

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4807902号  
(P4807902)

(45) 発行日 平成23年11月2日(2011.11.2)

(24) 登録日 平成23年8月26日(2011.8.26)

|                         |                  |        |
|-------------------------|------------------|--------|
| (51) Int. Cl.           | F I              |        |
| A 6 1 K 9/12 (2006.01)  | A 6 1 K 9/12     |        |
| A 6 1 K 38/00 (2006.01) | A 6 1 K 37/02    |        |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01) | A 6 1 P 11/00    |        |
| C 0 7 K 16/18 (2006.01) | C 0 7 K 16/18    |        |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00    |        |
|                         | A                |        |
|                         | 請求項の数 8 (全 28 頁) | 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願2000-577281 (P2000-577281)  
 (86) (22) 出願日 平成11年10月20日(1999.10.20)  
 (65) 公表番号 特表2002-527102 (P2002-527102A)  
 (43) 公表日 平成14年8月27日(2002.8.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/024675  
 (87) 国際公開番号 W02000/023569  
 (87) 国際公開日 平成12年4月27日(2000.4.27)  
 審査請求日 平成18年10月20日(2006.10.20)  
 (31) 優先権主張番号 60/104,941  
 (32) 優先日 平成10年10月20日(1998.10.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 500469235  
 チルドレンズ ホスピタル メディカル  
 センター  
 アメリカ合衆国45229-3039 オ  
 ハイオ州, シンシナティ, バーネット ア  
 ベニュー 3333  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100090516  
 弁理士 松倉 秀実  
 (72) 発明者 ホワイツェット, ジェフェリー エー.  
 アメリカ合衆国 オハイオ 45230  
 シンシナティ セーラム ロード 556  
 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺疾患の防止および診断のための表面活性剤タンパク質D

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

肺気腫の兆候を減少させるかまたは肺気腫を防止するのに有効な量の単離された哺乳動物の S P - D タンパク質を含むエアロゾル製剤である、肺気腫の防止および治療のための薬理的組成物。

【請求項2】

前記肺気腫は、慢性肺損傷後におこる、請求項1記載の薬理的組成物。

【請求項3】

気管内投与用途に適する、請求項1又は2記載の薬理的組成物。

【請求項4】

前記 S P - D タンパク質はアデノウィルスベクターにより発現され、単離されたものである、請求項1～3のいずれか1項記載の薬理的組成物。

【請求項5】

肺気腫の兆候を減少させるのに有効な量の S P - D タンパク質を含む、請求項1～4のいずれか1項記載の薬理的組成物。

【請求項6】

肺気腫を防止するのに有効な量の S P - D タンパク質を含む、請求項1～4のいずれか1項記載の薬理的組成物。

【請求項7】

薬理的に認められる担体を含む、請求項1～6のいずれか1項記載の薬理的組成物

## 【請求項 8】

緩衝液を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の薬理的組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明における政府の関連

本明細書に記載した本発明のある様態は、National Institutes of Health、交付番号 H L 4 1 3 2 0、S C O R H L 5 6 3 8 7、H L 2 8 6 2 3、H L 5 8 7 9 5 および H L 0 3 9 0 5 の下に、米国政府の支持によりなされた。米国政府は、本発明のこれらの態様に対して一定の権利を有する。

10

## 【0002】

発明の分野

本発明は、一般的に、生物学的に活性なタンパク質の分野に関する。より具体的には、本発明は、肺表面活性剤ホメオスタシスおよび構造、並びに肺および S P - D ( - / - ) ヌルマウスにおける肺胞の構造に含まれる S P - D タンパク質に関する。

## 【0003】

発明の背景

肺表面活性化は、正常な肺機構および肺におけるガス交換に必須である。肺表面活性剤は、I I 型上皮細胞により生成され、表面活性化の能力を与えて肺における表面張力を低下させるリン脂質成分から構成されている。さらに、コラーゲン性であり、レクチンドメイン含有ポリペプチドであるコレクチンと呼ばれる表面活性化と関連するタンパク質がある。表面活性剤タンパク質 A ( S P - A ) および表面活性剤タンパク質 D ( S P - D ) と呼ばれるこれらのうちの 2 つは、同様に表面活性化構造および機能および宿主防御に関連する。肺表面活性剤の定量的欠失および定性的欠失は、共に、新生児の呼吸窮迫、成人呼吸窮迫症候群、表面活性剤タンパク質 B の先天性欠失およびアレルギー性喘息に関連する。さらに、肺表面活性剤の欠失は、特に、不適切なまたは悪化した特定の免疫性の設定における微生物攻撃に対するいくつかの個体の増大した罹病性に関与しうる。これらの疾患、並びに肺炎の増大した危険に関連するいくつかの疾患（嚢胞性線維症、早熟、慢性気管支炎、びまん性肺胞損傷）はまた、コレクチン機能における後天性の欠損または欠失と関連し得る。肺胞表面活性剤蓄積は、肺胞マクロファージによるこれらの成分の細胞内合成、分泌、再取り込みおよび分解を含む複数のレベルにおいて調節される。表面活性剤リン脂質およびタンパク質の合成およびクリアランスは、さらに、生後の定常状態表面活性剤濃度を維持する作用を有する発生、機能的、および体液性刺激により影響される。

20

30

## 【0004】

表面活性剤および正常な肺機能におけるコレクチンの役割は、広範囲に試験されている。C 型レクチンのコレクチン族は、既知の宿主防御機能を有する多数の分子を含む。S P - A および S P - D、また C 型レクチンは、インフルエンザウイルスおよび単純ヘルペスウイルス並びにグラム陽性およびグラム陰性細菌および種々の菌類に結合する。結合により、これらは、肺胞マクロファージおよび好中球による取り込みを増大する。S P - A および S P - D における種々の細胞結合部位は、肺胞マクロファージまたは、S P - A の場合には、I I 型上皮細胞において同定された。宿主防御における S P - A の決定的に重要な役割は、S P - A 欠失マウスが、*i n v i v o* で B 群連鎖球菌、シュードモナス アルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、呼吸性シンシチウムウイルス、アデノウイルスおよびマイコプラズマによる感染症に感受性であるという観察により、支持される。したがって、呼吸性防御機構における S P - A の明確な役割および S P - D のそれらしい役割がある。コレクチンはまた、他の複合有機物質、例えば花粉および塵ダニアレルゲンの認識またはクリアランスに関与し得る。しかし、現在、いずれのヒト疾患も、S P - A または S P - D における特定の欠失には関連していない。

40

## 【0005】

S P - D は、肺における宿主防御において役割を果たすと提案された 4 3 キロダルトンタ

50

ンパク質である。このcDNAおよび遺伝子は、ヒトを含む種々の哺乳動物において配列決定されている。SP-Dは、表面活性剤タンパク質A (SP-A)、コングルチニン、ウシコレクチン-43およびマンノース結合タンパク質を含む他のC型レクチンと顕著な構造相同性を共有する。in vitro研究および哺乳動物Ca<sup>2+</sup>依存性レクチン族(特に共有された構造モチーフ)に対するその密接な構造的関連性は、この宿主防御における役割を支持する。SP-Dは先ず、肺中のII型上皮細胞および繊毛を有さない細気管支の上皮細胞により比較的高濃度で合成されるが、また胃腸管、心臓、腎臓、膵臓、尿管、生殖器管および腸間膜細胞においても発現され得る。in vitro研究により、SP-Dは、結合、凝集、オプソニン処理および、若干の例においてはin vitroでの食細胞による殺菌の活性化を引き起こすレクチンドメイン(または糖結合ドメイン)により生物の表面に結合する。SP-Dは、リポ多糖、種々の細菌、菌類およびインフルエンザウィルスを含むウィルスに結合する。これはまた、肺胞マクロファージおよび多形核細胞の両方に結合する。これは、場合によっては、in vitroでのII型細胞によるリン脂質に対するSP-Aの影響を含む表面活性リン脂質ホメオスタシスにおいて役割を奏し得るが、これには論争の余地があり、in vivoでのSP-Dの正確な役割は、依然として不明確である。

10

## 【0006】

in vitro研究は、表面活性剤タンパク質が表面活性剤ホメオスタシスの調節において重要であり得るという概念を支持する。疎水性表面活性剤タンパク質SP-BおよびSP-Cは、表面活性剤単一層の生成において役割を果たすが、in vitro研究により、表面活性剤タンパク質Aはまた、II型上皮細胞による表面活性剤取り込みおよび/または分泌を促進し得ることが示された。事実、SP-Aが表面活性剤ホメオスタシスにおいて重要な役割を有することが広く信じられてきた。しかし、SP-Aヌルマウスの最近の研究は、表面活性剤分泌または再取り込みにおいて表面活性剤タンパク質Aの主要な役割を支持していなかった。SP-Aの欠失は、肺の明らかな生理学的または形態的構造的異常に至らない。SP-Aヌル突然変異マウスは、管状ミエリン図式を欠くが、迅速に吸収され、単一層を生成する高度に機能的な表面活性剤を生成する。表面活性剤脂質合成、分泌および再取り込みは、本質的にSP-Aヌルマウスにおいて本質的に正常であった。

20

## 【0007】

したがって、表面活性剤調節において作用するさらなる表面活性剤タンパク質は、依然として同定されていない。さらに、正常な肺機能におけるSP-Dの正確な役割は、この時点では明確には規定されておらず、その疾患および疾患罹病性における役割は、不明確である。

30

## 【0008】

## 発明の概要

本発明は、気腫のモデルとして用いることができるSP-D(-/-)マウスを提供する。以前は、SP-Dタンパク質が肺の脂質ホメオスタシスに関与していることは、知られていなかった。またSP-Dヌルマウスが、気腫の兆候を有することは、知られていなかった。

40

## 【0009】

本発明の1つの実施形態は、ヒト以外のSP-D(-/-)哺乳動物を含む気腫のヒト以外の哺乳動物モデルである。

## 【0010】

さらなる実施形態は、哺乳動物SP-Dタンパク質または哺乳動物SP-Dタンパク質を発現するベクターを、ヒトまたは哺乳動物中に、疾患の兆候を減少させるかまたは疾患を防止するのに有効な量で導入することによる、肺疾患の浄化または治療方法である。

## 【0011】

さらなる実施形態は、SP-Dタンパク質と薬として認められる担体との混合物である、肺疾患を治療するのに有効な量の薬理的組成物である。

50

## 【 0 0 1 2 】

さらなる実施形態は、S P - Dを上方調節する薬剤である、哺乳動物における肺疾患を治療するための生物学的に活性な薬剤である。

## 【 0 0 1 3 】

さらなる実施形態は、S P - Dタンパク質と相互作用する薬剤である、哺乳動物における肺疾患を治療するための生物学的に活性な薬剤である。

## 【 0 0 1 4 】

さらなる実施形態は、不完全なS P - Dを生じるS P - D遺伝子における突然変異を同定し、試験哺乳動物におけるこの突然変異を、P C R、ハイブリダイゼーションまたはE L I S Aにより同定することによる、哺乳動物における肺疾患への罹病性の診断方法である。

10

## 【 0 0 1 5 】

さらなる実施形態は、S P - Dヌルマウスに肺疾患を発生させ、哺乳動物に薬剤を投与し、その薬剤を、肺疾患が改善されたか否かの効果として同定することによる、肺疾患を治療するのに有用な薬剤の同定方法である。

## 【 0 0 1 6 】

さらなる実施形態は、S P - D抗体を、S P - Dタンパク質を生成しない任意のマウスからの肺ホモジネートの固体相で精製する方法である。

## 【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

20

本発明者等は、S P - D ( - / - ) ノックアウトマウスを作製して、正常な肺機能および発達におけるS P - Dの役割を同定し、これらのマウスの肺における生後の気室拡大および自発的な炎症の変化のその時点の進行を例示した。S P - D ( - / - ) マウスには、肺胞マクロファージによる慢性炎症および増大したオキシダント生成に関連する進行性肺気腫が発生する。肺の異常は、このマウスを気腫についての優れたモデルにする。気腫の治療における在来の療法、最も一般的なのは肺容積減少手術である、は極めて少ないため、モデルが緊急に必要とされている。気腫におけるモデルマウスに基づいて、本発明者等は、S P - Dタンパク質および発現ベクターを試験する多くの方法、並びにモデルマウスにおいて気腫または慢性肺損傷の他の形態の治療に有効な薬物を提案した。本発明者等はまた、異所の表面活性生成、肺線維症、サルコイドーシス、肺損傷、毒薬ノ酸素露出、感染症、オキシダント露出の増大といった種々の他の疾患を治療するためのS P - Dタンパク質および発現ベクターの使用を提案した。最後に、本発明者等は、S P - Dのc D N A、S P - D抗体、P C Rおよびディファレンシャルハイブリダイゼーション手法を用いて、気腫、肺窮迫症候群、および他の種類の呼吸疾患の危険がある患者を同定することを提案した。本明細書に記載したものに類似するかまたはこれと同等である他の材料および方法を、本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい材料および方法をここで記載する。実施例1は、S P - D ( - / - ) マウスを作製するのに必要なステップについて記載する。

