

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6494594号
(P6494594)

(45) 発行日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日(2019.3.15)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15 Z
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10

請求項の数 2 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2016-505286 (P2016-505286)	(73) 特許権者	504173471
(86) (22) 出願日	平成27年2月26日 (2015.2.26)		国立大学法人北海道大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/055547		北海道札幌市北区北8条西5丁目
(87) 国際公開番号	W02015/129791	(74) 代理人	110002480
(87) 国際公開日	平成27年9月3日 (2015.9.3)		特許業務法人 I P アシスト特許事務所
審査請求日	平成30年2月6日 (2018.2.6)	(74) 代理人	100113332
(31) 優先権主張番号	特願2014-36070 (P2014-36070)		弁理士 一入 章夫
(32) 優先日	平成26年2月26日 (2014.2.26)	(74) 代理人	100160037
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 金子 真紀
		(72) 発明者	筒井 裕之
			北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大 学法人北海道大学内
		(72) 発明者	絹川 真太郎
			北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大 学法人北海道大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単核球細胞を GM - C S F および I L - 2 の存在下で培養する工程
、ならびに

培養された細胞を - ガラクトシルセラミドでパルスする工程
を含む方法により得られる樹状細胞を有効成分として含有する、心筋梗塞もしくはその合併症または虚血再灌流障害の予防および/または治療のための医薬。

【請求項 2】

単核球細胞を GM - C S F および I L - 2 の存在下で培養する工程
、ならびに

培養された細胞を - ガラクトシルセラミドでパルスする工程
を含む、心筋梗塞もしくはその合併症または虚血再灌流障害の予防および/または治療のための - ガラクトシルセラミドでパルスされた樹状細胞を有効成分として含有する医薬の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 - ガラクトシルセラミドをパルスした樹状細胞を含有する、T h 2 型サイトカインが有効な疾患の予防および/または治療のための医薬ならびにその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

心筋梗塞や脳血管障害などの心血管病は、悪性腫瘍と並ぶ主要死因である。これら心血管病の終末病態である心不全の患者は増加の一途をたどっており、人口の高齢化、心不全の原因となる生活習慣病の増加、急性心筋梗塞に対する急性期治療の普及と治療成績の向上などにより、患者数は100万人を超えるとされている。

【0003】

近年の薬物療法および非薬物療法の進歩によって、心不全患者の予後は格段に改善してきた。しかしながら、これら様々な心不全治療法によっても重症例の予後は未だに不良であり、患者は増悪による入院を反復し、最終的には死に至る。したがって、心筋梗塞や心不全を含む心血管病の新たな治療法の開発へのニーズは極めて高い。

10

【0004】

Tリンパ球の一種であるナチュラルキラーT(NKT)細胞は、NK細胞とT細胞の受容体を同時に発現するT細胞亜群である。そのT細胞受容体は可変性のない鎖を有し、マウスではV14-J18、ヒトではV24-J18であることが知られている。NKT細胞はMHCクラスI様分子であるCD1d分子により提示された糖脂質抗原を認識し、活性化される。活性化されたNKT細胞は、インターフェロン(IFN)- γ 、腫瘍壊死因子(TNF)- α を代表とするTヘルパータイプ(Th)1型サイトカイン、またはインターロイキン(IL)-4、IL-10を代表とするTh2型サイトカインを迅速にかつ大量に産生し、獲得免疫反応を形成する。このように、NKT細胞は自然免疫と獲得免疫の架け橋として機能し、組織炎症を統制していると考えられている(非特許文献1)。

20

【0005】

NKT細胞の内因性のリガンドはいまだ明らかになっていないが、 α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)は特異的にNKT細胞を活性化させることが知られており(非特許文献2)、これを用いたNKT細胞の研究は多数報告されている。過去の動物実験では、 α -GalCerの投与により1型糖尿病、自己免疫性脳脊髄炎、関節リウマチ、腸炎、肝臓虚血再灌流障害が改善されたことが報告されている(非特許文献3~7)。また本発明者らは、心筋梗塞後心不全モデル、心臓虚血再灌流障害モデルおよび腹部大動脈瘤モデルにおいて、 α -GalCer全身投与による治療効果を確認している(非特許文献8~10)。

30

【0006】

このような研究成果は、 α -GalCerによるNKT細胞の活性化が、新たな心血管病治療法を提供する可能性を支持するものである。しかしながら、 α -GalCerによるNKT細胞の活性化は一過性であり、繰り返し投与した場合は薬効が低下すること、および α -GalCerの全身投与は肝障害を引き起こすことから、 α -GalCerの臨床応用は困難であった。

