

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6143233号
(P6143233)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|----------------|--------------|------------------|-----------------------|
| C 1 2 Q | 1/02 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A |
| G O 1 N | 33/15 | (2006.01) | G O 1 N 33/15 Z |
| G O 1 N | 33/50 | (2006.01) | G O 1 N 33/50 Z |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |

請求項の数 9 (全 23 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2015-155453 (P2015-155453) | (73) 特許権者 | 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 |
| (22) 出願日 | 平成27年8月5日(2015.8.5) | (74) 代理人 | 100092901 弁理士 岩橋 祐司 |
| (65) 公開番号 | 特開2017-29116 (P2017-29116A) | (74) 代理人 | 100188260 弁理士 加藤 慎二 |
| (43) 公開日 | 平成29年2月9日(2017.2.9) | (72) 発明者 | 井上 治久 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 |
| 審査請求日 | 平成28年8月22日(2016.8.22) | (72) 発明者 | 江川 斉宏 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 |
| | | 審査官 | 小金井 悟 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 運動ニューロン疾患の検査方法及び治療剤のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者の体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンに対し、U3 snoRNA量又はU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲を測定する工程を含む、運動ニューロン疾患発症リスクの検査方法であって、
前記U3 snoRNA量が、健常者の体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンにおける該発現量よりも少ない場合、又は、
前記U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲が、健常者の体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンにおける該範囲よりも広い場合に、
運動ニューロン疾患発症リスクが高いと評価する、
運動ニューロン疾患発症リスクの検査方法。

【請求項2】

前記U3 snoRNA結合タンパクがFBLである、
請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】

前記U3 snoRNA結合タンパクがNCLである、
請求項1に記載の検査方法。

【請求項4】

下記工程(1)-(3)を含む、運動ニューロン疾患の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法；

(1) ヒト体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンと、被験物質とを接触させる工程、

(2) 前記運動ニューロンにおけるU3 snoRNA量又はU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲を測定する工程、

(3) 前記U3 snoRNA量が、工程(1)で被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該発現量よりも多い場合、又は、前記U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲が、工程(1)で被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該範囲よりも狭い場合に、前記被験物質を運動ニューロン疾患の予防及び/又は治療薬として選択する工程。

【請求項5】

前記ヒト体細胞が運動ニューロン疾患患者の体細胞である、請求項4に記載のスクリーニング方法。

10

【請求項6】

前記多能性幹細胞が、健常者の体細胞から樹立され、且つ、家族性運動ニューロン疾患の変異型原因遺伝子が導入された多能性幹細胞ある、請求項4に記載のスクリーニング方法。

【請求項7】

前記原因遺伝子が、SMN1、SOD1、TARDBP、又はFUS遺伝子である、請求項6に記載のスクリーニング方法。

【請求項8】

前記U3 snoRNA結合タンパクがFBLである、
請求項4 - 7のいずれかに記載のスクリーニング方法。

20

【請求項9】

前記U3 snoRNA結合タンパクがNCLである、
請求項4 - 7のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、運動ニューロン疾患の検査方法及び治療剤のスクリーニング方法に関し、さらに詳しくは、運動ニューロン疾患の発症リスクの検査方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

運動ニューロン疾患(Motor neuron disease; MND)は、運動ニューロンの選択的変性を原因とする疾患の総称である。MNDの代表である脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy; SMA)では、脊髄内に存在する下位運動ニューロンの選択的変性に起因して筋力低下や筋萎縮が生じ、患者は全身の自由を奪われる。そして、筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis; ALS)では、下位運動ニューロンとそれに投射する上位運動ニューロンが変性するため、筋萎縮だけでなく球麻痺が生じ、患者は自発呼吸不能となる。

【0003】

現時点において、MNDの有効な治療法は確立していない。また、診断に用いることができる生化学的マーカーも確立していないため、臨床所見と補助検査(電気生理学的検査と神経画像)を総合した診断方法が採用されている。しかしながら、初期の患者は他疾患(例として、変形性頸椎症、多発性筋炎等、脊髄腫瘍等)との鑑別が難しいため、他疾患の治療を受けたために症状が悪化するケースも報告されている。

40

よって、MNDにおいては、治療法もさることながら、早期診断の助けになる検査方法が切望されていた。

【0004】

これまで、MNDに属する各疾患の発症機序の研究は、当該家族性患者から原因遺伝子を同定し、その遺伝子産物の機能解析を中心として進められてきた。

ALSでは、約10%を占める家族性患者から原因遺伝子としてSOD1(superoxide dismuta

50

se 1, soluble)、TARDBP (TAR DNA binding protein; TDP-43とも呼ばれる)、FUS (FUS RNA binding protein) 等が同定され、これらの変異型遺伝子から生じる変異型タンパクの凝集化が発症に寄与することが示された。これを受けて、当該凝集過程を阻害し得る薬剤の開発が精力的に行われている (非特許文献 1)。

SMAでは、幼少期発症型の家族性患者から原因遺伝子SMN1 (survival of motor neuron 1, telomeric) が同定され、SMNタンパク量の減少が発症原因であることが示された。SMNタンパクは、Gemと呼ばれる核内構造体の主成分であり、核内低分子RNA (small nuclear RNA; snRNA) とその結合タンパクのアセンブルを促進して、スプライセオソーム (spliceosome) の必須成分である核内低分子リボ核タンパク (small nuclear ribonucleoprotein; snRNPs) の形成に寄与することが明らかにされた。そして、SMN1遺伝子変異を有するSMAモデル動物では、種々の遺伝子においてプライシングパターンが変化することが報告されている。これらの知見を受けて、SMNタンパクの補充やスプライシングの正常化を目的とした治療法が精力的に研究されている (非特許文献 2)。

【 0 0 0 5 】

ところが、近年、これらの疾患の原因遺伝子産物どうしは無関係ではなく、正常な細胞内で連携して機能していることを示す報告が続いている。

非特許文献 3 では、TARDBPとFUSタンパクはいずれもSMNタンパクと結合することができ、健常者の運動ニューロンではGemに局在するが、孤発性ALS患者の剖検脊髄組織中の運動ニューロンではGemそのものが消失していたことを報告している。さらに、前記患者組織では、スプライセオソームを構成するsnRNAs (U1、U2、U4、U5、U6、U11、U12、U4atac、U6atac snRNAs) の発現が増加し、当該snRNPsが運動ニューロンの核内で凝集していたことも明らかにされた。

そして、非特許文献 4 では、FUSがU1 snRNPと直接結合し、変異型FUSを発現する培養細胞ではスプライシング活性が低下することを明らかにしている。

さらに、SOD1についても、発症に先立って運動ニューロンのGem数が減少する変異型SOD1トランスジェニックマウス (ALSモデルマウス) が報告された。そして、当該マウスにSMNを過剰発現させると、Gem数の減少が遅れて発症時期も遅延することが示された (非特許文献 5)。

【 0 0 0 6 】

これらの報告に基づき、MNDを引き起こす共通の機構として、スプライシング障害が提唱されている。すなわち、運動ニューロンはスプライシング機構の障害に弱い細胞であり、MND患者では (遺伝子変異や環境要因等) 経緯は異なっても運動ニューロンのスプライシング機構が障害されるため、運動ニューロンが選択的に変性するという仮説である。

【 0 0 0 7 】

しかしながら、当該研究成果をMNDの診断 (特に、早期診断) に応用することは極めて困難である。MNDの病変は運動ニューロンに限局しており、前記仮説から予測される異常 (例えば、Gemの消失、snRNAsの発現増加、snRNPsの核内凝集等) の有無を判定するには、患者から運動ニューロンを抽出する必要があるからである。

このような侵襲性の著しく高い検査方法が許されるはずはなく、それゆえ、MNDの診断技術は進歩の無い状態が続いていた。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Sreedharan J., et al, Ann. Neurol., 74:309-316, 2013

【 非特許文献 2 】 Faravelli I., et al, Nat. Rev. Neurol., 11:351-359, 2015

【 非特許文献 3 】 Tsuiji H., et al, EMBO Mol. Med., 5:221-234, 2013

【 非特許文献 4 】 Sun S., et al, Nat. Commun., 6:6171, 2015

【 非特許文献 5 】 Kariya S., et al, Hum. Mol. Genet., 21:3421-3434, 2012

【 非特許文献 6 】 Watkins N.J., et al, Mol. Cell, 16:789-798, 2004

【 非特許文献 7 】 Egawa N., et al, Science Translational Medicine, 4:145ra1

10

20

30

40

50

04, 2012

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、前記従来技術が抱える問題に鑑みてなされたものであり、低侵襲性で且つMNDの早期診断に有益な検査方法、さらには、MND治療剤の新たなスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は上記課題を解決するために、MND患者（家族性SMA、家族性ALS、孤発性ALS患者）及び健常者の皮膚線維芽細胞から人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem Cell; iPSC）株を樹立し、運動ニューロンへの分化誘導を行った。そして、運動ニューロンに分化した細胞（iPSC-MN）のみを分取して遺伝子発現解析を行い、前記MND患者由来iPSC-MNではいずれもSNORD3Aの発現が有意に低下していることを見出した。SNORD3Aは、核小体低分子RNAの1種であるU3 snoRNAをコードする遺伝子である。

