

(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8月19日(19.08.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/161997 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/63 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) *C07K 14/705* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C12N 15/24* (2006.01)

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

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/004780

(22) 国際出願日: 2021年2月9日(09.02.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2020-020558 2020年2月10日(10.02.2020) JP
特願 2021-018256 2021年2月8日(08.02.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI
UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口
市吉田 1 6 7 7 - 1 Yamaguchi (JP).

(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).

(72) 発明者; および

(71) 出願人: 田口 昭彦(TAGUCHI Akihiko) [JP/JP];
〒7550033 山口県宇部市琴芝町 1 丁目 1 -
6 1 - 8 0 6 Yamaguchi (JP).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(74) 代理人: 藤本 昌平(FUJIMOTO Shohei);
〒7550033 山口県宇部市琴芝町一丁目 1 番 6
3 号 防長ビル 2 階 Yamaguchi (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,

(54) **Title:** MODIFIED HUMAN INTERLEUKIN-4 RECEPTOR POLYPEPTIDE AND INDUCTION AGENT FOR
DIFFERENTIATION OR POLARIZATION INTO M2 MACROPHAGES

(54) 発明の名称: ヒトインターロイキン4受容体の変異ポリペプチド、及びM2マ
クロファージへの分化又は分極誘導剤

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing: a polypeptide that contributes to polarization
into M2 macrophages independent of IL-4; and an induction agent for differentiation or polarization into M2 macrophages.
A polypeptide derived from the human interleukin-4 receptor, the polypeptide being the result of modifying the amino acid
sequence given by SEQ ID NO:1 by adding, deleting, or substituting one or more amino acids, preferably by substituting
the 242nd isoleucine of the amino acid sequence given by SEQ ID NO:1 with asparagine.

(57) 要約: 本発明の課題は、IL-4に依存せずにM2マクロファージの分極に関与するポリペプチドを提
供することや、M2マクロファージへの分化又は分極誘導剤を提供することにある。解決手段としては、
ヒトインターロイキン4受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列におい
て、1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド、好ましくは配列番号1に示すア
ミノ酸配列における242番目のイソロイシンがアスパラギンに置換したポリペプチドを作製する。



WO 2021/161997 A1

明 細 書

発明の名称：

ヒトインターロイキン4受容体の変異ポリペプチド、及びM2マクロファージへの分化又は分極誘導剤

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトインターロイキン4受容体に由来するIL-4受容体の変異ポリペプチドや、前記IL-4受容体の変異ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドや、前記ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターや、前記ポリヌクレオチド又は発現ベクターを含有する生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞や、前記ポリペプチドを含有する生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞や、前記マクロファージ又はマクロファージ前駆細胞と薬理的に許容される添加剤を含む、炎症疾患、神経変性疾患若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤や、前記ポリヌクレオチド又は前記発現ベクターを有効成分とする、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへの分化又は分極誘導剤や、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへの分化又は分極誘導方法に関する。

背景技術

[0002] 炎症疾患、神経変性疾患、及び虚血性疾患には様々な疾患が存在し、それぞれに応じた薬剤が開発されているが、未だ十分な効果が期待できない疾患も少なくない。こうした炎症性疾患、神経変性疾患、及び虚血性疾患の病巣には免疫細胞であるマクロファージが存在し、病態形成に関与していると考えられている。

[0003] 近年マクロファージの研究が進み、マクロファージには炎症を惹起するM1マクロファージと炎症抑制や組織修復を担うM2マクロファージが存在することが分かってきた。M2マクロファージは過剰な炎症を沈め、アルツハイマーで見られる β アミロイド蛋白質等を貪食する作用等、生体にとって有

益な働きを持っていることが分かってきている（非特許文献1、2参照）。また、M1とM2マクロファージの割合は加齢とともにM1優位となり、M1/M2バランス不均衡が老化を進める一因とも考えられている（非特許文献3参照）。このような背景からさまざまな方法でM2マクロファージを活性化させる研究が進んでいる。具体的には液性因子や低分子化合物を全身投与しM2マクロファージを活性化させる手法が主体であるが、臨床応用に向けた流れは今のところない（非特許文献4参照）。その理由として、たとえば活性化させてM2マクロファージとするための液性因子はBリンパ球に作用し、IgEの産生を高めることでアレルギー疾患の悪化を引き起こす等、マクロファージ以外の細胞へ与える危険性が知られている。さらに液性因子では血液脳関門（blood-brain barrier）を通過することができないため、アルツハイマー病をはじめとする中枢の炎症・神経変性疾患には十分な効果を発揮できない等の課題を有していた。

[0004] さらに炎症部位においては、M1マクロファージを活性化させる生理活性物質が豊富なため、液性因子の全身投与によって一度は活性化されたM2マクロファージも、実際の炎症部位においてはM1マクロファージに再分極している可能性が示唆されている。

[0005] 以上より、液性因子に頼らず、炎症部位でM1マクロファージへと分極しにくく、M2マクロファージを活性化する物質の開発が求められている。

[0006] ところで、これまで血液悪性リンパ腫、膀胱癌又は脳腫瘍において、IL-4受容体の変異体が報告されている（非特許文献5～7参照）。しかしながら、かかるIL-4受容体の変異とマクロファージの分化又は分極との関係は知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Abbas Shapouri-Moghaddam et al., Journal of Cellular Physiology Volume 233, Issue 9 September (2018):P6425-6440

非特許文献2: Leah Zuroff et al., Cell. Mol. Life Sci. (2017) 74:P2167-

2201

非特許文献3: Laren Becker et al., Gut. 2018 May; 67(5): P827-836.

非特許文献4: Ying Bi et al., Neural Plasticity Volume 2019, Article I
D 6724903:P21

非特許文献5: Elena Vigano et al., Blood 2018; 131(18):P2036-2046

非特許文献6: Guo G et al., Nat Genet. 2013;45(12): 1459-1463

非特許文献7: Frattini V et al., Nat Genet. 2013;45(10):1141-1149

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] これまで、M2マクロファージを増やす試みとしては、液性因子や化合物を全身に投与する方法が試みられていた。しかしながら、全身投与の問題点として、実際の炎症部位では、M1マクロファージへ誘導する液性因子の局所濃度が高く、投与量の割に効果が低いことや、他の細胞へ作用して、喘息等の免疫疾患を悪化させる危険性があった。また、M2マクロファージはアルツハイマー病等の中枢神経の変性疾患への効果も期待されているが、液性因子や化合物では血液脳関門を通過できないため、こうした手法ではアルツハイマー病等の中枢神経系の治療に用いることができない等が課題であった。さらに、M2マクロファージの活性化にIL-4を用いた場合には、IL-4がマクロファージ以外へと作用することによる未熟T細胞の増殖、マスト細胞の増殖等の発現増強等、多くの作用を有していることからM2マクロファージの活性化以外の作用をもたらすという問題もあった。そこで、本発明の課題は、IL-4に依存せずにM2マクロファージへの分化又は分極に関与するポリペプチドを提供することや、M2マクロファージへの分化又は分極誘導剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0009] 発明者はヒトインターロイキン4受容体に着目し、マクロファージに対してヒトインターロイキン4受容体の変異体を導入すれば、M2マクロファージとして活性化されるのではないかと考え検討を進めた。その結果、マクロ

ファージ又はマクロファージ前駆細胞においてヒトインターロイキン4受容体の変異体を発現させることでM2マクロファージへの分化又は分極に成功し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕ヒトインターロイキン4受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド。