【0007】

近年、 α -GalCerをパルスした樹状細胞によるNKT細胞活性化の手法が開発され(非特許文献11)、肺がん・頭頸部がんを対象に臨床試験が実施された(非特許文献12など)。

40

【0008】

NKT細胞を用いた細胞免疫療法においては、NKT細胞の免疫応答の方向性を制御することが、治療の成否を左右する。すなわち、Th1型サイトカインが治療上有効であることが知られているがんや感染症などの疾患を治療対象とする場合、NKT細胞の免疫応答をTh1型にシフトさせる必要がある。例えば、前述の肺がん・頭頸部がんを対象とした臨床試験においても、使用されたNKT細胞は、Th1型サイトカインであるIFN- γ の発現増加が顕著に認められている。

【0009】

一方、自己免疫性疾患や移植片対宿主病などの疾患を治療対象とする場合、NKT細胞

50

の免疫応答をTh2型にシフトさせる必要がある。例えば、実験的自己免疫脳脊髄炎モデルにおいて、*-GalCer*および抗CD86抗体で処理した抗原提示細胞を投与することによりTh2型へのシフトを起こすと、病状は改善された（非特許文献13）。

【0010】

非特許文献13はまた、*-GalCer*および抗CD40抗体で処理した抗原提示細胞を投与することによりTh1型へのシフトを引き起こすと、逆に病態が悪化することも明らかにしている。このことは、NKT細胞の免疫応答の制御は疾患の治療において極めて重要であり、その制御を誤ると疾患をかえって増悪させ得ることを示唆している。

【0011】

心血管病の治療のためには、NKT細胞を、IL-10を中心としたTh2型サイトカインを産生する方向に誘導することが重要である（非特許文献8～10）。NKT細胞をTh2型にシフトさせる能力を持つ*-GalCer*パルス樹状細胞を調製する従来の方法としては、上述の抗CD86抗体を用いる方法のほか、例えば特許文献1に記載されるような*-GalCer*誘導體で樹状細胞をパルスする方法などがあるが、有効性や安全性などの臨床応用の観点から十分なものではなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】WO2003/016326号パンフレット

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Godfrey DI, et al., Nat. Rev. Immunol, 2007; 7: 505 - 518

【非特許文献2】Van Kaer L. Nat. Rev. Immunol, 2005; 5: 31 - 42

【非特許文献3】Cao Z, et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol, 2009; 297: G249 - 258

【非特許文献4】Singh AK, et al., J. Exp. Med, 2001; 194: 1801 - 1811

【非特許文献5】Miellet A, et al., Eur. J. Immunol, 2005; 35: 3704 - 3713

【非特許文献6】Ronet C, et al., J. Immunol, 2005; 175: 899 - 908

【非特許文献7】Sharif S, et al., Nat. Med, 2001; 7: 1057 - 1062

【非特許文献8】Sobirin M. A. et al., Circ. Res. 2012; 111: 1037 - 1047

【非特許文献9】Homma T. et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 2013; 62: 179 - 188

【非特許文献10】Saito A. et al., "Activation of invariant natural killer T cells ameliorates the development of angiotensin II-mediated abdominal aortic aneurysm formation in obese ob/ob mice."、2013年11月19日、American Heart Association Scientific Session 2013、[2014年2月25日検索]、インターネット<<http://www.abstractsonline.com/plan/ViewAbstract.aspx?mID=3281&sKey=b063f1cf-d113-4296-bdf4-48183826fa33&cKey=02cc3289-0d67-466d-bd4b-c9473388e726&mKey=951e351e-429c-4b2>>

10

20

30

40

50

e - 8 4 d 0 - 8 d a 7 3 b 0 0 d e 4 5 # >

【非特許文献11】Ishikawa E. et al., Int. J. Cancer 2005; 117: 265 - 273

【非特許文献12】Ishikawa A. et al., Clin. Cancer Res. 2005; 11: 1910 - 1917

【非特許文献13】Endre Pal, et al., J. Immunol. 2001; 166: 662 - 668

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、心血管病などのTh2型サイトカインが有効な疾患を予防および/または治療するための細胞免疫療法に用いる新たな医薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、全く意外なことに、NK T細胞の免疫応答をTh1型にシフトさせる能力を持つ - GalCerパルス樹状細胞を調製する方法として知られていた方法を用いて樹状細胞を調製し、これをTh2型サイトカインが治療に有効とされる心血管病を有する個体に投与したところ、生存率の向上および心機能の改善がもたらされることを見出し、以下の発明を完成させた。