【0011】

本発明者はさらに、U3 snoRNAはSMNの下流で神経突起成分の発現を制御しており、U3 snoRNA量が減少すると、該RNA結合タンパクの核内における局在範囲が拡大し、iPSC-MNが変性し易くなることを明らかにした。そして、前記RNA量と結合タンパクの核内局在範囲は、iPSC-MNの脆弱性と連動して変化することを見出した。

【0012】

すなわち、被験者から負担の少ないiPSC技術を用いて得られる運動ニューロンに対し、U3 snoRNA量又は当該結合タンパクの核内局在範囲を測定することで、該被験者の運動ニューロンの潜在的脆弱性を評価できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0013】

本発明は、以下を包含する。

[1] 被験者の体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンに対し、U3 snoRNA量又はU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲を測定する工程を含む、運動ニューロン疾患発症リスクの検査方法。

[2] 前記U3 snoRNA量が、健常者の体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンにおける該発現量よりも少ない場合に、運動ニューロン疾患発症リスクが高いと評価する、[1]に記載の検査方法。

[3] 前記U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲が、健常者の体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンにおける該範囲よりも広い場合に、運動ニューロン疾患発症リスクが高いと評価する、[1]に記載の検査方法。

[4] 前記U3 snoRNA結合タンパクがFBLである、[1]又は[3]に記載の検査方法。

[5] 前記U3 snoRNA結合タンパクがNCLである、[1]又は[3]に記載の検査方法。

[6] 下記工程(1)-(3)を含む、運動ニューロン疾患の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法；

(1) ヒト体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンと、被験物質とを接触させる工程、

(2) 前記運動ニューロンにおけるU3 snoRNA量又はU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲を測定する工程、

(3) 前記U3 snoRNA量が、工程(1)で被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該発現量よりも多い場合、又は、前記U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲が、工程(1)で被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該範囲よりも狭い場合に、前記被験物質を運動ニューロン疾患の予防及び/又は治療薬として選択する工程。

[7] 前記ヒト体細胞が運動ニューロン疾患患者の体細胞である、[6]に記載のスク

10

20

30

40

50

リーニング方法。

[8] 前記多能性幹細胞が、健常者の体細胞から樹立され、且つ、家族性運動ニューロン疾患の変異型原因遺伝子が導入された多能性幹細胞ある、[6] に記載のスクリーニング方法。

[9] 前記原因遺伝子が、SMN1、SOD1、TARDBP、又はFUS遺伝子である、[8] に記載のスクリーニング方法。

[10] 前記U3 snoRNA結合タンパクがFBLである、[6] - [9] のいずれかに記載のスクリーニング方法。

[11] 前記U3 snoRNA結合タンパクがNCLである、[6] - [9] のいずれかに記載のスクリーニング方法。

10

【発明の効果】

【0014】

本発明により、侵襲性の低い方法で被験者の運動ニューロンの潜在的脆弱性を検査し、被験者のMND発症リスクを評価する方法が提供される。当該方法は、特にMNDの早期診断を補助する検査方法として非常に有益である。

また、本発明により、MNDの予防及び/又は治療薬をスクリーニングする方法が提供される。当該スクリーニング方法は、特に、運動ニューロンの潜在的脆弱性を改善し得る薬剤のスクリーニングに好適である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

20

下記図面の説明において、健常者又はSMA患者の体細胞から樹立したiPSC株から分化誘導した運動ニューロンを各々、Control-MN又はSMA-MNと表記した。また、図3、4中の“k.d.”、“o.e.”は、各々、“knockdown”、“overexpression”の略である。なお、図中のアスタリスク(*)は、有意性検定の結果、p value<0.05、ダブルアスタリスク(**)はp value<0.01で有意性が認められたことを表す。

【0016】

【図1】図1A：type1-3のSMA患者から作製したiPSC株(図中、SMA1-3)に対して免疫染色を行い、未分化マーカー(NANOG、SSEA-4)の発現を確認した結果である。図1B：前記SMA患者から作製したiPSC株に対してin vitroで分化誘導を行い、三胚葉に分化する能力があることを確認した結果である。各胚葉のマーカータンパク(外胚葉：-III tubulin、中胚葉：-smooth muscle actin; SMA、内胚葉：Sry-box containing gene 17;SOX17)に対する抗体を用いた免疫染色写真を表す。図1C：健常者由来iPSC株(Control 1-4)及び前記SMA患者由来iPSC株(SMA1-3)から抽出したDNAを制限酵素Dra1又はDde1で消化し、SMN1遺伝子のエクソン7(上パネル)又はエクソン8(下パネル)の有無を解析した結果である。図1D：前記健常者及びSMA患者から作製したiPSC株に対し、western blotting法を用いてSMNタンパクの発現量を解析した結果である。図1E、F：前記各iPSCをMNへ分化誘導後、HB9::GFP lentivirusを導入し、ニューロン(MAP2)及びグリア細胞(GFAP)のマーカータンパクに対する抗体を用いて免疫染色(E、上パネル)、GFP蛍光顕微鏡観察(E、下パネル)を行った結果を表す。さらに、SMI-32抗体を用いた免疫染色を行い、GFP陽性細胞(F、左グラフ)とSMI-32陽性細胞(F、右グラフ)の割合を測定した結果を表す。図1G：前記各iPSC株に対し、QRT-PCR法を用いてU3 snoRNA量を解析した結果を示す。

30

40

【図2】図2A、B、D、Eは、GeneChip Arrayの解析結果(Control-MN対SMA-MN)である。図2A：Control-MNに対するSMA-MNの遺伝子発現量を比較解析したVolcanoプロットを表す。矢印は、Fold change>2、p<0.05で有意に変化していた遺伝子を表す。図2B：U3 snoRNAのヒートマップを表す。左側のIDはU3 snoRNAのtranscript IDを示す。図2C：Control-MN及びSMA-MNに対し、QRT-PCR法を用いてU3 snoRNA量を解析した結果を示す。図2D、E：神経投射に関わる遺伝子群(D)、ストレス応答に関わる遺伝子群(E)のヒートマップを表す。図2F：Control-MN及びSMA-MNに対し、QRT-PCR法を用いてNEFL、NEFM、MAP2、STMN2のmRNA量を解析した結果を表す。

50

【図3】図3 A、B : Control-MNにSMN1及びSMN2遺伝子に対するsiRNAを導入して24時間後に、SMN1/2、U3 snoRNA、NEFL、NEFMのmRNA/RNA量をQRT-PCR法を用いて解析した結果 (A) と、SMI-32抗体で免疫染色されるMN数と該細胞あたりの神経突起長 (= SMI-32陽性神経突起長の総和をSMI-32陽性細胞数で除した値) を解析した結果 (B) を表す。図3 C - F : Control-MNにU3 snoRNAに対するsiRNAを導入して24時間後に、U3 snoRNA、SMN1/2、NEFL、NEFMのmRNA/RNA量をQRT-PCR法を用いて解析した結果 (C)、SMI-32抗体で免疫染色されるMN数と神経突起長を解析した結果 (D)、抗FBL抗体で免疫染色した写真 (E)、抗FBL抗体で免疫染色される核内構造体の数とその面積 (= SMI-32陽性細胞において、抗FBL抗体で免疫染色される面積をSMI-32陽性細胞数で除した値) を解析した結果 (F) を表す。図3 E中の白線は50 μmを表す。

10

【図4】図4 A - F : Control-MNにU3 snoRNAに対するantisense oligonucleotide (以下、ASOと略記) を導入、又はLenti6PW-H1::U3 lentivirusを感染させてから48時間後に、U3 snoRNA量をQRT-PCR法を用いて解析した結果 (A)、SMI-32抗体で免疫染色されるMN数と神経突起長を解析した結果 (B)、SMI抗体及び抗FBL抗体で二重免疫染色した写真 (C)、抗FBL抗体で免疫染色される核内構造体の数とその面積を解析した結果 (D)、SMI抗体及び抗NCL抗体で二重免疫染色した写真 (E)、抗NCL抗体で免疫染色される核内構造体の数とその面積を解析した結果 (F) を表す。図4 C、E中の白線は50 μmを表す。

【図5】Control-MN、SMA-MN (= type 2 SMA患者に由来するiPSC-MN) にSMN2E7 PMOを導入してから48時間後に、SMI-32抗体で免疫染色されるMN数と神経突起長を解析した結果 (A)、抗FBL抗体で免疫染色される核内構造体の数とその面積を解析した結果 (B)、SMI-32抗体と抗FBL抗体で二重免疫染色した写真 (C) を表す。

