

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/011337

発行日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(43) 国際公開日 平成15年2月13日(2003.2.13)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

A61K 45/00  
A61K 39/395  
A61P 25/00  
A61P 29/00  
C12Q 1/02

F I

A61K 45/00 ZNA  
A61K 39/395 D  
A61K 39/395 N  
A61K 39/395 Y  
A61P 25/00

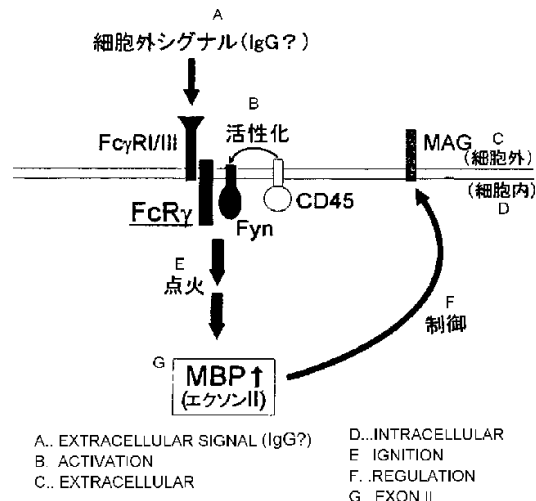
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-516567 (P2003-516567)	(71) 出願人	899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目15番45号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/007378	(74) 代理人	100098121 弁理士 間山 世津子
(22) 国際出願日	平成14年7月22日(2002.7.22)	(74) 代理人	100107870 弁理士 野村 健一
(31) 優先権主張番号	特願2001-229553 (P2001-229553)	(72) 発明者	中原 仁 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内
(32) 優先日	平成13年7月30日(2001.7.30)	(72) 発明者	阿相 皓晃 東京都板橋区栄町35-2 財団法人東京都老人総合研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	相磯 貞和 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

(54) 【発明の名称】 Fc 受容体 γ 鎖活性化物質を含有する医薬組成物

(57) 【要約】

Fc 受容体 鎖を活性化することができる物質(但し、静注用免疫グロブリンを除く)を有効成分として含有する医薬組成物およびミエリン形成促進剤が提供される。また、Fc 受容体 鎖を活性化することができる物質を有効成分として含有するオリゴデンドログリア前駆細胞分化促進剤、Fynチロシンキナーゼ活性化剤およびミエリン塩基性蛋白発現促進剤も提供される。さらに、オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞におけるFc 受容体 鎖の発現を指標として、ミエリン形成可能なオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞を検出する方法も提供される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

Fc受容体鎖を活性化することができる物質（但し、静注用免疫グロブリンを除く）を有効成分として含有する医薬組成物。

## 【請求項 2】

Fc受容体鎖を活性化することができる物質が、Fc受容体鎖に対するリガンドであって、以下の（A）、（B）および（C）のうちの少なくとも1つの作用を奏する前記リガンドである請求項1記載の医薬組成物。

（A）オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進する。

（B）Fynチロシンキナーゼを活性化する。

（C）ミエリン塩基性蛋白の発現を促進する。

10

## 【請求項 3】

Fc受容体鎖に対するリガンドが、抗Fc受容体鎖抗体である請求項2記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

Fc受容体鎖を活性化することができる物質が、Fc受容体鎖に会合することができるFc受容体のいずれかに対するリガンドであって、以下の（a）、（b）および（c）のうちの少なくとも1つの作用を奏する前記リガンドである請求項1記載の医薬組成物。

（a）オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進する。

（b）Fynチロシンキナーゼを活性化する。

（c）ミエリン塩基性蛋白の発現を促進する。

20

## 【請求項 5】

Fc受容体鎖に会合することができるFc受容体のいずれかに対するリガンドが、I型Fc受容体に対するリガンドである請求項4記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

I型Fc受容体に対するリガンドが、抗I型Fc受容体抗体である請求項5記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

Fc受容体鎖に会合することができるFc受容体のいずれかに対するリガンドが、II型Fc受容体に対するリガンドである請求項4記載の医薬組成物。

30

## 【請求項 8】

III型Fc受容体に対するリガンドが、抗III型Fc受容体抗体である請求項7記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

Fc受容体鎖を活性化することができる物質が、I型Fc受容体に対して結合性が高いIgGのサブクラスである請求項1記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

IgGのサブクラスがIgG3である請求項9記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

Fc受容体鎖を活性化することができる物質がIgG2bである請求項1記載の医薬組成物。

40

## 【請求項 12】

オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進するための請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物。

## 【請求項 13】

Fynチロシンキナーゼを活性化するための請求項1～12のいずれかに記載の医薬組成物。

## 【請求項 14】

ミエリン塩基性蛋白の発現を促進するための請求項1～13のいずれかに記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 15】

ミエリン形成を促進するための請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の医薬組成物。

## 【請求項 16】

脱髄疾患、髄鞘形成不全疾患および髄鞘破壊からなる群より選択される少なくとも 1 つの疾患を予防および / または治療するための請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の医薬組成物。

## 【請求項 17】

Fc 受容体 鎖を活性化することができる物質（但し、静注用免疫グロブリンを除く）を有効成分として含有するミエリン形成促進剤。

## 【請求項 18】

Fc 受容体 鎖を活性化することができる物質を有効成分として含有するオリゴデンドログリア前駆細胞分化促進剤。

## 【請求項 19】

Fc 受容体 鎖を活性化することができる物質を有効成分として含有する FcγR キナーゼ活性化剤。

## 【請求項 20】

Fc 受容体 鎖を活性化することができる物質を有効成分として含有するミエリン塩基性蛋白発現促進剤。

## 【請求項 21】

オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における Fc 受容体 鎖の発現を指標として、ミエリン形成可能なオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞を検出する方法。

## 【請求項 22】

さらに、PDGFR、MAG、A2B5、O4、O1、MBP、PLP、DM-20、CNPase、MOG、NG2 および AN2 からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も指標とする請求項 21 記載の方法。

## 【請求項 23】

免疫組織または細胞化学的解析により、動物の脳の組織または細胞における Fc 受容体 鎖の発現を調べる方法。

## 【請求項 24】

さらに、PDGFR、MAG、A2B5、O4、O1、MBP、PLP、DM-20、CNPase、MOG、NG2 および AN2 からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も調べる請求項 23 記載の方法。

## 【請求項 25】

遺伝子増幅法により、動物の脳の組織または細胞における Fc 受容体 鎖の発現を調べる方法。

## 【請求項 26】

ウェスタンブロット法により、動物の脳の組織または細胞における Fc 受容体 鎖の発現を調べる方法。

## 【請求項 27】

さらに、PDGFR、MAG、A2B5、O4、O1、MBP、PLP、DM-20、CNPase、MOG、NG2 および AN2 からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も調べる請求項 26 記載の方法。

## 【請求項 28】

抗 Fc 受容体 鎖抗体を含む、免疫組織または細胞染色試薬キット。

## 【請求項 29】

さらに、抗 PDGFR 抗体、抗 MAG 抗体、A2B5 抗体、O4 抗体、O1 抗体、抗 MBP 抗体、抗 PLP 抗体、抗 DM-20 抗体、抗 CNPase 抗体、抗 MOG 抗体、NG

10

20

30

40

50

2抗体およびAN2抗体からなる群より選択される少なくとも1つの抗体を含む、請求項28記載のキット。

【請求項30】

抗Fc受容体鎖抗体を含む、ウェスタンブロット試薬キット。

【請求項31】

さらに、抗PDGFR抗体、抗MAG抗体、A2B5抗体、O4抗体、O1抗体、抗MBP抗体、抗PLP抗体、抗DM-20抗体、抗CNPase抗体、抗MOG抗体、NG2抗体およびAN2抗体からなる群より選択される少なくとも1つの抗体を含む、請求項30記載のキット。

【請求項32】

Fc受容体鎖のmRNAを特異的に増幅することができる少なくとも1対のプライマーを含む、遺伝子増幅試薬キット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、Fc受容体鎖のリガンドを含有する医薬組成物、ミエリン形成促進剤、オリゴデンドログリア前駆細胞分化促進剤、Fynチロシンキナーゼ活性化剤、ミエリン塩基性蛋白発現促進剤、ミエリン形成可能なオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞を検出する方法、動物の脳の組織または細胞におけるFc受容体鎖の発現を調べる方法および試薬キットに関する。

背景技術

ミエリンは個々の神経軸索を包んでいる、多重層からなる膜状の鞘であるが、これは迅速な神経伝導に必要なだけでなく、軸索の機能や統合性の為にも必要なものである(1, 2)。ミエリンは中枢神経系(CNS)にて、オリゴデンドログリアによって形成され、この過程は生後間もなく起こる。ミエリンの障害はヒトにおいて重篤な病気をもたらす、多発性硬化症(MS)はその一つであり、CNSにおける重度のミエリン消失が特徴的である。この病気は一世紀以上に発見されているが、病因も治療法もほとんど分かっておらず、研究されていない(3)。最近になってようやく、MSの病巣においてオリゴデンドログリア前駆細胞の集団の存在が初めて報告された(4)。これらの内在性の前駆細胞を、消失したミエリンを再生するよう分化させる、あるいは強化させることができるような機構解明は、効果的な治療上の目標となる。従って、ミエリン形成機構の解明という包括的な研究は、脱髄疾患の治療の観点において非常に重要である。

ミエリンは限られた種類のミエリン蛋白より構成されている。ミエリン塩基性蛋白(MBP)はCNS内の全ミエリン蛋白のうち、30-40%を占めている。MBPはミエリン鞘の圧密化に決定的な役割を担っており、ミエリン形成に必須である(5)。MBPはまた他のミエリン蛋白、例えばMyelin-associated glycoprotein(MAG)の発現制御を行っており、ミエリン形成に極めて重要であることが示されている(6)。自然発生Shivererマウスは、MBP遺伝子の非人為的に生じた欠損があるが(7)、このマウスはCNS内軸索の重篤なミエリン低形成を引き起こし、3ヶ月以内に若年死してしまう。MBPのうちある特定のアイソフォーム、即ちMBP遺伝子のうちエクソン2を含むものは、ミエリン形成の制御的機能を担っているため(8)、ミエリン形成の初期段階ではMBPが必要であることが示唆されている。

ミエリン形成過程において、Fynチロシンキナーゼ(Fyn)はオリゴデンドログリア内の重要な信号伝達分子として働いており(9)、MBPの発現を促進する(10)。Fyn欠損マウスはMBP量の重篤な減少を起こし、重度のミエリン形成不全を起こす(9-11)。Fynは非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞外シグナルを受けるためには、アダプターとなる分子と会合する必要がある。Myelin-associated glycoprotein(MAG)は、ミエリン形成時初期のFynシグナルを始動させる候補分子と提唱されてきたが(9-13)、MAG欠損マウスはほとんどミエリン異常を呈しなかった(14, 15)。MBP発現については、MAG欠損マウスで顕著な差異が確認されず(14-16)、MAGがFynの上位シグナル分子であって細胞外シ

10

20

30

40

50

グナルを F y n に伝えているとの可能性が疑問視されるに至った。研究者によっては、M A G 欠損マウスでは何らかの分子が機能を代償していることを提唱したが、しかしながら、そのような分子はまだ発見されていない ( 1 7 , 1 8 )。

M A G はミエリン形成の始動分子にあらず、これまでに知られていない分子が始動を担っていることが示唆された ( 6 )。更に、*in vitro* の報告では、オリゴデンドログリアの形態的分化時の F y n 活性化は M A G の初発現以前に起こることが示されている ( 1 9 )。*In vivo* では、M B P が M A G の発現を制御しているのである ( 6 )。

本発明は、F y n と機能的に会合し、M B P の初発現をもたらす、始動分子を明らかにすることにより、ミエリン形成の障害によりもたらされる疾患の治療戦略を得ることを目的とする。この分子、即ち、本当のミエリン形成の始動分子は、M A G の初発現 ( 生後 2 週目初期 ; 6 , 2 0 ) よりも前に発現してなくてはならない。このシグナルカスケードを明らかにすることで、ミエリン形成の裏にある機構を細密に理解することができよう。

#### 発明の開示

本発明者らは、免疫系における重要なシグナル伝達分子である、免疫グロブリン F c 受容体鎖 ( F c R ) ( 総説は 2 1 参照 ) がミエリン形成に関与していることを明らかにした。F c R は F y n と会合し ( 2 1 )、オリゴデンドログリア内の M B P 初発現を制御している。本発明者らはこの F c R - F y n - M B P カスケードがミエリン形成に重要であることを提唱する。本発明者らは免疫グロブリン G に特異的な F c 受容体がオリゴデンドログリア内に発現していることを検出し、これにより、抗体 - F c 受容体相互作用がミエリン形成を制御している可能性が示唆された。C D 4 5 は F y n の制御分子であるが ( 2 2 )、この分子はミエリン形成時にオリゴデンドログリア内にて F c R を共発現している。またこの分子がミエリン形成過程に関わっていることは、M S の一部の患者集団で C D 4 5 に変異があることが発見されたこと ( 2 3 ) により支持される。本発明者らの発見は脳と免疫系の間にある連携を紹介するもので、ミエリン形成機構を明らかにするものである。この相互関連を明らかにすることで、M S を含めた脱髄疾患 / 髄鞘形成不全疾患の将来的な治療戦略が得られた。本発明は、以上の知見に基づいて完成されたものである。

本発明の要旨は、以下の通りである。

( 1 ) F c 受容体鎖を活性化することができる物質 ( 但し、静注用免疫グロブリンを除く ) を有効成分として含有する医薬組成物。

( 2 ) F c 受容体鎖を活性化することができる物質が、F c 受容体鎖に対するリガンドであって、以下の ( A )、( B ) および ( C ) のうちの少なくとも 1 つの作用を奏する前記リガンドである ( 1 ) 記載の医薬組成物。

( A ) オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進する。

( B ) F y n チロシンキナーゼを活性化する。

( C ) ミエリン塩基性蛋白の発現を促進する。

( 3 ) F c 受容体鎖に対するリガンドカンドが、抗 F c 受容体鎖抗体である ( 2 ) 記載の医薬組成物。

( 4 ) F c 受容体鎖を活性化することができる物質が、F c 受容体鎖に会合することができる F c 受容体のいずれかに対するリガンドであって、以下の ( a )、( b ) および ( c ) のうちの少なくとも 1 つの作用を奏する前記リガンドである ( 1 ) 記載の医薬組成物。

( a ) オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進する。

( b ) F y n チロシンキナーゼを活性化する。

( c ) ミエリン塩基性蛋白の発現を促進する。

( 5 ) F c 受容体鎖に会合することができる F c 受容体のいずれかに対するリガンドが、I 型 F c 受容体に対するリガンドである ( 4 ) 記載の医薬組成物。

( 6 ) I 型 F c 受容体に対するリガンドが、抗 I 型 F c 受容体抗体である ( 5 ) 記載の医薬組成物。

( 7 ) F c 受容体鎖に会合することができる F c 受容体のいずれかに対するリガンド

10

20

30

40

50

- が、III型Fc受容体に対するリガンドである(4)記載の医薬組成物。
- (8) III型Fc受容体に対するリガンドが、抗III型Fc受容体抗体である(7)記載の医薬組成物。
- (9) Fc受容体鎖を活性化することができる物質が、I型Fc受容体に対して結合性が高いIgGのサブクラスである(1)記載の医薬組成物。
- (10) IgGのサブクラスがIgG3である(9)記載の医薬組成物。
- (11) Fc受容体鎖を活性化することができる物質がIgG2bである(1)記載の医薬組成物。
- (12) オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進するための(1)~(11)のいずれかに記載の医薬組成物。 10
- (13) Fynチロシンキナーゼを活性化するための(1)~(12)のいずれかに記載の医薬組成物。
- (14) ミエリン塩基性蛋白の発現を促進するための(1)~(13)のいずれかに記載の医薬組成物。
- (15) ミエリン形成を促進するための(1)~(14)のいずれかに記載の医薬組成物。
- (16) 脱髄疾患、髄鞘形成不全疾患および髄鞘破壊からなる群より選択される少なくとも1つの疾患を予防および/または治療するための(1)~(15)のいずれかに記載の医薬組成物。
- (17) Fc受容体鎖を活性化することができる物質(但し、静注用免疫グロブリンを除く)を有効成分として含有するミエリン形成促進剤。 20
- (18) Fc受容体鎖を活性化することができる物質を有効成分として含有するオリゴデンドログリア前駆細胞分化促進剤。
- (19) Fc受容体鎖を活性化することができる物質を有効成分として含有するFynチロシンキナーゼ活性化剤。
- (20) Fc受容体鎖を活性化することができる物質を有効成分として含有するミエリン塩基性蛋白発現促進剤。
- (21) オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞におけるFc受容体鎖の発現を指標として、ミエリン形成可能なオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞を検出する方法。 30
- (22) さらに、PDGFR、MAG、A2B5、04、01、MBP、PLP、DM-20、CNPase、MOG、NG2およびAN2からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も指標とする(21)記載の方法。
- (23) 免疫組織または細胞化学的解析により、動物の脳の組織または細胞におけるFc受容体鎖の発現を調べる方法。
- (24) さらに、PDGFR、MAG、A2B5、04、01、MBP、PLP、DM-20、CNPase、MOG、NG2およびAN2からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も調べる(23)記載の方法。 40
- (25) 遺伝子増幅法により、動物の脳の組織または細胞におけるFc受容体鎖の発現を調べる方法。
- (26) ウェスタンブロット法により、動物の脳の組織または細胞におけるFc受容体鎖の発現を調べる方法。
- (27) さらに、PDGFR、MAG、A2B5、04、01、MBP、PLP、DM-20、CNPase、MOG、NG2およびAN2からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も調べる(26)記載の方法。
- (28) 抗Fc受容体鎖抗体を含む、免疫組織または細胞染色試薬キット。
- (29) さらに、抗PDGFR抗体、抗MAG抗体、A2B5抗体、04抗体、01 50

抗体、抗MBP抗体、抗PLP抗体、抗DM-20抗体、抗CNPase抗体、抗MOG抗体、NG2抗体およびAN2抗体からなる群より選択される少なくとも1つの抗体を含む、(28)記載のキット。

(30) 抗Fc受容体鎖抗体を含む、ウェスタンブロット試薬キット。

(31) さらに、抗PDGFR抗体、抗MAG抗体、A2B5抗体、O4抗体、O1抗体、抗MBP抗体、抗PLP抗体、抗DM-20抗体、抗CNPase抗体、抗MOG抗体、NG2抗体およびAN2抗体からなる群より選択される少なくとも1つの抗体を含む、(30)記載のキット。

(32) Fc受容体鎖のmRNAを特異的に増幅することができる少なくとも1対のプライマーを含む、遺伝子増幅試薬キット。

本明細書において、「Fc受容体鎖を活性化する」とは、FcR依存性の細胞内カスケードを始動ないし増強させることをいう。FcR依存性の細胞内カスケードとしては、FcR-Fyn-MBPカスケードを例示することができる。このFcR-Fyn-MBPカスケードは、FcRがFynと会合し、オリゴデンドログリア内のMBP初発現を制御しているものであることが本発明者らによって実証された。