【0016】

(1)

単核球細胞をGM-CSFおよびIL-2の存在下で培養する工程、ならびに培養された細胞を - ガラクトシルセラミドでパルスする工程を含む方法により得られる樹状細胞を含有する、心血管病の予防および/または治療のための医薬。

(2)

前記心血管病が心筋梗塞もしくはその合併症、虚血再灌流障害または動脈瘤である、(1)に記載の医薬。

(3)

単核球細胞をGM-CSFおよびIL-2の存在下で培養する工程、ならびに培養された細胞を - ガラクトシルセラミドでパルスする工程を含む、心血管病の予防および/または治療のための医薬の製造方法。

【発明の効果】

【0017】

本発明によると、従来はNK T細胞の免疫応答をTh1型にシフトさせる能力を持つ樹状細胞を調製する方法として知られていた方法により製造される樹状細胞を用いて心血管病などのTh2型サイトカインが有効な疾患を予防および/または治療することができる。この樹状細胞は、培養後の単核球画分の分離を必要とせずに調製できることから、細胞調製工程を簡略化でき、操作性および経済性の両方において利点がある。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】PBSまたは - GalCer / DCを投与した心筋梗塞後心不全モデルマウスの生存率を示すグラフである。

【図2】PBSまたは - GalCer / DCを投与した心筋梗塞後心不全モデルマウスの左室拡張末期径(左)および左室収縮末期径(中央)および左室短縮率(右)を表すグラフである。

【図3】PBS、DCまたは - GalCer / DCを投与した心筋虚血再灌流モデルマウスの心筋梗塞および虚血の状態を表す図である。上段はEvans BlueおよびTTCで染色した心臓左室スライスの一例を示す写真であり、下段は染色結果に基づいて算出された梗塞サイズ(左)および虚血リスク範囲(右)のグラフである。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の第一の態様は、単核球細胞を顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）およびIL-2の存在下で培養する工程、ならびに培養された細胞を - GalCer でパルスする工程を含む方法により得られる樹状細胞を含有する、Th2型サイトカインが有効な疾患の予防および/または治療のための医薬に関する。また、本発明の第二の態様は、第一の態様である医薬を製造する方法に関する。

【0020】

本発明の医薬に含有される樹状細胞は、単核球細胞をGM-CSFおよびIL-2の存在下で培養する工程ならびに培養された細胞を - GalCer でパルスする工程を含む方法により得られる樹状細胞である。

10

【0021】

本発明の医薬に含まれる樹状細胞を調製する方法は、単核球細胞をGM-CSFおよびIL-2の存在下で培養する工程（以下、培養工程と表す）ならびに培養された細胞を - GalCer でパルスする工程（以下、パルス工程と表す）を含み、この方法は例えば非特許文献11に記載されている。

【0022】

培養工程は、通常の方法に従って分離された単核球細胞を、GM-CSFおよびIL-2を含有する適当な培地で培養する工程であり、かかる工程によって単核球細胞は樹状細胞へと分化誘導される。単核球細胞は、様々な動物組織から分離することができ、典型的には例えば末梢血またはアフエレーシス細胞液から密度勾配遠心法などによって分離することができる。

20

【0023】

単核球細胞は、その後の樹状細胞投与の際の安全性を考慮した場合、細胞を投与する対象と同種または近縁種の動物から採取するのが好ましい。例えば、対象がヒトである場合、好ましくは同種であるヒトから採取された細胞が、より好ましくは投与を受けるヒト自身から採取された細胞、すなわち自己単核球細胞が用いられる。

【0024】

培養工程および後述のパルス工程において用いられる培地は、単核球細胞から樹状細胞を分化誘導するとき通常用いられる培地、例えばAIM-V培地やRPMI-1640培地などであり、必要に応じて血清、血漿またはアルブミンなどの他の成分を添加してもよい。培養工程では、これらの培地にGM-CSFを最終濃度が500~1000U/mL、好ましくは約800U/mLになるように、およびIL-2を最終濃度が50~200JRU/mL、好ましくは約100JRU/mLになるように添加したものをを用いて、単核球細胞を5~10日間、培養する。

