明　細　書

発明の名称 ： 心筋収縮改善治療法および心筋細胞死抑制法の開発

技術分野

[0001] 本発明は、α－ガラクトシルセラミド（α－ＧａｌＣｅｒ）をパルスした樹状細胞を含有する、心筋症の予防および／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] 心筋症は、一般的に、心機能障害を伴う心筋疾患と定義されており、心肥大、心拡大、収縮能及び／又は拡張能の低下等を主症状として有する。心筋症は、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、不整脈原性（催不整脈性）右室心筋症、分類不能の心筋症、特定心筋症に分類される。特定心筋症には、虚血性心筋症、弁膜症性心筋症、高血圧性心筋症、炎症性心筋症、代謝性心筋症等が含まれる。

[0003] 心筋症の原因は不明であることが多く、遺伝子的要因、免疫の異常、ウイルス感染、環境要因等が知られている。なかでも、肥大型心筋症は、「（１）左室ないしは右室心筋の肥大と（２）心肥大に基づく左室拡張能低下を特徴とする疾患群」と定義され、拡張型心筋症は、「左室拡大と左室収縮能障害を特徴とし、びまん性の収縮障害を引き起こしうる異常な負荷状況（高血圧や弁膜症）および冠動脈疾患の合併がない疾患群」と定義されている。動脈硬化等による心筋梗塞や狭心症は、虚血性心筋症を併発することがある。また、心房細動等の不整脈は、不整脈原性右室心筋症を併発することがある。このような他の疾患が原因となる二次性心筋症を発症した患者の治療では、その原因となる疾患を治療することが心筋機能の回復につながり得る。

[0004] また、ドキソルビシン等のアントラサイクリン系抗癌剤を癌患者に投与すると、用量依存的に心筋症（薬剤性心筋症）を発症するリスクが高まることが知られている（非特許文献１～２）。一旦、心筋症を発症すると、慢性心不全に発展する等の予後が極めて不良であり、癌治療を継続することが困難

となる場合がある。ドキソルビシンによる心筋障害のメカニズムはいまだ不明であり、これまでに有効な治療法は知られていない。ドキソルビシンによる薬剤性心筋症患者の心筋では、炎症性サイトカインの発現量が上昇しており、炎症細胞の浸潤も増加していることが報告されている（非特許文献３～４）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２０１５／１２９７９１号

特許文献2：国際公開第２００３／０１６３２６号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Barrett P J et al. Ann. Oncol. 2009;20: 816-827.

非特許文献2：Felker GM et al. N. Eng. J. Med. 2000;342: 1077-1084.

非特許文献3：Wang L et al. Sci. Rep. 2016 Jun21; 6: 28399.

非特許文献4：A. Riad et al. European Journal ofHeart Failure 10 (2008) 233-243.

非特許文献5：Sobirin M.A.et al., Circ. Res. 2012;111: 1037-1047.

非特許文献6：Van Kaer L. Nat. Rev. Immunol, 2005;5: 31-42.

非特許文献7：Ishikawa E. et al., Int. J. Cancer2005; 117: 265-273.

非特許文献8：Fujii et al., Nat. Immunol. 3: 867(2002).

非特許文献9：Ishikawa A.et al., Clin. CancerRes. 2005; 11: 1910-1917.

非特許文献10：Godfrey DI,et al., Nat. Rev. Immunol.2007; 7: 505-518.

非特許文献11：Homma T.et al., J. Mol. Cell. Cardiol.2013; 62: 179-188.

非特許文献12：Endre Pal,et al., J. Immunol. 2001;166: 662-668.

非特許文献13：Sharif S,et al., Nat. Med. 2001; 7:1057-1062.

非特許文献14：Morimoto et al., CirculationResearch, 2017, 185-194.

非特許文献15：Nonaka et al., British Journal ofPharmacology 2015, 172, 2369-2382.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明者らは、これまでにα－ＧａｌＣｅｒの投与が、心筋梗塞もしくはその合併症（例えば、心不全、不整脈、乳頭筋断裂、心破裂、心室瘤、心筋梗塞後症候群）または虚血再灌流障害の予防又は治療効果を示すことを見出した（特許文献１、非特許文献５）。

[0008] そこで、本発明は、心筋症の予防および／または治療のための医薬、あるいは、心筋症の予防および／または治療方法を提供することを目的とする。また、本発明は、心筋の収縮力を改善するための医薬、心筋細胞死を抑制および／または予防するための医薬、心筋の萎縮を抑制および／または改善するための医薬、心筋線維化の進行抑制および／または治療するための医薬、あるいは、心筋の炎症を抑制するための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

[0009] α－ガラクトシルセラミド（α－ＧａｌＣｅｒ）は、海綿から単離されたスフィンゴ糖脂質であり、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ細胞）を活性化させることが知られている（非特許文献６）。α－ＧａｌＣｅｒによるＮＫＴ細胞の活性化は一過性であり、反復投与した場合には薬効の低下、肝障害の惹起が見られるという課題を解決するために、α－ＧａｌＣｅｒをパルスした樹状細胞を利用する等の種々の検討がなされている（特許文献２、非特許文献７～９）。

[0010] ＮＫＴ細胞は、ただ１種類のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現しており、ＣＤ１ｄ分子により提示された糖脂質抗原のみを認識して活性化し、多様なサイトカインを産生する。このＴ細胞受容体は、可変性のないα鎖を有しており、マウスではＶα１４－Ｊα１８、ヒトではＶα２４－Ｊα１８と呼ばれる。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１（Ｔｈ１）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１０）。

[0011] ＮＫＴ細胞は、Ｔｈ１型及びＴｈ２型サイトカインの両方を産生することから、ＮＫＴ細胞を用いた細胞免疫療法では、ＮＫＴ細胞の免疫応答のバランスをいかに制御するかが重要である（非特許文献５、１１～１３）。例えば、自己免疫性疾患を治療する場合には、ＮＫＴ細胞の免疫応答をＴｈ２型にシフトさせ、液性免疫を活性化させる。一方、特定のがんや感染症などの疾患を治療する場合、ＮＫＴ細胞の免疫応答をＴｈ１型にシフトさせ、細胞性免疫を活性化させる。

[0012] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、α－ＧａｌＣｅｒでパルスされた樹状細胞を投与することにより、ＮＫＴ細胞を活性化させ、心筋の収縮力を改善し、心筋細胞死を抑制することができることを見出した。

[0013] すなわち、本発明は、以下の［１］～［３４］を提供する。

［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α－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、非虚血性心筋症の予防および／または治療のための医薬。

［２］

上記非虚血性心筋症が拡張型心筋症、または、アントラサイクリン系抗癌剤による薬剤性心筋症である、［１］に記載の医薬。

［３］

アントラサイクリン系抗癌剤を更に含有する、［１］または［２］に記載の医薬。

［４］

アントラサイクリン系抗癌剤を投与された対象の心筋症を予防および／ま

たは治療するための、［１］～［３］のいずれかに記載の医薬。

［５］

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α－ガラクトシルセラミドでパルスする工程

を含む、非虚血性心筋症の予防および／または治療のための医薬の製造方法。

［６］

上記非虚血性心筋症が、拡張型心筋症、または、アントラサイクリン系抗癌剤による薬剤性心筋症である、［５］に記載の医薬の製造方法。

［７］

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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、非虚血性心筋症の予防および／または治療方法。

［８］

上記非虚血性心筋症が、アントラサイクリン系抗癌剤による薬剤性心筋症、または、拡張型心筋症である、［７］に記載の非虚血性心筋症の予防および／または治療方法。

［９］

上記対象が、アントラサイクリン系抗癌剤を投与された患者である、［７］または［８］に記載の非虚血性心筋症の予防および／または治療方法。

［１０］

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α－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、心筋の収縮力の低下を抑制

するための医薬。

［１１］

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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋の収縮力の低下を抑制する方法。

［１２］

上記対象が、非虚血性心筋症を罹患した患者である、［１１］に記載の方法。

［１３］

上記対象が、アントラサイクリン系抗癌剤を投与された患者である、［１１］に記載の方法。

［１４］

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α－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、心筋細胞死を抑制または予防するための医薬。

［１５］

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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋細胞死を抑制または予防する方法。

［１６］

上記対象が、非虚血性心筋症を罹患した患者である、［１５］に記載の方法。

［１７］

上記対象が、アントラサイクリン系抗癌剤を投与された患者である、［１５］に記載の方法。

［１８］

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α－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、心筋の萎縮を抑制または改善するための医薬。

［１９］

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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋の萎縮を抑制または改善する方法。

［２０］

上記対象が、非虚血性心筋症を罹患した患者である、［１９］に記載の方法。

［２１］

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α－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、心筋線維化（特に、心筋間質の線維化）の進行抑制および／または治療のための医薬。

［２２］

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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋線維化（特に、心筋間質の線維化）の進行を抑制または治療する方法。

［２３］

上記対象が、非虚血性心筋症を罹患した患者である、［２２］に記載の方法。

［２４］

上記対象が、アントラサイクリン系抗癌剤を投与された患者である、［２２］に記載の方法。

［２５］

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α－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、心筋の炎症を抑制するための医薬。

［２６］

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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋の炎症を抑制する方法。

［２７］

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α－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の、非虚血性心筋症の予防および／または治療のための使用。

［２８］

上記非虚血性心筋症が拡張型心筋症、または、アントラサイクリン系抗癌

剤による薬剤性心筋症である、［２７］に記載の使用。

［２９］

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α－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の、心筋の収縮力の低下を抑制するための使用。

［３０］

上記非虚血性心筋症が拡張型心筋症、または、アントラサイクリン系抗癌剤による薬剤性心筋症である、［２９］に記載の使用。

［３１］

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α－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の、心筋細胞死を抑制または予防するための使用。

