、製造者の指示に従い、クロマチン免疫沈降キット（Ａｃｔｉｖｅ　Ｍｏｔｉｆ）を使用して行った。簡潔には、骨髄由来マクロファージを、１％ホルムアルデヒドとの１０分間の架橋前に３時間にわたって、ＡｎｇＩＩ（１０μＭ）、ＴＮＦα（１０ｎｇ　ｍＬ－１）、及びＩＬ－１β（２０ｎｇ　ｍＬ－１）を用いるか、または用いずに刺激した。クロマチンを、音波処理によって、２００～１０００塩基対（Ｃｏｖａｒｉｓ）の平均サイズに剪断した。免疫沈降は、抗ＫＬＦ６抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）及びウサギＩｇＧ抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用して行った。ＫＬＦ結合要素にまたがるＧＭ－ＣＳＦプロモーター領域のＰＣＲ増幅は、以下のプライマー、順方向５′－ＡＡＧＣＣＣＴＴＣＣＡＡＧＡＡＣＴＧＧＣ－３′（配列番号４）及び逆方向５′－ＧＧＣＣＣＣＴＣＡＡＡＡＡＧＧＡＧＡＧＧ－３′（配列番号５）を使用して行った。

ＫＬＦ６動員は、入力ＤＮＡによって正規化し、ＫＬＦ６抗体を有する対照群と比較した。

【００９４】

ＲＮＡ単離及び定量性リアルタイムＰＣＲ

培養された細胞、大動脈マクロファージ、骨髄由来好中球、またはマウス大動脈試料からの全ＲＮＡを、製造者の指示に従い、ＲＮｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）またはＲＮＡｌａｔｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ）のいずれかを使用して抽出した。０．５μｇ～１μｇのＲＮＡを、製造者の指示に従い、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して逆転写した。リアルタイムＰＣＲ反応を、ＳＹＢＲグリーンＩマスター（Ｒｏｃｈｅ）を含有する２０μＬの反応量当たり２μＬの結果として生じるｃＤＮＡを使用して行った。ＧＡＰＤＨを、内部対照として使用した。ＡｎｇＩＩ（１０μＭ、３時間）刺激した骨髄由来マクロファージを使用して、ＲＴ２プロファイラーＰＣＲアレイ（Ｑｉａｇｅｎ）を、ＩＬ－６／ＳＴＡＴ炎症経路に対する８４個の関連遺伝子を用いて行った。ＰＣＲは、製造者の推奨手順に従い、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０リアルタイムＰＣＲシステム（Ｒｏｃｈｅ）上で行った。リアルタイムＰＣＲプライマーは、表５に示される。

【００９５】

ウェスタンブロット分析

マウス大動脈標本を、プロテアーゼ阻害剤複合体（Ｒｏｃｈｅ）及びホスファターゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ）を含有する溶解緩衝液（Ｔ－ＰＥＲ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）により均質化した。タンパク質濃度は、ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用してアッセイし、５マイクログラムのこのタンパク質を、１０％　ＮｕＰＡＧＥ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって溶解し、次いで二フッ化ポリビニリデン膜に移した。ブロットは、一次抗体；ｐＳｍａｄ２（希釈１：４００）、ｐＥＲＫ１／２（１：３，０００）、ｐＳＴＡＴ３（１：３，０００）、Ｓｍａｄ２（１：１，０００）、ＥＲＫ１／２（１：３，０００）、またはｐＳＴＡＴ３（１：３，０００）（全てＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから入手されたウサギ抗体）、及び抗ＧＡＰＤＨ抗体（Ａｍｂｉｏｎ）でプローブした。膜を洗浄し、対応するホースラディッシュペルオキシダーゼ複合二次抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）でインキュベートした。タンパク質バンドを、ＥＣＬｐｌｕｓ（Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって検出し、ＧＡＰＤＨは、タンパク質負荷のための内部対照として役割を果たした。

【００９６】

酵素結合免疫吸着アッセイ

大動脈解離／壁内血腫を有するか、または有しないマウスまたはヒトにおけるＩＬ－６、ＭＣＰ－１、及びＧＭ－ＣＳＦの血漿レベルは、商業的に入手可能なＱｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）を用い、製造者の指示に従ってアッセイした。健康なボランティア及び大動脈瘤、冠動脈疾患、または大動脈解離を有する患者の血清は、東京大学病院研究倫理委員会によって承認されたプロトコルに基づき、インフォームドコンセントを得て入手した。ヒト対象のベースライン特徴は、表６に示される。

【００９７】

統計分析

全てのデータは、平均±平均値の標準誤差として表される。２群間の統計的差異は、パラメトリックデータに関してはスチューデントｔ検定（両側）を用いて、またはノンパラメトリックデータに関してはマン・ホイットニー検定を用いて、Ｆ検定分析による正常性の試験後に決定した。複数の時点を含有するデータの場合、同時点での２群比較を行った。複数の群を比較する場合、ダンポスト検定を伴うクラスカル・ウォリスノンパラメトリック一元配置分散分析によってデータを分析した。カプラン・マイヤー法を使用して生存曲線を作成し、対数順位検定によって比較した。マウス実験の統計力は、Ｂｉｏｍａｔｈ

（ｂｉｏｍａｔｈ．ｉｎｆｏ／ｐｏｗｅｒ）を使用して計算した。全ての試料サイズは、推奨される最小群のサイズ以上であった。全てのデータは、Ｐｒｉｓｍ　６．０（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して分析した。０．０５未満のＰ値は、有意であると見なした。

【００９８】

結果

実施例１－ＫＬＦ６ヘテロ接合性ノックアウトマウスにおける炎症を伴う大動脈瘤

発明者らは、最初に、ＫＬＦ６をヘテロ接合的に枯渇したマウスが、大動脈炎症を受けた場合［塩化カルシウム（ＣａＣｌ２）の局所適用を伴う２週間のアンジオテンシンＩＩ（ＡｎｇＩＩ）の注射］、悪化した大動脈瘤の表現型を呈することを見出した（保存大動脈壁を有する大動脈外径の５０％超の増加として定義される）（２１、２２）。組織学的見出は、虚弱な大動脈壁を有する大動脈腔の拡大、及びさらには、マクロファージの顕著な浸潤と複合した線維組織（Ｍａｃ３陽性細胞）の堆積を示した（図１ａ～ｅ）。機構的に、マトリックスメタロプロテアーゼ－９（ＭＭＰ９、血管再構築のマーカーとして）（２３）、Ｆ４／８０（マクロファージのマーカーとして）（２４、２５）、及びＩＬ－６（炎症のマーカーとして）（１６、２６～３０）の増加した発現が、大動脈内で見られた（図１ｆ）。

【００９９】

これらのマウスの罹患した大動脈内で免疫細胞の顕著な浸潤が見られたため、クロドロネートを使用してマクロファージを枯渇させ、これがマクロファージ浸潤がほぼ不在の大動脈表現型を排除した（図１ｇ、ｈ）。故に、マクロファージを含む免疫細胞は、このモデルにおける大動脈再構築に重要であった。

【０１００】

実施例２－ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスは、大動脈解離／血腫を呈する

ＫＬＦ６欠乏マウスにおける大動脈病態が、マクロファージによる炎症性応答の調節不全に関与すると思われたため、骨髄特異的ＫＬＦ６欠乏マウス（ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウス）をさらに生成し、対照マウスと比較して、７０％の骨髄系統におけるＫＬＦ６発現の特異的低減を示した。大動脈炎症を受けたＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスは、ヘテロ接合性ノックアウトマウスにおいて見られるものと同様の悪化した腹部大動脈瘤の表現型を示したが、興味深いことに、解離３の内膜断裂に付随する血腫形成を伴う大動脈内壁の分離として定義される、上行腎大動脈解離／壁内血腫をさらに示した（図６）。この病変はまた、Ｍａｃ３陽性マクロファージの浸潤を伴う線維組織の堆積を示し（図２ｂ～ｅ及び図７ａ、ｂ）、故に、ＫＬＦ６欠乏の大動脈表現型が、炎症性応答の混乱と関連していたことを確認する。死亡したマウスは、大動脈解離／壁内血腫に続いて、大動脈破裂に起因する可能性が高かった（図２ａ）。

【０１０１】

機構的に、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスは、大動脈病変におけるＩＬ－６の上昇した発現（図２ｇ）及び上昇した循環レベル（図２ｆ）を示した。さらに、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの骨髄から入手されたマクロファージは、ＩＬ－６下流ＳＴＡＴ３の活性化（図８ｄ）と共に、増加したＩＬ－６発現（図２ｈ）を呈した。発現における差異は、他の主要な炎症性サイトカイン、例えば、ＩＬ－１β、ＭＣＰ－１、またはＴＮＦαにおいて、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ及びＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭマウスからのマクロファージ間で見られなかった（図２ｈ）。これらのマウスの罹患した大動脈における免疫細胞は、フローサイトメトリー分析によって特徴付けられ、顕著に増加したＣＤ１１ｂ＋Ｌｙ６Ｃｈｉ炎症性単球の集団を示し、これは末梢血中でも見られた（図２ｉ）。顆粒球（例えば、好中球；Ｌｙ６Ｇ＋細胞）は、基本条件下、またはＣａＣｌ２及びＡｎｇＩＩ注射の設定において、数または（下位）集団に影響しなかっただけでなく（表１及び図９ａ、ｃ）、ＩＬ－８またはＴＮＦα等の炎症性サイトカインの発現によって調べられる、好中球の機能的活性（図９ｅ）または樹状細胞（系統ＣＤ１１ｃ＋