30

【0025】

パルス工程は、培養工程により調製された樹状細胞を - GalCer でパルスする工程であり、具体的には - GalCer を最終濃度50~200ng/mL、好ましくは約100ng/mLで含有する培地中で、樹状細胞を8~48時間培養することにより行われる。パルス工程において用いられる - GalCer は、 - ガラクトシルセラミドそのもののほか、その塩、エステル、または誘導體（例えば、Tashiro T., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012; 76(6): 1055-67に記載されるものなど）であってもよい。 - GalCer は、フナコシ株式会社、株式会社レグイミューンなどから購入することができる。

40

【0026】

培養工程とパルス工程とは各々別々に行ってもよく、または培養工程の後半で - GalCer を培地に添加することにより培養工程とパルス工程を同時に行うこともできる。

【0027】

単核球細胞、および培養工程により得られる樹状細胞は、通常の方法に従って凍結保存し、必要な時に融解してその後の工程に用いてもよい。同様に、パルス工程により得られ

50

る - GalCer をパルスした樹状細胞は、調製後に凍結保存し、必要な時に融解して、本発明の医薬として用いることもできる。

【0028】

上述のように調製された - GalCer をパルスした樹状細胞は、投与された対象の体内でTh2型サイトカインの産生を誘導または促進し、それ故に疾患に対する予防および/または治療効果を発揮するものと考えられる。 - GalCer パルス樹状細胞が持つかかる効果は、疾患を反映した評価系、例えば疾患モデル動物や疾患モデル動物由来細胞などを用いて、確認することができる。樹状細胞によって疾患の罹患もしくは発症が予防された場合、または病状が改善された、もしくは病状の悪化が抑制された場合、その樹状細胞は疾患に対する予防および/または治療効果を有すると判断される。ここで用いる評価系は、治療予定の疾患と同じまたは関連のある疾患についての評価系であるのが好ましい。

10

【0029】

ある実施形態においては、 - GalCer パルス樹状細胞の予防および/または治療効果は、 - GalCer パルス樹状細胞を投与した対象から血液や臓器などの試料を採取し、その中に含まれるTh2型サイトカインの量またはその遺伝子発現の量を測定することによって確認することもできる。また、対象から予めNK細胞を含む試料を採取し、 - GalCer パルス樹状細胞と接触させた後、NK細胞のTh2型サイトカイン産生量または遺伝子発現量を測定することによって確認してもよい。

【0030】

Th2型サイトカインの例としては、IL-4、IL-10、IL-13、IL-21、TGF(Transfoming growth factor) - などが挙げられる(非特許文献1)。 - GalCer パルス樹状細胞によって上記試料中のこれらのサイトカインの量またはその遺伝子発現量が増加した場合、その - GalCer パルス樹状細胞はTh2型サイトカインが有効な疾患の予防および/または治療に適していると判断される。これらのサイトカインまたはその遺伝子発現の量を測定する方法は、イムノアッセイ、RT-PCRその他の当業者に公知の方法により行うことができる。

20

【0031】

本発明の第一の態様である医薬は、Th2型サイトカインが有効な疾患に罹患した、または罹患するおそれのある対象に投与することにより、かかる疾患を予防および/または治療するために用いることができる。

30

【0032】

本発明における対象とは、Th2型サイトカインが有効な疾患に罹患し得る任意の動物を意味し、好ましくは哺乳動物の個体、例えば、ヒト、チンパンジーなどの霊長類、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどの齧歯類、ウシ、ヤギ、ヒツジなどの偶蹄目、ウマなどの奇蹄目、ウサギ、イヌ、ネコなどの個体であり、さらに好ましくはヒトの個体である。

【0033】

Th2型サイトカインが有効な疾患(「Th2型サイトカイン奏功性疾患」ともいう)とは、Th2型サイトカインを対象に投与することにより、または対象体内のTh2型サイトカインの産生を誘導もしくは促進することにより、予防および/または治療される任意の疾患であり、好ましくは、対象への - GalCer の投与により対象体内におけるTh2型サイトカインの産生を誘導または促進することで予防および/または治療される疾患である。これらの疾患としては、例えば炎症性疾患、自己免疫性疾患または心血管病が挙げられ、とりわけ心血管病が好適である。炎症性疾患としては移植片対宿主病、肝炎、肝硬変、閉塞性肺疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ベーチェット病などが挙げられ、自己免疫性疾患としては関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、多発性筋炎、皮膚筋炎、強皮症、甲状腺機能亢進症、自己免疫性副腎機能障害、真正赤血球性貧血、多発性硬化症およびリウマチ性心臓炎などが挙げられる。また、心血管病としては、例えば心筋梗塞;心筋梗塞の合併症である心不全、不整脈、乳頭筋断裂、心破裂、

