

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6550388号  
(P6550388)

(45) 発行日 令和1年7月24日(2019.7.24)

(24) 登録日 令和1年7月5日(2019.7.5)

(51) Int.Cl.	F I		
GO 1 N 33/66 (2006.01)	GO 1 N 33/66	Z	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1	
請求項の数 18 (全 71 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2016-539206 (P2016-539206)	(73) 特許権者	503146324
(86) (22) 出願日	平成26年12月12日 (2014.12.12)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-502278 (P2017-502278A)		The Brigham and Wom en's Hospital, Inc.
(43) 公表日	平成29年1月19日 (2017.1.19)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 1 5 ポストン フランシス ストリ ート 7 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/070099	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02015/089443		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成27年6月18日 (2015.6.18)	(74) 代理人	100120134
審査請求日	平成29年12月12日 (2017.12.12)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	61/963, 738	(74) 代理人	100149010
(32) 優先日	平成25年12月12日 (2013.12.12)		弁理士 星川 亮
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/049, 813		
(32) 優先日	平成26年9月12日 (2014.9.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における二次性進行型多発性硬化症 ( S P M S ) の存在を検出する、または S P M S の発症のリスク判定をするためのインビトロの方法であって、

対象のサンプル中のラクトシルセラミド ( L a c C e r ) のレベルを検出することと、  
前記サンプル中の L a c C e r の前記レベルを、 S P M S に罹患しているまたは S P M S を発症するリスクのある対照の L a c C e r のレベルを表す L a c C e r の基準レベルと比較することと、

前記サンプル中の L a c C e r の前記レベルが前記基準レベルを上回る場合、

前記サンプル中の L a c C e r の前記レベルを、対象が S P M S であると診断すること  
の指標とすること、または、

対象が S P M S を発症するリスクのある対象と特定することを含む、方法。

【請求項 2】

前記対象が、再発寛解型多発性硬化症を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記対象が、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月、2 年、3 年、4 年または 5 年以内に S P M S を発症するリスクが高い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

対象の進行型多発性硬化症 ( M S ) を治療するための情報を提供する方法であって、  
進行型 M S に罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のサンプル中のラクトシルセラ

10

20

ミド (L a c C e r) のレベルを検出することと、

前記サンプル中の L a c C e r の前記レベルを、L a c C e r の基準レベルと比較することと、

L a c C e r の前記レベルが前記基準レベルを上回る対象に、治療の有効量の L a c C e r 合成阻害剤を投与することを含む治療を施すための情報を提供することとを含み、

前記 L a c C e r 合成阻害剤が、小分子、B 4 G A L T 6 を標的にする阻害核酸または B 4 G A L T 6 に特異的に結合し L a c C e r 合成を阻害する阻害抗体からなる群から選択される B 4 G A L T 6 の阻害剤である、

方法。

#### 【請求項 5】

M S に罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のための治療を選択するための情報を供給する方法であって、

進行型 M S に罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のサンプル中のラクトシルセラミド (L a c C e r) のレベルを検出することと、

前記サンプル中の L a c C e r の前記レベルを、L a c C e r の基準レベルと比較することと、

L a c C e r の前記レベルが前記基準レベルを上回る対象に、治療の有効量の L a c C e r 合成阻害剤を投与することを含む治療を選択するための情報を提供することとを含み、

前記 L a c C e r 合成阻害剤が、小分子、B 4 G A L T 6 を標的にする阻害核酸または B 4 G A L T 6 に特異的に結合し L a c C e r 合成を阻害する阻害抗体からなる群から選択される B 4 G A L T 6 の阻害剤である、方法。

#### 【請求項 6】

前記進行型多発性硬化症 (M S) が、一次性進行型多発性硬化症 (P P M S) または二次性進行型多発性硬化症 (S P M S) である、請求項 4 または 5 に記載の方法。

#### 【請求項 7】

前記 L a c C e r の基準レベルが、進行型 M S に罹患しているまたは進行型 M S を発症するリスクのある対照の L a c C e r のレベルを表す基準レベルである、請求項 4 または 5 に記載の方法。

#### 【請求項 8】

前記 L a c C e r 合成阻害剤が、グルコシルセラミド (G l c C e r) 合成阻害剤である、請求項 4 または 5 に記載の方法。

#### 【請求項 9】

前記 G l c C e r 合成阻害剤が、1 - (3', 4' - エチレンジオキシ) フェニル - 2 - ノナノイルアミノ - 3 - ピロリジノ - 1 - プロパノール、1 - (3', 4' - エチレンジオキシ) フェニル - 2 - オクタノイルアミノ - 3 - ピロリジノ - 1 - プロパノール、D - トレオ - (1R, 2R) - フェニル - 2 - デカノイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール (P D M P) 及び D - P D M P を含むその類似体、P P M P (D L - トレオ - 1 - フェニル - 2 - パルミトイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール)、D - トレオ - E t D O - P 4、((1R, 2R) - ノナン酸 [2 - (2', 3' - ジヒドロ - ベンゾ [1, 4] ダイオキシ - 6' - イル) - 2 - ヒドロキシ - 1 - ピロリジン - 1 - イルメチル - エチル] - アミド - L - 酒石酸塩、C C G 0 2 0 3 5 8 6 (1 - ヒドロキシ - 3 - (ピロリジン - 1 - イル) アセトアミド)、G e n z - 1 1 2 6 3 8 (エリグルスタット)、G e n z - 5 2 9 4 6 8、デオキシノジリマイシン系 G l c C e r 阻害剤、G Z - 1 6 1、G e n z - 6 8 2 4 5 2、E X E L - 0 3 4 6、O G T 2 3 7 8、並びに G e n z - 1 2 3 3 4 6 からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

#### 【請求項 10】

前記デオキシノジリマイシン系 G l c C e r 阻害剤が、N - (5' - アダマンタン - 1' - イル - メトキシ) - ペンチル - 1 - デオキシノジリマイシン (A M P - D N M)、N - ブチル - デオキシノジリマイシン (ミグルスタット) またはアルキル鎖中に 9 個 ~ 約 2

10

20

30

40

50

0個の炭素原子を有する1,5-ジデオキシ-1,5-イミノ-D-グルシトールの長鎖N-アルキル誘導体である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記長鎖N-アルキル誘導体のN-アルキル置換基が、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、シス-11-ヘキサデセニル、オクタデシル、シス-13-オクタデセニル及びエイコシルからなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

B4GALT6を標的にする前記阻害核酸が、アンチセンス、siRNA、shRNA及びmiRNAからなる群から選択される、請求項4または5に記載の方法。

10

【請求項13】

B4GALT6阻害剤及びGlcCer合成阻害剤を投与するための情報を提供することを含む、請求項4または5に記載の方法。

【請求項14】

前記対象が、進行型MSに罹患していることに基づいて、前記対象を選択することを含む、請求項4または5に記載の方法。

【請求項15】

グルコセレブロシダーゼの活性化剤を投与するための情報を提供することを更に含む、請求項4または5に記載の方法。

【請求項16】

20

前記グルコセレブロシダーゼの活性化剤が、サボシンCもしくはサボシンCの活性断片もしくはその活性断片、NCGC00182186(5-シクロプロピリデン-7-(ジフルオロメチル)-N-(2-フェニルスルファニルフェニル)-1H-ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド)、NCGC00182510([2-(tert-ブチルアミノ)-2-オキソエチル]2-[2-(4-プロモアニリノ)-2-オキソエトキシ]ベンゾエート)またはホスファチジルセリンである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記化合物が、経口、経鼻、静脈内または髄腔内投与されるものである、請求項4または5に記載の方法。

30

【請求項18】

前記対象が、SPMSに罹患しているか、かつ/またはSPMSに罹患していることに基づいて選択される、請求項4または5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2013年12月12日出願の米国仮特許出願第61/963,738号、及び2014年9月12日出願の同第62/049,813号の利益を主張する。前述の全内容を参照により本明細書に援用する。

40

【0002】

連邦政府支援の研究または開発

本発明は、米国国立衛生研究所助成金番号AI075285及びAI093903に基づいた助成を受け、政府の支援によりなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、対象における進行型多発性硬化症(MS)、例えば、一次性進行型多発性硬化症(PPMS)または二次性進行型多発性硬化症(SPMS)の発症について、ラクツシルセラミド(LacCer)のレベルを検出することによって、診断またはリスク判定するための方法、及びLacCer合成阻害剤を投与することによって進行型MSを治療するための方法に関する。

50

## 【背景技術】

## 【0004】

星状膠細胞は、中枢神経系（CNS）で最も豊富な細胞である。正常状態下にて、星状膠細胞は、シナプス活性を調整し、神経細胞の生存に必要な栄養素及び支持を提供する<sup>1-4</sup>。神経炎症との関係において、星状膠細胞は、炎症性末梢血白血球によるCNS浸潤を調節し<sup>5-8</sup>、ミクログリア、希突起膠細胞及び適応免疫系細胞の活性を制御する<sup>9</sup>。したがって、CNS炎症時における星状膠細胞活性を制御する機構、及び星状膠細胞活性の治療的調整のための潜在的標的を特徴付けることは重要である。

## 【0005】

多発性硬化症（MS）は、CNSの慢性脱髄性自己免疫疾患である。多くの患者にて、MSは、初期に、再発寛解型臨床経過（再発寛解型MS、RRMS）を呈し、続いて、継続的かつ不可逆的な障害の蓄積を特徴とする進行期（二次性進行型MS、SPMS）を示すが、これに対しては、利用可能な治療法は限定的な有効性しか示さない<sup>10</sup>。最近の知見では、局所的なCNSの自然免疫応答がSPMSの疾患進行を促すことが示唆されている<sup>9, 11, 12</sup>。

## 【発明の概要】

## 【0006】

本明細書に記載するように、ラクトシルセラミド（LacCer）レベルは、多発性硬化症（MS）の実験モデルである慢性実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）時において、CNSで上方制御される。星状膠細胞にて、4-ガラクトシルトランスフェラーゼ6（B4GALT6）によって合成されるLacCerは、オートクライン的に作用し、CNS浸潤性単球及びミクログリアの動員及び活性化、並びに神経変性を促進する転写プログラムを誘発する。加えて、B4GALT6発現及びLacCerレベルの増加が、ヒト患者のCNSのMS病変で検出された。最後に、LacCer合成を阻害すると、EAEにおける局所的なCNSの自然免疫及び神経変性が抑制され、ヒト星状膠細胞の活性化がインビトロで阻害された。このように、B4GALT6は、MS及び他の神経炎症性障害の治療標的である。

## 【0007】

したがって、第1の態様において、本発明は、対象における二次性進行型多発性硬化症（SPMS）の発症について、診断またはリスク判定するための方法を提供する。方法は、対象のサンプル中のラクトシルセラミド（LacCer）のレベルを検出することと、サンプル中のLacCerのレベルを、SPMSに罹患しているまたはSPMSを発症するリスクのある対照のLacCerのレベルを表すLacCerの基準レベルと比較することと、サンプル中のLacCerのレベルが基準レベルを上回る場合、対象をSPMSと診断するまたはSPMSを発症するリスクのある対象と特定することを含む。いくつかの実施形態において、方法は、SPMSに罹患しているまたはSPMSを発症するリスクがあると特定された対象に、MSのための治療、例えば、当技術分野において周知のもののまたは本明細書に記載のものを施すことを含む。

## 【0008】

いくつかの実施形態において、対象は、再発寛解型多発性硬化症に罹患しており、そのレベルが、対象にはSPMSを発症するリスクがあることを示している。いくつかの実施形態において、対象は、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内にSPMSを発症するリスクが高い。

## 【0009】

別の態様において、本発明は、治療的有效量のLacCer合成阻害剤を対象に投与することによって、対象の進行型MS、例えば、一次性進行型多発性硬化症（PPMS）または二次性進行型多発性硬化症（SPMS）を治療するための方法を提供する。また、治療を必要とする対象の進行型MS、例えば、一次性進行型多発性硬化症（PPMS）もしくは二次性進行型多発性硬化症（SPMS）の治療における、または進行型MS、例えば、一次性進行型多発性硬化症（PPMS）もしくは二次性進行型多発性硬化症（SPMS



）を治療するための薬剤の製造における、L a c C e r 合成阻害剤の使用も提供する。

#### 【 0 0 1 0 】

更なる態様において、本発明は、対象の進行型多発性硬化症（M S）を治療するための方法を提供する。方法は、進行型M Sに罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のサンプル中のラクトシルセラミド（L a c C e r）のレベルを検出することと、サンプル中のL a c C e rのレベルを、L a c C e rの基準レベル、例えば、進行型M Sに罹患しているまたは進行型M Sを発症するリスクのある対照のL a c C e rのレベルを表す基準レベルと比較することと、L a c C e rのレベルが基準レベルを上回る対象に、治療的有効量のL a c C e r 合成阻害剤を投与することを含む治療を施すこととを含む。いくつかの実施形態において、方法は、M Sのための別の治療、例えば、当技術分野において周知のものまたは本明細書に記載のもの、例えば、M Sのための標準的治療を施すことを含む。

10

#### 【 0 0 1 1 】

更なる態様において、本発明は、M S、例えば進行型M Sに罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のための治療を選択するための方法の特徴とする。方法は、進行型M Sに罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のサンプル中のラクトシルセラミド（L a c C e r）のレベルを検出することと、サンプル中のL a c C e rのレベルを、L a c C e rの基準レベル、例えば、進行型M Sに罹患しているまたは進行型M Sを発症するリスクのある対照のL a c C e rのレベルを表す基準レベルと比較することと、L a c C e rのレベルが基準レベルを上回る対象に、治療的有効量のL a c C e r 合成阻害剤を投与することを含む治療を選択することとを含む。いくつかの実施形態において、方法は、S P M Sに罹患しているまたはS P M Sを発症するリスクがあると特定された対象に、M Sのための治療を施すことと、M Sのための別の治療、例えば、当技術分野において周知のものまたは本明細書に記載のものを任意に施すこととを含む。

20

#### 【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態において、L a c C e r 合成阻害剤は、グルコシルセラミド（G l c C e r）合成阻害剤である。いくつかの実施形態において、G l c C e r 合成阻害剤は、1 - （3' , 4' - エチレンジオキシ）フェニル - 2 - ノナノイルアミノ - 3 - ピロリジノ - 1 - プロパノール、1 - （3' , 4' - エチレンジオキシ）フェニル - 2 - オクタノイルアミノ - 3 - ピロリジノ - 1 - プロパノール、D - トレオ - （1 R , 2 R） - フェニル - 2 - デカノイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール（P D M P）及びD - P D M Pを含むその類似体、P P M P（D L - トレオ - 1 - フェニル - 2 - パルミトイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール）、D - トレオ - E t D O - P 4、（（1 R , 2 R） - ノナン酸 [ 2 - （2' , 3' - ジヒドロ - ベンゾ [ 1 , 4 ] ダイオキシ - 6' - イル） - 2 - ヒドロキシ - 1 - ピロリジン - 1 - イルメチル - エチル ] - アミド - L - 酒石酸塩、C C G 0 2 0 3 5 8 6（1 - ヒドロキシ - 3 - （ピロリジン - 1 - イル）アセトアミド）、G e n z - 1 1 2 6 3 8（エリグルスタット）、G e n z - 5 2 9 4 6 8、デオキシノジリマイシン系G l c C e r 阻害剤、G Z - 1 6 1、G e n z - 6 8 2 4 5 2、E X E L - 0 3 4 6、O G T 2 3 7 8、並びにG e n z - 1 2 3 3 4 6からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、デオキシノジリマイシン系G l c C e r 阻害剤は、N - （5' - アダマンタン - 1' - イル - メトキシ） - ペンチル - 1 - デオキシノジリマイシン（A M P - D N M）、N - ブチル - デオキシノジリマイシン（ミグルスタット）またはアルキル鎖中に9個～約20個の炭素原子を有する1 , 5 - ジデオキシ - 1 , 5 - イミノ - D - グルシトールの長鎖N - アルキル誘導体である。いくつかの実施形態において、N - アルキル置換基は、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、シス - 1 1 - ヘキサデセニル、オクタデシル、シス - 1 3 - オクタデセニル及びエイコシルからなる群から選択される。

30

40

#### 【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、L a c C e r 合成阻害剤は、小分子、B 4 G A L T 6を標的にする阻害核酸またはB 4 G A L T 6に特異的に結合しL a c C e r 合成を阻害する阻害抗体からなる群から選択されるB 4 G A L T 6の阻害剤である。

50

## 【0014】

いくつかの実施形態において、B4GALT6を標的にする阻害核酸は、アンチセンス、siRNA、shRNA及びmiRNAからなる群から選択される。

## 【0015】

いくつかの実施形態において、方法は、B4GALT6阻害剤及びGlcCer合成阻害剤を投与することを含む。

## 【0016】

いくつかの実施形態において、方法は、対象が進行型MS、例えば、PPMSまたはSPMSに罹患していることに基づいて、対象を選択することを含む。

## 【0017】

いくつかの実施形態において、方法は、グルコセレブロシダーゼの活性化剤を投与することを含む。いくつかの実施形態において、グルコセレブロシダーゼの活性化剤は、サボシンCもしくはその活性断片、NCGC00182186(5-シクロプロピリデン-7-(ジフルオロメチル)-N-(2-フェニルスルファニルフェニル)-1H-ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド)、NCGC00182510([2-(tert-ブチルアミノ)-2-オキソエチル]2-[2-(4-プロモアニリノ)-2-オキソエトキシ]ベンゾエート)またはホスファチジルセリンである。

## 【0018】

いくつかの実施形態において、方法は、治療薬、例えば化合物を、経口、経鼻、静脈内または髄腔内投与することを含む。

## 【0019】

いくつかの実施形態において、対象は、SPMSに罹患しているか、かつ/またはSPMSに罹患していることに基づいて選択される。

## 【0020】

別途の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本発明にて使用するための方法及び材料を本明細書中に記載するが、当該技術分野において周知の他の好適な方法及び材料も用いることができる。材料、方法及び実施例は、例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。本明細書中で言及する公開物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ及び他の参考文献は全て、その全体を参照により本明細書に援用する。矛盾が生じる場合には、定義を含め本明細書が優先される。

## 【0021】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の発明を実施するための形態及び図面から、また特許請求の範囲から明らかになるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0022】

本特許または本出願は、少なくとも1つのカラー印刷図面を含む。カラー図面を備える本特許または本特許出願公開の複製は、請求に応じて、必要な手数料を支払うことにより、特許庁によって提供されるであろう。

## 【0023】

【図1-1】図1a-1。B4GALT6活性がCNS炎症及び神経変性を調節する。(a、b)野生型(WT)及びGFAP-TKトランスジェニック(GFAP<sup>TK</sup>)F1ハイブリッドマウスにおけるEAEスコア(平均及びs.e.m.)。右パネルは線形回帰曲線であり、破線は回帰直線の95%信頼区間を示す。ガンシクロビル(GCV、25mg/kg)または指定のビヒクル(PBS)(黒棒)でマウスを毎日処理した。n=7マウス/群の3つの独立実験の代表データ。(a)マウスをEAE誘導の7日前から前処理し、15日まで継続するか、(b)または進行期間中(30~50日)のみ処理した。(c)Nanosttring nCounter分析によって検出された、ナイーブNODマウス、または急性期もしくは進行期中のNOD EAEのCNSから分離した星状膠細胞におけるmRNA発現差異プロファイルを表すヒートマップ。3つの独立実験の代表

10

20

30

40

50

データ。(d) 進行期のEAEにおいて特に上方制御された特有の遺伝子クラスターを表すヒートマップ。オリジナルにおいて、右端の3つのカラムの大部分が高発現であったのに対し、中央及び左側は低発現であった。(e) ナイーブまたはEAE NODマウス由来のミクログリアまたは星状膠細胞におけるb4gal t6発現のqPCR分析。発現は、gapdhに標準化し、ナイーブマウス由来の細胞の発現を基準に示す。3つの独立実験の代表データ、スチューデントt検定による統計分析。(f) 組織正味重量に対する、ナイーブまたはEAE NODマウスのCNSにおけるラクトシルセラミド(LacCer)の定量化。条件当たり試料数n = 15の3つの独立実験の代表データ、スチューデントt検定による統計分析。(g、h) 矢印または棒によって示される、LacCer(1マウス当たり10 µg)またはビヒクルの投与後のC57BL/6(g)及びNOD(h)マウスのEAE臨床スコア。n = 8マウス/群の2つの独立実験の代表データ。(a)と同様の統計分析。(g) EAE誘導中のC57BL/6マウスにLacCerまたはビヒクルをMOG(35-55)ペプチドとともに投与し、その後3日ごとに1回腹腔内(i.p.)投与した後のEAEスコア(平均及びs.e.m.)。(h) EAE誘導の35日後(進行期)に開始したLacCerまたはビヒクル投与後のEAEスコア。(i) PDMPは、B4GALT6によるLacCer合成を阻害する。(j)(k)に示すようにナイーブまたはPDMPもしくはビヒクルで処理したEAE NODマウスのCNSにおけるLacCerレベルの定量化。(k) PDMPまたはビヒクルをEAE誘導後40日(進行期)から実験期間中毎日投与(20 mg/kgを1日2回i.p.投与)して処理したNODマウスにおけるEAEの臨床スコア。n = 8マウス/群の3つの独立実験の代表データ。(l)(k)と同様にPDMPまたはビヒクルで処理し、脱髄または軸索消失の分析のためにそれぞれルクソールファストブルー染色またはビルショウスキー銀染色で染色したEAE NODマウス由来の腰髄切片の組織病理学分析。n = 6マウス/群の2つの独立実験の代表データ(平均及びs.e.m.)。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.001、n.s.非有意。

【図1-2】上記に記載のとおりである。

【図1-3】上記に記載のとおりである。

【図1-4】上記に記載のとおりである。

【図1-5】上記に記載のとおりである。

【図1-6】上記に記載のとおりである。

【図2-1】図2a-e。B4GALT6阻害は、EAE時の星状膠細胞活性化を抑制する。(a) Nanosttring nCounter分析によって検出された、ナイーブまたはPDMPもしくはビヒクル(ビヒクル)で処理したEAE NODマウスから分離した星状膠細胞におけるmRNA発現を表すヒートマップ。上のパネルは、各遺伝子クラスターの、標準化した遺伝子発現のヒストグラムを示す。3つの独立実験の代表データ、スチューデントt検定による統計分析。左側のグラフのオリジナルでは、左の縦列はほぼ高発現であり、中央の縦列は低発現であり、右の縦列は混合であり、右側のグラフのオリジナルでは、左の縦列はほぼ低発現であり、中央の縦列はほぼ高発現であり、右の縦列は混合であった。(b) ナイーブ及びビヒクルまたはPDMPで処理したEAE NODマウスから分離した星状膠細胞におけるcc12、cc15、cxcl10、il1b、nos2、opn、H2-Aa、vim及びtlr2発現のqPCR分析。発現は相対gapdhで示す。3つの独立実験の代表データ、スチューデントt検定による統計分析。(c) ビヒクルまたはPDMPで処理したEAE NODマウスから分離した星状膠細胞における髄鞘形成の調節に関連する遺伝子(表2)の相対的発現量(NODナイーブ群に対する)。3つの独立実験の代表データ。スチューデントt検定による統計分析。(d、e)(b)と同様に実施したIrf1(d)及びRelb(e)発現のqPCR分析。全てのデータを平均及びs.e.m.で表す。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.001及びn.s.非有意。

【図2-2】上記に記載のとおりである。

【図2-3】上記に記載のとおりである。

【図3 - 1】図3 a - m。 B 4 G A L T 6によって産生されるL a c C e rは、オートクライン的に作用し、星状膠細胞活性化を増大させる。培養した星状膠細胞をP D M P ( 2 5  $\mu$  M )、L a c C e r ( 1 0  $\mu$  M )、両方( L a c C e r + P D M P )またはビヒクル(ビヒクル)で1時間前処理し、続いてリポ多糖体( 1 0 0 n g / m l )及びインターフェロン - ( 1 0 0 単位 / m l ) ( L P S / I F N )で活性化するか、非処理(対照)のままとした。( a ) N a n o s t r i n g n C o u n t e r 分析によって検出された、L P S / I F N で刺激した星状膠細胞におけるm R N A 発現を表すヒートマップ。3つの独立実験の代表データ。( b ) ( a )に示す遺伝子発現を標準化したヒストグラムを示す。一元配置A N O V A、次いでテューキー事後分析による統計分析。( c ~ f ) 確認済みs h R N A ( n = 4 )を用いて、C 8 - D 3 0 星状膠細胞におけるB 4 g a l t 5 ( s h B 4 g a l t 5 )、B 4 g a l t 6 ( s h B 4 g a l t 6 )または非標的化s h R N A ( S h C o n t r o l )の発現をノックダウンした。( c ) B 4 g a l t 5 及びB 4 g a l t 6 m R N A 発現のq R T 分析。( d ~ f ) 星状膠細胞を( a )と同様に活性化し、( d ) H 2 - A a、( e ) C c l 5 及び( f ) C x c l 1 0 のm R N A 発現を特定した。発現をハウスキーピング遺伝子( G a p d h )に対して示す( n = 4 )。( g ) 星状膠細胞特異的s h R N A レンチウイルスベクターの模式図。( h ~ j ) 星状膠細胞特異的s h B 4 g a l t 6 レンチウイルスのi . c . v . 注入は、疾患の重症度を改善する。N O D マウスに $1 \times 10^7$  I U のs h C o n t r o l、s h B 4 g a l t 5 またはs h B 4 g a l t 6 レンチウイルスを、E A E 誘導後35日(進行期)にi . c . v . 注入した。1群当たりn = 10 マウス( h、i ) i . c . v . 注入後10日に実験を終了し、( h ) ナイーブまたはE A E N O D マウスから分離した星状膠細胞におけるb 4 g a l t 5 及びb 4 g a l t 6 発現レベルをq P C R で特定した。発現は、g a p d h に標準化し、ナイーブマウス由来の細胞の発現を基準に示す。2つの独立実験の代表データ、一元配置A N O V A、次いでテューキー事後分析による統計分析。( i ) ナイーブまたは( j ) に示すように処理したE A E N O D マウスのC N S におけるL a c C e r レベルを定量化した。一元配置A N O V A、次いでテューキー事後分析による統計分析。( j ) E A E 臨床スコア。2つの独立実験の代表データ。(図1 a )と同様の統計分析。( k ) 培養した初代星状膠細胞をP D M P ( 2 5  $\mu$  M )、L a c C e r ( 1 0  $\mu$  M )、両方( L a c C e r + P D M P )またはビヒクル対照(ビヒクル)で1時間前処理し、続いてL P S / I F N で45分間活性化するか、非処理(対照、C o n )のままとした。核画分中のI R F - 1 及びラミンB 発現をウェスタンブロットで分析し、I R F - 1 の核への移動の程度を、核画分中のI R F - 1 とラミンB の発現間の比によって評価し、続いて、4つの独立実験に関して濃度測定的に定量化した(右パネル)。一元配置A N O V A、次いでテューキー事後分析による統計分析。( l ) 初代培養星状膠細胞におけるN F -  $\kappa$  B 及びI R F - 1 とn o s 2 プロモータとの相互作用についてのC h I P 分析。(図4 c )と同様の実験設計及びデータ分析。2つの独立実験からのデータ( m ) L a c C e r またはビヒクルで前処理し、L P S / I F N で活性化したW T またはI R F - 1 欠損( I R F - 1 K O ) マウスから確立した星状膠細胞培養物におけるn o s 2、c s f 2、c c l 2、c c l 5、i l 6 及びt l r 2 の発現のq P C R 分析。5つの独立実験からのL P S / I F N 活性化細胞におけるL a c C e r 処理に対する平均遺伝子誘導。スチューデントt 検定による統計分析。全てのデータを平均及びs . e . m . で表す。\* P < 0 . 0 5、\*\* P < 0 . 0 1、\*\*\* P < 0 . 0 0 1 及びn . s . 非有意。

【図3 - 2】上記に記載のとおりである。

【図3 - 3】上記に記載のとおりである。

【図3 - 4】上記に記載のとおりである。

【図3 - 5】上記に記載のとおりである。

【図3 - 6】上記に記載のとおりである。

【図3 - 7】上記に記載のとおりである。

【図3 - 8】上記に記載のとおりである。

【図3 - 9】上記に記載のとおりである。

【図3 - 10】上記に記載のとおりである。

【図3 - 11】上記に記載のとおりである。

【図3 - 12】上記に記載のとおりである。

【図4 - 1】図4 a - m。 B4 g a l t 6 は、星状膠細胞における c c l 2 転写活性を制御する。(a) マウス c c l 2 プロモータ。(b) c c l 2 ルシフェラーゼレポータと、I R F - 1、p 6 5 または空の対照ベクター(空)をコードする下記の構築物のうちの1つとでトランスフェクトした 2 9 3 T 細胞におけるルシフェラーゼ活性。結果は、分泌型アルカリホスファターゼ活性に対するものであり、空ベクターからの誘導倍率として示す。3つの独立実験からのデータ、スチューデント t 検定による統計分析。(c) P D M P 及び L a c C e r で前処理し、L P S / I F N (図3と同様)で活性化し、L P S / I F N 誘導から2時間後の初代培養星状膠細胞における N F - B 及び I R F - 1 と c c l 2 プロモータとの相互作用についての C h I P 分析。(d ~ h) (図1 k)と同様に P D M P または ビヒクル で処理し、フローサイトメトリーによって分析し、細胞頻度(e、g)及び細胞総数(f、h)として示した、E A E N O D マウスの炎症性単核細胞(C D 1 1 b <sup>+</sup> L y 6 C <sup>高</sup> または C D 1 1 b <sup>+</sup> C D 4 5 <sup>高</sup> 細胞のいずれかとして定義)の C N S への動員。3つの独立実験の代表データ。スチューデント t 検定による統計分析。(i) (図3 j)と同様に、星状膠細胞特異的 s h R N A レンチウイルスの i . c . v . 注入から10日後の C N S において特定された C D 1 1 b <sup>+</sup> L y 6 C <sup>高</sup> 単球の頻度及び数。2つの独立実験の代表データ。一元配置 A N O V A、次いでデューキー事後分析による統計分析。(j) 単球を P D M P、L a c C e r、両方(L a c C e r + P D M P)または ビヒクル で1時間前処理し、トランスウェルチャンバシステムを用いて単球走化性を測定した。C C L 2 または P B S を下部区画に添加し、3時間後、細胞生存率(j、k)及び遊走性単球の数(l)及び細胞生存率を特定した。遊走データは対照からの倍率として、細胞生存率は対照に対する百分率として示す。作業濃度を赤で示す。4つの独立実験の代表データ。(m) C D 1 1 b <sup>+</sup> L y 6 C <sup>高</sup> 単球を P D M P、L a c C e r または ビヒクル で処理し、続いて(図3 a)と同様に L P S / I F N で6時間活性化するか、非処理(対照)のままとした。m R N A 発現を、n C o u n t e r N a n o s t r i n g 分析によって特定した。2つの A N O V A による統計分析では、L a c C e r または P D M P 処理の単球遊走に対する有意な作用は示されなかった。全てのデータについて、データを平均及び s . e . m . で表す。\* P < 0 . 0 5、\* \* P < 0 . 0 1、\* \* \* P < 0 . 0 0 1、及び n . s . 非有意。