〔2〕以下の(1-1)又は(1-2)である、上記〔1〕記載のポリペプチド。

(1-1)ヒトインターロイキン4受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列において、37番目のアスパラギン酸、62番目のチロシン、78番目のアスパラギン、115番目のフェニルアラニン、176番目のアスパラギン、200番目のアルギニン、242番目のイソロイシン、251番目のシステイン、及び／又は308番目のリシンが置換したポリペプチド；

(1-2)配列番号1に示すアミノ酸配列において、上記(1-1)において置換した37番目、62番目、78番目、115番目、176番目、200番目、242番目、251番目及び／又は308番目以外のアミノ酸において1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチドを含み、かつ、ホルボール12-ミリストート13-アセタートで刺激したTHP-1細胞、若しくはRAW264.7細胞で発現した場合に、当該ポリペプチドを発現していない場合と比較してヒトM2マクロファージマーカーの発現を増加するポリペプチド。

〔3〕配列番号1に示すアミノ酸配列において、37番目のアスパラギン酸、62番目のチロシン、78番目のアスパラギン、115番目のフェニルアラニン、176番目のアスパラギン、200番目のアルギニン、242番目のイソロイシン、251番目のシステイン、及び／又は308番目のリシンが置換したポリペプチドが、以下の(2-1)～(2-9)のいずれかであ

る、上記〔2〕記載のポリペプチド。

（2－1）配列番号1に示すアミノ酸配列において、37番目におけるアスパラギン酸が中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－2）配列番号1に示すアミノ酸配列において、62番目におけるチロシンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－3）配列番号1に示すアミノ酸配列において、78番目におけるアスパラギンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－4）配列番号1に示すアミノ酸配列において、115番目におけるフェニルアラニンが中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－5）配列番号1に示すアミノ酸配列において、176番目におけるアスパラギンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－6）配列番号1に示すアミノ酸配列において、200番目におけるアルギニンが中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－7）配列番号1に示すアミノ酸配列において、242番目におけるイソロイシンが酸性アミノ酸又は中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－8）配列番号1に示すアミノ酸配列において、251番目におけるシステインが中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（2－9）配列番号1に示すアミノ酸配列において、308番目におけるリシンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

〔4〕ヒトインターロイキン4受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列において、242番目のイソロイシンが置換したポリペプチドであることを特徴とする上記〔2〕記載のポリペプチド。

〔5〕ヒトインターロイキン4受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列において、242番目のイソロイシンがアスパラギンへ置換したポリペプチドであることを特徴とする上記〔4〕記載のポリペプチド。

〔6〕上記〔1〕～〔5〕のいずれか記載のポリペプチドをコードするポリ

ヌクレオチド。

〔７〕上記〔６〕記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

〔８〕上記〔６〕記載のポリヌクレオチド又は上記〔７〕記載の発現ベクターを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞。

〔９〕上記〔１〕～〔５〕のいずれか記載のポリペプチドを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞。

〔１０〕上記〔８〕又は〔９〕記載のマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞と薬理学的に許容される添加剤を含む、炎症疾患、神経変性疾患若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤。

〔１１〕上記〔６〕記載のポリヌクレオチド又は上記〔７〕記載の発現ベクターを有効成分とする、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からＭ２マクロファージへの分化又は分極誘導剤。

〔１２〕上記〔６〕記載のポリヌクレオチド又は上記〔７〕記載の発現ベクターを生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入することを特徴とする、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からＭ２マクロファージへの分化又は分極誘導方法。

発明の効果

[0011] 本発明のＭ２マクロファージへの分化又は分極誘導剤により、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞をＭ２マクロファージへと分化又は分極することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0012] [図１]実施例１において、Ｉ２４２Ｎ変異（２４２位のイソロイシンをアスパラギンに置換）ヒトＩＬ－４受容体をコードするポリヌクレオチドをＲＡＷ２６４．７細胞又はＴＨＰ－１細胞に導入してＩＬ－４受容体の発現を調べた結果である。

[図２]実施例２において、Ｉ２４２Ｎ変異ヒトＩＬ－４受容体をコードするポリヌクレオチドをＲＡＷ２６４．７細胞又はＴＨＰ－１細胞に導入して、Ａ

r g 1 又は C D 2 0 6 の発現を調べた結果である。

[図3]実施例3において、I 2 4 2 N変異ヒトI L - 4 受容体をコードするポリヌクレオチドをR A W 2 6 4 . 7 細胞に導入し、L P S を作用させてT N F α 又はA r g 1 の発現を調べた結果である。

[図4]実施例4において、I 2 4 2 N以外の変異ヒトI L - 4 受容体をコードするポリヌクレオチドをR A W 2 6 4 . 7 細胞に導入して、A r g 1 の発現を調べた結果である。

[図5]実施例5において、I 2 4 2 N変異ヒトI L - 4 受容体をコードするポリヌクレオチドを骨髓由来マクロファージ (BMDM) に導入し、A r g 1 の発現を調べた結果である。

[図6]実施例6において、I 2 4 2 N変異ヒトI L - 4 受容体をコードするポリヌクレオチドをR A W 2 6 4 . 7 細胞に導入し、I L - 1 0 の発現を調べた結果である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の「ヒトインターロイキン4受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド（以下、「本件変異I L - 4 Rポリペプチド」ともいう）」におけるヒトインターロイキン4受容体（ヒトI L - 4 受容体）は、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドであり、N C B IにおいてReference No. NP_000409. 1として登録されている。

[0014] 上記本件変異I L - 4 Rポリペプチドにおける「配列番号1に示すアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド」としては、好ましくは「配列番号1に示すアミノ酸配列における細胞外領域又は膜貫通領域を構成するアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド」、より好ましくは「配列番号1に示すアミノ酸配列における膜貫通領域を構成するアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド」を挙

げることができる。細胞外領域又は膜貫通領域は、公知の細胞外領域又は膜貫通領域予測アルゴリズムを用いて予測することができる。なお、配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 番目から 232 番目が細胞外領域、233 番目から 256 番目が膜貫通領域と考えられる。上記「細胞外領域を構成するアミノ酸」において 1 又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換する位置としては、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における 37 番目のアスパラギン酸、62 番目のチロシン、78 番目のアスパラギン、115 番目のフェニルアラニン、176 番目のアスパラギン、及び 200 番目のアルギニンを挙げることができる。上記「膜貫通領域を構成するアミノ酸」において 1 又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換する位置としては、242 番目のイソロイシン及び 251 番目のシステインを挙げることができ、242 番目のイソロイシンを好適に挙げることができる。

[0015] 本明細書において、中性非極性アミノ酸とは、グリシン (G)、アラニン (A)、バリン (V)、プロリン (P)、ロイシン (L)、イソロイシン (I)、フェニルアラニン (F)、メチオニン (M)、又はトリプトファン (W) を意味する。また、中性極性アミノ酸とは、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、セリン (S)、スレオニン (T)、チロシン (Y)、又はシステイン (C) を意味する。さらに、酸性アミノ酸とは、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) を意味する。

[0016] 上記「配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド」として、好ましくは「配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換したポリペプチド」を挙げることができる。かかる「配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換したポリペプチド」としては、好ましくは以下の (2-1) ~ (2-9) のいずれかを挙げることができ、より好ましくは以下の (2-1') ~ (2-9') のいずれかを挙げることができ、さらに好ましくは 242 番目におけるイソロイシンがアスパラギンへ置換したポリペプチドを好適に挙げることができるがこれらに限定されない。