例えば、Fc受容体鎖を抗体で架橋することにより、Fc受容体鎖を活性化することができる。あるいは、Fc受容体鎖が会合している、I型Fc受容体(以下、「FcRI」と記す)やIII型Fc受容体(以下、「FcRIII」と記す)(IgGのFc受容体)を、これらに対する抗体で架橋することでFc受容体鎖を活性化することができる。また、FcRIに対する抗体で架橋するとFcRが活性化されるという報告がある(総説: H. Turner & J. P. Kinet Nature 402, B24 (1999)、及び同総説内引用文献を参照)。FcRIの架橋ではLyn、Syk、PLC等の複雑なCouplingを経て、IP3Rによるカルシウムシグナルや、ERK、JNKなどの調節を行うことが報告されている(総説: H. Turner & J. P. Kinet Nature 402, B24 (1999)、及び同総説内引用文献を参照; FcRsについてはJ. V. Ravetch & S. Bolland Ann. Rev. Immunol. 19, 275 (2001)、及び同総説内引用文献を参照)。FcRIの下流も、FcRsの下流も全て、FcR依存性のカスケードであると考えられる。しかるに、FcRは細胞特異的にカスケードを持っているようである。

「静注用免疫グロブリン」とは、不特定多数の免疫グロブリンプールより抽出された免疫グロブリンであり、Polyclonalであり、主な成分はIgGである。これは医療用IVIgとして使用されている。

「Fc受容体鎖に対するリガンド(以下、「FcRに対するリガンド」と記す)」とは、Fc受容体鎖(以下、「FcR」と記す)に特異的に結合する物質をいう。

「オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進する」とは、オリゴデンドログリア前駆細胞がオリゴデンドログリアに成熟するまでの間に観察される何らかの形態的・化学的变化をもたらすことをいう。例えば、オリゴデンドログリア前駆細胞から突起が生じること、或いはMBP等のミエリン形成に必須の蛋白質の発現が増大することなどが含まれる。

「Fynチロシンキナーゼを活性化する」とは、Fynチロシンキナーゼの酵素活性を上昇させること(質的な上昇)、Fynそのものの発現(mRNAや蛋白)を上昇させること(数的な上昇)のいずれか一方または両方の作用を奏することをいう。ちなみに、この質的な上昇にはCD45が必要であろうと推測される。

「ミエリン塩基性蛋白の発現を促進する」とは、ミエリン塩基性蛋白の発現を引き起こす、あるいは上昇させることをいい、ミエリン塩基性蛋白の発現はRNAレベルでも、蛋白質レベルのいずれであってもよい。

ミエリン塩基性蛋白(以下、「MBP」と記す)としては、14.0、17.0、18.5、21.5 kDのアイソフォームが知られており、これらのアイソフォームはMBP遺伝子上の7つのエクソンの選択的使用によって生じる。FcRに対するリガンドにより発現が促進されるのは、主にエクソン2を有するアイソフォーム(17.0及び21.5

10

20

30

40

50

k Dのアイソフォーム)である。

「Fc受容体鎖に会合する」とは、Fc受容体鎖に機能的ないし物理的に共役していることを言い、例えば、FcRIでは、その構成分子の一つとしてFcRが含まれ(物理的共役)、かつ、FcRIのシグナルカスケードはFcR依存性である(機能的共役)。

「ミエリン形成を促進する」とは、脱髄疾患では脱落した髄鞘を置換ないし修復することであり、髄鞘形成不全疾患では不完全に形成された髄鞘を完全化ないし置換修復することであり、移植・再生医療においては、外来的に導入されたオリゴデンドログリアないしその前駆細胞が体内で実際に髄鞘を形成するべく刺激し、形成能を強化することである。

「脱髄疾患」とは、形成された髄鞘が何らかの理由により変性あるいは脱落する疾患をいい、「髄鞘形成不全疾患」とは、何らかの理由により髄鞘形成そのものが障害される疾患をいい、「移植・再生医療」とは何らかの方法にて調整したオリゴデンドログリアを患者に移植し、障害を来している髄鞘を置換修復し、あるいは低形成(無形成)の髄鞘を人為的に補うべく髄鞘を形成させる医療のことをいう。

「脱髄疾患」の例としては、多発性硬化症、視神経脊髄炎、急性散在性脳脊髄炎等が含まれる。「髄鞘形成不全疾患」の例としては、Krabbe病、Metachromatic Leukodystrophy、Adrenoleukodystrophy等が含まれる。他の代謝異常により髄鞘が形成不全を起こす疾患等は、髄鞘形成不全疾患でありながら代謝異常疾患に分類されることも多いが、何らかの理由で髄鞘形成が障害されれば、全て髄鞘形成不全疾患と定義することができる。

「髄鞘破壊」とは、形成された、あるいは形成途上の髄鞘が、何らかの理由により、物理的な崩壊を伴って髄鞘の機能を失わせることを言う。例えば、脳脊髄炎などでは、一般に免疫系細胞が炎症性に髄鞘を破壊する。

本発明のミエリン形成可能なオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞を検出する方法において、オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞におけるFcRの発現を指標とするが、Fc受容体鎖の発現は、RNAレベルでも、蛋白質レベルのいずれであってもよい。

「マーカー」とは、特定組織・細胞のIdentity(属性)を調べる上で、指標となる物質(例えばFcR)、或いは、その指標を検索する上で有用な物質(例えば抗FcR抗体)をいう。

「免疫組織または細胞化学的解析」とは、組織または細胞に存在する特定の抗原を抗原-抗体反応によって検出する手法である。例えば、組織または細胞に存在する特定の抗原を標識抗体で可視化し、顕微鏡下で観察する(直接法)。また、抗原に特異的な一次抗体と一次抗体に特異的な標識二次抗体を使用する方法(間接法)もある。フローサイトメトリー(FACS)によって、二次抗体にラベルしている蛍光を感知することもできる。

「遺伝子増幅法」とは、DNAポリメラーゼを用いて連鎖反応的にDNAを増幅する方法をいう。

「ウェスタンブロット法」とは、電気泳動によって分離された蛋白質をニトロセルロース膜、PVDF膜などに転移し、その蛋白質を抗体によって検出する方法をいう。

本発明の一態様において、FcRを活性化することができる物質を有効成分として含有する医薬組成物は、脱髄疾患、髄鞘形成不全疾患および髄鞘破壊からなる群より選択される少なくとも1つの疾患を予防および/または治療するために使用することができる。また、将来的には、神経幹細胞、ES細胞、献体由来のオリゴデンドログリアを移植・再生させる治療が行われると考えられ(末梢神経系でミエリンを形成するシュワン細胞を中枢神経系に移植する人体実験が、現在Yale Univ.で始まっている)、そのような治療が可能になった際には、ミエリン形成のBoosterとして当該技術を応用することが可能である。また、二次的に生じた髄鞘破壊(神経軸索の破壊が先行して髄鞘が破壊されたケース等)においても、神経軸索を人為的に修復しようとする試みが可能になれば、同様にしてオリゴデンドログリア移植・髄鞘再生が必要になると考えられ、この際もBoosterとして当該技術を応用し得る。

10

20

30

40

50

本発明の別の態様において、FcR をオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞のマーカーとして利用することができる。FcR 陽性オリゴデンドログリアは、ミエリン形成のポテンシャルを持っている細胞として見ることができる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2001-229553号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

発明の実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の医薬組成物はFcR を活性化することができる物質を有効成分として含有する。FcR を活性化することができる物質としては、FcR に対するリガンドであって、以下の(A)、(B)および(C)のうちの少なくとも1つの作用を奏する前記リガンドを挙げることができる。

10

(A)オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進する。

(B)Fynチロシンキナーゼを活性化する。

(C)ミエリン塩基性蛋白の発現を促進する。

あるいは、(A)~(C)のいずれの作用を持たなくても、FcR に特異的に結合して、ミエリン形成を促進する物質であればよい。FcR に対するリガンドとしては、抗FcR 抗体などを挙げることができる。抗FcR 抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。

抗FcR 抗体は、常法に従って調製することができる。

例えば、ポリクローナル抗体を調製するには、免疫抗原のFcR を動物に接種して免疫を行い、該免疫動物から抗FcR 抗体含有物を採取し、抗体を分離精製すればよい。あるいは、FcR の部分ペプチドを使用することも可能である。また、FcR の塩基配列(GenBank M33195(ヒトの場合))より予測され、合成された人工ペプチドで免疫することも可能である。この際は、短いペプチド(一般に6~18アミノ酸残基)を免疫原として用いるならば、Keyhole limpet haemocyaninなどのキャリア蛋白との複合体にするとよい。蛋白投与の場合は通常、50~100μgで免疫する。

20

モノクローナル抗体を調製するには、上記免疫動物から抗体価の高い個体を選び、最終免疫3~5日後に脾臓あるいはリンパ節を採取、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させ、安定的に力価の高い抗体を産生するハイブリドーマを選択する。該ハイブリドーマを動物の腹腔内で増殖させ、腹水からモノクローナル抗体を精製してもよいし、動物の血清等からモノクローナル抗体を精製してもよい。あるいはまた、ハイブリドーマを培地で培養して、モノクローナル抗体を生成させた後、該モノクローナル抗体を培養上清などから精製してもよい。モノクローナル抗体作成法は、P.N.Nelson et al., J.Clin.Pathol.:Mol.Pathol.53,111-117(2000)に記載されているので、これを参考として本明細書に引用する。

30

免疫抗原のFcR の調製方法は、Takaiらの論文(58)か、その論文内の引用文献にて記載されているので、これらを参考として本明細書に引用する。ヒトの場合は、公開されているヒトFcR の配列(GenBank M33195(ヒトの場合))を元に合成ペプチドを作ることは容易である。

40

動物の免疫にあたっては、免疫抗原であるFcR を動物(例えば、哺乳動物)に対して投与による抗体産生が可能な部位に単独であるいは担体、希釈剤とともに投与する。投与は、皮下注射による投与が好ましい。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常1週間毎に1回ずつ、モノクローナルならば1~2回、ポリクローナルならば3~4回行うとよい。

免疫する動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられる。

抗体は上記の方法で免疫された動物の血液、腹水などから採取される。抗体価の測定で最も多く使われるのはELISA(Enzyme Linked Immunosorb

50

ent Assay)法である。更に細かく検討するには、免疫細胞化学やWestern Blotを行うとよい。詳細については、Nelsonらの論文(P. N. Nelson et al., J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol. 53, 111-117 (2000))を参照するとよい。

抗体の分離精製は免疫グロブリンの分離精製法(例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例えば、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合物あるいはプロテイン-A等の活性吸着剤により特異抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法)に従って行うことができる。

このようにして作製された抗体は、IgGを主たる成分とし、IgM, IgA等、他の免疫グロブリンも含む。この抗体はFcRと特異的に結合する。

上記のポリクローナル抗体の調製法と同様に免疫された動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の1週間以内に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、抗FcR抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495 (1975))に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどを使用することができるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髄腫細胞としては、例えば、Sp2/0、NS1、NS0、X63Ag8等があげられるが、特にSp2等が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1~1:2程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が50%程度の濃度で添加され、37度で20~30分インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗FcRモノクローナル抗体の分離精製は上記のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。

抗FcR抗体は、FcRに特異的に結合して、所望の効果を奏するものであれば、IgG、IgA、IgMのいかなるクラスのものでもあってもよく、またそれらからFcあるいはFc領域を除去したFab'あるいはFab画分あるいはその重合体でもよい。また、抗FcR抗体の可変遺伝子部と、ヒトイムノグロブリン定常遺伝子とを融合させ、組み換え体として発現させたキメラ抗体を用いることもできる。

また、抗FcR抗体は、脳内に存在する酵素で壊れるような糖鎖で修飾されていてもよい。

抗FcR抗体以外のFcRを活性化することができる物質としては、以下のものを例示することができる。

- 1) 抗FcRI抗体
- 2) 抗FcRIII抗体
- 3) FcRIIのアンタゴニスト
- 4) FcRの構造よりFcRとの結合能が推測される人工化合物
- 5) IgGの中でもFcRIに結合性が高いIgGのサブクラス
- 6) 抗FcRI抗体

1)の抗FcRI抗体および2)の抗FcRIII抗体は、それぞれ、免疫抗原として、FcRIおよびFcRIIIを用い、前述の抗FcR抗体の調製方法に順じて調製することができる。

3)のFcRIIのアンタゴニストは、FcRに対して抑制的(負に)働く機能を抑制する作用を持つ物質であればよい。

FcRII(H型Fc受容体)はFcRの活性に対して抑制的に働くので、これをアンタゴニスト(antagonist)でブロックした上で、FcRを刺激をしてやると効果が高まると考えらる。

4)のFcRの構造よりFcRとの結合能が推測される人工化合物は、FcRを活性化することができる物質であればよく、FcRとの結合能は、IP-Westernなどにより推測することができる。例えば、その化合物をオリゴデンドログリアと反応さ

10

20

30

40

50

せてやり、FcR 抗体で免疫沈降反応 (IP: immunoprecipitation) をして、釣った物質が人工化合物であれば、結合能があると推定される。上記のようにしてFcR との結合能が推測された人工化合物は、市販されているものを購入してもよいし、化学合成してもよい。

5) のIgGの中でもFcRIに結合性が高いIgGのサブクラスとしては、ヒトの場合、IgG3、IgG1、IgG4、IgG2などを例示することができ、マウスの場合、IgG2a、IgG1、IgG2b、IgG3などを例示することができる。FcRIは高親和性IgG受容体、FcRIIは低親和性IgG受容体である。そこでFcRIを活性化するには、FcRIに結合能が高いIgGサブクラス、ヒトの場合は例えばIgG3を選択的に投与するとよい。関連する総説としては、J. E. Gessner et al., Ann. Hematol. 76, 231-248 (1998)を参照されたい。これらのIgGのサブクラスは、サブクラスが特定されたmonoclonal hybridomaより得られたIgGをpolyclonalとなるように混合するか、或いは、反応性の無いhybridomaの抗体を得ることにより調製することができる。

10

6) の抗FcRI抗体は、免疫抗原として、FcRIを用い、前述の抗FcR抗体の調製方法に順じて調製することができる。

上記のようなFcRを活性化することができる物質は、1種類のみ用いてもよいし、複数種を組み合わせて使用してもよい。

FcRを活性化することができる物質は単独で、あるいは、薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とともに、適当な剤型の医薬組成物として、哺乳動物(例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の脱髄疾患(例えば、多発性硬化症)の予防・治療のために使用する場合には、FcRを活性化することができる物質(例えば、抗FcR抗体)を1回量として通常150~500mg/kg体重程度、好ましくは400~500mg/kg体重程度を、1か月に1~2回程度、好ましくは治療開始時に同量を2~3日連続して、静脈注射により投与するとよい。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合にはその症状に応じて増量してもよい。

20

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は常法により製造することができ、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有してもよい。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどがあげられる。

30

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などがあげられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤型であるとよい。かかる注射剤は常法、すなわちFcRを活性化することができる物質を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製される。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノール)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤(例えば、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil))などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は通常適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、FcRを活性化することができる物質を通常坐薬用基剤に混合することによって調製することができる。

40

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、有効成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されるとよい。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、

50

注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられる。

また、上記の医薬組成物は、FcR を活性化することができる物質との配合により好ましくない相互作用を生じない限り、他の有効成分を含有してもよい。例えば、効果を強化するために、FcRII に対するアンタゴニストを投与してもよい。

Fc 受容体鎖を活性化することができる物質は、上記のような医薬品として使用できるだけでなく、他の用途にも使用できる。例えば、ミエリンの形成促進、オリゴデンドログリア前駆細胞の分化促進、Fynチロシンキナーゼの活性化、ミエリン塩基性蛋白の発現促進などを目的する、実験用の試薬、オリゴデンドログリア前駆細胞の人為的培養システムに用いる添加剤などとして、使用することができる。

本発明のミエリン形成可能なオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞を検出する方法においては、オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞におけるFcR の発現を指標とする。オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞におけるFcR の発現は、後述の実施例に記載のような方法（例えば、免疫組織または細胞化学的解析、遺伝子増幅法、ウェスタンブロット法など）で調べることができる。さらに、PDGFR、MAG、A2B5、04、01、MBP、PLP、DM-20、CNPase、MOG、NG2およびAN2 からなる群より選択される少なくとも1つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も指標とするとよい。これらのマーカーの発現を指標とすることで、より正確な検出を行うことができるようになる。上記のマーカーのうち、未熟オリゴデントログリアのマーカーである04、PDGFR、NG2、DM-20を選択することが好ましい。

免疫組織または細胞化学的解析により、動物の脳の組織または細胞におけるFcR の発現を調べる方法の手順の一例を以下に説明する。

免疫組織化学的解析の場合、まず、動物から取り出した脳の組織を固定し、その後、パラフィン切片を作製する。脱パラフィン処理を行った後、この切片上に一次抗体を滴下し、適当な温度で適当な時間反応させる。1次反応後、切片を洗浄し、次いで、二次抗体を適当な温度で適当な時間反応させる。二次抗体として、Biotin標識二次抗体を用いた切片に関しては、更にHRP標識ストレプトアビジンを適当な温度で適当な時間反応させる。切片を洗浄した後、DABを含む溶液にて染色を行う。また、メチルグリーンなどを用いてカウンター染色を行うとよい。

免疫細胞化学的解析の場合には、固定した後、切片化する必要がないため、この過程を飛ばして一次抗体反応へ入ることができる。また一般的に、細胞の場合は二次抗体に蛍光色素（FITCなど）をラベルしておいて、蛍光顕微鏡にて観察する。

免疫組織または細胞化学的解析により、動物の脳の組織または細胞におけるFcR の発現を調べる方法の手順の詳細については、後述の実施例の記載を参照されたい。

遺伝子増幅法により、動物の脳の組織または細胞におけるFcR の発現を調べる方法の手順の一例を以下に説明する。

動物の脳の組織または細胞から全RNAを抽出し、適当なプライマー対を用いて、RT-PCRによりFcR のmRNAを検出する。適当なプライマー対は、例えば、GenBank M33195のヒトFcR - mRNAの塩基配列（配列番号15）の特定の領域を特異的に増幅できるように設計する。増幅すべき特定の領域を見極めるポイントは以下の通りである。

- 1) 制限酵素がうまく使える領域をおさえる。
- 2) できるだけC, Gの含有量が多くなるようにする。

後述の実施例では、GenBank NM010185のマウスFcR - mRNA配列（配列番号17）から予測を立て、プライマー対（配列番号1および2）を設計した。配列番号1で表されるプライマーは、配列番号17のFcR - mRNA配列中の178 - 195番目の配列を、配列番号2で表されるプライマーは、284 - 303番目の配列を認識するように作成した。

