

## 明 細 書

発明の名称： 認知症の予防又は治療剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、R G M a 阻害物質を含む、糖尿病性認知症および血管性認知症の予防又は治療剤に関する。

### 背景技術

[0002] 高齢化に伴って糖尿病および認知症患者が年々増加し、糖尿病を発症している場合にはアルツハイマー病や血管性認知症の発症リスクが増大し、両疾患の間には密接な病態学的関連性があることが明らかとなった（非特許文献1，非特許文献2）。また、認知症を合併していない糖尿病患者では、非糖尿病患者と比較して認知機能の低下が認められる報告は多く、そのような糖尿病患者の認知機能障害として、注意－集中力の低下、視覚性記憶又は言語性記憶の低下やミニメンタルステート検査（Mini-Mental State Examination；MMSE）の低下等が報告されている（非特許文献3）。

[0003] 近年、糖尿病を伴う認知症の分類として、アルツハイマー病や血管性認知症以外に、糖代謝異常が認知症の発症に深く関与する糖尿病性認知症という臨床病型が提唱されている（非特許文献4，非特許文献5）。糖尿病性認知症は、アルツハイマー病の特徴的な脳画像所見（海馬の萎縮等）を呈することは少ないが、微小梗塞病変等の血管性病変の合併例がより多くみられ（非特許文献6）、臨床的にはやや高齢であり、糖尿病のコントロールが不良で、記憶障害よりも注意・集中力低下や遂行機能の障害が目立ち、進行はやや緩やかという特徴を有する。

[0004] 一方、血管性認知症は、主に脳血管障害に起因する認知症であり、特に、Binswanger病や多発ラクナ梗塞等の脳小血管病を主な原因とし、（1）認知症があり、（2）脳血管障害があり、（3）両者に因果関係があるものと定義されている。

臨床診断基準であるNINDS-AIREN（National Institute of Neurological D

isorders and Stroke-Association International pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences) による病型分類として、(1) 多発梗塞性、(2) 単一病変性、(3) 小血管病変性、(4) 低灌流性、(5) 脳出血性の5つを挙げている。しかしながら、これらの各病型は病因的、臨床的にも不均一であるという問題点があるため、血管性認知症は様々な病態を含むheterogeneousな疾患概念と考えられている(非特許文献7, 非特許文献8)。

また、血管性認知症の危険因子として糖尿病が含まれることは広く知られている(非特許文献8, 非特許文献9)

[0005] RGM (repulsive guidance molecule) は、当初、視覚系の軸索誘導分子として同定された膜タンパク質である(非特許文献10)。RGMファミリーには、RGMa、RGMb及びRGMcと呼ばれる3種類のメンバーが含まれ(非特許文献11)、少なくともRGMaとRGMbは同じシグナル伝達機構で働くことが知られている(非特許文献12)。RGMcは鉄代謝において重要な役割を發揮する。

その後の研究により、RGMは、ゼノパス及びニワトリ胚における軸索誘導及びラミナ形成、並びに、マウス胚における頭部神経管の閉鎖の制御等の機能を有することが明らかとなっている(非特許文献13)。特許文献1には抗RGM中和抗体を有効成分として含有する軸索再生促進剤が開示されている。

[0006] 発生段階の機能に加えて、成人ヒト及びラットの中枢神経系損傷後に再発現すること、ラットにおいてRGMa阻害が脊髄損傷後の軸索成長を亢進し、機能回復を促進することから(非特許文献14)、RGMaは中枢神経系損傷後の軸索再生阻害物質であると考えられている。RGMaを中和する具体的な抗体としては、例えば、特許文献2(例えば、5F9、8D1)、特許文献3(例えば、AE12-1、AE12-1Y)および特許文献4(例えば、r116A3、r70E4、r116A3C、rH116A3)に記載されている。

また、特許文献2には、抗RGMa抗体の認知症の治療用途が開示されている。

このように中枢神経系損傷ではRGMaの役割が明らかにされているが、特に、糖尿病性認知症および血管性認知症の治療におけるRGMaの関与は同定されておらず、そのような治療薬は知られていない。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0007] 特許文献1：国際公開 WO2005/087268号  
特許文献2：国際公開 WO2009/106356号  
特許文献3：国際公開 WO2013/112922号  
特許文献4：国際公開 WO2016/175236号

### 非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Neurology, 45: 1161, 1995  
非特許文献2：Am. J. Epidemiol. 145: 301, 1997  
非特許文献3：Diabetes Care, 20: 438, 1997  
非特許文献4：Dement Geriatr Cogn Disord, 35: 280-290, 2013  
非特許文献5：J. Neurol. Sci. 349: 45-51, 2015  
非特許文献6：Nat Rev Neurol 5: 305-306, 2009  
非特許文献7：Neurology, 43: 250-260, 1993  
非特許文献8：認知症疾患治療ガイドライン2017 第14章 血管性認知症  
非特許文献9：Neuron 83: 844-866, 2013  
非特許文献10：Neuron 5, 735-743 (1990)  
非特許文献11：Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 361: 1513-29, 2006  
非特許文献12：Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 795-800 (2009)  
非特許文献13：Curr. Opin. Neurobiol. 17, 29-34 (2007)  
非特許文献14：J. Cell Biol. 173, 47-58 (2006)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、糖尿病性認知症および血管性認知症に対する有効な薬剤を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、RGMa 阻害物質、とりわけ、抗RGMa 中和抗体が、糖尿病性認知症および血管性認知症に対する改善効果を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[0011] [1] RGMa 阻害物質を含む、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防剤又は治療剤。

[2] RGMa 阻害物質を含む、糖尿病性認知症の予防剤又は治療剤。

[3] RGMa 阻害物質を含む、血管性認知症の予防剤又は治療剤。

[4] RGMa 阻害物質が抗RGMa 中和抗体である、[1]～[3]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[5] 抗RGMa 中和抗体がヒト化抗体である、[4]に記載の予防又は治療剤。

[6] 抗RGMa 中和抗体が配列番号16、配列番号36、配列番号37、配列番号38及び配列番号39から選択されるアミノ酸配列を認識する抗体である、[4]又は[5]に記載の予防又は治療剤。

[7] 抗RGMa 中和抗体が、下記(a)～(l)：

(a) 配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号10に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa 中和抗体、

(b) 配列番号11に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号12に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号13に記載のアミノ酸配列を含むLC

DR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 15 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及びSFGをアミノ酸配列に含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(c) 配列番号 17 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 18 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 19 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 20 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 21 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 22 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(d) 配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 26 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 27 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 28 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(e) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 31 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(f) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 35 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(g) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 30 に記

載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(h) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(i) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(j) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 3 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(k) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 4 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a

中和抗体、及び

(1) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

から選択される抗体である、[4]～[6]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[0012] [8]治療を要する哺乳動物に対して有効量のRGMa阻害物質を投与することを含む、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療方法。

[9]RGMa阻害物質が抗RGMa中和抗体である、[8]に記載の予防又は治療方法。

[10]RGMa阻害物質の、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤の製造のための使用。

[11]RGMa阻害物質が抗RGMa中和抗体である、[10]に記載の使用。

### 発明の効果

[0013] 本発明によれば、RGMa阻害物質、とりわけ、抗RGMa中和抗体が、例えば、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤として有用である。

### 図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は糖尿病(DM)病態発症後4週経過時点での抗RGMa中和抗体(単に抗RGMa抗体と記載することがある)投与群、アイソタイプコントロール抗体投与群からそれぞれ取得したDiscrimination Index (DI) 値、および健常マウスのDI値を示す図である。

