(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年2月25日(25.02.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/033247 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/15 (2015.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/032322

(22) 国際出願日： 2019年8月19日(19.08.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(71) 出願人: セルアクシア株式会社(CELLAXIA INC.) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町１－１０－９ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 浅原 孝之 (ASAHARA, Takayuki); 〒2591193 神奈川県伊勢原市下糟屋１４３ 学校法人東海大学内 Kanagawa (JP). サルベコフ、アマンケルディ エー. (SALYBEKOV, Amankeldi A.); 〒2591193 神奈川県伊勢原市下糟屋１４３ 学校法人東海大学内 Kanagawa (JP). 関 誠(SEKI, Makoto); 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町１－１０－９ セルアクシア株式会社内 Tokyo (JP).

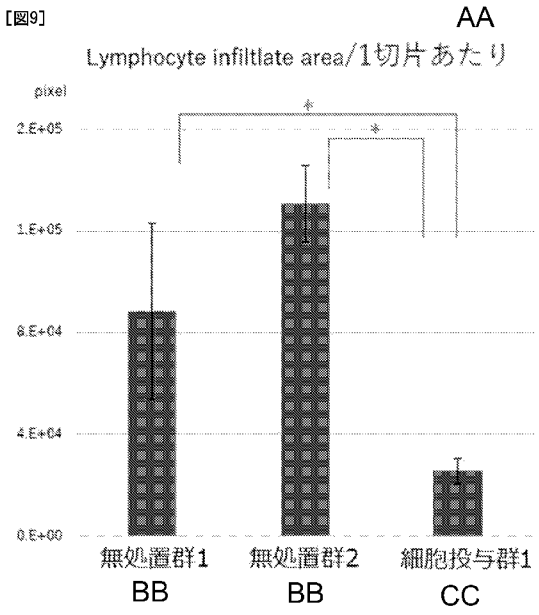
(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

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

(54) **Title:** CELL-CONTAINING PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) 発明の名称： 細胞含有医薬組成物

[図9]



AA Lymphocyte infiltlate area/per section
BB Untreated group
CC Cell administration group

(57) **Abstract:** The present invention provides a pharmaceutical composition that contains an M2 macrophage-enriched cell population and a pharmaceutically acceptable carrier. This composition is not trapped in the lungs when administered systemically and accumulates at a site of damage/inflammation. The pharmaceutical composition according to the present invention is therefore useful as an antiinflammatory pharmaceutical composition.

WO 2021/033247 A1

[続葉有]

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

規則4.17に規定する申立て:

一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約:本発明は、Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団と医薬上許容され得る担体とを含有する医薬組成物を提供し、該組成物は、全身投与した際に肺にトラップされず、障害／炎症部位に集積する。従って、本発明の医薬組成物は抗炎症用医薬組成物として有用である。

明　細　書

発明の名称 ： 細胞含有医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、病変部位に集積する細胞集団を含有する組成物に関する。より詳細には、Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団を含有し、全身投与により抗炎症効果を発揮する細胞含有医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 近年、細胞を患者に移植することによって、機能や形態の異常を補完し、病気を治療する再生医療技術が着目されている。免疫抑制作用や抗炎症作用を持つ細胞として知られている間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は、全身投与すると肺や肝臓、脾臓に細胞が集積するため、全身投与しても障害部位にリクルートされない（特許文献１、非特許文献１）。また、生体から単離されたＭＳＣは、遊走能を失った細胞が混在する場合、培養によって遊走能を失う場合がある。

これらの問題を解決した細胞としてＭＵＳＥ細胞（特許文献２、非特許文献２）やＲＥＣ細胞（特許文献３、非特許文献３）が知られているが、ＭＵＳＥ細胞やＲＥＣ細胞はＭＳＣから特定のマーカーを持つ細胞を分離することによって得るため、ＭＳＣからのソーティング、増殖培養という複雑な工程を経る必要がある。

[0003] 一方、再生に関与する細胞（血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）、抗炎症性マクロファージ、Ｔ細胞）を増加させる為の培養技術が虚血性疾患に対する幹細胞治療として提唱されている（特許文献４、非特許文献４、５）。該培養技術では、ナイーブな末梢血の炎症性細胞となり得る細胞（単球とタイプ１マクロファージ、Ｍ１）が、抗炎症性の性質を持つ細胞（タイプ２マクロファージ、Ｍ２）にコンバートされ、細胞障害性Ｔ細胞とナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の減少により免疫抑制性のヘルパーＴ細胞のサブセットである制御性Ｔ細胞が増加し、広範な組織の再生に寄与する。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：ＷＯ２０１６／１６１４６２

特許文献2：ＷＯ２０１４／０２７６８４

特許文献3：ＷＯ２０１６／０１７７９５

特許文献4：ＷＯ２０１４／０５１１５４

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Fischer UM, et al., Stem Cells Dev.2009; 18(5):683-92.

非特許文献2：Morikawa S., J. Exp. Med. 2009; 206(11):2483-2496.

非特許文献3：Mabuti Y., et al., Stem cell Reports. 2013; 1:152-165

非特許文献4：Masuda H., et al., Stem cells Translational Medicine. 2012; 1:160-171

非特許文献5：Masuda H., et al., Journal of the American Heart Association. 2014; e3

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、全身投与した際に肺にトラップされず、障害部位に遊走される細胞に富んだ細胞集団と医薬上許容し得る担体とを含む医薬組成物、特に抗炎症用医薬組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意研究を重ね、体液由来の単核球を、無血清培養下で培地交換も継代もせず培養することによって得られた細胞集団がＭ２マクロファージに富み、肺にトラップされにくく、また障害部位に集積する能力を有することを見出した。かかる細胞集団の幾つかの特性に関する知見を得て、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は以下の通りである。

［１］Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団と医薬上許容され得る担体

とを含有する、医薬組成物。

［２］細胞集団におけるＭ２マクロファージの割合が７％以上である、上記［１］記載の医薬組成物。

［３］細胞集団におけるＭ１マクロファージの割合が１０％未満である、上記［１］又は［２］記載の医薬組成物。

［４］Ｍ２マクロファージの富化が、体液由来の単核球を、無血清培地中、培地交換及び継代もせずに培養することによって為されることを特徴とする、上記［１］～［３］のいずれかに記載の医薬組成物。

［５］全身投与用である、上記［１］～［４］のいずれかに記載の医薬組成物。

［６］細胞集団が下記特徴を有する、上記［１］～［５］のいずれかに記載の医薬組成物：

（１）全身投与された場合に肺にトラップされない、

（２）障害／炎症部位に集積する、及び

（３）単核球由来である。

［７］炎症性疾患の予防及び／又は治療用である、上記［１］～［６］のいずれかに記載の医薬組成物。

［８］炎症性疾患が自己免疫疾患によるものである、上記［７］記載の医薬組成物。

発明の効果

[0008] 本発明の医薬組成物は、Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団を含有し、全身投与された場合に肺にトラップされず、障害／炎症部位に集積する。従って、本発明の医薬組成物は、治療に十分な数の抗炎症作用を有する細胞を、標的となる炎症又は組織損傷部位に移行させることができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明の細胞集団のフローサイトメトリー解析の結果を示す図である。培養前のラットＰＢＭＣ細胞懸濁液(Rat Fresh PBMC)、Ｅ培養後のラットＰＢＭＣ細胞懸濁液(Rat E conditioned PBMC)について調べた。リンパ球サイ

ズの細胞（Ａ）、単球サイズの細胞（Ｂ）、マクロファージサイズの細胞集団（Ｃ）を全生存細胞画分からゲートした。

[図2]Ｅ培養後の細胞集団（Ｍ２リッチＭＮＣ）ではＭ２マクロファージが富化されていることを示したグラフである。ＰＢＭＣ細胞懸濁液（ＰＢＭＣ）中の多くが炎症性の単球／マクロファージ（左側：ＣＤ６８陽性の細胞、右側：ＣＤ１１ｂ陽性／ＣＤ１１ｃ陽性／ＣＤ１６３陰性の細胞）であることを示した（Ａ）。Ｅ培養後、Ｍ２マクロファージの割合が急激に増加した（Ｂ）（各群でｎ＝６）。統計的有意差の検出にはMann-Whitney testを用いた。結果は平均±標準偏差で示した。

[図3]フローサイトメトリー解析の結果を示す図である。

[図4]ＰＢＭＣとＭ２リッチＭＮＣにおけるＴリンパ球の存在割合を示したグラフである（各群でｎ＝６）。統計的有意差の検出にはMann-Whitney testを用いた。結果は平均±標準偏差で示した。

[図5]ＰＢＭＣとＭ２リッチＭＮＣにおけるＣＤ８陽性である細胞障害性Ｔ細胞の割合を示したグラフである（各群でｎ＝６）。統計的有意差の検出にはMann-Whitney testを用いた。結果は平均±標準偏差で示した。

[図6]Ｍ２リッチＭＮＣが心筋梗塞組織に生着したことを示す図である。Ａ）梗塞部位周囲に取り込まれたｅＧＦＰ陽性のＭ２リッチＭＮＣを免疫組織化学的に追跡した代表的な染色画像である。Ｂ）梗塞部位では、組織に生着したｅＧＦＰ陽性の細胞数の顕著な増加が観察された。しかしながら、Ｃ）ＰＢＭＣ投与群では観察されなかった。ほとんどのｅＧＦＰ陽性ＰＢＭＣは脾臓（Ｄ）及び肺組織（Ｅ）でトラップされていた。スケールバー：２０μｍ（Ａ）と４０μｍ（Ｂ）。統計的有意差の検出にはMann-Whitney testを用いた。結果は平均±標準偏差で示した。

[図7]心筋梗塞から２８日後のＭ２リッチＭＮＣ投与群、ＰＢＭＣ投与群、コントロール群、Sham-operated群でのラット心組織のピクロシリウスレッド染色の代表的な染色図を示す（Ａ、Ｄ）。Ｂ及びＣは、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群では左心室の梗塞部位の面積と心室壁の厚さが保たれていたのに対して、

ＰＢＭＣ投与群とコントロール群では室壁の薄化と共に梗塞部位の面積が広がっていたことを示す。Ｅは間質性線維症の割合を示す。統計的有意差は2-way ANOVAとポストホックTurkey's他群比較テストで行った。結果は平均±標準偏差で示した。

[図8]Ｍ２リッチＭＮＣが梗塞部位において血管新生と動脈新生を促進したことを示す図である。境界領域と梗塞部位を含む６つのランダムに得られた２０倍で撮影された部位で平均の血管形成を評価した。Ａ）Ｍ２リッチＭＮＣ群では、統計的に機能的な微小血管の密度が増加し、Ｂ）１平方ミリメートルあたりのαＳＭＡで染色された小動脈が観察されたが、ＰＢＭＣ投与群とコントロール群では密度の増加も小動脈の形成も観察されなかった。Ｃ）免疫組織化学から、Ｅ培養条件ではｅＧＦＰを発現したＣＤ３１陽性細胞は、ホストの組織の中で管の長さを伸長させた。Ｄ）共焦点顕微鏡画像のＺ軸方向への３次元再構築で得られた、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群とＰＢＭＣ投与群、コントロール群の梗塞部位でのIsolectin B4とαＳＭＡの代表的な染色画像。Ｅ）心筋梗塞誘発６日後の梗塞部位組織における、angpt1、angpt2、及びpecam1といった血管新生に係る遺伝子の相対的な発現（全ての値は対数表示）。スケールバー：２０μｍ。統計的有意差はクラスカルーウォリスとポストホックDunn's他群比較テストで行った。結果は平均±標準偏差で示した。

