

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-522044

(P2019-522044A)

(43) 公表日 令和1年8月8日 (2019. 8. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00 Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-515772 (P2019-515772)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月31日 (2017. 5. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月31日 (2019. 1. 31)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/035285
 (87) 国際公開番号 W02017/210343
 (87) 国際公開日 平成29年12月7日 (2017. 12. 7)
 (31) 優先権主張番号 62/344, 164
 (32) 優先日 平成28年6月1日 (2016. 6. 1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 518426712
 ザ・ユニバーシティ・オブ・ヴァージニア
 ・パテント・ファウンデーション
 アメリカ合衆国・ヴァージニア・2290
 3・シャーロットヴィル・プレストン・ア
 ヴェニュー・722・スイート・107・
 ビー・オー・ボックス・800755

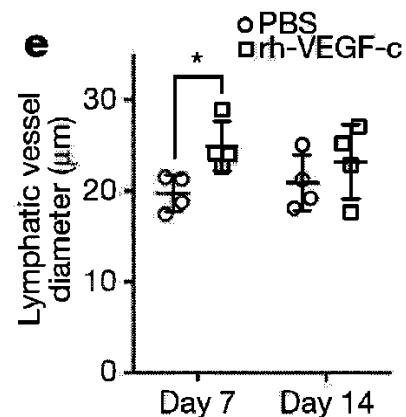
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経系におけるリンパ管を調節するための方法及び組成物

(57) 【要約】

本明細書におけるいくつかの実施形態において、中枢神経系のリンパ管を調節するための、方法、組成物及び使用を記載する。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を介する流れを増加させることを含む、神経変性疾患の症状を処置、予防又は改善するための、方法、組成物又は使用を記載する。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を阻害又は予防することによって、炎症性神経疾患の症状を処置、予防又は改善するための、方法、組成物又は使用を記載する。

Fig. 2E



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の中枢神経系における体液の流れを増加させる方法であって、
中枢神経系における体液の流れの増加を必要とする対象を決定する工程;及び
必要とする対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニスト又は線維芽細胞増殖因子2(FGF2)の有効量を
投与する工程を含み、
それによって、VEGFR3アゴニスト又はFGF2の前記量が、対象の髄膜リンパ管の直径を増加
させ、
それによって、対象の中枢神経系における体液の流れが増加する、
方法。

10

【請求項 2】

体液の流れの増加を必要とする対象を決定する工程が、神経変性疾患を有する対象を決
定する工程、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程、又はその両方
を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記神経変性疾患が、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎
縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎
、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんからなる群から選択され
る、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

体液の流れの増加を必要とする対象を決定する工程が、アルツハイマー病を有する対象
を決定する工程を含む、請求項2に記載の方法。

20

【請求項 5】

体液の流れの増加を必要とする対象を決定する工程が、アポリポタンパク質-E-イプシ
ロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体、apo-Jにおけるバリエント、ホスファチ
ジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエント、補体受容
体1(CR3)におけるバリエント、CD33(Siglee-3)におけるバリエント、若しくは骨髄細胞に
おいて発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエント、高齢、家族性AD、認知症の
症状、又は列挙した危険因子のいずれかの組み合わせからなる群から選択されるADに対
する危険因子を有する対象を決定する工程を含む、請求項2に記載の方法。

30

【請求項 6】

VEGFR3アゴニストが、投与され、前記VEGFR3アゴニストが、VEGF-cを含む、請求項2に
記載の方法。

【請求項 7】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2が、対象の髄膜腔に選択的に投与される、請求項1から6のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2が、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触
、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは
頭蓋骨の部分とVEGFR3アゴニスト若しくはFGF2との接触、VEGFR3アゴニスト若しくはFGF2
をコードする核酸の対象における発現、又は列挙した経路のいずれかの組み合わせからな
る群から選択される経路によって、対象に投与される、請求項1から6のいずれか一項に記
載の方法。

40

【請求項 9】

髄膜リンパ管の直径が、少なくとも20%増加する、請求項1から6のいずれか一項に記載
の方法。

【請求項 10】

対象の中枢神経系が、アミロイドベータ斑を含み、体液の流れの増加が、アミロイドベ
ータ斑の量を低減させる、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

50

流れの増加が、蓄積したアミロイドベータ斑の量を少なくとも5%低減させる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

蓄積したアミロイドベータ斑の少なくとも一部が、対象の脳の髄膜にある、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

VEGFR3アゴニストが、投与される、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

VEGFR3アゴニストが、VEGF-c、VEGF-d、これらのアナログ、バリエーション若しくは断片、又はこれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

10

【請求項15】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2の有効量が、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される、請求項2から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2の有効量が、神経変性疾患を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される、請求項2から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

対象の中枢神経系における体液の流れの増加が、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

20

CNSにおける体液の流れの増加が、対象の脳における可溶性分子のクリアランスを増加させる、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

増加する体液が、脳脊髄液(CSF)、間質液(ISF)、又はその両方を含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

神経変性疾患又はそれに対する危険因子を有する対象における蓄積したアミロイドベータ斑の量を低減させる方法であって、
神経変性疾患又は前記危険因子を有する対象を決定する工程;及び
対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニスト又はFGF2を投与する工程を含み、
それによって、対象の中枢神経系における体液の流れが増加し、
それによって、対象における蓄積したアミロイドベータ斑の量が低減する、
方法。

30

【請求項21】

蓄積したアミロイドベータ斑の少なくとも一部が、対象の脳の髄膜にある、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

蓄積したアミロイドベータ斑の量が、少なくとも5%低減する、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2を投与する工程が、対象の脳の髄膜リンパ管の直径を、少なくとも20%増加させ、それによって、体液の流れが増加する、請求項20に記載の方法。

40

【請求項24】

VEGFR3アゴニストが、投与され、前記VEGFR3アゴニストが、VEGF-cを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項25】

対象が、神経変性疾患を有する、請求項20から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

神経変性疾患を有する対象を決定する工程を更に含む、請求項20から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

50

神経変性疾患が、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんからなる群から選択される、請求項20から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

対象が神経変性疾患に対する危険因子を有する、請求項20から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む、請求項20から24のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 30】

危険因子が、アポリポタンパク質-E-イプシロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体、apo-Jにおけるバリエーション、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエーション、補体受容体1(CR3)におけるバリエーション、CD33(Sigle e-3)におけるバリエーション、若しくは骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエーション、高齢、家族性AD、認知症の症状、又は列挙した危険因子のいずれかの組み合わせからなる群から選択されるアルツハイマー病に対する危険因子を含む、請求項20から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

VEGFR3アゴニストが、VEGF-c、VEGF-d、これらのアナログ、バリエーション若しくは断片、又はこれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項20から23のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 32】

対象の中枢神経系における体液の流れの増加が、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む、請求項20から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

対象の中枢神経系(CNS)からの分子のクリアランスを増加させる方法であって、対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニスト又はFGF2を投与する工程を含み、それによって、対象のCNSにおける体液の流れが増加し、それによって、対象のCNSからの分子のクリアランスが増加する、方法。

30

【請求項 34】

対象のCNSからの分子のクリアランスの増加が、CNSから深頸リンパ節への分子の移動の割合の増加を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

VEGFR3アゴニストが、対象の髄膜腔に選択的に投与される、請求項33に記載の方法。

【請求項 36】

アミロイドベータ斑が、対象のCNSから取り除かれる、請求項33に記載の方法。

【請求項 37】

CNSに蓄積したアミロイドベータ斑の量が、少なくとも5%低減する、請求項36に記載の方法。

40

【請求項 38】

VEGFR3アゴニストが、投与され、前記VEGFR3アゴニストが、VEGF-cを含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 39】

神経変性疾患又は神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む、請求項33から38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記神経変性疾患が、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎

50

、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんからなる群から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

アルツハイマー病を有する対象を決定する工程を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項42】

アポリポタンパク質-E-イプシロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体、apo-Jにおけるバリエーション、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエーション、補体受容体1(CR3)におけるバリエーション、CD33(Siglee-3)におけるバリエーション、若しくは骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエーション、高齢、家族性AD、認知症の症状、又は列挙した危険因子のいずれかの組み合わせからなる群から選択されるアルツハイマー病に対する危険因子を有する対象を決定する工程を含む、請求項39に記載の方法。

10

【請求項43】

VEGFR3アゴニストが、投与される、請求項33から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

VEGFR3アゴニストが、VEGF-c、VEGF-d、これらのアナログ、バリエーション若しくは断片、又はこれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2が、対象の髄膜腔に選択的に投与される、請求項33から38のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項46】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2が、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アゴニスト若しくはFGF2との接触、VEGFR3アゴニスト若しくはFGF2をコードする核酸の対象における発現、又は列挙した経路のいずれかの組み合わせからなる群から選択される経路によって、対象に投与される、請求項33から45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2の有効量が、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される、請求項20から46のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項48】

VEGFR3アゴニスト又はFGF2の有効量が、神経変性疾患を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される、請求項20から46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

体液が、脳脊髄液(CSF)、間質液(ISF)、又はその両方を含む、請求項20から48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を減少させる方法であって、

(a)対象の髄膜腔に、VEGFR3アンタゴニストを投与する工程;若しくは

(b)対象の髄膜リンパ管をアブレーションする工程;又は

40

(a)及び(b)の組み合わせを含み、

それによって、対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走が減少する、方法。

【請求項51】

VEGFR3アンタゴニストが、対象の髄膜腔に選択的に投与される、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

リンパ管が、結紮、リンパ管中でのビスダインの光学的活性化、又はその両方によって、選択的にアブレーションされる、請求項50に記載の方法。

【請求項53】

50

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、対象の脳の実質から対象の深頸リンパ節への免疫細胞の移動の減少を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項54】

対象の脳の実質から対象の深頸リンパ節への免疫細胞の移動が、少なくとも5%減少する、請求項55に記載の方法。

【請求項55】

VEGFR3アンタゴニストが、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項56】

VEGFR3アンタゴニストが、VEGF-cに特異的な抗体を含む、請求項50に記載の方法。

10

【請求項57】

VEGFR3アンタゴニストが、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アンタゴニストとの接触、VEGFR3アンタゴニストをコードする核酸の対象における発現、又は列挙した経路のいずれかの組み合わせからなる群から選択される経路によって、対象に投与される、請求項50から56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

炎症性神経疾患又はそれに対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む、請求項50から56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項59】

20

危険因子が、家族性多発性硬化症、感染症、老齢、対象が多発性硬化症を有する疑い、神経運動機能の阻害の少なくとも1つの症状、又は列挙された危険因子のいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

炎症性神経疾患が、中枢神経系の脱髄疾患を含む、請求項58に記載の方法。

【請求項61】

炎症性神経疾患が、多発性硬化症を含む、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、対象の脳の実質から対象の深頸リンパ節への免疫細胞の移動の減少を含む、請求項50から52又は請求項55から61のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項63】

免疫細胞の遊走が、リンパ球の遊走を含む、請求項50から62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

リンパ球が、T細胞を含む、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、髄膜リンパ管のリンパ球の密度の減少を含む、請求項50から64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

40

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、遊走性の表現型を有する深頸リンパ節中の活性化T細胞の量を減少させる、請求項50から65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

遊走性の表現型が、CD11a+表現型、CD49d+表現型、又はその両方を含む、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、炎症性サイトカインを産生する中枢神経系中のT細胞の量を減少させる、請求項50から68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項69】

炎症性サイトカインが、IL-17、IFN-ガンマ、又はその両方を含む、請求項68に記載の

50

方法。

【請求項 70】

中枢神経系における炎症性神経疾患又はそれに対する危険因子を有する対象の神経系における炎症を低減させる方法であって、

(a) 対象の髄膜腔に、VEGFR3アンタゴニストを投与する工程;若しくは

(b) 対象の髄膜リンパ管をアブレーションする工程;又は

(a)及び(b)の組み合わせを含み、

VEGFR3アンタゴニスト、アブレーション又はその両方が、対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を減少させ、

それによって、中枢神経系における炎症が低減する、

方法。

10

【請求項 71】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、髄膜リンパ管中の免疫細胞の密度の減少を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 72】

髄膜リンパ管中の免疫細胞の密度が、少なくとも10%減少する、請求項70に記載の方法。

【請求項 73】

VEGFR3アンタゴニストが、対象の髄膜腔に選択的に投与される、請求項70に記載の方法。

20

【請求項 74】

VEGFR3アンタゴニストが、VEGF-cに特異的な抗体を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 75】

VEGFR3アンタゴニストが、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アンタゴニストとの接触、VEGFR3アンタゴニストをコードする核酸の対象における発現、又は列挙した経路のいずれかの組み合わせからなる群から選択される経路によって、対象に投与される、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

VEGFR3アンタゴニストが、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体を含む、請求項70から73のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 77】

炎症性神経疾患が、中枢神経系の脱髄疾患を含む、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

炎症性神経疾患が、多発性硬化症を含む、請求項77に記載の方法。

【請求項 79】

リンパ管が、結紮、リンパ管中でのビスダインの光学的活性化、又はその両方によって、選択的にアブレーションされる、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

危険因子が、家族性多発性硬化症、対象が多発性硬化症を有する疑い、感染症、老齢、神経運動機能の障害の少なくとも1つの症状、又は列挙された危険因子のいずれかの組み合わせからなる群から選択される、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 81】

対象が炎症性神経疾患を有する、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

対象が、炎症性神経疾患に対する危険因子を有する、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 83】

対象が、炎症性神経疾患に対する危険因子を有することを決定する工程を更に含む、請

50

求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項84】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、対象の実質から対象の深頸リンパ節への免疫細胞の移動の減少を含む、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項85】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、対象の脳脊髄液から対象の深頸リンパ節へのリンパ球の移動の減少を含む、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項86】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、髄膜リンパ管中の免疫細胞の密度の減少を含む、請求項73から74のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項87】

免疫細胞が、リンパ球を含む、請求項70から86のいずれか一項に記載の方法。

【請求項88】

リンパ球が、T細胞を含む、請求項79に記載の方法。

【請求項89】

中枢神経系における炎症の低減が、遊走性の表現型を有する深頸リンパ節中の活性化T細胞の量の減少を含む、請求項70から88のいずれか一項に記載の方法。

【請求項90】

遊走性の表現型が、CD11a+表現型、CD49d+表現型、又はその両方を含む、請求項89に記載の方法。

20

【請求項91】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少が、炎症性サイトカインを産生する中枢神経系中のT細胞の量を減少させる、請求項70から90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

炎症性サイトカインが、IL-17、IFN-ガンマ、又はその両方を含む、請求項83に記載の方法。

【請求項93】

対象における神経運動の症状を改善させる工程を更に含む、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項94】

VEGFR3アンタゴニストが、VEGFR3に特異的な抗体を含む、請求項48から93のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項95】

VEGFR3アンタゴニストが、VEGF-cに特異的な抗体を含む、請求項48から93のいずれか一項に記載の方法。

【請求項96】

VEGFR3アンタゴニストが、VEGF-dに特異的な抗体を含む、請求項48から93のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

参照によるあらゆる優先権出願への組み込み

本出願は、2017年6月1日に出願された、米国仮出願第62/344164号の利益を主張し、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による支援を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所によりそれぞれ授与された助成金番号AG034113及びNS061973の下で、政府支援により行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表の参照

50

本出願は、電子フォーマットの配列表と共に出願されている。配列表は、2017年5月26日に作成及び最終修正された、27,922バイトのサイズのSEQUENCEUVA005WO.TXTというタイトルのファイルとして、提供される。配列表の電子フォーマット中の情報は、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

神経疾患は、世界中の何百万もの人々に影響を与え、変性及び炎症性の神経疾患が含まれる。変性神経疾患の中でも、アルツハイマー病(AD)は、世界中で、最も流行している認知症の形態であり(Andrieuら、2015年)、早期及び著しい認知機能障害によって、弁別的に特徴付けられる(Andrieuら、2015年;Ballardら、2011年)。ADの症例の大部分(>98%)は、孤発性であり(Blennowら、2006年)、そのような症例において、アミロイド病理の病因は、十分には理解されていない(Benilovaら、2012年;Blennowら、2006年)。これは、アミロイド前駆体タンパク質(APP)又はプレセニリン1及び2における稀な遺伝性の優性突然変異が、アミロイドベータの非制御形成を推進する、家族性ADとは対照的である(Hardy及びSelkoe、2002年)。ADの脳の病理学的特徴は、細胞内の神経原線維変化及び細胞外のアミロイド斑であり、後者は、APPのアミロイド形成プロセッシング(amyloidogenic processing)の産物であり、脳実質におけるアミロイドベータの沈着をもたらす(Benilovaら、2012年;Hardy及びSelkoe、2002年;Ittner及びGotz、2011年)。ISF及びCSFからの毒性のオリゴマー中間体への拡散性のアミロイドベータペプチドの凝集の増加並びに脳実質におけるこれらの蓄積(Hongら、2011年;Iliffら、2012年)は、ADの脳における神経原線維変化の形成(Ittner及びGotz、2011年)及び明白な神経機能不全(Palopら、2007年;Sunら、2009年;Walshら、2002年)等の、異なる神経炎症性の異常に対する増悪因子(precipitating factor)であると考えられる(Guillot-Sestierら、2015年;Hongら、2016年;Matarinら、2015年)。

【0005】

多発性硬化症(MS)は、免疫系がミエリン鞘を標的とし、損傷を与える炎症性神経疾患であり、神経機能不全及び関連性の破壊的な運動及び認知機能障害をもたらす(Compston及びColes、2002年、2008年;Liblauら、2013年;Weiner、2004年)。MSは、世界中で、約250万の人々に影響を及ぼす。その病因は未知のままであるが、遺伝的素因及び環境因子の両方が、その発生に関係している。実際に、赤道に近い地理的位置や特定の感染症が、いくらか影響を及ぼすと思われる(Farezら、2015年;Goodin、2014年)。

【0006】

器官は、一般に、年齢と共に、あまり効率的に機能しなくなる。例えば、皮膚は、弾力性が減少し、筋緊張は、失われ、心臓の機能は、低下する。老化は、神経変性疾患及び炎症性神経疾患を含む、非常に多くの神経疾患に対する、実質的な危険因子である。

【0007】

分野

本明細書におけるいくつかの実施形態は、一般に、中枢神経系においてリンパ管を調節するための、組成物、方法及び使用に関する。いくつかの実施形態によれば、リンパ管の調節は、アルツハイマー病(AD)等の神経変性疾患、及び多発性硬化症(MS)等の炎症性神経疾患の症状を、処置、予防又は改善するために使用される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

- 【非特許文献1】Kress,B.T.ら、Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain.Ann.Neurol. 76巻、845~861頁(2014年)
- 【非特許文献2】Baker,A.ら、Experimental assessment of pro-lymphangiogenic growth factors in the treatment of post-surgical lymphedema following lymphadenectomy. Breast Cancer Res.BCR 12、R70(2010年)
- 【非特許文献3】Jang,J.Y.ら、Conditional ablation of LYVE-1+ cells unveils defen

sive roles of lymphatic vessels in intestine and lymph nodes. Blood 122巻、2151～2161頁、doi:10.1182/blood-2013-01-478941(2013年)

【非特許文献4】Tammela,T.ら、Photodynamic ablation of lymphatic vessels and intralymphatic cancer cells prevents metastasis. Sci Transl Med 3、69ra11、doi:10.1126/scitranslmed.3001699(2011年)

【非特許文献5】Nowotschin,S.&Hadjantonakis,A.K. Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. BMC developmental biology 9巻、49頁、doi:10.1186/1471-213X-9-49 (2009年)

【非特許文献6】「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」、第22改訂版、Pharmaceutical Press、Philadelphia、2012年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

概要

いくつかの実施形態は、対象の中樞神経系における体液の流れを増加させる方法を含む。1つの実施形態において、本方法は、中樞神経系における体液の流れの増加を必要とする対象を決定する(例えば、特定する)工程、並びに必要とする対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニスト及び/又は線維芽細胞増殖因子2(FGF2)等の流れ調節剤を含むか、実質的にこの流れ調節剤からなるか、又はこの流れ調節剤からなる組成物の有効量を投与する工程を含む、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2の量が、対象の髄膜リンパ管の直径を増加させる。1つの実施形態において、本方法は、対象の中樞神経系における体液の流れを増加させる。いくつかの実施形態において、体液の流れの増加を必要とする対象を決定する工程は、神経変性疾患を有する対象を決定する工程、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程、又はその両方を含む。いくつかの実施形態において、神経変性疾患は、以下の、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんの1つ又は複数からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、体液の流れの増加を必要とする対象を決定する工程は、アルツハイマー病を有する対象を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、体液の流れの増加を必要とする対象を決定する工程は、以下の、アポリポタンパク質-E-イプシロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体(diploidy)、apo-Jにおけるバリエント、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエント、補体受容体1(CR3)におけるバリエント、CD33(Siglee-3)におけるバリエント、若しくは骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエント、高齢、家族性AD、又は認知症の症状の少なくとも1つからなる群から選択される、ADに対する危険因子を有する対象を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、対象の髄膜腔に、選択的に投与されるか、又はそうでなければ、局在化される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2との接触、又はVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2をコードする核酸の対象における発現、或いは列挙した経路のいずれかの組み合わせの少なくとも1つからなる群から選択される経路によって、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストが、投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、以下の、VEGF-c、VEGF-d、又はこれらのアナログ、バリエント若しくは断片の1つ又は複数からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2の有効量は、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2の有効量は、神経変性疾患を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態において、髄膜リンパ管の直径は、少なくとも、5%、10%、15%、20%、30%、50%、又はそれを超えて、増加する(例えば、投与後を、投与前と比較する場合)。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管の直径は、CNS(例えば、脳)の体液の流れを増加させる方法で、例えば、少なくとも、10%、20%、30%、50%、又はそれを超えて、増加する(例えば、投与後を、投与前と比較する場合)。いくつかの実施形態において、対象の中樞神経系における体液の流れの増加は、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む。いくつかの実施形態において、対象の中樞神経系は、アミロイドベータ斑を含み、体液の流れの増加は、アミロイドベータ斑の量を低減させる。いくつかの実施形態において、流れの増加は、蓄積したアミロイドベータ斑の量を少なくとも5%低減させる。いくつかの実施形態において、蓄積したアミロイドベータ斑の少なくとも一部は、対象の脳の髄膜にある。いくつかの実施形態において、CNSにおける体液の流れの増加は、対象の脳における可溶性分子のクリアランスを増加させる(例えば、少なくとも10%、20%、30%、50%、又はそれ超)。例として、流れ調節剤を含む組成物の投与は、いくつかの実施形態において、CNSにおける体液の流れを増加させ、及びCNS(例えば、脳、CSF)における可溶性分子のクリアランスを、投与前と比較して、約10%、20%、30%、50%超、又はそれを超えて、増加させる。いくつかの実施形態において、増加する体液は、脳脊髄液(CSF)、間質液(ISF)、又はその両方を含む。いくつかの実施形態は、対象の中樞神経系における体液の流れを増加させる使用のための組成物を含む。

【0010】

いくつかの実施形態は、神経変性疾患又はそれに対する危険因子を有する対象における蓄積したアミロイドベータ斑の量を低減させる方法を含む。1つの実施形態において、本方法は、神経変性疾患又はその危険因子を有する対象を決定する工程、及び対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2を含むか、実質的にVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2からなるか、又はVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2からなる組成物を投与する工程を含み、対象の中樞神経系における体液の流れが増加する。したがって、本方法は、対象の蓄積したアミロイドベータ斑の量を低減させることができる。いくつかの実施形態において、蓄積したアミロイドベータ斑の少なくとも一部は、対象の脳の髄膜にある。いくつかの実施形態において、蓄積したアミロイドベータ斑の量は、少なくとも、5%、10%、20%、又はそれを超えて、低減される。いくつかの実施形態において、例えば、短期記憶又は長期記憶課題における対象の認知機能は、向上する。いくつかの実施形態において、対象の中樞神経系における体液の流れの増加は、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2を含むか、VEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2からなるか、又は実質的にVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2からなる組成物の投与は、対象の脳の髄膜リンパ管の直径を、少なくとも、5%、10%、15%、20%、30%、50%、又はそれを超えて、増加させ、それにより、体液の流れが増加する。いくつかの実施形態において、対象のCNS(例えば、脳)の体液の流れは、少なくとも、10%、20%、30%、40%、50%、又はそれを超えて、増加する。いくつかの実施形態において、対象は、神経変性疾患を有する。いくつかの実施形態において、本方法は、神経変性疾患を有する対象を決定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、神経変性疾患は、以下の、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんの1つ又は複数からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、対象は、神経変性疾患に対する危険因子を有する。いくつかの実施形態において、本方法は、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、危険因子は、以下の、アポリポタンパク質-E-イプシロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体、apo-Jにおけるバリエント、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエント、補体受容体1(CR3)におけるバリエント、CD33(Sigle e-3)におけるバリエント、若しくは骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエント、高齢、家族性AD、又は認知症の症状の、1つ若しくは複数からなる群

から選択されるアルツハイマー病に対する危険因子を含む。いくつかの実施形態は、神経変性疾患又はそれに対する危険因子を有する対象における蓄積したアミロイドベータ斑の量を低減させる使用のためのものである組成物を含む。

【0011】

いくつかの実施形態は、対象の中枢神経系(CNS)から分子のクリアランスを増加させる方法であって、対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2を含むか、VEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2からなるか、又は実質的にVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2からなる組成物を投与する工程を含み、対象のCNSにおける体液の流れが増加する、方法を含む。したがって、本方法は、対象のCNSからの分子のクリアランスを増加させることができる。いくつかの実施形態において、対象のCNSからの分子のクリアランスの増加は、CNSから深頸リンパ節への分子の移動の割合の増加を含む。いくつかの実施形態において、対象のCNSからの分子のクリアランスの増加は、脳の分子の蓄積を低減させる。いくつかの実施形態において、アミロイドベータ斑は、対象のCNSから取り除かれる。いくつかの実施形態において、少なくともいくつかのアミロイドベータ斑は、対象の中枢神経系の髄膜の部分から、取り除かれる。いくつかの実施形態において、CNSに蓄積したアミロイドベータ斑の量は、少なくとも、5%、10%、15%、20%、又はそれを超えて、低減される。いくつかの実施形態において、対象の中枢神経系における体液の流れの増加は、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む。いくつかの実施形態において、例えば、短期記憶又は長期記憶課題における対象の認知機能は、向上する。いくつかの実施形態において、本方法は、神経変性疾患又は神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、神経変性疾患は、以下の、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんの少なくとも1つからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、本方法は、アルツハイマー病を有する対象を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、以下の、アポリポタンパク質-E-イプシロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体、apo-Jにおけるバリエーション、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエーション、補体受容体1(CR3)におけるバリエーション、CD33(Siglee-3)におけるバリエーション、若しくは骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエーション、高齢、家族性AD、又は認知症の症状の、1つ若しくは複数からなる群から選択されるアルツハイマー病に対する危険因子を有する対象を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストが、投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、以下の、VEGF-c、VEGF-d、又はこれらのアナログ、バリエーション若しくは断片の1つ又は複数からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、対象の髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2との接触、又はVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2をコードする核酸の対象における発現、或いは列挙した経路のいずれかの組み合わせの1つ若しくは複数からなる群から選択される経路によって、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2の有効量は、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2の有効量は、神経変性疾患を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される。いくつかの実施形態において、体液は、脳脊髄液(CSF)、間質液(ISF)、又はその両方を含む。いくつかの実施形態は、対象の中枢神経系(CNS)からの分子のクリアランスを増加させる使用のための組成物を含む。

【0012】

いくつかの実施形態は、対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を減少させる方法

10

20

30

40

50

を含む。1つの実施形態において、本方法は、(a)対象の髄膜腔に、VEGFR3アンタゴニストを含むか、VEGFR3アンタゴニストからなるか、若しくは実質的にVEGFR3アンタゴニストからなる組成物を投与する工程、又は(b)対象の髄膜リンパ管をアブレーションする工程、或いは(a)及び(b)の組み合わせを含む。したがって、本方法は、対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を減少させることができる。いくつかの実施形態において、リンパ管は、結紮、リンパ管中でのビスダインの光学的活性化、又はその両方によって、選択的にアブレーションされる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、対象の髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アンタゴニストとの接触、又はVEGFR3アンタゴニストをコードする核酸の対象における発現、或いは列挙した経路のいずれかの組み合わせの少なくとも1つからなる群から選択される経路によって、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、血管新生の増加によって特徴付けられる疾患、例えば、がん又は腫瘍を有していない対象に、投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、炎症性神経疾患又はそれに対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、危険因子は、以下の、家族性多発性硬化症、感染症、老齢、対象が多発性硬化症を有する疑い、又は神経運動機能の障害の少なくとも1つの症状の少なくとも1つからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、炎症性神経疾患は、中枢神経系の脱髄疾患を含むか、又は実質的に中枢神経系の脱髄疾患からなる。いくつかの実施形態において、炎症性神経疾患は、多発性硬化症を含むか、又は実質的に多発性硬化症からなる。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、対象の脳の実質から対象の深頸リンパ節への免疫細胞の移動の減少を含む。いくつかの実施形態において、移動は、少なくとも、5%、例えば、少なくとも、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、又はそれを超えて、減少する(例えば、投与前及び投与後に遊走する細胞の量)。このようにして、いくつかの実施形態において、対象のCNS(例えば、脳)における炎症は、減少する。いくつかの実施形態において、免疫細胞の遊走は、リンパ球の遊走を含む。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、髄膜リンパ管中のリンパ球の密度の減少を含む。いくつかの実施形態において、リンパ球は、T細胞を含むか、又は実質的にT細胞からなる。いくつかの実施形態において、密度は、少なくとも、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、又はそれを超えて、減少する(例えば、投与前及び投与後の比較として)。このようにして、いくつかの実施形態において、対象のCNS(例えば、脳)における炎症は、減少する。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、遊走性の表現型を有する深頸リンパ節中の活性化T細胞の量を減少させる。いくつかの実施形態において、遊走性の表現型は、CD11a+表現型、CD49d+表現型、又はその両方を含む。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、炎症性サイトカインを産生する中枢神経系中のT細胞の量を減少させる。いくつかの実施形態において、炎症性サイトカインは、IL-17、IFN-ガンマ、又はその両方を含む。いくつかの実施形態において、対象の神経運動機能は、向上する。いくつかの実施形態は、対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を減少させる使用のための組成物を含む。

【0013】

いくつかの実施形態は、中枢神経系の炎症性神経疾患又はそれに対する危険因子を有する対象の神経系における炎症を低減させる方法を含む。本方法は、VEGFR3アンタゴニスト、アブレーション、又はその両方が、対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を減少させる、(a)対象の髄膜腔に、VEGFR3アンタゴニストを含むか、VEGFR3アンタゴニストからなるか、若しくは実質的にVEGFR3アンタゴニストからなる組成物を投与する工程;又は(b)対象の髄膜リンパ管をアブレーションする工程、或いは(a)及び(b)の組み合わせを含むことができる。したがって、本方法は、中枢神経系における炎症を低減することができる

。いくつかの実施形態において、炎症性神経疾患は、中枢神経系の脱髄疾患を含むか、又は実質的に中枢神経系の脱髄疾患からなる。いくつかの実施形態において、炎症性神経疾患は、多発性硬化症を含むか、又は実質的に多発性硬化症からなる。いくつかの実施形態において、対象は、炎症性神経疾患を有する。いくつかの実施形態において、対象は、炎症性神経疾患に対する危険因子を有する。いくつかの実施形態において、本方法は、対象が、炎症性神経疾患に対する危険因子を有することを決定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、危険因子は、以下の、家族性多発性硬化症、対象が多発性硬化症を有する疑い、感染症、老齢、又は神経運動機能の障害の少なくとも1つの症状の少なくとも1つからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、リンパ管は、結紮、リンパ管中でのビスダインの光学的活性化、又はその両方によって、選択的にアブレーションされる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、対象の髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アンタゴニストとの接触、又はVEGFR3アンタゴニストをコードする核酸の対象における発現、或いは列挙した経路のいずれかの組み合わせの少なくとも1つからなる群から選択される経路によって、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体を含むか、実質的にこの特異的な抗体からなる。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、対象の実質から対象の深頸リンパ節への免疫細胞の移動の減少を含む。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、対象の脳脊髄液から対象の深頸リンパ節へのリンパ球の移動の減少を含む。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、髄膜リンパ管中の免疫細胞の密度の減少を含む。いくつかの実施形態において、密度は、少なくとも10%減少する(例えば、投与前及び投与後を比較する場合)。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、リンパ球を含む。いくつかの実施形態において、リンパ球は、T細胞を含むか、又は実質的にT細胞からなる。いくつかの実施形態において、中枢神経系における炎症の低減は、遊走性の表現型を有する深頸リンパ節中の活性化T細胞の量の減少を含む。いくつかの実施形態において、遊走性の表現型は、CD11a+表現型、CD49d+表現型、又はその両方を含む。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、炎症性サイトカインを産生する中枢神経系中のT細胞の量を減少させる。いくつかの実施形態において、炎症性サイトカインは、IL-17、IFN-ガンマ、又はその両方を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、対象における神経運動の症状を改善させる工程を更に含む。いくつかの実施形態において、対象の神経運動機能は、向上する。いくつかの実施形態は、対象の神経系における炎症を低減させる使用のための組成物を含む。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Aは、硬膜のホールマウントの解剖の略図である。SSS、上矢状静脈洞;TS、横静脈洞。

【図1B】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Bは、ホールマウントの髄膜におけるCD3e標識化の代表的な画像である(スケールバー、2,000 μm)。挿入図、より高倍率の、bにおいて強調表示されたボックス(スケールバー、90 μm (上側の挿入図)又は150 μm (下側の挿入図))。DAPI、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール。

【図1C】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Cは、ホールマウントの髄膜の冠状切片の略図である。

【図1D】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Dは、ホールマ

ウントの髄膜の冠状切片の代表的な画像である(スケールバー、200 μm)。

【図1E】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Eは、ホールマウントの髄膜の冠状切片におけるCD3e及びCD31免疫標識化の代表的な画像である。スケールバー、100 μm 。挿入図、より高倍率の、左側のパネルにおいて強調表示されたボックス(スケールバー、30 μm 、挿入図、4 μm)は、管腔におけるCD31標識化及び管腔の外側におけるCD3e標識化を示す。

【図1F】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Fは、上矢状静脈洞への管腔側に対して、反管腔側に局在化した静脈洞のT細胞の百分率の定量化を示す(平均 $\pm$ s.e.m; 独立した3つの動物から分析されたn=18の領域;***p=0.0008、マンホイットニー検定)。

【図1G】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Gは、CD3e及びMHCIIの発現を示す、一連のパネルである。左側のパネルは、上矢状静脈洞の周囲のCD3e及びMHCIIの発現細胞の代表的な画像を示す(この場所及び他の場所の髄膜の画像は、提示する画像の位置を表す;スケールバー、50 μm)。中央のパネルは、より高倍率の、左側で強調表示されたボックスを示す(スケールバー、10 μm)。右側のパネルは、高倍率のCD3及びMHCIIの発現細胞を示す(スケールバー、10 μm)。

【図1H】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Hは、上矢状静脈洞の周囲のCD31及びCD3e標識化の代表的な画像である(スケールバー、30 μm)。矢印は、CD3e標識化を示す。

【図1I】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Iは、静脈洞周囲のCD31+管及び同様の直径の髄膜の血管における、管1mmあたりのT細胞の数の定量化を示すグラフである(平均 $\pm$ s.e.m;n=3動物;*P=0.05、片側マンホイットニー検定)。

【図1J】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Jは、ホールマウントの髄膜におけるLyve-1標識化の代表的な画像である(スケールバー、1,000 μm)。

【図1K】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Kは、より高倍率のLyve-1を発現する管を示し(スケールバー、70 μm);矢印は、Lyve-1+マクロファージを示す。

【図1L】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Lは、上矢状静脈洞の冠状切片のCD31及びLyve-1標識化の代表的な画像である(スケールバー、70 μm)。CD31及びLyve-1標識化は、それぞれ、破線の左側に観察されるが、一般に、重なり合わず、静脈洞の管腔は、矢印で示される。

【図1M】図1A～図1Mは、髄膜のT細胞の反管腔側の分布、及び硬膜静脈洞に隣接するLyve-1を発現する管の特定を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図1Mは、より高倍率の、導管様構造を提示するLyve-1陽性管を示す、画像及び対応する挿入図である(スケールバー、50 μm)。挿入図、左側のパネルに提示したLyve-1+管の $\times 1.7$ の倍率;矢印は、管の管腔を指し示す。

【図2A】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2Aは、Prox1^{tdT}マウスの硬膜静脈洞におけるLyve-1⁺管の主要部でのProx1の発現の、一連の代表的な画像である(スケールバー、10 μm)(左から右の順に、4つのパネルは、Lyve-1、Prox1-tdTOMATO、DAPI及び重ね合わせを示す)。

【図2B】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2Bは、硬膜静脈洞におけるポドプラニン及びLyve-1標識化の、一連

10

20

30

40

50

の代表的な画像である(スケールバー、40 μm)(左から右の順に、3つのパネルは、Lyve-1、ポドプラニン及び重ね合わせを示す)。

【図2C】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2Cは、硬膜静脈洞におけるVEGFR3及びLyve-1染色の、一連の代表的な画像である(スケールバー、20 μm)(左から右の順に、3つのパネルは、VEGFR3、Lyve-1及び重ね合わせを示す)。

【図2D】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2D及び図2Eについて、成熟マウスは、4 μg のrhVEGF-c(Cys156Ser)又はPBSで、i.c.v.(大槽)注射された。髄膜を、注射の7日後及び14日後に、回収した。図2Dは、注射の7日後の髄膜のLyve-1及びProx1標識化の、一群の代表的な画像である(スケールバー、30 μm)(左側のパネルは、PBSによる注射を示し、右側のパネルは、rhVEGF-cによる注射を示す)。

【図2E】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2D及び図2Eについて、成熟マウスは、4 μg のrhVEGF-c(Cys156Ser)又はPBSで、i.c.v.(大槽)注射された。髄膜を、注射の7日後及び14日後に、回収した。図2Eは、髄膜リンパ管の直径の定量化を示すグラフである(平均 $\pm$ s.e.m;各群について、n=4のマウス;*P<0.05、ボンフェローニ事後検定を伴う両側ANOVA)。

【図2F】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2F及び図2Gは、硬膜静脈洞における平滑筋細胞(アルファ-平滑筋アクチン、 α -SMA)及びLyve-1標識化の、一連の代表的な画像である(スケールバー、50 μm (g)又は20 μm (g))。

【図2G】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2F及び図2Gは、硬膜静脈洞における平滑筋細胞(アルファ-平滑筋アクチン、 α -SMA)及びLyve-1標識化の、一連の代表的な画像である(スケールバー、50 μm (g)又は20 μm (g))。図2Gにおいて、上側のパネルは、Lyve-1を示し、下側のパネルは、 α -SMAを示す。

