(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-14030
(P2016-14030A)
(43)公開日　平成28年1月28日(2016.1.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	ZNA	4C084
A61K 45/06	(2006.01)	A61K	45/06		4C085
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10		4H045
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	

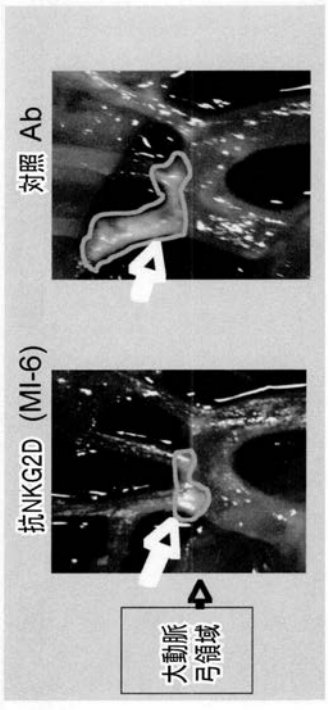
審査請求 有　請求項の数 13　ＯＬ　（全 70 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-151167 (P2015-151167)
(22)出願日　平成27年7月30日 (2015.7.30)
(62)分割の表示　特願2012-525628 (P2012-525628)の分割
原出願日　平成22年8月16日 (2010.8.16)
(31)優先権主張番号　61/234,425
(32)優先日　平成21年8月17日 (2009.8.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/304,113
(32)優先日　平成22年2月12日 (2010.2.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500273296
ザ・ペン・ステート・リサーチ・ファンデーション
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１６８０２，ユニバーシティ・パーク，オールド・メイン　３０４
(71)出願人　506115514
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　カリフォルニア
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９４６０７　オークランド　フランクリン　ストリート　１１１１　トゥエルフス　フロア
(74)代理人　110001243
特許業務法人　谷・阿部特許事務所
最終頁に続く

(54)【発明の名称】心血管疾患、および２型糖尿病などの代謝疾患の治療のためのＮＫＧ２Ｄ阻害剤の使用

(57)【要約】
【課題】本発明は、２型糖尿病および／またはＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態、例えば心血管疾患の治療および検出のための方法、組成物およびキットを提供する。糖尿病などの代謝機能不全関連疾患ならびに心血管の疾患および障害の予測、予防および治療のための有効な方法が必要である。
【解決手段】ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療ための、対象においてＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤の使用に関し、病態は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される。
【選択図】図４Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療用医薬組成物であって、
前記医薬組成物は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療をする対象におけるＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する有効量の薬剤を含み、
前記病態は、心血管疾患、炎症性疾患、および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択され、および、
前記対象が２型糖尿病に罹患した対象であり、
前記薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であることを特徴とする医薬組成物。
【請求項２】
ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療用医薬組成物であって、
前記医薬組成物は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療をする対象におけるＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する有効量の薬剤を含み、
前記病態は、心血管疾患、炎症性疾患、および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択され、および、
前記対象が２型糖尿病に罹患した対象であり、
前記薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であることを特徴とする医薬組成物。
【請求項３】
ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療用医薬組成物であって、
前記医薬組成物は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療をする対象におけるＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する有効量の薬剤を含み、
前記病態は、代謝機能不全関連疾患であり、および、
前記対象が２型糖尿病に罹患した対象であり、
前記薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であることを特徴とする医薬組成物。
【請求項４】
ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療用医薬組成物であって、
前記医薬組成物は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療をする対象におけるＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する有効量の薬剤を含み、
前記病態は、代謝機能不全関連疾患であり、および、
前記対象が２型糖尿病に罹患した対象であり、
前記薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であることを特徴とする医薬組成物。
【請求項５】
前記対象はヒトであることを特徴とする、請求項１から４のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項６】
前記抗体またはその抗原結合断片はヒトまたはヒト化であることを特徴とする請求項１から５のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項７】
前記抗体またはその抗原結合断片は、ヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合することを特徴とする請求項１から５のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項８】
前記抗体またはその抗原結合断片は、ＮＫＧ２Ｄにより仲介されるＮＫＧ２Ｄ発現細胞の活性化またはシグナル伝達を低下させることを特徴とする請求項１から５のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項９】
前記抗体またはその抗原結合断片は、ＮＫＧ２Ｄとの結合において、少なくとも１種のＮＫＧ２Ｄリガンドと競合することを特徴とする請求項１から５のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記ＮＫＧ２Ｄリガンドは、ＭＩＣＡ／Ｂであることを特徴とする請求項９に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
前記医薬組成物は、前記対象において以下：血糖値降下、耐糖能の改善、インスリン抵抗性の低下、体重の減少、血圧低下、炎症低下および代謝機能不全の減少の少なくとも１つをもたらすことを特徴とする請求項１から１０のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
前記医薬組成物は、静脈内、腹腔内または皮下に投与されることを特徴とする請求項１から１１のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤、ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤をさらに含むことを特徴とする請求項１から１２のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦政府による資金提供を受けた研究
本発明は、アメリカ合衆国農務省によって与えられた助成金番号ＰＥＮ０４１４３およびアメリカ国立衛生研究所（ＮＩＨ）によって与えられた助成金番号ＣＡ０９３６７８のもとに米国政府の援助によって為された。米国政府は本発明に所定の権利を有することができる。
【０００２】
関連出願の参照
本出願は、米国特許法§１１９（ｅ）のもとに、２００９年８月１７日提出の米国特許仮出願番号第６１／２３４，４２５号明細書、および２０１０年２月１２に提出の米国特許仮出願番号第６１／３０４，１１３号明細書の優先権の利益を主張するものであり、これらは参照によりその全体が組み込まれる。
【０００３】
本発明は、２型糖尿病および／または心血管疾患などのＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
多数の人々が糖尿病（ｄｉａｂｅｔｅｓ　ｍｅｌｌｉｔｕｓ）を患っており、その数は増大している。糖尿病（糖尿病（ｄｉａｂｅｔｅｓ）としても一般に知られている）は、膵臓ホルモンのインスリン相対的欠乏または絶対的欠乏のため、血糖値の上昇をもたらす代謝障害である。インスリンは、血糖値に応答して膵臓から血中に分泌され、主な機能は血糖を生体内蓄積に向かわせ、それによって血糖値を調節することである。
【０００５】
糖尿病は、１型および２型の形態が公知である。１型糖尿病は、一方のベータ細胞を標

的とする破壊的自己免疫プロセスおよび他方のこれらの細胞の再生能力との間の好ましくないバランスによる、膵臓ベータ細胞喪失の進行を特徴とする。このバランスの悪さは、最終的にはベータ細胞および内因性インスリン分泌の全損をもたらす。１型糖尿病は、糖尿病の５～１０％を占める。２型糖尿病は、インスリン抵抗性およびベータ細胞機能の低下を特徴とし、これは第１相インスリン放出の低下、ベータ細胞のパルス量の減少およびインスリン欠乏を含む。２型糖尿病は、糖尿病の９０～９５％を占めるこの疾患の最も一般的な形態である。

【０００６】

糖尿病を有する人々は、心血管疾患を発症する可能性が糖尿病を有さない人々より２から４倍高い。心血管疾患は主要な合併症であり、過去数十年にわたる療法のかなりの改善にもかかわらず、２型糖尿病を有する人々の死亡の主因である。心臓発作、脳卒中および下肢の切断の危険性の増加が、糖尿病を有する人々の早死にの主因である。肥満、高血圧、脂質異常症および運動不足を含む、心血管疾患危険因子の高い罹患率は、２型糖尿病の存在下に通常存在する。

【０００７】

心血管疾患は、最も重大な人の健康上の懸念であり米国（Ｕ．Ｓ．）における第１の死亡原因である。アメリカ心臓協会によれば、心血管疾患の予防および療法のコストは、驚くべきことにＵ．Ｓ．単独で２００８年に４４８５億ドルになると思われ、社会にとって大きな経済的負担をもたらす。アテローム性動脈硬化症は、動脈血管の内膜に、脂肪性物質および細胞成分で構成されるプラークが構築される、心血管疾患の一形態である。この疾患は、糖尿病などの代謝状態の機能不全を有する患者の動脈の生じやすい領域に堆積された異常な代謝産物により始まり、免疫活性化および炎症を含む複数の因子の関与により進行する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】国際公開第９２／０２１９０号
【特許文献２】米国特許出願第２００６００７３１３７号明細書
【特許文献３】米国特許第６７５０３２５号明細書
【特許文献４】米国特許第６６３２９２７号明細書
【特許文献５】米国特許第６６３９０５５号明細書
【特許文献６】米国特許第６５４８６４０号明細書
【特許文献７】米国特許第６４０７２１３号明細書
【特許文献８】米国特許第６１８０３７０号明細書
【特許文献９】米国特許第６０５４２９７号明細書
【特許文献１０】米国特許第５９２９２１２号明細書
【特許文献１１】米国特許第５８９５２０５号明細書
【特許文献１２】米国特許第５８８６１５２号明細書
【特許文献１３】米国特許第５８７７２９３号明細書
【特許文献１４】米国特許第５８６９６１９号明細書
【特許文献１５】米国特許第５８２１３３７号明細書
【特許文献１６】米国特許第５８２１１２３号明細書
【特許文献１７】米国特許第５７７０１９６号明細書
【特許文献１８】米国特許第５７７７０８５号明細書
【特許文献１９】米国特許第５７６６８８６号明細書
【特許文献２０】米国特許第５７１４３５０号明細書
【特許文献２１】米国特許第５６９３７６２号明細書
【特許文献２２】米国特許第５６９３７６１号明細書
【特許文献２３】米国特許第５５３０１０１号明細書
【特許文献２４】米国特許第５５８５０８９号明細書

【特許文献２５】米国特許第５２２５５３９号明細書
【特許文献２６】米国特許第６，４６５，４５４号明細書
【特許文献２７】米国特許第４，３７６，１１０号明細書
【非特許文献】
【０００９】
【非特許文献１】Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1988)
【非特許文献２】Jones et al., Nature 321 :522-525 (1986)
【非特許文献３】Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)
【非特許文献４】Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)
【非特許文献５】Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001
【非特許文献６】Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-lnterscience, New York, 1992
【非特許文献７】Gene Therapy: Principles and Applications, ed. T. Blackenstein, Springer Verlag, 1999
【非特許文献８】Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), ed. P. D. Robbins, Humana Press, 1997
【非特許文献９】Retro-vectors for Human Gene Therapy, ed. CP. Hodgson, Springer Verlag, 1996
【非特許文献１０】Advances in Immunology, volume 93, ed. Frederick W. Alt, Academic Press, Burlington, MA, 2007
【非特許文献１１】Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, eds. Gary C. Howard and Matthew R. Kaser, CRC Press, Boca Raton, Fl, 2006
【非特許文献１２】Medical Immunology, 6th ed., edited by Gabriel Virella, lnforma Healthcare Press, London, England, 2007
【非特許文献１３】Waldhauer, I. and A. Steinle, Oncogene, 27:5932-5943 (2008)
【非特許文献１４】Isaka Y., Curr Opin Mol Ther, 9:132-136 (2007)
【非特許文献１５】Sioud M. and Iversen P.O., Curr Drug Targets, 6:647-653 (2005)
【非特許文献１６】Ribozymes and siRNA Protocols (Methods in Molecular Biology) by Mouldy Sioud, 2nd ed., 2004, Humana Press, New York, New York
【非特許文献１７】Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc, and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)
【非特許文献１８】Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983)
【非特許文献１９】Kohler and Milstein, Nature 256:495-497, 1975
【非特許文献２０】Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc, and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992)
【非特許文献２１】Diefenbach et al., Nat Immunol, vol. 1 (2): 119-26, 2000
【非特許文献２２】Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000
【非特許文献２３】Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York
【非特許文献２４】Ogasawara et al., Immunity, 20:757-767 (2004)
【非特許文献２５】Salih et al., J Immunol., 169:4098-4102 (2002)
【非特許文献２６】Groh et al., Nature, 419:734-738 (2002)
【非特許文献２７】Diefenbach et al., Nature Immunology, 1:119-126 (2000)
【非特許文献２８】Takada et al., J Immunol., 180:1678-1685 (2008)
【非特許文献２９】Jamieson and Raulet、
【非特許文献３０】Park et al., Nat Med, 4:1025-1031(1998)

【非特許文献３１】Jamieson et al., Immunity, 17:19-29 (2002)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

糖尿病などの代謝状態の異常は、組織の炎症および免疫細胞活性化を誘導するさまざまな細胞性ストレス応答をもたらし、順に、代謝機能不全を悪化させ、心血管疾患の進行などの障害の根底にある下流の結果を持続させる悪循環を生み出す。しかし、これらのプロセスに関連する分子事象は十分理解されておらず、代謝機能不全および心血管疾患の合併症の治療のために免疫系を調節するための取り組みの妨げとなっている。

【００１１】

したがって、糖尿病などの代謝機能不全関連疾患ならびに心血管の疾患および障害の予測、予防および治療のための有効な方法が必要である。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明は、２型糖尿病および／または代謝機能不全に罹患する患者および動物においてアップレギュレーションされ、血管および肝臓の炎症、代謝機能不全および心血管疾患の発症に関する免疫細胞の賦活化において重要な役割を果たすと思われる、免疫刺激性分子のファミリーの発見に関する。具体的には、強力な免疫賦活化受容体であるＮＫＧ２Ｄに対する刺激性リガンドのレベルの上昇が、２型糖尿病のヒト患者および脂質代謝の機能不全およびアテローム性動脈硬化のための動物モデルにおいて検出された。

【００１３】

したがって、本発明は、２型糖尿病およびＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態、例えば心血管疾患の治療のための新規な方法、組成物およびキットを提供する。本発明は、２型糖尿病もしくは心血管疾患の発症の素因または２型糖尿病もしくは心血管疾患の存在の検出および診断のための新規な方法をさらに提供する。

【００１４】

一実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄの賦活化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、２型糖尿病の治療方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、２型糖尿病の治療方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療方法を提供し、この病態は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される。別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療方法を提供し、この病態は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される。

【００１５】

別の実施形態において、本発明は、２型糖尿病の治療のための、対象においてＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤の使用に関する。別の実施形態において、本発明は、２型糖尿病の治療のための、対象においてＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤の使用に関する。別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療ための、対象においてＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤の使用に関し、この病態は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される。別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療ための、対象においてＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤の使用に関し、病態は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾

患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される。
【００１６】
いくつかの実施形態において、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態は、２型糖尿病である。いくつかの実施形態において、この病態は心血管疾患である。
【００１７】
いくつかの実施形態において、対象はヒトである。
【００１８】
いくつかの実施形態において、薬剤は、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２Ｄリガンドおよびｎｋｇ２ｄリガンドの活性または発現の阻害剤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、薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトまたはヒト化である。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、ＮＫＧ２Ｄにより仲介されるＮＫＧ２Ｄ発現細胞の活性化またはシグナル伝達を低下させる。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、ＮＫＧ２Ｄとの結合において、少なくとも１種のＮＫＧ２Ｄリガンドと競合する。いくつかの実施形態において、ＮＫＧ２ＤリガンドはＭＩＣＡ／Ｂである。
【００１９】
いくつかの実施形態において、薬剤の投与は、対象において以下の少なくとも１つをもたらす：血糖値降下、耐糖能の改善、インスリン抵抗性の低下、体重の減少、血圧低下、炎症低下および代謝機能不全の減少。
【００２０】
いくつかの実施形態において、薬剤は、静脈内、腹腔内または皮下に投与される。
【００２１】
いくつかの実施形態において、本発明の方法は、抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤、ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤を含む。いくつかの実施形態において、さらなる薬剤は、（ａ）ＧＬＰ－１ならびにＧＬＰ－１の誘導体およびアナログ、エキセンディン（Ｅｘｅｎｄｉｎ）－４ならびにエキセンディン－４の誘導体およびアナログ、アミリンならびにアミリンの誘導体およびアナログ、スルホニルウレア、ビグアナイド、メグリチニド（ナテグリニドおよびレパグリニドなど）、グルコシダーゼ阻害剤、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ）阻害剤、ＳＧＬＴ２阻害剤、ＳＧＬＴ１の阻害剤またはアゴニスト、ガストリンならびにガストリンのアナログおよび誘導体、ＦＧＦ－２１（線維芽細胞成長因子２１）ならびにＦＧＦ－２１の誘導体およびアナログ、プロトンポンプ阻害剤、例えばランソプラゾール、オメプラゾール、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾールおよびラベプラゾール、ＲＸＲアゴニスト、コレスチラミン、コレスチポール、プロブコール、デキストロチロキシン、ＰＰＡＲアゴニストならびにアディポネクチンならびにアディポネクチンの誘導体およびアナログからなる群から選択される血糖降下薬；（ｂ）抗脂質異常症薬、ＨＭＧ　ＣｏＡ阻害剤（スタチン）例えばロバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンならびにフィブラート系薬、例えばゲムフィブロジルおよびクロフィブレートからなる群から選択される血中脂質低下薬または脂質代謝改善薬；（ｃ）ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）アンタゴニスト、ＰＹＹ（ポリペプチドＹＹ）アゴニスト、ＰＰ（膵臓ポリペプチド）アゴニスト、Ｙ２受容体アゴニスト、Ｙ４受容体アゴニスト、混合型Ｙ２／Ｙ４受容体アゴニスト、ＭＣ４（メラノコルチン４）アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、グルカゴンならびにグルカゴンの誘導体およびアナログ、ＣＲＦ（コルチコトロピン放出因子）アゴニスト、ＣＲＦ　ＢＰ（コルチコトロピン放出因子結合蛋白質）アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、β３アゴニスト、ＭＳＨ（メラノサイト刺激ホルモン）アゴニスト、ＭＣＨ

（メラノサイト凝集ホルモン）アンタゴニスト、ＣＣＫ（コレシストキニン）アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤、混合型セロトニンおよびノルアドレナリン作動性化合物、５ＨＴ（セロトニン）アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、ＴＲＨ（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）アゴニスト、ＵＣＰ２または３（脱共役蛋白質２または３）調節因子、レプチンアゴニスト、ＤＡアゴニスト（ブロモクリプチン、ドプレキシン（ｄｏｐｒｅｘｉｎ））、リパーゼ／アミラーゼ阻害剤、ＲＸＲ（レチノイドＸ受容体）調節因子、ヒスタミンＨ３アンタゴニストならびにＣＡＲＴ（コカインアンフェタミン調節転写産物）アゴニストからなる群から選択される食物摂取量を減少させる薬剤またはエネルギー消費を増加させる薬剤；ならびに（ｄ）β－遮断薬、例えばアルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロールおよびメトプロロール、ＡＣＥ（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、例えばベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリルおよびラミプリル、カルシウムチャネル遮断薬、例えばニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルならびにα－遮断薬、例えばドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシンおよびテラゾシンからなる群から選択される血圧低下薬；からなる群から選択される。

【００２２】

一実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する、治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【００２３】

いくつかの実施形態において、薬剤は、２型糖尿病の治療に有用である。いくつかの実施形態において、薬剤は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療に有用である。

【００２４】

いくつかの実施形態において、この病態は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患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、この病態は２型糖尿病である。いくつかの実施形態において、この病態は心血管疾患である。

【００２５】

いくつかの実施形態において、薬剤は、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２ＤリガンドおよびＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤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、薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトまたはヒト化である。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する。

【００２６】

いくつかの実施形態において、薬剤は、ＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤である。いくつかの実施形態において、ＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤はＭＩＣＡ／Ｂ阻害剤である。いくつかの実施形態において、ＭＩＣＡ／Ｂ阻害剤はＭＩＣＡ／Ｂ－特異的ｓｉＲＮＡである。

【００２７】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤、ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤を含む。いくつかの実施形態において、さらなる薬剤は、（ａ）ＧＬＰ－１ならびにＧＬＰ－１の誘導体およびアナログ、エキセンディン－４ならびにエキセンディン－４の誘導体およびアナログ、アミリンならびにアミリンの誘導体およびアナログ、スルホニルウレア、ビグアナイド、

メグリチニド（ナテグリニドおよびレパグリニドなど）、グルコシダーゼ阻害剤、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ）阻害剤、ＳＧＬＴ２阻害剤、ＳＧＬＴ１の阻害剤またはアゴニスト、ガストリンならびにガストリンのアナログおよび誘導体、ＦＧＦ－２１（線維芽細胞成長因子２１）ならびにＦＧＦ－２１の誘導体およびアナログ、プロトンポンプ阻害剤、例えばランソプラゾール、オメプラゾール、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾールおよびラベプラゾール、ＲＸＲアゴニスト、コレスチラミン、コレスチポール、プロブコール、デキストロチロキシン、ＰＰＡＲアゴニストならびにアディポネクチンならびにアディポネクチンの誘導体およびアナログからなる群から選択される血糖降下薬；（ｂ）抗脂質異常症薬、ＨＭＧ　ＣｏＡ阻害剤（スタチン）例えばロバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンならびにフィブラート系薬、例えばゲムフィブロジルおよびクロフィブレートからなる群から選択される血中脂質低下薬または脂質代謝改善薬；（ｃ）ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）アンタゴニスト、ＰＹＹ（ポリペプチドＹＹ）アゴニスト、ＰＰ（膵臓ポリペプチド）アゴニスト、Ｙ２受容体アゴニスト、Ｙ４受容体アゴニスト、混合型Ｙ２／Ｙ４受容体アゴニスト、ＭＣ４（メラノコルチン４）アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、グルカゴンならびにグルカゴンの誘導体およびアナログ、ＣＲＦ（コルチコトロピン放出因子）アゴニスト、ＣＲＦ　ＢＰ（コルチコトロピン放出因子結合蛋白質）アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、β３アゴニスト、ＭＳＨ（メラノサイト刺激ホルモン）アゴニスト、ＭＣＨ（メラノサイト凝集ホルモン）アンタゴニスト、ＣＣＫ（コレシストキニン）アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤、混合型セロトニンおよびノルアドレナリン作動性化合物、５ＨＴ（セロトニン）アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、ＴＲＨ（サイレオトロピン放出ホルモン）アゴニスト、ＵＣＰ２または３（脱共役蛋白質２または３）調節因子、レプチンアゴニスト、ＤＡアゴニスト（ブロモクリプチン、ドプレキシン）、リパーゼ／アミラーゼ阻害剤、ＲＸＲ（レチノイドＸ受容体）調節因子、ヒスタミンＨ３アンタゴニストならびにＣＡＲＴ（コカインアンフェタミン調節転写産物）アゴニストからなる群から選択される食物摂取量を減少させる薬剤またはエネルギー消費を増加させる薬剤；ならびに（ｄ）β－遮断薬、例えばアルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロールおよびメトプロロール、ＡＣＥ（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、例えばベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリルおよびラミプリル、カルシウムチャネル遮断薬、例えばニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルならびにα－遮断薬、例えばドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシンおよびテラゾシンからなる群から選択される血圧低下薬；からなる群から選択される。

【００２８】

一実施形態において、本発明は、（ａ）薬学的に許容される担体と組み合わせた、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤；および（ｂ）使用のための指示書を含むキットを提供する。別の実施形態において、本発明は、（ａ）薬学的に許容される担体と組み合わせた、ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤；および（ｂ）使用のための指示書を含むキットを提供する。

【００２９】

いくつかの実施形態において、薬剤は、２型糖尿病の治療に有用である。

【００３０】

いくつかの実施形態において、薬剤は、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療に有用である。

【００３１】

いくつかの実施形態において、病態は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患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、病態は２型糖尿病である。いくつかの実施形態において、病態は心血管疾患である。

【００３２】
いくつかの実施形態において、薬剤は、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２Ｄリガンドおよびｎｋｇ２ｄリガンドの活性または発現の阻害剤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、薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトまたはヒト化である。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する。
【００３３】
いくつかの実施形態において、本発明のキットは、抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤、ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤を含む。いくつかの実施形態において、さらなる薬剤は、（ａ）ＧＬＰ－１ならびにＧＬＰ－１の誘導体およびアナログ、エキセンディン－４ならびにエキセンディン－４の誘導体およびアナログ、アミリンならびにアミリンの誘導体およびアナログ、スルホニルウレア、ビグアナイド、メグリチニド（ナテグリニドおよびレパグリニドなど）、グルコシダーゼ阻害剤、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ）阻害剤、ＳＧＬＴ２阻害剤、ＳＧＬＴ１の阻害剤またはアゴニスト、ガストリンならびにガストリンのアナログおよび誘導体、ＦＧＦ－２１（線維芽細胞成長因子２１）ならびにＦＧＦ－２１の誘導体およびアナログ、プロトンポンプ阻害剤、例えばランソプラゾール、オメプラゾール、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾールおよびラベプラゾール、ＲＸＲアゴニスト、コレスチラミン、コレスチポール、プロブコール、デキストロチロキシン、ＰＰＡＲアゴニストならびにアディポネクチンならびにアディポネクチンの誘導体およびアナログからなる群から選択される血糖降下薬；（ｂ）抗脂質異常症薬、ＨＭＧ　ＣｏＡ阻害剤（スタチン）例えばロバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンならびにフィブラート系薬、例えばゲムフィブロジルおよびクロフィブレートからなる群から選択される血中脂質低下薬または脂質代謝改善薬；（ｃ）ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）アンタゴニスト、ＰＹＹ（ポリペプチドＹＹ）アゴニスト、ＰＰ（膵臓ポリペプチド）アゴニスト、Ｙ２受容体アゴニスト、Ｙ４受容体アゴニスト、混合型Ｙ２／Ｙ４受容体アゴニスト、ＭＣ４（メラノコルチン４）アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、グルカゴンならびにグルカゴンの誘導体およびアナログ、ＣＲＦ（コルチコトロピン放出因子）アゴニスト、ＣＲＦ　ＢＰ（コルチコトロピン放出因子結合蛋白質）アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、β３アゴニスト、ＭＳＨ（メラノサイト刺激ホルモン）アゴニスト、ＭＣＨ（メラノサイト凝集ホルモン）アンタゴニスト、ＣＣＫ（コレシストキニン）アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤、混合型セロトニンおよびノルアドレナリン作動性化合物、５ＨＴ（セロトニン）アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、ＴＲＨ（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）アゴニスト、ＵＣＰ２または３（脱共役蛋白質２または３）調節因子、レプチンアゴニスト、ＤＡアゴニスト（ブロモクリプチン、ドプレキシン（doprexin））、リパーゼ／アミラーゼ阻害剤、ＲＸＲ（レチノイドＸ受容体）調節因子、ヒスタミンＨ３アンタゴニストならびにＣＡＲＴ（コカインアンフェタミン調節転写産物）アゴニストからなる群から選択される食物摂取量を減少させる薬剤またはエネルギー消費を増加させる薬剤；ならびに（ｄ）β－遮断薬、例えばアルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロールおよびメトプロロール、ＡＣＥ（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、例えばベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリルおよびラミプリル、カルシウムチャネル遮断薬、例えばニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルならびにα－遮断薬、例えばドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシンおよびテラゾシンからなる群から選択される血圧低下薬；からなる群から選択される。