細胞）の集団の機能的活性（図９ｂ、ｄ）も、これらの条件下で影響されなかった。まとめると、大動脈及び循環における炎症性単球の拡大は、本実験的モデル及び条件と選択的に関連付けられた。

【０１０２】

マルファン大動脈障害の発病における中心分子であるＴＧＦβ（１２、１４、３２～３４）、及びその下流シグナル伝達経路（正準ｐＳｍａｄ－２３５及び非正準ｐＥＲＫ１／２１２）は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスまたはヘテロ接合性ノックアウトマウスのいずれにも影響を及ぼさず（図８ａ～ｄ）、ＴＧＦβ媒介型経路が、根底にある表現型に著しく関与しなかったことを示唆する。

【０１０３】

実施例３－ＧＭ－ＣＳＦは、ＫＬＦ６の下流標的である

次に、標的分子及び免疫細胞の調節機序の描写を、ＲＮＡプロファイリングアレイ分析を使用して説明した。注目すべきことに、ＧＭ－ＣＳＦレベルは、対照マクロファージと比較して、ＡｎｇＩＩ刺激（３．８９倍）に応答して、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの骨髄由来のマクロファージにおいて最大増加を示した（図３ａ）。

【０１０４】

驚くべきことに、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈から入手したマクロファージは、ＣａＣｌ２適用及びＡｎｇＩＩ注射の実験条件下で（図３ｂ）、及びこれらのマウスの骨髄由来のマクロファージにおいて（図１０ａ）、ＧＭ－ＣＳＦの顕著に増加した発現を示した。大動脈におけるＧＭ－ＣＳＦの発現は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの治療後（大動脈解離の発症前）３日目から上昇した（図３ｃ）。マクロファージにおけるＫＬＦ６の欠失が、ＧＭ－ＣＳＦの分泌、及びさらには全身循環レベルに影響を及ぼすかどうかを次に研究した。マクロファージ及びＧＭ－ＣＳＦは、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスの大動脈において共存し、ＧＭ－ＣＳＦは、炎症性刺激に応答して、マクロファージにより顕著に産生された（図３ｄ及び図１０ｂ）。ＧＭ－ＣＳＦの循環レベルは、ＫＬＦ６欠失マウスにおいて少なくとも７３．３倍高かった（図３ｅ）。したがって、ＧＭ－ＣＳＦにおいて顕著に増加した応答は、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈の驚くほど顕著な特徴である。

【０１０５】

次に発明者らは、ＫＬＦ６によるＧＭ－ＣＳＦ発現及び分泌の調節の根底にある機序を理解することを求めた。ＫＬＦ６の過剰発現は、マクロファージにおいて炎症性刺激によって誘導されたＧＭ－ＣＳＦ発現を著しく減衰させた（図１０ｃ）。転写的に、いくつかのＫＬＦ結合部位は、ＧＭ－ＣＳＦのプロモーター領域内に存在し、これにＫＬＦ６が、マクロファージにおけるアゴニスト刺激治療によって動員された（図１０ｄ）。これらの結果は、機構的に、ＧＭ－ＣＳＦが、ＫＬＦ６の直接標的であること、及びＫＬＦ６が、ＧＭ－ＣＳＦの発現を表すことを示した。

【０１０６】

実施例４－ＧＭ－ＣＳＦ操作は、大動脈解離／血腫を調節する

次に、これらのマウスの大動脈解離におけるＧＭ－ＣＳＦの要件を試験するために、大動脈解離／壁内血腫（図４ａ、ｂ）、ならびにＩＬ－６の血清レベル（図４ｃ）に加えて、ＧＭ－ＣＳＦ受容体α、ＭＭＰ９、Ｆ４／８０、及びＩＬ－６の発現（図４ｄ）を排除する中和抗体を使用して、ＧＭ－ＣＳＦの作用を遮断した。したがって、ＧＭ－ＣＳＦは、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおける大動脈表現型に必要とされた。

【０１０７】

発明者らは、ＧＭ－ＣＳＦが、大動脈障害を誘導するのに十分であるかどうかをさらに調査した。大動脈炎症を受けた野生型マウスにおけるＧＭ－ＣＳＦの投与（ＣａＣｌ２＋ＡｎｇＩＩ）は、大動脈解離／壁内血腫を引き起こし、この病態の発病におけるＧＭ－ＣＳＦの役割の一般性を確認する。マウスは、大動脈病変に起因して大動脈破裂により死亡し、この病態の病理学的特徴を示した（例えば、虚弱な大動脈、血腫による内膜断裂）（図４ｅ～ｈ）。しかしながら、大動脈解離／壁内血腫は、ＧＭ－ＣＳＦ単独の投与によっ

て発達せず、さらにはＧＭ－ＣＳＦの循環レベルが異常に増加した（少なくとも１８０．９倍）（図１１ａ、ｂ）。ＡｎｇＩＩ、ＣａＣｌ２、またはＧＭ－ＣＳＦ単独では、この病態を誘導するのに十分でなかったため、大動脈炎症とＧＭ－ＣＳＦ注射の組み合わせが、この表現型に必須であると思われる（図１２ａ、ｂ）。これと一貫して、マウスにおけるＧＭ－ＣＳＦの循環レベルは、各々単独と比較して、手段の組み合わせで治療された場合にのみ顕著に上昇した（図４ｉ）。これらの上昇したレベルは、ＫＬＦ６ｆｌ／ｆｌ；ＬｙｓＭ　Ｃｒｅマウスにおけるレベルに相当し、高度に上昇したレベルのＧＭ－ＣＳＦが必要であるが、大動脈解離／壁内血腫を引き起こすには十分でないことを示唆する（図３ｅ）。

【０１０８】

最後に、ＧＭ－ＣＳＦの操作が、末梢白血球の数に影響を及ぼすかどうかを調べた。ＧＭ－ＣＳＦ投与によって、循環リンパ球の数は、モデルの初期相（５日間）または発達相（１４日間）のいずれにおいても変化しなかった（表２及び３）。好中球に関して、末梢血中の数は、初期相において顕著に増加したが、１４日間のＧＭ－ＣＳＦ投与において差異は観察されなかった。これは、ＧＭ－ＣＳＦが単独で投与された群において同様に見られ、大動脈表現型をもたらさなかった。これらの変化は、外因性ＧＭ－ＣＳＦ治療による急性効果に起因し得るが、これは単独で、表現型とは何の関係もない。さらに、循環顆粒球及びリンパ球の数は、ＧＭ－ＣＳＦが中和抗体によって枯渇された場合に影響されなかった（表４）。これらの結果に基づいて、ＧＭ－ＣＳＦの操作は、少なくとも観察期間（１４日間）の間、本モデルにおいて循環白血球の数に影響しなかった。

【０１０９】

実施例５－大動脈解離を有する患者におけるＧＭ－ＣＳＦの上方調節

これらの見出の臨床的関連を確認するために、急性大動脈解離を有する患者の血清中でＧＭ－ＣＳＦの循環レベルを測定したところ、冠動脈疾患、大動脈瘤を有する患者、または無視できないが顕著に低いレベルを示した健康なボランティアとは対照的に、顕著な増加を示した（図５ａ）。さらに、炎症性浸潤（ＣＤ６８＋単球／マクロファージ）及びＧＭ－ＣＳＦ発現は、解離された大動脈において上方調節され、共存していた（図５ｂ）。故に、ＧＭ－ＣＳＦは、マウスにおいてのみならず、ヒト病態においても急性大動脈解離と関連付けられる。

【０１１０】

考察

本見出は、ＧＭ－ＣＳＦが、この病態のマウスモデルにおいて大動脈解離／壁内血腫を引き起こし、ヒトにおける病態とも関連付けられる重要な調節分子であることを示す。マウスにおいて、中和抗体または外因性投与それぞれによるＧＭ－ＣＳＦの調節は、この表現型の発症を予防または誘導した。ヒトにおいて、大動脈組織中の上昇した血清ＧＭ－ＣＳＦレベル及びサイトカインの発現が、大動脈解離を有する患者において見られた。

【０１１１】

ＧＭ－ＣＳＦは、発明者のマウスモデルにおける大動脈解離／壁内血腫の中心的構成要素であった。以前の研究は、大動脈疾患の発病におけるＧＭ－ＣＳＦの限定された役割を示唆していた（３６～３９）。例えば、ｓｍａｄ３を欠失するマウスは、大動脈瘤形成の表現型を呈し（３９）、ＧＭ－ＣＳＦは、発病における中枢的役割を果たすことが示されたが、ｓｍａｄ３は、マルファン大動脈障害に関連する中心的分子であるＴＧＦβの下流標的であるため、発病機序が、この遺伝的大動脈障害に限定されたと想定された。これらの見出は、ＴＧＦβ－ＳＭＡＤ経路から独立した様式でのＧＭ－ＣＳＦ経路の活性化が、ヒト高齢者において見られる大動脈解離／壁内血腫を反映する炎症及び変性大動脈のモデルにおいて（塩化カルシウム治療が、大動脈の硬化を引き起こし、アテローム硬化性ヒト大動脈において見られるような病態を模倣する（４０））、この病態を誘発するのに十分であり、マルファン症候群を有する若年患者における遺伝的大動脈障害とは区別されるべきであることを示す。ＧＭ－ＣＳＦ組織発現はまた、再発性隔膜炎症（４２）を特徴とする明白な自己免疫病態であるコーガン病（４１）において大動脈解離を示す患者において