40

50

心室瘤、心筋梗塞後症候群など；虚血再灌流障害；または動脈瘤が挙げられる。

【0034】

なお心筋梗塞などの発症後に迅速な治療を要する疾患の治療においては、予め単核球細胞、培養工程後の樹状細胞または - Gal Cer パルス樹状細胞を調製、凍結保存しておき、発症後、凍結保存細胞から本発明の医薬を速やかに調製して、急性期の患者に投与することが望ましい。

【0035】

本発明の医薬は、疾患の予防、治療のいずれの目的にも用いることができる。予防を目的とする場合、疾患に罹患する可能性がある対象に本発明の医薬を投与することで、疾患への罹患または発症を防ぐことができる。例えば、心筋梗塞を起こした患者に本発明の医薬を投与することで、心筋梗塞合併症の発生を防ぐことができる。また治療を目的とする場合、疾患に罹患した対象に本発明の医薬を投与することで、疾患の進行を遅らせること、進行を止めて疾患の状態を改善すること、または疾患を治癒させることができる。

10

【0036】

本発明の医薬は、 - Gal Cer をパルスした有効量の樹状細胞を含む。本明細書中で用いられる「有効量」とは、疾患を予防および/または治療するのに効果的な量を意味する。かかる有効量は疾患の種類、症状の重症度、患者その他の医学的要因によって適宜調節される。

【0037】

本発明の医薬の好ましい実施形態において、樹状細胞の有効量は、投与される個体の体表面積 1 m^2 あたり 10^6 個 ~ 10^9 個、好ましくは 10^7 個 ~ 10^9 個である。

20

【0038】

本発明の医薬は、通常、注射剤、点滴剤などの非経口製剤の形態で用いられる。非経口製剤に用いることができる担体としては、例えば、生理食塩水や、ブドウ糖、D - ソルビトールなどを含む等張液といった細胞製剤において通常用いられる水性担体が挙げられる。

【0039】

本発明の医薬はさらに、薬学的に許容される緩衝剤、安定剤、保存剤その他の成分を含む組成物であってもよい。薬学的に許容される成分は当業者において周知であり、当業者が通常の実施能力の範囲内で、例えば第十六改正日本薬局方その他の規格書に記載された成分から製剤の形態に応じて適宜選択して使用することができる。

30

【0040】

本発明の医薬の投与方法は、特に制限されないが、非経口製剤である場合は、例えば血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与などを挙げることができる。好ましい実施形態の一つにおいて、本発明の医薬は、静脈内投与により生体に投与される。また、本発明の医薬は、予防および/または治療される疾患に応じて、その他の医薬と併用して使用してもよい。

【0041】

本発明の第三の態様は、 - Gal Cer をパルスした有効量の樹状細胞を含む医薬を対象に投与することを含む、Th2型サイトカインが有効な疾患を予防および/または治療する方法に関する。かかる第三の態様における各用語の意味は、上記の第一の態様において説明したとおりである。

40

【0042】

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の理解を助けるためのものであって、本発明の技術的範囲はこれらにより限定されるものではない。

【実施例】

【0043】

<実施例1 - Gal Cer をパルスした樹状細胞の調製>

- Gal Cer をパルスした樹状細胞は、非特許文献11に記載の方法に従って調製

50

した。以下に具体的な手順を示す。

(1) 単核球細胞の調製

健常成人ドナーから連続式血液成分分離装置を用いてアフエーシス細胞液を採取した。50 mL遠心チューブ中のFicoll-Paque PREMIUM (GEヘルスケア・ジャパン) 20 mLにアフエーシス細胞液26.6 mLを積層し、400 × gで30分間、20 で遠心し、単核球細胞層を回収した。単核球細胞層を同量の生理食塩水で洗浄し、400 × gで10分間、20 で遠心した。沈渣にアルブミン加AIM-V培地 (AIM-V培地 (GIBCO Invitrogen Corporation) 20容量に対して4.4%献血アルブミン (日本製薬) 1容量を添加したもの) を加えて液量を45 mLにした懸濁液を再度遠心した。この操作をさらに1回繰り返した後、得られた沈渣を自己血漿加アルブミン加AIM-V培地 (AIM-V培地40容量に対して健常成人ドナーの血漿を1容量、4.4%献血アルブミンを2容量添加したもの) に懸濁し、細胞濃度が 2.7×10^8 個/mL以下となるように液量を調節して、細胞浮遊液とした。