[図2]図2は非糖尿病(non-DM)マウスまたは糖尿病(DM)マウスに抗RGMa中

和抗体またはアイソタイプコントロール抗体を投与したときのdoublecortin陽性細胞数を示す図である。doublecortin陽性細胞数は海馬歯状回面積で標準化した。

[図3] 図3は慢性脳低灌流モデルでの抗RGMa中和抗体投与群、アイソタイプコントロール抗体投与群からそれぞれ取得したDiscrimination Index (DI) 値、およびShamマウスでのアイソタイプコントロール抗体投与群から取得したDI値を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明に用いられる用語を説明する。

[中和]

本願において中和とは目的の標的に結合し、かつ、その標的のいずれかの機能を阻害することができる作用のことをいう。例えば、RGMa阻害物質は、RGMaへの結合の結果、RGMaの生物活性を阻害する作用を示す物質をいう。

[0016] [エピトープ]

本願においてエピトープとは、免疫グロブリン又はT細胞受容体に対して特異的に結合し得るポリペプチド決定基を含む。ある実施形態では、エピトープは分子の化学的に活性な表面基（例えば、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル又はスルホニル）を含み、ある実施形態では特定の3次元構造特性及び／又は特定の電荷特性を有し得る。エピトープは抗体により結合される抗原の領域である。

[0017] [単離された]

本願において単離されたRGMa阻害物質（例えば抗体等）等の「単離された」とは、同定され、かつ、分離された、及び／又は、自然状態での成分から回収された、という意味である。自然状態での不純物は、その抗体の診断的又は治療的使用を妨害し得る物質であり、酵素、ホルモン及びその他のタンパク質性の又は非タンパク質性の溶質が挙げられる。一般的に、RGMa阻害物質等を単離するには、少なくとも1つの精製工程によって精製すれ

ばよく、少なくとも1つの精製工程により精製されたRGMa阻害物質を「単離されたRGMa阻害物質」ということができる。

[0018] [抗体]

本願において抗体とは、広義には免疫グロブリン(Ig)分子の実質的にエピトープに結合する特徴を保持している2本の重鎖(H鎖)と2本の軽鎖(L鎖)の4本のポリペプチド鎖からなるIg分子を指す。

[0019] [ヒト抗体]

本願においてヒト抗体とは、軽鎖、重鎖ともにヒト免疫グロブリン由来の抗体をいう。ヒト抗体は、重鎖の定常領域の違いにより、 $\gamma$ 鎖の重鎖を有するIgG(IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む)、 $\mu$ 鎖の重鎖を有するIgM、 $\alpha$ 鎖の重鎖を有するIgA(IgA1、IgA2を含む)、 $\delta$ 鎖の重鎖を有するIgD、又は $\epsilon$ 鎖の重鎖を有するIgEを含む。また原則として軽鎖は、 $\kappa$ 鎖と $\lambda$ 鎖のどちらか一方を含む。

[0020] [ヒト化抗体]

本願においてヒト化抗体は、非ヒト動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域とからなる可変領域、及びヒト抗体由来の定常領域からなる抗体をいう。

[0021] [キメラ抗体]

本願においてキメラ抗体とは、軽鎖、重鎖、又はその両方が、非ヒト由来の可変領域と、ヒト由来の定常領域からなる抗体をいう。

[0022] [モノスペシフィック抗体]

本願においてモノスペシフィック抗体とは、単一の抗原特異性を有する、単一の独立した抗原認識部位を持ち合わせた抗体である。本明細書中においては、例えば、RGMaを認識するモノスペシフィック抗体をRGMaモノスペシフィック抗体と呼称することがある。

[0023] [マルチスペシフィック抗体]

本願においてマルチスペシフィック抗体とは、2つ以上の異なる抗原特異性を有する2つ以上の独立した抗原認識部位を持ち合わせた抗体であり、2

つの抗原特異性を有するバイスペシフィック抗体、3つの抗原特異性を有するトリスペシフィック抗体などが挙げられる。

[0024] [相補性決定領域 (CDR) ]

相補性決定領域 (CDR) とは免疫グロブリン分子の可変領域のうち、抗原結合部位を形成する領域をいい、超可変領域とも呼ばれ、免疫グロブリン分子ごとに特にアミノ酸配列の変化が大きい部分をいう。CDRには軽鎖及び重鎖それぞれに3つのCDRがある。軽鎖に含まれる3つのCDRをそれぞれLCDR1、LCDR2及びLCDR3、並びに重鎖に含まれる3つのCDRをHCDR1、HCDR2及びHCDR3と呼称することがある。例えば免疫グロブリン分子のCDRはカバット (Kabat) の番号付けシステム (Kabatら、1987、Sequences of Proteins of Immunological Interest、US Department of Health and Human Services、NIH、USA) に従って決定される。

[0025] [有効量]

有効量とは、障害又はその1つ以上の症状の重症度及び／又は期間を軽減又は改善させる、障害の進行を予防する、障害を後退させる、障害に関連する1つ以上の症状の再発、発生、発症又は進行を予防する、障害を検出する、或いは別の治療 (例えば、予防薬又は治療薬) の1つ以上の予防又は治療効果を強化又は向上させるのに十分な予防又は治療剤の量を指す。

[0026] [アミノ酸配列のパーセント (%) 同一性]

可変領域等の候補ポリペプチド配列のアミノ酸配列の、参照ポリペプチド配列のアミノ酸配列に関する「パーセント (%) 同一性」とは、配列を整列させ、最大の%同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。%同一性を測定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALI

GN、又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%同一性値は、ペアワイズアラインメントにおいて、配列比較コンピュータプログラムBLASTを使用することによって得られる。

アミノ酸配列比較にBLASTが用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの%同一性は次のように計算される：

分率 $X/Y$ の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムBLASTのA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%同一性は、BのAに対する%同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限りは、ここでの全ての%同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにBLASTコンピュータプログラムを用いて得られる。

[0027] [保存的置換]

保存的置換とは、ペプチドの活性を実質的に改変しないように、アミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合等が挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸の例として、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷

をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

[0028] 以下、本発明の実施形態について、詳細に説明する。

本発明は、R G M a 阻害物質の新規な用途である糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤を提供する。

また、本発明は、治療を要する哺乳動物に対して、有効量のR G M a 阻害物質を含む予防又は治療剤を投与するステップを含む、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療方法を提供する。

[0029] < R G M a 阻害物質 >

本発明のR G M a 阻害物質は、R G M a そのものに作用して、R G M a の活性（以下、本明細書中において、単に「R G M a 活性」ということがある。）を阻害又は減弱する物質であればよく、例えば、R G M a に結合して直接的にR G M a 活性を阻害（減弱）する活性、あるいはR G M a と受容体の結合を阻害して間接的にR G M a 活性を阻害（減弱）する活性を有する物質（例えば、後述の化合物や抗体等）を本発明のR G M a 阻害物質と称する。

また、本発明のR G M a 阻害物質は、R G M a の発現を抑制する物質であってもよく、例えば、R G M a の発現を阻害し、R G M a 活性を阻害（減弱）する物質（例えば、後述の核酸分子等）も本発明のR G M a 阻害物質に含まれる。