【００３４】
一実施形態において、本発明は、（ａ）対象から試料を得るステップ、（ｂ）試料を、ＭＩＣＡ／Ｂの発現の存在を検出する少なくとも１種の試薬と接触させるステップ、（ｃ）試料中のＭＩＣＡ／Ｂの発現レベルを測定するステップ、および（ｄ）ＭＩＣＡ／Ｂの過剰発現と、対象における２型糖尿病発症の素因または２型糖尿病の存在とを相関させるステップを含む、対象において２型糖尿病の発症の素因または２型糖尿病の存在を検出する方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、（ａ）対象から試料を得るステップ、（ｂ）試料を、ＭＩＣＡ／Ｂの発現の存在を検出する少なくとも１種の試薬と接触させるステップ、（ｃ）試料中のＭＩＣＡ／Ｂの発現レベルを測定するステップ、および（ｄ）ＭＩＣＡ／Ｂの過剰発現と、対象における心血管疾患発症の素因または心血管疾患の存在とを相関させるステップを含む、対象において心血管疾患の発症の素因または心血管疾患の存在を検出する方法を提供する。
【００３５】
いくつかの実施形態において、試薬はＭＩＣＡ／Ｂ抗体である。
【００３６】
いくつかの実施形態において、試料は血清である。
【００３７】
いくつかの実施形態において対象はヒトである。
【００３８】
いくつかの実施形態において、本発明の方法は、試料中のＭＩＣＡ／Ｂではない心血管疾患マーカーの発現レベルを測定するステップ、および心血管疾患マーカーの過剰発現または発現低下と、対象における心血管疾患発症の素因または心血管疾患の存在とを相関させるステップをさらに含む。
【図面の簡単な説明】
【００３９】
【図１Ａ】２型糖尿病患者の血清中可溶性ＭＩＣＡ蛋白質の検出および他の炎症促進性サイトカインの発現とのその関連を示す、一連のグラフである。２型糖尿病患者の血液中可溶性ＭＩＣＡの検出。糖尿病患者の血清を、ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を使用して、ＭＩＣＡ蛋白質に関してアッセイした。組み換えＭＩＣＡ蛋白質を標準として使用し、それに基づき血清ＭＩＣＡレベルを計算した。ｘ軸の各番号は、患者を表す。
【図１Ｂ】同じ患者中の血清中ＩＬ－６のレベルを、ヒト炎症促進性４－ｐｌｅｘ　ｐａｎｅｌ（ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１βおよびＩＦＮ－γ）（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）によって分析した。
【図１Ｃ】同じ患者中の血清中ＴＮＦ－αのレベルを、ヒト炎症促進性４－ｐｌｅｘ　ｐａｎｅｌ（ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１βおよびＩＦＮ－γ）（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）によって分析した。
【図１Ｄ】２型糖尿病患者の血清中Ｃ反応性蛋白質（ＣＲＰ）の血清レベルを、ＣＲＰ　ＥＬＩＳＡキット（Ｃａｌｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｖａｌｌｅｙ、ＣＡ）によって分析した。
【図１Ｅ】平均的糖尿病患者は、それらの血清において検査した５０例のがん患者より高いＭＩＣＡレベルを有する。２型糖尿病患者に関するデータを、グループ化し、５０例のがん患者のデータと比較した。
【図２Ａ】ヒト大動脈プラークに関する免疫組織化学染色によるＭＩＣＡ／Ｂの検出を示す、凍結切片の一連の顕微鏡像である。プラークの凍結切片を、抗ＭＩＣＡ／Ｂ抗体で染色した。
【図２Ｂ】隣接切片を、抗Ｍａｃ－３またはＣＤ３１抗体で染色し、マクロファージまたは内皮細胞を明らかにした。
【図２Ｃ】ヒト大動脈プラークに関する免疫組織化学染色によるＭＩＣＡ／Ｂの検出を示す、凍結切片の一連の顕微鏡像である。プラークの凍結切片を、抗ＭＩＣＡ／Ｂ抗体で染

色した。
【図２Ｄ】隣接切片を、抗Ｍａｃ－３またはＣＤ３１抗体で染色し、マクロファージまたは内皮細胞を明らかにした。
【図２Ｅ】ヒト大動脈プラークに関する免疫組織化学染色によるＭＩＣＡ／Ｂの検出を示す、凍結切片の一連の顕微鏡像である。プラークの凍結切片を、抗ＭＩＣＡ／Ｂ抗体で染色した。
【図２Ｆ】隣接切片を、抗Ｍａｃ－３またはＣＤ３１抗体で染色し、マクロファージまたは内皮細胞を明らかにした。
【図２Ｇ】ヒト大動脈プラークに関する免疫組織化学染色によるＭＩＣＡ／Ｂの検出を示す、凍結切片の一連の顕微鏡像である。プラークの凍結切片を、抗ＭＩＣＡ／Ｂ抗体で染色した。
【図２Ｈ】隣接切片を、抗Ｍａｃ－３またはＣＤ３１抗体で染色し、マクロファージまたは内皮細胞を明らかにした。
【図２Ｉ】正常な大動脈の切片を、ＭＩＣＡ染色の対照として使用した。
【図３Ａ】ＡｐｏＥ－／－マウスのアテローム性硬化性プラークにおけるＮＫＧ２Ｄリガンドの上方制御を実証する、電気泳動ゲルの像である。大動脈プラーク病変のＲＮＡ中のＮＫＧ２ＤリガンドＲａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂに関する転写産物の半定量的ＲＴ－ＰＣＲ分析。
【図３Ｂ】ウェスタン食餌（Ｗｅｓｔｅｒｎ　ｄｉｅｔ）（ＷＤ）を与えたＡｐｏＥ－／－マウスならびに週齢の一致するウェスタン食餌および通常の固形飼料を与えた野生型マウスの大動脈弓領域から単離したＲＮＡ試料中の、Ｒａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂの転写産物のリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析。この実験は２回実施した。
【図３Ｃ】免疫組織化学的に染色された凍結切片の一連の像である。自然にプラークを発症した（右）またはＳＴＺ誘導性糖尿病により促進された（左）ＡｐｏＥ－／－マウス由来のプラークの凍結切片の免疫組織化学染色。切片を、抗Ｒａｅ－１またはＨ６０抗体（茶色）および抗ＣＤ６８抗体（青）を用いて二重染色した。
【図３Ｄ】免疫組織化学的に染色された凍結切片の一連の像である。ＮＫＧ２ＤリガンドのＲａｅ－１およびＨ６０に関するウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスのアテローム硬化性大動脈の免疫組織化学染色。アテローム硬化性大動脈弓領域（上段および中段）および同じウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスの「プラークフリー」胸部領域（下段）の凍結切片を、ヤギポリクローナル抗マウス抗－Ｒａｅ－１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）抗体、またはＨ６０抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を用いて染色した。中段の写真は、上段のパネル（１００×）の四角で囲まれた領域の高倍率（４００×）である。
【図３Ｅ】ＡｐｏＥ－／－マウスのアテローム硬化性大動脈または野生型マウスの正常な大動脈から単離したマクロファージおよび内皮細胞上の細胞表面のＲａｅ－１発現のフローサイトメトリ分析。マクロファージについては、ＣＤ４５$^{+}$ＣＤ１１ｂ$^{+}$ＣＤ１６／３２$^{+}$集団に関してゲートをかけ、内皮細胞については、ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ３１$^{+}$集団に関してゲートをかけた。灰色の領域は、アイソタイプの一致する対照抗体の染色を示す。
【図３Ｆ】野生型マクロファージを用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏで処理した、総Ｒａｅ－１蛋白質のウェスタンブロット分析。
【図３Ｇ】培地のみ、およびさらなるｏｘＬＤＬ、天然ＬＤＬ（ｎＬＤＬ）およびＬＰＳ（対照として）の存在下で培養された野生型マクロファージにおける種々のＮＫＧ２Ｄリガンドの上方制御に関する半定量的ＲＴ－ＰＣＲ分析。
【図３Ｈ】酸化型ＬＤＬ（ｏｘＬＤＬ）または最終糖化産物（ＡＧＥ）の存在下でｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養された野生型マクロファージにおけるＲａｅ－１の発現のフローサイトメトリ分析。マクロファージを腹腔から単離し、５μｇ／ｍｌのｏｘＬＤＬまたは２００μｇ／ｍｌのＡＧＥを含有する培地において２日間、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養した後、破線が１０倍過剰の非標識抗－ｐａｎ－Ｒａｅ－１抗体の存在下で染色されたものであることを除き、パネルＥと同様にフローサイトメトリによって分析した。

【図４Ａ】糖尿病ＡｐｏＥヌルマウスにおいて抗ＮＫＧ２Ｄ抗体によるプラーク形成の抑制を示す、ＡｐｏＥヌルマウス由来の大動脈の一連の写真である。代表的な抗ＮＫＧ２Ｄまたは対照抗体処置の糖尿病ＡｐｏＥヌルマウスの大動脈のプラーク形成。大動脈をＰＢＳで灌流し、明らかな不透明なプラークに関して解剖顕微鏡下で観察した。抗ＮＫＧ２Ｄ抗体により処置したマウスにおけるプラークサイズの劇的な減少（丸く囲んだ領域）に留意されたい。

【図４Ｂ】一代表的実験による、抗ＮＫＧ２Ｄ（ＭＩ－６）および対照抗体（対照）処置ＡｐｏＥ－／－マウスにおける脂質内容物の堆積に関する大動脈の正面オイルレッドＯ染色。大動脈を開き、１０％のホルマリンで固定し、オイルレッドＯ染料を用いて染色した。脂質内容物が暗い赤に染まった。抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置マウスの大動脈弓領域におけるオイルレッドＯ染色の有意な喪失に留意されたい。

【図５Ａ】ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の標的化により、さまざまなマウスモデルにおけるアテローム性動脈硬化が防止されることを実証する、一連のグラフである。ストレプトゾトシン誘導性糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスにおけるアテローム性動脈硬化発症に関する抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の阻害効果。対照および抗ＮＫＧ２Ｄ処置糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスの大動脈のプラークサイズを、合計弓領域のオイルレッドＯ陽性染色領域の比に基づき計算した。

【図５Ｂ】ストレプトゾトシン誘導性糖尿病ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウス（ＫＬＲＫ１遺伝子はＮＫＧ２Ｄ蛋白質をコードする）におけるアテローム性動脈硬化発症に関するＮＫＧ２Ｄノックアウト効果。プラークサイズをパネル５Ａと同じ方法で計算した。ＡｐｏＥ－／－マウスを対照として使用した。

【図５Ｃ】ウェスタン食餌を与えたＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウス（ＫＬＲＫ１遺伝子はＮＫＧ２Ｄ蛋白質をコードする）におけるアテローム性動脈硬化発症に関するＮＫＧ２Ｄノックアウト効果。プラークサイズをパネルＡと同じ方法で計算した。ＡｐｏＥ－／－マウスを対照として使用した。

【図６】抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置糖尿病ＡｐｏＥヌルマウスの血清中の炎症促進性サイトカインの低下を示す、一連のグラフである。４匹の抗ＮＫＧ２Ｄ（ＭＩ－６　Ａｂ）処置糖尿病ＡｐｏＥヌルマウスおよび３匹の対照抗体（Ｃｏｎ　Ａｂ）処置糖尿病ＡｐｏＥヌルマウスならびにそれぞれ２匹の週齢の一致する野生型Ｂ６（野生型）、１ヶ月齢（若年ＡｐｏＥ）または８ヶ月齢（老齢ＡｐｏＥ）のＡｐｏＥ－／－マウスの血清を、マウス炎症促進性７ｐｌｅｘ　ｋｉｔ（ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１０、ＩＬ－１βおよびＫＣ／ＣＸＣＬ１）（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）において直接分析した。星印＊は、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスと、対照抗体処置糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスとの間の値の統計的有意差を示す。

【図７Ａ】ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウス（ＮＫＧ２Ｄ遺伝子の欠損を有する）の血清中炎症促進性サイトカインの低下を示すグラフである。ウェスタン食餌を与えた（１２マウス／群）のＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスおよびＡｐｏＥ－／－マウスの血清を、図６のように、マウス炎症促進性７ｐｌｅｘ　ｋｉｔ（ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１０、ＩＬ－１βおよびＫＣ／ＣＸＣＬ１）（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）により直接分析した。星印は、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスと、対照抗体処置糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスとの間の値の統計的有意差を示す（＊＊＊ｐ＜０．０１；＊ｐ＜０．０５）。

【図７Ｂ】ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウス（ＮＫＧ２Ｄ遺伝子の欠損を有する）の血清中炎症促進性サイトカインの低下を示すグラフである。ＳＴＺ－誘導性糖尿病（４マウス／群）のＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスおよびＡｐｏＥ－／－マウスの血清を、図６のように、マウス炎症促進性７ｐｌｅｘ　ｋｉｔ（ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１０、ＩＬ－１βおよびＫＣ／ＣＸＣＬ１）（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）により直接

分析した。星印は、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスと、対照抗体処置糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスとの間の値の統計的有意差を示す（＊＊＊ｐ＜０．０１；＊ｐ＜０．０５）。

【図８Ａ】ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスにおける代謝状態の緩和を示す、１対の血清の写真を表す。（Ａ）ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスより同様に与えたＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスの血清の鮮明な出現。

【図８Ｂ】ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスにおける代謝状態の緩和を示す、１対のグラフを表す。ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスの血中のコレステロールおよびトリクリセリドのレベルの減少。パネルＡの血清を、合計コレステロールおよびトリクリセリドに関して分析した。星印＊＊は、ＫＬＲＫ１／ＡｐｏＥダブルノックアウトマウスと、ＡｐｏＥノックアウトマウスとの間の値の統計的有意差を示す（＊＊ｐ＜０．０５）。各群に関して、少なくとも５匹のマウスを使用した。

【図９】ＡｐｏＥ－／－マウスと比較した、ＮＫＧ２ＤノックアウトＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウス中の血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）活性の減少を示すグラフである。各群に関して、少なくとも５匹のマウスを使用した。

【図１０Ａ】ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止が、ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓の炎症を減少させることを示すグラフである。ＮＫＧ２ＤノックアウトＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスのｅｘ　ｖｉｖｏで培養された肝臓外植片による、ＩＬ－６産生の減少。ＰＢＳで灌流した肝臓を、ウェスタン食餌与えたＡｐｏＥ－／－マウスまたはＮＫＧ２ＤノックアウトＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスから切除した。等量の切除肝臓を、約１ｍｍ^{3}の角切りにし、培地において１または３日間培養した。培養培地を回収し、ＥＬＩＳＡによりサイトカインに関して分析した。この実験は、２回繰り返した。

【図１０Ｂ】ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止が、ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓の炎症を減少させることを示すグラフである。ウェスタンダイエットを与えたＮＫＧ２ＤノックアウトＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓における免疫細胞浸潤の減少。個々の型の免疫細胞数／肝臓を、肝臓から単離した総単核球および個々の型のパーセントに基づき計算した。各群に関して、少なくとも３匹のマウスを使用した。３回の独立した実験の代表的な１つを示す。

【図１１Ａ】ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓の細胞においてＮＫＧ２Ｄリガンドが上方制御されること、およびＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止により、肝臓におけるＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞活性化が減少されることを示すグラフである。８週間ウェスタン食餌を与えた１２週齢の雄ＡｐｏＥ－／－マウスおよび同じ年齢の野生型マウスの肝臓および他の臓器中のＲａｅ－１δ転写産物のリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析。

【図１１Ｂ】ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスおよび野生型マウスの肝臓の精製マクロファージ中Ｒａｅ－１δ転写産物のリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析。

【図１１Ｃ】ウェスタン食餌をを与えたＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓マクロファージおけるＲａｅ－１発現のフローサイトメトリ分析（蛍光標識細胞分取分析のプロット）。

【図１１Ｄ】ウェスタン食餌をを与えたＡｐｏＥ－／－マウスの肝細胞におけるＲａｅ－１発現のフローサイトメトリ分析（蛍光標識細胞分取分析のプロット）。

【図１１Ｅ】ＮＫＧ２Ｄ－ノックアウトＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓ＮＫＴ細胞によるＩＦＮ－γおよびＩＬ－４の産生の減少を示す蛍光標識細胞分取分析のプロット。

【図１１Ｆ】ＮＫＧ２Ｄ－ノックアウトＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓ＮＫ細胞よるＩＦＮ－γ産生はＡｐｏＥ－／－マウスによるものより低いことを示す蛍光標識細胞分取分析のプロット。

【図１１Ｇ】ＮＫＧ２Ｄ－ノックアウトＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－およびＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓マクロファージによるＩＬ－６産生における差はないことを示す蛍光標識細胞分取分析のプロット。

【図１２】ＮＫＧ２Ｄの標的化により２型糖尿病が抑制されることを実証するグラフである。８週齢のＡｐｏＥ－／－およびＮＫＧ２Ｄ欠損ＡｐｏＥ－／－ＫＬＲＫ１－／－マウスにウェスタン食餌を３ヶ月間与えた。その後、血清を回収し、グルコースレベルに関して評価した。ＡｐｏＥ－／－マウスおよびＡｐｏＥ－／－ＫＬＲＫ１－／－マウスのグルコースレベルは、各群の６匹のマウスの平均であった。２つの群の差は、統計的に有意である（ｐ＜０．０５）。

【図１３】２型糖尿病の動物モデルであるアレチネズミ亜科のスナネズミ（Ｐｓａｍｍｏｍｙｓ　ｏｂｅｓｕｓ）（スナネズミとしても公知である）の糖尿病の発症に関する抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の効果を示す。雄および雌のP. obesus（Ｈａｒｌａｎ、Ｊｅｒｕｓａｌｅｍ、Ｉｓｒａｅｌ）に、低エネルギー（２．４ｋｃａｌ／ｇ）の固形飼料を９週齢まで与え、その時点で自由給餌で高エネルギー（３．１ｋｃａｌ／ｇ）食に移行し、その間体重（ＢＷ）および朝食前血糖値（ｍＢＧ）を１０日間まで（誘導期）追跡した。２回連続の測定値がｍＢＧ＞１０ｍｍｏｌ／Ｌと規定されている、ｍＢＧレベルの増加を示した動物を、低エネルギー食に戻し、１０日後にｍＢＧレベルが非糖尿病レベルに戻ったところで実際の研究（予防様式）に使用した。誘導期にｍＢＧの増加を全く示さなかった動物は犠牲にし、以降は使用しなかった（データ非掲載）。P. obesusに、腹腔内注射によって週に１回、生理食塩水（Ｎ＝１９）またはＮＫＧ２Ｄ－ＰＥ抗体（クローンＣＸ５）を用いて処置した（Ｎ＝９）。研究を６週にわたって実施し、その間、ｍＢＧおよびＢＷを定期的に追跡した。生理食塩水群のすべての動物は、重症の糖尿病になり、平均ｍＢＧは１４．５±２．６ｍＭ（平均±ｓｅｍ）であり、一方、ＮＫＧ２Ｄ抗体を用いて処置した動物は、正常血糖（ｍＢＧ＜８ｍＭ）を維持し、８．０±１．９ｍＭという有意に低いｍＢＧを有した、ｐ＜０．０００１（平均±ｓｅｍ）。ＮＫＧ２Ｄ抗体を用いた処置は、デブスナネズミにおいて２型糖尿病の発症を全体的に阻害し、重症の糖尿病性ケトアシドーシスのため、ビヒクル群の５匹すべての動物は研究中に犠牲にしなければならなかった。２つの処置群においてＢＷ増加に差はなかった。

【図１４】２型糖尿病の動物モデルであるPsammomys obesus（スナネズミ）由来の血球細胞と結合するＮＫＧ２Ｄ抗体のフローサイトメトリ分析を示す。スナネズミの血中ＮＫ細胞に対する抗マウスＮＫＧ２Ｄ－ＰＥ抗体（クローンＣＸ５）の用量依存性結合を観察した。アイソタイプ対照抗体（ラットＩｇＧ１－ＰＥアイソタイプ対照（Ｒ３－３４）およびマウスＩｇＧ１－ＰＥアイソタイプ対照（ＭＯＰＣ－２１））または抗ヒトＮＫＧ２Ｄ抗体（クローン１Ｄ１１およびクローンＯＮ７２）の結合は存在しなかったので、この結合は特異的であった。

【発明を実施するための形態】

【００４０】

定義

特に定義しない限り、本明細書に使用するすべての技術用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。

【００４１】

本明細書において使用する場合、「蛋白質」および「ポリペプチド」は、長さまたは翻訳後修飾、例えばグリコシル化またはリン酸化に関係なく、アミノ酸の任意のペプチド結合鎖と同義的に使用される。

【００４２】

本明細書において使用する場合、「ＭＩＣＡ／Ｂ蛋白質」または「ＭＩＣＡ／Ｂポリペプチド」という用語は、ＭＨＣクラスＩ鎖関連Ａ遺伝子またはＢ遺伝子の発現産物、例えば天然ヒトＭＩＣＡ蛋白質（受託番号Ｌ１４８４８）もしくは前述の遺伝子と少なくとも６５％（しかし好ましくは７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８または９９％）アミノ酸配列同一性を共有し、天然ＭＩＣＡ蛋白質の機能活性を示す蛋白質または天然ヒトＭＩＣＢ蛋白質（受託番号ＮＭ＿００５９３１）もしくは前述の遺伝子と少なくとも６５％（しかし好ましくは７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８または９９％）アミノ酸配列同一性を共有し、天然ＭＩＣＢ蛋白質の機能活性を示す蛋白質を意味

する。蛋白質の「機能活性」は、蛋白質の生理機能に関連する任意の活性である。例えば、天然ＭＩＣＡ／Ｂ蛋白質の機能活性は、ＮＫＧ２Ｄとの結合を含み、免疫活性化、例えばサイトカインの分泌などを含み得る。

【００４３】

本明細書において使用する場合、「ＮＫＧ２Ｄ蛋白質」または「ＮＫＧ２Ｄポリペプチド」という用語は、ＫＬＲＫ１遺伝子の発現産物、例えば、天然ヒトＮＫＧ２Ｄ蛋白質（受託番号５７４２４０）もしくは前述の遺伝子と少なくとも６５％（しかし好ましくは７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８または９９％）アミノ酸配列同一性を共有し、天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の機能活性を示す蛋白質を意味する。例えば、天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の機能活性は、そのリガンドとの結合およびそれらの遺伝子発現および活性化を調節するための免疫細胞へのシグナル伝達を含み得る。

【００４４】

本明細書において使用する場合、「遺伝子」という用語は、特定の蛋白質をコードする核酸分子、または場合によって、機能ＲＮＡ分子もしくは構造ＲＮＡ分子を意味する。

【００４５】

本明細書において使用する場合、「ＭＩＣＡ／Ｂ遺伝子」、「ＭＩＣＡ遺伝子」、「ＭＩＣＢ遺伝子」、「ＭＩＣＡ／Ｂポリヌクレオチド」、「ＭＩＣＡポリヌクレオチド」、「ＭＩＣＢポリヌクレオチド」、「ＭＩＣＡ／Ｂ核酸」、「ＭＩＣＡ核酸」または「ＭＩＣＢ核酸」という用語は、天然ヒトＭＩＣＡまたはＭＩＣＢをコードする核酸配列、例えば天然ヒトＭＩＣＡ遺伝子（受託番号Ｌ１４８４８）；例えば、天然ヒトＭＩＣＢ遺伝子（受託番号ＮＭ＿００５９３１）、ＭＩＣＡまたはＭＩＣＢのｃＤＮＡが転写されうる配列を有する核酸；および／または前述の対立遺伝子変異体およびホモログを意味する。この用語は、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡおよびＲＮＡを包含する。

【００４６】

本明細書において使用する場合、「ＫＬＲＫ１」、「Ｋｌｒｋｉ」、「ＫＬＲＫ１遺伝子」、「Ｋｌｒｋｉ遺伝子」、「ＮＫＧ２Ｄ遺伝子」、「ＮＫＧ２Ｄポリヌクレオチド」または「ＮＫＧ２Ｄ核酸」という用語は、天然ヒトＮＫＧ２Ｄをコードする核酸配列、例えば、天然ヒトＫＬＲＫ１遺伝子（受託番号５７４２４０）；ＫＬＲＫ１　ｃＤＮＡが転写され得る配列を有する核酸；および／または前述の対立遺伝子変異体およびホモログを意味する。この用語は、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡおよびＲＮＡを包含する。

【００４７】

本明細書において使用する場合、「核酸」または「核酸分子」は、２つ以上のヌクレオチド鎖、例えばＲＮＡ（リボ核酸）およびＤＮＡ（デオキシリボ核酸）を意味する。本明細書に記載の核酸分子は、ＲＮＡの形態、またはＤＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡおよび合成ＤＮＡ）の形態であり得る。ＤＮＡは、二本鎖または一本鎖であってよく、一本鎖であればコード鎖（センス）または非コード鎖（アンチセンス）であってよい。

【００４８】

本明細書において使用する場合、「患者」、「対象」および「個体」という用語は、本明細書において互換性があり、処置されるおよび／または生体試料を得るための哺乳動物（例えばヒト）対象を意味する。

【００４９】

本明細書において使用する場合、「結合する（ｂｉｎｄ）」、「結合する（ｂｉｎｄｓ）」または「相互作用する」という用語は、１つの分子が、試料または生体内の特定の第２の分子を認識し、接着するが、試料中の他の構造的に関連のない分子は実質的に認識しない、または接着しないことを意味する。

【００５０】

本明細書において使用する場合、プローブまたは抗体に関する「標識された」という用語は、検出可能な物質とプローブまたは抗体とのカップリング（すなわち、物理的結合）による、プローブまたは抗体の直接標識を包含する意図である。

【００５１】

本明細書において使用する場合、核酸分子またはポリペプチドに関して、「天然」という用語は、自然発生の（例えばＷＴ）核酸またはポリペプチドをさす。

【００５２】

本明細書において使用する場合、「診断（ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ）」、「診断する（ｄｉａｇｎｏｓｅ）」および「診断される（ｄｉａｇｎｏｓｅｄ）」という用語は、病的状態の存在または性質の特定を意味する。

【００５３】

本明細書において使用する場合、「試料」という用語は、その最も広範囲な意味で本明細書において使用する。ポリヌクレオチド、ペプチド、抗体などを含む試料は、体液、溶性細胞調製画分もしくは細胞が成長した培地の可溶性分画、ゲノムＤＮＡ、ＲＮＡもしくはｃＤＮＡ、細胞、組織、皮膚、毛などを含み得る。試料の例は、唾液、血清、生検標本、血液、尿および血漿を含む。

【００５４】

本明細書において使用する場合、「配列同一性」は、サブユニットの一致を最大にするように、すなわち、ギャップおよび挿入を考慮に入れて２つの配列をアライメントした場合の、２つの配列中の対応する位置において同一のサブユニットのパーセントを意味する。２つの配列両方の中のサブユニットの位置が、同じヌクレオチドまたはアミノ酸で占められている時、配列同一性が存在する、例えば、所与の位置が２つの個々のＤＮＡ分子においてアデニンにより占められている場合、その分子はその位置において同一である。例えば、１０ヌクレオチド長の配列の７つの位置が、第２の１０ヌクレオチドの配列中の対応する位置と同一である場合、２つの配列は７０％の配列同一性を有する。配列同一性は通常配列分析ソフトウェア（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ、１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．５３７０５）を使用して測定される。

【００５５】

核酸分子の突然変異に関して、「サイレント」変化は、ヌクレオチド配列中の１つまたは複数の塩基対を置換するが、その配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない変化である。「保存的」変化は、核酸の蛋白質コード領域中の少なくとも１つのコドンが、核酸配列によってコードされたポリペプチドの少なくとも１つのアミノ酸が同様の特徴を有する別のアミノ酸と置換されるように変化されたものである。

【００５６】

本明細書において使用する場合、「オリゴヌクレオチド」、「ｓｉＲＮＡ」、「ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチド」および「ｓｉＲＮＡの」という用語は、本明細書を通して互換性を持って使用され、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、それらの置換型およびアルファアノマー型、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ホスホロチオエート、メチルホスホネートなどを含む、天然の直鎖もしくは環状オリゴマーおよび／または修飾されたモノマーもしくは連鎖を含む。Ｗａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ型の塩基対、Ｈｏｏｇｓｔｅｅｎまたは逆Ｈｏｏｇｓｔｅｅｎ型の塩基対などのように、オリゴヌクレオチドは、モノマーとモノマーとの相互作用の正則パターンを用いて標的ポリヌクレオチドと特異的に結合できる。

【００５７】

本明細書において使用する場合、「抗体」という用語は、最も広範囲な意味で使用され、特に、完全長モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を含み、文脈が特に述べない限り、または特に矛盾しない限り、それらが所望の生物活性を示すのであれば抗原結合断片、抗体変異体およびそれらの多特異的分子を含む。一般的に、完全長抗体は、ジスルフィド結合によって相互に結合された少なくとも２本の重鎖（Ｈ）および２つの軽鎖（Ｌ）を含む糖蛋白質またはそれらの抗原結合部分である。個々の重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてＶＨと略する）および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は３つのドメ

イン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３から構成される。個々の軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてＶＬと略する）および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は１つのドメイン、ＣＬで構成される。ＶＨおよびＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存された領域が散在する相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細かく分割される。個々のＶＨおよびＶＬは、３つのＣＤＲおよび４つのＦＲで構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４の順番に配列されている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の分子構造の一般原則および抗体作製に関するさまざまな技術が提供されている（例えば、非特許文献１参照）。例えば、本明細書に記載の抗ＮＫＧ２Ｄ抗体は、ＮＫＧ２Ｄの活性化および／またはシグナル伝達に干渉するＮＫＧ２Ｄの部分に結合できる。本明細書に記載の抗ＮＫＧ２Ｄ抗体は、ＮＫＧ２Ｄリガンド結合相互作用に干渉するＮＫＧ２Ｄの部分にも結合できる。

【００５８】

本明細書において使用する場合、抗体の「抗原結合断片」は、通常少なくともＶＨ領域の１つまたは複数部分を含み、抗原に検出可能に結合できる、完全長抗体の一部を含む分子である。抗原結合断片は、抗体の１、２、３、またはそれを超える抗原結合部分を含む多価分子およびＶＬおよびＶＨ領域またはそれらの選択された部分が、合成リンカーによって、または機能性抗原結合分子を形成するための組み換え法によって結合された一本鎖構築体を含む。抗体のいくつかの抗原結合断片は、大型の抗体分子の実際の断片化（例えば、酵素的切断）によって得ることができるが、通常、大部分は組み換え技術によって作製される。