30

## 【 0 0 1 8 】

## 【表1】

40

表1 体重、肺容積、および容積対体重比 (平均±SE)

| 年齢  | 体重        |           | 肺容積       |           | LV:BW                     |           |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------|-----------|
|     | (g)       |           | (ml)      |           | (Ml/g x10 <sup>-2</sup> ) |           |
|     | SP-D(-/-) | SP-D(+/+) | SP-D(-/-) | SP-D(+/+) | SP-D(-/-)                 | SP-D(+/+) |
| 2日  | 1.8±0.1*  | 3.4±0.1   | ND        | ND        | ND                        | ND        |
| 5日  | 3.7±0.3   | 4.6±0.2   | ND        | ND        | ND                        | ND        |
| 7日  | 3.9±0.2*  | 5.3±0.2   | ND        | ND        | ND                        | ND        |
| 14日 | 6.6±0.2*  | 7.7±0.2   | ND        | ND        | ND                        | ND        |
| 17日 | 10.9±0.5  | 10.6±0.7  | 0.36±0.02 | 0.36±0.03 | 3.25±0.05                 | 3.36±0.03 |
| 3週  | 10.9±0.5* | 14.1±1.2  | 0.36±0.01 | 0.37±0.03 | 3.43±<br>0.21**           | 2.50±0.18 |
| 6週  | 23.2±0.6  | 24.7±0.5  | 0.63±0.03 | 0.58±0.02 | 2.71±<br>0.13**           | 2.25±0.18 |
| 9週  | 25.2±1.2  | 27.8±1.3  | 0.55±0.03 | 0.61±0.02 | 2.10±0.16                 | 2.20±0.09 |
| 28週 | 36.9±4.3  | 31.2±1.6  | 0.67±0.09 | 0.58±0.06 | 2.03±0.51                 | 1.86±0.10 |

10

20

\* 有意な統計的差異が、2日、 $p = 0.00001$ ；7日、 $p = 0.0002$ ；2週、 $p = 0.007$ ；および3週、 $p = 0.04$ の体重において観察された。\*\* LV:BW比における有意な統計的差異が、3週において( $p = 0.02$ )、および6週において( $p = 0.03$ )体重における差異により観察されたが、体重および肺容積は、この後の時点において統計的に異ならなかった。群あたりの動物 $N = 3.71$ である。LV:BW、肺容積対体重比；ND、検出されず。

【0019】

## 実施例1

SP-D(-/-)ノックアウトマウス作製

SP-D(-/-)マウスを、標的遺伝子の不活性化により発生させた。SP-D遺伝子のエクソン2の配列を含むpGKneo標的ベクターの組み込みにより、SP-D遺伝子の第2のエクソンの欠失が発生し、これは、開始メチオニンおよび翻訳開始配列の欠失を含んでいた。エクソン1および2のマウスSP-D遺伝子配列は、Genbank登録番号AF047741に見出すことができる。標的ベクターは、pGKneoを用いて、先ずイントロン2~エクソン6をコードする5.1kbの平滑末端化されたKpnIを末端に接続したHindIIIゲノムフラグメントを、ネオマイシン耐性カセットとチミジンキナーゼカセットとの間のKpnI部位中にサブクローニングして作製した。その後、イントロンIの部分を含む1.5-kbゲノムPstIフラグメントを、XhoIリンカーを末端

30

40

【0020】

50

S P - D ( - / - ) マウスは、Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio におけるバリア内施設の飼育器において正常に生存し、交配した。マウスは、血清学的に評価されてウィルスフリーであった。S P - D ( - / - ) マウスにおけるウィルス感染の血清学的証拠は、検死において決定された。

【 0 0 2 1 】

遺伝子型を決定するために、尾切片からの DNA を、B a m H I で消化し、エクソン 2 およびイントロン 2 の一部を含むゲノムマウス DNA から由来する P C R 生成物および G 4 1 8 耐性 c D N A クローンと検査した。S P - D ( ± ) および S P - D ( - / - ) マウスにおける G 4 1 8 耐性をコードする配列の存在とエクソン 2 欠失が同時に示された。

【 0 0 2 2 】

S P - D がヌル動物において発現されなかったことを示すために、RNA プロット分析をヌル、正常および異種接合動物からの肺の全ての RNA を用いて実施した。結果は、正常な大きさの S P - D m R N A がヌルマウスにおいては完全に消失し、異種接合動物においては S P - D ハイブリダイゼーションバンドの強度が約 5 0 % 低下した。長期の露出後、正常の S P - D m R N A よりも約 1 5 0 ヌクレオチド小さい拡散 m R N A バンドが検出された。デンシトメトリーを走査することにより、このバンドは、異種接合動物の正常な S P - D 転写物の強度の 5 % 未満を示す。

【 0 0 2 3 】

ウサギ抗ラット S P - D 抗血清を用いた肺ホモジネートのウェスタンブロット分析により、S P - D が、異種接合 S P - D ( + / - ) マウスにおいて約 5 0 % 低下し、S P - D ( - / - ) マウスにおいて消失することが明らかになった。

【 0 0 2 4 】

S P - D ( - / - ) マウスおよび S P - D ( + / - ) マウスが、共に出生前および出生後の期間において正常に生存した。選択された齢において、体、肺および心臓重量は、直接測定により得られ；肺および心臓容積は流体置換により得られた。肺タンパク質および DNA 含量は、それぞれ基準としてウシ血清アルブミンおよびサケ精子 DNA を用いて評価した。S P - D ( - / - ) マウスの体重は、離乳の前にわずかに小さかったが、3 週齢後では S P - D ( + / + ) マウスと有意には異ならなかった ( 表 1 )。肺の容積は顕著には異ならなかった一方、肺容積対体重比は、S P - D ( - / - ) マウスにおいて 3 および 6 週齢において増加した ( 表 1 )。心臓容積または心臓容積対体重比において有意な差異は観察されなかった。成熟期 ( 5 ヶ月 ) において、湿潤肺重量、合計肺 DNA またはタンパク質における変化は、記録されなかった。

【 0 0 2 5 】

しかし、体重においては異常が観察されなかったが、実施例 2 ~ 5 では、S P - D ( - / - ) マウスにおいて見出された他の異常または変化を記載する。

【 0 0 2 6 】

実施例 2 は、リン脂質レベルに対する効果を例示する。肺胞および組織リン脂質レベル、特にホスファチジルコリン蓄積レベルは顕著に上昇し、一方、合計の気管支肺胞洗浄液 ( B A L ) タンパク質レベルは、不変のままであった。

【 0 0 2 7 】

実施例 2

S P - D ( - / - ) マウスにおけるリン脂質レベル

肺胞、組織および合計飽和ホスファチジルコリン ( S a t - P C ) (  $p < 0 . 0 0 1$  ) は、S P - D ( - / - ) マウスにおいて約 3 倍増加した。S a t - P C のレベルは、S P - D ( + / - ) マウスにおいて変化しなかった。肺胞洗浄リン脂質組成分析については、2 ~ 3 匹のマウスからの蓄積した洗浄液から成る 2 ~ 4 の試料を、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、スフィンゴミエリンおよびリソビスホスファチジン酸の相対量について評価した。リン脂質組成は、遺伝子型間で異ならなかった。(  $^3\text{H}$  ) コリンの肺の総 S a t - P C への導入は、注射後 8 時間にわずかに増加し、導入は S P - D ( - / - ) マウスにおいて

10

20

30

40

50

約 20%大きかった ( $p < 0.05$ )。

【0028】

この結果は、以前の研究が、肺のリン脂質ホメオスタシスにおいて SP-A についての明らかな役割および SP-D についての限定された役割を提唱していたので、完全に予測されなかったものである。前記の疾患は、表面活性剤タンパク質および脂質の両方の蓄積を伴う表面活性剤ホメオスタシスと関連し、したがって SP-D (-/-)ヌルマウスは、SP-D は表面活性剤脂質ホメオスタシスにおいて重要な役割を有すること、および表面活性剤において合計のタンパク質濃度が変化しないため、表面活性剤脂質およびタンパク質ホメオスタシスは、*in vivo*で別のものとして考えることができることを初めて例証した。しかし、実施例 3 に例示するように、SP-A の合計濃度における若干の減少

10

【0029】

実施例 3

SP-D (-/-)マウスにおける SP-A レベルの低下

SP-B および SP-C mRNA またはタンパク質における差異は、SP-D (-/-)マウスにおいて観察されなかった。対照的に、SP-D (+/+)マウス、SP-D (+/-)マウスおよび SP-D (-/-)マウスからの全肺 RNA の SP-A プローブとのノーザンブロットハイブリダイゼーションは、SP-A mRNA が SP-D (-/-)マウスにおいて減少したことを示す。SP-A mRNA の減少と一致して、BAL-SP-A タンパク質における 3 匹のマウスからの肺胞洗浄のウェスタンブロット分析により評価されたように、SP-D (-/-)マウスにおいて明らかに約 25%減少した。

20

【0030】

したがって、SP-D は、SP-A 生成の調節の役割を有する。SP-A が肺における宿主防御に関係しており、SP-D は、2つの方法で宿主防御に影響することができる。SP-A 生成の上方調節により、および免疫および微生物細胞との直接相互反応によるものである。

【0031】

SP-D (-/-)マウスの BAL から分離されたリン脂質に富む物質の超構造は、実施例 4 に記載したように評価された。

【0032】

実施例 4

SP-D (-/-)マウスにおける表面活性化構造の変化

大きい表面活性剤凝集体が、SP-D (-/-)マウスおよび SP-D (+/+)マウスの蓄積した肺胞洗浄液から単離され、以下に概説する手法を用いて EM により試験された。SP-D (-/-)マウスにおける脂質凝集体は、拡大され、電子密リン脂質アレイを構築された。SP-D (+/+)マウスと比較して少ない管状ミエリンを含んでいた。超構造は、顕著に異常であり、減少した量の管状ミエリンを含み、独特の密に詰め込まれた脂質構造を形成することが明らかになった。したがって、SP-D は、肺胞脂質の構造的機構における役割を有する。

30

【0033】

肺胞洗浄液からの凝集形態。肺胞における表面活性体は、大きい凝集体(重い、高密度)および小さい凝集体(軽い、小胞状)分画に遠心分離により分離することができる。肺胞洗浄液を、 $40,000 \times g$  で 0.8 M スクロース緩衝剤で 15 分にわたり遠心分離した。大きい凝集表面活性体を、次に界面から採集し、通常の生理的食塩水で希釈し、再び  $40,000 \times g$  で 15 分遠心分離した。小さい凝集表面活性体を含む第 1 の  $40,000 \times g$  の遠心分離からの上清液を、4 で限外濾過により  $300,000$  分子量の保持フィルター(Minitan, Miliore Corp., Bedford, MA)または遠心分離濃縮器(Amicon Corp., Danvers, MA)を用いて濃縮した。小さい凝集体表面活性剤を、50 ml の通常の生理的食塩水で希釈し、3 回限外濾過して可溶性タンパク質を除去した。

40

【0034】

50

最後に、肺の構造を分析した。S P - D ( + / - ) マウスにおいては正常であったが、大きい泡状肺胞マクロファージの増大した数および拡大された肺胞が、S P - D ( - / - ) マウスにおいて観察された。実施例 5 においては、肺異常の同定についての方法および結果を概説する。

#### 【 0 0 3 5 】

##### 実施例 5

S P - D ( - / - ) マウスにおける肺異常

S P - D 発現の消失が構造異常に至ったか否かを決定するために、ヌル、正常および異種接合マウスからの肺を、膨張させて固定し、形態および組織化学的分析を、光学顕微鏡により切片に対して実施した。感染の証拠はなく、光学顕微鏡のレベルにおける気道上皮細胞における明らかな変化はなかった。しかし、拡大された肺胞とは異質の肺柔組織における異常は、S P - D ( - / - ) においては一貫して観察されたが、S P - D ( + / - ) または S P - D ( + / + ) 対照においては観察されなかった。

10

#### 【 0 0 3 6 】

形態的および組織化学的方法

肺組織は 2 週間、3 週間、および 6 週間に S P - D ( + / + ) および S P - D ( + / - ) マウスを屠殺したものである。動物を秤量し、ケタミン、アセプロマジンおよびキシラジンの 4 : 1 : 1 混合物で麻酔し、動脈空洞下部および大動脈下流を切断することにより放血した。気管にカニューレ挿入し、横隔膜を穿通することにより肺をつぶした。リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) に溶解した 4 % パラホルムアルデヒドで 2 5 c m の水圧において 1 分間肺を膨張固定した。カニューレをはずす際に気管を縛って、膨張した肺の固定を維持した。切除した肺および心臓を、これらが容器の底に沈むまで低温の固定液中で平衡化した。次に、肺および心臓の容積を、流体置換により決定した。各葉をその最長の軸に沿って測定し、長軸に垂直に二分し、パラフィンブロック中に加工した。5 ミクロンの切片を、各葉の長さにわたり連続して切り、ポリシン ( polysine ) で被覆したスライド上に置き、コラーゲンについてヘマトキシリンおよびエオシン、マッソンの三色染色、またはエラスチンについてオセイン ( osein ) で染色した。

