

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関

国際事務局

(43) 国際公開日

2019年12月26日(26.12.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/245060 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号 : PCT/JP2019/025759

(22) 国際出願日 : 2019年6月21日(21.06.2019)

(25) 国際出願の言語 : 日本語

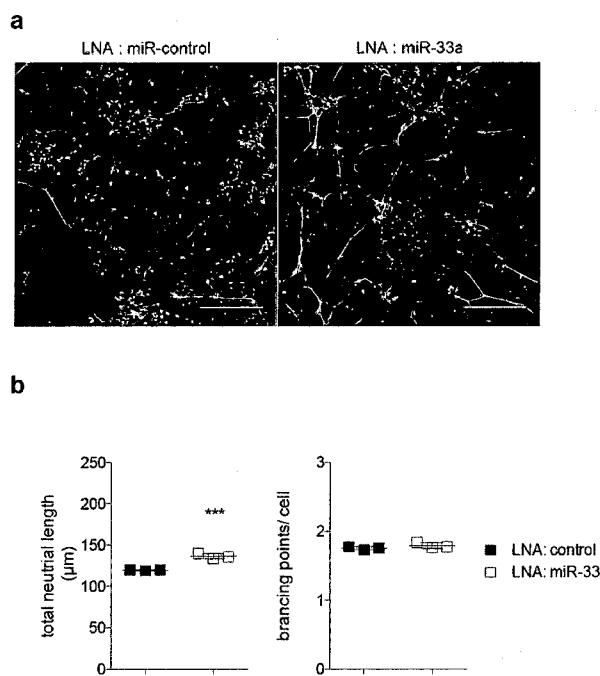
(26) 国際公開の言語 : 日本語

(30) 優先権データ :
特願 2018-119251 2018年6月22日(22.06.2018) JP(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO
UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).(72) 発明者: 井上治久 (INOUE, Haruhisa);
〒6068501 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 Kyoto (JP).
尾野宣(ONO, Koh); 〒6068501 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 Kyoto (JP). 今村恵子(IMAMURA, Keiko); 〒6068501 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 Kyoto (JP). 堀江貴裕(HORIE, Takahiro); 〒6068501 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 Kyoto (JP). 中関典子(NAKAZEKI, Fumiko); 〒6068501 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 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー32階 Tokyo (JP).

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASE

(54) 発明の名称 : 神経変性疾患の予防又は治療用組成物



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a therapeutic agent for hereditary spastic paraparesis (HSP) SPG4. More specifically, the present invention pertains to a composition for preventing or treating a neurodegenerative disease such as hereditary spastic paraparesis SPG4, said composition comprising, as an active ingredient, a substance inhibiting the function of miR-33a.

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類 :

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

(57) 要約：本発明は、遺伝性痙性対麻痺(Hereditary Spastic Paraplegia; HSP)SPG4の治療剤を提供することを目的とし、具体的には、miR-33aの機能を阻害する物質を有効成分として含有する、遺伝性痙性対麻痺SPG4等の神経変性疾患の予防又は治療用組成物に関する。

明細書

発明の名称

神経変性疾患の予防又は治療用組成物

技術分野

本発明は、例えば遺伝性痙性対麻痺(Hereditary Spastic Paraplegia; HSP)SPG4(以下、「HSP-SPG4」と称する場合がある)等の神経変性疾患の予防又は治療用組成物に関する。

背景技術

遺伝性痙性対麻痺(HSP)は、皮質脊髄運動路における神經突起の変性に起因する下肢の進行性の痙性麻痺を特徴とする神経変性疾患であり、HSPの多くは、SPAST 遺伝子に変異を有する HSP-SPG4 である(非特許文献 1)。SPAST 遺伝子は、SPASTIN と呼ばれる微小管切断タンパク質をコードする。

従来において、HSP-SPG4 に対する治療法としては、小胞体ストレスを軽減させて細胞死を抑制するような治療法しかなく、直接的な治療法がない。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献 1 Henson B. J. ら, PLoS ONE, 2012 年, Volume 7, Issue 5, e36505

発明の概要

本発明は、上述の実情に鑑み、HSP-SPG4 等の神経変性疾患の予防又は治療用組成物を提供することを目的とする。

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、microRNA(mirRNA ; miR)-33₁をノックアウトしたヒト iPS 細胞を用いて、発現量が増加する遺伝子をデータベースにて探索した結果、SPAST 遺伝子を抽出した。上述のように、SPAST 遺伝子は、HSP-SPG4 の原因遺伝子であることが既に知られていた。

一方、HSP-SPG4 患者由来細胞を用いて iPS 細胞を樹立し、神経細胞へと分化誘

導した。HSP-SPG4 患者由来細胞において、SPAST 遺伝子にコードされるタンパク質(SPASTIN)に変異(エキソン 9)があるという既知の事象を確認した。また、HSP-SPG4 患者由来細胞を神経細胞に分化誘導させたところ、神経突起が短く、枝分かれが少ないことが分かった。さらに、HSP-SPG4 患者由来細胞から分化誘導させた神経細胞において、合成 DNA オリゴヌクレオチドで miR-33a を抑制したところ、SPASTIN が増加し、HSP-SPG4 による神経細胞軸索の短縮が改善し、このように miR-33a を抑制することで、HSP-SPG4 を直接的に治療できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下を包含する。

(1) miR-33a の機能を阻害する物質を有効成分として含有する、miR-33a 機能阻害剤。

(2) miR-33a の機能を阻害する物質を有効成分として含有する、神経変性疾患の予防又は治療用組成物。

(3) 神経変性疾患が HSP-SPG4 である、(2) 記載の予防又は治療用組成物。

(4) miR-33a の機能を阻害する物質が、miR-33a の機能を阻害する核酸である、

(1)～(3) のいずれか 1 記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

(5) miR-33a の機能を阻害する核酸が、miR-33a にハイブリダイズし、且つ該 miR-33a の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、(4) 記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

(6) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 記載の塩基配列の相補鎖又はその 12 塩基以上の連続した塩基配列から成る、(5) 記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

(7) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 2 4 記載の塩基配列から成り、且つ該塩基配列における各ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である、(6) 記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

(8) miR-33a の機能を阻害する物質を対象に投与することを含む、神経変性疾患の予防又は治療方法。

- (9) 神経変性疾患が HSP-SPG4 である、(8) 記載の方法。
- (10) miR-33a の機能を阻害する物質が、miR-33a の機能を阻害する核酸である、
(8) または (9) 記載の方法。
- (11) miR-33a の機能を阻害する核酸が、miR-33a にハイブリダイズし、且つ該 miR-33a の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、(10) 記載の方法。
- (12) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 記載の塩基配列の相補鎖又はその 12 塩基以上の連続した塩基配列から成る、(11) 記載の方法。
- (13) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 24 記載の塩基配列から成り、且つ該塩基配列における各ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である、(12) 記載の方法。
- (14) 神経変性疾患を予防又は治療するための医薬の製造における、miR-33a の機能を阻害する物質の使用。
- (15) 神経変性疾患が HSP-SPG4 である、(14) 記載の使用。
- (16) miR-33a の機能を阻害する物質が、miR-33a の機能を阻害する核酸である、
(14) または (15) 記載の使用。
- (17) miR-33a の機能を阻害する核酸が、miR-33a にハイブリダイズし、且つ該 miR-33a の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、(16) 記載の使用。
- (18) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 記載の塩基配列の相補鎖又はその 12 塩基以上の連続した塩基配列から成る、(17) 記載の使用。
- (19) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 24 記載の塩基配列から成り、且つ該塩基配列における各ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である、(18) 記載の使用。
- (20) 神経変性疾患の予防又は治療における使用のための、miR-33a の機能を阻害する物質。
- (21) 神経変性疾患が HSP-SPG4 である、(20) 記載の物質。
- (22) miR-33a の機能を阻害する物質が、miR-33a の機能を阻害する核酸である、
(20) または (21) 記載の物質。

(23) miR-33a の機能を阻害する核酸が、miR-33a にハイブリダイズし、且つ該 miR-33a の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、(22) 記載の物質。

(24) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号1記載の塩基配列の相補鎖又はその12塩基以上の連続した塩基配列から成る、(23) 記載の物質。

(25) アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号24記載の塩基配列から成り、且つ該塩基配列における各ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である、(24) 記載の物質。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号 2018-119251 号の開示内容を包含する。

図面の簡単な説明

[図1-1](a) ターゲティング戦略を用いたヒト SREBF2 及び SREBF1 遺伝子座の概略図を示す。ドナー錠型は、PGK-ネオマイシン及び/又はピューロマイシン選択カセットが2つの loxP 部位及び相同性アームに隣接するように設計された。PGK プロモーター：ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、ネオマイシン R：ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン R：ピューロマイシン耐性遺伝子、ポリ A：ポリアデニル化配列。(b) DNA 配列決定により、CRISPR-Cas9 によって生成された欠失及び挿入が確認された。配列決定された loxP は下線で強調表示される。(c) 処理による成熟 miR-33a 及び宿主遺伝子(SERBF2)の発現レベルを示す。各クローニングにおいて n=3、各ノックアウト系統につき 2 クローニング。one-way ANOVA により *P<0.05、****P<0.0001。(d) 処理による成熟 miR-33b 及び宿主遺伝子(SERBF1)の発現レベルを示す。各クローニングにおいて n=3、各ノックアウト系統につき 2 クローニング。one-way ANOVA により *P<0.05、**P<0.01、****P<0.0001。(e) miR-33 KO iPSC における核型解析を示す。

[図1-2]図1-1の続きである。

[図1-3]図1-2の続きである。

[図1-4]図1-3の続きである。

[図1-5]図1-4の続きである。

[図 2－1] CRISPR-Cas9 は、miR-33 の発現を有意にダウンレギュレートすることができる。(a) miR-33 遺伝子座及び DNA 切断部位の概略構造を示す。(b) 成熟 miR-33 の発現レベルは、U6 小型核 RNA の発現レベルによって正規化した。各クローンにおいて n=3、各ノックアウト系統につき 2 クローン。one-way ANOVA により ***P<0.0001。(c) miR-33 KO iPSC における宿主遺伝子のタンパク質レベルを示す。各ノックアウト系統につき 2 クローン。(d) SREBF2 mRNA のエキソン 16 と 17 との間の接合部、及び SREBF1 のエキソン 17 と 18 との間の接合部の配列決定は、正しくスプライシングされたことを示す。

[図 2－2] 図 2－1 の続きである。

[図 2－3] 図 2－2 の続きである。

[図 2－4] 図 2－3 の続きである。

[図 3－1] SPAST の発現レベルは全ての miR-33 KO iPSC でアップレギュレートされた。(a) miR-33 KO iPSC 対コントロールの MA プロット(M、log 比；A、平均)を示す[倍数変化(FC)>2 は、括弧で強調された]。(b) Venn ダイアグラムは、各 KO iPSC におけるアップレギュレートされた遺伝子と、TargetScan により miR-33 の予測される上位 200 個の標的との間の重複を示した。(c) miR-33 の欠損により誘導される SPAST の検証を示す。各クローンにおいて n=3、各ノックアウト系統につき 2 クローン。one-way ANOVA による **P<0.01、***P<0.001。(d) miR-33 KO iPSC における SPASTIN のタンパク質レベルを示す。各ノックアウト系統につき 2 クローン、2 回の独立した実験。(e) SPAST の 3'-UTR における miR-33 標的領域の保存を示す。下線を付した配列は、miR-33 シード配列の潜在的結合部位である。*は種間の保存を示した。(f) 標的を確認するために用いた 3'-UTR レポーター アッセイを示す。miR-コントロール(miR-C)及び miR-33 を過剰発現する HEK293T 細胞におけるヒト SPAST 遺伝子 3'-UTR 構築物のルシフェラーゼレポーター活性(それぞれ n=6、独立 t-検定による ****P<0.0001)。(g) HEK293T 細胞における可能性のある miR-33 結合部位での WT 又は突然変異 SPAST 3'-UTR のルシフェラーゼレポーター活性を示す(それぞれ n=6、独立 t-検定による ***P<0.01、****P<0.0001)。

[図 3－2] 図 3－1 の続きである。

[図 3－3] 図 3－2 の続きである。

[図 3－4] 図 3－3 の続きである。

[図 3－5] 図 3－4 の続きである。

[図 4－1] SPG4 由来の皮質ニューロンの特徴を示す。 (a) 実施例における SPG4 患者の系統を示す。 (b) ヘテロ接合 SPG4 変異 IVS9+1 G→A の存在についての配列決定を示す。 (c) iPSC 由来の皮質ニューロンにおける SPAST の発現レベルを示す。 SPG4 では n=5、コントロールではそれぞれ n=4～5、コントロール系統につき 2 クローン。独立 t 検定による***P<0.001。 (d) iPSC 由来の皮質ニューロンにおける SPASTIN のタンパク質レベルを示す。 SPG4 では n=3、コントロールではそれぞれ n=2。独立 t 検定による***P<0.001。 (e) β 3-チューブリン(緑色)の代表的な免疫蛍光染色を示す。核は DAPI(白色)で標識される。SPG4 由来の皮質ニューロンからの神経突起の長さをコントロールニューロンと比較する。画像は Cellomics ArrayScanVTI を使用して自動的にキャプチャされた。10 倍の対物レンズを用いて、フィールド当たり少なくとも 50 個の細胞の分析のために十分な数のフィールド(>30)を取得した。独立 t 検定による*P<0.05、**P<0.01。

[図 4－2] 図 4－1 の続きである。

[図 4－3] 図 4－2 の続きである。

[図 5] (a) SPG4-iPSC における SPAST の RT-PCR 分析を示す。センスプライマーは SPAST のエキソン 8 において設計され、アンチセンスプライマーは SPAST のエキソン 10 において設計された。 (b) スキップされたエキソン 9 を示す、SPG4-iPSC における異常なバンド(最下部のバンド)の配列決定を示す。 (c) SPG4-iPSC における核型分析を示す。

[図 6] (a) レンチウイルスベクターを示す概要マップである。 (b) miR-33 を介した翻訳抑制の概要を示す。

[図 7－1] miR-33 は、SPAST 発現の調節により、SPG4 の神経表現型に影響を与えた。 (a) GFP で標識された、トランスフェクトされた SPG4 由来ニューロンの代表的な画像を示す。神経突起のトレースは黒色のインサートで示される。スケールバー：100 μ m。 (b) 示されたレンチウイルスでトランスフェクトされた GFP⁺SPG4 由来ニューロンにおける全神経突起の長さを示す。画像は Cellomics ArrayScanVTI を使用して自動的にキャプチャされた。10 倍の対物レンズを使用し

て、1 フィールド当たり少なくとも 1 つの細胞の分析のために、十分な数のフィールド(>50)が取得された。one-way ANOVA による^{*P>0.05}。

[図 7-2] 図 7-1 の続きである。

[図 8] (a) 未分化状態及び神経分化の両方での miR-33a 及び miR-33b の絶対レベルを示す。各クローンにおいて n=3~4。独立 t 検定による^{**P<0.01}、^{****P<0.0001}。 (b) iPSC 由来の皮質ニューロンにおける LNA 処理による miR-33a/b の発現レベルを示す。それぞれ n=4~5、独立 t 検定による^{**P<0.01}。 (c) iPSC 由来の皮質ニューロンにおける LNA 処理による ABCA1 の発現レベルを示す。それぞれ n=4~5。

[図 9] LNA による miR-33 の阻害は、SPG4 由来ニューロンにおいて神経突起の長さを回復させた。(a) β3-チューブリン(緑色)の代表的な免疫蛍光染色を示す。SPG4 由来ニューロンを LNA-コントロール又は LNA-miR-33a で 48 時間処理した。(b) LNA 処理した SPG4 由来ニューロンの全神経突起長を示す。10 倍の対物レンズを用いて、1 フィールド当たり少なくとも 50 個の細胞の分析のために十分な数のフィールド(>30)を取得した。one-way ANOVA による^{***P>0.001}。

[図 10-1] (a) SPG4 由来の皮質ニューロンにおける miR-33 の発現レベルを示す。それぞれ n=4~5、独立 t 検定による^{*P<0.05}。 (b) SPG4 由来の皮質ニューロンにおける SREBF2 及び SREBF1 の発現レベルを示す。それぞれ n=4~5、独立 t 検定による^{*P<0.05}、^{****P<0.0001}。 (c) SPG4 由来の皮質ニューロンにおける SREBP1 及び SREBP2 のタンパク質レベルを示す。 (d) Neuro 2a 細胞における spastin のノックダウンを確認する RT-PCR 分析を示す。それぞれ n=5、one-way ANOVA による^{***P<0.01}。 (e) 2 つの spastin RNAi Neuro 2a における miR-33a 及び Srebp2 の発現レベルを示す。それぞれ n=5、one-way ANOVA による^{*P<0.05}。

[図 10-2] 図 10-1 の続きである。

[図 10-3] 図 10-2 の続きである。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る miR-33a 機能阻害剤は、miR-33a の機能を阻害する物質を有効成

分として含有するものである。本発明に係る miR-33a 機能阻害剤によれば、HSP-SPG4 の原因遺伝子である SPAST 遺伝子から転写された mRNA の 3'-UTR に存在する miR-33 の結合部位への miR-33a の結合を抑制することで、SPAST 遺伝子によりコードされる SPASTIN タンパク質の発現を増加させ、HSP-SPG4 の症状(例えば、神経細胞軸索の短縮)を改善することができる。換言すれば、本発明に係る miR-33a 機能阻害剤は、HSP-SPG4 等の神経変性疾患の予防又は治療用組成物ということができる。以下では、本発明に係る miR-33a 機能阻害剤及び神経変性疾患の予防又は治療用組成物を併せて「本発明に係る薬剤」という場合がある。

ここで、miR-33a の機能とは、SPAST 遺伝子から転写された mRNA の 3'-UTR に存在する miR-33 の結合部位に結合し、当該 mRNA からタンパク質への翻訳を阻害するか、又は当該 mRNA の分解を誘導することによって、SPAST 遺伝子の発現を抑制することを意味する。

