

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5294635号
(P5294635)

(45) 発行日 平成25年9月18日(2013.9.18)

(24) 登録日 平成25年6月21日(2013.6.21)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 K	35/30	(2006.01)	A 6 1 K	35/30
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00

1 O 7

請求項の数 11 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-542516 (P2007-542516)
(86) (22) 出願日	平成17年11月29日 (2005.11.29)
(65) 公表番号	特表2008-521796 (P2008-521796A)
(43) 公表日	平成20年6月26日 (2008.6.26)
(86) 國際出願番号	PCT/IL2005/001275
(87) 國際公開番号	W02006/057003
(87) 國際公開日	平成18年6月1日 (2006.6.1)
審査請求日	平成20年12月1日 (2008.12.1)
審判番号	不服2012-22350 (P2012-22350/J1)
審判請求日	平成24年11月12日 (2012.11.12)
(31) 優先権主張番号	60/631,163
(32) 優先日	平成16年11月29日 (2004.11.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/690,498
(32) 優先日	平成17年6月15日 (2005.6.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	591015175 イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド イスラエル国レホボト ピー オー ポツクス 95
(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(72) 発明者	エイゼンバッハ - シュワルツ、ミカル イスラエル国、レホボト、シムタ ヘイ4、ニュー ワイズマン ハウジング フォー サイエンティスツ
(72) 発明者	アルノン、ルース イスラエル国、レホボト、ベイト カーン 22、ザ ワイズマン インスチチュート オブ サイエンス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】コポリマー1と組み合わせた、神経発生の誘発及び幹細胞治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経幹細胞又は神経前駆細胞の移植による幹細胞治療と組み合わせて、中枢神経系(CNS)の傷害、疾患、障害、又は病状を治療するための薬剤組成物を調製するための、コポリマー1の使用。

【請求項 2】

前記CNSの傷害が、脊髄損傷、閉鎖性頭部外傷、鈍的外傷、穿通性外傷、出血性脳卒中、虚血性発作、脳虚血、視神経障害、心筋梗塞、及び腫瘍切除により引き起こされる傷害からなる群から選択される、請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記疾患、障害、又は病状が、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、又は筋萎縮性側索硬化症(ALS)である、請求項1に記載の使用。

【請求項 4】

前記薬剤組成物は、個体に、該個体への前記細胞の移植の前に、それと同時に、又はその後に投与される、請求項1から3の何れか1項に記載の使用。

【請求項 5】

前記薬剤組成物は、前記細胞の移植と同時に投与される、請求項4に記載の使用。

【請求項 6】

コポリマー1を含む、神経幹細胞又は神経前駆細胞の移植による幹細胞治療と組み合わせて、中枢神経系(CNS)の傷害、疾患、障害、又は病状を治療するための薬剤組成物

。

【請求項 7】

コポリマー-1と組み合わせて、中枢神経系(CNS)の傷害、疾患、障害、又は病状を治療するための、神経幹細胞又は神経前駆細胞を含む薬剤組成物。

【請求項 8】

前記CNSの傷害が、脊髄損傷、閉鎖性頭部外傷、鈍的外傷、穿通性外傷、出血性脳卒中、虚血性発作、脳虚血、視神経障害、心筋梗塞、及び腫瘍切除により引き起こされる傷害からなる群から選択される、請求項6又は7に記載の薬剤組成物。

【請求項 9】

前記疾患、障害、又は病状が、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、又は筋萎縮性側索硬化症(ALS)である、請求項6又は7に記載の薬剤組成物。 10

【請求項 10】

個体に、該個体への前記細胞の移植の前に、それと同時に、又はその後に投与される、請求項7から9の何れか1項に記載の薬剤組成物。

【請求項 11】

前記細胞の移植と同時に投与される、請求項10に記載の薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、内因性の神経発生及び/又はオリゴデンドロジェネシスを、誘発及び/又は増強するための、並びに、特に中枢神経系(CNS)又は末梢神経系(PNS)に関連する傷害、疾患、障害、又は病状における幹細胞治療のための、特にコポリマー-1を用いる方法及び組成物に関する。

【0002】

略語：A - アミロイド；AD、アルツハイマー病；BDNF、脳由来神経栄養因子；BMS、Basso運動スコア；Brdu、5'-プロモ-2'-デオキシウリジン；CFA、完全フロイントンアジュバント；CNS、中枢神経系；Cop1、コポリマー-1、GAに同じ；DCX、ダブルコルチン；DG、歯状回；EAE、実験上の自己免疫性脳脊髄炎；EGF、上皮成長因子；FCS、ウシ胎児血清；FGF、線維芽細胞成長因子；i.c.v.、脳室内の；GA、酢酸グラチラマー；GFAP、グリア線維性酸性タンパク質；GFP、緑色蛍光タンパク質；IB4、イソレクチンB4；IFA、不完全フロイントンアジュバント；IGF-I、インスリン様成長因子1；IFN、インターフェロン；IL、インターロイキン；LPS、リポ多糖；MBP、ミエリン塩基性タンパク質；MG、ミクログリア；MHC-II、クラスII主要組織適合複合体分子；MOG、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質；MS、多発性硬化症；MWM、モーリス水迷路；NeuN、ニューロンの核抗原；NPC、神経幹/前駆細胞；OB、嗅球；PBS、リン酸緩衝食塩水；PDL、ポリ-D-リシン；PNS、末梢神経系；RMS、吻側細胞移動路；SCI、脊髄損傷；SGZ、顆粒細胞下帯；SVZ、脳室下帯；TGF-、トランスクォーミング成長因子-、TNF、腫瘍壊死因子。 30

40

【背景技術】

【0003】

中枢神経系(CNS)の細胞の修復能力は限られているので、CNSは細胞死又は部分的な損傷をもたらす発作に特に弱い。損傷を受けた脳組織は再生しないので、残りの無傷の脳から修復が生じなければならない。

【0004】

CNSにおける急性の発作又は慢性の変性障害からの回復が悪いのは、神経発生がなく、傷害を受けた神経の再生が限られており、変性の状態に特に脆弱であるためである。神経発生がないことは、生後すぐにCNSは永久に安定な状態に到達し、脳の複雑な組織回路の平衡を維持する必要があるという仮定によって説明された。しかし、過去10年間の 50

研究で、脳は、限られた程度ではあるが、生涯を通して神経発生することができる事が示された (Morsheadら、1994年)。炎症を起こした脳では、神経発生は阻止される (Ekdaleら、2003年; Monjeら、2003年)。この後者の発見は、CNSにおける局所の免疫細胞は神経発生に有害作用があるという、伝統的な見解を強化するものであった。同様に、炎症状態下又は急性発作後では、CNSニューロンの再生が限られ、過剰に脆弱であることは、CNSが、局所の炎症、及び、例えば腫瘍壞死因子 (TNF) - 又は一酸化窒素が媒介する細胞毒性にしばしば関連する、免疫由来の防御的な活性に耐える能力に乏しいことによる (Merrillら、1993年)。しかし、より最近の研究では、非制御の局所の免疫反応は実際に神経の生存を損ない、修復プロセスを阻止するが、適切に制御されている局所の免疫反応は生存を支え、修復を促進することができる事が示されている (Haubensら及びSchwartz、2003年; Schwartzら、2003年)。CNSに対する傷害の後では、末梢の適応免疫のプロセス (CD4⁺ヘルパーT細胞が病変部位にある自己抗原に対して向けられる) により時間、空間及び強度の点で良く制御されている局所の免疫反応が、外傷後のニューロンの生存及び修復に決定的な必要用件であることがさらに示された (Moalemら、1999年; Butovskyら、2001年; Schwartzら、2003年; Shakedら、2004年)。これらの結果及び他の結果により、本発明者のMoalemら及び同僚らは、保護的な自己免疫の概念を構築するに至った (Moalemら、1999年)。

【0005】

神経発生は、限られた程度であるが、生涯を通して成年個体で起こる。新規に形成された細胞のほとんどは、増殖後最初の2~3週間以内に死滅し、ほんの少数が成熟ニューロンとして生存する。成人の脳におけるニューロンの幹/前駆細胞 (NPC) の存在の根底を成すメカニズムについて、並びにこれらの細胞の量が限られており、ある部位に制限されている理由は、あまり知られていない。さらに、内因性のNPCプールからの神経発生が生理学的にどのように増大することができるかについては、ほとんど知られていない。成人個体において、このような幹細胞を存在させ、増殖させ、分化させる要因についての知見は、CNS修復伝導性の条件を理解し、促進するための必要条件である。これは、次に、内因性の幹細胞プールからの、又は外因性に適用される幹細胞からの神経細胞の再生を高めることを狙いとした介入の開発をもたらすことが期待され得る。

【0006】

本発明者らの研究室におけるラット及びマウスモデルでの実験では、特異的に活性化した血液由来のマクロファージ (Rapalinoら、1998年) 又は樹状細胞 (Haubensら、2003年) を十分に制御して移植すると、脊髄損傷 (SCI) からの回復を促進することが示されていた。他の研究で、病変部位にあるCNS抗原に反応性の自己免疫T細胞の活性を良好に制御すると、軸索の侵襲からの回復を促進できることが示された (Haubensら、2000年; Moalemら、1999年)。特にCNS関連の自己抗原に対するT細胞が媒介する神経保護は、CNS傷害に対する身体の生理学的反応であることも示された (Yolesら、2001年a、2001年b)。

【0007】

成人の脳における通常の条件下では、新しいニューロンは、側脳室の脳室下帯、及び海馬の歯状回の顆粒細胞下帯の、神経原性のニッチで形成される (Kempermannら、2004年)。病理学的条件下では、非神経原性の脳の部位において、ある程度の神経発生も誘発され得る。例えば、いくつかの研究では、動物ではCNSへの傷害後に、内因性のNPCが動員され、内因性のNPCは傷害の部位でニューロン及びグリアへの分化を経験することができる (Nakatomiら、2002年; Imitola、2004年a)。しかし、内因性の前駆体からの、傷害により誘発された細胞の再生は、程度が限られており、損傷を受けた組織を完全に交換するのに十分ではない。この欠点を克服するために、科学者たちは、現在、培養した成人のNPC (aNPC) を移植することにより回復を促進するための方法を模索している (McDonaldら、2004年)。外因性の

10

20

30

40

50

a N P C は、傷害を受けた C N S において新しいニューロン及びグリアの源として作用することにより (Cummingsら、2005年; Lepore及びFischer、2005年) 、或いは、直接的又は間接的に神経保護 (Luら、2005年) 及び内因性の幹細胞のプールからの神経発生 (Enzmannら、2005年) を促進する因子を分泌することにより、回復に貢献し得る。

【0008】

現在の意見は、神経発生が成人の脳で存続することに一致しており、この場合、これは傷害後の修復及び回復に貢献することができる。脳虚血 (Jinら、2003年) 、アボトーシス (Magaviら、2000年) 、又は自己免疫性の炎症性脱髓 (Picard-Rieraら、2002年) などの脳の発作は、神経発生を増強する。10 したがって、側脳室の海馬門部及び脳室下帯 (SVZ) に位置する多能性細胞により、病理学的状態における増殖及び遊走の増大が明らかになる。さらに、吻側細胞移動路 (RMS) を通って嗅球 (OB) へ遊走する SVZ からの前駆細胞は、星状細胞及びニューロンへの分化を引き起こすことができる (Picard-Rieraら、2004年) 。それでも、損傷を埋め合わせる機能的なニューロンを再生することができないので、CNSの病理における自己神経発生の治療的意義は限られている。

【0009】

多発性硬化症 (MS) 及びその動物モデルの実験上の自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) では、免疫系が、自己免疫性の炎症性のメカニズムにより有害なプロセスを引き起こす (Hellingら、2002年; Behiら、2005年) 。それでも、疾患の発症時に始まり、代償性のCNS源が消耗した場合に表れるニューロン及び軸索の変性は、特にミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 誘発性モデルにおける、不可逆性の神経学的能力障害の (Bjartmarら、2003年) 主な決定要因である (Hobomら、2003年) 。MSに対する現在の処置は、免疫の炎症プロセスを回復させるのに効果的であるが、内在性のCNS修復メカニズムを増強し、効果的な神経保護及び神経発生を誘発するその能力は示されていなかった。20

【0010】

CNS損傷を処置するための可能な取組みには、成人の神経幹細胞又はあらゆるタイプの幹細胞の使用が含まれる。成人の神経幹細胞は、自己複製の能力を有する成熟した哺乳動物の脳に存在する前駆体細胞であり、適切な刺激を与えると、脳のニューロン、星状細胞、及びオリゴデンドロサイトに分化することができる。幹細胞（他の組織からの）は、古典的には多能性と定義されており、自己再生し、増殖し、複数の様々な表現型の系列に分化する能力がある。造血幹細胞は、可能性が同等の娘細胞を生成するほかに、少なくとも1つの主要な造血性の系列の細胞を生じることができる幹細胞と定義されている。3つの主要な血液細胞の系列には、リンパ系列、例えば、B細胞及びT細胞、骨髄系列、例えば、単球、顆粒球、及び巨核球、並びに赤血球系列、例えば、赤血球が含まれる。ある種の造血幹細胞は、脳細胞を含む、他の細胞型に分化することができる。30

【0011】

多能性（幹）前駆細胞の移植は、單一又は少数の細胞型の喪失又は機能不全により引き起こされる様々な障害の治療に対する有望な戦略である。これらには、脊髄損傷などの神経学的障害、ハンチントン及びパーキンソンなどの皮質下の神経変性、並びにMSなどの脱髓性疾患、並びに糖尿病、心不全の心筋梗塞、組織傷害、及び創傷治癒不全など、他の病理学的状態が含まれる。特に、MS及びその動物モデルのEAEでは、オリゴデンドロサイト及びニューロンに分化する幹細胞は、ミエリンの損傷の修復、及び変性するニューロンの置換をもたらすことができる。しかし、今まで、これらの系における幹細胞移植は治療の結果が良くない結果に終わっていた。したがって、このようにしてEAEマウス中に移植した幹細胞は、主に注射部位周辺（局所投与の場合）、又は血管周囲位置（全身投与を用いた場合）に見られ、その増殖、遊走、及び分化は、疾患によりもたらされた損傷を埋め合わせるのに不十分であった (Goldman、2005年; Pluchino及びMartini、2005年) 。MS患者の脱髓した脳の部位中に幹細胞を移植する臨4050

床試験では、移植を受けた患者に幹細胞が生存する証拠が見られなかつたので、2003年に中止された(Pluchino及びMartinelli、2005年)。これらの結果は、移植された細胞及び常在の細胞を破壊する慢性の炎症プロセスに関連していた。幹細胞ベースの治療戦略、特にMSを意図した治療戦略は、細胞を送達するための疾患修飾の補助薬を必要とすることが示唆されていた。幹細胞治療は、神経学的障害に関連しない、多くの他の医学上の適用としても考慮されている。

【0012】

ネズミ科動物及びヒトの脳の両方からの神経幹細胞系統の分離及びクローニングが、報告されている。ヒトCNSの神経幹細胞は、ネズミ科動物のホモログ同様、マイトジエン含有の(典型的には上皮成長因子、又は上皮成長因子プラス基本の線維芽細胞成長因子)無血清培地で維持すると、懸濁培地中で成長してニューロスフェアとして知られる細胞の凝集塊を形成する。マイトジエンを除去し基質を供給すると、幹細胞はニューロン、星状細胞、及びオリゴデンドロサイトに分化する。このような幹細胞を発達中の、又は成熟した脳の中に再導入した場合、これらは分裂、遊走、及び成長のプロセスを通して経験することができ、通常ニューロンが産生する神経伝達物質及び成長因子の発現を含めた、神経の表現型を呈する。したがって、神経幹細胞を使用すると、少なくとも2つの方法で:(1)死滅した部位に部分的に再び住み着き、CNS損傷により失われた神経の連結を再確立する幹細胞により、並びに(2)CNS損傷後、配線し直すために脳が必要とする重要な神経伝達物質、及び成長因子を分泌することにより、CNS損傷の回復に有利であり得る。

10

【0013】

最近、ヒト成人の脳で、再生可能な神経幹細胞の源が発見された。これらの細胞は、神経系の障害に対する細胞補充療法の候補であり得る。これらの細胞をヒト成人の脳から単離する能力により、神経幹細胞の自家移植を行う可能性が生じる。パーキンソン病の患者を処置するために、ヒト成人の神経幹細胞で行う臨床試験が始まったと報告されている。成人の神経幹細胞を臨床試験で使用しようとする場合、これらは臨床上意義深い量に拡張するのに適さなければならない。残念なことに、これらの細胞の培養皿での寿命は限られているようであり、後の継代で安定であるか否か、及び有用な数のニューロンを産生することができるか否かはまだ決定されていない。

20

【0014】

脳は、長い間、免疫学的特権部位であると考えられてきた。しかし、自己免疫性のT細胞(その活性の開始、期間、及び強度に関して制御されている)は、CNS傷害後(Schwartzら、2003年)、及び精神機能障害の場合に(Kipnisら、2004年)、ニューロンの生存に有益な効果を及ぼすことが最近示された。さらに、変性の神経組織に対するT細胞の有益な効果の根底を成すメカニズムを徹底的に理解すると、傷害部位でT細胞が神経組織の表現型の支持を獲得するようにミクログリアに指示していることが示された。さらに、いくつかの免疫ベースの介入がこの保護反応を高めることができる様子であり、そのすべてがミクログリアの活性化に変換する(Shakedら、2004年)。損傷のタイプが取組みの選択を決定するのではなく、取組みの選択を決定するのは部位である。抗原の中には多くの抗原と交差反応するものがあり、そうして組織特異性のバリアを克服することができる。本発明により、本発明者らは、ニューロンの生存をもたらす同じ操作が、神経発生及びオリゴデンドロジエネシスをもたらすことを示している。同じミクログリアが、T細胞により、又はそれらのサイトカインにより活性化され、ニューロンの生存を支持するだけでなく、オリゴデンドロジエネシス及び神経発生も支持するようである。これらの結果は、T細胞ベースの操作が、内因性の幹細胞の源からだけではなく外因性に適用される幹細胞からの細胞の再生に好都合である、損傷を受けた神経組織における状態を作り出すであろうということを指摘している。

30

【0015】

コポリマー1、即ちCop1は、L-Glu、L-Lys、L-Ala、及びL-Tyrの4つのアミノ酸から構成される非病原性の合成のランダムのコポリマーである。Co

40

50

p 1の1形態である酢酸グラチラマー(GA)は、Copaxone(登録商標)(Teva Pharmaceutical Industries Ltd.、Petach Tikva、イスラエルの登録商標)の名称のもとに多発性硬化症の処置に現在認可されている薬物である。これは、いくつかの種で様々な脳炎誘発物質が誘発するEAエに対して顕著な抑制効果を発揮する(Armon及びSel a、2003年)。

【0016】

Cop 1は、大変耐容性のよい物質であり、有害作用が少なく、安全プロフィールが高い。経口摂取又は吸入によるCop 1での処置は、米国特許第6214791号に開示されている。

【0017】

最近、動物モデルにおいて、Cop 1はいくつかのさらなる障害に有益な効果をもたらすことが見出された。このように、Cop 1は、骨髄移植の場合の移植片対宿主病(GVHD)で(Schlegelら、1996年; Aharoniら、1997年; 米国特許第5858964号)、並びに実質臓器移植の場合の移植片拒絶で(Aharoniら、2001年、2004年)、並びに出願者の特許出願で(WO00/27417及びWO/009333A2)顕在化する免疫拒絶反応を抑制する。

【0018】

同出願者のWO01/52878及びWO01/93893は、Cop 1、Cop 1関連ペプチド及びポリペプチド、並びにそれらで活性化したT細胞は、CNS細胞をグルタミン酸塩の毒性から保護し、CNS及びPNSにおいてニューロンの変性を防ぎ、又は阻害し、或いは神経の再生を促進することを開示している。したがって、例えば、Cop 1は、視神経症及び縫内障などの神経変性疾患に対する治療用ワクチンとして評価にかけられている(Kipnis及びSchwartz、2002年)。

【0019】

Cop 1は、広範囲の自己反応性T細胞を活性化し、CNSの白質及び灰白質の両方の変性に対して効果的である神経保護の自己免疫をもたらす低親和性の抗原として作用することが示されていた(Schwartz及びKipnis、2002年)。Cop 1ワクチン接種の神経保護効果は、視神経傷害(Kipnisら、2000年)、頭部外傷(Kipnisら、2003年)、縫内障(Schoriら、2001年; Bakalashら、2003年)、筋萎縮性側索硬化症(Angelovら、2003年)などの急性及び慢性の神経学的障害の動物モデルにおいて、並びに本出願者らの特許出願WO01/52878、WO01/93893、及びWO03/047500において実証されていた。

【0020】

プリオントリニティ疾患を処置するためにコポリマー1を使用することは、WO01/97785に開示されている。Gendelman及び同僚たちは、Cop 1で免疫化したマウスの脾細胞で受動免疫をすると、MPTP処置マウスにドバミン作動性の神経保護を付与することを開示している(Bennerら、2004年)。

【0021】

Cop 1及び関連のコポリマー及びペプチドは、自己免疫疾患を処置するためにWO00/05250で(Aharoniら、2000年)、及び炎症性腸疾患を処置するためにWO2004/064717で(Aharoniら、2004年)開示されていた。

【0022】

GAの免疫調節効果は、高レベルの抗炎症性サイトカインを分泌するTh2/3細胞を誘導するその能力に起因するものであった(Aharoniら、1998年; Dudaiら、2000年)。これらの細胞は血液脳関門 BBB を越え、CNSに蓄積し(Aharoniら、2000年、2002年)、in situでインターロイキン-10(IL-10)、トランスフォーミング成長因子- (TGF-)、及び脳由来神経栄養因子(BDNF)を発現する(Aharoniら、2003年)。さらに、GAに特異的な細胞は、隣接するCNS細胞に対する傍観者効果を誘導してこれらの有益な因子を発現さ

10

20

30

40

50

せ、インターフェロン(I F N) - の発現を低減させる。G A が病理学的プロセスに対抗する能力における重要な問題は、病理学的プロセスの実際の標的であるニューロン系統に対するその効果である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

上記に記載した参照のいずれも、G A がC N S で神経発生を誘発することを特に開示しておらず、C N S における神経発生を誘発するまでのG A の効果の試験についてデータもプロトコールも発表されていない。

【課題を解決するための手段】

10

【0024】

本発明は、内因性の、及び外因性に投与される幹細胞からの神経発生及び／又はオリゴデンンドロジエネシスを誘発し、増強するための方法に関し、この方法は、それを必要とする個体に、コポリマー1、コポリマー1関連ポリペプチド、コポリマー1関連ペプチド、及びコポリマー1、コポリマー1関連ポリペプチド、又はコポリマー1関連ペプチドによって活性化された活性化T 細胞からなる群から選択される物質を投与することを含む。

【0025】

本発明はさらに、幹細胞を神経保護物質と組み合わせてそれを必要とする個体に移植することを含む幹細胞治療の方法に関し、前記神経保護物質は、コポリマー1、コポリマー1関連ポリペプチド、コポリマー1関連ペプチド、及びコポリマー1、コポリマー1関連ポリペプチド、又はコポリマー1関連ペプチドによって活性化された活性化T 細胞からなる群から選択される。

20

【0026】

本発明は、内因性の、及び患者に投与される外因性の幹細胞からの神経発生及び／又はオリゴデンンドロジエネシスを誘発し、増強するための薬剤組成物を調製するための、コポリマー1、コポリマー1関連ポリペプチド、コポリマー1関連ペプチド、及びコポリマー1、コポリマー1関連ポリペプチド、又はコポリマー1関連ペプチドによって活性化された活性化T 細胞からなる群から選択される神経保護物質の使用にも関する。

【0027】

好ましい一実施形態では、この物質は、幹細胞治療と組み合わせて使用するためのコポリマー1である。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

神経発生、及び神経系への分化に対するE A E 誘発の効果を解明し、疾患の様々な段階におけるG A 注射での末梢の免疫調節性の処置が神経発生及び神経保護のプロセスに何らかの効果があるか否かを調査しようとしていたが、本発明者らの何名かが、E A E マウスの神経増殖は疾患の出現後に増大するが、引き続きナイーブのマウスの神経増殖を下回って低下することを見出した。それとは対照的に、G A 処置によりニューロン／軸索の損傷の低下の持続、並びに神経前駆体の増殖及び動員の増強がもたらされた。新生仔の神経前駆体は、興奮中及び休止中の遊走経路を通じて、通常は神経発生を経験しない脳の領域における傷害部位への大量の遊走を現し、成熟したニューロンの表現型に分化したが、これはC N S における免疫調節、神経発生、及び治療上の結果の間の直接の関連を裏付けるものであった。

40

【0029】

過去10年間の研究により、脳は、限られた程度ではあるが、生涯を通して細胞を再生することが潜在的に可能であることが明らかになっていた(M o r s h e a dら、1994年)。しかし、成人の神経細胞の再生を制限し、又は有利に働くことができる機序は、知られていない。本発明者らの研究室からの最近の研究は、C N S に対する傷害の後、時間、空間、及び強度において末梢の適応免疫が適切に制御する局所の免疫反応が、外傷後のニューロンの生存にとって中心的な必要要件であることを示していた(M o a l e mら

50

、1999年；Butovskyら、2001年；Schwartzら、2003年；Shakedら、2004年）。したがって、本発明者らは、神経発生の欠如、及び回復の制限は、ひいては局所の免疫反応に関連するかもしれない共通の因子に起因し得る可能性を想定した。

【0030】

本発明は、脳における細胞の再生には良く制御された適応免疫が必要とされるという、本発明者らの何名かの仮定に基づくものである。したがって、神経発生及びオリゴデンドロジェネシスは、適応免疫に関連するサイトカインに出くわしたミクログリアによって誘発され、支持されるが、ナイーブのミクログリアによっては支持されず、内毒素に出くわしたミクログリアによって阻止されると仮定された。10

【0031】

実際に、本明細書では、ある種の特異的に活性化されたミクログリアは神経細胞の再生を誘発し支持できることを示している。したがって、神経再生もオリゴデンドロジェネシスも、両方とも適応免疫に関連するサイトカインであるIL-4及びIFN-によって活性化されたミクログリアと同時培養したNPCで誘発され、支持された。これとは対照的に、MG(LPS)は細胞の再生を阻止するという以前の報告と一致して、LPSに曝したミクログリアは、神経再生及びオリゴデンドロジェネシスの両方を阻止した(Monjeら、2003年)。

【0032】

活性化したミクログリアの形態の防御メカニズムは、急性及び慢性の神経変性状態にしばしば見られ、CNSはそれらを耐容するには備えが乏しい(Dijkstraら、1992年)。その結果、活性化したミクログリアは、炎症を起こし、細胞の生存を妨げ(Popovichら、2002年)、細胞の再生を阻止する(Monjeら、2002年、2003年)一様に敵対する細胞の集団と、一般に考えられていた。20

【0033】

しかし、最近の研究では、活性化のタイプがミクログリアの活性を決定し、ある環境ではこれらの効果が細胞の生存に対立的であり得るように、これらは他の環境では保護的であり得る。したがって、例えば、適応免疫に出くわしたミクログリア(CD4⁺T細胞)は、保護的な表現型を獲得することが示された(Butovskyら、2001年)。このようなT細胞により生成されミクログリアに神経保護の表現型を与えることができるサイトカインの中には、Th1細胞及びTh2細胞に特徴的な、それぞれIFN-及びIL-4がある。したがって、活性化されたTh1細胞又はIFN-に曝されたミクログリアは、神経変性障害における中心的存在であるグルタミン酸塩の取り込みの増大を示すが(Shakedら、未発表の知見)、これらをIL-4に曝すと、破壊的なミクログリアの表現型における一般的な存在であるTNF-の下方制御、及び、多分化能の成人神経前駆細胞からオリゴデンドロサイトの分化を促進するインスリン様成長因子(IGF-1)の上方制御をもたらす(本明細書の実施例に示す)(Hsiehら、2004年)。さらに、IGF-1は、in vitroでオリゴデンドロサイトに対するグルタミン酸塩が媒介する毒性の急性の破壊的効果を妨げ(Nessら、2002年)、一次性の脱髓の間の成熟オリゴデンドロサイトのアポトーシスを阻害する(Masonら、2000年)。これら及び他の所見は、損傷を受けたCNSにおける局所の免疫反応(ミクログリアに対するその効果の面で)の結果は、ミクログリアが兆しをどのように解釈するかによって、有益でも有害でもある。3040

【0034】

一般的に、組織の修復は、時間及び空間において良好に同調したプロセスであり、そのプロセスでは、病変部位を明らかにし、再生のための前駆体細胞の遊走、増殖、及び分化の状態を作り出すために免疫の活性が必要とされている。建設的な細胞の再生はCNSでは限られているというよく知られた事実、並びに、MG(LPS)で処置をするとニューロンの喪失を引き起こし(Bojeら、1992年)NPCのホーミング及び分化を妨害する(Monjeら、2003年)という報告された知見、並びに順応して活性化したミ

クログリアはニューロンの生存を支持することができるという報告された知見に照らして考えると、ニューロンの生存に有利に働く免疫の状態は細胞の再生も支持することを見出しても、驚くことではない。M G (L P S) は、過量の N O (酸化ストレスを引き起こす) 及び T N F - 、並びに他の細胞毒性要素を生成し、悪化する神経毒性のスパイラルをもたらす (B o j e ら、 1 9 9 2 年) 。 N O は、成年哺乳動物の脳において細胞の増殖及び神経発生の重要な負の調節物質として働き (P a c k e r ら、 2 0 0 3 年) 、 T N F - はオリゴデンドロジエネシスに対して阻害効果を有することが見出された (C a m m e r ら、 1 9 9 9 年) 。

【 0 0 3 5 】

本発明の結果は、 M G (L P S) は N P S の生存及び分化に実際に有害であるが、適応免疫の機能を有する細胞又はサイトカインによってミクログリアが活性化される場合、それらは細胞毒性でないだけでなく N P C の増殖に対してむしろ正の効果を発揮し、それらがニューロン又はオリゴデンドロサイトへ分化するのを誘発し、且つ支持することを示している。 i n v i v o では、ラット脳の側脳室中に M G (I L - 4) を注射すると、ニューロンの喪失をもたらさず、ミクログリアの C N S 実質への遊走は最小となり、新しいニューロン及びオリゴデンドロサイトの出現をもたらす (ニューロン又はオリゴデンドロサイトのマーカーで B r d U + 細胞を 2 重染色することにより示される) 。ミクログリアに対して染色すると、 M G (L P S) により健常 C N S が著しく侵襲されることが明らかになり、 M G (I L - 4) 又は M G (-) の場合と異なり、大量の組織が喪失する結果となった。興味深いことに、注射しなかった海馬では、常在のミクログリアが脳室下帯に隣接して見出された。神経発生を制御し、それらが静止期にある場合にそれを抑制するが (M G (-) を用いた現在の研究で見出されたように) 、適切に活性化された場合にそれを誘発し支持するのを担うのは細胞であり得るということを推測するのは魅力的である。

【 0 0 3 6 】

本発明者らの所見は、実験上の自己免疫性脳脊髄炎 (E A E) を有するマウスでは、 N P C は C N S 損傷の部位に遊走するという知見により支持されている (P l u c h i n o ら、 2 0 0 3 年) 。これは、傷害が存在しなければ再生に有利に働く状態は存在しないことを意味しているので、傷害は細胞の再生に有利に働くという一般的の経験とやはり一致している。

【 0 0 3 7 】

細胞の再生、及び新しい増殖によるその補充は、身体のほとんどの組織における組織の修復に一般的な手順である。これらのプロセスは脳では起こらず、したがっていかなるニューロンの喪失も取替え不可能であり、軽症から壊滅的な範囲の機能的欠損をもたらすと考えられていた。急性でも慢性でも C N S に対する発作の後に傷害後のニューロンの損傷が広がることが多いので、できるだけ多くのニューロンを救済することによりこの 2 次性の変性を最小にする方法を見出すことに多くの研究がささげられてきた。

【 0 0 3 8 】

本発明の結果により、本発明者らは興味深い結果に導かれた。第 1 に、病理学的条件下では (細胞の再生が重大な場合) ミクログリアは細胞の再生に有利に働くだけでなく、それを妨害する。第 2 に、この逆説的な状況は、ミクログリアの活性が細胞毒性ではなく保護的であり再生伝導性である方法でミクログリアを形作る、良く制御された適応免疫によって治療することができる。これは、保護的な自己免疫が回復の改善をもたらす場合には、神経発生及びグリア細胞産生の両方が起こる可能性があることを示している。これらのデータは、自己免疫疾患において細胞の再生がないことも説明することができ、このような場合には、循環している自己免疫性の T 細胞の量は、過剰の I F N - により、それを上回った T N F - の生成がミクログリアに保護的な表現型を獲得させない閾値を超える可能性がある。これらのデータはまた、ステロイドが有益でない理由を説明することができる、というのは、これらの抗炎症の活性が、破壊的であるだけでなく有益でもある適応免疫をマスクするからである。したがって、自己免疫疾患及び神経変性状態の両方に選択される治療は、疾患の急性期の後、生存している組織が比較的少量の T 細胞によって

10

20

30

40

50

維持され得る免疫調節であると思われる。

【0039】

本発明の発見は、成人の脳における自発的な、内因性の神経発生及びオリゴデンドロジエネシスの限界は、少なくとも部分的には、局所的な免疫活性の結果であり、免疫抑制よりもむしろ適応免疫を利用することは、CNSにおける細胞の再生を促進するための設計方法において選択すべき道であることを指摘している。

【0040】

成年の哺乳動物のCNSにおける細胞の再生は限られている。最近の研究では、炎症によってそれが抑止されることが示唆されている。環境の刺激に応じてミクログリアがこのような再生を誘発し、支持し、又は阻止することができるという本発明の発見は、この見識に挑戦するものである。in vitroでは、神経前駆細胞からの神経発生及びオリゴデンドロジエネシスは、本明細書では、T細胞関連性のサイトカイン(IFN- γ 、IL-4)に出くわしたマウスのミクログリアによって促進されるが、内毒素に出くわしたミクログリアによって阻止されることが示された。抗-IFN- γ 抗体はIL-4効果を中和し、抗-TNF- α 抗体はIFN- γ の効果を増強した。成年ラットの脳室中にIL-4で活性化したミクログリアを注射すると、著しい海馬の神経発生及び皮質のオリゴデンドロジエネシスを誘発し、一方、内毒素で活性化したミクログリアはニューロンの喪失、並びに神経発生及びオリゴデンドロジエネシスの阻止を引き起こした。これらの結果は、制御された適応免疫は、非制御の(例えば、内毒素誘発性の)炎症と異なり、ミクログリアを活性化して、ニューロン及びオリゴデンドロサイトの生存及び再生を誘発し支持するという本発明者らの仮定を強化するものである。したがって、CNSで細胞の再生を促進するために、良く制御された免疫が必要とされ、これを抑制してはならない。

10

【0041】

傷害後の生存及び修復には、CNSにおいて自己抗原に向けたT細胞の活性を制御することが必要であると報告されていた(Moalemら、1999年; Yolesら、2001年; Kipnisら、2002年)。これらの結果により、健常個体に存在することが知られている自己免疫性のT細胞の根本的役割は、CNSの完全性を維持するのを助けることであり、神経変性の環境におけるその治療効果は、極端な条件下における同様の回復性の役割の現れであると、本発明者らは考えるようになった。さらに、このような自己免疫性のT細胞が傷害後のニューロンの生存に関与することを証明する証拠を蓄積することで、これらが健常のCNSで同様の役割を有する場合、おそらくはそのような細胞の再生に必要とされる条件を維持することにより、成年期における神経発生と何か関係があつてもよいという仮定に本発明者らは導かれた。

20

【0042】

本発明に従って、本発明者らは、脳の炎症に関連した生理学的及び病理学的条件下で、成年ラットの海馬におけるミクログリアの活性化の性質が神経変性にどのように影響を及ぼすかを試験した。ミエリンに特異的なTh1細胞の一過性の蓄積に関連した一過性の炎症状態が、神経発生を促進した。IFN- γ (MG(IFN- γ))又はIL-4(MG(IL-4))により活性化したミクログリア(MG)を健常ラットの脳の側脳室中に注射すると神経発生を促進した。単相性の一過性のEA(EAE)を発症したラットでは、誘発された神経発生は、MG(IL-4)によりさらに促進された。in vitroにおける本発明者らの結果は、MG(IFN- γ)は、IFN- γ 濃度が低い限りは、成年ラットのNPCからの神経発生を支持することを示していた。高用量のIFN- γ が課す神経発生に対する妨害は、IL-4により対抗され得る。しかし、IL-4が誘発する神経発生は、低用量のIFN- γ により、又はIL-4と組み合わせて投与した高用量のIFN- γ により誘発されるものよりも弱かった。

30

【0043】

本明細書では、本発明者らは、局所の環境の変化及び必要性に反応することができ、その結果として成年NPCからの新しい細胞の形成を支持することができるCNSにおける細胞の要素を同定した。本発明者らは、ミクログリアは、循環しているT細胞由来のサイ

40

50

トカインにより適切に活性化された後、N P Cからのニューロン及びオリゴデンドログリアの分化を誘発することができることを実証した。この知見、及び、齧歯動物ではT細胞ベースのワクチン接種が挫傷性の脊髄損傷(S C I)からの回復を促進するという本発明者らの以前の実証を考慮すると、これらの発見を治療上の取組みに転換することは、傷害部位でニッチ様の神経発生/グリア細胞発生の環境を作り出すことにより修復のプロセスに有益であり得ると、本発明者らは仮定した。したがって、本発明者らは、相同のa N P Cを移植することによりワクチン接種を補うことで、S C I後の機能回復をさらに促進することを見出することを期待した。本発明では、本発明者らは実際に、マウスモデルを用いて、脊髄の挫傷性の損傷後に機能的な運動の回復を促進する上で、T細胞ベースの免疫活性化と移植したa N P Cとの間の相乗的な相互作用を実証した。

10

【0044】

本発明者であるM . S c h w a r t zによる以前の研究では、自己抗原の弱い作用物質に向けたT細胞の数を増大することに基づく免疫系の全身性の操作は、ニューロンの生存を促進することにより神経変性の状態に有益な効果を及ぼすことが示されていた(M o a l e mら、1999年；H a u b e nら、2001年；S c h w a r t z及びK i p n i s、2002年)。同様の操作、例えばT細胞ベースのワクチン接種が、神経発生を増大させるためにここで提唱され、加齢する脳及び病める心の統一性を維持する新規な方法をもたらしている。

【0045】

したがって、脳細胞の維持及び修復は、C N S - 自己反応性T細胞と脳に常在するミクログリアとの間の対話を必要とするようである。しかし、ミクログリアがA P Cとして作用することができ、関連する抗原をホーミングT細胞に提示しない限り、この対話は行われ得ない。したがって、本発明者らは、アルツハイマー病(A D)の進行を停止させるためには、凝集したアミロイド- β (A β)以外のC N Sに特異的な抗原を認識するT細胞が、脳で凝集したA β プラークの部位を標的としなければならないと仮定した。T細胞はこれらの部位に到達すると、これらに特異的な抗原に遭遇することにより活性化され、A P Cとして作用するミクログリアによりこれらに提示される。このように活性化されることにより、これらのT細胞は局所的に常在するミクログリア上の凝集したA β の負の効果を相殺することができるようになり、したがってA β がニューロンに対して細胞毒性となり、神経発生を阻止するのを妨げる。本発明者らは、多発性硬化症の処置にF D Aが認可した合成コポリマーであり、広範囲のC N S常在の自己抗原と弱く交差反応することができる酢酸グラチラマー(G A、コポリマー1又はC o p - 1としても知られる)をA Dマウスにワクチン接種することにより、この仮説を試験した(K i p n i sら、2000年)。G Aで活性化したT細胞は、C N Sに浸潤した後、自己免疫疾患を引き起こすと思われる圧倒的な増殖の危険性なしに、局所的に活性化される可能性を有する。本発明者ら及び他者による研究では、G Aは自己反応性T細胞の保護効果及び修復効果を擬し得ることが示されていた(K i p n i sら、2000年；B e n n e rら、2004年)。

20

【0046】

本発明では、認知の低下及びA β プラークの蓄積に罹患しているA P P / P S 1ダブルトランスジェニックA Dマウス(変異型のヒトプレセニリン1及びアミロイド- β 前駆体タンパク質を同時発現する)において、T細胞ベースのワクチン接種は、ミクログリアの表現型を変更することにより、認知能力を回復し、プラーク形成を低減し、皮質及び海馬のニューロンを救済し、及び海馬の神経発生を誘導した。

30

【0047】

本発明者らは、T gマウスをG Aでワクチン接種すると、認知のいくらかの喪失及びプラークのいくらかの形成がすでに起こった後にワクチン接種を与えた場合でも、プラークの形成を低減し、認知の低下を防ぎ、部分的に逆転さえしたことを本明細書に示している。G Aでワクチン接種すると、疾患の進行を妨げるのに効果的であるだけではなく、学習/記憶の喪失という臨床症状及びプラークの病理学的出現が始まった後に投与した場合に組織の修復を促進するのにも効果的であることに留意すべきである。上記の発見は、C N

40

50

S - 自己反応性 T 細胞の欠損したマウスでは、認知活性及び細胞の再生の両方に関連することが知られている脳由来の神経栄養因子（ B D N F ）の発現が損なわれるという本発明者らの知見と一致する。これは、 T 細胞は健常の、及び罹患している脳における認知機能を維持するために必要とされているという本発明者らの知見とも一致している（ K i p n i s ら、 2 0 0 4 年）。凝集した A は、ミクログリアが T 細胞との対話に従事する能力を明らかに妨害するので、脳に凝集した A が存在することは認知能力の喪失及び神経発生の機能障害を引き起こすと予想することができる。このような場合では疾患又は損傷の部位への C N S - 自己反応性 T 細胞のホーミングは決定的であるが、これら T 細胞が凝集した A の破壊的な活性を相殺することができる場合にのみ効果的である。ミエリンに特異的な T 細胞がそれと容易に対話を持つことができるミエリン提示性ミクログリアは、豊富に存在する様子である。したがってミエリンに関連する抗原、又はミエリンと弱い交差反応性のある抗原（例えば G A ）は、治療的なワクチン接種に選択される抗原であると思われる。次いで、ミエリンに特異的な T 細胞は C N S に戻り、そこでそれらに関連する A P C に遭遇すると局所的に活性化されて、凝集した A により活性化されたもののような有害なミクログリアを好適に調節するのに必要とされるサイトカイン及び成長因子を供給する。 T 細胞とミクログリアの間に得られたシナプスは、成人幹細胞のプールから神経発生を促進することにより細胞の再生を支持するニッチを作り出し、それにより炎症を起こした脳で誘発される年齢に関連した機能障害を克服する。

【 0 0 4 8 】

酢酸グラチラマー（ G A 、コポリマー 1 ）の知られている特徴は、神経学的障害及び他の障害を処置するための幹細胞移植に関する大変重要な点である。したがって、神経学的疾患、特に M S を含む様々な疾患に対する幹細胞移植の治療上の結果を改善するために G A を使用することが提唱されている。この目的のために G A を使用する根本的理由は、本発明者らである R . A h a r o n i 及び R . A r n o n のその作用機序に関する以前の結果に、並びに移植片と骨髄の拒絶反応、及び自己神経発生性の効果を低減するその有効性の発見に基づくものである。したがって、 G A は自己ニューロン前駆細胞の内因性の神経発生だけではなく、移植された多分化能の（幹）前駆細胞の外因性の神経発生も増強するのに効果的であることが想像される。その非常に高度に安全なプロファイルとともに G A の機能のこれらの現れは、神経学的障害に特に関連するものの他に、多くの臨床上の適用のための前駆幹細胞移植を改善するための組合せ治療におけるその適用を支持している。

【 0 0 4 9 】

したがって、本発明は、一態様では、内因性の、及び外因性に投与される幹細胞からの神経発生及び / 又はオリゴデンドロジエネシスを誘発し、増強するための方法に関し、この方法は、それを必要とする個体に、コポリマー 1 、コポリマー 1 関連ポリペプチド、コポリマー 1 関連ペプチド、及びコポリマー 1 、コポリマー 1 関連ポリペプチド、又はコポリマー 1 関連ペプチドによって活性化された活性化 T 細胞からなる群から選択される物質を投与することを含む。

【 0 0 5 0 】

本発明の方法は、新規に形成したニューロン又はオリゴデンドロサイトの増殖、分化、及び生存をさらに含み、ニューロン前駆体の増殖、ニューロンの遊走、及び / 又は新規に形成したニューロンの成熟ニューロンへのニューロンの分化を含む。

【 0 0 5 1 】

一実施形態では、本発明は、内因性の、又は外因性に適用される幹細胞からの神経発生を誘発し、増強するための方法に関する。別の実施形態では、この方法は、通常神経発生を経験する脳の領域、並びに線条体、側坐核、及び / 又は皮質など、通常神経発生を経験しない脳の領域の両方において、損傷又は傷害を受けた脳の領域における自己神経発生を誘発し、増強するためのものである。

【 0 0 5 2 】

別の一実施形態では、本発明は、中枢神経系（ C N S ）における、ニューロンの前駆体の増殖、ニューロンの遊走、及び / 又は新規に形成したニューロンの成熟ニューロンへの

10

20

30

40

50

ニューロンの分化を含む自己神経発生を誘発し、増強するための方法に関し、この方法は、必要とする個体に、コポリマー-1、コポリマー-1関連ポリペプチド、コポリマー-1関連ペプチドからなる群から選択される物質を投与することを含む。

【0053】

別の一実施形態では、本発明は、内因性の、又は外因性に適用される幹細胞からのオリゴデンドロジェネシスを誘発し、増強するための方法に関する。

【0054】

別の一実施形態では、本発明は、免疫調節により、内因性の、又は外因性に適用される幹細胞からのオリゴデンドロジェネシスを誘導し、増強するための方法に関し、この方法は、必要とする個体に、コポリマー-1、コポリマー-1関連ポリペプチド、コポリマー-1関連ペプチド、及びコポリマー-1、コポリマー-1関連ポリペプチド、又はコポリマー-1関連ペプチドによって活性化された活性化T細胞からなる群から選択される神経保護物質を投与することを含む。10

【0055】

別の一実施形態では、本発明で使用するための物質は、コポリマー-1、コポリマー-1関連ポリペプチド、又はコポリマー-1関連ペプチドによって活性化されたT細胞である。このT細胞は、内因性であり、抗原又はペプチドの投与により *in vivo* で活性化することができ、それによってCNS又はPNSの傷害又は疾患の部位に蓄積するT細胞の集団を生成し、或いはT細胞を、血液から単離し、次いで抗原に感作させたTリンパ球から調製する。T細胞は自己由来であることが好ましく、CD4及び/又はCD8表現型であることが最も好ましいが、例えば、同胞、両親、子供、又はHLA適合の若しくは部分的に適合した、半同種異系の、若しくは完全な同種異系のドナーなど、関連するドナーからの異質遺伝子型T細胞であってもよい。前記T細胞を調製するための方法は、上記に記載したWO99/60021に記載されている。20

【0056】

本発明の方法は、内因性の、及び外因性に投与される幹細胞両方からの神経発生及び/又はオリゴデンドロジェネシスを誘発し、増強するのに有用であり、今日見出される、幹細胞移植、特にCNS及びPNS両方の神経系の傷害、疾患、障害、及び病状の場合に結果の悪い問題を解決する助けとなり得る。

【0057】

一実施形態では、本発明の方法を、神経幹/前駆細胞の内因性のプールからの神経発生及び/又はオリゴデンドロジェネシスを誘発し、増強するために適用する。したがって、コポリマー-1、コポリマー-1関連ポリペプチド、コポリマー-1関連ペプチド、及びこれらで活性化されたT細胞は、損傷を受けた組織において、独立で内因性の神経発生及びオリゴデンドロジェネシスを高め、新しいニューロン及びオリゴデンドロサイトの生存も支持する。30

【0058】

別の一実施形態では、本発明の方法を、内因性の、及び患者に投与される外因性の幹細胞の両方からの神経発生及び/又はオリゴデンドロジェネシスを誘発し、増強するために適用する。前記神経保護物質の投与は、移植した幹細胞の上首尾の生着、細胞の再生、並びに幹細胞のニューロン及び/又はオリゴデンドロサイトへの分化の増強を助け、同時に損傷を受けた組織における内因性の神経発生及びオリゴデンドロジェネシスを誘発し、新しいニューロン及びオリゴデンドロサイトの生存を支持する。40