【００５９】

本明細書において使用する場合、「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク領域およびＣＤＲ領域の両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する（すなわち、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列と同一である、または本質的に同一である）可変領域を有する抗体を含むことを意図する。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域もまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列「に由来する」。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏのランダムな突然変異生成もしくは部位特異的突然変異生成によって、またはｉｎｖｉｖｏの体細胞突然変異によって導入された突然変異）。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書において使用する場合、別の哺乳動物種、例えばマウスの生殖系列に由来するＣＤＲ配列を、ヒトフレームワーク配列上に連結した（グラフトしてある）抗体を含むことを意図しない。

【００６０】

本明細書において使用する場合、「ヒト化」抗体は、非ヒトの免疫グロブリンに由来する最小の配列を含有する、ヒト／非ヒトのキメラ抗体である。大部分に関して、ヒト化抗体は、レシピエント（受容側）の超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する、非ヒト種（ドナー抗体）、例えばマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類の超可変領域由来の残基によって置き換えられた、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合に、ヒト免疫グロブリンのＦＲ残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中に見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに改良するために実施される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、通常は２つの可変ドメインの実質的にすべてを含むと思われ、超可変ループのすべてもしくは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、ＦＲ残基のすべてもしくは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のＦＲ残基である。ヒト化抗体は、場合により、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、通常ヒト免疫グロブリンの定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部をさらに含むことができる。さらなる詳細に関しては、例えば、非特許文献２、非特許文献３、非特許文献４、特許文献１、特許文献２および特許文献３、特許文献４、特許文献５、特許文献６、特許文献７、特許文献８、特許文献９、特許文献１０、特許文献１１、特許文献１２、

特許文献１３、特許文献１４、特許文献１５、特許文献１６、特許文献１７、特許文献１８、特許文献１９、特許文献２０、特許文献２１、特許文献２２、特許文献２３、特許文献２４および特許文献２５を参照されたい。

【００６１】

本明細書において使用する場合、「フレームワーク領域」または「ＦＲ」の残基は、本明細書で定義したＣＤＲ以外のそれらのＶＨまたはＶＬ残基である。

【００６２】

本明細書において使用する場合、「エピトープ」または「結合部位」は、抗原結合ペプチド（抗体など）が特異的に結合する、抗原上の範囲または領域である。蛋白質エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基（エピトープの免疫優性成分とも呼ばれる）および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基、例えば、特異的抗原結合ペプチドによって有効に遮断されるアミノ酸残基を含むことができる（言い換えると、アミノ酸残基は「溶媒排除表面」内である、および／または特異的抗原結合ペプチドの「フットプリント」である）。本明細書においてエピトープという用語は、特に明記しない限り（例えば、いくつかの文脈において、本発明は特定のアミノ酸残基に直接結合する抗体に関する）、抗ｈＮＫＧ２Ｄ抗体または本発明に従った別のｈＮＫＧ２Ｄ特異的薬剤と特異的に結合する、ｈＮＫＧ２Ｄの任意の特定の領域中の両方の型のアミノ酸結合部位を含む。ＮＫＧ２Ｄは、多くのさまざまなエピトープを含み、これらは、限定されることなく、（１）直鎖ペプチド抗原決定基（２）成熟ＮＫＧ２Ｄの立体配座において相互に近接する位置にある１つまたは複数の非連続アミノ酸からなる立体配座抗原決定基；および（３）ＮＫＧ２Ｄに共有結合した分子構造、例えば炭水化物群の全体、または一部からなる翻訳後抗原決定基を含み得る。文脈により明記されない、または矛盾しない限り、立体配座抗原決定基は、抗原結合ペプチドの原子から約４Åの距離内にＮＫＧ２Ｄアミノ酸残基を含む。

【００６３】

本明細書において使用する場合、対象の抗体（例えばＭＳまたは２１Ｆ２）「と本質的に同じエピトープまたは決定基と結合する」という表現は、抗体が、対象の抗体と特異的に結合するＮＫＧ２Ｄ分子に対して、対象の抗体と「競合する」ことを意味する。

【００６４】

本明細書において使用する場合、ＮＫＧ２Ｄ分子と天然のＮＫＧ２Ｄ－リガンド（例えばＭＩＣＡ）との結合を「遮断する」抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の能力は、可溶性または細胞表面関連ＮＫＧ２Ｄおよびリガンド分子を使用するアッセイにおいて、ＮＫＧ２Ｄ分子が抗体の不在下でリガンドと検出可能に結合する場合に、抗体が、用量依存様式でＮＫＧ２Ｄ分子とリガンドとの結合を検出可能に減少させ得ることを意味する。

【００６５】

本明細書において使用する場合、「ＮＫＧ２Ｄリガンド結合相互作用」という表現は、ＮＫＧ２Ｄとそのリガンド（例えば、ＭＩＣＡ／Ｂ、ＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１、Ｍｕｌｔ１、Ｒａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂ）との間の特異的認識および結合相互作用を指す。ＮＫＧ２Ｄリガンド結合相互作用を調節する薬剤の例は、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２ＤリガンドおよびＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤を含む。

【００６６】

コレステロールおよびトリグリセリドのレベルが高いことは、心血管疾患および２型糖尿病の危険性を増加させる脂質代謝異常であると考えられる。

【００６７】

本明細書において使用する場合、「糖尿病」は、膵臓ホルモンのインスリンの相対的欠乏または絶対的欠乏のため、血糖値の上昇をもたらす代謝異常をさす。糖尿病には２つの形態：１型糖尿病および２型糖尿病がある。１型糖尿病は、一方のベータ細胞を標的とする破壊的自己免疫プロセスおよび他方のこれらの細胞の再生能力との間の好ましくないバランスによる、膵臓ベータ細胞喪失の進行を特徴とする。このバランスの悪さは、最終的にはベータ細胞および内因性インスリン分泌の全欠損をもたらす。２型糖尿病は、インス

リン抵抗性およびベータ細胞機能の障害を特徴とし、これは第１相インスリン放出の障害、ベータ細胞のパルス量（pulse mass）の減少およびインスリン欠乏を含む。好ましい実施形態において、本発明は２型糖尿病の治療に関する。

【００６８】

本明細書において使用する場合、「２型糖尿病」は、体がインスリンの効果に対して抵抗性である、または体が、正常なグルコースレベルを維持するための十分なインスリンを産生しない、慢性の病態を意味する。さらに、脂質異常症などの疾患の早期の人々に存在する、代謝機能不全もまた意味する。

【００６９】

本明細書において使用する場合、「心血管疾患」という表現は、心臓および血管に関連する機能に影響を与える異常な病態を意味する。

【００７０】

本明細書において使用する場合、「安全かつ有効な量」という用語は、本明細書に記載の通り使用する際、合理的利益／危険性の比に釣り合った、過度に有害な副作用（毒性、刺激作用またはアレルギー反応）なしに所望の治療応答を得るために十分である成分量を指す。

【００７１】

本明細書において使用する場合、「治療有効量」という用語は、所望の治療応答を得るために有効な、本明細書に記載の組成物の量、例えば、アテローム硬化性プラークの発症を遅らせるために有効な量、または血糖値を降下させるため、および肥満患者において体重減少を促進するために有効な量を意味する。

【００７２】

具体的な安全かつ有効な量、または治療有効量は、特定の治療される病態、患者の生理的状態、治療される哺乳動物または動物の型、治療期間、（もしあれば）併用の療法の性質ならびに用いる具体的な製剤および化合物またはその誘導体の構造などの因子に伴い変動すると思われる。

【００７３】

本明細書において使用する場合、「治療」という用語は、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を回復、治癒、緩和、軽減、変質、救済、寛解、改善または影響を与える目的の、疾患、疾患症状もしくは疾患に対する素因を有する患者への治療薬の適用もしくは投与または患者由来の単離組織もしくは細胞株への治療薬の適用もしくは投与として定義される。例えば、疾患または障害の症状または臨床的に関連のある明示が特定された患者の臨床「治療」、治癒的「治療」または緩和「治療」は、一般的に防止または予防療法を構成しないが、疾患または障害の症状もしくは臨床的に関連のある明示が特定されない患者の「治療」は防止または予防療法である。対象における２型糖尿病の治療は、例えば、血糖値降下および対象の体重減少を含む。２型糖尿病の疾患進行の阻止は、脂質代謝状態の防止もしくは抑制、インスリン抵抗性の低下、脂質代謝異常の防止もしくは抑制、耐糖能の改善などを含む。２型糖尿病の治療および２型糖尿病の疾患進行の阻止は、糖尿病に関連する症状、障害または疾患、例えば、それらに関連するメタボリックシンドローム、糖尿病性網膜症、腎不全、血行不足および四肢障害の緩和もしくは防止を含み得る。治療の個々の形態は、本発明の独特の態様と考えることができる。

【００７４】

従来の分子生物学技術に関する方法を、本明細書に記載する。このような技術は一般に当分野において公知であり、非特許文献５および非特許文献６（定期的に更新）などの方法論に詳細に記載されている。遺伝子導入および遺伝子療法の従来の方法もまた、本発明における使用に適合され得る。例えば、非特許文献７、非特許文献８、および非特許文献９を参照されたい。免疫学的技術は一般に当分野において公知であり、非特許文献１０、非特許文献１１、非特許文献１２および非特許文献１などの方法論に詳細に記載されている。

【００７５】

本明細書に記載のものと同様または等価の方法、組成物およびキットは、本発明の実践または試験に使用できるが、適切な方法、組成物およびキットを以下に記載する。

【００７６】

本明細書において述べたすべての出版物、特許出願および特許は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。対立する場合、定義を含む本明細書が支配する。以下に論じる特定の実施形態は、単なる例示であり、限定する意図のものではない。

【００７７】

本発明は、免疫刺激分子のファミリーが糖尿病または脂質代謝機能不全の患者および動物においてアップレギュレーションされ、心血管疾患の発症にとって重要であるという発見に基づく。本明細書に記載のデータは、ＭＩＣＡ／Ｂ蛋白質が２型糖尿病のヒト患者の血清において上昇すること、および抗ＮＫＧ２Ｄ抗体を糖尿病マウスに注射することによって、ＮＫＧ２Ｄリガンド相互作用を遮断し、アテローム硬化性のプラーク形成を有意に抑制することの最初の証拠を提供する。本明細書に記載のデータは、ＮＫＧ２Ｄ／リガンドにより仲介される免疫活性化が２型糖尿病の進行に関与することをさらに示す。２型糖尿病の動物モデルに抗ＮＫＧ２Ｄ抗体を注射することにより、糖尿病を治療することができ、血糖値を有意に降下させることができる。ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の遮断は、コレステロールおよびトリグリセリドのレベルの減少を含む、異常な代謝状態をさらに緩和させる。

【００７８】

したがって、ＭＩＣＡ／Ｂおよび他のＮＫＧ２Ｄリガンドは、糖尿病患者において２型糖尿病および心血管疾患の発症を予測するための新規な分子マーカーであり、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用と同様に、ＭＩＣＡ／Ｂおよび他のＮＫＧ２Ｄリガンドは、２型糖尿病および他の異常な代謝状態または疾患（例えば、脂質異常症、糖尿病性網膜症、血行不足、四肢障害）および心血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化）を予防または治療するための新規な標的である。

【００７９】

したがって、本発明は、２型糖尿病および他の異常な代謝状態、例えば、心血管の疾患または障害を検出および治療するための新規な方法、組成物およびキットを提供する。

【００８０】

ＮＫＧ２Ｄは、多くの免疫細胞、例えばＮＫ、ＮＫＴ、ａｂ　Ｔおよびｇｄ　Ｔ細胞によって発現される免疫刺激分子である。その同族リガンドによるＮＫＧ２Ｄの刺激は、ＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞の活性化をもたらす。ＮＫＧ２Ｄに対するリガンドとして機能できる複数の分子が存在し、これらは、マウスにおいては蛋白質のＲａｅ－１、Ｈ６０およびＭｕｌｔ１ファミリーのメンバーならびにヒトにおいては蛋白質のＭＩＣＡ／ＢおよびＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１ファミリーのメンバーを含む。ＮＫＧ２Ｄリガンドの大部分は、正常細胞中では発現しない、または低レベルで発現するが、さまざまな疾患状態においてアップレギュレーションされ、順にＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞を活性化できる。このような免疫活性化は、宿主防御、例えば細菌免疫および腫瘍監視において重要な役割を果たすが、さらに免疫仲介疾患に寄与することもできる。

【００８１】

一実施形態において、本発明は、対象由来の生体試料中にＭＩＣＡ／Ｂ蛋白質を検出し、対象における２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患の存在を検出または発生を予測するための方法およびキットを提供する。代謝機能不全関連疾患は、高血糖、糖尿病性網膜症、血行不足、四肢障害および脂質異常症（例えば、高コレステロールおよび高トリグリセリド）を含む。

【００８２】

実施例１において本明細書に記載のデータは、臓器の炎症および関連する合併症を促進するであろうＮＫＧ２Ｄリガンドが、２型糖尿病患者においてアップレギュレーションされることを示す。本明細書に記載のデータは、ＭＩＣＡ／Ｂ蛋白質のレベルの上昇が２型糖尿病ヒト患者の血清およびアテローム硬化性プラーク中に検出されたことを提供する。

Ｈ６０およびＲａｅ－１（レチノイン酸早期誘導性遺伝子１）蛋白質が、脂質代謝機能不全およびアテローム性動脈硬化の動物モデルである、糖尿病または非糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスの血管中、特にアテローム硬化性病変領域および肝臓中においてアップレギュレーションされたこと、ならびにＭｕｌｔ１はこれらの動物の血清中でアップレギュレーションされたことがさらに見いだされた（実施例２を参照されたい）。したがって、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えば、ＭＩＣＡ／Ｂ蛋白質またはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１蛋白質）のアップレギュレーションは、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患の存在の検出または発生の予測に有用であり得る。

【００８３】

２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患もしくは代謝機能不全関連疾患の発症に対する素因または２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患もしくは代謝機能不全関連疾患の存在を検出するための通常の方法は、対象から生体試料を得るステップ；生体試料を、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現（例えばＭＩＣＡ／Ｂの発現）を検出する少なくとも１種の試薬と接触させるステップ；生体試料中のＮＫＧ２Ｄリガンドの発現レベルを測定するステップ；およびＮＫＧ２Ｄリガンドの過剰発現と、対象における２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患発症の素因とを相関させるステップを含む。実施例１において論じたデータによって例示されるように、可溶性ＭＩＣＡ／Ｂの発現を測定した。しかし、いくつかの実施形態において、ＭＩＣＡ／Ｂ発現の膜型を測定できる。ＭＩＣＡ／Ｂの代わり、またはＭＩＣＡ／Ｂに加えて、任意のＮＫＧ２Ｄリガンドの発現を分析できる。例えば蛋白質のＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１ファミリーはＮＫＧ２Ｄリガンドであり、ＭＩＣＡ／Ｂがそうであり得るように、シェディングされ（脱落し）、血清中に存在することが見出されており、したがってこれらの蛋白質を、本明細書に記載の方法、組成物およびキットのための適切なマーカーにする。ＮＫＧ２Ｄリガンドは、例えば、非特許文献１３に記載されている。

【００８４】

いくつかの実施形態において、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現（例えば、ＭＩＣＡ／Ｂの発現）を検出する試薬は、ＭＩＣＡ／Ｂ抗体および可溶性ＮＫＧ２Ｄなどの任意の適切な試薬を含み得る。

【００８５】

一般的に、生体試料は血清である。しかし、任意の適切な生体試料が使用できる。さらなる生体試料の例は、生検標本、血漿、尿、皮膚、血液および唾液を含む。

【００８６】

任意の適切な方法またはアッセイを使用して、対象の生体試料におけるＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）発現のレベルを測定できる。多くの抗体に基づく検出フォーマットは、当分野において周知であり、ＥＬＩＳＡ（enzyme linked immunosorbent assay））、ラジオイムノアッセイ、免疫ブロット、ウェスタンブロット、フローサイトメトリ、免疫蛍光アッセイ、免疫沈降、プロテインＡアッセイ、免疫電気泳動アッセイおよび他の関連技術を含む。いくつかの実施形態において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。別の実施形態において、一次抗体は、二次抗体または一次抗体に対する試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態において、二次抗体は標識される。免疫アッセイにおける結合の検出に関する多くの手段が当分野において公知であり、本明細書に記載の組成物、キットおよび方法の範囲内である。ＭＩＣＡ／Ｂまたは他のＮＫＧ２Ｄリガンドに特異的な抗体は、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）の発現を検出する、少なくとも１種のこれらの手順を組み込む診断キット中に提供され得る。キットは、他の成分、パッケージ、指示書または蛋白質の検出およびキットの使用を助ける他の材料を含有できる。

【００８７】

２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患の発症に対する素因または対象における２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患の存在を検出する方法は、ＭＩＣＡ／Ｂまたは他のＮＫＧ２Ｄリガンド（複数可）の過剰発

現と、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患に対する素因または対象において２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患を有することとを相関させるステップを含む。１種または複数のＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）が生体試料中で過剰発現されるかどうかを、生体試料中のＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）発現のレベルと、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）の発現のベースラインレベル（対照レベルとしても公知）とを比較することによって決定できる。「ベースラインレベル」は対照レベルであり、いくつかの実施形態において、正常レベルまたは２型糖尿病、炎症性疾患もしくは他の代謝機能不全関連疾患および心血管疾患に対する素因を有する対象において観察されないレベルである。したがって、２型糖尿病、炎症性疾患もしくは他の代謝機能不全関連疾患の発症に関して評価される試料が、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現において、ベースラインレベルと比較して測定可能な増加（すなわち、過剰発現、上方制御）、減少を有するか、または実質的に変化なしかどうかを、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）の発現の対照レベルまたはベースラインレベルに基づいて決定できる。特定の実施形態において、ベースラインレベルは、対象の疾患状態を時間とともにモニターできるように、および／または所与の治療プロトコルの有効性を時間とともに評価できるように、被検対象に由来する以前の試料から確立できる。

【００８８】

２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患の発症に対する素因または対象における２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連炎症性疾患の存在を検出する方法のいくつかの実施形態において、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）に加えて、１種または複数種のマーカーの発現を分析した。１種または複数種のマーカーはＮＫＧ２Ｄリガンドであってもよく、任意のＮＫＧ２Ｄリガンドの発現を分析できる。測定可能なさらなるマーカーの例は、Ｃ反応性蛋白質、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ｓｌＣＡＭ－１、ｓＣＤ４０、蛋白質のＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１ファミリー（例えば、ＵＬＢＰ１、ＵＬＢＰ２、ＵＬＢＰ３、ＵＬＢＰ４、ＲＡＥＴ１Ｇ、ＲＡＥＴ１Ｌ）などを含む。ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）に加えて、１種または複数種のマーカーの発現を分析した実施形態において、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）および他のバイオマーカーの組み合わせは、より信頼できる血管疾患の予測および／または代謝機能不全関連疾患の発症を提供できる。このような実施形態において、生体試料を、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現を検出する少なくとも１種の試薬およびＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）に加えて１種または複数種のマーカーの発現の存在を検出する２種以上の試薬とそれぞれと接触させる。生体試料中のＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）および２種以上のさらなるマーカーの発現レベルを測定し、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）の過剰発現を、対象における２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または代謝機能不全関連疾患（例えば、脂質異常症、糖尿病性網膜症、血行不足、四肢障害など）の発症に対する素因と相関させる。特定の２種以上のさらなるマーカーに依存して、それらの発現低下または過剰発現を、対象における２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または代謝機能不全関連疾患（例えば、脂質異常症、糖尿病性網膜症、血行不足、四肢障害など）の発症に対する素因と相関させることができる。

【００８９】

別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１蛋白質）の発現を調節（例えば、ＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１の発現の阻害）および活性を調節（例えばＮＫＧ２Ｄへの結合）し、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患または代謝機能不全関連疾患を有する対象を治療する組成物および方法を提供する。組成物は、心血管疾患（例えばアテローム性動脈硬化）に対して素因がある、および／もしくは発症している人々、ならびに／または代謝機能不全関連疾患、例えば、高コレステロールレベルまたは高トリグリセリドレベル、糖尿病、脂質異常症、糖尿病性網膜症、血行不足、四肢障害などを有する人々を治療するために有用であり得、本明細書に記載している。このような組成物は、１種または複数種のＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１）の発現または活性／シグナル伝達を

調節する治療有効量の薬剤および製薬的に許容される担体を一般的に含む。ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１）の阻害剤は、細胞中のＮＫＧ２Ｄリガンドのレベルを低下させるために活性である、および／または細胞においてＮＫＧ２Ｄリガンドの活性を低下させる。細胞中のＮＫＧ２Ｄリガンドのレベルを低下させるために活性であるＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１）の阻害剤は、ＮＫＧ２Ｄリガンドをコードする遺伝子の転写または翻訳の阻害剤であり得る。さらに、細胞中のＮＫＧ２Ｄリガンドのレベルを低下させるために活性であるＮＫＧ２Ｄリガンドの阻害剤は、ＮＫＧ２Ｄリガンドおよび／またはＮＫＧ２ＤリガンドをコードするｍＲＮＡの分解を刺激できる。転写および／または翻訳の阻害剤は、核酸に基づく阻害剤、例えば、標的ＮＫＧ２ＤリガンドｍＲＮＡに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび標的ｍＲＮＡの切断に対して触媒的に活性であるリボザイムおよびＤＮＡ酵素であり得る。

【００９０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物はＮＫＧ２Ｄリガンドをコードする遺伝子に特異的なｓｉＲＮＡを含む。配列特異的ｓｉＲＮＡは、標的核酸分子と結合し、それらの発現を阻害する。ｓｉＲＮＡの送達のための組成物およびそれらの治療方法を提供する。リボザイム、ｓｉＲＮＡおよびアンチセンス分子の構築および使用方法は、当分野において公知である（例えば、非特許文献１４、非特許文献１５、非特許文献１６参照）。「アンチセンス」核酸は、蛋白質をコードする「センス」核酸に相補的な、例えば、二本鎖ｃＤＮＡ分子のコード鎖に相補的な、またはｍＲＮＡ配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。アンチセンス核酸は、全ＭＩＣＡ／Ｂコード鎖またはそれらの一部にだけ相補的であり得る。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えば、５’および３’の非翻訳領域）をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。アンチセンス薬剤は、例えば、約８から約８０核酸塩基（すなわち、約８から約８０ヌクレオチド）、例えば約８から約５０核酸塩基、または１２から約３０核酸塩基を含み得る。アンチセンス化合物は、リボザイム、外部ガイド配列（ＥＧＳ）オリゴヌクレオチド（オリゴザイム）および他のより短い触媒ＲＮＡまたは標的核酸とハイブリダイズし、その発現を調節する触媒オリゴヌクレオチドを含む。アンチセンス化合物は、標的遺伝子中の配列に相補的である、少なくとも８個の連続する核酸塩基の伸張を含み得る。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能であるその標的核酸配列に１００％相補的である必要はない。オリゴヌクレオチドと標的との結合が、標的分子の正常な機能に干渉し、有用性喪失の原因となり、特異的結合が望ましい条件下、すなわち、ｉｎ　ｖｉｖｏのアッセイもしくは治療では生理条件下またはｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイではアッセイが実施される条件下で、オリゴヌクレオチドと非標的配列との非特異的結合を避けるために十分な程度の相補性がある場合、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズする。

【００９１】

いくつかの実施形態において、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現を調節（例えば、ＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１の発現の阻害）および活性（例えばＮＫＧ２Ｄへの結合）を調節し、心血管疾患（例えばアテローム性動脈硬化）に対して素因がある、および／もしくは心血管疾患（例えばアテローム性動脈硬化）発症している、ならびに／または異常な代謝状態、例えば、高コレステロールレベルまたは高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症などを有する、代謝機能不全関連炎症性疾患、例えば２型糖尿病を有する対象を治療するための組成物は、ＮＫＧ２Ｄと１種または複数種のそのリガンドとの相互作用（例えば、ＮＫＧ２Ｄ／ＭＩＣＡ／Ｂ相互作用）を遮断する治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体および心血管疾患、高血圧またはＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用経路以外の経路からもたらされる代謝障害を治療するための公知の薬剤を含む。心血管疾患を治療するための公知の薬剤の例は、任意の１種の３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリルコエンザイムＡレダクターゼ阻害剤（スタチン）である。スタチンの例は、セルビスタチン（Ｃｅｒｖｉｓｔａｔｉｎ）、フルバスタチン、アトルバスタチン、シンバス

タチン、プラバスタチンもしくはロバスタチンまたは薬学的に許容されるそれらの塩を含む。スタチンに関する組成物および方法は、当分野において公知である（特許文献２６を参照されたい）。

【００９２】

別の実施形態において、本発明は、ＮＫＧ２Ｄと１種または複数種のそのリガンドとの相互作用（例えば、ＮＫＧ２Ｄ／ＭＩＣＡ／Ｂ相互作用）を遮断する薬剤および薬学的に許容される担体を含む、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば高コレステロールレベルまたは高トリグリセリドレベル、脂質異常症、血行不足、四肢障害、糖尿病性網膜症など）を治療する組成物を提供する。別の実施形態において、組成物は、ＮＫＧ２Ｄの活性化およびシグナル伝達を阻害する薬剤および薬学的に許容される担体を含む。

【００９３】

実施例３において本明細書に記載のデータは、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体を使用したＮＫＧ２Ｄリガンド結合相互作用の遮断により、ＮＫＧ２Ｄ発現細胞の数を変えることなく、糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスにおいてプラーク形成が抑制され得たことを示す。

【００９４】

ＮＫＧ２Ｄと１種もしくは複数種のそのリガンドとの相互作用（例えば、ＮＫＧ２Ｄ／ＭＩＣＡ／Ｂ相互作用）を遮断する、またはＮＫＧ２Ｄの活性化もしくはシグナル伝達を阻害する任意の適切な薬剤が使用できる。例えば、薬剤は、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２ＤリガンドおよびＮＫＧ２Ｄリガンドの活性もしくは発現の阻害剤からなる群から選択できる。

【００９５】

ＮＫＧ２Ｄの活性化もしくはシグナル伝達を阻害する、またはＮＫＧ２Ｄと１種もしくは複数種のそのリガンドとの相互作用を遮断する典型的な薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、ヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する。

【００９６】

ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する任意の適切な抗体が使用できる。本明細書に記載の抗ＮＫＧ２Ｄ抗体は、ポリクローナルヒト抗体およびモノクローナルヒト抗体または免疫グロブリン可変領域の少なくとも１つの抗原結合領域を有するそれらの任意の抗原結合断片部分を含み、この抗体はＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する。ポリペプチドのエピトープに対して産生され、天然または組み換え蛋白質の少なくとも一部と結合する場合、抗体はＮＫＧ２Ｄに対して特異的である。ＮＫＧ２Ｄの活性化もしくはシグナル伝達を阻害する薬剤の別の例は、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ、ＵＬＢＰ）と特異的に結合する抗体である。ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ、ＵＬＢＰ）と特異的に結合する、任意の適切な抗体が使用できる。

【００９７】

モノクローナル抗体の特異性および親和性を、競合的阻害によって決定する方法は、非特許文献１、非特許文献１７および非特許文献１８に見出すことができ、この参考文献は全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００９８】

いくつかの実施形態において、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体は、ヒトモノクローナル抗体１６Ｆ１６、１６Ｆ３１、ＭＳおよび２１Ｆ２であり、配列を以下に記載する。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒトモノクローナル抗体ＭＳである。これらの抗体の完全長、可変およびＣＤＲの配列を表１に示す。

【００９９】

【表１】

表１

１６Ｆ１６、１６Ｆ３１、ＭＳおよび２１Ｆ２に関する完全長、可変およびＣＤＲのアミノ酸配列

抗体部分	配列番号	抗体部分	配列番号
16F16 IgG4 H鎖	1	MS IgG4 H鎖	21
16F16 L鎖	2	MS L鎖	22
16F31 IgG4 H鎖	3	21F2 IgG4 H鎖	23
16F16 L鎖	4	21F2 L鎖	24
16F16 VH領域	5	MS VH領域	25
16F16 VL領域	6	MS VL領域	26
16F31 VH領域	7	21F2 VH領域	27
16F31 VL領域	8	21F2 VL領域	28
16F16 VH CDR1	9	MS VH CDR1	29
16F16 VH CDR2	10	MS VH CDR2	30
16F16 VH CDR3	11	MS VH CDR3	31
16F16 VL CDR1	12	MS VL CDR1	32
16F16 VL CDR2	13	MS VL CDR2	33
16F16 VL CDR3	14	MS VL CDR3	34
16F31 VH CDR1	15	21F2 VH CDR1	35
16F31 VH CDR2	16	21F2 VH CDR2	36
16F31 VH CDR3	17	21F2 VH CDR3	37
16F31 VL CDR1	18	21F2 VL CDR1	38
16F31 VL CDR2	19	21F2 VL CDR2	39
16F31 VL CDR3	20	21F2 VL CDR3	40