20

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下に、本発明の好適な実施形態について詳述する。

本明細書では、主要な遺伝子について、遺伝子名、該遺伝子から生じるmRNA名とタンパク名をすべてOfficial Symbol (大文字) で表すが、核内低分子RNA及び核小体低分子RNAについては当該遺伝子と明確に区別するために慣用名で表した。例えば、SNORD3A遺伝子から生じるRNAは、“U3 snoRNA” と表記した。なお、本明細書におけるRNAは、特に断りがない限り、当該遺伝子から生じる転写物すべて (前駆体及び成熟RNAを含む) を包含する。

30

また、遺伝子 (NG_~) 又は該遺伝子から生じる転写物のヌクレオチド配列 (NR_~、又はNM_~)、或いはタンパクのアミノ酸配列 (NP_~) として、NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベースに登録されているヒトの標準配列 (Reference Sequence) のIDを示す。なお、転写物及びタンパクとして複数の標準配列が登録されているものについても一配列のみを例示記載するが、本発明は当該記載された配列からなる転写物及びタンパクに限定されるものではない。

【0018】

[MND発症リスクの検査方法]

本発明にかかるMND発症リスクの検査方法は、被験者の体細胞から樹立したiPSCから分化した運動ニューロン (= iPSC-MN) の潜在的脆弱性を検査し、当該脆弱性に基づいて該被験者のMND発症リスクを評価する方法である。前述したように、MNDは運動ニューロンが選択的に変性することで発症する疾患であるため、運動ニューロンが潜在的に脆弱であることは、MNDを発症し易いことと同義である。なお、本明細書における“潜在的脆弱性”とは、“genetic backgroundに規定される脆弱性”の意である。また、ニューロンにおける“脆弱性”とは、“変性し易さ”と同義である。

40

【0019】

実施例に示すように、本発明者は、MNDを発症した患者の体細胞からiPSCを経て分化した運動ニューロンでは、家族性・孤発性を問わず、健常者に由来するiPSC-MNと比べてU3 snoRNA量が有意に少ないことを見出した。当該U3 snoRNA量の違いはiPSCの段階では見られず、運動ニューロンに分化する過程で自律的に発現する (すなわち、genetic backg

50

roundに規定される)先天性形質である。

そして、U3 snoRNAの新たな機能として神経突起成分の発現制御と運動ニューロンの生存維持を見出し、該RNA量は運動ニューロンの脆弱性と連動していることを明らかにした。さらに、U3 snoRNA量の減少には該RNA結合タンパクの核内局在範囲の拡大が伴うことを見出し、U3 snoRNA量だけでなく、該RNA結合タンパクの核内局在範囲も、運動ニューロンの脆弱性の指標となり得ることを明らかにした。

【0020】

よって、本発明にかかるMND発症リスクの検査方法では、被験者の体細胞から製造したiPSC-MNに対し、“U3 snoRNA量”又は“U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲”を測定して該被験者の運動ニューロンの潜在的脆弱性を評価する。具体的には、前記“U3 snoRNA量”が健常者の体細胞から製造したiPSC-MNの当該RNA量よりも少ない場合、あるいは、前記“U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲”が健常者の体細胞から製造したiPSC-MNの当該範囲よりも広い場合に、前記被験者の運動ニューロンが潜在的に脆弱であると評価する。

10

【0021】

なお、本方法によって評価されるのは、被験者の運動ニューロンの潜在的脆弱性であって、被験者の体内の運動ニューロンが既に変性しているかどうか(=MNDを発症しているかどうか)ではない。すなわち、本発明にかかる検査方法は、MNDの診断方法そのものではない。

以下に、本発明にかかる検査方法の構成要件について説明する。

20

【0022】

・U3 snoRNAとその結合タンパク

U3 snoRNA (NR_006880)は、SNORD3A (small nucleolar RNA, C/D box 3A) 遺伝子にコードされる核小体低分子RNA (small nucleolar RNA; snoRNA) である。U3 snoRNAは前駆体として転写され、成熟する過程でFBL (fibrillarin, NM_001436, NP_001427)、NOP56 (NOP56 ribonucleoprotein, NM_006392, NP_006383)、及びNOP58 (NOP58 ribonucleoprotein, NM_015934, NP_0570181) 等の核タンパクと結合してU3 snoRNP (U3 small nucleolar ribonucleoprotein) と呼ばれる複合体を形成する (Verheggen C., et al, EMBO J., 21:2736-2745, 2002)。U3 snoRNPは通常核小体に局在し、47S rRNA前駆体から18S rRNAの切り出しを行い (Dutca L. M., et al, Nucleic Acids Res., 39:5164-5180, 2011)、rRNAのmaturationに寄与している (Gerbi S. A., et al, Curr. Opin. Cell Biol., 15:318-325, 2003)。

30

【0023】

本発明に用いることができるU3 snoRNA結合タンパクは、通常核内に存在し、U3 snoRNAと直接又は間接的に結合するタンパクである。U3 snoRNAと直接結合するタンパクの例としては、FBL、NOP56、NOP58等が挙げられる (Granneman S., et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 106:9613-9618, 2009)。また、U3 snoRNAと間接的に結合するタンパクとしては、NCL (nucleolin, NM_005381, NP_005372) 等が挙げられる (Padilla I.P., et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 105:3357-3361, 2008)。

本発明には、前記U3 snoRNAと直接結合又は間接的に結合するタンパクのいずれも好適に使用することができる。このうち、特にFBLとNCLが好適であり、最も好ましくはFBLである。

40

【0024】

なお、ヒトでは既に700種以上のsnoRNAが同定されている (参照: Small nucleolar RNA database (snOPY)、<http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp/>)。前述したスプライセオソームを構成するsnRNAは、核内低分子RNA (small nuclear RNA) と呼ばれるもので、snoRNAとは異なるカテゴリーに属するnon coding RNAである (Nilsen T. W., Bioessays, 25:1147-1149, 2003)。

【0025】

・多能性幹細胞

50

本発明において、多能性幹細胞とは、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞のことである。本発明では、ヒト体細胞から樹立された多能性幹細胞として、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSC) を用いることができる。

iPSCは、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 国際公開WO2007/069666)。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA又はES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3又はGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせ用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

【 0 0 2 6 】

上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 (例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNA及びshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など)、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327及びPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、Bio及びCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1及びG9aに対するsiRNA及びshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF阻害剤又はALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453及びA-83-01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNA及びshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNA及びshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295及びmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2及びプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2

、DMRTBI等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

【0027】

初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTAT及びポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

【0028】

一方、DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126:663-676, 2006; Cell, 131:861-872, 2007; Science, 318:1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322:945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質（GFP）、グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。

【0029】

また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジン及びps eudouridine（TriLink Biotechnologies）を取り込ませたRNAを用いても良い（Warren L, Cell Stem Cell, 7:618-630, 2010）。

【0030】

iPSC誘導のための培養液としては、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）又は市販の培養液（例えば、マウスES細胞培養用培養液（TX-WES培養液、トロンボX社）、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPSC用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTESR、Stemcell Technology社））などが含まれる。

【0031】

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

【0032】

あるいは、37℃、5%CO₂存在下にて、フィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上で10%FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに

10

20

30

40

50

、初期化される体細胞そのものを用いる (Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067又はWO2010/137746)、もしくは細胞外基質 (例えば、Laminin-5 (WO2009/123349) 及びマトリゲル (BD社)) を用いる方法が例示される。

【0033】

この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件 (0.1%以上、15%以下の酸素濃度) によりiPSCを樹立しても良い (Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241又はWO2010/13845)。

【0034】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約5×10³～約5×10⁶細胞の範囲である。

【0035】

iPSCは、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子 (例えば、Oct3/4、Nanog) と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液 (選択培養液) で培養を行うことにより樹立したiPSCを選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、iPSCを選択することができる。

【0036】

なお、本明細書中で使用する“体細胞”なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞又は分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞をいう。また、当該動物は、好ましくはヒトを含む哺乳動物、更に好ましくはヒト及びマウスである。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、及び成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば(1)神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2)組織前駆細胞、(3)リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞及び脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

【0037】

・運動ニューロン

本発明において運動ニューロン (Motor neuron; MN) とは、HB9 (Motor neuron and pancreas homeobox 1; Official SymbolはMNX1、NM_005515)、ISL1 (Homo sapiens ISL LIM homeobox 1、NM_002202)、CHAT (choline O-acetyltransferase、例としてNM_001142934)等の運動神経細胞のマーカー遺伝子を1以上発現する細胞と定義される。また、上記定義を満たし、且つ、SMI-32抗体で免疫染色される細胞を、運動ニューロンとしての分化段階がさらに進んだ、成熟した運動ニューロンとして扱うこともできる。SMI-32抗体は、成熟した大型ニューロン (例として、下位運動ニューロン) に多く発現する非リン酸化型ニューロフィラメントを認識する抗体であり、各社から市販されているものを使用することができる (例として、Covance社製、Calbiochem社製)。