【0059】

したがって、別の一態様では、本発明は、幹細胞を神経保護物質と組み合わせてそれを必要とする個体に移植することを含む幹細胞治療の方法を提供し、前記神経保護物質は、コポリマー-1、コポリマー-1関連ポリペプチド、コポリマー-1関連ペプチド、及びコポリマー-1、コポリマー-1関連ポリペプチド、又はコポリマー-1関連ペプチドにより活性化された活性化T細胞からなる群から選択される。

【0060】

50

一実施形態では、本発明の方法を、中枢神経系（CNS）、又は末梢神経系（PNS）の傷害、疾患、障害、又は病状に罹患している個体に適用する。

【0061】

本発明の方法に従って、好ましくは幹細胞治療により処置するCNS又はPNSの傷害には、脊髄損傷、閉鎖性頭部外傷、鈍的外傷、穿通性外傷、出血性脳卒中、虚血性発作、脳虚血、視神経障害、心筋梗塞、又は腫瘍切除により引き起こされる傷害が含まれる。移植した幹細胞は、細胞が死滅した（例えば、虚血により）傷害の領域に遊走し、ニューロン及び／又はオリゴデンドロサイトに分化する。

【0062】

本発明の方法により、好ましくは幹細胞治療により処置するCNS又はPNS疾患、障害、又は病状には、パーキンソン病及びパーキンソン病様障害、ハンチントン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、又は筋萎縮性側索硬化症（ALS）が含まれる。他の疾患、障害、又は病状には、顔面神経（ベル）麻痺、縫内障、アルパース病、バッテン病、コケイン症候群、ギランバレー症候群、レビー小体病、クロイツフェルトヤコブ病；又はアデノミエロニューロパチー、アルコール性神経障害、アミロイドニューロパチー若しくはポリニューロパチー、軸索神経障害、シェーグレン症候群に関連する慢性感覚失調性ニューロパチー、糖尿病性神経障害、絞扼性神経障害神経圧迫症候群、手根管症候群、頸部若しくは腰椎の椎間板ヘルニア形成に続くことがある神経根圧迫、巨大軸索神経障害、肝臓性神経障害、虚血性神経障害、ビタミン欠乏による栄養性多発神経障害、吸収不良症候群若しくはアルコール依存症、ポルフィリン症ポリニューロパチー、有機リン剤により引き起こされる中毒性ニューロパチー、尿毒症性多発神経障害；末端肥大症、血管拡張性失調症、シャルコーマリートウース病、慢性閉塞性肺疾患、ファブリー病、フリードライヒ失調症、ギランバレー症候群、低血糖症、IgG若しくはIgAモノクローナル免疫グロブリン異常症（非悪性の、又は多発性骨髄腫若しくは骨硬化性骨髄腫に関連した）、リボ蛋白血症、真性赤血球増加症、レフサム症候群、ライ症候群、及びシェーングレンラルソン症候群からなる群から選択される疾患又は障害に関連する神経障害；様々な薬物に、低血糖症に、HIV感染症などの感染症に、若しくは癌に関連する多発神経障害からなる群から選択される単神経障害若しくは多発神経障害などの末梢神経障害；てんかん、健忘症、不安、痛覚過敏、精神病、てんかん発作、酸化ストレス、アヘン剤耐性及び依存が含まれ、並びに不安障害、気分障害、統合失調症若しくは統合失調に関連する障害、薬物使用及び依存及び離脱、並びに記憶喪失若しくは認知障害からなる群から選択される精神病又は精神障害の処置のためである。

【0063】

別の一実施形態では、本発明の細胞治療の方法を、神経系に無関係の傷害、疾患、障害、又は病状に適用する。好ましい一実施形態では、この方法は、糖尿病、組織修復の不全、心筋梗塞、腎不全、肝硬変、筋ジストロフィー、皮膚の火傷、白血病、関節炎傷害、又は骨粗鬆症傷害から選択される傷害、疾患、障害、又は病状を処置するための骨髄由来の幹細胞移植に適している。

【0064】

本発明の方法で使用するための幹細胞には、それだけには限定されないが、成人の幹細胞、胎児の幹細胞、臍帯血の幹細胞、造血幹細胞、末梢血幹細胞、間葉系幹細胞、多機能幹細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、間質幹細胞、前駆細胞、又はこれらの前駆体、又は遺伝子改変した幹細胞、及び本発明の方法に適することが見出され得るあらゆる他の幹細胞が含まれる。このような細胞の例には、米国特許第6777233号、及び米国特許第6680198号に開示されているCNS神経幹細胞、神経の刺激薬と投与するために米国特許第6749850号に開示されている神経幹細胞及び造血細胞、並びにCNS疾患を処置するために米国特許第6653134号に開示されている間質細胞が含まれる。

【0065】

本明細書で用いられる語である「神経幹細胞」は、*in vitro*及び／又は*in vivo*で少なくとも1つの以下：ニューロン（多くのタイプの）、オリゴデンドログリ

10

20

30

40

50

ア、及びアストログリア、並びに同様の可能性の新しい神経幹細胞、の基本的な神経系統を生じることができる、中枢神経系、又は発達中の神経系の組織に由来する由来の単一の細胞を述べるのに用いられる。「多能性(multipotent)の」又は「多能性(pluripotent)の」神経幹細胞は、すべての上記の神経系統及び発生の可能性が等しい細胞を生じることができる。

【0066】

より好ましい一実施形態では、神経幹細胞は、発達中のCNS及び成人のCNS両方から単離することができ、培地中で上首尾に成長させることができヒトの神経幹細胞であり、自己再生可能であり、成熟ニューロンの及びグリアの子孫を産生することができる。胎児性のヒト神経幹細胞を誘発して、特定のニューロンの表現型に分化させることができる。ヒト神経幹細胞は、発達中のCNS及び成人のCNS中に移植した後、ホストの環境中に統合する。パーキンソン病及び脊髄損傷の動物モデル中に移植されたヒトの神経幹細胞は、機能の回復を誘発した。しかし、前記細胞の生着には未だに問題があり、本発明は、上首尾の生着、生存、及び移植した細胞のさらなる分化を増強するものである。最も好ましい一実施形態では、神経幹細胞は自己由来である。

10

【0067】

本明細書で用いられる語である「造血幹細胞」は、可能性の等しい娘細胞を生成する他に、少なくとも1つの主要な造血系統の細胞を生じることができる幹細胞を意味する。ある種の造血幹細胞は、脳細胞を含む他の多くの細胞型を生じることができる。

【0068】

20

幹細胞を単離した後、当技術分野では周知の方法により、例えば、これらの特許はすべてその全文が本明細書に開示されているように参照として組み入れられる、米国特許第5958767号、米国特許第5270191号、米国特許第5753506号に記載されているように培養する。

【0069】

本発明による処置レジメンを、投与の様式、投与のタイミング、及び用量に関して、傷害、疾患、又は障害のタイプ及び重症度、並びに患者の年齢及び病状に応じて実行する。免疫調節薬を、細胞の注射又は移植と同時に、その前に、又はその後に投与することができる。

【0070】

30

細胞の投与は、様々な方法により行うことができる。ある実施形態では、細胞を直接、脳卒中の空洞中に、髄液に、例えば、脳室内に、くも膜下腔内に、又は大槽内に投与することが好ましい。幹細胞を、コポリマー1又はT細胞も含むことができる薬学的に許容できる液体培地に配合することができる。細胞を、脳の損傷を受けた部位の周囲の領域中に注射してもよく、また、ある種の幹細胞が脳における好適な位置に遊走する能力を想定して、細胞を全身に投与してもよい。

【0071】

好ましい一実施形態では、本発明の方法は、幹細胞をコポリマー1と組み合わせて投与することによる幹細胞治療を含む。一実施形態では、幹細胞を患者に注射/移植し、その後コポリマー1でワクチン接種を行う。別の一実施形態では、幹細胞のコポリマー1との組合せを患者に注射/移植する。さらなる一実施形態では、幹細胞をコポリマー1とin vitroで(人工的に)培養し、移植前に分化させることができる。

40

【0072】

本出願における本明細書で用いられる語である、「Cop1」、「コポリマー1」、「酢酸グラチラマー」、及び「GA」は、交換可能に用いられる。

【0073】

本発明の目的では、「コポリマー1、又はコポリマー1関連ペプチド若しくはポリペプチド」は、MBPと機能的に交差反応し、抗原提示におけるMHCクラスII上でMBPと競合することができるランダムコポリマーを含む、あらゆるペプチド又はポリペプチドを含むものとされる。

50

【0074】

本発明で用いるための組成物は、有効物質として、グルタミン酸又はアスパラギン酸などの負に荷電したアミノ酸（好ましくはより少ない量で）と組み合わせて、フィラーとして働く、アラニン又はグリシンなどの非荷電の中性アミノ酸と場合により組み合わせて、並びにコポリマーに免疫原性の特質を与えるように適応されたアミノ酸、例えば、チロシン又はトリプトファンなどの芳香族アミノ酸と場合により組み合わせて、リシン又はアルギニンなどの正に荷電したアミノ酸の適切な割合からなる、ランダムコポリマーによって表されるC op 1、又はC op 1関連ペプチド若しくはポリペプチドを含むことができる。このような組成物は、その内容すべてが本明細書に参照として組み入れられるWO 00 / 05250に開示されているコポリマーのあらゆるものを含むことができる。

10

【0075】

より詳しくは、本発明で用いるための組成物は、以下の基：(a)リシン及びアルギニン、(b)グルタミン酸及びアスパラギン酸、(c)アラニン及びグリシン、並びに(d)チロシン及びトリプトファンの少なくとも3つの各々から選択されるアミノ酸を1つ含むランダムコポリマーからなる群から選択される少なくとも1つのコポリマーを含む。

【0076】

本発明で用いるためのコポリマーは、L - 若しくはD - アミノ酸、又はそれらの混合物から構成され得る。当業者であれば知っているように、L - アミノ酸はほとんどの天然のタンパク質に生じる。しかし、D - アミノ酸は市販されており、用いられるいくつか又はすべてのアミノ酸に置き換えて本発明で用いられるコポリマーを作ることができる。本発明は、D - 及びL - アミノ酸の両方を含むコポリマー、並びにL - 又はD - アミノ酸のいずれかから本質的になるコポリマーの使用を企図するものである。

20

【0077】

本発明の一態様では、コポリマーは各々(a)から(d)の異なる1群からの、4つの異なるアミノ酸を含む。

【0078】

より好ましい一実施形態では、本発明の薬剤組成物又はワクチンは、1.5 : 4.8 : 1 : 3.6の好適な比率のL - グルタミン酸(E)、L - アラニン(A)、L - チロシン(Y)、及びL - リシン(K)のアミノ酸から実質的になるランダムポリペプチドの混合物であるコポリマー1を含み、全体的に正の実行電荷を有し、分子量が約2KDaから約40KDaである。

30

【0079】

好ましい一実施形態では、C op 1の平均分子量は約2KDaから約20KDaであり、より好ましくは約4,7KDaから約13KDaであり、さらにより好ましくは約4KDaから約8.6KDa、約5KDaから9KDa、又は約6.25KDaから8.4KDaである。別の好ましい一実施形態では、C op 1の平均分子量は、約13KDaから約20KDa、より好ましくは約13,5KDaから約18KDaで、平均約15KDaから約16KD、好ましくは16KDaである。本発明は、40KDaより低いC op 1に対する他の平均分子量も包含する。前記の分子量の範囲のコポリマー1は、当技術分野では周知の方法により、例えば、その全文が本明細書に参照として組み入れられる米国特許第5800808号に記載されている方法により調製することができる。コポリマー1は、約15個から約100個の、好ましくは約40個から約80個のアミノ酸の長さを含むポリペプチドであることができる。

40

【0080】

本発明の好ましい一実施形態では、物質は、酢酸グラチラマーという一般名、又はC opaxone（登録商標）（イスラエル、Petach Tikva、Teva Pharmaceutical Industries Ltd.の登録商標）という商品名のもとで知られる、その酢酸塩の形態のC op 1である。

【0081】

本明細書に開示した組成物に対するコポリマー1の活性は、1つ又は複数の以下の置換

50

が行われる場合に残存すると思われる：グルタミン酸をアスパラギン酸で、アラニンをグリシンで、リシンをアルギニンで、チロシンをトリプトファンで置換。

【0082】

本発明の別の一実施形態では、C op 1 関連ペプチド又はポリペプチドは、(a)から(d)群の3つの異なる群の1つから各々1個の、異なる3個のアミノ酸のコポリマーである。これらのコポリマーを、本明細書ではターポリマーと呼ぶ。

【0083】

一実施形態では、C op 1 関連ペプチド又はポリペプチドは、以後YAKと呼ぶ、チロシン、アラニン、及びリシンを含むターポリマーであり、YAKではアミノ酸の平均モル分率は異なることができ、チロシンは約0.05～0.0250のモル分率で、アラニンは約0.3～0.6のモル分率で、及びリシンは約0.1～0.5のモル分率で存在することができる。より好ましくは、チロシン、アラニン、及びリシンのモル比は、それぞれ約0.10：0.54：0.35である。リシンをアルギニンで、アラニンをグリシンで、且つ／又はチロシンをトリプトファンで置換することが可能である。10

【0084】

別の一実施形態では、C op 1 関連ペプチド又はポリペプチドは、以後YEKと呼ぶ、チロシン、グルタミン酸、及びリシンを含むターポリマーであり、YEKではアミノ酸の平均モル分率は異なることができ、グルタミン酸は約0.005～0.300のモル分率で存在することができ、チロシンは約0.005～0.250のモル分率で存在することができ、リシンは約0.3～0.7のモル分率で存在することができる。より好ましくは、グルタミン酸、チロシン、及びリシンのモル比は、それぞれ約0.26：0.16：0.58である。グルタミン酸をアスパラギン酸で、リシンをアルギニンで、且つ／又はチロシンをトリプトファンで置換することが可能である。20

【0085】

別の一実施形態では、C op 1 関連ペプチド又はポリペプチドは、以後KEAと呼ぶ、リシン、グルタミン酸、及びアラニンを含むターポリマーであり、KEAではアミノ酸の平均モル分率は異なることができ、グルタミン酸は約0.005～0.300のモル分率で存在することができ、アラニンは約0.005～0.600のモル分率で、及びリシンは約0.2～0.7のモル分率で存在することができる。より好ましくは、グルタミン酸、アラニン、及びリシンのモル比は、それぞれ約0.15：0.48：0.36である。グルタミン酸をアスパラギン酸で、アラニンをグリシンで、且つ／又はリシンをアルギニンで置換することが可能である。30

【0086】

好ましい一実施形態では、C op 1 関連ペプチド又はポリペプチドは、以後YEAと呼ぶ、チロシン、グルタミン酸、及びアラニンを含むターポリマーであり、YEAではアミノ酸の平均モル分率は異なることができ、チロシンは約0.005～0.250のモル分率で、グルタミン酸は約0.005～0.300のモル分率で、アラニンは約0.005～0.800のモル分率で存在することができる。より好ましくは、グルタミン酸、アラニン、及びチロシンのモル比は、それぞれ約0.21：0.65：0.14である。チロシンをトリプトファンで、グルタミン酸をアスパラギン酸で、且つ／又はアラニンをグリシンで置換することが可能である。40

【0087】

ターポリマーYAK、YEK、KEA、及びYEAの平均分子量は、約2KDaから40KDaの間、好ましくは約3KDaから35KDaの間、より好ましくは約5KDaから25KDaの間で変化することができる。

【0088】

コポリマー1、並びに関連のペプチド及びポリペプチドは、当技術分野では周知の方法、例えば、縮合条件下で、望ましいモル比のアミノ酸の溶液を用いて、又は、固相合成手順により調製することができる。縮合条件には、あるアミノ酸のカルボキシル基と別のアミノ酸のアミノ基を縮合してペプチド結合を形成するのに適切な温度、pH、及び溶媒の50

条件が含まれる。縮合剤、例えば、ジシクロヘキシリカルボジイミドを用いて、ペプチド結合の形成を促進することができる。ブロッキング基を用いて、官能基、例えば側鎖部分、及びいくつかのアミノ基又はカルボキシリ基を望ましくない副反応に対して保護することができる。

【0089】

例えば、コポリマーを、米国特許第3849550号に開示されたプロセスにより調製することができ、この場合、チロシンのN-カルボキシ無水物、アラニン、L-ベンジルグルタミン酸塩、及びN-L-トリフルオロアセチル-L-リシンを、阻害剤としてのジエチルアミンと無水ジオキサン中、外界温度(20 ~ 26)で重合する。グルタミン酸の-L-カルボキシリ基を、氷酢酸中の臭化水素酸により脱プロックすることができる。1Mピペリジンにより、トリフルオロアセチル基をリシンから除去する。当業者であれば、望ましいアミノ酸、即ちグルタミン酸、アラニン、チロシン、又はリシンの任意の1つに関する反応を選択的に除くことにより、コポリマー1における4個のアミノ酸のうち3個を含むペプチド及びポリペプチドを作成するためにこのプロセスを調節することができることを容易に理解する。

【0090】

コポリマーの分子量を、ポリペプチド合成の間に、又はコポリマーを作成した後に調節することができる。ポリペプチド合成の間に分子量を調節するには、ポリペプチドが望ましい好適な長さに達したときに合成が停止するように、合成条件又はアミノ酸の量を調節する。合成後、望ましい分子量のポリペプチドを、分子量サイジングカラム又はゲル上でポリペプチドをクロマトグラフィーにかけ、望ましい分子量の範囲を収集するなど、あらゆる利用可能なサイズ選択手順により得ることができる。例えば、酸又は酵素の加水分解を行い、次いで精製して酸又は酵素を除去することにより、コポリマーを部分的に加水分解して高分子量の種を取り除くこともできる。

【0091】

一実施形態では、保護されたポリペプチドを臭化水素酸と反応させて望ましい分子量プロファイルを有するトリフルオロアセチル-ポリペプチドを形成することを含むプロセスにより、望ましい分子量のコポリマーを調製することができる。この反応は、1つ又は複数の試験反応により予め決定された時間及び温度で行われる。試験反応の間、時間及び温度は変動し、試験ポリペプチドの所与のバッチの分子量の範囲が決定される。そのバッチのポリペプチドに最適の分子量の範囲をもたらす試験条件を、そのバッチに用いる。このように、望ましい分子量プロファイルを有するトリフルオロアセチル-ポリペプチドを、試験反応により予め決定した時間及び温度で、保護されたポリペプチドを臭化水素酸と反応させることを含むプロセスにより生成することができる。次いで、望ましい分子量プロファイルのトリフルオロアセチル-ポリペプチドをピペリジン水溶液でさらに処理して、望ましい分子量を有する毒性の低いポリペプチドを形成させる。

【0092】

好ましい一実施形態では、所与のバッチから保護されたポリペプチドの試験サンプルを、約20 ~ 28の温度で約10 ~ 50時間、臭化水素酸と反応させる。そのバッチに最も良いの条件を、いくつかの試験反応を行うことにより決定する。例えば、一実施形態では、保護されたポリペプチドを、約26の温度で約17時間、臭化水素酸と反応させる。

【0093】

Cop1のMS関連HLA-DR分子に対する結合モチーフは知られているので(Fridkis-Harelら、1999年)、規定された配列を有するCop1由来のポリペプチドは、Fridkis-Harelら(1999年)の出版物に記載されているように、容易に調製し、HLA-DR分子のペプチド収容溝に対する結合性を試験することができる。このようなペプチドの例は、その内容すべてが本明細書に参照として組み込まれるWO00/05249及びWO00/05250に開示されているようなペプチドであり、以下の配列番号1 ~ 32のペプチドが含まれる。

【0094】

10

20

30

40

50

【化1】

配列番号	ペプチド配列	
1	AAAYAAAAAKAAAA	
2	AEKYAAAAAKAAAA	
3	AKEYAAAAAKAAAA	
4	AKKYAAAAAKAAAA	
5	AEAYAAAAAKAAAA	
6	KEAYAAAAAKAAAA	
7	AEEYAAAAAKAAAA	10
8	AAEYAAAAAKAAAA	
9	EKAYAAAAAKAAAA	
10	AAKYEA AAAKAAAA	
11	AAKYAEAAA AKAAAA	
12	EAAYAAAAAKAAAA	
13	EKKYAAAAAKAAAA	
14	EAKYAAAAAKAAAA	
15	AEKYAAAAA AAAAAA	
16	AKEYAAAAA AAAAAA	20
17	AKKYAAAAA AAAAAA	
18	AKKYAEAAAAA AAAAA	
19	AEAYKAAAAA AAAAA	
20	KEAYAAAAA AAAAAA	
21	AEEYKAAAAA AAAAA	
22	AAEYKAAAAA AAAAA	
23	EKAYAAAAA AAAAAA	
24	AAKYEA AAAA AAAAA	
25	AAKYAEAAA AAAAAA	30
26	EKKYAAAAA AAAAAA	
27	EAKYAAAAA AAAAAA	
28	AEYAKAAAAA AAAAA	
29	AEKAYAAAAA AAAAA	
30	EKYAAAAA AAAAAA	
31	AYKAEEAAA AAAAAA	
32	AKYAEAAA AAAAAA	

【0095】

40

このようなペプチド、及びC op 1に由来する他の類似のペプチドは、C op 1と同様の活性を有することが予想される。このようなペプチド、及び他の類似のペプチドは、また、C op 1関連ペプチド若しくはポリペプチドの定義内にあると考えられ、これらの使用は本発明の一部分であると考えられる。

【0096】

本発明による「C op 1関連ペプチド又はポリペプチド」の定義は、F rid k i s - H a r e l i ら、2002年が(多発性硬化症の処置の候補として)記載した、ランダムのアミノ酸4個のコポリマー、即ち、アミノ酸であるフェニルアラニン、グルタミン酸、アラニン、及びリシン(ポリF E A K)、又はチロシン、フェニルアラニン、アラニン、及びリシン(ポリY F A K)、並びにC op 1に類似の普遍的な抗原とみなすことができ

50

る発見されたあらゆる他の類似のコポリマーを含むコポリマー(14-、35-、及び50-アミノ酸長)などの他の合成のアミノ酸のコポリマーを包含することを意味する。

【0097】

投与すべきC op 1の用量は、患者の年齢及び疾患の段階に従って医師が決定し、1~80mgの範囲から選択することができ、好ましくは20mgであるが、本発明はあらゆる他の適切な投与量を包含する。処置は、処置すべき神経変性疾患、患者の年齢及び病状に従って、適切な時間間隔で繰り返し用量を投与することにより行うのが好ましい。一実施形態では、C op 1を毎日投与してもよい。別の実施形態では、免疫化に適するレジメンに従って、例えば、少なくとも1カ月に1回、又は少なくとも2若しくは3カ月毎に1回、又はより少ない頻度で投与を行うことができるが、本発明は、患者の病状に従つて免疫化の間のあらゆる他の適切な間隔を想定するものである。10

【0098】

本発明に従って使用するための薬剤組成物は、1つ又は複数の生理学的に許容される担体又は賦形剤を用いて従来の様式で配合することができる。担体は、組成物の他の成分と耐容性があるという意味において「許容でき」なければならず、その受容者に有害であつてはならない。

【0099】

投与方法には、それだけには限定されないが、例えば、アジュバントと一緒に又はそれなしで、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、粘膜(例えば、経口、鼻腔内、パッカル、腔内、直腸内、眼内)、くも膜下腔内、局所、及び、皮内の経路が含まれる。投与は全身的又は局所的であることができる。20

【0100】

本発明を、次に、以下の非限定的な実施例により説明する。

【実施例】

【0101】

(実施例1)

ミクログリアは神経細胞の再生を誘発する - IL - 4 又は IFN - により活性化されたミクログリアは成人の幹 / 前駆細胞からの神経発生及びオリゴデンドロジエネシスを様々に誘発する

材料と方法

(i) 動物

新生仔(P0~P1) C57B1/6Jマウスは、Weizmann Institute of ScienceのAnimal Breeding Center(Rehovot、イスラエル)により供給された。動物はすべて、Weizmann Institute's Animal Care and Use Committeeが構築した規則に従って扱った。30

【0102】

(ii) 試薬

リポ多糖(LPS)(混入タンパク質<1%含有)は、大腸菌(Escherichia coli) O127:B8(Sigma-Aldrich, St. Louis、ミズーリ州)から入手した。組換えのマウス腫瘍壞死因子(TNF) - 及びインスリン様成長因子(IGF) - I(両方とも、サイトカイン1μgあたり1EU未満の濃度の内毒素を含む)、組換えのラット及びマウスのインターフェロン(IFN) - 及びインターロイキン(IL) - 4(両方とも、サイトカイン1μgあたり0.1ng未満の濃度の内毒素を含む)、ヤギ抗マウス中和抗-TNF - 抗体(aTNF - ; Ab 1μgあたり0.001EU未満の濃度の内毒素を含む)、及びヤギ抗マウス中和抗-IGF - I(aIGF - I; Ab 1μgあたり0.1EU未満の濃度の内毒素を含む)をR&D Systems(Minneapolis、ミネソタ州)から入手した。40

【0103】

(iii) 神経前駆細胞(NPC)の培養

10

20

30

40

50

側脳室の脳室下帯を含む組織の冠状切片（厚さ2mm）を、成年C57B16/Jマウスの脳から得た。組織を細分し、次いで消化のために、パパイン0.94mg/ml（Worthington、Lakewood、ニュージャージー州）、並びにL-システイン及びEDTA0.18mg/mlを含むEarl'sの平衡塩類溶液中37、5%CO₂で45分間インキュベートした。110×gで15分間室温で遠心分離した後、組織をピペット粉碎により機械的に解離させた。単一の細胞懸濁液から得られた細胞を、75cm² Falcon組織培養フラスコ（BD Biosciences、Franklin Lakes、ニュージャージー州）中、NPC培地[L-グルタミン2mM、グルコース0.6%、ブトレシン9.6μg/ml、プロゲステロン6.3ng/ml、亜セレン酸ナトリウム5.2ng/ml、インスリン0.02mg/ml、トランスフェリン0.1mg/ml、ヘパリン2μg/ml（すべてSigma-Aldrich、Rehovot、イスラエルから）、線維芽細胞成長因子-2（ヒト組換え、20ng/ml）、及び上皮成長因子（ヒト組換え、20ng/ml、両方ともProtech、Rocky Hill、ニュージャージー州）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）/F12培地（Gibco/Invitrogen、Carlsbad、カリフォルニア州）]に塗抹した（3500細胞/cm²）。4～6日毎に球を通過させ、単一細胞として再び塗抹した。緑色蛍光タンパク質（GFP）発現性神経前駆細胞（NPC）を、以前に記載されている通りに得た（Pluchinoら、2003年）。

【0104】

(iv) ミクログリアの初代培養
新生仔（P0～P1）C57B1/6Jマウスからの脳を、その髄膜をはぎ取り、Leibovitz-15培地中（Biological Industries、Beit Ha-Emek、イスラエル）、手術用顕微鏡下（Zeiss、Stemi、DV4、ドイツ）、はさみで、細分した。トリプシン処理（トリプシン0.5%、10分間、37/5%CO₂）後、組織を粉碎した。細胞懸濁液をグリア細胞用培地[10%ウシ胎児血清（FCS、Sigma-Aldrich、Rehovot）、L-グルタミン（1mM）、ピルビン酸ナトリウム（1mM）、ペニシリン（100U/ml）、及びストレプトマイシン（100mg/ml）を補ったDMEM]で洗浄し、ポリ-D-リシン（PDL）（10mg/ml、Sigma-Aldrich、Rehovot）のホウ酸塩バッファ（ホウ砂2.37g及びホウ酸1.55gを滅菌水500mlに溶解したもの、pH8.4）溶液でコーティングした75cm² Falcon組織培養フラスコ（BD Biosciences）で37/5%CO₂で1時間培養し、次いで、滅菌の、ガラス蒸留した水で完全にすすいだ。6時間培養後、培地の半分を交換し、2日目に開始して10～14日の全培養時間の間、2日毎に交換した。ミクログリアを、10日目と14日目の間で収量が最大である最初に混合した脳のグリア細胞培養物から振り落とし（150rpm、37、6時間）、PDLで予め処置した24ウェルプレート（1ml/ウェル、Corning、Corning、ニューヨーク州）上に接種し（10⁵細胞/ml）、ミクログリア用培地[FCS10%、L-グルタミン（1mM）、ピルビン酸ナトリウム（1mM）、-メルカプトエタノール（50mM）、ペニシリン（100U/ml）、及びストレプトマイシン（100mg/ml）を補った RPMI-1640 培地（Sigma-Aldrich、Rehovot）]で増殖させた。細胞を、PDLコーティングした培養フラスコの表面に接着させ（1時間、37/5%CO₂）、非接着の細胞をすすぐ落とした。

【0105】

(v) 神経前駆細胞（NPC）及びマウスのミクログリアの同時培養
ミクログリアを、サイトカイン（IFN-γ、20ng/ml；IL-4、10ng/ml）又はLPS（100ng/ml）で24時間処置した。処置した、又は非処置のミクログリアを、新しいNPC分化培地（NPC用培地と同じであるが、成長因子を含まず、2.5%FCSを含む）で2回洗浄して試験した試薬の痕跡をすべて除去し、次いで氷上で15分間インキュベートし、室温で20分間、350rpmで振盪した。ミクログリ

10

20

30

40

50

アをフラスコから除去し、直ちにN P C (5×10^4 細胞 / ウェル) とともに、インスリンと、又はそれなしで、N P C 分化培地の存在下で、2 4 ウェルプレート中M a t r i g e l (B D B i o s c i e n c e s) でコーティングしたカバーガラス上で5又は10日間同時培養 (5×10^4 細胞 / ウェル) した。次いで培養物を、2 . 5 % パラホルムアルデヒドのP B S 溶液で30分間室温で固定し、ニューロン及びグリア細胞のマーカーに対して染色した。in vitroの細胞増殖速度及び細胞の生存を、5 - ブロモ - 2 ' - デオキシウリジン (Br d U、2 . 5 μ M、S i g m a - A l d r i c h、S t . L o u i s) で染色することにより判定した。生存細胞及び死細胞を定量化するために、生の培養物を1 μ g / ml ヨウ化プロピジウム (M o l e c u l a r P r o b e s、I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、カリフォルニア州) 及び1 μ g / ml H o e c h s t 3 3 3 4 2 (S i g m a - A l d r i c h、S t . L o u i s) で染色し、記載されているように、I m a g e - P r o (M e d i a C y b e r n e t i c s、S i l v e r S p r i n g、メリーランド州) を用いて計数した (H s i e h ら、2 0 0 4 年)。

【 0 1 0 6 】

(v i) 免疫細胞化学

N P C とマウスのミクログリアとの同時培養物からのカバーガラスをP B S で洗浄し、上記に記載したように固定し、1 0 % F C S、2 % ウシ血清アルブミン、1 % グリシン、及び0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 (S i g m a - A l d r i c h、R e h o v o t) を含む透過処理 / ブロックング溶液で処置し、マウス又はウサギ抗チューブリン - I I I - I 型C 終端抗体 (- I I I - チューブリン ; 1 : 5 0 0) 、ウサギ抗 - N G 2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (N G 2 ; 1 : 5 0 0) 、マウス抗 - R I P (R I P ; 1 : 2 0 0 0) 、マウス抗 - ガラクトセレブロシド (G a l C ; 1 : 2 5 0) 、マウス抗 - グルタミン酸デカルボキシラーゼ6 7 (G A D ; 1 : 1 0 0 0) 、マウス抗 - ネスチン (N e s t i n ; 1 : 1 0 0 0) 、ラット抗 - ミエリン塩基性タンパク質 (M B P ; 1 : 3 0 0) (すべて C h e m i c o n、T e m e c u l a、カリフォルニア州より) 、ヤギ抗 - ダブルコルチソ (D C X ; 1 : 4 0 0 , S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y、S a n t a C r u z、カリフォルニア州) 、及びマウス抗 - グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P ; 1 : 1 0 0 、 S i g m a - A l d r i c h、S t . L o u i s) の組合せで染色した。ミクログリアを標識するために、我々はラット a n d i - C D 1 1 b (M A C 1 ; 1 : 5 0 、 B D - P h a r m i n g e n、ニュージャージー州) 又は F I T C - 複合バンデイラエアシンプリシフォリア (B a n d e i r a e a s i m p l i c i f o l i a) イソレクチンB 4 (I B 4 ; 1 : 5 0 、 S i g m a - A l d r i c h、R e h o v o t) のいずれかを使用した。I G F - 1 の発現を、ヤギ抗 - I G F - 1 (1 : 2 0 、 R & D S y s t e m s) により検出した。

【 0 1 0 7 】

(v i i) R N A 精製、c D N A 合成、及び逆転写P C R 分析

細胞をT R I 試薬 (M R C、C i n c i n n a t i、オハイオ州) で溶解し、細胞性のR N A すべてを、R N e a s y キット (Q i a g e n、H i l d e n、ドイツ) を用いて製造元の指示に従って溶解物から精製した。残留するゲノムのD N A を、R N a s e を含まないD N a s e (Q i a g e n) とインキュベートすることにより精製プロセスの間に除去した。R N A をR N a s e を含まない水 (Q i a g e n) に - 8 0 度貯蔵した。R N A (1 μ g) を、S u p e r S c r i p t I I (P r o m e g a、M a d i s o n、ウイスコンシン州) を用いて、製造元による推奨通りにc D N A に変換した。c D N A 混合物を、P C R グレードの水で1 : 5 に希釈した。

【 0 1 0 8 】

我々は、半定量的な逆転写P C R (R T - P C R) を用いて、O L I G O v 6 . 4 (M o l e c u l a r B i o l o g y I n s i g h t s、C a s c a d e、コロラド州) を用いて選択された遺伝子に特異的なプライマー対で特定のm R N A の発現をアッセイした。

【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

50

用いたプライマーは：

T N F - 、センス 5' - A G G A G G C G C T C C C C A A A A A G A T G G G - 3
' (配列番号 33)、

アンチセンス 5' - G T A C A T G G G C T C A T A C C A G G G C T T G - 3' (標的
サイズ、551 b p) (配列番号 34)；

I G F - I、センス 5' - C A G G C T C C T A G C A T A C C T G C - 3' (配列番
号 35)、

アンチセンス 5' - G C T G G T A A A G G T G A G C A A G C - 3' (標的
サイズ、244 b p) (配列番号 36)、及び

- アクチン、センス 5' - T T G T A A C C A A C T G G G A C G A T A T G G - 3
' (配列番号 37)、

アンチセンス 5' - G A T C T T G A T C T T C A T G G T G C T A G G - 3' (標的
サイズ、764 b p) (配列番号 38)

【0110】

R T - P C R 反応は、c D N A 1 μ g、各プライマー 35 n m o l 、及び R e a d y M i x P C R M a s t e r M i x (A B g e n e 、 E p s o m 、 英国) の 30 μ l 反応液を用いて行った。P C R 反応は、E p p e n d o r f P C R システムで、95 で 30 秒間、60 で 1 分間、72 で 1 分間のサイクル (通常 25 ~ 30 サイクル) 、及び 72 で 5 分間であり、次いで 4 に保った。合成された c D N A の量に対する内部標準として、我々は、- アクチンの m R N A を用いた。P C R 産物を、アガロースゲル分析にかけ、エチジウムプロマイド染色により可視化した。シグナルを、G e l - P r o アナライザ - 3 . 1 (M e d i a C y b e r n e t i c s) を用いて定量化した。すべての場合で、1つの産物が各プライマーセットとともに観察され、観察された産物は、公表されている c D N A 配列から予測されたサイズにマッチした単位複製配列のサイズを有していた。

【0111】

(v i i i) 定量

顕微鏡の分析では、我々は、Z e i s s L S M 510 共焦点レーザー顕微鏡 (倍率 40 ×) を用いた。i n v i t r o の実験では、各実験群に対して、我々は 0.053 mm² の視野をスキャンした (n = 少なくとも 2 つの異なるカバーガラスから 8 ~ 16) 。各マーカーに対して、500 ~ 1000 個の細胞をサンプリングした。G F P 及び - I I I - チューブリン、N G 2 、R I P 、G a l C 、及び G F A P を同時発現する細胞を計数した。

【0112】

(i x) 統計学的分析

結果を、T u r k e y - K r a m e r の多重比較検定 (分散分析) により分析し、平均
値 ± S D で表す (別段の記載がない限り)。

【0113】

(実施例 1 (1))

i n v i t r o におけるミクログリアの神経発生に対する効果 - I L - 4 又は I F N - で予め処置したミクログリアは i n v i t r o で神経前駆細胞 (N P C) からのニ
ューロンの分化を誘発し、支持する

C N S の発作に対する良好に制御された T h 1 又は T h 2 の反応の形態の適応免疫により、ミクログリア (M G) は、ニューロンの保護及びニューロンの組織修復を促進する表現型をとるように誘発される (B u t o v s k y ら、2001 年)。ここでは、我々は、ミクログリアを活性化することにより、N P C の分化を誘発し、又は支持する適応免疫の能力を試験した。神経発生は、内毒素 (例えば、リポ多糖、L P S) で活性化されたミク
ログリアが引き起こす炎症によって阻止されると報告されている (E k d a h l ら、20
03 年)。したがって、我々は、L P S に曝されたミクログリア (M G (L P S)) の N
P C に対する効果を、本明細書でニューロンの生存に支持的であることが示されている低

レベルの特徴的な、それぞれ Th 1 (炎症促進性) 及び Th 2 (抗炎症性) サイトカインである、 IFN - に曝したミクログリア (MG (IFN -))、及び IL - 4 に曝したミクログリア (MG (IL - 4)) の効果と比較した。我々は、 NPC 発現性の緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて、培養物に見られたあらゆる神経細胞の分化は、ミクログリアの初代培養物の汚染に由来していたというよりむしろ、 NPC に由来していたことを検証した。

【 0114 】

ミクログリアを、その最適な増殖培地で増殖させ、 (Ziehlasekら、1992年) 、次いで、 IL - 4 、 IFN - (低レベル) 、又は LPS で 24 時間処置した。増殖培地の残留物及びサイトカインを洗い流し、処置したミクログリアの調製物の各々、及び非処置のミクログリアの調製物 (MG (-)) を、分化培地の存在下で解離した NPC 球と新たに同時培養した。我々は、 IFN - が活性化したミクログリア、及び IL - 4 が活性化したミクログリアの両方の効果を調べた。5日培養後、ニューロンのマーカーである - III - チューブリンを発現した GFP + 細胞を、ニューロンと同定した。

【 0115 】

最近、我々は、 IL - 4 が活性化したミクログリア (MG (IL - 4)) は高レベルの IGF - 1 を生成することを示したので (Butovskyら、2005年) 、また IGF - 1 は神経細胞の再生の重要な因子であることが報告されているので (O'Kuskyら、2000年) 、 IGF - 1 が、 IL - 4 が活性化したミクログリアの効果における因子の 1 つかもしれないという状況を想定した。したがって、以下の実験を、インスリンを含まない (活性化されたミクログリアが分泌するインスリン関連因子の効果が存在するすれば、それを検出するために) 、及びインスリンを含有する分化培地の両方で行った。

【 0116 】

定量分析により、インスリンの非存在下では、神経発生は MG (IFN -) により最低限に支持されるにすぎず、 MG (LPS) により損なわれるが、 MG (IL - 4) で同時培養した NPC ではコントロールよりもほぼ 3 倍高かった (図 1A) 。インスリンの存在下では、像は幾分異なり、神経発生を誘導するのに MG (IFN -) は MG (-) よりも有意に効果的であったが、神経発生に対する MG (IL - 4) の誘導効果及び MG (LPS) の阻止効果はインスリン非存在下のそれらの効果に類似していた (図 1B を比較されたい) 。ミクログリアの非存在下では、インスリンを添加 (0.02 mg / ml) しても、 NPC 培養物中の GFP + / - III - チューブリン + 細胞の数は増加しなかつた (図 1A) 。

【 0117 】

しかし、 NPC の MG (-) との同時培養では、インスリンなしのこののような同時培養における (図 1B) 、又はインスリン含有培地におけるコントロール (ミクログリアを含まない) 培養物における (図 1B) それらのパーセント値に比べてインスリンの添加により GFP + / - III - チューブリン + 細胞のパーセント値は増加した (図 1B) 。インスリンの存在下では、 MG (IFN -) と同時培養した NPC におけるニューロンの数は (図 1B) 、 MG (-) と同時培養した NPC におけるよりも多く (図 1B) 、 NPC を抗 - TNF - 中和抗体 (aTNF -) を含む MG (IFN -) と同時培養した場合よりも多かった (図 1B) 。観察された MG (IFN -) 同時培養物における aTNF - の有益な効果 (図 1B) は、神経発生に対する TNF - の有害作用を中和することによるものであったということを検証するために、我々は、 MG (IFN -) と新たに同時培養した NPC に組換えのマウス TNF - (rTNF -) を加えた。図 1C は、 rTNF - の存在下では、 GFP + / - III - チューブリン + 細胞の数は、コントロールの (非処置の) NPC 培養物における数と類似していたことを示している。

【 0118 】

MG (IFN -) と同時培養した NPC において新規に分化するニューロンと、 MG (IL - 4) との同時培養で產生された新規に分化するニューロンとの間に、形態学的な相違が観察された (図 1D) 。 GFP の - III - チューブリンとの同時発現を、図 1

10

20

30

40

50

Eに示す。新規に分化するニューロンは、より高次の脳の領域における主要な阻害性の伝達物質であるGABAの合成を担う酵素であるGAD67（グルタミン酸デカルボキシラーゼ67）に対してポジティブに標識され、また、GFPで同時標識されていることも見出された（-III-I-チューブリン⁺/GFP⁺/GAD⁺）（図1F）。別の1セットの実験では、我々は、上記に記載したのと類似の培養物を調製し、ニューロンの系統の初期の分化のマーカーであるダブルコルチニン（DCX、図2）でそれを染色した。この染色により、-III-I-チューブリンに対する染色で見られた様々なミクログリアの調製物の類似の効果が明らかになった。新規に分化するニューロンの形態における顕著な違いが、MG（IL-4）と同時培養したNPCと、MG（IFN-）と同時培養したNPCとの間に見られ（図2A）、前者は著しい枝分れを示したが、後者ではニューロンは極性化し、長い突起があった（図2A）。これらの相違は、2つのサイトカインによりミクログリアで活性化されるメカニズムは同一ではないことを示唆していた。GFPのDCXとの同時発現を図2Bに示す。DCX及び-III-I-チューブリンの両方に対して染色した培養物に、これら2つのニューロンのマーカーが共存することが見出された（図2C）。上記の実験すべてにおいて、生細胞をヨウ化プロピジウムで染色することによりアッセイすると、ミクログリアの生存率は（Hsiehら、2004年）、同時培養の条件による影響を受けなかった。図2Dに示した、GFP⁺/DCX⁺染色した細胞の定量分析では、-III-I-チューブリンをニューロンのマーカーとして用いた場合に得られた結果と同様の結果がもたらされた（図1A、1B）。

【0119】

10

（実施例1（2））

in vitroにおけるミクログリアのオリゴデンドロジェネシスに対する効果 - NPCのオリゴデンドロサイトへの分化は、IL-4で予め処置したミクログリア（MG（IL-4））と同時培養することにより誘発される

20

次に、我々は、同じ実験条件下で、ミクログリアがNPCのオリゴデンドロサイトへの分化も誘発するか否かを調べた。高倍率下で、我々は、新規に形成したオリゴデンドロサイトを検出することができた。NPCのオリゴデンドロサイトへの起こり得る分化を検出しようと、我々は、最初に、オリゴデンドロサイト前駆体のマーカーであるNG2を同時発現するGFP標識された細胞を探した。定量分析によりMG（IL-4）及び（より少ない程度で）MG（IFN-）は、同時培養したNPCからNG2⁺細胞の分化を誘発した（図3A、3B）。NPCと同時培養したMG（-）及びMG（IFN-）の両方に、インスリンの非存在下で（図3A）、その存在下よりも（図3B）有意に少ないNG2⁺発現性細胞が見られた。神経発生の場合（図1）と異なり、MG（IFN-）はインスリンの存在下でも、新規に分化するオリゴデンドロサイト（NG2⁺）の出現を誘発する上で、MG（IL-4）よりも大幅に有効性が劣っていた。かなりの割合のNG2⁺細胞を、また、MG（IFN-）及びMG（IL-4）の同時培養物の両方におけるRIP[細胞体の細胞質、並びに鞘で覆う前の段階で未熟なオリゴデンドロサイト及び成熟したオリゴデンドロサイトの突起を特異的に標識するモノクローナル抗体（Hsiehら、2004年）]に対して標識した（図3A、3B）。インスリンの非存在下では、ミクログリアを含まないコントロールの培地には、GFP⁺/NG2⁺細胞はほとんど見られなかった（図3A）。NPCのMG（-）との同時培養物では、少数のGFP⁺/NG2⁺細胞が見られたが（図3A）、MG（LPS）との同時培養物にはなかった（図3A）。MG（IL-4）との同時培養物で、これらの細胞の数における劇的な増大が見られた（図3A、3C）。

30

【0120】

40

NPC培養物にインスリンを添加しても、ミクログリアの非存在下ではNG2⁺細胞の発生率に影響を及ぼさなかった（コントロール；図3B）が、MG（-）と同時培養したNPCにおけるNG2⁺細胞の数の増大を引き起した（図3B）。さらに、インスリンの存在下では、新規に分化するNG2⁺細胞に対するMG（LPS）の阻止効果は変更されなかつたが（図3B）、MG（IFN-）との同時培養物におけるNG2⁺細胞の数

50

は増大した(図3B、3C)。各同時培養物では、NG2⁺細胞はすべてGFPで標識されることも見出された(図3D)。ミクログリアと新規に分化するオリゴデンドロサイトとの間に密接な空間的関連があるという知見は興味深かった(図3E)。

【0121】

神経発生及びオリゴデンドロジエネシスの両方に関して、MG_(IL-4)とMG_(IFN-)との効果の間で観察される初期の相違を考慮して、サイトカインが活性化するミクログリアで同時培養したNPCを、同時培養10日後に調べた。5日目、ミクログリアの非存在下ではNG2⁺細胞はほとんど見られなかつた(図4A)。これらの培養物を定量分析すると、顕著な相違が明らかになつた。サイトカインが活性化したミクログリアの調製物は両方とも、オリゴデンドロサイト(NG2⁺、RIP⁺、GalC⁺)及びニューロン(-III-チュープリン⁺)の両方への分化を誘発し、MG_(IL-4)は成熟オリゴデンドロサイトに向けた、MG_(IFN-)は成熟ニューロンに向けた正の偏りを示した。これらの培養物における星状細胞(GFAP⁺細胞)の発生率の分析(同時培養10日後)では、NPCのMG_(IL-4)との同時培養物と、NPCのMG_(IFN-)との同時培養物の間に、著しい相違は現れなかつたが、両方においてGFAP⁺細胞は、ミクログリアのないNPC培養物におけるよりも多数であった(図4A)。結果は、これら2タイプのサイトカインが活性化したミクログリアはニューロン細胞の3系統に影響を及ぼすこと、並びに、これらはニューロン系統及びオリゴデンドロサイト系統に様々な効果を有するが星状細胞系統には効果がないことを示唆していた(図4A)。

【0122】

MG_(IL-4)の存在下では、GFP⁺/NG2⁺細胞は、5日目におけるよりも(図3C)10日目における方が(図4B)より枝分れしていた。枝分れした細胞は、ニューロンのように見える細胞と接触を形成している様子であった(図4B)。これらの培養物を、成熟したオリゴデンドロサイトのマーカーであるガラクトセレブロシド(GalC)に対して、及びニューロンのマーカーである-III-チュープリンに対して染色すると、接触形成性の細胞は、新規に形成されたオリゴデンドロサイト及びニューロンであることが検証された(図4C)。同じ培養物をDCX及びRIPに対して分析すると(図4D)、新規に分化する細胞には、これらのマーカーの両方と一緒に発現するものはないことが明らかになつた。さらに、星状細胞のマーカーのグリア線維性酸性タンパク質(GFAP)とNG2と(図4E)、又はGFAPとDCXと(図4F)の発現には重複がなかった。サイトカインが活性化するミクログリアが誘発する神経突起の長さを分析すると(同時培養10日後)、MG_(IFN-)と同時培養したNPCで新規に形成したニューロンの神経突起は、MG_(IL-4)と同時培養したNPCにおけるよりも、又はNPC単独におけるよりも著しく長く、後二者における神経突起の長さの間には著しい相違はなかつたことが明らかになった(図4G)。興味深いことに、これらの3群で計数されたGFP⁺細胞の絶対数の間には有意な差がなかつた(NPC単独: 90.2 ± 32.0、MG_(IFN-)との同時培養: 70.5 ± 23.0、MG_(IL-4)との同時培養: 66.1 ± 10.4)。これにより疑問が生じる: 活性化したミクログリアは、分化に影響を及ぼす他に、NPCの増殖及び/又は生存にも影響を及ぼすのだろうか?