［３２］

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α－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の、心筋の萎縮を抑制または改善するための使用。

［３３］

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α－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の、心筋線維化（特に、心筋間質の線維化）の進行抑制および／または治療のための使用。

［３４］

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α－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の、心筋の炎症を抑制するための使用。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、心筋症の予防および／または治療のための医薬を提供すること、心筋症の予防および／または治療方法、心筋の収縮力の低下を抑制および／または改善する方法、心筋細胞死を抑制および／または予防する方法、あるいは、心筋の萎縮を抑制および／または改善する方法を提供することができる。また、本発明によれば、心筋線維化（特に、心筋間質の線維化）の進行を抑制および／または治療することができる。心筋の収縮力の低下および心筋線維化は、心筋症以外の疾患に伴う症状として表れることがある。したがって、本発明は、心筋症に伴う心筋の収縮力の低下および心筋線維化の進行に限らず、他の疾患に伴う心筋の収縮力の低下および心筋線維化の進行を抑制し得る。さらに、本発明によれば、心筋の炎症を抑制し得る。

[0015] α－ＧａｌＣｅｒは、ヒトに全身投与すると、重篤な肝障害を引き起こすことが知られている。しかし、α－ＧａｌＣｅｒをパルスした樹状細胞を投与することにより、副作用のリスクを低下させ、α－ＧａｌＣｅｒによる効果をより長い時間持続させることができる。

[0016] また、心臓の収縮能は、β受容体－ｃＡＭＰ（サイクリックＡＭＰ）／ＰＫＡ（プロテインキナーゼＡ）－ｐＰＬＮ（リン酸化ホスホランバン）－ＳＥＲＣＡ（筋小胞体Ca^{2+}ＡＴＰアーゼ）経路によって調整されている。本発明によれば、ＮＫＴ細胞を活性化することにより、ＩＦＮ－γ発現量が増加し、ＰＬＮ（ホスホランバン）のリン酸化を促進し、心収縮能の低下を抑制し得る。

[0017] さらに、本発明によれば、心筋細胞の線維化及び心筋細胞死（心筋細胞のアポトーシス）も抑制することができ、心保護効果（例えば、心機能の低下を抑制する効果）を奏し得る。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]Ｄａｙ０、７、１４、２１、２８の各時点での体重（ＢＷ）、左室内径短縮率（ＦＳ）の経時変化を示すグラフである。

[図2]Ｄａｙ７及び１４におけるＶα１４Ｊα１８の発現量を示すグラフであ

る。

[図3]Ｄａｙ７及び１４における炎症性サイトカインの変化を示すグラフである。

[図4]（ａ）は、ＤＯＸマウスに対するαＧａｌＣｅｒによる効果を評価する試験方法を示す図であり、（ｂ）は、各群マウスのＶα１４Ｊα１８の発現量を比較したグラフである。

[図5]各群マウスの左室内径短縮率（ＦＳ）、左室拡張末期径（ＬＶＤｄ）及び左室収縮末期径（ＬＶＤｓ）を比較したグラフである。

[図6]各群マウスの体重（ＢＷ）、心エコーにおける真腔（ＴＬ）、真腔に対する全心臓の比（ＷＨ／ＴＬ）、真腔に対する左心室の比（ＬＶ／ＴＬ）を比較したグラフである。

[図7]各群マウスから採取した心筋細胞をＴＵＮＥＬ染色して撮影した写真である。

[図8]Ｄａｙ７及び１４における各群マウスの炎症性サイトカインの発現量を比較したグラフである。

[図9]Ｄａｙ７及び１４における各群マウスの炎症性サイトカインの発現量を比較したグラフである。

[図10]（ａ）は、抗ＩＦＮ－γ抗体による効果を評価する試験方法を示す図であり、（ｂ）は、各群マウスの駆出率（ＥＦ）、左室内径短縮率（ＦＳ）、左室拡張末期径（ＬＶＤｄ）及び左室収縮末期径（ＬＶＤｓ）を比較したグラフである。

[図11]各群マウスの心筋細胞におけるＩＦＮγの発現量を比較したグラフである。

[図12]異種組織移植によるＶα１４Ｊα１８及び炎症性サイトカインのｍＲＮＡ発現量の変化を示すグラフである。

[図13]α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの懸濁液を単回投与した場合のＮＫＴ細胞の活性化を示すグラフである。

[図14]（ａ）は、ＤＣＭマウスと野生型Ｂａｌｂ／ｃマウス（ＷＴマウス）

の心筋組織の断面を示す写真であり、（ｂ）は、両マウスの心重量ＨＷ／ＢＷ及び肺重量ＬＷ／ＢＷを比較したグラフと、脾臓におけるＶα１４Ｊα１８の発現量を比較したグラフである。

[図15]ＤＣＭマウス及びＷＴマウス由来の脾臓細胞を用いたサイトグラムである。

[図16]（ａ）は、ＤＣＭマウスの経時的な生存率を示すグラフであり、（ｂ）は、ＤＣＭマウスにおける５週齢（投与時）と９週齢の左室駆出率（ＬＶＥＦ）の変化を示すグラフである。

[図17]（ａ）は、４群間における５週齢又は９週齢の左室拡張末期径（ＬＶＤｄ）、９週齢での心重量及び肺重量を示すグラフであり、（ｂ）は、心筋細胞の断面を示す写真であり、（ｃ）は、４群間における心筋間質の線維化した細胞の割合を示すグラフである。

[図18]４群間におけるＶα１４Ｊα１８、サイトカインの発現量を比較したグラフである。

[図19]ＤＣＭマウスにおけるα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ又はＰＢＳの投与前後の左室駆出率（ＬＶＥＦ）の変化を示すグラフである。

[図20]炎症性サイトカインの発現量を示すグラフである。

[図21]血液中のサイトカイン発現量の変化を示すグラフである。

[図22]（ａ）は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣによる急性効果を評価する試験方法を示す図であり、（ｂ）は、その結果を示すグラフである。

[図23]α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣによるｐＰＬＮ濃度の変化を示すグラフである。

[図24]培養心筋細胞におけるｐＰＬＮ濃度の変化を示す電気泳動の写真である。

[図25]培養心筋細胞におけるｐ－Ｓｔａｔ１及びｐＰＬＮ濃度の変化を示す電気泳動の写真である。

[図26]マイクロアレイのＧＯ解析の結果を示す図である。

[図27]野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）の心筋におけるｍＲ

ＮＡの発現量を示すグラフである。

[図28]野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）の心筋におけるタンパク質の発現量を示すウェスタンブロット及びそれを定量化したグラフである。

[図29]野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）の心筋におけるタンパク質Ａｎｇｐｔ１及びｖｅｇｆａの発現量を示すグラフである。

[図30]Ｂａｌｂ／ｃマウスへα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与して４日後の各遺伝子の発現量を示すグラフである。

[図31]心筋におけるタンパク質の発現量を示すウェスタンブロット及びそれを定量化したグラフである。

[図32]α－ＧａｌＣｅｒのみ、又は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣをマウスに投与してから４日後の心筋における各タンパク質の発現量をウェスタンブロットである。

[図33]各タンパク質の発現量の経時的変化を示すウェスタンブロットとそれを定量化したグラフである。

[図34]心筋におけるサイトカイン遺伝子の発現量を示すグラフである。

[図35]各タンパク質の発現量を示すウェスタンブロットである。

[図36]心筋におけるサイトカイン遺伝子の発現量を示すグラフである。

[図37]ＰＢＳ又はα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与してから２８日後におけるタンパク質の発現量を示すウェスタンブロットである。

[図38]心筋線維芽細胞にＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０を投与した後の、遺伝子の発現量の変化を示すグラフである。

[図39]ＩＦＮγで前処理した心筋線維芽細胞にＴＧＦβを投与した時のタンパク質の発現量を示すウェスタンブロット及びそれを定量化したグラフである。

[図40]ＩＦＮγで心筋線維芽細胞を処理したときのタンパク質の発現量を示すウェスタンブロット及びそれを定量化したグラフである。

[図41]ＩＬ４又はＩＬ１０で心筋線維芽細胞を処理したときのタンパク質の

発現量を示すウェスタンブロットとそれを定量化したグラフである。

[図42]（ａ）は仔ラット心筋細胞にＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０を投与した後のＡｎｇｐｔ１の発現量を示すグラフである。（ｂ）は、ｐＳｔａｔ１及びＳｔａｔ１の発現量を示すウェスタンブロットである。

[図43]ＩＦＮγ投与によるＡｎｇｐｔ１の発現量の変化を示すグラフである。

[図44]初代培養の心筋細胞にＩＦＮγを投与した後のタンパク質の発現量を示すウェスタンブロット及びそれを定量化したグラフである。

[図45]初代培養の心筋細胞にＩＬ４又はＩＬ１０を投与した後のタンパク質の発現量を示すウェスタンブロット及びそれを定量化したグラフである。

[図46]ミネソタ心不全質問票（ＭＬＨＦＱ）又はカンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）を用いたＱＯＬ評価の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明の実施形態について、以下に詳述する。

[0020] 本発明の第一実施形態は、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α－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、心筋症の予防および／または治療のための医薬に関する。

[0021] 本実施形態に係る樹状細胞は、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α－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。

[0022] この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α－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７及び８に記載されている。

[0023] 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ェ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。

[0024] 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。

[0025] 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に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用いて、単核球細胞を５～１０日間、培養する。

[0026] パルス工程は、上記培養工程により調製された樹状細胞をα－ＧａｌＣｅｒでパルスする工程であり、具体的にはα－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α－ＧａｌＣｅｒは、α－ガラクトシルセラミドそのもののほか、その塩、エステル、またはその誘導体（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。α－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。

[0027] 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α－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。

[0028] 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るα－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、本実施形態に係る医薬として用いることもできる。

