

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年12月14日(14.12.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/238869 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/395 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *A61P 25/14* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/021039

(22) 国際出願日: 2023年6月6日(06.06.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-092342 2022年6月7日(07.06.2022) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京医科歯科大学
(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY)

TY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 岡澤 均 (OKAZAWA, Hitoshi);
〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号
国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori);
〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号
アドレスビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,

(54) Title: PREVENTATIVE AGENT OR THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS, PARKINSON'S DISEASE, HUNTINGTON'S DISEASE, SPINOCEREBELLAR ATAXIA, AGING-RELATED DEGENERATIVE OR NEUROLOGICAL DISEASE, BRAIN AGING, OR DISEASES ASSOCIATED WITH BRAIN AGING

(54) 発明の名称: 筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a preventative agent or a therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), spinocerebellar ataxia (SCA), aging-related degenerative or neurological disease, brain aging, or diseases associated with brain aging, as well as a more stable antibody that exhibits a preventative or therapeutic effect against these diseases, Alzheimer's disease (AD), or frontotemporal lobar degeneration (FTLD). A human monoclonal antibody that binds specifically to human HMGB1, wherein the human monoclonal antibody (anti-human HMGB1 antibody) includes a heavy chain CDR1, heavy chain CDR2, and heavy chain CDR3 that are composed of specific amino acid sequences and a light chain CDR1, light chain CDR2, and light chain CDR3 that are composed of specific amino acid sequences, is used as a preventative agent or a therapeutic agent for ALS, PD, HD, SCA, aging-related degenerative or neurological disease, brain aging, or diseases associated with brain aging. An antibody in which the light-chain complementarity determining region (CDR) 3 of such an anti-human HMGB1 antibody has been modified is used.

(57) 要約: 本発明は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病 (PD)、ハンチントン病 (HD)、脊髄小脳失調症 (SCA)、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤や、これら疾患、アルツハイマー病 (AD)、又は前頭側頭葉変性症 (FTLD) に対して予防若しくは治療効果を発揮する、安定性がより高い抗体を提供することを課題とする。ヒトHMGB1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体であって、特定のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3と、特定のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、軽鎖CDR2及び軽鎖CDR3とを含むヒトモノクローナル抗体 (抗ヒトHMGB1抗体) を、ALS、PD、HD、SCA、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤として用いる。かかる抗ヒトHMGB1抗体の軽鎖相補性決定領域 (CDR) 3を改変した抗体を用いる。

MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4. 17に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4. 17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5. 2(a))

明 細 書

発明の名称：

筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、筋萎縮性側索硬化症（以下、「ALS」ということがある）、パーキンソン病（以下、「PD」ということがある）、ハンチントン病（以下、「HD」ということがある）、脊髄小脳失調症（以下、「SCA」ということがある）、老化（より具体的には、細胞老化 [senescence]）に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患（以下、これらを総称して、「本件疾患等」ということがある）を予防又は治療するための製剤；抗ヒトHMGB1抗体；アルツハイマー病（以下、「AD」ということがある）又は前頭側頭葉変性症（以下、「FTLD」ということがある）を予防若しくは治療するための製剤；等に関する。

背景技術

[0002] ALSは、成人発症の神経変性疾患であり、上位（大脳皮質運動野）及び下位（脊髄前角細胞及び脳幹部運動核）の系統的な運動ニューロン障害を呈する。ALS患者の約10%は、家族性疾患（遺伝子変異）であるのに対して、残りの90%は、特発性(孤発性)疾患である。ALSの発症原因は未だ不明であり、また、ALS治療薬リルゾール（特許文献1）の効果も症状進行を数か月遅らせる程度にとどまっており、有効なALS治療法が存在しないのが現状である。

[0003] 一方、FTLDは、ADに次いで2～3番目に頻度の高い早期発症型神経変性認知症であり、運動ニューロン疾患と関連性が高いと考えられている。FTLDは、顕著な挙動及び人格変化の症状を示し、しばしば言語機能障害が付随して起こり、これが徐々に認知障害や認知症へ進行していく。家族性

F T L Dの原因遺伝子として、V C P (Valosin-Containing Protein)、P G R N (progranulin)、C H M P 2 B (Charged Multivesicular Body Protein 2B)、T D P 4 3 (Transactive Response DNA Binding Protein of 43 kD) が知られている。F T L Dの研究は進められているが、A L Sと同様、発症機構の全貌は未だ明らかになっていないのが現状である。

[0004] A L S患者の最大50%が前頭側頭機能障害を発症するのに対して、F T L D患者の15%が運動ニューロンの機能不全を発症する。このように、A L SとF T L Dは、明確に異なる病徴にもかかわらず、分子レベルで重要な重複を示す。このため、様々な遺伝的要因と環境的要因の組合せにより、A L SとF T L Dが発症し、20を超える遺伝子がこれらの疾患に関与していると考えられている。

[0005] 一方、D N Aの構造維持や転写調節に関わる非ヒストンクロマチン関連性タンパク質の一つとして、H M G B 1 (High Mobility Group Box 1) タンパク質が知られている。最近、このH M G B 1は、核内での機能のみならず、細胞の壊死により細胞外に遊離したり、血管炎症性シグナル応答により細胞外に能動的に分泌することより、いわゆるD A M P s (損傷関連分子パターン) として機能することも注目されている。本発明者らは、A Dにおいて、ニューロンのネクロシスにより細胞内から漏出したH M G B 1が、リン酸化酵素の基質であるM A R C K Sの46番目のセリン (S e r 4 6) のリン酸化を誘導し、神経突起の変性を誘導するという知見を得て、H M G B 1に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、かかるマウスモノクローナル抗体が、M A R C K SのS e r 4 6のリン酸化を阻害するという知見を得た (非特許文献1)。また、本発明者らは、かかるマウスモノクローナル抗体やヒトモノクローナル抗体が、アルツハイマー病モデルマウスにおける認識障害を回復することを報告している (特許文献2、3)。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第2713384号公報

特許文献2：国際公開第2018/030405号パンフレット

特許文献3：国際公開第2020/059847号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1：SCIENTIFIC REPORT, 2016 Aug 25;6:31895

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、ALS、PD、HD、SCA、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤や、AD又はFTLDに対して予防若しくは治療効果を発揮する、安定性がより高い抗体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を続けている。その過程において、国際公開2020/059847号パンフレット（特許文献3）の実施例で作製したヒトモノクローナル抗体#129が、FTLD-ALSスペクトラム（以下、「FTLD-ALS」ともいう）における4種類の遺伝子変異（VCP^{T262A}変異、PGRN^{R504X}変異、CHMP2B^{Q165X}変異、及びTDP43^{N267S}変異）に対して治療効果を発揮することや、神経細胞（「ニューロン」ともいう）におけるTRAD（Transcriptional Repression-Induced Atypical cell Death）ネクロシスを抑制するとともに、さらにHMGB1誘導性のDNA損傷を基盤とするTRADネクロシスの相互増幅を阻害する作用を有することを見いだした。また、HD、PD、SCA、及びALSの病態では、神経細胞のTRADネクロシス及びその背景となるDNA損傷が起きているという従来技術と、上記4種類の遺伝子変異は、FTLDのみならずALSの原因となっているという従来技術を踏まえると、上記ヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通の相補性決定領域（CDR；Complementarity Determining Region）を有するHMGB1抗体は、ALS、PD、HD、SCAを含む神経変性疾患一般に対して治療効果を

有するといえる。また、上記ヒトモノクローナル抗体#129は、2種類のADモデルマウス（5×FADマウス及びAPP-K1マウス）の脳皮質における老化細胞の数を減少させるとともに、ニューロン、アストロサイト、及びミクログリアの細胞老化を抑制することを確認した。さらに、TR1ADネクロシスが増加する細胞死そのものであることを見出したことから、ヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体は、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患や、脳老化そのもの、及び脳老化を伴う疾患を治療する作用を有するといえる。

[0010] また、ヒトモノクローナル抗体#129に加え、ヒトモノクローナル抗体#129の軽鎖CDR3の改変抗体であるヒトモノクローナル抗体#129-L2を用いて、5種類のモデルマウス（HDモデルマウス、PDモデルマウス、ALSモデルマウス、脊髄小脳失調症〔以下、「SCA」ということがある〕モデルマウス、及び老化モデルマウス）に対する治療効果を解析した結果、ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2は、HD、PD、ALS、SCA、並びに、老化に伴う細胞形質変化、細胞死、認知機能（記憶力）及び運動機能に対して、治療効果を発揮することを確認した。

[0011] さらに、ヒトモノクローナル抗体#129-L2は、ヒトモノクローナル抗体#129と同程度のヒトジスルフィド型HMGB1（ds-HMGB1）に対する結合力和F-TLD-ALSモデルマウスやADモデルマウスに対する治療効果を有することや、ヒト還元型HMGB1に対する結合力はヒトモノクローナル抗体#129と同程度若しくはそれ以上に弱いことを確認した。さらに、ヒトモノクローナル抗体#129-L2は、ヒトモノクローナル抗体#129と異なり、N-グリカン糖鎖修飾は受けないこと、及び抗体を保存したときの安定性は、むしろ、ヒトモノクローナル抗体#129よりも高いことも確認した。

[0012] 本発明は、これらの知見に基づき、完成するに至ったものである。

[0013] すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔１〕ヒトH M G B １に特異的に結合し、かつ、
配列番号１に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（C D R）１；配列番号２に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖C D R ２；及び配列番号３に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖C D R ３；と、
配列番号４に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖C D R １；配列番号５に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖C D R ２；
及び配列番号６、配列番号２０、若しくは配列番号１７に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖C D R ３；とを含む

ヒトモノクローナル抗体を含む、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤。

〔２〕ヒトモノクローナル抗体が、配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号８、配列番号２１、又は配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む、上記〔１〕に記載の予防剤又は治療剤。

〔３〕ヒトモノクローナル抗体が、配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配

列番号 10、配列番号 22、又は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む、上記〔1〕又は〔2〕に記載の予防剤又は治療剤。

〔4〕 静脈内投与される、上記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の予防剤又は治療剤。

〔5〕 ヒト HMGB1 に特異的に結合し、かつ、
配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（CDR）1；配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 2；及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 3；と、
配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 1；配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 2；及び配列番号 20 又は配列番号 17 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 3；とを含む
ヒトモノクローナル抗体。

〔6〕 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 21 又は配列番号 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む、上記〔5〕に記載のヒトモノクローナル抗体。

〔7〕 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 22 又は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む、上記〔5〕又は〔6〕に記載のヒトモノクローナル抗体。

〔8〕 上記〔5〕～〔7〕のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を含む、アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症の予防剤若しくは治療剤。

〔9〕 静脈内投与される、上記〔8〕に記載の予防剤又は治療剤。

〔10〕 上記〔5〕～〔7〕のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を含む、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失

調症、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤。

〔11〕 静脈内投与される、上記〔10〕に記載の予防剤又は治療剤。

[0014] また本発明の実施の他の形態として、

ヒトHMG B1に特異的に結合し、かつ、

配列番号1に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重(H)鎖相補性決定領域(CDR)1；配列番号2に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなるH鎖CDR2；及び配列番号3に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなるH鎖CDR3；と、

配列番号4に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽(L)鎖CDR1；配列番号5に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなるL鎖CDR2；及び配列番号6、配列番号20、若しくは配列番号17に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなるL鎖CDR3；とを含む

ヒトモノクローナル抗体（以下、「本件ヒトモノクローナル抗体」ということがある）を、本件疾患等の予防又は治療を必要とする対象に投与するステップを含む、本件疾患等を予防又は治療する方法；

本件疾患等の予防剤又は治療剤として使用するための本件ヒトモノクローナル抗体；

本件疾患等の予防又は治療における使用のための本件ヒトモノクローナル抗体；及び

本件疾患等の予防剤又は治療剤を製造するための、本件ヒトモノクローナル抗体の使用；を挙げることができる。

[0015] また本発明の実施の他の形態として、

ヒトH M G B 1 に特異的に結合し、かつ、

配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるH鎖C D R 1；配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるH鎖C D R 2；及び配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるH鎖C D R 3；と、

配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるL鎖C D R 1；配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるL鎖C D R 2；及び配列番号20又は配列番号17に示されるアミノ酸配列からなるL鎖C D R 3；とを含む

ヒトモノクローナル抗体（以下、「本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2」ということがある）を、アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等の予防若しくは治療を必要とする対象に投与するステップを含む、アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等を予防若しくは治療する方法；

アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等の予防剤若しくは治療剤として使用するための本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2；

アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等の予防若しくは治療における使用のための本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2；及び

アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等の予防剤若しくは治療剤を製造するための、本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2の使用；

を挙げることができる。

発明の効果

[0016] 本件ヒトモノクローナル抗体を用いると、顕著な副作用を伴うことなく、本件疾患等を予防又は治療することができる。また、本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2を用いると、顕著な副作用を伴うことなく、アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等を予防若しくは治療することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1] 2種類の抗ヒトHMGB1抗体（本発明のヒトモノクローナル抗体#129 [図1A]、及びマウスモノクローナル抗体2C8C [図1B]）と、ヒトHMGB1タンパク質との相互作用を、表面プラズモン共鳴法（SPR）によって解析した結果を示す図である。

[図2-1] 4種類のFTLD-ALSモデルマウス（VCP^{T262A}-KIマウス [図2-1A]、PGRN^{R504X}-KIマウス [図2-1B]、CHMP2B^{Q165X}-KIマウス [図2-1C]、及びTDP43^{N267S}-KIマウス [図2-1D]）の脳皮質におけるpSer46-MARCKSレベルを、免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。なお、C57BL/6JマウスにおけるpSer46-MARCKSレベルを同様に数値化すると、全て0（ゼロ）であった。

[図2-2] 2種類のFTLD-ALSモデルマウス（VCP^{T262A}-KIマウス [図2-2A]、及びPGRN^{R504X}-KIマウス [図2-2B]）の脳組織を、ニッスル染色法により解析した結果を示す図である。左側の画像中の矢印は液胞を示す。右側の画像は、左側の画像中の黒色矢印が示す領域の高倍率画像である。

[図3] 図3Aは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したTDP43^{N267S}-KIマウス（図中の「KI Ab」[n=12]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=8]）、対照ヒトIgGを投与したTDP43^{N267S}-KIマウス（図中の「KI IgG」[n=11]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=6]）、あるいは、未投与のTDP43^{N267S}-KIマウス（図中の「KI n. t.」[n=10]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=6]）について、10か月齢から1～5日間、モーリスの水迷路試験（Morris Water-maze test）を行った結果を示す図である。図3Bは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したPGRN^{R504X}-KIマウス（図中の「KI Ab」[n=11]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「

B6 Ab」[n=6]）、対照ヒトIgGを投与したPGRN^{R504X}-KIマウス（図中の「KI IgG」[n=7]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=7]）、あるいは、未投与のPGRN^{R504X}-KIマウス（図中の「KI n. t.」[n=11]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=7]）について、7か月齢から1～5日間、モーリスの水迷路試験を行った結果を示す図である。図3Cは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したVCP^{T262A}-KIマウス（図中の「KI Ab」[n=13]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=6]）、対照ヒトIgGを投与したVCP^{T262A}-KIマウス（図中の「KI IgG」[n=5]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=7]）、あるいは、未投与のVCP^{T262A}-KIマウス（図中の「KI n. t.」[n=7]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=6]）について、10か月齢から1～5日間、モーリスの水迷路試験を行った結果を示す図である。図3Dは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したCHMP2B^{Q165X}-KIマウス（図中の「KI Ab」[n=7]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=6]）、対照ヒトIgGを投与したCHMP2B^{Q165X}-KIマウス（図中の「KI IgG」[n=5]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=7]）、あるいは、未投与のCHMP2B^{Q165X}-KIマウス（図中の「KI n. t.」[n=5]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=6]）について、6か月齢から1～5日間、モーリスの水迷路試験を行った結果を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、「KI n. t.」が「B6 n. t.」に対して、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、及び $p < 0.001$ ）ことを示す。また、図中の「#」、「##」、及び「###」は、「KI Ab」が「KI n. t.」に対して、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、及び p

< 0.001) ことを示す。

[図4]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したTDP43^{N267S}-K1マウス(図中の「K1 Ab」[n=12(図4A~C); n=9(図4D)])又はC57BL/6Jマウス(図中の「B6 Ab」[n=8(図4A~D)])、対照ヒトIgGを投与したTDP43^{N267S}-K1マウス(図中の「K1 IgG」[n=9(図4A~C); n=6(図4D)])又はC57BL/6Jマウス(図中の「B6 IgG」[n=7(図4A~D)])、あるいは、未投与のTDP43^{N267S}-K1マウス(図中の「K1 n. t.」[n=6(図4A); n=10(図4B); n=9(図4C); n=7(図4D)])又はC57BL/6Jマウス(図中の「B6 n. t.」[n=6(図4A); n=12(図4B~D)])について、7か月齢(図4A)、8か月齢(図4B)、9か月齢(図4C)、又は10か月齢(図4D)に、Y-迷路試験(Y-maze test)を行った結果を示す図である。図中の「*」、「**」、及び「***」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある(それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、及び $p < 0.001$)ことを示す(以下、図5~図16において同じ)。

[図5]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したPGRN^{R504X}-K1マウス(図中の「K1 Ab」[n=15(図5A、B); n=14(図5C)])又はC57BL/6Jマウス(図中の「B6 Ab」[n=7(図5A~C)])、対照ヒトIgGを投与したPGRN^{R504X}-K1マウス(図中の「K1 IgG」[n=10(図5A~C)])又はC57BL/6Jマウス(図中の「B6 IgG」[n=8(図5A~C)])、あるいは、未投与のPGRN^{R504X}-K1マウス(図中の「K1 n. t.」[n=11(図5A、C); n=12(図5B)])又はC57BL/6Jマウス(図中の「B6 n. t.」[n=7(図5A); n=11(図5B、C)])について、5か月齢(図5A)、6か月齢(図5B)、又は7か月齢(図5C)に、Y-迷路試験を行った結果を示す図である。

[図6]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したVCP^{T262A}-K

Ⅰマウス（図中の「KⅠ Ab」[n=15（図6A～C）；n=12（図6D）]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=8（図6A～C）；n=5（図6D）]）、対照ヒトIgGを投与したVCP^{T26}2A-KⅠマウス（図中の「KⅠ IgG」[n=8（図6A）；n=7（図6B、C）；n=5（図6D）]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=7（図6A～C）；n=6（図6D）]）、あるいは、未投与のVCP^{T26}2A-KⅠマウス（図中の「KⅠ n. t.」[n=11（図6A～C）；n=5（図6D）]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=17（図6A）；n=16（図6B）；n=13（図6C）；n=12（図6D）]）について、7か月齢（図6A）、8か月齢（図6B）、9か月齢（図6C）、又は10か月齢（図6D）に、Y-迷路試験を行った結果を示す図である。

[図7]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したCHMP2B^{Q165}X-KⅠマウス（図中の「KⅠ Ab」[n=8（図7A～C）]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=8（図7A～C）]）、対照ヒトIgGを投与したCHMP2B^{Q165}X-KⅠマウス（図中の「KⅠ IgG」[n=8（図7A～C）]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=8（図7A～C）]）、あるいは、未投与のCHMP2B^{Q165}X-KⅠマウス（図中の「KⅠ n. t.」[n=8（図7A～C）]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=12（図7A）；n=10（図7B）；n=10（図7C）]）について、4か月齢（図7A）、5か月齢（図7B）、又は6か月齢（図7C）に、Y-迷路試験を行った結果を示す図である。

[図8]図8Aは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したTDP43^{N267S}-KⅠマウス（図中の「KⅠ Ab」[n=12]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=8]）、対照ヒトIgGを投与したTDP43^{N267S}-KⅠマウス（図中の「KⅠ IgG」[n=9]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=7]）、ある

いは、未投与のTDP43^{N267S}-K1マウス（図中の「K1 n. t.」[n=9]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=7]）について、10か月齢に、恐怖条件付け試験（Fear-conditioning test）を行った結果を示す図である。図8Bは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したPGRN^{R504X}-K1マウス（図中の「K1 Ab」[n=11]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=6]）、対照ヒトIgGを投与したPGRN^{R504X}-K1マウス（図中の「K1 IgG」[n=10]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=7]）、あるいは、未投与のPGRN^{R504X}-K1マウス（図中の「K1 n. t.」[n=17]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=11]）について、7か月齢に、恐怖条件付け試験を行った結果を示す図である。図8Cは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したVCP^{T262A}-K1マウス（図中の「K1 Ab」[n=15]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=4]）、対照ヒトIgGを投与したVCP^{T262A}-K1マウス（図中の「K1 IgG」[n=5]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=6]）、あるいは、未投与のVCP^{T262A}-K1マウス（図中の「K1 n. t.」[n=9]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=6]）について、10か月齢に、恐怖条件付け試験を行った結果を示す図である。図8Dは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与したCHMP2B^{Q165X}-K1マウス（図中の「K1 Ab」[n=7]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 Ab」[n=8]）、対照ヒトIgGを投与したCHMP2B^{Q165X}-K1マウス（図中の「K1 IgG」[n=5]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 IgG」[n=6]）、あるいは、未投与のCHMP2B^{Q165X}-K1マウス（図中の「K1 n. t.」[n=7]）又はC57BL/6Jマウス（図中の「B6 n. t.」[n=8]）について、6か月齢に、恐怖条件付け試験を行った結果を示す図である。

[図9]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス(PGRN^{R504X}-KIマウス[図9A]、TDP43^{N267S}-KIマウス[図9B]、VCP^{T262A}-KIマウス[図9C]、及びCHMP2B^{Q165X}-KIマウス[図9D]) (図中の「KI Ab」) ; 対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI IgG」) ; 未投与のかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI n. t.」) ; 又は未投与のC57BL/6Jマウス (図中の「B6 n. t.」) ; について、それぞれ、6か月齢(C57BL/6Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-KIマウス) / 7か月齢(C57BL/6Jマウス及びPGRN^{R504X}-KIマウス) / 10か月齢(C57BL/6Jマウス、TDP43^{N267S}-KIマウス、及びVCP^{T262A}-KIマウス)に、大脳皮質におけるpSer46-MARCKSレベルを免疫組織化学染色法により解析した結果(n=3)を示す図である。

[図10]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス(PGRN^{R504X}-KIマウス[図10A]、TDP43^{N267S}-KIマウス[図10B]、VCP^{T262A}-KIマウス[図10C]、及びCHMP2B^{Q165X}-KIマウス[図10D]) (図中の「KI Ab」) ; 対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI IgG」) ; 未投与のかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI n. t.」) ; 又は未投与のC57BL/6Jマウス (図中の「B6 n. t.」) ; について、それぞれ、6か月齢(C57BL/6Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-KIマウス) / 7か月齢(C57BL/6Jマウス及びPGRN^{R504X}-KIマウス) / 10か月齢(C57BL/6Jマウス、TDP43^{N267S}-KIマウス、及びVCP^{T262A}-KIマウス)に、大脳皮質におけるKDEL蛍光レベルを免疫組織化学染色法により解析した結果(n=3)を示す図である。

[図11]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス(PGRN^{R504X}-KIマウス[図11A]、TDP

43^{N267S}-K1マウス [図11B]、VCP^{T262A}-K1マウス [図11C]、及びCHMP2B^{Q165X}-K1マウス [図11D]) (図中の「K1 Ab」) ; 対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「K1 IgG」) ; 未投与のかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「K1 n. t.」) ; 又は未投与のC57BL/6Jマウス (図中の「B6 n. t.」) ; について、それぞれ、6か月齢 (C57BL/6Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-K1マウス) / 7か月齢 (C57BL/6Jマウス及びPGRN^{R504X}-K1マウス) / 10か月齢 (C57BL/6Jマウス、TDP43^{N267S}-K1マウス、及びVCP^{T262A}-K1マウス) に、大脳皮質における γ H2AX蛍光レベルを免疫組織化学染色法により解析した結果 (n=3) を示す図である。

[図12] 本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス (PGRN^{R504X}-K1マウス [図12A]、TDP43^{N267S}-K1マウス [図12B]、VCP^{T262A}-K1マウス [図12C]、及びCHMP2B^{Q165X}-K1マウス [図12D]) (図中の「K1 Ab」) ; 対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「K1 IgG」) ; 未投与のかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「K1 n. t.」) ; 又は未投与のC57BL/6Jマウス (図中の「B6 n. t.」) ; について、それぞれ、6か月齢 (C57BL/6Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-K1マウス) / 7か月齢 (C57BL/6Jマウス及びPGRN^{R504X}-K1マウス) / 10か月齢 (C57BL/6Jマウス、TDP43^{N267S}-K1マウス、及びVCP^{T262A}-K1マウス) に、大脳皮質における53BP1蛍光レベルを免疫組織化学染色法により解析した結果 (n=3) を示す図である。

[図13] 本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス (PGRN^{R504X}-K1マウス [図13A]、TDP43^{N267S}-K1マウス [図13B]、VCP^{T262A}-K1マウス [図13C]、及びCHMP2B^{Q165X}-K1マウス [図13D]) (図中の「K1 Ab

b」) ; 対照ヒト IgG を投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「Kl IgG」) ; 未投与のかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「Kl n. t.」) ; 又は未投与のC57BL/6Jマウス (図中の「B6 n. t.」) ; について、それぞれ、6か月齢 (C57BL/6Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-Klマウス) / 7か月齢 (C57BL/6Jマウス及びPGRN^{R504X}-Klマウス) / 10か月齢 (C57BL/6Jマウス、TDP43^{N267S}-Klマウス、及びVCP^{T262A}-Klマウス) に、大脳皮質におけるpSer409/410-TDP43蛍光レベルを免疫組織化学染色法により解析した結果 (n=3) を示す図である。

[図14] 本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス (PGRN^{R504X}-Klマウス [図14A]、TDP43^{N267S}-Klマウス [図14B]、VCP^{T262A}-Klマウス [図14C]、及びCHMP2B^{Q165X}-Klマウス [図14D]) (図中の「Kl Ab」) ; 対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「Kl IgG」) ; 未投与のかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「Kl n. t.」) ; 又は未投与のC57BL/6Jマウス (図中の「B6 n. t.」) ; について、それぞれ、6か月齢 (C57BL/6Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-Klマウス) / 7か月齢 (C57BL/6Jマウス及びPGRN^{R504X}-Klマウス) / 10か月齢 (C57BL/6Jマウス、TDP43^{N267S}-Klマウス、及びVCP^{T262A}-Klマウス) に、大脳皮質におけるp62蛍光レベルを免疫組織化学染色法により解析した結果 (n=3) を示す図である。

[図15] 本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス (PGRN^{R504X}-Klマウス [図15A]、TDP43^{N267S}-Klマウス [図15B]、VCP^{T262A}-Klマウス [図15C]、及びCHMP2B^{Q165X}-Klマウス [図15D]) (図中の「Kl Ab」) ; 対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス (図中の「Kl IgG」) ; 未投与のかかる4種類のFTLD-ALS

モデルマウス（図中の「K I n. t.」）；又は未投与のC57BL/6 Jマウス（図中の「B6 n. t.」）；について、それぞれ、6か月齢（C57BL/6 Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-K Iマウス）／7か月齢（C57BL/6 Jマウス及びPGRN^{R504X}-K Iマウス）／10か月齢（C57BL/6 Jマウス、TDP43^{N267S}-K Iマウス、及びVCP^{T262A}-K Iマウス）に、大脳皮質におけるVAMP2蛍光シグナルと、PSD95蛍光シグナルとが共局在する細胞の割合を、免疫組織化学染色法により解析した結果（n=3）を示す図である。

[図16]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス（PGRN^{R504X}-K Iマウス [図16A]、TDP43^{N267S}-K Iマウス [図16B]、VCP^{T262A}-K Iマウス [図16C]、及びCHMP2B^{Q165X}-K Iマウス [図16D]）（図中の「K I A b」）；対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス（図中の「K I I g G」）；未投与のかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス（図中の「K I n. t.」）；又は未投与のC57BL/6 Jマウス（図中の「B6 n. t.」）；について、それぞれ、6か月齢（C57BL/6 Jマウス及びCHMP2B^{Q165X}-K Iマウス）／7か月齢（C57BL/6 Jマウス及びPGRN^{R504X}-K Iマウス）／10か月齢（C57BL/6 Jマウス、TDP43^{N267S}-K Iマウス、及びVCP^{T262A}-K Iマウス）に、大脳皮質におけるpSer203-タウ蛍光シグナルと、PSD95蛍光シグナルとが共局在する細胞の割合を、免疫組織化学染色法により解析した結果（n=3）を示す図である。

[図17]本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種類のFTLD-ALSモデルマウス（TDP43^{N267S}-K Iマウス [図17A]、PGRN^{R504X}-K Iマウス [図17B]、VCP^{T262A}-K Iマウス [図17C]、及びCHMP2B^{Q165X}-K Iマウス [図17D]）（図中の「K I A b」）；対照ヒトIgGを投与したかかる4種類のFTLD-ALSモデルマウス（図中の「K I I g G」）；未投与のかかる4種類のFTLD-ALS

モデルマウス（図中の「K I n . t . 」）；又は未投与のC 5 7 B L / 6 J マウス（図中の「B 6 n . t . 」）；について、それぞれ、6 か月齢（C 5 7 B L / 6 J マウス及びCHMP 2 B^{Q165X}-K I マウス）／7 か月齢（C 5 7 B L / 6 J マウス及びPGRN^{R504X}-K I マウス）／10 か月齢（C 5 7 B L / 6 J マウス、TDP 4 3^{N267S}-K I マウス、及びVCP^{T262A}-K I マウス）に、大脳皮質における、AD-F T L D のコアシグナルに関与する4 種類のタンパク質のリン酸化（p S e r 3 1 9 - P K C α 、p T h r 6 5 5 - P K C γ 、p S e r 6 4 3 - P K C δ 、及びp S e r 7 2 9 - P K C ϵ ）レベル（それぞれレーン（1）～（4））；1 種類のシナプスの不安定性関連タンパク質のリン酸化（p S e r 2 0 3 - タウ）（レーン（5））と、2 種類のシナプス関連タンパク質（P S D 9 5、及びVAMP 2）の発現レベル（それぞれレーン（6）及び（7））；2 種類のDNA ダメージ関連タンパク質（ γ H 2 A X 及び5 3 B P 1）の発現レベル（それぞれレーン（8）及び（9））；1 種類の細胞死関連タンパク質のリン酸化（p S e r 4 6 - M A R C K S）レベル（レーン（10））；1 種類のDNA 修復関連タンパク質のリン酸化（p S e r 7 7 / 7 8 - K u 7 0）レベル（レーン（11））；1 種類のタンパク質凝集マーカー（p S e r 4 0 9 / 4 1 0 - TDP 4 3）レベル（レーン（12））；及び内部標準タンパク質である β -アクチンの発現レベル（レーン（13））；を、ウェスタンブロット法により解析した結果を示す図である。

[図18a-b]図18aは、4 群のマウス（本発明のヒトモノクローナル抗体# 1 2 9 を頸背部領域に皮下投与〔以下、単に「皮下投与」という〕した非トランスジェニック同胞マウス〔B 6 / S J L マウス〕；コントロール I g G を皮下投与したB 6 / S J L マウス；本発明のヒトモノクローナル抗体# 1 2 9 を皮下投与した5 × F A D マウス；及びコントロール I g G を皮下投与した5 × F A D マウス）において、大脳皮質におけるMAP 2 陽性神経細胞のDNA 二本鎖切断レベルを、2 種類のマーカー（ γ H 2 A X 及び5 3 B P 1）に対する抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図で

ある。右のグラフは、かかる抗体で検出された蛍光強度を定量した結果（ $N = 3$ マウス、 $n = 30$ 細胞）を示す。図 18b は、上記 4 群のマウスにおける大脳皮質全体を、抗 $\gamma H2AX$ 抗体及び抗 53BP1 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した結果（ $n = 3$ ）を示す図である。

[図18c-d]図 18c は、4 群のマウス（本発明のヒトモノクローナル抗体 # 129 を静脈内投与した B6 / SJL マウス；コントロール IgG を静脈内投与した B6 / SJL マウス；本発明のヒトモノクローナル抗体 # 129 を静脈内投与した 5xFAD マウス；及びコントロール IgG を静脈内投与した 5xFAD マウス）において、後頭葉皮質ニューロンにおける MAP2 陽性神経細胞の DNA 二本鎖切断レベルを、2 種類のマーカー（ $\gamma H2AX$ 及び 53BP1）に対する抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。右のグラフは、かかる抗体で検出された蛍光強度を定量した結果（ $N = 3$ マウス、 $n = 30$ 細胞）を示す。図 18d は、上記 4 群のマウスにおける大脳皮質全体を、抗 $\gamma H2AX$ 抗体及び抗 53BP1 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した結果（ $n = 3$ ）を示す図である。

[図18e]神経疾患のない患者の脳組織サンプル（後頭葉）と、AD 患者の脳組織サンプル（後頭葉）とを、抗 $\gamma H2AX$ 抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。

[図18f-g]図 18f は、 6 ng/mL (0.24 nM) の ds-HMGB1 の存在下 (+) 又は非存在下 (-) で培養した U2OS 細胞中に、EGFP-Ku70 を一過性に発現させ、微量放射線照射により誘導した DNA 損傷部位への当該 Ku70 の動的局在を、イメージング解析した結果を示す図である。図 18g は、図 18f で得られた U2OS 細胞（ $n = 5$ ）のタイムラプス画像を基に、DNA 損傷部位への EGFP-Ku70 局在レベルを定量解析した結果（ $n = 5$ 、平均値 $\pm$ S.E.M.）を示す図である。

[図19a]3 種類のマウス（C57BL/6J マウス、5xFAD マウス、及び APP-KI マウス）の神経細胞、アストロサイト、及びミクログリアを、抗 ラミン B1 抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図

である。

[図19b]本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はコントロールIgGを静脈内投与した2種類のADモデルマウス(5×FADマウス及びAPP-K1マウス)神経細胞、アストロサイト、及びミクログリアを、抗ラミンB1抗体と、3種類の細胞老化マーカー(神経細胞における「NeuN」、アストロサイトにおける「GFAP」、及びミクログリアにおける「Iba1」)に対する抗体とを用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。図中のグラフは、これら細胞老化マーカー陽性細胞の割合を測定し、老化細胞の割合を測定した結果を示す。

[図20]図20aは、8ヶ月齢のADモデルマウス(5×FADマウス)の大腦皮質を、3種類の抗体(抗YAP抗体、抗pSer46-MARKS抗体、及び抗ラミンB1抗体)を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。図20bは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はコントロールIgGを静脈内投与した2種類のADモデルマウス(5×FADマウス及びAPP-K1マウス)の大腦皮質について、抗ラミンB1抗体を用いた免疫組織化学染色法を行い、老化細胞(すなわち、ラミンB1リング陰性細胞)の割合を解析した結果を示す図である。

[図21a]図21aの上段は、8ヶ月齢の2種類の正常マウス(B6/SJLマウス又はC57BL/6マウス[B6])又は2種類のADモデルマウス(5×FADマウス及びAPP-K1マウス)について、ミクログリアにおけるNFκBの核移行レベルを、抗NFκB抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。図21aの下段は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はコントロールIgGを静脈内投与した上記2種類のADモデルマウスについて、ミクログリアにおけるNFκBの核移行レベルを、抗NFκB抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。

[図21b]図21bの上段は、8ヶ月齢の2種類の正常マウス(B6/SJLマウス又はC57BL/6マウス[B6])又は2種類のADモデルマウス(

5×FADマウス及びAPP-K1マウス)について、アストロサイトやミクログリア周辺のMCP1及びIL6の発現レベルを、抗MCP1抗体及び抗IL6抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。図21aの下段は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はコントロールIgGを静脈内投与した上記2種類のADモデルマウスについて、アストロサイトやミクログリア周辺のMCP1及びIL6の発現レベルを、抗MCP1抗体及び抗IL6抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。

[図22a]図22b～fの実験プロトコルを模式的に示した図である。

[図22b]PKC阻害剤(Go6976)を皮下投与したB6/SJLマウス又は5×FADマウス(図22aの左図)において、後頭葉皮質ニューロンにおけるMAP2陽性神経細胞のDNA二本鎖切断レベルを、2種類のマーカー(γ H2AX及び53BP1)に対する抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した結果を示す図である。右のグラフは、かかる抗体で検出された蛍光強度を定量した結果(N=3マウス、n=30細胞)を示す。

[図22c]PKC阻害剤(Go6976)を皮下投与したB6/SJLマウス又は5×FADマウス(図22aの左図)における大脳皮質全体を、8種類のタンパク質(γ H2AX、53BP1、pSer77/78-Ku70、 β -アクチン、pThr638-PKC α 、pThr641-PKC β I、pSer660-PKC β II/ δ 、及びpan-PKC)の発現レベルをウェスタンブロット法により解析した結果を示す図である。

[図22d]PKC阻害剤(Go6976)を皮下投与したB6/SJLマウス又は5×FADマウス(図22aの左図)について、Y-迷路試験を行った結果を示す図である。

[図22e]本発明のヒトモノクローナル抗体#129又は対照ヒトIgGを皮下投与したB6/SJLマウス又は5×FADマウス(図22aの中央図)について、Y-迷路試験を行った結果を示す図である。

[図22f]PKC阻害剤(Go6976)を皮下投与したB6/SJLマウス又

は5×FADマウス（図22aの左図）における大脳皮質と、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又は対照ヒトIgGを皮下投与したB6／SJLマウス又は5×FADマウス（図22aの中央図）における大脳皮質と、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又は対照ヒトIgGを静脈内投与したB6／SJLマウス又は5×FADマウス（図22aの右図）における大脳皮質について、抗pSer46-MARKS抗体及び抗アミロイド（A） β 抗体を用いた免疫組織化学染色法を行い、活性ネクロシス（Active Necrosis）（各グラフにおける左側の2組のセット）、二次ネクロシス（Secondary Necrosis）（各グラフにおける中央の2組のセット）、及び細胞死のゴースト（Ghost of Cell Death）（各グラフにおける右側の2組のセット）の割合を解析した結果を示す図である。

[図23A-B]図23Aは、ハンチントン病モデルマウス（R6／2マウス）に対する治療実験のプロトコルを模式的に示した図である。図23Bは、ロータロッド試験を用いて、ハンチントン病モデルマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果を検討した結果を示す図である。図23Bにおいて、生理食塩水投与正常マウス（図中の「Normal+saline」；図23～28において同じ）、生理食塩水投与R6／2マウス（図中の「Tg+saline」；図23～28において同じ）、及びヒトモノクローナル抗体#129投与R6／2マウス（図中の「Tg+antibody」；図23～28において同じ）の3群（以下、「ハンチントン病モデルマウス解析用3群」ということがある）の各週における3日連続試験の結果（平均値±標準誤差）を示す。カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。

[図23C-D]図23Cは、オープンフィールド試験を用いて、ハンチントン病モデルマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果を検討した結果を示す図である。図23Dは、フットプリント試験を用いて、ハンチントン病モデルマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果を検討した結果を示す図である。図23C及び図23Dにおいて、ハンチントン病モデルマウス解析用3群の代表例と測定結果を示し、グラフのボックス

プロットは、最大値、最小値、中央値、及び4分位数（75%及び25%）を示し（以下のグラフ中のボックスプロットについて、同じ）、カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。なお、図23Dにおいて、歩幅（Distance）をハンチントン病モデルマウス解析用3群で測定した。

[図24]図24Aは、ハンチントン病モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、ハンチンチン（Htt）、ユビキチン（Ub）、及びMAP2を検出する免疫組織化学染色法を行い、MAP2陽性神経細胞中のHtt及びUbが共に陽性の封入体を有する細胞の割合（%）を測定した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図24Bは、大脳皮質におけるMAP2陽性細胞数（ニューロン細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図24Cは、大脳皮質におけるIba1陽性細胞数（ミクログリア細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図24Dは、大脳皮質におけるGFAP陽性細胞数（アストロサイト細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図中の「#」、「##」、及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、及び $p<0.001$ ）ことを示す。

[図25A]ハンチントン病モデルマウス解析用3群において、その線条体に対して、Htt、Ub、及びMAP2を検出する免疫組織化学染色法を行い、MAP2陽性神経細胞中のHtt及びUbが共に陽性の封入体を有する細胞の割合（%）を測定した結果（ $n=4$ ）を示す図である。

[図25B-D]図25Bは、線条体におけるMAP2陽性細胞数（ニューロン細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図25Cは、線条体におけるIba1陽性細胞数（ミクログリア細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図25Dは、線条体におけるGFAP陽性細胞数（アストロサイト細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3

群間で比較した結果（ $n = 4$ ）を示す図である。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ ）ことを示す。

[図26]図26Aは、ハンチントン病モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、YAP及びpSer46-MARCKSを検出する免疫組織化学染色法を行い、TR1AD細胞死の特徴（核YAPの消失かつpSer46-MARCKS陽性）を示す細胞の割合（%）を測定した結果（ $n = 4$ ）を示す図である。図26Bは、大脳皮質の異常なKDEL染色像を示すMAP2陽性神経細胞数（ニューロン細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n = 4$ ）を示す図である。図26Cは、大脳皮質における53BP1陽性及び γ H2AX陽性でかつ、MAP2陽性の神経細胞（ニューロン細胞）について、53BP1由来のシグナル強度（左図）と、 γ H2AX由来のシグナル強度（右図）とを、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果を示す図である。図中の「#」、「##」、及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、及び $p < 0.001$ ）ことを示す。

[図27]図27Aは、ハンチントン病モデルマウス解析用3群において、その線条体に対して、YAP及びpSer46-MARCKSを検出する免疫組織化学染色法を行い、TR1AD細胞死の特徴（核YAPの消失かつpSer46-MARCKS陽性）を示す細胞の割合（%）を測定した結果（ $n = 4$ ）を示す図である。図27Bは、線条体の異常なKDEL染色像を示すMAP2陽性神経細胞数（ニューロン細胞数）を、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n = 4$ ）を示す図である。図27Cは、線条体における53BP1陽性及び γ H2AX陽性でかつ、MAP2陽性の神経細胞（ニューロン細胞）について、53BP1由来のシグナル強度（左図）と、 γ H2AX由来のシグナル強度（右図）とを、ハンチントン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果を示す図である。図中の「##」及び「

###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ ）ことを示す。

[図28]ハンチントン病モデルマウス解析用3群において、基底核を含む全大脳をサンプルとして、pSer46-MARCKS、53BP1、pSer139- γ H2AX、pSer319-PKCa、pSer203-Tau、Ub、及びコントロールの β -アクチンを検出するウェスタンブロットを行った結果を示す図である。ラダー又はスメアとなるUbを除くマーカ分子のバンドについては、定量と統計的比較を行った。

[図29A-B]図29Aは、パーキンソン病モデルマウス（ α -synuclein A53Tマウス）に対する治療実験のプロトコルを模式的に示した図である。図29Bは、ロータロッド試験を用いて、 α -synuclein A53Tマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果を検討した結果を示す図である。図29Bにおいて、生理食塩水投与正常マウス（図中の「Normal+saline」；図29～32において同じ）、生理食塩水投与 α -synuclein A53Tマウス（図中の「Tg+saline」；図29～32において同じ）、及びヒトモノクローナル抗体#129投与 α -synuclein A53Tマウス（図中の「Tg+antibody」；図29～32において同じ）の3群（以下、「パーキンソン病モデルマウス解析用3群」ということがある）の各週における3日連続試験の結果（平均値 $\pm$ 標準誤差）を示す。カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。

[図29C-D]図29Cは、オープンフィールド試験を用いて、 α -synuclein A53Tマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果を検討した結果を示す図である。図29Dは、フットプリント試験を用いて、 α -synuclein A53Tマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果を検討した結果を示す図である。図29C及び図29Dにおいて、パーキンソン病モデルマウス解析用3群の代表例と測定結果を示し、カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。なお、図29Dにおいて、歩幅（Distance）をパーキンソン病モデルマウス解析用3群で測定した。

[図30]図30Aは、パーキンソン病モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、pSer129-Syn (Ser129リン酸化 synuclein)、Ub、及びMAP2を検出する免疫組織化学染色法を行い、MAP2陽性神経細胞中のpSer129-Syn及びUbが共に陽性の封入体を有する細胞の割合(%)を測定した結果(n=4)を示す図である。図30Bは、大脳皮質におけるMAP2陽性細胞数(ニューロン細胞数)を、パーキンソン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果(n=4)を示す図である。図30Cは、大脳皮質におけるIba1陽性細胞数(ミクログリア細胞数)を、パーキンソン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果(n=4)を示す図である。図30Dは、大脳皮質におけるGFAP陽性細胞数(アストロサイト細胞数)を、パーキンソン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果(n=4)を示す図である。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある(それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$) ことを示す。

[図31]図31Aは、パーキンソン病モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、YAP及びpSer46-MARKSを検出する免疫組織化学染色法を行い、TRIAD細胞死の特徴(核YAPの消失かつpSer46-MARKS陽性)を示す細胞の割合(%)を測定した結果(n=4)を示す図である。図31Bは、大脳皮質の異常なKDEL染色像を示すMAP2陽性神経細胞数(ニューロン細胞数)を、パーキンソン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果(n=4)を示す図である。図31Cは、大脳皮質における53BP1陽性及び γ H2AX陽性でかつ、MAP2陽性の神経細胞(ニューロン細胞)について、53BP1由来のシグナル強度(左図)と、 γ H2AX由来のシグナル強度(右図)とを、パーキンソン病モデルマウス解析用3群間で比較した結果を示す図である。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある(それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$) ことを示す。

[図32]パーキンソン病モデルマウス解析用3群において、基底核を含む全大

脳をサンプルとして、pSer46-MARCKS、53BP1、pSer139- γ H2AX、pSer319-PKCa、pSer203-Tau、Ub、及びコントロールの β -アクチンを検出するウェスタンブロットを行った結果を示す図である。ラダー又はスミアとなるUbを除くマーカ一分子のバンドについては、定量と統計的比較を行った。

[図33A-B]図33Aは、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス（SOD1-Tgマウス）に対する治療実験のプロトコルを模式的に示した図である。図33Bは、ロータロッド試験を用いて、SOD1-Tgマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129-L2の治療効果を検討した結果を示す図である。図33Bにおいて、生理食塩水投与正常マウス（図中の「Normal+saline」；図33～37において同じ）、生理食塩水投与SOD1-Tgマウス（図中の「Tg+saline」；図33～37において同じ）、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2投与SOD1-Tgマウス（図中の「Tg+antibody」；図33～37において同じ）の3群（以下、「筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群」ということがある）の各週における3日連続試験の結果（平均値 $\pm$ 標準誤差）を示す。カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。

[図33C-D]図33Cは、オープンフィールド試験を用いて、SOD1-Tgマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129-L2の治療効果を検討した結果を示す図である。図33Dは、フットプリント試験を用いて、SOD1-Tgマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129-L2の治療効果を検討した結果を示す図である。図33C及び図33Dにおいて、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群の代表例と測定結果を示し、カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。なお、図33Dにおいて、歩幅（Distance）を筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群で測定した。

[図34]図34Aは、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、SOD1、Ub、及びMAP2を検出する免疫組織化学染色法を行い、MAP2陽性神経細胞中のSOD1及びUbが共に陽性を示す細胞の割合（%）を測定した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図34

Bは、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、pSer386-Tau、Ub、及びMAP2を検出する免疫組織化学染色法を行い、MAP2陽性神経細胞中のpSer386-Tau及びUbが共に陽性を示す細胞の割合(%)を測定した結果(n=4)を示す図である。図34Cは、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、TDP43、Ub、及びMAP2を検出する免疫組織化学染色法を行い、MAP2陽性神経細胞中のTDP43及びUbが共に陽性を示す細胞の割合(%)を測定した結果(n=4)を示す図である。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある(それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$)ことを示す。

[図35]図35Aは、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群において、その腰髄に対して、YAP及びpSer46-MARCKSを検出する免疫組織化学染色法を行い、TRIAD細胞死の特徴(核YAPの消失かつpSer46-MARCKS陽性)を示す細胞の割合(%)を測定した結果(n=4)を示す図である。図35Bは、腰髄前角におけるMAP2陽性細胞数(ニューロン細胞数)を、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群間で比較した結果(n=4)を示す図である。図35Cは、腰髄前角におけるIba1陽性細胞数(ミクログリア細胞数)を、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群間で比較した結果(n=4)を示す図である。図35Dは、腰髄前角におけるGFAP陽性細胞数(アストロサイト細胞数)を、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群間で比較した結果(n=4)を示す図である。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある(それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$)ことを示す。

[図36]大脳皮質における53BP1陽性及び γ H2AX陽性でかつ、MAP2陽性の神経細胞(ニューロン細胞)について、53BP1由来のシグナル強度(左図)と、 γ H2AX由来のシグナル強度(右図)とを、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群間で比較した結果を示す図である。図中の

「###」は、Tukey' s HSD testにより統計学的に有意差がある ($p < 0.001$) を示す。

[図37]筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群において、基底核を含む全大脳をサンプルとして、pSer46-MARCKS、53BP1、pSer139- γ H2AX、pSer319-PKCa、pSer396-Taub、Ub、及びコントロールの β -アクチンを検出するウェスタンブロットを行った結果を示す図である。ラダー又はスメアとなるUbを除くマーカー分子のバンドについては、定量と統計的比較を行った。

[図38]図38Aは、脊髄小脳失調症モデルマウス（変異ataxin-1ノックインマウス）に対する治療実験のプロトコルを模式的に示した図である。図38Bは、ロータロッド試験を用いて、変異ataxin-1ノックインマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果の検討した結果を示す図である。生理食塩水投与正常マウス（図中の「Normal+saline」；図38～41において同じ）、生理食塩水投与変異ataxin-1ノックインマウス（図中の「KI+saline」；図38～41において同じ）、及びヒトモノクローナル抗体#129投与変異ataxin-1ノックインマウス（図中の「KI+antibody」；図38～41において同じ）の3群（以下、「脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群」ということがある）の各週における3日連続試験の結果（平均値±標準誤差）を示す。カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。図38Cは、フットプリント試験を用いて、変異ataxin-1ノックインマウスに対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果を検討した結果を示す図である。脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群の代表例と測定結果を示し、カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。歩幅（Distance）を脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群で測定した。

[図39]図39Aは、脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群において、その小脳皮質に対して、YAP、pSer46-MARCKS、及びDAPIによる免疫組織化学を行い、小脳皮質顆粒細胞層のpSer46-MARCKS染色のシグナルを定量し比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図39

Bは、脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群において、その大脳皮質に対して、 $Atxn-1$ ($Atxn1$)、Ub、及びMAP2を検出する免疫組織化学染色法を行い、MAP2陽性神経細胞中の $Atxn1$ 及びUbが共に陽性を示す細胞の割合(%)を測定した結果($n=4$)を示す図である。図39Cは、プルキンエ細胞における53BP1由来のシグナル強度(左図)と、 $\gamma H2AX$ 由来のシグナル強度(右図)を、脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群間で比較した結果を示す図である。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある(それぞれ、 $p<0.01$ 及び $p<0.001$)ことを示す。

[図40]図40Aは、異常なKDEL染色像を示すCalbindin陽性プルキンエ細胞数を、脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群間で比較した結果($n=4$)を示す図である。図40Bは、小脳皮質におけるプルキンエ細胞数(ニューロン細胞数)を、脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群間で比較した結果($n=4$)を示す図である。図40Cは、小脳皮質におけるIba1陽性細胞数(ミクログリア細胞数)を、脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群間で比較した結果($n=4$)を示す。図40Dは、小脳皮質におけるGFAP陽性細胞数(アストロサイト細胞数)を、脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群間で比較した結果($n=4$)を示す。

[図41]脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群において、基底核を含む全大脳をサンプルとして、pSer46-MARCKS、53BP1、pSer139- $\gamma H2AX$ 、pSer319-PKCa、pSer203-Tau、Ub、及びコントロールの β -アクチンを検出するウェスタンブロットを行った結果を示す図である。ラダー又はスメアとなるUbを除くマーカー分子のバンドについては、定量と統計的比較を行った。

[図42]図42Aは、老化モデルマウス(12ヶ月齢C57BL/6マウス)に対する治療実験のプロトコルを模式的に示した図である。図42Bは、Y-迷路試験を用いて、老化モデルマウスの認知機能低下に対するヒトモノクローナル抗体#129-L2の治療効果を検討した結果を示す図である。上

段は、生理食塩水投与12ヶ月齢C57BL/6マウス（図中の「Aged+saline」）、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2投与12ヶ月齢C57BL/6マウス（図中の「Aged+antibody」）の2群の各月齢におけるY-迷路試験の結果を示す図である。下段は、上段で得られた結果をまとめたものである。カッコ内の数値は、測定に用いた匹数を示す。

[図43]若齢マウス（3ヶ月齢C57BL/6マウス）（図中の「Young」；図43～45において同じ）、生理食塩水投与20ヶ月齢C57BL/6マウス（図中の「Aged+saline」；図43～45において同じ）、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2投与20ヶ月齢C57BL/6マウス（図中の「Aged+antibody」；図43～45において同じ）の3群（以下、「20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群」ということがある）において、その大脳皮質に対して、YAP、pSer46-MARCKS、及びLaminB1を検出する免疫組織化学染色法を行い、図43Aは、細胞質pSer46-MARCKが陽性でかつ、核YAP消失と判定されたTRIADネクロシス細胞の割合（%）を測定した結果（ $n=4$ ）を示す図であり、図43Bは、LaminB1の核リングが消失した老化細胞の割合（%）を測定した結果（ $n=4$ ）を示す図であり、図43Cは、TRIADネクロシスと老化の両方の特徴を有する細胞の割合（%）を測定した結果（ $n=4$ ）を示す図である。

[図44]図44Aは、大脳皮質における53BP1陽性及び γ H2AX陽性でかつ、MAP2陽性の神経細胞（ニューロン細胞）について、53BP1由来のシグナル強度（左図）と、 γ H2AX由来のシグナル強度（右図）とを、20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図44Bは、大脳皮質におけるMAP2陽性細胞数（ニューロン細胞数）を、20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図44Cは、大脳皮質におけるIba1陽性細胞数（ミクログリア細胞数）を、20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図44Dは、大脳皮質におけるGF