【図4 - 2】上記に記載のとおりである。

【図4 - 3】上記に記載のとおりである。

【図4 - 4】上記に記載のとおりである。

【図4 - 5】上記に記載のとおりである。

【図4 - 6】上記に記載のとおりである。

【図4 - 7】上記に記載のとおりである。

【図4 - 8】上記に記載のとおりである。

【図4 - 9】上記に記載のとおりである。

【図4 - 10】上記に記載のとおりである。

【図4 - 11】上記に記載のとおりである。

【図4 - 12】上記に記載のとおりである。

【図4 - 13】上記に記載のとおりである。

【図5 - 1】図5 a - m。 星状膠細胞中の B 4 G A L T 6 は、ミクログリア及び C N S 浸潤性単球の活性化を制御する。(a) n C o u n t e r N a n o s t r i n g 分析によって特定された、ナイーブまたは P D M P もしくは ビヒクル で処理した E A E N O D マウス由来のミクログリアにおける m R N A 発現を表すヒートマップ。3つの独立実験の代表データ。スチューデント t 検定による統計分析。(b) G a p d h に対する c c l 5、i l 1 b、o p n、n o s 2、c d 4 0 及び H 2 - A a 遺伝子発現の q P C R 分析。(c、d) ミクログリアの M 1 または M 2 表現型(表3)(c)及び L y 6 C <sup>高</sup> 単球(d)

に関連する遺伝子の平均標準化発現。スチューデント t 検定による統計分析。(e ~ h) 初代ミクログリアを PDMP、LacCer またはビヒクルで前処理し、続いて (図 3 a) と同様に LPS / IFN で 6 時間活性化するか、非処理 (対照) のままとした。mRNA 発現は、nCounter Nanostripping 分析によって特定し (e、g)、ミクログリアの生存率を特定した (f、h)。5 つの独立実験の代表データ。(i) 混合グリア培養物を緩やかなトリプシン / EDTA (T / E) で処理して、星状膠細胞の単一層を除去し、プレートに付着したミクログリアのみを残すか、非処理のままとした。培養物を PDMP、LacCer またはビヒクルで前処理して、LPS / IFN で 6 時間活性化した。活性化後、両方の培養物を洗浄し、マイルド T / E とともにインキュベートして星状膠細胞を除去することによって、プレートに付着したミクログリア (MG) のみを残した。星状膠細胞の非存在 [MG (純粋)] または存在 [MG (混合)] 下で処理したミクログリアから RNA を回収し、遺伝子発現を、gapdh に対して、cc12、cc15 及び nos2 の発現について qPCR によって分析した。データは、5 つの独立試験からの LPS / IFN で惹起した遺伝子誘導に対する PDMP (左パネル) または LacCer (右パネル) 前処理の相対効果を示す。スチューデント t 検定による統計分析。(j) 混合グリアを指定のブロック抗体または適切なアイソタイプコントロール (25 µg / ml) 及び LacCer (10 µM) またはビヒクル対照で前処理し、次いで、LPS / IFN で 6 時間活性化した。ミクログリアを (i) と同様に分離し、ミクログリア nos2 発現を qRT によって gapdh に対して特定し、(i) と同様に示した。3 つの独立実験の代表データ。(k) 初代培養星状膠細胞における NF- $\kappa$ B 及び IRF-1 と csf2 プロモータとの相互作用についての ChIP 分析。(l、m) (図 3 j) と同様に、星状膠細胞特異的 shRNA レンチウイルスの i.c.v. 注入から 10 日後の慢性 EAE NOD マウスの CNS から分離した、星状膠細胞における csf2 発現 (l) 及びミクログリア細胞における nos2 発現 (m)。2 つの独立実験からのデータ。全てのデータについて、平均及び s.e.m. を示す。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.001、及び n.s. 非有意。

【図 5 - 2】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 3】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 4】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 5】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 6】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 7】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 8】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 9】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 10】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 11】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 12】上記に記載のとおりである。

【図 5 - 13】上記に記載のとおりである。

【図 6 - 1】図 6 a - d。B4GALT5 及び B4GALT6 並びに LacCer レベルは、MS 病変にて上方制御される。MS 患者の病変 (n = 10) または NAWM (n = 5)、MS でない CNS 炎症性疾患 (ウイルス性脳炎、ラスマッセン脳炎及び ADEM を含む NMSCID、n = 5) 患者及び健康な対照 (n = 6) から剖検サンプルを得た。(a) ACTB に対する、CNS サンプルにおける B4GALT5 及び B4GALT6 mRNA 発現の qPCR 分析。(b) MS 患者の NAWM 及び病変における GFAP + 星状膠細胞の B4GALT6、CCL2 及び iNOS の IF 分析。(c) タンパク質含有量に対する、CNS サンプルにおいて特定された LacCer レベル。一元配置 ANOVA、次いでテューキー事後分析による統計分析。(d) 初代ヒト星状膠細胞を PDMP (25 µM) またはビヒクルで前処理し、IL-1 (10 ng / ml) またはポリ (I : C) (10 µg / ml) で活性化するか、非処理 (対照) のままとした。RNA を 6 時間後に回収し、3 つの独立試験における CCL2、CCL5、COX2、IL6、NOS2 及び

T L R 2 の発現を A C T B に対して q P C R によって分析した。スチューデント t 検定による統計分析。示すデータは、平均及び s . e . m . である。\* P < 0 . 0 5、\* \* P < 0 . 0 1 及び \* \* \* P < 0 . 0 0 1。

【図 6 - 2】上記に記載のとおりである。

【図 6 - 3】上記に記載のとおりである。

【図 6 - 4】上記に記載のとおりである。

【図 7 - 1】図 7 a - b。ミグルスタットの S P M S における治療的可能性。A . C N S 炎症における B 4 G A L T 6 / L a c C e r の役割。B . L P S 及び I F N ( L P S / I F N ) で活性化させた初代マウス星状膠細胞に対する、P D M P による B 4 G A L T 6 阻害またはミグルスタットによる G l c C e r 阻害の効果。

10

【図 7 - 2】上記に記載のとおりである。

【図 8 - 1】図 8 a - c。F 1 ハイブリッドマウスは、慢性進行型 E A E を発症する。( a ) N O D C 5 7 B L / 6 F 1 ハイブリッドマウス E A E の臨床スコアを平均及び s . e . m . で示す。右パネルは線形回帰曲線であり、破線は回帰直線の 9 5 % 信頼区間を示す。データは、7 つの独立実験の代表データである ( 平均及び s . e . m . )、( n 1 5 マウス / 群 )。( b、c ) 組織病理学分析。実験終了時に E A E 誘導 F 1 マウスの腰髄切片を得、( b ) 軸索密度についてはビルショウスキー銀染色または ( c ) ミエリン含有量についてはルクソールファストブルーによって染色した。データは、3 つの独立実験の代表データである。

【図 8 - 2】上記に記載のとおりである。

20

【図 8 - 3】上記に記載のとおりである。

【図 9 - 1】図 9 a - d。反応性星状膠細胞の枯渇により、末梢血白血球の C N S への動員が減少する。( a ~ d ) E A E を W T または G F A P <sup>T K</sup> F 1 ハイブリッドマウスで誘導し、ガンシクロビル ( G C V ) またはビヒクル対照 ( P B S ) を図 1 b と同様に投与した。データは、n 7 マウス / 群の 3 つの独立実験の代表データである ( 平均及び s . e . m . )。( a ) G F A P 染色によって検出された反応性星状膠細胞に対する G C V 投与の効果。( b ) F A C S によって評価した C N S への単球 ( 赤色ゲート ) 及びリンパ球 ( 緑色ゲート ) の動員。データは、3 つの独立実験の代表データである。スチューデント t 検定による統計分析。( c、d ) M O G ( <sub>35-55</sub> ) または抗 C D 3 への想起増殖応答に対する、E A E 慢性期中の反応性星状膠細胞の枯渇の効果 ( c )、及び脾臓 C D 4 + T 細胞における I F N - 、I L - 1 7 A、F o x p 3 及び I L - 1 0 の発現 ( d )。

30

\* P < 0 . 0 5、及び ( n . s ) 非有意。

【図 9 - 2】上記に記載のとおりである。

【図 9 - 3】上記に記載のとおりである。

【図 9 - 4】上記に記載のとおりである。

【図 10 - 1】図 10 a - g。C N S からの成体星状膠細胞の分離。( a ~ c ) 成体マウスからの星状膠細胞の分離。( a ) 死細胞の除外。( b ) C D 1 1 b <sup>+</sup> 染色 ( ミクログリア及び単球、青色ゲート ) または C D 4 5 <sup>+</sup> C D 1 1 b <sup>陰</sup> ( リンパ球、緑色ゲート ) に基づいた免疫細胞の除外。( c ) ダンプチャネルを用いて、汚染の免疫細胞及び希突起膠細胞を「非免疫」細胞画分 ( b、赤色ゲート ) から除外した ( 材料及び方法にて詳述 )。陰性画分 ( c、赤色ゲート ) を星状膠細胞に富む画分とし、細胞内染色 ( d ) または m R N A 分析 ( e ~ f ) に用いた。G F A P - G F P F V B マウス由来の全細胞、すなわちミクログリア / 単球及びリンパ球画分並びに G F P <sup>+</sup> 星状膠細胞も同様に m R N A 分析のために得た。( d ) 星状膠細胞に富む画分の G F A P 発現 ( 黒 - G F A P 染色、グレー - アイソタイプコントロール )。( e ~ f ) 濃縮した星状膠細胞、ミクログリア / 単球、リンパ球及び脳画分の純度の q P C R 分析。( e ) 星状膠細胞マーカの g f a p、a l d h 1 1 1 及び a q p 4 の発現。( f ) 免疫細胞マーカ：ミクログリア / 単球細胞 ( C d 1 1 b、F 4 / 8 0 )、樹状細胞 ( C d 1 1 c )、NK 細胞 ( K l r b 1 c )、T 細胞 ( C d 3 )、B 細胞 ( C d 1 9 ) の発現。( g ) 希突起膠細胞 ( m o g、m b p ) 及びニューロン ( S y t 1、S n a p 2 5 ) マーカの発現。データは、3 つの独立実験の代表データで

40

50

ある（平均及び  $s.e.m.$ ）、（ $n = 5$  マウス / 群）。

【図 10 - 2】上記に記載のとおりである。

【図 10 - 3】上記に記載のとおりである。

【図 10 - 4】上記に記載のとおりである。

【図 10 - 5】上記に記載のとおりである。

【図 10 - 6】上記に記載のとおりである。

【図 10 - 7】上記に記載のとおりである。

【図 11 - 1】図 11 a - d。  $LacCer$  合成発現は、慢性 NOD EAE 時の星状膠細胞で上方制御される。（a）白質、灰白質及び血管周囲グリア境界膜の GFAP + 星状膠細胞における B4GALT6 発現の免疫染色（CD31 を内皮細胞のためのマーカーとして使用した）。（b）ネスチン + 神経前駆細胞における B4GALT6 発現の免疫染色。ナイーブ NOD マウスまたは EAE 慢性期中の CNS から分離した（c）星状膠細胞または（d）ミクログリアにおける B4gal t5 mRNA 発現の qRT 分析。発現をハウスキーピング遺伝子（Gapdh）に対して示す。データは、4 つの実験の代表データである。示すデータは、平均及び  $s.e.m.$  である。統計分析は、スチューデント t 検定により実施した。\*  $P < 0.05$ 、及び（ $n.s.$ ）非有意。

【図 11 - 2】上記に記載のとおりである。

【図 11 - 3】上記に記載のとおりである。

【図 11 - 4】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 1】図 12 a - i。 B4GALT6 及び  $LacCer$  は、EAE 時の末梢 T 細胞応答に影響を与えない。（a）ナイーブ C57BL/6 マウス（左パネル）及び NOD マウス（右パネル）を  $LacCer$ （1 マウス当たり  $10 \mu g$ ）またはビヒクルで赤い矢印で示すように処理し、EAE 臨床スコアを記録した。実験終了時（25 日）に星状膠細胞を分離し、その転写プロファイルを nCounter Nanostring 分析で特定した。（b ~ e）EAE を C57BL/6 マウス（b、c）または NOD マウス（d、e）で誘導し、 $LacCer$  またはビヒクルをそれぞれ図 1 g 及び 1 h と同様に投与した。MOG<sub>35-55</sub>（ $20 \mu g/ml$ ）に対する脾臓 T 細胞想起応答；増殖（b、d）、並びに IL-17A、IFN- $\gamma$  及び IL-10 サイトカインの分泌（c、e）。データは、1 群当たり 8 マウス以上の 2 つの独立実験の代表データである（平均及び  $s.e.m.$ ）。（f ~ i）慢性期中の EAE NOD マウスを PDMP またはビヒクルで図 1 K と同様に処理した。データは、 $n = 8$  マウス / 群の 3 つの独立実験の代表データである（平均及び  $s.e.m.$ ）。（f）CNS から分離した  $CD3^+CD4^+$  T 細胞の  $tbx21$ 、 $ifng$ 、 $rorc$ 、 $il17A$ 、 $csf2$ 、 $il10$ 、 $foxp3$  及び  $tgf\beta1$  mRNA の発現についての qPCR 分析。発現を  $gapdh$  に対して示す。（g、h）MOG<sub>35-55</sub>（ $20 \mu g/ml$ ）に対する想起応答；増殖（g）、並びに IL-17A、IFN- $\gamma$  及び IL-10 サイトカインの分泌（h）。（i）脾臓  $CD3^+CD4^+$  T 細胞による IFN- $\gamma$ 、IL-17A、Foxp3 及び IL-10 の発現（平均及び  $s.e.m.$ ）。

【図 12 - 2】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 3】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 4】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 5】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 6】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 7】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 8】上記に記載のとおりである。

【図 12 - 9】上記に記載のとおりである。

【図 13】CCL-2 及び iNOS は、B4GALT6 + GFAP + 星状膠細胞によって、共発現される。免疫染色研究により、CCL-2 または iNOS の発現が慢性 EAE 時の B4GALT6 + GFAP + 星状膠細胞にて特定されたが、ナイーブ脊髄切片では特定されなかった。2 つの独立実験の代表データ、6 動物 / 群を用いた。



【図14-1】図14a-g。 B4GALT6は、星状膠細胞活性化を直接的に調節する。(a)培養した星状膠細胞をPDMP(25 $\mu$ M)、LacCer(10 $\mu$ M)、両方(LacCer+PDMP)またはビヒクル対照(ビヒクル)で1時間前処理し、続いてLPS/IFNで6時間活性化するか、非処理(対照、Con)のままとした。活性化から6時間後にmRNA発現を分析した。gapdhに対して示した、cc15、csf2、nos2、il6、H2-Aa及びtlr2の発現についてのqPCR分析。一元配置ANOVA、次いでテューキー事後分析による統計分析。(b、c)培養した星状膠細胞を指定濃度のLacCer(b)またはPDMP(c)で1時間前処理し、続いてLPS/IFNで活性化するか、非処理(対照、Con)のままとした。活性化から6時間後に細胞生存率を特定した。一元配置ANOVAによる統計分析により、有意な細胞死はないことが判明した。作業濃度(aと同様)を赤で示す。(d)確認済みshRNAを用いて、初代星状膠細胞におけるB4gal t6(shB4gal t6)または非標的化shRNA(ShControl)の発現をノックダウンした。次いで、星状膠細胞をPDMPまたはビヒクル対照(ビヒクル)で1時間前処理し、続いてLPS/IFNで6時間活性化するか、非処理(対照、Con)のままとした。H2-Aa、Cc15及びCxc110についてのmRNA発現を特定し、発現をハウスキーピング遺伝子(Gapdh)に対する誘導倍率として示す。一元配置ANOVA、次いでテューキー事後分析による統計分析(n=3)。(e)モックマウスまたはレンチウイルス感染マウス由来の脊髄スライスの免疫染色分析により、GFAP<sup>+</sup>星状膠細胞のみにGFAP<sup>+</sup>発現が特定される。2つの独立実験の代表データ、少なくとも6動物/群を用いた。(f)ウェスタンブロットで分析した細胞質画分及び核画分におけるNF- $\kappa$ B(P65)、GAPDH及びラミンB発現。NF- $\kappa$ Bの核への移動の程度を、核画分と細胞質画分中のP65の発現間の比によって評価し、続いて、4つの独立実験に関して濃度測定的に定量化した(右パネル)。一元配置ANOVA、次いでテューキー事後分析による統計分析。データは、5つの独立実験からのものである(平均及びs.e.m.)。\* P<0.05、及び\*\* P<0.01。(g)IFによって特定された、慢性EAE時のIRF-1<sup>+</sup>GFAP<sup>+</sup>星状膠細胞のCC1-2またはiNOSの発現。2つの独立実験の代表データ、6動物/群を用いた。

【図14-2】上記に記載のとおりである。

【図14-3】上記に記載のとおりである。

【図14-4】上記に記載のとおりである。

【図14-5】上記に記載のとおりである。

【図14-6】上記に記載のとおりである。

【図14-7】上記に記載のとおりである。

【図15-1】図15a-b。 LacCerは、初代軟膜食細胞及び脈絡叢細胞の転写応答に影響しない。軟膜食細胞(a)及び脈絡叢細胞(b)をLacCer(10 $\mu$ M)またはビヒクル対照(ビヒクル)で1時間前処理し、続いてLPS/IFNで6時間活性化するか、非処理(対照、Con)のままとした。mRNA発現を、nCounter Nanostring分析によって特定した。2つの独立実験の代表データ。

【図15-2】上記に記載のとおりである。

【図16】ミグルスタット治療は、慢性EAEの進行を停止する。NODマウスをMOG35-55で免疫化した。NOD EAEの慢性期/進行期の開始時及びそれ以後、マウスをミグルスタットまたはビヒクル対照で毎日処理した。

【図17】ミグルスタット治療により単球のCNSへの動員が減少する。

【図18】ミグルスタット治療は、T細胞分極に影響しない。

【図19】ミグルスタット治療は、体重に影響しない。

【発明を実施するための形態】

【0024】

星状膠細胞は、CNSの発達及び機能において複数の役割を担っている<sup>1-4</sup>。CNS炎症時の星状膠細胞には、調査対象の星状膠細胞の活性化状態、種類及び位置、関与する

活性化刺激、並びに免疫応答の継続期間などの要因に応じて、有益な役割と不利益な役割が付与されている<sup>3, 32-36</sup>。実際、星状膠細胞の不均一性が、星状膠細胞の活性化への反応に影響を及ぼす重要な要因であることが、ごく最近になって認識されるようになった<sup>37, 38</sup>。GFAP<sup>高</sup>反応性星状膠細胞は、CNS傷害及び急性EAEに反応して、白血球湿潤を調整し<sup>7, 8</sup>、炎症反応を制御するが<sup>5-9</sup>、慢性CNS炎症時のこれらの制御及び機能はよくわかっていない。

#### 【0025】

本明細書に記載するように、NOD EAEの慢性期における星状膠細胞中のB4GALT6の上方制御により、生物活性脂質LacCerのCNSレベルが増加し、このLacCerがオートクライン的に作用し、CNS炎症を増大させ、神経変性を促進する。B4GALT5及びB4GALT6は、LacCer合成を触媒する4-ガラクトシルトランスフェラーゼファミリーのメンバーである<sup>17</sup>。両方の酵素が慢性EAE及びMS時に星状膠細胞によって特に上方制御されるが、CNS LacCerレベルの増加、その結果としての星状膠細胞活性化及び疾患進行の要因であるのは、B4GALT5ではなく、B4GALT6である。これまでの研究は、B4GALT5及びB4GALT6の異なる生物学的役割について記載している。例えば、B4GALT6ではなく、B4GALT5は、胚発生に必須である<sup>23, 24</sup>。Tokuda及び同僚らは、B4GALT6欠損がナイーブマウスのCNSにおけるLacCerシンターゼ活性の有意な減少をもたらすが、腎臓におけるLacCer合成は、B4GALT5によって調節されることを最近実証した<sup>24</sup>。総合すると、これらのデータにより、B4GALT5及びB4GALT6のLacCerシンターゼ活性の空間的及び機能的区画化が示唆される。

#### 【0026】

ミクログリア及びLy6C<sup>高</sup>CCR2<sup>+</sup>炎症性単球は、CNSにおける免疫応答の主要要素であり、神経変性に多大な影響を及ぼす<sup>9, 14, 19, 21, 31</sup>。星状膠細胞は、グリア性瘢痕の形成<sup>39</sup>からケモカイン、例えば、炎症性単球をCNSに動員するCCL-2の分泌<sup>20, 21</sup>までの多岐にわたる複数の機構によって、白血球のCNSへの湿潤を制御する。本明細書で示すように、B4GALT6/LacCerの連係は、NF- $\kappa$ B及びIRF-1によるccl2プロモータのトランス活性化、その結果としての星状膠細胞によるCCL-2産生を調節する。したがって、LacCer合成を阻害すると、星状膠細胞によるCCL-2産生の減少と、炎症性単球のCNSへの動員の有意な減少がもたらされる。B4GALT6はまた、CCL-5及びCXCL-10の産生を調節することが判明した。したがって、これらのデータにより、B4GALT6/LacCer経路は、炎症性細胞のCNSへの動員の重要な制御因子であるとみなされる。

#### 【0027】

CNS浸潤性単球及びミクログリアは、炎症性または抗炎症性活性に関連付けられた異なる表現型を取り、M1炎症性ミクログリア及び単球は、MS及び他のCNS疾患の病因に関与すると考えられる<sup>29, 30, 40</sup>。複数の要因がミクログリア及び単球の活性化に影響する<sup>29, 30, 40</sup>。例えば、GM-CSFは、EAE時に、M1マクローファージの分極を促進し、ミクログリアを活性化する<sup>41</sup>。本明細書で示す通り、B4GALT6/LacCerの連係が星状膠細胞によるGM-CSFの産生を調節し、その結果ミクログリア活性化を調節する。したがって、Th17細胞に加えて<sup>42, 43</sup>、星状膠細胞もまた、慢性CNS炎症時におけるGM-CSFの重要な産生源を構成することがデータから示唆される。まとめると、データは、星状膠細胞によって産生されるLacCerが、慢性CNS炎症時における炎症性単球及びミクログリアの動員及び活性化を調節することを示している。

#### 【0028】

脂質は、微生物感染及び自己免疫における免疫応答に大きな影響を与え、免疫応答の標的または制御因子のいずれかとして作用する<sup>44-46</sup>。脂質特異的抗体及びT細胞がMSで特定されているが<sup>47, 48</sup>、CNS自己免疫における生物活性脂質の役割はほとんど知られていない。Steinman及び同僚らは、ミエリン鞘の脂質が自己反応性T細胞

10

20

30

40

50

胞のアポトーシスを誘発し、EAEを改善することを最近報告した<sup>44</sup>。これらの脂質のレベル減少がMSの脳サンプルで検出されたことから、これらの脂質がCNS特異的T細胞の制御に関与していることが示唆される。本明細書に示すLacCerの炎症性作用を考慮すると、CNSにおける抗炎症性脂質と炎症性脂質のバランスの乱れがMS病理に大きく関与していると思われる。したがって、CNS脂質のプロファイリングは、MSまたは他の神経変性疾患に罹患している対象を特定するために用いることができ、本明細書に記載する治療的介入の候補である。

#### 【0029】

重要なことに、図1A～Bに示す通り、急性期中の反応性星状膠細胞の枯渇は、EAEの有意な悪化を招いた(図1A)が、進行期中の星状膠細胞の枯渇は、EAEの有意な改善に至った(図1B)。更に、急性EAEにおける反応性星状膠細胞の枯渇は、本明細書に示す通り、単球及びT細胞のCNSへの動員増加をもたらすが、EAE進行期中の枯渇は、CNSにおける白血球湿潤を減少させた(図9b)のに対し、末梢T細胞応答には影響しなかった(図9c、d)。

#### 【0030】

総合すると、B4GALT6によって産生されるLacCerが、CNS炎症及び神経変性を駆動し進行型MSに重要な役割を果たすと考えられる、広範なプロセスを調節していることがこれらの結果により示されている。したがって、LacCer合成の調整は、進行型MSのための治療法、及び星状膠細胞の活性化が疾患病理に関与する他の神経疾患のための治療法でもある。

#### 【0031】

進行型MSの発症を診断及び予測するための方法

神経変性疾患、特に進行型多発性硬化症(例えば、PPMSまたはSPMS)を診断するための方法、及び同疾患の発症を予測するための方法について本明細書に記載する。方法は、対象からサンプルを得ることと、サンプル中のLacCerの存在及び/またはレベルを評価することと、その存在及び/またはレベルを、1つまたは複数の参照、例えば、LacCerの正常レベル(例えば、罹患していない対象のレベル)を示す対照参照、及び/または進行型多発性硬化症(例えば、PPMSまたはSPMS)に関連するLacCerのレベル(例えば、進行型多発性硬化症(例えば、PPMSまたはSPMS)に罹患している対象のレベル)を示す疾患参照と比較することを含む。基準レベルを上回るLacCerのレベルの存在は、対象が進行型多発性硬化症(例えば、PPMSまたはSPMS)に罹患していることを対象が示していることを示す。

#### 【0032】

いくつかの実施形態において、LacCerのレベルは、疾患参照のLacCerのレベルと同等であり、対象は、進行型MS、例えばPPMSまたはSPMSに関連する1つまたは複数の症状を有していることから、対象は、進行型MS、例えばPPMSまたはSPMSに罹患している。いくつかの実施形態において、対象は、進行型MS、例えばPPMSまたはSPMSの明らかな徴候または症状を有していないが(例えば、再発寛解型MSに罹患しているが、進行型MS、例えばPPMSまたはSPMSを発症している徴候を呈していない)、LacCerのレベルは、疾患参照のLacCerのレベルと同等であることから、対象は、進行型MS、例えばPPMSもしくはSPMSを発症する可能性があるか、または発症リスクが高い。いくつかの実施形態において、サンプルには、生体液、例えば、血液、血漿、血清、涙、唾液、精液、尿及び/もしくは脳脊髄液、または生物学的組織、例えば、CNS病変からの生検サンプルが挙げられる。

#### 【0033】

いくつかの実施形態において、人が進行型MS、例えばPPMSもしくはSPMSに罹患しているか、または進行型MS、例えばPPMSもしくはSPMSを発症するリスクが高いと判定された場合、次いで、治療、例えば、当技術分野において周知のものまたは本明細書に記載のものを施すことができる。

#### 【0034】

LacCerの存在及び/またはレベルは、当該技術分野において周知の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、液体または薄層クロマトグラフィー）及び/または質量分析法、例えば、LC-MS/MS分析を用いるもの、例えば、三連四重極型LC/MS/MSシステム上で実施されるもの、MRIスペクトロスコピー（例えば、Takiet al., J Biochem. 1992 May; 111(5): 614-9を参照）、バイオアッセイ（例えば、LacCerの存在下で増殖する腫瘍細胞株の増殖を測定することによる；例えば、Jiang et al., Glycobiology 16: 1045-1051(2006)；Hamamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102(31): 11041-11046(2005)を参照）、B4GALT6活性の検出のための酵素アッセイ、並びにイムノアッセイ、例えば、抗LacCer抗体を用いる定量的イムノアッセイ法（ELISAまたは免疫蛍光法など）を使用して評価することができる。抗LacCer抗体は、当該技術分野において周知であり、例えば、マウス抗ラクトシルセラミド抗体（クローンTrA7；IgM）（Symington et al., J Biol Chem 259: 6008-6012(1984)及びDohi et al., Cancer Res. 48: 5680-5685(1988)）があり、他の抗体も、例えば、Funakoshi Corp. から市販されている。

#### 【0035】

好適な基準値は、当該技術分野において周知の方法を用いて、例えば、標準的な臨床試験法及び統計分析を用いて決定することができる。基準値は、任意の関連する形態であってよい。場合によって、参照は、有意性のあるLacCerのレベル、例えば、LacCerの正常レベル、例えば、罹患していない対象もしくはRRMSに罹患しているが、進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSを発症するリスクが現時点でない対象のレベルを表す対照基準レベル及び/または進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSに関連するLacCerのレベル、例えば、進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSに罹患しているか、進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSを後に（例えば、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内に）発症する対象のレベルを表す疾患参照の所与の値を含む。

#### 【0036】

所定のレベルは、中央もしくは平均などの1つのカットオフ値（閾値）、または上位もしくは下位の四分位、三分位、もしくは他のセグメントと統計的に異なるものと決定される臨床試験集団の他のセグメントの範囲を定義するレベルであってよい。信頼区間などのカットオフ値（閾値）の範囲であってよい。所定のレベルは、1つの定義群における疾患を発症するリスクまたは疾患の存在との関連が、別の定義群における疾患のリスクまたは存在よりも数倍高いまたは低い（例えば、およそ2倍、4倍、8倍、16倍以上）場合など、比較群に基づいて確立することもできる。例えば、対象集団（例えば、対照）を、複数の群、例えば、低リスク群、中リスク群及び高リスク群、またはリスクが最小である対象の最低四分位及びリスクが最大である対象の最高四分位の四分位、またはリスクが最小である対象の第n四分位の最低及びリスクが最大である対象の第n四分位の最高の第n四分位（すなわち、nは規則的に空いた間隔）に均等に（または不均等に）分けた場合の範囲であり得る。