[0029] 上述のように調製されたα－ＧａｌＣｅｒをパルスした樹状細胞は、投与された対象の体内でＮＫＴ細胞を活性化させ、ＩＦＮ－γの産生を誘導または促進させる。ＮＫＴ細胞の活性化は徐々に高まっていき、７日目まで持続し得る。ＩＦＮ－γの産生も同様に徐々に高まっていき、２８日目まで持続し得る。心筋細胞において、ＩＦＮ－γはＰＬＮ（ホスホランバン）のリン酸化を促進し、心収縮能を増強すると考えられる。また、α－ＧａｌＣｅｒは、心筋症に伴う左室駆出率（ＬＶＥＦ）の低下を抑制する効果だけでなく、心筋間質の線維化を抑制する効果も奏する。α－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。

[0030] ある実施形態においては、α－ＧａｌＣｅｒパルス樹状細胞の予防および／または治療効果は、α－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、その中に含まれる炎症性サイトカイン（例えば、ＩＦＮ－γ）もしくはバイオマーカー（例えば、血漿ＢＮＰ（脳性ナトリウム利尿ペプチド）、血清ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ、血漿ＡＮＰ、心筋トロポニン、血漿ノルアドレナリン、アルドステロン、血漿レニン活性）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。上記予防および／または治療効果は、心エコー検査を用いた心機能評価によって確認してもよい。また、対象から予めＮＫＴ細胞を含む試料を採取し、α

－ＧａｌＣｅｒパルス樹状細胞と接触させた後、ＮＫＴ細胞の上記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。α－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α－ＧａｌＣｅｒパルス樹状細胞は心筋症の予防および／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。

[0031] 本実施形態に係る医薬は、非虚血性心筋症に罹患した、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。また、本実施形態に係る医薬は、他の疾患（例えば、循環器系疾患）に伴う心筋症様症状の予防および／または治療に用いてもよい。

[0032] 本明細書において、「非虚血性心筋症」とは、虚血性心筋症以外の心筋症を意味し、虚血性障害（心筋梗塞もしくはその合併症（例えば、心不全、不整脈、乳頭筋断裂、心破裂、心室瘤、心筋梗塞後症候群）、スタニング、ハイパネーション、微小循環障害、狭心症または虚血再灌流障害）による心血管病は除外される。非虚血性心筋症としては、例えば、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、不整脈原性右室心筋症、二次性心筋症が挙げられる。非虚血性心筋症は、遺伝性心筋症であっても、非遺伝性心筋症であってもよい。

[0033] 二次性心筋症の原因となり得る疾患としては、例えば、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ、多発性筋炎、ＳＬＥ、混合性結合組織病）、炎症性疾患（例えば、ウイルス性または非ウイルス性心筋炎、サルコイドーシス）、浸潤性疾患（例えば、アミロイドーシス、ヘモクロマトーシス）、内分泌性疾患（例えば、甲状腺機能亢進症、クッシング病、褐色細胞腫、副腎不全、成長ホルモン分泌異常）、代謝性疾患（例えば、糖尿病）、先天性酵素異常（例えば、ファブリー病、ポンペ病、ハーラー症候群、ハンター症候群）、

神経筋疾患（例えば、筋ジストロフィー、ラミノパチー、ミトコンドリア病）、高血圧性心疾患、弁膜症、心房中隔欠損症、好酸球増多心内膜炎、心内膜弾性症、不整脈（例えば、洞不全症候群、房室ブロック、心房細動、心房頻拍）が挙げられる。

[0034] 薬剤性心筋症の原因となり得る薬剤としては、例えば、アントラサイクリン系抗癌剤（例えば、ドキソルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、リポソーマルアントラサイクリン）、アルキル化剤（例えば、シクロフォスファミド、イホスファミド）、代謝拮抗薬（例えば、クロファラビン）、微小管阻害薬（例えば、ドセタキセル、パクリタキセル）、ヒト化モノクローナル抗体（例えば、トラスツズマブ、ベバシズマブ、ペルツズマブ）、免疫チェックポイント阻害薬（例えば、ニボルマブ、イピリムマブ）、チロシンキナーゼ阻害薬（例えば、スニチニブ、パゾパニブ、ソラフェニブ、ダサチニブ、イマチニブメシル酸塩、ラパチニブ、ニロチニブ）、プロテアソーム阻害薬（例えば、カルフィルゾミブ、ボルテゾミブ）が挙げられる。

[0035] 本実施形態における対象とは、非虚血性心筋症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る。

[0036] なお、心筋症（特に非虚血性心筋症）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α－ＧａｌＣｅｒ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実施形態に係る医薬を速やかに調製して、適切な時期に患者に投与することが望ましい。α－ＧａｌＣｅｒパルス樹状細胞の投与による効果は、投与後０～７日で発揮される傾向があり、特に心筋症患者の急性期の治療やリハビリに有効である。

[0037] 本実施形態に係る医薬は、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実施形態に係る医薬を投与することで、心筋症の発症を予防することができる。例えば、上述の薬剤性心筋症の原因となり得る薬剤を投与した、または投与予定である患者に本実施形態に係る医薬を投与することで、心筋症の発症を予防することができる。また治療を目的とする場合、心筋症と診断された、またはその兆候が確認された対象に本実施形態に係る医薬を投与することで、心筋症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。

[0038] 本実施形態に係る医薬は、α－ＧａｌＣｅｒ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。

[0039] 本実施形態に係る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１ｍ^{2}あたり１０^{6}個～１０^{9}個、好ましくは１０^{7}個～１０^{9}個である。

[0040] 本実施形態に係る医薬は、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。

[0041] 本実施形態に係る医薬は、薬学的に許容される緩衝剤、安定剤、保存剤その他の任意成分をさらに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。

[0042] また、本実施形態に係る医薬は、薬剤性心筋症の原因となり得る薬剤（例えば、アントラサイクリン系抗癌剤との合剤）をさらに含有してもよい。この場合、薬剤性心筋症の併発を予防することができ、癌等の所望の治療を継続することが可能となり、患者のＱＯＬもより改善し得る。

[0043] 本実施形態は、当該医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、非虚血性心筋症の予防および／または治療方法という側面も有する。

[0044] 当該医薬を投与する対象は、非虚血性心筋症を罹患した患者に限定されず、薬剤性心筋症の原因となり得る薬剤を投与された、又は投与予定である患者であってもよい。

[0045] 本実施形態に係る医薬の投与方法は、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、本実施形態に係る医薬は、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。例えば、薬剤性心筋症の原因となり得る薬剤を既に投与された患者に本医薬を投与することにより、薬剤性心筋症の発症を予防し得る。薬剤性心筋症の原因となり得る薬剤（例えば、アントラサイクリン系抗癌剤）の投与と同時に本医薬を患者に投与してもよく、薬剤性心筋症の原因となり得る薬剤と本医薬を組み合わせた合剤を投与してもよい。

[0046] 本発明の第二実施形態は、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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋の収縮力の低下を抑制する方法に関する。本実施形態における各用語の意味は、第一実施形態において説明したとおりである。

[0047] 当該医薬を投与する対象は、非虚血性心筋症を罹患した患者に限定されず、心筋の収縮力の低下を伴う疾患を罹患した患者であってもよい。心筋の収縮力の低下は、末梢血管や腎臓等における循環器疾患の原因となり得、患者のＱＯＬの低下、予後不良を引き起こしやすい。

[0048] 本発明の第三実施形態は、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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋細胞死を予防する方法に関する。本実施形態における各用語の意味は、第一及び第二実施形態において説明したとおりである。また、本実施形態は、第一実施形態に係る医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋の萎縮を改善する方法という側面も有する。アントラサイクリン系抗がん剤の使用により、心筋の萎縮または心筋細胞死を引き起こすことが知られている。本実施形態によれば、アントラサイクリン系抗がん剤による心筋の萎縮または心筋細胞死を抑制することができる。

[0049] 本発明の第四実施形態は、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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋線維化（特に、心筋間質の線維化）の進行を抑制する方法に関する。本実施形態における各用語の意味は、第一及び第二実施形態において説明したとおりである。

[0050] 本発明の第五実施形態は、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α－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医薬を、それを必要とする対象に投与することを含む、心筋の炎症を抑制する方法に関する。本実施形態における各用語の意味は、第一及び第二実施形態において説明したとおりである。

[0051] 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

[0052] １．ドキソルビシン誘発心筋症モデルマウス（ＤＯＸマウス）

（１）ＤＯＸマウスの作製

１０～１１週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにドキソルビシン（６ｍｇ

／ｋｇ）を２日に１度、尾静脈から静脈投与した。すなわち、最初にドキソルビシンを投与した日をＤａｙ０とした場合に、Ｄａｙ２、Ｄａｙ４にドキソルビシンを注射した（合計３回投与）。Ｄａｙ０、７、１４、２１、２８の各時点で、体重測定、心エコー検査を行い、心筋におけるＮＫＴ細胞の量及び炎症性サイトカインの発現量を評価した。