本発明では、多能性幹細胞から分化させた細胞であって上記定義を満たす細胞を、“iPSC-MN”と略記する場合がある。

【0038】

多能性幹細胞から運動ニューロンを得る方法としては、当業者に周知の方法を用いることができ、例えば、(1)無血清培地中で胚様体 (神経前駆細胞を含む細胞塊) を形成させて分化させる方法 (SFEB法: Watanabe K., et al, Nat. Neurosci., 8:288-296, 2005; SFEBq法: Wataya T., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 105:11796-11801, 2008)、(2)ストローマ細胞上で胚性幹細胞を培養して分化させる方法 (S

10

20

30

40

50

DIA法：Kawasaki H., et al, Neuron, 28:31-40, 2000)、(3)マトリゲル上に薬剤を添加して培養する方法(Chambers S.M., et al, Nat.Biotechnol., 27:275-280, 2009)、(4)サイトカインの代替物として低分子化合物を用いる方法(米国特許第5,843,780号)、(5)神経前駆細胞に神経誘導遺伝子を導入する方法(Hester M.E., et al, Mol. Ther., 19:1905-1912, 2011)、(6)多能性幹細胞に神経誘導遺伝子を導入する方法(国際公開W02014/148646号)、及びこれらの改良法が挙げられる。

【0039】

・U3 snoRNA量の測定

U3 snoRNA量の測定は、当業者に周知の方法を用いて行うことができ、例えば、quantitative real-time PCR(QRT-PCR)法、RT-PCR法、Single-cell-PCR法、northern blotting法、in situ hybridization法等を行って測定することができる。特に、iPSCからMNに分化した細胞の割合が比較低い場合には、FACS(fluorescence activated cell sorting)法等を用いてMNを濃縮又は純化したのちに、前記測定を行ってもよい。

なお、本検査方法において、U3 snoRNA量が少ない場合とは、健常者の体細胞から製造したiPSC-MNのU3 snoRNA量に対し、好ましくは75%以下、より好ましくは70%以下、さらに好ましくは60%以下、最も好ましくは50%以下であることをいう。

【0040】

・U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲の測定

U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲の測定は、当業者に周知の方法を用いて行うことができ、例えば、U3 snoRNA結合タンパクに対する抗体を用いて免疫染色を行い、細胞画像解析装置(例えば、IN Cell Analyzer、GE Healthcare社)を用いて当該抗体で免疫染色される範囲(面積又は体積)を計測して行うことができる。また、運動ニューロン以外の細胞が共存していても、前記運動ニューロンのマーカータンパク(HB9、ISL1、CHAT等)に対する抗体、又はSMI-32抗体と二重免疫染色を行うことで、運動ニューロン又は成熟した運動ニューロンにおける当該U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲を簡便に測定することができる。

【0041】

なお、本検査方法において、U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲が広い場合とは、当該範囲を面積として測定する場合には、健常者の体細胞から製造したiPSC-MNのU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲に対し、好ましくは120%以上、より好ましくは130%以上、さらに好ましくは140%以上、最も好ましくは150%以上であることをいう。また、当該範囲を体積として測定する場合には、健常者の体細胞から製造したiPSC-MNのU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲に対し、好ましくは130%以上、より好ましくは145%以上、さらに好ましくは165%以上、最も好ましくは180%以上であることをいう。

【0042】

・運動ニューロン疾患(Motor neuron disease; MND)

本発明にかかる検査方法及びスクリーニング方法は、MND全般に適用することができ、例えば、脊髄性筋萎縮症(Spinal muscular atrophy; SMA)、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)、原発性側索硬化症(Primary lateral sclerosis; PLS)、球脊髄性筋萎縮症(Spinal-Bulbar Muscular Atrophy)等に対して好適に用いることができる。いずれの疾患についても、家族性・孤発性を問うことなく、本発明にかかる検査方法及びスクリーニング方法を好適に用いることができる。

なお、本発明における“健常者”とは、MNDに罹患していない者の意である。

【0043】

[MNDの予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法]

本発明により、MNDの予防及び/又は治療薬をスクリーニングする方法が提供される。当該スクリーニング方法は、下記工程(1)-(3)を含むことを特徴とする；

(1)ヒト体細胞から樹立した多能性幹細胞から分化した運動ニューロンと、被験物質とを接触させる工程、

(2)前記運動ニューロンにおけるU3 snoRNA量又はU3 snoRNA結合タンパクの核内局在

10

20

30

40

50

範囲を測定する工程、

(3) 前記U3 snoRNA量が、工程(1)で被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該発現量よりも高い場合、又は、前記U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲が、工程(1)で被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該範囲よりも狭い場合に、前記被験物質を運動ニューロン疾患の予防及び/又は治療薬として選択する工程。

以下に、本発明にかかるスクリーニング方法の構成要件について説明する。

【0044】

・スクリーニングに用いる運動ニューロン

本発明にかかるスクリーニング方法に用いることができる運動ニューロンは、“U3 snoRNA量の低下”又は“U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲の拡大”を呈する“潜在的に脆弱な運動ニューロン”であることが好ましい。そのような運動ニューロンの例としては、家族性及び孤発性MND患者の体細胞から樹立された多能性幹細胞から分化した運動ニューロンが挙げられる。また、健常者の体細胞から樹立され、且つ、家族性患者から同定された変異型のMND原因遺伝子が導入された多能性幹細胞も、好適に用いることができる。

10

【0045】

前記MND原因遺伝子としては、例えば、SMN1 (NG_008691)、SOD1 (NG_008689)、TDP43 (NG_008734)、FUS (NG_012889)、C9orf72 (chromosome 9 open reading frame 7 2, NG_031977)、GRN (granulin, NG_007886)、PFN1 (profilin 1, NG_032945)、EPHA4 (EPH receptor A4, NM_001304537)、ERBB4 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 4, NG_011805)、ANG (NG_008717)、UBQLN2 (ubiquilin 2, NG_016249)、HNRNPA2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, NG_029680)、及びOPTN (optineurin 1, NG_012876)等が例示される(参照:英国King's College London大学公開データベース“ALSOD:The Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Database”、<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>)。このうち、SMN1、SOD1、TDP43、FUSが特に好適である。

20

また、前記家族性患者から同定された変異型遺伝子としては、例えば、前記ALSODデータベースに登録されている変異型遺伝子を好適に用いることができる。このうち、エクソン7の欠失を生じる変異を有するSMN1遺伝子、A4V、G37R、L38V、G41D、H46R、G85R、D90A、G93A、G93S、L106V、I112T、I113T、S134N、又はL144FVX変異を有するSOD1遺伝子、Q343R、M337V変異を有するTARDBP遺伝子、H517P、R521C変異を有するFUS遺伝子が特に好適である。

30

【0046】

・被験物質

本発明のスクリーニング方法に供される被験物質としては、例えば、タンパク質、ペプチド、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、合成低分子化合物、天然化合物、細胞抽出物、植物抽出物、動物組織抽出物、血漿、海洋生物由来の抽出物、細胞培養上清、及び微生物発酵産物等が挙げられる。これらの物質は新規なもの、公知なものいずれでもよい。

【0047】

また、前記被験物質は、(1)生物学的ライブラリー法、(2)デコンヴォリューションを用いる合成ライブラリー法、(3)1ビーズ1化合物(one-bead one-compound)ライブラリー法、及び(4)アフィニティークロマトグラフィー選別を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティークロマトグラフィー選別を使用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他のアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、又は化合物の低分子化合物ライブラリーに適用できる(Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145-67)。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において見出され得る(DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909-13; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-6; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678-85;

40

50

Cho et al. (1993) Science 261: 1303-5; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1233-51)。化合物ライブラリーは、溶液 (Houghten (1992) Bio/Techniques 13: 412-21 を参照のこと) 又はビーズ (Lam (1991) Nature 354: 82-4)、チップ (Fodor (1993) Nature 364: 555-6)、細菌 (米国特許第5,223,409号)、孢子 (米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、及び同第5,223,409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-9) 若しくはファージ (Scott and Smith (1990) Science 249: 386-90; Devlin (1990) Science 249: 404-6; Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-82; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222: 301-10; 米国特許出願公開第2002/0103360号) として作製され得る。

10

【0048】

本発明において、運動ニューロンと被験物質とを接触させるとは、運動ニューロンの培養液へ被験物質を添加することで行っても良い。当該接触は、前記指標の変化が確認できる時間であれば特に限定されないが、例えば、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上が例示される。より好ましくは、2日である。添加される被験物質の濃度は化合物の種類 (溶解性、毒性等) によって適宜調節可能である。

【0049】

本発明において、運動ニューロンと被験物質とを接触させる際に用いる、運動ニューロンの培養液は、当該運動ニューロンを培養できる培地であれば特に限定されないが、例えば、国際公開W02014/148646号に記載される運動ニューロン分化用培地が挙げられる。

