

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6653054号
(P6653054)

(45) 発行日 令和2年2月26日(2020.2.26)

(24) 登録日 令和2年1月29日(2020.1.29)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z N A D
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

請求項の数 5 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-184356 (P2015-184356)	(73) 特許権者	514039912
(22) 出願日	平成27年9月17日 (2015.9.17)		ナショナル キャンサー センター
(65) 公開番号	特開2017-57173 (P2017-57173A)		大韓民国 10408 キョンギード ゴ
(43) 公開日	平成29年3月23日 (2017.3.23)		ヤン-シ イルサンドン-グ イルサン-
審査請求日	平成30年9月5日 (2018.9.5)		ロ 323
特許法第30条第2項適用 論文 (タイトル「The HIF-1/glia1 TIM-3 axis controls inflammation-associated brain damage under hypoxia」) を「nature COMMUNICATIONS」に掲載 (公開日 2015年3月20日)		(74) 代理人	100091683
			弁理士 ▲吉▼川 俊雄
		(74) 代理人	100179316
			弁理士 市川 寛奈
		(72) 発明者	パク, ウン-ジョン
			大韓民国 06601 ソウル, ソチョ-
			グ, ソチョジュンアン-ロ, 200, # 1
			6-1402

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TIM-3をターゲットとする脳損傷疾患治療用組成物及びこのスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 3) 抗体を有効成分として含む脳損傷疾患の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項2】

前記抗体は、配列番号1のアミノ酸配列で表されるTIM-3に結合するか、これと反応して、TIM-3の活性を特異的に抑制または減少させる拮抗抗体であることを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記TIM-3抗体は、HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) の発現または活性を抑制させることを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記TIM-3抗体は、好中球走化因子 (neutrophil chemotactic factor) の発現または活性を減少させることを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記脳損傷疾患は、脳梗塞、脳卒中、低酸素性脳損傷、虚血性脳疾患及び中風からなる群から選択されることを特徴とする請求項1ないし4のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 3) 抑制剤を有効成分として含む脳損傷疾患の予防または治療用薬学的組成物及びTIM-3を利用した脳損傷疾患治療剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

脳虚血 (cerebral ischaemia) は、複雑な病態生理学的変化を引き起こし、究極的に、特に虚血組織の中心部位 (ischaemic core) を取り囲む半陰影領域 (penumbral area) で脳損傷を引き起こす。このような変化には、常在細胞 (resident cell) の活性化、炎症性メディエーター (inflammatory mediators) の生成及び炎症細胞の浸潤 (infiltration) が含まれる。臨床実験結果によると、脳虚血による炎症反応は、脳損傷の発病と関連があるように見えるが、これと関連した炎症反応については未だ多く知られていない。

【0003】

T-細胞免疫グロブリン及びムチンドメインタンパク質ファミリー (T-cell immunoglobulin and mucin domain protein family) のメンバーであるTIM-3は、TH1-依存的免疫反応を陰的に調節する第1型ヘルパー (helper) T細胞 (TH1) - 特異的表面分子として初めて同定されたが、後続の研究において、TIM-3は、TH17細胞、Tregs、NK細胞、タンパク白血球 (monocytes)、樹脂状細胞、肥満細胞 (mast cells) 及び小膠細胞 (microglia) を含む多様な種類の免疫細胞から発現されて、適応免疫 (adaptive immunity) だけでなく、先天免疫 (innate immunity) も調節するという事実が明かされた。最近の研究結果によると、TIM-3は、先天性免疫細胞の活性化を調節することに重要な役割をし、環境によって活性化マーカーまたは活性化制限因子として作用する。動物モデル及び人体で、TIM-3は、感染、自己免疫疾患及び癌を含む多様な免疫関連疾病と密接な関連があることが表れた。興味深いことに、TIM-3は、細胞の種類と環境によって多様な機能を表すとされる (非特許文献1)。例えば、晩成ウイルス感染及び腫瘍でTIM-3の抑制は、枯渇されたT細胞のエフェクター (effector) 機能を増加させる一方、TIM-3信号伝達の増加は、Th-1-媒介されたEAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) を改善することが表れた。また、自己免疫性肝炎でCD4+CD25-T細胞上のTIM-3水準の減少は、免疫調節の損傷に寄与した一方、晩成C型肝炎では、CD4+及びCD8+T細胞のTIM-3が過発現された。

【0004】

低酸素症 (hypoxia) に対する生理学的反応は、酸素-調節性アルファ-サブユニット (oxygen-regulated - subunit) と構成的ベータ-サブユニット (constitutive - subunit) とからなるヘテロ二量体の (heterodimeric) 転写因子である、HIF (hypoxia-inducible factor) - 1によって主に媒介すると知られている。HIF-1複合体は、低酸素症への適応と関連した様々な遺伝子の低酸素-反応部位 (hypoxic-response elements、HREs) に結合する。興味深いことに、HIF-1は、低酸素環境下だけでなく炎症環境下でも細胞反応を調節し、多くの炎症関連の疾病の発病にも重要な役割をするとされる。生体内 (in vivo) 及び試験管内 (in vitro) の実験において、HIF-1は、骨髄細胞の移動のような骨髄細胞媒介の炎症反応に必須であることが表れた。また、HIF-1活性は、虚血性肺及び腸の損傷後の病原性炎症反応と関連があった。従って、HIF-1は、炎症関連の信号伝達を調節す

10

20

30

40

50

る核心的な調節因子とされる。

【0005】

一方、中枢神経系(CNS)は、免疫寛容地域(immune-privileged regions)であると知られていたが、最近の研究結果で先天性及び後天的適応性免疫反応(subsequent adaptive immune responses)を速めに誘発することができる精巧な監視システム(sentinel system)を備えていると報告された。CNSの免疫反応において、主な免疫細胞として機能する膠細胞(glia cell)は、脳の微細な変化を認知し、病態生理学的刺激に速く反応する。

【0006】

上記のような従来への報告に基づいて研究した結果、本発明者らは、低酸素症環境で小膠細胞(microglia)及び星状細胞(astrocyte)のTIM-3発現が増加(upregulated)し、このようなTIM-3の発現増加が好中球(neutrophils)の低酸素性半陰影(hypoxic penumbra)への浸潤(infiltration)に影響を及ぼすという事実を新たに発見した。このような浸潤は、虚血性脳損傷の主な原因として知られている。また、本発明者らは、神経膠細胞でHIF-1がTIM-3の酸素-依存的発現を調節するという事実を明らかにし、このような実験結果から本発明を完成した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】US2014/0099254A1

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Han, G., et al. (2013)

【非特許文献2】Cramer, T. et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. Cell 112, 645-57 (2003)

【非特許文献3】Zhang, L. et al. Estrogen stimulates microglia and brain recovery from hypoxia-ischemia in normoglycemic but not diabetic female mice. J. Clin. Invest. 113, 85-5 (2004)

【非特許文献4】Swanson, R. A. et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. J. Cereb. Blood Flow Metab. 10, 290-93 (1990)

【非特許文献5】Frank, M. G., Wieseler-Frank, J. L., Watkins, L. R. & Maier, S. F. Isolation of highly enriched and quiescent microglia from adult rat hippocampus: immunophenotypic and functional characteristics. J. Neurosci. Methods 151, 121-30 (2006)

【非特許文献6】Weinstein, D. Isolation and purification of primary rodent astrocytes. Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 3, Unit 35 (2001)

【非特許文献7】Chang, C. Y. et al. Dual functionality of myeloperoxidase in rotenone-exposed brain-resident immune cells. Am. J. Pathol. 179, 964-79 (2011)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献8】Huang, Z. et al. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265, 1883-885 (1994)
- 【非特許文献9】Blouw, B. et al. The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4, 133-46 (2003)
- 【非特許文献10】Kutner, R. H., Zhang, X. Y. & Reiser, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 4, 495-05 (2009) 10
- 【非特許文献11】Zhang, L. et al. Estrogen stimulates microglia and brain recovery from hypoxia-ischemia in normoglycemic but not diabetic female mice. *J. Clin. Invest.* 113, 85-95 (2004)
- 【非特許文献12】Wang, G. L. & Semenza, G. L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 268, 21513-21518 (1993) 20
- 【非特許文献13】Bergeron, M., Yu, A. Y., Solway, K. E., Semenza, G. L. & Sharp, F. R. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4159-4170 (1999)
- 【非特許文献14】Williams, R. The Mouse Brain Library http://www.mbl.org/atlas165/atlas165_start (1999) 30
- 【非特許文献15】Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 3rd edn (Elsevier/Academic Press, 2008)
- 【非特許文献16】Gerriets, T. et al. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke* 35, 566-571 (2004)
- 【非特許文献17】Le, D. A. et al. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 15188-15193 (2002) 40
- 【非特許文献18】Broughton, B. R., Reutens, D. C. & Sobey, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331-e339 (2009)
- 【非特許文献19】Chaitanya, G. V., Steven, A. J. & Babu, P. P. PARP-1 cleavage fragments: signature of cell-death proteases in neurodegene 50

ration. Cell Commun. Signal. 8, 31 (2010)

【非特許文献20】McColl, B.W., Rothwell, N.J. & Allan, S.M. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1 and neutrophil dependent mechanisms. J. Neurosci. 27, 4403 - .4412 (2007)

【非特許文献21】Chen, H. et al. Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. Ann. Neurol. 35, 458 - .463 (1994)

【非特許文献22】Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., Burlak, C. & DeLeo, F.R. Neutrophils in the innate immune response. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 53, 505 - 517 (2005)

【非特許文献23】Murikinati, S. et al. Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. FASEB J. 24, 788 - 798 (2010)

【非特許文献24】Muir, K.W., Tyrrell, P., Sattar, N. & Warburton, E. Inflammation and ischaemic stroke. Curr. Opin. Neurol. 20, 334 - .342 (2007)

【非特許文献25】Saijo, K. & Glass, C.K. Microglial cell origin phenotypes in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 11, 775 - .787 (2011)

【非特許文献26】Ren, X. et al. Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. J. Neurosci. 31, 8556 - .8563 (2011)

【非特許文献27】Kleinschnitz, C. et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. PLoS Biol. 8, pii:e1000479 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 3) をターゲットとしてこの発現または活性を抑制させる脳損傷疾患の予防または治療用薬学的組成物を提供することにある。

【0010】

本発明の他の目的は、TIM-3を利用して脳損傷疾患の治療剤をスクリーニングする方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記目的を達成するために、本発明は、TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 3) 抑制剤を有効成分として含む脳損傷疾患の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0012】

本発明の一実施例において、前記TIM-3抑制剤は、直接または間接的にTIM-3に結合するか、これと反応するか、またはこの発現を調節する方法で、TIM-3の発現または活性を特異的に抑制または減少させることができる物質であり、有機または無機化合物、タンパク質、抗体、ペプチドまたは核酸分子などを含む。本発明の一実施例において、前記TIM-3抑制剤は、TIM-3に結合するか、これと反応して、TIM-3の活性を特異的に抑制または減少させる拮抗抗体またはその断片であるが、これに限定されない。本発明の一実施例において、前記TIM-3抑制剤は、TIM-3遺伝子の発現を直接または間接的に抑制する核酸分子であり、このような核酸分子の例としては、TIM-3遺伝子またはその断片に対するアンチセンスヌクレオチド、siRNA、shRNAまたはmiRNAなどがあるが、これに限定されない。

10

【0013】

本発明の一実施例において、前記TIM-3タンパク質は、序列番号1のアミノ酸序列からなり、前記TIM-3遺伝子は、序列番号2の塩基序列からなる。

【0014】

本発明の一実施例において、前記TIM-3抑制剤は、TIM-3遺伝子の上位(upstream)遺伝子またはTIM-3遺伝子の発現調節部位の発現または活性を抑制することで、TIM-3の発現を抑制する作用をする。