20

#### 【 0 0 3 7 】

肺形態

さらに詳細には、生命の最初の 2 週間以内の試験は、肺形態における検出可能な異常を例証しなかったが、正常な肺胞マクロファージの出現の数の増大が、14 日齢の S P - D ( - / - ) マウスの肺胞において記録された。対照的に、肺組織学における異常が、拡大された気室およびまれな泡状の肺胞マクロファージの湿潤が、3 および 6 週齢の S P - D ( - / - ) マウスにおいて観察された。肥大した泡状の肺胞マクロファージおよび血管周囲 / 細気管支周囲単細胞浸潤物の蓄積に関連した拡大された気室は、6 ~ 7 ヶ月齢により観察されたが、個別の S P - D ( - / - ) マウスにおける気室拡大の程度は、この齢の群において中程度から高程度に変化した。

30

#### 【 0 0 3 8 】

7 ヶ月齢の S P - D ( - / - ) マウスにおいて、胸膜下の線維症部位を観察し、コラーゲンについて強度に染色した。エラスチン体積における異常はまた、この時点において S P - D ( - / - ) マウスからの肺の柔組織において観察された。これらは、わずかな厚さの肺柔組織の領域、および一層高度にらせんまきした弾性繊維、並びにエラスチン染色が隣接する肺胞中隔 ( マクロファージ蓄積および線維症に隣接する ) から成った。

40

#### 【 0 0 3 9 】

増大した気管支付属リンパ組織 ( B A L T ) は、S P - D ( - / - ) マウスにおいて記録された。I I 型細胞における S P - B 免疫染色の強度は、3 つの遺伝子型間で類似した。I I 型細胞は、以下に概説するように精製された。しかし、大きい泡状の肺胞間細胞の増大した数の病巣領域があり、これは豊富な細胞質小胞を含む肺胞マクロファージであると見られる。細胞質小胞の数および容積が増大した結果、これらの細胞の大きさが増大した。小胞をニールブルーで染色した後、ニールレッドで染色し、5 2 0 ~ 5 5 0 n m の緑色

50



光で励起された際蛍光化したので、つまり脂質またはリン脂質を含んでいた。これらのマクロファージはまた、S P - B 抗血清により染色された。肺胞洗浄において、約4倍多いマクロファージ(マウスあたり  $1.2 \times 10^6$ )が、正常なマウス(マウスあたり  $0.36 \times 10^6$ )と比較して観察されたが、相対的な好中球またはリンパ球数に変化はなかった。マクロファージの大きさを、 $1500 \times g$ で2分間ガラススライド上に沈降したサイトスピン(cytospin)調整物から固定し、染色したマクロファージの直径から評価した。( + / + )からのマクロファージの平均直径は  $11.75 \pm 1.75 \mu m$ であり、これと比較して( - / - )マウスは  $18.75 \pm 7.25 \mu m$ であった。正常の2倍の直径を有するものとして定義された異常に大きいマクロファージは、( - / - )マウスからのマクロファージの  $22.4 \pm 0.6\%$ であり、これと比較して( + / + )マウスからは  $18 \pm 1.0\%$ であった。肺胞マクロファージの数および形態は、S P - D ( + / - )マウスにおいて異ならなかった。I I型細胞の超構造特性は、S P - D ( + / + )マウスと比較してS P - D ( - / - )において同様であった。肺胞マクロファージにおける形態は、炎症と関連すると知られている活性化された「泡」細胞のものとは一致する。

#### 【0040】

##### マウスI I型細胞の単離

I I型細胞は、以下の方法を用いてこの実験室において日常的に単離される。マウスを、腹腔内注射およびペントバルビタール( $50 mg / ml$ 、 $3.25 ml / 体重1 kg$ )により麻酔した。腹部凹部を開いた後、マウスを、動脈空洞下部を切断することにより放血した。気管を露出させ、20ゲージのルエルスタブ(luer stub)アダプターでカニューレ挿入し、縫合により固定した。胸プレートを除去し、肺を、見かけ上血液がなくなるまで肺動脈を通して $10 \sim 20 ml$ の無菌生理食塩水で灌流した。ディスペース(Dispase)(Collaborative Research, Inc., Bedford, MA)を、気管カテーテルを通して肺中に点滴し、次に1%低融点アガロースを、 $45^\circ C$ に加温した。肺を直ちに氷で覆い、2分間インキュベートしてアガロースを固定した。肺を切り出し、さらに $1 ml$ のディスペースを含む培養管中に入れ、室温で45分間インキュベートした。次に、肺を、 $7 ml$ のD MEM(Gibco BRL, Gaithersburgh, MD)に溶解した $100 U / ml$ のDNAアーゼ1(Sigma, St Louis, MO)を含む $60 mm$ の培養皿に移した。組織を丁寧に気道から引き裂き、5分間かきまぜた。次に、細胞を、しみ出されるまで氷上に置いた。細胞懸濁液を連続的に $100 \mu m$ および $40 \mu m$ の細胞ストレーナー、次に $25 \mu m$ のナイロンガーゼ(Tetko, Briarcliff Manor, NY)を通して濾過した。細胞を、 $4^\circ C$ で $130 \times g$ で7分間ペレット化し、10% FBS(Intergen Co., Purchase, NY)を含む $10 ml$  D MEM中に再懸濁した。粗細胞懸濁液を、予めCD - 45およびCD - 32抗体(Pharmingen, San Diego, CA)で被覆した $100 mm$ の培養皿に加え、5%  $CO_2$ の存在下で、 $37^\circ C$ で102時間インキュベートした。プレートをインキュベーターから除去し、静かに「動か」し、I I型細胞を自由に沈降させた。細胞懸濁液を、 $130 \times g$ で4分間遠心分離し、10% FBS(Intergen Co., Purchase, NY)を含む $10 ml$  D MEM中に再懸濁した。粗細胞懸濁液を、予めCD - 45およびCD - 32抗体(Pharmingen, San Diego, CA)で被覆した $100 mm$ の培養皿に加え、5%  $CO_2$ の存在下で、 $37^\circ C$ で102時間インキュベートした。プレートをインキュベーターから除去し、静かに「動か」して、I I型細胞を自由に沈降させた。細胞懸濁液を、 $130 \times g$ で7分間遠心分離し、細胞を、10% FBSを含むD MEM中に再懸濁した。

#### 【0041】

##### 気室および呼吸系組織

形態計測測定を、5日(0.5週)、14日(2週)および17日(2.5週)、3および6週、および6~7ヶ月齢においてマウスに対して実施した。呼吸系組織および気室の全体の割合(%部分領域)を、点計数法を用いて測定した。測定は、左、右上および右下葉を通して間隔をおいて採取した切片において実施した。 $20 \times$ 対物レンズを用いてスライドを観察し、画像(場)をビデオカメラによりコンピューター画面にMetaMorph画像形成ソフトウェア(Universal Imaging Corp., West Chester, PA)を用いてうつした。コン

10

20

30

40

50

ピューターにより発生させた121点の格子を、各場上に重ね合わせ、呼吸柔組織（肺胞および肺泡ダクト）または気室上の交差点（点）を計数した。細気管支、大血管および小動脈および細静脈上の点を、研究から除外した。部分領域（% F x Area）を、各区画についての点の数（n）を場内に含まれる点の合計数（N）で除算して、次に100倍することにより計算した：

【数1】

% 部分領域 =  $n / N \times 100$

【0042】

切片あたりの場を分析して、データを採集した。測定した各場についてのxおよびy座標を、乱数発生器を用いて選択した。

10

【0043】

図1に示すように、気室（a）および呼吸柔組織（b）の相対的割合（%部分領域）における差異が、5日（0.5週）、14日（2週）および17日（2.5週）齢において観察されなかった一方、気室の%部分領域は、3週齢のSP-D（-/-）マウスにおいて有意に増大した（ $p = 0.013$ ）。より具体的には、気室（a）および柔組織（b）の両方についての部分領域は、3週（ $p = 0.013$ ）、6週（ $p = 0.0007$ ）および28週（ $p = 0.004$ ）齢において、2つの異なる遺伝子型間で顕著に異なった。同様に、呼吸柔組織の%部分領域は、年齢に対応させたSP-D（+/+）対照（それぞれ34%柔組織 / 66%気室、これに対して42.5%柔組織 / 57.5%気室）と比較して、SP-D（-/-）マウスにおいて減少した（図1）。気室および呼吸柔組織の相対的割合は、後の時点において対照とは有意に異なり続け、%部分領域は、7ヶ月齢SP-D（-/-）マウスにおいて27%柔組織 / 73%気室 ~ 37%柔組織 / 63%気室の範囲内であった（ $n = 5$ ）。年齢に対応させたSP-D（+/+）対象は、比較的小さい可変性を示し、この時点において45%柔組織 / 55%気室 ~ 47%柔組織 / 53%気室の範囲内であった（ $n = 4$ ）。SP-D（-/-）マウスにおける7ヶ月齢における柔組織の全体的な%減少は、対照値の32%であり、一方SP-D（-/-）マウスにおける気室の%増加は、対照値の27%であった。

20

【0044】

細胞増殖

屠殺の4時間前に、動物にBrdUを予め注入して、細胞増殖の変化を評価した。含入されたBrdUの免疫組織化学的検出を、市場で入手できるキット（Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA）を用いて実施した。各動物からの小腸の切片を、BrdU含入についての正の対照として肺切片と平行して免疫染色した。

30

【0045】

BrdU標識係数は比較的低く、呼吸柔組織細胞または肺泡マクロファージのBrdU標識における変化は、対照と比較してSP-D（-/-）マウスの肺においては観察されなかった。

【0046】

肺容積

圧力 - 容積曲線を用いた肺容積の測定は、以下のように行われた：12週齢マウスに、ペントバルビタールナトリウムを注射し、100%酸素を含む室中に配置して、酸素吸収により肺泡が完全につぶれるのを確実にした。マウスを放血により屠殺し、気管にカニューレを挿入し、3方向コネクター（Mouse Pulmonary Testing System, TSS Incorporated, Cincinnati, OH）により圧力センサーに結合させたシリンジに接続した。横隔膜を開いた後、肺を、10秒おきに75  $\mu$ lの増分で膨張させて水の最大圧力28 cmとし、次に空気を抜いた。圧力 - 容積曲線を、各動物について作成し、収縮曲線間の10、5、および0 cmの水圧において肺容積を測定した（体重で除算した）。図2において、圧力 - 容積曲線を、12週齢において5 ~ 6匹のマウスにおいて作成した。圧力 - 容積曲線の収縮葉に関連する肺容積は、10 cm H<sub>2</sub>Oにおいて、および28 cm H<sub>2</sub>Oの最大圧力において年齢に対応させたSP-D（+/+）マウスと比較して12週齢のSP-D（-/-）マウス

40

50

スについて有意に大きかった ( $* p < 0.05$ )。

【0047】

統計的に有意な差異が、部分領域および圧力 - 容積曲線についての変化の分析、続いてステューデント - ニューマン - ケウルスの手順、または体重、肺および心臓容積、容積 : 体重比、合計タンパク質およびDNA含量の比較のためのステューデント T 検定の分析のいずれかを用いることにより決定された。  $p < 0.5$  の差異を、有意であると考慮した。値は、平均  $\pm$  SE として示した。

【0048】

増加した肺容積は、12週齢のSP-D (-/-) マウスにおいて容易に明らかであり、これは気腫を例証する組織学的および形態計測研究と一致した (図2参照)。

10

【0049】

肺胞

拡大された肺胞は、SP-D (-/-) マウスにおいて一貫して観察された。したがって、SP-Dは、肺において肺胞のリモデリングの調節に関与する傾向が極めて強い。異常および気室のリモデリングが気腫の決定的な特性であるため、SP-D (-/-) マウスは、気腫についての理想的なモデルである。

【0050】

実施例6

サイトカイン、過酸化水素生成、およびメタロプロテイナーゼ活性  
方法

20

サイトカイン測定

6 ~ 9 週齢マウスからの肺ホモジネートを、2000RPMにおいて遠心分離し、-20で貯蔵した。腫瘍壊死因子アルファ (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン (IL) - 1、IL - 6 およびマクロファージ炎症タンパク質 (MIP) - 2 を、ムリンサンドウィッチ ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて、製造者の指示に従って定量した。すべてのプレートを、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 上で読み取り、コンピューターでアシストされた分析プログラム (Softmax, Molecular Devices) を用いて分析した。  $> 0.95$  の計算された回帰線値を有する標準曲線を有するアッセイのみを、分析に受け入れた。