増加することが示されており、これは孤立した見出であると考えられた。

【０１１２】

他の非マクロファージ骨髄細胞に対する効果を調査したところ、樹状細胞（ＣＤ１１ｃ＋ＭＨＣＩＩ＋細胞）は、ＫＬＦ６欠乏状態で、罹患した大動脈において増加したが、循環中では増加せず、好中球（Ｌｙ６Ｇ＋細胞）に対しては、循環中または大動脈組織中のいずれにおいても効果がないことを示した（図９及び図８）。

【０１１３】

マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）は、血管再構築の重要な調節因子であることも示唆された（４３、４４）。Ｍ－ＣＳＦの作用の精密な分子機序は、依然として不明であるが、血管壁における異なる発現パターンを前提とすると、ＧＭ－ＣＳＦと比較して異なる作用が想到される。Ｍ－ＣＳＦは、内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、及び平滑筋細胞において生理学的条件下で構成的に発現されるが、対照的にＧＭ－ＣＳＦは、これらの細胞において基本条件下でわずかな量で発現されるだけであるが、代わりに、炎症性刺激（例えば、ＴＮＦ）（４５）または酸化低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）コレステロール刺激（４６）によって誘導される。マウス及びヒト病変において、Ｍ－ＣＳＦは、健康な動脈内、ならびにマクロファージ及び泡沫細胞含有物と関連するアテローム硬化性病変内の両方で検出され、後者においてプラークの進行と相関する。対照的に、わずかなレベルのＧＭ－ＣＳＦが、健康なヒト動脈の平滑筋細胞及び内皮細胞において見られるが、アテローム硬化性発達及びマクロファージ蓄積時に上昇する（４７）。これらの観察に基づいて、集合的に、Ｍ－ＣＳＦは、脈管構造における構成的に発現されるサイトカインであるが、ＧＭ－ＣＳＦは、罹患した血管内で顕著に誘導されて、記載の大動脈障害を含む病理学的病態を調節する。

【０１１４】

実験モデルに関する大半の以前の研究は、解離表現型を誘導する介入として、ＡｎｇＩＩ注射を単独で使用してきた（１６、４８）。しかしながら、炎症に関するものを含む機構的調査のためのこの手順の限界は、再現性が低く（３０％未満）、ＡｎｇＩＩの長期注射（４週間超）、及び特定の遺伝子背景を有する（ＡｐｏＥ－／－またはＬＤＬＲ－／－マウス）高齢マウス（７～１０ヶ月齢超）においてのみ表現型の発生／発現を必要とする。最も特筆すべきことは、本モデルが、若年野生型マウスにおいても高い再現性（少なくとも７０％）で２週間以内に大動脈解離／壁内血腫を誘導し得ることである。

【０１１５】

機構的に、このモデルは、腎臓下大動脈における増加した硬化のために（例えば、連続ＡｎｇＩＩ注射を伴うＣａＣｌ２適用後の圧力直径曲線の下方移行）（４０）、ウィンドケッセル効果（４９）の喪失に起因して、副腎解離部位上に血行動態的ストレスを伴う場合があり、これが、脆弱及び虚弱な副腎大動脈においてＧＭ－ＣＳＦ誘発型解離／壁内血腫形成の炎症性効果に曝露されたときに、動脈瘤形成を示した。大動脈留は、解離を有する患者において一般に共存するため（４）、記載の動物モデル及び見出は、患者において見られる病態に非常に類似する。

【０１１６】

まとめると、本明細書に記載される見出は、ＧＭ－ＣＳＦが、アテローム硬化性及び炎症性大動脈における大動脈解離／壁内血腫の中心的調節因子であることを示唆し、これは典型的に、この病態を有する高齢患者において見られ、診断的及び治療的活用のための潜在的な標的（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ拮抗薬を使用する大動脈安定化）ならびに診断的バイオマーカーとしての役割を果たし得る。

【０１１７】

まとめ

大動脈解離及び壁内血腫は、大動脈壁の分離を伴う大動脈障害を含む。この病態の根底にある機序は、依然として不明である。ここで発明者らは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）が、この病態の誘発分子であることを示す。転写因子クルッペル様因子６（ＫＬＦ６）－骨髄特異的条件付き欠乏マウスは、大動脈炎症を受けた場合

に、この大動脈表現型を呈した。機構的に、ＫＬＦ６は、ＧＭ－ＣＳＦの発現及び分泌を下方調節した。ＧＭ－ＣＳＦに対する中和抗体の投与は、これらのマウスにおいて病態を予防した。逆に、野生型マウスへの、大動脈炎症と組み合わせたＧＭ－ＣＳＦの投与は、効果の大まかな性質を示唆する表現型を誘導するのに十分であった。さらに、この病態を有する患者は、ＧＭ－ＣＳＦの高度に増加した循環レベルを示し、これは解離された大動脈においても局所的に発現された。したがって、ＧＭ－ＣＳＦは、この大動脈障害を引き起こす重要な調節分子であり、このサイトカインの調節は、この病態のための活用可能な治療戦略である。

【０１１８】

参照文献

1 Nienaber. C. A. &Powell. J. T. Management of acute aortic syndromes. Eur Heart J 33. 26－35b（２０１２）.
2 Tsai. T. T. . Nienaber. C. A. &Eagle. K. A. Acute aortic syndromes. Circulation 112. 3802－3813（２００５）.
3 Hiratzka. L. F. et al. 2010 ACCF／AHA／AATS／ACR／ASA／SCA／SCAI／SIR／STS／SVM Guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease. A Report of the American College of Cardiology Foundation／American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. American Association for Thoracic Surgery. American College of Radiology, American Stroke Association. Society of Cardiovascular Anesthesiologists. Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. Society of Interventional Radiology. Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. J Am Coll Cardiol 55. e27－e129（２０１０）.
4 Hagan. P. G. et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection（IRAD）：new insights into an old disease. JAMA 283. 897－903（２０００）.
5 Suzuki. T. et al. Biomarkers of aortic diseases. Am Heart J 165. 15－25（２０１３）.
6 Suzuki. T. . Distante. A. &Eagle. K. Biomarker－assisted diagnosis of acute aortic dissection：how far we have come and what to expect. Curr Opin Cardiol 25. 541－545（２０１０）.
7 Clough. R. E. &Nienaber. C. A. Management of acute aortic syndrome. Nature reviews. Cardiology doi：10. 1038（２０１４）.
8 Song. J. K. Aortic intramural hematoma：aspects of pathogenesis 2011. Herz 36. 488－497（２０１１）.
9 von Kodolitsch. Y. et al. Intramural hema

toma of the aorta:predictors of progression to dissection and rupture. Circulation 107. 1158-1163 (2003).
10 Milewicz. D. M. . Regalado. E. S. &Guo. D. C. Treatment guidelines for thoracic aortic aneurysms and dissections based on the underlying causative gene. J Thorac Cardiovasc Surg 140. S2-4; discussion S45-51 (2010).
11 Milewicz. D. M. et al. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections:focus on smooth muscle cell contractile dysfunction. Annu Rev Genomics Hum Genet 9. 283-302 (2008).
12 Holm. T. M. et al. Noncanonical TGFbeta signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. Science 332. 358-361 (2011).
13 Li. W. et al. Tgfbr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. J Clin Invest 124. 755-767 (2014).
14 Dietz. H. C. TGF-beta in the pathogenesis and prevention of disease:a matter of aneurysmic proportions. J Clin Invest 120. 403-407 (2010).
15 Ju. X. et al. Interleukin-6-signal transducer and activator of transcription-3 signaling mediates aortic dissections induced by angiotensin II via the T-helper lymphocyte 17-interleukin 17 axis in C57BL/6 mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 33. 1612-1621 (2013).
16 Tieu. B. C. et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. J Clin Invest 119. 3637-3651 (2009).
17 Date. D. et al. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. J Biol Chem 289. 10318-10329 (2014).
18 Starkel. P. et al. Oxidative stress. KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. J Hepatol 39. 538-546 (2003).
19 Holian. J. et al. Role of Kruppel-like factor 6 in transforming growth factor-be