- [0017] (2-1) 37番目におけるアスパラギン酸の中性極性アミノ酸への置換；
(2-2) 62番目におけるチロシンの中性極性アミノ酸への置換；
(2-3) 78番目におけるアスパラギンの中性極性アミノ酸への置換；
(2-4) 115番目におけるフェニルアラニンの中性非極性アミノ酸への置換；
(2-5) 176番目におけるアスパラギンの中性極性アミノ酸への置換；
(2-6) 200番目におけるアルギニンの中性非極性アミノ酸への置換；
(2-7) 242番目におけるイソロイシンの酸性アミノ酸又は中性非極性アミノ酸への置換；
(2-8) 251番目におけるシステインの中性非極性アミノ酸への置換；
(2-9) 308番目におけるリシンの中性極性アミノ酸への置換；
- [0018] (2-1') 37番目におけるアスパラギン酸のアスパラギンへの置換；
(2-2') 62番目におけるチロシンのシステインへの置換；
(2-3') 78番目におけるアスパラギンのチロシンへの置換；
(2-4') 115番目におけるフェニルアラニンのロイシンへの置換；
(2-5') 176番目におけるアスパラギンのセリンへの置換；
(2-6') 200番目におけるアルギニンのトリプトファンへの置換；
(2-7') 242番目におけるイソロイシンのアスパラギン又はアスパラギン酸への置換；
(2-8') 251番目におけるシステインのトリプトファンへの置換；
(2-9') 308番目におけるリシンのアスパラギンへの置換；
- [0019] 本明細書において、「1又は数個のアミノ酸」としては、例えば1～30個の範囲内、好ましくは1～20個の範囲内、より好ましくは1～15個の範囲内、さらに好ましくは1～10個の範囲内、より好ましくは1～5個の範囲内、さらに好ましくは1～3個の範囲内、より好ましくは1～2個、最も好ましくは1個のアミノ酸を意味する。
- [0020] 本明細書において、「ホルボール12-ミリストート13-アセタート（PMA）で刺激したTHP-1細胞、若しくはRAW264.7細胞で発現

した場合に、当該ポリペプチドを発現していない場合と比較してヒトM2マクロファージマーカーの発現を増加するポリペプチド」としては、本件変異IL-4Rポリペプチドを発現するPMAで刺激したTHP-1細胞、若しくはRAW264.7細胞と、本件変異IL-4Rポリペプチドを発現していないPMAで刺激したTHP-1細胞、若しくはRAW264.7細胞を培養してM2マクロファージマーカーの発現を調べ、本件変異IL-4Rポリペプチドを発現していない場合と比較して本件変異IL-4Rポリペプチドを発現するPMAで刺激したTHP-1細胞、若しくはRAW264.7細胞におけるM2マクロファージマーカーの発現が増加、好ましくは2倍以上、より好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上増加となるポリペプチドを挙げることができる。ここで、ヒトM2マクロファージマーカーとしては、CD206、CD163、IL-27RA、CD367、F13A1、又はCCL22を挙げることができる。なお、THP-1細胞はPMAで刺激することによってマクロファージに分化する。

[0021] 本発明の「本件変異IL-4Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（以下、「本件ポリヌクレオチド」ともいう）」は、本件変異IL-4Rポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであれば特に制限されず、アミノ酸をコードするために選択されるコドンは、発現させる宿主細胞の種類に応じて適宜最適化されてもよい。

[0022] 本発明の「本件ポリヌクレオチドを含有する発現ベクター（以下、「本件発現ベクター」ともいう）」における発現ベクターとしては直鎖状でも環状でもよく、ウイルスベクターでも、プラスミド等の非ウイルスベクターでも、トランスポゾンによるベクターでもよい。また、かかるベクターには、プロモーターやターミネーター等の制御配列や、薬剤耐性遺伝子、レポーター遺伝子等の選択マーカー配列を含有していてもよい。

[0023] 前記ウイルスベクターとしては、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターを挙げることができ、レンチウイルスベクターを好適に挙げることができる。なお

、レンチウイルスベクターやレトロウイルスベクターを用いれば、導入遺伝子は宿主細胞のゲノムへ取り込まれるため、長期間かつ安定に発現することが可能となる。短期間での発現が好ましい際には、ゲノムへの組み込みのないアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターが好適である。

[0024] 上記プロモーターとしては、レンチウイルスのLTRプロモーター、SV40初期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター等のウイルス由来プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、Xistプロモーター、 β -アクチンプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター、CAGプロモーター、EF1A等の哺乳類由来プロモーターを挙げることができる。また、テトラサイクリンによって誘導されるテトラサイクリン応答型プロモーター、インターロイキンによって誘導されるMx1プロモーターや、マクロファージでプロモーター活性を有するCD68プロモーター、M-CSFプロモーター等を用いてもよい。

[0025] 本発明の「本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞」（以下、「本件変異IL-4RマクロファージA」ともいう）における「マクロファージ」にはM1マクロファージとM2マクロファージの二つのフェノタイプが含まれる。また、「マクロファージ前駆細胞」には、少なくともM1マクロファージ又はM2マクロファージに分化可能な細胞が含まれ、CD14陽性（CD14⁺）細胞、非活性マクロファージ（M0マクロファージ）、単球、単芽球、骨髓単核球、末梢血単核球、ES細胞、iPS細胞を挙げることができる。前記M2マクロファージは、抗炎症性マクロファージとも呼ばれ、CD14陽性の細胞であるマクロファージのうち、ヒトにおいてはCD206、CD163、IL-27RA、CD367、F13A1、又はCCL22を発現する細胞、マウスにおいてはアルギナーゼ1（Arg1）、CD206、iNOS、CD163又はCD204を発現する細胞を挙げることができる。なお、本件変異IL-4RマクロファージA及び後述の本件変異IL

ー 4 R マクロファージ B には、それらを培養して得られた培養物も包含する。

[0026] 上記単球は循環血液中の血球細胞であり、血流から離れて結合組織に入るとマクロファージに分化しうる。上記単球の由来としては、ヒト、サル、マウス等の哺乳動物を挙げることができる。上記単球は、患者から採血した末梢血全血から遠心分離等の公知の手法を用いて末梢血単核球（P B M C s）を分離し、必要に応じて免疫磁気ビーズ法等により精製した単球を用いることができる。かかる単球は、M－C S F等のサイトカインの存在下で培養することで活性化させてマクロファージへと分化させることができる。また上記単球は、公知の手法を用いて骨髓液、E S細胞、i P S細胞等から作製することもできる。

[0027] 上記「本件ポリヌクレオチドを含有する」とは、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞内に本件ポリヌクレオチドを含有していればよく、例えば本件ポリヌクレオチドが発現ベクターに組み込まれた状態で含有することや、本件ポリヌクレオチドが生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞のゲノムに組み込まれた状態で含有することを挙げることができる。

[0028] 本件変異 I L－4 R マクロファージ A を作製する方法としては、本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入する方法を挙げることができる。あるいは、生体内から分離された線維芽細胞等の体細胞に本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを導入し、その後かかる体細胞から i P S細胞を樹立することによっても製造することができる。本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入する方法としては特に制限されないが、ウイルス感染法、カルシウムリン酸法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等の公知の方法を挙げることができ、ウイルス感染法により導入する方法を好適に挙げることができる。