[図9]Ｍ２リッチＭＮＣ投与群（細胞投与群１）及び無処置群（無処置群１、無処置群２）の唾液腺標本の連続切片についてＨＥ染色を行い、画像解析ソフトを利用して、唾液腺組織におけるリンパ球浸潤部分の面積を測定して比較した結果を示すグラフである。結果は平均±標準偏差で示した。（細胞投与群１：ｎ＝３、無処置群１：ｎ＝５、無処置群２：ｎ＝５）。

[図10]Ｅ培養後の細胞集団（Ｍ２リッチＭＮＣ）ではＭ２マクロファージが富化されていることを示したグラフである。実験は６回実施（実験１～６）し、いずれの場合もＥ培養により、Ｍ２マクロファージの割合が増加した。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、全身投与した際に肺にトラップされず、障害／炎症部位に遊走され、集積する細胞集団（以下、本発明の細胞集団とも称する）と医薬上許容し得る担体とを含む医薬組成物（以下、本発明の医薬組成物とも称する）を提供する。

本発明の細胞集団は、体液由来の単核球を、無血清培養下で培地交換も継代もせず培養することによって得られる、Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団である。従って、本発明の細胞集団は単核球由来である。体液としては、末梢血、骨髄液及び臍帯血が例示される。単核球とは、末梢血、骨髄または臍帯血等に含まれる白血球のうち、円形に近い核を有するもの、もしくは白血球のうち顆粒球を除いたものをいう。動物から体液（末梢血、骨髄または臍帯血）を採取し、それを例えば密度勾配遠心法に付して該画分を抽出することにより単核球画分が得られる。密度勾配遠心法としては、単核球画分が形成されれば特に限定されないがヒトの場合はHistopaque-1077、ラットおよびマウスの場合はHistopaque-1083 (Sigma-Aldrich)などが用いられる。

[0011] 本発明の細胞集団が由来する動物種は、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、イヌ、ネコ、サル、ウサギ、ウシ、ウマ、ブタなどが挙げられる。好ましくはヒトである。細胞が由来する個体の年齢は特に限定されず、成人であっても小児であっても胎児であってもよい。

[0012] 本発明における単核球の培養は、単核球を含有する細胞懸濁液をサイトカイン等の因子を添加した培地中で実施される。細胞懸濁液としてはまた、単核球を含有する体液自体（例えば、骨髄液、臍帯血、末梢血）を用いることもできる。単核球の培養条件は特に限定されず、通常当分野で実施される条件で実施することができる。例えば、各種因子を添加した、以下の培養条件が挙げられる。

[0013] 幹細胞因子（Stem cell factor；ＳＣＦ；Ｓ）、インターロイキン６（Interleukin-6；ＩＬ－６；Ｉ）、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３リガンド（FMS-like tyrosine kinase 3 ligand；ＦＬＴ－３Ｌ；Ｆ）、トロンボポエチン（T

hrombopoietin；ＴＰＯ；Ｔ）及び血管内皮細胞増殖因子（Vascular endopoietin；ＶＥＧＦ；Ｖ）より選択される１又は２以上の因子、好ましくは３以上の因子、より好ましくは４以上の因子の存在下での培養。

[0014] 本発明で用いられるＳＣＦは、２４８個のアミノ酸からなる分子量約３０，０００の糖タンパク質である。選択的スプライシングにより可溶型と膜結合型が存在するが、本発明で用いるＳＣＦはＥＰＣ等の培養に有用である限りいずれのタイプのＳＣＦでもよい。好ましくは可溶型である。ＳＣＦの由来等は特に限定されないが、安定した供給が見込まれる組換え体が好ましく、特に好ましくはヒト組換え体である。商業的に入手可能なものが知られている。無血清培地中のＳＣＦの濃度は、用いるＳＣＦの種類によっても異なり、単核球の培養に有用である限り特に限定されないが、例えば１０～１０００ｎｇ／ｍＬである。

[0015] 本発明で用いられるＩＬ－６は、Ｂ細胞の抗体産生細胞への最終分化を誘導する因子として単離された分子量２１万の糖タンパク質であり、免疫応答、造血系や神経系細胞の増殖分化、急性期反応等に関与することが知られている。本発明で用いるＩＬ－６は適宜選択されるが、単核球の培養に用いる場合には、ヒトＩＬ－６が好ましく、安定した供給が見込まれる組換え体が特に好ましい。商業的に入手可能なものが知られている。無血清培地中のＩＬ－６の濃度は、用いるＩＬ－６の種類によっても異なり、単核球の培養に有用である限り特に限定されないが、例えば１～５００ｎｇ／ｍＬである。

[0016] 本発明で用いられるＦＬＴ－３Ｌは、初期造血制御において重要な役目を担う受容体型チロシンキナーゼのリガンドとして知られている。いくつかの選択的スプライシングによる産物が知られているが、造血系幹細胞の増殖を刺激するという報告がある。本発明で用いるＦＬＴ－３Ｌは、単球等の培養に有用である限り、いずれのタイプのＦＬＴ－３Ｌであってもよい。商業的に入手可能なものが知られている。無血清培地中のＦＬＴ－３Ｌの濃度は、用いるＦＬＴ－３Ｌの種類によっても異なり、単核球の培養に有用である限り特に限定されないが、例えば１０～１０００ｎｇ／ｍＬである。

[0017] 本発明で用いられるＴＰＯは、造血系サイトカインの一種であり、造血幹細胞から巨核球が作られる過程に特異的に作用し、巨核球の産生を促進することが知られている。本発明で用いるＴＰＯの由来等は特に限定されないが、安定した供給が見込まれる組換え体が好ましく、特に好ましくはヒト組換え体である。商業的に入手可能なものが知られている。無血清培地中のＴＰＯの濃度は、用いるＴＰＯの種類によっても異なり、単核球の培養に有用である限り特に限定されないが、例えば１～５００ｎｇ／ｍＬである。

[0018] 本発明で用いられ得るＶＥＧＦは、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）に特異的に作用する増殖因子であり、主に血管周囲の細胞で産生されることが知られている。ＥＰＣは単核球画分中に存在する。選択的スプライシングによってサイズの異なる数種のＶＥＧＦタンパク質が産生され、いずれのタイプのＶＥＧＦでもよい。好ましくはＶＥＧＦ１６５である。ＶＥＧＦの由来等は特に限定されないが、安定した供給が見込まれる組換え体が好ましく、特に好ましくはヒト組換え体である。商業的に入手可能なものが知られている。無血清培地中のＶＥＧＦの濃度は、用いるＶＥＧＦの種類によっても異なり、単核球の培養に有用である限り特に限定されないが、例えば５～５００ｎｇ／ｍＬである。

[0019] 具体的には、以下の因子の組合せの存在下での培養が挙げられる。

Ｓ、Ｉ、Ｆ、Ｔ、Ｖ；

ＳＩ、ＳＦ、ＳＴ、ＳＶ、ＩＦ、ＩＴ、ＩＶ、ＦＴ、ＦＶ、ＴＶ；

ＳＩＦ、ＳＩＴ、ＳＩＶ、ＳＦＴ、ＳＦＶ、ＳＴＶ、ＩＦＴ、ＩＦＶ、ＩＴＶ、ＦＴＶ；

ＳＩＦＴ、ＳＩＴＶ、ＳＩＦＶ、ＳＦＴＶ、ＩＦＴＶ；

ＳＩＦＴＶ。

[0020] 好ましくは、以下の因子の組合せの存在下での培養が挙げられる。

ＳＩＦ、ＳＩＴ、ＳＩＶ、ＳＦＴ、ＳＦＶ、ＳＴＶ、ＩＦＴ、ＩＦＶ、ＩＴＶ、ＦＴＶ。

[0021] より好ましくは、以下の因子の組合せの存在下での培養が挙げられる。

ＳＩＦＴ、ＳＩＴＶ、ＳＩＦＶ、ＳＦＴＶ、ＩＦＴＶ。

[0022] 単核球の培地中の濃度は、培養によりＭ２マクロファージが富化された細胞集団が得られる限り特に限定されないが、例えば約０．５～１０×１０^{6}細胞／ｍＬ、より好ましくは約１～７×１０^{6}細胞／ｍＬ、最も好ましくは約３～６×１０^{6}細胞／ｍＬである。

[0023] 本発明で用いられる培地とは、当該分野で通常用いられている培地を利用することができ、例えば単核球の培養用培地として知られている無血清培地を用いることができ、又無血清培地であることが好ましい。無血清培地として用いられる基礎培地としては、例えば、ＲＰＭＩ、ＤＭＥＭ、ＭＥＭ、ＩＭＤＭ等が挙げられる。

[0024] 本発明の培地に添加される各種因子はまた、単核球が由来する動物と同種の動物に由来する因子で統一することが好ましい。このように単核球及び各種因子の由来を統一することで、同種異系移植等の同種移植に好適な細胞培養物が得られる。また、細胞移植が意図される個体由来の単核球を用いることで、同種同系移植に好適な細胞培養物を得ることも可能である。

[0025] 本発明の細胞集団とは抗炎症性マクロファージが富化されている限りその態様は特に限定されないが、Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団であることが好ましい。例えば、本発明の細胞集団は、単核球を上述した因子を含有する無血清培地で培養することによって得ることができる。ここで、抗炎症性マクロファージが富化された細胞集団とは、上述した因子を含有する無血清培地で培養する前の単核球全体におけるそれぞれの比率に比べて、培養後の細胞群全体における各細胞の比率が、２倍以上、好ましくは４倍以上、より好ましくは５倍以上に増加することをいう。本発明の細胞集団は、培養前のもとの単核球に比べて抗炎症性マクロファージの比率が著しく高くなっているため、炎症を効果的に抑えることができる。

[0026] 培地中、単核球を培養することによって、Ｍ２マクロファージが富化される。該培養は好ましくは無血清培地中で実施され、より好ましくは培地交換も継代もせずに培養する。単核球の培養期間は、所望する程度にＭ２マクロ

ファージが富化されれば特に限定されないが、例えば、５％CO_2雰囲気下、３７℃で３日間以上培養する。培地交換や継代をしないことが好ましいので、通常８日間以下、より好ましくは７日間以下である。

[0027] 本発明の細胞集団に含まれる抗炎症性マクロファージとは、抗炎症性で組織修復に寄与するマクロファージである。好ましくはＭ２マクロファージであり、より好ましくはＣＤ２０６陽性もしくはＣＤ１６３陽性のＭ２マクロファージである。これらのＭ２マクロファージのマーカーは動物種によって異なる。また市販されているフローサイトメトリー用の蛍光ラベル抗体に制限がある。したがって、ヒトＭ２マクロファージのマーカーとしてＣＤ２０６陽性もしくはＣＤ１６３陽性が利用され、マウスＭ２マクロファージのマーカーとしてＧａｌａｃｔｉｎ－３陽性、もしくはＣＤ２０６陽性などが利用され、ラットＭ２マクロファージではＣＤ１６３陽性が使用されることが多い。

本発明の細胞集団は、当該細胞集団中の抗炎症性マクロファージの割合が、上記単核球の培養前の細胞集団に比べ通常２倍以上、好ましくは４倍以上、より好ましくは５倍以上に増加している。抗炎症性マクロファージがＭ２マクロファージである場合、上記単核球の培養により富化されたＭ２マクロファージの割合はヒトの場合、上記のＭ２マクロファージマーカーで解析した場合、ドナーによって個人差があるものの総じて培養前は２％以下であるのに対して、培養後は培養前に比して単核球全体の割合として大幅に増加する。倍数については分母となる培養前のＰＢＭＣにおけるＭ２マクロファージが１％未満のことが多く、その場合でもＥ培養後の単核球中のＭ２マクロファージが１０％以上になることが多いため、倍率では１０倍から１００倍にも富化される。結果として、例えばヒトの場合、培養後の細胞集団におけるＭ２マクロファージの割合は５％以上、多くの場合７％以上、８％以上、９％以上、通常は１０％以上になることが多く、多い時は２０％以上に富化される。これらのことから、本発明の細胞集団は、全単核球に対し７％以上、８％以上、９％以上、好ましくは１０％程度、特に好ましくは１５％、い