【0015】

本発明の一実施例において、前記TIM-3抑制剤は、HIF-1(hypoxia-inducible factor-1)の発現または活性を抑制させる。

20

【0016】

本発明の一実施例において、前記TIM-3抑制剤は、好中球走化因子(neutrophil chemotactic factor)の発現または活性を減少させて、好中球の移動及び浸潤を阻害することで、脳損傷疾患の予防または治療効果を表す。

【0017】

また、本発明は、(a)TIM-3が発現される細胞または動物モデルに候補物質を処理する段階と、(b)前記候補物質処理後、TIM-3の発現または活性程度を測定する段階と、(c)前記TIM-3の発現または活性程度が候補物質を処理しない対照群に比べて減少した候補物質を選別する段階とを含む脳損傷疾患治療剤のスクリーニング方法を提供する。

30

【0018】

本発明の一実施例において、前記スクリーニング方法は、前記(c)段階で選別した候補物質が対照群に比べてHIF-1の発現または活性を抑制させるか否かを追加で分析する段階をさらに含む。

【0019】

本発明の一実施例において、前記(b)段階の測定及び/または前記HIF-1の発現または活性を分析する方法は、免疫組織化学染色、PCR、RT-PCR、ウエスタンブロット、ELISAまたはタンパク質チップで構成された群から選ばれる方法で行うが、これに限定されない。

40

【0020】

本発明の一実施例において、前記TIM-3が発現される細胞は、神経膠細胞(gliacell)であるが、これに限定されない。本発明の一実施例において、前記動物モデルは、低酸素虚血性(hypoxia-ischemia)脳損傷疾患モデルであるが、これに限定されない。

【0021】

本発明が適用可能な脳損傷疾患の例としては、脳梗塞、脳卒中、低酸素性脳損傷、虚血性脳疾患、中風などがあるが、これに限定されない。本発明の一実施例によると、前記脳損傷疾患は、低酸素(hypoxia)環境で発生した炎症(inflammation)関連の脳損傷である。

50

【発明の効果】

【0022】

本発明者らは、虚血によって発生する低酸素 (hypoxia) 状態時に誘発する脳損傷でTIM-3タンパク質がモジュレータとして役割をし、TIM-3の発現が低酸素状態で発生する遺伝子発現を調節するHIF-1によって調節を受けることを確認した。そこで、本発明は、低酸素症が伴われる脳神経系疾患、例えば、脳梗塞、脳卒中、低酸素性脳損傷、虚血性脳疾患及び中風疾患の治療及び予防のために有用に使用されることができ

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】TIM-3が低酸素虚血性脳卒中のマウスモデルの低酸素が誘導された脳領域で発現することを示す。(a)TIM-3転写レベルを低酸素虚血性脳卒中の誘導24時間後に、マウスモデルから対側性皮質 (C, boxed region) と脳卒中が誘導された同側性皮質 (I, boxed region) から脳組織を取り外して測定した。逆転写酵素遺伝子の増幅方法によって出た結果は、image Jプログラムを使用して量を測定し、actinの発現を反映して定量化した。HIF-1転写レベルは、低酸素のpositive controlで表した。右側パネルは、低酸素虚血性脳卒中誘導のマウスモデルの脳断面組織のTTC染色を示す。(b)ウエスタンブロット分析法は、TIM-3とHIF-1タンパク質の発現を示す (n=3)。相対的なTIM-3発現程度は、独立した3回の実験から測定された有意値で示した。(c)低酸素虚血性脳卒中のマウス脳断面の同側性皮質と対側性皮質でTIM-3発現をTim-3抗体を使用して免疫組織化学法を通じて確認し、TIM-3を発現する細胞数をmm²当たり個数で測定した。(d)免疫組織化学法は、低酸素虚血性脳卒中が誘導されたマウスで脳切片を取り外してTIM-3とhypoxyprobe-1 (red, to detect hypoxic regions) 抗体を使用して測定したものである。Scale bars、50µm (x20); 50µm (x40)。(e, f)グループごとに3匹から同側性部位と対側性部位から脳細胞を分離し、星状細胞を表すことができるGFAP (f) と小膠細胞を表すIba-1 (e)、そしてTIM-3抗体を一斉に付けてFACS (蛍光利用細胞分類機) を使用して分析した。この結果は、ゲーティングされた小膠細胞で相対的なTIM-3レベルを表したもので、3回の独立した実験を通じて確認された。

【図2】一次培養した神経膠細胞において、HIF-1がTIM-3のプロモータに結合し、その発現を調節することを示す。(a)BV2細胞に20%のO₂または1%のO₂環境を24時間維持した後、TIM-3の細胞表面発現様相をPEが結合されたTIM-3抗体で染色し、蛍光利用細胞分類機を使用して分析した。3回の独立した実験を通じて得た結果を棒グラフとして表し、平均値の変化 (±s.d.) を正常環境サンプルと比較して表した。(b)マウスから培養した神経膠細胞を24時間の間正常環境と低酸素環境で培養し、その細胞をTim-3抗体を使用して免疫細胞化学法を通じてTIM-3の発現を確認した。(c, d)マウスから一次培養した神経膠細胞と神経細胞を24時間の間正常環境と低酸素環境で培養し、逆転写酵素遺伝子増幅方法でTIM-3とactinの発現程度を測定した。発現変化を独立して3回繰り返した実験を通じて平均値変化 (±s.d.) をグラフで示す (NS、統計が有効でない、Student-Newman-Keuls test)。(e)マウスから由来した神経膠細胞を24時間の間正常環境と低酸素環境で培養し、免疫沈降精製法をHIF-1抗体と対照群IgGを持って行った。結果は、3回の独立した実験を通じてグラフで示した。(f)HIF-1^{+f}/^{+f}マウスから由来した神経膠細胞にAd-GFP or Ad-Cre/GFPウイルスを感染させ、この感染された細胞にTIM-3-luciferase reporter (Tim-3プロモータ遺伝子が入っているvector) constructsを形質注入し、24時間の間正常環境と低酸素環境で培養した。プロモータ遺伝子発現活性をratio of luciferase activity / -galactosidase activityとして表現した。(g, h)逆転写酵素遺伝子増幅方法 (g)

10

20

30

40

50

とwestern blot分析法(h)は、primerと抗体を使用して24時間の間正常環境と低酸素環境下で行った。このデータは、独立して3回の繰り返した実験を通じて表した。グラフは、低酸素環境化でAd-GFPが感染された細胞に比べてTIM-3遺伝子転写とタンパク質の発現量を比べて示す。IP、免疫沈降

【図3】TIM-3の遮断は、低酸素虚血性脳卒中後に誘導される脳損傷を有意に減少させることを示す。(a)IgG(n=12)とTIM-3 blocking抗体(n=12)100 μ gを処理した低酸素虚血性脳卒中モデルマウスからTTC染色された脳切片のイメージを示す代表図。梗塞volumeは、image Jプログラムを通じて分析し、損傷された同側性部位を百分率で表現した。(b)低酸素虚血性脳卒中の誘導24時間後、TIM-3抗体を処理したマウス(n=4)とIgG(n=4)を処理したマウスから得たMRI(磁気共鳴映像法)の代表写真。(c)低酸素虚血性脳卒中の誘導24時間後、TIM-3抗体を処理したマウス(n=4)とIgG(n=4)を処理したマウスから得たT2-MRI(磁気共鳴映像法)の代表写真。(d)浮腫の形成程度をT2-weighted MRI images and ADC mapを通じて得た。(e)低酸素虚血性脳卒中の誘導24時間後、TIM-3抗体を処理したマウスと、IgGを処理したマウスから得た脳切片中でNeuN(神経細胞)cleaved caspase-3(細胞死滅を検出する抗体)で免疫組織化学法をし、confocal顕微鏡で測定した代表写真。Scale bar、50 μ m。グラフは、NeuNとcleaved caspase-3抗体で染色された細胞数をmm²当たり平均個数を示す。(f)低酸素虚血性脳卒中の誘導24時間後、TIM-3抗体を処理したマウスと、IgGを処理したマウスから得た対側性皮質と同側性皮質の中でfull-length PARPタンパク質(細胞死滅を表すタンパク質)の発現を表したwestern blot写真。グラフは、full-length PARPのレベルを比べて示す。全てのデータは、3回の独立した実験から有意な値で表した。

【図4】TIM-3遮断抗体が好中球の移動を減少させることを示す。逆転写酵素遺伝子増幅方法(a)及びウエスタンブロット分析法(b)をIgGとTIM-3 blocking抗体が処理された低酸素虚血性脳卒中モデルマウスでMPO発現を測定するために使用した。グラフは、MPOレベルを比べて示した。(c)低酸素虚血性脳卒中の誘導24時間後、TIM-3抗体を処理したマウスと、IgGを処理したマウスから得た脳切片中からMPOとGr-1抗体で免疫組織化学法をし、confocal顕微鏡で測定した代表写真。Scale bar, 50 μ m。グラフは、MPOとGr-1抗体で染色された細胞数のmm²当たり平均個数を示す(\pm s.d.)。低酸素虚血性脳卒中モデルマウスから由来した(d)大脳皮質と(e)基底部位で得た脳切片をMPO抗体とGr-1抗体を使用して免疫組織化学法を行い、MPOとGr-1が染色された細胞をmm²当たり細胞数を数えた。

【図5】生体内と生体外の両方でTIM-3の遮断は、代表的な二つの好中球化学走性因子の発現を減少させることを示す。(a)マウスから一次培養した神経膠細胞(2×10^5)をトランスウェルのlow chamberに敷いて、TIM-3と対照群IgG抗体を図示のようにまず処理した後、脾臓細胞 5×10^5 をupper chamberに載せる。低酸素状態で24時間培養後、脾臓細胞low chamberに移動された程度を蛍光利用細胞分類機を使用して分析した。独立した3回の実験を通じてlow chamberに移動したGr-1^{high}CD11b^{high}細胞の%を平均値 \pm s.dで表現した。(b)Gr-1^{high}CD11b^{high}である好中球をC57BL/6マウスの骨髄から分離し、IgGとTIM-3抗体を処理した神経膠細胞と共に低酸素環境で培養する。3回の独立した実験から得た結果は、IgGを処理した細胞を1と見た時、減少された程度を表す。(c)逆転写酵素遺伝子増幅法をIgGとTIM-3を処理した低酸素虚血性脳卒中モデルから得た組織に対して行った。(d)グラフは、actinで補正して表した結果を示す(n=3)。(e)マウスから由来した神経膠細胞にIgGとTIM-3抗体を処理し、正常環境と低酸素環境で24時間の間培養する。CXCL1とIL-1 β 転写レベルは、逆転写酵素遺伝子増幅法によって決めた。グラフは、独

10

20

30

40

50

立して3回実験した結果から出た。NS、有効性がない。

【図6】低酸素によって誘導される好中球の移動は、HIF-1が欠けた環境で減少することを示す。(a) HIF-1^{+f/+f}マウスから一次培養した神経膠細胞(2×10⁵)にAd-GFP or Ad-Cre/GFPウイルスを感染させ、トランスウェルのlow chamberに載せ、5×10⁵をupper chamberに載せる。低酸素状況で24時間培養後、脾臓細胞がlow chamberに移動した程度を蛍光利用細胞分類機を使用して分析した。(b) Gr-1^{high}CD11b^{high}である好中球をC57BL/6マウスの骨髄から分離し、HIF-1^{+f/+f}マウスから一次培養した神経膠細胞をAd-GFPまたはAd-Cre/GFPウイルスで感染させて好中球細胞のように低酸素環境で培養する。3回の独立した実験を通じて得た結果は、Ad-GFP感染されたHIF-1^{+f/+f}マウスの神経膠細胞と比べて好中球細胞の移動変化を示した。(c) CXCL1とIL-1beta転写レベルは、Ad-GFPまたはAd-Cre/GFPウイルスを感染させた神経膠細胞を正常環境と低酸素環境で24時間の間培養してその発現を確認した。(d) グラフは、real-time quantitative PCRから得た結果である。