遺伝子増幅法により、動物の脳の組織または細胞におけるFcR の発現を調べる方法の手順の詳細については、後述の実施例の記載を参照されたい。

ウェスタンブロット法により、動物の脳の組織または細胞における F c R の発現を調べる方法の手順の一例を以下に説明する。

動物の脳の組織または細胞から蛋白質の試料液を調製し、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) にかける。電気泳動の済んだ S D S - P A G E ゲルをメンブレンに転写した後、ブロッキングを行い、メンブレンを洗浄し、一次抗体、酵素標識二次抗体の順に反応を行い、適当な洗浄を行った後で、酵素の基質を加えて発色させる。ウェスタンブロット法により、動物の脳の組織または細胞における F c R の発現を調べる方法の手順の詳細については、後述の実施例の記載および C . S e i w a , I . S u g i y a m a , T . Y a g i , T . I g u c h i , H . A s o u , N e u r o s c i , R e s . 3 7 , 2 1 ( 2 0 0 0 ) を参照されたい。

上記の免疫組織または細胞化学的解析およびウェスタンブロット法において使用できる一次抗体および二次抗体としては、後述の付記事項の 3 5 ) に記載のものを挙げる事ができる。

上記のような方法において、F c R の発現が確認されたオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞はミエリン形成が可能であると判定される。この判定は、脱髄疾患、髄鞘形成不全疾患、髄鞘破壊などの疾患の進行度や治療の予後の診断に利用できる。即ち、F c R 陽性細胞 ( オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞 ) が残っているならば、ミエリンが再生する可能性があることを示している訳であるから、F c 受容体 鎖を活性化することができる物質 ( 例えば、抗 F c R 抗体等 ) を使用した刺激治療も有効であろうと考えられる。或いは、真に脱髄が酷く、再生しても再生しても脱髄が起きる場合、オリゴデンドログリアまたはその前駆細胞は死滅する可能性があると考えられる。このような場合は F c R 陽性細胞は消失しているであろうし、また刺激治療もあまり大きな効果を得ないであろうと予測される。F c R 陽性細胞が多い方が予後は良いであろう。ただ、例外として、F c R を介するシグナル経路に変異や異常がある場合は除く。この場合は F c R 陽性細胞が存在していても、その経路が動かないと予測され、予後は悪いと考えるのが妥当である。

また、本発明は、免疫組織または細胞化学的解析、遺伝子増幅法またはウェスタンブロット法のいずれかの方法により、動物の脳の組織または細胞における F c R の発現を調べる方法を提供する。本発明のこれらの方法は、ミエリン形成可能なオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞を検出するのに有用である。F c R の発現が確認されたオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞はミエリン形成が可能であると判定され、この判定は、脱髄疾患、髄鞘形成不全疾患、髄鞘破壊などの疾患の進行度や治療の予後の診断に利用できる。

また、免疫組織若しくは細胞化学的解析、またはウェスタンブロット法のいずれかの方法により、動物の脳の組織または細胞における F c R の発現を調べる場合には、さらに、P D G F R、M A G、A 2 B 5、0 4、0 1、M B P、P L P、D M - 2 0、C N P a s e、M O G、N G 2 および A N 2 からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカーのオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞における発現も調べるとよい。

さらに、本発明は、抗 F c R 抗体を含む、免疫組織または細胞染色試薬キットおよびウェスタンブロット試薬キットを提供する。これらの試薬キットは、さらに、抗 P D G F R 抗体、抗 M A G 抗体、A 2 B 5 抗体、0 4 抗体、0 1 抗体、抗 M B P 抗体、抗 P L P 抗体、抗 D M - 2 0 抗体、抗 C N P a s e 抗体、抗 M O G 抗体、N G 2 抗体および A N 2 抗体からなる群より選択される少なくとも 1 つの抗体を含んでもよい。これらの抗体は、N . B a u m a n n & D . P h a m - D i n h , P h y s i o l . R e v . , 8 1 , 8 7 1 - 9 2 7 ( 2 0 0 1 ) の総説に記載の方法で調製することができる。

抗 F c R 抗体、抗 P D G F R 抗体、抗 M A G 抗体、A 2 B 5 抗体、0 4 抗体、0 1 抗体、抗 M B P 抗体、抗 P L P 抗体、抗 D M - 2 0 抗体、抗 C N P a s e 抗体、抗 M O G 抗体、N G 2 抗体および A N 2 抗体は、蛍光色素、酵素、重金属などで標識されていてもよい ( 直接法 ) 。あるいは、これらの抗体を標識する代わりに、これらの抗体 ( 一次抗体 ) に特異的な抗体 ( 二次抗体 ) を蛍光色素、酵素、重金属などで標識したものをを用いてもよ

10

20

30

40

50

い（間接法）。

本発明の免疫組織または細胞染色試薬キットは、さらに、発色剤（例えば、DAB）、過酸化水素水（内因性 peroxidase の消去、DAB の活性化に使う）、バッファー（例えば、PBS (Phosphate Buffered Saline)）、カウンター染色用色素（例えば、メチルグリーン）、カバースリップ（使用抗体量を減らすために、切片の上にかけるプラスチックカバー）などを含んでもよい。

本発明のウェスタンブロット試薬キットは、さらに、転写用バッファー、ブロッキング試薬、洗浄液などを含んでもよい。

本発明は、また、FcR の mRNA を特異的に増幅することができる少なくとも 1 対のプライマーを含む、遺伝子増幅試薬キットを提供する。プライマーは、例えば、対象とする検体の生物種の FcR - mRNA の塩基配列（ヒトの場合、GenBank M33195（配列番号 15）、マウスの場合、GenBank NM\_010185（配列番号 17））の特定の領域を特異的に増幅できるように設計したものであるとよい。

プライマーは、15 ~ 30 塩基の長さであるとよく、好ましくは、20 ~ 25 塩基の長さである。プライマーの例としては、配列番号 1 の塩基配列を有するもの、配列番号 2 の塩基配列を有するものなどを挙げるができる。

本発明の遺伝子増幅試薬キットは、さらに、reverse transcriptase（逆転写酵素）、DNA polymerase（DNA ポリメラーゼ）、RNase-free water、Buffer、Control mRNA、Control primer set、dNTP mix 等を含んでもよい。

本発明の試薬キットを用いることにより、動物の脳の組織または細胞における FcR の発現を調べることができる。

本発明の試薬キットは、説明書を含み、包装されていてもよい。説明書には、キットの使用法、結果の解析方法などが記載されているとよい。

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

〔実施例 1〕

#### In vitroにおける FcR のオリゴデンドログリア内発現

免疫系においては、Src ファミリーのチロシンキナーゼのシグナル伝達は、ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) のドメインを細胞内に持つような分子との相互作用が関与している (24; 総説は 25 参照)。Src ファミリーチロシンキナーゼは ITAM のチロシン残基をリン酸化し、細胞内シグナル伝達を始動させる (26)。Fyn は Src ファミリーの一員であり、ミエリン形成初期に重要である (9)。この事実は、ミエリン形成初期過程のオリゴデンドログリアにて発現しているような、ITAM を擁する分子が、ミエリン形成に関与している可能性を示唆する。FcR は Fyn でリン酸化される細胞内 ITAM を擁している (27)、候補の一つであるが、これまでにこの免疫学上の分子がオリゴデンドログリア系の細胞に存在していることは示されていない。

以下は、オリゴデンドログリア系に FcR が存在していることに関連する、初めての報告となる。マウス CNS より単離された、培養オリゴデンドログリア前駆細胞 (OPC) (28, 29) より全 RNA が抽出されたが、この時期にはまだ MAG は発現していない (30)。しかしながら、FcR の mRNA は RT-PCR により検出され (31)、発現程度は肥満細胞と匹敵するレベルであった (図 1A-a)。CD3 はまた ITAM を擁する分子であり (21)、神経細胞系の発達や可塑性に関与しているが (32)、OPC 内では RT-PCR によって検出されなかった (図 1A-b)。

本発明者らはまた、A2B5 陽性オリゴデンドログリア前駆細胞 (33; 図 1B-b)、04 及び 01 陽性未熟オリゴデンドログリア (34; 図 1B-d, f) に FcR が発現していることを免疫細胞化学的に検出した。従って、FcR は OPC 内に mRNA 及び蛋白レベルで発現している。04 陽性の培養未熟オリゴデンドログリア (37) の Western Blot によっても、この分子の存在が検出された (図 1C)。

10

20

30

40

50

OPC及び未熟オリゴデンドログリア内におけるFcRの発現は、この分子がITAMを介してFynと共役すること(27)を踏まえると、FcRがオリゴデンドログリアのミエリン形成に参与している可能性を示唆するものである。

〔実施例2〕

#### In vivoにおけるFcRのオリゴデンドログリア内発現

CNS内におけるFcRの発現をin vivoで検討するために、本発明者らは幾つかの日齢の新生児マウス脳に関して免疫組織化学的解析を行った(36, 38, 39)。FcR陽性細胞は生まれた日(P0)に既に脳室下帯(脳室に隣接したgerminal matrix領域; SVZ)内にて検出された(図2-a)。生後4日目(P4)では、発現パターンは白質領域に拡大しており、脳梁内で検出されるようになった(図2-b)。P7、即ちMBPやMAGが免疫組織化学的に検出できるようになる時期には、FcRの発現は主に白質に限局されていた(図2-c)。興味深いことに、この観察された染色部位の拡大は、SVZからの生後のグリア発生のパターン(40)に極めて類似している。FcR陽性細胞はまたP0にて、mouse-Musashi-1(m-Msi-1)陽性である、側脳室の神経幹細胞層に隣接して観察された(41; 図2-d, e)。これはFcR陽性細胞が神経幹細胞より分化していることを示唆するものである。成体のCNSでは、発現部位はP7にて見られたものと類似していた(図2-f)。従って、FcRはCNS内にてMAGの発現(生後2週目早期; 6, 20)に先行して発現しており、また成体CNS内にもこのFcR陽性集団は保たれているのである。成体CNS内にてFcR陽性細胞の集団が限局していたことを観察したのは非常に驚きである(図2-f)。これらの細胞の存在は、FcR陽性細胞のグリア発生が成体においても保たれているか、あるいは、生後すぐの時期に生じたそれら細胞がこの領域で静止状態に保たれていることを示唆する。

これらのFcR発現細胞がin vivoでオリゴデンドログリアの系譜より生じているものであることを確認するために、本発明者らはFcR発現細胞を幾つかの抗体でラベルすることにより、それら細胞の属性を調べた(42)。P0においては、FcR発現細胞はGFAP陽性細胞(アストログリアの系譜の細胞)及びOx-42陽性細胞(43; ミクログリアの系譜の細胞)と一線を画していた(図3A)。ごく少数のFcR陽性細胞が、SVZ内にて、GFAPと弱く共染色されたが、大多数の細胞はGFAP陰性であった。FcR発現細胞はOx-42で共染色されることはなかった。これらはP0におけるFcR陽性細胞の大多数がアストログリアあるいはミクログリアの系譜に由来しないことを示している。これらの細胞は恐らくはオリゴデンドログリアの系譜に由来するものである。P7では、FcR陽性細胞がFyn(図3B-a)あるいはMAG(図3B-b; 44)と共染色された。MAGはオリゴデンドログリア特異的に発現している(12)ので、FcR発現細胞はin vivoでオリゴデンドログリアの系譜に由来するものである。

成体CNS内では、FcR陽性細胞は白質の限られた領域内に観察された(図2-f)。本発明者らは未熟なオリゴデンドログリアの形態をもった細胞がFcR及びMBPの両方でラベルされたのを確認し(図3C-a)、これにより、成体CNS内のFcR陽性のオリゴデンドログリア系細胞の存在が示唆された。生後すぐの脳とは対照的に、主に成体SVZ内に存在する、GFAP陽性細胞の少数の集団がまたFcR陽性であった(図3C-b)。大多数のGFAP陽性細胞はFcR陰性であった。従って、このGFAP-FcR二重陽性細胞の限られた集団は、成体CNS内の特異的な集団である。これらの細胞がSVZアストロサイトと呼ばれる、神経幹細胞として働く細胞(45)であるか否かは今後検討する必要がある。

FcRはin vitroでもin vivoでも、MAGに先行してオリゴデンドログリアの系譜で発現している。しかしながら顕微鏡的観察では、MAGとFcRの発現は、ミエリン形成前の段階のin vivoのオリゴデンドログリアにて、完全に共在してはいなかった。MAGは細胞突起の先端を強く染めたが、FcRは細胞本体の細胞膜

を染めた(図3B-b)。Fynは主に細胞膜に観察され、FcRの発現に類似していることが二重染色で分かった(図3B-a)。In vivoにおける、ミエリン形成前のオリゴデンドログリア内のFynの発現は、FcRのそれに強く類似しており、MAGとは類似していない。FcR陽性細胞は灰白質、あるいはSVZと脳室上領域を除く白質では、解析したいずれの段階でもほとんど検出されなかった(図2-f)。染色領域の広がり(図2-a, b, c)並びに、これまでにSVZからのグリア形成に関する研究(40)と併せて考えると、上述の観察結果は、FcRがOPCあるいはミエリン形成段階前のオリゴデンドログリアに発現しており、成熟したミエリン形成後の細胞には発現していないことを示している。

FcRがミエリン形成の初期始動を行うとの仮定に基づくならば(即ち、Fyn-MBPカスケードを始動する; 6)、本発明者らはFcRの発現が、Fyn及びMBPの両者の発現に類似しているであろうことを期待した。連続切片を解析することで、本発明者らはFcR、Fyn、及びMBPの染色パターンが、P7の拡大しつつあるミエリン鞘で類似していることを観察した(図3D)。Fynは軸索にもまた発現している(46)。発現パターンにおける類似は、これらの分子間の関連を示唆している。この事実は、Fyn-MBPカスケードを始動するというFcRの役割を支持するものである。

〔実施例3〕

FcRシグナルはMBP発現を促進する

MBP発現促進に関するFcRの効果を検証するために、本発明者らは、抗FcRウサギポリクローナル抗体を投与すること(47)により、OPC(28, 29)に人為的にFcRシグナルを入れた。24時間の刺激によって、突起をほとんど持っていなかった培養OPCは、顕著な形態的变化を起こし、良く発達した突起を有するようになった(図4A-b)。このような発達は抗体の非存在下では見られなかった(図4A-a)。MBP発現もこのシグナルにより強く促進されることがWestern Blotによるコントロールとの比較によって示された(図4B; 48)。Fynに関する同様な検証によって、この発現もまた刺激されたオリゴデンドログリアで増大していたことがわかった(図4B)。Fynはオリゴデンドログリアの分化時に2から3倍上昇する(19)ので、本発明者らの観察結果、即ち、Fynの発現増大及び顕著な形態的变化は、FcRシグナルがOPCの分化を誘導したことを示している。FcRシグナルは従って、ミエリン形成において重要であり、同時にオリゴデンドログリア内でMBP発現を促進し、Fynの発現を増大させる。

MBP発現の促進は主にエクソン2を有するアイソフォームにおける増大であった(図4B)。MBPの4種類の主なアイソフォームは、MBP遺伝子上の7つのエクソンの選択的使用によって生じ、14.0、17.0、18.5、21.5kDの各蛋白質が合成される(49)。各々のアイソフォームの精細な役割は未だ研究される余地があるが、これらのアイソフォームはその細胞内分布により2つのグループに大別される。エクソン2を有するアイソフォーム、即ち17.0及び21.5kDの蛋白質は細胞質内に瀰漫性に分布し、またしばしば核内に集積する。一方で残る2つのアイソフォームは主に細胞膜に検出され、ミエリン圧密化の役割を担っている(8)。エクソン2を有するアイソフォームの、核内への能動輸送は、これらのアイソフォームがミエリン形成に於いて制御的役割を果たしている可能性を示唆している(50)。本発明者らの所見はこの可能性を支持している。このエクソン2を有するMBPアイソフォームの役割は、また本発明者らが提唱する、FcRがミエリン形成の始動を担うとのことを支持している。

本発明者らは、抗FcR抗体の代わりにマウス免疫グロブリンGの2bアイソフォーム(IgG2b)を投与することで、同様なエクソン2を有するMBPアイソフォームの上昇並びに、顕著な形態的分化を観察した(図4B)。使用したIgG2bモノクローナル抗体のエピトープはマウスで通常検出されないものである(47)。この抗体はフローサイトメトリーでオリゴデンドログリアの何れの蛋白質とも反応しなかった(データ省略)。エクソン2を有するMBPアイソフォームの発現促進は、従って、IgG2bがIgGに対するFc受容体(FcRs; 図7A)と相互作用することを示唆している。本発明

者らは I g G 2 b によって F y n の発現が促進されることを検出することができなかった ( 図 4 B ) 。これは恐らく抗 F c R 抗体に比して、I g G 2 b の使用が刺激の手法としてより間接的であることに由来するのであろう。

本発明者らは更に F c R 欠損マウス ( 5 8 ) 由来の O P C を刺激した。同じように I g G 2 b を投与したが、しかしながら、野生型 O P C で見られた変化とは対照的に、これら O P C を分化させることはできなかった ( 図 4 C ) 。これら結果は F c R が O P C の分化に重要なシグナル因子であることを示唆し、また I g G 2 b が確かに F c R s を介して F c R を活性化させたことを示している。

〔実施例 4〕

#### F c R 、 F y n 、 及び M B P 欠損マウスの比較

F c R と F y n はオリゴデンドログリア内で M B P 発現を促進するために共役しているのだろう。F c R の I T A M のリン酸化には S r c ファミリーのチロシンキナーゼとの相互作用が必要である ( 2 6 ) 。S r c ファミリーのメンバーで、5 種類のみが C N S 内に発現している ( 5 1 ) 。その 5 種類のうち、S r c 、 F y n 、 L y n だけがオリゴデンドログリア内に発現している ( 5 2 ) 。F y n は、しかしながら、ミエリン形成に重要な唯一の S r c ファミリーメンバーである ( 5 2 ) 。F y n は F c R の I T A M リン酸化を担うことは示されている ( 2 7 ) 。従って、オリゴデンドログリアの F c R の活性化は M B P の発現上昇をもたらしたが ( 図 4 B ) 、これは F y n がこの I T A M をリン酸化することに依存している ( 2 7 ) 。F y n のチロシンキナーゼ活性を点変異によって消失させると、F y n を欠損した際にみられるものと同様な重篤なるミエリン障害を引き起こすために、F y n のキナーゼ活性がミエリン形成に重要であることが示唆されている ( 5 2 ) 。M B P 発現の促進は主に F y n に依存しており ( 1 0 ) 、これは本発明者らの *i n v i t r o* の結果と矛盾しない ( 図 4 B ) 。

