

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年7月22日(22.07.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/145432 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 25/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/001261

(22) 国際出願日: 2021年1月15日(15.01.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-004444 2020年1月15日(15.01.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 田辺三菱製薬株式会社 (MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪府中央区道修町三丁目2番10号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 山下 俊英 (YAMASHITA, Toshihide); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 糸数 隆

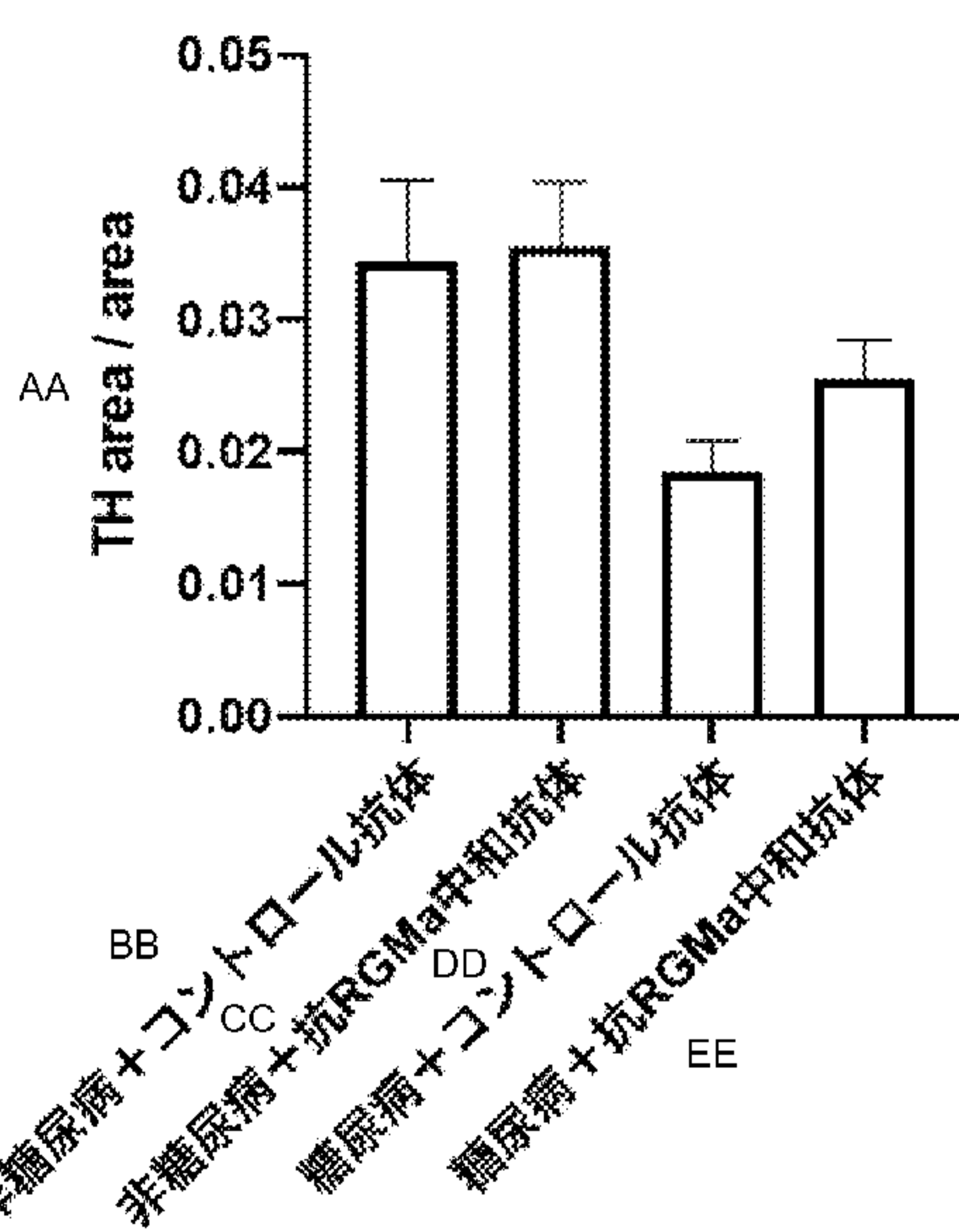
秀 (ITOKAZU, Takahide); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 宇野 広樹 (UNO, Hiroki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 石田 裕一 (ISHIDA, Hirokazu); 〒5418505 大阪府大阪府中央区道修町三丁目2番10号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所 (IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス 21ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: AGENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF DIABETIC AUTONOMIC NEUROPATHY

(54) 発明の名称: 糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤



AA TH area/area
BB Non-diabetes + control antibody
CC Non-diabetes + anti-RGMa neutralizing antibody
DD Diabetes + control antibody
EE Diabetes + anti-RGMa neutralizing antibody

(57) Abstract: Provided is an agent for the prevention or treatment of diabetic autonomic neuropathy, said agent containing an RGMa inhibitor.

(57) 要約: R G M a 阻害物質を含む、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤を提供する。

WO 2021/145432 A1

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、RGMa阻害物質を含む、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤に関する。

背景技術

[0002] 糖尿病性神経障害は糖尿病に特有の3大合併症の一つであり、早期に発症し、その頻度も高い。なかでも、糖尿病性自律神経障害は、慢性の高血糖により生じる全身の臓器を司る自律神経線維の障害であり、多彩な兆候や症状を呈する複雑な疾患である。心血管系、消化器系、泌尿器・生殖器系、皮膚、瞳孔、副腎などの機能に異常をきたし、それぞれ、起立性低血圧・食事性低血圧、胃排出障害、膀胱・性機能障害、発汗異常、瞳孔異常、無自覚低血糖を呈する（非特許文献1）。

[0003] また、糖尿病の3大合併症の一つである糖尿病性腎症は病態の進展に伴い、慢性腎不全へと移行する。糖尿病性腎症は、わが国での末期腎不全に対する透析療法導入原因疾患の第一位であり、その際、尿毒性並びに糖尿病性の双方に起因する自律神経障害を伴うことが知られている（非特許文献2、非特許文献3）。

[0004] 一方、糖尿病を有する腎不全患者で、蛋白尿が乏しい症例が存在する。これは他の腎疾患、特に高血圧性腎硬化症を糖尿病に合併していると考えられるが、蛋白尿を伴うことが前提である糖尿病性腎症との鑑別は困難である。そこで、2007年に米国では、病理所見を診断の必要条件とせず、臨床的に糖尿病がその発症や進展に関与していると考えられる慢性腎臓病（Chronic kidney disease:CKD）を糖尿病性腎臓病（Diabetic Kidney Disease:DKD）と定義し（非特許文献4）、日本でも糖尿病性腎臓病という病名を使用することになった。糖尿病性腎臓病は糖尿病性腎症を含む概念である（非特許文献5）。

このような概念の変化を反映して、過去の病期分類では糖尿病性腎症の進行には尿蛋白を伴うことが前提であったが、現在は糖尿病に腎機能障害が合併する場合に尿蛋白の有無は問われていない。

[0005] RGM (repulsive guidance molecule) は、当初、視覚系の軸索誘導分子として同定された膜タンパク質である（非特許文献6）。RGMファミリーには、RGMa、RGMb及びRGMcと呼ばれる3種類のメンバーが含まれ（非特許文献7）、少なくともRGMaとRGMbは同じシグナル伝達機構で働くことが知られている（非特許文献8）。RGMcは鉄代謝において重要な役割を發揮する。

その後の研究により、RGMは、ゼノパス及びニワトリ胚における軸索誘導及びラミナ形成、並びに、マウス胚における頭部神経管の閉鎖の制御等の機能を有することが明らかとなっている（非特許文献9）。特許文献1には抗RGM中和抗体を有効成分として含有する軸索再生促進剤が開示されている。

[0006] 発生段階の機能に加えて、成人ヒト及びラットの中枢神経系損傷後に再発現すること、ラットにおいてRGMa阻害が脊髄損傷後の軸索成長を亢進し、機能回復を促進することから（非特許文献10）、RGMaは中枢神経系損傷後の軸索再生阻害物質であると考えられている。RGMaを中和する具体的な抗体としては、例えば、特許文献2（例えば、5F9、8D1）、特許文献3（例えば、AE12-1、AE12-1Y）および特許文献4（例えば、r116A3、r70E4、r116A3C、rH116A3）に記載されている。

このように中枢神経系損傷ではRGMaの役割が明らかにされているが、特に、糖尿病性自律神経障害、特に糖尿病性腎臓病の治療におけるRGMaの関与は同定されておらず、そのような治療薬は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開 WO2005/087268号

特許文献2：国際公開 WO 2009 / 106356号

特許文献3：国際公開 WO 2013 / 112922号

特許文献4：国際公開 WO 2016 / 175236号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Diabetes Care 26: 1553-1579, 2003

非特許文献2：透析会誌, 19(9), 905-909, 1986

非特許文献3：糖尿病 27(6): 715-721, 1984

非特許文献4：Am J Kidney Dis 2007: 49: S12-154

非特許文献5：エビデンスに基づくCKD診療ガイドライン2018, P.104-105

非特許文献6：Neuron 5, 735-743 (1990)

非特許文献7：Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 361: 1513 - 29, 2006

非特許文献8：Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 795-800 (2009)

非特許文献9：Curr. Opin. Neurobiol.17, 29-34 (2007)

非特許文献10：J. Cell Biol. 173, 47-58 (2006)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、糖尿病性自律神経障害に対する有効な薬剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、RGMa 阻害物質、とりわけ、抗RGMa 中和抗体が、糖尿病性自律神経障害に対する改善効果を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[0011] 1. RGMa 阻害物質を含む、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤。
2. 糖尿病性自律神経障害が慢性の高血糖により生じる自律神経障害又は腎機能障害の原因としての自律神経障害である、項1に記載の予防又は治療剤