[0029] また、本件変異 I L - 4 R マクロファージ A は、本件ポリヌクレオチドを、公知の遺伝子編集技術を用いて、適切なプロモーターの制御下で発現可能なように、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞のゲノムに組み込むことによって作製してもよい。公知の遺伝子編集技術としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN（転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ）、CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat）-Cas9システム、又はCRISPR-Cas3システム等のエンドヌクレアーゼを用いる技術が挙げられる。適切なプロモーターの制御下で発現可能なようにポリヌクレオチドを細胞ゲノムに組み込む方法としては、適切なプロモーターの下流に機能的に連結した本件ポリヌクレオチド（即ち、当該プロモーターの制御下で発現可能なようにコード配列を連結したポリヌクレオチド）を、細胞ゲノムの非コード領域等に組み込む方法や本件ポリヌクレオチドを、細胞ゲノムの内在性プロモーターの下流に組み込む方法等が挙げられる。

[0030] 本発明の「本件変異 I L - 4 R ポリペプチドを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞」（以下、「本件変異 I L - 4 R マクロファージ B」ともいう）としては、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に本件変異 I L - 4 R ポリペプチド含有していればよく、本件変異 I L - 4 R ポリペプチドの細胞外領域がマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞の細胞外に配置されるようになっていることが好ましい。

[0031] 本件変異 I L - 4 R マクロファージ B を作製する方法としては、上述のように本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入し、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞内で本件変異 I L - 4 R ポリペプチドを発現させる方法を挙げることができる。また、上述の公知の遺伝子編集技術を用いて、内因性の I L - 4 受容体遺伝子を本件変異 I L - 4 R ポリペ

プチドをコードする変異 I L-4 受容体遺伝子配列へと直接編集する方法等を挙げることができる。

[0032] 上記方法で得られたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞は、引き続き、公知の方法による細胞回収、分離、精製を行ってもよい。なお、マクロファージ前駆細胞に本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを導入した場合には、本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを導入後に細胞を培養して、マクロファージを分離、又は精製してもよい。また、シャーレを用いてマクロファージ前駆細胞を培養した場合には、マクロファージに分化するとシャーレに付着して他の細胞は上清に含まれるという性質を利用してマクロファージ前駆細胞とマクロファージを分離、又は精製することができる。

[0033] 本発明の「本件変異 I L-4 R マクロファージと薬理的に許容される添加剤を含む、炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤（以下、「本件炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤」ともいう）としては、本件変異 I L-4 R マクロファージに薬理的に許容される添加剤を含んでいれば特に制限されない。かかる薬理的に許容される添加剤としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、細胞培養培地、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール及びこれらの組合せ、安定剤、可溶化剤及び界面活性剤、緩衝剤及び防腐剤、等張化剤、充填剤、並びに潤滑剤を挙げることができる。

[0034] 上記炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患としては、マクロファージが病態形成に関与する疾患を挙げることができる。上記炎症疾患としては、自己炎症性疾患、自己免疫疾患、膠原病、潰瘍性大腸炎、クローン病、自己免疫性肝炎、脳炎、心筋炎、腎炎、老化に伴い増加する M1 マクロファージ優位の慢性炎症、皮膚炎、皮膚の光老化、眼炎、膵炎、腸炎、糖尿病、アテローム性動脈硬化等の動脈硬化症、血管炎、寄生虫感染症、アレルギー疾患、移植片対宿主病（GVHD）を挙げることができる。また、上記神経変性疾患としては、アルツハイマー病、クロイツフェルトヤコブ病、多発性

硬化症、アミロイドーシス、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症を挙げることができる。さらに、上記虚血性疾患としては、虚血再灌流障害を挙げることができ、脳卒中又は心筋梗塞を挙げることができる。

[0035] 本件炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤は、当業者に既知の方法を用いて、炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の治療を必要とする被験体に投与することができ、投与方法としては、静脈内、腫瘍内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内、髄内、心臓内、関節内、滑液嚢内、頭蓋内、髄腔内、及びくも膜下（髄液）への注射を挙げることができる。

[0036] 投与する本件炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤に含まれる本件変異 I L-4 R マクロファージの量は、炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の種類、位置、重症度、治療を受ける被験体の年齢、体重及び状態等に応じて適宜調整できるが、好ましくは、一回の投与において $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$ 個、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 個、より好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 個を挙げることができる。

[0037] 投与する本件炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤は、1日4回、3回、2回又は1回、1日おき、2日おき、3日おき、4日おき、5日おき、週1回、7日おき、8日おき、9日おき、週2回、月2回、月1回、1カ月おき、又は2カ月おきに独立して投与する方法を挙げることができる。

[0038] なお、本件炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤の投与対象と、本件炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤を製造するために使用されるマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞のドナーとは、同じであっても異なってもよい。すなわち、ドナーと投与対象は一致しても不一致でもよい。さらに、投与対象がヒトの場合において、本件炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤を製造するために使用されるマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞としては、投与対象としての患者本人から採取した自家細胞を用いても、他

人から採取した他家細胞を用いてもよい。なお、他家細胞を用いる場合には、免疫拒絶反応を低減するために、例えば $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2 M$) やヒト白血球抗原 (HLA) 等をゲノム編集技術等の公知の手法により改変してもよい。

[0039] 本発明の「本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを有効成分とする、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへの分化又は分極誘導剤（以下、「本件M2マクロファージへの分化又は分極誘導剤」ともいう）としては、本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを有効成分としていれば特に制限されず、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に上記公知の方法で導入し、必要に応じて所定の培地で培養することによって、マクロファージ又はマクロファージ前駆細胞をM2マクロファージへ分化又は分極することが可能となる。なお、本明細書においてM0マクロファージ以外のマクロファージ前駆細胞からM0マクロファージになるまでの細胞における異なった性質又は機能の獲得のことを分化、M0マクロファージがM1マクロファージ若しくはM2マクロファージになること、M1マクロファージからM2マクロファージになること又はM2マクロファージからM1マクロファージになることを分極という。例えば、骨髓性幹細胞から単球、M0マクロファージを介してM2マクロファージとなる場合には、M0マクロファージになるまでが分化、M0マクロファージからM2マクロファージになるまでを分極という。本件M2マクロファージへの分化又は分極誘導剤は上記薬理学的に許容される添加剤を含んでもよい。かかる本件M2マクロファージへの分化又は分極誘導剤は、本件ポリヌクレオチドが上記発現ベクターに組み込まれていてもよい。

[0040] 本発明の「本件ポリヌクレオチドを生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入することを特徴とする、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへの分化又は分極誘導方法」としては、本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベク

ターを生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入し、必要に応じて所定の培地で培養すればよく、本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターは本件変異 I L-4 R マクロファージを作製する方法に記載と同様の方法でマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入することが可能である。

[0041] 本発明の別の態様 1 として、1) 本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞を、炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療に必要とする患者に投与することを特徴とする、炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療や、2) 炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤として使用するための、本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞や、3) 本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞の、炎症疾患、神経変性疾患、若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤の調製における使用を挙げることができる。

[0042] 本発明の別の態様 2 として、1) M2 マクロファージへの分化又は分極誘導剤として使用するための、本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターや、2) 本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターの、M2 マクロファージへの分化又は分極誘導剤の調製における使用を挙げることができる。