#### 【0037】

いくつかの実施形態において、所定のレベルは、同一対象における、例えば異なる時点、例えばより早い時点でのレベルまたは発生である。

#### 【0038】

所定の値に関連する対象は、通常、参照対象とも呼ばれる。例えば、いくつかの実施形態において、対照参照の対象は、本明細書に記載の疾患（例えば、進行型MS、例えば、PPMSまたはSMPMS）に罹患しておらず、進行型MS、例えば、PPMSまたはSMPMSを1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内に発症しない。ある場合には、対照がRRMSに罹患していることが望ましいことがあり、

10

20

30

40

50

他の場合には、対照が健全な対照であることが望ましいことがある。

【0039】

疾患参照の対象は、進行型MS、例えばPPMSまたはSPMSに罹患している（または発症するリスク、例えば、特定の期間内、例えば、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内に発症するリスクが高い）人である。リスクの高さは、一般集団における対象のリスクを上回るリスクと定義される。

【0040】

したがって、ある場合には、対象のLacCerのレベルがLacCerの基準レベル以上であることは、臨床状態の指標（例えば、本明細書に記載の疾患、例えばSPMSの指標）である。他の場合には、対象のLacCerのレベルがLacCerの基準レベル以下であることは、進行型MS、例えばPPMSもしくはSPMSの非存在、または進行型MS、例えばPPMSもしくはSPMSを、例えば1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内に発症するリスクが通常であることの指標である。いくつかの実施形態において、対象のレベルが基準レベルを上回る量は、対象と対照とを区別するのに十分なものであり、任意に、対照のレベルよりも統計的に有意に大きい。対象のLacCerのレベルがLacCerの基準レベルに等しい場合において、「等しい」とは、ほぼ等しい（例えば、統計的に差異がない）ことを指す。

【0041】

所定の基準値は、選択する対象（例えば、ヒト対象）の特定集団に応じて異なり得る。例えば、明らかに健康な集団、またはRRMSに罹患しているが進行型MS、例えばPPMSもしくはSPMSには罹患していない（及び所与の期間内、例えば、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内に、進行型MS、例えばPPMSまたはSPMSを発症しない）対象の集団は、本明細書に記載の疾患に罹患している、もしくは当該疾患を発症する可能性が（例えば、所与の期間内、例えば、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内に）ある対象の集団と比較して、LacCerレベルの異なる「正常」範囲を有することになる。したがって、選択される所与の値は、対象（例えば、ヒト対象）が属するカテゴリ（例えば、性別、年齢、健康、リスク、RRMSまたは他の疾患の存在）が考慮され得る。適切な範囲及びカテゴリは、当業者であれば、慣用的実験以上のものを用いることなく選択することができる。

【0042】

尤度またはリスクを特定する際に、多数の所与の値を確立することができる。

【0043】

LacCerレベルに代わるものとして、対象のサンプル中のAHR、CCL2、CCL5、CCL7、CXCL10、CXCL3、CXCL9、Marco、NRF2、Timp1、TLR2、TLR8、TNFaまたはVEGFのmRNAまたはタンパク質のレベルを評価することができる。基準レベルを上回るレベルは、対象が進行型MS、例えばPPMSもしくはSPMSに罹患しているまたは進行型MSを発症するリスクがあることを示す。mRNAまたはタンパク質のレベルを決定するには、多数の方法が当該技術分野において周知である。タンパク質の存在及び/またはレベルは、当該技術分野において周知の方法を用いて、例えば、定量的イムノアッセイ法を用いて評価することができる。いくつかの実施形態において、ハイスループット法、例えば、当該技術分野において周知であるタンパク質チップまたは遺伝子チップ（例えば、Ch.12, Genomics, in Griffiths et al., Eds. Modern genetic Analysis, 1999, W.H. Freeman and Company; Ekins and Chu, Trends in Biotechnology, 1999, 17:217-218; MacBeath and Schreiber, Science 2000, 289(5485):1760-1763; Simpson, Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002; H

10

20

30

40

50

ardiman, Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts, DNA Press, 2003を参照)を、タンパク質またはmRNAの存在及び/またはレベルを検出するために用いることができる。

#### 【0044】

##### 治療方法

本明細書に記載の方法は、LacCer合成阻害剤、例えば、B4GALT6及び/またはグルコシルセラミド(GlcCer)シンターゼの阻害剤を活性物質として用いる、神経疾患、すなわち、星状膠細胞の機能障害に関連する神経疾患の治療のための方法を含む。図1A~Bに示す通り、急性期中の反応性星状膠細胞の枯渇は、EAEの有意な悪化を招いた(図1A)が、進行期中の星状膠細胞の枯渇は、EAEの有意な改善に至った(図1B)。したがって、いくつかの実施形態において、疾患は、進行型MS、例えば、SPMSまたはPPMSであり、RRMSではない。あるいは、疾患は、別の神経変性病、例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、アレキサンダー病、ハンチントン病もしくはレット病(例えば、Maragakis and Rothstein, Nature Clinical Practice Neurology (2006) 2, 679-689を参照)、または脳及び脊髄傷害であり得る。星状膠細胞の機能障害については、例えば、Maragakis and Rothstein, Nature Clinical Practice Neurology (2006) 2, 679-689に記載されている。

#### 【0045】

いくつかの実施形態において、人が進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSに罹患しているか、または進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSを発症するリスクが高いか、またはLacCer合成のレベルが高いと判定された場合、次いで、治療的有效量のLacCer合成阻害剤の投与を含む治療を施すことができる。したがって、これらの方法は、対象からサンプルを得ることと、サンプル中のLacCerの存在及び/またはレベルを評価することと、その存在及び/またはレベルを、1つまたは複数の参照、例えば、LacCerの正常レベル(例えば、罹患していない対象のレベル)を表す対照参照、及び/または進行型多発性硬化症(例えば、PPMSまたはSPMS)に関連するLacCerのレベル(例えば、進行型多発性硬化症(例えば、PPMSまたはSPMS)に罹患している対象のレベル)を表す疾患参照と比較することを含む。基準レベルを上回るLacCerのレベルの存在は、対象が進行型多発性硬化症(例えば、PPMSまたはSPMS)に罹患しており、LacCer合成阻害剤で治療しなければならないことを対象が示していることを示す。これらの方法はまた、GlcCerシンターゼの阻害剤での治療による利益を受けるかどうかを予測するために用いることができ、基準レベルを上回るLacCerのレベルを有する対象は、基準レベルを下回るLacCerレベルを有する対象よりもLacCer合成阻害剤での治療による利益を得る傾向が高い。加えて、方法は、対象のための治療を選択するために用いることができ、基準レベルを上回るLacCerレベルを有する対象のためにLacCer合成阻害剤での治療が選択される。いくつかの実施形態において、対象は、進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSに関連する1つもしくは複数の症状を有するか、かつ/または対象は、MS、例えば進行型MS、例えばPPMSもしくはSMPMSの診断を受けたか、もしくはRRMSの診断を以前受けたが進行型MSに移行する疑いがある。

#### 【0046】

一般に、方法は、治療的有效量の、本明細書に記載するGlcCerシンターゼの阻害剤を、治療の必要があるか、または治療の必要があると判定された対象に投与することを含む。本文脈中で使用される場合、「治療する」とは、星状膠細胞の活性化に関連する疾患の少なくとも1つの症状を改善することを意味する。治療は、1つまたは複数のMSの症状、例えば、抑鬱及び疲労、膀胱機能障害、痙攣、疼痛、運動失調並びに企図振戦の低減をもたらすことができる。治療的有效量は、急性エピソードの発症を防止する、または急性エピソードの継続期間を短縮する、または1つもしくは複数の症状、例えば、熱感受

性、核間性眼筋麻痺、視神経炎及びレリット徴候の重症度を低減するために十分な量であり得る。いくつかの実施形態において、治療の有効量は、対象の脳、視神経及び脊髄のうちの1つまたは複数における脱髄した病変（例えば、MRIで示されるもの）の発現を防止する、その成長（すなわち、サイズ増大）を遅延もしくは防止する、または治癒を促進するために十分な量である。

#### 【0047】

いくつかの実施形態において、例えば、GlcCerシンターゼの阻害剤が投与される場合、疾患は、MS、例えば進行型MS、例えばPPMSまたはSPMSであり、いくつかの実施形態において、疾患は、アルツハイマー病（AD）、ニーマン・ピック病、パーキンソン病、ランドリー・ギラン・バレー・ストローク症候群、RRMS、ウイルス性脳炎、後天性免疫不全症（AIDS）関連認知症、筋萎縮性側索硬化症、脳傷害または脊髄疾患ではない。いくつかの実施形態において、例えば、GlcCerシンターゼの阻害剤が投与される場合、方法は、S-ニトログルタチオン（GSNO）、L-2-オキシ-チアゾリジン4-カルボキシレート（Procysteine）、N-アセチルシステイン（NAC）またはN-アセチルグルタチオンなどのグルタチオン供与体を活性物質として投与することを含まない。

#### 【0048】

##### 再発寛解型及び進行型MS

多発性硬化症（MS）は、中枢神経系（CNS）の炎症性脱髄疾患である。MSは、通常、CNSにおける病変によって引き起こされる再発型または慢性進行型神経機能障害を臨床的な特徴とする。病理学上、病変は、脳、視神経及び脊髄に影響を及ぼす複数の脱髄領域を含む。根元的な病因は明確ではないが、MSは、少なくとも部分的には自己免疫性または免疫介在性疾患であると広く考えられている。

#### 【0049】

患者の85%で、MSは、初期に、中枢神経系（CNS）に対する急性自己免疫攻撃に続いて完全な回復が見られる、再発寛解型の過程（RRMS）を辿る（Compston and Coles, Lancet 372, 1502-1517 (2008)）。RRMS患者の大多数は、神経障害の進行性の不可逆的な蓄積を特徴とする二次性進行型MS（SPMS）を引き続き発症する（Rovaris et al., Lancet Neurol 5, 343-354 (2006)）。SPMSを特徴付ける進行性不可逆性障害は、新たな炎症性病変の不在で生じることから、この段階のMSでは他の機構が関与している可能性が示唆される（Rovaris et al., Lancet Neurol 5, 343-354 (2006)）。いくつかの治療がRRMSに対して有効な効果を示すが、通常、SPMSに対しては効果がなく、SPMSへの移行をモニタするための利用可能なマーカーもない。実際、適応性炎症反応を停止させる治療は、RRMSの管理に対して有効な効果を示すが、通常、SPMSでは効果がない（Lopez-Diego and Weiner, Nat Rev Drug Discov 7, 909-925 (2008)）。したがって、進行型MSのための新しい治療法及びRRMSからSPMSへの移行をモニタするためのバイオマーカーを特定するために、SPMSへの移行に関与するプロセスを特徴付けることは重要である。

#### 【0050】

二次性進行型多発性硬化症（SPMS）は、国際的に認識されている4つの型の多発性硬化症（その他は、再発/寛解型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症及び進行型再発多発性硬化症）の1つであり、度重なる再発並びに軽微な寛解及び停滞期の有無にかかわらず、臨床的な神経傷害の着実な進行を特徴とする。SPMSを発症する人々は、一般に、2年～40年以上継続し得る、ある期間の再発/寛解型多発性硬化症（RRMS）を以前に罹患している。場合によって、対象は、SPMSの発症後に何回かの再発及び寛解を経験し得るが、これらは時間の経過とともに頻度が少なくなる傾向にある。

#### 【0051】

一次性進行型MS（PPMS）は、比較的珍しく（MS患者人口の約15%）、疾患の

10

20

30

40

50

発症後の緩慢な進行性機能喪失を特徴とする。大部分のP P M S患者は、進行性ミエロパシーまたは進行性小脳機能障害を有する。

【0052】

MSの診断及びサブタイプの判定は、当該技術分野において周知の方法、例えば、空間的及び時間的に広がったCNS病変の存在、並びに代替診断の除外に基づいて行うことができる(Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 122: 1965; 552 - 568)。あるいは、熱感受性、核間性眼筋麻痺、視神経炎及びレルミット徴候を含む、臨床的徴候及び症状の存在に基づいて診断を行うことができる(例えば、McDonald et al., Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines From the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann. Neurol. 2001; 50: 121; 及びPolman et al., Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the "McDonald Criteria." Ann Neurol 2005; 58: 840 - 846を参照)。

【0053】

MSの障害を定量化するための方法には、Kurtzke総合障害度評価尺度(EDSS)、MRIスキャン、Scripps神経症状評価尺度(SNRS)、Krupp疲労重症度尺度(FSS)、無能力状態尺度(ISS)、機能的自立度評価法(FIM)、歩行指数(AI)、ケンブリッジ多発性硬化症基礎スコア(CAMBS)、多発性硬化症の機能評価(FAMS)、気分状態特性尺度(POMS)及び疾病影響尺度(SIP)が挙げられる。

【0054】

MS及び進行型MS、例えば、P P M SまたはS M P Sの診断及び治療に関する更なる情報については、当該技術分野にて、例えば、Hurwitz et al., Ann Indian Acad Neurol. 2009 Oct - Dec; 12(4): 226 - 230; 及びSpinal Cord Medicine, Principles and Practice, Lin et al., Eds., (Demos Medical Publishing, Inc., 2003)(例えば、Section V, Chapter 32, "Multiple Sclerosis")に認められる。

【0055】

標的とするLacCer合成: B4GALT6及びGlcCer合成  
本明細書に記載の方法は、LacCer合成阻害剤、例えば、B4GALT6及び/もしくはグルコシルセラミド(GlcCer)シンターゼの阻害剤、またはグルコセレブロシダーゼの活性化剤を用いる、進行型多発性硬化症(例えば、P P M SまたはS P M S)の治療のための方法を含む。方法は、進行型多発性硬化症(例えば、P P M SまたはS P M S)に罹患している対象を特定することと、治療的有效量の、LacCer合成の特定の阻害剤、例えば、B4GALT6及び/またはGlcCer合成の特定の阻害剤を含む治療用組成物を、進行型多発性硬化症(例えば、P P M SまたはS P M S)に罹患している対象に投与することとを含む。

【0056】

GlcCerシンターゼの小分子阻害剤  
GlcCerシンターゼの阻害剤には小分子が挙げられ、これらの大部分は、酵素の活性部位に結合し基質の結合を妨げる酵素基質の類似体である。これらの阻害剤には、セラミド類似体(例えば、米国特許第6,569,889号、同第6,255,336号、同第



5, 916, 911号、同第5, 302, 609号; Lee et al., J. Biol. Chem. 274(21): 14662(1999); Abe et al., J. Biochem. 111: 191(1992); Inokuchi et al., J. Lipid Res. 28: 565(1987); Shayman et al., J. Biol. Chem. 266: 22968(1991); 及び Bell et al. Ed., 1993, *Advances in Lipid Research: Sphingolipids in Signaling* (Academic Press, San Diego) を参照) 及び糖類似体 (例えば、米国特許第6, 660, 749号、同第6, 610, 703号、同第5, 472, 969号、同第5, 525, 616号; Overkleeff et al., J. Biol. Chem. 273(41): 26522(1998) を参照) (同じく、US20120022126, US20130040953, US20130225573, US20070135487, 5, 700, 826 及び 5, 840, 721; 並びに Koltun et al., Bioorg Med Chem Lett. 2011 Nov 15; 21(22): 6773-7 を参照) が挙げられる。例としては、1-(3', 4'-エチレンジオキシ)フェニル-2-ノナノイルアミノ-3-ピロリジノ-1-プロパノール、1-(3', 4'-エチレンジオキシ)フェニル-2-オクタノイルアミノ-3-ピロリジノ-1-プロパノール、D-トレオ-(1R, 2R)-フェニル-2-デカノイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール(PDMP) 及び D-PDMP を含むその類似体 (例えば、Hillaert et al., Bioorg Med Chem. 2006 Aug 1; 14(15): 5273-84 を参照)、D-トレオ-EtDO-P4、((1R, 2R)-ノナン酸-(2', 3'-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ダイオキシシ-6'-イル)-2-ヒドロキシ-1-ピロリジン-1-イルメチル-エチル]-アミド-L-酒石酸塩、AMP-DNM、CG0203586(1-ヒドロキシ-3-(ピロリジン-1-イル)アセトアミド)、Genz-112638(エリグルスタット)、Genz-529468、GZ-161、Genz-682452、EXEL-0346(Richards et al., J Med Chem. 2012 May 10; 55(9): 4322-35)、OGT2378、Genz-123346、デオキシノジリマイシン系 GCS 阻害剤 (例えば、N-ブチル-デオキシノジリマイシン(ミグルスタットとしても知られる NB-DNJ)、N-(5'-アダマンタン-1'-イル-メトキシ)-ペンチル-1-デオキシノジリマイシン(AMP-DNM)、または長アルキル側鎖を有する a1-デオキシノジリマイシン、例えば、アルキル鎖中に9個~約20個の炭素原子を有する1, 5-ジデオキシ-1, 5-イミノ-D-グルシトールの長鎖 N-アルキル誘導体が上げられる。したがって、N-アルキル置換基は、例えば、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、シス-11-ヘキサデセニル、オクタデシル、シス-13-オクタデセニル及びエイコシルであり得る。US6, 610, 703 を参照されたい。PPMP(DL-トレオ-1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルホリノ-1-プロパノール) については、US20130217691 及び US20050101674 を参照されたい。

#### 【0057】

本方法において有用である更なる阻害剤には、8, 389, 517; 20110166134; 20070203223; 20050222244; 20130095089; 7, 335, 681; 7, 253, 185; 7, 148, 251; 6, 916, 802; 6, 890, 949; 6, 051, 598; 6, 040, 332; 6, 030, 995; 5, 952, 370; 5, 945, 442; 20090247559; 20060111400; 20060058349; 20060074107; 8, 557, 844; 20100204162; 8, 252, 789; 20130012539 及び 20090163500 に記載されているものが挙げられる。

#### 【0058】

B4GALT6 を標的にする阻害核酸

B4GALT6の特定の阻害剤には、B4GALT6遺伝子またはmRNAを標的にする阻害核酸が挙げられ、ヒトB4GALT6 mRNAの配列は、GenBankにて、アクセッション番号NM\_004775.3であり、ゲノム配列は、NC\_000018.10である。本方法及び本組成物において有用な阻害核酸には、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列(EGS)オリゴヌクレオチド、siRNA化合物、siRNA化合物などの一本鎖または二本鎖RNA干渉(RNAi)化合物、修飾塩基/ロックド核酸(LNA)、アンタゴmir、ペプチド核酸(PNA)、及び標的B4GALT6核酸の少なくとも一部にハイブリダイズし、その機能を調整する他のオリゴマー化合物またはオリゴヌクレオチド模倣物が挙げられる。いくつかの実施形態において、阻害核酸には、アンチセンスRNA、アンチセンスDNA、キメラアンチセンスオリゴヌクレオチド、修飾連結を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、干渉RNA(RNAi)、低分子干渉RNA(sRNA)、マイクロ干渉(miRNA)、小分子RNA(stRNA)もしくは小ヘアピンRNA(shRNA)、小RNA誘導遺伝子活性化(RNAa)、小分子活性化RNA(sRNA)、またはこれらの組み合わせが挙げられる。阻害核酸は、例えば、修飾ヌクレオチド(例えば、ロックド核酸)または主鎖(例えば、リン原子を含まない主鎖)を含むように修飾してもよいし、ミックスマーまたはギャップマーによるものでもよい(例えば、WO2013/006619を参照)。B4GALT6に対して指向された多数のsiRNAが、例えば、Origene、Labome、Abnova及びQiagenから市販されている。

【0059】

本明細書に記載の方法を実施するために用いられる阻害核酸は、RNA、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルスまたはこれらのハイブリッドのいずれであれ、遺伝子組み換えされた、増幅された及び/または組み換えでもしくは合成的に発現させたもしくは作製された各種源から分離することができる。組み換え核酸配列は、個別に分離またはクローン化することができ、所望の活性について試験を行うことができる。任意の組み換え発現系を用いることができ、例えば、インビトロ、細菌、真菌、哺乳動物、酵母菌、昆虫または植物細胞の各発現系が挙げられる。

【0060】

核酸配列は、送達ベクターに挿入し、ベクター内の転写ユニットから発現させることができる。組み換えベクターは、DNAプラスミドまたはウイルスベクターであり得る。ベクター構築物の作製は、当該技術分野において周知である任意の好適な遺伝子工学技術、例えば、限定するものではないが、PCR、オリゴヌクレオチド合成、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製及びDNA塩基配列決定の標準的な技術を用いて実施することができ、例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." (1989), Coffin et al. (Retroviruses. (1997)) 及び "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)) に記載されているものがある。当業者には明らかであるように、本発明の核酸を細胞に導入するために、種々の好適なベクターが利用可能である。核酸を送達するのに適したベクターの選択、及び選択した発現ベクターを細胞に挿入するための条件の最適化は、過度の実験をする必要のない当業者の技術範囲内である。ウイルスベクターは、パッケージング細胞中の組み換えウイルスを産生するための配列を有するヌクレオチド配列を含む。本発明の核酸を発現するウイルスベクターは、ウイルス骨格に基づいて構築することができ、例えば、限定するものではないが、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルスまたはアルファウイルスが挙げられる。本発明の核酸を発現することができる組み換えベクターは、本明細書に記載するように送達することができ、標的細胞(例えば、安定した形質転換体)中に存続することができる。

【0061】

阻害核酸は、周知の化学合成技術によってインビトロで合成することができ、例えば、

Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号に記載されているものがある。

#### 【0062】

本明細書に記載の方法にて用いるための阻害核酸は、1つまたは複数の修飾を含み得、例えば、修飾の導入、例えば、ヌクレオチド修飾などによって、核酸分解に対して安定化することができる。例えば、阻害核酸は、ヌクレオチド配列の5'末端または3'末端に、ホスホロチオエートの少なくとも第1、第2または第3のヌクレオチド間連結を含み得る。別の例として、阻害核酸には、2'-修飾ヌクレオチド、例えば、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)を挙げることができる。別の例として、阻害核酸は、少なくとも1つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み得、いくつかの実施形態では、全てのヌクレオチドが2'-O-メチル修飾を含む。いくつかの実施形態において、阻害核酸は、「ロック」されており、すなわち、リボース環が、2'-O原子と4'-C原子を連結するメチレン架橋によって「ロック」されている核酸類似体を含む(例えば、Kaupinnen et al., Drug Disc. Today 2(3):287-290(2005); Koshkin et al., J. Am. Chem. Soc., 120(50):13252-13253(1998)を参照)。更なる修飾については、US20100004320、US20090298916、及びUS20090143326を参照されたい。

#### 【0063】

阻害核酸の操作技術、例えば、サブクローニング、標識プローブ(例えば、Klenowポリメラーゼを用いるランダムプライマー標識、ニックトランスレーション、増幅)、配列決定、ハイブリダイゼーションなどは、科学文献及び特許文献に十分記載されており、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual 3d ed. (2001); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (John Wiley & Sons, Inc., New York 2010); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)を参照されたい。

#### 【0064】

B4GALT6に結合し阻害する抗体

B4GALT6に結合し、その活性を阻害する(すなわち、LacCer合成を阻害する)抗体も用いることができ、ヒトB4GALT6タンパク質の配列は、GenBankにて、アクセッション番号NP-004766.2である。本明細書で使用する「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子またはその抗原結合部分を指す。免疫グロブリン分子の抗原結合部分の例には、抗原に結合する能力を保持する、F(ab)及びF(ab')<sub>2</sub>

断片が挙げられる。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組み換え抗体、キメラ抗体、脱免疫化抗体もしくはヒト化抗体、完全ヒト抗体、非ヒト（例えば、ネズミ）抗体、または一本鎖抗体であり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、エフェクター機能を有し、補体を結合することができる。いくつかの実施形態において、抗体は、Fc受容体を結合する能力が低い、またはその能力がない。例えば、抗体は、アイソタイプもしくはサブタイプ、断片または他の変異体であり得、例えば、突然変異させたまたは欠失させたFc受容体結合領域を有し、Fc受容体への結合を支援しない。抗体及びその断片を製造するための方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Harlow et al., editors, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, (N.Y. Academic Press 1983); Howard and Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* (CRC Press; 1st edition, Dec 13, 2006); Kontermann and Dubel, *Antibody Engineering Volume 1* (Springer Protocols) (Springer; 2nd ed., May 21, 2010); Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology) (Humana Press; Nov 10, 2010); 及び Dubel, *Handbook of Therapeutic Antibodies: Technologies, Emerging Developments and Approved Therapeutics*, (Wiley-VCH; 1 edition September 7, 2010) を参照されたい。B4GALT6に結合する抗体は、EMD Millipore、R&D Systems、Cell Signaling Technology、OriGene、Novus Biologicals、Thermo Fisher Scientific、LSBio、Abcam及び/またはCloud-Clone Corp.) から市販されており、当業者であれば、抗体を容易に作製または取得することができ、B4GALT6を発現する細胞中でLacCer合成を阻害する抗体の能力を試験することができる。

#### 【0065】

##### グルコセレブロシダーゼの活性化剤

本明細書に記載の他の化合物に加えてまたは代替物として、グルコセレブロシダーゼの活性化剤も用いることができる。当該技術分野において、NCGC00182186 (5-シクロプロピリデン-7-(ジフルオロメチル)-N-(2-フェニルスルファニルフェニル)-1H-ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド) 及びNCGC00182510 ([2-(tert-ブチルアミノ)-2-オキシエチル]2-[2-(4-プロモアニリノ)-2-オキシエトキシ]ベンゾエート) (例えば、Goldin et al., *PLoS ONE* 7(1): e29861 を参照)、またはサボシンCまたはホスファチジルセリン (例えば、Salvioli et al., *Biochem. J.* (2005) 390(95-103) を参照) を含む、活性化剤が知られている。サボシンCは、8.5 kDaのスフィンゴ脂質活性化タンパク質であり、リソソームグルコセレブロシダーゼを活性化する。2つの機能ドメインが特定されており、各ドメインは、活性化部位に隣接するまたは部分的に重複する結合部位を含んでいる。ドメイン1はアミノ酸位置6~34内に位置し、ドメイン2はアミノ酸41~60である。活性化部位は、残基27~34及び41~49にわたり、結合部位は、残基6~27及び45~60からなる。ドメイン1または2のいずれかの配列を含むペプチドは、完全長合成サボシンCの活性の90%を呈した (Yoneshige et al., *J Neurosci Res.* 2010 Aug 1; 88(10): 2118-34; Weiler et al., *Protein Sci.* 1995 Apr; 4(4): 756-64; Weiler et al., *J Mol Neurosci.* 1993 Fall; 4

(3): 161-72; Fujibayashi and Wenger, Clin Chim Acta, 1985 Mar 15; 146(2-3): 147-56; Zschechoche et al., Eur J Biochem, 1994 May 15; 222(1): 83-90 参照)。したがって、サボシンCまたはその活性断片（例えば、ドメイン1または2を含有するもの）を用いることができる。ヒトサボシンCの配列は、次の通りである（ドメイン1及び2を[ ]で括って示す）。

SDVYC[EVC EFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDK]MCSKLP[KSLSEECQEVDITYGSSILS]ILL E EVSP'ELVCSMLHLCSG（配列番号1）

【0066】

進行型多発性硬化症（例えば、PPMSまたはSPMS）を有する対象の特定  
いくつかの実施形態において、方法は、例えば、進行型多発性硬化症（例えば、PPMSまたはSPMS）の1つまたは複数の指標についてスクリーニングすることによって、対象をSPMSについてスクリーニングすることを含む。進行型多発性硬化症（例えば、PPMSまたはSPMS）を有する対象を特定するための方法は、当該技術分野において知られており、本明細書に記載するようにLacCerレベルの増加を検出することによって対象を特定することも含み得る。いくつかの実施形態において、SPMSは、MSを有する対象の障害（通常は運動/小脳機能）が3.5以上のEDSSに進行することによって特定される。SPMSはまた、初期の再発寛解型の経過に続いて、6ヶ月以上の再発に  
関係ない症状の増悪の存在で診断することができる。PPMSは、例えば、疾患発症後の  
障害の進行（例えば、改善の期間がない）、例えば、脳MRI陽性、脊髄MRI陽性及び  
CSFの陽性所見のうちの少なくとも2つを伴う最低1年の疾患進行に基づいて診断する  
ことができる。

【0067】

方法は、対象における進行型多発性硬化症（例えば、PPMSまたはSPMS）の存在、または対象における進行型多発性硬化症（例えば、PPMSまたはSPMS）の発症の可能性（例えば、特定の期間内、例えば、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内）を、例えば、本明細書に記載の方法を用いて検出することと、対象が進行型多発性硬化症（例えば、PPMSまたはSPMS）に罹患している  
または発症する可能性があることに基づいて、対象を選択することを含む。

【0068】

一般に、本明細書に記載の方法は、任意の哺乳動物、好ましくは、ヒトに実施することができる。

【0069】

標準的治療

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の治療は、MSのための標準的治療、例えば、コルチコステロイド療法、インターフェロン-1b、グラチラマー酢酸塩、ミトキサントロン、フィンゴリモド、テリフルノミド、フマル酸ジメチル、ナタリズマブ、カンナビスまたはこれらの組み合わせの投与と組み合わせて施される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の治療は、1つまたは複数のMSの症状、例えば、抑鬱及び疲労、膀胱機能障害、痙縮、疼痛、運動失調並びに企図振戦のための治療と組み合わせて施され、かかる治療には、薬物、運動及び適切な機能回復訓練が含まれる。MSの診断及び治療に関する更なる情報は、nationalmssociety.orgのワールドワイドウェブ上のNational MS Societyのウェブサイトを確認することができる。

【0070】

いくつかの実施形態において、例えば、基準レベルを上回るGlcCeのレベルを有することから、対象がSPMSを有するか、または特定の期間内にSPMSを発症する可能性がある  
と特定された場合、例えば、ミトキサントロンまたはナタリズマブを含む、進行型MSのための治療を施す。

## 【0071】

## 医薬組成物

本明細書に記載の方法は、LacCer合成阻害剤を活性成分として含む、医薬組成物の製造及びその使用を含む。また医薬組成物自体も含まれる。

## 【0072】

医薬組成物は、通常、薬学的に許容可能な担体を含む。本明細書で使用する時、「薬学的に許容可能な担体」という言葉は、薬剤の投与と適合性のある、生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤、抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤などを包含する。補助的な活性化化合物もまた、組成物中に組み込むことができる。