A P陽性細胞数（アストロサイト細胞数）を、20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群間で比較した結果（ $n=4$ ）を示す図である。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p<0.01$ 及び $p<0.001$ ）ことを示す。

[図45] 20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群において、基底核を含む全大脳をサンプルとして、pSer46-MARCKS、53BP1、pSer139- γ H2AX、pSer319-PKCa、pSer396-Tau、Ub、及びコントロールの β -アクチンを検出するウェスタンブロットを行った結果を示す図である。ラダー又はスメアとなるUbを除くマーカ分分子のバンドについては、定量と統計的比較を行った。

[図46] 図46A及びBは、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体#129-L2 [図46A] 及びヒトモノクローナル抗体#129 [図46B]）と、ヒトdsHMGB1との相互作用を、SPRによって解析した結果を示す図である。図46C及びDは、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体#129-L2 [図46C] 及びヒトモノクローナル抗体#129 [図46D]）と、ヒト還元型HMGB1との相互作用を、SPRによって解析した結果を示す図である。

[図47] 図47A及びBは、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体#129-L2 [図47A] 及びヒトモノクローナル抗体#129 [図47B]）と、ヒトdsHMGB1との相互作用を、ELISA法によって解析した結果を示す図である。図47C及びDは、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体#129-L2 [図47C] 及びヒトモノクローナル抗体#129 [図47D]）と、ヒト還元型HMGB1との相互作用を、ELISA法によって解析した結果を示す図である。

[図48] 上記2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体を投与した3種類のFTLD-ALSモデルマウス（TDP43^{N267S}-KIマウス [図48A]、PGRN^{R504X}-KIマウス [図48B]、又はVCP^{T262A}-KIマウス [図

48C]) について、6 か月齢、7 か月齢、又は8 か月齢に、Y-迷路試験を行った結果を示す図である。各グラフの左から順に、正常マウス (normal saline)、生理食塩水を投与した各種FTLD-ALSモデルマウス (KI_saline)、ヒトモノクローナル抗体#129-L2を投与した各種FTLD-ALSモデルマウス (KI_129-L2)、及びヒトモノクローナル抗体#129を投与した各種FTLD-ALSモデルマウス (KI_129) の結果を示す。

[図49]上記2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体を投与した3種類のFTLD-ALSモデルマウス (PGRN^{R504X}-KIマウス [図49A]、TDP43^{N267S}-KIマウス [図49B]、又はVCP^{T262A}-KIマウス [図49C]) において、その大脳皮質に対して、YAP及びpSer46-MARCKSを検出する免疫組織化学染色法を行い、TR1AD細胞死の特徴 (核YAPの消失かつpSer46-MARCKS陽性) を示す細胞の割合 (%) を測定した結果 (n=3) を示す図である。各グラフは、左から順に、正常マウス (図中の「B6-nT」)、生理食塩水を投与した各種FTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI-nT」)、対照ヒトIgGを投与した各種FTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI-IgG」)、ヒトモノクローナル抗体#129を投与した各種FTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI-129」)、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2を投与した各種FTLD-ALSモデルマウス (図中の「KI-129L2」) の結果を示す。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある (それぞれ、 $p<0.01$ 及び $p<0.001$) ことを示す。

[図50]大脳皮質の異常なKDEL染色像を示すMAP2陽性神経細胞数 (ニューロン細胞数) を、上記2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体を投与した3種類のFTLD-ALSモデルマウス (PGRN^{R504X}-KIマウス [図50A]、TDP43^{N267S}-KIマウス [図50B]、又はVCP^{T262A}-KIマウス [図50C]) の間で比較した結果 (n=3) を示す図である。各グラフは、左から順に、正常マウス (図中の「B6-nT」)、生理食塩

水を投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - n T」）、対照ヒト I g Gを投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - I g G」）、ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9を投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - 1 2 9」）、及びヒトモノクローナル抗体# 1 2 9 - L 2を投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - 1 2 9 L 2」）の結果を示す。図中の「###」は、Tukey' s HSD testにより統計学的に有意差がある（ $p < 0.001$ ）ことを示す。

[図51]大脳皮質における γ H 2 A X陽性でかつ、M A P 2陽性の神経細胞数（ニューロン細胞数）について、 γ H 2 A X由来のシグナル強度を、上記2種類の本発明の抗ヒトH M G B 1抗体を投与した3種類のF T L D - A L Sモデルマウス（P G R N^{R504X}-K Iマウス [図51A]、T D P 4 3^{N267S}-K Iマウス [図51B]、又はV C P^{T262A}-K Iマウス [図51C]）の間で比較した結果（ $n = 3$ ）を示す図である。各グラフは、左から順に、正常マウス（図中の「B 6 - n T」）、生理食塩水を投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - n T」）、対照ヒト I g Gを投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - I g G」）、ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9を投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - 1 2 9」）、及びヒトモノクローナル抗体# 1 2 9 - L 2を投与した各種F T L D - A L Sモデルマウス（図中の「K I - 1 2 9 L 2」）の結果を示す。図中の「##」及び「###」は、Tukey' s HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ ）ことを示す。

[図52]大脳皮質における5 3 B P 1陽性でかつ、M A P 2陽性の神経細胞数（ニューロン細胞数）について、5 3 B P 1由来のシグナル強度を、上記2種類の本発明の抗ヒトH M G B 1抗体を投与した3種類のF T L D - A L Sモデルマウス（P G R N^{R504X}-K Iマウス [図52A]、T D P 4 3^{N267S}-K Iマウス [図52B]、又はV C P^{T262A}-K Iマウス [図52C]）の間で比較した結果（ $n = 3$ ）を示す図である。各グラフは、左から順に、正

常マウス（図中の「B6-nT」）、生理食塩水を投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-nT」）、対照ヒトIgGを投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-IgG」）、ヒトモノクローナル抗体#129を投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-129」）、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2を投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-129L2」）の結果を示す。図中の「##」及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ ）ことを示す。

[図53]上記2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体を投与した3種類のFTLD-AISモデルマウス（PGRN^{R504X}-KIマウス [図53A]、TDP43^{N267S}-KIマウス [図53B]、又はVCP^{T262A}-KIマウス [図53C]）において、その大脳皮質に対して、pSer409/410-TDP43及びUbを検出する免疫組織化学染色法を行い、pSer409/410-TDP43及びUbが共に陽性の封入体を有する細胞の割合（%）を測定した結果（ $n = 3$ ）を示す図である。各グラフは、左から順に、正常マウス（図中の「B6-nT」）、生理食塩水を投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-nT」）、対照ヒトIgGを投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-IgG」）、ヒトモノクローナル抗体#129を投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-129」）、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2を投与した各種FTLD-AISモデルマウス（図中の「KI-129L2」）の結果を示す。図中の「#」、「##」、及び「###」は、Tukey's HSD testにより統計学的に有意差がある（それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、及び $p < 0.001$ ）ことを示す。

[図54]ヒトモノクローナル抗体#129を安定に発現するCHO（Chinese Hamster Ovary）細胞株からヒトモノクローナル抗体#129を精製し、非還元キャピラリー電気泳動法で解析した結果を示す図である。

[図55]ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 2を安定に発現するCHO細胞株からヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 2を精製し、非還元キャピラリー電気泳動法で解析した結果を示す図である。

[図56]ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9を安定に発現するCHO細胞株2クローンから精製したヒトモノクローナル抗体# 1 2 9（図中の「# 1 2 9」）、ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 1を安定に発現するCHO細胞株1クローンから精製したヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 1（図中の「# 1 2 9 L 1」）、及びヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 2を安定に発現するCHO細胞株1クローンから精製したヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 2を、それぞれSDS-PAGEした結果を示す図である。図中の「HC」が抗体重鎖由来のバンドを示し、「LC」が抗体軽鎖由来のバンドを示す。

[図57]2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 2 [図57A及びB] 及びヒトモノクローナル抗体# 1 2 9 [図57C及びD]）を、4℃で6か月保存する前（左図）、又は4℃で6か月保存した後（右図）、ヒトdsHMGB1との相互作用を、SPRによって解析した結果を示す図である。

[図58]図58Aは、ADモデルマウス（5×FADマウス）に対する治療実験のプロトコルを模式的に示した図である。図58Bは、ADモデルマウスにおける大脳皮質のシナプス数を測定し、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 2又はヒトモノクローナル抗体# 1 2 9）の治療効果を検討した結果を示す図である。図58Cは、Y-迷路試験を用いて、ADモデルマウスの認知機能低下に対する上記2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体の治療効果を検討した結果を示す図である。図58B及びCのグラフは、左から順に、対照ヒトIgGを投与した正常マウス（図中の「ctrl B6/SJL」）、ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9-L 2を投与した正常マウス（図中の「1 2 9 L 2 B6/SJL」）、ヒトモノクローナル抗体# 1 2 9を投与した正常マウス（図中の「1 2 9 B

6 / S J L」)、対照ヒト I g G を投与した A D モデルマウス (図中の「c t r l 5 × F A D」)、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 を投与した A D モデルマウス (図中の「1 2 9 L 2 5 × F A D」)、及びヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 を投与した A D モデルマウス (図中の「1 2 9 5 × F A D」) の結果を示す。

[図59] 2 種類の本発明の抗ヒト H M G B 1 抗体 (ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 又はヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9) を投与した A D モデルマウス (5 × F A D マウス) において、その大脳皮質に対して、抗 p S e r 4 6 - M A R C K S 抗体及び抗 A β 抗体を用いた免疫組織化学染色法を行い、一次性 T R I A D ネクロシス、二次性 T R I A D ネクロシス、及び A β 細胞外沈着 (アミロイド斑) の割合を解析した結果を示す図である。グラフの「-」は対照ヒト I g G を投与した結果を示し、「+」はヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 (図中の「1 2 9 L 2」) 又はヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 (図中の「1 2 9」) を投与した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0018] <本発明の予防剤又は治療剤>

本発明の予防剤又は治療剤の 1 つ目の態様は、「筋萎縮性側索硬化症 ; パーキンソン病 ; ハンチントン病 ; 老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患 ; 脳老化 ; 及び脳老化を伴う疾患 ; の 1 若しくは 2 以上を予防又は治療するため」という用途に特定された、本件ヒトモノクローナル抗体を含有する剤 (以下、「本件予防剤 / 治療剤 1」ということがある) である。また、本発明の予防剤又は治療剤の 2 つ目の態様は、「アルツハイマー病 ; 前頭側頭葉変性症 ; 筋萎縮性側索硬化症 ; パーキンソン病 ; ハンチントン病 ; 老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患 ; 脳老化 ; 及び脳老化を伴う疾患 ; の 1 又は 2 以上を予防若しくは治療するため」という用途に特定された、本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 を含有する剤 (以下、「本件予防剤 / 治療剤 2」ということがある) である (以下、「本件予防剤 / 治療剤 1」及び「本件予防剤 / 治療剤 2」を総称して、「本件予防剤 / 治療剤」ということがあ

る)。本件予防剤／治療剤は、単独で医薬品（製剤）として使用してもよいし、さらに添加剤を混合し、組成物の形態（医薬組成物）として使用してもよい。なお、「脳老化の治療」は「脳老化の改善」ともいう。

[0019] <本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 >

本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 は、ヒト HMGB 1 に特異的に結合し、かつ、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる H 鎖 C D R 1 ; 配列番号 2 のアミノ酸配列からなる H 鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 3 のアミノ酸配列からなる H 鎖 C D R 3 ; と、配列番号 4 のアミノ酸配列からなる L 鎖 C D R 1 ; 配列番号 5 のアミノ酸配列からなる L 鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 2 0 又は配列番号 1 7 のアミノ酸配列からなる L 鎖 C D R 3 ; とを含むヒトモノクローナル抗体であり、本件ヒトモノクローナル抗体に包含される。

[0020] 本明細書において、「筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防」には、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の罹患や発症の抑制のみならず、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の罹患時期や発症時期の遅れも含まれる。また、「筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の治療（改善）」には、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の病変や症状の回復、改善のみならず、その進行の抑制も含まれる。

[0021] 本件予防剤／治療剤 1 に含まれる本件ヒトモノクローナル抗体や、本件予防剤／治療剤 2 に含まれる本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 は、後述する本実施例で実証されているとおり、ヒト HMGB 1 タンパク質に対して高い親和性を有し、かつ、MARCKS における 4 6 番目のセリン（S e r 4 6）のリン酸化（p S e r 4 6 - M A R C K S）レベルを低下・抑制する

作用；神経細胞におけるDNA損傷の修復機能の回復作用；TR I A D ネクローシス又はその増幅（「伝播」ともいう）の阻害作用；大脳皮質ニューロンにおけるタンパク質（例えば、T D P 4 3）凝集体を減少する作用；を有するものである。このため、本件予防剤／治療剤1の予防又は治療対象である本件疾患等や、本件予防剤／治療剤2の予防又は治療対象であるアルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等としては、H M G B 1 及び／若しくは p S e r 4 6 - M A R C K S ；神経細胞におけるDNA損傷の修復機能の低下；TR I A D ネクローシス若しくはその増幅；並びに大脳皮質ニューロンにおけるタンパク質（例えば、T D P 4 3）凝集体；から選択される1又は2以上に起因するものを好適に例示することができる。

[0022] 上記「老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患」としては、例えば、レビー小体型認知症、進行性核上性麻痺、大脳基底核変性症、線条体黒質変性症、神経核内封入体病、多系統変性症等を挙げることができる。また、上記「脳老化」とは、加齢に伴う脳神経の減少、神経細胞死の増加、及び／又は認知機能の低下を意味する。また、上記「脳老化を伴う疾患」としては、例えば、多発性硬化症、ウィルス性脳炎、急性脱髄性脳脊髄炎、視神経脊髄炎等を挙げることができる。

[0023] 本明細書において、「TR I A D（ネクローシス）」とは、転写の基本的分子であるRNAポリメラーゼIIの特異的阻害によって、神経細胞に生じる緩慢なネクローシス様細胞死のことを意味し、Y A P（Yes-associated protein）の機能低下が原因となって生じる（文献「J Cell Biol（2006）172（4）：589-604.」）。TR I A Dは、アポトーシスの形態学的・生化学的特徴を有さず、また、オートファジー細胞死とは異なりオートファゴソームの拡大・増加はなく、小胞体が膨張する形態学的特徴を有する。

[0024] 本件予防剤／治療剤の対象疾患としては、遺伝性疾患（例えば、V C P ^{T262A}変異等のV C P [Valosin-Containing Protein] 変異；P G R N ^{R504X}変異等のP G R N [progranulin] 変異；C H M P 2 B ^{Q165X}変異等のC H M P 2 B [Charged Multivesicular Body Protein 2B] 変異；T D P 4 3 ^{N267S}変

異等の TDP43 [Transactive Response DNA Binding Protein of 43 kD] 変異；などの遺伝子変異に起因する疾患）であっても、孤発性疾患であってもよい。

[0025] 本件ヒトモノクローナル抗体としては、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる H 鎖可変領域と、配列番号 8、配列番号 21、又は配列番号 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる L 鎖可変領域とを含むヒトモノクローナル抗体が好ましく、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 10、配列番号 22、又は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むヒトモノクローナル抗体がより好ましい。また、本件ヒトモノクローナル抗体 L1 / L2 としては、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 21 又は配列番号 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むヒトモノクローナル抗体が好ましく、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 22 又は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むヒトモノクローナル抗体がより好ましい。

[0026] 本明細書において、「HMG B1 (High Mobility Group Box 1)」は、HMG1、HMG3、SBP-1、HMG-1 とも称されるタンパク質である。ヒト由来のものとして、典型的には、NCBI レファレンスシーケンス：NP_002119.1 で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質（NCBI レファレンスシーケンス：NM_002128.5 で特定されるヌクレオチド配列がコードするタンパク質）である。しかしながら、遺伝子の DNA 配列は、その変異等により、自然界において（すなわち、非人工的

に) 変異し、それにコードされるタンパク質のアミノ酸配列もそれに伴い改変される。したがって、本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2 が結合するHMGB 1 には、NCBIレファレンスシーケンス: NP_002119. 1 で特定されるアミノ酸配列からなるタンパク質の他、天然に存在する、かかるタンパク質の変異体も包含される。

[0027] 本明細書において、「ヒトHMGB 1 に特異的に結合する抗体」とは、抗原-抗体間の特異性の高い認識機構によって、ヒトHMGB 1 を認識し結合する抗体を意味する。本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2 は、分離されているものが好ましい。ここで「分離されている」とは、人為的操作によって、抗体を、本来存在する環境から取り出したり、抗体が本来存在する環境とは別の環境下で発現させる等して、抗体が本来存在している状態とは異なった状態で存在していることを意味する。すなわち、「分離されている抗体」には、ある個体由来の抗体であって、かつ外的操作（人為的操作）が施されずに、当該個体の体内中又は体内由来の組織若しくは体液（血液、血漿、血清等）中に含まれる状態の抗体は含まれない。また、本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2 は、人為的操作によって作製した生物又は細胞から産生される抗体（例えば、ハイブリドーマから産生される抗体）が好ましい。かかる「人為的操作によって作製した生物又は細胞から産生される抗体」には、（人為的操作の施されていない）天然に存在する生物又はB細胞から産生される抗体は含まれない。

[0028] 本明細書において、「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体（抗体の機能的断片を含む）を意味する。モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2 には、ヒトの免疫グロブリンのクラス、サブクラスが含まれ、また、かかる抗体の機能的断片の形態も含まれる。本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体L 1 / L 2 のクラス、サブクラスには、IgG 1、IgG 2、IgG 3、

I g G 4 等の I g G ; I G A 1、I G A 2 等の I g A ; I g D ; I g E ; I g M ; などが含まれる。

[0029] 本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 は、典型的には、重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2、及び重鎖 C D R 3 と、軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2、及び軽鎖 C D R 3 とを含み、かつ、これらの C D R 1 ~ 3 の各領域のアミノ (N) 末端及びカルボキシル (C) 末端には、フレームワーク領域 (F R) が連結されており、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含むものである。

[0030] 上記 F R のうち重鎖 F R としては、重鎖 C D R 1 の N 末端に連結されている重鎖 F R 1 ; 重鎖 C D R 1 の C 末端と重鎖 C D R 2 の N 末端の間に連結されている重鎖 F R 2 ; 重鎖 C D R 2 の C 末端と重鎖 C D R 3 の N 末端の間に連結されている重鎖 F R 3 ; 及び、重鎖 C D R 3 の C 末端に連結されている重鎖 F R 4 ; を挙げることができる。また、上記 F R のうち軽鎖 F R としては、軽鎖 C D R 1 の N 末端に連結されている軽鎖 F R 1 ; 軽鎖 C D R 1 の C 末端と軽鎖 C D R 2 の N 末端の間に連結されている軽鎖 F R 2 ; 軽鎖 C D R 2 の C 末端と軽鎖 C D R 3 の N 末端の間に連結されている軽鎖 F R 3 ; 及び、軽鎖 C D R 3 の C 末端に連結されている軽鎖 F R 4 ; を挙げることができる。

[0031] 上記重鎖 F R 1 としては、具体的には、(H F 1) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列の 1 ~ 3 0 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は (H F 1 ') にかかるポリペプチドと少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記重鎖 F R 2 としては、具体的には、(H F 2) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列の 3 6 ~ 4 9 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は (H F 2 ') にかかるポリペプチドと少なくとも 8 0 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができ、
上記重鎖 F R 3 としては、具体的には、(H F 3) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列の 6 7 ~ 9 8 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、配列番

号 11 で示されるアミノ酸配列の 67～98 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は（HF3'）かかるポリペプチドと少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる、

上記重鎖 FR4 としては、具体的には、（HF4）配列番号 7 で示されるアミノ酸配列の 105～115 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は（HF4'）かかるポリペプチドと少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

[0032] 上記軽鎖 FR1 としては、具体的には、（LF1）配列番号 8 で示されるアミノ酸配列の 1～23 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は（LF1'）かかるポリペプチドと少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる、

上記軽鎖 FR2 としては、具体的には、（LF2）配列番号 8 で示されるアミノ酸配列の 35～49 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は（LF2'）かかるポリペプチドと少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる、

上記軽鎖 FR3 としては、具体的には、（LF3）配列番号 8 で示されるアミノ酸配列の 57～88 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は（LF3'）かかるポリペプチドと少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる、

上記軽鎖 FR4 としては、具体的には、（LF4）配列番号 8 で示されるアミノ酸配列の 98～107 番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は（LF4'）かかるポリペプチドと少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

[0033] 本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L1/L2 は、ヒト抗体である。かかる「ヒト抗体」としては、例えば、ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体等を挙げることができる、ヒト化抗体や完全ヒト抗体を好適に例示することができる。

[0034] 本明細書において、「ヒトキメラ抗体」とは、非ヒト動物（例えば、ニワトリ、マウス、ラット、ウシ等の非ヒト哺乳動物）由来の抗体の可変領域と、ヒト由来の抗体の定常領域とを連結した抗体である。ヒトキメラ抗体は、例えば、抗原を非ヒト動物（好ましくは非ヒト哺乳動物）に免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髓由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平 8-280387 号公報；米国特許第 4816397 号公報；米国特許第 4816567 号公報；米国特許第 5807715 号公報）。

[0035] ヒトキメラ抗体のヒトの定常領域としては、例えば重鎖においては、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$ 、 $C\gamma 4$ 、 $C\mu$ 、 $C\delta$ 、 $C\alpha 1$ 、 $C\alpha 2$ 、及び $C\epsilon$ を挙げることができる、軽鎖においては、 $C\kappa$ や $C\lambda$ を挙げることができる。これらの定常領域のアミノ酸配列や、それをコードする塩基配列は公知である。また、抗体自体の安定性、又は抗体の産生の安定性を改善するために、ヒト由来の抗体定常領域中の 1 又は複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、及び／又は挿入をすることができる。

[0036] 本明細書において、「ヒト化抗体」とは、非ヒト動物（例えば、ニワトリ、マウス、ラット、ウシ等の非ヒト哺乳動物）由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト由来の抗体遺伝子に移植（CDR グラフティング）した抗体であり、その作製方法は、オーバーラップエクステンション PCR 等、公知である（例えば、欧州特許出願公開第 239400 号明細書、欧州特許出願公開第 125023 号明細書、国際公開第 90/07861 号、国際公開第 96/02576 号）。抗体の可変領域は、通常、4 つのフレームワーク領域（framework region: FR）には含まれた 3 つの CDR で構成されている。CDR は、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDR のアミノ酸配列は多様性に富む一方、FR を構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い相同性を示すことが

多い。そのため、一般に、C D Rの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるといわれている。また、C D Rの機能の維持の観点から、非ヒト由来C D RのヒトF Rへの移植においては、その非ヒト動物由来のF Rと相同性の高いヒトF Rが選択される。すなわち、C D R内のアミノ酸は、抗原を認識するばかりでなく、C D Rの近傍にあるF Rのアミノ酸と配位し、C D Rのループ構造の維持にも関与しているため、移植すべきC D Rに隣接しているF Rのアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列からなるヒトF Rを利用することが好ましい。

[0037] 非ヒト動物由来のF Rと相同性の高い公知のヒトF Rの検索を、例えば、インターネットで利用可能な抗体に特化した検索システム (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>) を利用して行うことができる。このようにして得られたヒトF Rの配列と一致するように、非ヒト由来の抗体のC D R以外の配列に変異を導入することができる。あるいは、検索によって得られたヒトF Rのアミノ酸配列をコードする遺伝子 (c D N A) が入手可能な場合は、その配列中に非ヒト由来C D Rを導入してもよい。変異の導入等は核酸合成、部位特異的変異誘発などの当該分野で公知の技術を用いて行うことができる。

[0038] このようにして作製されたヒト化抗体の抗原への親和性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、C D Rを介して連結されたときに該C D Rが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト由来の抗体のF Rが好適に選択できる。また必要に応じ、文献「Cancer Res, 1993, 53, 851-856」等に記載の方法に従って、ヒト化抗体のC D Rが適切な抗原結合部位を形成するようにF Rのアミノ酸残基を置換することもでき、さらに当該アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への親和性を測定して評価することによって、所望の性質を有する変異F R配列を選択することができる。

[0039] 本明細書において、「完全ヒト抗体」とは、抗体のすべての配列がヒト由来の配列である抗体を意味する。完全ヒト抗体は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖抗体の遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製することができる。ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウス

は、例えば、国際公開第02/43478号パンフレット、米国特許第6657103号明細書（Abgenix）等に記載の方法に従って、調製することができる。次いで、所望の抗体を産生するトランスジェニックマウス由来のB細胞が融合したハイブリドーマ細胞株は、例えば、米国特許第5569825号明細書；米国特許第5625126号明細書；米国特許第5633425号明細書；米国特許第5661016号明細書；米国特許第5545806号明細書；文献「Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42(1998)」；文献「Green, et al, J. Exp. Med. 188:483-95(1998)」に記載の方法に従って作製することができる。

[0040] 前述したように、本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体L1/L2には、抗体の全体からなる抗体の他、抗体の一部分（部分断片）であって、HMGB1タンパク質を特異的に認識する機能的断片も含まれる。かかる機能的断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、sc(Fv)₂、ダイアボディー、多特異性抗体、及びこれらの重合体等が挙げられる。

[0041] ここで「Fab」とは、1つの軽鎖及び重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「Fab'」は、抗体のヒンジ領域の1つ又はそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fabとは異なる。「F(ab')₂」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二価の抗原結合断片を意味する。

[0042] 「可変領域断片(Fv)」は、完全な抗原認識及び結合部位を有する最少の抗体断片である。Fvは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。「一本鎖Fv(scFv)」は、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「sc(Fv)₂」は、2つの重鎖可変領域及び2つの

軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。「ダイアブディー」とは、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同一ポリペプチド鎖の中に軽鎖可変領域に結合した重鎖可変領域を含み、各領域は別の鎖の相補的領域とペアを形成している。「多特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。例えば、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現により調製することができる。

[0043] 本件ヒトモノクローナル抗体におけるH鎖CDR1～3やL鎖CDR1～3には、配列番号1～6のアミノ酸配列において、望ましい活性（すなわち、HMGB1に対する親和性）を減少させることなく、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入された修飾体が含まれる。かかるCDRの修飾体を含む本件ヒトモノクローナル抗体は、例えば、ヒトモノクローナル抗体#129の抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。抗体のCDR以外の領域（例えば、FR、定常領域）におけるアミノ酸の改変は、抗原との親和性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（例えば、文献「PNAS, 102:8466-8471(2005)」；文献「Protein Engineering, Design&Selection, 21:485-493(2008)」；国際公開第2002/051870号；文献「J. Biol. Chem., 280:24880-24887(2005)」；文献「Protein Engineering, Design&Selection, 21:345-351(2008)」；文献「MAbs. Mar-Apr;6(2):437-45(2014)」）。また、現在では、統合計算化学システム等（例えば、MOE [Molecular Operating Environment] [カナダCCG社製]）を利用することにより、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をモデリングすることもできる（例えば、<http://www.rsi.co.jp/kagaku/cs/ccg/products/application/protein.html>）。

[0044] 本明細書において、「1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入」における「複数のアミノ酸」とは、好ましくは10アミノ酸

以内、より好ましくは5アミノ酸以内、さらに好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸）を意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加、及び挿入としては、保存的な置換が好ましい。かかる「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、この技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を有するアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を有するアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を有するアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を有するアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）に分類することができる。

[0045] 本件ヒトモノクローナル抗体におけるH鎖CDR1としては、後述する本実施例でその効果が実証されているため、配列番号1のアミノ酸配列からなるH鎖CDR1が好ましく、本件ヒトモノクローナル抗体におけるH鎖CDR2としては、後述する本実施例でその効果が実証されているため、配列番号2のアミノ酸配列からなるH鎖CDR2が好ましく、本件ヒトモノクローナル抗体におけるH鎖CDR3としては、後述する本実施例でその効果が実証されているため、配列番号3のアミノ酸配列からなるH鎖CDR3が好ましく、本件ヒトモノクローナル抗体におけるL鎖CDR1としては、後述する本実施例でその効果が実証されているため、配列番号4のアミノ酸配列からなるL鎖CDR1が好ましく、本件ヒトモノクローナル抗体におけるL鎖CDR2としては、後述する本実施例でその効果が実証されているため、配列番号5のアミノ酸配列からなるL鎖CDR2が好ましく、本件ヒトモノクローナル抗体におけるL鎖CDR3としては、後述する本実施例でその効果が実証されているため、配列番号6、配列番号20、又は配列番号17のアミノ酸配列からなるL鎖CDR3が好ましい。

[0046] 本明細書において、所定のアミノ酸配列と「少なくとも８０％以上の配列同一性」とは、好ましくは、少なくとも８５％以上の配列同一性、より好ましくは、少なくとも９０％以上の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも９５％以上（例えば、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、１００％）の配列同一性を意味する。アミノ酸配列の相同性は、ＢＬＡＳＴＰ（アミノ酸レベル）のプログラム（例えば、文献「J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990」）を利用して決定することができる。該プログラムは、アルゴリズムＢＬＡＳＴ（例えば、文献「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990」、文献「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993」）に基づいている。ＢＬＡＳＴＰによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、文献「Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997」に記載の方法に従って行うことができる。ＢＬＡＳＴとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0047] 本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体Ｌ１／Ｌ２には、グリコシル化部位の数や位置を変化させる等の抗体の翻訳後プロセスを改変したものも含まれる。かかる改変体は、抗体のＡＤＣＣ活性（抗体依存性細胞障害活性）を向上させ得る。抗体のグリコシル化とは、典型的には、Ｎ－結合又はＯ－結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入又は欠失等の公知の方法で行うことができる（特開２００８－１１３６６３号公報、米国特許第５０４７３３５号、米国特許第５５１０２６１号、米国特許第５２７８２９９号、国際公開第９９／５４３４２号）。さらに、本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体Ｌ１／Ｌ２としては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸や、脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他

のアミノ酸に置換することにより、脱アミド化を抑制したものであってもよいし、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させたものであってもよい。

[0048] 本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 は、公知のハイブリドーマ法や、公知の組換え DNA 法によって作製することができる。ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラー及びミルスタインの方法（文献「Nature, 256:495(1975)」）が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、抗原（HMGB 1 タンパク質、その部分ペプチド、それらに Fc タンパク質等が融合してあるタンパク質、またはこれらを発現する細胞等）で免疫された動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ等の哺乳動物）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球等である。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞又はリンパ球等に対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞及びミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、HMGB 1 タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。HMGB 1 タンパク質に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

[0049] 組換え DNA 法は、本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 をコードする抗体遺伝子をハイブリドーマや B 細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば、HEK 細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞等）に導入し、本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1

／L 2 を組換え抗体として産生させる手法である（例えば、文献「Eur. J. Biochem. 192:767-775(1990)」）。本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 ／L 2 をコードする抗体遺伝子の発現においては、重鎖又は軽鎖をコードする抗体遺伝子を別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖及び軽鎖をコードする抗体遺伝子を単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（国際公開第 9 4 ／ 1 1 5 2 3 号公報）。本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 ／L 2 は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、本件ヒトモノクローナル抗体遺伝子や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 ／L 2 遺伝子に由来するヒトモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

[0050] 本明細書において、添加剤としては、薬学的に許容される担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH 緩衝剤、等張剤、溶解補助剤、栄養剤等の配合成分を例示することができる。かかる薬学的に許容される担体としては、本件予防剤／治療剤が粉体である場合、例えば、マンニトール、ラクトース、サッカロース、ヒトアルブミン等を挙げることができ、本件予防剤／治療剤が液体である場合、例えば、生理食塩水、注射用水、リン酸塩緩衝液、水酸化アルミニウム等を挙げることができる。

[0051] 本件予防剤／治療剤 1 の投与対象としては、本件疾患等の予防又は治療を必要とする対象（ヒト）であればよく、例えば、本件疾患等を発症する又は生じるリスクが高いと診断された対象や、本件疾患等を発症している又は生じている患者等を挙げることができる。また、本件予防剤／治療剤 2 の投与対象としては、アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等の予防若しくは治療を必要とする対象（ヒト）であればよく、例えば、アルツハイ

マー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等を発症する若しくは生じるリスクが高いと診断された対象や、アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等を発症している若しくは生じている患者等を挙げることができる。

[0052] 本件予防剤／治療剤の投与方法としては、例えば、注射による投与方法（例えば、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与）、口腔粘膜投与、直腸内投与、脳への局所投与（脳室内投与）、経皮投与、経口投与等を挙げることができ、静脈内投与を好適に例示することができる。本件ヒトモノクローナル抗体や本件ヒトモノクローナル抗体 L 1 / L 2 の投与量は、投与対象の年齢、体重、性別、健康状態、症状の進行の程度により変動しうるが、通常、成人には体重 1 k g 当たり 1 日 0. 1 ~ 1 0 0 0 m g、好ましくは 1 ~ 1 0 0 m g である。本件予防剤／治療剤 1 は、本件疾患等の予防又は治療に用いられる公知の医薬品と併用してもよい。また、本件予防剤／治療剤 2 は、アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症や本件疾患等の予防若しくは治療に用いられる公知の医薬品と併用してもよい。

[0053] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、本実施例は、日本政府及び国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関するガイドラインにおける推奨に厳密にしたがって実施された。また、すべての実験は、東京医科歯科大学の遺伝子組換え実験委員会、倫理委員会、及び動物実験委員会により承認されたものである。

実施例 1

[0054] 1. 材料と方法

[抗ヒト HMGB 1 抗体]

本実施例において、抗ヒト HMGB 1 抗体として、国際特許出願（PCTーJP2019-36926 [国際公開2020/059847号パンフレット]）の実施例で作製したヒトモノクローナル抗体（ヒト型 Ig G 抗体）# 1 2 9 を使用した。ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 の H 鎖及び L 鎖のアミノ酸配列を、それぞれ表 1 及び 2 に示す。なお、ヒトモノクローナル抗体

1 2 9 をマウスへ皮下投与し、脳内及び血清中の当該抗体濃度を E L I S A 法にて測定した結果、投与した 2 ～ 8 % のヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 が、血液脳関門 (B B B) を通過し、脳内に移行していることが確認された。

[0055] [表1]

ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 の H 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 9)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYAMS</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>DISGSG</u> <u>GSTYYADSVKG</u> RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>GYGMDV</u> WGQGT MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

表中の下線で示す領域は、H 鎖 V 領域 (配列番号 7) を示す。また、表中の四角で囲った 3 つの領域は、アミノ末端側から順に、H 鎖 C D R 1 (配列番号 1)、H 鎖 C D R 2 (配列番号 2)、及び H 鎖 C D R 3 (配列番号 3) を示す。

[0056] [表2]

ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 の L 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 10)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <u>RASQSV</u> TNYLA <u>WYQQK</u> PGKAPKLLIY <u>GASILET</u> <u>GVPSRF</u> SGSGSGTDFTLTINS <u>LQPED</u> FATYYC <u>LQHNSTPLT</u> FGQGTKLEIKTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表中の下線で示す領域は、L 鎖 V 領域 (配列番号 8) を示す。また、表中の四角で囲った 3 つの領域は、アミノ末端側から順に、L 鎖 C D R 1 (配列番号 4)、L 鎖 C D R 2 (配列番号 5)、及び L 鎖 C D R 3 (配列番号 6) を示す。

[0057] [表面プラズモン共鳴法 (S P R) による抗体親和性の解析]

本発明のヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 と、比較対照として国際公開 2 0 1 8 / 0 3 0 4 0 5 号パンフレットに記載のマウスモノクローナル抗体 2

C8Cとを用いて、ヒトHMGB1タンパク質との相互作用を解析した。具体的には、本発明のヒトモノクローナル抗体#129、又はマウスモノクローナル抗体2C8Cを固定化したセンサーチップと、アナライトとしてヒトHMGB1タンパク質とを用い、表面プラズモン共鳴測定装置（「Biacore T100」；GE healthcare社製）によって経時的に相互作用を測定し、抗体親和性の指標である平衡解離定数（KD値）を算出した（図1）。

[0058] [4種類のFTLD-ALSモデルマウスの作製]

4種類のFTLD-ALSモデルマウス（VCP^{T262A}-KIマウス、PGRN^{R504X}-KIマウス、CHMP2B^{Q165X}-KIマウス、及びTDP43^{N267S}-KIマウス）（本明細書において、「4種FTLD-ALSモデルマウス」ということがある）のうち、PGRN^{R504X}-KIマウスについては、文献「Nat. Commun., 2018 9, 433」に記載の方法に従って作製した。

[0059] また、VCP^{T262A}-KIマウスの作製用ターゲティングベクターを構築した。具体的には、Bacクローン（ID：RP23-111G9又はRP23-124L1）から増幅した5.4 kbのNotI-XhoI断片のPCR産物を、pBS-DTAのPspOMI-XhoI部位にサブクローニングした。同様に、同じBacクローンから増幅した2.9 kbのBamHI-NotI断片を、Neoカセット（loxP-Neo-loxP）を有するpBS-LNL(-)にサブクローニングした。4.5 kbの断片（1.6 kbのNeoカセット+2.9 kbの断片）をNotI処理により切り出し、T262Aの変異を有する0.8 kbのXhoI-SmaI断片を、同じBacクローンからPCRにより増幅し、XhoI及びSmaI処理を行った。かかる0.8 kb及び4.5 kbの断片をターゲティングベクターのXhoI-NotI部位にサブクローニングした。NotI処理によりターゲティングベクターを線形化した後、かかる断片をC57BL/6JバックグラウンドのES細胞にエレクトロポレーションした。LoxP配列を含むDNA断片を増幅するプライマーセット（プライマー1 [5'-ATATGCTCTCACTGTATGGTATTGC-3'；配列番号11]；及びプライマー2 [5'-TCCAGATGAGCTTAGAAGATTAGAA-3'；配列番号12]）を用いたPCRにより、非トランスジェニック同腹仔からVCP^{T262A}-KIマウスを選別

した。

[0060] また、CHMP2B^{Q165X}-KIマウス作製用ターゲティングベクターを構築した。具体的には、Bacクローン（ID：RP23-13H5又はRP23-273E18）から増幅した5.7 kbのClaI-SalI断片のPCR産物を、pBS-DTA（ユニテック社製）のClaI-SalI部位にサブクローニングした。Bacクローンから3.0 kbのSacII-NotI断片を増幅してNeoカセット（loxP-Neo-loxP）を有するpBS-LNL(+)にサブクローニングした。SacII-NotI及び4.6 kbの断片（1.6 kbのNeo カセット+3.0 kbの断片）を、ターゲティングベクターのSacII-ClaI部位にサブクローニングした。LoxP配列を含むDNA断片を増幅するプライマーセット（プライマー3 [5'-TGGATTTTATTTATGTCTGAATGTG-3'；配列番号13]及びプライマー4 [5'-ATAAGCAACTTCACAAGGCATCTTA-3'；配列番号14]）を用いたPCRにより、非トランスジェニック同腹仔からCHMP2B^{Q165X}-KIマウスを選別した。

[0061] また、TDP43^{N267S}-KIマウス作製用ターゲティングベクターを構築した。具体的には、Bacクローン（ID：RP23-364M1又はRP23-331P21）から5.9 kbのClaI-SalI断片を増幅し、pBS-TK（ユニテック社製）のClaI-SalI部位にサブクローニングした。Bacクローンから2.7 kbのSacII-NotI断片を増幅し、Neoカセット（loxP-Neo-loxP）を有するpA-LNL(+)にサブクローニングした。4.3 kbの断片（1.6 kbのNeoカセット+2.7 kbの断片）をターゲティングベクターのSacII-ClaI部位にサブクローニングした。LoxP配列を含むDNA断片を増幅するプライマーセット（プライマー5 [5'-ACAGTTGGGTGTGATAGCAGGTACT-3'；配列番号15]及びプライマー6 [5'-TCGAGAATTACAGGAATGTATCATC-3'；配列番号16]）、を用いたPCRにより、非トランスジェニック同腹仔からTDP43^{N267S}-KIマウスを選別した。

[0062] [免疫組織化学染色法]

各種月齢の4種FTLD-ALSモデルマウス又はC57BL/6Jマウスからそれぞれ脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを含むPBS中で12

時間固定処理を行った後、ミクロトーム（大和光機工業社製）を用いて5 μ m厚の脳組織パラフィン切片を作製した。作製した脳組織パラフィン切片を、キシレンを用いて脱パラフィン処理を行い、0.01Mのクエン酸緩衝液（pH 6.0）に浸けて再水和処理を行った後、120℃で15分間加熱処理を行った。その後、0.5%のtriton-X100を含むPBS中で透過処理を行い、10%のFBSを含むPBS中で60分間、ブロッキング処理を行った。その後、11種類のタンパク質（pSer46-MARCKS、 γ H2AX、53BP1、リン酸化TDP43 [Ser409/410] [pSer409/410-TDP43]、ユビキチン、p62、KDEL、MAP2、PSD95、VAMP2、及びリン酸化タウ [Ser203（マウス）/Ser214（ヒト）] [pSer203-タウ]）を検出する各種1次抗体（表3）を用いた抗体反応を、4℃で12時間行った。PBSで3回洗浄後、各種1次抗体に対する2次抗体（表3）を用いた抗体反応を、室温で1時間行い、PBSで3回洗浄後、0.2 μ g/mLのDAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）を含むPBS中で、細胞核を染色し、共焦点顕微鏡（FV1200IX83、Olympus社製）を用い、上記11種類のタンパク質由来の蛍光画像と、細胞核由来の蛍光画像を取得した。その後、DAPI蛍光画像及びpSer46-MARCKS蛍光画像を基に、143 μ m $\times$ 143 μ mの領域当たりのpSer46-MARCKS陽性の細胞数（個）を算出した（図2-1及び図9）。また、DAPI蛍光画像、KDEL蛍光画像、及びMAP2蛍光画像を基に、成熟ニューロンのマーカーであるMAP2陽性細胞について、KDELシグナル領域を測定した（図10）。また、DAPI蛍光画像、 γ H2AX蛍光画像、及びMAP2蛍光画像を基に、MAP2陽性細胞について、 γ H2AXシグナル領域を測定した（図11）。また、DAPI蛍光画像、53BP1蛍光画像、及びMAP2蛍光画像を基に、MAP2陽性細胞について、53BP1シグナル領域を測定した（図12）。また、DAPI蛍光画像、pSer409/410-TDP43蛍光画像、及びユビキチン蛍光画像を基に、ユビキチン陽性封入体におけるpSer409/4

10-TDP43シグナル領域を測定した（図13）。また、DAPI蛍光画像及びp62蛍光画像を基に、封入体におけるp62シグナル領域を測定した（図14）。また、DAPI蛍光画像、VAMP2蛍光画像、及びPSD95蛍光画像を基に、VAMP2シグナルと、PSD95シグナルとが共局在する細胞の割合を測定した（図15）。また、DAPI蛍光画像、pSer203-タウ蛍光画像、及びPSD95蛍光画像を基に、pSer203-タウシグナルと、PSD95シグナルとが共局在する細胞の割合を測定した（図16）。

[0063] [表3]

1次抗体	2次抗体（左欄の1次抗体に対する抗体）
ラビット抗pSer46-MARCKS抗体 (GL Biochem社製、希釈倍率1:2,000)	Cy3標識抗ラビットIgG（Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500）
マウス抗γH2AX抗体（Ser139、#05-636、Millipore社製、希釈倍率1:200）	Alexa488標識抗マウスIgG（A21202、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000）
ラビット抗53BP1抗体（NB100-304、Novus Biologicals社製、希釈倍率1:5,000）	Alexa488標識抗ラビットIgG、（A21206、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000）
ラビット抗リン酸化TDP43（Ser409/410）抗体（TIP-PTD-P02、コスモ・バイオ社製、希釈倍率1:5,000）	Alexa488標識抗ラビットIgG、（A21206、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000）
マウス抗ユビキチン抗体（P4D1、cell signaling technology社製、希釈倍率1:10,000）	Cy3標識抗マウスIgG、（715-165-150、Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500）
マウス抗p62抗体（#610497、BD bioscience社製、希釈倍率1:200）	Alexa488標識抗マウスIgG（A21202、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000）
マウス抗KDEL抗体（ADI-SPA-827、Enzo Life Science社製、希釈倍率1:200）	Alexa488標識抗マウスIgG（A21202、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000）
ラビット抗MAP2抗体（ab32454、Abcam、希釈倍率1:1,000）	Cy3標識抗ラビットIgG（Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500）
マウス抗MAP2抗体（sc-32791、Santa Cruz Biotechnology社製、希釈倍率1:50）	Cy3標識抗マウスIgG、（715-165-150、Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500）
ラビット抗PSD95抗体（D74D3、Cell Signaling Technology社製、希釈倍率1:200）	Alexa488標識抗ラビットIgG、（A21206、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000）
マウス抗VAMP2抗体（GTX634812、GeneTex社製、希釈倍率1:200）	Cy3標識抗マウスIgG、（715-165-150、Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500）
ラビット抗リン酸化タウ（Ser203/Ser214）抗体（ab170892、Abcam社製、希釈倍率1:200）	Cy3標識抗ラビットIgG（Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500）
マウス抗PSD95抗体（MA1-045、Thermo Fisher Scientific社製、希釈倍率1:200）	Alexa488標識抗マウスIgG（A21202、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000）

[0064] [ニッスル染色法]

上記〔免疫組織化学染色法〕の項目において、脱パラフィン処理及び再水和処理を行った脳組織パラフィン切片を、脱イオン水で洗浄した後、クレシルバイオレット液（0.1%のクレシルバイオレット及び5滴の10%の酢酸溶液を含む300mLの液）中に、37℃で15分間浸けた。その後、エタノール液で脱水処理し、キシレンで透明処理を行った後、電子顕微鏡（H-7100、日立ハイテク社製）を用いて、ネクローシスした脳組織画像を取得した（図2-2）。

[0065] [抗ヒトHMGB1抗体の投与]

4種FTLD-ALSモデルマウス及びそのバックグラウンドマウス（C57BL/6J）に対して、表4に示す投与期間、月に1回の頻度で、体重30g当たり6 μ gのヒトモノクローナル抗体#129又は対照ヒトIgG（#12000C、Thermo Fisher Scientific社製）を尾静脈内投与した（図3）。各FTLD-ALSモデルマウスにおける、抗体の投与開始時期は、モーリスの水迷路試験により発症が確認された月齢である。

[0066] [表4]

	VCP ^{T262A} -KI	PGRN ^{R504X} -KI	CHMP2B ^{Q165X} -KI	TDP43 ^{M267S} -KI
抗体の投与期間	6～10か月齢	3～7か月齢	1～6か月齢	6～10か月齢
モーリスの水迷路試験期間	10か月齢+1～5日間	7か月齢+1～5日間	6か月齢+1～5日間	10か月齢+1～5日間
Y-迷路試験期間	7～10か月齢	5～7か月齢	4～6か月齢	7～10か月齢
恐怖条件付け試験日	10か月齢	7か月齢	6か月齢	10か月齢

[0067] [認知機能試験]

表4に示す各試験期間又は試験日に、4種FTLD-ALSモデルマウスに対して、3種類の認知機能試験（モーリスの水迷路試験、Y-迷路試験、及び恐怖条件付け試験）を、文献「Hum Mol Genet 24, 540-558 (2015).」や文献「Mol. Psychiatry 20, 459-471 (2015).」に記載の方法に従って行った。具体的には、モーリスの水迷路試験においては、マウスに5日間、1日1回モーリスの水迷路試験を4回（60秒）受けさせ、プラットフォームにたどり着くまでの平均時間（latency）（図3の縦軸）を測定した。また、Y-迷路試験においては、それぞれのアームの間の角度が等しい3つの同一のアー

ムからなるY-迷路（小原医科産業社製）を使用した。1つのアームの端にマウスを置き、8分間の間迷路中を自由に行動させ、1つのアームから別のアームへ移動した回数の合計で、前のアームとは異なる新しいアームに進入した回数を割ることにより、自発的变化の割合を算出した（変化率 [Alternation Rate] として表示；図4～7の縦軸）。恐怖条件付け試験においては、条件付け（65 dBのホワイトノイズ、30秒+フットショック、0.4 mA、2秒）を受けた24時間後に、フットショックなしに同じチャンバー内において、すくみ反応を測定した（全すくみ割合 [Total Freeze percent] として表示；図8の縦軸）。

[0068] [ウェスタンブロット法]

各種月齢の4種F T L D-A L Sモデルマウス又はC 5 7 B L / 6 Jマウス的大脑皮質組織を、プロテアーゼ阻害剤カクテル（#539134、Calbiochem社製、希釈倍率1 : 100）を含む溶解バッファー（100 mMのT r i s - H C l [p H 7. 5]、2%のS D S）の存在下で、4℃で1時間溶解処理を行った。遠心分離（12,000 g × 10分間）後、上清を回収し、同量のサンプルバッファー（62.5 mMのT r i s - H C l、p H 6. 8、2% [w / v] のS D S、2.5% [v / v] の2-メルカプトエタノール、5% [v / v] のグリセロール、及び0.0025% [w / v] のブロモフェノールブルー）を添加した後、B C A法（PierceBCA protein assay kit、Thermo Scientific社製）を用いて試料中のタンパク質量を均一化（equalize）した。その後、S D S - P A G Eによりタンパク質試料を分離した後、セミドライ法によりP V D F（Poly Vinylidene Di-Fluoride）メンブレン（Immobilon-P [Millipore社製]）に転写し、5%のスkimミルクを含むT B S T（10 mMのT r i s - H C l [p H 8. 0]、150 mMのN a C l、0.05%のT w e e n 20）液中でブロッキング処理した後、0.1%のスkimミルク又はCan Get Signal溶液（東洋紡、大阪、日本）を含むT B S T液中で、13種類のタンパク質（リン酸化P K C α [S e r 3 1 9] [p S e r 3 1 9 - P K C α]、リン酸化P K C γ [T h r 6 5 5] [p T h r 6

55-PKC γ]、リン酸化PKC δ [Ser643] [pSer643-PKC δ]、リン酸化PKC ϵ [Ser729] [pSer729-PKC ϵ]、リン酸化タウ [Ser203 (マウス) / Ser214 (ヒト)] [pSer203-タウ]、PSD95、VAMP2、 γ H2AX、53BP1、リン酸化TDP43 [Ser409/410] [pSer409/410-TDP43]、pSer46-MARCKS、リン酸化Ku70 [Ser77/Ser78] [pSer77/78-Ku70]、及び β -アクチン)を検出する各種1次抗体(表5)を用いた抗体反応を、4℃で12時間行った。メンブレンをTBST液で3回洗浄した後、各種1次抗体に対する2次抗体(表5)を用いた抗体反応を、室温で1時間行った。その後、ECL Prime ウェスタンプロットティング検出試薬(RPN2232、GE healthcare社製)及びルミネセンスイメージアナライザー(ImageQuantLAS 500、GE healthcare社製)を用いて、上記13種類のタンパク質を検出した(図17)。

[0069]

[表5]

1 次抗体	2 次抗体（左蘭の 1 次抗体に対する抗体）
ラビット抗リン酸化 P K C α (Ser319) 抗体 (AP0560、NeoScientific社製、希釈倍率1:10,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化 P K C γ (Thr655) 抗体 (ab5796、Abcam社製、希釈倍率1:10,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化 P K C δ (Ser643) 抗体 (Cell signaling technology社製、#9376、希釈倍率1:3,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化 P K C ϵ (Ser729) 抗体 (ab63387、Abcam社製、希釈倍率1:3,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化タウ (Ser203/Ser214)、(ab170892、Abcam社製、希釈倍率1:10,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗 P S D 9 5 抗体 (D74D3、Cell Signaling Technology社製、希釈倍率1:5,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
マウス抗 V A M P 2 抗体 (GTX634812、GeneTex社製、希釈倍率1:5,000)	H R P 結合抗マウス I g G (NA931、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
マウス抗 γ H 2 A X 抗体 (Ser139、#05-636、Millipore社製、希釈倍率1:2,000)	H R P 結合抗マウス I g G (NA931、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗 5 3 B P 1 抗体 (NB100-304、Novus Biologicals社製、希釈倍率1:50,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化 T D P 4 3 (Ser409/410) 抗体 (TIP-PTD-P02、コスモ・バイオ社製、希釈倍率1:6,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗 p S e r 4 6 - M A R C K S (GL Biochem社製、希釈倍率1:100,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化 K u 7 0 (Ser77/Ser78) 抗体 (コスモ・バイオ社より注文、希釈倍率1:100,000)	H R P 結合抗ラビット I g G (NA934、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)
マウス抗 β -actin抗体 (Santa Cruz Biotechnology社製、希釈倍率1:3,000)	H R P 結合抗マウス I g G (NA931、GE healthcare社製、希釈倍率1:3,000)

[0070] 2. 結果

[表面プラズモン共鳴法 (S P R) による抗体親和性の解析]

マウスモノクローナル抗体 2 C 8 C の K D は、 $1.95 \times 10^{-9} \text{M}$ であったのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 の K D は、 $3.79 \times 10^{-11} \text{M}$ であった。マウスモノクローナル抗体 2 C 8 C の K D の他、一般的な抗体医薬の K D も $10^{-9} \text{M} \sim 10^{-10} \text{M}$ の範囲内であることを考慮すると、本発明のヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 は、ヒト H M G B 1 に対する親和性が極めて高い抗体であることを示している。

[0071] [免疫組織化学染色法]

p S e r 4 6 - M A R C K S が、アルツハイマー病発症前の早い段階から生じていることや、ニューロンのネクロシスにより細胞内から漏出した H M G B 1 が、M A R C K S のリン酸化を誘導し、神経突起の変性を誘導する（文献「SCIENTIFIC REPORT, 2016 Aug 25;6:31895」）。そこで、F T L D の発症初期の段階でも、M A R C K S のリン酸化やニューロンのネクロシスが生じているかどうかを、1～12か月齢の4種 F T L D - A L S モデルマウスを用いて解析した。

[0072] その結果、1か月齢、3か月齢、6か月齢、及び12か月齢の4種類の F T L D - A L S モデルマウス（V C P ^{T262A} - K I マウス、P G R N ^{R504X} - K I マウス、C H M P 2 B ^{Q165X} - K I マウス、及び T D P 4 3 ^{N267S} - K I マウス）の脳皮質において、p S e r 4 6 - M A R C K S 由来のシグナルが高いレベルで検出され、かつ、ゲノム DNA 由来の D A P I シグナルが減退した細胞が認められた（図2-1）。また、1か月齢の2種類の F T L D - A L S モデルマウス（V C P ^{T262A} - K I マウス及び P G R N ^{R504X} - K I マウス）の脳皮質において、ネクロシスの特徴である小胞体（E R）の拡張が認められた（図2-2）。

