

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-521401
(P2024-521401A)

(43)公表日 令和6年5月31日(2024.5.31)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全161頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-575711(P2023-575711)		(71)出願人	523142272	
(86)(22)出願日	令和4年6月9日(2022.6.9)			サニープルック リサーチ インスティチュート	
(85)翻訳文提出日	令和6年2月5日(2024.2.5)			カナダ国, オンタリオ州 エム4エヌ 3	
(86)国際出願番号	PCT/CA2022/050923			エム5, トロント, 2 0 7 5 ベイビュー	
(87)国際公開番号	WO2022/256933			アベニュー	
(87)国際公開日	令和4年12月15日(2022.12.15)		(71)出願人	518353957	
(31)優先権主張番号	63/208,627			ザ ガバニング カウンシル オブ ザ ユニバーシティ オブ トロント	
(32)優先日	令和3年6月9日(2021.6.9)			カナダ国, オンタリオ州 エム5ジー 1	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			エル5, トロント, 1 0 0 カレッジ ストリート	
(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, 最終頁に続く		(74)代理人	100114775	
				弁理士 高岡 亮一	
			(74)代理人	100121511	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 神経細胞リプログラミングのための方法及び組成物

(57)【要約】

本出願は、対応する野生型bHLH 転写因子に見出されプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼの1つ以上のリン酸受容体部位の変異体を単独で、またはHLHドメインの保存されたPKA部位の変異体と共に含み、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼ及びPKAによるリン酸化の減少を示す、変異型ベシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子を提供する。また、前記変異体bHLH転写因子をコードする核酸、及び前記コード核酸を含むベクターも提供する。前記変異型bHLH転写因子または前記変異型bHLH転写因子をコードする核酸を治療目的に使用することにより、抑制環境下でもグリア細胞の神経細胞系統変換を効率よく誘導することができ、神経変性疾患及び障害の予防ならびに治療、ならびにCNS損傷の治療に有用である。更に、グリア細胞の神経細胞系統変換のためのZBTB18転写因子または前記ZBTB18転写因子をコードする核酸の使用が提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変異型ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子であって、前記変異型 bHLH 転写因子は、対応する野生型 bHLH 転写因子中に見出されるプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼの 1 つ以上のリン酸受容体部位の変異体を含み、前記変異型 bHLH 転写因子は、前記対応する野生型 bHLH 転写因子よりもプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼによるリン酸化からの機能阻害の減少を示す、前記変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 2】

前記対応する野生型 bHLH 転写因子中に見出されるプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼの 2 つ以上、3 つ以上、または 4 つ以上のリン酸受容体部位の変異体を含む、請求項 1 に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 3】

前記対応する野生型 bHLH 転写因子中に見出されるプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼのすべてのリン酸受容体部位の変異体を含む、請求項 2 に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 4】

プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼのリン酸受容部位の各変異体は、前記リン酸受容部位内のセリンまたはスレオニンを、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、D-セリン、D-スレオニン、D-アラニン、D-グリシン、D-バリン、D-ロイシン及び D-イソロイシンからなる群から選択される別のアミノ酸による置換を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 5】

前記変異型 bHLH 転写因子は、Neurog2、Ascl1 及び Neurod4 からなる群から選択される前神経 bHLH 転写因子の変異体である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 6】

a) 配列番号 1 または配列番号 2 に対して少なくとも 80%、85%、90%、95% または 97% 同一である、

b) 配列番号 13 または配列番号 14 に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% または 97% 同一である、または

c) 配列番号 19 または配列番号 20 に対して少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95% または 97% 同一である、請求項 5 に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 7】

前記変異型 bHLH 転写因子は、ヒト Ascl1-SA5、マウス Ascl1-SA6、ヒト Ascl1-SA6、マウス Ascl1-SA7、ヒト Neurod4-SA4TA6、Neurod4-SA3TA4、ヒト Neurod4-SA5TA6、マウス Neurod4-SA4TA4、ヒト Neurog2-SA8TA1、マウス Neurog2-SA9TA1、ヒト Neurog2-SA8TA2、マウス Neurog2-SA9TA2 またはマウス Neurog2-SA9 である、請求項 6 に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 8】

前記変異型 bHLH 転写因子は、Neurod1 神経細胞分化転写因子の変異体である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 9】

配列番号 7 または配列番号 8 に対して少なくとも 80%、85%、90%、95% または 97% 同一である、請求項 8 に記載の変異型 bHLH 転写因子。

【請求項 10】

前記変異型 bHLH 転写因子は、ヒト Neurod1-SA6、マウス Neurod1

10

20

30

40

50

－ S A 6、Neuro d 1－ S A 7またはマウスNeuro d 1－ S A 7である、請求項 9 に記載の変異型 b H L H 転写因子。

【請求項 1 1】

前記対応する野生型 b H L H 転写因子のヘリックス・ループ・ヘリックスドメインにおける保存されたタンパク質キナーゼ A (P K A) 部位の変異体を更に含む、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の変異型 b H L H 転写因子。

【請求項 1 2】

前記保存された P K A 部位の変異体は、前記リン酸受容部位内のセリンまたはスレオニンを、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、D－セリン、D－スレオニン、D－アラニン、D－グリシン、D－バリン、D－ロイシン及びD－イソロイシンからなる群から選択される別のアミノ酸による置換を含む、請求項 1 1 に記載の変異型 b H L H 転写因子。

10

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の変異型 b H L H をコードする核酸。

【請求項 1 4】

前記変異型 b H L H 転写因子コード配列は、グリア細胞選択的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 3 に記載の核酸。

【請求項 1 5】

前記グリア細胞選択的プロモーターは、グリア原線維酸性タンパク質 (G F A P) プロモーターである、請求項 1 4 に記載の核酸。

20

【請求項 1 6】

請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の核酸を含むベクターであって、前記ベクターは非ウイルスベクターまたはウイルスベクターである、前記ベクター。

【請求項 1 7】

アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである、請求項 1 6 に記載のベクター。

【請求項 1 8】

前記 A A V ベクターは、A A V 2 / 5 ベクター、A A V 2 / 8 ベクターまたは A A V 9 ベクターである、請求項 1 7 に記載のベクター。

【請求項 1 9】

前記変異型 b H L H 転写因子をコードする核酸は、グリア細胞選択的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載のベクター。

30

【請求項 2 0】

前記ベクターは、第 2 の転写因子をコードする核酸配列を更に含む、請求項 1 6 ～ 1 9 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 2 1】

請求項 1 6 ～ 2 0 のいずれか一項記載のベクターを含む、ウイルス粒子。

【請求項 2 2】

請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の核酸、または請求項 1 6 ～ 2 0 のいずれか一項に記載のベクター、または請求項 2 1 に記載のウイルス粒子を含む、宿主細胞。

40

【請求項 2 3】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の変異型 b H L H 転写因子、請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の核酸、または請求項 1 6 ～ 2 0 のいずれか一項に記載のベクター、及び薬学的に許容される担体もしくは賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記組成物は、直接頭蓋内投与、頭蓋内注射、脳室内注射、大槽内注射、くも膜下腔内注射、静脈内注射、腹腔内注射、動脈内、ナノ粒子を介した送達、及び／または集束超音波を用いた投与のために配合される、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

グリア細胞の神経細胞形質転換を必要とする対象における、前記グリア細胞の神経細胞

50

形質転換のための、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の変異型 bHLH 転写因子、請求項 13～15 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 16～20 のいずれか一項に記載のベクター、または請求項 23 または 24 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 26】

前記対象における神経変性疾患もしくは障害の予防もしくは治療のため、または CNS もしくは脳卒中などの脳損傷の治療のための請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

前記神経変性疾患または障害は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、ダウン症候群、拳闘家認知症、多系統萎縮症、前頭葉側頭葉型認知症、進行性核上性麻痺、プリオン病、ハンチントン病、運動ニューロン疾患、及びレビー小体病からなる群から選択される、請求項 26 に記載の使用。

【請求項 28】

対象におけるグリア細胞の神経細胞形質転換のための方法であって、前記方法は、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の変異型 bHLH 転写因子、請求項 13～15 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 16～20 のいずれか一項に記載のベクター、または請求項 23 または 24 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 29】

対象における神経変性疾患もしくは障害の予防もしくは治療のための、または CNS もしくは脳損傷の治療の方法であって、前記方法は、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の変異型 bHLH 転写因子、請求項 13～15 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 16～20 のいずれか一項に記載のベクター、または請求項 23 または 24 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 30】

グリア細胞の神経細胞形質転換を必要とする対象における、前記グリア細胞の神経細胞形質転換のための ZBTB18 転写因子、または前記 ZBTB18 転写因子をコードする核酸の使用。

【請求項 31】

前記 ZBTB18 転写因子は、配列番号 36、38、40、42、44、46、48、50、52 または 54 のうちの 1 つに対して少なくとも 80%、85%、90%、95% または 97% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

対象におけるグリア細胞の神経細胞形質転換のための方法であって、前記方法は、ZBTB18 転写因子、または前記 ZBTB18 転写因子をコードする核酸を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 33】

配列番号 36、38、40、42、44、46、48、50、52 または 54 のうちの 1 つに対して少なくとも 80%、85%、90%、95% または 97% 同一であるアミノ酸配列を含む ZBTB18 転写因子をコードする核酸を含むベクターであって、前記ベクターは、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターである、前記ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2021 年 6 月 9 日出願の米国特許出願第 63/208,627 号の優先権を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、神経細胞リプログラミングの分野に関する。より詳細には、本出願は、中枢神経系の疾患、障害または損傷を治療するための神経細胞リプログラミングに使用するための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

概要

脊椎動物の中樞神経系（CNS）は、高次の認知機能ならびに運動処理及び感覚処理を可能にするために、機能的な脳領域を複雑に構成かつ接続する神経細胞及びマクログリア（アストロサイト及びオリゴデンドロサイト）の多様な細胞型で構成されている。転写因子のベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス（bHLH）ファミリーは、胚発生中の神経細胞の運命特定及び分化の不可欠な調節因子である。特に、前神経及び神経細胞の分化bHLH遺伝子は、胚脳での神経細胞の分化を促進し、いくつかの細胞の状況では、オリゴデンドロサイトの運命特定を誘導することもできる。

【0004】

前神経活動を伴う神経特異的bHLH遺伝子としては、Neurog1、Neurog2、Ascl1、Neurod4、Atoh1及びAtoh7が挙げられる。これらのbHLH遺伝子は、転写カスケードにおいて作用し、神経細胞の分化を制御する後の発生段階で機能する他のbHLH遺伝子を活性化する。具体的には、いくつかのbHLH遺伝子は発現され、神経系統の発生において、関与した神経／グリア前駆細胞または有糸分裂後の神経及びグリア細胞のいずれかにおいて、後で機能する。これらの中には、神経細胞及びグリア細胞の分化と成熟に重要な役割を果たすbHLH遺伝子があり、NeuroD（Neurod1、Neurod2／Ndrf、Neurod6／Math2）、Nsc1（Nhlh1／Nsc1、Nhlh2／Nsc2）及びOlig（Olig1、Olig2、Olig3、Bhlhe22）ファミリーのメンバーを含む。しかしながら、bHLH遺伝子は、すべての細胞状況で活性であるわけではなく、環境シグナルによって阻害される可能性がある。

【0005】

最近では、bHLH神経細胞分化（Neurod1）及び前神経（Neurog2、Ascl1）遺伝子が、アストロサイトから神経細胞へのin vitro及びin vivoでの変換を促進するために使用されている。このようなbHLH神経細胞分化を発現する発現ベクターと前神経遺伝子を用いた神経細胞変換の遺伝子治療法は、脳損傷及びハンチントン病などの神経学的疾患の治療に提案されている（例えば、米国特許公開第2019／0117797号、同第2020／0405801号及び同第2021／0032300号を参照）。研究者らはまた、Neurod1リプログラミングが、脳卒中モデルにおける機能的回復を提供できることを示した（例えば、Livingston et al., 2020, BioRx, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.02.929091>を参照のこと）。これらの方法は、状態を治療するために損傷または疾患部位での健康な神経細胞の生成を標的とすることを意図している。

【0006】

神経細胞プログラミング／リプログラミングは、治療にとって有望なアプローチであるが、今日まで、リプログラミングの効率は低いことが多く、報告されている変換率は群によって大きく異なっている。これらのbHLH遺伝子のそれぞれの神経発生を促進する能力は、環境に大きく依存しており、神経細胞の変換効率は、存在する抑制機序に応じて、発達時点、脳領域及び罹患または損傷した脳において異なる。

【0007】

損傷を含む神経疾患及び障害の有効な治療が依然として必要とされている。

【0008】

上記の情報は、本発明に関連する可能性があるという出願人がみなす情報を周知させる目的で提供される。上述の情報のいずれも本発明に反する先行技術を構成することは必ずしも意図しておらず、解釈されるべきでもない。

【発明の概要】

【0009】

本出願の目的は、神経変性疾患もしくは障害の治療もしくは予防、または神経損傷（例

10

20

30

40

50

えば、脳)の治療のための組成物、及び神経細胞リプログラミングにおける前記組成物の使用方法を提供することである。

【0010】

本出願の一態様によれば、変異型ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子であって、変異型 bHLH 転写因子は、対応する野生型 bHLH 転写因子中に見出されるプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼの1つ以上のリン酸受容体部位の変異を含み、変異型 bHLH 転写因子は、対応する野生型 bHLH 転写因子よりもプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼによるリン酸化からの機能阻害の減少を示す、前記変異型 bHLH 転写因子が提供される。いくつかの実施形態では、変異体は、対応する野生型 bHLH 転写因子中に見出されるプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼの2つ以上、3つ以上、または4つ以上のリン酸受容体部位の変異体を含む。あるいは、対応する野生型 bHLH 転写因子中に見出されるプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼのすべてのリン酸受容体部位は、変異している。いくつかの実施形態では、進化的に保存されかつ抑制性オン・オフスイッチである、タンパク質キナーゼ A (PKA) リン酸化の標的である保存された HLH ドメイン中の付加的保存されたセリンまたはスレオニン残基はまた、変異している。

10

【0011】

いくつかの実施形態によれば、変異型 bHLH 転写因子は、例えば、対象への投与に適した単離及び／または精製された形態にある。

【0012】

いくつかの実施形態によれば、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼ及び／または PKA のリン受容部位の各変異体は、リン受容部位内のセリンまたはスレオニンを、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、D-セリン、D-スレオニン、D-アラニン、D-グリシン、D-バリン、D-ロイシン及び D-イソロイシンからなる群から選択される別のアミノ酸による置換を含む。

20

【0013】

一実施形態によれば、変異型 bHLH 転写因子は、Neurog2、Ascl1 及び Neurod4 からなる群から選択される前神経 bHLH 転写因子の変異体であり、これは、場合により、(a) 配列番号1もしくは配列番号2に対して少なくとも80%、85%、90%、95%もしくは97%同一であるか、(b) 配列番号13もしくは配列番号14に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは97%同一であるか、または(c) 配列番号19もしくは配列番号20に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは97%同一である。このような変異型 bHLH 転写因子の例は、ヒト ASCL1-SA5、マウス Ascl1-SA6、ヒト ASCL1-SA6 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う)、マウス Ascl1-SA7 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う)、ヒト NEUROD4-SA4TA6、マウス Neurod4-SA3TA4、ヒト NEUROD4-SA5TA6 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う)、マウス Neurod4-SA4TA4 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う)、ヒト NEUROG2-SA8TA1、マウス Neurog2-SA9、ヒト NEUROG2-SA8TA2 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う)、及びマウス Neurog2-SA9TA1 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う) である。

30

40

【0014】

別の実施形態によれば、変異型 bHLH 転写因子は、配列番号7または配列番号8に対して任意選択で少なくとも80%、85%、90%、95%または97%同一である Neurod1 神経細胞分化転写因子の変異体である。そのような変異型 bHLH 転写因子の例は、ヒト NEUROD1-SA6、マウス Neurod1-SA6、ヒト NEUROD1-SA7 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う)、及びマウス Neurod1-SA7 (任意選択で、追加の PKA 部位変異を伴う) である。

【0015】

50

本出願の別の態様によれば、本明細書に記載される変異型 b H L H 転写因子をコードする核酸であって、1つ以上の調節エレメントに作動可能に関連し得る、前記核酸が提供される。核酸は、ウイルス（例えば、A A V、レンチウイルスまたはレトロウイルスベクター）または非ウイルスベクターであり得る。

【0016】

別の態様によれば、本明細書に記載の変異型 b H L H 転写因子、または変異型 b H L H 転写因子をコードする核酸、及び薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物が提供される。組成物は、任意選択で、直接頭蓋内投与、頭蓋内注射、脳室内注射、大槽内注射、くも膜下腔内注射、静脈内注射、腹腔内注射、ナノ粒子を介した送達、細胞外小胞を介した送達、及び／または集束超音波を用いた投与のために配合される。

10

【0017】

別の態様によれば、本明細書に記載される変異型 b H L H 転写因子、または変異型 b H L H 転写因子をコードする核酸の、グリア細胞の神経細胞形質転換を必要とする対象における、グリア細胞の神経細胞形質転換のための使用が提供される。この使用は、神経変性疾患もしくは障害の予防もしくは治療、または対象における脳卒中などの脳損傷の治療に用いることができる。

【0018】

別の態様によれば、対象におけるグリア細胞の神経細胞形質転換のための方法であって、前記方法は、本明細書に記載される変異型 b H L H 転写因子もしくは変異型 b H L H 転写因子をコードする核酸、または変異型 b H L H 転写因子もしくはコード核酸を含む医薬組成物を対象に投与することを含む、前記方法が提供される。この方法は、対象における神経変性疾患または障害の予防または治療、または脳損傷などの C N S 損傷の治療に有用である。

20

【0019】

いくつかの実施形態によれば、神経変性疾患または障害は、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、アルツハイマー病（A D）、パーキンソン病（P D）、ダウン症候群、拳闘家認知症、多系統萎縮症、前頭葉側頭葉型認知症、進行性核上性麻痺、プリオン病、ハンチントン病、運動ニューロン疾患、及びレビー小体病からなる群から選択される。

【0020】

別の態様によれば、Z B T B 1 8 転写因子、または Z B T B 1 8 転写因子をコードする核酸の、グリア細胞の神経細胞形質転換を必要とする対象における、グリア細胞の神経細胞形質転換のための使用が提供される。いくつかの実施形態では、Z B T B 1 8 転写因子は、配列番号 3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 または 5 4 のうちの 1 つに対して少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % または 9 7 % 同一であるアミノ酸配列を有する。

30

【0021】

別の態様によれば、対象におけるグリア細胞の神経細胞形質転換のための方法であって、前記方法は、Z B T B 1 8 転写因子、または Z B T B 1 8 転写因子をコードする核酸を対象に投与することを含む、前記方法が提供される。

【0022】

別の態様によれば、配列番号 3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 または 5 4 のうちの 1 つに対して少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % または 9 7 % 同一であるアミノ酸配列を含む Z B T B 1 8 転写因子をコードする核酸を含むベクターであって、前記ベクターは、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターである、前記ベクターが提供される。

40

【0023】

別の態様によれば、本明細書に記載の Z B T B 1 8 転写因子、または Z B T B 1 8 転写因子をコードする核酸、及び薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物が提供される。組成物は、任意選択で、直接頭蓋内投与、頭蓋内注射、脳室内注射、大槽内注射、くも膜下腔内注射、静脈内注射、腹腔内注射、ナノ粒子を介した送達、細胞外小胞

50

を介した送達、及び／または集束超音波を用いた投与のために配合される。

【0024】

本明細書に記載される用途、ならびに他の態様及び更なる特徴のより良い理解のために、添付の図面に関連して使用される以下の説明が参照される。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】 *Asc l 1-t 2 a-i C re* 及び *Asc l 1-S A 6-t 2 a-i C re* ベクターで処置したマウスの脳切片を *t d t o m a t o* 及び *N e u N* 抗体で免疫染色した画像 (A)、及び定量化し (B)、*Asc l 1-S A 6* の発現は、皮質アストロサイトの神経細胞への変換の促進で *Asc l 1* より効率的だったことを示す (棒グラフは平均値+/-SEMを表す。p値: ns-有意差なし、<0.05*、<0.01**、<0.001***)。

10

【図2】 *AAV 5-G F A P-i C re* (対照) 及び *AAV 5-G F A P-A s c l 1-S A 6-t 2 a-i C re* の定位注射から16週齢の *h S O D^{G 9 3} A* トランスジェニック *A L S* マウスへの免疫染色ならびに定量的発現の結果を示し、*Asc l 1-S A 6* 発現による神経細胞系列変換の効率的な誘導を実証している (棒グラフは平均値+/-SEMを表す。p値: ns-有意差なし、<0.05*、<0.01**、<0.001***)。

【図3】 *AAV 5-G F A P-i C re* (対照) 及び *AAV 5-G F A P-A s c l 1-S A 6-t 2 a-i C re* による処置後のマウスから得られた体重の測定値を示すグラフであり、*Asc l 1-S A 6* における体重の維持率は、注射された対照動物と比較して良好であり (マン・ホイットニー検定、 $P=0.0238$)、22週間で有意であることを示す (棒グラフは平均値+/-SEMを表す。p値: ns-有意差なし、<0.05*、<0.01**、<0.001***)。

20

【図4】 *AAV 5-G F A P-i C re* (対照) 及び *AAV 5-G F A P-A s c l 1-S A 6-t 2 a-i C re* による処置後のマウスから得られた神経細胞密度の測定値を示すグラフであり、*Asc l 1-S A 6* における体重の神経細胞密度は、注射された対照動物と比較して増加傾向であることを示す (棒グラフは平均値+/-SEMを表す。p値: ns-有意差なし、<0.05*、<0.01**、<0.001***)。

【図5】 *A L S T D I*-神経スコアにより捕捉された神経スコア (NS) 測定値を示すグラフであり、対照の注射と比較して *Asc l 1-S A 6* による処置後のほうが動物の生存が長く、健康の改善 (疾患の進行と共にスコアが高くなる) を示す (棒グラフは平均値+/-SEMを表す。p値: ns-有意差なし、<0.05*、<0.01**、<0.001***)。

30

【図6】 20週間で有意であることを示す、*Asc l 1-S A 6* で処置した動物が、対照注射と比較して、運動行動の改善を実証するロータロッドの結果を示すグラフである (マン・ホイットニー検定、 $P=0.0952$; 棒グラフは平均値+/-SEMを表す。p値: ns-有意差なし、<0.05*、<0.01**、<0.001***)。

【図7】 $A\beta$ プラーク及びタウ過剰リン酸化の特徴付け。(a) 6F3Dで標識された脳血管及び実質部プラークの代表的な顕微鏡写真。(b) タウの様々なリン酸化部位が、非トランスジェニック (nTg) 対照と比較して、*T g F 3 4 4-A D* ラットにおいてレベルが上昇していることを示す、代表的な免疫プロット。(c) 穴掘り及びバーンズ迷路作業における顕著な欠陥を、*T g F 3 4 4-A D* と nTg ラット間で検出した。棒グラフは平均値+SEMを表す。* $p<0.05$ 。

40

【図8】 12か月齢の *T g F 3 4 4-A D* ラット及びその nTg 同腹仔の海馬における *N e u N* 免疫組織化学染色の定性分析を示し、*T g F 3 4 4-A D* ラットにおける *N e u N* + 神経細胞またはシナプスマーカーの数において、nTg 同腹仔と比較して差異は検出されなかった。

【図9】 *T g F 3 4 4-A D* ラットにおける *G A B A* 作動性神経脱落。ウェスタンプロットの分析 (Ai) により、*G A D 6 5/G A D 2* の増加が示された (Aii) が、*G A D*

50

67 / GAD1 タンパク質のレベルに変化は見られなかった (A i i i)。対照的に、細胞数 (B i) は、SST または NPY を発現する GAD67 + 細胞の喪失を示した。* $p < 0.05$ であり、棒グラフは平均値 $\pm$ SEM である。

【図10】ウェスタンブロットの分析 (A i) により、TGF344 AD を nTg ラットと比較した場合、 $\alpha-5$ (A i i i) 及び δ (A i v) の増加が示されたが、 $\alpha-1$ (A i i) GABA_A 受容体サブユニットは増加しなかった。棒グラフは平均値 $\pm$ SEM である。* $p < 0.05$ 。

【図11】nTg ラット (A) における HPC からの未加工 (黒色) 記録、及び選別した (変調指数の下限における θ 、変調指数の上限における高 γ) 記録の代表的なトレース。HPC における nTg (左) 及び TgAD (右) ラットの平均共調節マップ。 θ から高 γ への変調指数は、TgAD の HPC では、nTg コホート (B) での HPC に対して、 $p = 0.05$ で $78.9 \pm 0.8\%$ 低下した。2 か月齢の nTg ラットと TgAD ラットとの間の変調指数または共変調マップに差異はない。

【図12】12 か月齢の TGF344 AD ラット海馬の AAV2 / 8 - Asc11 - mCherry 形質導入を、GFAP 免疫反応性 (明灰色) と mCherry 発現 (暗灰色) との共局在によって示す。感染細胞はすべて、反応性アストロサイト形態を失った。

【図13】反応性アストロサイトの神経細胞分化転換を、海馬の門部内に GFAP + mCherry + 細胞がない NeuN + mCherry + 細胞の存在によって確認した。A は、対照ベクター AAV - mCherry、注入半球であり、B は、AAV - Asc11 - mCherry 注入半球であり、C は、AAV - Asc11 - mCherry 半球の倍率である。スケールバー = $250 \mu\text{m}$ (A & B)、 $100 \mu\text{m}$ (C)。

【図14】新しい神経細胞が GABA 作動性介在神経細胞に分化することを、海馬の門部に GAD67 + mCherry + 神経細胞が存在することによって確認した。Tg 及び nTg 対象 (黒矢印) の海馬での頭蓋内刺激に続いて、nTg ラットは、トランスフェクトされた mCherry とトランスフェクトされた Asc11 - mCherry との間に同等の応答を示した (A)。一方、TGF344 AD ラットは、mCherry よりも Asc11 - mCherry のトランスフェクトされた海馬で大きな応答を示した (B)。これらの結果は、新しい神経細胞の形質導入後の神経回路網機能の改善を示唆している。スケールバー = $100 \mu\text{m}$

【図15】Asc11、Asc11 - SA6 及び Neurod1 は、同側半球と比較して、海馬門の NeuN + 神経細胞の数を効果的に増加させる。

【図16】Asc11 - SA6 を使用した直接的系統リプログラミングの結果、GFAP + 細胞が減少する。(A) 海馬門の GFAP + 細胞の各免疫蛍光像 ($i: 10\times$ 、 $ii \sim vi: 20\times$)。(B) 1mm^2 当たりの GFAP + 細胞の定量化 ($n = 5$ 、二元配置 ANOVA、ボンフェローニ試験)。(C) 注入された半球と未処置ラットとの間での海馬門の GFAP + 細胞の倍率変化 ($n = 5$ 、一元配置 ANOVA、ボンフェローニ試験)。

【図17】未感染の半球 (左) と比較して、Asc11 - SA6 感染門 (右) での反応性アストロサイトを減少させる。反応性アストロサイトは、非反応性細胞との違いを説明するために丸で囲む。スケールバー: $100 \mu\text{m}$ 。

【図18】Asc11 - SA6 は、*in vivo* で海馬門におけるブランク被覆率を大幅に減少させる。(A) 未処置及び処置 TGF344 AD ラットで抗 MOAB2 抗体を使用した免疫蛍光画像 ($20\times$)。(B) 全面積のパーセントとしてのブランク被覆率の定量分析 ($n = 5$ 、二元配置 ANOVA、ボンフェローニ試験)。(C) 処置と未処置ラットの注入された半球間のブランク被覆率の倍率変化 ($n = 5$ 、一元配置 ANOVA、ボンフェローニ試験)。

【図19】Asc11 及び Asc11 - SA6 のウイルス送達により、*in vivo* でブランク関連ミクログリア及び平均ブランクサイズの有意な変化がもたらされた。(A) 海馬門の IBA-1 + 4G8 + 細胞の免疫蛍光 ($20\times$)。(B) IBA-1 + 4G8 + 細胞の定量分析 ($n = 5$ 、一元配置 ANOVA、ボンフェローニ試験)。(C) 抗 4G8 抗体を用いた平均ブランクサイズの定量分析 ($n = 5$ 、一元配置 ANOVA、ボンフェローニ試験)。

一二試験)。

【図20】A s c l 1 - S A 6のウイルス送達により、i n v i v oで活性化の減少及び分枝型I B A - 1 +細胞の増加がもたらされた。(A)海馬門のI B A +細胞の免疫蛍光(20×)。(B)(i)活性化細胞及び(ii)分枝型I B A - 1 +細胞の高倍率(C)海馬門の総I B A - 1 +細胞の定量分析(n=5、一元配置A N O V A、ボンフェローニ試験)。(D)全I B A - 1 +細胞のパーセントとしての活性化細胞及び分岐型細胞の定量分析(n=5、二元配置A N O V A、ボンフェローニ試験)。

【図21】A s c l 1 - S A 6の一過性発現は、i n v i v oで肥大型アストロサイトの減少及び生理的アストロサイトの増加をもたらす。(A)海馬門のG F A P +細胞の免疫蛍光(20×)。(B)(i)肥大型アストロサイト及び(ii)生理的アストロサイトの高倍率(C)総G F A P +細胞のパーセントとしての肥大型及び生理的アストロサイトの定量分析(n=5、二元配置A N O V A、ボンフェローニ試験)。

【図22】A s c l 1 - S A 6のウイルス送達の結果、反応性アストロサイトを示すマーカーの存在量が減少する。(A)海馬門のS 1 0 0 β +細胞の免疫蛍光(20×)。(B)S 1 0 0 β +細胞の定量分析(n=5、一元配置A N O V A、ボンフェローニ試験)。(C)C 3のi n s i t uハイブリダイゼーション及びA DのS 1 0 0 βの免疫蛍光染色L i d d e l l o wら、N a t u r e 5 4 1, 4 8 1 - 4 8 7 (2017)から変更。(D)海馬門のC細胞及びS 1 0 0 β陽性細胞の免疫蛍光の定量分析(n=5、一元配置A N O V A、ボンフェローニ試験)。

【図23】直接的系統リプログラミングにより、i n v i v oでの壊死性神経細胞の減少がもたらされる。(A)未処置及び処置T g F 3 4 4 A Dラットにおけるβ I I I - チューブリン+細胞ならびにR I P K 1 +細胞の免疫蛍光(20×)。(B)総β I I I - チューブリン+細胞のパーセントとしての壊死性神経細胞(β I I I - チューブリン+ R I P K 1 +)の定量分析(n=5、一元配置A N O V A、ボンフェローニ試験)。

【図24】直接的系統リプログラミングにより、i n v i v oでの介在神経細胞の増加がもたらされる。(A)未処置及びA s c l 1またはA s c l 1 - S A 6で処置したT g F 3 4 4 A DラットにおけるG A D 6 7 +細胞の定量化(B)処置及び未処置T g F 3 4 4 A Dラットの間で比較して、A s c l 1 - S A 6で処置したT g F 3 4 4 A Dラットの2つの半球間の介在神経細胞の倍率変化を、定量的に分析する(n=5、一元配置A N O V A、複数の群についての補正あり)。

【図25】直接的系統リプログラミングにより、認知機能の改善がもたらされる。(A)未処置、A s c l 1 - 及びA s c l 1 - S A 6で処置したN T gラットの間の空間的記憶は、有意差を示さなかったのに対し、A s c l 1で処置したT g F 3 4 4 A Dラット、著しくはA s c l 1 - S A 6で処置したT g F 3 4 4 A Dラットは、未処置ラットと比較して改善された記憶を示した。(B)未処置のT g F 3 4 4 A Dラットは、A s c l 1 - S A 6で処置したA Dラット、ならびに処置及び未処置N T gラットと比較して、バーンズ迷路作業の学習が有意に遅かった。A s c l 1 - S A 6で処置したT g F 3 4 4 A Dラットは、処置ラット及び未処置ラットの両方でN T gラットと有意に異なることはなかった。(C)実行機能または問題解決能力の実験は、未処置のT g F 3 4 4ラット間で比較して、A s c l 1 - S A 6で処置したT g F 3 4 4 A Dラットでは有意により良好であり、処置及び未処置N T gラットでは有意に異なるものではなかった(n=5、一元配置A N O V A、複数の群についての補正あり)。

【図26】A s c l 1 - S A 6は、脳卒中の後のアストロサイトから神経細胞へのリプログラミングにおいてより効率的である。(A)実験パラダイムの概略図。マウスは、0日目にE T - 1脳卒中(単回)を受け、リプログラミング(A A V - C r e ; A A V - A s c l 1 ; A A V - A s c l 1 - S A 6)を受け、組織分析のためにP S D 2 8で殺された。(B)リプログラミング割合(T d T o m + N e u N + / T d T o m +細胞)により、対照(A A V - C r e)に対して、A A V - A s c l 1及びA A V - A s c l 1 - S A 6処置マウスでの神経細胞リプログラミングに対するアストロサイトが有意に高いことが明らかである。A s c l 1 - S A 6で処置したマウスは、A A V - A s c l 1で処置され

10

20

30

40

50

たマウスと比較して、リプログラミングされた神経細胞の割合が高かった。(C) PSD 28の(i) AAV-Cre、(ii) AAV-Ascl1及び(iii) AAV-Ascl1-SA6の脳卒中損傷皮質からの代表的な画像。白矢印は、TdTom+ (AAV形質導入)、NeuN+の例を示す。スケールバー=100 μ m。データは平均値+/-SEMを表す。N=6~12マウス/群、一元配置ANOVA、* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001。

【図27】Ascl1-SA6-過剰発現により、AAV形質導入の3週間後の脳卒中の亜急性モデルにおいて、改善された運動機能が得られる。(A)実験のタイムラインの概略図。マウスは、0日目にET-1脳卒中(単回注射)を受け、亜急性期の7日目にリプログラミングした(AAV-Cre(対照、明灰色の棒、 $n=4.7$); AAV-Ascl1(黒色の棒、 $n=7.8$)またはAAV-Ascl1-SA6(暗灰色の棒、 $n=9.10$))。後肢(B)及び肢(C)の滑りの割合を、ベースライン(脳卒中前)、PSD4(リプログラミング前)及びPSD29で評価した。Ascl1-Sa6を受けたマウスは、リプログラミング後21日目の滑り率が有意に低下した。データは平均値+/-SEMを表す。N=4~10マウス/群、二元配置ANOVA、チューキーの多重比較、* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001、**** p <0.0001。

【図28】Ascl1-SA6の異所性発現は、リプログラミング後3週間で歩行転帰の改善をもたらす:脳卒中及び処置後28日目に、対照(AAV-Cre、明灰色の棒)処置マウスでは、障害のある(左)後肢跡領域及び最大強度が、有意に障害を示す。脳卒中及びAAV-Ascl1-SA6を受けたマウスは、これらの歩行パラメータにおいて有意に良好な成績を残した。データは平均値+/-SEMを表す。N=5~7マウス/群、一元配置ANOVA、チューキーの多重比較、* p <0.05、** p <0.01。

【図29】Ascl1-SA6の異所性発現により、水平ラダータスクにおける熟練した運動行動が改善される:(A)3回のET-1脳卒中を受けたマウスにおける水平ラダータスクでの熟練した運動機能の技術の評価するための、実験設計の概略図である。(B)障害のある前肢の平均滑り率(左滑り/左ステップ*100)から、AAV-Ascl1-SA6で処置したマウスは、PSD4の性能と比較して、PSD29によって有意に改善されるが、AAV-Cre及びAAV-Ascl1で処置したマウスはPSD29で障害が残ることが明らかである。N=6~11マウス/群、二元配置ANOVA、チューキーの多重比較、* p <0.05、** p <0.01、**** p <0.0001、 ns =有意ではない。

【図30】Ascl1及びAscl1-SA6は、ET-1脳卒中後のPSD28での握力試験における機能的回復を促進することができる:(A)単回ET-1脳卒中後の前肢強度(g)を評価するための実験設計の概略図。(B)Stroke__AAV-Creマウスは、試験のどの時点でも握力の改善を示さなかった。Ascl1またはAscl1-SA6を受けたマウスは、PSD28によって顕著な改善を示した(脳卒中前のベースラインパフォーマンス(100%)と大きく変わらない)。データは平均値+/-SEMを表す。N=12~26マウス/群、二元配置ANOVA、チューキーの多重比較、*** p <0.0001、 ns =有意ではない。

【図31】Ascl1-SA6の異所性発現は、より重度の脳卒中モデルでAscl1より速い速度で握力強度タスクの機能回復を促進する:(A)3回ET-1脳卒中後の前肢強度(g)を評価するための実験設計の概略図。(B)Stroke__AAV-Creマウスは、試験したすべての時点でベースライン(脳卒中前)の性能から有意に障害を示した。Ascl1またはAscl1-SA6を受けたマウスは、PSD120によって顕著な改善を示した(脳卒中前のベースラインパフォーマンスと大きく変わらない)。AAV-Ascl1-SA6を受けたマウスは、PSD59により握力を回復し、回復は、PSD120まで維持された(調べられた最長時間)。データは平均値+/-SEMを表す。N=12~26マウス/群、二元配置ANOVA、チューキーの多重比較、* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001、**** p <0.0001、 ns =有意で

はない。

【図32】脳オルガノイド（CO）培養のための実験ワークフローの概略図。

【図33】AAV2／8-GFAP-mCherryを注入したCO（左）において、GFAP発現（アストロサイトマーカー）を、GFAPプロモーター下で発現するmCherryと共局在させた。逆に、AAV2／8-GFAP-Ascl1-mCherryを注入したCO（右）ではGFAPの発現が低下し、mCherryを発現する細胞の形態がアストロサイト様構造から神経細胞様構造に変化した。

【図34】AAV2／8-GFAP-mCherryを注入したCO（左）では、ダブルコルチン（DCX；初期神経細胞マーカー）の発現は、GFAPプロモーター下で発現するmCherryと共局在しなかった。しかしながら、DCXの発現は、AAV2／8-GFAP-Ascl1-mCherryを注入したCO（右）でmCherry（明色矢印）と共局在していた。

【図35】（A）AAV2／8-GFAP-Ascl1-mCherryまたはAAV2／8-mCherryを注射したヒトCO（90日間）では、神経細胞マーカー（NeuN、成熟ニューロン；DCX、形質導入後21日目の未成熟ニューロン）の同時増加を伴うアストロサイト（GFAP）の割合の減少が示された。（B）21日目のNeuN（矢印）で同時標識された形質導入されたアストロサイトを示す顕微鏡写真（i）、（ii）mCherry形質転換された細胞（矢印）は、GFAP（iv）ではなくNeuN（iii）を発現する；DAPI（v）。

【図36】in vivoで形質導入された皮質アストロサイトの運命に従う系統追跡系の確立。（A）AAV8-GFAP Long-mCherryベクター及びin vivoでの吻側大脳皮質への注入戦略の概略図。（B）GFAPまたはDcxの形質導入後1か月間、及びGFAPまたはNeuNの形質導入後2か月間のmCherry共発現。青色はDAPI対比染色である。（C）AAV8-GFAP Long-Ascl1-mCherryで形質導入後のNeuNを発現するmCherry⁺形質転換細胞の割合の定量化。（D）AAV5-GFAP short-iCreベクター及びin vivoでの皮質への注入戦略の概略図。（E）形質導入後2か月でのAAV5-GFAP short-Ascl1-iCreを注射したRosa-zsGreenマウスの皮質でのzsGreen発現。青色はDAPI対比染色である。（F、G）比色RNA in situハイブリダイゼーション（F）、及び形質導入後2か月でのAAV5-GFAP short-iCre（G）またはAAV5-GFAP short-Ascl1-iCre（F、G）で形質転換された皮質内のAscl1転写物分布の蛍光RNA scope分析。Gの四角で囲まれた領域は、パネル内で右に拡大されている。（H）指定されたSP部位を有する野生型（wt）Ascl1配列、及び示されたSA変異を有するAscl1-SA6配列の概略図。スケールバーは、B=25 μm、E=200 μm、G=75 μmで示される。

【図37】Ascl1-SA6は、Ascl1よりも成熟神経細胞マーカーであるNeuNを発現する形質導入された皮質細胞を誘導する。（A）AAV5-GFAP shortベクターと、Rosa-tdtomatoまたはRosa-zsGreenトランスジェニック動物を使用した、Creベース系統追跡戦略の概略図。（B）形質導入後21日目にAAV5-GFAP short-iCreで形質転換したRosa-zsGreen皮質の低倍率画像であり、ZsGreen落射蛍光及びNeuN発現を示す。（C）形質導入後21日目にAAV5-GFAP short-iCre、AAV5-GFAP short-Ascl1-t2a-iCre及びAAV5-GFAP short-Ascl1-SA6-t2a-iCreを用いて形質導入したRosa-tdtomato皮質であり、tdtomato落射蛍光及びNeuN発現を示す。（D）NeuNを共発現するtdtomato⁺細胞の割合の定量化。（E）形質導入後21日目にAAV5-GFAP Long-iCre、AAV5-GFAP Long-Ascl1-t2a-iCre、及びAAV5-GFAP Long-Ascl1-SA6-t2a-iCreで形質導入したRosa-zsGreen皮質であり、zsGreen落射蛍光及びNeuN発現を示す。（F）NeuNを共発現するzsGreen⁺細胞の割合の定量化。（G）形質導入後21

10

20

30

40

50

日目にAAV8-GFAPshort-iCre、AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre、及びAAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCreを用いて形質導入したRosa-zsGreen皮質であり、zsGreen落射蛍光及びNeuN発現を示す。(H) NeuNを共発現するzsGreen⁺細胞の割合の定量化。スケールバーはB=200 μm、及びC、E、G=100 μmである。