10

【図7】LysM-Hif-1^{-/-}形質転換マウスで低酸素虚血性脳卒中によって誘導された脳損傷が減少することを示す実験結果である。(a) HIF-1^{+f/+f}またはLysM-Hif-1^{-/-}マウスから培養した神経膠細胞で表示されたプライマーを利用して逆転写酵素遺伝子増幅法を行った。(b) TIM-3遺伝子転写レベルをHIF-1^{+f/+f} or LysM-Hif-1^{-/-}マウス(n=3)の対側性皮質と虚血性脳卒中が誘導された同側性皮質から由来した脳組織から確認した。(c) 24時間の間低酸素虚血性脳卒中が誘導されたHIF-1^{+f/+f}(n=12) or LysM-Hif-1^{-/-}マウス(n=12)からTTC染色された脳切片的のイメージを示した代表図。梗塞volumeは、image Jプログラムを通じて分析し、損傷された同側性部位を百分率で表現した。(d) 低酸素脳卒中24時間後、HIF-1^{+f/+f} or LysM-Hif-1^{-/-}マウスから得た脳切片中でNeuN(神経細胞をdetectionする抗体)cleaved caspase-3(細胞死滅をdetectionする抗体)で免疫組織化学法をし、confocal顕微鏡で測定した代表写真。Scale bar, 50 μm。グラフは、NeuNとcleaved caspase-3抗体で染色された細胞数のmm²当たり平均個数を示す。(±s.d. 3回独立して実験)

20

30

【図8】LysM-Hif-1a^{-/-}マウスにLV-TIM3-GFPの頭蓋腔接種は、脳梗塞範囲と神経学的後遺症を増加させることを示す実験結果である。(a) IVIS spectrum system(Xenogen IVIS-200)を使用してPBS、GFPが過発現されるレンチウイルスを接種したマウス、そして、TIM-3とGFPが過発現されたレンチウイルスを接種したマウスの蛍光イメージを測定した代表図(excitation filter, from 445 to 490 nm, and emission filter, from 515 to 575 nm)。(b) LV-TIM3-GFPまたはLV-GFPを接種したマウスからTTC染色された脳切片的のイメージを示した代表図。(c、d) 梗塞大きさ(c、n=6 for LV-GFP or n=5 for LV-TIM3-GFP) and 神経学的後遺症(d、n=6 for each group)は、低酸素虚血性脳卒中の誘導24時間後に検査した。

40

【図9】低酸素脳環境で発生可能なTIM-3関連事件の模式図である。低酸素環境依存的HIF-1aの活性は、小膠細胞と星状細胞でTIM-3発現を増加させる。HIF-1/TIM-3軸の活性化は、好中球誘引物質の生成と低酸素地域で好中球の浸潤を誘導する。好中球の非正常的な浸潤現象は、過度な炎症反応を誘導し、引き継いで脳の病態生理学的環境に原因となる。

【図10】1%の酸素条件及び20%の酸素条件下で一次培養膠細胞またはBV2小膠細胞にTIM-3のshRNAをそれぞれ細胞感染させた後、PCR及び免疫細胞化学法を通じて細胞内でTIM-3の発現程度を比較分析した結果を示し、10Aは、一次培養膠

50

細胞の結果を、10Bは、BV2小膠細胞の結果を示し、10AにおけるaはPCR分析結果であり、bは免疫細胞化学法を表す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、虚血性脳卒中など低酸素症による脳損傷疾患の治療用組成物及び脳損傷疾患治療剤のスクリーニング方法に関し、具体的には、TIM (T-cell immunoglobulin and mucin domain protein) - 3抑制剤を有効成分として含む脳損傷疾患の治療用組成物、及び(a)TIM-3が発現される細胞または動物に候補物質を処理する段階と、(b)TIM-3の発現または活性程度を測定する段階と、(c)TIM-3の発現または活性程度が候補物質を処理しない対照群に比べて減少した候補物質を選別する段階とを含む脳損傷疾患治療剤のスクリーニング方法に関する。

10

【0025】

大脳虚血(cerebral ischaemia)は、一連の病態生理学的変化を引き起こして脳損傷を誘発する。炎症媒介体(inflammatory mediator)の生産及び浸透は、脳損傷を引き起こす重要な段階で、大脳虚血による脳損傷程度は、炎症状態と非常に密接な関連があることを示唆する臨床及び研究結果が増加している。そこで、炎症調節をターゲットとする脳神経系疾患の治療剤の開発戦略に対する関心が高まっている。但し、現在までは、虚血性脳疾患時に伴われる炎症反応について知られた情報が非常に少ないという限界があった。

20

【0026】

本発明は、虚血以後に発生するhypoxia(低酸素)状態による脳損傷に、TIM-3が非正常的な炎症細胞の浸透及び炎症反応と連関があり、TIM-3の制御は、炎症反応、脳細胞の死滅、脳梗塞部位の減少に影響を与えるということを糾明することにその特徴がある。本発明は、虚血によって発生する低酸素(hypoxia)状態時に誘発する脳損傷で、TIM-3タンパク質がモジュレータとしての役割をしており、TIM-3の発現が低酸素状態で発生する遺伝子発現を調節するHIF-1によって調節を受けるという研究結果を基盤としている。本発明の一実施例によると、低酸素虚血性脳卒中のマウスモデル(Hypoxia-ischemia mouse model)の低酸素が誘導された脳領域の神経膠細胞(glia cell)でTIM-3の発現は増加し(図1)、TIM-3の発現は、HIF-1によって調節された(図2)。また、TIM-3の遮断は、低酸素虚血症後に伴われる脳梗塞部位及び脳細胞の死滅を減少させ(図3)、好中球の脳への移動及び移動関連サイトカインを減少させることを確認した(図4)。また、低酸素によって誘導される好中球の移動及び脳損傷は、HIF-1欠乏マウスの低酸素虚血脳卒中モデルでも減少され(図6)、該マウスにTIM-3の発現を増加させれば脳損傷が再び増加した。このような結果は、低酸素環境でHIF-1/TIM-3軸と脳損傷の関連性を表す。

30

【0027】

従って、本発明は、TIM-3抑制剤を有効成分として含有する脳損傷疾患、例えば、脳梗塞、脳卒中、低酸素性脳損傷、虚血性脳疾患及び中風疾患の予防または治療用薬学的組成物を提供することができる。本明細書で使用された用語「予防」は、療法剤(例えば、予防剤または治療剤)または療法剤の組合物を投与して対象体で脳損傷疾患の兆候が表れるか再発または発展することを防ぐことを意味する。本明細書で使用された用語「治療」は、脳損傷疾患患者の症状やいずれか一つ以上の身体的パラメータを改善させるか調節するかその発生や進展を遅延させることを意味し、患者の認識有無は問わない。本発明の薬学的組成物は、一つ以上の薬剤学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む。前記担体、賦形剤及び希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、デンプン、アラビアガム、アルジネート、ゼラチン、カルシウムホスフェート、カルシウムシリケート、セルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベン

40

50

ゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、マグネシウムステアレート及び鉱物油が挙げられる。また、充填剤、抗凝集剤、滑剤、湿潤剤、香料、乳化剤及び防腐剤などをさらに含んでもよい。使用に適合した担体としては、食塩水、燐酸塩緩衝食塩水、最小必須培地(MEM)またはHEPES緩衝液のMEMを含む水性媒質を挙げられるが、これに限定されない。

【0028】

また、本発明の薬学的組成物は、哺乳動物に投与された後、活性成分の迅速、持続または遅延された放出を提供するように当業界に公知された方法を使用して剤形化することができる。剤形は、粉末、料粒、精製、エマルジョン、シロップ、エアゾル、軟質または硬質のゼラチンカプセル、滅菌注射溶液、滅菌粉末などの形態であってもよい。本発明の薬学的組成物は、筋肉、皮下、経皮、静脈、鼻腔内、腹腔内または経口の経路で投与されてもよく、好ましくは、筋肉内または皮下経路で投与される。組成物の投与量は、投与経路、動物の年齢、性別、体重及び重症度などの様々な因子によって適切に選択される。

【0029】

本発明の薬学的組成物は、下記の多様な経口または非経口投与形態で剤形化するが、これに限定されない。まず、経口投与のための固形製剤としては、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、硬質または軟質カプセル剤などが含まれ、このような固形製剤は、本発明の有効成分に少なくとも一つ以上の賦形剤を交ぜて調剤される。また、単純な賦形剤の他にマグネシウムステアレート、タルクのような滑剤を使用してもよい。経口投与のための液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤またはシロップ剤などがあるが、よく使用される単純希釈剤である水、リキッドパラフィンの他に様々な賦形剤が含まれてもよい。また、本発明の薬学的組成物は、非経口投与も可能であり、非経口投与は、皮下注射剤、静脈注射剤、筋肉内注射剤または胸部内注射剤を注入する方法などによる。この場合、非経口投与用剤型に製剤化するために、本発明の有効成分を安定剤または緩衝剤と共に水で混合して溶液または懸濁液に製造し、これをアンプルまたはバイアルの単位投与型で製造することができる。非経口投与のための製剤としては、滅菌した水溶液、非水性溶剤、懸濁液剤、乳剤、凍結乾燥製剤または坐剤などが含まれる。非水性溶剤、懸濁液剤としては、プロピレングリコール(propylene glycol)、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性油またはエチルオレートのような注射可能なエステルなどが使用されてもよい。また、本発明の薬学的組成物は、マウス、ラット、家畜、人間などの哺乳動物に多様な経路で投与されてもよく、その例としては、経口、直腸、静脈、筋肉、皮下、子宮内硬膜または脳血管内注射などがある。本発明の薬学的組成物は、患者の年、性別、体重によって適切な方法を選択して投与する。

【0030】

以下、本発明を実施例によってさらに詳しく説明する。下記の実施例は、単に本発明をより具体的に説明するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例に限らないということは、当業界で通常の知識を持った者において自明である。

【実施例1】

【0031】

実験材料及び方法

<1-1> 実験動物

Randall Johnson博士が製作したHIF-1^{+/+}/HIF-1^{-/-} (HIF-1 floxed alleles)を持ったマウスを使用した。骨髄系統細胞でHIF-1^{-/-}に欠けたマウスは、HIF-1^{+/+}マウスとLysM-Cre形質転換マウスの異種交配から製作した(非特許文献2)。8週令の雄C57BL/6マウス(Orient Bio)を生体内(in vivo)及び試験管内(in vitro)実験に使用した。

【0032】

<1-2> 低酸素性脳虚血症モデル及び梗塞(infarct)の体積の測定

C57BL/6雄マウス(8週、Orient Bio)に対して非特許文献3のよう

な方法でH/Iを誘導した。簡単に説明すると、マウスをZoletil (Virbac)及びRompun (Bayer) (4:1)で麻酔させ、それぞれのマウスの右側総頸動脈 (common carotid artery) を露出させ、4-0手術用シルク (surgical silk) で二重接合した。切開部位を縫合し、過量の食べ物と水で2時間の間マウスを回復させた。全身性低酸素症 (systemic hypoxia) は、温度調節低酸素チャンバ (BioSpherix, C-474) で8%の酸素/バランスN₂に露出させて誘導した。このような一時的側脳虚血症 (transient unilateral cerebral ischaemia) モデルは、同側半球 (ipsilateral hemisphere) で再生可能な脳損傷を発生させるが、対側半球 (contralateral hemisphere) では発生させない。TIM-3-抑制 (blocking) 実験のために、H/I 30分後にマウスに100 µgのラット (rat) IgG2a, k isotype (eBioscience, 16-4321) または抗TIM-3モノクローナル抗体 (eBioscience, RMT-3-23) を静脈注射した。H/Iの24時間が経った後マウスを殺した後、脳を除去し、直ちに2mm厚さのセクションで切った後、TTCと共に37 °Cで30分間培養した。前記セクションのイメージは、カメラが装着された立体顕微鏡 (Zeiss, Stereo Discovery.V20) で観察した。梗塞 (infarct) 体積は、梗塞組織の浮腫に対して償う間接的な方式で測定し、半球面積に対する損傷面積の割合の百分率で計算し、浮腫による半球の膨潤 (swelling) は補正された。梗塞体積の計算式は、以下の通りである (非特許文献4) :