【０１００】

本明細書に記載の抗ＮＫＧ２Ｄおよび抗ＮＫＧ２Ｄリガンド抗体は、限定するものではないが、適切な動物へのポリペプチドもしくは抗原断片の接種、リンパ球集団のｉｎ　ｖｉｔｒｏ刺激、合成方法、ハイブリドーマおよび／または抗ＮＫＧ２Ｄ抗体などをコードする核酸を発現する組み換え細胞などの方法に従って、ルーチンに作製可能である。精製された組み換えＮＫＧ２Ｄまたはそれらのペプチド断片を使用した動物の免疫化は、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の調製方法の一例である。同様に、精製された組み換えＮＫＧ２Ｄリガンド（例えば、ＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１蛋白質、ＭＩＣＡ／Ｂ、Ｍｕｌｔ１などの１つ）またはそれらのペプチド断片を使用した動物の免疫化は、抗ＮＫＧ２Ｄリガンド抗体の調製方法の一例である。

【０１０１】

ＮＫＧ２ＤまたはＮＫＧ２Ｄリガンドと特異的に結合するモノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって得ることができる。例えば、非特許文献１９、特許文献２７、非特許文献２０、非特許文献１、非特許文献１７を参照されたく、この内容は参照によりその全体は本明細書に組み込まれる。このような抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびそれらの任意のサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスであってよい。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｓｉｔｕ　またはｉｎ　ｖｉｖｏで培養できる。

【０１０２】

別の実施形態において、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する薬剤は可溶性ＮＫＧ２Ｄである。可溶性ＮＫＧ２Ｄは、当分野において公知の任意の適切な方法によって調製できる（例えば、非特許文献２１を参照されたい）。一実施形態において、可溶性ＮＫＧ２Ｄは、任意の適切な送達経路および手段によって、対象に投与される。別の実施形態において、可溶性ＮＫＧ２Ｄをコードする核酸は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または代謝機能不全関連疾患（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、血行不足、四肢障害、糖尿病性網膜症など）を治療するために対象に投与され得る。可溶性ＮＫＧ２Ｄ蛋白質をコードするコード配列は、受託番号５７４２４０のヌクレオチド配列と同一であってよく、または受託番号５７４２４０のポリヌクレオチドと同じポリペプチドをコードする、遺伝コードの冗長また退縮の結果として異なるコード配列であってもよい。本明細書に記載の他の核酸分子は、天然ＮＫＧ２Ｄ遺伝子の変異体、例えば、天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の断片、アナログおよび誘導体をコードする変異体を含む。このような変異体は、例えば、天然ＮＫＧ２Ｄ遺伝子の天然発生の対立遺伝子多型、天然ＮＫＧ２Ｄ遺伝子のホモログまたは天然ＮＫＧ２Ｄ遺伝子の非天然発生変異体であってよい。これらの変異体は、１つまたは複数の塩基が天然のＮＫＧ２Ｄ遺伝子と異なるヌクレオチド配列を有する。例えば、このような変異体のヌクレオチド配列は、天然ＮＫＧ２Ｄ遺伝子の１つまたは複数のヌクレオチドの欠失、付加または置換を特徴とし得る。

【０１０３】

さらに別の実施形態において、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する薬剤は可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンドであってよい。ＭＩＣＡ／Ｂのシェディング（可溶性）形態が、体中でＮＫＧ２Ｄ機能を阻害することが示されている。このような実施形態において、可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンドまたは可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンドをコードする核酸は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または代謝機能不全関連疾患（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、血行不足、四肢障害、糖尿病性網膜症など）を治療するために対象に投与され得る。

【０１０４】

他の実施形態において、構造に実質的な変化を表す変異体ＮＫＧ２Ｄ蛋白質または変異体ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ、ＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１蛋白質など）を、コードされたポリペプチドにおいて保存的変化ではない変化を引き起こすヌクレオチドの置換を実施することによって作製できる。このようなヌクレオチド置換の例は、（ａ）ポリペプチド骨格の構造；（ｂ）ポリペプチドの電荷または疎水性；または（ｃ）アミノ酸側鎖のバルク（容量）に変化を起こす置換である。蛋白質の特性に最も大きな変化をもたらすことが一般的に期待されるヌクレオチドの置換は、コドンに非保存的変化を引き起こす置換である。蛋白質構造に主要な変化を引き起こす可能性のあるコドンの変化の例は、（ａ）疎水性残基、例えばロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリンもしくはアラニンに対する（またはこれらによる）親水性残基、例えばセリンもしくはスレオニンの置換；（ｂ）任意の他の残基に対する（またはこれらによる）システインもしくはプロリンの置換；（ｃ）電気陰性残基、例えば、グルタミンもしくはアスパラギンに対する（またはこれらによる）電気陽性側鎖を有する残基、例えばリジン、アルギニンまたはヒスチジンの置換；または（ｄ）側鎖を有さない残基、例えばグリシンに対する（またはこれらによる）嵩張る（ｂｕｌｋｙ）側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンの置換を引き起こすものである。

【０１０５】

本明細書に記載の天然Ｋｌｒｋ１遺伝子または天然Ｋｌｒｋ１　ｍＲＮＡの天然発生対立遺伝子変異体は、天然Ｋｌｒｋ１遺伝子または天然Ｋｌｒｋ１　ｍＲＮＡと、少なくとも７５％（例えば、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％および９９％）の配列同一性を有し、天然Ｋｌｒｋ１蛋白質と構造類似性を有するポリペプチドをコードする、ヒト組織から単離された核酸で

ある。本明細書に記載の天然Ｋｌｒｋ１遺伝子または天然Ｋｌｒｋ１　ｍＲＮＡのホモログは、天然ヒトＫｌｒｋ１遺伝子または天然ヒトＫｌｒｋ１　ｍＲＮＡと、少なくとも７５％（例えば、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％および９９％）の配列同一性を有し、天然ヒトＮＫＧ２Ｄ蛋白質との構造類似性を有するポリペプチドをコードする、他の種から単離された核酸である。公共のおよび／または私有の核酸データベースを検索し、天然Ｋｌｒｋ１遺伝子または天然Ｋｌｒｋ１　ｍＲＮＡとの高いパーセント（例えば、７０、８０、９０％またはそれを超える）の配列同一性を有する他の核酸分子を特定できる。

【０１０６】

非天然発生Ｋｌｒｋ１遺伝子またはｍＲＮＡ変異体は、天然には発生せず（例えば、ヒトの手によって作製される）、天然ヒトＫｌｒｋ１遺伝子または天然ヒトＫｌｒｋ１　ｍＲＮＡとの、少なくとも７５％（例えば、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％および９９％）の配列同一性を有し、天然ヒトＮＫＧ２Ｄ蛋白質との構造類似性を有するポリペプチドをコードする核酸である。非天然発生Ｋｌｒｋ１遺伝子変異体の例は、ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の断片をコードするもの、ストリンジェントな条件下で天然Ｋｌｒｋ１遺伝子または天然Ｋｌｒｋ１遺伝子の相補体とハイブリダイズするもの、天然Ｋｌｒｋ１遺伝子またはそれらの相補体と少なくとも６５％の配列同一性を共有するものおよびＮＫＧ２Ｄ融合蛋白質をコードするものである。

【０１０７】

本明細書に記載の天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の断片をコードする核酸は、天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の例えば、２、５、１０、２５、５０、１００、１５０、２００またはそれを超えるアミノ酸残基をコードするものである。天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の断片をコードする核酸をコードする、またはそれらとハイブリダイズするより短いオリゴヌクレオチド（例えば、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、５０塩基対長のオリゴヌクレオチド）は、プローブ、プライマーまたはアンチセンス分子として使用できる。天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質の断片をコードする核酸は、酵素的消化（例えば、制限酵素を使用する）または完全長天然Ｋｌｒｋ１遺伝子、Ｋｌｒｋ１　ｍＲＮＡもしくはｃＤＮＡまたは前述の変異体の化学的分解によって作製できる。天然ヒトＫｌｒｋ１遺伝子のヌクレオチド配列および先に報告した天然ＮＫＧ２Ｄ蛋白質のアミノ酸配列を使用して、当業者は、例えば、標準的核酸突然変異生成技術によって、または化学合成によって、それらのヌクレオチド配列にわずかな変動を有する核酸分子を作製できる。変異体Ｋｌｒｋ１核酸分子を発現させ、変異体ＮＫＧ２Ｄ蛋白質を作製できる。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患の阻害および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）の治療のための組成物は、ＮＫＧ２Ｄと１種または複数種のそのリガンドとの相互作用（例えば、ＮＫＧ２Ｄ／ＭＩＣＡ／Ｂ相互作用）を遮断する薬剤（例えば、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体または抗ＮＫＧ２Ｄリガンド抗体）、薬学的に許容される担体および心血管疾患を治療するための公知の薬剤を含む。心血管疾患を治療するための公知の薬剤の例は、任意の１種の３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリルコエンザイムＡレダクターゼ阻害剤（スタチン）である。スタチンの例は、セルビスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチンもしくはロバスタチンまたは薬学的に許容されるそれらの塩を含む。スタチンに関する組成物および方法は、当分野において公知である（特許文献２６を参照されたい）。

【０１０９】

実施例３において本明細書に記載のデータは、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体を使用したＮＫＧ２Ｄリガンド結合相互作用の遮断により、糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスにおいてアテローム硬

化性プラーク形成が有意に抑制されたことを例示し、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用が心血管疾患発症の促進において重要な経路であり、心血管疾患の予防または治療のための薬剤標的として機能できることを示唆している。実施例３および４において本明細書に記載のデータは、ＮＫＧ２Ｄノックアウトマウスおよび抗ＮＫＧ２Ｄ抗体研究を使用して、アテローム性動脈硬化および炎症におけるＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の決定的な役割をさらに例示する。ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の遮断により、実施例５に例示するように、コレステロールおよびトリグリセリドのレベルの低下を含め、異常な代謝状態もまた緩和される。さらに、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体治療群および対照群におけるサイトカイン発現プロファイルのさらなる比較は、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体治療が複数の炎症促進性サイトカインの産生を有意に抑制することを実証し、血管の炎症を防止することにより機能を果たすことが示唆される（実施例４を参照されたい）。本明細書に記載のデータは、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド仲介免疫活性化が、２型糖尿病の進行に関与することをさらに提供する。実施例７において本明細書に記載の実験において、ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスと比較して、同じ食餌を与えたＮＫＧ２Ｄ－欠損ＡｐｏＥ－／－Ｋｌｒｋ１－／－マウスが、有意に降下した血中グルコースレベルを有し、２型糖尿病の治療に対するＮＫＧ２Ｄまたはそのリガンドの標的化の有用性を実証する。さらに、実施例８に記載のように、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体治療は、２型糖尿病のげっ歯類モデルにおいて高血糖および糖尿病の発症および進行を防ぐことができる。

【０１１０】

別の実施形態において、本発明は、対象において２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）を治療する方法を提供する。特定の実施形態において、本発明は、２型糖尿病を治療するための方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、対象において、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療するための方法を提供する。このような病態は、例えば、２型糖尿病、心血管疾患、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）を含む。特定の実施形態において、病態は２型糖尿病である。特定の他の実施形態において、病態は心血管疾患である。

【０１１１】

通常の方法は、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態を阻害するための、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する、治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体の対象への投与を含む。特定の実施形態において、本方法は、ＮＫＧ２Ｄリガンド結合相互作用を遮断する、治療有効量の薬剤の投与を含む。薬剤は、任意の上記の薬剤、例えば、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＫＧ２Ｄリガンドに特異的な抗体、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）の活性または発現の阻害剤であってよい。特定の実施形態において、薬剤は、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトまたはヒト化である。特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、ヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する。特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、ＮＫＧ２Ｄ発現細胞の、ＮＫＧ２Ｄにより仲介される活性化またはシグナル伝達を減少させる。特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、ＮＫＧ２Ｄとの結合において少なくとも１種のＮＫＧ２Ｄリガンドと競合する。特定の実施形態において、ＮＫＧ２ＤリガンドはＭＩＣＡ／Ｂである。

【０１１２】

特定の実施形態において、薬剤の投与により、以下：血糖値降下、耐糖能の改善、インスリン抵抗性の低下、体重減少、血圧低下、炎症低下または代謝機能不全の減少の少なくとも１つをもたらす。

【０１１３】

本明細書に記載の（予防的治療を含む）治療法は、本明細書に記載の治療有効量の組成物の、哺乳動物、特にヒトを含むそれらを必要とする対象（例えば、動物、ヒト）、への投与を一般に含む。このような治療は、疾患、障害またはそれらの症状を患っている、有する、その疑いがあるまたはその危険性がある対象、特にヒトに適切に投与されるであろう。「危険性のある」それらの対象の決定は、診断検査または対象もしくは健康管理の提供者の見解（例えば、遺伝子検査、酵素または蛋白質マーカー、マーカー（本明細書において定義したような）、家族歴など）によって、任意の客観的決定または主観的決定によって実施できる。本明細書の組成物は、過剰なＮＫＧ２Ｄのシグナル伝達、発現または活性が関係していると思われる他の任意の障害の治療にも使用できる。

【０１１４】

一実施形態において、対象において２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）を治療する方法は、治療の進行をモニターするステップを含む。対象は、疾患またはその症状を治療するために十分な治療有効量の本明細書に記載の組成物を投与されている、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）に関連する障害またはそれらの症状を、患っている、またはその疑いがある対象において、診断マーカー（例えば、本明細書に記載の組成物または薬剤、それらの蛋白質もしくは指標などによって調節される、本明細書に描かれている任意の標的）または診断測定（例えば、スクリーニング、アッセイ）のレベルを決定することによって治療の進行をモニターできる。本方法において決定されるマーカーのレベルを、健康な正常な対照もしくは他の罹患患者のどちらかにおける既知のマーカーレベルと比較し、対象の疾患状態を確立できる。一般的に、対象におけるマーカーの第２のレベルが、第１のレベルの決定より遅い時点で決定され、２つのレベルを比較し、疾患の経過または治療の有効性をモニターする。特定の実施形態において、対象におけるマーカーの治療前のレベルは、本明細書に記載の治療の開始前に決定され、マーカーのこの治療前のレベルを、その後、治療を始めた後の対象におけるマーカーのレベルと比較し、治療の有効性を決定できる。

【０１１５】

糖尿病、心血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化）および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）の治療のための、ＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤（例えば、ＭＩＣＡ／Ｂ阻害剤）、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンド（複数可）、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体、抗ＮＫＧ２Ｄリガンド抗体などを含む組成物の投与は、他の成分と組み合わせて、２型糖尿病、心血管疾患（例えば、アテローム硬化性プラーク形成の抑制）、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）の寛解、減少または排除に有効である治療濃度をもたらす任意の適切な手段によるものであってよい。ＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤（例えば、ＭＩＣＡ／Ｂ阻害剤）、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンド（複数可）、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体、抗ＮＫＧ２Ｄリガンド抗体などは、任意の適切な量で、任意の適切な担体物質中に含有され、一般に、組成物の合計重量の１～９５重量％の量で存在し得る。組成物は、局所投与または全身投与に適切な剤形で提供され得る。（例えば、非経口、皮下、静脈内、筋肉内または腹腔内）。特定の実施形態において、組成物は、静脈内、腹腔内または皮下投与される。医薬組成物は従来の薬務にしたがって処方され得る（例えば、非特許文献２２および非特許文献２３を参照されたい）。

【０１１６】

本明細書に記載の組成物は、従来の、非毒性の薬学的に許容される担体および抗原補強剤（アジュバント）を含有する剤形、製剤で、または適切な送達デバイスもしくはインプラントを介して、注射、点滴または移植によって、非経口投与（皮下、静脈内、筋肉内、

腹腔内など）され得る。このような組成物の製剤および調製品は、製剤処方の当業者には周知である。製剤は、非特許文献２２、上記に見出すことができる。

【０１１７】

非経口使用のための組成物は、単位剤形で（例えば、単回用量のアンプルで）、または適切な保存料を加えた複数回用量を含有するバイアルで提供される（以下を参照されたい）。組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、点滴デバイスまたは移植のための送達デバイスの形態であってよく、または使用前に水もしくは別の適切な賦形剤（ビヒクル）で再構成される乾燥粉末として提示されてもよい。活性薬剤は別として、組成物は、適切な非経口的に許容可能な担体および／または添加剤を含む。活性治療薬（複数可）は、放出制御のために、微粒子（ミクロスフェア）、マイクロカプセル、ナノ粒子、リポソームなどに組み込むことができる。さらに、組成物は、懸濁剤、可溶化剤、安定剤、ｐＨ調整剤、等張化剤および／または分散剤を含むことができる。

【０１１８】

上記のように、本発明に従った医薬組成物は、滅菌注射に適切な形態であってよい。このような組成物を調製するために、適切な活性治療薬（複数可）は、非経口的に許容可能な液体賦活剤（ビヒクル）に溶解または懸濁される。用いることができる許容可能なビヒクルおよび溶媒は、水、適量の塩酸、水酸化ナトリウムまたは適切なバッファーを加えることによって適切なｐＨに調製した水、１，３－ブタンジオール、リンガー液ならびに等張の塩化ナトリウム溶液およびデキストロース溶液である。これらの水性製剤は、１種または複数の保存料（例えば、メチル、エチルまたはｎ－プロピルｐ－ヒドロキシ安息香酸）もまた含有できる。化合物の１種が、水にかろうじて、またはわずかに可溶性なだけであった場合において、溶解増強剤もしくは可溶化剤を加えることができ、または溶媒は、１０～６０％ｗ／ｗのプロピレングリコールなどを含むことができる。

【０１１９】

ミクロスフェアおよび／またはマイクロカプセルの調製に使用する材料は、例えば、生分解性／生体内分解性のポリマー、例えば、ポリグラクチン（polygalactia）、ポリ－（イソブチルシアノアクリレート）、ポリ（２－ヒドロキシエチル－Ｌ－グルタミン）およびポリ（乳酸）である。放出制御非経口製剤を製剤化する場合、使用できる生体適合性担体は、炭水化物（例えばデキストラン）、蛋白質（例えばアルブミン）、リポ蛋白質または抗体である。インプラントに使用する材料は、非生分解性（例えばポリジメチルシロキサン）または生分解性（例えばポリ（カプロラクトン）、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）もしくはポリ（オルトエステル）またはそれらの組み合わせ）であってよい。

【０１２０】

少なくとも２種の抗心血管疾患治療薬（例えば、ＮＫＧ２ＤまたはＭＩＣＡ／Ｂ阻害剤およびスタチン）を、１種の製剤中に一緒に混合してもよい。

【０１２１】

本明細書に記載の組成物は、例えば、抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、第２の、またはそれを越える薬理学的に活性な薬剤と組み合わせることができる。これらの薬理学的に活性な物質の例は、ＧＬＰ－１ならびにＧＬＰ－１の誘導体およびアナログ、ＧＬＰ－２ならびにＧＬＰ－２の誘導体およびアナログ、エキセンディン－４ならびにエキセンディン－４の誘導体およびアナログ、アミリンならびにアミリンの誘導体およびアナログ、スルホニルウレア、ビグアナイド、メグリチニド、グルコシダーゼ阻害剤、グルカゴンアンタゴニスト、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ）阻害剤、ＳＧＬＴ２阻害剤、ＳＧＬＴ１の阻害剤、糖新生および／または（glycogenosis）の刺激に関与する肝酵素の阻害剤、グルコース取り込み調節因子、脂質代謝を改変する化合物、例えばＨＭＧ　ＣｏＡ阻害剤（スタチン）として抗脂質異常症薬、食物摂取量を低下させる化合物、ＲＸＲアゴニスト、β細胞のＡＴＰ依存性カリウムチャネルに作用する薬剤、；コレスチラミン、コレスチポール、クロフィブレート、ゲムフィブ

ロジル、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、プロブコール、デキストロチロキシン、ナテグリニド、レパグリニド；β－遮断薬、例えばアルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロールおよびメトプロロール、ＡＣＥ（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、例えば、ベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリルおよびラミプリル、カルシウムチャネル遮断薬、例えば、ニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルならびにα－遮断薬、例えば、ドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシンおよびテラゾシン；ＣＡＲＴ（コカインアンフェタミン調節転写産物）アゴニスト、ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）アンタゴニスト、ＰＹＹ（ポリペプチドＹＹ）アゴニスト、ＰＰ（膵臓ポリペプチド）アゴニスト、Ｙ２受容体アゴニスト、Ｙ４受容体アゴニスト、混合型Ｙ２／Ｙ４受容体アゴニスト、アディポネクチンアゴニスト、ＰＰＡＲアゴニスト、ＭＣ４（メラノコルチン４）アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、ＴＮＦ（腫瘍壊死因子）アゴニスト、ＣＲＦ（副腎皮質刺激ホルモン放出因子）アゴニスト、ＣＲＦ　ＢＰ（副腎皮質刺激ホルモン放出因子結合蛋白質）アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、β３アゴニスト、ＭＳＨ（メラノサイト刺激ホルモン）アゴニスト、ＭＣＨ（メラノサイト凝集ホルモン）アンタゴニスト、ＣＣＫ（コレシストキニン）アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤、混合型セロトニンおよびノルアドレナリン作動性化合物、５ＨＴ（セロトニン）アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、ＴＲＨ（甲状腺刺激ホルモン（thyreotropin）放出ホルモン）アゴニスト、ＵＣＰ２または３（脱共役蛋白質２または３）調節因子、レプチンアゴニスト、ＤＡアゴニスト（ブロモクリプチン、doprexin）、リパーゼ／アミラーゼ阻害剤、ＲＸＲ（レチノイドＸ受容体）調節因子、ＴＲβアゴニスト、ヒスタミンＨ３アンタゴニスト、ガストリンならびにガストリンのアナログおよび誘導体、グルカゴンならびにグルカゴンの誘導体およびアナログ、ＦＧＦ－２１（線維芽細胞成長因子２１）ならびにＦＧＦ－２１の誘導体およびアナログ、プロトンポンプ阻害剤、例えばランソプラゾール、オメプラゾール、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾールおよびラベプラゾールならびにグルコキナーゼ活性因子である。

【０１２２】

本発明に従った組成物と、１種または複数種の上記の化合物および場合により１種または複数種のさらなる薬理学的に活性な物質の任意の適切な組み合わせは、本発明の範囲内であると考えられることを理解するべきである。

【０１２３】

上記の多数の組成物、方法およびキットは２型糖尿病および心血管疾患の治療に適切であるが、本明細書に記載の組成物および方法は、２型糖尿病および心血管疾患を含む、対象における任意の代謝機能不全関連疾患を予防するためにも使用できる。特定の実施形態において、本発明の組成物および方法は、疾患の症状を予防または無効にし、疾患の症状の発症を遅らせ、または疾患の重症度を軽減できる。

【０１２４】

他の実施形態において、本明細書に記載の組成物および方法は、対象が２型糖尿病を有するかどうかにかかわらず、対象における任意の代謝機能不全関連疾患を検出、予防および／または治療するために使用できる。例えば、対象におけるコレステロールおよびトリグリセリドのレベルの上昇を検出する方法を、本明細書に記載し、対象から生体試料を得るステップ；生体試料を、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現（例えばＭＩＣＡ／Ｂの発現）を検出する少なくとも１種の試薬と接触させるステップ；生体試料中のＮＫＧ２Ｄリガンドの発現レベルを測定するステップ；およびＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）の過剰発現と、コレステロールおよびトリグリセリドのレベルの上昇の素因または対象におけるコレステロールおよびトリグリセリドのレベルの上昇の存在を相関させるステップを含む。コレステロールおよびトリグリセリドのレベルの上昇を有する（２型糖尿病を有しても、または有さなくてもよい）対象を治療する方法は、コレステロールおよびトリグリセ

リドのレベルを低下させるための、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する、治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体を対象に投与するステップを含む。本明細書に記載の別の実施例は、糖尿病性網膜症を有する対象を治療するための方法である。このような方法は、糖尿病性網膜症を阻害するための、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する、治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体を対象に投与するステップを含む。糖尿病性網膜症を阻害するための、またはコレステロールおよびトリグリセリドのレベルを低下させるための、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する薬剤は、上記の薬剤、例えば、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄに特異的な抗体、可溶性ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＫＧ２Ｄリガンドに特異的な抗体、ＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／Ｂ）の活性または発現の阻害剤などであってよい。薬剤および薬学的に許容される担体は、上記のようなキットにパッケージングすることができる。

【０１２５】

さらなる実施形態において、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または代謝機能不全関連疾患（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、血行不足、四肢障害、糖尿病性網膜症など）を治療するための組成物および方法は、細胞表面からＮＫＧ２Ｄリガンドの脱離（ｓｈｅｄｄｉｎｇ）を促進する薬剤を含み得る。ＮＫＧ２Ｄリガンドは、多くの場合、プロテアーゼにより細胞表面から切断され（「ｓｈｅｄｄｉｎｇ」と呼ばれる）、シェディングは、シェディングされたリガンドとＮＫＧ２Ｄとの結合によってＮＫＧ２Ｄのシグナル伝達を阻害し、ＮＫＧ２Ｄの活性（例えばシグナル伝達）をダウンレギュレートすると考えられている。シェディングを促進または阻害する任意の薬剤は、ＮＫＧ２Ｄのシグナル伝達および活性を調節でき、このような実施形態に使用できる。例えば、シェディングに関与する蛋白質に対する抗体または抗原結合断片は、少なくとも１種のＮＫＧ２Ｄリガンドのシェディングを促進するための有効量で対象に投与され得る。

【０１２６】

さらに、本明細書に記載の組成物、キットおよび方法は、対象における代謝機能不全関連疾患を予防するために使用できる。例えば、医師は、本明細書に記載の組成物および方法を、家族歴（遺伝）であろうと、または環境要因（例えば、食餌、運動不足など）であろうと、心血管疾患および／または代謝機能不全関連疾患に対する素因を有する対象に投与できる。

【０１２７】

上記の組成物は、有効量、すなわち、治療される対象において所望の結果（例えば、２型糖尿病、心血管疾患、例えばアテローム性動脈硬化の阻害または予防、血糖値降下および２型糖尿病患者における体重減少の促進、対象におけるコレステロールまたはトリグリセリドレベルの低下、対象におけるインスリン抵抗性の低下、対象における脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足などの予防または緩和）を生み出すことができる量で対象（例えばヒト）投与されることが好ましい。本明細書に記載の組成物の毒性および治療有効性は、標準的な医薬手順によって決定できる。医学および獣医学の分野では周知のように、任意の１種の動物のための投薬量は、対象のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の組成物、投与の時間および経路、全体的な健康および同時に投与される他の薬剤を含む多くの因子に依存する。

【０１２８】

投与される治療薬の量は、投与の様式、患者の年齢および体重およびがんの臨床的症状に依存して変動する。本明細書に記載の組成物は、アテローム硬化性プラーク形成、血糖値、体重、コレステロールレベル、トリグリセリドレベル、インスリン抵抗性などにおける減少を特定する、あるいはＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１）の発現もしくは生物活性またはＮＫＧ２Ｄの活性もしくはシグナル伝達を測定する任意のそのアッセイを使用することによってアッセイされた、ＮＫＧ２Ｄの活性化および／またはシグナル伝達を阻害する投薬量で通常投与される。

【０１２９】

対象（例えばヒト）由来の生体試料中のＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１蛋白質）を検出し、対象における２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）の存在を検出する、またはその発生を予測するためのキットを、本明細書に記載する。典型的なキットは、対象由来の生体試料中のＮＫＧ２Ｄリガンド（例えばＭＩＣＡ／ＢまたはＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１）の発現を検出するための、少なくとも１種の試薬および使用のための指示書を含む。一実施形態において、キットは、ＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１蛋白質に対する、またはＭＩＣＡ／Ｂに対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体、検出可能な標識および使用のための指示書を含む。一般的に、生体試料は血清である。しかし、任意の適切な生体試料が使用できる。さらなる生体試料の例は、血液、血漿、尿、唾液、皮膚および生検標本を含む。

【０１３０】

糖尿病または任意のＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態、例えば、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）を有する対象（例えばヒト）に治療を投与するためのキットもまた、本明細書に記載する。一実施形態において、キットは、ＮＫＧ２Ｄと１種または複数種のそのリガンドとの相互作用（例えば、ＮＫＧ２Ｄ／ＭＩＣＡ／Ｂ相互作用、ＮＫＧ２ＤとＵＬＢＰ／ＲＡＥＴ１蛋白質の１種との相互作用）を遮断する、またはＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する、治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体を単位剤形中に含有する、治療用組成物または予防用組成物を含む。この薬剤は、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２Ｄリガンドおよびリガンドの活性または発現の阻害剤であってよい。特定の実施形態において、薬剤はＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトまたはヒト化である。特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片はヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する。