っそう好ましくは２０％以上のＭ２マクロファージを含む。培養後の細胞集団は、さらにＭ２マクロファージの割合を高める為、所望により濃縮してもよい。Ｍ２マクロファージの割合が低いと十分な抗炎症性効果が得られない。

[0028] 抗炎症性マクロファージの増幅は例えば、対象とする動物種によって適宜選択されるが、ヒトの場合、ＣＤ２０６（Cluster of DifferentiationはＣＤを意味する）及び／又はＣＤ１６３を；マウスの場合、Ｇａｌａｃｔｉｎ－３及び／又はＣＤ２０６を；ラットの場合、ＣＤ１６３を、それ（それら）に親和性を有する抗体により標識し、フローサイトメトリー解析により計測できる。

[0029] 本発明の細胞群においては、抗炎症性マクロファージの含有量が高まる一方で、炎症性マクロファージ（例、Ｍ１マクロファージ）の含有量が低下している。本発明の細胞集団は、当該細胞集団中の炎症性マクロファージの割合が、上記単核球の培養前の細胞集団に比べ１／２以下と大幅に減少し、通常は１／４倍以下、好ましくは１／８以下に減少している。炎症性マクロファージがＭ１マクロファージである場合、上記単核球の培養により減少したＭ１マクロファージの割合は、培養後の全単核球に対し１０％未満、５％未満、好ましくは３％未満、より好ましくは２％未満であり得る。Ｍ１マクロファージの割合が多いとＭ２マクロファージの割合が相対的に低くなり、十分な抗炎症性効果が得られない。

[0030] 炎症性マクロファージの減少は、例えばヒトの場合、ＣＣＲ２（C-C chemokine receptor 2）を、それに親和性を有する抗体により標識し、フローサイトメータ解析により計測できる。

[0031] あるいは、本発明の細胞集団は、さらに抗炎症性のＴｈ２細胞や、制御性Ｔ細胞を含み得る。したがって本発明の細胞集団は、抗炎症性マクロファージに加えて、さらに抗炎症性のＴｈ２細胞や制御性Ｔ細胞が富化した細胞集団でもあり得る。

[0032] 本発明の細胞集団に含まれる細胞は、適宜単離及び／又は精製できる。例

えばヒトの場合は、抗炎症性マクロファージの表面マーカーとしてＣＤ２０６やＣＤ１６３、Ｇａｌａｃｔｉｎ－３が公知であるので、これらの細胞表面マーカーに対して親和性を有する物質（例えば、抗体）を用いて細胞分離法に付すことで、所望の細胞が分離できる。このような細胞分離法としては、例えば、磁気細胞分離法（ＭＡＣＳ）、蛍光細胞分離法（ＦＡＣＳ）が挙げられる。表面マーカーとしてヒトの場合ＣＤ２０６やＣＤ１６３が、マウスの場合Ｇａｌａｃｔｉｎ－３やＣＤ２０６が、ラットの場合ＣＤ１６３が公知である。

[0033] 本発明の細胞集団は、抗炎症性マクロファージが富化されている為、抗炎症作用を発揮することができる。特に後述の実施例で示されるように、本発明の細胞集団は、全身投与された場合に肺にトラップされることなく、障害／炎症部位に集積することができる。本発明における全身投与とは、血管内に直接細胞懸濁液を投与（例、静脈内投与）することによって細胞懸濁液が全身循環することをいう。

尚、肺への移行／トラップが観察される場合であっても、障害／炎症部位への集積に影響が出ない程度であれば、実質的に「肺にトラップされない」として本発明に包含される。

[0034] 本発明の細胞集団は、該細胞集団と医薬上許容され得る担体とを含有する医薬組成物として提供され得る。該細胞集団には抗炎症性マクロファージが多く含まれていることから抗炎症作用を提供することができ、従って、本発明は炎症性疾患の予防及び／又は治療用の医薬組成物として提供され得る。

炎症性疾患としては、炎症を伴う疾患であればいずれであってもよく、例えば、アレルギー関連疾患、呼吸器関連疾患、虚血性疾患、糖尿病性関連疾患、骨・軟骨の炎症性疾患炎、脳神経関連疾患、消化管の炎症性疾患、自己免疫疾患のうち炎症を伴うものをいう。具体的には、各種の自己免疫疾患（関節リウマチ（ＲＡ）、ＳＬＥ、強皮症、多発性筋炎、シェーグレン症候群、ＡＮＣＡ関連性血管炎、ベーチェット病、川崎病、混合性クリオグロブリン血症、多発性硬化症、ギランバレー症候群、筋無力症、１型糖尿病、バセ

ドウ病、橋本病、アジソン病、ＩＰＥＸ、ＡＰＳ　ｔｙｐｅ－ＩＩ、自己免疫性心筋炎、間質性肺炎、気管支喘息、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、アトピー性皮膚炎、溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、特発性若年性関節炎の多関節炎型等）が挙げられる。

[0035] 本発明の医薬組成物は、通常、有効成分である本発明の細胞集団と医薬上許容され得る担体とを混合して製することができる。具体的には本発明の細胞集団が液状の担体に懸濁されている態様が例示される。液状の担体はヒトに注入可能な液体であればいずれであってもよく、例えば、リン酸緩衝液や生理食塩水あるいは培地等も利用可能である。また液状の担体にはアルブミンなど細胞の生存に好ましい化合物が含まれてもよい。好ましくはアルブミンを含む化合物として患者由来の血清が挙げられる。

本発明の医薬組成物は、有効成分として、上記本発明のＭ２リッチＭＮＣを含有し、該Ｍ２リッチＭＮＣには治療有効量のＭ２マクロファージが含まれる。治療有効量とは、本発明の医薬組成物を被験体に投与した場合に、該医薬組成物を投与していない被験体と比較して前記のような疾患に対して治療効果を得ることができるＭ２マクロファージの量である。具体的な治療有効量としては、投与方法、使用目的および被験体の年齢、体重、症状等によって適宜設定することができる。

実施例

[0036] 以下実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、実施例は本発明の説明のために記載するものであり、本発明を何ら限定するものではない。

全ての実験は、国および研究機関の倫理委員会の承認を得ている。国立研究評議会の実験動物取扱指針に基づいて、東海大学医学部の動物実験委員会からも承認を得ている。

１．ＰＢＭＣ（ラット）の単離と培養

全部で１２０匹のラットを使用した。麻酔下ラットの腹部大動脈から１０ｍＬシリンジに装着したヘパリン化（５００ＩＵ）翼状針を用いて末梢血を採取し、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ（ナカライテスク、京都、日本）を用いた密

度勾配遠心法により末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を単離した。培養に用いる無血清培地は、stemline™ II (Sigma-Aldrich)を用い、既知の方法（非特許文献６）に準じて調製した（以下、Effective培地、略してＥ培地とも称する）。１ウェル当たり２ｘ１０^{6}細胞／２ｍＬ　E培地の条件下、単離したＰＢＭＣを５日間培養した（以下、当該培養をEffective培養、略してＥ培養とも称する）。

培養後の細胞集団はＭ２マクロファージが富化された単核球由来の細胞集団である（以下、Ｍ２リッチＭＮＣとも称する）。

[0037] ２．フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析は下記の通りに行った。

２ｍＭ　ＥＤＴＡ／０．２％ＢＳＡ／ＰＢＳバッファーに、４ｘ１０^{5}個のＰＢＭＣとＭ２リッチＭＮＣを別々に懸濁した４５μＬの細胞懸濁液を、予め標識抗体を等量に分注した４つのチューブに入れ３０分間４℃で培養した後、１ｍＬの２ｍＭ　ＥＤＴＡ／０．２％ＢＳＡ／ＰＢＳバッファーで２回洗浄した。５００μＬの固定バッファー(BioLegend)で室温２０分間固定した直後に、細胞をＦＡＣＳバッファーで２回洗浄した。その後、細胞膜透過用バッファー(BioLegend)を、細胞を含んだチューブに入れ室温で１５分間培養し、抗ＣＤ６８－ＦＩＴＣ(BIO-RAD)を用いて染色し、ＦＡＣＳバッファーで２回洗浄した。データはＦＡＣＳ　Ｖｅｒｓｅ(BD Biosciences)で取得し、ＦｌｏｗＪｏ™ソフトウェアバージョン１０．２(Tomy Digital Biology)を用いて解析した。使用した全てのモノクローナル蛍光標識抗体の詳細を表１に示す。

[0038]

[表1]

Antibody	Isotype	Manufacture name & catalog #
CD3-FITC	FITC mouse IgM	BioLegent, #201403 and #401606
CD4-PE/Cy7	PE/Cy7 mouse IgG1, k	BioLegent, #201516 and # 400126
CD8a-AlexaFlour 647	AlexaFlour 647 mouse IgG1	BioLegent, #201710 and #400130
CD25-PE	PE mouse IgG1, k	BioLegent, #202105 and #400112
CD11b/c-PerCP/Cy5.5	PerCP/Cy5.5 mouse IgG2a	BioLegent, #201820 and #400258
CD68-FITC	FITC mouse IgG1	BIO-RAD, #MCA1209F and MCA341F
CD163- AlexaFlour 647	AlexaFlour 647 mouse IgG1	BIO-RAD, #MCA342A647 and MCA1209A647
CD34-PE	PE mouse IgG1, k	Novus Biologicals, #NBP2-29455 and BioLegent, #400112

[0039] ３．ラット心筋梗塞誘発方法と細胞移植実験

体重１５０－２００ｇの６－１０週齢ルイスラット（雄）(Charles River, 日本)を使用した。細胞標識実験には、日本ナショナルバイオリソースプロジェクト（ラット）より入手したLew-CAG-eGFPトランスジェニックラット（雄）を使用した。動物を２－４％のセボフルラン（丸石製薬、日本）で麻酔し、十分な麻酔後、口内より１４ゲージ静脈カテーテルを挿管し、げっ歯類用ベンチレーターで毎分１０ｍＬ／ｋｇ　６０回ベンチレーションを行った(UGO Basile S.R.I.,イタリア)。

簡潔には、左胸を開胸した後、左前下行枝(LAD)動脈を既報（Iwasaki H. et al., Circulation, 2006; 113:1311-1325）に記載の方法でMonoplane 6-0 suture (Ethicon Inc.,アメリカ)を用いて縫合した。縫合部から離れた心臓壁前部の白化と拍動障害により心筋梗塞を確認した。胸部筋を４－０ナイロンで縫合し、皮膚は３－０シルクで縫合し閉胸した。心筋梗塞誘発３日後に、Ｍ２リッチＭＮＣ（１ｘ１０^{5}個細胞）を投与した群（Ｍ２リッチＭＮＣ投与群）とＰＢＭＣ（１ｘ１０^{5}個）を投与した群（ＰＢＭＣ投与群）に分けた。コントロール群にはＲＰＭＩ培地液(GIBCO)を、尾静脈から２４ゲージのan

giocathether（テルモ）を用いて投与した。投与した細胞を追跡するため、Lew-CAG-eGFPトランスジェニックラットを用いた。

[0040] ４．心エコー

ラットの心エコー（EchoCG）は、２．０％のセボフルラン麻酔下で、記録計を搭載したＡＬＯＫＡ ProSound SSD4000モデルを使用して行った。本研究では、全てのラットにベースラインの経胸壁エコードップラーを行い、心筋梗塞後に生存したラットを１、２、３、４週間の期間経過を行った。乳頭筋レベルでの左心室（ＬＶ）の２次元短軸図の取得方法は常法に従った（Anzai A. et al., Circulation, 2012; 125:1234-1245）。次式から、駆出分画率EF=(EDV-ESV)/EDVx100%と、内径短縮率FS=((LVIDd-LVIDs)/LVIDd)x100%を計算した（Iwasaki H. et al., Circulation, 2006; 113:1311-1325; Anzai A. et al., Circulation, 2012; 125:1234-1245）。心臓カテーテルにはmicrotip catheter (Miller Instruments Inc., Houston, USA)を用いた。