[0043] 本発明の別の態様 3 として、上記本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを備えている、M2 マクロファージへの分化又は分極誘導剤を作製するためのキットを挙げることができ、かかるキットとしては、上記本件ポリヌクレオチド又は本件発現ベクターを備えていれば特に制限されず、M2 マクロファージへの分化又は分極誘導剤を作製するための説明書や、本件ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターをマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入するために用いる試薬を含んでいてもよい。

[0044] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範

囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[0045] [実施例1] (ヒトIL-4受容体を発現する細胞株の作製)

配列番号1に示すヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、242番目のイソロイシンをアスパラギンに置換(1242N)したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列(1242N変異ヒトIL-4受容体:配列番号2)をコードするポリヌクレオチド(配列番号3)をVector builder社に委託して作製した。次に、作製した1242N変異ヒトIL-4受容体をコードする上記ポリヌクレオチドを、レンチウイルスを用いてマウスマクロファージ不死化細胞株であるRAW264.7細胞(n=4:ケー・エー・シー社製)又はヒト単球由来の細胞株であり、活性化するとマクロファージに分化するTHP-1細胞(n=3 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB細胞バンクより購入)に導入した。コントロールの細胞として、1242N変異ヒトIL-4受容体の代わりに赤色蛍光タンパク質であるmCherry又は緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするポリヌクレオチドを上記と同様に導入した細胞を作製した。

[0046] それぞれのポリヌクレオチドを導入した上記細胞を、RAW264.7細胞はRAW培地(10%FBS(Fetal Bovine Serum)含有のDMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium))、THP-1細胞はTHP培地(2mM Glutamine、10%FBS含有のRPMI1640(Roswell Park Memorial Institute medium社))により、37℃、CO₂ 5%で培養した。THP-1細胞は250nM ホルボール12-ミリスタート13-アセタート(Phorbol 12-myristate 13-acetate: PMA)を含むTHP培地で24時間培養し、マクロファージへと分化させたのち、PMAを除いたTHP培地でさらに2日間培養した。その後、それぞれ細胞を回収し、トータルRNAをTrizol試薬(Invitrogen社)により単離し、cDNAを合成した後、IL-4受容体及びヒトGAPDH又はマウスGapdh(内部標準)の発現をリアルタイムPCR法によって確認した。リアルタイムPCR法においては、以下の表1に記載のプライマーを用

いた。なお、配列番号4に記載のhIL-4R フォワードプライマー及び配列番号5に記載のhIL-4R リバースプライマーによって野生型の配列番号1に示すヒトIL-4受容体のアミノ酸配列及び配列番号2に示すヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（I242N変異ヒトIL-4）のいずれも増幅可能である。

[0047] [表1]

配列番号	配列名	配列
4	hIL-4R forward primer	TTGCCCTGTTTGTGGAGCA
5	hIL-4R reverse primer	GGGACCATGCTGATTTTGG
6	mouse Gapdh forward primer	GGGATCTTCTTGTGGAGTG
7	mouse Gapdh reverse primer	ATGAAGGGTCTTTGATGTC
8	human GAPDH forward primer	CCAGCAAGAGCAAGAGGA
9	human GAPDH reverse primer	GAGATTCAGTGTGGTGGGG

[0048] 結果を図1に示す。図1中、上段がmCherryをコードするポリヌクレオチドを導入したRAW264.7細胞（mCherry RAW264.7細胞）及びI242N変異ヒトIL-4受容体をコードするポリヌクレオチドを導入したRAW264.7細胞（mut__IL-4R RAW264.7細胞）の結果である。また、図1中、下段がGFPをコードするポリヌクレオチドを導入したTHP-1細胞（GFP THP-1細胞）及びI242N変異ヒトIL-4受容体をコードするポリヌクレオチドを導入したTHP-1細胞（mut__IL-4R THP-1細胞）の結果である。また、縦軸はコントロールのmCherry RAW264.7細胞又はGFP THP-1細胞におけるIL-4受容体発現量を1とした場合の相対変異ヒトIL-4受容体発現量である。発現量はヒトGAPDH又はマウスGapdhで補正し、Unpaired T-testにて検定した。

[0049] 図1上段に示すように、mut__IL-4R RAW264.7細胞ではヒトIL-4受容体が発現しており、レンチウイルスで導入したI242N変異ヒトIL-4受容体が発現していることを確認した。また、図1下段に示すように、mut__IL-4R THP-1細胞ではコントロールと比して、ヒトIL-4受容体の発現が増加しており、レンチウイルスで導入したI242N変異ヒトIL-4受容体が発現していることを確認した。

[0050] [実施例2] (I 2 4 2 N変異ヒトIL-4受容体を発現する細胞におけるM2マクロファージマーカーArg1又はCD206の発現)

実施例1で作製した細胞のM2マクロファージへの分化又は分極を、マウスのM2マクロファージマーカーであるArg1やヒトのM2マクロファージマーカーであるCD206の発現によって調べた。具体的な手法は以下のとおりである。

[0051] 実施例1と同様に、野生型のヒトIL-4受容体をコードするポリヌクレオチドをRAW264.7細胞に導入してWT__IL-4R RAW264.7細胞を作製した。次に、実施例1で作製したmCherry RAW264.7細胞 (n=4)、mut__IL-4R RAW264.7細胞 (n=4)、mCherry THP-1細胞 (n=3)、mut__IL-4R THP-1細胞 (n=3) の4種類及びWT__IL-4R RAW264.7細胞 (n=4) を37℃、CO₂ 5%で3日間培養し、細胞を回収してRNAを抽出した。次に、リアルタイムPCR法によってArg1の発現及びCD206の発現を調べた。なお、mCherry RAW264.7細胞、mut__IL-4R RAW264.7細胞及びWT__IL-4R RAW264.7細胞はRAW培地により培養し、mCherry THP-1細胞及びmut__IL-4R THP-1細胞はTHP細胞で培養した (3日間のうち最初の24時間はPMAを含有)。リアルタイムPCR法においては、以下の表2に記載のプライマーを用いた。

[0052] [表2]

配列番号	配列名	配列
6	mouse Gapdh forward primer	CCGCATCTTTTGTGCACTG
7	mouse Gapdh reverse primer	ATGAGGGGTCGTTGATGGC
8	human GAPDH forward primer	CCAGCAAGAGCACAAGAGGA
9	human GAPDH reverse primer	GAGATTGAGTGTGGTGGGGG
10	Arg1 forward primer	ACAAGACAGGGGTCCTTTGAG
11	Arg1 reverse primer	CGTTGAGTTGCGAAGCAAGC
12	CD206 forward primer	GACGTGTGCACCTACCTCAA
13	CD206 reverse primer	CCTGGGCTTGACTGACTGTT

[0053] 結果を図2に示す。発現量はヒトGAPDH又はマウスGapdhで補正し、RAW264.7細胞は1-way ANOVAで検定し、THP-1

細胞はUnpaired T-testで検定した。

[0054] 図2に示すように、コントロールのmCherry RAW264.7細胞やWT__IL-4R RAW264.7細胞ではArg1の発現が低値であったが、mut__IL-4R RAW264.7細胞ではArg1がコントロールのmCherry RAW264.7細胞と比べて5.9倍、WT__IL-4R RAW264.7細胞と比べて2.8倍発現していた。同様に、コントロールのGFP THP-1細胞ではCD206の発現が低値であったが、mut__IL-4R THP-1細胞ではCD206が上記コントロールの細胞と比較して1.3倍も発現していた。したがって、1242N変異ヒトIL-4受容体を発現させることによって、マクロファージ前駆細胞がM2マクロファージへ分化及び／又は分極することが明らかとなった。