梗塞体積 (Infarct volume) (%) = [(対側性半球 - 同側性半球の健康な領域) / 対側性半球] × 100

【0033】

< 1-3 > 磁気共鳴映像の測定 (Magnetic resonance imaging assessments)

マウスを動物ベッドに固定させ、MRI測定装置 (Bruker 7T BioSpec) 下に位置させた後、映像測定の間麻酔させる。Relaxation Enhancement sequenceを持ったRapid Acquisitionを利用してT2-加重された (weighted) イメージを得た。0.7mm厚さの18個の隣接軸スライスを得た [matrix 256 × 256; field of view = 20 × 20 mm; TR (Repetition Time) = 2,500 ms; TE (Echo Time) = 35 ms; acquisition time = 4分; no gap]。ADC (apparent diffusion coefficient) マップは、スピン-エコーシーケンスを利用して拡散加重された (diffusion-weighted) イメージによって得た。このため、8個の隣接軸イメージを得た [thickness 0.7 mm, matrix 256 × 128, field of view = 20 × 20 mm, TR = 2,000 ms, TE = 26.936 ms, acquisition time = 16分, 1 average, b values = 45, 350, mm² 当たり 1,000及び2,000 s, no gap]。ADCマップは、スキャナで得た。浮腫体積は、T2-加重されたイメージから得、ADCマップは、Image J analyserから得た。浮腫体積 (Oedema volume) (%) = [(同側性体積 - 対側性体積) / 対側性体積] × 100。

【0034】

< 1-4 > マウス脳組織から小膠細胞 (microglia) 及び星状細胞 (astrocytes) の分離

公知の方法によって脳組織から小膠細胞を分離した (非特許文献5)。簡単に説明すると、かん流された (perfused) マウスから脳を除去し、同側性 (ipsilateral) 及び対側性 (contralateral) 半球に分けた後、研いで250 µg ml⁻¹ のcollagenase IV/DNase Iを処理した後、37 °Cで45分間培養して分解した。その細胞分解産物を50/70% Percoll濃度勾配 (g

10

20

30

40

50

radients)で1,000gで25分間分画した。50及び70%バンド間の境界面で小膠細胞を集め、HBSS(hanks' balanced salt solutions)で洗浄した(Welgene)。分離した小膠細胞の純度は、FACS分析で測定した。公知の方法によって星状細胞を分離した(非特許文献6)。簡単に説明すると、脳組織からの細胞サスペンション(suspensions)を30/60%のPercoll濃度勾配(gradient)で1,000gで25分間分画した。PBS/30%の境界面で星状細胞を収集した。分離した星状細胞の純度は、抗-GFAP抗体を利用したFACS分析で測定した(Cell Signaling Technology、#3670、1:500)。

【0035】

<1-5>神経膠細胞及びニューロン強化(enriched)中脳培養

1ないし3日が過ぎたマウスの大脳皮質からマウス1次混合神経膠細胞(primary mixed glial cells)を培養した(非特許文献7)。抗CD11b抗体を使用したFACS分析によってマウスの混合神経膠細胞の培養で小膠細胞の割合は30.50%と測定された(eBioscience、11-0112、5 μ gml⁻¹)。14胎児日(embryonic day)のマウスからニューロン強化(enriched)中脳細胞を培養した(非特許文献7)。簡単に説明すると、腹側の中脳組織(ventral mesencephalic tissues)を切開し、CMF-HBSS(Ca²⁺、Mg²⁺-free HBSS)で10分間培養し、CMF-HBSS内の0.01%のトリプシン(trypsin)で9分間37[°]で培養した。培養物を10%ウシ胎児血清、6mgml⁻¹グルコース、204mgml⁻¹L-グルタミン及びトリプシンの阻害のための100Uml⁻¹ペニシリン/ストレプトマイシン(P/S)を添加したDMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)で二回洗浄した後、粉碎して単一細胞に分離させた。細胞をポリ-D-lysin(5mgml⁻¹)及びラミニン(laminin)(0.2mgml⁻¹)コーティングプレートに分注した(ウェル当たり2 \times 10⁶細胞)。

【0036】

<1-6>アデノウイルス形質導入(Adenoviral transduction)

Cre再組合酵素遺伝子がサイトメガロウイルスプロモータの調節下で発現される非増殖性アデノウイルス(AD-GFP/Cre)をVector Biolabsから購入した。レポーターAd-GFPを対照群として使用した(Vector Biolabs)。アデノウイルスの形質導入のために、1次混合神経膠細胞をHIF-1^{+/+}マウスから培養し、Ad-GFPまたはAd-GFP/Creで24時間の間感染させた[MOI(multiplicity of infection)=100]。フローサイトメトリーで測定された感染効率(infection efficiency)は、約50%であった。

【0037】

<1-7>ChIPアッセイ

ChIPアッセイキット(Upstate Biotechnology)を使用してChIPアッセイを行った。マウス1次混合神経膠細胞を低酸素環境で24時間の間培養し、直ちに1%ホルムアルデヒド/ホスフェート-バッファー食塩水(phosphate-buffered saline)で固定し、超音波処理して500ないし1,000-bp DNA断片を得た。クロマチン(chromatin)を5 μ gの抗HIF-1(Novus、NB100-134)またはウサギIgGで免疫沈殿させた。免疫沈殿されたDNAをTIM-3-プロモータに特異的なプロモータ対で増幅させた[F, 5'-CCTGCTGCTTTGGAATTTGC-3'(序列番号3);及びR, 5'-GAGTACTTTGGCAGGGGAAATC-3'(序列番号4)]。

【0038】

<1-8>好中球移動測定(Neutrophil migration assay)

10

20

30

40

50

)

FITC - 結合された抗CD11b (eBioscience、11-0112、 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$) 及びPE - 結合された抗Gr-1 (Ly6G) (eBioscience、12-5931、 $2 \mu\text{g ml}^{-1}$) の結合に基づいて、FACS Aria system (BD Bioscience) を使用して好中球を分離した。分類された好中球をトランスウェル (Transwell) の上側チャンバにマウス1次混合神経膠細胞が分注された24-ウェルプレート上に添加した。前記細胞を1%または20%の酸素条件で24時間の間培養した。移動 (transmigration) は、ヘマサイトメータ (haematocytometer) 及びフローサイトメトリー (flow cytometry) を利用して測定した。

10

【0039】

<1-9> 神経学的後遺症 (neurological deficits) の測定
 神経学的後遺症は、神経学的スコアリングシステム (neurological scoring system) を使用して評価した (非特許文献8)。マウスの神経学的点数は、以下の通りである：0、正常運動機能 (normal motor function)；1、しっぽ持ち上げによる対側性胴体及び前肢の屈折 (flexion of contralateral torso and forelimb upon lifting by tail)；2、対側への回転 (circling to the contralateral side when mouse was held by the tail, but normal posture at rest)；3、休息期対側への偏向 (leaning to contralateral side at rest)；及び4、自発的運動能力の喪失 (no spontaneous motor activity)。

20

【0040】

<1-10> 免疫組織化学 (immunohistochemistry)
 免疫組織化学のために脳を除去し、パラフィンに固定及び包埋した。マイクローム (microtome) を使用して梗塞部位を通じて冠状部 (coronal sections) (10-mm 厚さ) を切ってスライドにマウントした。パラフィンを除去し、セクションをPBS-Tで洗浄し、10%ウシ血清アルブミンで2時間の間ブロッキングした。その後、次の1次抗体を適用した：goat anti-TIM-3 (Santa Cruz Biotechnology、sc-30326、 $2 \mu\text{g ml}^{-1}$)、rat anti-Gr-1 (Ly6G) (eBioscience、MPO (Dako、A0398、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$)、rabbit anti-Iba-1 (Wako、#019-19741、 $2 \mu\text{g ml}^{-1}$)、rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology、#9662S、1:300)、mouse anti-NeuN (Millipore、#MAB377、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$)。ピモニダゾール (pimonidazole) (Hypoxyprobe-1、Natural Pharmacia International) を使用して低酸素領域を検出した (非特許文献9)。共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) を使用してイメージを得た。1次神経膠細胞でTIM-3発現の測定のために、マウス1次混合神経膠細胞をメタノールで固定し、PBS-Tで洗浄し、抗TIM-3抗体 (R&D Systems、AF1529、 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$) で4で培養した。

30

40

【0041】

<1-11> TIM-3 プロモータアッセイ
 ゲノムDNAからマウスTIM-3プロモータの1,517-bp断片 (始めコドンに対して-1,517から+1) をPCR-増幅し、PGL3 basic vector (Promega) にクローニングした。突然変異プライマー及びPhusion High-Fidelity DNA重合酵素 (NEB) を使用して、それぞれのHREの部位特異的突然変異 (site-directed mutagenesis) を行った。

50

全ての製作物 (constructs) は、DNAシーケンシングで確認した。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用してマウス1次混合神経膠細胞 (primary mixed glial cells) をトランスフェクションした。トランスフェクション後に、細胞を1%または20%の酸素条件で24時間の間培養し、luciferase assay system (Promega) でレポーター遺伝子活性を測定した。トランスフェクション効率の標準化 (normalization) のためにベータ-ガラクトシダーゼ (β -Galactosidase) 活性を測定した。

【0042】

< 1 - 12 > ウエスタンブロットの分析

H/Iマウスの右側及び左側半球を切開し、プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitors) [2mM phenylmethylsulphonyl fluoride、 $100 \mu\text{gml}^{-1}$ leupeptin、 $10 \mu\text{gml}^{-1}$ pepstatin、 $1 \mu\text{gml}^{-1}$ aprotinin及び2mM EDTA] を含有した氷冷却したRIPAバッファーでpellet pestle (Fisher) で均質化した。均質化物を4で12,000rpmで30分間遠心分離し、上層液を収去した。サンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離し、ニトロセルロース膜 (nitrocellulose membranes) に移し、次の1次抗体と共に培養した: goat anti-TIM-3 (R&D Systems、AF1529、 $0.1 \mu\text{gml}^{-1}$)、mouse anti-PARP (Zymed、33-3100、 $2 \mu\text{gml}^{-1}$)、rabbit anti-MPO (Dako、A0398、 $2 \mu\text{gml}^{-1}$)、goat anti-Iba-1 (Abcam、ab5076、 $0.5 \mu\text{gml}^{-1}$)、mouse anti-GFAP (Cell Signaling Technology、#3670、1:1,000)、mouse anti-NeuN (Millipore、#MAB377、 $1 \mu\text{gml}^{-1}$)、mouse anti- α -tubulin (Sigma、T5168、1:5,000)、microtubule-associated protein 2 (Millipore、#MAB3418、 $1 \mu\text{gml}^{-1}$)、glutamate decarboxylase (Abcam、ab11070、 $1 \mu\text{gml}^{-1}$)、peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Bio-Rad、#170-6515、1:5,000)、peroxidase-conjugated rabbit anti-goat (Zymed、R-21459、1:5,000)、peroxidase-conjugated goat anti-mouse (Bio-Rad、#170-6516、1:5,000)。結果は、増加された化学発光システム (enhanced chemiluminescence system) を使用して視覚化し、濃度計 (densitometric analysis) (Image J software、NIH) で定量した。全ての実験は、独立して少なくとも3回繰り返して行われた。