これらの結果は、F T L D - A L S の発症初期の段階から、ネクロシスが生じていることを示している。

[0073] [F T L D - A L S モデルマウスの症状に対するヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 の治療効果：認知機能試験]

次に、本発明のヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 を、4 種 F T L D - A L S モデルマウスに投与したとき、F T L D - A L S の症状が改善するかどうかを、3 種類の認知機能試験（モーリスの水迷路試験、Y - 迷路試験、及び恐怖条件付け試験）を用いて解析した。まず、モーリスの水迷路試験において、4 種 F T L D - A L S モデルマウス（図3中の「K I n. t.」）は、正常マウスである C 5 7 B L / 6 J マウス（図3中の「B 6 n. t.」）と比べ、月齢の進行とともに、プラットフォームにたどり着くまでの時間が延長

することが確認された（図3）。一方、対照ヒトIgGを4種FTLD-ALSモデルマウスに投与した場合（図3中の「K1 IgG」）、プラットフォームにたどり着くまでの時間の延長に変化は認められなかったのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスに投与した場合（図3中の「K1 Ab」）、FTLDの変異遺伝子の種類に関わらず、いずれのFTLD-ALSモデルマウスにおいても、FTLD発症初期から、C57BL/6Jマウスと同程度まで、プラットフォームにたどり着くまでの時間の延長が有意に抑制（短縮）されることが示された（図3）。

[0074] この結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、FTLD-ALSによる認知機能の低下を予防・改善する効果を有することを示している。かかる同様の効果は、Yー迷路試験（図4～7）や、恐怖条件付け試験（図8）を行った場合にも確認された。

[0075] [FTLD-ALSモデルマウスの症状に対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果：免疫組織化学染色法]

次に、本発明のヒトモノクローナル抗体#129によるFTLD-ALSの認知機能改善効果について、免疫組織化学染色法を用いて解析した。まず、4種FTLD-ALSモデルマウス（図3中の「K1 n. t.」）は、正常マウスであるC57BL/6Jマウス（図3中の「B6 n. t.」）と比べ、大脳皮質におけるネクロシスマーカー（pSer46-MARCKS）陽性細胞の割合が増加するとともに（図9）、ERマーカー（KDEL）由来のシグナル領域が増大した（図10）。一方、対照ヒトIgGを4種FTLD-ALSモデルマウスに投与した場合（図9及び10中の「K1 IgG」）、かかるpSer46-MARCKS陽性細胞の割合の増加や、KDEL由来のシグナル領域の増加に変化は認められなかったのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスに投与した場合（図9及び10中の「K1 Ab」）、かかるpSer46-

MARCKS陽性細胞の割合の増加や、KDEL由来のシグナル領域の増加は、C57BL/6Jマウスと同程度まで、有意に抑制されることが示された（図9及び10）。

[0076] この結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、大脳皮質においてFTLD-ALSによって生じるネクロシスやERの拡張を予防・改善する効果を有することを示している。

[0077] また、4種FTLD-ALSモデルマウスは、C57BL/6Jマウスと比べ、大脳皮質におけるDNA損傷マーカー（ γ H2AX及び53BP1）由来のシグナル領域が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129の投与により、かかる γ H2AX及び53BP1由来シグナル領域の増加が、C57BL/6Jマウスと同程度まで、有意に抑制されることが示された（図11及び12）。

[0078] この結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、大脳皮質においてFTLD-ALSによって生じるDNA損傷を予防・改善する効果を有することを示している。

[0079] また、4種FTLD-ALSモデルマウスは、C57BL/6Jマウスと比べ、大脳皮質におけるタンパク質凝集マーカー（pSer409/410-TDP43及びp62）由来のシグナル領域が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129の投与により、かかるpSer409/410-TDP43及びp62由来シグナル領域の増加が有意に抑制されることが示された（図13及び14）。

[0080] この結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、大脳皮質においてFTLD-ALSによって生じるタンパク質凝集を予防・改善する効果を有することを示している。

[0081] また、本発明者らは、リン酸化プロテオームの解析学により、VAMP2とPSD95との共局在や、pSer203-タウとPSD95との共局在

を指標として、シナプス障害を予想した。そこで、これらの共局在を指標に、シナプス障害を解析した結果、4種FTLD-ALSモデルマウスは、C57BL/6Jマウスと比べ、大脳皮質におけるVAMP2とPSD95との共局在が減少したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129の投与により、かかる減少が有意に抑制されることが示された(図15)。また、4種FTLD-ALSモデルマウスの大脳皮質は、C57BL/6Jマウスと比べ、大脳皮質におけるpSer203-タウとPSD95との共局在が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129の投与により、かかる増加が有意に抑制されることが示された(図16)。

[0082] この結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、大脳皮質においてFTLD-ALSによって生じるシナプス損傷を予防・改善する効果を有することを示している。

[0083] [FTLD-ALSモデルマウスの症状に対するヒトモノクローナル抗体#129の治療効果：ウェスタンブロット法]

免疫組織化学染色法を用いた解析結果を裏付けるために、ウェスタンブロット法による解析を行った。まず、AD-FTLDのコアシグナルに関与する4種類のタンパク質のリン酸化(pSer319-PKC α 、pThr655-PKC γ 、pSer643-PKC δ 、及びpSer729-PKC ϵ)レベルを解析した結果、コアノード選択の厳しい閾値(中心性>2SD)で動的ネットワーク解析により予測された2種類のリン酸化レベル(pSer319-PKC α 及びpSer643-PKC δ)は、C57BL/6Jマウスと比べ、4種FTLD-ALSモデルマウスの方が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスへ投与することにより、かかるpSer319-PKC α 及びpSer643-PKC δ レベルの増加が抑制されることが示された(図17のレーン(1)及び(3))。一方、コアノード選択が相対的に緩い条件(中心性>0)で動的ネットワーク解析により予測された2種類のリン酸化レベル(pThr655-PKC γ 及びpSer729-PKC ϵ)は、上記4種

類のFTLD-ALSモデルマウスとC57BL/6Jマウスとの間で変化は認められなかった（図17のレーン（2）及び（4））。

[0084] また、シナプスの不安定性関連タンパク質のリン酸化（pSer203-タウ）は、C57BL/6Jマウスと比べ、4種FTLD-ALSモデルマウスの方が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスへ投与することにより、かかるpSer203-タウレベルの増加が抑制されることが示された（図17のレーン（5））。また、シナプス関連タンパク質（PSD95及びVAMP2）の発現レベルは、C57BL/6Jマウスと比べ、4種FTLD-ALSモデルマウスの方が減少したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスへ投与することにより、かかるPSD95及びVAMP2の発現レベルの低下が抑制されることが示された（図17のレーン（6）及び（7））。

[0085] また、DNAダメージ関連タンパク質（ γ H2AX及び53BP1）の発現レベルは、C57BL/6Jマウスと比べ、4種FTLD-ALSモデルマウスの方が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスへ投与することにより、かかる γ H2AX及び53BP1の発現レベルの増加が抑制されることが示された（図17のレーン（8）及び（9））。

[0086] また、細胞死関連タンパク質のリン酸化（pSer46-MARCKS）レベルは、C57BL/6Jマウスと比べ、4種FTLD-ALSモデルマウスの方が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスへ投与することにより、かかるpSer46-MARCKSレベルの増加が抑制されることが示された（図17のレーン（10））。

[0087] また、DNA修復関連タンパク質のリン酸化（pSer77/78-Ku70）レベルは、C57BL/6Jマウスと比べ、4種FTLD-ALSモデルマウスの方が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#1

29を4種FTLD-ALSモデルマウスへ投与することにより、かかるpSer77/78-Ku70レベルの増加が抑制されることが示された（図17のレーン（11））。

[0088] また、タンパク質凝集マーカー（pSer409/410-TDP43）のレベルは、C57BL/6Jマウスと比べ、4種FTLD-ALSモデルマウスの方が増加したのに対して、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を4種FTLD-ALSモデルマウスへ投与することにより、かかるpSer409/410-TDP43レベルの増加が抑制されることが示された（図17のレーン（12））。

[0089] 以上の結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、FTLD-ALSにより、壊死ニューロンから放出される細胞外HMGB1により誘発される二次的なニューロンの損傷や神経突起の損傷を予防・改善する効果を有することを示している。

[0090] [本発明のヒトモノクローナル抗体#129の副作用]

さらに、本発明のヒトモノクローナル抗体#129の副作用について調べた。図3～8の認知機能試験の終了後、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した4種FTLD-ALSモデルマウスやC57BL/6Jマウスから肺、肝臓、腎臓、腸、脾臓、骨格筋、心臓及び皮膚を切開し、病理学的検査に行った。

[0091] その結果、本発明のヒトモノクローナル抗体#129の投与による異常な所見（例えば、明白な炎症、細胞死、腫瘍）は、いずれの組織においても認められなかった。このことは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体は、顕著な副作用を伴うことなく、FTLD-ALSモデルマウスにおける症状を予防・改善し得ることを示している。

実施例 2

[0092] 1. 材料と方法

[ADモデルマウス]

5×FADマウス、すなわち、Swedish (KM670/671NL) 変異、Florida (I716V) 変異、及びLondon (V717I) 家族性アルツハイマー病 (FAD) 変異を有する変異型ヒトAPP (770) と、2つのFAD変異 (M146L及びL285V) を有するヒトPS1とを過発現したトランスジェニックマウスは、Jackson Laboratory社から購入した。5×FADマウスにおける上記APP及びPS1をコードする遺伝子は、マウスThy1プロモーターの制御下にある (文献「J Neurosci 26, 10129-10140 (2006).」)。5×FADマウスのバックグラウンドは、C57BL/6J雌とSJL/J雄の交配によって作製されたC57BL/SJLであった。1、3、6、12ヶ月齢の雄の5×FADマウスの脳組織サンプルを用いて、先に述べたように包括的なプロテオミクス解析を実施した (文献「Hum Mol Genet 24, 540-558 (2015).」)。

[0093] APP-KI (App^{NL-G-F/NL-G-F}) マウス (文献「Nat. Neurosci. 17, 661-663 (2014).」)、すなわち、ヒト化APPマウス遺伝子のSwedish (KM670/671NL) 変異、Beyreuther/Iberian (I716F) 変異、及びArctic (E693G) 変異を有するマウスは、理研バイオリソースセンターより入手した。

[0094] [本発明のヒトモノクローナル抗体#129の投与]

5×FADマウス又はB6/SJLマウスに、0.1 µg/kgのコントロールIgG (ヒトIgGアイソタイプコントロール、#12000C、Thermo Fisher Scientific社製) 又は本発明のヒトモノクローナル抗体#129を、6ヶ月から8ヶ月齢まで週に1回頸背部領域に皮下投与 (以下、単に「皮下投与」という) (計9回) した。本発明のヒトモノクローナル抗体#129を各種マウスへ静脈注射する場合は、生理食塩水で最終容量50 µLに希釈した本発明のヒトモノクローナル抗体#129を、生後6ヶ月から8ヶ月まで月1回尾静脈に注射した (計3回)。

[0095] [免疫組織化学染色法]

免疫組織化学染色法を行うために、マウスとヒトの脳組織試料を4%パラ

ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。マイクローム（大和工機工業社製）を用いて、 $5\mu\text{m}$ 厚の矢状断切片又は冠状断切片を得た。免疫組織化学染色法は、以下の1次抗体を用いて行った：ラビット抗リン酸化Ser46-MARKS抗体（1:2000 [GL Biochem（上海）社製]）；マウス抗A β 抗体（1:1000、クローン82E1、#10323、IBL社製）；マウス抗MAP2抗体（1:200、sc-32791、Santa Cruz社製）；ラビット抗MAP2抗体（1:2000、ab32454、Abcam社製）；マウス抗リン酸化H2X（ γH2X ）抗体（1:300、JBW301、Millipore社製）；ラビット抗53BP1抗体（1:5000、NB100-304、Novus社製）；ラビット抗YAP抗体（1:50、GTX129151、GeneTex社製）；ラビット抗NF κ B抗体（1:100、#8242、CellSignaling Technology社製）；マウス抗IL6抗体（1:50、ab208113、Abcam社製）；ラビット抗CCL2/MCP1抗体（1:100、NBP1-07035、Novus社製）；ラビット抗ラミンB1抗体（1:5000、ab16048、Abcam社製）；ヤギ抗Iba1抗体（1:500、#011-27991、富士フイルム和光純薬社製）；ラビット抗Iba1抗体（1:100、#019-19741、富士フイルム和光純薬社製）；マウス抗GFAP抗体Cy3コンジュゲート（1:5000、#C9205、Sigma-Aldrich社製）；マウス抗NeuN抗体（1:1000、ab104224、Abcam社製）；反応生成物は、Alexa Fluor 488-、568-、647-結合の2次抗体（1:1000、MolecularProbes社製）で可視化した。細胞核はDAPIで染色した（PBS中0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、#D523、同仁化学研究所社製）。顕微鏡画像は、すべて共焦点顕微鏡（FV1200IX83、Olympus社製）を用いて取得した。

[0096] [ウェスタンブロット法]

各種マウスの大脳皮質全体について、ウェスタンブロット法を用いた10種類のタンパク質（ γH2AX 、53BP1、 γH2AX 、53BP1、pSer77/78-Ku70、 β -アクチン、pThr638-PKC α 、pThr641-PKC β I、pSer660-PKC β II/ δ 、及びpan-PKC）の検出は、表5及び表6の抗体を用いて、上記実施例1の「ウェスタンブロット法」の項目に記載の方法に従って行った。

[0097] [表6]

1 次抗体	2 次抗体 (左欄の 1 次抗体に対する抗体)
ラビット抗リン酸化 PKC α (Thr638) 抗体 (ab32502、Abcam 社製、希釈倍率 1:20,000)	HRP 結合抗ラビット IgG (NA934、GE healthcare 社製、希釈倍率 1:3,000)
ラビット抗リン酸化 PKC β I (Thr641) 抗体 (sc-101776、Santa Cruz Biotechnology 社製、希釈倍率 1:1,000)	HRP 結合抗ラビット IgG (NA934、GE healthcare 社製、希釈倍率 1:3,000)
ヤギ抗リン酸化 PKC β II/ δ (Thr660) 抗体 (sc-11760、Santa Cruz Biotechnology 社製、希釈倍率 1:10,000)	HRP 結合抗ヤギ IgG (sc-2020、Santa Cruz Biotechnology 社製、希釈倍率 1:3,000)
ラビット抗 p a n - PKC 抗体 (GTX52352、GeneTex 社製、希釈倍率 1:1,500)	HRP 結合抗ラビット IgG (NA934、GE healthcare 社製、希釈倍率 1:3,000)

[0098] [タイムラプス Ku70 イメージング]

レーザー微小照射及び損傷部位からのシグナル取得は、既知の方法（文献「Nat Commun4, 1816 (2013).」、「Nat Cell Biol 5, 255-260 (2003).」）に従って実施した。U2OS細胞を、2 mLの培養液（DMEM, D5796, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA）を含む35 mmガラス底のディッシュ（D1114 0H, Matsunami Glass IND）に播種し、翌日、LipofectamineLTX（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）により2.5 μ gのEGFP-C1-FLAG-Ku70プラスミド（#46957, Addgene, Watertown, MA, USA）をU2OS細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間目であって、レーザー微小照射及びタイムラプスイメージングの3時間前に、ds-HMGB1（6 ng/mL、0.24 nM）及び／又は本発明のヒトモノクローナル抗体#129（6 ng/mL、0.04 nM）を培地に添加した。U2OS細胞は2 μ M Hoechst33258（DOJINDO, Kumamoto, Japan）で20分間処理し、DSBに感作させた。ステージトップインキュベーター（Tokai Hit, Shizuoka, Japan）で維持したライブセルイメージング条件（37℃、5%CO₂）下で共焦点顕微鏡（FV1200IX83, Olympus, Tokyo, Japan）を用い、405 nmレーザーダイオード（40×対物レンズ、95%, 100 scans, 12.5 units/pixel）で細胞核上の矩形の領域を、レーザー照射した。タイムラプス画像は30秒ごとに10分間取得した。

[0099] [Y-迷路試験]

図22d及び図22eにおいて、Y-迷路試験は、上記実施例1の「認知機能試験」の項目に記載の方法に従って行った。

[0100] 2. 結果

[HMGB1シグナルの遮断は、神経細胞におけるDNA損傷の修復機能を回復させる]

大脳皮質における γ H2AX及び53BP1の発現レベルを、免疫組織化学染色法及びウェスタンブロッティング法を用いて解析した結果、コントロールIgGを皮下投与した5xFADマウスは、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はコントロールIgGを皮下投与したB6/SJLマウスと比べ、 γ H2AX及び53BP1の発現レベルが有意に増加した(図18a及びb)。一方、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を皮下投与した5xFADマウスは、コントロールIgGを皮下投与した5xFADマウスと比べ、 γ H2AX及び53BP1の発現レベルが有意に低下した(図18a及びb)。また、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を静脈内投与した場合も同様に、5xFADマウスの大脳皮質ニューロンにおけるDNA損傷を有意に抑制した(図18c及びd)。

[0101] これらの結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体を5xFADマウスへ投与すると、大脳皮質ニューロンにおけるDNA損傷を抑制できることを示している。一方、ヒトAD患者の頭頂皮質においては、MAP2陽性神経細胞におけるDNA損傷が増加していたことから(図18e)、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体をヒトAD患者へ投与した場合も同様に、大脳皮質ニューロンにおけるDNA損傷を抑制できることが十分期待される。

[0102] Ku70は、非相同末端結合(NHEJ)経路でDSB部位に集合し、DNA損傷修復に関与することが知られている。そこで、TLR4とRAGE受容体を内在的に発現するヒトU2OS細胞において、細胞外HMGB1によるトリガーシグナルが、DSB部位へのKu70の集合にどのような影響

を及ぼすか検証するために、レーザー微量照射後のEGFP-Ku70発現細胞のタイムラプスイメージング解析を行った。まず、U2OS細胞培養に用いるHMGB1濃度を選択するために、ヒトAD患者（ $n=56$ ）の脳脊髄液（CSF）中のHMGB1濃度をELISA法で評価した結果、CSFにおけるHMGB1濃度が $11\text{ pg/mL} \sim 13.7\text{ ng/mL}$ （平均 $=936\text{ pg/mL}$ ）であることを確認した。そこで、このインビトロでの実験においては、 6 ng/mL （ 0.24 nM ）のds-HMGB1を、神経細胞損傷後の神経乳頭空間におけるHMGB1濃度のモデルとして使用した。

[0103] この条件下で、培地へds-HMGB1を添加すると、U2OS細胞のDNA損傷部位においては、EGFP-Ku70の蓄積が有意に遅延した（図18f及びg）。注目すべきことは、レーザー微小照射後に、Ku70のリザーバー領域が枯渇するのに対し（図18f、矢印）、ds-HMGB1の添加により、Ku70のリザーバー領域からKu70がリクルートされることが阻害されることである（図18f）。一方、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を、ds-HMGB1とともに添加すると、DNA損傷部位へのEGFP-Ku70の局在が、ほぼ完全に回復した（図18f及びg）。

[0104] これらの結果を総合すると、5×FADマウスにおいて、投与した本発明のヒトモノクローナル抗体#129がHMGB1シグナルを遮断することにより、神経細胞におけるDNA損傷部位へのKu70の集合が可能となったことを示すとともに、神経細胞におけるDNA損傷の修復機能を回復し、TRIAIDネクロシスの増幅を阻害できることを示している。

[0105] [TRIAIDは老化の細胞死表現型である]

神経変性脳や加齢脳において、老化したグリア細胞及び神経細胞が同定されている（文献「Aging Cell 17, (2018).」、「J. Clin. Invest. 128, 1208-1216 (2018).」、「Nat. Neurosci. 22, 719-728 (2019).」、「Nat. Neurosci. 22, 683-684 (2019).」、「Front. Cell. Neurosci. 14, 1-14 (2020).」、及び「Nat. Rev. Neurosci. 21, 433-444 (2020).」）。細胞老化は、

DNA損傷、SASP/DAMP分泌（特にHMGB1の分泌）、転写変化、アポトーシス耐性（文献「Cell 179, 813-827 (2019).」）などの複数の特徴が、TRADネクロシスの特徴と共通している（文献「Nat. Commun. 11, 1-22 (2020).」、「Sci Rep 6, 31895 (2016).」、「J. Cell Biol. 172, 589-604 (2006).」、「Hum Mol Genet 25, 4749-4770 (2016).」、及び「Cell Death Dis 7, e2207 (2016).」）。

[0106] そこで、TRADと細胞老化の間の同一性を検証した。細胞老化マーカーである核膜タンパク質ラミンB1は、正常マウス（C57BL/6Jマウス）の神経細胞、アストロサイト、及びミクログリアにおいてはリング状に局在したのに対して（図19a、矢印）、2種類のADモデルマウス（5×FADマウス及びAPP-K1マウス）の神経細胞及びアストロサイトの一部においては、リング状のラミンB1の局在が薄くなったり、消失してした（図19a、矢印）。また、かかる2種類のADモデルマウスのミクログリアにおいては、ラミンB1リングの異常な形態は観察されたものの、ラミンB1リング自体、大部分は残っていた（図19a、矢印）。

[0107] 5×FADマウス的大脑皮質を、3種類の抗体（抗YAP抗体、抗pSer46-MARCKS抗体、及び抗ラミンB1抗体）を用いた免疫組織化学染色法により解析すると、ラミンB1リング陰性の老化細胞は、核YAP陰性の場合が多く、TRADと細胞老化の表現型が重なっていることがわかった（図20a、細い白抜き矢印）。TRAD-老化細胞は、初期TRADネクロシスのより大きなpSer46-MARCKS陽性焦点を取り囲んでいた（図20a、太い白矢印）。一方、核YAP陽性細胞は、ラミンB1リングを維持していた（図20a、矢印）。

[0108] また、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を2種類のADモデルマウス（5×FADマウス及びAPP-K1マウス）へ静脈内投与すると、いずれのマウスにおいても、コントロールIgGを上記2種類のADモデルマウスへ静脈内投与した場合と比べ、大脑皮質における老化細胞の数が有意に減少するとともに（図20b）、ニューロン、アストロサイト及びミクログ

リアにおける老化細胞の数が有意に減少した（図19b）。

[0109] これらの結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患や、脳老化及び脳老化に伴う疾患を治療する作用を有することを示している。

[0110] さらに、本発明のヒトモノクローナル抗体#129が、細胞老化に関連したグリア細胞周辺の炎症を治療できるかを検討するために、炎症を調節する転写因子（NF κ B）や炎症性サイトカイン（MCP1及びIL6）を指標として解析を行った。2種類のADモデルマウス（5xFADマウス及びAPP-K1マウス）において、ミクログリア（抗Iba1抗体で検出）におけるNF κ Bの核移行レベルは、正常マウス（B6/SJLマウス又はC57BL/6マウス）と比べ、有意に増加していたのに対して（図21a）、これらADモデルマウスに、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与すると、ミクログリアにおけるNF κ Bの核移行レベルは、有意に減少した（図21a）。また、上記2種類のADモデルマウスにおいて、アストロサイト（抗GFAP抗体で検出）やミクログリア周辺のMCP1及びIL6の発現レベルは、正常マウス（B6/SJLマウス又はC57BL/6マウス）と比べ、増加していたのに対して（図21b）、これらADモデルマウスに、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与すると、アストロサイトやミクログリア周辺のMCP1及びIL6の発現レベルは、有意に減少した（図21b）。

[0111] これらの結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、細胞老化に関連するグリア細胞周辺の炎症を治療できることを示している。

[0112] [HMGB1シグナルの遮断は、DNA損傷とA β 病態の進行を抑制する]

Ku70のタンパク質キナーゼであるPKC α の活性を阻害した場合に、神経細胞におけるDNA損傷の修復機能を回復するかどうかをインビボで検証するために、6週齢（1.5か月）のB6/SJLマウス又は5xFAD

マウスに、PBS（コントロール）又はPKC α 阻害剤（Go6976）を皮下投与し（図22aにおける左図）、大脳皮質における γ H2AX及び53BP1の発現レベルを、免疫組織化学染色法及びウェスタンブロッティング法を用いて解析するとともに、ADの症状が改善するかどうかを、認知機能試験（Y-迷路試験）を用いて解析した。

[0113] 免疫組織化学染色法及びウェスタンブロッティング法を行った結果、PBSを皮下投与した5xFADマウスは、Go6976又はPBSを皮下投与したB6/SJLマウスと比べ、PKC α の活性化の指標である3種類のリン酸化（pThr638-PKC α 、pThr641-PKC β I、及びpSer660-PKC β II/ δ 、）レベルが増加し、Ku70のリン酸化（pSer77/78-Ku70）レベルが増加するとともに、 γ H2AX及び53BP1の発現レベルが有意に増加した（図22b及びc）。一方、Go6976を皮下投与した5xFADマウスは、PBSを皮下投与した5xFADマウスと比べ、上述したPKC α のリン酸化レベルが減少し、上述したKu70のリン酸化レベルが減少するとともに、 γ H2AX及び53BP1の発現レベルが有意に減少した（図22b及びc）。

[0114] また、Y-迷路試験を行った結果、PBSを皮下投与した5xFADマウスは、Go6976又はPBSを皮下投与したB6/SJLマウスと比べ、認知機能が有意に低下した（図22d）。一方、Go6976を皮下投与した5xFADマウスは、PBSを皮下投与した5xFADマウスと比べ、認知機能が有意に改善した（図22d）。

[0115] これらの結果は、5xFADマウスにおいて、Ku70のタンパク質キナーゼであるPKC α の活性を阻害すると、大脳皮質ニューロンにおけるDNA損傷が抑制された結果、認知機能が改善することを示している。

[0116] 次に、PKC α 阻害剤（Go6976）に代えて本発明のヒトモノクローナル抗体#129を投与した場合も5xFADマウスの認知機能が改善するかどうかを検証するために、6か月のB6/SJLマウス又は5xFADマウスに、コントロールIgG若しくは本発明のヒトモノクローナル抗体#12

9を皮下投与し（図22aにおける中央図）、認知機能試験（Y-迷路試験）を用いて解析した。

[0117] その結果、コントロールIgGを皮下投与した5×FADマウスは、コントロールIgGを皮下投与したB6／SJLマウスと比べ、認知機能が有意に低下した（図22e）。一方、本発明のヒトモノクローナル抗体#129を皮下投与した5×FADマウスは、コントロールIgGを皮下投与した5×FADマウスと比べ、認知機能が有意に改善した（図22e）。

[0118] この結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129又はこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体を5×FADマウスへ投与すると、大脳皮質ニューロンにおけるDNA損傷が抑制された結果、認知機能が改善することを示している。

[0119] 我々は最近、ADの超早期段階における大脳皮質神経細胞のYAP依存性一次ネクロシス（文献「Nat. Commun. 11, 1-22 (2020).」）が、TRIA Dと同一であり（文献「J. Cell Biol. 172, 589-604 (2006).」）、その後、隣接した神経細胞において、特徴不明であり、かつ細胞死のゴーストとしての細胞外Aβの凝集を伴う二次ネクロシスが生じることを発見した（文献「Nat. Commun. 11, 1-22 (2020).」）。そこで、5×FADマウスにおいて、PKCα阻害剤（Go6976）と本発明のヒトモノクローナル抗体#129が、この2種類のネクロシスと細胞外Aβの凝集に対して、どのように影響を及ぼすかを検証するために、6週齢（1.5か月）のB6／SJLマウス又は5×FADマウスに、PBS又はPKCα阻害剤（Go6976）を皮下投与するとともに（図22aにおける左図）、6か月のB6／SJLマウス又は5×FADマウスに、コントロールIgG若しくは本発明のヒトモノクローナル抗体#129を皮下投与（図22aにおける中央図）又は静脈内投与（図22aにおける右図）し、抗pSer46-MARKS抗体及び抗Aβ抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した。

[0120] その結果、5×FADマウスに、Go6976及び本発明のヒトモノクローナル抗体#129のいずれを投与した場合においても、コントロールのPB

S又はコントロールIgGを投与した場合と比べ、二次ネクロシス、A β の中心的沈着を取り囲むネクロシス神経細胞のクラスター、及び細胞外A β の凝集が有意に減少した（図22f）。

[0121] この結果は、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、ネクロシスを抑制する作用を有するとともに、HMGB1誘導性のDNA損傷を基盤とするTRADネクロシスの相互増幅を阻害する作用を有することを示している。

[0122] [考察]

特許文献3には、抗dsHMGB1ヒトモノクローナル抗体である本発明のヒトモノクローナル抗体#129が、YAP減少を伴うニューロンにおけるネクロシス（TRAD）を阻止する作用があることを示している。また、前述の本実施例1には、本発明のヒトモノクローナル抗体#129が、MARCKSリン酸化を伴う神経突起の損傷の予防・改善効果を有することが示されている。これらの治療的作用の背景となる病態として、TRADネクロシスの増幅（あるいは伝播）がある。ニューロンがTRADネクロシスを起こすと、ニューロンは、dsHMGB1を含むHMGB1を放出する。dsHMGB1がTLR4及びRAGEとの結合を介して、PKC ϵ 系を活性化し、MARCKSをリン酸化することに加えて（文献「2016 Aug 25;6:31895. doi:10.1038/srep31895.」）、今回、活性化PKCがKu70をリン酸化して、そのDNA損傷修復機能を低下させることが明らかになった（本実施例2の図18）。さらに、本発明のヒトモノクローナル抗体#129は、神経細胞におけるTRADネクロシスを抑制するとともに、HMGB1誘導性のDNA損傷を基盤とするTRADネクロシスの相互増幅を阻害することが、今回明らかになった（本実施例2の図18及び22）。

[0123] 本実施例1において、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、FTLD-ALSモデルマウスに対して治療効果を発揮することが示された。このFTLD-ALSモデルマ

ウスが有するVCP^{T262A}変異、PGRN^{R504X}変異、CHMP2B^{Q165X}変異、及びTDP43^{N267S}変異は、FTLDのみならず、ALSの原因となることが知られているとともに、FTLDとALSは同一の疾患スペクトラムとしてこの分野では理解されている（例えば、以下の文献1～13）。さらに、FTLDやALSを含む神経変性疾患の大多数の患者（孤発例）は、単一の原因遺伝子変異を持たない（あるいは複数のリスク遺伝子を有する）ヘテロな集団であり、既存治療薬の有効性も患者個々によって異なるという課題がある。本発明におけるHMGB1に対するヒトモノクローナル抗体は、本実施例で示すように様々な原因によって生じうる病態に対して一様な効果を示しており、家族性神経変性疾患のみならず孤発性神経変性疾患を含む、より多くの患者に対する治療薬として開発されうる。

[0124] 文献1 : Janssens J and Broeckhoven CV, Pathological mechanisms underlying TDP-43 driven neurodegeneration in FTLD-ALS spectrum disorders, Human Molecular Genetics, Volume 22, Issue R1, 15 October 2013, Pages R77-R87,

文献2 : Schymick JC, Yang Y, Andersen PM, et al. Progranulin mutations and amyotrophic lateral sclerosis or amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia phenotypes. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007;78(7):754-756. doi:10.1136/jnnp.2006.109553

文献3 : Sleegers K et al, Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 2008, 71 (4) 253-259; DOI : 10.1212/01.wnl.0000289191.54852.75

文献4 : Scarian E et al, The Role of VCP Mutations in the Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia. 2022 Front. Neurol. doi: 10.3389/fneur.2022.841394

文献5 : Sreedharan J et al, TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Science 2008 Vol 319, Issue 5870 pp. 1668-1672

文献 6 : Kabashi E et al, TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):572-4.

文献 7 : Williams K et al, A novel TARDBP mutation in an Australian amyotrophic lateral sclerosis kindred. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009 Nov;80(11):1286-8.

文献 8 : Parkinson N et al, ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B) *Neurology* 2006 Sep 26;67(6):1074-7.

文献 9 : Cox LE et al. (2010) Mutations in CHMP2B in Lower Motor Neuron Predominant Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *PLoS ONE* 5(3): e9872 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009872>

文献 10 : Waegaert R et al. Longitudinal transcriptomic analysis of altered pathways in a CHMP2B^{intron5}-based model of ALS-FTD. *Neurobiol Dis.* 2020 Mar;136:104710. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104710. Epub 2019 Dec 16 . PMID: 31837425

文献 11 : Vernay A et al, A transgenic mouse expressing CHMP2B intron 5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 2016 Aug 1;25(15):3341-3360. doi: 10.1093/hmg/ddw182. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27329763

文献 12 : Ugbo C, West RJH. Lessons learned from CHMP2B, implications for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2021 Jan;147:105144. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105144. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33144171 Review.

文献 13 : Blair IP et al. FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 Jun;81(6):639-45. doi:10.1136/jnnp

p. 2009.194399. Epub 2009 Dec 3. PMID: 19965854

[0125] 一方、YAP減少を伴うネクロシス（TRIAD）は、AD及びFTLDの他に、ハンチントン病（HD）マウス（文献「Mao et al, Hum Mol Genet 2016」）や、ヒトHD患者（文献「Yamanishi et al, Acta Neuropathol Commun 2017」）でもその存在が確認され、筋萎縮性側索硬化症（ALS）のモデルマウスである変異SOD1トランスジェニックマウスでは運動ニューロンの減少が確認されている（文献「Morimoto et al, J Neurosci Res 2009」）。TRIADのもう一つの特徴であるリン酸化MARCKSの増加について、また、ヒトALS患者の髄液や血清においてリン酸化MARCKSの量が増加していることが示されている（文献「Homma et al, Life Sci Alliance 2021」）。さらに、MARCKSリン酸化の亢進は、パーキンソン病（PD）モデルマウス（A53T Bacc Tgマウス）において認められている（文献「Fujita et al, eNeuro 2018」）。

[0126] また、本発明のヒトモノクローナル抗体#129は、本実施例1に示すとおり、FTLD-ALSモデルマウス4種類における大脳皮質ニューロンのTDP43凝集体を減少する作用を有する。したがって、本発明のヒトモノクローナル抗体#129は、TDP43凝集を伴うALS等の変性疾患に対する抑制効果を有することが十分期待される。

[0127] さらには、DNA損傷修復機能の低下は、今日では変性疾患の共通病態として認知されている（文献「McKinnon Nature Neurosci 2013」、文献「Madabhushi et al, Neuron 2014」）。

以上のことから、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体は、ALS、PD、HDを含む変性疾患一般に対して治療効果を発揮することが十分期待される。

[0128] また、DNA損傷が加齢の原因として知られることや、本発明のヒトモノクローナル抗体#129が、2種類のADモデルマウス（5×FADマウス及びAPP-K1マウス）の大脳皮質における老化細胞の数を減少させるとともに、ニューロン、アストロサイト、及びミクログリアの細胞老化を抑制

することから(本実施例2の図19及び20)、本発明のヒトモノクローナル抗体#129及びこれと共通のCDRを有する抗HMGB1抗体が、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患や、脳老化及び脳老化に伴う疾患を治療する作用を有することが確認された。

実施例 3

[0129] 1. 材料と方法

[各種疾患モデルマウス]

ハンチントン病モデルマウスとして、R6/2マウス(文献1)を用いた。パーキンソン病モデルマウスとして、 α -synuclein A53Tマウス(文献2)を用いた。筋萎縮性側索硬化症モデルマウスとして、SOD1-Tgマウス(文献3)を用いた。脊髄小脳失調症モデルマウスとして、変異ataxin-1ノックインマウス(文献4)を用いた。老化モデルマウスとして、12ヶ月齢のC57BL/6マウスを用いた。

[0130] [抗体投与]

各種疾患モデルマウスに対して、表7に示す投与期間、2週間に1回の頻度で、体重30g当たり6 μ g(0.2mg/kg BWに相当する)に生理食塩水で調整したヒトモノクローナル抗体#129又は抗体を含まない同量の生理食塩水を尾静脈内投与した。また、正常対照群として、正常遺伝子型兄弟マウスに対して同量の生理食塩水を尾静脈内投与した。

2回目の投与後に運動機能改善が明確でなかったハンチントン病モデルマウスと筋萎縮性側索硬化症モデルマウスについては、3回目の投与から体重30g当たり60 μ g(2mg/kg BWに相当する)に増量した。

また、老化モデルマウスに対する実験においては、体重30g当たり6 μ g(0.2mg/kg BWに相当する)を4週間に1回の間隔で静脈投与した。

[0131]

[表7]

	R6/2 マウス	α -synuclein A53Tマウス	SOD1-Tg マウス	変異ataxin-1 ノックインマウス	老化マウス
抗体の投与期間	6 ～ 1 2週齢	8 ～ 18週齢	6 ～ 20週 齢	8 ～ 18週齢	12 ～ 19 月齢
ロータロッド試 験期間	6 ～ 1 4週齢	8 ～ 20週齢	6 ～ 22週 齢	8 ～ 20週齢	—
オープンフィー ルド試験期間	6 ～ 1 4週齢	8 ～ 20週齢	6 ～ 22週 齢	—	—
フットプリント 試験期間	6 ～ 1 4週齢	8 ～ 20週齢	6 ～ 22週 齢	8 ～ 20週齢	—
Yー迷路試験	—	—	—	—	12 ～ 20 月齢

[0132] [改変抗体]

ヒトモノクローナル抗体#129の軽鎖CDR3には、糖鎖修飾を受ける可能性の高いアミノ酸配列があると考え、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス（SOD1-Tgマウス）及び老化モデルマウスに対しての抗体投与実験では、ヒトモノクローナル抗体#129に代えて、後述する実施例4で使用した軽鎖CDR3のアミノ酸配列改変体であるヒトモノクローナル抗体#129-L2を投与した。ヒトモノクローナル抗体#129とヒトモノクローナル抗体#129-L2の軽鎖可変領域アミノ酸配列のアラインメントは、図25に示すとおりである。ヒトモノクローナル抗体#129抗体及びヒトモノクローナル抗体#129-L2抗体を用いて、表面プラズモン共鳴法（Surface plasmon resonance：SPR）により、ヒトdsHMGB1に対する結合を検討した結果、ヒトモノクローナル抗体#129抗体及びヒトモノクローナル抗体#129-L2抗体のヒトdsHMGB1に対する解離定数（ K_D ）は、それぞれ 1.47×10^{-11} 及び 1.44×10^{-11} となり、両者はほぼ同等の結合力を有することを確認した。

[0133] [運動機能試験]

各種疾患モデルマウス及び正常遺伝子型兄弟マウスに対して、表7に示す各試験期間に、4種類の運動機能試験（ロータロッド試験、オープンフィールド試験、フットプリント試験、及びYー迷路試験）のうち、3種類の運動

機能試験（ロータロッド試験、オープンフィールド試験、及びフットプリント試験）については、以下の文献5～7に記載の方法に従って行った。具体的には、ロータロッド試験においては、マウスを回転ロッド（3.5 rpm）上に置き、300秒で回転速度を35 rpmまで直線的に増加させ、360秒まで35 rpmで継続した。マウスは、試行間に30～60分の休憩間隔を設けて12回の試行（連続3日間、1日あたり4回の試行）を受けた。マウスがロッドから落下するまでの時間を各試行において記録した。ロータロッドから落下するまでの平均時間を計算し、その後の分析に使用した。また、オープンフィールド試験においては、マウスをオープンフィールド空間（50 cm×50 cm×40 cm [高さ]）の中心に置き、10分間探索させた。光強度はフィールドの中心で70ルクスであった。指標としては、移動距離（cm）を採用した。また、フットプリント試験においては、歩行パターンを比較するために歩行中の足跡を記録した。後足を青インクで覆い、前足を赤インクで覆い、密閉箱までの滑走路となる長さ40 cm、幅7.5 cmの通路に置いた。走行ごとに通路床の白紙を貼り替えた。フットプリントパターンは、以下の文献8に記載されているフットプリントパターンのパラメータ：ストライド（歩幅）を測定した。また、Y-迷路試験については、実施例1に記載の方法に従って行った。

[0134] [免疫組織化学染色法]

各種月齢の疾患モデルマウス又は正常遺伝子型兄弟マウスからそれぞれ脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドを含むPBS中で12時間固定処理を行った後、ミクロトーム（大和光機工業社製）を用いて5 μm厚の脳組織パラフィン切片を作製した。作製した脳組織パラフィン切片を、キシレンを用いて脱パラフィン処理を行い、0.01 Mのクエン酸緩衝液（pH 6.0）に浸けて再水和処理を行った後、120℃で15分間加熱処理を行った。その後、0.5%のtriton-X100を含むPBS中で透過処理を行い、10%のFBSを含むPBS中で60分間、ブロッキング処理を行った。その後、17種類のタンパク質（pSer46-MARCKS、γH2AX、53BP1

、リン酸化TDP43 [Ser409/410] [pSer409/410-TDP43]、ユビキチン、KDEL、MAP2、リン酸化タウ [Ser396]、Huntingtin、Calbindin、 α -シヌクレイン、GFAP、Iba1、LaminB1、Ataxin-1、YAP、SOD1を検出する各種1次抗体（表8）を用いた抗体反応を、4℃で12時間行った。PBSで3回洗浄後、各種1次抗体に対する2次抗体（表8）を用いた抗体反応を、室温で1時間行い、PBSで3回洗浄後、0.2 μ g/mLのDAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）を含むPBS中で、細胞核を染色し、共焦点顕微鏡（FV1200IX83、Olympus社製）を用い、上記17種類のタンパク質由来の蛍光画像と、細胞核由来の蛍光画像を取得した。その後、DAPI蛍光画像を基に、大脳皮質については143 μ m $\times$ 143 μ mの領域当たりの、それぞれの図の説明に記載した条件に該当する細胞数（個）を算出した。また、pSer46-MARCKS蛍光画像、 γ H2AX蛍光画像、53BP1蛍光画像、及びKDEL蛍光画像については関心領域のシグナル値を測定した。

[0135]

[表8]

1 次抗体	2 次抗体 (左蘭の 1 次抗体に対する抗体)
ラビット抗 p S e r 4 6 -M A R C K S 抗体 (GL Biochem社製、希釈倍率1:300)	Zenon 568 Rabbit IgG Labeling Kits (Z25306、Invitrogen社製)
マウス抗 γ H 2 A X 抗体 (Ser139、#05-636、Millipore社製、希釈倍率1:500)	C y 3 標識抗マウス I g G、(715-165-150、Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500)
ラビット抗 5 3 B P 1 抗体 (NB100-304、Novus Biologicals社製、希釈倍率1:20,000)	Alexa647 標識抗ラビット I g G、(A31573、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000)
ラビット抗リン酸化 T D P 4 3 (Ser409/410) 抗体 (TIP-PTD-P02、コスモ・バイオ社製、希釈倍率1:500)	Alexa568 標識抗ラビット I g G、(A10042、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000)
マウス抗ユビキチン (Ub) 抗体488-conjugated (CL488-10201、proteintech社製、希釈倍率1:100)	なし
マウス抗Huntingtin (Htt) 抗体 (MAB5374、Sigma Aldrich社製、希釈倍率1:100)	C y 3 標識抗マウス I g G、(715-165-150、Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500)
マウス抗K D E L 抗体 (ADI-SPA-827、Enzo Life Science社製、希釈倍率1:200)	C y 3 標識抗マウス I g G、(715-165-150、Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500)
ラビット抗 M A P 2 抗体647-conjugated (ab225315、Abcam、希釈倍率1:100)	なし
マウス抗M A P 2 抗体488-conjugated(ab225316、Abcam社製、希釈倍率1:300)	なし
ラビット抗Calbindin抗体 (ab108404、Abcam社製、希釈倍率1:1000)	Alexa488 標識抗ラビット I g G、(A21206、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000)
マウス抗リン酸化 α -シヌクレイン抗体 (Ser129、015-25191、富士フイルム和光純薬社製、希釈倍率1:2,000)	C y 3 標識抗マウス I g G、(715-165-150、Jackson Laboratory社製、希釈倍率1:500)
ラビット抗リン酸化タウ (Ser396) 抗体 (ab109390、Abcam社製、希釈倍率1:200)	Alexa568 標識抗ラビット I g G (A10042、Molecular Probes社製、希釈倍率1:1000)
マウス抗GFAP抗体Cy3-conjugated (C9205、Sigma社製、1:100)	なし

[0136] [ウェスタンブロット法]

各種月齢の疾患モデルマウス及び正常遺伝子型兄弟マウスの大脳皮質組織、脊髄小脳失調症モデルマウス及びそのバックグラウンドマウスの小脳組織を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (#539134、Calbiochem社製、希釈倍率 1 : 100) を含む溶解バッファー (100 mMの T r i s - H C l [p H 7. 5]、2%の S D S) の存在下で、4℃で1時間溶解処理を行った。遠心分離 (12,000 g × 10 分間) 後、上清を回収し、同量のサンプルバッファー (125 mMの T r i s - H C l、p H 6. 8、4% [w/v] の S D

S、12% [v/v] の2-メルカプトエタノール、20% [v/v] のグリセロール、及び0.005% [w/v] のブロモフェノールブルー) を添加した。その後、SDS-PAGEによりタンパク質試料を分離した後、セミドライ法によりPVDF (Poly Vinylidene Di-Fluoride) メンブレン (Immobilon-P [Millipore社製]) に転写し、5%のスkimミルクを含むTBST (10mMのTris-HCl [pH8.0]、150mMのNaCl、0.05%のTween20) 液中でブロッキング処理した後、0.1%のスkimミルク又はCan Get Signal溶液 (東洋紡、大阪、日本) を含むTBST液中で、9種類のタンパク質 (リン酸化PKC α [Ser319] [pSer319-PKC α]、リン酸化タウ [Ser203 (マウス) /Ser214 (ヒト)] [pSer203-タウ]、リン酸化タウ [Ser384 (マウス) /Ser396 (ヒト)] [pSer384-タウ]、リン酸化 γ H2AX [Ser139] [pSer139- γ H2AX]、53BP1、リン酸化TDP43 [Ser409/410] [pSer409/410-TDP43]、pSer46-MARCKS、ユビキチン、及び β -アクチン) を検出する各種1次抗体 (表9) を用いた抗体反応を、4℃で12時間行った。メンブレンをTBST液で3回洗浄した後、各種1次抗体に対する2次抗体 (表9) を用いた抗体反応を、室温で1時間行った。その後、ECL Prime ウェスタンブロッティング検出試薬 (RPN2235、Cytiva社製) 及びルミネセンスイメージアナライザー (ImageQuant LAS 500、GE healthcare社製) を用いて、上記9種類のタンパク質を検出した。

[0137]

[表9]

1次抗体	2次抗体（左欄の1次抗体に対する抗体）
ラビット抗リン酸化PKC α (Thr638) 抗体 (ab32502、Abcam社製、希釈倍率1:5,000)	HRP結合抗ラビットIgG (NA934、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化タウ (Ser203/Ser214)、(ab170892、Abcam社製、希釈倍率1:20,000)	HRP結合抗ラビットIgG (NA934、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化タウ (S384/S396)、(ab109390、Abcam社製、希釈倍率1:5,000)	HRP結合抗ラビットIgG (NA934、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
マウス抗リン酸化 γ H2AX抗体 (Ser139、#05-636、Millipore社製、希釈倍率1:2,000)	HRP結合抗マウスIgG (NA931、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗53BP1抗体 (NB100-304、Novus Biologicals社製、希釈倍率1:20,000)	HRP結合抗ラビットIgG (NA934、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗リン酸化TDP43 (Ser409/410) 抗体 (TIP-PTD-P02、コスモ・バイオ社製、希釈倍率1:3,000)	HRP結合抗ラビットIgG (NA934、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
ラビット抗pSer46-MARKS (GL Biochem社製、希釈倍率1:20,000)	HRP結合抗ラビットIgG (NA934、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
マウス抗ユビキチン抗体 (3936、Cell signaling technology社製、希釈倍率1:50,000)	HRP結合抗マウスIgG (NA931、Cytiva社製、希釈倍率1:3,000)
マウス抗 β -actin抗体 (sc-47778、Santa Cruz Biotechnology社製、希釈倍率1:1,000)	HRP結合抗マウスIgG (NA931、Cytiva社製、希釈倍率1:1,000)

[0138] 2. 結果

[ハンチントン病モデルマウス]

ハンチントン病モデルマウスは、前述した「1. 材料と方法」に示すとおり、発症後のR6/2マウス（文献1）を使用して実験を行い、2週間に1回の静脈内投与を行った（図23A）。投与開始時期の6週齢において、ロータロッド試験は、R6/2マウスの運動機能低下を示した。前述した「1. 材料と方法」に示すとおり、体重30g当たり6 μ g（0.2mg/kg BWに相当する）のヒトモノクローナル抗体#129を2回行った後のロータロッド試験において、運動機能の改善が明確でなかったため、3回目の投与から体重30g当たり60 μ g（2mg/kg BWに相当する）に増量した。この結果、2回の6 μ g静脈投与と2回の60 μ gの計4回の静脈投与を行った後の14週齢の時点で、正常マウスと生理食塩水投与R6/2マウスの間では、ロータロッド試験の滞在時間に有意な差があるのに対し、正常マウスとヒトモノクローナル抗体#129投与R6/2マウスの間では有

意差が消失した（図 2 3 B）。しかし、生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスとヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与 R 6 / 2 マウスの間では有意差は認めなかった（図 2 3 B）。一方、14 週齢の時点で、オープンフィールド試験では、正常マウスと生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスの間の比較に加えて、生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスとヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与 R 6 / 2 マウスの間の比較でも、総歩行距離に顕著な有意差を認めた（図 2 3 C）。さらに、14 週齢の時点で、フットプリント試験において、正常マウスと生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスの間の比較に加えて、生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスとヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与 R 6 / 2 マウスの間の比較で、ストライド（歩幅）に顕著な有意差を認めた（図 2 3 D）。

[0139] 次に、14 週齢において、運動機能解析後の生理食塩水投与正常マウス、生理食塩水投与 R 6 / 2 マウス、及びヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与 R 6 / 2 マウスの 3 群（すなわち、「ハンチントン病モデルマウス解析用 3 群」）のマウスから脳組織をサンプリングして、病理学的解析を行った。免疫組織化学染色法において、H t t、U b、及び M A P 2 の 3 重染色を行ったところ、生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスでは、M A P 2 陽性の脳神経細胞に U b 陽性の H t t 核内封入体を認めた（図 2 4 A）。同様の H t t 核内封入体は、生理食塩水投与の有無にかかわらず、R 6 / 2 マウスにおいて、これまで広く認められてきた所見である（文献 1）。一方、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与 R 6 / 2 マウスにおいては、U b 陽性の H t t 核内封入体が顕著に減少していることが確認された（図 2 4 A）。また、大脳皮質の M A P 2 陽性神経細胞数を測定すると、正常マウスに対して生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスでは減少を示していたのに対して、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与 R 6 / 2 マウスでは生理食塩水投与 R 6 / 2 マウスからの回復が認められた（図 2 4 B）。一方、ミクログリアとアストロサイトの細胞数については、I b a 1 と G F A P の免疫染色によって検討を行ったが、14 週の時点で正常と R 6 / 2 マウスの間に有意差はなく、また、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与によって R 6 / 2 マウスのミクログリア細胞数と

アストロサイト細胞数に変化は見られなかった（図24C及びD）。

[0140] 同様な検討を線条体についても行ったところ、ヒトモノクローナル抗体#129投与によって、R6/2マウスの線条体におけるUb陽性のHtt核内封入体が顕著に抑制されていた（図25A）。また、線条体のMAP2陽性神経細胞数を測定すると、正常マウスに対して生理食塩水投与R6/2マウスでは減少を示していたのに対して、ヒトモノクローナル抗体#129投与R6/2マウスでは生理食塩水投与R6/2マウスからの回復が認められた（図25B）。一方、ミクログリアとアストロサイトの細胞数については、Iba1とGFAPの免疫染色によって検討を行ったが、14週の時点で正常とR6/2マウスの間に有意差はなく、また、ヒトモノクローナル抗体#129投与によってR6/2マウスのミクログリア細胞数とアストロサイト細胞数に変化は見られなかった（図25C及びD）。

[0141] TRIADと呼ばれる神経細胞ネクロシスがHMGB1を放出すること（文献9、文献10）や、放出されたHMGB1が周辺の神経細胞のTRIADネクロシスを誘発すること（文献11）が知られている。一方、TRIADネクロシスのマーカーとして、細胞体pSer46-MARCKSの陽性化（文献9～11）と、核内YAPの減少（文献10～13）が知られている。そこで、YAP、pSer46-MARCKS、及びDAPIの3重染色を行ったところ、生理食塩水投与R6/2マウスにおいて、pSer46-MARCKS陽性化と核内YAP減少を示すTRIADネクロシスが増加していた（図26A）。これに対して、ヒトモノクローナル抗体#129投与R6/2マウスでは、TRIADネクロシス神経細胞数が生理食塩水投与R6/2マウスより回復していることが認められた（図26A）。また、TRIADの際には小胞体の異常拡張が起きることが知られている（文献10～13）。そこで、小胞体マーカーであるKDELに対する免疫染色を行ったところ、生理食塩水投与R6/2マウスにおいてKDEL異常染色像を示す神経細胞が増加していた（図26B）。一方、ヒトモノクローナル抗体#129投与R6/2マウスでは、KDEL異常染色像を示す神経

細胞が減少していた（図 26 B）。

[0142] また、ハンチントン病を初めとする神経変性疾患病態においては、神経細胞の DNA 損傷増加が知られている（文献 14、文献 15）。そこで、DNA 損傷マーカーである 53BP1 と γ H2AX を用いて、MAP2 及び DAPI との 4 重染色により、大脳皮質における神経細胞の DNA 損傷を測定した。その結果、神経細胞の DNA 損傷が R6/2 マウスでは正常マウスに対して増加していること、そして、ヒトモノクローナル抗体 #129 投与によって、DNA 損傷を有する神経細胞数が抑制されることが示された（図 26 C）。

[0143] 同様な免疫組織化学的検討を線条体についても行った結果、線条体においてもヒトモノクローナル抗体 #129 投与が R6/2 マウスにおける TR1AD ネクロシス増加を顕著に抑制すること（図 27 A）、KDEL 異常染色像増加を顕著に抑制すること（図 27 B）、DNA 損傷含有神経細胞増加を顕著に抑制すること（図 27 C）を確認した。