[0030] R G M a は中枢神経系における神経突起成長阻害タンパク質として同定され、ヒトR G M a タンパク質は配列番号1に示すように450アミノ酸からなる前駆タンパク質として生合成される。N末端に存在するシグナルペプチドMet 1～Pro 47（N末端側から1番目のメチオニン残基から47番目のプロリン残基までのペプチドを指す、以後同様に記載）が除去され、Asp 168とPro 169の間のペプチド結合が切断されてN末端ドメインが生成し、さらにPro 169よりC末側のフラグメントのC末端ペプチドAla 425～Cys 450が除去されるとともに、C末端となったAla 4

24のC末端カルボキシル基にGPIアンカーが付加され、C末側ドメインが生成する。ヒトRGMaタンパク質は、上記N末側ドメイン(Cys48～Asp168)とC末側ドメイン(Pro169～Ala424)がジスルフィド結合により繋がった成熟タンパク質として、GPIアンカーを介して細胞膜上に発現する。

- [0031] 本発明においてRGMaは、いずれの動物由来のものでもよいが、好ましくはヒトRGMaである。ヒトのRGMaの前駆タンパク質は配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなる。マウスのRGMaの前駆タンパク質は配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列、ラットのRGMaの前駆タンパク質は配列表の配列番号3に示すアミノ酸配列からなるが、C末端ペプチドが除去されるため、成熟タンパク質としては同一のアミノ酸配列となる。

RGMa遺伝子としては、例えば配列番号4に示される塩基配列からなるヒトRGMa遺伝子等が挙げられるが、これに限定されるものではない。種々の生物由来のRGM遺伝子の塩基配列は公知のデータベース(GenBank等)から容易に取得することができる。

- [0032] 本発明のRGMa阻害物質としては、具体的には、低分子化合物、抗RGMa中和抗体、その機能改変抗体、そのコンジュゲート抗体又はそれら抗原結合断片等が挙げられ、また、RGMaの核酸分子であるsiRNA(short interfering RNA)、shRNA(short hairpin RNA)又はアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。これらのRGMa阻害物質のうち、好ましくは抗RGMa中和抗体、その機能改変抗体、そのコンジュゲート抗体およびそれらの抗原結合断片であり、より好ましくは抗RGMa中和抗体又はその抗原結合断片であり、とりわけ抗RGMa中和抗体が好ましい。

- [0033] <抗RGMa中和抗体>

本発明において、抗RGMa中和抗体とは、RGMaに結合して、RGMa活性を中和する抗体であればよく、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも良い。本発明において好ましくはモノクローナル抗体である。また、本発明の抗RGMa中和抗体はRGMaモノスペシフィック抗体でもR

G M a 及び他の抗原を複数認識するマルチスペシフィック抗体でもよいが、好ましくはR G M a モノスペシフィック抗体である。

[0034] また、具体的なエピトープとしては、ヒトR G M a において、配列番号 1 6 (配列番号 1 のアミノ酸番号 4 7 - 6 9)、配列番号 3 6 (配列番号 1 のアミノ酸番号 2 9 8 - 3 1 1)、配列番号 3 7 (配列番号 1 のアミノ酸番号 3 2 2 - 3 3 5)、配列番号 3 8 (配列番号 1 のアミノ酸番号 3 4 9 - 3 5 9)、配列番号 3 9 (配列番号 1 のアミノ酸番号 3 6 7 - 3 7 7) のうち、1 つ以上であることが好ましく、配列番号 3 6 及び 3 7 の組み合わせがより好ましく、配列番号 3 6、3 7 及び 3 9 の組み合わせがとりわけ好ましい。

[0035] 本発明の抗R G M a 中和抗体は、R G M a タンパク質又はその部分断片 (例えば、上記したエピトープ断片) を抗原として、該抗原をマウス等の哺乳動物に免疫して得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造されるキメラ抗体及びヒト化抗体、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造されるヒト抗体などが含まれる。本発明の抗体を医薬としてヒトに投与する場合は、副作用の観点から、ヒト化抗体又はヒト抗体が望ましい。

[0036] 本発明の抗R G M a 中和抗体として、具体的には、下記 (a) ~ (l) の抗体が挙げられ、それぞれ製造方法は特許文献 2 - 4 に記載された方法を用いることができる。

[0037] (a) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体 (当該抗R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 3 6、3 7 及び 3 9 をエピトープとする抗体も含む)、

(b) 配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列を含むLC

DR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及びSFGをアミノ酸配列に含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 3 6、3 7 及び 3 8 をエピトープとする抗体も含む）、

（c）配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 1 8 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 2 0 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

（d）配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

（e）配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 3 1 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 1 6 をエピトープとする抗体も含む）、

（f）配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 3 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 3 4 に記

載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号16をエピトープとする抗体も含む）、

（g）配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号40に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号16をエピトープとする抗体も含む）、

（h）配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号41に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号16をエピトープとする抗体も含む）、

（i）配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号42に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号16をエピトープとする抗体も含む）、

（j）配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号43に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号3

4に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号16をエピトープとする抗体も含む）、

（k）配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号16をエピトープとする抗体も含む）、及び

（l）配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号16をエピトープとする抗体も含む）、

から選択される抗体が挙げられる。

これらのうち、特に好ましくは(a)に記載される抗体が挙げられる。

[0038] 本発明の抗RGMa中和抗体の製造方法は、既存の一般に用いられる製造方法を用いることができる。抗原はそのまま免疫に使用してもよいし、キャリアタンパク質との複合体として用いてもよい。抗原とキャリアタンパク質の複合体の調製にはグルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性エステル等の縮合剤を用いることができる。キャリアタンパク質は牛血清アルブミン、サイログロブリン、ヘモシアニン、KLH等が例示される。

[0039] 免疫される哺乳動物としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ等が挙げられ、接種方法は皮下、筋肉あるいは腹腔内の投与が挙げられる。投与に際しては完全

フロイントアジュバンドや不完全フロイントアジュバンドと混和して投与してもよく、投与は通常2～5週毎に1回ずつ行われる。免疫された動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞は骨髓腫（ミエローマ）細胞と細胞融合させ、ハイブリドーマとして単離される。骨髓腫細胞としては哺乳動物由来、例えばマウス、ラット、ヒト等由来のものが使用される。

[0040] ＜ポリクローナル抗体＞

ポリクローナル抗体は、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、上記のような哺乳動物に免疫することで該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。

[0041] ＜モノクローナル抗体＞

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして取得することができる。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、上記のような哺乳動物の皮下、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1～数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1～14日毎に1～4回免疫を行って、最終免疫より約1～5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。

[0042] モノクローナル抗体は、当業者に周知方法を用いて得ることができる（例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』（John Wiley & Sons(1987))、Antibodies:A Laboratory Manual, Ed.Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)）。

[0043] モノクローナル抗体を分泌する「ハイブリドーマ」の調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature), 256,495, 1975) 及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓等に含まれる抗体産生細胞と、哺乳動物、好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞を細胞融合させることにより調製される。

[0044] 細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエロ

ーマP3/X63-AG8. 653 (653)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8. U1 (P3U1)、SP2/O-Ag14 (Sp2/O、Sp2)、PAI、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag. 2. 3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15等を使用することができる。

[0045] 融合促進剤としてはポリエチレングリコール等が挙げられ、通常には、20～50%程度の濃度のポリエチレングリコール（平均分子量1000～4000）を用いて20～40℃、好ましくは30～37℃の温度下、抗体産生細胞数と骨髓腫細胞数の比は通常1：1～10：1程度とし、約1～10分間程度反応させることにより細胞融合を実施することができる。