F c R - F y n - M B P カスケードを *i n v i v o* で更に検証するために、本発明者らは F c R 、 F y n 、あるいは M B P を欠損する変異マウス ( 3 9 ) を解析した。オリゴデンドログリアの増殖の最も強い時期は生後 9 日間に起こり ( 5 3 ) 、この時期のオリゴデンドログリアは主にエクソン 2 を有する M B P を発現している ( 8 ) 。本発明者らの *i n v i t r o* の刺激実験の結果は、この時期にミエリン形成プログラムを検証することで、ミエリン形成の障害が見られる可能性を示唆している。本発明者らはそれ故に生後 1 0 日齢のマウスの脳を解析し、ミエリン形成の初期段階を検証した。F c R 欠損、F y n 欠損、及び M B P 欠損の各変異マウスの白質を免疫組織化学的に解析した結果 ( 3 6 , 3 8 , 3 9 ) 、同日齢の野生型マウスに比して、3 種類の変異マウス全てに同様なミエリン形成の遅延が認められた。3 種類全ての変異にて見られた、M B P a n d / o r M A G の発現の制限は ( 図 5 A ) 、これら 3 種類の分子がミエリン形成に必須であることを示している。F c R 欠損及び F y n 欠損マウスの W e s t e r n B l o t では、1 0 日齢の新生児マウスでも、また成体でも、M B P 発現の減少があることが明らかとなった ( 図 5 B ; 4 8 ) 。これらの結果は F c R - F y n - M B P カスケードが *i n v i v o* でミエリン形成の初期段階の中核的存在となっていることを示唆している。

得られた W e s t e r n B l o t の結果を定量化すると ( 5 4 ) 、成体 C N S 内の M B P 全量は F y n 欠損マウスでは野生型の 4 0 . 3 % 、F c R 欠損では 6 0 . 8 % に減少していることが分かった。エクソン 2 を有する M B P の発現量 ( 2 1 . 5 k D と 1 7 . 0 k D の和 ) は、それら以外の 2 つのアイソフォームよりも、より重篤な影響を受けていることが分かった。即ち、これらアイソフォームは F y n 欠損マウスでは野生型の 3 1 . 9 % 、F c R 欠損では 4 0 . 0 % にまで減少していた。F c R 欠損と F y n 欠損マウスのいずれでも同様な傾向が見られたことは、これらの分子がミエリン形成を支配するシグナルカスケードに参与しているとの本発明者らの理論を支持する。いずれの欠損マウスにおいても、主にエクソン 2 を有する M B P アイソフォームが減少していたことは、本発明者らの *i n v i t r o* の結果 ( 図 4 ) を支持し、またこれらアイソフォームがミエリン形成過程に参与していることを示唆するものである。

P 1 0 における M A G の発現を組織学的にそれぞれの変異マウスで解析した結果、M A G

10

20

30

40

50

陽性未熟オリゴデンドログリア(6)の分布がFcR 欠損マウスに比して、MBP欠損マウスではより減少していることが明らかとなった(図5A-e, f, g)。Fyn欠損マウスはその中間の表現型を示した。これら変異マウスでは、P10までに脳梁より大脳皮質へ移動している、MAG陽性未熟オリゴデンドログリアの数(55)は、野生型に対して、FcR 欠損、Fyn欠損、MBP欠損でそれぞれ、約44%、25%、12%であった(図5C)。この結果はMBPの量と比例関係にあり、MBP、特にエクソン2を有するアイソフォームがミエリン形成に重要であることを示している。

〔実施例5〕

#### FcR 欠損によるミエリン形成不全

FcR の欠損によるミエリン形成を検証するために、本発明者らは幾つかの日齢でFcR 欠損マウスを解析した。P10で見られたミエリン形成の障害(図5)は、グリア発生過程上の障害による可能性がある。この可能性を追究するために、本発明者らは、オリゴデンドログリア系の最初期の前駆細胞のマーカであるPDGFR(56)の発現を解析した。FcR はPDGFRとP10の白質にて共染色され(図6A-a)、FcR がオリゴデンドログリア系の細胞に発現していることを示している(図3)。しかしながら、PDGFR陽性細胞のうち、一部のみが、FcR で共染色された(図6A-a)。FcR に陽性であった細胞はPDGFRにも陽性であったことから(図6A-a)、PDGFR陽性/FcR 陰性の細胞は、CNS内で休止状態にあるグリア前駆細胞と考えられる。PDGFRは一方で本発明者らの研究において、グリア発生の状態を検証するために適したマーカーとなる。P10、即ち本発明者らがミエリンの障害(図5)を発見した時期において、本発明者らはPDGFR陽性細胞の数あるいは分布に変化を認めなかった(図6A-b, c)。従って、P10で見られたミエリン形成の障害(図5)は、主にミエリン形成過程の障害によるものであり、グリア発生上のもではない。

P10で観察された障害(図5)を生体が後に代償しうるか否かを見極めるために、より遅い成長段階でMAG陽性未熟オリゴデンドログリア(6)の数を数えた(55)。欠損マウスと野生型マウスの間に見られたMAG陽性未熟オリゴデンドログリアの数的な差異は、成長に伴って目立たなくなった(図6B-a)。しかしながらこの時期になっても、この欠損マウスにて、ミエリン形成はやはり障害されていた。P50では、ミエリンの主たる構成蛋白であるProteolipid Protein(PLP)の免疫組織化学的解析の結果、欠損マウスでは、その発現がMBPに加えて野生型に比して減少していることが明らかとなった(図6B-b, c;一部データ省略)。即ち、成長が進んでも、広範なミエリン形成障害があることを示している。P67における脳梁の電子顕微鏡像(57)では、背側領域にて、重篤な低ミエリン形成の軸索が見られた(図6C-a, b)。驚くべきことに、胸側領域では重篤な軸索の膨化が加えて観察された(図6C-c, d)。ミエリン障害は、特にPLPの減少がある際には、軸索の膨化を引き起こすことが知られている(1)。これらの電子顕微鏡による観察結果はFcR の欠損によって重篤で広範なミエリン障害が生じることを示している。この欠損マウスでは、観察されたミエリン形成の障害は、単なる遅延ではなく、成長後も代償されない、広範なミエリン低形成である。

これらの観察結果はFcR がグリア発生ではなく、ミエリン形成に重要であることを示しており、FcR が*in vitro*でも*in vivo*でもミエリン形成を始動するとの本発明者らの主張を支持するものである。

〔実施例6〕

#### FcRs及びCD45のFcR との共発現

FcR は幾つかの免疫系受容体で共通である(21)。オリゴデンドログリアにおけるFcR の活性化に関与している受容体を特定することは、ミエリン形成の分子機構を理解する上で重要な点である。FcR 欠損マウスは、IgEに対するFc受容体(FcRI)及びIgGに対するFc受容体(FcRI/III)のいずれもの鎖(リガンドに結合するサブユニット)を細胞表面に発現できないことが示されている(58)。

この欠損マウスにおけるミエリン形成の障害は、FcR 及びこれらの鎖両方の欠損によるものであるかも知れない。野生型マウスより得られた未熟オリゴデンドログリアのRT-PCR解析(31)ではFcRIの鎖を検出できなかった。一方で、FcRIとFcRIIの鎖は容易に検出された(図7A)。これらの発現パターンはフローサイトメトリーによっても確認された(データ省略)。従って、IgEではなく、IgG特異的なFc受容体がミエリン形成に参与している可能性がある。しかしながら、本発明者らは、FcRを共通に使う、他のオリゴデンドログリア特異的な何らかの受容体が参与している可能性を否定し得る訳ではない。本発明者らの*in vitro*の実験では、FcRの活性化は、受容体の種類によらず、MBPの発現を促進し得ることを示した(図4)。新生児マウスにおける、neonatal FcR(FcRn)を介した、母体由来のIgGの存在(59)、及びP7までに免疫系内にIgG分泌細胞が存在すること(60)はこの結論を支持し得る。本発明者らが行った*in vitro*の、IgG2bを用いた刺激実験は、MBP発現度合の上昇をもたらしたが(図4)、これはこの仮説と矛盾しない。

CD45は蛋白チロシンフォスファターゼであるが、FcRシグナル伝達を制御している(総説は61)。CD45は、Fynを含むSrcファミリーのチロシンキナーゼの抑制領域を脱リン酸化する。CD45がない状態では、抑制領域のリン酸化の為にFynは不活性状態に留まっており(61)、FcRを介するシグナル伝達はこの分子無くしては進行しないであろう。CD45は白血球共通抗原(Leukocyte Common Antigen)としても知られており、免疫系の細胞に特異的に発現している。この分子のオリゴデンドログリア内発現は報告されていない。本発明者らは、生後7日目(P7)、10日目(P10)または成体マウス脳に関して、免疫組織化学的な二重染色を行った(36, 38, 42)結果、CD45及びMAGを共発現している細胞を検出した(図7B-c)。MAGはオリゴデンドログリアに特異的に発現しているため(12)、この共発現の所見は、CD45がオリゴデンドログリア内に発現していることを示している。この発現は、一方でアストロサイトにCD45が発現していないことと共に、フローサイトメトリーにて確認された(図7C)。CD45とFynがミエリン形成の初期段階に入る前に共発現していることは*in vivo*で確認された(図7B-b)。これら結果はCD45がFynの活性化に必要であることを示している。CD45は、拡張しつつあるFcR陽性ミエリン鞘において、P7(図7B-d)でも成体CNS(図7B-a)においても検出された。従ってCD45は、ミエリンが急速に生成される、生後の発達過程や、特にミエリン再生中の成体などにおいて、FcR-Fyn-MBPカスケードの制御的役割を果たしている可能性がある。

#### [実施例7]

##### FcR-Fyn二重欠損マウス

目的) FcRとFynが共役することは免疫学では知られたことであるが、脳の中で、実際にミエリンを形成する上で共役しているならば、二重欠損にすることで症状がより重篤化するであろうとの予測に基づいて実験を行った。二重欠損の解釈には二通りあり、A-B-Cというカスケードを予測している際に、真に一つのカスケードであれば、Aを潰しても、Bを潰しても、或いはAとBを両方潰しても、結果(Cの減少等)は同一になることが予測される。しかし現実の生物ではカスケードが入り混じっていたり、或いは、一つが潰れても別の機構が代償するということが考えられる。この仮定に基づく、Aを潰した時よりもBを潰した方が症状は重くなり(Bの方がCに近い為、代償機構が働くチャンスが減ると予測されるからである)、或いはAとBを両方潰すと最も重篤な症状を呈すると予測される。

方法) FcR欠損マウス(39, 58)とFyn欠損マウス(39, 46)を掛け合わせて、FcR+/-Fyn+/-マウス(第1世代)を誕生させた。更にこのマウス同士を掛け合わせると、1/16の確率で、FcR-/-Fyn-/-の二重欠損マウス(第2世代)ができることになるが、確率が低く、二重欠損を得るに至らなかった。そこで、第2世代マウスのうちから、FcR-/-Fyn+/-とFcR+/-Fyn-

/ - を選び ( 遺伝子のチェックは、尻尾を切ってそこから DNA を抽出し、PCR 法で確認した )、掛け合わせた。すると第 3 世代は 1 / 4 の確率で FcR - / - Fyn - / - マウスが得られることになる。マウスは一回の出産で大体 7 匹前後を産むので、これで二重欠損マウスが得られることになるが、現実には、重度の免疫不全のせい ( FcR と Fyn を潰すと免疫系がやられることが予測され、胎内であるいは生後間もなく死んでしまうケースが多い )、或いは脳奇形のせい、かなり確率は低い、数回に一回のチャンスで得られるようになった。現在はこの第 3 世代の二重欠損マウス同士を掛け合わせて、1 / 1 の確率で二重欠損マウス ( 第 4 世代 ) が得られないか試しているが、なかなか効率が上がっていない。実験に使用したのは第 3 世代である。得られた二重欠損マウスは生後 10 日齢 ( P10 ) で Acid - Alcohol 固定し、パラフィンに包埋した後、10 μ m の厚さに切片化して、免疫組織化学の手法によって MBP と MAG の発現を見た。また小胞体を染める Nissl 染色によって、脳の大まかな構造を見た。同様な実験を生後 1 . 5 ヶ月 ( Young Adult ) のマウスを使用して行った。

10

結果 ) P10 で、野生型 ( Wt )、Fyn - / -、FcR - / -、FcR - / - Fyn - / - を比較検討した結果、MBP・MAG の発現は何れも、Wt > FcR - / - > Fyn - / - > FcR - / - Fyn - / - となった ( 図 9 , 10 ) ので、FcR と Fyn の共役が確認された。更に P10 の Nissl 染色では脳室の拡大と脳弓の奇形が認められた。1 . 5 ヶ月齢では、何よりも Nissl 染色で重度の脳室拡大 ( 水頭症 ) と、海馬の奇形、更に脳弓の奇形が認められ ( 図 11 e - h )、MBP の染色では P10 と同様どころか、二重欠損マウスでは大脳皮質内にほとんどミエリンが存在しないことが確認された ( 図 11 a - d )。以上の結果は PLP など他のミエリン蛋白でも確認を得た。

20

結論 ) FcR と Fyn は脳のミエリン形成においても共役していることが確認された。  
〔実施例 8〕

#### CD45 欠損マウス

目的 ) 実施例 6 で確認したように、CD45 がオリゴデンドログリアに発現しており、免疫学上、CD45 は Fyn の活性化因子として知られていることから、CD45 がオリゴデンドログリアにおいてミエリン形成に一役買っているのではないかと推定した。また CD45 の遺伝子変異が多発性硬化症 ( MS ) で見つかったことから、オリゴデンドログリアの異常が MS の病因としてあるのではないかと推測した ( 但し、MS で発見されている CD45 の異常は、CD45 を完全に消失させる変異ではなく、CD45 の幾つかのアイソフォームの発現パターンを狂わせるのと、全量が減少するような変異である )。尚、MS 患者の CD45 の変異については、その後否定的な論文も出されており、いまだ決着が着いていない。これらをクリアにするために、CD45 の欠損マウスを使用して、オリゴデンドログリアのミエリン形成が阻害されるか確認することにした。

30

方法 ) CD45 の Exon 6 を欠損させたマウス ( これによって、CD45 の発現量はほぼゼロになる ) を九州大学の岸原健二先生から頂戴した。原著論文は、Cell 1993 Jul 16 ; 74 ( 1 ) : 143 - 56

Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45 - exon 6 protein tyrosine phosphatase - deficient mice .

40

Kishihara K , Penninger J , Wallace VA , Kundig TM , Kawai K , Wakeham A , Timms

E , Pfeffer K , Ohashi PS , Thomas ML , et al .

である。

このマウスの脳を生後 10 日齢で固定し、切片化して、MBP と MAG の免疫組織化学染色でミエリンの発現量を見た。更に、動物の脳をすり潰して、Western Blot 法によって、MBP の発現量を見た。また、Fyn 欠損マウスの P10 の脳を同様に固定、切片化して免疫組織学的に MAG を染色して、CD45 欠損マウスと同様なミエリン減少であるかどうか ( CD45 が Fyn の活性化因子であるならば、同様と予測されるから

50

である)を確認した。更に、CD45欠損マウスからオリゴデンドログリアの前駆細胞(OPC)を培養して、これをFcRに対する抗体或いはIgGで刺激して、そのレスポンス(形態変化とMBPの発現増大)を見た。加えて、CD45がオリゴデンドログリアに実際に発現していることを示す為に、培養OPCの染色と、組織染色(オリゴデンドログリアのマーカー、MAGとの二重染色)を行った。CD45に対する抗体が、実際にCD45と反応しており、何か別のものとの交叉反応が起きているわけではないことを確認するために、CD45欠損マウスでCD45染色を行った。

結果)P10のCD45欠損マウスではミエリン形成の明らかな低下が認められた(図13のc~e)。またその低下度合いがFyn欠損マウスと類似することを確認した(図13のc及びf~h)。更にCD45欠損マウスのOPCでは抗FcR抗体或いはIgGの何れに対してもレスポンスがないことを確認し(図13のa及びb)、CD45の欠損によって、OPCのオリゴデンドログリアへの分化が阻害されることが確認された。またCD45が実際にオリゴデンドログリアに出ていることが、MAGとの組織上の二重染色(図12のd)と、OPCの染色によって示され(図12のa及びb)、かつ、交叉反応でないことが、CD45欠損マウスの組織では同じ抗体で染色が得られないことによって示された(図12のe)。

結論)CD45はOPCと未熟オリゴデンドログリアに発現しており、OPCからミエリン形成オリゴデンドログリアへの分化への段階で必要であることが確認された。

[実施例9]

#### IgG欠損マウス

目的)実施例3において、FcRがミエリン形成のトリガーであることを示したが、実際の成体内ではFcRはFcRI或いはFcRII等の、免疫グロブリンFc受容体の一信号伝達分子である。治療の上ではFcRを直接刺激するにせよ、生理的環境下でこの機構が働くには、IgGがFcRI或いはFcRIIに結合し、それによってFcRへ刺激が入るであろうことが予測される。IgGは母体から胎盤を通じて供給されるし、或いは母乳中に入っており、胎児期~乳児期に掛けては、脳と血管の間にある関門(BBB)が未熟な為に、これらのIgGが脳内に入ることができる。逆に、成人ではBBBがあるため、IgGが脳内に入らず、ミエリンの過剰形成が防がれていると考えることができる。事実、MSの患者では脱髄を反映してか、BBBが破壊される。これはIgGを脳内に導入し、ミエリンを再生させるためかもしれない。これらのストーリーを考える上で、IgGが実際にそのような機能を持っているかを証明する必要がある。確かに免疫学上はFcRはFcRI/IIと共役し、FcRI/IIは何れもオリゴデンドログリアに出ていることが確認されており、IgGと強く予測されるが、脳内では別の分子が実はFcRI/IIと結合しているかもしれない。IgGが必要であることを証明するために、IgGを遺伝的に作れなくしたマウスを解析した。このマウスはFynもFcRも正常の働き・発現を持っている。

方法)IgGを欠損したµMTマウス(実際はIgMも欠損しているようである: IgMは胎盤を通過せず、母乳内にも殆ど入っていないので、実験上の影響はないと思われる)マウスをJackson研究所から購入した。オリジナルのマウスは以下の文献に記載されている。

Nature 350: 423 - 426 (1991)

Kitamura D, Roess J, Kuhn R, Rajewsky K. 1991

A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene.