【0043】

< 1 - 13 > RT-PCR分析

Easy-Blue (iNtRON) を使用して総RNAを分離し、avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (TaKaRa) を製造社の説明に従って使用してcDNAを合成した。25-30サイクルの連続反応でPCRを行った。全ての実験は、独立して少なくとも3回繰り返して行われ、PCR産物は、NIH Image Jを使用して定量してアクチンに対して標準化した。QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen) を使用してreal-time PCRを行った。Roche LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) 及びLightCycler 480 Quantification Software Version 1.5を使用してreal-time PCRを行い分析した。

10

20

30

40

50

【0044】

定量的 (quantitative) PCR に使用されたプライマーは、以下の通りである：

IL-1 に対して (forward) 5' - GGATGAGGACATGAGCACCT-3' (序列番号 5) 及び (reverse) 5' - TCCATTGAGGTGGA GAGCTT-3' (序列番号 6) ；

CXCL1 に対して (forward) 5' - TGCACCCAAACCGAAGTCAT-3' (序列番号 7) 及び (reverse) 5' - TTGTCAGAAAGCCAGCGTTCAC-3' (序列番号 8) ；

HIF-1 に対して (forward) 5' - CTCATCAGTTGCCACTTCC-3' (序列番号 9) 及び (reverse) 5' - TCATCTTCACTGTCTAGACCAC-3' (序列番号 10) ；

GAPDH に対して (forward) 5' - TGTCGTGGAGTCTACTGGTGTCTTC-3' (序列番号 11) 及び (reverse) 5' - CGTGGTTCACACCCATCACAA-3' (序列番号 12) 。

【0045】

その他に使用された PCR プライマー序列は、以下の通りである：

TIM-3 に対して (forward) 5' - CCCTGCAGTTACACTCTACC-3' (序列番号 13) 及び (reverse) 5' - GTATCCTGCAGCAGTAGAGTC-3' (序列番号 14) ；

HIF1 に対して (forward) 5' - AGCCTTAACCTGTCTGCCACTT-3' (序列番号 15) 及び (reverse) 5' - GAAATCATTTAACATTGCATATACTAGAACAT-3' (序列番号 16) ；

MPO に対して (forward) 5' - AGGATAGGACTGGATTTGCC TG-3' (序列番号 17) 及び (reverse) 5' - GTGGTGATGCCAGTGTGTGCA-3' (序列番号 18) ；

IL-1 に対して (forward) 5' - TACAGGCTCCGAGATGAA CAACAA-3' (序列番号 19) 及び (reverse) 5' - TGGGGAAGGCATTAGAAACAGTCC-3' (序列番号 20) ；

CXCL1 に対して (forward) 5' - CGCTCGCTTCTCTGTGCA GC-3' (序列番号 21) 及び (reverse) 5' - GTGGCTATGACTTCGGTTTGG-3' (序列番号 22) ；

Actin に対して (forward) 5' - CATGTTTGAGACCTTCAACACCCC-3' (序列番号 23) 及び (reverse) 5' - GCCATCTCC TGCTCGAAGTCTAG-3' (序列番号 24) 。

【0046】

< 1 - 14 > フローサイトメトリー (Flow cytometry)

全ての染色段階は、闇中で行われ、BD Fc Block で遮断された。新たに得た小膠細胞及び星状細胞を、次の抗体で染色した：rabbit anti-Iba-1 (Wako、#019-19741、 $1\mu\text{gml}^{-1}$) 後に Alexa 488-conjugated chick anti-rabbit (Invitrogen、A21441、 $2\mu\text{gml}^{-1}$)、及び PE-conjugated anti-mouse TIM-3 (eBioscience、RMT-3-23、 $2\mu\text{gml}^{-1}$) または isotype control Ab (eBioscience、 $2\mu\text{gml}^{-1}$) で 4 で 30 分間、GFAP の細胞内染色のために、IC fixation/permeabilization バッファー (eBioscience) を使用して細胞を 20 分間固定及び透過化し、透過化 (permeabilization) バッファーで二回洗浄し、抗 GFAP (Cell Signaling Technology、#3672、1:500) と共に透過化バッファーで 30 分間培養し、Alexa 488-conjugated chick anti-mouse (Invitrogen、A21200、

2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) で染色した。データは、Cell - Quest software (BD Bioscience) 及び Flow Jo software (Tree star) パッケージで分析した。

【0047】

< 1 - 15 > レンチウイルス生産及び定位注射 (stereotaxic injection)

TIM - 3 (GE Dharmacon) のコーディング序列を PLL3.7.EF1 プラスミド (Addgene, Inc.) に接合させて PLL3.7.EF1 - TIM3 を製作した。前記プラスミドを使用して再組合レンチウイルス LV - TIM3 - GFP を製作した。対照群として GFP のみを発現するレンチウイルスベクター (LV - GFP) を作った。レンチウイルスをフローサイトメトリーを使用して滴定した (非特許文献 10)。脳固定装置 (stereotaxic instrument) を利用して LV - TIM3 - GFP または LV - GFP を注射した。それぞれのマウスは、4 回のレンチウイルス ($5 \times 10^6 \text{ TU ml}^{-1}$ を含有した $20 \mu\text{リットル}$ を右側半球に) 頭蓋注射 (intracranial injections) を打たれた。試験管内 (in vitro) 蛍光イメージングのため、収集された細胞を FACS 及び抗 GFP 抗体 (Santa Cruz, sc - 9996, 1:1,000) を使用したウエスタンブロッティングで分析した。Caliper Life Science's Xenogen IVIS Spectrum を使用して全身の生体内 (in vivo) イメージングを行った [励起 (excitation) フィルターで 445 から 490 nm、放出 (emission) フィルターで 515 から 575 nm で照射]。

【0048】

< 1 - 16 > データの分析

全てのデータは、平均 \pm s.d で表示した。Sigma Plot 10.0 を使用して Post-hoc comparisons (Student - Newman - Keuls test) を行った。神経学的点数 (neurological scores) は非母数的 (nonparametric) 統計処理で評価した。二つのグループ (IgG vs anti - TIM - 3, HIF - 1^{+/+} マウス vs LysM - Hif - 1^{-/-} マウス、LV - GFP 注射 LysM - Hif - 1^{-/-} マウス vs LV - TIM3 - GFP 注射 LysM - Hif - 1^{-/-}) 間の比較は、Mann - hitney U - tests で分析した。

【実施例 2】

【0049】

低酸素半陰影 (hypoxic penumbra) での TIM - 3 発現の増加

虚血性脳損傷と炎症間の相互依存的関連性の基礎となる分子的機作を調べるために、本発明者らは、脳の低酸素虚血症 (cerebral hypoxia - ischaemia, H/I) による病態生理学的炎症反応に主な役割をすることができる候補分子を調査した。このため、右側頸動脈の一方接合 (unilateral ligation) 後、全体的低酸素症 (systemic hypoxia) を誘発した一時的側脳虚血症 (transient unilateral cerebral ischaemia) マウスモデルを利用した (非特許文献 11)。H/I の 24 時間後に対側性 (contralateral) 及び半陰影 (penumbral) 皮質領域から組織を得た後、多様な炎症関連分子の発現水準を RNA 及びタンパク質水準で調査した。その結果、同側性半陰影 (ipsilateral penumbra) で TIM - 3 (T - cell immunoglobulin and mucin domain - 3) の転写水準が対側性領域 (contralateral regions) ではるかに高く増加したことを発見した。また、同側性半陰影 (ipsilateral penumbra) で TIM - 3 タンパク質も対側性領域より増加したことを確認した (図 1a、b)。前記同側性半陰影領域は、低酸素下で陽性対照群 (positive control) である HIF - 1 の転写体及びタンパク質水準が高いと報告された (非特許文献 12; 及び非特許文

10

20

30

40

50

献13)。

【0050】

上記結果を確認するために、TIM-3に対する抗体を利用してH/Iマウスの冠状面 (coronal sections) に免疫組織化学法を行った (非特許文献14 ; 及び非特許文献15)。その結果、上記結果と一致するように、同側性半陰影でTIM-3 - 陽性細胞が非常に増加したことが確認できた (図1c)。さらに低酸素症マーカーであるピモニダゾール (pimonidazole) (hypoxyprobe-1) を利用して、H/Iマウスのhypoxyprobe-1染色された低酸素半陰影でTIM-3が強く発現されたことを確認した (図1d)。

【0051】

このような結果は、TIM-3発現が低酸素半陰影で上向き調節されるということを示し、TIM-3が脳虚血による病態生理学的変化に所定の役割ができることを示唆する。

【実施例3】

【0052】

低酸素環境の神経膠細胞でTIM-3発現の上向き調節

本発明者は、H/I後に如何なる細胞がTIM-3の上向き調節 (upregulation) を表すについて調査した。ウエスタンブロット分析の結果、H/I24時間後にH/Iマウスの同側性皮質で、活性化された小膠細胞マーカーであるIba-1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1) 及び活性化された星状膠細胞マーカーであるGFAP (glial fibrillary acidic protein) のタンパク質発現水準が対側性皮質よりさらに高かった。一方、NeuN (neuronal nuclei)、マイクロチューブル-連関タンパク質2 (microtubule-associated protein 2) 及びグルタメートデカルボキシラーゼ (glutamate decarboxylase) のようなニューロン細胞マーカーの発現水準は、半陰影皮質組織 (penumbral cortex tissues) で減少した。

【0053】

従って、本発明者らは、H/I24時間後に小膠細胞 (microglia) 及び星状膠細胞 (astrocytes) でTIM-3の発現水準を調査した。免疫組織化学の結果、H/Iマウスの同側性皮質でTIM-3 - 発現細胞の多くの領域は、Iba-1陽性で表れた。また、同側性皮質のGFAP - 免疫活性 (immunoreactive) 星状膠細胞でTIM-3の強い発現も観察された。さらに、H/Iマウスから分離した脳細胞のFACS (Fluorescence-activated cell sorting) 分析の結果、低酸素虚血症 (hypoxia-ischaemia) は、小膠細胞及び星状膠細胞の活性をもたらし、これは、増加したTIM-3の発現を表す。高い水準のIba-1を発現する小膠細胞及び高い水準のGFAPを発現する星状膠細胞は、H/I24時間後に同側性半陰影 (ipsilateral penumbra) で非常に増加し、これは、小膠細胞及び星状膠細胞が低酸素環境で活性化されたことを意味する。また、TIM-3の発現は、同側性皮質から分離したIba-1 - 陽性小膠細胞及びGFAP - 陽性星状膠細胞において、対側性領域で分離したものより、有意な水準で高く表れた (図1e、f)。

【0054】

このような結果は、低酸素下で活性化された小膠細胞及び星状膠細胞でTIM-3の発現が非常に増加するという事実を裏付ける。

【実施例4】

【0055】

低酸素環境でTIM-3のHIF-1 - 依存的増加

前記実験結果に基づいて本発明者らは、神経膠細胞 (glial cell) でTIM-3の発現が酸素分圧 (oxygen tension) によって変更され得るか否かを、BV2小膠細胞及び1次培養された神経膠細胞を使用して実験した。BV2細胞は、正

10

20

30

40

50

常酸素 (normoxic) (20%のO₂) または低酸素 (hypoxic) (1%のO₂) 条件で24時間の間培養し、TIM-3の細胞表面水準は、FACS分析で測定した。興味深いことに、TIM-3発現は、低酸素条件で非常に増加した(図2a)。免疫細胞化学 (immunocytochemistry) の分析結果も、マウス1次混合神経膠細胞 (primary mixed glial cells) でTIM-3発現が正常酸素 (normoxic) 環境に比べて低酸素 (hypoxic) 環境で非常に増加するということを示した(図2b)。また、本発明者らは、低酸素環境でTIM-3の転写水準が1次混合神経膠細胞では増加したことに対し、1次ニューロン細胞 (primary neuronal cells) では増加しないことを確認した(図2c、d)。このような結果は、神経膠細胞で低酸素症がTIM-3発現を誘導することを示す。