また、本発明に係る薬剤により予防又は治療することができる神経変性疾患は、miR-33a を原因とする神経変性疾患であれば特に限定されないが、HSP-SPG4 であることが好ましい。

本発明に係る薬剤の有効成分である miR-33a の機能を阻害する物質は、miR-33a の機能を阻害することが可能であればどのような物質であっても、特に限定されないが、miR-33a の機能を阻害する核酸であることが好ましい。

また、miR-33a の機能を阻害する核酸は、miR-33a にハイブリダイズし、且つ該 miR-33a の機能を阻害する核酸であれば特に限定されないが、miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであることが好ましい。miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、miR-33a と当該アンチセンスオリゴヌクレオチドが有する miR-33a の少なくとも部分配列に相補的な鎖とがハイブリダイズすることによって、miR-33a のレベルを抑制するか又は miR-33a の機能を阻害する。

miRNA(miR)は、20~25 塩基長の一本鎖のノンコーディング RNA である。miRNA は、まず、DNA から、miRNA とその相補鎖とを含みヘアピンループ構造を取ることが可能な一本鎖の pri-miRNA として転写される。次いで、pri-miRNA は、核内にある Drosha と呼ばれる酵素によって一部が切断され pre-miRNA となって核外に輸送される。その後、pre-miRNA はさらに Dicer によって切断されて、成熟 miRNA

となる。

miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒト成熟 miR-33a の塩基配列(配列番号 1)に基づいて公知の手法により化学的に合成することができる。miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 記載のヒト成熟 miR-33a の塩基配列の相補鎖若しくはその部分配列(例えば、シード配列を含む 12~20 塩基等の 12 塩基以上の連續した塩基配列)を含むか又は当該相補鎖若しくはその部分配列から成ることが好ましい。

また、miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば配列番号 1 記載のヒト成熟 miR-33a の塩基配列の 1~21 番目、好ましくは 2~13 番目の塩基配列にハイブリダイズすることができる塩基配列を含み得る。

さらに、miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 記載のヒト成熟 miR-33a の塩基配列の少なくとも一部と完全に相補的な塩基配列を含むことは必ずしも必要ではなく、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90%、さらにより好ましくは少なくとも 95% 相補的な塩基配列を含んでいればよい。

miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、miR-33a にストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含み、該 miR-33a の機能を阻害する核酸であってもよい。「ストリンジエントな条件」とは、例えば 6×SSC(1×SSC の組成：0.15M の NaCl、0.015M のクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5%SDS、5×デンハルト、100 μg/mL の変性サケ精子 DNA 及び 50% (v/v) ホルムアミドを含む溶液中、室温にて 12 時間インキュベートし、更に 0.5×SSC で 50°C 以上の温度で洗浄する条件をいう。さらに、よりストリンジエントな条件(例えば、45°C 又は 60°C にて 12 時間インキュベートすること、0.2×SSC 又は 0.1×SSC で洗浄すること、洗浄に際し 60°C 又は 65°C 以上の温度条件で洗浄すること等)も含む。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA であっても RNA であってもよく、又は DNA/RNA キメラであってもよい。

アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド分子は、天然型の DNA 又は RNA であってもよい。当該ヌクレオチド分子は、安定性(化学的安定性及び/又は酵素に対する安定性)又は比活性(RNA との親和性)を向上させるために、

種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基(ホスフェート)を、例えばホスホロチオエート、メチルホスホネート及びホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。各ヌクレオチドの糖(リボース)の 2' 位の水酸基を、-OR(R=CH₃(2'-O-Me)、CH₂CH₂OCH₃(2'-O-MOE)、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN 等)に置換してもよい。さらに、塩基部分(ピリミジン、プリン)に化学修飾を施してもよい。当該化学修飾としては、例えばピリミジン塩基の 5 位へのメチル基若しくはカチオン性官能基の導入、又は、2 位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換等が挙げられる。

RNA の糖部のコンフォーメーションは、C2'-endo(S 型)と C3'-endo(N 型)の 2 つが支配的であり、一本鎖 RNA ではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成すると N 型に固定される。従って、miR-33a に対して強い結合能を付与するために、BNA(Bridged Nucleic Acid)が好ましく使用される。BNA は、2' 酸素と 4' 炭素とを架橋することによって、糖部のコンフォーメーションを N 型に固定した RNA 誘導体である。BNA としては、例えば 2' 酸素と 4' 炭素がメチレンによって架橋された 2', 4'-BNA(LNA(Locked Nucleic Acid)とも称される)、及び 2' 酸素と 4' 炭素がエチレンにより架橋された ENA が挙げられる。

例えば、miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、2', 4'-BNA(LNA)が配列番号 1 記載のヒト成熟 miR-33a の塩基配列の相補鎖の 5' 側から 3' 側方向に 9、11、13、15、17 及び/又は 19 番目の位置に配置される。

具体的な miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下の実施例で使用された「LNA-アンチ-miR-33」(配列番号 24)である。当該 LNA-アンチ-miR-33 は、配列番号 1 記載のヒト成熟 miR-33a の塩基配列における 2~13 番目の塩基配列の相補鎖に相当する核酸であって、LNA が配列番号 1 記載のヒト成熟 miR-33a の塩基配列の相補鎖の 5' 側から 3' 側方向に 9、11、13、15、17 及び 19 番目の位置に配置され、且つ各ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である、核酸である。

本発明に係る薬剤は、経口的又は非経口的(例えば、静脈内、皮下若しくは筋肉

内注射、局所的、経直腸的、経皮的、脊髄内的又は経鼻的)に投与することができる。経口投与のための剤形としては、例えば、錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、散剤、液剤、懸濁剤等が挙げられる。非経口投与のための剤形としては、例えば、注射用水性剤、注射用油性剤、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、エアロゾル剤、坐剤、貼付剤等が挙げられる。これらの製剤は、従来公知の技術を用いて調製され、製薬上許容される担体又は添加剤を含有することができる。

本発明に係る薬剤を投与する対象としては、例えばヒト、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ等の哺乳動物が挙げられる。本発明に係る薬剤は、ヒトに対して好適に用いられる。

本発明に係る薬剤は、投与の目的、投与方法、投与対象の状況(性別、年齢、体重、病状等)によって異なるが、例えば有効成分が miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、且つヒトに対して投与される場合、1 日当たり 120 ~240 μ g/kg 体重の miR-33a に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが、投与されるように用いられる。

また、本発明は、上述の本発明に係る薬剤に準じて、
miR-33a の機能を阻害する物質を対象に投与することを含む、HSP-SPG4 等の神経変性疾患の予防又は治療方法；
HSP-SPG4 等の神経変性疾患を予防又は治療するための医薬の製造における、
miR-33a の機能を阻害する物質の使用；
HSP-SPG4 等の神経変性疾患の予防又は治療における使用のための、miR-33a の機能を阻害する物質；
に関する。

実施例

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[ヒト人工多能性幹細胞(ipSC)における CRISPR-Cas9 ゲノム編集を用いた SPG4 遺伝性痙性対麻痺の治療標的としての miR-33a の同定]

1. 序論

マイクロ RNA(miRNA)は、特定の mRNA に結合し、翻訳を阻害するか、又は mRNA 分解を促進する小さな非タンパク質コーディング RNA である。miRNA は、様々な細胞の状況において、細胞型、組織及び種特異的な標的制御を示す。従って、適切な細胞型、組織及び種において miRNA 機能を研究することが重要である。以前に、本発明者等は、miR-33 が miR-33 欠損マウスの使用によって脂質恒常性を制御することを示した。しかしながら、ヒトにおける miR-33 の生理学的機能は、適切なモデルの欠如のために依然として未知であった。

miR-33 は、miR-33a 及び miR-33b の 2 つのアイソフォームを有する。miR-33a 及び miR-33b は、成熟形態においてわずか 2 ヌクレオチドだけ異なるが、それらのシード配列においては同一である。miR-33a は進化を通じて高度に保存されているが、miR-33b は大型哺乳動物の SREBF1 遺伝子にのみ存在し、齧歯類は miR-33b を欠いている。

ヒトにおける miR-33a/b の新規標的遺伝子を調査するために、本発明者等は、CRISPR-Cas9 技術により、miR-33 単一(miR-33a 又は miR-33b)及び二重(miR-33a 及び miR-33b)ノックアウトヒト iPSC を作製し、それらのトランск립トームを分析した。

本実施例では、SPAST がヒトにおける miR-33 の新規標的遺伝子であることを明らかにした。実際には、SPAST 3'-UTR の miR-33 結合部位は、マウスではなく中～大型哺乳動物で保存されており、マウスの SPAST に対する miR-33a 及び miR-33b の役割を明らかにすることは不可能である。SPAST は、SPASTIN と呼ばれる微小管切断タンパク質をコードし、SPAST(以前は「SPG4」として知られていた)遺伝子の変異は、遺伝性痙性対麻痺(HSP-SPG4)の最も一般的な原因である。本発明者等は、miR-33a が、SPG4 患者の iPSC 由来皮質ニューロンにおいて SPAST 発現を調節し、病理学的表現型に影響を与えることを示した。さらに、ロッド核酸-アンチ-miR(LNA)を介した、ヒトニューロンにおける miR-33 の主要な形態である miR-33a の阻害は、HSP-SPG4 患者ニューロンにおいて病理学的表現型を改善した。このように、miR-33a は、HSP-SPG4 の治療のための治療標的であり得る。

2. 結果

2-1. miR-33 ノックアウトヒト iPSC の作製

ヒト細胞における miR-33 の役割を調べるために、本発明者等はヒト iPSC から miR-33 単一ノックアウト (KO) 及び miR-33 二重 KO 細胞を作製した。

一対の CRISPR ガイド RNA (gRNA) 発現ベクターを構築し(表 1)、それらを、二本鎖切断を導入するために D10A Cas9 ニッカーゼ (Cas9n) と共にコントロール iPSC (「201B7」と命名)に共エレクトロポレーションした。

[表 1]

表 1. 遺伝子ターゲティング戦略の配列

CRISPR-Cas9n の遺伝子ターゲティングのための選択した配列を示す

Gene targeting sequence	
miR-33a KO gRNA-1a	GCTGCCCGCCAGGAGGTATGC (SEQ ID NO:2)
miR-33a KO gRNA-2a	TGTAGTTGCATTGCATGTTCTGG (SEQ ID NO:3)
miR-33b KO gRNA-1b	TGCAACAGCAATGCACCGCG (SEQ ID NO:4)
miR-33b KO gRNA-2b	TCGGCAGTGCAGCCCCGGAGC (SEQ ID NO:5)

オフターゲット突然変異誘発を最小限に抑えるためにダブルニッキングアプローチを選択した。以前の研究では、miRNA シード領域が、高効率で且つ特異的に miRNA 遺伝子をノックアウトするための最も好ましい切断部位であることが示されており、本発明者等は、各シード領域内/その隣接の PAM (NGG) をトリガーとした。二重対立遺伝子欠失のスクリーニングを容易にするために、上記の手順を相同組換えドナーベクターと組み合わせ、ネオマイシン及び/又はピューロマイシン耐性選択を可能にした(図 1 a)。

成熟 miR-33 配列欠失及び loxP 配列挿入等の indels の予測されたサイズは、DNA 配列決定によって同定された(図 1 b、図 2 a)。KO iPSC における miR-33a/b 発現の完全な消失は、RT-PCR 分析(図 2 b)によって確認されたが、PCR ベースの miRNA 測定のためにわずかなシグナルが残っていた。SREBF2 及び SREBF1 のイントロンによってコードされる miR-33a 及び/又は miR-33b の欠失は、それらの宿主遺伝子のタンパク質レベル及びスプライシングに影響しなかった(図 2 c 及び d)。

さらに、本発明者等は、miR-33 の欠失がそれらの宿主遺伝子の活性化を干渉す

ることなく確立されたかどうかを確認しようと試みた。HMG-CoA 阻害剤である NK104 は、SREBF2 の転写を活性化し、また、LXR アゴニストである T090137 は、SREBF1 発現を増強する。これらの薬理学的刺激により、コントロール及び K0 iPSC における SREBF2 及び SREBF1 mRNA は有意に増加し、コントロール iPSC における miR-33a/b の発現レベルは並行して増加した。各 K0 iPSC における miR-33a 及び/又は miR-33b の発現レベルは、それらの宿主遺伝子の刺激によっても検出されなかつたので、miR-33a 及び/又は miR-33b の完全な喪失は、miR-33 単一及び二重 K0 iPSC において達成された(図 1 c 及び d)。

染色体 Q バンド分析は、確立された iPS 系統が正常な核型を有することを示した(図 1 e)。

2 – 2. miR-33 はヒトにおいて SPAST 発現を調節する

miR-33 のヒト細胞への効果を分析するために、miR-33 単一、二重 K0 及びコントロール iPSC(201B7)を用いてマイクロアレイ分析を行った。マイクロアレイデータは、コントロールに対して、miR-33a K0 において 93 個のアップレギュレート遺伝子及び 191 個のダウンレギュレート遺伝子、miR-33b K0 において 99 個のアップレギュレート遺伝子及び 110 個のダウンレギュレート遺伝子、miR-33 二重 K0 iPSC において 49 個のアップレギュレート遺伝子及び 127 個のダウンレギュレート遺伝子を検出した(倍数変化>2)(図 3 a)。

公的データベース TargetScan(<http://www.targetscan.org>)を使用して、miR-33 単一、二重 K0 iPSC の全てにおいてアップレギュレートされた遺伝子の中で miR-33 標的遺伝子について検索した。図 3 b に示すように、SPAST がこの方法によって同定されたただ 1 つの遺伝子であった。

次に、RT-PCR 及びウェスタンブロッティング分析によって SPAST 及び SPASTIN 発現レベルを検証した(図 3 c 及び d)。SPAST における 2 つの翻訳開始コドンの存在により、2 つの SPASTIN アイソフォーム(「M1」と呼ばれる完全長アイソフォーム、及び「M87」と呼ばれるわずかに短いアイソフォーム)が合成される。M87 は、ニューロン及び非ニューロン組織の両方においてより豊富である。

SPAST 3'-UTR は、中～大型哺乳動物において miR-33 の潜在的結合部位を有する。しかしながら、マウスには標的部位が存在しない(図 3 e)。SPAST 3'-UTR の

推定 miR-33 標的配列が翻訳抑制を媒介できるかどうかを試験するために、SPAST 転写物の 3'-UTR をルシフェラーゼ発現プラスミドに挿入し (psiCHECK-2-SPAST 3'-UTR)、HEK 293T 細胞にトランスフェクトした。CMV 駆動 miR-33a 及び miR-33b によれば、コントロールベクター (miR-コントロール) と比較してルシフェラーゼ活性が低下した (図 3 f)。3'-UTR の潜在的結合部位における突然変異は、miR-33 の効果を無効にした (図 3 g)。

2-3. SPASTIN 活性の消失は、遺伝性痙性対麻痺 SPG4 (HSP-SPG4) の特徴的な表現型である

SPAST 遺伝子の突然変異 (2p22.3 に位置する) は、HSP の最も一般的な原因である。ほとんどの場合、常染色体優性の HSP-SPG4 は、下肢の痙攣及び衰弱に起因する歩行障害を伴うプロトタイプの HSP であると考えられている。

ヒトの SPAST 遺伝子の調節における miR-33 の効果を考慮して、本発明者等は、miR-33 の阻害が 1 つの正常な SPAST 対立遺伝子の活性化を促進し、続いて病理学的表現型を減少させると仮説を立てた。この仮説に取り組むために、SPG4 患者 1 人と健常対照者から iPSC (「hc1-A」及び「hc3-A」と称する) を作製した。当該患者は、スプライス部位を変化させる SPAST 遺伝子のイントロン 9 に位置するヘテロ接合 G>A 置換を有し (IVS9+1 G→A)、エキソン 9 のスキッピングを引き起こす。エキソン 9 は、当該遺伝子の AAA カセットコード領域内にある (図 4 a の系統)。HSP 患者のこの IVS9+1 G→A 変異は、以前に記載されていた。この領域を配列決定して、SPG4 由来 iPSC が SPAST 遺伝子の当該変異を維持していることを確認した (図 4 b、図 5 a-b)。染色体 Q バンド分析は、SPG4 由来のこの iPSC が正常な核型を有することを示した (図 5 c)。

細胞表現型を調べるために、本発明者等は、以前に記載された無血清凝集浮遊培養 (SFEBq) 法によって SPG4 及びコントロール iPSC を皮質ニューロンに分化させた。SPG4 は常染色体優性突然変異によって引き起こされるので、SPG4 患者は、1 つの対立遺伝子が機能しない場合、SPASTIN 活性の約 50% を有する可能性が高い。以前の研究では、スプライス部位変異を有する SPG4 患者由来のニューロンは、コントロールと比較して約 50% の SPASTIN タンパク質レベルの減少を示すことが明らかにされている。これと一致して、コントロールと比較して SPAST mRNA 及び

SPASTIN タンパク質レベルの両方が有意に低下した(図 4 c 及び d)。

最後に、SPG4 由来の神経突起の形態を調べた。免疫蛍光染色により、SPG4 由来の皮質ニューロンにおいて全神経突起の長さ及び分岐点の数が減少することが明らかとなった(図 4 e)。

2 – 4. miR-33 は、SPAST 3' UTR 調節を介して iPSC 由来の皮質ニューロンの神経突起の長さを減少させる

以前の研究は、SPASTIN レベルの低下が観察された疾患の表現型と直接関連していることを示し、SPASTIN を過剰発現する SPG4 由来のニューロンが神経突起伸長欠損を救済できることが示されている。miR-33 が SPAST 発現を直接調節し、SPG4 由来ニューロンの神経表現型に影響するかどうかを調べるために、本発明者等は、レンチウイルス構築物を SPG4 由来ニューロンに同時トランスフェクトした。