- 。
3. 糖尿病性自律神経障害が腎機能障害の原因としての自律神経障害である、項1又は2に記載の予防又は治療剤。
 4. 糖尿病性自律神経障害が腎機能障害に関与する腎疾患である、項1～3のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
 5. 腎機能障害に関与する腎疾患が慢性腎臓病である、項4に記載の予防又は治療剤。
 6. RGMa阻害物質が抗RGMa中和抗体である、項1～5のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
 7. 抗RGMa中和抗体がヒト化抗体である、項6に記載の予防又は治療剤。
 - 。
 8. 抗RGMa中和抗体が配列番号16、配列番号36、配列番号37、配列番号38及び配列番号39から選択されるアミノ酸配列を認識する抗体である、項6又は7に記載の予防又は治療剤。
 9. 抗RGMa中和抗体が、下記(a)～(c)：
 - (a) 配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号10に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、
 - (b) 配列番号11に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号12に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号13に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号15に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及びSFGをアミノ酸配列に含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、
 - (c) 配列番号17に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号18に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号20に記載のアミノ酸配列を含むHC

DR1、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体

、

(d) 配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体

、

(e) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 3 1 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体

、

(f) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 3 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体

、

(g) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(h) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記

載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(i) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(j) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 3 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(k) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 4 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、及び

(l) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a

中和抗体、

から選択される抗体である、項6～8のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。

[0012] 10. 治療を要する哺乳動物に対して有効量のRGMa阻害物質を投与することを含む、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療方法。

11. RGMa阻害物質が抗RGMa中和抗体である、項10に記載の予防又は治療方法。

12. RGMa阻害物質の、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤の製造における使用。

13. RGMa阻害物質が抗RGMa中和抗体である、項12に記載の使用。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、RGMa阻害物質、とりわけ、抗RGMa中和抗体が、例えば、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は糖尿病病態下の腎臓におけるRGMa遺伝子発現変化を示す図である。

[図2]図2は代表的な染色画像を示す図（図面代用写真）である。上段左は、非糖尿病、コントロール抗体投与群、上段右は、非糖尿病、抗RGMa中和抗体投与群、下段左は、糖尿病、コントロール抗体投与群、下段右は、糖尿病、抗RGMa中和抗体投与群の結果を示す。

[図3]図3はTH線維密度の定量データを示す図である。

[図4]図4は尿中アルブミン/尿中クレアチニン比の定量データを示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明に用いられる用語を説明する。

[中和]

本願において中和とは目的の標的に結合し、かつ、その標的のいずれかの

機能を阻害することができる作用のことをいう。例えば、RGMa阻害物質は、RGMaへの結合の結果、RGMaの生物活性を阻害する作用を示す物質をいう。

[0016] [エピトープ]

本願においてエピトープとは、免疫グロブリン又はT細胞受容体に対して特異的に結合し得るポリペプチド決定基を含む。ある実施形態では、エピトープは分子の化学的に活性な表面基（例えば、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル又はスルホニル）を含み、ある実施形態では特定の3次元構造特性及び／又は特定の電荷特性を有し得る。エピトープは抗体により結合される抗原の領域である。

[0017] [単離された]

本願において単離されたRGMa阻害物質（例えば抗体等）等の「単離された」とは、同定され、かつ、分離された、及び／又は、自然状態での成分から回収された、という意味である。自然状態での不純物は、その抗体の診断的又は治療的使用を妨害し得る物質であり、酵素、ホルモン及びその他のタンパク質性の又は非タンパク質性の溶質が挙げられる。一般的に、RGMa阻害物質等を単離するには、少なくとも1つの精製工程によって精製すればよく、少なくとも1つの精製工程により精製されたRGMa阻害物質を「単離されたRGMa阻害物質」ということができる。

[0018] [抗体]

本願において抗体とは、広義には免疫グロブリン（Ig）分子の実質的にエピトープに結合する特徴を保持している2本の重鎖（H鎖）と2本の軽鎖（L鎖）の4本のポリペプチド鎖からなるIg分子を指す。

[0019] [ヒト抗体]

本願においてヒト抗体とは、軽鎖、重鎖ともにヒト免疫グロブリン由来の抗体をいう。ヒト抗体は、重鎖の定常領域の違いにより、 γ 鎖の重鎖を有するIgG（IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む）、 μ 鎖の重鎖を有するIgM、 α 鎖の重鎖を有するIgA（IgA1、IgA2を含む

）、 δ 鎖の重鎖を有するIgD、又は ϵ 鎖の重鎖を有するIgEを含む。また原則として軽鎖は、 κ 鎖と λ 鎖のどちらか一方を含む。

[0020] [ヒト化抗体]

本願においてヒト化抗体は、非ヒト動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域とからなる可変領域、及びヒト抗体由来の定常領域からなる抗体をいう。

[0021] [キメラ抗体]

本願においてキメラ抗体とは、軽鎖、重鎖、又はその両方が、非ヒト由来の可変領域と、ヒト由来の定常領域からなる抗体をいう。

[0022] [モノスペシフィック抗体]

本願においてモノスペシフィック抗体とは、単一の抗原特異性を有する、単一の独立した抗原認識部位を持ち合わせた抗体である。本明細書中においては、例えば、RGMaを認識するモノスペシフィック抗体をRGMaモノスペシフィック抗体と呼称することがある。

[0023] [マルチスペシフィック抗体]

本願においてマルチスペシフィック抗体とは、2つ以上の異なる抗原特異性を有する2つ以上の独立した抗原認識部位を持ち合わせた抗体であり、2つの抗原特異性を有するバイスペシフィック抗体、3つの抗原特異性を有するトリスペシフィック抗体などが挙げられる。

[0024] [相補性決定領域 (CDR)]

相補性決定領域 (CDR) とは免疫グロブリン分子の可変領域のうち、抗原結合部位を形成する領域をいい、超可変領域とも呼ばれ、免疫グロブリン分子ごとに特にアミノ酸配列の変化が大きい部分をいう。CDRには軽鎖及び重鎖それぞれに3つのCDRがある。軽鎖に含まれる3つのCDRをそれぞれLCDR1、LCDR2及びLCDR3、並びに重鎖に含まれる3つのCDRをHCDR1、HCDR2及びHCDR3と呼称することがある。例えば免疫グロブリン分子のCDRはカバット (Kabat) の番号付けシステム (Kabatら、1987、Sequences of Proteins of

Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA) に従って決定される。

[0025] [有効量]

有効量とは、障害又はその1つ以上の症状の重症度及び／又は期間を軽減又は改善させる、障害の進行を予防する、障害を後退させる、障害に関連する1つ以上の症状の再発、発生、発症又は進行を予防する、障害を検出する、或いは別の治療（例えば、予防薬又は治療薬）の1つ以上の予防又は治療効果を強化又は向上させるのに十分な予防又は治療剤の量を指す。

[0026] [アミノ酸配列のパーセント(%)同一性]

可変領域等の候補ポリペプチド配列のアミノ酸配列の、参照ポリペプチド配列のアミノ酸配列に関する「パーセント(%)同一性」とは、配列を整列させ、最大の%同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。%同一性を測定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%同一性値は、ペアワイズアラインメントにおいて、配列比較コンピュータプログラムBLASTを使用することによって得られる。

アミノ酸配列比較にBLASTが用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの%同一性は次のように計算される：

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムBLASTのA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%同一性は、BのAに対する%同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限りは、ここでの全ての%同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにBLASTコンピュータプログラムを用いて得られる。

[0027] [保存的置換]

保存的置換とは、ペプチドの活性を実質的に改変しないように、アミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合等が挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸の例として、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

[0028] 以下、本発明の実施形態について、詳細に説明する。

本発明は、RGMa阻害物質の新規な用途である糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤を提供する。

また、本発明は、治療を要する哺乳動物に対して、有効量のRGMa阻害物質を含む予防又は治療剤を投与するステップを含む、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療方法を提供する。

[0029] <RGMa阻害物質>

本発明のRGMa阻害物質は、RGMaそのものに作用して、RGMaの

活性（以下、本明細書中において、単に「RGMa活性」ということがある。）を阻害又は減弱する物質であればよく、例えば、RGMaに結合して直接的にRGMa活性を阻害（減弱）する活性、あるいはRGMaと受容体の結合を阻害して間接的にRGMa活性を阻害（減弱）する活性を有する物質（例えば、後述の化合物や抗体等）を本発明のRGMa阻害物質と称する。

また、本発明のRGMa阻害物質は、RGMaの発現を抑制する物質であってもよく、例えば、RGMaの発現を阻害し、RGMa活性を阻害（減弱）する物質（例えば、後述の核酸分子等）も本発明のRGMa阻害物質に含まれる。

[0030] RGMaは中枢神経系における神経突起成長阻害タンパク質として同定され、ヒトRGMaタンパク質は配列番号1に示すように450アミノ酸からなる前駆タンパク質として生合成される。N末端に存在するシグナルペプチドMet1~Pro47（N末端側から1番目のメチオニン残基から47番目のプロリン残基までのペプチドを指す、以後同様に記載）が除去され、Asp168とPro169の間のペプチド結合が切断されてN末端ドメインが生成し、さらにPro169よりC末側のフラグメントのC末端ペプチドAla425~Cys450が除去されるとともに、C末端となったAla424のC末端カルボキシル基にGPIアンカーが付加され、C末側ドメインが生成する。ヒトRGMaタンパク質は、上記N末側ドメイン（Cys48~Asp168）とC末側ドメイン（Pro169~Ala424）がジスルフィド結合により繋がった成熟タンパク質として、GPIアンカーを介して細胞膜上に発現する。

[0031] 本発明においてRGMaは、いずれの動物由来のものでもよいが、好ましくはヒトRGMaである。ヒトのRGMaの前駆タンパク質は配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなる。マウスのRGMaの前駆タンパク質は配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列、ラットのRGMaの前駆タンパク質は配列表の配列番号3に示すアミノ酸配列からなるが、C末端ペプチドが除去されるため、成熟タンパク質としては同一のアミノ酸配列となる。

RGMa 遺伝子としては、例えば配列番号 4 に示される塩基配列からなるヒト RGMa 遺伝子等が挙げられるが、これに限定されるものではない。種々の生物由来の RGM 遺伝子の塩基配列は公知のデータベース (GenBank 等) から容易に取得することができる。