【図2H】図2A～図2Hは、髄膜リンパ管の分子及び構造的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図2Hは、代表的な髄膜リンパ管の低倍率顕微鏡写真(透過型電子顕微鏡)である(スケールバー、5 μm)。挿入図、より高倍率の、図2Hにおいて強調表示されたボックス。黄色矢印1は、基底膜を示し;赤色矢印2は、アンカーフィラメント(コラーゲン線維)を示し;並びに緑色矢印3は、細胞の連結を示す。

【図3A】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3A及び図3Bは、髄膜の血管及び上矢状静脈洞におけるフルオレセイン標識化を示す低倍率画像である(スケールバー、図3A及び図3Bにおいて、20 μm)。対照的に、QDot655標識化(矢印)は、静脈洞周囲の管において突出している。

【図3B】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3A及び図3Bは、髄膜の血管及び上矢状静脈洞におけるフルオレセイン標識化を示す低倍率画像である(スケールバー、図3A及び図3Bにおいて、20 μm)。対照的に、QDot655標識化(矢印)は、静脈洞周囲の管において突出している。

【図3C】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3C及び図3Dは、図3A及び図3Bに提示されたz-スタックの冠状切片である(スケールバー、図3C及び図3Dにおいて、20 μm)。CSF、脳脊髄液。

【図3D】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3Dは、図3Cに提示されたz-スタックの冠状切片である(スケールバー、図3Dにおいて、20 μm)。

i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3C及び図3Dは、図3A及び図3Bに提示されたz-サックの冠状切片である(スケールバー、図3C及び図3Dにおいて、20 μ m)。CSF、脳脊髄液。

【図3E】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3Eにおける矢印は、CSFで満たされた管を示す。図3Eは、QDot655、及びAlexa488結合抗Lyve-1抗体の両方をi.c.v.注射されたマウスからの脳脊髄液で満たされた管の代表的なz-スタックの一群のパネルである(n=3マウス;スケールバー、30 μ m)(最も左側のパネルは、QDot655を示し、中央のパネルは、抗Lyve-1 Alexa488を示し、及び左側のパネルは、重ね合わせを示す)。

10

【図3F】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3Fは、髄膜において、Lyve-1と共に、CD3e及びMHCIIに対する免疫標識化の画像を示す一群のパネルである。上側のパネルは、髄膜において、Lyve-1と共に、CD3e及びMHCIIに対する免疫標識化の代表的な画像である(スケールバー、15 μ m)。下側のパネルは、CD3e及びMHCIIの発現細胞の管腔の局在化を示す、髄膜リンパ管の3D再構成の代表的な画像である(スケールバー、20 μ m)。

【図3G】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3G及び図3Hについて、成熟マウスは、5 μ lの10%エバンスブルーをi.c.v.注射された。浅頸リンパ節(図3G、矢印)及び深頸リンパ節(図3H)を、注射30分後に分析し(n=5マウス);白色矢印は、リンパ節を示し;黄色矢印は、深頸リンパ節への内頸静脈の近くに生じたエバンスブルーで満たされた管を表す(図3H)。

20

【図3H】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3G及び図3Hについて、成熟マウスは、5 μ lの10%エバンスブルーをi.c.v.注射された。浅頸リンパ節(図3G、矢印)及び深頸リンパ節(図3H)を、注射30分後に分析し(n=5マウス);白色矢印は、リンパ節を示し;黄色矢印は、深頸リンパ節への内頸静脈の近くに生じたエバンスブルーで満たされた管を表す(図3H)。

30

【図3I】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3I及び図3Jについて、深頸リンパ節に排液される、収集管(collecting vessel)(hにおける黄色矢印)は、結紮又は偽手術された。結紮の8時間後、髄膜を収集し、Lyve-1について免疫標識した。結紮及び偽手術されたマウスの横静脈洞における、Lyve-1についての免疫標識化の代表的な画像(図3I;スケールバー、30 μ m)。

40

【図3J】図3A～図3Jは、髄膜リンパ管の機能的特徴を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。フルオレセインを静脈内(i.v.)注射された成熟マウス、及びQDot655を脳室内(i.c.v.)注射された、成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタック(n=3マウス)。図3I及び図3Jについて、深頸リンパ節に排液される、採取された管(hにおける黄色矢印)は、結紮又は偽手術された。結紮の8時間後、髄膜を収集し、Lyve-1について免疫標識した。ドットプロットは、髄膜リンパ管の直径の測定を表す(図3J;平均 $\pm$ s.e.m.;独立した2つの実験から、各群について、n=5マウス;*P=0.031、マンホイットニー検定)。

【図4A】図4A～図4Gは、硬膜静脈洞における髄膜の免疫及びリンパ管を示す。図4Aは、ホールマウントの髄膜におけるCD31染色の代表的な画像である(スケールバー、2,000 μ m)。

50

【図 4 B】図4A～図4Gは、硬膜静脈洞における髄膜の免疫及びリンパ管を示す。図4Bは、硬膜-くも膜、軟膜、硬膜静脈洞及び脈絡叢におけるT細胞(CD3e、矢印)の代表的な画像である(スケールバー、70 μ m)。

【図 4 C】図4A～図4Gは、硬膜静脈洞における髄膜の免疫及びリンパ管を示す。図4Cは、異なる髄膜の区画におけるT細胞の密度の定量化を示す(平均 $\pm$ s.e.m.;独立した2つの実験から、各群について、N=6動物;***P<0.001;ダンの事後検定を伴うクラスカルウォリス検定)。

【図 4 D】図4A～図4Gは、硬膜静脈洞における髄膜の免疫及びリンパ管を示す。図4Dは、異なる髄膜の区画におけるMHCII発現細胞の定量化を示す(平均 $\pm$ s.e.m.;独立した2つの実験から、各群について、n=6動物;***P<0.001;ダンの事後検定を伴うクラスカルウォリス検定)。

【図 4 E】図4A～図4Gは、硬膜静脈洞における髄膜の免疫及びリンパ管を示す。図4Eについて、成熟マウスは、心臓血管系の標識化を可能にするために、安楽死の5分前に、100 μ lのDyLight488レクチンを、i.v.注射された。髄膜を、回収し、抗CD3eで染色した。図4Eは、管腔(白色矢印11)及び静脈洞の外側(黄色矢印12;n=2マウス;スケールバー、70 μ m)における、T細胞局在化の代表的な直交画像である。

【図 4 F】図4A～図4Gは、硬膜静脈洞における髄膜の免疫及びリンパ管を示す。図4Fについて、成熟マウスは、10 μ gの、FITC結合抗CD45抗体又はFITC結合アイソタイプ抗体を、i.v.注射された。髄膜を、注射の1時間後に回収し、抗CD3eで標識化した。図4Fは、示される硬膜静脈洞の周囲のCD3e免疫標識化の一連の代表的な画像である。CD45陽性細胞は、CD3e+細胞(a)と共局在化せず、後者の反管腔側の局在化を示唆する(各群について、n=2マウス;スケールバー、20 μ m)。

【図 4 G】図4A～図4Gは、硬膜静脈洞における髄膜の免疫及びリンパ管を示す。図4Gは、上矢状静脈洞の周囲のリンパ管局在化の代表的な3D再構成を示す。成熟マウスは、心臓血管系を染色するために、安楽死の5分前に、100 μ lのDyLight488レクチンを、i.v.注射された。髄膜を、回収し、抗Lyve-1で標識化した。Lyve-1陽性髄膜リンパ管におけるレクチン染色の欠如は、それらが、心臓血管系とは独立していることを示唆する(n=3マウス;スケールバー、左側、50 μ m、及び、右側、120 μ m)。髄膜全体のマウンティングは、静脈洞の平坦化をもたらし、したがって、これは管状には見えない。

【図 5 A】図5は、髄膜リンパ管による古典的なリンパ管内皮細胞マーカーの発現の、特定、特徴付け及び検証を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図5Aは、髄膜のLyve-1を発現する管におけるProx1標識化の代表的な画像である(n=3マウス;スケールバー、10 μ m)。

【図 5 B】図5は、髄膜リンパ管による古典的なリンパ管内皮細胞マーカーの発現の、特定、特徴付け及び検証を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図5Bは、隔膜(diaphragm)のホールマウントの解剖の略図である。

【図 5 C】図5は、髄膜リンパ管による古典的なリンパ管内皮細胞マーカーの発現の、特定、特徴付け及び検証を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図5Cは、ポドプラニン抗体の特異性の特徴付けを示す。抗Lyve-1及び抗ポドプラニンによって標識化されたホールマウントの隔膜の代表的な画像(パネルci)は、対照アイソタイプ(パネルcii)、又は組換えポドプラニンタンパク質の飽和濃度で終夜プレインキュベートされた抗ポドプラニン(ciii;スケールバー、20 μ m)を示す。パネルciは、抗Lyve1及びポドプラニンの重ね合わせを示す。

【図 5 D】図5は、髄膜リンパ管による古典的なリンパ管内皮細胞マーカーの発現の、特定、特徴付け及び検証を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図5Dは、VEGFR3抗体の特異性の特徴付けを示す。抗Lyve-1及び抗VEGFR3(di)、二次抗体のみ(dii)、又は組換えVEGFR3タンパク質の飽和濃度で終夜プレインキュベートされた抗VEGFR3(diii;スケールバー、20 μ m)で標識化された、ホールマウントの隔膜及び硬膜の代表的な画像。パネルdiは、Lyve-1及びVEGFR3の重ね合わせを示す。

【図 5 E】図5は、髄膜リンパ管による古典的なリンパ管内皮細胞マーカーの発現の、特

10

20

30

40

50

定、特徴付け及び検証を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図5Eは、リンパ管1mm²あたりのProx1+核の数の定量化を示す(平均±s.e.m.;各群について、n=4動物)。

【図6A】図6A～図6Bは、フローサイトメトリーによる髄膜のリンパ管内皮細胞集団の特定を示す、一連のグラフである。隔膜、皮膚(耳)及び硬膜静脈洞におけるリンパ管内皮細胞のFACS分析。図6Aは、リンパ管内皮細胞(CD31+ボドプラニン+)を特定するために用いられるゲーティング戦略を示す。リンパ管内皮細胞は、シングレット、生細胞、CD45-及びCD31+ボドプラニン+として特定される。

【図6B】図6A～図6Bは、フローサイトメトリーによる髄膜のリンパ管内皮細胞集団の特定を示す、一連のグラフである。隔膜、皮膚(耳)及び硬膜静脈洞におけるリンパ管内皮細胞のFACS分析。図6Bは、成熟マウスの隔膜、皮膚及び硬膜における、リンパ管内皮細胞(CD31+ボドプラニン+)についての代表的なドットプロットを表す。

【図7A】図7A～図7Eは、ヒト硬膜におけるリンパ管の試験的特定を示す、一連の顕微鏡画像である。図7Aは、ヒト上矢状静脈洞のホルマリン固定冠状切片の代表的な画像である。

【図7B】図7A～図7Eは、ヒト硬膜におけるリンパ管の試験的特定を示す、一連の顕微鏡画像である。図7B及び図7Cは、ヒト上矢状静脈洞の冠状切片におけるLyve-1染色のそれぞれの代表的な画像である(スケールバー、100 µm)。

【図7C】図7A～図7Eは、ヒト硬膜におけるリンパ管の試験的特定を示す、一連の顕微鏡画像である。図7B及び図7Cは、ヒト上矢状静脈洞の冠状切片におけるLyve-1染色のそれぞれの代表的な画像である(スケールバー、100 µm)。cにおけるボックスは、マウスにおいて見られるように、ヒト髄膜におけるLyve-1発現マクロファージの存在を強調表示する。

【図7D】図7A～図7Eは、ヒト硬膜におけるリンパ管の試験的特定を示す、一連の顕微鏡画像である。図7Dは、ヒト上矢状静脈洞の冠状切片のLyve-1(左側のパネル)及びCD68(右側のパネル)染色の一群の代表的な画像である。Lyve-1陽性構造においてCD68陽性がないことに留意されたい(スケールバー、50 µm)。

【図7E】図7A～図7Eは、ヒト硬膜におけるリンパ管の試験的特定を示す、一連の顕微鏡画像である。図7Eは、ヒト上矢状静脈洞の冠状切片のボドプラニン(右側のパネル)及びLyve-1(左側のパネル)染色の代表的な画像である(スケールバー、50 µm)。

【図8A】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8Aは、髄膜リンパ管のCCL21(中央のパネル)及びLyve-1(左側のパネル)標識化の代表的な画像である(スケールバー、10 µm)。重ね合わせを、右側のパネルに示す。

【図8B】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8B及び図8Cは、髄膜の血管(図8B)及び髄膜リンパ管(図8C)におけるVE-カドヘリン及びLyve-1染色のそれぞれの代表的な画像であり、矢印は、VE-カドヘリン凝集を指し示す(スケールバー、10 µm)。

【図8C】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8B及び図8Cは、髄膜の血管(図8B)及び髄膜リンパ管(図8C)におけるVE-カドヘリン及びLyve-1染色のそれぞれの代表的な画像であり、矢印は、VE-カドヘリン凝集を指し示す(スケールバー、10 µm)。

【図8D】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8D～図8Fは、髄膜の血管(図8D)及びリンパ管(図8E、左側のパネルは、クロードイン-5を示し、右側のパネルはLyve-1を示す)、並びに隔膜リンパ管(図8F、左側のパネルは、クロードイン-5を示し、右側のパネルはLyve-1を示す)におけるクロードイン-5及びLyve-1染色のそれぞれの代表的な画像であり、矢印は、クロードイン-5凝集を指し示す(スケールバー、10 µm)。

【図8E】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8D～図8Fは、髄膜の血管(図8D)及びリンパ管(図8E、左側のパネルは、クロードイン-5を示し、右側のパネルはLyve-1を示す)、並びに隔膜リンパ管(図8F、左側のパネルは、クロードイン-5を示し、右側のパネルはLyve-1を示す)にお

るクローディン-5及びLyve-1染色のそれぞれの代表的な画像であり、矢印は、クローディン-5凝集を指し示す(スケールバー、10 μ m)。

【図8F】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8D～図8Fは、髄膜の血管(図8D)及びリンパ管(図8E、左側のパネルは、クローディン-5を示し、右側のパネルはLyve-1を示す)、並びに隔膜リンパ管(図8F、左側のパネルは、クローディン-5を示し、右側のパネルはLyve-1を示す)におけるクローディン-5及びLyve-1染色のそれぞれの代表的な画像であり、矢印は、クローディン-5凝集を指し示す(スケールバー、10 μ m)。

【図8G】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8G及び図8Hは、皮膚におけるインテグリン- α 9及びLyve-1標識化(図8G;耳)、及び髄膜のホルマウント(図8H)のそれぞれの代表的な画像である。図8Gにおいて、右下側のパネルは、Lyve-1を示し、右上側のパネルは、インテグリン- α 9を示し、左側のパネルは、重ね合わせを示す。スケールバー、40 μ m。インテグリン- α 9発現バルブは、髄膜リンパ管において検出されなかった。

【図8H】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8G及び図8Hは、皮膚におけるインテグリン- α 9及びLyve-1標識化(図8G;耳)、及び髄膜のホルマウント(図8H)のそれぞれの代表的な画像である。

【図8I】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8Iは、髄膜リンパ管の代表的な低倍率顕微鏡写真(透過型電子顕微鏡)である(スケールバー、2 μ m);I、管腔;SC、支持細胞;BEC、リンパ管内皮細胞;BEC、静脈洞内皮細胞。赤色矢印は、アンカーフィラメントを指し示す。

【図8J】図8A～図8Jは、髄膜リンパ管の初期のリンパ管の特性を示す、一連の顕微鏡画像及びダイアグラムである。図8Jは、髄膜及び隔膜の異なる領域のリンパ管ネットワークの形態学的特性をまとめるダイアグラムテーブルである。直径は、 μ mで表し、分枝は、管1mmあたりの枝の数として表す(平均 $\pm$ s.e.m.;独立した2つの実験から、各群について、n=4動物;*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001;ボンフェローニ事後検定を伴う両側ANOVA)。統計学のために、提示された比較は、隔膜及び上矢状静脈洞の間、並びに上矢状静脈洞及び横静脈洞との間であった。

【図9A】図9A～図9Cは、髄膜リンパ管への脳脊髄液のドレナージを示す、一連の顕微鏡画像である。図9Aは、i.c.v.注射後の、血管の脈管構造(静脈洞)及び髄膜リンパ管の両方において、脳脊髄液ドレナージで満たされたQDot655の代表的なz-スタックである(スケールバー、20 μ m)。

【図9B】図9A～図9Cは、髄膜リンパ管への脳脊髄液のドレナージを示す、一連の顕微鏡画像である。図9Bは、ホルマウントの髄膜におけるCD31及びLyve-1免疫染色の代表的な画像である。成熟マウスは、2.5 μ gのAlexa488結合抗Lyve-1抗体をi.c.v.注射された。注射の30分後、髄膜を、回収し、抗CD31で染色した。インビボで注射されたLyve-1抗体は、リンパ管を照らす(スケールバー、20 μ m)。

【図9C】図9A～図9Cは、髄膜リンパ管への脳脊髄液のドレナージを示す、一連の顕微鏡画像である。図9Cは、QDot655をi.v.注射された成熟マウス、及びAlexa488結合抗Lyve-1抗体をi.c.v.注射された成熟マウスの上矢状静脈洞の代表的なz-スタックである。図9Cのパネル「i」は、パネルcに提示されたz-スタックの冠状切片である。残りの頭蓋骨及び/又は髄膜上のコラーゲンが豊富な構造からのシグナルを記録した(青色)。図9Cのパネルiiは、頭蓋骨下の髄膜リンパ管の局在化を示すパネルcにおいて提示されたz-スタックの再構成である(スケールバー、50 μ m)。

【図10A】図10A～図10Fは、免疫細胞を輸送する髄膜リンパ管を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図10Aは、硬膜静脈洞におけるT細胞(CD3e)及びリンパ管内皮細胞(Lyve-1)の代表的な画像である(スケールバー、20 μ m)。図10Aのパネルii及びiiiは、パネルiiの周囲のT細胞局在化、及びパネルiii内のLyve-1構造を表す直交切片である(スケールバー、5 μ m)。

【図10B】図10A～図10Fは、免疫細胞を輸送する髄膜リンパ管を示す、一連の顕微鏡画

10

20

30

40

50

像及びグラフである。図10Bは、リンパ管内の静脈洞のT細胞及びMHCII発現細胞の定量化を示す(平均±s.e.m.、独立した3つの実験から、n=7~8マウス)。

【図10C】図10A~図10Fは、免疫細胞を輸送する髄膜リンパ管を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図10C~図10Dは、CD11cYFPマウスからの硬膜、髄膜におけるLyve-1染色の代表的な画像を示す(スケールバー、20 µm)。CD11c陽性細胞(おそらく、樹状細胞)は、髄膜リンパ管の内側に見出すことができる。

【図10D】図10A~図10Fは、免疫細胞を輸送する髄膜リンパ管を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図10C~図10Dは、CD11cYFPマウスからの硬膜、髄膜におけるLyve-1染色の代表的な画像を示す(スケールバー、20 µm)。CD11c陽性細胞(おそらく、樹状細胞)は、髄膜リンパ管の内側に見出すことができる。

【図10E】図10A~図10Fは、免疫細胞を輸送する髄膜リンパ管を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図10Eは、髄膜におけるB220+細胞及びリンパ管内皮細胞(Lyve-1)の免疫標識化の代表的な画像である(矢印は、B220+CD11c細胞を示す;スケールバー、20 µm)。

【図10F】図10A~図10Fは、免疫細胞を輸送する髄膜リンパ管を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図10Fは、CD19を発現する硬膜静脈洞内のB220+細胞(シングルに対するゲート化、生、CD45+)の代表的なドットプロットである;約40%のB220+細胞がCD19を発現する。

【図11A】図11A~図11Eは、鼻粘膜ではないが、髄膜リンパ管から深頸リンパ節へのエバンスブルーの排泄を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図11A~図11Cにおいて、成熟マウスは、5 µlの10%エバンスブルーをi.c.v.注射された。髄膜を、注射の30分後に回収し、エバンスブルーの局在化を、共焦点顕微鏡によって評価した。図11Aは、静脈洞及び髄膜リンパ管の両方におけるエバンスブルーの局在化の代表的な画像である(n=9マウス;スケールバー、40 µm)。右側のパネルは、Lyve-1を示し、中央のパネルは、エバンスブルーを示し、左側のパネルは、重ね合わせを示す。

【図11B】図11A~図11Eは、鼻粘膜ではないが、髄膜リンパ管から深頸リンパ節へのエバンスブルーの排泄を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図11A~図11Cにおいて、成熟マウスは、5 µlの10%エバンスブルーをi.c.v.注射された。髄膜を、注射の30分後に回収し、エバンスブルーの局在化を、共焦点顕微鏡によって評価した。図11Bは、図11Aにおいて提示された画像の横断面における蛍光強度に対するエバンスブルー(31)及びLyve-1(32)の代表的なプロファイルであり、図11Cは、成熟マウスの静脈洞、リンパ管及び髄膜におけるエバンスブルーの平均強度の定量化を示す(平均±s.e.m.、n=16の独立した4つの動物から分析された領域;**P<0.01、ダンの多重比較検定を伴うクラスカルウォリス検定)。

【図11C】図11A~図11Eは、鼻粘膜ではないが、髄膜リンパ管から深頸リンパ節へのエバンスブルーの排泄を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図11A~図11Cにおいて、成熟マウスは、5 µlの10%エバンスブルーをi.c.v.注射された。髄膜を、注射の30分後に回収し、エバンスブルーの局在化を、共焦点顕微鏡によって評価した。図11Bは、図11Aにおいて提示された画像の横断面における蛍光強度に対するエバンスブルー(31)及びLyve-1(32)の代表的なプロファイルであり、図11Cは、成熟マウスの静脈洞、リンパ管及び髄膜におけるエバンスブルーの平均強度の定量化を示す(平均±s.e.m.、n=16の独立した4つの動物から分析された領域;**P<0.01、ダンの多重比較検定を伴うクラスカルウォリス検定)。

【図11D】図11A~図11Eは、鼻粘膜ではないが、髄膜リンパ管から深頸リンパ節へのエバンスブルーの排泄を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図11D~図11Eについて、成熟マウスは、5 µlの10%エバンスブルーを、経鼻注射された。注射の30分後、鼻粘膜の標的化の成功(図11D)及び深頸リンパ節中のエバンスブルーの蓄積の欠如(図11E)が実証される。

【図11E】図11A~図11Eは、鼻粘膜ではないが、髄膜リンパ管から深頸リンパ節へのエバンスブルーの排泄を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図11D~図11Eについて

、成熟マウスは、5 μ lの10%エバンスブルーを、経鼻注射された。注射の30分後、鼻粘膜の標的化の成功(図11D)及び深頸リンパ節中のエバンスブルーの蓄積の欠如(図11E)が実証される。

【図12A】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12A～図12Eは、切除(xDCLN)又は偽手術された、深頸リンパ節を示す。切除の3週間後、髄膜を、回収し、単細胞を、分離し、フローサイトメトリーによってT細胞数について分析した。図12Aは、髄膜のT細胞を分析するためのゲーティング戦略を示す。髄膜のT細胞は、シングレット、CD45+、生細胞及びTCR β +について選択される。

【図12B】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12A～図12Eは、切除(xDCLN)又は偽手術された、深頸リンパ節を示す。切除の3週間後、髄膜を、回収し、単細胞を、分離し、フローサイトメトリーによってT細胞数について分析した。図12Bは、偽マウス及びxDCLNマウスの髄膜におけるCD8+及びCD4+細胞についての代表的なドットプロットである。

【図12C】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12A～図12Eは、切除(xDCLN)又は偽手術された、深頸リンパ節を示す。切除の3週間後、髄膜を、回収し、単細胞を、分離し、フローサイトメトリーによってT細胞数について分析した。図12Cは、xDCLNマウス及び偽マウスの髄膜における、総T細胞(TCR β +)、CD4+及びCD8+の定量化を示す(平均 $\pm$ s.e.m.;各群について、n=3動物;*P<0.018、**P<0.006(CD8)、***P<0.003(TCRb);スチューデントのt検定;独立した2つの実施からの代表が提示される)。

【図12D】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12A～図12Eは、切除(xDCLN)又は偽手術された、深頸リンパ節を示す。切除の3週間後、髄膜を、回収し、単細胞を、分離し、フローサイトメトリーによってT細胞数について分析した。図12Dは、偽マウス及びxDCLNマウスにおけるCD4+ T細胞表現型によるCD62L及びCD44の代表的な発現を示す(1群あたり、n=3マウス)。

【図12E】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12A～図12Eは、切除(xDCLN)又は偽手術された、深頸リンパ節を示す。切除の3週間後、髄膜を、回収し、単細胞を、分離し、フローサイトメトリーによってT細胞数について分析した。図12Eは、偽マウス及びxDCLNマウスにおける髄膜のCD4+ T細胞によるCD71発現についての代表的なヒストグラムを示す(1群あたり、n=3マウス)。

【図12F】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12Fは、結紮手術の代表的な画像を示す。リンパ管を強調表示するために、エバンスブルーを、手術前に、i.c.v.注射した。黒色矢印は、節を指し示し、黄色矢印は、結紮された、エバンスブルーで満たされた管を指し示す。

【図12G】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12Gは、5 μ lの10%エバンスブルーを、i.c.v.注射された、偽手術された動物又は結紮された動物を提示する。深頸リンパ節を、注射の30分後に回収し、エバンスブルー量について分析した。偽手術された動物及び結紮された動物の深頸リンパ節中のエバンスブルー蓄積の代表的な画像を示す。

【図12H】図12A～図12Hは、深頸リンパ節切除、及び髄膜の免疫区画におけるリンパ管の結紮の効果を示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図12Hは、偽マウスにおける、上矢状静脈洞及び横静脈洞における髄膜リンパ管の直径、並びに結紮後に収集リンパ管の定量化を示す(平均 $\pm$ s.e.m.、独立した2つの実験からの1群あたり、n=5マウス;ボンフェローニ事後検定を伴う両側ANOVA)。

【図13】図13A及び図13Bは、グリンパ系と髄膜のリンパ系の間の連結を示す、模式図で

ある。中枢神経系の実質内から脳脊髄液中への間質液の収集を担うグリンパ系と、我々が新たに特定した髄膜リンパ管の間の連結の略図。

【図14A】図14A～図14Cは、髄膜リンパ管のフォトアブレーションを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図14Aは、実験の概略図を示す。

【図14B】図14A～図14Cは、髄膜リンパ管のフォトアブレーションを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図14Bは、690nmのレーザーを使用して活性化された(図14A)、5 μ g又は20 μ gのビスダイン(又は、対照として、PBS)を、i.c.v.(大槽)注射された成熟マウスを示す。髄膜は、アブレーションの24時間後に、Lyve-1、Prox1及びCD31について染色された。上矢状静脈洞(図14B)及び横静脈洞(図14C)におけるリンパ管の破壊。

【図14C】図14A～図14Cは、髄膜リンパ管のフォトアブレーションを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。上矢状静脈洞(図14B)及び横静脈洞(図14C)におけるリンパ管の破壊。図14Cにおいて、上側のパネルは、対照を指し、中央のパネルは、20,000ngのビスダインを指し、下側のパネルは、5,000ngのビスダインを指す。血管に対する効果はない($n=2$ マウス/群)。

【図15A】図15A～図15Eは、頸部リンパ節へのドレナージに影響を与える髄膜リンパ管の調節を示す、一連の略図、顕微鏡画像及びグラフである。図15Aは、リンパ管ドレナージの測定のスキームを示す。蛍光マイクロビーズ(直径0.5 μ m、5 μ l)を、0.5 μ l/分の速度で、マウスの側脳室に注射した。30分後、深頸リンパ節を、回収し、スライスし、蛍光ビーズの存在について、免疫染色した。

【図15B】図15A～図15Eは、頸部リンパ節へのドレナージに影響を与える髄膜リンパ管の調節を示す、一連の略図、顕微鏡画像及びグラフである。図15Bは、リンパ管の脈管構造(Lyve-1)、蛍光マイクロビーズ及びLyve-1について免疫染色された、偽手術されたマウス(左側)及び結紮されたマウス(右側)からの深頸リンパ節の代表的な切片のペアである。偽手術されたマウスにおけるリンパ節の被膜下の空間中のマイクロビーズの蓄積に留意されたい(左側)。

【図15C】図15A～図15Eは、頸部リンパ節へのドレナージに影響を与える髄膜リンパ管の調節を示す、一連の略図、顕微鏡画像及びグラフである。図15Cは、偽マウス及び結紮されたマウスにおける蛍光ビーズによるdCLN切片の被覆度の定量化を示す。1群あたり、 $N=3\sim4$ マウス、スチューデントのt検定。

【図15D】図15A～図15Eは、頸部リンパ節へのドレナージに影響を与える髄膜リンパ管の調節を示す、一連の略図、顕微鏡画像及びグラフである。d. PBS及びビスダインを注射されたマウスにおける蛍光ビーズによるdCLN切片の被覆度の定量化(アブレーションの24時間後)。1群あたり、 $N=3\sim5$ マウス、 $*P<0.05$ 、スチューデントのt検定。

【図15E】図15A～図15Eは、頸部リンパ節へのドレナージに影響を与える髄膜リンパ管の調節を示す、一連の略図、顕微鏡画像及びグラフである。e. PBS及びVEGF-cを注射されたマウスにおける、蛍光ビーズによるdCLN切片の被覆度の定量化(VEGF-c注射の5日後)。1群あたり、 $N=4$ マウス。

【図16A】図16A～図16Bは、高齢マウス(24カ月)及びJ20マウスにおけるリンパ管ドレナージの障害を示す、一連のグラフである。図16Aは、若齢対高齢マウスにおけるリンパ管ドレナージの測定を示す。若齢(10週齢)及び高齢(24カ月)の雄マウスにおける、蛍光ビーズによるdCLN切片の被覆度の定量化。1群あたり、 $N=4\sim6$ マウス、 $*p<0.05$ 、スチューデントのt検定。

【図16B】図16A～図16Bは、高齢マウス(24カ月)及びJ20マウスにおけるリンパ管ドレナージの障害を示す、一連のグラフである。図16Bは、WTマウス及びJ20マウスにおける、蛍光ビーズによるdCLN切片の被覆度の定量化を示す。1群あたり、 $N=4\sim6$ マウス。

【図17A】図17A～図17Dは、EAEの間の、髄膜の免疫及び髄膜リンパ管を示す、一連のグラフ及び顕微鏡画像である。図17A:C57Bl6/Jマウスは、CFA/Mog35-55で免疫され、それらの髄膜は、免疫後の異なる時点で、解剖及び分析された。3日目及び5日目において、髄膜リンパ管の直径の変化は観察されなかったが、7日目において、顕著な増加が明らかであった。

【図 1 7 B】図17A～図17Dは、EAEの間の、髄膜の免疫及び髄膜リンパ管を示す、一連のグラフ及び顕微鏡画像である。図17B:CFA/Mog35-55免疫マウスから切除された髄膜はまた、T細胞(CD3)の量について標識化し、細胞数を数えた。細胞計数における顕著な減少が、7日目に観察され、疾患の発病時の13日目に劇的に増加した。

【図 1 7 C】図17A～図17Dは、EAEの間の、髄膜の免疫及び髄膜リンパ管を示す、一連のグラフ及び顕微鏡画像である。図17C:マウスは、深頸リンパ節の除去のための生存手術を受けた。偽手術された動物及び無処置マウスを、対照として使用した。切除の3週間後、動物を、CFA/Mog35-55で免疫し、EAEを追跡した。深頸リンパ節の切除は、以前の公開された研究39と一致して、EAEの発生及びその重症度を改善した。

【図 1 7 D】図17A～図17Dは、EAEの間の、髄膜の免疫及び髄膜リンパ管を示す、一連のグラフ及び顕微鏡画像である。図17D:成熟マウスを、深頸リンパ節求心性のリンパ管結紮又は偽手術に付した。同日に、EAEを、完全フロイントアジュバント中に乳化した200 μ gのMOG35-55ペプチドの皮下注射によって誘導した。マウスを、毎日スコア化して、疾患の進行を評価した。反復測定の内側ANOVAを、統計解析のために使用した。図17Dのパネルiiは、示した外科的手順からの深頸リンパ節の画像を示す。

【図 1 8 A】図18A～図18Dは、髄膜リンパ管のフォトアブレーションを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。図18Aは、マウスが、2 μ lのビスダインを、i.c.v.(大槽)注射され、これが、菲薄化頭蓋骨を通して、多光子顕微鏡の690nmのレーザーを使用して活性化されたことを示す。アブレーションの2時間後、髄膜を、収集し、リンパ管内皮細胞(Lyve-1)及び血管(ラミニン)について染色した。

【図 1 8 B】図18A～図18Dは、髄膜リンパ管のフォトアブレーションを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。リンパ管の破壊は、アブレーションの領域(上矢状静脈洞、図18B)で明らかであるが、横静脈洞においても、破壊の傾向が見られた(図18C)。

【図 1 8 C】図18A～図18Dは、髄膜リンパ管のフォトアブレーションを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。リンパ管の破壊は、アブレーションの領域(上矢状静脈洞、図18B)で明らかであるが、横静脈洞においても、破壊の傾向が見られた(図18C)。

【図 1 8 D】図18A～図18Dは、髄膜リンパ管のフォトアブレーションを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。血管に対する効果がないことが観察された(図18D、n=2マウス/群)。

【図 1 9 A】図19A～図19Cは、KikGRを発現する髄膜のT細胞のインビボ光変換を示す、一連の画像である。図19Aにおいて、SCIDマウスは、フルオロフォアKikGRを発現するCD4+ T細胞で再構成した。2週間後、矢状静脈洞の上部の頭蓋骨を、菲薄化し、髄膜のT細胞を、麻酔された動物における二光子イメージングによって、画像化した。変換前の画像を取得した後、菲薄化マウス頭蓋骨を、紫外光源に2～3分間曝した後、変換後の同じ領域を再画像化した。レーザーを、イメージングのために、1000nm(KikGR-GFP)又は1075nm(KikGR-RFP)に合わせた。

【図 1 9 B】図19A～図19Cは、KikGRを発現する髄膜のT細胞のインビボ光変換を示す、一連の画像である。図19B～図19Cは、菲薄化されていない頭蓋骨を介した光変換を示す。図19Bは、アルミニウムオイルによって光から保護されたいくつかの領域で、収束UV光に5分間曝露された、CD4+ KikGR再構成SCIDマウスを示す。黒色のボックスは、およそそのイメージング領域を示す。

【図 1 9 C】図19A～図19Cは、KikGRを発現する髄膜のT細胞のインビボ光変換を示す、一連の画像である。図19B～図19Cは、菲薄化されていない頭蓋骨を介した光変換を示す。図19Cは、分離され、共焦点顕微鏡によって、直ぐに画像化された、硬膜を示す。光変換は、UV光を受けた領域で観察された(点線の上側は、遮蔽され、点線の下側は遮蔽されなかった)。スケールバーは、50 μ mを表す。

【図 2 0 A】図20A～図20Cは、髄膜のT細胞の欠乏を示す、一連の画像である。成熟マウスは、15 μ gの抗mCD3e f(ab')₂又は対照のf(ab')₂を、1日おきに6日間、経頭蓋注射された。髄膜を、最後の注射の4日後に、回収した。図20Aは、髄膜のCD4 T細胞の代表的なドットプロットである。

10

20

30

40

50

【図 2 0 B】図20A～図20Cは、髄膜のT細胞の欠乏を示す、一連の画像である。成熟マウスは、15 μ gの抗mCD3e f(ab')₂又は対照のf(ab')₂を、1日おきに6日間、経頭蓋注射された。髄膜を、最後の注射の4日後に、回収した。図20Bは、髄膜のCD4 T細胞の定量化を示す。

【図 2 0 C】図20A～図20Cは、髄膜のT細胞の欠乏を示す、一連の画像である。成熟マウスは、15 μ gの抗mCD3e f(ab')₂又は対照のf(ab')₂を、1日おきに6日間、経頭蓋注射された。髄膜を、最後の注射の4日後に、回収した。図20Cに示すように、抗CD3eが欠乏し、TCR複合体を内在化するだけではないことを評価するために、OTI-GFPマウスは、15 μ gの抗mCD3e f(ab')₂又は対照のf(ab')₂を1回、経頭蓋注射され、髄膜を、注射24時間後に回収した。対照マウス又は注射されたマウスの髄膜におけるGFP+集団の代表的なドットプロットを示す。

10

【図 2 1 A】図21A～図21Bは、リンパ管ドレナージの効率の評価を示す、一連の画像及びグラフである。成熟C57Bl6マウスは、結紮又は偽手術された。結紮の15時間後、5 μ lの直径が0.5 μ mの蛍光ビーズを、0.5 μ l/分の速度で、右側脳室に注射した。注射の30分後、深頸リンパ節を回収し、スライスし(30 μ mの厚さ)、DAPI及びリンパ管の脈管構造について染色した。リンパ節全体を画像化し、ビーズの被覆度を測定した。図21Aは、偽動物(左側の系列)及び結紮(右側の系列)された動物における深頸リンパ節の、一連の代表的な連続切片である。とりわけ、ビーズは、結紮された系列の深頸リンパ節において、観察されない。

【図 2 1 B】図21A～図21Bは、リンパ管ドレナージの効率の評価を示す、一連の画像及びグラフである。成熟C57Bl6マウスは、結紮又は偽手術された。結紮の15時間後、5 μ lの直径が0.5 μ mの蛍光ビーズを、0.5 μ l/分の速度で、右側脳室に注射した。注射の30分後、深頸リンパ節を回収し、スライスし(30 μ mの厚さ)、DAPI及びリンパ管の脈管構造について染色した。リンパ節全体を画像化し、ビーズの被覆度を測定した。図21Bは、偽動物及び結紮された動物におけるビーズの被覆度の定量化を示す。それぞれの色は、1動物を表し、それぞれのドットは、1リンパ節である。

20

【図 2 2】図22は、髄膜リンパ管のアブレーションがEAEスコアを減少させることを示すグラフである。その後、光変換されたか(髄膜のアブレーション)、又は光変換されなかった(対照)、成熟C57b16マウスは、ビスダインを、ICV(大槽)注射又は経鼻注入された。同日に、EAEを、MOG35-55乳濁液の皮下注射によって誘導した。17日目に、マウスを屠殺する前にスコア化した(脳、髄膜、及び脊髄を、IHCのために回収して、脱髄及び浸潤の量を測定した)。この実験はまた、髄膜のリンパ系のアブレーションが、疾患の重症度を減少させることを実証する。

30

【図 2 3 A】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 3 B】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 3 C】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

40

【図 2 3 D】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 3 E】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 3 F】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡

50

画像及びグラフである。

【図 2 3 G】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 3 H】図23A～図23Hは、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 4 A】図24A～図24Eは、髄膜の管の障害が、深頸リンパ節へのドレナージを顕著に減少させることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 4 B】図24A～図24Eは、髄膜の管の障害が、深頸リンパ節へのドレナージを顕著に減少させることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 4 C】図24A～図24Eは、髄膜の管の障害が、深頸リンパ節へのドレナージを顕著に減少させることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 4 D】図24A～図24Eは、髄膜の管の障害が、深頸リンパ節へのドレナージを顕著に減少させることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 4 E】図24A～図24Eは、髄膜の管の障害が、深頸リンパ節へのドレナージを顕著に減少させることを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 5 A】図25A～図25Bは、高齢マウスにおける髄膜リンパ管のアブレーションが、脳におけるCDFトレーサーの流入を更に悪化させないことを示す、一連のグラフである。

【図 2 5 B】図25A～図25Bは、高齢マウスにおける髄膜リンパ管のアブレーションが、脳におけるCDFトレーサーの流入を更に悪化させないことを示す、一連のグラフである。

【図 2 6】図26は、ゲル+VEGF-C156Sでの経頭蓋処置が、髄膜リンパ管の直径に対して顕著な効果を有していたことを示すグラフである。

【図 2 7 A】図27A～図27Dは、いくつかの実施形態によるVEGF-Cの経頭蓋適用が、高齢の対象における、脳へのCSF流入及び記憶の向上をもたらすことを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 7 B】図27A～図27Dは、いくつかの実施形態によるVEGF-Cの経頭蓋適用が、高齢の対象における、脳へのCSF流入及び記憶の向上をもたらすことを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 7 C】図27A～図27Dは、いくつかの実施形態によるVEGF-Cの経頭蓋適用が、高齢の対象における、脳へのCSF流入及び記憶の向上をもたらすことを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 7 D】図27A～図27Dは、いくつかの実施形態によるVEGF-Cの経頭蓋適用が、高齢の対象における、脳へのCSF流入及び記憶の向上をもたらすことを示す、一連の顕微鏡画像及びグラフである。

【図 2 8 A】図28A～図28Cは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、流れを増加させることを示す、一連のグラフである。

【図 2 8 B】図28A～図28Cは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、流れを増加させることを示す、一連のグラフである。

【図 2 8 C】図28A～図28Cは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、流れを増加させることを示す、一連のグラフである。

【図 2 9 A】図29A～図29Fは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、モリス水迷路試験で試験される、認知能力を向上させることを示す、一連のグラフである。

【図 2 9 B】図29A～図29Fは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、モリス水迷路試験で試験される、認知能力を向上させることを示す、一連のグラフである。

【図 2 9 C】図29A～図29Fは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、モリス水迷路試験で試験される、認知能力を向上させることを示す、一連のグラフである。

【図 2 9 D】図29A～図29Fは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、モリス水迷路試験で試験される、認知能力を向上させることを示す、一連のグラフである。

【図 2 9 E】図29A～図29Fは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、モ

10

20

30

40

50

リス水迷路試験で試験される、認知能力を向上させることを示す、一連のグラフである。

【図 29 F】図29A～図29Fは、CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、モリス水迷路試験で試験される、認知能力を向上させることを示す、一連のグラフである。

【図 30 A】図30A～図30Bは、アルツハイマー病のモデルにおいて、髄膜のアミロイドベータ沈着を示す、一連の顕微鏡画像である。

【図 30 B】図30A～図30Bは、アルツハイマー病のモデルにおいて、髄膜のアミロイドベータ沈着を示す、一連の顕微鏡画像である。

【図 31 A】図31A～図31Bは、成熟C57BL/6マウスの髄膜のホールマウントにおける、LYVE-1+リンパ管の総面積(図31A)及びA β 凝集物によって占められた面積(図31B)の定量化を示す、一連のグラフである。

10

【図 31 B】図31A～図31Bは、成熟C57BL/6マウスの髄膜のホールマウントにおける、LYVE-1+リンパ管の総面積(図31A)及びA β 凝集物によって占められた面積(図31B)の定量化を示す、一連のグラフである。

【図 32 A】図32A～図32Cは、5xFADマウスにおいて、髄膜リンパ管のアブレーションが、アミロイドベータ(A β)凝集体を増加させることを示す、一連のグラフである。

【図 32 B】図32A～図32Cは、5xFADマウスにおいて、髄膜リンパ管のアブレーションが、アミロイドベータ(A β)凝集体を増加させることを示す、一連のグラフである。

【図 32 C】図32A～図32Cは、5xFADマウスにおいて、髄膜リンパ管のアブレーションが、アミロイドベータ(A β)凝集体を増加させることを示す、一連のグラフである。

【図 33 A】図33A～図33Cは、ADモデルにおいて、髄膜リンパ管のアブレーションが、認知症の症状を増悪することを示す、一連のグラフである。

20

【図 33 B】図33A～図33Cは、ADモデルにおいて、髄膜リンパ管のアブレーションが、認知症の症状を増悪することを示す、一連のグラフである。

【図 33 C】図33A～図33Cは、ADモデルにおいて、髄膜リンパ管のアブレーションが、認知症の症状を増悪することを示す、一連のグラフである。

【図 34 A】図34A～図34Cは、ADモデルにおいて、CNS中のVEGF-Cの発現が、認知症の症状を改善することを示す、一連のグラフである。

【図 34 B】図34A～図34Cは、ADモデルにおいて、CNS中のVEGF-Cの発現が、認知症の症状を改善することを示す、一連のグラフである。

【図 34 C】図34A～図34Cは、ADモデルにおいて、CNS中のVEGF-Cの発現が、認知症の症状を改善することを示す、一連のグラフである。

30

【図 35】図35は、i.c.m.注射された抗体によって免疫染色されたリンパ管、及び注射後の異なる時点での総リンパ領域(挿入図)の定量化を示すグラフである。

【図 36 A】図36A～図36Bは、髄膜リンパ管の構造の特徴を示す、一連のグラフである。

【図 36 B】図36A～図36Bは、髄膜リンパ管の構造の特徴を示す、一連のグラフである。

【図 37 A】図37A～図37Fは、T細胞が、髄膜リンパ管に蓄積することを示す、一連の顕微鏡画像である。

【図 37 B】図37A～図37Fは、T細胞が、髄膜リンパ管に蓄積することを示す、一連の顕微鏡画像である。

【図 37 C】図37A～図37Fは、T細胞が、髄膜リンパ管に蓄積することを示す、一連の顕微鏡画像である。

40

【図 37 D】図37A～図37Fは、T細胞が、髄膜リンパ管に蓄積することを示す、一連の顕微鏡画像である。

【図 37 E】図37A～図37Fは、T細胞が、髄膜リンパ管に蓄積することを示す、一連の顕微鏡画像である。

【図 37 F】図37A～図37Fは、T細胞が、髄膜リンパ管に蓄積することを示す、一連の顕微鏡画像である。

【図 38】図38は、外因的に注射されたT細胞(CFSE)が、横静脈洞(CD31)の髄膜リンパ管(Lyve-1)に位置することを示す、顕微鏡画像である。

【図 39】図39は、外因的に注射されたDC(TAMRA、赤色)が、髄膜リンパ管内に位置する

50

ことを示す、顕微鏡画像である。

【図 4 0 A】図40A～図40Bは、髄膜、血液及び鼻粘膜(図40A)、並びにdCLN、sCLN及びILN(図40B)におけるKiKR CD4 T細胞の百分率の定量化を示す、一連のグラフである。

【図 4 0 B】図40A～図40Bは、髄膜、血液及び鼻粘膜(図40A)、並びにdCLN、sCLN及びILN(図40B)におけるKiKR CD4 T細胞の百分率の定量化を示す、一連のグラフである。

【図 4 1 A】図41A～図41Bは、T細胞の活性化、及び深頸リンパ節へのT細胞の遊走を示す、一連のグラフである。

【図 4 1 B】図41A～図41Bは、T細胞の活性化、及び深頸リンパ節へのT細胞の遊走を示す、一連のグラフである。

【図 4 2】図42は、dCLNの1mm²あたりのT細胞の密度を示すグラフである。

10

【図 4 3 A】図43A～図43Dは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 3 B】図43A～図43Dは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 3 C】図43A～図43Dは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 3 D】図43A～図43Dは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 4 A】図44A～図44Eは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

20

【図 4 4 B】図44A～図44Eは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 4 C】図44A～図44Eは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 4 D】図44A～図44Eは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 4 E】図44A～図44Eは、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 5 A】図45A～図45Cは、髄膜の樹状細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

30

【図 4 5 B】図45A～図45Cは、髄膜の樹状細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 5 C】図45A～図45Cは、髄膜の樹状細胞が、頸部リンパ節に循環することを示す、一連のグラフである。

【図 4 6 A】図46A～図46Gは、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す、一連のグラフである。

【図 4 6 B】図46A～図46Gは、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す、一連のグラフである。

【図 4 6 C】図46A～図46Gは、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す、一連のグラフである。

40

【図 4 6 D】図46A～図46Gは、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す、一連のグラフである。

【図 4 6 E】図46A～図46Gは、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す、一連のグラフである。

【図 4 6 F】図46A～図46Gは、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す、一連のグラフである。

【図 4 6 G】図46A～図46Gは、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す、一連のグラフである。

【図 4 7】図47は、髄膜リンパ管における、外因的に標識化されたT細胞のサイクルを示すグラフである。

50

【図 4 8 A】図48A～図48Dは、本明細書におけるいくつかの実施形態による、髄膜の脈管構造のアブレーションが、CNSにおける免疫細胞のサイズ及び被覆度に影響を与えることを示す、一連のグラフである。

【図 4 8 B】図48A～図48Dは、本明細書におけるいくつかの実施形態による、髄膜の脈管構造のアブレーションが、CNSにおける免疫細胞のサイズ及び被覆度に影響を与えることを示す、一連のグラフである。

【図 4 8 C】図48A～図48Dは、本明細書におけるいくつかの実施形態による、髄膜の脈管構造のアブレーションが、CNSにおける免疫細胞のサイズ及び被覆度に影響を与えることを示す、一連のグラフである。

【図 4 8 D】図48A～図48Dは、本明細書におけるいくつかの実施形態による、髄膜の脈管構造のアブレーションが、CNSにおける免疫細胞のサイズ及び被覆度に影響を与えることを示す、一連のグラフである。

【図 4 9 A】図49A～図49Dは、T細胞の遊走が、髄膜リンパ管のアブレーションによって阻害されることを示す、一連のグラフである。

【図 4 9 B】図49A～図49Dは、T細胞の遊走が、髄膜リンパ管のアブレーションによって阻害されることを示す、一連のグラフである。

【図 4 9 C】図49A～図49Dは、T細胞の遊走が、髄膜リンパ管のアブレーションによって阻害されることを示す、一連のグラフである。

【図 4 9 D】図49A～図49Dは、T細胞の遊走が、髄膜リンパ管のアブレーションによって阻害されることを示す、一連のグラフである。

【図 5 0 A】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 B】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 C】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 D】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 E】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 F】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 G】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 H】図50A～図50Hは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 0 I】図50Iは、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す、一連のグラフである。

【図 5 1 A】図51A～図51Dは、リンパ管ドレナージのアブレーションが、深頸リンパ節におけるMOG特異的T細胞活性化を改善して、疾患の発生を改善させることを示す一連のグラフである。

【図 5 1 B】図51A～図51Dは、リンパ管ドレナージのアブレーションが、深頸リンパ節におけるMOG特異的T細胞活性化を改善して、疾患の発生を改善させることを示す一連のグラフである。

【図 5 1 C】図51A～図51Dは、リンパ管ドレナージのアブレーションが、深頸リンパ節におけるMOG特異的T細胞活性化を改善して、疾患の発生を改善させることを示す一連のグラフである。

【図 5 1 D】図51A～図51Dは、リンパ管ドレナージのアブレーションが、深頸リンパ節におけるMOG特異的T細胞活性化を改善して、疾患の発生を改善させることを示す一連のグラフである。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0015】

詳細な説明

伝統的に、中枢神経系は、免疫特権であると考えられ、古典的なリンパ管ドレナージ系が欠如すると考えられてきた。本明細書において記載されるように、リンパ系は、髄膜腔に存在し、高分子、免疫細胞及び残屑の、中枢神経系(CNS)からの排出において機能する。更に、ここで、髄膜のリンパ管ドレナージによるドレナージの調節は、脳及び中枢神経系のある特定の疾患に影響を与え得るが、所与の調節の効果は、特定の疾患に依存することを発見した(例えば、本明細書に記載の実験は、髄膜のリンパ管ドレナージの低減が、いくつかの神経疾患を改善させることができるが、他のものは悪化させることを示す)。特に、本明細書のいくつかの実施形態において記載されるように、髄膜リンパ管によるドレナージの低減が、CNS、例えば、脳脊髄液(CSF)及び間質液(ISF)の体液の流れを低減させ得、中枢神経系における分子の濃縮及び/又は蓄積の増加によって特徴付けられる神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病(AD)の症状を増悪し得る。本明細書におけるいくつかの実施形態によって流れを増加させるためのリンパ管の調節は、認知的症状及びアミロイドベータ斑の蓄積を含む、ADの症状を軽減することができる。一方、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の阻害は、多発性硬化症(MS)等の炎症性神経疾患の生理的及び運動症状を改善させることができる。したがって、いくつかの実施形態において、CNS中の高分子、細胞及び残屑の濃縮並びに/又は蓄積の増加に関連する神経変性疾患(例えば、アミロイドベータ斑の蓄積と関連する、AD)の症状を、処置、予防、阻害又は改善させるための、方法、組成物及び使用を記載する。本方法、組成物及び使用は、リンパ管によるドレナージを増加させることができ、したがって、CSF及びISFにおける流れを増加させることができる。いくつかの実施形態において、MS等の炎症性神経疾患の症状を、処置、予防、阻害又は改善させるための、方法、組成物及び使用を記載する。本方法、組成物及び使用は、リンパ管を通した免疫細胞の遊走を、低減及び/又は阻害することができる。本明細書におけるいくつかの実施形態は、それらが、以下の利点の、1つ、いくつか又は全てを含むので、特に有利である:(i)CNSにおける流れの増加;(ii)CNS中の高分子、細胞又は残屑の蓄積の減少(例えば、アミロイドベータの蓄積の減少);(iii)認知症(例えば、AD等の神経変性疾患における)を患っているか、有する疑いがあるか、及び/若しくは危険性を有する対象における、認知機能(例えば、記憶機能)の維持又は向上;(iv)CNS中の活性化された免疫細胞(例えば、T細胞)の遊走の減少;(v)CNSにおける炎症の減少;(vi)乏突起膠細胞等のミエリン鞘形成細胞(myelinating cell)の免疫調節性破壊の減少;並びに/或いは(vii)MS等の炎症性神経疾患を患っているか、有する疑いがあるか、及び/若しくは危険性を有する対象における、運動ニューロン機能の維持又は向上。

【0016】

流れ及び流れ調節剤

本明細書で使用される場合、「流れ」には、その通常の意味が与えられ、対象の中枢神経系の領域を通じた灌流の割合も指すものとする。いくつかの実施形態における流れは、CSF中の標識又はトレーサーが、中枢神経系の特定の領域を通じて灌流する割合として測定することができる(例えば、実施例1を参照のこと)。このように、流れは、どのような速さで、注入された標識又はトレーサーが、脳及び/又はCNSの他の部分の特定の領域若しくは容積全体にわたって灌流するかを確認することによって、2つの対象又は2組の条件の間で、比較することができる。

【0017】

本明細書で使用される場合、「流れ調節剤」には、その通常の意味が与えられ、髄膜リンパ管の中へ及び外への物質の通路を増加又は減少させることができ、したがって、CSF及びISFにおける流れを調節することができ、並びに/或いは髄膜リンパ管の内側、中及び外で免疫細胞の遊走を調節することができる、組成物のクラスも広く指すものとする。

【0018】

本明細書で示すように、髄膜リンパ管の中へ及び外への通路並びに物質の増加は、CSF及びISFにおける流れを増加させることができる(実施例4～6及び図26～29を参照のこと)。理論によって限定されることなく、本明細書におけるいくつかの実施形態によれば、髄膜リンパ管を通した高分子の除去が、CSF中のそれらの濃度を低く保つことができ、実質から高分子を取り除くためのグラジエントを可能にすると考えられる。このように、髄膜リンパ管による分子のドレナージの割合が高いほど、CNS中(例えば、CSF及びISF中)の分子の流れの割合が高くなる。更にまた、CNS中の体液の流れ及びドレナージの割合が高いほど、CNSからの細胞、高分子、廃棄物及び残屑のクリアランスの割合が高くなり、並びに/又は濃度が低くなる。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、髄膜リンパ管の直径を増加させ、これはドレナージを増加させ、CSF及びISF中の流れの増加をもたらす。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、髄膜リンパ管の数を増加させ、したがって、正味のドレナージを増加させ、CSF及びISF中の流れの増加をもたらす。本明細書における様々な実施形態による流れの増加のための(例えば、髄膜リンパ管の直径の増加による)適切な流れ調節剤の例としては、VEGFR3アゴニスト、例えば、VEGF-c及びVEGF-d、並びに線維芽細胞増殖因子2(FGF2)、並びにこれらの分子の機能性断片、バリエーション、アナログ及びミメティックが挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

一方、髄膜リンパ管のサイズ、直径、アクセシビリティ又は量の低減は、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走を低減させることができる(実施例2及び図24を参照のこと)。理論によって限定されることなく、本明細書におけるいくつかの実施形態によれば、免疫細胞による(例えば、髄膜リンパ管の結紮、阻止、直径の低減、アブレーション、又は量の低減による)、髄膜リンパ管へのアクセスの制限が、髄膜リンパ管の中へ及び外への免疫細胞の遊走を制限し、したがって、1つの領域から別の領域への免疫細胞の遊走を制限することを意図する。例えば、髄膜リンパ管を介した、脳から、又は深頸リンパ節へ又はからの免疫細胞の遊走を、限定することができる。このように、髄膜リンパ管への若しくは髄膜リンパ管からの免疫細胞の流入及び/又は排出は、髄膜リンパ管の直径、サイズ、量又は機能を減少させる流れ調節剤によって、又は髄膜リンパ管を最小化、アクセスの制限又はアブレーションする外科的手順によって、阻止することができる。本明細書における様々な実施形態による、髄膜リンパ管のアクセスの制限、サイズ(例えば、直径を減少させる)、量、機能又は直径に対する(及び、このようにして、流れ及びドレナージを減少させる)適切な流れ調節剤の例としては、VEGFR3アンタゴニスト、及び髄膜リンパ管のアブレーション及び阻害のための組成物、例えば、ビスダインが挙げられるが、これらに限定されない。更にまた、本明細書におけるいくつかの実施形態によれば、例えば、結紮手術を介した、髄膜リンパ管の機械的アブレーション又は中和は、髄膜リンパ管の中へ及び/又は外への、免疫細胞による流れ及び/又は遊走を低減させることができる。

【0020】

いくつかの実施形態の、方法、使用又は組成物において、流れ調節剤(例えば、VEGFR3アゴニスト、VEGFR3アンタゴニスト又はFGF)は、改変、例えば、グリコシル化、ペグ化等を含む、ポリペプチド又はタンパク質を含むか、又は実質的にこれらからなる。

【0021】

いくつかの実施形態において、本発明に記載の方法及び使用による、組成物又は使用のための組成物は、1つ又は複数の流れ調節剤(例えば、VEGFR3アゴニスト、VEGFR3アンタゴニスト、FGF又はビスダイン)及び薬学的に許容される希釈剤又は担体を、含むか、又は実質的にこれらからなる。適切な薬学的に許容される担体及び製剤の例は、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」、第22改訂版、Pharmaceutical Press、Philadelphia、2012年に記載されており、これは、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、本組成物は、CNS液の流れを増加させるために有効な単位用量の流れ調節剤を含むか、又は実質的にこの流れ調節剤からなり、本明細書に記載の方法又は使用によれば、CNS中の分子のクリアランスを増加させ、蓄積したアミロイドベータ斑の量を低減させ、免疫細胞の遊走を低減させ、又は炎症を低減させる。いくつか

の実施形態において、組成物は、流れを増加させるために有効な単回単位用量の流れ調節剤を含むか、又は実質的にこの流れ調節剤からなり、蓄積したアミロイドベータ斑を低減させるクリアランスを増加させ、免疫細胞の遊走を低減させ、又は炎症を低減させる。いくつかの実施形態において、流れ調節剤の有効量は、約0.00015mg/kg～約1.5mg/kg(本明細書に開示の化合物の治療有効量として意図する、その他の量又は範囲を含む)であり、約1.5mg/kg未満(本明細書に開示の化合物の治療有効量として意図する、その他の範囲を含む)であり、又は0.00015mg/kg(本明細書に開示の化合物の治療有効量として意図する、その他の範囲を含む)を超える。

【0022】

VEGFR3アゴニスト

FLT4としても公知のVEGFR3は、受容体チロシンキナーゼであり、そのシグナル伝達経路は、胚血管発生及び成体のリンパ管形成に参与している。リガンドの結合の際に、VEGFR3は、二量化し、自己リン酸化を通じて活性化される。VEGFR3アゴニストが、髄膜リンパ管の直径を増加させる流れ調節剤のクラスであり、これは、本明細書におけるいくつかの実施形態による、CSF及びISFのドレナージ並びに流れを増加させる(実施例4～6、図26、27A～27D、28A、28Cを参照のこと)ことを本明細書において示す。このように、VEGFR3アゴニストは、本明細書におけるいくつかの実施形態による、脳における分子の蓄積と関連する神経変性疾患、例えば、ADを、処置、改善、症状の低減、又は予防のための、方法、組成物及び使用のために適切である。したがって、ドレナージ及び流れの増加が望まれる方法又は組成物などの、いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、VEGFR3アゴニストを含むか、VEGFR3アゴニストからなるか、又は実質的にVEGFR3アゴニストからなる。

【0023】

本明細書における方法、組成物及び使用によるVEGFR3アゴニストの有効量は、髄膜の管の直径を増加させるその能力の観点で、CSF若しくはISFの流れを増加させるその能力によって、又は処置、改善若しくは予防するためのその能力によって、CNSからの物質のクリアランスを増加させるその能力によって、AD等の神経変性疾患の症状、例えば、ベータアミロイド斑の量若しくは認知機能の測定によって、理解することができる。したがって、いくつかの実施形態の組成物、方法及び使用において、VEGFR3アゴニストの有効量は、髄膜の管の直径を、少なくとも約2%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも約2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%又は75%、増加させる。いくつかの実施形態の組成物、方法及び使用において、VEGFR3アゴニストの有効量は、CSF又はISFの流れを、少なくとも約2%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも約2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%又は75%、増加させる。

【0024】

本明細書におけるいくつかの実施形態による、方法、使用及び組成物のために適切なVEGFR3アゴニストの例としては、アミノ酸配列を下記のTable 1(表1)に示すポリペプチドであるVEGF-c及びVEGF-d、並びにVEGF-c及び/又はVEGF-dのバリエーション及びアナログが挙げられる。例として、本明細書におけるいくつかの実施形態によれば、VEGF-cは、髄膜リンパ管の直径を増加させること、並びにドレナージ、CSF及びISFの流れ、及びCNSのクリアランスを増加させることを実証している。実施例4を参照のこと。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、VEGF-cを含むか、VEGF-cからなるか、又は実質的にVEGF-cからなる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、VEGF-dを含むか、VEGF-dからなるか、又は実質的にVEGF-dからなる。いくつかの実施形態において、VEGF-c及びVEGF-dは、一緒にVEGFR3を作動(agonize)させ、単一の組成物中、又は別々の組成物中に提供することができる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、VEGF-c又はVEGF-dの、アナログ、バリエーション又は機能性断片、例えば、変異体、オルソログ、断片若しくはトランシェーションを含むか、これらからなるか、又は実質的にこれらからなり、例えば、ポリペプチドは、配列番号1又は2と、少なくとも約80%の同一性、例えば、列挙さ

れる値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又は実質的にこのアミノ酸配列からなる。

【0025】

実施例5、6及び11に示すように、VEGF-c等のVEGFR3アゴニストをコードする外因性のヌクレオチドはまた、本明細書におけるいくつかの実施形態による、方法、使用及び組成物のために適切であり得る。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書に記載のVEGF-c又はVEGF-dをコードするヌクレオチドは、対象にVEGFR3アゴニストを投与するために、対象中で発現する。例えば、本明細書に記載のVEGFRアゴニストをコードする核酸を含むか、又は実質的にこの核酸からなる、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等の外因性ベクターを、対象の宿主核酸(例えば、対象の体細胞のゲノム)に挿入することができる。いくつかの実施形態において、ベクターは、VEGFRアゴニストをコードする核酸の転写を促進するための転写装置、例えば、コアプロモーター、転写エンハンサーエレメント、(抑制的なクロマチン環境から隔離するための)インスレーターエレメント等を更に含む。

【0026】

【表1】

Table 1: VEGFR3 アゴニストの例

アゴニスト	UniProt アクセッション	配列番号:
VEGF-c	P49769	1
VEGF-d	O43915	2

【0027】

いくつかの実施形態の方法又は組成物において、VEGFR3アゴニストは、改変、例えば、グリコシル化、ペグ化等を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法による使用のための組成物は、VEGFR3アゴニスト(例えば、VEGF-c及び/又はVEGF-d)、及び薬学的に許容される希釈剤又は担体を含む。

【0028】

VEGFRアンタゴニスト

VEGFR3アゴニストは、髄膜リンパ管による流れ及びドレナージを増加させることを示しているが、本明細書におけるいくつかの実施形態によるVEGFR3アンタゴニストは、対象の髄膜リンパ管の構造、並びに/又は対象の髄膜リンパ管中へ及び外への物質の通過を低減させる量を変化させる、逆の効果を有することを意図する。したがって、いくつかの実施形態において、例えば、髄膜リンパ管を通じた免疫細胞の遊走の減少が望まれる場合、流れ調節剤は、VEGFR3アンタゴニストを含むか、VEGFR3アンタゴニストからなるか、又は実質的にVEGFR3アンタゴニストからなる。例えば、いくつかの実施形態において、免疫性神経疾患、例えば、MSの症状を、処置、改善、予防若しくは低減させるための方法又は組成物において、流れ調節剤は、VEGFRアンタゴニストを含むか、VEGFRアンタゴニストからなるか、又は実質的にVEGFRアンタゴニストからなることができる。

【0029】

いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストとしては、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体が挙げられる。例えば、抗体は、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的に結合する、モノクローナル抗体を含み得るか、又は実質的にこのモノクローナル抗体からなり得る。例として、抗体を、げっ歯類等の宿主生物において、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに対して生じさせることができ、クローンは、ハイブリドーマ技術を使用して、産生させることができ、スクリーニングを行って、VEGFR3、又はVE

GF-c若しくはVEGF-dと適切に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを特定することができる。任意選択で、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに対する特定のモノクローナル抗体は、性質、例えば、より高いVEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dへの親和性が望まれるバリエーションについて、更にスクリーニングされる。このようなスクリーニングは、当業者に公知の手法、例えば、抗体の超可変領域をコードする核酸配列のランダム変異を使用して、及び高親和性のバリエーションについてスクリーニングするためのファージディスプレイ技術を使用して、行うことができる。いくつかの実施形態において、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-d抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又は全ヒト抗体を、含むか、又は実質的にこれらからなる。いくつかの実施形態において、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-d抗体は、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dの細胞外ドメインに特異的に結合する。ヒトVEGFR3のポリペプチド配列の例は、Uniprotアクセッション番号P35916として入手可能であり、本明細書において、配列番号:3として提供される。ヒトVEGF-cのポリペプチド配列の例は、Uniprotアクセッション番号P49769として入手可能であり、本明細書において、配列番号:1として提供される。ヒトVEGF-dのポリペプチド配列の例は、Uniprotアクセッション番号043915として入手可能であり、本明細書において、配列番号:2として提供される。

【0030】

いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストと同じ又は同様の効果を機能的に有する分子は、これらの分子が、VEGFR3と直接相互作用しなくても、VEGFR3アンタゴニストの代わりに使用することができる。例えば、VEGF-c及び/又はVEGF-d等のVEGFRリガンドを中和する分子は、VEGFR3のシグナル伝達を低減させることができる。したがって、いくつかの実施形態の方法、組成物及び使用において、VEGF-c又はVEGF-dに対して特異的な抗体は、VEGFR3アンタゴニストの代わりに使用することができる。

【0031】

いくつかの実施形態において、デコイ分子は、VEGFR3シグナル伝達を阻害するために機能し、本明細書における方法、組成物及び使用によるVEGFR3アンタゴニストであり得る。いくつかの実施形態において、不活性なVEGFR3断片又は変異体は、VEGFR3シグナル伝達を低減又は阻害するために使用することができる。例えば、VEGFR3のより短い分泌型アイソフォームである「アイソフォーム3」(配列番号:4)は、VEGF-c及びVEGF-dのようなVEGFR3アゴニストと結合することによって、VEGFR3シグナル伝達を阻害し、このようにして、利用可能なリガンドの量を低減させて、機能性VEGFR3を活性化することを示している。

【0032】

FGF2

いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、線維芽細胞増殖因子2(FGF2)を含むか、又は実質的に線維芽細胞増殖因子2(FGF2)からなる。理論によって限定されることなく、FGF2は、例えば、髄膜リンパ管の直径を増加させることによって、髄膜リンパ管におけるCSF又はISFのドレナージ(及び、流れ)を増加させることができることを意図する。いくつかの実施形態による適切なFGF2アミノ酸配列の例は、Unitprotアクセッション番号P09038(ヒトFGF2)(配列番号:5)として提供される。

【0033】

ビスダイン

ビスダインは、髄膜リンパ管中に蓄積され得る物質であり、689nmの非熱赤色光での活性化の際に、髄膜リンパ管をアブレーション又は破壊する、酸素種を放出することができる。したがって、ビスダインは、髄膜リンパ管の阻害剤として、本明細書におけるいくつかの実施形態による流れ調節剤として適切であり得、これは、次に、髄膜リンパ管を通じた免疫細胞等の物質の通過及び/又は流れを低減又は阻害する。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、ビスダインを含むか、又は実質的にビスダインからなる。

【0034】

投与経路

本明細書における実施形態の方法、使用のための組成物又は使用による流れ調節剤は、

10

20

30

40

50

投与経路が対象の髄膜腔に流れ調節剤を投与する限り、多くの適切な投与経路のいずれかを使用して、対象に投与することができる。多くの化合物は、血液脳関門を容易に通過せず、このように、静脈内等のいくつかの投与経路では、必ずしも流れ調節剤を髄膜腔に送達するわけではないことが注目される(流れ調節剤が血液脳関門を容易に通過できる場合を除く)。本明細書で使用される場合、「対象の髄膜腔に投与すること」によって(このルート語の変形を含む)、流れ調節剤が直接髄膜腔に投与されることは必ずしも必要ではなく、むしろ、この用語は、流れ調節剤を、直接及び/又は間接的に髄膜腔に投与することを包含する。本明細書におけるいくつかの実施形態による対象の髄膜腔と体液伝達するように(典型的には、血液脳関門の「脳」側に対して流れ調節剤を投与することによって)、流れ調節剤を投与し、流れ調節剤が髄膜腔に投与されることが意図される。したがって、いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、全身投与されない。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、全身投与されず、むしろ、血液脳関門の脳側に対して、髄膜腔と体液伝達して、体液、組織又は器官に投与される。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、全身投与されず、むしろ、CNSに投与される。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、CNSに投与されるが、CNSの外側の任意の器官又は組織に投与されない。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、血液に投与されない。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、腫瘍、又は腫瘍の脈管構造に投与されない。

10

【0035】

いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、経鼻投与される。例えば、流れ調節剤は、点鼻用スプレー中に提供することができ、又は鼻粘膜と直接接触させることができる。

20

【0036】

いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、対象のCSFとの接触を通じて投与される。例えば、流れ調節剤は、患者のCSF中に(例えば、脳室中に)、直接注射することができる。注射のための適切な装置としては、シリンジ、又は対象に挿入若しくは埋入され、CSFと体液伝達するポンプを挙げることができる。いくつかの実施形態において、流れ調節剤を含むか、又は実質的に流れ調節剤からなる組成物、例えば、徐放性ゲルは、対象のCSFと体液伝達して、このようにして、CSFと接触するように、対象に埋入される。

【0037】

いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、経頭蓋投与される。例えば、流れ調節剤を含むか、又は実質的に流れ調節剤からなる組成物、例えば、ゲルは、対象の頭蓋骨の外側の部分に配置することができ、対象の頭蓋骨を通過することができる。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、経頭蓋送達を容易にするために、対象の頭蓋骨の菲薄化部分と接触させる。

30

【0038】

いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、対象中で流れ調節剤をコードする核酸を発現させることによって、投与される。核酸を含むか、又は実質的に核酸からなるベクター、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、又はアデノウイルスベクター若しくはアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)等のウイルスベクターを、例えば、注射又は吸入を介して、本明細書に記載の対象に投与することができる。いくつかの実施形態において、核酸の発現は、例えば、薬物又は転写の光学調節剤を介して、対象に導入される。

40

【0039】

いくつかの実施形態において、流れ調節剤(例えば、VEGFR3アゴニスト、FGF2又はVEGFR3アンタゴニスト)は、対象の髄膜腔に選択的に投与されるか、又は対象の髄膜腔への選択的投与における使用のためのものである。本明細書で使用される場合、「選択的に」投与されること、及びこのルート語の変形は、流れ調節剤が、血液脳関門の同じ側において、他の組織又は器官と比較して、優先的に、示された標的(例えば、髄膜腔)に、投与されることを示す。このように、脳の髄膜腔への直接注射は、「選択的」投与を表すのに対して、一般に、脊髄内注射を介するCSFへの投与は、そうではない。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、髄膜腔に選択的に投与され、髄膜腔の外側のCNSの部分にも、CNSの

50

外側の任意の組織又は器官にも投与されない。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、CNSに選択的に投与され、末梢神経系、筋肉、消化器系、筋肉組織又は脈管構造等のCNSの外側の組織又は器官に投与されない。

【0040】

本明細書における方法、使用及び組成物による、本明細書に列挙されたいずれかの投与経路について、流れ調節剤を、単回投与、又はある期間を離すことができる、2回以上の投与で、投与することができることを意図する。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に記載の流れ調節剤は、本明細書に記載の投与経路を介して、毎時間、毎日、1日おき、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、毎週、隔週、毎月、隔月等で、投与することができる。いくつかの実施形態において、流れ調節剤は、単回投与で投与されるが、任意の追加投与で投与されない。

10

【0041】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載の投与経路による投与のために適切な、本明細書に記載の流れ調節剤を含むか、若しくは実質的にこの流れ調節剤からなる、組成物又は医薬を作製する方法を含む。例えば、いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストを含むか、又は実質的にVEGFR3アゴニストからなる組成物は、経鼻投与、CSFへの投与、又は経頭蓋投与のために調製される。例えば、いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストを含むか、又は実質的にVEGFR3アンタゴニストからなる組成物は、経鼻投与、CSFとの接触による投与、又は経頭蓋投与のために調製される。

20

【0042】

神経変性疾患

本明細書におけるいくつかの実施形態による、方法、使用及び組成物は、1つ若しくは複数の神経変性疾患の症状を、処置、予防、阻害、改善又は低減させるため、或いはこれらの方法における使用のための組成物に有用であり得る。これらの疾患は、対象、例えば、ヒト、並びに非ヒト哺乳動物、及び、特に非ヒト霊長類等の非ヒト動物において生じ得る。

【0043】

いくつかの実施形態において、CNS中の高分子、細胞及び残屑の蓄積と関連する、神経変性疾患、神経発達性疾患、神経炎症性疾患又は神経精神病的疾患は、髄膜リンパ管における、流れ、ドレナージ及び/又はクリアランスを増加させる、方法、使用又は組成物によって、処置、予防、阻害又は低減される。いくつかの実施形態において、CNS中の高分子、細胞及び残屑の蓄積と関連する神経変性疾患は、処置、予防、阻害又は低減される。神経変性疾患の例としては、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんが挙げられる。

30

【0044】

いくつかの実施形態において、神経変性疾患は、予防、処置又は予防的改善され得る。したがって、神経変性疾患に対する1つ又は複数の危険因子を有する対象は、本明細書に記載の方法、使用又は組成物を受ける必要があると決定することができる。例えば、対象が認知的症状に基づくADの診断をまだ有していなくても、対象は、それらのCNS中に蓄積したアミロイドベータ斑を有していてもよく、流れの増加、ドレナージの増加、クリアランスの増加及び/又はアミロイドベータ斑の低減から、利益を得てもよい。

40

【0045】

ADに対する多くの危険因子は、本明細書におけるいくつかの実施形態の、方法、組成物及び使用による危険因子として、例えば、家族性AD、ADについての遺伝子マーカー、又は初期の認知症等のADの症状として、適切である。散発性ADに対する最も重要な危険因子は、高齢である。しかしながら、ADのこの形態の危険性の増加は、多様な遺伝的異常にも起因する。これらの1つは、アミロイドベータ凝集の早期発病及び脳からのアミロイドベータのクリアランスの欠陥の両方を促進する、主要な遺伝的危険因子として広く考えられている、アポリポタンパク質-E ϵ 4(Apo-E ϵ 4)についての二倍体である(Deaneら、2008年;Zi

50

okovic、2013年)。散発性ADに対する危険性を著しく増加させる他の遺伝的バリエーションは、apo-J(又は、クラスタリン)、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)、補体受容体1(CR1)、CD33若しくはSiglee-3、及び骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)である。興味深いことに、これらのタンパク質の全ては、脳からのアミロイドベータ除去の異なる機構に関与している(Bertramら、2008年;Guerreiroら、2013年;Haroldら、2009年;Lambertら、2009年、2013年;Najら、2011年)。いくつかの実施形態において、ADに対する危険因子は、以下の、アポリポタンパク質-E-イプシロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体、apo-Jにおけるバリエーション、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエーション、補体受容体1(CR3)におけるバリエーション、CD33(Siglee-3)におけるバリエーション、若しくは骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエーション、高齢、又は認知症の症状の、少なくとも1つからなる群から選択される。