【図38】Ascl1-SA6は、形質導入された皮質細胞において、Ascl1よりもグリオブラストマーカーであるSox9発現を効率的に抑制する。(A) 形質導入後21日目にAAV5-GFAPlong-iCre、AAV5-GFAPlong-Ascl1-t2a-iCre、及びAAV5-GFAPlong-Ascl1-SA6-t2a-iCreで形質導入したRosa-zsGreen皮質であり、zsGreen落射蛍光ならびにSox9 (赤色) 及びGFAP (白色) 発現を示す。青色はDAPI対比染色である。マージされた画像、ならびに分離されたSox9 (赤色) チャンネル及びGFAP (白色) チャンネルが示されている。(B) 形質導入後21日目にAAV8-GFAPshort-iCre、AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre、及びAAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCreを用いて形質導入したRosa-zsGreen皮質であり、zsGreen落射蛍光ならびにSox9 (赤色) 及びGFAP (白色) 発現を示す。青色はDAPI対比染色である。マージされた画像、ならびに分離されたSox9 (赤色) チャンネル及びGFAP (白色) チャンネルが示されている。(C、D) AAV5-GFAPlong系列 (C) 及びAAV8-GFAPshort系列 (D) の両方について、Sox9またはGFAPを共発現するzsGreen⁺細胞の割合及びGFAPを共発現するzsGreen⁺Sox9⁺細胞の割合の定量化。スケールバー=100 μm。

【図39】Ascl1及びAscl1-SA6の両方は、GFAP⁺形質導入アストロサイトでDcx発現を誘導する。(A~C) 形質導入後21日目にAAV5-GFAPlong-iCre (A)、AAV5-GFAPlong-Ascl1-t2a-iCre (B)、及びAAV5-GFAPlong-Ascl1-SA6-t2a-iCre (C) で形質導入したRosa-zsGreen皮質であり、zsGreen落射蛍光、Dcx (赤色) 及びGFAP (白色) 発現を示す。青色はDAPI対比染色である。(D) Dcx単独、またはDcx及びGFAPを共発現するzsGreen⁺細胞の割合の定量化。スケールバー=100 μm。

【図40】ChR2アクチュエータを光遺伝学的に刺激すると、Ascl1-SA6形質導入された細胞の減衰定数が短くなるが明らかになる。(A) 光遺伝学的アクチュエータであるChR2-(H134R)-YFPを保有するAAVとCreベースAAVをRosa-zsGreenマウスの皮質に注入した光遺伝学的実験の概略図。4週間後、光刺激実験を行った。(B) 光刺激と電気生理学的記録を同時に行うために使用される開頭及び皮質窓。また、Zs-green陽性細胞 (緑色チャンネル) 及びタングステン電極先端 (赤色チャンネル) を示す皮質組織の2光子Zスタック投影も示されている。丸で囲んだ黄色領域は、電極付近の刺激部位を表す。スケールバー=100 μm。(C) ASCL1-SA6 (紫色トレース) 及びiCre (黒色トレース) の両方の処置について、4 Hzでの3秒間の光刺激の後のLFPバンドの変化を示す代表的な未加工の電圧トレース。斜線領域は、同じ光刺激領域内で異なる反復にわたって測定された電圧標準偏差を示す。(D) iCre及びAscl1-SA6形質導入された脳における光刺激細胞の減衰定数の測定。各ボックスプロット内の点は個々の測定を示し、「N」は各群で使用されるマウスの数を示す。

【図41】3か月齢及び5か月齢のhSOD1^{G93A}脳における、反応性ミクログリオシスを伴わないCtip2⁺上部運動神経細胞の減少。(A) 吻側尾側の分析位置の概略図。(B) プレグマ2.15、1.85及び1.34での皮質切片のDAPI染色。(C~F) 3か月齢 (C、D) 及び5か月齢 (E、F) で、C57BL/6対照 (C、E) 及びhSod1^{G93A} (D、F) 運動皮質による冠状切片をCtip2 (緑色) 及びI

b a 1 (赤色)で免疫染色する。青色はD A P I対比染色である。(G~I) 3か月齢及び5か月齢での% C t i p 2⁺細胞 / D A P I⁺核の定量化であり、ブレグマ2.15 (G)、1.85 (H) 及び1.34 (J) での計数が示される。(J~O) ミクログリオーシスの分析であり、3か月齢及び5か月齢でのC 5 7 B l / 6対照における% I b a 1⁺細胞 / D A P I⁺核、ならびにh S o d 1^{G 9 3 A}運動皮質を示す(J)。3か月齢及び5か月齢のC 5 7 B l / 6対照ならびにh S O D 1^{G 9 3 A}運動皮質におけるI b a 1⁺細胞密度(K)、平均細胞体サイズ(L)、ならびに細胞あたりの分岐(M)の特性評価。(N、O) M O R P H I O U Sを用いた活性化ミクログリアの同定であって、活性化細胞を最適に同定するのに用いられる調整過程を示す。ヒートマップの赤色はより大きな値を示し、黒色は0を示し、これは3か月齢(N) 及び5か月齢(O) で示される。B~Fのスケールバー=200 μm。

10

【図42】アストログリオーシスは、3か月齢及び5か月齢の脳のh S o d 1^{G 9 3 A}では認められない。(A) 吻側尾側の分析位置の概略図。(B~E) 3か月齢(B、C) 及び5か月齢(D、E) で、C 5 7 B l / 6対照(B、D) 及びh S o d 1^{G 9 3 A}(C、E) 運動皮質による冠状切片をG F A P (緑色) 及びS o x 9 (赤色)で免疫染色する。青色はD A P I対比染色である。(F~I) 3か月齢及び5か月齢での% S o x 9⁺細胞 / D A P I⁺核の定量化であり、ブレグマ2.15 (F)、1.85 (G) 及び1.34 (H) での計数が示される。(I~K) 3か月齢及び5か月齢のC 5 7 B l / 6対照ならびにh S o d 1^{G 9 3 A}運動皮質における、G F A P発現を特徴付けるためにM O R P H I O U Sを使用したアストログリオーシスの分析(I)。(N、O) 活性化された細胞を最適に識別するために使用される調整過程が示されており、ヒートマップ内の赤色はより大きな値を示し、黒色は0を示し、3か月齢(J) 及び5か月齢(K) で示される。B~Eのスケールバー=200 μm。

20

【図43】未注射、i C r e、A s c l 1及びA s c l 1^{S A 6}を注射したh S o d 1^{G 9 3 A}運動皮質におけるクラスタ分析ならびに割り当て。(A、B) 定位固定を用いた16週齢h S o d 1^{G 9 3 A}; R o s a - z s G r e e nマウスの運動皮質への3つのA A Vの注入を示す実験プロトコル(A)。28 d p i後、脳をV i s i u m捕捉スポット上で薄片化し、組織を透過処理してバーコード化プライマー上のm R N Aを捕捉した(A)。プライマー配列は、空間バーコード、U M I及びポリd Tテールを含む(B)。基準フレーム及び各「スポット」の取り込み領域を示す(B)。(C、D) 基準フレーム内のH & E染色された切片、空間マップ及びU M A Pを示す、未注射h S o d 1^{G 9 3 A}のS T分析(C)。組織全体で可変的に発現される上位50つの遺伝子のヒートマップ(D)。(E、F) 基準フレーム内のH & E染色された切片、空間マップ及びU M A Pを示す、i C r eを注射したh S o d 1^{G 9 3 A}のS T分析(E)。組織全体で可変的に発現される上位50つの遺伝子のヒートマップ(F)。(G、H) 基準フレーム内のH & E染色された切片、空間マップ及びU M A Pを示す、A s c l 1を注射したh S o d 1^{G 9 3 A}のS T分析(G)。組織全体で可変的に発現される上位50つの遺伝子のヒートマップ(H)。(I、J) 基準フレーム内のH & E染色された切片、空間マップ及びU M A Pを示す、A s c l 1^{S A 6}を注射したh S o d 1^{G 9 3 A}のS T分析(I)。組織全体で可変的に発現される上位50つの遺伝子のヒートマップ(J)。D、F、H、Jにおけるクラスタ割り当てを、A l l e n B r a i n A t l a sを使用して行い、分子脳アトラスにおける266つの遺伝子の脳パレットと比較した³⁹。

30

40

【図44】i C r e形質導入細胞が炎症転写シグネチャと関連する。(A~E) 未注射、i C r e、A s c l 1及びA s c l 1^{S A 6}形質導入脳について、空間マップ上へのi C r e転写産分布のマッピング(A)。i C r eによって組み替えられるR o s a - z s G r e e n座の概略図(B)。i C r e、A s c l 1及びA s c l 1^{S A 6}形質導入脳におけるz s G r e e n発現の確認(C)。v 2 aトリガー型リボソームスキップのモデル。A s c l 1及びi C r eについてのコード配列を有するバイシストロニックm R N Aの生成が生じ、これらの両方は、リボソームスキップにより別個のタンパク質として翻訳される(D)。i C r e、A s c l 1及びA s c l 1^{S A 6}形質導入脳におけるi C r e発現

50

の正規化ならびにスケーリングにより、DEG分析が可能になる(E)。(F~J)ベン図であって、Ascl1からiCreまたはAscl1^{SA6}からiCreを比較した場合、アップレギュレートされ、ダウンレギュレートされるDEGの分布を示す(F)。各組織内のiCre陽性細胞とiCre陰性細胞との間のDEGのヒートマップ(G)。アップレギュレートされたDEGに関連するGO項を含む、Cre形質転換細胞のDEGに関連する意味空間内で分離されたGO項の比較(H)。未注射、iCre、Ascl1及びAscl1^{SA6}脳上のGfap、Vim、Tyrobp、Mpeg1、Cd52ならびにC4bについての転写物分布の空間マッピング(I)。iCre(黒色丸)、Ascl1(青色丸)及びAscl1^{SA6}(緑色丸)の値を示す、DEGのセットに対するトランスクリプト読み取りにおけるLog2FC(J)。

10

【図45】空間トランスクリプトーム(ST)データの品質管理(A~A'')未注入hSod1^{G93A}運動皮質のST解析であって、基準フレームにおけるH&E染色切片(A)、各クラスタにおけるUMI計数によるtSNEプロット(A)、空間マップ(A')及び対応するカラーコード化されたtSNEプロット(A')を示す。シーケンシング飽和も示されている(A'')。(B~B'')iCreを注入したhSod1^{G93A}運動皮質のST解析であって、基準フレームにおけるH&E染色切片(B)、各クラスタにおけるUMI計数によるtSNEプロット(B)、空間マップ(B')及び対応するカラーコード化されたtSNEプロット(B')を示す。シーケンシング飽和も示されている(B'')。(C~C'')Ascl1を注入したhSod1^{G93A}運動皮質のST解析であって、基準フレームにおけるH&E染色切片(C)、各クラスタにおけるUMI計数によるtSNEプロット(C)、空間マップ(C')及び対応するカラーコード化されたtSNEプロット(C')を示す。シーケンシング飽和も示されている(C'')。(D~D'')Ascl1^{SA6}を注入したhSod1^{G93A}運動皮質のST解析であって、基準フレームにおけるH&E染色切片(D)、各クラスタにおけるUMI計数によるtSNEプロット(D)、空間マップ(D')及び対応するカラーコード化されたtSNEプロット(D')を示す。シーケンシング飽和も示されている(D'')。

20

【図46】Ascl1及びAscl1^{SA6}形質導入細胞において神経細胞関連遺伝子発現が増強される。(A~C)Ptgds、Pvalb、Gad1及びSstを含む、未注入、iCre、Ascl1ならびにAscl1^{SA6}形質導入細胞におけるiCre陽性細胞のDEGの転写物分布(A)。Id3、C1qb及びC1qaを含む、未注入、iCre、Ascl1ならびにAscl1^{SA6}形質導入細胞における、in vitroでの出生後のアストロサイトにおけるAscl1^{ERT2}過剰発現実験で同定されたDEGの転写物分布(B)¹⁰。iCre(黒色丸)、Ascl1(青色丸)及びAscl1^{SA6}(緑色丸)の値を示す、DEGのセットに対するトランスクリプト読み取りにおけるLog2FC(C)。(D~G)Ascl1及びAscl1^{SA6}形質導入細胞(D)においてアップレギュレートされたDEGならびにダウンレギュレートされたDEGに関する意味空間内で分離されたGO項の比較。

30

【図47】in vivoでAscl1及びAscl1^{SA6}によって活性化されたZbtb18ならびにIdTFを含むGRNの同定。(A~C)TFから構成されるGRNを、iCre(A)、Ascl1(B)及びAscl1^{SA6}(C)形質導入脳について、STデータから構築した。最も暗い灰色の枠(元は赤色)は、iCre単独で、またはAscl1及び/またはAscl1^{SA6}で形質導入した脳のいずれかにおいて特異的にアップレギュレートされたDEGを取り囲む。濃い灰色の枠(元はオレンジ色)は、iCreならびにAscl1及び/またはAscl1^{SA6}のいずれかで形質導入した脳においてアップレギュレートされたDEGを取り囲む。最も明るい灰色の枠(元は青色)は、iCre単独で、またはAscl1及び/またはAscl1^{SA6}で形質導入した脳のいずれかにおいて特異的にダウンレギュレートされたDEGを取り囲む。中程度の灰色の枠(元は紫色)は、iCreならびにAscl1及び/またはAscl1^{SA6}のいずれかで形質導入した脳において特異的にダウンレギュレートされたDEGを取り囲む。(D~I)天然型ASCL1(WT51)(D~F)またはASCL1^{SA5}の変異型(G~I)

40

50

）を使用した、*in vivo* STデータからアップレギュレートされたDEGと、グリオブラストーマ細胞の*in vitro* リプログラミングからアップレギュレートされたDEGとの比較分析（GSE153823；²⁵）。アップレギュレートされたDEG（F、I）に焦点を当てた*iCre*（D、G）、*Ascl1*（E、H）及び*Ascl1^{SA6}* STデータの比較を示す。（J、K）アップレギュレートされた（J）及びダウンレギュレートされた（K）DEGの転写物読み取りにおけるLog2FCであって、*iCre*（黒色丸）、*Ascl1*（青色丸）及び*Ascl1^{SA6}*（緑色丸）の値を示す。（L、M）公開されたscRNAseqデータセットから推論される胚皮質GRNの生成⁹⁶であって、非摂動状態（L）または*Zbtb18*（M）の*in silico* ノックアウト（「KO」）に続く、グリオブラストーマ細胞（GSE153823；²⁵）における*Ascl1^{SA6}* 過剰発現にตอบสนองしてアップレギュレート（暗灰色の四角）またはダウンレギュレート（明灰色の四角）したTFを示す。（N～Q）E12.5皮質NPCにおける*Neurog2*（「N」で示される）、*Ascl1*（「A」で示される）及び*Zbtb18*（「Z」で示される）の比較分析であって、まず、3つの遺伝子すべてが*Neurog2* + *Ascl1* + NPCのRNAseq情報から構築された同じGRNの一部であることを実証している⁹⁷。E12.5皮質scRNAseqデータのSPRINGプロットに示される*Ascl1*、*Neurog2* 及び *Zbtb18* の系統トラジェクトリー解析であって、グルタミン酸作動性及びGABA作動性神経細胞系統の分岐（O）を示す⁹⁸。また、*Ascl1*、*Neurog2* 及び *Zbtb18* 発現の局所的バイアス（P）、ならびに3つの遺伝子の擬似時系列分析（Q）を示す擬似DVスコアも示す。

【図48】*in vivo*（STデータ）と公開された*in vitro* 神経細胞リプログラミングデータセットとの比較。（A～C）本実験における*in vivo* STデータからアップレギュレートされたDEGと、*ASCL1*を用いた生後アストロサイトの*in vitro* リプログラミングからアップレギュレートされたDEGとの比較分析（GSE06389；¹⁰）。アップレギュレートされたDEGに焦点をあてた*iCre*（A）、*Ascl1*（B）及び*Ascl1^{SA6}*（C）のSTデータとの比較を示す。（D～F）本実験における*in vivo* STデータからダウンレギュレートされたDEGと、*ASCL1*を用いた生後アストロサイトの*in vitro* リプログラミングからダウンレギュレートされたDEGとの比較分析（GSE06389；¹⁰）。ダウンレギュレートされたDEGに焦点をあてた*iCre*（D）、*Ascl1*（E）及び*Ascl1^{SA6}*（F）のSTデータとの比較を示す。（G～J）天然型*ASCL1*（WT51）（G～I）または*ASCL1^{SA5}*の変異型（J～L）を使用した、*in vivo* STデータからダウンレギュレートされたDEGと、グリオブラストーマ細胞の*in vitro* リプログラミングからダウンレギュレートされたDEGとの比較分析（GSE153823；²⁵）。ダウンレギュレートされたDEGに焦点をあてた*iCre*（G、J）、*Ascl1*（H、K）及び*Ascl1^{SA6}*（I、L）のSTデータとの比較を示す。

【図49】*hSOD1^{G93A}* 及び対照マウスにおける16週齢での*iCre* ならびに *Ascl1^{SA6}* 注射の実験概要、ならびに体重の測定。（A）AAV注射及び行動試験の予定表。*iCre* 及び *Ascl1^{SA6}* を、16週齢の*Rosa-⁺zsGreen*（対照）及び16週齢（症候性）の*hSOD1^{G93A}；Rosa-⁺zsGreen* マウス（雄及び雌の両方）に両側的に注射した。体重及び運動行動試験を毎週行い、15週のベースライン測定と比較した。（B、C）雄（B）マウス及び雌（C）マウスの実験のタイムラインにわたる体重の変化。二元配置ANOVAは、*hSOD1^{G93A}* マウスにおいて、19週目及び22週目に有意差を示した（それぞれ、 $p = 0.0470$ 及び $p = 0.0370$ ）。

【図50】雄及び雌の*hSOD1^{G93A}* マウスにおける16週目の*iCre* ならびに *Ascl1^{SA6}* 注射の神経スコアならびに生存曲線。行動試験を毎週行い、人道的なエンドポイントまで続けた。（A、B）雄（A）及び雌（B）の*hSOD1^{G93A}* マウスのNS割り当て。（C）*iCre* 及び *Ascl1^{SA6}* 注射した雄（C）及び雌（D）マウスのカプラン・マイヤー生存曲線。

【図51】hSOD1^{G93A}及び対照マウスにおける16週目のiCreならびにAsc11^{SA6}注射についてのロータロッド及び握力。(A、B)ロータロッド測定は、雄(A)及び雌(B)のhSOD1^{G93A}ならびに対照マウスにおいて、15週目(ベースライン)、16週齢のAAV注射後17週目から毎週行われた。Asc11^{SA6}で処置されたhSOD1^{G93A}雄は、ロータロッド上に留まる能力を増加させ、iCreを注射したコホートと比較して、19、20及び21週齢で有意な差を示した(A)。対照動物が生存しなかったため、統計試験を24週間以上で行うことができなかった(シダック多重比較試験、それぞれ19、20及び21週で $p=0.0471$ 、 $p=0.0379$ 、 $p=0.0329$)。Asc11^{SA6}を注射したhSOD1^{G93A}雌マウスは、ロータロッド上に留まる能力が向上し、23及び25週齢で有意な差を示した(シダック多重比較試験、それぞれ $p=0.0359$ 及び $p<0.0001$)。(C、D)神経筋機能の握力測定は、雄(C)及び雌(D)のhSOD1^{G93A}ならびに対照マウスにおいて、15週目(ベースライン)、16週齢のAAV注射後17週目から毎週行われた。Asc11^{SA6}を注射したhSOD1^{G93A}雌マウスは、握力が向上する傾向を示した。

10

【図52】16週齢でiCre及びAsc11^{SA6}処置した対照ならびにhSOD1^{G93A}マウスの歩行分析。雄(A)及び雌(B)の対照マウスならびにhSOD1^{G93A}マウスにおける前肢後肢跡の測定に基づく歩幅距離の歩行分析。(A)Asc11^{SA6}を注射したhSOD1^{G93A}雄マウスは、歩幅長が増加する傾向を示したが、有意な差は示さなかった。(B)iCreを注射したhSOD1^{G93A}雌マウスは、Asc11^{SA6}で処置した動物と比較して、15週齢及び21週齢で著しく長い歩幅長を有していた(シダック多重比較試験、それぞれ $p=0.0319$ 及び $p=0.0057$)。

20

【図53】16週目でのiCre及びAsc11^{SA6}注射後の右(RH)及び左(LH)後肢の歩幅距離のCatWalk XT(登録商標)歩行分析。(A、B)対照及びhSOD1^{G93A}雄マウスにおけるRH(A)及びLH(B)の歩幅長。(C、D)対照及びhSOD1^{G93A}雄マウスにおけるRH(C)及びLH(D)の歩幅長。

【図54】hSOD1^{G93A}及び対照マウスにおける19週齢でのiCreならびにAsc11^{SA6}注射後の体重測定。体重を毎週測定し、雄(A)及び雌(B)マウスの18週ベースライン測定値と比較した。

【図55】19週齢のiCre及びAsc11^{SA6}注射したhSOD1^{G93A}マウスの神経スコア及びカプラン・マイヤー生存曲線。行動試験を毎週行い、人動的なエンドポイントまで続けた。(A、B)雄(A)及び雌(B)のhSOD1^{G93A}マウスのNS割り当て。(C)iCre及びAsc11^{SA6}注射した雄及び雌マウスのカプラン・マイヤー生存曲線。Asc11^{SA6}注射した雄マウスは、iCre注射した雄マウスの0%と比較して、28週目まで60%の生存確率を示した。Asc11^{SA6}注射した雌マウスは、iCre注射した雌マウスの0%と比較して、26週目まで35%の生存確率を示した。

30

【図56】hSOD1^{G93A}及び対照マウスにおける19週目のiCreならびにAsc11^{SA6}注射についてのロータロッド及び握力。(A、B)ロータロッド測定は、雄(A)及び雌(B)のhSOD1^{G93A}ならびに対照マウスにおいて、18週目(ベースライン)、及び19週齢のAAV注射後の20週目から毎週行われた。Asc11^{SA6}で処置したhSOD1^{G93A}雌マウスは、ロータロッド上に留まる能力が向上する傾向があった(A)。Asc11^{SA6}またはiCreを注射されたhSOD1^{G93A}雌マウスは、ロータロッドに落ちるまでの潜時に違いを示さなかった(B)。(C、D)神経筋機能の握力測定は、雄(C)及び雌(D)のhSOD1^{G93A}ならびに対照マウスにおいて、18週目(ベースライン)及び19週齢のAAV注射後の20週目から毎週行われた。Asc11^{SA6}を注射したhSOD1^{G93A}雄マウスは、握力が増加する傾向を示した。

40

【図57】19週目でのiCre及びAsc11^{SA6}注射後の右(RH)及び左(LH)後肢の歩幅距離のCatWalk XT(登録商標)歩行分析。(A、B)対照及びhSOD1^{G93A}雄マウスにおけるRH(A)及びLH(B)の歩幅長。(C、D)対照

50

及び $hSOD1^{G93A}$ 雄マウスにおける RH (C) 及び LH (D) の歩幅長。

【図58】 $Ascl1-SA7$ は、形質導入された皮質細胞において、 $Ascl1$ よりも効率的にかつ $Ascl1-SA6$ と同程度に、グリオブラストマーカーである $Sox9$ 発現を抑制する。(A) 形質導入後21日目に $AAV8-GFAPshort-iCre$ 、 $AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre$ 、 $AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCre$ 及び $AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA7-t2a-iCre$ を用いて形質導入した $Rosa-zsGreen$ 皮質であり、 $zsGreen$ 落射蛍光ならびに $Sox9$ 及び $GFAP$ (白色) 発現を示す。対比染色として $DAPI$ を使用した。マージした画像 (上のパネル) ならびに分離した $Sox9$ (第2のパネル) 及び $GFAP$ (下のパネル) チャンネルが示されている。(B) グラフは、 $Sox9$ または $GFAP$ を共発現する $zsGreen^+$ 細胞の割合、及び $GFAP$ を共発現する $zsGreen^+ Sox9^+$ 細胞の割合の定量化を示す。スケールバー = $100\mu m$ 。

10

【図59】 $Ascl1-SA7$ 及び $Ascl1-SA6$ は、 $Ascl1$ よりも成熟神経細胞マーカーである $NeuN$ を発現する形質導入された皮質細胞をより誘導する。(A) 形質導入後21日目に $AAV8-GFAPshort-iCre$ 、 $AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre$ 、 $AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCre$ 及び $AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA7-t2a-iCre$ を用いて形質導入した $Rosa-zsGreen$ 皮質であり、 $zsGreen$ 落射蛍光ならびに $NeuN$ 発現を示す。(B) $NeuN$ を共発現する $zsGreen^+$ 細胞の割合の定量化。 $100\mu m$ のスケールバー。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。

【0027】

本明細書及び特許請求の範囲に使用される、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈によりそうでないことが明確に示されない限り、複数形の指示対象を含む。

30

【0028】

本明細書で使用される場合、「含む」という用語は、以下のリストが非網羅的であり、任意の他の適切な項目、例えば、1つ以上の更なる特徴(複数可)、要素(複数可)、及び/または成分(複数可)を必要に応じて含み得るか、または含み得ないことを意味すると理解されるであろう。

【0029】

本明細書全体における「一実施形態(one embodiment)」、「一実施形態(an embodiment)」、「別の実施形態」「特定の実施形態(particular embodiment)」、「関連する実施形態」、「特定の実施形態(certain embodiment)」、「追加の実施形態」、もしくは「更なる実施形態」、またはこれらの組み合わせに対する言及は、実施形態に関連して記載されている特定の特徵、構造、または特色が少なくとも1つの実施形態に含まれていることを意味する。したがって、本明細書全体の様々な箇所で出現する上記フレーズは、必ずしもすべて同じ実施形態を言及しているわけではない。更に、特定の特徵、構造、または特色は、1つ以上の実施形態における任意の好適な方法で組み合わせることができる。

40

【0030】

本明細書で使用される場合、物質の「有効量」という用語は、所望の効果を生じさせるのに十分な量である。いくつかの実施形態では、転写因子または転写因子をコードする核酸の有効量は、対象の標的組織の十分な数の標的細胞を分化転換するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、標的組織は、神経組織(例えば、脳組織、これらに限定され

50

ないが、例えば、脳皮質（C C T X）、海馬（H I P P O）、嗅内皮質（E C）、前頭前野皮質（P F C）、後内側皮質（P M C）、青斑核（L C）、視床（T H）、下丘（I C）、嗅球（O B）、前嗅核（A O N）、視床下部（H T）、小脳（C B L）、線条体、基底核、辺縁系（L C）、デフォルトモードネットワーク（D M N）、内側側頭葉（M T L）、脳幹、小脳、及び脊髄）である。いくつかの実施形態では、組成物またはベクターの有効量は、対象において治療上の利益を得るのに十分な量であり得、例えば、アストロサイトの神経細胞への神経細胞リプログラミングの提供、対象の寿命の延長、対象における神経変性疾患もしくは障害もしくは損傷の遅延、予防もしくは治療、または対象における中枢神経系疾患、障害もしくは損傷の治療などをするのに十分な量であり得る。有効量は、例えば、種、性別、年齢、体重、対象の健康、及び投与様式または投与部位などの様々な要因に依存し、したがって、対象及び投与ごとに変化し得る。

10

【0031】

本明細書で使用される場合、本発明の方法によって治療される「対象」または「患者」または「個体」は、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを指すことを意味する。「非ヒト動物」は、あらゆる脊椎動物または無脊椎動物の生物を含むが、好ましくは哺乳動物である。ヒト対象は、任意の年齢、性別、種族または民族的集団、例えば、コーカソイド（白人）、アジア人、アフリカ人、黒人、アフリカ系アメリカ人、アフリカ系ヨーロッパ人、ヒスパニック人、中東などであり得る。いくつかの実施形態では、対象は、患者または臨床環境における他の対象であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、既に治療を受けている。いくつかの実施形態では、対象は、新生児、乳児、子供、青少年、成人または高齢者である。

20

【0032】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は互換的に使用され、したがって、ポリペプチドという用語は、完全長タンパク質を指すために使用されてもよく、完全長タンパク質の断片、及び／またはその機能的変異体を指すために使用されてよい。

【0033】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」及び「核酸配列」という用語は互換的に使用され得、これらに限定されないが、RNA、DNA、mRNA、cDNAなどを含む遺伝物質を含み得、これは、完全長の配列、機能的変異体、及び／またはそれらの断片を含み得る。

30

【0034】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、*in vitro*または*in vivo*のいずれかで宿主細胞に送達されるべき核酸を含む、組換えプラスミドまたはウイルスなどの宿主細胞に外来遺伝物質を人工的に運ぶビヒクルを指すことを意味する。

【0035】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNAまたはポリペプチドの発現を指示するベクターを指す。発現する配列は、多くの場合、宿主細胞に対して異種であるが、必須ではない。発現ベクターは、追加のエレメントを含んでもよく、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有してもよく、したがって、発現ベクターは、2つの生物において、例えば、発現のためにヒト細胞において、ならびにクローニング及び増幅のために原核宿主において維持されることができる。「発現」という用語は、RNA及びタンパク質の生成、ならびに必要なに応じてタンパク質の分泌に関与する細胞過程を指し、これらに限定されないが、該当する場合、例えば、転写、転写処理、翻訳及びタンパク質の折り畳み、修飾及びプロセッシングを含む。発現産物には、遺伝子から転写されるRNA、及び遺伝子から転写されるmRNAの翻訳によって得られるポリペプチドが含まれる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に作動可能に連結されている場合、*in vitro*または*in vivo*でRNAに転写される核酸配列（DNA）を意味する。遺伝子は、変異型遺伝子であってよく、コード領域の前後の領域、例えば、5'非翻訳（5'UTR）及びコザック配列、または「リ

40

50

ーダー」配列及び3'UTRまたは「トレーラー」配列、ならびに個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含んでもよいし、含んでいなくてもよい。

【0036】

本発明は、例えば、中枢神経系（例えば、神経変性）疾患または障害、または中枢神経系損傷（例えば、脳卒中）の治療のため、直接的神経細胞リプログラミングにおける生成物、及びその使用方法に関する。本発明の生成物は、神経細胞分化ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス（bHLH）転写因子（例えば、Neurog2、Ascl1、Neurod1、Neurod4）を含み、これは、転写因子を阻害性環境制御に対して脱感作するための1つ以上の変異、または変異型bHLH転写因子をコードする核酸を含む。

10

【0037】

本発明者らは、驚くべきことに、リン酸受容体部位の変異を組み込むことにより、bHLH転写因子Ascl1が通常は活性でない細胞の状況においてもその活性を維持することが可能になることを見出した。このことは、他のbHLH転写因子におけるリン酸受容体部位の同様の変異も、それらが通常は活性でない細胞の状況において活性を維持する、これらの転写因子の能力を改善することを示す。bHLH転写因子のそのような変異型の例としては、例えば、Neurog2-SA9、Ascl1-SA6、Neurod1-SA6、Neurod4-SA3/TA4が挙げられる。bHLH転写因子のこれらの変異型の発現は、神経変性疾患または損傷後に存在するような抑制環境であっても、治療対象におけるグリア細胞（例えば、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、及びミクログリア）の神経細胞系列転換を誘導することができる。

20

【0038】

bHLH転写因子変異体

上記のように、bHLH転写因子は、機能的特性に基づいて前神経及び神経細胞分化遺伝子に分類され得る（D. J. Dennis et al. / Brain Research 1705 (2019) 48-6549）。前神経活動を伴う前神経bHLH遺伝子としては、Neurog1、Neurog2、Ascl1、Neurod4、Atoh1及びAtoh7が挙げられる。神経系列の発生の後で機能する神経分化bHLH転写因子は、NeuroD（Neurod1、Neurod2/Ndrf、Neurod6/Math2）、Nscl（Nhlh1/Nscl1、Nhlh2/Nscl2）、及びいくつかの状況では、Olig（Olig1、Olig2、Olig3、Bhlhe22）ファミリーを含む。

30

【0039】

神経発生中に、bHLH転写因子は、リン酸化の際に活性を失うように、種々のキナーゼによるリン酸化により少なくとも部分的に制御される。bHLH転写因子は、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼのリン酸受容体部位である、プロリン（P）残基（SPまたはTPと称される）に隣接するセリン（S）またはスレオニン（T）をコードするヌクレオチドを含む。プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼ（例えばGSK3、ERK、CDK1）によるこれらのbHLHタンパク質のリン酸化は、これらの転写因子がDNAに結合して神経細胞分化を誘導する能力を阻害する。このような阻害は、環境による抑制制御である。

40

【0040】

本発明者らは、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼのリン酸受容体部位を含まない、またはプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼの数が減少したリン酸受容体部位を有するbHLH転写因子の変異体が、CNS内、例えば脳のアストロサイトを、環境による抑制制御に影響されにくい方法で機能的神経細胞に効率的にリプログラミングする驚くべき能力を有することを見出した。

【0041】

bHLH遺伝子の神経発生を促進する能力は、環境に大きく依存していることが判明し、神経細胞の変換効率は、存在する抑制機序に応じて、発達時点、脳領域及び罹患または

50

損傷した脳において異なる。このことは、以下の表に示す要約によって実証される。また、bHLH転写因子のリン酸化を低減することにより、神経細胞の変換効率をどのように顕著に改善し、安定化できるかを示す。

【表 1】

源細胞	因子	サブタイプ	効率	機能的成果	参照
海馬アストロサイト (ADラット)	Neurod1、Ascl1またはAscl1-SA6	未試験	NeuN+神経細胞密度： Ascl1-SA6：4.5×↑ Ascl1：4.0×↑ Neurod1：2.5×↑	Neurod1-神経ネットワーク活動の強化	本出願
運動皮質アストロサイト (野生型マウス)	Ascl1-SA6、Ascl1	未試験	Ascl1-SA6：68% Ascl1：45%	未試験	本出願
運動皮質アストロサイト (ALS)	Ascl1-SA6	未試験	Ascl1-SA6：80%	未試験	本出願
皮質アストロサイト (脳卒中)	Ascl1-SA6、Ascl1	未試験	Ascl1-SA6：60% Ascl1-47%		本出願
増殖性グリア細胞	Neurog2、FGF、EGF	グルタミン酸作動性	72+/-5%	未試験	(Grande, Sumiyoshi et al. 2013)
アストロサイト	Neurog2、DAPT	グルタミン酸作動性、及びGABA作動性	50% (皮質)、30% (小脳)、20% (SC)	未試験	(Hu, Qin et al. 2019)

10

20

30

40

50

源細胞	因子	サブタイプ	効率	機能的成果	参照
アストロサイト	Neurog2、Nurr1	グルタミン酸作動性、及びGABA作動性	80%	電気生理学的活性、活動電位の生成、シナプスの形成、長距離の軸索投射	(Mattiugini, Bocchiet al. 2019)
線条体アストロサイト	Ascl1、Neurod1、Nurr1	DA	16%	電気生理学的活性、活動電位の生成、運動行動回復	(Rivet t i d i Val Cerv o, Romanov et al. 2017)
線条体神経細胞	Sox2、Nurr1、Lmx1a及びFoxa1 TF及びバルプロ酸、	DA	79%	電気生理学的活性、活動電位の生成、ドーパミン回復	(Niu, Zang et al. 2018)
皮質アストロサイト	Neurod1	グルタミン酸作動性神経細胞	92.8%	電気生理学的活性、活動電位の生成	(Guo, Zhang et al. 2014)
NG2グリア	Neurod1	グルタミン酸作動性、及びGABA作動性	42.5%	電気生理学的活性、活動電位の生成	(Guo, Zhang et al. 2014)
線条体ミクログリア	Neurod1	グルタミン酸作動性、及びGABA作動性	25~35%	電気生理学的活性、活動電位及び自発的シナプス電流の生成	(Matsuda, Irie et al. 2019)
反応性アストロサイト	Neurod1	グルタミン酸作動性、及びGABA作動性	70%	電気生理学的活性、活動電位の生成、運動行動改善	(Chen, Ma et al. 2020)

10

20

30

40

50

源細胞	因子	サブタイプ	効率	機能的成果	参照
線条体非反応性アストロサイト	Neurod1	グルタミン酸作動性神経細胞	80%	未試験	(Brulet, Matsuda et al. 2017)
皮質アストロサイト (脳卒中)	Neurod1	グルタミン酸作動性	20~27%	自発運動活動及び機能回復の改善	(Livingston, Lee et al. 2020)
線条体アストロサイト	Neurod1、Dlx2	GABA作動性中型有棘神経細胞	80%	電気生理学的活性、活動電位の生成、寿命の延長、運動機能を改善	(Wu, Parry et al. 2020)

10

20

【0042】

本明細書で提供される転写因子変異体は、1つ以上のプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位での、セリンからアラニンへまたはスレオニンからアラニンへなどの置換変異を含む。それぞれの場合において、置換変異は、転写因子活性に影響を及ぼすことなく、変異部位でのリン酸化を停止するように機能する。本明細書で提供される例は、セリンまたはスレオニンからアラニンへの置換を含むが、他の置換も可能である。例えば、標的とするプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸化部位（複数可）のセリンまたはスレオニンは、アラニンに類似した生化学的特性（例えば、サイズ、電荷及び疎水性）を有するアミノ酸、例えば、グリシン、バリン、ロイシンまたはイソロイシンで置き換えることができる。あるいは、変異体は、セリンまたはスレオニンから、D-セリン、D-スレオニン、D-アラニン、D-グリシン、D-バリン、D-ロイシンまたはD-イソロイシンなどのD-アミノ酸への置換を含み得る。

30

【0043】

bHLH転写因子におけるすべてのプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位の変異は、神経細胞分化を誘導する転写因子の能力の阻害を低減または排除することに関して最大の効果をもたらすことになる。しかしながら、これらのbHLH転写因子はレオスタット様に制御され、それによってリン酸化の程度により活性の制御が可変となる。したがって、天然に存在する配列に存在するプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位のすべてを変異することは必ずしも必要ではない。特に、いくつかの実施形態では、最大の効果は必要ないかまたは有益ではなく、抑制制御の部分的な削減のみが必要である。そのような場合、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位のすべてが変異されるよりも少ない。これらの実施形態では、bHLH転写因子はレオスタットのように制御されるので、抑制制御の変化を可能にするのは、変異の位置ではなく変異の数である。

40

【0044】

いくつかの実施形態によれば、本明細書で提供されるbHLH転写因子変異体は、1つ以上のプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位でのセリンまたはスレオニンの置換を含む。あるいは、変異型bHLH転写因子は、2つ以上のプロリン指向

50

性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位、もしくは3つ以上のプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位、もしくは4つ以上のプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位、もしくは5つ以上のプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位での、セリンまたはスレオニン残基の置換を含む。他の実施形態では、bHLH転写因子変異体は、天然に存在する配列に存在するプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位のすべてにおいてセリンまたはスレオニンの置換を含む。

【0045】

哺乳動物bHLH転写因子をコードする遺伝子は、高度に保存されている。この保存は、マウス対ヒトコード配列のBLAST配列（NCBI参照配列を使用）から示され、これは、以下の同一性パーセント：Ascl1 89.73%、Neurod1 90.78%、Neurod4 87.41%、Neurog2 82.54%を提供する。いくつかの実施形態では、変異型bHLH転写因子は、ヒトまたはマウスの配列に基づく。しかしながら、配列類似性を考慮すると、マウス配列などの非ヒト哺乳動物配列に基づく変異は、ヒトで有用である。

【0046】

変異型bHLH転写因子タンパク質は、天然に存在するタンパク質の対応する配列に対して少なくとも90%、またはより好ましくは少なくとも93%、少なくとも95%、または少なくとも97%同一であり、上記の少なくとも1つのプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸化部位の変異を含む、ポリペプチド配列を含み得る。

【0047】

配列同一性パーセントは、整列したアミノ酸配列中の一致した位置の数を決定し、一致した位置の数を整列したアミノ酸の総数で割り、100を掛けることによって計算される。一致した位置とは、同一のアミノ酸が整列したアミノ酸配列において同じ位置に存在する位置を指す。配列同一性パーセントはまた、任意の核酸配列について決定することもできる。

【0048】

いくつかの実施形態によれば、変異型bHLH転写因子は、変異型前神経bHLH転写因子である。特定の実施形態では、変異型転写因子は、ヒトまたはマウスの前神経bHLH転写因子に基づく。他の実施形態によれば、変異型bHLH転写因子は、変異型神経細胞分化bHLH転写因子である。特定の実施形態では、変異型転写因子は、ヒトまたはマウスの神経細胞bHLH転写因子に基づく。他の生物由来のbHLH転写因子配列が、対応する変異体の設計に使用される限り、対応するアミノ酸位置は、例えば、対または複数の配列アラインメントによって容易に決定することができる。

【0049】

いくつかの実施形態では、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸受容体部位変異は、PKAによりリン酸化される、ループ／ヘリックス2（L-H2）接合部における単一の保存されたS/T残基の変異と組み合わせて組み込まれ、脊椎動物及び無脊椎動物の前神経TFの両方のバイナリー「オフ」スイッチとして作用する（Quan et al. Cell 2016 Jan 28; 164(3): 460-75. Doi: 10.1016/j.cell.2015.12.048）。

【0050】

いくつかの実施形態によれば、Neurog2、Ascl1、Neurod4、及びNeurod1転写因子変異体が提供される。表1に、これらの転写因子中に存在するプロリン指向性セリンスレオニンキナーゼリン酸化部位の数を列挙し、そのうち、セリンを含むものは「SP」として識別され、スレオニンを含むものは「TP」として識別される。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1

遺伝子	ヒト		マウス	
	SP	TP	SP	TP
ASCL1	5		6	
NEUROD1	6		6	
NEUROD4	4	6	3	4
NEUROG2	8	1	9	1

10

【0051】

ヒト及びマウス野生型ASCL1の例示的なアミノ酸配列を以下に示す。ここで、リン酸化部位は影付きされており、囲み枠中に示される残基は、PKAによりリン酸化されるL-H2接合部で保存されたセリン残基、セリン155／150である。

