

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-513114

(P2022-513114A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全151頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2021-528981(P2021-528981)	(71)出願人 518086619
(86)(22)出願日 令和1年11月26日(2019.11.26)	デナリ セラピューティクス インコーポ
(85)翻訳文提出日 令和3年6月30日(2021.6.30)	レイテッド
(86)国際出願番号 PCT/US2019/063427	Denali Therapeutics
(87)国際公開番号 WO2020/112889	Inc.
(87)国際公開日 令和2年6月4日(2020.6.4)	アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(31)優先権主張番号 62/771,456	8 0 , サウス サンフランシスコ, オ
(32)優先日 平成30年11月26日(2018.11.26)	イスター ポイント ブールバード 1 6 1
(33)優先権主張国・地域又は機関	(74)代理人 100078282
米国(US)	弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号 62/817,955	(74)代理人 100113413
(32)優先日 平成31年3月13日(2019.3.13)	弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	(74)代理人 100181674
米国(US)	弁理士 飯田 貴敏
(31)優先権主張番号 62/890,506	(74)代理人 100181641
最終頁に続く	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂質代謝調節不全の治療方法

(57)【要約】

本明細書に記載の特定の実施形態は、脂質代謝調節不全及び/または炎症の治療を必要とする哺乳動物において、脂質代謝調節不全及び/または炎症を治療する方法であって、哺乳動物に、有効量のアゴニスト抗TREM2(骨髄系細胞上に発現されるトリガー受容体2)抗体を投与することを含む、方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における脂質代謝調節不全の治療に使用するための、アゴニスト抗 T R E M 2 (骨髄系細胞上に発現されるトリガー受容体 2) 抗体。

【請求項 2】

脂質代謝調節不全の治療を必要とする哺乳動物において前記脂質代謝調節不全を治療するための方法であって、有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を前記哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項 3】

前記哺乳動物における T R E M 2 を発現する細胞が、脂質代謝調節不全を示す、請求項 1 または 2 に記載の抗体または方法。 10

【請求項 4】

前記細胞が、ミクログリア細胞またはマクロファージである、請求項 3 に記載の抗体または方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物が、低下した T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定されており、任意選択で、前記哺乳動物が、低下したアポリポタンパク質 E (A p o E) 活性を有するか、または有すると判定されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 6】

前記脂質代謝調節不全が、1つ以上の脂質の蓄積の増加を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体または方法。 20

【請求項 7】

前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸種(B M P)、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 3 8 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 6 に記載の抗体または方法。 30

【請求項 8】

前記 1 つ以上の脂質は、コレステリルエステルを含む、請求項 7 に記載の抗体または方法。

【請求項 9】

前記哺乳動物が、アルツハイマー病、那須・ハコラ病(N H D)、レビー小体病、パーキンソン病、網膜変性症、ハンチントン病、前頭側頭葉変性症(F T D)、筋萎縮性側索硬化症(A L S)、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C 型、多発性硬化症または白質消失病を有するか、または発症しやすい、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 10】

前記哺乳動物が、肥満、2型糖尿病、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪肝疾患、関節リウマチ(R A)またはアテローム性動脈硬化症を有するか、または発症しやすい、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体または方法。 40

【請求項 11】

前記アゴニスト抗 T R E M 2 抗体が、M A B 1 7 2 9 1 または 7 8 . 1 8 である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 12】

前記投与が、脂質蓄積を低減し、任意選択で、G - C S F、I N F γ 、I L - 1 2 (p 4 0)、I L - 1 2 (p 7 0)、L I X (C X C L 5)、M C P - 1 (C C L 2)、M I G 50

(C X C L 9)、 I L - 1 、 I L - 1 、 及び I L - 1 8 からなる群から選択される少なくとも1つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減する、請求項 2 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

R X R アゴニスト、 L X R アゴニスト、 及びアセチル C o A アセチルトランスフェラーゼ 1 (A C A T 1) 阻害剤からなる群から選択される第 2 の治療薬を投与することをさらに含む、請求項 2 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

哺乳動物における脂質代謝調節不全を治療するための薬剤を調製するための、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用。

10

【請求項 1 5】

細胞内の1つ以上の脂質の細胞内蓄積の低減に使用するための、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体。

【請求項 1 6】

細胞内の1つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減させる方法であって、前記細胞を有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 1 7】

前記細胞が、ミクログリア細胞またはマクロファージである、請求項 1 5 または 1 6 に記載の抗体または方法。

【請求項 1 8】

前記1つ以上の脂質が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、 B M P、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 3 8 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

20

【請求項 1 9】

前記細胞が、低下した T R E M 2 活性を有するか、またはそれを有すると判定されており、任意選択で、前記細胞が、低下した A p o E 活性を有するか、または有すると判定されている、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

30

【請求項 2 0】

前記細胞が、哺乳動物に存在する、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 2 1】

細胞内の1つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減させるための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用。

【請求項 2 2】

哺乳動物におけるアルツハイマー病の治療に使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体であって、前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記アゴニスト抗 T R E M 2 抗体。

40

【請求項 2 3】

アルツハイマー病の治療を必要とする哺乳動物において前記アルツハイマー病を治療する方法であって、前記哺乳動物にアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含み、前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記方法。

【請求項 2 4】

前記哺乳動物が、 T R E M 2 発現細胞において脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、請求項 2 2 または 2 3 に記載の抗体または方法。

【請求項 2 5】

前記 T R E M 2 発現細胞が、低下した T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定さ

50

れている、請求項 2 4 に記載の抗体または方法。

【請求項 2 6】

前記脂質代謝調節不全が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、BMP、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 3 8 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ以上の脂質の細胞内蓄積の増加を含む、請求項 2 2 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 2 7】

哺乳動物におけるアルツハイマー病を治療するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 TREM 2 抗体の使用であって、前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記使用。

【請求項 2 8】

哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症の治療に使用するためのアゴニスト抗 TREM 2 抗体。

【請求項 2 9】

アテローム性動脈硬化症の治療を必要とする哺乳動物において前記アテローム性動脈硬化症を治療する方法であって、前記哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 TREM 2 抗体を投与することを含む、前記方法。

【請求項 3 0】

前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されており、前記脂質代謝調節不全が、1 つ以上の脂質の蓄積の増加を含む、請求項 2 8 または 2 9 に記載の抗体または方法。

【請求項 3 1】

前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、BMP、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 3 8 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 3 0 に記載の抗体または方法。

【請求項 3 2】

前記哺乳動物におけるマクロファージが、低下した TREM 2 活性を有するか、または有すると判定されている、請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 3 3】

哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症を治療するための薬剤を調製するための、アゴニスト抗 TREM 2 抗体の使用。

【請求項 3 4】

哺乳動物における炎症の治療に使用するための、アゴニスト抗 TREM 2 抗体。

【請求項 3 5】

炎症の治療を必要とする哺乳動物において前記炎症を治療する方法であって、前記哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 TREM 2 抗体を投与することを含む、前記方法。

【請求項 3 6】

前記投与は、G-CSF、INF γ 、IL-12(p40)、IL-12(p70)、LIX(CXCL5)、MCP-1(CCL2)、MIG(CXCL9)、IL-1、IL-1、及びIL-18からなる群から選択される少なくとも 1 つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減する、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記哺乳動物が、RA、痛風、または炎症性腸疾患(IBD)を有するか、または発症しやすい、請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

前記哺乳動物が、アルツハイマー病、那須・ハコラ病（NHD）、レビー小体病、パーキンソン病、網膜変性症、ハンチントン病、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C 型、多発性硬化症または白質消失病を有するか、または発症しやすい、請求項 34～36 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 39】

前記哺乳動物が、肥満、2 型糖尿病、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪肝疾患、またはアテローム性動脈硬化症を有するか、または発症しやすい、請求項 34～36 のいずれか一項に記載の抗体または方法。

【請求項 40】

哺乳動物における炎症を治療するための薬剤を調製するための、アゴニスト抗 TREM 2 抗体の使用。

【請求項 41】

組織試料から CNS 細胞の集団を選別する方法であって、

(a) 前記組織試料を、抗 CD 45 一次抗体、抗 CD 11b 一次抗体、及び抗星状膠細胞表面抗原 - 2 (ACSA - 2) 一次抗体（各一次抗体は一意に標識される）と接触させて、標識された組織試料を提供することと、

(b) 前記標識された組織試料中の前記細胞をフローサイトメトリーにより選別することと、を含み、

前記方法が、星状膠細胞及びミクログリア細胞の異なる細胞集団を提供する、前記方法。

【請求項 42】

2 つの物理的に別個の細胞集団を含む CNS 細胞の集合であって、第 1 の細胞集団が、CD 45^{low} / CD 11b⁺ / ACSA - 2⁻ 細胞の濃縮集団を含み、第 2 の細胞集団が、濃縮集団 CD 45⁻ / CD 11b⁻ / ACSA - 2⁺ 細胞を含む、前記 CNS 細胞の集合。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 11 月 26 日に提出された米国仮特許第 62 / 771, 456 号、2019 年 3 月 13 日に提出された米国仮特許第 62 / 817, 955 号、及び 2019 年 8 月 22 日に提出された米国仮特許第 62 / 890, 506 号の優先権を主張する。上記で参照される出願の内容全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

脂質は、エネルギーを貯蔵し、シグナル伝達し、細胞膜及びミエリン鞘の構造成分として機能するなど、複数の生化学的機能を発揮する、大きい多様なクラスの生体分子である。脂質代謝は、エネルギーのための脂肪の分解または貯蔵を含む、脂質の細胞内または細胞外合成及び分解を指す。好中球、単球、マクロファージ及びミクログリアを含む骨髄系細胞における脂質調節不全は、罹患細胞または組織において有害な炎症応答ならびに脂質毒性を引き起こし、多数の疾患プロセスを媒介することが示されている。脂質代謝及び疾患との関連を調査するために多くの研究が行われているが、脂質処理、脂質関連炎症及び脂質毒性の基礎となる分子機構をさらに明らかにするための追加の作業、ならびに特定の疾患及び状態における脂質調節不全及び / または関連炎症応答を治すための新しい療法を開発するための追加の作業が必要である。

【発明の概要】

【0003】

本明細書に記載の特定の実施形態は、脂質代謝調節不全の治療を必要とする哺乳動物において脂質代謝調節不全を治療するための方法であって、哺乳動物にアゴニスト抗 TREM 2（骨髄系細胞上に発現されるトリガー受容体 2）抗体を投与することを含む、方法を、

10

20

30

40

50

提供する。

【0004】

本明細書に記載の特定の実施形態は、哺乳動物の脂質代謝調節不全の治療に使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を提供する。

【0005】

本明細書に記載の特定の実施形態は、哺乳動物の脂質代謝調節不全を治療するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用を提供する。

【0006】

本明細書に記載の特定の実施形態は、細胞を有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体と接触させることを含む、細胞内の1つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減する方法を提供する。

10

【0007】

本明細書に記載の特定の実施形態は、細胞内の1つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減するのに使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を提供する。

【0008】

本明細書に記載の特定の実施形態は、細胞内の1つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用を提供する。

【0009】

本明細書に記載の特定の実施形態は、アルツハイマー病を治療することを必要とする哺乳動物におけるアルツハイマー病を治療する方法を提供し、方法は、哺乳動物にアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含み、哺乳動物は脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている。

20

【0010】

本明細書に記載の特定の実施形態は、哺乳動物におけるアルツハイマー病の治療に使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を提供し、哺乳動物は、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている。

【0011】

本明細書に記載の特定の実施形態は、哺乳動物におけるアルツハイマー病を治療するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用を提供し、哺乳動物は、脂質代謝の調節不全を有するか、または有すると判定されている。

【0012】

本明細書に記載の特定の実施形態は、哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含む、アテローム性動脈硬化症の治療を必要とする哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症を治療する方法を提供する。

30

【0013】

本明細書に記載の特定の実施形態は、哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症の治療に使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を提供する。

【0014】

本明細書に記載の特定の実施形態は、哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症を治療するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用を提供する。

【0015】

ある特定の実施形態は、哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含む、炎症の治療を必要とする哺乳動物における炎症を治療する方法を提供する。

40

【0016】

ある特定の実施形態は、哺乳動物における炎症の治療に使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を提供する。

【0017】

ある特定の実施形態は、哺乳動物の炎症を治療するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

50

【図1】クプリゾン食餌によって誘発される慢性脱髄を有する Trem2 変異体マウスにおける脂質代謝に関連する遺伝子の発現減弱。(A) 処置なしで Trem2 +/+、Trem2 +/-、及び Trem2 -/- マウス脳から単離されたバルクミクログリアにおける発現差のある遺伝子の数の Venn 図。(B) 慢性脱髄を有する Trem2 +/+、Trem2 +/-、及び Trem2 -/- マウス脳から単離されたバルクミクログリアにおける発現差のある遺伝子の数の Venn 図 (12 週間クプリゾン処置)。(C) 対照食餌 (左挿入図) 対 5 週間または 12 週間クプリゾン処置 (右挿入図、それぞれ上または下) による Trem2 +/+、Trem2 +/-、及び Trem2 -/- バルクミクログリアにおける脂質代謝に関連する個々の遺伝子における Log2 倍率発現変化 (左挿入図)。

【図2A】慢性脱髄を有する Trem2 ノックアウトマウスにおける脂質代謝に関連する遺伝子の発現減弱。12 週間クプリゾン処置 (Trem2 +/+ CPZ、Trem2 +/- CPZ、Trem2 -/- CPZ) による Trem2 +/+、Trem2 +/-、及び Trem2 -/- マウスから単離したミクログリアと比較した、個々に単離した Trem2 +/+ 対照食餌ミクログリア (Trem2 +/+ Ctrl) からの単細胞 RNA 配列決定データのミクログリアクラスター。左：各クラスターにおいて表されるすべての集約された試料の %；右：クラスターにおいて表される各個々の試料の百分率のヒートマップ。

【図2B】慢性脱髄を有する Trem2 ノックアウトマウスにおける脂質代謝に関連する遺伝子の発現減弱。クラスター knn5、8、及び 10 において上方制御及び下方制御された上位発現変動遺伝子の比率を示すヒートマップクラスタリング。

【図3A】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト前脳におけるコレステリルエステル及びミエリン脂質の増加した存在量。対照食餌またはクプリゾン食餌による Trem2 +/+、Trem2 +/-、及び Trem2 -/- マウスにおける未変化前脳総遊離コレステロールレベル。対照食餌または 5 週間クプリゾンによる Trem2 +/+、Trem2 +/-、及び Trem2 -/- マウス、ならびに 12 週間クプリゾンによる Trem2 +/+ 及び Trem2 +/- マウスと比較して、12 週間クプリゾン食餌による Trem2 -/- マウスからの前脳で認められる。

【図3B】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト前脳におけるコレステリルエステル及びミエリン脂質の増加した存在量。コレステリルエステルの増加。

【図3C】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト前脳におけるコレステリルエステル及びミエリン脂質の増加した存在量。酸化コレステリルエステル。

【図3D】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト前脳におけるコレステリルエステル及びミエリン脂質の増加した存在量。ピス (モノアシルグリセロ) リン酸 (BMP)。

【図3E】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト前脳におけるコレステリルエステル及びミエリン脂質の増加した存在量。トリアシルグリセリドの増加。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、二元配置分散分析、チューキー検定、***：+/+ 対照との比較、+++：12 週間 CPZ による遺伝子型間の比較。脂質を、LC/MS によって定量化した。

【図3F】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト前脳におけるコレステリルエステル及びミエリン脂質の増加した存在量。ガングリオシドレベルの増加。各ガングリオシド種について、以下の条件に対応するデータを左から右に示す。+/+ コントロール；+/+ 5 週間 CPZ；+/+ 12 週間 CPZ；+/- コントロール；+/- 5 週間 CPZ；+/- 12 週間 CPZ；-/- コントロール；-/- 5 週間 CPZ；及び -/- 12 週間 CPZ。

【図4A】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト単離ミクログリア中のコレステリルエステル及びミエリン由来脂質の増加した存在量。対象食餌または 5 週間クプリゾンによる Trem2 +/+、Trem2 +/-、及び Trem2 -/- ミクログリア、ならびに 12 週間クプリゾンによる Trem2 +/+ 及び Trem2 +/- ミクログリアと比較して、Trem2 -/- 脳 (12 週間クプリゾン食餌) から単離されたミクログリアで検出されたコレステリルエステルの増加。

【図4B】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト単離ミクログリア中のコレステリルエス

10

20

30

40

50

テル及びミエリン由来脂質の増加した存在量。対象食餌または5週間クプリゾンによる Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによる Trem2^{+/+} 及び Trem2^{+/-} ミクログリアと比較して、Trem2^{-/-} 脳(12週間クプリゾン食餌)から単離されたミクログリアで検出されたBMPの増加。

【図4C】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト単離ミクログリア中のコレステリルエステル及びミエリン由来脂質の増加した存在量。対象食餌または5週間クプリゾンによる Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによる Trem2^{+/+} 及び Trem2^{+/-} ミクログリアと比較して、Trem2^{-/-} 脳(12週間クプリゾン食餌)から単離されたミクログリアで検出されたヘキソシルセラミドの増加。

10

【図4D】慢性脱髄時の Trem2 ノックアウト単離ミクログリア中のコレステリルエステル及びミエリン由来脂質の増加した存在量。対象食餌または5週間クプリゾンによる Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによる Trem2^{+/+} 及び Trem2^{+/-} ミクログリアと比較して、Trem2^{-/-} 脳(12週間クプリゾン食餌)から単離されたミクログリアで検出されたガラクトシルセラミドレベルの増加。

【図4E】対照食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} 脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、コレステリルエステルの脂質レベルの変化はない。

20

【図4F】対照食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} 脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、BMPの脂質レベルの変化はない。

【図4G】対照食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} 脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、ヘキソシルセラミドの脂質レベルの変化はない。

【図4H】対照食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} 脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、ガラクトシルセラミドの脂質レベルの変化はない。

【図4I】対象食餌または5週間クプリゾンによる Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによる Trem2^{+/+} 及び Trem2^{+/-} ミクログリアと比較して、12週間クプリゾン食餌による Trem2^{-/-} 脳から単離されたミクログリアにおいて検出されたセラミドの増加。

30

【図4J】対象食餌または5週間クプリゾンによる Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによる Trem2^{+/+} 及び Trem2^{+/-} ミクログリアと比較して、12週間クプリゾン食餌による Trem2^{-/-} 脳から単離されたミクログリアにおいて検出されたGM3の増加。

【図4K】対象食餌または5週間クプリゾンによる Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによる Trem2^{+/+} 及び Trem2^{+/-} ミクログリアと比較して、12週間クプリゾン食餌による Trem2^{-/-} 脳から単離されたミクログリアにおいて検出されたホスファチジルグリセロールの増加。

40

【図4L】対象食餌または5週間クプリゾンによる Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによる Trem2^{+/+} 及び Trem2^{+/-} ミクログリアと比較して、12週間クプリゾン食餌による Trem2^{-/-} 脳から単離されたミクログリアにおいて検出されたスルファチドレベルの増加。

【図4M】セラミドの脂質レベルにおける変化は、対象食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-} 脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、検出されなかった。脂質を、LC/MSにより定量化した。

50

【図4N】GM3の脂質レベルにおける変化は、対象食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-}脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、検出されなかった。脂質を、LC/MSにより定量化した。

【図4O】ホスファチジルグリセロールの脂質レベルにおける変化は、対象食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-}脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、検出されなかった。脂質を、LC/MSにより定量化した。

【図4P】スルファチドの脂質レベルにおける変化は、対象食餌またはクプリゾン食餌による Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-}脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、検出されなかった。脂質を、LC/MSにより定量化した。

10

【図5】TREM2 KO BMDMは、酸化低密度リポタンパク質(oxLDL)による処置時に中性脂質染色の増加を示す。(A)酸化LDL(oxLDL、50ug/mL)またはビヒクルのいずれかで48時間処置した培養TREM2 WTまたはKO骨髄由来マクロファージ(BMDM)のニールレッド染色(63倍分解能)。(B)。総スポット面積の定量化は、TREM2 KOにおける中性脂質の蓄積を示し、両方とも、ビヒクル条件下では程度が小さく、ならびに脂質チャレンジ(oxLDL)条件下では程度がより大きい。データを、3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示す。

【図6A】TREM2 KO BMDMは、酸化LDLでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。50ug/mLのoxLDLを投与した場合、WT BMDMと比較して、培養TREM2 KO BMDMにおいて検出されるコレステリルエステルのレベルの増加。

20

【図6B】TREM2 KO BMDMは、酸化LDLでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。50ug/mLのoxLDLを投与した場合、WT BMDMと比較して、培養TREM2 KO BMDMにおいて検出されるガングリオシドGM3のレベルの増加。

【図6C】TREM2 KO BMDMは、酸化LDLでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。50ug/mLのoxLDLを投与した場合、WT BMDMと比較して、培養TREM2 KO BMDMにおいて検出されるトリアシルグリセリドのレベルの増加。

【図6D】TREM2 KO BMDMは、酸化LDLでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。50ug/mLのoxLDLを投与した場合、WT BMDMと比較して、培養TREM2 KO BMDMにおいて検出されるヘキソシルセラミドのレベルの増加。

30

【図6E】TREM2 KO BMDMは、酸化LDLでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。50ug/mLのoxLDLを投与した場合、WTと比較して、TREM2 KOにおいて、ホスファチジルコリンの変化は観察されなかった。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSにより測定した。

【図7A】TREM2 KO BMDMは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。培養Trem2 KO BMDMは、精製したマウス脳ミエリン(25ug/mL)で処理した場合、コレステリルエステル、

【図7B】TREM2 KO BMDMは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。培養Trem2 KO BMDMは、精製したマウス脳ミエリン(25ug/mL)で処理した場合、酸化コレステリルエステルのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及びS.E.Mとして示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSにより測定した。

40

【図7C】TREM2 KO BMDMは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。培養Trem2 KO BMDMは、精製したマウス脳ミエリン(25ug/mL)で処理した場合、ジアシルグリセリドのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及びS.E.Mとして示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSにより測定した。

【図7D】TREM2 KO BMDMは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。培養Trem2 KO BMDMは、精製したマウス脳ミエリン(25ug/mL)で

50

処理した場合、トリアシルグリセリドのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及びS.E.Mとして示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSにより測定した。

【図7E】TREM2 KO BMDMは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。培養Trem2 KO BMDMは、精製したマウス脳ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、ヘキソシルセラミドのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及びS.E.Mとして示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSにより測定した。

【図7F】TREM2 KO BMDMは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。培養Trem2 KO BMDMは、精製したマウス脳ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、ラクトシルセラミドのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及びS.E.Mとして示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSにより測定した。

【図7G】TREM2 KO BMDMは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。培養Trem2 KO BMDMは、精製したマウス脳ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、ガングリオシドのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及びS.E.Mとして示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSにより測定した。

【図8A】TREM2 KO誘導多能性幹細胞(iPSC)由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリアは、ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、遊離コレステロールのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

【図8B】TREM2 KO誘導多能性幹細胞(iPSC)由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリアは、ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、ホスファチジルセリン38:4のより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

【図8C】TREM2 KO誘導多能性幹細胞(iPSC)由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリアは、ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、BMP44:12のより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

【図8D】TREM2 KO誘導多能性幹細胞(iPSC)由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリアは、ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、リゾホスファチジルコリン16:0のより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

【図8E】TREM2 KO誘導多能性幹細胞(iPSC)由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリアは、ミエリン(25 µg/mL)で処理した場合、血小板活性化因子のより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

【図8F】TREM2 KO誘導多能性幹細胞(iPSC)由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクロ

10

20

30

40

50

グリアは、ミエリン (25 ug/mL) で処理した場合、コレステロール硫酸のより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

【図8G】TREM2 KO誘導多能性幹細胞 (iPSC) 由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリアは、ミエリン (25 ug/mL) で処理した場合、リゾホスファチジルエタノールアミンのより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

10

【図8H】TREM2 KO誘導多能性幹細胞 (iPSC) 由来のヒトマイクログリアは、ミエリンでの処置時の脂質蓄積の増加を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリアは、ミエリン (25 ug/mL) で処理した場合、プラズマロゲンホスファチジルエタノールアミン (PEp) のより大きな蓄積を示す。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に対して正規化している。脂質を、LC/MSにより分析した。

【図9】ミエリン由来コレステロールを、BMDM中のACAT1を介してコレステリルエステルに変換する。次いで、ミエリンの有無にかかわらず2時間投与した野生型マウス由来のBMDM中の遊離コレステロール及びコレステリルエステル (CE) レベルを、ミエリン取り込み (T0) の直後、またはミエリンウォッシュアウト及び2時間 (T2) もしくは4時間 (T4) の追跡後に、抽出した。ACAT1阻害剤をミエリン取り込み中に添加し、4時間のウォッシュアウトを通して維持した (T4 + ACAT1阻害剤)。脂質を、LC/MSによって測定した。

20

【図10】組み換えヒトAPOE3は、ミエリン処理時のTrem2 KO BMDM中の中性脂質蓄積を改善する。Trem2 KO BMDMは、ナイルレッド染色によって定量されるように、ミエリンデブリ (25 ug/mL) で24時間処理する場合、WT BMDMよりもより多い中性脂質を蓄積する。この蓄積は、組み換えヒトAPOE3 (10 ug/mL) を培養培地に添加することによって改善される。

【図11A】ACAT1阻害は、ミエリン処置時のiPSC由来ヒトマイクログリアにおけるコレステリルエステル増加を消失させる。ACAT1阻害は、精製ミエリンで治療されたWT及びTrem2 KO iPSC由来ヒトマイクログリアの両方で測定されるすべてのコレステリルエステル種の蓄積を防止する。

30

【図11B】ACAT1阻害は、ミエリン処置時のiPSC由来ヒトマイクログリアにおけるコレステリルエステル増加を消失させる。コレステリルエステル22:6の具体例を示す。

【図11C】ACAT1阻害は、ミエリン処置時のiPSC由来ヒトマイクログリアにおけるコレステリルエステル増加を消失させる。対照として、コレステロールレベルは、ACAT1阻害剤の存在によって影響されないことが示されている。データを3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示し、全てのデータをウェル当たりの平均細胞数に正規化している。脂質を、LC/MSによって測定した。

40

【図12A】アゴニスト抗TREM2抗体は、ミエリン処置時にiPSC由来ヒトマイクログリアにおける中性脂質蓄積を減少させる。ビヒクルまたはミエリン (50 ug/mL) のいずれかで処置し、次いでRSV対照またはアゴニスト抗TREM2抗体のいずれかで24時間後に処置した、iPSC由来ヒトマイクログリアのナイルレッド画像。

【図12B】アゴニスト抗TREM2抗体は、ミエリン処置時にiPSC由来ヒトマイクログリアにおける中性脂質蓄積を減少させる。トリアシルグリセリドのスポット定量化は、アイソタイプ対照 (RSV) と比較したTREM2抗体での処理時の脂質蓄積の低減を示す。リポドミクスのデータを、ウェル当たりの平均細胞数に正規化している。トリグリセリドを、LC/MSにより測定した。

【図12C】アゴニスト抗TREM2抗体は、ミエリン処置時にiPSC由来ヒトマイクロ

50

グリアにおける中性脂質蓄積を減少させる。脂質学は、アイソタイプ対照 (R S V) と比較した T R E M 2 抗体での処理時の脂質蓄積の低減を示す。リポドミクスのデータを、ウェル当たりの平均細胞数に正規化している。トリグリセリドを、 L C / M S により測定した。

【図 1 2 D】アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、ミエリン処置時に i P S C 由来ヒトマイクログリアにおける中性脂質蓄積を減少させる。(ミエリンで、続いて例示的な抗 T R E M 2 抗体とのインキュベーションにより処置した i P S C ミクログリアにおける) トリアシルグリセリド脂質種の定量化レベルを示す棒グラフを含む。

【図 1 2 E】アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、ミエリン処置時に i P S C 由来ヒトマイクログリアにおける中性脂質蓄積を減少させる。(ミエリンで、続いて例示的な抗 T R E M 2 抗体とのインキュベーションにより処置した i P S C ミクログリアにおける) トリアシルグリセリド脂質種の定量化レベルを示す棒グラフを含む。例示的な抗 T R E M 2 抗体とのインキュベーションの前にミエリンウォッシュアウトステップが含まれた i P S C ミクログリアについてのデータを表す。

【図 1 3 A】 T R E M 2 K O B M D M 中のミエリン貯蔵に対するベキサロテンの効果。 T r e m 2 K O B M D M は、ナイルレッド染色によって定量されるように、ミエリンデブリ (2 5 u g / m L) で 4 8 時間処置すると、 W T B M D M よりも多い中性脂質を蓄積する。この蓄積は、ベキサロテン (1 0 u M) との同時処置によって低減される。

【図 1 3 B】 A C A T 1 阻害剤及び L X R アゴニストは、ヒト i P S C 由来 T R E M 2 K O ミクログリアにおけるコレステリルエステル (C E) のレベルを低下させる。ヒト i P S C 由来マイクログリアを、薬物なし、 A C A T 1 阻害剤 K 6 0 4 (5 0 0 n M) 及び L X R アゴニスト G W 3 9 6 5 (1 0 u M) と共に、 C + + + 培地中のミエリン (2 5 u g / m L) で 4 8 時間処理した。 C E レベルは、 W T 細胞及び T R E M 2 K O 細胞の両方の薬物によって救出されたが、 T R E M 2 K O 細胞で見られるコレステロール増加は、薬物によって救済されなかった。 C E 及びコレステロールレベルを、 L C / M S によりライセート中で測定した。 N = 3 つの生物学的複製物。

【図 1 4 A】 T R E M 2 欠損は、慢性脱髄中の D A M 変換を防止する。対照食餌 (左挿入図) 対 5 週間または 1 2 週間クプリゾン処置 (右挿入図、それぞれ上または下) による T r e m 2 + / + 、 T r e m 2 + / - 、及び T r e m 2 - / - バルクマイクログリアにおけるリソソーム機能に関連する個々の遺伝子における L o g 2 倍発現変化 (左挿入図) 。

【図 1 4 B】 T R E M 2 欠損は、慢性脱髄中の D A M 変換を防止する。対照食餌 (左挿入図) 対 5 週間または 1 2 週間クプリゾン処置 (右挿入図、それぞれ上または下) による T r e m 2 + / + 、 T r e m 2 + / - 、及び T r e m 2 - / - バルクマイクログリアにおける脂質代謝に関連する個々の遺伝子における L o g 2 倍発現変化 (左挿入図) 。

【図 1 4 C】 T R E M 2 欠損は、慢性脱髄中の D A M 変換を防止する。野生型マイクログリアと比較した、上位 6 9 D A M 遺伝子下方制御 (上方) または 5 X F A D における上方制御 (下方) における 5 週間及び 1 2 週間対照対 C P Z 処置 T r e m 2 + / + 、 T r e m 2 + / - 、及び T r e m 2 - / - からのバルクマイクログリア発現変化 (l o g 2 倍変化) のヒートマップ (K e r e n - S h a u l , e t a l . (2 0 1 7) . C e l l 1 6 9 , 1 2 7 6 - 1 2 9 0 e 1 2 1 7) 。カメラ、 p < 1 x 1 0 - 4 1 。

【図 1 4 D】 T R E M 2 欠損は、慢性脱髄中の D A M 変換を防止する。 5 週間 (上) または 1 2 週間 (下) についての対照 (左挿入図) または C P Z 処置 (右挿入図) による T r e m 2 + / + 、 T r e m 2 + / - 、及び T r e m 2 - / - バルクマイクログリアにおける個体恒常性 D A M 遺伝子における L o g 2 倍発現変化。

【図 1 4 E】 T R E M 2 欠損は、慢性脱髄中の D A M 変換を防止する。 5 週間 (上) または 1 2 週間 (下) についての対照 (左挿入図) または C P Z 処置 (右挿入図) による T r e m 2 + / + 、 T r e m 2 + / - 、及び T r e m 2 - / - バルクマイクログリアにおける第 1 段階の D A M 遺伝子における L o g 2 倍発現変化。

【図 1 4 F】 T R E M 2 欠損は、慢性脱髄中の D A M 変換を防止する。 5 週間 (上) または 1 2 週間 (下) についての対照 (左挿入図) または C P Z 処置 (右挿入図) による T r

10

20

30

40

50

$em2^{+ / +}$ 、 $Trem2^{+ / -}$ 、及び $Trem2^{- / -}$ バルクミクログリアにおける第2段階のDAM遺伝子におけるLog2倍発現変化。

【図15A】TREM2欠損は、慢性脱髄中のDAM変換を防止する。5XFADマウス由来のDAM対恒常性ミクログリアで上方制御された遺伝子についての $Trem2^{+ / +}$ 12週間対照対CPZ処置マウス(上)及び $Trem2^{- / -}$ 12週間対照対CPZ処置マウス(下)についてのLog2倍率変化(Keren-Shaul, et al. (2017) Cell 169, 1276-1290 e1217)を参照されたい)。

【図15B】TREM2欠損は、慢性脱髄中のDAM変換を防止する。加齢野生型脳から単離されたミクログリアは損傷関連ミクログリア特徴を発現した。加齢対若年 $Trem2^{+ / +}$ マウス(x軸)及び加齢対若年 $Trem2^{- / -}$ マウス(y軸)から選別されたミクログリアのRNA配列プロファイルから計算されたt統計の比較; 群あたりn = 7匹のマウス。遺伝子は、対象目的の遺伝子セット内のメンバーシップによって着色される。ホメオスタチック、DAM1、及びDAM2遺伝子セットは、(Keren-Shaul, et al. (2017). Cell 169, 1276-1290 e1217)において定義されている。コレステロール代謝に関連することが事前に知られている、12週間CPZ対照処置マウスからの発現変動遺伝子のサブセットから同定されたコレステロール代謝関連遺伝子セット。

【図15C】TREM2欠損は、慢性脱髄中のDAM変換を防止する。加齢野生型脳から単離されたミクログリアは損傷関連ミクログリア特徴を発現した。(Keren-Shaul, et al. (2017). Cell 169, 1276-1290 e1217)に定義されているDAM2ミクログリアにおいて、または(15B)に定義されているコレステロール代謝関連遺伝子セットにおいて、上方制御される $Trem2$ クプリゾン及び加齢コホートからの発現変動遺伝子のヒートマップ。遺伝子発現値をゼロ平均及び単位分散としてプロットする。

【図16A】ScRNA配列は、 $Trem2^{- / -}$ ミクログリアが脱髄時に損傷関連ミクログリア状態への減弱移行を示すことを確認する。細胞当たりの正規化されたカウントとしてプロットされた、データセット全体にわたる選択されたマーカー遺伝子の発現プロファイル。左の凡例は、示されるクラスターにおける上方制御(上矢印)対下方制御(下矢印)マーカー遺伝子を示す。

【図16B】ScRNA配列は、 $Trem2^{- / -}$ ミクログリアが脱髄時に損傷関連ミクログリア状態への減弱移行を示すことを確認する。クラスターを定義する個々のマーカー遺伝子の固有の分子識別子(UMI)リードの正規化されたカウントを、全てのクラスターにおける発現にわたって比較した。左の凡例は、示されるクラスターにおける上方制御(上矢印)対下方制御(下矢印)マーカー遺伝子を示す。

【図16C-1】ScRNA配列は、 $Trem2^{- / -}$ ミクログリアが脱髄時に損傷関連ミクログリア状態への減弱移行を示すことを確認する。他の全てのクラスターにわたって比較した、クラスター8からの上方制御マーカー遺伝子の正規化された発現スコア。ドットは、クラスターによってシェードされた個々のセルを表す。

【図16C-2】ScRNA配列は、 $Trem2^{- / -}$ ミクログリアが脱髄時に損傷関連ミクログリア状態への減弱移行を示すことを確認する。他の全てのクラスターにわたって比較した、クラスター8からの上方制御マーカー遺伝子の正規化された発現スコア。ドットは、クラスターによってシェードされた個々のセルを表す。

【図17A】TREM2欠損は、脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間クプリゾン(CPZ)食餌による $Trem2^{+ / +}$ 、 $Trem2^{+ / -}$ 、及び $Trem2^{- / -}$ マウスから単離した血漿中の神経親和性軽鎖(Nf-L)レベル。***p < 0.001、相互作用p = 0.06、二元配置分散分析、チューキー検定、n = 7~16匹のマウス/条件。

【図17B】TREM2欠損は、脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。2ヶ月及び17ヶ月時点で $Trem2^{+ / +}$ 及び $Trem2^{- / -}$ マウスから単離された血漿中の神経親和性軽鎖(Nf-L)レベル(二元配置分散分析、FDR < 0.05、相互作用

10

20

30

40

50

年齢遺伝子型 $p < 0.05$)。

【図17C】TREM2欠損は、脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照対5週間CPZ処置で有意に変化した脂質のヒートマップ比較。N = 条件当たり3匹のマウス、二元配置分散分析、 $FDR < 0.05$ 。

【図17D-1】TREM2欠損は、脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウス前脳における遺伝子型及び/または12週間CPZ処置によって著しく変化した脂質のヒートマップ。二元配置分散分析、 $FDR < 0.05$ ；カラムは、個々のマウスからのデータを表し、条件当たり $n = 3 \sim 7$ 匹のマウスである。

【図17D-2】TREM2欠損は、脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウス前脳における遺伝子型及び/または12週間CPZ処置によって著しく変化した脂質のヒートマップ。二元配置分散分析、 $FDR < 0.05$ ；カラムは、個々のマウスからのデータを表し、条件当たり $n = 3 \sim 7$ 匹のマウスである。

【図17E】TREM2欠損は、脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食事によるTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウス前脳から抽出されたコレステリルエステル(CE)種の濃度。データは平均値 \pm SEMを表し、 \log_{10} スケールで提示されている。二元配置分散分析、 $FDR < 0.05$ ；アスタリスクで示されるように、12週間CPZ食事におけるTrem2^{-/-}からの示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。各CE種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+ / +コントロール；+ / + 5週間CPZ；+ / + 12週間CPZ；+ / - コントロール；+ / - 5週間CPZ；+ / - 12週間CPZ；- / - コントロール；- / - 5週間CPZ；及び- / - 12週間CPZ。

【図17F】TREM2欠損は、脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照食餌または5週間または12週間のCPZ後のTrem2^{+/+}マウス及びTrem2^{-/-}マウスの海馬におけるAPP陽性パンクタ、APP陽性領域、及びAPP強度の定量化。

【図18A】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。(A)対照、5週間または12週間クプリゾン(CPZ)処置時に、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウス脳から単離されたミクログリアにおける処置及び/または遺伝子型によって著しく変化した脂質のヒートマップ。二元配置分散分析、 $FDR < 0.05$ ；カラムは、個々のマウスからのデータを表し、条件当たり $n = 6$ 匹のマウスである。(B)対照、5週間または12週間CPZ処理時に、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウスから単離された脳脊髄液(CSF)中で検出された脂質のヒートマップ比較。カラムは、個々のマウスからのデータを表し、条件当たり $n = 5 \sim 6$ 匹のマウスである。A ~ Bに示されるように、ある特定の脂質学的変化が、慢性脱髄時にTrem2ノックアウト単離ミクログリア(A)には存在するが、CSFには存在しない(B)。

【図18B】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。(A)対照、5週間または12週間クプリゾン(CPZ)処置時に、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウス脳から単離されたミクログリアにおける処置及び/または遺伝子型によって著しく変化した脂質のヒートマップ。二元配置分散分析、 $FDR < 0.05$ ；カラムは、個々のマウスからのデータを表し、条件当たり $n = 6$ 匹のマウスである。(B)対照、5週間または12週間CPZ処理時に、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウスから単離された脳脊髄液(CSF)中で検出された脂質のヒートマップ比較。カラムは、個々のマウスからのデータを表し、条件当たり $n = 5 \sim 6$ 匹のマウスである。A ~ Bに示されるように、ある特定の脂質学的変化が、慢性脱髄時にTrem2ノックアウト単離ミクログリア(A)には存在するが、CSFには存在しない(B)。

10

20

30

40

50

【図18C】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間、または12週間CPZ処置時に、Trem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウスから単離された星状膠細胞中で検出された脂質のヒートマップ比較。カラムは、個々のマウスからのデータを表し、条件当たりn = 5~6匹のマウスである。

【図18D】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。増加した(D)コレステリルエステルレベルを、対照食餌または5週間クプリゾンによるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによるTrem2+/+及びTrem2+/-ミクログリアと比較して、12週間クプリゾン食餌によるTrem2-/-脳から単離されたミクログリア中で検出した。一般に、対照またはクプリゾン食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-脳から単離された、星状膠細胞が豊富な細胞集団(E)またはCSF(F)においては、コレステリルエステルの脂質レベルの変化は検出されなかった。脂質を、LC/MSにより定量化した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、二元配置分散分析、チューキー検定、*** : +/+対照との比較、+++ : 12週間CPZによる遺伝子型間の比較。(D~F)各ステロイド種について、以下の条件に対応するデータを、左から右に、+/+コントロール; +/+5週間CPZ; +/+12週間CPZ; +/-コントロール; +/-5週間CPZ; +/-12週間CPZ; -/-コントロール; -/-5週間CPZ; 及び -/-12週間CPZ。

【図18E】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。増加した(D)コレステリルエステルレベルを、対照食餌または5週間クプリゾンによるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによるTrem2+/+及びTrem2+/-ミクログリアと比較して、12週間クプリゾン食餌によるTrem2-/-脳から単離されたミクログリア中で検出した。一般に、対照またはクプリゾン食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-脳から単離された、星状膠細胞が豊富な細胞集団(E)またはCSF(F)においては、コレステリルエステルの脂質レベルの変化は検出されなかった。脂質を、LC/MSにより定量化した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、二元配置分散分析、チューキー検定、*** : +/+対照との比較、+++ : 12週間CPZによる遺伝子型間の比較。(D~F)各ステロイド種について、以下の条件に対応するデータを、左から右に、+/+コントロール; +/+5週間CPZ; +/+12週間CPZ; +/-コントロール; +/-5週間CPZ; +/-12週間CPZ; -/-コントロール; -/-5週間CPZ; 及び -/-12週間CPZ。

【図18F】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。増加した(D)コレステリルエステルレベルを、対照食餌または5週間クプリゾンによるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによるTrem2+/+及びTrem2+/-ミクログリアと比較して、12週間クプリゾン食餌によるTrem2-/-脳から単離されたミクログリア中で検出した。一般に、対照またはクプリゾン食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-脳から単離された、星状膠細胞が豊富な細胞集団(E)またはCSF(F)においては、コレステリルエステルの脂質レベルの変化は検出されなかった。脂質を、LC/MSにより定量化した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、二元配置分散分析、チューキー検定、*** : +/+対照との比較、+++ : 12週間CPZによる遺伝子型間の比較。(D~F)各ステロイド種について、以下の条件に対応するデータを、左から右に、+/+コントロール; +/+5週間CPZ; +/+12週間CPZ; +/-コントロール; +/-5週間CPZ; +/-12週間CPZ; -/-コントロール; -/-5週間CPZ; 及び -/-12週間CPZ。

10

20

30

40

50

【図18G】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウス脳からの選別ミクログリア由来の脂質種、選別星状膠細胞及びCSFの濃度：ミクログリアBMP。データは平均値±SEMを表し、log10スケールで提示されている。二元配置分散分析；アスタリスクで***p<0.0001と示されるように、12週間CPZ食餌におけるTrem2-/-由来の示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。各種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+/+コントロール；+/+5週間CPZ；+/+12週間CPZ；+/-コントロール；+/-5週間CPZ；+/-12週間CPZ；-/-コントロール；-/-5週間CPZ；及び-/-12週間CPZ。

10

【図18H】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウス脳からの選別ミクログリア由来の脂質種、選別星状膠細胞及びCSFの濃度：星状膠細胞BMP。データは平均値±SEMを表し、log10スケールで提示されている。二元配置分散分析；アスタリスクで***p<0.0001と示されるように、12週間CPZ食餌におけるTrem2-/-由来の示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。各種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+/+コントロール；+/+5週間CPZ；+/+12週間CPZ；+/-コントロール；+/-5週間CPZ；+/-12週間CPZ；-/-コントロール；-/-5週間CPZ；及び-/-12週間CPZ。

20

【図18I】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウス脳からの選別ミクログリア由来の脂質種、選別星状膠細胞及びCSFの濃度：CSFステロール。データは平均値±SEMを表し、log10スケールで提示されている。二元配置分散分析；アスタリスクで***p<0.0001と示されるように、12週間CPZ食餌におけるTrem2-/-由来の示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。各種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+/+コントロール；+/+5週間CPZ；+/+12週間CPZ；+/-コントロール；+/-5週間CPZ；+/-12週間CPZ；-/-コントロール；-/-5週間CPZ；及び-/-12週間CPZ。

30

【図18J】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウス脳からの選別ミクログリア由来の脂質種、選別星状膠細胞及びCSFの濃度：CSFスルファチド。データは平均値±SEMを表し、log10スケールで提示されている。二元配置分散分析；アスタリスクで***p<0.0001と示されるように、12週間CPZ食餌におけるTrem2-/-由来の示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。各種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+/+コントロール；+/+5週間CPZ；+/+12週間CPZ；+/-コントロール；+/-5週間CPZ；+/-12週間CPZ；-/-コントロール；-/-5週間CPZ；及び-/-12週間CPZ。

40

【図18K】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウス脳からの選別ミクログリア由来の脂質種、選別星状膠細胞及びCSFの濃度：CSFBMP。データは平均値±SEMを表し、log10スケールで提示されている。二元配置分散分析；アスタリスクで***p<0.0001と示されるように、12週間CPZ食餌におけるTrem2-/-由来の示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。各種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+/+コントロール；+/+5週間CPZ；+/+12週間CPZ；+/-コントロール；+/-5週間CPZ；+/-12週間CPZ；-/-コントロール；-/-5週間CPZ；及び-/-12週間CPZ。

50

【図18L】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウス脳からの選別ミクログリア由来の脂質種、選別星状膠細胞及びCSFの濃度：CSFヘキソシルセラミド。データは平均値±SEMを表し、log10スケールで提示されている。二元配置分散分析；アスタリスクで*** $p < 0.0001$ と示されるように、12週間CPZ食餌におけるTrem2-/-由来の示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。各種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+/+コントロール；+/+5週間CPZ；+/+12週間CPZ；+/-コントロール；+/-5週間CPZ；+/-12週間CPZ；-/-コントロール；-/-5週間CPZ；及び-/-12週間CPZ。

10

【図18M】TREM2欠損は、単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照、5週間または12週間CPZ食餌によるTrem2+/+、Trem2+/-、及びTrem2-/-マウス脳からの選別ミクログリア由来の脂質種、選別星状膠細胞及びCSFの濃度：CSFセラミド。データは平均値±SEMを表し、log10スケールで提示されている。二元配置分散分析；アスタリスクで*** $p < 0.0001$ と示されるように、12週間CPZ食餌におけるTrem2-/-由来の示される脂質種について示される遺伝子型処置相互作用。各種について、以下の条件に対応するデータを、左から右へ示す：+/+コントロール；+/+5週間CPZ；+/+12週間CPZ；+/-コントロール；+/-5週間CPZ；+/-12週間CPZ；-/-コントロール；-/-5週間CPZ；及び-/-12週間CPZ。

20

【図19A】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。示される試験脂質30%及びホスファチジルコリン(PC)70%からなるリポソームで刺激されたTREM2/DAP12発現安定HEK293細胞のホスホ-SYK(pSYK)倍率変化を緩衝液対照(点線)に正規化し、TREM2アゴニスト抗体及びアイソタイプ対照と比較した。2つ以上の平均技術的複製物からのN2の実験複製物；SM：スフィンゴミエリン、PE：ホスファチジルエタノールアミン、PS：ホスファチジルセリン、PI：ホスファチジルイノシトール、GalCer：ガラクトシルセラミド。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、二元配置分散分析、シダック検定。各種について、Trem2/DAP12が左に示され、DAP12が右に示される。

30

【図19B】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。示される試験脂質での刺激時の2~4ドナーからのヒトマクロファージ細胞におけるpSYK倍率変化のリポソーム滴定曲線、緩衝液対照に正規化され、TREM2アゴニスト抗体及びアイソタイプ対照と比較した。

【図19C】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。緩衝液対照(点線)に正規化された3μMの組換えTREM2またはTREM1細胞外ドメイン(ECD)タンパク質を有するリポソームのみ(刺激された)またはリポソームを有する4~5ドナーからのヒトマクロファージ細胞における示される試験脂質のリポソーム刺激。* $p < 0.05$ 、二元配置分散分析、チューキー検定。各種について、左から右へ、刺激された、Trem2-ECD、及びTREM1-ECDの条件を示す。

40

【図19D】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。野生型(暗陰影)及び変異体(浅陰影)R47HhTREM2タンパク質の濃度を30%スルファチド/70%PCまで高くする表面プラズモン共鳴結合応答。

【図19E】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。野生型(暗陰影)及び変異体(浅陰影)R47HhTREM2タンパク質の30%PS/70%PC100nmリポソームまで高くする表面プラズモン共鳴結合応答。

【図19F】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。5ng/mLのM-CSFを有するTrem2+/+及びTrem2-/-BMDSにおけるビヒクルまたはpHrod-miエリン(5μg/mL)食作用の強度。データは、3つの平均技術的複製物由来の3つの生物学的複製物±SEMを表し、* $p < 0.0$

50

5 であり、曲線両側検定下で曲線の下の特rem2+/+及び特rem2-/-の面積を比較する。

【図19G】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。50ng/mLのM-CSFを有する特rem2+/+及び特rem2-/-BMDMにおけるビヒクルまたはpHrodo-ミエリン(5µg/mL)食作用の強度。データは、3つの平均化された技術的複製物からの3つの生物学的複製物±SEMを表す。

【図19H】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。(H)hTREM2対(I)hTREM2 R47H変異体タンパク質及び(J~K)hTREM2対(K)hTREM2 R47H変異体タンパク質のホスファチジルセリン(PS)リポソームについての(D~E)スルファチドリポソームの表面プラズモン共鳴動態解析。ka:会合速度定数、kd:解離速度定数、KD:解離定数、s:秒、M:モル。

【図19I】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。(H)hTREM2対(I)hTREM2 R47H変異体タンパク質及び(J~K)hTREM2対(K)hTREM2 R47H変異体タンパク質のホスファチジルセリン(PS)リポソームについての(D~E)スルファチドリポソームの表面プラズモン共鳴動態解析。ka:会合速度定数、kd:解離速度定数、KD:解離定数、s:秒、M:モル。

【図19J】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。(H)hTREM2対(I)hTREM2 R47H変異体タンパク質及び(J~K)hTREM2対(K)hTREM2 R47H変異体タンパク質のホスファチジルセリン(PS)リポソームについての(D~E)スルファチドリポソームの表面プラズモン共鳴動態解析。ka:会合速度定数、kd:解離速度定数、KD:解離定数、s:秒、M:モル。

【図19K】ミエリンスルファチドは、TREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進する。(H)hTREM2対(I)hTREM2 R47H変異体タンパク質及び(J~K)hTREM2対(K)hTREM2 R47H変異体タンパク質のホスファチジルセリン(PS)リポソームについての(D~E)スルファチドリポソームの表面プラズモン共鳴動態解析。ka:会合速度定数、kd:解離速度定数、KD:解離定数、s:秒、M:モル。

【図20A】TREM2 KO BMDMは、ミエリン処置によるステロール蓄積を示す。ナイルレッド染色によって示されるように、WT BMDMと比較して、ミエリンで処置した特rem2 KO BMDM(25ug/ml)における中性脂質蓄積の増加を示す(左)。細胞を画像化し、ナイルレッドを総スポット面積として定量化した(右)。データは、3つの平均化された技術的複製物±SEMのうちの5つの生物学的複製物を表し、*p<0.05であり、片側t検定はミエリンを有する特rem2+/+とミエリンを有する特rem2-/-との比較のためのものである。

【図20B】TREM2 KO BMDMは、ミエリン処置によるステロール蓄積を示す。コレステリルエステルが、ミエリンを投与されたWT及びTREM2 KO BMDMの両方においてACAT阻害剤の存在下で蓄積しないことを示し、コレステリルエステル蓄積がACAT依存性であることを示す。コレステロールが対照として示され、コレステロールは、ミエリン処置及びACAT阻害を伴う特rem2 KO BMDMにおいてわずかに上昇する(C)。(B)各CE種について、左から右へ、+/+、-/-、+/+ミエリン、-/-ミエリン、+/+ミエリン/K604、-/-ミエリン/K604の条件を示す。(C)バーは、左から右へ、+/+、-/-、+/+ミエリン、-/-ミエリン、+/+ミエリン/K604、-/-ミエリン/K604の条件を示す。

【図20C】TREM2 KO BMDMは、ミエリン処置によるステロール蓄積を示す。コレステリルエステルが、ミエリンを投与されたWT及びTREM2 KO BMDMの両方においてACAT阻害剤の存在下で蓄積しないことを示し、コレステリルエステル蓄積がACAT依存性であることを示す。コレステロールが対照として示され、コレステ

10

20

30

40

50

ロールは、ミエリン処置及びACAT阻害を伴うTrem2 KO BMDMにおいてわずかに上昇する(C)。(B)各CE種について、左から右へ、+/+、-/-、+/+ミエリン、-/-ミエリン、+/+ミエリン/K604、-/-ミエリン/K604の条件を示す。(C)バーは、左から右へ、+/+、-/-、+/+ミエリン、-/-ミエリン、+/+ミエリン/K604、-/-ミエリン/K604の条件を示す。

【図21A-1】TREM2欠損関連コレステリルエステル蓄積は、ACAT1阻害剤及びLXRアゴニストによってインビトロで救済される。(A~B)培養Trem2+/+及びTrem2-/-BMDMからのコレステリルエステル(CE)、遊離コレステロール、トリアシルグリセロール(TG)、ジアシルグリセロール(DG)、ならびにヘキサシルセラミド(HexCer)(B)、ならびにACAT1阻害剤K604(500nM)またはLXRアゴニストGW(10μM)で48時間処理した培養iPSC由来ミクログリア(iMG)からのステロールの定量化。各脂質について以下の分散分析モデルを適合させることによって、実験群間の差別的存在量を同定した: log10(存在量)~処置+遺伝子型+チャレンジ: 遺伝子型+バッチ。各プロットは、各群についてバッチ調整平均及びその95%信頼区間を示す(群当たりN=3つの生物学的複製物)。遺伝子型間の有意なベースライン差(主な効果)が、#p<0.05、##p<0.01、及び###p<0.001として示される。有意な薬物処置効果は、ミエリン/ミエリン+阻害剤群を比較するlog10形質転換存在量に対して対応のあるt検定を行うことによって、各遺伝子型内で同定され(N=状態ごとに3つの生物学的複製物)、*p<0.05及び**p<0.01として示される。(A)各種について、左から右へ、ビヒクル、ミエリン、及びミエリン+K604の条件を示す。(B)各種について、左から右へ、ビヒクル、ミエリン、ミエリン+K604、及びミエリン+GWの条件を示す。

【図21A-2】TREM2欠損関連コレステリルエステル蓄積は、ACAT1阻害剤及びLXRアゴニストによってインビトロで救済される。(A~B)培養Trem2+/+及びTrem2-/-BMDMからのコレステリルエステル(CE)、遊離コレステロール、トリアシルグリセロール(TG)、ジアシルグリセロール(DG)、ならびにヘキサシルセラミド(HexCer)(B)、ならびにACAT1阻害剤K604(500nM)またはLXRアゴニストGW(10μM)で48時間処理した培養iPSC由来ミクログリア(iMG)からのステロールの定量化。各脂質について以下の分散分析モデルを適合させることによって、実験群間の差別的存在量を同定した: log10(存在量)~処置+遺伝子型+チャレンジ: 遺伝子型+バッチ。各プロットは、各群についてバッチ調整平均及びその95%信頼区間を示す(群当たりN=3つの生物学的複製物)。遺伝子型間の有意なベースライン差(主な効果)が、#p<0.05、##p<0.01、及び###p<0.001として示される。有意な薬物処置効果は、ミエリン/ミエリン+阻害剤群を比較するlog10形質転換存在量に対して対応のあるt検定を行うことによって、各遺伝子型内で同定され(N=状態ごとに3つの生物学的複製物)、*p<0.05及び**p<0.01として示される。(A)各種について、左から右へ、ビヒクル、ミエリン、及びミエリン+K604の条件を示す。(B)各種について、左から右へ、ビヒクル、ミエリン、ミエリン+K604、及びミエリン+GWの条件を示す。

【図21B】TREM2欠損関連コレステリルエステル蓄積は、ACAT1阻害剤及びLXRアゴニストによってインビトロで救済される。(A~B)培養Trem2+/+及びTrem2-/-BMDMからのコレステリルエステル(CE)、遊離コレステロール、トリアシルグリセロール(TG)、ジアシルグリセロール(DG)、ならびにヘキサシルセラミド(HexCer)(B)、ならびにACAT1阻害剤K604(500nM)またはLXRアゴニストGW(10μM)で48時間処理した培養iPSC由来ミクログリア(iMG)からのステロールの定量化。各脂質について以下の分散分析モデルを適合させることによって、実験群間の差別的存在量を同定した: log10(存在量)~処置+遺伝子型+チャレンジ: 遺伝子型+バッチ。各プロットは、各群についてバッチ調整平均及びその95%信頼区間を示す(群当たりN=3つの生物学的複製物)。遺伝子型間の有意なベースライン差(主な効果)が、#p<0.05、##p<0.01、及び###p

10

20

30

40

50

< 0.001として示される。有意な薬物処置効果は、ミエリン/ミエリン+阻害剤群を比較するlog₁₀形質転換存在量に対して対応のあるt検定を行うことによって、各遺伝子型内で同定され(N=状態ごとに3つの生物学的複製物)、*p<0.05及び**p<0.01として示される。(A)各種について、左から右へ、ビヒクル、ミエリン、及びミエリン+K604の条件を示す。(B)各種について、左から右へ、ビヒクル、ミエリン、ミエリン+K604、及びミエリン+GWの条件を示す。

【図22A】TREM2欠損は、インビトロでACAT1依存性コレステリルエステル蓄積を引き起こす。緩衝液対照(点線)に正規化され、TREM2アゴニスト抗体及びアイソタイプ対照と比較した、LDLまたは酸化LDL(oxLDL)で刺激されたTREM2/DAP12発現安定HEK293細胞におけるホスホ-SYK(pSYK)倍率変化。2つの平均化された技術的複製物から2つの実験複製物；***p<0.001(二元配置分散分析、シダック検定による)。各条件について、Trem2/DAP12が左に示され、DAP12が右に示されている。

10

【図22B】TREM2欠損は、インビトロでACAT1依存性コレステリルエステル蓄積を引き起こす。バッファー対照(点線)に正規化し、TREM2アゴニスト抗体及びアイソタイプ対照と比較した、oxLDL刺激時の2~4ドナーからのヒトマクロファージ細胞のpSYK倍率変化のリポソーム滴定曲線。

【図22C】TREM2欠損は、インビトロでACAT1依存性コレステリルエステル蓄積を引き起こす。緩衝液対照(点線)に正規化された3μMまたは9μMの組換えTREM2またはTREM1細胞外ドメイン(ECD)タンパク質を有するoxLDLのみ(刺激された)またはoxLDLを有する4~5ドナーからのヒトマクロファージ細胞における示される試験脂質のoxLDL刺激。各条件について、左から右へ、刺激された、Trem2-ECD、及びTrem1-ECDを示す。

20

【図22D】TREM2欠損は、インビトロでACAT1依存性コレステリルエステル蓄積を引き起こす。緩衝液対照(点線)に正規化され、TREM2アゴニスト抗体及びアイソタイプ対照と比較したoxLDLで刺激されたTrem2+/+(左)またはTrem2-/- (右)BMDM細胞におけるホスホ-SYK(pSYK)倍率変化。

【図22E】TREM2欠損は、インビトロでACAT1依存性コレステリルエステル蓄積を引き起こす。ビヒクルまたは25ug/mlのoxLDL処置Trem2+/+及びTrem2-/-BMDMにおけるナイルレッド染色の総スポット面積の定量化。データは、3つの平均化された技術的複製物±SEMからの7つの生物学的複製物を表し、*p<0.05であり、片側t検定はoxLDLを用いたTrem2+/+とoxLDLを用いたTrem2-/-との比較のためのものである。

30

【図22F】TREM2欠損は、インビトロでACAT1依存性コレステリルエステル蓄積を引き起こす。200分間の時間経過にわたるビヒクルまたは50ng/mlのoxLDLで処置された培養Trem2+/+及びTrem2-/-BMDM中の細胞当たりの平均蛍光強度。データは、3つの平均化された技術的複製物からの3つの生物学的複製物±SEMを表す。

【図22G】TREM2欠損は、インビトロでACAT1依存性コレステリルエステル蓄積を引き起こす。ACAT1阻害剤K604(500nM)と共にビヒクル、oxLDL、またはoxLDLで48時間処理した培養Trem2+/+及びTrem2-/-BMDMからのコレステリルエステル(CE)、遊離コレステロール、トリアシルグリセロール(TG)、及びヘキサシルセラミド(HexCer)の定量。各脂質についての以下の分散分析モデルを適合させることによって、実験群間の差別的存在量を同定した：log₁₀(存在量)~処置+遺伝子型+チャレンジ：遺伝子型+バッチ。各プロットは、各群についてバッチ調整平均及びその95%信頼区間を示す(群当たりN=3つの生物学的複製物)。遺伝子型間の有意なベースライン差(主な効果)が、#p<0.05、##p<0.01、及び###p<0.001として示される。有意な薬物処置効果は、oxLDL/oxLDL+阻害剤群を比較するlog₁₀形質転換存在量に対して対応のあるt検定を行うことによって、各遺伝子型内で同定され(N=状態ごとに3つの生物学的複製物

40

50

)、* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ として示される。各種について、左から右へ、
 ビヒクル、oxLDL、及びoxLDL+K604の条件を示す。

【図23A】TREM2 KO BMDMは、ミエリン処置によるフィリピン染色蓄積を示し、抗TREM2抗体は、ヒトiPSC由来ミクログリアにおけるフィリピン染色を低減させる。フィリピン染色によって示されるように、WT BMDMと比較して、ミエリンで処置したTrem2 KO BMDMにおけるエンドリソソーム遊離コレステロール蓄積の増加を示す。

【図23B】TREM2 KO BMDMは、ミエリン処置によるフィリピン染色蓄積を示し、抗TREM2抗体は、ヒトiPSC由来ミクログリアにおけるフィリピン染色を低減させる。総スポット面積としてのフィリピン蛍光の定量化を示す。データを、3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示す。

【図23C】TREM2 KO BMDMは、ミエリン処置によるフィリピン染色蓄積を示し、抗TREM2抗体は、ヒトiPSC由来ミクログリアにおけるフィリピン染色を低減させる。iPSCミクログリアが、RSV対照と比較して、TREM2抗体で処置したときにフィリピン染色低減を有することを示す。陽性対照細胞を、NPC1阻害剤U18666Aで3ug/mLで処置した。フィリピンによって染色されたエンドリソソーム遊離コレステロールの代表的な画像。

【図23D】TREM2 KO BMDMは、ミエリン処置によるフィリピン染色蓄積を示し、抗TREM2抗体は、ヒトiPSC由来ミクログリアにおけるフィリピン染色を低減させる。フィリピン蛍光の定量化を示す。データを、1~3つの技術的複製物の平均及び標準偏差として示す。

【図24】ApoE KO前脳は、慢性脱髄の存在下または非存在下でのコレステリルエステル(CE)の蓄積を示す。CE蓄積は、通常の食餌と比較して、4週間のクプリゾン食餌を受ける野生型前脳において生じる。CE蓄積は、通常の食餌と比較して、クプリゾンに関してApoEノックアウトマウスにおいて悪化する。野生型及びApoEノックアウトマウスの両方において、アシルホスファチジルセリン(アシルPS)の存在量は、クプリゾン処置により増加する。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、二元配置分散分析、ダネット事後検定、多重比較のための修正。脂質を液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)によって定量した。動物は6ヶ月齢であり、群あたりN=8匹の動物(雄3匹、雌5匹)であった。

【図25】ApoE KO前脳は、慢性脱髄の存在下または非存在下での複数のコレステリルエステル(CE)種の蓄積を示す。CE種蓄積は、通常の食餌と比較して、4週間のクプリゾン食餌を受ける野生型前脳において生じる。CE種蓄積は、通常の食餌と比較して、クプリゾンに関してApoEノックアウトマウスにおいて悪化する。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、二元配置分散分析、ダネット事後検定、多重比較のために修正された。脂質を、LCMSにより定量化した。動物は6ヶ月齢であり、群あたりN=8匹の動物(雄3匹、雌5匹)であった。

【図26】A~Cは、慢性脱髄時にApoE KOマウスから単離されたミクログリア、星状膠細胞、及びニューロン中のコレステリルエステル(CE)のレベルの増加。ほとんどのCE種レベルは、野生型(WT)脳と比較してAPOE KOマウスから単離されたミクログリア(A)においてより高く、12週間クプリゾン食餌は、対照食餌と比較して、両群におけるレベルを増加させる。12週間のクプリゾン食餌でのApoE KOマウス由来の星状膠細胞(B)は、対照食餌でのApoE KOマウス、ならびにクプリゾンまたは対照食餌のいずれかでのWTマウスと比較して、CEの蓄積の悪化を示す。CE(20:4)及びCE(22:6)を含むCEのいくつかの種は、いずれかの食餌でのWTマウスと比較して、いずれかの食餌でのApoE KOマウスから選別されたニューロン(C)において、増加する。脂質を、LCMSにより定量化した。動物は6ヶ月齢であり、群あたりN=6匹の動物(雄3匹、雌3匹)であった。

【図27A】APOE欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびにCSFにおいてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。p値(一元配置分散分析)でラン

10

20

30

40

50

ク付けされた、A p o e + / + 及び A p o e - / - マウス前脳における遺伝子型及び / または 12 週間 C P Z 処置によって変化した上位 50 個の脂質のヒートマップ。