【0123】

表1は、非活性化の、IL-4で活性化した、又はIFN-が活性化したミクログリアと同時培養したNPCの増殖を記録したものである。インスリンと、又はそれなしで、非処置のNPC(コントロール)、又は、MG₍₋₎、若しくはMG_(IL-4)、若しくはMG_(IFN-)、若しくはMG_(LPS)と同時培養したNPCを、塗抹24、48、又は72時間後に増殖及び細胞死について分析した。増殖のアッセイでは、各時間点の12時間前にBrDUのパルス投与を適用した。BrDU⁺細胞の数を、GFP⁺細胞のパーセント値として表し(3つの独立した実験を2回ずつ行ったものからの平均値 ± SEM)、分散分析により分析する。インスリンと、又はそれなしでの細胞死を、ヨウ化プロピジウム1μg/ml及びHoechst 33342 1μg/mlで生染色することにより判定した(2つの独立した実験を2回ずつ行ったものからの平均値 ± SEM; *

$P < 0.05$; * * * $P < 0.001$; 分散分析)。

【0124】

表1に示すように、培養物の24時間及び48時間での増殖を比較したものでは、相違は明らかにならなかった。72時間後、わずかではあるが有意ではない相違が、NPC単独と、MG(-)又はMG(IFN-)と同時培養したNPCとの間に見られたが、これはおそらく、同時培養物におけるいかなる増大によるよりむしろ、NPC単独の培養物で増殖が減少したからである。インスリンの非存在下では、NPC単独と、MG(-)又はMG(IL-4)と同時培養したNPCとの培養物の間に、いかなるときも有意差はなかった。インスリンと、又はそれなしでMG_{LPS}と同時培養したNPCに増殖の低減が観察された。5日後、いずれの同時培養物にも増殖は検出されなかつた(データは示さず)。死細胞又は死滅する細胞を判定するために、我々は、死細胞を染色するヨウ化プロピジウム1 μ g/m1、及び生細胞も死細胞も染色するHoechst 33342 1 μ g/m1で生の培養物を染色した(Hsiehら、2004年)。インスリンの非存在下、及びインスリンの存在下の両方で、MG_{LPS}と同時培養したNPCで著しい細胞死が観察されたが、単独で、又はMG(IFN-)又はMG(IL-4)と培養したNPCでは、細胞死のパーセント値は低く、NPC単独の培養物で見られたものと著しく違わなかつた(表1)。これらの結果は、in vitroのNPCの運命に対する、サイトカインが活性化したミクログリアの主要な効果は、選択的というよりむしろ教示的なメカニズムによって生じることを示唆していた。

【0125】

【表1】

表1. ミクログリアとの同時培養物における神経前駆細胞(NPC)の増殖及び生存

GFP ⁺ 細胞中のBrdU ⁺ 細胞の%			GFP ⁺ 細胞中のPI ⁺ 細胞の%				
処置	+インスリン			処置	+インスリン		
	24時間	48時間	72時間		24時間	48時間	72時間
コントロール	5.8±0.6	5.4±1.5	1.4±0.9	コントロール	3.3±0.9	1.7±0.4	1.7±0.7
MG(-)	6.2±0.5	6.9±1.9	5.6±1.4	MG(-)	4.0±0.5	2.8±0.7	2.8±0.9
MG(IFN- γ)	5.8±1.5	7.1±2.5	5.6±1.1	MG(IFN- γ)	5.9±0.6	4.2±1.5	3.6±2.1
MG(LPS)	3.1±0.8	1.7±0.4	1.1±0.1	MG(LPS)	14.0±0.1***	7.3±1.9	4.1±0.2
処置	-インスリン			処置	-インスリン		
	24時間	48時間	72時間		24時間	48時間	72時間
コントロール	4.1±0.6	3.2±0.5	1.2±0.7	コントロール	3.7±0.2	2.3±0.8	2.2±1.1
MG(-)	6.5±1.5	3.5±0.7	3.3±2.5	MG(-)	5.2±3.0	3.7±0.3	3.0±1.0
MG(IFN-4)	6.2±1.1	5.4±1.9	3.3±2.2	MG(IFN-4)	3.7±2.0	2.9±0.4	2.5±0.3
MG(LPS)	2.1±0.2	1.7±0.5	1.1±0.6	MG(LPS)	15.8±1.9*	7.0±5.0	4.8±0.8

ミクログリアとの同時培養物における神経前駆細胞(NPC)の増殖及び生存。インスリンと、又はそれなしで、非処置のNPC(コントロール)の、又はMG(-)、若しくはMG(IL-4)、若しくはMG(IFN-)、若しくはMG(LPS)と同時培養したNPCの培養物を、塗抹24、48、又は72時間後に増殖及び細胞死について分析した。増殖アッセイでは、各時間点の12時間前にBrdUのパルスを適用した。BrdU⁺細胞の数をGFP⁺細胞のパーセント値として表し(3つの独立した実験を2回ずつ行ったものからの平均値±SEM)、分散分析により分析した。インスリンと、又はそれなしでの細胞死を、ヨウ化プロピジウム1 μ g/m1及びHoechst 33342 1 μ g/m1で生染色することにより判定した(2つの独立した実験を2回ずつ行ったものからの平均値±SEM; * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; 分散分析)。

【0126】

10

20

30

40

50

(実施例 1 (3))

I L - 4 及び I F N - の活性化したミクログリアが誘発するオリゴデンロジエネシスの可能なメカニズム

インスリン様成長因子 (I G F) - I は、神経発生及びオリゴデンロジエネシスにおける重要な因子であると報告されている (C a r s o n ら、 1 9 9 3 年 ; A b e r g ら、 2 0 0 0 年 ; O ' K u s k y ら、 2 0 0 0 年 ; H s i e h ら、 2 0 0 4 年)。サイトカインが活性化する、ミクログリアの N P C の分化に対する有益な効果は、ミクログリアが I G F - 1 を生成する能力によって少なくとも部分的に媒介されるのか否かを決定するために、我々は、 I G F - I に特異的な中和抗体 (a I G F - I) を、活性化したミクログリアと同時培養した N P C に加えた。 a I G F - I は、オリゴデンロジエネシスに対する M G (I L - 4) 誘発性の効果を阻止したが (図 5 A)、これはオリゴデンロジエネシスに対する I L - 4 が活性化したミクログリアの効果は I G F - I に依存することを指摘するものであった。組換えの I G F - I (r I G F - I 、 5 0 0 n g / m l) を N P C に直接加えると、それらの N G 2 発現性細胞への顕著な分化をもたらした (図 5 B)。しかし、このような分化は、 M G (I L - 4) と同時培養した N P C に観察されるものほど幅広くなく (図 5 A)、 M G (I L - 4) 効果はさらなる (おそらく可溶性の) 因子により、又は細胞 - 細胞相互作用により、又は両方により媒介されることを示唆していた。 a I G F - I は、 M G (I F N -) によって誘発されるオリゴデンロジエネシスには効果がなかった (データは示さず)。我々は、 - I I I - チューブリンの発現を評価することにより、 M G (I L - 4) が誘発する神経発生に対する a I G F - I の効果も調べた。
G F P + / - I I I - チューブリン + 細胞のパーセント値は M G (I L - 4) と同時培養した N P C では 2 1 . 9 ± 2 . 9 % であり、これらの同時培養物に a I G F - I を加えた場合は 1 9 . 7 ± 4 . 5 % (P = 0 . 3) であった。これらの結果は、 M G (I L - 4) は I G F - I の他にさらなる有力な神経発生の因子を生成することを示唆していた。

【 0 1 2 7 】

M G (I F N -) が誘発する神経発生の結果に対する、観察された a T N F - の有益な効果を考慮して (図 1)、我々は、 T N F - の中和は M G (I F N -) 誘発性のオリゴデンロジエネシスも促進するか否かを調べた。実際に、オリゴデンロジエネシスは、 M G (I F N -) と同時培養した N P C において、 a T N F - により増強された (図 5 C)。 T N F - のほのめかされた負の効果は、 M G (I F N -) と同時培養した N P C に T N F - を直接加えることにより確認された (図 5 D)。

【 0 1 2 8 】

ミクログリアの m R N A のコンパラティブ (c o m p a r a t i v e) R T - P C R 分析で、活性化の非存在下ではミクログリアは I G F - I 及び低レベルの T N F - の両方を生成したことが明らかになった。時間の関数としての、 T N F - 及び I G F - I の生成の分析では、 I F N - は、 I L - 4 と異なり、 T N F - 生成の一過性の増大、及び I G F - I の下方制御をもたらすことが明らかになった (図 6 A 、 6 B)。タンパク質レベルでは、定量的な免疫細胞化学分析により、 M G (I L - 4) による I G F - I の発現の上方制御も明らかになった。 L P S は、 I G F - I の生成を完全に阻止した (図 6 C)。
。

【 0 1 2 9 】

考察

この研究の結果は、ミクログリアを特異的に活性化するあるものは、成人 C N S においてニューロン細胞の再生を誘発することができることを強力に示唆している。この発見は、ミクログリアが分化する成人 N P C の運命を決定し得ることを示していた。神経発生もオリゴデンロジエネシスも、 M G (I L - 4) 及び M G (I F N -) と同時培養した N P C で誘発され、 L P S に関連する炎症は成人の神経発生を阻止するという報告に一致して、両方とも M G (L P S) により阻止された (E k d a h l ら、 2 0 0 3 年 ; M o n j e ら、 2 0 0 3 年)。 M G (I L - 4) と同時培養した N P C は、オリゴデンロジエネシスに向いた偏りを示し、 M G (I F N -) と同時培養した N P C は、神経発生に向

いて偏っていた。

【0130】

(実施例2)

T細胞と成人神経前駆細胞との間の相乗作用は脊髄損傷からの機能回復を促進する

脊髄損傷からの回復は、傷害部位でミエリン関連抗原を認識するTリンパ球で免疫化することにより良好に制御された増強を受け入れることができる局所の免疫反応を明らかに必要とする。関連するT細胞は、局所のミクログリアを活性化して、ニューロンの生存及び再生を支持する表現型を発現させることができる。我々は、脊髄の挫傷からのマウスの回復は、ミエリン由来のペプチドとのT細胞ベースのワクチン接種、及び成人のニューロンの幹/前駆細胞(aNPC)の脳脊髄液中への注射により、相乗的に促進されることを示している。顕著なことに、ワクチン接種したマウスでは、ワクチン接種をしなかったマウスよりも、より多くのNPCが病変部位を標的としていた。in vitroでのaNPCとT細胞との間の相乗的な相互作用は、T細胞の特異性及び表現型に、決定的に依存していた。この結果は、制御された免疫活性が幹細胞のニッチの効率的な制御の根底をなし、幹細胞治療は、脊髄修復に対する免疫細胞のあらゆる有益な効果を排除する免疫抑制性の抗-拒絶反応薬物の代わりに、自己の、又は組織適合性にマッチしたドナーを必要とすることを示唆している。

【0131】

材料と方法

(x) 動物

近交系の成年野生型C57BL/6Jマウスは、The Weizmann Institute of ScienceのAnimal Breeding Centerにより供給された。動物はすべて、Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)が構築した規則に従って取り扱った。

10

20

【0132】

(xi) 抗原

以下のペプチドを、Weizmann Institute(Rehovot、イスラエル)でSynthesis Unitにより合成した: MOG、残基35~55MEV GWYRSPFSRVVHLYRNGK(配列番号39)、及び変更したMOGペプチド(45D)MEVGWYRSPFDRVVHLYRNGK(配列番号40)、示したようなアスパラギン酸の置換に対してセリンを含むMOG35~55ペプチドの類似体。OVAはSigmaから購入した。

30

【0133】

(xii) 免疫化

成年マウスを、結核菌(Mycobacterium tuberculosis)(5mg/ml)を含む等体積のCFA(Difco、Detroit、ミシガン州)又はIFAに、各々乳化した、MOG、45D、又はOVA(すべて100μg)で免疫化した。乳剤を(総体積0.15ml)、側腹部の片側にs.c.注射した。コントロールのマウスにはPBSを注射した。

40

【0134】

(xiisi) 脊椎損傷

マウスを麻酔し、その脊髄をT12で椎弓切除術することにより曝露し、良くキャリブレートされた脊髄の挫傷性の傷害を与えることが示されている装置である、Infinite Horizon脊髄インパクター(Precision Systems and Instrumentation、Lexington、ケンタッキー州)を用いて椎弓切除術した脊髄上に200kdynの力を1秒間課した。

【0135】

(xiv) 脊髄挫傷からの機能回復の評価

マウスにおける脊髄挫傷からの機能回復を、後肢歩行運動の成績により判定した。回復

50

は、最近、マウスに対して特に開発されたスケールであり、スコアの範囲が0（完全な麻痺）から9（正常の移動性）である、Basso Mouse Scale (BMS) オープンフィールド運動評点スケールにより得点付けた (Engesser-Cesarら、2005年)。ブラインドのスコア付けにより、確実に観察者が、各マウスが受けた処置に気付かないようにした。週2回、滑らかで、床の滑らない、成型したプラスチックでできた円形の囲い（直径90cm、壁の高さ7cm）の中心にマウスを4分間配置することにより、オープンフィールドにおけるマウスの歩行運動活性をモニターした。各評価の前には、会陰の感染症、後肢の傷、並びに尾及び足の自咬についてマウスを注意深く観察した。

【0136】

10

（xv）神経前駆細胞の定位固定注射

マウスを麻酔し、定位固定装置に配置した。頭蓋を曝露し、乾燥且つ清潔に保った。十字縫合を確認し、印をつけた。指定された注射点は脳の表面から2mmの深さで、前後軸における十字縫合の0.4mm後ろで、正中線に対して1.0mm外側であった。神経前駆細胞を、Hamiltonシリンジで適用し（3μl中に 5×10^5 細胞、1μl/分の速度）、傷上の皮膚を縫合した。

【0137】

（xvi）神経前駆細胞の培養物

成年神経前駆細胞（aNPC）の培養物を、先の実施例1に記載したように得た。

【0138】

20

（xvii）神経前駆細胞及びT細胞の同時培養

以前に記載したように、8週齢のC57BL/Jマウスのリンパ節からCD4+T細胞を精製した (Kipnisら、2004年)。T細胞を、L-グルタミン（2mM）、2-メルカプトエタノール（ 5×10^{-5} M）、ピルビン酸ナトリウム（1mM）、ペニシリソ（100IU/ml）、ストレプトマイシン（100μg/ml）、非必須アミノ酸（1ml/100ml）、及び自家血清2%（v/v）を補ったRPMI培地で、マウス組換えIL-2（mrIL-2；5ng/ml）、並びに可溶性抗-CD28及び抗-CD3抗体（1ng/ml）の存在下で活性化した。T細胞を、24ウェルのプレートで、Matrigel（BD Biosciences）でコーティングしたカバーガラス上、5日間、aNPC（ 5×10^4 細胞/ウェル）と同時培養した（ 5×10^4 細胞/ウェル）。次いで、培養物をパラホルムアルデヒド2.5%のPBS溶液で30分間、室温で固定し、ニューロンのマーカーに対して染色した。

30

【0139】

（xviii）免疫組織化学

SICIを受けさせたマウスを14日後又は60日後に再び麻酔し、冷PBSで灌流した。その脊髄を除去し、ブアン固定液（飽和ピクリン酸75%、ホルムアルデヒド25%、氷酢酸5%；Sigma-Aldrich）で48時間、後固定し、次いで70%ETOHに移した。組織を、キシレン及びパラフィン中70%、95%、及び100%のETOHのグラジェントに通して水和させ、次いで、パラフィンに包埋した。各染色に対して、各々6μmの厚さの組織切片5個を各マウスから取った。スライドを15分間、以下の各々：キシレン、ETOH100%、95%、70%、50%、及びPBSで連続的にすすぐことによりパラフィンを除去した。スライドの抗原への曝露は、10mMクエン酸ナトリウムpH6.0中、電子レンジでそれを沸点に加熱し、次いでさらなる10分間、20%のマイクロ波の電力で加熱することにより最大にした。スライドを20%正常ウマ血清で60分間ブロックし、その後、モノクローナル抗体の2%ウマ血清溶液と、室温で一夜（GFAP、神経フィラメント、及びBDNF）、又は4度で48時間（CD3）インキュベートした。我々は、GFAPに対してウサギ抗-マウスGFAP（1:200）（Dako Cytoporation、Glostrup、デンマーク）を、神経フィラメントに対してウサギ抗-神経フィラメント（1:200）を、低分子量及び高分子量（Serotec、Oxford、英国）を、並びにCD3に対してラット抗-ヒトCD3（1:5

40

50

0) (Serotec)を用いた。BDNFに対しては、我々は、モノクローナル抗体ニワトリ抗-ヒトBDNF(1:100)(Promega、Madison、ウィスコンシン州)をサポニン0.05%とともに用いた。

【0140】

すすいだ後、切片を、2次抗体Cy3ロバ抗-ラット(1:300)(Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、ペンシルベニア州)(CD3に対する染色)、Cy3ロバ抗-ニワトリ(Jackson ImmunoResearch)(1:250)(BDNFに対する染色)、又はCy3ロバ抗-ウサギ(Jackson ImmunoResearch)(1:250)(GFP及び神経フィラメントに対する染色)とともに、室温で1時間インキュベートした。IB4染色に対しては、切片を20%ウマ血清で1時間ブロックし、次いで、Cy2-IB4(1:50)(Sigma-Aldrich)と室温で1時間インキュベートした。切片をすべて、Hoechst(1:2000)(Molecular Probes-Invitrogen、Carlsbad、カリフォルニア州)で染色した。次いで、これらをNikon E-600蛍光顕微鏡下の検査用に作成した。傷害の部位における細胞(CD3-標識した)を計数することにより、又は密度(IB4-標識した、又はBDNF-標識した)を決定することにより、又は非染色の部位(GFP、神経フィラメント)を測定することにより結果を分析した。各パラメータは、マウスが受けた処置に対してプラインドの観察者が測定した。

【0141】

(実施例2(1))

成年神経前駆細胞は運動の回復を促進するために局所の免疫活性を必要とする
この研究における我々の作業仮説は、T細胞ベースの免疫化が傷害の部位で誘起した保護的な免疫反応は、細胞の生存だけでなく、組織の修復も支持するニッチを作り出すということであった。我々は、局所のT細胞が媒介する免疫反応は、外来性に送達されるaNPCを引き付け、それらが回復に貢献するのを支援し得ることをさらに疑った。この仮説を試すために、我々は、C57B1/6Jマウスを、SCIの直後に、結核菌0.5%を含むCFAに乳化した脳炎惹起性のペプチドであるpMOG35~55(配列番号39)でワクチン接種し(MOG/CFA)、1週間後、脳室内の(i.c.v.)経路によりaNPCを投与した。この2重の処置プロトコール(MOG/CFA/aNPC)を受けさせたマウスを、同じアジュvantで乳化した同じMOGペプチドで免疫化したがaNPCを移植せずその代わりにPBSでi.c.v.注射したコントロール群のマウス(MOG/CFA/PBS)と、又は、PBS及びCFA(0.5%)を注射しaNPCをi.c.v.移植したマウス(PBS/CFA/PBS)と、又はPBS/CFAを注射し次いでPBSをi.c.v.注射したコントロール群のマウス(PBS/CFA/PBS)と比較した。SCI後の行動の結果を評価するために、我々は、Basso運動スコア(BMS)評点スケールを用いたが(Engesser-Cesarら、2005年)、このスケールでは0は後肢の完全な麻痺を示し、9は完全な運動性を表す。MOG/CFA/aNPCを受けたマウスの、平均運動回復(BMS)スコア(4.21±0.45、値はすべて平均値±SEM)は、MOG/CFA/PBSで処置したマウスのスコアよりも高かった。PBS/CFA/aNPCで処置したマウスでは、回復はPBS/CFA/PBSで処置したコントロールのマウスほど良好ではなかった(1.5±0.27)。4.21というBMSは、肢の足首及び足底の広範囲の運動を示し(3匹の動物が示したもの、その他に時々体重を支え、足底で歩行)、1.5というスコアは軽微から広範囲の範囲の足首の運動を示す。MOG/CFA/PBSで処置したマウスは、コントロールのPBS/CFA/aNPC処置したマウスのスコア(1.5±0.4)、又はPBS/CFA/PBS処置したコントロールのマウスのスコアよりも有意に高いスコアである2.71±0.5をスコアした(図7A)。このように、これらの結果は、投与したaNPCとT細胞ベースの免疫反応との間の相乗的な相互作用を実証している。移植されたaNPCが、単独で(即ち、MOG/CFA免疫化の非存在下で)運動の回復を改善できないことは

10

20

30

40

50

、部位特異的な免疫反応がaNPC活性に必要であったことを示唆していた。図7Bは、傷害後28日目の、全試験群における個々のマウスのBMSを示す。免疫化の非存在下でのaNPCの移植はSCIからの回復を改善しなかったので、このコントロール群(PBS/CFA/aNPC)は後の実験に含まなかった。

【0142】

SCIからの回復を促進するのに必要とされるT細胞の量を増大すれば、脳炎惹起性ペプチドの使用を必要としないことを、我々は以前に実証しており、脳炎惹起性ペプチドの弱い作用物質は効果的であり、EAEを誘発する危険性を有していない。このような「安全な」ワクチン接種を、aNPC移植と組み合わせて利用することができるか否かを試すために、我々はMOG由来の変更された、アスパラギン酸がセリンの代わりになっているペプチドリガンド(pMOG33~55APL; 45Dペプチド、(配列番号40))を使用した。マウスを、結核菌2.5%を含むCFAで乳化した45Dペプチドでワクチン接種した。1週間後、免疫化したマウスに挫傷性のSCIを受けさせ、さらに1週間後、aNPCをi.c.v.移植した。運動活性の上昇(平均値±SEMの、BMSにより表して)が、PBS/CFA/aNPCでi.c.v.処置したコントロールのマウスよりもこれらのマウスに見られた(1.94±0.22に比べて、4.11±0.27; 図7C)。aNPC移植なしで、CFA中のペプチド45Dで免疫化したところ、PBS処置のコントロールに比べてほんのわずかな運動の回復の上昇をもたらした(2.57±0.24)。図7Dは、傷害後28日目における個々のマウスのBMS値を示す。上記の発見は、挫傷性のSCI後の運動の回復に対する移植したaNPCの寄与は、脳炎惹起性ペプチドの弱い作用物質の使用により、やはり促進され得ることを示唆していた。

【0143】

aNPCとの相乗的な相互作用に必要とされるT細胞の表現型及び特異性を決定するために、我々は、様々な免疫化のプロトコールを用いて上記の実験を繰り返した。不完全フロイントアジュバント(IFN)はCFAと異なり、細菌を含まず、脳炎惹起性ペプチドに対してTh2様反応を誘発することが知られている。我々は、IFNに乳化したMOG類似体(ペプチド45D)で免疫化すると何らかの有益な効果があるが、引き続きaNPCを移植しても相乗作用を示さなかつたことを見出した(MOG/IFN/PBS処置マウスに対するBMSが2.93±1.03、PBS/CFA/PBS処置マウスでは2.07±0.53であったのに比べ、MOG/IFN/aNPC処置マウスでは3.2±0.76、図7E)。これらの発見は、MOG/IFN/aNPC処置マウスでは、ワクチン接種したT細胞とaNPCとの間の傷害部位における相乗的な相互作用に好ましいT細胞はTh1であることを示唆している。

【0144】

CNS抗原に対する特異性がワクチン接種の相乗効果及び幹細胞移植に必要であることを検証するために、CFA(結核菌2.5%を含む)に乳化した非自己のタンパク質であるオバルブミン(OVA)でマウスを免疫化し、1週間後に、aNPCを、又はコントロールとしてPBSをi.c.v.注射した。OVA/CFAでの免疫化により、BMSにおけるわずかな、有意でない上昇がもたらされ、aNPCを移植してもBMSをそれ以上上昇させなかつた(OVA/CFA/PBS処置マウスでは2.2±0.68、及びPBS/CFA/PBS処置のコントロール群では1.5±0.29であったのに比べ、OVA/CFA/aNPC処置マウスでは2.43±1.78であった、図7F)。上記の結果をすべてまとめると、aNPC移植後に有益な効果がないことは、T細胞とaNPCとの間の相乗作用は、T細胞の抗原特異性及び表現型の両方の関数であることを示唆している。

【0145】

傷害を受けたCNS、特に脊髄における免疫の活性化は、近年における研究の主な注目的であった(Schwartz及びHaubens, 2002年)。いくつかの試験では、T細胞ベースの免疫反応は、その強度及び持続時間が良く制御されている場合のみ、保護的であることが示された。過度に強力な免疫化は過剰な免疫活性を生じ、この活性は損

傷を受けた脊髄に対する免疫反応の潜在的な利点を中和し、有害な効果さえあった。我々は、a N P Cが損傷部位へ戻る場合に、過剰な免疫活性という負の効果を相殺し、そして回復に寄与し得る可能性を考えた。したがって、我々は、局所の免疫活性が過剰である場合でも、a N P Cの投与が機能回復に寄与することができるか否かを決定することに着手した。S C Iの1週間前、我々は、結核菌2.5%を含むC F Aに乳化したM O Gペプチド35~55でマウスを免疫化した。S C Iからの運動の回復が、P B S / C F A注射後よりもM O G / C F Aでの免疫化後の方が悪い条件下で(B M Sがそれぞれ1.94±0.32、及び0.35±0.2)、a N P Cを投与すると回復が改善することを、我々は見出した(B M S 2.68±0.51、図7G、7H)。したがって、a N P Cをi.c.v.投与すると、局所の適応免疫反応が有害である場合でも、S C Iからの機能回復に貢献し得ると思われる。10

【0146】

(実施例2(2))

組織の統合性は局所の免疫活性に相關する

a N P Cと常在の免疫細胞との間の明らかな相乗作用の根底を成すメカニズムについての見識を得ようと、我々は、注射したa N P Cのいずれかが傷害を受けた脊髄への道を見つけるか否かを試験した。我々は、図7Aに示した実験を、G F P標識したa N P Cを用いて繰り返した。抗-G F P抗体で染色すると、M O G - C F A / a N P Cで処置したマウスにおいてのみ、傷害を受けた脊髄の実質でG F P⁺細胞が明らかになった(図8)。注射されたG F P⁺a N P Cが、病変の中心を取り囲んで、且つ、S C I 7日後という早期に髄膜に隣接した脊髄実質の外側に見ることができ(図8A~8C)、試験した最後の時間点である傷害60日後という後期でも依然として検出できた(図8D~8F)。20

【0147】

S C Iからの回復を特徴付ける形態学的特徴の1つは、病変部のサイズである。傷害の部位を描くために、我々は、脊髄の縦方向の切片を、グリア纖維性酸性タンパク質(G F A P)に対する抗体で染色した。我々は、G F A Pによって染色されなかった部位を測定することにより、病変部のサイズを評価した。この分析により、M O G / C F Aでワクチン接種したラットにa N P C移植後7日という早期に、傷害の部位の平均サイズが、ワクチンだけを接種した、又はa N P Cだけを接種したマウスにおけるよりも、ワクチン接種及びa N P C移植の両方を受けたマウスにおける方が有意に小さくなっていたことが明らかになった(図9A、9B)。30

【0148】

次に、我々は、回復の範囲で観察された相違は、局所の免疫学的变化に相關し得るか否かを試験した。脊髄組織の切片を、T細胞のマーカーに対して(C D 3)、また活性化したミクログリア/マクロファージの蓄積に対して(I B 4)染色した(図9C~9F)。切片すべてを、核マーカーとしてのH o e c h s tでも染色した。細胞移植7日後に組織を切除した。I B 4で染色すると、他の実験群におけるよりも、2重処置のプロトコールを受けた(0.5%C F A中p M O G 35~55)マウスでは、ミクログリア/マクロファージが少なかったことが明らかになった(図9C、9D)。定量分析により、M O G / C F A / P B S処置の、又はP B S / C F A / P B S処置のコントロールにおけるよりも2重処置を受けたマウスにおける傷害部位を取り囲む部位に、C D 3⁺T細胞が著しく多いことが明らかになった。顕著なことに、a N P C移植をせずに脳炎惹起性のp M O G 35~55で免疫化すると、コントロールにおけるよりも、傷害部位でC D 3⁺細胞がほんのわずかに多いという結果になった(図9E、9F)。したがって、a N P Cの移植は、傷害部位における局所的な免疫反応を調節すると思われる。40

【0149】

活性化したT細胞も、T細胞が活性化したミクログリアも、脳由来の神経栄養因子(B D N F)などの成長因子の源として働くことができる。B D N Fの免疫反応性は、他の群におけるよりもM O G / C F A / a N P Cで処置したマウスの脊髄における方が強力であった(図10A)。B D N F及びI B 4に対する2重染色により、傷害部位におけるB D50

NFの細胞の源は、ミクログリア／マクロファージの集団であったことが示された（図10B）。

【0150】

最近の研究で、骨形成タンパク質（BMP）阻害物質であるノギンは、傷害を受けた脊髄でaNPCからのニューロンの分化を誘発することができることが示されている（Setoguchiら、2004年）。このタンパク質は、脳室下帯でニューロン発生性の環境を提供することが必要とされていることも示されている。そこで我々は、様々な実験群においてノギンの免疫反応性をアッセイし、これが2重処置のプロトコールを受けたマウスで著しく増大したが、MOG免疫化単独では影響がなく、aNPC移植単独ではわずかに低減したことを見出した（図10C）。傷害部位で生成されたBDNFの場合と同様に、ノギンもIB4+細胞に局在していた（図10D）。

10

【0151】

（実施例2（3））

内因性幹細胞の局所的な分化

上記の結果は、重要な疑問を生じた：T細胞ベースのワクチン接種を、aNPC移植と組み合わせて与えた場合、内因性又は外因性のaNPCのニューロンの分化に好ましい条件をつくり得るだろうか？この可能性を試験するために、我々は図7に記載した実験を繰り返し、また、細胞増殖のマーカーであるBrdUをaNPC移植後7日目（即ち、SCI14日後）に開始して3日間、1日2回注射した。最後のBrdU注射の7日後に、BrdUに対する染色、及び初期の分化のマーカーであるダブルコルチニン（DCX）により、2重の処置を受けたマウスに、新規に形成したニューロンが有意に多いことが明らかになった（図11A～11E）。図11Bは、傷害を受けた部位の環境／付近におけるDCX+細胞の分布を実証している。BrdUとGFPとの組合せ、及びGFPとDCXとの組合せに対して染色すると、ダブルポジティブな細胞は実質的に現れず、傷害を受けた脊髄におけるほとんどのDCX+細胞は内因性のaNPCに由来したこと指摘された。顕著なことに、aNPC移植をせずにワクチン接種をしても、傷害を受けた脊髄において新規のニューロンの形成を増大しなかった。

20

【0152】

（実施例2（4））

in vitroにおける成人神経前駆細胞とT細胞との相互作用

30

上記の結果は、免疫細胞とaNPCとの間のクロストークが傷害の部位で行われていることを指摘していた。我々は、それぞれTh1-及びTh2-関連のサイトカインである、IFN- γ 及びIL-4で予め活性化したミクログリアは、aNPCからニューロンの分化を誘発することができることを上記で示した。そこで、我々は、aNPCとT細胞との間の直接の相互作用が、aNPCの分化のパターンの変更ももたらすか否かを決定しようとした。この疑問に対処するために、我々は、（抗-CD3抗体、抗-CD28抗体、及びIL-2での）同源のプロトコールによりin vitroでCD4+T細胞を24時間活性化し、次いで、トランスウェル培養系でaNPCとの同時培養においてその活性化を継続させた。コントロールとして、我々は、aNPC単独（抗-CD3抗体、抗-CD28抗体、及びIL-2の存在下で）、又は静止期のCD4+T細胞と培養したaNPC（IL-2だけを補った）の培養を用いた。5日後、培養物では、低い方のチャンバーにおけるaNPCを固定し、新規に形成したニューロンの出現について分析した。初期のニューロンのマーカーである-III-チューブリンに対して染色すると、ニューロンの分化に対するT細胞の劇的な効果が明らかになった（図12A）。約7%の細胞だけが

-III-チューブリンに陽性であったaNPC単独のコントロールの培養物に比べると、活性化したT細胞とのaNPCの同時培養では約90%の細胞が-III-チューブリンを発現した（図12A、12B）。顕著なことに、-III-チューブリン染色は、aNPCの非活性化T細胞との同時培養物におけるコントロールに対して、3倍の増大（18%）を示した。したがって、T細胞は可溶性の因子によりニューロンの分化を誘発していると思われる。図12Bは、aNPC単独（コントロール）の、又は活性化した

40

50

T細胞との同時培養物の - I I I - チューブリン染色した培養物の代表的な画像を示している。これらの発見が意味するのは、T細胞由来の可溶性の因子は、ニューロンの分化の経路の1つを引き起こし得るということである。

【0153】

T細胞は、N P C由来の化合物に遭遇した結果としてN P Cの分化に影響を及ぼした可能性を排除するために、また、観察された効果はT細胞由来の可溶性の物質により引き起こされたという我々の発見をさらに実証するために、我々は、活性化したT細胞によって訓練した培地の存在下でaN P Cを分化させた。5日後、これらの培養物を - I I I - チューブリンに対して染色したところ、同時培養系で得られた結果と同様の結果が明らかになり(図12C)、ニューロンの分化は静止のT細胞により、また、活性化したT細胞によりさらに誘発されることが確認された。数々の分化する細胞に対するこれらの効果の他に、枝分れし伸長した - I I I - チューブリン標識された線維で明らかであるように、T細胞由来の可溶性の因子も、また、明らかに細胞の形態に影響を及ぼしていた(図12D)。

10

【0154】

我々は、次に、T細胞誘発性の神経発生が、活性化したT細胞が分泌するサイトカインにより媒介されるか否かを決定しようとした。aN P Cを、様々な濃度の、特徴的なT細胞由来のサイトカインI F N - 及びI L - 4の存在下で培養した。分析により、5日培養後、I F N - は1ng/m1ほどの低濃度で - I I I - チューブリンの発現の増大を引き起こし得ることが明らかになった(図12E)。本明細書に記載した実験で、我々は、I F N - に短時間曝露(24h)したのではこのような効果を達成するのに十分ではないことを見出した。しかし、I F N - を補充した培養物における - I I I - チューブリン発現性の細胞の形態は、活性化したT細胞で、又はT細胞で訓練した培地で培養したaN P Cに見られたものほど発達しなかったことに留意すべきである。I F N - の効果とは対照的に、I L - 4で処置したaN P Cには、 - I I I - チューブリン発現における変化は観察されなかった。

20

【0155】

これらの発見は、I F N - はI L - 4と異なり、T細胞誘導性の神経発生を部分的に説明できることを示唆していた。しかし、I F N - の効果でさえ、T細胞の効果、又はT細胞由来の可溶性因子に比べて制限されている。aN P Cに対するI F N - 受容体-1の発現のP C R分析では、この受容体は、ここで試験したすべての条件下でaN P Cにより発現されることが明らかになった(データは示さず)。

30

【0156】

ノッチ経路の活性化はaN P Cの維持に不可欠であり、この経路、及びその下流の転写因子であるH e s遺伝子ファミリーの遮断は、ニューロンの分化における最初の事象の根底を成すものである。T細胞介在性のニューロンの分化がノッチのシグナリングにおける変化を誘発するか否かを決定するために、我々はT細胞由来の物質との相互作用後の、aN P CにおけるH e s遺伝子の発現における可能な変化を探し求めた。コントロールの培養物に比べると、T細胞で訓練した培地の存在下で24時間培養したaN P Cは、H e s - 5発現において5倍の減少を経験したことが、リアルタイムP C Rにより明らかになった(図12F)。したがって、T細胞が誘発する分化は、ノッチ経路の阻害を伴う様子である。aN P Cによるノッチ1~4の発現は、T細胞で訓練した培地の存在下では変更されず、阻害は、ノッチの発現における変化に起因し得ないことを示していた(データは示さず)。

40

【0157】

a N P CがI F N - 受容体を発現するという我々の知見を、これらの細胞は、T細胞と抗原提示細胞(A P C)との間のダイアログに参加することが知られているB - 7(I m i t o l a r a、2004年b)及びC D 4 4(P l u c h i n o r a、2003年)などの免疫関連分子を発現することを示す最近の研究とまとめて考えることにより、aN P CはT細胞の機能に影響を及ぼし得るか否かを試験することに我々は駆り立てられた。最初

50

に我々は、T細胞による [³H]チミジンの取り込みをアッセイすることにより、aNPCのCD4+T細胞の増殖に対する効果を試験した。T細胞をaNPC及びAPC（致死的に照射した脾細胞）と3日間同時培養すると、T細胞の増殖の有意な用量依存性の阻害がもたらされた（図13A）。これらの条件下では、aNPCの制限された増殖だけが存在することを留意することが重要である。T細胞の増殖に対する阻害効果が可溶性の因子により媒介されるのか、又は細胞同士の接觸を必要とするのかを決定するために、我々はトランスウェル系を利用し、aNPCを上部のウェルに塗抹した。T細胞とaNPCとを同じウェルで同時培養することで、T細胞の増殖の2倍の低減がもたらされたが、トランスウェルで2つの細胞の集団が分離された場合にこの効果は低減した。したがって、細胞同士の接觸は、aNPCがT細胞の増殖を阻害するのに必要であると思われる。aNPCは、T細胞によるサイトカインの生成に影響を及ぼし得るか否かを決定するために、aNPCとT細胞とを同時培養した培地で、6種の炎症性サイトカインの濃度を測定した。IL-12、IFN-γ、及びTNF-αの濃度は、aNPCと、及びそれなしのT細胞の培養物で類似していたが、IL-10の濃度は同時培養物でわずかに上昇（40%）した。T細胞培養物単独に比べると、IL-6の濃度はaNPCとの同時培養物で2倍高く、MCP-1濃度に顕著な違いが見られ、MCP-1濃度は同時培養物で2桁高かった（図13C）。まとめると、これらの結果は、aNPCはT細胞に直接作用することができ、その増殖活性を阻害し、そのサイトカイン／ケモカイン生成性のプロファイルを変更することを示している。

【0158】

10

考察

免疫細胞とaNPCとの間の局所の相互作用は、機能回復の根柢を成す。現在の研究で、我々は、SCIに対する2つの異なる治療上の取組み：T細胞ベースのワクチン接種、及び神経前駆細胞のCSF中への移植、を組み合わせた。これらの取組みは、各々、SCIからの機能回復を促進することができる事が示されており、我々は、これらを組み合わせた場合に相乗的に機能することをここに示している。我々の実験は、in vivoでもin vitroでも、免疫細胞とaNPCとの間のクロストークが病変部位で行われることを実証した。ワクチン接種が局所の免疫反応を引き出し、免疫反応が良く制御されている場合は、変性を減弱し修復を促進するのに必要とされる細胞及び分子の因子を提供する。同じ反応が、また、aNPCを傷害部位に動員し、内因性のaNPCからの神経発生を支持するニッチ様の区画を作り出すのに、役割を果たしている。aNPCと免疫細胞との間の相互作用は、相反することが見出され、aNPCは傷害後の免疫活性を調節することができ、免疫活性が過剰である条件下（aNPCの非存在下で、回復に有害な効果を有する）でも機能回復を確実にしていた。

20

【0159】

30

（実施例3）

T細胞ベースのワクチン接種は、アルツハイマー病のマウスモデルで認識を回復し、ブラークを除去し、神経発生を誘発する

- アミロイドの沈着（A_β）の蓄積、ニューロンの喪失、認知低下、及びミクログリアの活性化は、アルツハイマー病（AD）に特有の特徴である。プレセニリン1、及びキメラのマウス／ヒトのアミロイド前駆体タンパク質をコードする変異のヒト遺伝子を発現するADダブルトランスジェニックマウスを用いて、我々は、モーリス水迷路（MWM）における成績により評価して、酢酸グラチラマーのワクチン接種は認知低下を防ぎ、回復したことを示している。ワクチン接種はミクログリアの活性化を調節し、ブラークの形成を除去し、ニューロンの生存及び神経発生を誘発した。in vitroでは、A_βにより活性化したミクログリアが、成人の神経幹／前駆細胞からの神経発生を妨げた。これはIL-4により対抗され、IFN-γを加えた場合により対抗されたが、IFN-γ単独では対抗されなかった。

40

【0160】

材料と方法

50

(xix) 動物

B6C3-Tg (APPswe, PSEN1dE9) 85Dbo/J 系統の成年ダブルトランスジェニック APP_{K670N, M671L}+PSI_{E9} マウス 19 匹を The Jackson Laboratory (Bar Harbor、メイン州) から購入し、The Weizmann Institute of Science の Animal Breeding Center で育て、維持した。動物はすべて、Weizmann Institute's Animal Care and Use Committee が策定した規則に従って取り扱った。Tg AD マウスを、記載されているように、キメラのマウス / ヒト APPswe (Swedish 'K594M/N595L' 変異を内部に持つ APP695 [ヒト化 A ドメイン])、及び独立したマウスプリオンタンパク質プロモーター (MoPrP) 因子が制御するヒト PS1dE9 (エキソン 9 の欠失) ベクターを同時注射することにより生成した (Borchelt ら、1997 年)。

【0161】

(xx) 試薬

組換えのマウス IFN- γ 及び IL-4 (両方とも、サイトカイン 1 μgあたり 0.1 ng 未満の濃度の内毒素を含む) を、R&D Systems (Minneapolis、ミネソタ州) から入手した。 - アミロイドペプチド [アミロイドタンパク質フラグメント 1~40 及び 1~42 (A_{1~40/1~42})] を Sigma-Aldrich、St. Louis、ミズーリ州から購入した。A ペプチドを、内毒素を含まない水に溶解し、記載されているように、A_{1~40/1~42} をインキュベートすることにより A_{1~40/1~42} 凝集物を形成させた (Ishii ら、2000 年)。

【0162】

(xxi) 遺伝子型同定

この実験で用いたマウスはすべて、尾を 1 cm 切り落としたものから抽出したゲノムの DNA を PCR 増幅することにより、導入遺伝子の存在に関して、遺伝子型の同定をした (Jankowsky ら、2004 年)。反応は 4 つのプライマー : マウスのゲノムの PrP にも存在するベクター内のアンチセンスプライマーにマッチする 1 配列 (5' - G T G G A T A C C C C C T C C C C A G C C T A G A C C) (配列番号 41) ; ゲノムの PrP コード領域に特異的な第 2 のセンスのプライマー (MoPrP ベクターから除去したもの) (5' - C C T C T T T G T G A C T A T G T G G A C T G A T G T C G G) (配列番号 42) ; 及び PS1 導入遺伝子 cDNA に特異的な 2 つのセンス及びアンチセンスプライマー (PS1-a : 5' - A A T A G A G A A C G G C A G G A G C A) (配列番号 43) 、及び PS1-b : 5' - G C C A T G A G G G C A C T A A T C A T (配列番号 44) を含んでいた。すべての反応により、DNA の完全性、及び増幅が成功したことに対するコントロールとして内因性 PrP 遺伝子の 750 bp 生成物が得られ、PS1 導入遺伝子陽性のサンプルでは、約 608 bp にさらなるバンドがある。

【0163】

(xxii) 酢酸グラチラマーウクチン接種

各マウスに、PBS × 1 200 μl に乳化した酢酸グラチラマー (GA (TV-5010)、MW 13.5 ~ 18.5 kDa、平均 16 kDa、Teva Pharmaceutical Industries Ltd.、Petach Tikva、イスラエル) の全量 100 μg を、実験 0 日目から 24 日目まで、第 1 週の間に 2 回、以後 1 週間に 1 回の 5 回皮下注射した。

【0164】

(xxiii) 行動試験

空間学習 / 記憶を、モーリスの水迷路 (MWM) における海馬依存の視空間の学習課題に対する成績により評価した (Morris、1984 年)。マウスに、連続 4 日、1 日あたり 4 回の試験を行い、その間、マウスは、直径 1.4 m のプールの水の表面の 1.5 cm 下に位置した隠れたプラットホームを見つけることが必要とされる。試験室内では、

水浸状態のプラットホームの位置に対する、遠位の視空間の手がかりだけが利用可能であった。回避の潜伏期、即ち、マウスがプラットホームを見つけ、その上に上るのに必要とされた時間を、60秒を上限として記録した。各マウスは、プラットホーム上に30秒間留まることができ、次いで、迷路から各自のホームケージへ移された。マウスが60秒以内にプラットホームを見つけなかった場合は、手操作でプラットホーム上に配置し、30秒後に各自のホームケージに戻した。試験間の間隔は300秒であった。5日目に、プラットホームをプールから取り除き、各マウスを60秒間のプローブトライアルにより試験した。6日目及び7日目に、プラットホームを、1~4日目に選択した場所の4分円反対側に配置し、次いで、マウスを、1日あたり4セッションで再訓練した。EthoVision自動化トラッキングシステム(No1dus)を用いて、データを記録した。

10

【0165】

(x x iv) BrdUの投与及び組織標本

BrdUを超音波処理によりPBSに溶解し、各マウス中にi.p.注射した(50mg/kg体重; PBS×1 200μl中BrdU 1.25mg)。実験22日目から開始して、最初のGAワクチン接種後、BrdUを2.5日間、1日2回12時間毎にi.p.注射して増殖している細胞を標識した。最初のBrdU注射の3週間後、マウスを深く麻酔し、経心的に、最初にPBSで、次いで4%パラホルムアルデヒドで灌流した。脳を全部取り除き、一夜、後固定し、次いで、リン酸緩衝30%ショ糖で平衡にした。浮遊性の30μmの切片を凍結ミクロトーム(Leica SM2000R)上で回収し、4で貯蔵した後、免疫組織化学検査を行った。

20

【0166】

(x x v) 神經前駆細胞培養

側脳室の脳室下帯を含む組織の冠状切片(厚さ2mm)を、成年C57Bl/6Jマウスの脳から得た。組織を細分し、次いで、パパイン0.94mg/ml(Worthington、Lakewood、ニュージャージー州)並びにL-システイン及びEDTAを0.18mg/ml含むEarleの平衡塩類溶液に、37、5%CO₂で45分間、消化させるためにインキュベートした。室温で15分間、110×gで遠心した後、ピペット粉碎により組織を機械的に解離した。単一の細胞懸濁液から得た細胞を、NPC培地[L-グルタミン2mM、グルコース0.6%、ブトレシン9.6μg/ml、プロゲステロン6.3ng/ml、亜セレン酸ナトリウム5.2ng/ml、インスリン0.02mg/ml、トランスフェリン0.1mg/ml、ヘパリン2μg/ml(すべてSigma-Aldrich、Rehovot、イスラエルから)、線維芽細胞成長因子-2(ヒト組換え、20ng/ml)、及び上皮成長因子(ヒト組換え、20ng/ml、両方ともProtech、Rocky Hill、ニュージャージー州から)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)/F12培地(Gibco/Invitrogen、Carlsbad、カリフォルニア州)]入り、75cm²Falcon組織培養プラスコ(BD Biosciences、San Diego、カリフォルニア州)に塗抹(3500細胞/cm²)した。4~6日毎に球を通過させ、単一の細胞として再塗抹した。緑色蛍光タンパク質(GFP)発現性NPCを、先に記載された通りに得た(P1uchinoら、2003年)。

30

【0167】

(x x vi) ミクログリアの一実施形態培養物

新生仔の(P0~P1)C57Bl/6Jマウスからの脳の髄膜をはぎ取り、手術用顕微鏡(Zeiss、Stemi DV4、ドイツ)下Leibovitz-15培地(Biological Industries、Kibbutz Beit Ha-Emek、イスラエル)中、はさみで細分した。トリプシン処理後(0.5%トリプシン、10分間、37/5%CO₂)、組織を粉碎した。細胞懸濁液を、グリア細胞に対して培地で洗浄し[ウシ胎児血清(FCS; Sigma-Aldrich、Rehovot)10%、L-グルタミン(1mM)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、ペニシリノン(100U/ml)、及びストレプトマイシン(100mg/ml)を補充したDMEM]、ポリ