[0041] ５．Ｍ２リッチＭＮＣ（マウス）の調製

実施例６で使用するシェーグレン症候群の病態モデル動物と遺伝的バックグラウンドがほぼ同じマウス（Cb6F1/Slc）を用いてマウス由来のＭ２リッチＭＮＣを調製した。既知の方法（非特許文献６）及び上記「１．ＰＢＭＣ（ラット）の単離と培養」に準じて、マウスからＰＢＭＣを単離し、単離したＰＢＭＣをＥ培養してＭ２マクロファージが富化された単核球由来の細胞集団である「Ｍ２リッチＭＮＣ（マウス）を得た。

[0042] ６．Ｍ２リッチＭＮＣ（ヒト）の調製

ヒト末梢血を用いてＭ２リッチＭＮＣを調製した。既知の方法（非特許文献６）及び上記「１．ＰＢＭＣ（ラット）の単離と培養」に準じて、ヒト末梢血からＰＢＭＣを単離し、単離したＰＢＭＣをＥ培養し、Ｍ２マクロファージが富化された単核球由来の細胞集団である「Ｍ２リッチＭＮＣ（ヒト）を得た。

[0043] ７．ヘマトキシリン・エオジン（ＨＥ染色）

市販のヘマトキシリン溶液及びエオジン溶液を用いて、マウスの唾液腺標

本の連続切片を染色した。

[0044] ８．ＲＴ－ｑＰＣＲ解析

細胞及び組織から全ＲＮＡを単離し、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)を用いてｃＤＮＡに逆転写した。ｃＤＮＡ混合物をミリＱ水(Millipore Corporation, Billerica, MA)で希釈し、SYBR green master mix (Applied Biosystems)を製造元のマニュアルに従って添加した。各遺伝子に特異的なプライマーを用い相対的ｍＲＮＡ発現を既報に従って測定した（Bustin SA, et al., Clinical chemistry. 2009; 55 (4):611-22.）。

[0045] ９．統計解析

全ての値は平均±標準偏差で示した。２群間の比較にはMann-Whitney U testとKruskal Wallis test、３群間のノンパラメトリックな比較にはDunn's multiple comparison testを用いた。他群間の比較で、異なる時系列間の値の比較には、2-way ANOVAとポストホックTurkey's testを用いた。全ての統計解析は、GraphPad Prism 7.1 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。$P<0.05$を統計的有意差とした。

[0046] 実施例１：Ｍ２リッチＭＮＣの遺伝子発現プロファイル

ラットＰＢＭＣまたはＭ２リッチＭＮＣの散布図を示す。それぞれリンパ球サイズの細胞（Ａ）、単球サイズの細胞（Ｂ）、マクロファージサイズの細胞集団（Ｃ）を全生存細胞画分からゲートした（図１）。炎症性の性質を示す単核球／マクロファージタイプ１（Ｍ１マクロファージ：Ｍ１φ）は、全生存細胞画分中でＣＤ６８陽性、あるいはＣＤ１６９陰性かつＣＤ１１ｂ／ｃ共陽性の細胞として同定した。抗炎症性かつマクロファージタイプ２（Ｍ２マクロファージ：Ｍ２φ）は、全生存細胞画分中ＣＤ１６３陽性かつＣＤ１１ｂ／ｃ共陰性の細胞として同定した。

解析の結果、培養前のＰＢＭＣ細胞懸濁液ではＭ１φの割合が多い一方、Ｍ２リッチＭＮＣでは有意にＭ１φの割合が減少していた（ＣＤ６８陽性細胞の比率：２０±１．８５％　ｖｓ　５．５±１．３％，ＣＤ１６３陰性か

つＣＤ１１ｂ／ｃ共陽性の細胞比率：１７±２．０１％　ｖｓ　１．２５±０．１６％）（図２Ａ）。それに対して、Ｍ２リッチ ＭＮＣではＰＢＭＣに比べて、抗炎症性かつＭ２φの割合が大幅に増加した（ＣＤ１６３陽性かつＣＤ１１ｂ／ｃ共陰性細胞の比率：０．０６±０．０３％　ｖｓ　１３±１．５％；Ｐ＜０．００７）。（図２Ｂ、図３）。このデータは、Ｅ培養後のＰＢＭＣは、マクロファージが古典的なＭ１φからＭ２φへコンバートした可能性、および約３％の細胞はＭ１φとＭ２φの中間ステージにあることを示唆している。

ラットＭ１φで特異的に発現するマーカーとしてＣＤ３８が、ラットＭ２φ特異的なマーカーとしてerg2やarg1が知られている。ＲＴ－ｑＰＣＲ解析によりＭ２リッチ ＭＮＣではＰＢＭＣに比べて、Ｍ２φのマーカーであるarg1及びerg2の発現量が増加していたが、Ｍ１φのマーカーであるCD38及びil1bの発現量は低下していた。炎症に関わる遺伝子の発現は、Ｍ２リッチ ＭＮＣでは、例えばang1、ang2、vegfbの発現が大幅に上昇していた。

Ｔリンパ球のサブセット、特に細胞障害性Ｔ細胞のマーカーであるＣＤ８陽性細胞の割合は、ＣＤ３陽性細胞全体の中で、１０％から２．３％（Ｐ＜０．００８７）へと減少した（図４、図５）。免疫抑制性のＴ細胞サブセットマーカーであるｆｏｘｐ３遺伝子の発現は、Ｍ２リッチ ＭＮＣではＰＢＭＣと比較して４倍増加していた。

以上のことから、フローサイトメトリーとＲＴ－ｑＰＣＲのデータは、Ｅ培養したＰＢＭＣでは、組織機能の再生能を有する抗炎症性細胞（Ｍ２φ）と抗炎症性遺伝子（arg1，erg2）の発現、血管形成性細胞（ＣＤ３４陽性細胞、Ｍ２φ）と血管新生遺伝子（Angpt1，Angpt2，Vegfb）の発現、および抗炎症性細胞の割合を、細胞障害性Ｔ細胞の減少と免疫抑制性遺伝子の発現（Foxp3）を増加させることで増加させることを示した。

[0047] 実施例２：心臓虚血部位と、他臓器におけるＭ２リッチ ＭＮＣの追跡

ＰＢＭＣとＭ２リッチ ＭＮＣをLew-CAG-eGFPラットから単離し、心筋梗塞誘発３日後に、１ｘ１０^{5}個の細胞を尾静脈から投与した。細胞投与４週間後

に、免疫組織化学的に投与細胞のトレーシング実験を行った。組織解析では、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群では、ｅＧＦＰ陽性細胞は虚血部と虚血部周囲の組織で観察されたが（図６Ａ、Ｂ）、ＰＢＭＣ投与群では観察されなかった（図６Ｃ）。さらに、多くのｅＧＦＰ陽性細胞は、ＰＢＭＣ投与群ではＭ２リッチＭＮＣ投与群に比べ、柔組織である脾臓や肺でトラップされていた（図６Ｄ、Ｅ）。

[0048] 実施例３：Ｍ２リッチＭＮＣのＬＶパフォーマンスとＬＶ再構築への効果

手術前と術後２８日目にラットの体重測定を行った。手術後４週目では、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群の体重は３０６．４±５．９ｇと、ＰＢＭＣ投与群（２７７．６±６．１ｇ，Ｐ＜０．０００１）、およびコントロール（２８３．３±８．３ｇ，Ｐ＜０．００２）に比べて増加した。Ｓｈａｍ－ｏｐｅｒａｔｅｄ群（２８１．５±７．９ｇ，Ｐ＜０．０１）と比べても、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群の体重は増えていた。連続心エコー（ＥｃｈｏＣＧ）測定を、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群（ｎ＝９）、ＰＢＭＣ投与群（ｎ＝１１）、コントロール群（ｎ＝９）、およびＳｈａｍ－ｏｐｅｒａｔｅｄ群（ｎ＝５）で行った。心筋梗塞誘発２週目から２８日後まで、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群の内径短縮率（ＦＳ）は増加した（４５．５±４．６％）のに対し、ＰＢＭＣ投与群（３０．８７±６．３８％，Ｐ＜０．０００１）、およびコントロール群（３２．１５±７．７４％，Ｐ＜０．０００８）ではＦＳの増加は観察されなかった。虚血部位体積と左室収縮機能（ＬＶＳＤｓ）を含めたＥｃｈｏＣＧ指標は、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群では（９４．４±３．７μｌと０．３５±０．０３ｃｍ）と上昇したが、ＰＢＭＣ投与群では（６３．６±６．０７μｌ，Ｐ＜０．００４と０．４９±０．０３ｃｍ，Ｐ＜０．０００２）、コントロール群では（７１．１±２．０μｌ，Ｐ＜０．０３と　０．４６±０．０３ｃｍ，Ｐ＜０．００５）と、ＬＶ機能数値は悪化した。２Ｄドップラーモード解析では、僧帽弁のマイルド、あるいは中程度の機能不全がＰＢＭＣ投与群とコントロール群で観察されたのに対し、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群では、僧帽弁の機能不全は観察されなかった。

興味深いことに、この結果はシリウスレッド染色でも同様の結果が得られた。ＰＢＭＣ投与群とコントロール群のＬＶ　ａｎｔｅｒｉｏｒ－ｌａｔｅｒａｌ側とｐｏｓｔｅｒｉｏｒ－ｌａｔｅｒａｌ側の乳頭筋は、心筋梗塞後損傷していた（図７Ａ）。さらなる組織解析では、過剰な炎症反応により、ＰＢＭＣ投与群とコントロール群の虚血障害部位は広がっており心壁も薄くなっていた一方、Ｍ２リッチ ＭＮＣ投与群では保たれており、ＬＶの再構成と心壁の肥厚がＭ２リッチＭＮＣ投与群では促進したことを示している（図７Ａ～Ｃ）。間質間のコラーゲン断片化はＰＢＭＣ投与群で有意に増加しており、コントロール群においても、統計的にＭ２リッチＭＮＣ投与群との有意差はないものの、組織の線維化が高かった（図７Ｄ、Ｅ）。

[0049] 実施例４：Ｍ２リッチＭＮＣによる梗塞後に両側「機能的バイパス」の形成

ラットＭ２リッチＭＮＣの腹腔内投与４週間後、「機能的バイパス」が観察された。これは、ＬＡＤ縫合部から離れた部位において、動脈血がバイパスされる現象で、ＰＢＭＣ投与群やコントロール群においてはこのバイパスは観察されず、ＬＶ動脈瘤と周囲の組織（胸腺と胸壁前部）への酷い癒着が見られ、心臓の拍動を妨げていた。この現象が血管のバイパスかどうか確認するため、瞬間的に凍結した心組織のスライスをイソレクチンＢ４とａＳＭＡで染色した。共焦点顕微鏡の３次元立体再構築画像の解析から、ａＳＭＡによる血管の染色は、虚血部位において数が多く、広い血管内径の値を示し、虚血部位は胸壁由来の小動脈（恐らく肋間動脈と内胸動脈）により囲まれていた。