[0046] モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、ウェルの培養上清の免疫抗原に対する反応性をELISA等の免疫化学的方法によって測定することにより行うことができる。

[0047] 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングにおいては、RGMaタンパク質との結合アッセイに加えて、該抗体が本発明のRGMa活性を阻害するかの評価も行う。これらのスクリーニング方法により、本発明の抗RGMa中和抗体を選択することができる。

[0048] 目的の抗体を産生するハイブリドーマを含むウェルから更に、限界希釈法によってクローニングを行い、クローンを得ることができる。ハイブリドーマの選別、育種は、通常、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、10～20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地で行われる。

[0049] ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養するか、又はマウス、ラット等の哺乳動物の腹水中等のインビボで増殖させ、得られた培養上清、又は哺乳動物の腹水から単離すること

により行うことができる。

[0050] インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるのに適した栄養培地を用いることが可能である。栄養培地は、公知の栄養培地又は基本培地から調製される栄養培地等を上げることができる。

[0051] 基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／又は種々の無機あるいは有機物質等を含有させることができる。

[0052] モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAE又はDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。具体的には、モノクローナル抗体の精製は免疫グロブリンの精製法として既知の方法を用いればよく、たとえば、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法、陰イオン交換体の利用、さらにRGMaタンパク質を用いるアフィニティークロマトグラフィー等の手段により容易に達成することができる。

[0053] モノクローナル抗体はファージディスプレイ法により取得することもできる。ファージディスプレイ法では、任意のファージ抗体ライブラリより選別したファージを、目的の免疫原を用いてスクリーニングを行い、免疫原に対する所望の結合性を有するファージを選択する。次に、ファージ内に含まれる抗体対応配列を単離又は配列決定し、単離された配列又は決定された配列情報に基づき、抗体又は抗原結合ドメインをコードする核酸分子を含む発現ベクターを構築する。そしてかかる発現ベクターをトランスフェクションさ

れた細胞株を培養することにより、モノクローナル抗体を産生させることができる。ファージ抗体ライブラリとして、ヒト抗体ライブラリを用いることにより、所望の結合性を有するヒト抗体を生成することができる。

[0054] <核酸分子>

本発明の抗RGMa中和抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸分子は例えば、以下の方法によって得ることができる。まず、ハイブリドーマ等の細胞から、市販のRNA抽出キットを用いて全RNAを調製し、ランダムプライマー等を用い、逆転写酵素によりcDNAを合成する。次いで、既知のヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の可変領域において、それぞれ保存されている配列のオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCR法によって、抗体をコードするcDNAを増幅させる。定常領域をコードする配列については、既知の配列をPCR法で増幅することによって得ることができる。DNAの塩基配列は、配列決定用プラスミドに組み込むなどして、常法により決定することができる。

あるいは、可変領域又はその一部の配列を化学合成し、定常領域を含む配列に結合することによっても本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAを得ることができる。

当該核酸分子は重鎖と軽鎖の定常領域と可変領域の全てをコードするものであってもよいが、重鎖と軽鎖の可変領域のみをコードするものであってもよい。定常領域と可変領域の全てをコードする場合における重鎖及び軽鎖の定常領域の塩基配列は、Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986、The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 及びCell vol.22, p197, 1980 に記載のものが好ましい。

[0055] <機能改変抗体>

抗RGMa中和抗体の機能改変抗体は、以下のような方法で調製される。例えば、本願抗RGMa中和抗体を、宿主細胞として $\alpha 1$ , 6-フコース転移酵素(FUT8)遺伝子を破壊したCHO細胞を用いて製造すると、糖鎖のフコース含量が低下して細胞殺傷機能が高まった抗体が得られ、FUT8

遺伝子を導入したCHO細胞を宿主細胞として製造すると、細胞殺傷機能が低い抗体が得られる（国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第00/61739号）。また、Fc領域のアミノ酸残基を改変することで補体活性化機能を調節することができる（米国特許第6737056号、米国特許第7297775号、米国特許第7317091号）。さらに、Fc受容体の1つであるFcRnへの結合を高めたFc領域の変異体を使用することにより、血中半減期の延長を図ることができる（橋口周平ら、生化学、2010、Vol.82(8), p710）。これらの機能改変抗体は、遺伝子工学的に製造することができる。Fc受容体の1つであるFcRnへの結合を高めたFc領域の変異体を使用することにより、血中半減期の延長を図ることができる（橋口周平ら、生化学、2010、Vol.82(8), p710）。これらの機能改変抗体は、遺伝子工学的に製造することができる。

[0056] <コンジュゲート抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の改変分子として、コンジュゲート抗体が挙げられる。コンジュゲート抗体としては、抗RGMa中和抗体にポリエチレングリコール（PEG）等の非ペプチド性ポリマー、放射性物質、毒素、低分子化合物、サイトカイン、成長因子（TGF- $\beta$ 、NGF、Neurotrophinなど）、アルブミン、酵素、他の抗体などの本願の抗RGMa中和抗体以外の機能分子を化学的又は遺伝子工学的に結合したコンジュゲート抗体があげられる。

[0057] 機能分子としてPEGを結合する場合、PEGは非限定的に分子量2000から100000Da、より好ましくは10000から50000Daのものが使用でき、直鎖型でもよく、ブランチ型のものでもよい。PEGは、例えばNHS活性基を用いることにより、抗RGMa中和抗体のアミノ酸のN末端アミノ基等に結合することができる。

[0058] 機能分子として放射性物質を用いる場合、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{77}\text{Lu}$ 又は $^{211}\text{At}$ などが用いられる。放射性物質は、クロラミンT法などに

よって抗RGMa中和抗体に直接結合させることができる。

- [0059] 機能分子として毒素を用いる場合、細菌毒素（例えば、ジフテリア毒素）、植物毒素（例えば、リシン）、低分子毒素（例えば、ゲルダナマイシン）、メイタンシノイド、及びカリケアマイシン等が用いられる。
- [0060] 機能分子として低分子化合物を用いる場合、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトロレキサート、マイトマイシン、ネオカルチノスタチン、ビンデシン及びFITC等の蛍光色素等が挙げられる。
- [0061] 機能分子として、酵素を用いる場合、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4737456号）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRPO））、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、複素環式オキシダーゼ（例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等）、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ等が用いられる。
- [0062] 毒素、低分子化合物又は酵素を化学的に結合する時に使用するリンカーとしては、二価ラジカル（例えば、アルキレン、アリーレン、ヘテロアリーレン）、 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ （Rは任意の置換基、nは正の整数）で表されるリンカーやアルコキシの反復単位（例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ等）及びアルキルアミノ（例えば、ポリエチレンアミノ、Jeffamine（商標））、並びに、二酸エステル及びアミド（スクシネート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミド等が挙げられる）が挙げられる。機能分子を結合させる化学的修飾方法はこの分野において既に確立されている（D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152:127; Liu et al., Proc Natl Acad

Sci USA., 1996 Vol 93:8681)。

[0063] <抗原結合断片>

本発明の実施形態において、抗体の「抗原結合断片」とは、前述のような抗体の、抗原結合性を有する一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$  (variable fragment of antibody)、ジスルフィド結合 $Fv$ 、一本鎖抗体 ( $scFv$ )、及びこれらの重合体等が挙げられ、さらに、抗原結合断片にはポリエチレングリコール (PEG) 等の非ペプチド性ポリマー、放射性物質、毒素、低分子化合物、サイトカイン、成長因子 (TGF- $\beta$ 、NGF、Neurotrophinなど)、アルブミン、酵素、他の抗体などの本願の抗RGMa中和抗体以外の機能分子を化学的又は遺伝子工学的に結合しているコンジュゲートフラグメントが含まれる。