[0053] 結果を図１～３に示す。図１は、Ｄａｙ０、７、１４、２１、２８の各時点での体重（ＢＷ）、左室内径短縮率（ＦＳ）の経時変化を示すグラフである。図１中、アスタリスク（＊＊）は、Ｄａｙ０の数値に比べて有意差（ｐ＜０．０１）があることを示す。ドキソルビシンを投与した後、Ｄａｙ７以降、減少していた体重は徐々に増加していく傾向が見られたが、左室内径短縮率は改善していないことがわかった。図２は、Ｄａｙ７及び１４におけるＶα１４Ｊα１８の発現量を示すグラフである。図２中、アスタリスク（＊）は、Ｃｏｎｔｒｏｌの数値に比べて有意差（ｐ＜０．０５）があることを示す。ドキソルビシン非投与群（Ｃｏｎｔｒｏｌ）を１とした場合、ドキソルビシン投与群では、Ｖα１４Ｊα１８の発現量が低下しており、ＮＫＴ細胞数が減少していることがわかった。図３は、Ｄａｙ７及び１４における炎症性サイトカイン（ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α）の変化を示すグラフである。図３中、アスタリスク（＊）は、Ｃｏｎｔｒｏｌの数値に比べて有意差（ｐ＜０．０５）があることを示す。Ｄａｙ７では、ドキソルビシン投与群のＩＬ－６発現量が顕著に増加しており、ＩＬ－１β及びＴＮＦ－αの発現量は低下していた。Ｄａｙ１４では、ＩＬ－１β、ＩＬ－６及びＴＮＦ－αの発現量は、全てドキソルビシン非投与群よりも顕著に増加しており、長期にわたって炎症性サイトカインの発現量は増加していた。

[0054] ２．ＤＯＸマウスに対するαＧａｌＣｅｒによる効果

（１）心機能及び炎症性サイトカイン

１０週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスを、Ｃｏｎｔｒｏｌ群、ＧａｌＣｅｒ群、ＤＯＸ群、ＧａｌＣｅｒ＋ＤＯＸ群の４つに群分けした。以下に、最初にドキソルビシンを投与した日をＤａｙ０として、投与方法を説明する

（図４（ａ））。

Ｃｏｎｔｒｏｌ群マウスには、Ｄａｙ－７（Ｄａｙ０の７日前）にＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水）を腹腔内投与（ｉｐ）し、生理食塩水を静脈内投与した。

ＧａｌＣｅｒ群マウスには、Ｄａｙ－７にαＧａｌＣｅｒ（０．１μｇ／ｇ）を腹腔内投与（ｉｐ）し、Ｄａｙ０、２、４に生理食塩水を静脈内投与した。

ＤＯＸ群マウスには、Ｄａｙ－７にＰＢＳを腹腔内投与（ｉｐ）し、Ｄａｙ０、２、４にドキソルビシン（６ｍｇ／ｋｇ）を静脈内投与した。

ＧａｌＣｅｒ＋ＤＯＸ群マウスには、Ｄａｙ－７にαＧａｌＣｅｒ（０．１μｇ／ｇ）を腹腔内投与（ｉｐ）し、Ｄａｙ０、２、４にドキソルビシン（６ｍｇ／ｋｇ）を静脈内投与した。

Ｄａｙ１４の時点における各マウスの体重、血圧、心エコー、臓器重量、Ｖα１４Ｊα１８の発現量、心機能、炎症性サイトカインを評価した。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内径短縮率を（左室拡張末期径－左室収縮期末期径）／左室拡張末期径×１００として算出した。

[0055] 結果を図５～９に示す。図４（ｂ）は、各群マウスのＶα１４Ｊα１８の発現量を比較したグラフである。図４（ｂ）中、アスタリスク（＊＊）は、２群間のデータに有意差（ｐ＜０．０１）があることを示す。ＤＯＸ心筋症マウスにαＧａｌＣｅｒを投与すると、Ｖα１４Ｊα１８の発現量が約１０．６倍に増加したことがわかった。図５は、各群マウスの左室内径短縮率（ＦＳ）、左室拡張末期径（ＬＶＤｄ）及び左室収縮末期径（ＬＶＤｓ）を比較したグラフである。図５中、アスタリスク（＊、＊＊）は、２群間のデータに有意差（それぞれ、ｐ＜０．０５、ｐ＜０．０１）があることを示す。ＤＯＸ群マウスでは左室内径短縮率が低く、左室収縮末期径も大きいのに対

し、ＧａｌＣｅｒ＋ＤＯＸ群マウスでは、他の群のマウスと同程度まで改善していることがわかった。すなわち、ＧａｌＣｅｒ投与により、ＮＫＴ細胞が増加するだけでなく、心収縮能の低下も改善した。

[0056] 図６は、各群マウスの体重（ＢＷ）、心エコーにおける真腔（ＴＬ）、真腔に対する全心臓の比（ＷＨ／ＴＬ）、真腔に対する左心室の比（ＬＶ／ＴＬ）を比較したグラフである。図６中、アスタリスク（＊）は、２群間のデータに有意差（ｐ＜０．０５）があることを示す。ＤＯＸ群マウスでは、Ｃｏｎｔｒｏｌ群マウスと比べてＷＨ／ＴＬ及びＬＶ／ＴＬの値が有意に減少していた。一方、ＧａｌＣｅｒ＋ＤＯＸ群マウスでは、ＤＯＸ群マウスにおいて減少していたＷＨ／ＴＬ及びＬＶ／ＴＬの値が改善していたことがわかった。図７は、各群マウスから採取した心筋細胞をＴＵＮＥＬ（terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling）染色して撮影した写真である。ＤＯＸ群マウスでは、心筋細胞のアポトーシスが観察されたが（矢印で示した。）、ＧａｌＣｅｒ＋ＤＯＸ群マウスでは、アポトーシスが抑制されることが示唆された。すなわち、ＧａｌＣｅｒ投与により、心筋細胞のアポトーシスが抑制された。

[0057] 図８～９は、Ｄａｙ７及び１４における各群マウスの炎症性サイトカイン（ＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１０、ＩＬ－４、ＩＦＮ－γ）の発現量を比較したグラフである。図８～９中、アスタリスク（＊、＊＊）は、２群間のデータに有意差（それぞれ、ｐ＜０．０５、ｐ＜０．０１）があることを示す。すなわち、ＧａｌＣｅｒ投与により、炎症性サイトカインは減少せず、ＩＦＮγが増加した。

[0058] ３．抗ＩＦＮ－γ抗体による効果

１０週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスを、ＧＤ群、ＤＩ群、ＧＤＩ群の３つに群分けした。以下に、最初にドキソルビシンを投与した日をＤａｙ０として、投与方法を説明する（図１０（ａ））。

ＧＤ群マウスには、Ｄａｙ－７にαＧａｌＣｅｒ（０．１μｇ／ｇ）を腹腔内投与（ｉｐ）し、Ｄａｙ０、２、４にドキソルビシン（６ｍｇ／ｋｇ）

を静脈内投与した。

ＤＩ群マウスには、Ｄａｙ０、２、４にドキソルビシン（６ｍｇ／ｋｇ）を静脈内投与し、Ｄａｙ７に抗ＩＦＮγ抗体（１００μｇ）を腹腔内投与（ｉｐ）した。

ＧＤＩ群マウスには、Ｄａｙ－７にαＧａｌＣｅｒ（０．１μｇ／ｇ）を腹腔内投与（ｉｐ）し、Ｄａｙ０、２、４にドキソルビシン（６ｍｇ／ｋｇ）を静脈内投与し、Ｄａｙ７に抗ＩＦＮγ抗体（１００μｇ）を腹腔内投与（ｉｐ）した。

Ｄａｙ１４の時点における各マウスの心エコー、臓器重量、心機能、炎症性サイトカイン（ＩＦＮ－γ）を評価した。

[0059] 結果を表１及び図１０～１１に示す。図１０（ｂ）は、各群マウスの駆出率（ＥＦ）、左室内径短縮率（ＦＳ）、左室拡張末期径（ＬＶＤｄ）及び左室収縮末期径（ＬＶＤｓ）を比較したグラフである。心拍数（ＨＲ）、心室中隔（ＩＶＳ）、左室後壁（ＰＷ）を表１に示す。ＧＤ群マウスでは、駆出率及び左室内径短縮率が増加し、左室拡張末期径及び左室収縮末期径が低下しており、心筋症に対する改善効果が得られた。一方、ＧＤＩ群マウスでは、これら４つの指標はＤＩ群マウスのものと同程度であり、αＧａｌＣｅｒによる心保護効果が減弱したことがわかった。図１１は、各群マウスの心筋細胞におけるＩＦＮγの発現量を比較したグラフである。ＧＤ群マウスでは、ＤＩ群マウスよりもＩＦＮγの発現量が増加しており、このＩＦＮγ増加効果は、抗ＩＦＮγ抗体の投与により減弱した。ＮＫＴ細胞の量は、ＧＤＩ群マウスにおいて最も多かった。

[表1]

	GD群		DI群		GDI群	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
HR	511.1	16.0	520.4	8.4	527.3	10.2
IVS	0.86	0.05	0.79	0.06	0.77	0.02
LVDd	3.197	0.065	3.390	0.055	3.342	0.070
LVDs	1.858	0.050	2.117	0.073	2.064	0.038
PW	0.771	0.019	0.746	0.041	0.726	0.042
EF	73.80	1.84	68.69	1.89	69.59	1.01
FS	41.78	1.70	37.63	1.50	38.19	0.84

[0060] ４．異種組織移植

α－ＧａｌＣｅｒをパルスした樹状細胞は、非特許文献７に記載の方法に従って調製した。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ェレーシス細胞液を採取した。５０ｍＬ遠心チューブ中のFicoll-Paque PREMIUM（ＧＥヘルスケア・ジャパン）２０ｍＬにアフェレーシス細胞液２６．６ｍＬ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。沈渣にアルブミネート加ＡＩＭ－Ｖ培地（ＡＩＭ－Ｖ培地（GIBCO Invitrogen Corporation）２０容量に対して４．４％献血アルブミネート（日本製薬）１容量を添加したもの）を加えて液量を４５ｍＬ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ネート加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％献血アルブミネートを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。

[0061] 細胞浮遊液１３．８ｍＬを２５ｍＬ凍結バッグに分注し、抗凝固液ＡＣＤ－Ａ液（テルモ）２ｍＬおよび凍害保護液ＣＰ－１（極東製薬工業）９．２ｍＬを各バッグに添加した後、－８０℃で凍結保存した。