【0051】

30

過酸化水素生成

肺胞マクロファージを、3倍の1mlの色素を含まないRPMI培地(Gibco, Grand Island, NY)を有する気管支肺胞洗浄により採集した。8 ~ 10匹のマウスからの気管支肺胞洗浄液 (BALF) を蓄積して、分析用に十分な数のマクロファージを提供させた。洗浄を、1200RPMで10分間遠心分離して、100万のマクロファージをPBS中に再懸濁させた。マクロファージによる過酸化水素生成を、酸性条件下での過酸化水素による第一鉄イオン (Fe<sup>2+</sup>) の第二鉄イオン (Fe<sup>3+</sup>) への酸化に基づいて、市場で入手できるアッセイ (Bioxytech H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-560 assay, OXIS International, Portland, OR) を用いて測定した。方法は、製造者の推薦に従った。過酸化水素生成を、100ng/mlのホルボールミリストレートアセテート (PMA) での活性化の後または刺激を加えずに測定した。

40

【0052】

メタロプロテイナーゼ活性

マウス洗浄試料を、SW-28ローター (Beckman, Palo Alto, CA) において遠心分離した (100,000  $\times$  g, 1時間)。上清液を、Centricon-30濾過ユニット (Amicon, Inc., Beverly, MA) を用いて濃縮した。試料 (200  $\mu$ g タンパク質) を、非還元条件下で (レムリー)、10% ギイモグラム (Zymogram)、ゼラチンおよびカゼインゲル (Novex, San Diego, CA) 中に電気泳動した。電気泳動に続いて、ゲルを、2.5% のトライトン (Triton) X - 100 で2回洗浄し (37、15分)、40mMのトリス (Tris) - HCl、pH 7.5、10mMのCaCl<sub>2</sub>、1  $\mu$ MのZnCl<sub>2</sub>で16時間インキュベートした。ゲルを、50%メタノール、10%酢酸に溶解した0.5% (w/v) クマシーブルーで1時

50

間染色し、次に脱色した。メタロプロテイナーゼを、青いバックグラウンドに対して透明なバンドとして検出した。メタロプロテイナーゼ2および9のmRNAを、[<sup>32</sup>P]で標識したcDNAプローブ(Chemicon International, Inc., Temecula, CA)を用いて、野生型およびSP-D(-/-)マウスからの全肺のmRNAのノーザンブロット分析により定量した。

#### 【0053】

##### 結果

6および9週齢において、SP-D(-/-)マウスからの肺ホモジネートは、プロ炎症サイトカインTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6またはMIP-2の炎症レベルを含まなかったが、IL-1 $\beta$ の基底レベルは顕著に上昇した。図3。対照的に、SP-D(-/-)マウスから単離された肺胞マクロファージによる過酸化水素生成を測定することにより評価されたオキシダント生成は、10倍増大した。図4。過酸化水素およびスーパーオキシド生成は、マクロファージ活性化、特に殺微生物活性化の基準である。オキシダント生成が、多くのメタロプロテイナーゼの活性化並びにヒトおよび動物研究における気腫と関連していたので、メタロプロテイナーゼ活性は、SP-D(-/-)マウスおよびSP-D(+ / +)マウスから単離されたBALF上清液のSDS-PAGEの後のゼラチン基質の分解により評価された。メタロプロテイナーゼ-2および-9と一致する活性のバンドは、両方の遺伝子型において容易に検出されたが、SP-D(-/-)マウスからのBALFにおいて変化しなかった。同様に、メタロプロテイナーゼ-2および-9のmRNAに富んでいることは、ノーザンブロット分析により評価されたように、SP-D(-/-)マウスおよびSP-D(+ / +)マウスからの全肺RNA試料において同様であった。

#### 【0054】

実施例1~6の結果は、完全に予測されないものであった。SP-Dヌルマウスが気腫のモデルであることを示唆するものは、文献中には何も存在しない。

#### 【0055】

要するに、SP-D(-/-)マウスは、表面活性剤ホメオスタシスの調節、肺中の肺胞表面活性剤、SP-A発現の調節におけるSP-Dの顕著で驚異的な役割を決定的に例証し、または肺中のオキシダント、過酸化水素生成における決定的な障害の役割を果たす。したがって、このレベルは、継続するオキシダント生成および損傷および肺胞リモデリングの調節の抑制に重要である。これにより、SP-D(-/-)マウスは、気腫の優れたモデルとなる。実施例7は、気腫のモデルマウスについての結果を要約する。

#### 【0056】

##### 実施例7

気腫のモデルとしてのSP-D(-/-)マウス

SP-D欠失は、炎症、単離された肺胞マクロファージによる増大されたオキシダント生成、気腫および遺伝子不活性化SP-D(-/-)マウスにおける局所的な線維症を引き起こした。これらの肺異常のタイミングおよび進行性性質は、SP-D(-/-)マウスにおける肺胞拡大が、肺胞発生(alveologenesis)の間に発生する発生異常よりむしろ、慢性炎症に関連する肺胞リモデリングにより引き起こされたという結論を支持する。ここでの知見は、肺炎症およびオキシダント生成の調節におけるSP-Dの重要であり予測されない役割と一致し、SP-Dの調節または機能における変化が、慢性肺損傷に続く気腫に至る病理学的プロセスにおいて役割を奏し得ることを示唆する。

#### 【0057】

SP-D(-/-)マウスからの肺の組織学的および形態計測分析で、生後3週齢まで肺構造における異常は表れず、肺胞発生の1週間後にマウスにおいて見られる。これは、呼吸柔組織および気室の相対的割合が、生後5日と17日との間のSP-D(-/-)マウスとSP-D(+ / +)マウスとの両方において同様であったという観察結果と一致した。2週齢の後に、増大した柔組織-気室比率が、SP-D(-/-)マウスにおいて観察されたが、これは柔組織および肺胞室の進行するリモデリングと一致する。拡大された気

10

20

30

40

50

室は、一般的に大きい泡状の肺胞マクロファージの集中した蓄積と関連するが、炎症浸潤物および比較的加齢したマウスの局所化および範囲において若干の異質性があった。S P - D ( - / - ) マウスの肺における肺胞マクロファージの集中した蓄積が、2週齢と早く観察された際には、この時点においてマクロファージ形態は通常のままであった。拡大された泡状細胞から成る異常な肺胞マクロファージ形態は、3週齢において記録され、その後の肺胞構造の拡大と一致した。以前の研究は、8週齢までのS P - D ( - / - ) マウスにおける拡大された肺胞マクロファージの増加した数を例証した。したがって、S P - D ( - / - ) マウスにおける気腫の発生は、活性化されたマクロファージの一時的および空間的な蓄積と一致し、これは、リモデリングにおけるこれらの役割を示唆する。ここでの知見は、通常の長い形態発生および肺胞発生におけるS P - Dの役割を支持せず、プロセスは、一般的にマウスにおける生後約2週齢により完成される。

10

## 【0058】

ここでの知見は、気腫および線維症に至る肺胞マクロファージの活性化およびオキシダント生成の調節におけるS P - Dの重要な役割を支持する。S P - D ( - / - ) マウスにおけるマクロファージ浸潤および肺リモデリングは、I L - 1 b、M I P - 2を含むがT N F - およびI L - 6を含まず、むしろ単離された肺胞マクロファージによる顕著に増大した過酸化水素を含む種々のプロ炎症メディエーターの炎症レベルにおける中程度であるが有意な差異と関連した。I L - 1の基底レベルが、S P - D ( - / - ) マウスにおいて顕著に増大したが、I L - 1は、重度の炎症において代表的に検出されたレベルには増大しなかった。増大されたI L - 1 および過酸化水素生成が、S P - D ( - / - ) マウスにおいて観察された一方、これらのマウスに見られる肺異常がサイトカインまたはオキシダント誘発損傷により直接媒介されたか否かは、不明確なままである。S P - Dは、宿主防御において重要な役割を果たすことが提案されているが、S P - D ( - / - ) コロニーにおいて感染の組織学的または血清学的証拠はない。

20

## 【0059】

S P - D ( - / - ) マウスの肺において見出された増強された過酸化水素生成および増加した数の肺胞マクロファージは、S P - Dが、肺において決定的に重要な抗炎症役割を奏し、i n v i v oにおける肺胞マクロファージによる過酸化水素生成を調節するという概念を支持する。オキシダント損傷と気腫および肺線維症の発生との間の関係は、多くの動物および遺伝子モデルにおいて確立されている。例えば、高酸素症への新生仔の暴露は、新生マウスにおいて肺胞のリモデリングおよび線維症を引き起こす。メタロプロテイナーゼの活性化が、オキシダント損傷および気腫と関連するため、メタロプロテイナーゼ活性は、S P - D ( - / - ) マウスからのB A L Fにおいて評価された。メタロプロテイナーゼ-2および-9と一致するプロテアーゼ活性が、ザイモグラフィーにより容易に検出された一方、これらのプロテナーゼまたはこれらのm R N Aの活性の一致する変化は、S P - D ( - / - ) マウスにおいて検出されなかった。しかし、他のプロテアーゼまたは抗プロテアーゼにおけるメタロプロテイナーゼの増大し局所化された組織濃度がS P - D欠失と関連し得ることは、依然として可能性がある。抗プロテアーゼにおける欠失並びに酸化毒薬(例えばブレオマイシンまたはパラカート)からの喫煙およびオキシダント損傷はすべて、ヒト肺における気腫または肺線維症と関連する。

30

40

## 【0060】

表面活性剤リン脂質含量が、S P - D ( - / - ) マウスにおいて増加し、大きい泡状の肺胞マクロファージの増加した数と関連した一方、増大したリン脂質含量のみでは、S P - D ( - / - ) マウスにおいて観察された肺胞リモデリングを生じるのに十分ではない傾向がある。実際に、表面活性剤リン脂質の全体的な効果は、抗炎症性であり、食作用、オキシダント生成およびサイトカイン放出を変化させ、リンパ球増殖、免疫グロブリン生成および接着分子の発現を阻害すると見られる。他方、G M - C S Fが呼吸上皮において過剰発現されたトランスジェニックマウスは、通常存在する肺胞マクロファージの顕著に増大した数を有したが、肺胞タンパク症/リポイド沈着症、気腫または線維症を発生しなかった。対照的に、表面活性剤リン脂質およびタンパク質は、肺胞マクロファージ蓄積および

50

血管周囲/気管周囲単球浸潤と関連するGM-CSF(-/-)およびGM受容体共通ベータサブユニット(c)の両方からの肺において顕著に増大した;しかし、肺胞タンパク症/リポイド沈着症のいずれのモデルも、気腫または線維症に関連していなかった。同様に、肺においてIL-4を過剰に発現するトランスジェニックマウスはまた、増大した量の表面活性剤タンパク質および脂質並びに増加した数の炎症細胞を示したが、気腫を生じなかった。

#### 【0061】

肺におけるSP-Dの濃度が、発生中に変化して、年齢の進行に伴い増加するが、SP-Dレベルはまた、種々の臨床的条件により影響される。最近の研究は、嚢胞性線維症(CF)を患っている患者から得られたBALFのSP-D濃度の顕著な減少を例証し、CF肺疾患に関連する慢性炎症の病理学におけるSP-Dの強力な役割を支持する。SP-Dレベルはまた、喫煙者のBALFにおいても減少し、これは、これらの患者において、減少したレベルのSP-Dが後に慢性閉塞性肺病(COPD)を発生させるのに寄与し得ることを示唆している。BALFにおけるSP-Dの濃度が、肺胞タンパク症(PAP)を患っている患者において増大するが、特発性肺線維症(IPF)およびコラーゲン血管病(IPCD)と関連する間質性肺炎を患っている患者は、SP-Dの減少したBALFレベルを有する。他方、SP-Dの血清濃度は、PAP、IPFおよびIPCDを患っている患者において増大した;しかし、SP-AおよびSP-Dの両方の血清レベルは、IPFの重篤度と共に、および抗炎症療法の経過の間に変化する。これらの臨床的知見および本研究は、SP-Dが正常の肺構築およびオキシダント生成の抑制の維持に必要であることを例証するが、SP-D濃度における変化が、オキシダント損傷、肺膿瘍(abcess)、二次的疾患、嚢胞性線維症、間質性肺線維症(IPF)、および慢性閉塞性肺病(COPD)、種々の肺感染症、呼吸窮迫症候群(RDS)、気管支肺異形成症(BPD)、化学療法誘発肺損傷、一次膿瘍に対して二次的な肺線維症(即ちサルコイド)、および喘息を含む種々の臨床的条件と関連する肺損傷の病理学に関連するという概念を支持する。