10

【0056】

HIF-1は、低酸素環境で多くの遺伝子の主な転写調節因子である。神経膠細胞で低酸素によって刺激されたTIM-3の上向き調節がHIF-1によって媒介されるかについて調べるために、本発明者らは、抗HIF-1抗体及び潜在的HREコンセンサス序列 (HIF-responsive element (HRE) consensus sequences) を含むTIM-3プロモータ領域 (elements) を利用してChIPアッセイ (chromatin immunoprecipitation assay) を行った。図2eに示すように、低酸素環境の1次混合神経膠細胞 (primary mixed glial cell) でHIF-1は、HRE-含みTIM-3プロモータ領域に結合することができた。さらに、上記の結果を確認するために、本発明者らは、HIF-1欠乏神経膠細胞でTIM-3プロモータの活性を調査した。HIF-1^{flx/flx} (HIF-1^{+f/+f}) マウスから1次混合神経膠細胞を培養した後、アデノウイルス-Cre/GFP (Ad-Cre/GFP) または対照群GFP (緑蛍光タンパク質 (GFP) を暗号化するアデノウイルス (Ad-GFP)) で感染させた。FACSを利用してウイルス感染の効率を確認し、細胞をTIM-3ルシフェラーゼレポーター (-1, 517/+1) でトランスフェクションした後、TIM-3プロモータ活性を測定した。予想どおり、低酸素環境でTIM-3プロモータ活性は、対照群Ad-GFP-感染された神経膠細胞 (HIF1^{+f/+f}) では非常に増加したが、Ad-Cre/GFP-感染された、HIF-1欠乏神経膠細胞 (HIF1^{-/-}) では非常に減少した(図2f)。TIM-3プロモータの潜在的HREsの部位特異的突然変異 (site-directed mutagenesis) は、ルシフェラーゼ活性の低酸素-依存的増加を野生型レポーターに比べて非常に減少させた。また、Ad-Cre/GFP-感染されたHIF-1欠乏神経膠細胞でTIM-3転写体及びタンパク質の低酸素刺激による増加は非常に抑制された(図2g、h)。

20

30

【0057】

このような結果は、低酸素環境でTIM-3の発現がHIF-1-依存的 방식으로調節されることを示す。

【実施例5】**【0058】**

マウスH/IモデルでTIM-3抑制による脳損傷の減少

40

H/Iマウスモデルの神経膠細胞でTIM-3が上向き調節されたので、本発明者らは、大脳 (cerebral) H/I後に脳で低酸素誘導されたTIM-3の役割を調査した。このため、H/I24時間後にTIM-3-抑制抗体が脳損傷に及ぼす影響をTTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium) 染色を利用して調査した。図3aに示すように、対照群IgG-注射マウスに比べて100µgのTIM-3-抑制抗体を静脈注射したマウスでTTC-陰性領域が非常に減少したことを確認することができた。このような結果は、低酸素環境でTIM-3-抑制抗体が脳損傷を減少させることができることを示す。

【0059】

脳梗塞の生命を脅威する結果である浮腫は、炎症と虚血性脳損傷に伴って表れる (非特

50

許文献16)。従って、本発明者らは、TIM-3-抑制がH/Iによる浮腫の形成に及ぼす影響を調査した。梗塞(infarct)領域と浮腫の形成を観察するために、H/Iの1日から7日までT2-加重(weighted)磁気共鳴映像を得た。TTC染色から得た結果と同様に、H/Iの1日目、TIM-3-抗体-注入マウスの同側性半球(ipsilateral hemispheres)で梗塞と浮腫の形成は、IgG-注入マウスに比べて非常に減少し(図3b-d)、このような浮腫の形成と梗塞の減少は、3、5及び7日目にも持続した(図3c、d)。

【0060】

H/I後の脳損傷とTIM-3の関連性を追加で調査するために、TIM-3-抑制抗体がニューロン細胞の死滅に及ぼす影響を、脳虚血症に重要な役割をする細胞死滅エフェクタープロテアーゼ(cell death effector protease)であるカスパーゼ(caspase)-3の発現を測定することで調査した(非特許文献17;及び非特許文献18)。免疫組織化学の結果、IgG-処理H/Iマウスの同側性皮質領域のニューロン細胞でカスパーゼ-3の発現は非常に増加したことに對し、TIM-3抑制抗体処理マウスでこのような増加は非常に減少した(図3e)。次に、対照群IgGまたはTIM-3-抑制抗体を処理したH/Iマウスの同側性及び対側性皮質において、カスパーゼ-3によって切断するカスパーゼ-3活性のマーカーで、虚血性細胞の死滅と関連のあるPARP(poly(ADP-ribose)polymerase)の水準を測定した(非特許文献19)。図3fに示すように、対照群IgG-注射H/Iマウスの同側性皮質組織で全長PARPの発現は非常に減少したが、TIM-3-抑制抗体-注射H/Iマウスでは減少しなかった。

【0061】

このような結果は、TIM-3の抑制がマウスで脳虚血症後の梗塞部位とニューロン細胞の死滅を非常に減少させることができることを示す。

【実施例6】

【0062】

TIM-3抑制による好中球(neutrophil)の浸潤の減少
 様々な研究によると、好中球は、虚血性脳で数時間中に速く浸潤されて、炎症反応と脳損傷の発生に關与する(非特許文献20;及び非特許文献21)。神経膠細胞は、虚血症発生後の数分内に關連した活性を表す脳損傷に1次的に反応する細胞のうち一つであるので、本発明者らは、神経膠細胞でTIM-3のHIF-1-依存的増加が好中球の虚血半陰影(ischaemic penumbra)への浸潤に影響を及ぼし、TIM-3が好中球を集める能力の下向き調節(downregulation)は、脳虚血後の脳損傷を減少させることができるという仮説を立てた。これにより、先ず代表的な二つの好中球マーカーであるMPO(myeloperoxidase)及びGr-1(granulocyte receptor-1)の発現を測定し、H/I後、24時間になった時、対側性領域に比べて半陰影皮質(penumbra cortex)及び線条体(striatum)で前記マーカーに陽性である細胞(MPO⁺Gr-1⁺)が大きく増加することを確認した。次に、本発明者らは、神経膠細胞(glia cells)が低酸素環境でGr-1^{high}CD11b^{high}好中球を集めることができるか否かについて調査した。C57BL/6マウスから脾臓細胞(splenocytes)を分離し、1次混合神経膠細胞または免疫細胞を損傷部位に集めると知られたマウス胎仔線維芽細胞(murine embryonic fibroblast)の対照群細胞を含むか含まないトランスウェル(Transwell)システムにおいて、1または20%の酸素条件で24時間の間培養した(非特許文献22)。神経膠細胞またはマウス胎仔線維芽細胞の存在下で、Gr-1^{high}CD11b^{high}細胞は、低酸素環境では下側チャンバに非常に多く移動したが、正常(normoxic)環境では数個の細胞のみが移動した。しかし、このようなGr-1^{high}CD11b^{high}細胞の移動の低酸素依存的増加は、神経膠細胞のない状態では非常に減少した。このような結果は、神経膠細胞が低酸素環境でGr-1^{high}CD11b^{high}細胞を集めることに關与し得ることを示

唆する。

【0063】

次に、本発明者らは、H/I後の24時間になった時、TIM-3抑制が好中球の同側性半球 (*ipsilateral hemispheres*) への浸潤に及ぼす効果を実験した。H/Iマウスの皮質組織に対する逆転写-PCR (RT-PCR) 及びウエスタンブロット分析の結果は、対照群IgG-処理マウスに比べてTIM-3抑制抗体-処理マウスでMPO発現の水準が非常に減少することを示した (図4a、b)。同側性皮質の冠状面 (*coronal section*) に対する免疫組織化学の実験結果も、TIM-3抑制抗体処理によってMPO⁺Gr-1⁺細胞が非常に減少することを示す (図4c)。このような結果は、抗好中球及び抗MPO抗体を使用した免疫組織化学実験によっても確認された。また、H/I脳 (*bregma* - 2から+2) の多くの同側性領域の冠状面を使用して、TIM-3抑制が好中球の浸潤に及ぼす影響を様々な時点で測定した。図4d、eに示すように、全ての観察時点 (1~7日) でTIM-3を抑制させたマウスの半陰影皮質及び線条体 (*striatum*) でさらに少ない数のMPO⁺Gr-1⁺細胞が観察された。

10

【0064】

上記の結果は、低酸素環境でTIM-3が好中球の損傷された脳への浸潤と関連していることを強く示唆する。

【実施例7】

【0065】

TIM-3の遮断による好中球補充 (*recruitment*) の減少
 膠細胞TIM-3が好中球の移動に及ぼす影響をさらに特異的に測定するために、低酸素環境で膠細胞が好中球を補充する能力がTIM-3の遮断によって影響を受けるか否かを調査した。トランスウェル (*Transwell*) システムを利用して、1次膠細胞 (*primary glial cells*) を下側チャンバにプレーティングし、TIM-3抑制抗体または対照群IgGで前処理した後、上側チャンバに脾臓細胞 (*splenoocytes*) をローディングした。1%の酸素条件で24時間の間細胞を培養し、下側チャンバにあるGr-1^{high}CD11b^{high}細胞の割合をFACS分析で測定した。その結果、低酸素環境で下側チャンバにあるGr-1^{high}CD11b^{high}細胞が、対照群IgGに比べて、10mgのTIM-3抑制抗体によって非常に減少したことを確認した (図5a)。

20

上記の結果をさらに検証するために、低酸素環境で骨髄 (BM) 由来のGr-1^{high}CD11b^{high}細胞の移動を調査した。Gr-1^{high}CD11b^{high}細胞をBM細胞から分離して上側チャンバにプレーティングし、下側チャンバには、1%の酸素条件でTIM-3抑制抗体または対照群IgG-処理された1次混合神経膠細胞 (*primary mixed glial cells*) をローディングした。上記の結果と一致するように、BM由来のGr-1^{high}CD11b^{high}細胞の下側チャンバへの移動は、対照群IgG処理に比べてTIM-3抑制抗体処理によって非常に減少した (図5b)。このような結果は、脳虚血後、低酸素領域に好中球が補充されるにあたって膠細胞TIM-3の役割を明確に示す。

30

40

【実施例8】

【0066】

TIM-3抑制による好中球走化因子 (*chemoattractants*) の減少
 好中球の炎症または損傷部位への浸潤は、化学走性因子 (*chemoattractants*) によって調節され、これらは虚血後脳の好中球浸潤に先立って上向き調節される (非特許文献23)。従って、本発明者らは、TIM-3抑制が虚血状態の脳で好中球化学走性因子として作用するIL-1及びCXCL1の水準に及ぼす影響を調査した (非特許文献24)。H/I後、30分になった時、マウスに100mgのTIM-3抑制抗体または対照群IgGを静脈注射した。24時間後に、同側性及び対側性皮質組織でIL-1及びCXCL1転写水準を調査した。図5c、dに示すように、対照群IgGを

50

注射したH/Iマウスの同側性皮質領域でIL-1及びCXCL1の転写体水準が全て非常に増加したが、このような効果は、TIM-3-抑制抗体を注射したマウスでは非常に減少した。

【0067】

膠細胞TIM-3の役割をさらに調べるために、TIM-3の遮断がIL-1及びCXCL1発現水準に及ぼす影響を調査した。前記細胞にTIM-3-抑制抗体または対照群IgGを処理し、1%の酸素または20%の酸素条件下で24時間の間培養した。上記の結果と一致するように、20%の酸素条件に比べて1%の酸素条件で培養したIgG-処理対照群細胞でIL-1及びCXCL1転写体の水準は増加したが、このような増加は、TIM-3-抑制抗体を処理した細胞で非常に減少した(図5e、f)。