[0050] 実施例５：ラット心筋梗塞における血管新生にＭ２リッチＭＮＣが与える影響

図８Ａで、微小血管密度（ＭＶＤ）をイソレクチンＢ４－ＦＩＴＣ染色で調べた。ＭＶＤはＰＢＭＣ投与群（２６０±３５．７／ｍｍ^2，Ｐ＜０．０００１）とコントロール群（２９８±４５．５／ｍｍ^2，Ｐ＜０．０００１）に比べ、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群において有意に高かった（５５８±４４．４／ｍｍ^2）。機能している血管の形成を調べるため、虚血部位における１平方

ミリメートルあたりの小動脈密度を計算したところ、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群ではＰＢＭＣ投与群（５．７１４±２．９／ｍｍ^2，Ｐ＜０．０３）、およびコントロール群（４．６７±２．４／ｍｍ^2，Ｐ＜０．０１）に比べて高かった（図８Ｂ）。

共焦点顕微鏡を用いた３次元立体画像の再構築から、ＭＶＤ値はＭ２リッチＭＮＣ投与群ではＰＢＭＣ投与群とコントロール群に比べて上昇していた（図８Ｃ）。投与されたＭ２リッチＭＮＣがホストの心臓で血管内皮細胞に分化出来るかどうかを調べるため、Lew-CAG-eGFPトランスジェニックラットを用いて免疫組織化学的解析を行った。結果は、投与されたｅＧＦＰで標識されたＭ２リッチＭＮＣは、血管内皮細胞のマーカーであるＣＤ３１を発現しており、さらに、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群では１平方ミリメートルあたりのＭＶＤも上昇していたが、ＰＢＭＣ投与群ではそのような結果は示さなかった（図８Ｄ）。ＲＴ－ｑＰＣＲによる解析から、血管新生に関わるangpt1、angpt2及びpecam1といった遺伝子の発現は、細胞投与３日後で、Ｍ２リッチＭＮＣ投与群ではコントロール群に比べてそれぞれ３倍、９倍、５倍上昇していたのに対して、ＰＢＭＣ投与群ではコントロールに比べてそれら遺伝子の発現は２倍、１倍、２倍低下していた（図８Ｅ）。

[0051] 実施例６：シェーグレン症候群自然発症マウスにおける唾液腺病態（リンパ球浸潤）の進行におけるＭ２リッチＭＮＣが与える影響

病態モデルマウスを用いて、Ｍ２リッチＭＮＣが肺などにトラップされずに、効率的に炎症部位に到達して薬効を発揮できることを確認した。

病態モデル動物としては、シェーグレン症候群自然発症マウス（日本ＳＬＣ、ＮＯＤ）を用いた。このマウスはシェーグレン症候群様の唾液腺障害を自然発症的に起こすことが知られている。唾液腺障害発症後（８週齢以降）にＭ２リッチＭＮＣ（マウス）を尾静脈内投与し、唾液腺分泌障害を起こす２０週齢の時点で唾液腺組織の病理解析を実施した。Ｍ２リッチＭＮＣを投与した細胞投与群１匹（細胞投与群１）、無処置群２匹（無処置群１、２）それぞれから唾液腺組織を回収し、病理組織学的観察から「リンパ球浸潤領

域」を特定した。

面積測定値を標準化させるため、一つの唾液腺から連続切片を作成し、それぞれ画像解析ソフト（NIH ImageJ）を用いてＨＥ染色した複数の切片（３枚から６枚）の１切片あたりの唾液腺組織面積を算出し、平均値と標準偏差（ＳＤ）を算出した。また、リンパ球浸潤領域は、画像解析ソフトで全て同じ倍率で拡大し、切片間の面積を相対比較できるようにした。

１切片あたりの唾液腺組織の面積は、97,492～139,148ピクセルで細胞投与群及び無処置群間で有意な差はなかった。

一方、１切片あたりのリンパ球浸潤部の面積には、細胞投与群と無処置群で顕著な差が確認された（図９）。

細胞投与群は、無処置群に比べてリンパ球浸潤部の面積が小さいことが確認された。

以上の結果より、ラットのみならず、マウスにおいても、全身投与したＭ２リッチＭＮＣが肺などにトラップされることなく炎症局所において抗炎症作用を発揮し、組織の機能再生に寄与したことが確認された。

[0052] 実施例７：ヒトＰＢＭＣのＥ培養によるＭ２マクロファージの富化

既知の方法（非特許文献６）及び上記「１．ＰＢＭＣ（ラット）の単離と培養」に準じて、ヒト末梢血由来ＰＢＭＣの単離及び単離されたＰＢＭＣのＥ培養を実施した。Ｅ培養の期間は５～８日間であり、実験によって、培養開始後５日目、６日目、７日目、８日目で細胞を回収した（それぞれday5, day6, day7, day8と表記した）。

単核球／マクロファージの特異マーカーであるＣＤ１１ｂが陽性であり、かつ炎症性の性質を示す単核球／マクロファージタイプ１（Ｍ１マクロファージ）は、全生存細胞画分中でＣＤ１１ｂとＣＣＲ２の両陽性細胞として同定した。抗炎症性の性質を示すマクロファージタイプ２（Ｍ２マクロファージ）は、全生存細胞画分中でＣＤ１１ｂとＣＤ２０６の両陽性細胞として同定した。

実験は６回それぞれ独立に実施した。うち実験１、実験３、実験６がドナ

ー１、実験２と実験４がドナー２、実験４がドナー３から採血した末梢血を用いてＰＢＭＣを単離しＥ培養した（同じドナー由来のＰＢＭＣの採血日は異なっている）。

解析の結果、表２及び図１０に示す。

[0053] [表2]

実験１

	培養前	E培養後	
	PBMC	day5	day7
M1マクロファージ (CD11b/CCR2陽陽性)	24%	3%	1%
M2マクロファージ (CD11b/CD206陽陽性)	0%	25%	25%

実験２

培養前	E培養後	
PBMC	day5	day7
31%	4%	2%
1%	11%	23%

実験３

	培養前	E培養後	
	PBMC	day5	day7
M1マクロファージ (CD11b/CCR2陽陽性)	25%	9%	3%
M2マクロファージ (CD11b/CD206陽陽性)	0%	16%	22%

実験４

培養前	E培養後	
PBMC	day6	day8
20%	2%	2%
0%	12%	17%

実験５

	培養前	E培養後
	PBMC	day6
M1マクロファージ (CD11b/CCR2陽陽性)	19%	1%
M2マクロファージ (CD11b/CD206陽陽性)	0%	20%

実験６

培養前	E培養後
PBMC	day7
13%	1%
0%	9%

[0054] 表２及び図１０からも明らかなように、異なるドナーにおいていずれも培養前のＰＢＭＣにはＭ２マクロファージがほとんど検出されないが、Ｍ１マクロファージはＰＢＭＣ細胞全体の１０－３０％とＭ２マクロファージに比して多く存在する。一方、Ｅ培養５日目以降は総じてＭ２マクロファージが大幅に富化（単核球全体の７％以上、多くは９％以上）され、Ｍ１マクロファージが大幅に減少（単核球全体のおよそ５％以下、多くは３％以下）する。この傾向は培養５日目より６日目、７日目の方が顕著であった。

産業上の利用可能性

[0055] 本発明の医薬組成物は、Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団を含有

し、全身投与された場合に肺にトラップされず、障害／炎症部位に集積する。従って、本発明の医薬組成物は、治療に有効となる数の抗炎症作用を有する細胞を標的となる炎症又は組織損傷部位に移行させることができる。

請求の範囲

[請求項1] Ｍ２マクロファージが富化された細胞集団と医薬上許容され得る担体とを含有する、医薬組成物。

[請求項2] 細胞集団におけるＭ２マクロファージの割合が７％以上である、請求項１記載の医薬組成物。

[請求項3] 細胞集団におけるＭ１マクロファージの割合が１０％未満である、請求項１又は２記載の医薬組成物。

[請求項4] Ｍ２マクロファージの富化が、体液由来の単核球を、無血清培地中、培地交換及び継代もせずに培養することによって為されることを特徴とする、請求項１～３のいずれか１項に記載の医薬組成物。