【図 27B】A P O E 欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびに C S F においてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照または 12 週間 C P Z 食餌による A p o e + / + 及び A p o e - / - マウス前脳抽出物由来の遊離コレステロール、コレステリルエステル (C E)、B M P 及びトリアシルグリセリド種の濃度。B について、データは平均値 \pm S E M (n = 6) を表し、l o g 10 スケールで提示される。二元配置分散分析、F D R < 0 . 0 5 ; 遺伝子型効果はハッシュタグによって示され、遺伝子型処置相互作用はアスタリスクによって示されている。* p < 0 . 0 5、# p < 0 . 0 5、# # p < 0 . 0 1、# # # p < 0 . 0 0 1、# # # # p < 0 . 0 0 0 1。各種について、左から右へ、A p o e + / + 対照 ; A p o e + / + 12 週間 C P Z ; A p o e - / - 対照 ; A p o e - / - 12 週間 C P Z。

10

【図 27C】A P O E 欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびに C S F においてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。p 値 (一元配置分散分析) でランク付けされた、A p o e + / + 及び A p o e - / - 選別ミクログリアにおける遺伝子型及び / または 12 週間 C P Z 処置によって変化した上位 50 個の脂質のヒートマップ。

【図 27D】A P O E 欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびに C S F においてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照または 12 週間の C P Z 食事で選別した A p o e + / + 及び A p o e - / - ミクログリア由来の遊離コレステロール、C E、ヘキソシルセラミド、セラミド、スルファチド及びガングリオシド種の濃度。D について、データは平均値 \pm S E M (n = 6) を表し、l o g 10 スケールで提示される。二元配置分散分析、F D R < 0 . 0 5 ; 遺伝子型効果はハッシュタグによって示され、遺伝子型処置相互作用はアスタリスクによって示されている。* p < 0 . 0 5、# p < 0 . 0 5、# # p < 0 . 0 1、# # # p < 0 . 0 0 1、# # # # p < 0 . 0 0 0 1。各種について、左から右へ、A p o e + / + 対照 ; A p o e + / + 12 週間 C P Z ; A p o e - / - 対照 ; A p o e - / - 12 週間 C P Z。

20

【図 27E】A P O E 欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびに C S F においてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。p 値 (一元配置分散分析) でランク付けされた、A p o e + / + 及び A p o e - / - 選別星状膠細胞における遺伝子型及び / または 12 週間 C P Z 処置によって変化した上位 50 個の脂質のヒートマップ。

30

【図 27F】A P O E 欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびに C S F においてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照または 12 週間 C P Z 食餌による A p o e + / + 及び A p o e - / - 選別星状膠細胞由来の遊離コレステロール、C E、ヘキソシルセラミド、セラミド、スルファチド及びガングリオシド種の濃度。F について、データは平均値 \pm S E M (n = 6) を表し、l o g 10 スケールで提示される。二元配置分散分析、F D R < 0 . 0 5 ; 遺伝子型効果はハッシュタグによって示され、遺伝子型処置相互作用はアスタリスクによって示されている。* p < 0 . 0 5、# p < 0 . 0 5、# # p < 0 . 0 1、# # # p < 0 . 0 0 1、# # # # p < 0 . 0 0 0 1。各種について、左から右へ、A p o e + / + 対照 ; A p o e + / + 12 週間 C P Z ; A p o e - / - 対照 ; A p o e - / - 12 週間 C P Z。

40

【図 27G】A P O E 欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびに C S F においてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。p 値 (一元配置分散分析) でランク付けされた、A p o e + / + 及び A p o e - / - C S F からの遺伝子型及び / または 12 週間 C P Z 治療によって変化した上位 50 種の脂質のヒートマップ。

【図 27H】A P O E 欠損は、脳、選別されたミクログリア及び星状膠細胞、ならびに C S F においてコレステリルエステル蓄積を引き起こす。対照または 12 週間 C P Z 食餌による A p o e + / + 及び A p o e - / - C S F からの C E、スルファチド、ガングリオシド及びホスファチジン酸種の濃度。H について、データは平均値 \pm S E M (n = 6) を表し、l o g 10 スケールで提示される。二元配置分散分析、F D R < 0 . 0 5 ; 遺伝子型効果はハッシュタグによって示され、遺伝子型処置相互作用はアスタリスクによって示さ

50

れている。* $p < 0.05$ 、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ 、### $p < 0.001$ 、#### $p < 0.0001$ 。各種について、左から右へ、Apo e + / + 対照；Apo e + / + 12週間CPZ；Apo e - / - 対照；Apo e - / - 12週間CPZ。

【図28A】5XFADマウスの脳に由来するミクログリア及び星状膠細胞中のコレステリルエステル(CE)の増加した存在量。CEレベルは、野生型(WT)マウスと比較して、5XFADマウスから単離したミクログリアにおいてより高い。動物は14ヶ月齢であった。N = 4匹の動物/群。

【図28B】5XFADマウスの脳に由来するミクログリア及び星状膠細胞中のコレステリルエステル(CE)の増加した存在量。CEレベルは、野生型(WT)マウスと比較して、星状膠細胞においてより高い。動物は14ヶ月齢であった。N = 4匹の動物/群。

【図29A】LPS刺激及びミエリン処置時のマウスTREM2 KO BMDMにおける炎症性サイトカイン産生の増加。WT及びTREM2 KO BMDMを、ビヒクルまたは25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 精製マウスミエリンで48時間処理する前に、50 ng/mL のmCSF中に100,000細胞/ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の16時間、細胞を0または10 ng/mL のLPSのいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、(A)のレベルを定量免疫アッセイ(Eve Technologies) G-CSFによって測定した。データは平均 \pm SEMを表し、n = 2つの技術的複製物である。

【図29B】LPS刺激及びミエリン処置時のマウスTREM2 KO BMDMにおける炎症性サイトカイン産生の増加。WT及びTREM2 KO BMDMを、ビヒクルまたは25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 精製マウスミエリンで48時間処理する前に、50 ng/mL のmCSF中に100,000細胞/ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の16時間、細胞を0または10 ng/mL のLPSのいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、(B) INFYのレベルを定量免疫アッセイ(Eve Technologies)によって測定した。データは平均 \pm SEMを表し、n = 2つの技術的複製物である。

【図29C】LPS刺激及びミエリン処置時のマウスTREM2 KO BMDMにおける炎症性サイトカイン産生の増加。WT及びTREM2 KO BMDMを、ビヒクルまたは25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 精製マウスミエリンで48時間処理する前に、50 ng/mL のmCSF中に100,000細胞/ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の16時間、細胞を0または10 ng/mL のLPSのいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、IL-12(p40)のレベルを定量免疫アッセイ(Eve Technologies)によって測定した。データは平均 \pm SEMを表し、n = 2つの技術的複製物である。

【図29D】LPS刺激及びミエリン処置時のマウスTREM2 KO BMDMにおける炎症性サイトカイン産生の増加。WT及びTREM2 KO BMDMを、ビヒクルまたは25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 精製マウスミエリンで48時間処理する前に、50 ng/mL のmCSF中に100,000細胞/ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の16時間、細胞を0または10 ng/mL のLPSのいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、IL-12(p70)のレベルを定量免疫アッセイ(Eve Technologies)によって測定した。データは平均 \pm SEMを表し、n = 2つの技術的複製物である。

【図29E】LPS刺激及びミエリン処置時のマウスTREM2 KO BMDMにおける炎症性サイトカイン産生の増加。WT及びTREM2 KO BMDMを、ビヒクルまたは25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 精製マウスミエリンで48時間処理する前に、50 ng/mL のmCSF中に100,000細胞/ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の16時間、細胞を0または10 ng/mL のLPSのいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、LIX(CXC5)のレベルを定量免疫アッセイ(Eve Technologies)によって測定した。データは平均 \pm SEMを表し、n = 2つの技術的複製物である。

【図29F】LPS刺激及びミエリン処置時のマウスTREM2 KO BMDMにおける炎症性サイトカイン産生の増加。WT及びTREM2 KO BMDMを、ビヒクルまたは25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 精製マウスミエリンで48時間処理する前に、50 ng/mL のmCSF中に100,000細胞/ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の16時間、細胞を0または10 ng/mL のLPSのいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、MC

10

20

30

40

50

P - 1 (C C L 2) のレベルを定量免疫アッセイ (E v e T e c h n o l o g i e s) によって測定した。データは平均 ± S E M を表し、n = 2 つの技術的複製物である。

【図 29 G】L P S 刺激及びミエリン処置時のマウス T R E M 2 K O B M D M における炎症性サイトカイン産生の増加。W T 及び T R E M 2 K O B M D M を、ビヒクルまたは 25 u g / m L 精製マウスミエリンで 48 時間処理する前に、50 n g / m L の m C S F 中に 100,000 細胞 / ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の 16 時間、細胞を 0 または 10 n g / m L の L P S のいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、M I G (C X C L 9) のレベルを定量免疫アッセイ (E v e T e c h n o l o g i e s) によって測定した。データは平均 ± S E M を表し、n = 2 つの技術的複製物である。

【図 29 H】L P S 刺激及びミエリン処置時のマウス T R E M 2 K O B M D M における炎症性サイトカイン産生の増加。W T 及び T R E M 2 K O B M D M を、ビヒクルまたは 25 u g / m L 精製マウスミエリンで 48 時間処理する前に、50 n g / m L の m C S F 中に 100,000 細胞 / ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の 16 時間、細胞を 0 または 10 n g / m L の L P S のいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、I L - 1 a のレベルを定量免疫アッセイ (E v e T e c h n o l o g i e s) によって測定した。データは平均 ± S E M を表し、n = 2 つの技術的複製物である。

【図 29 I】L P S 刺激及びミエリン処置時のマウス T R E M 2 K O B M D M における炎症性サイトカイン産生の増加。W T 及び T R E M 2 K O B M D M を、ビヒクルまたは 25 u g / m L 精製マウスミエリンで 48 時間処理する前に、50 n g / m L の m C S F 中に 100,000 細胞 / ウェルで播種した。ミエリン処理の最後の 16 時間、細胞を 0 または 10 n g / m L の L P S のいずれかで刺激した。細胞培養培地を回収し、I L - 1 b のレベルを定量免疫アッセイ (E v e T e c h n o l o g i e s) によって測定した。データは平均 ± S E M を表し、n = 2 つの技術的複製物である。

【図 30 A】ヒト i P S C 由来 T R E M 2 K O ミクログリアにおける I L - 1 サイトカイン応答の増加、及び抗 T R E M 2 抗体による I L - 1 m R N A 応答の減弱。(A) W T 及び T R E M 2 K O i P S C 由来ミクログリアを L P S / A T P (それぞれ 1 u g / m l 及び 5 m M) で 4 時間処理して、N L R P 3 インフラマソーム活性化を刺激し、その後、細胞培養培地を収集し、I L - 1 のレベルを定量免疫アッセイ (E v e T e c h n o l o g i e s) によって測定した。* * p < 0 . 0 1 ; チューキー事後検定である二元配置分散分析、多重比較のための訂正。データは平均値 ± S E M を表し、N = 4 つの生物学的複製物である。各グループ内での以下の条件を示す：対照を左に示し、L P S + A T P を中央に示し、L P S + A T P + カスパーゼ 1 阻害剤 V X - 7 6 5 (I n v i v o G e n) を右に示す。(B) i P S C ミクログリアを 25 u g / m L のミエリンで 24 時間処理し、次いで、対照抗体 (抗 R S V) または抗 T R E M 2 抗体で 48 時間処理した。I L - 1 m R N A レベルを、Q P C R によって測定し、G A P D H に正規化した。N = 2 つの生物学的複製物。n = 2 つの技術的複製物である。

【図 30 B】ヒト i P S C 由来 T R E M 2 K O ミクログリアにおける I L - 1 サイトカイン応答の増加、及び抗 T R E M 2 抗体による I L - 1 m R N A 応答の減弱。(A) W T 及び T R E M 2 K O i P S C 由来ミクログリアを L P S / A T P (それぞれ 1 u g / m l 及び 5 m M) で 4 時間処理して、N L R P 3 インフラマソーム活性化を刺激し、その後、細胞培養培地を収集し、I L - 1 のレベルを定量免疫アッセイ (E v e T e c h n o l o g i e s) によって測定した。* * p < 0 . 0 1 ; チューキー事後検定である二元配置分散分析、多重比較のための訂正。データは平均値 ± S E M を表し、N = 4 つの生物学的複製物である。各グループ内での以下の条件を示す：対照を左に示し、L P S + A T P を中央に示し、L P S + A T P + カスパーゼ 1 阻害剤 V X - 7 6 5 (I n v i v o G e n) を右に示す。(B) i P S C ミクログリアを 25 u g / m L のミエリンで 24 時間処理し、次いで、対照抗体 (抗 R S V) または抗 T R E M 2 抗体で 48 時間処理した。I L - 1 m R N A レベルを、Q P C R によって測定し、G A P D H に正規化した。N = 2 つの生物学的複製物。

【図 31 A】T R E M 2 K O ヒト i P S C 由来ミクログリア (i M G) は、T R E M 2

WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、ベースライン（ビヒクル処理）時及び24時間の25ug/mL精製ミエリン処理時の両方において、TREM2 WT iMGと比較して、より高いレベルのABCA1 mRNAを有する。

【図31B】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、ベースライン（ビヒクル処理）時及び24時間の25ug/mL精製ミエリン処理時の両方において、TREM2 WT iMGと比較して、より高いレベルのABCA7 mRNAを有する。

10

【図31C】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、ベースライン（ビヒクル処理）時及び24時間の25ug/mL精製ミエリン処理時の両方において、TREM2 WT iMGと比較して、より高いレベルのABCG1 mRNAを有する。

【図31D】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのAPOC1 mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

20

【図31E】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのAPOE mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

【図31F】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのCH25H mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

30

【図31G】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのFABP3 mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

【図31H】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのFABP5 mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

40

【図31I】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのLPL mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

【図31J】TREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア（iMG）は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差

50

次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのOLR1 mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

【図31K】TREM2 KOヒトiPSC由来ミクログリア(iMG)は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KOヒトiPSC由来ミクログリア(iMG)は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、ベースライン(ビヒクル処理)時及び24時間の25 µg/mL精製ミエリン処理時の両方において、TREM2 WT iMGと比較して、より高いレベルのLDLR mRNAを有する。

10

【図31L】TREM2 KOヒトiPSC由来ミクログリア(iMG)は、TREM2 WT iMGと比較して、ベースライン時及びミエリンでの処置時の脂質代謝遺伝子の差次的制御を示す。TREM2 KO iMGは、TREM2 WT iMGと比較して、より低いレベルのLIPA mRNAを有する。N = 4つの生物学的複製物。データは、平均及びS.E.Mとして示される。

【図32】A~Bは、25 µg/mLの精製ミエリンで48時間処理すると、TREM2 KO及びTREM2 WTヒトiPSC由来ミクログリア(iMG)の両方において分泌APOE(A)及びAPOC1(B)タンパク質が増加する。分泌APOE(A)及びAPOC1(B)のレベルは、TREM2 WT iMGと比較して、ビヒクル及びミエリン処理条件両方の下でTREM2 KO iMGにおいて減少する。N = 3つの技術的複製物。データは、中央値及び四分位範囲として示される。各遺伝子型グループについて、「ビヒクル」は左に示され、「ミエリン」は右に示されている。

20

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書に記載されるように、TREM2の機能レベルの低下は、脂質代謝の調節不全をもたらすと判定されている。TREM2を発現する細胞において、同等の調節異常が脂質チャレンジで誘導される場合、アゴニスト抗TREM2抗体で改善することができる。同様に、脂質調節不全は、ACAT1阻害剤、アポリポタンパク質E(ApoE)、RXRアゴニスト、LXRアゴニスト、またはこれらの組み合わせで処理することによって、TREM2活性が低下した細胞で改善され得る(実施例を参照されたい)。RXR及びLXRアゴニストならびにACAT1阻害剤は、脂質クリアランスを改善するために使用されているが、それらの作用機構は、様々な細胞型を標的とし、望ましくない副作用をもたらし得る。対照的に、TREM2発現は、骨髄細胞系列の細胞(例えば、ミクログリア、樹状細胞、及びマクロファージ)に限定される。したがって、アゴニスト抗TREM2抗体は、様々な条件の脂質クリアランスを促進するためのより標的化されたアプローチとして使用され得る。例えば、ある特定の神経変性障害(例えば、アルツハイマー病)、アテローム性動脈硬化症、代謝症候群に関連する疾患、及びある特定のリソソーム蓄積症(例えば、ニーマン・ピック病C型(NPC))を含む、幅広い疾患及び障害は、骨髄細胞系列における脂質代謝調節不全と関連している。したがって、本明細書に記載のように、アゴニスト抗TREM2抗体を使用して、かかる状態を有する哺乳動物における脂質代謝調節不全を治療してもよい。

30

40

【0020】

さらに、TREM2の機能レベルの低下が炎症誘発性である(例えば、炎症性経路のサイトカインであるIL-1を含む炎症誘発性サイトカインの上方制御をもたらす)ことも示されている。逆に、TREM2を抗体で刺激することによって、かかる炎症は減弱される(例えば、インフラマソーム応答を低減させる)。したがって、炎症及びインフラマソーム応答に関連する様々な疾患及び障害もまた、アゴニスト抗TREM2抗体で治療され得る。

【0021】

TREM2遺伝子は、免疫グロブリン(Ig)受容体スーパーファミリーのメンバーであ

50

る1回膜貫通型タンパク質をコードする。TREM2は元々、TREM1ホモログをコードするcDNAとしてクローニングされた(Bouchon, A et al., J Exp Med, 2001.194(8): p.1111-22)。この受容体は、N-脱グリコシル化後に26kDaに減少される約40kDaの糖タンパク質である。TREM2遺伝子は、細胞外ドメイン、膜貫通領域、及び短い細胞質側末端を含む230アミノ酸長タンパク質をコードする(UniProtKB Q9NZC2;NCBI参照配列:NP_061838.1)。エクソン2によってコードされる細胞外領域は、3つの潜在的なN-グリコシル化部位を含有する単一のV型Ig-SFドメインから構成される。推定膜貫通領域は、荷電リジン残基を含有する。TREM2の細胞質側末端は、シグナル伝達モチーフを欠き、シグナル伝達アダプター分子DAP12/TYROBPを介して及びDAP10を介してシグナル伝達すると考えられる。TREM2は、破骨細胞、未成熟樹状細胞、及びマクロファージの表面上に見出される。中枢神経系において、TREM2は、ミクログリアにおいて排他的に発現される。

【0022】

したがって、本明細書に開示されるある特定の実施形態は、脂質代謝及び/または炎症の調節不全の治療を必要とする哺乳動物(例えばヒト)において脂質代謝及び/または炎症の調節不全を治療するための方法を提供し、哺乳動物に有効量のアゴニスト抗TREM2抗体を投与することを含む。

【0023】

ある特定の実施形態において、かかる方法は、脂質代謝調節不全を治療するために使用され得る。ある特定の実施形態において、かかる方法は、炎症(例えば、脂質代謝調節不全に関連する炎症)を治療するために使用され得る。ある特定の実施形態において、かかる方法は、脂質代謝調節不全及び炎症の両方を治療するために使用され得る。

【0024】

ある特定の実施形態において、哺乳動物においてTREM2を発現する細胞は、脂質代謝調節不全を示す。ある特定の実施形態において、細胞はミクログリア細胞である。ある特定の実施形態において、細胞はマクロファージである。

【0025】

本明細書で使用される場合、用語「脂質代謝調節不全」は、対照と比較して(例えば、脂質代謝調節不全、低下したTREM2活性、低下したApoE活性、またはAPOE4対立遺伝子を有しない健康な対照哺乳動物または対照動物と比較して)、細胞/哺乳動物における脂質代謝の変化を指す。例えば、脂質代謝調節不全は、変化したレベル(例えば、増加した形成または減少した分解を介して)、または1つ以上のクラスもしくは種の脂質の変化した局在化/貯蔵を包含し得る。ある特定の実施形態において、脂質代謝調節不全は、対照と比較して、1つ以上のクラスまたは種の脂質の蓄積(例えば、細胞内または細胞外蓄積)の増加を含む。

【0026】

ある特定の実施形態において、脂質代謝調節不全は、1つ以上の脂質の細胞内蓄積の増加を含む。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、ミクログリア細胞において細胞内に蓄積する。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、マクロファージにおいて細胞内に蓄積する。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、星状膠細胞において細胞内に蓄積されない。

【0027】

ある特定の実施形態において、脂質代謝調節不全は、1つ以上の脂質の細胞外蓄積の増加を含む。

【0028】

ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸種(BMP)、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキサシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン38:4、ビス(モノアシル

10

20

30

40

50

グリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン(例えば、S M d 1 8 : 1 / 1 8 : 0)、ホスファチジルグリセロール(例えば、P G d 1 6 : 0 / 1 8 : 1)、ホスファチジルエタノールアミン(例えば、P E 3 8 : 6)、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸種(BMP)、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 3 8 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、図または実施例等の本明細書に記載の脂質を含む。

10

【0029】

ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、コレステリルエステルを含む。

【0030】

ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、コレステリルエステルの酸化代謝産物(例えば、C E o x o O D E、C E H O D E、C E H p O D E、C E o x o H E T EまたはC E H E T E)を含む。

【0031】

ある特定の実施形態において、アゴニスト抗TREM2抗体は、脂質蓄積(例えば、細胞内または細胞外蓄積)を低減する。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗TREM2抗体は、コレステリルエステルの蓄積を低減する。

20

【0032】

ある特定の実施形態において、脂質蓄積は、対照と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%低減される。細胞内の脂質蓄積レベルは、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のアッセイを使用して試料(例えば、1つ以上の細胞を含む試料)を評価することによって確立される。

30

【0033】

ある特定の実施形態において、哺乳動物においてTREM2を発現する細胞は、炎症または炎症誘発性応答、例えば、炎症誘発性サイトカインの上方制御を示す。ある特定の実施形態において、インフラマソームは、TREM2を発現する細胞において上方制御される。ある特定の実施形態において、細胞はミクログリア細胞である。ある特定の実施形態において、細胞はマクロファージである。

【0034】

ある特定の実施形態において、少なくとも1つの炎症誘発性サイトカインの発現は、哺乳動物において(例えば、マクロファージまたはミクログリア細胞などのTREM2発現細胞において)上方制御される。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、G-CSF、INF γ 、IL-12(p40)、IL-12(p70)、LIX(CXCL5)、MCP-1(CCL2)、MIG(CXCL9)、IL-1、IL-1、及びIL-18からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、インフラマソーム経路(例えば、IL-1またはIL-18)と関連付けられる。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、IL-1である。

40

【0035】

ある特定の実施形態において、アゴニスト抗TREM2抗体は、哺乳動物における炎症誘発性応答(例えば、インフラマソーム応答)を低減する。例えば、ある特定の実施形態において、少なくとも1つの炎症誘発性サイトカインの発現が低下する(例えば、アゴニス

50

ト抗 T R E M 2 抗体を投与されなかった対応する哺乳動物などの対照と比較して)。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、G - C S F、I N F y、I L - 1 2 (p 4 0)、I L - 1 2 (p 7 0)、L I X (C X C L 5)、M C P - 1 (C C L 2)、M I G (C X C L 9)、I L - 1、I L - 1、及び I L - 1 8 からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、インフラソーム経路(例えば、I L - 1 または I L - 1 8)と関連付けられる。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、I L - 1 である。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインの発現は、対照と比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 低減される。細胞/哺乳動物におけるサイトカイン発現レベルは、本明細書に記載のまたは当該技術分野で既知のアッセイを使用して試料(例えば、1つ以上の細胞を含む試料)を評価することによって確立され得る。例えば、アッセイは、R N A (例えば、m R N A)またはタンパク質発現レベル(例えば、対照と比較して)を評価し得る。

【0036】

本明細書に記載の特定の実施形態はまた、脂質代謝調節不全の治療を必要とする患者において脂質代謝調節不全を治療する方法であって、

- 1) 患者から生体試料を得るまたは得ていることと、
- 2) 生体試料を分析するか、または試料を分析して、脂質代謝調節不全の存在を検出し、それによって患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することと、
- 3) 有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を診断された患者に投与することと、を含む、方法を提供する。

【0037】

本明細書に記載の特定の実施形態はまた、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体で患者を治療する方法を提供し、方法は、

- 1) 患者から生体試料を得るか、または得ていることと、
- 2) 生体試料を分析するか、または試料を分析して、脂質代謝調節不全の存在を検出し、それによって患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することと、
- 3) 有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を診断された患者に投与することと、を含む。

【0038】

低下した T R E M 2 活性、低下した A p o E 活性及び A p o E 4 発現

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、(例えば、健康な対照対象と比較して)正常な T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定されている。

【0039】

ある特定の他の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、T R E M 2 活性の低下を有するか、または有すると判定されている。本明細書で使用される場合、「低下した T R E M 2 活性」という用語は、対照細胞/哺乳動物(例えば、健康な対象由来の対応する細胞)と比較して、低下した T R E M 2 機能を有する細胞、またはかかる細胞を含む哺乳動物を指す。ある特定の実施形態において、機能性タンパク質のレベルの低下は、T R E M 2 の発現の低減(例えば、転写の阻害、R N A 成熟の阻害、R N A 翻訳の阻害、翻訳後修飾の改変、または R N A もしくはタンパク質の分解の増加)または T R E M 2 タンパク質の細胞表面レベルの低下に起因し得る。ある特定の実施形態において、機能性 T R E M 2 のレベルの低下は、T R E M 2 遺伝子(例えば、R 4 7 H、R 6 2 H、H 1 5 7 Y、Q 3 3 X、T 6 6 M または Y 3 8 C)における機能遺伝子変異の喪失または部分喪失によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 T R E M 2 のレベルの低下は、T R E M 2 タンパク質レベルの低下によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 T R E M 2 のレベルの低下は、脱インテグリン及びメタロプロテイナーゼ(A D A M)プロテアーゼ(例えば、A D A M 1 0 及び A D A M 1

7) による受容体の切断の増加によって引き起こされ、これにより、可溶性 T R E M 2 (s T R E M 2) が細胞外環境中に放出される。ある特定の実施形態において、低下した T R E M 2 活性は、低下したシグナル伝達を含む。

【 0 0 4 0 】

細胞 / 哺乳動物における低下した T R E M 2 活性の存在は、本明細書に記載または当該技術分野で既知のアッセイを使用して試料 (例えば、1つ以上の細胞を含む試料) を評価することによって確立され得る。例えば、このアッセイは、R N A もしくはタンパク質発現レベル、細胞表面 T R E M 2 タンパク質レベルを評価してもよく、または (例えば、対照と比較して) T R E M 2 活性 (例えば、シグナル伝達) を検査してもよい。他の実施形態において、アッセイは、s T R E M 2 のレベルを測定し得る (例えば、対照と比較して) 。対照細胞と比較して、低下した p S y k 活性またはクラス I P I 3 キナーゼ活性等の T R E M 2 活性の他の機能的尺度を使用して、T R E M 2 活性を低下させた細胞または哺乳動物を特定し得る。

10

【 0 0 4 1 】

ある特定の実施形態において、試料中の機能性 T R E M 2 のレベルは、対照と比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 低下する。ある特定の実施形態において、細胞 / 哺乳動物は、機能性 T R E M 2 を発現しない。

20

【 0 0 4 2 】

ある特定の実施形態において、哺乳動物は、リソソーム機能または脂質代謝に関連する遺伝子 (例えば、本明細書に記載の遺伝子) 等の 1 つ以上の追加の遺伝子の発現を変化させる。

【 0 0 4 3 】

A p o E は、脳における脂質輸送及び傷害修復をサポートする主要なコレステロール担体である。末梢組織では、A p o E は主に肝臓及びマクロファージによって産生され、アイソフォーム依存的な様式でコレステロール代謝を媒介する。ヒト A P O E 遺伝子は、A p o E 2、A p o E 3 及び A p o E 4 をコードする 3 つの多形対立遺伝子 (2、3 及び 4) として存在する (ゲノム座標 (G R C h 3 8) : 1 9 : 4 4 , 9 0 5 , 7 4 8 - 4 4 , 9 0 9 , 3 9 4 ; U n i P r o t K B P 0 2 6 4 9 を参照されたい)。A p o E は、299 個のアミノ酸からなり、約 34 k D a の分子量を有する。3 つの A p o E アイソフォーム間の差異は、アミノ酸 112 及び 158 に限定され、システインまたはアルギニンのいずれかが存在する : A p o E 2 (C y s 1 1 2、C y s 1 5 8)、A p o E 3 (C y s 1 1 2、A r g 1 5 8) 及び A p o E 4 (A r g 1 1 2、A r g 1 5 8)。これら 2 つの位置における単一のアミノ酸の差異は、A p o E アイソフォームの構造に影響を及ぼし、脂質、受容体、及びそれらの A に結合する能力に影響を及ぼす。

30

【 0 0 4 4 】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、(例えば、健康な対照対象と比較して) 正常な A p o E 活性を有するか、または有すると判定されている。

40

【 0 0 4 5 】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、A p o E 活性が低下しているか、または低下していると判定されている。本明細書で使用される場合、「低下した A p o E 活性」という用語は、対照細胞 / 哺乳動物 (例えば、健康な対象由来の対応する細胞) と比較して、低下した A p o E 機能を有する細胞、またはかかる細胞を含む哺乳動物を指す。ある特定の実施形態において、機能性タンパク質のレベルの低下は、A p o E の発現の低減 (例えば、転写の障害、R N A 成熟の障害、R N A 翻訳の障害、翻訳後修飾の改変、または R N A もしくはタンパク質の分解の増加) に起因し得る。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E のレベルの低下は、A P O E 遺伝

50

子における機能遺伝子変異またはコーディングバリエーションの喪失または部分喪失によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E のレベルの低下は、A p o E タンパク質レベルの低下によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E のレベルの低下は、A p o E 分泌の低下によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E のレベルの低下は、細胞内または細胞外 A p o E 輸送の低減によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E のレベルの低下は、形質膜へのリサイクリングの減少、エンドリソソームからゴルジ複合体への逆行輸送の減少、生体合成経路に沿った輸送の減少を含む、異常な細胞輸送によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E のレベルの低下は、脂質等の A p o E カージオの輸送の低減によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E のレベルの低下は、細胞脂質の流出の低減によって引き起こされる。ある特定の実施形態において、機能性 A p o E レベルの低下は、抗酸化特性の低下によって引き起こされる。

【0046】

細胞 / 哺乳動物における低下した A p o E 活性の存在は、本明細書に記載または当該技術分野で既知のアッセイを使用して試料（例えば、1つ以上の細胞を含む試料）を評価することによって確立され得る。例えば、アッセイは、RNA もしくはタンパク質発現レベルを評価してもよく、または（例えば、対照と比較して）A p o E 活性を検査してもよい。

【0047】

ある特定の実施形態において、試料中の機能性 A p o E のレベルは、対照と比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 低下する。ある特定の実施形態において、細胞 / 哺乳動物は、機能性 A p o E を発現しない。

【0048】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、A P O E 4 対立遺伝子を有しないか、または有しないと判定されている。

【0049】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、A P O E 4 対立遺伝子を有するか、または有すると判定されている。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、A P O E 4 対立遺伝子に対してヘテロ接合性である。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、A P O E 4 対立遺伝子に対してホモ接合性である。A P O E 4 対立遺伝子は、本明細書に記載のアッセイを使用して、または当該技術分野で既知のアッセイを使用して、試料（すなわち、哺乳動物由来の1つ以上の細胞を含む試料）中で検出され得る。ある特定の実施形態では、アッセイは、配列決定アッセイ等の遺伝子型判定アッセイである。

【0050】

本明細書に記載されるように、A p o E 4 を発現する哺乳動物は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体で治療され得る脂質代謝調節不全及び / または炎症を有してもよい。したがって、ある特定の実施形態において、A P O E 4 対立遺伝子を有する哺乳動物は、本明細書に記載の方法を使用して治療され得る。

【0051】

したがって、本明細書に開示されるある特定の実施形態は、脂質代謝調節不全の治療を必要とする哺乳動物において脂質代謝調節不全を治療するための方法であって、哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含み、哺乳動物は、T R E M 2 活性の低下、A p o E 活性の低下、及び / または A P O E 4 対立遺伝子を有するか、または有すると判定されている方法もまた、提供される。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、低下した T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定されている。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、低下した A p o E 活性を有するか、または有すると判

定されている。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、A P O E 4 対立遺伝子を有するか、または有すると判定されている。

【 0 0 5 2 】

ある特定の実施形態は、炎症の治療を必要とする哺乳動物において炎症を治療するための方法であって、哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含み、哺乳動物は、低下した T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定されている、方法もまた、提供する。

【 0 0 5 3 】

本明細書に開示のある特定の実施形態は、脂質代謝調節不全の治療を必要とする患者において脂質代謝調節不全を治療する方法であって、

- 1) 患者から生体試料を得るまたは得ていることと、
- 2) 試料において低下した T R E M 2 活性、低下した A p o E 活性、または A P O E 4 対立遺伝子を検出するか、または検出していることと、
- 3) 低下した T R E M 2 活性、低下した A p o E 活性、または A P O E 4 対立遺伝子を検出されたときに、患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することと、
- 4) 有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を診断された患者に投与することと、を含む、方法を、提供する。

【 0 0 5 4 】

ある特定の実施形態において、方法は、低下した T R E M 2 活性が検出されたときに患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することを含む。ある特定の実施形態において、方法は、A p o E 活性の低下が検出されたときに患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することを含む。ある特定の実施形態において、方法は、A P O E 4 対立遺伝子を検出されたときに患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することを含む。

【 0 0 5 5 】

本明細書に開示されるある特定の実施形態は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体で患者を治療する方法を提供し、方法は、

- 1) 患者から生体試料を得るか、または得ていることと、
- 2) 生体試料を分析するか、または試料を分析していて、低下した T R E M 2 活性、低下した A p o E 活性、または A P O E 4 対立遺伝子を検出し、それによって患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することと、
- 4) 有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を診断された患者に投与することと、を含む。

【 0 0 5 6 】

ある特定の実施形態において、方法は、生物学的試料を分析すること、または試料を分析して、低下した T R E M 2 活性を検出することを含む。ある特定の実施形態において、方法は、生体試料を分析すること、または試料を分析して低下した A p o E 活性を検出することを含む。ある特定の実施形態において、方法は、生体試料を分析すること、または試料を分析して A P O E 4 対立遺伝子を検出することを含む。

【 0 0 5 7 】

T R E M 2 発現細胞

本明細書に記載されるように、低下した T R E M 2 活性は、特定の細胞型（例えば、ミクログリア細胞及びマクロファージ）において脂質代謝調節不全を引き起こすが、特定の他の細胞型（例えば、星状膠細胞）においては引き起こさないことが特異的に示されている（実施例を参照されたい）。機能性 T R E M 2 の低減は、炎症誘発性応答の増加を引き起こすこともまた、示している。

【 0 0 5 8 】

したがって、本明細書に開示されるある特定の実施形態は、細胞を有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体と接触させることを含む、細胞における 1 つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減する方法を提供する。ある特定の実施形態は、細胞を有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体と接触させることを含む、細胞における少なくとも 1 つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減させる方法もまた、提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

ある特定の実施形態において、細胞は、TREM2を発現する。ある特定の実施形態において、細胞は、ミクログリア細胞である。ある特定の実施形態において、細胞は、マクロファージである。

【 0 0 6 0 】

ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸種(BMP)、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン38:4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸44:12、リゾホスファチジルコリン16:0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン(例えば、SMd18:1/18:0)、ホスファチジルグリセロール(例えば、PGd16:0/18:1)、ホスファチジルエタノールアミン(例えば、PE38:6)、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、BMP、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン38:4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸44:12、リゾホスファチジルコリン16:0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、コレステリルエステルを含む。ある特定の実施形態において、1つ以上の脂質は、本明細書に記載の脂質を含む。

10

20

【 0 0 6 1 】

ある特定の実施形態において、脂質蓄積は、対照と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%低減される。

【 0 0 6 2 】

ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、G-CSF、INF γ 、IL-12(p40)、IL-12(p70)、LIX(CXCL5)、MCP-1(CCL2)、MIG(CXCL9)、IL-1、IL-1、及びIL-18からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、インフラマソーム経路(例えば、IL-1またはIL-18)と関連付けられる。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、IL-1である。

30

【 0 0 6 3 】

ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインの発現は、対照(例えば、アゴニスト抗TREM2抗体を投与されなかった対応する対照細胞)と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%低減される。

40

【 0 0 6 4 】

ある特定の実施形態において、細胞は、低下したTREM2活性を有するか、または有すると判定されている。他の実施形態において、細胞は、正常なTREM2活性を有する。

【 0 0 6 5 】

ある特定の実施形態において、細胞は、低下したApoE活性を有するか、または有すると判定されている(例えば、細胞は、機能変異もしくはコーディングバリエーションのAPOE喪失もしくは部分喪失を有する)。他の実施形態において、細胞は、正常なApoE活性を有する。

50

【 0 0 6 6 】

ある特定の実施形態において、細胞は、A p o E 4 を発現するか、または発現すると判定されている。ある特定の他の実施形態では、細胞は、A p o E 4 を発現しないか、または発現しないと判定されている。

【 0 0 6 7 】

ある特定の実施形態において、細胞は、本明細書に記載のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体（例えば、M A B 1 7 2 9 1 または 7 8 . 1 8 等、本明細書に記載のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体）と接触する。

【 0 0 6 8 】

ある特定の実施形態において、細胞は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体と、インビトロ、インビボ、またはエクスピボで接触する。ある特定の実施形態において、細胞は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体とインビトロで接触する。ある特定の実施形態において、細胞は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体とインビボで接触する。ある特定の実施形態において、細胞は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体とエクスピボで接触する。 10

【 0 0 6 9 】

ある特定の実施形態において、細胞は、哺乳動物中に存在し、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体とインビボで接触する。かかる実施形態において、細胞は、本抗体の投与を通じて接触し得る。ある特定の実施形態において、投与は、全身投与である。

【 0 0 7 0 】

ある特定の実施形態において、哺乳動物は、細胞内脂質蓄積に関連する炎症を有する。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、少なくとも1つの炎症誘発性サイトカイン（例えば、本明細書に記載の炎症誘発性サイトカイン、G - C S F、I N F y、I L - 1 2 (p 4 0)、I L - 1 2 (p 7 0)、L I X (C X C L 5)、M C P - 1 (C C L 2)、M I G (C X C L 9)、I L - 1 a l p h a、I L - 1 b e t a または I L - 1 8 等）の発現を低減する。ある特定の実施形態において、少なくとも1つのサイトカインは、I L - 1 である。 20

【 0 0 7 1 】

ある特定の実施形態において、哺乳動物は、本明細書に記載の疾患または状態を有するか、または発症しやすい。

【 0 0 7 2 】

特定の疾患または状態の治療

実施例に記載されるように、マクロファージ及びミクログリアにおける T R E M 2 機能の喪失は、脂質（例えば、コレステロール、コレステリルエステル（C E）、トリグリセリド及びスフィンゴ脂質）を処理及び代謝することができないことをもたらす。さらに、これらの脂質の蓄積は、炎症誘発性応答（例えば、インフラマソーム経路のサイトカインである I L - 1 を含む炎症誘発性サイトカインの上方制御）につながることを示されている。逆に、抗体で T R E M 2 を刺激することは、脂質負荷を減少させ、炎症を減弱させる。したがって、本明細書に記載されるように、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体を使用して、T R E M 2 を発現するマクロファージ、ミクログリアまたは他の細胞型における脂質調節異常及び炎症応答を是正し、関連疾患及び障害を治療し得る。 30 40

【 0 0 7 3 】

例えば、ミクログリア細胞における脂質負荷の増加及び関連する炎症は、アルツハイマー病（A D）を含む様々な神経変性疾患の重要な特徴である。C E は、A D 患者の脳及び A D マウスモデルに蓄積することが知られている（A s t a r i t a , e t a l . (2 0 1 1) . P L o S O n e 6 , e 2 4 7 7 7 ; C h a n , e t a l . , (2 0 1 2) . J B i o l C h e m 2 8 7 , 2 6 7 8 - 2 6 8 8 ; M o r e l , e t a l . (2 0 1 3) . N a t C o m m u n 4 , 2 2 5 0 ; S h i b u y a , e t a l . (2 0 1 5) . F u t u r e M e d C h e m 7 , 2 4 5 1 - 2 4 6 7) 及び L O A D 結合 T R E M 2 バリエーションは機能の部分喪失をもたらす（U l l a n d , T . K . , a n d C o l o n n a , M . (2 0 1 8) . N a t R e v N e u r o l 1 4 , 6 6 7 - 6 50

75)。したがって、本明細書に記載の結果に照らして、TREM2機能の強化は、部分的にはミクログリアにおける脂質クリアランスを促進することによって、ADにおいて有益であり得る。同様に、アゴニスト抗TREM2抗体はまた、これらの病理を特徴とする他の神経変性障害における脂質負荷及び炎症を低減するために有用であり得る。かかる疾患としては、限定されないが、那須・ハコラ病(NHD)、レビー小体病、パーキンソン病、網膜変性症(例えば、黄斑変性症)、ハンチントン病、前頭側頭葉変性症(FTD)、及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)が挙げられる。

【0074】

実施例に記載のように、TREM2はまた、リソソームコレステロールを制御する役割を果たし、アゴニスト抗TREM2抗体は、TREM2発現が低下した細胞におけるエンドリソソーム遊離コレステロールの蓄積を低減することが示された。したがって、アゴニスト抗TREM2は、ニーマン・ピック病(A型、B型、またはC型)などのコレステロール蓄積に関連する特定のリソソーム蓄積障害を治療するのに有用であり得る。

10

【0075】

加えて、TREM2は、慢性ミエリン貪食時のミクログリア遺伝子発現及びコレステロール輸送の制御に関与することが示されており、このプログラムを適切に実行しないと、脳内で広範なニューロン損傷がもたらされる(実施例を参照されたい)。これらの結果は、TREM2活性の向上が神経保護的(例えば、老化のために)であり得、多発性硬化症及び消滅する白質消失病等の特定の神経変性疾患における再ミエリン化を刺激し得ることを示す。

20

【0076】

TREM2は、CNSの外側のマクロファージのサブセット(例えば、脂肪組織、肝臓、骨格筋肉、及び動脈におけるアテローム性動脈硬化性病変における)上でも発現される。様々な関連疾患を治療するために、これらの組織における脂質代謝及び炎症応答を変えるためにTREM2調節を使用することができる。例えば、肥満、2型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、アルコール性及び非アルコール性脂肪肝疾患、ならびにアルコール性及び非アルコール性脂肪性肝炎等の一連の状態を含む代謝症候群は、典型的には、脂肪組織、肝臓、及び骨格筋を含む様々な組織における低グレードの慢性(すなわち、未解決)炎症と関連付けられる。単球及びマクロファージ等の骨髄系細胞は、最終的にインスリン耐性、グルコース不耐性、及びアテローム性動脈硬化をもたらし得る、これらの炎症応答の主要な媒介物である。これらの組織における炎症応答の中心は、骨髄系細胞と脂肪細胞または肝細胞などの他の脂肪含有細胞との相互作用、ならびに骨髄系細胞自体における脂質調節不全の程度である。したがって、TREM2アゴニストで脂質代謝/炎症を調節することは、代謝症候群及び代謝症候群に関連する状態を治療するのに有用であり得る。さらに、関節リウマチ(RA)は、関節の慢性炎症を引き起こす自己免疫疾患であり、脂質調節不全にも関連する。これらの脂質異常は、様々な心血管疾患を発症するリスクを増加させる。したがって、TREM2アゴニストで脂質代謝/炎症を調節することは、RAを治療するのに有用であり得る。

30

【0077】

機能性TREM2の減少はまた、IL-1インフラマソーム経路関連サイトカインを含む、様々な炎症誘発性サイトカインの上方制御をもたらす。実施例に記載されるように、このインフラマソーム応答は、アゴニスト抗TREM2抗体によって低減され、炎症(例えば、インフラマソーム関連疾患及び障害)に関連する疾患及び状態を治療する際のその抗炎症効果及びその有用性が実証された。例えば、抗TREM2抗体の投与は、RA、痛風、及び特定の腸状態(例えば、炎症性腸疾患(IBD))等の疾患の治療に有用であり得る。

40

【0078】

したがって、特定の実施形態において、本明細書に開示の方法は、アルツハイマー病、NHD、レビー小体病、パーキンソン病、網膜変性症(例えば、黄斑変性症)、FTD、ALS、またはハンチントン病を有するか、または発症しやすい哺乳動物を治療するために

50

使用され得る。本明細書に開示される方法を使用して、肥満、2型糖尿病、アルコール性及び非アルコール性脂肪肝炎、アルコール性及び非アルコール性脂肪肝疾患、アテローム性動脈硬化症、ならびに代謝症候群に関連する他の疾患を治療してもよい。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法は、非アルコール性脂肪性肝炎を治療するために使用されない。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法は、リソソーム蓄積障害、例えば、ニーマン・ピック病A型、B型またはC型を治療するために使用され得る。ある特定の他の実施形態において、本明細書に記載の方法は、脱髄に関連する疾患（例えば、多発性硬化症または白質消失病）を治療するために使用され得る。本明細書に開示される方法を使用して、炎症または炎症に関連する疾患もしくは障害、例えば、インフラマソーム関連疾患及び障害を有するか、または発症しやすい哺乳動物を治療することができる。ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法は、関節リウマチ（RA）、痛風、及び特定の腸疾患（例えば、炎症性腸疾患（IBD））を治療するために使用され得る。本明細書に開示される方法を使用して、老化または老化に関連する影響を治療してもよい。ある特定の実施形態において、かかる方法は、細胞老化を低減し、及び/または細胞機能/活性を改善する。ある特定の実施形態において、かかる方法は、細胞の寿命を延ばす。

【0079】

これらの状態のうちの1つ以上を有する哺乳動物における脂質調節不全及び/または炎症を治療することは、疾患の自然経過を変えることができる（例えば、疾患の発生もしくは再発を予防すること、症状を軽減すること、疾患の任意の直接的もしくは間接的な病理学的結果を軽減すること、疾患進行速度を低下させること、疾患状態を改善もしくは緩和すること、または寛解もしくは予後を改善することによって）。

【0080】

本明細書で使用される場合、「発症しやすい」という用語は、特定の疾患または状態を発症するリスクが（例えば、ApoE4アイソフォームまたはTREM2変異を発現する等の遺伝子リスク因子に起因するか、脂肪が多い食餌を摂る等のライフスタイル選択に起因するか、または代謝症候群等の遺伝子及びライフスタイル因子の組み合わせに起因する状態に起因する）増加している哺乳動物を指す。

【0081】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、NHDを有する。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、NHDを発症しやすい。

【0082】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、ニーマン・ピック病C型を有する。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、ニーマン・ピック病C型を発症しやすい。

【0083】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、アルツハイマー病を有する。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、アルツハイマー病を発症しやすい。したがって、本明細書に記載の特定の実施形態は、アルツハイマー病を治療することを必要とする哺乳動物におけるアルツハイマー病を治療する方法を提供し、方法は、哺乳動物にアゴニスト抗TREM2抗体を投与することを含み、哺乳動物は脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、TREM2発現細胞（例えば、ミクログリア細胞）における脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている。ある特定の実施形態において、TREM2発現細胞は、低下したTREM2活性を有するか、または有すると判定されている。特定の実施形態において、脂質代謝調節不全は、本明細書に記載の1つ以上の脂質（例えば、コレステリルエステル）の細胞内蓄積の増加を含む。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、脂質代謝調節不全に関連する炎症を有する（例えば、本明細書に記載のサイトカイン（例えば、IL-1）等の少なくとも1つの炎症誘発性サイトカインが上方制御される）。

【 0 0 8 4 】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法を使用して治療される哺乳動物は、アテローム性動脈硬化症を有する。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、アテローム性動脈硬化症を発症しやすい。したがって、本明細書に開示されるある特定の実施形態はまた、アテローム性動脈硬化症の治療を必要とする哺乳動物においてアテローム性動脈硬化症を治療する方法であって、哺乳動物に有効量の本明細書に記載のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体（例えば、M A B 1 7 2 9 1 または 7 8 . 1 8 ）を投与することを含む方法を提供する。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、脂質代謝調節不全を有しているか、またはそれを有すると判定されている。ある特定の実施形態において、脂質代謝調節不全は、本明細書に記載の 1 つ以上の脂質の蓄積（例えば、細胞内または細胞外蓄積）の増加を含む。ある特定の実施形態では、1 つ以上の脂質は、マクロファージ（例えば、低下した T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定されているマクロファージ）において細胞内に蓄積される。ある特定の実施形態において、哺乳動物は、脂質代謝調節不全に関連する炎症を有する（例えば、本明細書に記載のサイトカイン（例えば、I L - 1 ）等の少なくとも 1 つの炎症誘発性サイトカインが上方制御される）。ある特定の実施形態において、方法は、第 2 の治療薬（例えば、本明細書に記載の治療薬）を投与することをさらに含む。ある特定の実施形態において、第 2 の治療薬は、アテローム性動脈硬化症を治療するために有用な薬剤である。ある特定の実施形態において、第 2 の治療薬は、本明細書に記載される L X R アゴニストもしくは R X R アゴニスト、または本明細書に記載される A C A T 1 阻害剤である。

10

20

【 0 0 8 5 】

アゴニスト抗 T R E M 2 抗体

本明細書に記載されるように、ある特定の実施形態において、有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を、脂質代謝の調節不全、または脂質代謝の調節不全に関連する疾患もしくは状態、例えば、アルツハイマー病もしくはアテローム性動脈硬化症を治療するために哺乳動物に投与する。ある特定の他の実施形態において、有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を、炎症または炎症に関連する疾患もしくは状態を治療するために哺乳動物に投与する。

【 0 0 8 6 】

本明細書で使用される場合、「T R E M 2 タンパク質」という用語は、遺伝子 T r e m 2 によってコードされる骨髄細胞タンパク質上に発現されるトリガー受容体 2 を指す。本明細書で使用される場合、「T R E M 2 タンパク質」は、限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）、げっ歯類（例えば、マウス、ラット）、及び他の哺乳動物等の任意の脊椎動物の天然（すなわち、野生型）T R E M 2 タンパク質を指す。いくつかの実施形態において、T R E M 2 タンパク質は、U n i p r o t K B 受託番号 Q 9 N Z C 2 において同定される配列を有するヒト T R E M 2 タンパク質である。

30

【 0 0 8 7 】

本明細書で使用される場合、「T R E M 2」という用語は、タンパク質バリエーション及び組換え T R E M 2 またはその断片も含む。

【 0 0 8 8 】

本明細書で使用される場合、「抗 T R E M 2 抗体」という用語は、T R E M 2 タンパク質（例えば、ヒト T R E M 2 ）に特異的に結合する抗体を指す。

40

【 0 0 8 9 】

本明細書で使用される場合、「アゴニスト抗 T R E M 2 抗体」という用語は、T R E M 2 に結合して活性化し得るか、または T R E M 2 の少なくとも 1 つの生物学的活性を増加させ得る抗体を指す。

【 0 0 9 0 】

特定の抗 T R E M 2 抗体（例えばアゴニスト抗体）及びその断片は、当該技術分野で既知である。例えば、抗 T R E M 2 抗体には、M A B 1 7 2 9 1 （クローン番号 2 3 7 9 2 0 、 R & D S y s t e m s ）及び 7 8 . 1 8 （カタログ番号 M C A 4 7 7 2 ; B i o - R

50

a d) が含まれるが、これらに限定されない。T R E M 2 に対する抗体については、例えば、特許 / 公開第 W O 2 0 1 6 / 0 2 3 0 1 9 号、W O 2 0 1 7 / 0 6 2 6 7 2 号、W O 2 0 1 7 / 0 5 8 8 6 6 号、W O 2 0 1 8 / 1 9 5 5 0 6 号、W O 2 0 1 9 / 1 1 8 5 1 3 号、及び W O 2 0 1 9 / 0 2 8 2 9 2 号にも記載されている。

【 0 0 9 1 】

ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体またはその断片は、M A B 1 7 2 9 1 または 7 8 . 1 8 である。

【 0 0 9 2 】

一実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体またはその断片は、T R E M 2 に特異的に結合し、その活性を増加させる。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、完全長抗体（例えば、I g G 1 または I g G 4 抗体）である。ある特定の実施形態では、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体の断片は、本明細書に開示される方法で使用され、抗原結合部分（例えば、F a b、F (a b ')₂ または s c F v 断片）のみを含む。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体またはその断片は、機能性に影響を及ぼすように修飾され、例えば、残存エフェクター機能を排除する (R e d d y e t a l . , 2 0 0 0 , J . I m m u n o l . 1 6 4 : 1 9 2 5 - 1 9 3 3) 。エフェクターを排除することができる変異としては、「L A L A」変異 (L 2 3 4 A / L 2 3 5 A 変異、E U 付番スキームに従って付番) が挙げられる。

10

【 0 0 9 3 】

ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、モノクローナル抗体、またはその断片である。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、T R E M 2 に特異的に結合する単離された組換えモノクローナル抗体、またはその断片である。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体またはその断片は、ヒト抗体またはその断片である。ある特定の実施形態において、抗体は、完全ヒト型である。

20

【 0 0 9 4 】

ある特定の実施形態において、抗体または抗原結合断片は、T R E M 2 に対する第 1 の結合特異性及び第 2 の標的エピトープに対する第 2 の結合特異性を含む二重特異性である。第 2 の標的エピトープは、T R E M 2 上または異なるタンパク質上の別のエピトープであり得る。

【 0 0 9 5 】

本明細書で使用される場合、「F c 受容体」という用語は、抗体の F c 領域に対する結合特異性を有する B リンパ球、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好塩基球、好中球、及び肥満細胞を含む免疫細胞上で見られる表面受容体タンパク質を指す。「F c 受容体」という用語には、F c y 受容体（例えば、F c y R I (C D 6 4)、F c y R I I A (C D 3 2)、F c y R I I B (C D 3 2)、F c y R I I I A (C D 1 6 a)、及び F c y R I I I B (C D 1 6 b)、F c a 受容体（例えば、F c a R I または C D 8 9)、及び F c s 受容体（例えば、F c s R I、及び F c s R I I (C D 2 3)) が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 9 6 】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、その可変領域を介して抗原に特異的に結合する免疫グロブリンフォールドを有するタンパク質を指す。この用語は、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、単一特異性抗体、一価抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体などの多重特異性抗体を包含する。本明細書で使用される「抗体」という用語は、F a b、F (a b ')₂、F v、s c F v、及び二価 s c F v を含むが、これらに限定されない結合特異性を保持する抗体断片も含む。抗体は、カッパまたはラムダのいずれかとして分類される軽鎖を含有し得る。抗体は、それぞれ免疫グロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D、及び I g E を定義する、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類される重鎖を含有し得る。

40

【 0 0 9 7 】

50

例示的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の2組の同一の対からなり、各対は、1つの「軽」鎖（約25 kD）と、1つの「重」鎖（約50～70 kD）とを有する。各鎖のN末端は、抗原認識に主に関与する約100～110以上のアミノ酸の可変領域を定義する。用語「可変軽鎖」（VL）及び「可変重鎖」（VH）はそれぞれ、これらの軽鎖及び重鎖を指す。

【0098】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、生殖系列可変（V）遺伝子、多様性（D）遺伝子、またはジョイニング（J）遺伝子に由来する（かつ定数（C_μ及びC_κ）遺伝子セグメントに由来しない）抗体重鎖または軽鎖中のドメインを指し、抗原への結合に対するその特異性を抗体に付与する。典型的には、抗体可変領域は、3つの超可変「相補性決定領域」が散在する4つの保存された「フレームワーク」領域を含む。

10

【0099】

「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、軽鎖及び重鎖可変領域によって確立された4つのフレームワーク領域を中断する各鎖の3つの超可変領域を指す。CDRは、抗原のエピトープへの抗体結合に主に関与する。各鎖のCDRは、典型的には、CDR1、CDR2、及びCDR3と称され、N末端から順次番号付けされ、また典型的には、特定のCDRが位置する鎖によって同定される。したがって、VH CDR3またはCDR-H3は、それが見出される抗体の重鎖の可変領域に位置する一方で、VL CDR1またはCDR-L1は、それが見出される抗体の軽鎖の可変領域由来のCDR1である。

【0100】

異なる軽鎖または重鎖の「フレームワーク領域」または「FR」は、種内で比較的保存される。抗体のフレームワーク領域、すなわち、構成軽鎖及び重鎖の組み合わせフレームワーク領域は、CDRを三次元空間内に位置決めし、アラインメントする役割を果たす。フレームワーク配列は、公開DNAデータベースまたは生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開されている参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、ヒト及びマウス配列の「VBASE2」生殖系列可変遺伝子配列データベースに見出すことができる。

20

【0101】

CDR及びフレームワーク領域のアミノ酸配列は、当該技術分野において様々な周知の定義、例えば、Kabata, Chothia, international Immunogenetics database (IMGT), AbM、及び観察された抗原接触（「接触」）を使用して決定され得る。いくつかの実施形態において、CDRは、接触定義に従って決定される。MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996)を参照されたい。いくつかの実施形態において、CDRは、Kabata、Chothia、及び/または接触CDR定義の組み合わせによって決定される。

30

【0102】

「抗原結合部分」及び「抗原結合断片」という用語は、本明細書において互換的に使用され、その可変領域を介して抗原（例えば、TREM2タンパク質）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗原結合断片の例としては、Fab断片（VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、及びCH1ドメインからなる一価断片）、F(ab')₂断片（ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片）、一本鎖Fv（scFv）、ジスルフィド結合Fv（dsFv）、相補性決定領域（CDR）、VL（軽鎖可変領域）、及びVH（重鎖可変領域）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0103】

「エピトープ」という用語は、抗体のCDRが特異的に結合する抗原の領域（area）または領域（region）を指し、いくつかのアミノ酸またはいくつかのアミノ酸の部分、例えば、5もしくは6、またはそれ以上、例えば、20以上のアミノ酸、またはそれらのアミノ酸の部分を含み得る。例えば、標的がタンパク質である場合、エピトープは、

50

連続するアミノ酸（例えば、直鎖状エピトープ）、またはタンパク質フォールディングによって近接にもたらされるタンパク質の異なる部分由来のアミノ酸（例えば、不連続または立体配座エピトープ）から構成され得る。いくつかの実施形態において、エピトープは、1つのアミノ酸で（例えば、セリンまたはトレオニン残基で）リン酸化される。

【0104】

本明細書で使用される場合、「エピトープを認識する」という語句は、抗TREM2抗体に関して使用される場合、抗体CDRが、そのエピトープまたはそのエピトープを含有する抗原の一部で抗原（すなわち、TREM2タンパク質）と相互作用するか、または特異的に結合することを意味する。

【0105】

本明細書で使用される場合、「多重特異性抗体」という用語は、2つ以上の異なる抗原結合部分を含む抗体を指し、各抗原結合部分は、異なる抗原を認識する異なる可変領域、またはその可変領域を介して2つ以上の異なる抗原に結合する抗体の断片もしくは部分を含む。本明細書で使用される場合、「二重特異性抗体」という用語は、2つの異なる抗原結合部分を含む抗体を指し、各抗原結合部分は、異なる抗原を認識する異なる可変領域、またはその可変領域を介して2つの異なる抗原に結合する抗体の断片もしくは部分を含む。

【0106】

「モノクローナル抗体」は、細胞の単一クローンまたは単一細胞株によって産生され、それらの一次アミノ酸配列において同一である抗体分子からなるか、または本質的にそれからなる抗体を指す。

【0107】

「ポリクローナル抗体」は、集団内の異なる抗体が抗原の異なるエピトープに結合する抗体の異種集団から得られる抗体を指す。

【0108】

「キメラ抗体」とは、抗原結合部位（すなわち、可変領域、CDR、またはその一部分）が異なるまたは変化したクラス、エフェクター機能、及び/または種の定常領域に連結されるように、定常領域またはその一部分が変化、置換、または交換されるか、または可変領域またはその一部分が、異なるまたは変化した抗原特異性を有する可変領域（例えば、CDR及び異なる種由来のフレームワーク領域）により変化、それと置換、または交換される抗体分子を指す。いくつかの実施形態において、キメラ抗体は、1つの供給源または種（例えば、マウス）由来の可変領域と、第2の供給源または種（例えば、ヒト）由来の定常領域とを含むモノクローナル抗体である。キメラ抗体を産生するための方法については、当該技術分野で説明されている。

【0109】

「ヒト化抗体」は、CDRの外側の非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する非ヒト供給源（例えば、マウス）に由来するキメラ抗体である。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ（例えば、2つ）の抗原結合可変ドメイン（複数可）を含み、CDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのものに実質的に対応し、フレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリン配列のものに実質的に対応する。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンの特定のフレームワーク領域残基は、非ヒト種由来の対応する残基で置換されて、例えば、特異性、親和性、及び/または血清半減期を改善し得る。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリン配列の少なくとも一部分を含み得る。抗体ヒト化方法は、当該技術分野において既知である。

【0110】

「ヒト抗体」または「完全ヒト型抗体」は、典型的にはヒト生殖系列遺伝子に由来するヒト重鎖及び軽鎖配列を有する抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト細胞によって、ヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト動物（例えば、ヒト抗体配列を発現するように遺伝子操作されるトランスジェニックマウス）によって、またはファージディスプレイプラットフォームによって産生される。

【0111】

10

20

30

40

50

「特異的に結合する」または「に特異的に結合する」などの用語は、結合分子（例えば、抗体またはその抗原結合断片）が、試料、例えば、生体試料中に存在する他の無関係分子を実質的に認識及び結合することなく、標的（例えば、TREM2などの抗原）に結合することができることを意味する。場合によっては、特異的結合は、約 10^{-6} 、 10^{-7} 、または 10^{-8} M以下の平衡解離定数によって特徴付けられ得る（より小さい K_D は、より密接な結合を示す）。2つの分子が特異的に結合するかどうかを判定するための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴（例えば、BIACORE（商標））等を含む。さらに、TREM2の1つのドメインに結合する多重特異性抗体、及びTREM2の2つの異なる領域に結合する1つ以上の追加の抗原または二重特異性抗体は、それでも、本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」抗体と見なされる。

10

【0112】

「高親和性」抗体という用語は、表面プラズモン共鳴、例えば、BIACORE（商標）または溶液親和性ELISAによって測定される場合、 K_D として表されるTREM2に対する結合親和性が少なくとも 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、または 10^{-11} MであるそれらのmAbを指す。

【0113】

アゴニスト抗TREM2抗体、またはその断片は、第2のアゴニスト抗TREM2抗体等のリガンドもしくは治療部分（「イムノコンジュゲート」）等の部分、または別の抗原に対する抗体に、コンジュゲートされ得る。

20

【0114】

本明細書で使用される場合、「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体（Ab）を実質的に含まない抗体（例えば、TREM2に特異的に結合する単離された抗体、またはその断片が、TREM2以外の抗原に特異的に結合するAbを実質的に含まない抗体を指すよう意図されている。

【0115】

「表面プラズモン共鳴」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、BIACORE（商標）システム（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.）を使用した、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化の検出によるリアルタイム生体分子相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。

30

【0116】

本明細書で使用される「 K_D 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の平衡解離定数を指すよう意図されている。

【0117】

ポリペプチドへ適用される場合、「実質的な類似性」または「実質的に類似の」という用語は、2つのペプチド配列が、既定のギャップ重みを使用してプログラムGAPまたはBESTFITなどによって最適にアラインメントされた場合、少なくとも80%の配列同一性、90%の配列同一性、または少なくとも95%、98%、または99%の配列同一性を共有することを意味する。同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なる場合がある。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を備えた側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基で置換されたものである。概して、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないことになっている。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合、類似性の割合または程度は、置換の保存的性質を補正するように上方調節してもよい。この調節を行うための手段は、当業者によく知られている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: SOT-SSIを参照されたい。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸基の例としては、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、2) 脂肪族 ヒドロキシル側鎖：セリン及びトレオニン、3) アミド含有側鎖：アス

40

50

パラギン及びグルタミン、4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン、6) 酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸、ならびに7) 硫黄含有側鎖：システイン及びメチオニンが挙げられる。保存的アミノ酸置換基としては、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸、及びアスパラギン - グルタミンが挙げられる。あるいは、保存的な置換は、参照により本明細書に組み込まれる、Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-45に開示されるPAM250対数尤度行列において正の値を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、PAM250対数尤度行列において非負の値を有する任意の変化である。

10

【0118】

ポリペプチドに対する配列類似性は、典型的には、配列分析ソフトウェアを使用して測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失及び他の修飾へ割り当てられた類似性の測定値を使用して類似の配列と一致させる。例えば、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドのような密接に関連するポリペプチド間の、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータと共に使用することができるGAP及びBESTFIT等のプログラムを、GCGソフトウェアは含有する。例えば、GCGの第6.1版を参照されたい。ポリペプチド配列は、GCGの第6.1版のプログラムである、既定パラメータまたは推奨パラメータを備えたFASTAを使用して比較することもできる。FASTA(例えば、FASTA2及びFASTA3)は、問い合わせ配列と検索配列との最良オーバーラップ領域のアラインメント及び配列同一性の百分率を提供する(上記Pearson(2000))。本明細書に開示される配列を異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別のアルゴリズムは、既定パラメータを使用するコンピュータプログラムBLAST、特にBLASTPまたはTBLASTNである。例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410及び(1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402を参照されたい。

20

【0119】

本明細書に開示されるように使用され得る抗体及び抗原結合断片は、TREM2に特異的に結合する。アゴニスト抗TREM2抗体は、高親和性または低親和性でTREM2に結合し得る。それらは、脂質代謝及び/または炎症の調節不全を治療するために、単独で、または当該技術分野で既知の他の治療部分または様式(すなわち、少なくとも1つの追加の治療薬)での補助療法として使用され得る。

30

【0120】

ある特定のアゴニスト抗TREM2抗体は、インビトロアッセイまたはインビボアッセイによって決定されるように、TREM2に結合し、かつTREM2の活性を増加させることができる。TREM2に結合し、TREM2の活性を増加させる抗体の能力は、結合アッセイまたは活性アッセイを含む、当業者に既知の任意の標準的な方法を用いて測定され得る。

40

【0121】

TREM2に特異的な抗体は、追加の標識もしくは部分を含有しなくてもよく、またはN末端もしくはC末端標識もしくは部分を含有してもよい。一実施形態において、標識は放射性核種または蛍光色素であってもよい。特定の実施形態では、かかる標識抗体は、診断アッセイで使用され得る。