## 【0073】

医薬組成物は、通常、目的の投与経路に適合するように製剤化される。本方法にて特に有用である投与経路の例には、非経口（例えば、静脈内）、髄腔内、経口及び経鼻または鼻腔内（例えば、滴剤または吸入での投与による）投与が挙げられる。血液脳関門を通過しない化合物については、例えば、埋め込んだ髄腔内ポンプ（例えば、Borrini et al., Archives of Physical Medicine and Rehabilitation 2014; 95: 1032-8; Penn et al., N. Eng. J. Med. 320: 1517-21 (1989); 及び Rezai et al., Pain Physician 2013; 16: 415-417を参照）またはナノ粒子、例えば金ナノ粒子（例えば、グルコース被覆金ナノ粒子、例えば Gromnicova et al. (2013) PLoS ONE 8(12): e81043を参照）を用いて、CNSまたはCSFへの直接送達を用いることができる。好適な医薬組成物を製剤化するための方法及び送達するための方法については、当該技術分野において知られており、例えば、Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY); and Allen et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Lippincott Williams & Wilkins; 8th edition (2004)の書籍シリーズを参照されたい。

## 【0074】

注入用途に適した医薬組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）、または滅菌した注入可能な溶液もしくは分散体を即時調製するための分散体及び滅菌粉末を挙げることができる。静脈内投与の場合、好適な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は滅菌でなければならず、容易に注入可能である程度に流動的であるべきである。組成物は、製造及び貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用を受けないように保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど）、並びにこれらの好適な混合物を含有する、溶媒または分散媒であってよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散体の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより行うことができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどを組成物内に含むことが好ましい。注入可能な組成物の持続的吸収は、組成物中に、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含むことによりもたらすことができる。

## 【0075】

殺菌した注入可能な溶液は、活性化化合物を必要な量で、上述した成分の1つまたは組み合わせとともに、適切な溶媒中に組み込み、必要に応じて、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散体は、塩基性分散媒及び上述のものから必要な

10

20

30

40

50

他の成分を含む滅菌賦形剤に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌した注入可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥及び凍結乾燥であり、予め滅菌濾過した当該溶液から、活性成分の粉末と任意の所望の追加成分を合わせた粉末が得られる。

#### 【0076】

経口投与の場合、組成物は、不活性希釈剤または可食担体とともに製剤化することができる。治療的な経口投与の目的では、活性化合物を賦形剤とともに組み込むことができ、錠剤、トローチ剤またはカプセル剤、例えばゼラチンカプセル剤の形態で使用する事ができる。口腔用組成物もまた、マウスウォッシュとして使用するために流体担体を用いて調製することができる。薬学的に適合性のある結合剤及び/または補助剤物質を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸薬、カプセル剤、トローチ剤などは、微結晶セルロース、トラガカントガムもしくはゼラチンなどの結合剤、デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogelもしくはコーンスターチなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotesなどの滑沢剤、コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤、スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤、もしくはペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジフレーバなどの着香剤の成分または類似の性質の化合物のいずれかを含み得る。

10

#### 【0077】

吸入による投与の場合、化合物は、好適な噴射剤、例えば二酸化炭素などのガスを含有する加圧容器もしくはディスペンサ、またはネブライザによるエアゾールスプレーの形態で供給され得る。このような方法には、米国特許第6,468,798号に記載のものが挙げられる。

20

#### 【0078】

核酸であるまたは核酸を含む治療用化合物は、DNAワクチンなどの核酸薬剤の投与に適した任意の方法によって投与することができる。これらの方法には、遺伝子銃、バイオインジェクタ及び皮膚貼付剤、並びに針を用いない方法、例えば、米国特許第6,194,389号に記載されている微粒子DNAワクチン技術、及び米国特許第6,168,587号に記載されている粉末状ワクチンを用いる哺乳動物の経皮的無針ワクチン接種が挙げられる。更に、特にHamajima et al., Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10(1998)に記載されているように、鼻腔内送達も可能である。

30

#### 【0079】

リポソーム（例えば、米国特許第6,472,375号に記載のもの）及びマイクロカプセル化を用いて、本明細書に記載の化合物を送達することもできる。生分解性微粒子送達系も用いることができる（例えば、米国特許第6,471,996号に記載のもの）。

#### 【0080】

一実施形態において、治療用化合物は、インプラント及びマイクロカプセル送達系を含む、制御放出製剤などの、治療用化合物が身体から急速に排泄されるのを防ぐ担体とともに調製される。エチレンビニルアセタート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤は、標準的な技術を用いて調製してもよいし、例えば、Alza Corporation及びNova Pharmaceuticals, Inc.から購入してもよい。また、リポソーム懸濁液（選択した細胞に標的化したりポソームを、細胞抗原に対するモノクローナル抗体とともに含む）を薬学的に許容可能な担体として使用することもできる。これらは、当業者に知られた方法、例えば、米国特許第4,522,811号に記載の方法に従って調製することができる。

40

#### 【0081】

医薬組成物は、投与に関する説明書とともに、容器、パックまたはディスペンサ、例えば、単回用量ディスペンサ中に含めることができる。容器、パックまたはディスペンサは、例えば、1日、1週間または1ヶ月の治療に対して十分な単回用量を含み得る、キット

50

の一部として包含され得る。

【0082】

用量

化合物の用量、毒性及び治療有効性は、例えば、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法によって、例えば、LD50（集団の50％にとって致死的な用量）及びED50（集団の50％で治療的に有効な用量）を特定するための手法によって、決定することができる。毒性与治療効果との用量比は、治療指数であり、LD50 / ED50の比で表すことができる。治療指数の高い化合物が好ましい。有毒な副作用を呈する化合物を用いてもよいが、冒されていない細胞に対する潜在的損傷を最小限に抑えるために、当該化合物を罹患組織の部位に対して標的化し、これによって副作用を低減する送達系を設計

10

【0083】

細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトにおける使用のための用量範囲を定式化する際に用いることができる。当該化合物の用量は、好ましくは、毒性をほとんどまたは全く有さないED50を含む血中濃度の範囲内である。用量は、用いられる剤形及び利用する投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明の方法で使用されるいずれの化合物に関しても、治療的有效量は、初めに細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養にて決定されたIC50（すなわち、症状の最大半数の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む血漿中濃度範囲を達成するように、動物モデルにおける用量を定式化することができる。このような情報は、ヒトにて有用な用量をより正確に決定するために用いることができる。例えば、高速液体クロマトグラフィーによって、血漿中レベルを測定することができる。

20

【0084】

「有効量」は、有益なまたは所望の結果を達成するのに十分な量である。例えば、治療量は、所望の治療効果を達成する量である。この量は、疾患の発症または疾患の症状を防ぐために必要な量である予防的有效量と同じであっても異なってもよい。有効量は、1つまたは複数の投与、適用または用量にて適用することができる。組成物の治療的有效量は、選択する組成物に左右される。組成物は、1日1回以上から1週間1回以上まで投与することができる（1日おきに1回を含む）。当業者であれば、特定の要因、例えば、限定するものではないが、対象の疾患または障害の重症度、以前の治療、全般的な健康及び/または年齢、並びに他の疾患の存在が、対象を効果的に治療するために必要とされる用量及びタイミングに影響し得ることを理解するであろう。更に、治療的有效量の本明細書に記載の組成物を用いた対象の治療は、単回治療または一連の治療を含み得る。

30

【実施例】

【0085】

以下の実施例で本発明について更に記載するが、実施例は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0086】

材料及び方法

以下の材料及び方法を以下に記載する実施例で使用した。

40

【0087】

動物。C57BL/6J、NOD/ShiLtJ（NOD）、IRF-1欠損マウス及びGFAP-HSV-TKマウスは、The Jackson Laboratoryから得た。ヘテロ接合体GFAP-HSV-TKを持つC57BL/6マウスを用いて、GFAP<sup>TK</sup>またはWTF1のいずれかであるF1同腹仔を作製した。Tg（GFAP-hGFAP）FVBトランスジェニックマウスについては記載されている<sup>4,9</sup>。全ての動物は、Harvard Institutes of Medicineの病原体フリー施設に維持した。全ての実験は、Institutional Animal Care and Use Committee of Harvard Medical Schoolが規定したガイドラインに従って実施した。

50



## 【0088】

EAE誘導及び処置。CFA(Difco Laboratories)中で乳化させたMOG<sub>35-55</sub>ペプチドを1マウス当たり100 $\mu$ g(C57BL/6及びF1マウス)または150 $\mu$ g(NODマウス)の用量で用いて雌マウスを免疫化し、続いて、0日及び2日に百日咳毒素(1マウス当たり150ng; List biological laboratories, Inc.)を投与することによって、記載の通り<sup>14</sup>EAEを誘導した。EAEの臨床的徴候を次のスコアに従って評価した。0:疾患の徴候なし、1:尾の緊張損失、2:後肢の不全麻痺、3:後肢の完全麻痺、4:四肢麻痺、5:瀕死状態。GCV(APP薬剤)またはビヒクル対照(PBS)を、EAE誘導の7日前から毎日投与し(25mg/kg、皮下)、急性期の期間中(15日)または進行性/慢性期間中(30~50日)のみ継続した。EAE誘導中のC57BL/6Jマウスに、1マウス当たり10 $\mu$ gの用量で、LacCer(Matrea LLC)またはビヒクル(10%DMSO)をMOG<sub>35-55</sub>ペプチドとともに投与し、その後は3日ごとに1回腹腔内(i.p.)投与した。NODマウスへのLacCerまたはビヒクル投与は、疾患誘導後35日から開始し、1マウス当たり10 $\mu$ gの用量で3日ごとに1回i.p.投与した。PDMP(Matrea LLC)またはビヒクル対照(5%Tween-80)を、EAE誘導後40日から、実験期間中20mg/kgの用量で1日2回i.p.投与した。

10

## 【0089】

免疫蛍光法(IF)。0.1M PBS中の4%パラホルムアルデヒドで動物を灌流した。30%スクロースを加えた0.1M PBS中で組織を凍結保護し、クライオスタットで10 $\mu$ m厚の切片に切り出した。5%ヤギ血清、0.3%Triton(商標)X-100(Sigma-Aldrich)を含有するM.O.M.(商標)マウスIgブロック試薬(Vector laboratories)中で、切片を固定し、次の抗体:GFAP(ニワトリ、1:500、Abcam)、GFP(ニワトリ、1:500、Abcam)、IBA-1(ウサギ、1:200、Dako)、B4GALT6(ウサギ、1:100、Proteintech)、iNOS[マウス(4E5)、1:100、iNOS]、CCL2[マウス(2D8)、1:100、Fisher scientific]、Nestin[マウス(rat-401)、Millipore]、CD31[マウス(RM0032-1D12)、1:100、Abcam]、及びIRF-1(ウサギ、1:250、Santa cruz)とともに4で一晩インキュベートした。翌日の切片を3回洗浄し、適切な蛍光色素結合ヤギ二次Ab(1:1000; Abcam)とともに室温で1時間インキュベートした。1群当たり6匹の動物を用いた。LSM710共焦点顕微鏡(Carl Zeiss)を用いて画像を撮影した。

20

30

## 【0090】

成体マウスCNSからの細胞の分離。先の記載<sup>50</sup>の通りに、軽微な修正を加えて、CNSから単核細胞を分離した。ナイーブ及びEAEマウスを安楽死させ、次いで、氷冷滅菌PBSを用いて左心室からの灌流にかけた。その後、脳及び脊髄を摘出し、細かく刻み、0.05%(w/v)III型コラゲナーゼ(Worthington Biochemical)、0.5%Dispase II(Roche Applied Science)、40 $\mu$ g/mlのDNase I、HBSS中20mM HEPES)を用いて、37で30分間、酵素的に分解して、単一細胞の懸濁液を作製した。酵素を、2mM EDTA及び20mM HEPESを含む20mlのCa<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>不含HBSSで不活性にした。消化した組織を粉砕し、100 $\mu$ Mのセルストレナに通した。細胞を遠心分離にかけ、30%等張Percoll(GE Healthcare)及び40 $\mu$ g/mlのDNase I中に再懸濁させ、70%等張Percollで重層し、1000 $\times$ gで4 $^{\circ}$ Cにて25分間、遠心分離にかけた。70%~30%の中間相の細胞を収集し、FACS Ariaによって分取した。

40

## 【0091】

星状膠細胞、ミクログリア及び単球のFACSソーティング。これらの精製手順は、先

50

に記載された分離及び精製プロトコルに基づく<sup>50, 51</sup>。分離したCNS細胞を、抗マウスCD16/CD32とともに氷上で15分間インキュベートし、Fc受容体をブロックし、蛍光色素結合抗体でCD11b(M1/70)、CD45(90)、CD3(145-2C11)、CD4(GK1.5)及びLy6C(HK1.4)並びにビオチン結合GSLI-イソレクチンB4(Vector labs)、CD105(N418)、CD140a(APA5)、CD11c(N418)、F4/80(BM8)、O4(O4、Miltenyi Biotec)及びCD19(eBio1D3)並びにマウスMOG認識非結合抗体(8-18C5、Millipore)、O1(O1)並びにガラクトセレブロシド(mGlaC、Millipore)を染色した。全ての抗体は、別途の記載がない限り、Ebioscienceから得た(該当する場合、クローン番号を括弧内に示す)。細胞を洗浄し、PE結合ストレプトアビジン及びR-フィコエリトリンAffiniPure F(ab')<sub>2</sub>断片のヤギ抗マウスIgG+IgM(H+L)(Jackson ImmunoResearch laboratories)を4で暗所にて20分間インキュベートした。細胞を洗浄し、死細胞を除外するために、7-AADまたはFixable Viability Dye eFluor(登録商標)450(細胞を細胞内染色に用いる場合)とともにインキュベートし(図S3A)、次に従って分取した。ミクログリアは、CD11b<sup>+</sup>細胞で、CD45発現が低く、Ly6Cが低いもの(CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>低</sup>/Ly6C<sup>低</sup>)として分取し、炎症性単球はCD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>高</sup>のものとした<sup>52</sup>。T細胞は、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞として分取した。リンパ球、ミクログリア、単球(図S3B)及び希突起膠細胞及びリンパ球(T細胞、B細胞及びNK細胞)(図S3C)を枯渇させた後、星状膠細胞を分離した。分取した細胞は、FACS分析(図S3D)によって、85%超がGFAP<sup>+</sup>であることがわかった。星状膠細胞マーカーである<sup>44, 51</sup>gfap、aldh1l1及びaqp4に関するqPCRによって、比較的純粋な星状膠細胞の集団が分離されたことを確認し、これらが星状膠細胞画分で排他的に(Tg(GFP-hGFAP)FVBトランスジェニックマウスから分取したGFP<sup>+</sup>星状膠細胞の発現パターンと類似の発現パターンで<sup>49</sup>)発現していることが認められた(図S3E)。更なるマーカーコホートを用いて、免疫細胞[ミクログリア/単球細胞:itgam(CD11b)及びemr1(F4/80)、樹状細胞:itgax(CD11c)、NK細胞:Klrb1c(Nk1.1)、T細胞:cd3及びB細胞:cd19]、希突起膠細胞(mog、mbp)、及びニューロン(syt1、snap25)の存在について調査した(図S3F、G)。

#### 【0092】

LacCer測定。化学標準のLacCer(d18:1/16:0)及びLacCer(d18:1/18:0)をAvanti Polar Lipidsから入手した。LacCer(d18:1/16:0)及びLacCer(d18:1/18:0)の定量化を、Agilent(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)6460三連四重極型LC/MS/MSシステム上で実施するLC-MS/MS分析によって実施した。LacCer及び内部標準の[M+H]<sup>+</sup>イオンのフラグメントを衝突誘起解離に供し、2つの主要な種類のフラグメントイオンを、陽イオンモードのエレクトロスプレーイオン化により、各イオンの多重反応モニタリング(MRM)モードでモニタした。これらの2つのMRMトランジションは、天然ラクトシル部分の損失及びラクトースイオンの形成に該当した。具体的には、LacCer(d18:1/16:0)及びLacCer(d18:1/18:0)の定量化に用いたMRMトランジションは、それぞれ862.5>464.5及び890.6>548.5であった。862.5>264.3及び890.6>264.3のLacCer(d18:1/16:0)及びLacCer(d18:1/18:0)の二次確認用MRMトランジションについてもモニタした。質量分析計のパラメータ設定は、ガス温度(325)、ガス流量(12L/分)、ネプライザ(25psi)、シースガス温度(400)、シースガス流量(12L/分)、キャピラリー電圧(4000V)及びノズル電圧(500V)であった。分離には、Phenomenex Gemini C18カラム、4.6×50mm、5µm

粒径の液体クロマトグラフィー条件を用いた。クロマトグラフィー法は、流量 = 0.4 mL / 分、溶媒 A = 5 % MeOH 及び 0.1 % ギ酸中 5 mM ギ酸アンモニウム v / v / v、溶媒 B = 80 % 2 - プロパノール、15 % メタノール、5 % 水及び 0.1 % ギ酸 (v / v / v) であった。グラジエントは、20 % A で開始し、10 分間で 100 % A まで増加させ、次の 10 分間維持した。次の注入の前に、カラムを開始条件に 5 分間、再平衡化した。安定した同位体の型を入手できなかったため、非天然 LacCer (18 : 1 / 12 : 0) の内部標準を用いた。LacCer (d18 : 1 / 16 : 0) については 0.1 nM ~ 3.3 µM の種々の濃度及び 1 µM の内部標準濃度で、標準曲線の組み合わせを分析した。定量化の下限値は 1 nM で推定し、0.9969 の  $R^2$  は線形回帰分析を用いて得た。内部標準をドープした標準曲線は、1 nM ~ 3.3 µM で実施した。標準は、LacCer (18 : 1 / 16 : 0) に対するものしか入手できなかったため、LacCer (18 : 1 / 18 : 0) の値は、2 つの密接に関係した脂質についての相対的イオン化効率が一であるとして仮定する。

#### 【0093】

脂質の抽出。脳組織を秤量し、Bligh-Dyer 法の液-液抽出を用いた抽出溶媒中で、Dounce ホモジナイザー (VWR) を用いてホモジナイズした。全ての溶媒は、Sigma-Aldrich から超高純度で入手した。内部標準 LacCer (18 : 1 / 12 : 0) を、2 : 1 クロロホルム - メタノール v / v、6 mL の 2 : 1 クロロホルム - メタノール及び 2 mL の PBS 中に溶解させた。約 2 分のホモジナイズの後、液体を 8 mL のガラスバイアルに移した。混合物を高速遠心分離器で 1000 g で 20 分間回転させた。これにより、中間にタンパク質ディスク及び不溶性物質が形成された。ガラス Pasteur ピペットを用いて底層を取り出し、穏やかな窒素流下における蒸発のために、清浄なバイアルに移した。乾燥させた試料を 100 µL の 2 : 1 クロロホルム - メタノールで再構成し、HPLC-MS を用いて分析した。

#### 【0094】

nCounter 遺伝子発現。製造者の説明書 (NanoString Technologies) に従って、100 ~ 200 ng の全 RNA を、nCounter Gene Expression コードセット (マウス炎症キットまたは受注生産の星状膠細胞指向性プローブセット (表 S1)) のレポータプローブ及びキャプチャプローブとハイブリダイズした。スパイクした陽性対照及びハウスキーピング遺伝子に対して、データを標準化した (nSolver Analysis システム)。各サンプルについて、陰性対照転写物の平均に 2 倍の標準偏差を加えたものに満たない転写物数は、バックグラウンドとみなした。

#### 【0095】

遺伝子発現データの分析。NanoString で生成した遺伝子発現データを Expand 6.06 プラットフォームの使用により分析した<sup>53</sup>。偏りのない CLICK アルゴリズムを用いて、遺伝子をクラスター化し、各クラスターを転写因子結合部位の集積に関して更に分析した (プロモータ分析)。

#### 【0096】

qPCR。RNA を RNAeasy カラム (Qiagen) または TRIzol (登録商標) (Invitrogen) で抽出し、cDNA を調製し、qPCR に用いた。結果を gapdh (マウス) または ACTIN (ヒト) に標準化した。全てのプライマー及びプローブは、Applied Biosystems から得た。Aldh1l1 (Mm03048957\_\_m1)、aqp4 (Mm00802131\_\_m1)、b4gal t5 (Mm00480147\_\_m1)、b4gal t6 (Mm00480045\_\_m1)、cc15 (Mm01302427\_\_m1)、cd19 (Mm00515420\_\_m1)、cd3e (Mm00599684\_\_g1)、cd40 (Mm00441891\_\_m1)、csf2 (Mm01290062\_\_m1)、cxcl10 (Mm00445235\_\_m1)、emr1 (Mm00802529\_\_m1)、foxp3 (Mm00475162\_\_m1)、gapdh (Mm00484668\_\_m1)、gfap (Mm01253033\_\_m1)

)、h2 - Aa (Mm00439211\_\_m1)、Ifng (Mm01168134\_\_m1)、Il10 (Mm00439614\_\_m1)、il17a (Mm00439618\_\_m1)、il1b (Mm00434228\_\_m1)、il6 (Mm00446190\_\_m1)、irf1 (Mm01288580\_\_m1)、itgam (Mm00434455\_\_m1)、itgax (Mm00498698\_\_m1)、klrb1c (Mm00824341\_\_m1)、mbp (Mm01266402\_\_m1)、mog (Mm00447824\_\_m1)、nos2 (Mm00440502\_\_m1)、relb (Mm00485664\_\_m1)、snap25 (Mm00456921\_\_m1)、spp1 (Mm00436767\_\_m1)、sytl (Mm00436858\_\_m1)、tbx21 (Mm00450960\_\_m1)、tgfb1 (Mm01178820\_\_m1)、tlr2 (Mm00442346\_\_m1)、tnf (Mm00443260\_\_g1)、vim (Mm01333430\_\_m1)、ACTB (Hs01872448\_\_s1)、B4GALT5 (Hs00941041\_\_m1)、B4GALT6 (Hs00153133\_\_m1)、CCL2 (Hs01060665\_\_g1)、CCL5 (Hs00941041\_\_m1)、IL6 (Hs00234140\_\_m1)、NOS2 (Hs00174575\_\_m1)、PTGST2 (Hs00191135\_\_m1)、及びTLR2 (Hs00985639\_\_m1)。

#### 【0097】

T細胞増殖及びサイトカイン測定。脾細胞及びリンパ節細胞をX-VIVO培地中で培養し、1ウェル当たり $5 \times 10^5$ 細胞の密度でMOG<sub>35-55</sub>ペプチドの存在下で72時間プレート培養した。最後の16時間中に、細胞を1 Ci [3H]チミジン (PerkinElmer) で標識し、続いて、細胞をガラス繊維フィルタ上に回収し、取り込まれた[3H]チミジンをカウンタ(1450 MicroBeta TriLux; PerkinElmer)で分析した。酵素結合免疫吸着法によるサイトカイン測定のために、培養の48時間後に上清を回収した<sup>14</sup>。細胞内サイトカインの染色のために、細胞をPMA (ホルボール12-ミリスレート13-アセタート; 50 ng/mL; Sigma)、イオノマイシン (1 µg/mL; Sigma) 及びモネンシン (Golgi Stop; 1 ml/ml; BD Biosciences) で6時間刺激した。表面マーカーの染色後、製造者の説明書BD Cytofix/Cytoperm (商標) キット (BD Biosciences) またはFoxp3 Fixation/Permeabilization (Ebioscience) に従って、細胞を固定し、透過を行った。

#### 【0098】

マウス初代ミクログリア。マウス初代ミクログリアを記載の通りに<sup>54</sup>、軽微な修正を加えて調製した。1~3日齢の新生マウスの大脳皮質を切開し、その髄膜を慎重に取り出し、0.25%トリプシンで消化し、単一細胞レベルまで分散させた。次いで、細胞懸濁液(「混合グリア」)を37℃、加湿5%CO<sub>2</sub>-95%空気下にて培養した。4~5日ごとに培地を交換した。混合したグリア培養物は、7~10日後にコンフルエントに達し、調製後15~20日の間にミクログリアを採取した。先に記載の通り<sup>54</sup>、ミクログリアを緩やかなトリプシン処理手順(マイルドT/E)にて分離した。簡潔に述べれば、コンフルエントの混合グリア培養物を0.06%トリプシン(マイルドT/E)で処理することにより、ほぼ全ての星状膠細胞を含む細胞のインタクトな層が剥離し、高濃度のミクログリア集団が後に残った(フルオレセイン結合グリフォニア・シンプリシフォリア由来イソレクチンB4 (IB4) (Vector Laboratories) またはPE結合CD11b Abでの染色により判定した場合98%超(データ不図示))。付着したミクログリアを24~48時間回復させた。

#### 【0099】

マウス初代星状膠細胞。混合グリアを上記の通り調製し、20 µg/mLのビオチン抗IB4 (Vector Labs) とともに室温で20分間インキュベートし、洗浄し、ストレプトアビジン結合磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) とともに4~15分間インキュベートした。細胞を洗浄し、セル分離カラム (Miltenyi Biotec) を用いて、IB4<sup>+</sup>細胞(ミクログリア細胞及び内皮細胞)を除去した<sup>51</sup>。

次いで、細胞をコンフルエント（7～10日）まで培養し、緩やかなトリプシン処理手順を用いて星状膠細胞の単一層を分離し、Accutase（Invitrogen）で分離して単一細胞の懸濁液にし、プレート培養した。細胞は、GFAPまたはGLASTでの染色によって判定すると、98%を超える細胞が星状膠細胞であり、CD11b<sup>+</sup>ミクログリア細胞の2%未満の汚染があった（データ不図示）。

#### 【0100】

マウス初代軟膜食細胞。1～3日齢の新生マウスの脳から髄膜を慎重に取り出し、1%コラゲナーゼにより37℃で20分間消化し、次いで、単一細胞レベルまで分散させた。分離した細胞を、抗マウスCD16/CD32とともに氷上で15分間インキュベートしてFc受容体をブロックし、CD11b（M1/70）に対するAPC結合抗体を用いて4℃で30分間染色した。細胞を洗浄し、死細胞を除外するために7-AADとともにインキュベートし、分取した。

10

#### 【0101】

マウス初代脈絡叢細胞。マウス初代脈絡叢細胞を記載の通りに<sup>55, 56</sup>、軽微な修正を加えて調製した。簡潔に述べれば、1～3日齢の新生マウスから脈絡叢を取り出し、1%コラゲナーゼにより37℃で20分間消化し、次いで、単一細胞レベルまで分散させた。細胞懸濁液を脈絡叢細胞用の培地中で洗浄し[10%ウシ胎児血清（Sigma-Aldrich）、1-グルタミン1mM、ピルビン酸ナトリウム1mM、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100mg/ml、インスリン5mg/ml、Ara-C 20mMを添加したダルベッコ改変イーグル培地/ハムF12（Invitrogen）]、ポリ-D-リシンをコーティングした24ウェルプレート中で、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて培養した（2.5×10<sup>5</sup>細胞/ウェル）。24時間後、培地を交換し、記載の通り、細胞を未処理のままにするか、処理するかのいずれかとした。

20

#### 【0102】

プラスミド。ネズミCcl2プロモータ下でガウシアルシフェラーゼと、CMVプロモータ下で分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）（トランスフェクションの標準化のために使用）とを発現するデュアルレポータ構築物は、GeneCopoeia, Inc. から得た。IRF1をコードする構築物は、Addgeneから得た。pLenti-GFAP-EGFP-mir30-shAct1ベクター<sup>25</sup>は、Dr. Guang-Xian Zhang（Thomas Jefferson University, PA, USA）から寄贈された。

30

#### 【0103】

shRNAによるインビトロノックダウン。b4gal<sup>5</sup>（TRCN0000018782）、b4gal<sup>6</sup>（TRCN0000334278）、または対照としての非標的化配列（TRCN0000018782）（Sigma）に対するshRNAレンチウイルス粒子を用いて、LacCerシンターゼの発現をC8-D30星状膠細胞でノックダウンさせた。星状膠細胞をレンチウイルス及び8μg/mlのポリブレン（両方ともSigma-Aldrichより入手）とともに12時間インキュベートし、24時間回復させ、ピューロマイシン（2μg/ml）で選択した。ピューロマイシン耐性細胞の遺伝子ノックダウンをqPCRで確認した。

40

#### 【0104】

shRNAレンチウイルスでのインビボ星状膠細胞特異的ノックダウン。pLenti-GFAP-EGFP-mir30-shAct1ベクター<sup>25</sup>を骨格にして、Act1のshRNAを上述のインビトロで確認したshRNA配列に置き換えて用いることによって、b4gal<sup>5</sup>、b4gal<sup>6</sup>に対するshRNA配列及び非標的化shRNAを持つpLenti-GFAP-EGFP-mir30-shRNAをクローニングした（b4gal<sup>5</sup>: 5'-GCAGCCTGAATGACTCAGATTctcgaagAATCTGAGTCAATTCAGGCTGC-3'（配列番号2）、b4gal<sup>6</sup>: 5'-CGATGGACTGAACAATTTATTCctcgaagAATAAATTTGTT CAGTCCACG-3'（配列番号3）、及び非標的化shRNA: 5'-GCGCG

50

ATAGCGCTAATAATTTctcggagAAATTATTAGCGCTA-TCGCGC-3' (配列番号4))。次いで、293FT細胞(Invitrogen)を、新しく作製した3µgのpLenti-GFAP-EGFP-mir30-shRNAベクター及び9µgのViraPower(商標)パッケージングミックス(ヘルパープラスミドpLP1、pLP2、pLP/VSV-G、Invitrogen)でトランスフェクションすることによって、レンチウイルス粒子を作製した。48時間後、上清を回収し、0.45µMのPVDFフィルタに通して濾過し、Lenti-X(商標)濃縮キット(Clontech)を製造者の説明書に従って用いて一晩濃縮した。ウイルス力価を、Lenti-X(商標)qRT-PCR力価測定キット(Clontech)を製造者の説明書に従って用いて判定し、-70℃で保存した。