[0144] 次に、病理学解析結果の再確認を行うために、14 週齢のハンチントン病モデルマウス解析用 3 群のマウス脳組織サンプルについて、生化学的解析を行った。具体的には、ウェスタンブロットによって、pSer46-MARKS、53BP1、 γ H2AX、Ub、及び pSer203-Tau のタンパク量を比較すると、これらの変性病態マーカー分子の全てが、正常マウスに対して R6/2 マウスでは増加していることや、ヒトモノクローナル抗体 #129 投与によって、R6/2 マウスにおける、これら増加した変性病態マーカー分子が、正常化レベルまで減少することが示された（図 28）。

[0145] 以上の結果は、ヒトモノクローナル抗体 #129 が、ハンチントン病（HD）病態における病態変化及び細胞死を抑制し、運動機能低下を抑制する作用を有することを示している。

[0146] [パーキンソン病モデルマウス]

パーキンソン病モデルマウスは、前述した「1. 材料と方法」に示すとおり、発症後の α -synuclein A53T マウス（文献 2）を使用して実験を行

い、2週間に1回の静脈内投与を行った(図29A)。8週齢から18週齢にかけて2週間に一回の間隔で、体重30g当たり6 μ g(0.2mg/kg BWに相当する)のヒトモノクローナル抗体#129を計6回の投与した(図29A)。投与開始時期の8週齢において、ロータロッド試験は、 α -synuclein A53Tマウスは過活動を示し(図29B)、すでにパーキンソン病を発症していることを示している。計3回の投与を行った後の12週齢の時点及び計6回の投与を行った後の20週齢の時点で、 α -synuclein A53Tマウスの過活動が2日目(Day 2)で有意差をもって抑制された(図29B)。同様に、20週齢時点のオープンフィールド試験において、正常マウスに比較して生理食塩水投与 α -synuclein A53Tマウスでは総移動距離が増加し、 α -synuclein A53Tマウスの過活動を意味していたが、ヒトモノクローナル抗体#129投与によって総移動距離が抑制され(図29C)、症状の改善が示めされた。一方、20週齢時点のフットプリン ト試験において、生理食塩水投与正常マウス、生理食塩水投与 α -synuclein A53Tマウス、及びヒトモノクローナル抗体#129投与 α -synuclein A53Tマウスの3群(すなわち、「パーキンソン病モデルマウス解析用3群」)間の比較において、ストライド(歩幅)に有意差はなく、歩行障害の症状は出現していないことを意味していた(図29D)。このことは、本実施例で使用したパーキンソン病モデルマウスは、発症後早期に相当することを意味している。

[0147] 次に、20週齢において、運動機能解析後のパーキンソン病モデルマウス解析用3群のマウスから脳組織をサンプリングして、病理学的解析を行った。免疫組織化学染色法において、pSer129-Syn、Ub、MAP2、及びDAPIの4重染色を行ったところ、生理食塩水投与 α -synuclein A53Tマウスでは、MAP2陽性大脳神経細胞の細胞質に、Ub陽性タンパク質の増加と細胞核内のpSer129-Synの増加を認めた(図30A)。一方pSer129-SynとUbの陽性所見は、ヒトモノクローナル抗体#129投与によって正常化した(図30A)。MAP2免疫組織染

色においては、大脳皮質の神経細胞（ニューロン数）が α -synuclein A53 Tマウスでは減少していたが、ヒトモノクローナル抗体#129投与 α -synuclein A53 Tマウスでは、正常化していた（図30B）。一方、 α -synuclein A53 Tマウスでは、Iba1陽性のミクログリアとGFAP陽性のアストロサイトに細胞数の変化はなく、また、ヒトモノクローナル抗体#129投与によっても細胞数の変化はなかった（図30C及びD）。

[0148] 次に、TRIA Dと呼ばれる神経細胞ネクロシス（文献12）について検討した。前述のとおり、TRIA DがHMGB1を放出すること（文献9、文献10）や、放出されたHMGB1が周辺の神経細胞のTRIA Dネクロシスを誘発すること（文献11）が知られている。また、別のパーキンソン病モデルマウスの免疫組織化学染色法において、pSer46-MARCKSが神経細胞に染色される所見が報告されている（文献16）。そこで、YAP、pSer46-MARCKS、及びDAPIの3重染色を行ったところ、生理食塩水投与 α -synuclein A53 Tマウスの大脳皮質において、生理食塩水投与正常マウスに比較して、pSer46-MARCKS陽性化と核内YAP減少を示すTRIA Dネクロシスが増加していた（図31A）。これに対して、ヒトモノクローナル抗体#129投与 α -synuclein A53 Tマウスでは、生理食塩水投与 α -synuclein A53 Tマウスより、TRIA Dネクロシス神経細胞数が顕著に減少していた（図31A）。また、TRIA Dは、小胞体異常拡張を伴うことが知られているため（文献12、文献13）、小胞体マーカーであるKDELに対する免疫染色を行ったところ、生理食塩水投与 α -synuclein A53 TマウスにおいてKDEL異常染色像を示す神経細胞が増加していた（図30B）。一方、ヒトモノクローナル抗体#129を投与した α -synuclein A53 Tマウスでは、KDEL異常染色像を示す神経細胞が正常化していた（図30B）。

[0149] また、DNA損傷マーカーである53BP1と γ H2AXを用いて、MAP2及びDAPIとの4重染色により、神経細胞のDNA損傷を大脳皮質において測定した。その結果、神経細胞のDNA損傷が α -synuclein A53 T

マウスでは正常マウスに対して増加していることや、ヒトモノクローナル抗体 # 129 投与によって DNA 損傷が抑制されることが示された (図 30C)。

[0150] 次に、病理学解析結果の再確認を行うために、20週齢のパーキンソン病モデルマウス解析用3群のマウス脳組織サンプルの生化学的解析を行って、病理学解析結果の再確認を行った。ウェスタンブロットによって、5種類のタンパク質 (pSer46-MARCKS、53BP1、 γ H2AX、Ub、及び pSer203-Tau) を比較すると、これら5種類のタンパク質全てが、正常マウスに対して α -synuclein A53Tマウスでは増加していることや、ヒトモノクローナル抗体 # 129 投与によって、 α -synuclein A53Tマウスにおける、これら増加した5種類のタンパク質が、正常化レベルまで減少することが示された (図 32)。

[0151] 以上の結果は、ヒトモノクローナル抗体 # 129 が、パーキンソン病 (PD) 病態における病態変化及び細胞死を抑制し、運動機能低下を抑制する作用を有することを示している。

[0152] [筋萎縮性側索硬化症モデルマウス]

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスは、前述した「1. 材料と方法」に示すとおり、発症後の SOD1-Tgマウス (文献3) を使用して実験を行い、2週間に1回の静脈内投与を行った (図 33A)。6週齢から9週齢にかけて2週間に一回の間隔で、体重30g当たり $6\mu\text{g}$ ($0.2\text{mg}/\text{kg BW}$ に相当する) のヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 を計2回の投与した (図 33A)。6週齢の SOD1-Tgマウスにおいて、投与開始直前のロータロッド試験から運動機能低下が示されおり (図 33B)、SOD1-Tgマウスがすでに筋萎縮性側索硬化症を発症していること示していた。10週齢までにロータロッド試験で有意差を示す改善が認められなかったため、10週齢における3回目の投与から20週齢における8回目の投与まで、投与量を体重30g当たり $60\mu\text{g}$ ($2\text{mg}/\text{kg BW}$ に相当する) に増量した。

- [0153] ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 投与の結果、22週齢の時点で、S O D 1 - T g マウスのロータロッド滞在時間は正常マウスに比較して有意に減少していたが、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 投与によって、有意差をもって抑制された（図 3 3 B）。
- [0154] 同様に、22週齢時点のオープンフィールド試験において、正常マウスに比較して生理食塩水投与 S O D 1 - T g マウスでは総移動距離が減少しており運動機能低下を意味していたが、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 投与によって総移動距離が増加し（図 3 3 C）、症状の改善が示めされた。また、22週齢時点のフットプリント試験において、正常マウスと生理食塩水投与 S O D 1 - T g マウスの比較において、ストライド（歩幅）の減少を認めたが、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 投与によってストライドが増加して（図 3 3 C）、運動機能低下の症状改善が示めされた（図 3 3 D）。
- [0155] 次に、22週齢において、運動機能解析後の生理食塩水投与正常マウス、生理食塩水投与 S O D 1 - T g マウス、及びヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 投与 S O D 1 - T g マウスの3群（すなわち、「筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用3群」）のマウスから脳組織をサンプリングして、病理学的解析を行った。免疫組織化学染色法において、U b、S O D 1、M A P 2、及びD A P Iの4重染色を行ったところ、S O D 1 - T g マウスの脊髓前角大型ニューロンにS O D 1及びU bの染色シグナル上昇があり、一部は封入体様の形態を示した。このような病的形態は、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 投与によって、ほとんど消失した（図 3 4 A）。また、U b、p S e r 3 9 6 - T a u、M A P 2、及びD A P Iの4重染色では、S O D 1 - T g マウスの脊髓前角大型ニューロンにU bとp S e r 3 9 6 - T a uの細胞質内での共局在が見られたが、これもヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 投与によって、ほとんど消失した（図 3 4 B）。また、U b、p T D P 4 3、M A P 2、及びD A P Iの4重染色では、p T D P 4 3の細胞質への移行はほとんど認められなかったが、U bの細胞質封入体に淡いp

TDP43の染色性が認められた(図34C)。このようなユビキチン陽性細胞質封入体を有するMAP2陽性神経細胞数を腰髄において測定したところ、いずれの4重染色においても、正常マウスに比較してSOD1-Tgマウスでは顕著に増加していたが、ヒトモノクローナル抗体#129-L2投与によって顕著に抑制されていた(図34A~C)。SOD1-TgマウスにおけるTDP43凝集体についての検討はほとんどなく定説はない。しかし、ヒトのSOD変異を伴う筋萎縮性側索硬化症(ALS)の患者病理においても、明確なTDP43陽性封入体はほとんど認められておらず(文献17)、上記の所見に合致している。

[0156] 次に、TRADと呼ばれる神経細胞ネクロシス(文献12)について検討した。前述のとおり、TRADがHMGB1を放出すること(文献9、文献10)や、放出されたHMGB1が周辺の神経細胞のTRADネクロシスを誘発すること(文献11)が知られている。また、別のSOD1-Tgマウスの免疫組織化学染色法において、YAPの変動が報告されている(文献18)。一方、TRADネクロシスのマーカーとして、細胞体pSer46-MARCKSの陽性化(文献9)と核内YAPの減少(文献10)が知られている。そこで、YAP、pSer46-MARCKS、及びDAPIの3重染色を行ったところ、生理食塩水投与SOD1-Tgマウスの脊髄前角の大型ニューロン(運動ニューロン)において、pSer46-MARCKS陽性化と核内YAP減少を示すTRADネクロシスが増加していた(図35A)。これに対して、ヒトモノクローナル抗体#129-L2投与SOD1-Tgマウスでは、TRADネクロシスを起こしている神経細胞数が抑制されていることが認められた(図35A)。

[0157] さらに、腰髄のMAP2陽性神経細胞数を測定すると、正常マウスに対して生理食塩水投与SOD1-Tgマウスでは減少を示していたのに対して、ヒトモノクローナル抗体#129-L2を投与したSOD1-Tgマウスでは生理食塩水投与SOD1-Tgマウスからの回復が認められた(図35B)。また、SOD1-TgマウスではneuropilのMAP2染色性が低

下する傾向が見られたが、これもヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 を投与した SOD1-Tg マウスでは回復が認められた (図 35B)。脊髓のミクログリア細胞数については、Iba1 染色において正常と SOD1-Tg マウスの間に有意差はなく、ヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 投与による SOD1-Tg マウスのミクログリア細胞数の変化はなかった (図 35C)。一方 GFAP 染色では、アストロサイト細胞数が SOD1-Tg マウスにおいて有意に増加していたが、ヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 投与によって顕著に抑制された (図 35D)。

[0158] また、ハンチントン病を初めとする神経変性疾患病態においては、前述のとおり、神経細胞の DNA 損傷増加が知られている (文献 14、文献 15)。そこで、DNA 損傷マーカーである 53BP1 と γ H2AX を用いて、MAP2 及び DAPI との 4 重染色により、神経細胞の DNA 損傷を腰髄前角において測定した。その結果、神経細胞 DNA 損傷が SOD1-Tg マウスでは正常マウスに対して増加していること、そして、ヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 投与によって神経細胞の DNA 損傷が抑制されることが示された (図 36)。

[0159] 次に、病理学解析結果の再確認を行うために、22 週齢の筋萎縮性側索硬化症モデルマウス解析用 3 群のマウス脳組織サンプルについて、生化学的解析を行った。具体的には、ウェスタンブロットによって、pSer46-MARKS、53BP1、 γ H2AX、Ub、及び pSer396-Tau のタンパク量を比較すると、これらの全ての変性病態マーカー分子が、正常マウスに対して SOD1-Tg マウスでは増加していることや、ヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 投与によって、SOD1-Tg マウスにおける、これら増加した変性病態マーカー分子が、正常化レベルまで減少することが示された (図 37)。

[0160] 以上の結果は、ヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 が、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 病態における病態変化及び細胞死を抑制し、運動機能低下を抑制する作用を有することを示している。

[0161] [脊髄小脳失調症モデルマウス]

脊髄小脳失調症モデルマウスは、前述した「1. 材料と方法」に示すとおり、発症後の変異ataxin-1ノックインマウス（文献4）を使用して実験を行い、2週間に1回の静脈内投与を行った（図38A）。8週齢から18週齢にかけて2週間に一回の間隔で、体重30g当たり6 μ g（0.2mg/kg BWに相当する）のヒトモノクローナル抗体#129を計6回の投与した（図38A）。投与開始時期の8週齢において、ロータロッド試験における変異ataxin-1ノックインマウスの運動機能低下は明確であり（図38B）、すでに脊髄小脳失調症を発症していることを示している。計6回の投与を行った後の20週齢の時点で、変異ataxin-1ノックインマウスのロータロッド滞在時間は正常マウスに比較して有意に減少していたが、ヒトモノクローナル抗体#129投与によって、変異ataxin-1ノックインマウスのロータロッド滞在時間は有意差をもって改善した（図38B）。同様に、20週齢時点のフットプリント試験において、正常マウスと生理食塩水投与変異ataxin-1ノックインマウスの比較において、ストライド（歩幅）の減少を認めたが、ヒトモノクローナル抗体#129投与によって変異ataxin-1ノックインマウスのストライドが有意差をもって増加しており（図38C）、症状の改善が認められた。

[0162] 次に、20週齢において、運動機能解析後の生理食塩水投与正常マウス、生理食塩水投与変異ataxin-1ノックインマウス、及びヒトモノクローナル抗体#129投与変異ataxin-1ノックインマウスの3群（すなわち、「脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群」）のマウスから脳組織をサンプリングして、病理学的解析を行った。まず、ヒトモノクローナル抗体#129の標的となる細胞死であるTRADについて検討した。TRADと呼ばれる神経細胞ネクロシス（文献12）は、前述のとおり、HMGB1を放出すること（文献9、文献10）、放出されたHMGB1が周辺の神経細胞のTRADネクロシス（文献11）あるいは神経突起変性（文献9）を誘発することが知られている。一方、TRADネクロシスマーカーとして、細

胞体あるいは神経突起の p S e r 4 6 - M A R C K S 陽性化（文献 9 ～ 1 1）並びに核内 Y A P の減少（文献 1 0 ～ 1 3）が知られている。また、脊髄小脳失調症 1 型（S C A 1）病態においても、Y A P 発現量が変異 ataxin-1 ノックインマウスの予後に影響することが知られている（文献 1 9）。そこで、Y A P、p S e r 4 6 - M A R C K S、及び D A P I の 3 重染色を行ったところ、生理食塩水投与変異 ataxin-1 ノックインマウスにおいて、生理食塩水投与正常マウスに比較して、小脳皮質顆粒細胞層の顆粒細胞及びその神経線維の p S e r 4 6 - M A R C K S 染色性が顕著に上昇していた（図 3 9 A）。これは、アルツハイマー病態で観察されている HMGB1 放出による神経突起変性 (neurite degeneration) の際に見られる p S e r 4 6 - M A R C K S 染色性上昇（文献 9）と同様であり、顆粒細胞層の神経突起変性を意味するものである。一方、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 を投与された変異 ataxin-1 ノックインマウスにおいては、このような顆粒細胞及びその神経線維の p S e r 4 6 - M A R C K S 染色性上昇は見られず、正常化していた（図 3 9 A）。

[0163] 封入体については、過去の報告（文献 4）にあるように、変異 ataxin-1 ノックインマウスにおいて、プルキンエ細胞においても顕著な核内封入体は見られないものの、高シグナルの U b と A t x n 1 の共局在が認められた（図 3 9 B）。このような所見は正常マウスには見られず、変異 a t a x i n - 1 ノックインマウスにおいてもヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与によって消失した（図 3 9 B）。

[0164] また、S C A 1 をはじめとして神経変性疾患病態においては、神経細胞の D N A 損傷増加が知られている（文献 1 4、文献 1 5）。そこで、D N A 損傷マーカーである 5 3 B P 1 と γ H 2 A X を用いて、M A P 2 及び D A P I との 4 重染色により、プルキンエ細胞の D N A 損傷を測定した。その結果、プルキンエ細胞の D N A 損傷が変異 ataxin-1 ノックインマウスでは正常マウスに対して増加していることや、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 投与によってプルキンエ細胞の D N A 損傷が抑制されることが示された（図 3 9 C）。

[0165] さらに、T R I A D の特徴である小胞体異常を検出する目的で行ったK D E L 染色では、プルキンエ細胞層及び顆粒細胞層のK D E L シグナル値が変異ataxin-1ノックインマウスでは正常マウスに対して増加しており、T R I A D で観察される小胞体不安定性が認められた（図40A）。このような所見が、最終的にプルキンエ細胞数あるいは小脳皮質におけるミクログリアやアストロサイトの細胞数に影響を与えるかを、M A P 2、I b a 1、及びG F A P の染色で確認した（図40B）。その結果、プルキンエ細胞数は、変異ataxin-1ノックインマウスでは正常マウスよりも減少したが、ヒトモノクローナル抗体#129投与によって細胞脱落が抑制された（図40B）。一方、ミクログリアやアストロサイトに変化はなかった（図40B）。

[0166] 次に、病理学解析結果の再確認を行うために、20週齢の脊髄小脳失調症モデルマウス解析用3群のマウス脳組織サンプルについて、生化学的解析を行った。具体的には、ウェスタンブロットによって、p S e r 4 6 - M A R C K S、5 3 B P 1、 γ H 2 A X、U b、及びp S e r 2 0 3 - T a u のタンパク量を比較すると、これらの全ての変性病態マーカー分子が、正常マウスに対して変異ataxin-1ノックインマウスでは増加していることや、ヒトモノクローナル抗体#129投与によって、変異ataxin-1ノックインマウスにおける、これら増加した変性病態マーカー分子が、正常化レベルまで減少することが示された（図41）。

[0167] 以上の結果は、ヒトモノクローナル抗体#129が、脊髄小脳失調症における病態変化及び細胞死を抑制し、運動機能低下を抑制する作用を有することを示している。

[0168] [老化モデルマウス]

老化モデルマウスは、前述した「1. 材料と方法」に示すとおり、12ヶ月齢のC 5 7 B L / 6 マウスを使用して実験を行い、12ヶ月齢から19ヶ月齢まで4週間に1回の静脈内投与を計8回行った（図42A）。12ヶ月齢から18ヶ月齢まで、Y-迷路試験では生理食塩水投与12ヶ月齢C 5 7 B L / 6 マウスと、ヒトモノクローナル抗体#129-L 2 投与12ヶ月齢

C57BL/6マウスとの間に有意差はなかったが、生理食塩水投与12ヶ月齢C57BL/6マウスについて、加齢に伴うスコア低下が見られたY-迷路試験19ヶ月齢以後になって、両者の間に有意差が認めれた(図42B)。

[0169] 次に、運動機能解析後の若齢マウス(3ヶ月齢C57BL/6マウス)、生理食塩水投与20ヶ月齢C57BL/6マウス、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2投与20ヶ月齢C57BL/6マウスの3群(すなわち、「20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群」)のマウスから脳組織をサンプリングして、病理学的解析を行った。LaminB1は、核膜裏打ちタンパク質であり、免疫組織化学染色法において核のリング状の染色パターンを示すが、細胞老化に際して核リング状局在が消失すると言われている(文献20)。また、TRADネクロシスを起こした神経細胞においては、同様にLaminB1の核リング状局在が消失することから(文献11)、TRADが正常老化における細胞死という仮説がある(文献11)。このため、20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群のマウス脳組織について、2種類のTRADマーカー(YAP及びpSer46MARCKS)と、LaminB1との3重免疫染色を行い、正常老化におけるTRADネクロシスの増加の有無と、老化における神経細胞死に対するヒトモノクローナル抗体#129-L2の効果について検討した。

[0170] その結果、生理食塩水投与20ヶ月齢C57BL/6マウスの大脳皮質においては、3ヶ月齢C57BL/6マウスと比較して、YAP核染色消失とpSer46-MARCKS細胞質染色を示すTRADネクロシスが顕著に増加しており(図43)、同時にLaminB1核リング染色の消失した老化神経細胞が顕著に増加していた(図43)。さらに、YAP核染色消失、pSer46-MARCKS細胞質染色、及びLaminB1核リング染色消失の3つの特徴を示すTRADネクロシスを起こした老化神経細胞も有意に増加していた(図43)。一方、ヒトモノクローナル抗体#129-L2を投与した高齢マウス(20ヶ月齢)においては、このような3つ

の特徴を示す細胞の割合は、いずれも顕著に抑制されていた（図43）。

[0171] DNA損傷マーカーである53BP1と γ H2AXを用いて、MAP2及びDAPIとの4重染色により、大脳皮質神経細胞のDNA損傷を測定した。その結果、神経細胞のDNA損傷が高齢マウスでは若齢マウスに対して増加していること、そして、ヒトモノクローナル抗体#129-L2投与によって高齢マウスにおける大脳皮質神経細胞のDNA損傷が抑制されることが示された（図44A）。このような所見が、最終的に大脳皮質の神経細胞数、ミクログリアの細胞数、及びアストロサイトの細胞数に影響を与えるかをMAP2、Iba1、及びGFAPの染色で確認した（図44B）。その結果、神経細胞数は、生理食塩水投与20ヶ月齢C57BL/6マウスでは若齢マウス（3ヶ月齢C57BL/6マウス）よりも減少したが、ヒトモノクローナル抗体#129-L2投与によって細胞脱落が抑制された（図44B）。一方、ミクログリアの細胞数及びアストロサイトの細胞数に変化は認められなかった（図44C及びD）。

[0172] 次に、病理学解析結果の再確認を行うために、20ヶ月齢老化モデルマウス解析用3群のマウス脳組織サンプルについて、生化学的解析を行った。具体的には、ウェスタンブロットによって、pSer46-MARCKS、53BP1、 γ H2AX、Ub、及びpSer203-Tauのタンパク量を比較すると、これらの全ての変性病態マーカー分子が、若齢マウス（3ヶ月齢）に対して高齢マウス（20ヶ月齢）では増加していることや、ヒトモノクローナル抗体#129-L2投与によって、高齢マウスにおける、これら増加した変性病態マーカー分子が、正常化レベルまで減少することが示された（図45）。

[0173] 以上の結果は、ヒトモノクローナル抗体#129-L2が、老化に伴う細胞形質変化及び細胞死を抑制し、認知機能低下を抑制する作用を有することを示している。

[0174] 3. まとめ

本件ヒトモノクローナル抗体は、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、

パーキンソン病、脊髄小脳失調症、並びに、老化に伴う細胞形質変化、細胞死、認知機能（記憶力）及び運動機能に対して、治療効果を発揮することを示している。

[0175] 文献1 : Mangiarini, L., K. Sathasivam, M. Seller, B. Cozens, A. Harper, C. Hetherington, M. Lawton, Y. Trottier, H. Lehrach, S. Davies, and G. Bates. 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*. 87:493-506.

文献2 : Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*. 2002 May 16;34(4):521-33.

文献3 : Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994 264(5166): 1772-1775. Erratum in: *Science* 1995 269(5221): 149.

文献4 : Watase K, Weeber EJ, Xu B, Antalffy B, Yuva-Paylor L, Hashimoto K, Kano M, Atkinson R, Sun Y, Armstrong DL, Sweatt JD, Orr HT, Paylor R, Zoghbi HY. A long CAG repeat in the mouse *Sca1* locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron*. 2002 Jun 13;34(6):905-19.

文献5 : Ito H, Yoshimura N, Kurosawa M, Ishii S, Nukina N, Okazawa H. Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. *Hum Mol Genet*. 2009 Nov 15;18(22):4239-54.

文献6 : Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints SG, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu SI, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arum

ughan A, Wanker EE, Rich T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer VM, Okazawa H. In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry*. 2015 Apr;20(4):459-71.

文献 7 : Taniguchi JB, Kondo K, Fujita K, Chen X, Homma H, Sudo T, Mao Y, Watase K, Tanaka T, Tagawa K, Tamura T, Muramatsu SI, Okazawa H. RPA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair. *Hum Mol Genet*. 2016 Oct 15;25(20):4432-4447.

文献 8 : Keiser, M.S., Boudreau, R.L. and Davidson, B.L. (2014) Broad Therapeutic Benefit After RNAi Expression Vector Delivery to Deep Cerebellar Nuclei: Implications for Spinocerebellar Ataxia Type 1 Therapy. *Mol. Ther.*, 22, 588-595.

文献 9 : Fujita K, Motoki K, Tagawa K, Chen X, Hama H, Nakajima K, Homma H, Tamura T, Watanabe H, Katsuno M, Matsumi C, Kajikawa M, Saito T, Saido T, Sobue G, Miyawaki A, Okazawa H. HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2016 Aug 25;6:31895.

文献 10 : Tanaka H, Homma H, Fujita K, Kondo K, Yamada S, Jin X, Waragai M, Ohtomo G, Iwata A, Tagawa K, Atsuta N, Katsuno M, Tomita N, Furukawa K, Saito Y, Saito T, Ichise A, Shibata S, Arai H, Saido T, Sudol M, Muramatsu SI, Okano H, Mufson EJ, Sobue G, Murayama S, Okazawa H. YAP-dependent necrosis occurs in early stages of Alzheimer's disease and regulates mouse model pathology. *Nat Commun*. 2020 Jan 24;11(1):507.

文献 11 : Tanaka H, Kondo K, Fujita K, Homma H, Tagawa K, Jin X, Jin M, Yoshioka Y, Takayama S, Masuda H, Tokuyama R, Nakazaki Y, Saito T, Saido T, Murayama S, Ikura T, Ito N, Yamamori Y, Tomii K, Bianchi ME

, Okazawa H. HMGB1 signaling phosphorylates Ku70 and impairs DNA damage repair in Alzheimer's disease pathology. *Commun Biol.* 2021 Oct 11; 4(1):1175.

文献 1 2 : Hoshino M, Qi ML, Yoshimura N, Miyashita T, Tagawa K, Wada Y, Enokido Y, Marubuchi S, Harjes P, Arai N, Oyanagi K, Blandino G, Sudol M, Rich T, Kanazawa I, Wanker EE, Saitoe M, Okazawa H. Transcriptional repression induces a slowly progressive atypical neuronal death associated with changes of YAP isoforms and p73. *J Cell Biol.* 2006 Feb 13;172(4):589-604.

文献 1 3 : Mao Y, Chen X, Xu M, Fujita K, Motoki K, Sasabe T, Homma H, Murata M, Tagawa K, Tamura T, Kaye J, Finkbeiner S, Blandino G, Sudol M, Okazawa H. Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology. *Hum Mol Genet.* 2016 Nov 1;25(21):4749-4770.

文献 1 4 : Qi ML, Tagawa K, Enokido Y, Yoshimura N, Wada Y, Watase K, Ishiura S, Kanazawa I, Botas J, Saitoe M, Wanker EE, Okazawa H. Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppresses genotoxic stress in polyglutamine diseases. *Nat Cell Biol.* 9(4):402-14, 2007.

文献 1 5 : Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumugan A, Komuro A, Shiwa H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N, Tagawa K, Wanker EE, Okazawa H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol.* 2010 189(3):425-43, 2010.

文献 1 6 : Fujita K, Homma H, Kondo K, Ikuno M, Yamakado H, Tagawa K, Murayama S, Takahashi R, Okazawa H. Ser46-Phosphorylated MARCKS Is a Marker of Neurite Degeneration at the Pre-aggregation Stage in PD/DLB Pathology. *eNeuro.* 2018 Sep 4;5(4):ENEURO.0217-18.2018.

文献 1 7 : Forsberg KM, Graffmo KS, Stenvall E, Tabikh N, Marklund SL,

Brannstrom T, Andersen PM. Widespread CNS pathology in amyotrophic lateral sclerosis homozygous for the D90A SOD1 mutation. *Acta Neuropathol.* 2023 Jan;145(1):13-28.

文献 18 : Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, Okazawa H, Abe K. Progressive decrease in the level of YAPdeltaCs, prosurvival isoforms of YAP, in the spinal cord of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. *J Neurosci Res.* 2009 Mar;87(4):928-36.

文献 19 : Fujita K, Mao Y, Uchida S, Chen X, Shiwaku H, Tamura T, Ito H, Watase K, Homma H, Tagawa K, Sudol M, Okazawa H. Developmental YAPdeltaC determines adult pathology in a model of spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Commun.* 2017 Nov 30;8(1):1864.

文献 20 : Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell.* 2012 Jun;23(11):2066-75.

実施例 4

[0176] ヒトモノクローナル抗体 # 129 の軽鎖 CDR3 には、前述のとおり、糖鎖修飾を受ける可能性の高いアミノ酸配列があると考え、2 種類の軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列改変体（ヒトモノクローナル抗体 # 129-L1 及びヒトモノクローナル抗体 # 129-L2 を、定法に従って作製した（表 10）

。

[0177] [表10]

	軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列
ヒトモノクローナル抗体 # 129	LQHNSTPLT
ヒトモノクローナル抗体 # 129-L1	LQH <u>N</u> ANPLT
ヒトモノクローナル抗体 # 129-L2	LQH <u>A</u> STPLT

表中の下線で示すアミノ酸配列は、ヒトモノクローナル抗体 # 129 の軽

鎖CDR3のアミノ酸配列に対して改変した部位を示す。

- [0178] ヒトモノクローナル抗体#129とヒトモノクローナル抗体#129-L2のヒトdsHMGB1に対する抗体親和性を、実施例1に記載のSPRにより解析した。その結果、ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2のヒトdsHMGB1に対する解離定数(K_D)は、それぞれ 1.47×10^{-11} 及び 1.44×10^{-11} であり、両抗体は、ヒトdsHMGB1に対してほぼ同等の結合力を有することが示された(図46B及びA)。また、ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2のヒト還元型HMGB1に対する解離定数(K_D)は、それぞれ 2.07×10^{-7} 及び 1.51×10^{-5} であり、ヒトモノクローナル抗体#129-L2の方がヒトモノクローナル抗体#129よりも結合が弱いことが示された(図46D及びC)。
- [0179] さらに、ELISAを用いて解離定数(K_D)を求めた場合にも、ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2のヒトdsHMGB1に対する結合力に差は認められなかった(図47B及びA)。また、ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2のヒト還元型HMGB1に対する結合力は、共に弱く、この場合は、両抗体の結合力に差は認められなかった(図47D及びC)。
- [0180] そこで、ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2を用いて、3種類のFTLD-ALSモデルマウス(TDP43^{N267S}-KIマウス、PGRN^{R504X}-KIマウス、及びVCP^{T262A}-KIマウス)に対する治療効果を、実施例1に記載のY-迷路試験を用いて検討した。各種FTLD-ALSモデルマウス1匹に、 0.2 mg/kg 体重($6 \mu\text{g/匹}$)のヒトモノクローナル抗体#129又はヒトモノクローナル抗体#129-L2を含む生理食塩水を、尾静脈から静脈注射により、図48に示す治療実験のプロトコルに従って、1ヶ月に1回投与を行った。また、対照群として、同量の生理食塩水を、各種FTLD-ALSモデルマウス又は正常マウス(各種FTLD-ALSモデルマウスの変異遺伝子を有さな

い兄弟マウス)に、同様に投与した。なお、投与は、Y-迷路試験において発症が確認された後開始した。

[0181] その結果、いずれのFTLD-ALSモデルマウスにおいても、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体(ヒトモノクローナル抗体#129-L2又はヒトモノクローナル抗体#129)の投与開始1ヶ月目から、Y-迷路試験における認知機能改善を認めた(図48)。ヒトモノクローナル抗体#129の方がいくつかのタイムポイントで優れた治療効果を示したが、総じて、ヒトモノクローナル抗体#129とヒトモノクローナル抗体#129-L2との間に、治療効果の実質的な差は認められず、共に統計学的に有意な治療効果が認められた(図48)。

[0182] さらに、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体(ヒトモノクローナル抗体#129-L2又はヒトモノクローナル抗体#129)の月1回投与を、2回追加した後、脳組織の病理学的解析を、実施例3に記載の方法に従って行った。免疫組織化学染色法において、pSer46-MARCKS(図49)とKDEL(図50)の染色によってTRIADネクロシスの検討を行い、 γ H2AX(図51)と53BP1(図52)の染色によってDNA損傷の検討を行い、pSer409/410-TDP43(図53)の染色により封入体の検討を行ったところ、総じて、ヒトモノクローナル抗体#129とヒトモノクローナル抗体#129-L2との間に、治療効果の実質的な差は認められず、共に統計学的に有意な治療効果が認められた(図49~53)。

[0183] 一方、ヒトモノクローナル抗体#129とヒトモノクローナル抗体#129-L2には、以下の点で相違が見られた。具体的には、ヒトモノクローナル抗体#129を安定に発現するCHO細胞株の複数のクローンから、ヒトモノクローナル抗体#129を定法に従って精製し、定法に従って非還元キャピラリー電気泳動法により解析した結果、図54に示すとおり、いずれのクローンにおいても、IgGのピークより高分子量側になだらかなピーク(図中の矢印で示す箇所)が認められた。一方、ヒトモノクローナル抗体#1

29-L2を安定に発現するCHO細胞株の複数のクローンから、ヒトモノクローナル抗体#129-L2を精製し、非還元キャピラリー電気泳動法で解析した結果、図55に示すとおり、いずれのクローンにおいても、高分子量側になだらかなピークは認められなかった。

この結果は、ヒトモノクローナル抗体#129はN-グリカン糖鎖修飾を受けたのに対して、ヒトモノクローナル抗体#129-L2はN-グリカン糖鎖修飾を受けなかったことを示している。

[0184] さらに、5 μ gの3種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体#129、ヒトモノクローナル抗体#129-L1、及びヒトモノクローナル抗体#129-L2）を用いて、通常の還元条件のSDS-PAGEを行い、アクリルアミドゲルをクマシーブリリアントブルー（CBB）染色した結果、ヒトモノクローナル抗体#129の軽鎖由来のバンドの上に、淡いバンドが認められたのに対して、ヒトモノクローナル抗体#129-L1の軽鎖由来のバンドの上や、ヒトモノクローナル抗体#129-L2の軽鎖由来のバンドの上には、かかるバンドは認められなかった（図56）。

この結果は、ヒトモノクローナル抗体#129の軽鎖はN-グリカン糖鎖修飾を受けたのに対して、ヒトモノクローナル抗体#129-L1の軽鎖や、ヒトモノクローナル抗体#129-L2の軽鎖は、N-グリカン糖鎖修飾を受けなかったことを示している。

[0185] また、2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体（ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2）の安定性について検討するために、4℃で6ヶ月間保存する前と後に、かかる2種類の本発明の抗ヒトHMGB1抗体のHMGB1に対する抗体親和性を、SPRにより解析した。その結果、ヒトモノクローナル抗体#129の K_D は、4℃で6ヶ月間保存する前は 1.47×10^{-11} であったのに対して（図57C）、4℃で6ヶ月間保存した後は 6.51×10^{-10} であり（図57D）、約45倍上昇した。一方、ヒトモノクローナル抗体#129-L2の K_D は、4℃で6ヶ月

間保存する前は 1.44×10^{-11} の 4°C であったのに対して (図 5 7 A)、 4°C で 6 ヶ月間保存した後は 3.51×10^{-11} であり (図 5 7 B)、約 2.5 倍程度の上昇にとどまった。

この結果は、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 はヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 よりも抗体の安定性が高いことを示している。

[0186] さらに、2 種類の本発明の抗ヒト HMGB 1 抗体 (ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 及びヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2) を用いて、アルツハイマー病モデルマウス (5 × FAD マウス) に対する治療効果を検討した。具体的には、当該アルツハイマー病モデルマウス 1 匹に、 0.2 mg/kg 体重 ($6 \mu\text{g}$ / 匹) のヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 又はヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 を含む生理食塩水を、尾静脈から静脈注射により、発症後の 6 ヶ月齢から 1 ヶ月に 1 回投与を計 3 回行った (図 5 8 A)。また、対照群として、 0.2 mg/kg 体重 ($6 \mu\text{g}$ / 匹) のヒト IgG を含む生理食塩水を、同様に投与した (図 5 8 A)。投与後、2 光子顕微鏡観察による大脳皮質のシナプス数の計測 (図 5 8 B)、Y-迷路試験による認知機能試験 (図 5 8 C)、並びに、マウス大脳皮質について抗 pSer46-MARKS 抗体及び抗 A β 抗体を用いた免疫組織化学染色法を行い、細胞死及び細胞外 A β 沈着を評価した (図 5 9)。

[0187] その結果、8 ヶ月齢の 5 × FAD マウスにおいて、ヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 及びヒトモノクローナル抗体 # 1 2 9 - L 2 は、シナプス減少を同等に正常化すること (図 5 8 B)、認知機能低下を同等に正常化すること (図 5 8 C) が示された。また、アルツハイマー病態の病理解析において、細胞内アミロイド蓄積による 1 個のニューロンの TR1AD ネクロシス (一次性 TR1AD ネクロシス)、一次性 TR1AD ネクロシスから放出された HMGB 1 が誘導する周辺の多数の神経細胞の TR1AD ネクロシス (二次性 TR1AD ネクロシス)、さらに二次性 TR1AD ネクロシスの細胞残骸が除去された細胞外 A β 沈着 (アミロイド斑) の 3 段階 (図 5 9 A) が時間的に順を追って起きることが報告されている (文献「Tanaka et

al, Nature Commun 2020」)。ヒトモノクローナル抗体#129及びヒトモノクローナル抗体#129-L2は、共に一次性TRIA Dネクローシスには影響を及ぼさないものの、二次性TRIA Dネクローシスとアミロイド斑を顕著に抑制し、両者の効果は同等であることが示された(図59B)。

産業上の利用可能性

[0188] 本発明は、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、アルツハイマー病、前頭側頭葉変性症、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防及び／又は治療に資するものである。

請求の範囲

[請求項1]

ヒトHMG B 1 に特異的に結合し、かつ、
配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（CDR）1；配列番号 2 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 2；及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 3；と、
配列番号 4 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 1；配列番号 5 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 2；及び配列番号 6、配列番号 20、若しくは配列番号 17 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 3；とを含む
ヒトモノクローナル抗体を含む、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤。

[請求項2]

ヒトモノクローナル抗体が、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 8、配列番号 21、又は配列番号 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80%以上の配列同一性を有するアミ

ノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む、請求項 1 に記載の予防剤又は治療剤。

[請求項3] ヒトモノクローナル抗体が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 10、配列番号 22、又は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む、請求項 1 又は 2 に記載の予防剤又は治療剤。

[請求項4] 静脈内投与される、請求項 1 又は 2 に記載の予防剤又は治療剤。

[請求項5] ヒト HMGB1 に特異的に結合し、かつ、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域 (CDR) 1 ; 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 2 ; 及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 3 ; と、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 1 ; 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 2 ; 及び配列番号 20 又は配列番号 17 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 3 ; とを含むヒトモノクローナル抗体。

[請求項6] 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号 21 又は配列番号 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む、請求項 5 に記載のヒトモノクローナル抗体。

[請求項7] 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号 22 又は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む、請求項 5 に記載のヒ

トモノクローナル抗体。

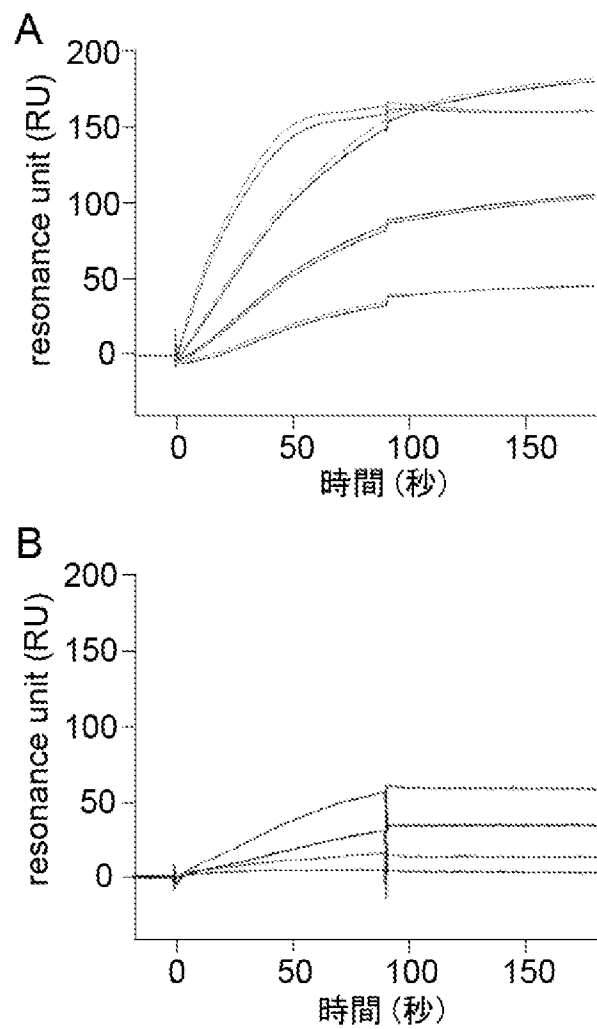
[請求項8] 請求項5～7のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を含む、
アルツハイマー病又は前頭側頭葉変性症の予防剤若しくは治療剤。

[請求項9] 静脈内投与される、請求項8に記載の予防剤又は治療剤。

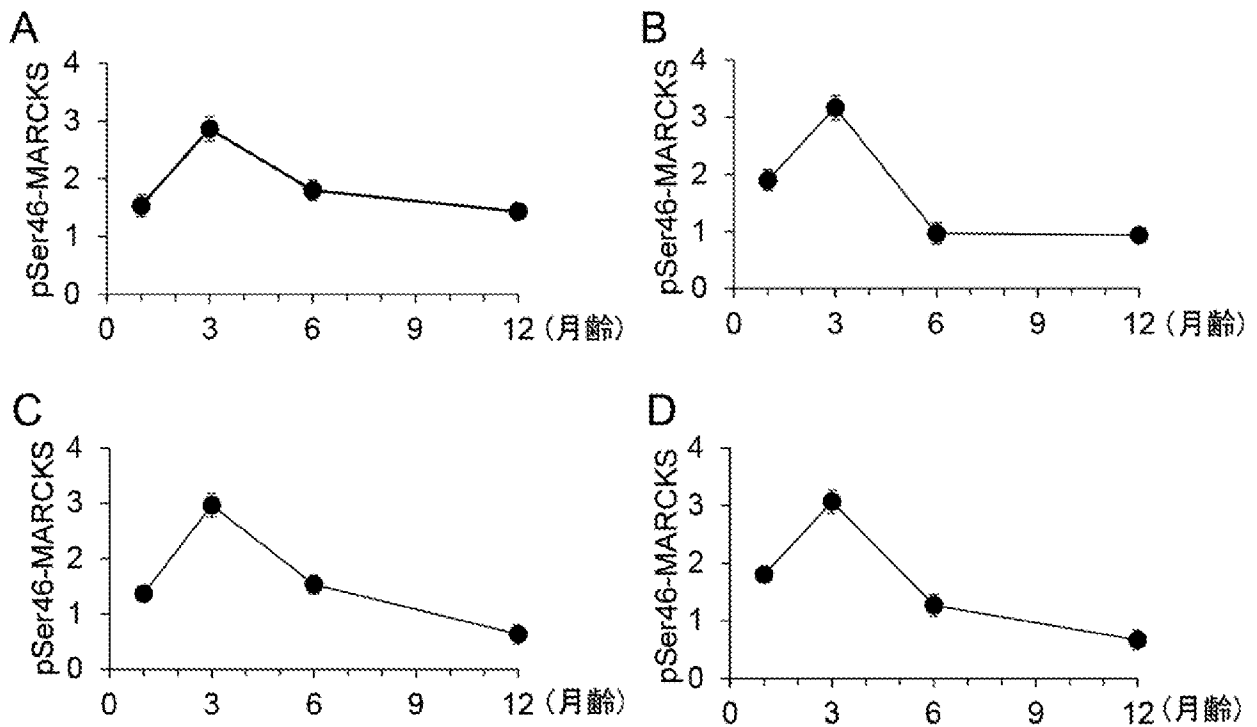
[請求項10] 請求項5～7のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体を含む、
筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、老化に関連する変性疾患若しくは神経疾患、脳老化、あるいは
脳老化を伴う疾患の予防剤又は治療剤。

[請求項11] 静脈内投与される、請求項10に記載の予防剤又は治療剤。

[図1]

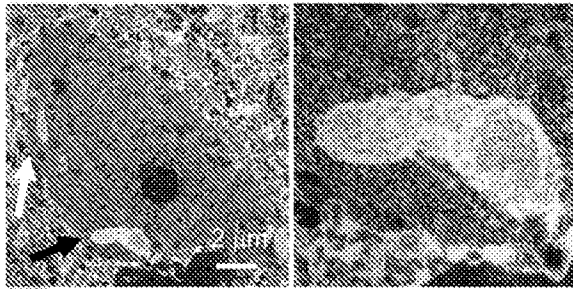


[図2-1]

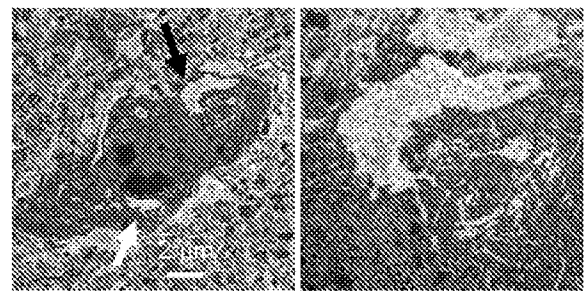


[図2-2]

A

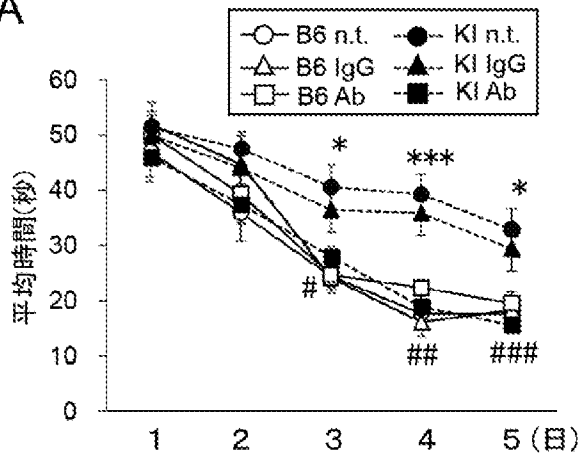


B

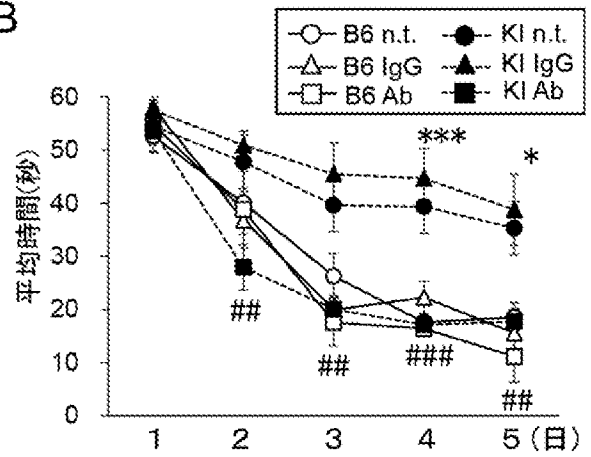


[図3]

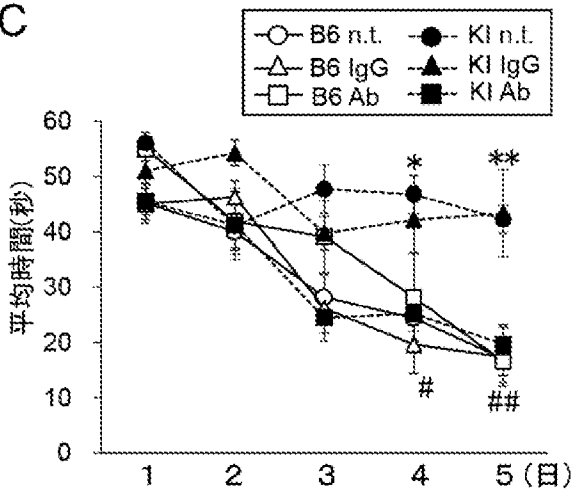
A



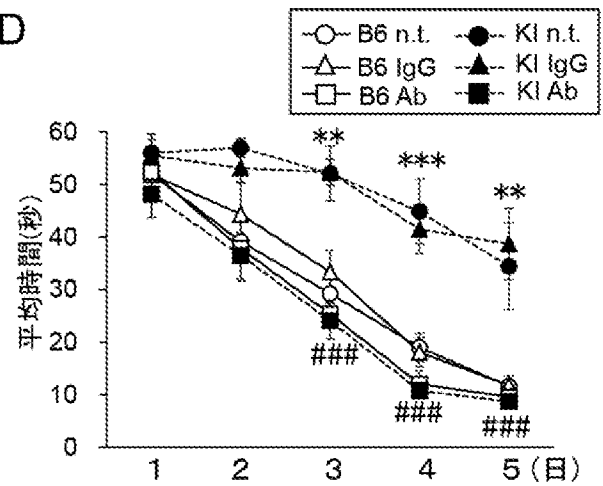
B



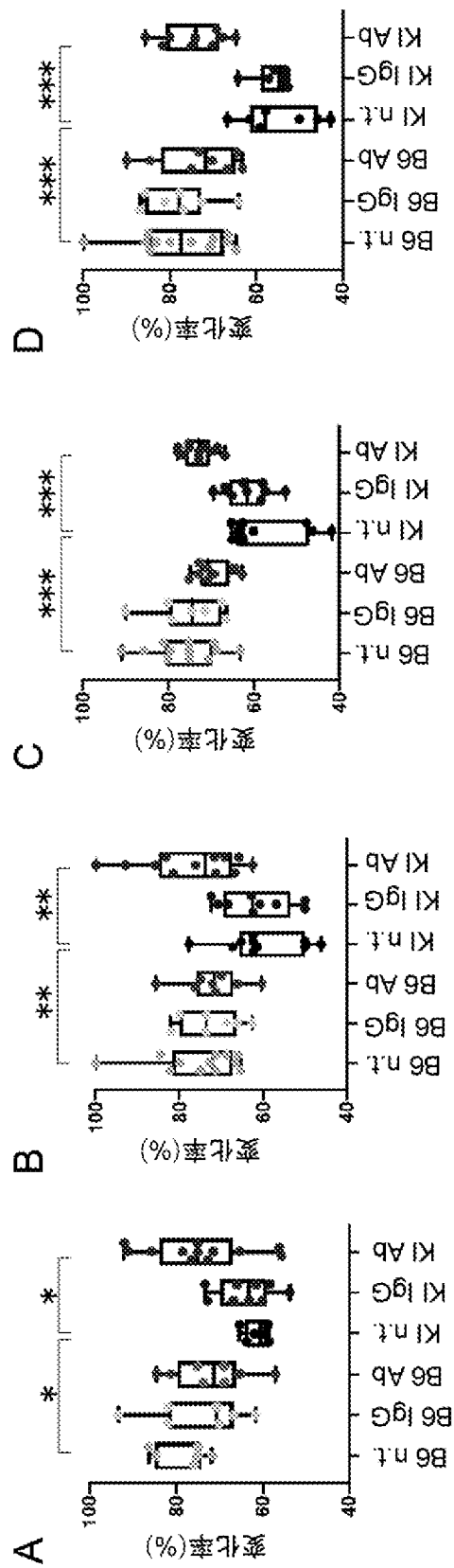
C



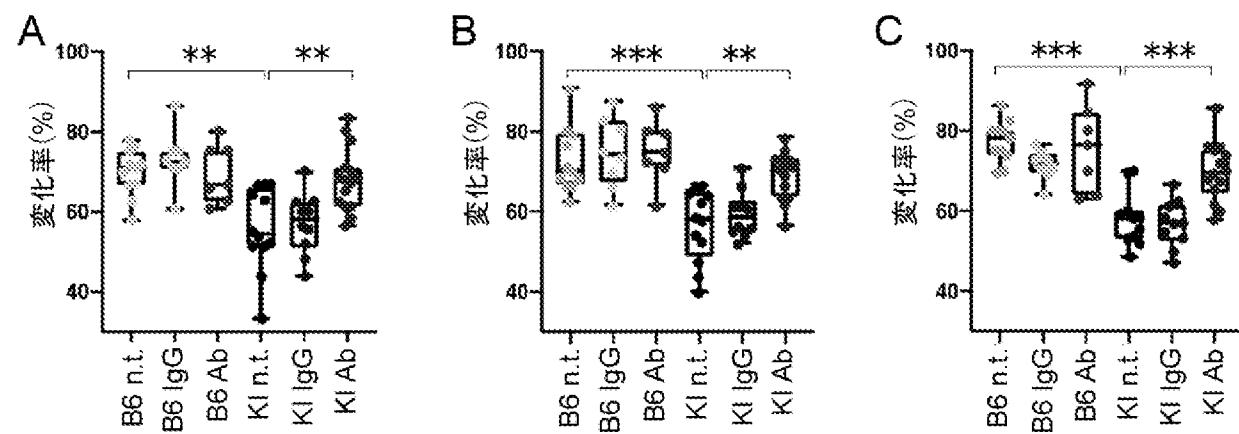
D



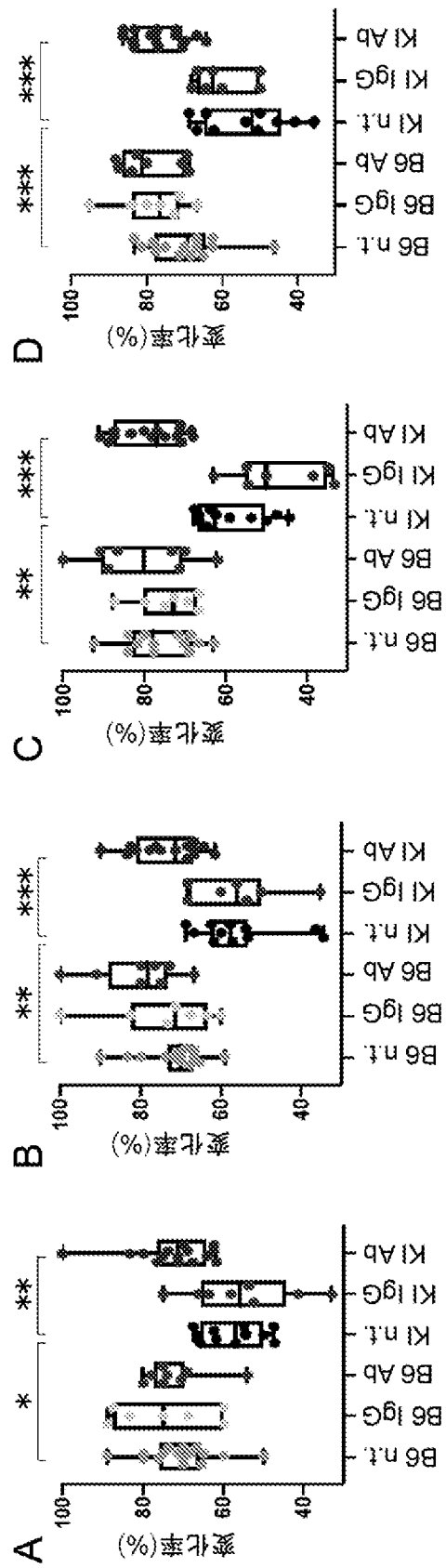
[図4]