10

【0068】

このような結果は、細胞TIM-3が好中球の浸潤の調節を通じて脳虚血症の発病に重要な役割をする因子であることを示す。

【実施例9】

【0069】

HIF-1欠乏による好中球の移動及び梗塞(infarct)の減少

低酸素環境の神経膠細胞でHIF-1がTIM-3の発現を調節するという発見に基づいて、本発明者らは、HIF-1が低酸素環境で神経膠細胞の好中球の補充能力に影響を及ぼすか否かを調査した。HIF-1^{+f/+f}マウスから培養した1次混合神経膠細胞をAd-GFPまたはAd-GFP/Creで感染させ、トランスウェル(Transwell)システムで脾臓細胞(splenocytes)と共に1%または20%の酸素条件で24時間の間培養した。低酸素環境で下側チャンバのGr-1^{high}CD11b^{high}細胞の割合は、脾臓細胞をAd-GFP/Cre感染されたHIF-1欠乏神経膠細胞と共に培養した時、対照群Ad-GFP-感染細胞に比べて非常に減少した。一方、20%の酸素条件で移動したGr-1^{high}CD11b^{high}細胞の数は、HIF-1欠乏及び正常細胞の間に大きな差がなかった(図6a)。次に、本発明者らは、移動したBM-由来Gr-1^{high}CD11b^{high}細胞の数が、1%の酸素条件でHIF-1欠乏神経膠細胞と共に培養することによって非常に減少したことを発見した(図6b)。また、対照群Ad-GFP-感染細胞に比べて、TIM-3の低酸素-依存的増加が表れないAd-GFP/Cre-感染されたHIF-1欠乏神経膠細胞でIL-1及びCXCL1の低酸素-依存的増加は非常に減少した(図6c、d)。

20

30

【0070】

小膠細胞(microglia)は、脳で常在骨髄細胞(resident myeloid cells)となることが知られている(非特許文献25)。膠細胞HIF-1の役割を確認するために、本発明者らは、骨髄細胞で特異的にHIF-1が欠けたLysMCre-HIF-1^{+f/+f}(LysM-Hif-1^{-/-})マウスでH/I後の脳損傷の程度を調査した。まず、本発明者らは、LysM-Hif-1^{-/-}マウスの1次小膠細胞でHIF-1の水準を測定した。図7aに示すように、HIF-1転写体の水準は、HIF-1^{+f/+f}に比べてLysM-Hif-1^{-/-}マウスの小膠細胞で非常に低かった。H/I後、24時間になった時、TIM-3転写体の水準もLysM-Hif-1^{-/-}マウスの東側皮質領域でさらに低かった(図7b)。本発明者らは、HIF-1^{+f/+f}マウスに比べてLysM-Hif-1^{-/-}マウスでTTC染色-陰性領域が非常に減少したことを発見し、これは、H/Iの24時間後、脳損傷で小膠細胞HIF-1の役割を表す(図7c)。HIF-1^{+f/+f}マウスに比べてLysM-Hif-1^{-/-}マウスのニューロン細胞でカスパーゼ(caspase)-3の発現も非常に減少した(図7d)。さらに、H/Iの24時間後、LysM-Hif-1^{-/-}マウスの同側性皮質でIL-1及びCXCL1発現の有意な増加は検出されなかった。

40

【0071】

50

このような結果は、低酸素症でHIF-1 がTIM-3-関連の好中球の浸潤及び繋がる脳損傷と密接な関連があることを示す。

【実施例10】

【0072】

TIM-3の遮断及びHIF-1 の欠乏がNDSに及ぼす影響

減少された梗塞 (infarct) の体積及びニューロン細胞の死滅が神経機能の改善と関連するか否かを調べるために、公知の方法を使用してH/IモデルでNDS (neurological deficit score) を測定した (非特許文献26 ; 及び非特許文献27)。神経学的後遺症 (neurological deficits) は、対側性胴体 (contralateral torso) と前肢の屈折 (flexion)、対側への回転 (circling to the contralateral side)、停止期の対側への偏向 (leaning to the contralateral side at rest)、及び自発的運動活動 (spontaneous motor activity) によって測定した。H/Iによる神経学的後遺症は、IgG-処理マウスに比べて、TIM-3-抑制抗体を処理したマウスで減少した。H/Iの20時間後に、IgG処理マウスに対するNDSは2.8 ± 0.8 (± s.d.) であったことに対し、TIM-3-抑制抗体処理マウスに対するNDSは0.8 ± 0.8 であった (表1 ; P = 0.012 ; Mann-Whitney U-test)。

10

【0073】

【表1】

20

Neurological deficit scores in mice after 24 h of H/I in mice with IgG (n=5) or anti-TIM-3 (n=6).							
Treatment	Number with the indicated score					n	Mean ± s.d.
	0	1	2	3	4		
IgG control	0	0	2	2	1	5	2.8 ± 0.8
TIM-3-blocking antibody	3	2	1	0	0	6	0.8 ± 0.8*

H/I, hypoxia-ischaemia; TIM, T-cell immunoglobulin and mucin domain protein. The data were analysed by Mann-Whitney U-test; *P=0.012.

30

【0074】

このような結果は、TIM-3が低酸素環境で神経機能と関連があることを示す。次に、本発明者らは、HIF-1^{+/+}マウス (n=10) 及びLysM-Hif-1^{-/-}マウス (n=11) に対して、H/I後24時間になった時、NDSを測定した。HIF-1^{+/+}マウスでは偏向 (leaning) 行動と自発的運動機能の不在が観察されたが、LysM-Hif-1^{-/-}マウスでは観察されなかった。LysM-Hif-1^{-/-}マウスにおける平均NDSは、HIF-1^{+/+}マウスより非常に低かった (表2 ; 1.2 ± 0.6 vs. 2.6 ± 1.1、P = 0.0008)

40

【0075】

【表 2】

Neurological deficit scores after H/I in HIF-1 α ^{+/+} (n=10) and LysM-Hif-1 α ^{-/-} (n=11) mice Mean scores are given \pm s.d.							
Mouse	Number with the indicated score					n	Mean \pm s.d.
	0	1	2	3	4		
HIF-1 α ^{+/+}	0	2	3	2	3	10	2.6 \pm 1.1
LysM-Hif-1 α ^{-/-}	6	4	1	0	0	11	1.2 \pm 0.6**

H/I, hypoxia-ischaemia.
The data were analysed by Mann-Whitney U-test; **P=0.0008.

10

【 0 0 7 6 】

このような結果は、H I F - 1 / T I M - 3 軸 (a x i s) が脳梗塞体積及び病態生理学的炎症反応だけでなく、神経機能とも密接に関連していることを示す。

【実施例 1 1】

【 0 0 7 7 】

H I F - 1^{-/-} 欠乏マウスで T I M - 3 による神経損傷の増加
本発明者らは、T I M - 3 が H / I 後に H I F - 1^{-/-} 欠乏マウスの形質に影響を及ぼし得るか否かを実験した。このため、T I M - 3 及び G F P を発現するレンチウイルスベクター (L V - T I M 3 - G F P) を製作した。まず、レンチウイルスが神経膠細胞を感染できるか否かを調査した後、レンチウイルス - 注射マウスの G F P - 陽性 - C D 1 1 b^{high} C D 4 5^{low} 神経膠細胞で T I M - 3 の発現が非常に増加したことを観察した。脳固定装置 (s t e r e o t a x i c i n s t r u m e n t) を利用してウイルスを L y s M - H i f - 1^{-/-} マウスの右側半球に注射した。対照群マウスには、G F P のみを発現する L V - G F P を注射した。それぞれのマウスの右側半球に 4 回の頭蓋内注射 (i n t r a c r a n i a l i n j e c t i o n) を行った (図 8 a) 。 H / I は、L y s M - H i f - 1^{-/-} マウスに L V - T I M 3 - G F P または L V - G F P を注射し、5 日後に誘導し、梗塞大きさ (i n f a r c t s i z e) 及び神経学的結果は、2 4 時間後に調査した。図 8 b、c に示すように、対照群 L V - G F P - 注射マウス (n = 6) に比べて、L V - T I M 3 - G F P 注射マウス (n = 5) で T T C - 染色 - 陰性領域が非常に増加した。また、L V - T I M 3 - G F P を注射した L y s M - H i f - 1^{-/-} マウスに対する平均 N D S は、L V - G F P - 注射対照群マウスより高かった (図 8 d) (1 . 1 \pm 0 . 7 v s . 2 . 3 \pm 0 . 8、P = 0 . 0 4 6) 。このような結果は、低酸素環境で H I F - 1 / T I M - 3 軸と脳損傷の関連性を再度示す結果である。

20

30

【実施例 1 2】

【 0 0 7 8 】

T I M - 3 に対する s h R N A を利用した T I M - 3 抑制活性の分析

上記で行った実施例における実験は、T I M - 3 に対する抗体を利用して行い、さらに、本発明者らは、T I M - 3 を抑制することができるまた他の方法として、T I M - 3 に対する s h R N A の使用可能性を確認した。このため、まず一次培養膠細胞 (図 1 0 A) または V 2 小膠細胞 (図 1 0 B) に T I M - 3 に対する s h R N A を発現するレンチウイルスまたは対照群レンチウイルスを製品生産会社 (S a n t a c r u z # s c - 7 2 0 1 5 - V) から提供された説明書に従って細胞内に感染させた。以後、感染された細胞を 2 4 時間の間 1 % または 2 0 % の酸素条件で培養し、逆転写重合酵素連鎖反応分析法、免疫細胞化学法及び流細胞分析法を利用して T I M - 3 の発現を確認し、このような実験は、3 回の独立した繰返し実験から結果を得て、m e a n S D として示した。

40

【 0 0 7 9 】

分析の結果、図 1 0 に示すように、本発明の実験で使用した T I M - 3 に対する s h R

50

NAは、対照群と比べてみると、効果的にTIM-3の発現を要請することが表れ、また、低酸素条件下でTIM-3に対するshRNAを処理した群の場合、対照群を処理した群に比べてTIM-3の発現増加が阻害することが表れた。

【0080】

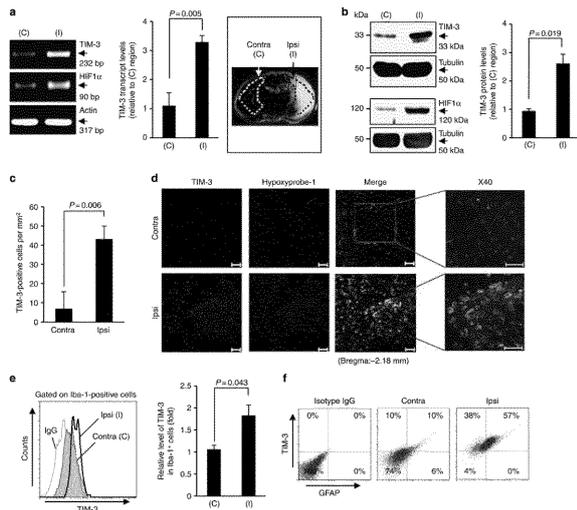
従って、このような結果からみると、TIM-3の発現または活性を阻害し得るTIM-3に対する抗体またはshRNAを含むTIM-3阻害剤は、TIM-3の発現または活性を効果的に阻害することができることが表れ、よって、このような阻害剤を脳損傷疾患の予防または治療のための製剤として使用可能なことが分かった。