【０１３１】

所望であれば、キットは、有効量の、心血管疾患を治療するための公知の薬剤（例えばスタチン）および／または異常な代謝状態（例えば、高コレステロールレベル、高トリグリセリドレベル、脂質異常症、糖尿病性網膜症、四肢障害、血行不足など）を治療するための薬剤をさらに含有する。

【０１３２】

特定の実施形態において、キットは、抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤を、さらに含む。

【０１３３】

一般に、本明細書に記載のキットは、パッケージおよび使用のための指示書を含む。いくつかの実施形態において、キットは、治療用組成物または予防用組成物を含有する滅菌容器を含み、このような容器は、箱、アンプル、ビン、バイアル、チューブ、袋、小袋、ブリスターパックまたは当分野において公知の他の適切な容器形態であってよい。このような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔または薬物を保持するために適切な他の材料で作製されていてよい。

【０１３４】

本発明を、以下の具体的実施例によってさらに例示する。実施例は単なる例示のために提供し、決して本発明の範囲を限定するものと解釈するべきではない。

【実施例】

【０１３５】

（実施例１）
２型糖尿病患者の血清およびアテローム硬化性プラーク中のＭＩＣＡ、ＮＫＧ２Ｄのためのリガンドの検出および他の炎症促進性サイトカインの発現との関連
代謝機能不全が、特定のストレス応答性免疫刺激分子のアップレギュレーションを引き起こし得るかどうかを決定するために、ＭＩＣＡ／Ｂの発現を、糖尿病が確認され、そのうちのいくらかは脂質異常症が確認された２型糖尿病患者の群において評価した。１型糖尿病ＮＯＤマウスの研究（例えば、非特許文献２４参照）より推察されるように、１型糖尿病患者は大部分が自己免疫疾患であり、代謝状態とは独立してＭＩＣＡのアップレギュレーションを有すると思われるので、１型糖尿病患者は含まれなかった。患者の血管におけるＭＩＣＡ／Ｂの発現を分析することは非実用的であるので、血液中の可溶性ＭＩＣＡ（ｓＭＩＣＡ）蛋白質のレベルをアッセイした。ｓＭＩＣＡは、細胞表面において発現した膜ＭＩＣＡ（ｍＭＩＣＡ）の酵素的に切断された産物であり、さまざまながん患者および免疫疾患患者の血液中に検出されたが、健康な人々には検出されなかったことが、以前に報告されていた。したがって、糖尿病患者の血液中のｓＭＩＣＡの検出は、血管または他の組織におけるＭＩＣＡのアップレギュレーションを示すことになる。
【０１３６】
２２例の患者を試験し、それらの有意なパーセントにおいてｓＭＩＣＡのレベルの上昇が検出された（図１Ａ）。２２例の患者のうち、６例（２７％）は、４００ｐｇ／ｍｌより高いレベルの血清ＭＩＣＡを有し、最も高いものは１２２５０ｐｇ／ｍｌであった（図１Ａ、患者番号１～６）。さらに、４例の患者（１８％）は、検出可能なレベルの血清ｓＭＩＣＡ（５０～３５０ｐｇ／ｍｌ）を有した（図１Ａ、患者番号７～１０）。糖尿病患者におけるｓＭＩＣＡレベルが、どのようにがん患者のｓＭＩＣＡレベルと比較可能かを決定するために、さまざまながん患者由来の５０例の血清試料をさらに試験した。５０例のがん患者のｓＭＩＣＡレベルはすべて２０ｐｇ／ｍｌより低かった（図１Ｅ）ので、２型糖尿病患者は、がん患者より有意なｓＭＩＣＡ蛋白質レベルの上昇を有する。がん患者のｓＭＩＣＡレベルはがんの型およびステージに多く依存して変動するが、２型糖尿病患者のｓＭＩＣＡレベルは、文献に報告されたがん患者のｓＭＩＣＡレベルと比較した場合、やはり非常に高かった（例えば、非特許文献２５、非特許文献２６参照）。
【０１３７】
これらの患者が、さまざまな健康状態でありながら、１から２０年間糖尿病の診断を受けていたことを考えれば、これらの患者が可変レベルのｓＭＩＣＡを有することは驚くべきことではない。変動にかかわらず、特に、ＭＩＣＡが高い患者とＭＩＣＡ陰性の患者と比較した場合、高い血清ｓＭＩＣＡレベルに関連する特定の傾向が見出された。具体的には、平均血糖値は、ＭＩＣＡ陰性の患者においてより、ＭＩＣＡが高い患者において高かった（１９０±６５対１５７±４７；ｐ＝０．１）。血液中のｓＭＩＣＡ蛋白質のレベルが高さは、動脈においてであれば、複数の免疫細胞において発現されたその受容体ＮＫＧ２Ｄとの相互作用を介して血管炎症に影響を与えうる特定の細胞型において、膜ＭＩＣＡが発現されたことを示した。ＭＩＣＡ蛋白質の膜形態および可溶性形態の両方がＮＫＧ２Ｄと結合するが、それらが免疫活性化に関して異なる影響を与えることに留意するべきである。ＮＫＧ２Ｄ／ｍＭＩＣＡの会合は免疫細胞を活性化するが、一方、ＮＫＧ２Ｄ／ｓＭＩＣＡ相互作用は免疫細胞を活性化しない。実際に、ｓＭＩＣＡは、ＮＫＧ２Ｄの結合に対するｍＭＩＣＡとの競合を介して、ＮＫＧ２Ｄ／ｍＭＩＣＡ相互作用により仲介される免疫活性化に干渉できる。したがって、糖尿病患者の血清におけるいくつかの炎症関連のサイトカインおよび因子の発現を分析し、それらと、可溶性ＭＩＣＡの発現を相関させる試みを実施した。
【０１３８】
同じ糖尿病患者の血清におけるサイトカインＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）およびＣ反応性蛋白質（ＣＲＰ）のレベルを評価し、ｓＭＩＣＡのアップレギュレーションが任意のこれらのパラメーターと関連するかどうかを決定した（図１Ｂ～Ｄ）。ＩＬ－１βおよびＩＦＮ－γは、アッセイの検出範囲より下で

あった。ｓＭＩＣＡ／Ｂと、ＴＮＦ－αまたはＣＲＰとの間に相関はなく（図１Ａ、Ｃ＆Ｄ）、ＭＩＣＡの発現が、２種の十分に規定された炎症マーカーであるＴＮＦ－αまたはＣＲＰから差次的に制御されたことを示唆した。興味深いことに、血清中のｓＭＩＣＡ／Ｂの発現とＩＬ－６の発現との間に逆相関が存在した（図１ＡおよびＢ）。ＭＩＣＡ陽性群（患者番号１～１０）中のＩＬ－６の血清レベルは、ＭＩＣＡ陰性群（患者番号１１～２２）のＩＬ－６の血清レベルより有意に低く（１．２１±０．５１ｎｇ／ｍｌ対１．８５±１．１３ｎｇ／ｍｌ、Ｐ＝０．０５）、これら２種の因子の間の相互依存的な関係を示唆した。

【０１３９】

総合して、これらのデータは、２型糖尿病患者においてＭＩＣＡ／Ｂ分子がアップレギュレーションされ、血管炎症およびアテローム性動脈硬化に関与し得ることを実証した。ｓＭＩＣＡのレベルの高さは、糖尿病患者におけるＭＩＣＡのアップレギュレーションを明らかに示すが、炎症およびアテローム性動脈硬化に対するＭＩＣＡのアップレギュレーションの正味の効果は、可溶性ＭＩＣＡ蛋白質と膜ＭＩＣＡ蛋白質との相対的寄与に依存する。ｓＭＩＣＡの産生は、普通、免疫活性化を制御するためのｍＭＩＣＡ／ＮＫＧ２Ｄ相互作用の代償機序である。したがって、マウスモデルを使用して、動脈におけるＮＫＧ２Ｄリガンドのアップレギュレーションおよび炎症およびアテローム性動脈硬化にけるその重要性を直接評価した。

【０１４０】

ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現の臨床的関連をさらに確立するために、ヒト患者のアテローム硬化性大動脈切片の免疫組織化学染色を実施し、ＮＫＧ２Ｄのリガンドが組織においてアップレギュレーションされたかどうかを決定した。プラークフリーの大動脈とは対照的（図２１）に、アテローム硬化性大動脈中の多くの細胞がＭＩＣＡ／Ｂ抗体により陽性に染色された（図２Ａ、Ｃ、ＥおよびＧ）。隣接切片におけるＭａｃ－３またはＣＤ３１によるＭＩＣＡ／Ｂの重複染色パターンは、アテローム硬化性大動脈のマクロファージおよび内皮細胞の両方がＭＩＣＡ／Ｂを発現したことを示唆し（図２Ｂ、Ｄ、Ｆ、Ｈ）、ヒトは、影響を受けた組織においてＮＫＧ２Ｄリガンドの同様の発現パターンを有することを示唆した。

【０１４１】

（実施例２）

ＡｐｏＥ－／－マウスのアテローム硬化性プラークおよび他の組織の細胞におけるＮＫＧ２Ｄリガンドのアップレギュレーション

ＮＫＧ２Ｄに対するリガンドが、糖尿病および脂質異常症のマウスの血管においてアップレギュレーションされたかどうかを直接試験するために、脂質異常症およびアテローム性動脈硬化の動物モデルであるＡｐｏＥ－／－マウスにおいて、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現を決定した。ＡｐｏＥ－／－マウスにおける慢性の代謝機能不全がアテローム硬化性プラークの発症をもたらし、免疫細胞が重要な部分を占めることは、十分確立されている。これらのマウスは、脂質代謝を損傷しており、老化に伴いアテローム性動脈硬化を発症する。アテローム硬化性プラークを発症したＡｐｏＥ－ヌルマウスの大動脈において、ＮＫＧ２Ｄリガンドのアップレギュレーションを分析した。

【０１４２】

まず、ＮＫＧ２ＤリガンドのｍＲＮＡ発現を、大動脈、特に弓領域にアテローム硬化性プラークを有する８～１０月齢のＡｐｏＥ－／－マウス（糖尿病の誘導はない）の大動脈において検査した。図３Ａを参照すると、プラーク病変が異なるレベルのＮＫＧ２Ｄリガンドの発現を有するかどうかを具体的に決定するために、８～１０月齢の非糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウス（「アテローム硬化性ＡｐｏＥ－／－」）のアテローム硬化性大動脈弓（「プラークあり」）および明らかなプラークを有さなかった胸部大動脈（「プラークフリー」）から、別々にＲＮＡを単離した。２月齢のプラークフリーのＡｐｏＥ－／－マウス由来の大動脈の対応する部分のＲＮＡを、対照として使用した（「プラークフリーＡｐｏＥ－／－」）。さまざまな個別のＮＫＧ２Ｄリガンドのアップレギュレーションをより具

体的に決定するために、Ｒａｅ－１遺伝子ならびにＨ６０およびＭｕｌｔ－１遺伝子のさまざまなアイソフォームに対するアイソフォーム特異的プライマーを使用した。Ｒａｅ－１、Ｈ６０およびＭＵＬＴ－１はすべて、さまざまなファミリーに属するＮＫＧ２Ｄリガンドである（例えば、非特許文献２７、非特許文献２８参照）。マウスには５種の密接に関連したＲａｅ－１遺伝子が存在し（＞９８％同一）、Ｈ６０遺伝子の３つの異なるアイソフォーム（Ｈ６０ａ、ｂおよびｃ）が特定されている（例えば、非特許文献２７、非特許文献２８参照）。Ｒａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０に対する転写産物を、半定量的放射性ＲＴ－ＰＣＲによって分析した。簡潔にいうと、ＲＮＡ試料を、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＲＮａｓｅ－Ｈ逆転写酵素を用い、オリゴ－ｄＴプライマーを使用して逆転写した。ＲＴ産物を段階的に希釈し（各５倍）、P^{32}ｄＣＴＰの存在下で、遺伝子特異的プライマーを使用して、ＰＣＲに供した。使用したプライマーは、報告された遺伝子配列に基づく（例えば、非特許文献２７、非特許文献２８参照）。ＰＣＲ産物を、ポリアクリルアミドゲルにおいて泳動させ、その後これを乾燥させ、Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｉｍａｇｅ　ｓｃｒｅｅｎに曝露した。β－アクチンをローディング対照として使用した。

【０１４３】

対照と比較して、Ｒａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂに対する転写産物は、アテローム硬化性ＡｐｏＥ－ヌルマウスのプラーク領域において大幅にアップレギュレーションされた（図３Ａ）。アテローム性動脈硬化フリーのより若いＡｐｏＥ－ヌル対照と比較して、Ｒａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂの転写産物の最大１００倍の増加が、プラーク範囲において検出された（図３Ａ）。同じマウスの大動脈の非プラーク部分と比較した場合でさえ、プラーク範囲において、Ｒａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０βの１０～２０倍の増加が見出された（図３Ａ）。老齢ＡｐｏＥ－／－マウスの大動脈の非プラーク領域は、若齢アテローム性動脈硬化フリーのＡｐｏＥ－／－マウスの対応する領域と比較して、Ｒａｅ－１δおよびεの中程度のアップレギュレーションを有した。年齢の一致した野生型（ＷＴ）対照より非常に高いレベル（１０～３０倍の増加）の、ＮＫＧ２ＤリガンドのＲａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂに対する転写産物が、ウェスタンダイエット（ＷＤ）を与えたＡｐｏＥ－／－マウスの大動脈弓において検出された（図３Ｂ）。これらのデータは、アテローム硬化性プラークの特定の細胞成分が、ＮＫＧ２Ｄリガンド発現の非常に劇的なアップレギュレーションを有することを示唆した。

【０１４４】

プラークにおけるＮＫＧ２Ｄリガンドのアップレギュレーションをさらに確認するために、免疫組織化学染色を、ＡｐｏＥ－ヌルマウスアテローム硬化性プラークの凍結切片について、ポリクローナル抗Ｒａｅ－１抗体および抗Ｈ６０抗体を用いて実施した。糖尿病および高脂肪ウェスタン食餌がプラーク形成を加速し、ＮＫＧ２Ｄリガンドのアップレギュレーションに関与すると思われるので、ストレプトゾトシン（ＳＴＺ）の注射によって糖尿病をもたらされた、またウェスタン食餌を与えられたＡｐｏＥ－ヌルマウスにおけるプラークをさらに検査した。図３Ｃを参照すると、ＳＴＺ処置のために、６週齢のＡｐｏＥ－ヌルマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂ、Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｍａｉｎｅ）を、ストレプトゾトシン（ＳＴＺ）（５５ｍｇ／ｋｇ、ｐＨ４．５クエン酸バッファーに要時溶解）の腹腔内注射によって連続６日間誘導し、糖尿病を発症させ、血中グルコース濃度を確認した（＞３００ｍｇ／ｄＬ）。糖尿病の誘導の２ヶ月後、大動脈を単離し、凍結保存した。凍結切片を、ポリクローナルヤギ抗Ｒａｅ－１抗体またはポリクローナルヤギ抗Ｈ６０抗体（それぞれ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ａｎｄ　Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を用いて染色し、その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合ロバ抗ヤギＩｇＧ抗体およびＡＢＣ－ＨＲＰ染色システムを用いて染色し、陽性染色（茶色）（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を明らかにした。切片を、モノクローナルラット抗マウスＣＤ６８抗体（Ｓｅｒｏｔｅｃ）を用いてさらに染色し、その後アルカリホスファターゼ（ＡＰ）結合ロバ抗ラット抗体およびＡＢＣ－ＡＰ染色キットを用いてさらに染色した（青色）（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）。ウェスタン食餌を与えたアテローム性動脈硬化のＡｐｏＥ－／－モデルのために

、６週齢のＡｐｏＥ－ヌルマウスを、普通の固形試料からウェスタン食餌に切り換えた。ウェスタン食餌を続けた２ヶ月後、大動脈を単離し、凍結保存し、抗Ｒａｅ－１抗体および抗Ｈ６０抗体染色によって分析した（図３Ｄ）。

【０１４５】

糖尿病および非糖尿病両方のＡｐｏＥヌルマウスのアテローム硬化性大動脈弓領域のプラーク範囲の切片においてＲａｅ－１およびＨ６０に対する陽性染色が明白であったが、中膜(血管平滑筋層)または外膜(血管平滑筋層)においては非常に少なくかった（図３Ｃおよび３Ｄ）。対照として、同じマウスのプラークフリーの大動脈領域において、Ｒａｅ－１またはＨ６０の染色はほとんど検出されなかった（図３Ｄ、下段パネル）。組織在住マクロファージのマーカーであるＣＤ６８に対する染色は、ＲＡＥ－１およびＨ６０の染色と有意な重複を有し、マクロファージが浸潤したプラークが、ＮＫＧ２Ｄリガンドを発現したプラークの少なくとも１つの細胞集団であったことを示し、このことを、アテローム硬化性大動脈から直接単離したマクロファージにおけるＲａｅ－１発現をフローサイトメトリ分析することによってさらに確認した（図３Ｅ）。さらに、アテローム硬化性ＡｐｏＥ－／－マウスの大動脈から単離した内皮細胞もまた、高いＲａｅ－１発現を有した（図３Ｅ）。

【０１４６】

それらの代謝不全を考えると、ＡｐｏＥ－／－マウスのマクロファージは、血液および組織中の異常な代謝産物の増加に応答してＮＫＧ２Ｄリガンド発現をアップレギュレーションしたと思われる。したがって、マクロファージが脂質異常症および糖尿病に関連した２種の異常な代謝産物である、酸化型ＬＤＬ（ｏｘＬＤＬ）または終末糖化産物（ＡＧＥ）によってｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養において誘導され得るかどうかを決定した。示したように、ｏｘＬＤＬおよびＡＧＥの存在下で培養した場合、野生型マウスのマクロファージは、複数のＮＫＧ２Ｄリガンドのそれらの発現を、転写産物および蛋白質両方のレベルにおいて有意にアップレギュレーションした（図３Ｆ～Ｈ）。図３Ｆを参照すると、培養２日後、ｍＲＮＡをさまざまに処置したマクロファージから単離し、逆転写させてｃＤＮＡを作製し、これを５倍段階的に希釈し、ＮＫＧ２ＤリガンドのＲａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂの検出のためにＰＣＲに供した。図３Ｇを参照すると、図３Ｆと同じ方法で処置したマクロファージを溶解し、ＰＡＧＥゲルにおいて分離し、Ｒａｅ－１分子のすべてのアイソフォームと反応する抗Ｒａｅ１抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。図３Ｈを参照すると、ｏｘＬＤＬまたはＡＧＥと一緒に培養した野生型マクロファージもまた、フローサイトメトリ分析に基づいて、より高い細胞表面レベルのＲａｅ－１染色を有した。Ｒａｅ－１染色は、色のない「コールド」抗ＲＡＥ－１抗体によって競合からはずすことができ、ＮＫＧ２Ｄリガンドの特異的アップレギュレーションを確認した（図３Ｈ）。

【０１４７】

総合すると、これらの実験は、ＮＫＧ２Ｄに対する複数のリガンドが、脂質および／またはグルコースの代謝障害を有するマウスの動脈においてアップレギュレーション御されたことを実証した。プラーク病変におけるＮＫＧ２Ｄリガンドの重度のアップレギュレーションは、血管炎症およびアテローム性動脈硬化の伝播におけるＮＫＧ２Ｄリガンドの直接の役割を示唆した。興味深いことに、プラーク中の細胞、例えばマクロファージだけが、ＮＫＧ２Ｄリガンドの転写産物および蛋白質の最も重度のアップレギュレーションを有した。プラーク中の多くの細胞が脂質成分に応答して活性化されることを考慮すると、これらのデータは、ＮＫＧ２Ｄリガンドアップレギュレーションは、さまざまな細胞型において、ストレス応答性経路および免疫活性化経路の両方を介して誘導される可能性があることを示唆した。

【０１４８】

（実施例３）

ＮＫＧ２Ｄ／リガンドとモノクローナル抗ＮＫＧ２Ｄ抗体またはＮＫＧ２Ｄノックアウトとの相互作用の妨害による、ＡｐｏＥ－ヌルマウスにおけるプラーク形成の抑制

動脈、特にプラークにおけるＮＫＧ２Ｄリガンドアップレギュレーションは、ＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞を活性化し、血管炎症およびアテローム性動脈硬化を促進できる。このことを試験するために、モノクローナル抗ＮＫＧ２Ｄ抗体（クローンＭＩ－６）を糖尿病ＡｐｏＥ－ヌルマウスに注射し、潜在的ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用を遮断し、このような妨害がプラーク形成を抑制できるかどうかを決定した。抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の注射は、ＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞の欠失がないマウスにおいてＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用を遮断することが示されている。（非特許文献２９、非公開）。Ｃ５７ＢＬ／６がバックグラウンドの６週齢の雄ホモ接合ＡｐｏＥ－ヌルマウスに、ＳＴＺ注射により糖尿病を誘導し、プラーク形成を加速させた。ＳＴＺ投与の１週間前および３日前に、２００マイクログラム／注射のモノクローナル抗ＮＫＧ２Ｄ抗体（クローンＭＩ－６、ラットＩｇＧ２ａ）をＡｐｏＥ－ヌルマウスに腹腔内注射した。対照群において、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の代わりにアイソタイプの一致する対照抗体を与えたこと以外は同じ方法でマウスを処置した。糖尿病の誘導後８週間マウスに普通の固形試料を与え続け、その間、実験期間中を通して週に１回、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体または対照抗体をマウスに与えた。最後の抗体注射の１週間後、マウスを犠牲にして、大動脈におけるアテローム硬化性病変を分析した。

【０１４９】

アイソタイプの一致する対照抗体を注射したものと比較して、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体を注射した糖尿病ＡｐｏＥ－ヌルマウスは、プラーク形成が劇的に減少した（図４）。抗ＮＫＧ２Ｄ抗体により処置した７匹のマウスおよび対照抗体により処置した８匹のマウス（３回の個別の実験中）のすべてのうち、ＮＫＧ２Ｄ－抗体処置マウス中のプラークサイズは、対照抗体処置マウスのものより常に有意に小さかった（図４Ａ）。プラーク形成の抑制の程度をさらに決定するために、大動脈の正面染色を、（２回の個別の実験の）７匹の抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置マウスのうちの５匹および８匹の対照抗体処置マウスのうちの６匹において、脂質内容物の堆積に関して正面オイルレッドＯ染料を用いて実施した。対照抗体処置マウスの大動脈の弓領域において大量のオイルレッドＯ染色が存在した（図４Ｂ、右の３種）。対照的に、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置マウスにおいて染色はそれほど強くなく（図４Ｂ、左の２種）、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体遮断により、脂質の堆積およびプラーク形成が抑制されたことをさらに実証した。平均して、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置マウス中のオイルレッドＯ染色陽性範囲は、対照と比較して約５倍減少した（図５Ａ）。

【０１５０】

ＮＫＧ２Ｄ発現細胞の欠失の誘導なしに、ＮＫＧ２Ｄ－抗体処置がＮＫＧ２Ｄを特異的に遮断することを確認すると、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体および対照抗体により処置されたマウス中には同数のＮＫ１．１＋ＮＫ細胞およびＮＫＴ細胞が存在し、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置マウスのＮＫ細胞はＮＫＧ２Ｄを正常に発現したことが見出された。さらに、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置は、ＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞の全体的なアネルギーをもたらさなかった。ｉｎｖｉｔｒｏアッセイにおいて、抗ＮＫＧ２Ｄ処置マウスのＮＫ細胞は、抗ＮＫ１．１抗体の刺激に応答して、対照抗体処置マウスと同じ程度に効率的にインターフェロン－γを発現した。総合して、これらの実験は、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用により仲介される免疫活性化が、アテローム性動脈硬化において重要な役割を果たし、このような相互作用の妨害により、アテローム性動脈硬化が抑制されたことを実証した。

【０１５１】

アテローム性動脈硬化におけるＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の重要な役割を証明するために、ＡｐｏＥ－／－マウスをＮＫＧ２Ｄノックアウトマウスと交配させ、ＡｐｏＥ／ＮＫＧ２Ｄダブルノックアウト（ＡｐｏＥ－／－ＫＬＲＫ１－／－）マウスを作製した。アテローム性動脈硬化の発症におけるＡｐｏＥ／ＮＫＧ２Ｄダブルノックアウトの効果を試験するための２種のモデルを試験した。第１のモデルは、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体妨害アッセイにおいて使用したＳＴＺ誘導性糖尿病である（図４）。第２のモデルは、マウスは高脂肪食を、６週齢から開始して与えられた、ウェスタン食餌により加速されたアテローム性動脈硬化である。糖尿病発症またはウェスタン食餌の開始の８から１０週間後、ＡｐｏＥ－／－ＫＬＲＫ１－／－マウスを、正面オイルレッドＯ染色によって、大動脈におけるプ

ラーク形成に関して分析した。同じ方法で処置したＡｐｏＥ－／－ＫＬＲＫ１＋／＋マウスと比較して、糖尿病およびウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－ＫＬＲＫ１－／－マウスの両方が、オイルレッドＯ染色陽性範囲に基づいてプラークサイズが劇的に減少した（図５ＢおよびＣ）。これらの発見は、アテローム性動脈硬化におけるＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の重要な役割の遺伝学的証明を提供した。さらに、それらは、糖尿病および脂質異常症関連アテローム性動脈硬化の両方において、この相互作用が広範に関与することについての証拠をさらに提供し、さまざまな起源のアテローム性動脈硬化の治療および予防のために、この分子の相互作用を標的化することの潜在的用法を示唆した。

【０１５２】

（実施例４）

ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の遮断により、アテローム硬化性ＡｐｏＥ－ヌルマウスにおける炎症促進性サイトカインの発現が減少される。

【０１５３】

ＮＫＤ２Ｄ／リガンド相互作用は、複数のＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞型において免疫活性化を仲介するので、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の遮断によるアテローム性動脈硬化の抑制は、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体が炎症の阻害を介して機能したことを示唆した。このことを試験するために、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体および対照抗体により処置された糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウス由来の血清を、プラーク分析の時点で回収し、血清中の複数の炎症促進性サイトカインのレベルを、他の対照マウスの血清と一緒に、マウス炎症促進性－７ｐｌｅｘ　ｋｉｔ（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ）を使用して分析した。評価した７種のサイトカインのうち、５種（ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１０およびＩＬ－１２ｐ７０）が、対照抗体処置マウスと比較して抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置マウスにおいて減少した（図６）。最も著しいことには、ＩＬ－６が、年齢の一致する健康な野生型Ｂ６マウスまたは脂質異常症または糖尿病を有していなかった若齢ＡｐｏＥ－／－マウスのレベルまで劇的に減少した（１０倍を超える減少、Ｐ＜０．００１）。ＴＮＦ－αは、抗ＮＫＧ２Ｄ処置マウスにおいて検出不可能なレベルまで減少した。これらのデータは、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の抗体妨害が、糖尿病ＡｐｏＥ－／－マウスにおいて炎症を抑制し、アテローム性動脈硬化を予防することを示した。

【０１５４】

抗ＮＫＧ２Ｄ抗体処置マウスにおけるＩＬ－６の減少は、糖尿病患者の血清中の可溶性ＭＩＣＡとＩＬ－６との逆の関係と相関する（図１）。抗ＮＫＧ２Ｄ抗体およびｓＭＩＣＡ両方が、ＮＫＧ２Ｄにより仲介された免疫活性化に干渉することによって機能することを考慮すると、ヒト患者における高レベルのｓＭＩＣＡは、炎症の抑制のための天然発生の機序であると思われる。

【０１５５】

炎症促進性サイトカインの産生の減少が、ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスにおいても観察された。糖尿病またはウェスタン食餌を与えた、ＮＫＧ２Ｄが十分なＡｐｏＥ－／－マウスと比較すると、同様に処置されたＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスは、大部分の炎症促進性サイトカインの血清レベルが減少した（図７）。複数の炎症性サイトカイン（ＩＬ－６、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２およびＴＮＦ－α）もまた、ＮＫＧ２Ｄ－抗体により処置されたＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスの血清において減少した。著しいことには、すべてのモデルにおいて、ＩＬ－６およびＩＦＮ－γが、劇的に減少した。総合すると、これらの結果は、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止により、炎症が抑制され、アテローム性動脈硬化が減少することを実証した。

【０１５６】

（実施例５）

ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止により、ＡｐｏＥ－／－マウスにおける異常な代謝状態が緩和される。