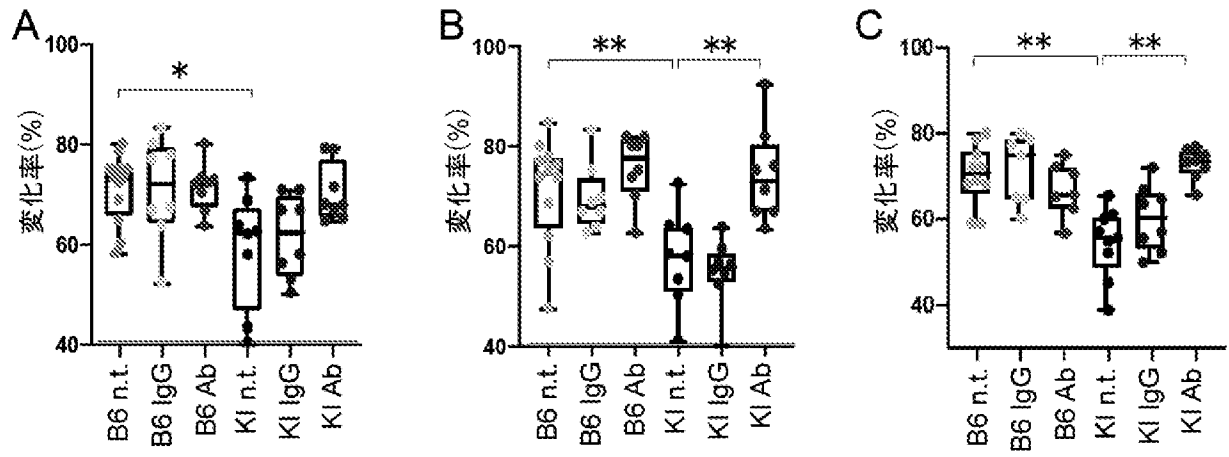
[図5]



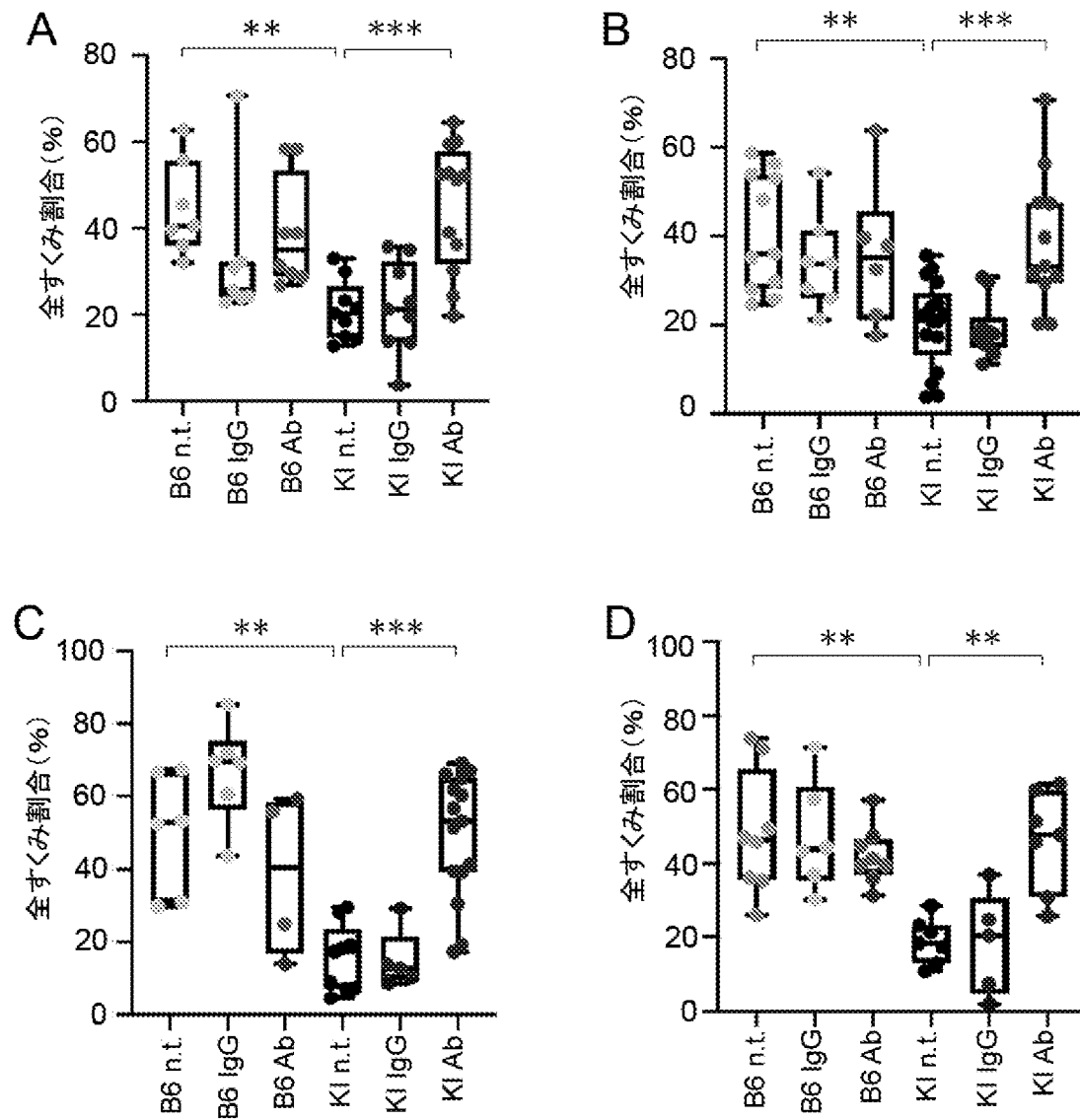
[図6]



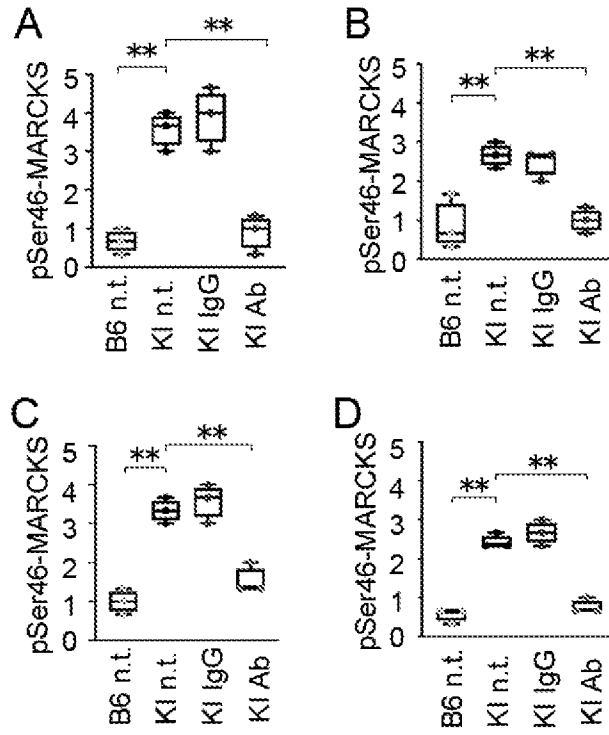
[図7]



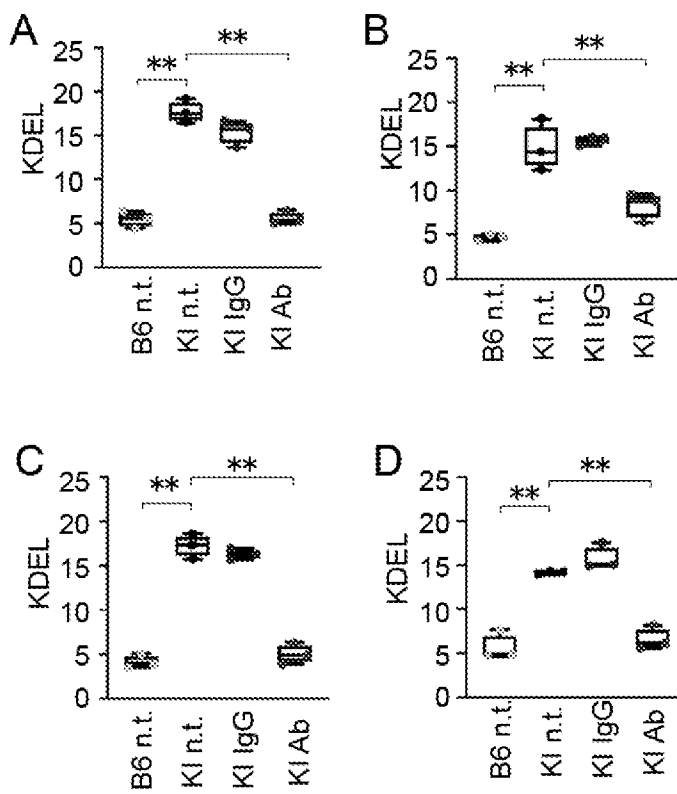
[図8]



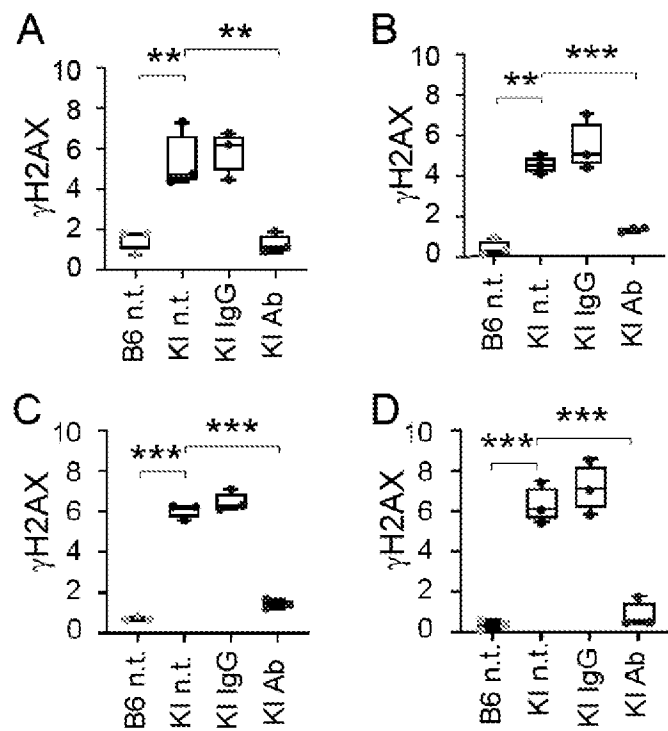
[図9]



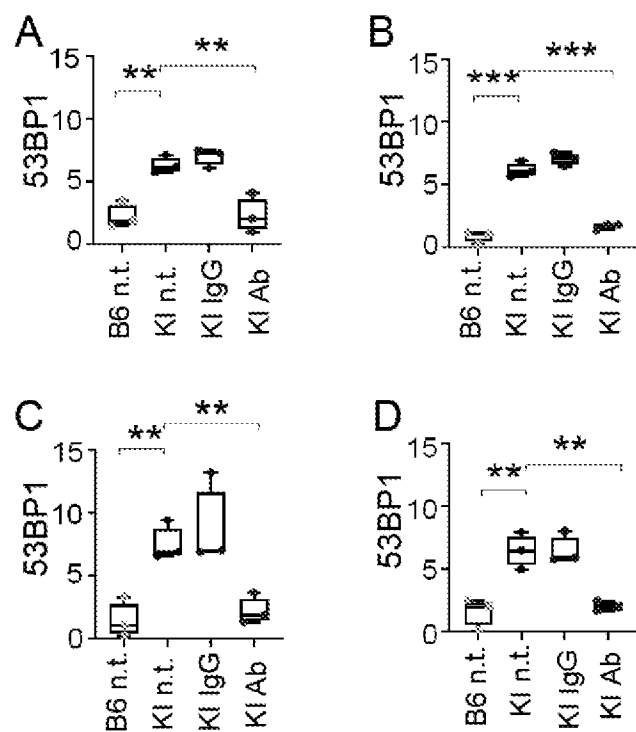
[図10]



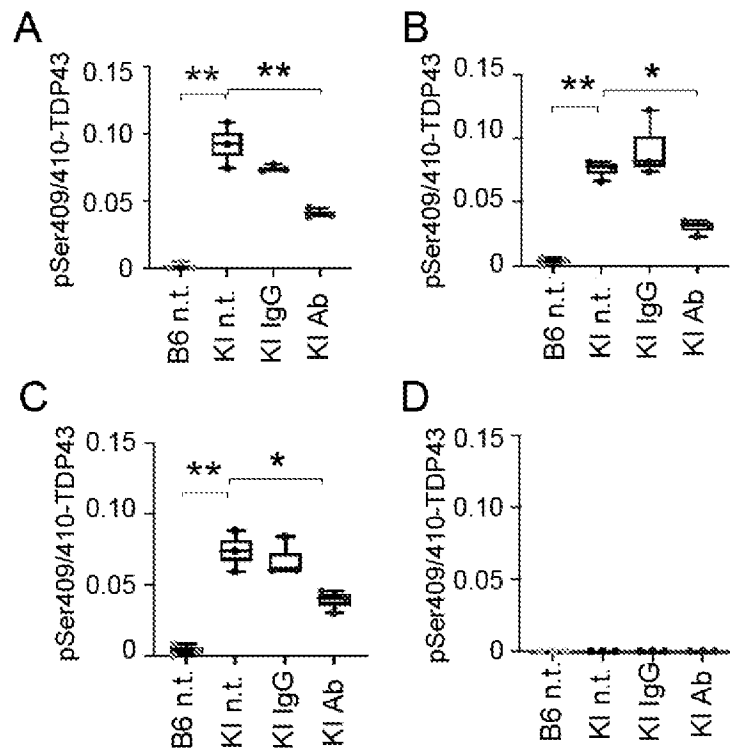
[図11]



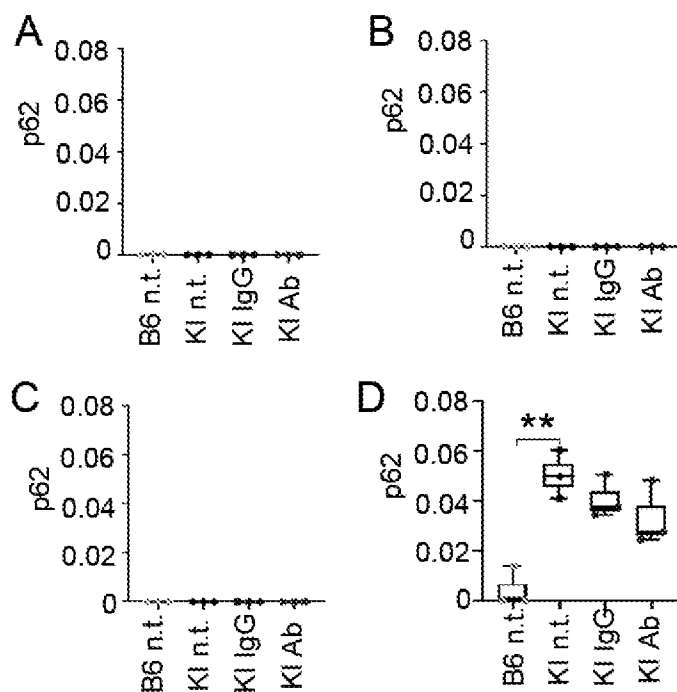
[図12]



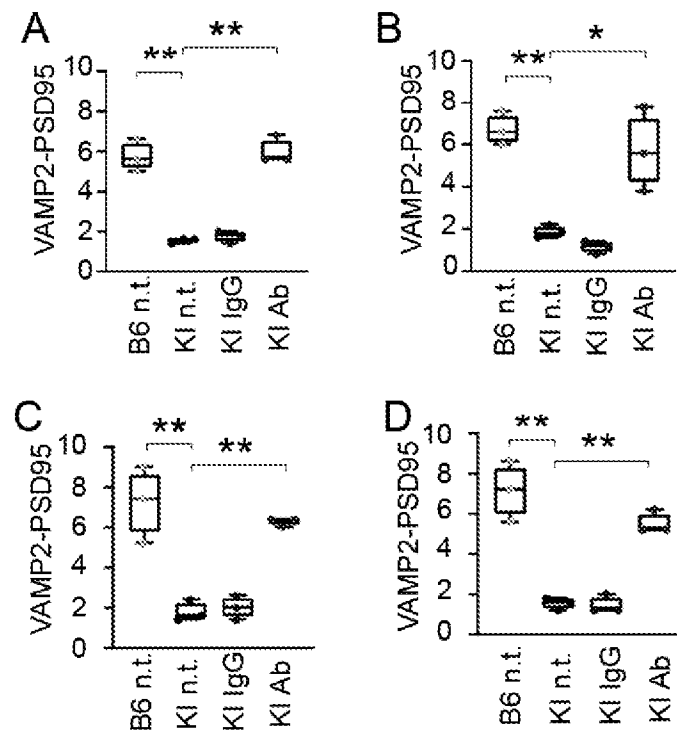
[図13]



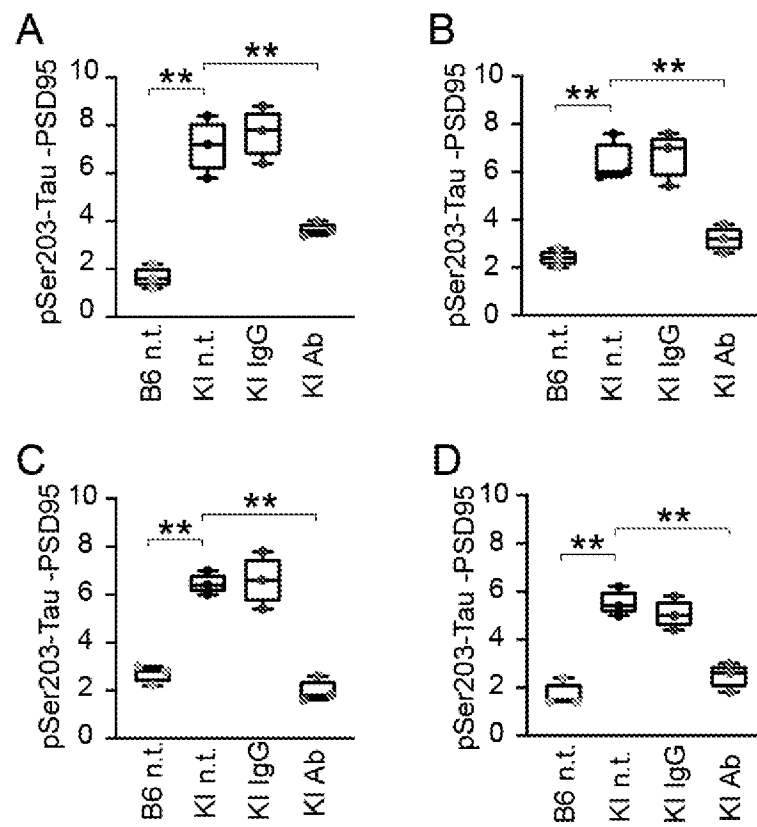
[図14]



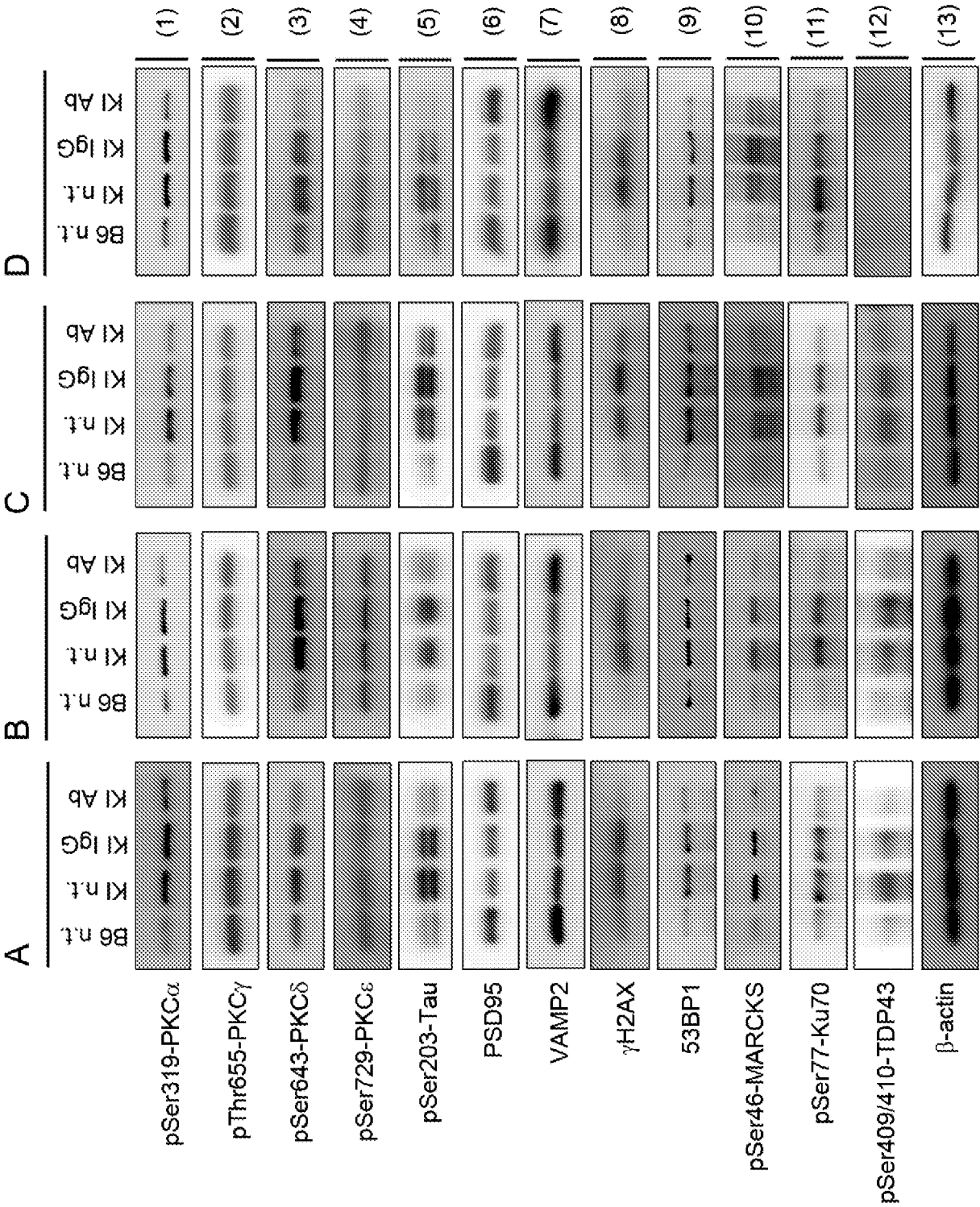
[図15]



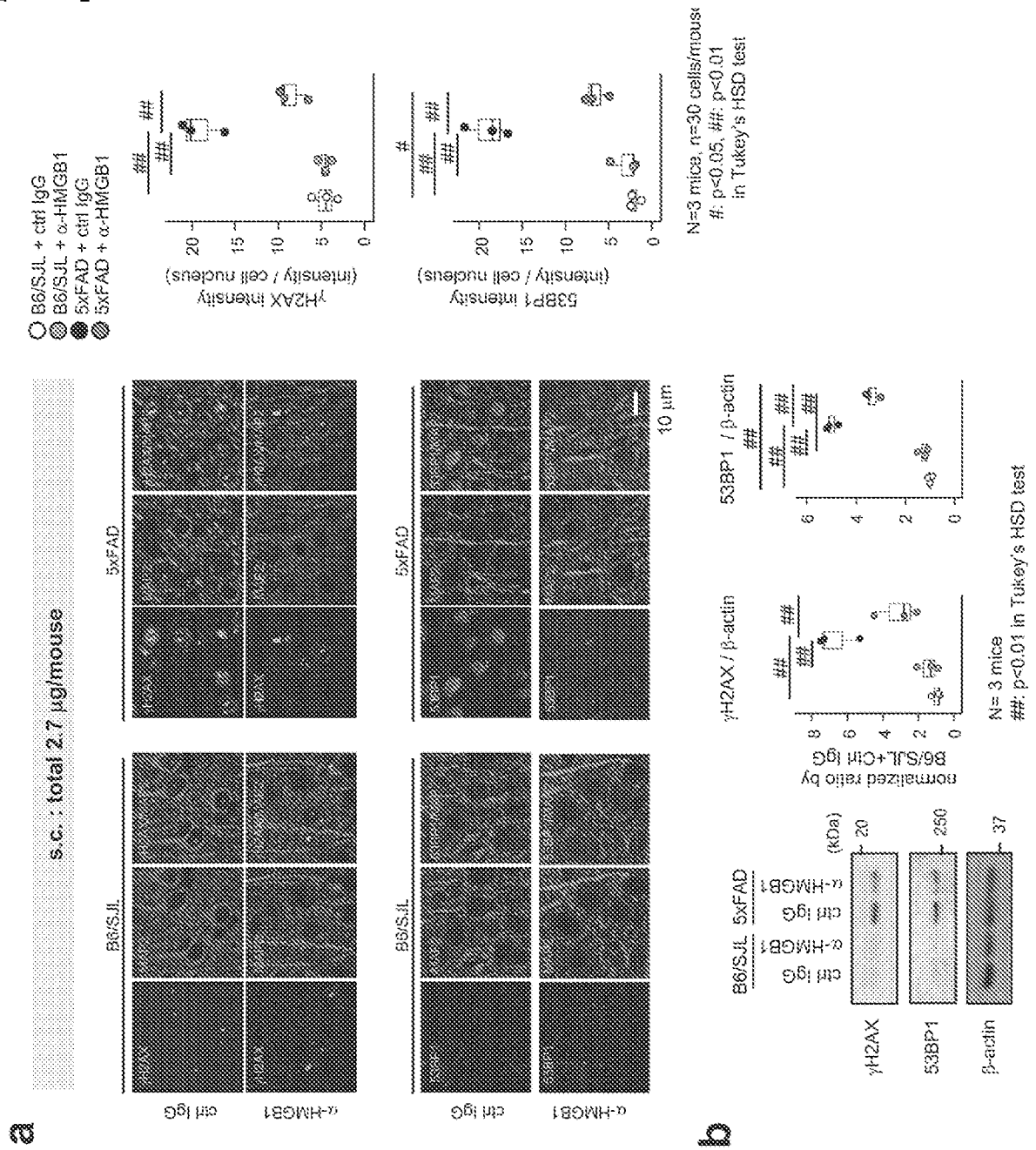
[図16]



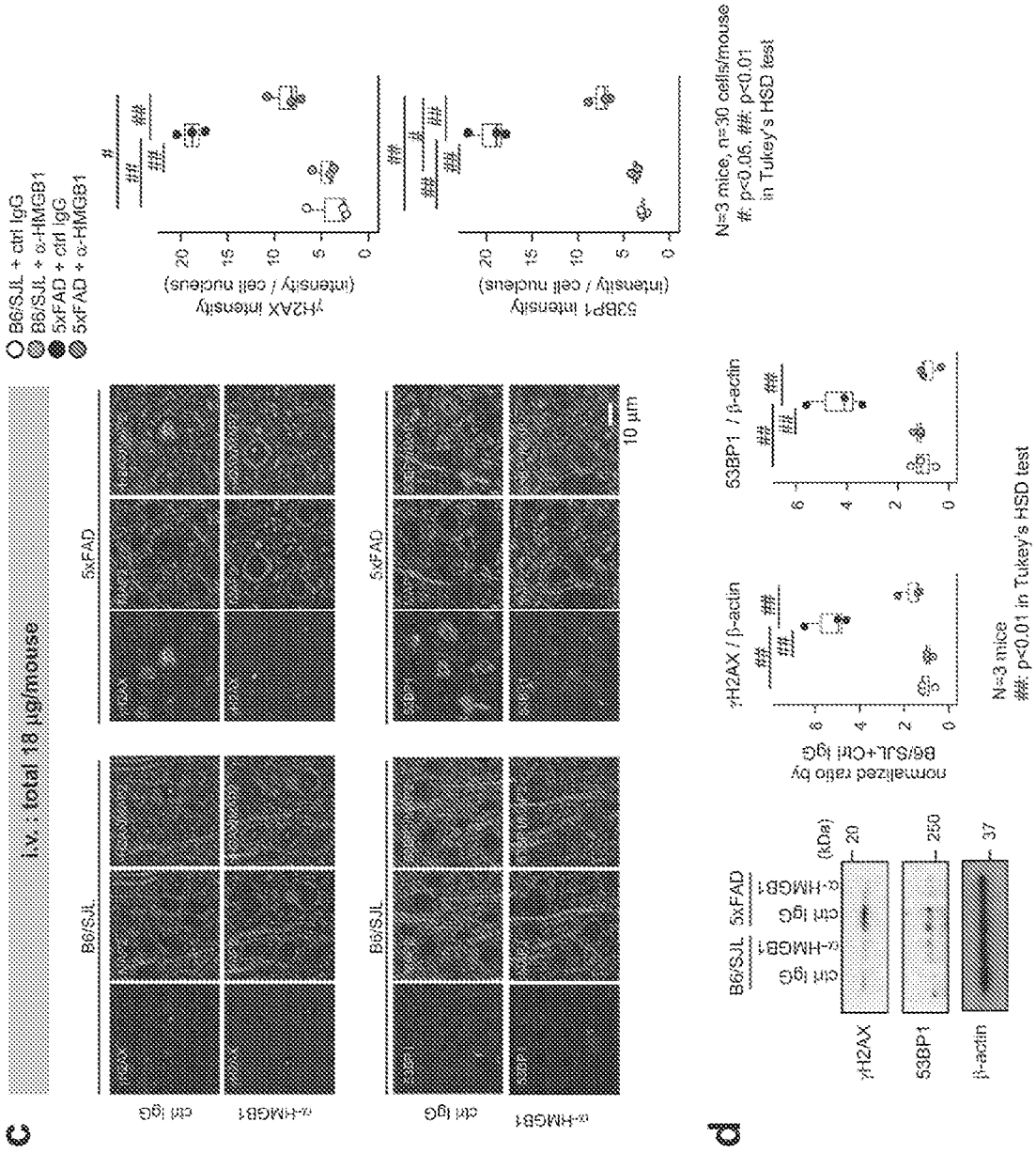
[図17]



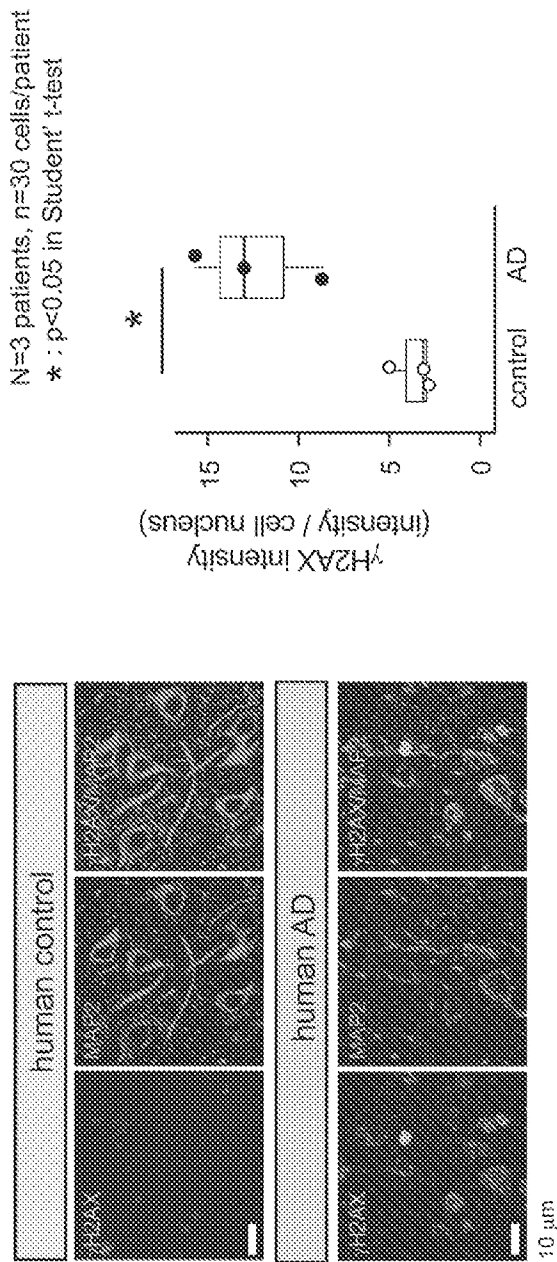
[図18a-b]



[18c-d]

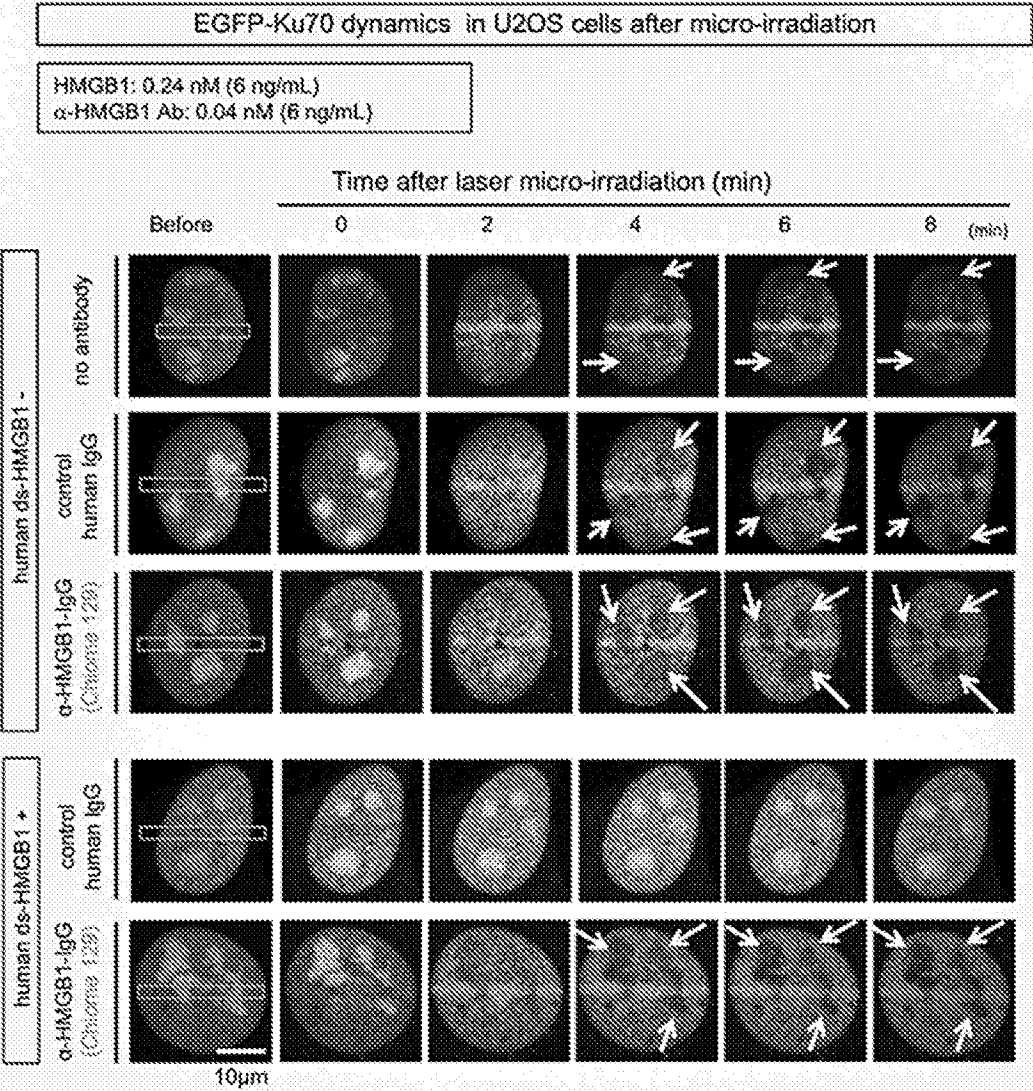


[Figure 18e]

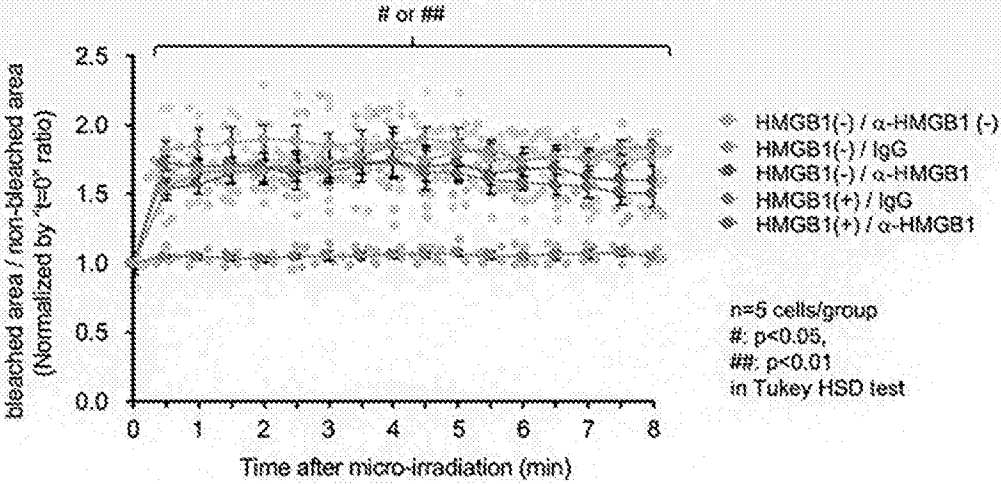


[18f-g]

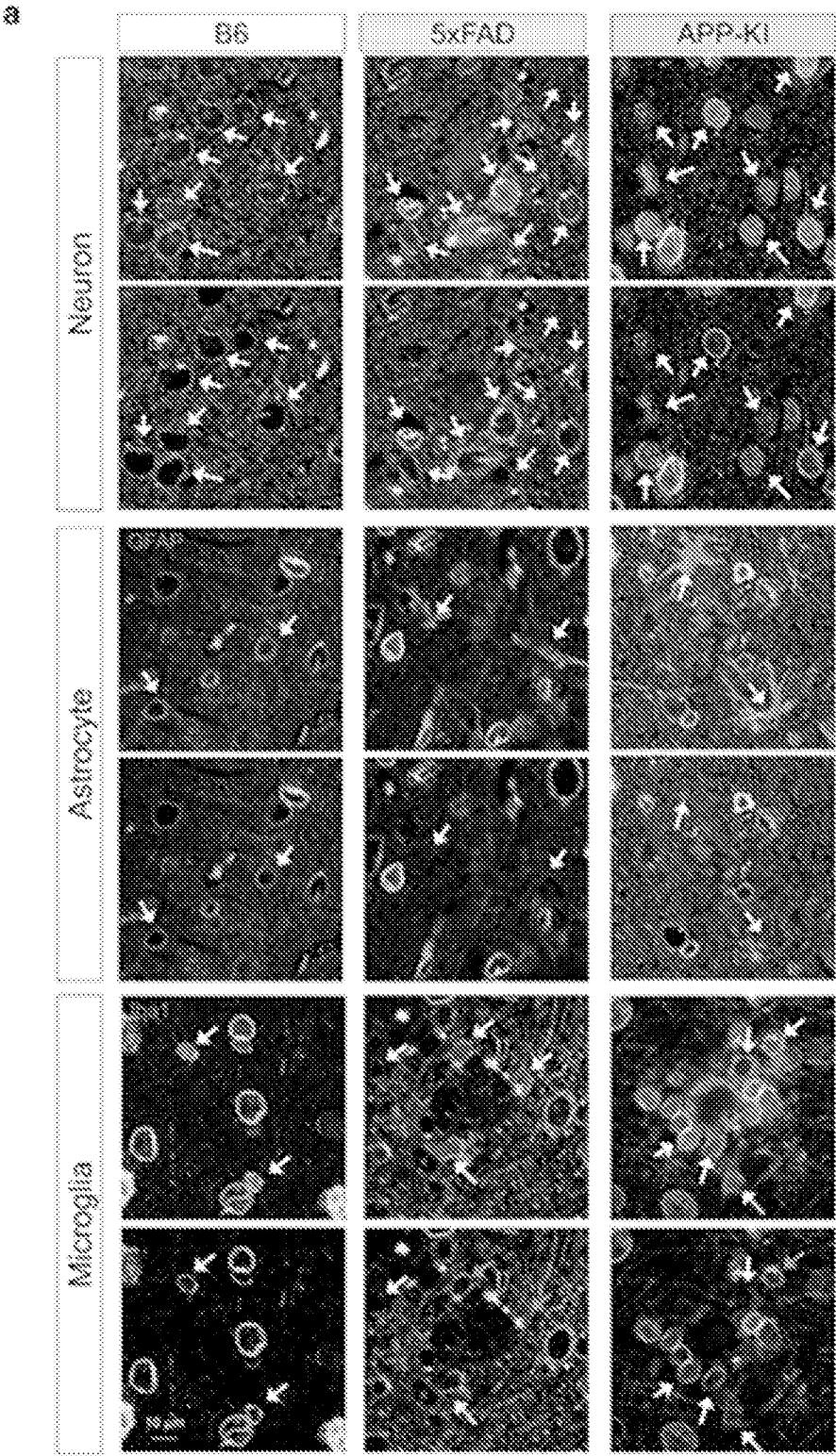
f



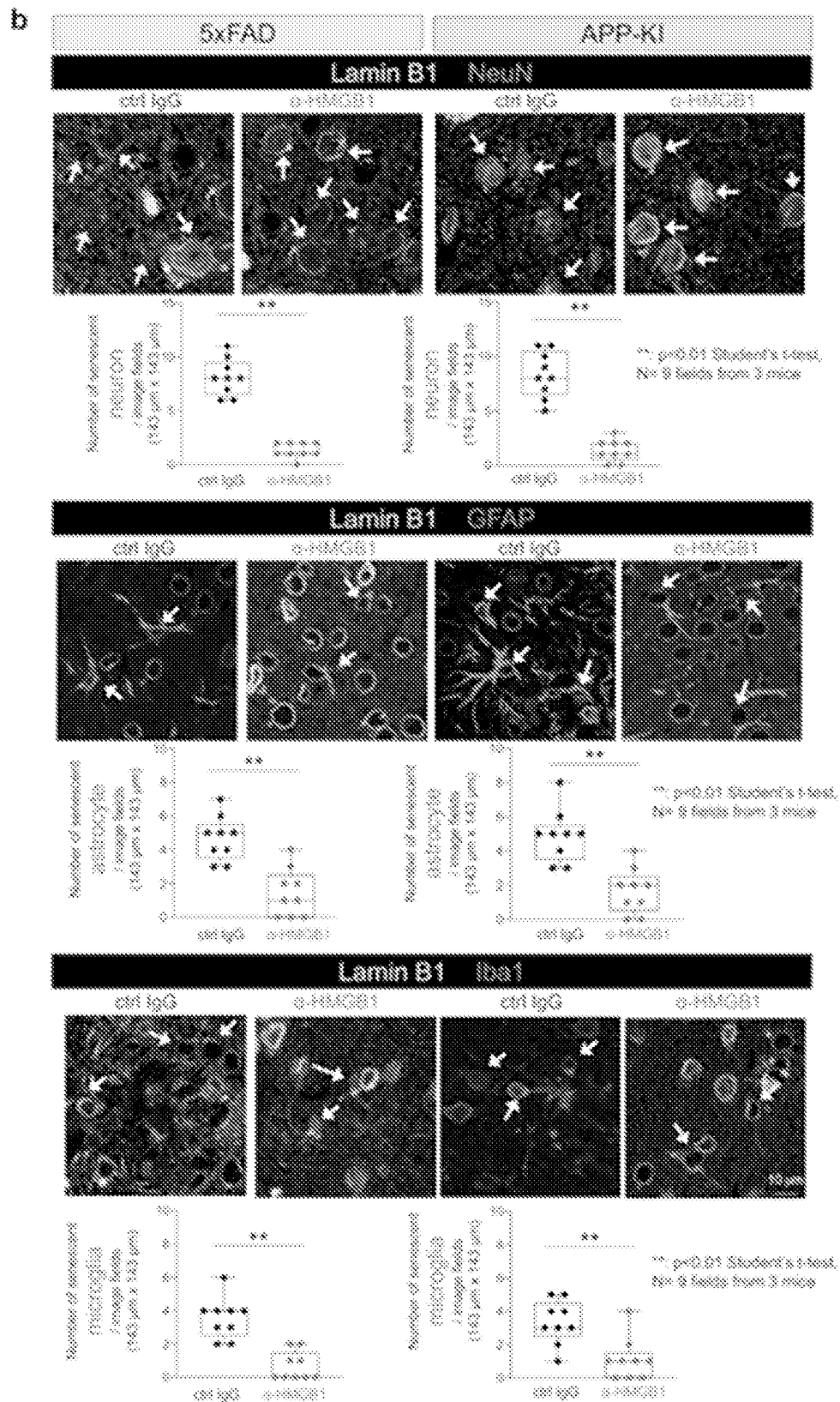
g



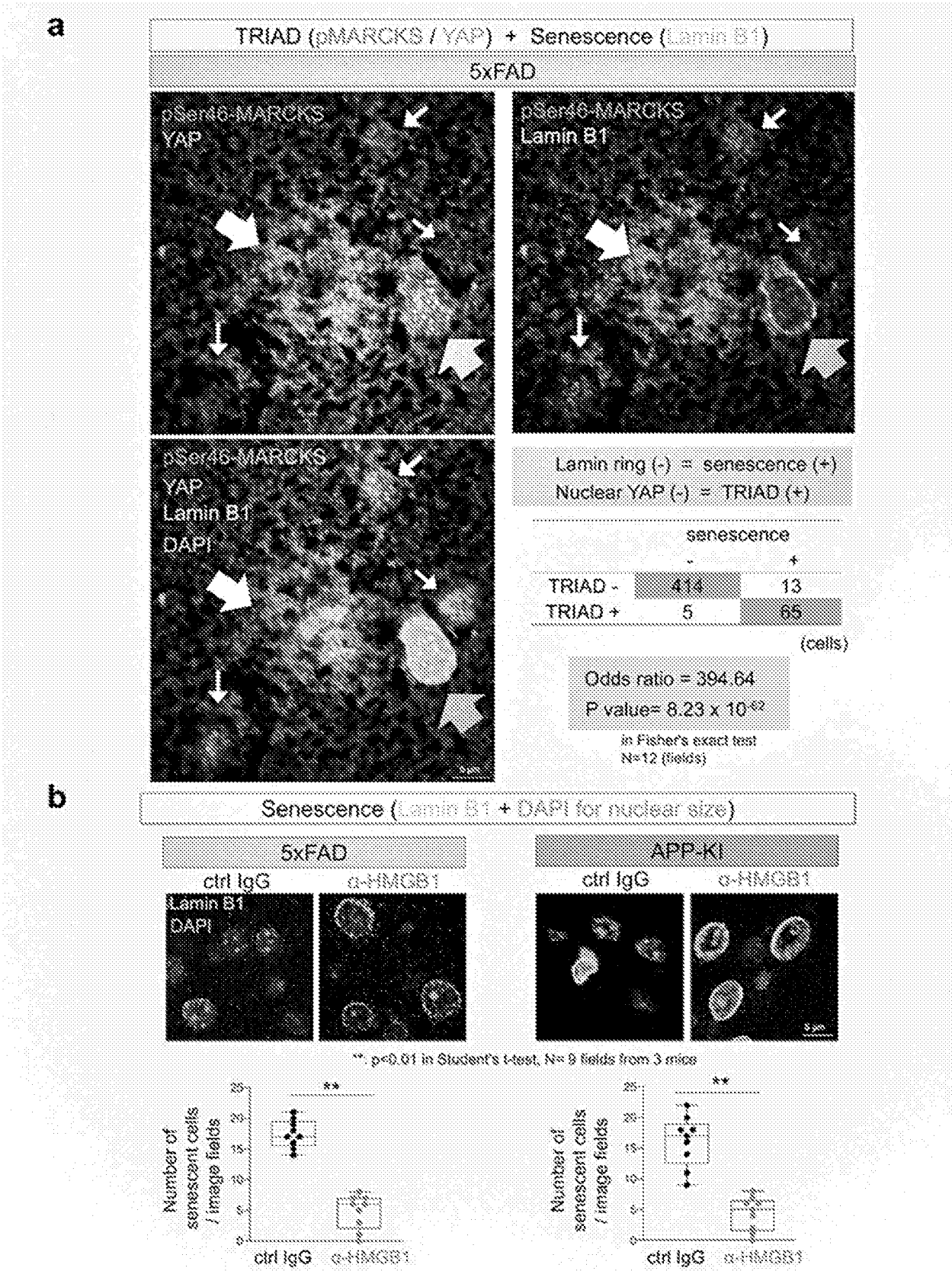
[図19a]



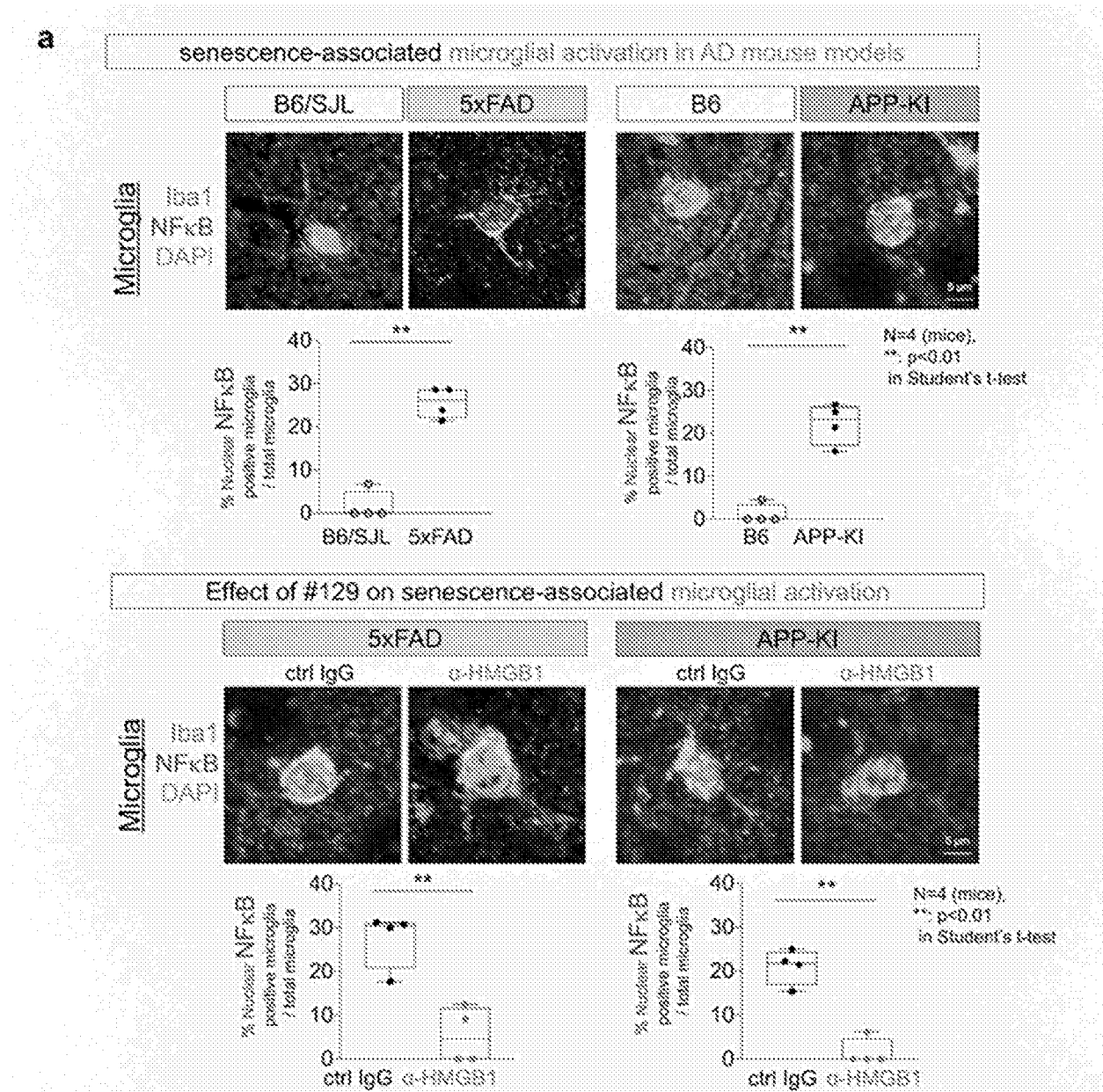
[図19b]