20

【0050】

本発明において運動ニューロンと被験物質とを接触させる際の培養温度は、特に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。

【0051】

・予防及び/又は治療薬の選択

本発明にかかるスクリーニング方法では、前記被験物質と接触させた運動ニューロンにおけるU3 snoRNA量が、被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該発現量よりも多い場合、又は、前記被験物質と接触させた運動ニューロンにおけるU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲が、被験物質と接触させなかった運動ニューロンの該範囲よりも狭い場合に、前記被験物質を運動ニューロン疾患の予防及び/又は治療薬として選択することができる。本発明における予防及び/又は治療薬は、シード化合物となるものも含めた意である。

30

【0052】

本スクリーニング方法における“U3 snoRNA量の測定”及びU3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲の測定には、MND発症リスクの検査方法において説明した方法を用いることができる。

本スクリーニング方法において、“U3 snoRNA量”が多い場合とは、被験物質と接触させなかった運動ニューロンの“U3 snoRNA量”に対し、好ましくは120%以上、より好ましくは125%以上、さらに好ましくは130%以上、最も好ましくは135%以上であることをいう。なお、当該“U3 snoRNA量”は200%以下であることが好ましく、より好ましくは190%以下、さらに好ましくは180%以下、最も好ましくは170%以下である。健常者由来iPCS-MNにおいてU3 snoRNA量が通常時の2倍を超えると、神経変性が誘導される場合があるからである。

40

また、本発明において、“U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲”が狭い場合とは、被験物質と接触させなかったiPSC-MNの“U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲 (=面積)”に対し、好ましくは90%以下、より好ましくは80%以下、さらに好ましくは75%以下、最も好ましくは70%以下であることをいう。なお、SMA患者由来iPSC-MNでは、FBLの核内

50

局在範囲が約93%に減少することで、脆弱性の顕著な回復が認められる場合もある（図5 A、B）。

さらに、前記“U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲”を体積として計測する場合には、被験物質と接触させなかったiPSC-MNの当該体積に対し、好ましくは80%以下、より好ましくは75%以下、さらに好ましくは70%以下、最も好ましくは65%以下であることをいう。

前記“U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲”は、面積又は体積のいずれとして測定する場合にも、健常者由来iPSC-MNにおける該値よりも下回らないことが好ましい。

【0053】

また、本発明により、MNDの治療薬のスクリーニングキットが提供される。当該キットには、前記U3 snoRNA量を測定するためのPCR用プライマーセットや、U3 snoRNA結合タンパクに対する抗体（免疫染色用）を含み得る。本キットには、さらにスクリーニングの手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

【実施例】

【0054】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

なお、以下の実施例では、健常者又はMND患者の体細胞から樹立したiPSCを“Control-iPSC”、“MND-iPSC”と表記し、MND患者のうちSMA又はALS患者の体細胞から樹立したiPSCを、各々“SMA-iPSC”、“ALS-iPSC”と表記する場合がある。そして、“Control-iPSC”、“MND-iPSC”、“SMA-iPSC”、“ALS-iPSC”から分化したMNを、各々“Control-MN”、“MND-MN”、“SMA-MN”、“ALS-MN”と表記する場合がある。

【0055】

続いて、下記実施例で用いた主な実験手法について説明する。

[手法1] iPSCからMNへの分化誘導

改変SFEBq (quick embryoid body-like aggregate method) 法を用いて、iPSCからMNへ分化誘導した（非特許文献7）。具体的には、ヒトiPSCを単一細胞に解離させ、低細胞親和性U型96-well plate (Lipidure-Coat Plate A-U96, NOF Corporation社製) を用いて、2 μ M dorsomorphin含有5% DFK medium中で培養して再凝集させた（= Day0；分化誘導開始）。12日後（= Day12）、前記培地をB27サプリメント、1 μ M レチノイン酸、100-500ng/ml Sonic Hedgehog、12.5ng/ml Fibroblast growth factor 2を含有するNeurobasal mediumに置換し、さらに10日間培養した。Day22に凝集塊（= 付着性の胚葉体）をMatrigel-coated dishに播種し、10ng/ml BDNF、10ng/ml GDNF、10ng/ml NT-3を含有するNeurobasal medium中で培養した。Day35に、Accutase (Innovative Cell Technologies社製) を用いて当該胚葉体を単一細胞又は小塊に解離させ、500,000 cells/mlの細胞密度でMatrigel-coated 24-well dishに播種した。

本願実施例では、MNに分化した細胞をリアルタイムで可視化するために、Day35にHB9プロモーターに制御されるGFP遺伝子をコードしたレンチウイルスベクター（HB9::GFP lentivirus、非特許文献7を参照のこと）を導入した。これにより、GFP蛍光が確認された細胞を、MNに分化した細胞と判定した。GFP陽性細胞の数は約Day50にかけて増加した。さらに、GFP陽性細胞のうち、SMI-32抗体で免疫染色される細胞を、分化段階がさらに進んだ（いわゆる成熟した）MNと判定した。

【0056】

[手法2] 遺伝子発現解析

前記[手法1]でHB9::GFP lentivirusを導入した細胞に対し、Day50にAccutaseを用いて単一細胞に解離させた後、FACS AriaII (BD Bioscience社製) に供してGFP陽性細胞（= MN）を分取した。また、7-aminoactinomycin-D(7-AAD、BD Bioscience社製) 染色を行い、死細胞を除去した。得られたGFP陽性生細胞を、20,000-30,000 cells/wellの細胞密度でMatrige-coated 96-well platesに播種した。

翌日、前記MNからRNAを抽出し（Prelude Direct Lysis module (Nugen社製)）、ラ

10

20

30

40

50

ランダムプライマーを用いてcDNAを作製・増幅した (Ovation Pico WTA System (Nugen社製))。Encore biotin module (Nugen社製)を用いて断片化・ラベル化した前記cDNAをプローブとして、Human Gene 1.0 ST GeneChip Array (Affymetrix社製)にハイブリダイズした (45、16時間)。Affymetrix GeneChip scanner 3000 7Gでスキャンニングして得られたデータ (=CELL files)をAffymetrix GeneChip command software (version 2.0)で解析した。Control-MNと各MND-MNとのpair-wise comparisonは、GeneSpring GX software (Agilent社製)を用いて行った。また、Volcano plot解析は、Fold change (以降、F.C.と略記する) >2、p-value<0.05である遺伝子について行い、F.C.>1.4の遺伝子についてgene ontology解析を行った。

【0057】

10

[手法3] U3 snoRNA、SMN1/2のノックダウン

U3 snoRNAのノックダウンには、両端5ヌクレオチドが2'-O-methoxyribonucleotides、中央の10ヌクレオチドがdeoxynucleotidesからなるphosphorithioate-modified ASO (Eurofines Genomics社製、Ideue T., et al, RNA, 15:1578-1587, 2009を参照のこと)、陰性コントロールとしてGFP-ASOを用いた。SMN1/2のノックダウンには、mission siRNA (Sigma-Aldrich社製)を用いた。

各ASO 40 μM、siRNA 50nMを4D-Nucleofector Y unit (LONZA社製)を用いてiPSC-MNにtransfectionした。

【0058】

20

[手法4] U3 snoRNA、SMNの過剰発現

U3 snoRNAを過剰発現させるために、H1 promoterで制御されるヒトU3 snoRNAをコードしたレンチウイルスベクター (Lenti6PW-H1::U3、特許文献7参照のこと)を作製し、Day35のiPSC-MNに導入した。

SMNの発現量増加には、SMN2E7 phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO)を用いた(Mitrpant C., et al, PLoS One, 8, e62114, doi:10.1371/journal.pone.0062114, 2013;Yoshida M., et al, Stem cell reports, doi:10.1016/j.stemcr.2015.02.010, 2015を参照のこと)。SMNタンパクはSMN2遺伝子にもコードされるが、SMN2遺伝子から生じるmRNAの約90%では、エクソン7がスプライシングによって除去されるため、機能が著しく低下したSMNタンパクを生じる。SMN2E7 PMOは、SMN2遺伝子のイントロン7内に標的配列を有し、エクソン7のスプライシングを抑制することで、SMN2遺伝子から機能的なSMNタンパクの発現を増加させることが報告されている。本願実施例5では、10 μM SMN2E7 PMOを4D-Nucleofector Y unit (LONZA社製)を用いてiPSC-MNにtransfectionした。

30

【0059】

[手法5] U3 snoRNA量の測定

FACS法 ([手法2])を用いて純化したiPSC-MNからRNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN社製)を用いてRNAを抽出し、ReverTra Ace (東洋紡社製)を用いてfirst-strand cDNAを合成した。Ovation Pico WTA System (Nugen社製、ランダムプライマー使用)を用いて前記cDNAを増幅し、配列番号1、2に記載したプライマーセットを用いて、SYBR Green法によるQRT-PCRを行った。得られたシグナルをStepOne software v2.1 (Applied Biosystems社製)を用いて解析し、GAPDH (内部コントロール)のシグナルに対する相対値として表した。