[0032] 本発明の RGMa 阻害物質としては、具体的には、低分子化合物、抗 RGMa 中和抗体、その機能改変抗体、そのコンジュゲート抗体又はそれら抗原結合断片等が挙げられ、また、RGMa の核酸分子である siRNA (short interfering RNA)、shRNA (short hairpin RNA) 又はアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。これらの RGMa 阻害物質のうち、好ましくは抗 RGMa 中和抗体、その機能改変抗体、そのコンジュゲート抗体およびそれらの抗原結合断片であり、より好ましくは抗 RGMa 中和抗体又はその抗原結合断片であり、とりわけ抗 RGMa 中和抗体が好ましい。

[0033] <抗 RGMa 中和抗体>

本発明において、抗 RGMa 中和抗体とは、RGMa に結合して、RGMa 活性を中和する抗体であればよく、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも良い。本発明において好ましくはモノクローナル抗体である。また、本発明の抗 RGMa 中和抗体は RGMa モノスペシフィック抗体でも RGMa 及び他の抗原を複数認識するマルチスペシフィック抗体でもよいが、好ましくは RGMa モノスペシフィック抗体である。

[0034] また、具体的なエピトープとしては、ヒト RGMa において、配列番号 16 (配列番号 1 のアミノ酸番号 47-69)、配列番号 36 (配列番号 1 のアミノ酸番号 298-311)、配列番号 37 (配列番号 1 のアミノ酸番号 322-335)、配列番号 38 (配列番号 1 のアミノ酸番号 349-359)、配列番号 39 (配列番号 1 のアミノ酸番号 367-377) のうち、1 つ以上であることが好ましく、配列番号 36 及び 37 の組み合わせがより好ましく、配列番号 36、37 及び 39 の組み合わせがとりわけ好ましい。

[0035] 本発明の抗 RGMa 中和抗体は、RGMa タンパク質又はその部分断片 (例えば、上記したエピトープ断片) を抗原として、該抗原をマウス等の哺乳

動物に免疫して得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造されるキメラ抗体及びヒト化抗体、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造されるヒト抗体などが含まれる。本発明の抗体を医薬としてヒトに投与する場合は、副作用の観点から、ヒト化抗体又はヒト抗体が望ましい。

[0036] 本発明の抗RGMa中和抗体として、具体的には、下記(a)～(l)の抗体が挙げられ、それぞれ製造方法は特許文献2～4に記載された方法を用いることができる。

[0037] (a) 配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号10に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号36、37及び39をエピトープとする抗体も含む）、

(b) 配列番号11に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号12に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号13に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号15に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及びSFGをアミノ酸配列に含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体（当該抗RGMa中和抗体は、さらに配列番号36、37及び38をエピトープとする抗体も含む）、

(c) 配列番号17に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号18に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号20に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号21に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号22に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(d) 配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 26 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 27 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 28 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

(e) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 31 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 16 をエピトープとする抗体も含む）、

(f) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 35 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 16 をエピトープとする抗体も含む）、

(g) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号 40 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 16 をエピトープとする抗体も含む）、

(h) 配列番号 29 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号 30 に記

載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 1 6 をエピトープとする抗体も含む）、

（i）配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 1 6 をエピトープとする抗体も含む）、

（j）配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 3 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 1 6 をエピトープとする抗体も含む）、

（k）配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 4 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 1 6 をエピトープとする抗体も含む）、及び

（l）配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記

載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体（当該抗 R G M a 中和抗体は、さらに配列番号 1 6 をエピトープとする抗体も含む）、

から選択される抗体が挙げられる。

これらのうち、特に好ましくは(a)に記載される抗体が挙げられる。

[0038] 本発明の抗 R G M a 中和抗体の製造方法は、既存の一般に用いられる製造方法を用いることができる。抗原はそのまま免疫に使用してもよいし、キャリアタンパク質との複合体として用いてもよい。抗原とキャリアタンパク質の複合体の調製にはグルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性エステル等の縮合剤を用いることができる。キャリアタンパク質は牛血清アルブミン、サイログロブリン、ヘモシアニン、K L H等が例示される。

[0039] 免疫される哺乳動物としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ等が挙げられ、接種方法は皮下、筋肉あるいは腹腔内の投与が挙げられる。投与に際しては完全フロイントアジュバンドや不完全フロイントアジュバンドと混和して投与してもよく、投与は通常 2～5 週毎に 1 回ずつ行われる。免疫された動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞は骨髓腫（ミエローマ）細胞と細胞融合させ、ハイブリドーマとして単離される。骨髓腫細胞としては哺乳動物由来、例えばマウス、ラット、ヒト等由来のものが使用される。

[0040] <ポリクローナル抗体>

ポリクローナル抗体は、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバンド（Freund's Adjuvant）とともに、上記のような哺乳動物に免疫することで該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。

[0041] <モノクローナル抗体>

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして取得することができる

る。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント (Freund's Adjuvant) とともに、上記のような哺乳動物の皮下、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1～数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1～14日毎に1～4回免疫を行って、最終免疫より約1～5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。

[0042] モノクローナル抗体は、当業者に周知方法を用いて得ることができる (例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons(1987))、Antibodies:A Laboratory Manual, Ed.Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))。

[0043] モノクローナル抗体を分泌する「ハイブリドーマ」の調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法 (ネイチャー(Nature), 256,495, 1975) 及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓等に含まれる抗体産生細胞と、哺乳動物、好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞を細胞融合させることにより調製される。

[0044] 細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8.653(653)、P3/NS1/1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)、SP2/0-Ag14(Sp2/O、Sp2)、PA1、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15等を使用することができる。

[0045] 融合促進剤としてはポリエチレングリコール等が挙げられ、通常には、20～50%程度の濃度のポリエチレングリコール (平均分子量1000～4000) を用いて20～40℃、好ましくは30～37℃の温度下、抗体産生細胞数と骨髓腫細胞数の比は通常1:1～10:1程度とし、約1～10

分間程度反応させることにより細胞融合を実施することができる。

[0046] モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、ウェルの培養上清の免疫抗原に対する反応性をE L I S A等の免疫化学的方法によって測定することにより行うことができる。

[0047] 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングにおいては、R G M aタンパク質との結合アッセイに加えて、該抗体が本発明のR G M a活性を阻害するかの評価も行う。これらのスクリーニング方法により、本発明の抗R G M a中和抗体を選択することができる。

[0048] 目的の抗体を産生するハイブリドーマを含むウェルから更に、限界希釈法によってクローニングを行い、クローンを得ることができる。ハイブリドーマの選別、育種は、通常、H A T（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、10～20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地で行われる。

[0049] ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養するか、又はマウス、ラット等の哺乳動物の腹水中等のインビボで増殖させ、得られた培養上清、又は哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

[0050] インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるのに適した栄養培地を用いることが可能である。栄養培地は、公知の栄養培地又は基本培地から調製される栄養培地等を上げることができる。

[0051] 基本培地としては、例えば、H a m' F 1 2培地、M C D B 1 5 3培地あるいは低カルシウムM E M培地等の低カルシウム培地及びM C D B 1 0 4培地、M E M培地、D - M E M培地、R P M I 1 6 4 0培地、A S F 1 0 4培地あるいはR D培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／又は種々の無機ある

いは有機物質等を含有させることができる。

[0052] モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAE又はDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。具体的には、モノクローナル抗体の精製は免疫グロブリンの精製法として既知の方法を用いればよく、たとえば、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法、陰イオン交換体の利用、さらにRGMaタンパク質を用いるアフィニティークロマトグラフィー等の手段により容易に達成することができる。

[0053] モノクローナル抗体はファージディスプレイ法により取得することもできる。ファージディスプレイ法では、任意のファージ抗体ライブラリより選別したファージを、目的の免疫原を用いてスクリーニングを行い、免疫原に対する所望の結合性を有するファージを選択する。次に、ファージ内に含まれる抗体対応配列を単離又は配列決定し、単離された配列又は決定された配列情報に基づき、抗体又は抗原結合ドメインをコードする核酸分子を含む発現ベクターを構築する。そしてかかる発現ベクターをトランスフェクションされた細胞株を培養することにより、モノクローナル抗体を産生させることができる。ファージ抗体ライブラリとして、ヒト抗体ライブラリを用いることにより、所望の結合性を有するヒト抗体を生成することができる。

[0054] <核酸分子>

本発明の抗RGMa中和抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸分子は例えば、以下の方法によって得ることができる。まず、ハイブリドーマ等の細胞から、市販のRNA抽出キットを用いて全RNAを調製し、ランダムプライマー等を用い、逆転写酵素によりcDNAを合成する。次いで、既知のヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の可変領域において、それぞれ保存されている配列のオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCR法によって、抗体をコードするcDNAを増幅させる。定常領域をコードする配列につい

ては、既知の配列をPCR法で増幅することによって得ることができる。DNAの塩基配列は、配列決定用プラスミドに組み込むなどして、常法により決定することができる。

あるいは、可変領域又はその一部の配列を化学合成し、定常領域を含む配列に結合することによっても本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAを得ることができる。

当該核酸分子は重鎖と軽鎖の定常領域と可変領域の全てをコードするものであってもよいが、重鎖と軽鎖の可変領域のみをコードするものであってもよい。定常領域と可変領域の全てをコードする場合における重鎖及び軽鎖の定常領域の塩基配列は、Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986、The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 及びCell vol.22, p197, 1980 に記載のものが好ましい。

[0055] <機能改変抗体>

抗RGMa中和抗体の機能改変抗体は、以下のような方法で調製される。例えば、本願抗RGMa中和抗体を、宿主細胞として $\alpha 1, 6$ -フコース転移酵素(FUT8)遺伝子を破壊したCHO細胞を用いて製造すると、糖鎖のフコース含量が低下して細胞殺傷機能が高まった抗体が得られ、FUT8遺伝子を導入したCHO細胞を宿主細胞として製造すると、細胞殺傷機能が低い抗体が得られる(国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第00/61739号)。また、Fc領域のアミノ酸残基を改変することで補体活性化機能を調節することができる(米国特許第6737056号、米国特許第7297775号、米国特許第7317091号)。さらに、Fc受容体の1つであるFcRnへの結合を高めたFc領域の変異体を使用することにより、血中半減期の延長を図ることができる(橋口周平ら、生化学、2010、Vol.82(8), p710)。これらの機能改変抗体は、遺伝子工学的に製造することができる。Fc受容体の1つであるFcRnへの結合を高めたFc領域の変異体を使用することにより、血中半減期の延長を図ることができる(橋口周平ら、生化学、2010、Vol.8