ヒト（配列番号1）：

MESSAKMESGGAGQQPQPQPQPFLPPAACFFATAAAAAAAAAA
AAAAAQSAQQQQQQQQQQQAPQLRPAADGQPSGGGHKSAPK
QVKRQRSSSPELMRCKRRLNFSGFGYSLPQQQPAAVARRNER
ERNRVKLVNLGFATLREHVPNGAANKKMS[S]KVETLRSAYEYI
RALQQLLDEHDAVSAAFQAGVLSPTISPNYSNDLNSMAGSPV
SSYSSDEGSYDPLSPREEQLLDFTNWF

20

マウス（配列番号2）：

MESSGKMESGAGQQPQPQPFLPPAACFFATAAAAAAAAAAAAA
AQSAQQQQQPQAPPQQAPQLSPVADSQPSGGGHKSAAKQVKRQ
RSSSPELMRCKRRLNFSGFGYSLPQQQPAAVARRNERERNRV
KLVNLGFATLREHVPNGAANKKM[S]KVETLRSAYEYIRALQQL
LDEHDAVSAAFQAGVLSPTISPNYSNDLNSMAGSPVSSYSSD
EGSYDPLSPREEQLLDFTNWF

30

【0052】

いくつかの実施形態によれば、配列番号1または配列番号2に対して少なくとも80%同一であり、かつ少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのリン酸受容体部位の変異を含む、ASCL1転写因子変異体が提供され、各変異は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する。より好ましくは、ASCL1転写因子変異体は、配列番号1または配列番号2に対して少なくとも85%、90%、95%、97%同一である。また本明細書において、配列番号1または配列番号2に対して少なくとも80%、85%、90%、95%または97%同一であり、かつ少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのリン酸受容体部位の変異を含み、各変異は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する、ASCL1転写因子変異体をコードする核酸も提供される。これらの変異体は、転写因子活性を保持する。

40

【0053】

50

一例によれば、bHLH転写因子変異体は、ヒトAscl1-SA5またはマウスAscl1-SA6 (S62/88/185/189/202/218A; 配列番号3) である。あるいは、bHLH転写因子変異体は、ヒトAscl1-SA6またはマウスAscl1-SA7 (S62/88/150/185/189/202/218A; 配列番号5) であり、L-H2接合部のセリンも置換されている。

【0054】

以下に、マウスAscl1-SA6変異体の核酸コード配列 (配列番号4) を提供する。変異型コドンは、影付きされている。

```
A T G G A G A G C T C T G G C A A G A T G G A G A G T G G A G C C G G C C A G C
A G C C G C A G C C C C C G C A G C C C T T C C T G C C T C C C G C A G C C T G
C T T C T T T G C G A C C G C G G C G G C G G C G G C A G C G G C G G C G G C C
G C G G C A G C T C A G A G C G C G C A G C A G C A A C A G C C G C A G G C G C
C G C C G C A G C A G G C G C C G C A G C T G G C C C C G G T G G C C G A C A G
C C A G C C C T C A G G G G G C G G T C A C A A G T C A G C G G C C A A G C A G
G T C A A G C G C C A G C G C T C G T C C G C T C C G G A A C T G A T G C G C T
G C A A A C G C C G G C T C A A C T T C A G C G G C T T C G G C T A C A G C C T
G C C A C A G C A G C A G C C G G C C G C C G T G G C G C G C C G C A A C G A G
C G C G A G C G C A A C C G G G T C A A G T T G G T C A A C C T G G G C T T T G
C C A C C C T C C G G G A G C A T G T C C C C A A C G G C G C G G C C A A C A A
G A A G A T G G C C A A G G T G G A G A C G C T G C G C T C G G C G G T C G A G
T A C A T C C G C G C G C T G C A G C A G C T G C T G G A C G A G C A C G A C G
C G G T G A G C G C T G C C T T T C A G G C G G G C G T C C T G G C G C C C A C
C A T C G C C C C C A A C T A C T C C A A C G A C T T G A A C T C T A T G G C G
G G T G C T C C G G T C T C G T C C T A C T C C T C C G A C G A G G G A T C C T
A C G A C C C T C T T G C C C C A G A G G A A C A A G A G C T G C T G G A C T T
T A C C A A C T G G T T C ( T G A )
```

10

20

【0055】

以下に、マウスAscl1-SA7変異体の核酸コード配列 (配列番号6) を提供する。変異型コドンは、影付きされている。

```
A T G G A G A G C T C T G G C A A G A T G G A G A G T G G A G C C G G C C A G C
A G C C G C A G C C C C C G C A G C C C T T C C T G C C T C C C G C A G C C T G
C T T C T T T G C G A C C G C G G C G G C G G C G G C A G C G G C G G C G G C C
G C G G C A G C T C A G A G C G C G C A G C A G C A A C A G C C G C A G G C G C
C G C C G C A G C A G G C G C C G C A G C T G G C C C C G G T G G C C G A C A G
C C A G C C C T C A G G G G G C G G T C A C A A G T C A G C G G C C A A G C A G
G T C A A G C G C C A G C G C T C G T C C G C T C C G G A A C T G A T G C G C T
G C A A A C G C C G G C T C A A C T T C A G C G G C T T C G G C T A C A G C C T
G C C A C A G C A G C A G C C G G C C G C C G T G G C G C G C C G C A A C G A G
C G C G A G C G C A A C C G G G T C A A G T T G G T C A A C C T G G G C T T T G
C C A C C C T C C G G G A G C A T G T C C C C A A C G G C G C G G C C A A C A A
G A A G A T G G C C A A G G T G G A G A C G C T G C G C T C G G C G G T C G A G
T A C A T C C G C G C G C T G C A G C A G C T G C T G G A C G A G C A C G A C G
C G G T G A G C G C T G C C T T T C A G G C G G G C G T C C T G G C G C C C A C
C A T C G C C C C C A A C T A C T C C A A C G A C T T G A A C T C T A T G G C G
G G T G C T C C G G T C T C G T C C T A C T C C T C C G A C G A G G G A T C C T
A C G A C C C T C T T G C C C C A G A G G A A C A A G A G C T G C T G G A C T T
T A C C A A C T G G T T C ( T G A )
```

30

40

【0056】

ヒト及びマウス野生型Neurod1の例示的なアミノ酸配列を以下に示す。ここで、リン酸受容体部位は影付きされている (囲み枠中の残基は、PKAによりリン酸化される

50

L-H2 接合部で保存されたセリン残基、セリン138 / 138である)。

ヒト (配列番号7)

MTKSYSESGLMGEPQPQGPPSWTDECLSSQDEEHEADKKEDD
LETMNAEEDSLRNGGEEDEDEDLEEEEEEEEEEDDDQKPKRR
GPKKKKMTKARLERFKLRRMKANARERNRMHGLNAALDNLRK
VVPCYSKTQKL[S]KIETLRLAKNYIWALSEILRSGKSPDLVSF
VQTLCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPRTFLPEQNQDMPPHLP
TASASFPVHPYSYQSPGLPSPPYGTMDSSHVFHVKPPPHAYSAA
LEPFFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSINGNFSFKHEPSAEFE
KNYAFTMHYPAATLAGAQSHGSIFSGTAAPRCEIPIDNIMSF
DSHSHHERVMSAQLNAIFHD

10

マウス (配列番号8)

MTKSYSESGLMGEPQPQGPPSWTDECLSSQDEEHEADKKEDE
LEAMNAEEDSLRNGGEEEEDEDEDLEEEEEEEEEEDDQKPKRR
GPKKKKMTKARLERFKLRRMKANARERNRMHGLNAALDNLRK
VVPCYSKTQKL[S]KIETLRLAKNYIWALSEILRSGKSPDLVSF
VQTLCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPRTFLPEQNPDMPPHLP
TASASFPVHPYSYQSPGLPSPPYGTMDSSHVFHVKPPPHAYSAA
LEPFFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSINGNFSFKHEPSAEFE
KNYAFTMHYPAATLAGPQSHGSIFSSGAAAPRCEIPIDNIMS
FDSHSHHERVMSAQLNAIFHD

20

【0057】

いくつかの実施形態によれば、配列番号7または配列番号8に対して少なくとも80% 同一であり、かつ少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4 つのリン酸受容体部位の変異を含む、Neurod1 転写因子変異体が提供され、各変異 は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する。より好ましくは、Neu ro d1 転写因子変異体は、配列番号7または配列番号8に対して少なくとも85%、9 0%、95%、97%同一である。また本明細書において、配列番号7または配列番号8 に対して少なくとも80%、85%、90%、95%または97%同一であり、かつ少な くとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのリン酸受容体部位 の突然変異を含み、各変異は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する 、Neurod1 転写因子変異体をコードする核酸も提供される。

30

【0058】

一例によれば、bHLH 転写因子変異体は、ヒトNeurod1-SA6またはマウス Neurod1-SA6 (S162 / 223 / 228 / 259 / 266 / 274A ; 配列 番号9) である。あるいは、bHLH 転写因子変異体は、ヒトNeurod1-SA7ま たはマウスNeurod1-SA7 (S138 / 162 / 223 / 228 / 259 / 26 6 / 274A ; 配列番号11) であり、L-H2 接合部のセリンも置換されている。

40

【0059】

以下に、マウスNeurod1-SA6 変異体の核酸コード配列 (配列番号10) を提 供する。変異型コドンは、影付きされている。

ATGACCAAATCATACAGCGAGAGCGGGCTGATGGGCGAGC
CTCAGCCCAAGGTCCCCCAAGCTGGACAGATGAGTGTC
CAGTTCTCAGGACGAGGAACACGAGGCGAGACAAGAAAGAG

50

G A C G A G C T T G A A G C C A T G A A T G C A G A G G A G G A C T C T C T G A
G A A A C G G G G G A G A G G A G G A G G A A G A T G A G G A T C T A G A
G G A A G A G G A G G A A G A A G A A G A G G A G G A G G A T C A A A A G
C C C A A G A G A C G G G G T C C C A A A A A G A A A A A G A T G A C C A A G G
C G C G C C T A G A A C G T T T T A A A T T A A G G C G C A T G A A G G C C A A
C G C C C G C G A G C G G A A C C G C A T G C A C G G G C T G A A C G C G G C G
C T G G A C A A C C T G C G C A A G G T G G T A C C T T G C T A C T C C A A G A
C C C A G A A A C T G T C T A A A A T A G A G A C A C T G C G C T T G G C C A A
G A A C T A C A T C T G G G C T C T G T C A G A G A T C C T G C G C T C A G G C
A A A G C C C C T G A T C T G G T C T C C T T C G T A C A G A C G C T C T G C A
A A G G T T T G T C C C A G C C C A C T A C C A A T T T G G T C G C C G G C T G
C C T G C A G C T C A A C C C T C G G A C T T T C T T G C C T G A G C A G A A C
C C G G A C A T G C C C C G C A T C T G C C A A C C G C C A G C G C T T C C T
T C C C G G T G C A T C C C T A C T C C T A C C A G G C C C C T G G A C T G C C
C G C C C C G C C C T A C G G C A C C A T G G A C A G C T C C C A C G T C T T C
C A C G T C A A G C C G C C G C C A C A C G C C T A C A G C G C A G C T C T G G
A G C C C T T C T T T G A A G C C C C C C T A A C T G A C T G C A C C G C C C C
T T C C T T T G A C G G A C C C C T C G C C C C G C C G C T C A G C A T C A A T
G G C A A C T T C T C T T T C A A A C A C G A A C C A T C C G C C G A G T T T G
A A A A A A A T T A T G C C T T T A C C A T G C A C T A C C C T G C A G C G A C
G C T G G C A G G G C C C C A A A G C C A C G G A T C A A T C T T C T C T T C C
G G T G C C G C T G C C C C T C G C T G C G A G A T C C C C A T A G A C A A C A
T T A T G T C T T T C G A T A G C C A T T C G C A T C A T G A G C G A G T C A T
G A G T G C C C A G C T T A A T G C C A T C T T T C A C G A T (T A G)

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

以下に、マウス *Neurod1-SA7* 変異体の核酸コード配列（配列番号 12）を提供する。変異型コドンは、影付きされている。

A T G A C C A A A T C A T A C A G C G A G A G C G G G C T G A T G G G C G A G C
C T C A G C C C C A A G G T C C C C C A A G C T G G A C A G A T G A G T G T C T
C A G T T C T C A G G A C G A G G A A C A C G A G G C A G A C A A G A A A G A G
G A C G A G C T T G A A G C C A T G A A T G C A G A G G A G G A C T C T C T G A
G A A A C G G G G G A G A G G A G G A G G A A G A T G A G G A T C T A G A
G G A A G A G G A G G A A G A A G A A G A G G A G G A G G A T C A A A A G
C C C A A G A G A C G G G G T C C C A A A A A G A A A A A G A T G A C C A A G G
C G C G C C T A G A A C G T T T T A A A T T A A G G C G C A T G A A G G C C A A
C G C C C G C G A G C G G A A C C G C A T G C A C G G G C T G A A C G C G G C G
C T G G A C A A C C T G C G C A A G G T G G T A C C T T G C T A C T C C A A G A
C C C A G A A A C T G G C T A A A A T A G A G A C A C T G C G C T T G G C C A A
G A A C T A C A T C T G G G C T C T G T C A G A G A T C C T G C G C T C A G G C
A A A G C C C C T G A T C T G G T C T C C T T C G T A C A G A C G C T C T G C A
A A G G T T T G T C C C A G C C C A C T A C C A A T T T G G T C G C C G G C T G
C C T G C A G C T C A A C C C T C G G A C T T T C T T G C C T G A G C A G A A C
C C G G A C A T G C C C C C G C A T C T G C C A A C C G C C A G C G C T T C C T
T C C C G G T G C A T C C C T A C T C C T A C C A G G C C C C T G G A C T G C C
C G C C C C G C C C T A C G G C A C C A T G G A C A G C T C C C A C G T C T T C
C A C G T C A A G C C G C C G C C A C A C G C C T A C A G C G C A G C T C T G G
A G C C C T T C T T T G A A G C C C C C C T A A C T G A C T G C A C C G C C C C
T T C C T T T G A C G G A C C C C T C G C C C C G C C G C T C A G C A T C A A T
G G C A A C T T C T C T T T C A A A C A C G A A C C A T C C G C C G A G T T T G
A A A A A A A T T A T G C C T T T A C C A T G C A C T A C C C T G C A G C G A C

GCTGGCAGGGGCCCCAAAGCCACGGATCAATCTTCTCTTCC
GGTGCCGCTGCCCTCGCTGCGAGATCCCCATAGACAACA
TTATGTCTTTTCGATAGCCATTTCGCATCATGAGCGAGTCAT
GAGTGCCCAAGCTTAATGCCATCTTTTACGAT (TAG)

【0061】

ヒト及びマウス野生型 *Neurod4* の例示的なアミノ酸配列を以下に示す。ここで、リン酸化部位は影付きされている（囲み枠中の残基は、PKAによりリン酸化される L-H2 接合部で保存されたセリン残基、セリン124 / 124である）。

ヒト（配列番号13）

MSKTFVKSKEMLVNTPSWMDKGLGSQNEVKEEESRPPTYG
MLSSLTEEHDSIEEEEEEEEDGEKPKRRGPKKKKMTKARLER
FRARRVKANARERTRMHGLNDALDNLRRVMPCYSKTQKL[S]KI
ETLRLARNYIWALSEVLETGQTPEGKGFVEMLCGLSQPTSN
LVAGCLQLGPQSVLLEKHEDKSPICDSAISVHNFNYQSPGLP
SPPYGHMETHLLHLKPQVFKSLGESSFGSHLPDCSTPPYEGP
LTPPLSISGNFSLKQDGSPDLEKSYSFMPHYPPSSSLSSGHVH
STPFQAGTPRYDVPIDMSYDSYPHHGIGTQLNTVFTE

10

20

マウス（配列番号14）

MAKMYMKSKDMVELVNTQSWMDKGLSSQNEMKEQERRPGSYG
MLGTLTEEHDSIEEDEEEEDGDGKPKRRGPKKKKMTKARLER
FRARRVKANARERTRMHGLNDALDNLRRVMPCYSKTQKL[S]KI
ETLRLARNYIWALSEVLETGQTLEGKGFVEMLCGLSQPTSN
LVAGCLQLGPQSTLLEKHEEKSSICDSTISVHSFNYQSPGLP
SPPYGHMETHSLHLKPQPFFKSLGDSFGSHPPDCSTPPYEGPL
TPPLSISGNFSLKQDGSPDLEKSYNFMPHYTSASLSSGHVHS
TPFQTGTTPRYDVPVDLSYDSYSHHSIGTQLNTIFSD

30

【0062】

いくつかの実施形態によれば、配列番号13または配列番号14に対して少なくとも75%同一であり、かつ少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのリン酸受容体部位の変異を含む、*Neurod4* 転写因子変異体が提供され、各変異は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する。より好ましくは、*Neurod4* 転写因子変異体は、配列番号13または配列番号14に対して少なくとも80%、85%、90%、95%または97%同一である。また本明細書において、配列番号13または配列番号14に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%または97%同一であり、かつ少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのリン酸受容体部位の変異を含む、*Neurod4* 転写因子変異体をコードする核酸が提供され、各変異は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する。

40

【0063】

一例によれば、bHLH転写因子変異体は、ヒト *Neurod4*-SA4TA6 またはマウス *Neurod4*-SA3TA4 (S206 / 211 / 269A ; T245 / 253 / 295 / 301A ; 配列番号15) である。あるいは、bHLH転写因子変異体は、ヒ

50

トNeurod4-SA5TA6またはマウスNeurod4-SA4TA4 (S124/206/211/269A; T245/253/295/301A; 配列番号17) であり、L-H2接合部のセリンも置換されている。

【0064】

以下に、マウスNeurod4-SA3TA4変異体の核酸コード配列（配列番号16）を提供する。変異型コドンは、影付きされている。

```
ATGGCAAA AATGTATATGAAATCC AAGGACATGGTGGAGC
TGGTCAACACACAATCCTGGATGGACAAAGGTCTGAGCTC
TCAAAATGAGATGAAGGAGCAAGAGAGAAGACCGGGCTCT
TATGGAATGCTCGGAACCTTAACCTGAAGAGCATGACAGTA
TTGAGGAGGATGAAGAAGAGGGAAGAAGATGGAGATAAACC
TAAAGAGAGAGGTCCCAAGAAAAAGAAAGATGACTAAAGCT
CGCCTTGAAAGATTTCAGGGCTCGAAGAGTCAAGGCCAATG
CTAGAGAACGGACCCGGATGCATGGCCTGAATGATGCCTT
GGATAATCTTAGGAGAGTTCATGCCATGTTACTCTAAAACT
CAAAAGCTTTTCCAAGATAGAGACTCTTCGACTGGCAAGGA
ACTACATCTGGGCTCTTGTCTGAAGTCTCTGGAGACTGGTCA
GACACTTGAAAGGGAAGGGGATTTGTAGAGATGCTATGTAAA
GGTCTCTCTCAACCCACAAGCAACCTGGTTTGCTGGATGCC
TCCAACCTGGGGCTCTCAATCTACCCTCCTGGAGAAAGCATGA
GGAAAAAATCTTCAATTTGTGACTCTACTATCTCTGTCCAC
AGCTTCAACTATCAGGCTCCAGGGCTCCCCCGCCCCCTCCTT
ATGGCCATATGGAAACACATTTCTCTCCATCTCAAGCCTCA
ACCATTTTAAGAGTTTGGGGTGACTCTTTTGGGAGGCCATCCA
CCTGACTGCAGTGCCCCCCCCCTTATGAGGGTCCACTCGCAC
CACCCCTGAGCATTAGTGGAACCTTCTCCTTAAGCAAGA
CGGCGCCCCCTGATTTGGAAAAATCCTACAATTTTCATGCCA
CATTATACCTCTGCAAGTCTAAGTTTCAGGGGCATGTGCATT
CAGCTCCCTTTTCAGACTGGCGCTCCCCGCTATGATGTTCC
TGTAGACCTGAGCTATGATTCCTACTCCACCATAGCATT
GGAACCTCAGCTCAATACGATCTTCTCTGAT (TAG)
```

【0065】

以下に、マウスNeurod4-SA4TA4変異体の核酸コード配列（配列番号18）を提供する。変異型コドンは、影付きされている。

```
ATGGCAAA AATGTATATGAAATCC AAGGACATGGTGGAGC
TGGTCAACACACAATCCTGGATGGACAAAGGTCTGAGCTC
TCAAAATGAGATGAAGGAGCAAGAGAGAAGACCGGGCTCT
TATGGAATGCTCGGAACCTTAACCTGAAGAGCATGACAGTA
TTGAGGAGGATGAAGAAGAGGGAAGAAGATGGAGATAAACC
TAAAGAGAGAGGTCCCAAGAAAAAGAAAGATGACTAAAGCT
CGCCTTGAAAGATTTCAGGGCTCGAAGAGTCAAGGCCAATG
CTAGAGAACGGACCCGGATGCATGGCCTGAATGATGCCTT
GGATAATCTTAGGAGAGTTCATGCCATGTTACTCTAAAACT
CAAAAGCTTTGCCAAGATAGAGACTCTTCGACTGGCAAGGA
ACTACATCTGGGCTCTTGTCTGAAGTCTCTGGAGACTGGTCA
GACACTTGAAAGGGAAGGGGATTTGTAGAGATGCTATGTAAA
GGTCTCTCTCAACCCACAAGCAACCTGGTTTGCTGGATGCC
TCCAACCTGGGGCTCTCAATCTACCCTCCTGGAGAAAGCATGA
GGAAAAAATCTTCAATTTGTGACTCTACTATCTCTGTCCAC
AGCTTCAACTATCAGGCTCCAGGGCTCCCCCGCCCCCTCCTT
```

A T G G C C A T A T G G A A A C A C A T T C T C T C C A T C T C A A G C C T C A
A C C A T T T A A G A G T T T G G G T G A C T C T T T T G G G A G C C A T C C A
C C T G A C T G C A G T G C C C C C C C T T A T G A G G G T C C A C T C G C A C
C A C C C C T G A G C A T T A G T G G C A A C T T C T C C T T A A A G C A A G A
C G G C G C C C C T G A T T T G G A A A A A T C C T A C A A T T T C A T G C C A
C A T T A T A C C T C T G C A A G T C T A A G T T C A G G G C A T G T G C A T T
C A G C T C C C T T T C A G A C T G G C G C T C C C C G C T A T G A T G T T C C
T G T A G A C C T G A G C T A T G A T T C C T A C T C C C A C C A T A G C A T T
G G A A C T C A G C T C A A T A C G A T C T T C T C T G A T (T A G)

【 0 0 6 6 】

10

ヒト及びマウス野生型 *Neurog2* の例示的なアミノ酸配列を以下に示す。ここで、リン酸受容体部位は影付きされている（囲み枠中の残基は、PKAによりリン酸化されるL-H2接合部で保存されたスレオニン残基、スレオニン149／149である）。

ヒト（配列番号19）

M F V K S E T L E L K E E E D V L V L L G S A S P A L A A L T P L S S S A D E E E E
E E P G A S G G A R R Q R G A E A G Q G A R G G V A A G A E G C R P A R L L G L V H
D C K R R P S R A R A V S R G A K T A E T V Q R I K K T R R L K A N N R E R N R M H
N L N A A L D A L R E V L P T F P E D A K L T K I E T L R F A H N Y I W A L T E T L
R L A D H C G G G G G G L P G A L F S E A V L L S P G G A S A A L S S S G D S P S P
A S T W S C T N S P A P S S S V S S N S T S P Y S C T L S P A S P A G S D M D Y W Q
P P P P D K H R Y A P H L P I A R D C I

20

マウス（配列番号20）

M F V K S E T L E L K E E E E V L M L L G S A S P A S A T L T P M S S S A D E E E D
E E L R R P G S A R G Q R G A E A G Q G V Q G S P A S G A G G C R P G R L L G L M H
E C K R R P S R S R A V S R G A K T A E T V Q R I K K T R R L K A N N R E R N R M H
N L N A A L D A L R E V L P T F P E D A K L T K I E T L R F A H N Y I W A L T E T L
R L A D H C A G A G G L Q G A L F T E A V L L S P G A A L G A S G D S P S P P S S W
S C T N S P A S S S N S T S P Y S C T L S P A S P G S D V D Y W Q P P P P E K H R Y
A P H L P L A R D C I

30

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態によれば、配列番号19または配列番号20に対して少なくとも70％同一であり、かつ少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのリン酸受容体部位の変異を含む、*Neurog2* 転写因子変異体が提供され、各変異は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する。より好ましくは、*Neurog2* 転写因子変異体は、配列番号19または配列番号20に対して少なくとも75％、80％、85％、90％、95％または97％同一である。また本明細書において、配列番号19または配列番号20に対して少なくとも70％、75％、80％、85％、90％、95％または97％同一であり、かつ少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つのリン酸受容体部位の変異を含む、*Neurod4* 転写因子変異体をコードする核酸が提供され、各変異は、対応する変異型リン酸受容体部位でのリン酸化を排除する。

40

【 0 0 6 8 】

一例によれば、bHLH転写因子変異体は、ヒト*Neurog2-SA8TA1*またはマウス*Neurog2-SA9TA1*（S24／66／192／203／205／215

50

／ 2 2 4 ／ 2 3 1 ／ 2 3 4 A ； T 3 1 A ； 配列番号 2 1 ）である。あるいは、b H L H 転写因子変異体は、ヒト *Neurog2-SA8TA2* またはマウス *Neurog2-SA9TA2* (S 2 4 ／ 6 6 ／ 1 9 2 ／ 2 0 3 ／ 2 0 5 ／ 2 1 5 ／ 2 2 4 ／ 2 3 1 ／ 2 3 4 A ； T 3 1 ／ 1 4 9 A ； 配列番号 2 3) であり、L-H2 接合部のセリンも置換されている。他の実施形態では、b H L H 転写因子変異体は、マウス *Neurog2-SA9* (S 2 4 ／ 6 6 ／ 1 9 2 ／ 2 0 3 ／ 2 0 5 ／ 2 1 5 ／ 2 2 4 ／ 2 3 1 ／ 2 3 4 A ； 配列番号 2 5) である。

【 0 0 6 9 】

以下に、マウス *Neurog2-SA9TA1* 変異体の核酸コード配列（配列番号 2 2 ）を提供する。変異型コドンは、影付きされている。

```
ATGTTTCGTCAAATCTGAGACTCTGGAGTTTGAAGGAGGGAAG
AGGAGGTTACTGATGCTGCTGGGCTCGGGCTGCCCCGGGCCTC
GGCGACCCCTGGCCCCGATGTCCTCCAGCGCGGGACGAGGAG
GAGGACGAGGAGCTGCGCCCGGCCGGGCTCCGCGCGCTGGGGC
AGCGTGGAGCGGAAGCCGGGCGAGGGGGTGCAAGGGCGCTCC
GGCGTCTGGGTGCGGGGGGGTTGCCGGGCCAGGGCGGGCTGCTG
GGCCTGATGCACGAGTGCAGCGTCCGCCGTCGCGCTTCAC
GGGCCGTCTCCCGAGGTGCCAAGACGGCGGGAGACGGGTGCA
GCGCATCAAGAAAGACCCGCGAGGCTCAAGGCCCAACAACCGC
GAGCGCAACCGCATGCACAACCTAAACGCCCGCGCTGGACG
CGCTGCGCGAGGTGCTGCCCACTTCCCCGAGGATGCCAA
GCTCACGAAGATCGAGACGCTGCGCTTCCGCCACAATTAC
ATCTGGGCGCTCACCGAGACTCTGCGCCTGGGCGGACCACT
GCGCCGGCGGCCGGTGGCCTCCAGGGGGCGCTCTTTCACGGA
GGCGGTGCTCCTGGCCCCGGGAGCTGCGCTCGGGCGCCAGC
GGGGACGCCCCCTGCTCCACCTTCTCTCTGGAGCTGCACCA
ACGCCCCCGGCGTCACTCTCCAACCTCCACGGCCCCATACAG
CTGCACCTTTAGCGCCCGCTGCCCCCGGGGTCAGACGTGGAC
TACTGGCAGCCCCCACCTCCGGAGAAAGCATCGTTATGCGC
CTCACCTGCCCCCTCGGCCAGGGACTGTATC (TAG)
```

10

20

30

【 0 0 7 0 】

以下に、マウス *Neurog2-SA9TA2* 変異体の核酸コード配列（配列番号 2 4 ）を提供する。変異型コドンは、影付きされている。

```
ATGTTTCGTCAAATCTGAGACTCTGGAGTTTGAAGGAGGGAAG
AGGAGGTTACTGATGCTGCTGGGCTCGGGCTGCCCCGGGCCTC
GGCGACCCCTGGCCCCGATGTCCTCCAGCGCGGGACGAGGAG
GAGGACGAGGAGCTGCGCCCGGCCGGGCTCCGCGCGCTGGGGC
AGCGTGGAGCGGAAGCCGGGCGAGGGGGTGCAAGGGCGCTCC
GGCGTCTGGGTGCGGGGGGGTTGCCGGGCCAGGGCGGGCTGCTG
GGCCTGATGCACGAGTGCAGCGTCCGCCGTCGCGCTTCAC
GGGCCGTCTCCCGAGGTGCCAAGACGGCGGGAGACGGGTGCA
GCGCATCAAGAAAGACCCGCGAGGCTCAAGGCCCAACAACCGC
GAGCGCAACCGCATGCACAACCTAAACGCCCGCGCTGGACG
CGCTGCGCGAGGTGCTGCCCACTTCCCCGAGGATGCCAA
GCTCGCGGAAGATCGAGACGCTGCGCTTCCGCCACAATTAC
ATCTGGGCGCTCACCGAGACTCTGCGCCTGGGCGGACCACT
GCGCCGGCGGCCGGTGGCCTCCAGGGGGCGCTCTTTCACGGA
GGCGGTGCTCCTGGCCCCGGGAGCTGCGCTCGGGCGCCAGC
GGGGACGCCCCCTGCTCCACCTTCTCTCTGGAGCTGCACCA
ACGCCCCCGGCGTCACTCTCCAACCTCCACGGCCCCATACAG
```

40

50

CTGCACTTTAGCGCCCGCTGCCCCCGGGTCAAGACGTGGAC
TACTGGCAGCCCCCACCCTCCGGAGAAAGCATCGTTATGCGC
CTCACCTGCCCCCTCGCCAGGGACTGTATC (TAG)

【0071】

場合によっては、変異型bHLLH転写因子タンパク質は、リン酸化を制限または防止するために導入された置換以外の追加の置換を含むことができる。そのような追加の置換は、1つ以上の保存的变化を導入し、それによって、アミノ酸が類似の化学構造、類似の化学特性または類似の側鎖体積の他のアミノ酸と置き換えられる。導入されるアミノ酸は、それらが置き換えるアミノ酸と同様の極性、親水性、疎水性、塩基性、酸性、中性または電荷を有するであろう。あるいは、保存的变化は、既存の芳香族アミノ酸または脂肪族アミノ酸の代わりに、芳香族または脂肪族である別のアミノ酸を導入し得る。保存的アミノ酸変化は当技術分野では周知であり、20の主要アミノ酸の特性に従って選択され得る。保存的置換は、タンパク質またはポリペプチドの機能に影響を及ぼさない。このような保存的置換を含むタンパク質は、本明細書では「保存的変異体」と称する。

10

【0072】

治療法及び組成物

本明細書に記載されるように、哺乳動物（例えば、神経変性疾患もしくは障害、またはCNSもしくは脳損傷を有する哺乳動物）は、グリア細胞を刺激して神経細胞を形成するやり方で、上記の単離された変異型bHLLH転写因子を哺乳動物脳内（例えば、大脳皮質）のグリア細胞、好ましくはアストロサイトに送達することにより治療され得る。形成された神経細胞は、電気生理学的機能を有していても、有していなくてもよい。いくつかの実施形態では、形成された神経細胞は、神経可塑性を高め、他の細胞型の成長及び発達を支援し、及び／またはそれらの微小環境を改変する（例えば、それらの微小環境の毒性を低下させる）ために機能する。変異型bHLLH転写因子は、単離または精製されたタンパク質として直接送達されるか、または変異型bHLLH転写因子をコードする核酸の発現を介して送達され得る。

20

【0073】

いくつかの実施形態によれば、2つ以上の変異型bHLLH転写因子は、対象の治療に使用される。2つ以上の変異型は、同時にまたは順番に使用され得る。

【0074】

神経変性疾患または障害は、例えば、アルツハイマー病（AD）（初老性及び老年性の形態）、軽度認知障害、アルツハイマー病関連認知症、タウオパチー、 α -シヌクレイン病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、運動ニューロン疾患、痙性対麻痺、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、フリードライヒ運動失調症；対応する遺伝子内のトリヌクレオチドまたはテトラヌクレオチドエレメント素の病理学的拡大から生じる、ポリグルタミン、ポリアラニンまたは他のリピートを伴うタンパク質の細胞内及び／または神経細胞内の凝集に関連する神経変性疾患；ダウン症候群、プリオン関連疾患、家族性英国型認知症、家族性デンマーク型認知症、痙性運動失調を伴う初老期認知症、脳アミロイド血管症（英国型）；痙性運動失調、脳アミロイド血管症を伴う初老期認知症（デンマーク型）；顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、拳闘家認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、パーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、プリオン関連疾患、ハラーホルデン・スパッツ症候群、筋緊張性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアマニアン運動ニューロン疾患、ピック病、脳炎後パーキンソニズム、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性全脳炎、及び神経原線維変化型認知症；レビー小体型認知症、グリア細胞質内封入体を伴う多系統萎縮症、シャイ・ドレーガー症候群、線条体黒質変性症、オリブ橋小脳萎縮症；脳内鉄蓄積I型、嗅覚障害及び筋萎縮性側索硬化症を伴う神経変性であり得、痙性対麻痺及び脊髄小脳失調症は、DRPLAまたはマシャド・ジョセフ病であり；プリオン関連疾患は、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、及び変異型クロイツフェルト・ヤコブ病である。好ましくは、神経変性

30

40

50

疾患または障害は、ALS、AD、アルツハイマー病関連認知症、パーキンソン病、ダウン症候群、拳闘家認知症、多系統萎縮症、前頭葉側頭葉型認知症、進行性核上性麻痺、プリオン病、ハンチントン病、運動ニューロン疾患、またはレビー小体病である。脳またはCNSの損傷は、例えば、外傷、脳震盪、脳卒中、腫瘍、感染、薬物濫用、低酸素症、無酸素症、動脈瘤、神経学的疾患から生じる損傷、毒素、塞栓、血腫、脳出血、遺伝性疾患から生じる損傷、または昏睡であり得る。

【0075】

本出願は更に、変異型bHLH転写因子及び1つ以上の薬学的に許容される希釈剤、賦形剤または担体を含む、組成物を提供する。1つ以上の変異型bHLH転写因子を送達するための組成物は、例えば、リポソームもしくは生体材料などのナノキャリアまたはナノ粒子の形態であり得る（このような送達配合物のレビューについては、Kha it NL, Ho E, 及びSho ichet MS, Advanced Functional Materials, special issue on Advanced Materials for Drug Delivery and Theranostics. (2021) 2010674: 1-32を参照のこと）。そのような送達配合物は、変異型bHLH転写因子（複数可）をCNS内の標的グリア細胞に特異的に誘導するためのターゲティングエレメントを更に組み込むことができる。

【0076】

いくつかの実施形態では、神経細胞系列変換の効率を改善するため、またはサブタイプの同一性を付与するために、変異bHLH転写因子は、1つ以上の他の転写因子（TF）と一緒に使用される。本明細書に記載される変異型bHLH転写因子と一緒に発現し得る、運命決定因子として作用する他のTFとしては、領域同一性を特定するホメオドメインTF（Dlx1、Dlx2、Pax6、Emx1、Lhx2）、層V決定因子（Fezf2、Ctip2）、Nurr1（公式遺伝子名、Nr4a2、神経細胞リプログラミング効率を高める）、Brn2（公式遺伝子名、Pou3f2、神経発生を促進するためにAscl1と共に協同）SoxファミリーTF（神経同一性を特定する）、及び代替的な非神経細胞運命の多系列抑制因子であるMyt1lが挙げられるが、これらに限定されない。分化した細胞を分化転換させる方法におけるこれらのTFのいくつかの使用について、欧州特許出願第3099786号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0077】

あるいは、本明細書にも記載されるように、哺乳動物（例えば、神経変性疾患もしくは障害、またはCNSもしくは脳損傷を有する哺乳動物）は、グリア細胞、好ましくはアストロサイトを刺激して神経細胞を形成するやり方で、上記の変異型bHLH転写因子を発現するように設計された核酸を哺乳動物の脳内（例えば、大脳皮質）のグリア細胞、好ましくはアストロサイトに投与することにより治療され得る。上記のように、形成された神経細胞は、電気生理学的機能を有していても、有していなくてもよい。いくつかの実施形態では、形成された神経細胞は、神経可塑性を高め、他の細胞型の成長及び発達を支援し、及び／またはそれらの微小環境を改変する（例えば、それらの微小環境の毒性を低下させる）ために機能する。

【0078】

したがって、本出願は更に、変異型bHLH転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸または核酸コンストラクトを提供する。核酸は、本明細書に記載の変異型bHLH転写因子をコードするポリヌクレオチドであって、制御配列と適合する条件下で、適切な宿主細胞においてコード配列の発現を指示する1つ以上の制御配列に作動可能に連結されている、前記ポリヌクレオチドを含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、核酸は、発現標的グリア細胞のために設計される。あるいは、核酸は、変異型bHLH転写因子を製造するために、細菌系などのin vitro系での発現のために設計される。また本明細書において、そのような核酸と、1つ以上の希

10

20

30

40

50

釈剤、賦形剤または担体とを含む組成物であって、組成物が対象を治療するために投与される場合、それは1つ以上の薬学的に許容される希釈剤、賦形剤または担体である、前記組成物も提供される。

【0080】

変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに加えて、核酸はコード配列に作動可能に連結された1つ以上の調節エレメントを含み得る。本明細書で 사용되는場合、「作動可能に連結されている」とは、コードされたポリペプチドの発現を可能にするまたは促進するような方法でのベクター中の調節エレメントの核酸に対する位置決めを指す。調節エレメントの例としては、翻訳開始配列（例えば、非標的組織での発現を回避するためのコザック共通配列または組織特異的コザック配列（例えば、McCllements et al. Mol. Vis. 2021, 27:233-242））；核酸の発現（例えば、転写または翻訳）を調節するプロモーター配列、エンハンサー配列、応答エレメント、シグナルペプチド、内部リボソームエンタリー配列、5'UTR、3'UTR、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターまたは誘導性エレメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【0081】

例えば、変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸の転写を促進するために、プロモーターを核酸に含ませることができる。プロモーターは、構成的または誘発性であってよく、ポリペプチドをコードする核酸の発現に一般的にまたは組織特異的に影響を及ぼし得る。グリア細胞（例えば、アストロサイト）における変異型bHLH転写因子ポリペプチドの発現を促進するために使用することができる細胞特異的及び／または組織特異的プロモーターの例には、ネスチン、ビメンチン、NG2、GFAP、gfapABC₁D（最小GFAPプロモーター）、Olig2、CAG、EF1a、Aldh1L1、CMV及びCBA（キメラCMV-ニワトリβ-アクチン）プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、アストロサイトにおける変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸の転写を容易にするために、GFAPプロモーターをウイルスベクターに含ませることができる。

【0082】

変異型bHLH転写因子の発現のために核酸に含まれることができる追加の調節エレメントの中には、3'UTR及び／または5'UTR配列がある。特定の実施形態では、核酸は、野生型Ascl1 3'UTRを組み込む。野生型Ascl1における3'UTRは、ナンセンス媒介崩壊（NMD）に関するメッセージを標的とするイントロンを含む。変異bHLH転写因子をコードする核酸にAscl1 3'UTRを加えると、転写物の安定性が低下する可能性があるため、それは神経細胞への細胞変換後に分解され、それによって、神経細胞リプログラミングが達成された後の継続的な発現が回避される。場合によっては、bHLHタンパク質はP1脳NSCを神経細胞に変換することができるが、これらの神経細胞は、bHLHタンパク質の発現が維持される場合、経時的に死滅する（L. Cai, E. M. Morrow, and C. L. Cepko, Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. Development 127 (2000) 3021-30）。したがって、いくつかの実施形態では、変異型bHLH転写因子遺伝子の発現をオフにするのに有用なそのような制御配列を組み込むことが有益であり得る。