【0122】

抗ヒトTREM2抗体の調製

トランスジェニックマウスにおいてヒト抗体を生成するための方法は、当該技術分野で既知である。任意のかかる既知の方法は、TREM2に特異的に結合するヒト抗体を作製するために、本明細書に開示されるように使用され得る。

50

【 0 1 2 3 】

T R E M 2 またはその断片に対する抗体を生成するために、以下のうちのいずれか 1 つを含む免疫原を使用することができる。例えば、一次免疫原は、完全長 T R E M 2 (U n i P r o t K B Q 9 N Z C 2 を参照されたい)、または T R E M 2 もしくは修飾ヒト T R E M 2 断片もしくは修飾カニクイザル T R E M 2 断片の組換え型であってもよい。ある特定の実施形態において、一次免疫原に続いて、二次免疫原で、または T R E M 2 の免疫原性活性断片で免疫化され得る。あるいは、T R E M 2 またはその断片は、標準的な生化学的技術を使用して生成され、修飾され、免疫原として使用され得る。免疫原は、T R E M 2 の生物学的活性及び/または免疫原性断片、またはその活性断片をコードする D N A であり得る。

10

【 0 1 2 4 】

ある特定の実施形態において、免疫原は、T R E M 2 の N 末端または C 末端からのペプチドであり得る。一実施形態において、免疫原は T R E M 2 の特定のドメインである。いくつかの実施形態において、免疫原は、E . c o l i i において、またはチャニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞等の任意の他の真核細胞もしくは哺乳類細胞において発現された組換え T R E M 2 ペプチドであり得る。ペプチドは、タグ付けのために、または K L H 等の担体分子へのコンジュゲーションの目的のために、ある特定の残基の添加または置換を含むように修飾されてもよい。例えば、システインは、ペプチドの N 末端または C 末端のいずれかに添加されてもよく、またはリンカー配列を添加して、例えば、免疫化のための K L H へのコンジュゲーションのためのペプチドを調製してもよい。

20

【 0 1 2 5 】

F c バリエーションを含むアゴニスト抗 T R E M 2 抗体

アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、例えば、中性 p H と比較して酸性 p H で、F c R n 受容体への抗体結合を増強または減少させる 1 つ以上の変異を含む F c ドメインを含んでもよい。例えば、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、F c ドメインの C_H2 または C_H3 領域に変異を含み得、変異 (複数可) は、酸性環境 (例えば、p H 範囲約 5 . 5 ~ 約 6 . 0 のエンドソーム内) において、F c R n に対する F c ドメインの親和性を高める。そのような変異は、動物に投与したときに抗体の血清半減期の増加をもたらし得る。

【 0 1 2 6 】

アゴニスト抗 T R E M 2 抗体、またはその断片の生物学的特性

一般に、本明細書に開示されるように有用な抗体は、T R E M 2 に結合することによって機能し、例えば、高い親和性を有する T R E M 2 分子に結合するアゴニスト抗 T R E M 2 抗体及びその抗原結合断片を含む。例えば、表面プラズモン共鳴によって測定して、約 5 0 n M 未満の K_D で T R E M 2 に (例えば、2 5 または 3 7 で) 結合する抗体及び抗体の抗原結合断片を、本明細書に開示されるように使用してもよい。ある特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、表面プラズモン共鳴または実質的に類似のアッセイによって測定した場合、約 4 0 n M 未満、約 3 0 n M 未満、約 2 0 n M 未満、約 1 0 n M 未満、約 5 n M 未満、約 2 n M 未満、または約 1 n M の K_D で T R E M 2 に結合する。本明細書に開示の抗体またはその抗原結合断片はまた、表面プラズモン共鳴によって測定して、約 3 5 n M 未満の K_D でカニクイザル (M a c a c a f a s c i c u l a r i s) T R E M 2 (例えば、2 5 または 3 7 で) に結合し得る。ある特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、表面プラズモン共鳴または実質的に類似のアッセイによって測定した場合、約 3 0 n M 未満、約 2 0 n M 未満、約 1 5 n M 未満、約 1 0 n M 未満、または約 5 n M 未満の K_D でカニクイザル T R E M 2 に結合する。

30

40

【 0 1 2 7 】

本明細書に記載の方法及び使用はまた、2 5 もしくは 3 7 の表面プラズモン共鳴、または実質的に類似のアッセイによって測定した場合、約 1 . 1 分超の解離半減期 (t_{1/2}) で T R E M 2 に結合する抗体及びその抗原結合断片の使用を含む。ある特定の実施形態において、抗体または抗原結合断片は、2 5 または 3 7 での表面プラズモン共鳴 (例えば、m A b 捕捉または抗原捕捉フォーマット) または実質的に同様のアッセイによ

50

て測定される、約5分超、約10分超、約30分超、約50分超、約60分超、約70分超、約80分超、約90分超、約100分超、約200分超、約300分超、約400分超、約500分超、約600分超、約700分超、約800分超、約900分超、約1000分超、または約1200分超の $t_{1/2}$ で T R E M 2 に結合する。

【0128】

いくつかの実施形態において、抗体は、T R E M 2 の特定のドメインまたはドメインの断片に結合し得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される使用のための抗体は、2つ以上のドメイン（交差反応性抗体）に結合し得る。

【0129】

ある特定の実施形態において、本明細書に開示される使用のための抗体は、二重特異性抗体であり得る。二重特異性抗体は、1つのドメイン内の1つのエピトープに結合し得、T R E M 2 の異なるドメイン内の第2のエピトープにも結合し得る。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、同じドメイン内の2つの異なるエピトープに結合し得る。

10

【0130】

一実施形態において、T R E M 2 に結合する単離された完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の使用が提供される。

【0131】

種の選択性及び種の交差反応性

ある特定の実施形態によると、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、ヒト T R E M 2 に結合し得るが、他の種由来の T R E M 2 には結合しない。あるいは、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、ヒト T R E M 2 及び1つ以上の非ヒト種由来の T R E M 2 に結合し得る。例えば、ヒト T R E M 2 にアゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、場合によっては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルまたはチンパンジーの T R E M 2 のうちの1つ以上に結合し得るか、または結合し得ない。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、同じ親和性または異なる親和性でヒト及びカニクイザル T R E M 2 に結合し得るが、ラット及びマウス T R E M 2 には結合しない。

20

【0132】

追加の治療薬

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法は、1つ以上の追加の治療剤（例えば、第2の治療薬）を投与することをさらに含む。

30

【0133】

1つ以上の追加の治療薬は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体と同時にまたは順次に投与され得る。ある特定の実施形態において、1つ以上の追加の治療薬は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体と同時に投与される。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体及び1つ以上の追加の治療薬を含む薬学的組成物が投与される。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体及び1つ以上の追加の治療薬は、順次に投与される。ある特定の実施形態において、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体は、1つ以上の追加の治療薬の前に投与される。ある特定の実施形態において、1つ以上の追加の治療薬は、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体の前に投与される。

40

【0134】

ある特定の実施形態において、追加の治療薬は、アルツハイマー病またはアテローム性動脈硬化症の治療に有用な薬剤である。

【0135】

ある特定の実施形態において、追加の治療薬は、炎症を治療するのに有用な薬剤である。

【0136】

ある特定の実施形態において、追加の治療薬は、L X R アゴニストである。本明細書に記載されるように、脂質代謝の調節不全、またはかかる調節不全に関連する疾患もしくは状態を治療するために、有効量の L X R アゴニストを哺乳動物に投与してもよい。L X R は、リガンド依存性核受容体転写因子のスーパーファミリーの一部である。コレステロール

50

(オキシステロール)の酸化誘導体は、LXRの天然リガンドであり、LXR活性化を刺激する能力及び拮抗させる能力の両方を有する。LXR (NR1H3によってコードされる)は、肝臓、マクロファージ、及び他の高度に代謝される組織において高度に発現される一方で、LXR (NR1H2)は、普遍的に発現される。リガンド活性化の際、LXRはRXRとヘテロ二量体を形成し、脂質代謝及び炎症シグナル伝達の調節に役割を果たす。

【0137】

「LXRアゴニスト」という用語は、標的LXRの1つ以上の機能を活性化、増強、増加、または別様に刺激することができる薬剤を指す。LXRのアゴニストは、直接的または間接的のいずれかで、任意のLXR活性、例えば、LXR媒介シグナル伝達を誘導し得る。本明細書で使用される場合、LXRアゴニストは、LXRに結合するために必要とされる場合があるが、必要とされない場合があり、LXRと直接相互作用する場合もそうでない場合もある。LXRアゴニストは、LXR、LXR、またはその両方を特異的に刺激し得る。LXRアゴニストは、LXRを刺激することに加えて、他の受容体/経路に影響を及ぼし得る。

10

【0138】

LXRアゴニストとしては、天然オキシステロール、合成オキシステロール、合成ノノキシステロール、及び天然ノノキシステロールが挙げられる。例示的な天然オキシステロールとしては、20(S)ヒドロキシコレステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25(S)エポキシコレステロール、及び27-ヒドロキシコレステロールが挙げられる。例示的な合成オキシステロールとしては、N,N-ジメチル-3,3'-ヒドロキシコレンアミド(DMHCA)が挙げられる。例示的な合成非オキシステロールとしては、N-(2,2,2-トリフルオロエチル)-N-{4-[2,2,2-トリフルオロ-1-ヒドロキシ-1-(トリフルオロメチル-イル)エチル]フェニル}ベンゼンスルホンアミド(TO901317、Tularik 0901317)、[3-(3-(2-クロロ-トリフルオロメチルベンジル-2,2-ジフェニルエチルアミノ)プロポキシ)-フェニル酢酸](GW3965)、N-メチル-N-[4-(2,2,2-トリフルオロ-1-ヒドロキシ-1-トリフルオロメチル-1-エチル)-フェニル-1]-ベンゼンスルホンアミド(TO314407)、4,5-ジヒドロ-1-(3-(3-トリフルオロメチル-7-プロピル-ベンジソキサゾール-6-イルオキシ)プロピル)-2,6-ピリミジンジオン、3-クロロ-4-(3-(7-プロピル-3-トリフルオロメチル-6-(4,5)-イソキサゾリル)プロピルチオ)-フェニル酢酸(Fsub3-MethylAA)、及びアセチルポドカルピン酸二量体が挙げられる。例示的な天然非オキシステロールとしては、パキシリン、デスモステロール、及びスティグマステロールが挙げられる。

20

30

【0139】

他の有用なLXRアゴニストについては、例えば、米国特許出願公開第2006/0030612号、第2005/0131014号、第2005/0036992号、第2005/0080111号、第2003/0181420号、第2003/0086923号、第2003/0207898号、第2004/0110947号、第2004/0087632号、第2005/0009837号、第2004/0048920号、及び第2005/0123580号、米国特許第6,316,503号、第6,828,446号、第6,822,120号、及び第6,900,244号、WO2008036239、WO2001/41704、Menke J G et al., *Endocrinology* 143:2548-58(2002)、Joseph S B et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7604-09(2002)、Fu X et al., *J. Biol. Chem.* 276:38378-87(2001)、Schultz J R et al., *Genes Dev.* 14:2831-38(2000)、Sparrow C P et al., *J. Biol. Chem.* 277:10021-27(2002)、Yang C et al., *J. Biol.*

40

50

Chem., Manuscript M603781200 (Jul. 20, 2006)、Bramlett K S et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 307: 291-96 (2003); Ondeyka J G et al., J. Antibiot (Tokyo): 58: 559-65 (2005)に開示されている。

【0140】

ある特定の実施形態において、LXRアゴニストは、ヒポコラミド、T0901317、GW3965、IMB-808、またはN,N-ジメチル-3-ヒドロキシコレンアミド(DMHCA)である。ある特定の実施形態において、LXRアゴニストは、GW3965である。

【0141】

ある特定の他の実施形態において、追加の治療薬は、RXRアゴニストである。本明細書に記載されるように、脂質代謝の調節不全、またはかかる調節不全に関連する疾患もしくは状態を治療するために、有効量のRXRアゴニストをまた、哺乳動物に投与してもよい。RXRは、9-シス-レチノイン酸及び9-シス-13,14-ジヒドロ-レチノイン酸によって活性化される核受容体の一種である。以下の3つのRXRフォームが存在する：RXRA、RXRB、RXRG遺伝子によってそれぞれコードされる、RXR-、RXR-、及びRXR-。RXRは、CAR、FXR、LXR、PPAR、PXR、RAR、TR、及びVDRを含むサブファミリー1核受容体とヘテロ二量体化する。他のI型核受容体と同様に、リガンドの不在下でのRXRヘテロ二量体は、コアプレッサータンパク質と複合体化されたホルモン応答要素に結合する。アゴニストリガンドのRXRへの結合は、コアプレッサーの解離及びコアアクチベータータンパク質の動員をもたらし、これは次に、下流標的遺伝子のmRNAへの転写を促進し、最終的にはタンパク質への転写を促進する。

【0142】

用語「RXRアゴニスト」は、標的RXRの1つ以上の機能を活性化、増強、増加、またはそれ以外の場合刺激することができる薬剤(例えば、RXRホモ及びヘテロ二量体の転写制御活性を高める)を指す。RXRのアゴニストは、直接的または間接的のいずれかで、任意のRXR活性、例えば、RXR媒介シグナル伝達を誘導し得る。本明細書で使用される場合、RXRアゴニストは、RXRに結合するために必要とされる場合があるが、必要とされない場合があり、RXRと直接相互作用してもしなくてもよい。RXRアゴニストは、RXR、RXR、もしくはRXR、またはそれらの組み合わせを特異的に刺激し得る。RXRアゴニストは、RXRを刺激することに加えて、他の受容体/経路に影響を及ぼし得る。

【0143】

ある特定のRXRアゴニスト及びそのようなアゴニストの合成方法が知られている。例えば、RXRアゴニストとしては、限定されないが、Boehm et al., J. Med. Chem. 38: 3146 (1994)、Boehm et al., J. Med. Chem. 37: 2930 (1994)、Antras et al., J. Biol. Chem. 266: 1157-61 (1991)、Salazar-Olivo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 204: 10257-263 (1994)、Safanova, Mol. Cell. Endocrin. 104: 201 (1994)、M. L. Dawson and W. H. Okamura, Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids, Chapters 3, 8, 14 and 16, CRC Press, Inc., Florida (1990)、M. L. Dawson and P. D. Hobbs, The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine, M. B. Sporn et al., Eds. (2nd ed.), Raven Press, New York, N. Y., pp. 5-178 (1994)、Liu et al., Tetrahedron, 40: 1931 (1984)、Cancer Res., 43: 5268 (1983)、Eur. J. Med. Chem. 15: 9 (1

10

20

30

40

50

980)、Allegretto et al., J. Bio. Chem., 270: 23906 (1995)、Bissonette et al., Mol. Cell. Bio., 15: 5576 (1995)、Beard et al., J. Med. Chem., 38: 2820 (1995)、Koch et al., J. Med. Chem., 39: 3229 (1996)、U.S. 4, 326, 055、U.S. 4, 578, 498、U.S. 5, 399, 586、U.S. 5, 466, 861、U.S. 5, 721, 103、U.S. 5, 780, 676、U.S. 5, 801, 253、U.S. 5, 830, 959、U.S. 6, 083, 977、U.S. 6, 131, 050、U.S. 20160324874、US20180185342、US20180263939、US20180318241、WO93/11755、WO93/21146、WO94/15902、WO94/23068、WO95/04036、WO96/20913、WO20100105728、WO2013056232、及びWO2013090616に記載されるものが挙げられる。

【0144】

ある特定の実施形態において、RXRアゴニストは、CD3254、ドコサヘキサエン酸、フルオロベキサロテン、ベキサロテン(LGD1069)、IRX4204、HX630、PA024、イソトレチノイン、レチノイン酸、SR11237、LG101506、LGD100268またはLGD100324である。ある特定の実施形態において、RXRアゴニストはベキサロテンである。

【0145】

ある特定の他の実施形態において、追加の治療薬は、ACAT1阻害剤である。本明細書に記載されるように、脂質代謝の調節不全、またはかかる調節不全に関連する疾患もしくは状態を治療するために、有効量のACAT1阻害剤をまた、哺乳動物に投与してもよい。

【0146】

ACAT1遺伝子は、短鎖長特異的チオラーゼであるミトコンドリアルアセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ(UniProtKB P24752)をコードする。本明細書で使用される場合、「ACAT1阻害剤」は、直接的または間接的のいずれかでACAT1の発現及び/または機能を阻害する(例えば、転写、RNA成熟、RNA翻訳、翻訳後修飾、または酵素活性を阻害する)ことができる任意の化合物または治療を含む。本明細書で使用される場合、ACAT1阻害剤は、ACAT1に結合するために必要とされる場合があるが、必要とされない場合があり、酵素と直接相互作用してもしなくてもよい。ある特定の実施形態において、阻害剤は、例えば、本明細書に記載のアッセイまたは当該技術分野で公知のアッセイを使用して測定されるACAT1の発現レベルまたは生物学的活性を検出可能に阻害する。ある特定の実施形態において、阻害剤は、ACAT1の発現レベルまたは生物学的活性を少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%阻害する。

【0147】

阻害剤は、天然由来または合成由来であり得る。例えば、それは、核酸、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、または有機化合物であり得る。一実施形態において、阻害剤は、siRNA、shRNA、小分子、または抗体である。

【0148】

ある特定の実施形態において、阻害剤は、ACAT1の転写または対応するメッセンジャーRNAの翻訳を阻害することができるアンチセンス核酸(例えば、siRNAまたはshRNA)である。当業者は、市販のソフトウェア及びACAT1の遺伝子配列を使用して、アンチセンス核酸を設計することができる。

【0149】

ある特定の実施形態において、阻害剤は、ポリペプチド、例えば、ACAT1に対する抗体、またはその断片もしくは誘導體、例えば、Fab断片、CDR領域、もしくは一本鎖

抗体である。

【0150】

「小分子」という用語は、約1000 amu未満の分子量の有機分子を含む。一実施形態において、小分子は、約800 amu未満の分子量を有し得る。別の実施形態において、小分子は、約500 amu未満の分子量を有し得る。

【0151】

特定のACAT1阻害剤は、当該技術分野で既知である。例えば、特定の実施形態において、ACAT1阻害剤は、US2004/0038987、US20140044757、US20170292128、またはWO2015/038585に記載されるACAT1阻害剤である。ある特定の実施形態において、ACAT1阻害剤は、アバシミベ(CI-1011)、パクチミベ、パーパクチン、マナサンチンA、ジフェニルピリダジン誘導体、グリソブレニンA、CP113、818、K604、ピューベリオリドI、ピューベリオリドIII、U18666A、TMP-153、YM750、GERI-BP002-A、Sandoz Sah 58-035、VULM 1457、ロバスタチン、CI976、CL-283、546、CI-999、E5324、YM17E、FR182980、ATR-101(PD132301またはPD132301-2)、F-1394、HL-004、F-12511(エフルシミベ)、けい皮酸誘導体、けい皮誘導体、Dup 128、RP-73163、ピリピロペンC、FO-1289、AS-183、SPC-15549、FO-6979、Angekica、ニンジン、デクルシン、テルペンドールC、ピューベリシン、スピリドン、pentacecicides、CL-283、546、ベツリニン酸、シコニン誘導体、エスクレオゲニンA、Wu-V-23、ピリピロペン誘導体A、B及びD、glisoprenin B-D、サウセルネオールB、セスペンドール、ピロカルボン酸ジエチル、ポーベリオリド類似体、アカテリン、DL-メリナミド、PD 138142-15、CL277、082、EAB-309、エンニアチン抗生物質、エピ-コクリオキノンA、FCE-27677、FR186485、FR190809、NTE-122、オボバトール、パナキサジオール、プロトパナキサジオール、ポリアセチレン、Sah 57-118、AS-186、BW-447A、447C88、T-2591、TEI-6522、TEI-6620、XP 767、XR 920、GERI-BP001、ゴミシンN、ギブセチン、ヘルミントスポロール、TS-962、A 922500(CAS 959122-11-3)、N-[3-(4-ヒドロキシフェニル)-1-オキソ-2-プロペニル]-L-フェニルアラニン、メチルエステル(CAS 615264-52-3)、3,4-ジヒドロキシヒドロけい皮酸(L-アスパラギン酸ジベンジルエステル)アミド(CAS 615264-62-5)、CI-976、FR14523(Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd.)、F1394(Fujirebio Inc.)、isochromophilonones、kudingosides、ラテリチン、ナリングニン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態において、ACAT1阻害剤は、CP-113、818、CI-1011、またはK-604である。ある特定の実施形態において、ACAT1阻害剤は、K-604である。

【0152】

ある特定の実施形態において、追加の治療薬は、本明細書に記載される薬剤である。

【0153】

投与

治療薬(例えば、アゴニスト抗TREM2抗体または追加の治療薬)は、薬学的組成物として製剤化され、静脈内、筋肉内、局所または皮下経路によって、選択された投与経路に、すなわち、経口的または非経口的に適合した様々な形態のヒト患者などの哺乳動物宿主に投与することができる。

【0154】

したがって、治療薬は、不活性希釈剤または吸収可能な可食担体等の薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、例えば経口(例えば、飲料水に添加)で全身に投与されてもよ

10

20

30

40

50

い。それらは、ハードまたはソフトシエルのゼラチンカプセルに封入されてもよく、錠剤に圧縮されてもよく、または患者の食事の食物に直接組み込まれてもよい。経口的な治療投与のために、治療薬は、1つ以上の賦形剤と組み合わせられ、摂取可能な錠剤、口腔錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェーハ等の形態で使用されてもよい。かかる組成物及び調製物は、概して、薬剤の少なくとも0.1%を含有する。組成物及び調製物のパーセンテージは、もちろん変化してもよく、都合よく所与の単位剤形の重量の約2~約60%であってもよい。かかる治療上有用な組成物中の薬剤の量は、有効な用量レベルが得られるようになる。

【0155】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル等はまた、以下を含有してもよい：結合剤、例えば、トラガカンスガム、アカシア、トウモロコシデンプン、もしくはゼラチン；賦形剤、例えば、リン酸ニカルシウム；崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸等；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム；及び甘味剤、例えば、スクロース、フルクトース、ラクトースもしくはアスパルテーム；または香味剤、例えば、ペパーミント、冬緑油、もしくはチェリー風味を添加してもよい。単位剤形がカプセルである場合、上記の種類 material に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体担体を含んでもよい。様々な他の材料は、被覆として存在し得るか、またはそれ以外の場合、固体単位剤形の物理的形態を修飾するために存在してもよい。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルは、ゼラチン、ワックス、シェラック、または糖などでコーティングされてもよい。シロップまたはエリキシルは、治療薬、甘味剤としてのスクロースまたはフルクトース、防腐剤としてのメチル及びプロピルパラベン、染料、ならびにチェリーまたはオレンジの風味などの調味料を含んでもよい。もちろん、任意の単位剤形の調製に使用される任意の材料は、薬学的に許容され、使用される量で実質的に無毒である必要がある。加えて、治療薬は、持続放出調製物及びデバイスに組み込んでもよい。

【0156】

治療薬は、点滴または注射によって静脈内または腹腔内投与されてもよい。治療薬またはその塩の溶液は、任意選択で非毒性界面活性剤と混合した、水中で調製されてもよい。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、及びそれらの混合物、ならびに油中で調製されてもよい。通常の保管及び使用条件下で、これらの調製物は、微生物増殖を阻止するための保存料を含有する。

【0157】

注射または注射に適した薬学的剤形は、滅菌水溶液、またはリポソームに任意に封入された滅菌注射液もしくは不溶解液もしくは分散液を即時調製するために適合される活性成分を含む分散液もしくは滅菌粉末を含み得る。いずれの場合においても、最終剤形は、製造及び保存条件下で滅菌、流体及び安定でなければならない。液体担体または溶媒は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、植物油、無毒グリセリルエステル、及びそれらの好適な混合物を含む溶媒または液体分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、リポソームの形成によって、分散の場合は必要な粒径を維持することによって、または界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物作用の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等の種々の抗菌剤及び抗真菌剤によってもたらされ得る。多くの場合、それは、等張化剤、例えば、糖、緩衝液または塩化ナトリウムを含み得る。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤の組成物、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン中での使用によってもたらされ得る。

【0158】

滅菌注射溶液は、必要に応じて、上に列挙される他の成分の様々なものを含む適切な溶媒に、必要とされる量の治療薬を組み込み、その後で濾過滅菌することによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌粉末は真空乾燥及び凍結乾燥技術によって調製することができ、予め滅菌濾過した溶液中に存在する活性成分及び任意の追加の所望の成分の粉末を得る。

10

20

30

40

50

【0159】

局所投与のために、治療薬は、純粋な形態で、すなわち、それらが液体である場合に、適用され得る。しかしながら、それらを、固体または液体であり得る皮膚科的に許容される担体と組み合わせて、組成物または製剤として皮膚に投与することが一般的に望ましいであろう。

【0160】

有用な固体担体としては、タルク、粘土、微結晶セルロース、シリカ、アルミナ等の微細分割固体が挙げられる。有用な液体担体としては、治療薬が、任意に非毒性界面活性剤を用いて、有効レベルで溶解または分散することができる、水、アルコールもしくはグリコール、または水-アルコール/グリコールブレンドが挙げられる。香料及び追加の抗菌剤等のアジュバントを添加して、所与の使用のための特性を最適化することができる。得られた液体組成物は、吸収パッドから適用することができ、包帯及び他のドレッシング材を
10
含浸させるために使用するか、またはポンプタイプもしくはエアロゾルスプレーヤーを使用して患部にスプレーすることができる。

【0161】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸及びエステル、脂肪アルコール、修飾セルロースまたは修飾ミネラル材料等の増粘剤も、液体担体と共に使用して、使用者の皮膚に直接塗布するための伸び広がり易いペースト、ゲル、軟膏、石鹸等を形成することができる。

【0162】

治療薬を皮膚に送達するために使用することができる有用な皮膚科組成物の例としては、当該技術分野では、次が既知である：例えば、Jacquet et al. (米国特許第4,608,392号)、Geria (米国特許第4,992,478号)、Smith et al. (米国特許第4,559,157号)、及びWortzman (米国特許第4,820,508号)。
20

【0163】

治療薬の有用な投薬量は、動物モデルにおけるそれらのインビトロ活性及びインビボ活性を比較することによって決定することができる。マウス及び他の動物における有効用量をヒトに対して推定するための方法は、当該技術分野に既知であり、例えば、米国特許第4,938,949号を参照されたい。

【0164】

治療で使用するために必要とされる治療薬、またはその活性塩もしくは誘導体の量は、選択される特定の塩だけでなく、投与経路、治療される状態の性質、及び患者の年齢及び状態によっても変化し、最終的には、担当医または臨床医の裁量による。
30

【0165】

治療薬は、単位剤形で都合よく製剤化され得る。一実施形態において、かかる単位剤形に製剤化された治療薬を含む組成物が使用され得る。

【0166】

所望の用量は、好都合に、単回用量で、または適切な間隔で投与される分割用量として、例えば、1日当たり2、3、4回以上の副用量として提示され得る。副用量自体は、例えば、インシュフラレータからの複数の吸入、または複数の滴を眼に適用することによって、いくつかの離散したゆるやかな間隔の投与にさらに分けられてもよい。
40

【0167】

ある特定の実施形態において、アゴニスト抗TREM2抗体が、哺乳動物に投与される。ある特定の実施形態において、追加の治療薬が、哺乳動物にさらに投与される(例えば、RXRアゴニスト、LXRアゴニスト、ACAT1阻害剤、または脂質調節不全/炎症の治療に有用な他の薬剤)。これらの薬剤のうち2つ以上の組み合わせが投与される場合、それらは、同時にまたは連続的に投与されてもよい。ある特定の実施形態において、2つ以上の薬剤が、順次投与される。ある特定の実施形態において、2つ以上の薬剤が、同時に投与される。ある特定の実施形態において、2つ以上の薬剤の組み合わせを含む薬学的組成物が投与される。例えば、一実施形態では、アゴニスト抗TREM2抗体、少なく
50

とも1つの他の治療薬、ならびに薬学的に許容される希釈剤または担体を含む組成物は、脂質代謝調節不全及び/または炎症の治療に使用するために提供される。

【0168】

ある特定の実施形態はまた、アゴニスト抗TREM2、パッケージ材料、ならびにアゴニスト抗TREM2抗体を動物に投与して脂質代謝調節不全及び/または炎症を治療するための説明書を含むキットを提供する。ある特定の実施形態において、キットは、少なくとも1つの他の治療薬をさらに含む。

【0169】

濃縮CNS細胞集団を単離する方法

脳組織からCNS細胞型の濃縮集団を単離する方法（例えば、星状膠細胞またはミクログリア細胞の濃縮集団）が本明細書に提供される。 10

【0170】

したがって、ある特定の実施形態は、組織試料からCNS細胞の集団を選別する方法であって、

(a) 組織試料を、抗CD45一次抗体、抗CD11b一次抗体、及び抗星状膠細胞表面抗原-2 (ACSA-2) 一次抗体（各一次抗体は一意に標識される）と接触させて、標識された組織試料を提供することと、

(b) 標識された組織試料中の細胞をフローサイトメトリーにより選別することと、を含み、

方法が、星状膠細胞及びミクログリア細胞の異なる細胞集団を提供する、方法を、提供する。 20

【0171】

本明細書で使用される場合、「別個の細胞集団」という用語は、特定のCNS細胞型（例えば、ニューロンまたは星状膠細胞）に対して濃縮された細胞の物理的に別個の集団を指す。

【0172】

特定の実施形態はまた、本明細書に記載の方法（例えば、選別されたミクログリア細胞集団または選別された星状膠細胞集団）を使用して単離された選別された別個の細胞集団を含む組成物を提供する。

【0173】

ある特定の実施形態において、ミクログリア細胞集団は、以下のマーカープロファイルに基づいて選別される：CD45^{low}/CD11b⁺/ACSA-2⁻。 30

【0174】

ある特定の実施形態において、星状膠細胞集団は、以下のマーカープロファイルに基づいて選別される：CD45⁻/CD11b⁻/ACSA-2⁺。

【0175】

ある特定の実施形態は、2つの物理的に別個の細胞集団を含むCNS細胞の集合であって、第1の細胞集団が、CD45^{low}/CD11b⁺/ACSA-2⁻細胞の濃縮集団を含み、第2の細胞集団が、濃縮集団CD45⁻/CD11b⁻/ACSA-2⁺細胞を含む、CNS細胞の集合を提供する。 40

【0176】

本明細書に記載されるように、抗CD45一次抗体及び抗CD11b抗体の組み合わせを使用して、他のCNS細胞型から濃縮されたミクログリア細胞集団を単離することができる。CD45、別名、白血球共通抗原(LCA)及びタンパク質チロシンホスファターゼ受容体C型(PTPRC)は、赤血球及び血小板を除き、ほとんどの造血細胞によって様々なレベルで発現される細胞表面抗原である。CD45は、ミクログリア細胞において低レベルで発現し、星状膠細胞によって発現せず、マクロファージ等の特定の非ミクログリア非星状膠細胞において高レベルで発現する。したがって、抗CD45一次抗体を使用して、CD45細胞表面マーカー(CD45⁺)を発現する細胞を標識し得、フローサイトメトリーを使用して、低レベルでCD45を発現する標識細胞（例えば、CD45^{low} 50

マイクログリア細胞)を単離し得る。CD45^{low}細胞を特定し、カットオフ基準値に基づいてCD45^{high}細胞から分離してもよい。例えば、参照値は、対照細胞または対照細胞集団、例えば、既知のマイクログリア細胞(複数可)または既知のCD45^{high}細胞におけるCD45発現の量であり得る。いくつかの実施形態において、基準値は、例えば、基準値が複数の試料から取得されるときに値の範囲である。さらに、基準値は、標準偏差または誤差基準の有無にかかわらず、単一の値(例えば、測定された存在量値、平均値、または中央値)または値の範囲として提示され得る。

【0177】

CD11bは、CD18と対形成してCR3ヘテロ二量体を形成するインテグリンファミリーメンバーである。CD11bは、マクrophage及びマイクログリア細胞を含む様々な細胞型で発現されるが、星状膠細胞によって発現されない。したがって、CD11b細胞表面マーカーを発現する細胞を標識するために抗CD11b一次抗体を使用してもよく、標識細胞(例えば、CD11b⁺マイクログリア細胞)を単離するためにフローサイトメトリーを使用してもよい。

10

【0178】

抗ACSA-2抗体は、星状膠細胞によって発現されるグリコシル化表面分子を認識する。対照的に、この表面分子は、ニューロン、オリゴデンドロサイト、NG2⁺細胞、マイクログリア、内皮細胞、白血球、または赤血球等のCNS中の非星状膠細胞によって発現されない(Kantzer et al., 2017, *Glia*, 65:990-1004)。したがって、ACSA-2細胞表面マーカーを発現する細胞を標識するために抗ACSA-2一次抗体を使用してもよく、標識細胞(例えば、ACSA-2⁺星状膠細胞)を単離するためにフローサイトメトリーを使用してもよい。

20

【0179】

ある特定の実施形態において、一次抗体は、組成物内に含まれ、組織試料は、組成物(例えば、抗ACSA-2抗体、抗CD11b抗体、及び抗CD45抗体を含む組成物)と接触させる。ある特定の実施形態において、各一次抗体は、フローサイトメトリーによる選別に好適な標識(例えば、蛍光標識)で一意に標識される(すなわち、組成物中の各抗体は異なる標識を含む)。ある特定の実施形態において、組成物は生存能染料をさらに含み、生存細胞と非生存細胞をフローサイトメトリーによって区別するために使用され得る(例えば、Fixable Viability Stain BV510)。ある特定の

30

【0180】

ある特定の実施形態において、組織試料内に存在する細胞は、生存能染料及び/または組成物と接触する前に解離される。

【0181】

ある特定の実施形態において、組織試料は、抗体がその対応するマーカーに結合し、細胞を標識するのに好適な条件下で組成物と接触される。ある特定の実施形態において、フローサイトメトリーによってソートされる前の標識された組織試料は、標識されたACSA-2⁺細胞、標識されたCD45⁺細胞、及び標識されたCD11b⁺細胞を含む。ある

40

【0182】

ある特定の実施形態において、組織試料内に存在する細胞は、非生存細胞の集団及び生存細胞の集団にフローサイトメトリーによって選別される(例えば、生存能染料を用いて)。

【0183】

ある特定の実施形態において、組織試料内に存在する細胞は、フローサイトメトリーによって、CD45⁺細胞の集団及びCD45⁻細胞の集団に選別される。特定の実施形態において、CD45⁺細胞の集団は、フローサイトメトリーによってCD45^{low}細胞の集団及びCD45^{high}細胞の集団に選別される。

50

【0184】

ある特定の実施形態において、組織試料内に存在する細胞は、フローサイトメトリーによって、CD11b⁺細胞の集団及びCD11b⁻細胞の集団に選別される。

【0185】

ある特定の実施形態において、組織試料内に存在する細胞は、フローサイトメトリーによって、ACSA-2⁺細胞の集団及びACSA-2⁻細胞の集団にソートされる。

【0186】

標識細胞は、CD45^{low}/CD11b⁺/ACSA-2⁻マイクログリア細胞の単離された集団及びCD45⁻/CD11b⁻/ACSA-2⁺星状膠細胞の単離された集団をもたらす任意のゲーティング組み合わせを使用して、フローサイトメトリーによって選別され得る。例えば、特定の実施形態において、組織試料内に存在する細胞は、フローサイトメトリーによって、非生存細胞の集団及び生存細胞の集団に選別される（例えば、生存能染料を用いて）。特定の実施形態において、生存細胞の集団は、フローサイトメトリーによって、CD11b⁺細胞の集団及びCD11b⁻細胞の集団に選別される。特定の実施形態において、CD11b⁺細胞の集団は、CD45⁺細胞の集団及びCD45⁻細胞の集団にさらに選別される。特定の実施形態において、CD11b⁺/CD45⁺細胞の集団は、フローサイトメトリーによって、CD11b⁺/CD45^{low}細胞の集団及びCD11b⁺/CD45^{high}細胞の集団に選別される。特定の実施形態において、CD11b⁻細胞の集団は、フローサイトメトリーによって、ACSA-2⁺細胞の集団及びACSA-2⁻細胞の集団に選別される。そのような選別は、CD45^{low}/CD11b⁺/ACSA-2⁻マイクログリア細胞の集団及びCD45⁻/CD11b⁻/ACSA-2⁺星状膠細胞の集団をもたらす。

【0187】

特定の実施形態において、濃縮された星状膠細胞の選別集団（例えば、生存、CD45⁻、CD11b⁻、ACSA-2⁺細胞）は、約25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%未満の非星状膠細胞を含む。ある特定の実施形態において、濃縮された星細胞の選別集団は、非星状膠細胞を含有しない。

【0188】

特定の実施形態において、濃縮された星状膠細胞の選別集団（例えば、生存、CD45^{low}、CD11b⁺、ACSA-2⁻細胞）は、約25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%未満の非星状膠細胞を含む。ある特定の実施形態において、濃縮されたマイクログリア細胞の選別集団は、（非マイクログリア細胞を含有しない）。

【0189】

特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団は、代謝種（例えば、脂質種）または核酸種の定量化のために分析される。ある特定の実施形態において、濃縮された星状膠細胞集団は、代謝種または核酸種の定量化のために分析される。ある特定の実施形態において、濃縮されたマイクログリア細胞集団は、代謝種または核酸種の定量化のために分析される。ある特定の実施形態において、濃縮された星状膠細胞集団及びマイクログリア細胞集団を、代謝または核酸種の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団を、代謝種の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団を、2つ以上の代謝種（例えば、2、3、4、5、10、25、50個以上）の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団を、核酸種の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団を、2つ以上の核酸種（例えば、2、3、4、5、10、25、50個以上）の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団を、代謝種及び核酸種の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団を、2つ以上の代謝種及

10

20

30

40

50

び2つ以上の核酸種の定量化のために分析する。

【0190】

本明細書で使用される場合、代謝種という用語は、脂質種等の巨大分子を含む。例えば、特定の実施形態において、代謝種は、本明細書に記載の脂質種（例えば、コレステリルエステル種）などの脂質種である。ある特定の実施形態において、代謝種の組み合わせ、例えば、本明細書に記載の脂質の組み合わせを定量化する。代謝種は、当該技術分野で既知の方法を使用して定量化され得る。例えば、代謝種は、液体クロマトグラフィー質量分析（LCMS）アッセイを使用して定量化され得る（例えば、実施例を参照されたい）。

【0191】

核酸は、例えば、ゲノムDNA、ゲノムDNAから転写されるRNA、またはRNAから生成されるcDNA等のRNAまたはDNAであってもよい。ある特定の実施形態において、核酸種は、RNAである。ある特定の実施形態において、核酸種は、DNAである。ある特定の実施形態において、核酸種は、ゲノムDNAである。核酸種を定量化する方法は当該技術分野において既知である。例えば、かかる方法には、定量的PCR（qPCR）及びリアルタイム定量的逆転写PCR（qRT-PCR）、RNA配列、ノーザンブロット分析、発現マイクロアレイ分析、次世代配列決定（NGS）、ならびに蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）を含む、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、核酸種は、本明細書に記載のアッセイを使用して定量化される。

【0192】

ある特定の実施形態において、1つ以上の濃縮された細胞集団を、投与される治療薬の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、濃縮された星状膠細胞集団を、投与された治療薬の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、濃縮されたマイクログリア細胞集団を、投与された治療薬の定量化のために分析する。ある特定の実施形態において、濃縮された星状膠細胞集団及びマイクログリア細胞集団を、投与された治療薬の定量化のために分析される。治療薬を定量するための方法は当該技術分野で既知であり、本明細書に記載される。

【0193】

特定の技術

本明細書で使用される場合、「生理学的試料」という語句は、タンパク質、脂質、及び/または核酸を含有する対象から得られた生体試料を指すことを意味する。したがって、試料は、核酸、脂質、またはタンパク質レベルで評価され得る。ある特定の実施形態において、生理学的試料は、組織、脳脊髄液（CSF）、尿、血液、血清、または血漿を含む。ある特定の実施形態において、試料は、組織を含む（例えば、マイクログリアを含む）。ある特定の実施形態において、試料は、CSFを含む。ある特定の実施形態において、試料は、血液及び/または血漿を含む。

【0194】

生物学的試料は、当業者に既知の方法を用いて得られ得る。生物学的試料は、脊椎動物、特に哺乳動物から得られ得る。DNA、RNAまたはタンパク質の多様性（例えば、変異、発現または局在化）は、試料から検出され得る。

【0195】

核酸は、例えば、ゲノムDNA、ゲノムDNAから転写されるRNA、またはRNAから生成されるcDNAであり得る。核酸またはタンパク質は、脊椎動物、例えば、哺乳動物に由来し得る。核酸またはタンパク質は、その供給源から直接得られる場合、またはその供給源に見出される核酸のコピーである場合、特定の供給源に「由来する」と言われる。

【0196】

特定の実施形態において、ゲノムDNAは、生体試料から単離され、検出アッセイにおいて分析され得る。ある特定の実施形態において、mRNAは、生体試料から単離され、検出アッセイにおいて分析される。特定の実施形態において、生体試料から単離されたmRNAは、cDNAを生成するために逆転写され得る。

10

20

30

40

50

【0197】

核酸及びアミノ酸配列の多様性は、当業者に既知のある特定の方法によって検出され得る。同様に、核酸発現（例えば、mRNA発現）は、当該技術分野で既知の方法を使用して検出され得る。かかる方法としては、定量的PCR（qPCR）及びリアルタイム定量的逆転写PCR（qRT-PCR）を含むポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ノーザンブロット分析、発現マイクロアレイ分析、次世代配列決定（NGS）、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）、DNA配列決定、対立遺伝子特異的ヌクレオチド取り込みアッセイ及び対立遺伝子特異的プライマー伸長アッセイ（例えば、対立遺伝子特異的PCR、対立遺伝子特異的ライゲーション連鎖反応（LCR）、及びギャップ-LCR）を含むプライマー伸長アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ）、切断剤からの保護を使用して核酸二本鎖中のミスマッチ塩基を検出する切断保護アッセイ、MutSタンパク質結合の分析、バリエーション及び野生型核酸分子の移動度を比較する電気泳動分析、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE、例えば、Myers et al. (1985) Nature 313: 495におけるような）、塩基対におけるミスマッチ塩基対におけるRNase切断の分析、ヘテロ二本鎖DNAの化学的切断または酵素的切断の分析、質量分析法（例えば、MALDI-TOF）、遺伝子ビット解析（GBA）、5'ヌクレアーゼアッセイ（例えば、TaqMan（登録商標）、及びモレキュラービーコンを使用するアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0198】

ある特定の実施形態において、タンパク質発現も検出し得る。タンパク質発現を検出及び測定するためのアッセイは当該技術分野において既知であり、例えば、ウェスタンブロット分析、免疫蛍光、免疫組織化学（例えば、組織アレイの）などを含む。

20

【0199】

ある特定の実施形態において、マクロファージは、当該技術分野で既知であるか、または本明細書に記載されるアッセイを用いて評価される。ある特定の実施形態において、iPSCは、当該技術分野で既知であるか、または本明細書に記載されるアッセイを使用して評価される。ある特定の実施形態において、マイクログリア細胞は、当該技術分野で既知であるか、または本明細書に記載されるアッセイを使用して評価される。ある特定の実施形態において、iPSCから分化されたマイクログリア細胞は、当該技術分野で既知であるか、または本明細書に記載されるアッセイを使用して評価される。

30

【0200】

特定の定義

「対照」または「対照試料」という用語は、使用される検出技術に適切な任意の試料を指す。対照試料は、使用される検出技術の生成物または試験される材料を含んでもよい。さらに、対照は、陽性対照または陰性対照であってもよい。

【0201】

用語「遺伝子」は、生物学的機能に関連する核酸の任意の断片を指すために広く使用される。遺伝子には、コード配列及び/またはそれらの発現に必要な制御配列が含まれる。例えば、遺伝子は、その制御配列を含む、mRNA、機能性RNA、または特定のタンパク質を発現する核酸断片を指す。遺伝子はまた、例えば、他のタンパク質の認識配列を形成する非発現DNA断片も含む。遺伝子は、目的の源由来のクローニングまたは既知のまたは予測される配列情報由来の合成を含む様々な源から得られ、所望のパラメータを有するように設計された配列を含み得る。加えて、「遺伝子」または「組換え遺伝子」は、オープンリーディングフレームを含み、少なくとも1つのエクソン及び（任意選択で）イントロン配列を含む核酸分子を指す。用語「イントロン」は、タンパク質に翻訳されず、概してエクソン間で見出される所与の遺伝子内に存在するDNA配列を指す。

40

【0202】

「変異遺伝子」または「変異」または「機能的変異」は、変異遺伝子を有しない対象と比較して、変異遺伝子を有する対象の表現型を変更することができる遺伝子の対立遺伝子形

50

態を指す。

【0203】

分子の「バリエーション」は、天然分子の配列と実質的に類似する配列である。ヌクレオチド配列については、バリエーションには、遺伝コードの縮重に起因して、天然タンパク質の同一のアミノ酸配列をコードする配列が含まれる。これらのような天然に存在する対立遺伝子バリエーションは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びハイブリダイゼーション技術と同様に、周知の分子生物学的技法を使用して同定することができる。バリエーションヌクレオチド配列はまた、合成由来ヌクレオチド配列、例えば、天然タンパク質をコードする部位特異的突然変異誘発、ならびにアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードするものを使用することによって生成されるものなども含む。一般に、本明細書で開示されるヌクレオチド配列バリエーションは、少なくとも1つの実施形態では、天然（内因性）ヌクレオチド配列に対して40%、50%、60%、~70%、例えば、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、~79%、概して少なくとも80%、例えば、81%~84%、少なくとも85%、例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、~98%、配列同一性を有する。

10

【0204】

本明細書で使用される場合、用語「特異的にハイブリダイズする」または核酸に関して「特異的に検出する」は、試料核酸の少なくとも約6個の連続するヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子の能力を指す。

20

【0205】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、及び「ポリペプチド」は、本明細書において互換的に使用される。

【0206】

「自然発生型」、「ネイティブ型」または「野生型」は、人工的に産生されるものとは異なるものとして自然界に見出すことができるオブジェクトを説明するために使用される。例えば、天然の供給源から単離され得、かつ実験室において意図的に修飾されていない、生物（ウイルスを含む）中に存在するヌクレオチド配列は、天然に存在する。さらに、「野生型」とは、いかなる既知の変異もなく、自然界で見出される正常な遺伝子または生物を指す。

30

【0207】

以下の用語は、2つ以上の核酸、ポリヌクレオチド、またはポリペプチド間の配列関係を説明するために使用される：（a）「参照配列」、（b）「比較ウィンドウ」、（c）「配列同一性」、（d）「配列同一性の百分率」、及び（e）「実質的同一性」。

（a）本明細書で使用される場合、「参照配列」は、配列比較のための基礎として使用される定義された配列である。参照配列は、特定の配列のサブセットまたは全体であってもよく、例えば、全長cDNAもしくは遺伝子配列のセグメントとして、または完全cDNAもしくは遺伝子配列としてであってもよい。

（b）本明細書で使用する場合、「比較ウィンドウ」は、ポリヌクレオチド配列の連続した特定のセグメントを指し、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列は、2つの配列の最適なアラインメントのために、参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（即ち、ギャップ）を含んでもよい。一般に、比較ウィンドウは、少なくとも20個の連続するヌクレオチド長であり、任意に、30個、40個、50個、100個、またはそれより長くあり得る。当業者であれば、ポリヌクレオチド配列にギャップが含まれることによる参照配列との高い類似性を回避するために、ギャップペナルティが典型的に導入され、適合の数から減算されることを理解するであろう。

40

【0208】

比較のための配列のアラインメントの方法は、当該技術分野において周知である。したがって、任意の2つの配列間の同一性一致度の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

50

【0209】

配列同一性を決定するための配列の比較のために、これらの数学的アルゴリズムのコンピュータ実装を利用することができる。そのような実装は、以下を含むが、これらに限定されない：PC / 遺伝子プログラムのCLUSTAL (Intelligent, Mountain View, Californiaから入手可能) ; Wisconsin Genetics Software Package, Version 8 (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USAから入手可能) のALIGNプログラム (バージョン2.0) 及びGAP, BESTFIT, BLAST, FASTA、及びTFASTA。これらのプログラムを使用するアラインメントは、デフォルトパラメータを使用して実行することができる。

【0210】

BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター (World Wide Web ncbi.nlm.nih.govを参照されたい) により公開されている。このアルゴリズムでは、最初にクエリ配列内の長さWの短い単語を識別することにより、高スコアの配列対 (HSP) を識別し、これは、データベース配列内の同じ長さの単語とアラインメントされたときに正の値の閾値スコアTに一致するかそれを満たす。Tは、近傍単語スコア閾値と呼ばれる。これらの最初の近隣単語ヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するためのシードとして機能する。次いで、単語ヒットは、累積アラインメントスコアを増やすことができる限り、各配列に沿って両方向に拡張される。累積スコアは、ヌクレオチド配列について、パラメータM (一对のマッチング残基についての報酬スコア、常に > 0) 及びN (ミスマッチング残基についてのペナルティスコア、常に < 0) を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを計算する。各方向の単語ヒットの拡張は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から数量Xだけ低下する、1つ以上の負のスコアの残基アラインメントの蓄積により累積スコアがゼロ以下になる、またはいずれかの配列の末端に到達したときに、停止される。

【0211】

配列同一性の百分率の計算に加えて、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析も実行する。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小の合計確率 ($P(N)$) であり、これは、2つのヌクレオチド間の一致またはアミノ酸配列間の一致が偶然に起こる確率の指標を提供する。例えば、試験核酸配列と参照核酸配列との比較における最小の合計確率が約0.1未満、約0.01未満、またはさらに約0.001未満である場合、その試験核酸配列はその参照配列と類似しているとみなされる。

【0212】

比較目的でギャップのあるアラインメントを得るために、Gapped BLAST (BLAST 2.0) を利用することができる。あるいは、PSI-BLAST (BLAST 2.0) を使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を行うことができる。BLAST、Gapped BLAST、PSI-BLASTの使用時には、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ (例えば、ヌクレオチド配列のBLASTN、タンパク質のBLASTX) を使用することができる。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列について) は、デフォルトとして、11のワード長 (W)、10の期待値 (E)、100のカットオフ、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、及び両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長さ (W)、10の期待値 (E)、及びBLOSUM62スコアリング行列を使用する。[Ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)のワールドワイドウェブを参照されたい。アラインメントは、目視検査によって手動で行うこともできる。

【0213】

本明細書に開示されるプロモーター配列との配列同一性の百分率を決定するためのヌクレ

オチド配列の比較は、BlastNプログラム（バージョン1.4.7以降）をそのデフォルトパラメータまたは任意の等価プログラムと共に使用して行うことができる。「同等のプログラム」は、当該の任意の2つの配列に関して、BLASTプログラムによって生成された対応するアラインメントと比較したとき、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基マッチ及び同一の配列同一性の百分率を有するアラインメントを生成する、任意の配列比較プログラムが意図されている。

【0214】

(c) 本明細書で使用される場合、2つの核酸配列またはポリペプチド配列に関して「配列同一性」または「同一性」は、配列比較アルゴリズムによって、または目視検査によって測定される、指定された比較ウィンドウにわたって最大限に一致するようにアラインメントされたときに同じである2つの配列中の残基の特定の百分率を参照する。配列同一性の百分率がタンパク質に関して使用されるとき、同一でない残基部分は、多くの場合、保存的アミノ酸置換によって異なることが認識され、この保存的アミノ酸置換において、アミノ酸残基は、同様の化学特性（例えば、電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基と置換され、したがって、分子の機能特性を変化させない。配列が保存的置換の点で異なるるとき、配列同一性の百分率は、置換の保存的性質を補正するように上方調節されてもよい。かかる保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると称される。この調節を行うための手段は、当業者によく知られている。通常は、これは、保存的置換を完全なミスマッチよりもむしろ部分的なミスマッチとしてスコアリングし、それにより、配列同一性の百分率を増加させることを伴う。したがって、例えば、同一アミノ酸に1のスコアが与えられ、非保存的置換にゼロのスコアが与えられる場合、保存的置換は、ゼロ～1の間のスコアが与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムPC/GENE (Intelligentics, Mountain View, California) で実装されるように計算される。

10

20

【0215】

(d) 本明細書で使用される場合、「配列同一性の百分率」は、比較ウィンドウにわたって2つの最適にアラインメントされた配列を比較することによって決定された値を意味し、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントのために、参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。百分率は、同一核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中で生じる位置の数を決定して、マッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除算し、その結果に100を乗算して、配列同一性の百分率を得ることによって計算される。

30

【0216】

(e) (i) ポリヌクレオチド配列の「実質的同一性」という用語は、ポリヌクレオチドが、標準パラメータを使用して記載されるアラインメントプログラムのうちの1つを使用する参照配列と比較して、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、もしくは79%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、もしくは89%、少なくとも90%、91%、92%、93%、もしくは94%、またはさらには少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。当業者であれば、これらの値を適切に調整して、コドン変性、アミノ酸類似性、リーディングフレーム位置決め等を考慮することによって、2つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定することができることを認識するであろう。これらの目的のためのアミノ酸配列の実質的同一性は、通常、少なくとも70%、または少なくとも80%、90%、またはさらには少なくとも95%の配列同一性を意味する。

40

【0217】

ヌクレオチド配列が実質的に同一であるという別の指標は、2つの分子がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズする場合である（以下を参照されたい）。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度及びpHでの特定の配列についての熱融

50

解点 (T_m) よりも約 5 低くなるように選択される。しかしながら、ストリンジェントな条件は、本明細書で別途制限が加えられるような所望のストリンジェンシーの程度に応じて、約 1 ~ 約 20 の範囲内の温度を包含する。ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一である場合、依然として実質的に同一である。これは、例えば、遺伝コードによって許容される最大コドン変性を使用して核酸のコピーが作成されるときに生じ得る。2つの核酸配列が実質的に同一である1つの指標は、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であるときである。

【0218】

(e) (ii) ペプチドの文脈における「実質的同一性」という用語は、ペプチドが、指定された比較ウィンドウにわたって参照配列と少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、もしくは79%、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、もしくは89%、または少なくとも90%、91%、92%、93%、もしくは94%、またはさらには少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含むことを示す。2つのペプチド配列が実質的に同一であるという指標は、1つのペプチドが、第2のペプチドに対して産生された抗体と免疫学的に反応性であることである。したがって、ペプチドは、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、第2のペプチドと実質的に同一である。

10

【0219】

配列比較のために、通常は、1つの配列は、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列と参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて、部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列(複数可)の配列同一性百分率を計算する。

20

【0220】

用語「RNA転写物」は、DNA配列のRNAポリメラーゼ触媒転写から得られる生成物を指す。RNA転写物がDNA配列の完全な相補的コピーである場合、それは一次転写物と称されるか、または一次転写物の転写後処理に由来するRNA配列であってよく、成熟RNAと称される。「メッセンジャーRNA」(mRNA)は、イントロンを含まず、細胞によってタンパク質に翻訳され得るRNAを指す。「cDNA」は、mRNAに相補的であり、mRNAに由来する一本鎖または二本鎖DNAを指す。

30

【0221】

本明細書で使用される場合、「治療」(及び「治療する」または「治療すること」などのその文法的変形)は、治療される個体の自然経過を変化させるための臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理学の経過中のいずれかのために実施され得る。治療の望ましい効果としては、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、ならびに寛解または予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。

【0222】

語句「有効量」は、(i)特定の疾患、状態もしくは障害を治療もしくは予防するか、(ii)特定の疾患、状態もしくは障害の1つ以上の症状を軽減、改善もしくは排除するか、または(iii)本明細書に記載の特定の疾患、状態もしくは障害の1つ以上の症状を予防もしくは遅延させる、本明細書に記載の化合物の量を意味する。

40

【0223】

本明細書に開示される物質/分子の「治療的に有効な量」は、個体の病状、年齢、性別、及び体重等の因子、ならびに個体に所望の応答を誘発する物質/分子により異なり得る。治療有効量は、物質/分子のいずれの毒性または有害作用も治療上有益な効果が上回る量を包含する。「予防有効量」は、所望の予防結果を達成するために必要な投与量で必要な期間にわたる有効な量を指す。典型的には、必ずしもではないが、予防用量は、疾患の前

50

または早期に対象において使用されるため、予防有効量は、治療有効量よりも少ないであろう。

【0224】

「哺乳動物」という用語は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ハムスター、モルモット、ウサギ、家畜等の任意の哺乳動物種を指す。

【0225】

「患者から試料を得ること」、「患者から得られた」及び類似の語句は、患者から試料を直接得ること、ならびに中間個体を介して患者から間接的に試料を得ること（例えば、患者から試料を得た看護師から試料を得た宅配業者から試料を得ること）を指すために使用される。

10

【0226】

細胞組成物の文脈における「濃縮集団」という用語は、集団が、細胞が由来する組織内に見出されるものよりも実質的に大きい割合の特定の細胞型の量を含有することを意味する。指定された種類の細胞は、天然組織と比較して、少なくとも10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、500%、または1000%まで濃縮され得る。あるいは、細胞集団は、指定された細胞型の少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、または95%を含有し得る。

【0227】

特定の実施形態

本明細書に記載の特定の実施形態は、以下に含まれる。

20

【0228】

実施形態1．脂質代謝調節不全の治療を必要とする哺乳動物において脂質代謝調節不全を治療するための方法であって、有効量のアゴニスト抗TREM2（骨髄系細胞上に発現されるトリガー受容体2）抗体を前記哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

【0229】

実施形態2．前記哺乳動物においてTREM2を発現する細胞が、脂質代謝調節不全を示す、実施形態1に記載の方法。

【0230】

実施形態3．前記細胞が、ミクログリア細胞またはマクロファージである、実施形態2に記載の方法。

30

【0231】

実施形態4．前記哺乳動物が、低下したTREM2活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態1～3のいずれか1つに記載の方法。

【0232】

実施形態5．前記低下したTREM2活性は、低下したTREM2タンパク質レベルによって引き起こされる、実施形態4に記載の方法。

【0233】

実施形態6．前記低下したTREM2活性は、細胞表面タンパク質レベルの低下によって引き起こされる、実施形態4に記載の方法。

【0234】

実施形態7．前記低下したTREM2活性は、TREM2機能喪失または部分喪失型突然変異によって引き起こされる、実施形態4に記載の方法。

40

【0235】

実施形態8．前記哺乳動物が、低下したアポリポタンパク質E（ApoE）活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態1～7のいずれか1つに記載の方法。

【0236】

実施形態9．前記哺乳動物が、APOE機能喪失型もしくは機能部分喪失型突然変異またはコーディングパリアントを有するか、または有すると判定されている、実施形態8に記載の方法。

【0237】

50

実施形態 10 . 前記哺乳動物が、APOE 4 対立遺伝子を有するか、または有すると判定されている、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0238】

実施形態 11 . 前記哺乳動物が、APOE 4 対立遺伝子を有しないか、または有しないと判定されている、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0239】

実施形態 12 . 前記脂質代謝調節不全が、1 つ以上の脂質の蓄積の増加を含む、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0240】

実施形態 13 . 前記 1 つ以上の脂質の前記増加した蓄積が、細胞内である、実施形態 12 に記載の方法。 10

【0241】

実施形態 14 . 前記 1 つ以上の脂質が、ミクログリア細胞またはマクロファージにおいて細胞内に蓄積する、実施形態 13 に記載の方法。

【0242】

実施形態 15 . 前記 1 つ以上の脂質の前記増加した蓄積が、細胞外である、実施形態 12 に記載の方法。

【0243】

実施形態 16 . 前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸種(BMP)、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 38 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 44 : 12、リゾホスファチジルコリン 16 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 12 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【0244】

実施形態 17 . 前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステルを含む、実施形態 16 に記載の方法。

【0245】

実施形態 18 . 前記哺乳動物が、前記脂質代謝調節不全に関連する炎症を有する、実施形態 1 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

【0246】

実施形態 19 . 前記哺乳動物が、アルツハイマー病、那須・ハコラ病(NHD)、レビー小体病、パーキンソン病、網膜変性症(例えば、黄斑変性症)、ハンチントン病、前頭側頭葉変性症(FTD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C 型、肥満、2 型糖尿病、アルコール性または非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性または非アルコール性脂肪肝疾患、多発性硬化症、白質消失病、リウマチ性関節炎(RA)またはアテローム性硬化症を有するか、または発症しやすい、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0247】

実施形態 20 . 前記哺乳動物が、アルツハイマー病、那須・ハコラ病(NHD)、レビー小体病、パーキンソン病、網膜変性症、ハンチントン病、前頭側頭葉変性症(FTD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ニーマン・ピック病 A 型、ニーマン・ピック病 B 型、ニーマン・ピック病 C 型、多発性硬化症または白質消失病を有するか、または発症しやすい、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。 40

【0248】

実施形態 21 . 前記哺乳動物が、肥満、2 型糖尿病、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪肝疾患、関節リウマチ(RA)またはアテローム性動脈硬化症を有するか、または発症しやすい、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。 50

【 0 2 4 9 】

実施形態 22 . 前記哺乳動物が、アルツハイマー病を有するか、または発症しやすい、実施形態 19 に記載の方法。

【 0 2 5 0 】

実施形態 23 . 前記哺乳動物が、NHD を有するか、または NHD を発症しやすい、実施形態 19 に記載の方法。

【 0 2 5 1 】

実施形態 24 . 前記哺乳動物が、アテローム性動脈硬化症を有するか、または発症しやすい、実施形態 19 に記載の方法。

【 0 2 5 2 】

実施形態 25 . 前記哺乳動物が、C 型ニーマン・ピック病を有するか、または発症しやすい、実施形態 19 に記載の方法。

10

【 0 2 5 3 】

実施形態 26 . 前記アゴニスト抗 TREM2 抗体が、MAB 17291 または 78 . 18 である、実施形態 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 5 4 】

実施形態 27 . 前記アゴニスト抗 TREM2 抗体が、脂質蓄積を低減する、実施形態 1 ~ 26 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 5 5 】

実施形態 28 . 前記アゴニスト抗 TREM2 抗体が、コレステリルエステルの蓄積を低減する、実施形態 27 に記載の方法。

20

【 0 2 5 6 】

実施形態 29 . 前記アゴニスト抗 TREM2 抗体が、細胞内脂質蓄積を低減する、実施形態 27 または 28 に記載の方法。

【 0 2 5 7 】

実施形態 30 . 前記アゴニスト抗 TREM2 抗体が、細胞外脂質蓄積を低減する、実施形態 27 または 28 に記載の方法。

【 0 2 5 8 】

実施形態 31 . 前記投与が、少なくとも 1 つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減する、実施形態 1 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 2 5 9 】

実施形態 32 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、G - CSF、INF γ 、IL - 12 (p 40)、IL - 12 (p 70)、LIX (CXCL5)、MCP - 1 (CCL2)、MIG (CXCL9)、IL - 1 β 、IL - 1 α 、及び IL - 18 からなる群から選択される、実施形態 31 に記載の方法。

【 0 2 6 0 】

実施形態 33 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、IL - 1 β である、実施形態 32 に記載の方法。

【 0 2 6 1 】

実施形態 34 . 第 2 の治療薬を投与することをさらに含む、実施形態 1 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【 0 2 6 2 】

実施形態 35 . 前記第 2 の治療薬が、RXR アゴニスト、LXR アゴニスト、及びアセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ 1 (ACAT1) 阻害剤からなる群から選択される、実施形態 34 に記載の方法。

【 0 2 6 3 】

実施形態 36 . 前記第 2 の治療薬が、RXR アゴニストである、実施形態 35 に記載の方法。

【 0 2 6 4 】

実施形態 37 . 前記 RXR アゴニストが、ベキサロテンである、実施形態 36 に記載の方

50

法。

【 0 2 6 5 】

実施形態 3 8 . 前記第 2 の治療薬が、L X R アゴニストである、実施形態 3 5 に記載の方法。

【 0 2 6 6 】

実施形態 3 9 . 前記 L X R アゴニストが、G W 3 9 6 5 である、実施形態 3 8 に記載の方法。

【 0 2 6 7 】

実施形態 4 0 . 前記第 2 の治療薬が、アセチル - C o A アセチルトランスフェラーゼ 1 (A C A T 1) 阻害剤である、実施形態 3 5 に記載の方法。

10

【 0 2 6 8 】

実施形態 4 1 . 前記 A C A T 1 阻害剤が、C P - 1 1 3、8 1 8、C I - 1 0 1 1、または K - 6 0 4 である、実施形態 4 0 に記載の方法。

【 0 2 6 9 】

実施形態 4 2 . 前記 A C A T 1 阻害剤が、K - 6 0 4 である、実施形態 4 1 に記載の方法。

【 0 2 7 0 】

実施形態 4 3 . 前記第 2 の治療薬が、アルツハイマー病またはアテローム性動脈硬化症の治療に有用な薬剤である、実施形態 3 4 に記載の方法。

【 0 2 7 1 】

20

実施形態 4 4 . 脂質代謝調節不全の治療を必要とする患者において前記脂質代謝調節不全を治療する方法であって、

- 1) 前記患者から生体試料を得るか、または得ていることと、
- 2) 前記試料において低下した T R E M 2 活性、低下した A p o E 活性、または A P O E 4 対立遺伝子を検出するか、または検出していることと、
- 3) 低下した T R E M 2 活性、低下した A p o E 活性、または A P O E 4 対立遺伝子が検出されたときに、前記患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することと、
- 4) 有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を前記診断された患者に投与することと、を含む、前記方法。

【 0 2 7 2 】

30

実施形態 4 5 . 患者をアゴニスト抗 T R E M 2 抗体で治療する方法であって、前記方法が、

- 1) 前記患者から生体試料を得るか、または得ていることと、
- 2) 前記生体試料を分析するか、または前記試料を分析して、低下した T R E M 2 活性、低下した A p o E 活性、または A P O E 4 対立遺伝子の存在を検出し、それによって前記患者を脂質代謝調節不全を有すると診断することと、
- 3) 有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を前記診断された患者に投与することと、を含む、前記方法。

【 0 2 7 3 】

実施形態 4 6 . 前記哺乳動物における脂質代謝調節不全の治療に使用するための、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体。

40

【 0 2 7 4 】

実施形態 4 7 . 前記哺乳動物が、低下した T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態 4 6 に記載の使用するための抗体。