2(8), p710)。これらの機能改変抗体は、遺伝子工学的に製造することができる。

[0056] <コンジュゲート抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の改変分子として、コンジュゲート抗体が挙げられる。コンジュゲート抗体としては、抗RGMa中和抗体にポリエチレングリコール(PEG)等の非ペプチド性ポリマー、放射性物質、毒素、低分子化合物、サイトカイン、成長因子(TGF- β 、NGF、Neurotrophinなど)、アルブミン、酵素、他の抗体などの本願の抗RGMa中和抗体以外の機能分子を化学的又は遺伝子工学的に結合したコンジュゲート抗体があげられる。

[0057] 機能分子としてPEGを結合する場合、PEGは非限定的に分子量2000から100000Da、より好ましくは10000から50000Daのものが使用でき、直鎖型でもよく、ブランチ型のものでよい。PEGは、例えばNHS活性基を用いることにより、抗RGMa中和抗体のアミノ酸のN末端アミノ基等に結合することができる。

[0058] 機能分子として放射性物質を用いる場合、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、⁶⁴Cu、⁹⁹Tc、⁷⁷Lu又は²¹¹Atなどが用いられる。放射性物質は、クロラミンT法などによって抗RGMa中和抗体に直接結合させることができる。

[0059] 機能分子として毒素を用いる場合、細菌毒素(例えば、ジフテリア毒素)、植物毒素(例えば、リシン)、低分子毒素(例えば、ゲルダナマイシン)、メイタンシノイド、及びカリケアマイシン等が用いられる。

[0060] 機能分子として低分子化合物を用いる場合、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトロレキサート、マイトマイシン、ネオカルチノスタチン、ビンデシン及びFITC等の蛍光色素等が挙げられる。

[0061] 機能分子として、酵素を用いる場合、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4737456号)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ(例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO))、アルカリホスファターゼ、 β -ガラ

クトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、複素環式オキシダーゼ（例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等）、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ等が用いられる。

[0062] 毒素、低分子化合物又は酵素を化学的に結合する時に使用するリンカーとしては、二価ラジカル（例えば、アルキレン、アリーレン、ヘテロアリーレン）、 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ （Rは任意の置換基、nは正の整数）で表されるリンカーやアルコキシの反復単位（例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ等）及びアルキルアミノ（例えば、ポリエチレンアミノ、Jeffamine（商標））、並びに、二酸エステル及びアミド（スクシネート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミド等が挙げられる）が挙げられる。機能分子を結合させる化学的修飾方法はこの分野において既に確立されている（D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152:127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681）。

[0063] <抗原結合断片>

本発明の実施形態において、抗体の「抗原結合断片」とは、前述のような抗体の、抗原結合性を有する一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 $Fa b'$ 、 Fab 、 Fv （variable fragment of antibody）、ジスルフィド結合 Fv 、一本鎖抗体（ $scFv$ ）、及びこれらの重合体等が挙げられ、さらに、抗原結合断片にはポリエチレングリコール（PEG）等の非ペプチド性ポリマー、放射性物質、毒素、低分子化合物、サイトカイン、成長因子（ $TGF-\beta$ 、 NGF 、 $Neurotrophin$ など）、アルブミン、酵素、他の抗体などの本願の抗RGMa中和抗体以外の機能分子を化学的又は遺伝子工学的に結合しているコンジュゲートフラグメントが含まれる。

[0064] 「F(ab')₂」及び「Fab」は、イムノグロブリンを、タンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本の重鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本の重鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（軽鎖可変領域）とCL（軽鎖定常領域）からなる軽鎖、及びVH（重鎖可変領域）とCH_γ1（重鎖定常領域中のγ1領域）とからなる重鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fabという。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本の重鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFabがヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

[0065] <キメラ抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の好ましい態様としてキメラ抗体が挙げられる。「キメラ抗体」としては、可変領域が、非ヒト動物（マウス、ラット、ハムスター、ニワトリ等）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域である、キメラ抗体が例示される。例えば、抗原をマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する可変領域を切り出し、ヒト骨髄由来の抗体定常領域と結合して作製することができる。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA（IgA1、IgA2）、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラ抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。このように作製したキメラ抗体の遺伝子を用いて発現ベクターを作製することができる。該発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりキメラ抗体産生形質転換細胞を得、該

形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のキメラ化抗体を得る。

[0066] <ヒト化抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の別の好ましい態様としてヒト化抗体が挙げられる。本発明における「ヒト化抗体」は、マウスなどの非ヒト動物抗体の抗原結合部位（CDR；相補性決定領域）のDNA配列だけをヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフトイング）した抗体である。例えば、特表平4-506458号公報及び特許2912618号明細書等に記載の方法を参照して作製することができる。具体的には、そのCDRの一部又は全部が非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスター等）のモノクローナル抗体に由来するCDRであり、その可変領域のフレームワーク領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域のフレームワーク領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト化抗体を意味する。

[0067] 本発明におけるヒト化抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

[0068] 例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト化抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、マウス重鎖CDR部分のDNAとマウス軽鎖CDR部分のDNAを単離し、ヒトイムノグロブリン遺伝子からヒト重鎖CDR以外の全領域のヒト重鎖遺伝子と、ヒト軽鎖CDR以外の全領域のヒト軽鎖遺伝子を単離する。

[0069] 単離したマウス重鎖CDR部分のDNAを移植したヒト重鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様にマウス軽鎖CDR部分のDNAを移植したヒト軽鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。又は、マウスのCDRを移植したヒトの重鎖及び軽鎖

遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト化抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト化抗体を得る。

[0070] <ヒト抗体>

本発明の抗RGMa中和抗体の別の好ましい態様としてヒト抗体が挙げられる。ヒト抗体とは、イムノグロブリンを構成する重鎖の可変領域及び重鎖の定常領域並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域を含むすべての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンとなっている抗体であって、ヒト抗体遺伝子をマウスに導入して作製することができる。具体的には、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

[0071] 例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994 ; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997 ; 特表平4-504365号公報 ; 特表平7-509137号公報 ; 国際公開WO 94 / 25585号パンフレット ; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994 ; 及び特表平6-500233号公報等に記載の方法に従って作製することができる。より具体的には、HuMab (登録商標)マウス (Medarex, Princeton NJ)、KMTMマウス (Kirin Pharma Company, Japan)、KM(FC γ R II b-KO)マウス等が挙げられる。

[0072] 本発明の抗RGMa中和抗体として、具体的には、重鎖可変領域に特定のアミノ酸配列を含むCDRを有し、軽鎖可変領域に特定のアミノ酸配列を含むCDRを有するもの (好ましくは、上述の (a) ~ (l) の抗RGMa中和抗体) が挙げられる。

なお、RGMaとの結合能を有し、RGMaの活性を阻害 (中和) すると

いう本発明の抗体の特性が維持される限り、抗RGMa中和抗体（好ましくは、上述の(a)～(l)の抗RGMa中和抗体）のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸（1～20個、1～10個又は1～5個、好ましくは1ないし2個）の置換、欠失、付加又は挿入があってもよい。このような置換、欠失、付加はCDRに導入されてもよいが、CDR以外の領域に導入されることが好ましい。また、該アミノ酸置換は本発明の特性を維持するために保存的置換であることが好ましい。

[0073] アミノ酸配列において置換、欠失等が含まれた本発明の抗RGMa中和抗体（好ましくは、上述の(a)～(l)の抗RGMa中和抗体）のアミノ酸配列は、例えば、アミノ酸配列改変後の重鎖可変領域が改変前のアミノ酸配列と90%以上（より好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上）の%同一性を有するアミノ酸配列であり、アミノ酸配列改変後の軽鎖可変領域が改変前のアミノ酸配列と90%以上（より好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上）の%同一性を有するアミノ酸配列である。

[0074] 本発明において、siRNAとは標的となる遺伝子（本発明においてはRGMa遺伝子）の発現を抑制することができる短い二本鎖RNAである。本発明のRGMa活性を阻害するsiRNAとして機能する限りにおいて、塩基配列や長さ（塩基長）は特に限定されないが、好ましくは約30塩基未満、より好ましくは約19～27塩基、さらに好ましくは約21～25塩基である。

本発明において、shRNAとは一本鎖RNAで部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造からなる約20塩基対以上の分子のことをいう。そのようなshRNAは、細胞内に導入された後、細胞内で約20塩基（代表的には例えば、21塩基、22塩基、23塩基）の長さに分解され、siRNAと同様に標的となる遺伝子の発現を抑制することができる。

本発明においては、上述のsiRNA及びshRNAは、RGMa遺伝子

の発現を抑制できるものであればどのような形態であってもよい。

[0075] 本発明において、*siRNA*又は*shRNA*は、人工的に化学合成することができる。また、例えばT7RNAポリメラーゼ及びT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンス及びセンスのRNAをインビトロで合成することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RGMa遺伝子のDNA配列中の連続する5から100の塩基配列に対して相補的な、又はハイブリダイズするヌクレオチドであればよく、DNA又はRNAのいずれであってもよい。また、機能に支障がない限り修飾されたものであってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは常法によって合成することができ、例えば、市販のDNA合成装置によって容易に合成することができる。

好ましい配列は通常の方法を用いて選択することができ、本発明における*siRNA*又は*shRNA*としては、機能性RGMaの発現阻害を評価することで確認することが出来る。

[0076] <糖尿病性自律神経障害>

本発明における糖尿病性自律神経障害とは、糖尿病等の慢性の高血糖により生じる自律神経の障害および腎機能障害の原因としての自律神経の障害を意味する。

ここで、糖尿病等の慢性の高血糖により生じる自律神経の障害とは、慢性の高血糖が原因で生じる全身の臓器でみられる多彩な兆候や症状があげられ、例えば、(1)心血管系の自律神経障害としては起立性低血圧や不整脈等を、(2)消化器系の自律神経障害としては胃不全麻痺による嘔吐や下痢(糖尿病性下痢等)等を、(3)泌尿器系・生殖器系の自律神経障害としては神経因性膀胱や勃起障害等を、(4)代謝系の自律神経障害としては無自覚性低血糖や低血糖関連自律神経不全等を、(5)末梢血管運動機能に係る自律神経障害としては、当該障害によりもたらされる血圧調節機構の破綻や内分泌系障害による体液恒常性の破綻、貧血等があげられる。