40

50

- D - リシン (P D L) (1 0 m g / m l ; S i g m a - A l d r i c h , R e h o v o t) でコーティングした 7 5 c m² F a l c o n 細胞培養フラスコ (B D B i o s c i e n c e s) 中、ホウ酸バッファ (ホウ砂 2 . 3 7 g 及びホウ酸 1 . 5 5 g を滅菌水 5 0 0 m l に溶解したもの、 pH 8 . 4) で 3 7 / 5 % C O₂ で 1 時間培養し、次いで、滅菌の、ガラス蒸留した水で徹底的にすすいだ。培養 6 時間後、及びその後 2 日目に開始して全培養時間の 1 0 ~ 1 4 日間、2 日毎に培地の半分を交換した。ミクログリアを、 1 0 日目と 1 4 日目の間に最高の収量であった始めの混合した脳のグリア細胞培養物から振り落とし (1 5 0 r p m 、 3 7 、 6 時間) 、 P D L で予め処置した 2 4 ウェルプレート (1 m l / ウェル、 C o r n i n g) 上に接種し (1 0⁵ 細胞 / m l) 、ミクログリア用の培地 [F C S 1 0 % 、 L - グルタミン酸塩 (1 m M) 、ピルビン酸ナトリウム (1 m M) 、 - メルカプトエタノール (5 0 m M) 、ペニシリノン (1 0 0 U / m l) 、及びストレプトマイシン (1 0 0 m g / m l) を補った R P M I - 1 6 4 0 培地 (S i g m a - A l d r i c h)] で増殖させた。細胞を、 P D L コーティングした培養フラスコの表面に接着させ (3 0 分、 3 7 / 5 % C O₂) 、非接着の細胞をすすぐ落とした。

【 0 1 6 8 】

(x x v i i) マウス神経前駆細胞とマウスミクログリアの同時培養

処置した、又は非処置のミクログリアの培養物を、新しい N P C 分化培地 (N P C 用の培地と同じであるが、成長因子を含まず、 2 . 5 % F C S を含む) で 2 回洗浄して試験した試薬の痕跡をすべて除去し、次いで、氷上で 1 5 分間インキュベートし、室温で 2 0 分間 3 5 0 r p m で振盪した。ミクログリアをフラスコから除去し、直ちに N P C と 1 0 日間、 N P C 分化培地の存在下で、 2 4 ウェルのプレートで、 M a t r i g e l (商標) (B D B i o s c i e n c e s) でコーティングしたカバーガラス上、 N P C (5 × 1 0⁴ 細胞 / ウェル) と同時培養 (5 × 1 0⁴ 細胞 / ウェル) した。次いで、培養物を 2 . 5 % パラホルムアルデヒドの P B S 溶液で 3 0 分間室温で固定し、ニューロンのマーカー及びグリアのマーカーに対して染色した。

【 0 1 6 9 】

(x x v i i) 免疫細胞化学及び免疫組織化学

N P C とマウスミクログリアとの同時培養物からのカバーガラスを P B S で洗浄し、上記に記載したように固定し、 1 0 % F C S 、 2 % ウシ血清アルブミン、 1 % グリシン、及び 0 . 1 % トリトン X - 1 0 0 (S i g m a - A l d r i c h , R e h o v o t) を含む透過処理 / ブロッキング溶液で処置し、マウス抗 - チュープリン - I I I - イソ型 C - 末端抗体 (- I I I - チュープリン ; 1 : 5 0 0 ; C h e m i c o n , T e m a c u l a 、カリフォルニア州) と C D 1 1 b (M A C 1 ; 1 : 5 0 ; B D - P h a r m i n g e n , F r a n k l i n L a k e s 、ニュージャージー州) の組合せで染色した。

【 0 1 7 0 】

B r d U 染色では、切片を P B S で洗浄し、 2 N H C l で、 3 7 で 3 0 分間インキュベートした。切片を、ブロッキング溶液 (2 0 % 正常ウマ血清及び 0 . 1 % トリトン X - 1 0 0 を含む P B S 、又は V e c t o r L a b o r a t o r i e s (B u r l i n g a m e 、カリフォルニア州) から得たマウス免疫グロブリンブロッキング試薬を含む P B S) で 1 時間プロックした。

【 0 1 7 1 】

免疫組織化学検査用に、組織切片を、 1 0 % F C S 、 2 % ウシ血清アルブミン、 1 % グリシン、及び 0 . 0 5 % トリトン X - 1 0 0 (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s) を含む透過処理 / ブロッキング溶液で処置した。組織切片を、以下の 1 次抗体の特定の組合せで、 4 で一夜染色した：ラット抗 - B r d U (1 : 2 0 0 O x f o r d B i o t e c h n o l o g y , K i d l i n g t o n , O x f o r d s h i r e 、英国) 、ヤギ抗 - D C X [ダブルコルチン] (1 : 4 0 0 ; S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) 、及びマウス抗 - N e u N [ニューロンの核タンパク質] (1 : 2 0 0 ; C h e m i c o n , T e m e c u l a 、カリフォルニア州) 。 2 次抗体は、 F I T C 複合したロバ抗 - ヤギ、 C y 3 複合したロバ抗 - マウス、及び C y 5 又は C y 6 複合し

たロバ抗 - ラット (1 : 200 ; Jackson ImmunoResearch, West Grove、ペンシルベニア州) であった。ミクログリアを標識するために、我々は、CD11b (MAC1 ; 1 : 50 ; BD - Pharmingen)、又は FITC 複合したバンデイラエアシンプリシフォリア (Bandeiraera Simplicifolia) イソレクチン B4 (IB4、1 : 50 ; Sigma - Aldrich, Rehovot) のいずれかを使用した。細胞表面のMHC - II タンパク質の発現を検出するため、我々は、抗 - MHC - II 抗体 (ラット、クローン IB4 - 5 / 22 ; 1 : 50 ; Chemicon, Temecula、カリフォルニア州) を用いた。ヒト A の発現を検出するために、我々は、抗 - A (ヒトアミノ酸残基 1 ~ 17) (マウス、クローン 6E10, Chemicon, Temecula、カリフォルニア州) を用いた。IGF - I の発現を、ヤギ抗 - IGF - I 抗体 (1 : 20 ; R & D Systems) により検出した。TNF - の発現を、ヤギ抗 - TNF - 抗体 (1 : 100 ; R & D Systems) により検出した。T 細胞を抗 - CD3 ポリクローナル抗体 (ウサギ、1 : 100 ; DakoCytomation、カリフォルニア州) で検出した。核を染色するのに、ヨウ化プロピジウム (1 µg / ml ; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad、カリフォルニア州) を用いた。

【0172】

特異的な染色を、非特異性の抗体又は自己蛍光成分の染色から区別するために、コントロールの切片 (1 次抗体で処置していないもの) を用いた。次いで切片を PBS で洗浄し、抗退色剤としてのジアザビシクロオクタンとともに、ポリビニルアルコール中でカバーガラスをかけた。

【0173】

(× × i ×) 定量化及び立体解析学的計数手順

顕微鏡の分析では、我々は、Zeiss LSM510 共焦点レーザー顕微鏡 (倍率 40 ×) を使用した。in vitro の実験では、我々は、各実験群に対して、0.053 mm² (少なくとも 2 枚の異なるカバーガラスから n = 8 ~ 16) の視野をスキャンした。各マーカーに対して、500 ~ 1000 個の細胞をサンプリングした。GFP と - III - チュープリンを同時発現する細胞を計数した。

【0174】

in vivo の実験では、海馬における A⁺ のブラーク及び CD11b⁺ / IB-4⁺ ミクログリアの数を、各マウスからの 6 ~ 8 個の冠状切片 (30 µm) から、300 µm の間隔で計数した。DG の神経発生を、各マウスからの 6 個の冠状切片 (30 µm) において、未熟なニューロン (DCX⁺)、増殖している細胞 (BrdU⁺)、及び新規に形成した成熟ニューロン (BrdU⁺ / NeuN⁺) を計数することにより評価した。BrdU⁺ / NeuN⁺ の同時発現の特異性を、光学的な切片で 1 µm の間隔で、共焦点顕微鏡 (LSM510) を用いてアッセイした。細胞数、A⁺ ブラークの数、ブラークの面積、及び DG における単位面積あたりの NeuN 染色の強度を、Image - Plus 4.5 ソフトウェアを用いて自動的に評価した (Media Cybernetics)。

【0175】

(× × ×) 統計学的分析

MWM 行動スコアを、処置群及びトライアルブロックを変動の源として、3 要因の分散分析を用いて分析し、MWM においてトライアルブロックを獲得している間の平均スコア間の差の有意性を評価した。得られた P 値が有意であった場合、2 個 1 組のフィッシュマンの最小有意差法の多重比較検定を行って、どの群に有意差があるかを決定した。

【0176】

in vitro の結果を、Turkey - Kramer の多重比較検定 (分散分析) により分析し、平均値 ± SEM で表した。in vivo の結果を、Student の t 検定、又は 1 要因の分散分析により分析し、平均値 ± SEM で表した。

【0177】

10

20

40

50

(実施例3(1))

T細胞ベースのワクチン接種はADにおける認知低下に対抗する

我々は、変異のヒトプレセニリン1遺伝子(PS1dE9)を発現するADダブルトランスジェニックマウス(Tgマウス)におけるGAの効果、及び、両方とも、早期発症の家族性ADに特有な特徴である、学習/記憶障害、及び主に皮質及び海馬におけるAβラーカの蓄積をもたらす、キメラのマウス/ヒトのアミロイド前駆体タンパク質(APPswe)を試験した(Borcheltら、1997年)。各マウスにおける両方の導入遺伝子の発現を、ゲノムのDNAのPCR増幅により検証した。次いで、約8月齢のAPP/PS1 Tgマウスを、第1週目の間に2回、その後週1回、GAを皮下にワクチン接種した(n=6)。年齢をマッチさせたTgマウス(n=7)、及び導入遺伝子を保有しない非-Tgの同腹仔(n=6)は処置せず、それぞれ、非処置のTg、及び野生型の非-Tgコントロールとした。最初のGA注射の5週間後、マウスをすべて、海馬依存性の空間学習/記憶の課題の成績を反映する、認知活動に対するモーリスの水迷路(MWM)で評価した(van Praagら、2000年に再考)。非処置のTgマウスのMWM成績は、平均して、年齢にマッチさせた非-Tgの同腹仔の成績よりも有意に悪かった(図14)。しかし、GAでワクチン接種したTgマウスの成績は非処置のTgマウスの成績よりも優れており、非-Tgの同腹仔の成績と有意差がなく(図14)、GAでのワクチン接種は、さらなる認知の喪失を防ぎ、早期の機能欠損の部分を逆転さえすることを示していた。認知の喪失又は改善は、獲得及び逆転の課題の両方で明らかであった(図14A~14C)。

【0178】

(実施例3(2))

T細胞ベースのワクチン接種は、ミクログリアの免疫活性を調節し、-アミロイドplaquesの形成を除去し、ニューロンの生存を支持し、神経発生を誘発する

我々は上記の結果に駆り立てられて、観察された認知の喪失の停止及び反転は、Aβラーカの減少、及び海馬におけるニューロンの生存に関連していた可能性について試験した。ヒトAβに特異的な抗体を有するTgマウスからの脳の凍結切片を染色したところ、非処置のTgマウスでは多数のplaquesが明らかになったが、GAでワクチン接種したものにはほとんどなかった(図15A)。それぞれの非-Tgの同腹仔では、plaquesは見られなかった(図15A)。NeuNの免疫活性を試験すると、非処置のTgマウスではニューロンの喪失が明らかになったが、GAでワクチン接種したTgマウスではニューロンが保存されていたことが明らかになった(図15A)。

【0179】

活性化されたミクログリアは、ADの病原性で役割を果たしていることが知られている。我々は、上記の実施例で、炎症性疾患及び神経変性疾患に関連して見られるミクログリアと異なり、神経組織の生存に関連しているミクログリアは、MHC-IIを発現し、IGF-Iを生成し、ほとんど又はまったくTNF-αを発現しないことを示してきた。そこで、我々は、GAでワクチン接種したTgマウス、及び非処置のTgマウスからの脳の切片を、CD11b又はTNF-α(細胞毒性の炎症性の表現型に関連する活性化のマーカー)に対してポジティブに染色するミクログリアの存在について試験した。plaquesの存在は、TNF-αを発現するCD11b⁺ミクログリア(図15B)の出現に相関することが見出され、(図15C及びAβplaques及びTNF-αを発現するCD11b⁺ミクログリアの3-D再構築を描く、動画S1(本発明者らが作成したが、ここには示していない)。この動画は、図15Cに示した非処置のTgマウスの海馬におけるAβplaques内に埋め込まれたミクログリア細胞の3-Dの共焦点画像の代表を表しているが、図15ではTNF-αの高い免疫反応性及び細胞質で貪食されたAβが注目できる)、非処置のTgマウスに豊富であった。GAでワクチン接種したTgマウスでは、検出可能なCD11b⁺ミクログリアは著しく少なかった(図15B)。抗-MHC-II抗体で染色すると、非処置のTgマウスにはMHC-IIを発現するミクログリアはほとんどないが(それらがAPCとして作用する能力がないことを示している、データは示さず)、GAでワ

クチン接種した Tg マウスでは、残留の A⁻ + プラークに近接するミクログリアのほとんどが MHC - II を発現し、それらの中には TNF -⁻ を発現するものはほとんどなかつたことが明らかになった（図 15 D、及び GA でワクチン接種した Tg マウスにおける MHC - II⁺ ミクログリアに関連した A⁻ - 免疫反応性の 3D - 再構築を描いた動画 S 2（本発明者らが作成したが、ここには示していない）。この動画は、また、図 15 D に示した、限界のレベルの TNF -⁻ 及び高レベルの MHC - II を発現するミクログリアの代表的な 3 - D の共焦点画像を示している）。これらの後者のミクログリアも IgF - I を発現し（図 15 E、及び、 IgF - 1 及び MHC - II⁺ を同時発現するミクログリア細胞の 3 - D の再構築を描いた動画 S 3（本発明者らが作成したが、ここには示していない）。この動画は、図 15 E に示した IgF - I - 発現性の GA でワクチン接種した Tg マウスからの MHC - II⁺ ミクログリアの代表的な 3 - D 共焦点画像を示すものである）、神経保護及び神経発生を促進するそれらの可能性、並びに学習及び記憶に有益に影響を及ぼすそれらの可能性を指摘していた。MHC - II⁺ 細胞はすべて、 IB 4 で同時標識され、それらがミクログリアであると同定された（データは示さず）。 CD11b⁺ ミクログリア（主に非処置の Tg マウスで見られる）は、比較的少数の分岐した突起を示したが、これらの突起は GA でワクチン接種した Tg マウスにおける MHC - II⁺ ミクログリアでは豊富であり、ふさふさした外見を与えていた（動画 S 1 及び S 2 に描く、示していない）ことに注目するのが重要である。
10

【 0180 】

さらに、非処置の Tg マウスと異なり、 GA でワクチン接種した Tg マウスでは多くの T 細胞（抗 - CD3 抗体により同定して）が、 MHC - II⁺ ミクログリアの極めて近くに見られた。これらのマウスに見られたあらゆる A⁻ - 免疫反応性は、 MHC - II⁺ ミクログリアと関連があるようであり、 CD3⁺ T 細胞と免疫シナプスを作り出している（図 15 F、及び MHC - II⁺ ミクログリアの極めて近くの CD3⁺ 細胞（ T 細胞）に関連した A⁻ プラークの 3 - D 再構築を描いた動画 S 4（本発明者らが作成したが、示していない）。この動画は、 CD3⁺ 細胞と、 MGc - II 及び A⁻ の複合体との間の免疫学的シナプスの、図 15 F に示した、 GA でワクチン接種した Tg マウスからの MHC - II⁺ ミクログリアの代表的な 3 - D 共焦点画像を示すものである）。

【 0181 】

GA でワクチン接種したマウスは、 6 週間後に試験した場合、非処置の Tg マウスよりも有意に少ないプラークを示し（図 15 G）、プラークによって占められた面積は、年齢にマッチさせた非処置の相対物よりも有意に小さかった（図 15 H）ことが定量分析で確認された。さらに、 GA でワクチン接種した Tg マウスは、非処置の Tg マウスの対応する群よりも、有意に少ない CD11b⁺ ミクログリア、及び NeuN に対して有意に強力な染色性を示した（図 15 I、 15 J）。

【 0182 】

MHC - II - 発現性のミクログリアは、 in vitro で神経発生とも関連しているので、我々は、海馬の歯状回（ DG ）における新規のニューロンの形成について、同じ切片を試験した。マウスにはすべて、組織を切除する 3 週間前に、増殖する細胞のマーカーである BrdU を注射してあったのでこれは可能であった。定量分析により、 GA でワクチン接種した Tg マウスでは（図 16 A ）非処置の相対物におけるよりも BrdU⁺ 細胞が有意に多かったことが明らかになった。さらに、それぞれの非 - Tg の同腹仔における新規に形成した成熟ニューロン（ BrdU⁺ / NeuN⁺ ）の数に比べると、非処置の Tg 群では数は有意に少なかったが、ワクチン接種した群では類似しており、ニューロンは、 GA のワクチン接種により少なくとも部分的に回復したことを指摘するものであった（図 16 B ）。対応する切片を、成年 DG で新規に産生された未成熟のニューロンの絶対数を分析するのに有用なマーカーであるダブルコルチニン（ DCX ）に対して分析すると、非 - Tg の同腹仔に比べて、非処置の Tg マウスの DG に存在する DCX⁺ 細胞は有意に少なかったが、 GA でワクチン接種した Tg マウスの DG ではわずかであるが有意に多かったことが明らかになった（図 16 C ）。共焦点顕微鏡写真は、 BrdU⁺ / NeuN⁺
30
40
50

細胞の数、又は D C X⁺ 細胞の数における相違、並びに、非-Tg の同腹仔、非処置の Tg マウス、及び G A でワクチン接種した Tg マウスの間のそれらの樹状突起を示している（図 16 D）。神経発生は、非処置の Tg マウスにおけるよりも G A でワクチン接種したマウスにおける方が実際に豊富であったことを、結果は示していた。しかし、興味深いことに、D C X⁺ 細胞が M H C - I I⁺ ミクログリアに隣接して位置する、G A でワクチン接種したマウスにおけるもの以外では、非処置の Tg マウス及び G A でワクチン接種した Tg マウスの両方で、D G の顆粒細胞下帯における D C X⁺ - 染色したニューロンの突起は短かった（図 16 E）。

【0183】

（実施例 3（3））

10

凝集した - アミロイドは、ミクログリアを誘発して神経発生を阻止する表現型を発現させ、この阻止は I L - 4 によって対抗される

上記に示した in vivo の結果は、神経発生の停止、A の凝集、及び活性化したミクログリアの表現型の間の関係を指摘している。凝集した A で活性化したミクログリアが神経発生を阻止するか否か、及び T 細胞由来のサイトカインが阻害効果に対抗することができるか否かを決定するために、我々は、G F P 発現性の N P C を、凝集した A ペプチド 1 ~ 40 / 1 ~ 42 (A (1 ~ 40 / 1 ~ 42); 5 μM) の存在下又は非存在下でそれらに最適の増殖培地で 48 時間プレインキュベートした G F P ミクログリアと同時培養し、引き続き、I F N - (10 ng / ml) と、又は I L - 4 (10 ng / ml) と I F N - (10 ng / ml) と、さらなる 48 時間処置した。次いで、増殖培地及びサイトカインの残渣を洗い流し、処置したミクログリアの調製物の各々を、分化培地の存在下で、Matrigel (商標) でコーティングしたカバーガラス上で、解離した N P C 球と新たに同時培養した（図 17 A）。N P C による G F P の発現により、培養物に見られたあらゆる分化しつつあるニューロンは、ミクログリアの一次培養物の汚染に由来するというよりも、むしろ N P C に由来することが確認された。10 日後、我々は、ニューロンのマーカーである - I I I - チュープリン (I I I T) を発現する G F P 陽性の N P C を識別することができた（図 17 B、17 C）。I I I T⁺ 細胞は、N P C なしで培養したミクログリアには見られなかった。ミクログリアなしで（コントロール）培養したコントロールの N P C では、著しく少ない G F P⁺ / I I I T⁺ 細胞が見られた。しかし、N P C の、I F N - (10 ng / ml) とのインキュベートにより予め活性化したミクログリアとの同時培養では、G F P⁺ / I I I T⁺ 細胞の数の増加は劇的であった。それとは対照的に、凝集した A (1 ~ 40) (5 μM) によって活性化されたミクログリアは、神経発生を阻止し、N P C の数を低下させた。この負の効果は、5 μM の A (1 ~ 40) によって活性化されたミクログリアでは表れなかった（データは示さず）。興味深いことに、凝集した A (1 ~ 40) で予め処置したミクログリアに I L - 4 (10 ng / ml) を加えると、凝集した A の、N P C の生存及び分化に対する有害作用に部分的に対抗し、これらのミクログリアは N P C を誘発してニューロンに分化させることができるという結果となった（図 17 D）。したがって、凝集した A (1 ~ 40) は神経発生を支持する能力を損ない、その効果は I L - 4 によりある程度、また I L - 4 と I F N - との組合せによりさらに強力に、対抗され得る様子である。

【0184】

考察

認知の低下、及び A ブラークの蓄積に冒されている A P P / P S 1 ダブルトランスジェニック A D マウスのこの試験では、T 細胞ベースのワクチン接種は、ミクログリアの表現型を変更することにより、認知の成績を改善し、ブラークの形成を低減し、皮質及び海馬のニューロンを救済し、海馬の神経発生を誘発した。

【0185】

（実施例 4）

筋萎縮性側索硬化症 (A L S) の動物モデルにおける酢酸グラチラマーのワクチン接種と幹細胞との組合せ

20

30

40

50

材料と方法

(×××i) 動物

Gly93 Ala (G93A) 遺伝子を含む、欠損したヒト変異体 SOD1 対立遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウス (B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (本明細書では「ALS」マウス) を、The Jackson Laboratory (Bar Harbor、メイン州、米国) から購入した。

【0186】

(×××ii) 免疫化

成年マウスを、Cop-1、100 µg の 200 µl PBS 溶液の s.c. で免疫化した。

10

【0187】

(×××iii) 神経前駆細胞培養

成人神経前駆細胞 (aNPC) の培養物を、先の実施例で記載したように入手した。

【0188】

(×××iv) 神経前駆細胞の定位注射

マウスに、最初の免疫化の 1 週間後に麻酔をし、定位固定装置に配置した。頭蓋を露出し、乾燥且つ清浄に保った。十字縫合を確認し、印をつけた。指定した注射点は脳の表面から 2 mm の深さで、前後軸における十字縫合の 0.4 mm 後方で、正中線に対して 1.0 mm 外側であった。神経前駆細胞を、Hamilton シリンジ (3 µl 中 5 × 10⁵ 細胞、1 µl / 分の速度) で適用し、傷上の皮膚を縫合した。

20

【0189】

(×××v) 運動機能障害

マウスの運動機能障害を、日齢 60 日以降、週 2 回、ロータロッドタスクを用いて評価した。動物を、水平方向に加速する桿状体 [マウス用の加速する桿状体 7650 (Jones and Roberts)] 上に配置し、各マウスが桿から落下するのに要する時間を記録した。我々は、各動物に対して各時間点に 3 回試験を行い、要した最長の時間を記録した。カットオフ時間点を 180 秒に設定し、少なくとも 180 秒間桿の上に留まっていたマウスを無症候とみなした。疾患の症状の開始を、毎週の時間点の間のロータロッドの成績の低下と決定した。動物が、配置された側に 30 秒以内に立ち直ることができなくなった場合に、安楽死により屠殺した。

30

【0190】

(実施例 4)

動物を、59 日目から Cop-1 で処置し、最初の 2 週間は、Cop-1 を週 2 回、以後、Cop-1 の注射を週 1 回投与した。幹細胞を、CSF 中に、500000 細胞投与した (成年神経幹細胞の 1 回注射)。

【0191】

Cop-1 のワクチン接種と幹細胞の組合せの投与が、ALS マウスモデル (本明細書では「ALS マウス」) に有益な効果を有するか否かを探索するために、実験を行った。この目的では、59 日齢の ALS マウスを、以下のように処置した：群 1 (図 18、Cop-1 + NPC) オス 4 匹を、Cop-1 / PBS 100 µg / 200 µl を週 2 回、2 週間 s.c. して免疫化し (最初の免疫化は 59 日齢のとき)、その後、安楽死まで 1 週間に 1 回免疫化した。第 3 回目の免疫化とともに、右の脳室中に 100000 NPC^{GFP} の i.c.v. (CSF) をマウスに投与した；群 2 (図 18、Cop-1) オス 5 匹を Cop-1 / PBS 100 µg / 200 µl で週 2 回、2 週間免疫化し、その後、安楽死まで 1 週間に 1 回免疫化を受けさせた；群 3 (図 18、コントロール) オス 5 匹を PBS 200 µl で週 2 回、2 週間免疫化し、その後、安楽死まで 1 週間に 1 回免疫化を受けさせた。

40

【0192】

各群からのマウスの体重を量り (週 2 回)、生命徵候について、及び運動機能障害の徵候について日常的に調べた。図 18 における得られた結果は、各群の ALS マウスの生存

50

の可能性を示している。結果は、C o p - 1でのワクチン接種とN P Cとの併用処置はA L Sマウスの生存の増大をもたらしたことを見ている。

【0193】

(実施例5)

酢酸グラチラマーでのE A Eの末梢の免疫調節性の処置により誘発される神経発生及び神経保護

材料と方法

(x x x v i) 動物

C 5 7 B L / 6 マウスを、H a r l a n (J e r u s a l e m 、イスラエル)から購入した。運動及び感覚のニューロンの集団上に黄色蛍光タンパク質 (Y F P)を選択的に発現する、Y F P 2 . 2 遺伝子導入マウス (C 5 7 B L / 6 と C B A のハイブリッドから生じた) (F e n g ら、2 0 0 0 年)は、J . R . S a n e s (W a s h i n g t o n U n i v e r s i t y S t . L o u i s 、ミズーリ州)より快く提供された。すべての実験で、8 ~ 1 0 週齢のメスマウスを用いた。

【0194】

(x x x v i i) E A E

ラットM O G (配列番号3 9) のペプチド p 3 5 ~ 5 5 で免疫化することにより、疾患を誘発した (S i g m a 、S t . L o u i s 、ミズーリ州)。マウスの側腹部に、C F A 中M O G 3 0 0 μ g 、及び熱不活性化した結核菌 5 0 0 μ g (S i g m a) を含むC F A の乳濁液 2 0 0 μ l を皮下注射した。1週間後、他方の側腹部に同一のブースターを投与した。最初のM O G 注射の直後、及び4 8 時間後に百日咳毒素 (S i g m a) をマウス1匹あたり 3 0 0 μ g 静脈注射した。マウスを毎日検査した。以下のようにE A Eをスコア付けた：0、疾患なし；1、だらりとした尾；2、後肢の麻痺；3、すべての四肢の麻痺；4、瀕死状態；5、死亡。

【0195】

(x x x v i i i) 酢酸グラチラマー (G A 、C o p a x o n e (登録商標)、コポリマー-1)は、L - アラニン、L - グルタミン酸、L - リシン、及びL - チロシンの4つのアミノ酸を含む合成ポリペプチドの酢酸塩からなる。T e v a P h a r m a c e u t i c a l I n d u s t r i e s (P e t a c h T i k v a 、イスラエル)から得た、平均分子量 7 3 0 0 k D a の、バッヂ 2 4 2 9 9 0 5 9 9 からのG Aを、試験を通して使用した。様々な疾患の時期 [即ち (1) E A E 誘発の直後に開始 (予防処置)、(2) 2 0 日目に疾患の徴候が出現した後に開始 (抑制処置)、又は (3) 誘発 4 5 日後の慢性期の間に開始 (遅延型抑制)] に、5 ~ 8 回連続した毎日の皮下注射 (2 m g / マウス)によりG A 処置を適用した。

【0196】

(x x x i x) B r d U

分裂する細胞のD N A中に組み込まれるチミジン類似体である5 - プロモ - 2' - デオキシウリジン (B r d U 、S i g m a)を、G A 処置と同時に (毎日1回)、又はG A 注射の完了直後 (毎日2回)のいずれかに、腹腔内注射 (5 0 m g / k g)した。

【0197】

(x 1) 灌流

動物をN e m b u t a l で深く麻酔をかけ、2 . 5 % パラホルムアルデヒドで経心的に灌流した。脳を取り除き、1 % パラホルムアルデヒドで後固定し、1 5 % ショ糖のP B S 溶液で凍結保護した。浮遊切片 (厚さ 1 6 μ m)を、滑走式ミクロトーム (L e i c a S M 2 0 0 0 r)で、脳全体にわたり、冠状又は球欠的に切断し、連続的にP B S に回収した。

【0198】

(x 1 i) 免疫組織化学

B r d U の組み込まれた細胞を検出するために、切片を 2 M H C l のP B S 溶液で、3 7 ℃ で 3 0 分間変性させ、次いで、室温で 1 0 分間、0 . 1 M ホウ酸バッファ (p H 8

10

20

30

40

50

.5)で中和した。特定の細胞型を検出するために、切片を、血清20%及びTrition-X-1000.5%を含むPBS溶液で1時間プレインキュベートし、次いで、1次抗体と室温で一夜インキュベートした。以下の1次抗体を用いた：ヤギ抗-ダブルコルチン(DCX)C-18(1:200、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、カリフォルニア州)、マウス抗-NeuN(1:300、Chemicon、Temecula、カリフォルニア州)、マウス抗-GFAP(1:100、Pharmingen、San Jose、カリフォルニア州)、ウサギ抗-ホスホ-ヒストン(phospho-histone)(1:200、Upstate Biotechnology、Charlottesville、バージニア州)、ラット抗-BrdU(1:200、Harlan、Indianapolis、インディアナ州)、ラット抗-Cd11b(1:50、Pharmingen)、及びニワトリ抗-BDNF(1:50、Promega、Madison、ウィスコンシン州)。第2の抗体のステップは、交差反応性を避けるために、高度に交差吸収されたCy2-又はCy3-複合したラット、マウス、ウサギ、ヤギ、又はニワトリに対する抗体(Jackson ImmunoResearch、West Grove、ペンシルベニア州)で標識することにより(1:200、20~40分)行った。コントロールのスライドは、2次抗体単独でインキュベートした。いくつかの場合では、シグナルを増強するために、我々はビオチン化した2次抗体を90分間使用し、その後Cy2-又はCy3-複合したストレプトアビジン(Jackson Immuno-Research)を用いた。核を標識するために、切片をHoechst 33258(Molecular Probes)で染色した。アポトーシスを検出するために、我々は、ウサギアンチクリープド(anti-cleaved)カスパーゼ3(1:75、Cell Signaling Technology、Beverly、マサチューセッツ州)、又はTUNELアッセイ(Apop-tag Fluorescein Detection Kit、Intergen、Purchase、ニューヨーク州)のいずれかを用いた。さらに、我々は、変性するニューロンに特異的に結合するFluoro-Jade B誘導体(Chemicon)を使用した。

【0199】

(x1ii) 顕微鏡

染色した切片を、CCDカメラ(DMX1200F、Nikon、東京、日本)に接続したPlan Fluor対物レンズを装着した、共焦点顕微鏡(Axiovert 100M、Zeiss、Oberkochen、ドイツ)により、又は蛍光顕微鏡(E600、Nikon)により調べ、写真撮影した。デジタル画像を収集し、Image Pro+ソフトウェアを用いて分析した。画像は、Adobe Photoshop(Adobe Systems、San Jose、カリフォルニア州)を用いて組み立てた。

【0200】

(x1iii) 定量

神経前駆細胞を、BrdU⁺細胞(BrdU/DCX2重染色したもの)を計数することにより、及びDCX⁺細胞(SVZにおける)を計数することにより、又はDCX染色した部位(SVZ及びRMSにおける、この場合密度により個々の細胞が計数できなかつた)を測定することにより定量した。定量は、冠状切片で、SVZでは内側中隔のレベルで開始して640μm後方へ、また海馬のDG(BrdU/DCXに対する両方のブレード、又はDCXに対する上部のブレードにおける)においてその中隔側頭軸を通って行った。RMSにおける定量を、脳の中央線から1mmで開始して、640μm外側の矢状切片で行った。各脳の構造に対する結果を、マウス1匹あたりの8個の片側のレベル(80μm離れて、各処置群でマウス3~4匹)から平均し、ナイーブのコントロールからの変化の倍数で表す。皮質におけるBrdU/NeuNのダブルポジティブ細胞の定量を、無作為に選択した0.15mm²の面積で行った(マウス1匹あたり10切片を計数、各処置群でマウス3匹)。

【0201】

10

20

30

40

50

(x1iv) 統計学的分析

BrdU 及び DCX の分析では、平均値 \pm SEM (マウス 1 匹あたり 8 個の片側レベルからの平均、各処置群でマウス 3 ~ 4 匹) を一元配置の分散分析 (ANOVA) にかけ、その後、必要に応じて、比較法の誤り率 0.05 でフィッシャーの最小有意差法 (LSD) を行った。BrdU の組み込みに対するコントロール値は、時間の関数として低下したので、結果は BrdU を同時に注射したナイーブのコントロールからの変化の倍数として表した。皮質における BrdU / NeuN ダブルポジティブの細胞数を、マウス 1 匹あたり 10 個の切片から平均し (各処置群でマウス 3 匹)、1 mm³ あたりの細胞数として表した。

【0202】

10

(x1v) 幹細胞の調製

ROSA26 マウスは、胎児のすべての組織において、及び成年マウスのほとんどの組織において、lacZ を発現する。ROSA26 マウスから、大腿骨及び脛骨を、10% ウシ胎児血清を含むハンクス平衡塩類溶液で洗い流すことにより、骨髄 (BM) 細胞を単離した。単一の細胞の懸濁液を、移植用に調製した。

【0203】

(実施例 5 (1))

実験モデルの記載

EAE の出現、及び CNS における GA 処置を試験するために、我々は、C57BL/6 の感受性系統、並びに、その運動及び感覚のニューロンの集団上に YFP (黄色蛍光タンパク質) を選択的に発現し、したがって軸索 / ニューロンの損傷を追跡する単純な手段を提供している、YFP2.2 トランスジェニックマウスのマウスの 2 系統の MOG35 ~ 55 ペプチド誘発性の EAE モデルを用いた (Fengら、2000 年)。YFP2.2 マウスは、C57BL/6 マウス同様、MOG 誘導性 EAE に感受性であった (図 19 A)。両方の系統で、EAE の誘発は、16 ~ 20 日目に開始して (重症度を増し、20 ~ 24 日目までに平均スコアが 3 に到達した) 慢性的 (非緩解性の) 疾患をもたらし、灌流するまでグレード 2 ~ 2.5 の慢性期を維持した。GA 処置は、様々な段階、即ち (1) 疾患誘発の直後に開始 (予防処置)、(2) 20 日目に疾患の徴候が出現した後に開始 (抑制処置)、又は (3) 誘発 45 日後、慢性期の間に開始 (遅延型抑制) において毎日の注射を 5 ~ 8 回することにより適用した。GA は、それが投与された段階に関わらず、EAE の臨床徴候を改善した (図 19 B)。有益な効果は、時を経ても安定しており、マウスを屠殺するまで持続した。EAE を与えたマウス (EAE マウス) 対、GA で処置した EAE 誘発性マウス (EAE + GA) の脳における、in situ の徴候を、ナイーブのマウス (コントロール) の脳と比較して試験した。

20

【0204】

30

(実施例 5 (2))

神経学的損傷の特徴付け

YFP2.2 マウスでは、YFP は、主に軸索及び樹状突起により発現された。大脳皮質及び海馬における部分的な集団は、細胞体でも YFP を発現した。グレード 2 ~ 4 の EAE に罹患したマウスからの脳切片における YFP 発現は、軸索の横断面に現れた多数のニューロンの形成異常、まばらな突起、及び線維の変性が明らかだった (図 20 A)。様々な脳の領域で、複数の広範な病変部が高頻度に観察され (図 20 B)、かなりのニューロン及び軸索の喪失を示していた。EAE マウスにおける細胞の形態学におけるさらなる変形は、膨張する中空の Hoeschst 染色された核により明らかのように、核の辺縁趨向を伴うニューロンの細胞体の拡大及び膨張であった (図 20 C)。これらの欠点は、ニューロンのマーカーである NeuN により染色した EAE 誘導性の C57BL/6 マウスで類似の現象が観察されたので (データは示さず)、遺伝子導入系統の異常に起因するものではなかった。変性するニューロンに結合する Fluoro-jade B で染色すると、疾患誘発 25 日後に、皮質においてポジティブに染色される細胞が明らかになったが、これが臨床上の徴候のピークである (図 20 D)。しかし、我々は、切断されたカスパーゼ

40

50

- 3 抗体、又は TUNEL アッセイのいずれを用いても両系統の皮質及び線条体における著しい量のアポトーシスを見ることはできず、アポトーシスのメカニズムは、このモデルにおける損傷の程度を説明することができなかったことを示していた。CD3で染色した細胞の血管周囲の浸潤は、異常な領域に隣接して、又はその内部に見出され、浸潤するT細胞の有害な役割を示していた(図20A)。ナイーブのコントロール、及びGAを注射したがEAEで誘発しなかったマウスでは、我々は、ニューロンの形成異常、又は血管周囲の浸潤を見ることはなかった(示さず)。

【0205】

EAE+GAマウスの脳(予防処置、又は抑制処置のいずれか)では、EAEマウスの脳よりも検出された損傷は著しく少なく、変性する線維の量が減少し(図20A)、病変部の数及びサイズが低減し(図2B)、細胞核の膨潤(図20C)が減少したことが明らかになった。YFPポジティブの線維の薄層が、GA処置した動物の病変部にわたって高頻度に見出され、損傷を受けた領域における生存するフィラメントの生存、又は軸索の出芽を示唆していた。GA処置マウスの脳にも、T細胞の浸潤が見られたが、少量であり、その位置は損傷とは関連がなかった(図20A)。

【0206】

(実施例5(3))

ミクログリアの活性化

MAC-1に対する免疫染色(CD11b、マクロファージ及びミクログリア上に発現され、これらの活性化の後上方制御される)は、EAEマウスにおけるニューロンの傷害の程度と相関していた(小脳で示す、図21A)。したがって、活性化したミクログリアで占められる部位では、線維が低密度であり、軸索の喪失が一般に明らかであったが(ボックスI)、非活性化のミクログリアの隣接部位では、ニューロンの構造はそのままの様子であった(ボックスII)。活性化したMAC-1⁺細胞の血管周囲の浸潤は、傷害部位で見られ、末梢を起源とするマクロファージも、病理学的プロセスに関与していたことを示唆していた。図21Bに示すように、EAEマウスに見られたMAC-1染色強度における莫大な増大が、線条体、視床、及び海馬などのさらなる脳の領域において実証された。コントロールのマウスの脳におけるMAC-1⁺細胞は、比較的小さい細胞体を有し、静止のミクログリアを示す長い枝分れした突起を有していた。それとは対照的に、EAEマウスの脳は、サイズの増大した丸い細胞体、及び多くの後退した短い突起が表れ、高度に活性化したミクログリアを指摘するものであった(挿入部分)。EAE+GAマウスの脳では、MAC-1の発現が著しく低減し、中程度の活性化を示していた。GA処置したマウスにおけるMAC-1⁺細胞の細胞形態は、ナイーブのマウスにおける非活性化のミクログリアの形態と類似していた(挿入部分)。この、EAE+GAマウスにおけるミクログリアの活性化の停止は、GA注射中止後最高30日の様々な時間で見られた。

【0207】

(実施例5(4))

神経前駆細胞の増殖

EAEの病理学的プロセス後、及びGA処置後の神経前駆細胞の発生及び増殖を評価するために、我々は、GA処置と同時に注射した2つのマーカー：未成熟なニューロンのマーカーであるDCX(胎児及び成人の脳の遊走し、分化するニューロンに関連する)、並びにBrdU(分裂する細胞のDNA中に組み込まれるチミジン類似体)を使用した。したがって、DCXの発現は、動物を屠殺する10~14日前に産生された新規のニューロンの量を示し、BrdUを組み込んだ細胞の数(BrdU/DCXで2重染色されたもの)はBrdU注射期間の間に表れたニューロン前駆細胞の数を示すものであった。ニューロン増殖を、ニューロン増殖性地帯即ち脳室下帯(SVZ)で、並びに、海馬の顆粒細胞下帯(SGZ)及び顆粒細胞層(GCL)で試験した。BrdU及びDCXは、重複するパターンを表した。

【0208】

EAEマウスのSVZでは、疾患の出現後、コントロールに比べてニューロン前駆細胞

10

20

30

40

50

の増殖が増大した（EAE誘発25日後、最後のBrDU注射1日後）（図22A、22B I）。これは、BrDU及びDCXの発現において、それぞれ2.1倍及び1.4倍の増大により明らかだった（図22D、SVZ、I、赤色のカラム）。それでも、10日後及び20日後、EAEマウスとナイーブのコントロールとの間には、BrDU及びDCXの発現における有意差はなかった（図22B、22D、II、III）。さらに、長期間（35日間及び60日間）疾患に持ちこたえているマウスにおいて、BrDUをEAEの誘発と同時に注射し1カ月後に試験した場合（図22D、最初の赤色のカラム）、又は灌流前の慢性状態の間（図22D、最後の赤色のカラム）の場合のいずれかに、BrDDUの組み入れにより表れた増殖は、コントロールの増殖よりも低かった。EAEマウスにおけるGA処置（投与スケジュールを図22Eに示す）は、非処置のEAEマウス及びコントロールに比べて、SVZにおけるニューロンの増殖を増強した（図22A、22B）。この増加は、GA注射終了1日後及び10日後に、抑制処置によるBrDU及びDCXの両方について、コントロール及びEAEを上回る統計学的有意性に到達した（図22D）。遅延型抑制処置は、EAEを上回る有意な上昇をもたらしたが、コントロールを上回らなかった。予防処置では、DCXについてのみ、EAE及びコントロールを上回る実質的な上昇が観察された（4倍）が、BrDUを組み入れても、EAEに比べて有意な上昇が示された。
10

【0209】

海馬のSGZでは、ニューロンの増殖は疾患の出現後に増大したが、ナイーブのコントロールの増殖を下回って実質的に低下した（図22C、22D、海馬、赤色のカラム）。海馬におけるGA処置の効果は、SVZにおけるその効果と類似していた、即ち、増殖の増大は、BrDUの組み入れ、及び抑制処置の終了後に持続しないDCX発現の両方により表れた。予防処置、及び遅延型抑制処置は、GA/BrDU注射が終了し、それ1カ月後及び1日後に、EAEマウスよりも高いニューロン増殖をもたらした。とりわけ、EAEマウスの海馬では、また、より大きい程度でEAE+GAマウスでは（図22C）、²⁰ BrDU⁺/DCX⁺細胞がSGZ及びGCLに隣接して見られた。DCX発現性の細胞は、内側の分子層を横切り、外側の分子層中に拡張した、発達の良好な尖端樹状突起を伴う高密度で枝分れした樹状突起の木を表していた。

【0210】

灌流前、又は1カ月前に、ナイーブのマウス（EAEなしの）にGAを注射しても、SVZ及びDGの両方で、BrDU又はDCXの発現の著しい増大をもたらさなかった（図22D、灰色のカラム）。

【0211】

（実施例5（5））

神経前駆細胞の遊走

誘発された前駆細胞の密度を試験するために、我々は、最初に、成年マウスにおいてSVZ細胞が通常遊走する経路である吻側細胞移動路（RMS、図23Aに示す）中への前駆細胞の動員を追跡した。SVZに隣接する切片に（図23D）、及びより中央の切片で示したように（図23E）、EAEマウスのRMSに沿って遊走するBrDU、及びDCX標識した細胞の量は（疾患誘発25日後、BrDU注射1日後）、コントロールに比べて上昇した。これは、BrDU⁺/DCX⁺細胞の数において、及びDCX染色された面積において、それぞれ3.1倍及び1.6倍の上昇により明らかだった（図23F、23G、赤色のカラム）。GA処置後（20~25日目、抑制）、RMSにおけるニューロン前駆体の量はより多く、BrDU/DCX発現性細胞の広範な流れを示していた（図23B、23D、23E）。したがって、BrDU及びDCXの発現におけるコントロールを7.8倍及び2.6倍上回った上昇、並びにEAEマウスを2.2倍及び1.6倍上回った上昇が、GA処置後に得られた（図23F、23G、青色のカラム）。とりわけ、GA単独の注射も、前駆体のRMS中への動員を強化したが、より低い程度であった（図23F、23G、灰色のカラム）。

【0212】

10

20

30

40

50

ニューロン前駆体の同様の動員のパターンが、後の時間点で見られた（EAE誘発35日後、GA処置を予防処置として与えた場合、即ちEAE対コントロールのマウスのRMSにおけるDCX発現の上昇、及びEAE+GAマウスにおけるより頑強な遊走）（図23H）。興味深いことに、（13匹のマウス中）1匹のEAEマウスで、我々は、GA処置マウスの遊走に類似したニューロンの遊走の強化を見出した。このマウス（EAE-reecと表す）は、ほんのわずかな、短期間の疾患を表し（スコア2、誘発後24～26日目）、灌流の日までに完全に回復した。

【0213】

EAEマウスのGAでの処置は、RMSを介したニューロン前駆体の動員の強化をもたらしただけではなく、発達中の前脳に自然に見られるニューロンの遊走の側方皮質経路（LCS）に対応する領域内へのそれらの遊走ももたらした（図23Aに示す）。したがって、DCX⁺細胞は、脳梁及び海馬・脳梁（hippocampo-callosal）の界面に沿った鎖において、様々な皮質の領域、主に後頭部の皮質に向かってSVZから尾側に移動する様子であった（図23C）。我々は、GAで処置しなかったEAEマウスの対応する切片では、このような動員のパターンを追跡することはできなかった。さらに、EAE+GAマウスでは、ニューロン前駆体は古典的なニューロン増殖性地帯及び遊走流から分岐し、線条体、側坐核、及び皮質などの非定型的な領域に広がった（図24）。DCX⁺細胞は、YFP発現性フィラメントにごく近接したRMSから遠ざかる様子であり、神経線維に沿ったそれらの遊走を示唆していた（図24A）。これらの方向及び配向によって見ると、これらはRMS及びSVZの両方から離れて遊走するが、幾匹かのマウスでは、ほとんどの細胞はSVZから伸長し（図24B）、他のマウスではRMSはそれらの主要な起源と思われた（図24C）。DCX⁺細胞は、RMSから前頭部の皮質中に（図23B、24D）、またLCSから後頭部の皮質（図23C）に到達している様子であった。これらは、先導する及び引きずる突起を有する紡錘状の細胞体など（O'Rourkeら、1995年）遊走するニューロンに特徴的な形態学的特徴を表し、これらの配向は、遊走流から神経線維に沿って皮質の内部部分中の遊走と一致していた（層5及び層6で示す、図24E、24F）。我々は、ニューロン増殖性地帯、並びに小脳及び橋などの遊走流から離れた部位ではニューロン前駆細胞を検出しなかった。

【0214】

GA処置及びBrdU注射後の早期の時間点では（1～10日）、RMSから遊走して出た神経前駆細胞は、線条体（図25A）及び側坐核（図25B）で示されるように、BrdUとDCXとの同時発現を表し、これらがGA処置と同時に分裂を経験していたことを指摘していた。いくつかの場合では、これらのダブルポジティブの細胞は小集団で出現し、局所の分裂も示唆するものであった。さらに、M期における細胞の内因性のマーカーであるリン酸化ヒストンH³で染色すると、図25Cにおける側坐核に蓄積したニューロン前駆細胞に対して見られるように、いくつかのDCX⁺細胞は灌流の前に増殖したことを示していた。

【0215】

後の時間点では（GA処置完了1ヶ月後）、ニューロンの核の抗原（NeuN）を同時発現するBrdU⁺細胞が、線条体（図25D、25F）、側坐核（図25E）、及び皮質（図25G、帯状の皮質層5）に見られ、いくつかのニューロン前駆細胞は、成熟ニューロンの表現型に向けてさらに分化していたことを指摘していた。YFPマウスの皮質では（図25H、25I、帯状、図25J、後頭部、図25K、運動）、BrdU及びYFPを尖端樹状突起及び軸索と同時発現する錐体細胞が観察され、成熟した機能性のニューロンを指摘するものであった。平均 $128 \pm 46 / \text{mm}^3$ のBrdU⁺/NeuN⁺で2重標識した細胞が、EAE+GAマウスの皮質に見られ、全NeuN⁺細胞の1.3%を構成していた。BrdU⁺/NeuN⁺細胞は、GAで処置しなかったEAEマウスの皮質にも、より少数ではあるが（ $48 \pm 25 / \text{mm}^3$ 、NeuN⁺細胞から0.58%）見出されたことに留意されたい。ナイーブのマウスの皮質では、BrdU⁺/NeuN⁺細胞は見られなかった。