このマウスをP7、P10、P50で免疫組織化学的にMAGの染色を行い、野生型(Wt)と比較した。

結果)やはり、P7、P10、P50の何れにおいても、Wtに比較して、ミエリンが減少していることがわかった(図15、16、17)。P7、P10の結果から、母体由来

の I g G (この時期はまだ子供自身で I g G を生成することはほとんどできない時期である：尚、いずれにせよ、実験に使用した  $\mu$  M T マウスは母親・子供共に I g G を作成できない) がミエリン形成に重要であることが示唆された。

結論) 生体内でオリゴデンドログリアがミエリンを形成するために F c R が重要であるのは示したとおりであるが、I g G がその生理的トリガーとなっていることが示された。

#### 考察

本発明者らが提唱するミエリン形成メカニズムのモデルは図 8 にまとめられている。F c R は *in vitro* でも *in vivo* でもオリゴデンドログリア系の細胞に発現している (図 1 - 3)。ここに本発明者らは F c R がミエリン形成を始動することを提唱する。F c R は F y n との機能的な共役 (27) を通じて、形態学的な分化並びに M B P 発現の上昇、特にエクソン 2 を有するアイソフォームの上昇を引き起こす (図 4)。このモデルは *in vivo* にて、F c R 欠損マウスではオリゴデンドログリアの発生に顕著な変化が見られないにも関わらず、ミエリン形成に重篤な障害があることによって確証を得た (図 6)。この変異マウスは同時に M B P 発現の減少を呈し、エクソン 2 を有するアイソフォームにより重篤な減少が見られた (図 5)。I g E ではなく、I g G に対する F c 受容体の発現 (図 7 A) は、I g G が細胞外からオリゴデンドログリアの F c 受容体を活性化する分子として働く可能性を示唆する。*In vitro* で I g G 2 b によって刺激を与えると、野生型 O P C では顕著な形態学的な分化が生じたが、F c R 欠損 O P C では生じなかった (図 4)。更に、C D 45 は F y n 及び F c R と、オリゴデンドログリアにおいて、ミエリン形成の初期段階で共発現しており (図 7 B, C)、C D 45 がミエリン形成に必要となる F y n の活性化を制御している可能性を示唆している。C D 45 の変異が M S 患者のある集団では関与していることが報告されている (23)。

I g G 2 b は *in vitro* で、O P C の M B P の発現及び形態学的な分化を促進した (図 4)。ミエリン形成を始動するという I g G の生理的な役割の可能性を支持するためには、I g G がミエリン形成に先立って存在していることが期待される。母体由来の I g G が新生児マウスに存在していること (59) に加えて、I g G 分泌細胞は P 7 までに胸腺及び脾臓で検出される。そしてこれらの細胞はこの時期に急速に増殖する (60)。オリゴデンドログリア上の F c 受容体を介して、I g G がミエリン形成を引き起こすことによって、脱髄疾患に用いられる免疫グロブリン静注療法 (I V I g) の効果を説明し得る。大量 I V I g の適用は脱髄疾患の患者に対する奏効性の高い治療法である (総説は 62)。

M S では I V I g は再発率を低下させることができる (63)。しかしながら、この治療法の機序は明らかでなかった。動物モデルでは、免疫グロブリンは T h e i l e r ウイルスによって引き起こされた脱髄に対し、C N S 内のミエリン再生を促すことができる (64)。この免疫グロブリンのミエリン再生誘発能は、この分子の F c 部分によって引き起こされている。即ち、F (a b')<sub>2</sub> 断片はこのような効果を動物モデルで引き起こすことができない (65)。これらのことは、I V I g によるミエリン再生の促進能が、免疫グロブリンの F c 部分によって為されている可能性を示唆し、恐らくはオリゴデンドログリア内の F c R - F y n - M B P カスケードを活性化することによると考えられる。F c R s における遺伝子多型は M S による障害に関与しており、I g G に対する親和性がより高い F c R s を持つ M S 患者は、より良い臨床予後を示す (66)。

I I b 型 F c R (F c R I I B) は I g G と相互作用する、特殊な抑制型 F c 受容体である (総説は 67)。この受容体は、F c R - F y n - M B P カスケードを負に制御し、ポリクローナルな I V I g によるミエリン形成促進能を低下させてしまう可能性がある。本発明者らは培養オリゴデンドログリア内に F c R I I B が発現していることを R T - P C R 及びフローサイトメトリーで確認した (データ省略)。また一方で、本発明者らは F c R s の推定されるリガンドが免疫グロブリンでない可能性を否定できない。しかしながらミエリン形成における F c R それ自身の促進能は、F c R に対する抗体投与で示されたように (図 4)、この機構が将来的にミエリン再生を促進しうる現実的な可能性を示している。

エクソン 2 を有する M B P は、ある程度のミエリン再生が生じた M S の病巣にて検出され

ている(68)。FcRの活性化は、エクソン2を有するMBPの発現上昇と、顕著な形態的分化を引き起こした(図4)。報告されているところの、慢性化したMS病巣に残されている、数的には充分だが休止状態にあるような未熟オリゴデンドログリアの存在(4)と併せて考えるならば、本発明者らが示したミエリン形成に関するより深い理解は、MSや他の脱髄疾患の治療或いは予防の為の将来的に有望な治療戦略を与えるであろう。まとめとして、本発明者らの結果は、CNSのミエリン形成がFcRによって始動されていることを示している。これは脳と免疫系の間の新しい連関を明らかにしたものである。

〔参考文献及び付記事項〕

- 1) I. Griffiths et al., Science 280, 1610 (1998).
- 2) X. Yin et al., J. Neurosci. 18, 1953 (1998).
- 3) J. H. Noseworthy, Nature 399, A40 (1999).
- 4) G. Wolswijk, J. Neurosci. 18, 601 (1998).
- 5) F. X. Omlin, H. D. Webster, C. G. Palkovits, S. R. Cohen, J. Cell Biol. 95, 242 (1982).
- 6) J. Nakahara et al., Neurosci. Lett. 298, 163 (2001).
- 7) A. Roach, N. Takahashi, D. Pravtcheva, F. Ruddle, L. Hood, Cell 42, 149 (1985).
- 8) B. Allinquant, S. M. Staugaitis, D. D'Urso, D. R. Colman, J. Cell Biol. 113, 393 (1991).
- 9) H. Umemori, S. Sato, T. Yagi, S. Aizawa, T. Yamamoto, Nature 367, 572 (1994).
- 10) H. Umemori et al., J. Neurosci. 19, 1393 (1999).
- 11) C. Seiwa, I. Sugiyama, T. Yagi, T. Iguchi, H. Asou, Neurosci. Res. 37, 21 (2000).
- 12) U. Bartsch, F. Kirchhoff, M. Schachner, J. Comp. Neurol. 284, 451 (1989).
- 13) R. Sadoul, T. Fahrigh, U. Bartsch, M. Schachner, J. Neurosci. Res. 25, 1 (1990).
- 14) C. Li et al., Nature 369, 747 (1994).
- 15) D. Montag et al., Neuron 13, 229 (1994).
- 16) M. D. Weiss, J. Hammer, R. H. Quarles, J. Neurosci. Res. 62, 772 (2000).
- 17) M. Schachner, U. Bartsch, Glia 29, 154 (2000).
- 18) K. Biffiger et al., J. Neurosci. 20, 7430 (2000).
- 19) D. J. Osterhout, A. Wolven, R. M. Wolf, M. D. Resh, M. V. Chao, J. Cell Biol. 145, 1209 (1999).
- 20) A. Niehaus, J. Stegmuller, M. Diers-Fenger, J. Trotter, J. Neurosci. 19, 4948 (1999).
- 21) M. J. Wilson, J. A. Lindquist, J. Trowsdale, Immunol. Res. 22, 21 (2000).
- 22) T. R. Hurley, R. Hyman, B. M. Sefton, Mol. Cell Biol. 13, 1651 (1993).

- 23) M. Jacobsen et al., Nat. Genet. 26, 495 (2000).
- 24) M. Reth, Nature 338, 383 (1989).
- 25) J. V. Revetch, Cell 78, 553 (1994).
- 26) M. Iwashima, B. A. Irving, N. S. C. van Oers, A. C. Chan, A. Weiss, Science 263, 1136 (1994).
- 27) L. S. Quek et al., Blood 15, 4246 (2000).
- 28) K. Itoh, Y. Sakurai, H. Asou, H. Umeda, J. Neurosci. Res. 60, 579 (2000).
- 29) 伊藤氏の方法(ラットOPC用の培養条件を詳細に記述してある; 28)を、胎生17日目より得られたマウスOPC(東京都老人総合研究所 神経生物部門 清和千佳様の御厚意による)に対して適用した。培養細胞の約90%が常にOPC特異的マーカーであるA2B5(Chemicon(日本ではフナコシが販売))に陽性であった(69を参照)。
- 30) H. Asou, K. Murakami, M. Toda, K. Uyemura, Keio J. Med. 44, 47 (1995).
- 31) 培養OPCより、Trizol reagent(GIBCO BRL)を用いて、全RNAを抽出した。RNAは20 $\mu$ lのTEにて再浮遊した。それぞれのサンプルに関して、first strand cDNA synthesis kit(Boehringer Mannheim)を用いて1 $\mu$ lのRNAを逆転写し、最終容量20 $\mu$ lを得た。標準化用にはマウスアクチンを並行して増幅した。マウスFcR、CD3、FcRI、FcRII、及びアクチン用のアニーリングは52度の温度で行った。FcRIII、FcRIIb用のアニーリングは53度の温度で行った。cDNAサンプルは35サイクル増幅した(94度で30秒間、アニーリングが30秒間、72度で30秒間)。使用したプライマーは以下の通りである。

10

20

FcR $\gamma$  センス (5'-ctcaagatccaggtccga-3' (配列番号 1)) ;

FcR $\gamma$  アンチセンス (5'-ctactgggggtggtttttcat-3' (配列番号 2)) ;

CD3 $\zeta$  センス (5'-aggcacagagctttgggtct-3' (配列番号 3)) ;

CD3 $\zeta$  アンチセンス (5'-ctggtaaaggccatcgtgc-3' (配列番号 4)) ;

Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  センス (5'-aaatgaactctactactaaa-3' (配列番号 5)) ;

Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  アンチセンス (5'-cttttactacagcaattctgaa-3' (配列番号 6)) ;

Fc $\gamma$ RI $\alpha$  センス (5'-gaacagccgttcagatct-3' (配列番号 7)) ;

Fc $\gamma$ RI $\alpha$  アンチセンス (5'-ttcgtctcacagttcagg-3' (配列番号 8)) ;

Fc $\gamma$ RIII $\alpha$  センス (5'-ctaaggtgccatagctgcagg-3' (配列番号 9)) ;

Fc $\gamma$ RIII $\alpha$  アンチセンス (5'-ctgattgacagggacttctctc-3' (配列番号 10)) ;

Fc $\gamma$ RIIB センス (5'-gtgaggtatcatcactacagt-3' (配列番号 11)) ;

Fc $\gamma$ RIIB アンチセンス (5'-ggttctggtaatcatgctctg-3' (配列番号 12)) ;

$\beta$  アクチン センス (5'-tggtcgtcgacaacggct-3' (配列番号 13)) ;

$\beta$  アクチン アンチセンス (5'-tttacgggatgtcaacgtcac-3' (配列番号 14))。

32) G. S. Huh et al., Science 290, 2155 (2000) .

33) M. C. Raff, R. H. Miller, M. Noble, Nature 303, 390 (1983) .

34) I. Sommer, M. Schachner, Dev. Biol. 83, 311 (1981) .

35) 培養OPC及び未熟オリゴデンドログリア(東京都老人総合研究所神経生物部門 清和千佳様の御厚意による)はPLPにて室温15分間固定した。続いて1次抗体にて一晩4度で処理し、次いで二次抗体にて室温1.5時間処理し染色した。二重染色では異なるセットの抗体を用いて、同じ手法を繰り返した。

36) 今回の研究で使用した抗体は以下の通りである。1次抗体として、01及び04マウスモノクローナル抗体(34; Chemicon(日本ではフナコシが販売))、A2B5マウスモノクローナル抗体(33; Chemicon(日本ではフナコシが販売))、抗FcR ウサギポリクローナル抗体(58; 東北大学加齢医学研究所、遺伝子導入

10

20

30

40

50

- 研究分野、高井俊行教授の御厚意による)、抗MBPウサギポリクローナル抗体(ニチレイ)、抗MAGウサギポリクローナル抗体(国立精神神経センター、故Y. Matsuda博士の御厚意による)、抗GFAPウサギポリクローナル抗体(DAKO)、Ox-42マウスモノクローナル抗体(43; Serotech)、抗PLPウサギポリクローナル抗体(Sigma)、抗PDGF Rウサギポリクローナル抗体(UBI)、抗m-Mssi-1ラットモノクローナル抗体(慶應義塾大学医学部生理学教室、岡野栄之教授の御厚意による)、抗CNPaseマウスモノクローナル抗体(Sigma)、抗CD45ラットモノクローナル抗体(clone: 30-F11; Pharmingen)を使用した。免疫組織化学には、HRP標識抗ウサギIgG抗体(MBL)、HRP標識抗マウスIgG抗体(MBL)、biotin標識抗ラットIgG抗体(DAKO)及びHRP標識streptavidin(ニチレイ)を二次抗体として使用した。免疫細胞化学には、rhodamine標識抗マウスIgM抗体(EY Labo. Inc.)、fluorescein標識抗ウサギIgG抗体(Cappel)を二次抗体として使用した。
- 37) 04陽性未熟オリゴデンドログリア(東北大学加齢医学研究所、遺伝子導入研究分野、海部知則様の御厚意による)の培養には、新生児マウスの脳を切り出し、分離培養系に調整した(70)。10日間の培養を経て、アストロサイトの単層の上に敷かれたオリゴデンドログリアはorbital shakingによって機械的に剥離し、回収した。これら細胞は常に95%以上の細胞が04陽性であった。残存するアストロサイト層はtrypsin/EDTAによって剥離した。回収された細胞はBlotによる解析に使用した。
- 38) 取り出された脳は酢酸-アルコール固定液(95%エタノール・5%酢酸;容量%)にて一晚浸漬固定した。パラフィン化の処理は固定された脳に標準的な手法を用いて行われた(100%エタノール 安息香酸メチル キシレン キシレン・パラフィン溶液 パラフィン;それぞれ1~2時間)。この処理後、脳を包埋した。包埋後の脳はマイクロトームを使用して10µmの厚さで切片化した。得られた切片は標準的な手法によって脱パラフィン処理を行った(キシレン 100%エタノール 90%エタノール 70%エタノール PBS)。細胞内ペルオキシダーゼ活性は3%過酸化水素水にて室温で10分間処理することにより消失させた。更にPBSで洗浄した後、1次抗体を、4度で一晩あるいは37度で2時間反応させた。1次反応後、切片を十分にPBSで洗浄し、次いで適した2次抗体を37度で1時間反応させた。二次抗体としてBiotin標識二次抗体を用いた切片に関しては、更にHRP標識streptavidin(ニチレイ)を37度で30分間反応させた。PBSで十分に洗浄した後、DAB(和光)を含む溶液にて染色を行った。カウンター染色にはメチルグリーン(和光)を使用した。
- 39) 野生型(C57BL/6; 埼玉実験動物)、FcR欠損マウス(58; 東北大学加齢医学研究所、遺伝子導入研究分野、高井俊行教授の御厚意による)、Fyn欠損マウス(46; 大阪大学細胞生体工学センター、八木健教授の御厚意による)、MBP欠損マウス(別名shivererマウス; Jackson Lab.)は何れの日齢においても、適切な麻酔下で脳を取り出した。変異マウスを含め、使用した全てのマウスの血統はC57BL/6である。
- 40) S. W. Levison, J. E. Goldman, Neuron 10, 201 (1993).
- 41) S. Sakakibara, H. Okano, J. Neurosci., 17, 8300 (1997).
- 42) 1組目の反応後、切片をPBSで数回洗浄した。0.1Mのglycine-HCl緩衝液(pH 2.2)にて室温1時間洗浄し、1組目の抗体を剥離洗浄した。同様にして2組目の染色反応を行った。2組目の最後の染色反応に関しては、4-chloro-1-naphthol(和光)を用いて染色を行った。
- 43) A. P. Robinson, T. M. White, D. W. Mason, Immunology 57, 239 (1986).
- 44) 使用した抗MAG抗体(血清)の特異性を検証するために、実験的自己免疫性脳

脊髄炎 (EAE) を引き起こした脳の切片を同抗体で染色し、CNS内に存在し得るFcRを持つ免疫系細胞との交差反応の可能性を調べた。しかしながら、この抗体はEAE脳内に浸潤してくる免疫系の細胞と反応しなかった(データ省略)。従って、この抗体には免疫系細胞との交差反応性はないことが示された。

45) F. Doetsch, I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, *Cell* 97, 703 (1999).

46) T. Yagi et al., *Nature* 366, 742 (1994).

47) 35mmのシャーレに、1皿 $1 \times 10^6$ 個のOPCを撒き、poly-L-lysine (100  $\mu$ g/ml; Sigma)のみ、poly-L-lysineと抗FcRウサギポリクローナル抗体(70  $\mu$ g/ml)、poly-L-lysineと抗FcRIマウスモノクローナル抗体(clone CRA-1, subtype IgG2b, 20  $\mu$ g/ml; 極東)のいずれかで処理した。細胞は24時間培養した(図5A)。細胞溶解液(50mM Tris-HCl (pH 7.4)、1% NP40、0.25% sodium deoxycholate、150mM NaCl、1mM EDTA-2Na、1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1mM NaF、1mM PMSF、1  $\mu$ g/ml aprotinin、1  $\mu$ g/ml leupeptin、及び1  $\mu$ g/ml pepstatin)にて細胞を溶解した後、得られた溶解液に対してSDS-PAGEを行った。その後ゲルに標準的な手法によりWestern Blotを行った。使用したCRA-1抗体はオリゴデンドログリアの蛋白と反応しないことは、フローサイトメトリーによって確認してある。 10 20

48) ミエリン分画の調整法、SDS-PAGEの方法、Blotの方法等は以前の本発明者らの文献に記されている(11)。図5Bでは、それぞれのレーンに、野生型あるいは変異マウスより得られたミエリン分画より等量を流している。

49) F. de Ferra et al., *Cell* 43, 721 (1985).

50) L. Pedraza, L. Fidler, S. M. Staugaitis, D. R. Colman, *Neuron* 18, 579 (1997).

51) S. M. Thomas, J. S. Brugge, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13, 513 (1997).

52) B. R. Sperber et al., *J. Neurosci.* 21, 2039 (2001). 30

53) C. Mathis, C. Hindelang, M. LeMeur, E. Borrelli, *J. Neurosci.* 20, 7698 (2000).

54) Blotデータの定量化には、Kodak 1D Image Analysis Software・EDAS290 (ver. 3.5)を使用した。

55) 抗MAG抗体にて染色反応を行った後、野生型マウスと各変異マウスについて、それぞれ3枚の切片で、大脳皮質に存在する、MAG陽性未熟オリゴデンドログリア(6)を数えた。定量化に用いられた脳の位置は、全てのマウスについて、解剖学的に同一になるようにしてある。得られた数値の平均値及び標準偏差を計算し、グラフ化した。

56) N. P. Pringle, H. S. Mudhar, E. J. Collarini, W. D. Richardson, *Development* 115, 535 (1992). 40

57) 電子顕微鏡用の固定法については他の文献に記されている通りである(51)。超薄切片は2% uranyl acetate及び鉛溶液によって染色し、JEOL 100C電子顕微鏡(日本光電; 80kV)にて観察した。

58) T. Takai, M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, J. V. Ravetch, *Cell* 76, 519 (1994).