10

#### 【0105】

インビボ注入の場合、ケタミン(100mg/kg)及びキシラジン(20mg/kg)のi.p.注入によって免疫化から35日後(進行期)のNOD-EAEマウスに麻酔をかけ、Kopf Stereotaxic Alignment System内に置いた。ハミルトンシリンジを用いて、1マウス当たり $1 \times 10^7$  IUのshB4gal<sup>+</sup>5、shBrgal<sup>+</sup>5、shControl(非標的化)ウイルスを、ブレグマの後方0.44mm、外側1.0mm、頭蓋骨表面の下2.2mmに注入した。注入速度は、漏出を防ぐために1µl/分を維持した。

#### 【0106】

生存率アッセイ。星状膠細胞、ミクログリアまたはLy6C高単球を指定濃度のPDM PまたはLaCcerで前処理し、LPS/IFN(ミクログリア及び星状膠細胞)、CCL-2(単球)で更に活性化するか、未処理のままとした。CellTiter-Fluor(商標)細胞生存率アッセイ(Promega)を用いて、活性化後の生存率を評価した。

20

#### 【0107】

細胞成分分画及び免疫ブロット法分析。星状膠細胞を指定の通りに処理し、全抽出物(30µgのタンパク質)、すなわち細胞の核及び細胞質の細胞画分をNuPAGE10%Bis-Tris Gel(Invitrogen)によって分離し、サポート付ニトロセルロース膜上にエレクトロブロットした。細胞成分分画は、NE-PER(登録商標)Nuclear and Cytoplasmic Extractionキット(Pierce Biotechnology)を製造者の説明書に従って用いて調製した。ブロットは、ウサギ抗IRF-1(D5E4)XP(登録商標)ウサギmAb、GAPDH(D16H11)XP(登録商標)ウサギmAb、ラミンB1ポリクローナルウサギAb、NF-Bp65(D14E12)XP(登録商標)ウサギmAb、続いて、ヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼ結合Ab(抗体は全てCell signalingより入手)でプローブした。SuperSignal West Pico化学発光キット(Pierce Biotechnology)を用いてブロットを現像した。タンパク質の均一性を確認するために、各ブロットをGAPDH(全抽出物、すなわち細胞質画分)またはラミンB1(核分画)で再度プローブした。データ定量化をImage Studioソフトウェア(Version3.1.4)(LI-COR, Inc.)を用いて行った。

30

40

#### 【0108】

トランスフェクション及びルシフェラーゼアッセイ。10%FBSを添加したDMEM中で293T細胞を増殖させ、CCL2デュアルレポーター及びIRF1、NF-Bp65または適切な空対照をコードする構築物を含むFugene-HD Transfection Reagent(Roche)でトランスフェクションした。Secret-Pair Dual Luminescence Assay Kit(GeneCopoeia, Inc)でのトランスフェクションの24時間後に、ルシフェラーゼ及びSEAP活性を分析した。

#### 【0109】

50

ChIP。細胞を1%ホルムアルデヒドで15分間クロスリンクした。クロスリンクをグリシンの添加により停止し、1×プロテアーゼ阻害剤「カクテル」(Roche Molecular Biochemicals)を含有する0.35mlの溶解バッファ(1%SDS、10mMEDTA及び50mMTris-HCl、pH8.1)で細胞を溶解した。クロマチンを超音波処理によって切断し、遠心分離後に上清を回収し、バッファ(1%Triton X-100、2mMEDTA、150mMNaCl及び20mMTris-HCl、pH8.1)で希釈した。抗体(5μg)をタンパク質A及びタンパク質GのDynal磁気ビーズ(Invitrogen)に6時間予め結合させ、PBS中氷冷5%BSAで3回洗浄し、次いで、希釈したクロマチンを添加し、一晚、免疫沈降させた(抗体については後述)。次いで、磁気ビーズ-クロマチン複合体をRIPAバッファ(50mMHEPES、pH7.6、1mMEDTA、0.7%デオキシコール酸ナトリウム、1%Nonidet-P40及び0.5MLiCl)で3回、続けてTris-EDTAバッファで3回洗浄した。次いで、免疫沈降したクロマチンを1%SDS、0.1MNaHCO<sub>3</sub>で抽出し、ホルムアルデヒドのクロスリンクを逆転させるために65℃で少なくとも8時間加熱した。DNA断片をQIAquick DNA精製キット(Qiagen)で精製して、SYBR GreenリアルタイムPCR(プライマーについては後述)によって分析した。ChIPには、次の抗体：抗IRF1(SC-640x; Santa Cruz Biotechnology)、抗NF- $\kappa$ B p65(ab7970; Abcam)及びウサギIgG(ab27478; Abcam)を用いた。以下のプライマー対を用いた。以下のプライマー対を用いた。cc12: NF- $\kappa$ B フォワード5'-CAGCTAAATATCTCTCCCGAAGG-3'(配列番号5)及びリバー5'-CATAGATGCCACAGCTCAT-3'(配列番号6); cc12: ISRE フォワード5'-CTGCCAATTCTTCCCTCTTTC-3'(配列番号7)及びリバー5'-GTGGGTGGA-ATTTGGTATTTT-3'(配列番号8); csf2: NF- $\kappa$ B フォワード5'-GACCAGATGGGTGGAGTGACC-3'(配列番号9)及びリバー5'-AGCCACACGCTTCTGGTTCC-3'(配列番号10); csf2: ISRE フォワード5'-GCTTTCGAGGGTCA-GATAACA-3'(配列番号11)及びリバー5'-CACACGCTTGCGCTAAGA-3'(配列番号12); nos2: NF- $\kappa$ B (1) フォワード5'-CACAGACTAGGAGTGTCCATCA-3'(配列番号13)及びリバー5'-GCAGCAGCCATCAGGTATTT-3'(配列番号14); nos2: ISRE/NF- $\kappa$ B (2) フォワード5'-ACCATGCGAAGATGAGTGGA-3'(配列番号15)及びリバー5'-AGCC-AGGAACACTACACAGAA-3'(配列番号16)。

#### 【0110】

単球遊走アッセイ。脾臓Ly6C<sup>高</sup>単球を分取し(CD11b<sup>+</sup>/F4-80<sup>+</sup>、SSC<sup>低</sup>/Ly6C<sup>高</sup>)、孔径3μmの24ウェル細胞培養インサート(Corning)の上部チャンバに播種した。細胞をPDMP、LacCer、PDMP+LacCerまたはビヒクルとともに1時間、前処理した。次いで、インサートを、CLL-2(50ng/ml、Peprotech)またはビヒクル(PBS)を含有する予め加温した培地を含む、異なるウェルに移した。3時間後、下部チャンバの遊走性単球を定量化した。

#### 【0111】

ヒト初代星状膠細胞。Canadian Institutes for Health Research承認ガイドラインに従って、ヒト胎児組織リポジトリ(Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)から入手した妊娠17~23週間の胎児由来のヒトCNS組織からヒト胎児星状膠細胞を先に記載の通り<sup>5,7</sup>分離した。培養物は90%を超える純度であった。

#### 【0112】

MS組織。臨床的に診断され、かつ神経病理学的に確認されたMSであるMS患者と、MSでないCNS炎症性疾患(ウイルス性脳炎、ラスムッセン脳炎及びADEMを含むN

10

20

30

40

50

M S C I D ) の対照と、健康な対照から脳組織を入手した。剖検サンプルは、液体窒素で直ちに凍結した。白質のM S 組織サンプルを先に記載の通りに選択した<sup>5 8</sup>。全ての患者及び対照またはその近親者に、剖検及びその脳組織の研究目的での使用に関するインフォームドコンセントを得た。剖検の前に倫理審査の承認を得た( C H U M 倫理承認: S L 0 5 . 0 2 2 及び S L 0 5 . 0 2 3 及び B H 0 7 . 0 0 1 )。

#### 【 0 1 1 3 】

統計分析。統計分析には、P r i s m ソフトウェアバージョン 6 . 0 e ( G r a p h P a d S o f t w a r e ) を用いた。0 . 0 5 未満の P 値を有意とみなした。

#### 【 0 1 1 4 】

実施例 1。L a c C e r シンターゼは、C N S 炎症及び神経変性を調節する。

感受性マウス系統で誘導させた実験的自己免疫性脳脊髄炎( E A E ) は、有用な M S の実験モデルを構成する。しかし、M S の異なる側面については、各マウス系統で発現する E A E によってモデル化される。ミエリンペプチド M O G<sub>35-55</sub> で免疫化した C 5 7 B L / 6 マウスは、例えば、R R M S 時の単回発作に似た单相型の E A E を発症する。一方、非肥満性糖尿病( N O D ) マウスを同じ抗原で免疫化すると、急性発作( 急性期 ) を起こし、進行期が続き、S P M S に似た神経障害の不可逆的蓄積( 進行期 ) が生じる<sup>1 3 , 1 4</sup>。

#### 【 0 1 1 5 】

発明者らは、N O D と C 5 7 B L / 6 マウスの交配由来の F 1 ハイブリッドマウスも同じく慢性進行型の E A E を発症することを最近見出した( 図 8 a ~ c )。このため、C N S 炎症時における星状膠細胞の役割を研究するために、反応性星状膠細胞をガンシクロビル( G C V ) 投与によって枯渇することができる( 図 9 a )、F 1 N O D C 5 7 B L / 6 G F A P - H S V - T K ハイブリッドマウスにおける E A E の過程を分析した。C 5 7 B L / 6 マウスにおける先の所見<sup>7 , 8</sup>と一致して、急性期中の反応性星状膠細胞の枯渇が E A E の有意な悪化を招くことを確認した( 図 1 a )。一方で、進行期中の星状膠細胞の枯渇は、E A E の有意な改善に至った( 図 1 b )。更に、急性 E A E における反応性星状膠細胞の枯渇は、単球及び T 細胞の C N S への動員増加をもたらすが<sup>5 , 8</sup>、E A E 進行期中の枯渇は、C N S における白血球湿潤を減少させた( 図 9 b ) のに対し、末梢 T 細胞応答には影響しなかった( 図 9 c , d ) ことがわかった。G C V 投与により、N O D C 5 7 B L / 6 G F A P - H S V - T K ハイブリッドマウスの神経前駆細胞( N P C ) が枯渇した可能性があるが、N P C は、E A E にて保護効果を示すこと<sup>1 5 , 1 6</sup>に注目されたい。したがって、これらのデータは、反応性星状膠細胞の枯渇が E A E の改善に関係することを示唆している。

#### 【 0 1 1 6 】

慢性自己免疫性 C N S 炎症における星状膠細胞活性を調節する分子機構を研究するために、ナイーブ N O D マウスから、急性期及び進行期の E A E ( 図 1 0 a ~ g ) の星状膠細胞を分離し、受注生産の N a n o s t r i n g n C o u n t e r アレイを用いてそのトランスクリプトームを分析した( 表 1 )。N O D E A E の異なる期で、星状膠細胞の m R N A 発現プロファイルに著しい違いがあることを見出し( 図 1 c )、進行期中に上方制御される特有の遺伝子クラスターを特定した( 図 1 d )。遺伝子発現が進行型 N O D E A E と関連する遺伝子の 1 つは、b 4 g a l t 6、すなわち L a c C e r シンターゼであった<sup>1 7</sup>。q P C R 検証研究では、N O D E A E の進行期中における星状膠細胞で B 4 g a l t 6 発現の上方制御が確認されたが、ミクログリア細胞では確認されなかった( 図 1 e )。免疫蛍光法( I F ) による更なる検証では、白質の G F A P + 星状膠細胞で B 4 G A L T 6 発現が検出されたが、灰白質、血管周囲グリア境界膜またはネスチン + 神経前駆細胞では検出されなかった( 図 1 1 a , b )。加えて、B 4 G A L T 6 とともに L a c C e r シンターゼ活性を有する B 4 G A L T ファミリーの唯一のメンバーである<sup>1 7</sup>、- 1 , 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼ 5 ( B 4 G A L T 5 ) の有意な上方制御も検出した( 図 1 1 c )。事実、B 4 G A L T 5 及び B 4 G A L T 6 ( B 4 G A L T 5 / 6 ) の L a c C e r シンターゼ活性と一致して、進行期の E A E の N O D マウスの C N S にて

10

20

30

40

50



L a c C e r レベルの増加を検出した ( 図 1 f )。

【 0 1 1 7 】

次に、L a c C e r の C N S 炎症に対する作用を調査した。M O G 免疫付与の不在下における L a c C e r 投与は、インビボで E A E 様疾患の誘導も、星状膠細胞活性化ももたらさなかった ( 図 1 2 a )。しかしながら、L a c C e r 投与は、C 5 7 B L / 6 マウスにて E A E の有意な悪化を招いた ( 図 1 g )。同様に、N O D マウスの E A E 誘導の 3 5 日後の進行期中に開始した L a c C e r 投与もまた疾患の臨床症状の有意な悪化を招いた ( 図 1 h )。L a c C e r 投与に続く C 5 7 B L / 6 及び N O D E A E の悪化が、T 細胞応答の変化に関連しなかったことに注目されたい ( 図 1 2 b ~ e )。

【 0 1 1 8 】

進行期の N O D E A E における L a c C e r の役割を更に調査するために、B 4 G A L T 5 / 6 特異的阻害剤である D - トレオ - 1 - フェニル - 2 - デカノイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール ( P D M P ) <sup>1 7</sup> を用いて、その合成を阻害した ( 図 1 i )。E A E 誘導の 4 0 日後に開始した P D M P の毎日の投与 ( 2 0 m g / k g 、1 日 2 回 ) は、C N S L a c C e r レベルの有意な減少 ( 図 1 j ) 並びに臨床スコアを基準にした疾患進行、脱髄及び軸索消失の抑制 ( 図 1 k 、l ) をもたらしめた。しかしながら、P D M P 処理マウスの T 細胞応答に有意な変化は検出されなかった ( 図 1 2 f ~ i )。総合すると、これらのデータは、B 4 G A L T 5 / 6 によって産生される L a c C e r が C N S 炎症にて有害な役割を担っていることを示唆している。

【表 1 - 1】

表 1 星状膠細胞の受注設計 NanoString Counter のコードセット。		
種類	符号	遺伝子名
標的遺伝子	<i>Ahr</i>	芳香族炭化水素受容体
	<i>Akr1b10</i>	アルドーケト還元酵素ファミリー 1、メンバー B 1 0 (アルドース還元酵素)
	<i>Aldh1l1</i>	アルデヒドデヒドロゲナーゼ 1 ファミリー、メンバー L 1
	<i>Aqp4</i>	アクアポリン 4
	<i>Arg1</i>	アルギナーゼ、肝臓
	<i>B4gal t6</i>	UDP-Gal: $\beta$ GlcNAc $\beta$ 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、ポリペプチド 6
	<i>Bcan</i>	ブレビカン
	<i>Bdnf</i>	脳由来神経栄養因子
	<i>Bruno14</i>	ブルーノ様 4、RNA 結合タンパク質 (ショウジョウバエ)
	<i>Ccl2</i>	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 2
	<i>Ccl3</i>	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 3
	<i>Ccl4</i>	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 4
	<i>Ccl5</i>	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 5
	<i>Ccl7</i>	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 7
	<i>Ccl20</i>	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 2 0
	<i>Cd3e</i>	CD 3 抗原、 $\epsilon$ ポリペプチド
	<i>Cd19</i>	CD 1 9 抗原
	<i>Cd24a</i>	CD 2 4 a 抗原
	<i>Cd274</i>	CD 2 7 4 抗原
	<i>Cd36</i>	CD 3 6 抗原
	<i>Cd38</i>	CD 3 8 抗原
	<i>Cd40</i>	CD 4 0 抗原
	<i>Cd80</i>	CD 8 0 抗原
	<i>Cd86</i>	CD 8 6 抗原
	<i>Cd163</i>	CD 1 6 3 抗原
	<i>Chi3l3</i>	キチナーゼ 3 様 3 (ym1)
	<i>Ciita</i>	II 型トランス活性化因子
	<i>Csf1</i>	コロニー刺激因子 1 (マクロファージ)
	<i>Csf2</i>	コロニー刺激因子 2 (顆粒球-マクロファージ)
	<i>Csf3</i>	コロニー刺激因子 3 (顆粒球)
	<i>Cspg4</i>	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4
	<i>Cxcl3</i>	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 3
	<i>Cxcl9</i>	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 9
	<i>Cxcl10</i>	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 1 0
	<i>Cxcl11</i>	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 1 1
	<i>Cxcl12</i>	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 1 2
	<i>Cxcl15</i>	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 1 5
	<i>Cyp1a1</i>	シトクロム P 4 5 0、ファミリー 1、サブファミリー a、ポリペプチド 1

10

20

30

40

【表 1 - 2】

表 1 星状膠細胞の受注設計 NanoString nCounter のコードセット。		
種類	符号	遺伝子名
標的 遺伝子	<i>Ddx58</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックス ポリペプチド 58 (RIG-I)
	<i>Dhx58</i>	DEXH (Asp-Glu-X-His) ボックスポリ ペプチド 58 (LPG2)
	<i>Ebi3</i>	エプスタインバールウイルス誘導遺伝子 3
	<i>Emr1</i>	E G F 様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様配 列 1
	<i>Entpd1</i>	細胞外ヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ 1 (CD39)
	<i>Fas1</i>	Fas リガンド (TNF スーパーファミリー、メンバー 6)
	<i>Fgf2</i>	線維芽細胞増殖因子 2
	<i>Gfap</i>	グリア線維性酸性タンパク質
	<i>Glu1</i>	グルタミン酸アンモニアリガーゼ (グルタミンシンテタ ーゼ)
	<i>H2-Aa</i>	組織適合性 2、クラス II 抗原 A、 $\alpha$
	<i>H2-Ab1</i>	組織適合性 2、クラス II 抗原 A、 $\beta$ 1
	<i>H2-Ea</i>	組織適合性 2、クラス II 抗原 E、 $\alpha$
	<i>Icam1</i>	細胞間接着分子 1
	<i>Ifih1</i>	ヘリカーゼ C ドメイン 1 (MDA5) で誘発されるイン ターフェロン
	<i>Ifnb1</i>	インターフェロン $\beta$ 1、線維芽細胞
	<i>Ifng</i>	インターフェロン $\gamma$
	<i>Ifnga</i>	インターフェロン $\alpha$
	<i>Igf1</i>	インスリン様成長因子 1
	<i>Il1b</i>	インターロイキン 1 $\beta$
	<i>Il2</i>	インターロイキン 2
	<i>Il4ra</i>	インターロイキン 4 受容体 $\alpha$
	<i>Il6</i>	インターロイキン 6
	<i>Il10</i>	インターロイキン 10
	<i>Il10ra</i>	インターロイキン 10 受容体 $\alpha$
	<i>Il11</i>	インターロイキン 11
	<i>Il12a</i>	インターロイキン 12 a
	<i>Il12b</i>	インターロイキン 12 b
	<i>Il13</i>	インターロイキン 13
	<i>Il15</i>	インターロイキン 15
	<i>Il17ra</i>	インターロイキン 17 受容体 A
	<i>Il17rc</i>	インターロイキン 17 受容体 C
	<i>Il21</i>	インターロイキン 21
	<i>Il23a</i>	インターロイキン 23、 $\alpha$ サブユニット p19
	<i>Il27</i>	インターロイキン 27
	<i>Il27ra</i>	インターロイキン 27 受容体 $\alpha$
	<i>Il33</i>	インターロイキン 33
	<i>Irf1</i>	インターフェロン制御因子 1
	<i>Irf2</i>	インターフェロン制御因子 2

10

20

30

40

【表 1 - 3】

表 1 星状膠細胞の受注設計 NanoString nCounter のコードセット。		
種類	符号	遺伝子名
標的遺伝子	<i>Irf3</i>	インターフェロン制御因子 3
	<i>Irf4</i>	インターフェロン制御因子 4
	<i>Irf5</i>	インターフェロン制御因子 5
	<i>Irf6</i>	インターフェロン制御因子 6
	<i>Irf7</i>	インターフェロン制御因子 7
	<i>Irf8</i>	インターフェロン制御因子 8
	<i>Irf9</i>	インターフェロン制御因子 9
	<i>Itgam</i>	インテグリン $\alpha$ M (CD 11b)
	<i>Itgax</i>	インテグリン $\alpha$ X (CD 11c)
	<i>Ly6c1</i>	リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 C 1
	<i>Ly6g</i>	リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 G
	<i>Maf</i>	トリ筋腱膜線維肉腫 (v-maf) AS 42 癌遺伝子ホモログ
	<i>Marco</i>	膠原性構造を有するマクロファージ受容体
	<i>Mbp</i>	ミエリン塩基性タンパク質
	<i>Mmp2</i>	マトリックスメタロペプチダーゼ 2
	<i>Mmp9</i>	マトリックスメタロペプチダーゼ 9
	<i>Mmp12</i>	マトリックスメタロペプチダーゼ 12
	<i>Mog</i>	ミエリン希突起膠細胞糖タンパク質
	<i>Mrc1</i>	マンノース受容体 C 型 1
	<i>Ncan</i>	ニューロカン
	<i>Ncr1</i>	ナチュラル細胞傷害誘発受容体 1
	<i>Nfe2l2</i>	核因子赤血球由来 2 様 2
	<i>Ngf</i>	神経成長因子
	<i>Nod1</i>	ヌクレオチド結合オリゴマー形成ドメイン含有 1
	<i>Nod2</i>	ヌクレオチド結合オリゴマー形成ドメイン含有 2
	<i>Nos2</i>	一酸化窒素合成酵素 2、誘導性
	<i>Nqo1</i>	NAD (P) H 脱水素酵素、キノン 1
	<i>Ntf3</i>	ニューロトロフィン 3
	<i>Prom1</i>	プロミン 1 (CD 133)
	<i>Relb</i>	トリ細網内皮症ウイルス (v-rel) 癌遺伝子関連 B
	<i>Retnla</i>	レジスチン様 $\alpha$
	<i>Rnf146</i>	リングフィンガータンパク質 146
	<i>Slc1a2</i>	溶質キャリアファミリー 1 (グリア高親和性グルタミン酸トランスポーター)、メンバー 2
	<i>Spp1</i>	分泌型リントタンパク質 1、オステオポンチン (OPN)
	<i>Stat1</i>	シグナル伝達転写活性化因子 1
	<i>Stat2</i>	シグナル伝達転写活性化因子 2
	<i>Stat3</i>	シグナル伝達転写活性化因子 3
	<i>Stat4</i>	シグナル伝達転写活性化因子 4
	<i>Stat5a</i>	シグナル伝達転写活性化因子 5 A
	<i>Tdo2</i>	トリプトファン 2, 3-ジオキシゲナーゼ
	<i>Tgfb1</i>	トランスフォーミング増殖因子、 $\beta$ 1
	<i>Tgfb2</i>	トランスフォーミング増殖因子、 $\beta$ 2
	<i>Tgfb3</i>	トランスフォーミング増殖因子、 $\beta$ 3

10

20

30

40

【表 1 - 4】

表 1 星状膠細胞の受注設計 NanoString Counter のコードセット。		
種類	符号	遺伝子名
	<i>Timp1</i>	メタロプロテアーゼ 1 の組織阻害物質
	<i>Tiparp</i>	T C D D 誘導ポリ ( A D P - リボース ) ポリメラーゼ
	<i>Tlr1</i>	T o l l 様受容体 1
	<i>Tlr2</i>	T o l l 様受容体 2
	<i>Tlr3</i>	T o l l 様受容体 3
	<i>Tlr4</i>	T o l l 様受容体 4
	<i>Tlr5</i>	T o l l 様受容体 5
	<i>Tlr6</i>	T o l l 様受容体 6
	<i>Tlr7</i>	T o l l 様受容体 7
	<i>Tlr8</i>	T o l l 様受容体 8
	<i>Tlr9</i>	T o l l 様受容体 9
	<i>Tlr11</i>	T o l l 様受容体 1 1
	<i>Tlr12</i>	T o l l 様受容体 1 2
	<i>Tlr13</i>	T o l l 様受容体 1 3
	<i>Tnf</i>	腫瘍壊死因子
	<i>Traf3ip2</i>	T R A F 3 相互作用タンパク質 2 ( A C T 1 )
	<i>Vcam1</i>	血管細胞接着分子 1
	<i>Vegfa</i>	血管内皮細胞増殖因子 A
ハウスキーパー遺伝子	<i>Vim</i>	ビメンチン
	<i>Vwf</i>	フォン・ヴィレブランド因子ホモログ
	<i>Gapdh</i>	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
	<i>B2m</i>	$\beta$ 2 ミクログロブリン
	<i>Cltc</i>	クラスリン、重ポリペプチド ( H c )
	<i>Gusb</i>	グルクロニダーゼ $\beta$
	<i>Hprt1</i>	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1
	<i>Pgk1</i>	ホスホグリセリン酸キナーゼ 1
	<i>Tubb5</i>	チューブリン $\beta$ 5

10

20

30

## 【 0 1 1 9 】

実施例 2。B 4 G A L T 5 / 6 阻害は、E A E 時の星状膠細胞活性化を抑制する。

L a c C e r は、実験脊髄損傷時における病変を促進することが示唆されている<sup>18</sup>。そのため、発明者らは、E A E の進行期 ( 1 0 0 日 ) のビヒクルまたは P D M P 処理 N O D マウスから分離した星状膠細胞の転写プログラムに対する B 4 G A L T 5 / 6 阻害の効果を研究した。偏りのない分析により、E A E 時に下方制御され P D M P によって上方制御された遺伝子、及び E A E 時に上方制御され P D M P によって下方制御された遺伝子 ( それぞれ図 2 a のクラスター 1 及び 2 ) の 2 つの遺伝子セットを特定した。クラスター 2 は、E A E 及び M S 病理に関連するいくつかの遺伝子、すなわち c c l 2 ( 炎症性単球の C N S への動員 )<sup>19-21</sup>、c c l 5 及び c x c l 1 0 ( 末梢免疫細胞の C N S への動員 )、I L - 1 ( i l 1 b )、オステオポンチン ( o p n )、一酸化窒素合成酵素 ( n o s 2 )、M H C - I I ( H 2 - A a ) 並びにビメンチン ( v i m、星状膠細胞活性化に関連 ) を含んでいた。独立したサンプルに関する q P C R による検証実験により、クラスター 2 に含まれる代表的な遺伝子の発現に対する P D M P の抑制効果を確認した ( 図 2 b )。E A E 及び M S 病理に関連する遺伝子の発現を制御する際の B 4 G A L T 6 の役割に関する更なる裏付けは、G F A P<sup>+</sup> 星状膠細胞における B 4 G A L T 6 と C C L 2 及び i N O S の共発現が検出された、I F 研究によってもたらされた ( 図 1 3 )。

40

## 【 0 1 2 0 】

更に、星状膠細胞が髄鞘再生及び神経細胞生存率を制御することが報告されているので<sup>9, 22</sup>、星状膠細胞による髄鞘形成の調節に関連する遺伝子の発現について分析した (

50

表 2 及び図 2 c )。図 1 l に示す脱髄及び軸索損傷と一致して、進行期の N O D E A E において、脱髄に関連する遺伝子の有意な上方制御、及び髄鞘再生に関連する遺伝子の下方制御を検出した。しかしながら、P D M P による B 4 G A L T 5 / 6 阻害は、脱髄関連遺伝子の有意な減少、及びこれに伴う髄鞘再生関連遺伝子の発現増大をもたらした (図 2 c )。総括すると、これらのデータは、B 4 G A L T 5 / 6 が E A E 時の星状膠細胞活性化を調節することを示している。

#### 【 0 1 2 1 】

E A E 時の星状膠細胞の転写応答に対する B 4 G A L T 5 / 6 遮断の作用を媒介する分子機構を特定するために、特定の転写因子結合部位の集積に関して、クラスター 1 及び 2 に含まれる遺伝子のプロモータ配列を調べた。B 4 G A L T 5 / 6 阻害によって発現が抑制される、クラスター 2 に含まれる遺伝子は、インターフェロン感受性応答エレメント ( I S R E ) (  $P = 4.83 \times 10^{-6}$  ) 及び N F -  $\kappa$  B 応答エレメント (  $P = 9.99 \times 10^{-6}$  ) に富むことがわかった。B 4 G A L T 5 / 6 による E A E の制御におけるこれらの経路の関与は、E A E 時に検出された i r f 1 及び r e l B 発現の上方制御及び L a c C e r 合成を P D M P で阻害したときのその後の抑制によって更に裏付けられた (図 2 d、e )。総合すると、これらの結果は、B 4 G A L T 5 / 6 が C N S 炎症時における N F -  $\kappa$  B 及び I R F - 1 の活性化を調節することを示唆している。

#### 【表 2】

表 2 先に記載された髄鞘形成及び神経細胞生存率／軸索成長の調節に関連する星状膠細胞遺伝子 <sup>9, 59</sup>			
脱髄		髄鞘再生	
<i>Bcan</i>	<i>Il12</i>	<i>Bdnf</i>	<i>Il4</i>
<i>Ccl2</i>	<i>Icam</i>	<i>Cd274</i>	<i>Il5</i>
<i>Ccl5</i>	<i>Il1b</i>	<i>Cntf</i>	<i>Lif</i>
<i>Cd24</i>	<i>Il23</i>	<i>Csf1</i>	<i>Mmp12</i>
<i>Cd40</i>	<i>Il33</i>	<i>Ctla4</i>	<i>Mmp9</i>
<i>Cd80</i>	<i>Il6</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Ngf</i>
<i>Cd86</i>	<i>Mmp2</i>	<i>Cxcl12</i>	<i>Nos2</i>
<i>Csf2</i>	<i>Ncan</i>	<i>Cd95l</i>	<i>Nrf2</i>
<i>Cx3cl1</i>	<i>Nos2</i>	<i>Fgf2</i>	<i>Nt3</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Opn</i>	<i>Gs</i>	<i>Ntf4</i>
<i>Cxcl8</i>	<i>TNFA</i>	<i>Igf1</i>	<i>Pdgf</i>
<i>Gfap</i>	<i>Traf3ip2</i>	<i>Il10</i>	<i>Slc1a2</i>
<i>H2-Aa</i>	<i>Vcam</i>	<i>Il11</i>	<i>Tgfb1</i>
<i>H2-Ab</i>	<i>Vim</i>	<i>Il27</i>	<i>Timpl</i>