10

20

30

40

50

【0216】

(実施例5(6))

病変部位への遊走

新規に產生されたニューロンは、損傷を受けた領域に引き付けられると思われた。したがって、DCX/BrdUの集団、及びNeuN/BrdUを同時発現する細胞は、変質するYFP発現性の線維及び病変部の部位に位置していた(図24B、24C、25A～25D)。さらに、DCX発現性の細胞は、線条体(図26B、26C)、皮質(図26D、26E)、及び側坐核(図26F)の、辺縁周辺及び内部の病変部に見られた。EAEマウス(GAにより処置していない)では、病変部を取り囲む少数のDCX⁺細胞も観察されたが(図26A)、EAE+GAマウスでは、病変部に遊走する前駆体の量ははるかに多かった。DCX⁺ニューロン前駆細胞は、GAPを発現する星状細胞で広範囲に占められた部位中に局在しており(図27A～27C)、グリア性瘢痕の部位中へのこれらの遊走を示唆していた。

【0217】

DCX⁺細胞によって占められた病変部で(図26D～26F)、我々は、YFP発現性の線維が病変部中に伸長していたのを観察し、ニューロン前駆細胞による軸索の再発生又は出芽の誘発が示唆された。新規に產生されたニューロンが、実際に増殖を促進性の環境を誘発することができるか否かを見出すために、我々は、これらがBDNFを発現する能力を試験した。図27に示すように、核小体側坐核(図27D、27E)、及び海馬(図27F)では、EAE+GAマウスで、かなりの割合の遊走するDCX⁺細胞が、BDNFの広範囲の発現を表していた。

【0218】

(実施例5(7))

EAEのマウスモデルにおける、酢酸グラチラマーと前駆幹細胞との併用処置

酢酸グラチラマー(GA)及び幹細胞の組合せ投与の、EAEモデルにおける効果を評価するために、以下の実験を行った。我々は、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)誘発性EAEマウスモデルを使用した。ニューロン及び軸索の変性は、EAEマウスでは広範に明らかであった。GA処置を、一手技により幹細胞と組み合わせてEAEマウスに適用したが、これは自己神経発生を產生するのに、即ち毎日皮下注射することにより、効果的であることが見出された。

【0219】

多分化能の幹細胞を、成年マウスのほとんどの組織でLac-zを発現するROSA26トランスジェニックマウスの骨髄から得た。Lac-z遺伝子の発現を、遺伝子産物である-ガラクトシダーゼの酵素活性により検出した。これらの幹細胞を、脳の側脳室中の局所的な定位的な包含により、EAE C57BL/6マウス中に移植した。或いは、幹細胞を静脈注射により全身的に投与することが可能である。

【0220】

GAと幹細胞の併用投与の効果を、GA及び幹細胞の別々の投与と比較した。非処置のEAEマウス、及びナイーブのマウスをコントロールとした。処置後、マウスを、ニューロンの症状について毎日調べ、疾患の重症度及び/又は臨床上の改善についてスコア付けをした。処置のin situの効果を、上記5(2)に記載したようにニューロンの損傷を特徴付けることにより評価した。移植した細胞の運命を、上記5(4)、5(5)、及び5(6)に記載した免疫組織学的方法を用いてモニターした。例えば、増殖を、移植と同時に注射したBrdUなどのマーカーを用いて評価し、分化をDCX及びNeuNマーカーを検出することによりモニターした。我々は、また、移植した細胞の遊走、及びそれらが病変部位に到達する能力を追跡した。

【0221】

得られた予備的な結果は、調べた上記のパラメータにより証明されるように、GA+幹細胞の併用処置は、各処置の有益な効果を別々に増強したことを示している。同じ有益な効果を、他の実験モデルで、GA及び幹細胞の併用処置により得ることができる。したが

10

20

30

40

50

つて、G A と幹細胞との併用処置は、さらなる神経学的疾患及び他の疾患の治療で用いることができる。

【0222】

考察

ここに報告した主な発見は、炎症性の自己免疫性神経変性疾患の、末梢の免疫調節性の処置は、神経保護、及び病理学的プロセスにより誘発される自己神経発生の増強を誘発することである。これは、通常神経発生を経験しない脳の領域において、傷害部位への新規のニューロンの大量の遊走をもたらし、E A E 及びM S におけるG A の有益な効果に対する関連性を示唆するものである。

【0223】

M O G 誘発性E A E の組織病理学的徴候は、C 5 7 B L / 6 及びY F P 2 . 2 両方の系統において、線維の悪化、軸索の喪失、広汎性の病変部位、及び核の辺縁趨向であり、重症の損傷を示すものであった(図20)。T 細胞(図20A)及びマクロファージ(図21A)の血管周囲の浸潤は、この疾患におけるこれらの有害な役割に一致して、異常な領域に極めて近接して見られた(B e h i ら、2005年；S t o l l g 及びJ a n d e r 、1999年)。G A の保護効果は、悪化する線維が減少し、より小規模に病変部の量が減り、細胞の核の辺縁趨向が小さくなることから明らかなように、典型的な軸索及びニューロンの損傷を防止するといった形で現れた。G A のさらなる顕著な効果は、様々な計画によりすべての時間点(処置終了後1～30日)で表れた、ミクログリアの活性化の低減であった(図21B)。ミクログリアは、C N S 内で抗原提示細胞として機能し、したがって脳炎惹起性のT 細胞を活性化し、炎症性の毒性メディエーターを生成するが、これらが神経栄養因子を発現する能力による2重の機能も実証された(S t o l l g 及びJ a n d e r 、1999年)。現在のモデルでは、ミクログリアの活性化は、E A E を罹患したマウスで様々な脳の領域で顕著に増大し、この活性化はニューロンの傷害の量と相関していた。

【0224】

G A 処置は、ニューロンの損傷の低下をもたらすだけでなく、ニューロンの増殖の増大ももたらした。2つの検出マーカーの組合せにより、我々は、未成熟なニューロンのマーカーであるD C X の全体の発現により、我々は、動物を屠殺する10～14日前に產生された新規のニューロンの量(B a y e r ら、1991年)、及びB r d U / G A の同時注射期間の間に現れたニューロン前駆細胞(分化してニューロン系列になり、したがってB r d U / D C X の2重染色性を表したもの)の数の両方を評価することができた。両方の系統により、E A E の病理学的プロセスの効果、及びG A 処置の効果に関して、比較可能な結果が得られた。それゆえ、E A E の誘発は、ニューロン増殖性地帯(S V Z 及びS G Z)で傷害後に細胞増殖の増大を実証した以前の試験と一致して、疾患の出現後にニューロン増殖性地帯においてニューロン前駆細胞増殖の増大を引き起こした(図22)(J i n ら、2003年；M e g a v i ら、2000年；P i c a r d - R i e r a ら、2002年)。それでも、このニューロン増殖は、徐々に、且つ引き続きナイーブのマウスのニューロン増殖を下回って低下し、疾患により、及び損傷を補償するための自己神経発生の失敗により罹患した機能障害を示していた。E A E マウスに対して様々な計画により適用したG A 処置は、S V Z 及びS G Z の両方でE A E マウスよりもニューロンの増殖を増強し、その期間を延長した。特に意義深いのは、疾患の慢性期に開始したG A 処置の神経保護の結果である(遅延型抑制)、というのは、この時期はE A E / M S では、消耗した自己補償性の神経発生が失敗し、広範な神経変性が打ち勝つ段階とみなされているからである(B j a r t m a r ら、2003年；H o b o m ら、2004年)。

【0225】

S V Z を起源とするニューロン前駆細胞は、これらが成年において通常遊走する経路である、R M S 中に動員された。この動員は、E A E マウスで増大し、G A はそれをさらにさらに増強した(図23)。この効果の治療上の関連性は、軽微な短期間の疾患及び自発的な回復を表したE A E マウスに見られるニューロンの遊走の増大によりほのめかされる

10

20

30

40

50

。それでも、G A 処置マウスのニューロン前駆細胞では、遊走は R M S に限定されなかつた。我々は、D C X 発現性細胞が、脳梁及び海馬 - 脳梁界面に沿って、様々な皮質の領域、主に後頭部の皮質に向かって遊走したときに、天然では胎児の前脳に見られる L C S - ニューロンの遊走経路の再発を見出した (Francicら、1999年) (図23C)。さらに、ニューロン前駆体は、古典的なニューロン増殖性地帯、及び遊走流から分岐し、線条体、側坐核、及び皮質など、通常は神経発生を経験しない隣接する非定型の脳の領域に広がった (図24)。E A E マウスの海馬では、疾患の出現に続き、より大きな程度で、また E A E + G A マウスではより長い期間で、B r d U 及び D C X 発現性の細胞は、分岐した樹状突起を内側及び外側の分子層を介して伸長して、S G Z から隣接の G C L 中に遊走した (図22C)。しかし、S G L 起源の細胞の動員は、おそらく海馬に制限されていた、というのは、ニューロン前駆細胞の遊走の源として S G Z よりもむしろ S V Z を同定した以前の研究と一致して、この領域を越えて遊走する証拠を我々は見出さなかったからである (Jinら、2003年)。

【0226】

G A 及び B r d U 注射後の早期の時間点では (これらの最後の注射後 1 ~ 10日)、B r d U⁺ ニューロン前駆細胞は、遊走し、分化するニューロンに特徴的な、未成熟なニューロンのマーカーである D C X を発現し (Bernierら、2002年)、遊走の形態、先導する及び引きずる突起を有する紡錘状の細胞体を表した (O'Roukeら、1995年) (図24)。前駆体が、ニューロン増殖性地帯を離れた後もそれらが増殖する能力を保持するか否かについては疑われていた (Gould及びGross、2002年; Iwaiら、2002年)。E A E + G A マウスで、我々は、B r d U / D C X 同時発現性細胞の小集団を線条体及び側坐核で発見したが、これは局所的な分裂を示唆するものであった。さらに、M期における細胞の内因性のマーカーであるリン酸化ヒストンで染色すると、これらの領域におけるいくつかの D C X⁺ 細胞は、灌流の前に分裂していたことが示され (図25)、古典的なニューロン増殖性地帯の外側における in situ の増殖を示唆していた。後の時間点では (G A 処置完了 1カ月後)、枝分れの突起を有する D C X⁺ 細胞 (図26)、及び成熟ニューロンのマーカーである N e u N を発現し、成熟した形態を表す B r d U⁺ 細胞が観察された (図25)。E A E マウスの皮質における新規のニューロンの量は、損傷誘発性の神経発生の他の場合に見られたものと比較可能であった (Magaviら、2000年; Picard-Rieraら、2002年; Arlottaら、2003年)。G A 処置によりこの数は 2.6 倍増加し、新規に產生されたニューロンの実質的な上昇を示していた。B r d U / N e u N⁺ 細胞は、ナイーブのマウスの皮質には見られず、成年齧歯動物の皮質には神経発生は通常起こらないことが確認された (Iwaiら、2002年; Jinら、2003年; Arlottaら、2003年)。このように、神経発生を構成する 3 つのプロセスである、細胞の増殖、遊走、及び分化 (Jinら、2003年; Chenら、2004年) が G A 処置後に増大した。

【0227】

これらの発見により、G A 処置と神經保護及び神經発生の產生との間の相関が確立された。これらの効果は炎症の抑制に起因することが可能であり、即ち、内毒素投与後の抗炎症薬処置で実証されたように、発作が病理学的プロセスを開始し、このように損傷が続く (Monjeら、2003年)。G A がサイトカインの分泌を、T h 1 の炎症性経路から T h 2 / 3 の抗炎症性の経路に転換する能力は、マウス及びヒトの末梢で実証された (Aharoniら、1998年; Dudaら、2000年)。さらに、G A は、B B B を越える特異的な T h 2 / 3 細胞を誘発し、C N S に蓄積し (Aharoniら、2000年、2002年)、in situ で抗炎症性サイトカインである I L - 10 及び T G F - を発現する (Aharoniら、2003年)。現在の研究でも、T 細胞は E A E + G A マウスの脳で見られ、それとは対照的に E A E マウスではそれらの位置は損傷とは関連していないかった (図19C)。しかし、C N S における G A 誘導性細胞の効果は、炎症の阻止を越えている。したがって、I L - 10 はグリア細胞の活性化を調節することが示され (Ledeboerら、2000年)、したがって、その in situ の発現は G A

10

20

30

40

50

処置マウスにおけるミクログリアの活性化の遮断を説明することができる(図21)。TGF- β については、その神経保護活性は様々な種で示されており(Dhandapani及びBrann、2003年)、ニューロン増殖及び分化を誘発するその能力も示されている(Newmanneyal.、2000年; Kawachiら、2003年)。さらに、脳におけるGAに特異的な細胞は、成人の脳においてニューロンの生存及び神経発生の主要な制御因子である(Lassmannら、2003年)、有力な神経栄養因子のBDNFを発現することが示された(Aharoniら、2003年)。BDNFは、この研究における発見と同様に、SVZ細胞の補充、成人では神経発生を表さないRMSを介した構造へのそれらの遊走、及びそれらのニューロンへの分化を刺激することが示された(Penceaら、2001年)。したがって、特に関連があるのは、GAに特異的なT細胞の養子移入又はGA注射自体は、CNSの常在性の細胞、例えば星状細胞及びニューロンに対する傍観者効果を誘発して、IL-10、TGF- β 、及びBDNFを広範囲に発現させ、様々な脳の領域でそれらの著しい上昇をもたらしたという、我々の以前の発見である(Aharoniら、2003年、2004年)。

【0228】

新規に產生されたニューロンは、神経膠症の瘢痕領域中への遊走(図27)、並びに線維の悪化、ニューロンの喪失、及び病変部を表す領域への遊走(図24B、24C、25A～25D、26)によって明らかのように、損傷を受けた領域に引き付けられ、又は補充されることは特に意義深い。新規のニューロンが傷害部位へ直接遊走することは、脳虚血後(Jinら、2003年)、及びEAEマウスにおけるこの研究で(図26A)実証された。しかし、GAで処置したEAEマウスにおける病変部はあまり広範囲ではないが、その中に遊走する前駆体の量は強烈に大きい。これらの新規のニューロンは、死滅した、又は機能障害の細胞を置き換えるためのプールを構成し、且つ又は神経保護及び軸索の成長を支持する成長促進性の環境を誘発することができた。後者の活性は、新規のニューロンのBDNF発現によって証明された(図27D～27F)。さらに、ニューロン前駆細胞によって占められた病変部では、病変部中に伸長したYFP発現性の線維が観察され(図20B、26D～26F)、軸索の再生、又は出芽の誘発を示唆していた。ここに示した蓄積したデータは、免疫調製性の薬物は、神経変性疾患の経過に対抗する、神経保護及び神経発生を誘発することができるという概念を支持するものである。

REFERENCES

Aberg, M. A., Aberg, N. D., Hedbäcker, H., Oscarsson, J. & Eriksson, P. S. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 2896-903 (2000).

Aharoni R, Schlegel PG, Teitelbaum D, Roikhel-Karpov O, Chen Y, Arnon R, Sela M, Chao NJ. (1997) Studies on the mechanism and specificity of the effect of synthetic random copolymer GLAT on graft-versus-host disease. *Immunol. Lett.* 58 (2):79-87. 10

Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R (1998) Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1. *J. Neuroimmunol.* 2:135-146

Aharoni R, Teitelbaum D, Leitner O, Meshorer A, Sela M, Arnon R (2000) Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:11472-11477. 20

Aharoni R., Teitelbaum D., Arnon R., Sela M. (2001). Copolymer 1 inhibits manifestations of graft rejection. *Transplantation* 27: 598-605.

Aharoni R, Meshorer A, Sela M, Arnon R (2002) Oral treatment of mice with copolymer 1 (glatiramer acetate) results in the accumulation of specific Th2 cells in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 126:58-68. 30

Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, Arnon R (2003) Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100:14157-14162.

Aharoni R, Eilam R, Labunskay G, Sela M Arnon R (2004) Copaxone (glatiramer acetate) injection augment brain derived neurotrophic factor expression in the brain. *Multiple Sclerosis* 10:S256

Aharoni R., Yussim A., Sela M., Arnon R. (2005). Combined treatment of glatiamer acetate and low doses of immunosuppressive drugs is effective in the prevention of graft rejection. *Int Immunopharmacol.* 5(1):23-32. 40

Aharoni R, Kayhan B, Arnon R (2005) Therapeutic effect of the immunomodulator glatiramer acetate on trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 11(2):106-115.

Angelov DN, Waibel S, Guntinas-Lichius O, Lenzen M, Neiss WF, Tomov TL, Yoles E, Kipnis J, Schori H, Reuter A, Ludolph A, Schwartz M. (2003). Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(8):4790-4795. 10

Arnon, R, Sela M. (2003) Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate. *J. Mol. Recognit.* 16:412-421.

Bakalash S, Kessler A, Mizrahi T, Nussenblatt R, Schwartz, M. (2003) Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 3374-3381.

Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Dai XF, Simmons JA (1991) Cell migration in the embryonic neocortex. I. *Comp. Neurol.* 307:499-516. 20

Behi ME, Dubucquoi S, Lefranc D, Zephir H, De Seze J, Vermersch P, Prin L (2005) New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunology Letters* 96:11-26.

Benner EJ, Mosley RL, Destache CJ, Lewis TB, Jackson-Lewis V, Gorantla S, Nemachek C, Green SR, Przedborski S, Gendelman HE. (2004) Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9435-40. 30

Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:11464-11469.

Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD (2003) Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J. Neurol. Sci.* 15:165-171 40

Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-9 (1993).

Boje, K. M. & Arora, P. K. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* **587**, 250-6 (1992).

Borchelt, DR *et al.*, *Neuron* **19**, 939 (1997).

Brown, J. et al. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* **17**, 2042-6 (2003).

Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol.* **467**: 1-10.

Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* **29**:381-393 (2005).

Butovsky, O., Hauben, E. & Schwartz, M. Morphological aspects of spinal cord autoimmune neuroprotection: colocalization of T cells with B7--2 (CD86) and prevention of cyst formation. *Faseb J.* **15**, 1065-7 (2001).

Cameron, H.A. & McKay, R.D. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* **2**, 894-7 (1999).

Cameron, H.A. & McKay, R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* **435**, 406-17 (2001).

Cammer, W. & Zhang, H. Maturation of oligodendrocytes is more sensitive to TNF alpha than is survival of precursors and immature oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* **97**, 37-42 (1999).

Chen J, Magavi SS, Macklis JD (2004) Neurogenesis od corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **101**:16357-16362.

Cummings, B. J., Uchida, N., Tamaki, S. J., Salazar, D. L., Hooshmand, M., Summers, R., Gage, F. H. & Anderson, A. J. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14069-74 (2005).

Dawson, M. R., Polito, A., Levine, J. M. & Reynolds, R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* **24**, 476-88 (2003).

Dhandapani KM, Brann DW (2003) Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem Biophys.* 39:13-22.

Dijkstra, C. D., De Groot, C. J. & Huitinga, I. The role of macrophages in demyelination. *J Neuroimmunol* **40**, 183-8 (1992). 10

Duda, P.W., Schmied, M.C., Cook, S.L., Krieger, J.I., and Hafler, D.A. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 105:967-976 (2000).

Ekdahl, C. T., Claassen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z. & Lindvall, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13632-7 (2003). 20

Engesser-Cesar, C., Anderson, A.J., Basso, D.M., Edgerton, V.R. & Cotman, C.W. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury. *J Neurotrauma* **22**, 157-71 (2005).

Enzmann, G. U., Benton, R. L., Woock, J. P., Howard, R. M., Tsoulfas, P. & Whittemore, S. R. *Exp Neurol* **195**, 293-304 (2005).

Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peak Cynthia, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Samee JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41-51. 30

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. (1999) Doublecortin is a developmentally regulated microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23:247-256.

Fridkis-Hareli M, Aharoni R, Teitelbaum D, Armon R, Sela M, Strominger JL. (1999) Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis- and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules. *J Immunol.* 162(8):4697-4704. 40

Gould E, Gross CG (2002) Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J. Neuroscience*. 22:619-623.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. & Shors, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2, 260-5 (1999).

Hauben E, Schwartz M. Therapeutic vaccination for spinal cord injury: helping the body to cure itself. *Trends Pharmacol Sci* 24:7-12 (2003). 10

Hauben, E., Gothilf, A., Cohen, A., Butovsky, O., Nevo, U., Smirnov, I., Yoles, E., Akselrod, S. & Schwartz, M. (2003) *J Neurosci* 23, 8808-19.

Hauben, E., Agranov, E., Gothilf, A., Nevo, U., Cohen, A., Smirnov, I., Steinman, L. & Schwartz, M. Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 108, 591-9 (2001). 20

Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, G., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I. R. & Schwartz, M. Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J. Neurosci.* 20, 6421-6430 (2000).

Hellings N, Raus, J. Stinissen P (2002) Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res.* 25:27-51.

Hobom M, Storch MK, Weissert R, Maier K, Radhakrishnan A, Kramer B, Bahr M, Diem R. (2004) Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Pathol.* 14:148-157. 30

Hsieh, J., Aimone, J.B., Kaspar, B.K., Kuwabara, T., Nakashima, K., and Gage, F.H. 2004. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 164, 111-22 (2004).

Imitola, J., Raddassi, K., Park, K. I., Mueller, F. J., Nieto, M., Teng, Y. D., Frenkel, D., Li, J., Sidman, R. L., Walsh, C. A., Snyder, E. Y. & Khouri, S. J. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 18117-22 (2004a). 40

Imitola, J., Comabella, M., Chandraker, A. K., Dangond, F., Sayegh, M. H., Snyder, E. Y. & Khouri, S. J. Neural stem/progenitor cells express costimulatory

molecules that are differentially regulated by inflammatory and apoptotic stimuli.
Am J Pathol **164**, 1615-25 (2004b).

Ishii, K. et al., *Faseb J* **14**, 1485 (2000).

Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Abe K. (2002) Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gurus after transient ischemia J. Cereb. Blood Flow Metab. 22:411-419.

Jankowsky, JL et al., *Hum Mol Genet* **13**, 159 (2004).

Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mau XO, Batteur S, Greenberg DA (2003) Directed migration of neuronal precureors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24:171-189.

Jones, L. L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W. B. & Tuszyński, M. H. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* **22**, 2792-803 (2002).

Kawauchi S, Beites CL, Crocker CE, Wu HH, Bonnin A, Murray R, Calof AL. (2004) Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. *Dev. Neurosci.* 26:166-180.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. & Kronenberg, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* **27**, 447-52 (2004).

Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493-5 (1997).

Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y. & Schwartz, M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: Implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 8180-8185 (2004).

Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D, Alexandrovich A, Yoles E, Akselrod S, Shohami E, Schwartz M. (2003) Therapeutic vaccination for closed head injury. *J. Neurotrauma* 20(6):559-569.

10

20

30

40

Kipnis, J. and Schwartz, M. (2002) Dual Action of Glatiramer Acetate (Cop-1) as a Treatment for Autoimmune Diseases and a Vaccine for Protective Autoimmunity after CNS Injury. *Trends Mol. Med.* **8**: 319-323.

Kipnis, J., Mizrahi, T., Yoles, E., Ben-Nun, A., Schwartz, M. & Ben-Nur, A. *J Neuroimmunol* **130**, 78-85 (2002a).

Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E. & Schwartz, M. 10
Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 15620-5 (2002b).

Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M. (2000), T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies, Proc Natl Acad Sci USA. 97:7446-7451. 20

Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M. & Tonegawa, S. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* **78**, 399-408 (1994).

Ledeboer A, Breve JP, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM (2000) Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* 30:134-141. 30

Lepore, A. C. & Fischer, I. *Exp Neurol* **194**, 230-42 (2005).

Lessmann V, Gottmann K, MacLangio M, (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospect. *Progress in Neurobiology* 69:341-374.

Li, W.W., Setzu, A., Zhao, C., and Franklin, R.J. Minocycline-mediated inhibition of microglia activation impairs oligodendrocyte progenitor cell responses and remyelination in a non-immune model of demyelination. *J Neuroimmunol* 158:58-66 (2005). 40

Lu, P., Jones, L. L. & Tuszynski, M. H. *Exp Neurol* **191**, 344-60 (2005).

Magavi SS, Leavitt BR, Mackliss J (2000) Induction of Neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405:951-955.

Magavi SS, Leavitt BR, Macklils J (2000) Induction of Neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405:951-955.

Mason, J. L., Ye, P., Suzuki, K., D'Ecole, A. J. & Matsushima, G. K. Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci* **20**, 5703-8 (2000).

McDonald, J. W., Becker, D., Holekamp, T. F., Howard, M., Liu, S., Lu, A.,
Lu, J., Platik, M. M., Qu, Y., Stewart, T. & Vadivelu, S. *J Neurotrauma* **21**, 383-93
(2004). 10

Merrill, J. E., Ignarro, L. J., Sherman, M. P., Melinek, J. & Lane, T. E. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* **151**, 2132-41 (1993).

Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, IR. & Schwartz M Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* **5**, 49-55 (1999). 20

Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, IR. & Schwartz, M.. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun* **15**, 331-45 (2000).

Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R. & Palmer, T. D. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* **8**, 955-62 (2002).

Monje, M. L., Toda, H. & Palmer, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* **302**, 1760-5 (2003). 30

Morris, R. *J Neurosci Methods* **11**, 47 (1984).

Morshead, C. M. et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**, 1071-82 (1994).

Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T. & Nakafuku, M. *Cell* **110**, 429-41 (2002). 40

Ness, J. K. & Wood, T. L. Insulin-like growth factor I, but not neurotrophin-3, sustains Akt activation and provides long-term protection of immature

oligodendrocytes from glutamate-mediated apoptosis. *Mol Cell Neurosci* **20**, 476-88 (2002).

Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., and Wekerle, H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**:5779-5784 (1998).

Newman MP, Feron F, Mackay-Sim A (2000) Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience* **99**:343-350.

O'Kusky, J. R., Ye, P. & D'Ercole, A. J. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci* **20**, 8435-42 (2000).

O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowsky CE, Jacobs AA, McConnell SK (1995) Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* **121**:2165-2176.

Packer, M. A. et al. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9566-71 (2003).

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*. **1**:6706-6717.

Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, Goude K, Nait-Oumesmar B, Liblau R, Pham-Dinh D, Evercooren (2002) Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilized neuronal progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**:13211-13216.

Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A (2004) Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci. Res.* **76**:223-231.

Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., Furlan, R., Comi, G., Vescovi, A. L. & Martino, G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* **422**, 688-94 (2003).

Popovich, P. G., Wei, P. & Stokes, B. T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* **377**, 443-64 (1997).

Popovich, P. G. et al. The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 623-33 (2002).
10

Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G. J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M. & Schwartz, M. *Nat Med* **4**, 814-21 (1998).

Schori, H., Yoles, E. & Schwartz, M. T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* **119**, 199-204 (2001).

Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Schwartz M. (2001b) Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3398-3403.
20

Schlegel PG, Aharoni R, Chen Y, Chen J, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, Chao NJ. (1996) A synthetic random copolymer with promiscuous binding to class II MHC molecules inhibits T-cell proliferative response to major and minor histocompatibility antigens in vitro and confers the capacity to prevent murine graft-versus-host disease in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 5061-6.
30

Schwartz, M. & Hauben, E. T cell-based therapeutic vaccination for spinal cord injury. *Prog Brain Res* **137**, 401-6 (2002).

Schwartz, M. & Kipnis, J. Harm or heal - divergent effects of autoimmune neuroinflammation?. Response from Schwartz and Kipnis. *Trends Immunol* **24**, 7-8 (2003).

Schwartz, M. & Kipnis, J. Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4(+)CD25(+) T cells as part of the evolutionary compromise between a 'need' and a 'risk'. *Trends Immunol*. **23**, 530-4 (2002).
40

Schwartz M, Kipnis J (2002) Multiple sclerosis as a by-product of the failure to sustain protective autoimmunity: a paradigm shift. *Neuroscientist* 8: 405-413.

Schwartz, M., Shaked, I., Fisher, J., Mizrahi, T. & Schori, H. Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. *Trends Neurosci.* **26**, 297-302 (2003).

Setoguchi, T., Nakashima, K., Takizawa, T., Yanagisawa, M., Ochiai, W., Okabe, M., Yone, K., Komiya, S. & Taga, T. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol* **189**, 33-44 (2004).
10

Shaked, I., Porat, Z., Gersner, R., Kipnis, J. & Schwartz, M. Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J Neuroimmunol* **146**, 84-93 (2004).

Shaked, I., Tchoresh, D., Gersner, R., Meiri, G., Mordechai, S., Xiao, X., Hart, R. P. & Schwartz, M. *J Neurochem* **92**, 997-1009 (2005).
20

Shors, T.J. et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372-6 (2001).

Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. & Gould, E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* **12**, 578-84 (2002).

Snyder, J.S., Hong, N.S., McDonald, R.J. & Wojtowicz, J.M. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* **130**, 843-52 (2005).
30

Stollg G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in Neurology* 58:233-247

van Praag, H., G. Kempermann, F. H. Gage, *Nat Rev Neurosci* **1**, 191 (2000).
van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J. & Gage, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13427-31 (1999).
40

Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I. R., Weiner, H. & Schwartz, M. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* **21**, 3740-8 (2001a).

Yoles, E., Friedmann, I., Barouch, R., Shani, Y. & Schwartz, M. J
Neurotrauma **18**, 339-49 (2001b).

Zhao, X., Ueba, T., Christie, BR., Barkho, B., McConnell, MJ., Nakashima, K., Lein, ES., Eadie, BD., Willhoite, AR., Muotri, AR., Summers, RG., Chun, J., Lee, KF. & Gage, FH. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6777-
10
 82 (2003).

Zielasek J, Tausch M, Toyka KV, Hartung HP. Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cell Immunol* **141**:111-120 (1992).

【図面の簡単な説明】

【0229】

【図1A - 1F】N P Cのニューロンへの分化は、N P Cが活性化される方法に応じてミクログリアによって誘発又は阻止され得ることを示す図である。緑色蛍光タンパク質(G F P)発現性N P C(緑色)を、様々に活性化したマウスからのミクログリアと、5日間同時培養した。共焦点画像から得られた、インスリンなし(-I n s)又はあり(+I n s)の、-I I I - チューブリン⁺細胞(G F P⁺細胞のパーセント値として表した)の定量化を、それぞれ図1A及び1Bにまとめてある。図1Cは、インスリンの存在下でのN P CとM G_(I F N -)の同時培養物におけるG F P⁺細胞のパーセント値で表した、数々の-I I I - チューブリン⁺細胞に対するr T N F - の効果の結果を示す。エラーバーは、平均値±S Dを表す。データは、同型培養での、少なくとも3つの独立した実験のうちの1つからである。バー上のアステリスクは、非処置の(コントロールの)N P Cに対する差を表す(*P<0.05; **P<0.001; 分散分析)。図1Dは、インスリン非存在でミクログリアなし(コントロール)；非処置のミクログリアと(M G_(-))；L P S活性化したミクログリアと(M G_(L P S))；I L - 4活性化したミクログリア(M G_(I L - 4))と；及びインスリン存在下でI F N - 活性化したミクログリア(M G_{(I F N -)+I n s})、又はI F N - 活性化したミクログリア(M G_{(I F N -)+I n s})とa T N Fとの、G F P発現性N P C(緑色)の代表的な共焦点画像を示す。図1Eは、-I I I - チューブリンとネスチントを同時発現するG F P発現性N P Cを示す。図1Fは、N P Cから新規に形成されたニューロンは、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(G A D)67(-I I I - チューブリン⁺/G F P⁺/G A D⁺)に対してポジティブに染色されることを示す。注意、共焦点チャネルを、別々に表してある。

【図2A - 2D】I F N - 又はI L - 4で活性化したミクログリアは、様々な形態のダブルコルチン(D C X)発現性ニューロンへの、N P Cの分化を誘発することを示す図である。G F P発現性N P C(緑色)を、図1で記載したように様々に活性化したミクログリアと同時培養し、ニューロンのマーカーであるD C Xに対して染色した。図2Aは、インスリンの非存在下でM G_(I L - 4)と(パネル左)、又はインスリンの存在下でM G_(I F N -)と(M G_{(I F N -)+I n s}、パネル右)5日間同時培養したG F P発現性N P C(緑色)の代表的な2つの共焦点画像を表す。図2Bは、D C Xを同時発現するG F P発現性N P Cの代表的な共焦点画像を示す。図2Cは、D C Xを同時発現する-I I I - チューブリン⁺細胞の代表的な共焦点画像を示す。注意、共焦点チャネルを、別々に表してある。図2Dは、共焦点画像から得た、インスリンなし、又はそれと一緒にD C X⁺細胞の定量化(G F P⁺細胞のパーセント値として表した)を示す。エラーバーは、平均値±S Dを表す。データは同型培養における少なくとも3つの独立した実験の
40
50

うち1つからである。バー上のアステリスクは、非処置の（コントロールの）N P Cに対する差を表す（*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001；分散分析）。

【図3A-3E】N P Cのオリゴデンドロサイトへの分化は、N P Cが活性化される方法に応じてミクログリアにより誘発又は阻止され得ることを示す図である。図1で記載したように、G F P発現性N P C（緑色）を、単独で（コントロール）、又は様々に活性化されたミクログリアと同時培養した。N G 2⁺又はR I P⁺細胞の定量化を示すヒストグラム（G F P⁺細胞のパーセント値として表した）は、（3A）インスリンを含まない培地（-I n s）、又は（3B）インスリン含有培地（+I n s）で5日間同時培養後の共焦点画像から得た。示したデータは、同型培養における3つの独立した実験のうちの1つからであり、バーは平均値±S Dを表している。バー上のアステリスクは、非処置の（コントロールの）N P Cに対する差を表す（**P<0.01；***P<0.001；分散分析）。図3Cは、5日間、ミクログリアなし（コントロール）；非処置のミクログリアと同時培養（M G（-））；インスリンの存在下でI F N-活性化したミクログリアと同時培養（M G（I F N-）+I n s）；I L-4活性化したミクログリアと同時培養（M G（I L-4））したG F P発現性N P C（緑色）及びN G 2⁺細胞（赤色）の4つの代表的な共焦点画像を示している。図3Dは、G F P、N G 2、及びネスチン細胞の共存を示す共焦点画像を示す。注意、共焦点チャネルを、別々に表してある。図3Eは、N G 2⁺細胞はM A C 1⁺細胞に隣接して見られることを示す。

【図4A-4G】M G（I F N-）又はM G（I L-4）の存在下で10日間培養後のN P Cの分化及び成熟を示す図である。非処置のN P C（コントロール）の、又はM G（I F N-）若しくはM G（I L-4）と同時培養したN P Cの培養物を10日後に分析した。図4Aは、G F P⁺細胞のパーセント値として表した、N G 2⁺、R I P⁺、G a 1 C⁺、G F A P⁺、又は-I I I-チューブリン⁺細胞の数を表す。値は、平均値±S Dである（*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001；分散分析）。図4B～4Fは、M G（I L-4）の存在下で10日培養後の、N P Cの代表的な共焦点画像である。図4Bは、N G 2で染色される突起の枝分れの増大が、10日後に見られたことを示す（図4Bを図3C、M G（I L-4）と比較されたい）。N G 2⁺突起と隣接の細胞の間に、接触が形成されたのが見られる（高倍率の四角で囲んだ部位）。図4Cは、成熟オリゴデンドロサイト（G a 1 C⁺）及びニューロン（-I I I-チューブリン⁺）に対して同じ培養物を染色したものは、ニューロンと高度に枝分れしたオリゴデンドロサイトとの間の接触を示す（高倍率の四角で囲んだ部位）。図4Dは、ニューロン（D C X⁺）に対する標識化とオリゴデンドロサイト（R I P⁺）に対する標識化との間に重複が見られないことを示す。図4E及び4Fは、G F A PとN G 2標識化との間に、又はG F A PとD C Xの標識化との間に、それぞれ重複が見られないことを示す。図4Gは、M G（I F N-）及びM G（I L-4）細胞の神経突起の長さを示す。値は、平均値±S Dである（***P<0.001；分散分析）。

【図5A-5D】I L-4及びI F N-活性化したミクログリアによるオリゴデンドロジエニシスの誘発における、I G F - I及びT N F - の役割を示す図である。（5A）G F P発現性N P C（緑色）を、単独で（コントロール）、a I G F - Iの存在下で、a I G F - I（5 μg / m l）の非存在下又は存在下でのM G（I L-4）との同時培養物で、又はa T N F - （1 n g / m l）の存在下で培養した。（5B）独立した実験で、N P Cをr I G F - I（5 0 0 n g / m l）の存在下で培養した。図5A及び5Bでは、培地にインスリンは加えなかった。（5C）N P Cを、単独で（コントロール）、a T N F - （1 n g / m l）と、又はa T N F - の非存在下又は存在下でM G（I F N-）と培養した。（5D）独立した実験で、N P Cを、インスリン及びr T N F - （1 0 n g / m l）の存在下でM G（I F N-）と培養した。エラーバーは、平均値±S Dを表す。バー上のアステリスクは、非処置の（コントロールの）N P Cに対する差を表す（*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001；分散分析）。

【図6A-6C】I F N-は、I L-4と異なり、ミクログリアで一過性にT N F -

10

20

30

40

50

を誘発し、IGF-I 発現を低減することを示す図である。(6A) IL-4 (10ng/ml)、IFN- (20ng/ml)、又はLPS (100ng/ml)と24時間処置したミクログリアを、TNF- 及び IGF-I の mRNA に対して、半定量 RT-PCR により分析した。3つの独立した実験のうち1つの代表的な結果を示す。(6B) MG (IL-4) 及び MG (IFN-) による TNF- 及び IGF-I の mRNA 発現の時間経過。各時間点における PCR を、すべての cDNA 種に対する同じ逆転写混合物で行った。値は、同一サンプルにおける - アクチンに対して標準化した増幅した mRNA の相対量を表し、コントロールに対する誘発の倍数として表してある(平均値 ± SD)。増幅の直線的な作業範囲を確認した後、実験を行った。各サンプルを3回繰り返して試験し、3つの異なるミクログリアの培養物で類似した結果が得られた。(6C) IGF-I 発現の統計学的分析は、MG (-) (コントロール) に対する強度の増大のパーセント値として計算して、細胞1個あたりの蛍光強度を実証している(各々4回繰り返した、2つの独立した実験で得られた、平均値 ± SD)。注意、非処置のコントロールに対して、MG (IL-4) は IGF-I で有意な増大を示した。バー上のアステリスクは、MG (-) に対する差を表す(* P < 0.05; ** P < 0.001; 両側のスチューデントの t 検定)。

【図 7 A - 7 H】ミエリンに特異的な自己免疫反応は、脊髄損傷(SCI)からの機能回復を促進するのに、移植した ANC 移植と相乗的に作用することを示す図である。オス C57B1/6J マウス(各群における n = 6 ~ 9 匹)における、SCI (200k ダインで 1 秒間) 後の運動機能の回復。(7A) マウスを、結核菌 1% を含む CFA に乳化した MOG ペプチド又は PBS で免疫化した(それぞれ、MOG-CFA、及び PBS-CFA)。SCI 1 週間後、ANC をそれらの側脳室中に移植した(MOG-CFA/ANC、又は PBS-CFA/ANC)。同様に傷害を与え、免疫化したコントロール群におけるマウスの側脳室を、PBS で処置した(MOG-CFA/PBS 又は PBS-CFA/PBS)。Basso 運動スコア(BMS) 評点スケールの値を表す。(7B) 実験 28 日目に、(7A) に記載した個々のマウスの BMS スコア。(7C) 結核菌 2.5% を含む、CFA で乳化した MOG ペプチド 45D で免疫化したオス C57B1/6J マウス(各群における n = 6 ~ 9 匹)における、SCI (200k ダインで 1 秒) 後の運動機能の回復。SCI 1 週間後、ANC を側脳室中に移植した。ANC で移植する代わりに、同様に傷害を与え免疫化したコントロール群に PBS を注射した。BMS 値を示す。(7D) 実験 28 日目における、(7C) に記載した個々のマウスの BMS スコアの記録。(7E) 傷害及び ANC 移植は(7A) と同じであったが、免疫化を SCI の 7 日前に行い、マウスを MOG-IFA で免疫化し、又は PBS を注射した(コントロール)。(7F) 傷害及び ANC 移植は(7A) と同じであったが、免疫化を SCI の 7 日前に行い、マウスを OVA/CFA で免疫化した。(7G、7H) 傷害及び ANC 移植は(7A) におけるのと同じであったが、免疫化を SCI の 7 日前に行い、マウスを MOG ペプチド、及び結核菌 2.5% を含む CFA で免疫化した。全群における結果は、平均値 ± SEM である。アステリスクは、両側のスチューデントの t 検定により分析して、指摘された時間点における差を示す(* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001)。

【図 8 A - 8 F】GFP 標識した ANC が、MOG 免疫化及び ANC 移植で 2 重処置した後、脊髄の実質に見られることを示す図である。ANC を側脳室に移植し 7 日又は 60 日後に切除した脊髄の、縦方向のパラフィン切片の免疫組織化学的染色。切片を抗-GFP 抗体で染色し、Hoechst で対比染色して核を検出した。次いで、これを蛍光顕微鏡で GFP+ 細胞の存在に対してスキャンした。ANC の移植 7 日後(8A ~ 8F) 及び移植 60 日後(8A ~ 8F) の病変部に隣接した部位における、GFP で免疫標識した細胞の代表的な顕微鏡写真を示す。

【図 9 A - 9 F】MOG/CFA 免疫化及び ANC 移植で 2 重処置した後に傷害を与えた C57B1/6J マウスからの脊髄の組織学的分析を示す図である。細胞移植 1 週間後に脊髄を切除した。SCI C57B1/6J マウス(各群における n = 3 ~ 4 匹)に S

C I (2 0 0 k ダインで 1 秒) を受けさせ、S C I の日に、結核菌 1 % を含む C F A に乳化した M O G ペプチドで免疫化した。S C I 1 週間後、a N P C を移植し、又は P B S を注射した、M O G - C F A で免疫化したマウスの側脳室。(9 A、9 B) 、傷害を与えた脊髄の縦方向の切片の G F A P 染色は、あらゆる他の群におけるよりも、M O G - C F A / a N P C での処置後の瘢痕組織の面積が著しく小さいことを示している。(9 A) M O G - C F A / a N P C 、M O G - C F A / P B S 、P B S - C F A / a N P C 、又は P B S - C F A / P B S で処置したマウスからの脊髄の代表的な顕微鏡写真を示す。(9 B) G F A P 染色により規定された部位の定量化 (* P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 、両側のスチューデントの t 検定 ; 各マウスからの分析したスライスの n = 4) 。(9 C 、9 D) 細胞移植 7 日後、及び挫傷性の S C I 1 4 日後に切除し I B 4 10 に対して染色した脊髄の、縦方向のパラフィン切片は、あらゆる他の群における染色よりも、M O G / C F A / a N P C 処置マウスにおける染色が有意に少ないことを示す。(9 D) I B 4 染色により占められた部位の定量化 (* P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 、両側のスチューデントの t 検定) 。(9 E 、9 F) 傷害部位で浸潤する T 細胞を同定するための、抗 - C D 3 抗体での染色。(9 E) M O G - C F A / a N P C 、M O G - C F A / P B S 、P B S - C F A / a N P C 、又は P B S - C F A / P B S で処置したマウスからの脊髄の代表的な顕微鏡写真。傷害部位の周囲の 4 つの領域から得た、各マウスからの 4 枚のスライスにおける細胞をマニュアルで計数することにより、あらゆる他の群におけるよりも、M O G - C F A / a N P C で処置した群における C D 3 + 細胞は有意に多いことが明らかになった (* P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 ; 20 両側のスチューデントの t 検定) 。

【図 1 0 A - 1 0 D 】 M O G / C F A 免疫化及び a N P C 移植で 2 重処置した後の、傷害を与えた C 5 7 B 1 / 6 J マウスからの脊髄における B D N F 及びノギンの発現の組織学的分析を示す図である。C 5 7 B 1 / 6 J マウスに S C I (各群の n = 3 ~ 4 匹) を受けさせ、S C I の日に、C F A (結核菌 1 %) に乳化した p M O G 3 5 ~ 5 5 で免疫化した。S C I 1 週間後、a N P C を移植し、又は P B S を注射した、M O G - C F A で免疫化したマウスの側脳室。細胞移植 7 日後、及び S C I 1 4 日後に切除した脊髄の縦方向の切片を (各群の n = 3 ~ 4 匹) 、B D N F に対して染色した。(1 0 A) B D N F に対して染色した部位の定量化 (* P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 ; 両側のスチューデントの t 検定) 。B D N F に対する染色は、あらゆる他の群におけるよりも、M O G - C F A / a N P C で処置したマウスで有意に強力である。(1 0 B) B D N F 及び I B 4 に対する 2 重染色により、I B 4 + ミクログリア / マクロファージは B D N F の主要な源であることが示される。(1 0 C) あらゆる他の群におけるよりも M O G / C F A / a N P C で処置したマウスで、ノギンに対する有意に強力な染色が見られた。(1 0 D) ノギンで染色した部位の定量化 (* P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 ; 両側のスチューデントの t 検定) 。ノギン及び I B 4 に対する 2 重染色により、I B 4 + ミクログリアはノギンの主要な源であることが示されている。30

【図 1 1 A - 1 1 E 】 免疫化及び a N P C 移植で 2 重処置した後、傷害部位の近傍で B r d U / D C X の 2 重染色が増大することを示す図である。図 7 におけるのと同じ、S C I 及び a N P C 移植。a N P C 移植 1 週間後、マウスに B r d U を、1 日 2 回 3 日間注射した。細胞移植 1 4 日後、及び挫傷性の S C I の 2 8 日後 (各群の n = 3 ~ 4 匹) に切除した脊髄の縦方向の切片を、B r d U 及び D C X に対して染色した。あらゆる他の群におけるよりも M O G - C F A / a N P C で処置したマウスに、有意に多くの B r d U + / D C X + 細胞が見られた。(40)

【図 1 2 A - 1 2 F 】 T 細胞は、i n v i t r o で a N P C からニューロンの分化を誘発することを示す図である。(図 1 2 A) 単独で培養 (コントロール) 、又は予め活性化した C D 4 + T 細胞と、若しくは静止中の C D 4 + T 細胞と同時培養し、5 日後の - I I I - チューブリン + 細胞の定量 (D A P I 細胞のパーセント値として表す) (** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 ; 分散分析) 。(図 1 2 B) 単独で培養 (コントロール) 、又は予め活性化した C D 4 + T 細胞と同時培養し、5 日後の a N P C における - I I I 50

I I - チューブリンの発現を示す代表的な画像。（図12C）活性化したT細胞で訓化した培地の存在下でaNPCを培養し、5日後のI I I - チューブリン+細胞の定量化（D A P I 細胞のパーセント値として表す）。（図12D）枝分れし、伸長したI I I - チューブリンのレベルド（l e b e l e d）線維を示す代表的な画像。（図12E）様々な濃度のIFN-γ又はIL-4と培養し5日後の、aNPCにおけるI I I - チューブリン+細胞の定量化（***P<0.001；分散分析）。（図12F）活性化したCD4+T細胞により24時間訓化した培地で培養したaNPCにおいて、Hes-5発現が5倍低減することを示す定量的RT-PCR。

【図13A - 13C】aNPCはT細胞の増殖を阻害し、サイトカインの生成を調節することを示す図である。（図13A）[³H]-チミジンを、aNPCと同時培養したCD4+T細胞中に組み入れることにより活性化し、96時間後に増殖をアッセイした。3つの代表的な実験のうちの1つからの値を記録し、4回の繰り返しの平均値±SDとして表してある。（図13B）単独で、又はaNPCの存在下で（同時培養）、又はトランスウェルの上部チャンバーでaNPCと培養したCD4+T細胞の増殖（図13C）。単独、又はaNPCと同時培養した、CD4+T細胞の活性化72時間後の増殖培地におけるサイトカイン濃度（pg/ml）。