[0055] [実施例3] (1242N変異ヒトIL-4受容体を発現する細胞におけるM1マクロファージ誘導の抑制)

M1マクロファージへ誘導する液性因子であるリポポリサッカライド(LPS)を作用させた場合に、mut__IL-4R RAW264.7細胞から分極したM2マクロファージがM1マクロファージへ分極せずにM2マクロファージとして維持しているかどうかをArg1及びM1マクロファージマーカーである腫瘍壊死因子(TNF α)の発現によって調べた。具体的な手法は以下のとおりである。

[0056] mut__IL-4R RAW264.7細胞(n=4)及びコントロールのmCherry RAW264.7細胞(n=4)をLPS(1ng/mL含有RAW培地又はコントロールとしてLPS未含(Basal))のRAW培地により37℃、CO₂ 5%で3日間培養し、細胞を回収してRNAを抽出した。次に、リアルタイムPCR法によってTNF α の発現及びArg1の発現を調べた。リアルタイムPCR法においては、以下の表3に記載のプライマーを用いた。

[0057]

[表3]

配列番号	配列名	配列
6	mouse Gapdh forward primer	GGCCATCTTCTTGTGCAGTG
7	mouse Gapdh reverse primer	ATGAAGGGGTGGTTGATGGC
10	Arg1 forward primer	ACAAGAGAGGGGCTCCTTTGAG
11	Arg1 reverse primer	GGTTGAGTTCCGAAGCAAGC
14	TNF α forward primer	TAGCCCACTCGTAGCAAAAC
15	TNF α reverse primer	CTTTGAGATCCATGCGGTGG

[0058] 結果を図3に示す。発現量はヒトGAPDH又はマウスGapdhで補正し、Unpaired T-testにて検定した。

[0059] 図3から明らかなように、コントロールのmCherry RAW264.7細胞ではLPSに作用させることによってM1マクロファージマーカーのTNF α の発現が増加しているが、mut__IL-4 RAW264.7細胞ではLPSに作用させてもTNF α の発現がほとんど増加していなかった。また、mut__IL-4 RAW264.7細胞ではLPSに作用させてもM2マクロファージマーカーのArg1の発現がLPSに作用させていないBasal（LPSなしのコントロール）と有意差が無く、Arg1発現の低下を認めなかった。

[0060] 図2、図3の結果から、I242N変異ヒトIL-4受容体を発現させることで、マクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへ分化及び／又は分極されること、あるいはM1マクロファージがM2マクロファージへと分極されること、及びM1マクロファージへ誘導する液性因子の存在下でもM1マクロファージに分極せずにM2マクロファージとして維持可能であることが明らかとなった。

[0061] [実施例4]（I242N以外のヒトIL-4受容体におけるM2マクロファージへの分極）

実施例1～3では、配列番号2に示す242位の変異を用いたが、コントロールのGFP及び以下の(1)～(10)の242位以外の他の変異におけるマクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへの分化及び／又は分極作用をArg1の発現によって調べた。Arg1の発現は実施例2と同様の方法で行った。すなわち、GFP又は以下の(1)～(10)をコードす

るポリヌクレオチドをPrimeSTAR（登録商標）Mutagenesis Basal Kit（TAKARA社）により作製し、それぞれRAW264.7細胞（ $n=3$ ）に導入してRAW培地により37℃、CO₂ 5%で3日間培養し、細胞を回収してRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によってArg1の発現を調べた。

[0062] (1) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、37番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（D37N変異ヒトIL-4受容体：配列番号16）

(2) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、62番目のチロシンをシステインに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（Y62C変異ヒトIL-4受容体：配列番号17）

(3) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、78番目のアスパラギンをチロシンに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（N78Y変異ヒトIL-4受容体：配列番号18）

(4) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、115番目のフェニルアラニンをロイシンに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（F115L変異ヒトIL-4受容体：配列番号19）

(5) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、176番目のアスパラギンをセリンに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（N176S変異ヒトIL-4受容体：配列番号20）

(6) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、200番目のアルギニンをトリプトファンに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（R200W変異ヒトIL-4受容体：配列番号21）

(7) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、242番目のイソロイシンをアスパラギン酸に置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（I242D変異ヒトIL-4受容体：配列番号22）

(8) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、251番目のシステインをトリプトファンに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列（C

251W変異ヒトIL-4受容体：配列番号23)

(9) ヒトIL-4受容体のアミノ酸配列において、308番目のリシンをアスパラギンに置換したヒトIL-4受容体の変異アミノ酸配列(K308N変異ヒトIL-4受容体：配列番号24)

[0063] 結果を図4に示す。発現量はヒトGAPDH又はマウスGapdh補正し、Unpaired T-testにて検定した。

[0064] 図4に示されるように、D37N変異ヒトIL-4受容体、Y62C変異ヒトIL-4受容体、N78Y変異ヒトIL-4受容体、F115L変異ヒトIL-4受容体、N176S変異ヒトIL-4受容体、R200W変異ヒトIL-4受容体、I242D変異ヒトIL-4受容体、C251W変異ヒトIL-4受容体、K308N変異ヒトIL-4受容体を発現させることでArg1の発現が増加していた。すなわち、I242N変異ヒトIL-4受容体以外の本件変異IL-4Rポリペプチドを含有しても、M2マクロファージへ分化又は分極できることが明らかとなった。

[0065] [実施例5] (M2マクロファージの持続)

I242N変異ヒトIL-4受容体を発現する細胞において、M2マクロファージとしての特徴をどの程度の間維持できるかをArg1の発現を指標として調べた。

[0066] マウス骨髄細胞を公知の手法で採取後、M-CSF (20 ng/ml) を添加した培養液で5日間培養し、骨髄由来マクロファージ(BMDM)に分化させた。その後、M-CSF (20 ng/ml) 存在下で、実施例1と同様に、I242N変異ヒトIL-4受容体をコードするポリヌクレオチド若しくはコントロール(GFPをコードするポリヌクレオチド)を、レンチウイルスを用いて上記BMDMへ導入し、48時間培養後にBMDMを回収して保存した。それぞれのBMDMをIL-4 (100 pg/ml) で24時間刺激してM2マクロファージに分極させた後に1週間そのまま培養し、M2マクロファージマーカーであるArg1の発現をリアルタイムPCRで解析した。結果を図5に示す。横軸は培養日数(IL-4で24時間刺激した

後をDay 0とする)、縦軸はコントロールのDay 0におけるArg 1の発現量を1とした場合のArg 1の相対発現量である。発現量はマウスGapdhで補正した(N=3)。

[0067] コントロールのIL-4刺激のみでM2マクロファージに分極させたBMDM(細胞)は、Day 3にはArg 1の発現が低下するのに対し、IL242N変異ヒトIL-4受容体を発現する細胞はDay 7(1週間後)もArg 1の発現が継続していた。したがって、本件変異IL-4Rポリペプチドを含有すれば、M2マクロファージへ分化又は分極し、その後M2マクロファージとして少なくとも1週間は維持できることが明らかとなった。従来の方法では、M2マクロファージが体内に入ると、数日でその機能を失うため、治療効果は限定的であった。一方、本発明で作製したM2マクロファージは長期間M2マクロファージとしての機能を維持できるため、炎症性疾患、神経変性疾患、及び虚血性疾患に対する高い治療効果が期待される。