#### 【0062】

本発明者等の以前の研究において、肺胞マクロファージまたは肺形態における異常は、異種接合SP-D(+/-)マウスにおいて観察されず、BALFにおけるSP-D濃度の50%の減少は、肺異常を引き起こすのに十分ではないことを例証する。オキシダント誘発損傷および肺リモデリングの阻害に必要なSP-Dの正確な濃度は、現在不明確である。SP-D(+/-)マウスまたはSP-D(-/-)マウスの肺のさらなる損傷またはオキシダントストレスが、動物モデルにおいて気腫および線維症を悪化させるか否かは、決定されるべき問題として残っている。

#### 【0063】

SP-D(-/-)マウスにおいて見出された肺SP-A濃度の中程度の減少は、これらのマウスにおいて観察された肺形態の変化に寄与する傾向はない。その理由は、SP-A(+/-)マウスもSP-A(-/-)マウスも、気腫を発生しないからである。さらに、SP-A欠失マウスの肺形態は正常であり、SP-D(-/-)マウスとは対照的に、SP-A欠失は、単離された肺胞マクロファージにより減少した過酸化水素生成と関連した。

#### 【0064】

SP-D(-/-)マウスは、重篤な進行性気腫を発生した。肺胞リモデリングおよびマクロファージ異常は、3週齢という早期に明らかであり、一方穏やかな病巣の肺線維症は、6~7週齢において観察され、炎症および肺胞リモデリングの調節におけるSP-Dの役割を例証する。本研究はまた、*in vivo*における肺胞マクロファージによる過酸化水素生成の調節においてSP-Dの予期されない役割を例証し、これは、SP-D(-/-)マウスにおける肺の気腫の発生に寄与し得る。SP-D欠失が、進行する炎症または、喫煙または他のオキシダントにより発生したものである種々のヒト慢性肺疾患において見出される気腫および線維症の発生に寄与するか否かは、決定されるべき問題として残っている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 5 】

## モデルマウスにおける試験療法

気腫の治療のための薬理的療法がないために、可能な療法を試験するためのモデルが必要不可欠である。S P - D ( - / - ) マウスは、このモデルを提供する。したがって、実施例 8 は、薬物の試験、タンパク質調製、または気腫の治療のための遺伝子操作のための試料枠組みを提供する。

## 【 0 0 6 6 】

## 実施例 8

適切な緩衝液で希釈した多くの用量または濃度のタンパク質または薬剤を、S P - D ( - / - ) マウスに気管内に投与した。タンパク質および薬剤を、*in vivo*での使用に適するように精製した。関連する遺伝子を含む組換えアデノウイルスまたは他の遺伝子ベクターを、以下のようにして投与した。S P - D ( - / - ) マウスを、免疫抑制して、T 細胞媒介免疫応答を特異的に遮断し、遺伝子導入された細胞において関連する遺伝子を発現するように設計されたアデノウイルス構成体で処理した。マウスに、アデノウイルス構成体を与える 3 日前に、H 5 7 抗体を腹腔内に注射した。H 5 7 は、T 細胞受容体における免疫認識を変化させ、脾臓のおよび肺の T および B リンパ球を減少させた。1 用量を、気管内に点滴し、他の群を H 5 7 で腹腔内処理し、次に賦形剤のみの気管内投与を施した。関連するタンパク質のレベルを投与の 1 週間後に測定して、ベクターの取り込みおよび発現を検出した。4 匹のマウスを試験し、未処理 S P - D ( - / - ) マウスを対照として用いた。気管内接種は、イソフルオランでの麻酔を含み、前方の中心線切開を実施して気管を露出させた。ツベルクリンシリンジに付着させた 3 0 ゲージ針を気管内に挿入し、タンパク質または薬物の 1 0 0  $\mu$  l 接種物を肺中に分散させた。切開を 1 滴のネクサバンド (Nexaband) を添加し閉じた。非化膿性 P B S を、対照として気管内に注入した。

## 【 0 0 6 7 】

タンパク質、薬物、または気腫の消失における遺伝子複製の効率を試験するために、多くの試験を実施した。

## 【 0 0 6 8 】

肺構造に対するタンパク質または薬剤の効果を測定するために、肺を膨張固定し、切片を電子顕微鏡により評価した。処理および未処理マウスからの肺を、4 % のパラホルムアルデヒドを含む圧力 2 0 c m の気管カニューレにより膨張させ、胸郭から一括して除去した。肺を脱水し、パラフィン中に包埋した。組織切片 ( 5  $\mu$  m ) を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。

## 【 0 0 6 9 】

マクロファージの数および形態を試験するために：ナイルレッドでの染色は、小胞を検出し、ナイルブルーでの染色および 5 2 0 ~ 5 5 0 m m の緑色光での励起は、脂質またはリン脂質を検出するための追加の方法である。マクロファージ数は、S P - B 抗血清での染色により決定される。マクロファージの大きさは、1 5 0 0  $\times$  g での 2 分間のガラスライド上に沈降したサイトスピン (cytospin) 調製物からの固定し染色したマクロファージの直径から推定する。

## 【 0 0 7 0 】

表面活性剤組成および超構造を、以下のようにして分析する：表面活性化の構造を、S P - D ( - / - ) 処理および未処理マウスの蓄積した肺胞洗浄液からの大きい凝集物を単離することにより分析し、E M により試験する ( 以下の原理を参照 ) 。肺胞洗浄リン脂質組成分析のために、2 ~ 3 匹のマウスからの蓄積した洗浄液から成る 2 ~ 4 個の試料を、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリンおよびリソビスホスファチジン酸の相対的量について評価する。(  $^3$  H ) コリンの合計肺 S a t - P C 中への導入を評価して、合計リン脂質濃度を測定する。

## 【 0 0 7 1 】

肺胞洗浄液からの凝集形態。肺胞からの表面活性体を、大きい凝集体 ( 重い、高密度 ) お

10

20

30

40

50

よび小さい凝集体（軽い、小胞状）部分に遠心分離により分離することができる。肺胞洗浄は、 $40,000 \times g$ で0.8 Mスクロース緩衝剤で15分にわたり遠心分離した。大きい凝集表面活性体を、次に界面から採集し、通常の生理的食塩水で希釈し、再び $40,000 \times g$ で15分遠心分離した。小さい凝集表面活性体を含む第1の $40,000 \times g$ の遠心分離からの上清液を、4 で限外濾過により $300,000$ 分子量の保持フィルター(Minitan, Miliore Corp., Bedford, MA)または遠心分離濃縮器(Amicon Corp., Danvers, MA)を用いて濃縮した。小さい凝集表面活性体を、50 mlの通常の生理的食塩水で希釈し、3回限外濾過して可溶性タンパク質を除去した。

#### 【0072】

肺疾患のための治療としてのSP-D

SP-Dの欠失が気腫のためのモデルマウスを生成するため、SP-Dは、気腫の治療または防止として明らかな選択である。これはまた、これらの疾患が異常な表面活性剤生成により特徴づけられるため、他の種類の肺疾患の明らかな治療である。さらに、SP-Aに対する効果および宿主防御における可能な役割は、これを、肺における免疫機能を増大するための有用なツールとする。呼吸上皮に対する遺伝子の導入は、種々の肺疾患のための治療として極めて有望である。種々のウイルスに基づく、およびウイルスに基づかないベクターが、遺伝子を気道の細胞に移動させるために開発されてきたが、これには組換えアデノウイルスベクターが含まれる。これらのベクターは、これらがエアロゾル化できるため、呼吸治療において用いるのに特に有望である。したがって、実施例9は、SP-D (-/-)マウスにおける気腫の治療のための精製したマウスSP-Dタンパク質を用いた実験である。実施例10は、アデノウイルスを用いて、SP-D (-/-)マウスにおける気腫の治療のためのラットSP-Dを発現する実験である。実施例11は、SP-Dペプチドの使用のための試料基盤またはこれらの疾患の防止および治療のためのSP-Dを発現するベクターを提供する。気腫は、例示的な肺疾患として用いられる。アデノウイルスは、例示的なベクターとして用いられる。

#### 【0073】

精製したSP-Dでの処理

実施例9

SP-D (-/-)マウスを、精製したマウスSP-Dで処理し、以下に概説するように精製した。飽和PCレベルを、肺胞洗浄液および合計肺洗浄液において分析した。24時間間隔での気管内への繰り返した投与の結果、3~7投与の後に脂質蓄積の部分的な補正が生じた(図12参照)。

#### 【0074】

SP-Dの気道における半減期を、マウスにおいて13時間であると判定した(図13参照)(この手法を以下に概説する);したがって、SP-D欠失を、エアロゾルまたは粒状吸入器または表面活性体混合物により合理的な間隔でSP-Dタンパク質の置換により処理することができる。

#### 【0075】

マウスSP-Dの精製

GMC SFおよびSP-A二重ヌル突然変異マウスからのマウス気管支肺胞洗浄(BAL)液を採集し、凍結し、後のSP-Dの精製のために蓄積した。マルトシル-アガロース(Sigma)を、重力フローカラム( $10 \times 80$  mm)中に詰め、20 mMのトリス-HCl、pH 7.4、10 mMの塩化カルシウム、0.02% (W/V)のアジ化ナトリウムを含む緩衝液(TCB)で平衡にした。BALを、トリス-HClに対して20 mM、EDTAに対して10 mMとし、pH 7.4とし、室温で1時間かきまぜた。混濁溶液を、 $10,000 \times g$ で40分間、4 で遠心分離した。上清液を、塩化カルシウムに対して20 mMとし、マルトシル-アガロースカラムに装填する前にpH 7.4に再調整した。カラムをバックグラウンド吸収のためTCBで洗浄し、続いて1.0 M塩化ナトリウムを含むTCBで洗浄した。マルトースへの結合において特別の要求を有するSP-Dを、50 mMの塩化マグネシウム、20 mMのトリス-HCl、0.02% (W/V)のアジ化ナ

10

20

30

40

50



トリウム、pH 7.4で溶出した。SP-Dを含むフラクションを、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動または直接ELISAにより測定し、蓄積し、20 mMのトリス-HCl、100 mMの塩化ナトリウム、5 mMのEDTA、pH 7.4の3回交換で透析した。このプロトコルは、Strong, Peter; Kishore, Uday; Morgan, Cluff; Bernal, Anders Lopez; Singh, Mamta; およびReid, Kenneth B. M.; Journal of Immunological Methods 220 (1998) 139-149から適合された。

【0076】

マウスの表面活性体成分での処理。本発明者等は、問題なく、7日目まで毎日SP-Dでマウスを反復して処理するため、イソフルランでの麻酔の下に、マウスにおいて26gの供給管を用いた経口盲目挿管法のための手法を、好首尾に用いた。この方法は、外科手術を回避し、SP-D置換のために提案された実験および突然変異SP-Dタンパク質での処理の形を可能にする。

10

【0077】

最初に、SP-D(-/-)マウスを、気管点滴により精製したマウスSP-Dで処理した。24時間間隔で与えられた2.9gのSP-Dの3回以上の投与により、肺胞および飽和PC蓄積の両方が減少した(図14参照)。与えられたSP-Dのこの用量は、およそSP-D(+/-)マウスにおける内因性蓄積に存在する量である。肺結合およびクリアランスカイネティクスが考慮されると、これは、低い用量である。SP-Dの外因性投与は、表面活性剤脂質代謝に直接影響し、本発明者等が*in vivo*で改変SP-D分子の機能を試験することができる実験モデルを提供する。

20

【0078】

生物学的半減期プロトコル。本発明者等は、マウスにおけるSP-Dの生物学的半減期を測定して、SP-Dでの処理のための実験を設計した。本発明者等は、以前に本発明者等がSP-Aおよび他の表面活性剤タンパク質について実施したように、ボルトン-ハンター(Bolton-Hunter)試薬を用いて、<sup>125</sup>Iで精製したマウスSP-Dをヨウ素標識した。SP-D(+/-)マウスおよびSP-D(-/-)マウスの肺胞洗浄液からのSP-Dのクリアランスは、約13時間の半減期と同様であった(図13参照)。SP-D(-/-)マウスの肺におけるSP-Dについての17時間の $t^{1/2}$ は、SP-D(+/-)マウスについての13時間の $t^{1/2}$ のものより若干長かった。

30

【0079】

GM-CSF欠失は、SP-Dにおいて48倍の増加を生じ、GM-CSF(-/-)×SP-A(-/-)の交差は、同様にSP-Dを上昇させたがSP-Aを上昇させなかった。本発明者等は、高純度で、および大量に、Persson等により記載された方法により、Ca<sup>2+</sup>の存在下においてマンノース-セファロースのアフィニティーカラムを用いて、GM-CSF(-/-)×SP-A(-/-)マウスからの肺胞洗浄液からSP-Dを単離した。