#### 【 0 1 2 2 】

実施例 3。B 4 G A L T 6 によって産生される L a c C e r は、オートクライン的に作用し、星状膠細胞活性化を増大させる。

B 4 G A L T 5 / 6 によって産生される L a c C e r がネズミ星状膠細胞に直接作用してその活性を制御するかどうかを調べるために、初代星状膠細胞の活性化の転写応答に対する B 4 G A L T 5 / 6 阻害及び L a c C e r 添加の作用について調査した。B 4 G A L T 5 / 6 の阻害により、リポ多糖体及びインターフェロン -  $\gamma$  ( L P S / I F N  $\gamma$  ) での刺激に対する星状膠細胞の転写応答が抑制されることがわかった (図 3 a、b 及び図 1 4 a )。逆に、外因性 L a c C e r を添加すると、L P S / I F N  $\gamma$  に対する星状膠細胞の応答が増大したことから、B 4 G A L T 5 / 6 によって合成される L a c C e r がオートクライン的に作用し、これらの実験条件下で、星状膠細胞活性化を促進することが示唆される (図 3 a、b 及び図 1 4 a )。この解釈に一致して、外因性 L a c C e r は、星状膠細胞活性化に対する P D M P の抑制作用を上回った (図 3 a、b 及び図 1 4 a )。P D M P または L a c C e r 処理が星状膠細胞の生存率に影響せず (図 1 4 b、c )、I L - 1  $\beta$ 、ポリ ( I : C ) または I F N  $\gamma$  及び I L - 1 7 (脳炎誘発性 T 細胞によって産生され

る)との組み合わせによって活性化された星状膠細胞に対する作用を分析した場合、P D M P及びL a c C e rの同様の作用が認められたことに注目されたい。

#### 【0123】

B 4 G A L T 5及びB 4 G A L T 6の星状膠細胞活性化に対する相対的寄与を分析するために<sup>17, 23, 24</sup>、確認済みレンチウイルス由来s h R N Aを用いて、b 4 g a l t 5及びb 4 g a l t 6発現をノックダウンした(図3c)。b 4 g a l t 6のノックダウンが、L P S / I F N 活性化によって誘発されるh 2 - A a、c c l 5及びc x c l 1 0の発現の上方制御を、P D M P処理と同様の程度まで有意に抑制することがわかった。一方、b 4 g a l t 5のノックダウンは、これらの遺伝子の発現に影響しなかったことから(図3d~f)、B 4 G A L T 6がL a c C e rによる星状膠細胞活性化の制御において支配的な役割を担うことが示唆される。s h R N AでノックダウンさせたB 4 G A L T 6の星状膠細胞のP D M P処理がh 2 - A a、c c l 5及びc x c l 1 0発現を更に抑制しなかったことに注目されたい。これは、P D M Pの効果がB 4 G A L T 6依存性L a c C e r合成の特異的阻害に起因するものであることが示唆される(図14d)。

#### 【0124】

インビトロでの星状膠細胞活性化に対するB 4 G A L T 5及びB 4 G A L T 6の相対的寄与及びE A E進行の調節を特定するために、インビボでの星状膠細胞特異性ノックダウンに最適化したレンチウイルスをベースにした系を用いて<sup>25</sup>、N O Dマウスにs h R N Aを送達した(図3g)。この系において、マウスg f a pプロモータは、選定したs h R N A及びG F P レポータの発現を駆動する。N O DマウスのE A E誘導から35日後の進行期中に、s h R N Aをコーディングしたレンチウイルスの脳室内(i . c . v .)注入後、G F P レポータの発現がG F A P + 星状膠細胞に限られ、I b a 1 + ミクログリア及び炎症性マクロファージには発現しないことがわかった(図3h及び図14e)。したがって、b 4 g a l t 6及びb 4 g a l t 5発現の星状膠細胞特異性ノックダウンを認めた(図3h)。b 4 g a l t 5ではなくb 4 g a l t 6のノックダウンは、進行期のN O D E A E時のC N S L a c C e rレベルの有意な減少をもたらした(図3i)。更に、b 4 g a l t 5ではなく、b 4 g a l t 6のノックダウンは、N O Dマウスの疾患進行を抑制した(図3j)。総合すると、これらのデータは、B 4 G A L T 6によって産生されるL a c C e rがオートクライン的に作用し、星状膠細胞の活性化及びE A Eの進行を促進することを示している。

#### 【0125】

L a c C e rの星状膠細胞活性化に対する作用を媒介する分子機構を調査するために、特定のT F結合部位の集積に関して、培養物中の初代星状膠細胞にてL a c C e rによって制御される遺伝子のプロモータを調べた(図3a)。P D M Pで処理したN O Dマウスから分離した星状膠細胞における本所見と同様に、N F - B及びI S R E応答性エレメントに有意な集積( $P < 10^{-5}$ )を認めた。

#### 【0126】

L a c C e rが星状膠細胞のN F - k Bを活性化するということがこれまでに報告されている<sup>18, 26</sup>。これに応じて、B 4 G A L T 6阻害後のN F - Bの核への移動の減少が認められたが、逆に、外因性L a c C e rは、N F - B活性化を誘発し、P D M Pによって誘発された阻害をむしろ妨げた(図14f)。しかしながら、L a c C e rによる星状膠細胞活性の制御におけるI R F 1 / I S R Eの役割はわかっていない。L a c C e r処理がI R F - 1の核への移動を増加させるのに対して、B 4 G A L T 6阻害はこのプロセスを妨げることがわかった(図3k)。更に、クロマチン免疫沈降(C h I P)実験において、L P S / I F N で活性化させた星状膠細胞において、N F - B及びI R F - 1のn o s 2プロモータへの有意な動員を認めた(図3l)。星状膠細胞のL a c C e rに対する応答とI R F - 1の機能的関連性を調べるために、L P S / I F N による活性化に対するW T及びI R F - 1欠損の星状膠細胞の応答を比較した。I R F - 1欠損が、n o s 2、及びプロモータにI S R E結合部位を有する他の遺伝子(c s f 2、c c l 2、c c l 5、i l 6及びt l r 2)の、L a c C e rによって誘発される上方制御を

阻害することがわかった（図3m）。進行型NOD EAE時のcc12及びnos2発現の制御におけるIRF-1の役割は、GFAP<sup>+</sup>星状膠細胞においてIFによって検出されたIRF-1とCCL-2及びiNOSの共発現によって更に裏付けられた（図14g）。総合すると、これらの結果は、B4GALT6によって産生されるLacCerがオートクライン的に作用し、NF- $\kappa$ B及びIRF-1依存性経路を介して星状膠細胞を活性化することを示している。

#### 【0127】

実施例4。B4GALT6は、星状膠細胞のcc12転写活性を制御する。

CCL-2によって駆動される炎症性単球のCNSへの動員は、MS及びEAEにおける神経変性及び疾患進行を促進すると考えられる<sup>19-21, 27</sup>。発明者らは、B4GALT6及びLacCerが、星状膠細胞によるcc12発現を調節することを見出した（図2a、b及び3a）。星状膠細胞におけるNF- $\kappa$ B及びIRF-1の活性化に対するLacCerの作用に関する本所見に基づいて、これらの転写因子に対する応答性エレメントについてcc12プロモータを調べた。本バイオインフォマティクス研究で、NF- $\kappa$ B及びIRF-1の結合部位の候補が特定された（図4a）。これらの機能的関連性を評価するために、cc12プロモータの制御下のルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータ構築物を使用した。IRF-1及びNF- $\kappa$ B(p65)が有意にcc12プロモータをトランス活性化することがわかった（図4b）。更に、ChIP実験において、LPS/IFN $\gamma$ で活性化させた星状膠細胞において、NF- $\kappa$ B及びIRF-1のcc12プロモータへの有意な動員を認めた（図4c）。この動員は、PDMPによるLacCer合成の阻害によって阻止され、PDMPの作用は、外因性LacCerの添加によって妨げることが可能であった（図4c）。したがって、B4GALT6によって産生されるLacCerは、cc12発現を調節する。

#### 【0128】

B4GALT6-LacCerによるcc12発現の制御のインビボでの関連性を調査するために、ビヒクルまたはB4GALT6阻害剤のPDMPで処理したNOD EAEマウスのCNSへの炎症性単球の動員を分析した。B4GALT6阻害により、EAE時のCNSに動員される炎症性単球（CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>高</sup>またはCD11b<sup>+</sup>CD45<sup>高</sup>細胞のいずれかとして定義）の頻度及び総数（図4d~h）が有意に減少することがわかった。また、NOD EAEの慢性期中にレンチウイルス由来shRNAを用いて星状膠細胞のB4GALT6をノックダウンした場合も、同様の結果が得られた（図4i）。したがって、B4GALT6は、CCL-2の産生及び炎症性単球のCNSへの動員を調節する。B4GALT6の阻害またはLacCerでの処理が、精製したLy6C<sup>高</sup>単球の生存率、CCL-2勾配における当該単球の遊走、またはLPS/IFN $\gamma$ 刺激に対する当該単球の応答に影響しなかったことに注目されたい（図4j~m）。これは、B4GALT6/LacCerが単球において、そのCNSへの動員を制御することに直接作用しないことを示唆している。

#### 【0129】

実施例5。星状膠細胞中のB4GALT6は、ミクログリア及びCNS浸潤性単球の活性化を制御する。

ミクログリアは、CNS炎症の調節において中心的な役割を担っている<sup>28</sup>。B4GALT5/6のミクログリアに対する作用を研究するために、ナイーブマウスまたは進行期中のNOD EAEのビヒクルもしくはPDMP処理マウスからミクログリア細胞を分離し、NanoString nCounterによってその転写プロファイルを分析した。B4GALT5/6阻害により、EAE時のミクログリア活性化に関連する遺伝子の発現が減少することがわかった（図5a、b）。ミクログリア及びCNS浸潤性単球に対するB4GALT5/6阻害の効果を更に分析するために、MS及びEAEの疾患病理に影響を及ぼすと考えられる<sup>29-31</sup>、マクロファージ/単球系統の炎症性または抗炎症性表現型（それぞれM1またはM2）に関連する遺伝子の発現を調べた。B4GALT5/6の阻害は、ミクログリア及びCNS浸潤性単球において、M1関連遺伝子の有意な下方

10

20

30

40

50



制御、及びこれに伴うM2関連遺伝子の上方制御をもたらすことがわかった(図5c、d及び表3)。したがって、B4GALT5/6は、EAE期にミクログリアによって上方制御されないが、LacCerは、ミクログリア及びCNS浸潤性単球の活性化を調整する。

#### 【0130】

インビボでのB4GALT5/6阻害が、ミクログリア及びCNS浸潤性単球におけるM1/M2バランスを変化させるということから(図5c、d)、ミクログリア及び単球におけるB4GALT5/6及びLacCerの作用が細胞自律的であるかどうかを検討した。培養した初代マウスミクログリアのLPS/IFNに対する生存率も応答も、星状膠細胞の不存在下でのB4GALT5/6の阻害またはLacCerの添加による影響を受けないことがわかった(図5e~h)。加えて、LacCerは、軟膜食細胞または脈絡叢細胞のいずれかの活性化に対する転写応答に影響しなかった(図15a、b)。

10

#### 【0131】

しかしながら、ミクログリアと星状膠細胞の両方を含有する混合グリア培養物では、PDMP及びLacCerのミクログリア活性化に対する有意な作用を認めた(図5i)。星状膠細胞によるミクログリア活性化の制御に関与するB4GALT6/LacCer依存性機構を特定するために、ブロッキング抗体を用いた。混合グリア培養物をブロッキング抗体で処理して、GM-CSF、IL-12、TNFまたはIL-6シグナル伝達を無効にし、LPS/IFN及びLacCerの存在下におけるミクログリア活性化(nos2上方制御によって示される)を分析した。GM-CSFの遮断により、ミクログリアnos2の上方制御のLacCer依存性増加が阻害されることがわかった(図5j)。事実、B4GALT6/LacCer経路が、星状膠細胞活性化時に、NF- $\kappa$ B及びIRF-1のcsf2(GM-CSF)プロモータへの動員を調節することもわかった(図5k)。

20

#### 【0132】

これらのインビトロでの所見の生理学的関連性を評価するために、NOD EAEの慢性期中にshRNAでb4gal t6をノックダウンした後の星状膠細胞中のcsf2発現を分析した。インビトロでの本結果と一致して、b4gal t6のノックダウンは、星状膠細胞中のcsf2発現を有意に減少するに至った(図5l)。更に、星状膠細胞のb4gal t6の特異的ノックダウンにより、ミクログリア中のnos2発現が減少した(図5m)。総合すると、これらのデータは、B4GALT6/LacCerに依存した形態で星状膠細胞によって生産されるGM-CSFが、ミクログリア活性化を調整することを示唆している。

30

【表 3】

表 3 先に記載された M 1 / M 2 関連遺伝子 <sup>29, 30, 60-62</sup>			
M 1 関連遺伝子		M 2 関連遺伝子	
<i>Ccl14</i>	<i>Icam</i>	<i>Arg1</i>	<i>Il18</i>
<i>Ccl15</i>	<i>Il1b</i>	<i>Ccl11</i>	<i>Il121</i>
<i>Ccl18</i>	<i>Il16</i>	<i>Ccl12</i>	<i>Il121r</i>
<i>Ccl115</i>	<i>Il17r</i>	<i>Ccl117</i>	<i>Irf4</i>
<i>Ccl119</i>	<i>Il15</i>	<i>Ccl120</i>	<i>Maf</i>
<i>Ccl120</i>	<i>Il15ra</i>	<i>Cd14</i>	<i>Pparg</i>
<i>Ccl123</i>	<i>Il12a</i>	<i>Cd163</i>	<i>Ptgst1</i>
<i>Cd40</i>	<i>Il12b</i>	<i>Cd206</i>	<i>Sra1</i>
<i>Cd80</i>	<i>Il12ra</i>	<i>Cd209</i>	<i>Stat6</i>
<i>Cd83</i>	<i>Il18</i>	<i>Cd36</i>	<i>Tgfb</i>
<i>Cd86</i>	<i>Il18r</i>	<i>Cd39</i>	<i>Tlr1</i>
<i>Cxcl9</i>	<i>Il23a</i>	<i>Cd73</i>	<i>Tlr8</i>
<i>Cxcl10</i>	<i>Irf5</i>	<i>Cxcl11</i>	<i>Ym1</i>
<i>Cxcl11</i>	<i>Nos2</i>	<i>Cxcl12</i>	
<i>Cxcl113</i>	<i>Ptgs2</i>	<i>Cxcl13</i>	
<i>H2-Aa</i>	<i>Socs3</i>	<i>Fizz1</i>	
<i>H2-ab</i>	<i>Stat1</i>	<i>Igf1</i>	
<i>H2-Ea</i>	<i>Tnf</i>	<i>Il10</i>	
<i>Marco</i>			

10

20

## 【0133】

実施例 6。B 4 G A L T 6 及び L a c C e r レベルは、M S 病変にて上方制御される。

M S に関する所見の関連性を検討するために、M S 患者及び対照由来の脳サンプルにおける B 4 G A L T 6 及び B 4 G A L T 5 発現を分析した。M S 病変では、B 4 G A L T 5 ( 2 . 1 5 ± 0 . 2 8 倍 ) 及び B 4 G A L T 6 ( 8 . 2 6 . 1 5 ± 2 . 1 1 倍 ) の発現の有意な上方制御が認められたが、正常に見える白質 ( N A W M ) または対照では認められなかった。加えて、M S でない C N S 炎症性疾患 ( N M C I D ) に由来する脳サンプルでは、B 4 G A L T 5 ( 1 . 9 5 ± 0 . 3 4 ) の上方制御が認められたが、B 4 G A L T 6 発現 ( 0 . 8 2 ± 0 . 3 7 ) は認められなかった ( 図 6 a ) 。

30

## 【0134】

M S における B 4 G A L T 6 の上方制御の役割を更に調べるために、患者の脳サンプルを I F によって分析し、G F A P + 星状膠細胞中の B 4 G A L T 6 の発現を検出した ( 図 6 b ) 。更に、G F A P + 星状膠細胞における B 4 G A L T 6 と C C L 2 及び i N O S の共発現が認められた ( 図 6 b ) 。

## 【0135】

B 4 G A L T 5 / 6 発現の上方制御の生物学的関連性を調査するために、同じサンプルコレクションの L a c C e r レベルを定量化した。B 4 G A L T 5 / 6 発現に関する本データと一致して、対照、N M C I D 及び M S N A W M サンプルでは、類似した L a c C e r レベルが認められた ( 図 6 c ) 。一方、M S 病変では、L a c C e r レベルが有意に上方制御されたことから、B 4 G A L T 6 活性及び L a c C e r レベルの増加が M S 病理に関連することも示唆される。

40

## 【0136】

次に、B 4 G A L T 6 がヒト星状膠細胞の活性を調整するかどうかについても検討した。このために、ヒト初代星状膠細胞を、P D M P またはビヒクル対照の存在下で、T L R - 3 アゴニストポリ ( I : C ) ( 外因性刺激 ) または I L - 1 ( 内因性刺激 ) のいずれかで活性化した。B 4 G A L T 6 阻害は、C C L 2、C C L 5、C O X 2、I L 6、N O S 2 及び T L R 2 の発現に有意な減少をもたらすことがわかった ( 図 6 d ) 。したがって、これらの結果は、B 4 G A L T 6 が、ヒト神経炎症性障害にて星状膠細胞の活性を制御

50

するための治療標的の候補であることを示唆している。

#### 【0137】

実施例7。ミグルスタットは、星状膠細胞活性化を阻害する。

本明細書にて示す通り、LacCerは、星状膠細胞の活性化及び神経変性を促進する。ヒト使用が認められた薬剤であるミグルスタット(Venier, R. E. & Igdo  
ura, S. A. Miglustat as a therapeutic agent:  
prospects and caveats. J Med Genet 49, 591-597 (2012))は、血液脳関門を通過し、B4GALT6によってLacCer  
を合成するために使用されるグルコシルセラミド(GlcCer)の合成を阻害する(図1A)(Venier & Igdo  
ura, J Med Genet 49, 591-597 (2012); Jeyakumar et al., Nature reviews  
. Neuroscience 6, 713-725 (2005); Platt et al.  
Science (New York, N. Y.) 276, 428-431 (1997))。星状膠細胞の活性を調整するという別の目的の裏付けとして、ミグルスタットが、  
PDMPでの観察と同様に、星状膠細胞の活性化を阻害することがわかった(図7B)。したがって、MS及び他の神経変性疾患における病理学的な星状膠細胞の活性化を抑制する  
ために、ミグルスタットを用いることができる。

10

#### 【0138】

実施例8。ミグルスタット治療は、慢性EAEの進行を停止する。

実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)は、MS研究に関する実績に裏付けられた、有用なMSの実験モデルを構成するものであり、事実、EAEは、多発性硬化症(MS)での使用が認められたグラチラマー酢酸塩、ミトキサントロン及びナタリズマブの3つの治療の開発に直接つながるものであった。MOG<sub>35-55</sub>で非肥満性糖尿病(NOD)マウスを免疫化すると、急性発作(急性期)を起こし、進行期が続き、二次性進行型MSに似た神経障害の不可逆的蓄積(進行期)が生じる。

20

#### 【0139】

進行期のNOD EAEにおけるミグルスタットの治療可能性を調査するために、進行期の発症時にミグルスタット投与を開始した。(図16)。ミグルスタットを経口または経鼻により毎日投与した。経口処理したマウスには、1800 mg/kgまたは600 mg/kgのいずれかの単回用量のミグルスタットを与え、経鼻処理したマウスは、900 mg/kgの用量で1日2回処理した(合計で1日当たり1800 mg/kg)。ミグルスタットを毎日投与すると、疾患進行の臨床経過が抑制されることがわかった(図16)。更に、MSの病因及び他の神経変性疾患の主要な寄与因子であると考えられる、炎症性単球のCNSへの動員も減少した(図17)(例えば、David and Krone  
r, Nat Rev Neurosci. 2011; 12(7): 388-99; Lawrence and Natoli, Nat Rev Immunol. 2011; 11(11): 750-61; Murray and Wynn, Nat Rev Immunol. 2011; 11(11): 723-37を参照)。ミグルスタットがT細胞応答または体重減少に影響しなかったことに注目されたい(それぞれ図18及び19)。総合すると、これらのデータは、ミグルスタットの投与が慢性EAEの進行を停止し、進行型MSのための治療法を示すことを示唆している。

30

40

#### 【0140】

参考文献

1. Clarke, L. E. & Barres, B. A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nat Rev Neurosci 14, 311-321 (2013).
2. Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K. & Giaume, C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. Science 322, 1551-1555 (2008).

50

3. Seifert, G., Schilling, K. & Steinhauser, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7, 194 - 206 (2006).
4. Tsai, H. H., et al. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* 337, 358 - 362 (2012).
5. Bush, T. G., et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297 - 308 (1999).
6. Myer, D. J., Gurkoff, G. G., Lee, S. M., Hovda, D. A. & Sofroniew, M. V. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129, 2761 - 2772 (2006).
7. Toft-Hansen, H., Fuchtbauer, L. & Owens, T. I. Inhibition of reactive astrogliosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease. *Glia* 59, 166 - 176 (2011).
8. Voskuhl, R. R., et al. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci* 29, 11511 - 11522 (2009).
9. Mayo, L., Quintana, F. J. & Weiner, H. L. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* 248, 170 - 187 (2012).
10. Nylander, A. & Hafler, D. A. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 122, 1180 - 1188 (2012).
11. Weiner, H. L. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol* 65, 239 - 248 (2009).
12. Joseph, J., Bittner, S., Kaiser, F. M., Wiendl, H. & Kissler, S. IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. *J Immunol* 188, 216 - 221 (2012).
13. Basso, A. S., et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* 118, 1532 - 1543 (2008).
14. Farez, M. F., et al. Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE. *Nat Immunol* 10, 958

- 964 (2009) .

15. Cao, W. , et al. Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease. *Immunity* 35 , 273 - 284 (2011) .

16. Pluchino, S. , et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422 , 688 - 694 (2003) .

10

17. Chatterjee, S. & Alsaeedi, N. Lactosylceramide synthase as a therapeutic target to mitigate multiple human diseases in animal models. *Adv Exp Med Biol* 749 , 153 - 169 (2012) .

18. Pannu, R. , Won, J. S. , Khan, M. , Singh, A. K. & Singh, I. A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide / interferon- gamma - mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases. *J Neurosci* 24 , 5942 - 5954 (2004) .

20

19. Ajami, B. , Bennett, J. L. , Krieger, C. , McNagny, K. M. & Rossi, F. M. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14 , 1142 - 1149 (2011) .

20. Izikson, L. , Klein, R. S. , Charo, I. F. , Weiner, H. L. & Luster, A. D. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR) 2. *J Exp Med* 192 , 1075 - 1080 (2000) .

30

21. Mildner, A. , et al. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* 132 , 2487 - 2500 (2009) .

22. Watkins, T. A. , Emery, B. , Mulinyawe, S. & Barres, B. A. Distinct stages of myelination regulated by gamma - secretase and astrocytes in a rapidly myelinating CNS coculture system. *Neuron* 60 , 555 - 569 (2008) .

40

23. Nishie, T. , et al. Beta4 - galactosyltransferase - 5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra - embryonic development. *Glycobiology* 20 , 1311 - 1322 (2010) .

24. Tokuda, N. , et al. beta4GalT6 is involved in the synthesis of lactosylceramide with less intensity than beta4GalT5. *Glycobiology* 23 , 1175 - 1183 (2013) .

25. Yan, Y. , et al. CNS - specific therapy for

50

ongoing EAE by silencing IL-17 pathway in astrocytes. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 20, 1338-1348 (2012).

26. Lee, J. K., et al. Lactosylceramide Mediates the Expression of Adhesion Molecules in TNF- $\alpha$  and IFN $\gamma$ -stimulated Primary Cultured Astrocytes. The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology 15, 251-258 (2011).

27. Huang, D. R., Wang, J., Kivisakk, P., Rollins, B. J. & Ransohoff, R. M. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 193, 713-726 (2001).

28. Heppner, F. L., et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. Nat Med 11, 146-152 (2005).

29. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. Nat Rev Immunol 11, 750-761 (2011).

30. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol 11, 723-737 (2011).

31. Miron, V. E., et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. Nat Neurosci 16, 1211-1218 (2013).

32. Bi, F., et al. Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 4069-4074 (2013).

33. Colombo, E., et al. Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. J Exp Med 209, 521-535 (2012).

34. Freeman, M. R. Specification and morphogenesis of astrocytes. Science 330, 774-778 (2010).

35. Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q. & Anderson, D. J. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a home

10

20

30

40

50

- odomain code. *Cell* 133, 510 - 522 (2008).
36. Matyash, V. & Kettenmann, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 63, 2 - 10 (2010).
37. Zhang, Y. & Barres, B. A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 20, 588 - 594 (2010).
38. Molofsky, A. V., et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & development* 26, 891 - 907 (2012). 10
39. Sofroniew, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32, 638 - 647 (2009).
40. David, S. & Kroner, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12, 388 - 399 (2011).
41. Ponomarev, E. D., et al. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178, 39 - 48 (2007). 20
42. Codarri, L., et al. ROR $\gamma$ mat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12, 560 - 567 (2011). 30
43. El-Behi, M., et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12, 568 - 575 (2011).
44. Zamanian, J. L., et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32, 6391 - 6410 (2012).
45. Jahng, A., et al. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 199, 947 - 957 (2004). 40
46. Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M. & Serhan, C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869 - 874 (2007).
47. Kanter, J. L., et al. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med* 12, 138 - 143 (2006). 50

48. Quintana, F. J. , Yeste, A. , Weiner, H. L. & Co vacu, R. Lipids and lipid - reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis . J Neuroimmunol 248 , 53 - 57 ( 2012 ) .
49. Nolte, C. , et al. GFAP promoter - controlled EGFP - expressing transgenic mice : a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue . Glia 33 , 72 - 86 ( 2001 ) .
50. Cardona, A. E. , Huang, D. , Sasse, M. E. & Ransohoff, R. M. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry . Nat Protoc 1 , 1947 - 1951 ( 2006 ) .
51. Cahoy, J. D. , et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes : a new resource for understanding brain development and function . J Neurosci 28 , 264 - 278 ( 2008 ) .
52. Prinz, M. , Priller, J. , Sisodia, S. S. & Ransohoff, R. M. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration . Nat Neurosci 14 , 1227 - 1235 ( 2011 ) .
53. Ulitsky, I. , et al. Expander : from expression microarrays to networks and functions . Nat Protoc 5 , 303 - 322 ( 2010 ) .
54. Saura, J. , Tusell, J. M. & Serratos, J. High - yield isolation of murine microglia by mild trypsinization . Glia 44 , 183 - 189 ( 2003 ) .
55. Kunis, G. , et al. IFN - gamma - dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair . Brain 136 , 3427 - 3440 ( 2013 ) .
56. Menheniott, T. R. , Charalambous, M. & Ward, A. Derivation of primary choroid plexus epithelial cells from the mouse . Methods in molecular biology 633 , 207 - 220 ( 2010 ) .
57. Jack, C. S. , et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes . J Immunol 175 , 4320 - 4330 ( 2005 ) .
58. Alvarez, J. I. , et al. The Hedgehog pathway promotes blood - brain barrier integrity and CNS immune quiescence . Science 334 , 1727 - 1731 ( 2011 ) .
59. Nair, A. , Frederick, T. J. & Miller, S. D. Astrocytes in multiple sclerosis : a product of their environment . Cellular and molecular life sciences : CMLS 65 , 2702 - 2720 ( 2008 ) .

10

20

30

40

50



60. Krausgruber, T., et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. Nat Immunol 12, 231-238 (2011).

61. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest 122, 787-795 (2012).

62. Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library 13, 453-461 (2008).