【 0 2 7 5 】

実施形態 4 8 . 前記哺乳動物が、低下した A p o E 活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態 4 6 または 4 7 に記載の使用するための抗体。

【 0 2 7 6 】

実施形態 4 9 . 前記哺乳動物が、A P O E 機能喪失または部分喪失型突然変異またはコーディングバリエーションを有するか、または有すると判定されている、実施形態 4 6 または 4

50

7に記載の使用するための抗体。

【0277】

実施形態50．前記哺乳動物が、APOE 4対立遺伝子を有するか、または有すると判定されている、実施形態46または47に記載の使用のための抗体。

【0278】

実施形態51．前記哺乳動物が、APOE 4対立遺伝子を有しないか、または有しないと判定されている、実施形態46または47に記載の使用のための抗体。

【0279】

実施形態52．哺乳動物における脂質代謝調節不全を治療するための薬剤を調製するための、アゴニスト抗TREM2抗体の使用。

10

【0280】

実施形態53．前記哺乳動物が、低下したTREM2活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態52に記載の使用。

【0281】

実施形態54．哺乳動物が、ApoE活性を低下させたか、または低下させたと判定されている、実施形態52または53に記載の使用。

【0282】

実施形態55．前記哺乳動物が、APOE機能喪失または部分喪失型突然変異またはコーディングバリエーションを有するか、または有すると判定されている、実施形態52または53に記載の使用。

20

【0283】

実施形態56．前記哺乳動物が、APOE 4対立遺伝子を有するか、または有すると判定されている、実施形態52または53に記載の使用。

【0284】

実施形態57．前記哺乳動物が、APOE 4対立遺伝子を有しないか、または有しないと判定されている、実施形態52または53に記載の使用。

【0285】

実施形態58．細胞内の1つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減させる方法であって、前記細胞を有効量のアゴニスト抗TREM2抗体と接触させることを含む、前記方法。

【0286】

30

実施形態59．前記細胞が、ミクログリア細胞である、実施形態58に記載の方法。

【0287】

実施形態60．前記細胞が、マクロファージである、実施形態58に記載の方法。

【0288】

実施形態61．前記1つ以上の脂質が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、BMP、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン38:4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸44:12、リゾホスファチジルコリン16:0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態58~60のいずれか1つに記載の方法。

40

【0289】

実施形態62．前記1つ以上の脂質が、コレステリルエステルを含む、実施形態61に記載の方法。

【0290】

実施形態63．前記細胞が、低下したTREM2活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態58~62のいずれか1つに記載の方法。

【0291】

実施形態64．前記細胞が、低下したApoE活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態58~63のいずれか1つに記載の方法。

50

【0292】

実施形態65．前記細胞が、APOE機能喪失または部分喪失型突然変異またはコーディングバリエーションを有するか、または有すると判定されている、実施形態58～63のいずれか1つに記載の方法。

【0293】

実施形態66．前記細胞が、APOE4を発現するか、または発現すると判定されている、実施形態58～63のいずれか1つに記載の方法。

【0294】

実施形態67．前記細胞が、APOE4を発現しない、または発現しないと判定されている、実施形態58～63のいずれか1つに記載の方法。

10

【0295】

実施形態68．前記アゴニスト抗TREM2抗体が、MAB17291または78.18である、実施形態58～67のいずれか1つに記載の方法。

【0296】

実施形態69．前記細胞が、インビトロ、インビボ、またはエクスビボでアゴニスト抗TREM2抗体と接触する、実施形態58～68のいずれか1つに記載の方法。

【0297】

実施形態70．前記細胞が、哺乳動物中に存在する、実施形態58～68のいずれか1つに記載の方法。

【0298】

実施形態71．前記細胞が、哺乳動物中に存在し、インビボで前記アゴニスト抗TREM2抗体と接触する、実施形態58～68のいずれか1つに記載の方法。

20

【0299】

実施形態72．前記哺乳動物が、細胞内脂質蓄積に関連する炎症を有する、実施形態70または71に記載の方法。

【0300】

実施形態73．前記アゴニスト抗TREM2抗体が、少なくとも1つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減させる、実施形態72に記載の方法。

【0301】

実施形態74．前記少なくとも1つのサイトカインが、G-CSF、INF γ 、IL-12(p40)、IL-12(p70)、LIX(CXCL5)、MCP-1(CCL2)、MIG(CXCL9)、IL-1 β 、IL-1 α 、及びIL-18からなる群から選択される、実施形態73に記載の方法。

30

【0302】

実施形態75．前記少なくとも1つのサイトカインが、IL-1 β である、実施形態74に記載の方法。

【0303】

実施形態76．前記哺乳動物が、アルツハイマー病、NHD、レビー小体病、パーキンソン病、網膜変性症(例えば、黄斑変性症)、ハンチントン病、FTD、ALS、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C型、肥満、2型糖尿病、アルコール性または非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性または非アルコール性脂肪肝疾患、多発性硬化症、白質消失病、RAまたはアテローム性硬化症を有するか、または発症しやすい、実施形態70～75のいずれか1つに記載の方法。

40

【0304】

実施形態77．前記哺乳動物が、NHDを有するか、またはNHDを発症しやすい、実施形態76に記載の方法。

【0305】

実施形態78．前記哺乳動物が、アテローム性動脈硬化症を有するか、または発症しやすい、実施形態76に記載の方法。

【0306】

50

- 実施形態 79 . 前記哺乳動物が、C 型ニーマン・ピック病を有するか、または発症しやすい、実施形態 76 に記載の方法。
- 【0307】
- 実施形態 80 . 前記細胞を第 2 の治療薬と接触させることをさらに含む、実施形態 58 ~ 79 のいずれか 1 つに記載の方法。
- 【0308】
- 実施形態 81 . 前記第 2 の治療薬が、RXR アゴニストである、実施形態 80 に記載の方法。
- 【0309】
- 実施形態 82 . 前記 RXR アゴニストが、ベキサロテンである、実施形態 81 に記載の方法。 10
- 【0310】
- 実施形態 83 . 前記第 2 の治療薬が、LXR アゴニストである、実施形態 80 に記載の方法。
- 【0311】
- 実施形態 84 . 前記 LXR アゴニストが、GW3965 である、実施形態 83 に記載の方法。
- 【0312】
- 実施形態 85 . 前記第 2 の治療薬が、ACAT1 阻害剤である、実施形態 80 に記載の方法。 20
- 【0313】
- 実施形態 86 . 前記 ACAT1 阻害剤が、CP-113、818、CI-1011、または K-604 である、実施形態 85 に記載の方法。
- 【0314】
- 実施形態 87 . 前記 ACAT1 阻害剤が、K-604 である、実施形態 86 に記載の方法。
- 【0315】
- 実施形態 88 . 細胞内の 1 つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減するのに使用するための、アゴニスト抗 TREM2 抗体。
- 【0316】 30
- 実施形態 89 . 細胞における 1 つ以上の脂質の細胞内蓄積を低減するための薬剤を調製するための、アゴニスト抗 TREM2 抗体の使用。
- 【0317】
- 実施形態 90 . アルツハイマー病の治療を必要とする哺乳動物において前記アルツハイマー病を治療する方法であって、前記哺乳動物にアゴニスト抗 TREM2 抗体を投与することを含み、前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記方法。
- 【0318】
- 実施形態 91 . 前記哺乳動物が、TREM2 発現細胞において脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、実施形態 90 に記載の方法。 40
- 【0319】
- 実施形態 92 . アルツハイマー病の治療を必要とする哺乳動物において前記アルツハイマー病を治療する方法であって、前記哺乳動物にアゴニスト抗 TREM2 抗体を投与することを含み、前記哺乳動物が、TREM2 発現細胞において脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記方法。
- 【0320】
- 実施形態 93 . 前記 TREM2 発現細胞が、ミクログリア細胞である、実施形態 91 または 92 に記載の方法。
- 【0321】
- 実施形態 94 . 前記 TREM2 発現細胞が、低下した TREM2 活性を有するか、または 50

有すると判定されている、実施形態 9 1 ~ 9 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 2 2 】

実施形態 9 5 . 前記脂質代謝調節不全が、1 つ以上の脂質の細胞内蓄積の増加を含む、実施形態 9 0 ~ 9 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 2 3 】

実施形態 9 6 . 前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、BMP、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 3 8 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 9 5 に記載の方法。

10

【 0 3 2 4 】

実施形態 9 7 . 前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステルを含む、実施形態 9 6 に記載の方法。

【 0 3 2 5 】

実施形態 9 8 . 前記哺乳動物が、前記脂質代謝調節不全に関連する炎症を有する、実施形態 9 0 ~ 9 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 2 6 】

実施形態 9 9 . 前記投与が、少なくとも 1 つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減する、実施形態 9 8 に記載の方法。

20

【 0 3 2 7 】

実施形態 1 0 0 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、G-CSF、INF γ 、IL-12(p40)、IL-12(p70)、LIX(CXCL5)、MCP-1(CCL2)、MIG(CXCL9)、IL-1、IL-1、及びIL-18からなる群から選択される、実施形態 9 9 に記載の方法。

【 0 3 2 8 】

実施形態 1 0 1 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、IL-1 である、実施形態 1 0 0 に記載の方法。

【 0 3 2 9 】

実施形態 1 0 2 . 前記アゴニスト抗 TREM 2 抗体が、MAB 1 7 2 9 1 または 7 8 . 1 8 である、実施形態 9 0 ~ 1 0 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 3 3 0 】

実施形態 1 0 3 . 前記哺乳動物に第 2 の治療薬を投与することをさらに含む、実施形態 9 0 ~ 1 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 3 1 】

実施形態 1 0 4 . 前記第 2 の治療薬が、RXRアゴニストである、実施形態 1 0 3 に記載の方法。

【 0 3 3 2 】

実施形態 1 0 5 . 前記 RXRアゴニストが、ベキサロテンである、実施形態 1 0 4 に記載の方法。

40

【 0 3 3 3 】

実施形態 1 0 6 . 前記第 2 の治療薬が、LXRアゴニストである、実施形態 1 0 3 に記載の方法。

【 0 3 3 4 】

実施形態 1 0 7 . 前記 LXRアゴニストが、GW 3 9 6 5 である、実施形態 1 0 6 に記載の方法。

【 0 3 3 5 】

実施形態 1 0 8 . 前記第 2 の治療薬が、ACAT 1 阻害剤である、実施形態 1 0 3 に記載の方法。

50

【 0 3 3 6 】

実施形態 1 0 9 . 前記 A C A T 1 阻害剤が、C P - 1 1 3、8 1 8、C I - 1 0 1 1、または K - 6 0 4 である、実施形態 1 0 8 に記載の方法。

【 0 3 3 7 】

実施形態 1 1 0 . 前記 A C A T 1 阻害剤が、K - 6 0 4 である、実施形態 1 0 9 に記載の方法。

【 0 3 3 8 】

実施形態 1 1 1 . 哺乳動物におけるアルツハイマー病の治療に使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体であって、前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記アゴニスト抗 T R E M 2 抗体。

10

【 0 3 3 9 】

実施形態 1 1 2 . 哺乳動物におけるアルツハイマー病の治療に使用するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体であって、前記哺乳動物が、T R E M 2 発現細胞において脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記アゴニスト抗 T R E M 2 抗体。

【 0 3 4 0 】

実施形態 1 1 3 . 哺乳動物におけるアルツハイマー病を治療するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用であって、前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記使用。

【 0 3 4 1 】

実施形態 1 1 4 . 哺乳動物におけるアルツハイマー病を治療するための薬剤を調製するためのアゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用であって、前記哺乳動物が、T R E M 2 発現細胞において脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、前記使用。

20

【 0 3 4 2 】

実施形態 1 1 5 . アテローム性動脈硬化症の治療を必要とする哺乳動物において前記アテローム性動脈硬化症を治療する方法であって、前記哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含む、前記方法。

【 0 3 4 3 】

実施形態 1 1 6 . 前記哺乳動物が、脂質代謝調節不全を有するか、または有すると判定されている、実施形態 1 1 5 に記載の方法。

【 0 3 4 4 】

実施形態 1 1 7 . 前記脂質代謝調節不全が、1 つ以上の脂質の蓄積の増加を含む、実施形態 1 1 5 または 1 1 6 に記載の方法。

30

【 0 3 4 5 】

実施形態 1 1 8 . 前記 1 つ以上の脂質の前記増加した蓄積が、細胞内である、実施形態 1 1 7 に記載の方法。

【 0 3 4 6 】

実施形態 1 1 9 . 1 つ以上の脂質は、マクロファージにおいて細胞内に蓄積する、実施形態 1 1 7 に記載の方法。

【 0 3 4 7 】

実施形態 1 2 0 . 前記マクロファージは、低下した T R E M 2 活性を有するか、または有すると判定されている、実施形態 1 1 9 に記載の方法。

40

【 0 3 4 8 】

実施形態 1 2 1 . 前記 1 つ以上の脂質の前記増加した蓄積が、細胞外である、実施形態 1 1 7 に記載の方法。

【 0 3 4 9 】

実施形態 1 2 2 . 前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステル、酸化コレステリルエステル、B M P、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、ヘキソシルセラミド、ガラクトシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ガングリオシド、ホスファチジルセリン 3 8 : 4、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸 4 4 : 1 2、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0、血小板活性化因子、コレステロール硫酸、リゾホスファチジルエタノー

50

ルアミン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 1 1 7 ~ 1 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 5 0 】

実施形態 1 2 3 . 前記 1 つ以上の脂質が、コレステリルエステルを含む、実施形態 1 2 2 に記載の方法。

【 0 3 5 1 】

実施形態 1 2 4 . 前記哺乳動物が、前記脂質代謝調節不全に関連する炎症を有する、実施形態 1 1 6 ~ 1 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 5 2 】

実施形態 1 2 5 . 前記投与が、少なくとも 1 つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減する、実施形態 1 2 4 に記載の方法。

10

【 0 3 5 3 】

実施形態 1 2 6 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、G - C S F、I N F γ 、I L - 1 2 (p 4 0)、I L - 1 2 (p 7 0)、L I X (C X C L 5)、M C P - 1 (C C L 2)、M I G (C X C L 9)、I L - 1 、I L - 1 、及び I L - 1 8 からなる群から選択される、実施形態 1 2 5 に記載の方法。

【 0 3 5 4 】

実施形態 1 2 7 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、I L - 1 である、実施形態 1 2 6 に記載の方法。

【 0 3 5 5 】

20

実施形態 1 2 8 . 前記アゴニスト抗 T R E M 2 抗体が、M A B 1 7 2 9 1 または 7 8 . 1 8 である、実施形態 1 1 5 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 5 6 】

実施形態 1 2 9 . 第 2 の治療薬を投与することをさらに含む、実施形態 1 1 5 ~ 1 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 5 7 】

実施形態 1 3 0 . 前記第 2 の治療薬が、アテローム性動脈硬化症の治療に有用な薬剤である、実施形態 1 2 9 に記載の方法。

【 0 3 5 8 】

実施形態 1 3 1 . 前記第 2 の治療薬が、R X R アゴニスト、L X R アゴニストまたは A C A T 1 阻害剤である、実施形態 1 2 9 に記載の方法。

30

【 0 3 5 9 】

実施形態 1 3 2 . 哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症の治療に使用するための、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体。

【 0 3 6 0 】

実施形態 1 3 3 . 哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症を治療するための薬剤を調製するための、アゴニスト抗 T R E M 2 抗体の使用。

【 0 3 6 1 】

実施形態 1 3 4 . 炎症の治療を必要とする哺乳動物において前記炎症を治療する方法であって、前記哺乳動物に有効量のアゴニスト抗 T R E M 2 抗体を投与することを含む、前記方法。

40

【 0 3 6 2 】

実施形態 1 3 5 . 前記投与が、少なくとも 1 つの炎症誘発性サイトカインの発現を低減する、実施形態 1 3 4 に記載の方法。

【 0 3 6 3 】

実施形態 1 3 6 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、インフラマソーム応答に関連する、実施形態 1 3 5 に記載の方法。

【 0 3 6 4 】

実施形態 1 3 7 . 前記少なくとも 1 つのサイトカインが、G - C S F、I N F γ 、I L - 1 2 (p 4 0)、I L - 1 2 (p 7 0)、L I X (C X C L 5)、M C P - 1 (C C L 2

50

)、MIG(CXCL9)、IL-1、IL-1、及びIL-18からなる群から選択される、実施形態135または136に記載の方法。

【0365】

実施形態138．前記少なくとも1つのサイトカインが、IL-1である、実施形態137に記載の方法。

【0366】

実施形態139．前記哺乳類が、インフラマソーム関連疾患または障害を有するか、または発症しやすい、実施形態134～138のいずれか1つに記載の方法。

【0367】

実施形態140．前記哺乳動物が、関節リウマチ、痛風、または炎症性腸疾患(IBD)を有するか、または発症しやすい、実施形態134～138のいずれか1つに記載の方法。

【0368】

実施形態141．前記炎症が、脂質代謝調節不全に関連する、実施形態134～138のいずれか1つに記載の方法。

【0369】

実施形態142．前記アゴニスト抗TREM2抗体の投与が、脂質蓄積を低減する、実施形態141に記載の方法。

【0370】

実施形態143．前記哺乳動物が、アルツハイマー病、那須・ハコラ病(NHD)、レビ-小体病、パーキンソン病、網膜変性症(例えば、黄斑変性症)、ハンチントン病、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C型、肥満、2型糖尿病、アルコール性または非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性または非アルコール性脂肪肝疾患、多発性硬化症、白質消失病、またはアテローム性硬化症を有するか、または発症しやすい、実施形態141または142に記載の方法。

【0371】

実施形態144．前記哺乳動物が、アルツハイマー病、那須・ハコラ病(NHD)、レビ-小体病、パーキンソン病、網膜変性症、ハンチントン病、ニーマン・ピック病A型、ニーマン・ピック病B型、ニーマン・ピック病C型、多発性硬化症または白質消失病を有するか、または発症しやすい、実施形態141または142に記載の方法。

【0372】

実施形態145．前記哺乳動物が、肥満、2型糖尿病、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性もしくは非アルコール性脂肪肝疾患、またはアテローム性動脈硬化症を有するか、または発症しやすい、実施形態141または142に記載の方法。

【0373】

実施形態146．前記アゴニスト抗TREM2抗体が、MAB17291または78.18である、実施形態134～145のいずれか1つに記載の方法。

【0374】

実施形態147．第2の治療薬を投与することをさらに含む、実施形態134～146のいずれか1つに記載の方法。

【0375】

実施形態148．前記第2の治療薬が、RXRアゴニスト、LXRアゴニスト、またはACAT1阻害剤である、実施形態147に記載の方法。

【0376】

実施形態149．哺乳動物における炎症の治療に使用するための、アゴニスト抗TREM2抗体。

【0377】

実施形態150．哺乳動物における炎症を治療するための薬剤を調製するための、アゴニスト抗TREM2抗体の使用。

【0378】

実施形態151．前記炎症が、脂質代謝調節不全に関連する、実施形態149に記載の抗体または実施形態150に記載の使用。

【0379】

実施形態152．組織試料からCNS細胞の集団を選別する方法であって、

(a)前記組織試料を、抗CD45一次抗体、抗CD11b一次抗体、及び抗星状膠細胞表面抗原-2(ACSA-2)一次抗体(各一次抗体は一意に標識される)と接触させて、標識された組織試料を提供することと、

(b)前記標識された組織試料中の前記細胞をフローサイトメトリーにより選別することと、を含み、

前記方法が、星状膠細胞及びミクログリア細胞の別個の細胞集団を提供する、前記方法。

10

【0380】

実施形態153．前記抗CD45一次抗体、前記抗CD11b一次抗体、及び前記抗ACSA-2一次抗体が、組成物中に存在する、請求項152に記載の方法。

【0381】

実施形態154．組織試料からCNS細胞の集団を選別する方法であって、

(a)前記組織試料を、抗CD45一次抗体、抗CD11b一次抗体、及び抗星状膠細胞表面抗原-2(ACSA-2)一次抗体(各一次抗体は一意に標識される)を含む組成物と接触させて、標識された組織試料を提供することと、

(b)前記標識された組織試料中の前記細胞をフローサイトメトリーにより選別することと、を含み、

前記方法が、星状膠細胞及びミクログリア細胞の別個の細胞集団を提供する、前記方法。

20

【0382】

実施形態155．前記組成物が、生存能染料をさらに含む、実施形態153または154に記載の方法。

【0383】

実施形態156．前記組織試料を生存能染料と接触させることをさらに含む、実施形態152～154のいずれか1つに記載の方法。

【0384】

実施形態157．約20%未満の非ミクログリア細胞を含むミクログリア細胞の別個の集団を提供する、実施形態152～156のいずれか1つに記載の方法。

30

【0385】

実施形態158．約20%未満の非星状膠細胞を含む別個の星状膠細胞の別個の集団を提供する、実施形態152～156のいずれか1つに記載の方法。

【0386】

実施形態159．前記ミクログリア細胞集団が、以下のマーカープロファイル：CD45^{low}/CD11b⁺/ACSA-2⁻に基づいて選別される、実施形態152～158のいずれか1つに記載の方法。

【0387】

実施形態160．前記星状膠細胞集団が、以下のマーカープロファイル：CD45⁻/CD11b⁻/ACSA-2⁺に基づいて選別される、実施形態152～159のいずれか1つに記載の方法。

40

【0388】

実施形態161．前記別個の細胞集団が、代謝種または核酸種の定量化のために分析される、実施形態152～160のいずれか1つに記載の方法。

【0389】

実施形態162．前記代謝種が、脂質種である、実施形態161に記載の方法。

【0390】

実施形態163．前記核酸種が、RNA、DNA、及びゲノムDNAから選択される、実施形態161に記載の方法。

50

【0391】

実施形態164．前記別個の細胞集団が、投与される治療薬の定量化のために分析される、実施形態152～160のいずれか1つに記載の方法。

【0392】

実施形態165．実施形態152～160のいずれか1つに記載の方法によって単離された別個の細胞集団を含む、組成物。

【0393】

実施形態166．前記別個の細胞集団が、ミクログリア細胞集団である、実施形態165に記載の組成物。

【0394】

実施形態167．前記別個の細胞集団が、星状膠細胞集団である、実施形態165に記載の組成物。

【0395】

実施形態168．2つの物理的に別個の細胞集団を含むCNS細胞の集合であって、第1の細胞集団が、CD45^{low}/CD11b⁺/ACSA-2⁻細胞の濃縮集団を含み、第2の細胞集団が、濃縮集団CD45⁻/CD11b⁻/ACSA-2⁺細胞を含む、前記CNS細胞の集合。

【0396】

以下の実施例は、非限定的であることが意図される。

【実施例】

【0397】

実施例1：慢性脱髄を有するTrem2ノックアウトマウスにおける脂質代謝に関する遺伝子の発現減弱

この実施例では、マウスミクログリア遺伝子発現解析について記載する。

【0398】

マウスにおける脱髄を誘導するクプリゾン食餌

Trem2^{-/-}マウスをJackson Laboratory (Stock # : 027197) から購入し、C57BL/6Jマウスに戻し交配してTrem2^{+/-}マウスを生成した。Trem2^{+/-}マウスをさらに交雑させて、この研究のための3つの遺伝子型の同腹のマウス (Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}及びTrem2^{-/-}) を生成した。9～11ヶ月齢前後のマウスを使用した。マウスの各遺伝子型を、通常の食餌 (Envigo TD. 160766) またはクプリゾン食事 (0.2%のクプリゾン、Envigo TD. 160765) のいずれかの治療パラダイムを有する2つの群 (6～11匹/群) に5週間または12週間分けた。各動物の体重を毎週記録して、クプリゾンの効果をモニタリングした。

【0399】

マウス脳由来のミクログリア、星状膠細胞、及び他の細胞の蛍光活性化細胞選別 (FACS)

CNS細胞を選別するための単一細胞懸濁液を調製するために、マウスにPBSを灌流させ、脳を解剖し、成人脳解離キット (Miltenyi Biotec 130-107-677) を使用して製造業者のプロトコルに従って単一細胞懸濁液に処理した。細胞をFcブロックし、Fixable Viability Stain BV510を用いたフローサイトメトリ解析のために染色して、死細胞 (BD Biosciences 564406)、CD11b⁻BV421 (BD Biosciences 562605)、CD45⁻APC (BD Biosciences 559864)、及びACSA-2⁻PE (Miltenyi Biotec 130-102-365) を除外した。細胞をHibernate A (BrainBits LLC) で2回洗浄し、100µmフィルターを通して歪ませた後、100µmノズルでFACS Aria III (BD Biosciences) 上でCD11b⁺ミクログリア及びACSA-2⁺星状膠細胞を選別した。RNAseq、scRNAseqまたはリポドミクスを含む下流解析の

10

20

30

40

50

ために、選別した細胞を処理した。

【0400】

ミクログリア遺伝子発現のFACS-RNAseq分析

生細胞を、他の全ての未染色細胞(100,000~200,000細胞)に対してCD11b+ミクログリア(100,000~120,000細胞)に選別し、1:100-メルカプトエタノールを含むRLT+緩衝液(Qiagen)中に直接収集した。RNAを、RNeasy Plus Micro Kit(Qiagen, 74034)を使用して抽出し、14µlのヌクレアーゼを含まない水に再懸濁した。RNAの量及び品質を、2100 Bioanalyzer(Agilent)上のRNA 6000 Picoチップ(Agilent 5067-1513)で評価した。製造業者が定義した「低入力」プロトコルに従って、Illumina(Lexogen)のためのQuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWDを使用して、RNAを処理した。Illumina用のNEBNext Library Quant Kit(NEB, E7630S)を使用して、バーコード化試料を定量した。全ての試料を等モル比で1つの配列決定ライブラリにプールし、これを、High Sensitivity DNAチップを有するBioanalyzer(Agilent, 5067-4626)上で定量化した。UCSF Center for Advanced TechnologyのIllumina HiSeq 4000レーンで50 bpのシングルエンドリードを生成した。

10

【0401】

読み取りデータをマウスゲノムバージョンGRCm 38_p6にアラインメントした。STARのインデックス(Dobin, A et al., Bioinformatics, 2013.29(1):p.15-21;version 2.5.3a)を、--sjdbOverhang=50引数を用いて構築した。Gencode遺伝子モデルからのスプライスジャンクション(リリースM17)が、--sjdbGTFfile引数を介して提供された。STARのアラインメントを、以下のパラメータを用いて生成した: --outFilterType BySJout, --quantMode TranscriptomeSAM, --outFilterIntronMotifs RemoveNoncanonicalUnannotated, --outSAMstrandField intronMotif, --outSAMattributes NH HI AS nM MD XS及び--outSAMunmapped Within。アラインメントを、以下のパラメータを用いて取得した: --readFilesCommand zcat --outFilterType BySJout --outFilterMultimapNmax 20 --alignSJoverhangMin 8 --alignSJDBoverhangMin 1 --outFilterMismatchNmax 999 --outFilterMismatchNoverLmax 0.6 --alignIntronMin 20 --alignIntronMax 1000000 --alignMatesGapMax 1000000 --quantMode GeneCounts --outSAMunmapped Within --outSAMattributes NH HI AS nM MD XS --outSAMstrandField intronMotif --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --outBAMcompression 6。subreadパッケージからのfeatureCountsを使用して、遺伝子レベルカウントを得た(Liao, Y et al., Nucleic Acids Res, 2013.41(10):e108;version 1.6.2)。遺伝子記号及びEntrez遺伝子識別子を、biomaRt Rパッケージ(Durinck, S et al., Nat Protoc, 2009.4(8):p.1184-91;version 2.34.2)を介してR(バージョン3.4.3)を用いてEnsembl(バージョン91)を使用してマッピングした。

20

30

40

【0402】

50

発現差のある遺伝子を同定するために、線形モデルを、limma Bioconductorパッケージを使用して適合させた(Liu, Ret al., Nucleic Acids Res, 2015.43:p.e97)。統計解析には、edgeRの「filterByExpr」機能によって決定されるように、十分に大きなカウントを有する遺伝子のみが含まれた。各試料のTMMスケール係数を「calcNormFactors」関数で計算した(Robinson, MD et al., Genome Biol, 2010.11(3):p.R25)。我々は、log2形質転換カウント及び導出した観察レベルの重みの平均分散関係をlimma Bioconductorパッケージからの「voom」関数により推定した(Liu, Ret al., Nucleic Acids Res 2015.43:p.e97)。線形モデルは、「lmFit」及び「eBayes」機能に適合していた。結果を、ggplot2 Rパッケージ(Wickham, H et al., ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, 2016)を使用してプロットした。競合遺伝子セット試験を、limma Rパッケージからの「カメラ」アルゴリズムを使用して行った(Wu, D et al., Nucleic Acids Res, 2012.40(17):p.e133)。

10

【0403】

単一細胞RNA配列ライブラリ調製及び分析

(2)対照食餌Trem2+/+半脳、ならびに(2)Trem2+/+、(2)Trem2+/-、及び(2)Trem2-/-12週間クプリゾン処理半脳からの解離細胞を、上述のように処理し、染色した。30,000個の生CD11b+/CD45loミクログリアを各半脳から選別し、(2)条件当たりの半脳をPBS+0.5%BSA中にプールして、全部で4つ配列決定群を生成した。ミクログリアをカウントし、70µl中500,000細胞/mlに希釈し、生存率が>70%であることを確認した。単一細胞ライブラリをバーコード化し、Stanford Functional Genomics Facilityで、Chromium Controller(10X Genomics)を用いて、v2 chemistry(10X Genomics, product # 120267)を用いたChromium Single Cell 3' Library Kitを使用して調製した。scRNAseqライブラリを、UCSFのCenter for Advanced TechnologyでNovaSeq S4(シーケンサー)を使用して配列決定した。

20

30

【0404】

4つの単一細胞データセットが生成した。DropletUtils(Lun, ATLET et al., biorXiv, 2018.doi:10.1101/234872)、Scater(McCarthy DJ et al., Bioinformatics, 2017.33(8):p.1179-1186)、及びscrane(Lun, ATLET et al., Genome Biology, 2016.17:p.75)Bioconductor(v3.8)パッケージを参照されたい。各実験を、以下の方法で独立して品質制御及びフィルタリングした。(i)周囲RNAのみを含有する液滴(FDR<0.01)を、「空滴」機能を使用して同定し、除去し、(ii)低リードカウント、低遺伝子カウント、または高ミトコンドリア負荷を有する細胞を、「isOutlier」機能で同定し、除去した。次に、各実験からの残りの細胞を、下流分析のために細胞のユニバーサルアトラスにまとめた。「computeSumFactors」関数を使用して、細胞当たりの配列決定深さの差を説明し、各遺伝子についての正規化された対数カウントを「正規化」関数で計算した。最初のPCA及びその次のtSNE分析により、高ミトコンドリア荷重が唯一の実際の区別特性である各試料からの細胞群をさらに特定した。この細胞群は、技術的アーチファクトであると見なされ、最終的な高品質の細胞アトラスを構成するために除去された。

40

【0405】

「buildSNNGraph」関数(k=6)を使用して共有最近傍グラフをまず構築

50

し、続いて Louvian 法を使用してコミュニティ検出することによって、ミクログリア細胞の 10 個のクラスターをアトラス内で特定した。最大クラスターには 595 個の細胞 (knn_07) が含まれ、最小クラスターには 147 個の細胞 (knn_10) が含まれる。クラスターは、まず、各クラスターに属するアトラス全体の細胞の画分を特定することによって特徴付けられ (図 2 A、左)、続いて、各クラスターに属する試料当たりの細胞の画分によって特徴付けられた (図 2 A、右)。マーカー遺伝子及び遺伝子セット濃縮分析を、2つのシナリオの下で各クラスターについて行った：ユニバーサル - 各クラスターをデータセット全体に対して試験した；または制限 - 3つの興味深い細胞クラスター (knn_05、knn_05、及び knn_10) のみを互いに対して試験した。クラスターあたりのマーカー遺伝子を、「pairwiseWilcox」機能を使用して、Wilcoxon Test によって特定し、0.001 の FDR 閾値を使用してフィルタリングした。所与のクラスター内の遺伝子の log₂ 倍率変化の平均と、残りの各遺伝子の log₂ 倍率変化の平均を取ることによって、遺伝子当たりの倍率変化を報告した (「pairwiseTests」関数によって計算される)。

表 1：ミクログリアクラスター knn_5、8、及び 10 において、遺伝子が増加した。

10

20

30

40

50

【表 1】

遺伝子	方向性	クラスター	FDR	Log2 FC
Cd14	上げ	knn_5	6.34E-04	1.448
Cd74	上げ	knn_5	1.33E-04	1.736
Tmem176a	上げ	knn_5	5.07E-05	1.081
Piprc	上げ	knn_5	1.65E-06	0.720
Scl2a1a	上げ	knn_5	7.06E-10	0.777
Spp1	上げ	knn_5	6.67E-04	1.552
Axl	上げ	knn_5	2.57E-07	0.804
Ctsh	上げ	knn_5	1.97E-05	0.691
Lgi	上げ	knn_5	3.78E-06	1.204
Nfkbi2	上げ	knn_5	5.19E-04	0.703
Tmsb4x	上げ	knn_8	7.43E-05	0.466
Sh3bgr3	上げ	knn_8	5.86E-05	0.615
Serf2	上げ	knn_8	4.98E-04	0.453
Aip5j2	上げ	knn_8	7.54E-06	0.507
Rpl35	上げ	knn_8	1.65E-04	0.399
Ppia	上げ	knn_8	3.04E-04	0.294
Rpl6	上げ	knn_8	1.52E-05	0.312
Rpl23a	上げ	knn_8	3.07E-04	0.366
Rpl36ai	上げ	knn_8	2.59E-04	0.396
Rpl38	上げ	knn_8	9.22E-04	0.310
Btg1	下げ	knn_8	5.81E-23	-1.783
Irf5	下げ	knn_8	1.35E-26	-1.927
Jun	下げ	knn_8	1.11E-25	-2.494
Dusp1	下げ	knn_8	1.93E-29	-2.539
Rhob	下げ	knn_8	1.26E-30	-1.911
Zfp36	下げ	knn_8	5.64E-27	-2.166
Malat1	下げ	knn_8	1.03E-29	-4.234
Jund	下げ	knn_8	1.10E-30	-2.471
Big2	下げ	knn_8	1.21E-30	-2.584
Junb	下げ	knn_8	1.10E-30	-2.954
Ltc4s	上げ	knn_10	2.59E-10	1.069
P2ry12	上げ	knn_10	5.05E-10	1.123
Sgk1	上げ	knn_10	7.33E-04	1.278
Serpine2	上げ	knn_10	3.06E-08	0.886
Arl4c	上げ	knn_10	2.55E-09	0.852
Pmp22	上げ	knn_10	1.02E-09	0.891
Gpr34	上げ	knn_10	7.32E-09	0.819
Fcrls	上げ	knn_10	8.46E-06	0.713
Sh2d1	上げ	knn_10	2.03E-07	0.727
Tmem86a	上げ	knn_10	9.81E-07	0.767
Arpc1b	下げ	knn_10	1.08E-05	-0.456
Pfn1	下げ	knn_10	3.42E-07	-0.491
Sh3bgr3	下げ	knn_10	2.73E-06	-0.653
Spp1	下げ	knn_10	4.47E-06	-1.792
Fth1	下げ	knn_10	1.03E-09	-0.644
Tmem176b	下げ	knn_10	5.97E-06	-1.246
Tmsb4x	下げ	knn_10	4.39E-17	-0.628
Tmsb10	下げ	knn_10	2.64E-13	-1.569
Trem2	下げ	knn_10	5.54E-09	-1.322
Cd52	下げ	knn_10	1.40E-13	-1.843

10

20

30

40

【0406】

図 1 A ~ C、図 2 A ~ B、及び表 1 に示されるように、脂質代謝に関与する遺伝子は、急性及び慢性脱髄時に Trem2^{+/+}及び Trem2^{+/-}マウスマイクログリアで上方制御されるが（それぞれ、5 週間及び 12 週間 Kuprinon 処置）、慢性及び急性脱髄を伴う Trem2^{-/-}マウスマイクログリアでの上方制御の低減を示す。対照食餌によるマウスにおいて、バルク単離された Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-}マウスマイクログリア間には、ほとんど遺伝子型の違いがない（図 1 A）。何百もの遺伝子が、慢性脱髄を伴うバルク Trem2^{+/+}及び Trem2^{+/-}マウスマイクログリアで上方制御されるが、Trem2^{-/-}マイクログリアで上方制御される遺伝子はごくわず

50

かである(図1B)。バルク Trem2^{+/+}及び Trem2^{+/-}で上方制御されるが、Trem2^{-/-}マイクログリアでは上方制御されない遺伝子のうち、多くは脂質代謝に
 関与する(図1C)。図1Cは、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-}バルクマイクログリアにおける脂質代謝に関連する個々の遺伝子における遺伝子発現
 の log₂ 倍率変化を、5週間または12週間クプリゾン処置(それぞれ右挿入、上または下)と比較して示す。図2A及び2Bは、慢性脱髄を有する Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及び Trem2^{-/-}マウス(Trem2^{+/+} CPZ、Trem2^{+/-}
 CPZ、Trem2^{-/-} CPZ)から単離されたマイクログリアと比較して、個々に単離された Trem2^{+/+} 対照食餌マイクログリア(Trem2^{+/+} Ctrl)から
 の単細胞 RNA 配列決定データのマイクログリアクラスターを特定する。クラスター knn_8は、遺伝子型にかかわらず、クプリゾン治療で上方または下方制御される遺伝子を
 有するマイクログリアの集団を特定する。Cluster knn_5は、Trem2^{+/+} CPZ及び Trem2^{+/-} CPZマウスにおいて慢性脱髄で上方制御されるが、
 対照または Trem2^{-/-} CPZマウスにおいては上方制御されない遺伝子を有するマイクログリアの集団を特定する。Cluster knn_10は、Trem2^{-/-}
 CPZマウスにおいて上方または下方制御されるが、Trem2^{+/+} CPZ、Trem2^{+/-} CPZ、または対照マウスにおいては上方または下方制御されない遺伝子を
 有するマイクログリアの集団を特定する。表1は、クラスター knn_5、8、及び10で特定された遺伝子、log₂ 倍率変化及び変化の方向、ならびに偽発見率(FDR)を列挙
 する。

10

20

【0407】

実施例2. Trem2ノックアウト前脳及び慢性脱髄時の単離されたマイクログリアにおける
 コレステリルエステル及びミエリン脂質の増加

この実施例では、マウス前脳ならびに単離されたマイクログリア及び星状膠細胞集団の脂質
 学について記載する。

【0408】

前脳脂質抽出

PBS灌流後、液体窒素中で矢状マウス半脳をフラッシュ冷凍し、Leica CM 1
 950クライオスタットを使用して、交互に100µm(脂質学)または20µm(組織
 学)幅で-20℃で冠状凍結した。脳梁を含有するマッチした前脳領域からの2つの10
 0µm切片を、内部標準物質を含有する200µlのLC-MSグレードのメタノールを
 有する3mmステンレスピース(Qiagen)を含有する1.5mLのLoBindチ
 ューブ(Eppendorf)内に配置した。チューブを、Tissue Lysar(Q
 iagen)を使用して、2x:1分間、25Hz、4℃で溶解させた。20µlの試料
 を、ピシンコニン酸(BCA)アッセイ(Pierce, Rockford, IL, US
 A)を使用してタンパク質濃度測定のために除去した。溶解物を20分間、18,000
 xg、4℃でスピンスさせた。上清をガラスLC-MSバイアル(Waters)に移した
 。

30

【0409】

FACS脂質抽出

全ての染色緩衝液がPBS+1%脂肪酸を含まないBSA(Sigma)を含有したことを
 を除き、解離した細胞を上述のFACSプロトコルに従って染色した。400µlのLC
 -MSグレードの内部標準物質を含有するメタノールを2mLのLo-bindチューブ
 (Eppendorf)に添加した。選別後、全容積を脱イオン水(Milli-Q)で
 800µlに調整した。試料を、5分間、室温で2500rpmボルテックスした。80
 0µlのメチルターシャリーブチルエーテル(MTBE)を添加し、試料を室温で5分間
 、2500rpmボルテックスした後、21000xg、10分間、4℃でスピンスさせた
 。600µlのMTBE上清をガラスLC-MSバイアルに移し、窒素ガス下で乾燥させ
 た。試料を100µlのLC-MSグレードのメタノールに再懸濁した。

40

【0410】

50

脂質の質量分析

脂質分析を、エレクトロスプレー質量分析法 (QTRAP 6500+, Sciex, Framingham, MA, USA) に結合させた液体クロマトグラフィー (Shimadzu Nexera X2システム、Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA) によって実施した。各分析について、5 μ L の試料を、55 で 0.25 mL / 分の流量を使用して、BEH C18 1.7 μ m、2.1 x 100 mm カラム (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) 上に注入した。陽性イオン化モードの場合、移動相 A は、10 mM のギ酸アンモニウム + 0.1 % のギ酸を有する 60 : 40 のアセトニトリル / 水 (v / v) からなり、移動相 B は、10 mM のギ酸アンモニウム + 0.1 % のギ酸を有する 90 : 10 のイソプロピルアルコール / アセトニトリル (v / v) からなる。負のイオン化モードの場合、移動相 A は、10 mM の酢酸アンモニウムを有する 60 : 40 のアセトニトリル / 水 (v / v) からなり、移動相 B は、10 mM の酢酸アンモニウムを有する 90 : 10 のイソプロピルアルコール / アセトニトリル (v / v) からなる。勾配を以下のようにプログラムした：45 % B ~ 99 % B で 0.0 ~ 8.0 分、99 % B で 8.0 ~ 9.0 分、45 % B まで 9.0 ~ 9.1 分、及び 45 % B で 9.1 ~ 10.0 分。以下の設定を適用して、正または負のいずれかのイオンモードでエレクトロスプレーイオン化を行った：カーテンガスは 30 で、衝突ガスは中位に設定し、イオンスプレー電圧は 5500 (正モード) または 4500 (負モード) で、温度は 250 (正モード) または 600 (負モード) で、イオン源ガス 1 は 50 で、イオン源ガス 2 は 60 である。データ取得を、多重反応モニタリングモード (MRM) で Analyst 1.6.3 (Sciex) を使用して実行し、以下のパラメータを用いた：表 2 (ポジティブモード) または表 3 (ネガティブモード) に報告される各種についての滞留時間 (ms) 及び衝突エネルギー (CE)、脱クラスタリング電位 (DP) は 80、入口電位 (EP) は 10 (ポジティブモード) または -10 (ネガティブモード)、ならびに衝突細胞出口電位 (CXP) は 12.5 (ポジティブモード) または -12.5 (ネガティブモード)。脂質を、表 2 及び 3 に報告しているように、非内因性内部標準物質の混合物を使用して定量化した。脂質を、それらの保持時間及び市販の参照標準物 (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL, USA) の MRM 特性に基づいて同定した。MultiQuant 3.02 (Sciex) を使用して定量化を行った。代謝産物は、総タンパク質量または細胞数のいずれかに対して正規化した。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : ポジティブモードでのリピドミクスアッセイのための LC-MS 取得パラメータ

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
スフィンゴシン d17:1	該当なし	1.38	286.2	268.3	10
スフィンゴシン	スフィンゴシン d17:1	1.56	300.2	282.2	10
スフィンガニン	スフィンゴシン d17:1	1.69	302.2	284.2	10
ヘキソシルスフィンゴシン	スフィンゴシン d17:1	1.23	462.3	282.2	10
Cer d18:1/17:0	該当なし	5.83	552.4	264.3	5
Cer d18:1/16:0	Cer (d18:1/17:0)	5.58	538.5	264.6	5
Cer d18:1/18:0	Cer (d18:1/17:0)	6.05	566.6	264.4	5
Cer d18:1/20:0	Cer (d18:1/17:0)	6.44	594.6	264.4	5
Cer d18:1/22:0	Cer (d18:1/17:0)	6.78	622.6	264.4	5
Cer d18:1/24:0	Cer (d18:1/17:0)	7.08	650.6	264.4	5
Cer d18:1/24:1	Cer (d18:1/17:0)	6.74	648.6	264.4	5
SM(d18:1(d9)/18:1)	該当なし	5.04	738.7	184.1	5
SM d18:1/16:0	SM(d18:1(d9)/18:1)	5.02	703.6	184.1	5
SM d18:1/18:0	SM(d18:1(d9)/18:1)	5.56	731.6	184.1	5
SM d18:1/20:0	SM(d18:1(d9)/18:1)	6.01	759.6	184.1	5
SM d18:1/22:0	SM(d18:1(d9)/18:1)	6.39	787.7	184.1	5
SM d18:1/24:0	SM(d18:1(d9)/18:1)	6.73	815.7	184.1	5
SM d18:1/24:1	SM(d18:1(d9)/18:1)	6.35	813.7	184.1	5
GlcCer (d18:1/12:0)	該当なし	3.99	644.5	264.3	10
HexCer d18:1/16:0	GlcCer (d18:1/12:0)	5.18	700.6	264.6	10
HexCer d18:1/18:0	GlcCer (d18:1/12:0)	5.69	728.6	264.4	10
HexCer d18:1/20:0	GlcCer (d18:1/12:0)	6.11	756.6	264.4	10
HexCer d18:1/22:0	GlcCer (d18:1/12:0)	6.48	784.7	264.4	10
HexCer d18:1/24:0	GlcCer (d18:1/12:0)	6.8	812.7	264.4	10
HexCer d18:1/24:1	GlcCer (d18:1/12:0)	6.44	810.7	264.4	10
LacCer d18:1/16:0	GlcCer (d18:1/12:0)	4.99	862.6	264.6	10
LacCer d18:1/18:0	GlcCer (d18:1/12:0)	5.5	890.7	264.4	10
LacCer d18:1/20:0	GlcCer (d18:1/12:0)	5.43	918.7	264.4	10
LacCer d18:1/22:0	GlcCer (d18:1/12:0)	6.34	946.7	264.4	10
LacCer d18:1/24:0	GlcCer (d18:1/12:0)	6.27	974.8	264.4	10
LacCer d18:1/24:1	GlcCer (d18:1/12:0)	6.29	972.7	264.4	10
LPC(18:1(d7))	該当なし	1.85	529.3	184.1	5
lysoPC 16:0	LPC(18:1(d7))	1.81	496.3	184.1	5
lysoPC 18:0	LPC(18:1(d7))	2.34	524.3	184.1	5
lysoPC 18:1	LPC(18:1(d7))	1.86	522.3	184.1	5
lysoPC 20:4	LPC(18:1(d7))	1.48	544.3	184.1	5
lysoPC 22:6	LPC(18:1(d7))	1.41	568.3	184.1	5
Lyso SM d18:1	18:1(d7)LPC	1.41	465.5	184.1	10
15:0-18:1(d7)PC	該当なし	5.23	754.6	184.1	5

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
PC 34:1	15:0-18:1(d7) PC	5.5	760.6	184.1	5
PC 34:2	15:0-18:1(d7) PC	5.09	758.6	184.1	5
PC 36:1	15:0-18:1(d7) PC	5.95	788.6	184.1	5
PC 36:2	15:0-18:1(d7) PC	5.59	786.6	184.1	5
PC 36:4	15:0-18:1(d7) PC	4.67	782.6	184.1	5
PC 38:1	15:0-18:1(d7) PC	6.72	816.6	184.1	5
PC 38:2	15:0-18:1(d7) PC	6.35	814.6	184.1	5
PC 38:4	15:0-18:1(d7) PC	5.48	810.6	184.1	5
PC 38:5	15:0-18:1(d7) PC	4.98	808.6	184.1	5
PC 38:6	15:0-18:1(d7) PC	4.8	806.6	184.1	5
PC 40:4	15:0-18:1(d7) PC	5.92	838.6	184.1	5
PC 40:5	15:0-18:1(d7) PC	5.66	836.6	184.1	5
PC 40:6	15:0-18:1(d7) PC	5.31	834.6	184.1	5
PC 40:7	15:0-18:1(d7) PC	4.82	832.6	184.1	5
PC 42:5	15:0-18:1(d7) PC	5.82	864.6	184.1	5
PC 42:6	15:0-18:1(d7) PC	5.37	862.6	184.1	5
PC 42:7	15:0-18:1(d7) PC	5.3	860.6	184.1	5
POVPC	15:0-18:1(d7) PC	1.79	594.5	184.1	10
PGPC	LPC(18:1(d7))	1.85	610.2	184.1	10
PC(16:0/9:0(CHO)) ALDO (PONPC)	LPC(18:1(d7))	2.05	650.3	184.1	10
PC(16:0/9:0(COOH)) PAZPC	LPC(18:1(d7))	1.98	666.4	184.1	10
KOOA-PC	LPC(18:1(d7))	2.36	648.3	184.1	10
KODiA-PC	LPC(18:1(d7))	1.54	664.4	184.1	10
PAF 16:0 C2	LPC(18:1(d7))	1.86	524.3	184.1	10
15:0-18:1(d7) PE	該当なし	5.38	711.6	570.5	5
PE 34:1	15:0-18:1(d7) PE	5.63	718.6	577.5	5
PE 34:2	15:0-18:1(d7) PE	5.22	716.6	575.5	5
PE 36:1	15:0-18:1(d7) PE	6.06	746.6	605.5	5
PE 36:2	15:0-18:1(d7) PE	5.72	744.6	603.5	5
PE 36:4	15:0-18:1(d7) PE	5.11	740.6	599.5	5
PE 38:1	15:0-18:1(d7) PE	6.39	774.6	633.5	5
PE 38:2	15:0-18:1(d7) PE	6.09	772.6	631.5	5
PE 38:4	15:0-18:1(d7) PE	5.61	768.6	627.5	5
PE 38:5	15:0-18:1(d7) PE	5.27	766.6	625.5	5
PE 38:6	15:0-18:1(d7) PE	4.93	764.6	623.5	5
PE 38:7	15:0-18:1(d7) PE	4.43	762.6	621.5	5
PE 40:4	15:0-18:1(d7) PE	5.91	796.6	655.5	5
PE 40:5	15:0-18:1(d7) PE	5.78	794.6	653.5	5
PE 40:6	15:0-18:1(d7) PE	5.45	792.6	651.5	5
PE 40:7	15:0-18:1(d7) PE	4.95	790.6	649.5	5
PE 42:5	15:0-18:1(d7) PE	6.38	822.6	681.5	5
PE 42:6	15:0-18:1(d7) PE	5.51	820.6	679.5	5
d7-コレステロール	該当なし	4.92	376.2	376.2	10

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
コレステロール	d7-コレステロール	4.95	369.3	369.3	10
18:1(d7) CE	該当なし	8.28	675.2	369.4	10
CE 16:1	18:1(d7) CE	8.05	640.6	369.3	10
CE 18:1	18:1(d7) CE	8.29	668.6	369.3	10
CE 18:2	18:1(d7) CE	8.07	666.6	369.3	10
CE 20:1	18:1(d7) CE	8.49	696.6	369.3	10
CE 20:4	18:1(d7) CE	7.94	690.6	369.3	10
CE 20:5	18:1(d7) CE	7.74	688.6	369.3	10
CE 22:5	18:1(d7) CE	7.93	716.6	369.3	10
CE 22:6	18:1(d7) CE	7.81	714.6	369.3	10
d7-24 OH コレステロール	該当なし	2.0	392.4	374.3	10
7 ケトコレステロール	18:1(d7) CE	3.5	401.3	383.3	10
OH コレステロール	d7-24 OH コレステロール	2.1	385.4	367.5	10
4-β ヒドロキシコレステロール	18:1(d7) CE	4.27	420.3	385.3	10
7 デヒドロコレステロール	18:1(d7) CE	4.32	366.3	366.3	10
CE オキソ ODE	18:1(d7) CE	7.09	680.6	369.2	10
CE HODE	18:1(d7) CE	7.3	682.6	369.2	10
CE HpODE	18:1(d7) CE	6.3	698.6	369.2	10
CE オキソ HETE	18:1(d7) CE	7.31	704.6	369.2	10
CE HETE	18:1(d7) CE	7.27	706.6	369.2	10
15:0-18:1(d7)-15:0 TG	該当なし	7.93	829.4	523.5	8
TG 50:2/16:1	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.93	848.7	577.4	8
TG 52:4/18:1	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.73	872.7	573.4	8
TG 52:5/18:1	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.55	870.6	571.3	8
TG 52:3/18:1	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.94	874.7	575.4	8
TG 54:1/18:0	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.47	906.8	605.5	8
TG 54:2/18:0	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.3	904.7	603.4	8
TG 54:3/18:0	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.13	902.7	601.4	8
TG 54:4/18:1	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.93	900.7	601.4	8
TG 52:5/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.66	870.6	549.3	8
TG 54:4/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.08	900.6	579.3	8
TG 54:5/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.87	898.6	577.3	8
TG 54:6/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.68	896.6	575.3	8
TG 54:7/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.46	894.6	573.3	8
TG 56:3/18:1	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.27	930.8	631.5	8
TG 56:4/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.26	928.8	607.5	8
TG 56:5/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.06	926.7	605.4	8
TG 56:6/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.87	924.7	603.4	8
TG 56:7/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.67	922.7	601.4	8
TG 56:8/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.47	920.7	599.4	8
TG 56:9/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.27	918.6	597.3	8
TG 58:5/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.24	954.7	633.4	8
TG 58:6/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.04	952.7	631.4	8

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
TG 58:7/20:4	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.86	950.7	629.4	8
TG 58:8/22:6	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.76	948.7	603.4	8
TG 58:9/22:6	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.57	946.7	601.4	8
TG 60:7/22:6	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	8.15	978.7	633.4	8
TG 60:8/22:6	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	7.95	976.7	631.4	8
スフィンゴシン-1-リン酸 d17:1	該当なし	1.41	366.3	250.3	10
スフィンゴシン-1-リン酸	スフィンゴシン-1-リン酸 d17:1	1.58	380.3	264.3	10
スフィンガニン-1-リン酸	スフィンゴシン-1-リン酸 d17:1	1.68	382.3	266.3	10
15:0-18:1(d7) DAG	該当なし	6.08	605.6	346.5	10
DAG(16:0/18:0)	15:0-18:1(d7) DAG	6.64	614.4	313.2	10
DAG(16:0/18:1)	15:0-18:1(d7) DAG	6.29	612.6	313.2	10
DAG(18:0/18:1)	15:0-18:1(d7) DAG	6.65	640.4	341.3	10
DAG(18:1/18:1)	15:0-18:1(d7) DAG	6.29	638.4	339.3	10
DAG(16:0/20:4)	15:0-18:1(d7) DAG	5.8	634.5	313.3	10
DAG(18:1/20:4)	15:0-18:1(d7) DAG	5.81	660.5	339.3	10
DAG(18:0/20:4)	15:0-18:1(d7) DAG	6.21	662.5	341.3	10
DAG(18:0/22:6)	15:0-18:1(d7) DAG	6.06	686.6	341.3	10
DAG(18:1/22:6)	15:0-18:1(d7) DAG	5.65	684.6	339.3	10
18:1(d7) MAG	該当なし	2.5	381.3	272.5	10
20:4 MAG	18:1(d7) MAG	1.96	396.3	287.3	10
18:1 MAG	18:1(d7) MAG	2.56	374.3	265.3	10
AEA	18:1(d7) MAG	2.1	348.3	62.1	10
OEA	18:1(d7) MAG	2.57	326.3	62.1	10
PEA	18:1(d7) MAG	2.22	300.3	62.1	10
SM (d18:0/16:0)	SM(d18:1(d9)/18:1)	5.1	710.6	184.2	10
SM (d18:0/18:1)	SM(d18:1(d9)/18:1)	5.6	736.6	184.2	10
SM (d18:0/24:0)	SM(d18:1(d9)/18:1)	6.75	822.7	184.2	10
SM (d18:0/24:1)	SM(d18:1(d9)/18:1)	6.4	820.7	184.2	10
Cer (d18:0/16:0)	Cer (d18:1/17:0)	5.72	540.6	522.3	10
Cer (d18:0/18:0)	Cer (d18:1/17:0)	6.03	568.7	550.4	10
Cer (d18:0/24:0)	Cer (d18:1/17:0)	7.16	652.9	634.4	10
Cer (d18:0/24:1)	Cer (d18:1/17:0)	6.85	650.9	632.4	10
GB3 (d18:1/16:0)	GlcCer (d18:1/12:0)	4.93	1024.6	520.5	10
GB3 (d18:1/18:0)	GlcCer (d18:1/12:0)	5.45	1052.6	548.6	10
GB3 (d18:1/24:0)	GlcCer (d18:1/12:0)	6.65	1136.8	632.6	10
GB3 (d18:1/24:1)	GlcCer (d18:1/12:0)	6.28	1134.8	630.6	10
lysoPC 26:0	LPC(18:1(d7))	4.93	636.5	104.1	10
lysoPC 24:0	LPC(18:1(d7))	4.31	608.5	184.1	10
lysoPC 26:1	LPC(18:1(d7))	4.25	634.5	104.1	10
lysoPC 24:1	LPC(18:1(d7))	3.63	606.5	184.1	10
lysoPC 16:1	LPC(18:1(d7))	1.36	494.5	184.1	10

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : ネガティブモードでのリピドミクスアッセイのLC-MS取得パラメータ

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
15:0-18:1(d7) PA		5.37	666.5	241.3	10
PA 34:1	15:0-18:1(d7) PA	5.65	673.5	255.3	10
PA 36:1	15:0-18:1(d7) PA	6.12	701.5	283.3	10
PA 36:2	15:0-18:1(d7) PA	5.7	699.5	281.3	10
PA 38:5	15:0-18:1(d7) PA	5.1	721.5	281.3	10
PA 38:4	15:0-18:1(d7) PA	5.39	723.5	283.3	10
PA 40:7	15:0-18:1(d7) PA	5.71	745.5	281.3	10
PA 40:6	15:0-18:1(d7) PA	5.4	747.5	283.3	10
15:0-18:1(d7) PE		5.57	709.5	241.3	10
PE 36:1p	15:0-18:1(d7) PE	6.08	728.6	283.3	10
PE 36:2p	15:0-18:1(d7) PE	6.08	726.6	281.3	10
PE 36:4p	15:0-18:1(d7) PE	5.56	722.6	303.3	10
PE 38:4p	15:0-18:1(d7) PE	6.04	750.6	303.3	10
PE 38:5p	15:0-18:1(d7) PE	5.55	748.6	303.3	10
PE 38:6p	15:0-18:1(d7) PE	5.38	746.6	327.3	10
PE 40:4p	15:0-18:1(d7) PE	5.49	778.6	303.3	10
PE 40:5p	15:0-18:1(d7) PE	5.4	776.6	303.3	10
PE 40:6p	15:0-18:1(d7) PE	5.89	774.6	327.3	10
スルファチド (d18:1/12:0)		3.41	722.5	96.7	10
スルファチド (d18:1/16:0)	スルファチド (d18:1/12:0)	4.66	778.5	96.7	10
スルファチド (d18:1/18:0)	スルファチド (d18:1/12:0)	5.21	806.6	96.7	10
スルファチド (d18:1/18:0h)	スルファチド (d18:1/12:0)	5.13	822.6	96.7	10
スルファチド (d18:1/24:0)	スルファチド (d18:1/12:0)	6.45	890.7	96.7	10
スルファチド (d18:1/24:0h)	スルファチド (d18:1/12:0)	6.39	906.7	96.7	10
スルファチド (d18:1/24:1)	スルファチド (d18:1/12:0)	6.08	888.7	96.7	10
スルファチド (d18:1/24:1h)	スルファチド (d18:1/12:0)	6.06	904.7	96.7	10
GM3 d34:1	15:0-18:1(d7) PI	4.63	1151.7	290.1	10
GM3 d36:1	15:0-18:1(d7) PI	5.18	1179.8	290.1	10
GM3 d38:1	15:0-18:1(d7) PI	5.66	1207.8	290.1	10
GM3 d40:1	15:0-18:1(d7) PI	6.09	1235.8	290.1	10
GD3 d34:1	15:0-18:1(d7) PI	4.35	720.9	290.1	10
GD3 d36:1	15:0-18:1(d7) PI	4.87	734.9	290.1	10
GD3 d38:1	15:0-18:1(d7) PI	5.42	748.9	290.1	10
GD3 d40:1	15:0-18:1(d7) PI	5.8	762.9	290.1	10
GD3 d42:2	15:0-18:1(d7) PI	5.7	775.9	290.1	10
GD3 d42:1	15:0-18:1(d7) PI	6.2	776	290.1	10
GD1a/b d36:1	15:0-18:1(d7) PI	4.6	917.5	290.1	10
GD1a/b d38:1	15:0-18:1(d7) PI	5.2	931.5	290.1	10
GT1b d36:1	15:0-18:1(d7) PI	4.4	1063	290.1	10
GT1b d38:1	15:0-18:1(d7) PI	5	1077	290.1	10
GQ1b d36:1	15:0-18:1(d7) PI	5.67	1208.6	290.1	10
GQ1b d38:1	15:0-18:1(d7) PI	5.89	1222.6	290.1	10
9-PAHSA	15:0-18:1(d7) PI	5.12	537.6	255	10

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
9-OAHSA	15:0-18:1(d7) PI	5.12	563.6	281	10
9-PAHPA	15:0-18:1(d7) PI	5.12	509.6	255	10
9-OAHOA	15:0-18:1(d7) PI	5.12	561.6	281	10
9-POAHSA	15:0-18:1(d7) PI	5.12	537.6	253	10
9-POAHPA	15:0-18:1(d7) PI	5.12	509.6	253	10
BMP 28:0		3.55	665.3	227.2	10
BMP 40:8	BMP 28:0	3.62	817.5	303.3	10
BMP 44:12	BMP 28:0	3.35	865.5	327.3	10
BMP 36:2	BMP 28:0	4.65	773.5	281.3	10
AA d8		2.39	311.3	311.3	10
FFA(16:0)	AA d8	3.01	255.1	255.1	10
FFA(16:1)	AA d8	2.47	253.1	253.1	10
FFA(18:0)	AA d8	3.72	283.2	283.2	10
FFA(18:1)	AA d8	3.05	281.2	281.2	10
FFA(18:2)	AA d8	2.53	279.2	279.2	10
FFA(18:3)	AA d8	2.22	277.2	277.2	10
FFA(20:4)	AA d8	2.68	303.2	303.2	10
FFA(20:5)	AA d8	2.4	301.2	301.2	10
FFA(22:6)	AA d8	2.37	327.2	327.2	10
18:1(d7) pLPE		2.04	485.3	196.1	10
lysoPEp C16:0	18:1(d7) pLPE	2.21	436.3	196.1	10
lysoPEp C18:0	18:1(d7) pLPE	2.81	464.3	196.1	10
lysoPEp C18:1	18:1(d7) pLPE	2.25	462.3	196.1	10
18:1(d7) LPE		2.04	485.3	288.3	10
LPE(16:0)	18:1(d7) LPE	2	452.3	255.3	10
LPE(18:0)	18:1(d7) LPE	2.57	480.3	283.3	10
LPE(18:1)	18:1(d7) LPE	2.06	478.3	281.3	10
lysoPI 16:0	18:1(d7) LPE	1.66	571.3	241.1	10
lysoPI 18:0	18:1(d7) LPE	2.13	599.3	241.1	10
lysoPI 20:4	18:1(d7) LPE	1.4	619.3	241.1	10
LPS(17:1)		1.53	508.3	267.3	10
LPS(16:0)	LPS(17:1)	1.68	496.3	255.3	10
LPS(18:0)	LPS(17:1)	2.16	524.3	283.3	10
LPS(18:1)	LPS(17:1)	1.73	522.3	281.3	10
LPS(20:4)	LPS(17:1)	1.3	544.3	303.3	10
LPS(22:6)	LPS(17:1)	1.2	568.3	327.3	10
LPG(16:0)	18:1(d7) LPE	1.6	483.3	255.3	10
LPG(18:0)	18:1(d7) LPE	2.23	511.3	283.3	10
LPG(18:1)	18:1(d7) LPE	1.78	509.3	281.3	10
LPG(20:4)	18:1(d7) LPE	1.3	531.3	303.3	10
LPA(16:0)	18:1(d7) LPE	1.68	409.3	255.3	10
LPA(18:0)	18:1(d7) LPE	2.16	423.3	283.3	10
LPA(18:1)	18:1(d7) LPE	1.73	421.3	281.3	10
CL 58:0/14:0		7.22	619.5	227.2	10
CL 72:8	CL 58:0/14:0	7.37	723.7	279.2	10

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
コレステロール硫酸 d7		3.03	472.3	96.7	10
コレステロール硫酸	コレステロール硫酸 d7	3.06	465.3	96.7	10
15:0-18:1(d7) PG		5.01	740.5	241.3	10
PG 32:0	15:0-18:1(d7) PG	5.25	721.5	255.3	10
PG 32:1	15:0-18:1(d7) PG	5.58	719.5	255.3	10
PG 34:0	15:0-18:1(d7) PG	5.73	749.5	283.3	10
PG 34:1	15:0-18:1(d7) PG	5.24	747.5	255.3	10
PG 34:2	15:0-18:1(d7) PG	5.58	745.5	255.3	10
PG 36:0	15:0-18:1(d7) PG	6.15	777.5	283.3	10
PG 36:1	15:0-18:1(d7) PG	5.76	775.5	283.3	10
PG 36:2	15:0-18:1(d7) PG	5.25	773.5	281.3	10
PG 38:4	15:0-18:1(d7) PG	5.2	797.6	283.3	10
15:0-18:1(d7) PI		4.88	828.6	241.3	10
PI 36:1	15:0-18:1(d7) PI	5.64	863.6	283.3	10
PI 36:2	15:0-18:1(d7) PI	5.15	861.6	281.3	10
PI 36:4	15:0-18:1(d7) PG	4.63	857.6	255.3	10
PI 38:4	15:0-18:1(d7) PG	5.15	885.6	283.3	10
PI 38:5	15:0-18:1(d7) PG	4.65	883.6	281.3	10
PI 38:6	15:0-18:1(d7) PG	4.46	881.6	255.3	10
PI 40:5	15:0-18:1(d7) PG	5.01	911.6	283.3	10
PI 40:6	15:0-18:1(d7) PG	5.01	909.6	283.3	10
PI 40:8	15:0-18:1(d7) PG	4.06	905.6	303.3	10
15:0-18:1(d7)PS		5.03	753.5	241.3	10
PS 36:0	15:0-18:1(d7) PS	5.51	790.6	283.3	10
PS 36:1	15:0-18:1(d7) PS	5.75	788.6	283.3	10
PS 38:5	15:0-18:1(d7) PS	5.02	808.6	283.3	10
PS 38:4	15:0-18:1(d7) PS	5.25	810.6	283.3	10
PS 38:6	15:0-18:1(d7) PS	4.55	806.6	255.3	10
PS 40:7	15:0-18:1(d7) PS	4.56	832.6	281.3	10
PS 40:6	15:0-18:1(d7) PS	5.05	834.6	283.3	10
PS 40:4	15:0-18:1(d7) PS	5.77	838.6	303.3	10