[0062] （２）α－ＧａｌＣｅｒをパルスした樹状細胞の調製

（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％献血アルブミネートを加えて洗浄した後、４００×ｇで５分間、２０℃で遠心した。沈渣にアルブミネート加生理食塩水４５ｍＬ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。

単核球細胞１×１０^{8}個を２２５ｃｍ^{2}フラスコに播種し、ヒトＩＬ－２（塩野義製薬）を最終濃度１００ＪＲＵ／ｍＬで、ヒトＧＭ－ＣＳＦ（North China Pharmaceutical Group Corporation-GeneTech）を最終濃度８００Ｕ／ｍＬで添加した自己血漿加アルブミネート加ＡＩＭ－Ｖ培地５０ｍＬを用いて、温度３７℃、CO_2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ネート加ＡＩＭ－Ｖ培地５０ｍＬをさらに添加し、ヒトＩＬ－２を最終濃度１００ＪＲＵ／ｍＬになるように、ヒトＧＭ－ＣＳＦを最終濃度８００Ｕ／ｍＬになるように添加した。培養６日目にα－ＧａｌＣｅｒ（フナコシ）を最終濃度１００ｎｇ／ｍＬとなるよう添加した。

培養終了後、細胞をセルスクレーパーおよびピペッ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）４５ｍＬ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１０ｍＬに懸濁した。細胞懸濁液の全量をシリンジで回収し、５０ｍＬ生理食塩水ボトルに添加した。これをα－ＧａｌＣｅｒ添加樹状細胞（α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ）として以下の実施例で用いた。

[0063] （３）α－ＧａｌＣｅｒをパルスしていない樹状細胞及び白血球の調製

α－ＧａｌＣｅｒを添加しないこと以外は上述と同様の方法で、α－ＧａｌＣｅｒ非添加樹状細胞（ＤＣ）及びα－ＧａｌＣｅｒ非添加白血球（Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ）を調製した。

[0064] （４）異種組織移植によるＮＫＴ細胞の変化

上述で得られたα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ、ＤＣ及びＬｅｕｋｏｃｙｔｅの

各懸濁液（３×１０^{6}個／ＰＢＳ　５０μＬ）を調製し、５週齢の雄性Ｂａｌｂ／ｃマウスの尾静脈に注射した。Ｃｏｎｔｒｏｌとして、ＰＢＳ（５０μＬ）をＢａｌｂ／ｃマウスに投与した。投与後４日目に各群マウスの心筋細胞及び血清を採取し、ＲＴ－ＰＣＲ法によってＶα１４Ｊα１８及び炎症性サイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－１０）のｍＲＮＡ発現量を測定した。

[0065] 結果を図１２に示す。各ｍＲＮＡ発現量は、ＰＢＳ群マウスにおけるｍＲＮＡ発現量に対する相対値として示した。図１２中、アスタリスク（＊＊）は、２群間のデータに有意差（ｐ＜０．０１）があることを示す。ＤＣ群及びＬｅｕｋｏｃｙｔｅ群マウスは、ＰＢＳ群マウスと同程度のｍＲＮＡ発現量であり、単にヒト由来の樹状細胞又は白血球と投与したとしても、ｍＲＮＡ発現量は変化しないことがわかった。一方、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ群マウスでは、いずれもｍＲＮＡ発現量が顕著に増加しており、血清中のＩＦＮ－γのｍＲＮＡ発現量も増加していた。

[0066] （５）α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣによる効果の持続性

上述で得られたα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの懸濁液（３×１０^{6}個／ＰＢＳ５０μＬ）を調製し、５週齢の雄性Ｂａｌｂ／ｃマウスの尾静脈に注射した。注射した日（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１、４、７、１４及び２８の各時点において、マウスから心筋細胞を採取し、Ｖα１４Ｊα１８、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－１０の各ｍＲＮＡの発現量を測定した。

[0067] 結果を図１３に示す。図１３中、アスタリスク（＊、＊＊）は、Ｄａｙ０の発現量に対して有意差（それぞれ、ｐ＜０．０５、ｐ＜０．０１）があることを示す。α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの懸濁液を単回投与した場合、４日目にＮＫＴ細胞の活性化が最も高まり、７日目まで持続することが確認された。また、ＩＦＮ－γ発現量の増加は、投与後２８日後まで持続した。

[0068] ５．拡張型心筋症モデルマウスへの投与

（１）拡張型心筋症モデルマウスの作製

非特許文献１４及び１５を参考にして、トロポニンＴ変異型拡張型心筋症

モデルとして、Ｂａｌｂ／ｃマウスを背景とするΔＫ２１０ノックインマウス（ＤＣＭマウス）を作製した。作製したＤＣＭマウスは、５週齢の時点で、高度の左心室拡張と左室駆出率（ＬＶＥＦ）の低下を呈し、ピモベンダンを投与しないと約９週齢の時点で全頭が心不全で死亡した。

[0069] 図１４（ａ）は、ＤＣＭマウスと野生型Ｂａｌｂ／ｃマウス（ＷＴマウス）の心筋組織の断面を示す写真である。図１４（ｂ）は、両マウスの心重量ＨＷ／ＢＷ及び肺重量ＬＷ／ＢＷを比較したグラフと、脾臓におけるＶα１４Ｊα１８の発現量を比較したグラフである。

[0070] また、ＤＣＭマウス及びＷＴマウスから脾臓細胞を採取し、ＰＥ標識化されたＣＤ１ｄ　ｔｅｔｒａｍｅｒ抗体及び抗ＣＤ３抗体を用いて各細胞を分離した。得られたサイトグラムを図１５に示す。$CD3^+$細胞における$CD3^+CD1d$　ｔｅｔｒａｍｅｒ$^+$細胞の割合をグラフに示す。ＤＣＭマウスは、ＷＴマウスと比べて、心重量及び肺重量が大きく、ＮＫＴ細胞が少ないことがわかった。

[0071] （２）ＤＣＭマウスへのα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与（遠隔期での評価）

上記で得られたα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの懸濁液（3×10^6個／ＰＢＳ５０μＬ）又はＰＢＳ（５０μＬ）を、５週齢のＷＴマウス又はＤＣＭマウスの尾静脈に注射した。その後、９週齢（投与後４週後）までマウスの状態観察を行い、生存したマウスの心エコーによる心機能評価、組織の解析、サイトカインの発現量の変化を解析した。

[0072] 結果を図１６～１８に示す。図１６（ａ）は、ＤＣＭマウスの経時的な生存率を示すグラフである。両群の比較において、投与後早期に生存率に差が見られ始め、９週齢の時点で統計的に有意な差（ｐ＜０．０５）が得られた。図１６（ｂ）は、ＤＣＭマウスにおける５週齢（投与時）と９週齢の左室駆出率（ＬＶＥＦ）の変化を示すグラフである。ＰＢＳ投与群では、ＬＶＥＦが有意に減少したのに対し、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与群では、有意な低下は認められなかった。両群マウス間のＬＶＥＦの経時的変化量を比較すると、ＬＶＥＦの低下を抑制する傾向があることがわかった。図１７（ａ）

は、４群間における５週齢又は９週齢の左室拡張末期径（ＬＶＤｄ）、９週齢での心重量（ＨＷ／ＴＬ（Tibial length））及び肺重量（ＬＷ／ＴＬ）を示すグラフである。αＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与により、左室拡張末期径、心重量及び肺重量に有意な変化は認められなかった。図１７（ｂ）は、心筋細胞の断面を示す写真である。図１７（ｃ）は、４群間における心筋間質の線維化した細胞の割合を示すグラフである。ＰＢＳを投与されたＤＣＭマウス（ＤＣＭ＋ＰＢＳ群）と比べて、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与されたＤＣＭマウスでは、線維化した細胞の割合が有意に少なかった。すなわち、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与により、心筋間質の線維化が抑制された。図１８は、４群間におけるＶα１４Ｊα１８、サイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－１０）の発現量を比較したグラフである。ＷＴマウス及びＤＣＭマウスのいずれにおいても、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与により、Ｖα１４Ｊα１８、ＩＦＮ－γ及びＩＬ－４の発現量が増加し、ＩＬ－１０の発現量が減少していた。これらの変化は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与から４週間経過後においても認められた。

[0073] （３）ＤＣＭマウスへのα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与（早期での評価）

上記で得られたα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの懸濁液（３×１０^{6}個／ＰＢＳ５０μＬ）又はＰＢＳ（５０μＬ）を、５週齢のＷＴマウス又はＤＣＭマウスの尾静脈に注射した。投与後４日目の時点で、各群マウスの心エコーによる心機能評価、サイトカインの発現量の変化を解析した。

[0074] 結果を図１９～２０に示す。図１９は、ＤＣＭマウスにおけるα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ又はＰＢＳの投与前後の左室駆出率（ＬＶＥＦ）の変化を示すグラフである。ＰＢＳ投与群では、ＬＶＥＦが有意に低下したのに対し、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与群では、ＬＶＥＦが有意に増加したことがわかった。また、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与により、脳性ナトリウム利尿ペプチド（ＢＮＰ）のｍＲＮＡ発現量は有意に減少した。図２０は、４群間における炎症性サイトカインの発現量を示すグラフである。図２０のグラフは、ＷＴ＋ＰＢＳ群（ＷＴマウスにＰＢＳを投与した群）に対する相対値として

記録した。図２０中、アスタリスク（＊＊）は、ＷＴ＋ＰＢＳ群のデータに対して有意差（ｐ＜０．０１）があることを示す。α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与により、各種サイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－１０）の発現量が変化することが認められた。

[0075] （４）血液中のサイトカイン発現量の変化

上記（３）における４群において、Ｄａｙ４の時点での血液中のサイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、ＩＬ－１０）濃度を測定した。また、比較のため、Ｂａｌｂ／ｃマウスの尾静脈にα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを注射し、Ｄａｙ１、４、７、１４及び２８の各時点での血中ＩＦＮ－γ濃度を測定した。