シナプシン I ニューロンドライバーの存在下で緑色蛍光タンパク質(GFP)-内部リボソーム進入部位(IRES)-潜在的結合部位を含む 3'-UTR を伴う/伴わない SPAST(ベクター1 及びベクター2)を過剰発現させた。コントロールとして GFP 過剰発現 SPG4 ニューロンを用いた(図 6 a)。

以前の報告と一致して、SPASTIN を過剰発現する SPG4 由来のニューロンは、GFP コントロールと比較して神経突起の長さを回復させた。ベクター1 又はベクター2 のいずれかの過剰発現による同時トランスフェクト CMV 駆動 miR コントロールは、SPG4 由来ニューロンにおける神経突起の長さの回復をもたらした。しかしながら、CMV 駆動 miR-33a のベクター2との同時トランスフェクションは、ベクター1で観察されなかった神経突起の長さを減少させた(図 6 b、図 7 a-b)。

2 – 5. ロックド核酸-アンチ-miR を介した miR-33a の阻害は神経突起の長さを改善する

本発明者等は、miR-33 が、SPAST 3'-UTR を標的とすることによって、SPG4 由来ニューロンにおいて神経表現型を調節することを示した。miR-33 の阻害が SPG4 の潜在的治療標的であるかどうかを調べるために、SPG4-iPSC を LNA-アンチ-miR-33a(LNA-miR-33a)又はコントロール(LNA-コントロール)でトランスフェクトした。miR-33a を選択した理由としては、miR-33a の絶対的レベルが、未分化状態及び神経分化の両方において miR-33b よりも豊富であったためである(図 8 a)。

LNA-アンチ-miR-33a のノックダウン効率を確認するために、miR-33a の発現レベルを、トランスフェクションの 48 時間後に RT-PCR によって評価した。iPSC 由来ニューロンにおいて、miR-33a のノックダウンが約 40% であった(図 8 b)。

miR-33a のダウンレギュレーションは、miR-33a の直接下流標的として知られている ABCA1 のアップレギュレーションと関連していた(図 8 c)。

本発明者等は、SPG4 由来ニューロンの神経突起の長さが LNA-miR-33a のトランスフェクションの 48 時間に有意に回復したことを観察し、このことは SPG4 の治療のための miR-33a 阻害の治療可能性を示唆するものである(図 9 a 及び b)。

さらに、宿主遺伝子の mRNA 発現及びタンパク質レベルと並行して、コントロールと比較して、本発明者等の SPG4 由来ニューロンにおいて、miR-33a の発現の増強が観察された(図 10 a-c)。miR-33a 上昇の原因を同定するために、shRNA 構築物のレンチウイルス感染を用いて Spast-knockdown Neuro 2a 系統を樹立した。それぞれ Spast RNAi 系統 1 及び 2 における Spast mRNA 発現の約 50% がノックダウンした(図 10 d)。RT-PCR の結果によれば、コントロールと比較して spastin が減少したニューロン細胞が、宿主遺伝子 Srebf2 と並行して miR-33a の発現レベルを増加させる傾向があることが明らかになった(図 10 e)。このように、本発明者等の SPG4 由来ニューロンにおける miR-33a の発現の増強は、SPASTIN 減少の直接的な効果であり得る。

3. 考察

以前の報告では、マウスにおける miR-33 の役割が、脂質代謝の調節因子としての証拠と共に探求されてきた。しかしながら、ヒトにおいては、適切なモデルを欠いていたため、依然として不明確であった。

本実施例において、本発明者等は、CRISPR-Cas9 によって miR-33 単一(miR-33a 又は miR-33b) 及び二重(miR-33a 及び miR-33b) ノックアウト iPSC を作製し、これらの KO iPSC における成熟 miR-33 生合成の完全な欠失を示した。さらに、SPAST がヒトにおける miR-33 の新規標的遺伝子であることを同定した。遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子の 1 つである SPAST は、miR-33 によって直接的に調節された。LNA による miR-33a の阻害は、SPG4 由来皮質ニューロンの病理学的表現型を部分的に減少させた。合成 RNA オリゴによる miR-33a の阻害が 1 つの正常な SPAST 対立遺

伝子の活性化を促進し、続いて病理学的表現型を減少させることが推測される。

miRNA の特異的で安定したノックアウトは、miRNA の機能を研究する上で不可欠である。miRNA の遺伝子ノックアウトは、miRNA の機能喪失の研究に関する最も信頼できる技術である。近年、CRISPR-Cas9 技術が多様なモデルの機能遺伝子の研究に応用されている。さらに、幾つかの刊行物は、CRISPR-Cas9 技術が pre-miRNA の末端ループ又は 5' 領域を標的とすることによって miRNA 発現を抑制し得ることを報告した。本実施例では、宿主遺伝子の発現に影響を与えることなく、CRISPR-Cas9 によって miR-33 単一及び二重ノックアウト iPSC を作製した。

神経変性疾患は、主に遺伝子の発現レベルの変化を伴うタンパク質症と考えられている。以前の研究では、SPG4 由来ニューロンは、ヒト ECS 由来ニューロンを siRNA によって SPASTIN を枯渇させた場合に観察された表現型に類似する、より短く、且つより分岐の少ない一次神経突起の数がより少ないと示された。さらに、SPG4 由来ニューロンにおける SPASTIN の過剰発現は、それらの病理学的表現型を回復させ、このことは、SPG4 表現型が SPASTIN 投与量に依存することを示唆している。HSP-SPG4 患者に見られる突然変異の圧倒的大部分は、突然変異 SPAST 対立遺伝子から生成された SPASTIN の微小管作用活性を無効にし、理論的には数が少ないと示す結果である。

本実施例では、本発明者等は、miR-33 の阻害が 1 つの正常な対立遺伝子の転写の促進を介して SPASTIN レベルを増加させることができ、続いて病理学的表現型を減少させると仮説を立てた。この仮説に対処するために、1 人の SPG4 患者と対照者から iPSC を生成した。以前の研究と一致して、本発明者等の SPAST IVS9+1 G→A 変異を有する SPG4 由来ニューロンが神経突起の長さ及び分枝の障害を示すことが観察された。さらに、結合部位を含む 3' UTR を有するか又は有しない SPAST のいずれかの過剰発現を伴う同時トランسفェクトされた CMV 駆動 miR コントロールが、SPG4 由来ニューロンにおける神経突起の長さ及び正常分枝を回復させるのに十分であることを観察した。一方、3' UTR を有する SPAST を伴う同時トランسفェクトされた CMV 駆動 miR-33a は、3' UTR を有しない SPAST の場合には観察されなかった神経突起表現型の回復を損なった。本発明者等のデータは、miR-33a

が SPAST 発現を直接調節し、SPG4 由来ニューロンの神経表現型に影響を及ぼすことを示した。

幾つかの siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)及び LNA は、現在、様々な疾患の臨床試験において研究中である。本実施例では、miR-33a の LNA に基づく薬理学的阻害が、SPG4 由来皮質ニューロンにおいて神経突起の長さを回復させることが示された。miRNA 発現プロファイリング研究は、当初癌分野で行われ、特定の miRNA(miR-33 を含む)が、腫瘍抑制機能又は腫瘍形成能を有するとして同定されている。最近、miRNA プロファイル研究により、アルツハイマー病(AD)及びパーキンソン病(PD)等の神経変性疾患において示差的に発現される miRNA が同定された。本発明者等は、本発明者等の SPG4 由来ニューロンにおける miR-33a の発現の増強を観察し、これは miR-33a の LNA に基づく阻害の実質的効果を説明し得る。HSP は、SPASTIN(SPG4)、ATLASTIN-1(SPG3)及び REEP1(SPG31)タンパク質をコードする遺伝子の変異によって引き起こされる。これまでの報告では、これらのタンパク質が互いに結合して、細胞全体に管状小胞体ネットワークを形成し、脂質液滴の形成及び拡大にも関与していることが示された。さらに、HSP 遺伝子の劣性形態は、DDHD1 及び DDHD2 等の脂肪酸代謝に関与する遺伝子発現の変化に関連付けられている。これらのデータ及び Spast-knockdown Neuro 2a 系統を用いた本発明者等の実験は、HSP の脂質代謝の変化が、本発明者等の SPG4 由来ニューロンにおいて miR-33a を上昇させる可能性があることを示唆した。

まとめると、本発明者等は、遺伝性痙性対麻痺(HSP-SPG4)の原因遺伝子の 1 つである SPAST が、ヒトにおいて miR-33 の新規標的遺伝子であることを同定した。LNA による miR-33a の阻害は、SPG4 由来皮質ニューロンの神経突起長の減少等の病理学的表現型を正常化した。本発明者等のデータは、miR-33a が SPG4 の治療のための潜在的な治療法であり得ることを示した。

4. 方法

4-1. iPSC の生成と細胞培養

以前に報告されているように (Okita, K. et al. Stem Cells. 31, 458-466 (2013))、OCT3/4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin28 及びドミナントネガティブ p53、又は OCT3/4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin28 及び p53-shRNA のためのエピソームベクタ

一を用いて、末梢血単核細胞(PBMC)又はTリンパ球からSPG4患者のiPSCを作製し、4 ng/mlの塩基性纖維芽細胞増殖因子(FGF; Wako Chemicals, Osaka, Japan)及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充したヒトiPSC培地(靈長類胚性幹細胞培地; ReproCELL, Yokohama, Japan)を用いてSNLフィーダー層上で培養した。

4-2. 遺伝子ターゲティングのためのプラスミドの構築

CRISPR-Cas9nプラスミドについては、ガイドRNAを、CRISPR Design(<http://crispr.mit.edu/>)を用いて設計した。ガイドRNAオリゴヌクレオチド(表1)を、pHL-Ha-ccdBプラスミドに挿入した。供与体プラスミドを構築するため、選択カセット及びPCRによって増幅されたゲノム配列5'及び3'の断片を挿入することによってpBluescript SK(+)を改変した。各相同アームを、In-Fusion HDクローニングキット(Clontech, Mountain View, CA)を用いて5'及び3'相同性アームとして結合させた。

4-3. 遺伝子ターゲティングによるiPSCのゲノム編集

CRISPR-Cas9nのトランスフェクションについては、NEPA21エレクトロポレーション(Nepa Gene, Chiba, Japan)を用いて、それぞれ3 μgの2つのgRNAプラスミド、5 μgのCas9n(D10A Cas9)プラスミド及び10 μgのドナープラスミドで、 1×10^6 個のiPSCをエレクトロポレーションした。トランスフェクションした細胞を、フィーダー細胞上にプレーティングし、10 μMのY-27632を補充したヒトES培地で1日間培養した。トランスフェクションの3日後、ネオマイシン及び/又はピューロマイシン選択を適用し、10日間続けた。耐性コロニーを取り出し、ゲノムDNA抽出及びPCRスクリーニングのために拡大した。選択カセットを除去するために、エレクトロポレーションによりCreリコンビナーゼを発現するプラスミド(pCXW-Cre-Puro)で細胞を一過的にトランスフェクションし、ピューロマイシン耐性コロニーを選択した。選択カセット切除並びにmiR-33a及び/又はmiR-33bの二重対立遺伝子欠失は、ゲノムPCRスクリーニング及びサンガーパターン分析によって確認した。

4-4. 皮質ニューロン分化の誘導

ヒトiPSCを单一細胞に解離させ、100%エタノール中の2%Pluronic(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で予めコーティングした浮遊培養用の

U 底 96 ウェルプレート (Greiner Bio-One, Frick-enhausen, Germany)において迅速に再凝集させた。胚様体 (EB) の凝集体を、神経誘導段階 (0~8 日目)において 5% DFK 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (Sigma-Aldrich)、5% KSR (Gibco, Waltham, MA)、NEAA (Invitrogen)、L-グルタミン (Sigma-Aldrich)、0.1M 2-メルカプトエタノール (Invitrogen) ; 2 μM ドルソモルフィン及び 10 μM SB431542 (Wako Chemicals) を含む又は有さない) 中で培養した。誘導後、EB をマトリゲル (Becton Dickinson) コーティング 6 ウェル培養プレート上に移し、1×N2 supplement (Invitrogen)、2 μM ドルソモルフィン及び 10 μM SB431542 を補充して、パターニング段階 (8~24 日目)において培養した。パターニング段階後、遊走した神経前駆細胞を、Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc.) を用いてプレート底から分離して、ビタミン A を含まない 1x B27 (Invitrogen/Gibco)、1x Glutamax (Invitrogen/Gibco)、10ng/ml BDNF、10ng/ml GDNF 及び 10ng/ml NT-3 を補充した Neurobasal medium FULL, Neurobasal medium (Invitrogen/Gibco) 中、マトリゲルでコーティングした 12 ウェル若しくは 24 ウェル培養プレート又はカバースリップ上で、神経成熟段階において培養し、次いで、実験まで培養した。

4-5. ウエスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、既述の標準的な方法を用いて行った⁴⁰。サンプルを、100mM Tris-HCl, pH7.4、75mM NaCl 及び 1% Triton X-100 (Nacalai Tesque) から成る溶解バッファーで溶解した。溶解バッファーに、使用直前に完全ミニプロテアーゼインヒビター (Roche)、ALLN (25 μg ml⁻¹)、0.5mM NaF 及び 10mM Na₃VO₄ を補充した。タンパク質濃度は、ビシンコニン酸 (BCA) タンパク質アッセイキット (Bio-Rad) を用いて測定した。全てのサンプル (タンパク質 10 μg) を溶解バッファーに懸濁し、NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) ゲルを用いて分画し、Protran ニトロセルローストランスファーメンブレン (Whatman) に転写した。メンブレンを、5% 脱脂乳を含む 1×リン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いて 1 時間ブロッキングし、SPASTIN に対する一次抗体 (S7074, Sigma-Aldrich)、ABCA1 に対する一次抗体 (NB400-105, Novus Biologicals)、SREBP-1 に対する一次抗体 (2A4, Santa Cruz)、SREBP-2 に対する一次抗体 (Cayman)、TF2B に対する一次抗体 (EP4588, Abcam)、β アクチンに対する一次抗体 (C4, Santa Cruz) と共に 4°C で一晩インキュベートし

た。PBS-0.05%Tween 20(0.05%T-PBS)中での洗浄ステップの後、メンブレンを二次抗体(抗ウサギ又は抗マウス IgG HRP 結合；1:2,000)と共に室温で1時間インキュベートした。次いで、メンブレンを0.05%T-PBSで洗浄し、LAS-4000システム(GE Healthcare Life Science)を用いて、ECL ウェスタンプロット検出試薬(GE Healthcare)で検出した。

4-6. RNA抽出及びqRT-PCR

TriPure Isolation Reagent(Roche)を用いて全RNAを単離精製し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)を用いて製造業者の説明書に従って、100 ngの全RNAからcDNAを合成した。定量的RT-PCRのために、SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)を用いて、特定の遺伝子を40サイクルで増幅した。発現は、ハウスキーピング遺伝子である18SリボソームRNAに対して正規化した。遺伝子特異的プライマーを表2に示す。

[表2]

表2. プライマー配列
使用した遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマー配列

Gene	Species	Forward	Reverse
SREBF1	Human	AACAGTCCCCTGGTCGTAGAT (SEQ ID NO:6)	TGTTGCAGAAAGCGAATGTAGT (SEQ ID NO:7)
SREBF2	Human	AGGAGAACATGGTGCTGA (SEQ ID NO:8)	TAAAGGAGAGGCACAGGA (SEQ ID NO:9)
SPAST	Human	AGCTGGTCAAGACTTGGCAA (SEQ ID NO:10)	AGGTTGCATTGATTCTGCA (SEQ ID NO:11)
ABCA1	Human	GTCCTCTTCCCGCATTATCTGG (SEQ ID NO:12)	AGTTCCCTGGAAGGTCTTGTTCAC (SEQ ID NO:13)
18S	Human	AGAAACGGCTACCACATCCA (SEQ ID NO:14)	CCCTCCAATGGATCCTCGTT (SEQ ID NO:15)
Srebf2	Mouse	GTGGAGCAGTCTAACGTCA (SEQ ID NO:16)	TGGTAGGTCTCACCCAGGAG (SEQ ID NO:17)
Spast	Mouse	CGGGCCAAGGTGAACAGTAT (SEQ ID NO:18)	GATGTCCATTGCGGCATGTC (SEQ ID NO:19)
18S	Mouse	CGCGGTTCTATTTGTTGGT (SEQ ID NO:20)	AGTCGGCATCGTTATGGTC (SEQ ID NO:21)

4-7. miRNAの定量PCR

全RNAを、TriPure Isolation Reagent(Roche)を用いて単離した。miR-33を、

TaqMan MicroRNA アッセイ (Applied Biosystems) プロトコルに従って測定し、生成物をサーマルサイクラー (ABI Prism7900HT 配列検出システム) を用いて分析した。サンプルを、U6 snRNA 発現によって標準化した。また、miR-33a 及び miR-33b のオリゴヌクレオチド 16pM、4pM、1pM、250fM、62.5fM 及び 15.625fM を測定し、検量線を作成した。サンプルの吸光度値を計算して濃度を算出した。

4-8. デュアルルシフェラーゼアッセイ

SPAST の 3'-UTR の完全長 PCR 断片をヒト iPSC cDNA から増幅し、psi-CHECK2-let-7 8X ベクター (addgene) にサブクローニングした。WT 又は変異体 3'-UTR ルシフェラーゼレポーター遺伝子を作製するために、以下の SPAST 3'-UTR の断片を psi-CHECK2-let-7 8X ベクターに挿入した：

野生型：acagacttaaacaatatacatgcaaattttgtttaag (配列番号 2
2)

変異体：acagacttaaacaatatacCCGTAAaatgtaattttgtttaag (配列番号 2
3)