【0083】

Ascl1 3'UTR配列（配列番号38）の配列を以下に示す（NM_008553.5）。陰付きの配列は第1のエクソンであり、配列の残りは第2のエクソンを構成する。

ggaccctgccaggcctctcctggggaatggacttttggaagcagg
gatggcagcagatcctgcatacttttagtggtttctcggccaac

g a c g t c a a a t g g g g a g g c a g a a a a a c a a g g g g a a a a a a g a
 a g a a g a a a t g a a a c a a a c a a a c c a g a c a g c c a a c c t a c a g
 g g g c a c c t t c a c t a a g a t g c a a t g t t c t c a g c a a a c a g g g
 g t g g g c t c c a a c a g t g t c t c t g c a t t c c a a c a t c a t t t c c
 a g a c a c g a g a a g a g t g a c t g g t g t c t g a a c c t a a g c c c g a
 a t c a c a g a t g g g t t c c t t t c c t g g a g c a a g a g c g t c a c a c
 a c a c a c a c a c a c a c a c a g a c a g a c a c t a t a t t a a c t c c c a
 a c c a c t a a c a g g c a g g g c t g g a a g c g c g c a t g t g c a a g t g
 c c t t c a c c t c c c a c t c t c t g t c a g a g c t g t c t t a g c c c c c
 t g a a a c t g g g t t g a t g t c t t t c c t c a g t c a c c c c c a t t c c
 a g c g a t c t a t g g a c a t t t g c c t c c a t t g a a g c a a c g t c a g
 t t c t c g g a c a g c c t t t c c c t c t c c t g g t g g c c t c c t c c c c
 a a a c c c c a c a t c g c c c t c c c a c g g t c t t t g c t t c t g t t t t
 c t t c a t a g a a t g c t t c c a a t c t t t g t g a a t t t t t t a t t a
 t a a g a a a a a a a t c t a t t t g t a t c t a t c c t a a c c a g t t t g g
 g g a t a t a t t a a g a t a t t t t g t a c a t a a g a a a a a g a g a g a
 g a a a a a a t t t a t a g a a g t t t t g t a c a a a t g g t t t a a a a a t
 g t g t a t a t c t t g a t a c t t t a a c a t g t a a t g a g a t t a c c t c
 t g c g t a c t t t a g a t a t g t a g t t c a t c t t a c a a c t g c c a t c
 c c c a c c c c c a t c c c c a g t g t g g t t t t g g a a a g a a c t c t c c
 t c a t a g g t g a g a t c t a a a t g c c a c c a g a a t g a c t t c a g c a
 c c a a t g t g t c t t a c t t c a c a g a a a c g t g g t t a a t g t a t t a
 a t g a t g t t a t t a a a a a a a a c t g t t c a a g a a g a a c a a a a g t
 t t a t g c a g c t a c t g t c c a a a c g c a a a g t g g c a g c c c g t t g
 g t t c c c a t a g g t t g c c t t t t g g a a g t t t c t a c c a t t g c c t
 t c c c c c t c a c a c c c a c c c c t t a c t g t t t t a t t a c a a a c t t
 a c a a a a a a a a g t g t a t a a c c c t g t t t t a t a c a a a c t a g t t
 t t g t a a t a a a a c t t t t t c c t t t t t a t a t a a a a a g a a g a g
 a g a g a g a g a a t g a a a a a a a a a a

【0084】

以下に、発現をオフにするのに有用な A s c l 1 イントロン配列（マウス；（配列番号 39））を提供する。

g t a c g c t t c a t g t g g g g a t g g g c a g a g c c t t t c t t g a c t a
 g g t c c c t t t t t c t t t t t c g g t g t g g a g g g g g a g t t c a c g
 g a a g g t a g g g g c t g t c t c c a g g a a c c c a g g g g t g a g a g g a
 g g t t a c t a t g t t g t t a g t t t g t c c a t c t c a a g t g c t a g t g
 t g t t a a c t t c a g t c t t g g c c c c t g a g a g t g g c t t t g c c c a
 a g t t t c c a a g a g c a g a a g g t c g a g g t g a g g c a t a g a g a c c
 c t g c g t a t t g a g t c c t g g g a c t t t g t c c a a a g a g a t g t t t
 t a c c t g a c a g a t t c t c c a a g c c t g a a t a g c t t c t a c c a c a
 c c c c t t c a a g t t c a c a c t a a c c t c t c t t g t t t c t g t t a c a
 g

【0085】

いくつかの実施形態では、神経細胞系列変換の効率を改善するため、またはサブタイプの同一性を付与するために、変異 b H L H 遺伝子は、1つ以上の他の転写因子（TF）と一緒に発現される。コード配列は、ポリシストロニック転写物から複数の遺伝子の化学量論的発現を可能にするために、リボソームスキッピング配列（例えば、v 2 A、t 2 A、p 2 A）によって分離される。本明細書に記載される変異型 b H L H 転写因子と一緒に発現し得る、運命決定因子として作用する他の TF としては、領域同一性を特定するホメオドメイン TF（D l x 1、D l x 2、P a x 6、E m x 1、L h x 2）、層 V 決定因子（

F e z f 2、C t i p 2)、N u r r 1 (公式遺伝子名、N r 4 a 2、神経細胞リプログラミング効率を高める)、B r n 2 (公式遺伝子名、P o u 3 f 2、神経発生を促進するためにA s c l 1と共に協同) S o xファミリーTF (神経同一性を特定する)、及び代替的な非神経細胞運命の多系列抑制因子であるM y t 1 lが挙げられるが、これらに限定されない。分化した細胞を分化転換させる方法におけるこれらのTFのいくつかの使用について、欧州特許出願第3 0 9 9 7 8 6号に記載されている。

【0086】

上記のように、いくつかの実施形態では、2つ以上の変異型bHLH転写因子は、対象の治療に使用される。この実施形態の一例では、核酸は、ポリシストロニック転写物から複数の遺伝子の化学量論的発現を可能にするために、リボソームスキッピング配列（例えば、v 2 A、t 2 A、p 2 A）により分離される2つ以上の変異型bHLH転写因子についてのコード配列を含むことができる。例えば、核酸は、第1の変異型bHLH転写因子及び第2の異なる変異型bHLH転写因子をコードする配列、ならびに介在するt 2 aポリペプチド配列を含み得る。このような核酸は、神経細胞リプログラミング効率を高めるために、2つの変異型bHLH転写因子のタンデムでの発現に有用である。

【0087】

いくつかの実施形態では、1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸は、ウイルスベクターなどの1つ以上のベクターを用いて哺乳動物に投与することができる。核酸（例えば、変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸）を投与するためのベクターは、適切な材料（例えば、パッケージング細胞株、ヘルパーウイルス及びベクターコンストラクト）を用いて調製することができる。例えば、Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), edited by Jeffrey R. Morgan, Humana Press, Totowa, N. J. (2002) 及びViral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, edited by Curtis A. Machida, Humana Press, Totowa, N. J. (2003)を参照のこと。場合によっては、ウイルス系ベクターを使用し、分裂細胞において核酸を発現させることができる。場合によっては、ウイルス系ベクターを使用し、非分裂細胞において核酸を発現させることができる。場合によっては、ウイルス系ベクターを使用し、分裂細胞及び非分裂細胞の両方において核酸を発現させることができる。生きている哺乳動物のCNS内で変異型bHLH転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸を送達するための、ウイルス系核酸送達ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、及びパピローマウイルスなどの動物ウイルスに由来し得る。場合によっては、変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター（例えば、AAV血清型2、AAV血清型2/5、AAV血清型2/8、AAV血清型5またはAAV血清型9ウイルスベクター）、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、またはボックスウイルスベクターを使用してアストロサイトに送達することができる。例えば、変異bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸を、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて哺乳動物に投与し、分裂細胞及び非分裂細胞の両方において変異bHLH転写因子ポリペプチドを発現させることができる。

【0088】

変異型bHLH転写をコードする核酸中に組み込むことができる部位特異的組換えエレメントの例は、組換え標的部位（例えば、LoxP部位）、または核酸の部位特異的組換えを調節するフリップ切除(FLEx)スイッチであるが、これらに限定されない。ウイルスベクターに含めることができるエレメント（複数可）の選択は、誘導性、標的化、所望の発現レベル、及び所望の組換え部位を含むいくつかの要因に依存するが、これらに限定されない。

【0089】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、1つ以上の変異型bHLH転写因子をコードする核酸を、非ウイルスベクターにおいて調製することができる。非ウイルスベクターの例には、リポプレックス、無機ナノ粒子、及びネイキッドDNAまたはプラスミドDNAが含まれるが、これらに限定されない。非ウイルスベクターは、通常、いかなるウイルス成分にも依存しない。いくつかの実施形態では、非ウイルスベクターは、1つ以上の変異型bHLH転写因子をコードする配列を標的細胞染色体に組み込むことができる、トランスポゾンまたは可動性DNAエレメントである。

【0090】

1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチドの発現のためのウイルスベクターまたは非ウイルスベクター核酸は、例えば、DNAトロイの木馬、リポソームもしくは生体材料などのナノキャリアまたはナノ粒子で調製され得る（このような送達配合物のレビューについては、Khait NL, Ho E, and Shoichet MS, *Advanced Functional Materials, special issue on Advanced Materials for Drug Delivery and Theranostics*. (2021) 2010674:1-32を参照のこと）。このような配合物は、核酸をCNS内の標的グリア細胞に特異的に誘導するためのターゲティングエレメントを更に組み込むことができる。

【0091】

ウイルス及び非ウイルスベクターを含む変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸は、これらに限定されないが、分子クローニング、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、化学的核酸合成技術、及びこのような技術の組み合わせを含む技術により製造することができる。例えば、PCRまたはRT-PCRは、変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸（例えば、ゲノムDNAまたはRNA）を増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーと共に使用することができる。次いで、後続の分子クローニング技術を使用し、変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸を、ウイルスベクター（例えば、AAV2/5、AAV2/8、AAV9などのAAV）または非ウイルスベクター内の適切な位置に挿入することができる。

【0092】

1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチドの発現のための核酸を対象のグリア細胞に送達することにより、変異型bHLH転写因子ポリペプチドの効率的な発現及びその後のグリア細胞のリプログラミングが、環境抑制制御の影響を受けることなく、または最小限の影響を受けてもたらされる。同様に、1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチドを対象のグリア細胞に送達することにより、グリア細胞のリプログラミングが、環境抑制制御からの影響を受けることなく、または最小限の影響を受けてもたらされる。

【0093】

1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチド、または1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸を、CNS内のグリア細胞（例えば、アストロサイト）に送達するために、任意の適切な方法を使用することができる。

【0094】

1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチド、または1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸を含む本明細書に記載の組成物は、例えば、直接頭蓋内投与、線条体内注射、脳室内注射、大槽内注射、実質内注射、くも膜下腔内注射、腹腔内投与、静脈内投与、動脈内、鼻腔内投与、筋肉内投与、またはナノ粒子及び／または薬剤の錠剤、カプセルもしくは丸剤での経口投与を介して大脳皮質などのCNSのグリア細胞（例えば、アストロサイト）に投与することができる。

【0095】

本明細書に記載されるように、変異型bHLH転写因子ポリペプチド、または変異型bHLH転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸、またはこれらの任意の組み合わせは、神経変性疾患もしくは障害、またはCNS損傷（例えば、脳卒中）を有する哺乳動物（例えば、ヒト）に投与され、疾患もしくは障害を治療もしくは予防するか、ま

10

20

30

40

50

たは損傷を治療することができる。投与された変異型 b H L H 転写因子（複数可）または発現した変異型 b H L H 転写因子（複数可）は、グリア細胞（例えば、C N Sのアストロサイト）の神経細胞への変換、神経細胞：グリア比のリバランシング、励起：抑制のリバランシング、損傷した脳組織の修復、グリア瘢痕の軽減、神経炎症の軽減、血液脳関門の回復、及び／または毒性ミクログリア量の低減によって、神経変性疾患もしくは障害の治療もしくは予防、または損傷の治療に機能する。任意選択で、神経変性疾患もしくは障害の治療もしくは予防のため、または損傷の治療のための方法は、並行してまたは順番に 2 つ以上の変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドの発現を含むことができる。

【0096】

特定の実施形態によれば、変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドもしくは変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸、またはこれらの任意の組み合わせは、A L Sを患う、またはA L Sを発症させるリスクがある哺乳動物（例えば、ヒト）に投与され得る。この実施形態では、投与または発現した変異型 b H L H 転写因子ポリペプチド（複数可）は、グリア細胞（例えば、アストロサイト）の機能的神経細胞への変換、神経細胞：グリア比のリバランシング、励起：抑制のリバランシング、損傷した脳組織の修復（例えば、運動皮質及び／または脊髄における神経変性を修復）、病原性 T D P - 4 3 タンパク質凝集の低減、及び／または神経炎症の軽減によって、哺乳動物の A L S を治療または予防する。任意選択で、A L S の治療または予防のための方法は、2 つ以上の変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドを並行してまたは順番に投与または発現することを含み得る。

【0097】

別の特定の実施形態によれば、変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドもしくは変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸、またはこれらの任意の組み合わせは、アルツハイマー病（A D）を患う、またはA Dを発症させるリスクがある哺乳動物（例えば、ヒト）に投与され得る。この実施形態では、投与または発現した変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドは、グリア細胞（例えば、アストロサイト）の神経細胞、特にグルタミン作動性及び G A B A 作動性神経細胞への変換、励起：抑制のリバランシング、神経細胞：グリア比のリバランシング、神経炎症の軽減、海馬神経細胞結合性の増加、ブランクとミクログリアの会合を増大、及び／またはアミロイドブランククリアランスの刺激によって哺乳動物の A D を治療または予防に機能する。任意選択で、A D の治療または予防のための方法は、2 つ以上の変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドを並行してまたは順番に投与または発現することを含み得る。

【0098】

別の特定の実施形態では、変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドもしくは変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドを発現するように設計された核酸、またはこれらの任意の組み合わせは、脳損傷、例えば、脳卒中後の哺乳動物（例えば、ヒト）に投与され得る。この実施形態では、投与または発現した変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドは、グリア細胞（例えば、アストロサイト）の神経細胞、特にグルタミン作動性及び G A B A 作動性神経細胞への変換、励起：抑制のリバランシング、神経細胞：グリア比のリバランシング、瘢痕形成の低減、神経炎症の軽減、神経細胞結合性の増加、神経可塑性の増加によって哺乳動物の損傷の治療に機能する。任意選択で、脳卒中の治療のための方法は、2 つ以上の変異型 b H L H 転写因子ポリペプチドを並行してまたは順番に投与または発現することを含み得る。

【0099】

したがって、更に本明細書で提供及び使用されることは、本明細書で開示される核酸（複数可）、ベクター（複数可）及び／またはタンパク質（複数可）を含む組成物（複数可）である。組成物は、1 つ以上の薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、担体などを含む、医薬組成物であり得る。

【0100】

いくつかの実施形態によれば、哺乳動物（例えば、生きている哺乳動物）内の脳（例え

10

20

30

40

50

ば、大脳皮質)を監視し、本明細書に記載の治療の有効性を評価することができる。哺乳動物内に存在する疾患もしくは障害、または脳損傷が有効に治療されているかどうかを判定するために、任意の適切な方法を使用することができる。例えば、イメージング技術及び／または実験室アッセイを使用し、哺乳動物の脳内に存在するアストロサイトの数及び／または神経細胞の数を評価することができる。場合によっては、イメージング技術及び／または実験室アッセイを使用し、変異型bHLH転写因子媒介効果(例えば、グリア細胞(例えば、アストロサイト)を機能的神経細胞に変換する、神経細胞：グリア比をリバランシングする、損傷した脳組織を修復する(例えば、グリア瘢痕形成を低減させる)、神経炎症を軽減させる、血液脳関門を回復させる、神経血管単位を回復させる、毒性ミクログリア量を低減させる、海馬神経細胞結合性を増加させる、プラークとミクログリアの会合を増大させる、及び／またはアミロイドプラーククリアランスを刺激する)があるかどうかを評価できる。場合によっては、変異型bHLH転写因子媒介効果を評価するために使用できるイメージング技術及び／または実験室アッセイは、実施例に記載するとおりであり得る。治療した対象では、治療の効果を、例えば、PET、MRIまたはCTスキャンを使用して監視することができる。

10

【0101】

本明細書において、本明細書に記載の1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチド(例えば、Neurog2-SA9、Ascl1-SA6、Neurod4-SA3/T A4、Neurod1-SA6、またはこれらの任意の組み合わせ)、または本明細書に記載の1つ以上の変異型bHLH転写因子ポリペプチドをコードする核酸を含む、キットもまた提供される。キットはまた、本明細書に記載の方法のいずれかを行うための指示を含み得る。場合によっては、キットは、本明細書に記載の組成物のいずれかの少なくとも1投与量を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の組成物のいずれかを投与するための手段(例えば、注射器)を提供することができる。

20

【0102】

本明細書に記載の本発明のより良い理解を得るために、以下の実施例が示される。これらの実施例は例示のみを目的とすることを理解されたい。したがって、それらは決して本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0103】

30

実施例1：ALS治療のための神経細胞系列変換

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、脳及び脊髄の運動神経細胞の喪失を招き、運動機能の低下をもたらし、最終的には死に至る、末期の神経変性疾患である。アストロサイトは神経細胞毒性の一因となり、死順行性モデルは、神経細胞変性が最初に運動皮質で生じること示唆し、これは脊髄における運動神経細胞死を引き起こす。ここで、ALS患者で見出されるG93A変異を保有するヒトSOD1導入遺伝子を発現するhSOD1^{G93A}トランスジェニックマウスを用いて、疾患の進行を遅延させる手段として、運動皮質アストロサイトの神経細胞系統変換を研究した。アストロサイトから神経細胞への変換を促進するために、6つのセリンがアラニンに変換された前神経遺伝子Ascl1(Ascl1-SA6)の改変形態の異所性発現は、胎児脳での神経細胞変換率を向上させる。遺伝子送達には、グリア原線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーターの制御下で、ベクターとしてアデノ随伴ウイルス(AAV)2/5を使用して達成した。まず、Ascl1-SA6が皮質アストロサイトをAscl1よりも効率的に神経細胞に変換できることを確認した。次に、皮質アストロサイトにおいてAscl1-SA6を異所性発現させることによる疾患の進行に及ぼす影響を監視し、hSOD1^{G93A}トランスジェニックマウスが、その体重を維持する能力が高く、良好な(すなわち、低い)神経スコアを保持し、運動機能の改善の徴候を有していたことを明らかにした。まとめると、これらのデータは、運動皮質アストロサイトを標的とした神経細胞系統変換を、ALSの治療のための治療戦略として使用できることを示している。

40

【0104】

50

概要

A L Sは、骨格、内臓及び心筋を神経支配する、運動皮質における上位運動神経細胞、ならびにそれらの神経支配の標的、脳幹及び脊髄における下位運動神経細胞の死と関連している^{1、2}。下位運動神経細胞の喪失は、筋肉の除神経、筋萎縮を引き起こし、最終的には死に至る²。この疾患の研究の多くは、脊髄運動神経細胞で見られる病理に焦点を当てているが、最近のエビデンスでは、死順行性モデルが支持されており、このモデルでは、神経変性が運動皮質で始まり、その後、脊髄に進行する。このモデルの裏付けとして、経頭蓋磁気刺激（T M S）により、A L Sの患者では臨床的な運動症状の前に皮質過剰興奮性が増加することが明らかになった³。同様に、A L Sの動物モデルであるh S O D 1 G 9 3 Aトランスジェニックマウスでは、樹状突起退行、脊椎喪失及び過剰興奮性は、生後（P）30日目の症状発症前に運動皮質で観察される⁴。

10

【0105】

死順行性モデルはまた、運動皮質における病理が脊髄疾患に先行するだけでなく、死順行性も推進させ得ることも提示した。このモデルとの相関として、上位運動神経細胞の死を防ぐことによって、疾患の進行が失速する可能性があることが示唆されている。この発見と一致して、症状発症前のh S O D 1 G 9 3 Aラットの運動皮質における変異S O D 1のノックダウンは、疾患の進行を遅延させ、生存期間を延長させ、下位運動神経細胞と神経筋接合部変性を遅延させる⁵。加えて、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）を分泌するアストロサイトに分化するh S O D 1 G 9 3 Aの運動皮質に移植された神経前駆細胞は、上位運動神経細胞死及び下位運動神経細胞死の両方を遅延させる⁶。

20

【0106】

アストロサイトは、健康な宿主脳に移植されると病理を誘発する可能性があるため、A L S動物モデルにおける神経細胞死の主要な寄与体である⁷。A L Sアストロサイトに関連する毒性を防ぐため、及び失われた上位運動神経細胞を置換する可能性を高めるために、現在では神経細胞系統変換の手法が開発されている。Neuro g 1、Neuro g 2、Ascl 1、Neuro d 4を含む前神経遺伝子は、胎児脳における神経発生の決定的アーキテクト、及び成人における神経細胞リプログラミングとして現れたb H L H転写因子（T F）をコードする⁹。これらのb H L H遺伝子は、転写カスケードにおいて作用し、神経細胞の分化を制御する後の発生段階で機能する、Neuro d 1などの他のb H L H遺伝子を活性化する。しかしながら、これらのb H L H遺伝子は、すべての細胞状況で活性であるわけではなく、環境シグナルによって阻害される可能性がある。例えば、胚皮質では、Neuro g 2は、胎生期E 17で終わる神経原性期中の後期段階での継続した発現にもかかわらず、（E）11.5～E 14.5の間のグルタミン酸作動性神経細胞運命を特定するのに（機能獲得により¹⁰）十分であり、かつ（機能喪失により）必要であるだけである^{11～13}。

30

【0107】

前神経b H L HのT F機能が阻害される1つの方法は、「レオスタット様」に作用する、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼ（例えば、G S K 3、E R K 1 / 2、C d k）によるリン酸化によるものである。セリンープロリン（S P）またはスレオニンープロリン（T P）部位がリン酸化が多いほど、これらのT FがD N Aに結合して標的遺伝子をトランス活性化し、神経細胞の運命の特定及び分化を促進する能力が低下する^{10、14～16}。マウスNeuro g 2には9つのS P部位があり、マウスAscl 1には6つのS P部位がある。野生型Ascl 1は、E R Kによりリン酸化される¹⁶。更に、Ascl 1-SA 6を生成するための6つのセリン（S P）のアラニン（S A）への変異により、Ascl 1の前増殖性／グリオ形成性が低下するため、ほぼ独占的に神経発生が促進される¹⁶。また、Neuro g 2はG S K 3によりS P部位でリン酸化されており、Neuro g 2の前神経活性が低下することも判明した。Neuro g 2のリン酸化を阻害すると、Neuro g 2は発達段階のE 14.5でも、より強い前神経活性を有する。

40

【0108】

前神経遺伝子の細胞状況に依存した活動は、成人の脳及び神経細胞リプログラミングに

50

まで及ぶ。Ascl1は、線維芽細胞^{17~22}、肝細胞²³、心筋細胞²⁴、アストロサイト²⁵の神経細胞系統変換、及び多能性細胞²⁶の分化を効率的に促進することができるが、Ascl1は、成人の新皮質²⁷、海馬、及び脊髄^{28, 29}では効率が低くなる。同様に、Neurog2は、神経細胞リプログラミングに使用される頻度が低くなる。なぜなら、Neurog2は、強力な系統変換体になるために他のシグナルと組み合わせる必要があるからである³⁰。したがって、前神経遺伝子がどのように調節されるかをより良く理解することにより、それらを再生医療においてより効率的に使用することができる。

【0109】

本実験は、アストロサイト型プロモーター（すなわち、GFAP）の制御下で、環境抑制制御を受けないように設計されている、Ascl1-SA6と呼ばれる、改変型Ascl1を使用して行った。

【0110】

方法

動物及び遺伝子型判定。動物手順は、Guidelines of the Canadian Council of Animal Careに従ってSunnybrook Research Institute（21-757）によって承認された。hSOD1^{G93A}（B6.Cg-Tg（SOD1*G93A）1Gur/J、JAX#008230）及びRosa-ZsGreen（JAX#007906）マウスを、Jackson Laboratoryから購入し、C57BL/6バックグラウンドで維持した。マウスを、食品及び水への自由なアクセスを備えた12：12時間の明暗サイクル下でケージに収容した。PCRプライマー及び遺伝子判定のための条件を、Jackson Laboratoryプロトコルを使用して行った。hSOD1^{G93A}フォワード：CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA（配列番号26）；リバーズ：CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA（配列番号27）。Rosa-ZsGreen：野生型フォワード：CTG GCT TCT GAG GAC CG（配列番号28）；野生型リバーズ：AAT CTG TGG GAA GTC TTG TCC（配列番号29）；変異フォワード：ACC AGA AGT GGC ACC TGA C（配列番号：30）；変異リバーズ：CAA ATT TTG TAA TC C AGA GGT TGA（配列番号31）。

【0111】

hSOD1^{G93A}マウスを、疾患の進行を決定するために、毎週の体重測定及び毎日の行動評価を含む、症状について詳細に監視した。疾患の発症及び進行の程度を、ALSTDI-Neuroscoreを使用して監視した。Hatzipetros, T., Kidd, J. D., Moreno, A. J., Thompson, K., Gill, A., & Vieira, F. G. (2015). A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS. Journal of visualized experiments: Jove, (104), 53257に詳述されているように、スコアリングを以下のように実行した。

1. 以下が観察される場合、NS0（前症候性）を割り当てる：マウスが尾で吊り下げられると、後肢は通常の広がりを示す。つまり、後肢は外側正中線から完全に離れて伸びて、この位置に2秒以上留まる。マウスを歩行させると、正常な歩行が観察される。

2. 以下が観察される場合、NS1（最初の症状）を割り当てる：マウスが尾で吊り下げられると、後肢は異常な広がりを示す。つまり、後肢は横方向正中線に向かって縮められるか、もしくは部分的に縮められるか、または尾で吊り下げていると、後肢は震えるか、もしくは後肢は引っ込められる／固く屈曲する。マウスを歩行させると、正常な歩行またはわずかに遅い歩行が観察される。

3. 以下が観察される場合、NS2（不全麻痺の発症）を割り当てる：マウスが尾で吊

り下げられると、後肢は部分的にまたは完全に縮められ、あまり広がっていない。（関節の動きはまだあるかもしれない）。マウスを歩行させると、後肢は、前進運動のために使用されるが、趾は、90 cmの歩行中に少なくとも2回下方に丸まるか、または脚のあらゆる部分はケージの底部／台に沿って引きずられている。マウスを横向きに置くと、両側から10秒以内にマウスは起き上がることができる。

4. 以下が観察される場合、NS3（麻痺）を割り当てる：マウスが尾で吊り下げられると、後肢に強固な麻痺がみられるか、または関節の動きが最小限である。マウスを歩行させると、前進運動があるが、後肢は前進運動のために使用されない。マウスを横向きに置くと、両側から10秒以内にマウスは起き上がることができる。注記：稀に、麻痺の発症後に後肢に尿の水分が生じることがある。未処理の尿の水分が残ると、尿の「熱傷」及び皮膚病変を生じる可能性がある。尿の水分は毛を刈って処理し、温水浸漬を行って尿を除去し、穏やかに拭き取る。皮膚病変が存在する場合、抗生物質軟膏が適用される。

10

5. 以下が観察される場合、NS4（人道的なエンドポイント）を割り当てる：マウスが尾で吊り下げられると、後肢に強固な麻痺がある。マウスを歩行させると、前進運動は行われない。マウスを横向きに置くと、どちらの側からでも10秒以内にマウスは起き上がることができない、すなわち、正向反射がない。

【0112】

麻痺が蓄積され、動物がもはや15秒以内に起き上がれない、及び／または齢の一致した対照と比較して体重の20%を失う、毛づくろいができなくなる、及び／または膀胱機能障害の徴候を示した場合、疾患の最終段階に達する。これらの動物は直ちに 殺した。

20

【0113】

AAVクローニング。AAV2／5-GFAP-iCre及びAAV2／5-GFAP-Ascl1-SA6-t2a-iCreを、GenScript（商標）によってクローニングし、VectorBuilder（商標）Inc.によってパッケージ化した。

【0114】

AAVの頭蓋内注射。頭蓋内注射の場合、16週齢のC57BL／6（同腹仔の対照）またはhSOD1^{G93A}マウスを、イソフルラン（2%、1L／分）を用いて麻酔し、ブプレノルフィン（0.1mg／kg）、バイトリル（2.5mg／kg）及び生理食塩水（0.5ml）を皮下注射した。穿頭孔を、運動皮質上の頭蓋骨に穿孔し、定位固定を用いて、注射のプレグマ及び入濃度（AP：+2.15mm、L／M：±1.7mm、DV：-1.7mm）を特定した。AAV2／5-GFAP-iCreまたはAAV2／5-GFAP-Ascl1-SA6-2a-iCreを、1μLの全容量中の1.0×10¹²／mlで0.1μL／分で10分間にわたって、30ゲージの針を備えた5μLハミルトンシリンジを使用して注入した。21日後、動物を 殺し、記載したように組織を収獲した。疾患の進行を、実験終点まで、体重、NS、運動行動試験（ロータロッド、握力、及び歩行分析）を調べることにより測定した。マウスを横向きに置いた後、30秒以内にマウスが起き上がれなかった場合、マウスを 殺した。

30

【0115】

組織処理及び切片化。マウスを、灌流の前に、ケタミン（75mg／kg）及びキシラジン（10mg／kg）で麻酔した。心臓内灌流は、氷冷生理食塩水（0.9%NaCl）を用いて10ml／分の流量で蠕動ポンプを使用して約20×血液量で行い、続いて、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の4%パラホルムアルデヒド（PFA）で約5分間行った。脳及び脊髄を回収し、PBS中の4%PFAに一晩後固定し、20%スクロース／1×PBS中で4℃にて一晩凍結保護し、O.C.T.化合物（Tissue-Tek（登録商標）O.C.T.化合物，Sakura（登録商標）Finetek，PA，USA）に埋め込み、-80℃で保存した。冠状脳切片を、Leica CM3050（商標）クライオスタット（Leica Microsystem Canada Inc.，Richmond Hill，ON，Canada）上で30μmに切断し、Fisherbrand（商標）Superfrost（商標）プラススライドガラス（Thermo Fisher Scientific，Ottawa，ON，Canada）で収集

40

50

した。

【0116】

免疫染色。スライドガラスをPBSで洗浄し、次いでPBS中10%ウマ血清(HS)、0.075%ウシ血清アルブミン(BSA)及び0.3%Triton X-100で室温にて1時間インキュベートした。ブロッキングし、続いて、抗体溶液(PBS中10% HS、0.75% BSA及び0.1% Triton X-100)中のウサギ抗GFAP(1:500、#G9260、Sigma Aldrich Canada, Mississauga, ON, Canada)を用いて4℃にて一晩インキュベートした。一次抗体は、ウサギ抗z s Green(1:500、Takara #632474)、ウサギ抗NeuN(1:500、Abcam #ab177487)、ウサギ抗GFAP(1:500、Dako Cytomation #Z0334)、ラット抗GFAP抗体(1/500、Thermo Fisher Scientific #13-0300)、ウサギ抗Sox9(1:500、Millipore #AB5535)、ウサギ抗Tbr1(1:500、Abcam #Ab31940)、マウス抗Satb2(1:500、Abcam #ab51502)、ラット抗Ctip2(1:100、Abcam、ab18465)、及びウサギ抗S100b(1:100、Dako/Agilent #Z031129-2)を含んだ。スライドガラスを、PBS中の0.1% Triton X-100でそれぞれ10分間3回洗浄し、Alexa568(1:500; Invitrogen Molecular Probes (商標)、ThermoFisher Scientific, Markham, ON, Canada)、Alexa488(1:500; Molecular Probes)とコンジュゲートした種特異的二次抗体と室温にて1時間インキュベートした。スライドガラスをPBS中で3回洗浄し、4,6-ジアミジノー2-フェニルインドール(DAPI)(Sigma Aldrich Canada, Mississauga, ON, Canada)で対比染色した。最後に、スライドガラスを3回洗浄し、Aqua-polymount (商標)(Polysciences Inc., PA, USA)にマウントした。

10

20

【0117】

RNA in situハイブリダイゼーション。比色RNA-in situハイブリダイゼーション(ISH)を、前述のジゴキシゲニン標識Ascl1リボプローブを使用して実施した³¹。蛍光RNA-ISHは、製造業者の指示に従ってRNA scope (登録商標)マルチプレックス蛍光検出キットv2(ACD#323110)を使用して実施した。簡単に説明すると、脳切片を4℃で15分間、後固定(4% PFA/1×PBS)し、次いで室温にて50%、70%及び100%エタノール中でそれぞれ5分間脱水洗し、H₂O₂溶液中で10分間インキュベートした。次に、切片を1×標的回収溶液中で95℃で5分間インキュベートし、dH₂Oで洗浄し、次いでProtease Plus (商標)中で40℃にて15分間インキュベートし、その後、洗浄緩衝液で洗浄した。RNAプローブ(Mm-Ascl1 #313291及び提供された陰性及び陽性対照プローブ)を、40℃で2時間切片上でインキュベートした。増幅及び染色工程を、Opal (商標)570(Akoya #FP1488001KT; 1:1500)フルオロフォアを使用して、製造業者の指示に従って完了した。

30

40

【0118】

イメージング。遺伝子治療を用いて標的とする脳の体積を計算するために、Zeiss Axioscan (商標)スライドスキャナーを使用した。より高倍率の画像については、Leica DMI8 (商標)蛍光顕微鏡、Zeiss Axiovert (商標)200M共焦点顕微鏡、またはZeiss observer Z1 (商標)回転ディスク共焦点顕微鏡を使用した。免疫標識細胞を、ImageJ (商標)ソフトウェアを使用して計数した。

【0119】

行動アッセイ。同腹仔をグループ間でわけ、性別の均衡を保った。試験は、Cox比例ハザードモデルを使用する試料サイズ計算に基づく生存及び行動測定のために、12匹の

50

雄及び12匹の雌のhSOD1^{G93A}動物で、0.95検出力、95%信頼度及び20%効果量で試験を行った。

【0120】

ロータロッド：運動協調、強度、及びバランスをロータロッド装置で評価した。データを記録する1週間前に、マウスをロータロッドで訓練した。マウスをシリンダー上に置き、2rpmで回転を開始した。180秒以内に、回転速度は1分間18rpmまで上昇した。運動神経細胞の症状の発生と共に、動物は弱くなり、センシングプラットフォーム上に落下した。落下時間は、磁気スイッチにより検知され、実験の最後にディスプレイに表示される。

【0121】

握力：握力計（Bioseb（商標））を使用して神経筋機能を調べた。マウスを、20°のグリッドホルダの角度で100×80mmにわたって尾で保持した。マウスがグリッドをしっかりと把持したら、グリッドを離すまで力センサの軸に沿って引っ張った。握力試験を、ラウンド間にホームケージに5分間置き、1回の試験を3回にわけて行った。すべての握力試験を、体重に対して正規化した。

【0122】

歩行異常：マウスが長さ50cm、幅10cmの通路を歩行している間に、マウスのフットプリントのパターンを監視した。前肢に赤色染料を塗り、後肢に青色染料を塗った。フットプリントのパターンを、3つのステップパラメータ、1) スライド長、各スライド間の前方移動の平均距離の測定、2) スウェイ距離、左右の後フットプリントの間の平均距離の測定、3) スタンス長、左右の前フットプリントから右または左後ろフットプリントまでの平均距離の測定について分析した。

【0123】

定量化及び統計。統計解析を、GraphPad Prism（商標）ソフトウェアを使用して行った。平均値及び平均値の標準誤差（SEM）を表すエラーバーをプロットした。各実験に使用した統計検定は、図面の説明に示されている。免疫染色細胞の定量化は、状態当たり少なくとも3つの脳、及び脳当たり少なくとも3つの切片で行った。

【0124】

結果

Ascl1におけるセリンホスホアクセプター部位の変異は、成体運動皮質における神経細胞系統変換を増強する抑制制御を取り除く

胚脳内のNeurog2及びAscl1の神経発生誘導活性を阻害する抑制シグナルは、同定された¹⁰、¹⁶。本実験は、これらの同じシグナルが、成体脳で神経細胞系列変換を誘発するAscl1の能力をブロックすることを実証するために行った。前神経遺伝子Ascl1を環境（特に、損傷または神経変性疾患）における抑制合図に対して非感受性にするために、変異型Ascl1は、Ascl1中のプロリンに隣接するセリン（S）をコードする6つのヌクレオチドがアラニン（A）で置き換えられるように操作され、本明細書ではAscl1-SA6と呼ぶ。対照としてAscl1（野生型、未改変遺伝子）、Ascl1-SA6またはNeurod1を、アストロサイトプロモーター（GFAP）の制御下で、t2a-iCreカセットも保有するAAV2/5ベクターにクローニングした。

【0125】

このAAVベクターを、creレポーター系であるRosa-tdtomatoマウスの運動皮質に頭蓋内注射したところ、形質導入ニューロンの運命を追跡するのが可能になった。3週間後、脳を切開し、薄片を作り、tdtomato及びNeuN抗体で免疫染色した。驚くべきことに、Ascl1及びNeurod1は同様の約50%の変換率を有していたが、Ascl1-SA6の異所性発現は、75%の神経細胞変換率（すなわち、%NeuN⁺tdtomato⁺/tdtomato⁺細胞）にほぼ達することがわかった（図1）。これらの変換速度はすべて、変換速度の対照であるiCre単独発現後に観察された約15%のNeuN⁺zsGreen⁺/zsGreen⁺細胞を十分に上回っ

10

20

30

40

50

た。

【0126】

AAV5-GFAP-iCre（対照）及びAAV5-GFAP-Ascl1-SA6-t2a-iCreの定位注射を、16週齢のhSOD^{G93A}トランスジェニックALSマウスに行い、今回はRosa-zsGreen導入遺伝子を保有した。アストロサイトから神経細胞への変換を、NeuN免疫染色を使用して監視した。これらの動物は疾患の終点で殺されたため、変換効率の評価には、形質導入後5～12週間（及び17週間で1つ）に収集された動物が含まれた。Ascl1-SA6の発現後、NeuN+zsGreen+／zsGreen+細胞の数（神経細胞変換効率）の有意な増加が観察された。神経細胞染色のバックグラウンドレベルも、iCre形質導入された脳において上昇した。この増加には多くの可能な理由があり、一次形質導入されたアストロサイトと隣接する神経細胞との間のzsGreen導入のアーチファクトの可能性が高いことに留意されたい。それにもかかわらず、図2に示すように、Ascl1-SA6の発現後の神経細胞変換率は、対照と比較して有意に増加した。

10

【0127】

神経変性疾患の進行をモデル化するために、体重を測定した。ALSは消耗性疾患であり、また運動行動だからである。ベースラインの測定を、15週齢のhSOD^{G93A}及びC57BL/6（野生型）雄マウスで行った。hSOD^{G93A}マウスでは、15週目に症候性相が発症する。結果を図3に示す。Ascl1-SA6ベクターを注入された雄マウスは、経時的に体重を維持するのがより良好に可能になり、ニューロン生存率を向上させる間接的な測定及び疾患治療の指標が観察された。

20

【0128】

神経細胞密度（NeuN+細胞の総数）も試験した。図4に示されるように、Ascl1-SA6対iCre対照の形質導入脳で神経細胞が増加する傾向がいくらか見られた。

【0129】

ALSTDI-Neuroscore（スコアシート付録1）により捕捉された神経学的スコア（NS）を、処置したマウスにおいて監視した。対照の注射と比較してAscl1-SA6による動物のほうが生存が長く、スコアが低いほど健康状態が良好であることを示している（スコアは疾患の進行と共に増加する）。結果を図5にまとめる。

【0130】

更に、処置したマウスの運動協調、強度及びバランスを評価するためにロータロッド性能試験を使用すると、対照マウスと比較してAscl1-SA6処置の後に運動行動の改善に向かう明らかな傾向が観察された。結果を図6にまとめる。

30

【0131】

全体として、本実験の結果から、Ascl1、Ascl1-SA6の改変型の使用が、運動皮質アストロサイトの変換を誘導する際にAscl1より効率的であり、Ascl1-SA6を使用してhSOD^{G93A}形質導入マウスの運動皮質アストロサイトの神経系統変換を促進することにより、動物は、対照動物よりも高い体重及びより良い神経スコアを長期間維持することを確認した。これらの動物も、運動行動が改善される傾向があった。まとめると、このデータは、運動皮質アストロサイトの神経細胞系統変換がALSの治療として有用であることを示している。

40

【0132】

参考文献

1 de Carvalho, M. & Swash, M. Lower motor neuron dysfunction in ALS. Clin Neurophysiol 127, 2670-2681, doi:10.1016/j.clinph.2016.03.024 (2016).

2 Turner, M. R. et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet Neurol 12, 310-322, doi:10.10

50

16 / S1474-4422 (13) 70036-X (2013) .

3 Vucic, S., Nicholson, G. A. & Kiernan, M. C. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540-1550, doi:10.1093/brain/awn071 (2008) .

4 Ozdinler, P. H. et al. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31, 4166-4177, doi:10.1523/JNEUROSCI.4184-10.2011 (2011) .

5 Thomsen, G. M. et al. Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 34, 15587-15600, doi:10.1523/JNEUROSCI.2037-14.2014 (2014) .

6 Thomsen, G. M. et al. Transplantation of Neural Progenitor Cells Expressing Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor into the Motor Cortex as a Strategy to Treat Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cells*, doi:10.1002/stem.2825 (2018) .

7 Qian, K. et al. Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* 8, 843-855, doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.003 (2017) .

8 Masserdotti, G., Gascon, S. & Gotz, M. Direct neuronal reprogramming: learning from and for development. *Development* 143, 2494-2510, doi:10.1242/dev.092163 (2016) .

9 Oproescu, A. M., Han, S. & Schuurmans, C. New Insights Into the Intricacies of Proneural Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* 14, 642016, doi:10.3389/fnmol.2021.642016 (2021) .

10 Li, S. et al. GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *J Neurosci* 32, 7791-7805, doi:10.1523/JNEUROSCI.1309-12.2012 (2012) .

11 Britz, O. et al. A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells. *Cerebral cortex* 16 Suppl 1, i138-151, doi:10.1093/cercor/bhj168 (2006) .

10

20

30

40

50

12 Schuurmans, C. et al. Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *The EMBO journal* 23, 2892–2902 (2004).

13 Fode, C. et al. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development* 14, 67–80 (2000).

14 Ali, F. et al. Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138, 4267–4277, doi:10.1242/dev.067900 (2011).

15 Hindley, C. et al. Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation. *Development* 139, 1718–1723, doi:10.1242/dev.077552 (2012).

16 Li, S. et al. RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* 34, 2169–2190, doi:10.1523/jneurosci.4077-13.2014 (2014).

17 Vierbuchen, T. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041, doi:10.1038/nature08797 (2010).

18 Pang, Z. P. et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476, 220–223, doi:10.1038/nature10202 (2011).

19 Caiazzo, M. et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476, 224–227, doi:10.1038/nature10284 (2011).

20 Son, E. Y. et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* 9, 205–218, doi:10.1016/j.stem.2011.07.014 (2011).