[0076] 結果を図２１に示す。Ｂａｌｂ／ｃマウスへの投与では、Ｄａｙ１～４の期間において、血中ＩＦＮ－γ濃度が顕著に上昇していることがわかった。また、ＤＣＭマウスにおいても、血中ＩＦＮ－γ濃度は顕著に上昇していた。一方、血液中においてＩＬ－４及びＩＬ－１０の濃度は、検出下限以下であった。

[0077] ６．α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣによる急性効果

ＤＣＭマウスの心エコーを測定した後、抗マウスＩＦＮ－γ抗体又はアイソタイプ抗体（２００μｇ／匹）を腹腔内投与した（図２２（ａ））。抗体の投与から２時間後、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの懸濁液（３×１０^{6}個／ＰＢＳ　５０μＬ）を尾静脈に注射し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ４の時点で心エコーを測定した。

[0078] 結果を図２２（ｂ）に示す。アイソタイプ抗体投与群では、左室駆出率（ＬＶＥＦ）が増加しているのに対し、抗ＩＦＮ－γ抗体投与群では、ＬＶＥＦは低下しており、両群には有意な差が認められた。また、抗ＩＦＮ－γ抗体投与群では、ナトリウム利尿ペプチド遺伝子（Ｎｐｐｂ）の発現量も有意に増加していた。これにより、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣによる急性の収縮能改善効果は、ＩＦＮ－γを介していることがわかった。

[0079] ７．心筋におけるＰＬＮのリン酸化誘導

（１）ＤＣＭマウス

α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの懸濁液（３×１０^{6}個／ＰＢＳ　５０μＬ）をＢａｌｂ／ｃマウスの尾静脈に注射し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ０、１、４、７、１４及び２８の各時点で、ＤＣＭマウスから採取した心筋細胞を破砕し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により、ＰＬＮ、リン酸化ＰＬＮ（ｐ－ＰＬＮ、Ｓｅｒ１６がリン酸化されたＰＬＮ）及びＧＡＰＤＨ（グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ）の発現量を評価した。図２３に示すように、ｐＰＬＮ濃度は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与からやや遅れて増加し始め、Ｄａｙ１～７で最も高値となった。

[0080] （２）培養心筋細胞

培養された心筋細胞に、３つの濃度（１、１０、５０ｎｇ／ｍＬ）のＩＦＮ－γ溶液を加えて刺激し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により、ｐＰＬＮ濃度の変化を評価した。図２４に示すように、培養された心筋細胞をＩＦＮ－γで刺激すると、ＰＬＮはリン酸化されることがわかった。

[0081] （３）培養心筋細胞

培養された心筋細胞に、５０ｎｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ溶液を加えて刺激し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により、ｐＰＬＮ濃度の経時的変化を評価した。図２５に示すように、培養された心筋細胞をＩＦＮ－γで刺激すると、刺激直後はｐ－Ｓｔａｔ１（リン酸化Ｓｔａｔ１、Ｔｈｅ７０１がリン酸化されたＳｔａｔ１）が上昇し、ｐＰＬＮはやや遅れてリン酸化された。

[0082] （４）マイクロアレイのＧＯ解析

上述のＷＴ＋ＰＢＳ群、ＤＣＭ＋ＰＢＳ群、ＤＣＭ＋α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ群の各群について、マイクロアレイ解析を行い、発現が増加又は減少している遺伝子を抽出した。図２６に示すように、ＤＣＭ＋ＰＢＳ群において発現が増加し、ＤＣＭ＋α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ群において発現が変化していない遺伝子（クラスター２）を２７７個同定した。また、ＤＣＭ＋ＰＢＳ群において発現が減少し、ＤＣＭ＋α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ群において発現が変化していない遺伝子（クラスター９）を１１７個同定した。ＤＣＭマウ

スへのα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与により、心筋において、低下していた血管新生関連遺伝子発現が増加し、減弱していた免疫反応関連遺伝子が増加し、低下していた脂肪酸代謝関連遺伝子発現が正常化し、亢進した線維化を表す遺伝子発現が正常化していた。

[0083] α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与してから４日後のＤＣＭマウスの心臓から得られた遺伝子から同定されたクラスター２及び９について、更にＧＯ解析を行った。得られた結果を表２～３に示す。特に、クラスター２では、トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦβ）刺激に対する細胞応答に、クラスター９では、脈管形成に着目した。

[表2]

Cluster 2: GO Term	Count	%	P value
fat cell differentiation	4	9.1	<0.001
cellular response to fibroblast growth factor stimulus	3	6.8	0.002
positive regulation transcription from RNA polymerase II promoter	8	18.2	0.007
cellular response to transforming growth factor beta stimulus	3	6.8	0.008
response to mechanical stimulus	3	6.8	0.009
positive regulation of endothelial cell proliferation	3	6.8	0.010
positive regulation of osteoblast differentiation	3	6.8	0.010
endothelial cell chemotaxis	2	4.5	0.022

[表3]

Cluster 9: GO Term	Count	%	P value
morphogenesis of an epithelium	4	3.7	<0.001
vasculogenesis	5	4.6	<0.001
fatty acid metabolic process	6	5.6	0.001
positive regulation of phagocytosis	4	3.7	0.002
cellular response to tumor necrosis factor	5	4.6	0.002
response to lipopolysaccharide	6	5.6	0.003
innate immune response	8	7.4	0.004
inflammatory response	7	6.5	0.008

[0084] ８．線維化および血管新生に関わる遺伝子の発現量の比較

野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）に、ＰＢＳ又はα－Ｇａ

ＩＣｅｒ／ＤＣ（投与細胞数：３×１０^{6}個）を投与してから４日後に、線維化および血管新生に関わる遺伝子の発現量を評価した。その結果を図２７～２９に示す。

[0085] 図２７は、野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）の心筋におけるｍＲＮＡの発現量を示すグラフである（ｎ＝４～６）。Ｔｇｆｂは、マイクロアレイのＧＯ解析でクラスター２に分類されている。内在性コントロールとして、Ｒｐｓ１８を使用した。野生マウス（ＷＴ）及びＤＣＭマウス（ＤＣＭ）では、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与の有無にかかわらず、Ｔｇｆｂの発現量は有意に変化しなかった。しかし、その下流にある線維化に関わる遺伝子（Ｃｔｇｆ、Ｃｏｌ１ａ、Ｃｏｌ３ａ）のｍＲＮＡ発現量は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与によって有意に抑制された。

[0086] 図２８（ａ）は、野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）の心筋におけるタンパク質（ＴＧＦβ、ｐＳｍａｄ２、Ｓｍａｄ２、ｐＳｍａｄ３、Ｓｍａｄ３）の発現量を示すウェスタンブロットである（ｎ＝３～８）。内在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。図２８（ｂ）は、図２８（ａ）の結果を定量化したグラフである。ｐＳｍａｄ２及びｐＳｍａｄ３はそれぞれ、リン酸化されたＳｍａｄ２及びリン酸化されたＳｍａｄ３を意味する。タンパク質レベルにおいても、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与の有無にかかわらず、ＴＧＦβの発現量は変化しなかった。しかし、その下流にあるタンパク質Ｓｍａｄ２及びＳｍａｄ３のリン酸化は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与によって有意に抑制された。

[0087] 図２９（ａ）は、野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）の心筋におけるタンパク質Ａｎｇｐｔ１（アンギオポイエチン－１）及びｖｅｇｆａ（血管内皮細胞増殖因子）の発現量を示すグラフである（ｎ＝４～６）。Ａｎｇｐｔ１は、血管新生に関わるタンパク質である。ＤＣＭマウスの心筋におけるＡｎｇｐｔ１の発現量は、野生マウスの心筋での発現量よりも抑制されていたところ、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与することにより、正常レベル（野生マウス、α－ＧａｌＣｅｒ非投与）と同等まで改善していた。内

在性コントロールとして、Ｒｐｓ１８を使用した。図２９（ｂ）は、内皮細胞の免疫染色を行った毛細血管密度を示す写真（左）及びそれを定量化したグラフ（右）である。毛細血管密度を評価したところ（ｎ＝４～７）、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与することにより、血管床の改善が認められた。グラフ中、＊はＰ＜０．０５を示し、＊＊はＰ＜０．０１を示す。

[0088] ９．投与するα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの細胞数依存性の評価

投与するα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの細胞数を変えて、心筋での遺伝子発現量への影響を評価した。図３０は、Ｂａｌｂ／ｃマウスへα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与して４日後の各遺伝子の発現量を示すグラフである（各ｎ＝５）。内在性コントロールとして、Ｒｐｓ１８を使用した。α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与すると、投与細胞数依存的に、心筋におけるサイトカイン遺伝子（Ｖα１４Ｊα１８（invariant TCR）、Ｉｆｎｇ、Ｉｌ４、Ｉｌ１０）の発現量が増加した。

[0089] 図３１（ａ）は、心筋におけるタンパク質（ｐＳｔａｔ１、Ｓｔａｔ１、ｐＳｔａｔ６、Ｓｔａｔ６）の発現量を示すウェスタンブロットである（ｎ＝３～８）。ｐＳｔａｔ１及びｐＳｔａｔ６はそれぞれ、リン酸化されたＳｔａｔ１及びリン酸化されたＳｔａｔ６を意味する。内在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。図３１（ｂ）は、図３１（ａ）の結果を定量化したグラフである。投与するα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの細胞数が増加するにつれて、Ｓｔａｔ１の発現量およびＳｔａｔ１のリン酸化は増加しており、Ｓｔａｔ６のリン酸化も促進された。グラフ中、＊はＰ＜０．０５を示し、＊＊はＰ＜０．０１を示す。