【０１５７】

アテローム性動脈硬化および炎症の減少の他に、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止

もまた、代謝障害を大幅に緩和した。ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウス由来の血清の濁った外観とは著しく対照的に、同様に餌を与えたＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスのものはクリアであり（図８Ａ）、それらの血液中の脂質成分の堆積の減少を示唆している。このことを確認すると、コレステロールおよびトリグリセリドの血清レベルは、ＫＬＲＫ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスにおいてＡｐｏＥ－／－マウスより有意に低かった（図８Ｂ）。異常な脂質代謝状態がアテローム性動脈硬化に直接寄与し、炎症を促進することを考慮すると、これらの結果は、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用が、炎症および代謝機能不全の正のフィードバックサイクルを伝播し、アテローム硬化性の進行を持続することを示唆していた。

【０１５８】

要約すれば、これらの結果は、ＮＫＧ２Ｄリガンドの異常な代謝状態に関連するアップレギュレーションが、アテローム性動脈硬化に決定的に関与し、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻害が、炎症の減少および異常な代謝障害の緩和よって疾患の進行を抑制することを実証し、そのことが、アテローム性動脈硬化に対する治療において、魅力的な治療標的であることを示唆している。

【０１５９】

（実施例６）

ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用を阻止することによって、ＡｐｏＥ－／－マウスにおいて肝臓の炎症が抑制された

ウェスタン食餌を与えたＮＫＧ２Ｄ－ノックアウトＡｐｏＥ－／－マウスにおけるコレステロールおよびトリグリセリドの血清レベルの減少は、ＮＫＧ２Ｄ／リガンドにより仲介された免疫活性化が、代謝機能不全を悪化させたことを示唆した。肝臓は、脂質代謝の主要な器官なので、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用により仲介される炎症は、機能を損傷することによって異常な代謝状態を悪化させると思われる。実際に、ＡｐｏＥ－／－マウスと比較して、ＮＫＧ２Ｄ－ノックアウトＡｐｏＥ－／－マウスは血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）の有意に低い活性を有し（図９）、肝臓機能不全の緩和を示す。血清中のＡＬＴの活性を、Ｂｉｏｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ａｕｓｔｉｎ、ＴＸ）によるキットを使用して、製造業者の指示書に従って決定した。個々の群に関して、少なくとも５匹のマウスを使用した。＊＊Ｐ＜０．０１。

【０１６０】

ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止が、肝臓の炎症の量を減少させるかどうかを試験した。ＡｐｏＥ－／－マウスのものと比較して、ＮＫＧ２Ｄ－ノックアウトＡｐｏＥ－／－マウスのｅｘ　ｖｉｖｏで培養された肝臓外植片はＩＬ－６の産生が有意に低く、炎症の減少を示す（図１０Ａ）。さらに、ＡｐｏＥ－／－マウスのものと比較して、マクロファージ、ＮＫＴおよびＮＫ細胞を含む多数のさまざまな免疫細胞はすべて、ＮＫＧ２Ｄ－ノックアウトＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓において減少し（図１０Ｂ）、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用を阻止することによって実際に肝臓の炎症が減少することを示している。

【０１６１】

免疫細胞がＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用により影響を受け、肝臓の炎症に寄与することを調査した。アテローム硬化性大動脈のように、ＡｐｏＥ－／－のマウスの肝臓は、ＮＫＧ２Ｄリガンドの高いアップレギュレーションを有した（図１１Ａ）。肝臓のマクロファージおよび肝細胞の両方は、野生型対照と比較して、ＡｐｏＥ－／－マウスにおいてＲａｅ－１の発現のアップレギュレーションを有した（図１１Ｂ～Ｄ）。ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスの肝臓におけるリガンドのアップレギュレーションに対応して、これらのマウスの肝臓のＮＫＧ２Ｄ発現免疫細胞、例えばＮＫおよび特にナチュラルキラーT細胞（ＮＫ　Ｔ細胞）は、ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４を含む大量のサイトカインの産生を示し、マウスがＮＫＧ２Ｄをも喪失した場合、これは著しく減弱した（図１１ＥおよびＦ）。対照的に、ＮＫＧ２Ｄを発現しない肝臓マクロファージは、マウスがＮＫＧ２Ｄを発現したかどうかにかかわらず、ＡｐｏＥ－／－マウスにおいて、高レベルのＩＬ－６を産生した（図１１Ｇ）。しかし、すでに述べたように、マクロファージの数はＫｌ

ｒｋ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスにおいて実質的に減少し、ＮＫＧ２Ｄにより仲介される炎症によって、マクロファージが間接的に影響を受けたことを示している。これらの発見は、異常な代謝状態が、特に異常な代謝産物が堆積する組織、例えばアテローム硬化性プラークおよび肝臓においてＮＫＧ２Ｄリガンドのアップレギュレーションを誘導し、したがって、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用はアテローム性動脈硬化に対する有用な介入標的であることを実証する。

【０１６２】

（実施例７）

ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用を阻止することによって、ウェスタンダイエットを与えたＡｐｏＥ－／－マウスにおいてグルコースレベルが減少した

一実験において、８週齢のＡｐｏＥ－／－およびＮＫＧ２Ｄ－欠損ＡｐｏＥ－／－Ｋｌｒｋ１－／－マウスに、ウェスタン食餌を３ヶ月間与えた。その後、血清を回収し、給餌措置の終わりにグルコースレベルを評価した。３ヶ月のウェスタン食餌の給餌後、平均してＡｐｏＥ－／－Ｋｌｒｋ－／－マウスは、ＡｐｏＥ－／－マウスより有意に低いグルコースレベルを有し（図１２）、ＮＫＧ２Ｄ／リガンド相互作用の阻止が、高血糖の進行を抑制できることを示唆している。

【０１６３】

（実施例８）

抗ＮＫＧ２Ｄ抗体は、２型糖尿病のげっ歯類モデルにおいて高血糖および糖尿病の発症および進行を阻止する

２型糖尿病の発症および進行に関するＮＫＧ２Ｄの遮断の効果をさらに決定するために、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体を、スナネズミの２型糖尿病動物モデルであるPsammomys obesus（スナネズミとしても公知である）に投与した。

【０１６４】

雄および雌のP. obesus（Ｈａｒｌａｎ、Ｊｅｒｕｓａｌｅｍ、Ｉｓｒａｅｌ）に低エネルギー（２．４ｋｃａｌ／ｇ）の固形飼料を９週齢まで与え、その時点で自由摂取の高エネルギー（３．１ｋｃａｌ／ｇ）食に移行し、その間体重（ＢＷ）および朝食前血糖値（ｍＢＧ）を１０日間まで（誘導期）追跡した。２回連続の測定値がｍＢＧ＞１０ｍｍｏｌ／Ｌと規定されている、ｍＢＧレベルの増加を示した動物を、低エネルギー食に戻し、１０日後にそれらのｍＢＧレベルが非糖尿病レベルに戻ったところで実際の研究（予防）に使用した。誘導期にｍＢＧの増加を全く示さなかった動物は犠牲にし、以降は使用しなかった。

【０１６５】

P. obesusを、腹腔内注射によって週に１回、賦形剤（Ｎ＝１９）またはＮＫＧ２Ｄ－ＰＥ抗体（クローンＣＸ５）を用いて処置した（Ｎ＝９）。ＮＫＧ２Ｄげっ歯類抗体製剤は、ＣＸ５　ＯＰ００１－ｃａ．を、１０ＥＵ／ｍｌまたは０．９６ｍｇ／ｍｌで含む。ＰＢＳバッファーに溶解した４５ｍｌの１つのバイアルを４℃に維持し、使用した用量体積は０．５２ｍｌ／ｋｇまたは０．５ｍｇ／ｋｇであった。

【０１６６】

研究を６週にわたって実施し、その間、ｍＢＧおよびＢＷを定期的に追跡した。ｍＢＧ（ｍｍｏｌ／ｌ）の決定のために、血液試料を、尾の毛細血管の先端から、１０μｌのガラスの毛細管に採取し、速やかにエッペンドルフのバイアル中のバッファー（５００μｌのＢｉｏｓｅｎの分析バッファー）に懸濁し、試験日のグルコースに関して分析した。

【０１６７】

研究期間中、重症のｍＢＧの上昇およびケトアシドーシスのため、賦活剤群の５匹の動物およびＮＫＧ２Ｄ抗体群の１匹は犠牲にしなければならなかった。この研究は、Ａｎｉｍａｌ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ　Ｉｎｓｐｅｃｔｏｒａｔｅ、Ｍｉｎｉｓｔｒｙ　ｏｆ　Ｊｕｓｔｉｃｅ、Ｄｅｎｍａｒｋによって承認された。

【０１６８】

図１３に示すように、賦活剤またはＮＫＧ２Ｄ抗体の最初の用量の６週間後、ビヒクル

のすべての動物は、重症の糖尿病になり、平均ｍＢＧは１４．５±２．６ｍＭ（平均±ｓｅｍ）であり、一方、ＮＫＧ２Ｄ抗体を用いて処置した動物は、正常血糖（ｍＢＧ＜８ｍＭ）を維持し、８．０±１．９ｍＭという有意に低いｍＢＧを有した、ｐ＜０．０００１（平均±ｓｅｍ）。２つの処置群においてＢＷ増加に差はなかった。これらの発見は、２型糖尿病を有するヒトと多くの同じ特徴を有するげっ歯類動物モデルにおいて、顕性２型糖尿病の発症に、ＮＫＧ２Ｄが（おそらく炎症、インスリン抵抗性およびβ細胞の減少を介して）非常に重要な役割を果たすことを実証している。抗体を用いてＮＫＧ２Ｄの効果を遮断することによって、高エネルギー食餌により誘導されたP. obesusにおける２型糖尿病の発症は完全に無効になった。

【０１６９】

抗ＮＫＧ２Ｄ抗体の特異性を確認するために、ＮＫＧ２Ｄ抗体と、P. obesus由来の血液細胞との結合のフローサイトメトリ分析を実施した。

【０１７０】

簡潔にいうと、ＥＤＴＡにより安定化されたスナネズミ由来の血液を、１００μｌのアリコートにおいて、ＮＫＧ２Ｄまたはアイソタイプ対照に対する抗体：抗マウスＮＫＧ２Ｄ－ＰＥ（クローンＣＸ５）、ラットＩｇＧ１－ＰＥアイソタイプ対照、抗ヒトＮＫＧ２Ｄ－ＰＥ（クローン１Ｄ１１）、マウスＩｇＧ１－ＰＥアイソタイプ対照および抗ヒトＮＫＧ２Ｄ－ＰＥ（クローンＯＮ７２）を用いて染色した。その後、ＢＤ　ＦＡＣＳ溶解／固定溶液およびＰＢＳを使用して、血液を溶解、固定および洗浄し、ＰＥ結合抗体の結合をＬＳＲＩＩフローサイトメーターにおいて測定した。非顆粒球の特定のためにＦＳＣ／ＳＳＣを使用した。

【０１７１】

図１４のフローサイトメトリ分析によって示されるように、スナネズミの血液において抗マウスＮＫＧ２Ｄ－ＰＥ抗体（クローンＣＸ５）とＮＫ細胞に関する用量依存性結合が観察された。アイソタイプ対照抗体（ラットＩｇＧ１－ＰＥアイソタイプ対照（Ｒ３－３４）およびマウスＩｇＧ１－ＰＥアイソタイプ対照（ＭＯＰＣ－２１））または抗ヒトＮＫＧ２Ｄ抗体（クローン１Ｄ１１およびクローンＯＮ７２）の結合は存在しなかったので、この結合は特異的であった。

【０１７２】

この結果は、２型糖尿病および高血糖の治療のためにＮＫＧ２Ｄを標的化することの有用性を実証している。

材料および方法

【０１７３】

マウスモデルおよびヒト患者：Ｃ５６ＢＬ／６バックグラウンドのＡｐｏＥ－／－マウスは、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂから購入した。Ｋｌｒｋ１－／－マウスは、先に記載した。ＡｐｏＥ－／－とＫｌｒｋ１－／－マウスとを交配させ、仔を交雑受精させることによって、Ｋｌｒｋ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスを作製した。アテローム性動脈硬化を加速するために、６週齢の雄にウェスタン食餌を自由給餌で与え、またはストレプトゾトシン（ＳＴＺ）を注射し、糖尿病を誘導し（例えば、非特許文献３０参照）、処置開始後８～１０週間後に分析した。ＮＫＧ２Ｄ抗体遮断実験のために、ＳＴＺ投与の１週間前および３日前ならびにその後８週間の毎週に１回、ＡｐｏＥ－／－マウスにモノクローナルＮＫＧ２Ｄ抗体を注射した（２００μｇ／初回の注射および他は１００μｇ／注射）（クローンＭＩ－６、ラットＩｇＧ２ａ）（例えば、特許文献３１参照）。

【０１７４】

抗体および試薬：ＮＫＧ２Ｄ抗体（クローンＭＩ－６）は、本研究所において調製した。Ｐａｎ－Ｒａｅ－１抗体はＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入し、他はＢＤ　ＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓもしくはｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅによる、または以下の関連する項に示した。

【０１７５】

正面オイルレッドＯ染色：さまざまに処置したマウスの大動脈を開き、１０％のホルマ

リンで固定し、オイルレッドO染料を用いて染色した。オイルレッドO染色陽性プラーク範囲のサイズを、Ａｄｏｂｅ　Ｐｈｏｔｏｓｈｏｐを使用して染色された大動脈のデジタル画像に基づいて計算した。

【０１７６】

免疫組織化学染色：マウス大動脈プラークの凍結切片を、ポリクローナルヤギ抗マウス抗－Ｒａｅ－１またはＨ６０抗体（それぞれ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓおよび Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を用いて染色し、その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合ロバ抗ヤギＩｇＧ抗体およびＡＢＣ－ＨＲＰ染色システムを用いて染色した（茶色）（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）。切片を、モノクローナルラット抗マウスＣＤ６８抗体（Ｓｅｒｏｔｅｃ）を用いてさらに染色し、その後アルカリホスファターゼ（ＡＰ）結合ロバ抗ラット抗体およびＡＢＣ－ＡＰ染色キットを用いてさらに染色した（青色）（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）。ヒト大動脈プラークの隣接凍結切片を、モノクローナルマウス抗ヒトＭＩＣＡ／Ｂ抗体（クローン６Ｄ４、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、抗－Ｍａｃ－３または抗ＣＤ３１抗体を用いて染色した。

【０１７７】

細胞の単離：単核球、内皮細胞および肝細胞を、報告した手順に従って大動脈または肝臓から単離した。単離細胞をカウントし、さまざまな分析に使用した。

【０１７８】

フローサイトメトリ：細胞を、蛍光標識抗体の特有の組み合わせを用いて染色し、フローサイトメーターＦＣ５００（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｎｔｅｒ）を使用してフローサイトメトリによって分析した。

【０１７９】

半定量的ＲＴ－ＰＣＲ分析およびリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析：ＲＮＡを、Ｒａｅ－１δ、Ｒａｅ－１εおよびＨ６０ｂの転写産物に関して、半定量的放射性ＲＴ－ＰＣＲまたはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって分析した。

【０１８０】

マクロファージのＩｎ　ｖｉｔｒｏ処置：腹腔マクロファージを、ｏｘＬＤＬ（１０μｇ／ｍｌ）、天然ＬＤＬ（ｎＬＤＬ）（１０μｇ／ｍｌ）、ＡＧＥ（２００μｇ／ｍｌ）またはＬＰＳ（２００ｎｇ／ｍｌ）を含有する培地において２日間ｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養し、ＮＫＧ２Ｄリガンドの発現に関して分析した。

【０１８１】

合計Ｒａｅ－１蛋白質に関するウェスタンブロット分析：マクロファージを溶解し、ＰＡＧＥゲルにおいて分離し、ＰＥＧＦ膜に移行し、抗Ｒａｅ１抗体（Ｃ２０、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を用いてブロットし、ＳＥＬシステムを用いて発色させた。

【０１８２】

血清サイトカインの多重分析：マウス血清を、マウス炎症促進性７ｐｌｅｘ　ｋｉｔ（ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１０、ＩＬ－１βおよびＫＣ／ＣＸＣＬ１）（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）において直接分析した。

【０１８３】

血清中のコレステロールおよびトリグリセリドレベルの評価：コレステロールおよびトリグリセリドのレベルを、ＶｅｔＴｅｓｔ（登録商標）Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（ＩＤＥＸＸ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．Ｍａｉｎｅ）において分析した。

【０１８４】

ＡＬＴ活性の分析：血清中のＡＬＴ活性を、Ｂｉｏｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ａｕｓｔｉｎ、ＴＸ）によるキットを使用して、製造業者の指示書に従って決定した。

【０１８５】

肝臓外植片のＥｘ　ｖｉｖｏ培養：ＰＢＳで灌流した肝臓を、ウェスタン食餌を与えたＡｐｏＥ－／－マウスまたはＫｌｒｋ１－／－ＡｐｏＥ－／－マウスから切除した。等重量の切除肝臓を、約１ｍｍ^{3}の角切りにし、培地において１または３日間培養した。培養培地を回収し、ＥＬＩＳＡによりサイトカインに関して分析した。

【０１８６】

細胞内サイトカイン染色：肝臓から単離した単核球を、ブレフェルジンＡの存在下で一晩培地において培養し、ゲートをかけた免疫細胞のサブセットにおいてＩＬ－６、ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４の産生に関して細胞内サイトカイン染色によって、製造業者の指示書（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅおよびＢｉｏｌｅｇｅｎｄ）に従って分析した。

【０１８７】

可溶性ＭＩＣＡのＥＬＩＳＡ検出：２型糖尿病患者およびがん患者の血清を、ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）を使用してＭＩＣＡ蛋白質に関してアッセイした。

【０１８８】

統計分析：すべてのデータは、平均±ｓ．ｅ．ｍ．で表した。統計的有意性を、両側スチューデントＴ検定を用いて決定した。Ｐ＜０．０５は、統計的に有意であると思われる。

【０１８９】

本明細書に引用した出版物、特許出願および特許を含むすべての参考文献は、個々の参考文献が個別かつ具体的に参照により組み込まれることが示され、その全体を本明細書において説明したかのような同じ程度に、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０１９０】

上記の要素の可能な変形におけるそれらの任意の組み合わせは、本明細書において明示される、または文脈により明らかに矛盾しない限り、本発明に包含される。

【０１９１】

本発明を記述する文脈において使用される「ａ」および「ａｎ」および「ｔｈｅ」という用語ならびに同様の指示対象は、本明細書において明示される、または文脈により明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を含むものと解釈するべきである。

【０１９２】

本明細書において提供される、任意のおよびすべての実施例、または例示的言語（例えば「など（ｓｕｃｈ　ａｓ）」）の使用は、単に本発明の理解をより容易にする意図のものであり、特に明示しない限り本発明の範囲を限定する姿勢ではない。本明細書中の言語はいずれも、等しく明示的に述べない限り、任意の要素が本発明の実践に必須であることを示すと解釈すべきではない。

【０１９３】

要素（単数または複数）に関する「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」または「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」などの用語を使用した、本発明の任意の態様または実施形態の本明細書における説明は、本明細書において明示される、または文脈により明らかに矛盾しない限り、その特定の要素（単数または複数）「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｏｆ）」、「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」または「を実質的に含む（ｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ　ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」本発明の同様の態様または実施形態のための支持を提供する意図のものである（例えば、特定の要素を含む本明細書に記載の組成物は、本明細書において明示される、または文脈により明らかに矛盾しない限り、その要素からなる組成物もまた記述すると理解すべきである）。

【０１９４】

本発明は、本明細書に提示した態様または特許請求の範囲に列挙した主題のすべての変形および等価物を、準拠法が認める最大の程度で含む。

【０１９５】

例示的実施形態
以下は、本発明の例示的実施形態である。
【０１９６】
１．ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、２型糖尿病の治療方法。
【０１９７】
２．ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、２型糖尿病の治療方法。
【０１９８】
３．ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、病態が、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療方法。
【０１９９】
４．ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、病態が、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療方法。
【０２００】
５．病態が２型糖尿病である実施形態３または４に記載の方法。
【０２０１】
６．病態が心血管疾患である実施形態３または４に記載の方法。
【０２０２】
７．対象がヒトである、前記実施形態のいずれか１つに記載の方法。
【０２０３】
８．薬剤が、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２ＤリガンドおよびＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤からなる群から選択される、前記実施形態のいずれか１つに記載の方法。
【０２０４】
９．薬剤が、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である、実施形態８に記載の方法。
【０２０５】
１０．抗体またはその抗原結合断片がヒトまたはヒト化である、実施形態９に記載の方法。
【０２０６】
１１．抗体またはその抗原結合断片がヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する、実施形態９に記載の方法。
【０２０７】
１２．抗体またはその抗原結合断片が、ＮＫＧ２Ｄにより仲介されるＮＫＧ２Ｄ発現細胞の活性化またはシグナル伝達を低下させる、実施形態９に記載の方法。
【０２０８】
１３．抗体またはその抗原結合断片が、ＮＫＧ２Ｄとの結合において、少なくとも１種のＮＫＧ２Ｄリガンドと競合する、実施形態９から１２のいずれか１つに記載の方法。
【０２０９】
１４．ＮＫＧ２ＤリガンドがＭＩＣＡ／Ｂである、実施形態１３に記載の方法。
【０２１０】
１５．薬剤の投与が、対象において以下：血糖値降下、耐糖能の改善、インスリン抵抗性の低下、体重の減少、血圧低下、炎症低下および代謝機能不全の減少の少なくとも１つをもたらす、前記実施例のいずれか１つに記載の方法。
【０２１１】

１６．薬剤が、静脈内、腹腔内または皮下に投与される、前記実施例のいずれか１つに記載の方法。

【０２１２】

１７．抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤を投与するステップをさらに含む、前記実施例のいずれか１つに記載の方法。

【０２１３】

１８．さらなる薬剤が、（ａ）ＧＬＰ－１ならびにＧＬＰ－１の誘導体およびアナログ、エキセンディン－４ならびにエキセンディン－４の誘導体およびアナログ、アミリンならびにアミリンの誘導体およびアナログ、スルホニルウレア、ビグアナイド、メグリチニド（ナテグリニドおよびレパグリニドなど）、グルコシダーゼ阻害剤、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ）阻害剤、ＳＧＬＴ２阻害剤、ＳＧＬＴ１の阻害剤またはアゴニスト、ガストリンならびにガストリンのアナログおよび誘導体、ＦＧＦ－２１（線維芽細胞成長因子２１）ならびにＦＧＦ－２１の誘導体およびアナログ、プロトンポンプ阻害剤、例えばランソプラゾール、オメプラゾール、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾールおよびラベプラゾール、ＲＸＲアゴニスト、コレスチラミン、コレスチポール、プロブコール、デキストロチロキシン、ＰＰＡＲアゴニストならびにアディポネクチンならびにアディポネクチンの誘導体およびアナログからなる群から選択される血糖降下薬；（ｂ）抗脂質異常症薬、ＨＭＧ　ＣｏＡ阻害剤（スタチン）例えばロバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンならびにフィブラート系薬、例えばゲムフィブロジルおよびクロフィブレートからなる群から選択される血中脂質低下薬または脂質代謝改善薬；（ｃ）ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）アンタゴニスト、ＰＹＹ（ポリペプチドＹＹ）アゴニスト、ＰＰ（膵臓ポリペプチド）アゴニスト、Ｙ２受容体アゴニスト、Ｙ４受容体アゴニスト、混合型Ｙ２／Ｙ４受容体アゴニスト、ＭＣ４（メラノコルチン４）アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、グルカゴンならびにグルカゴンの誘導体およびアナログ、ＣＲＦ（コルチコトロピン放出因子）アゴニスト、ＣＲＦ　ＢＰ（コルチコトロピン放出因子結合蛋白質）アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、β３アゴニスト、ＭＳＨ（メラノサイト刺激ホルモン）アゴニスト、ＭＣＨ（メラノサイト凝集ホルモン）アンタゴニスト、ＣＣＫ（コレシストキニン）アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤、混合型セロトニンおよびノルアドレナリン作動性化合物、５ＨＴ（セロトニン）アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、ＴＲＨ（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）アゴニスト、ＵＣＰ２または３（脱共役蛋白質２または３）調節因子、レプチンアゴニスト、ＤＡアゴニスト（ブロモクリプチン、ドプレキシン）、リパーゼ／アミラーゼ阻害剤、ＲＸＲ（レチノイドＸ受容体）調節因子、ヒスタミンＨ３アンタゴニストならびにＣＡＲＴ（コカインアンフェタミン調節転写産物）アゴニストからなる群から選択される食物摂取量を減少させる薬剤またはエネルギー消費を増加させる薬剤；ならびに（ｄ）β－遮断薬、例えばアルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロールおよびメトプロロール、ＡＣＥ（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、例えばベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリルおよびラミプリル、カルシウムチャネル遮断薬、例えばニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルならびにα－遮断薬、例えばドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシンおよびテラゾシンからなる群から選択される血圧低下薬；からなる群から選択される、実施形態１７に記載の方法。

【０２１４】

１９．ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する、治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【０２１５】
２０．ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤および薬学的に許容される担体を含む組成物。
【０２１６】
２１．薬剤が、２型糖尿病の治療に有用である、実施形態１９または２０に記載の組成物。
【０２１７】
２２．薬剤が、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療に有用である、実施形態１９または２０に記載の組成物。
【０２１８】
２３．病態が、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される、実施形態２２に記載の組成物。
【０２１９】
２４．病態が２型糖尿病である、実施形態２３に記載の組成物。
【０２２０】
２５．病態が心血管疾患である、実施形態２３に記載の組成物。
【０２２１】
２６．薬剤が、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２Ｄリガンドおよびｎｋｇ２ｄリガンドの活性または発現の阻害剤からなる群から選択される、前記実施形態１９から２５のいずれか１つに記載の組成物。
【０２２２】
２７．薬剤が、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である、実施形態２６に記載の組成物。
【０２２３】
２８．抗体またはその抗原結合断片がヒトまたはヒト化である、実施形態２７に記載の組成物。
【０２２４】
２９．抗体またはその抗原結合断片がヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する、実施形態２７に記載の組成物。
【０２２５】
３０．薬剤が、ＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤である、実施形態２６に記載の組成物。
【０２２６】
３１．ＮＫＧ２Ｄリガンドの活性または発現の阻害剤がＭＩＣＡ／Ｂ阻害剤である、実施形態３０に記載の組成物。
【０２２７】
３２．ＭＩＣＡ／Ｂ阻害剤がＭＩＣＡ／Ｂ特異的ｓｉＲＮＡである、実施形態３１に記載の組成物。
【０２２８】
３３．抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤をさらに含む、実施形態１９から３２のいずれか１つに記載の組成物。
【０２２９】
３４．さらなる薬剤が、（ａ）ＧＬＰ－１ならびにＧＬＰ－１の誘導体およびアナログ、エキセンディン－４ならびにエキセンディン－４の誘導体およびアナログ、アミリンならびにアミリンの誘導体およびアナログ、スルホニルウレア、ビグアナイド、メグリチニド（ナテグリニドおよびレパグリニドなど）、グルコシダーゼ阻害剤、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ）阻害剤、ＳＧＬＴ２阻害剤、ＳＧＬＴ１の阻害剤または

アゴニスト、ガストリンならびにガストリンのアナログおよび誘導体、ＦＧＦ－２１（線維芽細胞成長因子２１）ならびにＦＧＦ－２１の誘導体およびアナログ、プロトンポンプ阻害剤、例えばランソプラゾール、オメプラゾール、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾールおよびラベプラゾール、ＲＸＲアゴニスト、コレスチラミン、コレスチポール、プロブコール、デキストロチロキシン、ＰＰＡＲアゴニストならびにアディポネクチンならびにアディポネクチンの誘導体およびアナログからなる群から選択される血糖降下薬；（ｂ）抗脂質異常症薬、ＨＭＧ　ＣｏＡ阻害剤（スタチン）例えばロバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンならびにフィブラート系薬、例えばゲムフィブロジルおよびクロフィブレートからなる群から選択される血中脂質低下薬または脂質代謝改善薬；（ｃ）ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）アンタゴニスト、ＰＹＹ（ポリペプチドＹＹ）アゴニスト、ＰＰ（膵臓ポリペプチド）アゴニスト、Ｙ２受容体アゴニスト、Ｙ４受容体アゴニスト、混合型Ｙ２／Ｙ４受容体アゴニスト、ＭＣ４（メラノコルチン４）アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、グルカゴンならびにグルカゴンの誘導体およびアナログ、ＣＲＦ（コルチコトロピン放出因子）アゴニスト、ＣＲＦ　ＢＰ（コルチコトロピン放出因子結合蛋白質）アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、β３アゴニスト、ＭＳＨ（メラノサイト刺激ホルモン）アゴニスト、ＭＣＨ（メラノサイト凝集ホルモン）アンタゴニスト、ＣＣＫ（コレシストキニン）アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤、混合型セロトニンおよびノルアドレナリン作動性化合物、５ＨＴ（セロトニン）アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、ＴＲＨ（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）アゴニスト、ＵＣＰ２または３（脱共役蛋白質２または３）調節因子、レプチンアゴニスト、ＤＡアゴニスト（ブロモクリプチン、ドプレキシン）、リパーゼ／アミラーゼ阻害剤、ＲＸＲ（レチノイドＸ受容体）調節因子、ヒスタミンＨ３アンタゴニストならびにＣＡＲＴ（コカインアンフェタミン調節転写産物）アゴニストからなる群から選択される食物摂取量を減少させる薬剤またはエネルギー消費を増加させる薬剤；ならびに（ｄ）β－遮断薬、例えばアルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロールおよびメトプロロール、ＡＣＥ（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、例えばベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリルおよびラミプリル、カルシウムチャネル遮断薬、例えばニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルならびにα－遮断薬、例えばドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシンおよびテラゾシンからなる群から選択される血圧低下薬；からなる群から選択される、実施形態３３に記載の組成物。