ルシフェラーゼ活性は、以前に記載のように測定した⁴¹。

4-9. SPASTIN 及び GFP の過剰発現

SPAST の全長 3'-UTR を有するか又は有しないヒト SPAST をヒト iPSC からクローニングし、pCMV-IRES-GFP ベクターに挿入し、次いで CMV プロモーターを、比較的ニューロン特異的なシナプシン I プロモーターと置換した。製造者のプロトコル (Invitrogen) に従って、293FT 細胞中にレンチウイルスストックを產生した。要するに、トランスフェクションの 48 時間後にウイルス含有培地を回収し、0.45 μm フィルターで濾過した。細胞に、SPAST、3'-UTR を有する SPAST 又は空の GFP コントロールレンチウイルスを感染させた。神経細胞培養物を DNA 形質導入後 10 日間分化させた。感染細胞は GFP で強調された。

4-10. LNA-アンチ-miR-33 による細胞トランスフェクション

製造者の説明書に従って、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて、10nM LNA-アンチ-miR-33 又は LNA-コントロールで細胞をトランスフェクトした。トランスクエクションの 48 時間後に、細胞を分析に使用した。

LNA-アンチ-miR-33 は、以下の配列を有する核酸である：

A(L) ^ a ^ 5(L) ^ t ^ A(L) ^ c ^ A(L) ^ a ^ T(L) ^ g ^ 5(L) ^ a (配列番号 2 4)

また、LNA-コントロールは、以下の配列を有する核酸である：

A(L) ^ a ^ 5(L) ^ a ^ A(L) ^ t ^ A(L) ^ c ^ T(L) ^ a ^ 5(L) ^ g (配列番号 2 5)

(表記規則) N(L)=LNA, 5(L)=LNA_mC(5-メチルシトシン), ^=ホスホロチオエート結合。

4-1-1. 免疫細胞化学

細胞を、室温で 30 分間 4% パラホルムアルデヒド(pH7.4)において固定し、PBS でリソスした。細胞を、室温で 10 分間、0.2% Triton-X 100 を含有する PBS 中で透過処理し、続いて PBS でリソスした。非特異的結合を、Block Ace(DS pharma biomedical)で室温で 60 分間ブロックした。細胞を、一次抗体と共に 4°C で一晩インキュベートし、次いで適切な蛍光標識二次抗体で標識した。核を標識するために DAPI(DOJINDO)を使用した。以下の一次抗体を免疫細胞化学で使用した： β III チューブリン(1:1000, CST, 5568S)。免疫細胞化学の陽性カウント率を評価するために、ArrayScan による自動顕微鏡検査を用いて細胞を画像化し、HCS Studio 2.0 細胞分析ソフトウェア(Thermo Fisher Scientific)を用いて、免疫染色構造を計数した。

4-1-2. 統計分析

データは、平均±平均の標準誤差(SEM)として示される。統計的比較は、図の凡例に示すように、独立 t 検定又は Sidak 事後検定(3 つ以上の群)を用いた一元配置分散分析(ANOVA)を用いて行った。 <0.05 の p 値を統計学的に有意とみなし、GraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc.)を用いて統計分析を行った。

産業上の利用可能性

本発明によれば、HSP-SPG4 等の神経変性疾患を直接的に治療することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項 1]

miR-33a の機能を阻害する物質を有効成分として含有する、miR-33a 機能阻害剤。

[請求項 2]

miR-33a の機能を阻害する物質を有効成分として含有する、神経変性疾患の予防又は治療用組成物。

[請求項 3]

神経変性疾患が遺伝性痙性対麻痺 SPG4 である、請求項 2 記載の予防又は治療用組成物。

[請求項 4]

miR-33a の機能を阻害する物質が、miR-33a の機能を阻害する核酸である、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

[請求項 5]

miR-33a の機能を阻害する核酸が、miR-33a にハイブリダイズし、且つ該 miR-33a の機能を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 4 記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

[請求項 6]

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 1 記載の塩基配列の相補鎖又はその 12 塩基以上の連続した塩基配列から成る、請求項 5 記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

[請求項 7]

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号 2 4 記載の塩基配列から成り、且つ該塩基配列における各ヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 6 記載の miR-33a 機能阻害剤又は神経変性疾患の予防若しくは治療用組成物。

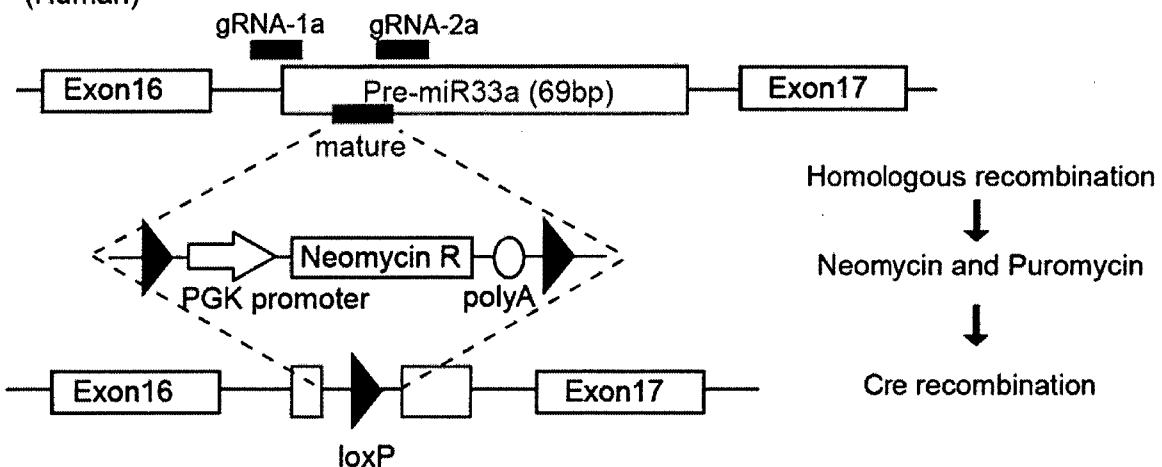
図 1 - 1

a

Chromosome 22

SREBF2

(Human)



Chromosome 17

SREBF1

(Human)

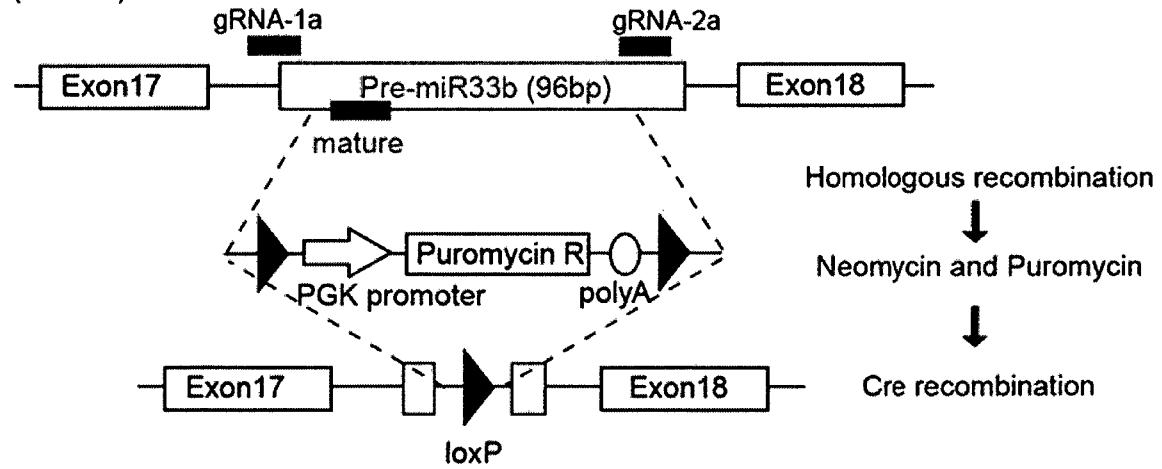


図 1 — 2

b

premiR-33a without seed sequence

CTGTGGCGAACGCAATTAGTGATAACTTCGTATAGCATTACGAAGTTATGTTTGTACCATTTGTGTTCTAATTGGTACCCA
TGCAATGTTCCACAGTCATCACAG (SEQ ID NO:26)

premiR-33b without seed sequence

GCGGGGGGGCAACGCCAATTAGTGATAACTTCGTATAGCATTACCAAGTTATGTTTGTACCATTTGCCCTGGCACAC
(SEQ ID NO:27)

図 1 — 3

C

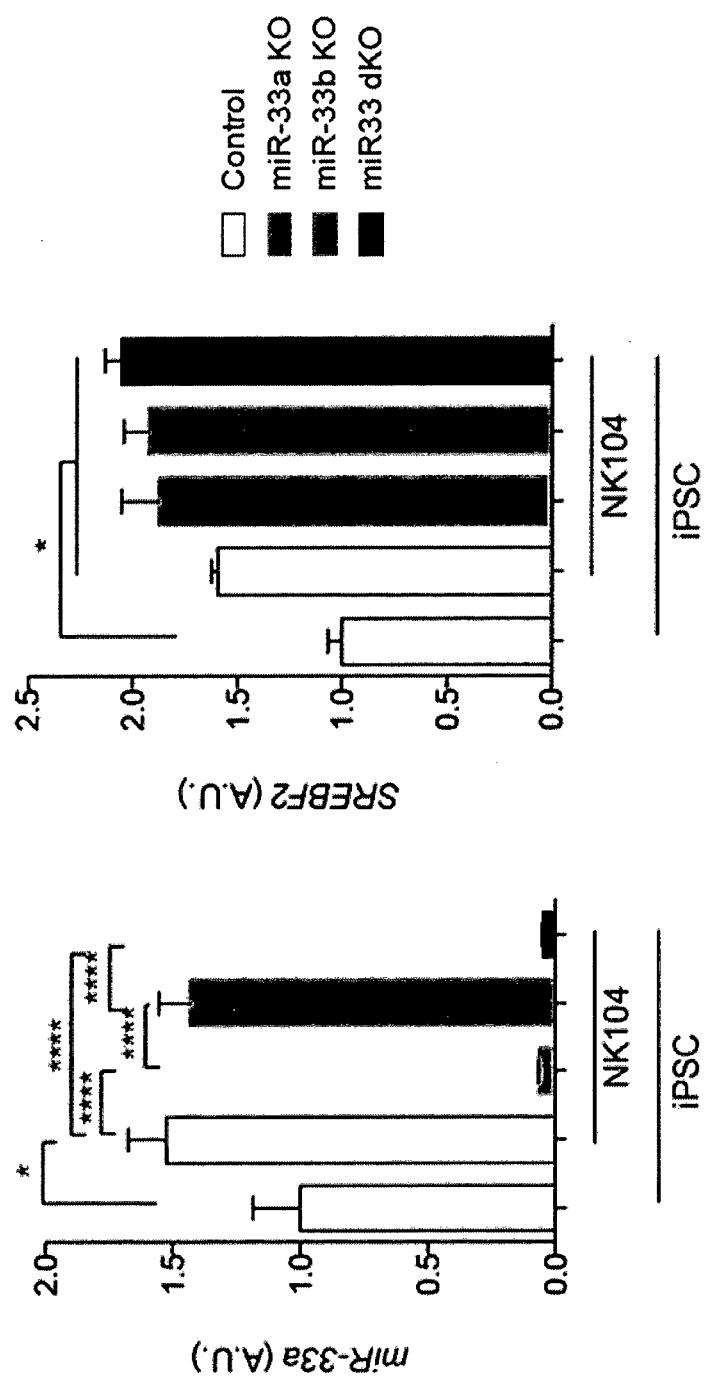


図 1 — 4

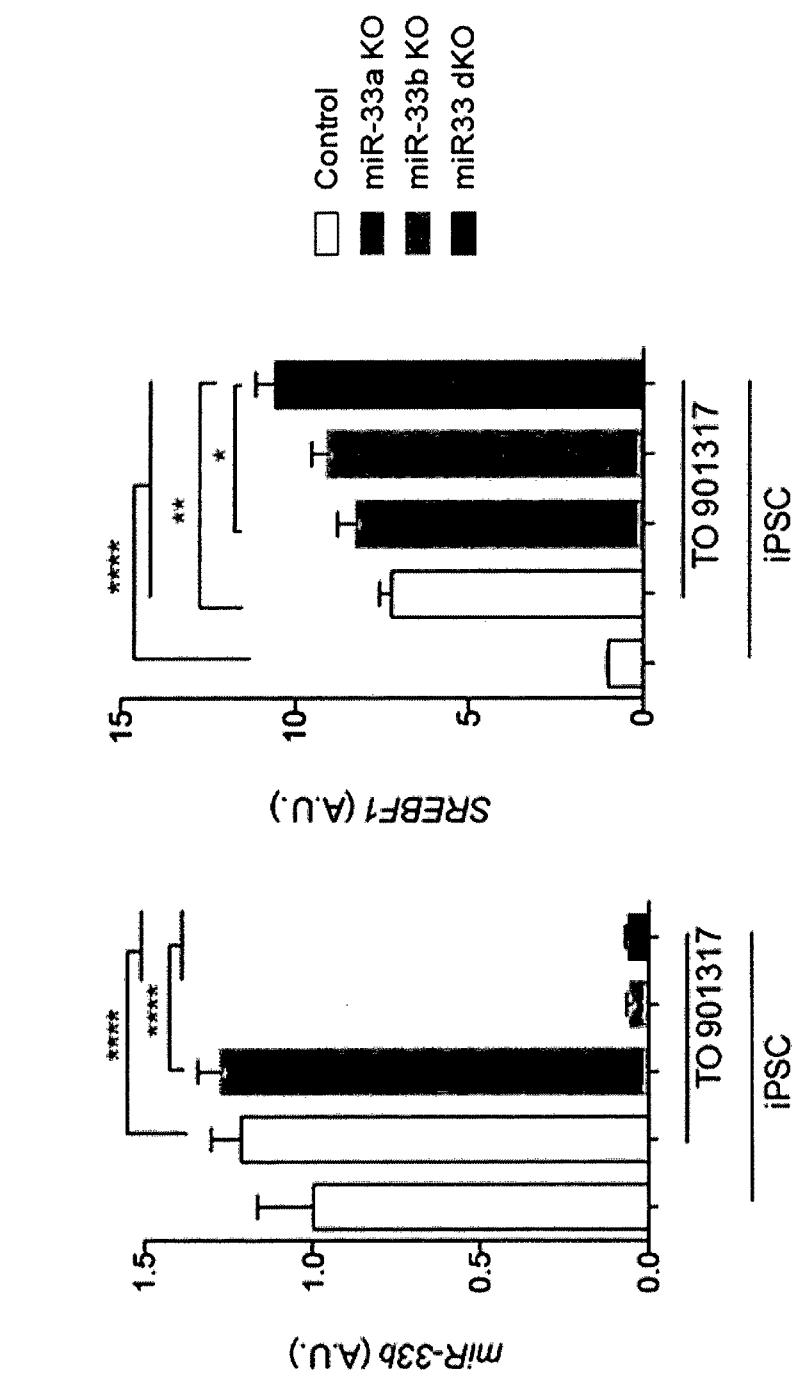


図 1 - 5

e

	miR-33a KO	miR-33b KO	miR-33 dKO
clone-1	2) (C 44 15 22	2) 15 11 11 11	1) 11 11 11 11
	1) 23 23 11 11	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11
	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11
	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11
clone-2	2) 15 11 15 22	2) 11 11 21 11	1) 11 11 11 11
	1) 15 11 15 22	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11
	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11
	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11	1) 11 11 11 11