[0090] １０．α－ＧａｌＣｅｒ投与とα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与の違い

α－ＧａｌＣｅｒのみを投与した場合とＤＣを担体として投与（すなわち、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与、投与細胞数：３×１０^{6}個）した場合における、タンパク質Ｓｔａｔ１及びＳｔａｔ６の発現量及びリン酸化の程度の違いをウェスタンブロットにより評価した。

[0091] 試験は、α－ＧａｌＣｅｒのみ、又は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣをＢａｌ

ｂ／ｃマウスに投与し、投与から４日後の心筋における各タンパク質の発現量をウェスタンブロットにて評価した。結果を図３２に示す。α－ＧａｌＣｅｒのみを投与した場合には、Ｓｔａｔ１の活性化反応は非常に弱く、用量依存性も見られなかった。

[0092] １１．α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与後の経時的変化

α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ（投与細胞数：３×１０^{6}個）を投与した後の、心筋におけるＳｔａｔリン酸化の経時的変化を評価した。試験は、Ｂａｌｂ／ｃマウスにα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを単回投与した後、投与日（Ｄａｙ０）、投与日から１、４、７、１４及び２８日後（順にＤａｙ１、４、７、１４、２８）に、各タンパク質（ｐＳｔａｔ１、Ｓｔａｔ１、ｐＳｔａｔ６、Ｓｔａｔ６、ｐＳｔａｔ３、Ｓｔａｔ３）の発現量を測定した。ｐＳｔａｔ３は、リン酸化されたＳｔａｔ３を意味する。内在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。

[0093] 結果を図３３に示す。図３３（ａ）は、各タンパク質の発現量の経時的変化を示すウェスタンブロットである（各ｎ＝４）。図３３（ｂ）は、図３３（ａ）の結果を定量化したグラフである。横軸は、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与してからの日数を示す。Ｄａｙ４から、Ｓｔａｔ１の発現量が増加し始め、Ｄａｙ７～１４にかけてＳｔａｔ１の発現とＳｔａｔ１のリン酸化がピークを示した。一方、Ｓｔａｔ６のリン酸化は、Ｄａｙ４でピークを示した。その後、Ｓｔａｔ１、ｐＳｔａｔ１及びｐＳｔａｔ６の発現量は顕著に低下した。グラフ中、＊はＰ＜０．０５を示し、＊＊はＰ＜０．０１を示し、いずれもＤａｙ０における発現量に対する有意水準である。

[0094] １２．α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与によるサイトカイン遺伝子の発現量の変化

野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）に、ＰＢＳ又はα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ（投与細胞数：３×１０^{6}個）を投与してから４日後に、心筋におけるサイトカイン遺伝子（ＩＦＮγ、ＩＬ４、ＩＬ１０）の発現量を評価した。

[0095] 図３４は、心筋におけるサイトカイン遺伝子（Ｉｆｎｇ、ＩＬ４、ＩＬ１０）の発現量を示すグラフである。内在性コントロールとして、Ｒｐｓ１８を使用した。野生マウスにα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与すると、いずれのサイトカイン遺伝子においても発現量の顕著な上昇が見られた。一方、ＤＣＭマウスにおいても、野生マウスと比べると弱いけれども、サイトカイン遺伝子の発現が有意に上昇した。

[0096] 図３５（ａ）は、各タンパク質（ｐＳｔａｔ１、Ｓｔａｔ１、ｐＳｔａｔ６、Ｓｔａｔ６、ｐＳｔａｔ３、Ｓｔａｔ３）の発現量を示すウェスタンブロットである（各ｎ＝３）。図３５（ｂ）は、図３５（ａ）の結果を定量化したグラフである。内在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。野生マウス及びＤＣＭマウスの両方について、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与することにより、Ｓｔａｔ１の発現、Ｓｔａｔ１及びＳｔａｔ６のリン酸化の有意な上昇が見られた。グラフ中、＊＊はＰ＜０．０１を示す。一方、Ｓｔａｔ３のリン酸化については、α－ＧａｒＣｅｒ／ＤＣを投与することにより、野生マウスでは、ｐＳｔａｔ３の割合が増加し、ＤＣＭマウスではｐＳｔａｔ３の割合が減少した。

[0097] １３．α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与によるサイトカイン遺伝子の発現量の変化

野生マウス（ＷＴ）又はＤＣＭマウス（ＤＣＭ）に、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ（投与細胞数：３×１０^{6}個）を投与してから２８日後に、心筋におけるサイトカイン遺伝子（Ｖα１４Ｊα１８、Ｉｆｎｇ、ＩＬ４、ＩＬ１０）の発現量を評価した。

[0098] 図３６は、心筋におけるサイトカイン遺伝子（Ｖα１４Ｊα１８、Ｉｆｎｇ、ＩＬ４、ＩＬ１０）の発現量を示すグラフである。グラフ中、＊＊はＰ＜０．０１を示す。α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与してから２８日後においても、Ｖα１４Ｊα１８、Ｉｆｎｇ、ＩＬ４の遺伝子は発現が有意に上昇したが、ＩＬ１０は野生マウスと比べて、変化しなかった。図３４に示したＤａｙ４の結果と比べると、Ｄａｙ２８におけるサイトカイン遺伝子の上昇は

小さかった。

[0099] 図３７（ａ）は、ＰＢＳ又はα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを投与してから２８日後（Ｄａｙ２８）における、タンパク質（Ｓｔａｔ１、Ｓｔａｔ６）の発現量を示すウェスタンブロットである。内在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。Ｄａｙ２８では、野生マウスとＤＣＭマウスとの間で、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与によるＳｔａｔ１の発現量に有意な差は見られなかった。

[0100] １４．心筋線維芽細胞のα－ＧａｌＣｅｒ処理

α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣ（投与細胞数：３×１０^{6}個）の投与によりＴＧＦβ－Ｓｍａｄシグナル系が抑制されるメカニズムを調べるために、ＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０を初代培養の心筋線維芽細胞に投与した後の線維化に関する遺伝子（Ｃｔｇｆ、Ｃｏｌ１ａ、Ｃｏｌ３ａ）の発現量の変化を評価した。

[0101] 図３８は、心筋線維芽細胞にＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０を投与した後の、遺伝子（Ｃｔｇｆ、Ｃｏｌ１ａ、Ｃｏｌ３ａ）の発現量の変化を示すグラフである。ＩＦＮγ、ＩＬ４及びＩＬ１０は、それぞれ１、１０又は５０ｎｇ／ｍＬの濃度で投与した。内在性コントロールとして、Ｒｐｓ１８を使用した。グラフ中の「Ｖｅｈ」は、非投与群（Ｖｅｈｉｃｌｅ）を意味する。ＩＬ４及びＩＬ１０投与群では、いずれの濃度においても、非投与群と同等の遺伝子発現料を示した。一方、ＩＦＮγ投与群では、投与量依存的に、遺伝子の発現量が有意に低下した。この結果により、ＩＦＮγがＴＧＦβ－Ｓｍａｄシグナル系を抑制させる因子であることが示唆された。

[0102] １５．ＩＦＮγによる前処理の効果

ＩＦＮγで前処理した心筋線維芽細胞に、ＴＧＦβを投与した時のタンパク質の発現量の変化を評価した。

[0103] 図３９（ａ）は、ＩＦＮγで前処理した心筋線維芽細胞にＴＧＦβを投与した時のタンパク質（ｐＳｍａｄ２、Ｓｍａｄ２、ｐＳｍａｄ３、Ｓｍａｄ３）の発現量を示すウェスタンブロットである（ｎ＝４）。図３９（ｂ）は

、図３９（ａ）の結果を定量化したグラフである。前処理に使用したＩＦＮγの投与量は、０、１、１０又は５０ｎｇ／ｍＬであり、ＴＧＦβの投与量は１０ｎｇ／ｍＬである。対照群（ＣＴＬ）では、ＩＦＮγ及びＴＧＦβのいずれも投与しなかった。各グラフは、ＣＴＬ群でのリン酸化比率（例えば、ｐＳｍａｄ２／Ｓｍａｄ２）を１．０とする相対値として示す。ＴＧＦβを投与すると、Ｓｍａｄ２及びＳｍａｄ３がリン酸化され、ｐＳｍａｄ２及びｐＳｍａｄ３の発現量が増加した。ＩＦＮγで前処理すると、用量依存的にＳｍａｄ２及びＳｍａｄ３のリン酸化の割合が低下した。

[0104] 図３９（ｃ）は、ＩＦＮγで前処理した心筋線維芽細胞にＴＧＦβを投与した時のタンパク質（Ｃｔｇｆ、Ｃｏｌ１ａ、Ｃｏｌ３ａ）の発現量を示すグラフである（ｎ＝３～６）。前処理に使用したＩＦＮγの投与量は、０、１、１０又は５０ｎｇ／ｍＬであり、ＴＧＦβの投与量は１０ｎｇ／ｍＬである。各グラフは、ＣＴＬ群でのリン酸化比率（例えば、ｐＳｍａｄ２／Ｓｍａｄ２）を１．０とする相対値として示す。グラフ中、＊＊はＰ＜０．０１を示し、これはＣＴＬ群の発現量に対する有意水準である。グラフ中、†はＰ＜０．０５を示し、††はＰ＜０．０１を示し、これらはＩＦＮγ前処理をしていないＴＧＦβ投与群の発現量に対する有意水準である。ＴＧＦβを投与すると、上記タンパク質の発現量は増加した。一方、ＩＦＮγで前処理すると、ＴＧＦβ投与による発現量の増加が、ＩＦＮγの用量依存的に抑制された。

[0105] １６．ＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０による処理

初代培養の心筋線維芽細胞を、ＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０で処理して、それぞれタンパク質（Ｓｔａｔ１、Ｓｔａｔ６、Ｓｔａｔ３）の発現量及びそのリン酸化を評価した。