【図14A - 14C】酢酸グラチラマー（GA）のワクチン接種は、アルツハイマー病（AD）のAPP/PS1 Tgマウスマodelにおける認知の喪失に対抗することを示す図である。海馬依存性の認知活性を、MWMで試験した。（図14A ~ 14C）GAでワクチン接種したTgマウス（ダイアモンド型、n=6）は、獲得及び逆転の段階の間、非処置のTgマウス（四角、n=7）よりも有意に優れた学習/記憶能力を示したが、試験の消衰段階では示さなかった。非処置のTgマウスは、空間記憶課題において、一貫した長時間継続性の機能障害を示した。それとは対照的に、GAでワクチン接種したTgマウスによるMWM試験の成績は、年齢にマッチさせたナイーブの非Tgのそれらの同腹仔の成績に、平均して類似していた（三角、n=6）（3元配置分散分析、反復測定：獲得段階に対して、群、df(2,16)、F=22.3、P<0.0002；試験、df(3,48)、F=3.1、P<0.035；及び、逆転段階に対して、群、df(2,16)、F=14.9、P<0.003；試験、df(3,48)、F=21.7、P<0.0001；日数、df(1,16)、F=16.9、P<0.0008）。

【図15A - 15J】T細胞ベースのGAのワクチン接種は、-アミロイド（Aβ）の減少をもたらし、Tgマウスの脳で海馬のニューロンの喪失に対抗するという、ミクログリアの重要な役割を示す図である。（図15A）NeuN（成熟ニューロン）及びヒトAβに対して染色した、非-Tg、非処置-Tg、及びGAでワクチン接種したTg同腹仔からの脳の海馬のスライスの、代表的な共焦点顕微鏡画像。非-Tgマウスは、ヒトAβに対する染色を示さない。非処置-Tgマウスは、細胞外Aβマークが豊富であるが、GAでワクチン接種したTgマウスではAβ免疫反応性が低いことを示す。その非-Tgの同腹仔に比較して非処置のTgマウスの海馬のCA1及びDG領域には弱いNeuN+染色が見られるが、GAでワクチン接種したTgマウスにおけるNeuN+染色はほとんど正常である。（図15B）抗-CD11b抗体を用いた、活性化したミクログリアに対する染色。低倍率及び高倍率での画像により、非処置のTgマウスの海馬のCA1及びDG領域にAβ及びCD11bに対して2重免疫染色された細胞の発生率が高いことが示されるが、GAでワクチン接種したTgマウスではCD11b+ミクログリアがほんの少し存在するにすぎない。矢印は、下に示す高倍率の領域を示す。（図15C）非処置のTgマウスで高レベルのTNF-αを発現するAβマークに関連するCD11b+ミクログリア。（図15D）Aβに対してポジティブに染色した部位で、GAでワクチン接種したTgマウスから採取した凍結切片におけるMHC-II（抗原提示のマーカー）に対する染色は、MHC-II+ミクログリアの発生率が高く、TNF-α+のミクログリアはほとんどないことを示している。（図15E）GAでワクチン接種したマウスにおけるMHC-II+ミクログリアは、IGF-Iを同時発現する。（図15F）CD3+T細

10

20

30

40

50

胞が、A⁻免疫反応性に関連するMHC-II I⁺ミクログリアにごく近接して見られる。四角で囲んだ部位は、高倍率の、T細胞(CD3⁺)とMHC-IIを発現するミクログリア細胞との間の免疫学的シナプスを示す。(図15G) A⁻ plaqueの総数を示すヒストグラム(30 μmの海馬のスライスにおける)。(図15H) 染色したA⁻免疫反応性の全細胞を示すヒストグラム。GAでワクチン接種したTgマウスと非処置のTgマウスとの間の有意差に留意されたく、また、ワクチン接種したTgマウスにおけるA⁻ plaqueの存在が低減したことも検証している。(図15I) 非処置のTgマウスと比較した、GAでワクチン接種したTgマウスにおける、活性化したミクログリア及び炎症を示す、CD11bに対して染色した細胞における顕著な低減を示すヒストグラム。非-Tgの同腹仔において、年齢とともにCD11b⁺ミクログリアが増大することに留意されたい。(図15J) 非処置のTgマウスに比較すると、GAでワクチン接種したTgマウスのDGにおけるNeuN⁺ニューロンの生存率が増大することを示すヒストグラム。エラーバーは、平均値±SEMを示す。バー上のアステリスクは、免疫染色における有意差を表す(*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; 両側のスチュードントのt検定)。この試験におけるマウスはすべて、分析に含まれることに留意されたい(マウス1匹あたり6~8切片)。

【図16A-16E】成年Tgマウスの海馬で、T細胞ベースの酢酸グラチラマー(GA)のワクチン接種により誘発される細胞の再生の増強を示す図である。GAでの最初のワクチン接種の3週間後、各実験群のマウスに、Brduを、1日2回2.5日間、i.p.注射した。最後の注射の3週間後に、これらの脳を切除し、海馬を、Brdu、DCX、及びNeuNに対して分析した。(図16A~16C) 増殖する細胞(Brdu⁺)の定量化(図16A)、新規に形成された成熟ニューロン(Brdu⁺/NeuN⁺)(図16B)、及びすべての未成熟(DCX⁺染色された)ニューロン(図16C)を示すヒストグラム。この研究で試験したすべてのマウスの脳の両側からの、6つの等間隔の皮質の切片(30 μm)から計算した、DGあたりのBrdu⁺、Brdu⁺/NeuN⁺、及びDCX⁺細胞の数。エラーバーは、平均値±SEMを表す。バー上のアステリスクは、非-Tgの同腹仔に対する有意差を示す(**P<0.01; ***P<0.001; 両側のスチュードントのt検定)。それらの上の、P値のある水平な線は、指摘した群間の差を示す(分散分析)。(図16D) 非処置のTgマウスにおけるものに対する、GAでワクチン接種したTgマウス及び非-Tg同腹仔における、Brdu/DCX/NeuNに対する免疫染色を示すDGの代表的な共焦点顕微鏡画像。(図16E) 枝分れしたDCX⁺細胞が、GAでワクチン接種したTgマウスの海馬のDGの細胞顆粒下帯に位置するMHC-II I⁺ミクログリア付近に見られる。

【図17A-17D】IL-4は、ミクログリアの毒性及び神経発生の促進に対する、凝集したA⁻の有害作用に対抗することができることを示す図である。(図17A) in vitro処置の実例。(図17B) ミクログリアなしで(コントロール)、又は非処置のミクログリアと、又はA_(1~40)(5 μM)で48時間予め活性化し(MG_(A 1~40))、引き続きIFN-(10 ng/ml)で(MG_(A 1~40 / IFN 10 ng / ml))、若しくはIL-4(10 ng/ml)で(MG_(A 1~40 / IL-4))、若しくはIFN-(10 ng/ml)及びIL-4(10 ng/ml)の両方で(MG_(A 1~40 / IFN + IL-4))活性化したミクログリアと10日間同時培養した、GFP及び-I II - チューブリンを発現するNPCの代表的な共焦点画像。凝集したA⁻は、ミクログリアを誘発してアメーバ状の形態に適応せざるが、IL-4を加えた後は、これらのミクログリアは分枝型様構造を表したことに留意されたい。(図17C) CD11b⁺ミクログリアに隣接してGFP及び-I II - チューブリンを同時発現するNPCの別々の共焦点画像。(図17D) 共焦点画像から得た、GFP及び-I II - チューブリンで2重標識した細胞の定量化(GFP⁺細胞のパーセント値として表した)。結果は、同型培養における、3つの独立した実験のものであり、バーは平均値±SEMを表す。バー上のアステリスクは、非処置(コントロール)のNPCに対する有意差を示す(*P<0.05; **P<0.01; 両側のスチュードントのt検定)。

ントの t 検定）。上に P 値を付けた水平の線は、指摘した群間の差を示す（分散分析）。

【図 18】筋萎縮性側索硬化症（ALS）のマウスモデルに対する、酢酸グラチラマーと組み合わせた幹細胞の投与の効果を示す図である。

【図 19 A - 19 B】MOGペプチド 35 ~ 55 によって誘発される EAE の臨床徴候を示す図である。（図 19 A）C57BL/6 及び YFP2.2 マウス。（図 19 B）疾患の様々な段階で、即ち、疾患の誘導後直ちに開始して - 預防処置、20 日目に疾患の徴候の出現後に開始して - 抑制処置、又は疾患出現の 6 週間後の慢性期の間に - 遅延型抑制、毎日の GA 注射を 5 ~ 8 回行うことにより処置した C57BL/6 マウスにおける GA 処置の効果。各処置の注射期間を、x 軸に沿って示してある（n = 6）。

【図 20 A - 20 E】MOGペプチド 35 ~ 55 によって誘発される EAE の組織学的徴候を示す図である。（図 20 A ~ 20 D）そのニューロンの集団上に YFP（緑色）を発現する YFP2.2 マウスの脳の矢状切片における GA 処置の効果。（図 20 A）小脳における YFP 発現性線維の劣化及びトランザクション（transaction）、並びに血管周囲の浸潤との相関。挿入部分は、T 細胞のマーカーである CD3 に対する抗体で染色することにより実証された、血管周囲の浸潤の部位を示す。（図 20 B）線条体における病変部の線維の排除。（図 20 C）大脳皮質の層 5 における錐体細胞の典型的な形態。矢印及び挿入部分は、EAE マウスにおいて核が辺縁に追いやられた異常なニューロンの細胞体を示す。非処置の EAE マウスの脳よりも、EAE + GA マウスの脳に見られる損傷はかなり少なく、即ち、纖維の劣化は少なく、病変部の数は少なく、より小さい程度であり、細胞核の膨潤は少なかった。YFP ポジティブの線維の薄層が、GA 処置マウスの病変部にわたって頻繁に見られたことに留意されたい。（図 20 D）疾患誘発 25 日後、C57BL/6 マウスの皮質における、変性するニューロンに結合する Fluoro-Jade B（緑色）での染色。スケールバーは、（図 20 A）では 500 μm、（図 20 B、20 C）では 50 μm、及び（図 20 E）では 20 μm を示す。L-2、L-5、及び L-6、大脳皮質の層 2、5、及び 6。

【図 21 A - 21 B】EAE YFP2.2 マウスにおけるミクログリアの活性化を示す図である。（図 21 A）小脳の白質における、ミクログリア及びマクロファージのマーカーである MAC-1（赤色）の、YFP 発現性線維（緑色）の変性及び傷害との相関。ボックス I では、線維密度の低下を伴った、高度に活性化したミクログリア細胞が観察されるが、ボックス II の近くの部位では、低 MAC-1 発現、及び正常の線維の出現が存在する。（図 21 B）EAE マウスの様々な脳の領域、即ち線条体、視床、（背側の側面の膝状の核）、及び海馬（顆粒及び分子の層）における MAC-1 発現に対する、及びミクログリア細胞の形態に対する GA の効果。EAE マウスの脳に、MAC-1 染色の増大、及び活性化したミクログリアに典型的な細胞の形態が示された（挿入部分）。それとは対照的に、EAE + GA マウスの脳における MAC-1 の発現は、広範に減少し、ナイーブのマウスにおける非活性化のミクログリアの形態に類似の細胞形態を表していた。EAE は、灌流 35 日前に、YFP2.2 マウスで誘発された。GA 処置を、EAE 誘発直後に開始して、毎日の注射を 8 回行うことにより適用した。矢状切片。スケールバーは、（図 21 A）500 μm、（図 21 B）線条体及び視床では 100 μm、海馬では 50 μm を示す。

【図 22 A - 22 E】C57BL/6 マウスのニューロン増殖性地帯における増殖マーカーである BrdU（赤色）、及び未成熟なニューロンのマーカーである DCX（緑色）に対する免疫染色により可視化した、新規に産生されたニューロンの増殖を示す図である。EAE 誘導 25 日後、最終の GA 注射の 1 日後、（図 22 A）SVZ における、共焦点画像及び（図 22 C）海馬の SGZ における、EAE マウスで、及びより大きい程度で EAE + GA マウスでの、BrdU 及び DCX の発現の増大。GCL 中に遊走した、海馬における DCX⁺ 細胞に留意されなく、密度の濃い枝分れした樹状の木が表れている。（図 22 B）最終の GA 注射後 1 日（I）、10 日（II）、及び 30 日（III）の様々な時間点における、SVZ における DCX 発現。ニューロン増殖は時間とともに低下するが、GA 処置マウスにおける DCX 発現は、処置 1 日及び 10 日後、EAE マウスにおけるよ

10

20

30

40

50

り高かった。冠状切片。スケールバーは、(図22A)では $50\text{ }\mu\text{m}$ 、(図22B)及び(図22C)では $200\text{ }\mu\text{m}$ 、並びに(図22C)の右のパネルでは $20\text{ }\mu\text{m}$ を示す。S t、線条体；L V、側脳室；SG Z、顆粒細胞下帯；G C L、顆粒細胞層；I M L、O M L、内部の、及び外部の分子層。(図22D) E A E 誘発及びG A 処置の後の様々な時間点における、E A E(赤色)及びE A E + G A(青色)マウスにおけるB r d U組み込み及びD C X 発現の定量分析。疾患の出現後、両方のニューロン増殖性地帯にニューロンの増殖の増大が観察され、引き続き、ナイープのマウスを下回って低下し、様々なG A 処置の計画によりニューロン増殖が増強する。内側中隔のレベルで開始して $640\text{ }\mu\text{m}$ 後方に(B r d U / D C X の2重染色で)B r d U ポジティブの細胞を計数し、D C X 染色された面積を測定することにより、及び、海馬のD GにおいてB r d U⁺ / D C X⁺細胞(両ブレードで)、及びD C X⁺細胞(鋸歯における上方のブレードで)を、その中隔側頭の軸を介して計数することによりS V Zで定量化を行った。各脳構造に対するB r d U / D C X 染色した細胞の数は、マウス1匹あたり8つの片側レベルから、 $80\text{ }\mu\text{m}$ 離れて、処置群に対し3~4匹のマウスについて平均した。結果は、ナイープのコントロールからの変化の倍数として表した。B r d Uの組み込みに対するコントロールの値は、最後のB r d U 注射1日後、及び1カ月後のB r d U / D C X⁺細胞はそれぞれ、S V Zでは 211 ± 31 及び 23 ± 6 、海馬では 45 ± 13 及び 17 ± 8 、D C X 染色では、 10 匹のナイープのマウスから平均したポジティブの細胞は、S V Zでは 19 、 $464 \pm 3550\text{ }\mu\text{m}^2$ 及び海馬では $78 \pm 12\text{ }\mu\text{m}^2$ であった。統計学的分析を、分散分析により、その後、適宜、フィッシャーのL S Dにより行った。^{*}ナイープのコントロールを上回る有意な効果、# E A E 非処置マウスを上回る有意な効果、($p < 0.05$)。(図22E) 実験スケジュール：E A E 誘発(0日目)から灌流までの時間の長さ；予防(P)、抑制(S)、又は遅延型抑制(D S)の処置としてのG A 注射、及びB r d U接種 - G A 処置同時に、又は直後に。

【図23A - 23H】G A 処置したE A E マウスにおけるニューロンの前駆細胞の、遊走流を介した動員及び遊走の促進を示す図である。(図23A) 脳室下帯(S V Z)から吻側細胞移動路(R M S - 赤色)及び外側皮質流(L C S - 黄色)の両方を通る遊走経路の矢状方向の模式図。(図23B) S V ZからO BまでのD C X ポジティブの細胞(赤色)の経路を示すR M Sを通る矢状切片。(図23C) 胎児の前脳で一般的に機能的であり、E A E 成年マウスにおいてG A 処置後に再度出現するL C Sにおけるニューロン前駆細胞。D C X ポジティブの細胞(赤色)は、海馬と脳梁の間の界面のY F P 発現性線維(緑色)に沿って、様々な皮質の領域に、主に後頭部の皮質に向かって遊走する。(図23D~23E) E A E マウス及びナイープのコントロールと比較した、E A E + G A マウスのR M Sにおける、S V Zに隣接したR M S切片における(図23D)、及びR M S弧のより内側の切片における(図23E)、B r d U(橙色)及びD C X(緑色)免疫染色で可視化した新規に產生されたニューロンの動員の増大。矢状切片。スケールバーは、(図23B)では $1000\text{ }\mu\text{m}$ 、(図23C)では 25 、(図23D)では 500 、及び(図23E)では $50\text{ }\mu\text{m}$ を示す。L V、側脳室；C t x、皮質；S t、線条体；O B、嗅球；A C、前交連；c c、脳梁；H i p、海馬；L - 5及びL - 6、大脳皮質の層5及び層6。(図23F~23H) B r d U及びG A 注射終了1日後(図23F、23G)及び1カ月後(図23H)における、R M SにおけるB r d U(D C Xを同時発現する)又はD C Xの定量分析であり、E A E マウスのR M Sではコントロールを超えたニューロン前駆細胞の有意な増大、及びE A E + G A マウスにおいてより高い上昇を示している。軽微な、短期の疾患、及び自発的な回復を示した1匹のE A E マウスでは(E A E - r e c、図23H)ニューロンの遊走の強化が観察されたことに留意されたい。線条体の縁に沿って、B r d U⁺ / D C X⁺細胞を計数し、D C X 染色された領域(0.2^2 mm における)を計算することにより定量化を行った。B r d U / D C X 染色した細胞の量を、 $80\text{ }\mu\text{m}$ 離れて、マウス1匹あたり8切片から平均した。1匹のマウスを示すE A E r e cを除いて、処置群あたり3匹のマウスを計数した。結果をナイープのコントロールからの変化の倍数として表す。B r d U組み込みに対するコントロール値：最終のB r d U注射の1日後、

及び D C X 染色に対して、B r d U⁺ / D C X⁺ 細胞 146 ± 31 : 6 匹のナイーブのマウスから平均して 2193 ± 305 μm²。ナイーブのコントロールに対して * p < 0.05。(図 23 B、23 C、23 H) では E A E マウスを、疾患の誘発に引き続き、灌流の 1 カ月前に G A で処置した - 預防、(図 23 D、23 E、及び 23 F、23 G) では E A E 誘発マウスに、疾患誘発 20 日後、灌流 1 ~ 5 日前、G A 及び B r d U を注射した - 抑制。

【図 24 A - 24 F】G A 処置した E A E 誘発マウスにおけるニューロン前駆細胞の遊走を示す図である。D C X 発現性のニューロン前駆体(橙色)は、古典的なニューロン増殖性地帯又は遊走流から分岐し、Y F P 発現性線維(緑色)に沿って非定型の領域に広がる。(図 24 A) R M S から線条体中へ。(図 24 B、24 C) 側坐核の領域へ、S V Z から(図 24 B)、及び R M S から(図 24 C)。(図 24 D) R M S から、皮質の内部へ、(図 24 E)、層 5、及び(図 24 F)、層 6。D C X 発現性細胞の形態学的特徴、即ち、遊走するニューロンに特徴的な、先導する及び引きずる突起を有する紡錘状の細胞体(図 24 C 挿入部分、及び図 24 E、24 F)、並びにそれらの配向、即ち、神経線維に沿って遊走流から遊走して離れる(図 24 A、24 D ~ 24 F)に留意されたい。矢状切片。スケールバーは、図 24 A ~ 24 D では 200 μm、図 24 E では 100 μm、及び、図 24 F では 10 μm を示す。図 24 A ~ 24 C では、ボックスの部位の拡大を、右のパネルに示す。R M S、吻側細胞移動路；S V Z、脳室下帯；S t、線条体；A C、前交通；c c、脳梁；L - 5 及び L - 6、大脳皮質の層 5 及び層 6。

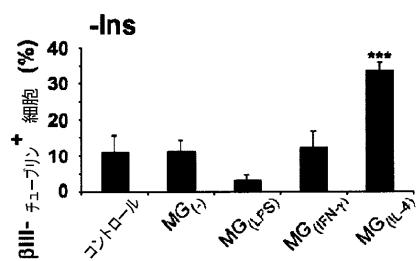
【図 25 A - 25 K】E A E マウスで G A 処置の経過に產生されたニューロン前駆細胞の運命の追跡を示す図である。B r d U 及び G A の同時注射中に生まれた、B r d U を組み込んだ細胞(赤色)は、様々な脳の領域に遊走し、ニューロンのマーカーを発現した。(図 25 A、25 B) 最後の注射の 10 日後、線条体(図 25 A)、及び側坐核(図 25 B)における、未成熟のニューロンのマーカーである D C X を同時発現する B r d U ポジティブ細胞(緑色)。局所の分裂を示唆する、ダブルポジティブの細胞の集団に留意されたい。(図 25 C) マウスを屠殺する前に in situ で増殖した D C X ポジティブの細胞を示す、内因性の増殖マーカーであるホスホヒストン(phosphohistone)での、側坐核における D C X 発現性細胞の染色(青色)。(図 25 D ~ 25 G) 成熟ニューロンのマーカーである N e u N を同時発現する B r d U ポジティブ細胞(緑色)、G A / B r d U 注射完了 1 カ月後、線条体における(図 25 D、25 F)、側坐核における(図 25 E)、及び帯状の皮質層 5 における共焦点画像(図 25 G)。矢印は、代表的な B r d U / N e u N 同時発現性の細胞を示す。(図 25 H、25 K) Y F P マウスに G A / B r d U を注射し 1 カ月後、帯状の層 5 において(図 25 H、25 I)、後頭部の層 6 において(図 25 J)、及び皮質の運動層 5(図 25 K)において Y F P を同時発現する(緑色) B r d U ポジティブ細胞。成熟した機能上のニューロンを示す、尖端樹状突起及び軸索が特徴的に伸長した錐体の細胞を見ることができる。図 25 G 及び図 25 K は共焦点画像である。矢状切片。スケールバーは、(図 25 A、25 B、25 H) では 200 μm、図 25 C、25 D では 100 μm、図 25 E、図 25 I ~ 25 K では 50 μm、図 25 F、25 G では 15 μm を示す。

【図 26 A - 26 F】ニューロン前駆体の病変部位への遊走を示す図である。D C X 発現性細胞(橙色)が、Y F P 発現性線維(緑色)の変質のある傷害領域に見られた。(図 26 A)、E A E マウス(G A により処置していない)において、疾患の誘発 35 日後、線条体における。(図 26 B ~ 26 F) E A E マウスにおいて、疾患誘発 35 日後、G A により処置(疾患誘発直後に開始して、毎日の注射を 8 回 - 預防)。R M S から線条体における病変部に向かって分岐する D C X 発現性細胞(図 26 B)、線条体の病変部を取り囲んで(図 26 C)、前頭部の皮質層 5 / 6 における病変部の内側(図 26 D、26 E)、及び側坐核における病変部を取り囲む集団における(図 26 F)。G A 処置したマウスにおける病変部は、非処置のマウスにおけるほど広範ではなかったが、これらの病変部と隣り合う前駆体の量は広範に高かった。病変部中に伸長する Y F P 発現性線維、及び D C X 発現性細胞により占められる病変部における軸索の出芽に留意されたい(図 26 D ~ 26 F)。

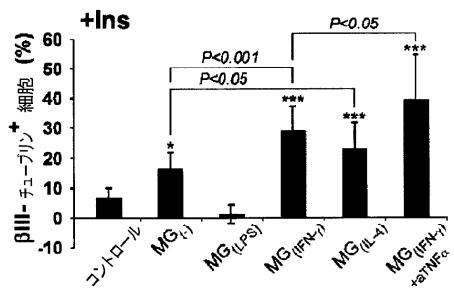
F）。矢状切片。スケールバーは、図26A、26Bでは100 μm、図26C、26D、26Fでは50 μm、及び図26Eでは20 μmを示す。

【図27A - 27F】GA誘発性のニューロンの前駆体は神経膠症の瘢痕領域に遊走し、*in situ*でBDNFを発現することを示す図である。図27A～27C、線条体においてGFAP発現性星状細胞（赤色）が定住する領域における、DCX発現性細胞（緑色）。図27D～27F、DCX発現性細胞（緑色）は、側坐核（図27D、27E）及び海馬の歯状回（図27F）において、BDNF（オレンジ色）の広範な発現を表している。冠状切片。スケールバーは、図27A～27Cでは100 μm、図27Dでは50 μm、図27Eでは12 μm、及び図27Fでは30 μmを示す。

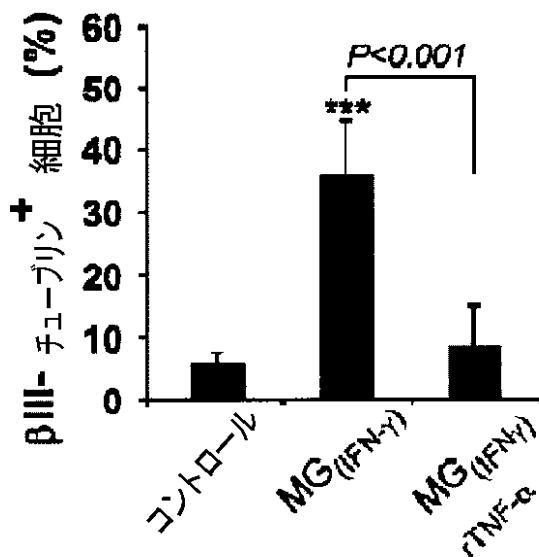
【図1A】



【図1B】



【図1C】



【図 1 F】

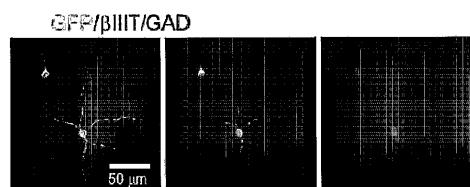


Fig. 1F

【図 2 A】

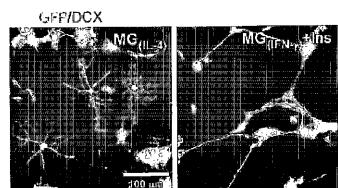


Fig. 2A

【図 2 B】

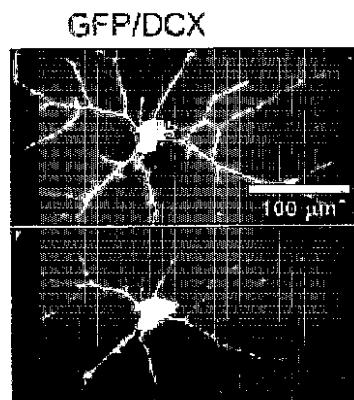


Fig. 2B

【図 2 C】

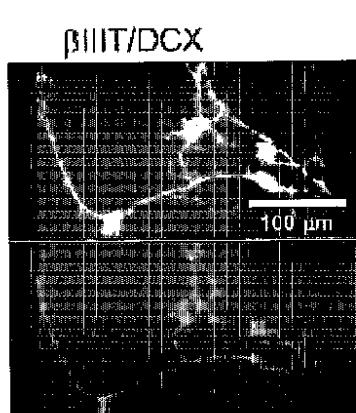
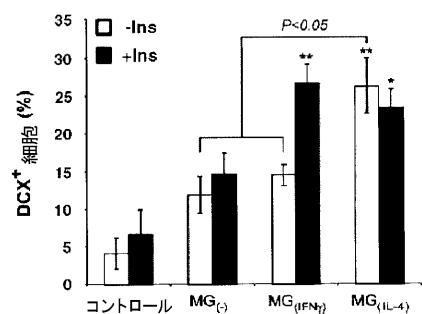
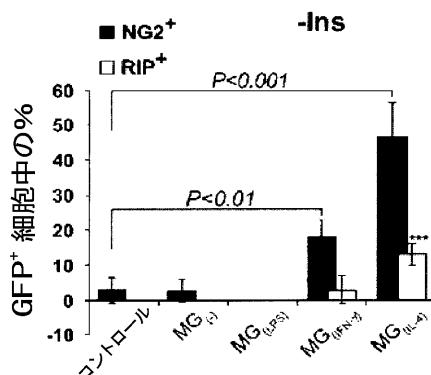


Fig. 2C

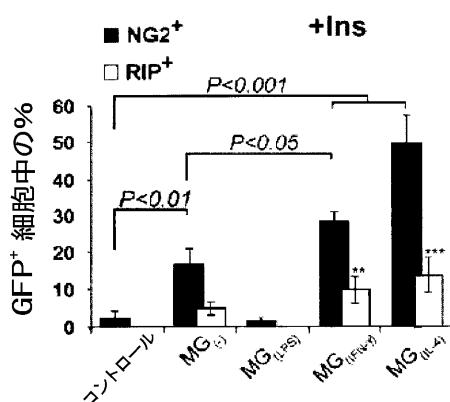
【図 2 D】



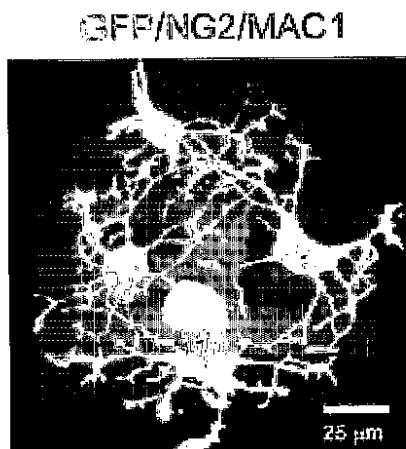
【図 3 A】



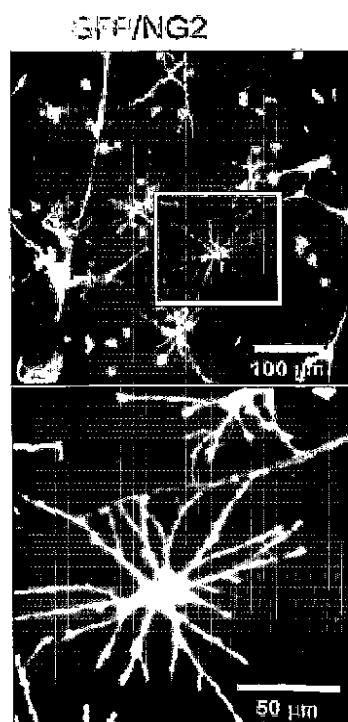
【図 3 B】



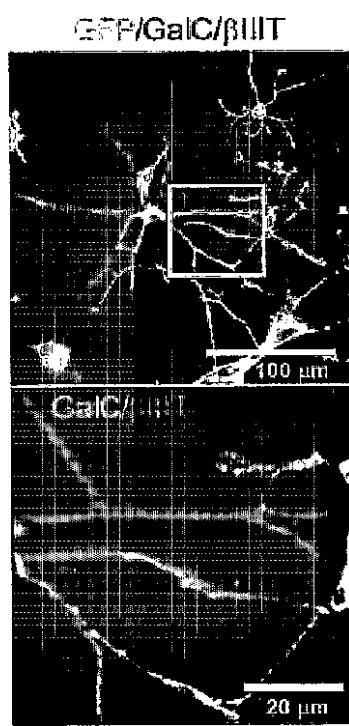
【図3E】

**Fig. 3E**

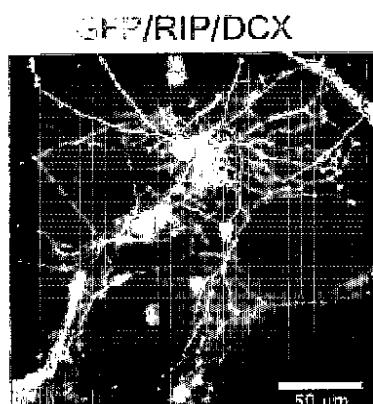
【図4B】

**Fig. 4B**

【図4C】

**Fig. 4C**

【図4D】

**Fig. 4D**

【図 4 E】

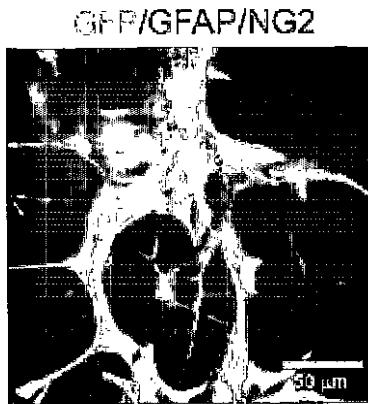


Fig. 4E

【図 4 F】

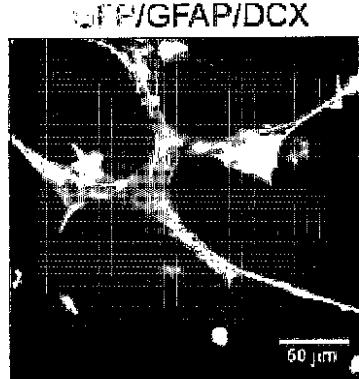
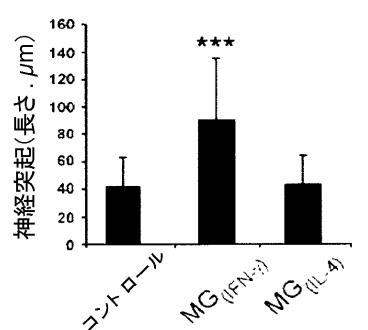
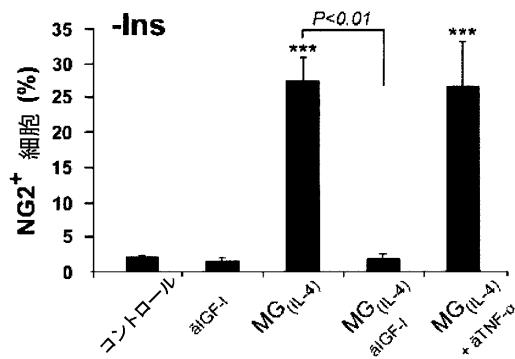


Fig. 4F

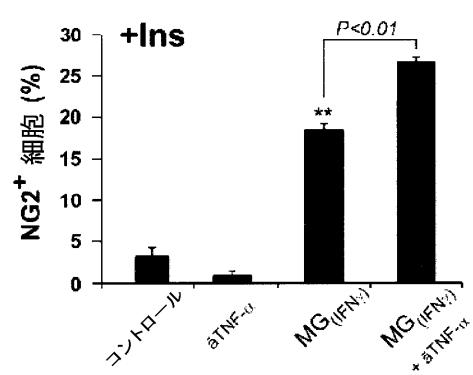
【図 4 G】



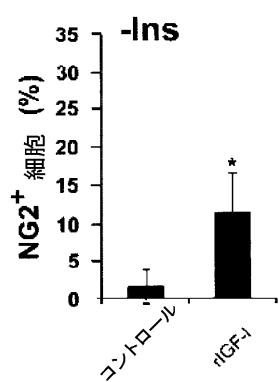
【図 5 A】



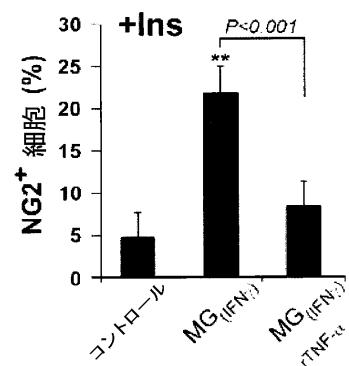
【図 5 C】



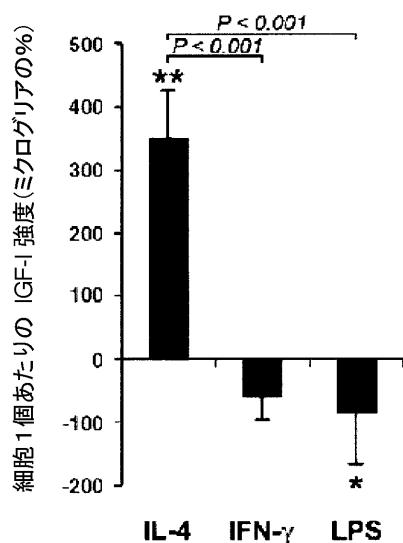
【図 5 B】



【図 5 D】



【図 6 C】



【図 8 A】

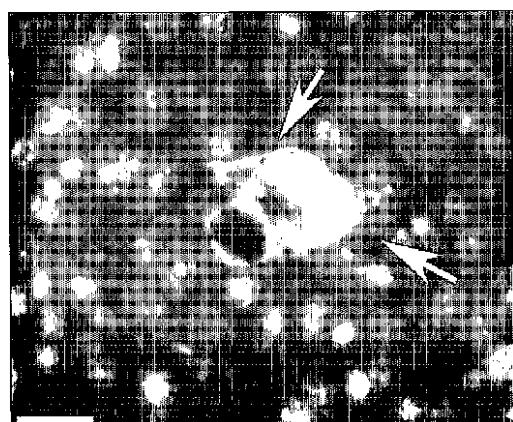


Fig. 8A

【図 8 B】

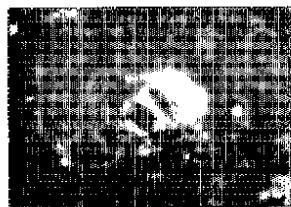


Fig. 8B

【図 8 D】

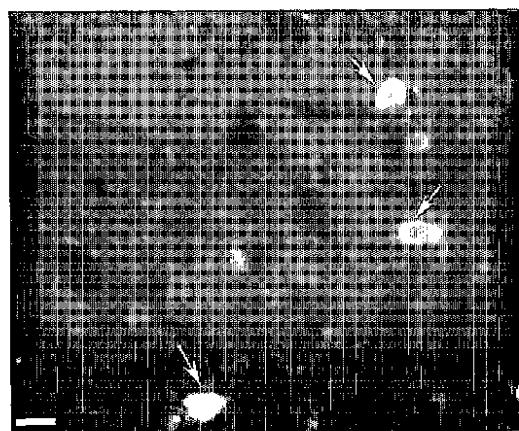


Fig. 8D

【図 8 C】

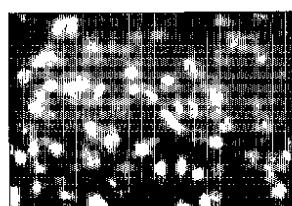


Fig. 8C

【図 8 E】

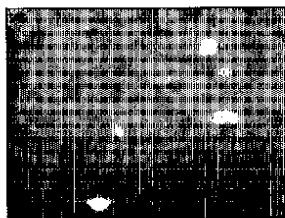


Fig. 8E

【図 8 F】

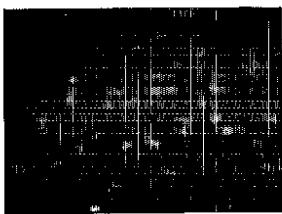


Fig. 8F

【図 9 A】

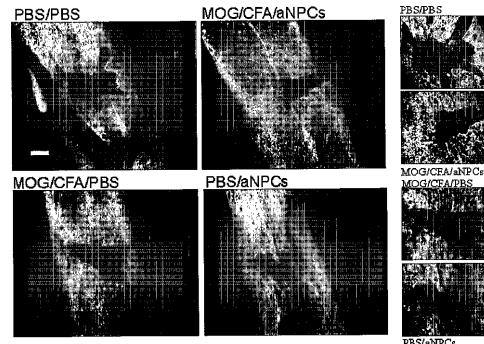
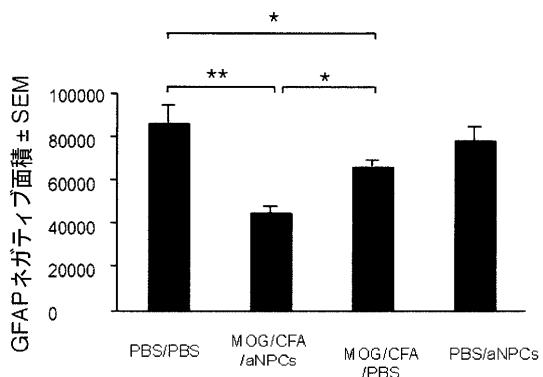


Fig. 9A

【図 9 B】



【図 9 C】

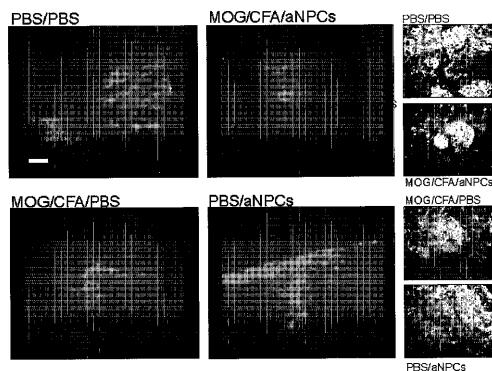
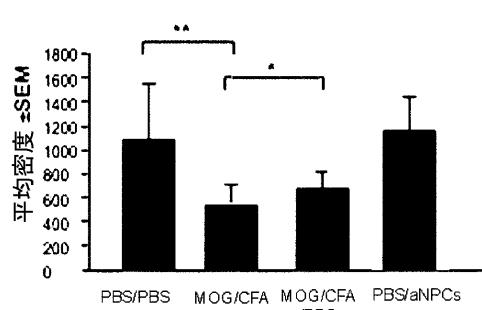


Fig. 9C

【図 9 D】



【図 9 E】

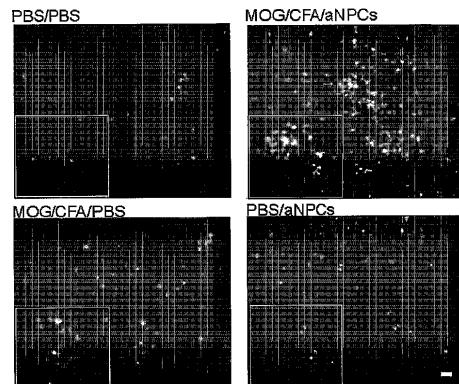
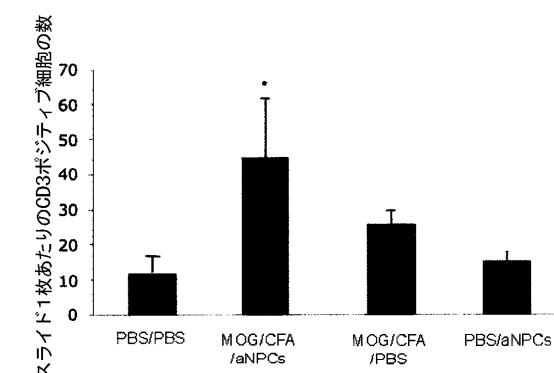
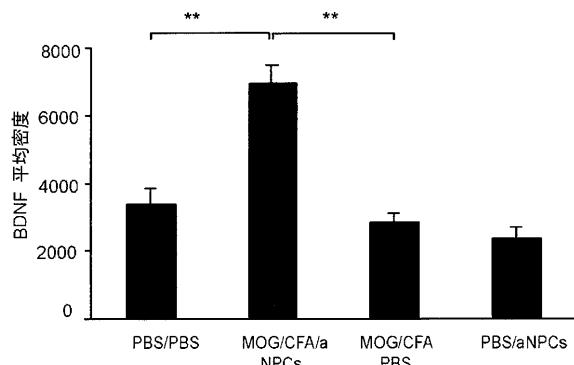


Fig. 9E

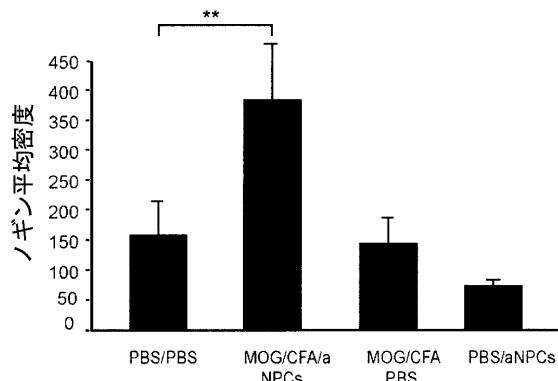
【図 9 F】



【図 10 A】



【図 10 C】

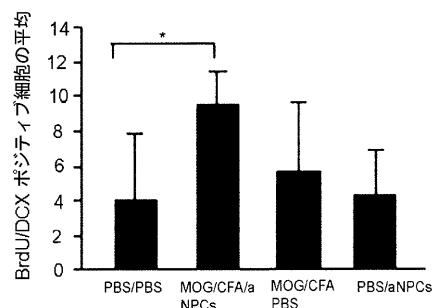


【図 10 B】



Fig. 10B

【図 11 A】



【図 11 B】

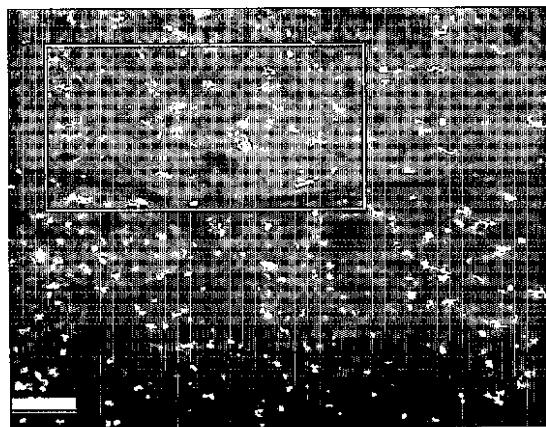


Fig. 11B

【図 11 C】

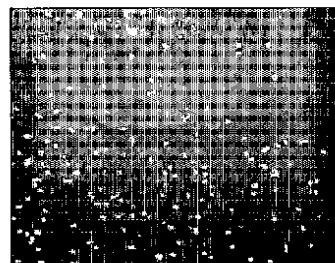


Fig. 11C

【図 11 D】

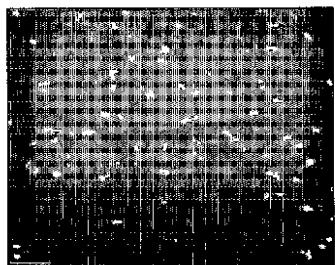


Fig. 11D

【図 1 1 E】

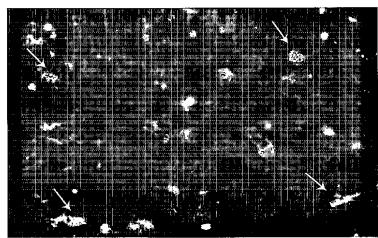
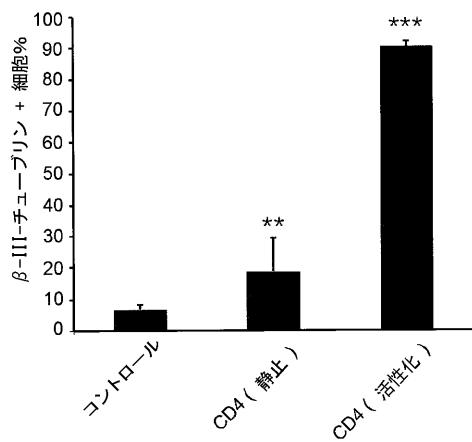
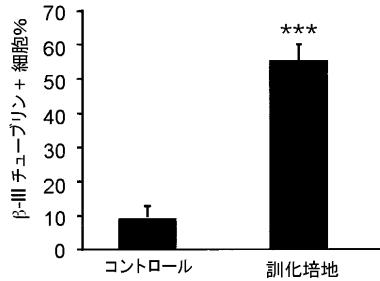


Fig. 11E

【図 1 2 A】



【図 1 2 C】



【図 1 2 D】

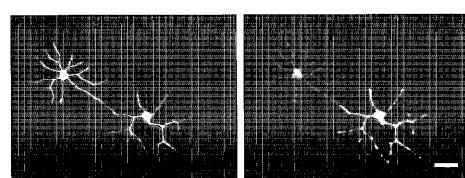
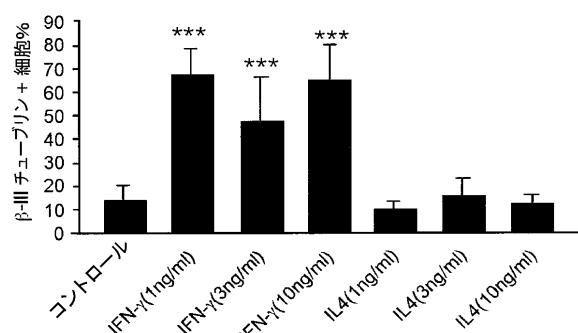
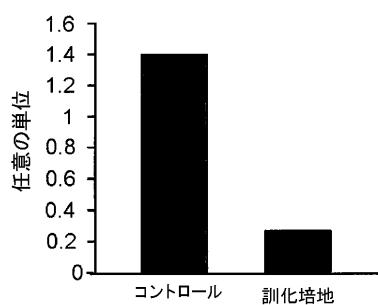