[図20]

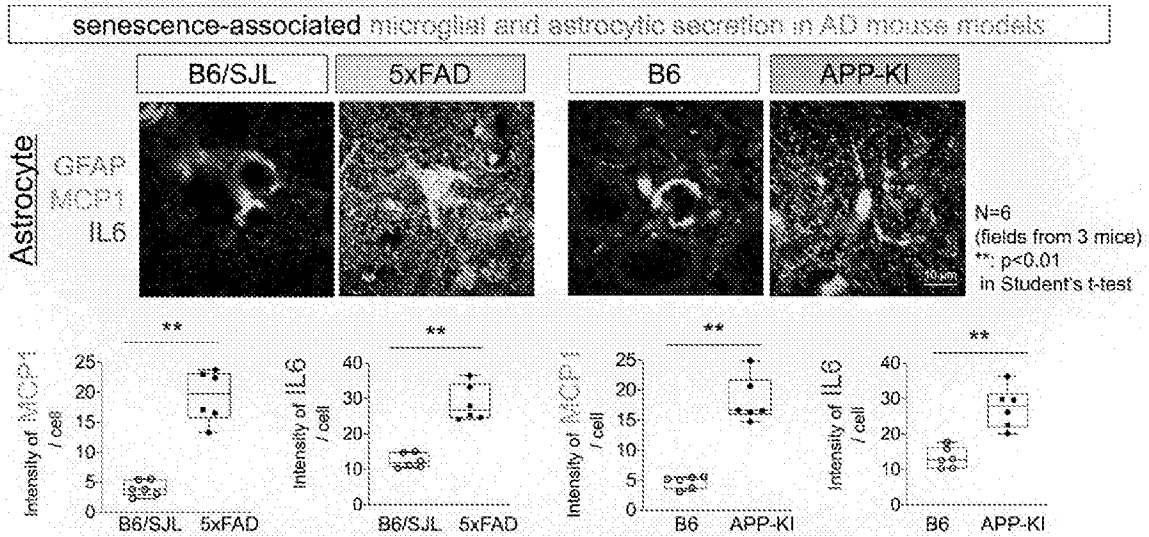


[図21a]

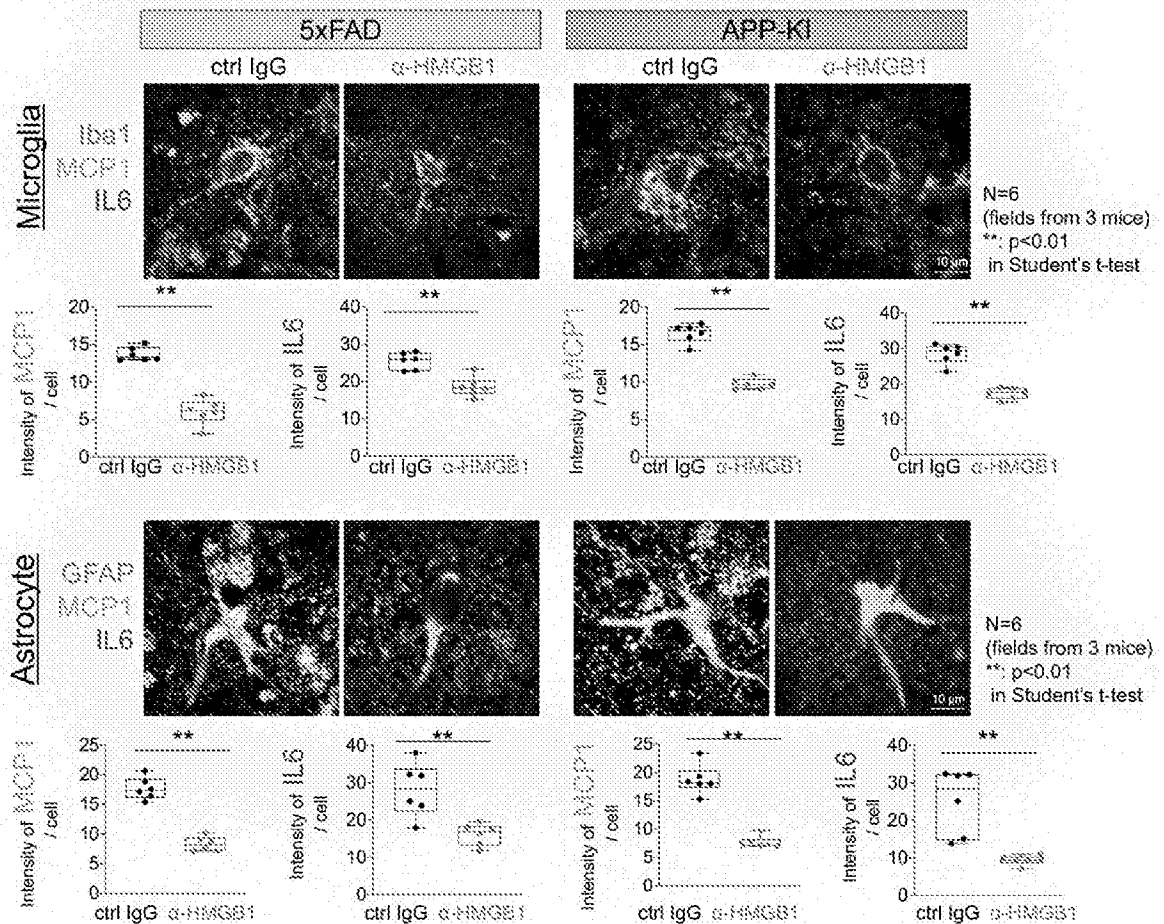


[図21b]

b

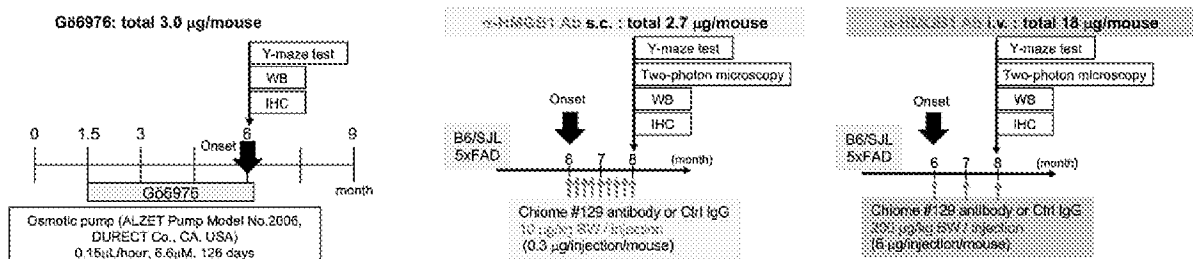


Effect of #129 on senescence-associated microglial and astrocytic secretion

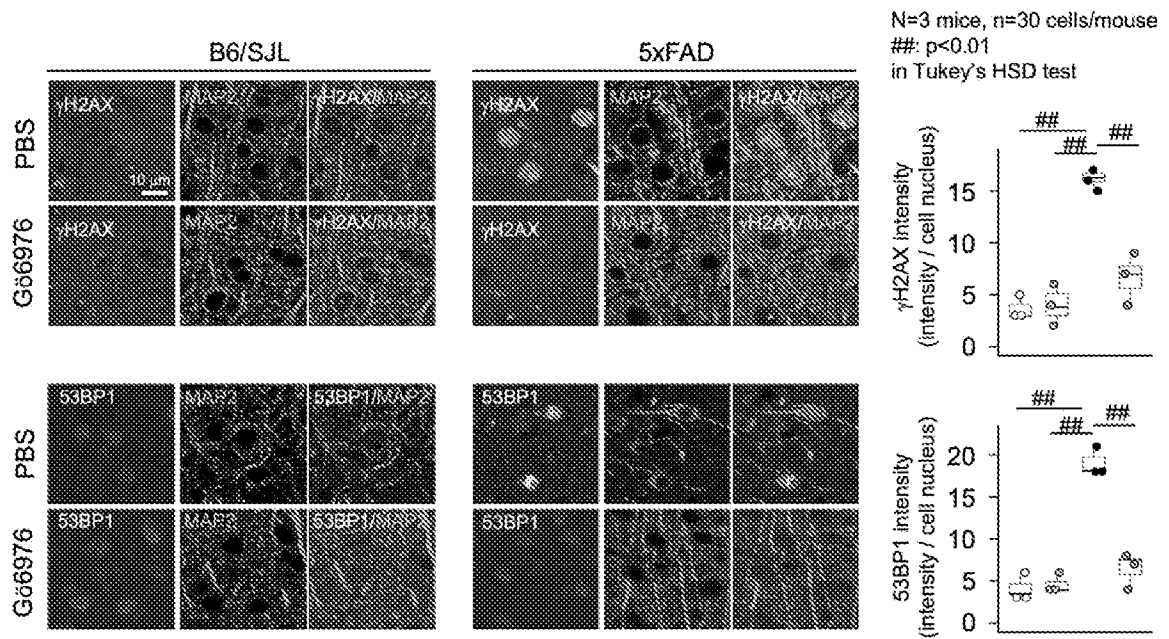


[図22a]

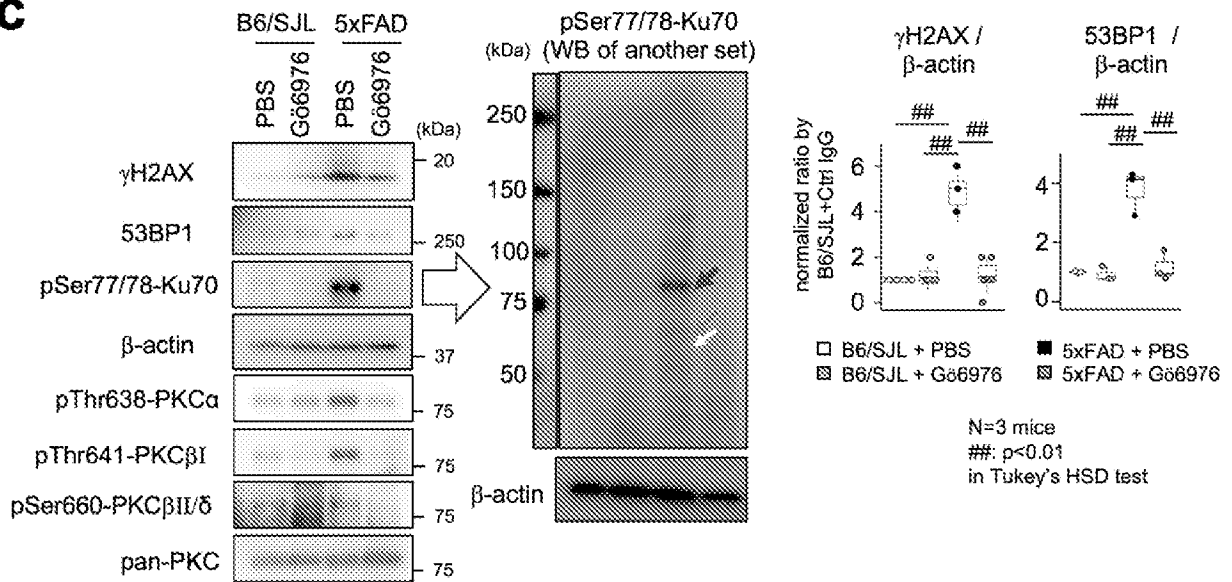
a



[22b]

b

[22c]

c

[図22d]

d

Effect of PKC inhibitor (Gö6976) on
Y-maze (Alternation Rate) at 6 months

○ B6/SJL + PBS (N=7)

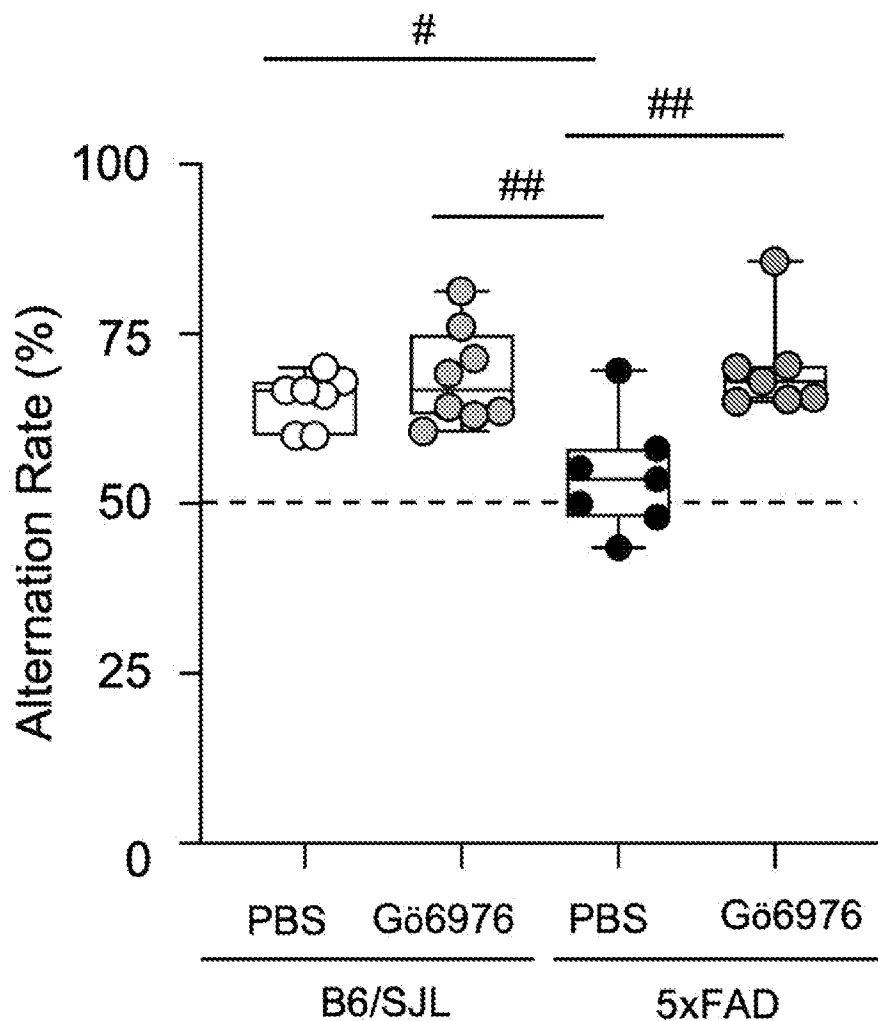
● B6/SJL + Gö6976 (N=8)

● 5xFAD + PBS (N=7)

● 5xFAD + Gö6976 (N=7)

: $p < 0.05$,## : $p < 0.01$

in Tukey's HSD test



[図22e]

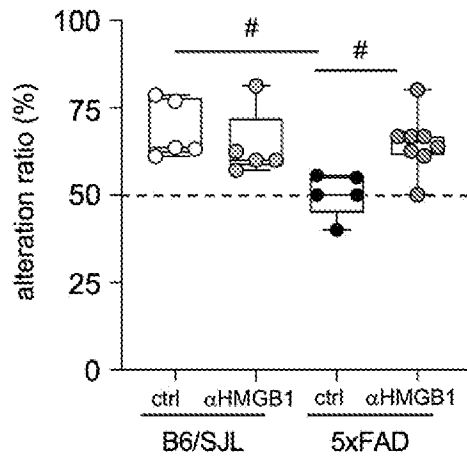
e

Effect of α -HMGB1 Ab on
Y-maze (Alternation Rate) at 8 months

: $p < 0.05$,## : $p < 0.01$ in Tukey's HSD test

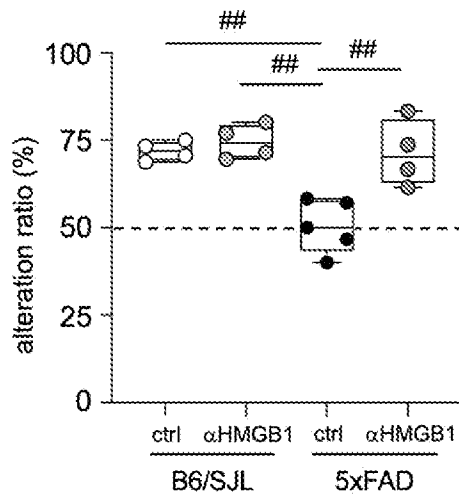
s.c. : total 2.7 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

- B6/SJL + ctrl IgG (N=5)
- B6/SJL + α -HMGB1 (N=5)
- 5xFAD + ctrl IgG (N=5)
- 5xFAD + α -HMGB1 (N=8)



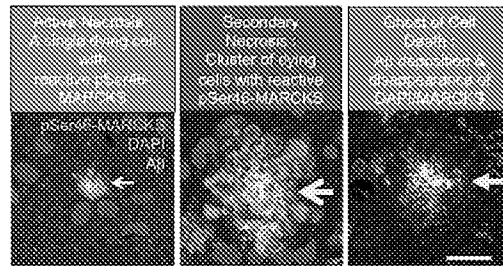
i.v. : total 18 $\mu\text{g}/\text{mouse}$

- B6/SJL + ctrl IgG (N=4)
- B6/SJL + α -HMGB1 (N=4)
- 5xFAD + ctrl IgG (N=5)
- 5xFAD + α -HMGB1 (N=4)



[22f]

f

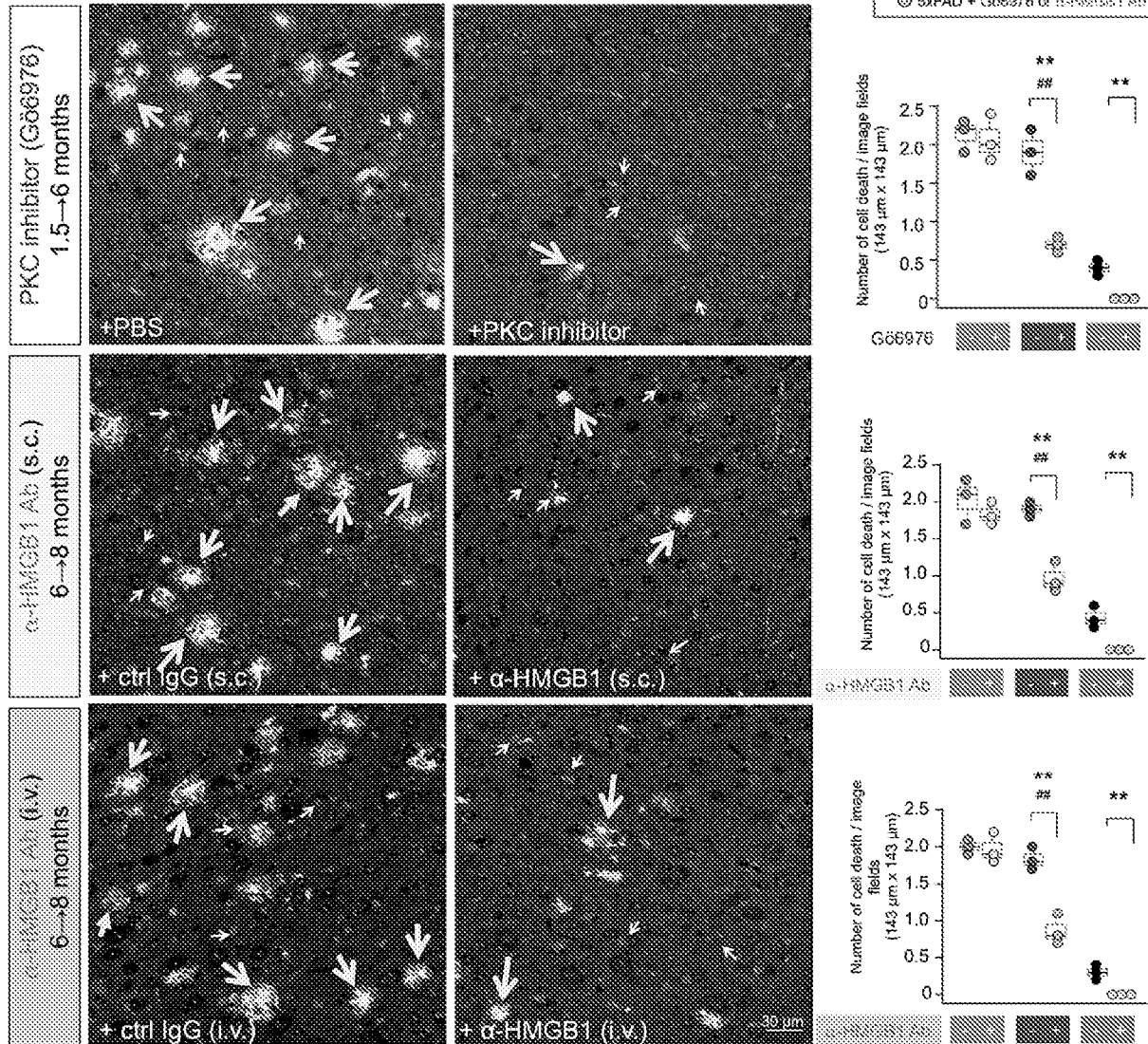
count
each typegraph and
statistics

N=3 mice
n=30 fields/mouse
: p<0.01 in Tukey's HSD test
** : p<0.01 in Student t-test

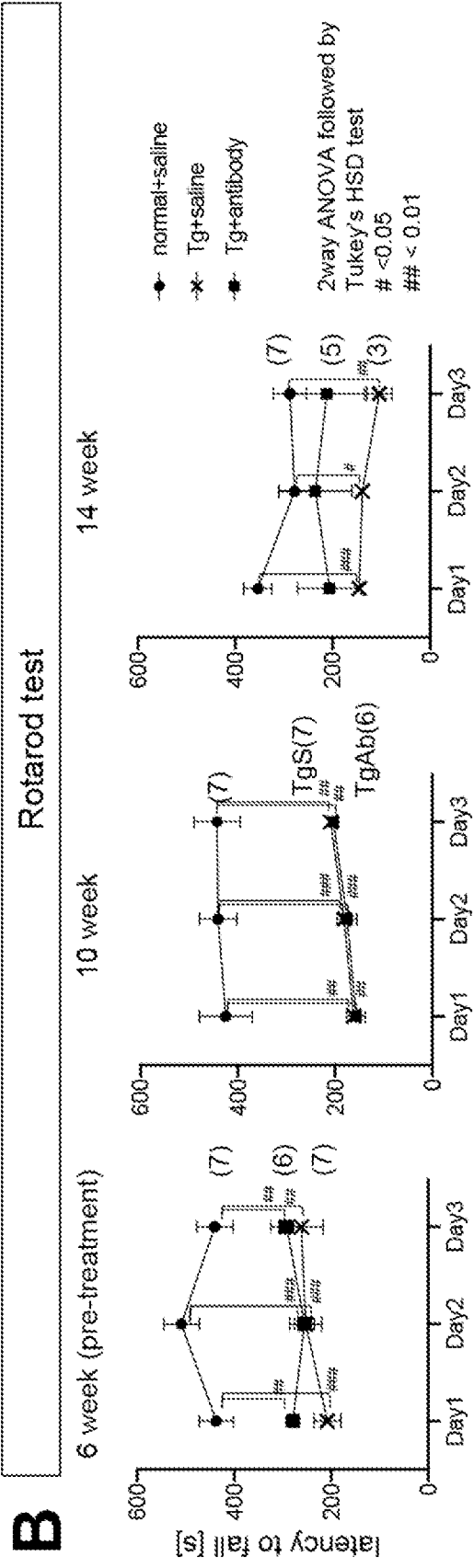
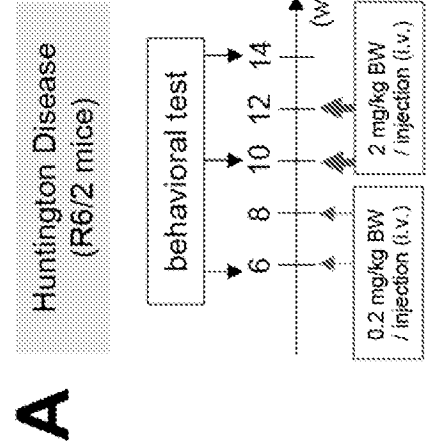
Primary Nucleus
 ○ 5xFAD + PBS or control IgG
 ● 5xFAD + G66976 or α -HMGB1 Ab

Secondary Nucleus
 ○ 5xFAD + PBS or control IgG
 ● 5xFAD + G66976 or α -HMGB1 Ab

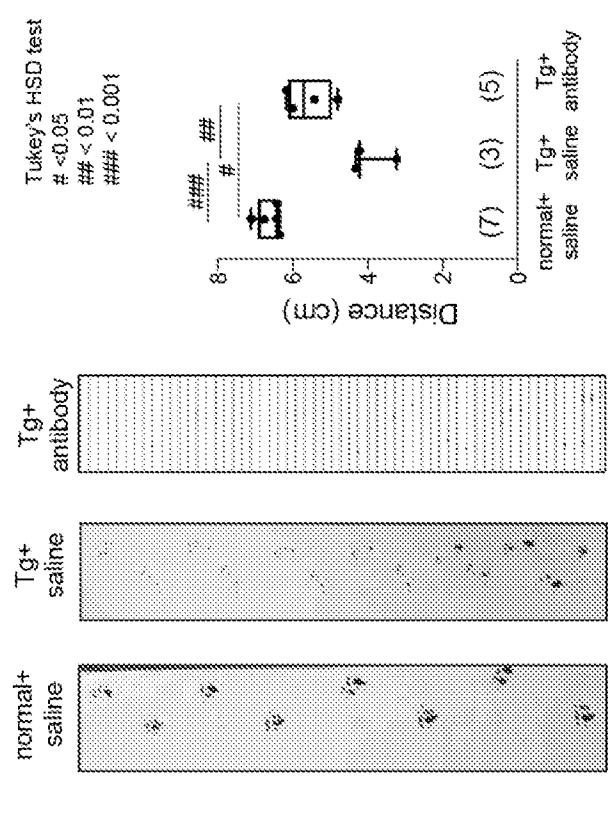
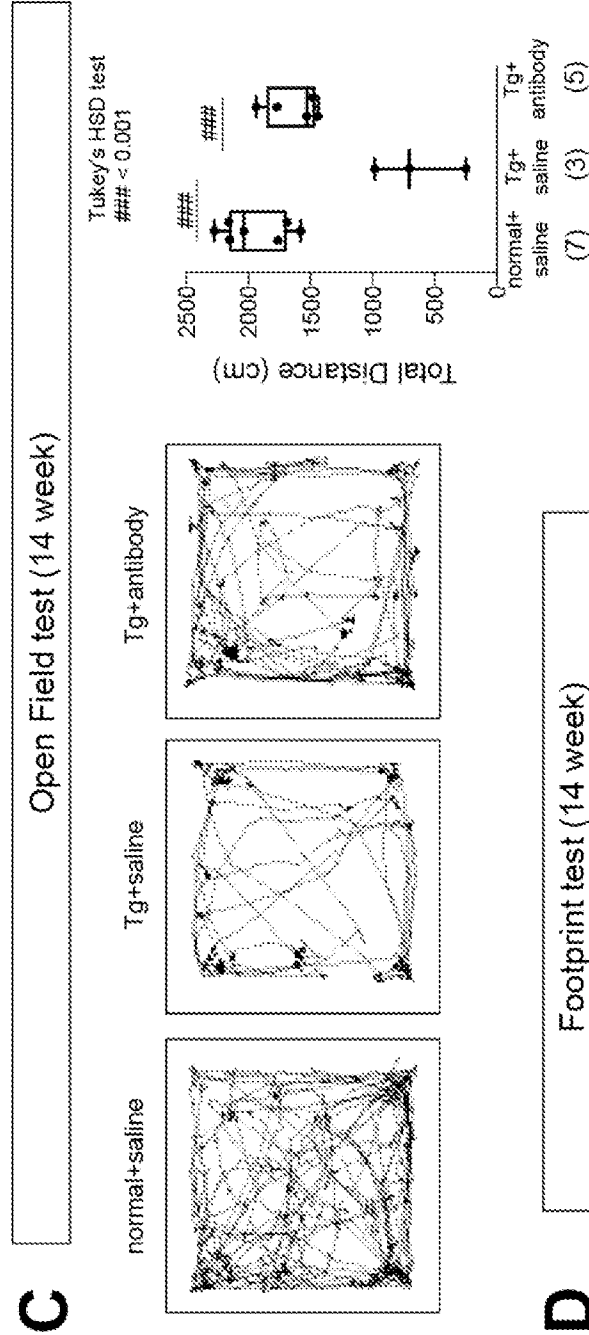
Effects of Cell Death
 ○ 5xFAD + PBS or control IgG
 ● 5xFAD + G66976 or α -HMGB1 Ab



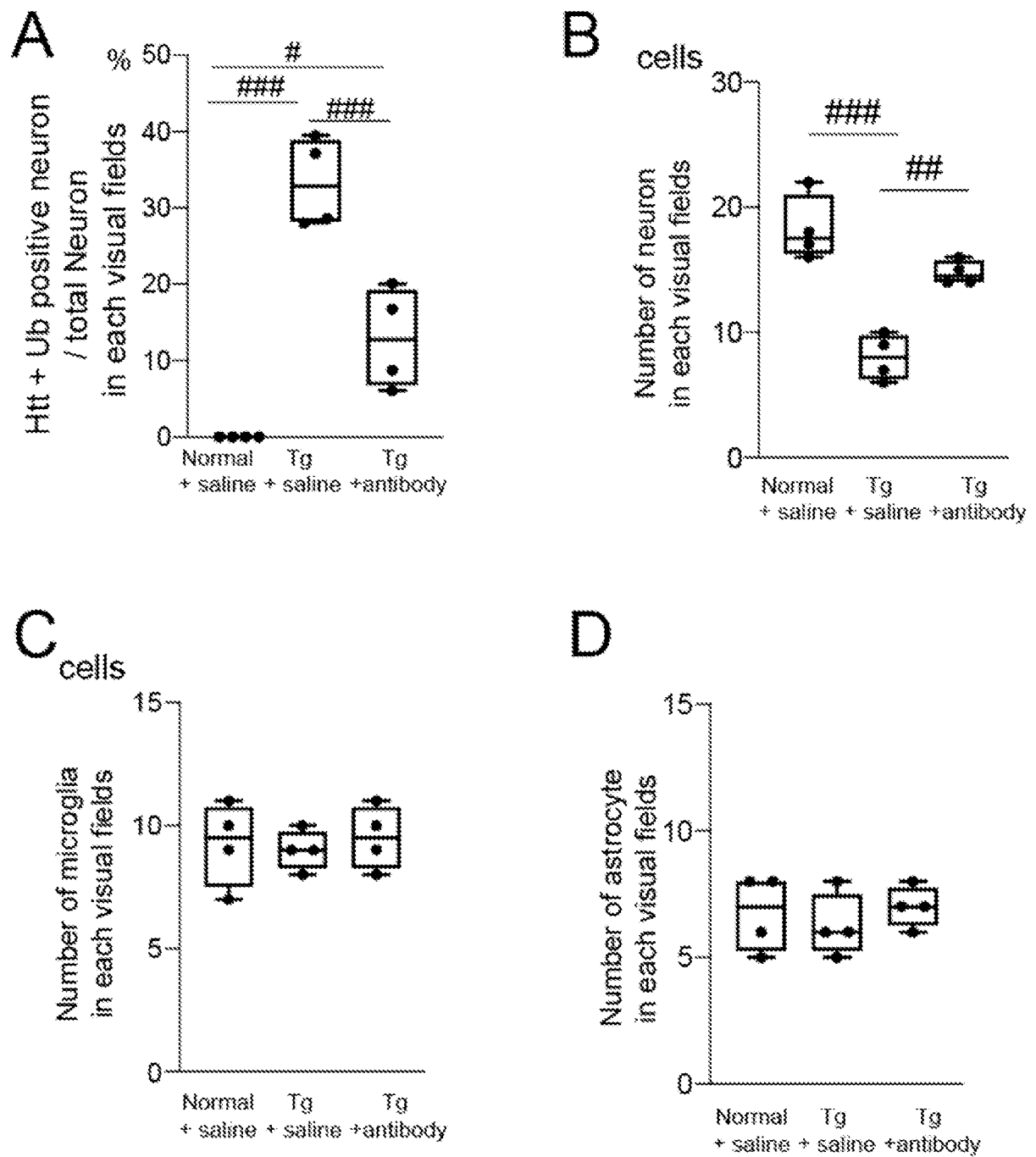
[23A-B]



[ 23C-D]

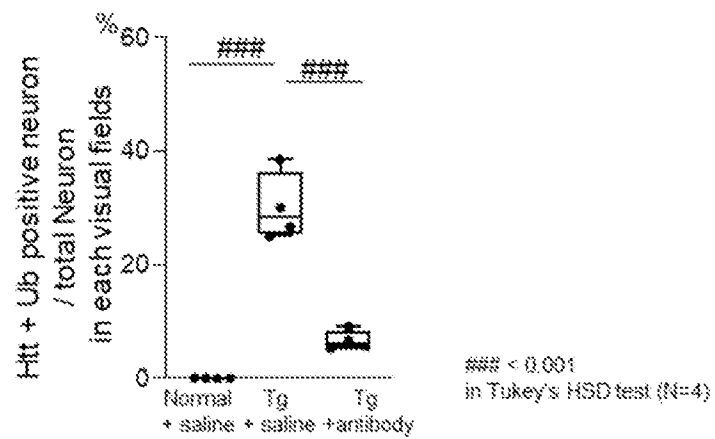
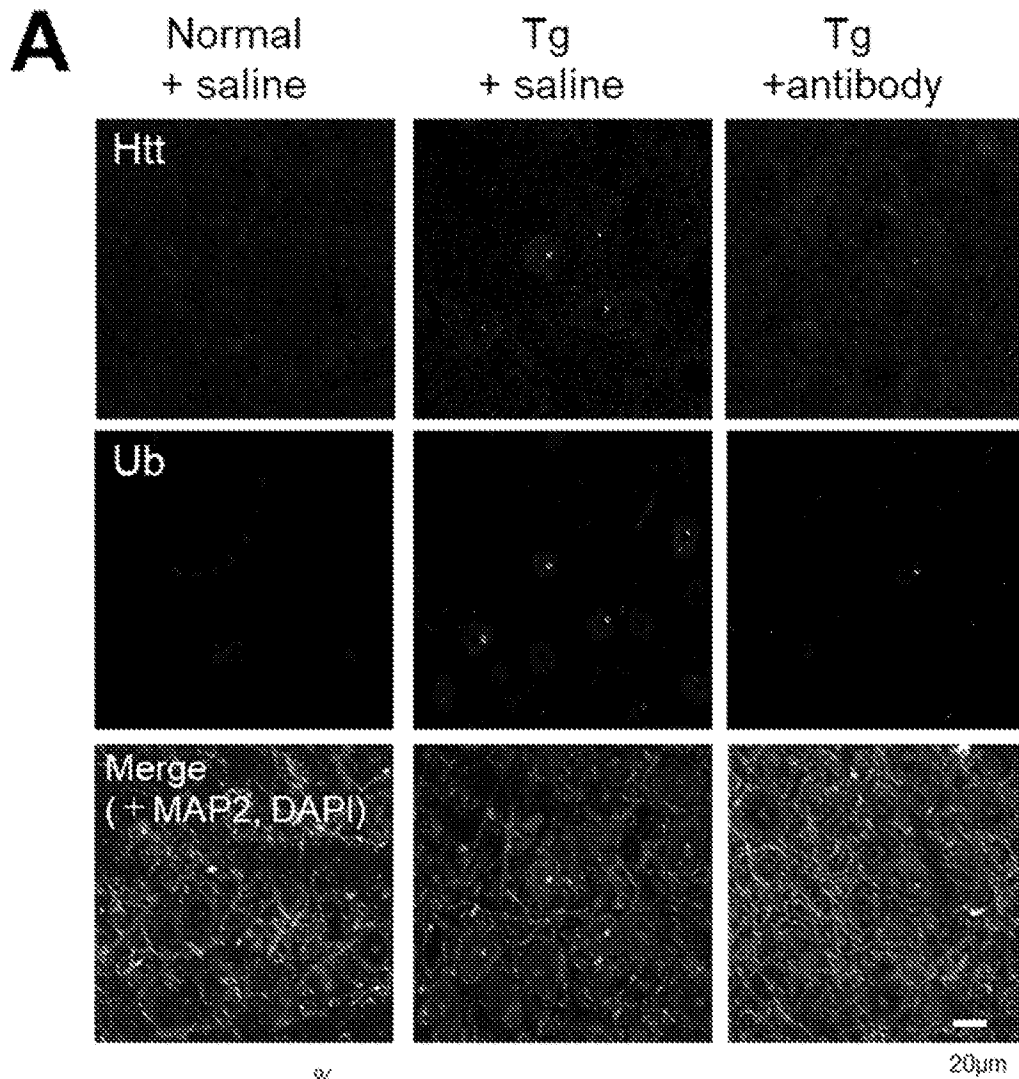


[図24]

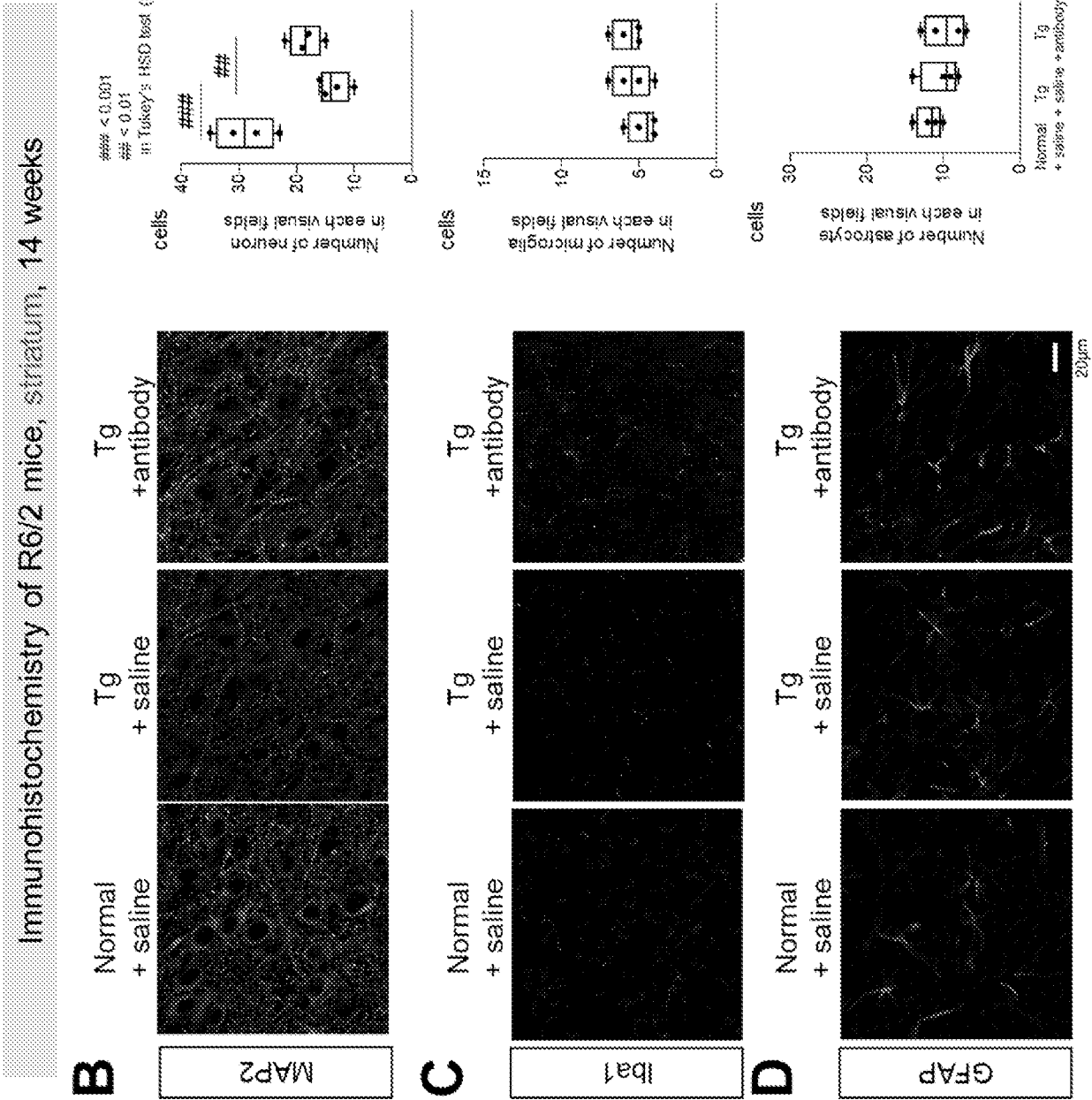


[図25A]

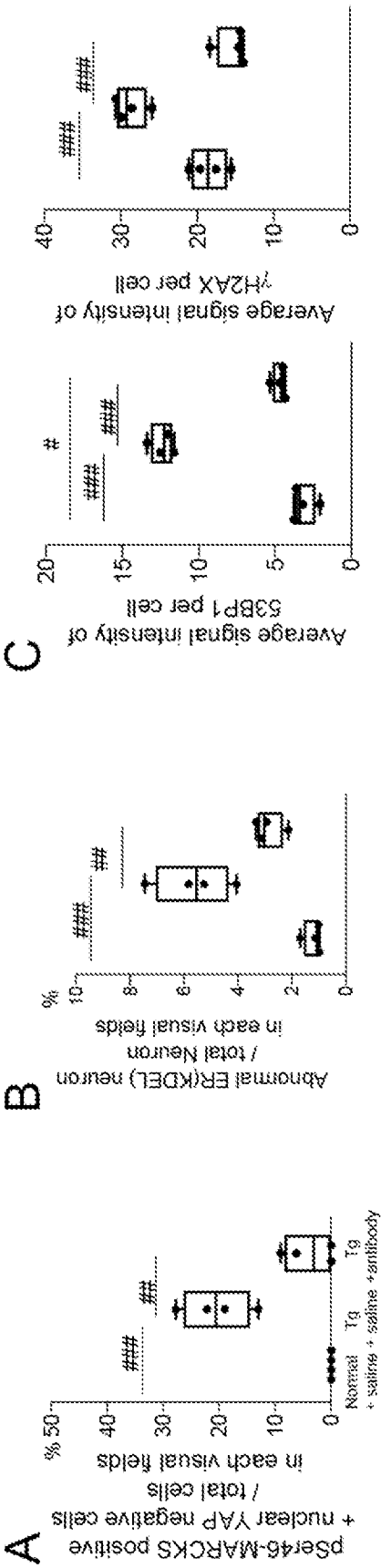
Immunohistochemistry of R6/2 mice, striatum, 14 weeks



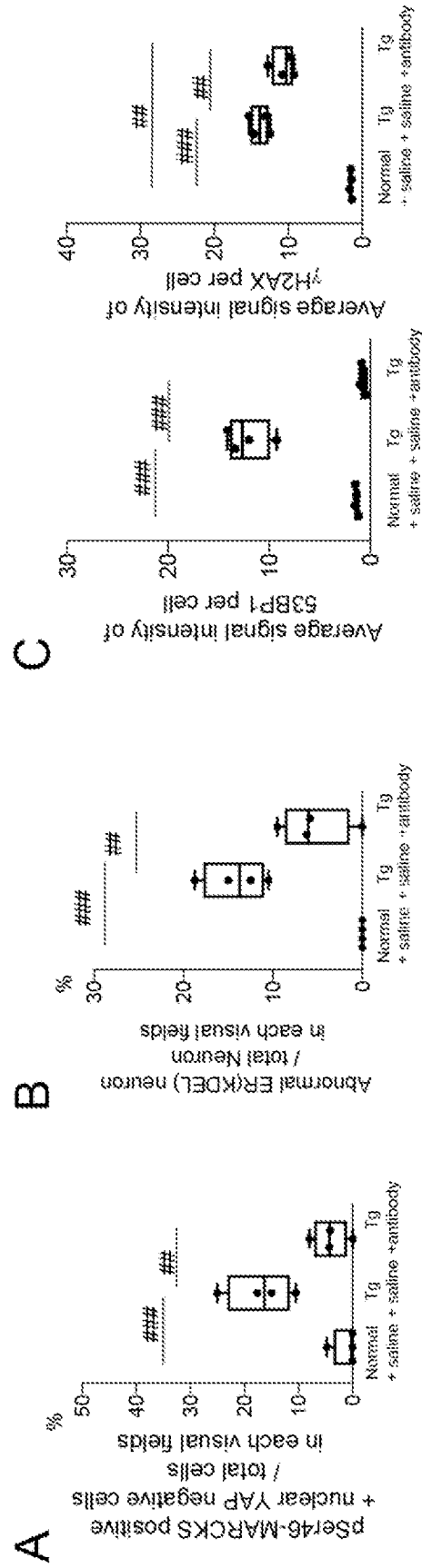
[25B-D]



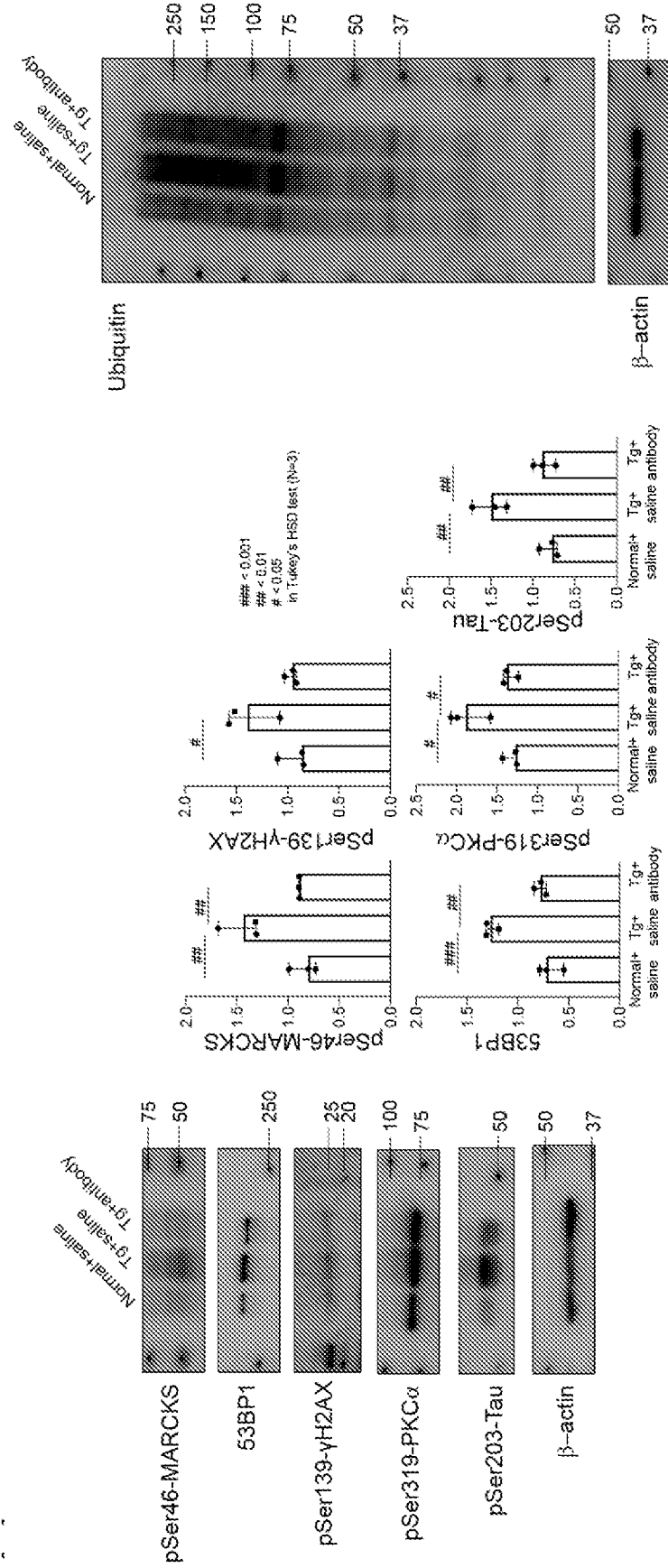
[図26]



[図27]

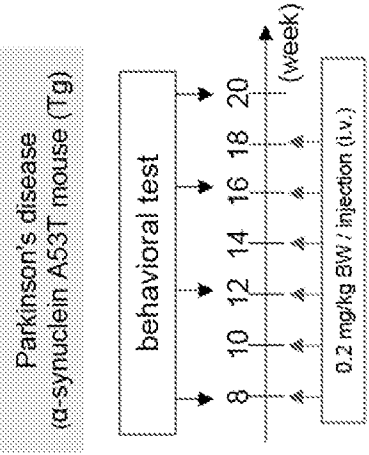


[図28]



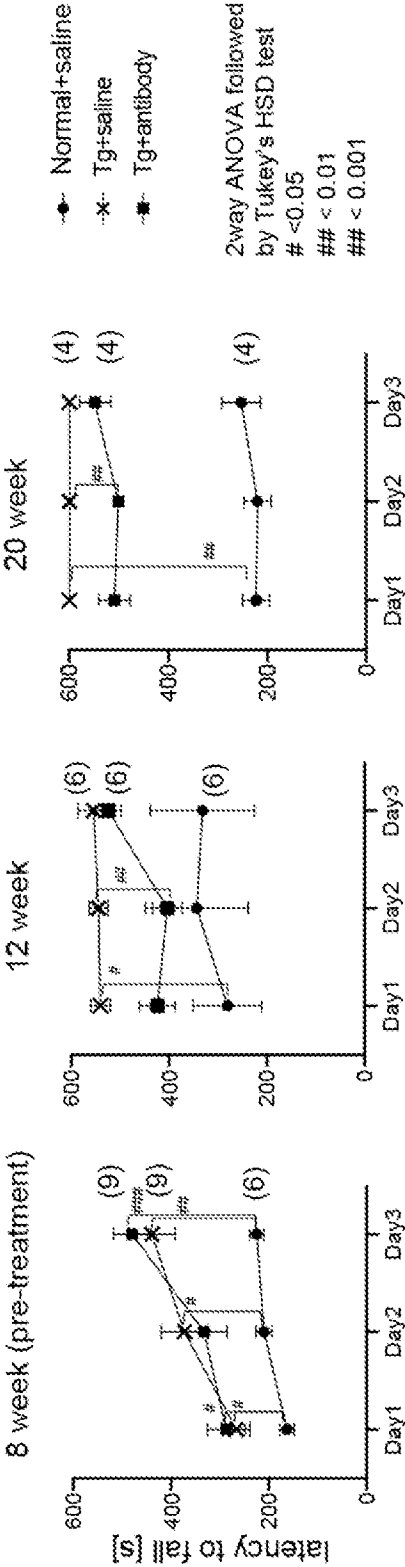
[図29A-B]

A



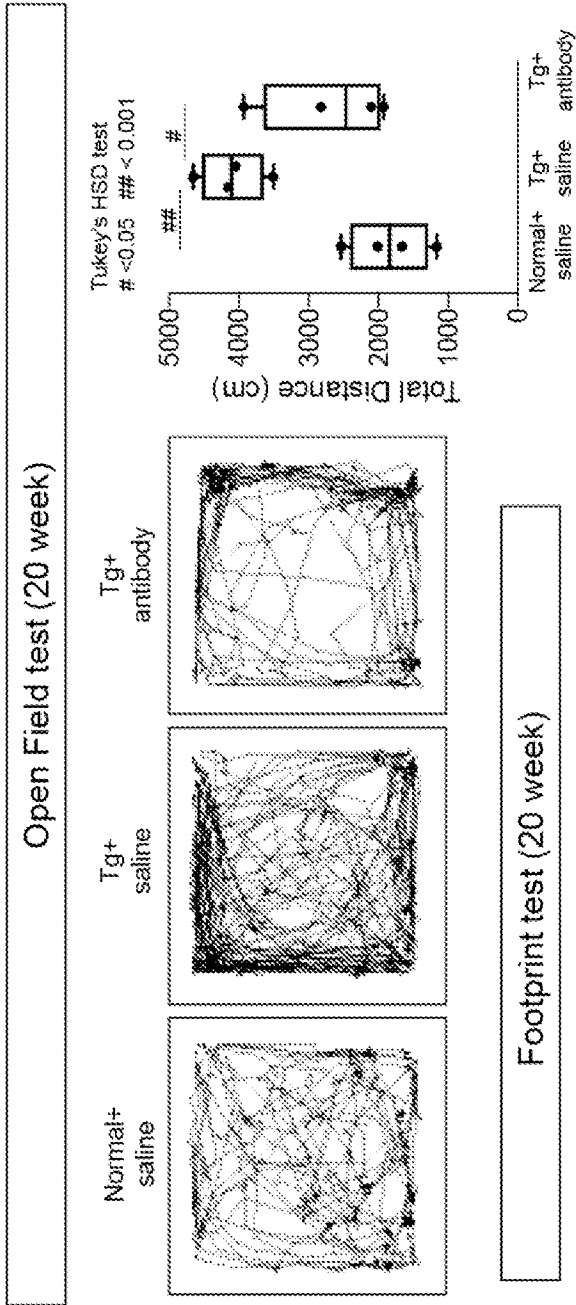
B

Rotarod test

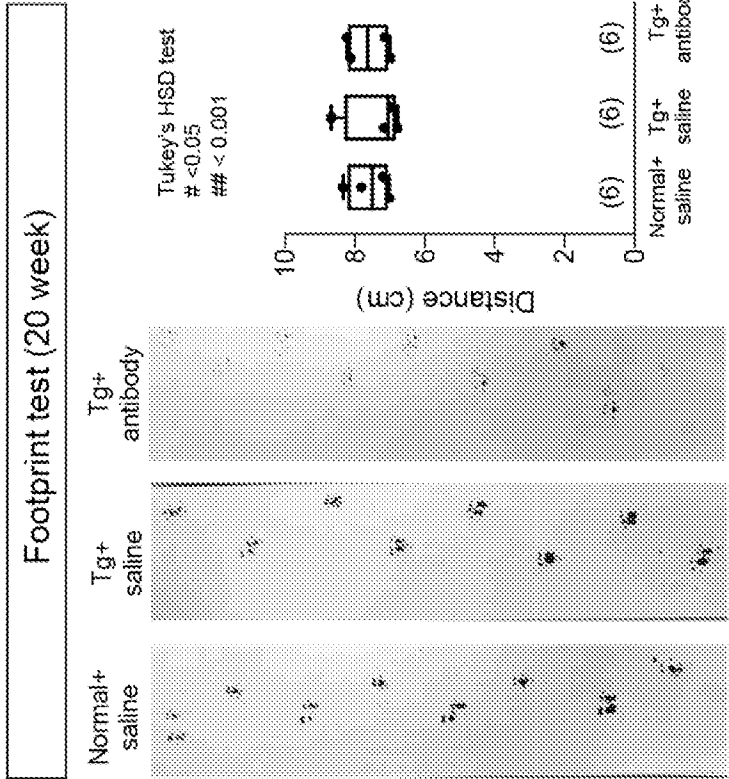


[ 29C-D]