21 Kim, J. et al. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 9, 413–419, doi:10.1016/j.stem.2011.09.011 (2011).

22 Pfisterer, U. et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic

10

20

30

40

50

neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 10343–10348, doi:10.1073/pnas.1105135108 (2011).

23 Marro, S. et al. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. Cell Stem Cell 9, 374–382, doi:10.1016/j.stem.2011.09.002 (2011).

24 Chuang, W. et al. Partial Reprogramming of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes into Neurons. Sci Rep 7, 44840, doi:10.1038/srep44840 (2017).

25 Rivetti di Val Cervo, P. et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. Nat Biotechnol 35, 444–452, doi:10.1038/nbt.3835 (2017).

26 Yang, N. et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. Nat Methods 14, 621–628, doi:10.1038/nmeth.4291 (2017).

27 Grande, A. et al. Environmental impact on direct neuronal reprogramming in vivo in the adult brain. Nat Commun 4, 2373, doi:10.1038/ncomms3373 (2013).

28 Jessberger, S., Toni, N., Clemenson, G. D., Jr., Ray, J. & Gage, F. H. Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. Nat Neurosci 11, 888–893, doi:10.1038/nn.2148 (2008).

29 Ohori, Y. et al. Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. J Neurosci 26, 11948–11960, doi:10.1523/JNEUROSCI.3127-06.2006 (2006).

30 Gascon, S. et al. Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. Cell Stem Cell 18, 396–409, doi:10.1016/j.stem.2015.12.003 (2016).

31 Touahri, Y. et al. Non-isotopic RNA In Situ Hybridization on Embryonic Sections. Curr Protoc Neurosci 70, 12221–12225, doi:10.1002/0471142301.ns0122s70 (2015).

10

20

30

40

50

【0133】

実施例2：アルツハイマー病治療のための神経細胞系統変換

アルツハイマー病（AD）は、個人の認知能力を徐々に奪う破壊的な神経変性疾患である。ADの進行性の認知低下は、いくつかの特徴的な病理：アミロイドβペプチド（Aβ）の沈着、神経原線維変化の形成、及び神経細胞喪失に関連する¹。シナプス喪失はADの症状を開始するとみなされ、現在までに認知低下の最も優れた神経生理学的相関を提供し^{2、3}、神経機能障害が疾患の進行に不可欠であることを示唆している。しかしながら、認知機能低下は、独立していくつかのシナプスの障害によってではなく、興奮細胞、抑制細胞、及び神経調節細胞の間の相互作用を介して組み立てられる、神経回路網全体の機能の異常によって引き起こされる。疾患が進行すると、細胞の特定の集団の喪失により認知機能が悪化し、現在の治療的介入は戻れない地点に立つことになる。Aβとタウの両方の病理を示すTgADマウスの神経病理学的研究は、神経細胞侵害及びAβ非依存性神経細胞喪失の速度の加速を示し、AD進行におけるタウオパチーの有意な役割を示し^{4、5}、Aβ蓄積と神経原線維変化形成の両方が毒性を引き起こし⁶、それらの複雑な相互作用が変性を悪化させるため^{6、7}、Aβ蓄積と神経原線維変化形成の両方を示すADモデルにおける神経細胞の損傷を評価することの重要性が強調されている。

10

【0134】

脳回路は、神経回路網を形成する神経細胞の特定のサブセットを迅速かつ選択的に結合することにより、情報を処理する。回路網の動的形成は、知覚、認知、及び運動性能と密接に関連するリズムカルに同期した神経細胞活動において明らかであることが多い²。電気生理記録のスペクトル内容は、古典的に周波数帯域に分割され、振動活性は全体的な状態または特定の動作に関連する。神経振動は様々な周波数で発生し、ADにとって重要なのは、運動行動及び記憶形成に関連するθ波（4～8Hz）、及び意識的な思考において役割を果たすγ波（30～200Hz）である。重要なことに、通常の回路網通信中、θ振動とγ振動とが周波数間カップリングを介して相互作用する。ヒトと齧歯類の両方におけるADに関連する認知機能の障害は、θ振動及びθ-γカップリングの時間的変調に関連しており^{9、10}、これは、興奮性神経活動と抑制性神経活動との間のバランスに依存する。

20

【0135】

ここで特に興味深いのは、θ振動の位相は、神経可塑性の調整（すなわち、経験に応じた神経細胞変化）、ならびに海馬及び皮質領域における長期増強の誘導（すなわち、活動パターンに基づく神経細胞シナプスまたは他の神経細胞への接続の強化）によって記憶処理に影響を及ぼすということである。作業記憶を含む様々な認識プロセスは、γ振動を変調し^{11、12}、それ自体はθ振動によって変調される¹³。θによるこのγの変調は、γ-アミノ酪酸（GABA作動性）の介在神経細胞のインタクト抑制回路網に依存することが知られている。

30

【0136】

神経ペプチド及びカルシウム結合タンパク質の発現によって特徴付けられる、いくつかの種類のGABA作動性神経細胞がある。記憶獲得には、海馬（GABA作動性）介在神経細胞を発現するパルブアルブミン（PV）及びソマトスタチン（SST）の発火パターンの変化が必要である^{14、15}。これらの抑制性神経細胞間サブ集団は、海馬興奮性顆粒細胞の活性を制御し、PV発現介在神経細胞は、顆粒細胞神経細胞体及び軸索セグメントを標的として顆粒細胞の活動電位出力を制御し、SST発現細胞は、顆粒細胞への入力を制御するために樹状突起を標的とする¹⁶。近年、海馬顆粒細胞によりSST介在神経細胞が活性化され、記憶痕跡のサイズ、記憶保存のユニット、ならびに得られる記憶の安定性が制御されることが示された¹⁷。

40

【0137】

AD患者及びマウスモデルでは、PV及びSSTを発現する介在神経細胞の選択的かつ早期の喪失は、Aβまたはタウ蓄積及びApoE4発現によって媒介される^{18～24}。PV-GABA作動性介在神経細胞の損失はてんかん性活動と相関し、SST-介在神経

50

細胞の損失は認知低下に関連し、GABAシグナル伝達の調節は、マウスモデルにおけるてんかん性活動と記憶障害の両方を妨げた^{23, 25~27}。

【0138】

歴史的に、GABA作動性標的薬の使用ならびに外因性幹細胞置換は、記憶改善のためにADの齧歯類モデルにおいて有望であることが示されてきたが、患者において深刻な副作用が生じてきた。GABA作動性調節薬はしばしば鎮静副作用または抗不安副作用を引き起こすが、それらの慢性投与は加齢に伴う認知機能の悪化と関連している²¹。更に、GABA作動性薬物療法は、介在神経細胞の劣化が続いているため、一時的な作用機会が限られている可能性がある。

【0139】

多くの最近の研究上の注目では、細胞療法戦略に焦点が当てられてきたが、特定の介在神経細胞集団の再生可能な供給源を生成するための効率的かつ安全な方法は欠如している^{28~30}。胚腹側終脳の内側基底核隆起からの前駆細胞の移植は、様々な疾患状態において適切なサブタイプの特異的介在神経細胞を誘導する可能性を実証しており、細胞置換療法の可能性を支持している^{28, 29}。このアプローチをより臨床的に重要な用途に進展させるためには、よりアクセスしやすく、より安全なGABA作動性神経細胞の供給源が必要である。潜在的により安全な代替手段は、系統特異的転写因子の超生理学的上発現を用いた直接的神経細胞リプログラミングによって内因性細胞を神経細胞に変換することである^{31~33}。線維芽細胞、肝細胞、多能性幹細胞、及び他の細胞を、4つまでの転写因子の組み合わせを有する神経細胞に変換するために、このアプローチを利用した多くの研究がなされてきた^{34~37}。これらの研究は、依然として侵襲的細胞移植を必要としていたが、転写因子Ascl1を単独で、またはDlx2と組み合わせて利用して、サブタイプ特異的GABA作動性介在神経細胞を生成する可能性を実証した^{38, 39}。したがって、本発明の治療戦略は、AAV送達転写因子によって、内因性活性化アストロサイトを環境シグナルに適切に応答する完全に組み込まれたGABA作動性神経細胞への分化転換を誘導することにより、神経回路網をリバランスさせることである。

【0140】

ヒトと齧歯類の両方において、神経回路網の空間的記憶表現は、 θ 振動及び θ - γ カップリングの時間変調に関連している。AD患者は、安静状態のEEGリズムの低下したカップリングを示しており、特定の周波数帯域での皮質リズムのカップリングは、ADの特定のマーカーであり得る。理論に束縛されるものではないが、GABA作動性介在神経細胞機能の喪失と最終的には細胞の喪失は、神経回路網機能障害を引き起こし、認知機能障害の一因になることが提示されている。したがって、GABA作動性介在神経細胞機能の回復は、興奮抑制神経伝達をリバランスさせ、認知機能の改善につながる。

【0141】

このアプローチの有効性を試験で実証するために、海馬領域内で完全に機能的かつ集積されたGABA作動性神経細胞への分化転換を誘導するために、前神経転写因子Ascl1、Ascl1-SA6、Neurod1を、反応性GFAP+アストロサイトにおいて一過性に発現させた。

【0142】

このアプローチを裏付けるために、今日までの研究では、出生後の初期の動物において、または最良に最小限の神経細胞損失を示すADマウスモデルにおいてアストロサイトから神経細胞への分化転換が誘導されている。その結果、新たに形成された神経細胞を、基本的にAD脳に存在する状態とは異なる、完全に機能的な神経回路網に組み込む必要があった^{29, 38, 40, 41}。本研究は、グルタミン作動性神経細胞系統決定因子(Neurod1)における過剰発現とは対照的に、GABA作動性の同一性を特定する遺伝子の過剰発現を利用しているため、これまでの研究とは一線を画す。

【0143】

これまでの研究から、老齢の齧歯類において分化転換が可能であることが証明された⁴⁰。このアプローチの別の考察は、アストロサイトが反応性であるだけでなく増殖性でも

10

20

30

40

50

あることの程度であり、異なる病理条件下で活性化された反応性アストロサイトは、異なる増殖速度を示すことが示された。特に、A P P P S 1またはC K / p 2 5マウスにおける反応性アストロサイトの増殖速度が低いのに対して、穿刺傷害反応性アストロサイトは高度に増殖することができる^{4 2}。このより低い増殖は、実際にはA Dにおいて利益となり得る。というのも、その目的は、バランスを主に興奮性から抑制性へと変化させる抑制性細胞の過剰生成を生じさせず、回路網をリバランスさせることであり、これは有害な可能性もある。

【0144】

方法

A Dが男女の両方に影響を及ぼすため、T g 3 4 4 A D及びn T g（非トランスジェニック）の4つの性別のバランスのとれた群を使用した：1）感染したA A V 2 / 8 - m C h e r r y対照ウイルス、及び2）感染したA A V 2 / 8 - A s c l 1 - m C h e r r y、またはA s c l 1 - S A 6もしくはN e u r o d 1。A A V 2 / 8は、出生前及び出生後の齧歯類の神経細胞を好むが、これは、G F A Pプロモーターと組み合わせてベクター特異性を増加させる成体動物におけるアストロサイトを標的とする^{4 0}。G A B A作動性神経細胞喪失が海馬で、特に疾患の初期段階の門部で起こるため、病態によって決まる定位注射を用いて、活性化アストロサイトを感染させた。侵襲的ではあるが、この戦略により、規定された場所内で有限のウイルス負荷の制御された送達が可能になり、これにより、各海馬領域におけるG A B A作動性喪失の役割を個別にかつ同時に決定することができる。いくつかの研究では、ウイルス感染後3週間でアストロサイトのグルタミン酸作動性神経細胞への分化転換を調べたが^{4 0}、他の研究では、G A B A作用性神経細胞の成熟が感染後に28～42日目に起こったことが示唆されている^{5 4}。したがって本アッセイは、感染後4週間及び7週間で行われた。新しい成熟神経細胞の生成は、i n v i v o電気生理学的読み取り値を利用して、海馬内の既存の回路網に新しい神経細胞を病理学的分析、構造的及び機能的に組み込むことによって評価した。ウイルス感染は、有意に明らかなG A B A作動性神経細胞喪失後の段階、月齢9か月及び月齢14か月で開始した。

【0145】

ウイルス投与：トランスジェニックA Dラットモデルで系統変換を誘導するために、A A V 2 / 8 - A s c l 1 - m C h e r r y及びA A V 2 / 8 - m C h e r r y（対照）ベクターを最初に使用した。これらのベクターは以前に、背側中脳においてアストロサイトから神経細胞への分化転換を促進することが示されていた^{4 1}。その後、A A V 2 / 5ベクターを前神経転写因子の比較に使用した。というのも、これはC N S内でより効率的であることが後に示されたからである。更に、i C r eを含むため、m C h e r r yタグはベクターには不要であった。

【0146】

A A V - G F A P - 前神経転写因子ベクターの定位固定注射を、麻酔を施したT g F 3 4 4 - A Dラット及びそのn T g同腹仔の海馬の各半球の門部に、頭蓋骨を通して穿孔された穿頭孔を通して行った。A A Vの拡散は、定位固定注射に応じた間質液の流れの変化によって制限され、A A Vは、グリアリンパ排液によって除去されるため、細胞外空間において短い半減期を有する^{6 5}、^{6 6}。このプロジェクトの目標は、海馬回路網内の興奮性／抑制活性をリバランスすることであり、G A B A作動性神経細胞は、神経細胞集団の10%のみを占めるので、目標は、十分であるが限られた数のm C h e r r y + N e u N + G A D 6 7 + 神経細胞を得ることであった。4 . 0 × 1 0 ⁸及び1 . 2 × 1 0 ⁹のウイルス力価を使用し、ウイルス力価が低いほど、変換率を制限し、神経回路網に利益をもたらすことがわかった。

【0147】

i n s i t u電気生理学：これらの実験を、最も感度の高いアッセイ、すなわち、各動物内の同側半球及び対側半球におけるi n v i v o電気生理学的記録の間の対比を可能にするために、ラットの独立したセットで実施した。このように、A A V 2 / 8 - m C h e r r y及びA A V 2 / 8 - A s c l 1 - m C h e r r yベクター注射を、コホート内

の各ラットの右半球と左半球にランダムに行った。この実験は、海馬神経回路網の機能を評価するために以前に確立されたプロトコルに従った⁵³。2つの頭蓋窓を半球につき1つずつ開けたので、開頭の中心は、背側海馬の上に位置していた。2軸の直線状多電極アレイ (LMA) を各窓に下げた。各軸には、2つの白金／イリジウム記録部位 (直径 200 μm 、Microprobes (商標) Life Science) が備えられていた。静止状態の局所フィールド電位は、0.3 Hz ~ 5 kHz の間で増幅され、20 kHz でサンプリングされ、分析のために記憶された。

【0148】

目的の周波数帯域 (θ (3 ~ 9 Hz)、 α (10 ~ 14 Hz)、 β (15 ~ 30 Hz)、低 γ (30 ~ 58) 及び高 γ (62 ~ 120 Hz)) は、構造回路に基づく動的モチーフから生じ、入出力変換後に行動関数を指示するという仮説が立てられている⁶⁷。高 γ 波は、感覚事象、運動事象、及び認知事象によって調節され、低 γ とは機能的に異なり、明確な生理学的原因を有する⁶⁸。1つの周波数帯域が異なる周波数帯域の波を変調できる現象は、動物データ及びヒトデータの両方で観察されており、周波数間カップリングと呼ばれる⁶⁹。特に、 θ 波の位相は γ 帯域の振幅を変調することができ、この現象を位相-振幅カップリングと称し、皮内局所フィールド電位で分解することができる^{52, 70, 71}。位相-振幅カップリングを定量化するために、変調指数 (MI) が使用され、これは、高周波数帯域の時系列の振幅エンベロープと低周波数帯域の位相時系列とを結合して、1つの複合複素値信号にする。

【0149】

病理学的特性評価：GABA 作動性介在神経細胞喪失／レスキュー、グローバル GAD65 / 67、SST、NPY、CCK 及び VIP を含む神経ペプチド発現、ならびに GABA_A (高速抑制) 及び GABA_B (低速抑制) 受容体サブユニット発現を、ウェスタンブロット分析を使用して定量化した²⁰。GABA 作動性神経細胞集団、GAD67+ が NeuN との共発現を用いて完全に成熟しているかどうかを調べた。GABA の mCherry+ 細胞への発現及び共局在を、免疫組織化学的に調べた。アミロイドプラークの AD 関連転帰の評価及び効果サイズの免疫組織化学的分析の確認を、前述のプロトコルに従って行った^{53, 63, 86}。分化転換後のグリア応答の変化を、アストロサイトに対する GFAP 抗体及びミクログリア細胞に対する Iba-1 抗体を用いて評価した。S100 β と補体成分 3 (C3) の共位置及び β IIIT びリンと RIPK1 の共位置をそれぞれ用いて、神経毒素及び神経変性を評価した。すべての免疫組織化学を Zeiss Observer (商標) Z1 顕微鏡または Nikon A1 (Melville, New York, NY) レーザ走査共焦点顕微鏡：A β 、NeuN、GFAP、Iba-1 (10 $\times$ 分析、20 $\times$ 代表) で撮像した。A β プラーク分析を、バックグラウンドを取り去り、画像を二値化し、ImageJ (商標) 中の染色密度 (被覆面積%) について分析することにより行った。

【0150】

バーンズ迷路：すべてのラットは、行動評価に未経験であった。バーンズ迷路 (Maze Engineers) 試験を、空間合図を有する行動スイート、及び訓練以外のすべての試験における平均光で行った。Ethovision (商標) XT (Noldus、バージョン 11.5) をビデオデータの収集及び分析に利用した。出口までの訓練の後、ラットは3日間にわたってタスクを学習し、1日当たり2回の試験を行った。3日後、1回の試験で空間的記憶を評価した。翌日から、実行機能の反転学習 (5日間、1日2回の試験) が開始され、再訓練なしで出口穴の位置を切り替えた。

【0151】

結果

以前に公開された研究を考慮して、F344 ラット系統を本研究で使用した。このラット系統は、過去40年間にわたり正常な老化のモデルとして使用されてきており⁴³、したがって、認知障害の時間的進化は既知である^{44, 45}。6 ~ 8 か月の月齢の F344 ラットは、わずかに実行上の機能不全を示すが、記憶障害を示さない⁴⁶。更に、これら

のラットは、加齢ヒト集団で報告されているのと同様に、ラット A β の蓄積の年齢依存性の増加、A β の脳から血液への流出の減少、及び認知機能障害と相関するコリン作動性シナプス機能の低下を示す^{43~46}。

【0152】

本明細書で使用される T g R 3 4 4 A D ラットは、進行性アミロイド及びタウ病理、ならびに認知障害、炎症及び明白な神経細胞喪失を示し、したがって、ヒト A D の前駆期及び症候期の双方の顕著な特徴を再現している。本実験で使用されたコロニーにおける認知表現型及びアミロイド表現型は実証されており、このモデルの元の刊行物によく整合している⁸。具体的には、この動物には、3 か月齢でアミロイドプラークがなく、6 か月齢でいくらかの実質プラークがあり、更には9 か月齢までに脳血管アミロイド血管症、タウ過剰リン酸化、及びアミロイド組織プラークがある（図7）。それにもかかわらず、本実験に使用されたコロニーでは、T g F 3 4 4 A D ラットは6 か月齢まで日常生活及び認知の通常の活動を示した。12 か月齢までに、T g A D 動物は、オープンフィールド試験、穴掘り活動、及びバーンズ迷路作業で欠陥を示した（図7C）。

【0153】

海馬における神経細胞生存を評価するために、神経細胞マーカー N e u N を使用して、有糸分裂後神経細胞の核を標識した⁴⁷。N e u N 免疫組織化学的染色の定性分析は、前に示したように、12 か月齢の T g F 3 4 4 A D ラット及びその非トランスジェニック（n T g）同腹仔の海馬に同等数の N e u N + 細胞を示した（図8）。したがって、シナプス前タンパク質、シナプトフィジン、シンタキシン及びシナプトタグミンならびにシナプス後タンパク質 P S D 9 5 のレベルは、2つのコホート間で区別がつかない（図8）。大部分の海馬神経細胞は興奮性であり、約10%は抑制性 G A B A 作動性介在神経細胞である。介在神経細胞は海馬の神経細胞のごく一部しか占めないで、N e u N 計数だけでは介在神経細胞集団の相違をマスクする可能性があり、シナプスマーカーは抑制神経機能よりも興奮性を示す可能性がある。

【0154】

グルタミン酸デカルボキシラーゼ（G A D）は、グルタミン酸を G A B A に変換し、その2つのアイソフォームである G A D 6 7 及び G A D 6 5 は、それぞれ、主に G A B A 作動性細胞体及び軸索末端に局在する。A D 患者からの海馬組織の死後の組織学的分析では、G A D 6 5 タンパク質レベルは低下し、一方で G A D 6 7 は比較的保持される。対照的に、現在検査されている疾患の進行の初期段階では、n T g 動物のタンパク質と比較して、T g F 3 4 4 の A D ラットで G A D 6 5 のタンパク質発現の増加が見出されたが（図9A）、G A D 6 7 では変化は検出されなかった。これらの結果は、G A D 6 5 タンパク質の増加から明らかのように、シナプス G A B A 産生が機能の維持を図る試みで増加したことを示している。

【0155】

G A B A 作動性介在神経細胞によって発現される神経ペプチドとしては、コレシストキニン（C C K）、ソマトスタチン（S S T）、血管作動性小腸ポリペプチド（V I P）、及び神経ペプチド Y（N P Y）が挙げられる。カルシウム結合タンパク質は、パルブアルブミン（P V）、カルビンジン、及びカルレチニン（C R）である。G A D 6 7 の全海馬タンパク質レベルとは対照的に、主に S S T 及び N P Y 発現細胞を含む、G A D 6 7 を発現する海馬のすべての領域内で、介在神経細胞の数の減少が観察された（図9B）。これらの結果を組み合わせると、G A D 6 7 発現細胞の数は減少したが、残りの細胞は、神経細胞の喪失を補う試みとして G A D 6 7 発現を増加させることが示唆された。老化、A D 及び A D マウスモデルにおける S S T 発現 G A B A 作動性介在神経細胞の喪失は、良好に特徴付けられ、認知障害と相関することが示されている^{18~23}。重要なことに、海馬門の S S T 発現 G A B A 作動性介在神経細胞の低下の大きさは、記憶障害の重症度を強く予測する^{28、48}。A D のマウスモデルとは異なり、海馬にわたる P V 発現 G A B A 作動性介在神経細胞の喪失は、この実験で調べられた年齢では観察されなかった（データは示されていない）。

10

20

30

40

50

【0156】

実験の次の部分では、GABA受容体の2つの主要なクラス：GABA_A及びGABA_Bのレベルを調べた。GABA_A受容体は、ADを含む疾患状態に関与している⁴⁹。GABA_A受容体は、複数のサブユニットから構成されており、脳内で最も一般的なタイプは、2αx、2βx及び1γxサブユニットの組み合わせを有する5量体である。GABA_A受容体は、シナプス内またはシナプス外に局在し、それぞれ一過性抑制及び持続性抑制を媒介する。サブユニットα-1はシナプス内受容体の一部であり、α-5はシナプス内またはシナプス外のいずれかであってもよく、δサブユニットはもっぱらシナプス外である^{49, 50}。TgF344 ADを持続性抑制の増加を示唆するnTgラットと比較した場合、α-5及びδの発現が増加しているが、α-1 GABA_A受容体サブユニットの発現は増加していないことが観察された（図10）。GABA作動性介在神経細胞の欠陥は、以前に様々なAD齧歯類モデルで報告されてきたが、神経細胞神経ペプチド及びカルシウム結合タンパク質の発現によって分類されるサブタイプレベルの変化は、導入遺伝子（複数可）の発現によって異なる。全体として、これらのデータは、TgF344 ADラットの9か月齢までのGABA作動系の機能不全を実証している。

10

【0157】

脳領域全体または脳領域内の神経回路網を特徴付けるために電気生理学で使用される、異なる周波数帯域の振動間の相互作用は、周波数間カップリング（CFC）と呼ばれる。高速発火GABA作動性介在神経細胞は、γ及びθリズムの両方に寄与しているため、CFCにおいて重要な役割を果たすと考えられている^{51, 52}。このことから、CFC評価は、介在神経細胞活性を調べるための有用なアッセイとなる。in vivoで、9か月齢のTgF344 ADラットは、齢の一致するnTg同腹仔と比較した場合、海馬におけるCFCの減衰に反映される海馬神経機能に著しい障害を示した⁵³（図11A～図11C）。特に、海馬における高γ振幅に関するθ相の変調指数（MI）を推定し、TgADコホートにおけるMIの減少を、nTg動物と比較して（図11B、図11C）、観察した（図11B、図11C）。更に、変調の搬送周波数は、TgF344のADコホートとは対照的に、nTgコホートにおいて6Hzを中心に行っていることがわかった（図11D）。若年動物（2か月未満）の海馬におけるパワーを測定したが、遺伝子型の差は見られなかった（ $p > 0.05$ ）。同様に、θから高γへの変調によっても差は見られなかった（ $p > 0.05$ 、データは示されず）。これらのデータは、2か月齢の時点で、TgF344 ADラットが海馬ネットワーク機能障害の徴候を示さず（図11D）、多くのADマウスモデルとは対照的に²⁶、これらのラットの神経回路網が正常に発達し、回路網の欠陥が加齢と共に現れることを示唆していることを実証している。

20

30

【0158】

反応性アストロサイトのGFAPプロモーター41下でAAV2/8が駆動するAscl1転写因子発現が⁴¹、TgF344 ADラットとそのnTg同腹仔のGABA作動性神経細胞への分化転換を促進することを証明するために、6～12か月齢のTgF344 ADラット及びnTg同腹仔の海馬門を、ウイルスの定位注射により感染させた。AAV2/8-mCherry及びAAV2/8-Ascl1-mCherryベクターを、同じラット内の左半球または右半球にそれぞれ注入した。6か月齢（データは図示せず）及び12か月齢のTgF344 ADラットにおける反応性アストロサイトの効果的な感染（図6）は、GFAPとアストロサイト形態を有する細胞におけるmCherry蛍光マーカー発現との共局在によって証明されるように達成された（図12）。

40

【0159】

28日後、AAV2/8-mCherry感染半球は、mCherryの発現がほとんどなく、発現はNeuN発現と相関しなかった（図13）。このことは、AAV2/8-mCherryベクターが増殖性アストロサイトを感染させるであろうが、細胞が増殖サイクルを終え、GFAP発現が安定化するにつれて、ウイルスの発現、ひいてはmCherryの発現は経時的に低下するであろうため、驚くべきことではない。GFAPは低い代謝回転速度を有する安定な構造タンパク質であり、mCherryの発現はGFAP

50

ロモーターによって制御されるため、翻訳不足により、それは経時的にも低下することになる。対照的に、AAV2/8-Asc11-mCherry感染半球は、反応性アストロサイトが占める領域に大規模なmCherry+NeuN+二重標識細胞を有していた。mCherry+NeuN+細胞の形態学的特徴及び位置に基づき、これらの細胞は未成熟であり、神経回路網に遊走しておらず、完全には組み込まれていないことが提示される。更に、門には多数のmCherry+NeuN+細胞も存在しており、これらの細胞は、すべてのアストロサイトが同時に分化転換するわけではないので、分化の初期段階にある可能性が高い（図13）。

【0160】

若年及び高齢の両方のTgF344 ADならびにnTgラットにおいて、GAD67+mCherry+神経細胞が門部に存在していた（図14）。GAD67+mCherry+細胞の数は少なく、おそらく28~42日の分化転換を用いた運命特異化に起因しており⁵⁴、そのため、本実験の結果は、GABA作動性神経細胞成熟の初期段階を表す可能性がある。したがって、後の時点でこの介入によって、より多くのGABA作動性神経細胞が生じると予想される。この実験の目的にとって最も重要なのは、海馬回路網活性に対する神経細胞特異化の潜在的な利益を調査したことである。nTgラットでは、AAV2/8-mCherry感染半球は、mCherry-Asc11感染半球と有意な差はなかった（図14）。これらの結果は、新しい神経細胞の特異化は、完全に機能的な回路網を活性化または阻害しないことを示唆している。それに対して、TgF344のADラットでは、AAV2/8-mCherry対照ウイルス感染半球と比較して、AAV2/8-mCherry-Asc11感染半球では海馬活性が増強された（図14B）。これらの複合的な結果は、反応性アストロサイトの神経細胞への分化転換が、損傷した神経回路網の機能に有益な効果を及ぼし、GABA作動性神経細胞の損失がADの認知障害の一因であるメカニズムに対処するための新しい技術を表していることを示唆している。

【0161】

GABA作動性神経細胞及びグルタミン酸作動性神経細胞の両方が、TgF344 ADラット及びアルツハイマー病患者においても失われていることが以前に示されている。GABA作動性のグルタミン酸作動性神経細胞に対する優先的な産生がAD病理学及び海馬機能に有益であることを示すために、様々な転写因子Asc11及びNeurod1の有効性を調べた。前述のとおり、Asc11は、環境要因に応じてGABA作動性及びオリゴデンドログリア細胞の分化を優先的に促進するが、Neurod1は、グルタミン酸作動性神経細胞の運命を優先的に促進する。発生において、これらの転写因子は、配列全体にわたるセリン/スレオニン残基のリン酸化によって制御され、その結果、正確な発生段階で転写因子が不活性化される。Asc11の成熟前の不活性化を防ぐために、アラニン残基を、Asc11活性をオフにするために通常使用されるセリンリン酸化部位6つすべてに組み込んだ（SからAへの変異）。3つの転写因子はすべて、非感染側と比較してウイルスに感染した半球において、海馬門内のNeuN+細胞の数を計数することによって測定されるように、アストロサイトの神経細胞への分化転換を効果的に促進した（図15）。しかしながら、Asc11-SA6変異体は、親Asc11よりも20%高い有効性を示し、4.5倍及び4.0倍のNeuN+神経細胞の増加があり、一方、Neurod1は分化転換で2.5倍の効果があつた。神経細胞の増加は、感染した半球における反応性アストロサイトの減少を伴った（図16、図17）。NeuN+神経細胞に対する転写因子の差次的効果に一致して、Asc11-SA6の発現は、アストロサイトにおいて約50%の減少をもたらし、一方、Asc11はアストロサイトを15%減少させ、Neurod1はアストロサイトを5%だけ減少させた。反応性アストロサイトの喪失は、Asc11及びNeurod1により誘導される分化転換の神経細胞の増加よりも低い倍率変化であると思われたが、反応性アストロサイトは減少した。理論に束縛されるものではないが、反応性アストロサイトのいくつかは神経細胞に分化転換していてもよいし、他はAD病理に寄与しない静止状態表現型を表していてもよい。

【0162】

反応性アストロサイトが減少しているため、門部の毒性環境が変化した可能性があるように思われ、最終的にはアルツハイマー病関連の病理に対してポジティブな下流効果をもたらされると予想された。これを調べるために、感染した半球に存在するアミロイドプラーク及び反応性ミクログリアの数を計数し、未感染の半球と比較した。トランスフェクトされた半球の切片をMOAB2（アミロイドβペプチドのN末端を認識する抗体）で染色した後、未感染の同側門と比較して、感染した門でアミロイドプラークが減少したことが直ちに明らかになった（図18A及び図18B）。定量化により、プラークは、A β Sc11（SA6）によるアストロサイトから神経細胞への分化転換の後、約70%減少し、一方でA β Sc11は約20%減少し、NeuroD1は減少しないことが実証された（図18C）。アミロイドプラークの減少は、産生の減少または分解の増加の結果であり得る。しかしながら、実験パラダイムは約45日のみであったため、9か月齢以降、プラークは1か月当たり10%ずつ増加することが以前に示されているため、生成の減少により半球間のプラークが50%失われる可能性は低い。これを踏まえて、アミロイドプラークの減少は、アミロイド分解の増加によると考えられる。

10

20

30

40

50

【0163】

アミロイドは、プラークを取り囲む活性化されたミクログリア細胞によって分解されるのに対して、可溶性アミロイドβペプチドは、非プラーク関連ミクログリア細胞によって分解される。A β ペプチドのアミノ酸残基17～24に特異的な抗4G8抗体及び抗IBA-1抗体を用いて、病理組織を使用してIBA-1+4G8+細胞を定量化した（図19）。NeuroD1による系統リプログラミングの後に、IBA-1+4G8+細胞において約60%の増加が見られたが、これは、未処置のトランスジェニックラットには大きな影響はなかった。A β Sc11を受けたラットはプラーク関連ミクログリアで有意な増加を示し、それは約1.7倍の倍率変化であった。しかしながら、他の分析と同様に、A β Sc11-SA6による分化転換は、未処置のトランスジェニックラットに比べて、IBA-1+4G8+細胞が約2.7倍増加するという最大の変化をもたらした。このプラーク関連ミクログリアの増加は、A β Sc11及びNeuroD1の両方よりも有意に大きかったが（ $p < 0.01$ ）、A β Sc11及びNeuroD1は統計的に区別されなかった（ $p > 1.00$ ）。更に、bHLH転写因子の一過性発現後に、平均プラークサイズを評価した。NeuroD1の発現は、平均プラークサイズを約25%低下させたが、これらの変化は、未処置のトランスジェニックラットでは有意ではなかった。しかし、A β Sc11を受けたラットは、約50%のプラークサイズの有意な減少を示し、一方でA β Sc11-SA6は約60%の減少を示した（ $p < 0.01$ ）。A β Sc11-SA6の送達後のプラークサイズの減少は、NeuroD1とは有意に異なっていた（ $p = 0.01$ ）。また、NeuroD1と比較して、A β Sc11発現による平均プラークサイズが減少する傾向があった（ $p = 0.09$ ）。

【0164】

ミクログリアはアミロイドプラークの食作用の増加を示したので、ミクログリアの表現型が疾患の表現型からより恒常的な表現型に戻っていることを示唆している。したがって、IBA-1+細胞の免疫蛍光染色を使用して、ミクログリア形態を調べた（図20A）。前神経bHLH転写因子による直接的系統リプログラミングは、門のIBA-1+細胞の総密度に有意な変化を示さなかった（図20B）。NeuroD1の一過性発現によっても、未処置のラットとの有意差は得られなかったが（ $p > 1.00$ ）、A β Sc11-SA6と比較してわずかな差があった（ $p = 0.04$ ；図20C）。未処置のトランスジェニックラットは、IBA-1+細胞の約72%で活性化形態を示したが、9%だけ分岐化した（図20C）。A β Sc11による分化転換後、IBA-1の形態は変化する傾向があり、61%が活性化され、19%が分岐化した（それぞれ、 $p = 0.07$ 及び $p = 0.09$ ）。しかしながら、A β Sc11-SA6を受けたラットは、IBA-1形態に大きな変化を示し、細胞の約42%が活性化形態を示し、31%が分岐化した（図20D）。NeuroD1では、未処置のラットに比べてミクログリアの形態に有意な変化は見られなかった（ $p > 1.00$ ）。これらのデータは、A β Sc11-SA6が環境を恒常性にシフト

させることを示唆している。

【0165】

アストロサイトの表現型が恒常性にシフトしたかどうかを試験するために、G F A P + v e アストロサイトの形態を使用し、アストロサイトを肥大型または生理学的のいずれかに分類した（図21）。A s c l 1 - S A 6 発現後に観察された総G F A P + 細胞の減少に加えて、生理学的状態の増加を伴う、肥大型アストロサイトの減少が見られた（図21C）。未処置のトランスジェニックラットでは、アストロサイトの約80%が肥大型であるのに対し、生理学的は10%のみであった。しかしながら、A s c l 1 - S A 6 による分化転換に続いて、アストロサイト形態において有意な変化が見られ、肥大型54%及び生理学的39%であった。肥大型及び生理学的アストロサイトの存在量は、A s c l 1 及びN e u r o d 1 と比較して、A s c l 1 - S A 6 のウイルス送達後に有意に異なる（ $p < 0.01$ ）。A s c l 1 の発現により、肥大型が約10%低下及び生理学的G F A P + 細胞が5%増加したが、これらの値は、未処置のトランスジェニックラットとは有意差はなかった（それぞれ、 $p = 0.27$ 及び $p > 1.00$ ）。それに対して、N e u r o d 1 の一過性発現ではアストロサイト形態に変化は生じず、肥大型及び生理学的G F A P + 細胞のレベルは同等であり、 p 値は1.00を超える（図21C）。

10

【0166】

アストログリオシスの更なる特徴付けのために、S 1 0 0 β + 細胞の免疫蛍光分析を注射部位で行った。G F A P + 細胞の定量分析及びアストロサイト形態に従って、A s c l 1 - S A 6 のウイルス送達は、注射部位でのS 1 0 0 β + 細胞の有意な減少をもたらす（図22A、図22B）。未処置のトランスジェニックラットと比較して、A s c l 1 - S A 6 を受けたラットは、S 1 0 0 β + 細胞で約45%の減少を示した。A s c l 1 及びN e u r o d 1 は、未処置のT g ラットからは有意ではないが（ $p > 1.00$ ）、A s c l 1 - S A 6 とは異なる（ $p < 0.01$ ）最小限の差をもたらした。アストログリオシスの特徴付けのためのC 3 の定量を示唆する実験に従って、注入部位のS 1 0 0 β + C 3 + 細胞を定量する免疫蛍光分析を実施した（図22C、図22D）。A s c l 1 及びN e u r o d 1 は、海馬門のS 1 0 0 β + C 3 + 細胞を約10%減少させたが、これらの差は有意ではなかった（ $p \geq 0.73$ ；図22D）。A s c l 1 - S A 6 の発現により、S 1 0 0 β + C 3 + 細胞が、未処置のT g ラット（ $p < 0.01$ ）と比較して約50%減少し、A s c l 1 及びN e u r o d 1 （ $p < 0.01$ ）とも有意に異なっていた。したがって、A s c l 1 - S A 6 によって、G F A P + 細胞、S 1 0 0 β + 細胞、C 3 + アストロサイトにおけるアストログリオシス減少及びアストロサイト形態の変化を示す、4つの要因の減少が生じた。

20

30

【0167】

A D 患者及び疾患の動物モデルにおける認知低下の最良の相関は神経機能障害であるが、神経細胞喪失及び神経変性はシナプス喪失に関与する。これまでの研究から、C N S 疾患では、アストロサイト及びミクログリアの活性化によって炎症遺伝子の特徴がアップレギュレーションされることが示されている。これにより、神経細胞におけるR I P K 1 活性化が生じ、最終的には細胞死が生じる。実際に、R I P K 1 阻害は、A D 病理の低減をもたらす、マウスモデルにおける神経細胞死を防止する。したがって、直接的系統リプログラミングによって壊死神経細胞の数が増変したかどうか判断された（図23）。壊死ニューロンを定量化するために、抗 β I I I - チューブリン及び抗R I P K 1 抗体を用いた免疫蛍光染色を使用した（図23A）。その結果、A s c l 1、A s c l 1 - S A 6 及びN e u r o d 1 による分化転換が、門の β I I I - チューブリン + R I P K 1 + 細胞を有意に減少させることが明らかになった（図23B）。A s c l 1 - S A 6 を受けたラットは、壊死神経細胞の最大減少を示し、 β I I I - チューブリン + R I P K 1 + 細胞は、未処置の対応物に比べて、50%超減少した（ $p < 0.01$ ）。

40

【0168】

したがって、壊死神経細胞の減少及びグリア恒常性のリバランシングが、処置した半球内だけでなく反対側の半球においても、G A B A 作動性神経細胞の全体的な増加をもたら

50

すと仮定された。Neurod1はこれらの効果を示さなかったことから、分析は、Ascl1及びAscl1-SA6に焦点を当てた。Ascl1及びAscl1-SA6の両方により、転写因子が注入された半球のGAD67+細胞の数は有意に増加したが（図24A）、Ascl1-SA6のみは、未処置のTgラットと比較して、反対側のGABA作動性神経細胞の数は有意に増加させた。Ascl1-SA6処置したラットのGABA作動性神経細胞全体の有意な増加を、同側半球と対側半球、注射半球と未処置半球の間の倍率変化の比較によって示す（図24B）。

【0169】

最後に、反応性アストロサイトの神経細胞への直接的系統転移分化、及びその結果として生じる下流の恒常的利益が、TgF344 ADラットにおける認知機能の改善につながるかどうかを調べるために、バーンズ迷路作業を、未処置ラットと比較してAscl1-SA6対Ascl1で行った（図25）。未処置、Ascl1-及びAscl1-SA6で処置したNTgラットの間の空間的記憶は、有意差を示さなかったのに対し、Ascl1で処置したTgF344 ADラット、著しくはAscl1-SA6で処置したTgF344 ADラットは、未処置TgF344 ADラットと比較して改善された記憶を示した（図25A）。Ascl1-SA6 TgF344 ADラットは、Ascl1処置したラットと比較して記憶が増加する傾向を示した。Ascl1-SA6で処置したTgF344 ADラットの改善された能力を更に調査するために、バーンズ迷路作業の学習段階及び反転段階を調べた。未処置のTgF344 ADラットは、Ascl1-SA6で処置したADラット、ならびに処置及び未処置NTgラットと比較して、バーンズ迷路作業の学習が有意に遅かった（図25B）。重要なことに、Ascl1-SA6で処置したTgF344 ADラットは、処置ラット及び未処置ラットの両方でNTgラットと有意に異なることはなかった。実行機能または問題解決能力の実験は、未処置TgF344ラットで比較して、Ascl1-SA6で処置したTgF344 ADラットでは有意により良好であり、処置及び未処置NTgラットでは有意に異なるものではなかった（図25C）。

【0170】

結論

本実験は、前神経転写因子であるAscl1、Ascl1-SA6及びNeurod1が、反応性アストロサイトをTgF344 ADラットモデルの神経細胞に効果的に分化転換することを実証する。海馬におけるAscl1発現は、GABA作動性神経細胞の数を増加させ、Ascl1発現は、海馬の神経細胞連結性を増加させ、産生された新規神経細胞が回路に組み込まれ、有益であることを示した。更に、新たに生まれた神経細胞の結果として生成される成長因子も、利益に寄与する。

【0171】

変異Ascl1-SA6転写因子は、アストロサイトを神経細胞に分化転換する際の最も効果的な因子であった。予想外にも、反応性アストロサイトにおけるAscl1-SA6減少は、分化転換後に、海馬環境を変化させ、アミロイドプラーククリアランスを内因的に刺激した。アミロイドプラークの減少は、プラークとのミクログリア会合の増加を伴い、これは、脳内のプラーク負荷を減少させるメカニズムの1つである。Ascl1-SA6による分化転換の後、海馬における実質環境は、アストロサイト及びミクログリア細胞の形態変化、炎症メディエーターS100β及びC3の減少、ならびに壊死神経細胞の減少によって示される恒常性表現型に向かってシフトした。Ascl1-SA6による分化転換後の全体的な有益な結果は、未処理のTgF344のラットと比較して、処置したTgF344のADラットにおいて空間学習、記憶及び実行機能を改善した。

【0172】

参考文献

1. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2010 Jan 28;362(4):329-344.