図 2 – 1

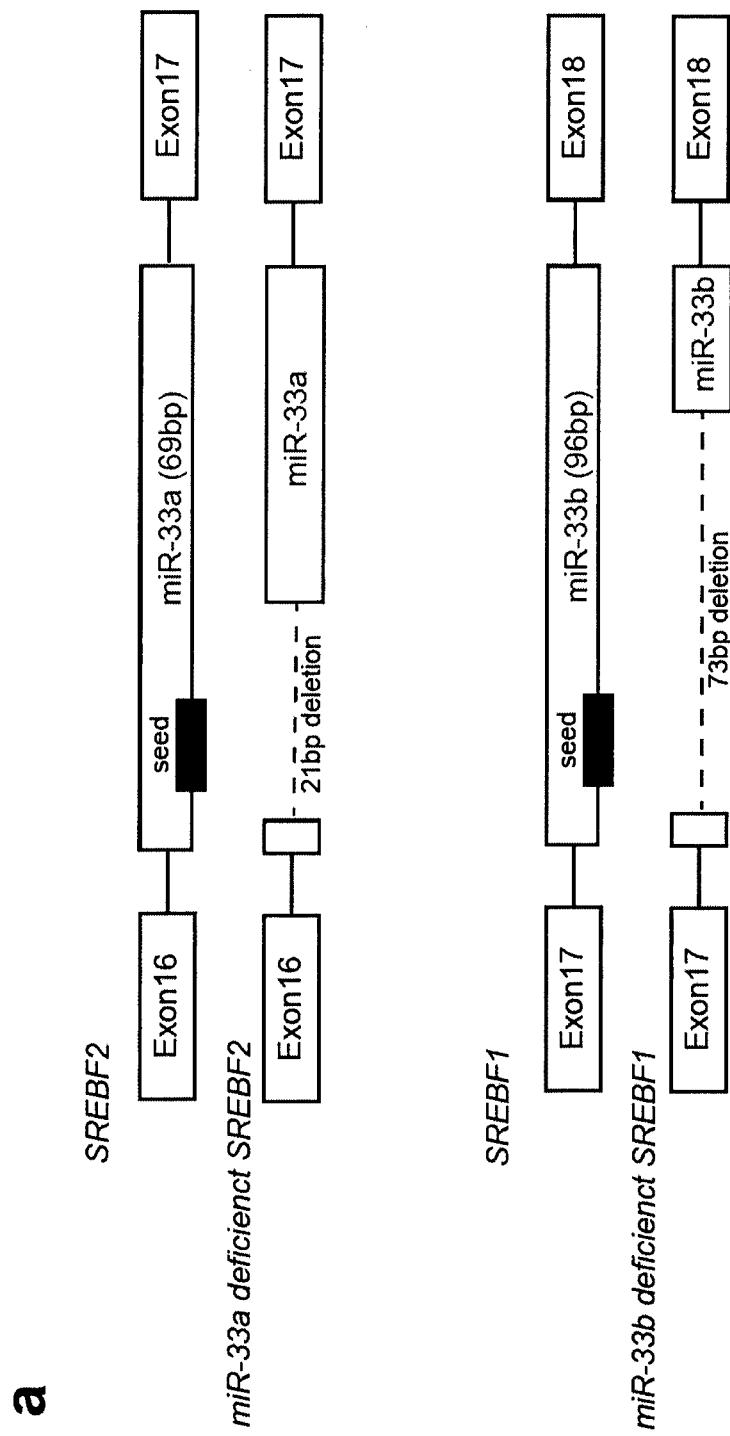
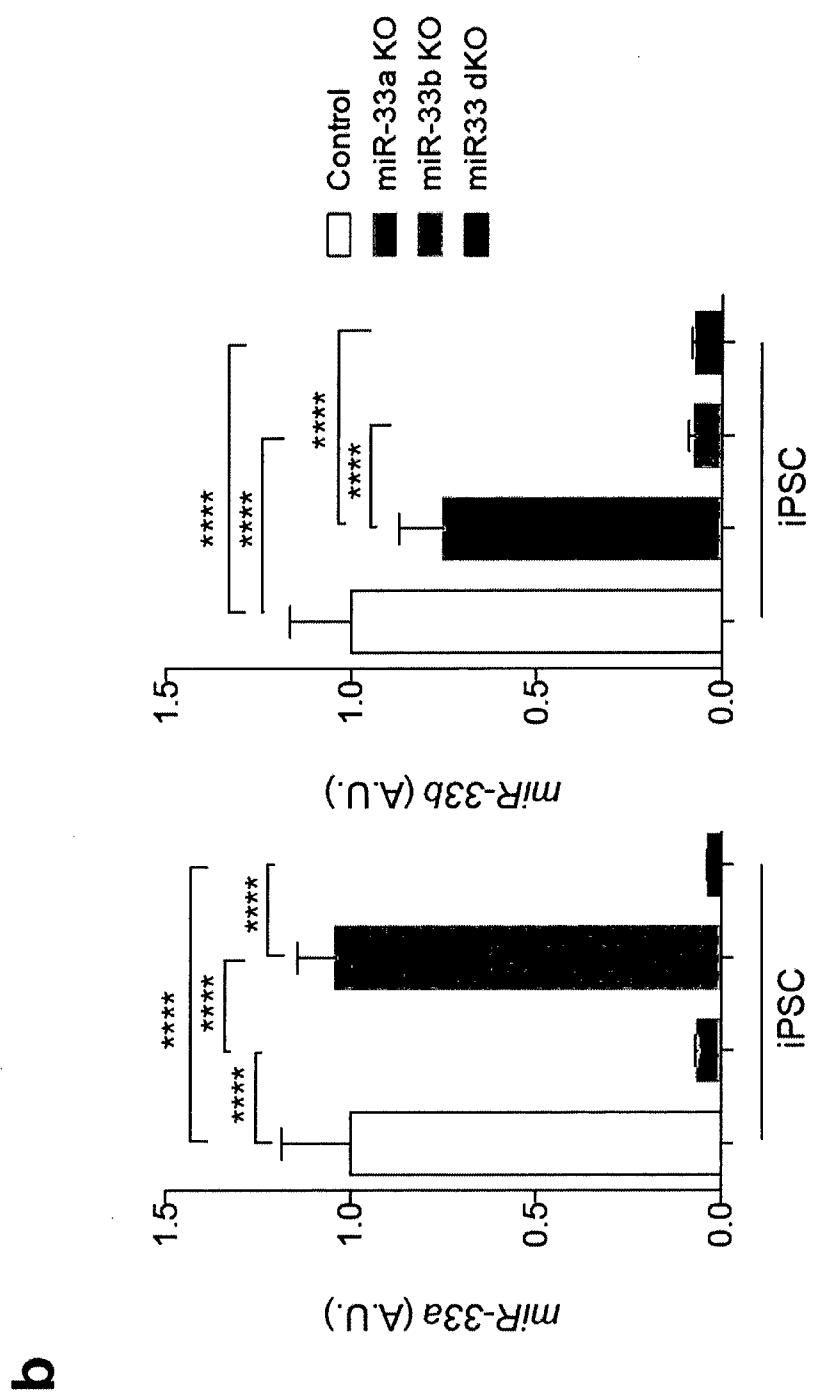