10

20

30

【0411】

GlcCer及びGalCerの質量分析

グルコシルセラミド (GlcCer)、ガラトシルセラミド (GalCer)、グルコシルスフィゴシン及びガラトシルスフィゴシン分析を、エレクトロスプレー質量分析 (QTRAP 6500+, Sciex, Framingham, MA, USA) に結合させた液体クロマトグラフィー (Shimadzu Nexera X2システム, Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA) によって実施した。各分析について、45 で 0.45 mL / 分の流量を用いて、10 µL の試料を HALO HILIC 2.0 µm、3.0 × 150 mm カラム (Advanced Materials Technology) に対して注入した。移動相 A は、5 mM のギ酸アンモニウム及び 0.5 % のギ酸を含む 92.5 / 5 / 2.5 の ACN / IPA / H₂O から構成された。移動相 B は、5 mM のギ酸アンモニウム及び 0.5 % のギ酸を含む 92.5 / 5 / 2.5 の H₂O / IPA / ACN から構成された。勾配を以

40

50

下のようにプログラムした：100% Bで0.0～3.1分間、95% Bで3.2分間、85% Bで5.7分間、85% Bで7.1分間に保持し、7.25分間で0% Bに低下し、8.75分間保持し、10.65分で100%に戻り、11分間保持した。以下の設定を適用して、ポジティブイオンモードでエレクトロスプレーイオン化を行った：カーテンガスは25、衝突ガスは中間に設定され、イオンスプレー電圧は5500、温度は350、イオン源ガス1は55、イオン源ガス2は60。以下のパラメータを用いて、多重反応モニタリングモード(MRM)でAnalyst 1.6(Sciex)を使用してデータ取得を実行した：表4に報告している各種の滞留時間(msec)及び衝突エネルギー(CE)、脱クラスタリング電位(DP)は45、入口電位(EP)は10、及び衝突細胞出口電位(CXP)は12.5。脂質を、表4に報告される内部標準物質の混合物を使用して定量した。グルコシルセラミド及びガラクトシルセラミドを、それらの保持時間及び市販の参照標準物質(Avanti Polar Lipids、Birmingham、AL、USA)のMRM特性に基づいて同定した。MultiQuant 3.02(Sciex)を使用して定量化を行った。代謝産物を細胞数に正規化した。

10

【表4】

表4：GlcCer及びGalCerアッセイのLC-MS取得パラメータ

脂質	内部標準	RT	Q1 質量	Q2 質量	時点 (ミリ秒)
GlcCer(d18:1, 16:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.33	700.6	264.3	50
GlcCer(d18:1, 18:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.28	728.6	264.3	50
GlcCer(d18:2, 18:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.27	726.6	262.3	50
GlcCer(d18:1, 20:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.23	756.6	264.3	50
GlcCer(d18:2, 20:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.22	754.6	262.3	50
GlcCer(d18:1/22:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.19	784.6	264.3	50
GlcCer(d18:1/22:1)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.2	782.6	264.3	50
GlcCer(d18:2/22:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.18	782.6	262.3	50
GlcCer(d18:1/24:1)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.17	810.6	264.3	50
GlcCer(d18:1/24:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.15	812.7	264.3	50
Glu-Sph 18:1	Glu-Sph_d5	7.77	462.2	264.3	200
GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5		2.27	733.6	269.3	7
Glu-Sph_d5		7.77	467.2	269.3	15
GalCer(d18:1/16:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.5	700.5	264.3	50
GalCer(d18:1/18:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.45	728.6	264.3	50
GalCer(d18:2/18:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.45	726.6	262.3	50
GalCer(d18:1/20:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.4	756.6	264.3	50
GalCer(d18:2/20:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.39	754.6	262.3	50
GalCer(d18:1/22:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.35	784.6	264.3	50
GalCer(d18:1/22:1)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.56	782.6	264.3	50
GalCer(d18:2/22:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.34	782.6	262.3	50
GalCer(d18:1/24:1)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.31	810.7	264.3	50
GalCer(d18:1/24:0)	GlcCer(d18:1/ 18:0)-d5	2.3	812.7	264.3	50
Gal-Sph 18:1	Glu-Sph_d5	7.87	462.2	282.3	200

20

30

40

【0412】

図3A～F及び図4A～Pは、慢性脱髄を有するTrem2^{-/-}マウスからの前脳及び星状膠細胞ではないが単離されたミクログリアにおけるコレステリルエステル及びミエリン濃縮脂質の上昇を強調する。図3において、対照またはクプリゾン食餌によるTrem2^{+ / +}、Trem2^{+ / -}、及びTrem2^{- / -}マウスにおいて、前脳総コレステロ

50

ールレベルは変化しない(図3A)。コレステリルエステル(図3B)、酸化コレステリルエステル(図3C)、BMP(図3D)、及びトリアシルグリセリド(図3E)レベルは、対照食餌または5週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウス、ならびに12週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}、及びTrem2^{+/-}と比較して、12週間クプリゾンによるTrem2^{-/-}マウスからの前脳において増加する。GM3 d38:1及びGM3 d40:1(図3F)のレベルは、対照食餌または5週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウス、ならびに12週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}、及びTrem2^{+/-}マウスと比較して、12週間クプリゾン食餌によるTrem2^{-/-}マウスからの前脳において増加する。図4では、12週間クプリゾン食餌によるTrem2^{-/-}脳から単離されたミクログリアは、対照食餌または5週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}及びTrem2^{+/-}と比較して、コレステリルエステル(図4A)、BMP(図4B)、ヘキソシルセラミド(図4C)、及びガラクトシルセラミドレベル(図4D)の増加が示されている。対照またはクプリゾン食餌によるTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}脳から単離された星状膠細胞濃縮細胞集団において、コレステリルエステル(図4E)、BMP(図4F)、ヘキソシルセラミド(図4G)、及びガラクトシルセラミド(図4H)の脂質レベルの変化は検出されなかった。

10

20

【0413】

実施例3. Trem2 KOマウス及びiPSCミクログリアから培養されたBMDMにおけるインビトロでの脂質貯蔵の増加

この実施例では、免疫細胞化学及び質量分析の両方によって、インビトロで培養され、酸化低密度リポタンパク質(oxLDL)またはミエリンで処理されるTrem2 KO BMDMで観察される脂質貯蔵表現型について記載する。

【0414】

マウスBMDMの収穫及び培養

マウス大腿骨及び脛骨を解剖し、70%エタノールで短時間滅菌した。骨をHBSSで2回洗浄し、次いで、10mLのHBSS中で乳鉢及び乳棒で割断した。細胞懸濁液を70µmの細胞ストレーナーを通して濾過し、300xgで5分間スピンさせ、上清を廃棄した。細胞ペレットを、室温で4分間、ACK溶解緩衝液(Thermo Fisher A1049201)に再懸濁した。10mLのRPMI-1640(Thermo Fisher)+10%のHyclone FBS(GE Healthcare)+ペニシリンストレプトマイシン(Thermo Fisher)を添加して、ACK溶解を停止させ、次いで、300xgで5分間スピンさせ、上清を廃棄した。細胞を、50ng/mLのマウスM-CSF(Life Technologies、PMC2044)を含むRPMI培養培地に再懸濁し、カウントし、1x10⁶細胞/mLに希釈した後、非組織培養処理ペトリ皿に播種した。播種後3日目に、新鮮なマウスM-CSF(50ng/mL)を添加した。播種後5日目に、細胞培養培地を吸引し、PBSで細胞を一度洗浄した。細胞を、RPMI/FBS/Pen-Strepに再懸濁し、細胞スクレーパーで回収した。細胞を300xgで5分間スピンさせ、上清を廃棄し、組織培養処理プレート上で直接培養するために1x10⁶細胞/mLに希釈か、または後で使用するためにRPMI/FBS/Pen-Strep+10%DMSO中に凍結のいずれかを行った。

30

40

【0415】

iPSCミクログリア法

ヒトiPSC由来ミクログリアの生成

方法の概要: 造血前駆細胞を、野生型及びノックアウトiPS細胞(下記のノックアウトラインプロトコルの生成)から、市販のキット(StemCell Technologiesカタログ番号05310)を使用して、製造業者の指示に従って生成する。造血幹細胞分化の12日目に、細胞は、HSCマーカーCD34、CD43、及びCD45に対

50

して陽性であり、この時点で、浮遊細胞及び接着細胞は、一次ヒト星状膠細胞を含有する6ウェルプレートに移される。再播種細胞は、培地C(出典:Pandya, H et al., Nat Neurosci, 2017. 20(5): p. 753-759)(IMDM、10% Hyclone FBS、PenStrep、20 ng/ml IL3、20 ng/ml GM-CSF、20 ng/ml M-CSF)において14~21日間星状膠細胞と共培養され、その間に前駆細胞は漸進的に除去され、浮遊細胞は主に(>80%)成熟ミクログリアである。成熟ミクログリアを、恒常的培養条件(出典:Muffat, J et al., Nat Med, 2016. (11): p. 1358-1367)(MGdM培地)にアッセイ前3~7日間、移行させる。

【0416】

安定したノックアウト細胞株の生成

CRISPRベースのアプローチを、IDT(Alt-Rシステム:<https://www.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing/alt-r-crispr-cas9-system>)及びLonza cat #V4XP-3032を使用してnucleofectionを介して導入されたNEB(Cas9 cat #M0646M)からの試薬を用いたRNPベースのプロトコルで使用した。

【0417】

ミエリン精製

ミエリンを、Safaiyan, S et al. Nat Neurosci, 2016. 19(8): p. 995-8に記載される方法を使用して、野生型C57Bl/6マウス脳(Jackson Laboratories)から精製した。精製後、ミエリンをPBSに再懸濁し、DCタンパク質アッセイキット2(BioRad, 5000112)を使用して、1 mg/mLのタンパク質濃度に調整した。

【0418】

BMDMを、5 ng/mLマウスM-CSFを補充した組織培養処理96ウェルプレート(Cell Carrier, PerkinElmer)中1ウェル当たり100,000細胞の密度でRPMI/10%FBS/Pen-Strep中に播種した。ACAT阻害剤K604を、公開されているプロトコル(US2004/0038987A1)に従って調製した。

【0419】

ナイルレッド染色、フィリピン染色または脂質学のためのインビトロ脂質貯蔵アッセイWTまたはTREM2 KOのいずれかのiPSCミクログリア(30,000/ウェル)またはBMDM(100,000/ウェル)を、20 ng/mLのmCSFを含むそれぞれのそれぞれの完全血清培地中のPDL被覆96ウェルプレート上に播種した。37°Cで24時間後、精製されたミエリン(上述のマウス脳から単離され、5 µg/mL(2時間取り込み)または25 µg/mLまたは50 µg/mL(48~72時間取り込み)最終濃度)またはoxLDL(Thermo Fisher L34357, 50 µg/mL最終濃度)をウェルに添加した。oxLDLを用いた実験の場合、同じ量のoxLDLの第2の添加を、第1の添加の24時間後にウェルに添加した。ACAT阻害剤の実験では、500 nMのACAT阻害剤K604またはビヒクル対照を第1の脂質用量と一緒に添加した。脂質処理から2時間(図9)後または37°Cで48時間~72時間後、細胞を収集またはイメージングした。ミエリンウォッシュアウト実験の場合、ミエリンを24時間のインキュベーション期間の後に除去し、続いて24~48時間のインキュベーションのために抗体含有培地に置き換えた。

【0420】

LC-MSのために、細胞を、以下のプロトコルに従って抽出した。ナイルレッドイメージングのために、上清を除去し、細胞を、1 µMのナイルレッド(Thermo Fisher N1142)及び1滴/mLのNucBlue(Thermo Fisher R37605)を含有する生細胞イメージング緩衝液(Life Technology

10

20

30

40

50

es、A14291DJ)中37で30分間インキュベートした。インキュベーション後、染色溶液を除去し、細胞を4%のパラホルムアルデヒドに固定した。次いで、細胞を、Opera Phoenixハイコンテント共焦点イメージング装置で568及びDAPI照明設定を使用してイメージングした。フィリピン染色のために、上清を除去し、細胞を4%のパラホルムアルデヒドを使用して固定した。細胞を、コレステロール検出洗浄緩衝液(Abcam ab133116)で各々5分間、3回洗浄した。フィリピンIIをコレステロール検出アッセイ緩衝液(Abcam ab133116)中で1:100に希釈し、細胞に30分間添加した。細胞をさらに2回洗浄緩衝液で洗浄し、DAPI照明設定を使用してイメージングした。機器に付属のHarmonyソフトウェア上のスポット調査アルゴリズムを使用して、脂質及びフィリピンスポットを分析した。図5A~Bは、ニールレッド染色によって示されるように、WT BMDMと比較して、48時間にわたってoxLDL(50µg/mL)で処理したTrem2 KO BMDMにおける脂質蓄積の増加を示す(図5A)。細胞を63倍の解像度でイメージングし、ハーモニーソフトウェア上のスポット調査アルゴリズムを使用して、ニールレッドを総スポット面積として定量化した(図5B)。

10

【0421】

図9は、2時間5µg/mLのミエリンが投与された野生型マウスからマクロファージが分化され、続いて、ミエリン取り込み(T0)の直後、またはミエリンウォッシュアウト及び2時間(T2)もしくは4時間(T4)の追跡後に抽出されるの骨髄におけるコレステロール及びコレステリルエステル(CE)レベルを示す。ACAT阻害剤を、ミエリン取り込み中に添加し、4時間のウォッシュアウトを通して維持した(T4+ACAT阻害剤)。

20

【0422】

図11A~Cは、ミエリンが投与されたWT及びTREM2 KO iPSCミクログリアの両方においてACAT阻害剤の存在下でコレステリルエステルが蓄積されていないことを示し、コレステリルエステル蓄積がACAT依存性であることを示す。コレステロールが対照として示され、コレステロールはACAT阻害によっては影響を受けない。

【0423】

インビトロ試料の脂質抽出プロトコル

次いで、上記のようにoxLDLまたはミエリンのいずれかで処理した細胞を、氷上に保ちながらPBSで洗浄した。96ウェルプレート中の細胞に、内部標準物質を含有する9:1メタノール:水の水溶液70µlを加えた。プレートを4C及び1200rpmで20分間シェーカー上で攪拌し、次いで、300xgで5分間スピンドウンした。50µlの上清をLC-MSバイアルに移し、機器上で実行するまで-80Cに維持した。質量分析プロトコルについては、実施例2を参照されたい。

30

【0424】

図6A~Eにおいて、48時間、oxLDLで処理したWT及びTrem2 KO BMDMに対して質量分析を行い、細胞内に蓄積している脂質種を特徴付けた。oxLDL処理は、WT及びTrem2 KO BMDMの両方において脂質存在量を増加させるが、Trem2 KO BMDMにおいて、コレステリルエステル(図6A)、ガングリオシド(図6B)、トリアシルグリセリド(図6C)、及びヘキソシルセラミド(図6D)の増加が悪化する。

40

【0425】

図7A~Gにおいて、ミエリンで48時間処理したWT及びTrem2 KO BMDMに対して質量分析を行い、細胞内に蓄積する脂質種を特徴付けた。Trem2 KO BMDMは、WT BMDMと比較して、コレステリルエステル(図7A)、酸化コレステリルエステル(図7B)、ジアシルグリセリド(図7C)、トリアシルグリセリド(図7D)、ヘキソシルセラミド(図7E)、ラクトシルセラミド(図7F)、及びガングリオシド(図7G)のより大きな蓄積を示す。

【0426】

50

図 8 A ~ H において、ミエリン (2 5 u g / m L) で 7 2 時間処理した W T 及び T R E M 2 K O i P S C ミクログリアに対して質量分析を行い、細胞内に蓄積する脂質種を特徴付けた。T R E M 2 K O i P S C は、コレステロール (図 8 A)、ホスファチジルセリン 3 8 : 4 (図 8 B)、ピス (モノアシルグリセロ) リン酸 4 4 : 1 2 (図 8 C)、リゾホスファチジルコリン 1 6 : 0 (図 8 D)、血小板活性化因子 (図 8 E)、コレステロール硫酸 (図 8 F)、及びリゾホスファチジルエタノールアミン (図 8 G) のより大きな蓄積を示す。

【 0 4 2 7 】

図 2 3 A 及び 2 3 B は、ミエリン (2 5 u g / m L) での処理及びフィリピンでの遊離コレステロールの染色後、T r e m 2 W T B M D M よりも、T r e m 2 K O B M D M がエンドリソソーム系においてより多くの遊離コレステロールを蓄積することを示す。

10

【 0 4 2 8 】

図 2 3 C 及び 2 3 D は、抗 T R E M 2 抗体が、対照抗体 (抗 R S V) と比較して、ヒト i P S C 由来ミクログリア中の遊離コレステロールレベルを低下させることを示す。図 2 3 C は、様々な条件下でのフィリピンによる遊離コレステロールの染色を示し、図 2 3 D は、フィリピンパンクタの定量化を示す。

【 0 4 2 9 】

実施例 4 . T R E M 2 抗体または外因性 A P O E による i P S C ミクログリアにおける脂質蓄積の改善

i P S C を生成し、B M D M を、実施例 3 と同様の方法を使用して回収 / 培養した。

20

【 0 4 3 0 】

インビトロ脂質貯蔵アッセイ及びナイルレッド染色または脂質学のための上記実施例 3 からのプロトコルを以下のように修正した：3 7 での脂質処理の 2 4 時間後、T R E M 2 抗体または R S V 対照を、1 0 0 n M の最終濃度までウェル中に添加した。細胞を収集またはイメージングする前に、細胞を 3 7 でさらに 4 8 時間インキュベートした。A P O E 3 での実験では、細胞をミエリン (2 5 u g / m L) で 2 4 時間処理した後、培地を 1 0 u g / m L の A P O E 3 を含有する培地と交換した。2 4 時間後、細胞が分析のために収集された。リポドミクスまたはナイルレッド染色を、上記のプロトコルに従って行った。

【 0 4 3 1 】

図 1 0 は、ナイルレッド染色の総スポット面積によって定量化されるように、ミエリンを供給するとき (2 4 時間) に、T r e m 2 K O B M D M が W T B M D M よりも多くの脂質を蓄積することを示す。この蓄積は、脂質流出を媒介することが示されている外因性ヒト A P O E 3 の添加によって改善される (P M I D : 9 5 4 1 4 9 7、P M I D : 1 0 6 9 3 9 3 1、P M I D : 1 5 4 8 5 8 8 1) 。

30

【 0 4 3 2 】

図 1 2 A ~ 1 2 C は、T R E M 2 抗体が、ヒト i P S C 由来の W T ミクログリア中のミエリン誘導脂質蓄積の量を減少させ得ることを示す。これは、L C - M S 上のナイルレッド染色及びトリアシルグリセリドレベルの測定の両方によって示される。

【 0 4 3 3 】

図 1 2 D は、2 4 時間のミエリン処理後 7 2 時間で、いくつかの異なる抗 T R E M 2 抗体で処理した i P S C ミクログリア細胞の細胞溶解物中の質量分析によって検出されるトリアシルグリセリド (T A G) 脂質種のレベルを示す。抗 T R E M 2 抗体 A 及び B は T R E M 2 のストーク領域に結合するが、抗 T R E M 2 抗体 C、D 及び E は T R E M 2 の I g V 領域に結合する。図 1 2 E は、抗 T R E M 2 抗体を用いたミエリンウォッシュアウト実験を行った i P S C ミクログリア細胞の細胞溶解物における質量分析によって検出される T A G 脂質種のレベルを示す。図 1 2 D 及び 1 2 E で生成した L C / M S データを、各脂質種についてミエリン + アイソタイプ対照に正規化した。

40

【 0 4 3 4 】

i P S C ミクログリア中の脂質蓄積は、細胞溶解物中の特定の脂質種の検出のための中性

50

脂質染色（ナイルレッド）の増加によって及びLC/M Sによって反映されるミエリン処理により誘導される。図12A～12Eに例示されるデータは、LC/M Sによって測定されたTAG脂質種レベルの減少によって示されるように、複数の抗TREM2抗体によるミエリンチャレンジ後のiPSCマイクログリア細胞の処置が脂質種の蓄積を減少させたことを集合的に示している。抗体処置の結果としての脂質レベルの低下が、24時間～72時間の範囲の異なる時点で観察された。脂質レベルの低下が脂質取り込みの遮断によって引き起こされる可能性を排除するために、抗TREM2抗体添加の前にミエリンを除去したミエリンウォッシュアウト実験を実施した。図12Eは、抗TREM2抗体が、アイソタイプ対照と比較した抗体処理前のミエリンウォッシュアウトを伴うiPSCマイクログリアにおける脂質レベルも低下させたことを示す。

10

【0435】

実施例5．TREM2 KO細胞におけるミエリンまたはoxLDL貯蔵に対するACAT1阻害剤、ベキサロテン、及びGW3965の効果
WTまたはTREM2 KOのいずれかのiPSCマイクログリア（30,000/ウェル）またはBMDM（100,000/ウェル）を、20ng/mLのmCSFを含むそれぞれの完全血清培地中のPDLコーティング96ウェルプレート上に播種した。37℃で24時間後、精製されたミエリン（上述のマウス脳から単離され、5μg/mL（2時間取り込み）または25μg/mLまたは50μg/mL（48～72時間取り込み）最終濃度）またはoxLDL（Thermo Fisher L34357、50μg/mL最終濃度）をウェルに添加した。OxLDLを用いた実験の場合、同じ量のoxLDLの第2の添加を、第1の添加の24時間後にウェルに添加したACAT阻害剤の実験では、500nMのACAT阻害剤K604またはビヒクル対照を第1の脂質用量と一緒に添加した。ベキサロテンを用いた実験では、10μMのベキサロテンまたはビヒクル対照を精製ミエリンと一緒に添加した。GW3965を用いる実験では、10μMのGW3965またはビヒクル対照を精製ミエリンと一緒に添加した。脂質処理の2時間（図9）後または37℃で48時間～72時間後に、細胞を収集またはイメージングした。

20

【0436】

図13Aは、ナイルレッド染色によって定量されるように、ミエリンデブリ（25μg/mL）で48時間処理した場合、Trem2 KO BMDMがWT BMDMよりも中性脂質を蓄積することを示す。この蓄積は、ベキサロテン（10μM）との共処理によって低減される。

30

【0437】

図13Bは、ヒトiPSC由来TREM2 KOマイクログリアが様々なコレステリルエステル（CE）種を蓄積し、この蓄積がACAT阻害剤K604（500nM）及びLXRアゴニストGW3965（10μM）との共処理によって低減されることを示す。

【0438】

実施例6．慢性脱髄を有するTrem2ノックアウトマウスにおける脂質代謝及びリソソーム機能に關与する遺伝子の発現の変化

この実施例では、マウスマイクログリア遺伝子発現分析について記載する。特に、これらの分析は、1)TREM2欠損が、慢性脱髄中のDAM変換を防止すること、2)TREM2欠損が、年齢依存的な損傷関連マイクログリア状態への変換をブロックすること、及び3)Trem2^{-/-}マイクログリアが、単一細胞RNAseqによって示されるように、脱髄時に損傷関連マイクログリア状態への減弱した転移を呈することを実証する。

40

【0439】

一般に、実施例1に記載される方法に類似する方法を使用し、単一細胞RNA配列クラスター及び発現分析を以下に示されるように実施した。

【0440】

単一細胞RNA配列クラスター及び発現分析

Log2正規化遺伝子発現マトリックス上でPCAを行い、上位21個の主要成分を保持した。共有最近傍グラフ（Xu, C., and Su, Z. (2015). Bioinf

50

ormatics 31, 1974 - 1980) は、PC空間内のデータにわたって構築された後、Louvain法 (Blondel, et al., (2008) Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment 2008) を使用してコミュニティ検出が行い、8つのクラスターのうちの1つに細胞を割り当てた。クラスターごとのマーカー遺伝子は、scrannパッケージで実装されるように、対ウィルコクソン試験を徹底的に実施することによって特定された。簡潔には、クラスター内の各遺伝子の発現レベルを、他の7つのクラスターの各々に対して個別に試験した。得られた7つのp値をシムズ法 (Simes, R. J. (1986). Biometrika 73, 751 - 754) を使用して組み合わせて、クラスター当たりの遺伝子の発現変動状態について最終的なp値を提供し、次いで、Benjamini-Hochberg法 (Benjamini, Y., 及び Hochberg, Y. (1995) Journal of the Royal Statistical Society 57, 289 - 300) を用いて複数の試験について修正するように調整した。各比較のための効果的なサイズは、「オーバーラップ割合」、すなわち、ソースクラスター内でランダムに選択された細胞が、クエリクラスター内のランダム細胞よりも高い遺伝子Xの発現を有する確率として計算される。オーバーラップ割合 (ウィルコクソン効果量) を全ての対比較にわたって平均化して、クラスター内の遺伝子の最終的な効果サイズを提供する。最後に、FDR < 0.05、及び0.4未満または0.6超の平均オーバーラップ割合を有する遺伝子を同定することによって、クラスター当たりのマーカー遺伝子を抽出した。

10

20

【0441】

TREM2欠損は、慢性脱髄中のDAM変換を防ぐ
ミクログリアにおけるTrem2依存性遺伝子発現に対する急性及び慢性脱髄の効果を特徴付けるために、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウスに、5週間または12週間のいずれかの0.2%のCPZの食餌を与えた。CD11b⁺ミクログリアをFACSによって単離し、トランスクリプトーム分析をRNAseqを使用して行った。CD11b⁺細胞の大部分がCD45^{low}であった。実際、CD45^{high}細胞は、3つ全ての遺伝子型についてCPZの不在下での全生細胞の0.2%未満、及びCPZ食餌の存在下での0.5%未満を表し、このモデルにおけるマクロファージのわずかな浸潤を示唆した。主成分分析 (PCA) は、CPZ処置がTrem2^{+/+}及びTrem2^{+/-}動物由来のミクログリア試料の転写変化を誘導したが、CPZがチャレンジしたTrem2^{-/-}ミクログリアは、未処置動物のものとクラスター化したことを示した。遺伝子発現変動分析は、通常食餌条件下での顕著な遺伝子型依存性差異を明らかにすることができなかった (実施例1、図1A~B、絶対log₂倍率変化 > 0.5、FDR < 0.2を参照されたい)。対照的に、同じ閾値をCPZの効果に適用することで、5週間後の変化、及び12週間後のより強い効果を有する、数百個の著しく上方または下方制御された遺伝子が同定された (実施例1、図1A~1Bを参照されたい)。5週間~12週間CPZ対対照食事との間の遺伝子型別比較により、これらの遺伝子発現変化は、ほぼ完全に、Trem2^{+/+}及びTrem2^{+/-}動物由来のミクログリアに限定される一方で、Trem2^{-/-}マウス由来のミクログリアは、ミエリンチャレンジに应答することができなかったことが確認された。

30

40

【0442】

Reactomeデータベースからの遺伝子セット分析 (Fabregat, et al. (2018). Nucleic Acids Res 46, D649 - D655) を使用して、リソソーム及びファゴソーム機能、AD、酸化リン酸化及びコレステロール代謝に関与する遺伝子の有意なTrem2依存性上方調節が検出された。例えば、図14A~14Bに示すように、リソソーム機能及び脂質代謝に関与する遺伝子は、急性及び慢性脱髄時にTrem2^{+/+}及びTrem2^{+/-}マウスミクログリアにおいて上方制御されるが (それぞれ、5週間及び12週間クプリゾン処置)、慢性及び急性脱髄を伴うTrem2^{-/-}マウスミクログリアにおいて上方制御の低減を示す。図14Aは、Trem

50

m2+/+, Trem2+/-、及びTrem2-/- バルクミクログリアにおけるリソソーム機能に関連する個々の遺伝子における遺伝子発現のlog2倍率変化を、5週間または12週間クプリゾン処置（それぞれ、右挿入、上または下）と比較して示す。図14Bは、Trem2+/+, Trem2+/-、及びTrem2-/- バルクミクログリアにおける脂質代謝に関連する個々の遺伝子における遺伝子発現のlog2倍率変化を、5週間または12週間クプリゾン処置（それぞれ右挿入、上または下）と比較して示す。例えば、Ctse及びCts1等のリソソーム分解経路の主要遺伝子はTrem2+/+及びTrem2+/- ミクログリアにおける慢性脱髄時に2倍上方制御された（FDR<0.05）が、Trem2-/- ミクログリアにおいては変わらなかった（図14A、相互作用p値0.05）。いくつかのTrem2遺伝子は、ApoEに加えてCh25h、Lipa、Nceh1、Npc2、及びSoat1を含む、コレステロール輸送及び代謝の複数の態様を制御するように見える。遺伝子セット濃縮はまた、前述のDAM遺伝子（Keren-Shaul, et al. (2017). Cell 169, 1276-1290 e1217）は、両方の時点でTrem2+/+及びTrem2+/- の両方の動物からのミクログリアにおけるCPZ処置に応答して有意に上方制御された（図14C）。このDAM様応答は、Trem2-/- 動物由来の試料中で減弱し（図14C及び15C）、これは、慢性CPZ脱髄が、5XFAD及びSOD1ミクログリアで観察されたものを反映するミクログリア発現変化を誘導することを示唆する（Keren-Shaul, et al. (2017). Cell 169, 1276-1290 e1217）。

10

20

【0443】
恒常性からDAMへのミクログリア移行については、中間状態へのTREM2非依存性移行（DAM段階1）、続く第2のTREM2依存性変化（DAM段階2）（Keren-Shaul et al. (2017) Cell 169, 1276-1290 e1217）の2段階のプロセスとして記載されている。以前のモデルと一致して、恒常的遺伝子P2ry12及びTmem119は、CPZに反応してTrem2+/+及びTrem2+/-（FDR<0.01）において有意に下方制御されたが、Trem2-/- ミクログリアでは下方制御されなかった（図14D、遺伝子型-食餌相互作用p値<0.05）。CPZ処置後のTrem2+/+及びTrem2+/- ミクログリアと比較して、Trem2-/- におけるApoE（相互作用p値<0.001）、Fth1（相互作用p値<0.005）、及びTyrobp（相互作用p値<0.1）等のステージ1DAM遺伝子の低減した誘導も観察された（図14E）。例えば、Ax1（相互作用p値<0.05）、Cd9（相互作用p値<0.001）、またはCsf1（相互作用p値<0.1）等のステージ2DAM遺伝子について観察されるものと同様に、12週間後にTrem2+/+及びTrem2+/- 動物のCPZ処理によって、ApoEの発現を8倍以上上方制御したが、この応答は、Trem2-/- 動物において減弱した（図14F）。要約すると、これらのデータは、ミエリンデブリの食細胞クリアランスの調節因子としてのTREM2を確認し、エンドリソソーム処理及び脂質代謝における役割を指し、コレステロール輸送及び代謝が明確に示される。さらに、それらは、CPZ慢性脱髄が損傷関連ミクログリア状態を誘発し、これはTrem2-/- ミクログリアで開始されないことを示唆している。

30

40

【0444】
TREM2欠損は、年齢依存性の損傷関連ミクログリア状態への変換をブロックする。遺伝子発現研究は、加齢ミクログリアがDAM転写状態を取得することを示し、ミクログリアが加齢誘発性実質損傷に反応し得ることを示唆している（Keren-Shaul, et al. (2017). Cell 169, 1276-1290 e1217）。野生型ミクログリアと比較して、加齢Trem2-/- ミクログリアが損傷関連ミクログリア状態に移行する能力が低いかどうかを試験するために、若年（2ヶ月齢）及び加齢（15~17ヶ月齢）野生型及びTrem2-/- マウスに由来する選別ミクログリアに対して遺伝子発現解析を行った。

【0445】

50

様々な恒常的遺伝子の下方制御、ならびにDAM1及びDAM2遺伝子の上方制御に基づいて、加齢野生型脳から単離されたミクログリアが損傷関連ミクログリア特徴を発現したことが確認された(図15B及び15C)。この応答は、CPZ処置Trem2^{-/-}ミクログリアにおいて観察されるように、Trem2^{-/-}ミクログリアにおいて大部分減弱した。DAM2遺伝子セットは、加齢Trem2^{-/-}ミクログリアと比較して、加齢野生型ミクログリアにおけるLpl及びSpp1のより顕著な上方制御によって例示されるように、DAM1遺伝子セットよりも大いに影響を受けた(図15B及び15C)。これは、5XFADミクログリアに示されたDAM2プロファイルのTrem2依存性と一致する(Keren-Shaul, et al. (2017). Cell 169, 1276-1290 e1217)。しかしながら、コレステロール代謝関連遺伝子モジュールは、対照ミクログリアと比較して、CPZ処置Trem2^{-/-}ミクログリアと同様に、加齢Trem2^{-/-}ミクログリアにおいて大いに影響を受けなかった(図15B及び15C)。まとめると、これらのデータは、CPZチャレンジTrem2^{-/-}マウス由来のミクログリアにおいて観察される適応不良機能が、加齢Trem2^{-/-}マウス由来のミクログリアにおいても存在することを示唆するが、後者における遺伝子発現は、CPZチャレンジと比較した場合、それほど大いに変化しない。

10

【0446】

Trem2^{-/-}ミクログリアは、単一細胞RNA配列によって示すように、脱髄時に損傷関連ミクログリア状態への減弱移行を示す。

以下の実験は、1)バルクRNAseqプロファイルで観察される集団ベースのCPZ誘導転写変化がすべてのミクログリアに普遍的であるか、または2)単一細胞レベルで異種転写応答が生じるかどうかを判定するように設計された。この問題に対処するために、scRNAseqを、慢性脱髄を有するTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}マウスからのミクログリアと比較して、Trem2^{+/+}対照脳から単離されたCD11b⁺/CD45^{low}ミクログリアで行った。

20

【0447】

これらの実験により、3,023個の個々の細胞についてデータが生成された。これらのデータ内で転写的に異なるミクログリアの亜集団を特定するために、共有最近傍アプローチを使用して、単一細胞発現プロファイルにわたって教師なしのグラフベースのクラスタリングを実行した(Xu, C., and Su, Z. (2015). Bioinformatics 31, 1974-1980)。これにより、ミクログリアの8つの亜集団が特定され、各々が全ての分析細胞の2%~19%を占める。群にわたるクラスターメンバーシップの定量化は、Trem2^{+/+}対照において本質的に存在しなかったが(3%未満)、強力な治療特異的及び遺伝子型特異的拡大及び崩壊を示した2つのクラスター(4及び8)を特定した。クラスター4における細胞の発現プロファイルは、Trem2の少なくとも1つの機能的コピー(Trem2^{+/+}対照の約1%、Trem2^{+/+}CPZ及びTrem2^{+/-}CPZの16%~19%、Trem2^{-/-}CPZの約1.5%)で慢性脱髄に曝露されたミクログリアにおいてのみ観察された。クラスター8におけるミクログリアの発現プロファイルはまた、Trem2^{+/+}対照(2.3%未満)においてもほとんど存在せず、Trem2^{+/+}CPZマウス及びTrem2^{+/-}CPZマウスにおいてそれらの相対的存在量が軽度増加し(約10%)、Trem2^{-/-}CPZマウスにおいて最も豊富であった(約20%)。

30

40

【0448】

各クラスター内の発現プロファイルをさらに特徴付けるために、マーカー遺伝子解析を行って、FDR<0.05で残りの7つのクラスターに関してクラスター特異的な過剰発現及び過小発現を示した所与のクラスター内の遺伝子を特定した。クラスター当たりの上位15個の上方制御遺伝子及び下方制御遺伝子の相対発現は、これらのクラスターが転写的に異なることの確認となるが、クラスター間の発現において排他的である遺伝子を見出すことは稀である。バルクミクログリアデータからの所見と一致して、Trem2^{+/+}CPZ及びTrem2^{+/-}CPZ濃縮クラスター4における上位上方制御マーカー遺伝

50

子は、C t s b、C t s d、及びC t s z等のリソソーム遺伝子、ならびにA p o e及びL p l等の脂質代謝に関与する遺伝子から構成された(図16A)。クラスター4において下方制御されたマーカー遺伝子は、P 2 r y 1 2及びT m e m 1 1 9等のミクログリア恒常性遺伝子を含むし、このクラスターにおけるミクログリアがより反応性が高い状態にあることを示唆している(図16A及び16B)。クラスター8内の上位上方制御マーカー遺伝子は、上方制御クラスター4と同様であるが、程度は低い(図16A及び16C)。したがって、クラスター8における上方制御マーカー遺伝子は、同様に、C t s b、C t s d、及びA p o e等のリソソーム及び脂質代謝関連遺伝子から構成された(図16A)。このデータは、T r e m 2 - / - C P Zミクログリアが、脱髄の存在下での反応状態への適切な変換を可能にするために、リソソーム及び脂質代謝関連遺伝子の転写を完全に上方制御することができないことを強化する。しかしながら、T r e m 2 + / +マウス及びT r e m 2 + / -マウスの脳内の全てのミクログリアが、慢性脱髄で遺伝子発現を変化させるわけではない。むしろ、総ミクログリア集団のおよそ20%は、上記の遺伝子を上方制御する。

10

【0449】

バルクミクログリアデータからの所見と一致して、T r e m 2 + / +及びT r e m 2 + / - C P Zミクログリアクラスター4で見出された転写プログラムはまた、以前にD A M 2発現で特徴付けられた上方制御マーカー遺伝子から多く構成され(K e r e n - S h a u l , e t a l . (2 0 1 7) . C e l l 1 6 9 , 1 2 7 6 - 1 2 9 0 e 1 2 1 7)、L g a l s 3、C d 6 3、S p p 1、C s t 7、C d 6 8、C a p g、及びF t h 1を含む(図16A)。クラスター4及び8がD A Mステージ1及び2遺伝子に関連する程度を特徴付けるために、D A M状態ごとに以前に報告されたマーカー遺伝子のセットを使用して、各細胞について集約されたD A Mスコアを提供した。次いで、これらのスコアをクラスターによって平均化して、各クラスターが所与のD A M状態に類似する程度をまとめた。クラスター4は、D A M 2遺伝子発現についての最も高い濃縮を示し、続いてクラスター8を示し、T r e m 2 + / + C P Z及びT r e m 2 + / - C P Zミクログリアが、T r e m 2 - / - C P Zミクログリアにおいて大幅に減弱した慢性脱髄にตอบสนองしてD A M 2様遷移を示すことを示唆する。さらに、T R E M 2非依存性D A M 1遺伝子は、T r e m 2 + / + C P Z、T r e m 2 + / - C P Z、及びT r e m 2 - / - C P Zミクログリアで上方制御されたが、T r e m 2 + / + C P Z及びT r e m 2 + / - C P Zミクログリアは、T r e m 2 - / - C P Zミクログリアと比較して、より高いD A M 1遺伝子の発現を示した。したがって、慢性脱髄時に、T r e m 2 - / -ミクログリアのサブセットは、特定のD A M遺伝子の減弱発現を示す。これらのデータは、T r e m 2 - / - C P Zミクログリアが、慢性脱髄中の反応状態への適切な転換を可能にするために、T r e m 2の少なくとも1つの機能的コピーを有するミクログリアのように、リソソーム、脂質代謝、及びD A M遺伝子の転写を完全に上方制御することができないことを実証している。

20

30

【0450】

実施例7. T R E M 2欠損は、慢性脱髄中に神経損傷を引き起こす
この実施例では、慢性脱髄中の神経細胞損傷に対するT R E M 2欠損の効果について記載する。

40

【0451】

マウスにおける脱髄を誘導するクブリゾン食餌
実施例1に記載される方法と同様の方法を脱髄プロトコルに使用した。

【0452】

試薬

一次抗体：1：100ウサギ抗 - A P P (L i f e T e c h n o l o g i e s , 5 1 2 7 0 0) ; 1 : 1 0 0 0マウス抗S M I - 3 2 (M i l l i p o r e 5 5 9 8 4 4)
。二次抗体：ヤギ抗マウス - 5 5 5、ヤギ抗マウス - 6 4 7、ヤギ抗ウサギ - 5 5 5、及びヤギ抗ウサギ - 6 4 7 (I n v i t r o g e n) 。

【0453】

50

免疫蛍光法

PBS灌流後、液体窒素中で矢状マウス半脳をフラッシュ冷凍し、Leica CM 1950クライオスタットを使用して、交互に100 μ m(脂質学)または20 μ m(組織学)幅で-200Cで冠状凍結した。各半脳について、吻側から尾側脳への領域を表す10個の連続した組織学的スライドセットを収集し、-800で冷凍した。染色の前に、スライドを乾燥するまで室温で解凍し、次いで、4%のパラホルムアルデヒド(Electron Microscopy Sciences 15710)で10分間固定した。スライドをPBSで5分間2回洗浄し、次いで、PBS+0.3% Triton X-100+5% Normal Goat Serum(Vector Labs S-1000)を用いて室温で1時間遮断した。一次抗体が、遮断緩衝液中に希釈され、40で一晚スライドに追加された。スライドをPBS中で3x15分間洗浄し、遮断緩衝液中室温で2時間1:1000に希釈した二次抗体と共にインキュベートした。スライドをPBS中で3x15分間洗浄し、室温で乾燥させ、Fluoromount G(Southern Biotech 0100-01)で固定した。免疫染色された脳切片の画像を、20倍の対物レンズ及びZeiss Cell Observer SDを用いてZeiss AxioScan自動スライドイメージャーで捕捉し、次いで、トリミングして海馬領域に焦点を当てた。

【0454】

ニューロフィラメント光検出

マウス血液をキャピラリーチューブ(Sarstedt 201278100)を用いてEDTAチューブ(Sarstedt 201341102)に収集し、40Cで15,000xgで7分間スピンさせ、上部血漿層を1.5mLチューブに移し、-800Cで保管した。凍結した血漿試料を氷上で解凍し、10倍に希釈し、製造業者のプロトコルに従ってSimoa NF-light advantage kit(Quanterix 103186)を使用して、SR-X(Quanterix)上で実行した。

【0455】

ジストロフィー性APP陽性パンクタの蓄積は、他の全ての群と比較して、5週間または12週間のCPZ後のTrem2-/-マウスの海馬及び脳梁において同定された(図17F)。APPパンクタは、細胞核のサイズであったが、それらはDAPIと共存しなかった。それに代えて、パンクタはSMI32+非リン酸化神経フィラメント染色によって囲まれたか、または連続したものであり、ジストロフィー性神経炎を示唆した。半自動化または手動で行われたAPP陽性ジストロフィー性神経突起パンクタの定量化は、定量化されたパラメータ(パンクタ数、強度、または面積)に応じて、5週間及び/または12週間の治療について、強力な遺伝子型効果、ならびに遺伝子型とCPZ治療との間の相互作用を示した(図17F)。

【0456】

慢性脱髄がTREM2の非存在下で神経細胞損傷を引き起こすことを確認するために、血漿中のニューロフィラメント-軽鎖(Nf-L)レベルも測定した。アプリ染色と一致して、Nf-Lレベルは、対照またはCPZ Trem2+/+及びTrem2+/-血漿中では変化しなかったが、それらは、慢性脱髄時にTrem2-/-血漿中で上昇した(図17A)。CPZ処置によるTrem2-/-CNSにおいて観察される増加したニューロン損傷と一致して、加齢Trem2-/-マウスは、その血漿中のNf-Lレベルの増加を示した(図17B、二元配置分散分析、FDR<0.05、相互作用年齢遺伝子型p<0.05)。これらのデータは、TREM2が神経保護的役割を果たすという概念を支持する。

【0457】

実施例8. 慢性脱髄を有するTrem2ノックアウトマウスにおける脂質学的変化

この実施例では、慢性脱髄を有するTrem2ノックアウトマウスからの前脳及び単離されたミクログリア、星状膠細胞及びCSFの脂質学について記載する。

【0458】

10

20

30

40

50

マウスにおける脱髄を誘導するクプリゾン食餌

実施例 1 に記載される方法と同様の方法を脱髄プロトコルに使用した。

【0459】

C S F 分離

C S F 単離のために、マウスを 2 . 5 % アベルチン / t e r t - アミルアルコールを使用して麻酔した。鎮静後、動物の頭蓋骨の後ろに矢状切開を行って、大槽を曝露させ、ガラスキャピラリーチューブに取り付けられた針を使用して、大槽を穿刺して C S F を収集した。C S F を 0 . 5 m L の l o - b i n d チューブ (E p p e n d o r f) に移し、12,000 r p m で 10 分間、4 でスピンのさせた。L C M S 分析の前に、2 μ L の上清をガラス L C M S バイアルに移し、内部標準物質を含有する 50 μ L のメタノールを添加した。

10

【0460】

マウス脳由来のミクログリア、星状膠細胞、及び他の細胞の F A C S

実施例 1 に記載される方法と同様の方法を脳解離及び F A C S プロトコルに使用した。

【0461】

F A C S 脂質抽出及び質量分析

前脳、ミクログリア、星状膠細胞、及び C S F の脂質抽出及び質量分析を、実施例 2 に記載される方法と同様の方法を使用して行った。

【0462】

T R E M 2 欠損は脳内にコレステリルエステル蓄積を引き起こす。

20

実施例 6 に記載されるように、脂質代謝に関する遺伝子の発現は、コレステロール代謝に直接関与するタンパク質をコードする 6 つの遺伝子、細胞外輸送を媒介する (A p o e)、リソソーム中のコレステリルエステルの加水分解 (L i p a)、リソソームからの非エステル化コレステロールの放出 (N p c 2)、脂質液滴中のコレステリルエステル合成及び貯蔵 (S o a t 1)、脂質液滴中のコレステリルエステル加水分解 (N c e h 1)、及び 25 - ヒドロキシル化 (C h 25 h) を含む、野生型ミクログリアにおいてであるが T r e m 2 - / - ミクログリアにおいてではない (図 14 B 及び 16 A) 慢性脱髄時に強く誘導される (例えば、図 14 B 及び 16 A を参照されたい)。したがって、C P Z チャレンジ後の T r e m 2 - / - ミクログリアにおいて細胞内及び細胞外コレステロール輸送が欠損しているかどうかを試験するために、脳梁を含有する冠状前脳切片からの脂質抽出物の L C M S 分析を行った。

30

【0463】

対照条件下での対照 T r e m 2 + / +、T r e m 2 + / -、及び T r e m 2 - / - 脳の脂質学的プロファイルの差異は認められなかった (図 17 D)。急性脱髄 (5 週間 C P Z) の際、最小限の変化が検出され、3 つ全ての遺伝子型においてコレステリルエステル (C E) 及び C E の酸化形態 (o x C E) のレベルが増強された (図 17 C)。慢性脱髄 (12 週間 C P Z) では、C E 及び o x C E 脂質種が著しく上昇した (図 17 D ~ 17 E ; 二元配置分散分析、F D R < 0 . 05、相互作用 p < 0 . 01、12 週間 C P Z ; 実施例 2、図 3 A ~ 3 C も参照されたい)。さらなる比較により、T r e m 2 + / + 及び T r e m 2 + / - 12 週間 C P Z 脳と比較して、C E 22 : 6 (ドコサヘキサエン酸、D H A) 及び程度が低い C E 20 : 4 (アラキドン酸) 等の多価不飽和脂肪酸を含有する C E 種を著しく蓄積した慢性脱髄を有する T R E M 2 欠損脳が明らかになった (図 17 E、相互作用 p < 0 . 0001、二元配置分散分析)。C E 22 : 6 は、慢性脱髄を伴う T r e m 2 - / - 脳において最も顕著な増加を示し、T r e m 2 - / - 対照脳と比較して 3.8 倍超、T r e m 2 + / + 12 週間 C P Z 脳と比較して 2.5 倍であった (図 17 E)。同様に、以前はアテローム性動脈硬化性病変でのみ報告された o x C E 種 (C h o i , e t a l . (2017) . B i o c h i m B i o p h y s A c t a M o l C e l l B i o l L i p i d s 1862, 393 - 397 ; H u t c h i n s , e t a l . (2011) . J L i p i d R e s 52, 2070 - 2083 を参照されたい) については、T r e m 2 - / - 脳において、T r e m 2 + / + 対照脳と比較して、慢性脱髄を伴っ

40

50

て有意に上方制御されたが、それらは、CEよりもはるかに低いレベルで見出された（実施例2、図3Cを参照されたい）。CEの有意な蓄積にもかかわらず、コレステロールレベルは、CEよりも大きな量で存在するという事実と一致して、脳内で変化しないままであった（実施例2、図3Aを参照されたい）（Martin, et al. (2014). *EMBO Rep* 15, 1036-1052）。ガングリオシドGM3のレベルは、慢性脱髄を伴うTrem2^{-/-}脳でも増加し（実施例2、図3Fを参照されたい）。これは、リソソーム蓄積疾患であるニーマン・ピック病C型に見られるエンドリソソーム欠損を彷彿とさせる（Bissig, C., and Gruenberg, J. (2013). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a016816; Zervas, et al. (2001). *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 49-64）。TG等の他の中性脂質も、対照と比較して、CPZ処置時にTrem2^{-/-}脳において上昇した（実施例2、図3Eを参照されたい）。

10

【0464】

全体的に、これらのデータは、慢性脱髄が、コレステロール代謝の深刻な変化、ならびにTREM2欠損脳における特異的脂質変化を引き起こすことを示す。

【0465】

TREM2欠損は、CPZ処理マウスから単離されたミクログリアにおいてコレステリルエステル蓄積を引き起こす

CE蓄積が主に細胞内または細胞外であるかどうかを調査するために、FACSに基づく脂質学的アプローチを開発して、細胞型特異的様式で脂質種を測定した。CSFも収集し、分析して、CNS中の脂質の循環レベルを評価した。

20

【0466】

前脳からの全組織分析で観察されるように、慢性脱髄は、未治療の遺伝子型対照と比較して、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}ミクログリアにおける特定の脂質種のレベルを増加させた。Trem2^{-/-}ミクログリアは、慢性脱髄に曝露されたTrem2^{+/+}及びTrem2^{+/-}ミクログリアと比較して、慢性脱髄時にある特定の脂質種の存在量の劇的な増加を示したが、CPZ処置なしの対照ミクログリアにおいて有意な遺伝子型依存的効果はなかった（図18A、二元配置分散分析、FDR < 0.05）。驚くべきことに、慢性脱髄時の脂質学的プロファイルの変化は、星状膠細胞濃縮集団またはCSFが、いかなる顕著な遺伝子型特異的变化またはCPZ治療特異的变化も示さなかったため、ミクログリアに特有であった（図18B及び18C；二元配置分散分析、FDR < 0.05）。

30

【0467】

増加した（図18D）コレステリルエステルレベルを、対照食餌または5週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}ミクログリア、ならびに12週間クプリゾンによるTrem2^{+/+}及びTrem2^{+/-}ミクログリアと比較して、Trem2^{-/-}から単離されたミクログリア中で検出した。一般に、対照またはクプリゾン食餌によるTrem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、及びTrem2^{-/-}脳から単離された、星状膠細胞が豊富な細胞集団（図18E）またはCSF（図18F）においては、コレステリルエステルの脂質レベルの変化は検出されなかった。慢性脱髄時のTrem2^{-/-}ミクログリア対星状膠細胞で特異的に増加した脂質には、CE18:1、CE20:4、及びCE22:6などの前脳で特定された同じ種のいくつかが含まれ（図18D及び18E；相互作用p < 0.01、12週間のCPZ、二元配置分散分析）、これらは、対照と比較して、12週間CPZ治療時にTrem2^{-/-}ミクログリアで8倍～43倍上昇した。脱髄時のTrem2^{-/-}ミクログリア、ミエリン濃縮脂質またはその代謝産物中のミエリンデブリの蓄積をさらに確認し、ガングリオシドGM3は、慢性脱髄時のTrem2^{-/-}ミクログリア中で唯一濃縮されたが、星状膠細胞中では変化しなかった（実施例2、図4を参照されたい）。このデータは、ミエリン脂質がTrem2^{-/-}ミクログリアに貪食されることができ、ミクログリア内で適切に代謝され、経時的に蓄積されないことを示唆している。加えて、BMP 36:2のようなある種のB

40

50

MPを、対照と比較して、12週間CPZ処理時にTrem2^{-/-}-ミクログリアで上昇させ(図18G及び18H)、リソソーム応力または機能障害の可能性を示した(Bissig, C., and Gruenberg, J. (2013). Cold Spring Harb Perspect Biol 5, a016816; Miranda, et al. (2018). Nat Commun 9, 291)。慢性脱髄を有するTrem2^{-/-}-マウス由来のCSFのLCMS分析よっては、CPZ処置の有無にかかわらず、Trem2^{+/+}、Trem2^{+/-}、またはTrem2^{-/-}-CSFからの、いかなる有意な脂質学的相違も明らかにはならず(図18I~18M)、これは、バルク前脳組織において観察される脂質蓄積が細胞外蓄積を反映しないことを示唆したが、間質流体の変化は排除されなかった。

10

【0468】

これらのデータは、TREM2欠損ミクログリアが脱髄中にミエリンデブリを貪食することができるが、ミエリン脂質の排出を適切に代謝または媒介することができないことを示す。

【0469】

実施例9. ミエリンスルファチドはTREM2に結合し、下流シグナル伝達を促進するこの実施例では、Trem2^{-/-}-ミクログリアにおける脂質蓄積の増加の基礎となる機構をより正確に描写するためのインビトロシステムの使用について記載する。特に、TREM2に結合し、TREM2介してシグナル伝達し、次に、ミエリンの食細胞クリアランスを調節し得る特異的ミエリン脂質を特徴付けた。

20

【0470】

リポソーム調製

70モル%のDOPC(1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、Avanti Polar Lipid)及び1種の試験脂質の30モル%を、ガラスバイアル中のクロロホルム中で組み合わせ、N₂ガスの流れの下で1~2時間、または完全に乾燥するまで乾燥させた。試験脂質には、スルファチド(Avanti)、POPS(Avanti)、SM(Avanti)、PI(Avanti)、GalCer(Avanti)、PE(Echelon Biosciences)、及び遊離コレステロール(Echelon Biosciences)が含まれた。脂質混合物をHBSS(1~2mg/mLの最終脂質濃度)に再懸濁させ、2~3分間ボルテックスした。その後、脂質懸濁液を10分間浴内で超音波処理した。表面プラズモン共鳴実験のために、1つの孔径が100nmの膜で構築されたAvanti mini-extruderを使用して、リポソームを10回押し出して、小さな単層小胞を形成した。

30

【0471】

TREM2/DAP12及びDAP12 HEK293安定細胞株

HEK293細胞を、野生型ヒトTREM2及びDAP12、ならびにDAP12単独を発現するpBudCE4.1哺乳動物発現ベクター(ThermoFisher)でトランスフェクトした。安定した発現クローンを選択し、細胞表面TREM2発現を、APCコンジュゲートラット-抗ヒト/マウス-TREM2モノクローナル(R&D MAB17291)を用いたフローサイトメトリーによって評価した。最も高い野生型のTREM2発現クローンを拡大のために選択した。DAP12を安定して発現するクローンをウェスタンブロットによって分析した。

40

【0472】

pSYK AlphaLISA

市販のAlphaLISAアッセイ(PerkinElmer)を使用して、TREM2依存性pSYKシグナル伝達の活性化を測定した。HEK293細胞:実験の2日前に、TREM2及びDAP12を安定して過剰発現するHEK293細胞を、40,000細胞/ウェルで96ウェルポリ-D-リジン被覆プレート上に播種した。分化ヒトマクロファージ及びBMDMを、組織培養処理した96ウェルプレート上に100,000細胞/ウェルで播種した。細胞をHBSSで1回洗浄した後、ウェル当たり50µLのリポソ-

50

ム混合物を添加した。競合実験のために、hTREM2 - ECDまたはTREM1 - his (Novoprotein Scientific)をリポソームと共に室温で1時間インキュベートした後、細胞に添加した。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒト特異的マウス抗TREM2 (Abnova)または15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のマウス特異的ヒツジ抗TREM2 (R&D Systems)を、それぞれ、並列アイソタイプ対照、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のマウスIgG3 (R&D Systems)及び15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のポリクローナルヒツジIgG (R&D Systems)を有する陽性対照として各実験に添加した。次いで、細胞プレートを37のインキュベーターに5分間移した。リポソーム溶液を廃棄し、40 μL の溶解緩衝液 (Cell Signaling Technologies, CST)を用いた。溶解物を4Cで30分間インキュベートし、次いで、-80Cで凍結するか、または直ちに -LISAアッセイに進められた。溶解物を、PerkinElmer pSYK AlphaLISAキットの標準プロトコルを使用してアッセイした。10 μL の溶解物/ウェルを、白色不透明な384ウェルOptiplate (PerkinElmer)に移した。5 μL のアクセプター混合物 (アクセプタービーズの作用溶液を含有する)をウェルごとに添加し、続いて、ホイルシールでプレートを密封し、室温で1時間インキュベートした。5 μL のドナー混合物 (ドナービーズの作動溶液を含有する)を還元光条件下で各ウェルに添加した。プレートを再び密閉し、室温で1時間インキュベートした。プレートは、PerkinElmer EnVisionプレートリーダー上のAlfaLISA設定を使用して読み取った。

【0473】

Histaタグ付きhTREM2及びhTREM2 R47H ECDの組換え発現及び精製TREM2のエクトドメイン (残基19~172)を、マウスIgC μ 鎖V-IIIからの分泌シグナル、N末端領域におけるアミノ酸1~20、及びC末端領域における6X-Histaタグを用いてpRKベクター内でサブクローニングした。Exp293F (商標)細胞を、製造業者の指示に従ってExp293 (商標)発現システムキットを使用してトランスフェクトし、培地上清をトランスフェクトの96時間後に回収した。収穫した培地に1Mのイミダゾール (pH8.0)を最終濃度10mMまで補充し、濾過し、負荷緩衝液 (20mMのTris (pH8.0)、150mMのNaCl、及び10mMのイミダゾール)で平衡化したHisPur (商標)Ni-NTA樹脂上に載置した。非特異的に結合したタンパク質を、50及び100mMのイミダゾールを補充したローディングバッファーで洗浄し、TREM2エクトドメインを20mMのTris (pH8.0)、150mMのNaCl、及び200mMのイミダゾールで溶出した。溶出したタンパク質をプールし、1X PBSを実行緩衝液として使用して、HiLoad Superdex 75 16/600カラム上でサイズ排除クロマトグラフィーに供した。溶出画分をSDS PAGEによって解析し、解析サイズ排除クロマトグラフィー及びインタクトなタンパク質量決定によってさらに特徴付けた。

【0474】

表面プラズモン共鳴 (SPR)を用いた脂質結合解析
結合解析は、シリーズSセンサーチップL1及びBiacore T200装置 (GE Healthcare)を25で使用して行った。脂質をコーティングする前に、センサー表面を30 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流量で40 μM の3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸塩 (CHAPS)及び40 μM の -オクチルグルコシドで1分間注入して洗浄した。センサー表面上の残留洗剤を30%エタノールの30秒間の注入によって洗い流した。1mg/mlのスルファチド/DOPCまたはPS/DOPC小単層小胞を、第2のフローセル上に5 $\mu\text{L}/\text{分}$ で注入した。第1のフローセルにDOPCを被覆し、基準表面として機能させた。緩く結合した小胞を、30 $\mu\text{L}/\text{分}$ で10mMのNaOHの2つの短いパルス (15秒)で洗い流し、続いて、0.1mg/mlのウシ血清アルブミンを3分間注入して不十分に被覆された表面をブロックした。組換えhTREM2 - ECDまたはhTREM2 - R74H - ECDタンパク質をPBS (0、0.19、0.56、1.7、5、及び15 μM)中で希釈し、両方のフローセルに30

μl /分で60秒間注入し、解離をさらに2分間監視した。各測定の間、脂質表面を10mMのNaOHの注入によって再生成した。Biacore(商標)T200 Evaluation Software v3.1を使用して、濃度に対する応答を平衡に適合させることによって、定常状態親和性を得た。

【0475】

ミエリン精製及び貪食

前述の方法を使用して、ミエリンを野生型C57Bl/6マウス脳(Jackson Laboratories)から精製した(Safaiyan, et al. (2016). Nat Neurosci 19, 995-998)。精製後、ミエリンをPBSに再懸濁し、DCタンパク質アッセイキット2(BioRad, 5000112)を使用して、1mg/mLのタンパク質濃度に調整した。製造業者の推奨に従って、pHrodo Red Microscale Labeling Kit(ThermoFisher, P35363)を使用して、精製ミエリンの画分を標識した。BMDMを、5ng/mLマウスM-CSFを補充した組織培養処理96ウェルプレート(CellCarrier, PerkinElmer)中1ウェル当たり100,000細胞の密度でRPMI/10%FBS/Pen-Strep中に播種した。陰性対照として、10 μM のサイトカラシンDをミエリンの1時間前に細胞に添加し、取り込みアッセイを通して保持した。細胞を、細胞培養培地中のCellMask Deep Red Plasma Membrane Stain(1:5000, ThermoFisher C10046)及びNucBlue Live Ready Probes 試薬(1mL当たり2滴、ThermoFisher R37605)で10分間、37°Cに保持した。pHrodoミエリンを細胞培養培地中で5 μg /mLに希釈し、1分間浴内で超音波処理した後、細胞に2~4時間添加し、Opera Phenix HCSシステム(PerkinElmer)上で15~30分の間隔でライブ撮像した(5%CO₂、37°C)。個々の細胞を核及び細胞膜染色によって特定し、次いで、pHrodo取り込み強度をHarmony HCA Software(PerkinElmer)を使用してウェル当たりの細胞当たりに定量化した。

【0476】

結果

HEK293細胞中のヒトDAP12の存在下または非存在下でヒトTREM2を過剰発現させた。下流のphospho-SYK(pSYK)レベルを監視して、死細胞の表面上で濃縮される、PSと比較したミエリン中に見出される推定TREM2脂質リガンドによる受容体活性化を特徴付けた。ミエリン候補リガンドを含有する全てのリポソームが、TREM2/DAP12 HEK293細胞におけるpSYKレベルを高めるわけではない。PI及びスルファチドはpSYKレベルを有意に増加させたが、試験した他の脂質は、DAP12発現細胞またはベースライン緩衝液刺激対照を上回る有意なpSYK活性化を示さなかった(図19A)。

【0477】

TREM2/DAP12の内因性発現を有する系におけるリポソーム誘導TREM2シグナル伝達をさらに特徴付けるために、ヒト末梢血単球をマクロファージに分化させた。ヒトマクロファージは、スルファチド及びPSについて、リポソーム用量依存的なpSYKレベルの増加を示したが、PIまたはGalCerでは示さなかった(図19B)。スルファチドを含有するリポソームに応答するpSYKの増加は、組換えTREM2の添加によって、TREM1タンパク質の添加によってではなく、してベースラインレベルまで低減され、TREM2結合及びシグナル特異性が確認された(図19C)。

【0478】

R47Hを含む特定のTREM2負荷変異形は、脂質リガンドに対するTREM2親和性を低下させると考えられている(Kober, et al. (2016). Elife 5; Ulland, T. K., and Colonna, M. (2018). Nat Rev Neurol 14, 667-675; Wang, et al. (2015). C

e11 160, 1061-1071)。したがって、組換えヒト野生型TREM2 (hTREM2) 及び変異体R47H (hTREM2 R47H) タンパク質の細胞外ドメイン (ECD) へのスルファチド及びPSの結合親和性及び動態を、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定を通じて特徴付けた。30%スルファチド/70%PC及び30%PS/70%PCリポソームをセンサーチップ上に被覆し、濃度の増加するhTREM2 ECDタンパク質をチップ上に流して、100%PCリポソームベースラインコントロールと比較して、結合特性を評価した。hTREM2は、スルファチド及びPSリポソームに対する最高分析物濃度で、それぞれ、 $K_D = 6.8 \mu M$ 、応答単位 (RU) = 704 及び $K_D = 5.6 \mu M$ 、RU = 631 で同様の結合親和性及び応答を示した (図19D及び19E)。これと比較して、hTREM2 R47Hは、スルファチド及びPSリポソーム、 $K_D = 20 \mu M$ 、RU = 191 及び $K_D = 14 \mu M$ 、RU = 267 のそれぞれに対して、親和性の低下及びより低い結合応答 (すなわち、RU) を示し、リガンド特異性を示唆した (図19D及び19E)。より低い結合応答は、相互作用のより速いオフレートに起因し、脂質表面上の変異体TREM2のより短い常駐をもたらす。スルファチドの場合、R47Hバリエーションで観察された減少した親和性及び応答値を、5倍 (スルファチド) 及び2.4倍 (PS) 速いオフレート及び比較的類似したオンレートで説明した (図19H~19K)。この結果は、スルファチドがTREM2を介して結合してシグナル伝達し、R47H LOADバリエーションがこの脂質との相互作用において著しく損なわれていることを示す。コレステロール、SM、PE、GalCer、及びPIを含む、他のミエリン濃縮脂質は、TREM2を介して結合し、シグナル伝達するようには見えなかった。

10

20

【0479】

スルファチド脂質リガンドへのTREM2結合を実証するこれらの研究は、TREM2欠損マイクログリアがミエリン結合において損なわれ得ることを示唆している。急性TREM2依存性ミエリンの取り込みを評価するために、Trem2^{+/+}及びTrem2^{-/-} BMDMをpHrodoコンジュゲートミエリンで処置した。低濃度のM-CSF (5 ng/mL、マクロファージ分化及び生存を促進することが知られている因子) において、pHrodo-ミエリン貪食は、Trem2^{+/+}と比較して、Trem2^{-/-} BMDMにおいて減少した (図19F)。しかしながら、高濃度のM-CSF (50 ng/mL) では、pHrodo-ミエリン貪食は、両方の遺伝子型においてより同等となる (図19G)。これらのデータにより、高レベルのM-CSFが、Trem2^{-/-} BMDMにおける貪食経路の補償的上方制御を提供し得、TREM2欠損細胞における貪食欠損が状況依存性であり得ることが明らかになり得ることが示唆される。