【０２３０】

３５．（ａ）薬学的に許容される担体と組み合わせた、ＮＫＧ２Ｄの活性化またはシグナル伝達を阻害する治療有効量の薬剤；および

（ｂ）使用のための指示書、

を含むキット。

【０２３１】

３６．（ａ）薬学的に許容される担体と組み合わせた、ＮＫＧ２Ｄリガンドの結合相互作用を遮断する治療有効量の薬剤；および

（ｂ）使用のための指示書、

を含むキット。

【０２３２】

３７．薬剤が２型糖尿病の治療に有用である、実施形態３５または３６に記載のキット。

【０２３３】

３８．薬剤が、ＮＫＧ２Ｄの阻害を介して制御または正常化され得る病態の治療に有用である、実施形態３５または３６に記載のキット。

【０２３４】

３９．病態が、２型糖尿病、心血管疾患、炎症性疾患および代謝機能不全関連疾患からなる群から選択される、実施形態３８に記載のキット。

【０２３５】

４０．病態が２型糖尿病である、実施形態３９に記載のキット。

【０２３６】

４１．病態が心血管疾患である、実施形態３９に記載のキット。

【０２３７】

４２．薬剤が、可溶性ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、ＮＫＧ２Ｄリガンドおよびｎｋｇ２ｄリガンドの活性または発現の阻害剤からなる群から選択される、前記実施形態３５から４１のいずれか１つに記載のキット。

【０２３８】

４３．薬剤が、ＮＫＧ２Ｄと特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である、実施形態４２に記載のキット。

【０２３９】

４４．抗体またはその抗原結合断片がヒト抗体またはヒト化抗体である、実施形態４３に記載のキット。

【０２４０】

４５．抗体またはその抗原結合断片がヒトＮＫＧ２Ｄ（ｈＮＫＧ２Ｄ）と結合する、実施形態４３に記載のキット。

【０２４１】

４６．抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲制御薬、抗高血圧薬、糖尿病に起因または関連する合併症の治療および／または予防のための薬剤ならびに肥満に起因または関連する合併症および障害の治療および／または予防のための薬剤からなる群から選択される、少なくとも１種のさらなる薬剤をさらに含む、前記実施形態３５から４５のいずれか１つに記載のキット。

【０２４２】

４７．さらなる薬剤が、（ａ）ＧＬＰ－１ならびにＧＬＰ－１の誘導体およびアナログ、エキセンディン－４ならびにエキセンディン－４の誘導体およびアナログ、アミリンならびにアミリンの誘導体およびアナログ、スルホニルウレア、ビグアナイド、メグリチニド（ナテグリニドおよびレパグリニドなど）、グルコシダーゼ阻害剤、ＤＰＰ－ＩＶ（ジペプチジルペプチダーゼ－ＩＶ）阻害剤、ＳＧＬＴ２阻害剤、ＳＧＬＴ１の阻害剤またはアゴニスト、ガストリンならびにガストリンのアナログおよび誘導体、ＦＧＦ－２１（線維芽細胞成長因子２１）ならびにＦＧＦ－２１の誘導体およびアナログ、プロトンポンプ阻害剤、例えばランソプラゾール、オメプラゾール、デクスランソプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾールおよびラベプラゾール、ＲＸＲアゴニスト、コレスチラミン、コレスチポール、プロブコール、デキストロチロキシン、ＰＰＡＲアゴニストならびにアディポネクチンならびにアディポネクチンの誘導体およびアナログからなる群から選択される血糖降下薬；（ｂ）抗脂質異常症薬、ＨＭＧ　ＣｏＡ阻害剤（スタチン）例えばロバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンならびにフィブラート系薬、例えばゲムフィブロジルおよびクロフィブレートからなる群から選択される血中脂質低下薬または脂質代謝改善薬；（ｃ）ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）アンタゴニスト、ＰＹＹ（ポリペプチドＹＹ）アゴニスト、ＰＰ（膵臓ポリペプチド）アゴニスト、Ｙ２受容体アゴニスト、Ｙ４受容体アゴニスト、混合型Ｙ２／Ｙ４受容体アゴニスト、ＭＣ４（メラノコルチン４）アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、グルカゴンならびにグルカゴンの誘導体およびアナログ、ＣＲＦ（コルチコトロピン放出因子）アゴニスト、ＣＲＦ　ＢＰ（コルチコトロピン放出因子結合蛋白質）アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、β３アゴニスト、ＭＳＨ（メラノサイト刺激ホルモン）アゴニスト、ＭＣＨ（メラノサイト凝集ホルモン）アンタゴニスト、ＣＣＫ（コレシストキニン）アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤、混合型セロトニンおよびノルアドレナリン作動性化合物、５ＨＴ（セロトニン）アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、

ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、ＴＲＨ（甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン）アゴニスト、ＵＣＰ２または３（脱共役蛋白質２または３）調節因子、レプチンアゴニスト、ＤＡアゴニスト（ブロモクリプチン、ドプレキシン）、リパーゼ／アミラーゼ阻害剤、ＲＸＲ（レチノイドＸ受容体）調節因子、ヒスタミンＨ３アンタゴニストならびにＣＡＲＴ（コカインアンフェタミン調節転写産物）アゴニストからなる群から選択される食物摂取量を減少させる薬剤またはエネルギー消費を増加させる薬剤；ならびに（ｄ）β－遮断薬、例えばアルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロールおよびメトプロロール、ＡＣＥ（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、例えばベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリルおよびラミプリル、カルシウムチャネル遮断薬、例えばニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルならびにα－遮断薬、例えばドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシンおよびテラゾシンからなる群から選択される血圧低下薬；からなる群から選択される、実施形態４６に記載のキット。

【０２４３】

４８．（ａ）対象から試料を得るステップ、

（ｂ）試料を、ＭＩＣＡ／Ｂの発現の存在を検出する少なくとも１種の試薬と接触させるステップ、

（ｃ）試料中のＭＩＣＡ／Ｂの発現レベルを測定するステップ、および

（ｄ）ＭＩＣＡ／Ｂの過剰発現と、対象における２型糖尿病発症の素因または２型糖尿病の存在とを相関させるステップ、

を含む、対象において２型糖尿病の発症の素因または２型糖尿病の存在を検出する方法。

【０２４４】

４９．（ａ）対象から試料を得るステップ、

（ｂ）試料を、ＭＩＣＡ／Ｂの発現の存在を検出する少なくとも１種の試薬と接触させるステップ、

（ｃ）試料中のＭＩＣＡ／Ｂの発現レベルを測定するステップ、および

（ｄ）ＭＩＣＡ／Ｂの過剰発現と、対象における心血管疾患発症の素因または心血管疾患の存在とを相関させるステップ、

を含む、対象において心血管疾患の発症の素因または心血管疾患の存在を検出する方法。

【０２４５】

５０．試薬がＭＩＣＡ／Ｂ抗体である、実施形態４８または４９に記載の方法。

【０２４６】

５１．試料が血清である、実施形態４８または４９に記載の方法。

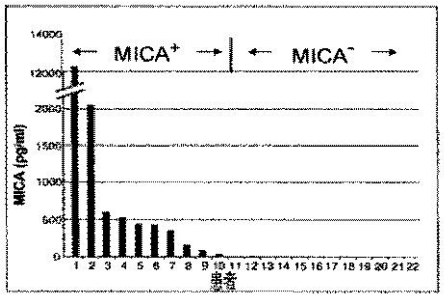
【０２４７】

５２．対象がヒトである、実施形態４８または４９に記載の方法。

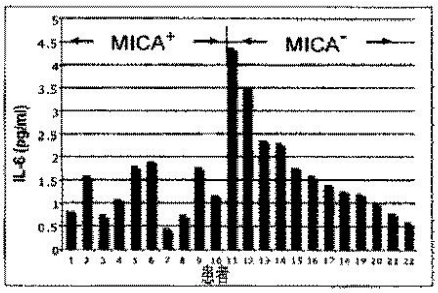
【０２４８】

５３．試料中のＭＩＣＡ／Ｂではない心血管疾患マーカーの発現レベルを測定するステップ、および心血管疾患マーカーのアップレギュレーションまたは過小発現と、対象における心血管疾患発症の素因または心血管疾患の存在とを相関させるステップをさらに含む、前記実施形態４８から５２のいずれか１つに記載の方法。

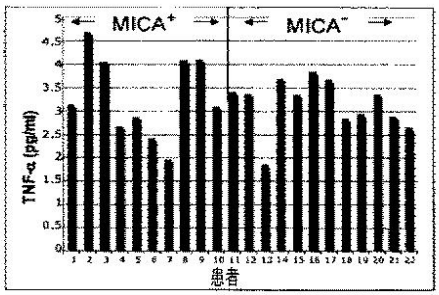
【図１Ａ】



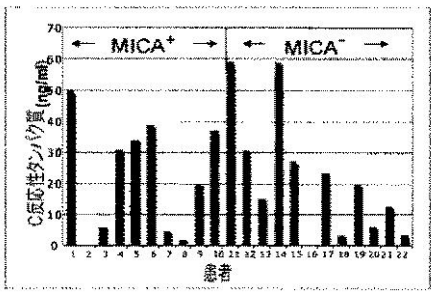
【図１Ｂ】



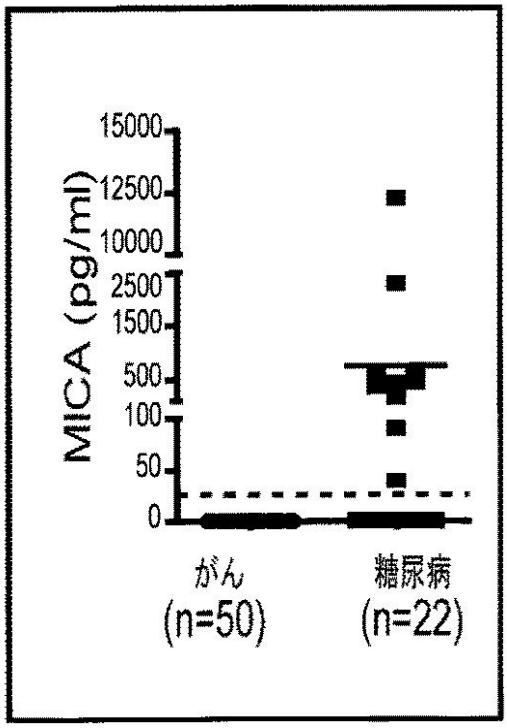
【図１Ｃ】



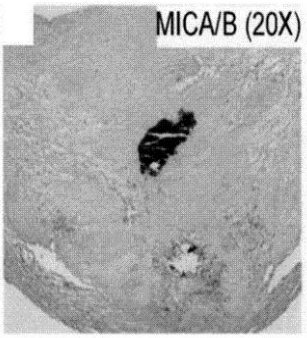
【図１Ｄ】



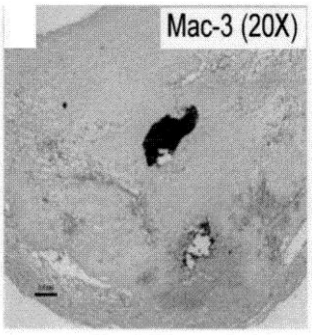
【図１Ｅ】


MICA (pg/ml)
15000
12500
10000
2500
1500
500
100
50
0
がん
(n=50)
糖尿病
(n=22)

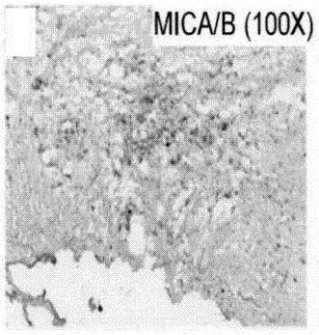
【図２Ａ】


MICA/B (20X)

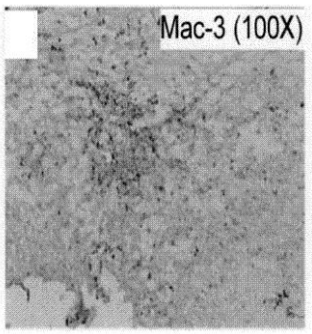
【図２Ｂ】


Mac-3 (20X)

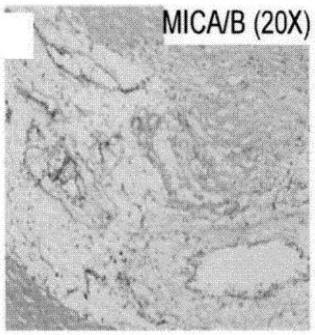
【図２Ｃ】



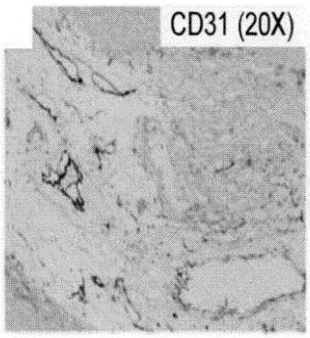
【図２Ｄ】



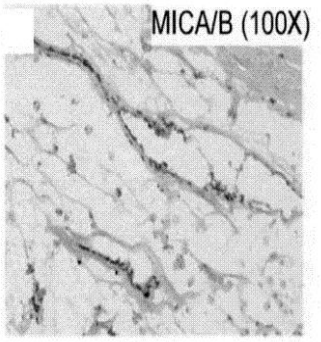
【図２Ｅ】



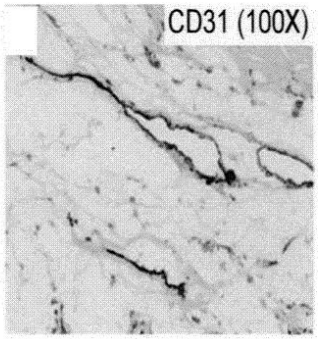
【図２Ｆ】



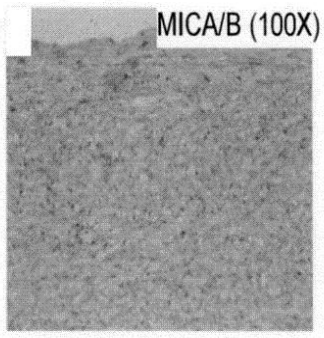
【図２Ｇ】



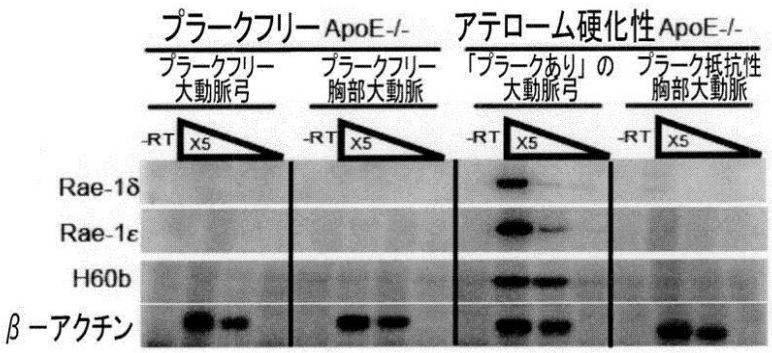
【図２Ｈ】



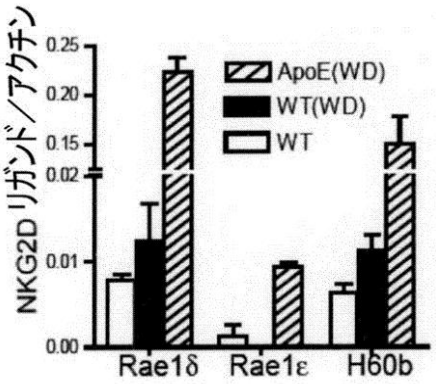
【図２Ｉ】



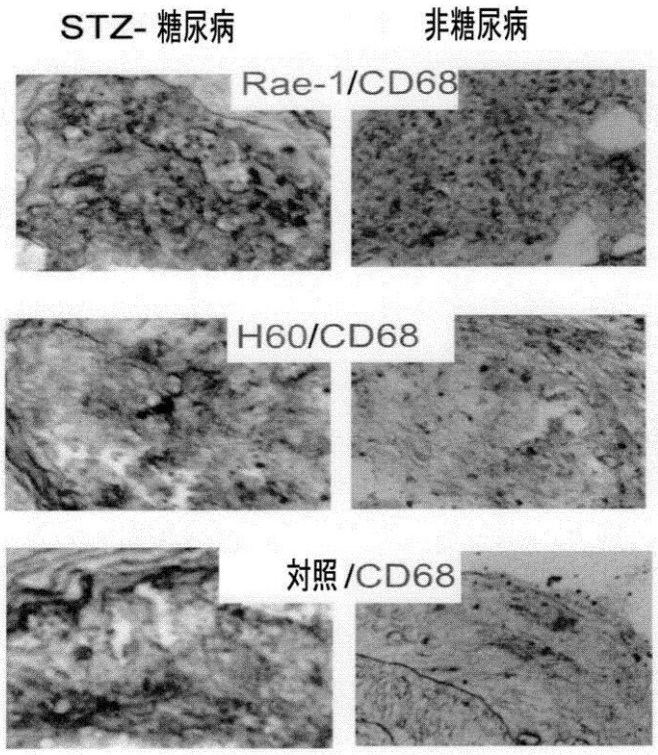
【図３Ａ】



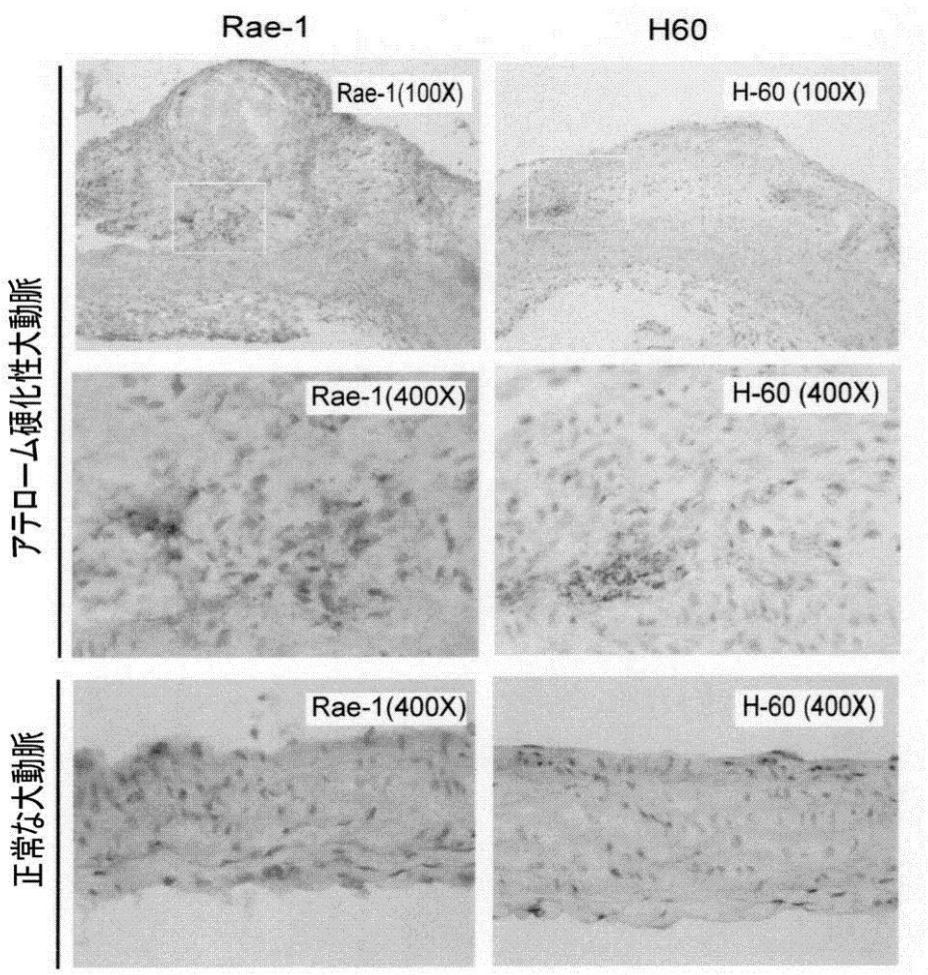
【図３Ｂ】


NKG2D リガンド／アクチン
0.25
0.20
0.15
0.02
0.01
0.00
ApoE(WD)
WT(WD)
WT
Rae1δ
Rae1ε
H60b

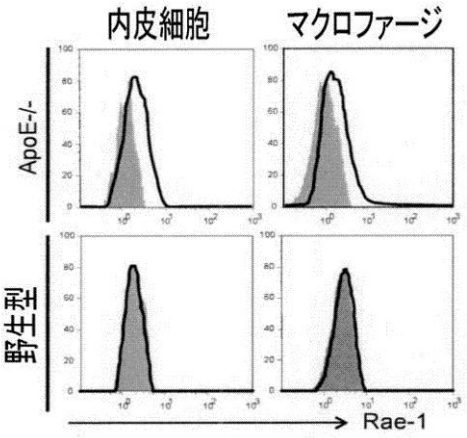
【図３Ｃ】


STZ- 糖尿病
非糖尿病
Rae-1/CD68
H60/CD68
対照/CD68

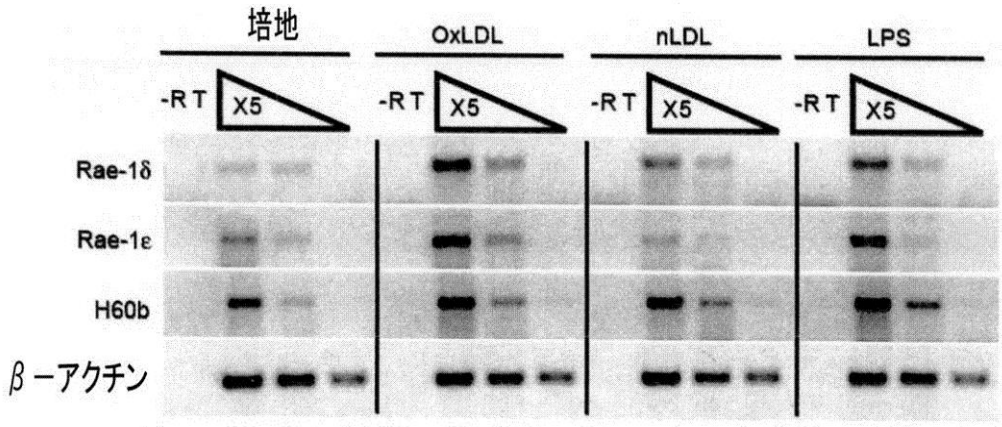
【図３Ｄ】


Rae-1
H60
Rae-1(100X)
H-60 (100X)
Rae-1(400X)
H-60 (400X)
Rae-1(400X)
H-60 (400X)
アテローム硬化性大動脈
正常な大動脈

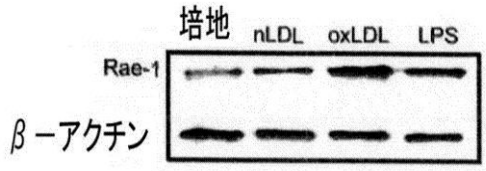
【図３Ｅ】


内皮細胞
マクロファージ
ApoE-/-
野生型
Rae-1

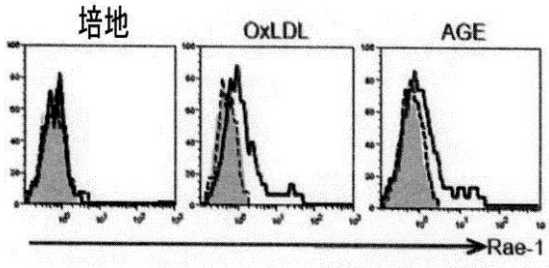
【図３Ｆ】


培地
OxLDL
nLDL
LPS
-RT
X5
Rae-1δ
Rae-1ε
H60b
β－アクチン

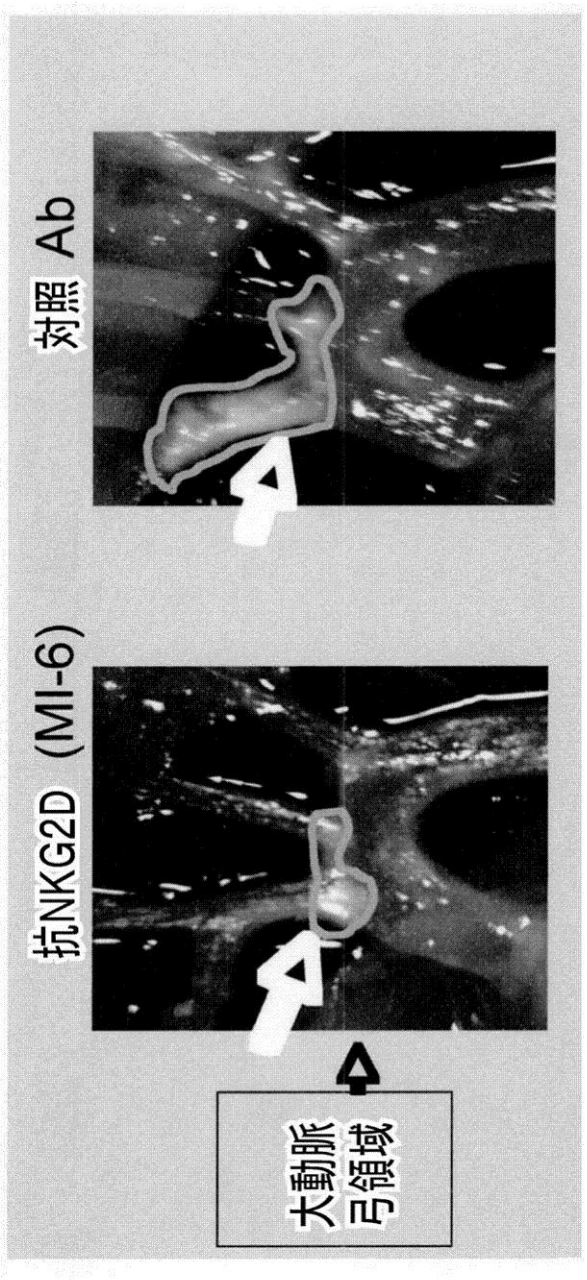
【図３Ｇ】


培地
nLDL
oxLDL
LPS
Rae-1
β－アクチン

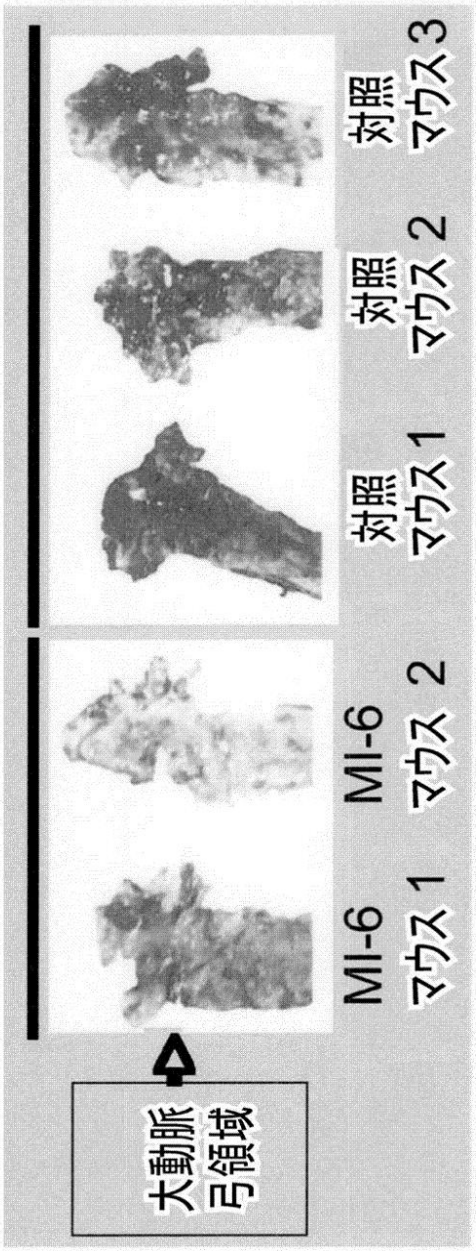
【図３Ｈ】


培地
OxLDL
AGE
Rae-1

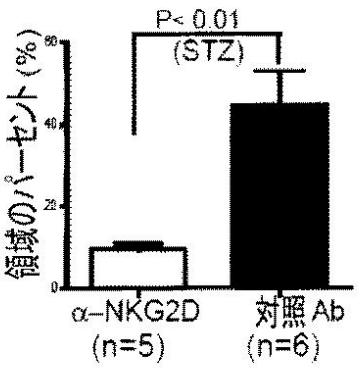
【図４Ａ】



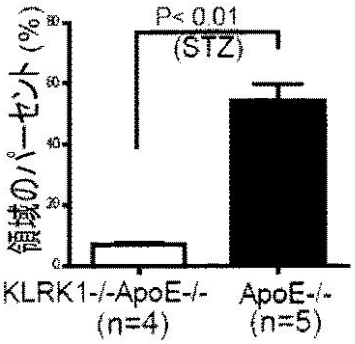
【図４Ｂ】


大動脈弓領域
MI-6 マウス１
MI-6 マウス２
対照 マウス１
対照 マウス２
対照 マウス３

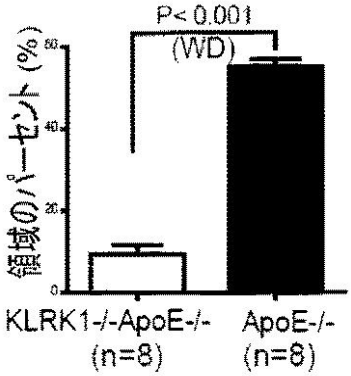
【図５Ａ】


P< 0.01
(STZ)
領域のパーセント(%)
α-NKG2D
(n=5)
対照 Ab
(n=6)