59) N. E. Simister, in *Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity*, J. G. J. van de Win 40 50

- kel, P. M. Hogarth, Eds. (Kluwer Academic Publishers, Netherland, 1998), pp. 63 - 71.
- 60) S. Haba, A. Nisonoff, Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 5185 (1992).
- 61) M. L. Thomas, Curr. Opin, Immunol. 11, 270 (1999).
- 62) M. Stangel, K. Toyka, R. Gold, Arch. Neurol. 56, 661 (1999).
- 63) F. Fazekas et al., Lancet 349, 589 (1997).
- 64) M. Rodriguez, V. A. Lennon, Ann. Neurol. 27, 12 (1990).
- 65) F. Miyagi et al., J. Neuroimmunol. 78, 127 (1997).
- 66) K. M. Myhr, G. Raknes, H. Nyland, C. Vedeler, Neurology 52, 1771 (1999).
- 67) M. Daeron, Fc receptor biology. Annu. Rev. Immunol. 15, 203 - 234 (1997).
- 68) E. Capello, R. R. Voskuhl, H. F. McFarland, C. S. Raine, Ann. Neurol. 41, 797 (1997).
- 69) Y. Nakai et al., J. Neurosci. Res. 62, 521 (2000).
- 70) K. D. McCarthy, J. de Vellis, J. Cell Biol. 85, 890 (1980).

10

20

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

本発明の医薬組成物および薬剤は、オリゴデンドログリア前駆細胞の分化を促進することができる。また、本発明の医薬組成物および薬剤は、Fynチロシンキナーゼの発現を増大することができる。さらに、本発明の医薬組成物および薬剤は、ミエリン塩基性蛋白の発現を促進することができる。

30

本発明の医薬組成物および薬剤は、ミエリン形成を促進するために有用である。

また、本発明の医薬組成物は、脱髄疾患、髄鞘形成不全疾患および髄鞘破壊からなる群より選択される少なくとも1つの疾患を予防および/または治療するために有用である。

将来的には、神経幹細胞、ES細胞、献体由来のオリゴデンドログリアを移植・再生させる治療が行われると考えられ、そのような治療が可能になった際には、ミエリン形成のBoosterとして当該技術を応用することが可能である。

また、本発明により、FcRをオリゴデンドログリアまたはその前駆細胞のマーカーとしての利用法が提供された。FcR陽性オリゴデンドログリアは、ミエリン形成のポテンシャルを持っている細胞として見ることができる。

40

#### 配列表フリーテキスト

配列番号1は、FcR センスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号2は、FcR アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号3は、CD3 センスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号4は、CD3 アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号5は、Fc RI センスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号6は、Fc RI アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号7は、Fc RI センスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号8は、Fc RI アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号9は、Fc RI II センスプライマーの塩基配列を示す。

50

配列番号 10 は、Fc R I I I アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号 11 は、Fc R I I B センスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号 12 は、Fc R I I B アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号 13 は、アクチンセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号 14 は、アクチンアンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

配列番号 15 は、ヒト Fc R - m R N A の塩基配列を示す。

配列番号 16 は、配列番号 15 のヒト Fc R - m R N A の塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

配列番号 17 は、マウス Fc R - m R N A の塩基配列を示す。

配列番号 18 は、配列番号 17 のマウス Fc R - m R N A の塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。 10

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> Pharmaceutical compositions comprising a substance capable of activating FcRgamma, agents for stimulating myelinogenesis, agents for stimulating differentiation of oligodendroglial precursor cells, agents for activating Fyn tyrosine kinase, agents for stimulating myelin basic protein expression, a method of detecting oligodendroglial or oligodendroglial precursor cells capable of forming myelin, a method of examining FcRgamma expression in animal brain tissues or cells, and reagent kits

10

<130> FP-011PCT

20

<140>

<141>

<150>JP P2001-229553

<151>2001-07-30

<160> 18

30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1		
ctcaagatcc aggtccga	18	
<210> 2		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		
<400> 2		
ctactgggggt ggtttttcat	20	
<210> 3		20
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		
<400> 3		30
aggcacagag ctttggctt	19	
<210> 4		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		

<400> 4		
ctggtaaagg ccatcgtgc	19	
<210> 5		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		
<400> 5		
aaatgaactc tactactaaa	20	
<210> 6		20
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		
<400> 6		30
cttttactac agcaattctg aa	22	
<210> 7		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA		

<400> 7  
gaacagccgt tcagatct 18

<210> 8  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8  
ttcgtctcac agttcagg 18

<210> 9 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9 30  
ctaaggtgcc atagctgcag g 21

<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 40

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10  
ctgattgaca gggacttcct c 21

<210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11  
gtgaggtatc atcactacag t 21

<210> 12 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12 30  
ggttctggta atcatgctct g 21

<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 40

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13  
tggtcgtcga caacggct 18

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14  
tttacggatg tcaacgtcac 20

<210> 15 20  
<211> 591  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> source  
<222> (1).. (591) 30

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (26).. (78)

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (26).. (283) 40

<220>  
<221> CDS

<222> (26).. (286)

<300>

<303> J. Biol. Chem.

<304> 265

<306> 6448-6452

<307> 1990

<400> 15

10

cagaacggcc gatctccagc ccaag atg att cca gca gtg gtc ttg ctc tta 52

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu

1

5

ctc ctt ttg gtt gaa caa gca gcg gcc ctg gga gag cct cag ctc tgc 100

Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys

10

15

20

25

20

tat atc ctg gat gcc atc ctg ttt ctg tat gga att gtc ctc acc ctc 148

Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu

30

35

40

ctc tac tgt cga ctg aag atc caa gtg cga aag gca gct ata acc agc 196

Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser

45

50

55

30

tat gag aaa tca gat ggt gtt tac acg ggc ctg agc acc agg aac cag 244

Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln

60

65

70

gag act tac gag act ctg aag cat gag aaa cca cca cag tag 286

Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln

75

80

85

40

ctttagaata gatgcggtea tattcttctt tggettctgg ttcttccage cctcatgggt 346

ggcatcacat atgcctgcat gccattaaca ccagctggcc ctaccctat aatgatcctg 406

tgctcctaaat taatatacac cagtggttcc tctcctctgt taaagactaa tgctcagatg 466

ctgtttacgg atattttatat tctagtctca ctctcttgtc ccacccttct tctcttcccc 526

attcccaact ccagctaaaa tatgggaagg gagaaccccc aataaaaactg ccatggactg 586

gactc 591

10

<210> 16

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala

1 5 10 15

20

Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu

20 25 30

Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile

35 40 45

Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val

50 55 60

Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys

65 70 75 80

30

His Glu Lys Pro Pro Gln

85

<210> 17

<211> 593

<212> DNA

<213> Mus musculus

40

<220>

<221> source  
<222> (1).. (593)

<220>  
<221> gene  
<222> (1).. (593)

<220>  
<221> CDS  
<222> (43).. (303)

10

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (43).. (96)

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (97).. (300)

20

<300>  
<303> J. Biol. Chem.  
<304> 264  
<306> 15323-15327  
<307> 1989

30

<400> 17  
tgategccag ctcccagegc cgcagccccc agcgcaccca gg atg atc tca gcc 54  
Met Ile Ser Ala  
-15

gtg atc ttg ttc ttg ctc ctt ttg gtg gaa caa gca gcc gcc ctg gga 102  
Val Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala Ala Ala Leu Gly  
-10 -5 -1 1 40

gag cag cag ctc tgc tat atc ctg gat gct gtc ctg ttt ttg tat ggt 150  
Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Val Leu Phe Leu Tyr Gly



Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Val Leu  
 20 25 30  
 Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile  
 35 40 45  
 Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Ala Ser Arg Glu Lys Ala Asp Ala Val  
 50 55 60  
 Tyr Thr Gly Leu Asn Thr Arg Ser Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys  
 65 70 75 80  
 His Glu Lys Pro Pro Gln  
 85

10

### 【図面の簡単な説明】

図1は、OPC及び未熟オリゴデンドログリアにおけるFcRの*in vitro*での発現を示す。A: FcR発現のRT-PCRによる検出。OPCはFcRを発現している(a)が、CD3は発現していない(b)。骨髄由来の肥満細胞並びに脾臓細胞(58)をポジティブコントロールとして使用した。半定量的RT-PCRでは、FcRのmRNA発現量は未熟オリゴデンドログリアと肥満細胞とでほぼ同等であった(データ省略)。B: 免疫細胞化学的手法によるFcRの検出。FcRはA2B5陽性オリゴデンドログリア前駆細胞(a, b)、04陽性(c, d)及び01陽性未熟オリゴデンドログリア(e, f)にて発現している。Barは15µm。C: 未熟オリゴデンドログリアのWestern Blotでは、野生型マウス(wt)由来の細胞からはFcRの顕著な発現を認めたが、FcR欠損型マウス(FcR<sup>-/-</sup>)(58)由来の細胞からは認めなかった。

20

図2は、*In vivo*におけるFcR発現細胞の分布を示す。大脳の冠状断切片上で、FcR発現細胞はP0で主にSVZ内に分布している(a)。P4ではこれらの細胞分布は白質に広がりを見せ(b)、P7では主に白質内に限局している(c)。FcR陽性細胞はSVZに見られ、VZ(ventricular zone)のmouse-Musashi-1(m-Msi-1)陽性細胞層に隣接して存在しており(41)、FcR陽性細胞が神経幹細胞由来であることを示唆している(d, e)。成体CNS内でもFcR陽性細胞は存在し続けており、その分布はP7におけるものに類似している。即ち、分布は脳室上部の白質に限局されており、灰白質にはほとんど見られない(f)。LV: lateral ventricle(側脳室)、cc: corpus callosum(脳梁)、vz: ventricular zone(脳室帯)、svz: subventricular zone(脳室下帯)、CTX: cerebral cortex(大脳皮質)、CG: cingulum(帯状束)、Cpu: caudate putamen(被殻・尾状核)。Barは50µm(c)、25µm(e)、50µm(f)。

30

図3は、FcR陽性細胞は*in vivo*でオリゴデンドログリアの系列に由来することを示す。A: P0大脳冠状断切片の二重染色像では、FcR陽性細胞は主にSVZ内に分布していることを示している(a)。これらの細胞のほとんどはGFAPの発現細胞、即ちアストログリアの系列の細胞、と一致しない(b)。Ox-42陽性であるミクログリアの系列の細胞とFcR陽性細胞の分布は明らかに異なる(c)。以上より、この日齢におけるFcR陽性細胞は主にオリゴデンドログリア系列に由来する。bはaを拡大したものである(囲ってある領域)。o: オリゴデンドログリア系列の細胞、a: アストログリア系列の細胞、m: ミクログリア系列の細胞。Bar: は、50µm(a, c)、25µm(b)。B: P7におけるミエリン形成以前の脳梁における冠状断二重染色写真。FcRとFynは細胞膜に共在している(矢印の頭; a)。MAGはFcRと共染色される(矢印の頭)が、その発現は細胞突起の先端でより強くなっている(b)。

40

50

Barは25 $\mu$ m。C：成体CNS内のFcR陽性細胞の性質。FcR-MBP二重陽性オリゴデンドログリア系細胞は白質内に見られ、新生児CNSの分布に類似している(a)。一方、GFAP陽性細胞の一部の集団、主に成体SVZ内に見られるそれら集団もFcR陽性である(b)。Barは25 $\mu$ m。D：連続切片の解析によって、FcR(a)、Fyn(b)、及びMBP(c)の分布に類似性がある(矢印及び矢印の頭)ことが示された。写真はP7の脳梁および脳弓の一部の部分を撮影してある。FcRはFynやMBPと異なり、軸索にも発現している(46)。Barは50 $\mu$ m。

図4は、*In vitro*におけるFcRの活性化を示す。A：抗FcR抗体による24時間の刺激によって、OPCは顕著な形態学的な変化を示し、良く発達した突起を伸ばした(b)。同様な変化がIgG2b(エピトープはマウスでは存在しない;47)で代用して投与した際にも見られた(c)。これらの変化は刺激なしには観察されなかった(a)。Barは35 $\mu$ m。B：Western blottingによるMBPとFynの検出。Aの写真の細胞が溶解され、解析された。主にエクソン2を有するMBPアイソフォーム(17.0kD and 21.5kD)及びFynが、活性化刺激のないOPC(ctrl;1レーン)に比して、抗FcRで刺激されたOPCで上昇していた(FcR;2レーン)。IgGに対するFc受容体を介するように、IgG2bで刺激したOPC(IgG2b;3レーン)でもMBPの発現は上昇したが、Fynに関しては顕著な差が見られなかった。これは恐らく刺激方法が間接的であることを反映している。OPC及び分化後のオリゴデンドログリア双方のマーカーであるCNPaseをローディングコントロールとして使用した。C：FcR欠損マウス(FcR-/-)(58)由来のOPCをIgG2bは刺激することができない(bとaを比較)。これはAで見られたOPCの変化がFcR依存性であることを示している。Barは35 $\mu$ m。

図5は、野生型(Wt)、FcR欠損(FcR-/-)、Fyn欠損(Fyn-/-)、MBP欠損マウス(MBP-/-)の比較を示す。A：P10の脳冠状断を示している。a-d、b-e、c-fは隣接切片であり、ミエリン及びミエリン形成中のオリゴデンドログリアの形態が容易に観察し得る帯状束領域を選んで撮影している。MBPの分布はFcR欠損マウス(b)及びFyn欠損マウス(c)で減少しており、これら二者のうち、Fyn欠損マウスはより重篤な表現型を示している(c)。MAG陽性未熟オリゴデンドログリア(矢印の頭)は3種類全ての変異マウスで制限されている。このうちMBP欠損マウスは最も重篤で(g)、Fyn欠損マウスは中間であり(f)、FcR欠損マウスの表現型が最も軽症である(e)。これらの所見はミエリン形成を担うオリゴデンドログリア内にFcR-Fyn-MBPカスケードが存在することを示している。Barは100 $\mu$ m。B：Western blotによるミエリン分画中のMBPの解析。MBPはFyn欠損及びFcR欠損マウスで、P10(a)及び成体(b)の何れでも減少が見られる。成体CNSでは、全MBP量はFyn欠損及びFcR欠損マウスでそれぞれ野生型マウスの40.3%及び60.8%まで減少している(54)。エクソン2を有するMBPアイソフォーム(17.0kD及び21.5kD)は残る2つのアイソフォームより、より重篤に影響を受けており、Fyn欠損及びFcR欠損マウスでそれぞれ野生型マウスの31.9%及び40.0%まで減少している(54)。これらの結果は*in vitro*の結果(図4)と合致する。C：P10までに大脳皮質へ移動した、MAG陽性未熟オリゴデンドログリア(6)をそれぞれの冠状断切片で数値評価し、統計的に解析した(55)。一切片当たりのそれら細胞数は、FcR欠損、Fyn欠損、MBP欠損マウスでそれぞれ野生型の約44%、25%、12%であった。この結果はMBPの量と比例しており、エクソン2を有するMBPがミエリン形成に重要であることを示唆している。

図6は、FcR欠損によるミエリン形成不全を示す。A：FcRは、OPCのマーカーであるPDGF-R(56)と視神経で共染色され(矢印の頭;a)、FcRがオリゴデンドログリア系列の細胞に発現していることを示している。P10におけるPDGF-R陽性細胞(矢印)の分布に、FcR欠損マウス(FcR-/-)(c)と野生型マウス(b)との間に顕著な差は認められなかった。SVZと白質の境界領域が示さ

10

20

30

40

50

れている。これらの所見は、P10で観察されたミエリン形成の初期異常(図5)はミエリン形成過程の障害によるもので、グリア発生の障害によるものではないことを示している。bとcはメチルグリーンでカウンター染色している。Barは40 $\mu$ m。B: MAG陽性オリゴデンドログリア(6, 55)をより遅い発達段階で統計的に解析すると、細胞数にP50或いはP90で顕著な差異は認められない(a)。しかしながらこの時点になってもミエリンの異常は明らかに認められた。免疫組織化学的な解析の結果、MBPだけでなく(データ省略; 図5B-b参照)、P50の脳梁でPLPの染色性が野生型(b)に比して減少しているのをFcR欠損マウスで認めた(c)。Barは40 $\mu$ m。C: 電子顕微鏡では、P67の脳梁背側領域で重篤なミエリン低形成がFcR欠損マウスで認められる(aとbを比較)。脳梁腹側領域では、FcR欠損マウスの低ミエリンが伴った軸索にて、軸索の膨化(アスタリスク)が認められた(cとdを比較)。Barは2 $\mu$ m(b)、500nm(d)。

図7は、FcRI/III及びCD45がオリゴデンドログリア内にFcRと共発現していることを示す。A: 未熟オリゴデンドログリアのRT-PCR(37)ではFcRI/IIIの鎖は検出されるが、FcRIの鎖は検出されない。故に、FcRのパートナーはIgG特異的なFc受容体であることを示唆している。半定量的RT-PCRでは、骨髄由来肥満細胞に比して、未熟オリゴデンドログリアでは約1.8倍(FcRI)及び0.8倍(FcRII)のmRNA発現があることが分かった(データ省略)。B: CD45はMAG陽性細胞に発現しており(矢印の頭)、即ちオリゴデンドログリア内に発現している(c)。CD45はP10におけるミエリン形成初期段階にて、オリゴデンドログリア内にてFynと共発現している(矢印の頭; b)。CD45はまたP7(矢印の頭; d)及び成体CNS(矢印の頭; a)内の拡張中のミエリン鞘でFcRと共発現している。これら写真は全てCNS内の白質を示している(aは白質と成体SVZの境界領域、b及びdは脳梁、cは前交連)。Barは25 $\mu$ m。C: CD45は培養未熟オリゴデンドログリアのフローサイトメトリーで容易に検出されたが(37)、アストロサイトでは検出されなかった。これらの所見はCD45が本発明者らの提唱するシグナルカスケードの制御に参与していることを示唆している。

図8は、本発明者らが提唱するミエリン形成メカニズムを示す。IgGのような細胞外シグナルが、IgGに対するFc受容体(FcRI/III)と会合することで、FcRを始動させる。CD45はまずFynを活性化し、次いでFcRのITAMリン酸化がFynのチロシンキナーゼ活性によって生じる。このシグナルはMBP、特にエクソン2を有するアイソフォーム、の発現を促進する。MBPは、以前報告したように、MAGの発現調節に寄与する(6)。FcRsの遺伝子多型(66)及びCD45の変異(23)がMSの一部の集団では存在していることが報告されている。このモデルは脱髄の機序及びIVI療法脱髄疾患への効果(62)を説明できる。FcRの直接的活性化(図4)は将来的にミエリン再生を促進する、効果的な治療法となりうる。

図9a~dは、生後10日齢マウスの脳のMBPに対する免疫組織化学染色像である。各写真の右上にある(野生型、FcR<sup>-/-</sup>、Fyn<sup>-/-</sup>、FcR<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup>)は遺伝型である。何れの動物も血統はC57B1/6である。脳梁から帯状束にかけての領域(大脳)を写真にしてある。写真下部にある楕円形の構造は海馬に相当する。写真の通り、MBPの発現量はWild > FcR<sup>-/-</sup> > Fyn<sup>-/-</sup> > FcR<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup>となっている。

図10a~dは図9に類似するが、MAGに対する染色である。解釈は図9に同じ。eはMBPを欠損したShivererマウス(MBP<sup>-/-</sup>)の脳である。FcR Fyn MBPのカスケードを考えている訳であるが、図9のdにあるように、FcRとFynを両方潰すとほとんどMBPが検出できない。そこで、MBPをそもそも欠損している動物と同じような表現型になるかを見たわけである。事実、MAGの発現パターンはMBPの欠損マウスとFyn・FcRの二重欠損マウス(FcR<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup>)で類似し、fにあるグラフの通り、MAG陽性未熟オリゴの数も類似する。即ち、FcRとFynがMBPの発現に必須であることを示した。