【0080】

実施例10

アデノウイルスで発現させたSP-Dでの処理

本発明者等は、ラットSP-Dを発現する新規なアデノウイルスを作成した。このウイルスは、正常またはSP-D欠失マウスの細胞および肺においてSP-Dを生成する。本発明者等は、293細胞およびマウスにおいて生成したラットSP-Dのウエスタンブロットを有する。

40

【0081】

Ad-rSPDアデノウイルスの構成(図14参照)。野生型ラットSPD cDNAを、EcoRI消化でプラスミドWT-rSPD/pg3Zから切り出し、3'末端をクレンウ(Klenow)で埋めた。1.3kB rSPD cDNAを、プラスミドpAVS6aのEcoRV部位に挿入して、プラスミドpAVS6a-rSPDを作成した。プラスミドpAVS6a-rSPDは、RSVプロモーター、rSPC cDNA、SV40ポリAシグナルおよびAd5配列(9.24~17.34mu)を有する。NotIでp

50

AvS6a-rSPDを直鎖化したものは、アデノウイルスDNA Ad.d1327のCla I消化された大きなフラグメントと293細胞中に同時トランスフェクトするが、これは、E3領域(78.5~84.7mu)が削除されている。相同組換えの後、個別のブランクを、ウエスタンブロットアッセイにより分析して、rSPDタンパク質発現を決定した。1つのrSPD陽性クローンに、ブランク精製を一回施した。Ad-rSPDアデノウイルスは、E1およびE3領域において欠失を有し、複製欠損である。293細胞の増幅の後、精製されたAd-rSPDアデノウイルスを、2回のCsCl勾配超遠心分離により生成した。SP-Dを発現するアデノウイルスは、気管内投与により若干の脂質異常を補正することができた。したがって、これは、気腫および多くの他のSP-D欠失疾患並びに種々の他の形態の肺損傷および欠失の治療のために極めてよい可能性を残す。

10

## 【0082】

## 実施例11

他のベクター、タンパク質または薬剤から発現したSP-Dでの処理

リン脂質ホメオスタシスの回収におけるSP-Dに対する時間的、空間的および化学量論的要求を、実施例9において決定した。SP-Dのクリアランスカイネティクスを決定する最初の研究を、<sup>125</sup>Iで標識したSP-Dを気管内に投与して実施し；半減期を計算し、情報をSP-D置換実験の設計において用いた。投与後のSP-Dの通常の生理学的濃度を達成するのに必要なSP-Dの用量を、明らかにした。

## 【0083】

実施例9において、精製したSP-Dタンパク質の投与を用いて、種々の肺疾患を治療した。しかし、肺疾患における生理学的異常は、肺中のSP-Dの長期間補正を必要とし得る。したがって、哺乳動物SP-D遺伝子を含む組換えアデノウイルスまたは他の遺伝子ベクターを用いる(実施例10および11参照)。組換えアデノウイルスベクターは、クララ(Clara)細胞分泌タンパク質(CCSF)およびSP-Cプロモーターを用いて、細気管支(クララ細胞)および肺胞(II型細胞)区画においてSP-Dを選択的に発現する(実施例10参照)。アデノウイルスベクターでの処理の3日前に、マウスを、200ugのモノクローナル抗T細胞受容体抗体、H57を腹腔内注入することにより免疫抑制した。アデノウイルスを、ウイルスの $5 \times 10^8$ PFUの気管内注入により投与した。SP-Dタンパク質のレベルを、投与の1週間後に測定して、ベクターの取り込みおよび発現を検出した。4匹のマウスを試験し、処理を受けていないSP-D(-/-)マウスを、対照として用いた。気腫の影響を消失させるSP-Dの効率を試験するために、多くの試験を以下のように実施した。

20

30

## 【0084】

肺構造に対するタンパク質または薬剤の効果を決定するために(実施例11)、肺を膨張固定し、切片を電子顕微鏡により評価する。肺を、4%のパラホルムアルデヒドを含む圧力20cmの気管カニューレにより膨張させ、胸郭から一括して除去する。肺を脱水し、パラフィン中に包埋する。組織切片(5μm)を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色する。

## 【0085】

マクロファージの数および形態を分析する。ナイルレッドでの染色は、小胞を検出し、ナイルブルーでの染色および520~550nmの緑色光での励起は、脂質またはリン脂質を検出するための追加の方法である。マクロファージ数は、SP-B抗血清での染色により決定される。マクロファージの大きさは、1500xgでの2分間のガラススライド上に沈降したサイトスピン調製物から固定し、染色したマクロファージの直径から推定する。

40

## 【0086】

表面活性体組成および超構造を、以下のようにして分析する：表面活性体の構造を、SP-D(-/-)処理および未処理マウスの蓄積した肺胞洗浄液からの大きい凝集物を単離することにより分析し、EMにより試験する。肺胞洗浄液リン脂質組成分析のために、2

50

～ 3匹のマウスからの蓄積した洗浄液から成る2～4個の試料を、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンシトール、スフィンゴミエリンおよびリソビスホスファチジン酸の相対量について評価した。( <sup>3</sup>H ) コリンの合計肺 S a t - P C 中への導入を評価して、合計リン脂質濃度を測定した。

【 0 0 8 7 】

処理の効率が決定されれば、処理を他の適切な哺乳動物に対して試験することができる。

【 0 0 8 8 】

S P - D の肺感染の改善

肺での宿主防御における S P - D および S P - A の役割を、繰り返して例証した。S P - A および S P - D は、サイトカインおよびフリーラジカル生成の調節による *in vitro* での肺炎症を調節をする種々の微生物と *in vitro* で特異的な相互作用を有する。細菌クリアランスおよび肺の炎症応答における S P - D の役割を、S P - D 欠失のモデルマウスを用いて *in vivo* で評価した。S P - A 欠失マウスは、感染症に一層罹病性であることが知られている。多くの *in vitro* 研究は、S P - A の上方調節におけるこの役割に加えて、宿主防御についての S P - D の可能な役割を示した。実施例 8 ～ 11 は、細菌または菌類感染した S P - D ( - / - ) マウス並びに S P - A ( - / - ) マウスにおける治療として S P - D を試験するための試料プロトコルを概説する。実施例 12 ～ 14 は、細菌、菌類およびウイルス感染に対する応答における S P - D の役割を示す実験である。実施例 13 は、呼吸シンシチウムウイルスに感染した S P - D ( - / - )

10

20

【 0 0 8 9 】

実施例 12

S P - D ( - / - ) マウスからの細菌病原体のクリアランス

S P - D 欠失マウス ( S P - D - / - ) に、B 群ストレプトコッカス ( G B S ) またはヘモフィルス・インフルエンザ ( Hemophilus influenzae ) ( H f l u ) を気管内に感染させて、野生型マウスと比較してのクリアランスを評価した。A 群ストレプトコッカスを、 $10^4$  C F U において投与した。また、肺炎症を、合計細胞数 ( 図 5、6 および 7 )、肺ホモジネートにおけるサイトカインレベル ( 図 8 )、肺マクロファージによる酸素ラジカル生成 ( 図 11 ) および B A L における亜硝酸塩レベル ( 図 9 ) について、B A L 液の分析により評価した。

30

【 0 0 9 0 】

S P - D - / - マウスは、野生型マウスと同様に、細菌を排出した ( 図 5 および 6 参照 )。G B S および H f l u での感染の結果、野生型マウスと比較して、S P - D - / - マウスの B A L 液における有意に大きい合計細胞数を生じた ( 図 7 )。サイトカインレベルの選択的变化は、S P - D - / - マウスにおいて検出された。腫瘍壊死因子 ( T N F - ) およびインターロイキン ( I L ) - 6 レベルは、G B S または H f l u での感染の後の早期の S P - D - / - マウスからの肺ホモジネートにおいて大きかった ( 図 8 )。マクロファージ炎症タンパク質 - 2 ( M I P - 2 )、好中球化学誘引物質は、H f l u 感染の後に S P - A - / - マウスからの肺ホモジネートにおいて顕著に多かったが、G B S 感染ではなかった ( 図 8 )。S P - D - / - マウスからのマクロファージは、野生型マウスと比較して、顕著にスーパーオキシドおよび過酸化水素を多く発生した ( 図 11 )。

40

【 0 0 9 1 】

B A L 亜硝酸塩レベルは、野生型マウスと比較して、S P - D ( - / - ) マウスにおいて増加した。一酸化窒素は、B A L F 中の亜硝酸塩として測定された。一酸化窒素は、殺菌に寄与し、宿主防御の役割を有する。一酸化窒素は、スーパーオキシドと反応して、有力な殺微生物剤であるペルオキシ硝酸塩を生成する。

【 0 0 9 2 】

図 10 において、光学顕微鏡を用いて、食作用を評価した。S P - D ( - / - ) マウスは、野生型と比較して、顕著に減少した細菌の食作用を示した。

50

## 【0093】

したがって、SP-Dの非存在時に、増大した炎症応答が、GBSまたはHfl uでの細菌感染に続いて観察された。肺胞マクロファージによる活性酸素種の生成は、SP-D-/-マウスにおいて増大した。これらの結果は、in vivoでの細菌感染に対する肺免疫および炎症応答におけるSP-Dの決定的に重要であり明らかな役割を支持する。

## 【0094】

実施例13においては、SP-D(-/-)マウスに、呼吸シンシチウムウィルスを感染させた。

## 【0095】

宿主防御機構は、細菌の生来のメディエータおよびウィルスクリアランスおよび後天性免疫応答を含む微生物病理学の肺クリアーを維持した。

10

## 【0096】

実施例13

SP-D(-/-)マウスからのウィルスのクリアランス

SP-D(-/-)マウスに、呼吸シンシチウムウィルス(RSV)、小児における一般的な呼吸病原菌を気管内に感染させた。ウィルス力価および肺炎症を、SP-D(-/-)マウスおよび野生型マウスにおいて評価した。肺ホモジネートにおけるRSV力価は、投与の3日後および5日後で、SP-D(-/-)マウスと野生型マウスとの間で同様であった。しかし、炎症細胞の顕著に増加した数は、RSV感染の3日後および5日後に、野生型マウスと比較して、PMNの大きい割合を有するSP-D(-/-)マウスのBAL液において見出された。さらに、RSV感染の5日後に、組織学的に評価された肺炎症は、野生型マウスと比較して、SP-D(-/-)において多かった。TNF-a、IL-1、IL-6およびMIP-2を含むプロ炎症サイトカインは、RSV感染の3日後および5日後に、SP-D(-/-)マウスからの肺ホモジネートにおいて多かった。SP-D(-/-)マウスは、肺からの効率的なウィルスクリアランスを有していたが、RSV感染に続いて野生型マウスよりも大きい炎症応答を例示した。これらの発見は、SP-Dが、in vivoでのRSV感染の後に肺における生体の防御および炎症の調節において重要な役割を果たすことを例証する。

20

## 【0097】

実施例14

SP-D(-/-)マウスからの菌のクリアランス

マウスを以下のように感染させる：菌類病原菌の適切なプロトタイプを用いる。感染性病原菌を、適切に精製し、適切な緩衝液中に懸濁し、SP-D(-/-)マウス中にSP-Dと共に、またはこれを含めずに気管内に投与する(実施例12および13におけるように)。菌プロトタイプを、適切な用量において投与する。SP-D(-/-)マウスおよびSP-D(+/-)マウスを用いて、感染に対するマウスの罹病性におけるSP-Dの効果を試験する。SP-Dタンパク質を含む、または含まないSP-D(-/-)マウスを用いて、感染についての治療としてSP-Dを試験する。感染のクリアランスを、実施例12および13におけるように、および以下のようにして評価する：

30

## 【0098】

菌クリアランスを、動物に感染性病原菌またはSP-Dを含む感染性病原菌を接種した6、24および48時間後において肺および脾臓ホモジネートを精製することにより、決定した。肺からの細菌クリアランスを、SP-D濃度を適切に変化させた後に決定した。また、定量的培養を、SP-D(+/-)マウスについて決定して、SP-Dの50%の減少が、細菌またはウィルスクリアランスについて十分な内因性SP-Dを提供するか否かを決定する。

40

## 【0099】

哺乳動物SP-Dの適切な濃度を、肺感染症の治療のために他の哺乳動物において用いる。

## 【0100】

50

### SP-Dレベルを調節する薬剤

通常の機能および肺の発達におけるSP-Dの重要性は、SP-D(-/-)ヌルマウスにより明確に例証される。したがって、SP-Dの生成、発現または作用を調節する薬剤は、重要な将来的な薬剤であり、さらにこのような薬剤を同定するための実験的補剤である。このような薬剤を同定するための多くの手法は、当業者には自明であろう。実施例15および16は、これらの手法の2つについての試料プロトコルを概説する。実施例17は、IL-4が、*in vivo*においてSP-Dレベルを顕著に増大させ、したがってSP-Dを付加したかまたは付加しない種々の肺疾患を治療するのに用いることができることを示す。