40

【0060】

[手法6] U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲の測定

iPSC-MNを含む培養系に対して4% パラホルムアルデヒド固定を行い、0.2% Triton X-100含有PBSで処理して免疫染色を行った。抗FBL抗体 (Cell Signaling Technology社製、1000倍希釈)、又は抗NCL抗体 (Proteintech社製、1000倍希釈)を用いて一次抗体反応を行った後 (4、overnight)、fluorescently-tagged二次抗体を反応させた。また、DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole、Life Technologies社製)による核染色も行った。その後、IN Cell Analyzer 2000又は6000 (GE Healthcare社製)に供し、MNの核

50

内で前記二次抗体の蛍光シグナルが占める面積を測定した（36イメージをtriplicateで測定）。得られた蛍光シグナルの総和をMN数で除して、MNあたりのFBL又はNCL局在範囲を算出した。

また、前記二次抗体の蛍光シグナルの数を測定し、その総和をMN数で除することにより、MNあたりのFBL又はNCL陽性核内構造体の数を算出した。

【0061】

その他、神経突起長とGem数の測定も、IN Cell Analyzer 2000又は6000（GE Healthcare社製）を用いて行った。（=3セット×36イメージ）。GFP陽性又はSMI-32陽性細胞の神経突起長を測定し、当該突起長の総和をMN数で除して、MNあたりの神経突起長として算出した。なお、SMI-32抗体による免疫染色には、Covance社製 SMI-32抗体（500倍希釈）を用いた。また、Gem数は、抗SMN抗体（BD Bioscience社製、1000倍希釈）を用いた免疫染色において認められるSMN陽性核内構造体の数として測定した。

【0062】

本願実施例で得られた結果に対する有意性検定は、2群間についてはunpaired two-tailed Student's t-test又はpaired t-test、多群間についてはone-way又はtwo-way ANOVAを用いて行った。P value < 0.05の場合に有意性ありと判断した。

【0063】

[実施例1] 健常者及びNMD患者由来iPSC-MNの作製

健常者2名、SMN1遺伝子にエクソン7の欠失を生じる変異を有する家族性SMA患者3名（幼少期発症型type1-III、各1名ずつ、計3名）、TARDBP、FUS、又はSOD1遺伝子に変異を有する家族性ALS患者10名、孤発性ALS患者4名から、同意のもとに皮膚線維芽細胞の提供を受けた。前記家族性ALS患者の変異の種類は、TARDBPについてはQ343R、M337V変異が各1名ずつ（計2名）、FUSについてはH517P、R521C変異が各1名ずつ（計2名）、SOD1についてはL38V、L106V、H46R、G93S変異が各1名ずつ、L144FVX変異が2名（計6名）である。

これらの線維芽細胞に、Takahashi K, et al, Cell, 131:861-872, 2007に記載された方法に従って、4因子（Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Myc）又は3因子（Oct3/4、Sox2、及びKlf4）を導入し、前記計19名の細胞提供者に由来する25株のiPSC株を樹立した（健常者由来：4株、家族性SMA患者由来：3株、家族性ALS患者由来：14株、孤発性ALS患者由来：4株）。いずれのiPSC株も、胚性幹細胞マーカー（NANOG、SSEA-4）を発現し、三胚葉への分化能力を有していることが確認された。このうち、SMA患者3名から樹立したiPSCの解析結果を図1A、Bに示す。これらのSMA-iPSCのゲノムでは、SMN1遺伝子のエクソン7とエクソン8がホモ接合性に欠失していることが確認された（図1C）。そして、当該遺伝子変異を有する患者の体細胞と同様に、SMA-iPSCでは、Control-iPSCよりもSMNタンパク量が少なく（図1D）、Gem数も若干少なかった。

【0064】

前記iPSCに対し、SFEBq法を用いてMNへ分化誘導した（[手法1]）。図1Eに示されるように、Control-iPSC、SMA-iPSCいずれから分化誘導した場合にも、GFP陽性で神経突起を伸展させたMNが多数観察されたが、SMA-MNの方がControl-MNよりも神経突起長が短い傾向が認められた（図1E下段）。さらに、SMA-MNでは、Control-MNよりも、SMI-32陽性となった細胞数が有意に少なかった（図1F）。この結果は、SMA-iPSCでは、MNに分化した後、成熟する過程で一部の細胞が変性して失われたことを示すものである。

よって、SMA-MNは、当該体細胞提供者の運動ニューロンと同様に、潜在的に脆弱で、運動ニューロンとして成熟するに伴い変性し易くなることが示された。

【0065】

前記SMA-MNと同様の潜在的な脆弱性は、前記家族性ALS-iPSCから分化誘導したMNについても認められた。これに対し、前記孤発性ALS-iPSCから分化誘導したMNでは、前記Control-MNと同様に、分化の進行に伴って細胞数が減少するような脆弱性は見られず、またGem数の減少も特に認められなかった。

【0066】

以上より、健常者及びNMD患者から、各々のgenetic backgroundに基づく形質を備えた

10

20

30

40

50

iPSC-MNが得られたことが示唆された。

【 0 0 6 7 】

[実施例 2] iPSC-MNの遺伝子発現解析

各 iPSC-MNの遺伝子発現パターンを網羅的に解析して、NMD-MNに共通する遺伝子発現変化の検出を試みた。

図 1 E からわかるように、各 iPSC-MNを含む培養系には、MN以外に分化した細胞が多数含まれていた(図 1 E、上段)。そこで、FACS法を用いてMNを分取し、純化したMNに対してGeneChip Array解析を行った([手法 2])。その結果、SMA-MNで6個、TARDBP変異型ALS-MNで194個、FUS変異型ALS-MNで5個、SOD1変異型ALS-MNで351個、孤発性ALS-MNで345個、Control-MNとの比較において発現量が有意に変化しているtranscriptが見つかった。そして、全MND-MNに共通して有意に減少していたtranscriptとして、U3 snoRNAが見出された(表 1)。表 1 に示されるように、U3 snoRNAのFold change(Control-MNとの発現量比)は、SMA-MNで約1/4.5、TARDBP変異型ALS-MNで約1/3.6、FUS変異型ALS-MNで約1/4.4、SOD1変異型ALS-MNで約1/7.5、孤発性ALS-MNで約1/3.8で、いずれもp valueが非常に低く(約 4.7×10^{-8} - 2.2×10^{-5})、有意性の極めて高い結果である。

【 0 0 6 8 】

【表 1】

| iPSC情報 | | | GeneChip Array 解析結果 | | | |
|---------|-----------|-----------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| iPSC株名 | 細胞提供者の診断名 | 変異遺伝子 | 発現量に変化していた transcript 数 | U3 snoRNA | | |
| | | | Fold change | | | |
| | | | p-value | | | |
| Control | 201B7 | 健常 | | | 1.000000 | |
| | 409B2 | | | | | |
| | TIG107 | | | | | |
| | 421C-1 | | | | | |
| MND | SMA type1 | 家族性SMA type I | SMN1 | 6 | $(4.469547)^{-1}$ | 4.67189E-08 |
| | SMA type2 | 家族性SMA type II | | | | |
| | SMA type3 | 家族性SMA type III | | | | |
| | A21412 | 家族性ALS | TARDBP | 194 | $(3.5725772)^{-1}$ | 6.70345E-06 |
| | A21421 | | | | | |
| | A3411 | | | | | |
| | A3416 | | | | | |
| | F714 | | FUS | 5 | $(4.388614)^{-1}$ | 1.08586E-06 |
| | F718 | | | | | |
| | A2916 | | | | | |
| | A2933 | SOD1 | 351 | $(7.529237)^{-1}$ | 2.18333E-05 | |
| | A20415 | | | | | |
| | A30111 | | | | | |
| | A3316 | | | | | |
| | S3536 | | | | | |
| | A37288 | | | | | |
| | A5411 | 孤発性ALS | | 345 | $(3.7529655)^{-1}$ | 3.5502E-05 |
| | A1142 | | | | | |
| | A131 | | | | | |
| A4114 | | | | | | |
| A821 | | | | | | |

【 0 0 6 9 】

図 2 に、SMA-MNについての解析結果を示す。GeneChip Arrayで得られた結果に基づくVolcano plot(図 2 A)及びヒートマップ(図 2 B)、さらにQRT-PCR法(図 2 C)の結果が示すように、SMA-MNにおけるU3 snoRNA量は、Control-MNよりも大幅且つ有意に低下していた。これに対し、大部分の遺伝子の発現量は、Control-MNと比べて有意差が認められなかった。しかしながら、ヒートマップ解析では、神経突起の伸展開に関わる遺伝子群の発現低下と(図 2 D)ストレス応答に関わる遺伝子群の発現上昇(図 2 E)が、有意性のある違いとして検出された。そこで、NEFL(Neurofilament light polypeptide)、NEFM(Neurofilament medium polypeptide)、MAP2(Microtubule-associated protein