10

【0044】

細胞浮遊液13.8 mLを25 mL凍結バッグに分注し、抗凝固液ACD-A液 (テルモ) 2 mLおよび凍害保護液CP-1 (極東製薬工業) 9.2 mLを各バッグに添加した後、-80 で凍結保存した。

【0045】

(2) -GalCerをパルスした樹状細胞の調製

20

(1)で凍結保存した単核球細胞を37 で解凍し、2倍容量の4.4%献血アルブミンを加えて洗浄した後、400 × gで5分間、20 で遠心した。沈渣にアルブミン加生理食塩水45 mLを加えて再度洗浄、遠心分離を行い、単核球細胞の沈渣を得た。

【0046】

単核球細胞 1×10^8 個を 225 cm^2 フラスコに播種し、ヒトIL-2 (塩野義製薬) を最終濃度100 JRU/mLで、ヒトGM-CSF (North China Pharmaceutical Group Corporation - GeneTech) を最終濃度800 U/mLで添加した自己血漿加アルブミン加AIM-V培地50 mLを用いて、温度37、CO₂濃度5.0%で7日間培養した。培養3日目および6日目に自己血漿加アルブミン加AIM-V培地50 mLをさらに添加し、ヒトIL-2を最終濃度100 JRU/mLになるように、ヒトGM-CSFを最終濃度800 U/mLになるように添加した。培養6日目に -GalCer (フナコシ) を最終濃度100 ng/mLとなるよう添加した。

30

【0047】

培養終了後、細胞をセルスクレーパーおよびピペティングによりフラスコから回収し、セルストレーナーでろ過後、アルブミン加生理食塩水 (生理食塩水10容量に対して25%献血アルブミン (化学及血清療法研究所) 1容量を添加したもの) 45 mLで洗浄した後、400 × gで5分間、20 で遠心した。沈渣をさらに3回、同様に洗浄した後、アルブミン加生理食塩水10 mLに懸濁した。細胞懸濁液の全量をシリンジで回収し、50 mL生理食塩水ボトルに添加した。これを -GalCer添加樹状細胞 (-GalCer/DC) として以下の実施例で用いた。

40

【0048】

また、 -GalCerを添加しないこと以外は上述と同様の方法で -GalCer非添加樹状細胞 (DC) を調製し、以下の実施例で用いた。

【0049】

<実施例2 心筋梗塞後心不全モデルマウスに対する治療効果>

-GalCer/DCの心筋梗塞に対する治療効果を評価するため、心筋梗塞モデルマウスを用いた試験を行った。心筋梗塞モデルマウスは非特許文献8に記載の方法に従って作成した。すなわち、10~12週齢の雄性C57BL/6Jマウスにペントバルビタ

50

ール (50 mg / kg 体重) を投与して麻酔した後、左側胸部を開胸し、8 - 0 糸を使用して冠動脈左前下行枝を結紮し、心筋梗塞を発生させた。

【0050】

心筋梗塞後マウスを - GalCer / DC 群 (n = 32) および PBS 群 (n = 38) の2群に分け、手術後1日目および4日目に、 - GalCer / DC 群には PBS 200 μ L に懸濁した実施例1の - GalCer / DC 3×10^6 個を、PBS 群には PBS 200 μ L を静脈内投与した。手術後4週間飼育し、カプランマイヤー法により生存曲線を作成した。

【0051】

手術から4週後に心エコー検査を行い、心機能を評価した。心エコー検査は超音波記録装置 EUB - 8000 (日立) を用いて、マウスをペントバルビタールで麻酔して行った。エコー画像から左室拡張末期径および左室収縮期末期径を測定し、左室収縮力の指標となる左室短縮率を (左室拡張末期径 - 左室収縮期末期径) / 左室拡張末期径 $\times 100$ として算出した。

【0052】

結果を図1および図2に示す。PBS 群では手術後1週以内で半数以上の個体が心不全および梗塞巣部位での心破裂を来して死亡したが、 - GalCer / DC 投与群では急性期の心破裂は減少し、観察期間終了時点での生存率も有意に改善した (図1)。