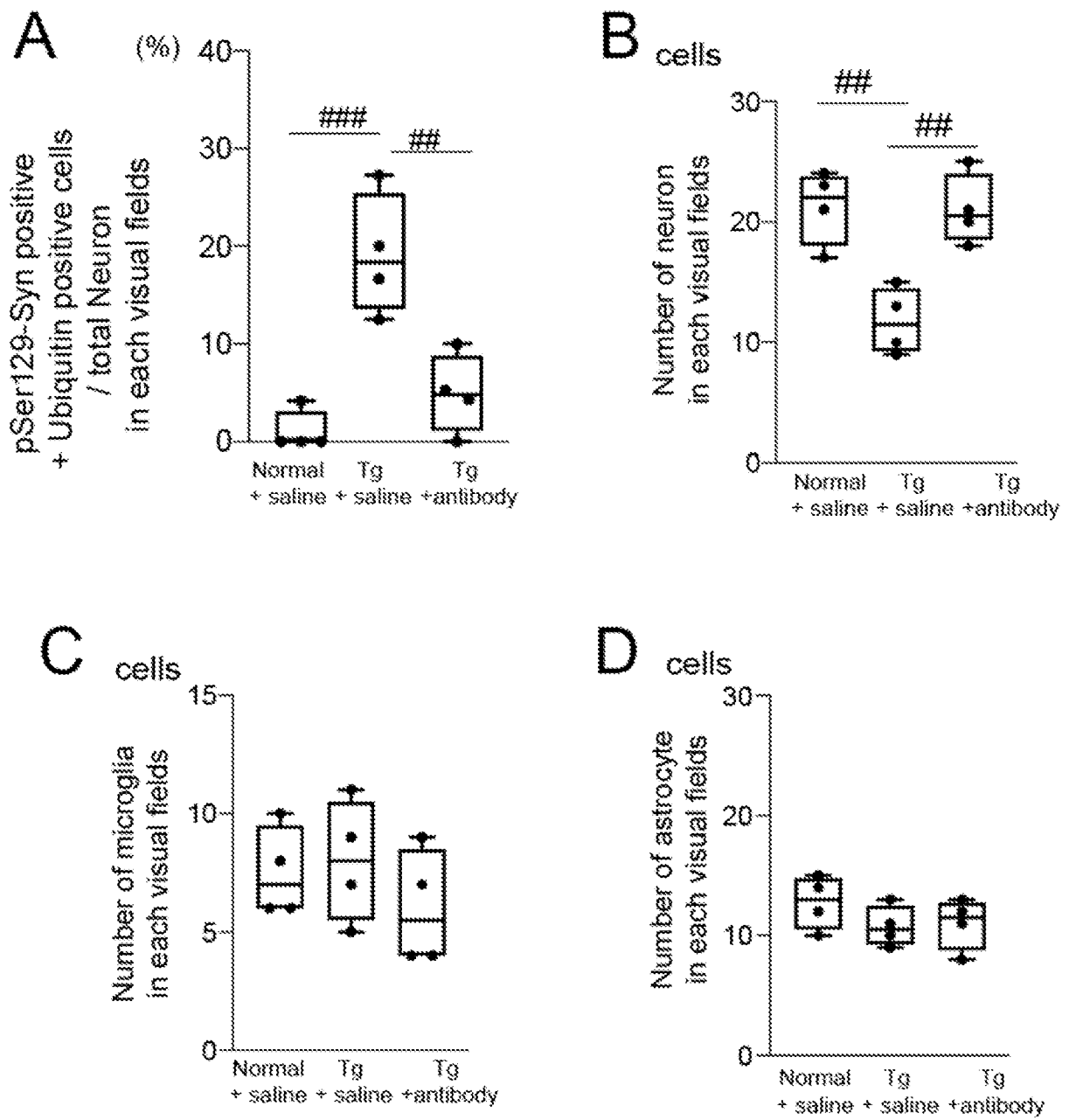
C



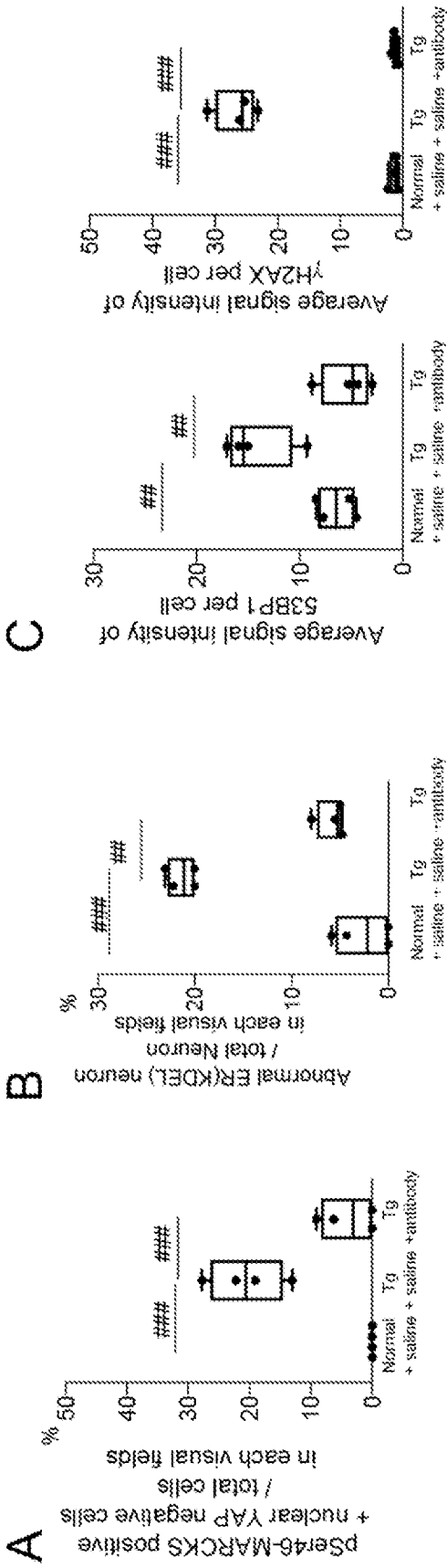
D



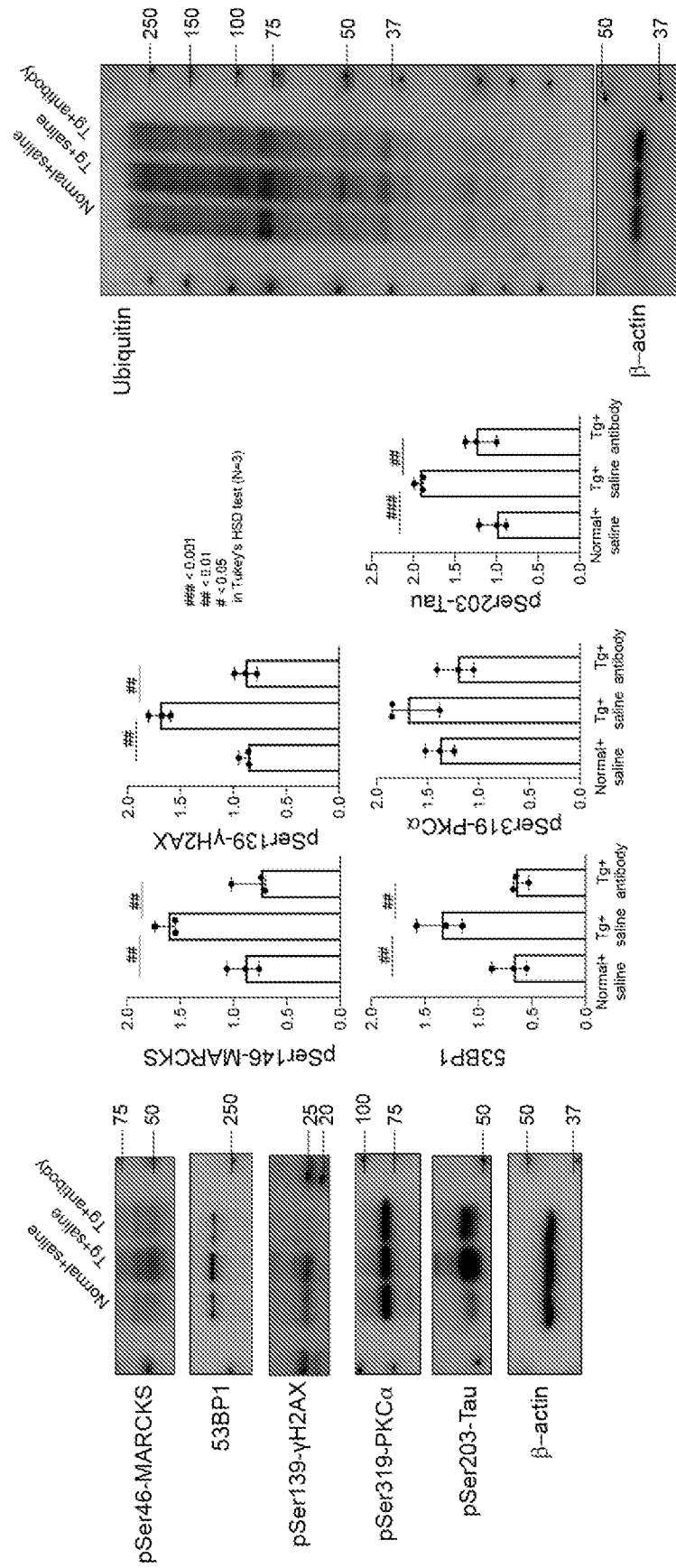
[図30]



[図31]

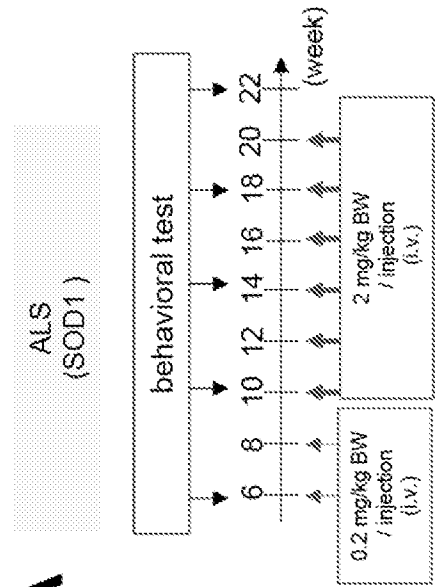


[図32]

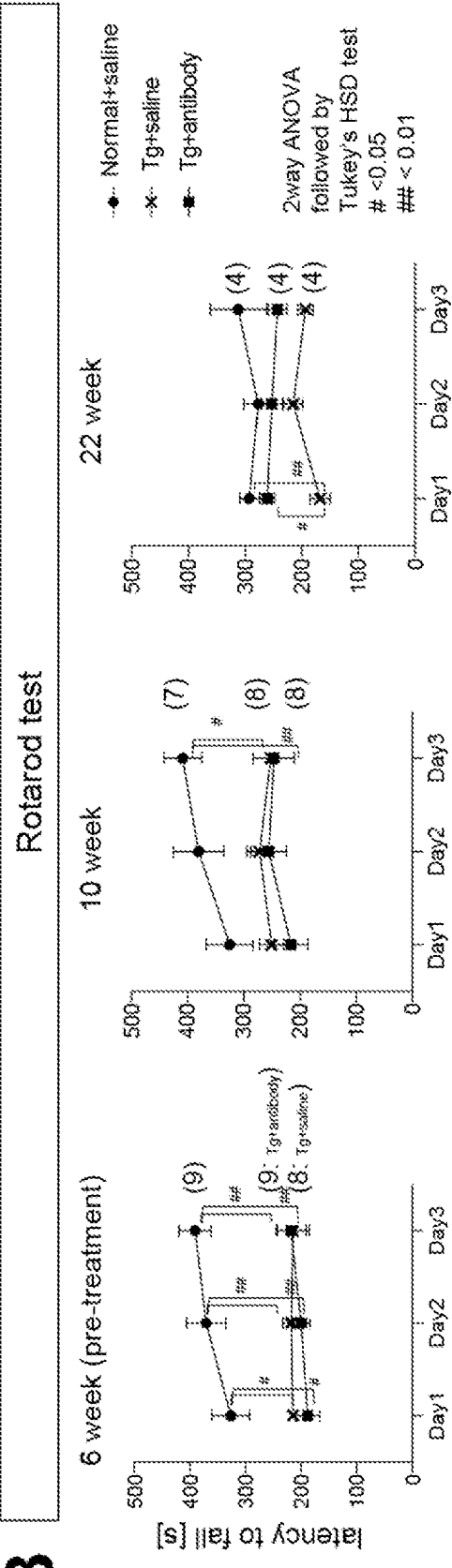


[図33A-B]

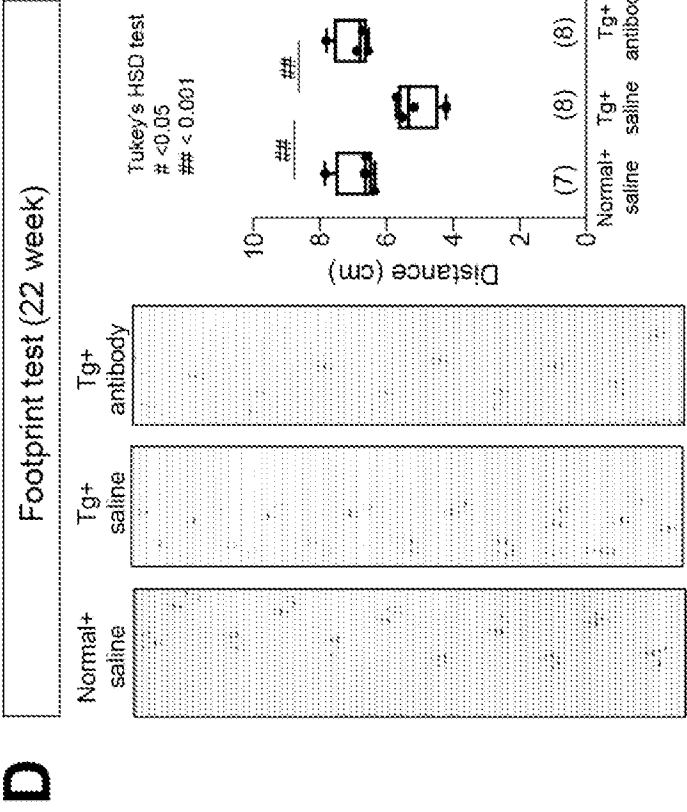
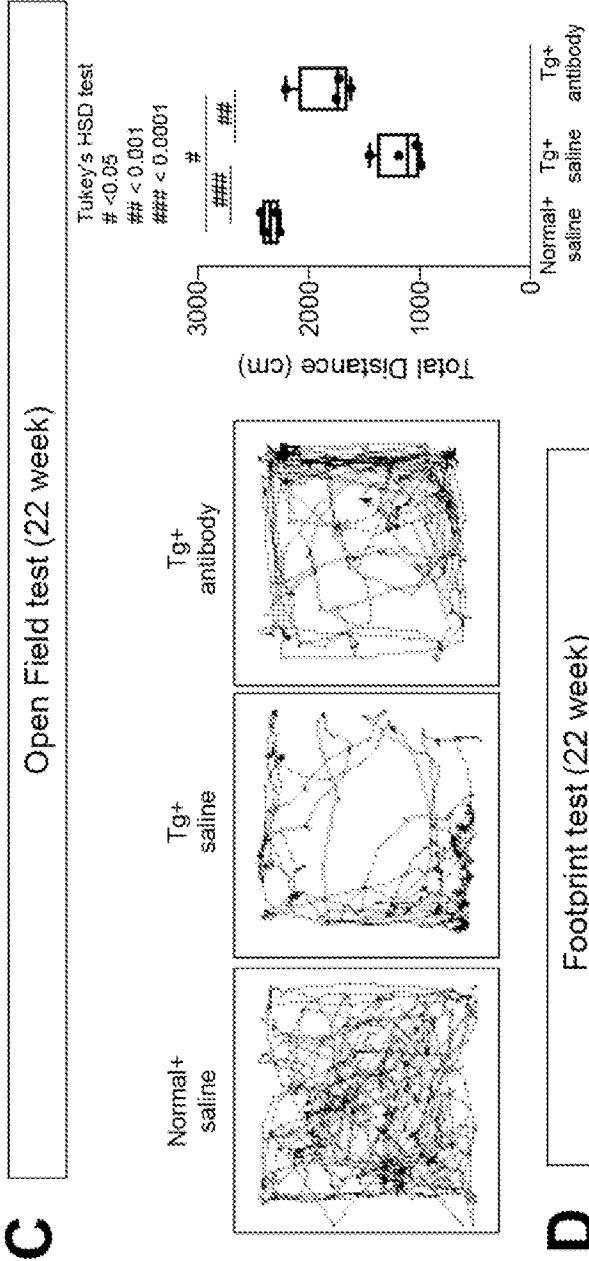
A



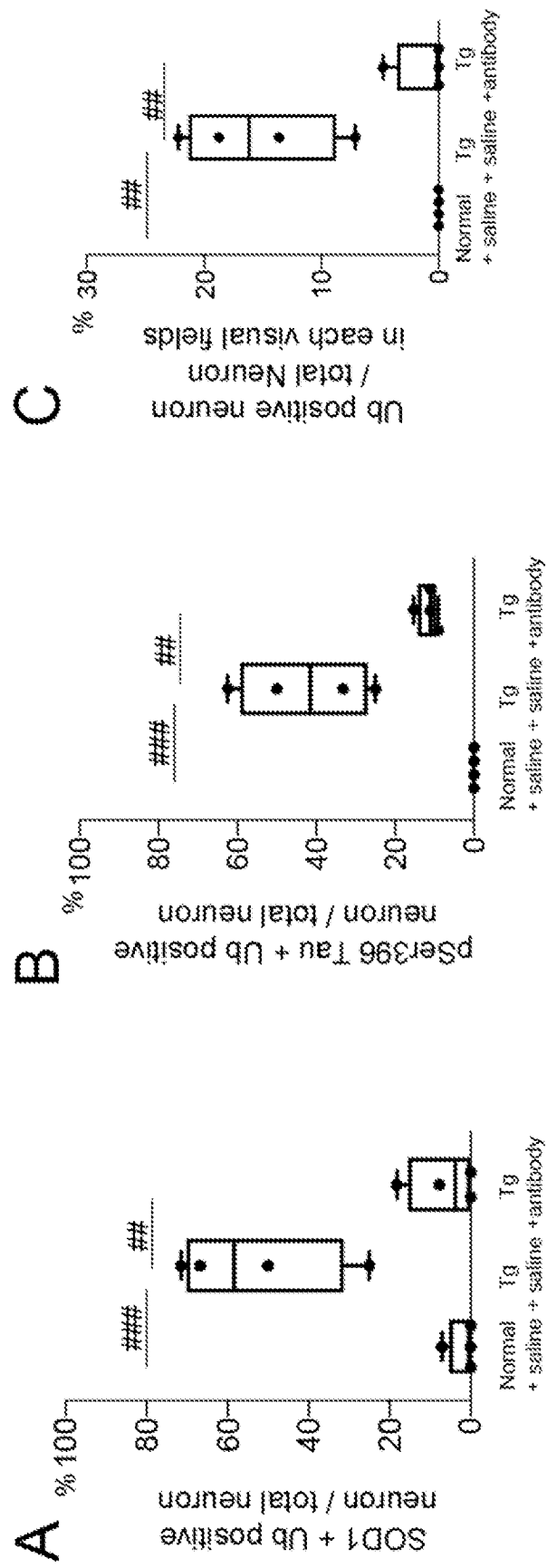
B



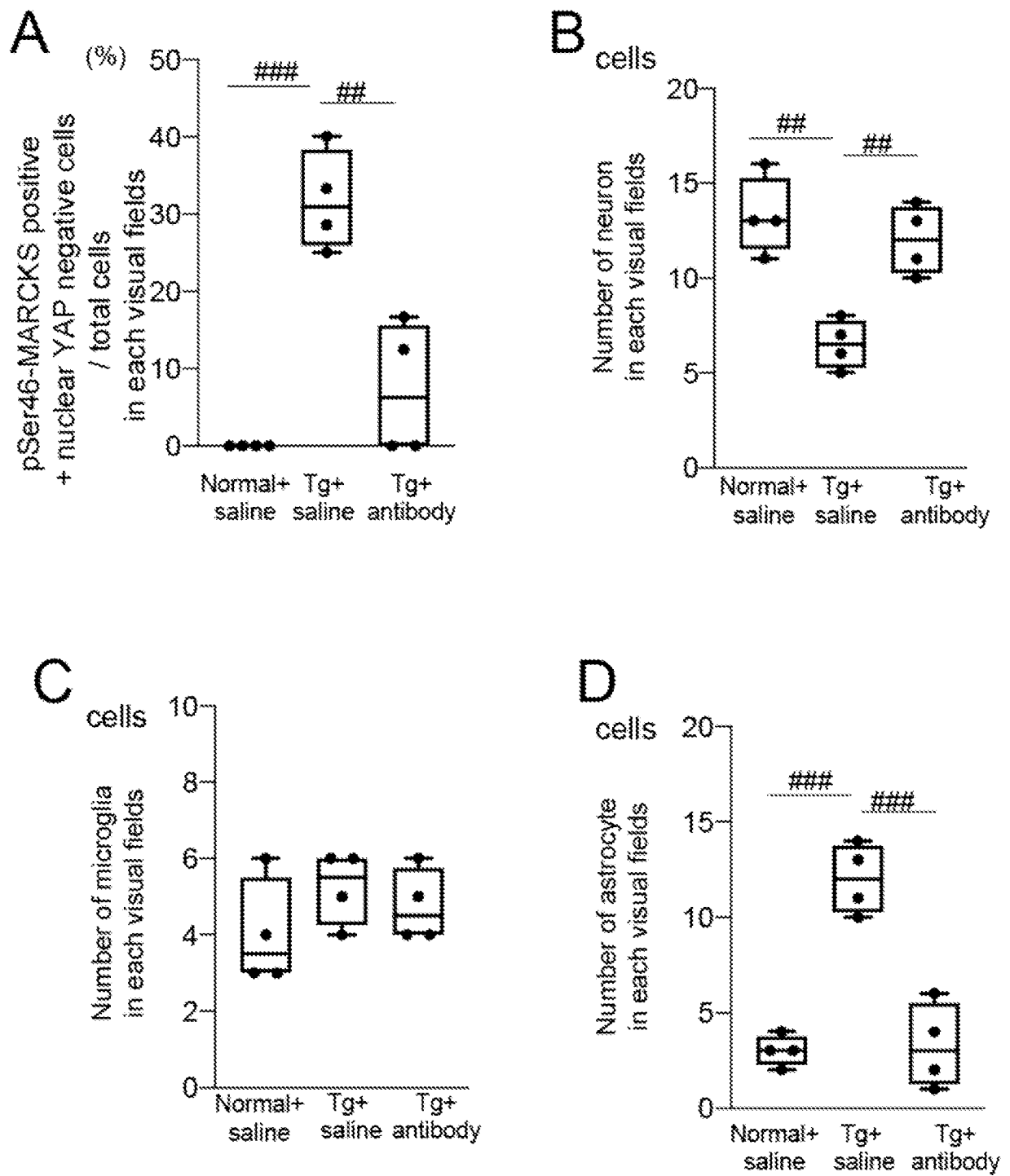
[33C-D]



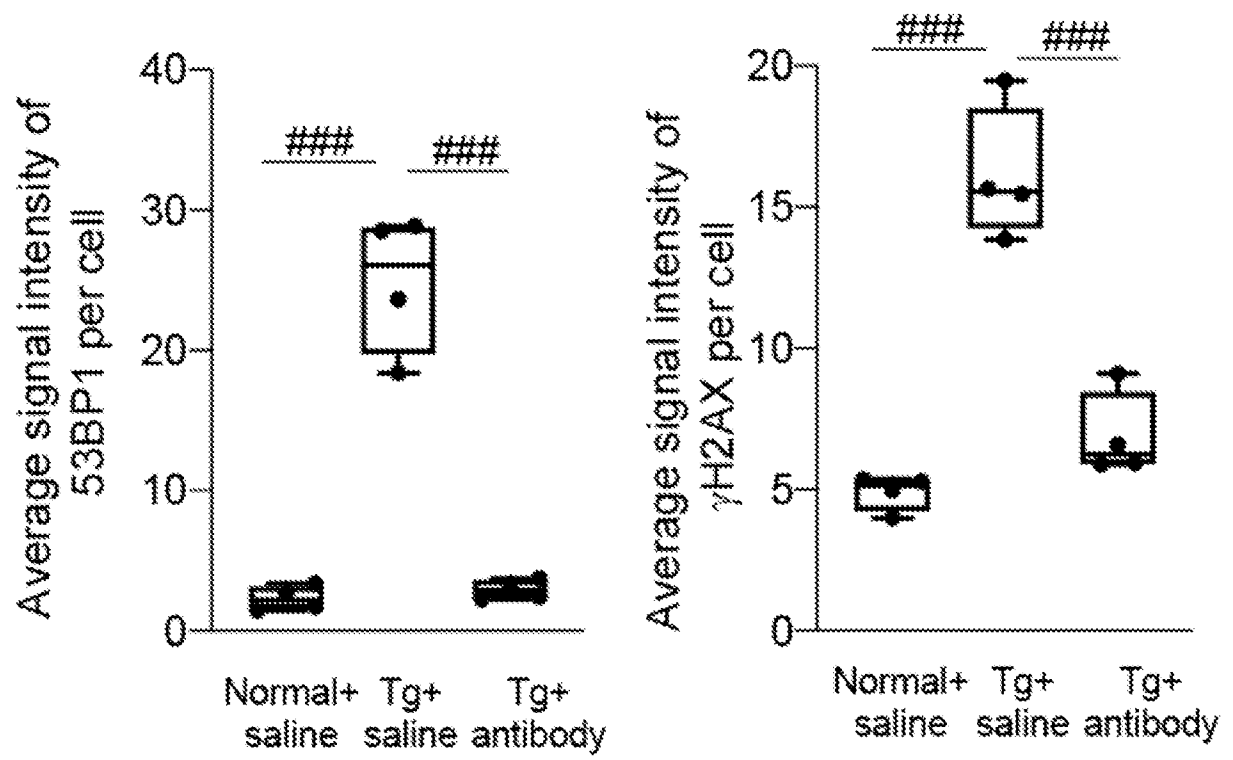
[図34]



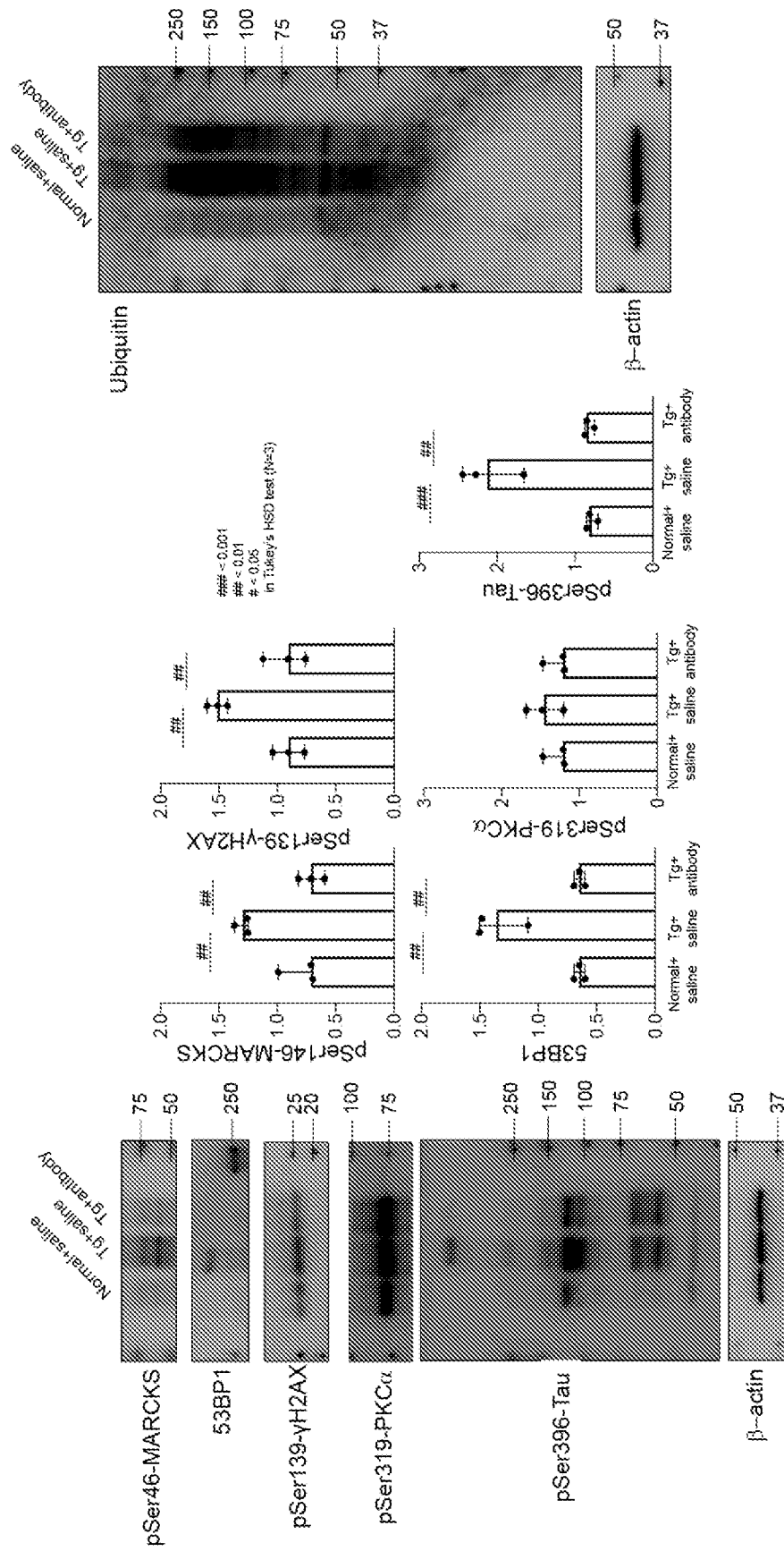
[図35]



[図36]

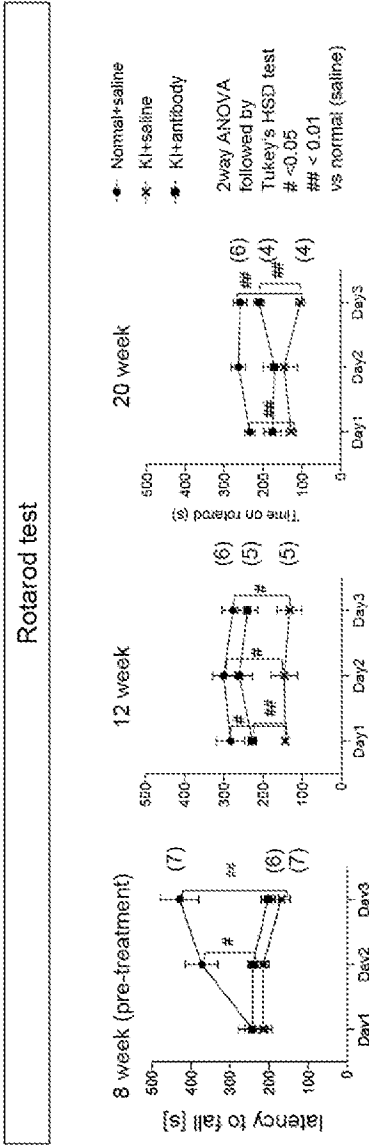


[図37]

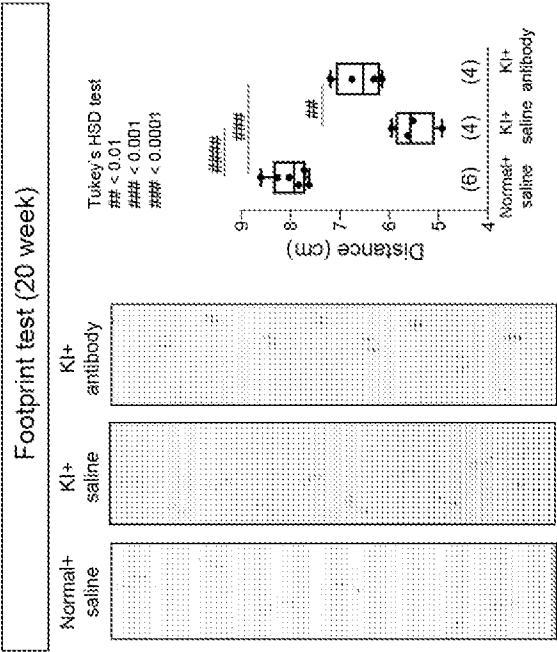


[38]

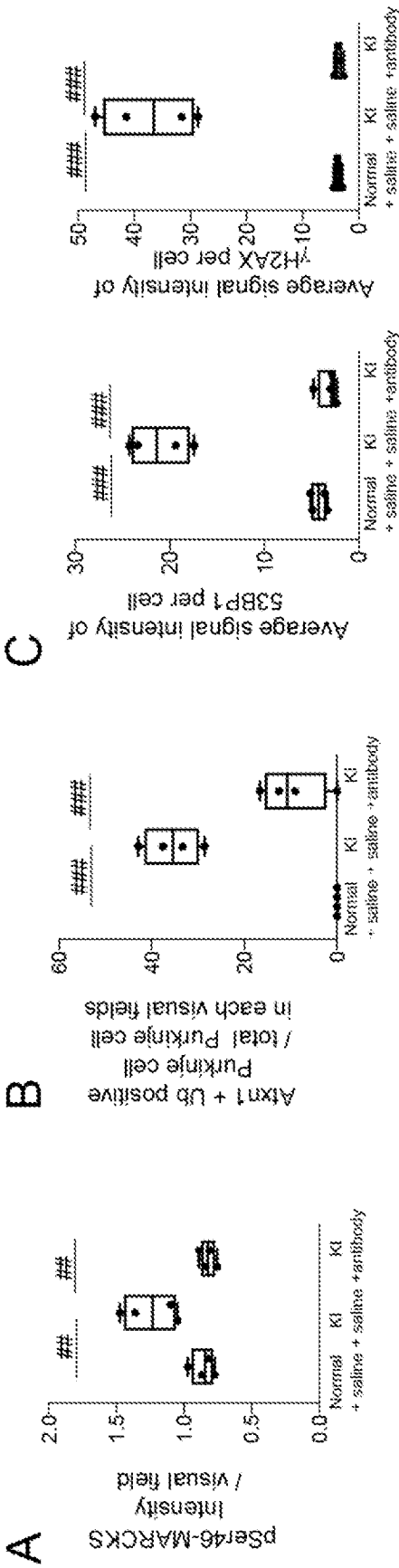
B



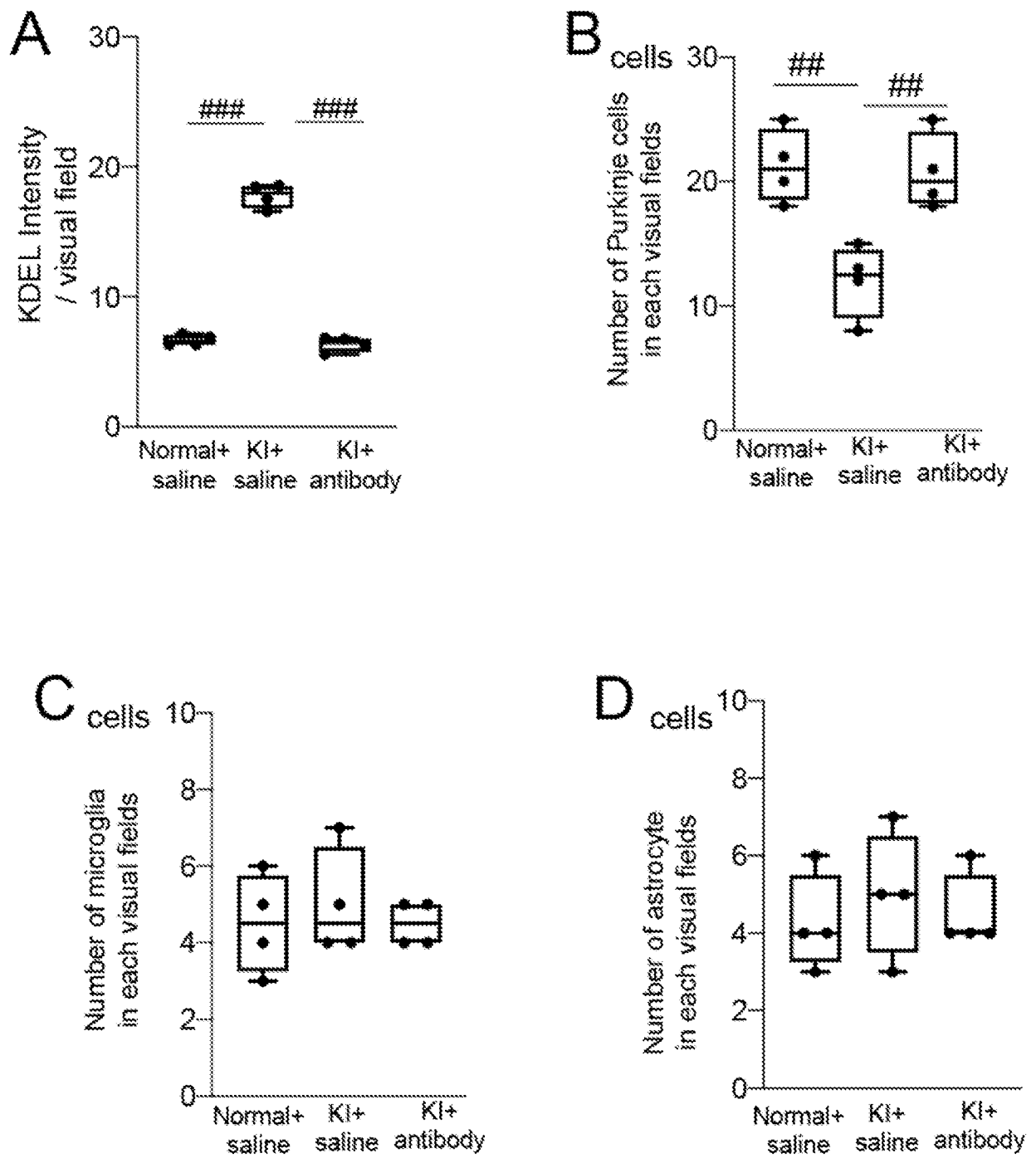
C



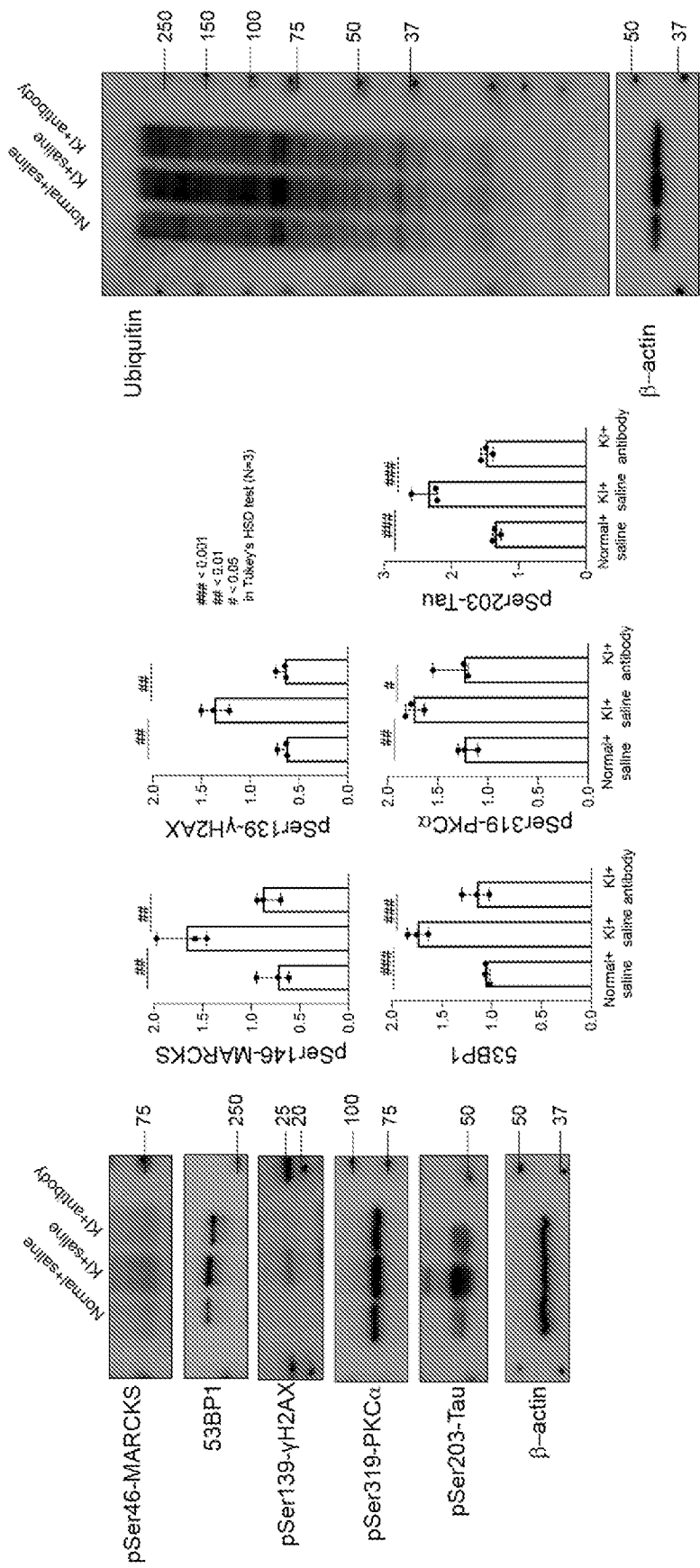
[図39]



[図40]

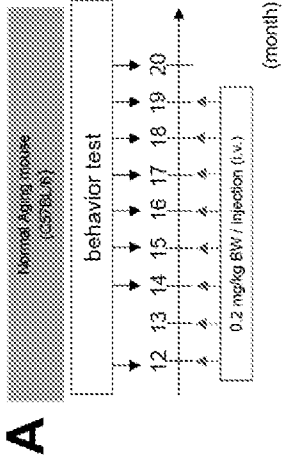
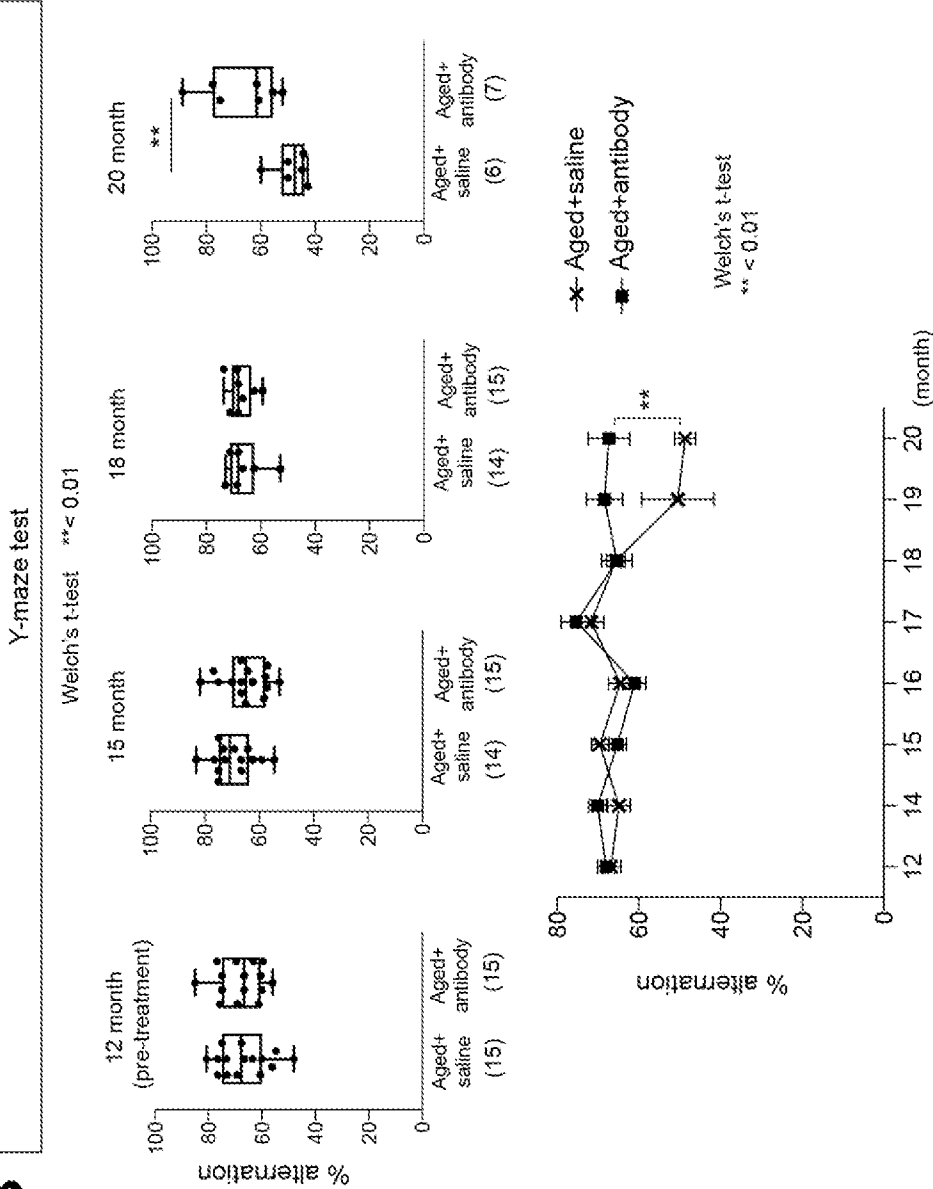


[図41]

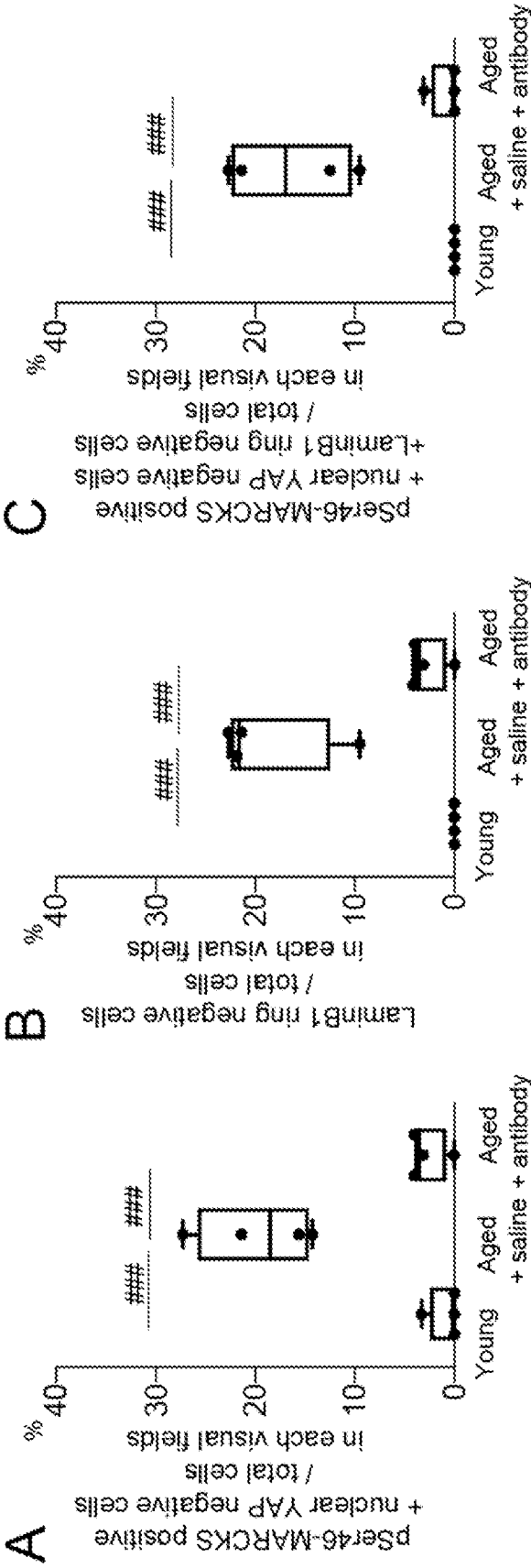


[42]

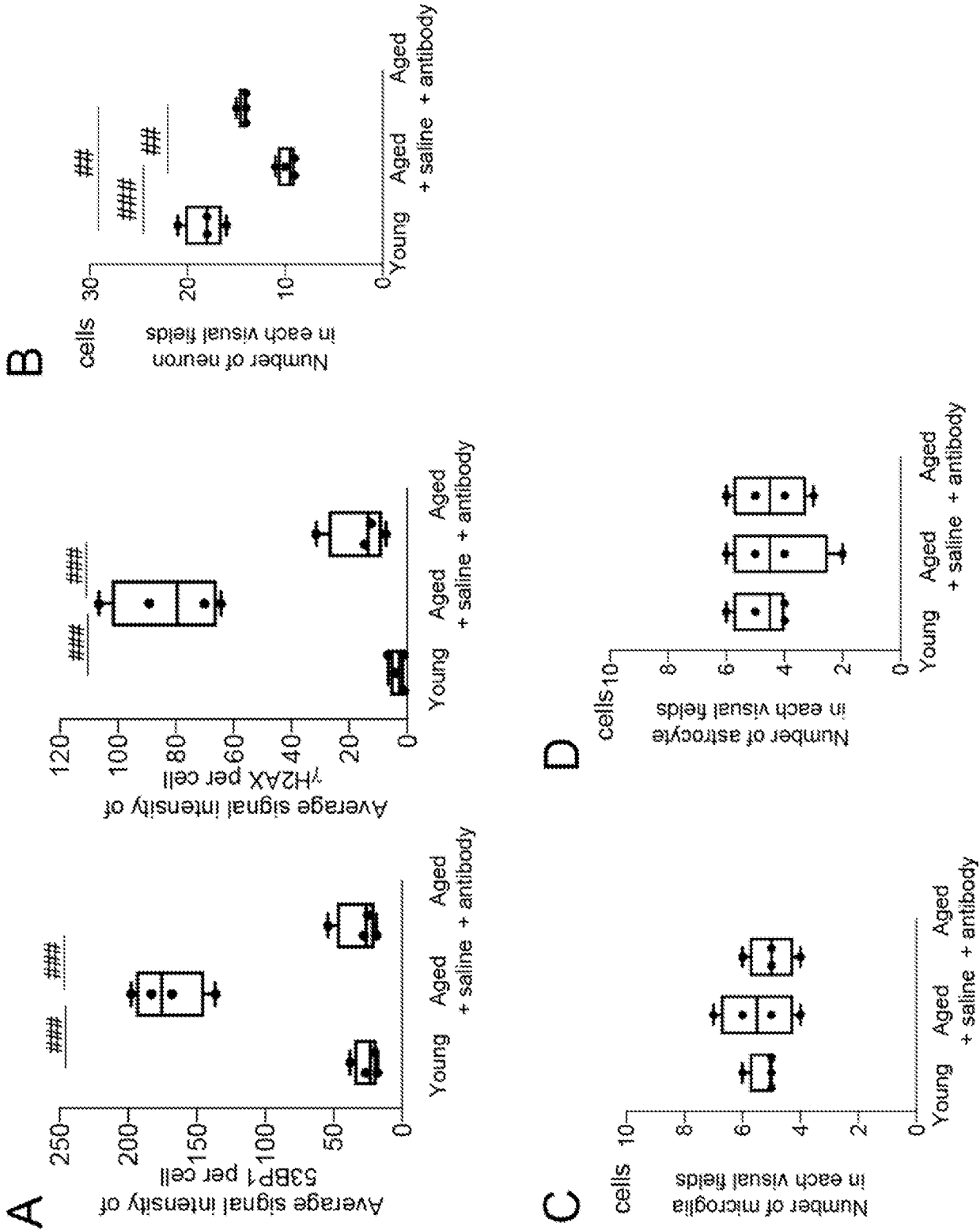
B



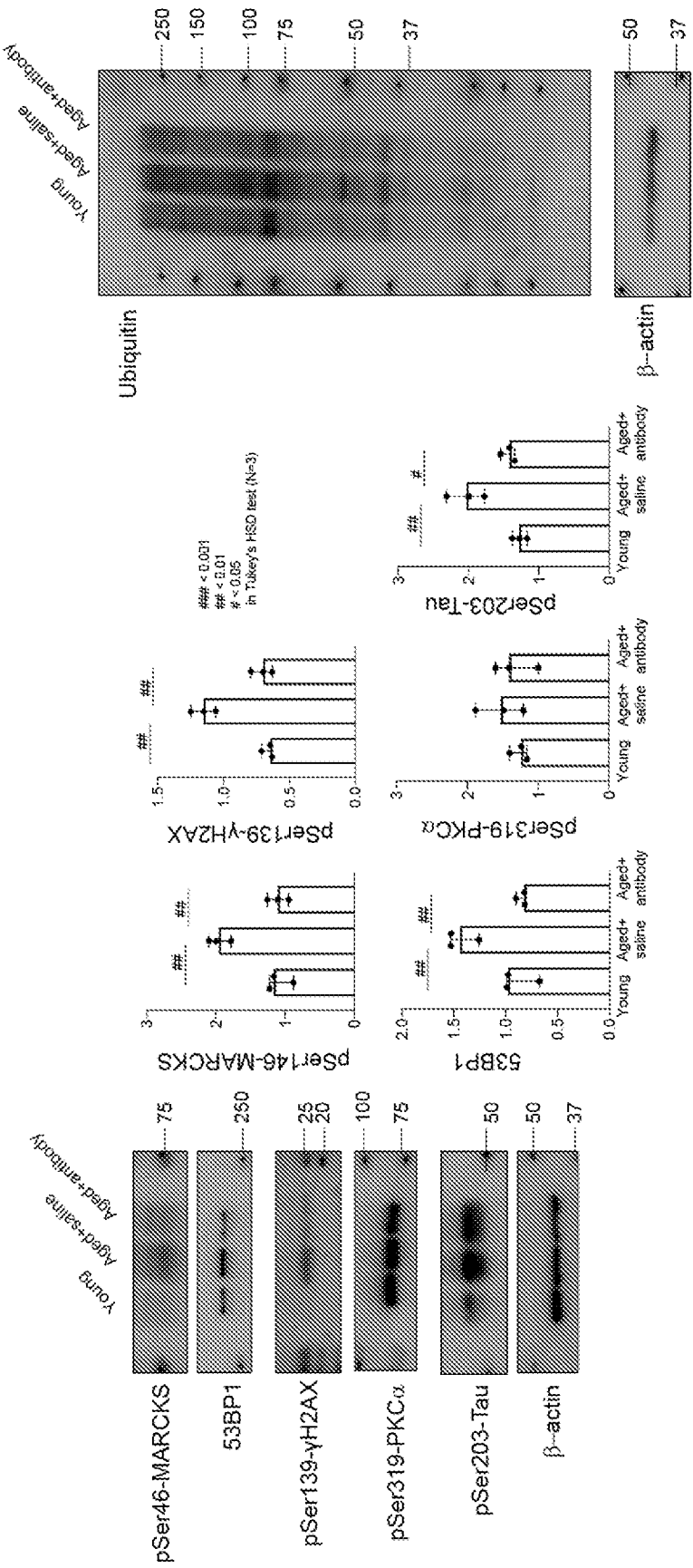
[図43]