10

20

30

40

50

図11 a - dは、生後1.5ヶ月(P1.5M)のそれぞれ右上にある遺伝型のマウスの大脳皮質を示している。染色はMBPである。FynとFcRの欠損型では野生型よりも1 大脳皮質が若干薄く、2 MBPの染色が弱い、ということが判る。更にFcR・Fynの二重欠損では、1 大脳皮質は極めて薄く、2 MBPの染色はほぼ消失している、ことがわかる。これは図9、10で示した生後10日齢の現象が、成長に伴って代償されるものではなく、永続的な障害となっていることを示している。e - hはNissl染色であるが、それぞれ、写真の下に記している遺伝型と日・月齢である。矢印は、水頭症が生じていること示している。矢印が指しているのは脳室に相当する領域であるが、ここに脳脊髄液が過剰にたまっているのがわかる。P10ではP1.5M程ではないが、同じような水頭症が見られる。

10

図12 a, bは培養OPCの写真である。aは位相差像、bはCD45に対する免疫染色像である。矢印はCD45が陽性のOPCを指している。一方、Arrowhead(矢印の頭だけのもの)はあまり染まっていない(むしろ陰性)のOPCを指している。陽性細胞はより突起があり、分化が進んでいるOPCであるが、陰性のものはまだあまり分化していないOPCに相当する。つまり、分化と関連してCD45が発現していることを示している。cは生後7日齢の野生型大脳の写真で、領域としては内包周囲になる。MAGで染まるオリゴがCD45も染まっている(矢印)。即ちオリゴデンドログリアがCD45陽性であることが示されている。一方でArrowheadはCD45のみが陽性のものを指している。これはオリゴデンドログリア以外の細胞か、あるいはまだMAGを発現していない未分化オリゴデンドログリアが染まっていることを示している。FimはFimbria(脳弓)で、LVはLateral Ventricle(側脳室)である。d, eはCD45の染色像である。これは使用しているCD45抗体が特異的に反応しているか確認したものである。野生型ではCD45陽性細胞が、特にCC(脳梁)等の白質で染まっているが、CD45欠損マウス(CD45-/-)ではそれが染まらない。従って、抗体は特異的反応を示していることを示唆する。ただ、CD45欠損マウスでもLV(側脳室)内にある脈絡叢と呼ばれる構造物がCD45で染まっている。この部位は非特異的反応が出る場所として知られている。CTXはCortex(大脳皮質)、CCはCorpus Callosum(脳梁)、SVZはsubventricular zone(脳室下帯)である。

20

図13 aは野生型並びにCD45欠損マウス(CD45-/-)からの培養OPCに、何も刺激しないか(コントロール)或いは抗FcR抗体で24時間刺激したときの写真である。野生型は刺激によって細胞の形態が分化するが、CD45欠損は分化しない。CD45がOPCの分化に必要であることを示している。bはaの細胞をWestern blotで見たものである。FcRの刺激だけでなく、IgGによる刺激も入れている。IgGとFcRの刺激によって野生型ではMBPの発現増大が見られるが、CD45欠損マウスではそれが起こらない。つまりCD45がOPCの分化に必要であることを示している。cはP10の野生型・CD45欠損マウス・Fyn欠損マウス(Fyn-/-)の脳よりミエリン分画を抽出して、Western BlotにてMBPを検出したものである。写真の通り、CD45欠損マウスとFyn欠損マウスでは野生型に比してMBPの減少が見られ、これは組織解析の結果(d - h)を支持すると共に、CD45もFynもミエリン形成(MBPの発現)に重要であることを示唆している。d, eは野生型とCD45欠損マウスの生後10日齢の線条体のミエリンをMBPに対する免疫組織化学で見ている写真である。LVは側脳室である。CD45欠損マウスではMBPの発現低下が見られる。さらにf, g, hはMAGに対する免疫組織化学をそれぞれP10で行ったものである。CD45はFynの活性化を担っていると推測されることから、Fyn欠損マウスと比較している。野生型では多数のMAG陽性オリゴデンドログリアが脳梁(CC)にも大脳皮質内(CTX)にも見られるが、CD45欠損、Fyn欠損ではいずれも同じように減少している。これらのことはCD45がFynの活性化に関わっていることを支持する。

30

40

図14は、生後1.5ヶ月の野生型並びにCD45欠損マウス(CD45-/-)の線条

50

体と呼ばれる領域のミエリンを観察したものである。MBPに対する免疫組織化学染色で、CD45欠損マウスではミエリンの染まりがまだらになり、ミエリンの崩壊（或いは最初からの形成不全）を示唆している。つまり、図12、13で示したミエリン異常が生後1.5ヶ月になって成熟してもまだ引き続いており、代償されないことを示している。（つまりP10での像が単なる成長不良ではないことを示す）。

図15は、IgGを欠損しているμMTのマウスと野生型をP7で比較している、MAGに対する免疫組織化学の像である。大脳の断面を示している。これらはいずれもμMTでミエリンの減少を示している。これらは、IgGが実際に生理的機能としてミエリン形成に必要であることを示している。

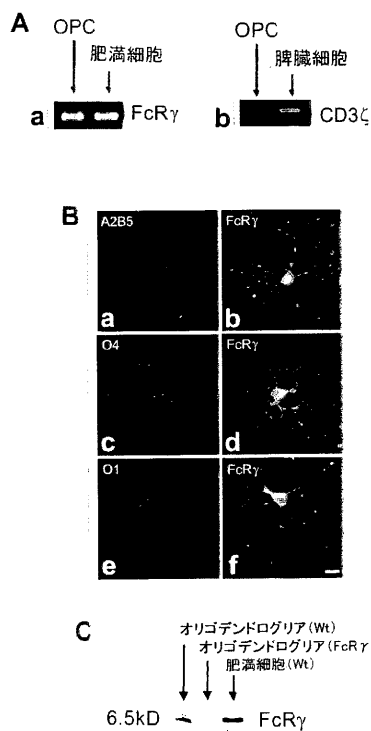
図16は、IgGを欠損しているμMTのマウスと野生型をP10で比較している、MAGに対する免疫組織化学の像である。大脳の断面を示している。これらはいずれもμMTでミエリンの減少を示している。これらは、IgGが実際に生理的機能としてミエリン形成に必要であることを示している。

図17は、IgGを欠損しているμMTのマウスと野生型(Wt)を成体(P50)で比較している、MAGに対する免疫組織化学の像である。大脳皮質内を示している。これらはいずれもμMTでミエリンの減少を示している。これらは、IgGが実際に生理的機能としてミエリン形成に必要であることを示している。