【0053】

左室拡張末期径は、PBS 群において6 mm 程度であり、心筋梗塞発症後の左室リモデリングによる左室拡大を呈していた。一方、 - GalCer / DC 投与群の左室拡張末期径は PBS 群と比較して有意に小さく、 - GalCer / DC 投与による心筋梗塞発症後左室リモデリングの進展抑制が示唆された (図2左)。左室収縮末期径は、 - GalCer / DC 投与群では PBS 群と比較して有意に小さかった (図2中央)。さらに、左室短縮率 (%) は、PBS 群において10%程度と心筋梗塞発症による著しい低下が認められた一方、 - GalCer / DC 投与群では15%程度であり、PBS 群と比較して有意に大きかった (図2右)。

【0054】

以上の結果から、実施例1のヒト - GalCer / DC がマウスにおける心筋梗塞後心不全および心機能を改善することが確認された。

【0055】

< 実施例3 心筋虚血再灌流モデルマウスに対する治療効果 >

- GalCer / DC の虚血再灌流に対する治療効果を評価するため、心筋虚血再灌流モデルマウスを用いた試験を行った。試験に使用したマウス - GalCer / DC および - GalCer 非添加マウス DC は、マウス末梢血から分離した単核球細胞を用いて、実施例1と同様の手順で調製した。

【0056】

心筋虚血再灌流モデルマウスは非特許文献9に記載の方法に従って作成した。すなわち、10 ~ 12 週齢の雄性 C57BL / 6J マウスを - GalCer / DC 群 (n = 10)、DC 群 (n = 7) および PBS 群 (n = 8) の3群に分け、全てのマウスに以下の手順に従って虚血再灌流手術を施した。ペントバルビタール (50 mg / kg 体重) 麻酔下でマウスの左側胸部を開胸し、冠動脈左前下行枝を、冠動脈上に置いた polyethlen - 10 チューブと共に、8 - 0 糸を使用して3回結紮した。心筋が白くなったことで虚血が得られたことを確認した。

【0057】

虚血開始後15分時に、 - GalCer / DC 群には PBS 200 μ L に懸濁したマウス - GalCer / DC 3×10^6 個を、DC 群には PBS 200 μ L に懸濁した - GalCer 非添加マウス DC 3×10^6 個を、PBS 群には PBS 200 μ L を静脈内に投与した。45分の虚血時間の後、再灌流のため冠動脈を結紮した糸を切断し、polyethlen - 10 チューブを除去した。白色となっていた心筋が赤くなること

10

20

30

40

50

で再灌流が得られたことを確認した。

【0058】

続いて、以下のように Evans Blue および TTC での染色を行い、心筋の虚血および梗塞の程度について評価を行った。

【0059】

再灌流から24時間後、2, 2, 2-トリプロモエタノール(2.5% wt/vol、8 μL/g 体重)麻酔下、マウスを開腹し下大静脈を露出させた。左胸部を再開胸し、虚血再灌流手術で結紮した部位と同じ位置で8-0糸を用いて冠動脈を再結紮した。結紮後すみやかに下大静脈に三方活栓をつけた注射器を刺入し、採血を行った。注射器を刺したまま三方活栓の向きを変え、4% Evans Blue (Wako) を下大静脈から0.5 mL 静脈内投与し、非虚血部を Evans Blue により染色することで虚血部と非虚血部とを識別した。

10

【0060】

Evans Blue の投与後、直ちに心臓を摘出し、4 の PBS で洗浄した後、両心房と右室を切除して左室のみを分離した。分離した左室を液体窒素に15秒間浸した後、顕微鏡下で、長軸方向に結紮部位から心尖部が5等分となるようカミソリで左室を輪状に切断した。心尖部端を除く4枚の左室スライスを1.5% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Wako) に浸し、37 で15分間反応させて非梗塞部を赤色に染色した後、10%ホルマリン溶液中に室温で15分間浸漬し、固定した。それぞれの左室スライスの心尖部側を顕微鏡下で撮像し、重量を測定した。撮像された左室スライスの一例を図3上段の写真に示す。Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を使用して左室スライス画像の白色部分、赤色部分、青色部分それぞれの面積を測定し、全体に占める割合を計算した。次いで、各々の左室スライスについて重量に面積割合を乗ずることで各部の重量を近似的に計算し、4スライス分の和を部分ごとに算出した。

20

【0061】

一連の染色により、心筋の「梗塞部」は白色を、「非梗塞虚血部(梗塞には至らなかったが虚血障害をきたした部分)」は赤色を、「非虚血部」は青色を呈する。白色部分の重量合計を梗塞サイズ (Infarct size: IS) として、白色部分および赤色部分の重量合計を虚血にさらされた範囲(虚血リスク範囲、area at risk: AAR)として、白色部、赤色部および青色部の重量合計を左室全体重量(left ventricle: LV)として算出した後、左室心筋の虚血および梗塞の程度を、それぞれ左室全体に占める虚血リスク範囲の割合(AAR/LV)、虚血リスク範囲に占める梗塞に至った範囲の割合(IS/AAR)を指標として評価した。