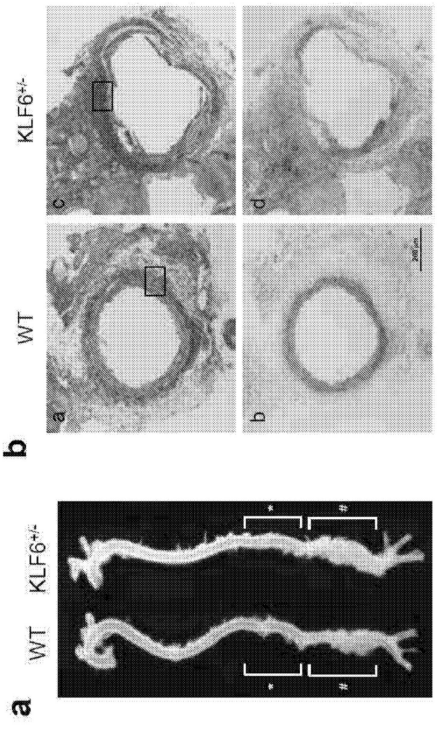
ta1−induced epithelial−mesenchymal transition of proximal tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol 295. F1388−1396 (2008).
20 Hamilton. J. A. &Anderson. G. P. GM−CSF Biology. Growth Factors 22. 225−231 (2004).
21 Daugherty. A.. Manning. M. W. &Cassis. L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E−deficient mice. J Clin Invest 105. 1605−1612 (2000).
22 Johnston. K. W. et al. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms. Ad Hoc Committee on Reporting Standards. Society for Vascular Surgery and North American Chapter. International Society for Cardiovascular Surgery. J Vasc Surg 13. 452−458 (1991).
23 Nagasawa. A. et al. Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase−9 in human thoracic aortic aneurysms. J Surg Res 183. 472−477 (2013).
24 Ezekowitz. R. A. &Gordon. S. Down−regulation of mannosyl receptor−mediated endocytosis and antigen F4／80 in bacillus Calmette−Guerin−activated mouse macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines. J Exp Med 155. 1623−1637 (1982).
25 Ezekowitz. R. A.. Austyn. J.. Stahl. P. D. &Gordon. S. Surface properties of bacillus Calmette−Guerin−activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose−specific endocytosis. Fc receptors. and antigen F4／80 accompanies induction of Ia. J Exp Med 154. 60−76 (1981).
26 Atreya. R. et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T−cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation:evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. Nat Med 6. 583−588 (2000).
27 Cheuk. B. L. &Cheng. S. W. Can local secretion of prostaglandin E2. thromboxane B2. and interleukin−6 play a role in ruptured abdominal aortic aneurysm? World J Surg 32. 55−61 (2008).
28 Dawson. J. et al. Aortic aneurysms secrete interleukin−6 into the circulation. J Vasc Surg 45. 350−356 (2007).

29 Dawson. J. . Cockerill. G. . Choke. E. . Loftus. I. &Thompson. M. M. Aortic aneurysms as a source of circulating interleukin-6. Ann N Y Acad Sci 1085. 320-323 (2006).
30 Treska. V. . Topolcan. O. &Pecen. L. Cytokines as plasma markers of abdominal aortic aneurysm. Clin Chem Lab Med 38. 1161-1164 (2000).
31 Wright. H. L. . Moots. R. J. . Bucknall. R. C. & Edwards. S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. Rheumatology 49. 1618-1631 (2010).
32 Habashi. J. P. et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. Science 332. 361-365 (2011).
33 Lindsay. M. E. et al. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. Nat Genet 44. 922-927 (2012).
34 Sawaki. D. &Suzuki. T. Targeting transforming growth factor-beta signaling in aortopathies in Marfan syndrome. Circ J 77. 898-899 (2013).
35 Feng. X. H. &Derynck. R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. Annu Rev Cell Dev Biol 21. 659-693 (2005).
36 Shindo. J. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis via changes in the cellular and extracellular composition of atherosclerotic lesions in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Circulation 99. 2150-2156 (1999).
37 Zhu. S. N. . Chen. M. . Jongstra-Bilen. J. &Cybulsky. M. I. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. J Exp Med 206. 2141-2149 (2009).
38 Haghighat. A. . Weiss. D. . Whalin. M. K. . Cowan. D. P. &Taylor. W. R. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor exacerbate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 115. 2049-2054 (2007).
39 Ye. P. et al. GM-CSF contributes to aortic aneurysms resulting from SMAD3 deficiency. J Clin Invest 123. 2317-2331 (2013).
40 Kimura. T. et al. Tenascin C protects ao

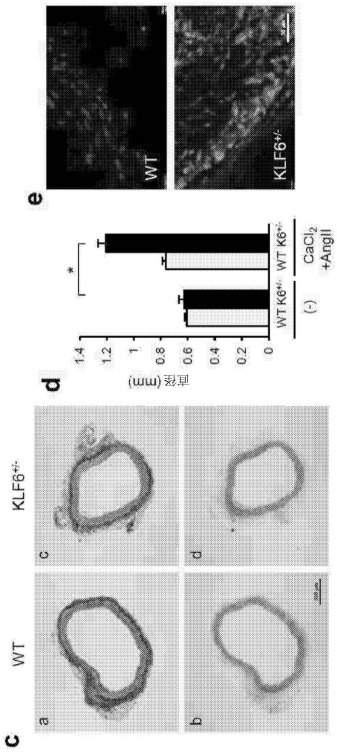
rta from acute dissection in mice. Sci Rep 4. 4051 (2014).
41 Weissen-Plenz. G. et al. Aortic dissection associated with Cogans's syndrome: deleterious loss of vascular structural integrity is associated with GM-CSF overstimulation in macrophages and smooth muscle cells. J Cardiothorac Surg 5. 66 (2010).
42 Kessel. A. . Vadasz. Z. &Toubi. E. Cogan syndrome - Pathogenesis. clinical variants and treatment approaches. Autoimmun Rev 13. 351-354 (2014).
43 Babamusta. F. et al. Angiotensin II infusion induces site-specific intra-laminar hemorrhage in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. Atherosclerosis 186. 282-290 (2006).
44 Brocheriou. I. et al. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. Atherosclerosis 214. 316-324 (2011).
45 Filonzi. E. L. . Zoellner. H. . Stanton. H. &Hamilton. J. A. Cytokine regulation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor production in human arterial smooth muscle cells. Atherosclerosis 99. 241-252 (1993).
46 Sakai. M. et al. Glucocorticoid inhibits oxidized LDL-induced macrophage growth by suppressing the expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19. 1726-1733 (1999).
47 Plenz. G. . Koenig. C. . Severs. N. J. &Robenek. H. Smooth muscle cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the undiseased and atherosclerotic human coronary artery. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17. 2489-2499 (1997).
48 Saraff. K. . Babamusta. F. . Cassis. L. A. &Daugherty. A. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused. apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23. 1621-1626 (2003).
49 Cavalcante. J. L. . Lima. J. A. . Redheuil. A. &Al-Mallah. M. H. Aortic stiffness: current understanding and future directions. J Am Coll Cardiol 57. 1511-1522 (2011).

50 Tarocchi. M. et al. Carcinogen−induced hepatic tumors in KLF6+／− mice recapitulate aggressive human hepatocellular carcinoma associated with p53 pathway deregulation. Hepatology 54. 522−531（2011）.
51 Clausen. B. E.. Burkhardt. C.. Reith. W.. Renkawitz. R. &Forster. I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. Transgenic Res 8. 265−277（1999）.