[請求項5] 全身投与用である、請求項１～４のいずれか１項に記載の医薬組成物。

[請求項6] 細胞集団が下記特徴を有する、請求項１～５のいずれか１項に記載の医薬組成物：

（１）全身投与された場合に肺にトラップされない、

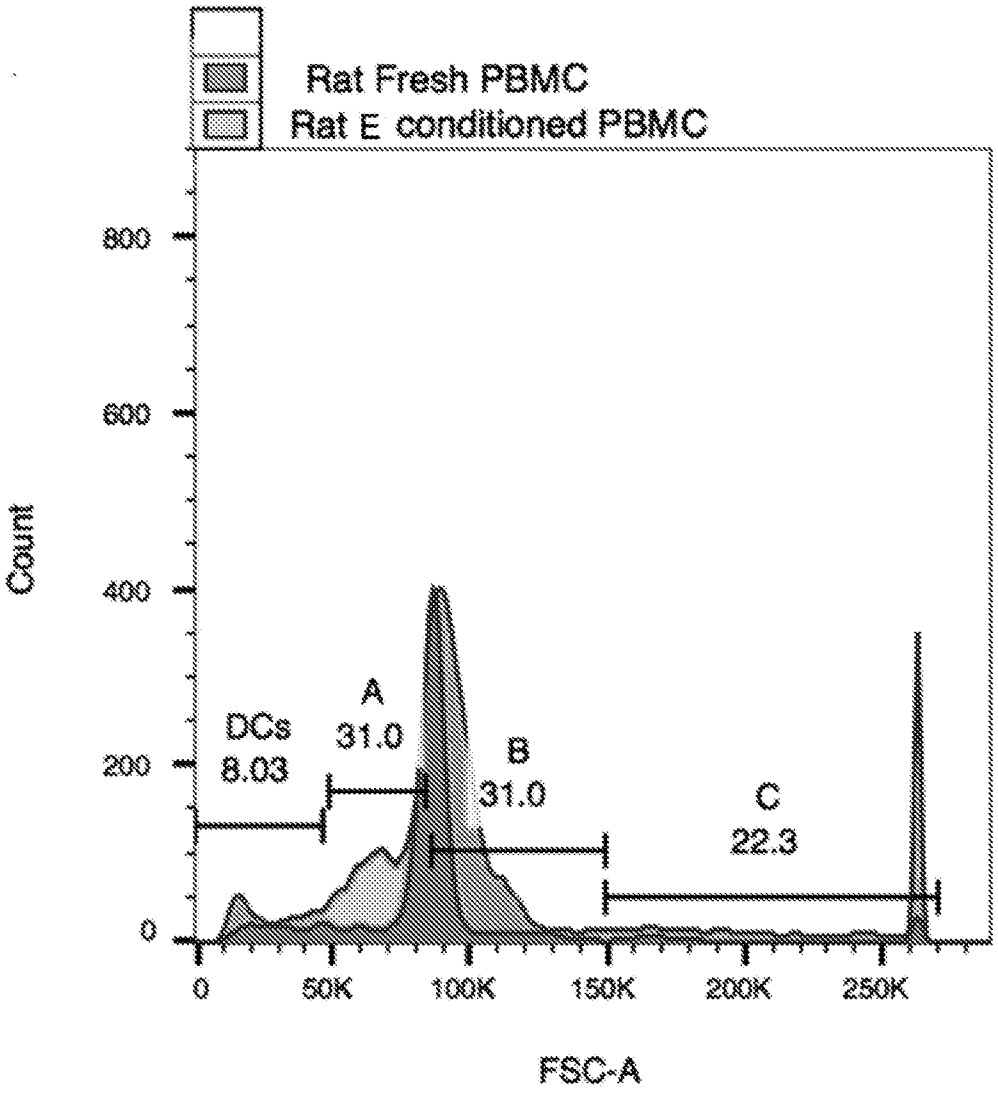
（２）障害／炎症部位に集積する、及び

（３）単核球由来である。

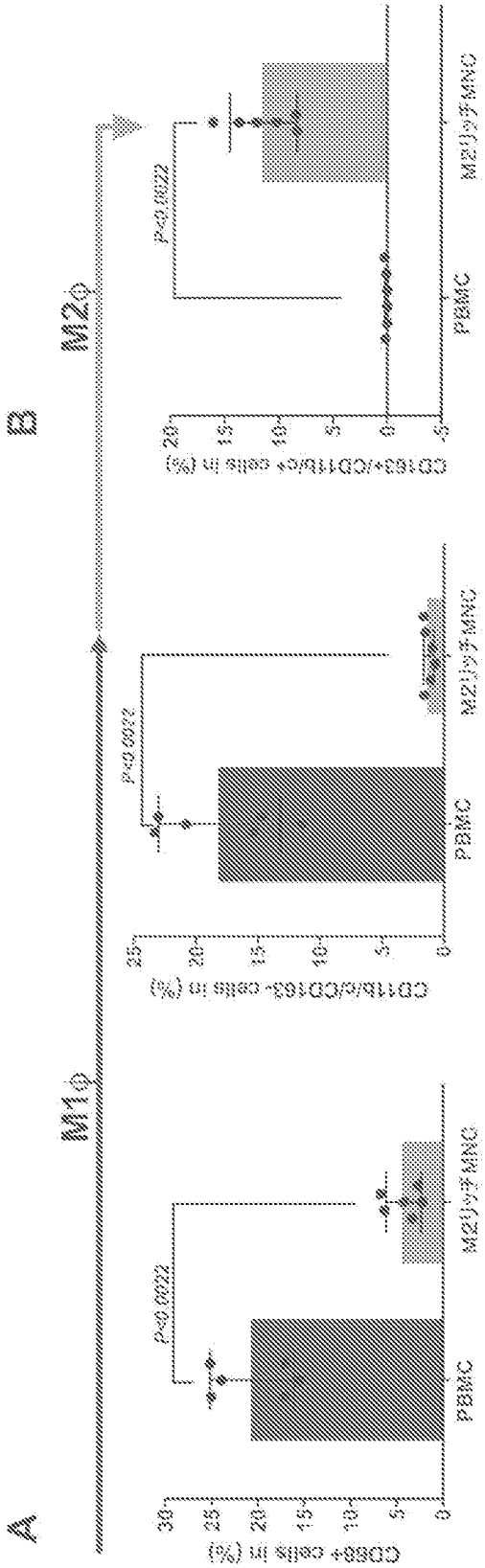
[請求項7] 炎症性疾患の予防及び／又は治療用である、請求項１～６のいずれか１項に記載の医薬組成物。

[請求項8] 炎症性疾患が自己免疫疾患によるものである、請求項７記載の医薬組成物。

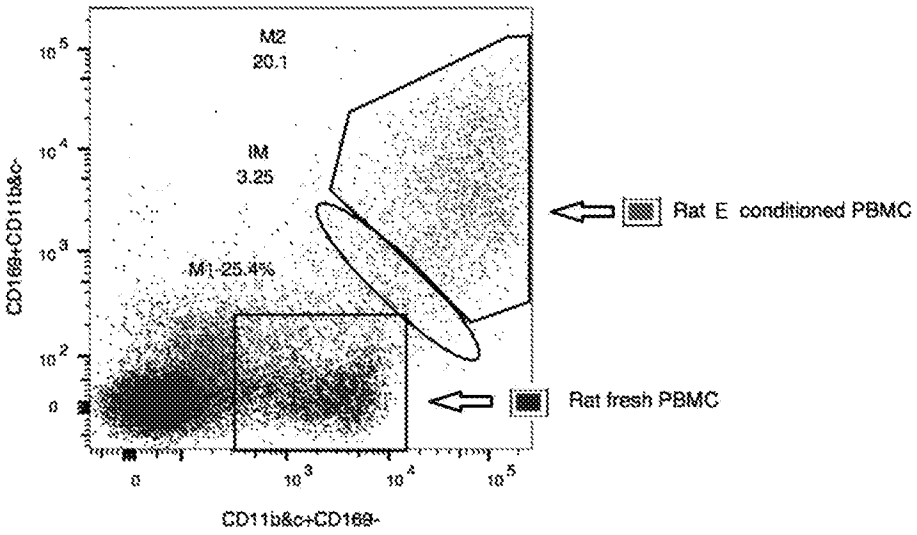
[図1]


Rat Fresh PBMC
Rat E conditioned PBMC
Count
800
600
400
200
0
DCs
8.03
A
31.0
B
31.0
C
22.3
0
50K
100K
150K
200K
250K
FSC-A

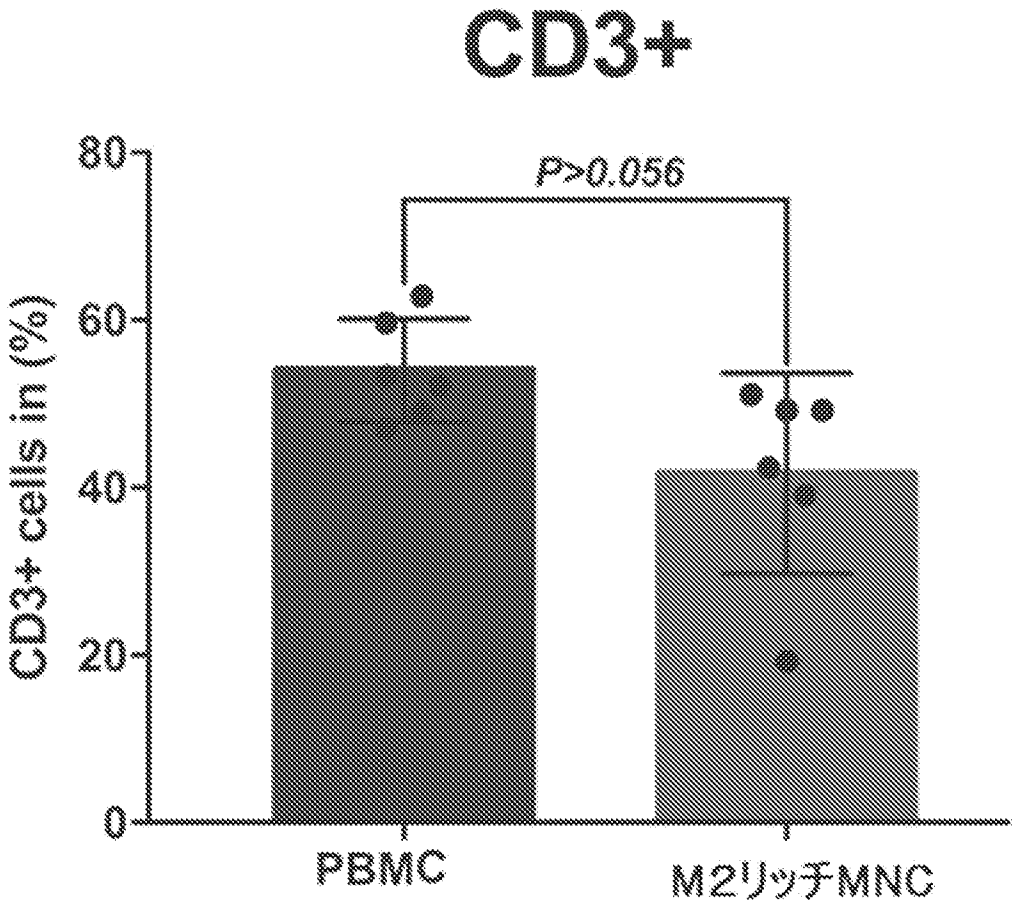
[図2]


A
M1φ
CD68+ cells in (%)
P<0.0022
PBMC
M2ソッチMNC
B
M2φ
CD11b/c/CD163- cells in (%)
P<0.0022
PBMC
M2ソッチMNC
C
M2φ
CD163+/CD11b/c+ cells in (%)
P<0.0022
PBMC
M2ソッチMNC

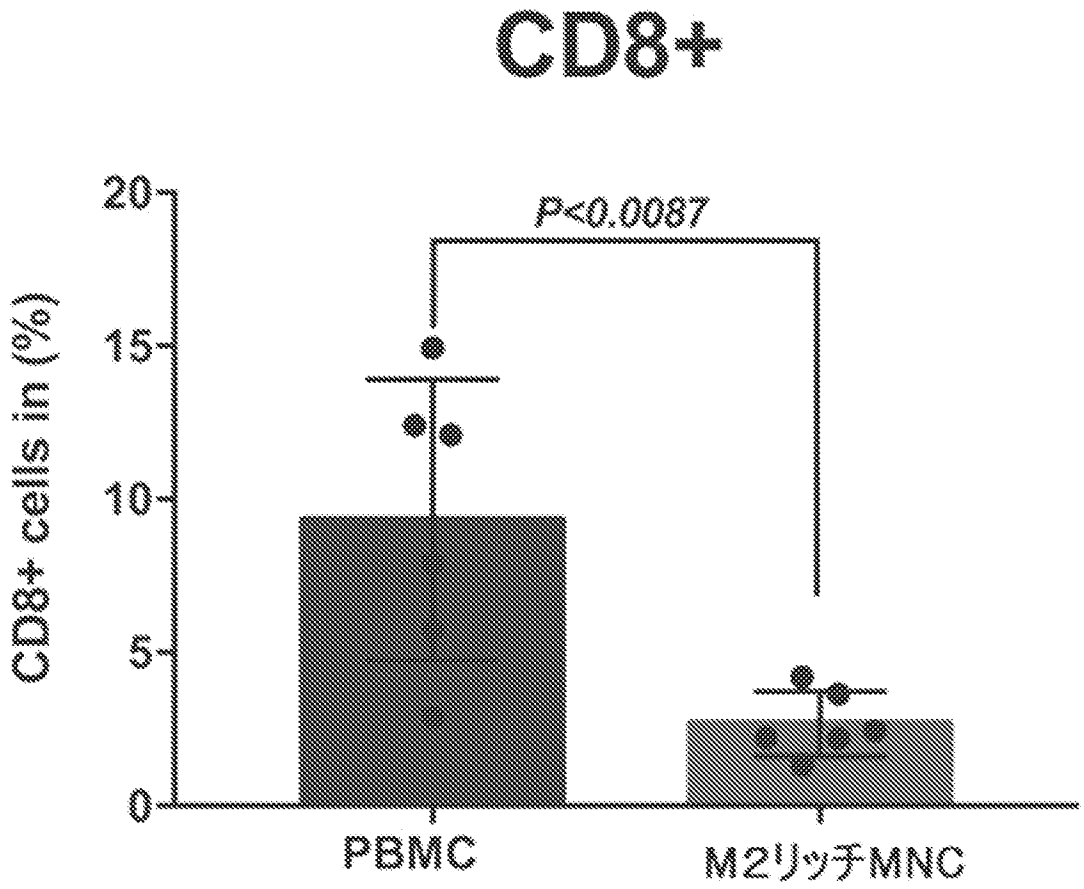
[図3]


M2
20.1
IM
3.25
M1 25.4%
Rat E conditioned PBMC
Rat fresh PBMC
CD169+CD11b&c-
CD11b&c+CD169-