图 2 — 2



C

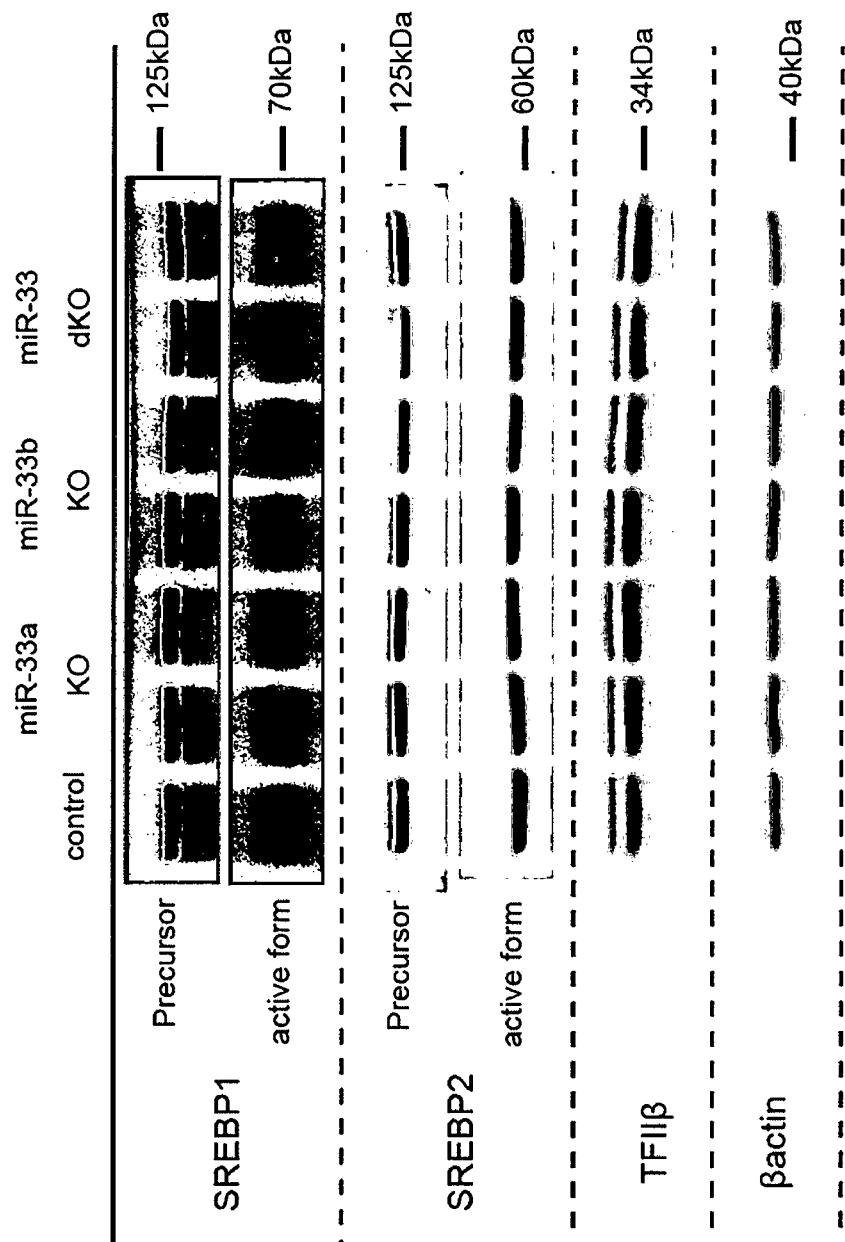


图 2 — 4

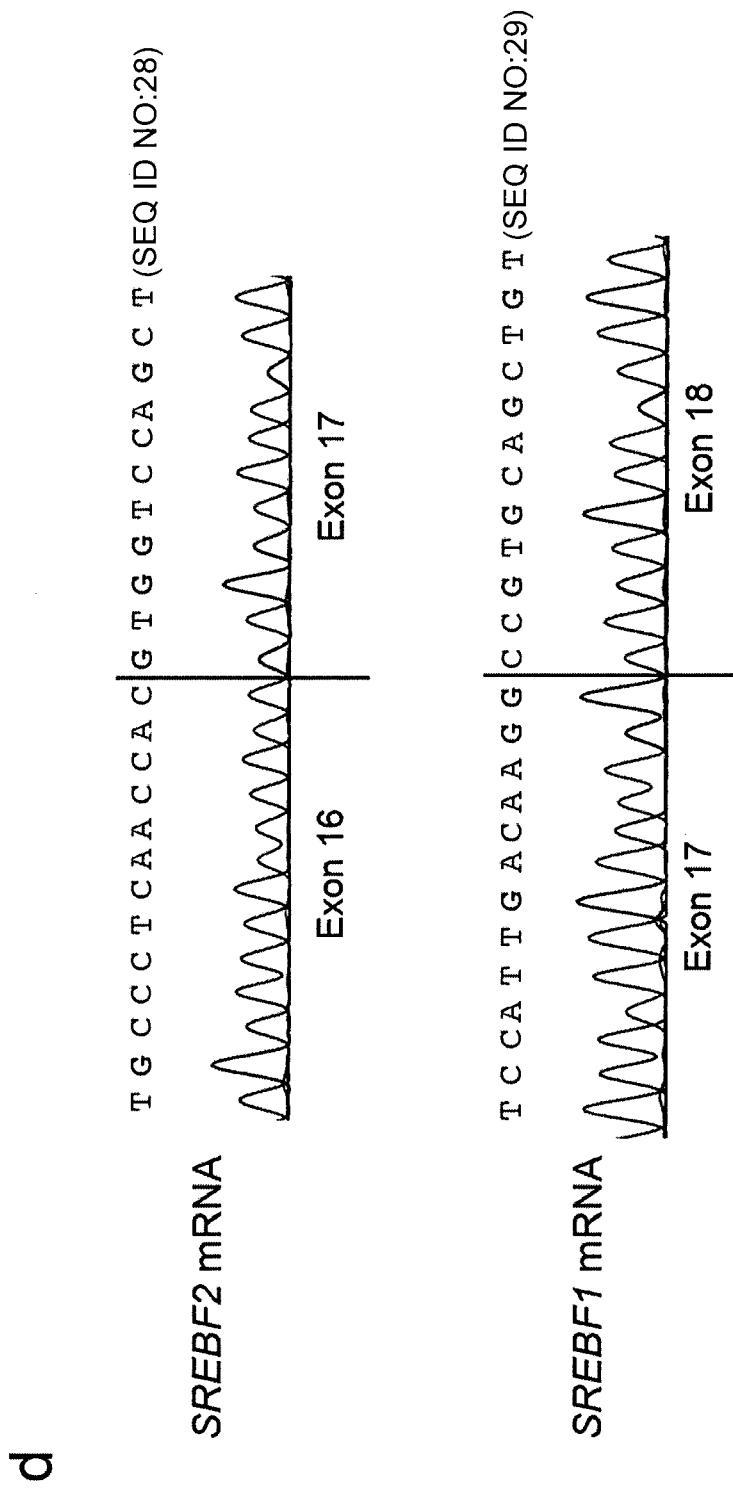


図3-1

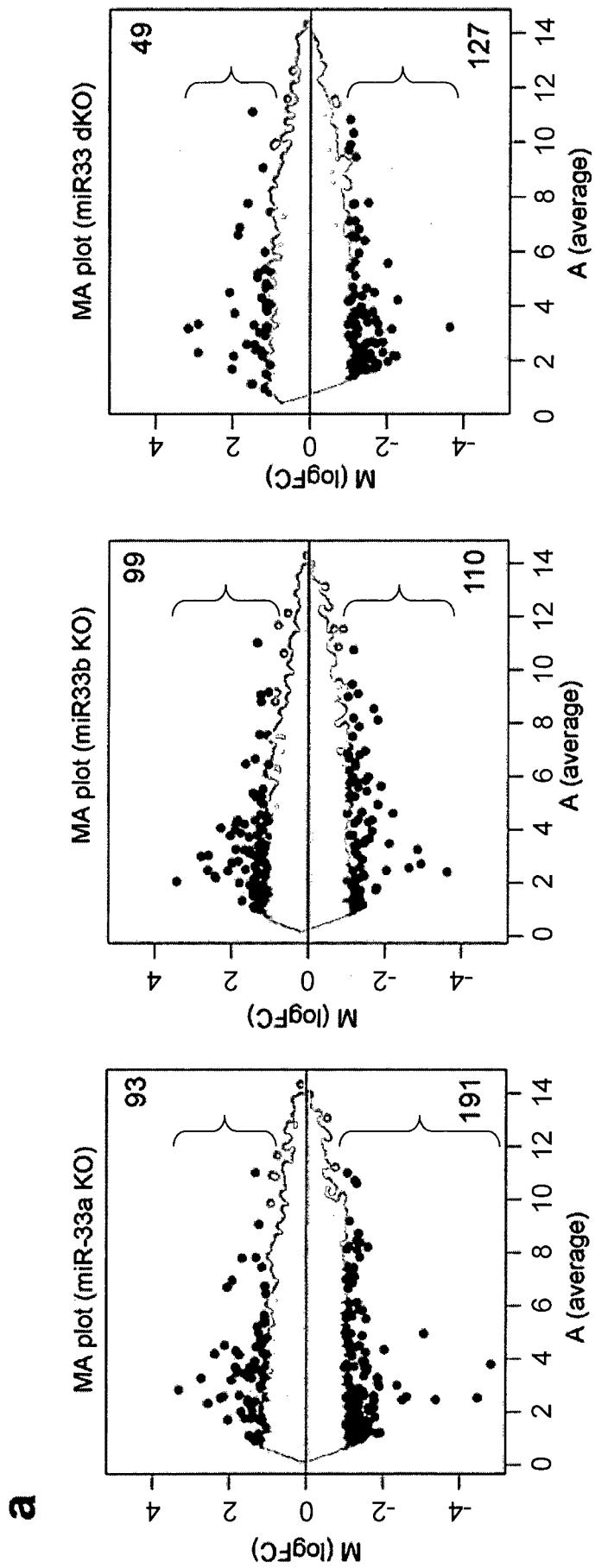


図 3 — 2

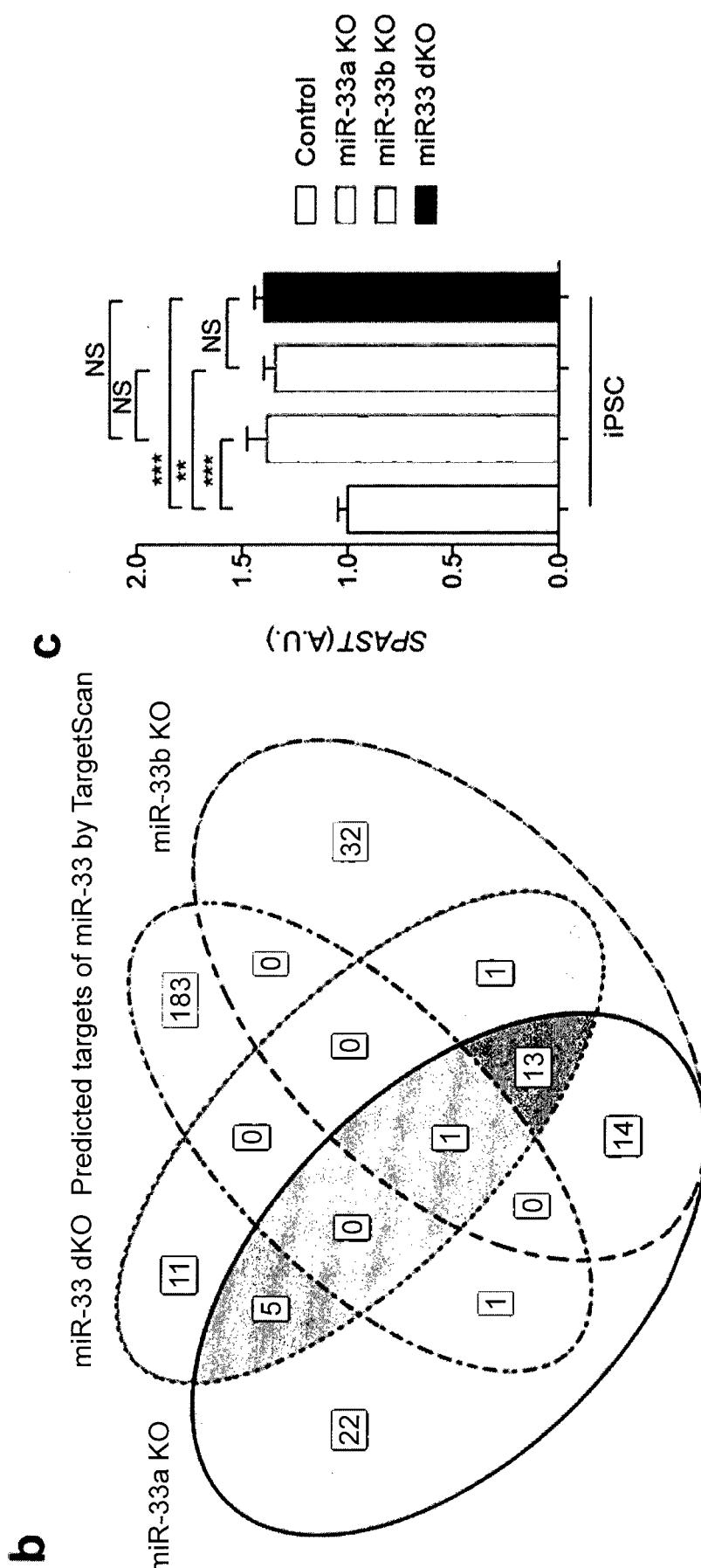


図 3－3

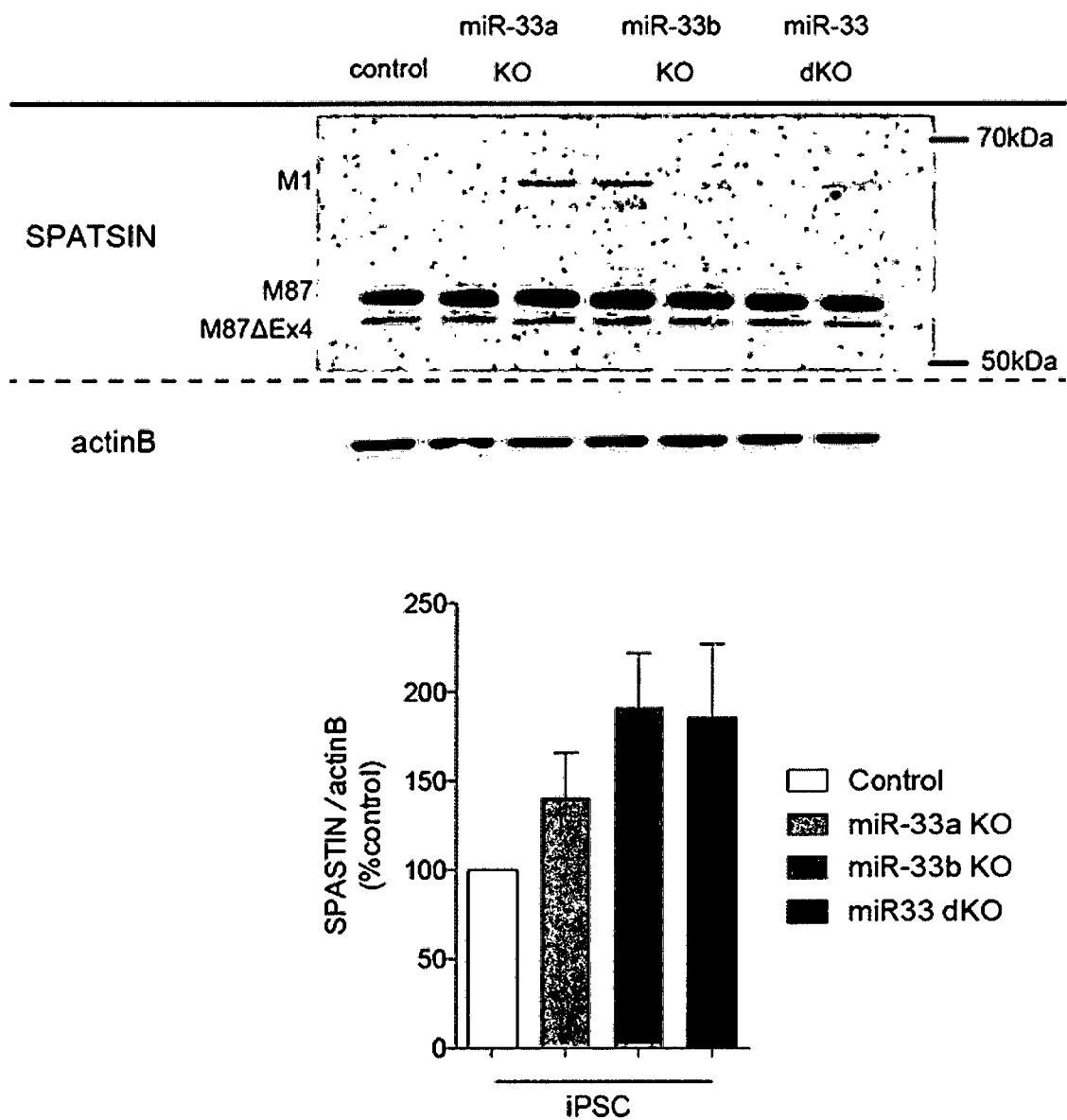
d

図 3－4**e**

Human	A-AAAC-AGACUUAAAC-AAAAUUA <u>UACAAUGCAA</u> UUGUAAUU (SEQ ID NO:30)
Chimpanzee	A-AAAC-AAACUUAAAC-AAAAUUA <u>UACAAUGCAA</u> UUGGAAUU (SEQ ID NO:31)
Rhesus	A-AAAC-AAACUUAAAC-AAAAUUA <u>UACAAUGCAA</u> UAGAAUU (SEQ ID NO:32)
Dog	A-AAAC-AAA <u>UUUAAA</u> -AAAAUUA <u>UACAAUGCAA</u> UUGGAGUA (SEQ ID NO:33)
Cow	A-AAA <u>UAAA</u> UAAA-AAA <u>GUAUACAAUGCAA</u> UUGGAAUA (SEQ ID NO:34)
Mouse	A-AGAC-AGACC <u>UAAA</u> -AAAAU <u>AUGCAAUAUGAAUGGAA</u> -- (SEQ ID NO:35) *****

图 3 — 5

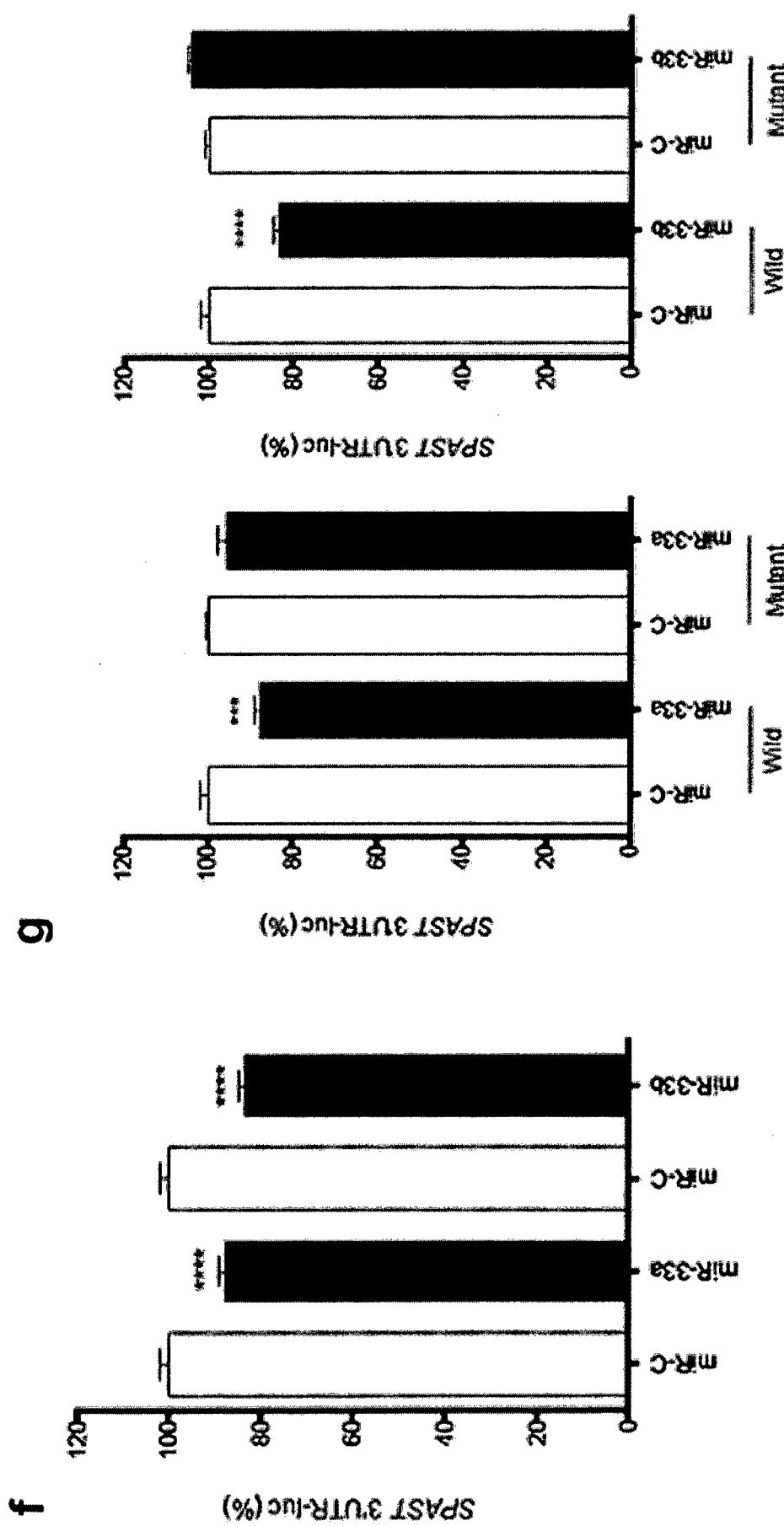
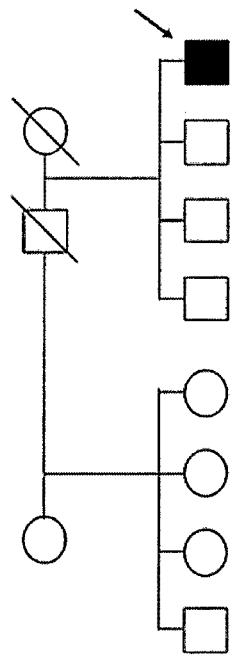


図 4-1

a



b

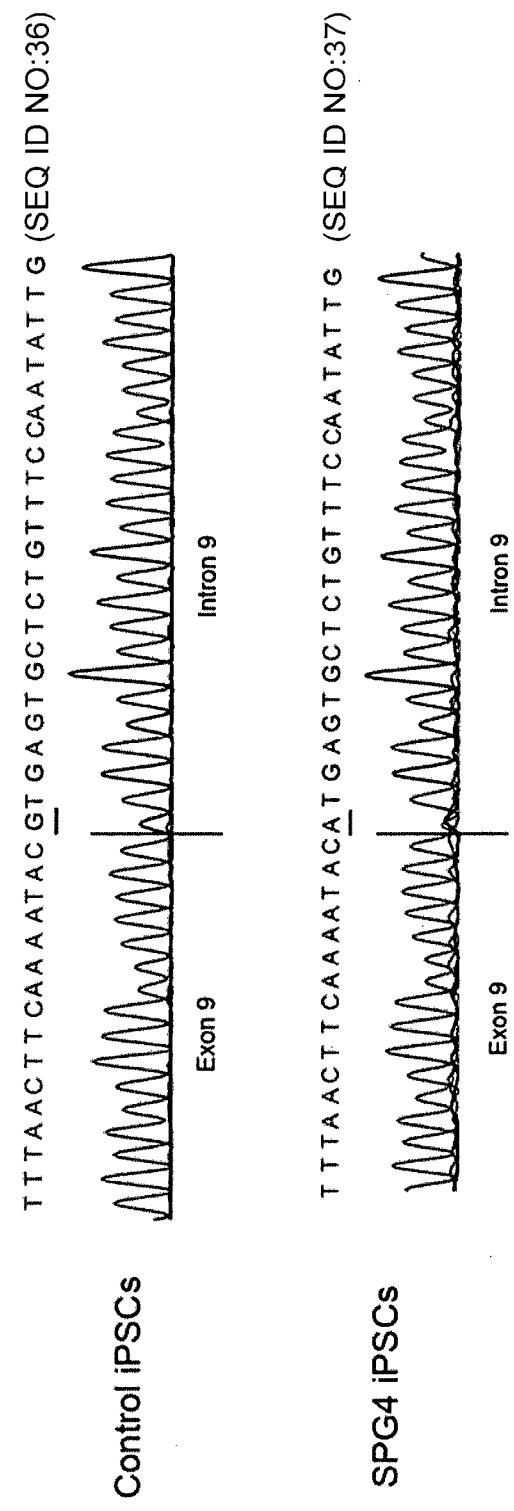


図 4-2

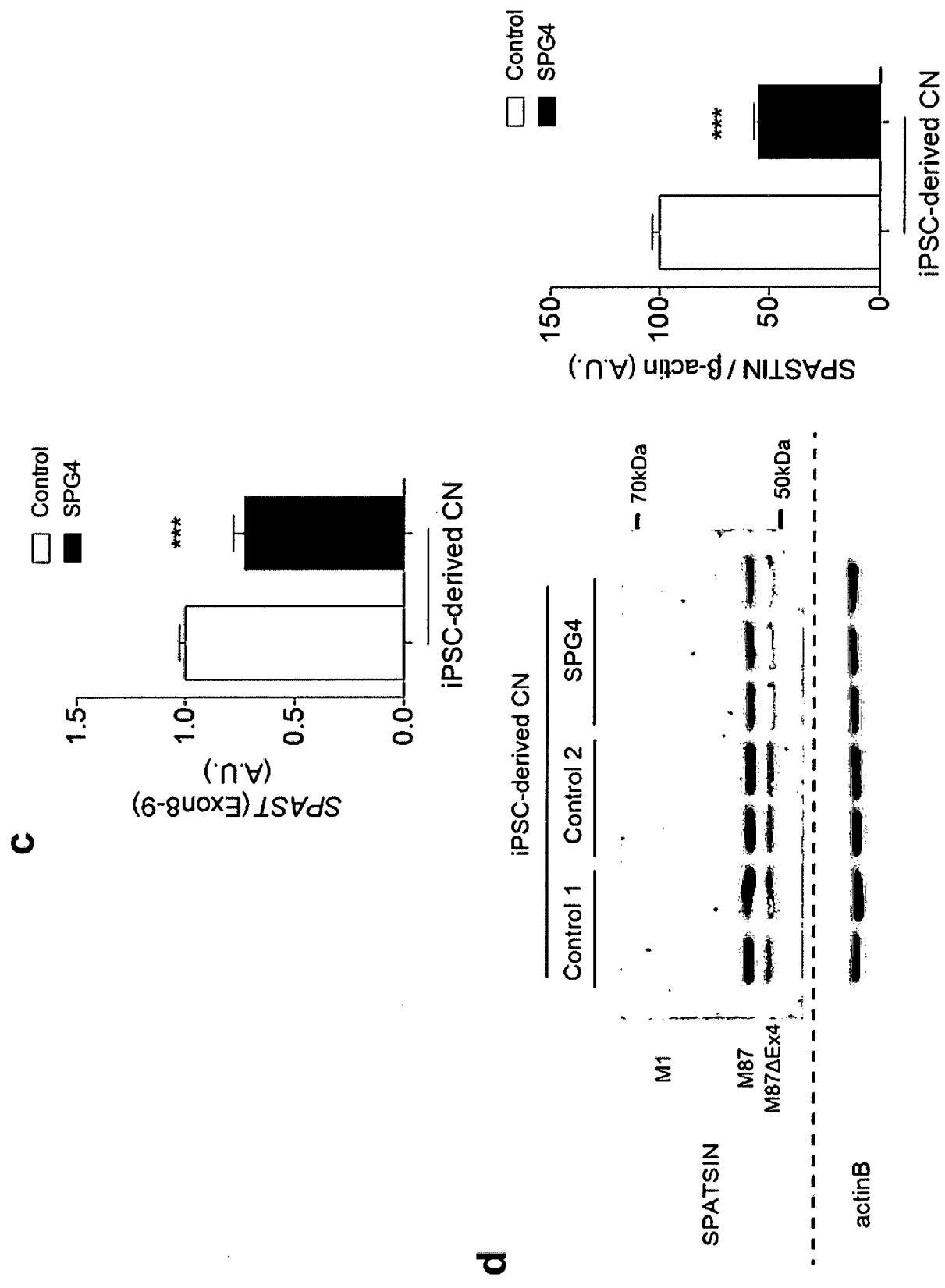
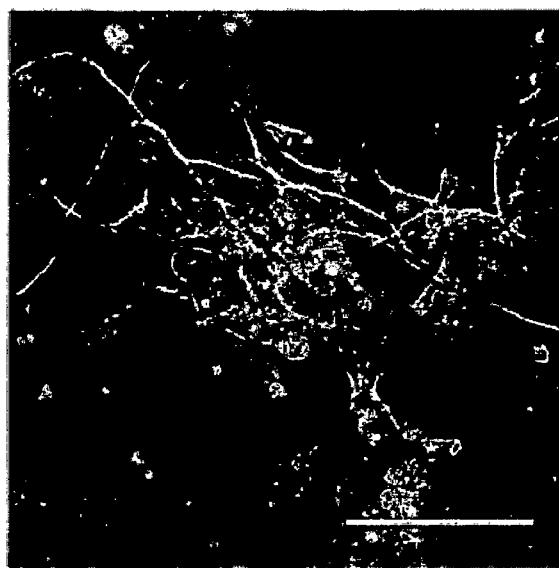


図 4-3

e

Control (CN)