30

【0480】

実施例10. Trem2 KOマウスから培養されたBMDM及びiPSC由来マイクログリアにおけるインビトロでの脂質貯蔵の増加
この実施例では、免疫細胞化学及び質量分析の両方によって、インビトロで培養し、ミエリンで処理したTrem2 KO BMDMにおいて観察される脂質貯蔵表現型について記載する。脂質蓄積表現型は、iPSC由来マイクログリアにおいて同様に評価された。実施例3及び9に記載されるものと同様の方法を使用して分析を行った。

40

【0481】

CEが優先的に細胞質脂質液滴中に蓄積する中性脂質であることを踏まえて、Trem2^{+/+}及びTrem2^{-/-} BMDMを48時間にわたって25 µg/mLのミエリンで処理し、次いで、蛍光顕微鏡で中性脂質貯蔵を評価するためにニールレッドで染色した。細胞を画像化し、Harmonyソフトウェア上のスポット調査アルゴリズムを使用して、ニールレッドを総スポット面積として定量化した。ミエリンの食細胞取り込みにおける遺伝子型特異的差を最小限に抑えるために、これらの実験を高M-CSF (50 µg/mL) の存在下で行った。

【0482】

図20Aは、ニールレッド染色によって示されるように、WT BMDMと比較して、ミエリンで処理したTrem2 KO BMDMにおける中性脂質蓄積の増加を示す。それ

50

に続く脂質学的分析は、ミエリン治療の非存在下で最小限の遺伝子型特異的脂質変化を、しかし、ミエリン治療による Trem2^{-/-} BMDM のリピドームにおける大きな変化 (CE 種、CE 18:2、CE 20:4、及び CE 22:5 の顕著な遺伝子型特異的蓄積を含む) を明らかにした (図 21A; 双方向 ANOVA、 $p < 0.01$; 図 20B も参照されたい)。遊離コレステロール、ならびに様々な種の トリアシルグリセロール (TG)、ジアシルグリセロール (DG)、及びミエリン由来スフィンゴ糖脂質種 (HexCer) も、Trem2^{-/-} BMDM に蓄積した (図 20C 及び 21A)。全体的に、これらの脂質変化は、慢性 CPZ 誘発性脱髄後のインビボでの Trem2^{-/-} ミクログリアで観察されたものを強く連想された (実施例 8、図 18A、18D、及び実施例 2、図 4A ~ 4P を参照されたい)。

10

【0483】

ACAT1 は、小胞体において遊離コレステロールを CE に変換する。ミエリンチャレンジによって誘導される Trem2^{-/-} 細胞における観察された脂質蓄積における ACAT1 の役割を決定するために、Trem2^{+/+} 及び Trem2^{-/-} BMDM をミエリンで 48 時間慢性的に処理し、ACAT1 阻害剤 (500 nM K604) と同時投与した (Ikenoya, et al. (2007). *Atherosclerosis* 191, 290-297)。図 20B 及び 21A は、ほとんどのコレステリルエステルが、ミエリンを投与した WT 及び TREM2 KO BMDM の両方において ACAT 阻害剤の存在下で蓄積されないことを示し、コレステリルエステル蓄積が ACAT 依存性であり、ミエリン由来のコレステロールが実際に脂質液滴中のエステル化形態として蓄積されていることを示す。ミエリン処理された TREM2 欠損 BMDM 中の他の脂質の蓄積は、K604 によって救済されず (図 21A)、CE に対する ACAT1 阻害の特異性を示す。コレステロールが対照として示され、ミエリン及び ACAT 阻害を伴う Trem2 KO BMDM においてわずかに上昇する (図 20C 及び 21A)。

20

【0484】

Trem2^{+/+} 及び Trem2^{-/-} BMDM を酸化 LDL (oxLDL) で処置して、Trem2^{-/-} BMDM 中の CE 蓄積がミエリン貪食に特異的であるか、または他の生理学的に関連する取り込み機構が同様の効果を引き起こし得るかどうかを判定した。まず、対照として LDL を使用して、oxLDL が TREM2 に結合し、TREM2 を刺激することができるかどうかを試験した。ヒト DAP12 の存在下または非存在下でヒト TREM2 を安定的に過剰発現する HEK293 細胞株を使用して、oxLDL 刺激が pSYK レベルを増加させる傾向を有すると判定した (図 22A)。ヒトマクロファージにおけるリポソーム滴定は、oxLDL による刺激後の pSYK レベルの用量依存的な増加を明らかにした (図 22B)。その増加は、リポソーム/hTREM2 競合実験 (3 μ M) で使用されるもの等のより低い濃度ではなく、9 μ M で高濃度の組換え hTREM2 ECD と予めインキュベートすることによって減弱された (図 22C、実施例 9、図 19C も参照されたい)。これは、Trem2^{-/-} BMDM が、oxLDL による急性刺激後に Trem2^{+/+} BMDM と同様の pSYK レベルを有するという事実によって裏付けられた (図 22D)。50 μ g/mL の oxLDL で慢性的に処理した場合、Trem2^{-/-} BMDM は、Trem2^{+/+} BMDM と比較する場合、ニール赤色染色の総スポット面積の増加によって示されるように、処理時の中性脂質の悪化した蓄積を示した (図 22E、実施例 3、図 5A も参照されたい)。この増加は、Trem2^{+/+} 細胞と同等の DiI 標識された oxLDL の内部化によって示されるように、Trem2^{-/-} BMDM による oxLDL 取り込みの増加によるものではなかった (図 22F)。LCMS によって、特定の種の CE 及び TG が、oxLDL で慢性的に処置された Trem2^{-/-} BMDM の悪化した増加を示すことが観察された (図 22G)。対照的に、HexCer、コレステロール、及び DG は、有意な oxLDL 依存性脂質学的変化を示さなかった (図 22G)。K604 は、コレステロールレベルを増加させることなく、または他の脂質ファミリーのレベルを変化させることなく、ミエリン取り込み実験で見られるよりも実質的に少ないが、oxLDL 曝露時に Trem2^{-/-} BMDM 中の CE 2

30

40

50

0 : 5 及び C E 2 2 : 6 などの C E の特定の種のレベルを低下させた (図 2 2 G 、 スチューデントの t 検定、 $p < 0 . 0 5$) 。これらの結果は、 o x L D L パラダイムにおいて、かつミエリンパラダイムとは対照的に、 A C A T 1 が T R E M 2 欠損 B M D M 中の C E 蓄積の一部にのみ関与することを示し、 C E のプールが脂質液滴、おそらくリソソーム以外の器官中に蓄積することを示唆する。

【 0 4 8 5 】

マウス B M D M について示されるように、 i M G は p H r o d o - ミエリンを取り込むことができ、 T R E M 2 K O i M G は、 4 時間のインキュベーション後に、野生型 i M G と比較して 2 2 % のミエリン取り込みの減少を示した ($n = 4$ つの技術的複製物) 。ミエリン貪食の減少にもかかわらず、 C E 、特に C E 2 0 : 4 及び C E 2 2 : 6 種、ならびに遊離コレステロールにおける遺伝子型特異的な増加があった (図 2 1 B 、二元配置分散分析、 C E 及び遊離コレステロールについて、それぞれ $p < 0 . 0 5$ 及び $p < 0 . 0 1$) 。マウス B M D M の場合と同様に、遊離コレステロールの増加ではなく、 C E の増加は、 A C A T 1 阻害剤である K 6 0 4 との共処理によって消失された (図 2 1 B 、 S t u d e n t ' s t - t e s t 、 $p < 0 . 0 5$) 。

10

【 0 4 8 6 】

T r e m 2 - / - i M G 細胞における C E 増加の基礎となる分子機構をさらに明確にするために、両方の遺伝子型からの i M G を、 A B C A 1 / A B C G 1 を含むコレステロール流出機構の発現を増強する L X R アゴニスト、 G W 3 6 9 5 で処理した。この化合物は、ミエリン処理された T r e m 2 + / + 及び T r e m 2 - / - i M G で測定されたすべての C E 種の蓄積を救済した (図 2 1 B 、学生 t 検定、 T r e m 2 + / + 及び T r e m 2 - / - i M G について、それぞれ $p < 0 . 0 1$ 及び $p < 0 . 0 5$) 。これらのデータは、 T R E M 2 欠損がコレステロール流出欠損を引き起こし、ヒト i M G 中の C E の A C A T 1 阻害剤感受性プールの蓄積をもたらすことを示唆している。

20

【 0 4 8 7 】

実施例 1 1 . A p o E K O 脳におけるコレステリルエステル蓄積、 A p o E K O ミクログリア、星状膠細胞及びニューロン、ならびに A p o E K O C S F の選別。この実施例には、前脳組織、ならびに C S F 、ならびに慢性脱髄を有する A p o E ノックアウトマウスから単離されたミクログリア、星状膠細胞、及びニューロンの脂質学が記載される。これらの実験は、 T r e m 2 K O ミクログリアがはるかに低いレベルの A p o E を発現することを考慮して、 T r e m 2 対 A p o E K O マウスの表現型を比較するために行った。

30

【 0 4 8 8 】

マウスにおける脱髄を誘導するクプリゾン食餌

実施例 1 に記載される方法に類似する方法を、クプリゾンを用いた脱髄プロトコルのために使用した。

【 0 4 8 9 】

マウス脳由来のミクログリア、星状膠細胞、及びニューロンの F A C S

一般に、実施例 1 に記載される方法と同様の方法を脳解離及び F A C S プロトコルに使用した。ニューロン、星状膠細胞及びミクログリア細胞集団を選別するために、各細胞型に特異的であった一意に標識された抗体を、固定可能な生存能染色 B V 5 1 0 と共に使用して、死細胞を除外した。

40

【 0 4 9 0 】

F A C S 脂質抽出及び質量分析

ミクログリア、星状膠細胞及びニューロンの脂質抽出及び質量分析を、実施例 2 に記載される方法と同様の方法を使用して行った。

【 0 4 9 1 】

図 2 4 は、 4 週間クプリゾン食餌によって誘導される脱髄の存在下または非存在下での A p o E K O 前脳における総コレステリルエステル (C E) 蓄積を示す。脱髄の非存在下で K 前脳に C E が蓄積され、この蓄積はクプリゾン食事によって悪化した。同様に、

50

APOE 及び / または 12 週間 CPZ 治療の欠如は、概して、脳 CE レベルの著しい上昇を引き起こした (図 27A)。

【0492】

図 25 は、脱髄の存在下または非存在下 (通常食餌と比較した 4 週間 CPZ 食餌) での ApoE KO 中の CE の様々な分子種の蓄積を示す。同様に、12 週間 CPZ 処置は、CE 18 : 1、20 : 4、及び 22 : 6 種レベルの顕著な増加をもたらした (図 27B、二元配置分散分析からの主な効果、FDR < 0.05、 $p < 0.001$)、ならびに APOE 欠損は、CE 18 : 1 及び CE 20 : 4 の処置効果を著しく悪化させた (遺伝子型処置相互作用 $p < 0.05$)。対照食餌による野生型前脳と比較して、CE 18 : 1 及び CE 22 : 6 のレベルは、ApoE^{-/-} 前脳において 2.7 倍及び 4 倍増加した。CPZ 食餌では、野生型前脳と比較して、CE 18 : 1、CE 20 : 4、及び CE 22 : 6 の倍率変化は、それぞれ 6.6、1.4、及び 6.7 であった。加えて、2 つの BMP 種 (BMP 40 : 4 及び 44 : 12) のレベルは、リソソーム欠損と一致して、ApoE^{-/-} 前脳においてより高かった (図 27B、 $p < 0.05$)。

10

【0493】

図 26A は、CE 18 : 1、CE 20 : 4、及び CE 22 : 6 等の特定の CE 種が、ApoE WT 脳から単離されたミクログリア、及び対照食餌による ApoE KO 脳から単離されたミクログリアと比較して、12 週間クプリゾン食餌による ApoE KO 脳から単離されたミクログリアに蓄積することを示す (図 27C ~ 27D も参照されたい)。図 26B は、CE 18 : 1 及び CE 22 : 6 等の特定の CE 種が、脱髄の非存在下で ApoE KO 脳から単離された星状膠細胞に蓄積されることを示す (図 27E ~ 27F も参照されたい)。これらの CE 種は、12 週間クプリゾン食餌による ApoE WT 脳から単離された星状膠細胞、及び対照食餌による ApoE KO 脳から単離された星状細胞と比較して、12 週間クプリゾン食餌による ApoE KO 星状膠細胞においてさらに劇的に蓄積する。図 26C は、CE 20 : 4 及び CE 22 : 6 等の特定の CE 種が、脱髄の非存在下で ApoE KO 脳から単離されたニューロンに蓄積することを示す。これらのニューロン CE 種は、クプリゾン食餌による影響を受けない。前脳または選別されたグリア細胞において遊離コレステロールについての変化は見出されなかった (図 27B 及び 27D)。さらに、Trem2^{-/-} CSF とは異なり、CE は、ApoE^{-/-} CSF で上昇し、変異脳におけるこれらのステロールの広範な増加を示した (図 27G 及び 27H)。

20

30

【0494】

これらのデータは、APOE 欠損から生じるコレステロール輸送の障害が、CNS において、特に CSF でも検出され得るグリア細胞においてコレステロールの貯蔵形態、すなわち CE の大規模な蓄積を引き起こすことを示す。APOE が下方制御される Trem2 KO ミクログリアが同様の CE 貯蔵を示すという事実は、この生化学的表現型がコレステロール輸送の欠損に起因し得ることを示唆する。

【0495】

実施例 12.5 XFAD 脳から単離されたミクログリア及び星状膠細胞におけるコレステリルエステル蓄積。

40

この実施例では、5XFAD 脳から単離されたミクログリア及び星状膠細胞の脂質学が記載される。

【0496】

マウス脳由来のミクログリア及び星状膠細胞の FACS

実施例 1 に記載される方法と同様の方法を脳解離及び FACS プロトコルに使用した。

【0497】

FACS 脂質抽出及び質量分析

ミクログリア及び星状膠細胞の脂質抽出及び質量分析は、実施例 2 に記載される方法と同様の方法を使用して行った。

【0498】

50

図 28 A は、WTマウスの脳に由来するものと比較して、5XFADマウスの脳に由来するミクログリアにおけるコレステリルエステル (CE) のレベルの上昇を示す。CE 18 : 1、CE 20 : 4、及び CE 22 : 6 等の特定の CE 種は、5XFADマウスに由来するミクログリアにおいて、WTマウスよりも高い。図 28 B は、WTマウスの脳に由来するものと比較して、5XFADマウスの脳に由来する星状膠細胞におけるコレステリルエステル (CE) のレベルの上昇を示す。ほとんどの CE 種は、5XFAD星状細胞において上方制御されるが、5XFADミクログリアよりも程度が低い。動物は 14ヶ月齢であった。N = 4 匹の動物 / 群。

【0499】

実施例 13 . Trem2 KOマウスから培養したBMDM及びヒト iPSC由来 TREM2 KOミクログリアにおけるインビトロでの炎症応答の増加、ならびにミエリン処置ヒト iPSC由来 TREM2 KOミクログリアにおける抗 TREM2 抗体の抗炎症作用。Trem2 WT及び Trem2 KO BMDMを、実施例 3 の方法と同様の方法を使用して回収 / 培養した。BMDMをビヒクルまたは精製マウスミエリンのいずれかで処置し、続いてリポ多糖 (LPS) で刺激して、Trem2 遺伝子型、脂質蓄積、及び炎症性サイトカイン分泌間の関係の特徴付けた。細胞を、ウェル当たり 100,000 個で播種し、24 時間後にビヒクルまたは 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のミエリンのいずれかで 48 時間処理した。ミエリン処理の最後の 16 時間、0 または 10 ng/mL のいずれかの LPS をウェルに添加した。細胞培養培地を回収し、3000 $\times g$ でスピンドリを除去し、-80 で凍結した。Eve Technologies で定量免疫アッセイによってサイトカインレベルを測定した。

【0500】

TREM2 WT及び KOヒト iPSC由来ミクログリア (iMG) を、ポリ D-リジン被覆 96 ウェルプレート上に 30,000 細胞 / ウェルで播種し、完全限定無血清中枢神経系細胞培養培地中でインキュベートすることによって恒常的培養条件下で培養した。LPS 添加前に、細胞を、50 μM の Casp-1 阻害剤 (InvivoGen、# VX-765) で 1 時間処置した。培地を、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LPS (InvivoGen) を含有する培地に置き換えた。3 時間後に、細胞に、5 mM の ATP をさらに 1 時間添加した。次いで、50 μl の培養培地を回収し、フラッシュ凍結し、定量免疫アッセイ (Eve Technologies, Inc.) によって IL-1 タンパク質レベルについてアッセイした。iMG をまた、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のミエリンで 24 時間処理し、次いで、100 nM の対照抗体 (抗 RSV) または抗 TREM2 抗体で 48 時間処理した。IL-1 mRNA レベルを、QPCR によって測定し、GAPDH に正規化した。N = 2 つの生物学的複製物。

【0501】

図 29 A ~ 29 I は、LPS 刺激 (10 ng/mL) 及びミエリン治療時の Trem2 KOマウス BMDMにおける炎症性サイトカイン産生の増加を示す。以下のサイトカインは、Trem2 WT BMDMと比較して、Trem2 KOにおいて増加し、(図 29 A) G-CSF、(図 29 B) INF γ 、(図 29 C) IL-12 (p40)、(図 29 D) IL-12 (p70)、(図 29 E) LIX (CXCL5)、(図 29 F) MCP-1 (CCL2)、(図 29 G) MIG (CXCL9)、(図 29 H) IL-1a 及び (図 29 I) IL-1b を定量免疫アッセイ (Eve Technologies) によって測定した。データは平均 \pm SEM を表し、n = 2 つの技術的複製物である。

【0502】

図 30 A ~ 30 B は、ヒト iPSC由来の TREM2 KOミクログリアにおける IL-1 サイトカイン応答の増加、及び抗 TREM2 抗体による IL-1 mRNA 応答の減少を示す。図 30 A は、TREM2 KO iPSC由来のミクログリアが、LPS 及び ATP でのミクログリアの処理後に増加したインフラマソーム応答及び IL-1 サイトカイン分泌を有することを示す。図 30 B は、抗 TREM2 抗体が、ミエリンでのミクログリアの処置後に、IL-1 mRNA レベルを低下させることを示す。

【0503】

実施例14. ミエリン処理 Trem2 KOヒトiPSC由来マイクログリア (iMG) における脂質代謝遺伝子の変動制御及びタンパク質分泌

この実施例では、ビヒクルまたはミエリンで処理したWT及びTREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア (iMG) における遺伝子発現及びタンパク質分泌分析を記載する。

【0504】

iPSCマイクログリア法

実施例3と同様の方法を用いて、TREM2 WT及びTREM2 KOヒトiMGを生成した。

【0505】

遺伝子発現分析

TREM2 WT及びTREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア (iMG) を、ポリD-リジン被覆96ウェルプレート上にウェル当たり30,000細胞で播種した。細胞をビヒクルまたは25ug/mLの精製ミエリンで24時間処理し、次いで、RNAの収集のために溶解した。選択された脂質代謝遺伝子のmRNAレベルをqPCRによって測定し、GAPDHに正規化した。

【0506】

図31に示すように、ABCA1 (図31A) 及びABCG1 (図31C) mRNAレベルは、TREM2 WT及びTREM2 KO iMGの両方においてミエリンに反応して増加し、TREM2 KO iMGでは、TREM2 WT iMGと比較して、ビヒクル及びミエリン処理条件下でより高くなった。ABCA7 (図31B) 及びLDLR (図31K) mRNAは、ミエリンに反応して減少したが、TREM2 KOでは、TREM2 WT iMGと比較して高い。APOC1 (図31D)、APOE (図31E)、CH25H (図31F)、FABP3 (図31G)、FABP5 (図31H)、LPL (図31I)、OLR1 (図31J)、及びLIPA (図1L) mRNAレベルは、ビヒクル及びミエリン処置条件の両方においてTREM2 WT iMGと比較して、TREM2 KOにおいて低い。

【0507】

タンパク質分泌分析

TREM2 WT及びTREM2 KOヒトiPSC由来マイクログリア (iMG) を、ポリD-リジン被覆96ウェルプレート上にウェル当たり30,000細胞で播種した。細胞をビヒクルまたは25ug/mLの精製ミエリンで48時間処理し、続いて、上清をMSD分析のために回収した。細胞をBCAアッセイのために溶解してタンパク質濃度を決定し、MSDデータをこれらの溶解物濃度に正規化した。

【0508】

図32は、ミエリンが、TREM2 KO及びTREM2 WT iMGの両方において分泌APOE (図32A) 及びAPOC1 (図32B) タンパク質を増加させるが、両方の条件下でTREM2 KO細胞においてAPOE及びAPOC1レベルが低かったことを示す。これらのデータは、TREM2の欠如がAPOE機能の低下を引き起こし、TREM2欠損マイクログリアで観察される脂質蓄積と一致することをさらに示す。さらに、APOC1のレベルの低下は、APOE以外の他のアポリポタンパク質の機能の低下が、TREM2欠損マイクログリアの脂質表現型に寄与することを示唆する。

【0509】

すべての刊行物、特許、及び特許文献は、参照により個別に組み込まれるかのように、参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、様々な具体的かつ好ましい実施形態及び技術を参照して記載されている。しかしながら、多くの変形及び変更が、本発明の主旨及び範囲内にとどまる一方で、行われ得ることが理解されるべきである。

10

20

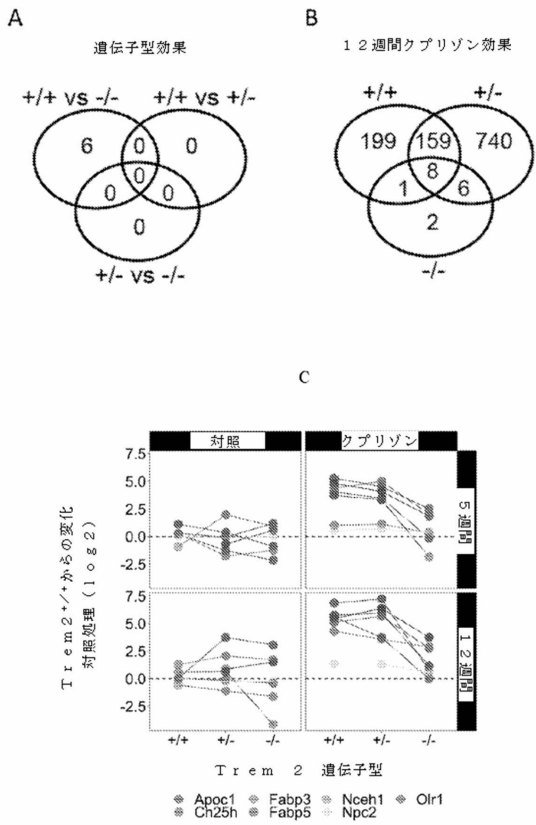
30

40

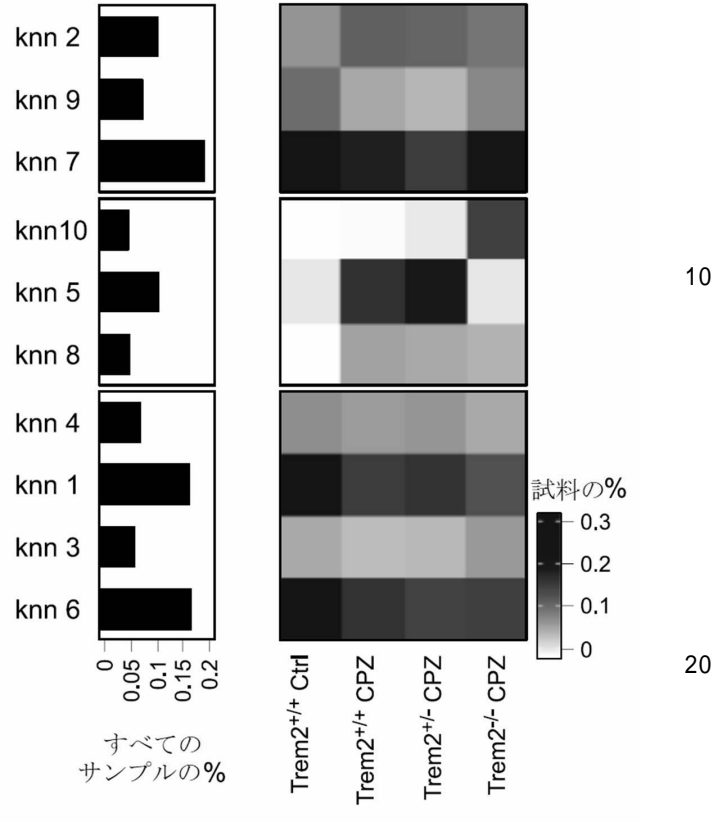
50

【 図 面 】

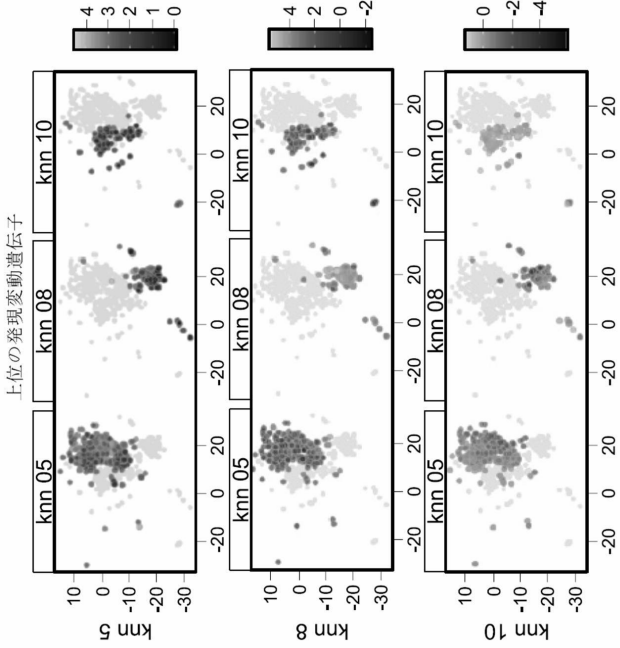
【 図 1 】



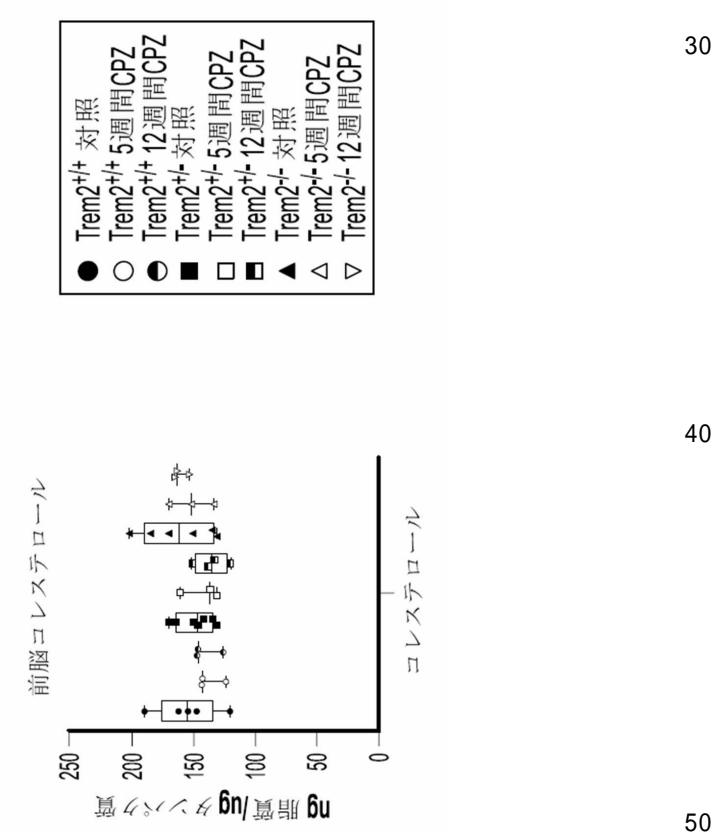
【 図 2 A 】



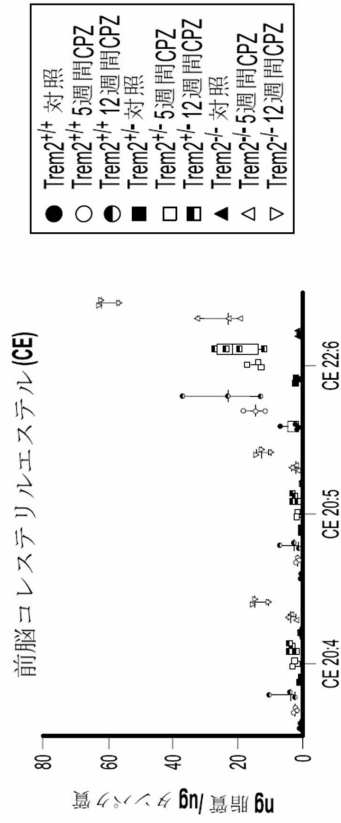
【 図 2 B 】



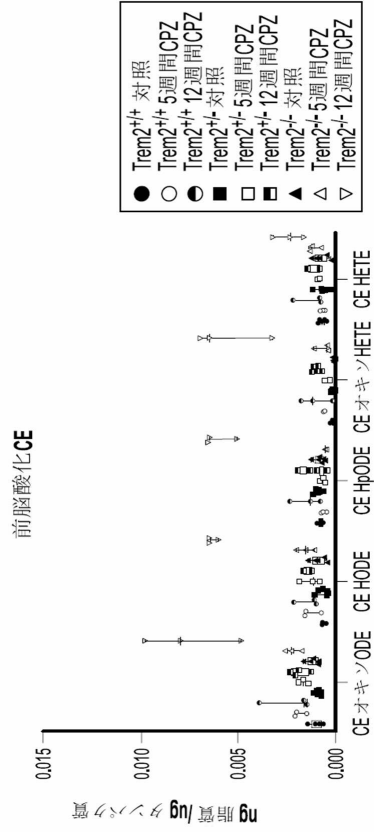
【 図 3 A 】



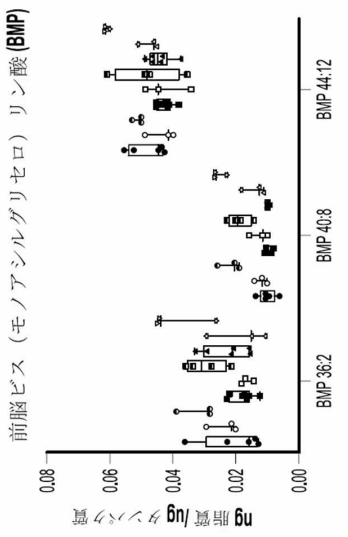
【 図 3 B 】



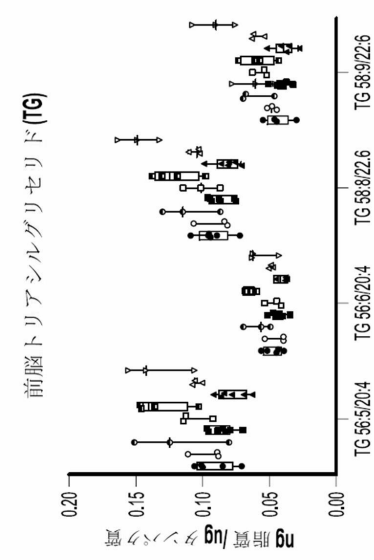
【 図 3 C 】



【 図 3 D 】



【 図 3 E 】



10

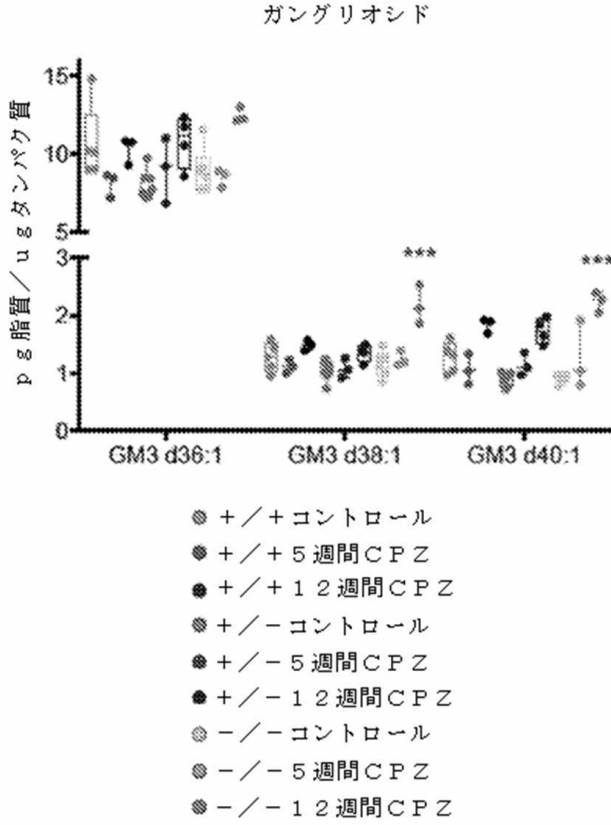
20

30

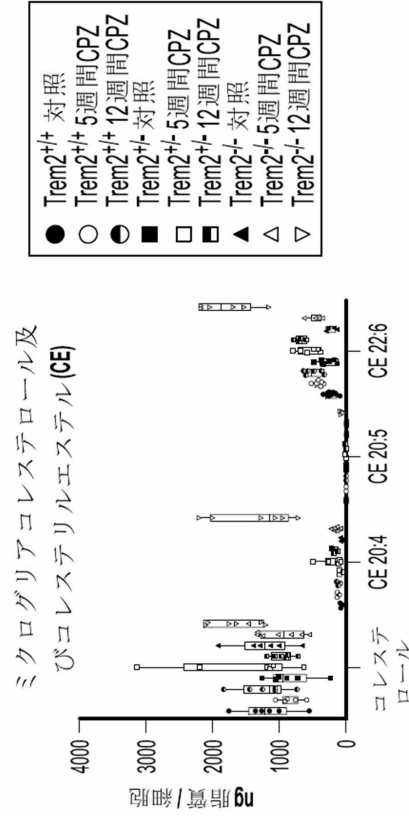
40

50

【 図 3 F 】



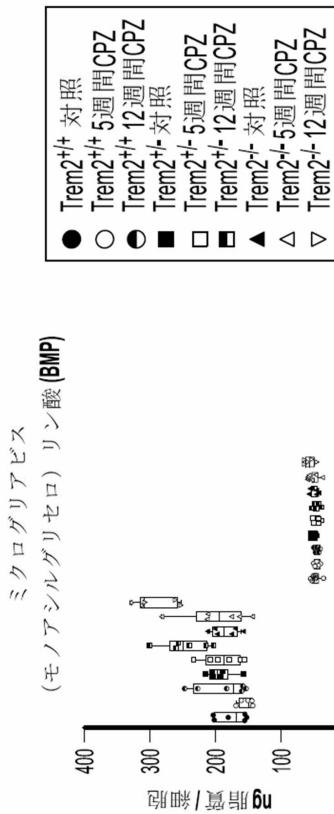
【 図 4 A 】



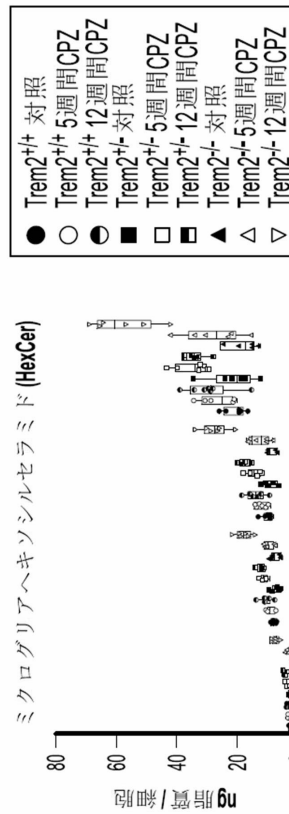
10

20

【 図 4 B 】



【 図 4 C 】

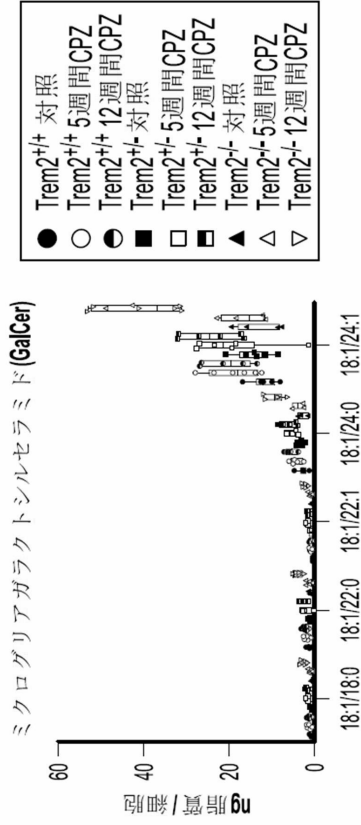


30

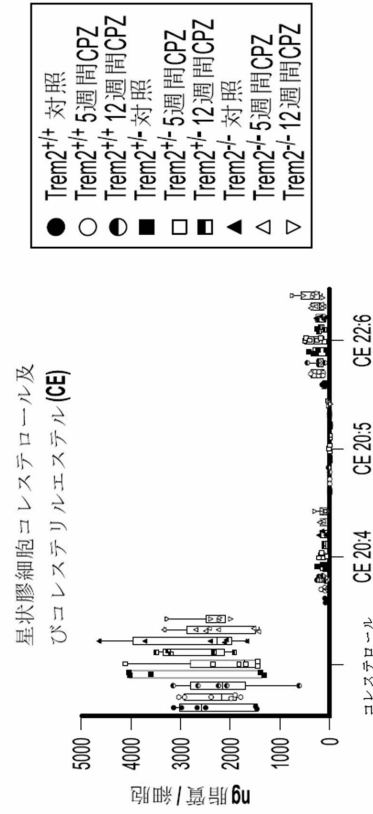
40

50

【 図 4 D 】



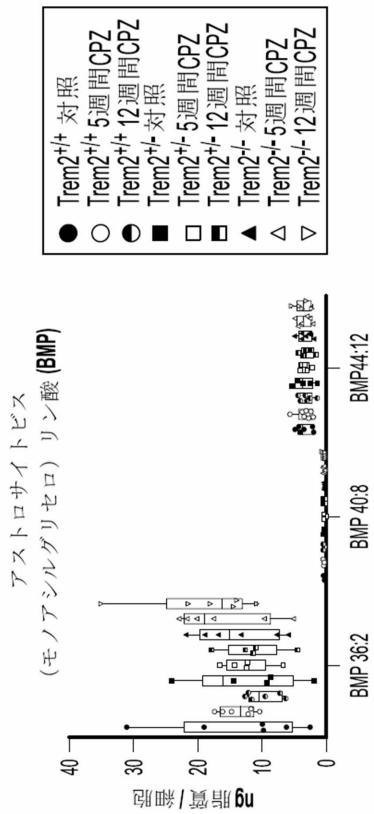
【 図 4 E 】



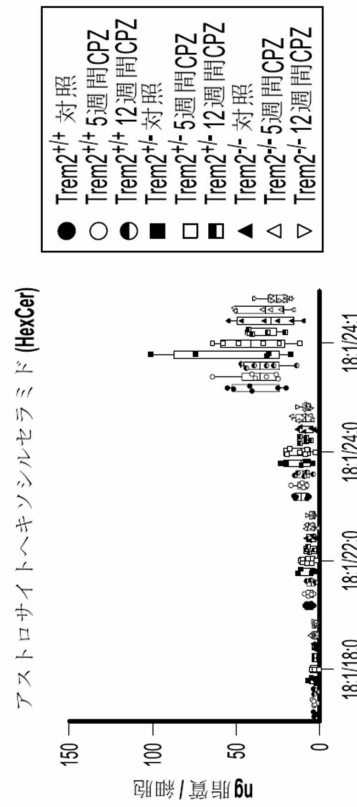
10

20

【 図 4 F 】



【 図 4 G 】



30

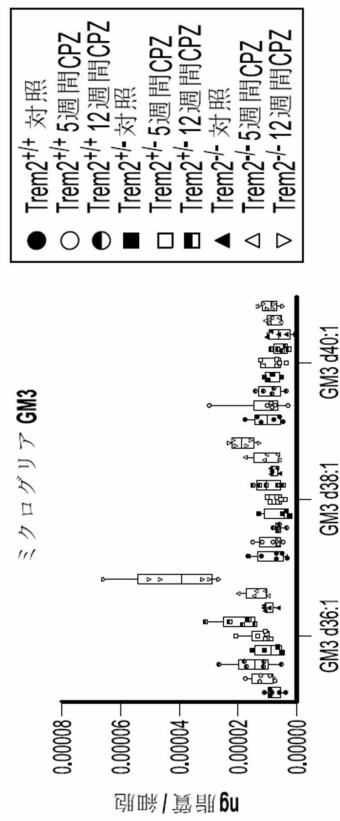
40

50

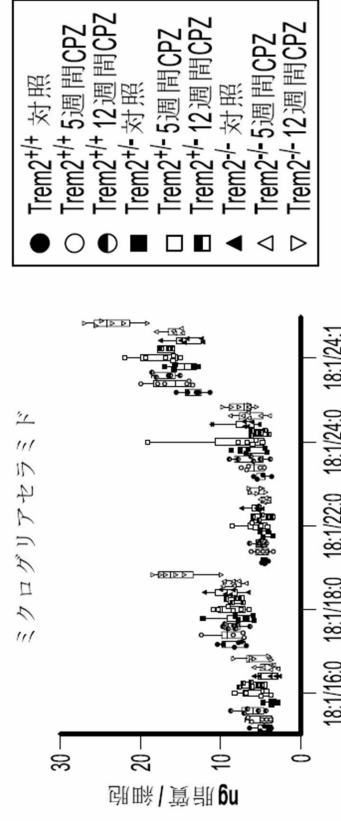
【 図 4 H 】



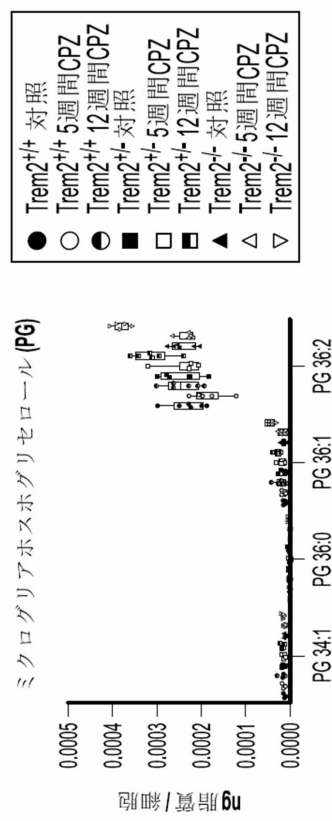
【 図 4 J 】



【 図 4 I 】



【 図 4 K 】



10

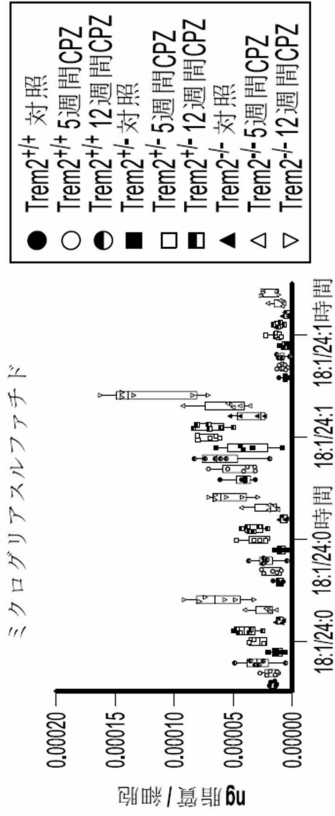
20

30

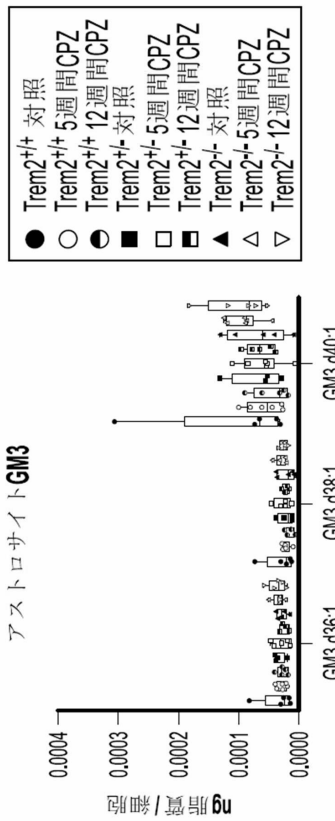
40

50

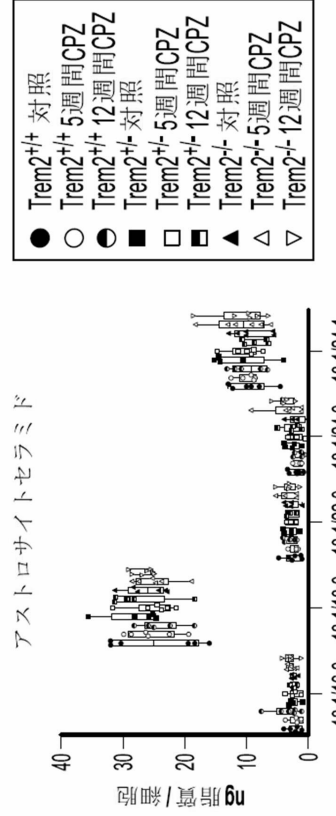
【 図 4 L 】



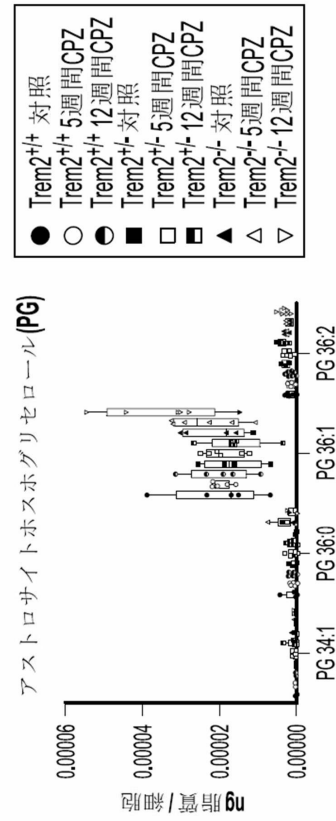
【 図 4 N 】



【 図 4 M 】



【 図 4 O 】



10

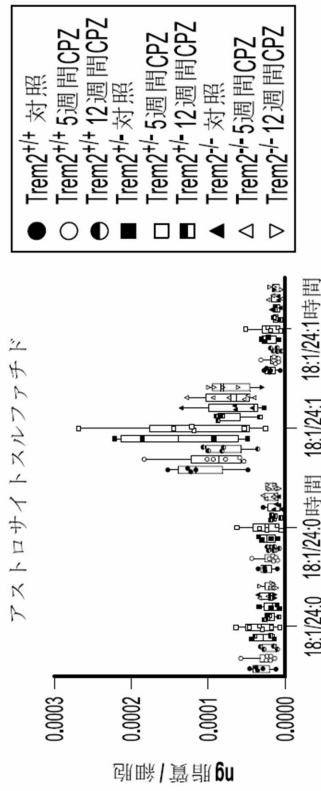
20

30

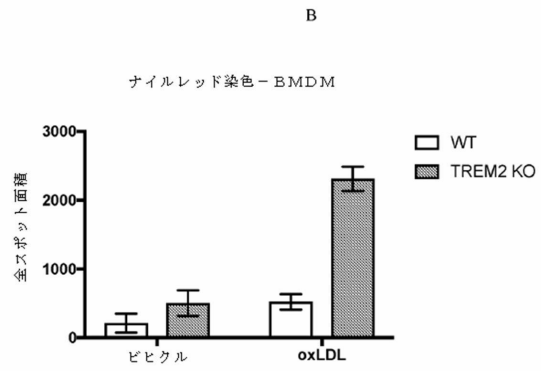
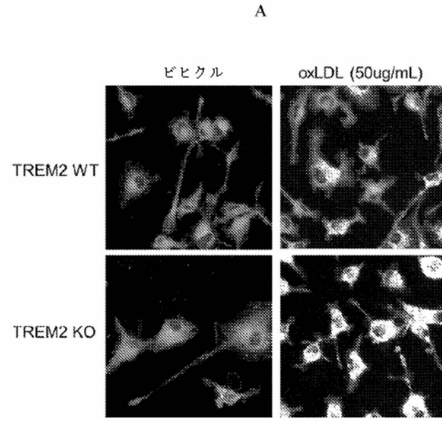
40