2)、STMN2 (Stathmin-2) といった神経突起の代表的な構成成分の発現量をQRT-PCR法を用いて解析したところ、いずれについてもSMA-MNでは顕著に低下していることが確認された(図2F)。これらは、SMA-MNの神経突起が短いこと(図1E)と整合する結果である。

なお、運動ニューロンに分化誘導する前のSMA-iPSCとControl-iPSCでは、U3 snoRNA量に有意差は認められなかった(図1G)。よって、前記SMA-MNとControl-MNにおけるU3 snoRNA量の差は、iPSから運動ニューロンに分化する過程で生じたことがわかる。

【0070】

以上より、家族性及び孤発性も含めてMND患者から製造したiPSC-MNには、健常者から製造したiPSC-MNよりもU3 snoRNA量が少ないという共通の特徴があることが明らかとなった。

10

【0071】

[実施例3] SNORD3AとSMNの関係について

U3 snoRNAは、U3 snoRNPとしてrRNAの成熟に寄与することが知られる核小体低分子RNAである。ヒト疾患との関係では、全身性強皮症(Systemic sclerosis)の患者でU3 snoRNPに対する自己抗体の産生が報告されているが(Hamaguchi Y., Jpn. J. Clin. Immunol., 36:139-147, 2013)、MNDを含めて神経変性疾患への関与は知られていない。

近年、U3 snoRNAを含む一部のsnoRNAについて、その結合タンパクとのアセンブルにSMNタンパクが関与することが報告された(非特許文献6)。そこで、健常者由来iPSC-MNを用いて、運動ニューロンにおけるU3 snoRNAとSMNの関係を解析した。

20

【0072】

まず、SMNの発現低下がSNORD3Aの発現に及ぼす影響を解析した。

Control-MNにSMN1及び2に対するsiRNAを導入すると、24時間後にはSMN1及び2のmRNA量が約30%に減少し、NEFL及びNEFMのmRNA量も有意に減少した(図3A)。そして、MNの神経突起長が有意に減少し、SMI32陽性MN数も僅かに減少して(図3B)、神経変性が誘導された。この系においてU3 snoRNA量を測定すると、前記SMN1/2に対するsiRNAを導入したMNでは、control siRNAを導入したMNと比べて有意に減少していた(図3A)。

よって、SNORD3Aの発現は、SMNによって直接的又は間接的に制御されていることが明らかとなった。

【0073】

30

次に、U3 snoRNA量の減少がSMN1及び2の発現に及ぼす影響を解析した。

Control-MNにSNORD3Aに対するsiRNAを導入すると、24時間後にはU3 snoRNA量が約24%に減少し、NEFL、NEFMのmRNA量も有意に減少して神経突起長が有意に減少し、SMI32陽性MN数が顕著に減少した(図3C、D)。よって、前述のSMNの発現低下と同様に、U3 snoRNA量の減少によっても、MNに神経変性が誘導されたことがわかる。しかしながら、当該MNでは、SMN1及び2のmRNA量は有意には減少していなかった(図3C)。

よって、SMN1及び2の発現は、SNORD3Aには制御されていないことが明らかとなった。

【0074】

これらの結果より、U3 snoRNAとSMNはともに、NEFL・NEFM等の神経突起構成成分の発現を促し、神経突起の伸展を促して、運動ニューロンの生存維持を促す細胞内シグナリング経路に属する分子であって、且つ、該経路ではU3 snoRNAがSMNの下流に位置すると考えられる。すなわち、U3 snoRNA量の減少は、SMNの発現低下によって誘導される運動ニューロン変性機構の一部であり、運動ニューロンが潜在的に脆弱になる一因であることが示唆された。

40

【0075】

さらに、MNにおいてU3 snoRNA量が減少すると、その結合タンパクであるFBLの核内における局在範囲が拡大することも明らかとなった。図3Eは、前記SNORD3Aに対するsiRNAを導入したControl-MNを、抗FBL抗体を用いて免疫染色した写真を示す。SNORD3A siRNA導入MNでは、抗FBL抗体によって認識される核内構造体(=FBL陽性構造体、すなわち、核小体)の大きさが顕著に増加し、その総面積(=細胞あたりのFBL陽性構造体の総面積)

50

はControl siRNA導入MNの約1.6倍であった(図3F、左グラフ)。これら2種類のsiRNA導入MNでは、前記FBL陽性構造体の数(=細胞あたりのFBL陽性構造体数)に有意差はなく(図3F、右グラフ)、細胞の大きさ(面積)にも顕著な違いは認められなかった。なお、前記SNORD3A siRNA導入MNでは、FBLタンパクの凝集像は認められなかった。

【0076】

以上より、U3 snoRNAはSMNの下流で運動ニューロンの生存維持に寄与しており、当該RNA量が減少すると、運動ニューロンが変性し易くなることがわかった。また、U3 snoRNA量が減少すると、当該RNA結合タンパクの核内局在範囲が拡大することも明らかとなった。

【0077】

[実施例4] 運動ニューロンの潜在的脆弱性とU3 snoRNA量との関係(1)

U3 snoRNA量の変化が運動ニューロンに及ぼす影響を解析した。

Control-MNに、SNORD3Aに対するASOを導入してSNORD3Aをロックダウン、又はH1プロモーターに制御されるSNORD3A(Lenti6PW-H1::U3)を導入してSNORD3Aを過剰発現させた。導入から48時間後のU3 snoRNA量は、ロックダウンした場合には約53%に減少し、過剰発現させた場合には約2.2倍に増加していた(図4A)。そして、ロックダウン・過剰発現いずれの場合にも、成熟したMNの数が大幅に減少し、神経突起長も減少する傾向が認められた(図4B)。

また、FBL及びNCLの核内局在範囲は、ロックダウンよりも過剰発現させた場合の方が一段と拡大していた(図4C-F)。特に、U3 snoRNAを過剰発現させたMNでは、抗NCL抗体で免疫染色される範囲が著しく拡大し、当該染色範囲の細胞あたりの数が減少する結果となった(図4F)。なお、FBL及びNCLのmRNA量は、過剰発現させた場合には若干低下し、ロックダウンした場合にはほとんど変化していなかった。よって、前記MNで観察されたFBL及びNCL陽性範囲の拡大は、当該タンパクの発現量増加によるものではなく、該タンパクの局在が変化したことを示す結果と考えられる。

【0078】

以上より、MNでは、U3 snoRNA量が少なすぎても多すぎても変性し易くなることが明らかとなった。このことは、U3 snoRNAがMN内で複数の重要な機能を果たしていることを示唆している。そして、U3 snoRNA量の減少及び増加には、U3 snoRNA結合タンパクの核内局在範囲の拡大が伴うことも明らかとなった。

【0079】

[実施例5] 運動ニューロンの潜在的脆弱性とU3 snoRNA量との関係(2)

運動ニューロンの潜在的脆弱性と、U3 snoRNA量と該結合タンパクの核内局在範囲との関係を追及した。具体的には、SMNタンパクの発現量増加によって当該脆弱性を回復させたiPSC-MNにおける、前記RNA量等の変化を解析した。

前述したように、SMN1遺伝子変異を有するSMA-MNは、SMNタンパク量が少ないことに起因して潜在的に脆弱である(実施例1)。iPSCからMNに分化した後徐々に変性するため、Control-MNと比べて神経突起長が短く(図5A、C:Ctrl-PMO導入SMA-MNの神経突起長は、Ctrl-PMO導入Cont-MNの約69%)、FBLの核内局在範囲も広い(図5B、C:Ctrl-PMO導入SMA-MNのFBL陽性核内構造体総面積は、Ctrl-PMO導入Cont-MNの約1.5倍)。

【0080】

このSMA-MNに対し、SMN2E7 PMOを導入して機能的なSMNタンパクの発現量を増加させた。すると、前記PMO導入から48時間後には、神経突起長が有意に増加し、SMI-32陽性MN数も顕著に増加して、脆弱性の回復が認められた(図5A)。すなわち、SMN2E7を導入したSMA-MNでは、Ctrl-PMOを導入したSMA-MNと比べて、細胞あたりの神経突起長が約125%に増加し、SMI-32陽性MN数が約2.3倍に増加した。そして、当該脆弱性が回復したSMA-MNでは、U3 snoRNA量が増加し、抗FBL抗体で免疫染色される核内構造体の大きさが有意に減少していた(図5B:Ctrl-PMO導入SMA-MNに対し、SMN2E7導入SMA-MNでは、FBL陽性核内構造体の総面積が約93%に減少)。