[0064] 「 $F(ab')_2$ 」及び「 $Fab$ 」は、イムノグロブリンを、タンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本の重鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本の重鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL (軽鎖可変領域) とCL (軽鎖定常領域) からなる軽鎖、及びVH (重鎖可変領域) とCH $\gamma$ 1 (重鎖定常領域中の $\gamma$ 1領域) とからなる重鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fabという。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本の重鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFabがヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

[0065] <キメラ抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の好ましい態様としてキメラ抗体が挙げられる。「キメラ抗体」としては、可変領域が、非ヒト動物 (マウス、ラット、ハムスター、ニワトリ等) のイムノグロブリン由来の可変領域であり、定常

領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域である、キメラ抗体が例示される。例えば、抗原をマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する可変領域を切り出し、ヒト骨髄由来の抗体定常領域と結合して作製することができる。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1、IgA2)、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラ抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。このように作製したキメラ抗体の遺伝子を用いて発現ベクターを作製することができる。該発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりキメラ抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のキメラ化抗体を得る。

[0066] <ヒト化抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の別の好ましい態様としてヒト化抗体が挙げられる。本発明における「ヒト化抗体」は、マウスなどの非ヒト動物抗体の抗原結合部位(CDR; 相補性決定領域)のDNA配列だけをヒト抗体遺伝子に移植(CDRグラフトイング)した抗体である。例えば、特表平4-506458号公報及び特許2912618号明細書等に記載の方法を参照して作製することができる。具体的には、そのCDRの一部又は全部が非ヒト哺乳動物(マウス、ラット、ハムスター等)のモノクローナル抗体に由来するCDRであり、その可変領域のフレームワーク領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域のフレームワーク領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト化抗体を意味する。

[0067] 本発明におけるヒト化抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

[0068] 例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト化抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、マウス重鎖CDR部分のDNAとマウス軽鎖CDR部分のDNAを単離し、ヒトイムノグロブリン遺伝子からヒト重鎖CDR以外の全領域のヒト重鎖遺伝子と、ヒト軽鎖CDR以外の全領域のヒト軽鎖遺伝子を単離する。

[0069] 単離したマウス重鎖CDR部分のDNAを移植したヒト重鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様にマウス軽鎖CDR部分のDNAを移植したヒト軽鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。又は、マウスのCDRを移植したヒトの重鎖及び軽鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト化抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト化抗体を得る。

[0070] <ヒト抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の別の好ましい態様としてヒト抗体が挙げられる。ヒト抗体とは、イムノグロブリンを構成する重鎖の可変領域及び重鎖の定常領域並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域を含むすべての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンとなっている抗体であって、ヒト抗体遺伝子をマウスに導入して作製することができる。具体的には、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

[0071] 例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997;

特表平4-504365号公報；特表平7-509137号公報；国際公開WO 94 / 2 5 5 8 5 号パンフレット；Nature, Vol. 368, p. 856-859, 1994；及び特表平 6 - 5 0 0 2 3 3 号公報等に記載の方法に従って作製することができる。より具体的には、HuMa b (登録商標)マウス (Medarex, Princeton NJ)、KMTMマウス (Kirin Pharma Company, Japan)、KM (FCγRIIb-KO)マウス等が挙げられる。

[0072] 本発明の抗RGMa中和抗体として、具体的には、重鎖可変領域に特定のアミノ酸配列を含むCDRを有し、軽鎖可変領域に特定のアミノ酸配列を含むCDRを有するもの（好ましくは、上述の (a) ～ (l) の抗RGMa中和抗体）が挙げられる。

なお、RGMaとの結合能を有し、RGMaの活性を阻害（中和）するという本発明の抗体の特性が維持される限り、抗RGMa中和抗体（好ましくは、上述の (a) ～ (l) の抗RGMa中和抗体）のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸（1～20個、1～10個又は1～5個、好ましくは1ないし2個）の置換、欠失、付加又は挿入があってもよい。このような置換、欠失、付加はCDRに導入されてもよいが、CDR以外の領域に導入されることが好ましい。また、該アミノ酸置換は本発明の特性を維持するために保存的置換であることが好ましい。

[0073] アミノ酸配列において置換、欠失等が含まれた本発明の抗RGMa中和抗体（好ましくは、上述の (a) ～ (l) の抗RGMa中和抗体）のアミノ酸配列は、例えば、アミノ酸配列改変後の重鎖可変領域が改変前のアミノ酸配列と90%以上（より好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上）の%同一性を有するアミノ酸配列であり、アミノ酸配列改変後の軽鎖可変領域が改変前のアミノ酸配列と90%以上（より好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上）の%同一性を有するアミノ酸配列である。

[0074] 本発明において、siRNAとは標的となる遺伝子（本発明においてはRGMa遺伝子）の発現を抑制することができる短い二本鎖RNAである。本

発明の R G M a 活性を阻害する s i R N A として機能する限りにおいて、塩基配列や長さ（塩基長）は特に限定されないが、好ましくは約 30 塩基未満、より好ましくは約 19 ～ 27 塩基、さらに好ましくは約 21 ～ 25 塩基である。

本発明において、s h R N A とは一本鎖 R N A で部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、3' 末端に突出部を有する短いヘアピン構造からなる約 20 塩基対以上の分子のことをいう。そのような s h R N A は、細胞内に導入された後、細胞内で約 20 塩基（代表的には例えば、21 塩基、22 塩基、23 塩基）の長さに分解され、s i R N A と同様に標的となる遺伝子の発現を抑制することができる。

本発明においては、上述の s i R N A 及び s h R N A は、R G M a 遺伝子の発現を抑制できるものであればどのような形態であってもよい。

[0075] 本発明において、s i R N A 又は s h R N A は、人工的に化学合成することができる。また、例えば T7 R N A ポリメラーゼ及び T7 プロモーターを用いて、鋳型 D N A からアンチセンス及びセンスの R N A をインビトロで合成することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、R G M a 遺伝子の D N A 配列中の連続する 5 から 100 の塩基配列に対して相補的な、又はハイブリダイズするヌクレオチドであればよく、D N A 又は R N A のいずれであってもよい。また、機能に支障がない限り修飾されたものであってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは常法によって合成することができ、例えば、市販の D N A 合成装置によって容易に合成することができる。

好ましい配列は通常の選択方法を用いて選択することができ、本発明における s i R N A 又は s h R N A としては、機能性 R G M a の発現阻害を評価することで確認することが出来る。

[0076] <糖尿病性認知症>

本発明における糖尿病性認知症とは、糖代謝異常により引き起こされる認知症であり、典型的には糖尿病に伴う認知症が挙げられる。その発症メカニズムとしては、脳梗塞や動脈硬化等の血管要因に加えて、糖毒性や酸化スト

レス、AGE (advanced glycation end-product) 等による加齢変化の促進、さらに、高インスリン血症、インスリン抵抗性、インスリンシグナル伝達の障害が関与すると推定されている (Lancet Neurol, 5: 64-74, 2006)。糖尿病性認知症は、臨床的には糖代謝異常との密接な関連が示されるか、または示唆されるのに対し、アルツハイマー病の病理変化や血管性病変が認められないか、またはより軽微な認知症である。また、このような糖尿病性認知症は、糖代謝障害（高血糖等を含む）による神経障害が関与する認知症も含まれる。本発明における糖尿病性認知症には、認知症に至らない軽度の認知機能障害である糖尿病性認知機能障害も包含する。