[0068] [実施例6] (IL-10の分泌)

本件変異IL-4Rポリペプチドを発現するM2マクロファージにおける抗炎症作用の確認のため、強力な抗炎症性サイトカインであるIL-10の分泌を調べた。実施例1と同様に、IL242N変異ヒトIL-4受容体若しくはコントロール(GFPをコードするポリヌクレオチド)をコードするポリヌクレオチドを、レンチウイルスを用いてRAW264.7細胞に導入して安定発現細胞株を作製した。次に、培養皿へそれぞれの細胞株を播種して24時間培養した。培養後の上清を回収し、上清に含まれるIL-10をELISA法によって解析した。Unpaired T-testにて検定(N=3)した。結果を図6に示す。

[0069] 図6から明らかなように、本件変異IL-4Rポリペプチドを含有すれば、IL-10の発現がコントロールと比較して4倍以上増加していた。したがって、本件変異IL-4Rポリペプチドを含有するM2マクロファージは、抗炎症作用を有することが確認された。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明は、炎症疾患、創傷治癒、神経変性疾患、及び虚血性疾患に対するバイオ医薬品として利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] ヒトインターロイキン4（ヒトIL-4）受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチド。
- [請求項2] 以下の（1-1）又は（1-2）である、請求項1記載のポリペプチド。
- （1-1）ヒトインターロイキン4受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号1に示すアミノ酸配列において、37番目のアスパラギン酸、62番目のチロシン、78番目のアスパラギン、115番目のフェニルアラニン、176番目のアスパラギン、200番目のアルギニン、242番目のイソロイシン、251番目のシステイン、及び／又は308番目のリシンが置換したポリペプチド；
- （1-2）配列番号1に示すアミノ酸配列において、上記（1-1）において置換した37番目、62番目、78番目、115番目、176番目、200番目、242番目、251番目及び／又は308番目以外のアミノ酸において1又は数個のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したポリペプチドを含み、かつ、ホルボール12-ミリストート13-アセタートで刺激したTHP-1細胞、若しくはRAW264.7細胞で発現した場合に、当該ポリペプチドを発現していない場合と比較してヒトM2マクロファージマーカーの発現を増加するポリペプチド。
- [請求項3] 配列番号1に示すアミノ酸配列において、37番目のアスパラギン酸、62番目のチロシン、78番目のアスパラギン、115番目のフェニルアラニン、176番目のアスパラギン、200番目のアルギニン、242番目のイソロイシン、251番目のシステイン、及び／又は308番目のリシンが置換したポリペプチドが、以下の（2-1）～（2-9）のいずれかである、請求項2記載のポリペプチド。
- （2-1）配列番号1に示すアミノ酸配列において、37番目におけ

るアスパラギン酸が中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－２）配列番号１に示すアミノ酸配列において、６２番目におけるチロシンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－３）配列番号１に示すアミノ酸配列において、７８番目におけるアスパラギンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－４）配列番号１に示すアミノ酸配列において、１１５番目におけるフェニルアラニンが中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－５）配列番号１に示すアミノ酸配列において、１７６番目におけるアスパラギンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－６）配列番号１に示すアミノ酸配列において、２００番目におけるアルギニンが中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－７）配列番号１に示すアミノ酸配列において、２４２番目におけるイソロイシンが酸性アミノ酸又は中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－８）配列番号１に示すアミノ酸配列において、２５１番目におけるシステインが中性非極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

（２－９）配列番号１に示すアミノ酸配列において、３０８番目におけるリシンが中性極性アミノ酸へ置換したポリペプチド；

[請求項４] ヒトインターロイキン４受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号１に示すアミノ酸配列において、２４２番目のイソロイシンが置換したポリペプチドであることを特徴とする請求項２記載のポリペプチド。

[請求項５] ヒトインターロイキン４受容体に由来するポリペプチドであって、配列番号１に示すアミノ酸配列において、２４２番目のイソロイシンがアスパラギンへ置換したポリペプチドであることを特徴とする請求項４記載のポリペプチド。

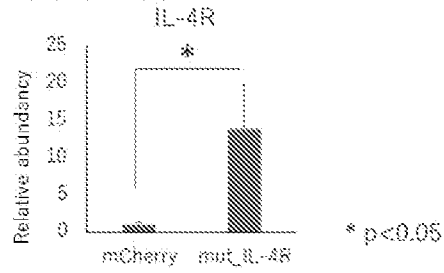
[請求項６] 請求項１～５のいずれか記載のポリペプチドをコードするポリヌクレ

オチド。

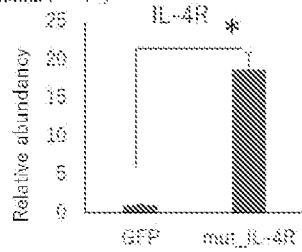
- [請求項7] 請求項6記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。
- [請求項8] 請求項6記載のポリヌクレオチド又は請求項7記載の発現ベクターを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞。
- [請求項9] 請求項1～5のいずれか記載のポリペプチドを含有する、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞。
- [請求項10] 請求項8又は9記載のマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞と薬理学的に許容される添加剤を含む、炎症疾患、神経変性疾患若しくは虚血性疾患の予防又は治療剤。
- [請求項11] 請求項6記載のポリヌクレオチド又は請求項7記載の発現ベクターを有効成分とする、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへの分化又は分極誘導剤。
- [請求項12] 請求項6記載のポリヌクレオチド又は請求項7記載の発現ベクターを生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞に導入することを特徴とする、生体から分離されたマクロファージ又はマクロファージ前駆細胞からM2マクロファージへの分化又は分極誘導方法。

[図1]

RAW264.7細胞(マウス)

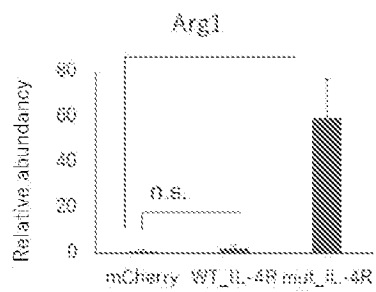


THP-1細胞(ヒト)

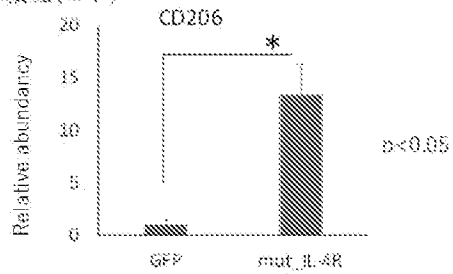


[図2]