50

【 図 4 P 】



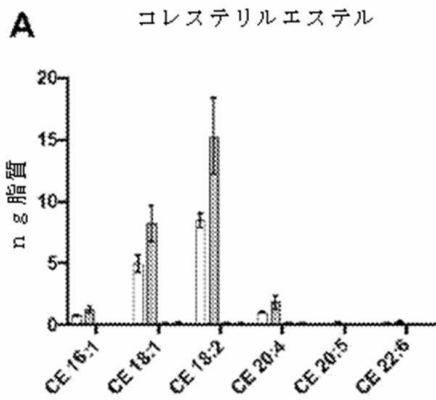
【 図 5 】



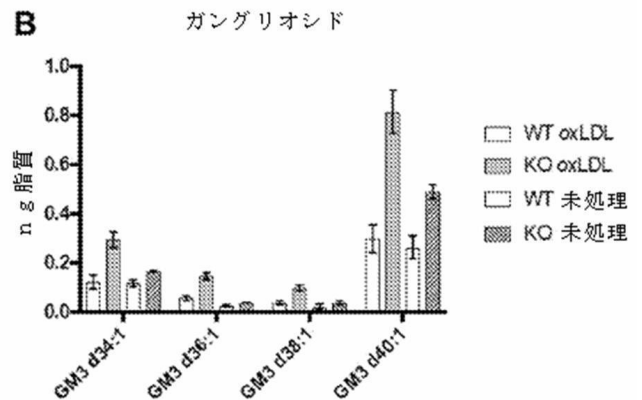
10

20

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

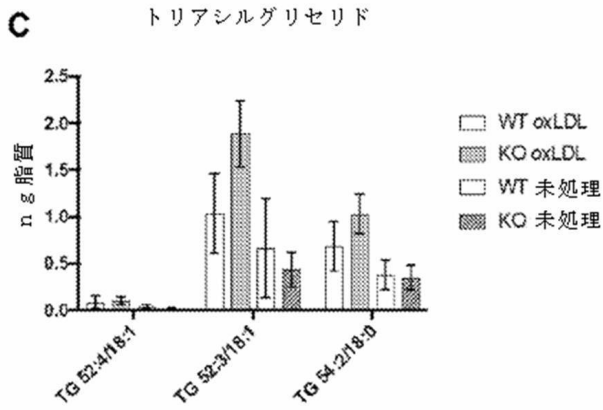


30

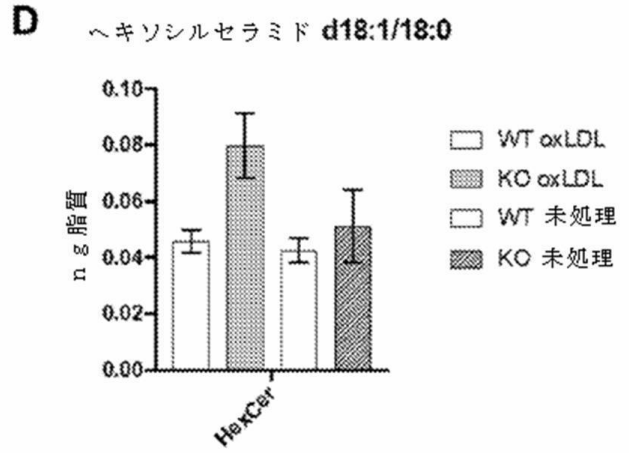
40

50

【 図 6 C 】

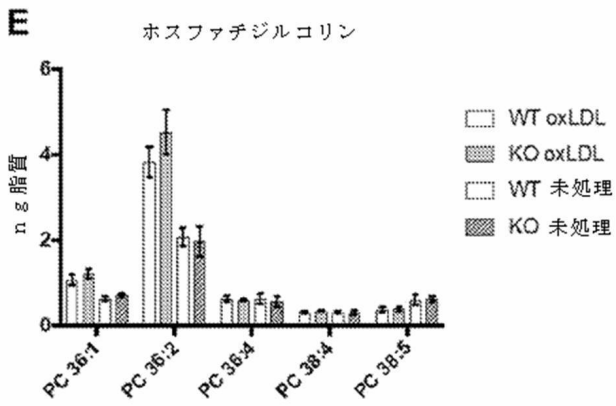


【 図 6 D 】

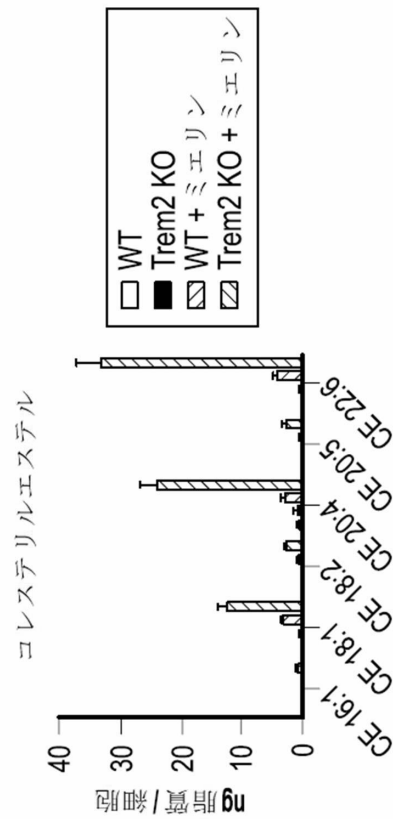


10

【 図 6 E 】



【 図 7 A 】



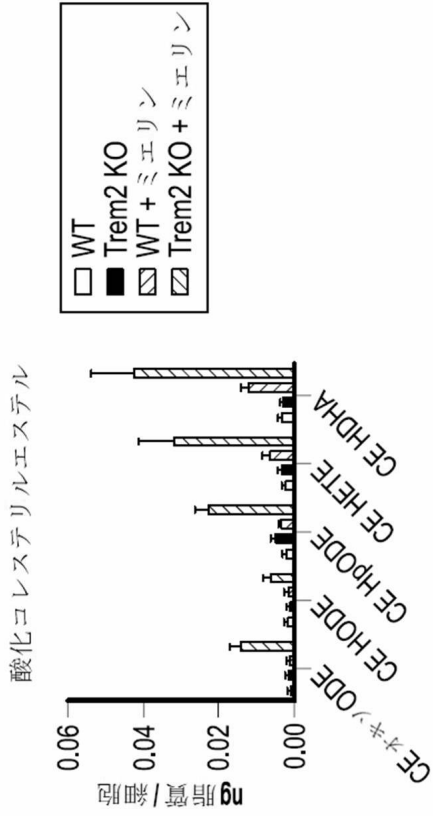
20

30

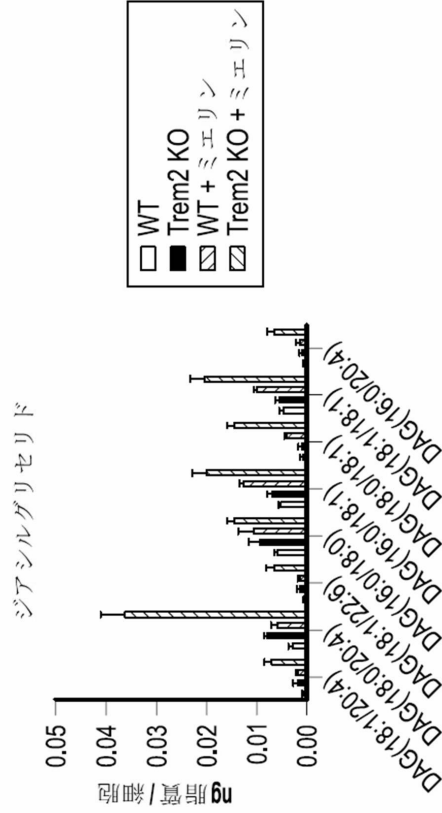
40

50

【 図 7 B 】



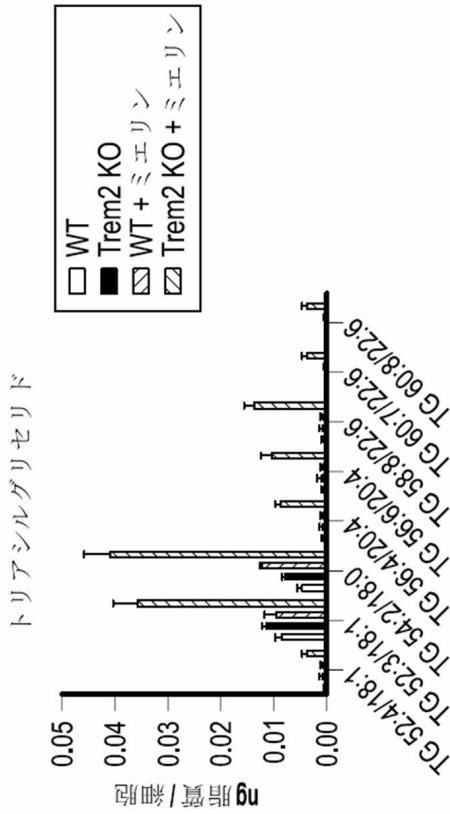
【 図 7 C 】



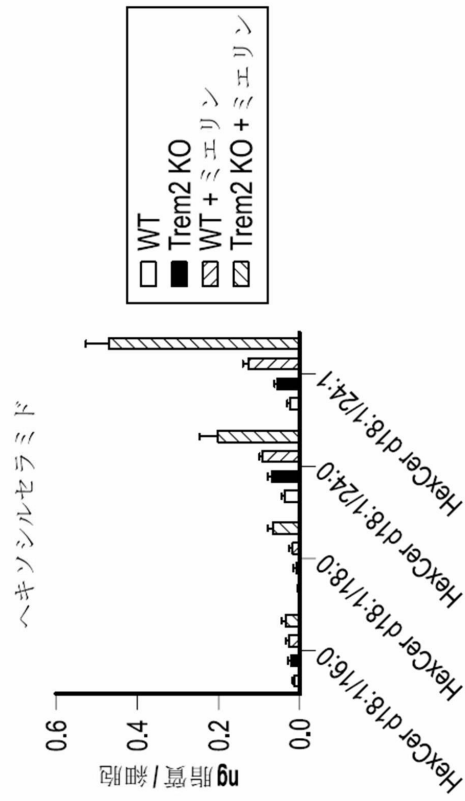
10

20

【 図 7 D 】



【 図 7 E 】

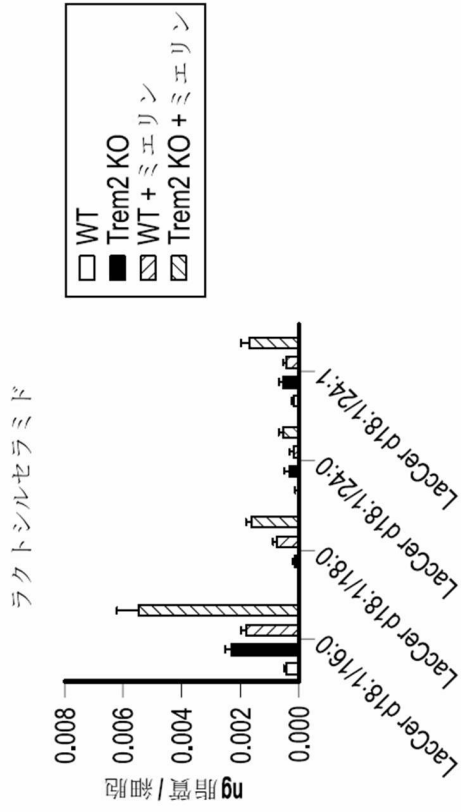


30

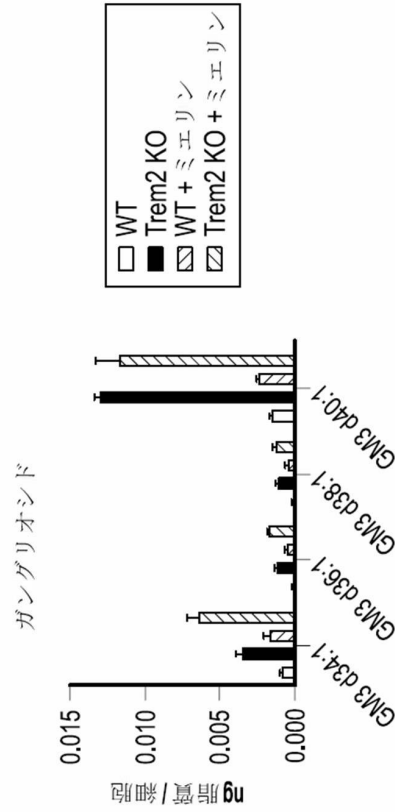
40

50

【 図 7 F 】



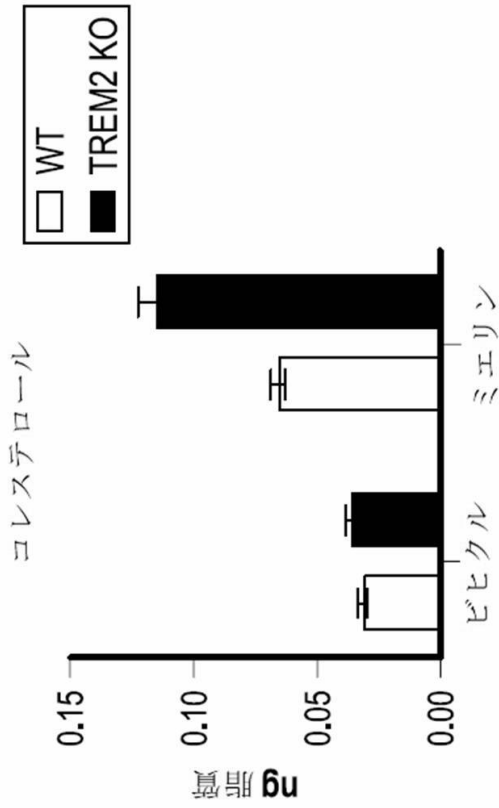
【 図 7 G 】



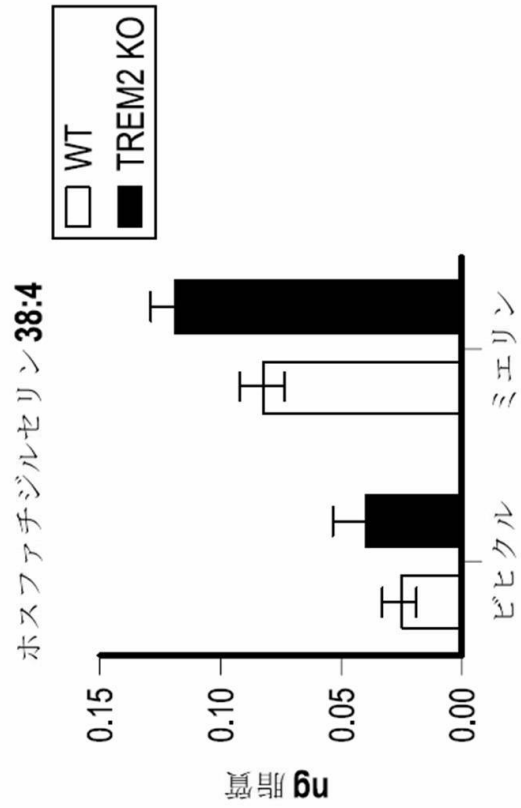
10

20

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

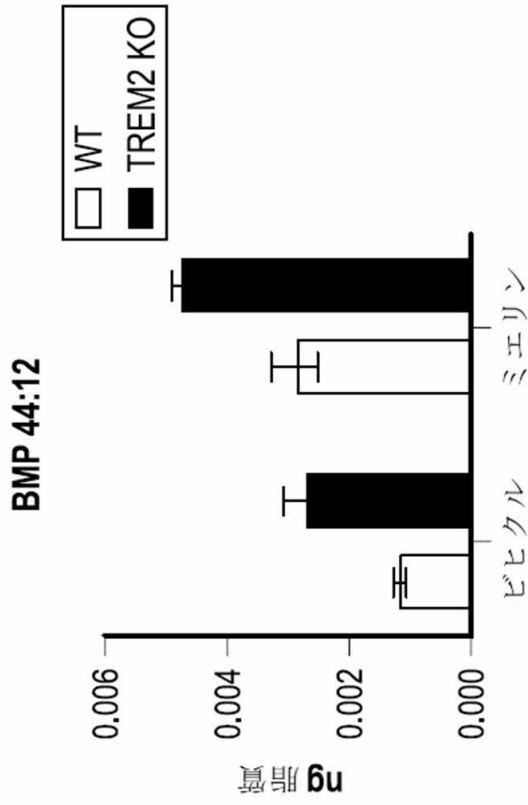


30

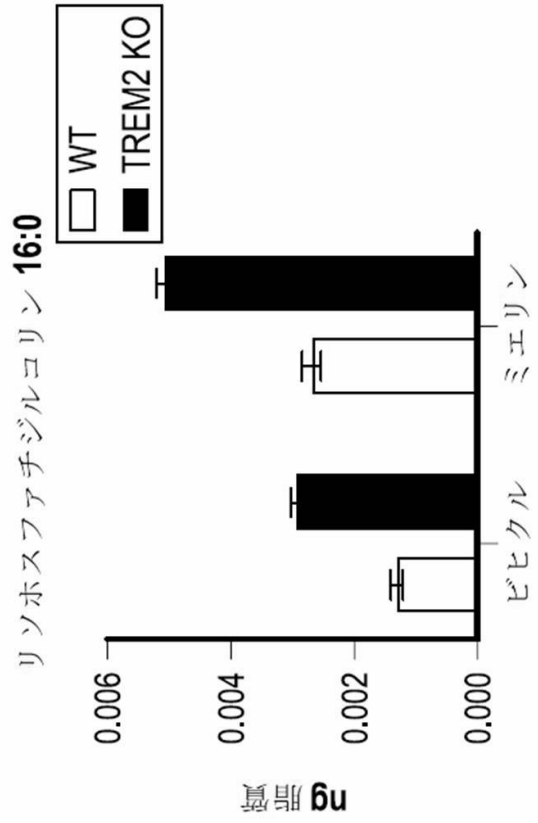
40

50

【 図 8 C 】



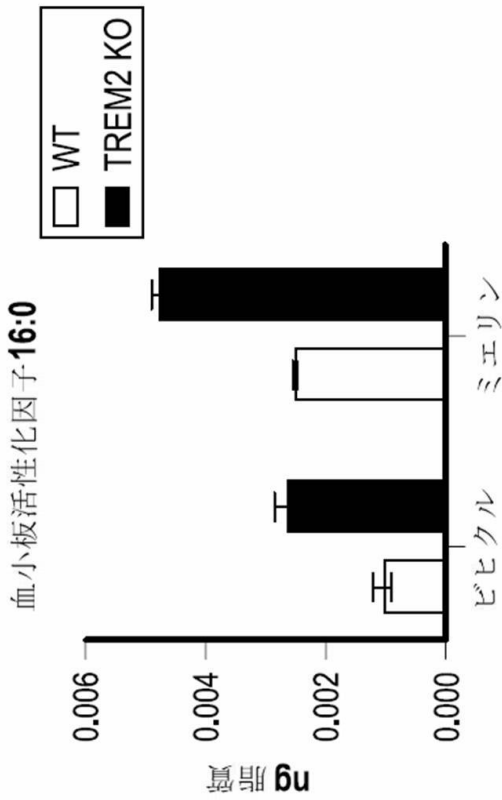
【 図 8 D 】



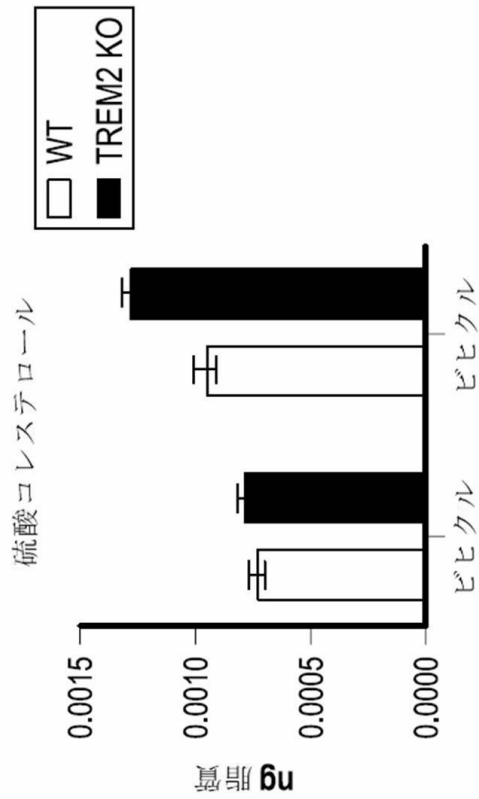
10

20

【 図 8 E 】



【 図 8 F 】

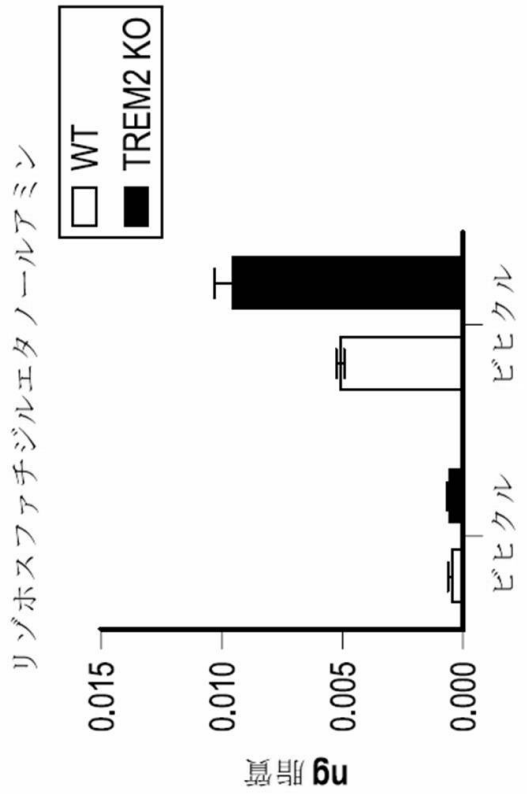


30

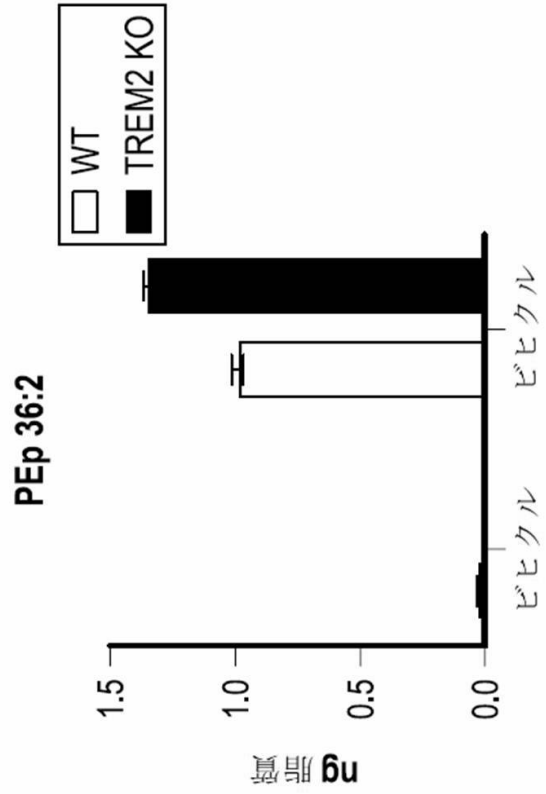
40

50

【 図 8 G 】



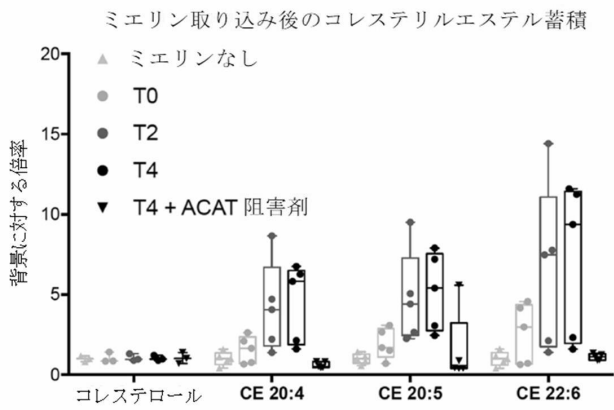
【 図 8 H 】



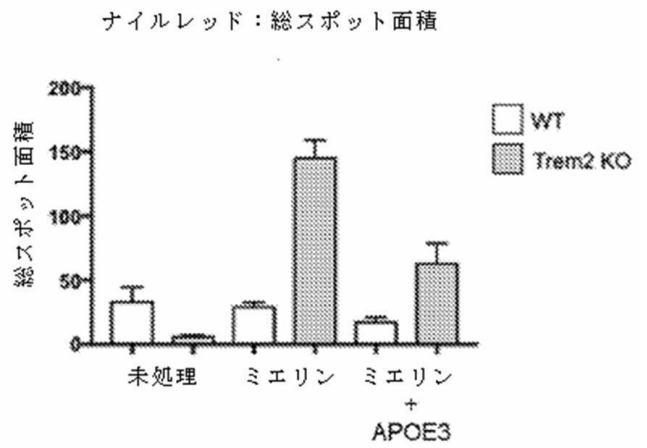
10

20

【 図 9 】



【 図 10 】

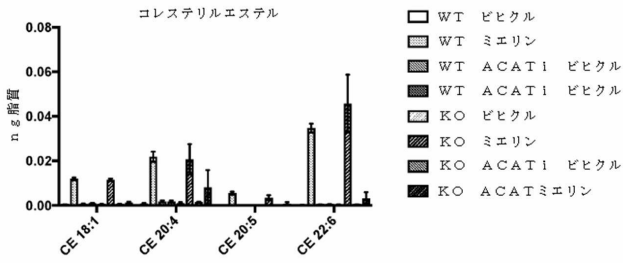


30

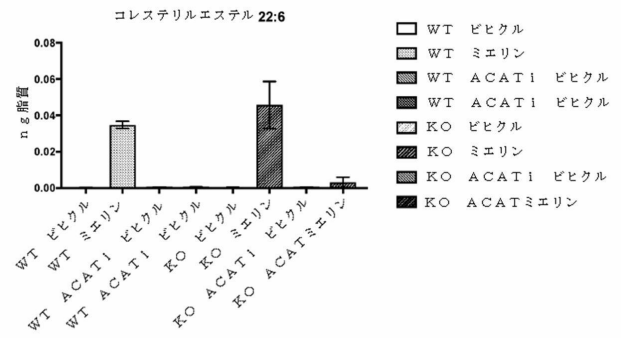
40

50

【図 1 1 A】

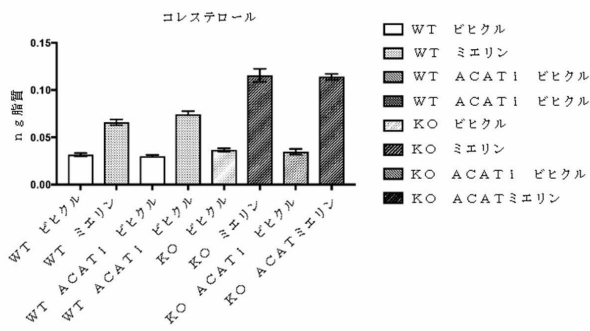


【図 1 1 B】

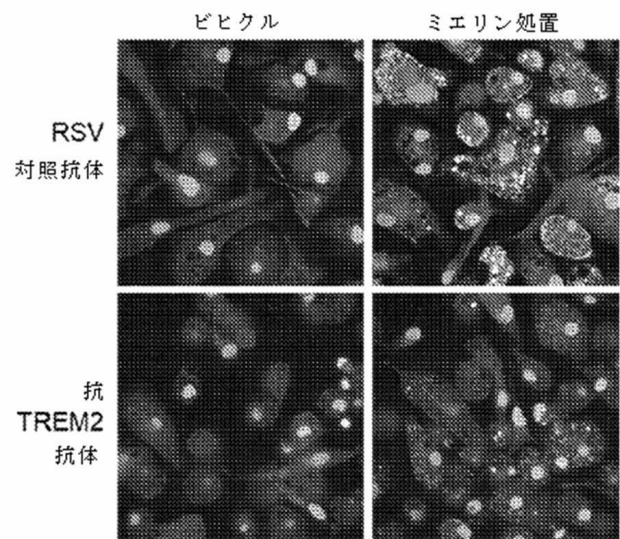


10

【図 1 1 C】



【図 1 2 A】



20

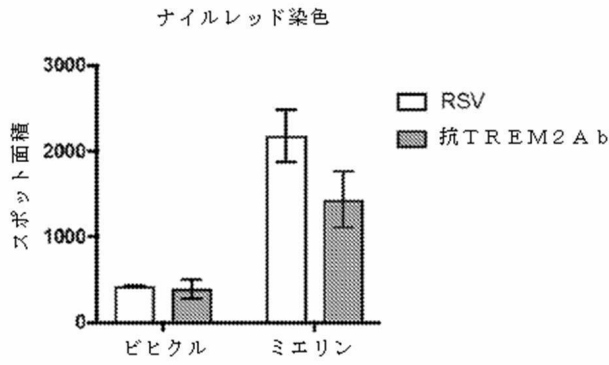
30

40

50

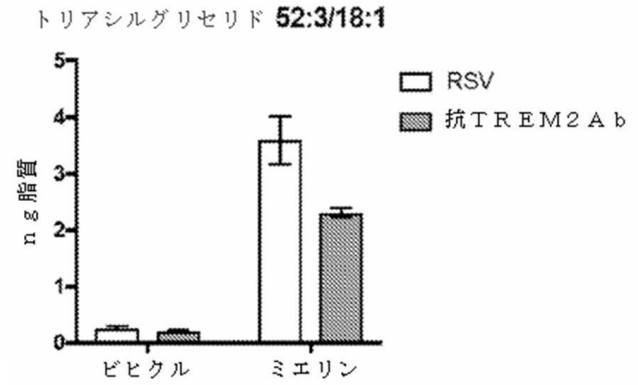
【 図 1 2 B 】

B



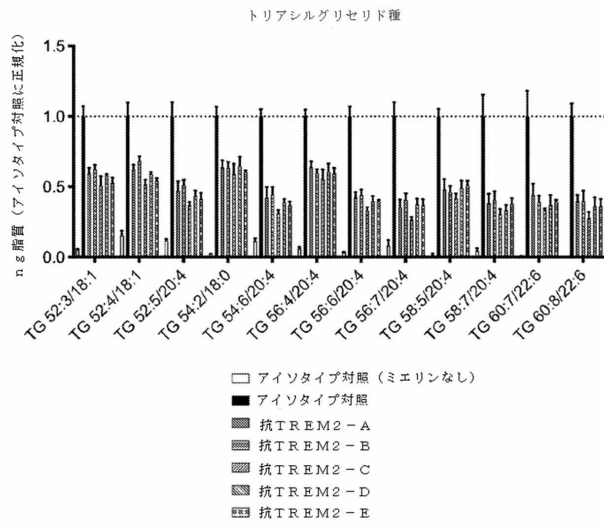
【 図 1 2 C 】

C

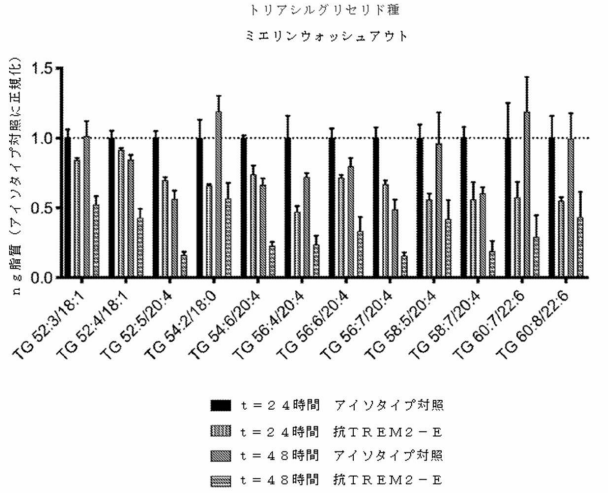


10

【 図 1 2 D 】



【 図 1 2 E 】



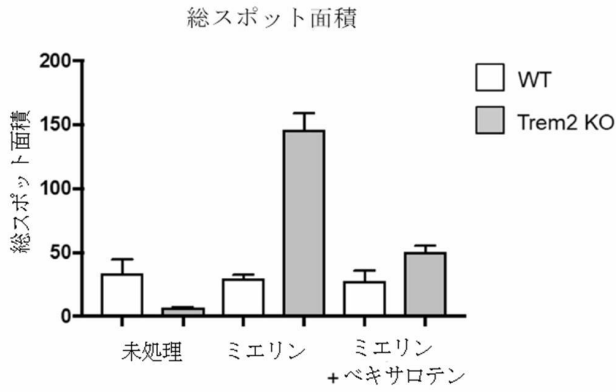
20

30

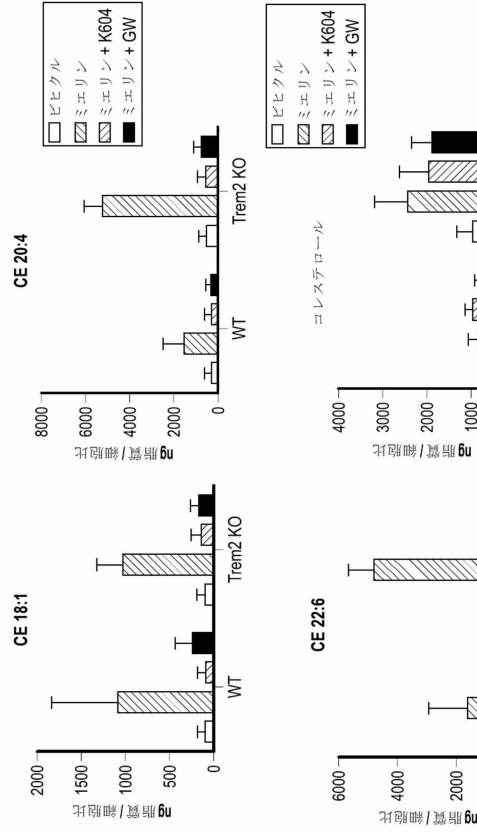
40

50

【 図 1 3 A 】



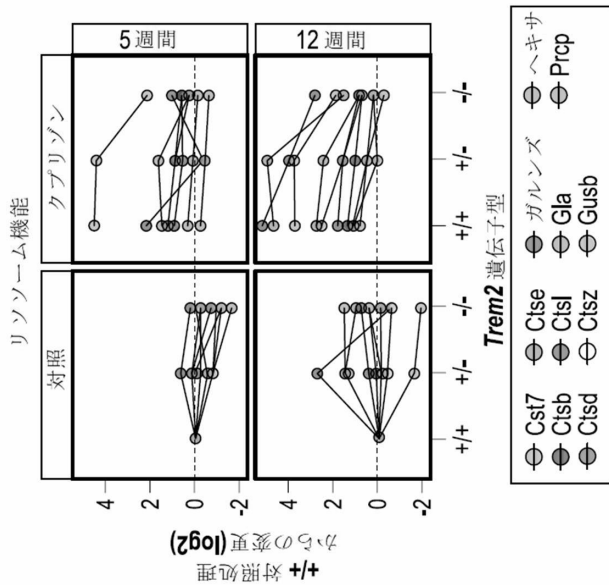
【 図 1 3 B 】



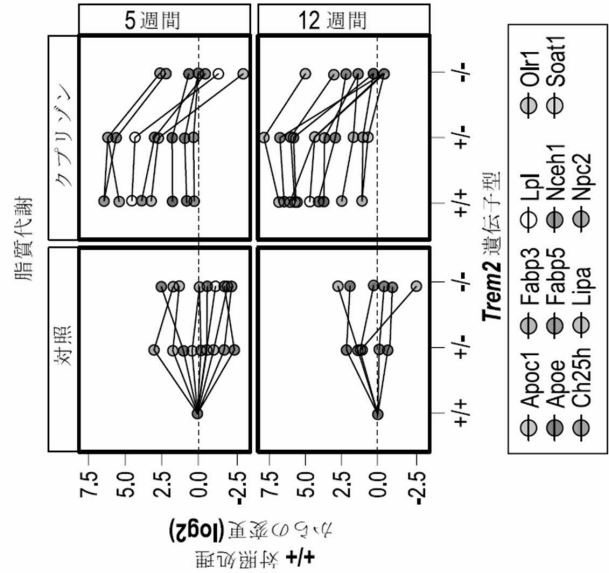
10

20

【 図 1 4 A 】



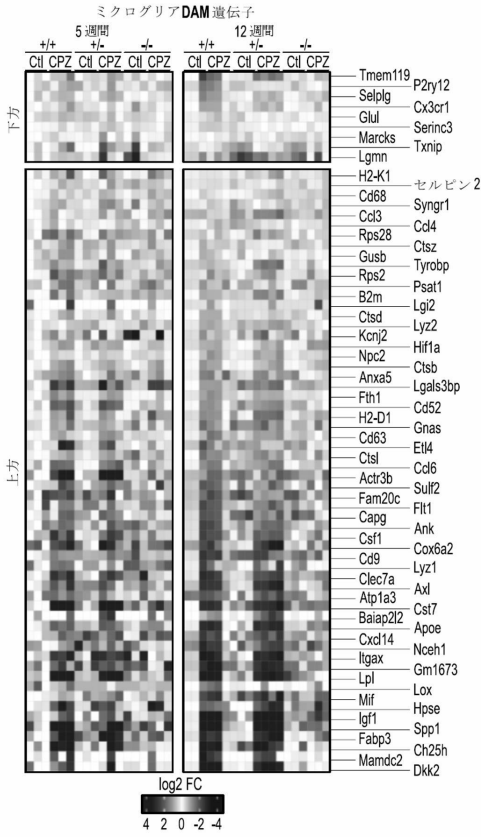
【 図 1 4 B 】



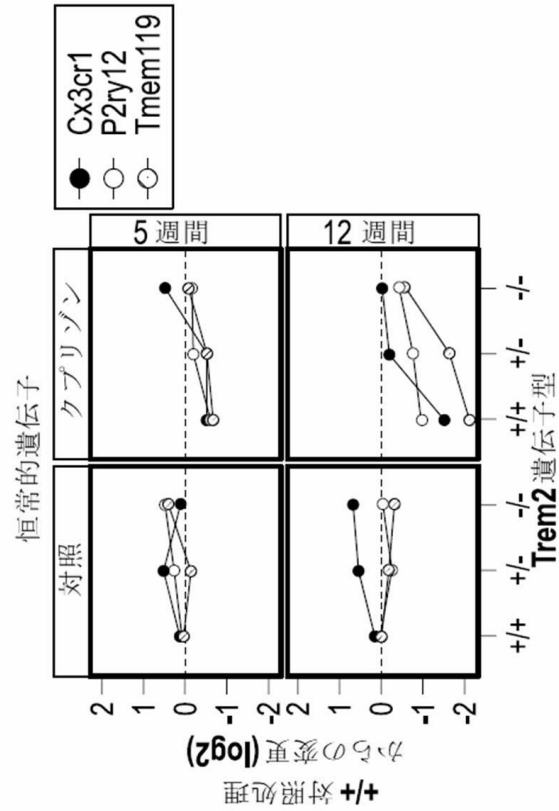
30

40

【 図 1 4 C 】



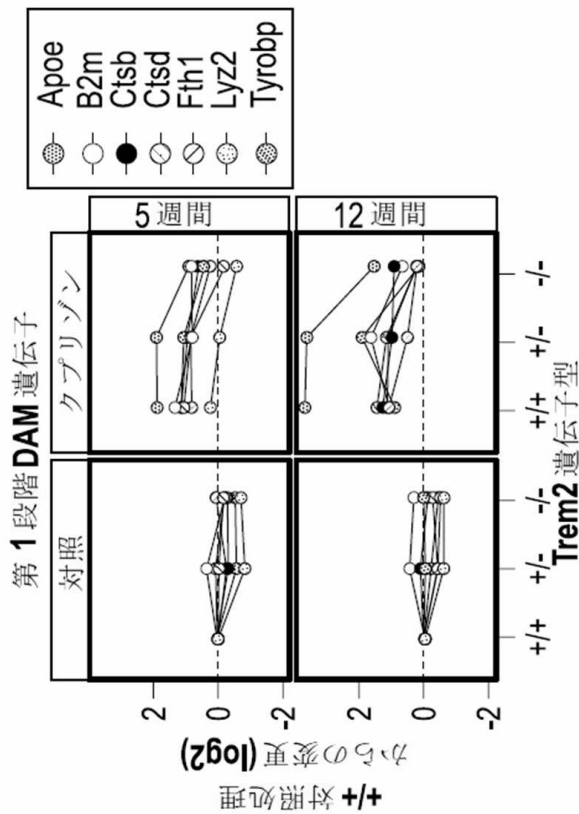
【 図 1 4 D 】



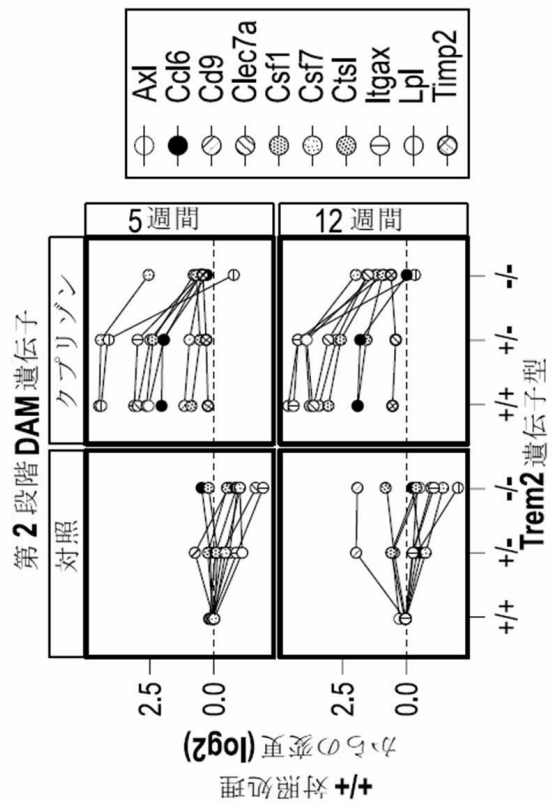
10

20

【 図 1 4 E 】



【 図 1 4 F 】

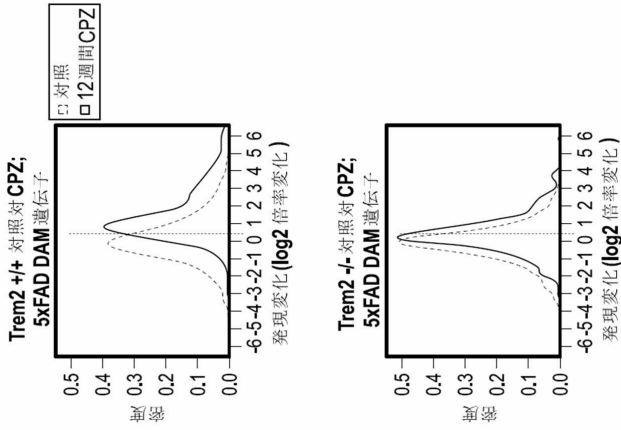


30

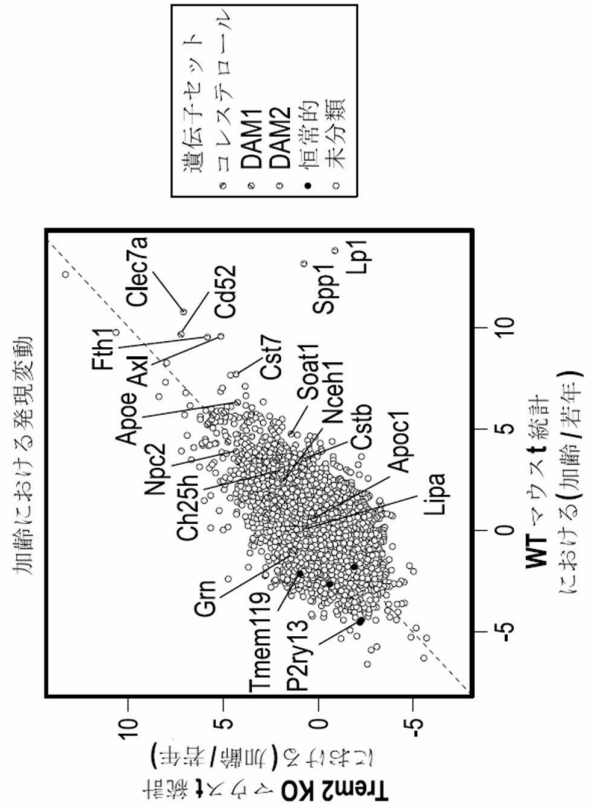
40

50

【 図 1 5 A 】



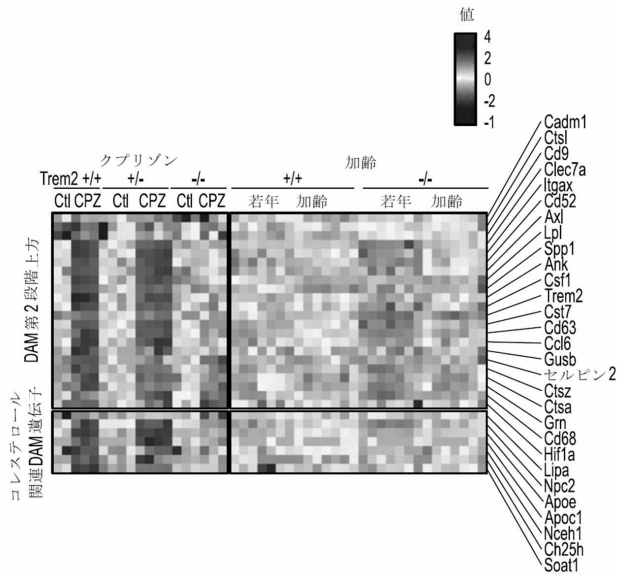
【 図 1 5 B 】



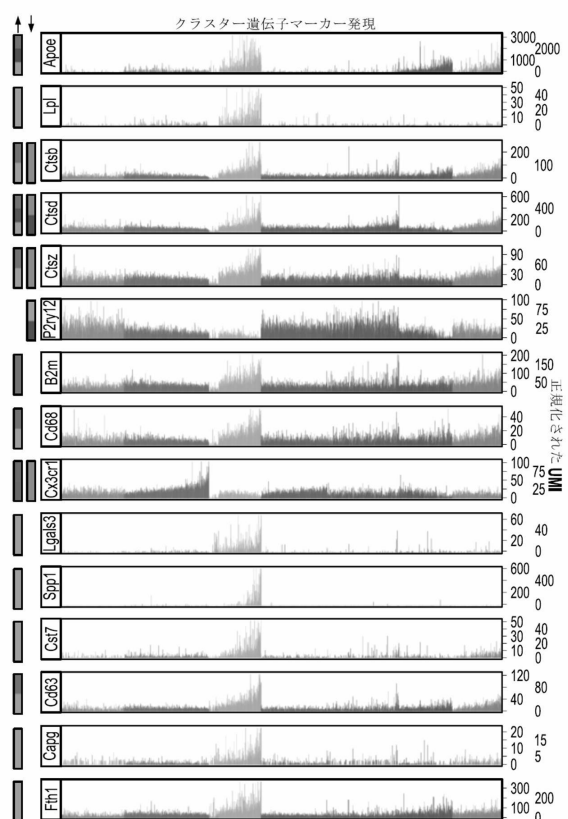
10

20

【 図 1 5 C 】



【 図 1 6 A 】

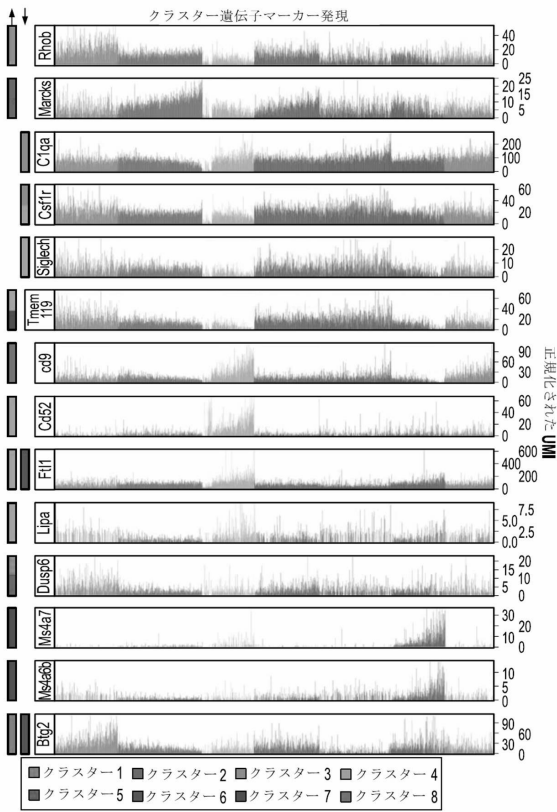


30

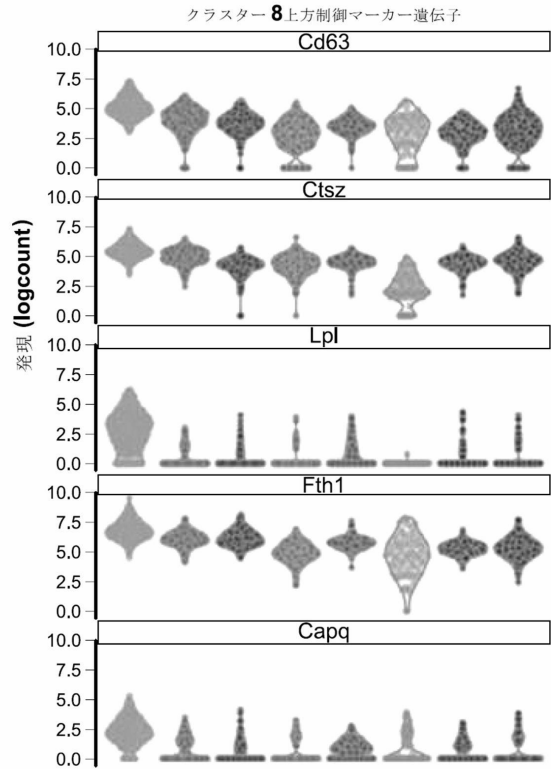
40

50

【 図 1 6 B 】



【 図 1 6 C - 1 】

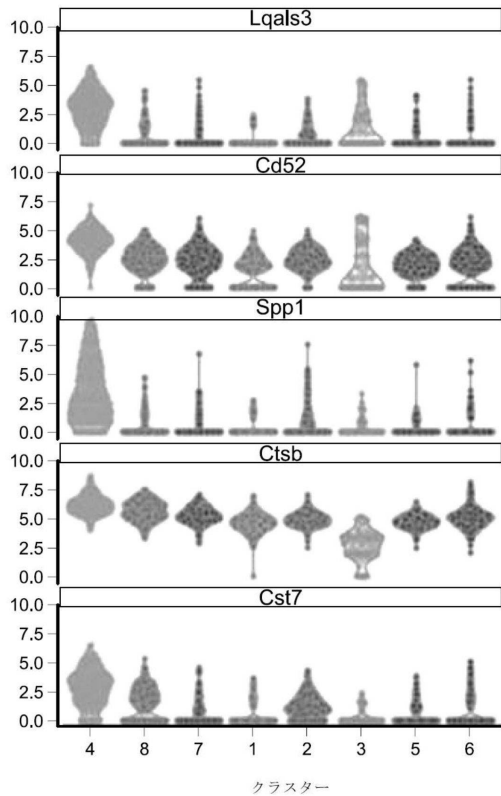


10

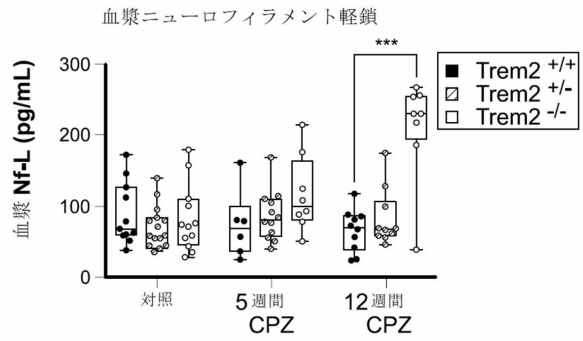
20

【 図 1 6 C - 2 】

(続き)



【 図 1 7 A 】

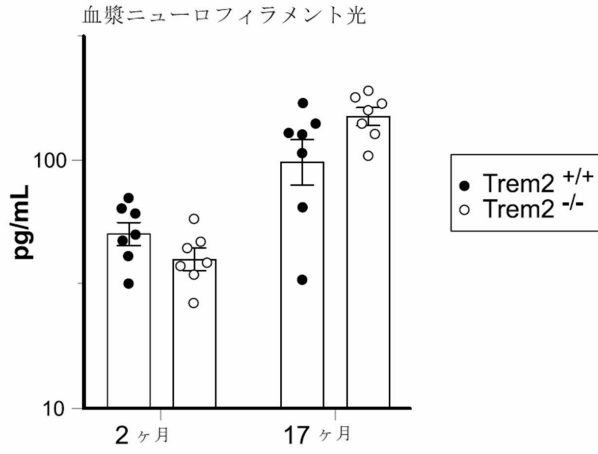


30

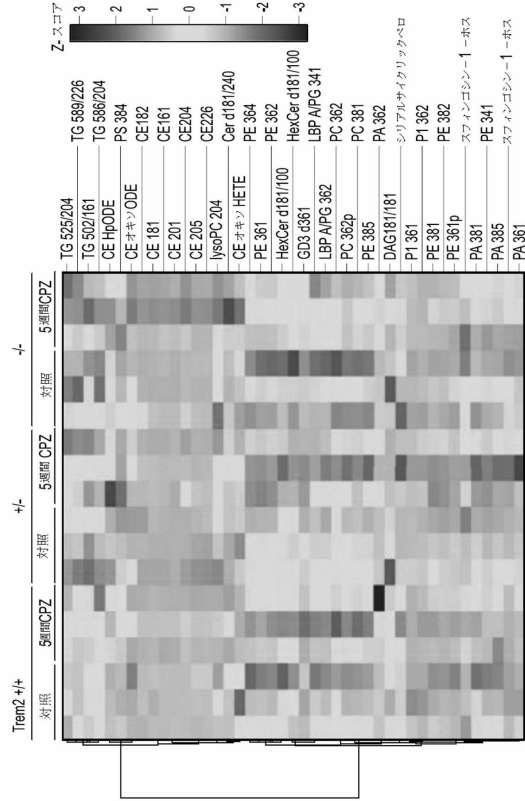
40

50

【 図 1 7 B 】



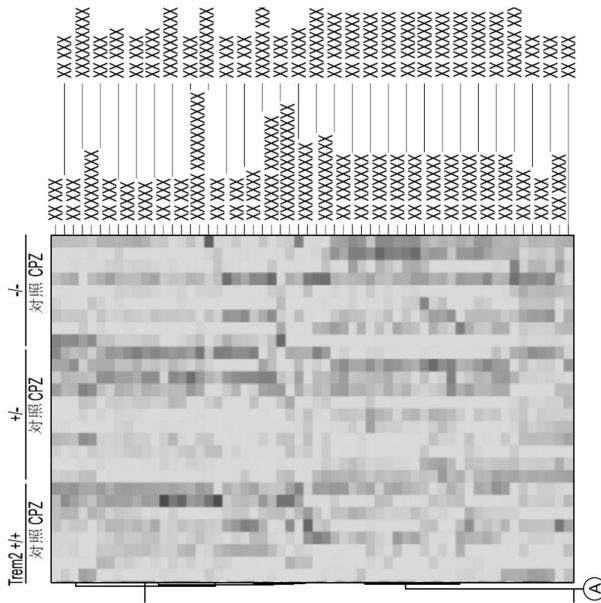
【 図 1 7 C 】



10

20

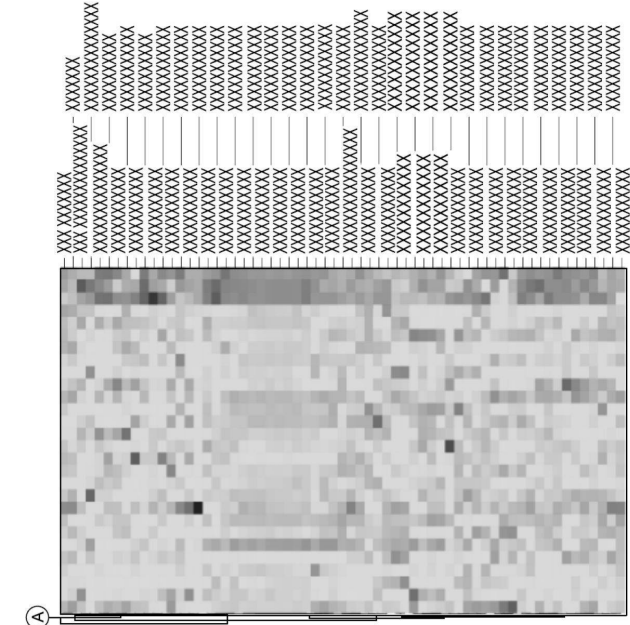
【 図 1 7 D - 1 】



(A)

【 図 1 7 D - 2 】

(続き)



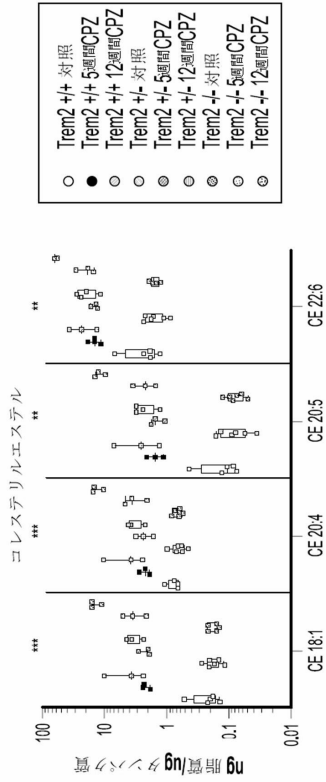
(A)

30

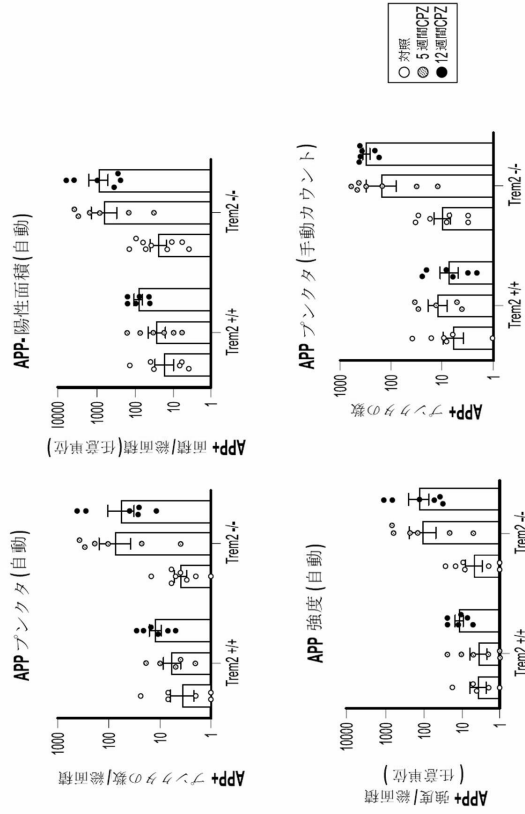
40

50

【 図 1 7 E 】



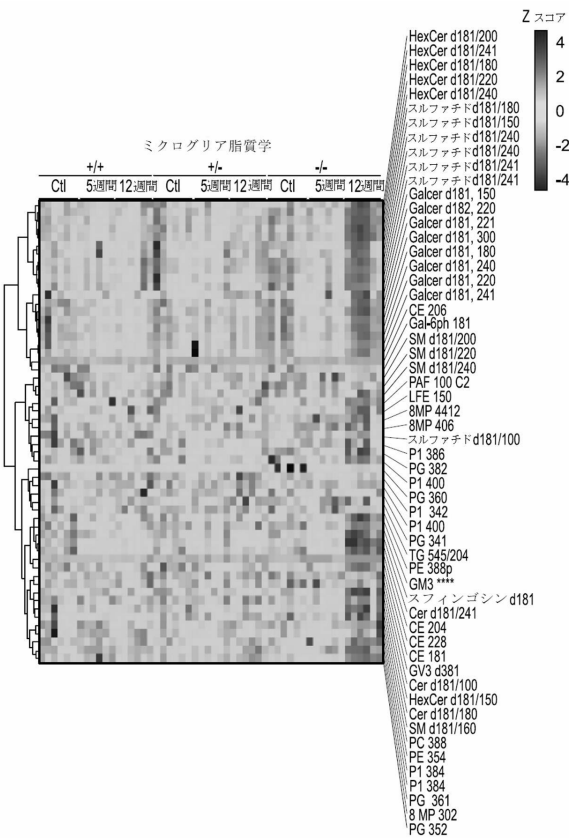
【 図 1 7 F 】



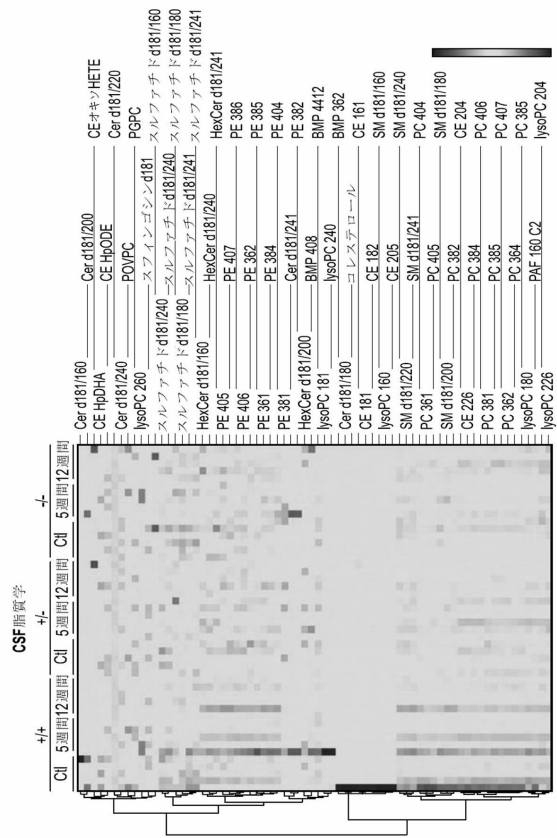
10

20

【 図 1 8 A 】



【 図 1 8 B 】

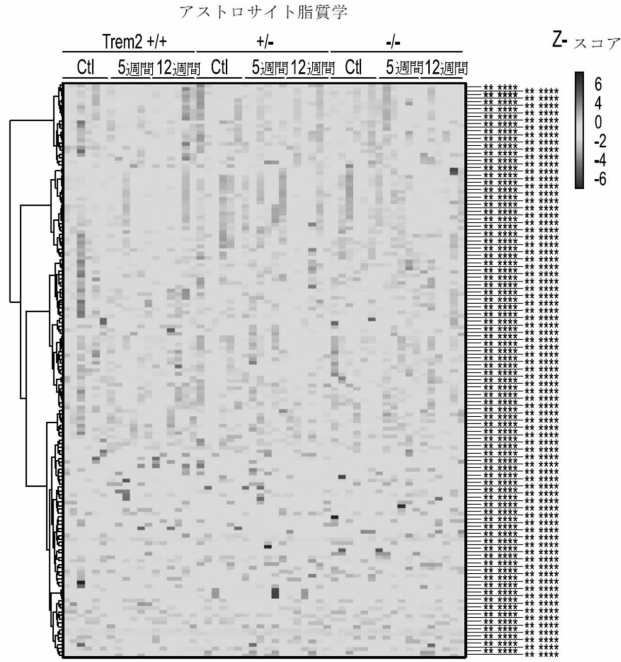


30

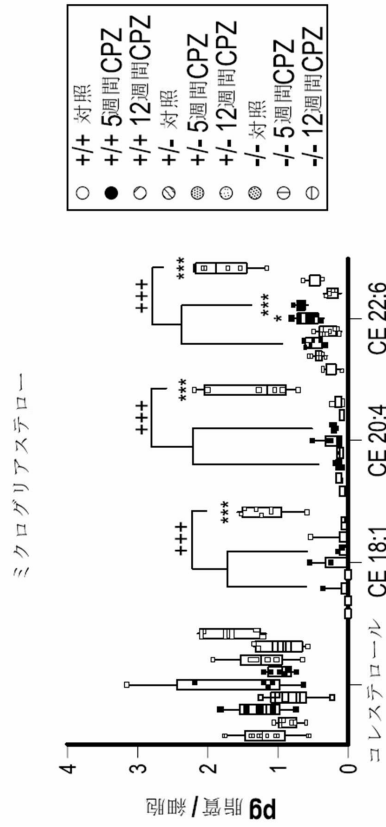
40

50

【 図 1 8 C 】



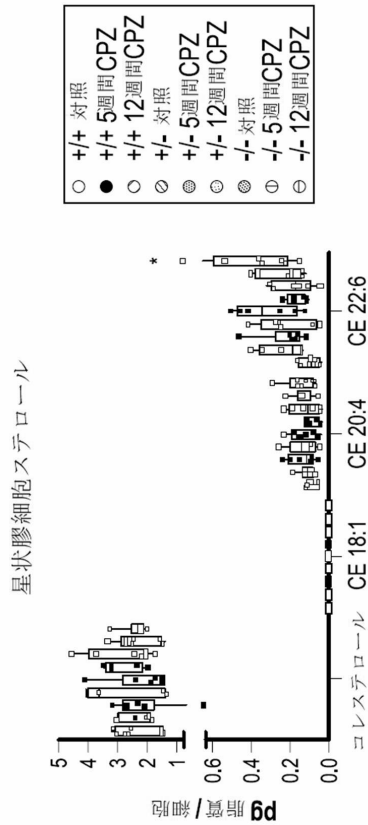
【 図 1 8 D 】



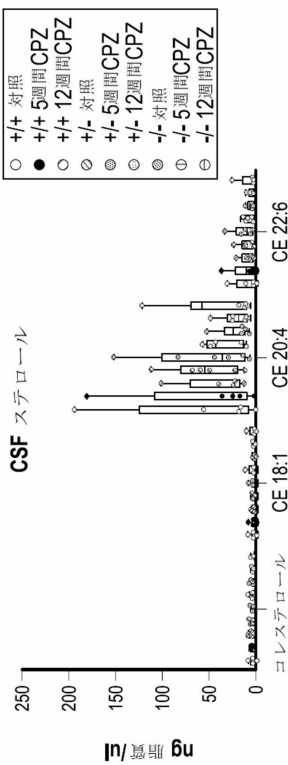
10

20

【 図 1 8 E 】



【 図 1 8 F 】

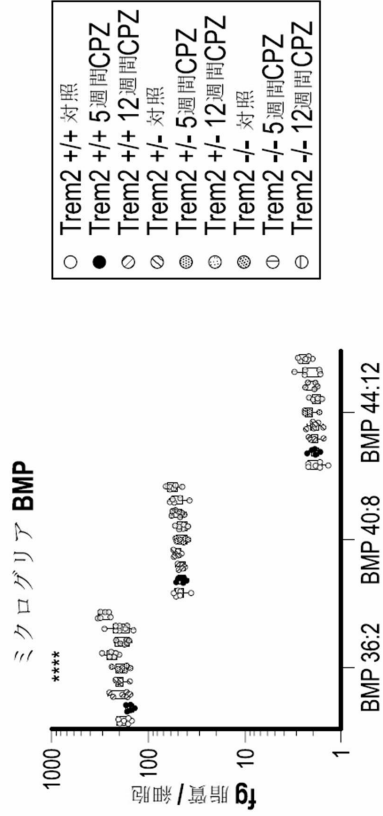


30

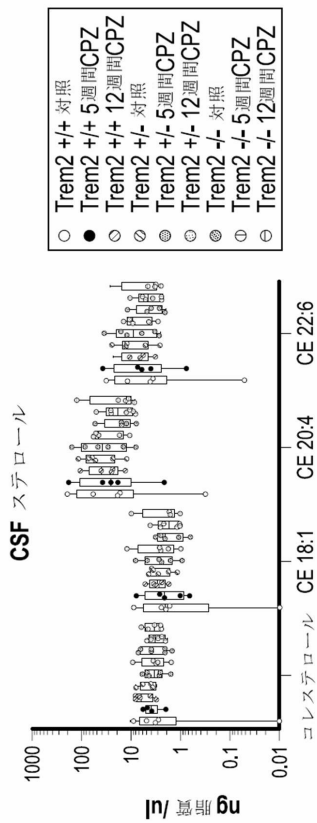
40

50

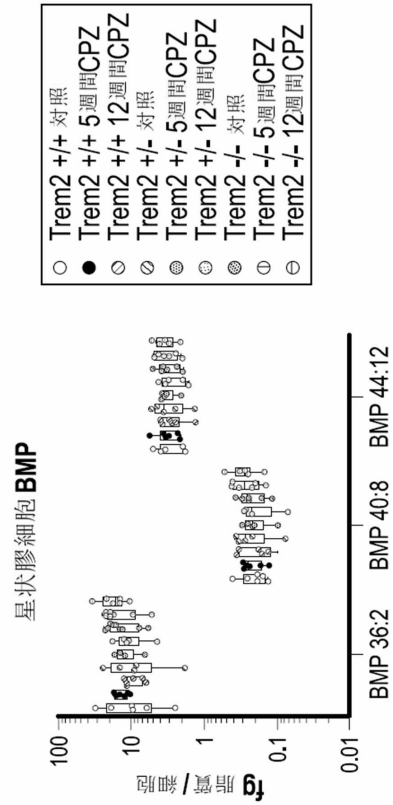
【 図 1 8 G 】



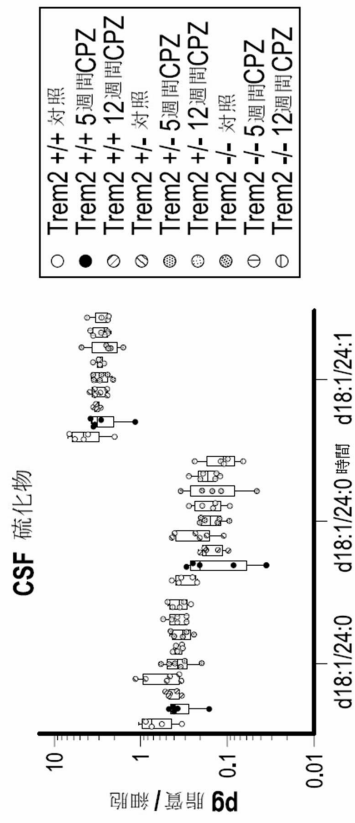
【 図 1 8 I 】



【 図 1 8 H 】



【 図 1 8 J 】



10

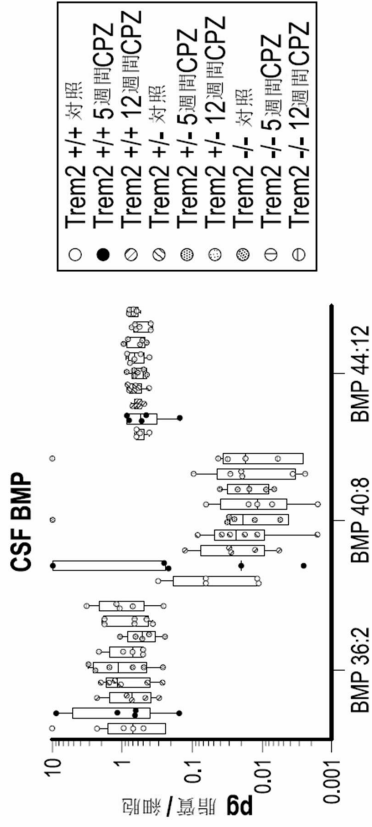
20

30

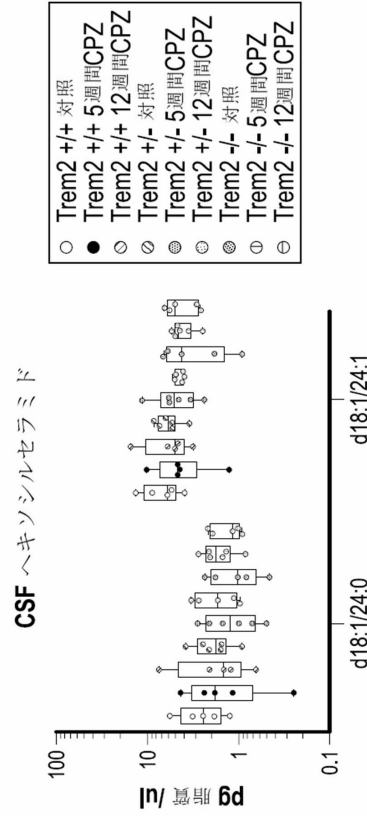
40

50

【 図 1 8 K 】



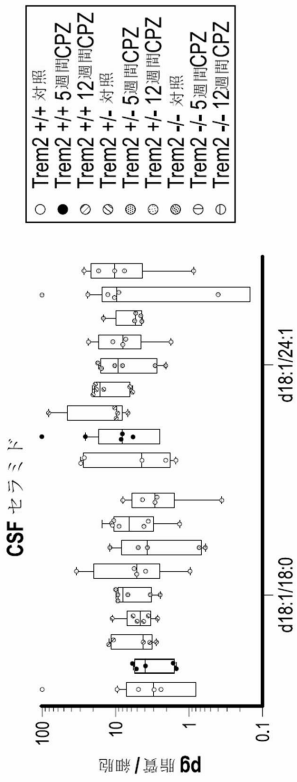
【 図 1 8 L 】



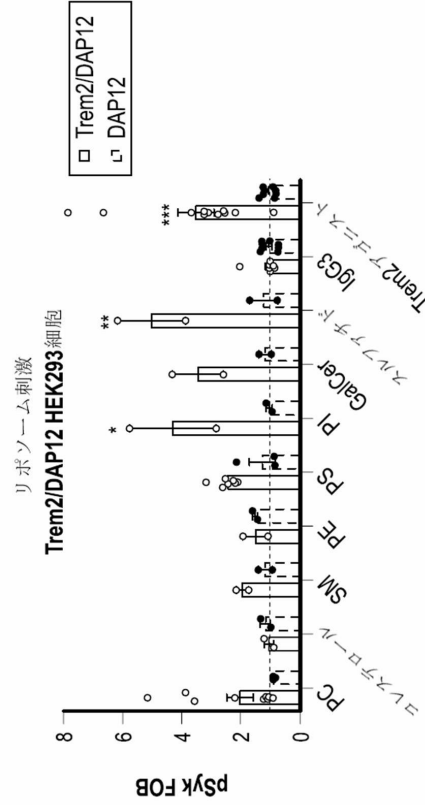
10

20

【 図 1 8 M 】



【 図 1 9 A 】

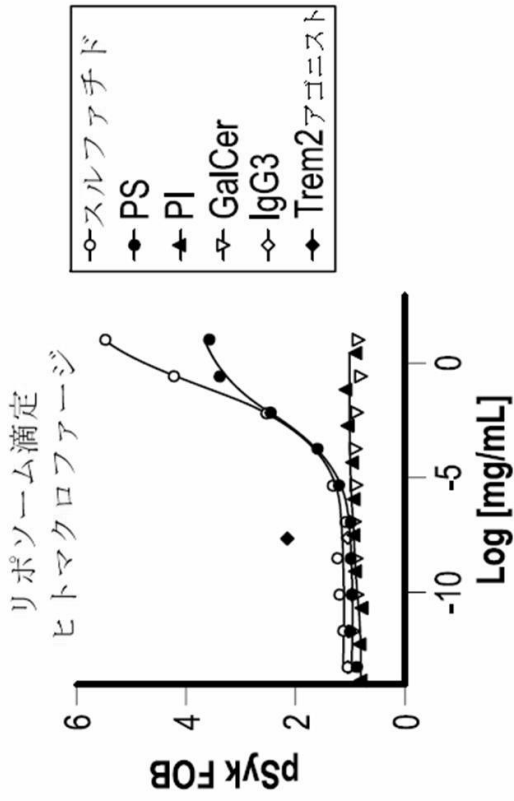


30

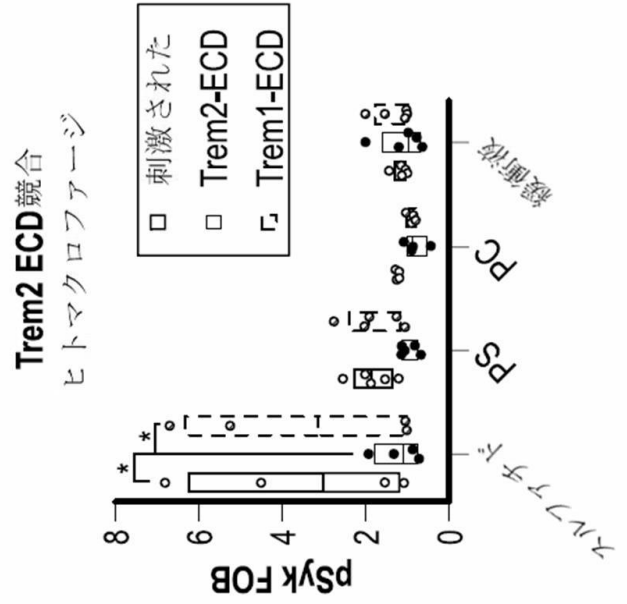
40

50

【 図 1 9 B 】



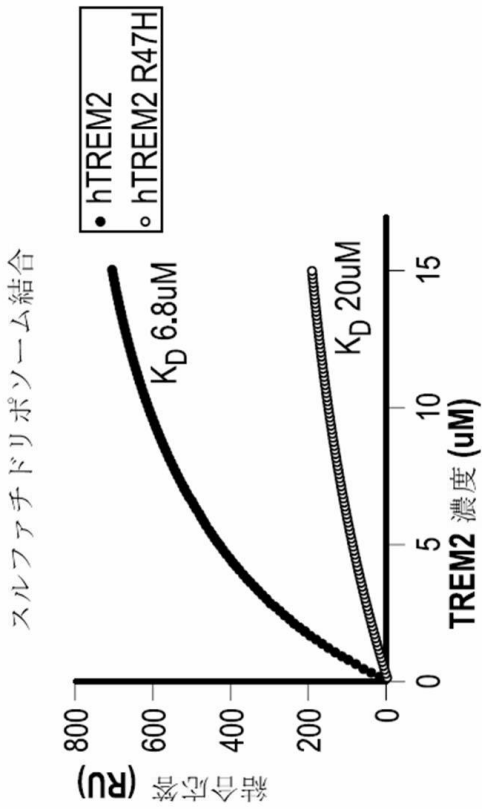
【 図 1 9 C 】



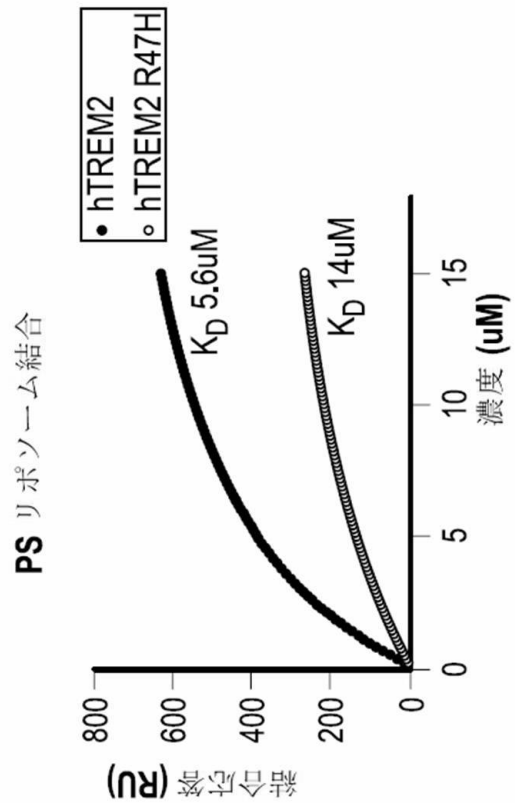
10

20

【 図 1 9 D 】



【 図 1 9 E 】

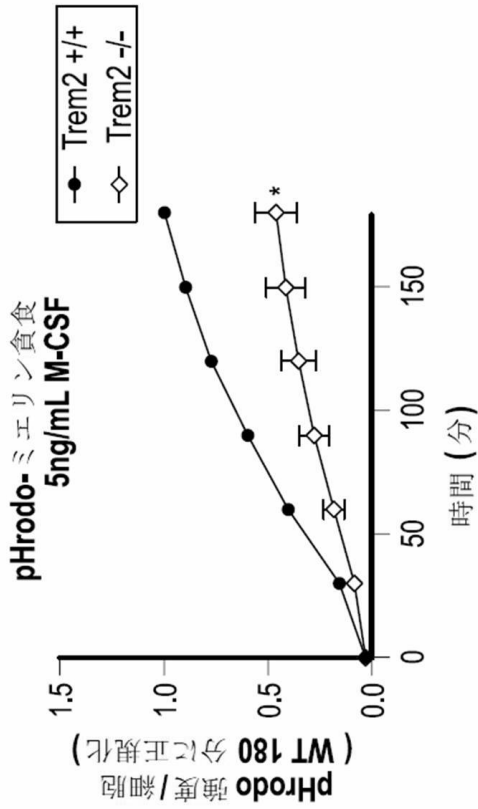


30

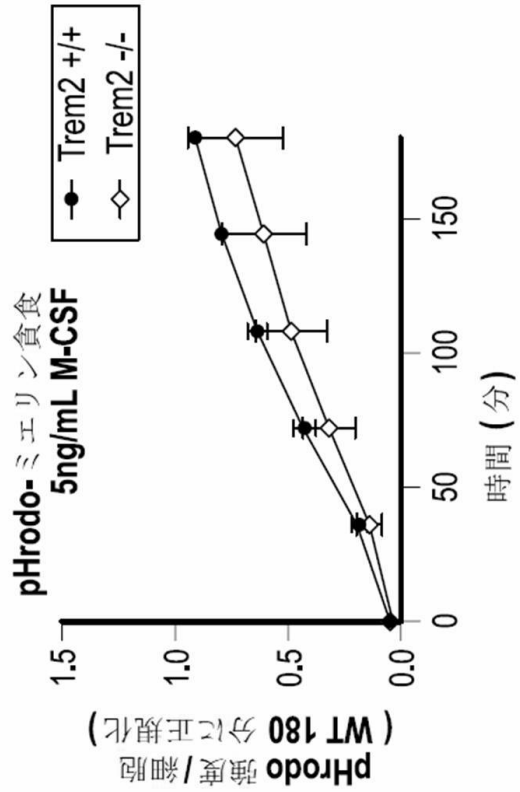
40

50

【 図 1 9 F 】



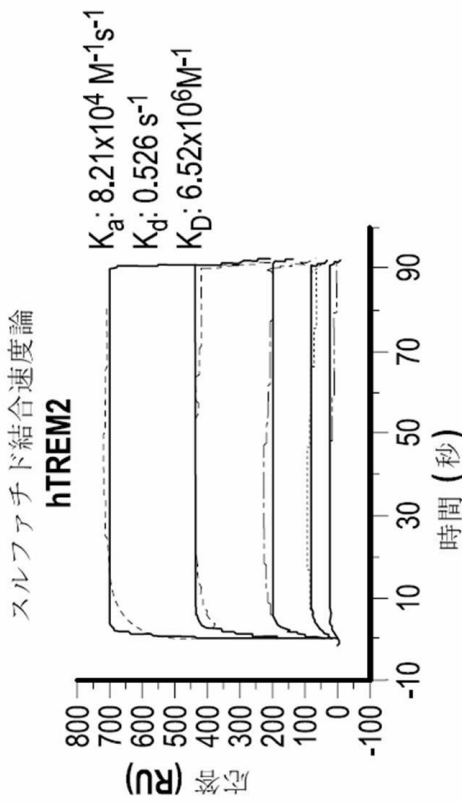
【 図 1 9 G 】



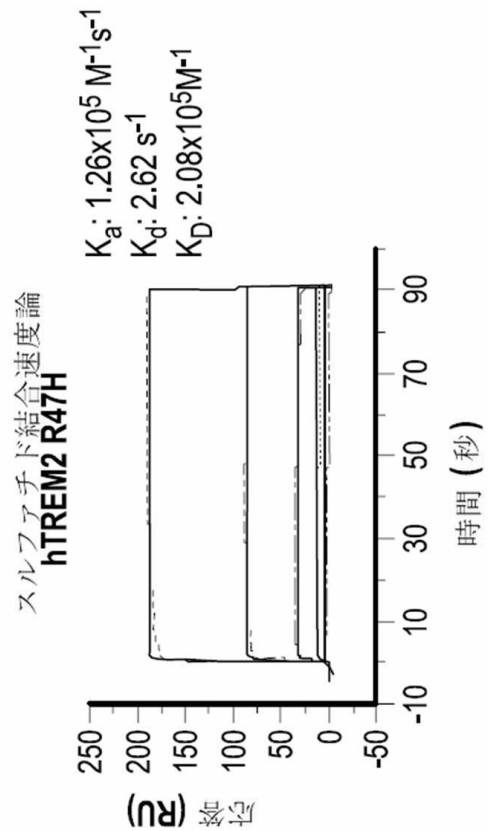
10

20

【 図 1 9 H 】



【 図 1 9 I 】

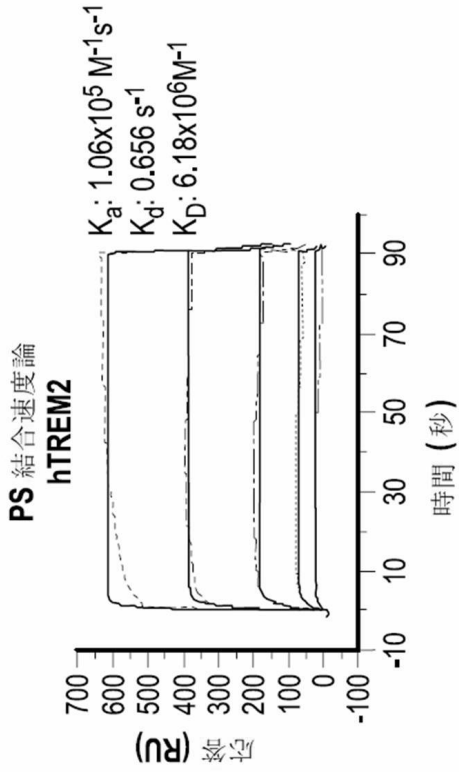


30

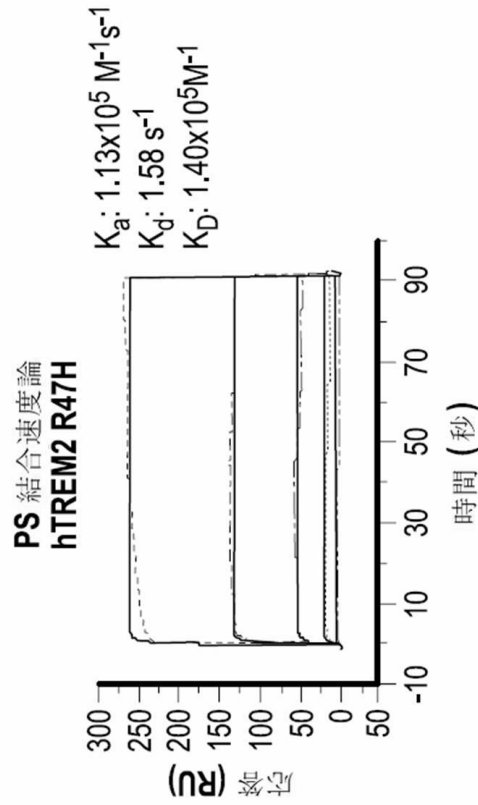
40

50

【 図 1 9 J 】



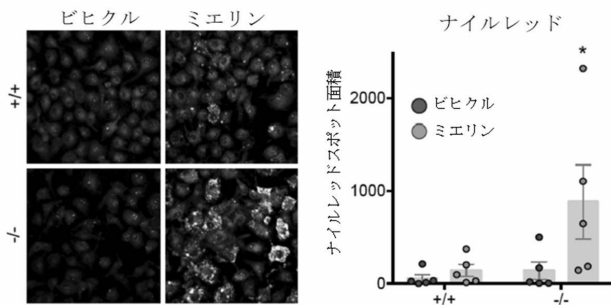
【 図 1 9 K 】



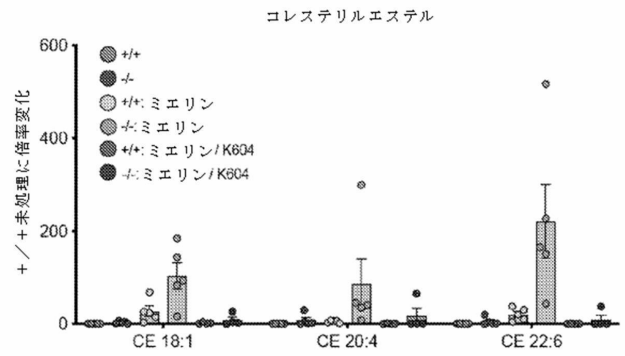
10

20

【 図 2 0 A 】



【 図 2 0 B 】

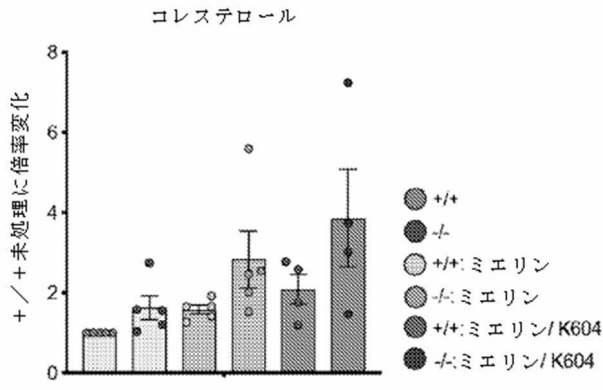


30

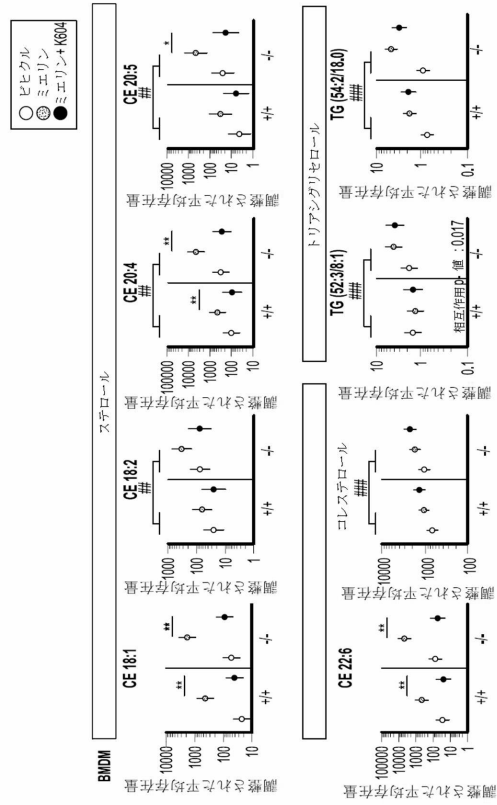
40

50

【 図 2 0 C 】



【 図 2 1 A - 1 】

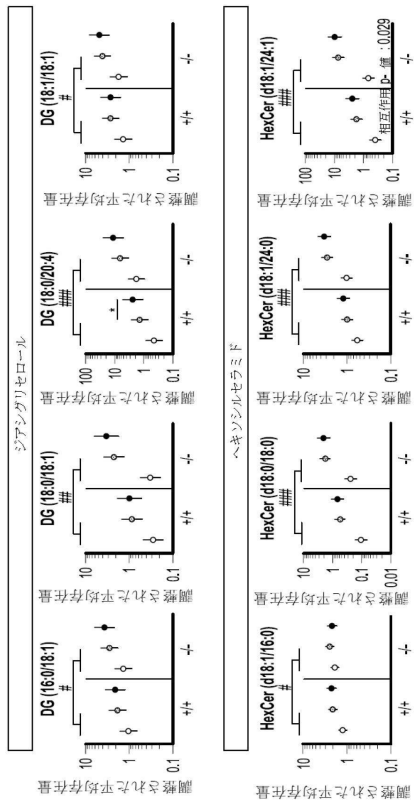


10

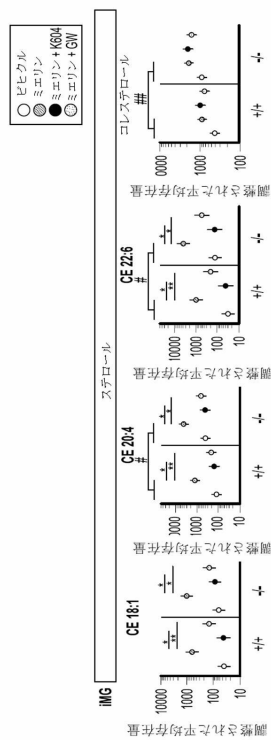
20

【 図 2 1 A - 2 】

(続き)