#### 【0101】

10

##### 実施例15

#### SP-Dプロモーターと相互作用するタンパク質

SP-Dプロモーターを用いて1つのハイブリッドを行い、SP-Dの発現を上方調節するタンパク質を同定する。次に、これらのタンパク質を、SP-D(-/-)マウスにおいて、気腫並びに実施例8における他の肺疾患および感染症の治療の効率について試験する。

#### 【0102】

##### 実施例16

#### SP-Dタンパク質と直接相互作用するタンパク質

2つのハイブリッド手法を行い、SP-Dタンパク質と直接相互作用するタンパク質を同定する。次に、これらのタンパク質を、SP-D(-/-)マウスにおいて、気腫並びに実施例8における他の肺疾患および感染症の治療の効率について試験する。

20

#### 【0103】

##### 実施例17

#### IL-4は、*in vivo*でのSP-Dレベルを上昇させる

クララ細胞においてIL-4を発現するマウス(CCSP-IL-4)は、慢性気道炎症および肺胞タンパク質症状症候群を発生する。表面活性剤ホメオスタシスにおけるIL-4の役割を同定するために、本発明者等は、*in vivo*でのCCSP-IL-4マウスの肺における脂質およびタンパク質代謝を測定した。肺胞の飽和ホスファチジルコリン(Sat PC)蓄積を、6.5倍増加させ、肺組織Sat PC蓄積を、IL-4トランスジェニックマウスにおいて4.8倍増大させた(図15参照)。SP-Dは、野生型マウスと比較して、IL-4マウスにおいて約90倍増加し、SP-D mRNAの2.8倍の増加に関連した(図15参照)。パルミチン酸塩およびコリンのSat PCへの導入は、CCSP-IL-4マウスにおいて約2倍増加した。CCSP-IL-4マウスの肺からのSat PCの正味のクリアランスは、野生型のマウス(10.3モル/kg)よりも、IL-4マウスにおいて6倍高かった(60モル/kg)。クララ細胞におけるIL-4の発現は、表面活性剤脂質合成およびクリアランスを増大させたが、これは、SP-Dタンパク質における選択的増大に関連する増大した表面活性剤蓄積および肺胞タンパク質症との新たな平衡を確立し、肺表面活性剤ホメオスタシスの従来予測されなかった効果を例証する。

30

40

#### 【0104】

#### SP-Dタンパク質または配列を用いた診断

SP-Dは、正常な肺の機能および発達に重要である。SP-D(-/-)マウスは、気腫のモデルである。次に、これは、遺伝子またはSP-Dについての遺伝子の対立遺伝子における突然変異が、肺疾患罹病性に対して顕著な効果を有することを示唆する。したがって、突然変異または対立遺伝子、および突然変異体タンパク質を同定する方法は、気腫、肺感染症および多くの他の呼吸疾患の恐れのある個体を同定する。実施例18および19は、これらの診断手法の試料プロトコルである。

#### 【0105】

#### SP-D遺伝子における突然変異を有する患者の診断

50

## 実施例 18

S P - D 遺伝子における突然変異は、気腫の兆候および病因論に關与する傾向がある。したがって、突然変異は、統計的に有意な数の患者の配列分析により同定される。これらの突然変異を用いて、診断試験を得る。S P - D 遺伝子における突然変異は、以下の方法により検出される：適切なプライマーを用いた S P - D 遺伝子の P C R 分析を実施する。得られた P C R フラグメントを、S S C P により分析し、配列決定して、突然変異または対立遺伝子を決定する。あるいはまた、ゲノム D N A または c D N A のディファレンシャルハイブリダイゼーションを用いて、突然変異を検出する。

【0106】

突然変異体 S P - D タンパク質を有する患者の診断

10

## 実施例 19

気腫および他の肺疾患に關連する突然変異体 S P - D タンパク質または S P - D の対立遺伝子の特異的に認識するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を得る。次に、これらの抗体を用いて、これらの肺疾患に対する酵素結合イムノアッセイを行う。実施例 20 の抗体を、このアッセイに用いることができる。

【0107】

実施例 20 は、トランスジェニック技術を用いたポリクローナル抗体の精製またはモノクローナル抗体のさらなる精製についてのプロトコルを示す。

【0108】

## 実施例 20

20

S P - D 特異的モノクローナルおよびポリクローナル抗体の精製

高い反応性での特異的なポリクローナル抗体の生成は、關連する抗原の広範囲な精製を必要とする。本発明者等は、投与のための關連する抗原に關して高い力価を有し、不純物と反応性である抗体を得た部分的に精製された抗原を用いて、いくつかのポリクローナル抗体を開発した。トランスジェニックマウスからの組織固体相を用いて、これらの抗血清から非特異的抗体を除去した。表面活性剤タンパク質 D ( S P - D ) を、マンガン溶出液を有するマルトースカラムを用いて、精製した。精製した S P - D を、不完全フロイントアジュバント中のニューゼランドラビット中に注入した。得られた抗血清を、ウエスタンブロットにおいて全肺洗浄液に対して試験し、S P - D および他のタンパク質に対する結合を明らかにした。この抗血清を、S P - D タンパク質を生成しないヌル突然変異体マウスからの肺ホモジネート固体相と共に一夜反応させた。抗血清を、S P - D に対してのみ反応性を示す吸着の後に、全肺洗浄液に対して反応させた。また、この抗血清を、免疫組織化学的実験において評価し、これは、S P - D ヌル突然変異体マウスからの肺切片に対する極めて低い反応性および正常な対照マウスにおける極めて特異的な I I 型細胞反応性を例証した。この手法は、高い力価を有する高度に特異的な抗体を調製する能力を大きく増強し、吸着抗体を用いる際のブロッキング剤を用いる必要性を解消する。

30

【0109】

この抗体は、診断、精製および S P - D タンパク質の他の研究に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 A、図 1 B、図 1 C および図 1 D。

40

S P - D ( - / - ) マウスの齡および齡一致した S P - D ( + / + ) 対照との気室 ( a ) および呼吸系組織 ( b ) の部分領域 ( % F x A r e a ) における変化の比較。各個別の遺伝子型についての齡に伴うこれらのパラメーターの変化 ( c および d )。データは % 部分領域として表現し、平均 ± S E を示す。

【図 2】 S P - D ( + / + ) マウスおよび S P - D ( - / - ) マウスの収縮葉の圧力容積曲線。データは m l / k g として表し、平均 ± S E を示す。

【図 3】 S P - D ( - / - ) マウスからの肺ホモジネートにおけるプロ炎症サイトカイン。T N F - 、I L - 1、I L - 6 および M I P - 2 の濃度は、S P - D ( - / - ) マウス ( 黒塗り棒 ) および S P - D ( + / + ) マウス ( 斜線棒 ) からの肺ホモジネートにおいて評価した。データは、p g / m l で表し、群あたり n = 5 で平均 ± S E を示す； S P -

50

D (+ / +) マウスと比較して、\*  $p < 0.05$ 。

【図4】 SP-D (- / -) マウス (黒塗り棒) からの肺胞マクロファージにおける過酸化水素生成を、PMA 刺激を有するおよび有さない SP-D (+ / +) マウス (斜線棒) と比較して気管支肺胞洗浄液 (BALF) から単離した  $1 \times 10^8$  マクロファージから評価した。データを、 $H_2O_2$  の M として表し、群あたり  $n = 4$  で平均  $\pm$  SE を示す； SP-D (+ / +) マウスと比較して、\*  $p < 0.05$ 。

【図5】 B 群ストレプトコッカス (GBS) で感染させた後の SP-D (- / -) マウスおよび SP-D (+ / +) マウスにおける肺のコロニー数。

【図6】 ヘモフィルス・インフルエンザ (H. flu) で感染させた後の SP-D (- / -) マウスおよび SP-D (+ / +) マウスにおける肺のコロニー数。

10

【図7】 図7A および図7B。

GBS および H. flu で感染させた後の気管支肺胞洗浄 (BAL) 液における合計細胞数。

【図8】 図8A および図8B。

GBS および H. flu で感染させた後の肺ホモジネートにおけるサイトカインレベル。

【図9】 図9A および図9B。

GBS および H. flu で感染させた後の BAL 亜硝酸塩レベル。

【図10】 図10A および B。

GBS および H. flu で感染させた後の光学顕微鏡により分析した食作用および FACS 分析。

20

【図11】 図11A および図11B。

GBS および H. flu で感染させた後の BAL から単離されたマクロファージにおける過酸化水素およびスーパーオキシドレベル。

【図12】 SP-D (- / -) マウスに対する SP-D タンパク質処理の効果。

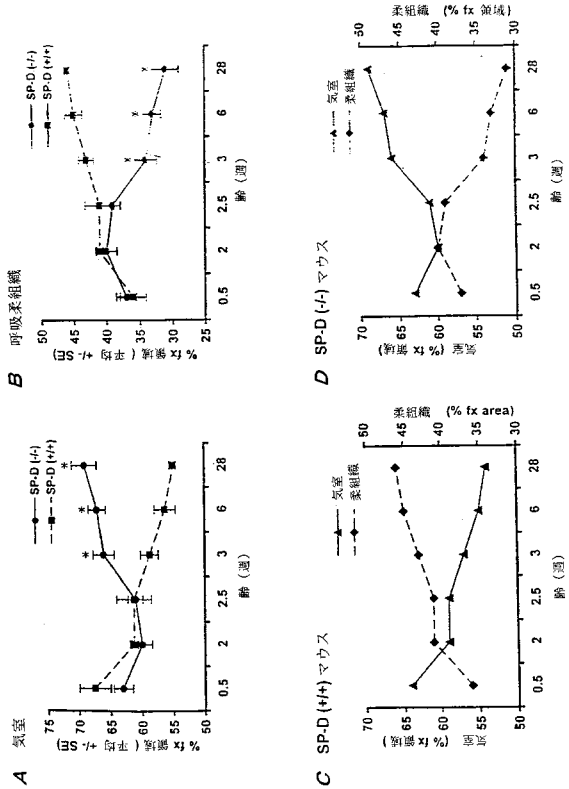
【図13】 図13A および図13B。

マウスにおける SP-D タンパク質の全肺および肺胞クリアランスカイネティクス。

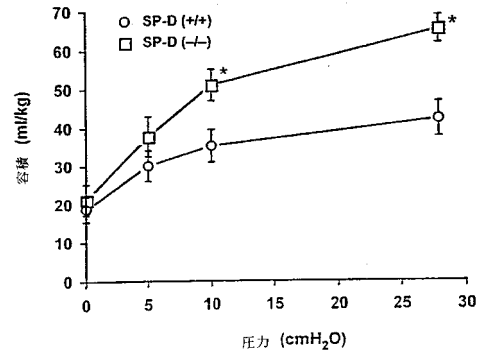
【図14】 ラット SP-D cDNA を含むアデノウイルスベクター Ad-rSPD。

【図15】 野生型マウスおよび CCSP-IL-4 マウス (IL-4 マウス) からの肺胞洗浄における SP-A および SP-D のイムノプロットの定量。  $p < 0.01$ 。