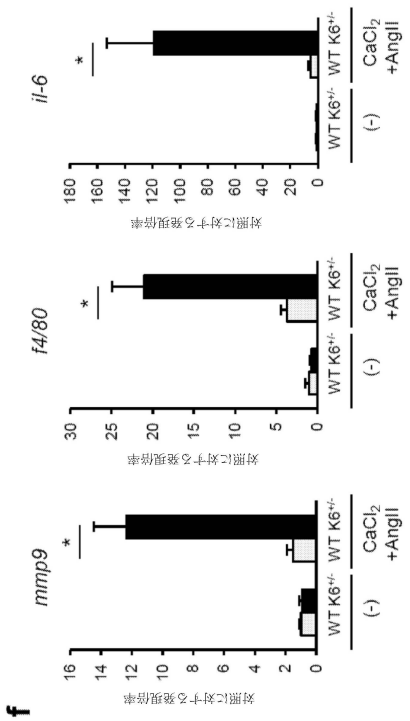
【図１Ａ】



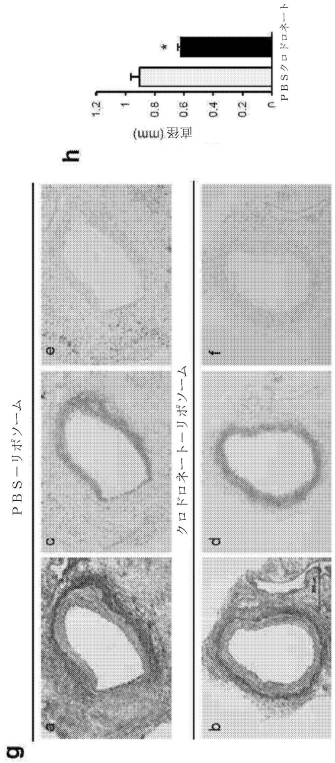
【図１Ｂ】



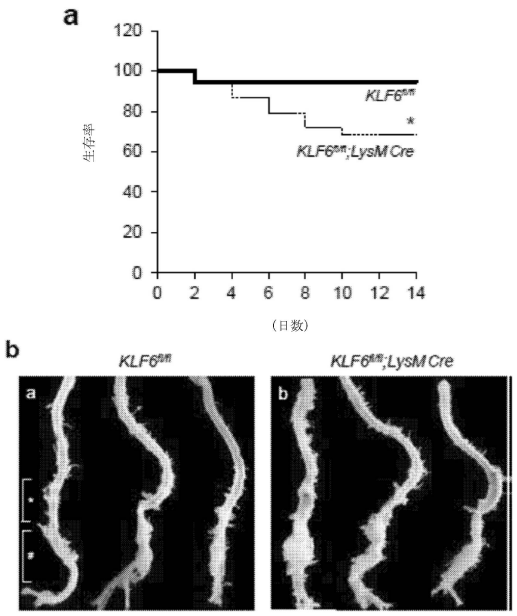
【図１Ｃ】



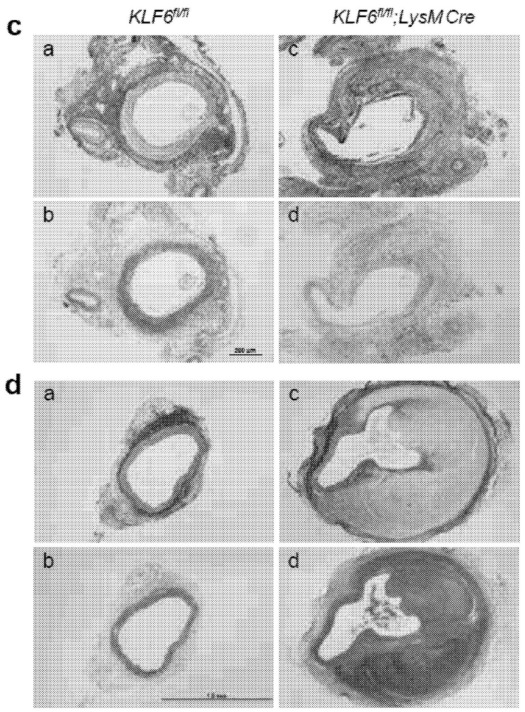
【図１Ｄ】



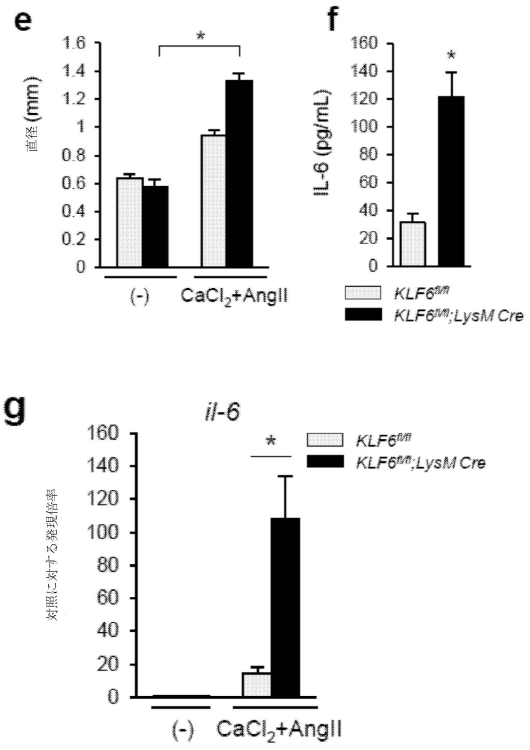
【図２Ａ】



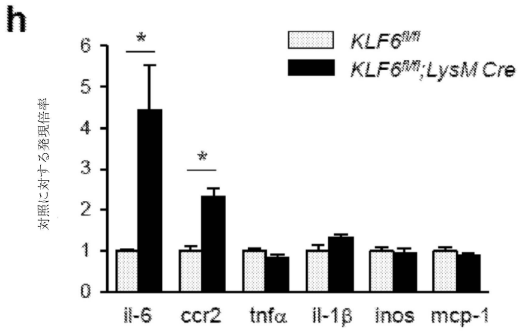
【図２Ｂ】



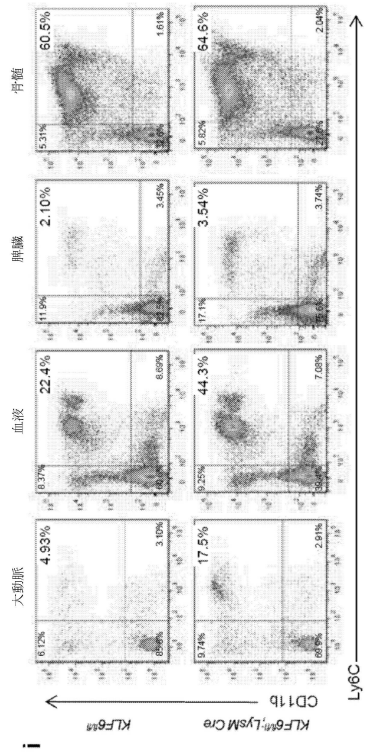
【図２Ｃ】



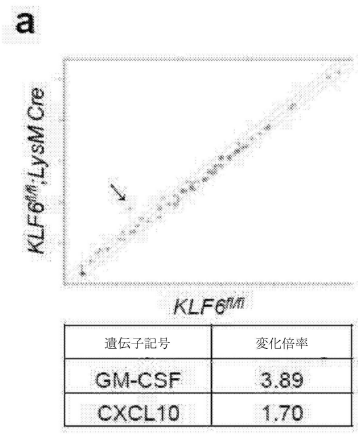
【図２Ｄ】



【図２Ｅ】

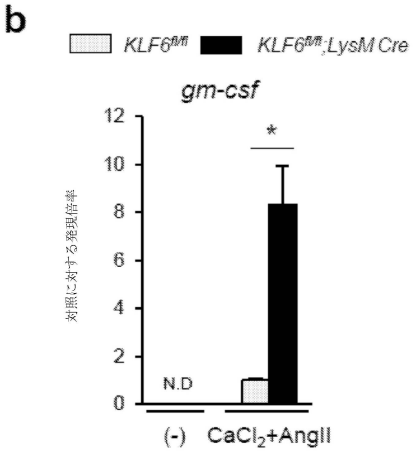


【図３Ａ】

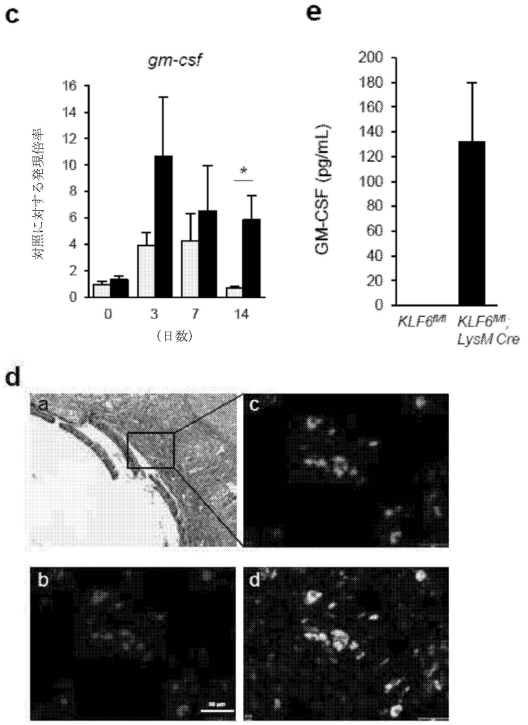


遺伝子記号	変化倍率
GM-CSF	3.89
CXCL10	1.70

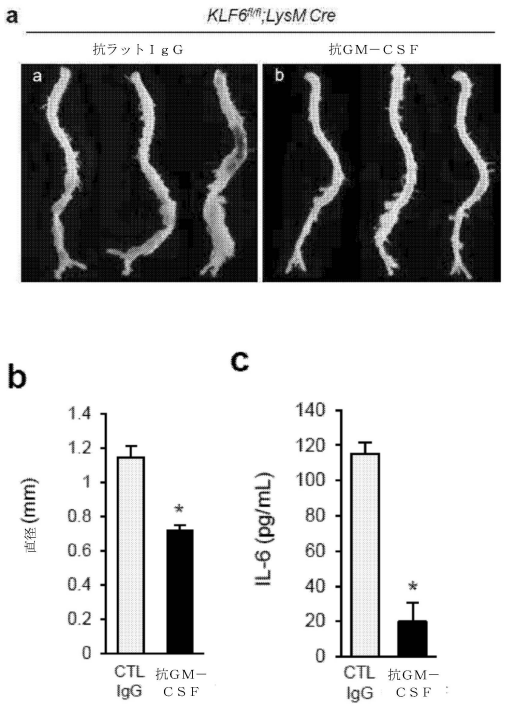
【図３Ｂ】



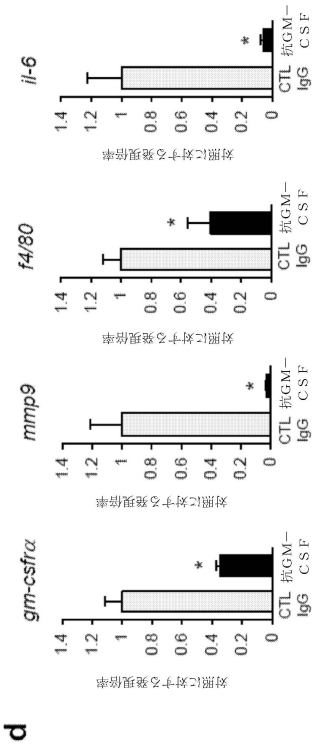
【図３Ｃ】



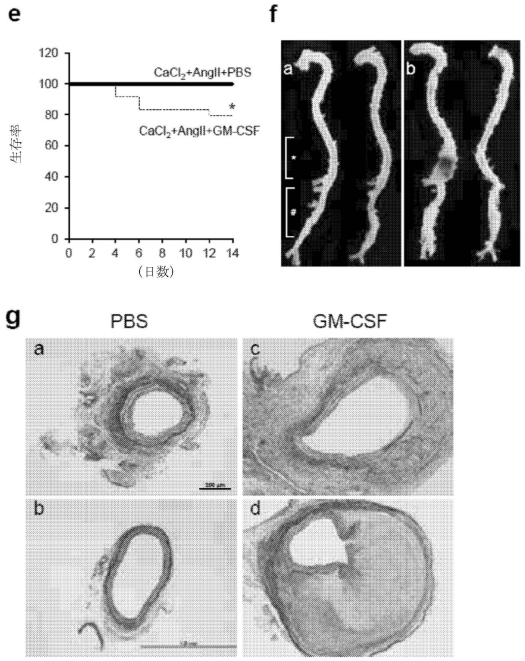
【図４Ａ】



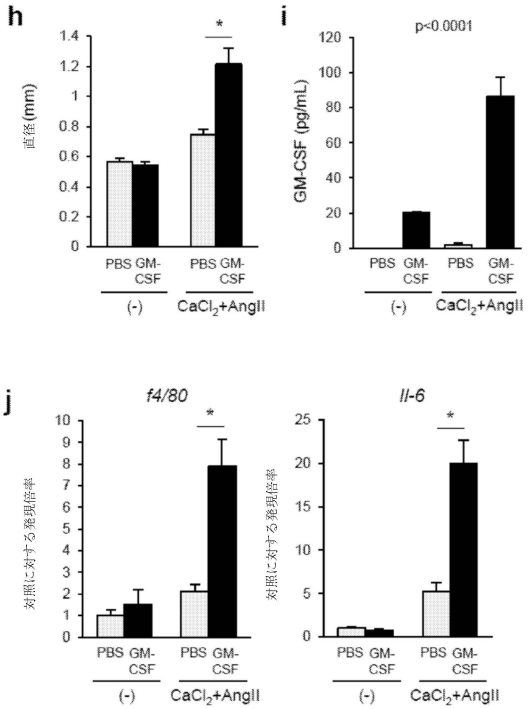
【図４Ｂ】



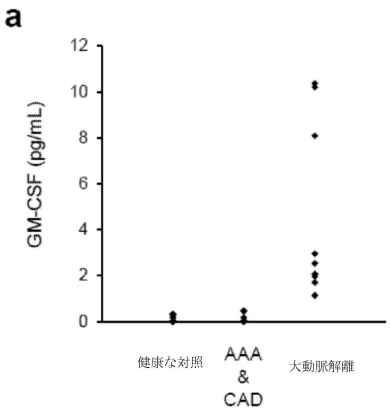
【図４Ｃ】



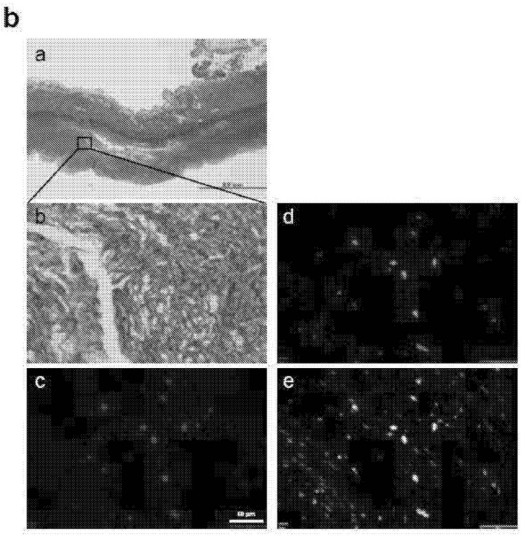
【図４Ｄ】



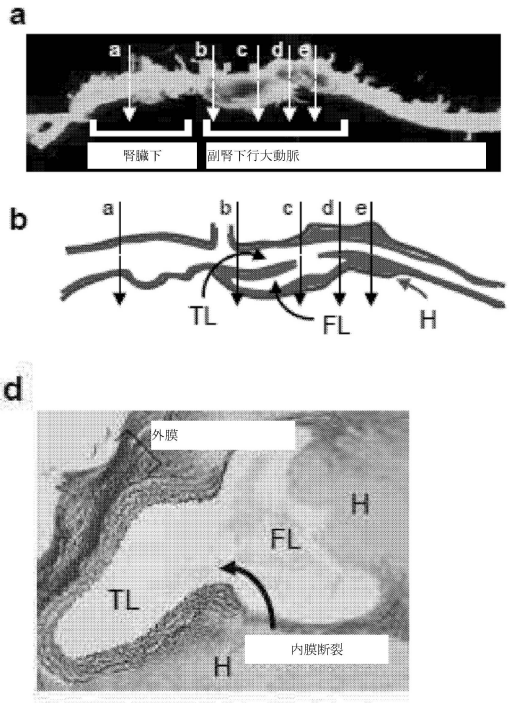
【図５Ａ】



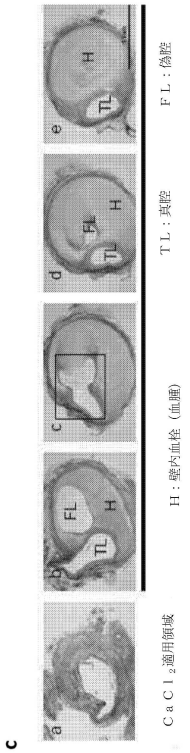
【図５Ｂ】



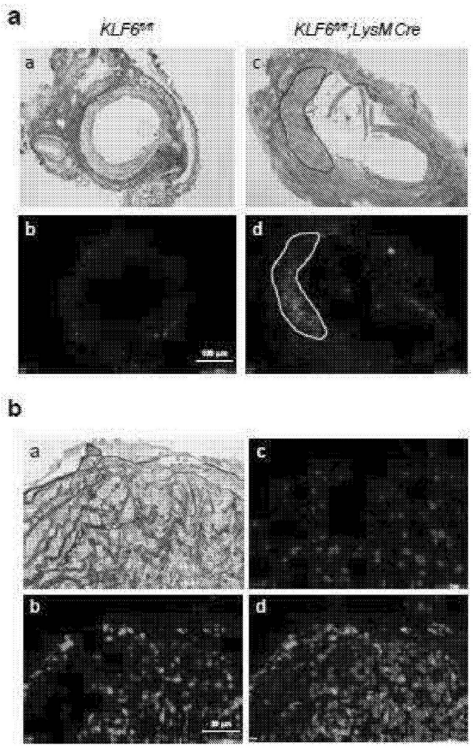
【図６Ａ】



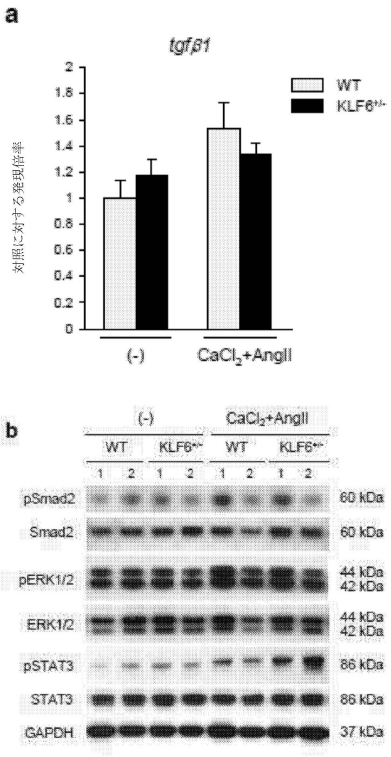
【図６Ｂ】



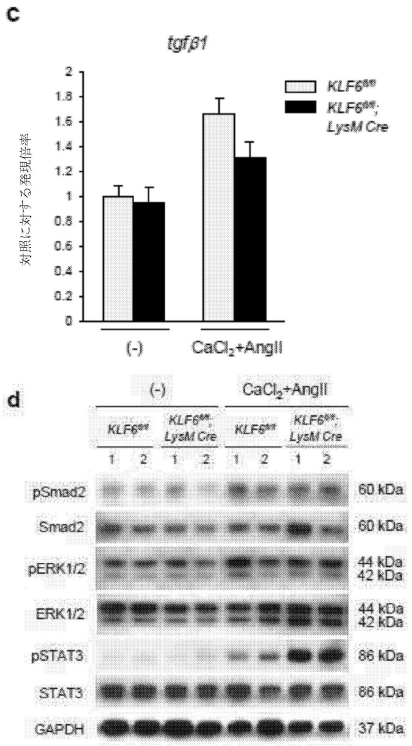
【図７】



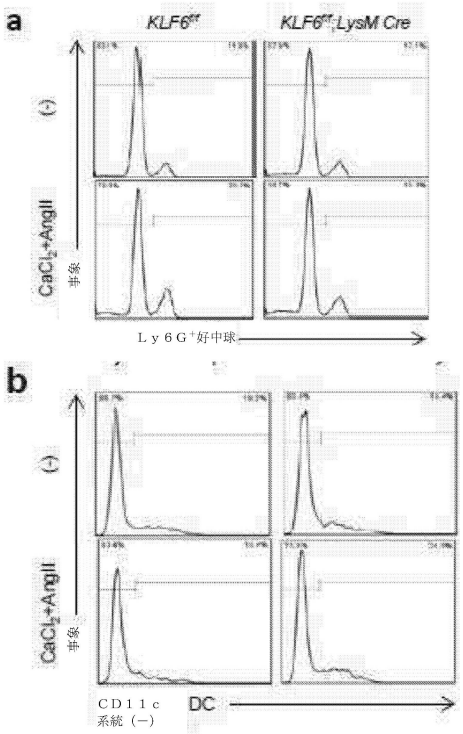
【図８Ａ】



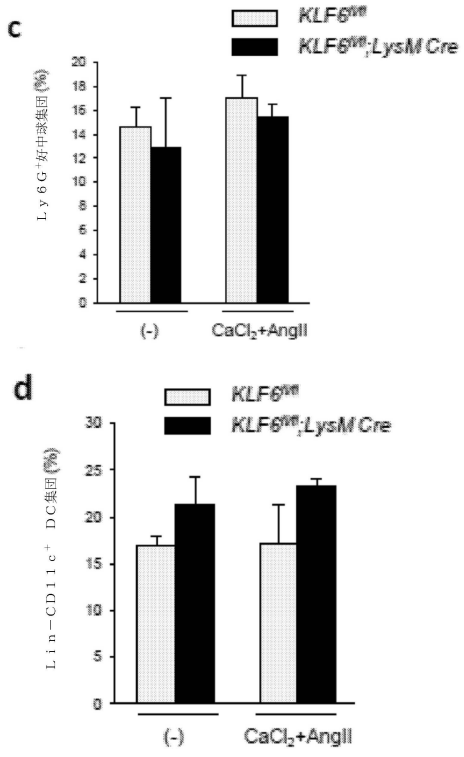
【図８Ｂ】



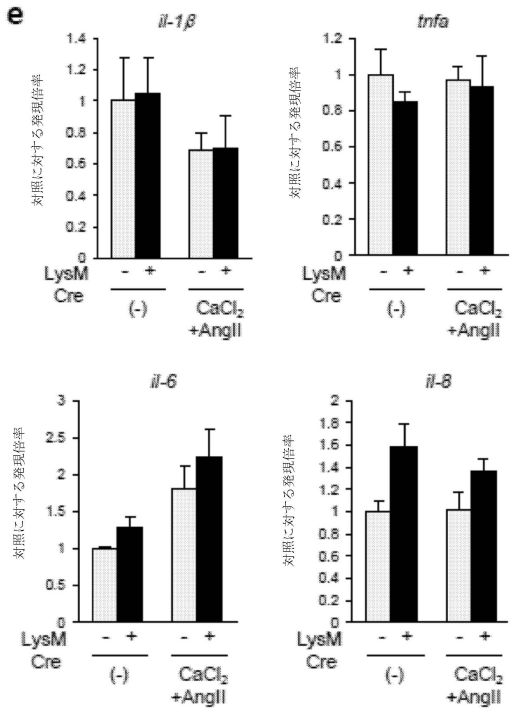
【図９Ａ】



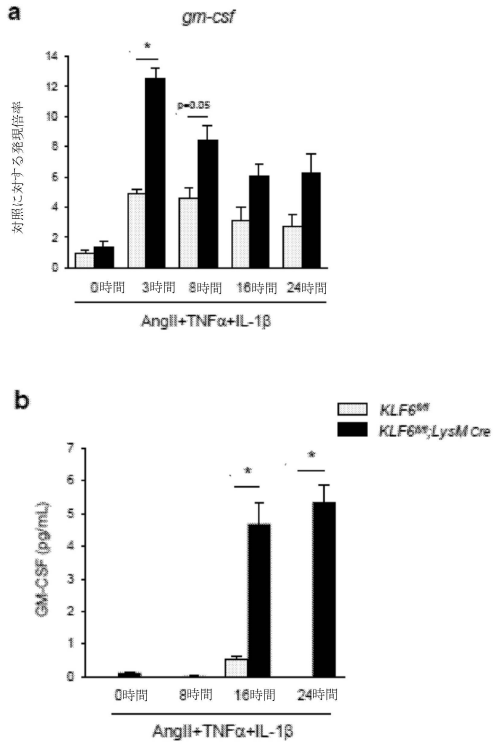
【図９Ｂ】



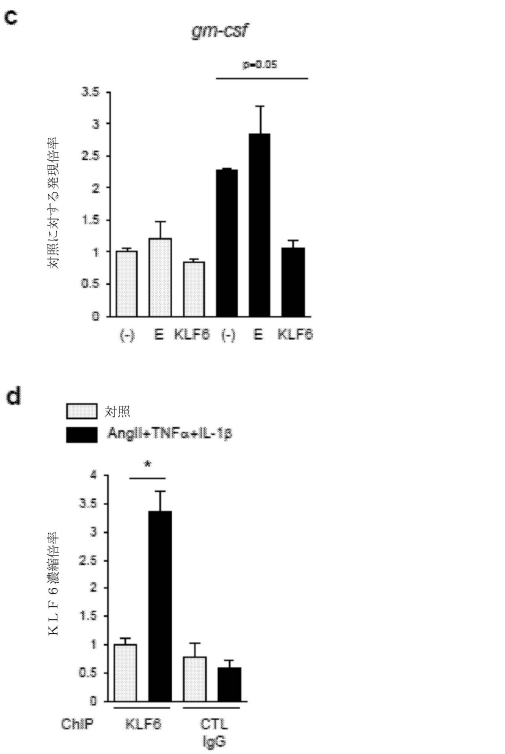
【図９Ｃ】



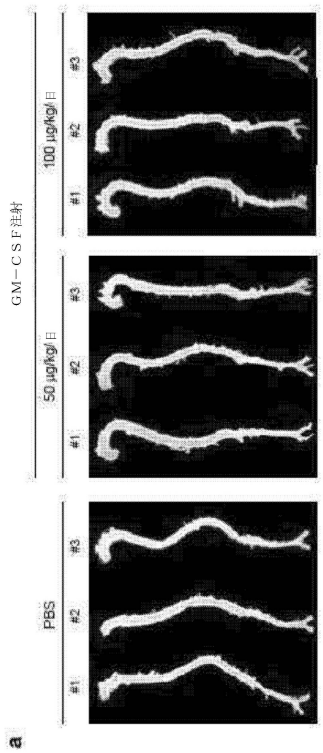
【図１０Ａ】



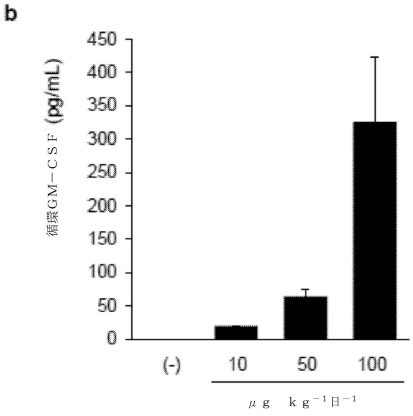
【図１０Ｂ】



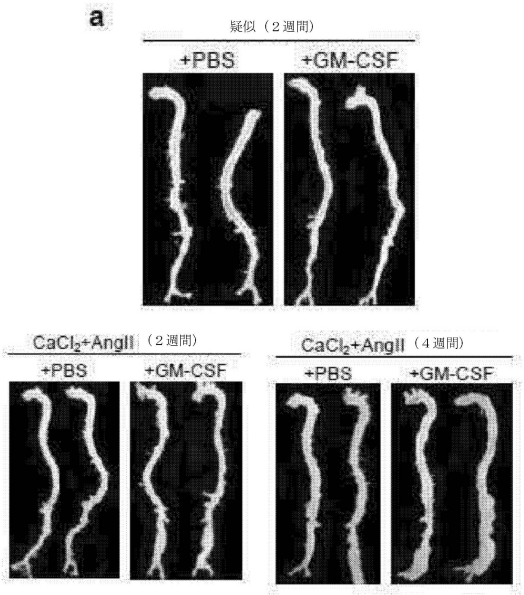
【図１１Ａ】



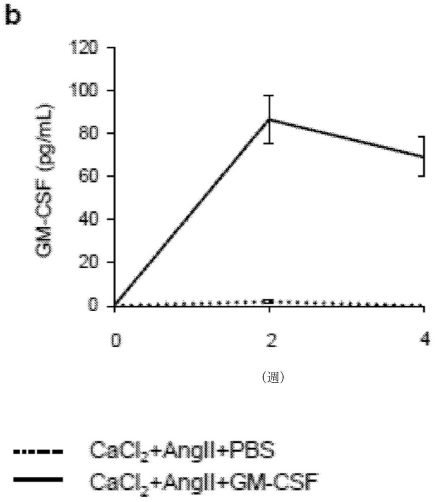
【図１１Ｂ】



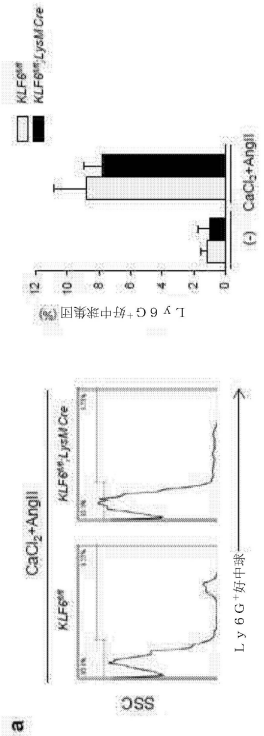
【図１２Ａ】



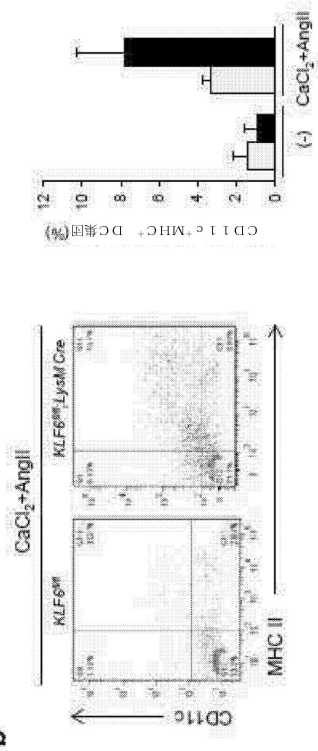