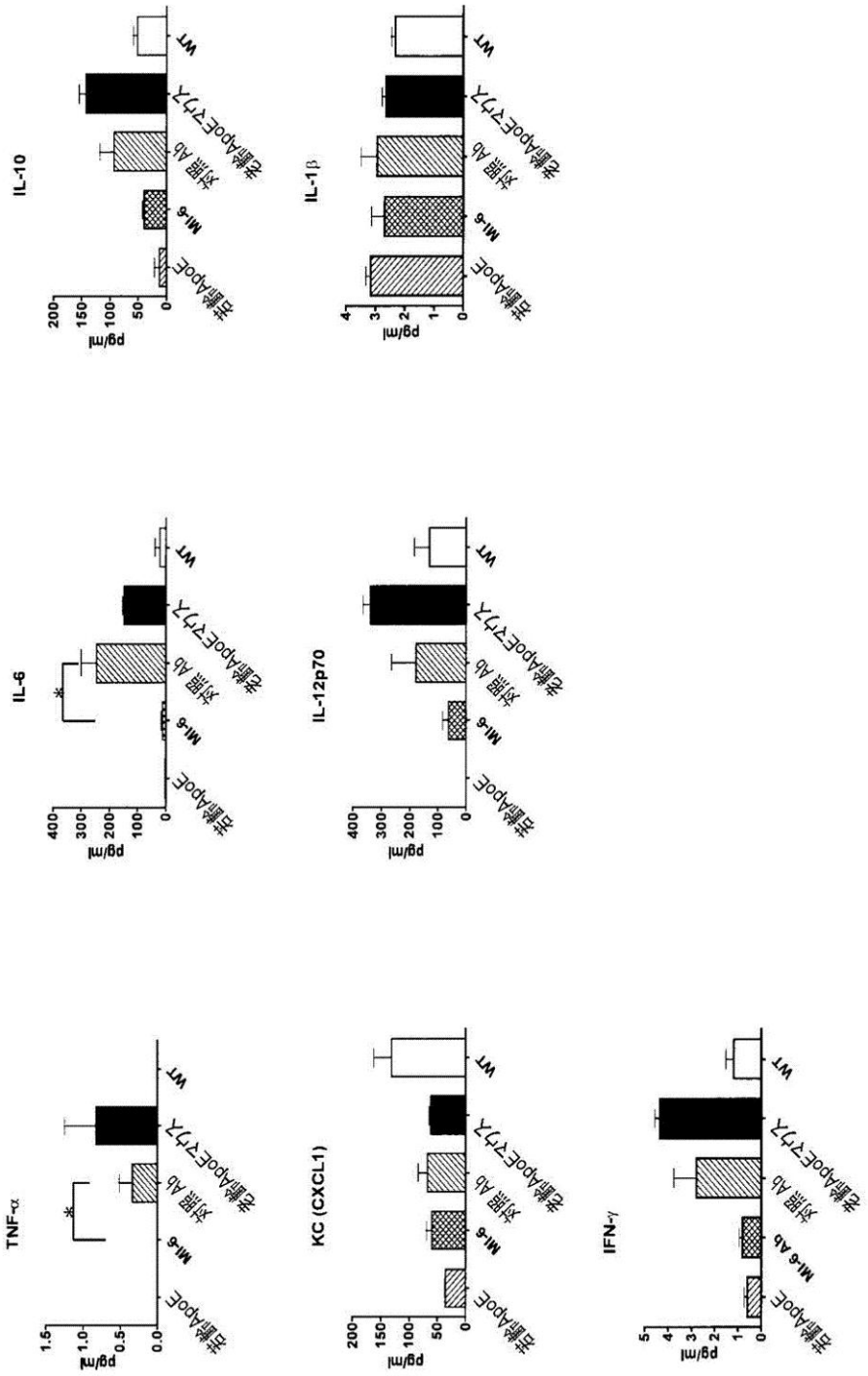
【図５Ｂ】


P< 0.01
(STZ)
領域のパーセント(%)
KLRK1-/-ApoE-/-
(n=4)
ApoE-/-
(n=5)

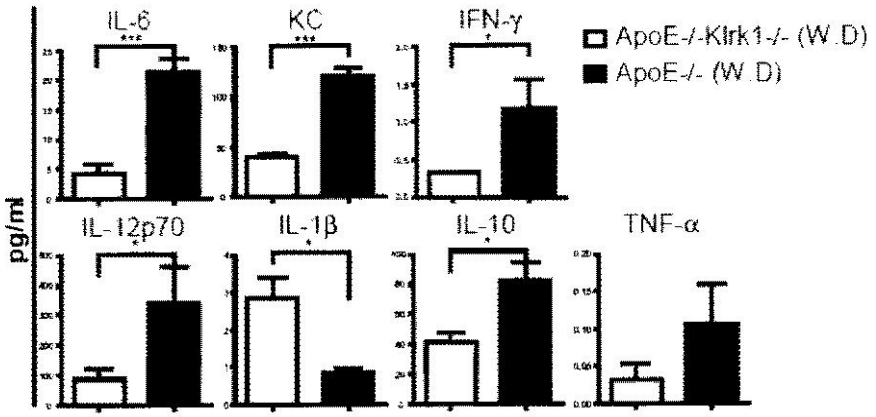
【図５Ｃ】


P< 0.001
(WD)
領域のパーセント(%)
KLRK1-/-ApoE-/-
(n=8)
ApoE-/-
(n=8)

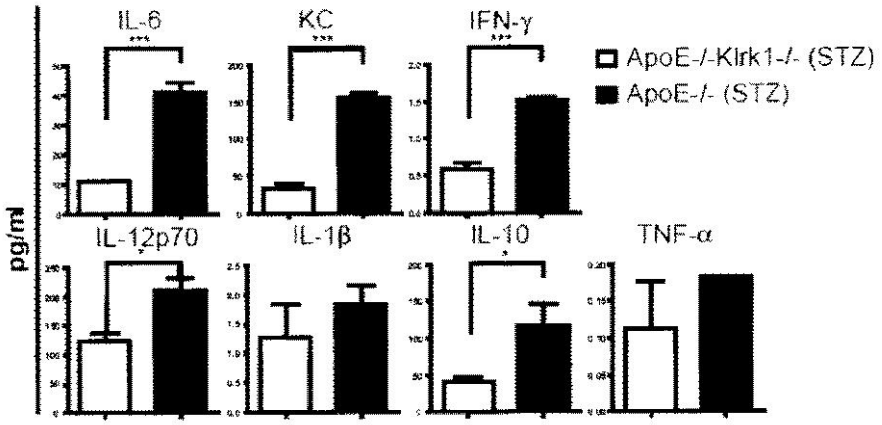
【図６】


IL-10
IL-1β
IL-6
IL-12p70
TNF-α
KC (CXCL1)
IFN-γ
pg/ml
WT
対照Ab
ヒ臨ApoEマウス
Mi-6
Mi-6 Ab
ヒ臨ApoE

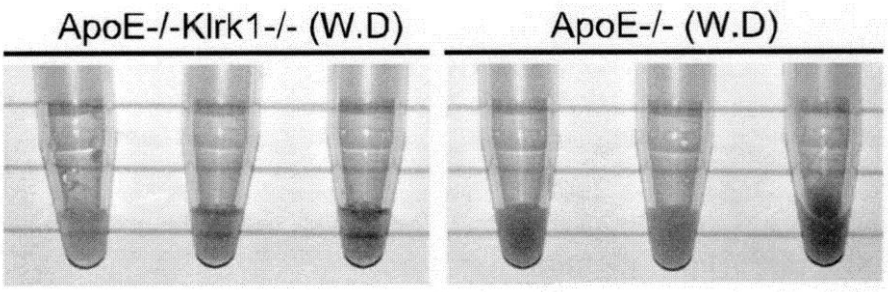
【図７Ａ】


IL-6
KC
IFN-γ
ApoE-/-Klrk1-/- (W.D)
ApoE-/- (W.D)
pg/ml
IL-12p70
IL-1β
IL-10
TNF-α

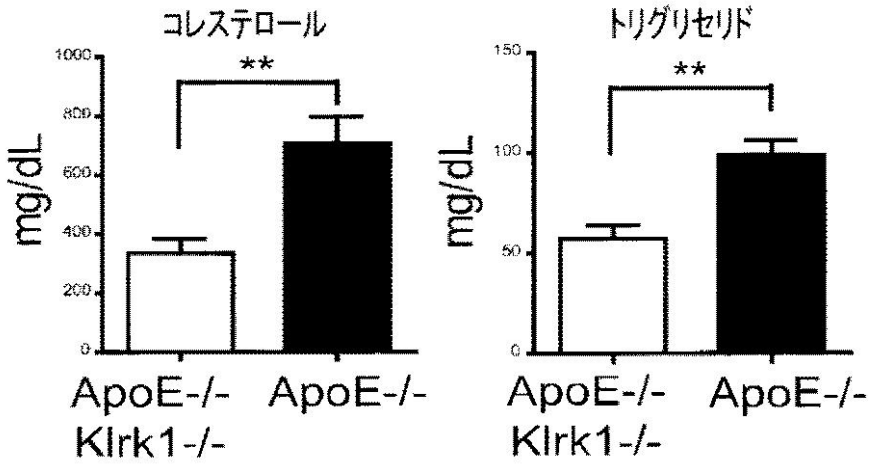
【図７Ｂ】


IL-6
KC
IFN-γ
ApoE-/-Klrk1-/- (STZ)
ApoE-/- (STZ)
pg/ml
IL-12p70
IL-1β
IL-10
TNF-α

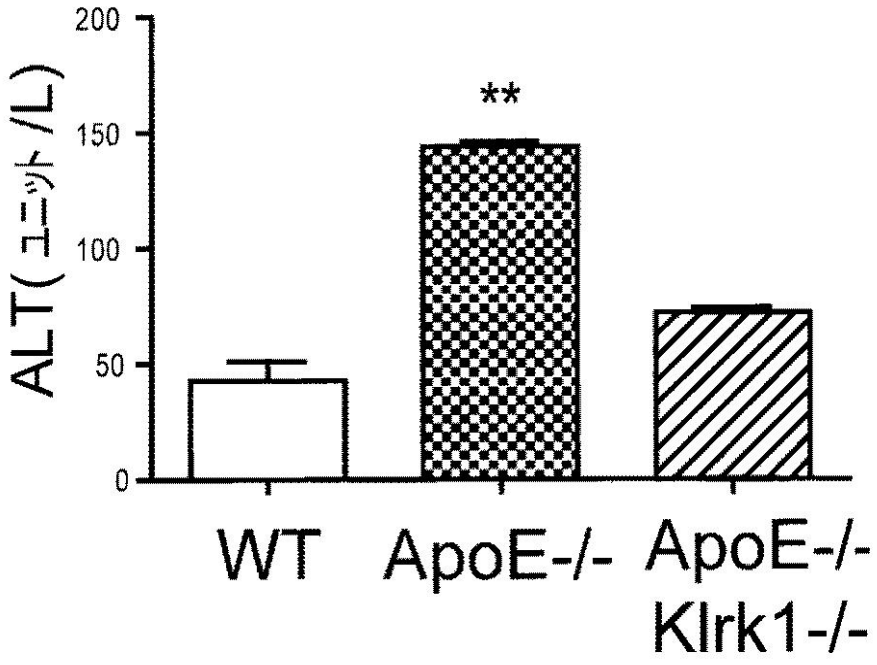
【図８Ａ】


ApoE-/-Klrk1-/- (W.D)
ApoE-/- (W.D)

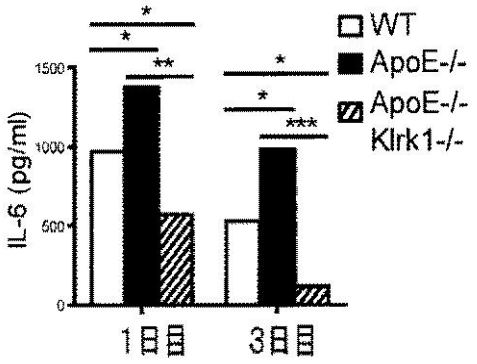
【図８Ｂ】


コレステロール
**
mg/dL
1000
800
600
400
200
0
ApoE-/-
Klrk1-/-
ApoE-/-
トリグリセリド
**
mg/dL
150
100
50
0
ApoE-/-
Klrk1-/-
ApoE-/-

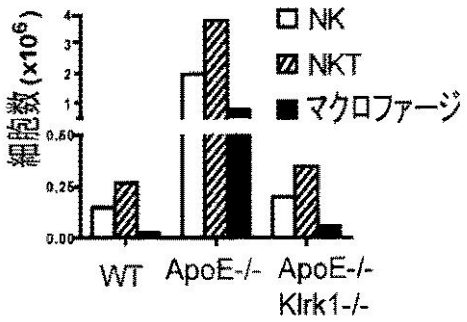
【図９】


ALT(ユニット/L)
200
150
100
50
0
**
WT
ApoE-/-
ApoE-/-
Klrk1-/-

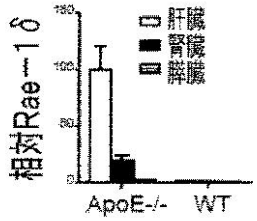
【図１０Ａ】


IL-6 (pg/ml)
1500
1000
500
0
*
*
**
*
*
***
WT
ApoE-/-
ApoE-/-
Klrk1-/-
1日目
3日目

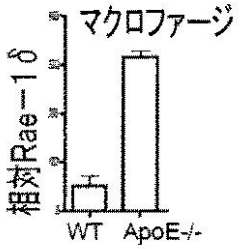
【図１０Ｂ】



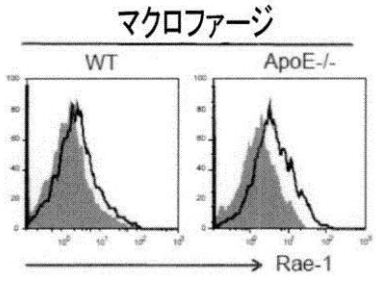
【図１１Ａ】



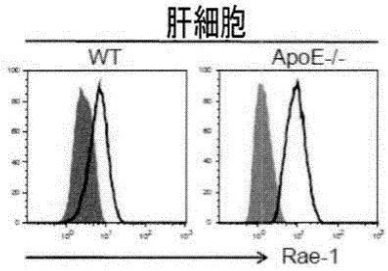
【図１１Ｂ】



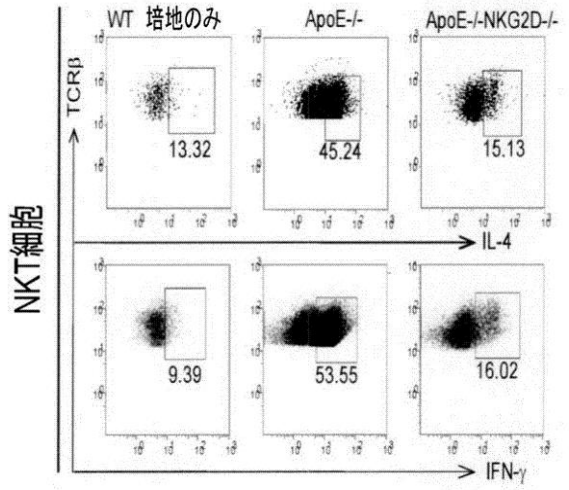
【図１１Ｃ】



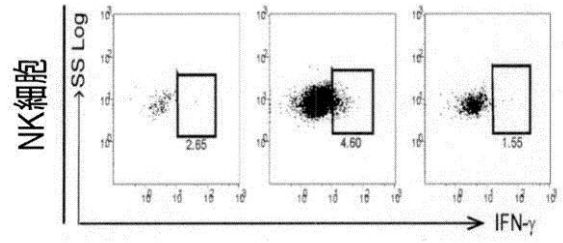
【図１１Ｄ】



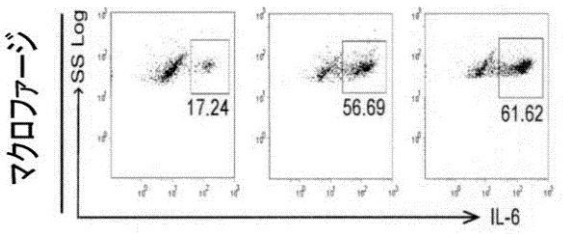
【図１１Ｅ】



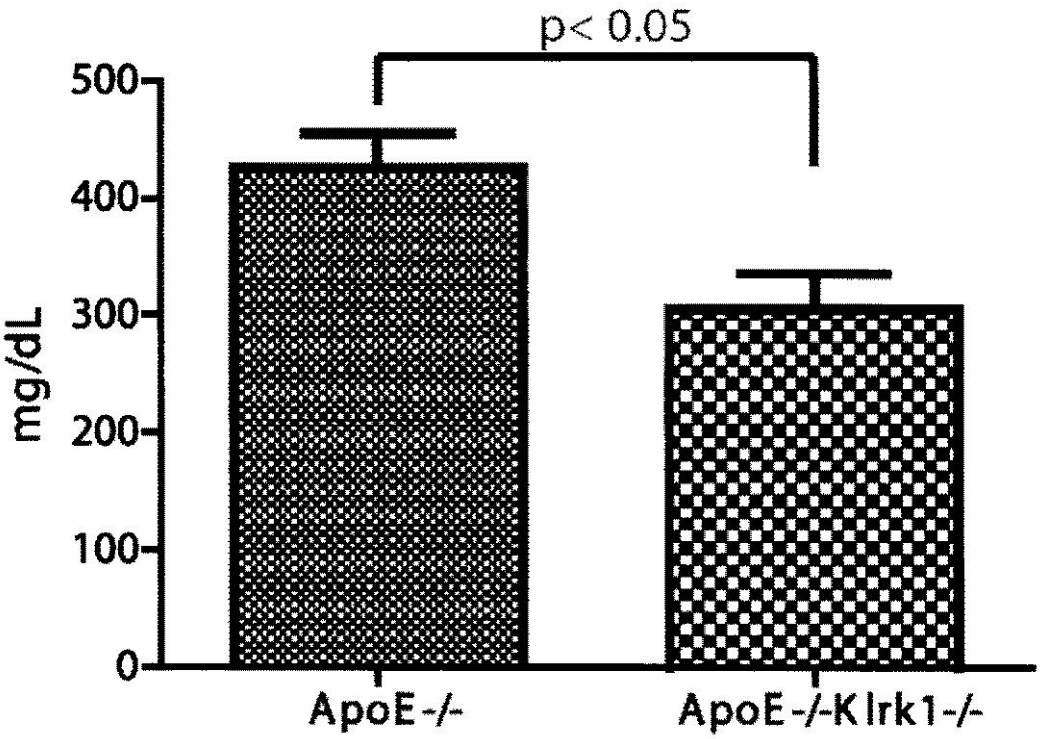
【図１１Ｆ】



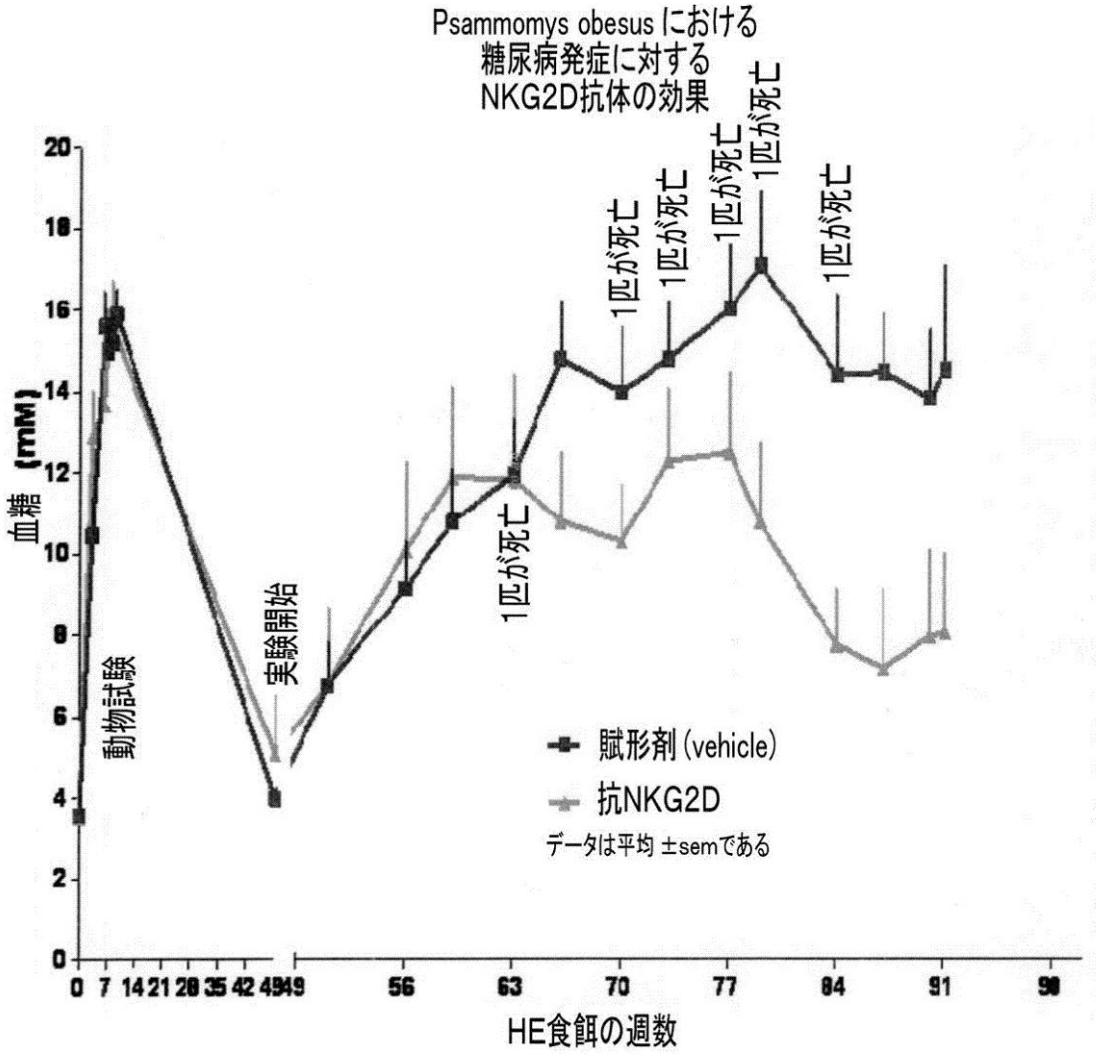
【図１１Ｇ】



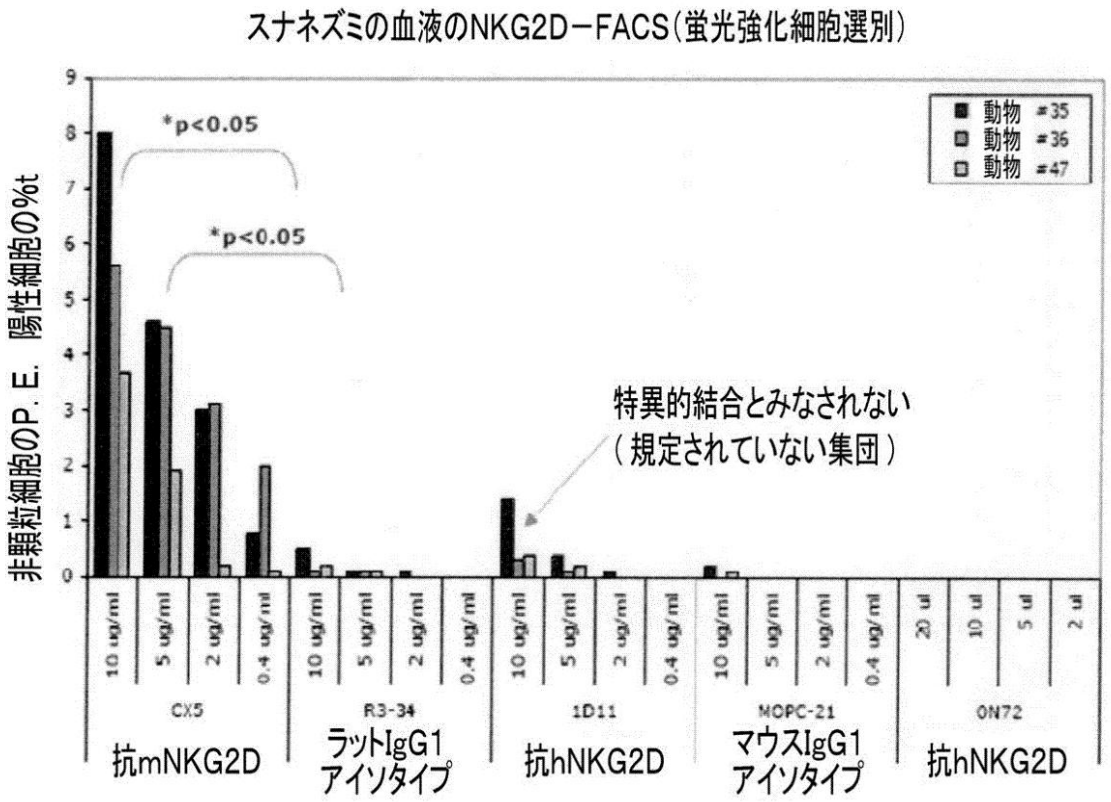
【図１２】



【図１３】


Psammomys obesus における
糖尿病発症に対する
NKG2D抗体の効果
血糖 (mM)
動物試験
実験開始
1匹が死亡
1匹が死亡
1匹が死亡
1匹が死亡
1匹が死亡
賦形剤 (vehicle)
抗NKG2D
データは平均 ±semである
HE食餌の週数

【図１４】



【配列表】

2016014030000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
			Ｃ０７Ｋ	16/28		

(72)発明者　シオン　ナ
アメリカ合衆国　１６８０３　ペンシルベニア州　ステート　カレッジ　サガモア　ドライブ　２３８６
(72)発明者　シア　ミンカン
アメリカ合衆国　１６８０３　ペンシルベニア州　ステート　カレッジ　ウェスト　アーロン　ドライブ　９５０　ディー８
(72)発明者　デイビッド　エイチ．ローレ
アメリカ合衆国　９４７０７　カリフォルニア州　バークレー　ミラマー　アベニュー　９００
(72)発明者　ジェイコブ　ステン　ピーターセン
デンマーク　ディーケー－２９２０　シャーロテンルン　クララスベジ　１２
(72)発明者　ソラ　ブリニャ　ボドヴァルスドティア
デンマーク　ディーケー－２９５０　ベズベック　クロゴルマガルドスベジ　１０８

Ｆターム(参考)　4C084 AA17 AA19 AA20 MA01 MA02 MA66 NA14 ZC352 ZC712
4C085 AA13 AA14 BA11 CC22 CC23 EE01 EE03 GG02 GG04 GG06
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA27 FA71