SPG4-derived CN

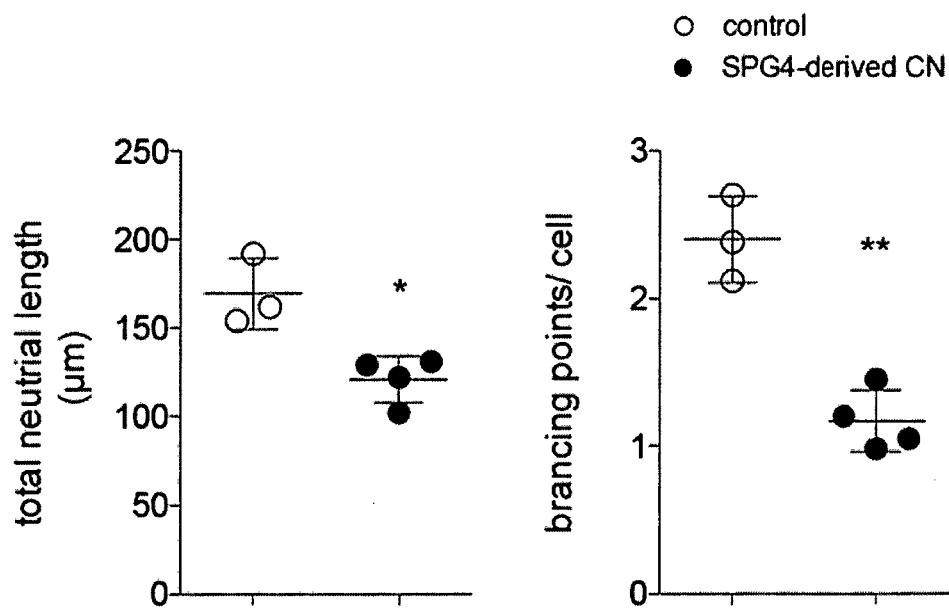
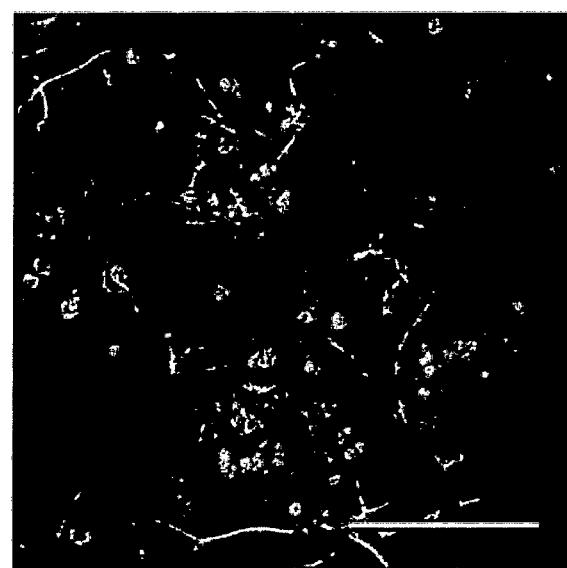


図 5

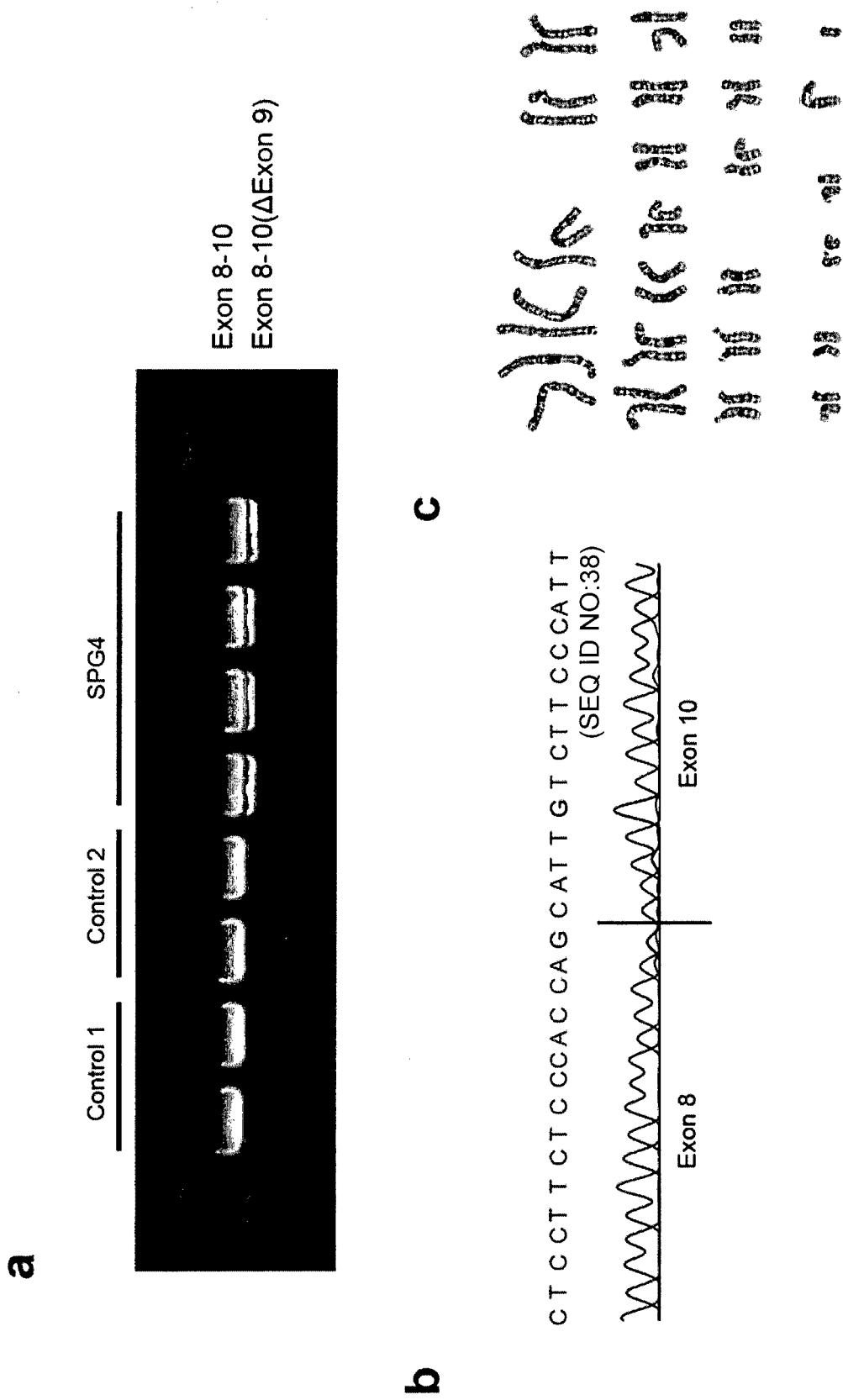
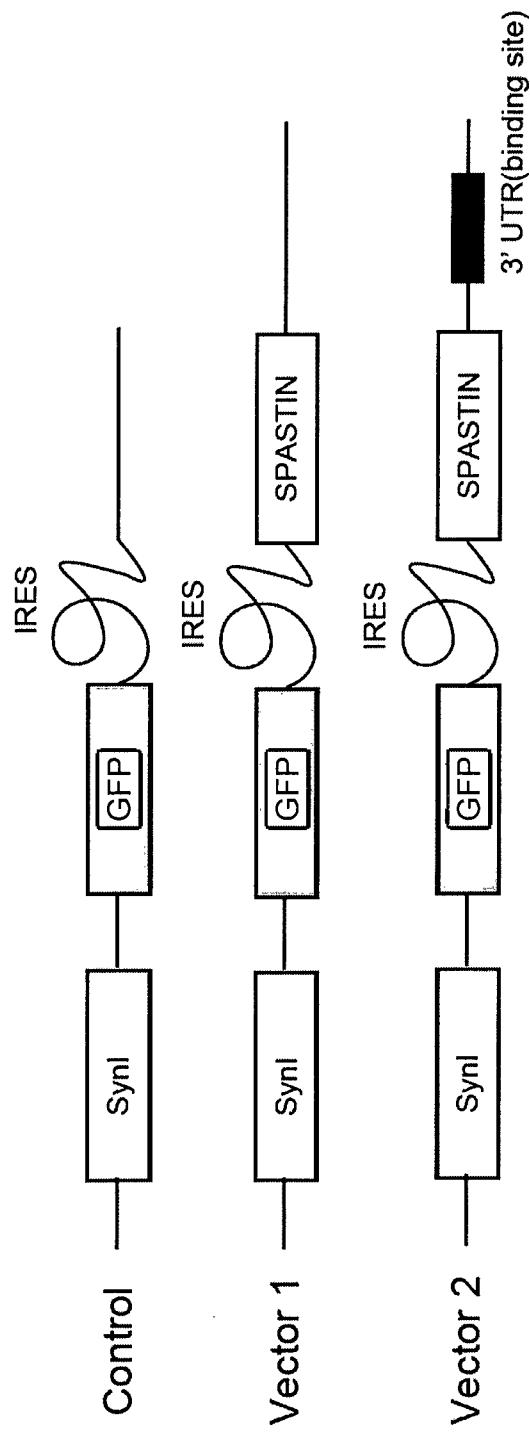