【図１２Ｂ】



【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】



【図１４】

表1
末梢血中の白血球の数に対する効果（１４日間）

	KLF6$^{f/f}$マウス		KLF6$^{f/f}$;LysM Creマウス		
#/mL	疑似 (n=3)	$CaCl_2$+AngII (n=3)	疑似 (n=3)	$CaCl_2$+AngII (n=3)	P値
リンパ球	3452.3 ± 792.9	1730.0 ± 92.7	3830.0 ± 107.1	2288.7 ± 996.7	0.414
好中球	1867.0 ± 351.4	2253.3 ± 606.8	1340.0 ± 238.0	1308.3 ± 639.6	0.546
単球	28.3 ± 13.0	96.7 ± 9.8	20.0 ± 9.4	361.0 ± 81.5	0.002

データは、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１５】

表2
末梢血中の白血球の数に対するGM−CSF投与の効果（５日間）

	野生型マウス				
	疑似		$CaCl_2$+AngII		
#/mL	PBS (n=3)	GM-CSF (n=3)	PBS (n=3)	GM-CSF (n=3)	P値
リンパ球	3588.7 ± 149.3	3150.0 ± 231.5	1646.7 ± 426.7	1803.3 ± 124.0	0.003
好中球	999.3 ± 186.1	2536.7 ± 454.3	980.0 ± 192.2	1686.7 ± 147.0	0.007
単球	100.0 ± 26.2	353.3 ± 103.4	290.0 ± 70.4	386.7 ± 112.5	0.063

データは、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１６】

表3
末梢血中の白血球の数に対するGM−CSF投与の効果（１４日間）

	野生型マウス				
	疑似		$CaCl_2$+AngII		
#/mL	PBS (n=5)	GM-CSF (n=5)	PBS (n=5)	GM-CSF (n=6)	P値
リンパ球	2784.2 ± 128.5	3052.0 ± 420.3	2255.0 ± 227.4	1667.2 ± 371.3	0.846
好中球	777.8 ± 118.7	976.0 ± 116.7	866.2 ± 75.0	1052.2 ± 239.2	0.523
単球	139.6 ± 19.2	295.3 ± 66.2	294.6 ± 7.4	310.0 ± 45.9	0.018

データは、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１７】

表4
末梢血中の白血球の数に対する、抗体を中和することによるGM−CSF遮断の効果

	KLF6$^{f/f}$;LysM Creマウス				
	疑似		$CaCl_2$+AngII		
#/mL	抗対照IgG (n=3)	抗GM−CSF (n=3)	抗対照IgG (n=3)	抗GM−CSF (n=4)	P値
リンパ球	3830.0 ± 107.1	2138.7 ± 384.4	2288.7 ± 996.7	1843.3 ± 311.1	0.225
好中球	1340.0 ± 238.0	2849.3 ± 437.2	1308.3 ± 639.6	785.5 ± 117.5	0.069
単球	20.0 ± 9.4	48.0 ± 11.7	361.0 ± 81.5	82.5 ± 12.5	0.001