【0141】

他の実施形態

本発明について、発明を実施するための形態とともに記載してきたが、前述の記載は、本発明の範囲を例示するものであり、これを限定するものではなく、本発明は、添付する特許請求の範囲によって定義されることを理解されたい。他の態様、利点及び変更は、以下の特許請求の範囲内である。

本願は以下の発明に関するものである。

(1) 対象における二次性進行型多発性硬化症 (SPMS) の発症を診断またはリスク判定するためのインビトロの方法であって、

対象のサンプル中のラクトシルセラミド (LacCer) のレベルを検出することと、  
前記サンプル中の LacCer の前記レベルを、SPMS に罹患しているまたは SPMS を発症するリスクのある対照の LacCer のレベルを表す LacCer の基準レベルと比較することと、

前記サンプル中の LacCer の前記レベルが前記基準レベルを上回る場合、対象を SPMS と診断するまたは SPMS を発症するリスクのある対象と特定することを含む、方法。

(2) 前記対象が、再発寛解型多発性硬化症を有する、前記 (1) に記載の方法。

(3) 前記対象が、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年または5年以内に SPMS を発症するリスクが高い、前記 (1) に記載の方法。

(4) 対象における進行型多発性硬化症 (MS)、例えば、一次性進行型多発性硬化症 (PPMS) または二次性進行型多発性硬化症 (SPMS) を治療するための方法であって、治療的有效量の LacCer 合成阻害剤を前記対象に投与することを含む、方法。

(5) 対象の進行型多発性硬化症 (MS)、例えば、一次性進行型多発性硬化症 (PPMS) または二次性進行型多発性硬化症 (SPMS) の治療における LacCer 合成阻害剤の使用。

(6) 対象の進行型多発性硬化症 (MS) を治療するための方法であって、

進行型 MS に罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のサンプル中のラクトシルセラミド (LacCer) のレベルを検出することと、

前記サンプル中の LacCer の前記レベルを、LacCer の基準レベル、例えば、進行型 MS に罹患しているまたは進行型 MS を発症するリスクのある対照の LacCer のレベルを表す基準レベルと比較することと、

LacCer の前記レベルが前記基準レベルを上回る対象に、治療的有效量の LacCer 合成阻害剤を投与することを含む治療を施すことを含む、方法。

(7) MS、例えば進行型 MS に罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のための治療を選択するための方法であって、

進行型 MS に罹患しているまたは罹患の疑いのある対象のサンプル中のラクトシルセラミド (LacCer) のレベルを検出することと、

前記サンプル中の LacCer の前記レベルを、LacCer の基準レベル、例えば、進行型 MS に罹患しているまたは進行型 MS を発症するリスクのある対照の LacCer

10

20

30

40

50

のレベルを表す基準レベルと比較することと、

L a c C e r の前記レベルが前記基準レベルを上回る対象に、治療の有効量の L a c C e r 合成阻害剤を投与することを含む治療を選択することを含む、方法。

( 8 ) 前記 L a c C e r 合成阻害剤が、グルコシルセラミド ( G l c C e r ) 合成阻害剤である、前記 ( 4 ) ~ ( 6 ) に記載の方法または前記 ( 7 ) に記載の使用。

( 9 ) 前記 G l c C e r 合成阻害剤が、1 - ( 3 ' , 4 ' - エチレンジオキシ ) フェニル - 2 - ノナノイルアミノ - 3 - ピロリジノ - 1 - プロパノール、1 - ( 3 ' , 4 ' - エチレンジオキシ ) フェニル - 2 - オクタノイルアミノ - 3 - ピロリジノ - 1 - プロパノール、D - トレオ - ( 1 R , 2 R ) - フェニル - 2 - デカノイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール ( P D M P ) 及び D - P D M P を含むその類似体、P P M P ( D L - トレオ - 1 - フェニル - 2 - パルミトイルアミノ - 3 - モルホリノ - 1 - プロパノール )、D - トレオ - E t D O - P 4、( ( 1 R , 2 R ) - ノナン酸 [ 2 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロ - ベンゾ [ 1 , 4 ] ダイオキシ - 6 ' - イル ) - 2 - ヒドロキシ - 1 - ピロリジン - 1 - イルメチル - エチル ] - アミド - L - 酒石酸塩、C C G 0 2 0 3 5 8 6 ( 1 - ヒドロキシ - 3 - ( ピロリジン - 1 - イル ) アセトアミド )、G e n z - 1 1 2 6 3 8 ( エリグルスタット )、G e n z - 5 2 9 4 6 8、デオキシノジリマイシン系 G l c C e r 阻害剤、G Z - 1 6 1、G e n z - 6 8 2 4 5 2、E X E L - 0 3 4 6、O G T 2 3 7 8、並びに G e n z - 1 2 3 3 4 6 からなる群から選択される、前記 ( 8 ) に記載の方法。

( 1 0 ) 前記デオキシノジリマイシン系 G l c C e r 阻害剤が、N - ( 5 ' - アダマンタン - 1 ' - イル - メトキシ ) - ペンチル - 1 - デオキシノジリマイシン ( A M P - D N M )、N - ブチル - デオキシノジリマイシン ( ミグルスタット ) またはアルキル鎖中に 9 個 ~ 約 2 0 個の炭素原子を有する 1 , 5 - ジデオキシ - 1 , 5 - イミノ - D - グルシトールの長鎖 N - アルキル誘導体である、前記 ( 9 ) に記載の方法。

( 1 1 ) 前記 N - アルキル置換基が、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、シス - 1 1 - ヘキサデセニル、オクタデシル、シス - 1 3 - オクタデセニル及びエイコシルからなる群から選択される、前記 ( 1 0 ) に記載の方法。

( 1 2 ) 前記 L a c C e r 合成阻害剤が、小分子、B 4 G A L T 6 を標的にする阻害核酸または B 4 G A L T 6 に特異的に結合し L a c C e r 合成を阻害する阻害抗体からなる群から選択される B 4 G A L T 6 の阻害剤である、前記 ( 4 ) ~ ( 6 ) に記載の方法または前記 ( 7 ) に記載の使用。

( 1 3 ) B 4 G A L T 6 を標的にする前記阻害核酸が、アンチセンス、s i R N A、s h R N A 及び m i R N A からなる群から選択される、前記 ( 1 7 ) に記載の方法。

( 1 4 ) B 4 G A L T 6 阻害剤及び G l c C e r 合成阻害剤を投与することを含む、前記 ( 4 ) ~ ( 6 ) に記載の方法。

( 1 5 ) 前記対象が、進行型 M S、例えば、P P M S または S P M S に罹患していることに基づいて、前記対象を選択することを含む、前記 ( 4 ) ~ ( 6 ) に記載の方法。

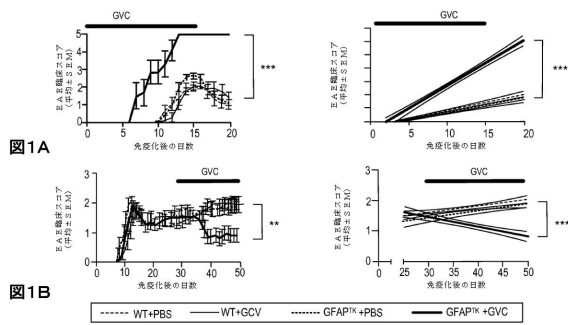
( 1 6 ) グルコセレブロシダーゼの活性化剤を投与することを更に含む、前記 ( 4 ) ~ ( 6 ) に記載の方法。

( 1 7 ) 前記グルコセレブロシダーゼの活性化剤が、サポシン C もしくはサポシン C の活性断片もしくはその活性断片、N C G C 0 0 1 8 2 1 8 6 ( 5 - シクロプロピリデン - 7 - ( ジフルオロメチル ) - N - ( 2 - フェニルスルファニルフェニル ) - 1 H - ピラゾロ [ 1 , 5 - a ] ピリミジン - 3 - カルボキサミド )、N C G C 0 0 1 8 2 5 1 0 ( [ 2 - ( t e r t - ブチルアミノ ) - 2 - オキソエチル ] 2 - [ 2 - ( 4 - プロモアニリノ ) - 2 - オキソエトキシ ] ベンゾエート ) またはホスファチジルセリンである、前記 ( 1 6 ) に記載の方法。

( 1 8 ) 前記化合物が、経口、経鼻、静脈内または髄腔内投与される、前記 ( 4 ) ~ ( 1 7 ) のいずれかに記載の方法または使用。

( 1 9 ) 前記対象が、S P M S に罹患しているか、かつ / または S P M S に罹患していることに基づいて選択される、前記 ( 4 ) ~ ( 1 8 ) のいずれかに記載の方法または使用。

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】

図1C

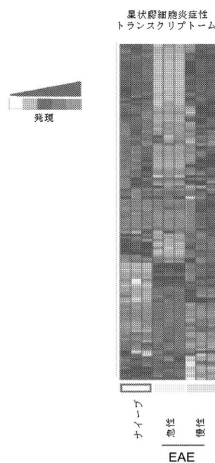
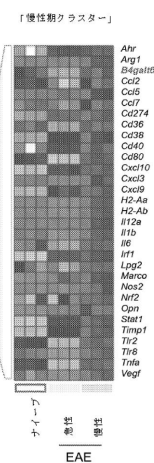
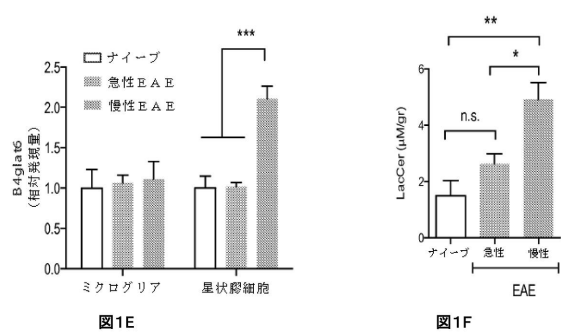


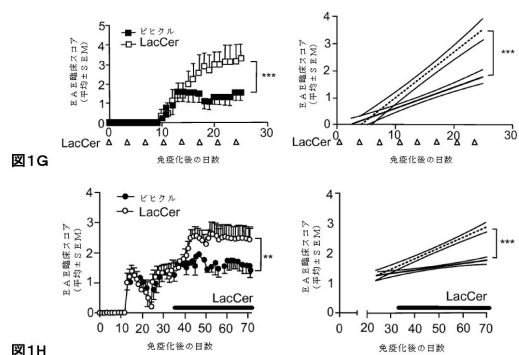
図1D



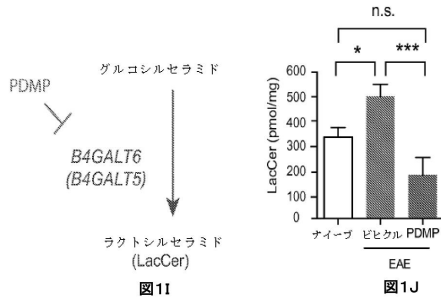
【図 1 - 3】



【図 1 - 4】



【図 1 - 5】



【図 1 - 6】

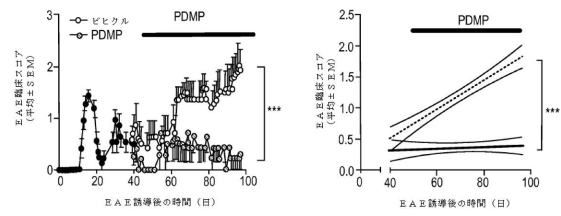


図1K

【図 2 - 1】

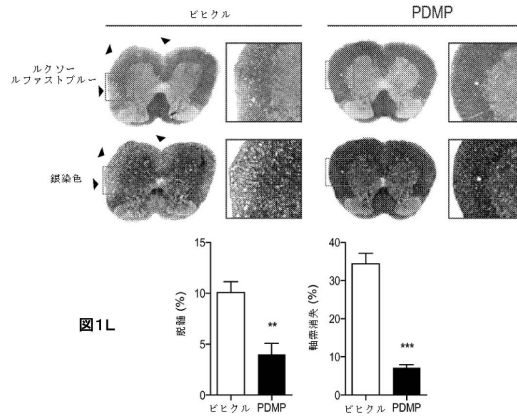


図2A

【図 2 - 2】

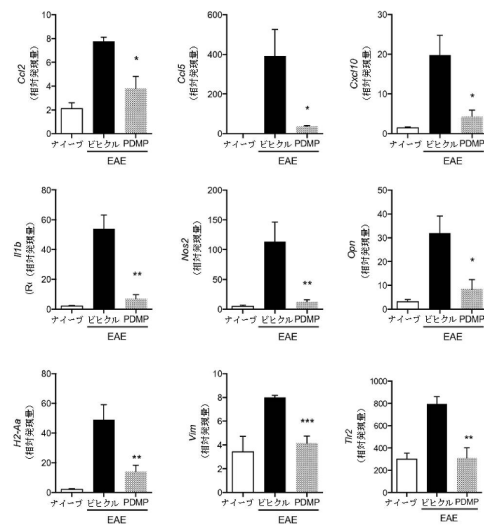


図2B

【図 2 - 3】

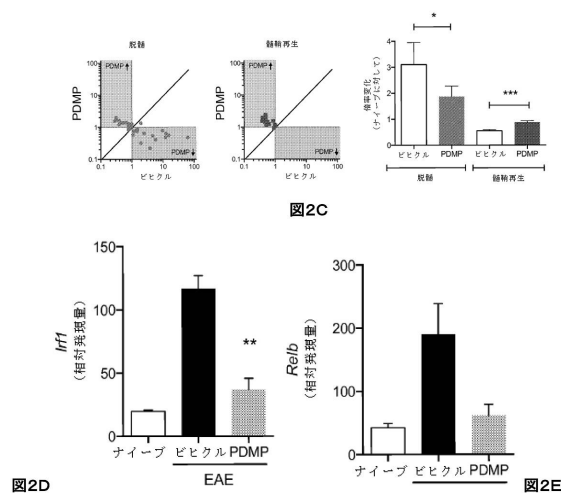


図2C

図2D

図2E

【図 3 - 1】

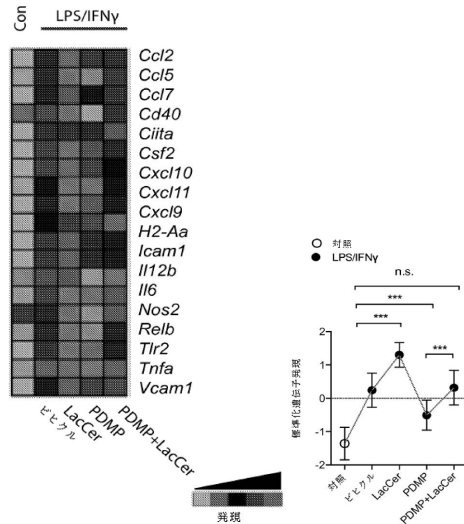


図3A

図3B

【図 3 - 2】

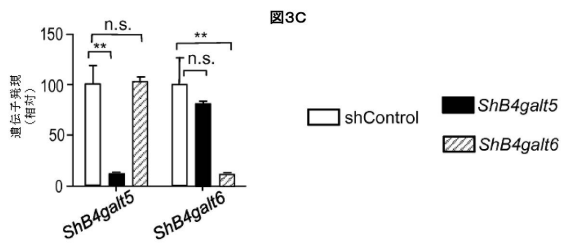


図3C

【図 3 - 3】

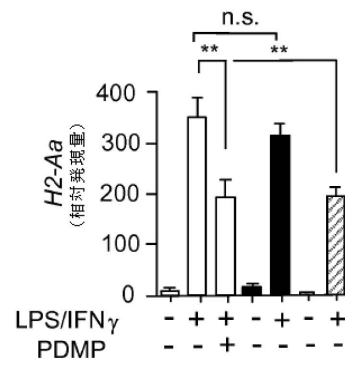


図3D

【図 3 - 4】

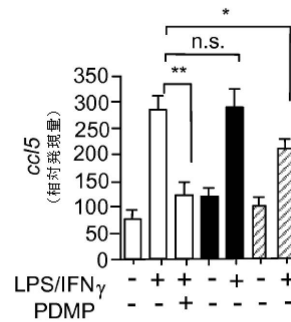


図3E

【図 3 - 5】

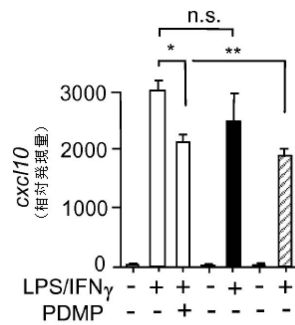


図3F

【図 3 - 8】

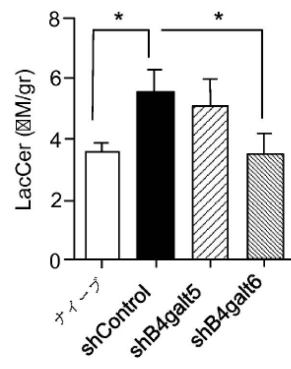


図3I

【図 3 - 6】

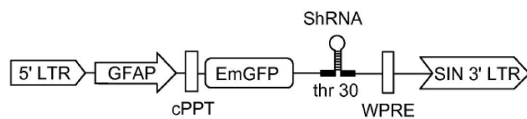


図3G

【図 3 - 7】

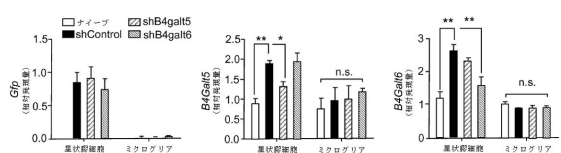


図3H

【図 3 - 9】

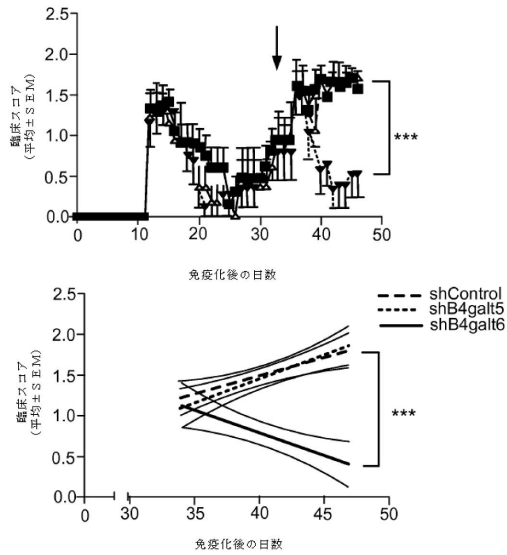
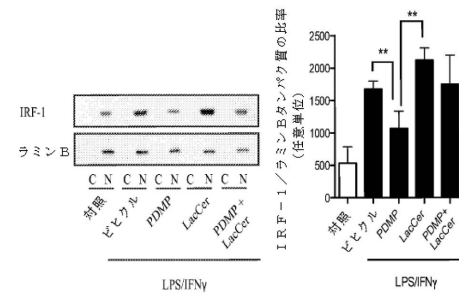


図3J

【図 3 - 10】

図3K



【図 3 - 11】

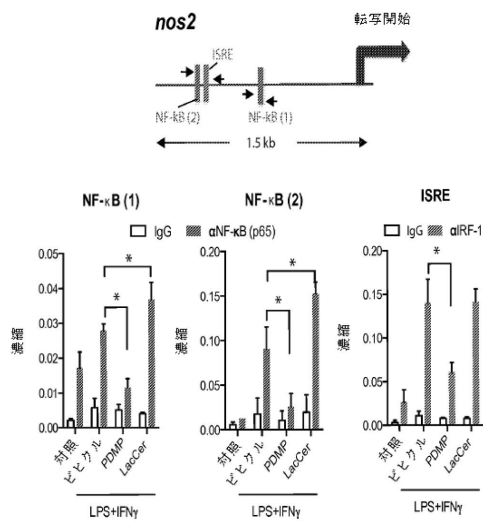


図3L

【図 3 - 12】

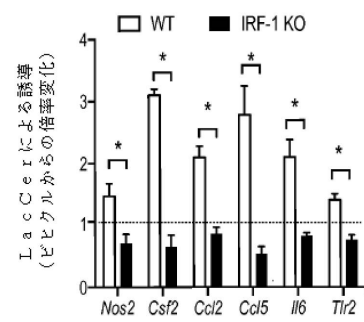


図3M

【図 4 - 1】

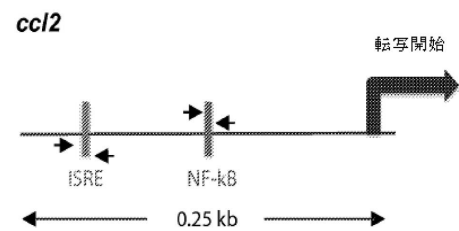


図4A

【図 4 - 2】

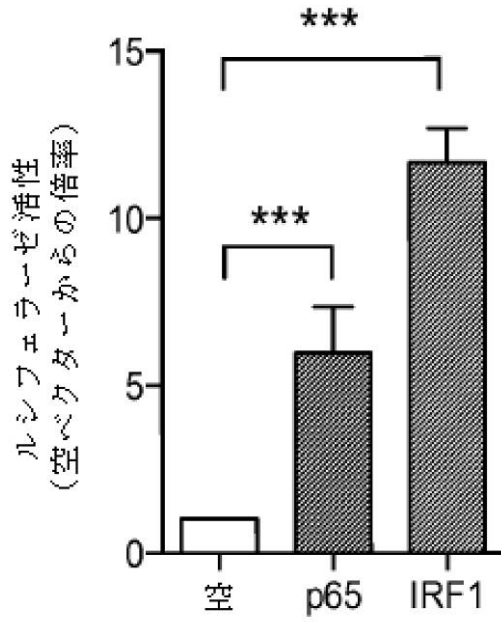


図4B

【図 4 - 3】

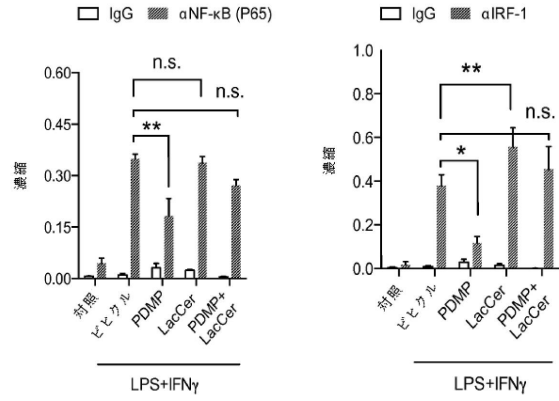


図4C

【図 4 - 4】

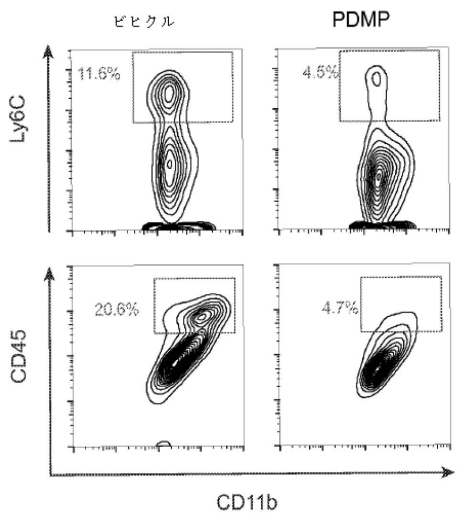


図4D

【図 4 - 5】

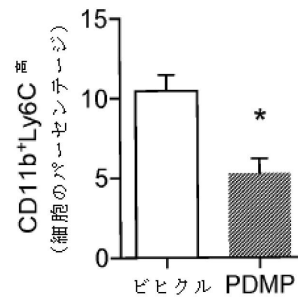


図4E

【図 4 - 6】

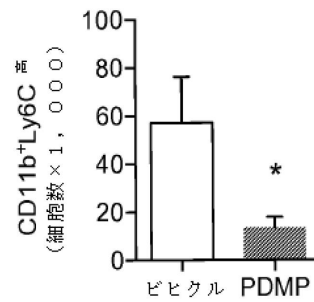


図4F

【図4-7】

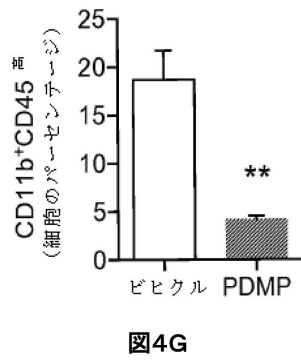


図4G

【図4-8】

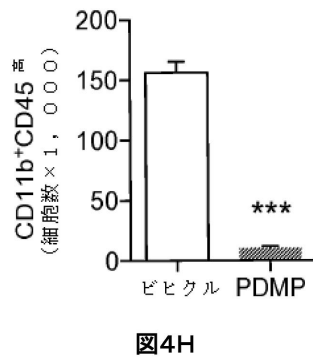


図4H

【図4-9】

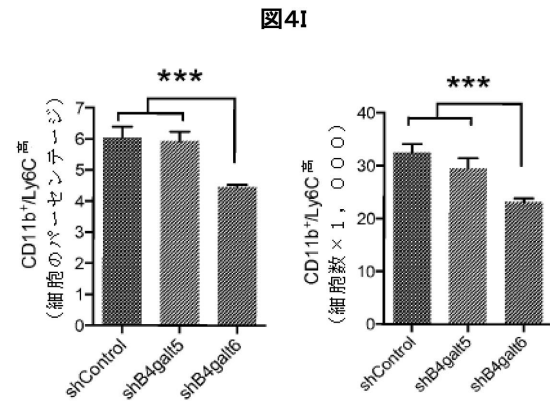


図4I

【図4-10】

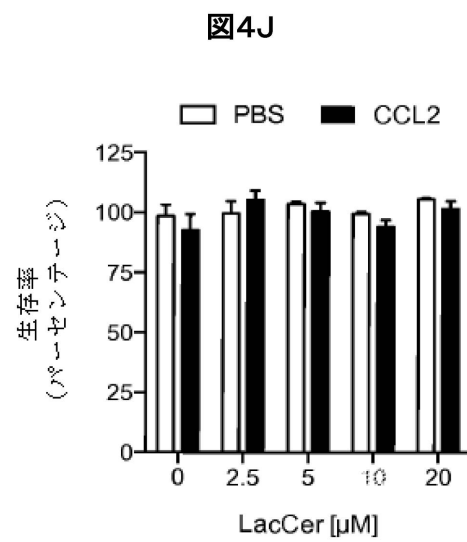


図4J

【図4-11】

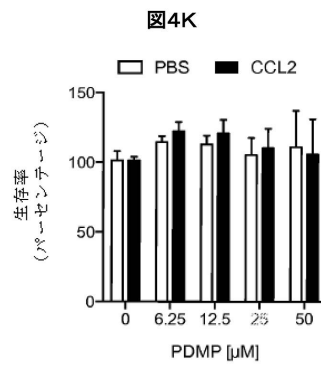


図4K

【図4-12】

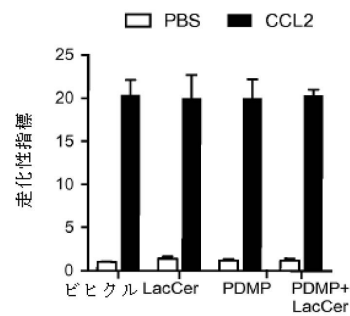


図4L



【図 4 - 1 3】

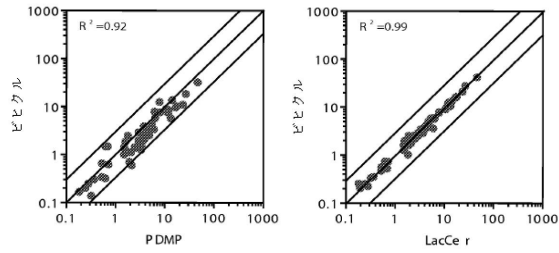


図4M

【図 5 - 1】

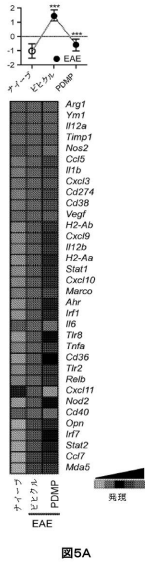


図5A

【図 5 - 3】

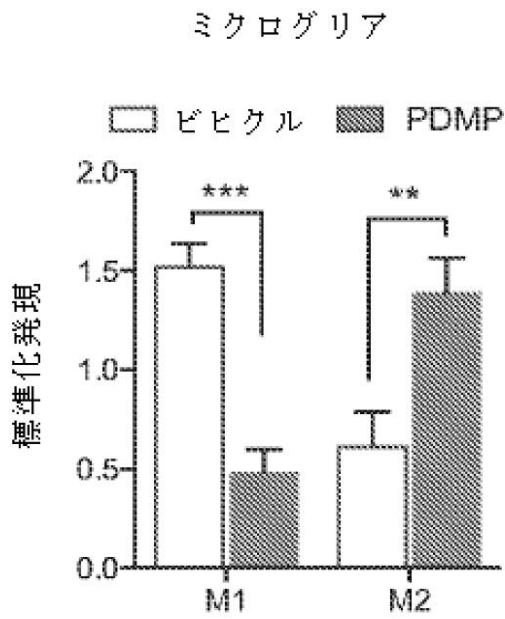


図5C

【図 5 - 2】

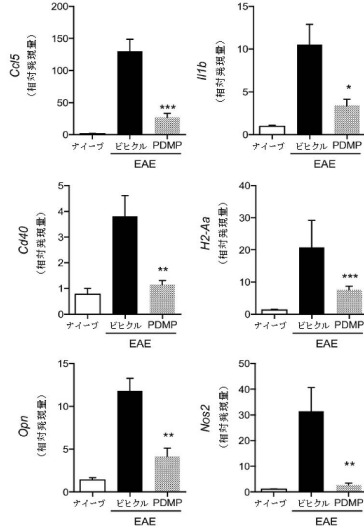


図5B

【図 5 - 4】

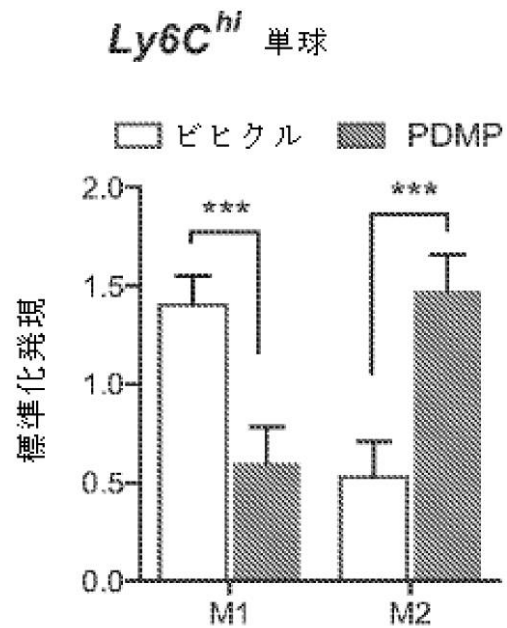


図5D

【図 5 - 5】

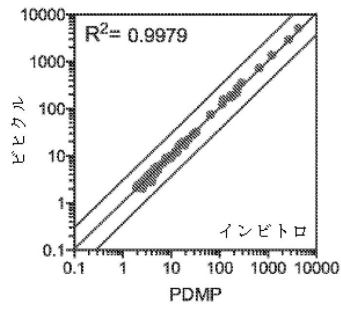


図5E

【図 5 - 7】

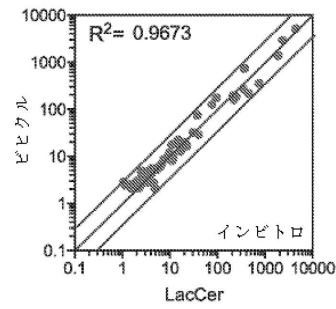


図5G

【図 5 - 6】

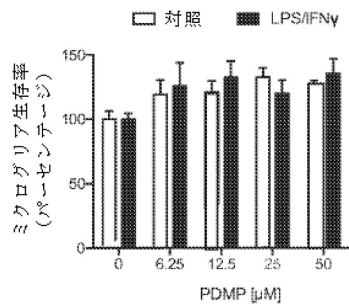


図5F

【図 5 - 8】

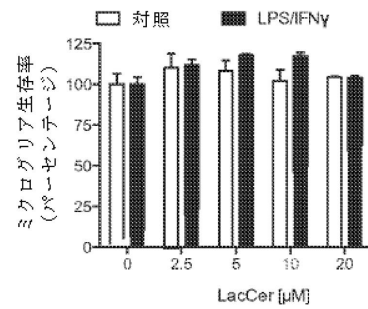


図5H

【図 5 - 9】

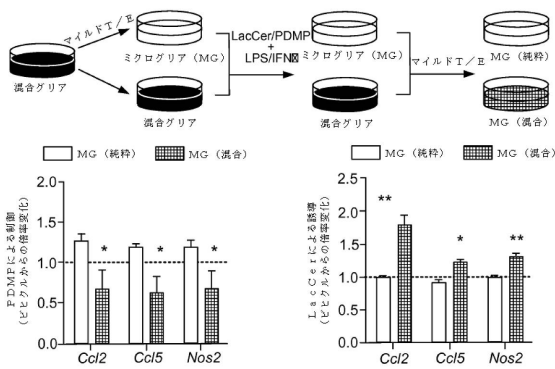


図5I

【図 5 - 11】

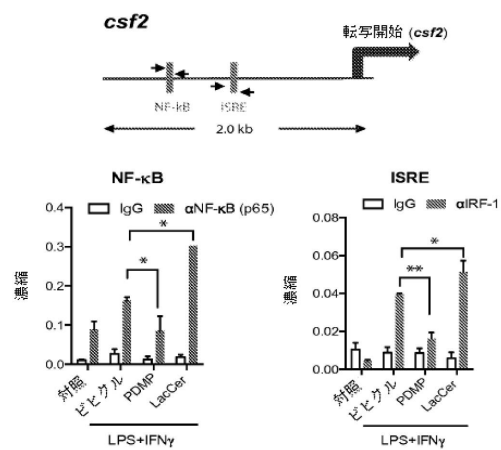


図5K

【図 5 - 10】

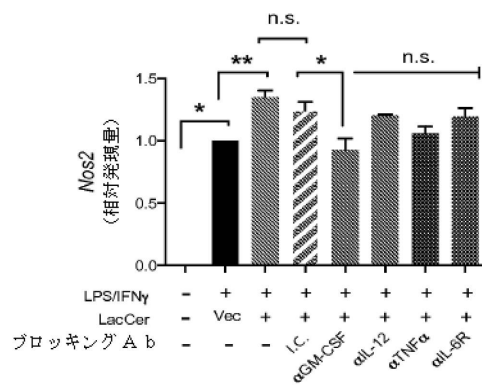
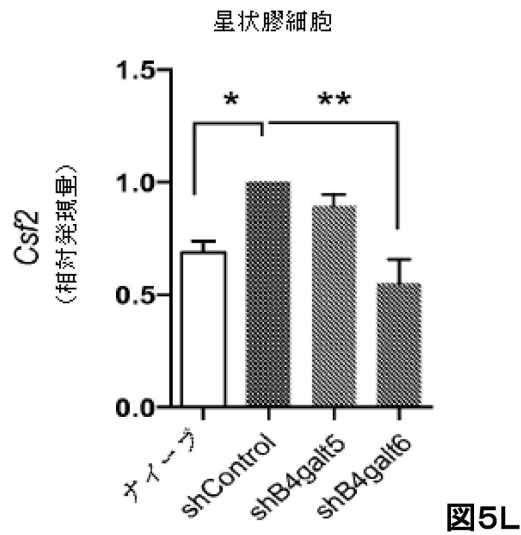
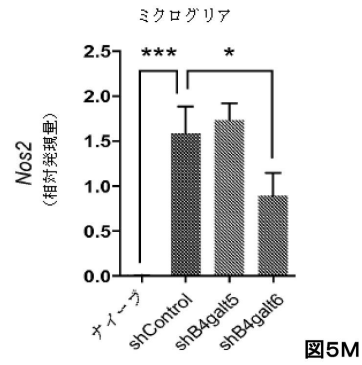