[0077] <血管性認知症>

本発明における血管性認知症とは、脳血管障害に起因する認知症であり、脳血管障害と認知症の間に因果関係が存在するものを意味する。血管性認知症の原因としては、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血に加えて、脳循環不全、低灌流、白質病変などの病型も含まれる。本発明における血管性認知症には、認知症に至らない軽度の認知機能障害である血管性認知機能障害も包含する。また、血管性認知症に関する診断基準に準じて、本発明の血管性認知症を特定することもできる（非特許文献8）。

本発明における治療対象（好ましくは哺乳動物、特にヒト）は、糖尿病性認知症または血管性認知症を発症した患者が対象となり、本発明の糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤を、これら患者に投与することができる。

[0078] ここで、「治療」とは、治療対象、好ましくは哺乳動物、特にヒトの疾患の任意の治療を含み、疾患及び症状の進行を阻止し、そのような疾患及び症状を消滅、治癒、軽減又は緩和させることを含む。

[0079] また、「予防」とは、治療対象、好ましくは哺乳動物、特にヒトにおいて、上記疾患の発症を防止または抑制することを含む。さらに、本発明における「予防」には、治療対象、好ましくは哺乳動物、特にヒトにおいて、寛解、再発を繰り返す上記疾患の再発を防止する「再発予防」が含まれる。

## [0080] &lt;医薬組成物&gt;

本発明における糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤は、通常、全身的又は局所的に、経口又は非経口の形で投与される。

本発明における糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤は、RGMa阻害物質を有効成分とし、薬学的に許容される担体又は添加剤を適宜配合して製剤化することができる。そのように製剤化した医薬組成物を経口又は非経口の形で投与することができる。具体的には、錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の経口剤とすることができ、また、注射剤、輸液、坐剤、軟膏、パッチ剤等の非経口剤とすることができる。担体又は添加剤の配合割合については、医薬品分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体又は添加剤は特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性又は油性基剤等の各種担体、例えば、賦形剤、結合剤、pH調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料等の各種添加剤が挙げられる。

[0081] RGMa阻害物質が抗RGMa中和抗体、その機能改変抗体、そのコンジュゲート抗体又はそれらの抗原結合断片である場合、薬学的に許容される担体とともに製剤化された注射剤又は輸液として、非経口投与経路、例えば、静脈内、筋肉内、皮膚内、腹腔内、皮下又は局所に投与することが好ましい。

例えば、抗RGMa中和抗体を含む注射剤又は輸液は、溶液、懸濁液又は乳濁液として用いることができる。その溶剤として、例えば、注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖溶液及び等張液（例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、プロピレングリコール等の溶液）等を用いることができる。

さらに、このような抗RGMa中和抗体を含む注射剤又は輸液は、安定剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤、防腐剤、p

H調整剤等を含んでもよい。

安定剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール、プロピレングリコール、アスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、EDTAナトリウム、クエン酸ナトリウム、ジブチルヒドロキシトルエン等を用いることができる。

溶解補助剤としては、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤例えば、ポリソルベート80（登録商標）、HCO-50等）等を用いることができる。

懸濁化剤としては、例えば、モノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。

乳化剤としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。

無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。

緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液等を用いることができる。

保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等を用いることができる。

防腐剤としては、例えば、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

pH調整剤としては、例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等

を用いることができる。

[0082] RGMa阻害物質が核酸（s i RNA、s h RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）である場合、非ウイルスベクター又はウイルスベクターの形態で投与することができる。非ウイルスベクター形態の場合、リポソームを用いて核酸分子を導入する方法（リポソーム法、HVJ-リポソーム法、カチオニックリポソーム法、リポフェクション法、リポフェクトアミン法など）、マイクロインジェクション法、遺伝子銃（Gene Gun）でキャリア（金属粒子）とともに核酸分子を細胞に移入する方法などを利用することができる。例えば、s i RNA又はs h RNAをウイルスベクターを用いて生体に投与する場合は、組換えアデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルスベクターを利用することができる。無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス、SV40などのDNAウイルス又はRNAウイルスに、s i RNA又はs h RNAを発現するDNAを導入し、細胞又は組織にこの組換えウイルスを感染させることにより、細胞又は組織内に遺伝子を導入することができる。

[0083] このようにして得られる製剤は、例えばヒトや他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して、その有効量を投与することにより、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症を予防又は治療することができる。投与量は、目的、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、有効成分の種類などを考慮して、適宜設定される。例えば、有効成分が抗RGMa中和抗体である場合、約65～70kgの体重を有する平均的なヒトを対象とした場合、1日当たり0.02mg～4000mg程度が好ましく、0.1mg～200mg程度がより好ましい。1日当たりの総投与量は、単一投与量であっても分割投与量であってもよい。

[0084] <他の薬剤又は治療との併用>

本発明において、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤は、抗糖尿病薬との併用で投与することができる。併用される抗糖尿病薬の治療剤としては、例えば、インスリン抵抗性改善薬等があげられる。

本発明において、糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防又は治療剤は、抗血栓療法や降圧剤との併用で投与することができる。併用される降圧剤としては、例えば、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（カンデサルタン等）、ACE阻害薬（ペリンドプリル等）等があげられる。

- [0085] 上記他の薬剤又は治療は、本発明の糖尿病性認知症および血管性認知症から選ばれる認知症の予防若しくは治療剤の投与前又は投与後に投与又は実施してもよく、また、同時に投与又は実施してもよい。

### 実施例

- [0086] 以下、本発明について実施例を挙げてより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

なお、抗RGMa中和抗体として、本明細書に記載した(a)のアミノ酸配列（配列番号5～10）を含む抗RGMa中和抗体を各実施例で用いた。

- [0087] [実施例1]

薬剤誘導性1型糖尿病モデルマウスを用いて、認知機能障害に対する抗RGMa中和抗体の治療効果を、新奇物体認識試験により検討した。

- [0088] <糖尿病の誘導>

7～8週齢のC57BL/6J雌性マウスを実験に使用した。糖尿病誘導群にはストレプトゾシン（STZ: Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA）20 mg/mlを10 ml/kgの用量で単回腹腔内投与し、非糖尿病誘導群には溶媒を10 ml/kgの用量で投与した。先行研究を参考にし（参考文献1,2）、糖尿病誘導から1週間後に血糖値測定を行い、血糖値が300 mg/dlに満たなかった個体は除外した。

- [0089] <群分け、抗体投与スケジュール>

購入したマウスを「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」または「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群」の2群に分け、両群とも糖尿病誘導3日後より抗体投与を開始した。何れの抗体も6 mg/mlの濃度に調整後、30 mg/kgの用量で各週1回、計4回尾静脈内投与した。「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」は14匹、「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群」は15匹物体認識試験に用いた。物体認識試験の基準を満たした「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」10匹、「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群」8匹を解析に用いた。また非糖尿病マウス (健常マウス) におけるDI値の算出には7匹を用いた。