データは、平均±平均値の標準誤差として表される。

【図１８】

表５

リアルタイムＰＣＲのためのプライマー

プライマー		配列（5′～3′）		
IL-6	順方向	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	配列番号	6
	逆方向	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	配列番号	7
F4/80	順方向	TTGGCCAAGATTCTCTTCCT	配列番号	8
	逆方向	TCACTGCCTCCACTAGCATC	配列番号	9
MMP9	順方向	ATCTCTTCTAGAGACTGGGAAGGAG	配列番号	10
	逆方向	AATAAAAGGTCAGAATCCACCCTAC	配列番号	11
CCR2	順方向	AGAGAGCTGCAGCAAAAAGG	配列番号	12
	逆方向	GGAAAGAGGCAGTTGCAAAG	配列番号	13
TNFα	順方向	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	配列番号	14
	逆方向	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	配列番号	15
IL-1β	順方向	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	配列番号	16
	逆方向	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	配列番号	17
iNOS	順方向	ACCTTGTTCAGCTACGCCTT	配列番号	18
	逆方向	CATTCCCAAATGTGCTTGTC	配列番号	19
MCP-1	順方向	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG	配列番号	20
	逆方向	ATGTCTGGACCCATTCCTTC	配列番号	21
GM-CSF	順方向	GGCCTTGGAAGCATGTAGAG	配列番号	22
	逆方向	GGGGGCAGTATGTCTGGTAG	配列番号	23
GM-CSFRα	順方向	CACCGCGTCCTGTAACTCTT	配列番号	24
	逆方向	GCACCTTGACCTTGTGACCT	配列番号	25
TGFβ1	順方向	TGGCGTTACCTTGGTAACC	配列番号	26
	逆方向	GGTGTTGAGCCCTTTCCAG	配列番号	27
IL-8	順方向	CATCTTCGTCCGTCCCTGTG	配列番号	28
	逆方向	CTGCTATCACTTCCTTTCTGTTGC	配列番号	29
GAPDH	順方向	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	配列番号	30
	逆方向	ACACATTGGGGGTAGGAACA	配列番号	31

【図１９】

表６

ヒト対象の特徴付け

特徴	健康な対照	AAA & CAD	大動脈解離
n（男性）	12 (6)	14 (14)	10 (9)
年齢、歳	37.8 ± 5.5	69.0 ± 15.7	66.8 ± 16.2

ＡＡＡ：腹部大動脈瘤、ＣＡＤ：冠動脈疾患
データは、数字または平均±標準偏差として表される。

大動脈解離を有する患者のベースライン人口統計

	性別	年齢	
患者1	男性	73	スタンフォードB
患者2	男性	87	スタンフォードB
患者3	男性	50	スタンフォードB
患者4	男性	66	スタンフォードA
患者5	男性	41	スタンフォードA
患者6	男性	45	スタンフォードA