【0081】

10

20

30

40

50

よって、潜在的に脆弱な iPSC-MN に特徴的に認められる “U3 snoRNA 量の減少” と “U3 snoRNA 結合タンパクの核内局在範囲の拡大” は、当該脆弱性が回復する際には是正される方向に向かうことが明らかになった。

【 0 0 8 2 】

実施例 3 - 5 の結果より、U3 snoRNA 量と該 RNA 結合タンパクの核内局在範囲は、運動ニューロンの潜在的脆弱性と連動して変化することがわかった。すなわち、これらの値を測定することで、運動ニューロンの潜在的脆弱性を評価できることが明らかとなった。

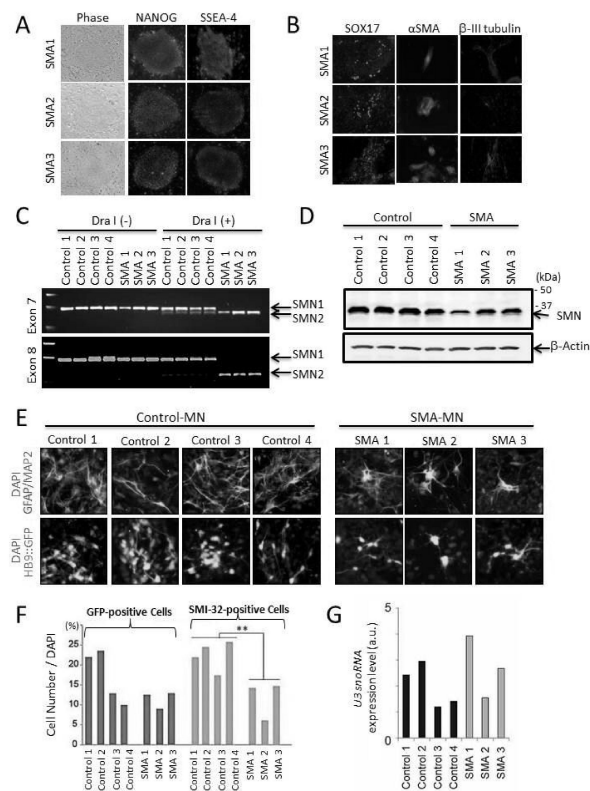
【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 8 3 】

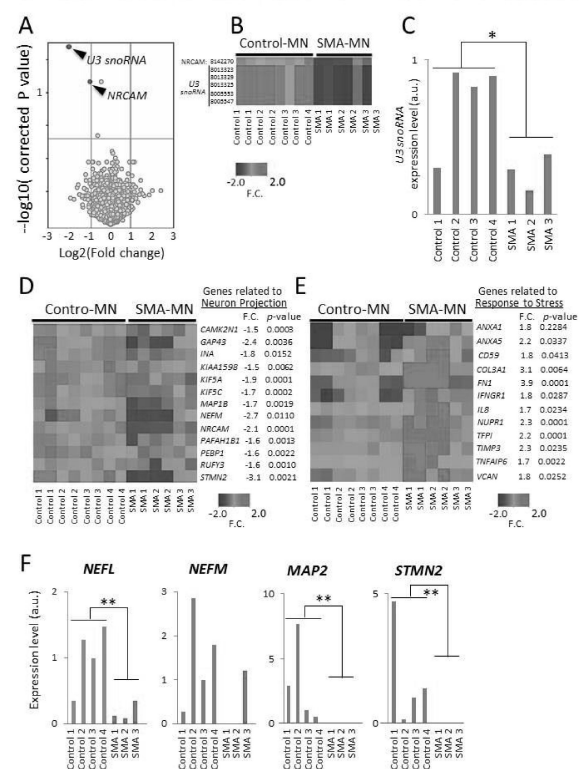
これまで医療の現場では、筋力低下や筋萎縮を呈する患者に対し、家族歴がない場合には他疾患の検査を行い、それらの可能性がすべて否定される場合に MND を告知していた。そのため、MND の診断には時間と費用がかかり、鑑別が難しい初期の MND 患者ほどその負担が大きく、また、医療機関においても負荷となる場合があった。

本発明にかかる検査方法は、患者の病変部位が運動ニューロンである可能性を評価できる、初めての実用的な検査方法である。よって、本検査方法の普及により、MND 患者及び医療機関の負担が軽減されることが期待される。

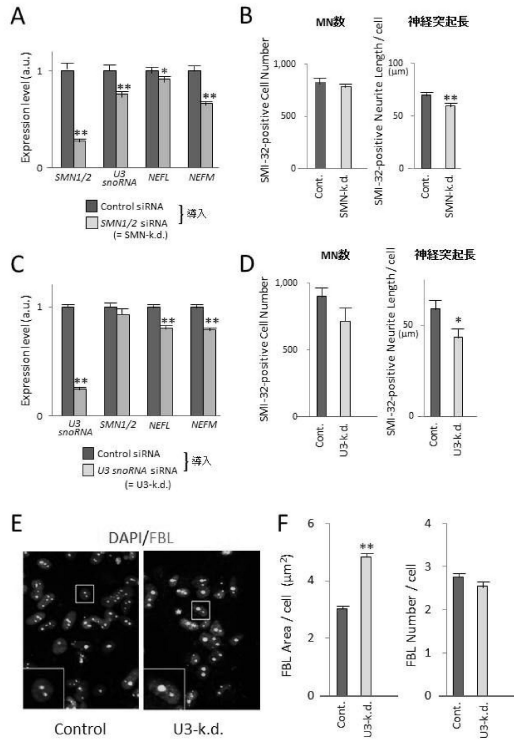
【 図 1 】



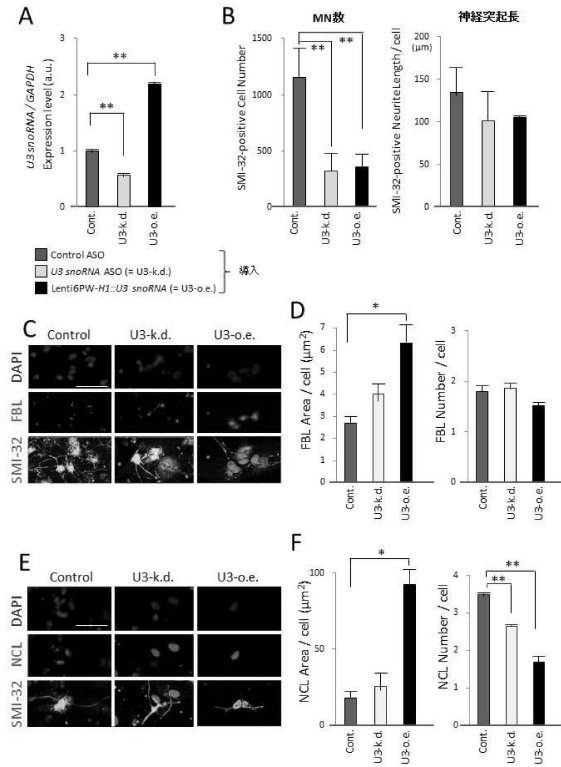
【 図 2 】



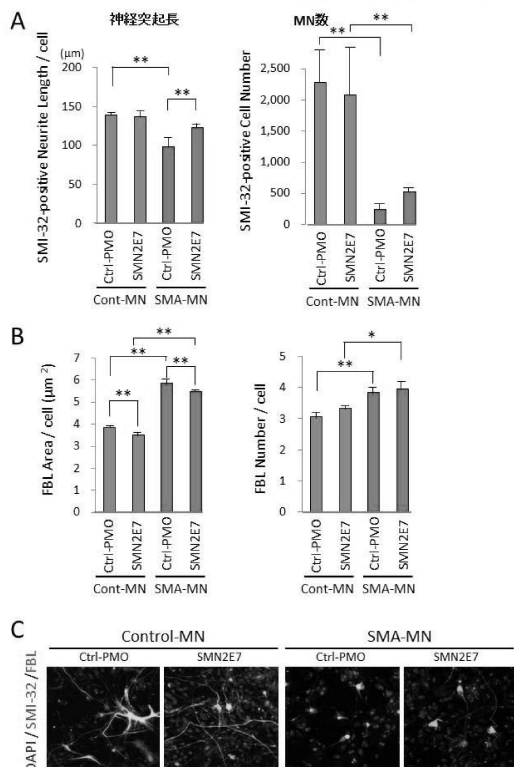
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

0006143233000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/0793 (2010.01) C 1 2 N 5/0793
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

(56)参考文献 国際公開第2013/108926(WO,A1)
Dementia Japan, 2011年 9月25日, Vol.25, No.2, p.137-144
Nature, 2009年 1月15日, Vol.457, No.7227, p.277-280
Brain Res., 2002年 8月 2日, Vol.945, No.2, p.160-173
J. Cell. Biochem., 2006年 8月 1日, Vol.98, No.5, p.1320-1333
EMBO Mol. Med., 2013年 2月, Vol.5, No.2, p.221-234

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S (S T N)