10

【0046】

炎症性神経疾患

本明細書におけるいくつかの実施形態による、方法、使用及び組成物は、中枢神経系の脱髄疾患及び多発性硬化症(MS)を含むが、これらに限定されない、1つ若しくは複数の炎症性神経疾患の症状を、処置、予防、阻害、改善又は低減させるために有用であり得る。これらの疾患は、対象、例えば、ヒト、並びに非ヒト哺乳動物、及び、特に非ヒト霊長類等の非ヒト動物において生じ得る。理論によって限定されることなく、本明細書におけるいくつかの実施形態によれば、髄膜リンパ管は、高分子及び残屑の除去に加えて、組織の免疫監視の制御において機能することが意図される。本明細書に示すように、免疫細胞は、髄膜リンパ管中に見出され、髄膜リンパ管を通過する。実施例14~22。また、本明細書において、EAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎)における炎症症状及び臨床(神経運動)症状、並びにMSの炎症媒介モデルが、髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を阻害することによって改善されることを示す。いくつかの実施形態において、方法、使用又は組成物は、炎症性神経疾患を患う対象、炎症性神経疾患を有する疑いがある対象、又は炎症性神経疾患に対する危険性を有する対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、方法、使用又は組成物は、がんを有さない、炎症性神経疾患を患う対象、炎症性神経疾患を有する疑いがある対象、又は炎症性神経疾患に対する危険性を有する対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、方法、使用又は組成物は、腫瘍を有さない、炎症性神経疾患を患う対象、炎症性神経疾患を有する疑いがある対象、又は炎症性神経疾患に対する危険性を有する対象を処置するためのものである。いくつかの実施形態において、方法、使用又は組成物は、例えば、がん又は腫瘍等の血管新生の増加によって特徴付けられる疾患を有さない、炎症性神経疾患を患う対象、炎症性神経疾患を有する疑いがある対象、又は炎症性神経疾患に対する危険性を有する対象を処置するためのものである。

20

30

【0047】

いくつかの実施形態において、炎症性神経疾患は、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走を、低減、阻害若しくは予防する、方法、使用又は組成物によって、処置、予防、阻害又は低減される。このような疾患の例としては、CNSへのT細胞等の免疫細胞の活性化及び増殖が、これらの細胞の髄膜リンパ管への遊走によって促進される、炎症性疾患が挙げられる。このような疾患としては、中枢神経系の炎症性疾患、例えば、MS等の脱髄疾患が挙げられる。上記で述べたように、いくつかの実施形態において、炎症性疾患(MS等)は、予防、処置、又は予防的に改善することができ、このように、MSに対する危険因子を有する対象は、本明細書に記載の方法、使用又は組成物を受ける必要があると決定することができる。例えば、対象が、あらゆる広域的な脱髄、実質的な運動障害の症状、又は古典的なMSの診断をまだ有していないとしても、対象は、それらのCNSにおいてT細胞浸潤を有していてもよく、例えば、髄膜リンパ管へのアクセス、直径及び/又は量を減少させることによって、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走を減少させることから利益を得ることができる。MSに対する多くの危険因子は、本明細書におけるいくつかの実施形態による危険因

40

50

子として、例えば、家族性MS、MSについての遺伝子マーカー、脱髄、乏突起膠細胞の低減、感染症、老齡、又は運動神経の機能の喪失等のMSの症状として、適切である。

【0048】

流れを増加させるための、方法、組成物又は使用

いくつかの態様は、対象の中枢神経系における体液の流れを増加させるための、方法、使用のための組成物若しくは使用、又はこれらの方法における使用のための組成物を含む。本方法又は使用は、対象が、中枢神経系における体液の流れの増加を必要とするかどうかを決定する工程を含むことができる。対象が、体液の流れの増加を必要とする場合、本方法又は使用は、対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニストの有効量を投与する工程を含むことができる。理論によって限定されることなく、その量のVEGFR3アゴニストは、例えば、対象の髄膜リンパ管の直径を増加させることによって、対象の髄膜リンパ管の量を増加させることによって、及び/又は対象の髄膜リンパ管を通してドレナージを増加させることによって、流れを増加させることができる。このようにして、対象の中枢神経系における体液の流れを増加させることができる。いくつかの実施形態において、体液は、脳脊髄液(CSF)、間質液(ISF)、又はその両方を含む。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、VEGF-c若しくはVEGF-d、又はこれらのアナログ、バリエーション若しくは断片を含む。本明細書のいくつかの実施形態における方法及び使用のために、FGF2は、流れを増加させるために、示されたVEGFR3アゴニストと置き換えることができ、又は流れを増加させるために、VEGFR3アゴニストに加えて使用することができることも意図する。

【0049】

このような、CNSにおける体液の流れを増加させるための、方法、組成物又は使用は、CNSにおける分子若しくは細胞若しくは残屑の濃縮及び/又は蓄積の増加と関連する、神経変性疾患の症状を、処置、予防又は改善するために有用であり得る。したがって、いくつかの実施形態において、対象は、対象が神経変性疾患を有するか、又は神経変性疾患を発生する危険性があるかどうかを決定することによって、体液の流れの増加を必要とすることが決定され得る。疾患は、CNSにおける分子若しくは細胞若しくは残屑の濃縮及び/又は蓄積の増加と関連する、例えば、アルツハイマー病(AD)であり得る。いくつかの実施形態において、対象は、例えば、疾患の家族性発症を有することによるか、疾患と関連する1つ若しくは複数の遺伝子マーカーを有することによるか、老齡によるか、又は疾患、例えば、ADの症例における初期の認知症の症状を示すことによって、疾患に対する危険性があると決定することができる。本明細書で使用される場合、「老齡」とは、記憶機能の減少、CSF産生の減少、ニューロンの老化の実質的な増加によって特徴付けられる年齢を指し、いくつかの実施形態の文脈において、少なくとも65歳のヒト、例えば、これらの値の任意の間の範囲を含む、少なくとも、60歳、65歳、70歳、75歳、80歳又は85歳を含むことができる。いくつかの実施形態において、対象が体液の流れの増加を必要とするかどうかを決定する工程は、AD等の神経変性疾患を有する対象を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象が体液の流れの増加を必要とするかどうかを決定する工程は、本明細書に記載のCNSにおける分子若しくは高分子若しくは細胞若しくは残屑の濃縮及び/又は蓄積の増加と関連する、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象が体液の流れの増加を必要とするかどうかを決定する工程は、危険因子を有する対象を決定する工程、及び、また疾患それ自体を有する対象を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、神経変性疾患は、以下の、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及

びてんかんの少なくとも1つからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、神経変性疾患は、アルツハイマー病である。いくつかの実施形態において、危険因子は、本明細書に記載のアルツハイマー病に対する危険因子である。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、対象が、例えば、予防的処置又は予防のために、神経変性疾患に対する危険因子を有することを決定する工程の後(対象が、疾患それ自

体を必ずしも有していないとしても)、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、対象が神経変性疾患を有することを決定する工程の後に、対象に投与される。

【0050】

理論によって限定されることなく、本明細書におけるいくつかの実施形態によれば、全身投与は、髄膜リンパ管のサイズ及びドレナージ又は流れを効果的に調節する、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2のために必要ではないことを意図する。したがって、いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、対象の髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、髄膜腔に投与されるが、CNSの外側に投与されない。いくつかでは、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、髄膜腔に投与されるが、血液に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2との接触、又はVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2をコードする核酸の対象における発現、或いは列挙した経路のいずれかの組み合わせの少なくとも1つからなる群から選択される経路によって、対象に投与される。いくつかの実施形態において、これは、投与されるVEGFR3アゴニストである。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、以下の、VEGF-c、VEGF-d、又はこれらのアナログ、バリエーション若しくは機能性断片の少なくとも1つからなる群から選択される。

【0051】

いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストの投与は、CNSの体液の流れ、髄膜リンパ管の直径、髄膜リンパ管の数、髄膜リンパ管のドレナージ、又は神経変性疾患の症状の改善の増加をもたらす。例えば、いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストの投与は、髄膜リンパ管の直径を、少なくとも約5%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%又は50%、増加させる。いくつかの実施形態において、対象の髄膜リンパ管の集合の平均直径は、本明細書において述べた値に、増加する。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストの投与は、対象の中樞神経系における体液の流れを増加させ、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む。いくつかの実施形態において、例えば、対象がADを有する場合、VEGFR3アゴニストの投与は、ISFの流れを増加させ、次に、対象のCNS中のアミロイドベータ斑の量を低減させる。例えば、蓄積したアミロイドベータ斑の量は、少なくとも2%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%、低減され得る。本明細書において、ADのヒトの脳の一部は、髄膜にアミロイドベータ斑と似た構造を有することを示す(図30Bを参照のこと)。したがって、いくつかの実施形態において、蓄積したアミロイドベータ斑の少なくとも一部は、対象の脳の髄膜にある。いくつかの実施形態において、体液の流れの増加は、対象の脳における可溶性分子のクリアランスを増加させる。可溶性分子のクリアランスは、例えば、特定の期間にわたって、脳の領域にわたる特定の化合物、分子又は標識の保持をモニターすることによって、確認することができる。いくつかの実施形態において、体液の流れの増加は、対象の脳における可溶性分子のクリアランスを、少なくとも2%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%、増加させる。

【0052】

アミロイドベータ斑を低減させるための、方法、組成物及び使用

いくつかの態様は、神経変性疾患を有するか、若しくはこのような疾患に対する危険因子を有する対象において、蓄積したアミロイドベータ斑の量を低減させるため、若しくはアミロイドベータ斑の蓄積の割合を減少させるための、方法、使用のための組成物及び使

用、又はこのような方法における使用のための組成物を含む。本方法又は使用は、神経変性疾患又はその危険因子を有する対象を決定する工程を含むことができる。本方法又は使用は、対象の中枢神経系における体液の流れ(例えば、ISF、CSF、又はその両方の流れ)が増加するように、対象の髄膜腔に、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2を投与する工程を含むことができる。体液の流れの増加を通じて、対象における蓄積したアミロイドベータ斑の量を低減させることができるか、又は蓄積の割合を低減させることができる。いくつかの実施形態において、蓄積したアミロイドベータ斑の少なくとも一部は、対象の脳の髄膜にある。いくつかの実施形態において、蓄積したアミロイドベータ斑の量、又は蓄積の割合は、少なくとも2%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%、低減される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、CNSに投与されるが、CNSの外側に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、CNSに投与されるが、血液に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、以下の、VEGF-c、VEGF-d、又はこれらのアナログ、バリエーション若しくは機能性断片の少なくとも1つからなる群から選択される。

【0053】

いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2の投与は、対象の脳の髄膜リンパ管の直径を、少なくとも2%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%又は50%、増加させ、このようにして、ISFにおける流れが増加する。本明細書において述べるように、対象の中枢神経系における体液の流れの増加は、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む。

【0054】

いくつかの実施形態において、対象は、神経変性疾患、例えば、AD、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍又はてんかんを有することが知られている。いくつかの実施形態において、本方法は、対象が、神経変性疾患を有することを決定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、例えば、本方法又は使用が、予防的である場合、本方法は、対象が、疾患それ自体について診断を必ずしも有していなくても、対象が、神経変性疾患に対する危険因子を有するかどうかを決定する工程を含んでいた。例えば、本明細書におけるいくつかの実施形態の方法、組成物及び使用によれば有用である、ADに対する危険因子としては、アポリポタンパク質-E-イプシロン-4(apo-E-イプシロン-4)についての二倍体、apo-Jにおけるバリエーション、ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質(PICALM)におけるバリエーション、補体受容体1(CR3)におけるバリエーション、CD33(Siglee-3)におけるバリエーション、若しくは骨髄細胞において発現するトリガー受容体2(TREM2)におけるバリエーション、家族性AD、老齢、又は認知症の症状が挙げられる。

【0055】

CNSからの分子のクリアランスを増加させる、方法、組成物及び使用

いくつかの態様は、対象の中枢神経系からの分子のクリアランスを増加させる使用のための、方法、使用又は組成物を含む。本方法又は使用は、対象の髄膜腔に、流れ調節剤(例えば、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2)を含むか、流れ調節剤からなるか、又は実質的に流れ調節剤からなる組成物を投与する工程を含み、対象の中枢神経系における体液の流れが増加する。したがって、本方法又は使用は、対象のCNSからの分子のクリアランスを増加させることができる。対象のCNSからの分子のクリアランスの増加は、CSFから深頸リンパ節への分子の移動の割合の増加を含み、このようにして、深頸リンパ節への、CNSにおける分子及び/又は標識の移動の割合をモニターすることによって、確認することができる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、髄膜腔に、選

択的に投与される。いくつかの実施形態において、流れ調節剤(例えば、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2)を含むか、流れ調節剤からなるか、又は実質的に流れ調節剤からなる組成物は、CNSに投与されるが、CNSの外側には投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、CNSに投与されるが、血液に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、以下の、VEGF-c、VEGF-d、又はこれらのアナログ、バリエーション若しくは機能性断片の1つ又は複数からなる群から選択される。

【0056】

理論によって限定されることなく、本明細書におけるいくつかの実施形態によれば、本明細書に記載の髄膜リンパ管の、直径を増加させることによる、そのドレナージを増加させることによる、及び/又はその量を増加させることによる流れの増加は、対象のCNSから分子のクリアランスを増加させることができ、したがって、本明細書におけるいくつかの実施形態により、CNS及び脳における分子の濃縮及び/又は蓄積を低減させることを意図する。したがって、いくつかの実施形態において、CNSにおける分子のクリアランスの増加は、CNS及び脳における分子の濃縮及び/又は蓄積を低減させる。例えば、アミロイドベータ斑が、対象のCNSに存在する場合、クリアランスの増加は、アミロイドベータ斑を低減させることができるか、又はそれらの蓄積の割合を減少させることができる。理論によって限定されることなく、CNSから可溶性アミロイドベータを取り除くことによって、CNSにおいて体液が流れ続け、CNSが取り除かれ続け、アミロイドベータ斑が低減し得るか、又は増加の割合を低減させることができるように、グラジエントが、アミロイドベータ斑の可溶化に好都合であることを意図する。このように、アミロイドベータ斑の減少は、アミロイドベータ斑によって引き起こされる疾患の病因の減少を表すことができ、より一般的には、例えば、髄膜リンパ管によるドレナージを介した、CNSにおける体液の流れの増加を示すことができる。いくつかの実施形態において、中枢神経における蓄積したアミロイドベータ斑の量、又はこれらの蓄積の割合は、少なくとも2%、例えば、列挙される値の任意の2つの間の範囲を含む、少なくとも、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%、低減される。いくつかの実施形態において、アミロイドベータ斑は、対象の中枢神経系の髄膜の部分から、取り除かれる。いくつかの実施形態において、対象の中枢神経系における体液の流れの増加は、対象の脳の領域全体にわたる体液の灌流の割合の増加を含む。

【0057】

本明細書において議論されるように、CNSから分子のクリアランスを増加させるための、方法、使用及び組成物は、神経変性疾患、例えば、CNSにおける高分子、細胞若しくは残屑の蓄積と関連する疾患の症状を、処置、予防又は改善するのに有用であり得る。したがって、いくつかの実施形態において、本方法又は使用は、このような神経変性疾患又はこのような神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む。神経変性疾患の例としては、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかんが挙げられる。本明細書において述べるように、いくつかの実施形態において、神経変性疾患に対する危険因子を持つ対象は、対象が診断されていないとしても、CNSからの分子のクリアランスの増加から利益が得られ得る。したがって、いくつかの実施形態において、対象は、神経変性疾患に対する危険因子を有すると決定され、対象が、CNSから分子のクリアランスの増加を必要とするか、及び/又はそこから利益が得られ得ることを示す。例えば、対象は、本明細書に述べるADに対する危険因子を有し得る。

【0058】

いくつかの実施形態において、本明細書において述べる、流れを増加させるため、クリアランスを増加させるため、ドレナージを増加させるため、髄膜リンパ管の直径を増加させるため、及び/又はアミロイドベータ斑を低減させるための、方法、組成物又は使用のいずれかのために、本明細書に記載のVEGFR3アゴニストを投与することができる。いくつ

かの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、以下の、VEGF-c、VEGF-d、又はこれらのいずれかの、アナログ、バリエーション若しくは機能性断片の1つ又は複数からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、対象の髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2との接触、又はVEGFR3アゴニスト及び/若しくはFGF2をコードする核酸の対象における発現、或いは列挙した経路のいずれかの組み合わせの少なくとも1つからなる群から選択される経路によって、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、神経変性疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程の後に、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、対象が神経変性疾患を有することを決定する工程の後に、対象に投与される。VEGFR3アゴニスト及び/又はFGF2は、有効量で投与することができる。

10

【0059】

髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走を減少させる、方法、組成物及び使用

いくつかの態様は、対象の髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走を減少させる、方法、使用若しくは使用のための組成物、又はこのような方法における使用のための組成物を含む。本明細書において議論するように、いくつかの炎症性神経疾患(MS等)は、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の、流入、排出及び/又は遊走、例えば、T細胞等のリンパ球の遊走を減少させることによって、改善することができる。したがって、いくつかの態様は、対象における髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走(例えば、脳又は深頸リンパ節へ又はから)を減少させる、方法又は使用を含む。本方法又は使用は、対象の髄膜腔にVEGFR3アンタゴニストを投与する工程、若しくは対象の髄膜リンパ管をアブレーションする工程、又はこれらの組み合わせを含むことができる。したがって、本方法又は使用は、対象の髄膜リンパ管を通して免疫細胞の遊走を減少させることができる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、CNSに投与されるが、CNSの外側に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、CNSに投与されるが、血液に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体を含むか、実質的にこの特異的な抗体からなる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、血管新生の増加によって特徴付けられる疾患、例えば、がん又は腫瘍を有していない対象に、投与される。

20

30

【0060】

いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、対象の髄膜腔に、投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、対象の髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アゴニストは、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アンタゴニストとの接触、又はVEGFR3アンタゴニストをコードする核酸の対象における発現、或いは列挙した経路のいずれかの組み合わせの少なくとも1つからなる群から選択される経路によって、対象に投与される。

40

【0061】

いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管は、結紮、リンパ管中でのビスダインの光学的活性化、又はその両方によって、選択的にアブレーションされる。結紮は、外科的に行うことができる。いくつかの実施形態において、ビスダインは、髄膜の管を選択的にアブレーションするために使用される。ビスダインは、(本明細書における流れ調節剤について述べた投与経路を介して)対象に投与することができ、次いで、投与されたビスダインは、光学的に活性化されて、選択的に髄膜リンパ管をアブレーションすることができる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3、又はVEGF-c若しくは

50

VEGF-dに特異的な抗体を含むか、実質的にこの特異的な抗体からなる。

【0062】

本明細書において議論するように、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、MS等の炎症性神経疾患の症状を、処置、予防又は改善するために有用であり得る。実施例27に示すように、本明細書におけるいくつかの実施形態による髄膜リンパ管のアブレーションは、げっ歯類のMSの当技術分野で承認されているモデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発生の臨床的適応を弱めた。更にまた、EAEモデルにおける髄膜リンパ管のアブレーションは、T細胞の遊走を阻害した(実施例25を参照のこと)。したがって、いくつかの実施形態において、本方法は、炎症性神経疾患又はこのような疾患に対する危険因子を有する対象を決定する工程を更に含む。疾患の例としては、中枢神経系の脱髄疾患、例えば、MSを挙げることができる。いくつかの実施形態において、例えば、本方法が、予防的に行われる場合、本方法は、MSに対する危険因子を有するが、MSの診断を必ずしも有していない、対象に対して行われる。例えば、危険因子としては、家族性多発性硬化症、対象が多発性硬化症を有する疑い、感染症、老齢、又は神経運動機能の阻害の少なくとも1つの症状を挙げることができる。

10

【0063】

いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、対象の実質から深頸リンパ節への移動の減少を含む。いくつかの実施形態において、細胞としては、リンパ球、例えば、T細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、対象の脳脊髄液から深頸リンパ節へのリンパ球の移動の減少を含む。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、髄膜リンパ管中の免疫細胞(例えば、リンパ球)の密度の減少を含む。例えば、密度は、少なくとも5%、例えば、列挙される値のいずれかの間の範囲を含む、少なくとも、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%又は50%、減少し得る。いくつかの実施形態において、リンパ球は、T細胞を含むか、又は実質的にT細胞からなる。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、遊走性の表現型を有する深頸リンパ節中の活性化T細胞の量を減少させる。活性化T細胞は、例えば、CD62L-CD44+表現型によって、特定され得る。また、いくつかの実施形態において、遊走性の表現型は、CD11a+、CD49d+、又はその両方として、特定され得る。加えて、いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、炎症性サイトカインを産生する中枢神経系中のT細胞の量を減少させる。いくつかの実施形態に従って低減し得る炎症性サイトカインの例としては、IL-17、IFN-ガンマ、又はその両方が挙げられる。

20

30

【0064】

中枢神経系における炎症を低減させるための、方法、組成物及び使用

いくつかの態様は、中枢神経系における炎症、例えば、炎症性神経疾患を減少させることにおける、方法、使用及び使用のための組成物、又はこのような方法における使用のための組成物を含む。本方法又は使用は、中枢神経系の炎症性疾患又は中枢神経系の炎症性疾患に対する危険因子を有する対象の神経系における炎症を低減することができる。いくつかの実施形態において、本方法又は使用は、対象の髄膜腔にVEGFR3アンタゴニストを投与する工程、対象の髄膜リンパ管をアブレーションする工程、又はこの2つの組み合わせを含む。VEGFR3アンタゴニスト、アブレーション、又はその両方は、対象の髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走を減少させることができ、このようにして、中枢神経系の炎症が低減する。いくつかの実施形態において、本方法又は使用は、対象における神経運動の症状を改善させる工程を含む。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、髄膜腔に、選択的に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、CNSに投与されるが、CNSの外側に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、CNSに投与されるが、血液に投与されない。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体、或いはVEGFR3デコイ分子を含むか、実質的にこれらからなる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、血管新生の増加によって特徴付けられる疾患、例えば、腫瘍又

40

50

はがんを有していないが、CNSにおいて炎症の低減を必要とする対象に、投与される。

【0065】

いくつかの実施形態において、炎症性疾患は、中枢神経系の脱髄疾患、例えば、MSを含むか、又は実質的に中枢神経系の脱髄疾患からなる。いくつかの実施形態において、本方法は、炎症性疾患を有する対象において行われる。したがって、いくつかの実施形態において、本方法は、対象が、炎症性疾患を有することを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、例えば、本方法が、予防的に行われる場合、対象は、炎症性疾患に対する危険因子を有し得る。したがって、いくつかの実施形態において、本方法は、対象が、炎症性疾患に対する危険因子を有することを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、危険因子は、家族性多発性硬化症、感染症、老齢、対象が多発性硬化症を有する
10
疑い、又は神経運動機能の障害の少なくとも1つの症状を含むか、又は実質的にこれらからなる。

【0066】

いくつかの実施形態において、本方法は、化学的、外科的、又はその両方で、髄膜リンパ管をアブレーションする工程を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、結紮、リンパ管中のビスダインの光学的活性化、又はその両方によって、髄膜リンパ管を選択的にアブレーションする工程を含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、本方法は、VEGFR3アンタゴニストを、対象の髄膜腔に、選択的に投与する工程を含む。理論によって限定されることなく、VEGFR3アンタゴニストは、例えば、管のサイズ及び/又は量を減少させることによって、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走を阻害できることを意図する。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3、又はVEGF-c若しくはVEGF-dに特異的な抗体を含むか、実質的にこの特異的な抗体からなる。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3デコイ分子を含むか、実質的にVEGFR3デコイ分子からなる。
20

【0068】

いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニスト又はビスダインは、以下の、経鼻投与、経頭蓋投与、対象の脳脊髄液(CSF)との接触、対象のCSFへのポンプ注入、頭蓋骨若しくは脳への埋入、対象の菲薄化頭蓋骨若しくは頭蓋骨の部分とVEGFR3アンタゴニストとの接触、又は列挙した経路のいずれかの組み合わせの少なくとも1つからなる群から選択
30
される経路によって、対象に投与される。いくつかの実施形態において、VEGFR3アンタゴニストは、VEGFR3アンタゴニストをコードする核酸を、対象において発現させることによって、投与される。

【0069】

いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、対象の深頸リンパ節への対象の脳脊髄液中の分子の移動の減少を含む。いくつかの実施形態において、髄膜リンパ管を通した免疫細胞の遊走の減少は、対象の実質から深頸リンパ節へのリンパ球の移動の減少を含む。いくつかの実施形態において、免疫細胞の遊走の減少は、髄膜リンパ管中のリンパ球の密度を減少させる。例えば、密度は、少なくとも5%、例えば、列挙される値のいずれかの間の範囲を含む、少なくとも、5%、10%、15%、20%、25%、30
40
%、35%、40%、45%又は50%、減少し得る。いくつかの実施形態において、リンパ球は、T細胞を含むか、又は実質的にT細胞からなる。また、いくつかの実施形態による中枢神経系におけるT細胞媒介性炎症の低減は、本明細書に記載の遊走性の表現型を有する深頸リンパ節中の活性化T細胞の量の減少を含む。遊走性の表現型を有する深頸リンパ節中の活性化T細胞の量の減少に加えて、又はこれに代えて、いくつかの実施形態において、中枢神経系におけるT細胞媒介性炎症の低減は、炎症性サイトカインを産生する中枢神経系中のT細胞の量を減少させることができる。炎症性サイトカインの例としては、IL-17、IFN-ガンマ、又はその両方が挙げられる。

【0070】

追加の実施形態

10

20

30

40

50

他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、本主題が属する、当業者によって、通常理解される意味を有する。

【0071】

「血管拡張剤」、「血管拡張」等の用語は、本明細書において、リンパ管(例えば、髄膜リンパ管)を含む、管の拡張を意味するものとして使用される。

【0072】

「血管収縮剤」、「血管収縮」等の用語は、本明細書において、リンパ管(例えば、髄膜リンパ管)を含む、管の収縮を意味するものとして使用される。

【0073】

特定のRNAを「コードする」DNA配列は、RNAに転写されるDNA核酸配列である。DNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されるRNA(mRNA)をコードしてもよく、又はDNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないRNA(例えば、tRNA、rRNA、又はDNA標的化RNA; 「非コード」RNA又は「ncRNA」ともいう)をコードしてもよい。

【0074】

本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「an」及び「the」は、文脈が他に明確に指示しない限り、複数形の言及を含む。したがって、例えば、「化合物(a compound)」への言及は、1つ又は複数の化合物への言及であり、当業者に公知のその等価物を含む。

【0075】

加えて、「含む(comprises)」という用語は、方法、装置、組成物等が、列挙された工程、成分等から実質的になる、及び/又は列挙された工程、成分等からなる実施形態を含むことを意図する。同様に、「実質的に、からなる(consists essentially of)」という用語は、方法、装置、組成物等が、列挙された工程、成分等からなる実施形態を含むことを意図する。特許請求の範囲は、あらゆる任意選択の要素を排除して、作成されてもよいことに更に留意されたい。このように、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連して「単に」、「のみ」等のような排他的用語の使用のため、又は「ネガティブ」な限定の使用のための先行詞の役割を果たすことを意図する。

【0076】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、本明細書において、それが先行する正確な数、並びに所与の数字から10%未満異なる数字についての、文言上のサポートを提供するために使用される。他の実施形態において、「約」という用語は、数字が、所与の数字から、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%未満異なることを示す。

【0077】

別々の実施形態の文脈中に明確に記載された、ある特定の特性はまた、単一の実施形態において、組み合わせで提供されてもよいことは明らかである。反対に、単一の実施形態の文脈中に簡潔に記載された、様々な特性はまた、別々に、又は任意の適切な、下位の組み合わせで提供されてもよい。本明細書における主題に係る実施形態の全ての組み合わせは、それぞれ及び全ての組み合わせが、個々に及び明確に開示された場合と全く同じように、本明細書において、特に意図、及び開示される。加えて、これらの様々な実施形態及び要素の全ての下位の組み合わせも、それぞれ及び全てのこのような下位の組み合わせが、本明細書に個々に及び明確に開示された場合と全く同じように、本明細書において、特に意図、及び開示される。

【0078】

いくつかの態様は、a) 髄膜リンパ管のドレナージ;b) 髄膜リンパ管の直径;c) 髄膜リンパ管のリンパ管形成;d) 髄膜リンパ管の収縮性;及び/又はe) 髄膜リンパ管の透過性の、1つ又は複数を調節する化合物の治療有効量を、対象に投与する工程を含む、対象における神経学的病変を伴う状態を処置する方法を提供する。本開示はまた、髄膜リンパ管のドレナージを増加させ、髄膜リンパ管の直径を増加させ、髄膜リンパ管のリンパ管形成を引き起こし、髄膜リンパ管の収縮性を調節してドレナージを増加させ、及び/又は髄膜リンパ管の透過性を調節してドレナージを増加させる、化合物を、対象に投与することによって、対象のADを処置する方法を提供する。本開示はまた、髄膜リンパ管のドレナージを増加させ

10

20

30

40

50

、髄膜リンパ管の直径を増加させ、髄膜リンパ管のリンパ管形成を引き起こし、髄膜リンパ管の収縮性を調節してドレナージを増加させ、及び/又は髄膜リンパ管の透過性を調節してドレナージを増加させる、化合物を、対象に投与することによって、対象の脳腫瘍を処置する方法を提供する。本開示は、髄膜リンパ管のドレナージを減少させ、髄膜リンパ管の直径を減少させ、髄膜リンパ管の収縮性を調節してドレナージを減少させ、及び/又は髄膜リンパ管の透過性を調節する、化合物を、対象に投与することによって、対象のMSを処置する方法を更に提供する。本開示はまた、脳の組織クリアランス及び免疫細胞の輸送機能の両方として機能する、髄膜リンパ管系の特定及び説明を提供する。

【0079】

神経学的病変を伴う状態を処置する方法

10

いくつかの態様は、a) 髄膜リンパ管のドレナージ、b) 髄膜リンパ管の直径、c) 髄膜リンパ管のリンパ管形成、d) 髄膜リンパ管の収縮性、及び/又はe) 髄膜リンパ管の透過性の、1つ又は複数を調節する化合物の治療有効量を、対象に投与することによって、対象における神経学的病変を伴う状態を処置する方法を含む。

【0080】

いくつかの実施形態において、本方法は、前記処置を必要とする対象を特定する工程を更に含む。更なる実施形態において、前記処置を必要とする対象は、AD、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、てんかん、脳腫瘍、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、MS、及び重症筋無力症からなる群から選択される障害になりやすいか、又はこの障害を患っている。

20

【0081】

いくつかの実施形態において、前記化合物の治療有効量が投与される。更なる実施形態において、前記化合物は、血管拡張剤である。他の実施形態において、前記化合物は、成長因子である。更なる実施形態において、前記成長因子は、VEGF-c、VEGF-d及びFGF2からなる群から選択される。更なる実施形態において、前記化合物は、ノルアドレナリンである。

【0082】

いくつかの実施形態において、前記化合物は、血管収縮剤である。更なる実施形態において、前記化合物は、一酸化窒素競合剤のNG-モノメチルL-アルギニン、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、及びホスファチジルコリンからなる群から選択される。

30

【0083】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg～約1.5mg/kgである。更なる実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgである。

40

【0084】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg

50

/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgより少ない。

【0085】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgを超える。

【0086】

いくつかの実施形態において、化合物は、可溶性の形態で提供される。いくつかの実施形態において、化合物は、ゆっくりと一定に放出するために、ナノゲルに吸収されて、提供される。ある特定の実施形態において、化合物は、RNA又はポリペプチドである試薬をコードするウイルスベクターで提供される。

【0087】

いくつかの態様において、化合物は、対象の脳脊髄液(CSF)に投与される。他の態様において、軟膏は、前記化合物を含み、軟膏は、対象の頭部への軟膏の適用を介して投与される。

【0088】

認知症、例えば、ADを処置する方法

例:

外科的結紮又は薬理学的アブレーション(ビスダインによる、図4)が、頸部リンパ節へのリンパ管ドレナージの変化をもたらすことを示すデータを提供する(図5a～図5d)。また、我々は、リンパ管新生性成長因子(VEGF-c)による処置が、ドレナージを向上させることを示す(図5e)。これらの結果は、くも膜下腔からの高分子の除去における髄膜リンパ管の重要性を強調する。最後に、我々は、高齢のマウス及びJ20マウスが、髄膜リンパ管を通じたドレナージの障害によって特徴付けられることを実証し(図6)、リンパ管ドレナージの有効性の減少が、高齢及びADマウス26の両方で観察された、正常な老化プロセスの一部であり、かつクリアランスの欠如の関与の可能性があることを示唆する(Kress, B.T. ら、Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. Ann. Neurol. 76巻、845～861頁(2014年))。

【0089】

リンパ管新生性成長因子(VEGFC、VEGFD、FGF2等)を使用することによるJ20マウスにおけるA β 病理及び記憶障害を向上させる方法は、例えば、組換えタンパク質のようなウイルスベクターを介して(このアプローチは、我々の研究室によって、効率性3であることがすでに実証されている)、ゆっくりと一定に放出するために、ナノゲルに可溶化又は吸収されて、投与された(Baker, A. ら、Experimental assessment of pro-lymphangiogenic growth factors in the treatment of post-surgical lymphedema following lymphadenect

omy. Breast Cancer Res.BCR 12、R70(2010年))。

【0090】

提供されたデータは、組換えVEGF-cのCSFへの単回注射が、髄膜リンパ管の直径を増加させ、ドレナージ有効性を増加させるのに十分であることを示す(図2e)。リンパ管ドレナージ(多光子顕微鏡を使用する)、疾患の病理(髄膜及び脳中に沈着したA β の定量化)、及び挙動(オープンフィールド及びモリス水迷路)が、リンパ管新生性因子による処置の間及び後に評価される。

【0091】

処置の方法

いくつかの実施形態は、髄膜リンパ管のドレナージを増加させ、髄膜リンパ管の直径を増加させ、髄膜リンパ管のリンパ管形成を引き起こし、髄膜リンパ管の収縮性を調節してドレナージを増加させ、及び/又は髄膜リンパ管の透過性を調節する、化合物を、対象に投与することによって、対象のADを処置する方法を含む。本開示は、髄膜リンパ管のドレナージを増加させ、髄膜リンパ管の直径を増加させ、髄膜リンパ管のリンパ管形成を引き起こし、髄膜リンパ管の収縮性を調節してドレナージを増加させ、及び/又は髄膜リンパ管の透過性を調節する、化合物を、対象に投与することによって、対象の脳腫瘍を処置する方法を、更に提供する。

【0092】

いくつかの態様は、既存のアミロイド斑又は他のミスフォールドされたタンパク質の数及び/又は容積を低減させるための方法であって、髄膜リンパ管のドレナージを増加させ、及び/又は髄膜リンパ管の直径を増加させる、化合物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、方法を含む。いくつかの場合において、対象は、アルツハイマー病になりやすいとして特定された対象、及びアルツハイマー病を患う対象からなる群から選択される。

【0093】

いくつかの実施形態において、本方法は、前記処置を必要とする対象を特定する工程を更に含む。更なる実施形態において、前記処置を必要とする対象は、AD及び脳腫瘍からなる群から選択される障害になりやすいか、又はこの障害を患っている。

【0094】

このような対象の特定は、当業者に公知の手法を使用して行ってもよい。

【0095】

いくつかの実施形態において、前記化合物の治療有効量が投与される。更なる実施形態において、前記化合物は、血管拡張剤である。他の実施形態において、前記化合物は、成長因子である。更なる実施形態において、前記成長因子は、VEGF-c、VEGF-d及びFGF2からなる群から選択される。更なる実施形態において、前記化合物は、ノルアドレナリンである。

【0096】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg～約1.5mg/kgである。更なる実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgである。

【0097】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgより少ない。

【0098】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgを超える。

【0099】

いくつかの実施形態において、化合物は、可溶性の形態で提供される。いくつかの実施形態において、化合物は、ゆっくりと一定に放出するために、ナノゲルに吸収されて、提供される。ある特定の実施形態において、化合物は、RNA又はポリペプチドである試薬をコードするウイルスベクターで提供される。

【0100】

いくつかの態様において、化合物は、対象の脳脊髄液(CSF)に投与される。他の態様において、軟膏は、前記化合物を含み、軟膏は、対象の頭部への軟膏の適用を介して投与される。

【0101】

多発性硬化症を処置する方法

例：

EAEマウスモデルを使用して、データは、CFA/Mogによる免疫の7日後に、髄膜リンパ管の直径の増加(図7a)及び髄膜腔内でT細胞の数の低減(図7b)があることを示す。これらの結果は、髄膜のT細胞が、実際に、活性化のために深頸リンパ節にリコールされたことを示す。13日目(臨床徴候の開始)、髄膜は、再びT細胞で満たされる(図7b)。CFA/Mog免疫の前の深頸リンパ節の外科的切除は、対照又は偽手術マウスと比較して、EAEの改善をもたらす(図7c)。同様の結果は、リンパ管が結紮された場合に得られた(結紮部位は、図7diiの矢印によって示される)。リンパ管の結紮の際に、マウスは、CFA/Mogによって直ぐに免疫され、疾患経過を追跡した。顕著であるが、一時的な疾患の減弱は、明白であった(図7d)。これらの結果は、EAEの過程において髄膜リンパ管が果たす役割を、更に示した。適度かつ一時的な効果は、おそらく、結紮部位の周囲の増殖及び連結を再確立する、リンパ管内皮細胞の能力に起因する。したがって、強固な効果を得るために、結紮は、5~7日ごとに繰り返す必要があるだろう。

【0102】

アブレーションについて、2つの公開されたアプローチが利用され(Jang, J.Y. ら、Conditional ablation of LYVE-1+ cells unveils defensive roles of lymphatic vessels in intestine and lymph nodes. Blood 122巻、2151~2161頁、doi:10.1182/blood-2013-01-478941(2013年))、Proxcre-ERT2マウスが利用可能であった。Prox-1cre-ERT2:DTASTOP-loxマウスは、タモキシフェン(TAM)でi.c.v.処置されて、細胞を死滅させる、Prox-1発現リンパ管内皮細胞中での細胞内のジフテリア毒素(DTA)の発現を誘導する。或いは、野生型マウスは、光変換の際にROSを産生する、光変換可能な毒素(ベルテポルフィン(Tammela, T. ら、Photodynamic ablation of lymphatic vessels and intralymphatic cancer cells prevents metastasis. Sci Transl Med 3、69ra11、doi:10.1126/scitranslmed.3001699(2011年)))で、i.c.v.注射される(図8)。アブレーションアプローチの代替は、リンパ管の結紮である。図7dに実証するように、本方法は、実行可能であり、EAEに対する効果を有する。結紮/アブレーションのためのより効果的な方法は、EAEに対してより強固な効果をもたらす可能性がある。

【0103】

マウスからのT細胞は、光変換可能な蛍光タンパク質を遍在的に発現させ、それをT細胞欠損宿主に移して、髄膜へのT細胞の遊走の動態を研究するために使用される(Nowotschin, S.&Hadjantonakis, A.K. Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. BMC developmental biology 9巻、49頁、doi:10.1186/1471-213X-9-49 (2009年))。T細胞は、頭蓋骨を通して静脈洞の領域に、又は深頸リンパ節において、生存手術手順を使用して、光標識化(緑から赤の蛍光;図9)される。標識後、髄膜へのT細胞の遊走の動態を、二光子顕微鏡、組織学的検査及びフローサイトメトリーを使用して、静止状態の間、及びEAE誘導後に研究する。我々は、T細胞が、健康なマウスにおいて、ある特定の割合で、髄膜及び深頸リンパ節の間を再循環することを予期する。この割合は、T細胞が、推定では、深頸リンパ節における大量の増殖のために髄膜腔から離れ、次いで、戻り、脳を攻撃する場合に、EAE誘導の際に変化すると予期される。