Fig. 12D

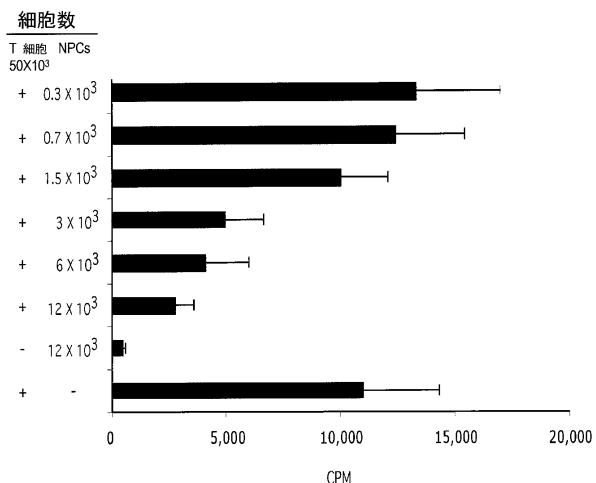
【図 1 2 E】



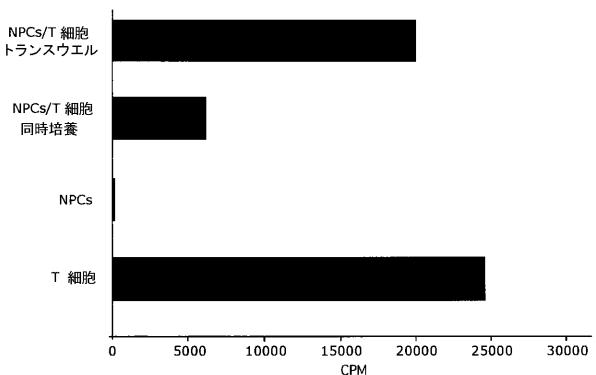
【図 1 2 F】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 13C】

	サイトカイン濃度 pg/ml					
	IL-12	TNF- α	IFN- γ	MCP-1	IL-10	IL-6
T 細胞	5	293	3055	12	87	48
T 細胞/NPCs	5	265	2877	4968	125	96

【図 15C】

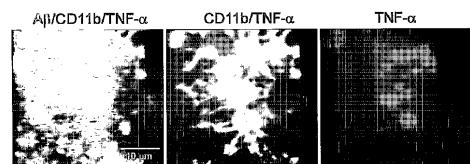


Fig. 15C

【図 15D】

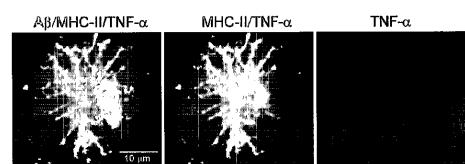


Fig. 15D

【図 15E】

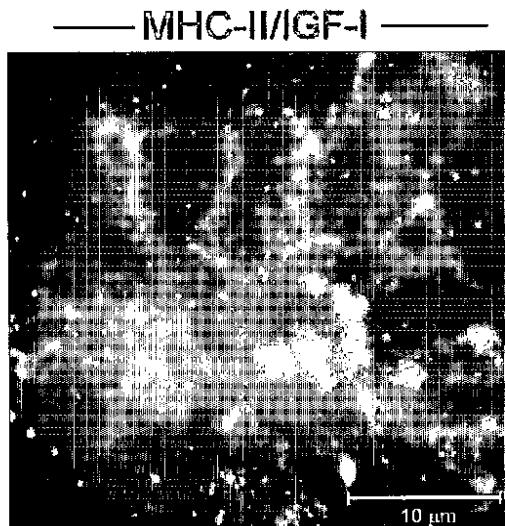


Fig. 15E

【図 15F】

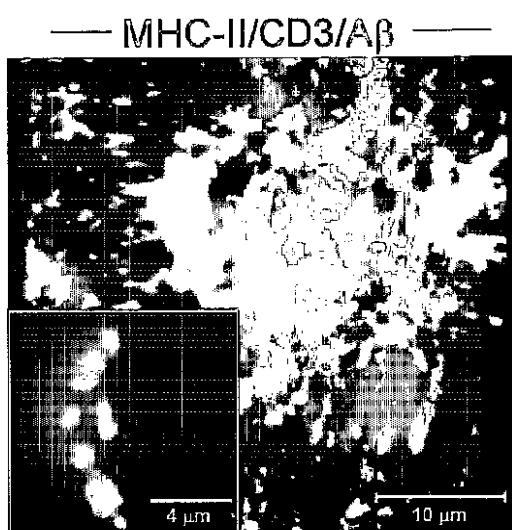
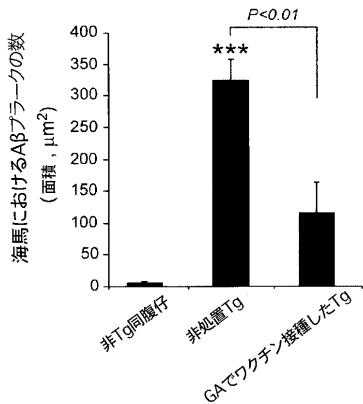
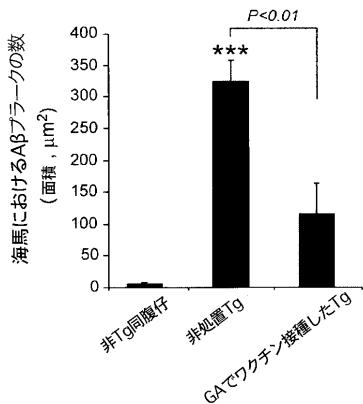


Fig. 15F

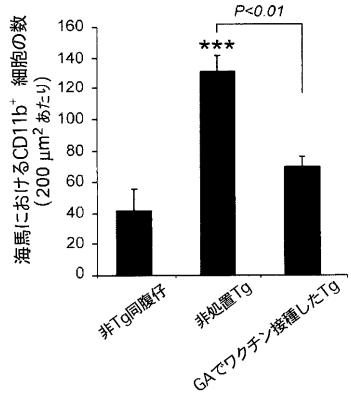
【図 15G】



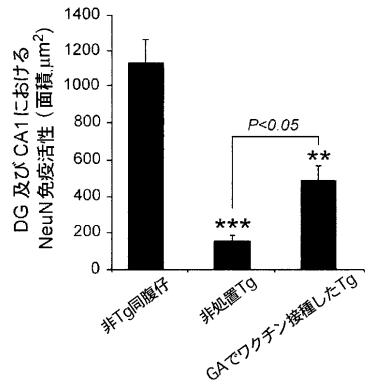
【図 15H】



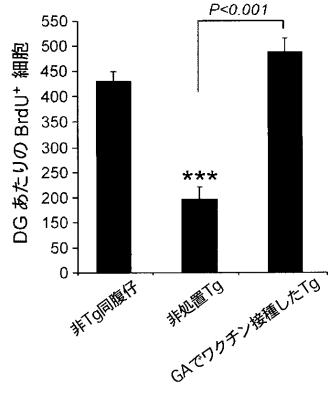
【図 15 I】



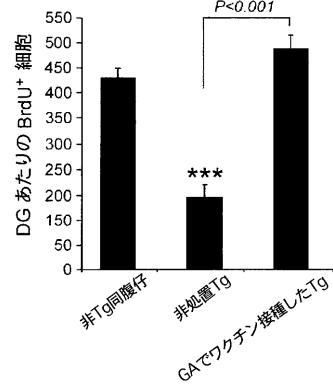
【図 15 J】



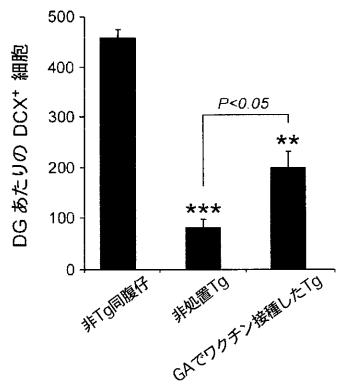
【図 16 A】



【図 16 B】



【図 16 C】



【図 17 C】

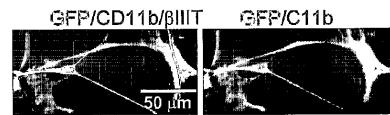
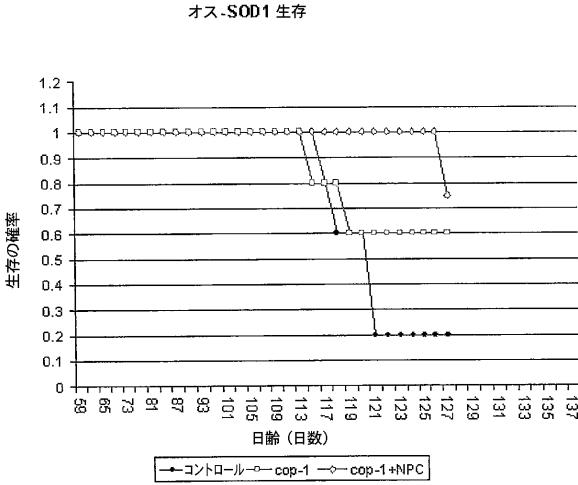
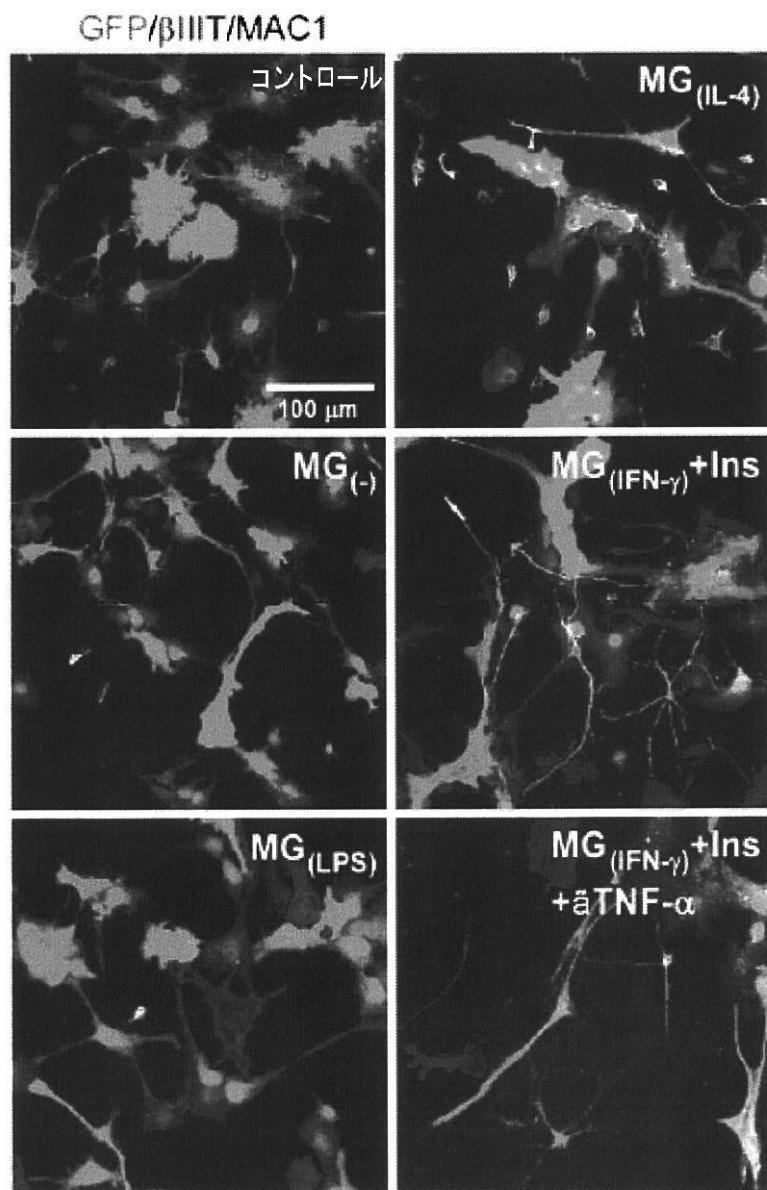