患者7	男性	63	スタンフォードB
患者8	男性	87	スタンフォードB
患者9	男性	84	スタンフォードB
患者10	女性	72	スタンフォードB

【配列表】

0006683723000001.app

フロントページの続き

審査官　大西　隆史

(56)参考文献　GM-CSF Antibody (A-6): sc-377039, Santa Cruz Biotechnology, ２０１５年　1月２９日, ＵＲＬ, http://www.scbt.com/datasheet-377039-gm-csf-a-6-antibody.html
YE, Ping et al., The Journal of Clinical Investigation, ２０１３年　5月, Vol. 123, No. 5, pp. 2317-2331, DOI: 10.1172/JCI67356
TIEU, Brian C. et al., The Journal of Clinical Investigation, ２００９年１２月, Vol. 119, No. 12, pp. 3637-3651, DOI: 10.1172/JCI38308
WAGNER, Katharina et al., Blood, ２００１年１１月　1日, Vol. 98, No. 9, pp. 2689-2696, DOI: 10.1182/blood.V98.9.2689
NOTARANGELO, Luigi D. and PESSACH, Itai, The Journal of Experimental Medicine, ２００８年１１月２４日, Vol. 205, No. 12, pp. 2693-2697, DOI: 10.1084/jem.20082378
LINGHAO NIU; HEANEY MARK L; VERA JUAN CARLOS; ET AL, High-affinity binding to the GM-CSF receptor requires intact N-glycosylation sites in the extracellular domain of the beta subunit, BLOOD, 米国, ２０００年　6月　1日, VOL:95, NR:11, PAGE(S):3357 - 3362
SHAPOSHNIK, Zory et al., Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, ２００７年　3月　1日, Vol. 27, No. 3, pp. 621-627, DOI: 10.1161/01.ATV.0000254673.55431.e6
SUBRAMANIAN, Manikandan et al., Circulation Research, ２０１４年１０月２７日, Vol. 116, No. 2, pp. e13-e24, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304794
HAGHIGHAT, Amir et al., Circulation, ２００７年　4月１７日, Vol. 115, No. 15, pp. 2049-2054, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.665570

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３８／００－５１／１２
Ａ６１Ｐ　１／００－４３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）