また、腎自律神経は、全身及び腎血流の調節、神経体液性因子の分泌、腎脈管に対する直接作用等により腎機能に深く関与しているため、腎自律神経

の保護は、広く慢性腎臓病の病態における腎機能の改善に寄与するものと考えられる（参考文献：Front Med. 2018 Mar 29;5:82. doi: 10.3389/fmed.2018.00082.）。したがって、腎機能障害の原因としての自律神経障害とは、例えば、慢性腎臓病（例えば、糖尿病性腎臓病（糖尿病性腎症を含む）等）等の腎機能障害に関与する腎疾患があげられる。

本発明では、上述の糖尿病性自律神経障害によりもたらされる不利益（疾患又は症状）に対する予防又は治療効果が期待される。

本発明における治療対象（好ましくは哺乳動物、特にヒト）は、糖尿病性自律神経障害を発症した患者が対象となり、本発明の糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤を、これら患者に投与することができる。

[0077] ここで、「治療」とは、治療対象、好ましくは哺乳動物、特にヒトの疾患の任意の治療を含み、疾患及び症状の進行を阻止し、そのような疾患及び症状を消滅、治癒、軽減又は緩和させることを含む。

[0078] また、「予防」とは、治療対象、好ましくは哺乳動物、特にヒトにおいて、上記疾患の発症を防止または抑制することを含む。さらに、本発明における「予防」には、治療対象、好ましくは哺乳動物、特にヒトにおいて、寛解、再発を繰り返す上記疾患の再発を防止する「再発予防」が含まれる。

[0079] <医薬組成物>

本発明における糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤は、通常、全身的又は局所的に、経口又は非経口の形で投与される。

本発明における糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤は、RGMa阻害物質を有効成分とし、薬学的に許容される担体又は添加剤を適宜配合して製剤化することができる。そのように製剤化した医薬組成物を経口又は非経口の形で投与することができる。具体的には、錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の経口剤とすることができ、また、注射剤、輸液、坐剤、軟膏、パッチ剤等の非経口剤とすることができる。担体又は添加剤の配合割合については、医薬品分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体又は添加剤は特

に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性又は油性基剤等の各種担体、例えば、賦形剤、結合剤、pH調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料等の各種添加剤が挙げられる。

[0080] RGMa阻害物質が抗RGMa中和抗体、その機能改変抗体、そのコンジュゲート抗体又はそれらの抗原結合断片である場合、薬学的に許容される担体とともに製剤化された注射剤又は輸液として、非経口投与経路、例えば、静脈内、筋肉内、皮膚内、腹腔内、皮下又は局所に投与することが好ましい。

例えば、抗RGMa中和抗体を含む注射剤又は輸液は、溶液、懸濁液又は乳濁液として用いることができる。その溶剤として、例えば、注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖溶液及び等張液（例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、プロピレングリコール等の溶液）等を用いることができる。

さらに、このような抗RGMa中和抗体を含む注射剤又は輸液は、安定剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤、防腐剤、pH調整剤等を含んでいてもよい。

安定剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール、プロピレングリコール、アスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、EDTAナトリウム、クエン酸ナトリウム、ジブチルヒドロキシトルエン等を用いることができる。

溶解補助剤としては、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、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等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80（登録商標）、HCO-50等）等を用いることができる。

懸濁化剤としては、例えば、モノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。

。 乳化剤としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。

無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。

緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液等を用いることができる。

保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等を用いることができる。

防腐剤としては、例えば、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

pH調整剤としては、例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等を用いることができる。

[0081] RGMa阻害物質が核酸（siRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）である場合、非ウイルスベクター又はウイルスベクターの形態で投与することができる。非ウイルスベクター形態の場合、リポソームを用いて核酸分子を導入する方法（リポソーム法、HVJ-リポソーム法、カチオニックリポソーム法、リポフェクション法、リポフェクトアミン法など）、マイクロインジェクション法、遺伝子銃（Gene Gun）でキャリア（金属粒子）とともに核酸分子を細胞に移入する方法などを利用することができる。例えば、siRNA又はshRNAをウイルスベクターを用いて生体に投与する場合は、組換えアデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルスベクターを利用することができる。無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス、SV40などのDNAウイルス又はRNAウイルスに、siRNA又

はshRNAを発現するDNAを導入し、細胞又は組織にこの組換えウイルスを感染させることにより、細胞又は組織内に遺伝子を導入することができる。

[0082] このようにして得られる製剤は、例えばヒトや他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して、その有効量を投与することにより、糖尿病性自律神経障害を予防又は治療することができる。投与量は、目的、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、有効成分の種類などを考慮して、適宜設定される。例えば、有効成分が抗RGMa中和抗体である場合、約65～70kgの体重を有する平均的なヒトを対象とした場合、1日当たり0.02mg～4000mg程度が好ましく、0.1mg～200mg程度がより好ましい。1日当たりの総投与量は、単一投与量であっても分割投与量であってもよい。

[0083] <他の薬剤又は治療との併用>

本発明において、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤は、血糖コントロールを目的として、抗糖尿病薬との併用で投与することができる。併用される抗糖尿病薬としては、例えば、血糖降下剤があげられ、具体的には、DPP4阻害剤、SGLT阻害剤、GLP-1受容体作動薬等があげられる。

本発明において、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤は、血圧コントロールを目的として、高血圧治療薬との併用で投与することができる。併用される高血圧治療薬としては、例えば、アンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）、ACE阻害薬等があげられ、降圧効果が不十分な場合にはCa拮抗薬や利尿薬を併用してもよい。

[0084] 上記他の薬剤又は治療は、本発明の糖尿病性自律神経障害の予防若しくは治療剤の投与前又は投与後に投与又は実施してもよく、また、同時に投与又は実施してもよい。

実施例

[0085] 以下、本発明について実施例を挙げてより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

なお、抗RGMa中和抗体として、本明細書に記載した(a)のアミノ酸配列（配列番号5～10）を含む抗RGMa中和抗体を各実施例で用いた。

[0086] [実施例1]

薬剤誘導性糖尿病モデルマウスを用いて、糖尿病態下での腎臓におけるRGMa mRNAの発現解析を行い、次いで腎自律神経障害に対する抗RGMa中和抗体の治療効果を組織学的に検討した。

[0087] <糖尿病の誘導>

7～8週齢のC57BL/6J雌性マウスを実験に使用した。糖尿病誘導群にはストレプトゾシン（STZ: Sigma-Aldrich）20 mg/mlを10 ml/kgの用量で単回腹腔内投与した。非糖尿病誘導群には溶媒を10 ml/kgの用量で投与した。先行研究を参考にし（参考文献1,2）、糖尿病誘導から1週間後に血糖値測定を行い、血糖値が300 mg/dl に満たなかった個体は除外した。

[0088] <RGMa mRNA発現解析>

STZによる糖尿病誘導後8週経過時点のマウス（4匹）、及びコントロールマウス（4匹）を十分に麻酔したのち、開腹後、氷冷PBSを左心室より灌流させ、脱血を行った。早急に腎臓を摘出し、TRIzol溶液（15596026; Thermo Fisher Scientific）および破砕用ジルコニアビーズ（ZB-10; TOMY SEIKO Co, Ltd.）を適量含んだ組織破砕チューブ（TM-625S; TOMY SEIKO Co, Ltd.）に回収し、ビーズ式細胞破砕装置（MS-100R; TOMY SEIKO Co, Ltd.）を用いて破砕を行った。次いでRNAを抽出・精製（RNeasy Mini Kit（74104; QIAGEN）を使用）したのち、逆転写反応によりcDNAを作成し、Fast SYBR Green Master mix（4385612, Thermo Fisher Scientific）、QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）を用いて反応を行った。本結果から計測されたCt値より、Gapdhを内在性コントロールとした $\Delta\Delta Ct$ 法で相対定量を行った。

[0089] <組織学的解析：抗体投与方法、群分け>

購入したマウスをランダムに「非糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」、「非糖尿病-アイソタイプコントロール抗体（Palivizumab）投与群」、「糖尿病-抗

RGMa中和抗体投与群」、および「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群」の4群に分け、STZ (糖尿病群)、もしくは溶媒 (クエン酸バッファー (pH = 4.5)) 投与3日後より、抗RGMa中和抗体またはコントロール抗体の投与を開始した。何れの抗体も6 mg/mlの濃度に調整後、30 mg/kgの用量で週1回、計6回尾静脈内投与し、6週後に採材を行った。

[0090] <組織採材・腎透明化・免疫組織染色>

十分な麻酔の後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) による灌流固定後腎臓を摘出し、後固定ののち30%スクロース/PBS溶液中で4°Cで2~3日静置後、CUBIC法に則って透明化を行った。先行研究 (参考文献3-7) を参考とし、条件検討の上で修正した以下の手順を用いた。30%スクロース置換後の腎臓をPBS洗浄後、超純水で50%に希釈したCUBIC-L溶液中に移し、室温で一晩振盪した。次いで100% CUBIC-L溶液に移し、37°Cで5日間振盪した。PBSで洗浄後0.1% Triton X-100、0.5% BSA、および0.01% アジ化ナトリウムを含むPBSに一次抗体を溶解した一次抗体液中に移し、37°Cで5日間振盪した。PBS-0.5% Triton-X100で1日洗浄後、0.1% Triton X-100、0.1% BSA、および0.01% アジ化ナトリウムを含むPBSに二次抗体を希釈した二次抗体液中に移し、37°Cで5日間振盪した。PBS-0.5%Triton X-100で1日洗浄し、PB (0.2 M) で希釈した1%ホルムアルデヒド溶液に3時間浸し、PBSで洗浄した。超純水で50%に希釈したCUBIC-Rに6時間以上浸し、100% CUBIC-Rに浸すことで透明化を行った。透明化した組織の観察および撮像は共焦点レーザー顕微鏡FV-3000 (Olympus) を用いた。透明化した腎臓の中央部、表面から200 μ mまでの部位をz間隔1 μ mの間隔で撮像し、撮影画像を1枚の画像に投影したのち、単位面積当たりのTH陽性交感神経線維密度の定量を行った。この操作を各群6個体ずつ行い、解析を行った。用いた試薬は以下の通りである。