[0090] <新奇物体認識記憶試験>

馴らし (ハンドリング) を3日間行い、翌日、オープンフィールドに各個体を入れ、15分間自由探索させることによりフィールドへの順化を行った (慣らし試行1)。翌日より獲得試行を行った。獲得試行に先行して各個体につき、5分間のフィールド自由探索 (慣らし試行2) を実施した。慣らし試行2を実施後、一時的に各個体を居住ケージに戻し、ブロックを用いて作製した同一の形状を持つ物体 (物体A) をフィールドの対角線上左上および右下の2箇所に設置したのち、各個体をフィールドに戻して自由探索させた (獲得試行)。獲得試行終了後、12時間のインターバル (事前の条件検討により決定) をあけてテスト試行を実施した。テスト施行時には、フィールドの対角線上右下に配置していた物体Aの代わりに新奇物体として不透明のビーズを入れたボトル (物体B) を配置した。一方でフィールド対角線上左上の物体Aは獲得試行同様に配置した。テスト試行では、各個体を上記物体AおよびBを配置したフィールドに戻し、10分間自由探索させた。尚、物体Aおよび物体Bは先行研究に基づき作製した (参考文献3)。全試行をビデオカメラにて録画し、行動試験終了後に各試行における各個体の両物体への探索時間をそれぞれ算出した。探索行動には各物体への匂いを嗅ぐ行動および物体に触れる行動を含め、物体に登る行動は除外した。解析には先行研究を参考にして算出した、テスト試行におけるDiscrimination Index (DI) を用いた (参考文

献4)。DIは  $\{(\text{物体Bへの探索時間}) - (\text{物体Aへの探索時間})\} / \{(\text{物体Bへの探索時間}) + (\text{物体Aへの探索時間})\}$  と定義される。テスト試行における物体AおよびBへの探索時間の合計が30秒に満たなかった個体は解析には用いなかった。尚、基準となる健常マウスのDIは、16週齢非糖尿病マウスにおいて本行動試験を実施し、算出した。

[0091] <結果>

糖尿病病態発症後4週経過時点での抗RGMa中和抗体投与群、アイソタイプコントロール抗体投与群からそれぞれ取得したDI値、および健常マウスのDI値を図1に示す。「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」では健常マウスと比較して有意なDIの低下が見られた ( $p < 0.05$ , Tukey's multiple comparisons test)。一方、「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」では「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」と比較して有意なDI値の上昇がみられ ( $p < 0.05$ , Tukey's multiple comparisons test)、健常マウスとの比較では差は見られなかった ( $p = 0.8640$ , Tukey's multiple comparisons test)。この結果より抗RGMa中和抗体投与によって、糖尿病により障害される物体記憶障害を改善できることがわかった。

以上の結果から、RGMa阻害物質、特に抗RGMa中和抗体は、糖尿病性認知症に対する薬効を示すことが明らかとなった。

[0092] [実施例2]

糖尿病の動物モデルにおける海馬依存性の認知機能障害の原因として、海馬における神経新生障害が指摘されている(参考文献6)。薬剤誘導性1型糖尿病モデルマウスを用いて、糖尿病により引き起こされる海馬歯状回神経新生の抑制に対する抗RGMa中和抗体の治療効果を免疫組織化学染色法により検討した。

[0093] <糖尿病の誘導>

7~8週齢のC57BL/6J雌性マウスを実験に使用した。糖尿病誘導群にはストレプトゾシン (STZ: Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) 20 mg/mlを10 ml/kgの用量で単回腹腔内投与し、非糖尿病誘導群には溶媒を10 ml/kg

の用量で投与した。先行研究を参考にし（参考文献1,2）、糖尿病誘導から1週間後に血糖値測定を行い、血糖値が300 mg/dl に満たなかった個体は除外した。

[0094] <抗体投与>

購入したマウスを「非糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」、「非糖尿病-アイソタイプコントロール抗体（Palivizumab）投与群」、「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」、および「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体（Palivizumab）投与群」の4群に分け、糖尿病群にはSTZ溶液、非糖尿病誘導群には溶媒を投与し、3日後より抗RGMa中和抗体もしくはアイソタイプコントロール抗体の投与を開始した。何れの抗体も6 mg/mlの濃度に調整後、30 mg/kgの用量で各週1回、計6回尾静脈内投与した。

[0095] <組織採材・免疫組織化学染色>

マウス脳の採材を糖尿病誘導6週間後に実施した。十分な麻酔ののち、4%パラホルムアルデヒド（PFA）による灌流固定を行った後に脳を摘出し、4%PFA中で後固定を行った。次いでPBSを溶媒とした30%スクロース溶液中に組織を移し、4℃で2日間から3日間静置後OCT compound（Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA）を用いて包埋した。クライオスタットを用いて脳を厚み30 μmで薄切し、作製した切片をMASコートスライドグラスに貼り付け、免疫染色に供した。3% Normal Donkey Serum（NDS）、0.3% Triton X-100を含んだPBS（ブロッキング溶液）により常温で1時間ブロッキングしPBS洗浄したのち、一次抗体として抗マウスdoublecortin抗体（1:100; abcam, Cambridge, UK、ブロッキング溶液で希釈）を用い4℃で一晩反応させた。PBSTで洗浄後、二次抗体としてAlexa Fluor 568 donkey 抗rabbit IgG（H+L）抗体（1:500; Invitrogen, Waltham, MA, USA、ブロッキング溶液で希釈）を用い室温で1時間反応させた。PBSTで洗浄後、DAPI（1 μg/ml）を用いて核染色を行ったのち封入した。共焦点レーザー顕微鏡FV3000（Olympus, Tokyo, Japan）を用いて海馬歯状回全体を撮像し、doublecortin陽性神経前駆細胞の細胞体数を計測した。各個体6切片ずつ海馬歯状回の計測を行った。d

oublecortin陽性細胞数は、ImageJを用いて測定した海馬歯状回の面積で標準化した。

[0096] <結果>

海馬歯状回面積で標準化したdoublecortin陽性細胞数を図2に示す。非糖尿病誘導群間では投与した抗体の種類にかかわらず、doublecortin陽性細胞数に変化はなかった ( $p > 0.9999$ , Tukey's multiple comparisons test)。また、「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」では「非糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」および「非糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」と比較して有意にdoublecortin陽性細胞数が減少していた (vs 「非糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」;  $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons test, vs 「非糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」;  $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons test)。一方で、「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」では「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」と比較して有意にdoublecortin陽性細胞数が改善した ( $p < 0.05$ , Tukey's multiple comparisons test)。「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」は「非糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」および「非糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」と比較してdoublecortin陽性細胞数に有意な差は見られなかった (vs 非糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群;  $p = 0.1071$ , Tukey's multiple comparisons test, vs 非糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群;  $p = 0.1130$ , Tukey's multiple comparisons test)。これらの結果より、糖尿病に起因する海馬歯状回におけるdoublecortin陽性神経前駆細胞による神経新生の減少を、抗RGMa中和抗体を投与することで改善させることができることがわかった。

以上の結果から、RGMa阻害物質、特に抗RGMa中和抗体は、糖尿病性認知症の原因の一つである海馬における神経新生の障害に対する薬効を示すことが明らかとなった。

[0097] [実施例3] 抗RGMa中和抗体を用いた治療介入による新奇物体認識記憶への影響

両側内頸動脈マイクロコイル留置により誘導される慢性脳低灌流モデルマ

ウス(Bilateral common carotid artery stenosis model: BCAS model) の認知機能障害に対する抗RGMa中和抗体の治療効果を新奇物体認識試験により検討した。