【0081】

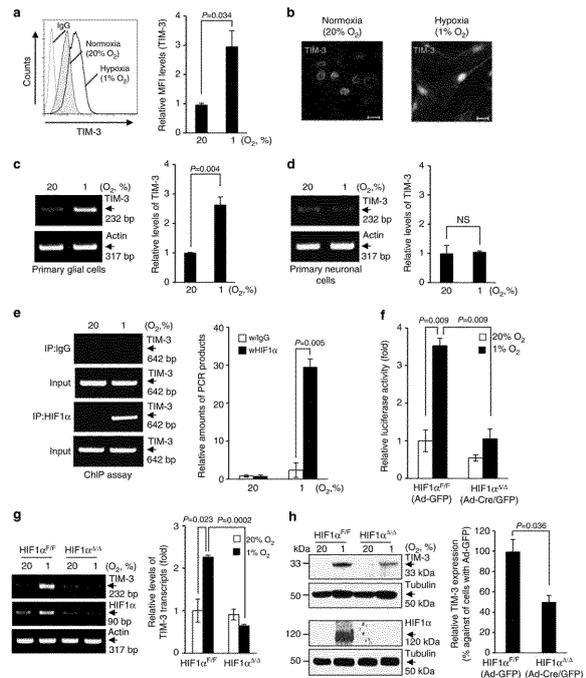
これまで本発明についてその好ましい実施例を中心として検討した。本発明が属する技術分野で通常の知識を持った者は、本発明が本発明の本質的な特性から逸脱しない範囲で変形された形態で具現可能なことが理解できるであろう。従って、開示された実施例は、限定的な観点ではなく、説明的な観点で考慮されるべきである。本発明の範囲は、前述した説明ではなく、特許請求の範囲に表れており、それと同等な範囲内にある全ての差異点は、本発明に含まれると解釈されなければならない。

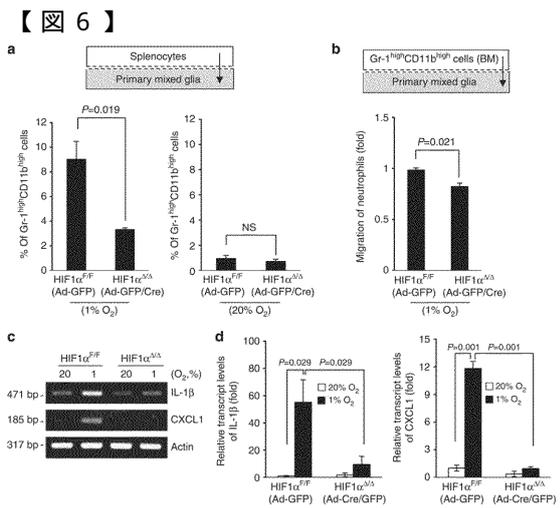
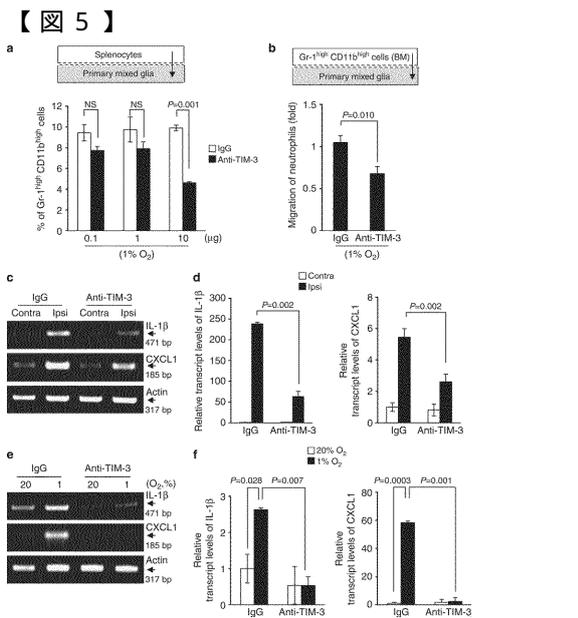
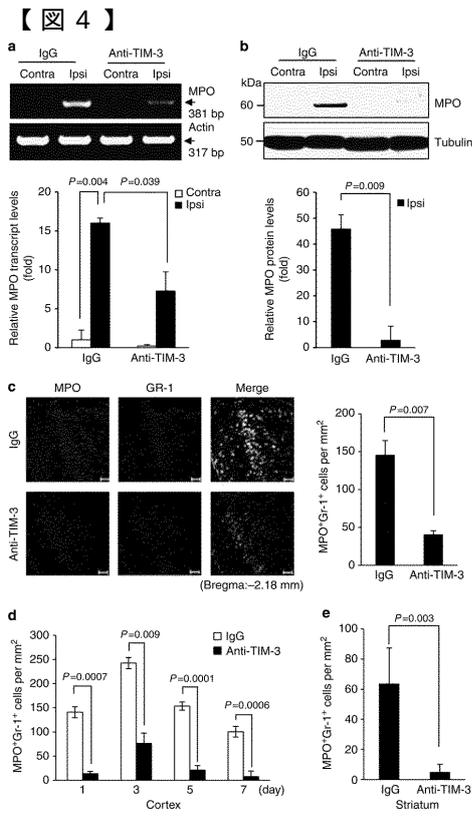
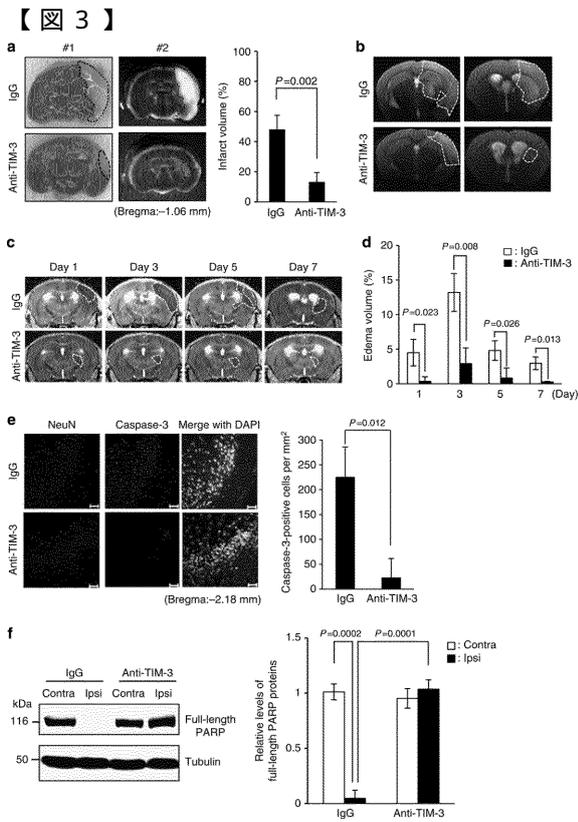
10

【図1】

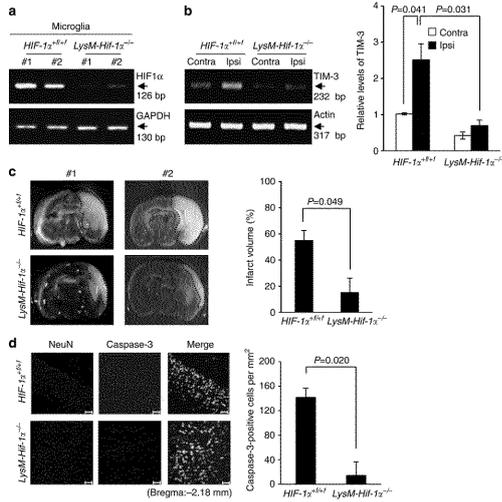


【図2】

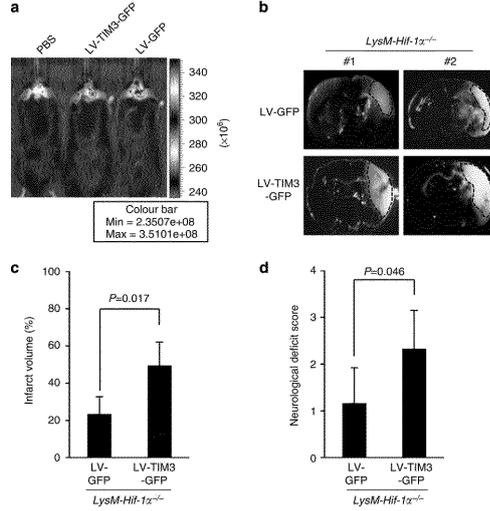




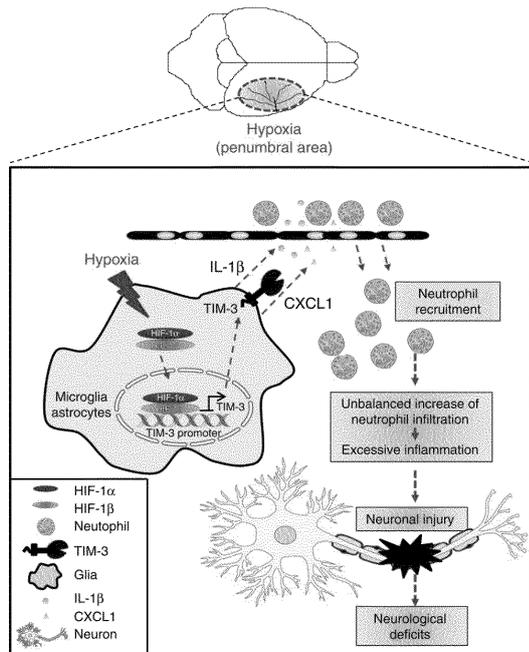
【 7 】



【 8 】

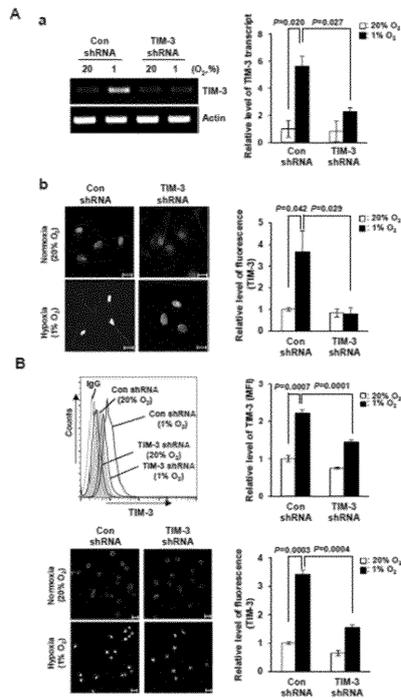


【 9 】



【 10 】

Figure 2 for Reviewers



【配列表】

0006653054000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K 16/18

(72)発明者 コ,ハン - ソク

大韓民国 1 4 0 5 1 ギョンギ - ド, アンヤン - シ, ドンアン - グ, グァンピョン - ロ 2 1 2
ボン - ギル, 2 1, # 3 1 0 - 1 3 0 8

(72)発明者 ジョン, ソン - ホ

大韓民国 1 3 8 3 4 ギョンギ - ド, グァチョン - シ, ビョリヤン - ロ, 6 6 - 1 1, # 3 4 6
- 9 0 3

(72)発明者 チャン, チ - ヨン

大韓民国 1 4 4 1 4 ギョンギ - ド, プチョン - シ, オジョン - グ, ゴガン - ロ 5 6 ボン - ギ
ル, 1 6 - 1 6, # ガ ドン - 4 0 1

(72)発明者 ユン, ヒ - ジョン

大韓民国 1 0 8 7 2 ギョンギ - ド, パジュ - シ, チョンアム - ロ, 2 7, # 6 0 9 - 1 4 0 4

(72)発明者 ジョン, セ - ボム

大韓民国 1 0 4 0 6 ギョンギ - ド, ゴヤン - シ, イルサンドン - グ, サンドウ - ロ, 1 5 6,
8 0 1 - 2 0 4

(72)発明者 キム, ヒョン - ソク

大韓民国 1 0 4 1 9 ギョンギ - ド, ゴヤン - シ, イルサンドン - グ, ベクソク - ロ, 1 1 9,
2 0 6 - 7 0 2

(72)発明者 アン, イェ - ヒョン

大韓民国 0 6 5 4 7 ソウル, ソチョ - グ, バンボ - デロ, 2 7 5, # 1 0 4 - 8 0 3

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 国際公開第2011/155607(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 9 / 0 0

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 2 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 1 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)