[0091] ・ CUBIC-L溶液

Triton X-100 (NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan) : 10w%N-buthyldiethanolamine (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan) : 10w%
上記試薬を超純水に溶解。

・ CUBIC-R溶液

2,3-dimethyl-1-phenyl-5-pyrazolane/antipyrine (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan) : 45w%
nicotinamide (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan) : 30w%

上記試薬を超純水に溶解。

・ 一次抗体

抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体 (1:100; abcam, Cambridge, UK)

・ 二次抗体

Alexa Fluor 488 donkey anti-sheep IgG (H+L) (1:200; Invitrogen, Waltham, MA, USA)

[0092] <結果>

遺伝子発現解析により、糖尿病病態では腎臓におけるRGMaのmRNAの発現上昇がみられ (図1)、本病態におけるRGMaの関与が示唆された。次いで行った糖尿病マウスへの抗RGMa抗体およびコントロール投与実験の代表的な染色画像 (図2)、及びTH線維密度の定量データ (図3) を示す。定量データで示した4群の結果は、各群n=6で取得したものである

。非糖尿病群では投与した抗体の種類にかかわらず、TH線維の密度に変化はなかった。一方、非糖尿病群と「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」を比較すると、TH線維密度が減少している傾向が見られた。一方で、「糖尿病-抗RGMa中和抗体投与群」では、「糖尿病-アイソタイプコントロール抗体投与群」と比較してTH線維密度の改善傾向が見られた。以上の結果から、抗RGM中和抗体は糖尿病によって惹起される腎自律神経の障害を緩和すると考えられる。

[0093] [実施例2]

薬剤誘導性糖尿病モデルマウスを用いて、腎機能障害に対する抗RGMa中和抗体の治療効果を尿蛋白量の指標により検討した。

[0094] <糖尿病の誘導>

7～8週齢のC57BL/6J雌性マウスを実験に使用した。糖尿病誘導群にはス

トレプトゾシン (STZ: Sigma-Aldrich) 20 mg/mlを10 ml/kgの用量で単回腹腔内投与した。非糖尿病誘導群には溶媒を10 ml/kgの用量で投与した。先行研究を参考にし (参考文献1, 2)、糖尿病誘導から3日後に血糖値測定を行い、血糖値が300 mg/dl に満たなかった個体は除外した。

[0095] <組織学的解析：抗体投与方法、群分け>

購入したマウスをランダムに「非糖尿病－生理食塩水投与群」、「糖尿病－抗RGMa中和抗体投与群」、および「糖尿病－アイソタイプコントロール抗体 (Palivizumab) 投与群」の3群に分け、STZ (糖尿病群)、もしくは溶媒 (クエン酸バッファー (pH = 4.5)) 投与3日後より、生理食塩水、抗RGMa中和抗体またはコントロール抗体の投与を開始した。生理食塩水は30 mg/kgの用量で週1回、計5回尾静脈内投与した。また、何れの抗体も6 mg/mlの濃度に調整後、30 mg/kgの用量で週1回、計5回尾静脈内投与し、5週後に採材を行った。

[0096] <尿中アルブミン/尿中クレアチニン比の算出>

腎障害による蛋白尿の指標として尿中アルブミン/尿中クレアチニン比を用いた。糖尿病誘導後5週時点において、各群の個体をそれぞれ代謝ケージ (Tecniplast Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に入れ、自由行動下において採尿を行った。サンプルは測定に使用するまでの間、-30°Cで保存した。尿中アルブミンはレビス アルブミンマウスELISAキット (FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation, Gunma pref., Japan)、尿中クレアチニンはラボアッセイクレアチニン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いて定量し、尿中アルブミン/尿中クレアチニン比 (UACR) を算出した。

[0097] <結果>

尿中アルブミン/尿中クレアチニン比の定量データを図4に示す。定量で示した3群の結果は、各群n=6で取得したものである。非糖尿病－生理食塩水投与群と「糖尿病－アイソタイプコントロール抗体投与群」を比較すると尿中アルブミン/尿中クレアチニン比の上昇傾向が見られ、腎障害を反映したものと考えられた。一方で「糖尿病－抗RGMa中和抗体投与群」では、「糖尿病－

アイソタイプコントロール抗体投与群」と比較して尿中アルブミン/尿中クレアチニン比の改善傾向が見られた。したがって、抗RGMa中和抗体は糖尿病による腎障害を緩和する効果を有すると考えられる。以上の結果から、抗RGMa中和抗体は糖尿病によって惹起される腎自律神経の障害を緩和すると考えられる。

以上より、RGMa阻害物質、好ましくは、抗RGMa中和抗体は、腎機能障害の原因としての自律神経障害の予防又は治療剤、および慢性腎臓病等の腎機能障害に関与する腎疾患の予防又は治療剤として期待することができる。

[0098] <参考文献>

1. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *LabAnim.* 2011;45(3):131-140. doi:10.1258/la.2010.010090
2. O' brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J.* 2014;54(3):259-272. doi:10.1093/ilar/ilt052
3. Hasegawa S, Susaki EA, Tanaka T, et al. Comprehensive three-dimensional analysis (CUBIC-kidney) visualizes abnormal renal sympathetic nerves after ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 2019;96(1):129-138. doi:10.1016/j.kint.2019.02.011
4. Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, et al. Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* 2017;20(1):236-250. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.010
5. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, et al. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep.* 2018;24(8):2196-2210.e9. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.056
6. Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell.* 2015;162(2):246-257. doi:10.1016/j.cell.2015.06.067
7. Yokoyama T, Lee JK, Miwa K, et al. Quantification of sympathetic h

yperinnervation and denervation after myocardial infarction by three-dimensional assessment of the cardiac sympathetic network in cleared transparent murine hearts. PLoS One. 2017;12(7):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0182072

[0099] <配列表の説明>

- 配列番号 1 : ヒト RGMa 前駆タンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 2 : マウス RGMa 前駆タンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 3 : ラット RGMa 前駆タンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 4 : ヒト RGMa 遺伝子の DNA 配列
- 配列番号 5 : 抗 RGMa 中和抗体 r116A3 の L C D R 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 6 : 抗 RGMa 中和抗体 r116A3 の L C D R 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 7 : 抗 RGMa 中和抗体 r116A3 の L C D R 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 8 : 抗 RGMa 中和抗体 r116A3 の H C D R 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 9 : 抗 RGMa 中和抗体 r116A3 の H C D R 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 10 : 抗 RGMa 中和抗体 r116A3 の H C D R 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 11 : 抗 RGMa 中和抗体 r70E の L C D R 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 12 : 抗 RGMa 中和抗体 r70E の L C D R 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 13 : 抗 RGMa 中和抗体 r70E の L C D R 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 14 : 抗 RGMa 中和抗体 r70E の H C D R 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 15 : 抗 RGMa 中和抗体 r70E の H C D R 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 16 : ヒト RGMa のエピトープのアミノ酸配列
- 配列番号 17 : 抗 RGMa 中和抗体 5F9 の L C D R 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 18 : 抗 RGMa 中和抗体 5F9 の L C D R 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 19 : 抗 RGMa 中和抗体 5F9 の L C D R 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 20 : 抗 RGMa 中和抗体 5F9 の H C D R 1 のアミノ酸配列
- 配列番号 21 : 抗 RGMa 中和抗体 5F9 の H C D R 2 のアミノ酸配列
- 配列番号 22 : 抗 RGMa 中和抗体 5F9 の H C D R 3 のアミノ酸配列
- 配列番号 23 : 抗 RGMa 中和抗体 8D1 の L C D R 1 のアミノ酸配列

- 配列番号 24 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の L C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 25 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 26 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の H C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 27 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の H C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 28 : 抗 R G M a 中和抗体 8D1 の H C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 29 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の L C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 30 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の L C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 31 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 32 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の H C D R 1 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 33 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の H C D R 2 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 34 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1 の H C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 35 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1Y の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 36 : ヒ ト R G M a の エ ピ ト ー プ の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 37 : ヒ ト R G M a の エ ピ ト ー プ の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 38 : ヒ ト R G M a の エ ピ ト ー プ の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 39 : ヒ ト R G M a の エ ピ ト ー プ の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 40 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1F の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 41 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1H の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 42 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1L の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 43 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1V の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 44 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1I の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列
- 配列番号 45 : 抗 R G M a 中和抗体 AE12-1K の L C D R 3 の ア ミ ノ 酸 配 列

産業上の利用可能性

- [0100] 本発明は、R G M a 阻害物質が糖尿病性自律神経障害の予防又は治療に有用であることから、医薬品産業において高い利用価値を有する。

請求の範囲

- [請求項1] R G M a 阻害物質を含む、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療剤。
- [請求項2] 糖尿病性自律神経障害が慢性の高血糖により生じる自律神経障害又は腎機能障害の原因としての自律神経障害である、請求項1に記載の予防又は治療剤。
- [請求項3] 糖尿病性自律神経障害が腎機能障害の原因としての自律神経障害である、請求項1又は2に記載の予防又は治療剤。
- [請求項4] 糖尿病性自律神経障害が腎機能障害に関与する腎疾患である、請求項1～3のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項5] 腎機能障害に関与する腎疾患が慢性腎臓病である、請求項4に記載の予防又は治療剤。
- [請求項6] R G M a 阻害物質が抗R G M a 中和抗体である、請求項1～5のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項7] 抗R G M a 中和抗体がヒト化抗体である、請求項6に記載の予防又は治療剤。
- [請求項8] 抗R G M a 中和抗体が配列番号16、配列番号36、配列番号37、配列番号38及び配列番号39から選択されるアミノ酸配列を認識する抗体である、請求項6又は7に記載の予防又は治療剤。
- [請求項9] 抗R G M a 中和抗体が、下記(a)～(l)：
- (a) 配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号10に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (b) 配列番号11に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号12に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号13に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号15に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (c) 配列番号16に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号17に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号18に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号19に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号20に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (d) 配列番号21に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号22に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号23に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号24に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号25に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (e) 配列番号26に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号27に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号28に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (f) 配列番号31に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号35に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (g) 配列番号36に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号37に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号38に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号39に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号40に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (h) 配列番号41に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号42に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号43に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号45に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (i) 配列番号46に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号47に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号48に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号49に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号50に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (j) 配列番号51に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号52に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号53に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号54に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号55に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (k) 配列番号56に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号57に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号58に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号59に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号60に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、
- (l) 配列番号61に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号62に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号63に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号64に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号65に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗R G M a 中和抗体、

ノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号15に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及びSFGをアミノ酸配列に含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(c) 配列番号17に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号18に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号20に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号21に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号22に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(d) 配列番号23に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号24に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号25に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号26に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号27に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号28に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(e) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号31に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(f) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号35に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(g) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号40に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(h) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号41に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(i) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号42に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(j) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号43に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含むHCDR2及び配列番号34に記載のアミノ酸配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗RGMa中和抗体、

(k) 配列番号29に記載のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号30に記載のアミノ酸配列を含むLCDR2及び配列番号44に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号32に記載のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号33に記載のアミノ酸配列

を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、及び

(1) 配列番号 2 9 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR 2 及び配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 1、配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 2 及び配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含むHCDR 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 R G M a 中和抗体、

から選択される抗体である、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。

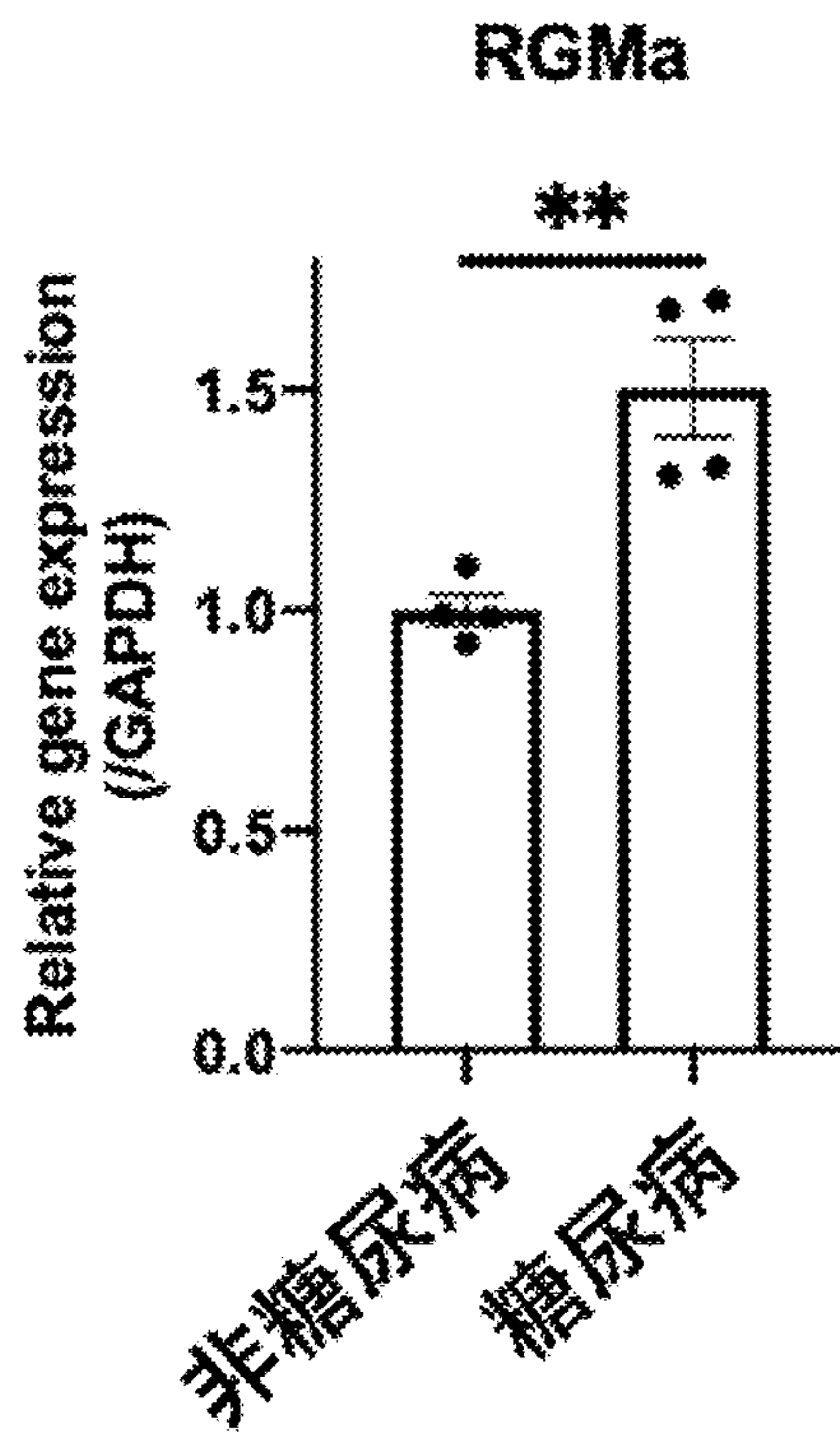
[請求項10] 治療を要する哺乳動物に対して有効量の R G M a 阻害物質を投与することを含む、糖尿病性自律神経障害の予防又は治療方法。

[請求項11] R G M a 阻害物質が抗 R G M a 中和抗体である、請求項 1 0 に記載の予防又は治療方法。

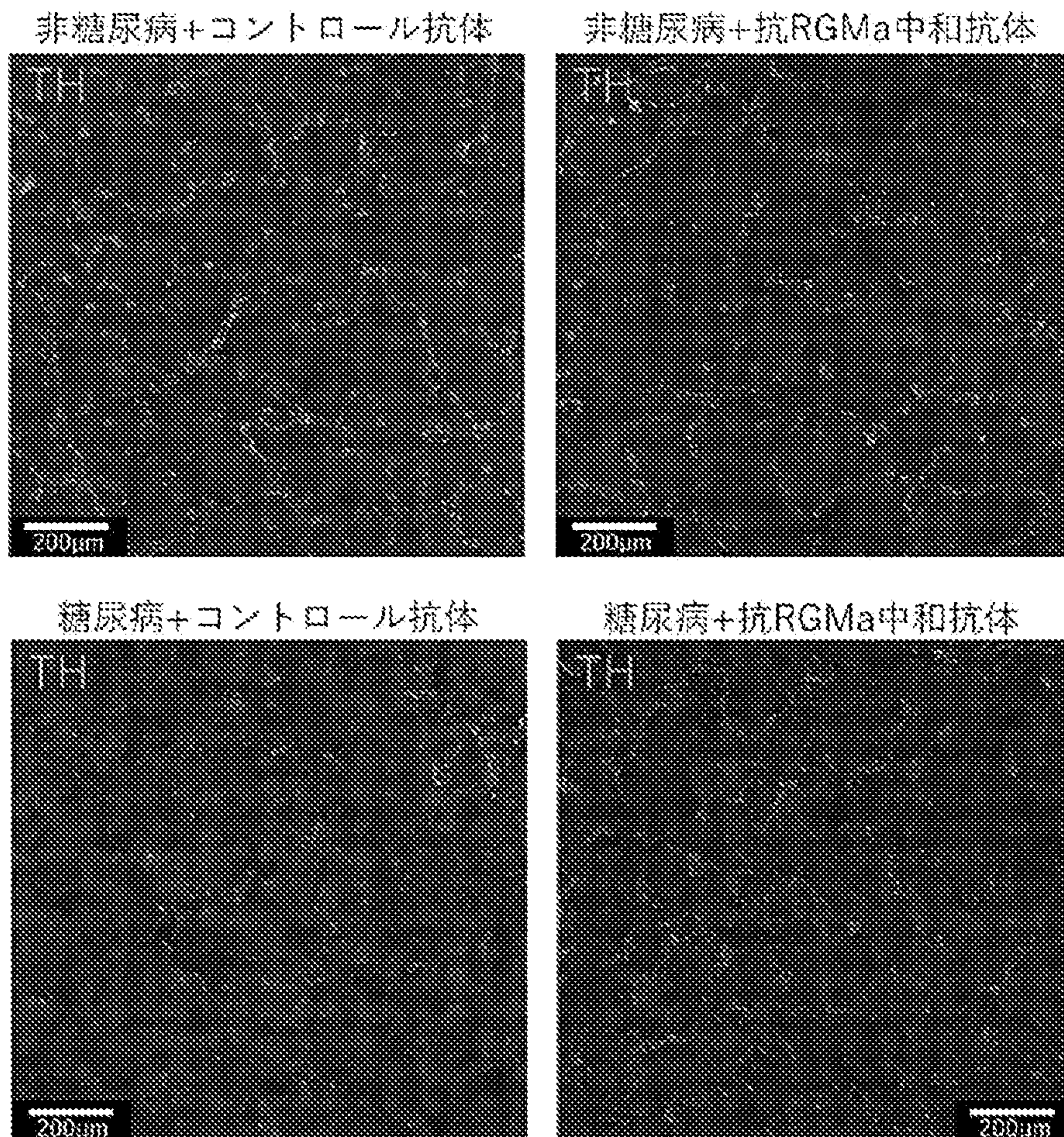
[請求項12] R G M a 阻害物質の、糖尿病性自律神経障害の予防剤又は治療剤の製造における使用。