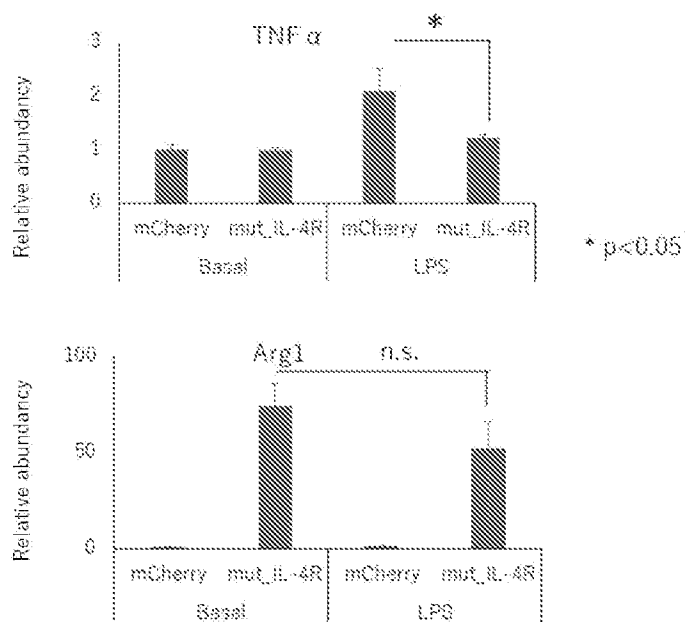
RAW264.7細胞(マウス)



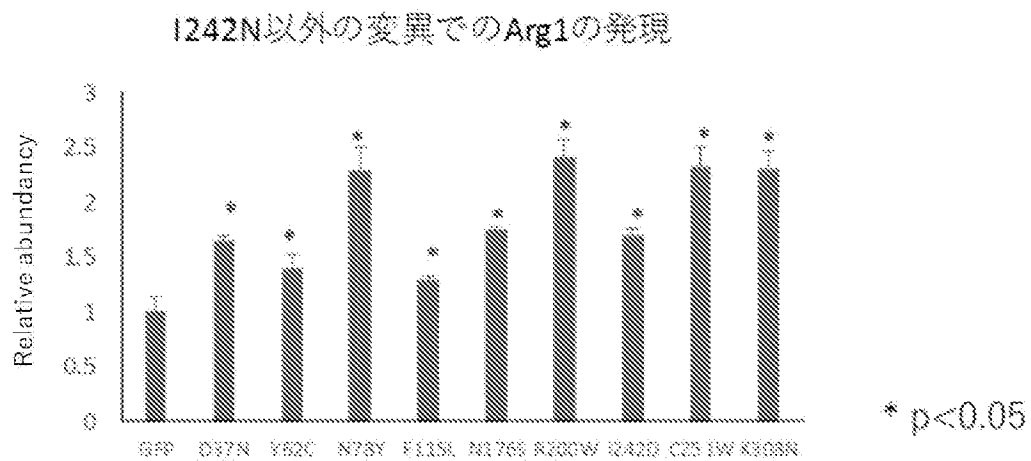
THP-1細胞(ヒト)



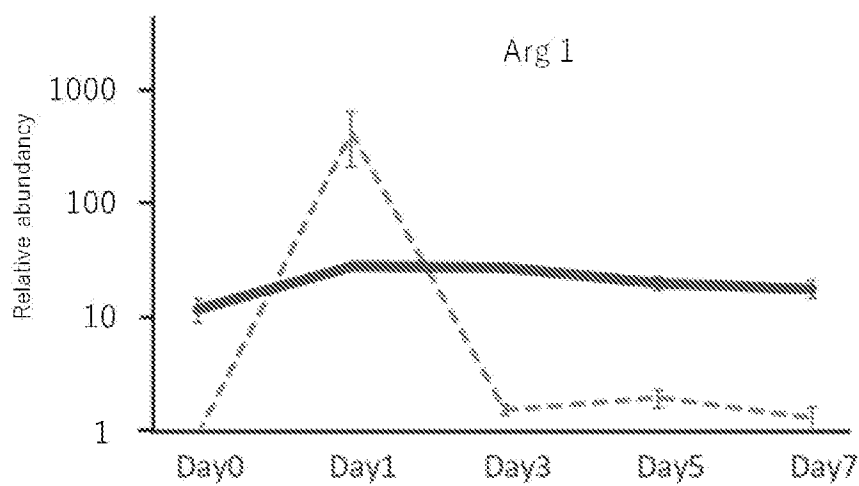
[図3]



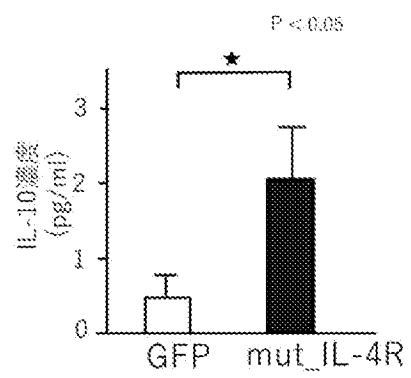
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/004780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/63(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/24(2006.01)i

FI: C12N15/63 Z; C12N15/24; C12N5/10; A61P9/00; A61P25/00; A61P29/00; A61K35/12; C07K14/705 ZNA

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)

C12N15/63; A61K35/12; A61P9/00; A61P25/00; A61P29/00; C07K14/705; C12N5/10; C12N15/24

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN) JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VI GANO, Elena et al., "Somatic IL4R mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma lead to constitutive JAK-STAT signaling activation", Blood, 03 May 2018, vol. 131, no. 18, pp. 2036-2046 page 2036, Abstract, page 2037, IL4R expression, site-directed mutagenesis, reporter gene assay in HEK293-STST6 cells, fig. 1B	1-7
Y		8-12
X	VIGANO, Elena et al., "Recurrent IL4R Somatic Mutations in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Lead to an Altered Gene Expression Profile and Changes in Tumor Microenvironment Composition", Blood, 29 November 2018, vol. 132, supplement 1, p. 669 entire text	1, 6-7, 9
Y		8-12
A		2-5



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
03 March 2021 (03.03.2021)

Date of mailing of the international search report
30 March 2021 (30.03.2021)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/004780

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-532073 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 02 October 2002 (2002-10-02) example 5	1, 6-7 2-5, 8-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/004780

Patent Documents
referred in the
Report

Publication
Date

Patent Family

Publication
Date

JP 2002-532073 A

02 Oct. 2002

WO 2000/034789 A2
example 5
US 6379890 B1
EP 1137947 A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/63(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/24(2006.01)i FI: C12N15/63 Z; C12N15/24; C12N5/10; A61P9/00; A61P25/00; A61P29/00; A61K35/12; C07K14/705 ZNA		
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）） C12N15/63; A61K35/12; A61P9/00; A61P25/00; A61P29/00; C07K14/705; C12N5/10; C12N15/24		
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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN) JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	VIGANO, Elena et al., Somatic IL4R mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma lead to constitutive JAK-STAT signaling activation, Blood, 2018.05.03, Vol.131, No.18, p.2036-2046 p.2036 Abstract, p.2037 IL4R expression, site-directed mutagenesis, reporter gene assay in HEK293-STST6 cells, Fig1B	1-7
Y		8-12
X	VIGANO, Elena et al., Recurrent IL4R Somatic Mutations in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Lead to an Altered Gene Expression Profile and Changes in Tumor Microenvironment Composition, Blood, 2018.11.29, Vol.132, Supplement1, p.669 全文	1,6-7,9
Y		8-12
A		2-5
☒ 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、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 03.03.2021		国際調査報告の発送日 30.03.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 坂井田 京 4B 1150 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2002-532073 A (チルドレンズ ホスピタル メディカル センター) 02.10.2002 (2002 - 10 - 02)	1, 6-7
A	実施例 5	2-5, 8-12

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際出願番号
PCT/JP2021/004780

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2002-532073	A	02.10.2002	W0	2000/034789	A2	
				Example5			
				US	6379890	B1	
				EP	1137947	A2	
<hr/>							