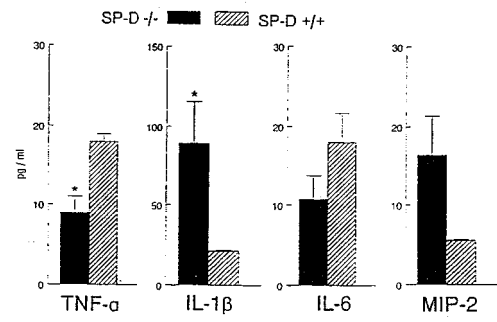
【 図 1 】



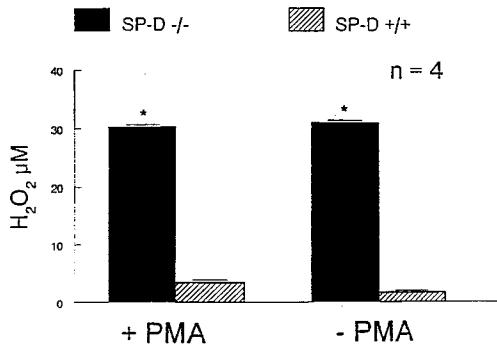
【 図 2 】



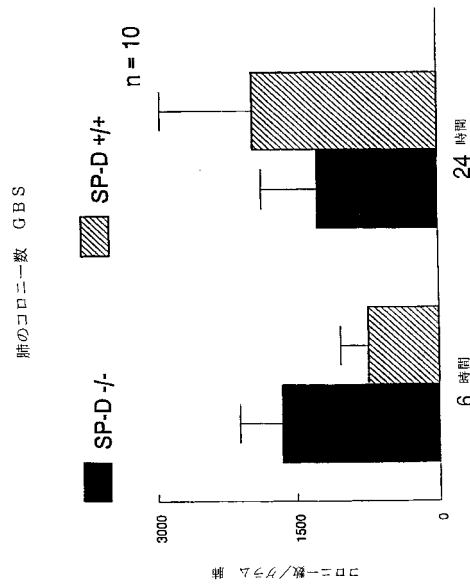
【 図 3 】



【 図 4 】

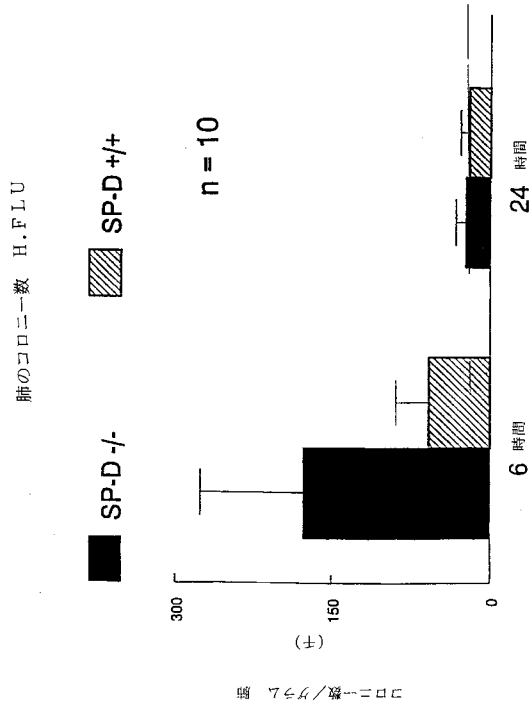


【 図 5 】

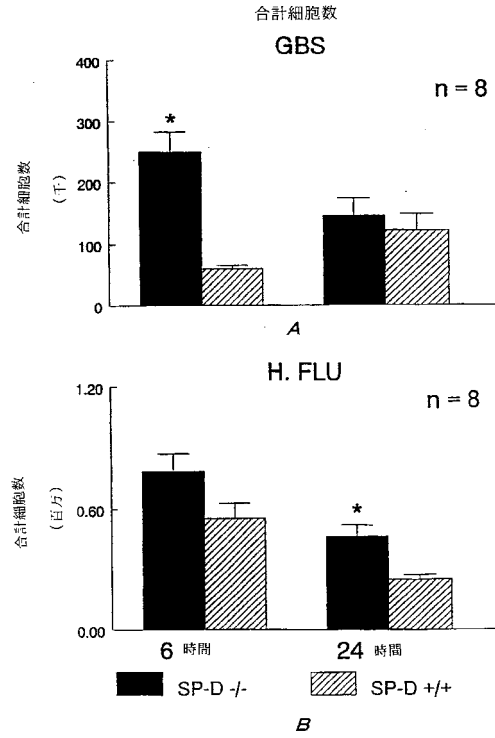




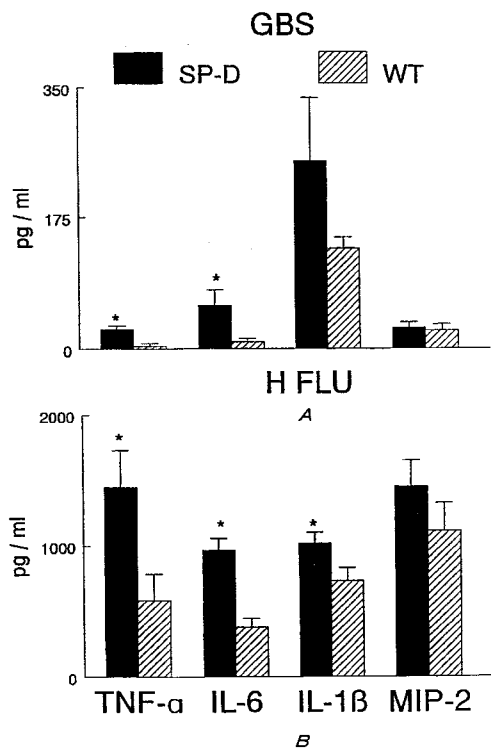
【図6】



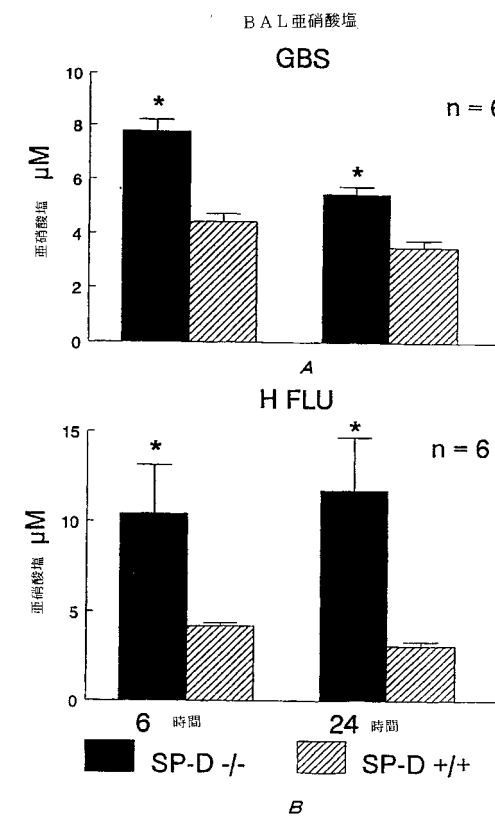
【図7】



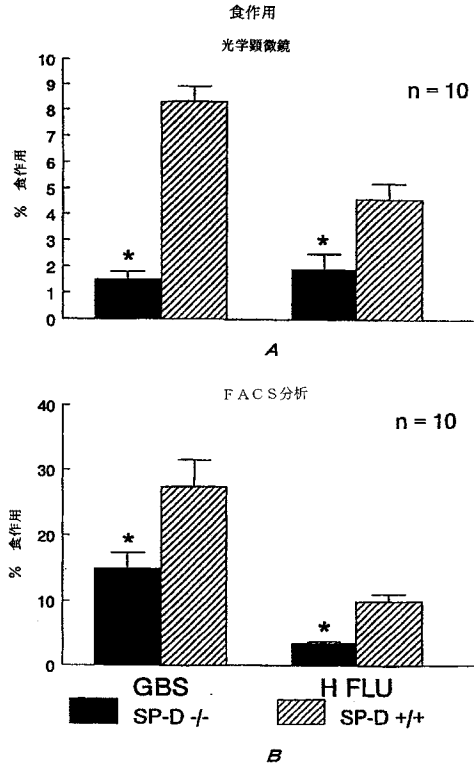
【図8】



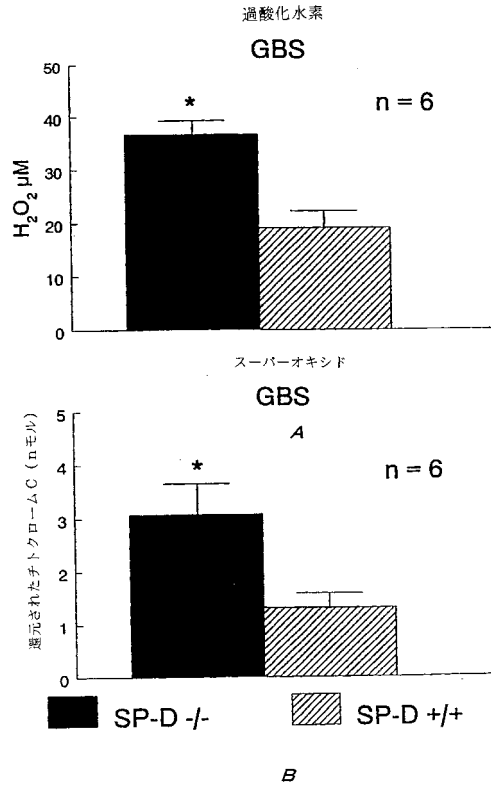
【図9】



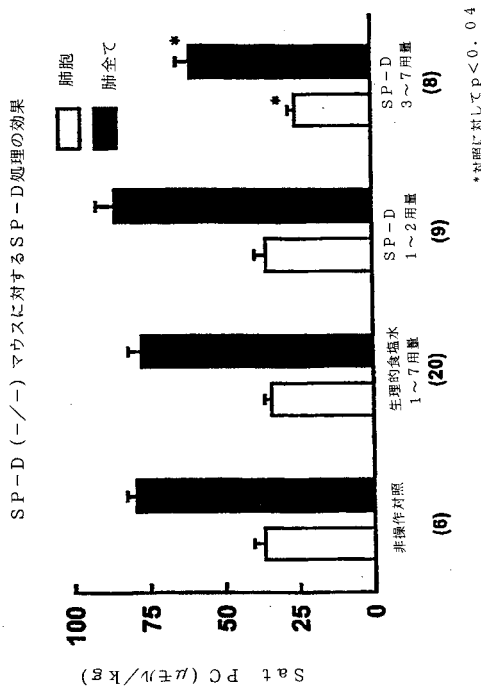
【図10】



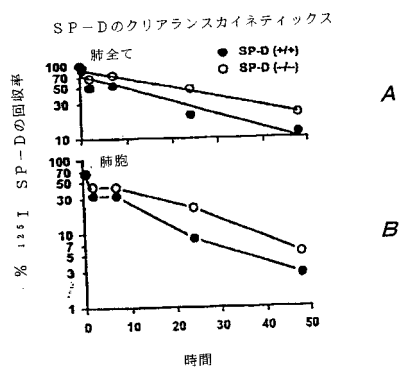
【図11】



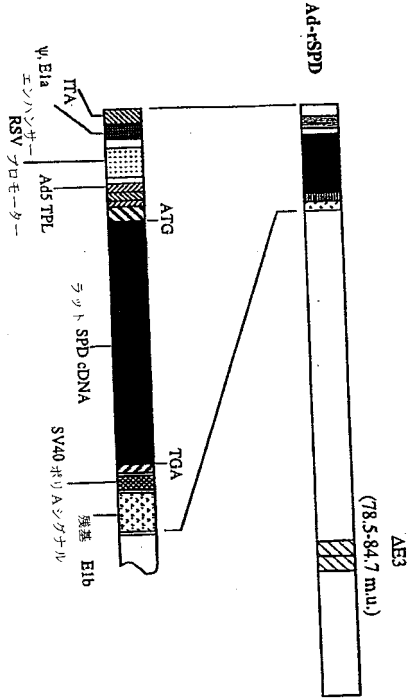
【図12】



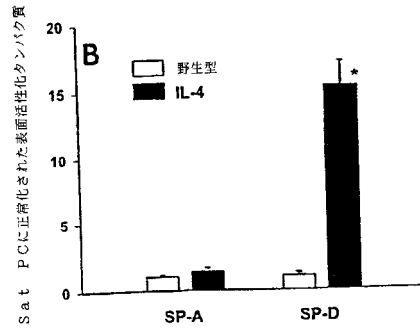
【図13】



【 図 14 】



【 図 15 】



## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.   |               | F I              |                |                       |
|----------------|---------------|------------------|----------------|-----------------------|
| <i>C 1 2 Q</i> | <i>1/68</i>   | <i>(2006.01)</i> | <i>C 1 2 Q</i> | <i>1/68</i> <i>A</i>  |
| <i>G 0 1 N</i> | <i>33/15</i>  | <i>(2006.01)</i> | <i>G 0 1 N</i> | <i>33/15</i> <i>Z</i> |
| <i>G 0 1 N</i> | <i>33/50</i>  | <i>(2006.01)</i> | <i>G 0 1 N</i> | <i>33/50</i> <i>Z</i> |
| <i>G 0 1 N</i> | <i>33/53</i>  | <i>(2006.01)</i> | <i>G 0 1 N</i> | <i>33/53</i> <i>D</i> |
| <i>G 0 1 N</i> | <i>33/566</i> | <i>(2006.01)</i> | <i>G 0 1 N</i> | <i>33/566</i>         |

審査官 守安 智

## (56) 参考文献 特表平 0 9 - 5 0 0 7 8 2 ( J P , A )

J. CLIN. INVEST. , 1 9 9 4 年 , 94(1) , P.311-319

J. CLIN. INVEST. , 1 9 9 2 年 , 90(1) , P.97-106

AM. J .RESPIR. CRIT. CARE MED. , 1 9 9 8 年 8 月 , 158(2) , P.510-518

BIOCHEM. J. , 1 9 9 2 年 , 286(PT1) , P.5-8

日本界面医学会雑誌 , 1 9 9 5 年 , 26(1/2) , P.1-13

日本臨床 , 1 9 9 6 年 , 54(2) , P.334-340

PROC. NATL. ACAD. SCI. USA , 1 9 9 8 年 9 月 2 9 日 , 95(20) , P.11869-11874

INFCT. IMMUN. , 1 9 9 8 年 9 月 , 66(9) , P.4229-4236

## (58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/00-38/58

A61K 48/00

PudMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)