10

20

30

40

50

2. Terry RD, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 1991, 30, 572-580.

3. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 1990, 27, 457-464.

4. Oddo, S. et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 2003, 39, 409-421.

5. Bittner, T. et al. Multiple Events Lead to Dendritic Spine Loss in Triple Transgenic Alzheimer's Disease Mice. *PLoS One* 2010, 5, e15477.

6. Ittner, L. M. & Gotz, J. Amyloid- β and tau - a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2011, 12, 65-72.

7. Rhein, V. et al. Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci* 2009, 106, 20057-20062.

8. Cohen, RM et al., A transgenic Alzheimer's rat with plaques, tau pathology, behavioural impairment, oligomeric A and frank neuronal loss. *J. Neurosci.* 2013, 33, 6245-6256.

9. Bott J-B, et al., Spatial Reference Memory is Associated with Modulation of Theta-Gamma Coupling in the Dentate Gyrus. *Cereb Cortex.* 2016, 26, 3744-3753.

10. Huxter J, Burgess N, O'Keefe J. Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells. *Nature.* 2003, 425, 828-832.

11. Cardin JA, et al., Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature.* 2009, 459, 663-667.

12. Onslow ACE, Bogacz R, Jones MW. Quantifying phase-amplitude coupling in neuronal network oscillations. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011 105, 49-57.

13. Canolty RT, et al., High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science.* 2006, 313, 1626-1628.

10

20

30

40

50

14. Lee H, et al., Phase locking of single neuron activity to theta oscillations during working memory in monkey extrastriate visual cortex. *Neuron*. 2005, 45, 147–156.
15. Sohal VS, et al., Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. 2009, 459, 698–702.
16. Liguz-Leczinar M, Urban-Clecko J, Kossut M. Somatostatin and somatostatin containing neurons in shaping neuronal activity and plasticity. *Frontiers in Neural Circuits* 2016, 10, article 48, 1–15. 10
17. Stefanelli T., et al., Hippocampal somatostatin interneurons control the size of the neuronal memory ensembles. *Neuron* 2016, 89, 1074–1085.
18. Ramos B, et al., Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006, 27, 1658–1672. 20
19. Krantic S, Isorce N, Mechawar N, Davoli MA, Vignault, E., Albuquerque, M., Chabot J-G, Chauvin J-P, Aubert I. McLaurin J, Quirion R, Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid beta toxicity in vitro and are decreased in number in the Alzheimer's disease TgCRND8 mouse model. *J. Alz. Disease* 2012, 29, 293–308. 30
20. Ma K, McLaurin J. -Melanocyte stimulating hormone prevents GABAergic cell loss to improve cognition in Alzheimer's disease. *J. Neuroscience* 2014, 34, 6736–6745.
21. Li Y, et al., Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2016, 8, article 31, 1–12. 40
22. Tong LM, et al., . Enhancing GABA signaling during middle adulthood prevents age-dependent GABAergic interneuron decline and learning and memory deficits in ApoE4 mice. *J. Neuroscience* 2016, 36, 2316–2322.
23. Schmid LC, et al., . Dysfunction of somatostatin-positive interneurons associated with memory deficits in an Alzheimer's disease model. *Neuron* 2016, 92, 114–125. 50

24. Soler H, et al., The GABAergic septohipocampal connection is impaired in a mouse model of tauopathy. *Neurobiol Aging* 2017, 49, 40–51.

25. Verret L, et al., Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 2012, 149, 708–721.

26. Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2016, 17, 777–792.

27. Sanchez PE, et al., Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *PNAS* 2012, 109, E2895–2903.

28. Shetty AK, Bates A. Potential of GABAergic cell therapy for schizophrenia, neuropathic pain and Alzheimer's and Parkinson's disease. *Brain Res.* 2016, 1638, 74–87.

29. Colasante G, et al., Rapid conversion of fibroblasts into functional forebrain GABAergic interneurons by direct genetic reprogramming. *Cell Stem Cell* 2015, 17, 719–734.

30. Hunt RF, et al., GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behaviour. *Nat Neurosci* 2013, 16, 692–697.

31. Vierbuchen, T. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010, 463, 1035–1041.

32. Pang, Z. P. et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 2011, 476, 220–223.

33. Son, E. Y. et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell stem cell* 2011, 9, 205–218.

34. Pfisterer, U. et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2011, 108, 10343–10348.

35. Marro, S. et al. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell stem cell* 2011, 9, 374–382.

10

20

30

40

50

36. Chuang, W. et al. Partial Reprogramming of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes into Neurons. *Scientific reports* 2017, 7, 44840.
37. Rivetti di Val Cervo, P. et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nature biotechnology* 2017, 35, 444-452.
38. Yang, N. et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nature methods* 2017, 14, 621-628. 10
39. Dennis DJ, Wilkinson G, Li S, Dixit R, Adnani L, Balakrishnan A, Han S, Kovach C, Gruenig N, Kurrasch DM, Dyck RH, Schuurmans C. Neurog2 and Ascl1 together regulate a postmitotic derepression circuit to govern laminar fate specification in the murine neocortex. *PNAS* 2017, 114, E4934-E4943. 20
40. Guo Z, et al., In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*. 2014, 14, 188-202.
41. Liu Y, Miao Q, Yuan J, Han S 'e, Zhang P, Li S, Rao Z, Zhao W, Ye Q, Geng J, Zhang X, Cheng L. Ascl1 Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo. *J Neurosci*. 2015, 35, 9336-9355. 30
42. Sirko S, et al., Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. *Cell Stem Cell*. 2013, 12, 426-439.
43. Sprott, RL & Ramirez, L. Current inbred and hybrid rat and mouse models for gerontological research. *ILAR J*. 1997, 38:104-109.
44. Beas, BS et al., Distinct manifestations of executive dysfunction in aged rats. *Neurobiol Aging* 2013, 34: 2164-2174. 40
45. Pancani, T et al., Effect of high-fat diet on metabolic indices, cognition and neuronal physiology in aging F344 rats. *Neurobiol. Aging* 2013, 34: 1977-1987.
46. Guidi, M et al., Assessing the emergence and reliability of cognitive decline over the life span in Fisher 344 rats using the spatial water maze. *Frontiers in* 50

Aging Neurosci 2014, 6:1–11.

47. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. Acta Naturae 2015, 7, 42–47.

48. McGail JA, Frazier CJ, Bizon JL. Molecular aspects of age-related decline: the role of GABA signaling. Mol Med 2015, 21, 450–460.

49. Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic inhibition of GABA_A receptors. Nat Rev Neurosci 2005, 6, 215–229. 10

50. Tong X, et al., Ectopic expression of 6 and GABA_A receptor subunits in hilar somatostatin neurons increases tonic inhibition and alters network activity in the dentate gyrus. J. Neurosci 2015, 35, 16142–16158.

51. Buzsaki G, Leung LW, Vanderwolf CH. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. Brain Res. 1983, 287, 139–171. 20

52. Bragin A, et al., Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. J Neurosci. 1995, 15, 47–60.

53. Bazzigaluppi P, Beckett TL, Koletar MM, Lai AY, Joo IL, Brown ME, Carlen PL, McLaurin J, Stefanovic B. Early stage attenuation of phase amplitude coupling in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a transgenic rat model of AD. J Neurochem. 2017 doi: 10.1111/jnc.14136. 30

54. Christian KM, Song H, Ming G-l. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. Ann Rev Neurosci 2014, 37, 243–262.

55. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. J. Psychiatry Neurosci 2013, 38, 6–23. 40

56. Berninger B, Guillemot F, Gotz M. Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. Eur J Neurosci. 2007, 25, 2581–2590.

57. Britz O, Mattar P, Nguyen L, Langevin L-M, Zimmer C, Alam S, Guillemot F, Schuu 50

- rmans C. A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells. *Cereb Cortex*. 2006, 16 Suppl 1:i138–151.
58. Casarosa S, Fode C, Guillemot F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development*. 1999, 126, 525–534.
59. Li S, Mattar P, Dixit R, Lawn SO, Wilkinson G, Kinch C, Eisenstat D, Kurrasch DM, Chan JA, Schuurmans C. RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci*. 2014, 34, 2169–2190.
60. Masserdotti G, et al., Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell*. 2015, 17, 74–88.
61. Pang ZP, et al., Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. 2011, 476, 220–223.
62. Treutlein B, et al., Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq. *Nature*. 2016, 534, 391–395.
63. McLaurin J, Kierstead ME, Brown ME, Hawkes CA, Lambermon MHL, Phinney AL, Darabie AA, Cousins JE, French JE, Lan MF, Chen F, Wong SSN, Mount HTJ, Fraser PE, Westaway D, St George-Hyslop P. Cyclohexanohexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med*. 2006, 12, 801–808.
64. Fenili D, Brown M, Rappaport R, McLaurin J. Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *J Mol Med*. 2007, 85, 603–611.
65. Murlidharan G, Samluski RJ, Asokan A. Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Frontiers in Mol Neurosci* 2014, 7, article 76, 1–9.
66. Murlidharan G, et al., Glymphatic fluid transport controls paravascular clearance of AAV vectors from the brain. *J. Clin. Invest. Insight* 2016, 1, e88034.
67. Womelsdorf T, et al., Dynamic circuit motifs underlying rhythmic gain control, gating and integration. *Nature Neurosci* 2014, 17, 1031–1039

10

20

30

40

50

68. Edwards E, et al., High gamma activity in response to deviant auditory stimuli recorded directly from human cortex. *Journal of neurophysiology* 2015, 94, 4269–4280.

69. Canolty RT, Knight RT. The functional role of cross-frequency coupling. *Trends in cognitive sciences*, 2010, 14, 506–515.

70. Lee H, et al., Phase locking of single neuron activity to theta oscillations during working memory in monkey extrastriate visual cortex. *Neuron*, 2005, 45, 147–156. 10

71. Chrobak JJ, Buzsaki G. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *Journal of Neurosci* 1998, 18, 388–398.

72. Turner KM, Burne THJ. Comprehensive behavioural analysis of Long Evans and Sprague-Dawley rats reveals differential effects of housing conditions on tests relevant to neuropsychiatric disorders. *PLoS ONE*. 2014, 9, e93411. 20

73. Deacon RMJ. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behav Brain Res*. 2009 200, 128–133.

74. Birrell JM, Brown VJ. Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J Neurosci*. 2000, 20, 4320–4324. 30

75. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1979, 93, 74–104.

76. Hof PR, Bouras C, Object recognition deficit in Alzheimer's disease: possible disconnection of the occipito-temporal component of the visual system. *Neurosci Lett*. 1991, 122, 53–56. 40

77. Viggiano, M., et al., Visual recognition memory in Alzheimer's disease: Repetition-lag effects. *Experimental Aging Research* 2008, 34, 267–281.

78. Francis, B.M., Kim J., Barakat, M.E., Fraenkl, S., Yucel, Y.H., Peng, S., Michalski, B., Fahnestock, M., McLaurin, J., Mount, H.T.J. Object recognition memory and BDNF expression are reduced in young 50

g TgCRND8 mice. Neurobiol. Aging 2012, 33, 555–563.

79. Barker GRI, et al., Recognition memory for object, place, and temporal order: A disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. J. Neurosci 2007, 27, 2948–2957.

80. Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. Behav Brain Res. 2009 247–251.

81. Cordova CA, et al., Impaired executive function following ischemic stroke in the rat medial prefrontal cortex. Behav Brain Res. 2014, 258, 106–111.

82. Caroni P. Inhibitory microcircuit modules in hippocampal learning. Current Opinion in Neurobiol 2015, 35, 66–73.

83. Yuan M, et al., Somatostatin-positive interneurons in the dentate gyrus of mice provide local- and long-range septal synaptic inhibition. eLife 2017, 6, e21105.

84. Ko J, Choi G, Lim JW. The balancing act of GABAergic synapse organizers. Trends in Molecular Medicine 2015, 21, 256–268.

85. Krueger-Burg D, Papadopoulos T, Brosse N. Organizers of inhibitory synapses come of age. Current Opinion in Neurobiology 2017, 45, 66–77.

86. Joo, IL, Lai, AY, Bazzigaluppi P, Kollerar, MM, Dorr A, Brown ME, Thomason LAM, Sled JG, McLaurin J, Stefanovic B. Early neurovascular dysfunction in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. Scientific Report, 2017, 7, Article number: 46427.

87. Busche MA, et al., Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer's disease models. Nat Neurosci 2016, 18, 1623–1630.

【0173】

実施例3：脳卒中を治療するための神経細胞系統変換

脳卒中は、世界で死亡及び障害の主な原因である。脳卒中生存者の2／3以上は、日常生活を妨げる認知機能障害及び／または運動機能障害を有する。神経機能障害は、世界の疾病負担の主な原因である^{1～4}。脳卒中生存者に対する治療法はなく、治療の選択肢は限られている。脳卒中は、神経細胞及びグリア細胞の喪失を招く虚血傷害であり、損傷部位及び病変周囲の実質におけるグリオシスを伴う。また、脳卒中は、神経細胞の喪失、

10

20

30

40

50

損傷及び異所性増殖による、機械的及び細胞変性、ならびに神経回路網レベルでの興奮抑制バランスの全体的な変化をもたらす。

【0174】

概要

脳卒中は年齢を問わず起こり得るが、成人や老年集団においてより顕著である。脳卒中は、世界の疾病負担の主な原因の1つである⁴。現在のところ、脳卒中の最も一般的な形態である虚血発作後の脳を保護または修復するための治療法はなく、治療の選択肢は限られている。障害の主な原因として世界中で年間1,500万人以上の脳卒中患者が発生しており、2020年の推定される世界コスト（直接的及び間接的）は7,500億ドルであり⁴、2030年にはこの費用は2倍になると予想されている。

10

【0175】

脳卒中は、脳への血流が遮断されたときに起こる。これは、脳内の血管が破裂したときに起こる出血性脳卒中（脳卒中症例の約15%）によって、または脳への血流が閉塞したときに起こる虚血性脳卒中によって起こり得る。出血性脳卒中は、漏出した血液により脳圧の上昇を引き起こし、死亡リスクの増加と関連する。⁵虚血性脳卒中は最も一般的な脳卒中のタイプであり、これは全体の症例の約85%を占める。⁶虚血性脳卒中は、脳へのグルコース及び酸素の送達を減少させ、その結果、急速な神経細胞死がもたらされ、神経機能障害を引き起こす。

【0176】

虚血性脳卒中は、脳卒中の後、興奮毒性、カルシウム調節異常、酸化ストレス及びニトロソ化ストレス、皮質拡散脱分極、血液脳関門の崩壊（BBB）、浮腫及び炎症の機序を介して、数分以内に細胞の喪失をもたらす。^{7、8}これらの機序によって、虚血性傷害の中心部内のすべての細胞の急速な死が伝播するが、その際に、当初の傷害の後に数時間生存可能であり得る、周辺部領域でより緩慢かつより進行性の細胞死が生じる。脳卒中傷害の進行は、重複する段階で起こる。急性期（最長4日間）では、虚血中心部における壊死性細胞死は、無酸素脱分極及びアデノシン三リン酸（ATP）の欠如の結果であり、脳卒中発症後数分以内に不可逆的な損傷を生じさせる。付近の梗塞周囲は、脳卒中後の数日以内と数週間にわたり、アポトーシス細胞死を起こし始める。更に、梗塞周囲環境及び細胞外環境は、グリア瘢痕の形成の一因となるアストロサイト（「反応性」アストロサイト）、活性化ミクログリア及び浸潤免疫細胞の活性化につながる炎症促進性及び抗炎症シグナルに曝露される。^{9~11}反応性アストロサイトは、中間線維タンパク質GFAP（グリア線維酸性タンパク質）をアップレギュレートし、プロテオグリカン及び炎症性細胞（例えば、マクロファージ、ミクログリア）と共に、損傷組織を取り囲む密なバリアを形成する。^{11、12}

20

30

【0177】

脳卒中を治療するための治療介入は、主に、最初の発作後の細胞死を防ぐための血流回復及び神経保護に焦点を合わせていた。これらの介入には限定的にしか成功せず、成功した介入は時間に敏感であり、脳卒中発症後の短時間の枠内にそれらの管理を必要とする。これに関して、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）は、血餅を分解して流れを回復させ、ひいては最初の発作後の更なる細胞損失を防止する、FDAに承認された脳卒中の治療である。しかし、この方法は、有効性の短い治療期間（脳卒中後4.5時間以内）ならびに治療についての患者の認定要件によって制限されており、ほとんどの脳卒中患者の可用性と有用性を排除している。¹³脳卒中患者の治療の基準はリハビリテーションに焦点を当てているが、その利点は限られており、実施及び評価のための標準化されたアプローチはない。¹⁴

40

【0178】

脳卒中は、失われた細胞を置換し、治療機会を拡大し、最終的には機能回復を促進するための治療的介入が必要とされることから、細胞ベースの治療の理想的な標的である。傷害によって失われた神経細胞を置換するために、常在する脳細胞を新しい神経細胞に変換することは、脳修復のための魅力的なアプローチである。更に、脳卒中の発作の非進行性

50

の性質は、おそらく細胞のリプログラミングに、単回投与遺伝子治療の最大の可能性をもたらす。損傷した脳が回復すると、治療が結果として生じ、神経細胞が置換され、機能的回復につながり、「退行」の可能性が低くなる。更に、最近の研究では、脳卒中後のアストロサイト不均一性が強調されており¹⁵、神経細胞死の一因となり得るグリア瘢痕内の「毒性」アストロサイトのサブ集団が同定されている。神経細胞死に寄与する毒性アストロサイトを除去するための直接的細胞リプログラミングは、アストロサイトから神経細胞へのリプログラミング戦略に更なる利益をもたらす。

【0179】

治療的介入を研究するためには、ヒトの状態を模倣した動物モデルが必要である。脳卒中は不均一な転帰をもたらすという知識により、各モデルの利点及び欠点を、実験の種類（例えば、再生対神経保護）及び使用すべき転帰基準に対するそれぞれの適合性と併せて考慮する必要がある。^{16~22} 前臨床治療回復研究では、予測可能で再現性のある組織損傷及び機能障害をもたらすモデルが不可欠である。²³

10

【0180】

これまでの多くの研究は、*Ascl1* 及び *Neurod1* を含む単一の神経特異的 bHLH TF または TF のカクテルを使用した神経疾患ならびに損傷のマウスならびに非ヒト霊長類モデルにおける、アストロサイトから神経細胞への変換を誘導し、様々な程度のリプログラミング効率と機能的改善が報告された^{30~34}。近年、虚血の齧歯類モデルにおいて、発生中の神経細胞分化に重要な天然転写因子 *Neurod1* を用いて、改善された機能的成果が報告された。^{31、32} これらの研究は、脳卒中後の神経修復及び機能的回復に関する遺伝子治療の有望な可能性を強調しているが、リプログラミングの有効性及び機能的成果への影響の観点からは多くの問題が残っている。

20

【0181】

本研究では、脳卒中障害脳で見られるであろう環境抑制制御を受けないように設計された前神経遺伝子 *Ascl1* (*Ascl1-SA6* と呼ばれる) の改変型を使用する。虚血性脳卒中の亜急性モデルの脳卒中障害脳における天然型 *Ascl1* 遺伝子 (野生型) 及び *Ascl1-SA6* (変異体) を用いて、アストロサイトから神経細胞への転化の有効性を調べ、比較した。細胞リプログラミング後の機能的成果を、アストロサイトプロモーター (すなわち、GFAP) の制御下で *Ascl1* 及び *Ascl1-SA6* を使用して、2 つのモデルの局所虚血性脳卒中中で比較した。

30

【0182】

方法

脳卒中モデル。脳卒中は、神経細胞及びグリア細胞の喪失を招く虚血傷害であり、損傷部位及び病変周囲の実質におけるアストログリオシスを伴う。十分に確立されかつ再現性のあるエンドセリン-1 (ET-1) モデルを使用し、運動皮質脳卒中を誘発する。ET-1 は、局所虚血性損傷、アストロサイト反応性及び持続性運動障害を誘発する血管収縮ペプチドであり、回復研究に最適である。受け取ったマウスは、感覚運動皮質 (プレグマに対して +0.6 mm 前部、-2.25 mm 側部及び 1.0 mm 腹側部) への単回 ET-1 注射 (400 pmol、1 µl、Calbiochem) または感覚運動皮質の 3 × ET-1 注射 (400 pmol、1 µl / 注射、プレグマから +0.6 AP、-2.25 ML、-1.0 DV; +1.6 AP、-2.25 ML、-1.0 DV; 及び -0.4 AP、-2.25 ML、-1.0 DV) (トリプル-ET-1) を受ける。実験を、レポーターマウス (R26R-YFP (Jackson Labs: B6.129X1-Gt (ROSA) 26Sortm1 (EYFP) Cos/J) 及び R26R-tdTomato (Jackson Labs: Gt (ROSA) 26Sortm9 (CAG-tdTomato) Hze) Cre コンディショナルトランスジェニックマウス及び C57/B16 マウスの成人 (8~12 週齢) 雄ならびに雌コホートで行った。簡潔に言えば、マウスをイソフルオロランを用いて麻酔し、定位固定装置上に配置した。頭皮を切開し、小さな穴を注入位置 (上方) の頭蓋内に穿孔した。滅菌 PBS に溶解させた ET-1 を、0.1 µl / 分の速度でベベル先端 26 ゲージのハミルトンシリンジを用いて注入した。ET-1 注射の

40

50

完了後、針を10分間留置し、その後、徐々に引き抜いた。加熱パッドを使用して体温を37℃に維持し、動物を熱ランプ下で回復させた。ケトプロフェン(5.0mg/kg; 皮下)を手術後の鎮痛のために投与した。

【0183】

AAV注射。AAV2/5-GFAP-CreもしくはAAV2/5-GFAP-Asc11-t2a-CreもしくはAAV2/5-GFAP-Asc11-SA6-t2a-Cre(Creコンディショナルトランスジェニックマウスに)、またはC57/BL6マウスにAAV2/5-Flex::GFP+AAV2/5-GFAP-Asc11-CreもしくはAAV2/5-Flex::GFP+AAV2/5-GFAP-Asc11-SA6-Creもしくは空ベクター(AAV2/5-Flex::GFP+AAV2/5-GFAP-Cre)を、脳卒中後7日目またはシャム損傷後病変部位と同側の皮質内に注射した。脳卒中病変の前範囲から後範囲までを包含する領域を示す、それぞれ以下の座標:ブレガムから[+0.6AP、+2.25ML、-1.0DV]; [+1.6AP、+2.25ML、-1.0DV]; 及び[-0.4AP、+2.25ML、-1.0DV]mmに、26ゲージの針を備える5μlハミルトンシリンジを使用して、0.1μl/分で全容量1μl中1.0×10¹²/ml。逆流防止のために、各AAV注入後10分間にわたって針を留置し、その後、徐々に引き抜いた。加熱パッドを使用して体温を37℃に維持し、マウスを熱ランプ下で回復させた。ケトプロフェン(5.0mg/kg; 皮下)を手術後の鎮痛のために投与する。群には、実験に応じて、脳卒中+AAV(Creのみ、Asc11、Asc11-SA6)及びシャム(無損傷マウス)+AAV(Cre)が含まれていた。すべてのマウスを、脳卒中前(ベースライン)及び脳卒中後3日目または4日目(PSD3/4)の一連の行動作業で試験した(脳卒中後に運動障害が確実に観察された)。行動評価では、治療介入が行動の回復を評価していることを確認するために、機能障害を示す脳卒中で損傷したマウスを使用した。マウスは、以下で詳述するように、作業に応じて、脳卒中後に最大4か月まで行動試験を受けた。

【0184】

AAVコンストラクト。すべてのAAVコンストラクトを、VectorBuilder(商標)Inc.により生成及びパッケージ化した。

組織処理及び分析。マウスに過剰量のアベルチン(250mg/kg; 腹腔内)で麻酔し、生理食塩水を経皮的に灌流し、続いて4%のパラホルムアルデヒド(PFA)を灌流した。脳を除去し、4%のPFAで4時間後固定し、次いで凍結保存のために30%のスクロースに入れ、その後、凍結切片化(20μm)し、スーパーフロストスライドガラスに取り付けた。切片をPBS中の10%正常ヤギ血清(NGS)及び0.3%Tritonで遮断し、PBS中で一次抗体(下記の表に示す)で4℃にて一晚標識し、次いで室温にて1時間PBS中で二次抗体及びDAPIと共にインキュベートした。ブレガムから+1.6及び-1.0APの領域内に位置する、20×倍率で見たマウス1匹当たり3以上の冠状切片の5~9画像におけるマーカーの重複発現について、切片を分析した。

【0185】

行動評価。本実験で使用したマウスモデルで十分に確立された一連の行動/機能試験を利用した。これは、(1)足の握力の最大ピーク力の読み取りを提供するBIOSEP握力試験、(2)熟練した協調を評価するために使用される水平ラダータスク及び(3)フットフォルトタスク、(4)自発的歩行の間の様々なパラメータにおける差を測定するためのCatWalk(商標)を使用したデジタル歩行分析を含む。

【0186】

フットフォルト分析:テーブル表面から12インチ(7.64cm)上方に吊り下げられた金属グリッド(1cm間隔)上にマウスを置いた。動物をグリッドの周りを3分間歩行させ、下から記録した。傷害反対側の前肢及び後肢を用いて行われたステップ及び足の滑りの数を分析し(かつ別々に考慮し)、滑りの割合を#滑り/#ステップとして計算した。試験は、脳卒中前(ベースライン)、4日目(PSD4; 脳卒中後及びリプログラミング前)及びPSD28(AAV後21日目)に行った。以下の組み入れ基準:(i)脳

卒中後の実証された欠陥（ベースライン性能と比較して滑りが30%多いと定義される）及び（i i）試験中に50超のステップを適用した。

【0187】

歩行分析：歩行分析を、自動化されたNoldus CatWalk XTシステム（Noldus, The Netherlands）を使用して実施した。マウスに、ライトで照らされたガラスの歩道を横断させ、複数の歩行パラメータを測定した。マウスが直接経路を選択し、通過の間に速度が60%を超えて変化しない、少なくとも3回の成功した試験が必要であった。フットプリントを高速ビデオカメラを使用して記録し、CatWalk XT 8.1ソフトウェアを使用して歩行中の足の配置及び四肢の協調に関する様々な変数を分析した。ベースライン時に群間で有意に異なるパラメータ、または脳卒中後に有意な障害がなかったパラメータは分析から除外した。歩行分析を、PSD 28及び処置群間で比較したパラメータで実施した。

10

【0188】

ラダータスク：水平ラダー試験は、装置の端部にゴールボックスを備える、不均等な間隔の棧を備える上げられたラダーからなる。マウスをゴールボックスに2分間順応させ、次いで試験日ごとに3回連続してラダーを越えるように促した。試験中にマウスを記録し、ビデオを反対側の前肢のステップ及び滑りの数を調べて、損傷した前肢の滑り割合を計算した。マウスを、脳卒中の前（ベースライン）、ならびにPSD 3 / 4（AAVの前）及びPSD 28で試験した。PSD 3 / 4で滑り%の増加を示さないマウスは、更なる分析から除外した。

20

【0189】

握力：握力計（Bioseb（商標））を使用して前肢の神経筋機能を評価した。マウスを尾部で保持し、前肢で金属製プルバーを掴ませた。バーが離されてセンサの値が記録されるまで、マウスを力センサの軸線に沿って水平面においてそっと引き離した。マウスは1回の試験で3回把持試験を実行し、試験日の平均値を記録する（ベースライン、PSD 3 / 4、PSD 14及びPSD 28 / 29）。トリプルET-1脳卒中を受けたマウスは、長期障害及び回復を調べるためにPSD 28、PSD 59、PSD 89及びPSD 120のタスクで評価した。PSD 3 / 4のベースラインに対して握力（グラムで加えられる力）の変化が30%超のマウスを、分析に含めた。

30

【0190】

データ取得及び統計解析：すべての実験を、損傷／治療条件を目隠しにした実験で行った。Prism（商標）（v. 9、GraphPad（商標））を使用して統計解析を行った。一元配置分散分析（ANOVA）を使用して、3つ以上の群を比較した。二元配置反復測定ANOVAを行動データ分析に用いた。p < 0.05で差が有意であると判断した。値は平均値 ± SEMとして示す。

40

50

【表 3】

表 2：免疫組織化学に使用する試薬の概要

一次抗体	希釈	会社	カタログ番号
C h 抗 G F P	1：200	A v e s	G F P－1020
R b 抗 N e u N	1：200	M i l l i p o r e	A B N 78
二次抗体	希釈	会社	カタログ番号
抗 R b A l e x a 568（商標）	1：400	L i f e T e c h	A 11036
抗 C h A l e x a 488（商標）	1：400	L i f e T e c h	A 11039
核染色剤	希釈	会社	カタログ番号
D A P I	50ng／ μ l	L i f e T e c h	D 3571

【0191】

結果

A s c l 1 セリンリン酸受容体部位を突然変異すると、損傷皮質におけるアストロサイトから神経細胞への変換が増強される。

以前の研究は、前神経遺伝子 A s c l 1（野生型）が、感覚運動皮質への頭蓋内注射の後、対照（無傷）成体マウスの大脳皮質でアストロサイトを神経細胞に変換できることを示している。更に、微小環境の抑制合図に対して非感受性になるように設計された、A s c l 1（プロリンに隣接する6つのセリン（S）ヌクレオチドがアラニン（A）で置き換えられるように操作、A s c l 1－S A 6 と称される）の変異型は、無傷皮質での変換においてより効率的である。A s c l 1 及び A s c l 1－S A 6 を A A V 2／5 ベクターにクローニングし、G F A P プロモーターの制御下で標的アストロサイトにクローニングし、更に t 2 A－C r e カセットを運び、これは、A s c l 1 または A s c l 1－S A 6 の不在下で対照ベクターとして使用した。問われた最初の問題は、脳卒中で損傷を受けた皮質環境において、A s c l 1－S A 6 がアストロサイトから神経細胞へのリプログラミングに対してより効果的であったか否かであった。

【0192】

この問題に答えるために、A A V ベクター（A A V－A s c l 1、A A V－A s c l 1 S A 6 または A A V－C r e）を、感覚運動皮質脳卒中を受けた成体 c r e レポーターマウス（R o s a－Y F P または R o s a－T d T o m）に頭蓋内注射し、A A V 形質導入されたアストロサイトの運命トラッキングを可能にした。マウスは、0 日目に局所虚血性脳卒中を誘導するための E T－1 注射を受け、脳卒中後の亜急性期を表す、7 日目に病変皮質に A A V 注射を行った。E t－1 脳卒中は、神経細胞死及び病変部位を取り囲むグリア瘢痕形成を生じる（S h e n X－Y e t a l, 2021；L i v i n g s t o n e t a l., 2020）。脳卒中後の28日目（P S D 28）、A A V 送達から3週間後に、脳を取り出し、切片化し、成熟神経細胞（N e u N+）を染色した。t d T o m a t o+（A A V 導入 G F A P 発現細胞）及び t d T o m a t o+／N e u N+（リプログラミングされた神経細胞）の総数を図 26 に示す。予測されたように、A s c l 1 は、C r e 対照と比較して、リプログラミングされた神経細胞の割合の有意な増加をもたらした（（それぞれ、48.32±3.21 対 28.01±1.71% T d T o m a t o+ N e

uN+ / TdTomato+細胞、Ascl1対Cre)。神経細胞変換は、Ascl1-S A6マウスにおいて有意に増加した(61.52±4.03% TdTomato+NeuN+ / TdTomato+細胞)。したがって、変異Ascl1-S A6遺伝子は、天然型Ascl1と比較して神経細胞リプログラミングを増加させる。

【0193】

Ascl1及びAscl1 S A6の過剰発現は、脳卒中損傷後の機能的成果の改善をもたらす

ET-1感覚運動皮質脳卒中を受けたマウスは、いくつかの行動作業を用いて測定できる機能障害を有する。(1)熟練した歩行(フットフォルト及び水平ラダー作業)、(2)歩行分析(歩行時の細かい運動協調)、及び(3)神経筋力を評価するための握力を含む運動機能を評価する、行動作業が採用された。

【0194】

フットフォルト作業は、脳卒中後7日目に、単回ET-1脳卒中及びAAV注射(AAV-Ascl1、AAV-Ascl1-S A6またはAAV-Cre対照)を受けたマウスで実施した。傷害反対側のステップ及び滑り(すなわち、脳卒中の反対側にある身体の障害のある側)を、前肢及び後肢について記録した。図27に示すように、脳卒中を受けたマウスはすべて、PSD3/4で有意に障害を示し、後肢(A)及び前肢(B)の滑り%が増加した。PSD29により、AAV-Ascl1-S A6を受けたマウスは、有意に改善され、ベースラインと同様に実行した。これらのデータから、損傷後の運動転帰の改善には、Ascl1-S A6過剰発現にはリプログラミング後21日目で十分であるが、Ascl1過剰発現では十分でないことが明らかとなる。

【0195】

わずかな運動障害を検出するため高感度アッセイである、歩行分析も行った。PSD28の運動機能の障害を示すフットフォルトデータの支援では、AAV-Creを受けた脳卒中損傷マウスは、PSD28のシャムマウス(AAV-Creを受けた非損傷マウス)と比較して、傷害反対側(左)後肢プリント領域及び重量分布(最大強度)において有意に障害を示した(図28)。特に、フットフォルト作業で観察されたのと同様に、AAV-Ascl1及びAAV-Ascl1-S A6を受けた脳卒中損傷マウスは、改善された歩行性能を有していたが、AAV-Ascl1-S A6で処置したマウスのみが、PSD28で脳卒中損傷対照と比較して、著しく良好に実行した。

【0196】

Ascl1-S A6処置後のET-1脳卒中の比較的重症モデルでは、改善された機能的転帰が観察される。

運動皮質へのET-1の単回注射を用いた脳卒中の誘発は、運動障害をもたらす再現性の高い脳卒中モデルである。したがって、より重度の運動皮質脳卒中モデルでも行動改善が観察されるか否かを調べるために、エンドセリン-1(ET-1)のトリプル注射を行い32、35、続いてAAV処置及び行動評価を行った。

【0197】

C57BL/6マウスのコホートは、運動皮質へのトリプルET-1注射で誘発された脳卒中を受けた。脳卒中後の7日目、Ascl1(AAV5-Flex::GFP+AAV5-GFAP-Ascl1-Cre)、またはAscl1-S A6(AAV5-Flex::GFP+AAV5-GFAP-Ascl1-S A6-Cre)または空ベクター(AAV5-Flex::GFP+AAV5-GFAP-Cre)を、ET-1脳卒中注射部位に送達した。様々な処置群における機能的転帰を調べるために、水平ラダー作業を実施した。図29に示すように、脳卒中及びAscl1-S A6処置を受けたマウスは、PSD29で有意に改善され(前肢の滑りが少ない)、マウス自体のベースライン性能と比較して損傷されていない。したがって、皮質脳卒中のより深刻なモデルでは、Ascl1-S A6処置によって機能的転帰が改善される。

【0198】

Ascl1及びAscl1-S A6の異所性発現後に、握力が向上する。

握力解析を、単回 E T - 1 脳卒中またはトリプル E T - 1 脳卒中のいずれかを受けたマウスのコホートにおいて実施した。単回 E T - 1 脳卒中を受けたマウスは、P S D 3 で有意に障害を示し、P S D 2 8 では、A A V - C r e (対照) 処置を行ったマウスは依然として障害を示した。しかしながら、A A V - A s c l 1 及び A A V - A s c l 1 - S A 6 で処置されたマウスは、P S D 2 8 までにベースラインのレベルまで回復し、天然または変異型 A s c l 1 遺伝子の異所性発現が、より軽症の脳卒中モデルでの機能的回復を促進するのに十分であったことが明らかになる (図 3 0)。

【 0 1 9 9 】

より重度の脳卒中モデル (トリプル E T - 1) の握力において、回復速度のあらゆる潜在的な差を捕捉するために、野生型及び変異型 A s c l 1 遺伝子が同様に回復を促進するのに効率的であったか否かを調べるために、長期間 (最長 4 か月) の間にわたり試験を行った。図 3 1 に示すように、A A V - C r e (対照) で処置したマウスは、トリプル E T - 1 脳卒中後の P S D 1 2 0 までのベースライン性能と比較して、有意に障害を示したままであった。単回 E T - 1 脳卒中障害マウスと同様に、A A V - A s c l 1 及び A A V - A s c l 1 - S A 6 のいずれかの異所性発現は、A A V - A s c l 1 で処置したマウスの P S D 1 2 0 までに生じた握力作業の性能をベースラインまで回復するには十分であった。興味深いことに、A A V - A s c l 1 - S A 6 で処置されたマウスを P S D 5 9 までにベースライン性能に回復させた。このことは、変異型 A s c l 1 遺伝子が、野生型 A s c l 1 よりも機能的転帰を改善する際に効率的であることを示している。

【 0 2 0 0 】

結論：

まとめると、この実施例の所見により、A s c l 1、A s c l 1 - S A 6 の改変型の使用が、脳卒中後のアストロサイトから神経細胞への変換を誘発する際、A s c l 1 よりも効率的であったことが確認される。この効率の改善は、熟練した運動作業 (フットフォルト及びラダー作業)、歩行及び握力における改善された機能的転帰と相関している。A s c l 1 - S A 6 の異所性発現は、単回 E T - 1 またはトリプル E T - 1 病変を受けたマウスにおける機能的転帰の改善において A s c l 1 よりも効率的であった。したがって、A s c l 1 - S A 6 媒介による皮質アストロサイトの神経細胞系列変換は、損傷した脳を治療するための有用な戦略である。

【 0 2 0 1 】

参考文献

1. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol. 18: 459-480, PM:30879893.
2. Anderson CS, Carter KN, Brownlee WJ, Hackett ML, Broad JB, Bonita R (2004) Very long-term outcome after stroke in Auckland, New Zealand. Stroke 35: 1920-1924, PM:15178818.
3. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson L, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C (2014) Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. Lance

t 383: 245–254, PM:24449944.

4. Feigin VL et al., (2020) The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol.*, 19:255–265.

5. Andersen, K. K., Olsen, T. S., Dehlendorf, C., and Kammergaard, L. P. (2009). Hemorrhagic and Ischemic Strokes Compared: Stroke Severity, Mortality, and Risk Factors. *Stroke* 40, 2068–2072. 10

6. Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., de Ferranti, S., Despres, J.-P., Fullerton, H. J., Howard, V. J., et al. (2015). Heart Disease and Stroke Statistics–2015 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 131, e29–e322

7. Iadecola, C., and Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 17, 796–808. 20

8. Rayasam, A., Hsu, M., Hernandez, G., Kijak, J., Lindstedt, A., Gerhart, C., Sandor, M., and Fabry, Z. (2017). Contrasting roles of immune cells in tissue injury and repair in stroke: The dark and bright side of immunity in the brain. *Neurochem. Int.* 107, 104–116.

9. Huang, L., Wu, Z.-B., ZhuGe, Q., Zheng, W., Shao, B., Wang, B., Sun, F., and Jin, K. (2014). Glial Scar Formation Occurs in the Human Brain after Ischemic Stroke. *Int. J. Med. Sci.* 11, 344–348. 30

10. Burda, J., and Sofroniew, M. (2014). Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron* 81, 229–248.

11. Silver, J. (2016). The glial scar is more than just astrocytes. *Exp. Neurol.* 286, 147–149. 40

12. Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.

13. Diamandis, T. and Borlongan, C. V. (2015) One, Two, Three Steps Toward Cell Therapy for Stroke, *Stroke* 46(2), 588–591

14. Saver, J. L., Fonarow, G. C., Smith, E. E., Reeves, M. J., Navalkele, D., Grotta, J. C., Grau-Sepulveda, M. V., Hernandez, 50

A. F., Peterson, E. D., and Schwamm, L. (2015). Abstract 50: Shape of the TPA Time – Benefit Curve: Insights From The National US Get With The Guidelines – Stroke Population. *Stroke* 46, A50–A50.

15. Shen X-Y et al., (2021) Activation and Role of Astrocytes in Ischemic Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience.*, 15: DOI=10.3389/fncel.2021.755955

16. Carmichael, S. T. (2005). Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2, 396–409.

17. Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D. W., Hurn, P. D., Kent, T. A., Savitz, S. I., Lo, E. H., and for the STAIR Group (2009). Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke* 40, 2244–2250.

18. Fluri, F., Schuhmann, M., and Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des. Devel. Ther.* 3 445.

19. Jolkkonen, J., and Kwakkel, G. (2016). Translational Hurdles in Stroke Recovery Studies. *Transl. Stroke Res.* 7, 331–342.