図 6
a



b

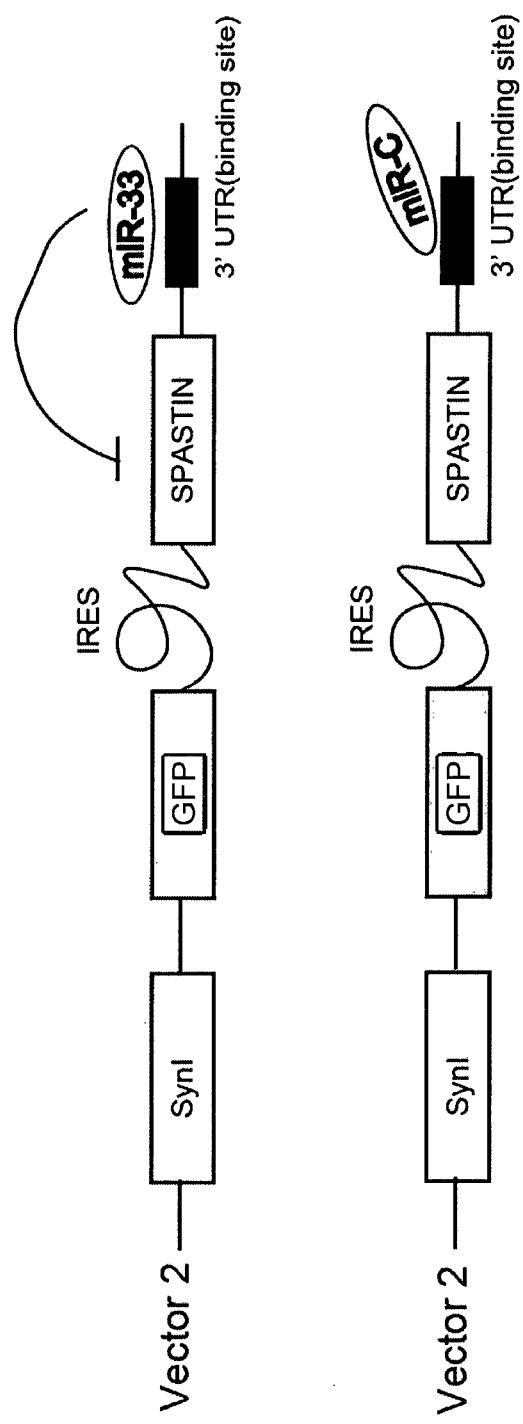


図 7-1

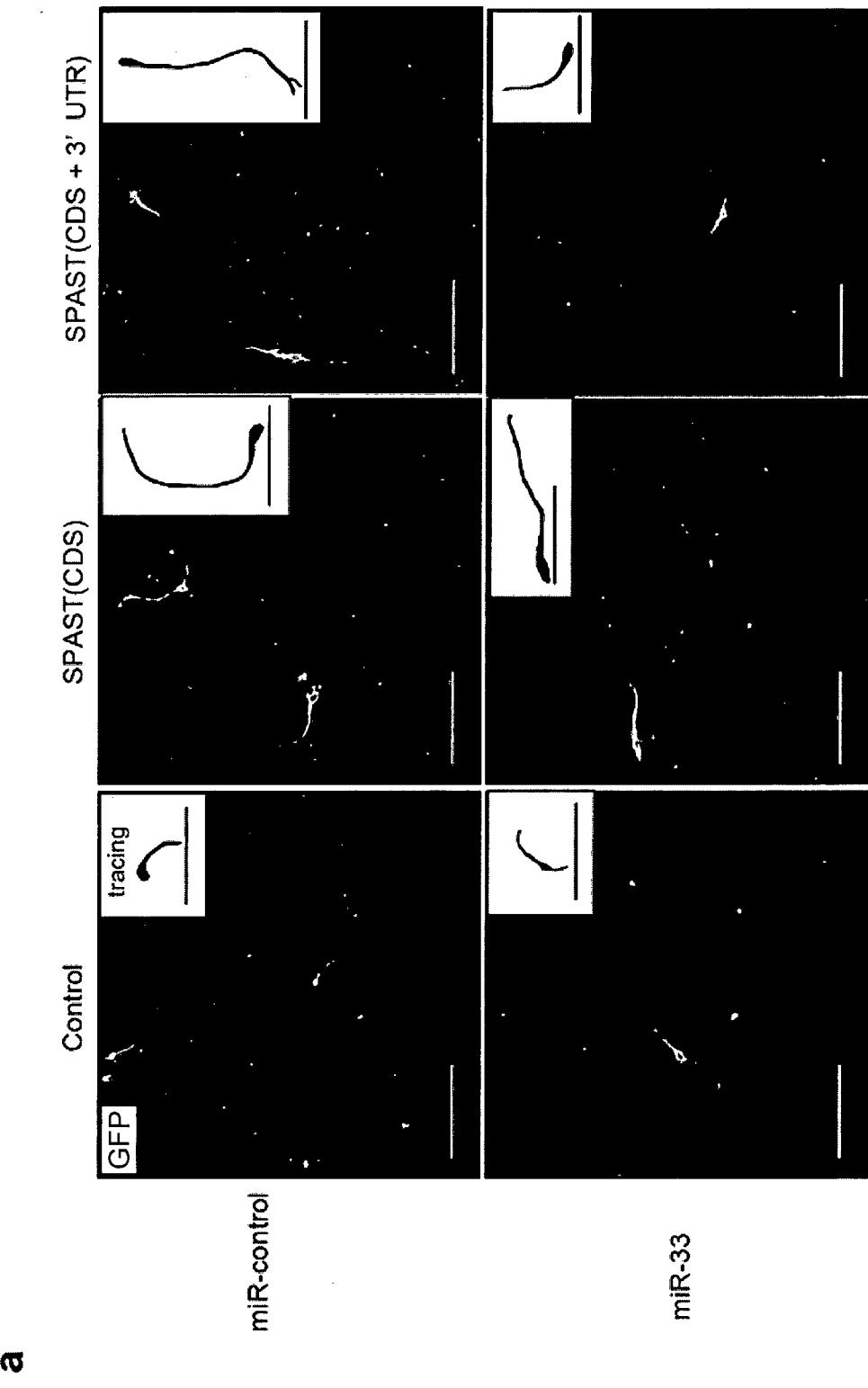


図 7-2

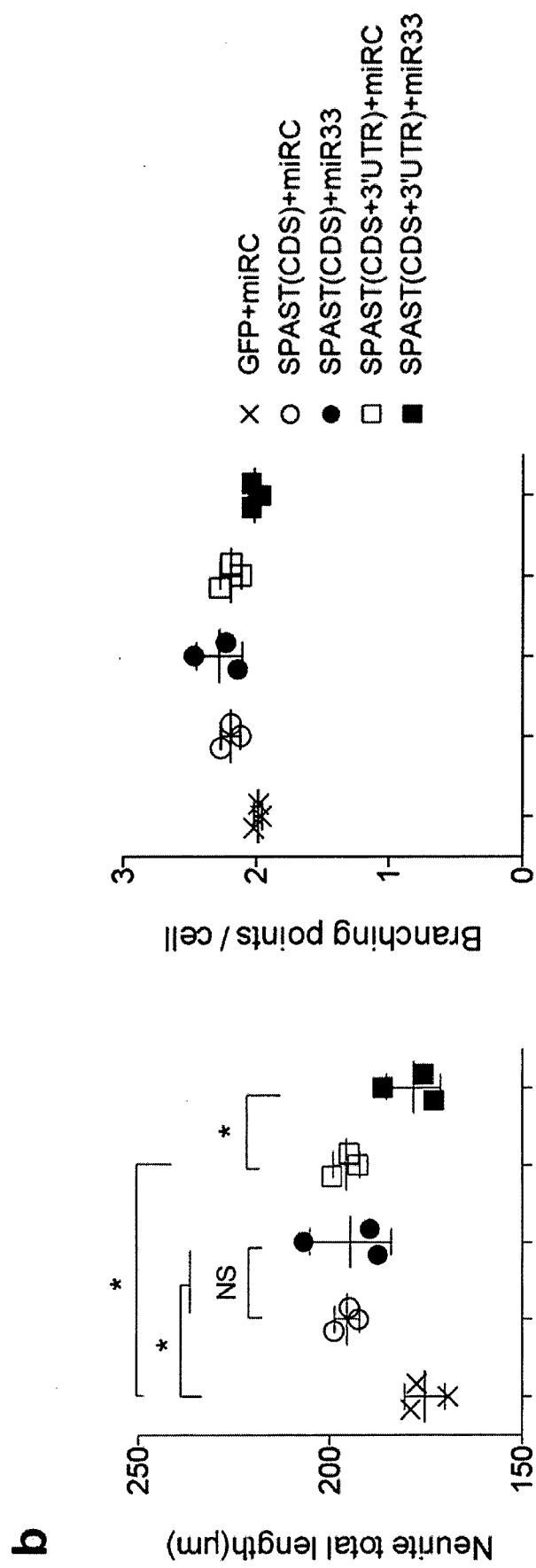


图 8

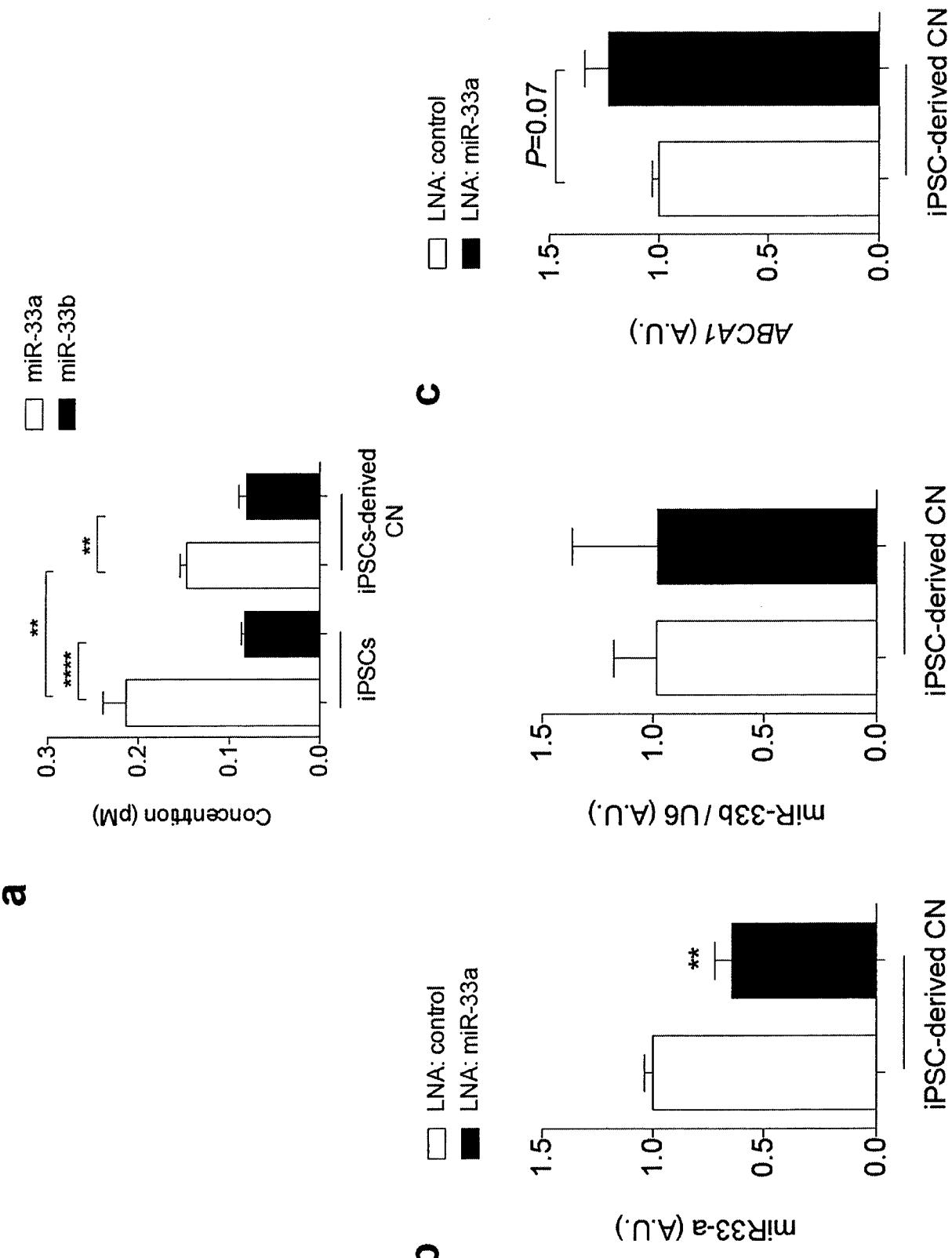


図 9

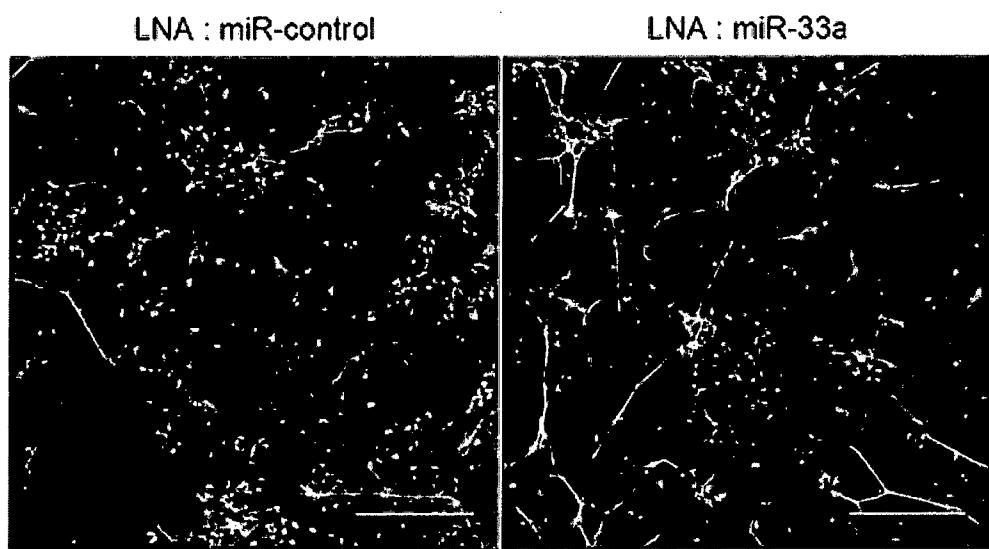
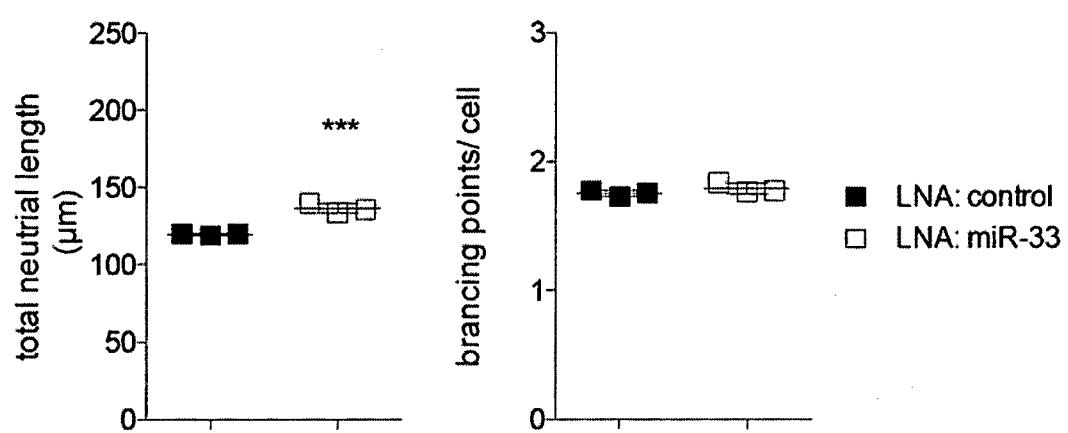
a**b**

図 1 O - 1

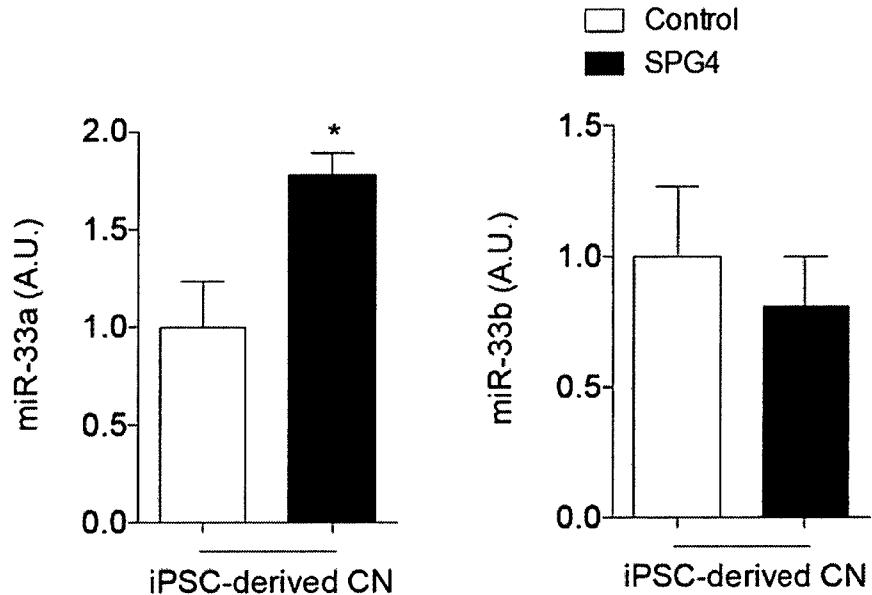
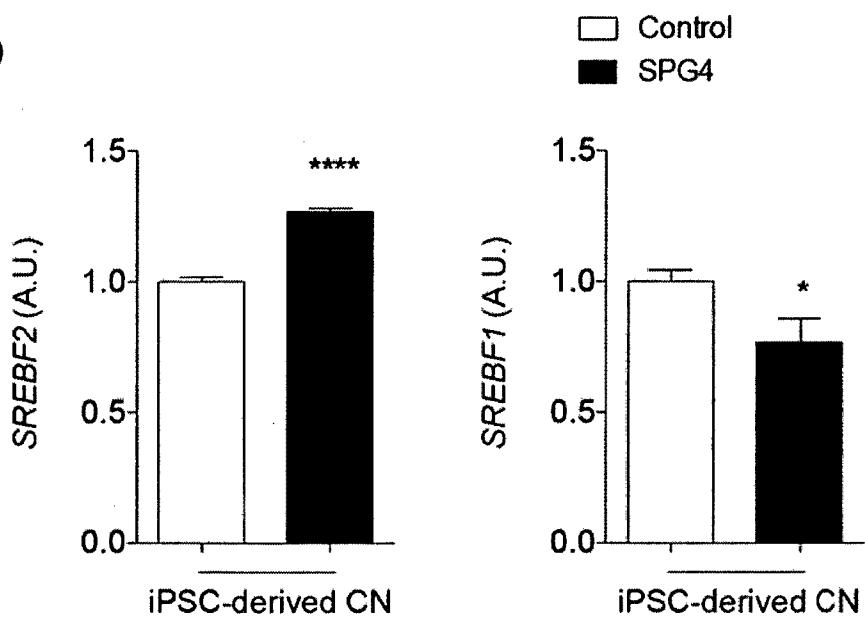
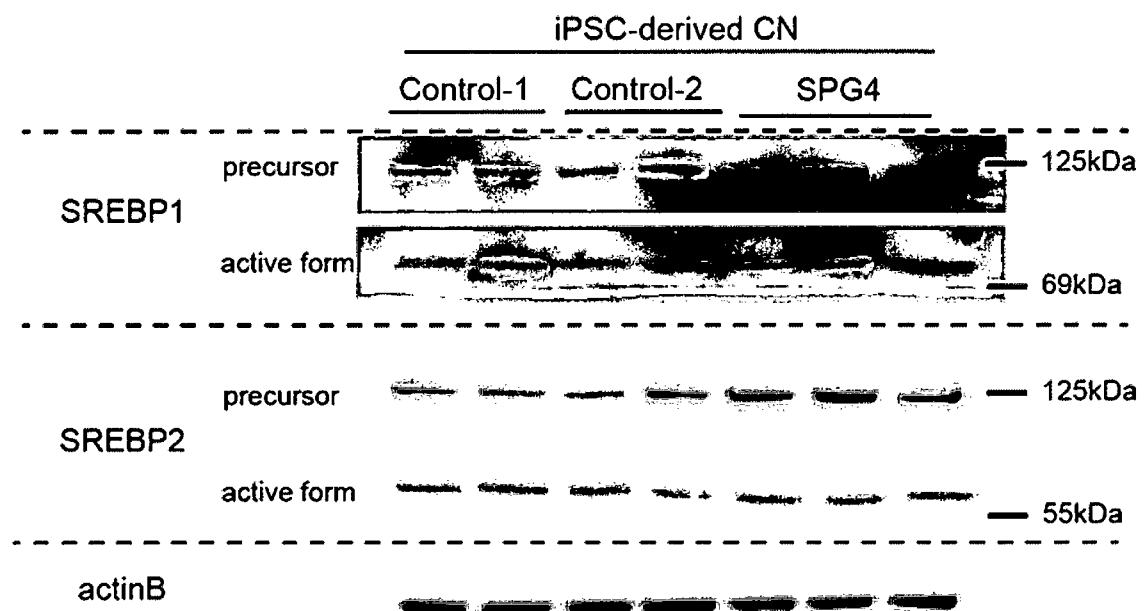
a**b**

図 10-2

C



d

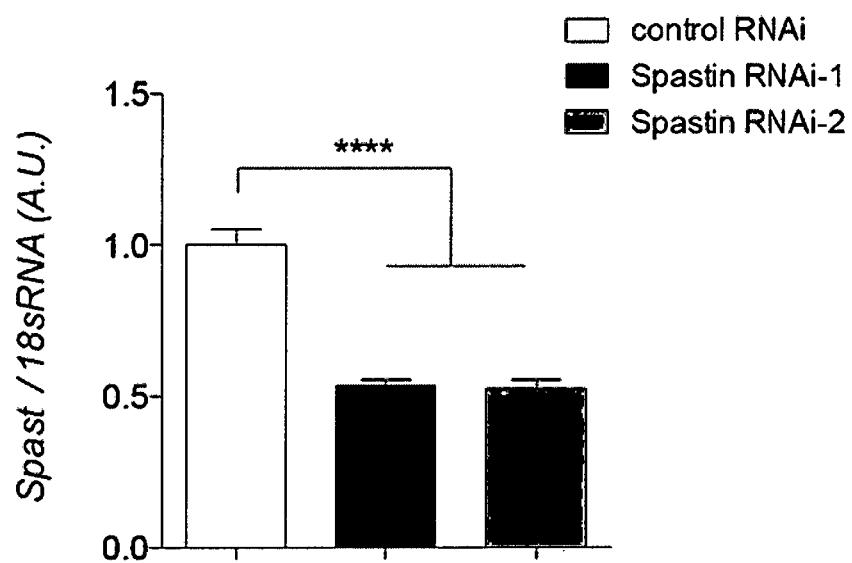
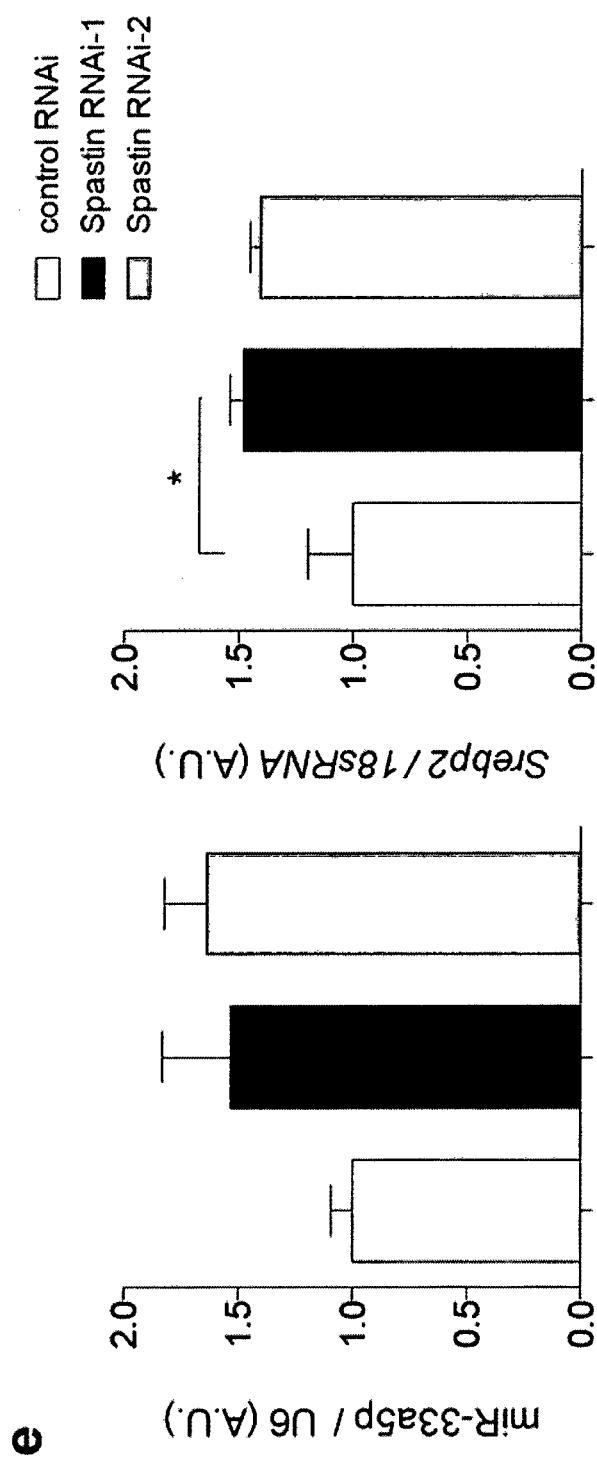


図 10-3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/025759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K45/00 (2006.01) i, A61K31/7088 (2006.01) i, A61K48/00 (2006.01) i, A61P25/00 (2006.01) i

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)

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7088, A61K48/00, A61P25/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922–1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971–2019
Registered utility model specifications of Japan	1996–2019
Published registered utility model applications of Japan	1994–2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2012/027704 A1 (NEW YORK UNIVERSITY) 01 March 2012, claims 1–23, page 20, paragraph [0004] to page 22, paragraph [0003], examples 1–15 & US 2013/0150431 A1 & EP 2609199 A1	1, 4–7 2–3
X A	WO 2013/111081 A1 (BAR-ILAN UNIVERSITY) 01 August 2013, paragraphs [0047]–[0062], fig. 6 & US 2015/0018405 A1	1–2, 4–7 3
P, X	NAKAZEKI, F. et al., "MiR-33a is a therapeutic target in SPG4-related hereditary spastic paraplegia human neurons", Clinical Science, February 2019, vol. 133, pp. 583–595, in particular, abstract, ISSN 0143-5221	1–7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 August 2019 (09.08.2019)

Date of mailing of the international search report
20 August 2019 (20.08.2019)

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

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7088, A61K48/00, A61P25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2012/027704 A1 (NEW YORK UNIVERSITY) 2012.03.01,	1, 4-7
A	Claims 1-23, p. 20 第4段落-p. 22 第3段, Examples 1-15 & US 2013/0150431 A1 & EP 2609199 A1	2-3
X	WO 2013/111081 A1 (BAR-ILAN UNIVERSITY) 2013.08.01,	1-2, 4-7
A	[0047]-[0062], Figure 6 & US 2015/0018405 A1	3

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 09.08.2019	国際調査報告の発送日 20.08.2019	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 高橋 樹理	4C 4498 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	NAKAZEKI, F. et al., MiR-33a is a therapeutic target in SPG4-related hereditary spastic paraplegia human neurons, Clinical Science, 2019. 02, Vol. 133, p. 583-595, 特に Abstract, ISSN 0143-5221	1-7