【0104】

PD-L1は、脳のリンパ管内皮細胞において高度に発現し(データは示さない)、我々は、それが、脳の抗原に対する忍容性を媒介することを示唆する。マウスは、EAE誘導と共に、抗PD-L1中和抗体を、i.c.v.で注射される。

【0105】

早発性EAEの間の静脈洞周辺のT細胞の数の減少を示し、これらのT細胞が、再活性化のために、深頸リンパ節に再循環することを示唆している。我々は、CFA/Mog免疫の前及び免疫の7日後(T細胞が髄膜腔を離れると思われる時点)に、(ガンマナイフ照射を使用して)マウスの髄膜領域に照射する。脊髄、小脳、深頸リンパ節及び髄膜での免疫応答は、免疫の15日後に評価される。別の群は、行動評価のために3週間保ち、その後、CNSの組織学的検査のために屠殺される。

【0106】

VEGF-cのi.c.v.注射が、髄膜リンパ管の直径の増加をもたらすことを実証した(図3I、jの上側)。マウスは、EAE誘導の直前に、VEGF-cをi.c.v.注射され、EAEの進行を評価する。我々は、髄膜の免疫応答が、EAEの間のリンパ管の拡張によって、刺激及び追加免疫されると予期し、我々は、この操作が、より重症のEAEをもたらすと仮定する。

【0107】

上記で説明するように、深頸リンパ節にアクセスするにつれて、このリンパ管の結紮は、一次的にEAEを減弱する(図7d、上側)。リンパ管内皮細胞(Lyve-1creER)における発現を推進する特定のTAM誘導性creマウス系統を用いる遺伝的アブレーション(Jang, J.Y. ら、Conditional ablation of LYVE-1+ cells unveils defensive roles of lymphatic vessels in intestine and lymph nodes. Blood 122巻、2151~2161頁、doi:10.1182/blood-2013-01-478941(2013年))は、末梢リンパ管のための強力な方法である。トランスジェニックマウスは、B6バックグラウンドであり、したがって、我々は、Mog誘発EAEを継続する。TA

Mのi.c.v.注射を、CFA/Mog免疫の直前、免疫の7日後(T細胞が髄膜腔を離れると思われる時点)、及び免疫の10日後(免疫の13日後に評価したときに、髄膜腔のT細胞数が、爆発的に増えた)に行い、長期間のアブレーションを確保する。脊髄及び小脳での免疫応答、並びに髄膜及び深頸リンパ節における免疫応答を、Teffの活性化及び増殖、Tregの拡大を含めて、評価し、全ての群における細胞内のサイトカイン発現(T細胞のTh1及びTh17プロファイル)を、免疫の15日後(早期の臨床徴候)に評価する。マウスの別の群は、行動評価のために3週間保ち、その後、CNSの組織学的検査のために屠殺される。

【0108】

フォトアブレーションを、CFA/Mog免疫の直前、免疫の7日後(T細胞が髄膜腔を離れると思われる時点)、及び免疫の10日後(免疫の13日後に評価したときに、髄膜腔のT細胞数が、爆発的に増えた)に行う。脊髄及び小脳での免疫応答、並びに髄膜及び深頸リンパ節における免疫応答を、Teffの活性化及び増殖、Tregの拡大を含めて、評価し、全ての群における細胞内のサイトカイン発現(T細胞のTh1及びTh17プロファイル)を、免疫の15日後(早期の臨床徴候)に評価する。マウスの別の群は、行動評価のために3週間保ち、その後、CNSの組織学的検査のために屠殺される。我々は、フォトアブレーションされたリンパ管を有するマウスが、T細胞活性化の低減、Th1/Th17細胞の数の減少、及び疾患の進行の改善を示すと予想する。

【0109】

髄膜のT細胞の特定の欠乏は、抗CD3e抗体欠乏の有効な手順である経頭蓋適用によって行われる(図11)。

【0110】

処置の方法

いくつかの態様は、髄膜リンパ管のドレナージを減少させ、髄膜リンパ管の直径を減少させ、髄膜リンパ管の収縮性を調節してドレナージを減少させ、及び/又は髄膜リンパ管の透過性を調節する、化合物を、対象に投与することによって、対象のMSを処置する方法を含む。

【0111】

他の実施形態において、本方法は、前記処置を必要とする対象を特定する工程を更に含む。更なる実施形態において、前記処置を必要とする対象は、MSになりやすいか、又はMSを患っている。このような対象の特定は、当業者に公知の手法を使用して行ってもよい。

【0112】

いくつかの実施形態において、前記化合物の治療有効量が投与される。更なる実施形態において、前記化合物は、血管収縮剤である。更なる実施形態において、前記化合物は、一酸化窒素競合剤のNG-モノメチルL-アルギニン、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、及びホスファチジルコリンからなる群から選択される。

【0113】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg～約1.5mg/kgである。更なる実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgである。

【0114】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgより少ない。

【0115】

いくつかの実施形態において、化合物の前記治療有効量は、約0.00015mg/kg、約0.00030mg/kg、約0.00045mg/kg、約0.00060mg/kg、約0.00085mg/kg、約0.001mg/kg、約0.0015mg/kg、約0.002mg/kg、約0.0025mg/kg、約0.003mg/kg、約0.0035mg/kg、約0.004mg/kg、約0.0045mg/kg、約0.0050mg/kg、約0.0055mg/kg、約0.006mg/kg、約0.0065mg/kg、約0.007mg/kg、約0.0075mg/kg、約0.008mg/kg、約0.0085mg/kg、約0.009mg/kg、約0.0095mg/kg、約0.01mg/kg、約0.015mg/kg、約0.02mg/kg、約0.025mg/kg、約0.03mg/kg、約0.035mg/kg、約0.040mg/kg、約0.045mg/kg、約0.05mg/kg、約0.055mg/kg、約0.06mg/kg、約0.065mg/kg、約0.07mg/kg、約0.075mg/kg、約0.08mg/kg、約0.085mg/kg、約0.09mg/kg、約0.095mg/kg、約0.1mg/kg、約0.15mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.35mg/kg、約0.4mg/kg、約0.45mg/kg、約0.5mg/kg、約0.55mg/kg、約0.6mg/kg、約0.65mg/kg、約0.7mg/kg、約0.75mg/kg、約0.8mg/kg、約0.85mg/kg、約0.9mg/kg、約0.95mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、又は約1.5mg/kgを超える。

【0116】

いくつかの実施形態において、化合物は、可溶性の形態で提供される。いくつかの実施形態において、化合物は、ゆっくりと一定に放出するために、ナノゲルに吸収されて、提供される。ある特定の実施形態において、化合物は、RNA又はポリペプチドである試薬をコードするウイルスベクターで提供される。

【0117】

いくつかの態様において、化合物は、対象の脳脊髄液(CSF)に投与される。他の態様において、軟膏は、前記化合物を含み、軟膏は、対象の頭部への軟膏の適用を介して投与される。

【0118】

追加の選択肢を、下記に説明する。

【0119】

いくつかの実施形態において、対象における神経学的病変を有する状態を処置する方法を提供する。本方法は、a) 髄膜リンパ管のドレナージ;b) 髄膜リンパ管の直径;c) 髄膜リンパ管のリンパ管形成;d) 髄膜リンパ管の収縮性;及び/又はe) 髄膜リンパ管の透過性の、1つ又は複数を調節する化合物の治療有効量を、対象に投与する工程を含むことができる。いくつかの実施形態において、前記対象の脳脊髄液(CSF)に投与される。いくつかの実施形態において、軟膏は、前記化合物を含み、頭部への軟膏の適用を介して投与される。いくつかの実施形態において、本方法は、前記処置を必要とする対象を特定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、前記処置を必要とする対象は、アルツハイマー病(AD)、認知症、パーキンソン病、脳浮腫、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、小児自己免疫性溶連菌感染関連性精神神経障害(PANDAS)、髄膜炎、脳出血、自閉症スペクトラム障害(ASD)、脳腫瘍及びてんかん、又は列挙した障害のいずれかの組み合わせからなる群から選択される障害になりやすいか、又はこの障害を患っている。いくつかの実施形態において、投与は、髄膜リンパ管のドレナージを増加させ、及び/又は髄膜リンパ管の直径を増加させる。

いくつかの実施形態において、投与は、髄膜リンパ管のドレナージを増加させ、及び/又は髄膜リンパ管の直径を増加させ;前記処置を必要とする対象は、アルツハイマー病(AD)及び脳腫瘍、又はこの2つの組み合わせからなる群から選択される障害になりやすいか、又はこの障害を患っている。いくつかの実施形態において、化合物は、血管拡張剤である。いくつかの実施形態において、投与は、髄膜リンパ管のドレナージを減少させ、及び/又は髄膜リンパ管の直径を減少させる。いくつかの実施形態において、投与は、髄膜リンパ管のドレナージを減少させ、及び/又は髄膜リンパ管の直径を減少させ;前記処置を必要とする対象は、多発性硬化症(MS)になりやすいか、又は多発性硬化症(MS)を患っている。いくつかの実施形態において、化合物は、血管収縮剤である。

【0120】

10

いくつかの実施形態において、対象におけるアルツハイマー病を処置する方法を提供する。本方法は、対象の脳脊髄液(CSF)に、治療有効量の成長因子を、対象に投与する工程を含むことができ、成長因子が、VEGF-c、VEGF-d及びFGF2からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、本方法は、前記処置を必要とする対象を特定する工程を更に含む。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、CSFに投与され、前記ウイルスベクターは、成長因子をコードする。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、可溶性である。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、投与の前に、ナノゲル中に吸収される。

【0121】

20

いくつかの実施形態において、対象におけるMSを処置する方法を提供する。本方法は、前記対象において1つ又は複数の髄膜リンパ管を結紮する工程を含むことができる。いくつかの実施形態において、本方法は、前記処置を必要とする対象を特定する工程を更に含む。

【0122】

下記は、本明細書におけるいくつかの実施形態の非限定的な実施例である。

【実施例】

【0123】

(実施例1)

成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害は、脳液のホメオスタシスに影響を与える

30

ビスダイン(ベルテポルフィン)又はビヒクル(対照として)を、麻酔した成熟C57BL/6マウス(3カ月齢)の大槽(大槽内、ICM)に、注射し、続いて、頭蓋骨上の5つのポイントに非熱赤色光(689nm)を当てることによって、達成される光変換工程を行った。初回の手順の7日後、 $A\beta_{42}$ -HiLyte647(1 μ g)を、脳実質中に、定位的に注射した(ブレグマから調整、AP=+1.5mm、ML=-1.5mm、DV=+2.5mm)。注射の1時間後、マウスを、生理食塩水で経心的に灌流し、髄膜、深頸リンパ節(dcLN)及び脳を、分析のために収集した。ビヒクル(図23A)又はビスダイン(図23B)を注射された群からの髄膜のホールマウント(スケールバー、1mm)を、リンパ管、内皮ヒアルロン酸受容体1(LYVE-1、緑色)及び血管内皮細胞マーカーのCD31(赤色)について、染色した。ビスダイン単独を、図23A及び図23Bの右上の角の挿入図に示す。LYVE-1⁺管の領域の顕著な減少が、ビスダイン群において観察されたが(図23C)、群間の変化は、CD31⁺管による被覆度において検出されなかった(図23D)。dcLNにおける4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)及びLYVE-1についての染色は、ビスダイン群における $A\beta_{42}$ (赤色)の顕著に劣るドレナージを示した(ビヒクル群について図23E、ビスダイン群について図23F)。 $A\beta_{42}$ 単独を、図23E及び図23Fのそれぞれの右上の角の挿入図に示し、LYVE-1単独を、図23E及び図23Fのそれぞれの右下の角の挿入図に示す。脳冠状切片(100 μ m厚さ)の注射部位の吻側及び尾側の両方を、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)について染色した。ビスダイン群からのマウスは、脳からの $A\beta_{42}$ の流出の減少を示し、これは、蛍光ペプチドによって占められた領域率の増加によって表された(図23G)(結果は、図23C、図23D及び図23Gでは平均 $\pm$ s.e.m.として示す;ビヒクル群においてn=6、及びビスダイン群においてn=5;*P<0.05、**P<0.01、片側マンホイットニー検定;独立した2つの実験

40

50

の代表)。

【0124】

したがって、これらの実験は、いくつかの実施形態による成熟マウスにおける髄膜リンパ管ドレナージの障害が、脳液のホメオスタシスに影響を与えることを示す。

【0125】

(実施例2)

髄膜管の障害は、深頸リンパ節中へのドレナージを顕著に減少させる

成熟C57BL/6マウスに、ビスダイン又はビヒクルを注射し(ICM)、続いて、光変換の工程を行った。アブレーションの7日後、2.5 μ gのオボアルブミン-Alexa647(OVA-A647)を、CSF中に注射し(ICM)、マウスを、2時間後に、生理食塩水で経心的に灌流した。j、dcLNの代表切片を、DAPI及びLYVE-1で染色し、排出されたOVA-A647のレベルを測定し、代表切片を、ビヒクル(図24A)及びビスダイン(図24B)について示した。OVA-A647単独を、図24A及び図24Bのそれぞれの右上の角の挿入図に示し、LYVE-1単独を、図24A及び図24Bのそれぞれの右下の角の挿入図に示す。dcLN中に排出されたOVA-A647の量は、ビスダイン注射マウスにおいて、顕著に減少した(図24C)。脳切片の分析は、ビスダイン注射マウスの脳実質中へのOVA-A647(赤色)の流入の顕著な減少を示した(図24D)。ビスダイン誘発髄膜リンパ管アブレーションを受けた成熟マウスは、アクアポリン4(AQP4、緑色)発現細胞による、脳実質の被覆度の変化を示さなかった(図24E)(結果は、平均 $\pm$ s.e.m.として示す;図24C～図24Eにおいて、1群あたり、n=7マウス;*P<0.05、***P<0.001、片側マンホイットニー検定;図24C～図24Eにおいて、独立した2つの実験をプール;独立した3つの実験の代表)。

【0126】

したがって、これらの実験は、髄膜管の障害が、深頸リンパ節中へのドレナージを顕著に減少させることを示す。

【0127】

(実施例3)

老マウスにおける髄膜リンパ管のアブレーションは、脳におけるCDFトレーサーの流入を更に悪化させない

ビスダイン又はビヒクルの注射(ICM)、続いて、光変換工程を、成熟(3カ月齢)C57BL/6マウス又は老(20～24カ月齢)C57BL/6マウスにおいて行った。アブレーションの7日後、OVA-A647(2.5 μ g)を、CSF中に注射し(ICM)、マウスを、2時間後に、生理食塩水で経心的に灌流した。LYVE-1についてのdcLNの染色は、排液されたOVA-A647の量が、老マウスにおいて顕著に減少したことを明らかにした(図25A)。老マウスにおける髄膜リンパ管のアブレーションは、脳中へのCSFトレーサーの流入を更に悪化させない(図25B)(結果は、平均 $\pm$ s.e.m.として示す;成熟+ビヒクル群及び老+ビスダイン群ではn=7、老+ビヒクル群ではn=8;*P<0.05、片側マンホイットニー検定;図25A及び図25Bにおいて、独立した2つの実験をプール;独立した3つの実験の代表)。

【0128】

したがって、これらの実験は、老マウスにおける髄膜リンパ管のアブレーションが、脳におけるCDFトレーサーの流入を更に悪化させないことを示す。

【0129】

(実施例4)

老マウスにおけるVEGF-Cの経頭蓋適用は、脳中へのCSF流入の向上をもたらす

1mLのゲルマトリックス単独(ビヒクル)又は200ngの組換えヒトVEGF-C156Sを含有するゲルマトリックスを、老C57BL/6マウスの菲薄化頭蓋骨の上部に、2週ごとに適用した。初回の処置の1カ月後、OVA-A647を、ICMに注射し、マウスを、注射の2時間後に、生理食塩水で経心的に灌流した。老マウスからの髄膜リンパ管中のLYVE-1についての染色は、ゲル+VEGF-C156Sによる処置が、管の直径に対する顕著な効果を有することを明らかにした(図26)。OVA-A647(赤色)を表し、DAPIで染色され(青色)、LYVE-1に対する(緑色)、dcLNの代表的な画像は、老マウスのdcLN中へのOVA-A647のドレナージの減少が、VEGF-C156Sの送達によって増加したことを示す(図27A～図27C)。OVA-A647単独を、図27A及び図27Bのそれぞれ

の右上の角の挿入図に示し、LYVE-1単独を、図27A及び図27Bのそれぞれの右下の角の挿入図に示す。代表的な老マウスからの脳冠状切片(スケールバー、5mm)は、CSFから実質中へのOVA-A647(赤色)の流入に対するVEGF-C156Sの顕著な効果を示した(図27D)(結果は、平均 $\pm$ s.e.m.として示す;図26、図27C、及び図27Dにおいて、1群あたり、 $n=7$; * $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、片側マンホイットニー検定;独立した2つの実験の代表)。

【0130】

これらの実験は、いくつかの実施形態によるVEGF-Cの経頭蓋適用が、高齢の対象の脳中へのCSFの流入の向上をもたらすことを示す。

【0131】

(実施例5)

CNS中の細胞による、外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が流れを増加させる

成熟C57BL/6マウス及び老C57BL/6マウスは、麻酔され、AAV1-CMV-EGFP(又はEGFP)、対照ウイルス又はAAV1-CMV-mVEGF-C(又はmVEGF-C)のいずれかの 10^{12} ゲノムコピー(GC)/mLを注射して(ICM)、CNS中の細胞によるmVEGF-Cの発現を増加させた。1カ月後、2.5 μ gのOVA-A647を、ICMに注射し、マウスを、注射の2時間後に、生理食塩水で経心的に灌流した。髄膜のホルマウントを、DAPI(青色)で、並びに、LYVE-1及びCD31について、染色した。成熟マウス及び老マウスにおけるmVEGF-Cの過剰発現は、上矢状静脈洞(SSS)で、リンパ管の直径の顕著な増加をもたらしたが(図28A)、CD31⁺血管による被覆度は増加させなかった(図28B)。DAPI及びLYVE-1について染色されたdcLNは、EGFPウイルスを受けたものと比較して、mVEGF-Cウイルスを受けた20~24カ月齢の老マウスにおいて、OVA-A647のドレナージの顕著な増加を示した(図28C)(結果は、平均 $\pm$ s.e.m.として示す;図28A~図28Cにおいて、3カ月+EGFP群及び3カ月+mVEGF-C群では $n=4$ 、20~24カ月+EGFP群では $n=5$ 、20~24カ月+mVEGF-C群では $n=6$; * $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、ボンフェローニ事後検定を伴う両側ANOVA;独立した2つの実験の代表)。

【0132】

これらの実験は、本明細書におけるいくつかの実施形態による、CNS中の細胞による、外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、CNS中で流れを増加させることを示す。

【0133】

(実施例6)

CNS中の細胞による外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、流れを増加させ、認知能力を向上させる

若年成熟(2カ月齢)C57BL/6マウス及び中年(12~14カ月)C57BL/6マウスに、AAV1-CMV-EGFP(又はEGFP)、又はAAV1-CMV-mVEGF-C(又はmVEGF-C)のいずれかの 10^{12} ゲノムコピー(GC)/mLを注射した(ICM)。1カ月後、モリス水迷路(MWM)試験において、マウスの学習能力及び記憶能力を評価した(図29A~図29C)。若年成熟マウスの2つの群間の相違は、MWMの習得課題、プローブ試行課題及び逆転課題において、観察されなかった(図29D~図29F)。習得、プローブにおいて、変化は観察されなかったが、中年マウスにおけるmVEGF-Cウイルスの注射は、MWMの逆転学習課題の2日目において、顕著に良好な能力をもたらした。結果は、平均 $\pm$ s.e.m.として示す;図29A~図29Cにおいて、2カ月+EGFP群及び2カ月+mVEGF-C群では $n=8$ 及び9、図29D~図29Fにおいて、12~14カ月齢群では、それぞれ $n=8$; * $P<0.05$ 、ボンフェローニ事後検定を伴う、反復測定の内側ANOVA。

【0134】

これらの実験は、本明細書におけるいくつかの実施形態による、CNS中の細胞による、外因性VEGF-C導入遺伝子の発現が、CNS中で流れを増加し、MWM試験における能力を実行することを示す。

【0135】

(実施例7)

AD患者における髄膜のアミロイドベータ沈着

それぞれの付着した髄膜層を含有する、非AD皮質及びAD皮質の脳切片を、アストロサイトマーカーのGFAPのためにDAPI(細胞核)で、及びヒトN末端アミロイドベータ(A β)_{37~42}

10

20

30

40

50

残基(クローンD54D2)を認識する抗体で染色した。アミロイド沈着(矢印)は、ADにおいて観察されたが(図30B)、非AD(図30A)、脳実質、及び皮質の髄膜の脈管構造においては、観察されなかった(スケールバー、500 μm ; 挿入図のスケールバー、200 μm)。

【0136】

これらの実験は、アミロイドベータ沈着が、AD患者の髄膜中に観察されるが、対照では観察されないことを示す。

【0137】

(実施例8)

髄膜リンパ管の(機能不全)機能は、アルツハイマー病のモデルにおいて、アミロイド病理を調節する

C57BL/6成熟マウスを、麻酔し、髄膜リンパ管のアブレーションを誘導するためのビスダイン、又は対照としてビヒクルを、ICMに注射した。光変換工程後、マウスは、72時間回復させた。次いで、カテーテルを、全てのマウスの大槽に埋入し、2.5 μg の $\text{A}\beta_{42}$ を、24時間ごとに、CSF中に、合計で5日間注射した。髄膜のホルマウントにおける、LYVE-1、 $\text{A}\beta$ 及びマクロファージマーカーのIBA1による染色は、 $\text{A}\beta_{42}$ 凝集の形成に応答するマクロファージの活性化を示した。髄膜のホルマウントにおいて、LYVE-1⁺リンパ管の総領域(図31A)及び $\text{A}\beta$ 凝集によって占められた領域(図31B)の定量化を行い、ビスダインによる髄膜リンパ管のアブレーションに供された群における凝集の顕著な増加を示した。結果は、平均 $\pm$ s.e.m.として示す;1群あたり、 $n=5$; * $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、片側マンホイットニー検定。

【0138】

これらの実験は、髄膜リンパ管の(機能不全)機能が、アルツハイマー病のモデルにおいて、アミロイド病理を調節することを示す。

【0139】

(実施例9)

髄膜リンパ管のアブレーションは、アミロイドベータ($\text{A}\beta$)の凝集を増加させる

1.5月齢の5xFAD(APP^{SweFlLon}、PSEN1^{*M146L*L286V})トランスジェニックマウスにおける髄膜リンパ管のアブレーションは、ビスダイン又は対照としてのビヒクルのICM注射、続いて、経頭蓋の光変換の工程によって達成された。この手順を、3週間ごとに、合計で1.5カ月、繰り返した。異なる群からの5xFADマウスの髄膜を、DAPIで、並びに、LYVE-1及び $\text{A}\beta$ について、染色した。 $\text{A}\beta$ 凝集は、ビスダインによるリンパ管のアブレーションを受けた5xFADマウスの髄膜中で検出されたが、ビヒクルを注射されたマウスの髄膜中で検出されなかった。 $\text{A}\beta$ 凝集は、特に静脈洞の周囲、及び小脳の髄膜中に形成された。海馬は、ビヒクル又はビスダインを注射された5xFADマウス中のDAPI及びアミロイドベータについて、染色された(スケールバー、1mm、挿入図、200 μm)。アミロイド斑の数(図32A)及び被覆度(図32B)の統計学的に顕著な増加、並びに斑のサイズの増加の傾向(図32C)が、髄膜リンパ管のアブレーションで、5xFADマウスの海馬中において観察された。結果は、平均 $\pm$ s.e.m.として示す;1群あたり、 $n=5$; * $P<0.05$ 、片側マンホイットニー検定。

【0140】

これらの実験は、髄膜リンパ管のアブレーションが、アミロイドベータの凝集を増加させることを示す。

【0141】

(実施例10)

髄膜リンパ管のアブレーションは、ADモデルにおける認知症の症状を悪化させる

成熟(6~7カ月齢)APP^{Swe}トランスジェニックマウスを、2週ごとに、合計で1カ月間、麻酔し、ビスダイン(ICM)、又は対照としてビヒクルを注射し、経頭蓋の光変換の工程に付した。次いで、異なる群からのマウスの間の、空間参照機能及び作業記憶機能の変化を、MWMにおいて評価した。 n 、顕著な相違は、MWMの習得フェーズの4日目におけるプラットフォームを探索する待ち時間に関する、ビスダイン及びビヒクル群の間に観察された(図33A)。プローブ(図33B)及び逆転(図33C)において、相違は見出されなかった。結果は、平均

±s.e.m.として示す;1群あたりn=9;*P<0.05、ボンフェローニ事後検定を伴う、反復測定
の両側ANOVA。

【0142】

これらの実験は、髄膜リンパ管のアブレーションが、ADモデルにおける認知症の症状を
増悪することを示す。

【0143】

(実施例11)

CNS中でのVEGF-Cの発現は、ADモデルにおける認知症の症状を改善する

2 μ LのAAV1-CMV-EGFP又はAAV1-CMV-mVEGF-C(10^{12} GC/mL)を、6~7カ月のAPPSweInd(J20)
トランスジェニックマウスのCSF中に注射した(ICM)。注射の1カ月後、マウスを、MWMにお
いて試験した(図34A~図34C)。異なる群のJ20マウスを比較することによって、MWMの逆転
フェーズの最終日に、プラットフォームの探索の待ち時間において、統計学的有意差を観
察することが可能であった(図34C)(結果は、平均±s.e.m.として示す;J20+EGFPではn=11
、及びJ20+mVEGF-Cではn=12;逆転の最終日における群の比較により、*P<0.05、ボンフェ
ローニ事後検定を伴う、反復測定の両側ANOVA)。

【0144】

これらの実験は、本明細書におけるいくつかの実施形態によるCNS中での外因性VEGF-C
の発現が、ADモデルにおける認知症の症状を改善することを示す。

【0145】

(実施例12)

大槽から髄膜リンパ管へのインビボの流れ

成熟C57Bl6マウスは、2 μ lのA488結合Lyve-1抗体を、大槽(i.c.m.)中に注射された。髄
膜を、異なる指示された時点で回収し、リンパ管の脈管構造(Lyve-1)について免疫染色し
た。リンパ管の画像を、i.c.m.注射された抗Lyve-1A488及び外因的に適用された抗Lyve-1
A660の両方により、i.c.m.注射後の異なる時点で、免疫染色した。i.c.m.注射され、外因
的に適用された抗Lyve-1抗体による、髄膜リンパ管の二重標識を観察した。スケールバー
= μ m。i.c.m.注射された抗体によって免疫染色されたリンパ管、及び総リンパ領域の百分
率を、注射後の異なる時点で、定量化した(図35)(平均±s.e.m、n=4マウス/群)。

【0146】

これらの実験は、大槽から髄膜リンパ管へのインビボの流れを特定する。

【0147】

(実施例13)

髄膜リンパ管構造の特徴

成熟Prox1GFPマウスの横静脈洞の髄膜リンパ管を画像化した。ボタン様構造が、リンパ
管に沿って、観察された。スケールバー= μ m。松果腺の中央から始まる横静脈洞の隣接部
位における、リンパ管の長さ及びリンパ管のボタンの数の定量化を行った(図36A~図36B)
(平均±s.e.m.、n=5マウス、n=2横静脈洞/マウス、長さ:*p=0.0252(0~400対1200~1600)
、*p=0.0111(0~400対1600~2000)、*p=0.0456(0~400対2000~2400)(図36A);ボタン:*p=
0.0402(0~400対1200~1600)、チューキーの多重比較検定を伴う、反復測定のANOVA)(図3
6B)。したがって、これらの実験は、いくつかの髄膜リンパ管構造の特徴を特定する。

【0148】

(実施例14)

髄膜リンパ管中のT細胞の蓄積

成熟C57Bl6マウスは、0.5 μ lの0.5 μ mビーズ+2.5 μ lのOVA^{A594}を、i.c.m.注射された。
髄膜を、注射の2時間後に、回収した。横静脈洞のリンパ管(Lyve-1)に沿った、OVA^{A594}及
び蛍光ビーズの蓄積の代表的な画像を図37A~図37Fに示す。外因的に注射されたT細胞(CF
SE)は、i.c.m.注射の12時間後に、横静脈洞のホットスポットに蓄積した。これらの実験
は、T細胞が、髄膜リンパ管中に蓄積することを示す。

【0149】

(実施例15)

10

20

30

40

50

髄膜リンパ管中の内因性T細胞の蓄積

成熟Prox1^{GFP}マウスは、5 μ lのQDot⁶⁵⁵を、大槽(ICM)中に注射された。横静脈洞及び上矢状静脈洞を、注射およそ5分後に、菲薄化頭蓋骨を通して、画像化した。上矢状静脈洞に沿ったリンパ管は、SASから分離されるが、横静脈洞リンパ管の一部はSAS内に位置することが観察された。

【0150】

成熟Prox1^{GFP}マウスは、5 μ lの(95 μ lの生理食塩水に希釈された)QDot⁶⁵⁵を、静脈内(i.v.)注射された。横静脈洞を、注射およそ5分後に、菲薄化頭蓋骨を通して、画像化した。複雑な髄膜リンパ管の画像は、SASの方向に向かって下行するリンパ管ボタンを示したホットスポットでの横静脈洞を示した。内因性T細胞(Lck^{tdTOMATO})は、横静脈洞に沿ってリンパ管のボタン(Prox1^{GFP})内に局在化した。これらの実験は、T細胞が、髄膜リンパ管中に蓄積することを示す。

10

【0151】

(実施例16)

髄膜リンパ管中の外因性T細胞の密度

成熟C57Bl6マウスは、100万個のCFSE標識化T細胞を、i.c.m.注射された。髄膜を、細胞注射の12時間後に、収集した。外因的に注射されたT細胞(CFSE)は、横静脈洞(CD31)の髄膜リンパ管(Lyve-1)に位置した(図38)。分析されたマウス及び領域に応じて、非常にわずかな量から非常に詰まった量(very packed amount)の外因性T細胞が見出され得ることに留意されたい。これらの実験は、T細胞が、髄膜リンパ管中に蓄積し、異なる密度を有することを示す。

20

【0152】

(実施例17)

髄膜リンパ管中の外因性樹状細胞の蓄積

成熟C57Bl6マウスは、50万個のTAMRA標識化樹状細胞を、i.c.m.注射された。髄膜を、細胞注射の15時間後に、収集した。外因的に注射されたDC(TAMRA、赤色)は、横静脈洞の髄膜リンパ管(Lyve-1、白色)内に位置した(図39)。これらの実験は、樹状細胞が、髄膜リンパ管中に蓄積することを示す。

【0153】

(実施例18)

dCLN、sCLN及びILN中のKiKR CD4 T細胞の百分率の定量化を示す

C57Bl6マウスは、致死線量照射後、KiKGRマウスからの骨髓を用いて再構成された。再構成の10週間後、髄膜を、紫色光による2分間の曝露(未損傷の頭蓋骨を通じて)で、12時間ごとに変換した。最後の変換の10時間後、組織を、回収し、FACSによって分析した。対照マウス及び変換マウスの、髄膜、血液及び鼻粘膜中の変換されたCD4 T細胞(KiKR+)の百分率の定量化(平均 $\pm$ s.e.m、n=5~6マウス/群、****p<0.0001、シダックの多重比較検定を伴う、両側ANOVA)を、図40Aに示す。KiKR CD4 T細胞の百分率の定量化を、対照マウス及び変換マウスの、dCLN、sCLN及びILNにおいて示す(図40B)(平均 $\pm$ s.e.m、2つの実験からプールされたn=8~9マウス/群、**p=0.0048、シダックの多重比較検定を伴う、両側ANOVA)。これらの実験は、樹状細胞が、dCLN、sCLN及びILNの間でサイクルすることを示す。

30

40

【0154】

(実施例19)

深頸リンパ節中でのT細胞の活性化及び遊走

成熟マウスは、100万個の外因的に標識されたCD4 T細胞を、i.c.m.注射された。リンパ節を、指示された時点で、回収した。注射されたT細胞は、注射の12時間後に、深頸リンパ節(dCLN)中に観察された。注射後の異なる時点でのdCLNの1mm²あたりの活性化T細胞の密度の定量化を、図41Aに示す(平均 $\pm$ s.e.m、n=3~5マウス/群)。注射の6及び12時間後のマウスのdCLN中のi.c.m.注射された無処置T細胞の画像は、6時間で、T細胞は、リンパ節のリンパ管のカプセル内にほぼ局在化していたが、これらは、注射の12時間後で、T細胞ゾーンに局在化していることを示す。dCLN、sCLN、腕部

50

(brachial) 及びILNの1mm²あたりの無処置T細胞の密度を、注射後の異なる時点で、定量化した(平均±s.e.m、独立した2つの実験からプールされた、1群あたり、n=2~7マウス)。分離されたCD4 T細胞を、C57Bl6マウスへのi.c.m.注射の前に、Xngの百日咳毒素と共に、2時間インキュベートした。WTマウス 12時間のdCLN中の対照及びPTX処理T細胞の画像を、i.c.m.注射後に、取得した。dCLNの1mm²あたりのT細胞の密度を定量化した(対照条件の百分率として表す)(図42)。(平均±s.e.m、独立した2つの実験からプールされたn=9マウス/群、**p=0.0013、対応のないt検定)。これらの実験は、dCLN中の活性化T細胞の存在を示す。

【0155】

(実施例20)

CCR7-CCL21に依存する方法で、頸部リンパ節中に循環する髄膜のT細胞

成熟C57Bl6マウスは、CCR7-WT及びCCR7-KO CD4 T細胞を1:1の比で(合計で100万細胞)、i.c.m.注射された。リンパ節を、注射の12時間後に、回収した。注射の12時間後、dCLN中のCCR7-WT(赤色)及びCCR7-KO(緑色)CD4 T細胞の画像を得た。総リンパ節の1mm²あたり(図43A)又はT細胞ゾーンあたり(図43B)のCCR7-WT及びCCR7-KO細胞の密度を、注射の12時間後に、定量化した(平均±s.e.m、独立した2つの実験からプールされたn=7マウス/群、*p=0.0102、**p=0.0014、対応のあるt検定)。C57Bl6マウス及びCCR7^{GFP}マウスの髄膜中のCD4 T細胞によるGFP発現の代表的なドットプロットを、図43Cに示す(独立した3匹のマウスの代表)。CCR7^{GFP}マウスの髄膜中のCCR7⁺及びCCR7⁻ CD4 T細胞表現型の代表的な輪郭プロットを図43Dに示す。

【0156】

横静脈洞に沿った髄膜リンパ管(Lyve-1及びCCL21)中及びその周辺のCCR7発現(CCR7GF)の画像は、髄膜リンパ管の内側に位置するCCR7を発現するT細胞形細胞を特定した。CCR7-WT及びCCR7-KOマウスの髄膜中の、T細胞(図44A)、CD4エフェクターT細胞(図44B)及びCD8 T細胞(図44C)の合計数を定量化した(図44E) (平均±s.e.m、n=4~5マウス/群、***p=0.0007(T細胞)、***p=0.0002(CD8 T細胞)、*p=0.0231(CD4エフェクターT細胞)、対応のないt検定)。上矢状静脈洞の髄膜リンパ管(Lyve-1、青色)中及びその周辺のT細胞(CD3e、赤色)の画像を得た。CCR7-WT及びCCR7-KOマウスの静脈洞におけるT細胞の密度を定量化し(図44D)、T細胞の百分率は、リンパ管の内側に局在化した(図44E)(平均±s.e.m、n=3マウス/群、**p=0.0039(密度)、**p=0.0098(リンパ管の百分率)、対応のないt検定)。

【0157】

これらの実験は、CCR7-CCL21に依存する方法で、髄膜のT細胞が、頸部リンパ節中に循環することを示す。

【0158】

(実施例21)

髄膜の樹状細胞は頸部リンパ節中に循環する

KiKGRマウス髄膜を、12時間ごとに、2日間、紫色光で、2分間、変換した。2日後、マウスは、ペプチドと共にPoly(I:C)を、i.c.m.注射された。組織を、Poly(I:C)注射の24時間後に、回収した。試料を、ゲーティングして、樹状細胞を特定した。代表的なドットプロットを、KiKG+及びKiKR+樹状細胞であるB6対照について(図45A)、及びKiKGR対照マウスについて(図45B)、示す。変換されたマウスにおいて、Poly(I:C)注射の24時間後の、dCLN、sCLN及びILN中のKiKR+樹状細胞の代表的なドットプロット。4匹のマウスの代表。Poly(I:C)注射の24時間後の、対照マウス及び変換されたマウスにおける、dCLN、sCLN及びILN中のKiKR+樹状細胞の百分率の定量化を、図45Cに示す。(平均±s.e.m、n=3~4マウス/群、独立した2つの実験の代表)。

【0159】

これらの実験は、髄膜の樹状細胞が、頸部リンパ節中で循環することを示す。

【0160】

(実施例22)

髄膜リンパ管は、頸部リンパ節中への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であ

10

20

30

40

50

る

Prox1 WTマウス及びProx1 HetマウスのdCLN中の外因的に注射されたT細胞(CFSE)の画像を、i.c.m.注射の12時間後に得た。Prox1 WTマウス及びProx1 HetマウスのdCLNの1mm²あたりのT細胞の密度を定量化した(対照条件の百分率として表す)(図46A)。(平均±s.e.m、n=3~4マウス/群、***p=0.0001、対応のないt検定)。Prox1 WTマウス及びProx1 HetマウスのdCLN中の外因的に注射された蛍光マイクロビーズ(0.5 μmの直径、赤色)の画像を、i.c.m.注射の2時間後に得た。Prox1 WTマウス及びProx1 HetマウスのdCLN中のビーズ被覆度の百分率を定量化した(対照条件の百分率として表す)(図46B)。(平均±s.e.m、n=5~6マウス/群、*p=0.0490、対応のない片側t検定)。Prox1 WTマウス及びProx1 Hetマウスの髄膜中のT細胞(TCRb+)の数も定量化した(図46C)。(平均±s.e.m、独立した2つの実験からプールされたn=5~7マウス/群、**p=0.0034、対応のないt検定)。成熟C57Bl6マウスは、外科的に結紮又は偽手術されたdCLNに達する求心性リンパ管を有していた。F.i.c.m.注射の12時間後の、偽マウス及び結紮マウス(手術の24時間後)のdCLN中の外因的に注射されたT細胞(深赤色細胞トラッカー、赤色)の代表的な画像。偽マウス及び結紮マウスのdCLNの1mm²あたりのT細胞の密度を定量化した(図46E)(対照条件の百分率として表す)(平均±s.e.m、n=4~5マウス/群、*p=0.0194、対応のないt検定)。偽マウス及び結紮マウスのdCLN中の外因的に注射された蛍光マイクロビーズ(0.5 μmの直径、緑色)の画像(対照条件の百分率として表す)を得た。偽マウス及び結紮マウスのdCLN中のビーズの被覆度の百分率を定量化した(対照条件の百分率として表す)(図46E)(平均±s.e.m、1群あたり、n=4~6マウス、**p=0.0017、対応のないt検定)。偽マウス及び結紮マウスの髄膜中のT細胞を定量化した。偽マウス及び結紮マウスの髄膜中のT細胞(TCRb+;図46F)及びCD4エフェクターT細胞(TCRb+CD4+FoxP3-;図46G)の数を、定量化した(平均±s.e.m、n=2~5マウス/群(TCRb+);独立した2つの実験からプールされたn=4~7マウス/群(CD4 Eff)、*p=0.0146、***p=0.0006、対応のないt検定)。