図5J

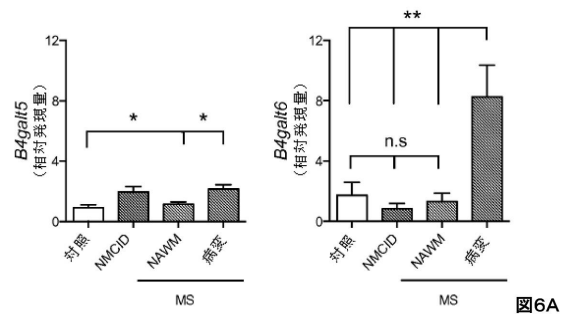
【図 5 - 1 2】



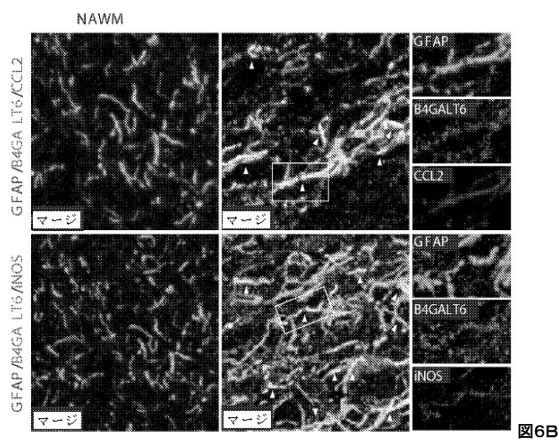
【図 5 - 1 3】



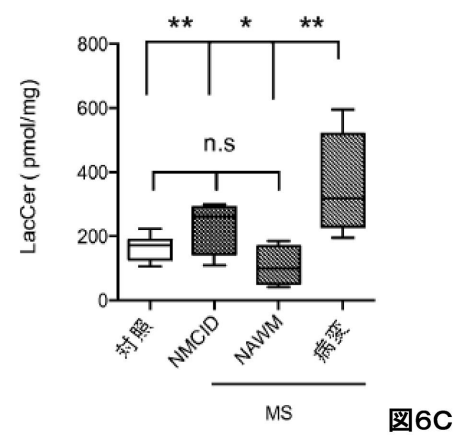
【図 6 - 1】



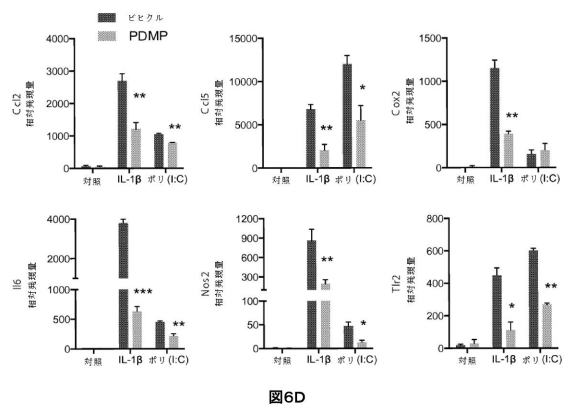
【図 6 - 2】



【図 6 - 3】



【図 6 - 4】



【図 7 - 1】

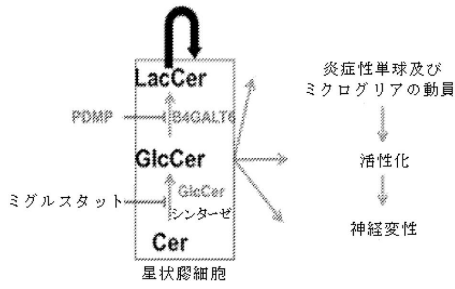


図7A

【図 7 - 2】

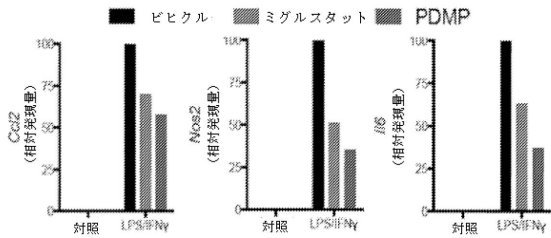


図7B

【図 8 - 1】

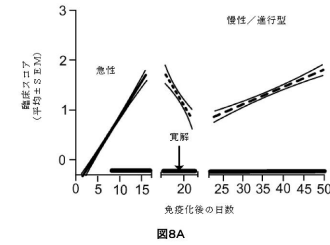
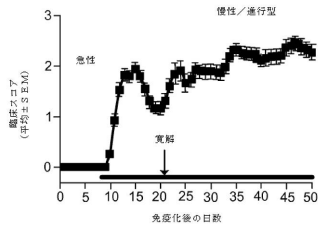


図8A

【図 8 - 2】

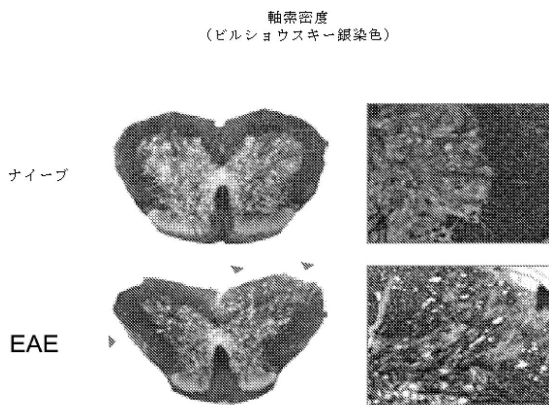


図8B

【図 8 - 3】

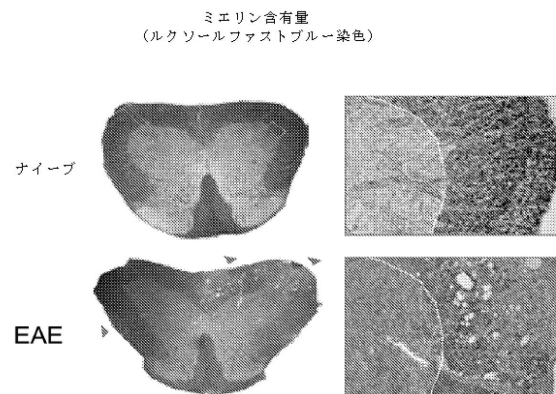


図8C

【図 9 - 1】

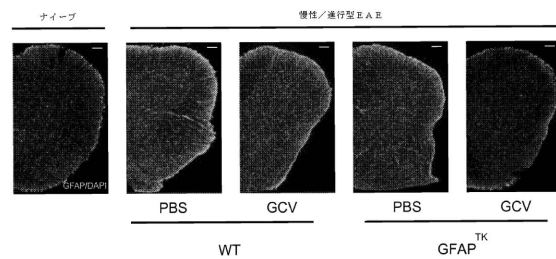


図9A

【図 9 - 2】

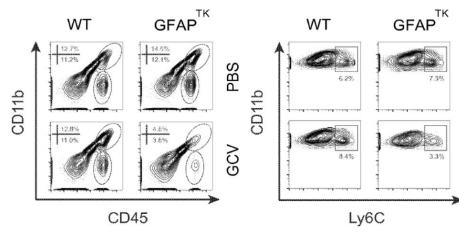


図9B

【図 9 - 3】

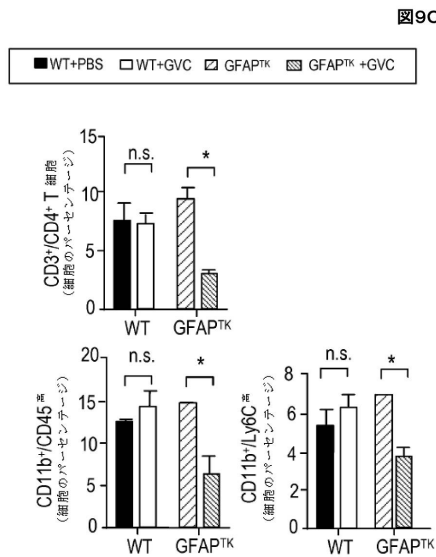


図9C

【図 9 - 4】

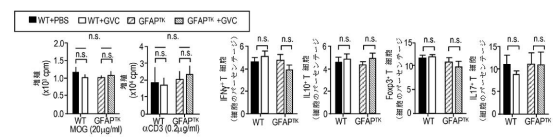
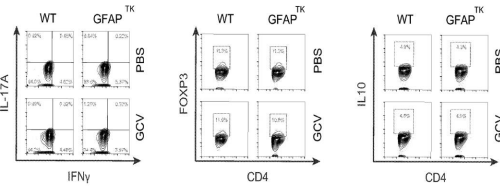


図9C

図9D



【図 10 - 1】

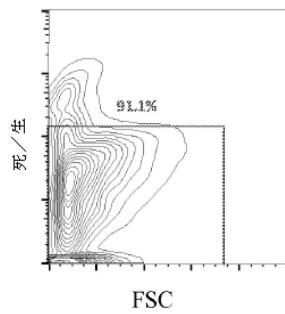


図10A

【図 10 - 2】

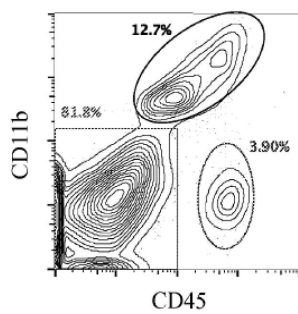


図10B

【図 10 - 3】

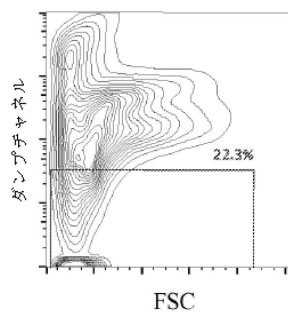


図10C

【図 10 - 4】

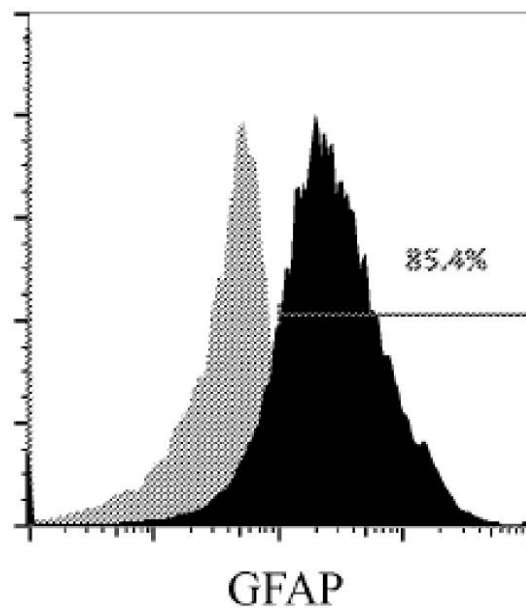


図10D

【図 10 - 5】

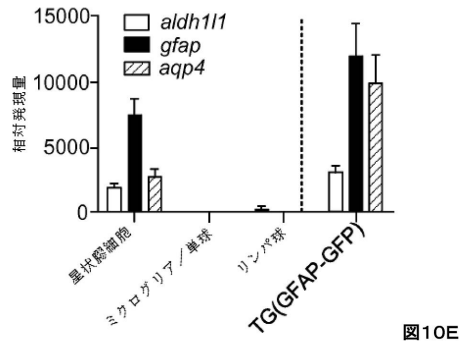


図10E

【図 10 - 7】

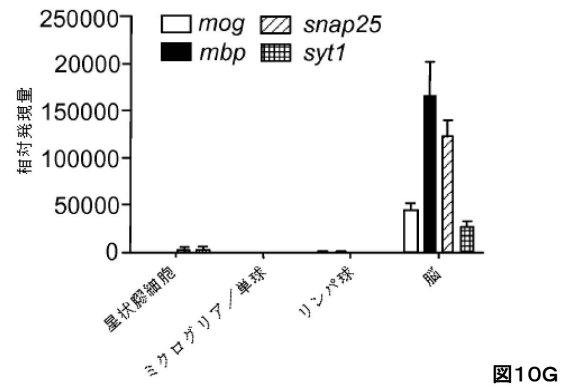


図10G

【図 10 - 6】

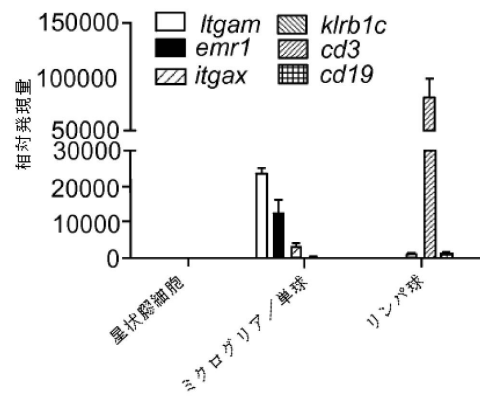


図10F

【図 11 - 1】

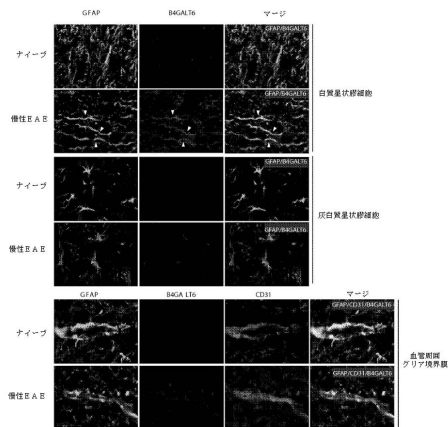


図11A

【図 11 - 2】

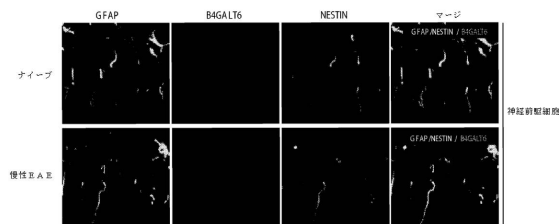


図11B

【図 11 - 3】

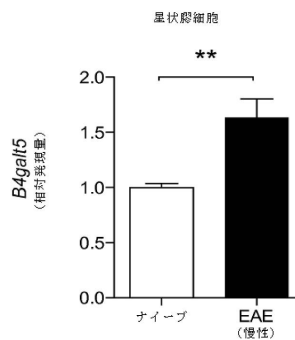


図11C

【図 11 - 4】

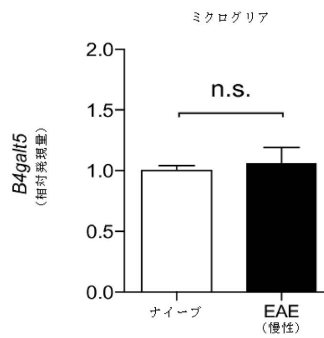
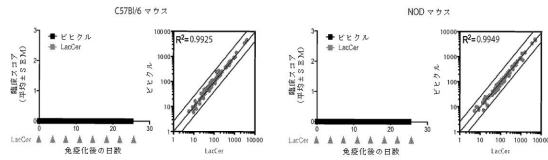


図11D

【図 12 - 1】

図12A



【図 12 - 2】

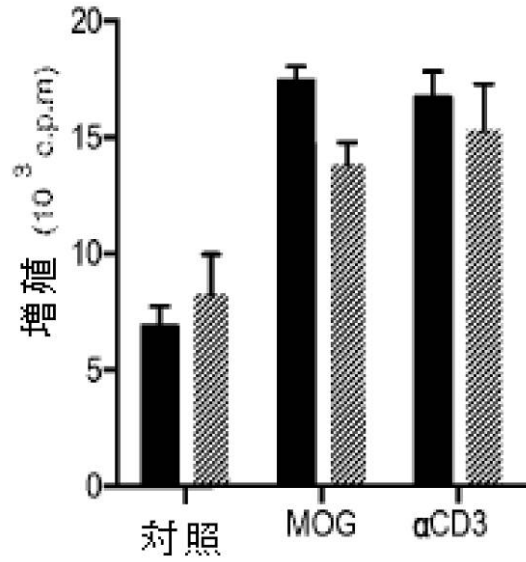


図12B

【図 12 - 3】

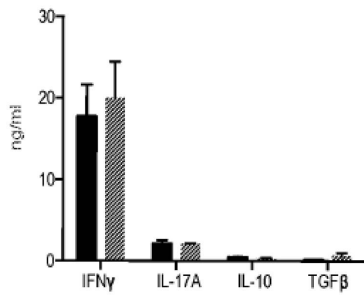


図12C

【図 12 - 5】

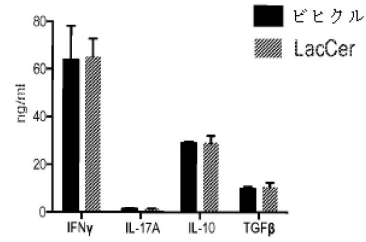


図12E

【図 12 - 4】

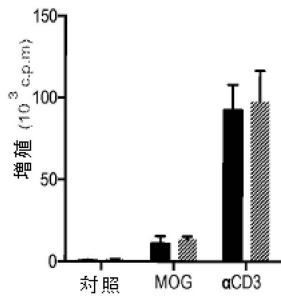


図12D

【図 12 - 6】

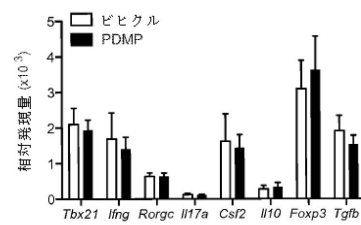


図12F

【図 12 - 7】

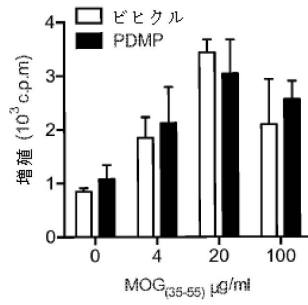


図12G

【図 12 - 8】

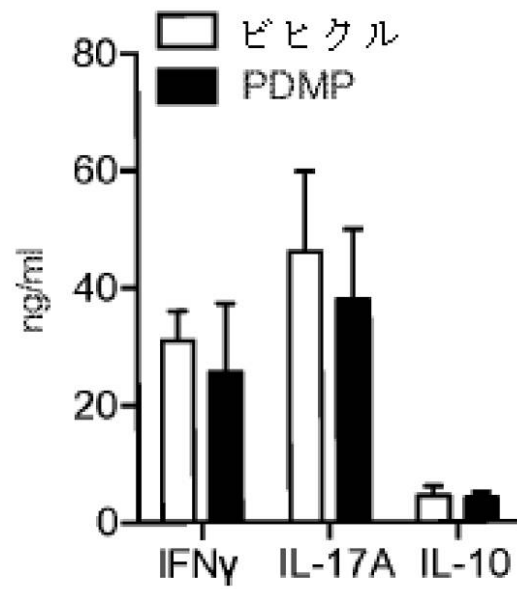


図12H

【図 12 - 9】

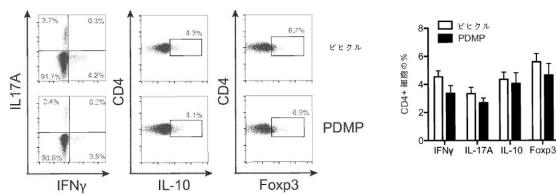


図12I

【図 14 - 1】

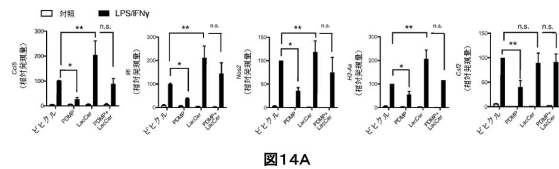


図14A

【図 14 - 2】

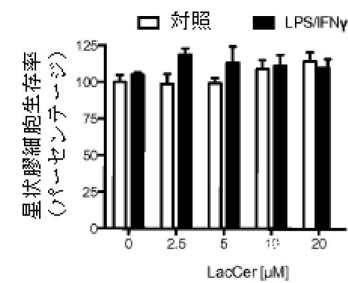


図14B

【図 13】

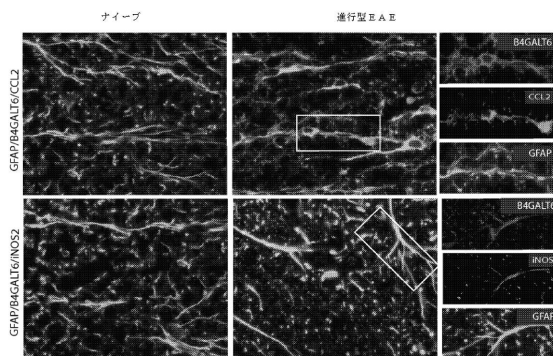


図13



【図14-3】

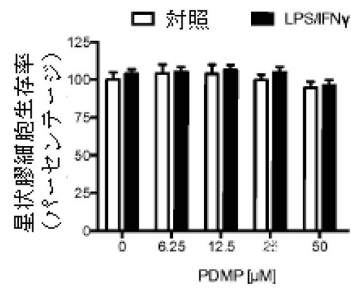


図14C

【図14-4】

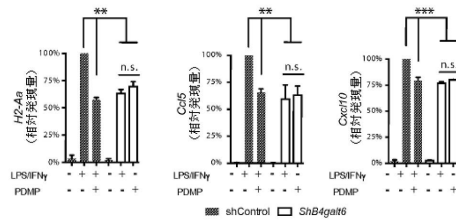


図14D

【図14-5】

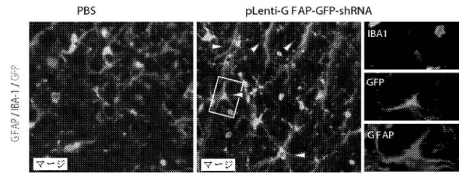


図14E

【図14-6】

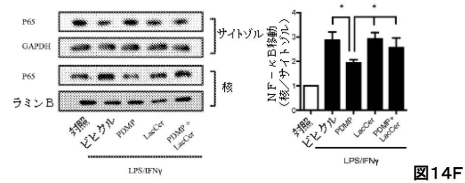


図14F

【図14-7】

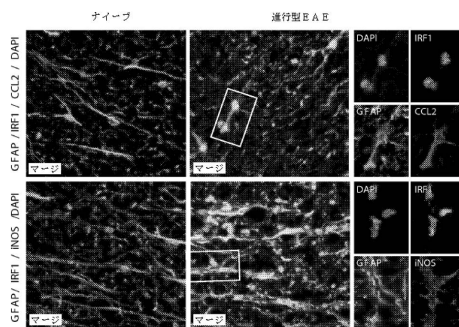


図14G

【図15-1】

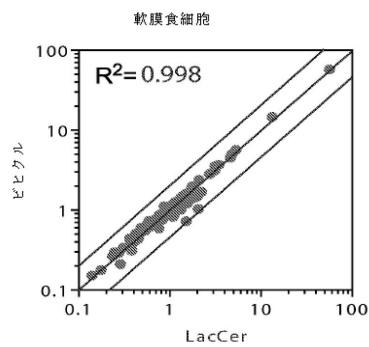


図15A

【図15-2】

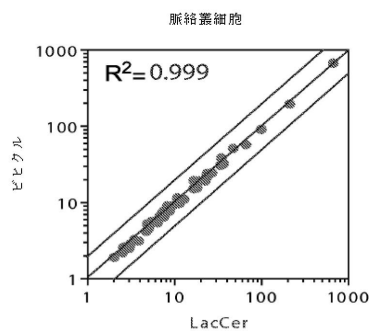


図15B

【図16】

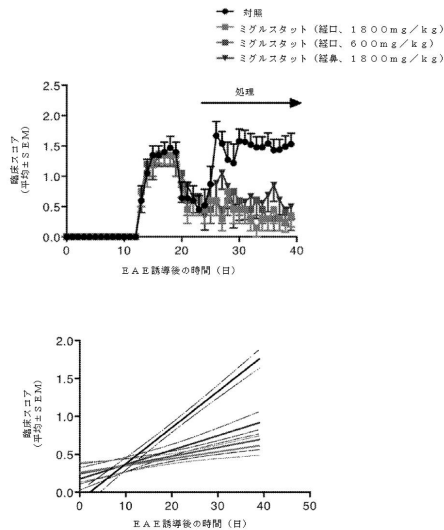


図16

【図 17】

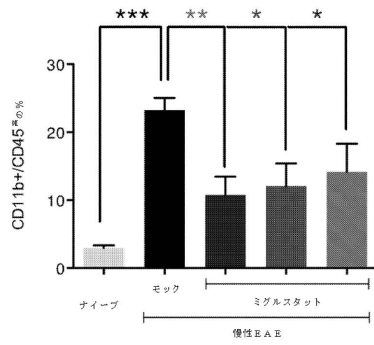


図17

【図 19】

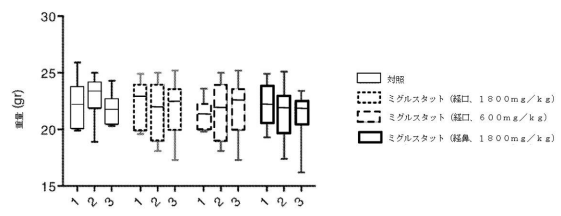


図19

【図 18】

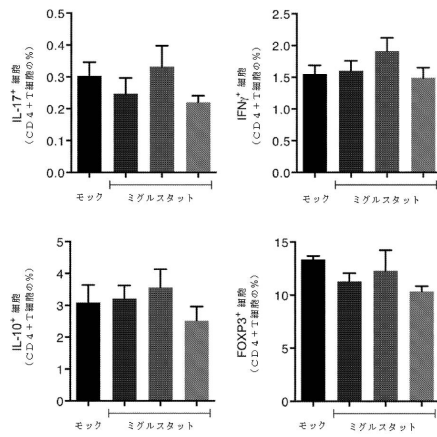


図18

【配列表】

0006550388000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 31/5375 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/445 (2006.01)		A 6 1 K 31/5375	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/445	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 31/7105	
C 1 2 N 9/96 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
		C 1 2 N 9/96	Z N A
		C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 キンタナ, フランシスコ ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 0, ジャマイカ ブレイン, サウス ストリート  
7 2 アパートメント 2

(72)発明者 マヨ, リオル

イスラエル国 5 3 4 2 1 フィヴァタイム, ハザンハニム 5

(72)発明者 ウェイナー, ハワード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 4 5, ブルックライン, コルボーン クレセント  
7 2

(72)発明者 ハルセ, レザ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 6, ボストン, ニューベリー ストリート 2 8  
0, アpartment 5

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 1 6 2 9 4 ( J P , A )

特表平 0 9 - 5 0 3 9 9 9 ( J P , A )

国際公開第 2 0 0 5 / 1 2 3 0 5 5 ( W O , A 2 )

特表 2 0 1 2 - 5 0 8 8 6 5 ( J P , A )

MAYO, L. et al., The Lactosylceramide synthase B4GALT6 controls astrocytes activation during chronic CNS inflammation, GLIA, 2 0 1 3 年 6 月, vol.6, no.S1, p.S158, XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Berlin Abstract Book

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8