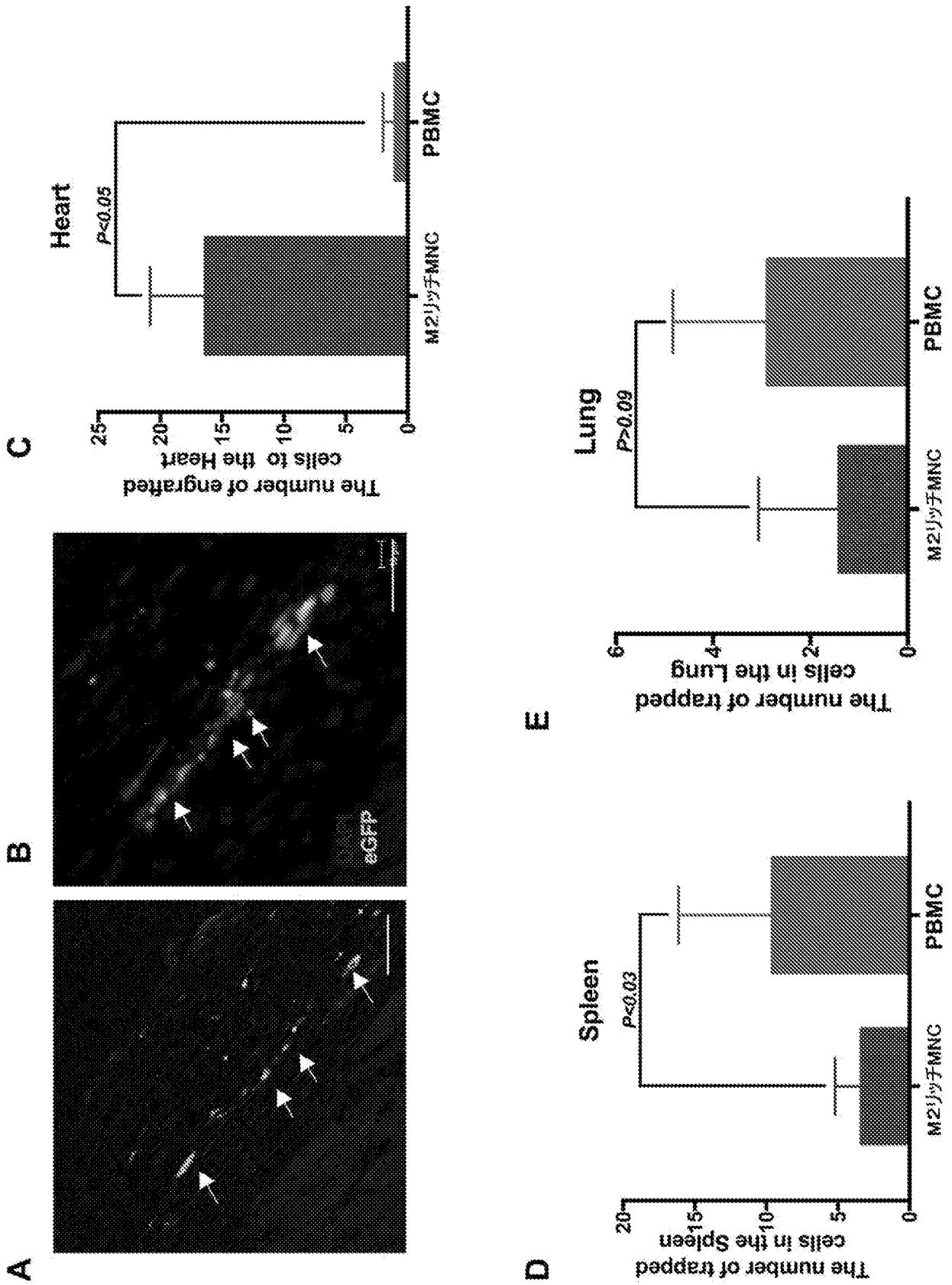
[図4]


CD3+
P>0.056
CD3+ cells in (%)
80
60
40
20
0
PBMC
M2リッチMNC

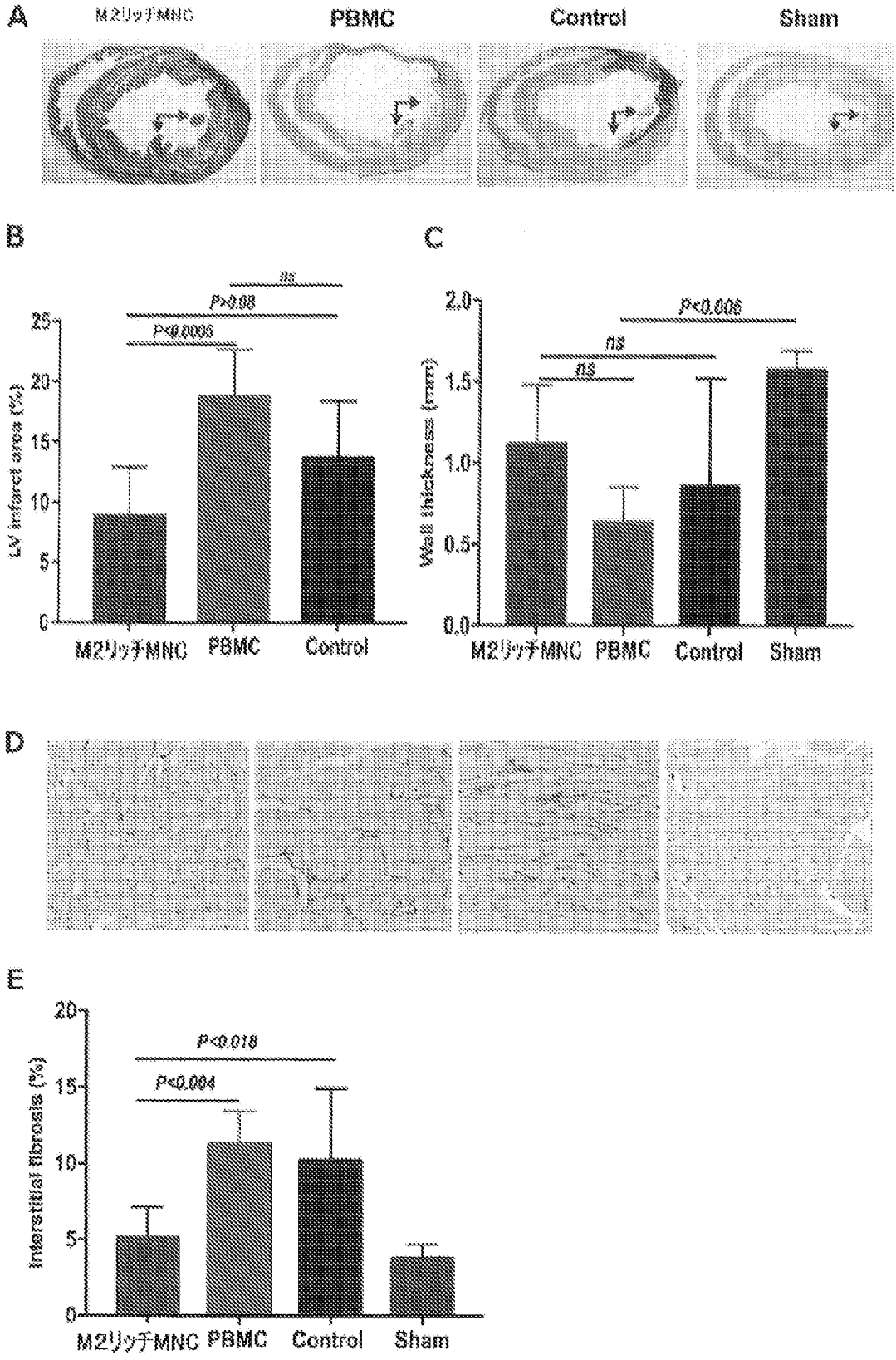
[図5]



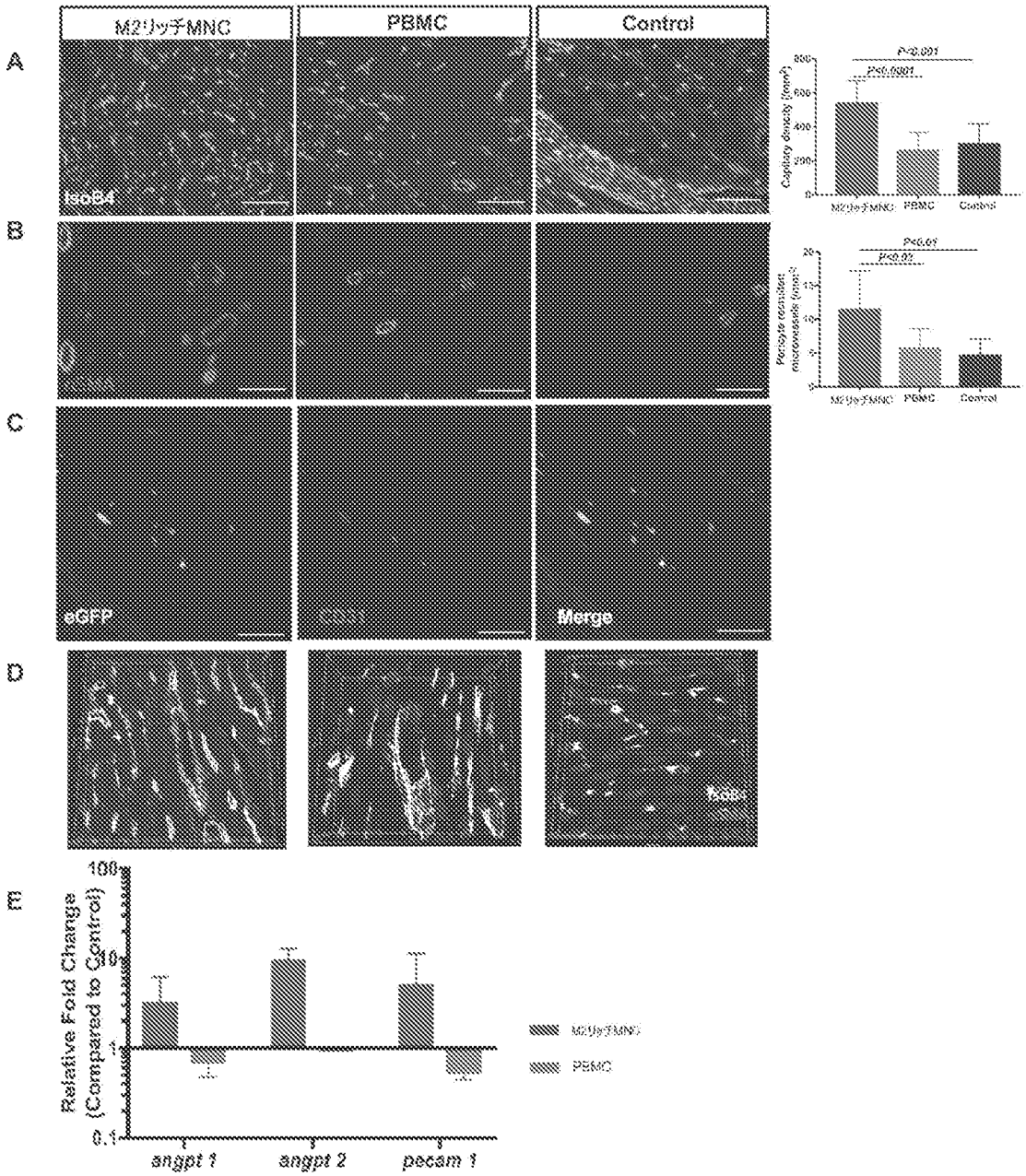
[図6]