【0161】

これらの実験は、髄膜リンパ管が、頸部リンパ節中への免疫細胞及び高分子の循環のための主要な経路であることを示す。

【0162】

(実施例23)

髄膜リンパ管中での外因的に標識化されたT細胞のサイクル

成熟マウスは、100万個の外因的に標識化されたT細胞をi.c.m.注射され、髄膜及び鼻腔を、指示された時点で、回収及び分析した。CFSE標識化T細胞(緑色)のi.c.m.注射の2及び12時間後の、篩板の領域の代表的な画像。i.c.m.注射されたT細胞(深赤色細胞トラッカー、赤色)は、篩板のリンパ管中で検出されたが、鼻の付け根のリンパ管中及びその周辺でも検出された。リンパ管内のT細胞及びリンパ管周囲のT細胞が観察された。i.c.m.注射後の異なる時点で、マウスの髄膜リンパ管及び鼻粘膜において、髄膜中の外因的に注射されたT細胞の数を定量化した(図47)(平均±s.e.m、独立した2つの実験からプールされた、1群あたり、n=2~8マウス、*p=0.0114(髄膜リンパ管、30分/2時間/6時間対12時間)、**p=0.0018(髄膜リンパ管、24時間対12時間)、***p=0.0003(髄膜リンパ管対鼻粘膜)、シダックの多重比較検定を伴う両側ANOVA)。これらの実験は、外因的に標識化されたT細胞が、髄膜リンパ管中でサイクルすることを示す。

【0163】

(実施例24)

免疫細胞のサイズ及び被覆度の髄膜の脈管構造のアブレーションの効果

成熟マウスは、5 μlのビスダイン(又は、PBS)を、i.c.m.注射された。注射の15分~30分後、ビスダインを、非熱689nmレーザーを使用して、未損傷の頭蓋骨を通して髄膜リンパ管の上部の5つの異なるポイントで、変換した。レーザー単独、ビスダイン単独及びビスダイン+レーザーで処置された、光変換の4日後のマウスの、髄膜リンパ管(Lyve-1)及び血管(CD31)の脈管構造の画像を得た。レーザー単独、ビスダイン単独及びビスダイン+レーザーで処置された、光変換の4日後のマウス、上矢状静脈洞及び横静脈洞におけるLyve-

1(図48A)及びCD31(図48B)の被覆度定量化を行った。(平均±s.e.m、独立した3つの実験の代表、n=4マウス/群、**p=0.008、*p=0.025(TS)、*p=0.045(SSS)、シダックの多重比較検定を伴う両側ANOVA)。マクロファージ(Iba1、MHCII)は、レーザー又はビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置された、アブレーションの4日後のマウスの横静脈洞に沿って、観察された。スケールバー=μm。レーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置されたマウスの横静脈洞におけるマクロファージのサイズの定量化(平均±s.e.m、n=4マウス/群)。図48C。レーザー、ビスダイン(i.c.m.)及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置された、i.c.m.注射の12時間後のマウスのdCLN中の、外因的に注射されたT細胞(アブレーションの4日後)(CFSE)の画像を得た。レーザー、ビスダイン(i.c.m.)及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置されたマウスのdCLNの1mm²あたりの外因的に注射されたT細胞の密度を定量化した(図48D)(対照条件の百分率として表す)(平均±s.e.m、n=6~11マウス/群、*p=0.0298(レーザー対ビスダイン(i.c.m.)+レーザー)、*p=0.0412(ビスダイン(i.c.m.)対ビスダイン(i.c.m.)+レーザー)、チューキーの多重比較検定を伴う片側ANOVA)。これらの実験は、本明細書におけるいくつかの実施形態による、髄膜の脈管構造のアブレーションが、CN Sにおける免疫細胞のサイズ及び被覆度に影響を与えることを示す。

10

【0164】

(実施例25)

T細胞の遊走は、髄膜リンパ管のアブレーションによって阻害される

成熟マウスは、ビスダインを、i.c.m.注射された。注射の15~30分に、ビスダインを、未損傷の頭蓋骨に対して適用する非熱689nmレーザーを使用して、変換した。標的化群において、レーザーは、髄膜リンパ管の上部に局在化する5つの異なるスポットに向けた。非標的化群において、レーザーは、髄膜リンパ管内に局在化したビスダインを変換しないように、更に離れた方に向けた。

20

【0165】

標的化及び非標的化されたビスダイン処置マウスのdCLNの1mm²あたりの外因的に注射されたT細胞の密度を定量化した(図49A)(対照条件の百分率として表す)(平均±s.e.m、n=4~6マウス/群、**p=0.0072、スチューデントのt検定)。鼻リンパ管の画像(Prox1GFP:緑色、Lyve1:赤色)を、レーザー又はビスダインの経鼻(i.n.)注射の24時間後に得た。挿入図は、ビスダイン処置後にアブレーションされた頭蓋底のリンパ管束を示す。スケールバー=50μm。レーザー、ビスダイン(i.n.)+レーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置されたマウスのdLCNにおいて、dCLNの1mm²あたりのT細胞の密度を定量化し(図49B)、又はビーズの被覆度の百分率を定量化した(図49C)(対照条件の百分率として表す)(平均±s.e.m、n=5~9マウス/群(T細胞)、*p=0.0103(T細胞)、n=7~9マウス/群(ビーズ)、**p=0.0055(レーザー対ビスダイン(i.c.m.)+レーザー)、***p=0.0007(ビスダイン(i.n.)+レーザー対ビスダイン(i.c.m.)+レーザー)、チューキーの多重比較検定を伴う片側ANOVA)。アブレーションの7日後での、レーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザー処置されたマウスの髄膜中のT細胞を定量化した。レーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザー処置されたマウスの髄膜中のT細胞を定量化した(図49D)(平均±s.e.m、独立した2つの実験からプールされたn=8マウス/群、*p=0.0360、対応のないt検定)。

30

【0166】

これらの実験は、T細胞の遊走が、本明細書におけるいくつかの実施形態による髄膜リンパ管のアブレーションによって阻害されることを示す。

40

【0167】

(実施例26)

髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如

成熟C57Bl6メスは、200μgのMOG_{35~55}+CFAを、200μlの百日咳毒素と一緒に(PTXの注射を1日目に繰り返す)、s.c.注射した。髄膜を、免疫後の指示された時点で、回収した。無処置マウス、CFA免疫化マウス及びMOG免疫化マウスの上矢状静脈洞(図50A)及び横静脈洞(図50B)の髄膜リンパ管の直径の定量化を、免疫後の異なる時点で、行った(平均±s.e.m、独立した2つの実験からプールされたn=4~8マウス/群)。無処置マウス、CFA免疫化マ

50

ウス及びMOG免疫化マウスの上矢状静脈洞(図50C)及び横静脈洞(図50D)の総リンパ管の長さの定量化を、免疫後の異なる時点で、行った(平均±s.e.m、n=3~5マウス/群)。CFA免疫化マウス及びMOG免疫化マウスの上矢状静脈洞の髄膜リンパ管(Lyve1)中及びその周辺のT細胞(CD3e)の画像を、免疫化の13日後に、得た。無処置マウス、CFA免疫化マウス及びMOG免疫化マウスの上矢状静脈洞及び横静脈洞のT細胞の密度を、免疫後の異なる時点で、定量化した(図50E)(平均±s.e.m、1群あたりn=2~5マウス、****p<0.001(CFA対MOG、SSS)、*p=0.0113(CFA対MOG、TS)、両側ANOVA)。上矢状静脈洞の髄膜リンパ管の外側及び内側のT細胞の密度を、免疫後の異なる時点で、定量化した(非リンパ性T細胞を図50Gに示し;リンパ性T細胞を図50Fに示す)(平均±s.e.m、n=2~5マウス/群、***p=0.003(CFA対MOG、リンパ管の外側)、**p=0.0092(MOG D5対MOG D13)、*p=0.0162(MOG D8対MOG D13)、チューキーの多重比較検定を伴う両側ANOVA)。無処置マウス及びMOG免疫化マウス(D21)は、蛍光マイクロ粒子(直径0.5µm)を、i.c.m.注射された。注射の2時間後、リンパ節を、回収及び分析した。無処置マウス及び病的MOG免疫化マウス(D21)のdCLN中のビーズ被覆度の百分率の定量化(対照条件の百分率として表す)(図50I)(平均±s.e.m、n=4~5マウス/群、*p=0.0125、対応のないt検定)。これらの実験は、髄膜リンパ管内皮細胞の炎症誘発性のリンパ管形成の欠如を示す。

【0168】

(実施例27)

リンパ管ドレナージのアブレーションは、深頸リンパ節におけるMOG特異的T細胞活性化を改善して、疾患の発症を改善させる

EAEの臨床症状の発生を、レーザー、ビスダイン(i.n.)+レーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置されたマウスにおいて(平均±s.e.m、独立した3つの実験からプールされたn=12~41マウス/群、****p<0.0001、チューキーの多重比較検定を伴う、反復測定の両側ANOVA)、図51Aに示す。レーザー、ビスダイン(i.n.)+レーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置されたマウスにおける、EAE発生(マウスが1又はそれを超えるスコアに達した日)の発生率(独立した3つの実験からプールされたn=12~41マウス/群、***p<0.0001、ログランク(モンテ-コックス)試験)を図51Bに示す。EAEの後期発症の間のレーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーのマウスの脊髄中のCD4 T細胞及びCD8 T細胞の代表的なドットプロットを、図51Cに示す。免疫の17日後での、レーザー及びビスダイン(i.c.m.)+レーザーで処置されたマウスの脊髄中のCD4 T細胞の数の定量化(平均±s.e.m、1群あたり、n=4/5マウス、独立した2つの実験の代表、**p=0.005、対応のないt検定)を図51Dに示す。これらの実験は、本明細書におけるいくつかの実施形態による髄膜リンパ管のアブレーションが、深頸リンパ節におけるMOG特異的T細胞の活性化を改善し、疾患の発生を更に改善することを示す。したがって、本明細書におけるいくつかの実施形態によるリンパ管のアブレーションが、EAE(MOG)がモデルであるMSの症状及び疾患の発生を改善することができることを意図する。

【0169】

いくつかの実施形態において、本方法、使用又は組成物は、(複数の工程又は特性とは対照的に)単一の工程又は特性として存在する、様々な工程又は特性を含む。例えば、1つの実施形態において、本方法は、単回使用のための、流れ調節剤、又は流れ調節剤を含むか、若しくは実質的にこの流れ調節剤からなる組成物の単回投与を含む。流れ調節剤は、流れを増加させる(又は、免疫細胞の遊走を減少させる)ために有効な、単一用量単位で存在していてもよい。組成物又は使用は、本明細書に記載の、流れを増加させる(又は、免疫細胞の遊走を阻害する)ために有効な、流れ調節剤の単一用量単位を含んでいてもよい。複数の特性又は成分は、代替の実施形態において、提供される。いくつかの実施形態において、本方法、組成物又は使用は、流れの調節のための1つ又は複数の手段を含む。いくつかの実施形態において、この手段は、流れ調節剤を含む。

【0170】

様々な態様及び実施形態を、本明細書に開示したが、他の態様及び実施形態も、当業者には明らかであろう。本明細書に開示された様々な態様及び実施形態は、説明の目的のため

10

20

30

40

50

めであって、以下の特許請求の範囲に示される正確な範囲及び精神により、限定することを意図するものではない。本明細書に記載のそれぞれの方法について、本方法における使用のための関係する組成物は、明確に意図され、本方法における組成物の使用、及び適用可能な場合には、本方法における使用のための医薬を作製する方法も、明確に意図される。例えば、流れ調節剤を含む流れを増加させる方法について、対応する方法における使用のための流れ調節剤も意図され、同様に本方法による流れを増加させる流れ調節剤の使用も、流れを増加させる使用のための流れ調節剤を含む医薬を作製する方法も意図される。

【0171】

当業者には、本明細書に開示される、このプロセス及び方法、並びに他のプロセス及び方法について、異なる順序でのそのプロセス及び方法において行われる機能を実装することができることは明らかであろう。更にまた、要点が述べられた工程及び操作は、例としてのみ提供され、開示された実施形態の本質を損なうことなく、いくつかの工程及び操作は、任意選択であり得、より少ない工程及び操作へと組み合わせることができ、又は追加の工程及び操作に拡張することができる。

【0172】

本明細書における実質的にあらゆる複数形及び/又は単数形の用語の使用に関して、当業者は、文脈及び/又は応用に対して適切であるように、複数形から単数形に、及び/又は単数形から複数形に言い換えることができる。様々な単数形/複数形の置換は、明確性の目的のために、本明細書において明確に説明され得る。

【0173】

一般に、本明細書、特に添付の特許請求の範囲(例えば、添付の特許請求項の範囲のボディ)で使用される用語が、一般に「オープン」な用語として意図されることは、当業者によって理解されるだろう(例えば、「含む(including)」という用語は「含むが、それらに限定されない(including but not limited to)」として解釈されるべきであり、「有する(having)」という用語は「少なくとも、有する(having at least)」として解釈されるべきであり、「含む(includes)」という用語は「含むが、それらに限定されない(include s but is not limited to)」として解釈されるべきである等)。当業者には、導入された特許請求の範囲の特定の数の記述が意図される場合、そのような意図は、特許請求の範囲において明示的に記述されるだろうし、そのような記述がない場合には、そのような意図は何ら存在しないことが、更に理解されるであろう。例えば、理解の補助として、以下に添付された特許請求の範囲は、特許請求の範囲の記述を導入するために、「少なくとも1つ(at least one)」及び「1つ又は複数(one or more)」の導入句の使用を含んでいてもよい。しかしながら、このような語句の使用は、同じ特許請求の範囲が「1つ又は複数(one or more)」又は、「少なくとも1つ(at least one)」の導入句、及び「a」若しくは「an」等の不定冠詞を含む場合でさえ、「a」若しくは「an」の不定冠詞による特許請求の範囲の記述の導入が、このように導入された特許請求の範囲の記述を含む、あらゆる特定の特許請求の範囲を、1つのこのような記述のみを含む実施形態に限定するという意味を含むように解釈されるべきではない(例えば、「a」及び/又は「an」は、「少なくとも1つ(at least one)」又は「1つ又は複数(one or more)」を意味するとして解釈されるべきである)。特許請求の範囲の記述を導入するために使用される定冠詞の使用についても同様に当てはまる。加えて、導入された特許請求の範囲の記述の特定の数が明示的に記述される場合であっても、当業者は、そのような記述が、少なくとも記述された数を意味するように解釈されるべきであることを認識するだろう(例えば、「2つの記述」のそのままの記述は、他の修飾がない場合には、少なくとも2つの記述、又は2又はそれ以上の記述を意味する)。更にまた、「A、B及びC等の少なくとも1つ(at least one of A, B, and C, etc.)」に類似した規則が使用されるこれらの場合において、一般に、このような解釈は、当業者がこの規則を理解するであろう意味において意図させる(例えば、「A、B及びCの少なくとも1つを有するシステム」は、A単独、B単独、C単独、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、並びに/又はA、B及びCと一緒に等を、有するシステムを含むが、これらに限定されないだろう)。「A、B又はC等の少なくとも1つ」に類似した規則が使用され

10

20

30

40

50

るこれらの場合において、一般に、このような解釈は、当業者がこの規則を理解するであろう意味において意図させる(例えば、「A、B又はCの少なくとも1つを有するシステム」は、A単独、B単独、C単独、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、並びに/又はA、B及びCと一緒に等を、有するシステムを含むが、これらに限定されないだろう)。当業者には、2つ以上の代替の用語を提示する、実質的にあらゆる離接的な語及び/又は句は、明細書、特許請求の範囲又は図面においてであっても、この用語の1つ、この用語のいずれか、又はその両方の用語を含む可能性を意図することが理解されるべきであることが、更に理解されるだろう。例えば、「A又はB (A or B)」という語句は、「A」、「B」又は「A及びB (A and B)」の可能性を含むことが理解されるだろう。

【0174】

10

加えて、本開示の特性又は態様が、マーカッシュ群の観点で記載される場合、当業者は、この開示はまた、それによって、このマーカッシュ群の任意の個々のメンバー又は下位群のメンバーの観点で記載されることを、理解するだろう。

【0175】

当業者によって理解されるように、明細書を提供する観点等の、任意の及び全ての目的のために、本明細書において開示される全ての範囲はまた、任意の及び全ての可能な部分的な範囲並びにその部分的な範囲の組み合わせを包含する。任意に列挙される範囲は、同じ範囲が、少なくとも半等分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1等に分解されることを、十分に記載し、かつ可能にするものとして、容易に理解することができる。非限定的な例として、本明細書において議論されるそれぞれの範囲は、下3分の1、中3分の1、上3分の1等へと容易に分解することができる。また当業者によって理解されるように、「～まで (up to)」、「少なくとも (at least)」等の全ての言語は、記述される数を含み、その後、上記で議論するように部分的な範囲へと分解することができる範囲を指す。例えば、「約5」は、5という数字を含まなければならない。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は、それぞれの個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1～3個の細胞を有する群は、1、2又は3個の細胞を有する群を指す。同様に、1～5個の細胞を有する群は、1、2、3、4又は5個の細胞を有する群等を指す。

20

【0176】

前述から、本開示の様々な実施形態が、説明を目的として本明細書に記載され、様々な変形を、本開示の範囲及び精神から逸脱することなく、行い得ることが、明らかであろう。したがって、本明細書に開示された様々な実施形態は、限定することを意図するものではなく、真の範囲及び精神は、以下の特許請求の範囲に示される。

30

【図 1 A】

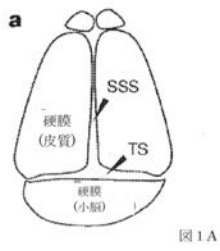


図 1A

【図 1 B】

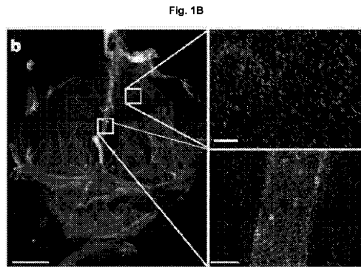


Fig. 1B

【図 1 C】



図 1C

【図 1 D】

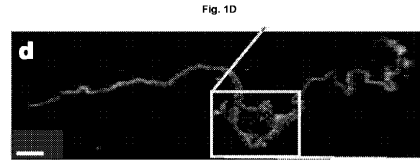


Fig. 1D

【図 1 E】

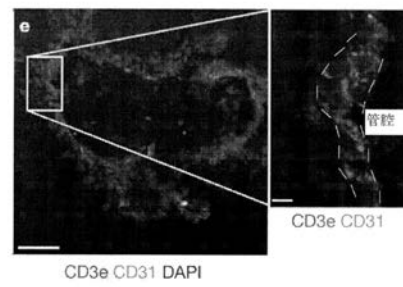


図 1E

【図 1 F】

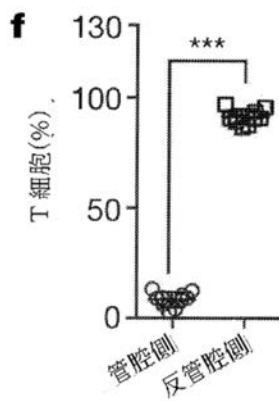


図 1F

【図 1 H】

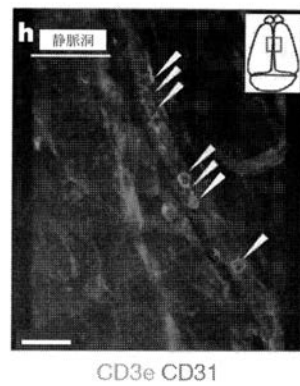


図 1H

【図 1 G】

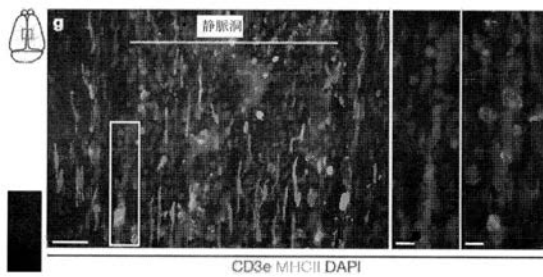


図 1G

【図 1 I】

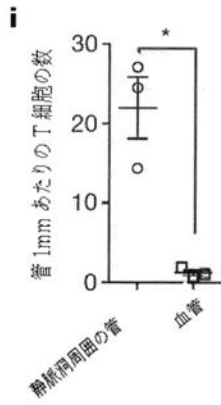
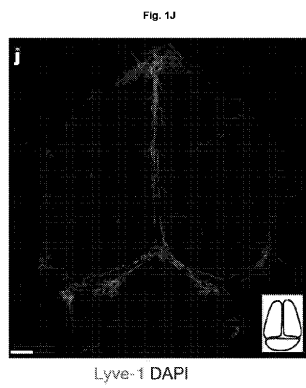


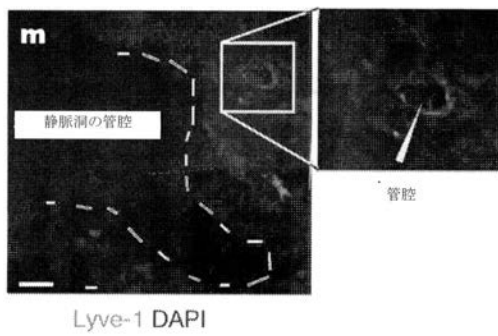
図1I

【図 1 J】



Lyve-1 DAPI

【図 1 M】



Lyve-1 DAPI

図1M

【図 2 A】

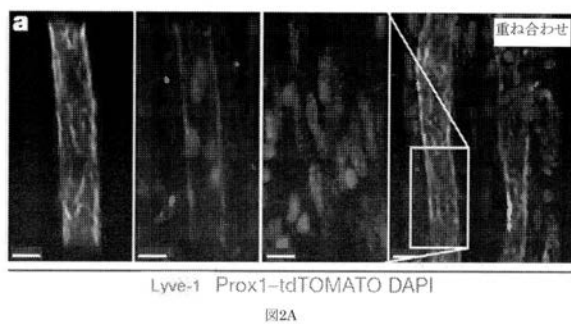
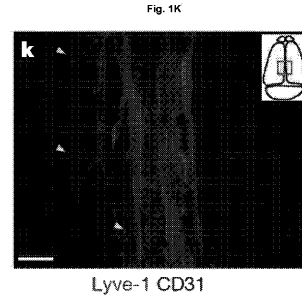


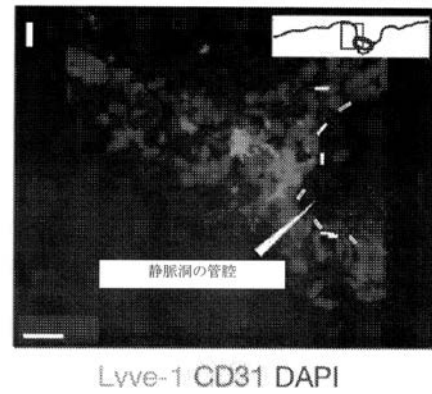
図2A

【図 1 K】



Lyve-1 CD31

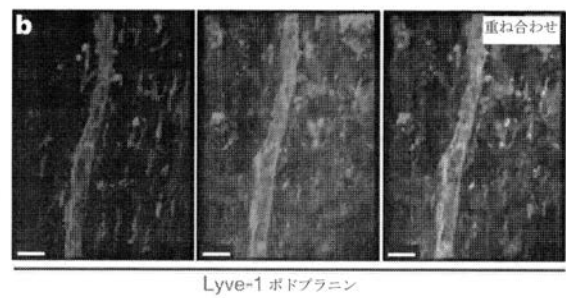
【図 1 L】



Lyve-1 CD31 DAPI

図1L

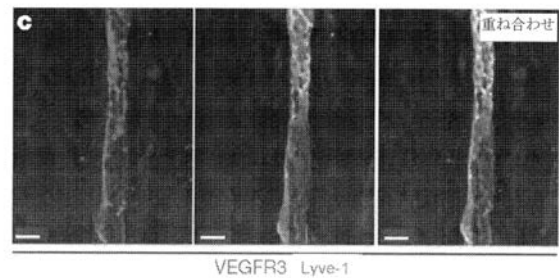
【図 2 B】



Lyve-1 ポドプラン

図2B

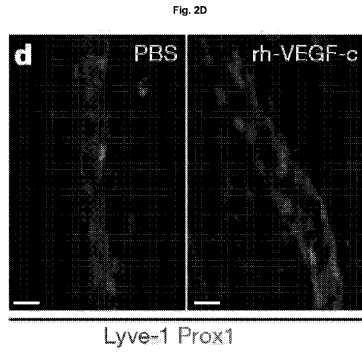
【図 2 C】



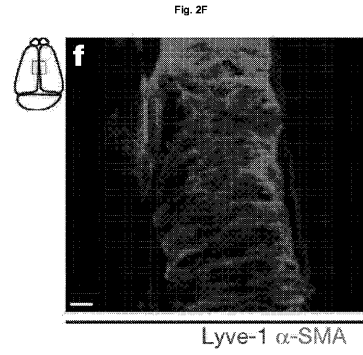
VEGFR3 Lyve-1

図2C

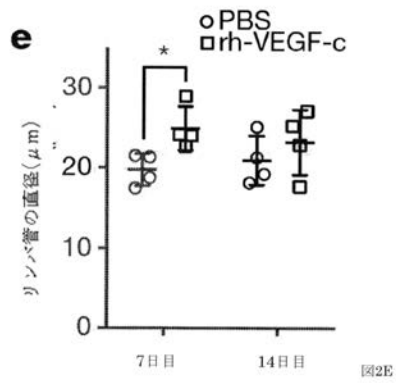
【図 2 D】



【図 2 F】



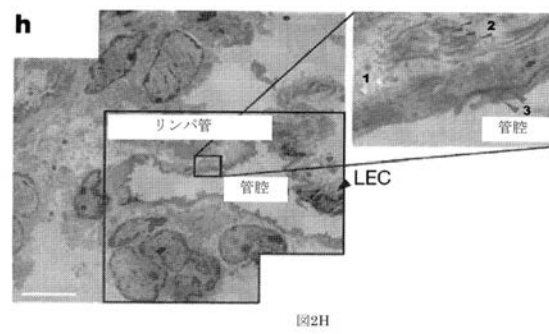
【図 2 E】



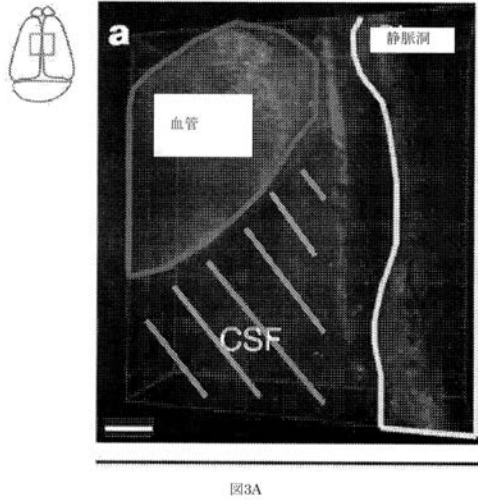
【図 2 G】



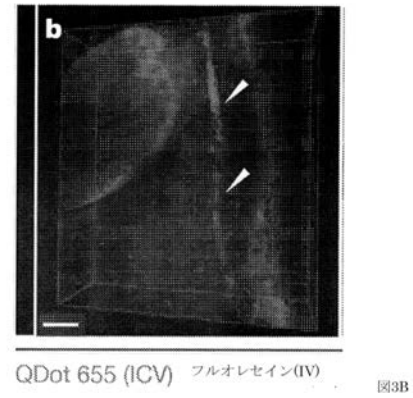
【図 2 H】



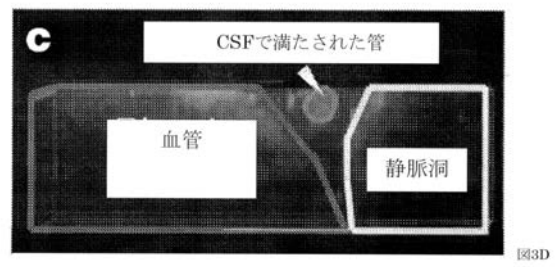
【図 3 A】



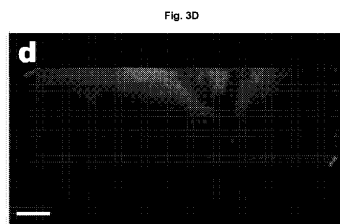
【図 3 B】



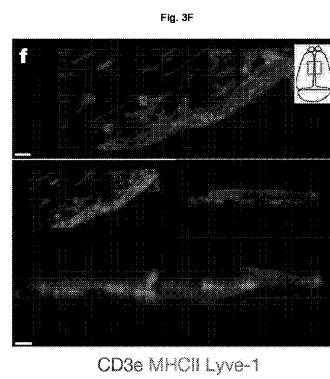
【図 3 C】



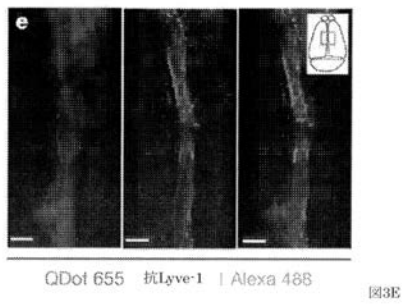
【図 3 D】



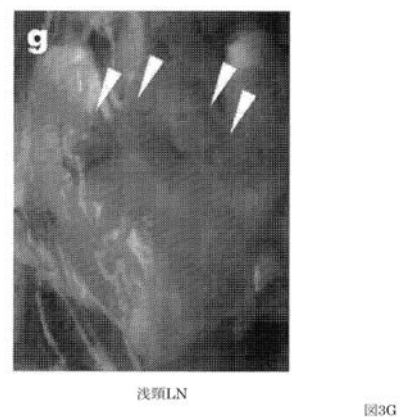
【図 3 F】



【図 3 E】



【図 3 G】



【図 3 H】

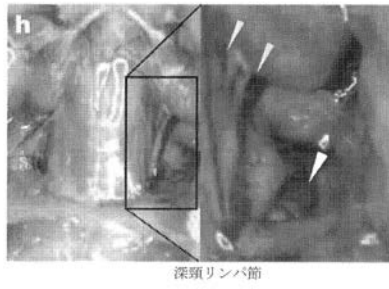


図3H

【図 3 J】

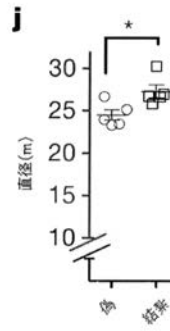


図3J

【図 3 I】

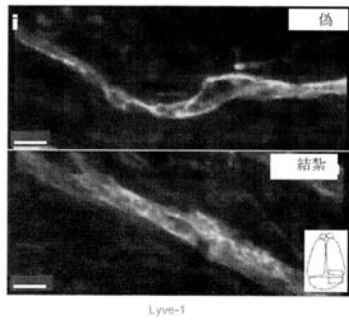
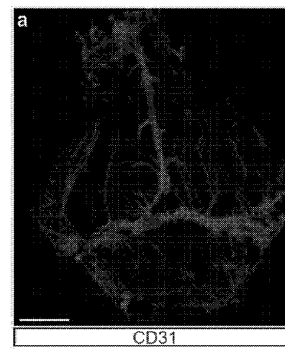


図3I

【図 4 A】

Fig. 4A



【図 4 B】

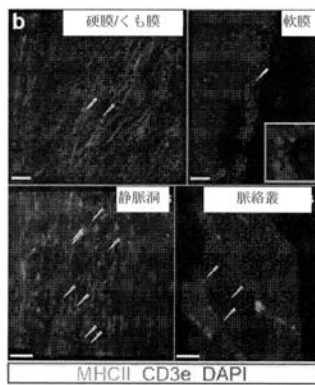


図4B

【図 4 D】

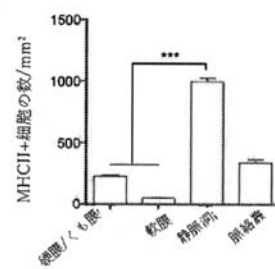


図4D

【図 4 C】

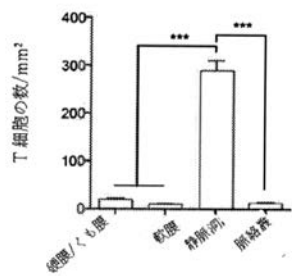
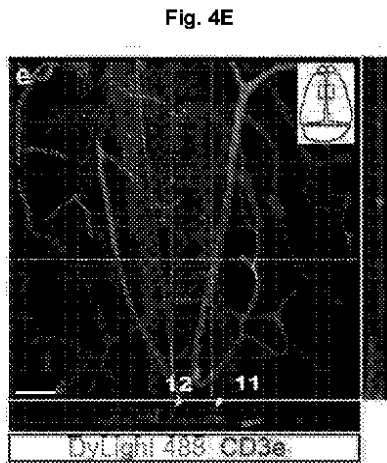
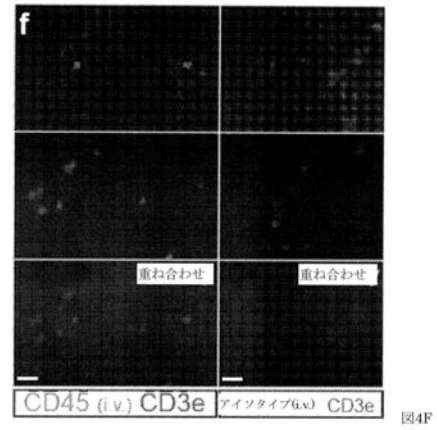


図4C

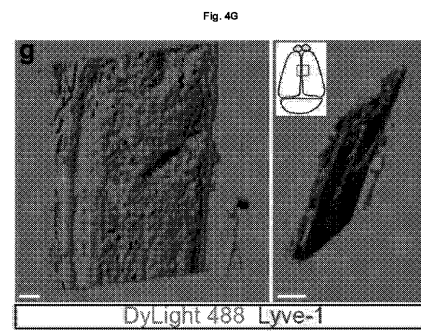
【図 4 E】



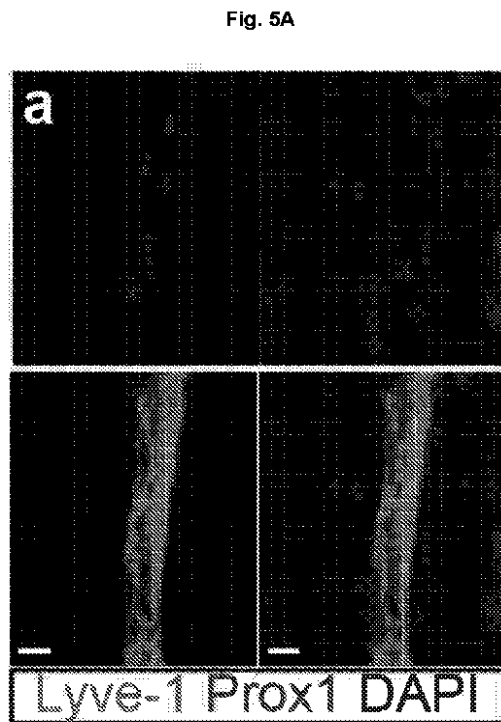
【図 4 F】



【図 4 G】



【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】

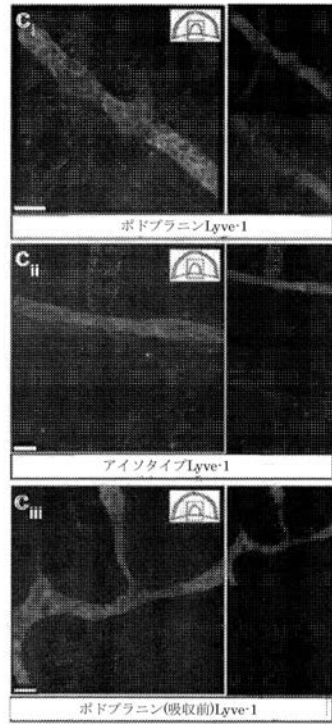


図5C

【図 5 D】

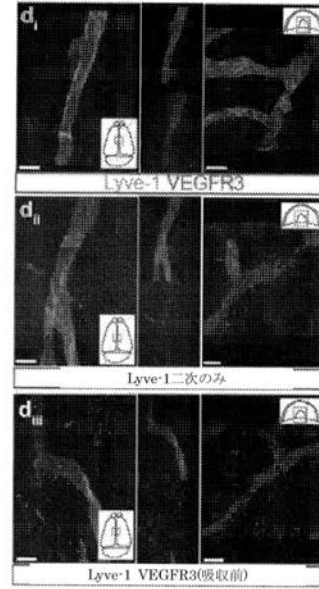


図5D

【図 5 E】

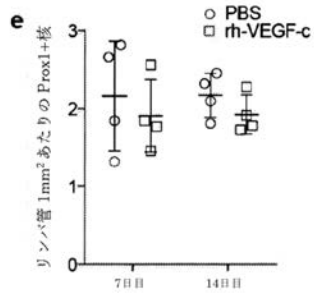


図5E

【図 6】

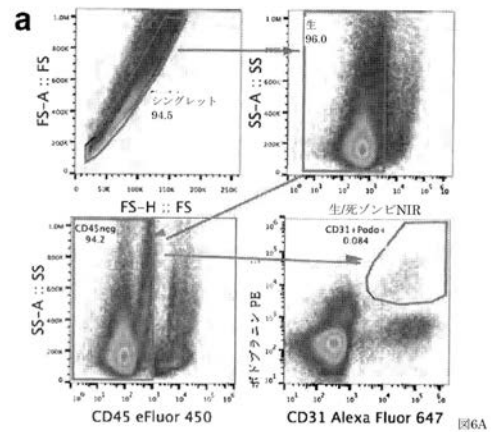


図6A

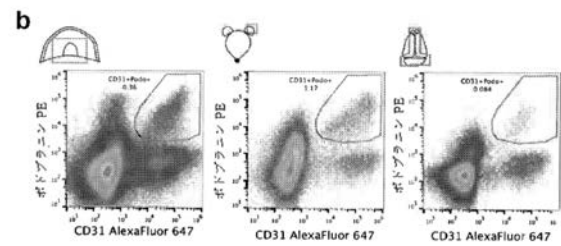
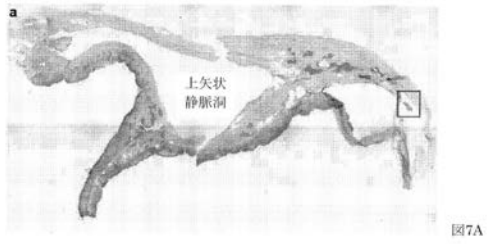
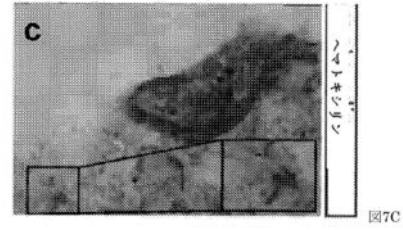