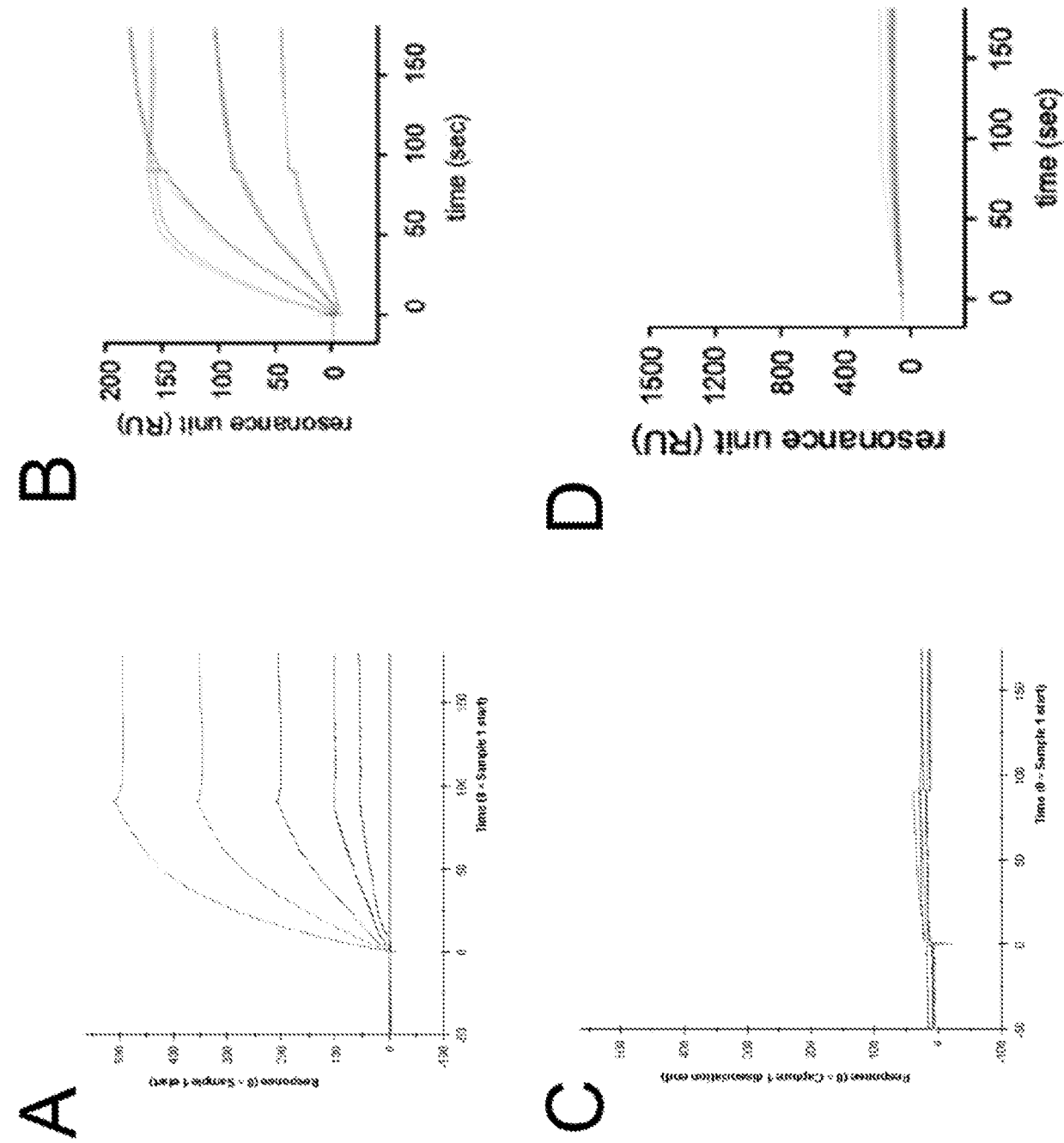
[図44]



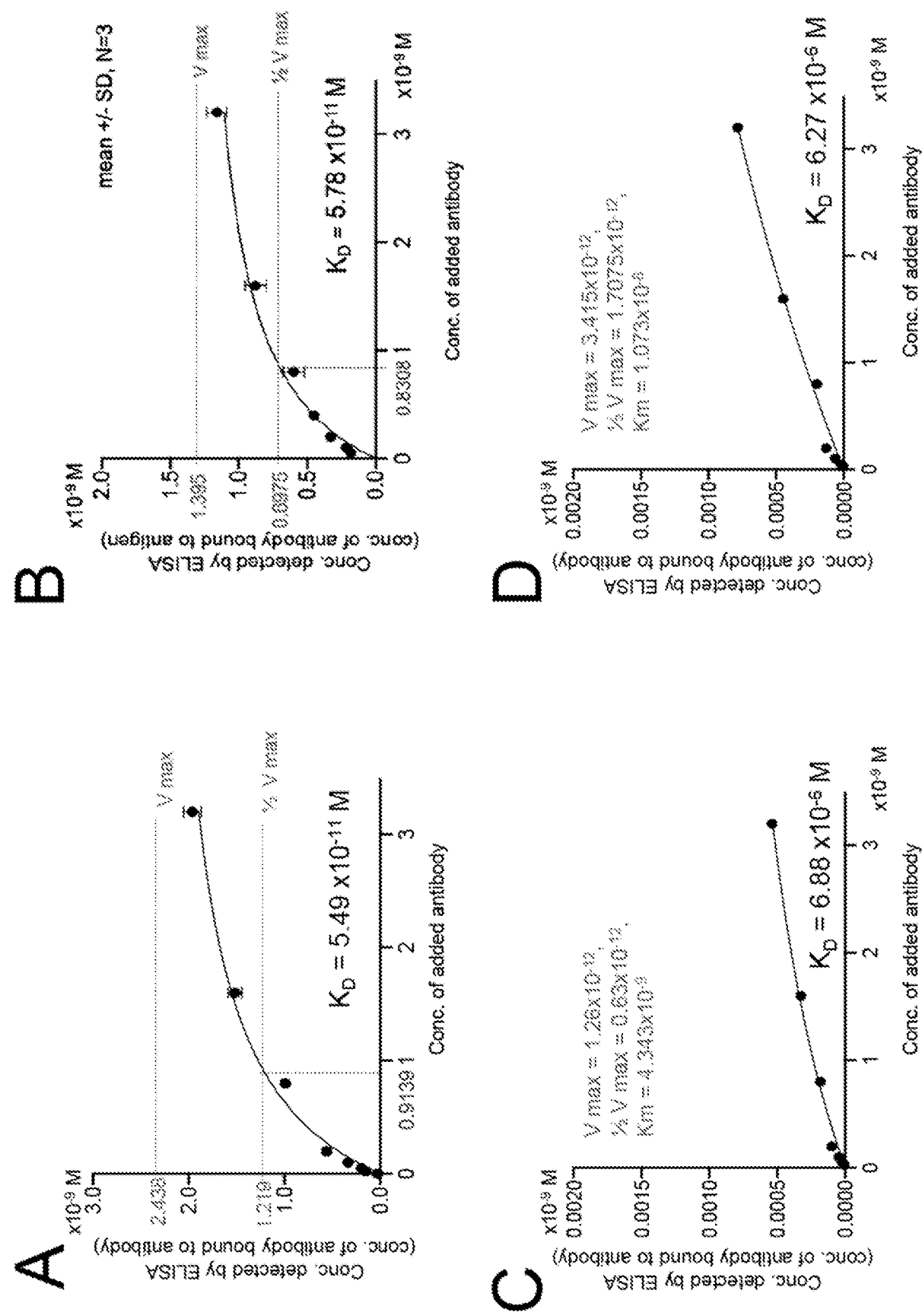
[図45]



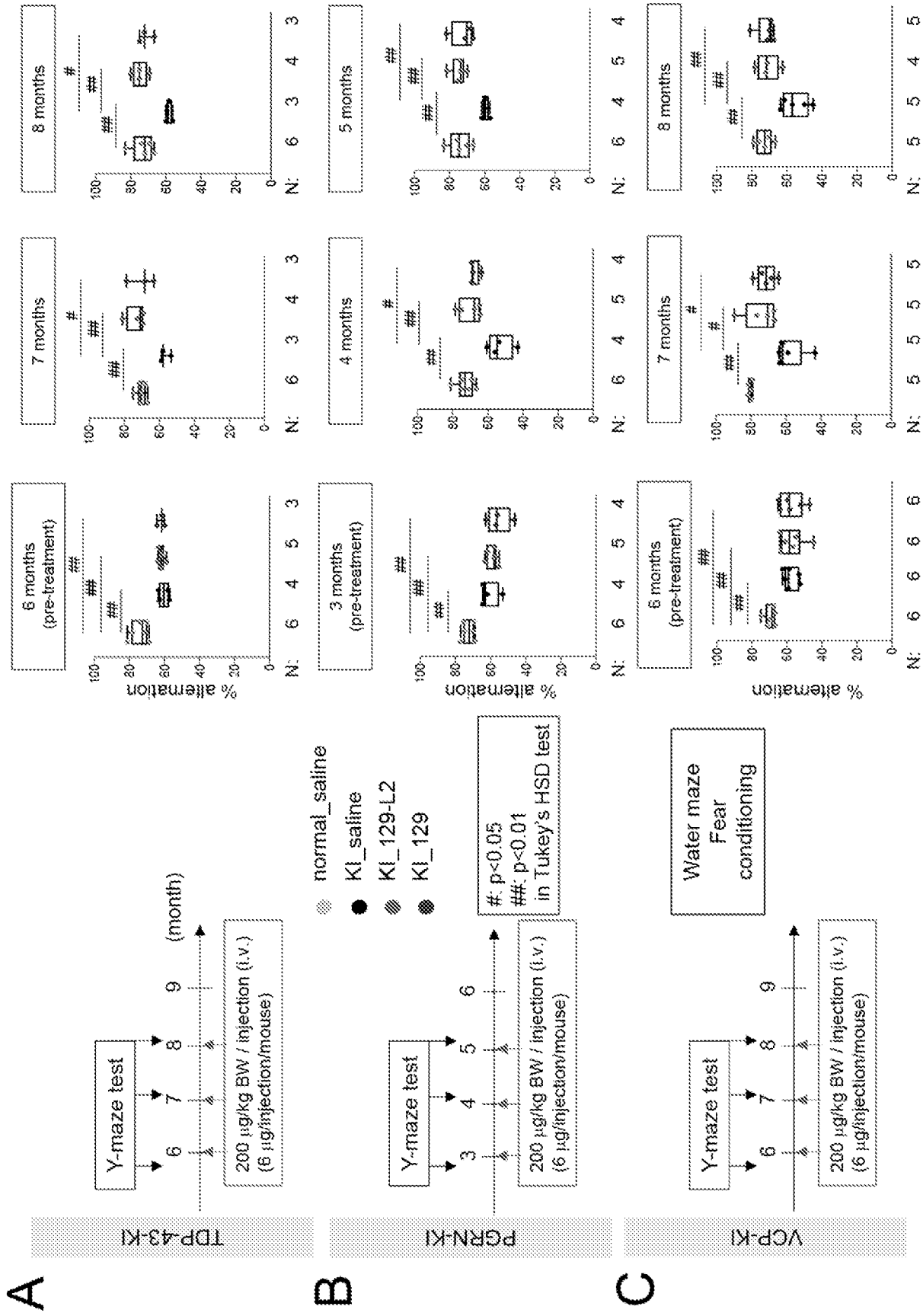
[図46]



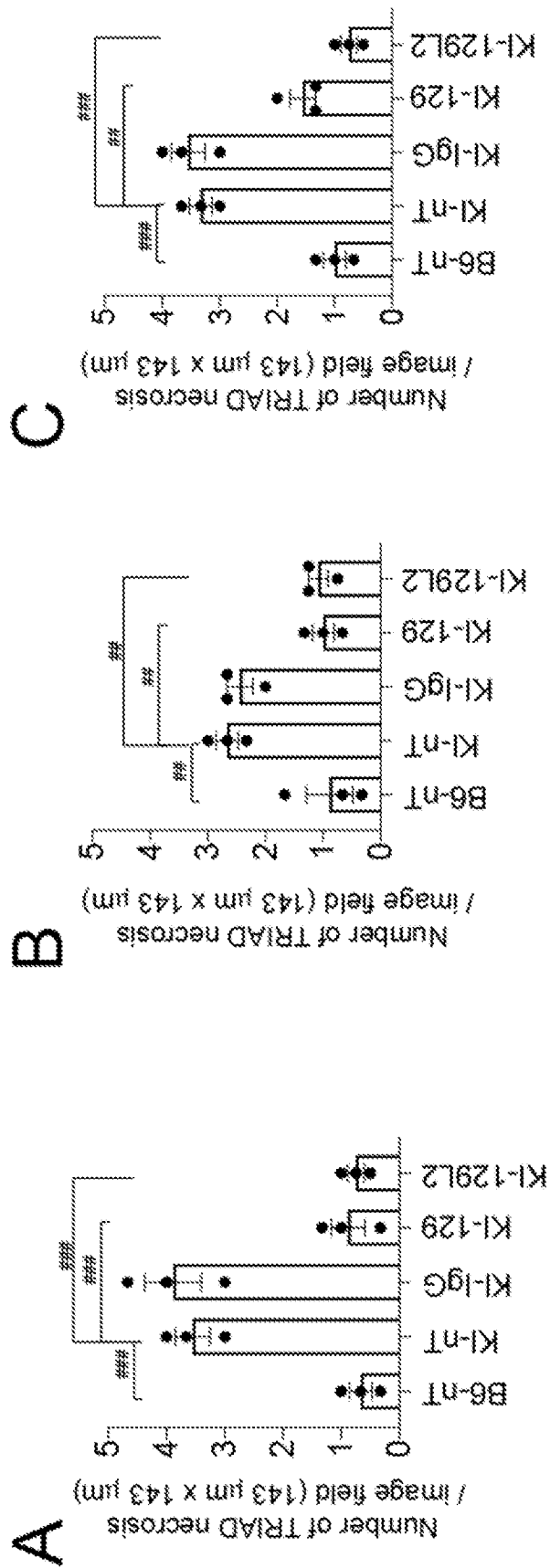
[図47]



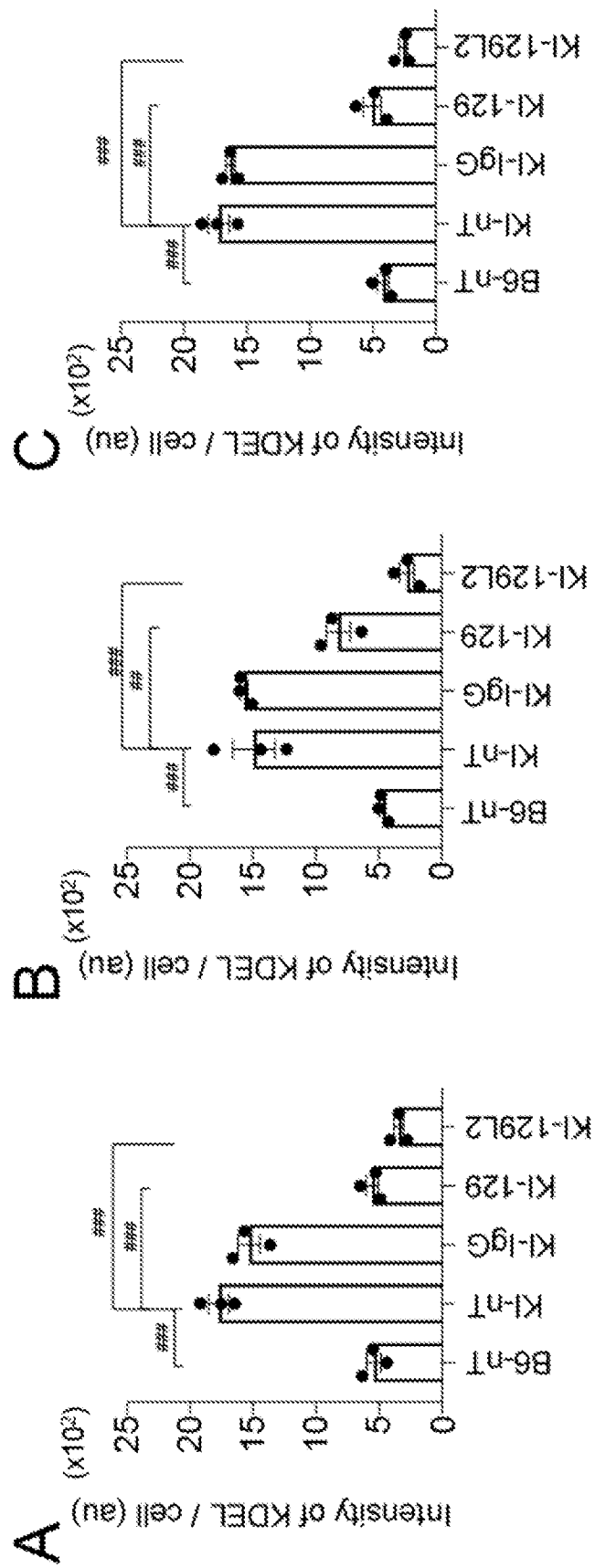
[図48]



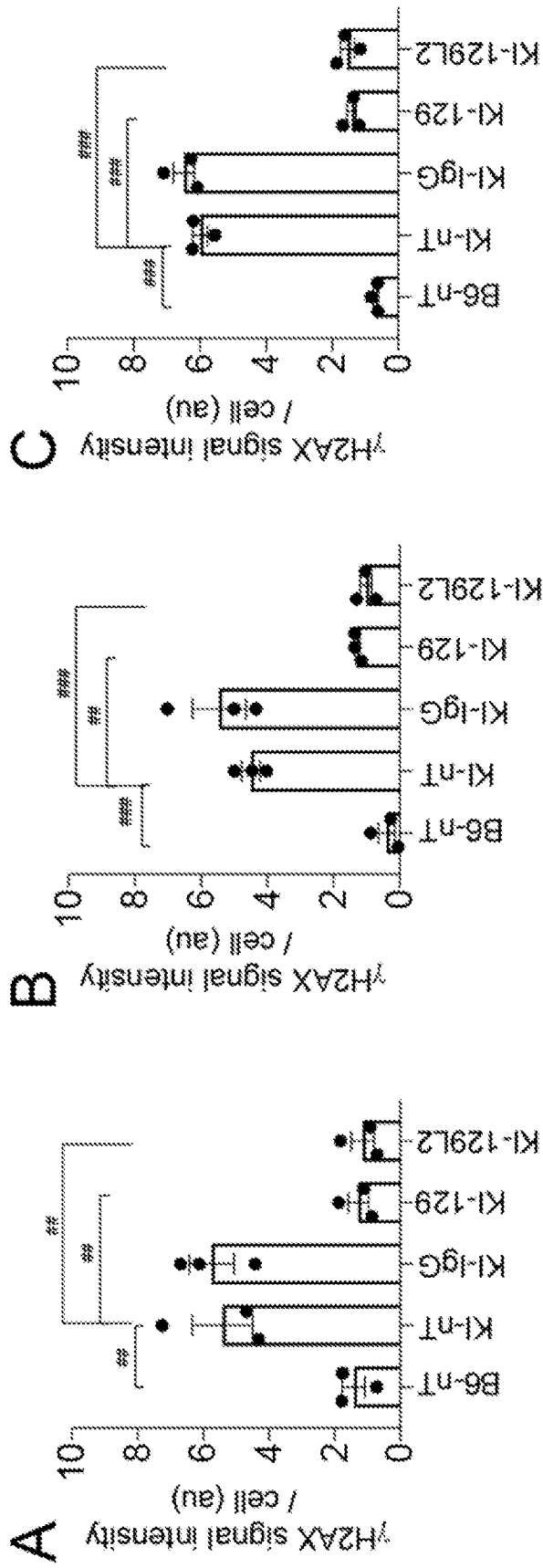
[図49]



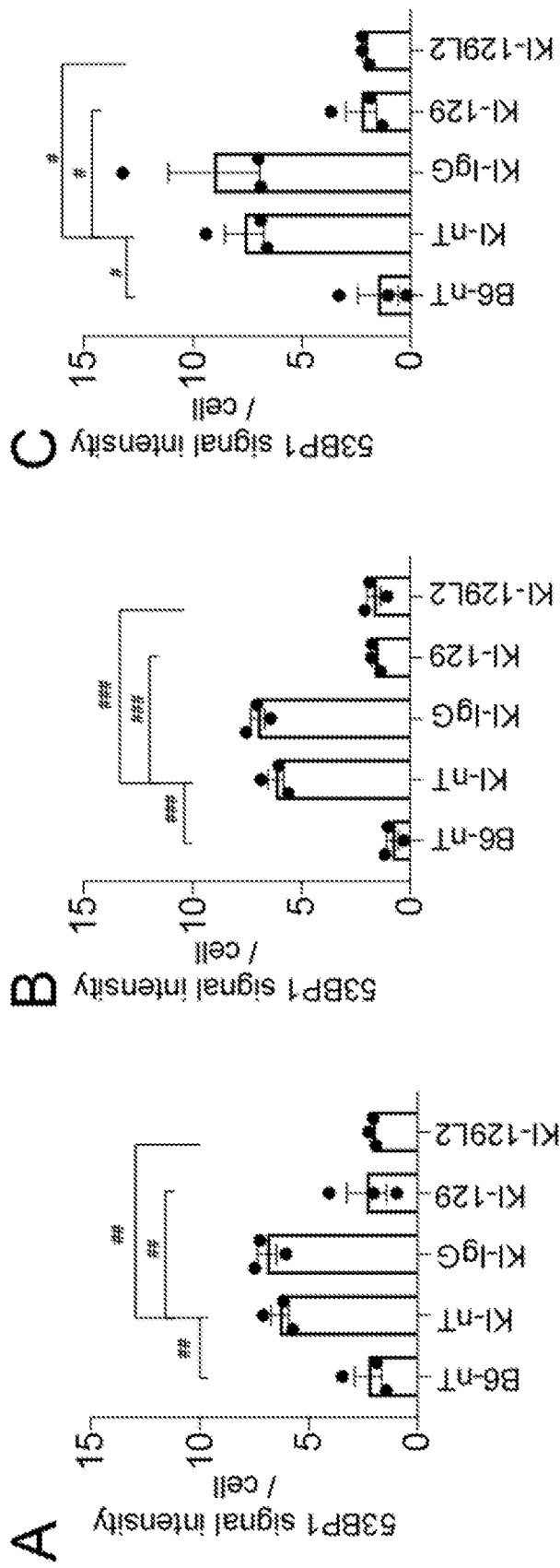
[図50]



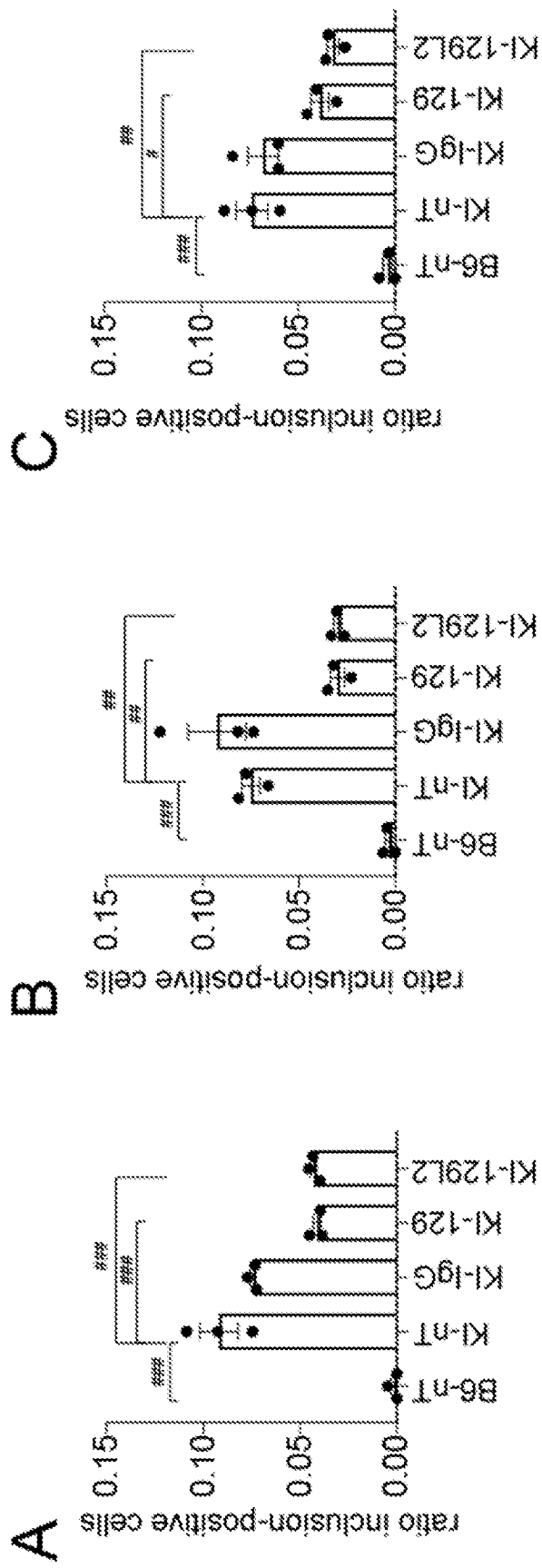
[図51]



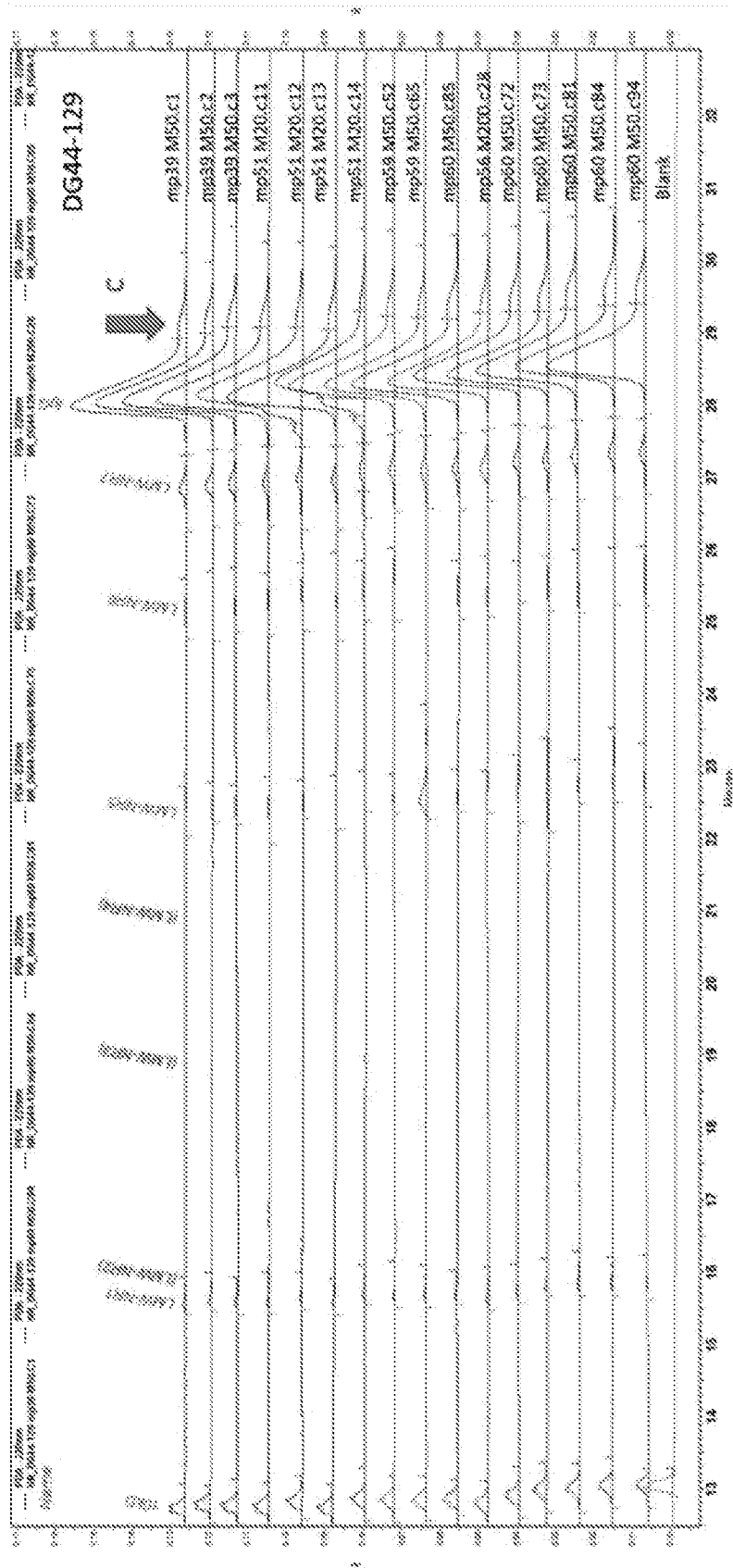
[図52]



[図53]

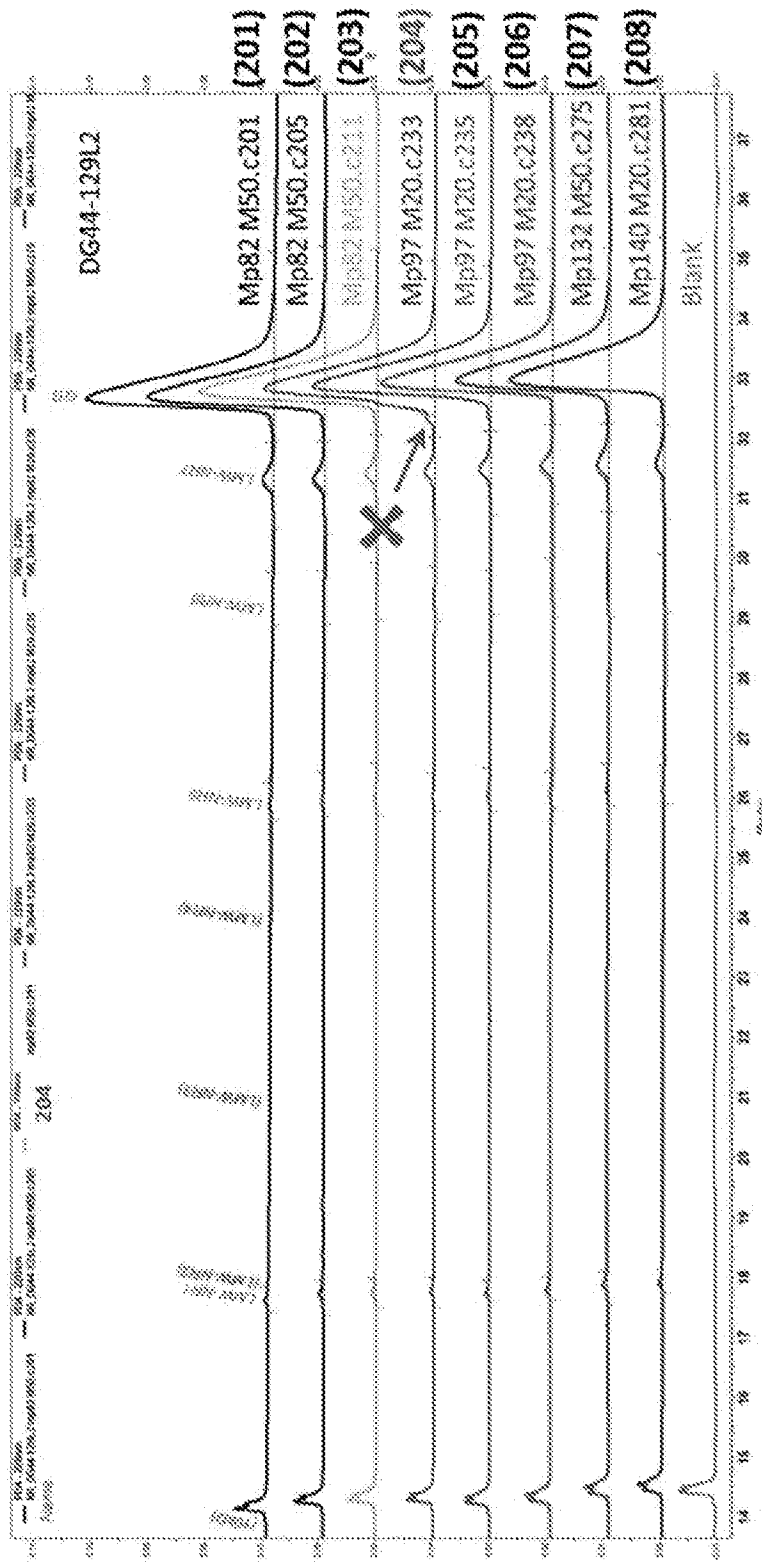


[54]



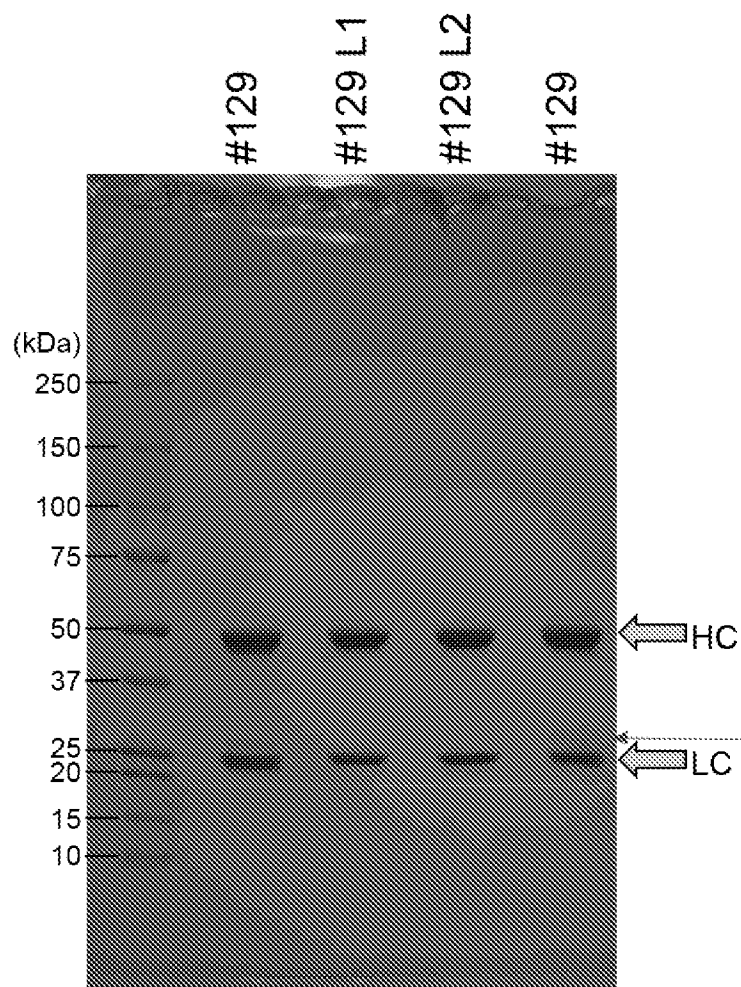
Peak "c" was showed on all 129 clones and this peak should be IgG with additional N-glycan.

[55]

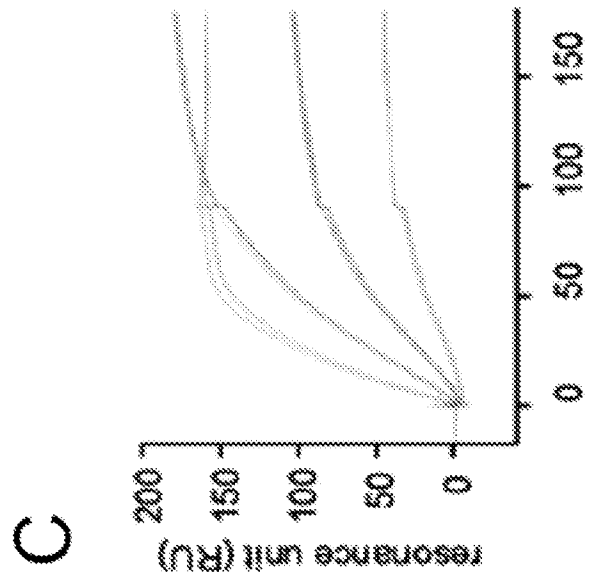
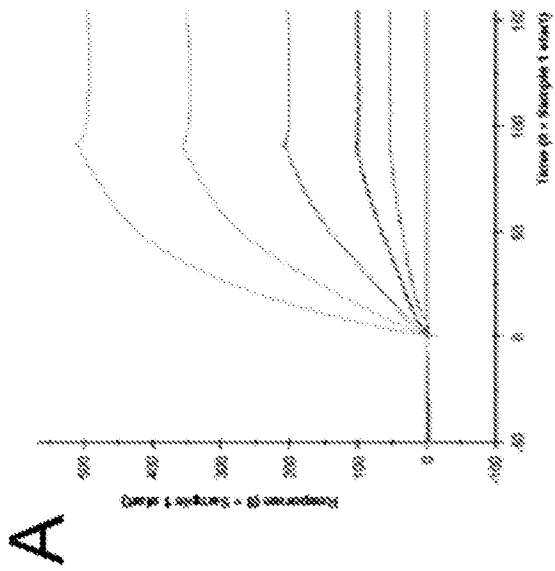
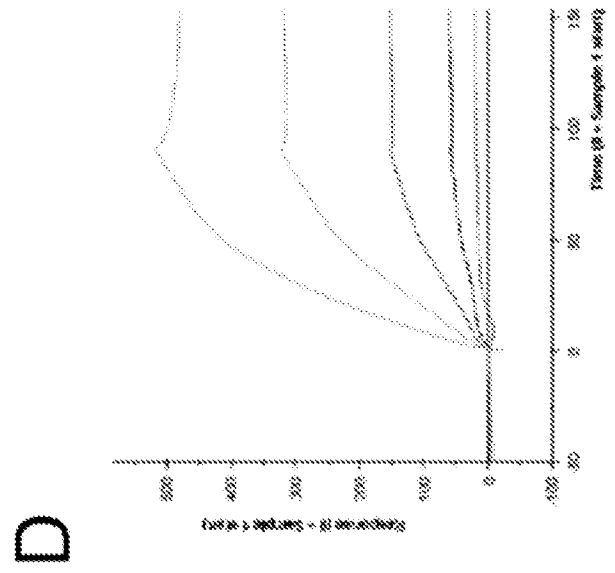
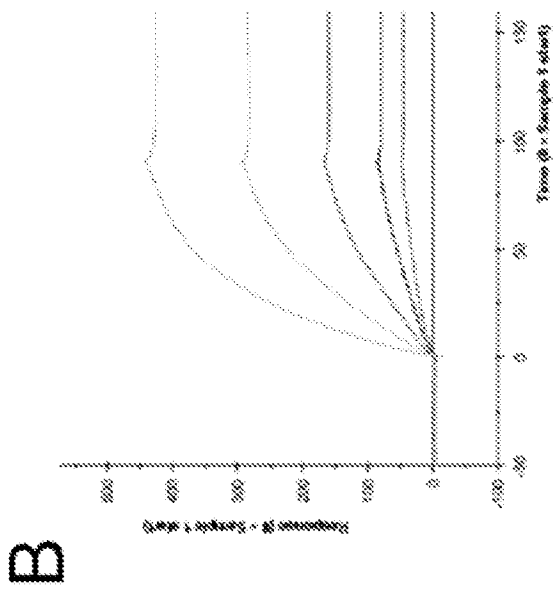


An unknown peak presented in the CE-SDS profile of 129L2 204's product which is an impurity, so clone 129L2 204 was excluded.

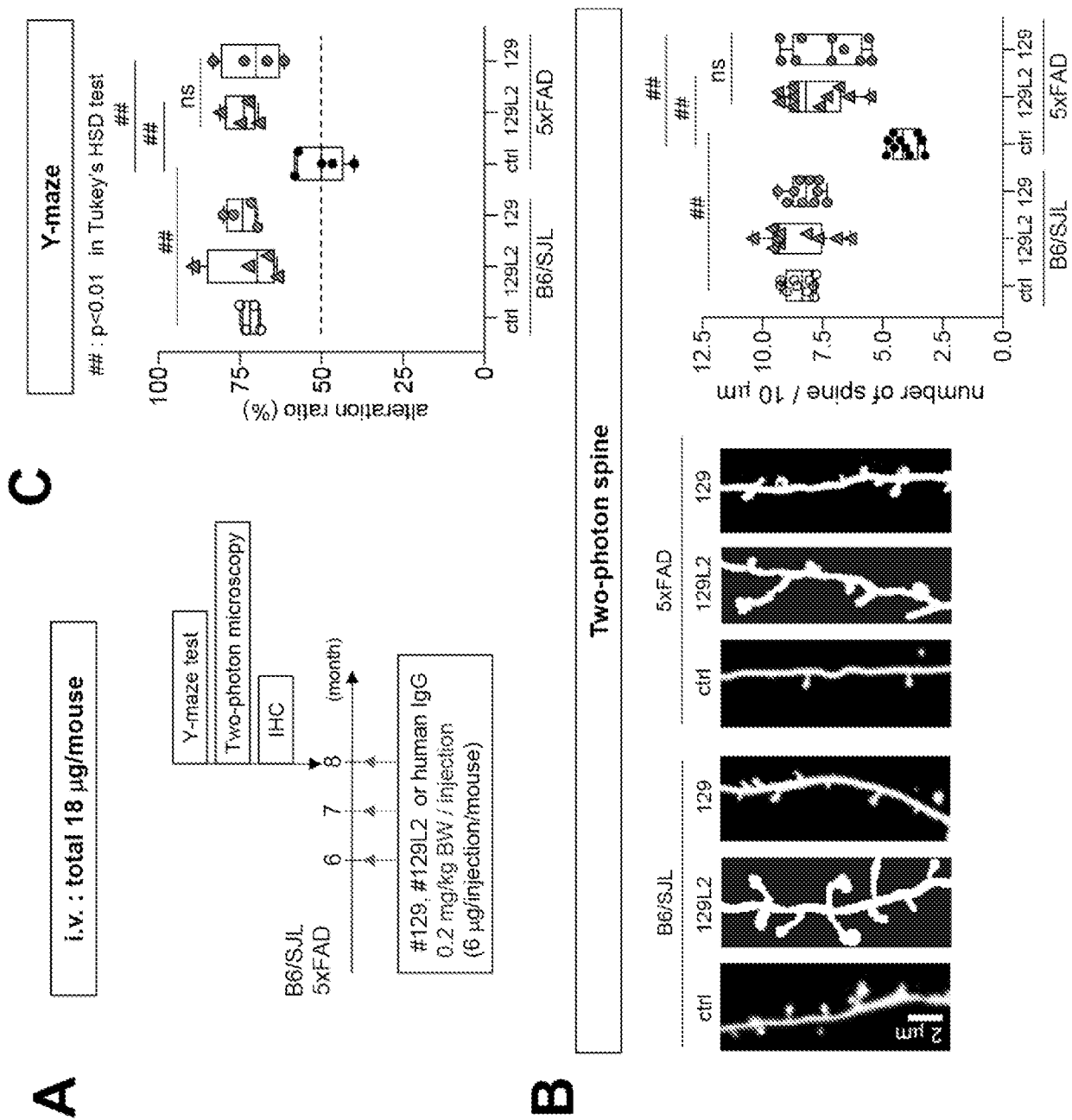
[図56]



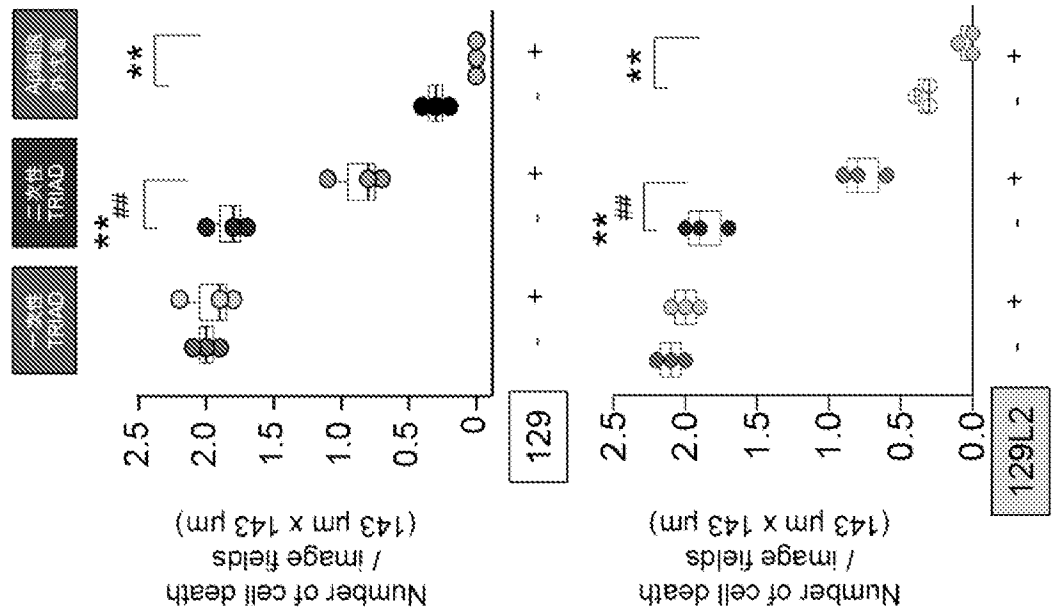
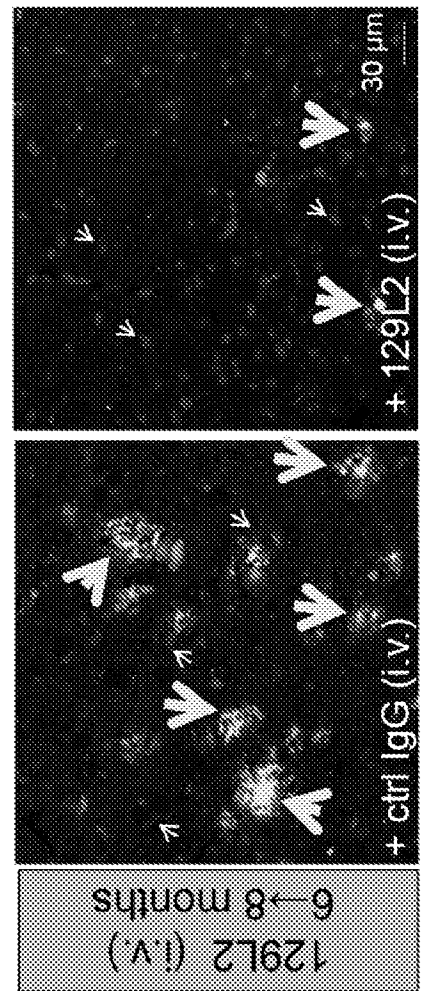
[図57]



[58]



A



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/021039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i; **A61P 21/00**(2006.01)i; **C07K 16/18**(2006.01)i; **C12N 15/13**(2006.01)i; **A61P 25/00**(2006.01)i; **A61P 25/14**(2006.01)i; **A61P 25/16**(2006.01)i; **A61P 25/28**(2006.01)i

FI: A61K39/395 N; A61P21/00; A61P25/00; A61P25/16; A61P25/14; A61P25/28; C12N15/13; C07K16/18 ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39/395; A61P21/00; C07K16/18; C12N15/13; A61P25/00; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/059847 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 26 March 2020 (2020-03-26) claims, examples 6, 7, paragraphs [0002], [0003], sequence tables	1-11
Y		1-11
Y	NISHIBORI, M. et al. Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for a wide range of CNS and PNS diseases. Journal of Pharmacological Sciences. vol. 140, no. 1, pp. 94-101 abstract, p. 98, 6.	1-11
Y	SASAKI, T. et al. Anti-high mobility group box 1 antibody exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. Experimental Neurology. 2016, vol. 275, pp. 220-231 abstract, etc.	1-11
Y	ANGELOPOULOU, E. et al. Exploring the role of high-mobility group box 1 (HMGB1) protein in the pathogenesis of Huntington's disease. Journal of Molecular Medicine. 2020, vol. 98, no. 3, pp. 325-334 abstract, etc.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2023

Date of mailing of the international search report

29 August 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/021039

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRAMBILLA, L. et al. Dysregulation of Astrocytic HMGB1 Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. <i>Frontiers in Neuroscience</i> . 2018, vol. 12, article. 622, pp. 1-7 abstract, etc.	1-11
Y	LEE, J. D. et al. Therapeutic blockade of HMGB1 reduces early motor deficits, but not survival in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. <i>Journal of Neuroinflammation</i> . 2019, vol. 16, article. 45, pp. 1-12 abstract, etc.	1-11
Y	岡澤 均, HMGB1モノクローナル抗体による前頭側頭葉変性症の治療開発, 老年精神医学雑誌, 2021, vol. 32 extra edition-I, p. 167 (S-14-4) entirety, (OKAZAWA, Hitoshi. <i>Japanese Journal of Geriatric Psychiatry.</i>), non-official translation (Therapeutic developments for frontotemporal lobar degeneration using HMGB1 monoclonal antibody)	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/021039

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/021039

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/059847 A1			26 March 2020	US 2023/0038521 A1 claims, examples 6, 7, paragraphs [0002], [0003], sequence listing EP 3854875 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 39/395(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/14(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i FI: A61K39/395 N; A61P21/00; A61P25/00; A61P25/16; A61P25/14; A61P25/28; C12N15/13; C07K16/18 ZNA		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K39/395; A61P21/00; C07K16/18; C12N15/13; A61P25/00; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2020/059847 A1 (国立大学法人 東京医科歯科大学) 26.03.2020 (2020-03-26) 特許請求の範囲、実施例 6、7、[0002] [0003]、配列表	1-11
Y		1-11
Y	NISHIBORI, M. et al., Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for a wide range of CNS and PNS diseases, Journal of Pharmacological Sciences, Vol.140 No.1, p.94-101 要約、p.98 6.	1-11
Y	SASAKI, T. et al., Anti-high mobility group box 1 antibody exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease, Experimental Neurology, 2016, Vol.275, p.220-231 要約等	1-11
Y	ANGELOPOULOU, E. et al., Exploring the role of high-mobility group box 1 (HMGB1) protein in the pathogenesis of Huntington's disease, Journal of Molecular Medicine, 2020, Vol.98 No.3, p.325-334 要約等	1-11
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10.08.2023		国際調査報告の発送日 29.08.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 横田 倫子 4U 3764 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	BRAMBILLA, L. et al., Dysregulation of Astrocytic HMGB1 Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis, Frontiers in Neuroscience, 2018, Vol.12, Article.622, p.1-7 要約等	1 - 1 1
Y	LEE, J. D. et al., Therapeutic blockade of HMGB1 reduces early motor deficits, but not survival in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, Journal of Neuroinflammation, 2019, Vol.16, Article.45, p.1-12 要約等	1 - 1 1
Y	岡澤 均, HMGB1モノクローナル抗体による前頭側頭葉変性症の治療開発, 老年精神医学雑誌, 2021, Vol.32 増刊号-I, p.167 (S-14-4) 全体	1 - 1 1

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/021039

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2020/059847	A1	26.03.2020	US 2023/0038521 A1 Claims, Ex6, 7, [0002] [0003], Sequence Listing EP 3854875 A1	