20. Savitz, S. I., Chopp, M., Deans, R., Carmichael, S. T., Phinney, D., Wechsler, L., The STEPS Participants, and The STEPS Writing Committee: Sean I. Savitz, Larry Wechsler, Robert Deans, Michael Chopp, Tom Carmichael, and Donald Phinney. Contributors: Jaraslaw Aronowski, Martin Bednar, Johannes Boltze, Cesar Borlongan, Tom Carmichael, Thomas Chase, Michael Chopp, D (2011a). Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke* 42, 825–829.

21. Savitz, S. I., Chopp, M., Deans, R., Carmichael, S. T., Phinney, D., and Wechsler, L. (2011b). Stem cell therapy as an emerging paradigm for stroke (STEPS) II. *Stroke* 42, 825–829.

22. Sommer, C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 245–261.

23. Winstein, C. J., Stein, J., Arena, R., Bates, B., Cherney, L. R., Cramer, S. C., Deruyter, F., Eng, J. J., Fisher, B., Har

10

20

30

40

50

vey, R. L., et al. (2016). Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery : A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 47, e98–e169.

24. Napoli, E., and Borlongan, C. V. (2016). Recent Advances in Stem Cell-Based Therapeutics for Stroke. *Transl. Stroke Res.* 7, 452–457.

25. Vonderwalde I, Azimi A, Rolvink G, et al., 2019 Transplantation of directly reprogrammed human neural precursor cells following stroke promotes synaptogenesis

26. Chen, L., Zhang, G., Gu, Y., and Guo, X. (2016). Meta-Analysis and Systematic Review of Neural Stem Cells therapy for experimental ischemia stroke in preclinical studies. *Sci. Rep.* 6.

27. Wang, Y., Ji, X., Leak, R. K., Chen, F., and Cao, G. (2017). Stem cell therapies in age-related neurodegenerative diseases and stroke. *Ageing Res. Rev.* 34, 39–50.

28. Janowski, M., Wagner, D.-C., and Boltze, J. (2015). Stem Cell-Based Tissue Replacement After Stroke: Factual Necessity or Notorious Fiction? *Stroke* 46, 2354–2363.

29. Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., and Chen, G. (2014). In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 14, 188–202.

30. Faiz, M., Sachewsky, N., Gascon, S., Bang, K. W., Morshead, C. M., and Nagy, A. (2015). Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* 17, 624–634.

31. Livingston J, Lee T, Enbar T, Daniele E, Phillips C, Krassikova A, Enbar T, Kortebi I, Bang KWA, Donville B, Ibragimov O, Sachewsky N, Morshead CM, Faiz M. Direct reprogramming of astrocytes to neurons leads to functional recovery after stroke. *BioRx*, doi:<https://doi.org/10.1101/2020.02.02.929091>

32. Chen, Y. C., Ma, N. X., Pei, Z. F., Wu, Z., Do-Monte, F. H., Keefe, S., Yellin, E

. , Chen, M. S. , Yin, J. C. , Lee, G. , Minier-Toribio, A. , Hu, Y. , Bai, Y. T. , Lee, K. , Quirk, G. J. , and Chen, G. (2020). A NeuroD1 AAV-Based Gene Therapy for Functional Brain Repair after Ischemic Injury through In Vivo Astrocyte-to-Neuron Conversion. *Mol Ther.* 28 (1) : 217-234.

33. Ge, L. J. , Yang, F. H. , Li, W. , Wang, T. , Lin, Y. , Feng, J. , Chen, N. H. , Jiang, M. , Wang, J. H. , Hu, X. T. , and Chen, G. (2020). In vivo Neuroregeneration to Treat Ischemic Stroke Through NeuroD1 AAV-Based Gene Therapy in Adult Non-human Primates. *Front Cell Dev Biol* 8, 590008.

34. Rivetti di Val Cervo, P. et al. (2017) Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nature biotechnology*, 35, 444-452.

35. Roome RB, et al. , (2014) A reproducible Endothelin-1 model of forelimb motor cortex stroke in the mouse. *J Neurosci Methods*. 2014 Aug 15; 233:34-44. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.05.014.

【0202】

実施例4：大脳オルガノイド（CO）の培養

方法

この実験の全体的なワークフローを図32に示す。

【0203】

フィーダーフリーのH1ヒト胚性幹細胞（hESC, WiCell）を、hESC/h iPSC維持のためにTeSR（商標）-E8（商標）キット（StemCell Tech; #05990）のマトリゲル上で培養した。hESCを使用して、STEMdiff大脳オルガノイドキット（StemCell Tech; #08570）及びSTEMdiff大脳オルガノイド成熟キット（StemCell Tech; #08571）に含まれる媒体を使用してCOを生成し、いくつかの修正を加えた。簡潔に言えば、hESCを、96ウェルV型ボトム超低取付けプレートに、胚様体（EB）形成培地中の12,000細胞／ウェルで、50 μ M Y-27632（ROCK阻害剤；StemCell Tech; #72302）の存在で2日目までプレーティングした。二重SMAD阻害剤（2 μ Mのドルソモルフィン；StemCell Tech; #72102及び2 μ MのA83-01；StemCell Tech; #72022）を播種日から5日目まで添加した。新たに形成されたEBを、誘導培地を含む低結合24ウェルプレートに移した。9日目に、光学的に半透明のエッジを有するEBをマトリゲル（Corning; #354277）中に埋め込み、StemCell Tech増殖培地を含む6ウェル超低接着プレート中に堆積させた。5日目から13日目まで、培地に1 μ MのCHIR-99021（StemCell Tech; #72052）及び1 μ MのSB-431542（StemCell Tech; #72232）を補充し、明確に定義された極性神経上皮様構造の形成をサポートした。13日目に、出芽表面として伸長した神経上皮細胞を示す埋め込まれたEBを、37℃のインキュベーター内で、成熟培地を含有する12ウェル回転バイオリアクター（Spin Omega）に移した。COに、週2回成熟培地を供給した。2014 Lancaster methodologyによって生成されたCO（Lan

caster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. Nat Protoc. 2014; 9: 2329–2340. doi: 10.1038/nprot.2014.158) をこれらの実験で同様に用いた。

【0204】

アデノ随伴ウイルス (AAV) によるCOの注入

90日目または119日目に、個々のCOに、成熟媒体中の 1×10^{12} GC/mlで AAV2/8-GFAP-mCherryまたはAAV2/8-GFAP-ASCL1-mCherryのいずれかを注入し、オービタルシェーカーに移した。注入後48時間で培地を変え、3週間COを培養し、収集した。

10

【0205】

COの収集及び分析

COを一度PBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) 中で4℃のロッカーにて一晚固定した。翌日、COを一晚かけて30%スクロースに移し、凍結切片するためにOCTで瞬間凍結した。免疫組織化学のために、試料 (厚さ $10 \mu\text{m}$) を0.1% Triton X (商標) -100を含むPBSで洗浄し、過剰のOCTを除去し、クエン酸緩衝液において抗原回収を行った。ブロッキングは、0.1% Triton X-100及び10%ウマ血清を含有するPBSを用いて1時間行った。ブロッキング溶液で希釈した一次抗体 (GFAP; Novus biologicals; NB100-53809, mCherry; Millipore; M11217, Doublecortin; Abcam; ab77450) を一晚インキュベートし、続いて二次抗体を1時間インキュベートした後、核染色及びマウントを行った。

20

【0206】

結果

図33に示すように、AAV2/8-GFAP-mcherryを注入したCO (左) において、GFAP発現 (アストロサイトマーカー) を、GFAPプロモーター下で発現するmCherryと共局在させた。一方で、AAV2/8-GFAP-ASCL1-mcherryを注入したCO (右) ではGFAPの発現が失われ、mCherryを発現する細胞の形態がアストロサイト様構造から神経細胞様構造に変化した。

30

【0207】

図34に示すように、AAV2/8-GFAP-mcherryを注入したCO (左) では、ダブルコルチン (DCX; 初期神経細胞マーカー) の発現は、GFAPプロモーター下で発現するmCherryと共局在しなかった。しかしながら、DCXの発現は、AAV2/8-GFAP-ASCL1-mCherryを注入したCO (右) でmCherry (明色矢印) と共局在していた。

【0208】

図35に示すように、AAV2/8-GFAP-Ascl1-mCherryまたはAAV2/8-mCherryを注射したヒトCO (90日間) では、神経細胞マーカー (NeuN、成熟ニューロン; DCX、形質導入後21日目の未成熟ニューロン) の同時増加を伴うアストロサイト (GFAP) の割合の減少が示された。

40

【0209】

これらの結果は、ヒトCO中でマウスbHLH転写因子を発現させた後に、アストロサイトの神経細胞へのリプログラミングが成功したことを実証している。本明細書で実証された変異型bHLH転写因子の効果に基づいて、変異型bHLH転写因子を使用することにより、ヒトCOにおけるアストロサイトの神経細胞へのリプログラミングが改善されることが認識される。

【0210】

実施例5: Ascl1リン酸部位変異は、in vivoでの成人皮質アストロサイトの神経細胞変換を増強する

神経疾患は、特定の神経細胞集団の喪失または機能不全を伴うことが最も多い。喪失す

50

ると、神経細胞は、稀な状況及び制限された脳ニッチを除き、置換されない [1、2]。再生応答の欠如と神経療法の不足とが相まって、外因性細胞移植及び内因性神経幹細胞の刺激を含む、様々な神経細胞置換戦略の検討が促された。しかしながら、これらのアプローチは、長期の機能回復に対して十分な神経細胞の組み込みをもたらしていない [3、4]。更に、外因性ヒト細胞、特に胎児幹細胞または前駆細胞を導入することは、倫理的な懸念を高め、免疫拒絶、腫瘍形成及び供給制約によって混乱する場合がある。新しい神経細胞が既存の神経回路網に機能的に組み込まれる、内因性神経細胞修復戦略を特定することは、神経変性疾患を治療するための新しい治療戦略を提供するであろうため、変化するであろう。

【0211】

我々は、内因性神経細胞置換のために直接的神経細胞リプログラミングの可能性を開拓し始めている [5、6]。この功績は、胚脳におけるサブタイプ特異的な神経形成を促進する上で、系統特異的ベシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子 (TF) の役割に関する数十年間の研究を利用している [1、6]。Neurog2、Ascl1及びNeurod4を含む前神経bHLH TF、ならびにNeurod1などの下流bHLH遺伝子は、胚脳における神経形成の重要なアーキテクトとして現れ [7]、現在では異種細胞型の神経変換を促進するために利用されている [5、6]。発達中、前神経bHLH TFは転写カスケードの最上位で作用し、神経細胞分化を制御するために発育の後期段階で機能するNeurod1などの他のTFを活性化する。しかしながら、bHLH TFは、すべての細胞状況で活性であるわけではなく、環境シグナルによって阻害される可能性がある。例えば、胚皮質では、Neurog2は、胎生期 (E) 17で終わる神経原性期中の後期段階での継続した発現にもかかわらず、E11.5～E14.5の間のグルタミン酸作動性神経細胞運命を特定するのに (機能獲得により [8]) 十分であり、かつ (機能喪失により [9; 10; 11]) 必要であるだけである。同様に、胚腹側終脳におけるGABA作動性介在神経細胞運命を特定する [12] Ascl1は、胚性期後期 (E14.5) ではなく、初期 (E12.5) に背側終脳前駆細胞においてのみ異所性GABA作動性遺伝子を誘導することができる [9、10、11]。

【0212】

前神経遺伝子の細胞状況依存活性は、神経細胞のリプログラミングに及ぶ。この場合、スターター細胞が同一性 (すなわち、神経系統) により類似している場合、体細胞から誘導神経細胞 (iNeuron) 運命の変換がより効率的であるというコンセンサスが高まっている。したがって、遠位に関連する線維芽細胞をiNeuronに効率的に変換するために、Ascl1は、最初の「BAM」の組み合わせ (Brn2/Pou3f2, Ascl1, Myt1l) のように、他のTFと組み合わせられる [13; 14]。この状況で、Ascl1は、パイオニアTFとして重要な役割を果たし、特異的な三価シグネチャ (H3K4me1、H3K27ac、H3K9me3) に関連するクロマチンを開放し、これは、次いでBrn2及び他の神経原性TFによってアクセスされる [14]。他の研究では、Ascl1が線維芽細胞をiNeuronに直接変換できるが、これらのiNeuronの成熟は制限されていることが報告されている [15]。同様に、Ascl1は、ヒト周皮細胞を誘発してiNeuronへの分化転換を行うことができるが、これは、Sox2と共発現した場合にのみ行われ、神経幹/前駆細胞様期を通じた細胞の移行を促進する (すなわち、変換は直接的ではない) [16、17]。神経前駆細胞を誘導して神経細胞に分化させるAscl1の能力は、その発生の役割に従っており [7]、前駆細胞株 [18] または多能性幹細胞を用いてin vitroで再現され、Ascl1はパイオニアTFとして作用した [15、19、20]。

【0213】

アストロサイトは、神経変性疾患及び脳卒中などの損傷における活性化状態が疾患の病理に寄与するため、神経細胞変換の一般的な標的細胞である [5、6]。Ascl1は、単独で [21; 22; 23; 24] または他のTFと一緒に異所発現した場合、例えば、ドーパミン作動性iNeuronsを作製するために、アストロサイトをin vitro

10

20

30

40

50

oでiNeuronに変換することができる[25]。脊髄アストロサイトもiNeuronにリプログラミングすることができるが、興味深いことに、皮質表現型ではなく、明確なV2介在神経細胞様同一性が達成される[24]。Ascl1がin vivoで成体中脳アストロサイトをiNeuronに変換できるという報告があるが[26]、ほとんどの研究は、Ascl1がin vivoで成体皮質及び海馬において低い変換効率を有することを示唆している[27; 28]。したがって、Ascl1などの前神経遺伝子が、特にin vivoで、どのようにして制御（すなわち、阻害）されるか理解することは、再生医療におけるその効率的な使用のために重要である。Ascl1及びNeurog2の神経細胞変換効率を高めるために、いくつかのアプローチが採用されている。例えば、最近、CRISPRベースのアプローチで示されたように、Ascl1を他のTFと一緒に発現させると、神経細胞の変換を促進することができ、その結果、パーキンソン病モデルにおいて治療上の有益性を有するiNeuronが得られる[29]。同様に、Neurog2をBcl2などの他のシグナルと組み合わせ、in vivoで強力な系統コンバーターとなることができる[30]。神経原性遺伝子の転写抑制因子であるRESTのノックダウンは、神経細胞系統変換も増強する[31、32]。最後に、別の画期的な研究では、神経細胞に富んでいるミトコンドリア遺伝子のCRISPR活性化により、Neurog2及びAscl1のリプログラミング有効性が向上した[33]。したがって、bHLH TF活性を阻害する調節イベントを特定して標的することは、神経細胞のリプログラミングを改善する有益な戦略であることを証明している。

10

20

【0214】

in vitroと比較してin vivoでの神経細胞変換効率が低いという課題に対処するために[6]、リン酸化の重要性を、Ascl1の重要な翻訳後修飾として調べた。神経原性bHLH TFは、その通常の細胞状況の範囲外で発現する場合[8、34]、その神経原性活性を制限するリン酸化依存的阻害を受けることが今や十分に認められている。確かに、bHLHのTF機能は、「レオスタット様」に作用する、プロリン指向性セリンスレオニンキナーゼ（例えば、GSK3、ERK1/2、Cdk）によるリン酸化を介して阻害される。セリン-プロリン（SP）またはスレオニン-プロリン（TP）部位がリン酸化が多いほど、TFがDNAに結合し、標的遺伝子をトランス活性化し、神経細胞の運命の特定及び分化を促進するのが低下する[8、34、35、36]。bHLH TFを活性に保つために、本発明者ら[8、34]及び他の者[35、36、37、38、39]は、プロリン（P）指向性リン酸部位のセリン（S）及びスレオニン（T）をアラニン（A）へ変異（すなわち、SP/TPからSA/TAへの変異）させた。これらの変異は、抑制性プロリン指向性キナーゼによるリン酸化を阻害し、胚性マウス及びカエル神経系におけるbHLH TFの神経形成能を上昇させる[8、34、35、36、37、38、39、40]。

30

40

【0215】

この実施例の目標は、Ascl1-SA6と呼ばれるAscl1の変異型が、in vivoで成体脳での皮質アストロサイトの神経細胞変換を誘導するのにより効率的であるかどうかを判断することであった。本発明者らは、AAV及びGFAPプロモーター[41]を使用して本研究を開始したが、この組み合わせは当初報告されていたものよりもアストロサイト特異性が低いことが示されている[42]。それにもかかわらず、本発明者らのすべての研究において、Ascl1をAscl1-SA6と直接比較することにより、Ascl1-SA6が神経細胞マーカー発現を誘導し、成人大脳皮質でアストロサイト遺伝子を抑制する優れた能力を有することを実証する。Ascl1-SA6の神経細胞遺伝子発現を誘導する能力の強化は、以前に行われた胚研究と一致している。

【0216】

材料及び方法

動物及び遺伝子型判定。動物の処置は、Sunnybrook Research Institute (21-757) により、Canadian Council of Animal Care Guidelinesに従って承認された。すべての実験にお

50

いて、C57BL/6バックグラウンドで維持し、Jackson Laboratory から得た、雄C57BL/6野生型マウス、Rosa-ZsGreen (JAX#007906) 及びRosa-TdTomato (JAX#007914) トランスジェニックマウスを使用した[43]。マウスは、食料及び水への自由なアクセスを備えた12時間明/12時間暗サイクルで収容した。PCRプライマー及び遺伝子判定のための条件を、Jackson Laboratory プロトコルを使用して行った：Rosa-ZsGreen：野生型フォワード：5'-CTG GCT TCT GAG GAC CG-3' (配列番号28)；野生型リバース：5'-AAT CTG TGG GAA GTC TTG TCC-3' (配列番号29)；変異フォワード：5'-ACC AGA AGT GGC ACC TGA C-3' (配列番号30)；変異リバース：5'-CAA ATT TTG TAA TCC AGA GGT TGA-3' (配列番号31)。Rosa-TdTomato：変異リバース：5'-GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC-3' (配列番号32)；変異フォワード：5'-CTG TTC CTG TAC GGC ATG G-3' (配列番号33)。PCRサイクルは以下のとおり：94℃2分、10×(94℃20秒、65℃15秒*0.5秒/サイクル減少、68℃10秒)、28×(94℃15秒、60℃15秒、72℃10秒)、72℃2分。

【0217】

AAVクローニング及びパッケージング。AAV2/8-GFAP Long-mCherry 及び AAV2/8-GFAP Long-Ascl1-mCherry は、Leping Cheng からの寄贈であり、2.2 kb GFAP プロモーターを含んでいた[26]。Ascl1 を、AAV2/8-GFAP Long-Ascl1-mCherry の Ascl1-SA6 に置き換えた。Ascl1-SA6 では、6 つすべての SP 部位のセリンがアラニンに変異した ([34] 参照)。AAV5-GFAP short-iCre は先に記載されており [44]、681 塩基対 (gfaABC (1) D 改変 GFAP プロモーターを含む [41])。Ascl1-t2a-iCre 及び Ascl1-SA6-t2a-iCre の AAV5-GFAP short へのクローニング、ならびに Leping Cheng [26] からの AAV 中の GFAP Long プロモーターとの GFAP short プロモーターの交換を、Genscript にアウトソーシングした。クローニング後、すべての AAV を Vector Builder Inc. により AAV キャプシド 8 または キャプシド 5 のいずれかとパッケージした。光遺伝学的実験のために、AAV5-EF1a-ダブル floxed-hChR2 (H134R)-EYFP-WPRE-HGFpA (カタログ番号 51502-AAV5) を Addgene (20298) から購入した。

【0218】

AAV の頭蓋内注射。頭蓋内注射、16 週齢の雄 C57BL/6 マウスを、実施例 1 に記載のように、ベイトリル (2.5 mg/kg; Bayer, 02249243) 及び生理食塩水 (0.5 ml, Braun, L8001) と共に、ブプレノルフィン (0.1 mg/kg; Vetergesic, 02342510) または ترامドール-HCL (20 mg/kg; Chiron, RxN704598) を鎮痛剤として使用して実施した。

【0219】

図 36B における mCherry の AAV 注入については、座標 (AP: +1.1、L/M: ±1.2 DV: -2) で 1 µL の総体積において合計 1.0×10^8 GC を注入した。Rosa-TdTomato マウスにおける iCre AAV 注射の場合 (図 37C)、1 µL の総体積において 1×10^{12} GC/ml (または 1×10^9 GC 総量) を、座標 (AP: 2.2 LM: 0.6 DV: 1.0) で注入した。iCre AAV を有する Rosa-ZsGreen 動物で行われた他のすべての実験において (図 37E、図 37G、図 38、図 39 及び図 40)、1 µL の総体積において 4.8×10^{12} GC/ml (または 4.8×10^9 GC 総量) を、以下の座標 (AP: +2.15、L/M: ±1.7、DV: -1.7) で注入した。

【0220】

光遺伝学及び電気生理学。AAV注入マウスを2%イソフルランを用いて麻酔し、4 mmの開頭術を行った（ブレグマから：AP 1.7 mm、ML + 2.15）。硬膜を除去した後、皮質組織を覆う1%のアガロース（PBS中）の薄層上にシリコン系ポリジメチルシロキサン（PDMS）窓を置いた。マウスをFVMPE-RS多光子顕微鏡（Olympus）に移し、25×/1.05 NA対物レンズ（Olympus）の下に置き、タングステン電極（0.255 mmφ、A~Mシステム）を30°の角度でPDMS窓を通して挿入し、100 μmの深さに達した。900 nmに調整されたインサイトTi：サファイアレーザ（Spectra Physics）を使用して、Zs-グリーン蛍光を励起し、その発光は、次に帯域通過フィルタ（485~540 nm）と整合されたPMTによって収集された。また、組織内へのタングステン電極の先端の位置をより良好に視覚化するために、第2のチャンネル（575~630 nm）も同時に記録した。ChR2の同時焦点光刺激（PS）のために、別個のガルバノメータを備えるラスト走査可視波長レーザ（458 nm）を使用した。PSは、Zs-グリーン-陽性細胞が存在する直径250 μmの円形領域にわたって示された。PSを、10秒の間隔（PSオフ）で同じ領域で10回繰り返した。PSを、4 mW/mm²の出力で4 Hzの円形領域に送達させ、合計3秒間続けた。低インピーダンスタングステン電極を使用して、Axonマルチクランプ700B増幅器（Molecular devices）により電流クランプモードで記録された、LFP帯（1~300 Hz）における電圧変化を取得した。このアナログシグナルを40倍増幅（40 mV/mV）し、データ取得システムであるDigidata 1440A（商標）（Molecular devices）によりデジタル化した。LFP信号の再分極相を記述するために、2相減衰モデルを使用し、減衰定数として緩慢な成分を報告した。

10

20

30

40

50

【0221】

組織処理及び切片化。マウスを、灌流の前に、ケタミン（75 mg/kg、Narketan、0237499）及びキシラジン（10 mg/kg、Rompun、02169592）で麻酔した。心臓内灌流は、氷冷生理食塩水（0.9% NaCl、Braun、L8001）を用いて10 ml/分の流量で蠕動ポンプを使用して約20×血液量で行い、続いて、リン酸緩衝生理食塩水（PBS、Wisent、311-011-CL）中の4%パラホルムアルデヒド（PFA、Electron Microscopy Sciences、19208）で5分間行った。脳を回収し、PBS中の4% PFAに一晩後固定し、20%スクロース（Sigma、84097）/1×PBS中で4℃にて凍結保護した。冠状脳切片を、Leica CM3050（商標）クライオスタット（Leica Microsystem Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada）上で10~30 μmに切断し、Fisherbrand（商標）Superfrost（商標）プラスライドガラス（Thermo Fisher Scientific、12-550-15）で収集した。

【0222】

免疫染色。スライドガラスをPBS中の0.3% Triton X-100で洗浄し、次いでPBS中の10%ウマ血清（HS、Wisent、065-150）及び0.1% Triton X-100（Sigma、T8787）で室温にて1時間遮断した。一次抗体を、以下のようなブロッキング溶液中で希釈した：ウサギ抗NeuN（1:500、Abcam#ab177487）、ヤギ抗GFAP（1:500、Novus#100-53809）、ウサギ抗Sox9（1:500、Millipore#AB5535）及びウサギ抗Dcx（1/500、Abcam#ab77450）。スライドガラスを、PBS中の0.1% Triton X-100でそれぞれ10分間3回洗浄し、Alexa568（1:500; Invitrogen Molecular Probes（商標）, ThermoFisher Scientific, Markham, ON, Canada）、Alexa488（1:500; Molecular Probes）とコンジュゲートした種特異的二次抗体と室温にて1時間インキュベートした。スライドガラスをPBS中で3回洗浄し、4', 6-ジアミジノー2-フェニルインドール（DAPI、I

n v i t r o g e n、D 1 3 0 6) で対比染色した。最後に、スライドガラスを P B S 中で3回洗浄し、Aqua-polymount (Polysciences Inc.、18606-20) にマウントした。

【0223】

R N A i n s i t u ハイブリダイゼーション。比色 R N A - i n s i t u ハイブリダイゼーション (I S H) を、前述のジゴキシゲニン標識 A s c l 1 リボプローブを使用して実施した [45]。蛍光 R N A - I S H は、R N A s c o p e (登録商標) マルチプレックス蛍光検出キット v 2 (A C D # 3 2 3 1 1 0) を使用し、製造業者の指示に従って実施した。簡単に説明すると、脳切片を 4 °C で 1 5 分間、後固定 (4 % P F A / 1 × P B S) し、次いで室温にて 5 0 %、7 0 % 及び 1 0 0 % エタノール (C o m m e r c i a l A l c o h o l s、P 0 1 6 E A A N) 中でそれぞれ 5 分間脱水し、H₂O₂ 溶液中で 1 0 分間インキュベートした。次に、切片を 1 × 標的回収溶液中で 9 5 °C で 5 分間インキュベートし、d H₂O で洗浄し、次いで P r o t e a s e P l u s (商標) (A C D、3 2 2 3 3 1) 中で 4 0 °C にて 1 5 分間インキュベートし、その後、洗浄緩衝液で洗浄した。標識 R N A プローブを A s c l 1 (M m - A s c l 1 # 3 1 3 2 9 1) に使用し、提供された陰性及び陽性対照プローブも使用した。切片をプローブと共に 4 0 °C で 2 時間インキュベートした。増幅及び染色工程を、O p a l (商標) 5 7 0 (1 : 1 5 0 0、A k o y a # F P 1 4 8 8 0 0 1 K T) フルオロフォアを使用して、製造業者の指示に従って完了した。

【0224】

イメージング、定量化及び統計。すべての画像は、以下の例外を除いて、L e i c a D M i 8 倒立顕微鏡 (L e i c a M i c r o s y s t e m s C M S、1 1 8 8 9 1 1 3) を使用して撮影した。図 3 6 E の画像は、Z e i s s Z 1 オプザーバ / Y o k o g a w a 回転ディスク (C a r l Z e i s s) 顕微鏡を使用して取得した。運動皮質全体を包含するタイル型画像を、2 0 倍対物レンズで、1 µm 刻み幅を有する 3 0 µm の z スタックを使用して取得した。図 3 6 F では、全切片画像は、Z e i s s A x i o S c a n Z 1 ユニット (C a r l Z e i s s C a n a d a) を使用して、P l a n - A p o c h r o m a t 1 0 倍対物レンズを用いてスキャンし、H a m a m a t s u C C D カメラで取得した。免疫染色細胞の定量化は、状態当たり 3 つの脳、及び脳当たり少なくとも 3 つの切片で行った。比較は、一元配置 A N O V A 及びチューキー多重比較を使用して行った。有意性を 0 . 0 5 未満の p 値として定義し、以下のように示した：n s - 有意ではない、< 0 . 0 5 *、< 0 . 0 1 **、< 0 . 0 0 1 ***。

【0225】

結果

皮質アストロサイトにおける A A V - G F A P - m C h e r r y の発現は、i n v i v o では長期には維持されない

この実施例の目標は、i n v i v o で成人皮質アストロサイトに異所発現された場合、神経細胞マーカー発現を誘導する際に、A s c l 1 - S A 6 が A s c l 1 よりも効率的であるか否かを判断することであった。この問題に対処するために、G F A P l o n g プロモーターを有する第 1 の A A V 8 (2 . 2 k b、[41] のように) を使用して、皮質アストロサイトにおいて m C h e r r y (対照) または A s c l 1 - m C h e r r y を発現させた (図 3 6 A)。特に、このウイルス送達システムは、i n v i v o で成人中脳アストロサイトを i N e u r o n に首尾よく変換することが報告されている [26]。A A V 8 - G F A P l o n g - m C h e r r y または A A V 8 - G F A P l o n g - A s c l 1 - m C h e r r y の合計 1×10^9 ゲノムコピー (G C) を定位脳手術を用いて大脳皮質の各半球に注入した (図 3 6 A、[46] のように)。1 か月後及び 2 か月後に、各 A A V 注入群から動物を回収した。形質導入から 1 か月後に、A A V 8 - G F A P l o n g - m C h e r r y で形質転換された脳では、アストロサイトにおける m C h e r r y 及び G F A P の予期される同時発現が観察された (図 3 6 B)。しかしながら、分析のタイムラインが 2 か月に延長されたとき、m C h e r r y の発現は、対照の A A V 8 - G F

A P l o n g - m C h e r r y で形質導入された脳のいずれにおいても検出されなかった（図36B）。対照的に、1か月後に、A A V 8 - G F A P l o n g - A s c l 1 - m C h e r r y で形質導入された多くのm C h e r r y +細胞は、初期神経芽細胞マーカーであるD c xを発現し、2か月後に、ほとんどのm C h e r r y +細胞は後期神経細胞マーカーであるN e u Nを共発現した（図36B、図36C）。それにもかかわらず、対照レポーターの発現が失われたため、m C h e r r y対照及びA s c l 1 - m C h e r r y実験群における神経細胞マーカー発現の誘導効率を比較することができず、採用された追跡システムでの変化を促す。

【0226】

A A V - G F A P - i C r e は、i n v i v o で形質転換された皮質アストロサイトの運命を長期間追跡するために使用され得る

長期的なm C h e r r yレポーター発現に伴う問題を回避するために、C r eベースの永久系統追跡システム、具体的には、N e u r o d 1を異所発現させる神経細胞リプログラミング研究で以前に使用されたA A V 5 - G F A P s h o r t - i C r eベクターを使用し[44]、N e u r o d 1をA s c l 1に置き換えてA A V 5 - G F A P s h o r t - A s c l 1 - t 2 a - i C r eを作成した（図36D）。特に、G F A P s h o r tプロモーターは、681bp（g f a A B C（1）D修飾プロモーターであり、これは、G F A P l o n gと類似のアストロサイト特異性を示すが、2倍高いレベルの遺伝子発現を駆動する[41]。

【0227】

パッケージングしたA A V（1μL総量で合計4.8×10⁹GC）を、図36Bと同じ座標を使用して、R o s a - z s G r e e nマウスの皮質に定位的に注入した。A A V 5 - G F A P s h o r t - i C r e対照ウイルス（図示せず）またはA A V 5 - G F A P s h o r t - A s c l 1 - t 2 a - i C r eの導入の2か月後に、頑強なz s G r e e n発現が観察された（図36E）。更に、A s c l 1転写物が、ジゴキシゲニン標識A s c l 1リボプローブによるRNA i n s i t uハイブリダイゼーション（図36F）を用いて、2か月後でも、A s c l 1 - t 2 a - i C r e導入脳において検出されたことが確認された。A s c l 1転写物はi C r e対照ベクターで形質導入された成体皮質には検出されなかったが、形質導入後2か月の間にA s c l 1 - t 2 a - i C r e導入された脳では頑強なA s c l 1発現が検出されたことを確実に示した、RNA s c o p e（商標）を使用して最終確認を行った（図36G）。したがって、i C r e系を使用することで、A s c l 1を発現させ、C r e依存的なレポーター発現を誘発することができ、これにより、今度は、成体大脳皮質の形質導入細胞の運命を追跡することができる。

【0228】

A s c l 1中のセリンリン酸受容体部位の変異は、成体皮質における神経細胞系列の変換を増強する

本実験の主な目標は、A s c l 1の6つのS P部位におけるセリンからアラニンへの変異（図36H）が、神経細胞変換効率を高めるか否かを決定することであった。特に、A s c l 1 - S A 6がE 1 2.5皮質前駆細胞に導入された際に神経細胞変換でより効率的であることが以前に実証されたが[34]、この改変されたb H L H転写因子が成体皮質アストロサイトをより効果的にi N e u r o nに変換するのかという問題が残っていた。この問題に対処するために、皮質アストロサイトの形質導入が報告されているA A V 5及びA A V 8キャプシド[47]、G F A P l o n g及びG F A P s h o r tプロモーター[41]、ならびに最も明るい蛍光レポーターのうちの2つであるR o s a - z s G r e e n及びR o s a - t d t o m a t oレポーターマウス[43]を、比較した（図37）。各比較群は、3つの遺伝子カーゴ：i C r e単独（対照）、A s c l 1 - t 2 a - i C r eまたはA s c l 1 - S A 6 - t 2 a - i C r eのセットを有していた。2つの主な比較は、A A V 8と短いG F A Pプロモーターを有するA A V 5、及びA A V 5におけるG F A P s h o r tとG F A P l o n gを比較したものである。上記のように、すべてのパッケージ化されたA A Vを、定位手術を使用してR o s a - z s G r e e nまたはR o s

10

20

30

40

50

a-t d t o m a t o マウスのいずれかの大脳皮質に注入した。

【0229】

まず、R o s a - t d t o m a t o マウスの皮質に注入されたときに N e u N 発現を誘導する A A V 5 - G F A P s h o r t コンストラクトの能力を比較した (図 3 7 C)。形質導入後 21 日目に、同様の数の i C r e 及び A s c l 1 形質導入細胞が N e u N 発現を発現したが、A s c l 1 - S A 6 のみが i C r e 「ベースライン」レベルを上回る N e u N 発現細胞の数を増加させることができる (図 3 7 D)。次に、R o s a - z s G r e e n マウスの皮質に導入された際の A A V 5 - G F A P l o n g コンストラクトの作用を調べた (図 3 7 E)。形質導入後 21 日目に、i C r e 形質導入対照細胞の約 70% が N e u N を発現し (図 3 7 F)、このロングプロモーターが G F A P s h o r t プロモーターのようにアストロサイトに限定されないことが示唆された。それにもかかわらず、A s c l 1 - S A 6 が G F A P l o n g プロモーターから発現した場合、A s c l 1 または i C r e と比較して、形質導入細胞がより N e u N を発現した (図 3 7 F)。最後に、G F A P s h o r t プロモーターを、A A V 8 キャプシドで試験した (図 3 7 G)。この系を用いた場合、i C r e 対照細胞の約 50% が N e u N を発現したが、A s c l 1、更に顕著なことに A s c l 1 - S A 6 の両方が、導入後 21 日目に N e u N を発現する細胞の数の増加を誘導することが可能であることが判明した (図 3 7 H)。

【0230】

これらの実験から、A s c l 1 - S A 6 形質導入細胞は、G F A P プロモーターエレメントを用いて成体大脳皮質に送達された場合、A s c l 1 形質導入細胞よりも N e u N を発現する頻度が高いと結論づけられた。更に、この実験は、G F A P s h o r t プロモーターが G F A P l o n g プロモーターよりも皮質アストロサイトに特異的であることを示唆するトランスジェニックマウスを用いた過去の研究をサポートしている [41]。最後に、A A V 5 キャプシドは、G F A P プロモーターエレメントと組み合わせた場合に、A A V 8 よりも少ない皮質神経細胞を標識し、i n v i v o での神経細胞リプログラミングにより適している可能性がある。

【0231】

A s c l 1 - S A 6 及び A s c l 1 は、アストロサイトマーカーの発現を抑制する真の系統変換には、標的細胞、この場合はアストロサイトが、神経細胞マーカーをオンにするだけでなく、グリアマーカーの発現も消す必要がある。実際に、胚皮質では、A s c l 1 と比較して、A s c l 1 - S A 6 が神経細胞遺伝子発現をオンにするのにより効率的であり、S o x 9 グリアルプロモーターをトランス活性化するのにより効率的ではないことが示されている [34]。そこで、成体皮質において A s c l 1 - S A 6 が S o x 9 発現をより効率的にダウンレギュレートできるかどうか問われた。この一連の実験において、2つの系：G F A P l o n g プロモーターを有する A A V 5 ベクターと、G F A P s h o r t プロモーターを有する A A V 8 ベクターとを比較した。予想どおり、A A V 5 - G F A P - l o n g - i C r e (図 3 8 A、図 3 8 C) または A A V 8 - G F A P s h o r t - i C r e (図 3 8 B、図 3 8 D) で形質導入された細胞の約 60% は、21 日後に S o x 9 を発現し、そのアストロサイト同一性を確認した。興味深いことに、G F A P を同時発現させた i C r e 対照細胞の比率は、A A V 5 - G F A P - l o n g - i C r e (図 3 8 A、図 3 8 C) または A A V 8 - G F A P s h o r t - i C r e (図 3 8 B、図 3 8 D) の両方でより低く、約 30% であった。1つの可能性としては、形質導入時に最初に G F A P を発現していたアストロサイトが、分析前 21 日以内にその G F A P 発現を止めたということである。それにもかかわらず、矛盾に関係なく、i C r e 対照細胞の半分以上は実際にアストロサイトであると結論付けられた。

【0232】

次の比較は、A A V 5 - G F A P - l o n g - A s c l 1 - S A 6 - i C r e (図 3 8 A、図 3 8 C) または A A V 8 - G F A P s h o r t - A s c l 1 - S A 6 - i C r e (図 3 8 B、図 3 8 D) の形質導入後のグリアマーカー発現であった。予想どおり、A s c l 1 及び A s c l 1 - S A 6 形質導入細胞はいずれも、形質導入後 21 日目に、i C r e

対照細胞と比較して、Sox9及びGFAPの発現頻度が低かった（図38C、図38D）。注目すべきは、マーカー発現のこの低下により、Sox9及びGFAPを共発現させた細胞の比率は変化せず、したがって両方の細胞集団は等しく影響を受けた（図38C、図38D）。まとめると、このデータは、Ascl1及びAscl1-SA6の両方が成体皮質のアストロサイトの運命を抑制するという主張をサポートしており、更に、胚皮質で実証されるように、Ascl1-SA6がグリア抑制においてより効率的であることを示唆している[34]。

【0233】

Ascl1及びAscl1-SA6形質導入細胞は、Dcx+神経芽細胞期を経る系統変換を示すためのもう1つの要件は、形質転換アストロサイトが未成熟Dcx+神経芽細胞期を経ることを証明することである。このように、AAV5-GFAP-longコンストラクトを使用した変換効率を、成体大脳皮質の形質導入後21日目のDcx発現を調べることによって評価した（図39）。21日後、iCreレベル及びAscl1レベルを上回ってDcxを発現したAscl1-SA6形質転換細胞の数は、わずかなが有意な増加が見られた（図39A～図39D）。しかしながら、レポーターの発現は、本注入戦略により上衣下部の実質アストロサイトと幹細胞の両方で観察されたため（図39C）、GFAP及びDcx共発現を使用して、「一時的な」神経芽期でアストロサイトを同定した。Dcx+GFAP+zsGreen+細胞の定量化により、Ascl1及びAscl1-SA6形質導入細胞のいずれも、iCre形質導入皮質アストロサイトよりも一過性の神経芽細胞様状態を獲得する可能性が高いことが明らかになった（図39D）。したがって、Ascl1及びAscl1-SA6形質導入細胞は、Dcx発現を開始する等しい能力を有するが、Ascl1-SA6のみが高いDcxレベルを維持でき（図39D）、最終的には成熟神経細胞マーカーであるNeuNをオンにすることができる（図37）。

【0234】

Ascl1-SA6は、標的アストロサイトにおいてiNeuronの電気生理学的特性を誘導する

病理学的状態での機能回復を促進するために、iNeuronは、内因性神経細胞とのシナプス接続を確立し、軸索を適切な神経細胞標的に送ることによって、既存の神経回路網に統合しなければならない。in vivoでiNeuronの神経回路網統合を試験するために、GFAP-iCreまたはGFAP-Ascl1-SA6を有するAAVを、FLEX-ChR2-(H134R)-YFP（神経細胞を光活性化し、大きな誘発電位を誘発するCre依存型光遺伝的アクチュエータ）と同時形質導入した（図40A）。36日後に、脳窓を作成し、局所フィールド電位、すなわち凝集神経細胞活性の尺度をChR2光活性化（20Hz、10msパルス長、合計5秒）に応じて評価するために、皮内電気生理学的記録を行った（図40B）。代表的な追跡で、複数の部位の定量化では、Ascl1-SA6iNeuron形質導入皮質は、神経細胞特徴であるiCre形質導入皮質よりもベースラインに対する誘発電位の速い減衰を示した（図40C、図40D）。したがって、このデータは、Ascl1-SA6は、形質導入アストロサイトを機能的iNeuronに変換することに成功したという主張を裏付けている。

【0235】

考察

この実施例は、in vivoで成体皮質アストロサイトで発現した場合、神経細胞マーカーを誘導し、グリアマーカーを抑制するAscl1及びAscl1-SA6の能力の詳細な比較を提供する。AAVキャプシド、GFAPプロモーター及びRosa-レポーター株の各組み合わせを試験したところ、Ascl1-SA6形質導入細胞の大部分は、Ascl1またはiCre対照で形質導入した細胞と比較して、成熟神経細胞マーカーであるNeuNを一貫して発現した。対照的に、同じ数のAscl1及びAscl1-SA6形質導入細胞は、一過性GFAP+Dcx+神経芽細胞期の特徴を有し、Ascl1が未成熟神経細胞の一部の特徴を誘導する可能性がある一方で、完全分化カスケードを誘導

する際に *Ascl1-SA6* よりも効率が低いことを示唆している。更に、*Ascl1* 及び *Ascl1-SA6* の両方はアストロサイトマーカー (*Sox9* 及び *GFAP*) の発現を抑制できたが、*Ascl1-SA6* はこの点では再度優れていた。加えて、*ASCL1-SA5* (ヒト *ASCL1* 遺伝子は5つのSP部位を有することに留意されたい) は、グリオブラストーマ幹細胞株を誘導して最終分化を起こし、天然型 *ASCL1* より効果的に細胞周期を終了し、この腫瘍細胞株の増殖抑制をもたらす [39]。本実施例の研究と併せて、ここで、*Ascl1* に対する *Ascl1-SA6* などの *bHLH* 変異体の増強された神経原性後及び抗アストロサイト性能に対する累積的なサポートがある。

【0236】

参考文献

1. S. Grade, and M. Gotz, Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. *NPJ Regen Med* 2 (2017) 29.

2. R. A. Barker, M. Gotz, and M. Parmar, New approaches for brain repair—from rescue to reprogramming. *Nature* 557 (2018) 329–334.