[請求項13] R G M a 阻害物質が抗 R G M a 中和抗体である、請求項 1 2 に記載の使用。

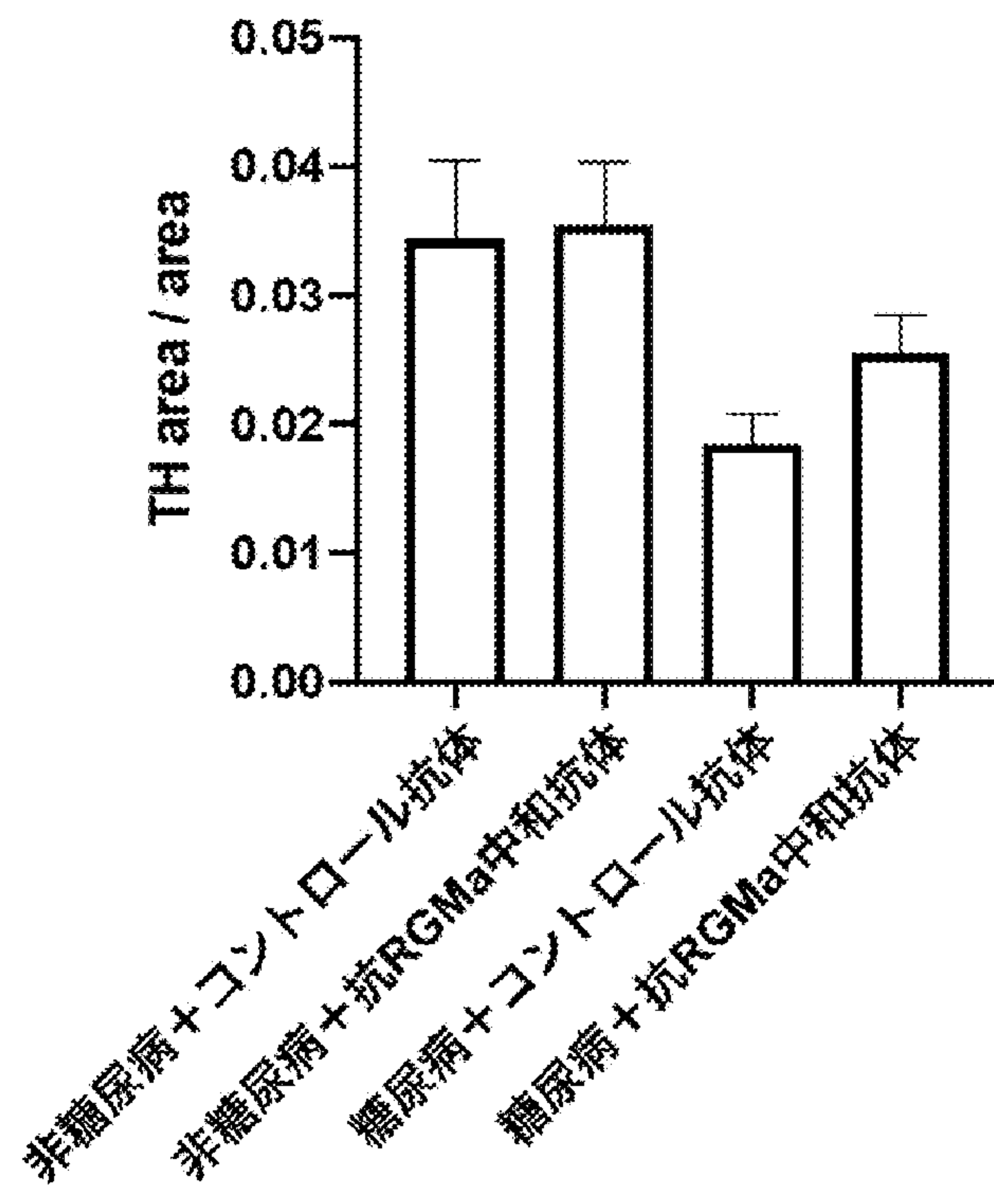
[図1]



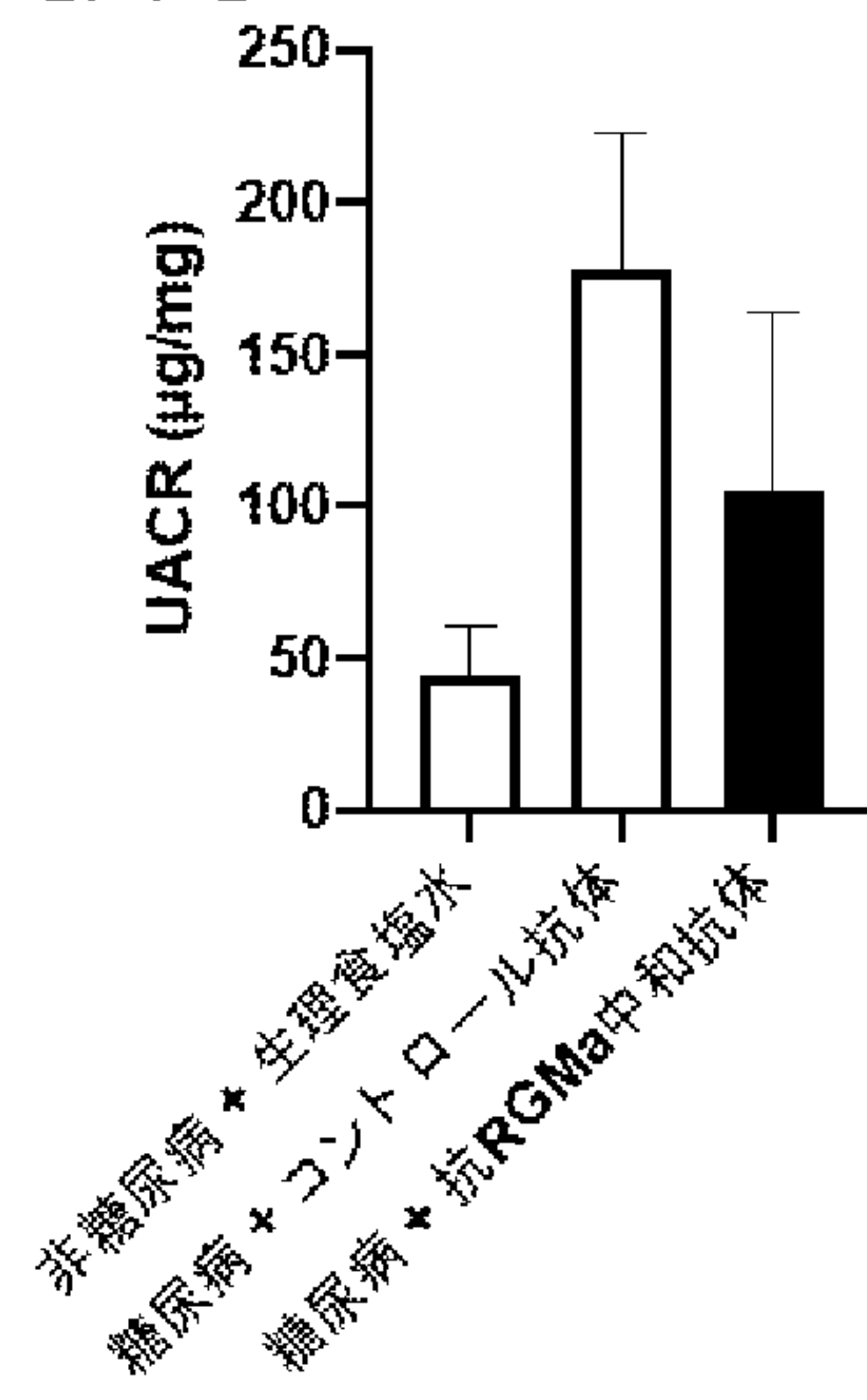
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/001261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 25/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i
 FI: A61K45/00; A61K39/395 N; A61P43/00 111; A61P25/02 103; A61P13/12; C12N15/13 ZNA

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00; A61K39/395; A61P13/12; A61P25/02; A61P43/00; C12N15/13

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/175236 A1 (MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION) 03 November 2016 (2016-11-03) claims 1, 13, 14, 17, examples 15, 16	1-13
Y	KORECKA, Joanna A. et al., "Repulsive Guidance Molecule a (RGMa) Induces Neuropathological and Behavioral Changes That Closely Resemble Parkinson's Disease", J Neurosci., 27 September 2017, vol. 37, no. 39, pp. 9361-9379 section "RGMa decreases neuronal density in the SN", fig. 6	1-13
Y	JUNGEN, Christiane et al., "Increased arrhythmia susceptibility in type 2 diabetic mice related to dysregulation of ventricular sympathetic innervation", Am J Physiol Heart Circ Physiol, 18 October 2019, vol. 317, p. H1328-H1341 abstract, fig. 6	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search
 12 March 2021 (12.03.2021)

Date of mailing of the international search report
 23 March 2021 (23.03.2021)

Name and mailing address of the ISA/
 Japan Patent Office
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

 Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/001261

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2016/175236 A1	03 Nov. 2016	US 2018/0100012 A1 claims 1, 13, 14, 17, examples 15, 16	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 45/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 25/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i FI: A61K45/00; A61K39/395 N; A61P43/00 111; A61P25/02 103; A61P13/12; C12N15/13 ZNA</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K45/00; A61K39/395; A61P13/12; A61P25/02; A61P43/00; C12N15/13</p>										
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年									
<p>国際調査で使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） CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
Y	WO 2016/175236 A1 (田辺三菱製薬株式会社) 03.11.2016 (2016 - 11 - 03) 請求項1, 13, 14, 17、実施例15, 16	1-13								
Y	KORECKA, Joanna A. et al., Repulsive Guidance Molecule a (RGMa) Induces Neuropathological and Behavioral Changes That Closely Resemble Parkinson's Disease, J Neurosci., 2017.09.27, Vol. 37, No. 39, p. 9361-9379 「RGMa decreases neuronal density in the SN」の項、fig. 6	1-13								
Y	JUNGEN, Christiane et al., Increased arrhythmia susceptibility in type 2 diabetic mice related to dysregulation of ventricular sympathetic innervation, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019.10.18, Vol. 317, p. H1328-H1341 要約、Fig. 6	1-13								
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p>		<p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>								
<p>国際調査を完了した日 12.03.2021</p>		<p>国際調査報告の発送日 23.03.2021</p>								
<p>名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>権限のある職員（特許庁審査官） 大島 彰公 4U 4869 電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>								

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/001261

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2016/175236 A1	03.11.2016	US 2018/0100012 A1 請求項1, 13, 14, 17、実施例 15, 16	