[0098] <慢性脳低灌流モデルの誘導>

9週齢から10週齢のC57BL/6J雄性マウスを実験に使用した。Isoflurane吸入麻酔(導入4%, 維持1.5%)下で、腹臥位にてマウスを固定しLaser speckle flowmetryにて脳血流を計測した。計測中はheat padを使用して直腸温を35.0~36.5℃で管理した。その後、仰臥位に固定し頸部を切開し、Carotid sheathを解放後に両側内頸動脈にmicro-coilを留置した(参考文献5)。BCAS誘導から1日後に脳血流測定を行い、脳血流が手術前と比較して90%以下に低下していない個体は除外した。脳血流の測定にはOZ-3(Omegawave, Tokyo, Japan)を用いた。

[0099] <新奇物体認識記憶試験>

オープンフィールドに各個体を入れ、15分間自由探索させることによりフィールドへの順化を行った(慣らし試行1)。翌日、獲得試行に先行して各個体につき5分間のフィールド自由探索(慣らし試行2)を実施した。慣らし試行2を実施後、一時的に各個体を居住ケージに戻し、ブロックを用いて作製した同一の形状を持つ物体(物体A)をフィールドの対角線上左上および右下の2箇所に両面テープを用いて壁から10cmの距離に設置したのち、各個体をフィールドに戻して自由探索させた(獲得試行)。獲得試行終了後、12時間のインターバルを開け、テスト試行を実施した。テスト試行ではフィールドの対角線上右下に配置していた物体Aの代わりに新奇物体として不透明のビーズを入れたボトル(物体B)を、壁から10cmの位置に両面テープを用いて配置した。一方でフィールド対角線上左上の物体Aは獲得試行同様に配置した。インターバル経過後、各個体を上記物体AおよびBを配置したフィールドに戻し、10分間自由探索させた(テスト試行)。各試行に用いた物体Aおよび物体Bは先行研究を基に作製した(参考文献3)。インターバルの間、各個体は居住ケージにて水、餌共に自由摂取とした。全ての試行をビデオ

オカメラにて録画し、行動試験終了後に各試行における各個体の物体への探索時間を算出した。探索行動には各物体への匂いを嗅ぐ行動および物体に触れる行動を含め、物体に登る行動は除外した。解析にはテスト試行における Discrimination Index (DI) を用いた。DIは  $\{(\text{物体Bへの探索時間}) - (\text{物体Aへの探索時間})\} / \{(\text{物体Bへの探索時間}) + (\text{物体Aへの探索時間})\}$  と定義される。テスト試行における物体AおよびBへの探索時間の合計が30秒に満たなかった個体は解析には用いなかった。

[0100] <抗体投与>

購入したマウスをBCAS-抗RGMa中和抗体投与群、BCAS-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群、Sham-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群の3群に分け、3群ともBCAS手術もしくはSham手術3日後より抗体投与を開始した。何れの抗体も2 mg/mlの濃度に調整後、体重依存的に10 mg/kgの用量で各週2回、計7回腹腔内投与した。各群の匹数は以下のとおりである。

BCAS-抗RGMa中和抗体投与群 13匹

BCAS-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群 9匹

Sham-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群 9匹

[0101] <結果>

BCAS-アイソタイプコントロール抗体群ではSham - アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群と比較して有意なDIの低下が見られた ( $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons test)。一方でBCAS-抗RGMa中和抗体投与群ではBCAS-アイソタイプコントロール抗体群と比較して有意にDIが上昇した ( $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons test)。これより抗RGMa中和抗体投与による治療介入は、慢性虚血により障害される物体認識記憶障害を有意に改善することがわかった。(図3)

以上の結果から、RGMa阻害物質、特に抗RGMa中和抗体は、血管性認知症に対する薬効を示すことが明らかとなった。

[0102] [参考文献]

1. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*. 2011;45(3):131-140. doi:10.1258/la.2010.010090
2. O' brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J*. 2014;54(3):259-272. doi:10.1093/ilar/ilt052
3. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013;8(12):2531-2537. doi:10.1038/nprot.2013.155
4. Grinan-Ferre C, Puigoriol-Illamola D, Palomera-avalos V, et al. Environmental enrichment modified epigenetic mechanisms in SAMP8 mouse hippocampus by reducing oxidative stress and inflammaging and achieving neuroprotection. *Front Aging Neurosci*. 2016;8(OCT). doi:10.3389/fnagi.2016.00241
5. Hattori Y et al, Gradual Carotid Artery Stenosis in Mice Closely Replicates Hypoperfusive Vascular Dementia in Humans. *Journal of the American Heart Association* 2016 2 Feb.22;5(2): e002757.DOI: 10.1161/JAHA.115.002757
6. Stranahan, A., Arumugam, T., Cutler, R. et al. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 11, 309-317 (2008). <https://doi.org/10.1038/nn2055>

[0103] <配列表の説明>

- 配列番号 1 : ヒト R G M a 前駆タンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 2 : マウス R G M a 前駆タンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 3 : ラット R G M a 前駆タンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 4 : ヒト R G M a 遺伝子のDNA配列
- 配列番号 5 : 抗 R G M a 中和抗体r116A3のLCDR1のアミノ酸配列
- 配列番号 6 : 抗 R G M a 中和抗体r116A3のLCDR2のアミノ酸配列

配列番号 7 : 抗 R G M a 中和抗体 r116A3 の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 8 : 抗 R G M a 中和抗体 r116A3 の H C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 9 : 抗 R G M a 中和抗体 r116A3 の H C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 10 : 抗 R G M a 中和抗体 r116A3 の H C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 11 : 抗 R G M a 中和抗体 r70E の L C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 12 : 抗 R G M a 中和抗体 r70E の L C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 13 : 抗 R G M a 中和抗体 r70E の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 14 : 抗 R G M a 中和抗体 r70E の H C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 15 : 抗 R G M a 中和抗体 r70E の H C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 16 : ヒ ト R G M a の エ ピ ト ー プ の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 17 : 抗 R G M a 中和抗体 5F9 の L C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 18 : 抗 R G M a 中和抗体 5F9 の L C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 19 : 抗 R G M a 中和抗体 5F9 の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 20 : 抗 R G M a 中和抗体 5F9 の H C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 21 : 抗 R G M a 中和抗体 5F9 の H C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 22 : 抗 R G M a 中和抗体 5F9 の H C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 23 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の L C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 24 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の L C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 25 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 26 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の H C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 27 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の H C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 28 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の H C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 29 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の L C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 30 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の L C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 31 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 32 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の H C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 33 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の H C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列  
配列番号 34 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の H C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列

配列番号 35 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1Y の L C D R 3 の アミノ酸配列

配列番号 36 : ヒト R G M a の エピトープ の アミノ酸配列

配列番号 37 : ヒト R G M a の エピトープ の アミノ酸配列

配列番号 38 : ヒト R G M a の エピトープ の アミノ酸配列

配列番号 39 : ヒト R G M a の エピトープ の アミノ酸配列

配列番号 40 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1F の L C D R 3 の アミノ酸配列

配列番号 41 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1H の L C D R 3 の アミノ酸配列

配列番号 42 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1L の L C D R 3 の アミノ酸配列

配列番号 43 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1V の L C D R 3 の アミノ酸配列

配列番号 44 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1I の L C D R 3 の アミノ酸配列

配列番号 45 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1K の L C D R 3 の アミノ酸配列

#### 産業上の利用可能性

- [0104] 本発明は、R G M a 阻害物質が糖尿病性認知症または血管性認知症の予防又は治療に有用であることから、医薬品産業において高い利用価値を有する。