【 図 2 1 B 】

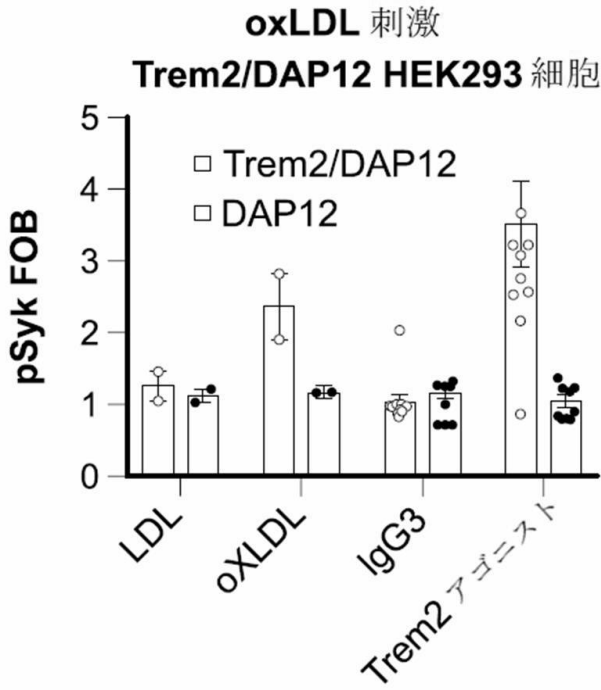


30

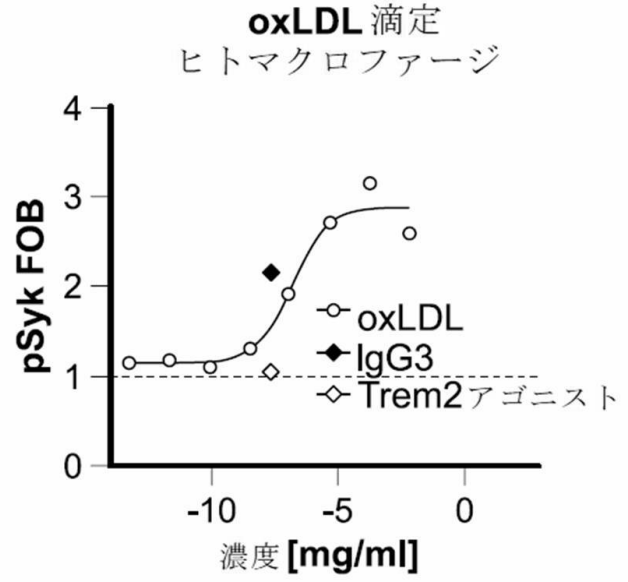
40

50

【 図 2 2 A 】



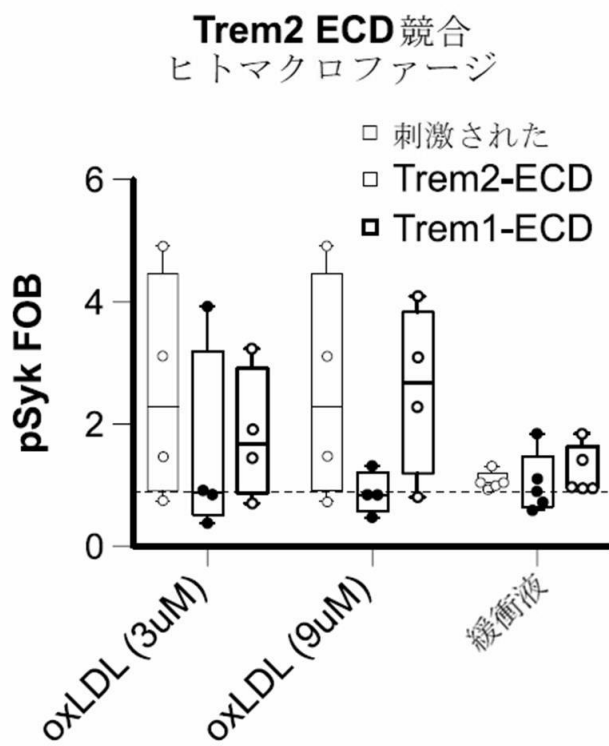
【 図 2 2 B 】



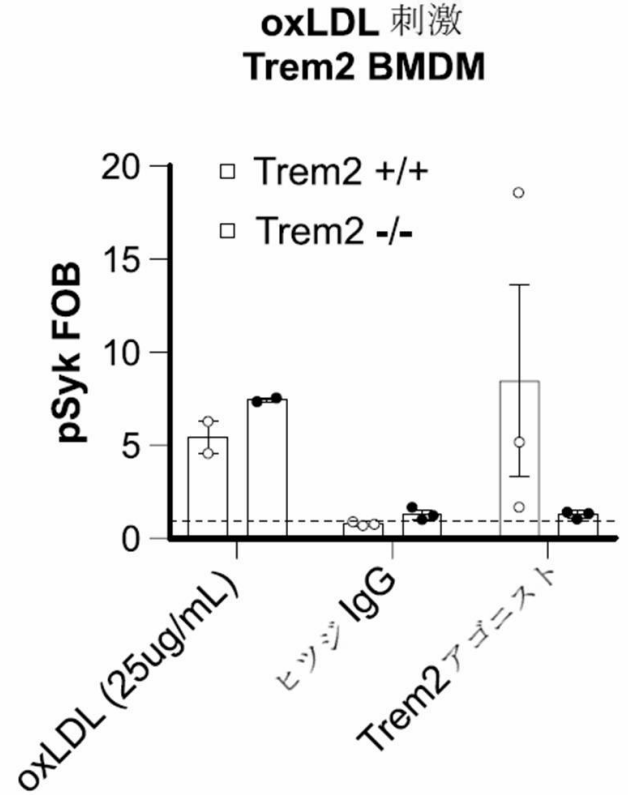
10

20

【 図 2 2 C 】



【 図 2 2 D 】

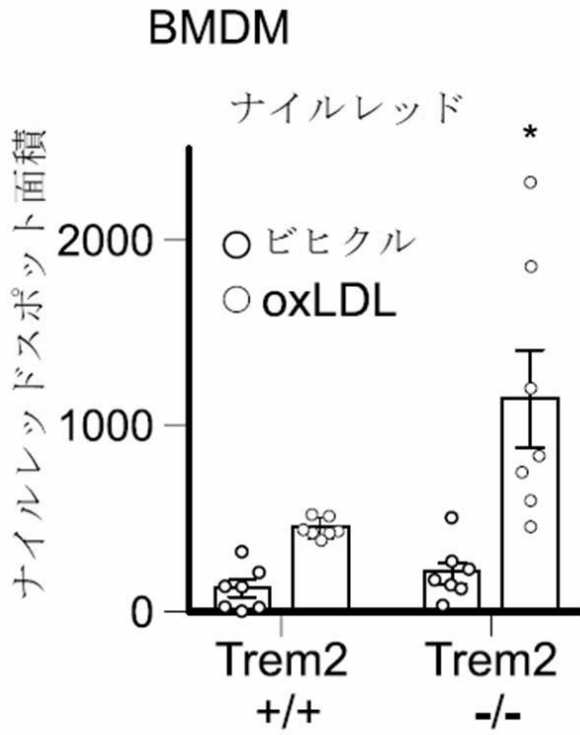


30

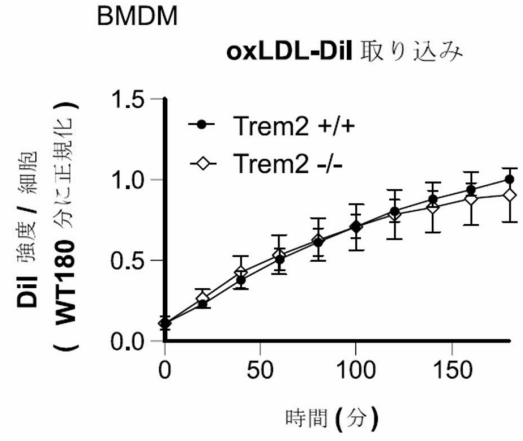
40

50

【 図 2 2 E 】



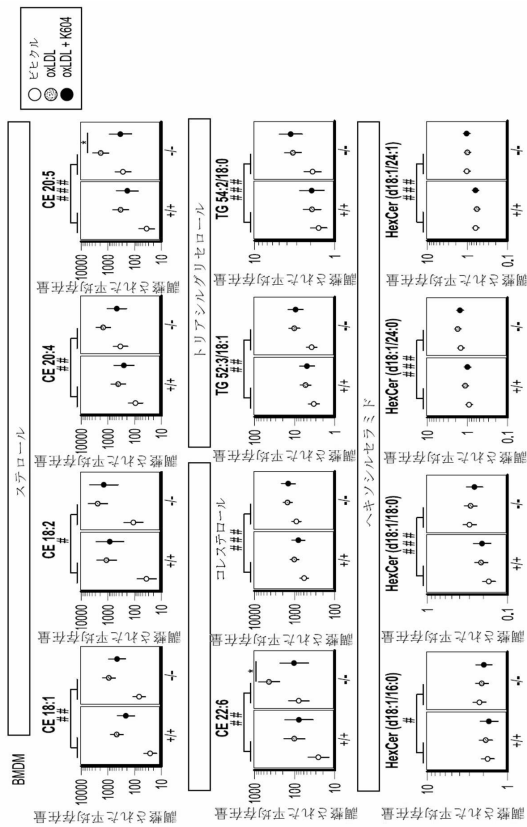
【 図 2 2 F 】



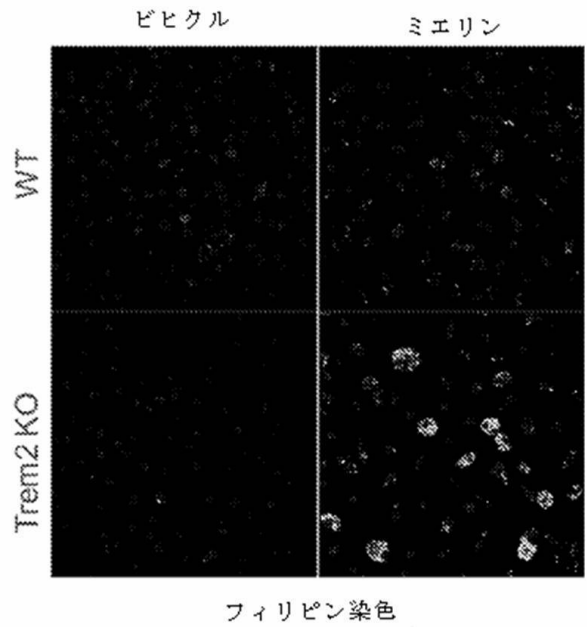
10

20

【 図 2 2 G 】



【 図 2 3 A 】

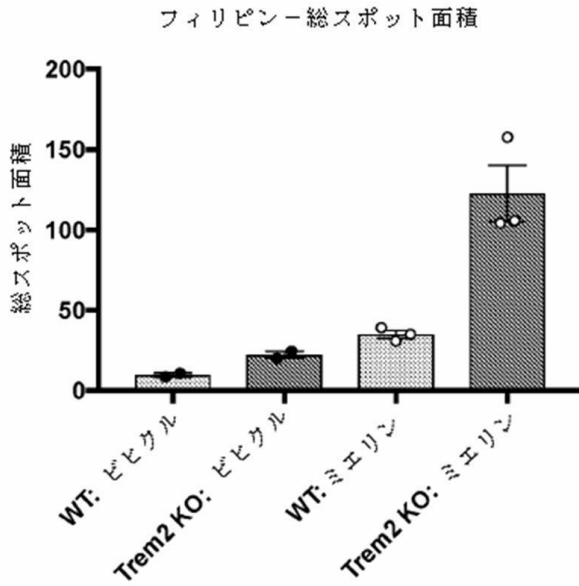


30

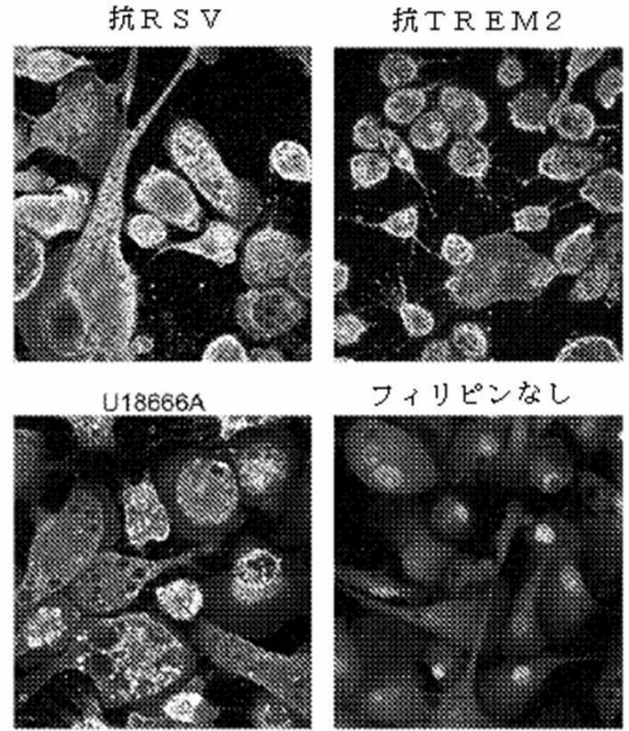
40

50

【図 2 3 B】



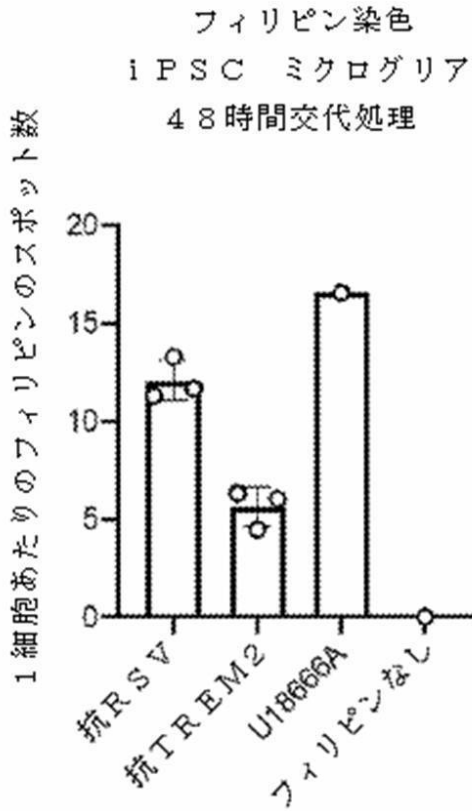
【図 2 3 C】



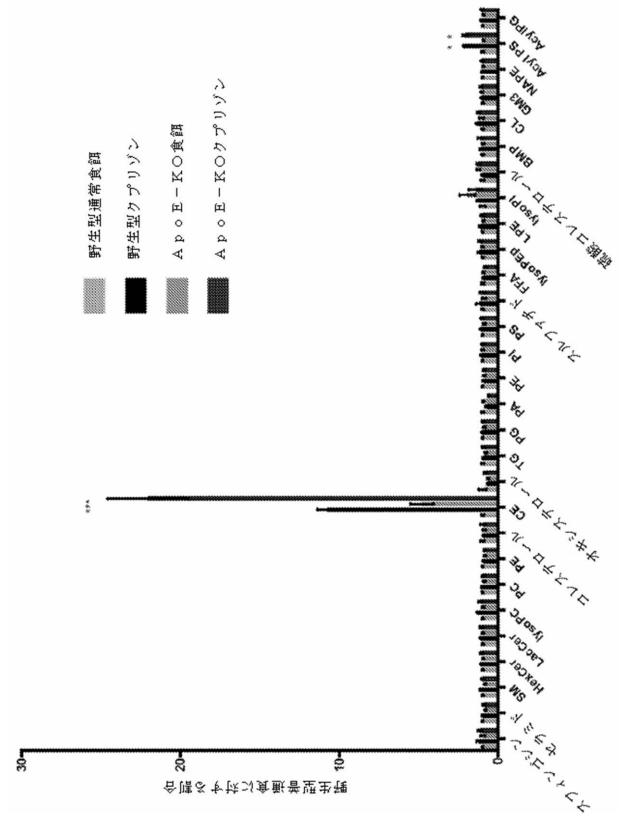
10

20

【図 2 3 D】



【図 2 4】

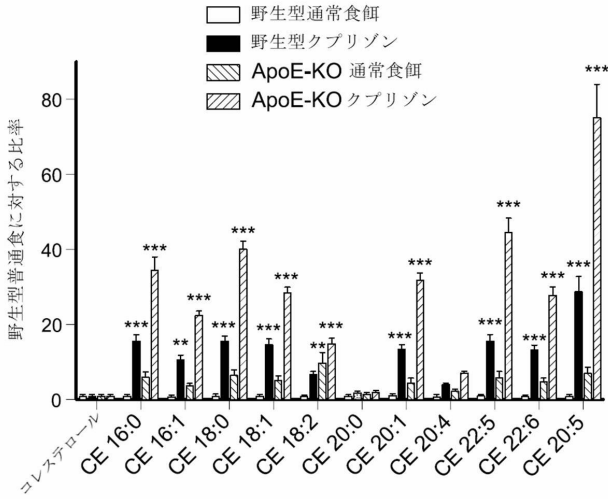


30

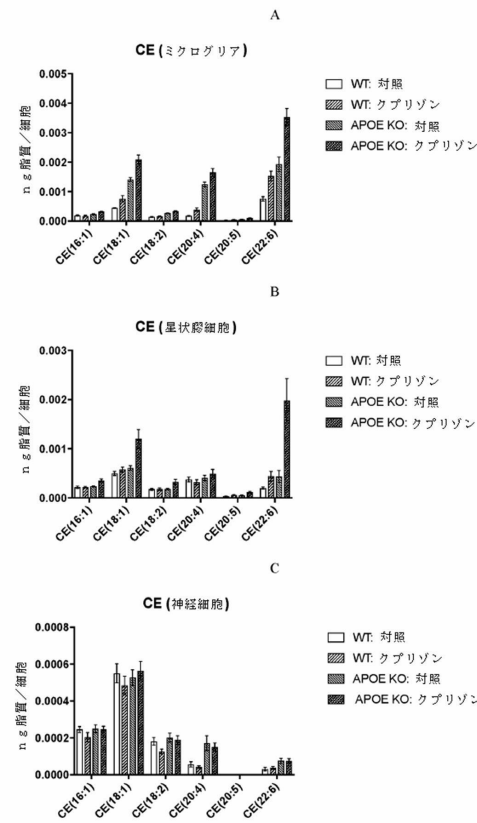
40

50

【 図 2 5 】



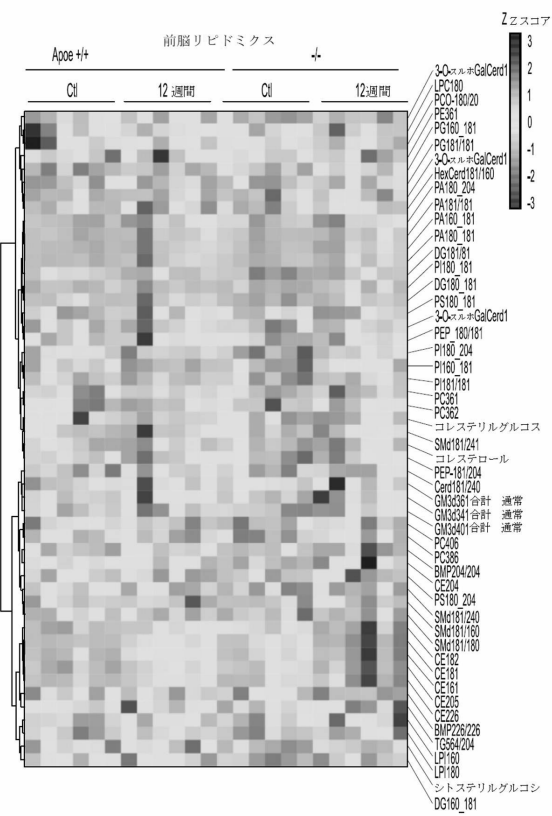
【 図 2 6 】



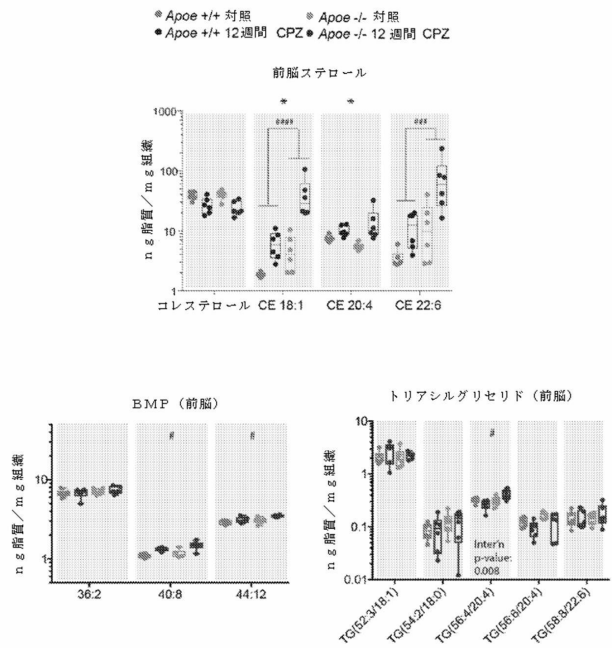
10

20

【 図 2 7 A 】



【 図 2 7 B 】

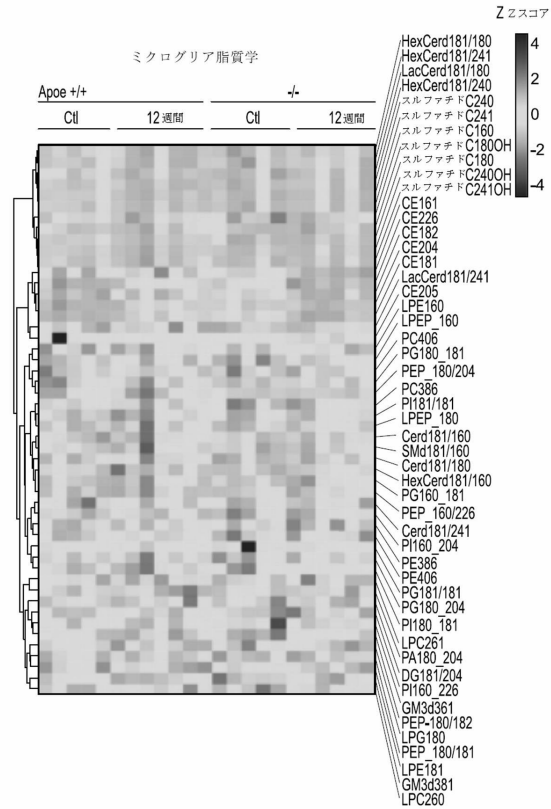


30

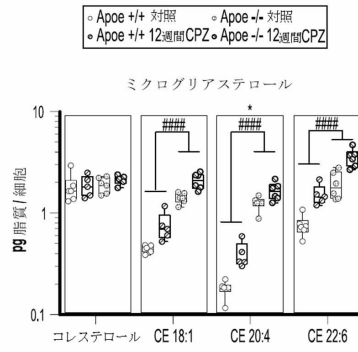
40

50

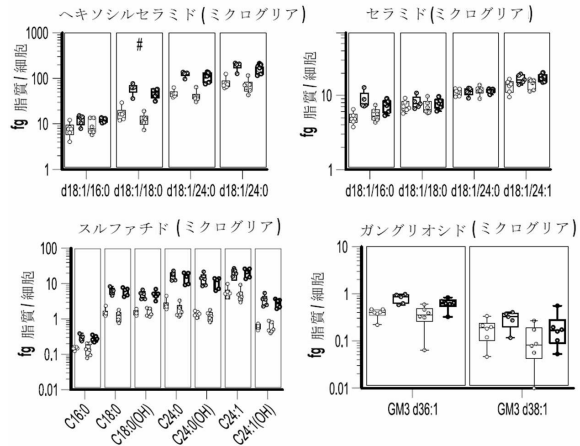
【 図 2 7 C 】



【 図 2 7 D 】

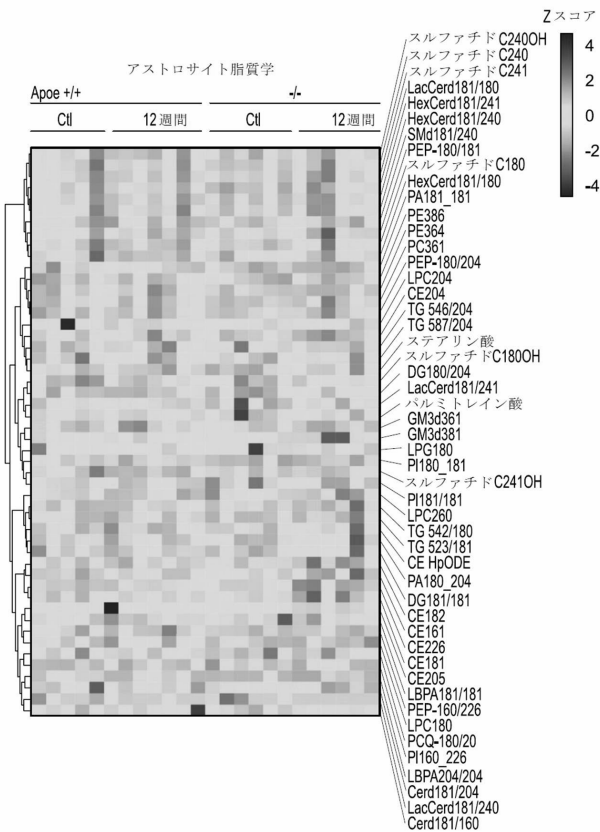


10

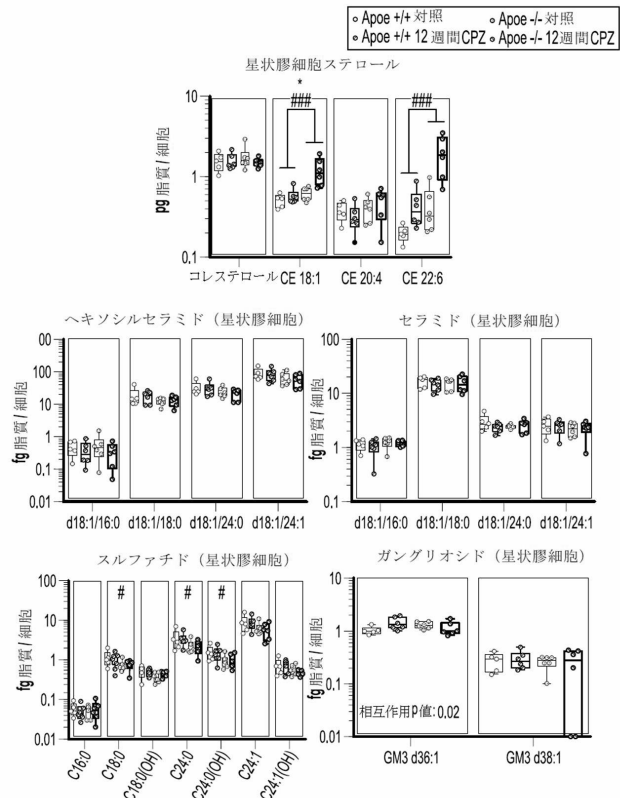


20

【 図 2 7 E 】



【 図 2 7 F 】

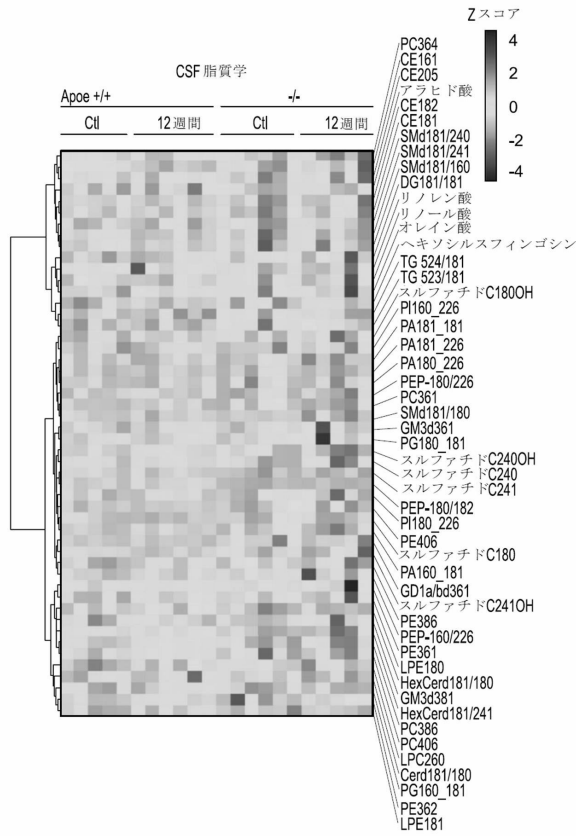


30

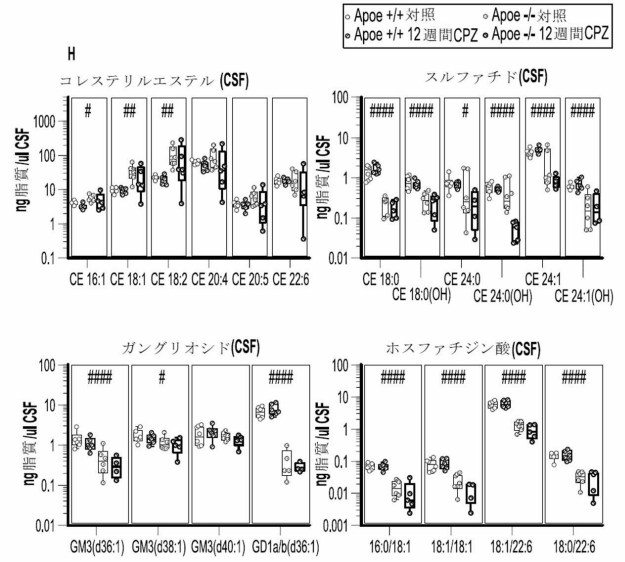
40

50

【 図 2 7 G 】



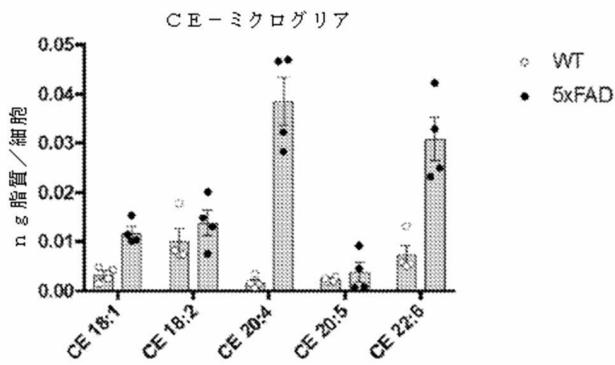
【 図 2 7 H 】



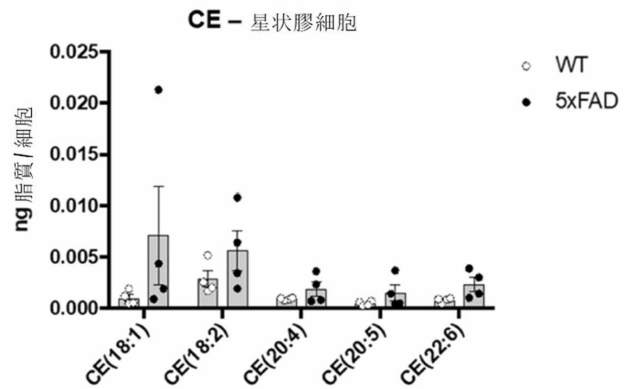
10

20

【 図 2 8 A 】



【 図 2 8 B 】

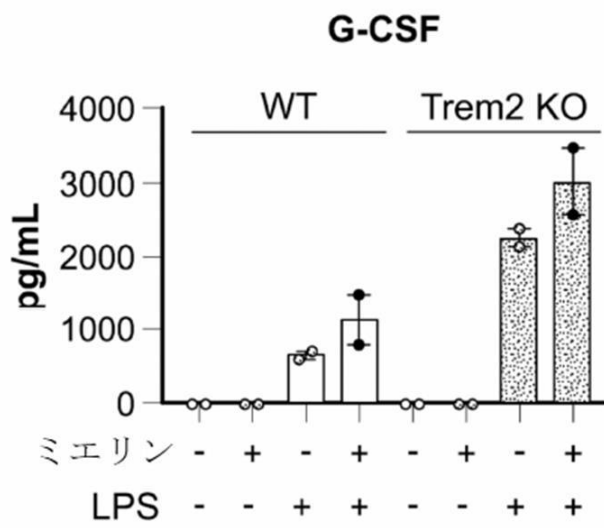


30

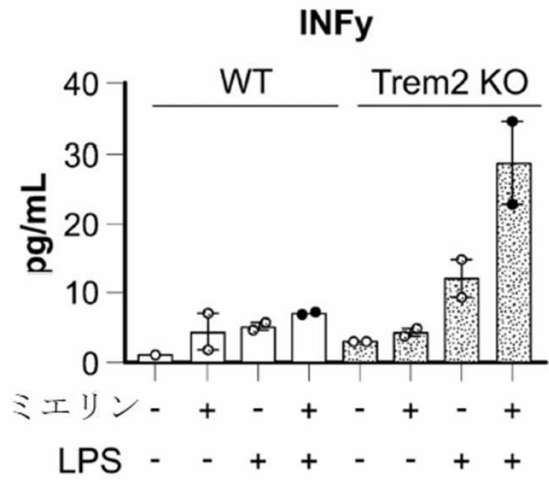
40

50

【 図 2 9 A 】

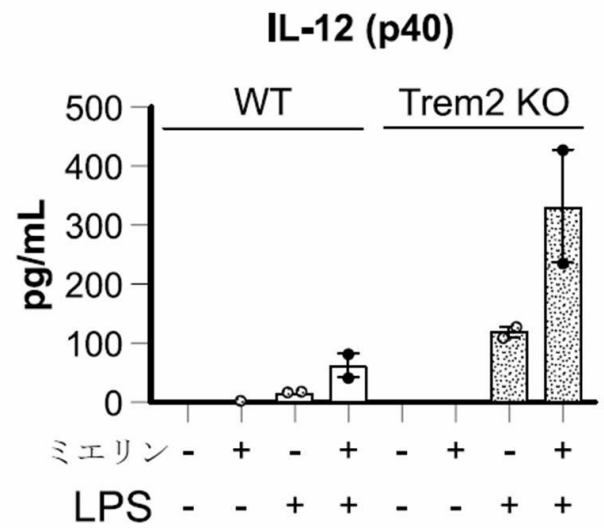


【 図 2 9 B 】

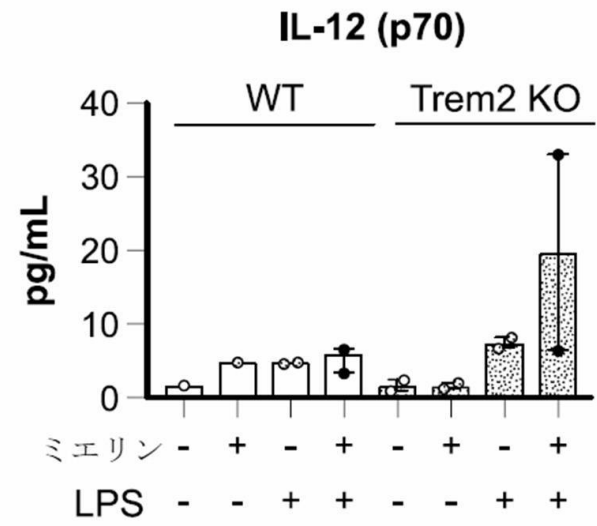


10

【 図 2 9 C 】



【 図 2 9 D 】



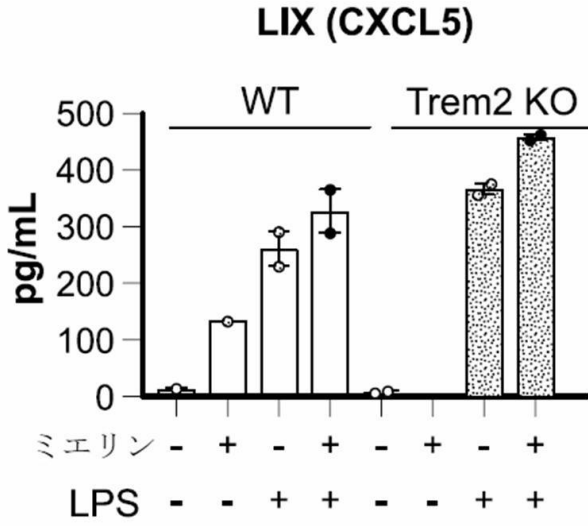
20

30

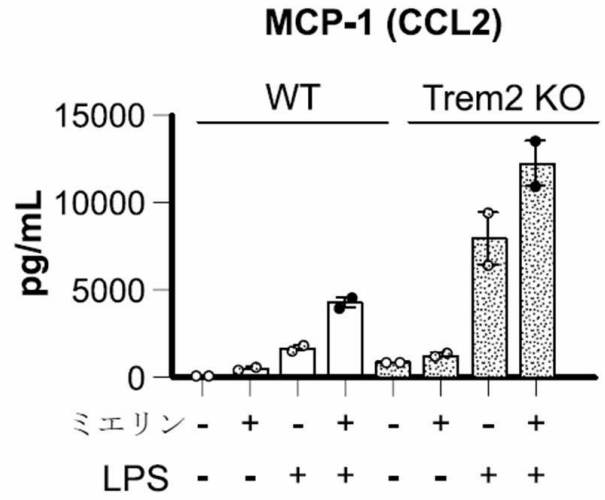
40

50

【 図 2 9 E 】

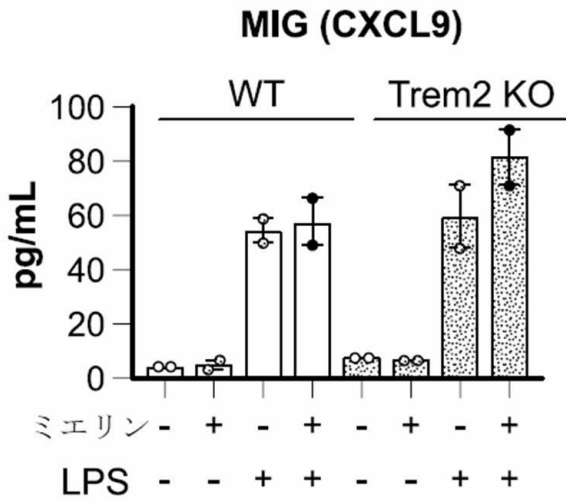


【 図 2 9 F 】

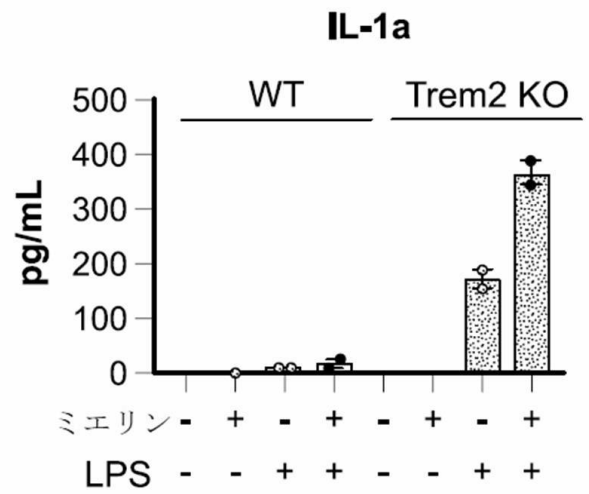


10

【 図 2 9 G 】



【 図 2 9 H 】



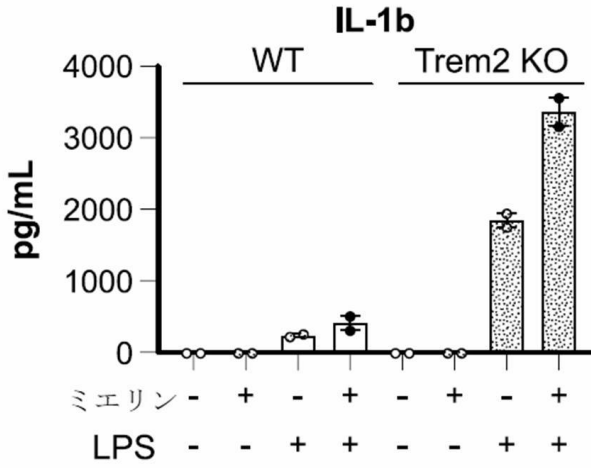
20

30

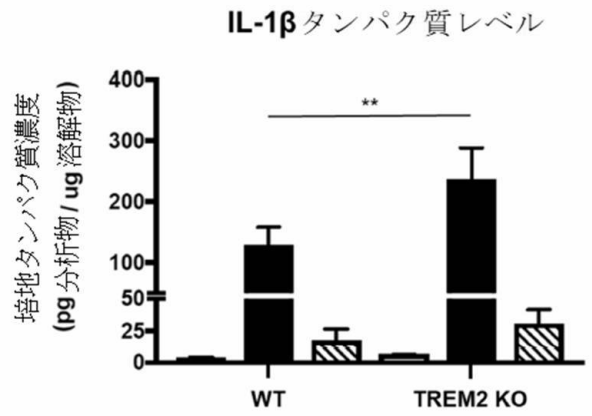
40

50

【 図 2 9 I 】

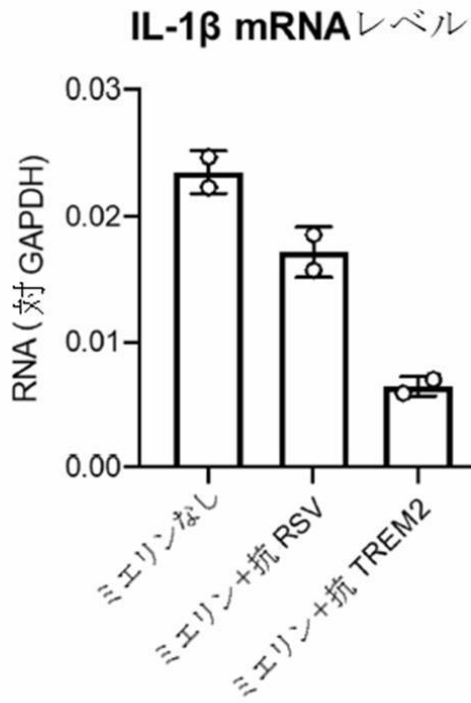


【 図 3 0 A 】

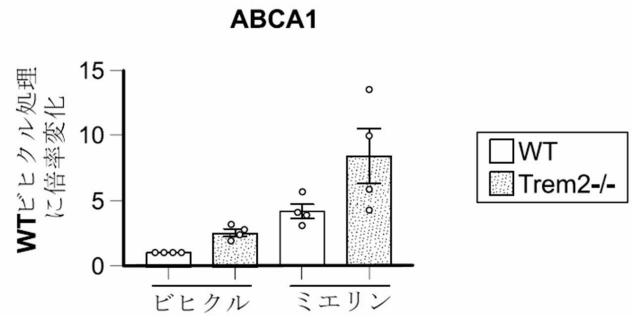


10

【 図 3 0 B 】



【 図 3 1 A 】



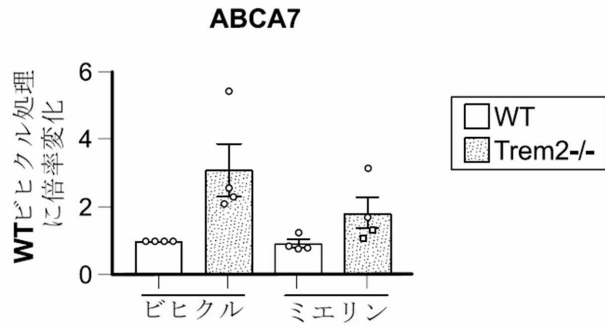
20

30

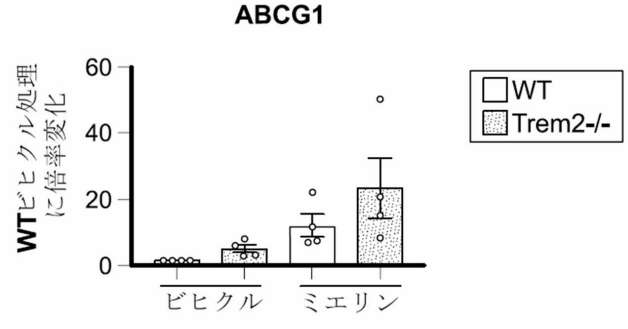
40

50

【 図 3 1 B 】

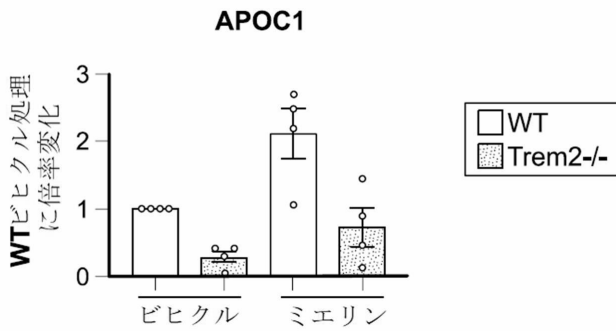


【 図 3 1 C 】

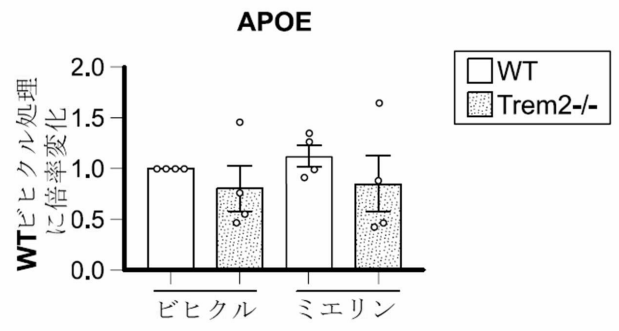


10

【 図 3 1 D 】

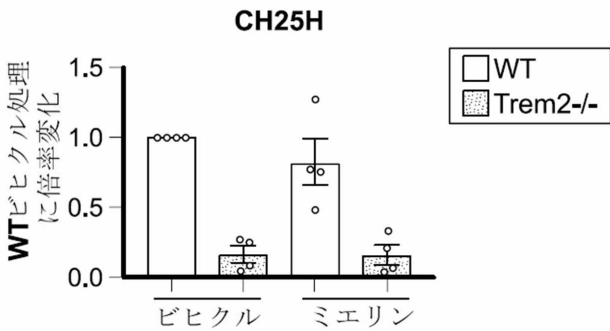


【 図 3 1 E 】

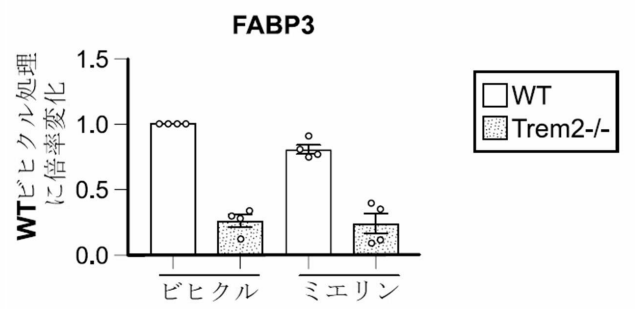


20

【 図 3 1 F 】



【 図 3 1 G 】

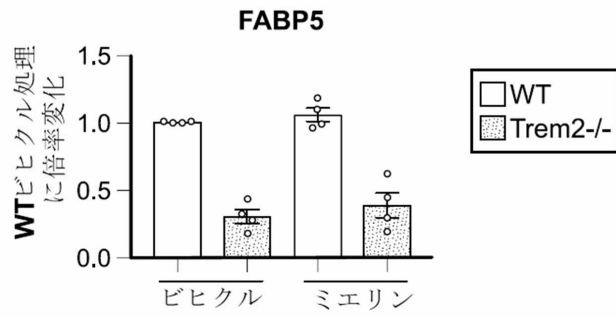


30

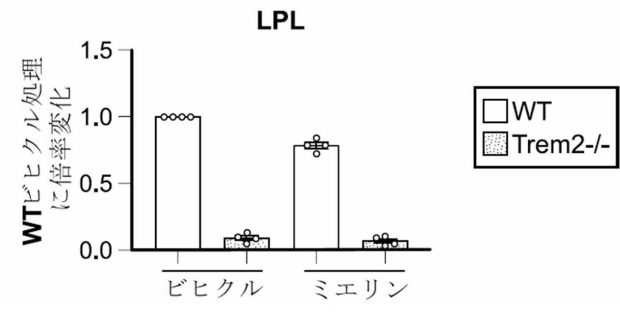
40

50

【 図 3 1 H 】

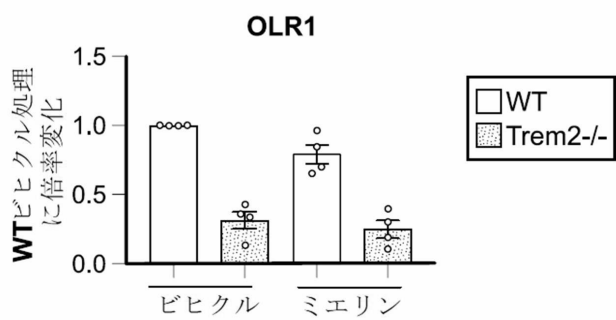


【 図 3 1 I 】

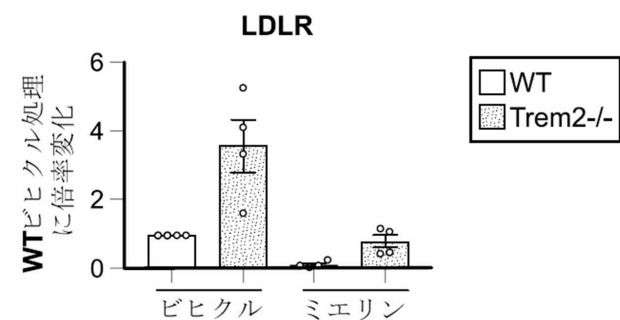


10

【 図 3 1 J 】



【 図 3 1 K 】



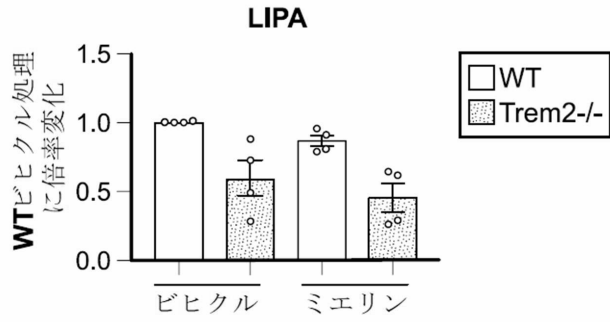
20

30

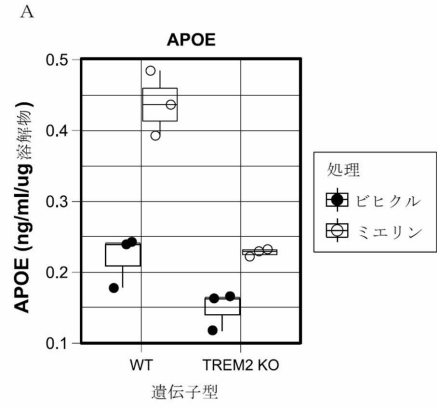
40

50

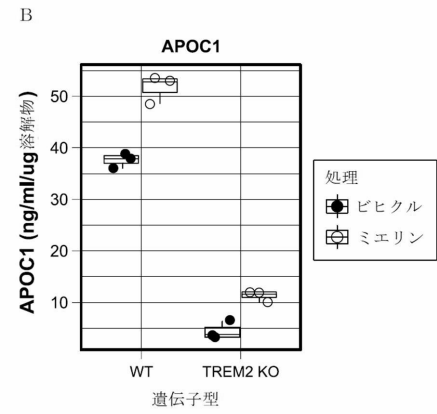
【 図 3 1 L 】



【 図 3 2 】



10



20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/063427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61P3/00 A61P25/28 ADD.		
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) C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/023019 A2 (ALECTOR LLC [US]) 11 February 2016 (2016-02-11)	34,35
Y	[050], [0438], [0066, 0067], [0201], [0252], [0603-0607], [0656], claims 1-102; claims 1-146	1-33, 36-40
Y	----- WO 2018/195506 A1 (AMGEN INC [US]) 25 October 2018 (2018-10-25)	1-33, 36-40
	[0072], [0302], [0248-0251], [0307], claim 78; claims 1-78	
X	----- WO 2017/062672 A2 (ALECTOR LLC [US]) 13 April 2017 (2017-04-13)	34,35
Y	[0043], [0256], [0269], [0308], [0667], [0668], example 55; claims 1-146; example 55	1-33, 36-40
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" 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 *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 27 February 2020		Date of mailing of the international search report 23/06/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klee, Barbara

10

20

30

40

3

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/063427

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. 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. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. 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. 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.:

30

40

1-40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2019/063427

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/134815 A2 (YEDA RES & DEV [IL]) 26 July 2018 (2018-07-26) page 13, paragraph 4 - paragraph 5; claims 1,17	9
Y	----- CANTONI CLAUDIA ET AL: "TREM2 regulates microglial cell activation in response to demyelination in vivo", ACTA NEUROPATHOLOGICA, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 129, no. 3, 29 January 2015 (2015-01-29), pages 429-447, XP035451847, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/S00401-015-1388-1 [retrieved on 2015-01-29] page 431, column 2, paragraph 2	1
A	----- LINDSAY KOSACK ET AL: "The lipid-sensor TREM2 aggravates disease in a model of LCMV-induced hepatitis", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 12 September 2017 (2017-09-12), XP055671755, DOI: 10.1038/s41598-017-10637-y page 2, paragraph 3 page 8, paragraph 4 - paragraph 5	1-33, 36-40
Y	----- WANG YAMING ET AL: "TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease M", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 160, no. 6, 26 February 2015 (2015-02-26), pages 1061-1071, XP029203782, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2015.01.049 abstract page 1067, column 2, paragraph 2 to page 1069, column 1	1-33, 36-40
Y	----- MIN PARK ET AL: "Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Promotes Adipogenesis and Diet-Induced Obesity", DIABETES, vol. 64, no. 1, 11 August 2014 (2014-08-11), pages 117-127, XP055671908, US ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/db13-1869 abstract	1-33, 36-40

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/063427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016023019 A2	11-02-2016	AU 2015300787 A1	02-02-2017
		CA 2955086 A1	11-02-2016
		CN 107106679 A	29-08-2017
		EP 3177322 A2	14-06-2017
		JP 6669749 B2	18-03-2020
		JP 2017523814 A	24-08-2017
		JP 2020063268 A	23-04-2020
		SG 10201913611Q A	30-03-2020
		SG 11201700901S A	30-03-2017
		US 2017240631 A1	24-08-2017
		US 2019010230 A1	10-01-2019
		US 2019315858 A1	17-10-2019
		WO 2016023019 A2	11-02-2016
WO 2018195506 A1	25-10-2018	AU 2018254600 A1	24-10-2019
		CA 3060409 A1	25-10-2018
		CL 2019003000 A1	14-02-2020
		CN 110709100 A	17-01-2020
		CO 2019012998 A2	18-02-2020
		CR 20190525 A	20-03-2020
		EP 3612218 A1	26-02-2020
		KR 20200018778 A	20-02-2020
		SG 11201909646T A	28-11-2019
		TW 201906628 A	16-02-2019
		UY 37698 A	31-10-2018
		WO 2018195506 A1	25-10-2018
		WO 2017062672 A2	13-04-2017
CA 2997960 A1	13-04-2017		
CN 108738323 A	02-11-2018		
EP 3359569 A2	15-08-2018		
JP 2018537956 A	27-12-2018		
KR 20180068999 A	22-06-2018		
SG 10201912150T A	27-02-2020		
US 2019330335 A1	31-10-2019		
WO 2017062672 A2	13-04-2017		
WO 2018134815 A2	26-07-2018		
		US 2019367623 A1	05-12-2019
		WO 2018134815 A2	26-07-2018

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 N 5/079(2010.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
	C 1 2 N 5/079	
	C 1 2 P 21/08	

(32)優先日 令和1年8月22日(2019.8.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁理士 山本 健策

(72)発明者 アスタリタ, ジュゼッペ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 ディ パオロ, ギルバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 リン, カイ リン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 モンロー, キャスリン エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 ニュージェント, アリシア エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

(72)発明者 ヴァン レンゲリッチ, ベッティーナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA00 DA06

4B065 AA91X AC20 BA30 CA46

4C084 AA19 NA05 ZA161 ZA162 ZA451 ZA452 ZB111 ZB112 ZC331 ZC332
ZC411 ZC412 ZC751

4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE01 EE03 GG02 GG06

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA21 EA23 EA27 FA74