10

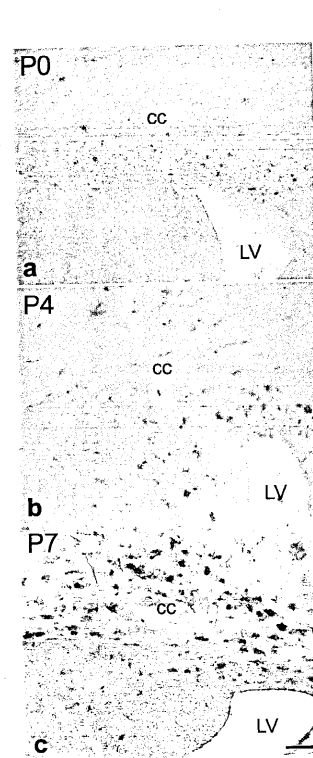
【図1】

図1

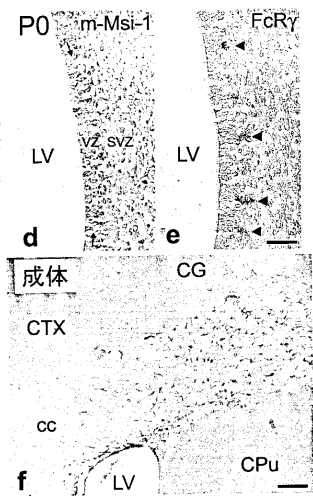


【図2 a - c】

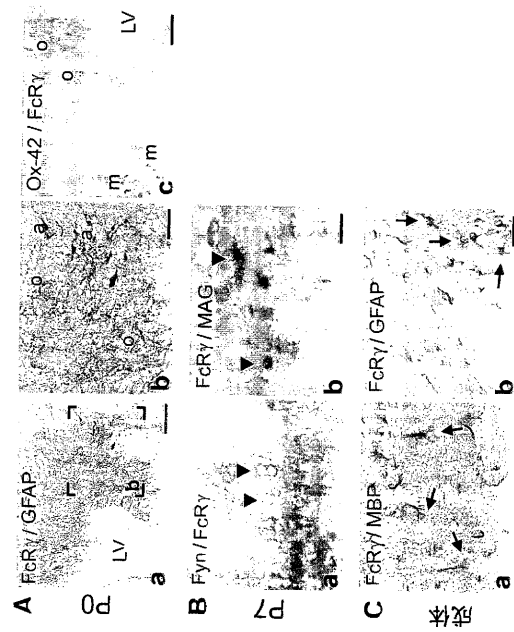
図2 a, b, c



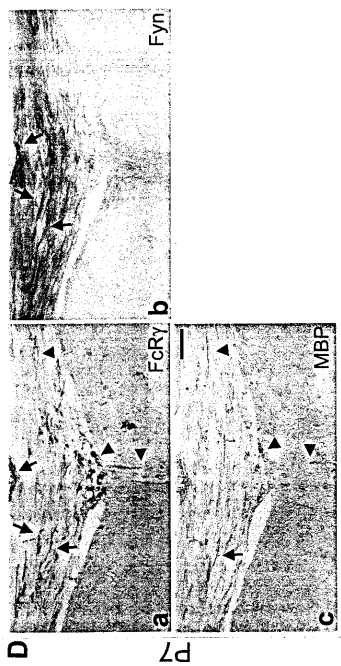
【 図 2 d - f 】 図 2 d, e, f



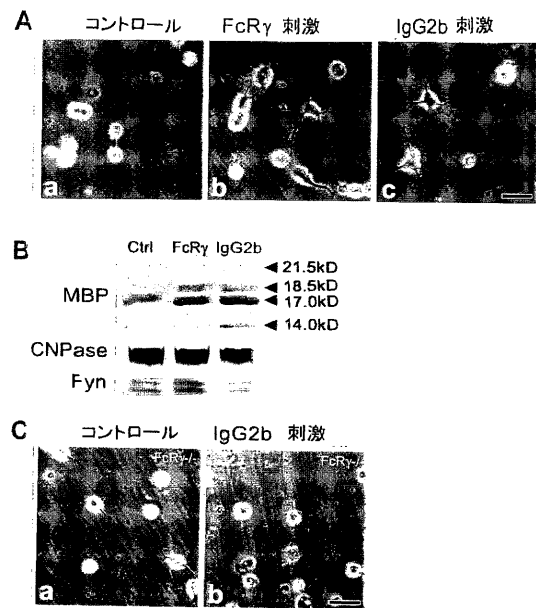
【 図 3 A - C 】 図 3 A, B, C



【 図 3 D 】 図 3 D

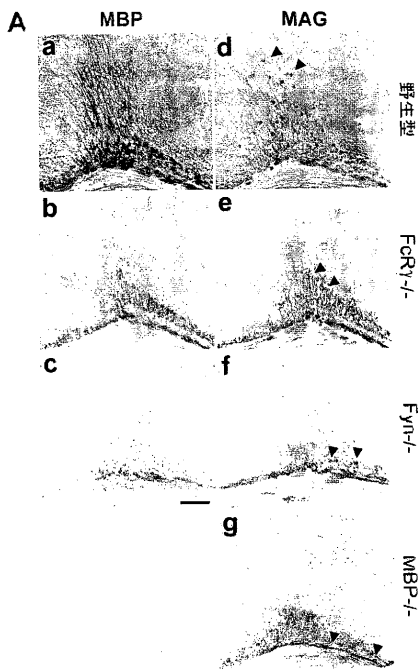


【 図 4 】 図 4



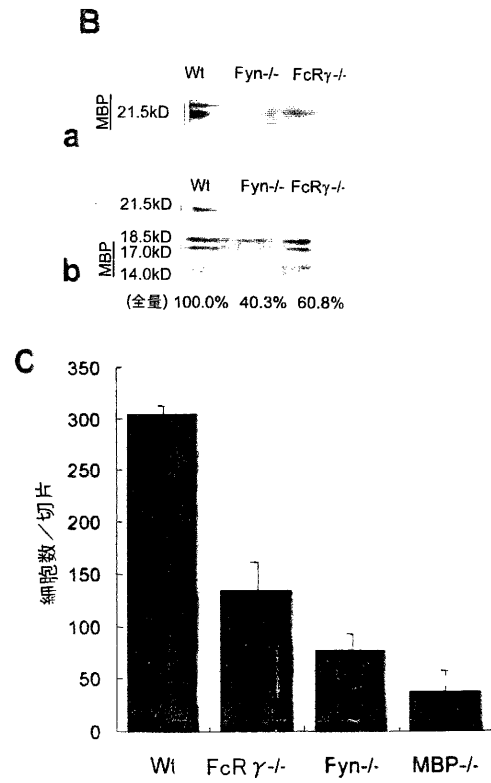
【 図 5 A 】

図 5 A



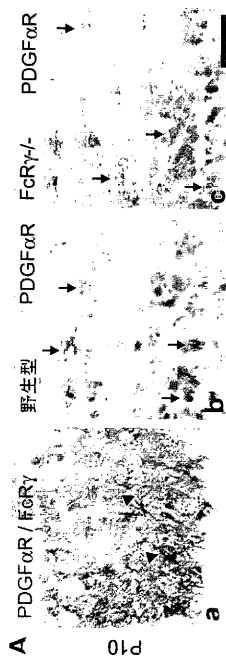
【 図 5 B - C 】

図 5 B, C



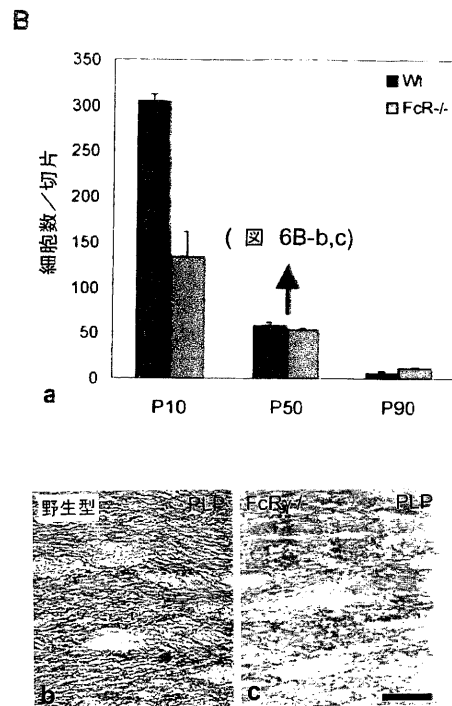
【 図 6 A 】

図 6 A



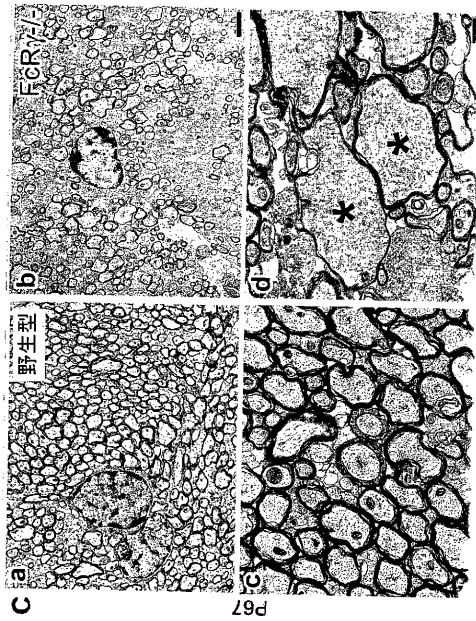
【 図 6 B 】

図 6 B



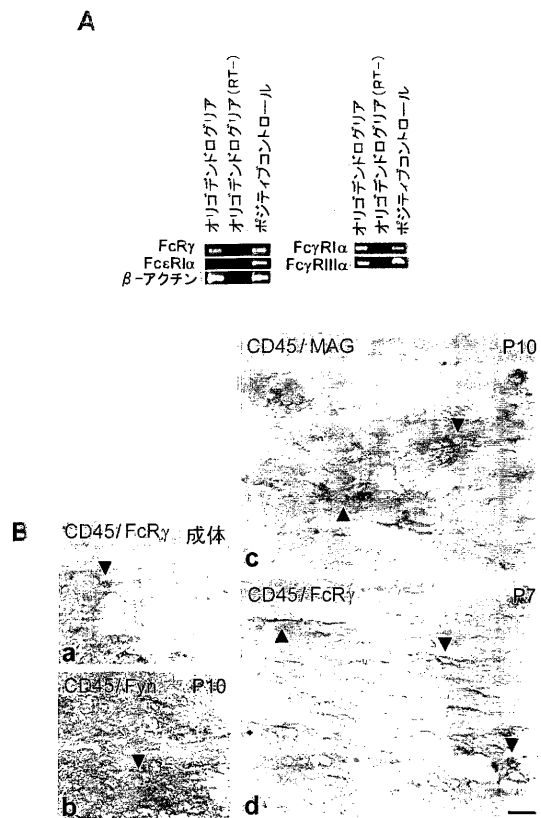
【 図 6 C 】

図 6 C



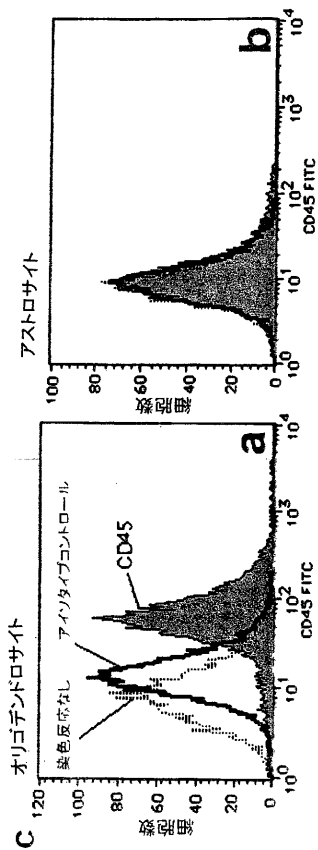
【 図 7 A - B 】

図 7 A, B



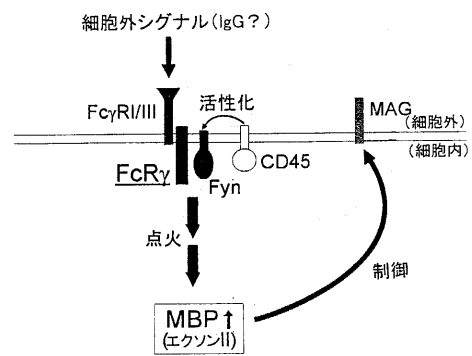
【 図 7 C 】

図 7 C



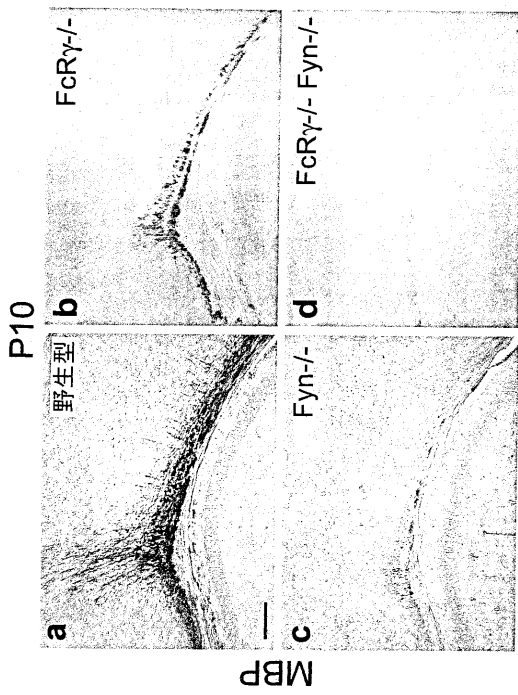
【 図 8 】

図 8



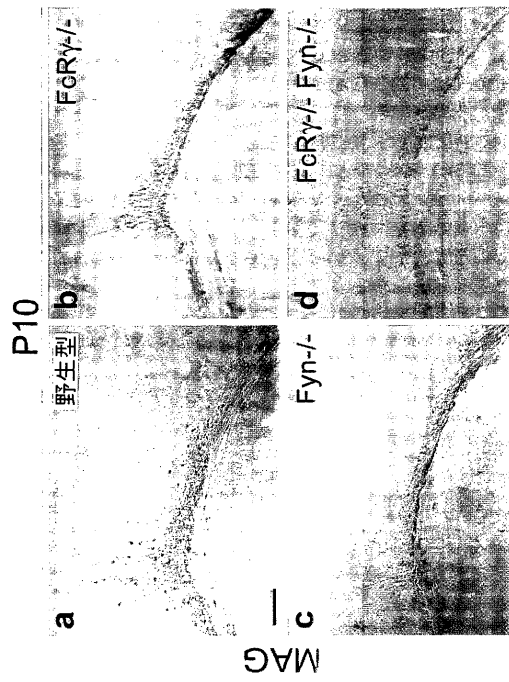
【 図 9 】

図 9



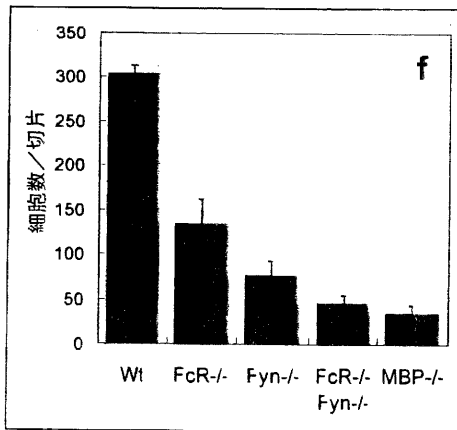
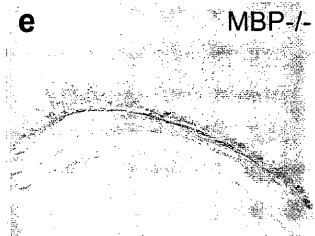
【 図 10 a - d 】

図 10 a, b, c, d



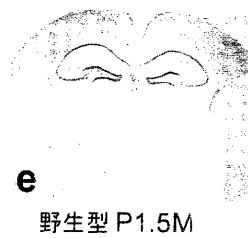
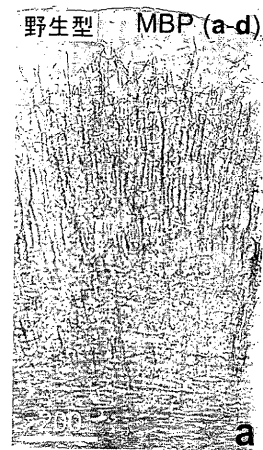
【 図 10 e - f 】

図 10 e, f

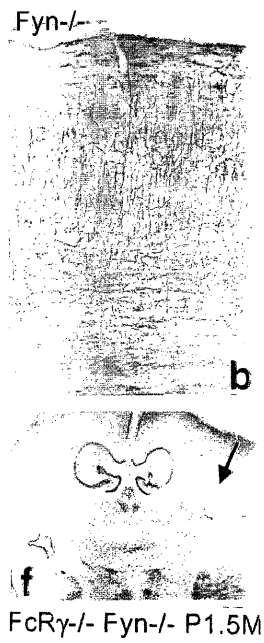


【 図 11 a - e 】

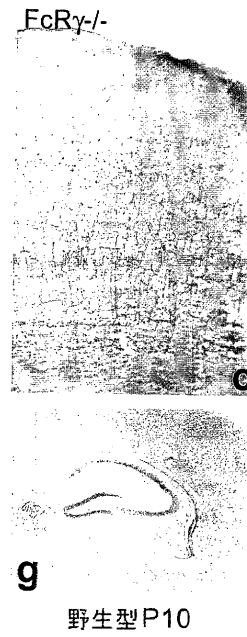
図 11 a, e



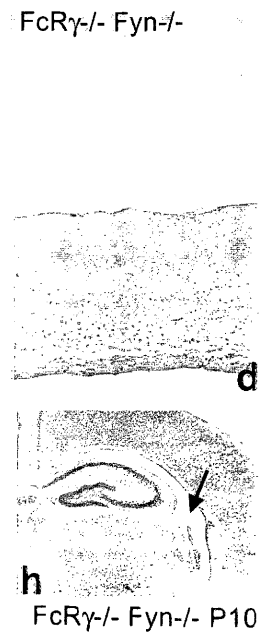
【図11b-f】  
図11b, f



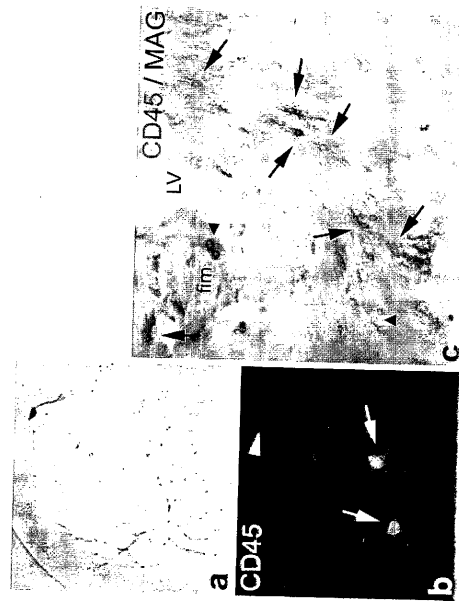
【図11c-g】  
図11c, g



【図11d-h】  
図11d, h

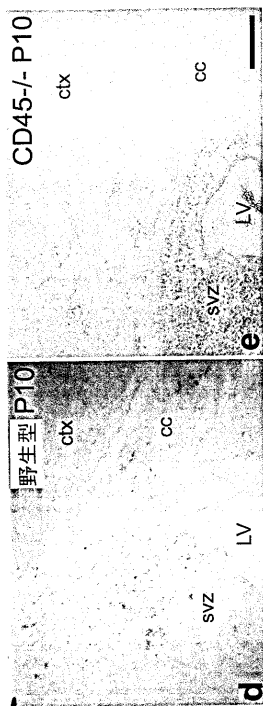


【図12a-c】  
図12a, b, c



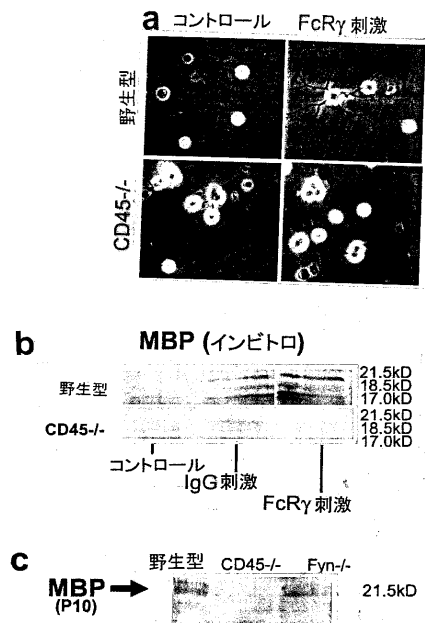
【 図 1 2 d - e 】

図 1 2 d, e



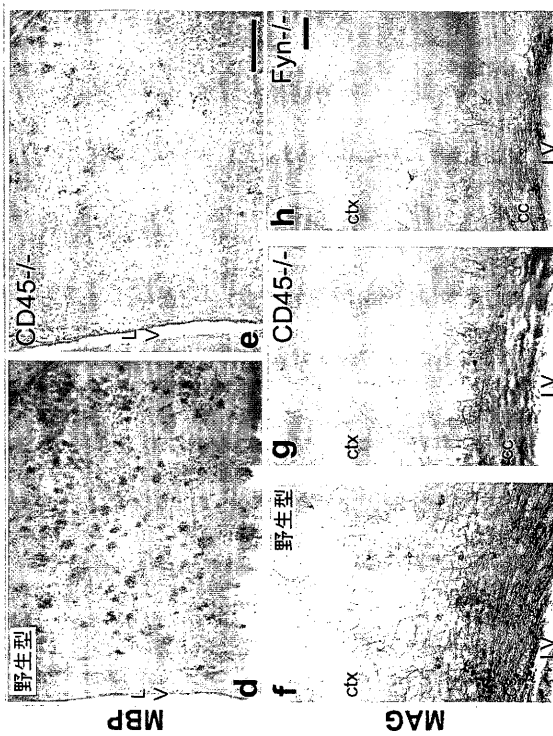
【 図 1 3 a - c 】

図 1 3 a, b, c



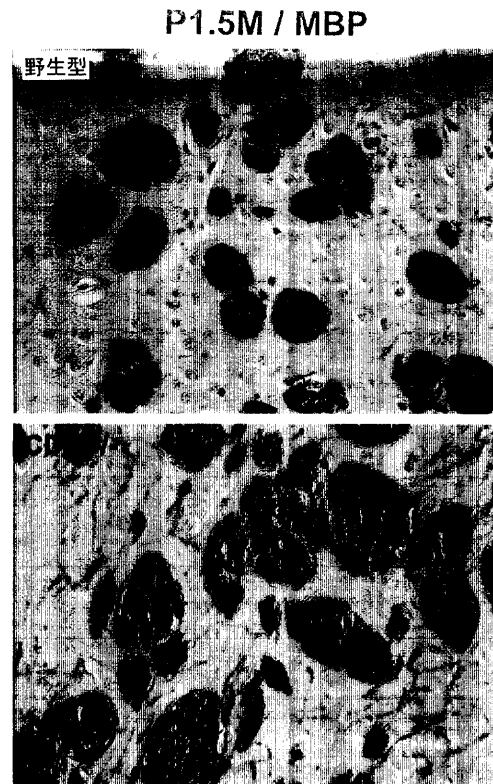
【 図 1 3 d - h 】

図 1 3 d, e, f, g, h



【 図 1 4 】

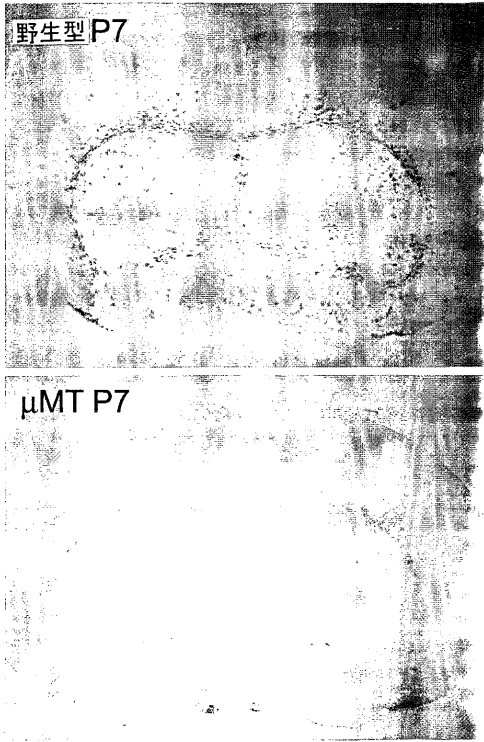
図 1 4



【 図 1 5 】

図 1 5

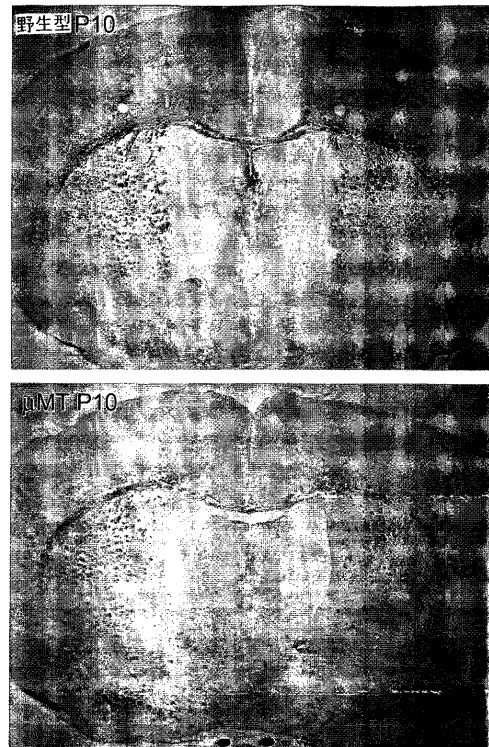
MAG



【 図 1 6 】

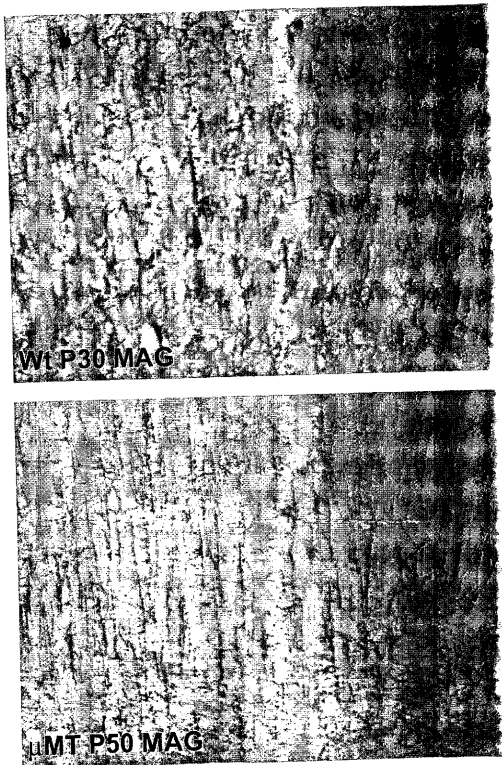
図 1 6

MAG



【 図 1 7 】

図 1 7



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/07378
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. <sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P43/00  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P43/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1926-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	EP 826696 A1 (GSF-Forschungszentrum Umwelt & Gesundheit, GmbH), 04 March, 1998 (04.03.98), Full text & JP 10-182487 A	1,9-11 21-32 2-8,12-20
X Y A	EP 826695 A1 (GSF-Forschungszentrum Umwelt & Gesundheit, GmbH), 04 March, 1998 (04.03.98), Full text & JP 10-179151 A	1,9-11 21-32 2-8,12-20
Y	JP 2001-133448 A (Japan Science and Technology Corp.), 18 May, 2001 (18.05.01), Full text (Family: none)	21,22,26,27, 30,31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "F" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October, 2002 (22.10.02)		Date of mailing of the international search report 05 November, 2002 (05.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/07378

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 9-145714 A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), 06 June, 1997 (06.06.97), Full text (Family: none)	21-24, 28, 29
Y	JP 2000-135089 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 May, 2000 (16.05.00), Full text (Family: none)	21, 22, 25, 32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/07378

<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Concerning the invention as set forth in claim 1 and the inventions as set forth in claims 21 to 32, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Such being the case, this international application fails to fulfill the requirement of unity of invention.	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input checked="" type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/07378
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, A61P43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1992 日本国公開実用新案公報 1971-1992 日本国登録実用新案公報 1994-1996 日本国実用新案登録公報 1996-2002		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 826696 A1 (GSF-FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT & GESUNDHEIT, GmbH)	1,9-11
Y	1998.03.04 全文	21-32
A	& JP 10-182487 A	2-8,12-20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の目的後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.10.02	国際調査報告の発送日 <b>05.11.02</b>	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 岩下 直人 電話番号 03-3581-1101 内線 6612	4C 9841 印

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/07378
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 826695 A1 (GSF-FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT & GESUNDHEIT, GmbH)	1, 9-11
Y	1998.03.04 全文	21-32
A	& JP 10-179151 A	2-8, 12-20
Y	JP 2001-133448 A (科学技術振興事業団) 2001.05.18 全文 (ファミリーなし)	21, 22, 26, 27, 30, 31
Y	JP 9-145714 A (出水興産株式会社) 1997.06.06 全文 (ファミリーなし)	21-24, 28, 29
Y	JP 2000-135089 A (中外製薬株式会社) 2000.05.16 全文 (ファミリーなし)	21, 22, 25, 32

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO2/07378
<p><b>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</b>            法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p><b>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</b>            次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>請求項1の発明と請求項2 1-3 2の発明とは、これらの発明の間に一又は二以上の同一の又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるものとは認められない。したがって、本国際出願は、発明の単一性を欠如している。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/68  
G 0 1 N 33/53  
G 0 1 N 33/566  
// C 0 7 K 16/28

F I

A 6 1 P 29/00  
C 1 2 Q 1/02  
C 1 2 Q 1/68 A  
G 0 1 N 33/53 D  
G 0 1 N 33/53 M  
G 0 1 N 33/566  
C 0 7 K 16/28

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	包含Fc受体γ链活化剂的药物组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2003011337A1</a>	公开(公告)日	2004-11-18
申请号	JP2003516567	申请日	2002-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
[标]发明人	中原仁 阿相皓晃 相磯貞和		
发明人	中原 仁 阿相 皓晃 相磯 貞和		
IPC分类号	A61K45/00 A61K39/395 A61P25/00 A61P29/00 A61P43/00 C07K16/28 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K45/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/283		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P25/00 A61P29/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C07K16/28		
代理人(译)	间山 世津子 野村健一		
优先权	2001229553 2001-07-30 JP		
其他公开文献	JP4214249B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了一种药物组合物，其包含能够激活Fc受体γ链的物质（然而，静脉内免疫球蛋白除外）作为活性成分，以及髓磷脂形成促进剂。还提供了少突胶质祖细胞分化启动子，Fyn酪氨酸激酶激活剂和髓磷脂碱性蛋白表达启动子，它们含有能够激活Fc受体γ链的物质作为活性成分。还提供了一种以少突胶质细胞或其祖细胞中的Fc受体γ链的表达为指标，检测能够形成髓鞘的少突胶质细胞或其祖细胞的方法。