[0106] 図４０（ａ）は、ＩＦＮγで心筋線維芽細胞を処理したときのＳｔａｔ１の発現量及びリン酸化の割合を示すウェスタンブロットである。図４０（ｂ）は、図４０（ａ）の結果を定量化したグラフであり、左のグラフがＳｔａｔ１の発現量を示し、右のグラフがＳｔａｔ１のリン酸化の状態を示す。内

在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。グラフ中、＊＊はＰ＜０．０１を示し、これはＣＴＬ群の発現量に対する有意水準である。ＩＦＮγを心筋線維芽細胞に投与すると、Ｓｔａｔ１の発現量及びリン酸化ともに増加した。

[0107] 図４１（ａ）は、ＩＬ４又はＩＬ１０で心筋線維芽細胞を処理したときのＳｔａｔ６又はＳｔａｔ３の発現量及びリン酸化の割合を示すウェスタンブロットと、である。図４１（ｂ）は、図４１（ａ）の結果を定量化したグラフであり、Ｓｔａｔ６又はＳｔａｔ３のリン酸化の状態を示す。グラフ中、＊＊はＰ＜０．０１を示し、これはＣＴＬ群の発現量に対する有意水準である。ＩＬ４を心筋線維芽細胞に投与すると、用量依存的にＳｔａｔ６のリン酸化が増加した。ＩＬ１０を心筋線維芽細胞に投与しても、Ｓｔａｔ６のリン酸化に変化は見られなかった。

[0108] １７．サイトカイン投与によるＡｎｇｐｔ１の発現量の変化

仔ラット心筋細胞にＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０を投与した後の、血管新生因子Ａｎｇｐｔ１の発現量の変化を評価した（各ｎ＝３）。

[0109] 図４２（ａ）は、仔ラット心筋細胞にＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０を投与した後の、血管新生因子Ａｎｇｐｔ１の発現量の変化を示すグラフである。グラフ中、＊はＰ＜０．０５を示し、＊＊はＰ＜０．０１を示し、いずれもＣＴＬ群の発現量に対する有意水準である。ＩＦＮγを投与すると、Ａｎｇｐｔ１の発現量は用量依存的に増加した。一方、ＩＬ４又はＩＬ１０を投与しても、Ａｎｇｐｔ１の発現量は増加しなかった。

[0110] １８．Ｓｔａｔ１標的化ｓｉＲＮＡによる効果

初代培養の心筋細胞に、Ｓｔａｔ１標的化ｓｉＲＮＡをトランスフェクトさせて、ＩＦＮγ（５０ｎｇ／ｍＬ）を投与したときのＳｔａｔ１の総発現量及びリン酸化の様子を評価した。対照群（ｓｉＣＴＬ）には、Ｓｔａｔ１標的化ｓｉＲＮＡに由来するスクランブルｓｉＲＮＡを、心筋細胞にトランスフェクトした。

[0111] 図４２（ｂ）は、ｐＳｔａｔ１及びＳｔａｔ１の発現量を示すウェスタン

ブロットである（各ｎ＝３）。内在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。グラフ中、＊＊はＰ＜０．０１を示し、これはｓｉＣＴＬ群の発現量に対する有意水準である。図４２（ｃ）は、図４２（ｂ）の結果を定量化したグラフである。Ｓｔａｔ１標的化ｓｉＲＮＡによりノックアウトすることにより、ＩＦＮγ投与によるＳｔａｔ１及びｐＳｔａｔ１発現量の増加が顕著に抑制された。

[0112] 図４３は、ＩＦＮγ投与によるＡｎｇｐｔ１の発現量の変化を示すグラフである。グラフ中、＊はＰ＜０．０５を示し、＊＊はＰ＜０．０１を示し、いずれもＶｅｈ＋ｓｉＣＴＬ群（ｓｉＣＴＬ群でＩＦＮγを投与していない）の発現量に対する有意水準である。Ｓｔａｔ１標的化ｓｉＲＮＡによりノックアウトすることにより、ＩＦＮγ投与によるＡｎｇｐｔ１発現量の増加も顕著に抑制された。

[0113] １９．初代培養の仔ラット心筋細胞にＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０の投与

初代培養の仔ラット心筋細胞にＩＦＮγ、ＩＬ４又はＩＬ１０を投与し、タンパク質（Ｓｔａｔ１、Ｓｔａｔ６、Ｓｔａｔ３）のリン酸化の変化を評価した。

[0114] 図４４（ａ）は、初代培養の心筋細胞にＩＦＮγを投与した後のＳｔａｔ１のリン酸化を示すウェスタンブロットである。図４４（ｂ）は、図４４（ａ）の結果を定量化したグラフである。内在性コントロールとして、ＧＡＰＤＨを使用した。グラフ中、＊はＰ＜０．０５を示し、これはＣＴＬ群の発現量に対する有意水準である。

[0115] 図４５（ａ）は、初代培養の心筋細胞にＩＬ４又はＩＬ１０を投与した後のＳｔａｔ６又はＳｔａｔ３のリン酸化を示すウェスタンブロットである。図４５（ｂ）は、図４５（ａ）の結果を定量化したグラフである。グラフ中、＊はＰ＜０．０５を示し、これはＣＴＬ群の発現量に対する有意水準である。心筋組織で認められたαＧａｌＣｅｒ／ＤＣによるＳｔａｔ１のリン酸化は、培養心筋細胞においては、ＩＦＮγおよびＩＬ－４の投与により再現され、ＩＬ－１０の投与では再現されなかった。つまり、αＧａｌＣｅｒ／

ＤＣによるＳｔａｔ１のリン酸化に関与するサイトカインは、ＩＦＮγおよびＩＬ－４の可能性が考えられる。

[0116] ２０．慢性心不全患者へのα－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣの投与

心筋症患者は心機能が低下しているため、通常、身体的制限（息切れ、疲労、足首のむくみ）および精神的制限（抑うつ状態、不安状態）を生じている。したがって、一般的に、これらの制限が緩和することは、患者の生活の質（ＱＯＬ）の改善につながり、心筋症の治療効果の二次的評価の指標として利用できる。そこで、駆出率が低下した慢性心不全患者５名に対して、α－ＧａｌＣｅｒ／ＤＣを２回投与した。投与方法は、１回あたりの投与細胞数を２．５×１０^{8}個／ｍ^{2}として、６日間隔で２回点滴静注した。投与から４週間後、ミネソタ心不全質問票（ＭＬＨＦＱ）及びカンザスシティ心筋症質問票（ＫＣＣＱ）を用いて、患者の生活の質（ＱＯＬ）を評価した。

[0117] ＭＬＨＦＱによる評価（Heart Fail. 1987; 3: 198-209）では、２１個の質問があり、１つの質問につき０～５の６段階でスコア化する。ＱＯＬが高いほど、スコアの合計値は低くなる。結果を図４６に示す。投与前のスコアは２９．０±２５．８であったところ、４週間後のスコアは２３．４±２１．８まで低下しており、有意な改善傾向を示した（ｐ＝０．１８９、対応のあるｔ検定）。特に、被験者５名のうち、もともとＱＯＬが低下していた３名では、顕著なスコアの改善が見られた。

[0118] ＫＣＣＱによる評価（J. Am. Coll. Cardiol. 35:1245-5(2000)）では、The Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire Scoring Instructionsに従い、スコアを算出した。ＱＯＬが高いほど、スコアの合計値は高くなる。結果を図４６に示す。投与前のスコアが５０．０±２４．３０であったところ、４週間後のスコアは６６．６７±２４．３０まで上昇しており、有意な改善傾向を示した（ｐ＝０．００３、対応のあるｔ検定）。また、全体的総合スコア（Overall summary score）についても、投与前のスコアは６４．７９±３１．５８であったところ、４週間後のスコアは８２．０５±１７．０２まで改善していた（ｐ＝０．０４４、対応のあるｔ検定）。

[0119] αＧａｌＣｅｒ／ＤＣ投与により、心不全患者ＱＯＬが有意に改善することが示されたが、これは、心臓の機能改善による結果として、患者自覚症状が改善したと考えられ、これまでの動物実験での結果をサポートする結果と考えられる。

[0120] ２１．心筋における炎症細胞の浸潤抑制

炎症細胞にＩＦＮγを投与すると、容易に細胞死が起こったが、心筋細胞にＩＦＮγを投与しても細胞死は起こらなかった。ＤＣＭ心筋では、炎症細胞の浸潤が抑制されることが示唆された。

請求の範囲

[請求項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α－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、非虚血性心筋症の予防および／または治療のための医薬。

[請求項2] 上記非虚血性心筋症が拡張型心筋症、または、アントラサイクリン系抗癌剤による薬剤性心筋症である、請求項１に記載の医薬。

[請求項3] アントラサイクリン系抗癌剤を更に含有する、請求項１または２に記載の医薬。

[請求項4] アントラサイクリン系抗癌剤を投与された対象の心筋症を予防および／または治療するための、請求項１～３のいずれか一項に記載の医薬。

[請求項5] 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α－ガラクトシルセラミドでパルスする工程

を含む、非虚血性心筋症の予防および／または治療のための医薬の製造方法。

[請求項6] 上記非虚血性心筋症が、拡張型心筋症、または、アントラサイクリン系抗癌剤による薬剤性心筋症である、請求項５に記載の医薬の製造方法。

[請求項7] 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α－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、心筋の収縮力の低下を抑制するための医薬。

[請求項8] 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α－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、心筋細胞死を抑制または予防するための医薬。

[請求項9] 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α－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、心筋の萎縮を抑制または改善するための医薬。

[請求項10] 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α－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、心筋線維化の進行抑制および／または治療のための医薬。