図6B

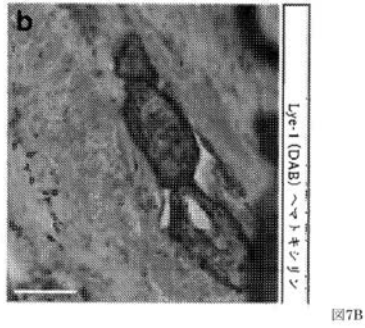
【図 7 A】



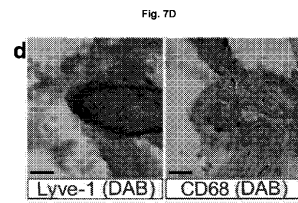
【図 7 C】



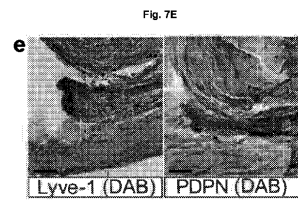
【図 7 B】



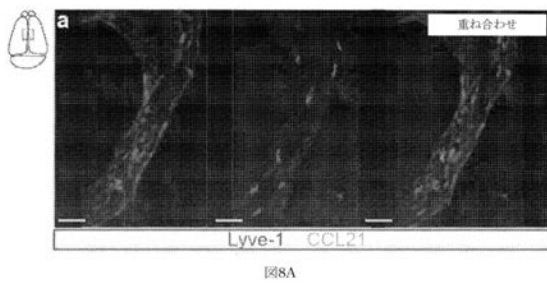
【図 7 D】



【図 7 E】



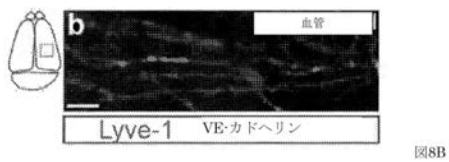
【図 8 A】



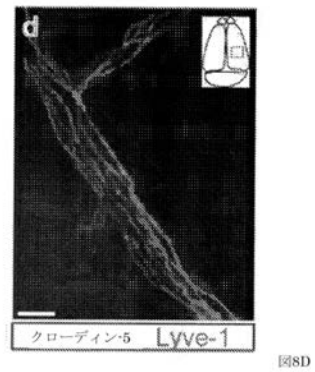
【図 8 C】



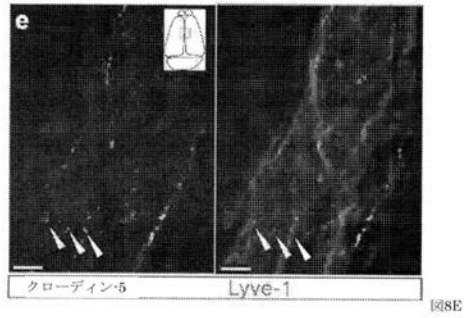
【図 8 B】



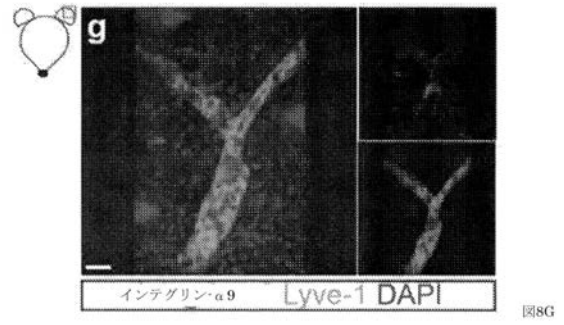
【図 8 D】



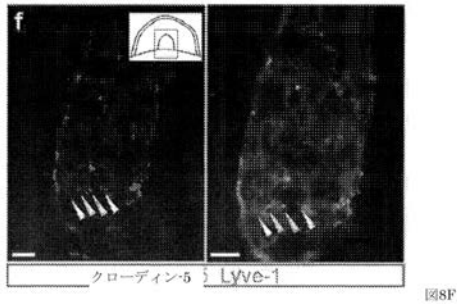
【図 8 E】



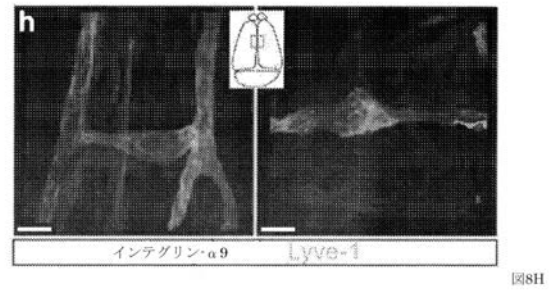
【図 8 G】



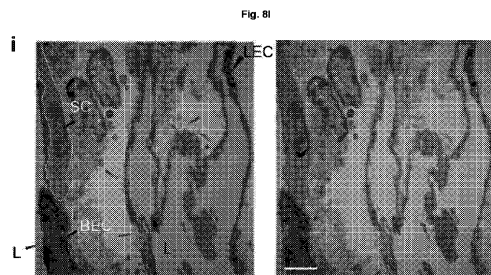
【図 8 F】



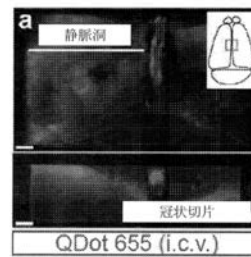
【図 8 H】



【図 8 I】



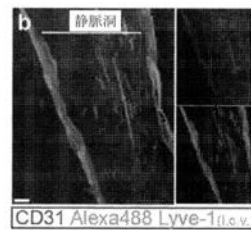
【図 9】



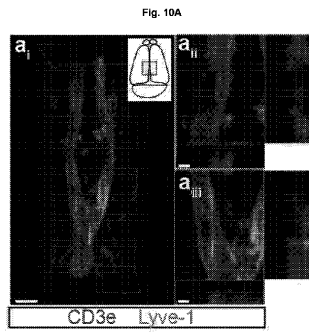
【図 8 J】

	直径	分枝
隔膜	32.75±1.052	3.24±0.2922
上矢状静脈洞	16.70±0.58***	0.41±0.097**
横静脈洞	23.76±1.771	1.08±0.241*

図8J

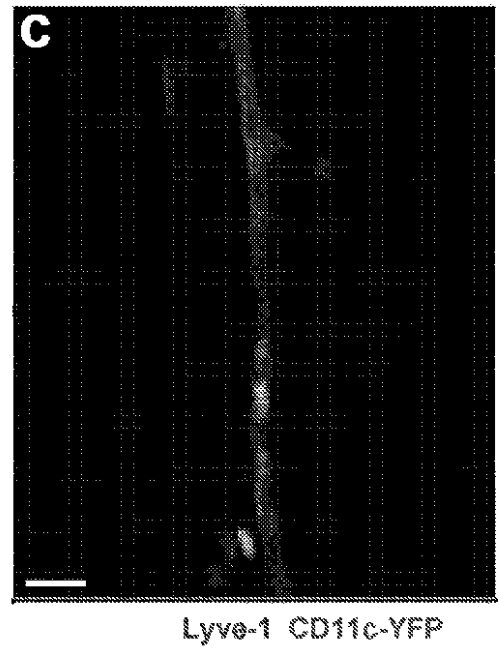


【図 10 A】



【図 10 C】

Fig. 10C



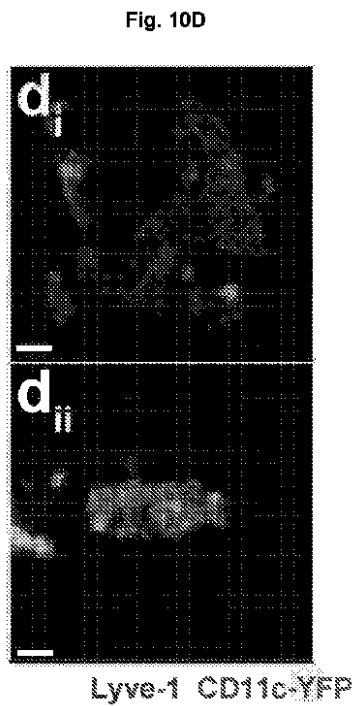
【図 10 B】

b

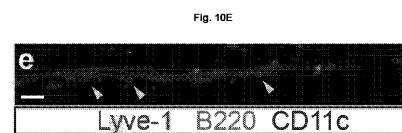
	リンパ (%)	N
T細胞	24.3±2.7	7
MHC II 細胞	12.5±0.89	8

図10B

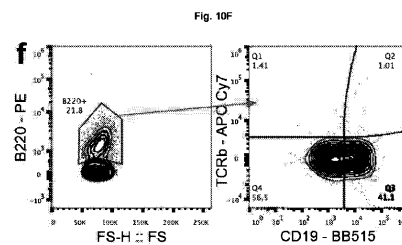
【図 10 D】



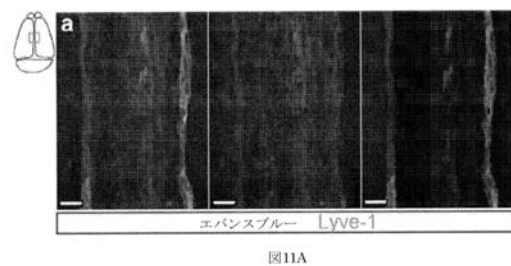
【図 10 E】



【図 10 F】



【図 11 A】



【図 1 1 B】

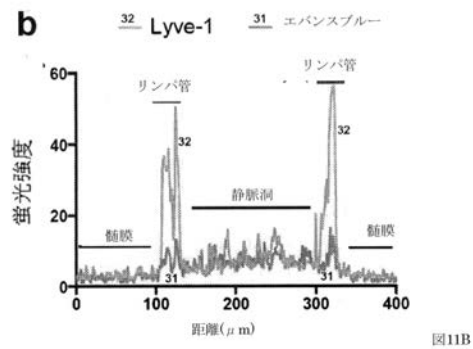


図11B

【図 1 1 D】

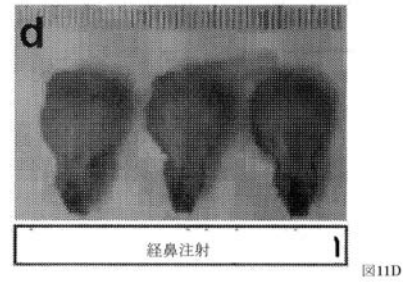


図11D

【図 1 1 C】

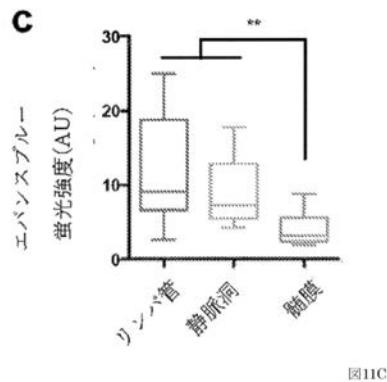


図11C

【図 1 1 E】

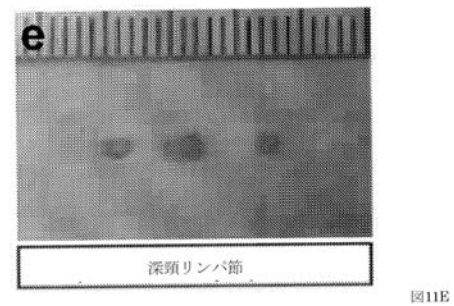


図11E

【図 1 2 A】

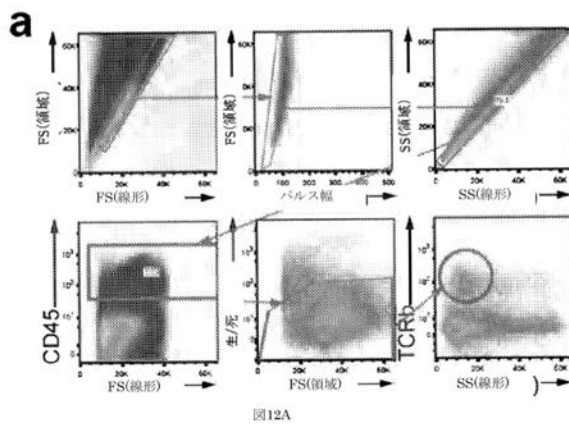


図12A

【図 1 2 C】

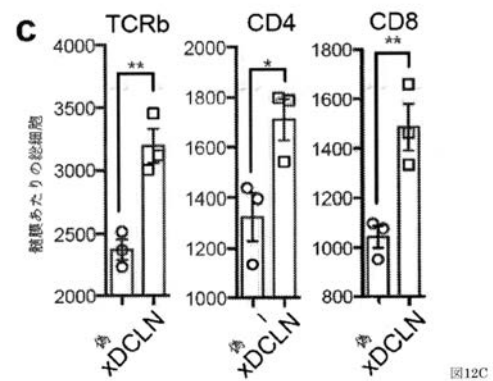


図12C

【図 1 2 B】

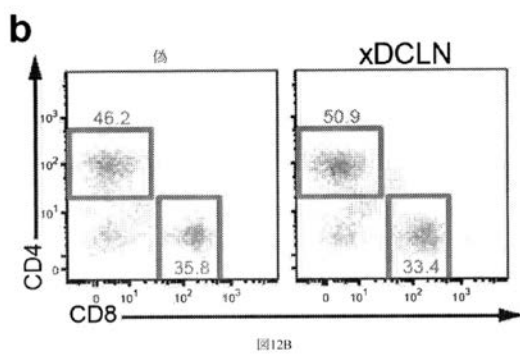


図12B

【図 1 2 D】

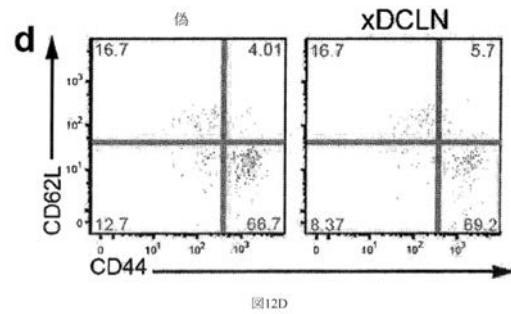


図12D

【図 1 2 E】

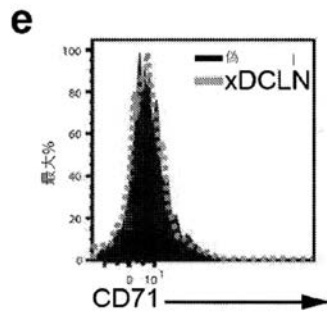


図12E

【図 1 2 G】

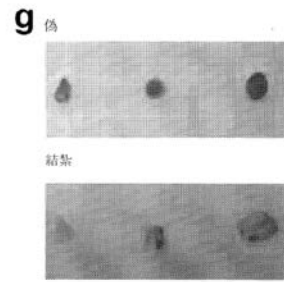


図12G

【図 1 2 F】

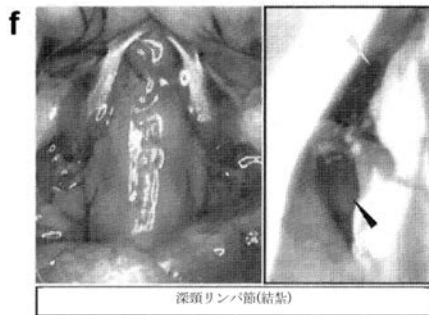


図12F

【図 1 2 H】

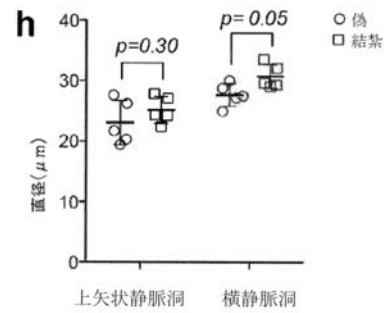


図12H

【図 1 3】

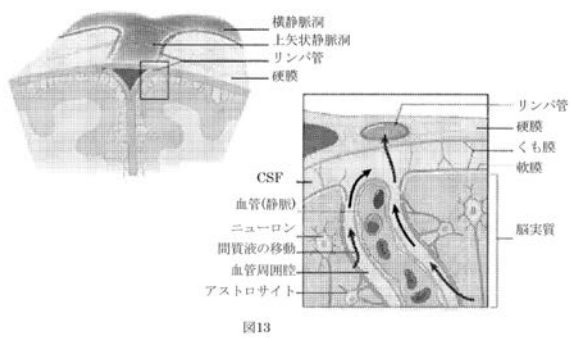


図13

【図 1 4 B】

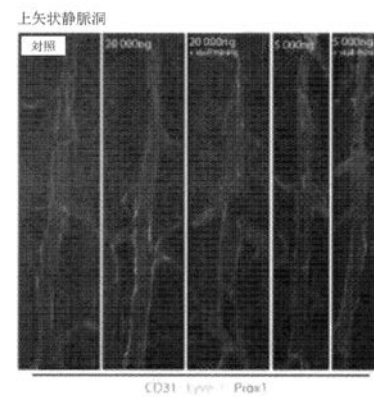
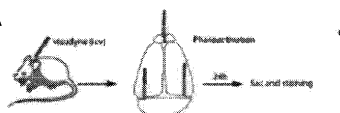


図14B

【図 1 4 A】

Fig. 14A



【図 14 C】

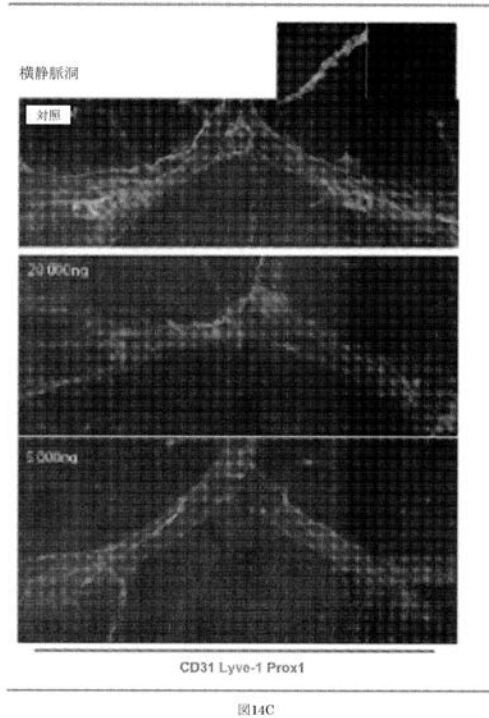


図14C

【図 15】

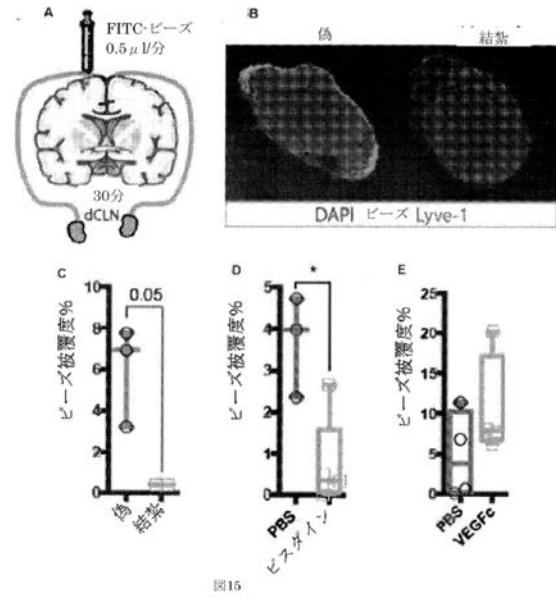
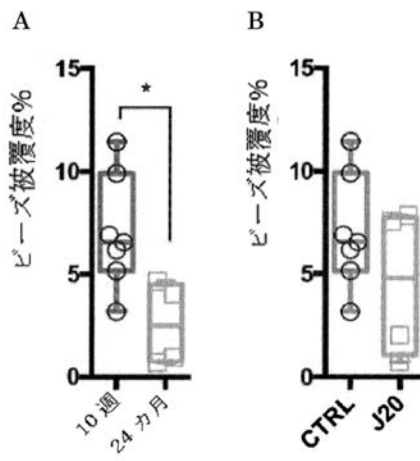


図15

【図 16】



【図 17 A】

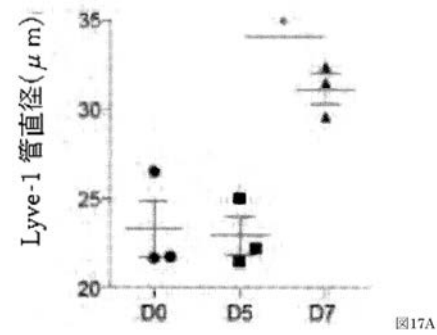


図17A

【図 17 B】

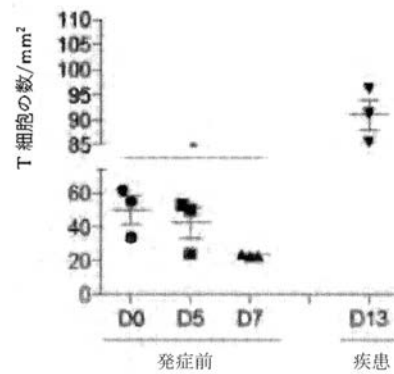


図17B

【図 17 C】

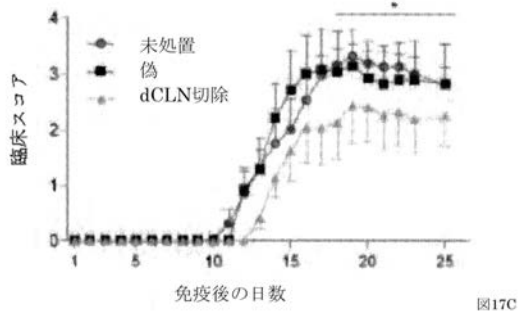


図17C

【図 17 D】

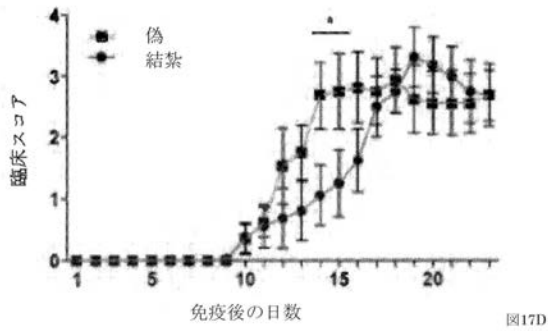


図17D

【図 18】

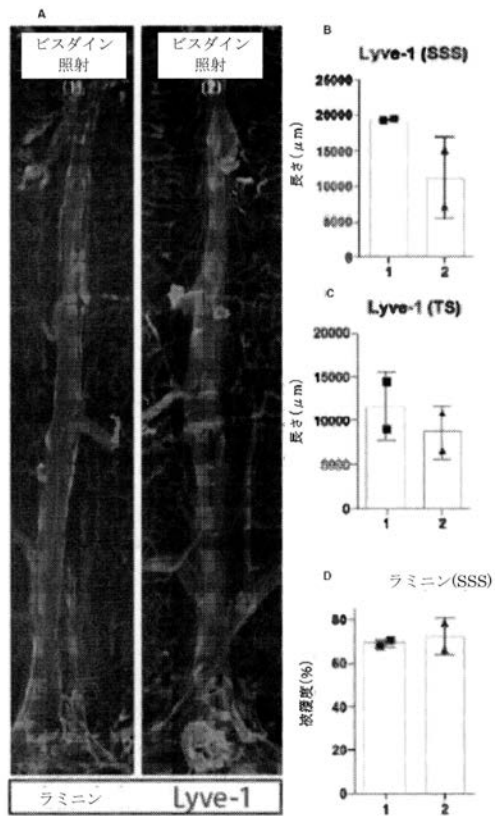


図18

【図 17 d - 1】

Fig. 17d_{II}

【図 19】

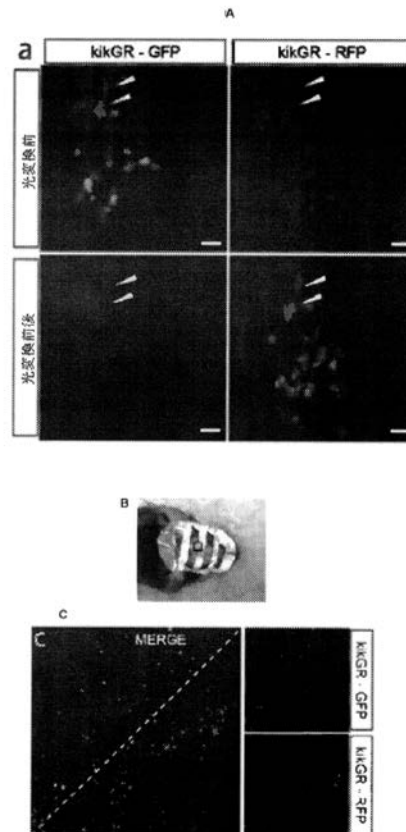
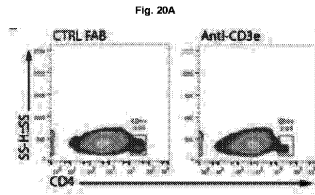
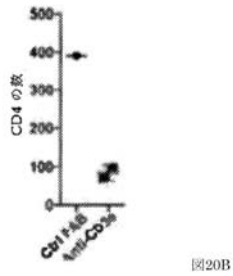


図19

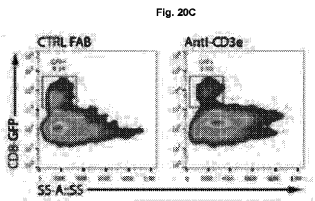
【図 20 A】



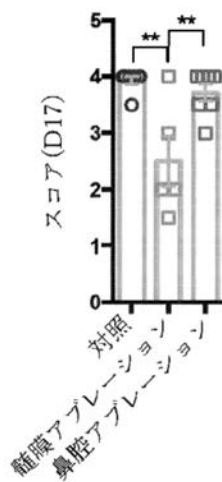
【図 20 B】



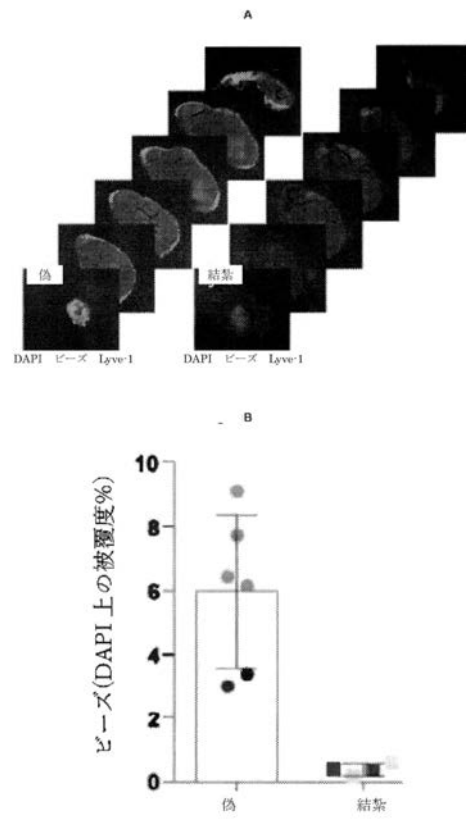
【図 20 C】



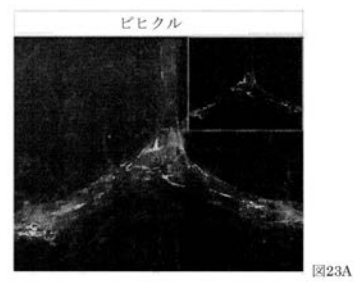
【図 22】



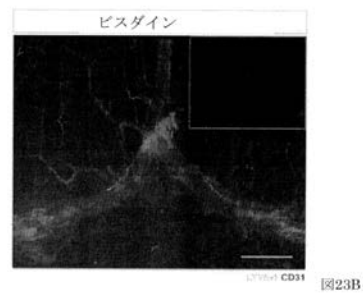
【図 21】



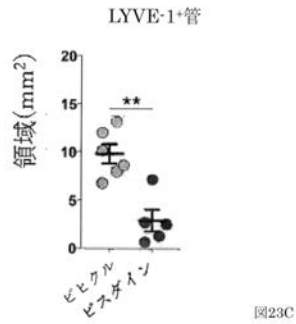
【図 23 A】



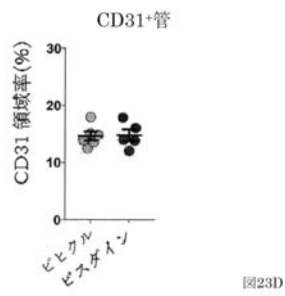
【図 23 B】



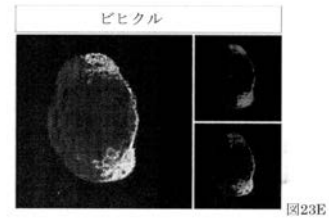
【図 2 3 C】



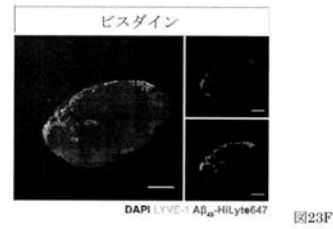
【図 2 3 D】



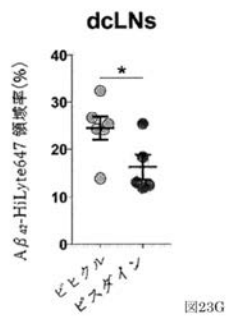
【図 2 3 E】



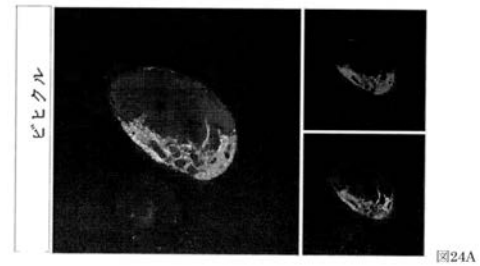
【図 2 3 F】



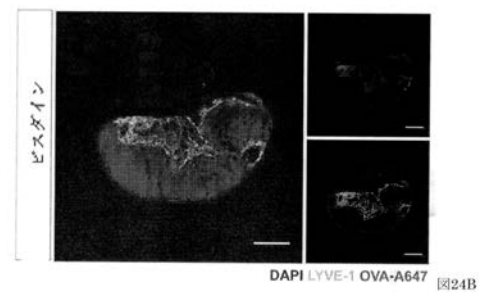
【図 2 3 G】



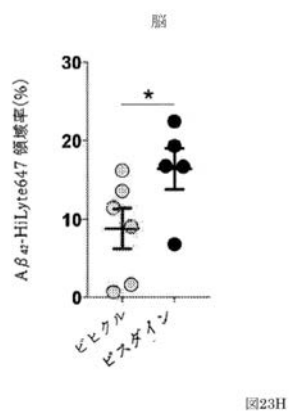
【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



【図 2 3 H】



【図 2 4 C】

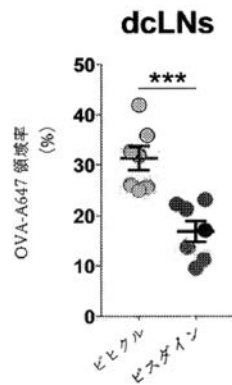


図24C

【図 2 4 E】

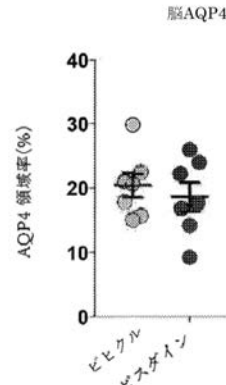


図24E

【図 2 4 D】

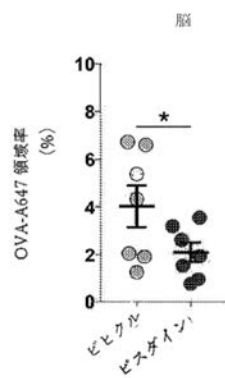


図24D

【図 2 5】

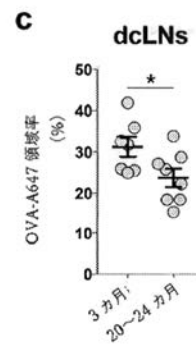


図25A

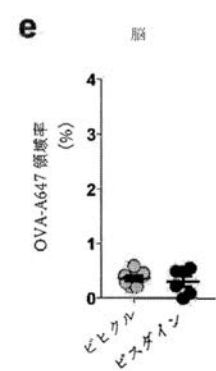


図25B

【図 2 6】

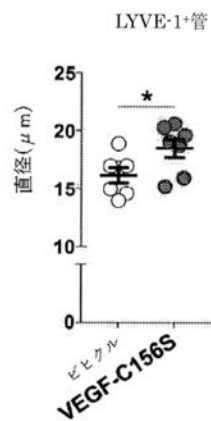
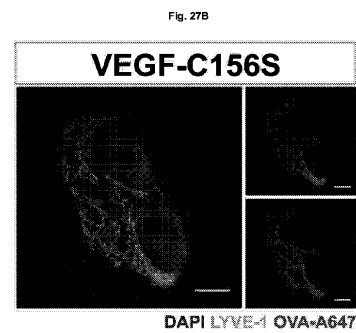


図26

【図 2 7 B】



【図 2 7 C】

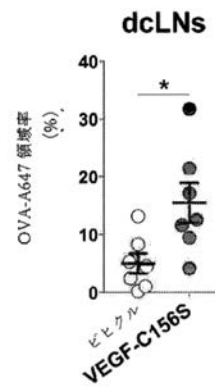


図27C

【図 2 7 A】

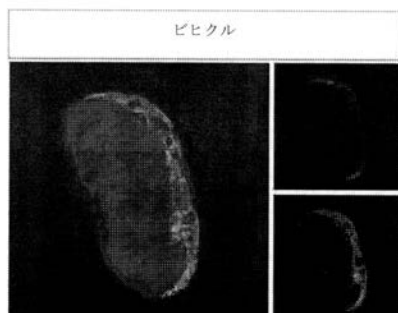
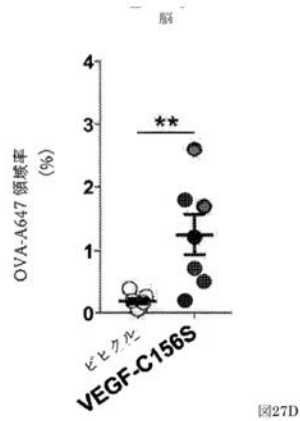
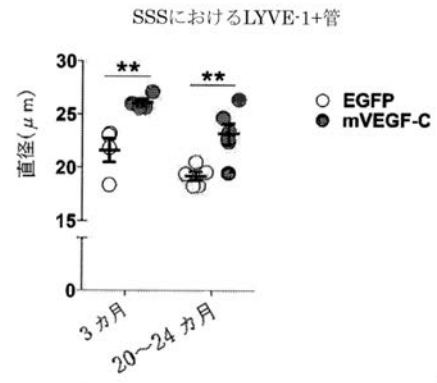


図27A

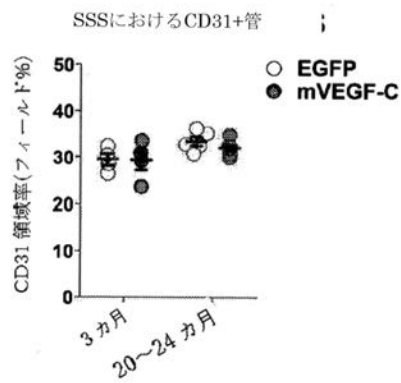
【図 27 D】



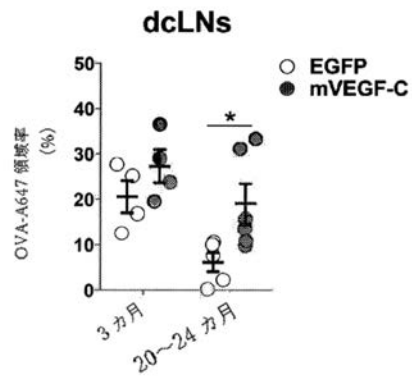
【図 28 A】



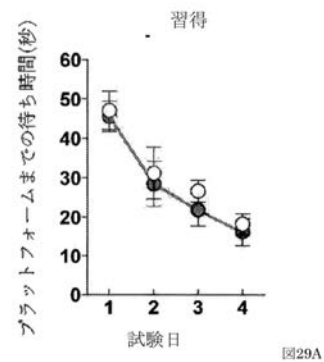
【図 28 B】



【図 28 C】



【図 29 A】



【図 29 B】

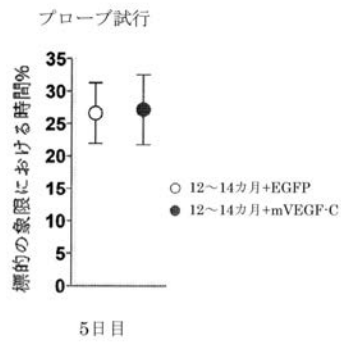


図29B

【図 29 D】

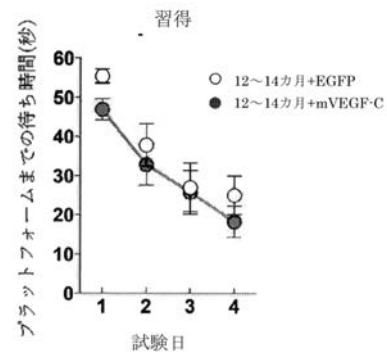


図29D

【図 29 C】

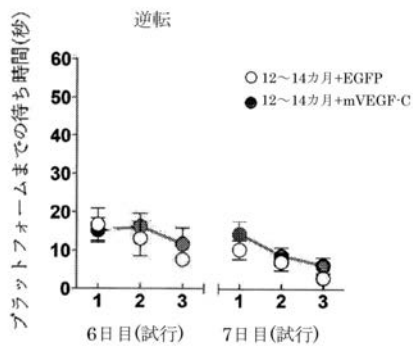


図29C

【図 29 E】

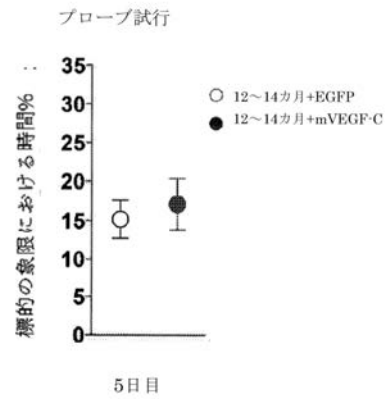


図29E

【図 29 F】

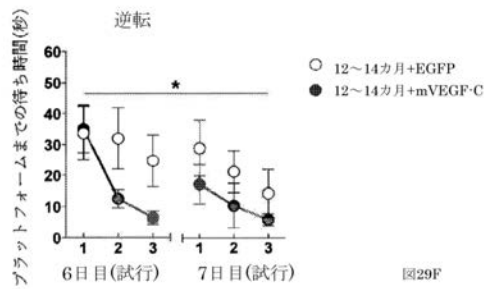


図29F

【図 30】

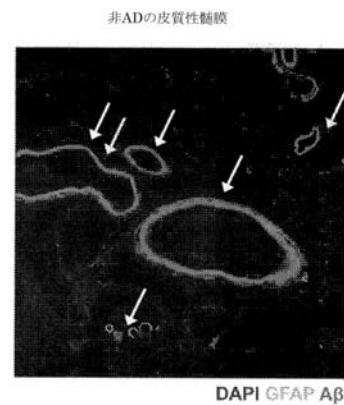


図30A

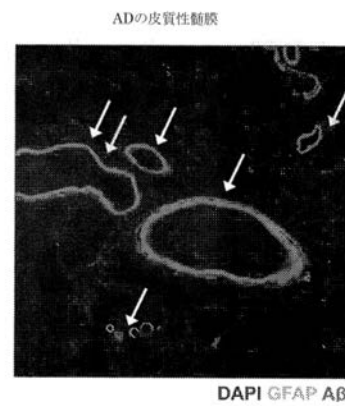
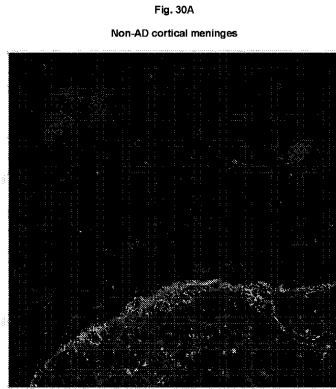