A
B
eGFP
C
Heart
P<0.05
The number of engrafted cells to the Heart
25
20
15
10
5
0
M2ﾏｸﾛﾌｧｰｼﾞMNC
PBMC
D
Spleen
P<0.03
The number of trapped cells in the Spleen
20
15
10
5
0
M2ﾏｸﾛﾌｧｰｼﾞMNC
PBMC
E
Lung
P>0.09
The number of trapped cells in the Lung
6
4
2
0
M2ﾏｸﾛﾌｧｰｼﾞMNC
PBMC

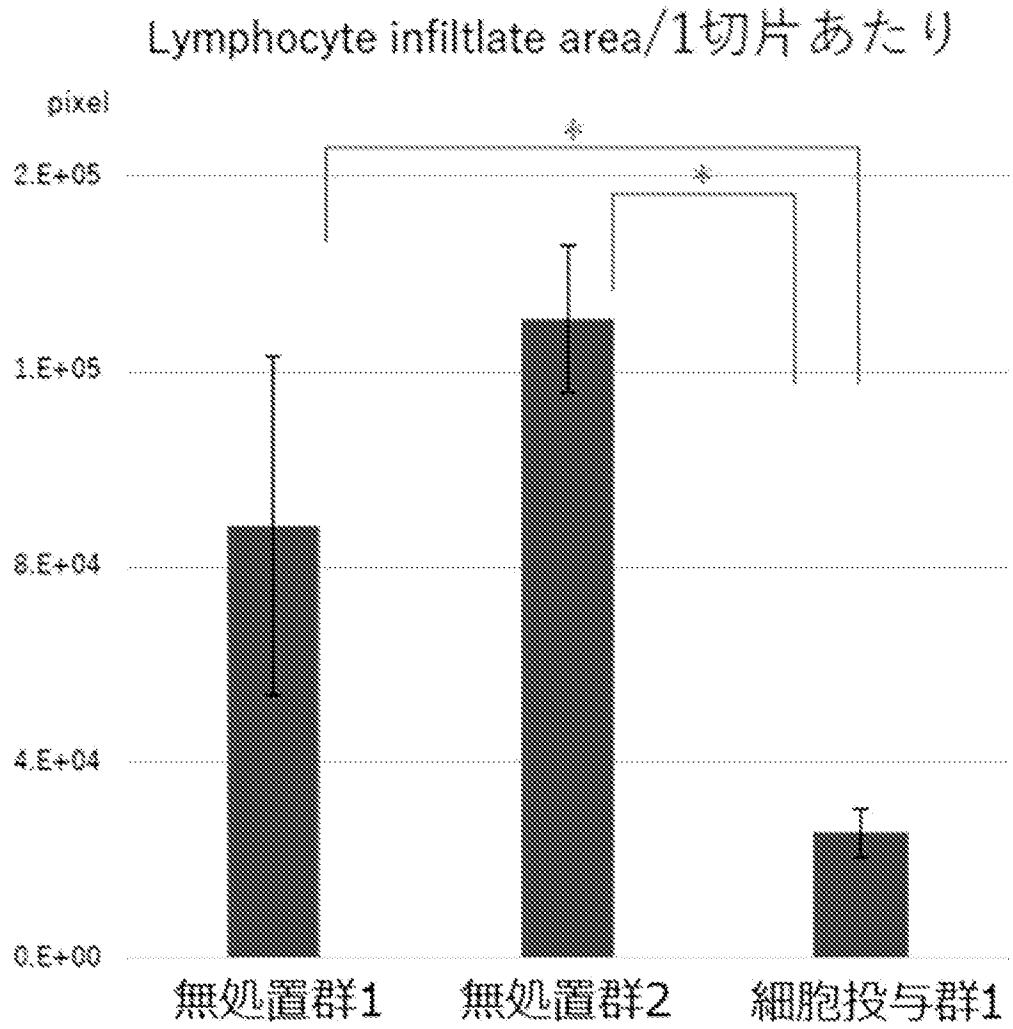
[図7]


A
M2リッチMNC
PBMC
Control
Sham
B
LV infarct area (%)
ns
P>0.08
P<0.0005
M2リッチMNC
PBMC
Control
C
Wall thickness (mm)
P<0.006
ns
ns
M2リッチMNC
PBMC
Control
Sham
D
E
Interstitial fibrosis (%)
P<0.018
P<0.004
M2リッチMNC
PBMC
Control
Sham

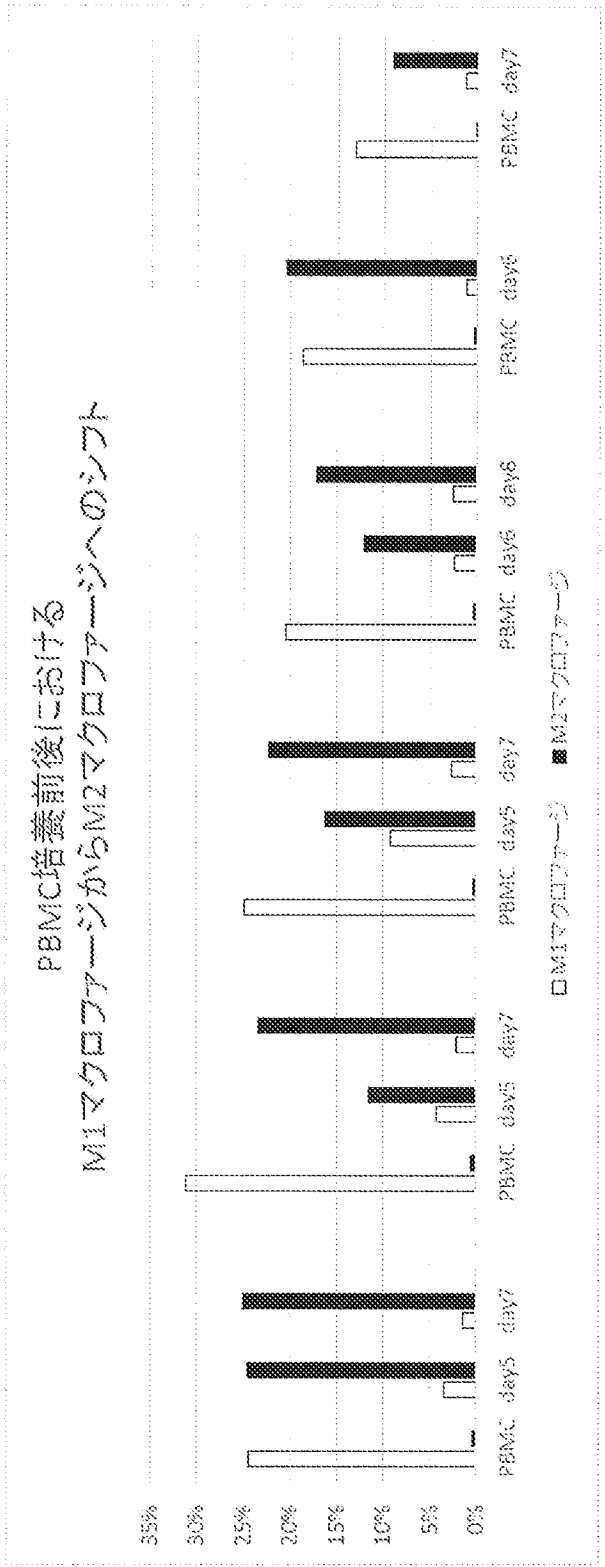
[図8]


M2リッチMNC
PBMC
Control
A
B
C
D
E
Isolectin B4
eGFP
Merge
DAPI
P<0.001
P<0.0001
Capillary density (/mm²)
M2リッチMNC
PBMC
Control
P<0.05
P<0.01
Relative Fold Change (Compared to Control)
100
10
1
0.1
angpt 1
angpt 2
pecam 1
M2リッチMNC
PBMC

[図9]


Lymphocyte infiltlate area/1切片あたり
pixel
2.E+05
1.E+05
8.E+04
4.E+04
0.E+00
*
*
無処置群1
無処置群2
細胞投与群1

[図10]


PBMC培養前後におけるM1マクロファージからM2マクロファージへのシフト
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
PBMC day5 day7 PBMC day5 day7 PBMC day5 day7 PBMC day6 day8 PBMC day5 PBMC day7
□M1マクロファージ ■M2マクロファージ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/032322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. A61K35/15(2015.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i

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)
Int.Cl. A61K35/15, A61P29/00, A61P37/04

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 6372782 B1 (FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH AND INNOVATION) 27 July 2018, claims 1, 2, 4, paragraph [0039], examples 1, 2, 6-8 & US 2015/0238538 A1 claims, paragraphs [0010], [0071], examples 1,2, 6-8 & WO 2014/051154 A1 & EP 2902483 A1 & CN 105073980 A	1-4, 6, 7 5-8
X Y	CHENG, Z. et al., "Bone marrow-derived innate macrophages attenuate oxazolone-induced colitis.", Cellular Immunology, 2017, vol. 311, pp. 46-53	1-3, 5-8 5-8

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 October 2019 (09.10.2019)	21 October 2019 (21.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/032322

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SALYBEKOV, AA. et al., "Regeneration-Associated Cells Improve Recovery from Myocardial Infarction through Enhanced Vasculogenesis, Anti-inflammation, and Cardiomyogenesis.", bioRxiv [online], 20 August 2018, <http://dx.doi.org/10.1101/396101> retrieval date 09 October 2019	1-8
X	SALYBECOV, AA. et al., "Regeneration-associated cells improve recovery from myocardial infarction through enhanced vasculogenesis, anti-inflammation, and cardiomyogenesis.", PLOS ONE, 28 November 2018, vol. 13, no. 11, e0203244	1-8
A	MASUOA, H. et al., "Vasculogenic Conditioning of Peripheral Blood Mononuclear Cells Promotes Endothelial Progenitor Cell Expansion and Phenotype Transition of Anti-Inflammatory Macrophage and T Lymphocyte to Cells With Regenerative Potential.", J. Am. Heart Assoc., 2014, vol. 3, e000743	1-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０３２３２２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K35/15(2015.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K35/15, A61P29/00, A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９年

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

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

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 6372782 B1 (公益財団法人神戸医療産業都市推進機構) 2018.07.27, 請求項1,2,4、[0039]、実施例1,2,6-8 & US 2015/0238538 A1 請求の範囲、[0010],[0071]、実施例1,2,6-8 & WO 2014/051154 A1 & EP 2902483 A1 & CN 105073980 A	1-4,6,7 5-8
X Y	CHENG Z. et al., Bone marrow-derived innate macrophages attenuate oxazolone-induced colitis., Cellular Immunology, 2017, Vol.311, p.46-53	1-3,5-8 5-8

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０９．１０．２０１９	２１．１０．２０１９

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

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　３２２８
長谷川　茜
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	SALYBEKOV AA. et al., Regeneration-Associated Cells Improve Recovery from Myocardial Infarction through Enhanced Vasculogenesis, Anti-inflammation, and Cardiomyogenesis., bioRxiv [online], 2018.08.20, <http://dx.doi.org/10.1101/396101> 検索日 2019 年 10 月 9 日	1-8
X	SALYBECOV AA. et al., Regeneration-associated cells improve recovery from myocardial infarction through enhanced vasculogenesis, anti-inflammation, and cardiomyogenesis., PLOS ONE, 2018.11.28, Vol.13, No.11, e0203244	1-8
A	MASUDA H. et al., Vasculogenic Conditioning of Peripheral Blood Mononuclear Cells Promotes Endothelial Progenitor Cell Expansion and Phenotype Transition of Anti-Inflammatory Macrophage and T Lymphocyte to Cells With Regenerative Potential., J. Am. Heart Assoc., 2014, Vol.3, e000743	1-8