30

【0062】

結果を図3に示す。梗塞の程度(図3下段左)は、DC群ではPBS群と同等であった一方、-GalCer/DC群では有意に減少しており、-GalCer/DCは虚血再灌流障害を軽減することが明らかとなった。虚血の程度(図3下段右)は3群間で有意な差がなかった。

【0063】

NKT細胞を用いた細胞免疫療法においてはNKT細胞の免疫応答の制御が極めて重要であるところ、NKT細胞をTh1型にシフトさせることが知られている非特許文献11に記載の方法で作製された-GalCer/DCを心血管病の治療に用いることは、かえって疾患の増悪を招くものと考えられていた。しかしながら、非特許文献11と同様の方法で作製された-GalCer/DCは、従来予想に反し、心筋梗塞後心不全および虚血再灌流障害に対する治療効果を示すことが本実施例によって明らかとなった。

40

【産業上の利用可能性】

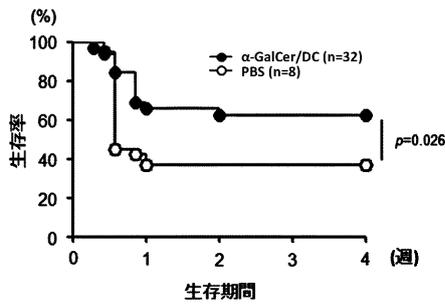
【0064】

本発明によれば、細胞免疫療法において実績のある方法により調製された樹状細胞を用いて、Th2型サイトカインが有効な疾患を予防および/または治療することが可能にな

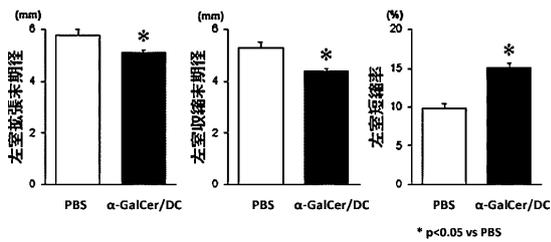
50

る。この樹状細胞調製方法は、がんの細胞免疫療法において既に実績を有することから、信頼性があり、他の細胞免疫療法と比べ、臨床応用が比較的容易である。

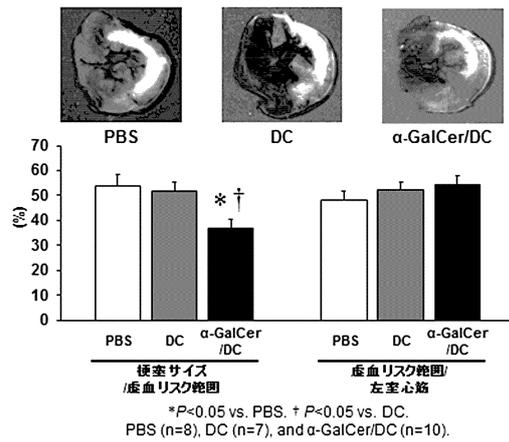
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



* P<0.05 vs. PBS. † P<0.05 vs. DC. PBS (n=8), DC (n=7), and α-GalCer/DC (n=10).

フロントページの続き

- (72)発明者 石森 直樹
北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
- (72)発明者 齋藤 晶理
北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内

審査官 佐々木 大輔

- (56)参考文献 中国特許出願公開第102978160(CN, A)
米国特許出願公開第2010/0008954(US, A1)
国際公開第2007/043630(WO, A1)
Circ. Res., 2012, Vol.111, No.8, pp.1037-1047
J. Mol. Cell. Cardiol., 2013, Vol.62, pp.179-188
医学のあゆみ, 2013, Vol.246, No.3, pp.229-234
Circulation, 2013, Vol.128, A11427
J. Immunol., 2001, Vol.166, No.1, pp.662-668
Int. J. Cancer, 2005, Vol.117, No.2, pp.265-273
J. Immunol. Methods, 2007, Vol.322, No.1-2, pp.70-81
Clin. Cancer Res., 2005, Vol.11, No.5, pp.1910-1917
J. Immunol., 2009, Vol.182, pp.2492-2501

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/768
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)