Fig. 17C

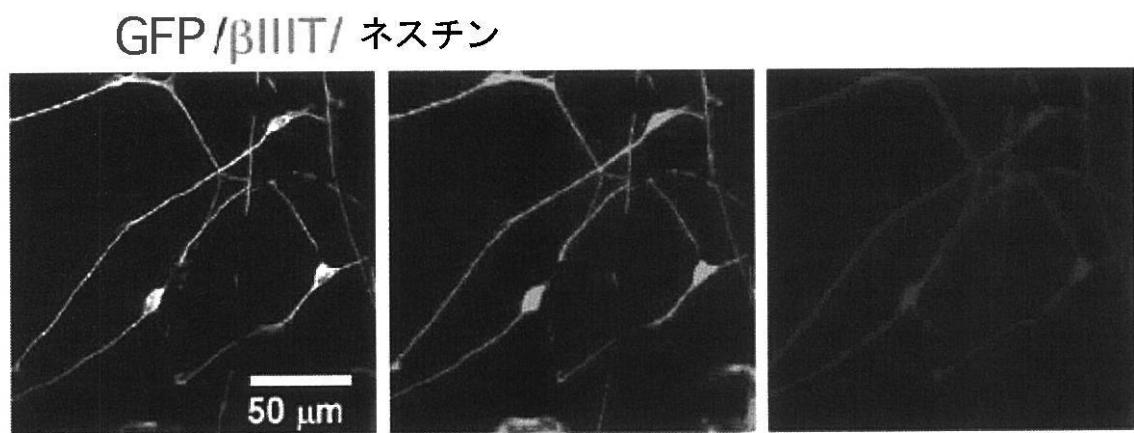
【図 18】



【図1D】

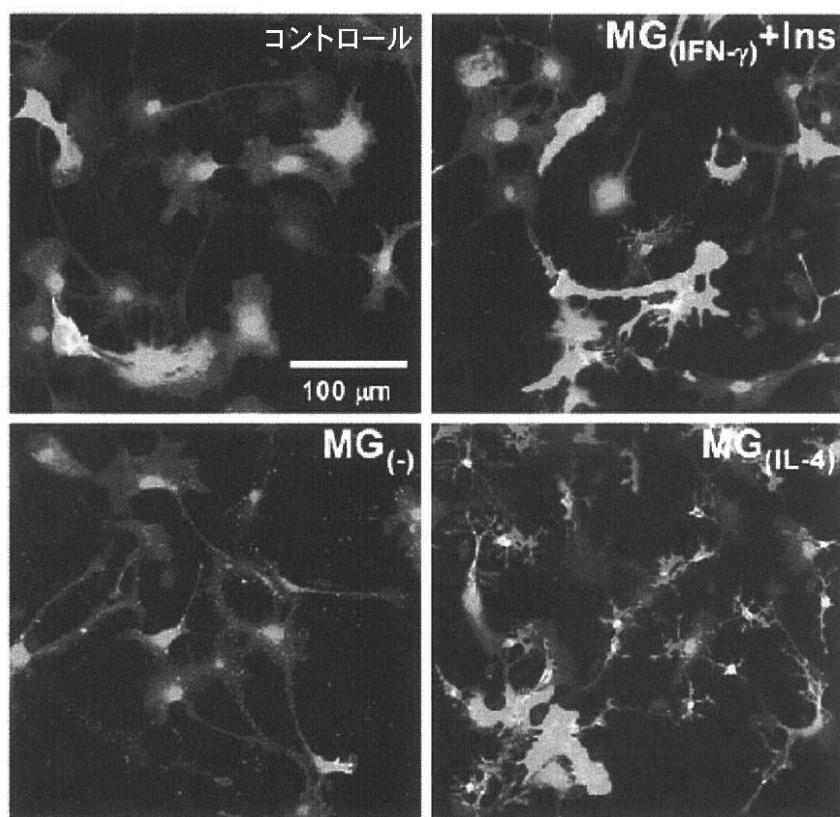


【図1E】



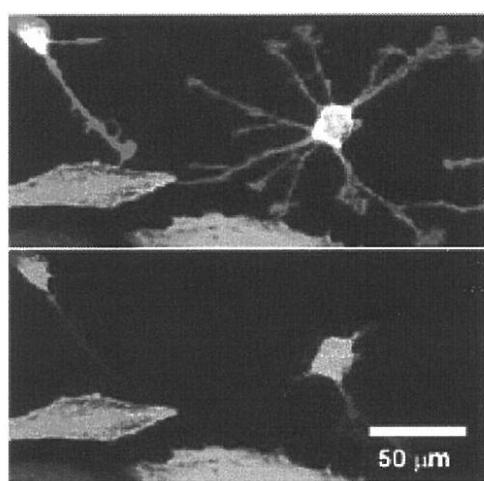
【図3C】

GFP/NG2

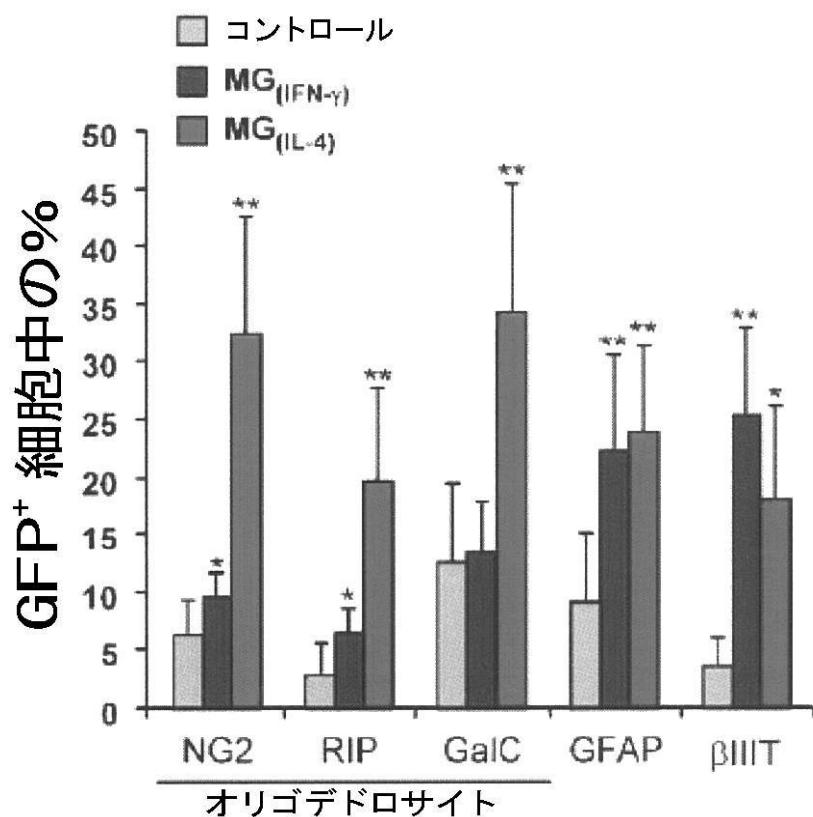


【図3D】

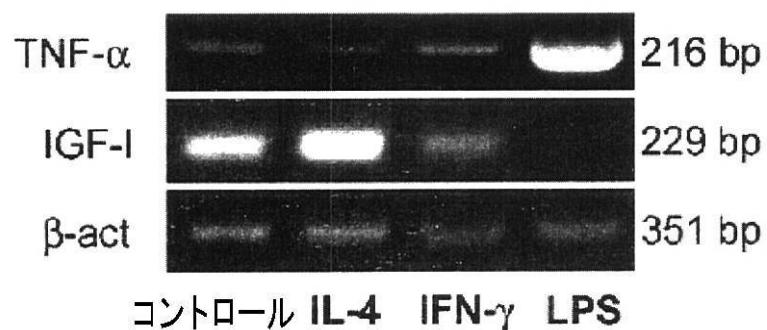
GFP/NG2/ ネスチン



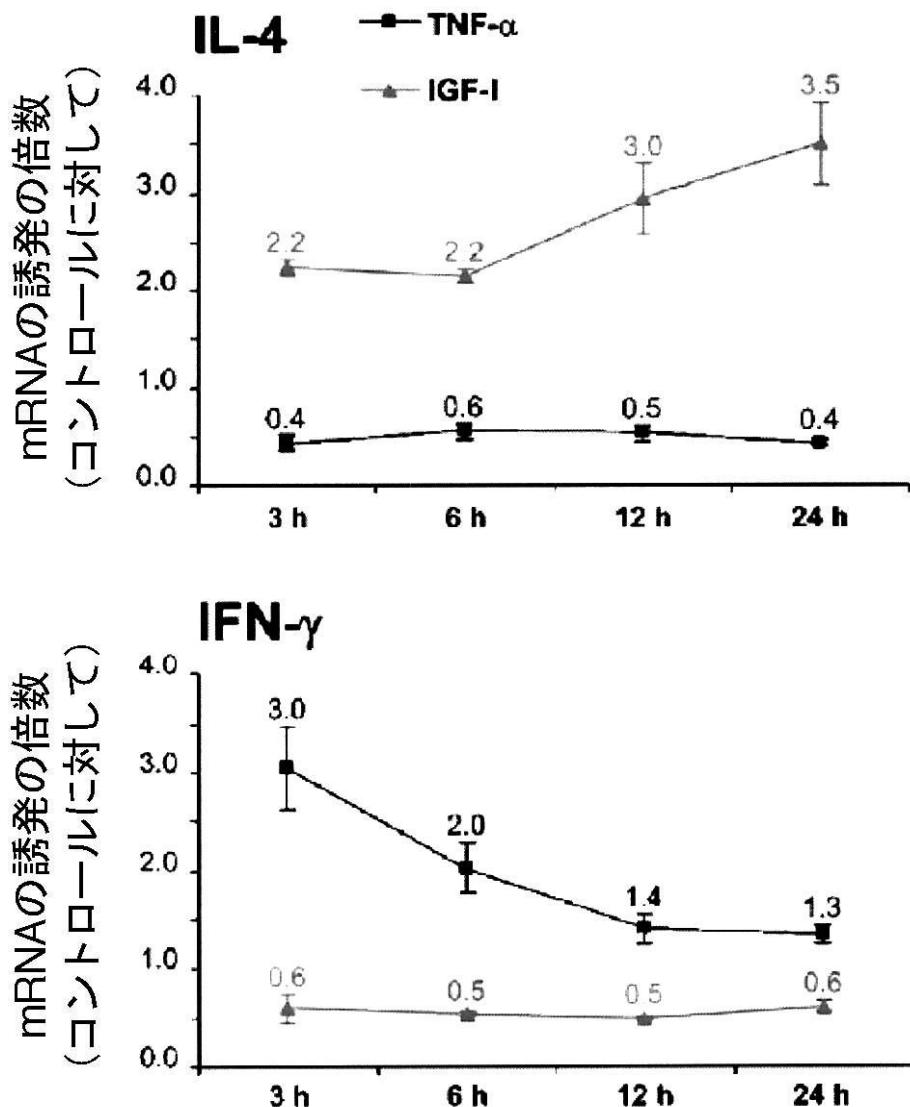
【図4A】



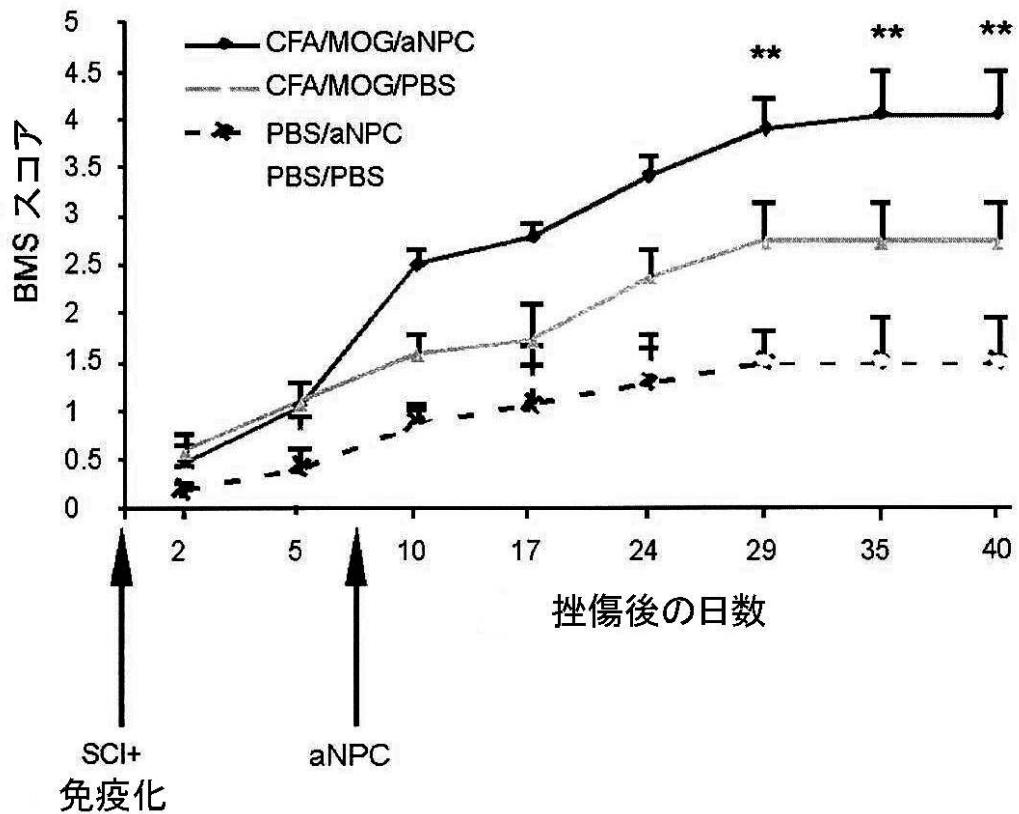
【図6A】



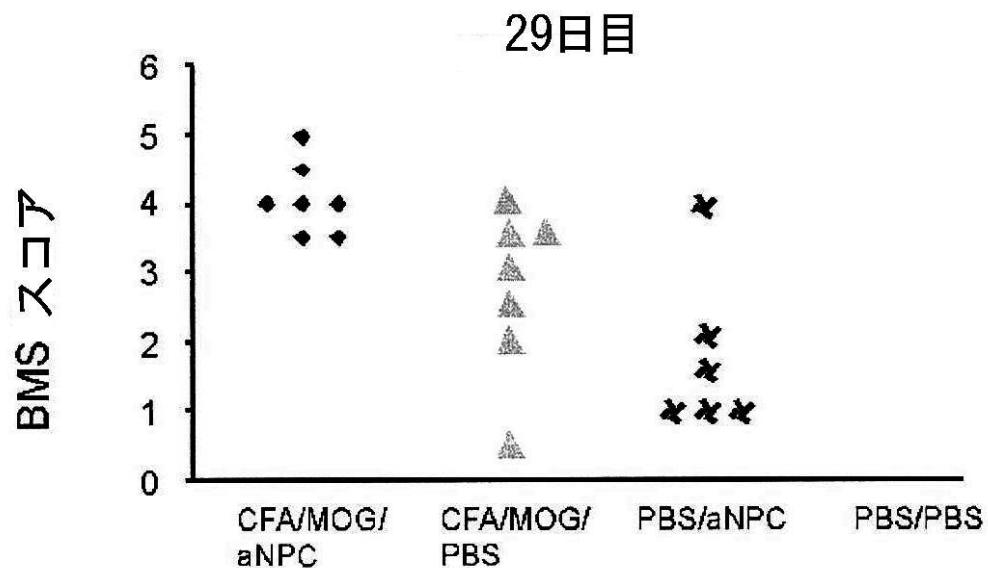
【図 6 B】



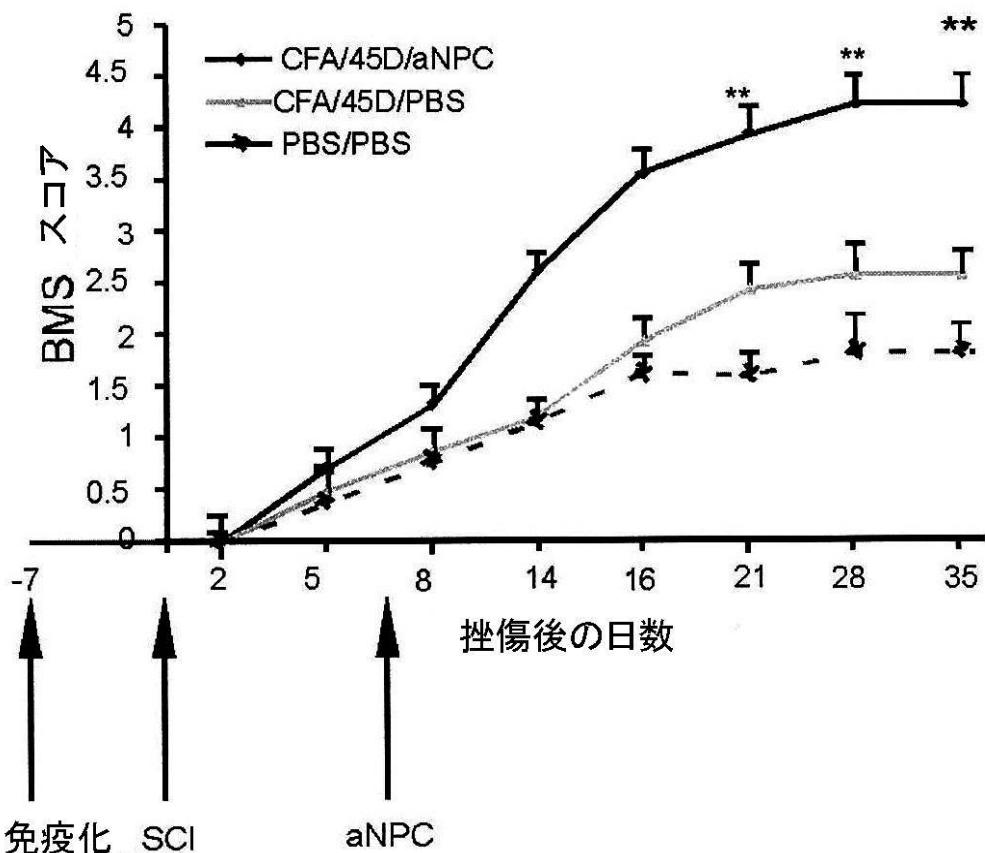
【図 7 A】



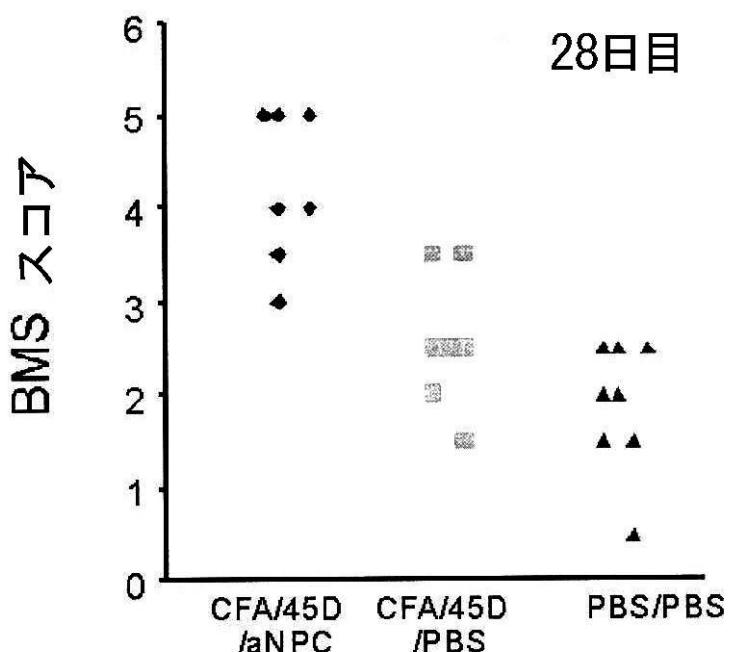
【図 7 B】



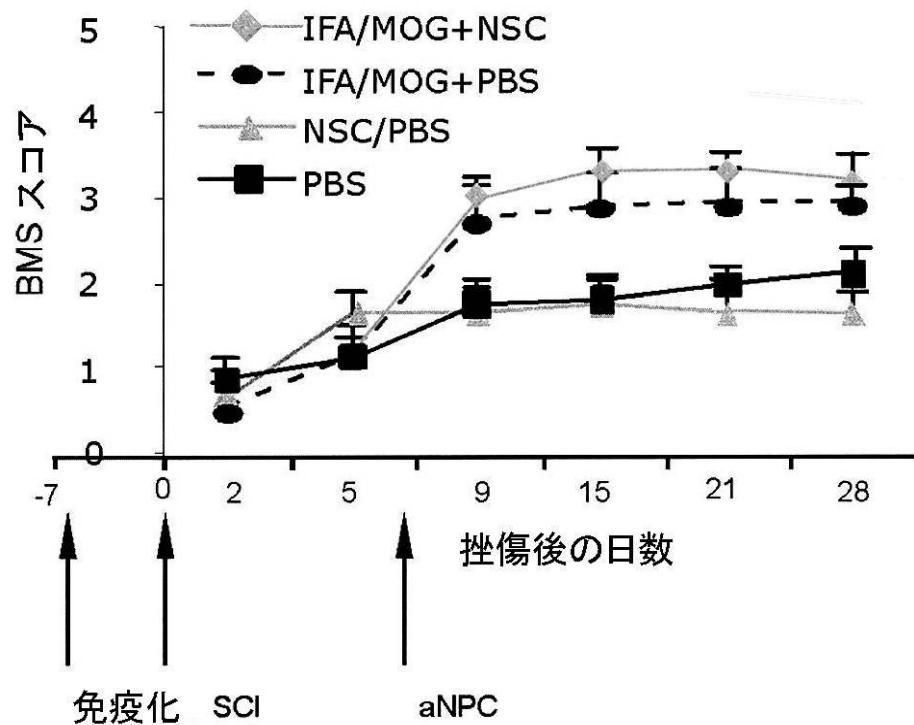
【図7C】



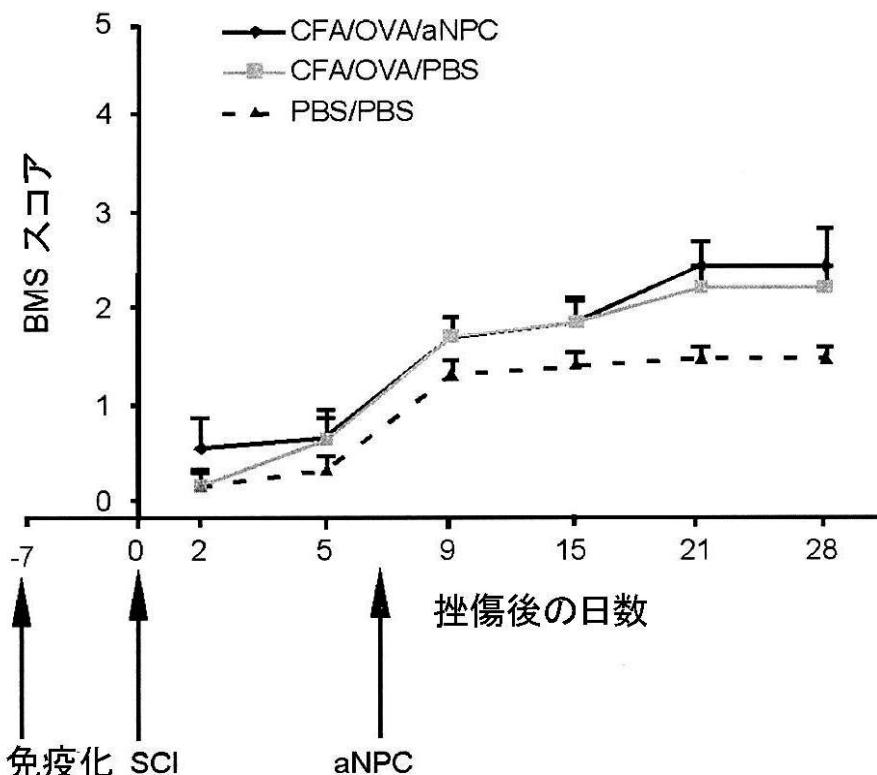
【図7D】



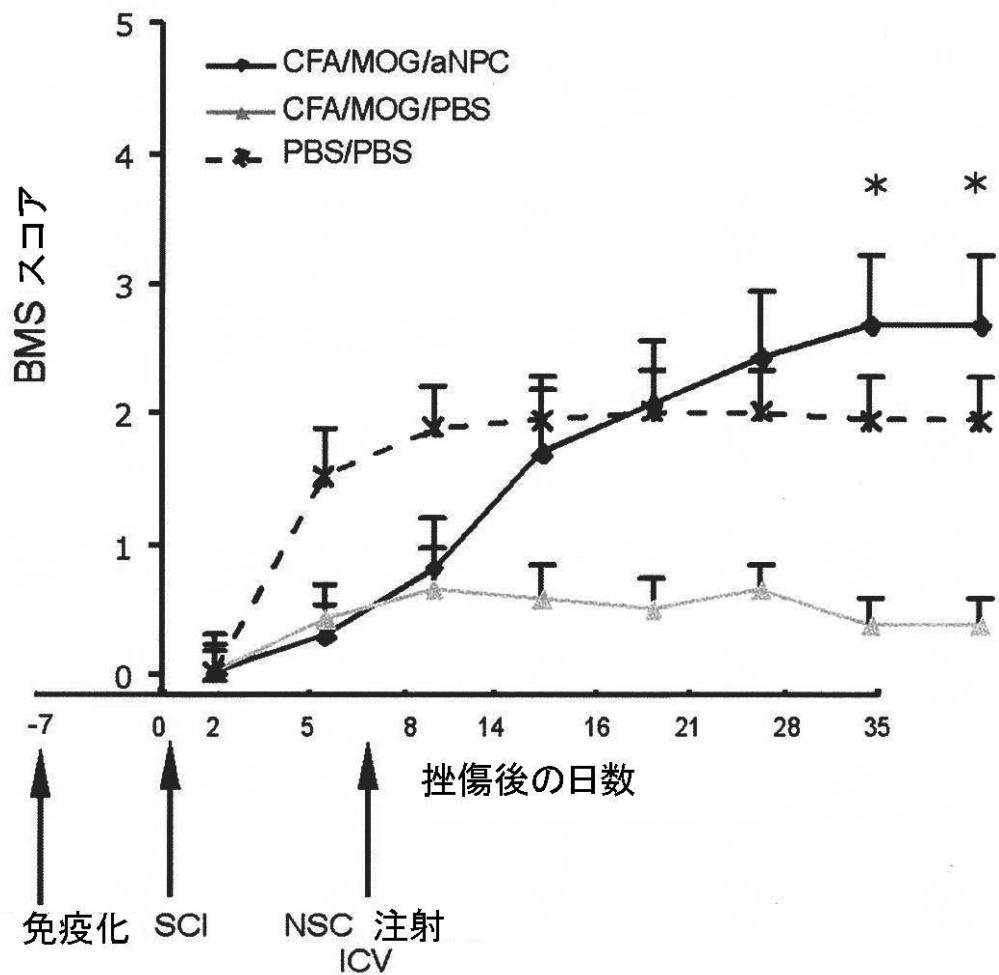
【図7E】



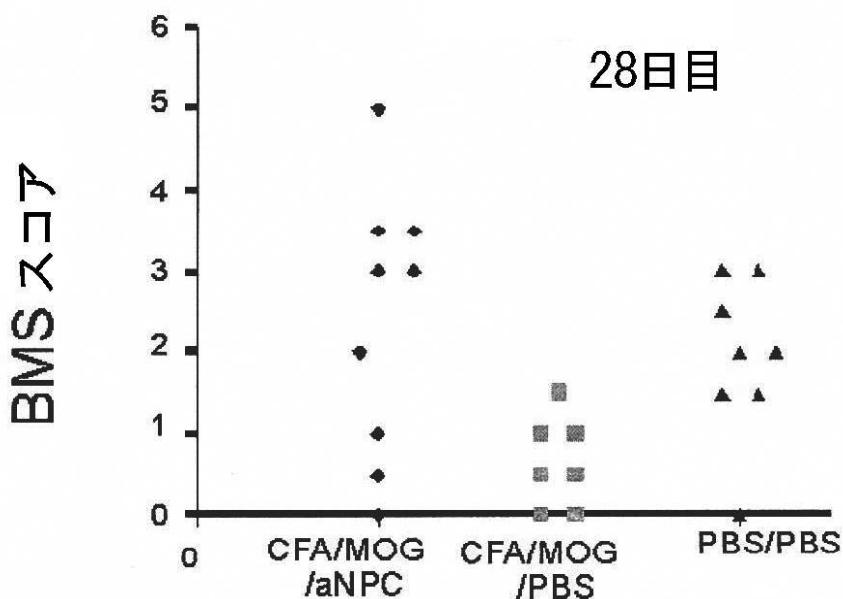
【図7F】



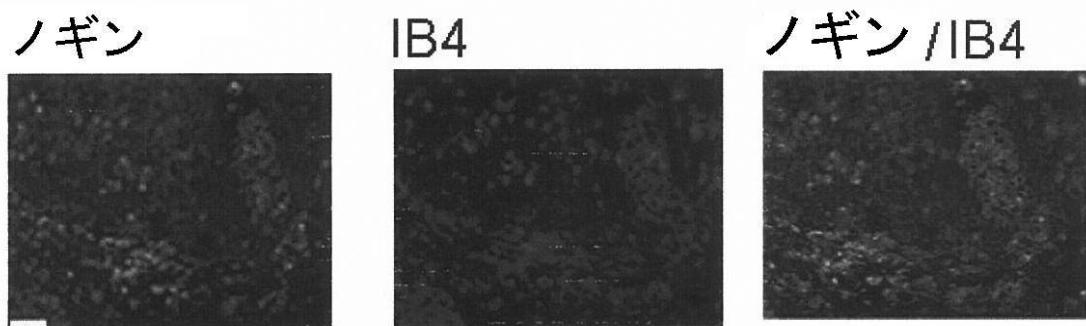
【図7G】



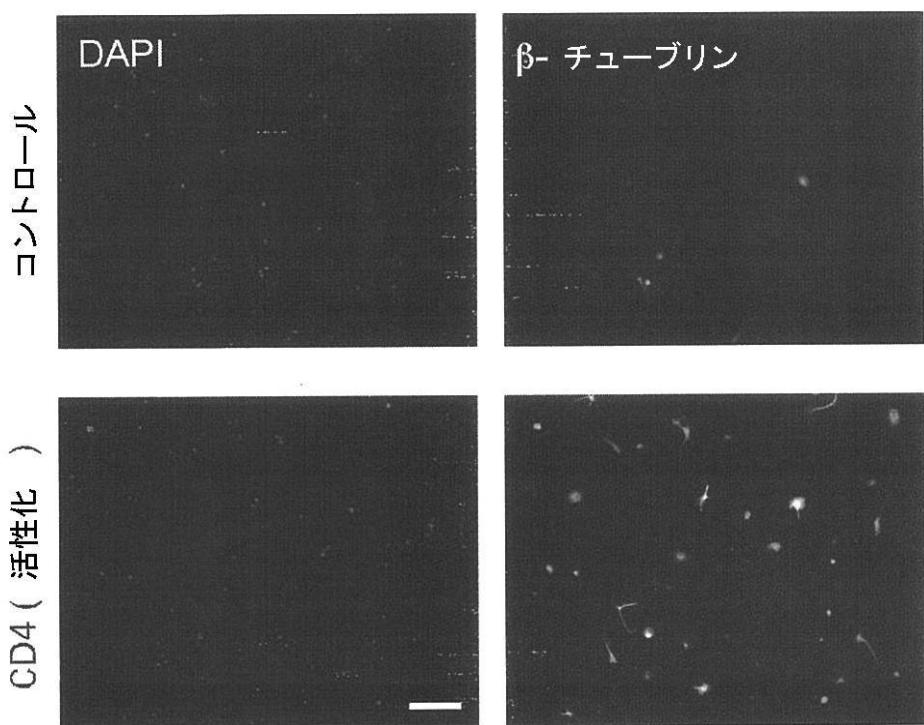
【図7H】



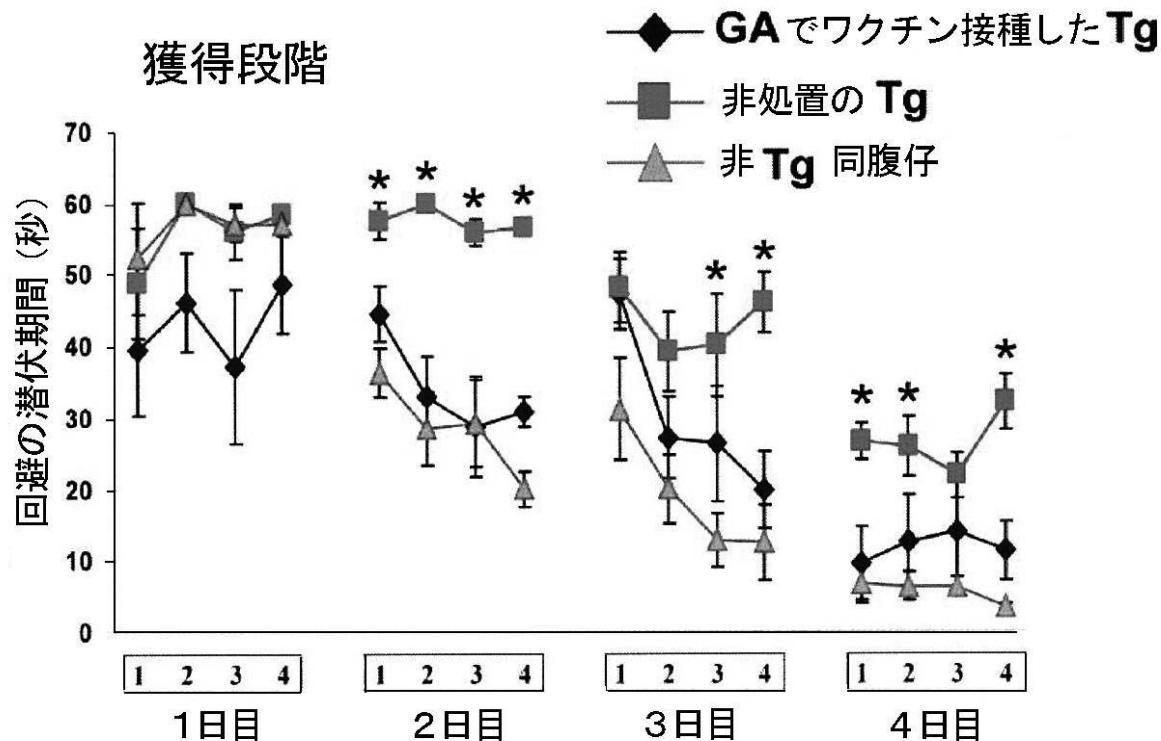
【図 10 D】



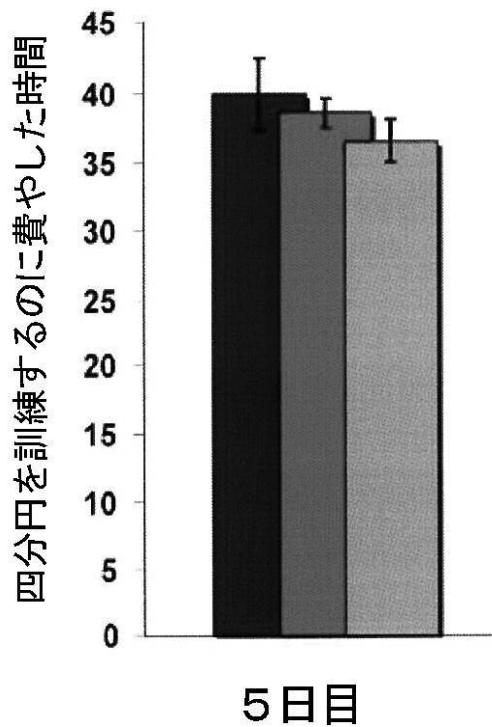
【図 12 B】



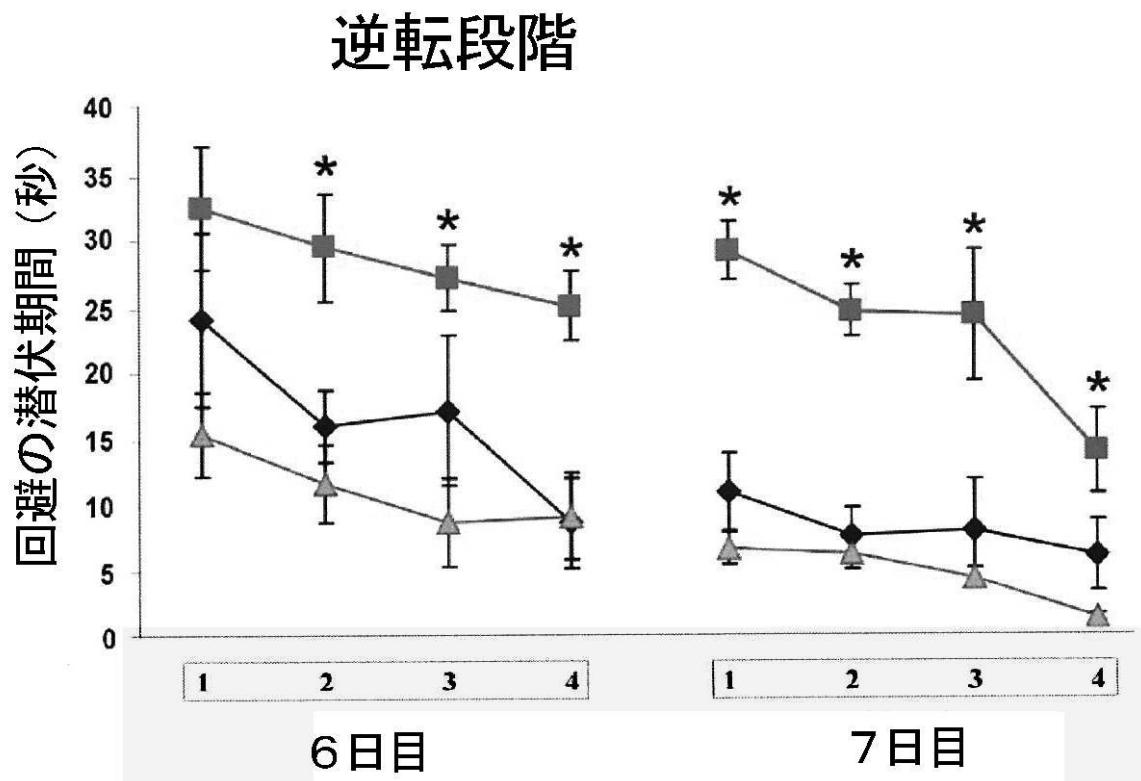
【図14A】



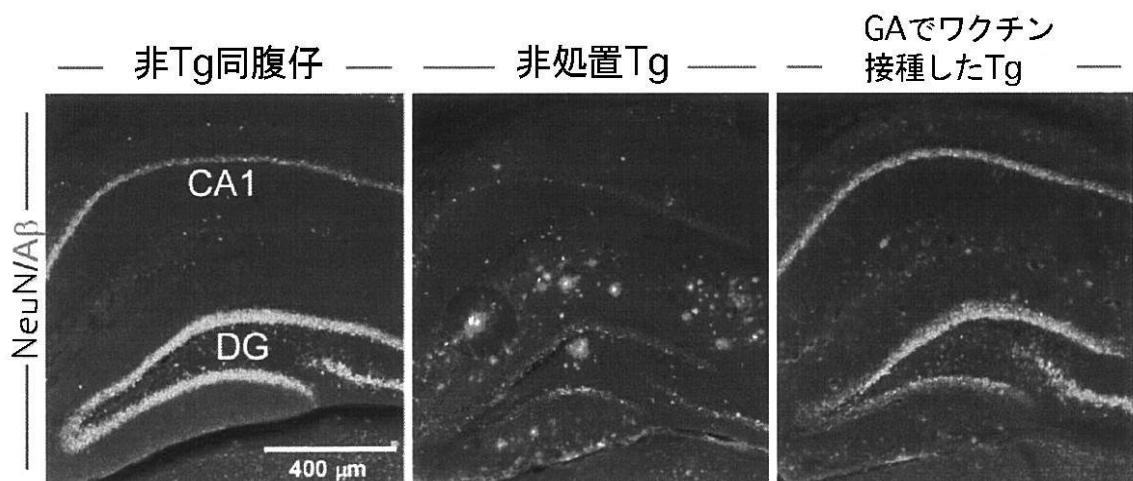
【図14B】

消衰段階

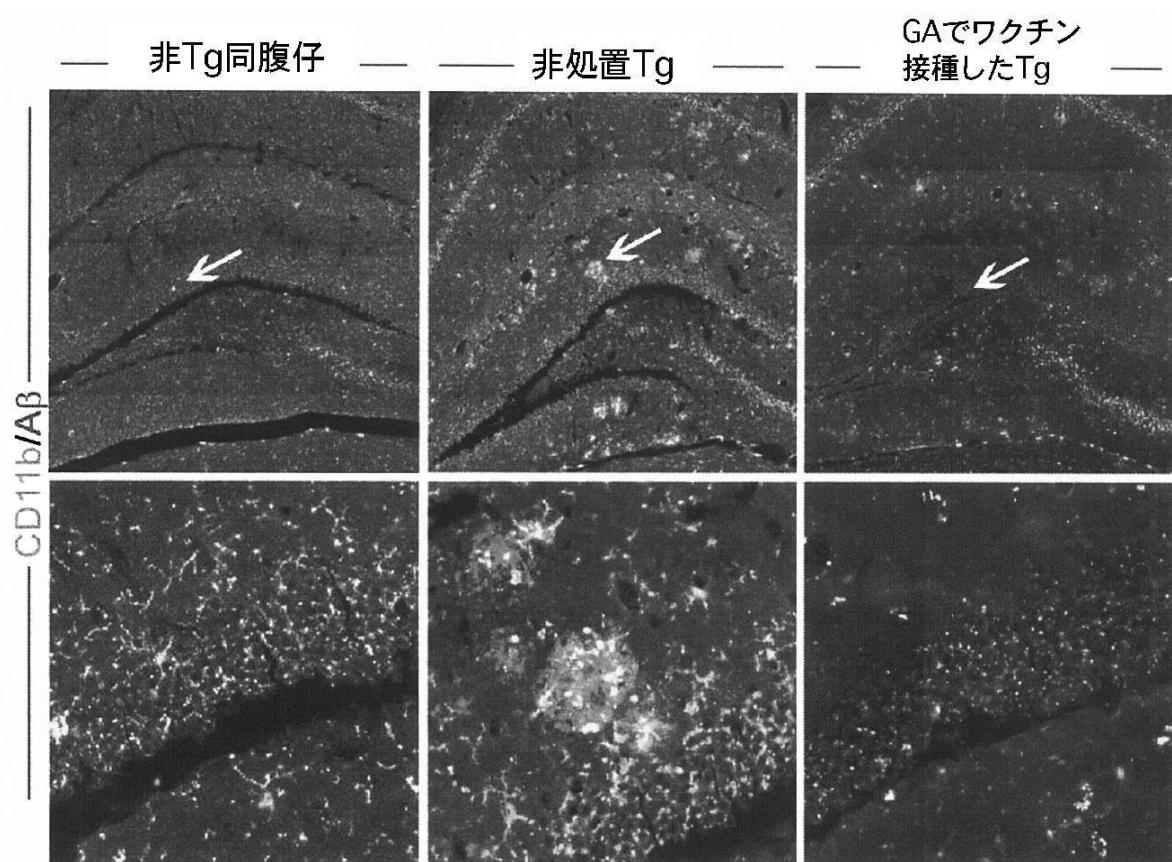
【図14C】



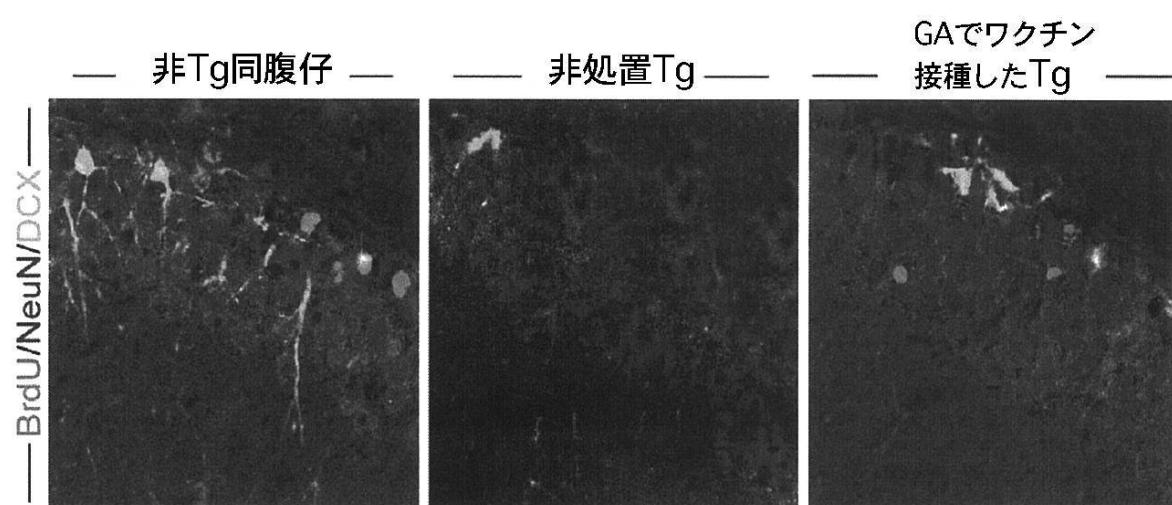
【図15A】



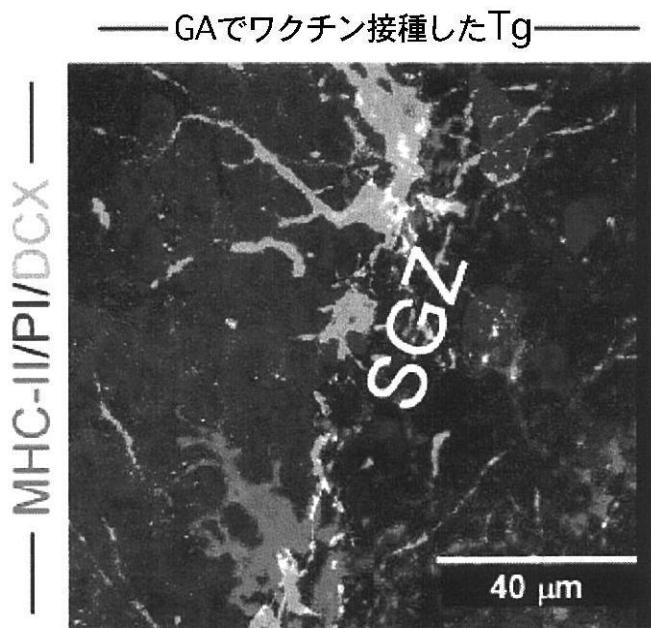
【図 15 B】



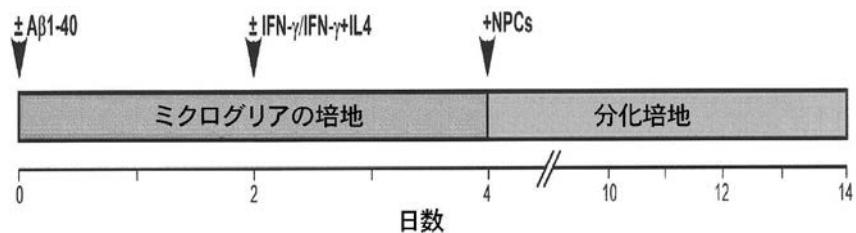
【図 16 D】



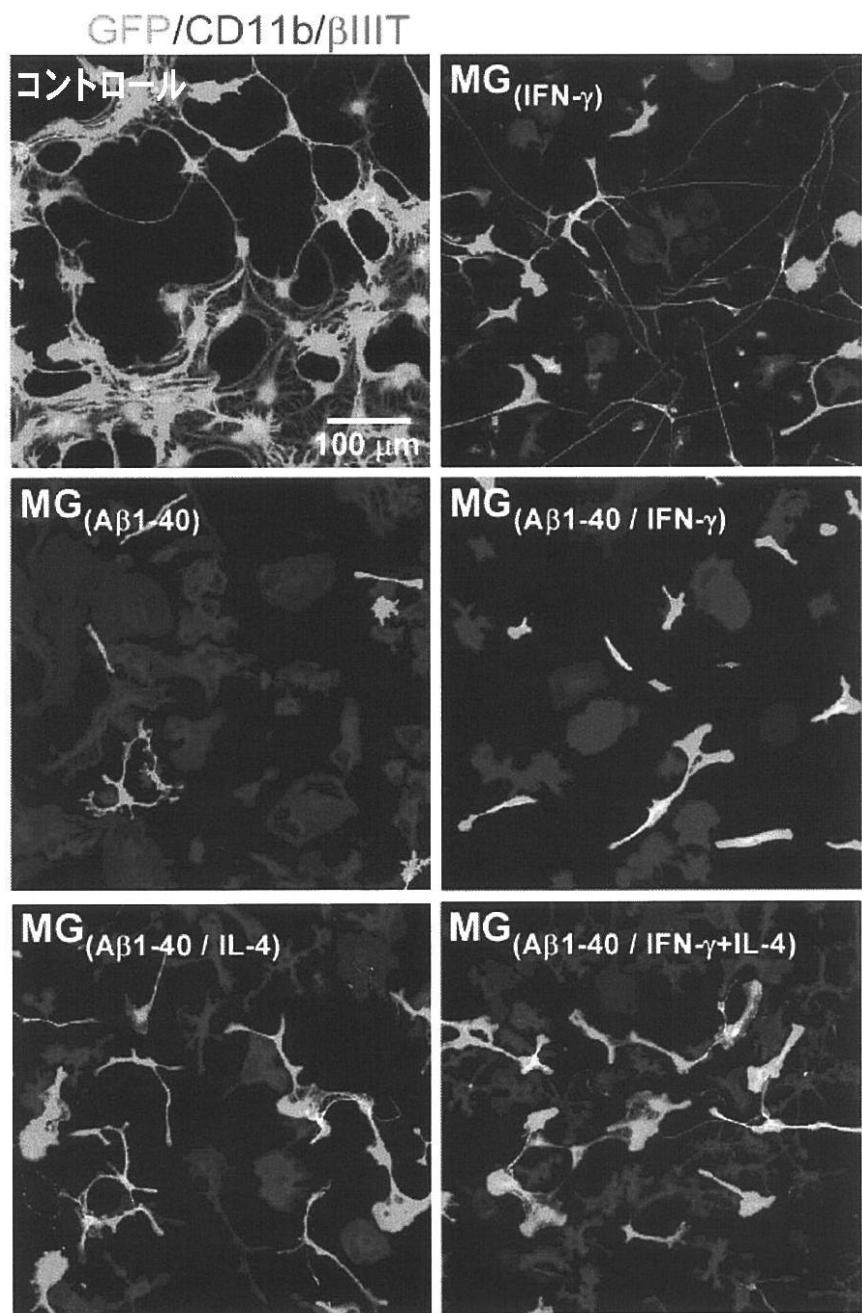
【図 1 6 E】



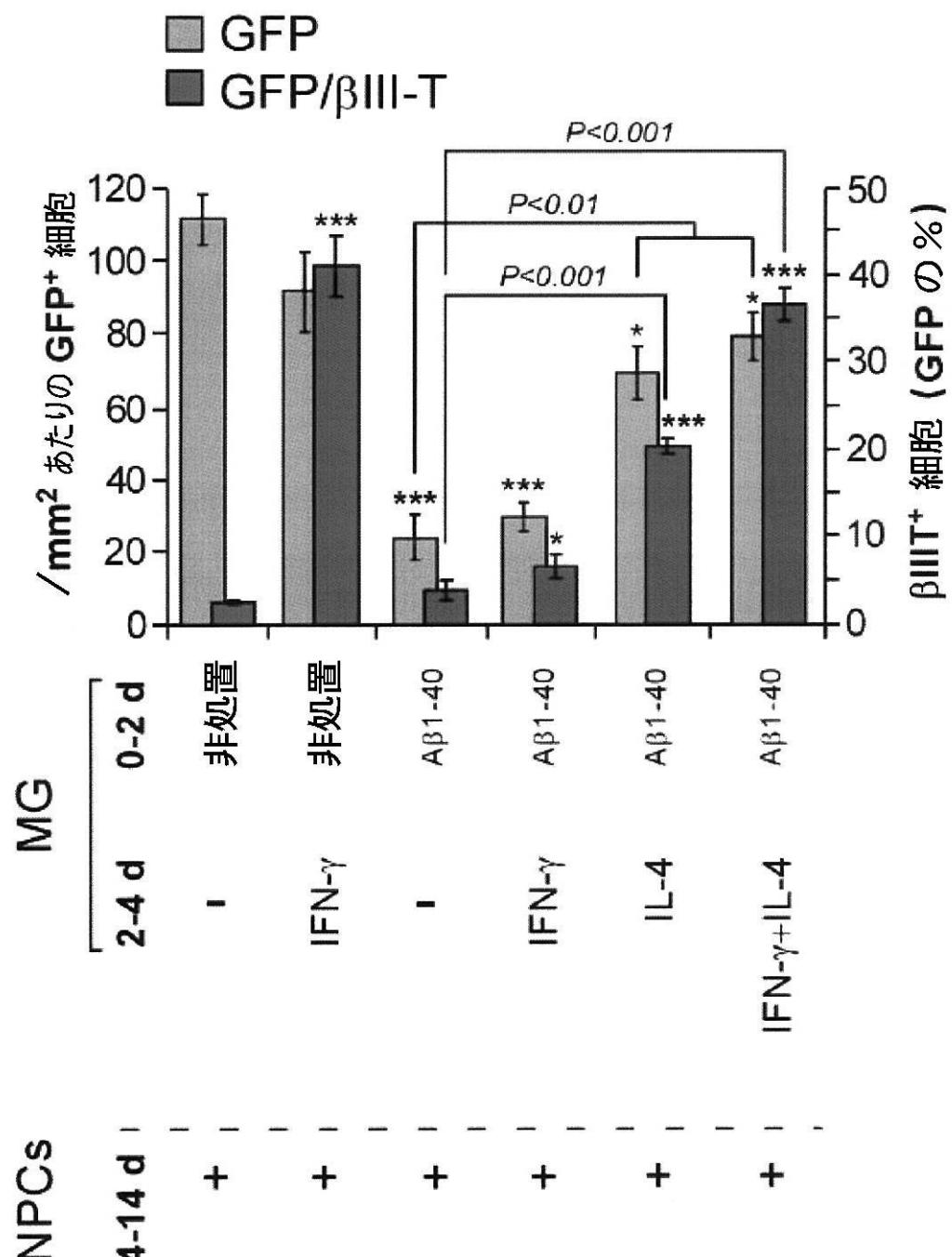
【図 1 7 A】



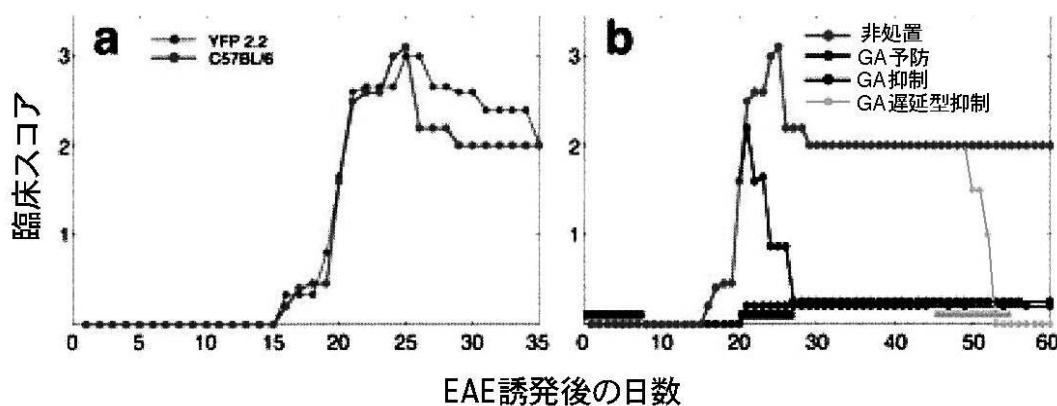
【図17B】



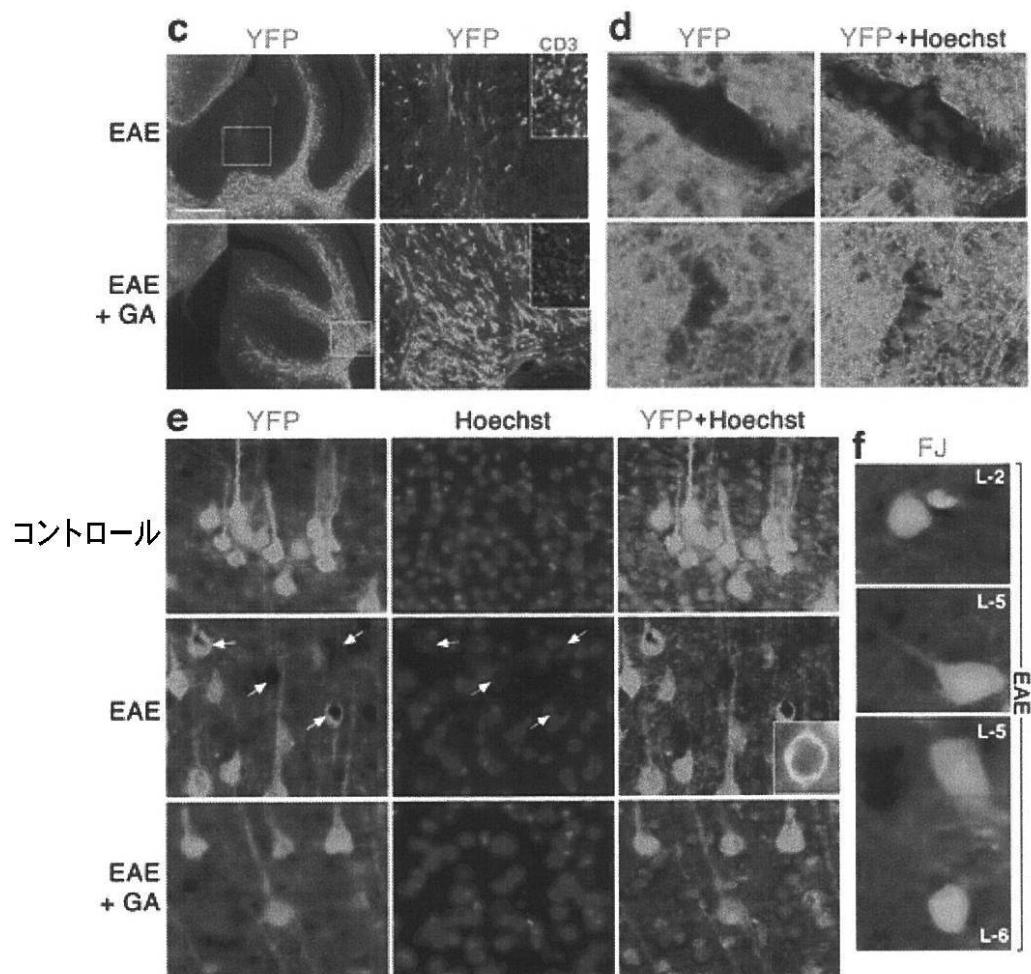
【図 17D】



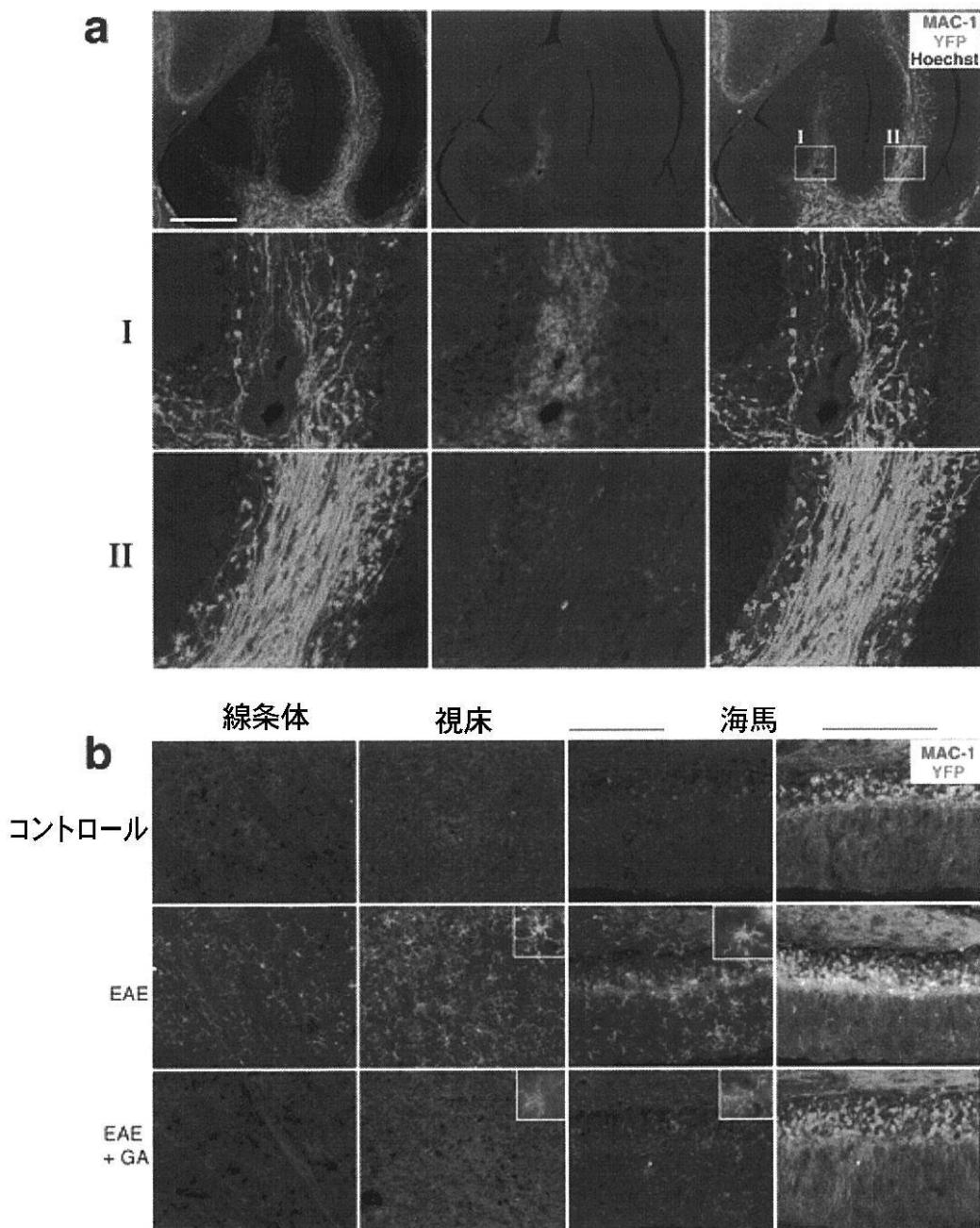
【図 19】



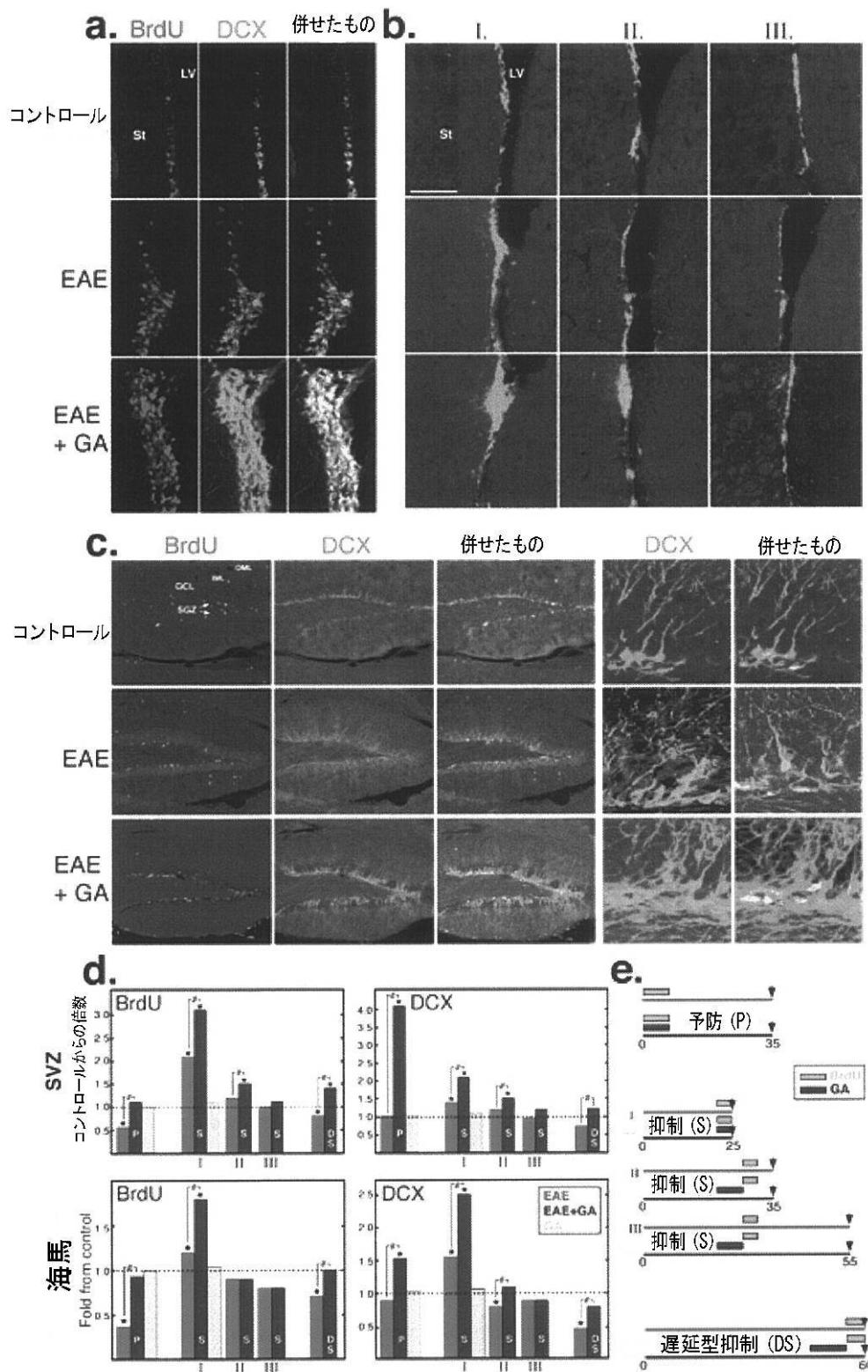
【図20】



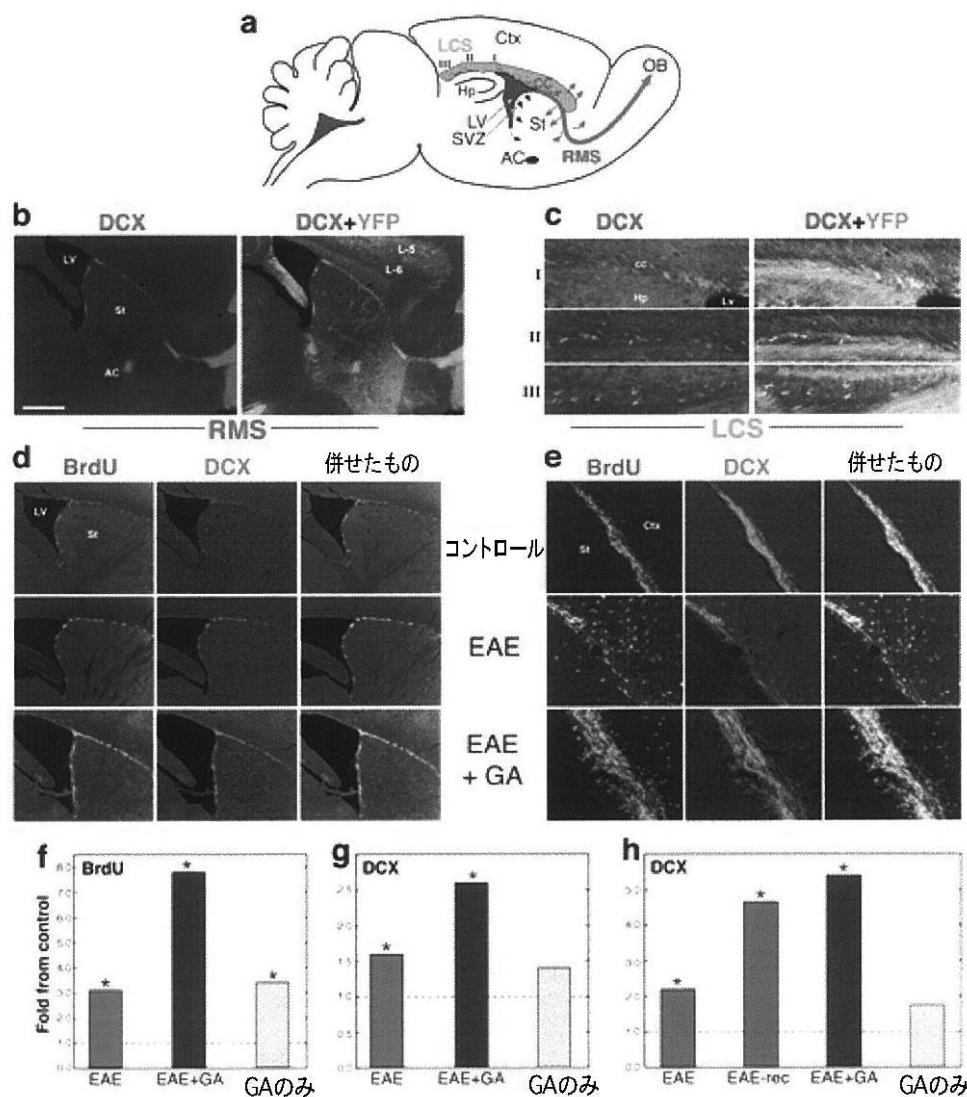
【図21】



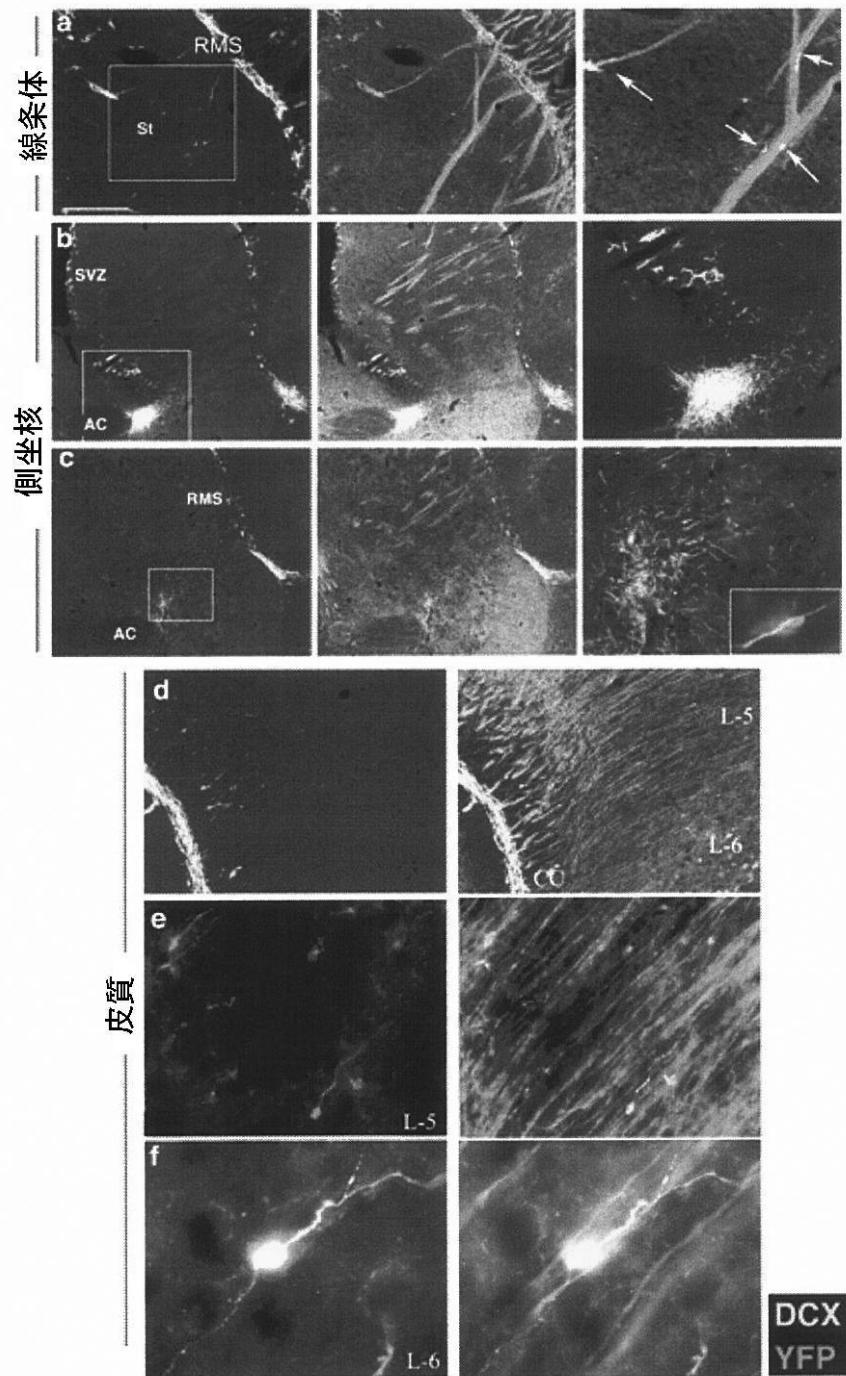
【図22】



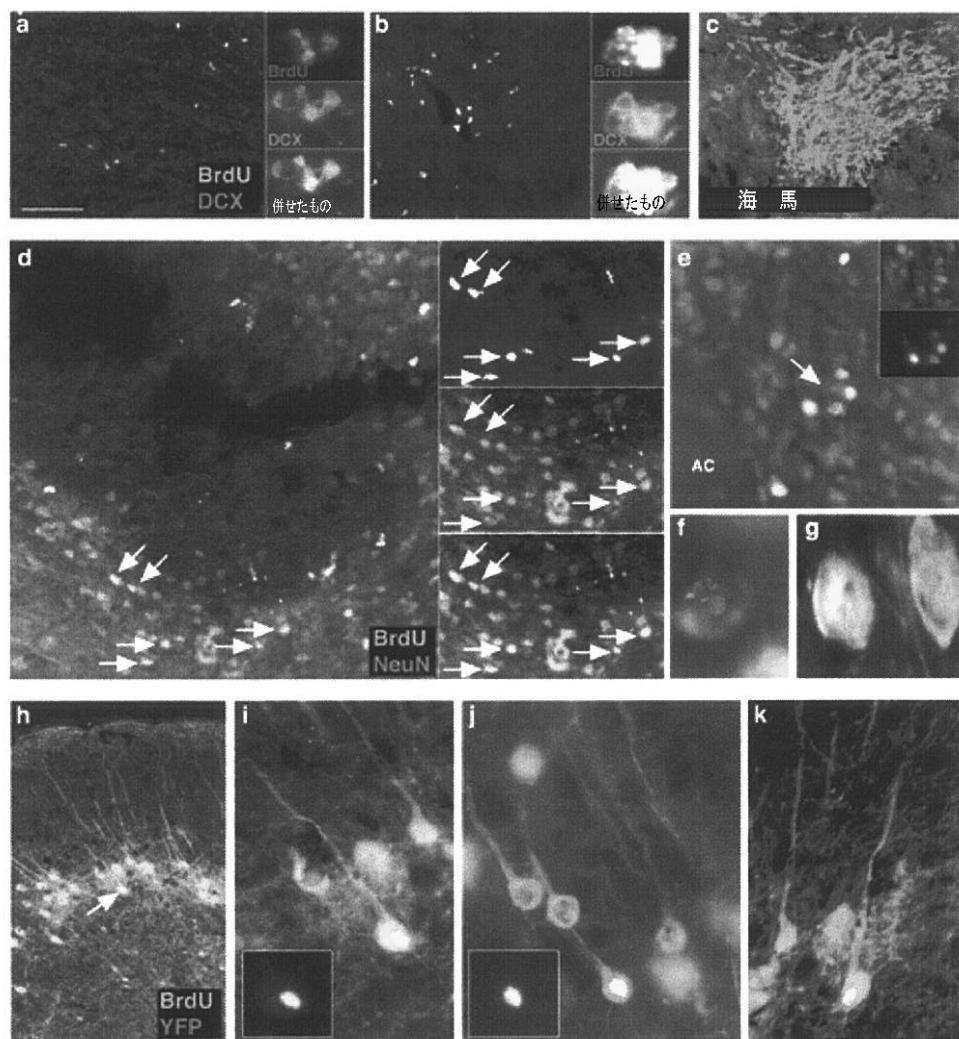
【図23】



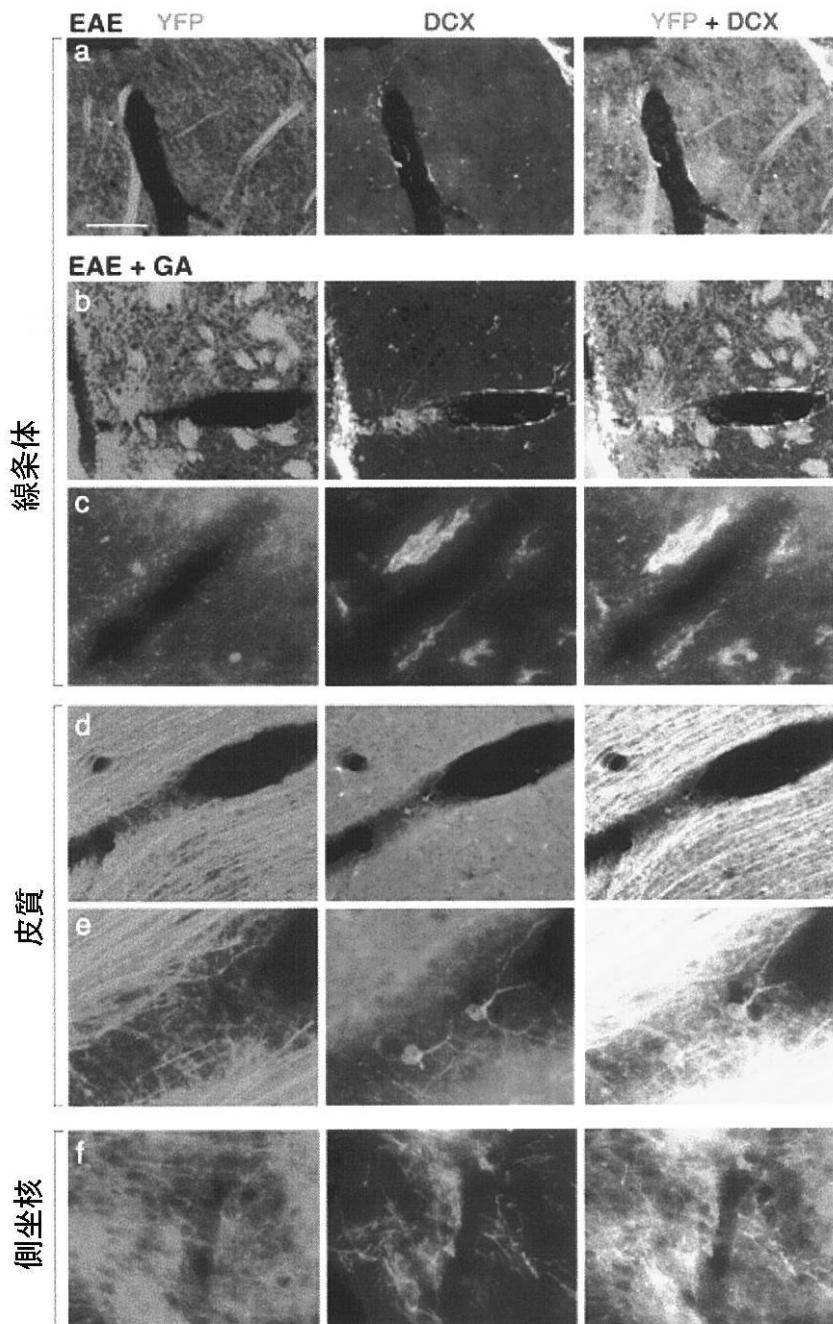
【図24】



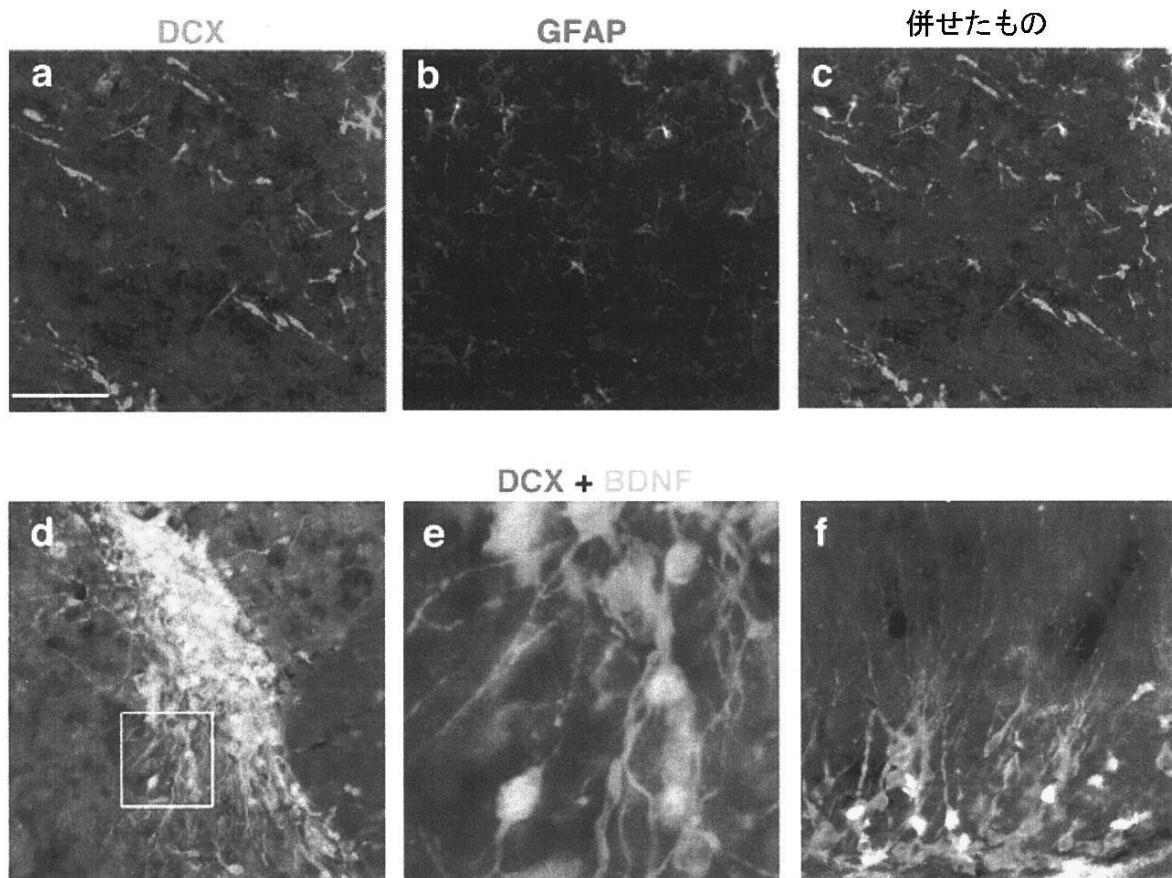
【図25】



【図26】



【図27】



【配列表】

0005294635000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 61 K 39/00 (2006.01) A 61 K 39/00 H

早期審理対象出願

- (72)発明者 ブトフスキー、オレグ
イスラエル国、レホボト、ベイト カーン 22、ザ ウィズマン インスチチュート オブ
サイエンス
(72)発明者 ジフ、ヤニフ
イスラエル国、ラマト - ガン、ベイト ヒバット シオン ストリート 7
(72)発明者 キブニス、ヨナサン
イスラエル国、モディーン、ナハル ヤルデン ストリート 3/1
(72)発明者 ロン、ノガ
イスラエル国、カツィール、ハモラグ ストリート 11
(72)発明者 エイラム、ラヤ
イスラエル国、エルサレム、ドル ドル ヴェドルシャフ ストリート 11、ザ ゲルマン
コロニー
(72)発明者 アハロニ、リーナ
イスラエル国、レホボト、ヘス ストリート 24ビー

合議体

審判長 内田 淳子
審判官 大久保 元浩
審判官 中村 浩

- (56)参考文献 特表2003-520246 (JP, A)
国際公開第2003/59365 (WO, A1)
特表2002-518043 (JP, A)
PNAS, (2004.06.22) vol. 101, no. 25 p. 9435-9440

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K
CA (STN)
MEDLINE (STN)
EMBASE (STN)
BIOSIS (STN)