図30B



【図 3 1】

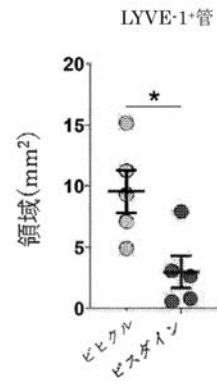


図31A

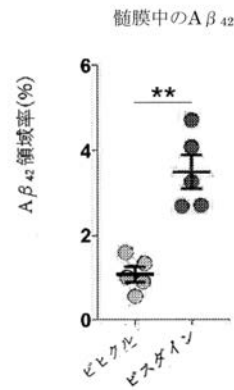


図31B

【図 3 2 A】

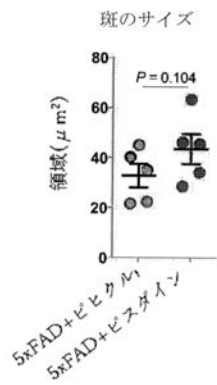


図32A

【図 3 2 C】

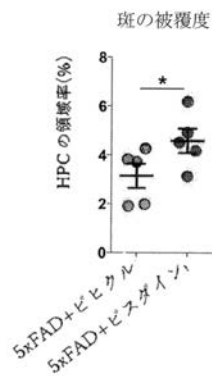


図32C

【図 3 2 B】

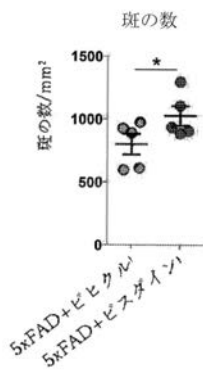


図32B

【図 3 3 A】

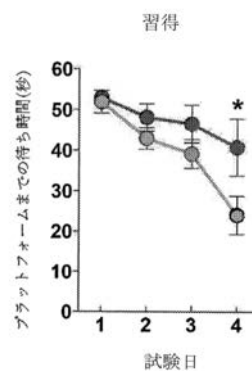


図33A

【図 3 3 B】

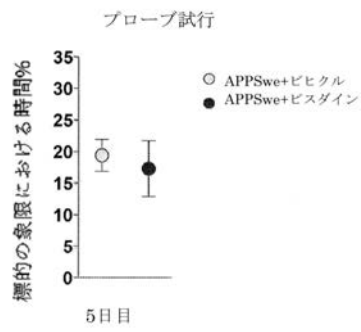


図33B

【図 3 4 A】

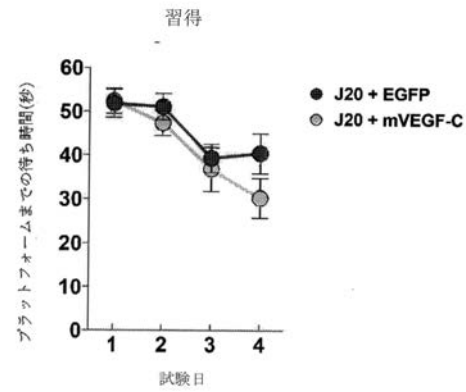


図34A

【図 3 3 C】

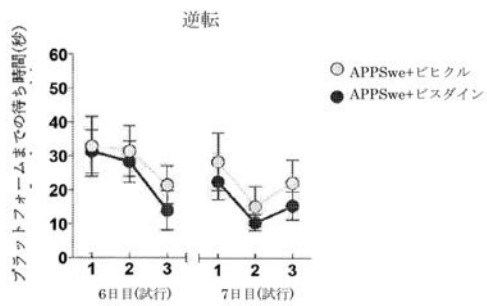


図33C

【図 3 4 B】

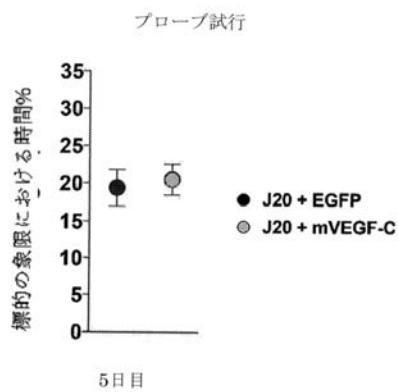


図34B

【図 3 5】

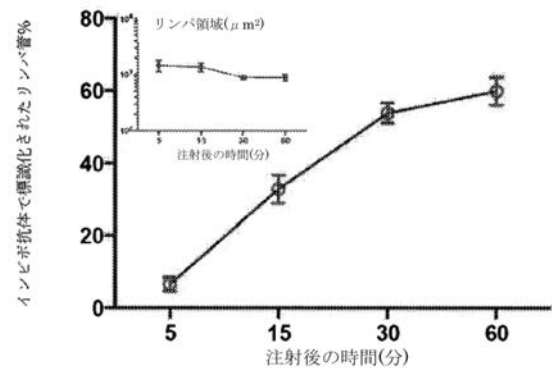


図35

【図 3 4 C】

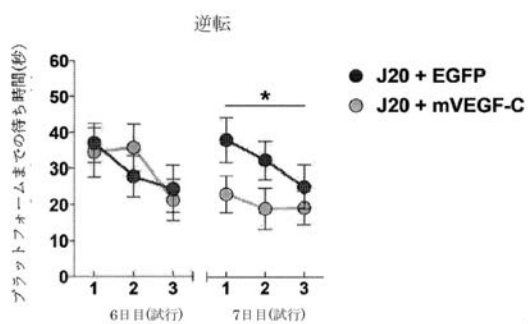


図34C

【図 3 6】

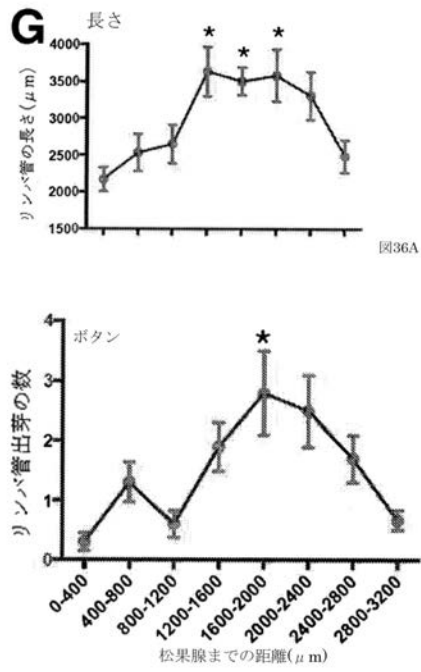
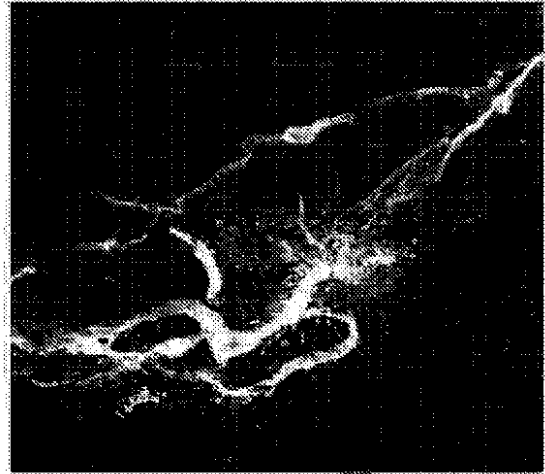


図36A

図36B

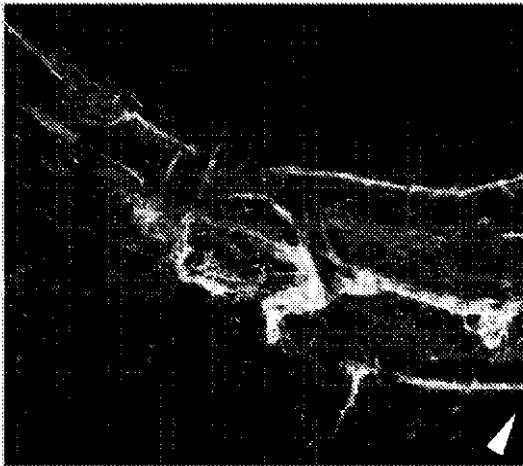
【図 3 7 A】

Fig. 37A



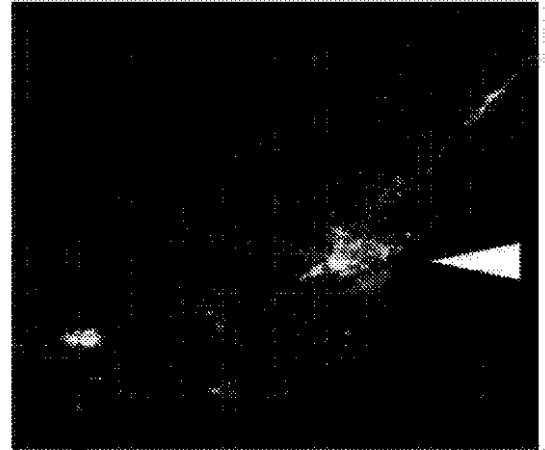
【図 3 7 B】

Fig. 37B



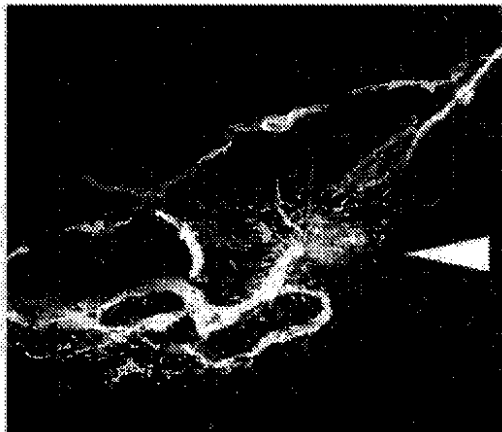
【図 3 7 C】

Fig. 37C



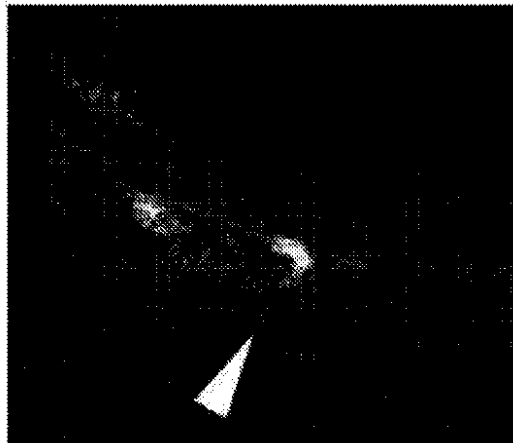
【図 3 7 D】

Fig. 37D



【図 3 7 E】

Fig. 37E



【図 3 7 F】

Fig. 37F



【図 3 8】

横静脈洞

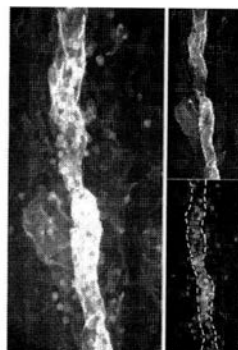


図38

【図 3 9】

横静脈洞



図39

【図 4 0】

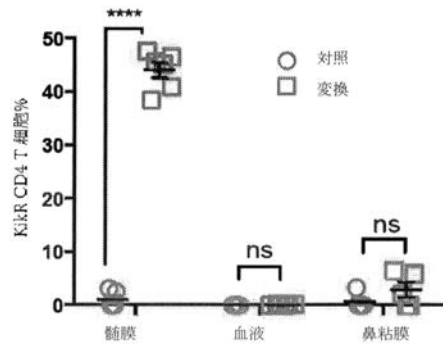


図40A

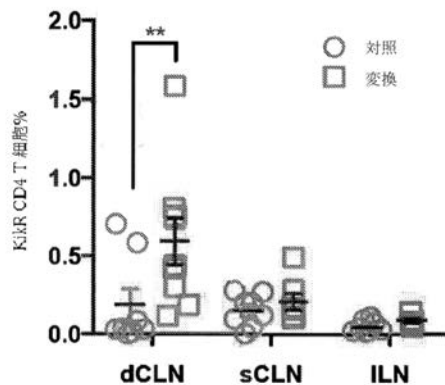


図40B

【図 4 1】

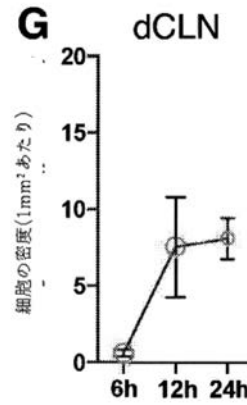


図41A

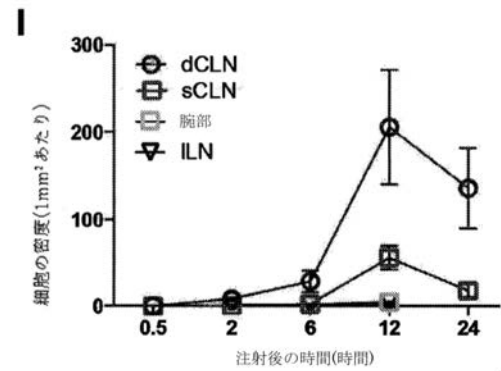


図41B

【図 4 2】

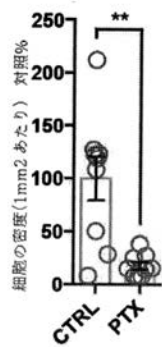


図42

【図 4 3 B】

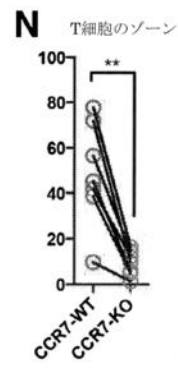


図43B

【図 4 3 A】

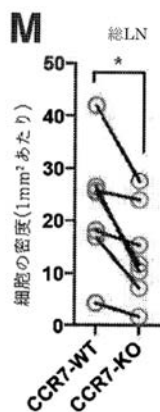
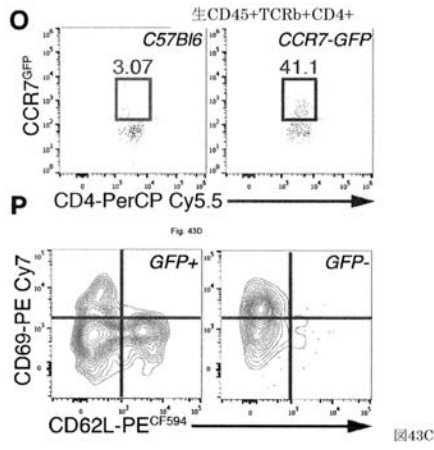
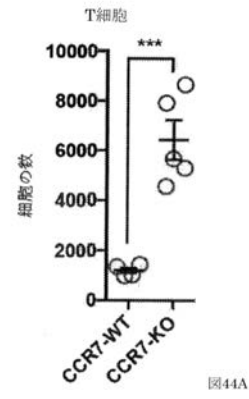


図43A

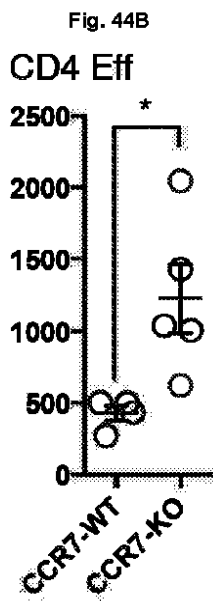
【図 4 3 C】



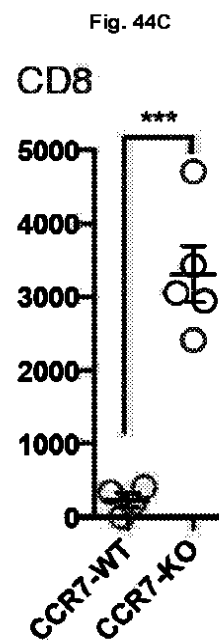
【図 4 4 A】



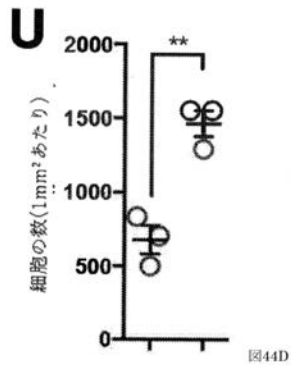
【図 4 4 B】



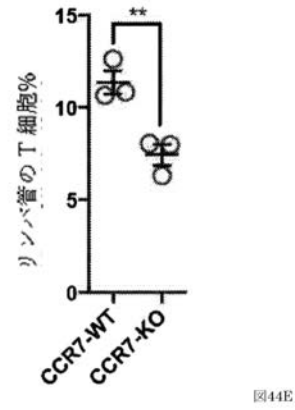
【図 4 4 C】



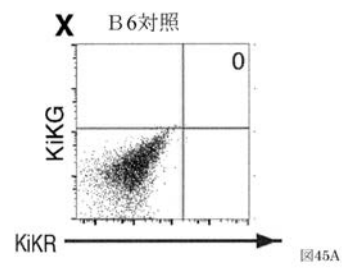
【図 4 4 D】



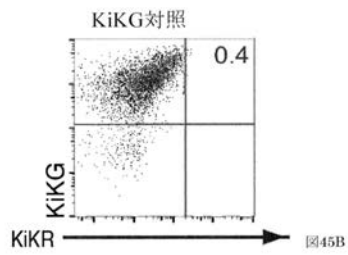
【図 4 4 E】



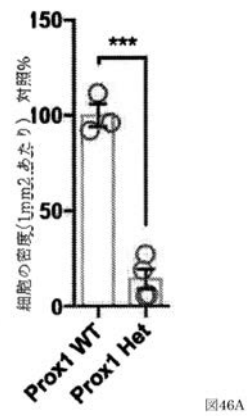
【図 4 5 A】



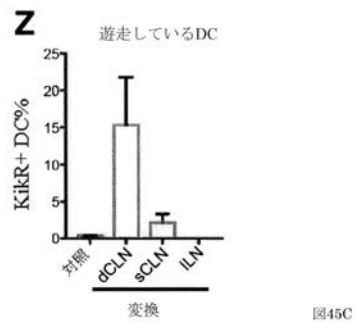
【図 4 5 B】



【図 4 6 A】



【図 4 5 C】



【図 4 6 B】

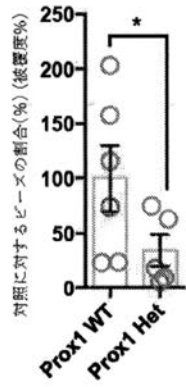


図46B

【図 4 6 C】

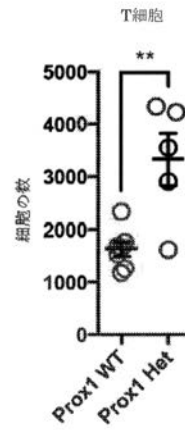


図46C

【図 4 6 D】

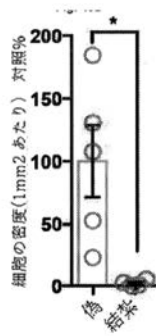


図46D

【図 4 6 F】

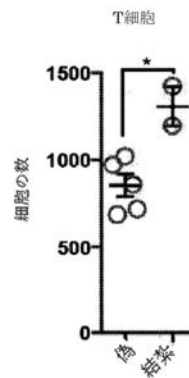


図46F

【図 4 6 E】

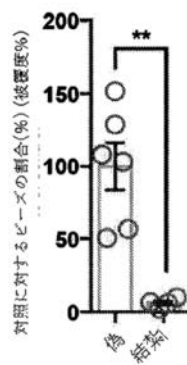


図46E

【図 4 6 G】

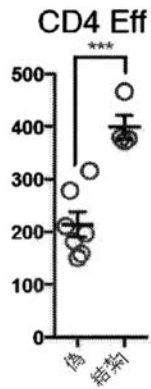


図46G

【図 4 8 A】

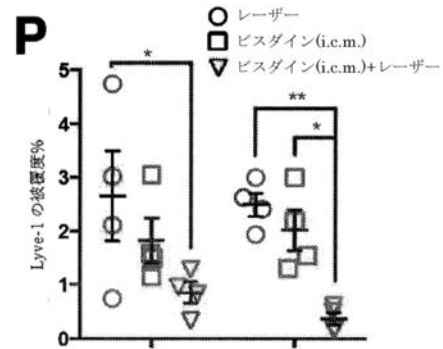


図48A

【図 4 7】

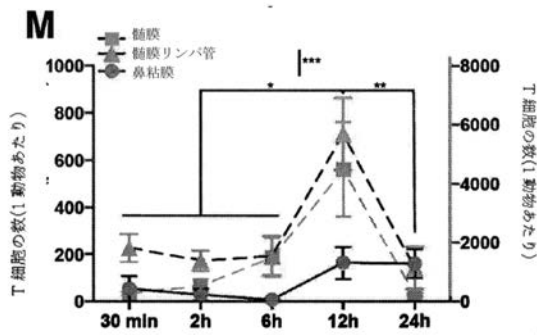


図47

【図 4 8 B】

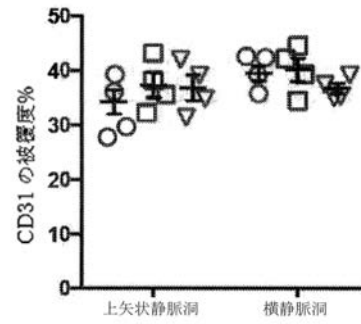


図48B

【図 4 8 C】

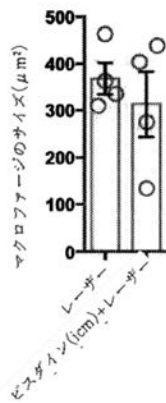


図48C

【図 4 8 D】

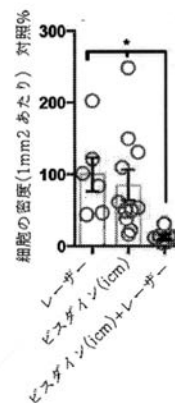


図48D

【図 4 9 A】

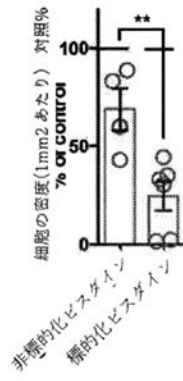


図49A

【図 4 9 B】

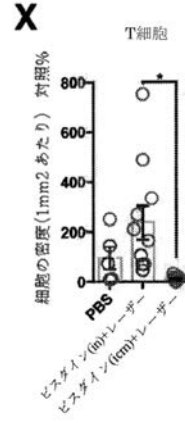


図49B

【図 4 9 C】

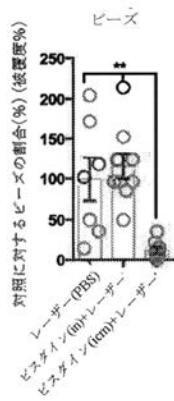


図49C

【図 4 9 D】

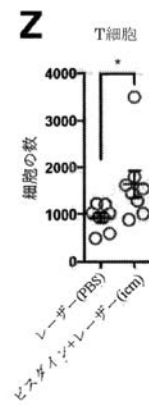
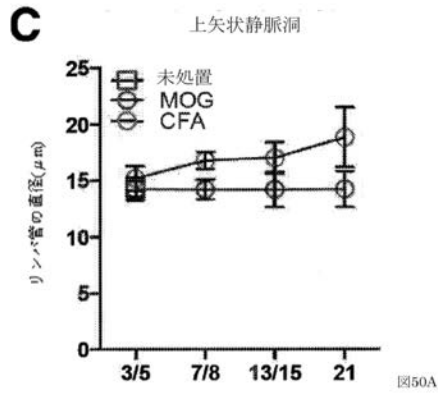
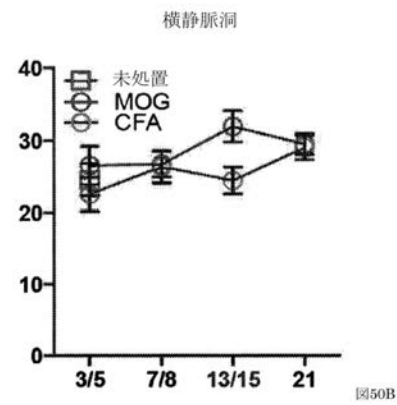


図49D

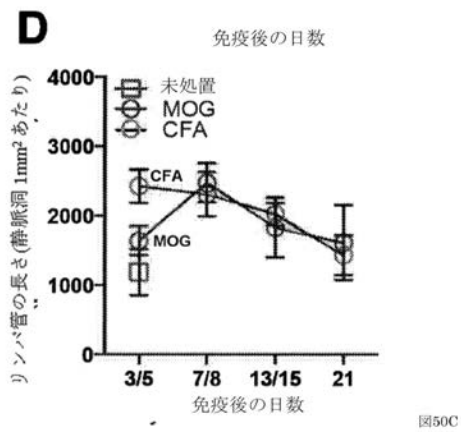
【図 50 A】



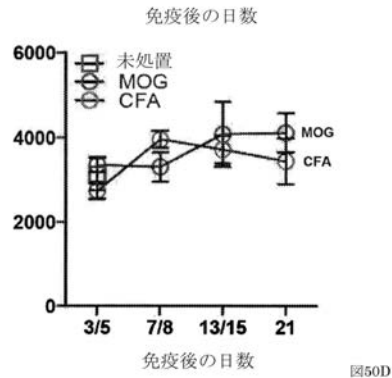
【図 50 B】



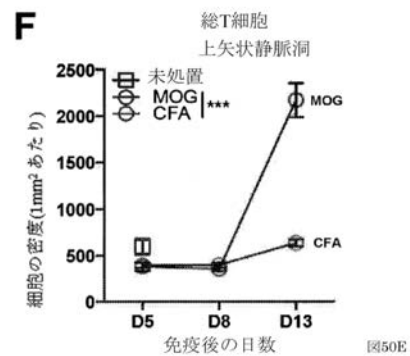
【図 50 C】



【図 50 D】



【図 50 E】



【図 50 F】

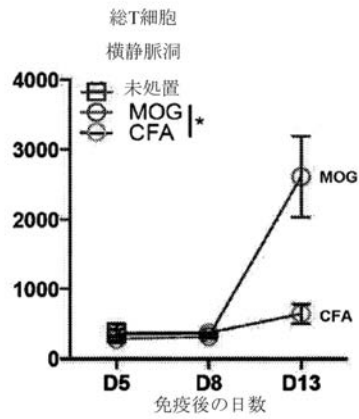


図50F

【図 50 G】

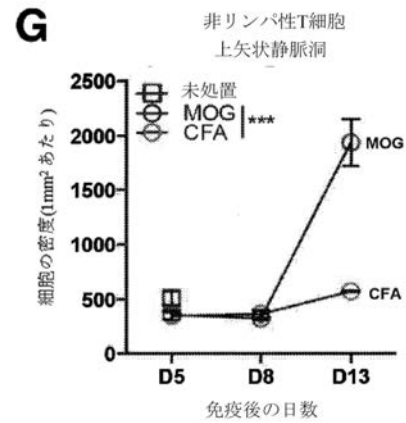


図50G

【図 50 H】

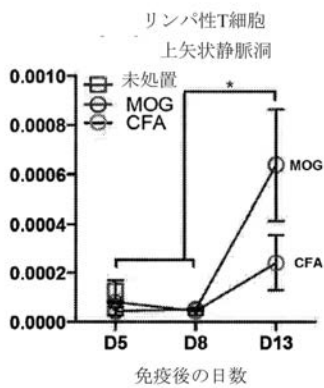


図50H

【図 51 A】

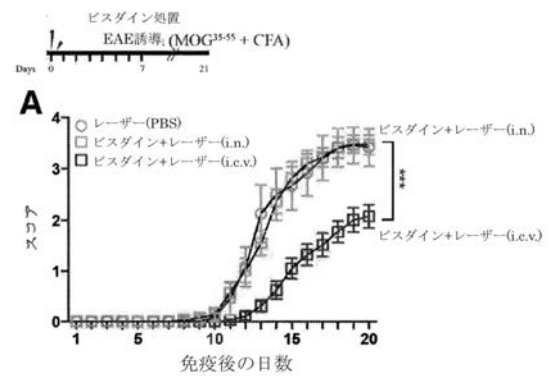


図51A

【図 50 I】

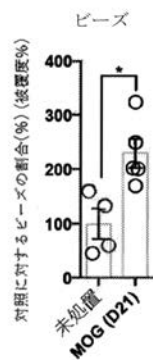


図50I

【図 51 B】

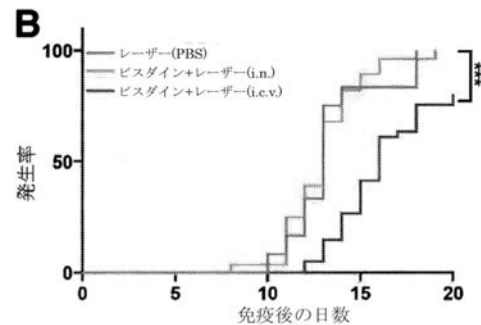
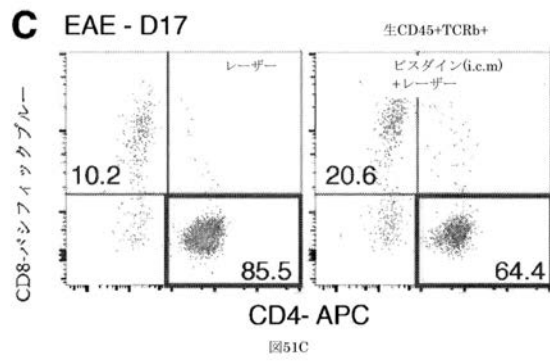
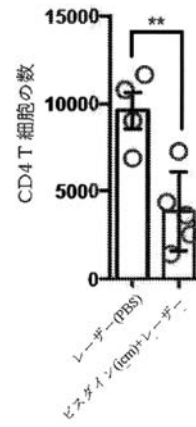


図51B

【図 5 1 C】



【図 5 1 D】



【配列表】

2019522044000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/35285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61P 25/28; A61K 39/395, 38/18, 47/68, 51/10; C12Q 1/68 (2017.01) CPC - A61K 39/395, 39/3955, 38/1866, 47/6845, 51/1021; C12Q 1/6827, 1/6883 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(LOUVEAU, A et al.) Structural and Functional Features of Central Nervous System Lymphatics. Nature. 16 July, 2015; Vol. 523, No. 7560; pages 1-22; page 3, paragraphs 1-2; page 4, paragraph 1-2; page 5, paragraph 3; page 6, paragraph 3; figures 2d, 9h; DOI: 10.1038/nature14432.	1-6, 7/1-6, 8/1-6, 13/1-5, 14/13/1-5, 20-22, 24, 25/20-22, 25/24, 26/20-22, 26/24, 27/20-22, 27/24, 28/20-22, 28/24, 29/20-22, 29/24, 30/20-22, 30/24, 31/20-22, 33-38, 39/33-38, 40/39/33-38, 41/39/33-38, 42/39/33-38, 43/33-37, 44/43/33-37, 45/33-38
Y	(CONWAY, JMT et al) Clearance Systems in the Brain—Implications for Alzheimer Disease. Nature Reviews. 21 July, 2015; Vol. 11, No. 8; pages 1-29; page 3, paragraph 2; page 10, paragraphs 1, 6; page 5, paragraph 4; page 7, paragraph 1; page 11, paragraphs 2-3; page 12, paragraph 2; DOI: 10.1038/nrneuro.2015.119	1-6, 7/1-6, 8/1-6, 13/1-5, 14/13/1-5, 20-22, 24, 25/20-22, 25/24, 26/20-22, 26/24, 27/20-22, 27/24, 28/20-22, 28/24, 29/20-22, 29/24, 30/20-22, 30/24, 31/20-22, 33-38, 39/33-38, 40/39/33-38, 41/39/33-38, 42/39/33-38
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 August 2017 (13.08.2017)		Date of mailing of the international search report 29 AUG 2017
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT O&P: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/35285

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		43/33-37, 44/43/33-37, 45/33-38
A	(ILIFF, JJ et al.) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid beta. <i>Science translational Medicine</i> . 15 August 2012; Vol. 4, No. 147; pages 1-22; page 5, paragraph 3; DOI: 10.1126/scitranslmed.3003748	9/1-6, 10/1-6, 11/10/1-6, 12/11/10/1-6, 23, 25/23, 26/23, 27/23, 28/23, 29/23, 30/23
A	(GOGINENI, A et al.) Inhibition of VEGF-C Modulates Distal Lymphatic Remodeling and Secondary Metastasis. <i>PLoS One</i> . 16 July, 2013; Vol. 8, No. 7; pages 1-15; page 2, column 2, paragraph 4; page 4, column 2, paragraph 1; DOI: 10.1371/journal.pone.0068755	50-56, 57/50-56, 58/50-56, 59/58/50-56, 60/58/50-56, 61/60/58/50-56, 70-74, 75/70-74, 76/70-73, 77/70-74, 78/77/70-74, 79/70-74, 80/70-74, 81/70-74, 82/70-74, 83/70-74, 84/70-74, 85/70-74, 86/73-74, 92/83/70-74, 93/70-74
A	(TAMMELA, T et al.) Photodynamic Ablation of Lymphatic Vessels and Intralymphatic Cancer Cells Prevents Metastasis. <i>Science translational Medicine</i> . 09 February, 2011; Vol. 3, No. 69; pages 1-8; abstract; page 2, column 1, paragraph 3; DOI: 10.1126/scitranslmed.3001699	50-56, 57/50-56, 58/50-56, 59/58/50-56, 60/58/50-56, 61/60/58/50-56, 70-74, 75/70-74, 76/70-73, 77/70-74, 78/77/70-74, 79/70-74, 80/70-74, 81/70-74, 82/70-74, 83/70-74, 84/70-74, 85/70-74, 86/73-74, 92/83/70-74, 93/70-74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/35285

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 15-19, 32, 46-49, 62-69, 87-91, 94-96
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
C O 7 K 14/50 (2006.01)	A 6 1 K	38/22	
C O 7 K 14/475 (2006.01)	C O 7 K	14/50	
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K	14/475	
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K	16/28	
	C O 7 K	16/22	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(71)出願人 518427502

ジョナサン・キプニス

アメリカ合衆国・ヴァージニア・22908・シャーロットツヴィル・(番地なし)・ユニバーシティ・オブ・ヴァージニア・センター・フォー・ブレイン・イミュノロジー・アンド・グリア・(ビーアイジー)・デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(71)出願人 518427513

アントワヌ・ルーヴォー

アメリカ合衆国・ヴァージニア・22908・シャーロットツヴィル・(番地なし)・ユニバーシティ・オブ・ヴァージニア・センター・フォー・ブレイン・イミュノロジー・アンド・グリア・(ビーアイジー)・デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(71)出願人 518427535

サンドロ・ダ・メスキータ

アメリカ合衆国・ヴァージニア・22908・シャーロットツヴィル・(番地なし)・ユニバーシティ・オブ・ヴァージニア・センター・フォー・ブレイン・イミュノロジー・アンド・グリア・(ビーアイジー)・デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ジョナサン・キプニス

アメリカ合衆国・ヴァージニア・22908・シャーロットツヴィル・(番地なし)・ユニバーシテ

ィ・オブ・ヴァージニア・センター・フォー・ブレイン・イミュノロジー・アンド・グリア・（ピーアイジー）・デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(72)発明者 アントワヌ・ルーヴォー

アメリカ合衆国・ヴァージニア・２２９０８・シャーロットツヴィル・（番地なし）・ユニバーシティー・オブ・ヴァージニア・センター・フォー・ブレイン・イミュノロジー・アンド・グリア・（ピーアイジー）・デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(72)発明者 サンドロ・ダ・メスキータ

アメリカ合衆国・ヴァージニア・２２９０８・シャーロットツヴィル・（番地なし）・ユニバーシティー・オブ・ヴァージニア・センター・フォー・ブレイン・イミュノロジー・アンド・グリア・（ピーアイジー）・デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA22 BA44 DA45 DB54 MA13 MA56
MA59 MA66 MA67 NA05 NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA061
ZA062 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA181 ZA182 ZA221 ZA222 ZA361
ZA362 ZB071 ZB072 ZB111 ZB112 ZB311 ZB312 ZC521 ZC522
4C085 AA14 AA16 CC02 CC03 CC04 EE01 GG10
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA01 EA21 FA74