3. K. V. Adams, and C. M. Morshead, Neural stem cell heterogeneity in the mammalian forebrain. *Prog Neurobiol* 170 (2018) 2–36.

4. R. M. Ruddy, and C. M. Morshead, Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury. *Cell Tissue Res* 371 (2018) 125–141.

5. R. Bocchi, G. Masserdotti, and M. Gotz, Direct neuronal reprogramming: Fast forward from new concepts toward therapeutic approaches. *Neuron* (2021).

6. L. Vasan, E. Park, L. A. David, T. Fleming, and C. Schuurmans, Direct Neuronal Reprogramming: Bridging the Gap Between Basic Science and Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* 9 (2021) 681087.

7. A. M. Oproescu, S. Han, and C. Schuurmans, New Insights Into the Intricacies of Proneural Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* 14 (2021) 642016.

8. S. Li, P. Mattar, D. Zinyk, K. Singh, C. P. Chaturvedi, C. Kovach, R. Dixit, D. M. Kurrasch, Y. C. Ma, J. A. Chan, V. Wallace, F. J. Dilworth, M. Brand, and C. Schuurmans, GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *J Neurosci* 32 (2012) 7791–805.

9. O. Britz, P. Mattar, L. Nguyen, L. M. Langevin, C. Zimmer, S. Alam, F. Guillemot, and C. Schuurmans, A role for proneural genes in the maturation of cortical pro

10

20

30

40

50

genitor cells. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1 (2006) i138–51.

10. C. Schuurmans, O. Armant, M. Nieto, J.M. Stenman, O. Britz, N. Klenin, C. Brown, L.M. Langevin, J. Seibt, H. Tang, J.M. Cunningham, R. Dyck, C. Walsh, K. Campbell, F. Polleux, and F. Guillemot, Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *Embo J* 23 (2004) 2892–902. 10

11. C. Fode, Q. Ma, S. Casarosa, S.L. Ang, D.J. Anderson, and F. Guillemot, A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14 (2000) 67–80.

12. S. Casarosa, C. Fode, and F. Guillemot, *Mash1* regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126 (1999) 525–34.

13. T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z.P. Pang, Y. Kokubu, T.C. Sudhof, and M. Wernig, Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 (2010) 1035–41. 20

14. O.L. Wapinski, T. Vierbuchen, K. Qu, Q.Y. Lee, S. Chanda, D.R. Fuentes, P.G. Giresi, Y.H. Ng, S. Marro, N.F. Neff, D. Drechsel, B. Martynoga, D.S. Castro, A.E. Webb, T.C. Sudhof, A. Brunet, F. Guillemot, H.Y. Chang, and M. Wernig, Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 155 (2013) 621–35. 30

15. S. Chanda, C.E. Ang, J. Davila, C. Park, M. Mall, Q.Y. Lee, H. Ahlenius, S.W. Jung, T.C. Sudhof, and M. Wernig, Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Reports* 3 (2014) 282–96.

16. M. Karow, R. Sanchez, C. Schichor, G. Masserdotti, F. Ortega, C. Heinrich, S. Gascon, M.A. Khan, D.C. Lie, A. Dellavalle, G. Cossu, R. Goldbrunner, M. Gotz, and B. Berninger, Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell* 11 (2012) 471–6. 40

17. M. Karow, J.G. Camp, S. Falk, T. Gerber, A. Pataskar, M. Gac-Santel, J. Kageyama, A. Brazovskaja, A. Garding, W. Fan, 50

T. Riedemann, A. Casamassa, A. Smiyakin, C. Schichor, M. Gotz, V.K. Tiwari, B. Trettlein, and B. Berninger, Direct pericyte-to-neuron reprogramming via unfolding of a neural stem cell-like program. *Nat Neurosci* 21 (2018) 932–940.

18. A. Raposo, F.F. Vasconcelos, D. Drexhse, C. Marie, C. Johnston, D. Dolle, A. Bithell, S. Gillotin, D.L.C. van den Berg, L. Ettwiller, P. Flicek, G.E. Crawford, C.M. Parras, B. Berninger, N.J. Buckley, F. Guillemot, and D.S. Castro, *Ascl1* Coordinately Regulates Gene Expression and the Chromatin Landscape during Neurogenesis. *Cell Rep* 10 (2015) 1544–1556.

19. B. Aydin, A. Kakumanu, M. Rossillo, M. Moreno-Estelles, G. Garipler, N. Ringstad, N. Flames, S. Mahony, and E.O. Mazzoni, Proneural factors *Ascl1* and *Neurog2* contribute to neuronal subtype identities by establishing distinct chromatin landscapes. *Nat Neurosci* 22 (2019) 897–908.

20. N. Yang, S. Chanda, S. Marro, Y.H. Ng, J.A. Janas, D. Haag, C.E. Ang, Y. Tang, Q. Flores, M. Mall, O. Wapinski, M. Li, H. Ahlenius, J.L. Rubenstein, H.Y. Chang, A.A. Buylly, T.C. Sudhof, and M. Wernig, Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nat Methods* 14 (2017) 621–628.

21. B. Berninger, F. Guillemot, and M. Gotz, Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci* 25 (2007) 2581–90.

22. C. Heinrich, R. Blum, S. Gascon, G. Masserdotti, P. Tripathi, R. Sanchez, S. Tiedt, T. Schroeder, M. Gotz, and B. Berninger, Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 8 (2010) e1000373.

23. C. Heinrich, M. Gotz, and B. Berninger, Reprogramming of postnatal astroglia of the mouse neocortex into functional, synapse-forming neurons. *Methods Mol Biol* 814 (2012) 485–98.

24. J. Kempf, K. Knelles, B.A. Hersbach, D. Petrik, T. Riedemann, V. Bednarova, A. Janjic, T. Simon-Ebert, W. Enard, P. Smialowski, M. Gotz, and G. Masserdotti, He

terogeneity of neurons reprogrammed from spinal cord astrocytes by the proneural factors *Ascl1* and *Neurogenin2*. *Cell Rep* 36 (2021) 109409.

25. P. Rivetti di Val Cervo, R. A. Romanov, G. Spigolon, D. Masini, E. Martin-Montanez, E. M. Toledo, G. La Manno, M. Feyder, C. Piffl, Y. H. Ng, S. P. Sanchez, S. Linarsson, M. Wernig, T. Harkany, G. Fison e, and E. Arenas, Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol* 35 (2017) 444–452. 10

26. Y. Liu, Q. Miao, J. Yuan, S. Han, P. Zhang, S. Li, Z. Rao, W. Zhao, Q. Ye, J. Geng, X. Zhang, and L. Cheng, *Ascl1* Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo. *J Neurosci* 35 (2015) 9336–55. 20

27. S. Jessberger, N. Toni, G. D. Clemenson, Jr., J. Ray, and F. H. Gage, Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11 (2008) 888–93.

28. A. Grande, K. Sumiyoshi, A. Lopez-Juarez, J. Howard, B. Sakthivel, B. Aronow, K. Campbell, and M. Nakafuku, Environmental impact on direct neuronal reprogramming in vivo in the adult brain. *Nat Commun* 4 (2013) 2373. 30

29. J. Giehl-Schwab, F. Giesert, B. Rausser, C. L. Lao, S. Hembach, S. Lefort, I. L. Ibarra, C. Koupourtidou, M. D. Luecken, D. J. Truong, J. Fischer-Sternjak, G. Masserdotti, N. Prakash, J. Ninkovic, S. M. Holter, D. M. Vogt Weisenhorn, F. J. Theis, M. Gotz, and W. Wurst, Parkinson's disease motor symptoms rescue by CRISPRa-reprogramming astrocytes into GABAergic neurons. *EMBO Mol Med* (2022) e14797. 40

30. S. Gascon, E. Murenu, G. Masserdotti, F. Ortega, G. L. Russo, D. Petrik, A. Deshpande, C. Heinrich, M. Karow, S. P. Robertson, T. Schroeder, J. Beckers, M. Irmeler, C. Berndt, J. P. Angeli, M. Conrad, B. Berninger, and M. Gotz, Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell* 18 (2016) 396–409. 50

31. G. Masserdotti, S. Gillotin, B. Sutor, D. Drechsel, M. Irmeler, H.F. Jorgensen, S. Sass, F.J. Theis, J. Beckers, B. Berninger, F. Guillemot, and M. Gotz, Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* 17 (2015) 74–88.
32. J. Drouin-Ouellet, S. Lau, P.L. Brattas, D. Rylander Ottosson, K. Piracs, D.A. Grassi, L.M. Collins, R. Vuono, A. Andersson Sjolund, G. Westergren-Thorsson, C. Graff, L. Minthon, H. Toresson, R.A. Barker, J. Jakobsson, and M. Parmar, REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO Mol Med* 9 (2017) 1117–1131. 10
33. G.L. Russo, G. Sonsalla, P. Natarajan, C.T. Breunig, G. Bulli, J. Merl-Pham, S. Schmitt, J. Giehl-Schwab, F. Giesert, M. Jastroch, H. Zischka, W. Wurst, S.H. Stricker, S.M. Hauck, G. Masserdotti, and M. Gotz, CRISPR-Mediated Induction of Neuron-Enriched Mitochondrial Proteins Boosts Direct Glia-to-Neuron Conversion. *Cell Stem Cell* 28 (2021) 524–534 e7. 20
34. S. Li, P. Mattar, R. Dixit, S.O. Lawn, G. Wilkinson, C. Kinch, D. Eisenstat, D.M. Kurrasch, J.A. Chan, and C. Schuurmans, RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* 34 (2014) 2169–90. 30
35. F. Ali, C. Hindley, G. McDowell, R. Deibler, A. Jones, M. Kirschner, F. Guillemot, and A. Philpott, Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138 (2011) 4267–77. 40
36. C. Hindley, F. Ali, G. McDowell, K. Cheng, A. Jones, F. Guillemot, and A. Philpott, Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation. *Development* 139 (2012) 1718–23.
37. F.R. Ali, D. Marcos, I. Chernukhin, 50

L. M. Woods, L. M. Parkinson, L. A. Wylie, T. D. Papkovskaia, J. D. Davies, J. S. Carroll, and A. Philpott, Dephosphorylation of the Proneural Transcription Factor ASCL1 Re-Engages a Latent Post-Mitotic Differentiation Program in Neuroblastoma. *Mol Cancer Res* 18 (2020) 1759–1766.

38. R. Azzarelli, L. J. Hardwick, and A. Philpott, Emergence of neuronal diversity from patterning of telencephalic progenitors. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4 (2015) 197–214.

39. R. Azzarelli, A. McNally, C. Dell'Amico, M. Onorati, B. Simons, and A. Philpott, ASCL1 phosphorylation and ID2 upregulation are roadblocks to glioblastoma stem cell differentiation. *Sci Rep* 12 (2022) 2341.

40. E. A. Marcus, C. Kintner, and W. Harris, The role of GSK3 β in regulating neuronal differentiation in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Neurosci* 12 (1998) 269–80.

41. Y. Lee, A. Messing, M. Su, and M. Brenner, GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56 (2008) 481–93.

42. L. L. Wang, C. Serrano, X. Zhong, S. Ma, Y. Zou, and C. L. Zhang, Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing in vivo. *Cell* 184 (2021) 5465–5481 e16.

43. L. Madisen, T. A. Zwingman, S. M. Sunkin, S. W. Oh, H. A. Zariwala, H. Gu, L. L. Ng, R. D. Palmiter, M. J. Hawrylycz, A. R. Jones, E. S. Lein, and H. Zeng, A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13 (2010) 133–40.

44. J. Livingston, T. Lee, E. Daniele, C. Phillips, A. Krassikova, T. Enbar, I. Kortebi, K. W. A. Bang, B. Donville, O. Ibragimov, N. Sachewsky, C. M. Morshead, and M. Faiz, Direct reprogramming of astrocytes to neurons leads to functional recovery after stroke. *bioRxiv* (2020) 2020.02.02.929091.

45. Y. Touahri, L. Adnani, P. Mattar, K. Markham, N. Klenin, and C. Schuurmans, Non-isotopic RNA In Situ Hybridization on Embryonic Sections. *Curr Protoc Neurosci*

10

20

30

40

50

70 (2015) 1 22 1-1 22 25.

46. C. S. Khademullah, A. J. Aqrabawi, K. M. Place, Z. Dargaei, X. Liang, J. C. Press ey, S. Bedard, J. W. Yang, D. Garand, I. K eramididis, A. Gasecka, D. Cote, Y. De Koni nck, J. Keith, L. Zinman, J. Robertson, J . C. Kim, and M. A. Woodin, Cortical inter neuron-mediated inhibition delays the on set of amyotrophic lateral sclerosis. *Br ain* 143 (2020) 800-810. 10

47. D. F. Aschauer, S. Kreuz, and S. Rump el, Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV sero types 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse br ain. *PLoS One* 8 (2013) e76310.

48. Y. Rao, S. Du, B. Yang, Y. Wang, Y. L i, R. Li, T. Zhou, X. Du, Y. He, Y. Wang, X. Zhou, T. F. Yuan, Y. Mao, and B. Peng, NeuroD1 induces microglial apoptosis and cannot induce microglia-to-neuron cross- lineage reprogramming. *Neuron* 109 (2021) 4094-4108. e5. 20

49. Y. Sun, M. Nadal-Vicens, S. Misono, M. Z. Lin, A. Zubiaga, X. Hua, G. Fan, and M. E. Greenberg, Neurogenin promotes neur ogenesis and inhibits glial differentiat ion by independent mechanisms. *Cell* 104 (2001) 365-76.

50. C. Kovach, R. Dixit, S. Li, P. Mattar , G. Wilkinson, G. E. Elsen, D. M. Kurrasc h, R. F. Hevner, and C. Schuurmans, Neuro g2 simultaneously activates and repress es alternative gene expression programs i n the developing neocortex. *Cereb Cortex* 23 (2013) 1884-900. 30

51. S. Han, S. Okawa, G. A. Wilkinson, H. Ghazale, L. Adnani, R. Dixit, L. Tavares, I. Faisal, M. J. Brooks, V. Cortay, D. Zin yk, A. Sivitilli, S. Li, F. Malik, Y. Iln ytskyy, V. E. Angarica, J. Gao, V. Chinch alongporn, A. M. Oproescu, L. Vasan, Y. T ouahri, L. A. David, E. Raharjo, J. W. Kim, W. Wu, W. Rahmani, J. A. Chan, I. Kovalchu k, L. Attisano, D. Kurrasch, C. Dehay, A. Swaroop, D. S. Castro, J. Biernaskie, A. Del Sol, and C. Schuurmans, Proneural ge nes define ground-state rules to regulat e neurogenic patterning and cortical fol ding. *Neuron* 109 (2021) 2847-2863 e11. 40

52. T. Matsuda, T. Irie, S. Katsurabayas 50

hi, Y. Hayashi, T. Nagai, N. Hamazaki, A. M.D. Adefuin, F. Miura, T. Ito, H. Kimura, K. Shirahige, T. Takeda, K. Iwasaki, T. Imamura, and K. Nakashima, Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion. *Neuron* 101 (2019) 472-485 e7.

53. T. Matsuda, and K. Nakashima, Clarifying the ability of NeuroD1 to convert mouse microglia into neurons. *Neuron* 109 (2021) 3912-3913.

54. D. Leib, Y. H. Chen, A. M. Monteys, and B. L. Davidson, Limited astrocyte-to-neuron conversion in the mouse brain using NeuroD1 overexpression. *Mol Ther* 30 (2022) 982-986.

55. C. M. Parras, C. Schuurmans, R. Scardigli, J. Kim, D. J. Anderson, and F. Guillemot, Divergent functions of the proneural genes *Mash1* and *Ngn2* in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16 (2002) 324-38.

56. N. Sharif, F. Calzolari, and B. Berninger, Direct In Vitro Reprogramming of Astrocytes into Induced Neurons. *Methods Mol Biol* 2352 (2021) 13-29.

57. H. Qian, X. Kang, J. Hu, D. Zhang, Z. Liang, F. Meng, X. Zhang, Y. Xue, R. Maimon, S. F. Dowdy, N. K. Devaraj, Z. Zhou, W. C. Mobley, D. W. Cleveland, and X. D. Fu, Reversing a model of Parkinson's disease with in situ converted nigral neurons. *Nature* 582 (2020) 550-556.

58. T. Irie, T. Matsuda, Y. Hayashi, A. Kamiya, J.-i. Kira, and K. Nakashima, Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke. *bioRxiv* (2021) 2021.09.26.461831.

【0237】

実施例6：筋萎縮性側索硬化症のマウスモデルにおける、*in vivo*でのアストロサイトの神経細胞系列変換のトランスクリプトーム解析

直接的神経細胞リプログラミングとは、多分化能を経ることなく成熟体細胞から誘導 (i) *Neuron* への変換を指し^{1、2}、多分化能状態へのリプログラミングが初期に実証される前からさえ最初に記録された³。この最初の発見により、前神経遺伝子 *Neurog2* 及び *Ascl1* ならびに神経分化遺伝子 *Neurod1* によってコードされるベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子 (TF) は、脳グリア (例えば、アストロサイト、ミクログリア) を含む体細胞を *iNeuron* に変換するのに最適な TF となっている²。これらの bHLH TF を、胚神経形成及び神経細胞サブタ

イブ特異化の駆動におけるそれらの役割に基づいて選択した⁴。例えば、胚前脳では、*Ascl1*は、GABA作動性の抑制神経細胞同一性を特定するのに必要かつ十分であるが、*Neurog2*は、*Neurod1*を含む転写カスケードにおけるグルタミン酸刺激性神経細胞運命を特定する^{5~9}。いくつかの群は、これらのbHLH TFを*in vitro*での神経細胞リプログラミング実験に使用したが^{10~17}、*in vivo*での脳の内因性細胞に適用される場合、*iNeuron*の変換の効率は低いままである²。抑制制御の1つのモードは、Cdk、Erk及びGsk3を含むプロリン指向性セリンースレオニン(S/T)キナーゼによるリン酸化であり、これは、胚マウス脳において、一次ツメガエル神経発生の間、及びがん細胞株においてbHLH TFをリン酸化し、阻害する^{18~25}。

10

【0238】

この知見を用いて、セリン-アラニン(SA)リン酸化変異を*Ascl1*(*Ascl1*SA6)で使用したところ、*Ascl1*SA6は、*in vivo*で成体脳アストロサイトのアストロサイトで発現した場合(実施例5)、神経細胞マーカー発現を誘導する際に、*Ascl1*よりも効率的であることが示され、これは、神経細胞系統変換を引き起こす能力の強化と一致する。本実施例では、遺伝子発現に対する神経細胞リプログラミングTFの影響を組織規模で網羅的にマッピングするためのレポーター不可知論法として、空間トランスクリプトームが使用された。

【0239】

最終的に、神経細胞リプログラミングの目標は、神経変性疾患モデルにおける失われた神経細胞を置き換えることであり、多くの場合、標的細胞としてアストロサイトが選択される。まだ完全に特徴付けられないが、神経細胞リプログラミング効率は、特に解剖学的位置^{28, 29}及び疾患状態³⁰に応じてアストロサイトの不均一性の程度が高い場合、異なる脳領域で、及び健康的対神経変性環境で異なる場合がある¹。本実施例では、リプログラミングTFを筋萎縮性側索硬化症(ALS)のマウスモデルに導入した。ALSは新皮質の深層V及びVIにおける上位神経細胞(MN)の変性と関連しており、これは、線条体(皮質線条体経路)及び脊髄(皮質脊髄経路)を含む皮質下標的に向けられる。その後、骨格筋及び他の筋肉(心臓、内臓)を神経支配する、脳幹ならびに脊髄の下位MNも変性する^{31, 32}。最終的に、より下位のMNが失われると、筋肉の脱神経、筋萎縮が起こり、最終的には診断の後3~5年で死に至る³²。ほとんどのALS診断は散発的であり、症例の5~10%のみが遺伝性である³³。家族性症例の中でも、Cu-Znスーパーオキシドジスムターゼ1をコードするSOD1において、いくつかの変異が同定された³⁴。SOD1におけるG93Aミスセンス変異により、グリシンからアラニンへの置換が生じ、この変異は、マウスに導入され、hSOD1^{G93A}トランスジェニックマウスを生成し、これを疾患モデリングに使用した³⁵。ヒト(h)SOD1^{G93A}変異型導入遺伝子を保有するトランスジェニックマウス系統は、ALS運動機能障害を繰り返し³⁶、脊髄の下位運動神経細胞の前に、皮質の上位運動神経細胞が減少する³⁷。

20

30

【0240】

アストロサイトは、健康な宿主脳に移植されると病理を誘発する可能性があるため、ALS動物モデルにおける神経細胞死の主要な寄与体である³⁸。ALSアストロサイトに関連する毒性を防止し、失われた上位運動神経細胞を潜在的に置き換えるために、本実施例は、神経原性TF(*Ascl1*、*Ascl1*SA6)の発現を駆動するグリア線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーターを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)を、SOD1^{G93A}運動皮質においてアストロサイト*iNeuron*間変換を誘導するために使用できるかどうかを調べた。上記の実施例5では、*Ascl1*SA6が、*in vivo*で野生型マウスの運動皮質において神経細胞マーカー発現を誘導する際に、*Ascl1*よりも効率的であることが示された²⁶。ここで、*Ascl1*及び*Ascl1*SA6が神経細胞系統変換を*in vivo*で誘導するかどうかを判定するために、10X Genomics Visium空間トランスクリプトーム(ST)プラットフォームを使用して、空間的に定義された方法で遺伝子発現変化を調査した。Molecular Brain

40

50

Atlasを使用して、脳領域を組織学的に描写し、転写的にクラスタ化し、注釈を付けた³⁹。予想外にも、対照*iCre*ベクターにより、炎症遺伝子シグネチャ、すなわち、同じAAVを使用して*Ascl1*または*Ascl1^{SA6}*のいずれかを発現した場合に減衰される表現型が誘導された。代わりに、*Ascl1*及び*Ascl1^{SA6}*は、アストロサイト遺伝子のサブセット (*Nr4a1*、*Thra*、*Npas4*、*Clu*) をダウンレギュレートし、*in vitro*での神経細胞変換の間にアップレギュレートされたもの (例えば*Zbtb18*、*Id2*、*Id3*) を含む神経原性遺伝子セットを活性化した¹⁰、²³。ヒト*ASCL1*または*ASCL1^{SA5}*がグリオブラストーマ細胞株で発現した前*in vitro*神経細胞変換データセットに基づいて遺伝子調節回路網 (GRN) を構築することにより²³、*ZBTB18*は重要なハブTFとして同定され、その*in silico*ノックアウト (KO) によりGRNが破壊された。まとめると、これらのデータは、*bHLH* TFが、少なくとも部分的に、*in vivo*で運動皮質アストロサイトにおいて神経原性GRNを活性化するという考えを支持しており、このアプローチが、これに限定されるものではないがALSなどの神経変性疾患のための治療として役立ち得ることを実証している。

10

【0241】

材料及び方法

動物。すべての動物の処置は、Canadian Council of Animal Care (CCAC) のガイドラインに従って、Sunnybrook Research Institute Animal Care Committee (ACC Protocol #22-757) によって承認された。動物は、食料及び水への自由なアクセスを備えた、12時間明暗サイクルで収容された。*Rosa-ZsGreen*; *hSOD1^{G93A}* 重ヘテロ接合マウスを、両方ともC57B6/J遺伝子バックグラウンドで維持された、*Rosa-ZsGreen*雌 (B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor^{tm6} (CAG-ZsGreen1) Hze/J; JAX (登録商標) 系統#: 007906) を*hSOD1^{G93A}*雄 (B6; Cg-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J; JAX (登録商標) 系統#: 004435) と共に飼育することによって生成した。2重ヘテロ接合マウスは、Jackson Laboratoryプロトコルを使用してPCR遺伝子型判定により同定した。*hSOD1^{G93A}*導入遺伝子及び内部陽性対照プライマー (導入遺伝子フォワード、5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3' (配列番号26); リバース、5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3' (配列番号27); 内部陽性対照フォワード、5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3' (配列番号34); 内部陽性対照リバース、5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC C-3' (配列番号35))。 *hSOD1^{G93A}*導入遺伝子バンドは236bpであり、挿入野生型バンドの座は324bpである。*Rosa-ZsGreen*: 野生型フォワード: 5'-CTG GCT TCT GAG GAC CG-3' (配列番号28); 野生型リバース: 5'-AAT CTG TGG GAA GTC TTG TCC-3' (配列番号29); 変異フォワード: 5'-ACC AGA AGT GGC ACC TGA C-3' (配列番号30); 変異リバース: 5'-CAA ATT TTG TAA TCC AGA GGT TGA-3' (配列番号31)。

20

30

40

【0242】

AAV送達。AAV5-GFAP-*iCre*プラスミドは、Dr. Maryam Faizからの寄贈であった¹⁰⁸。AAV5-GFAP-*iCre* (2.31×10¹³ GC/ml)、AAV5-GFAP-*Ascl1-t2a-iCre* (5.35×10¹³ GC/ml) 及びAAV5-GFAP-*Ascl1^{SA6}-t2a-iCre* (12.30×10¹³ GC/ml) は、VectorBuilder Inc. (Chicago, IL) によりパッケージ化された。各ウイルスを希釈して、1µL容量で合計4.8×10⁹ GCを送達し、5µLのHamiltonシリンジ及び30ゲージ針 (Hamilton, 7803-07) を用いて10分にわたり0.1µL/分で送達した。16週

50

齢の h S O D 1 G 9 3 A ; R o s a - z s G r e e n マウスの一次運動皮質を、定位固定器を用いて標的とした (A P : + 2 . 1 5 、 L / M : ± 1 . 7 、 D V : - 1 . 7) 。動物を、イソフルオラン (2 % 、 1 L / 分 ; F r e s e n i u s K a b i 、 C P 0 4 0 6 V 2) で麻酔し、ブプレノルフィン (0 . 1 m g / k g ; V e t e r g e s i c 、 0 2 3 4 2 5 1 0) 、バイトリル (2 . 5 m g / k g ; B a y e r 、 0 2 2 4 9 2 4 3) 及び生理食塩水 (0 . 5 m l 、 B r a u n 、 L 8 0 0 1) を皮下投与した。マウスは、 2 8 d p i 後に 殺した。

【 0 2 4 3 】

1 0 X V i s i u m 空間トランスクリプトーム切片及びライブラリ調製。マウスを、切開の前に、ケタミン (7 5 m g / k g) 及びキシラジン (1 0 m g / k g) で麻酔した。新しい脳を採取し、卓上液体窒素容器内のイソペンタン (2 - メチルブタン、 S i g m a) 浴に 5 分間入れた。凍結した脳を、予め冷却した 5 0 m l f a l c o n チューブに移し、 - 8 0 ° C で保存した。新しい凍結組織を - 2 0 ° C で L e i c a C M 3 0 5 0 クリオスタット (L e i c a m i c r o s y s t e m s C a n a d a I n c . , R i c h m o n d H i l l , O N , C a n a d a) を使用して凍結切片化し、 1 0 μ m の冠状切片を、 1 0 X V i s i u m 空間スライドガラス上のフレーム付きキャプチャ領域内に直ちに配置した。 V i s i u m 空間組織最適化試薬キット (1 0 X G e n o m i c s) を使用する、更なる処理及び空間転写 (S T) ライブラリ作製のために、スライドガラスをドライアイス上で P r i n c e s s M a r g a r e t G e n o m i c s C e n t r e に移した。手短に言えば、スライドガラスを - 2 0 ° C で予め冷却した M e O H 中で 3 0 分間脱水し、蓋を 3 7 ° C で 1 分間開いたサーモサイクラー内で乾燥させ、次いでヘマトキシリン及びエオシンで染色した。組織切片を、 7 0 μ l の透過酵素に、組織最適化スライドガラス (1 0 X G e n o m i c s) を使用して最適時間として選択された 1 8 分間曝露し、ポリアデニル化された m R N A が放出され、これは、 I l l u m i n a T r u S e q R e a d (商標) 、空間バーコード及び V i s i u m スライドガラス上の U M I を含むポリ d T プライマーによって捕捉できる。第 1 及び第 2 の鎖 c D N A の合成ならびに増幅を、 V i s i u m 空間遺伝子発現試薬キット (1 0 X G e n o m i c s) を使用して、製造業者のプロトコルに従って、サーマルサイクラー内の V i s i u m スライドカセットで行った。デュアルインデックスのイルミナ互換ライブラリは、デュアルインデックスキット T T セット A (1 0 X G e n o m i c s) ならびに E 3 、 E 4 、 E 5 及び E 6 インデックスプライマーを使用し、メーカーの指示に従い、サンプルインデックス P C R によって作成された。 3 ' 末端シーケンシングを、 I l l u m i n a N o v a S e q 6 0 0 0 (商標) システムを用いて P r i n c e s s M a r g a r e t G e n o m i c s F a c i l i t y で行った。

【 0 2 4 4 】

S T データの処理。初期データ分析は、 S p a c e R a n g e r (商標) (バージョン 1 . 3 . 1) 及び L o u p e B r o w s e r 4 . 0 (商標) を含む 1 0 X G e n o m i c s オープンソフトウェアを使用して実施した。 z s G r e e n 及び i C r e 配列を追加した b c l 2 f a s t q バージョン 2 . 2 0 を使用して F A S T Q ファイルを生成し、 S p a c e R a n g e r バージョン 1 . 3 . 1 を使用して、シーケンシング読み出しをカスタムマウスゲノム (r e f d a t a - g e x - m m 1 1 0 - 2 0 2 0 - A _ z s g r e e n _ i C r e) に合わせて調整した。このパイプラインは、各特徴スポットの固有の分子識別子 (U M I) 数のマトリックスを生成し、 1 0 以上の U M I を有する遺伝子のみが考慮されるようにフィルタリングを実行する。 S p a c e R a n g e r は 2 成分ガウス混合モデルを使用し、 U M I 当たりの平均読み取りがより高い高発現遺伝子を同定する。また、 L o u p e B r o w s e r を使用して、固有の細胞クラスタに対応する色分けされたシーケンシングスポットで組織画像を示す空間マップを作成した。これは、 2 D T 分布型確率的近傍埋め込み (t S N E) プロットを作成するためにも使用された。組織切片の対応する色分けされた領域内の固有の細胞クラスタを識別するための t S N E 投影。最後に、個々の選択された目的の遺伝子の発現パターンを、 L o u p e B r o w s e

rを使用して可視化した。

【0245】

発現変動遺伝子 (DEG)。追加の特徴選択及びクラスタリング分析を実行するために、単細胞ゲノム用の `Seurat v. 3. 2. 3 R` パッケージツール¹⁰⁹を使用した。`Seurat`を使用して、データセット中の非常に変動する遺伝子を選択した (デフォルトで2000個の遺伝子)。次に、これらの高度に変化する遺伝子を、下流クラスタリング分析に使用し、各脳試料中のすべてのクラスタ間の上位2000の変化遺伝子のリストを得た。`RunUMAP`関数を使用し、空間マップ内の位置に相関する割り当てクラスタを有するUMAPプロットを生成した。2種類の差次的遺伝子発現を行った: まず、ペアワイズ比較を実行することにより、脳のそれぞれの*iCre*陽性細胞と*iCre*陰性細胞との間で発現変動遺伝子 (DEG) を調べ、これにより、*iCre*クラスタで高度に発現され、残りのクラスタでは発現されない遺伝子のリストの同定が可能になる。各脳における上位50の可変遺伝子を図43D、図43F、図43H、図43Jに示す。これらの表は、統合データセットに含まれるすべての3000の遺伝子からなる。統合データセットは、`Seurat`の`SelectIntegrationFeatures`を用いて作成された。この関数は、N個の最も多様な特徴 (この場合は、3000) に基づいてデータセットを統合する。したがって、これらのデータセットは、p値カットオフを有さない。次に、試料間 (*Ascl1* vs 対照; *Ascl1*^{SA6} vs 対照、*Ascl1* 対 *Ascl1*^{SA6}) の*iCre*陽性に対して制限されたDEGも調べた。p値は、*iCre*陽性細胞プール間の個々のペアワイズ比較から計算した。

【0246】

差次的遺伝子発現のために、`pathfindR Bioconductor`パッケージを使用して経路クラスタリングが得られた¹¹⁰。GOカテゴリを意味類似性を反映する`treemap`としてプロットした。`treemap`は、`rrvgo Bioconductor`パッケージを使用して準備した。

【0247】

クラスタアノテーション。個々のクラスタに表される組織の分子アノテーションを、異なる脳領域で発現した266の固有の遺伝子の*Brain Palette* (商標) を使用して判断した³⁹。割り当てられた各クラスタにおけるすべてのスポットの平均遺伝子発現を使用し、`github`での3D STビューア及び*Brain Palette*実験からの*atlas*視覚化を使用して局所的同一性と比較した³⁹。各クラスタにおけるGO項の濃縮は、`enrichR R`パッケージによるGO、BP及びGO、CC (2021年バージョン) を検索することによって実行され、0.05の調整されたp値カットオフを有する差分アップレギュレーションされた遺伝子のみを調べた¹¹¹。

【0248】

遺伝子制御回路網 (GRN) の推論。GRN推論を、*iCRE-CT*、*Ascl1*及び*Ascl1*^{SA6}について (Okawa et al., 2015)¹¹²に記載されているように実行した。PKNを、*MetaCore* (*GeneGo Inc.* (15871913))、*TRRUST* (29087512) 及び*RegNetwork* (26424082) からアセンブルした。TFと遺伝子の各ペアのピアソン相関係数を、それぞれの空間トランスクリプトーム試料に対して計算した。PKNとピアソン相関係数の間の90パーセンタイル超の交差は、維持された。*Cytoscape v. 3*をGRN (14597658) の視覚化で使用し、ここで、差次的にアップレギュレーションされた遺伝子及びダウンレギュレートされた遺伝子は、それぞれ赤色または橙色及び青色または紫色のノードとして示され、その一方で発現非変動遺伝子は白色ノードとして示された。

【0249】

In silico ZBTB18 ノックダウンシミュレーション。神経芽腫細胞株 *SH-SY5Y* における0時間の対照と比較した、*ASCL1* 過剰発現の24時間後の発現変動TFを、(35366798) からのデータセットを用いて得た。遺伝子をその強度によって2つのビンに入れ、t検定を *limma R* パッケージを用いてそれぞれのビン

に適用した (16646809)。p 値を、Benjamini-Hochberg 法による複数回の試験のために 0.05 の調整 p 値カットオフで補正した。2 未満の平均絶対倍率変化の遺伝子も廃棄した。発現変動 TF 間の GRN は、上記のように再構成されたが、TF と遺伝子の各ペアについてのピアソン相関係数を計算するために、発達中のヒト皮質の scRNA-seq データ (26406371) を使用した。更に、ZBTB18 結合標的遺伝子は (30392794) から得られ、GRN に添加された。in silico 摂動は、ZBTB18 の発現を常に抑制することによって実行した。GRN シミュレーションを、多数決論理ルールを用いたブーリアンネットワーク形式主義により実行した。ブーリアン初期発現状態 1 及び 0 を、差分としてアップレギュレートされた TF 及び差分としてダウンレギュレートされた TF にそれぞれ割り当てた。同期更新を 1000 回繰り返し、最終的な GRN 状態を記録した。GRN の視覚化には Cytoscape v. 3 を用いた。

10

【0250】

免疫染色のための組織処理。免疫染色のために、マウスを、灌流の前にケタミン (75 mg/kg) 及びキシラジン (10 mg/kg) で麻酔した。心臓内灌流は、氷冷生理食塩水 (0.9% NaCl) を用いて 10 ml/分の流量で蠕動ポンプを使用して約 20 × 血液量で行い、続いて、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で約 5 分間行った。脳を回収し、PBS 中の 4% PFA に一晩後固定し、20% スクロース / 1 × PBS に移し、4℃ にて一晩凍結保護し、O.C.T. 化合物 (Tissue-Tek (登録商標) O.C.T. 化合物, Sakura (登録商標) Finetek, PA, USA) に埋め込み、-80℃ で保存した。脳を Leica CM3050 クライオスタット (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, Ontario, Canada) の内部にて -26℃ で凍結させ、30 µm で冠状に切断した。切片を、Fisherbrand (商標) Superfrost (商標) プラス顕微鏡スライドガラス (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) に収集した。

20

【0251】

免疫染色。スライドガラスを PBS で洗浄し、次いで PBS 中 10% ウマ血清 (HS)、0.075% ウシ血清アルブミン (BSA) 及び 0.3% Triton X-100 で室温にて 1 時間インキュベートした。ブロッキングに続いて、以下の一次抗体：ヤギ抗 GFAP (1:500、#NB100-53809、Novus)、ラット抗 Ctip2 (1:300、#AB18465、Abcam)、ラット抗 Iba1 (1:500、#019-19741、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて、抗体溶液 (PBS 中の 10% HS、0.75% BSA 及び 0.1% Triton-X-100) 中で 4℃ にて 72 時間インキュベートした。スライドガラスを、PBS 中の 0.1% Triton-X-100 でそれぞれ 10 分間 3 回洗浄し、Alexa568 (商標) (1:500; Invitrogen Molecular Probes (商標)、ThermoFisher Scientific)、Alexa488 (商標) (1:500; Molecular Probes) または Alexa647 (商標) (1:500; Molecular Probes) とコンジュゲートした種特異的二次抗体で 4℃ で一晩インキュベートした。スライドガラスを PBS 中で 3 回洗浄し、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) (Sigma Aldrich Canada, Mississauga, ON, Canada) で対比染色した。最後に、スライドガラスを 3 回洗浄し、Aqua-polymount (Polysciences Inc., PA, USA) にマウントした。

30

40

【0252】

免疫陽性細胞の定量化。GFAP、Ctip2 及び Iba1 発現細胞を、FIJI/ImageJ を使用して定量化した⁹³。簡単に説明すると、目的の皮質領域を、ポリゴンツールを用いて描写した。Ctip2 については、免疫蛍光シグナルを「粒子を分析」コマンドを使用して閾値化し、陽性細胞を定量化した。GFAP については、免疫蛍光シグ

50

ナルを、閾値調整「トライアングル」アルゴリズムを使用して閾値とし、「測定」コマンドを使用して測定した。各マウスについて、平均強度及び面積率を、複数の切片にわたって収集された加重平均として評価した。ミクログリアは、MORPHIOUS分析ツールを備えて提供されたマクロを使用してF I J I / Image Jで分析した⁴¹。このマクロを用いて、I b a 1の平均強度及び面積率を、A u t o l o c a l閾値（方法：P h a n s a l k a r、パラメータ1：0、パラメータ2：0）を用いて評価した。MORPHIOUSは、骨格測定基準（例えば、分岐の数、分岐長さ）及び細胞体測定基準（例えば、細胞体サイズ）を定量化するための機能を提供する。骨格測定基準を、ミクログリア細胞体の数に対して正規化した。更に、ミクログリア細胞体のその近傍ミクログリア細胞体に対するユークリッド距離を表す最近傍距離（NND）も評価した。各マウスについて、測定基準を、複数の切片にわたって収集された加重平均として評価した。

10

【0253】

イメージング及び統計。定量分析は、マウス脳を用いて同定したB r e g m a 1 . 3 4、1 . 8 5、2 . 1 5の一致した冠状運動皮質切片で行った。すべての他の画像は、Z e i s s Z 1 オブザーバ/Y o k o g a w a 回転ディスク（C a r l Z e i s s）顕微鏡を使用して取得した。運動皮質全体を包含するタイル型画像を、20倍対物レンズで、1 μ m刻み幅を有する30 μ mのzスタックを使用して取得した。すべての分析は、20倍率の画像を使用して行った。A d o b e P h o t o s h o pを使用して図面を作成し、B i o R e n d e r . c o mのライセンスは模式図の作成に使用された。G r a p h P a d P r i s m 9 . 2 . 0 S o f t w a r eを使用してグラフを作成し、統計試験を行った。平均値及び平均値の標準誤差（s . e . m .）を表すエラーバーをプロットする。免疫染色細胞の定量化は、状態当たり3つの脳、及び脳当たり少なくとも3つの切片で行った。比較は、一元配置A N O V A及びチューキー多重比較を使用して行った。有意性を、0 . 0 5未満のp値として定義し、以下のように示した：n s - 有意ではない、< 0 . 0 5 *、< 0 . 0 1 * *、< 0 . 0 0 1 * * *。

20

【0254】

結果

h S O D 1 ^{G93A}運動皮質における神経変性及びグリア活性化の評価

i n v i v oで脳グリア（アストロサイト、ミクログリア）を神経細胞に変換できるかどうかを疑問視した2つの注目を集めた2021年の刊行物によって引き起こされた最近の議論に応じて^{16、27}、実施例は、i n v i v oでの成体脳アストロサイトに対する神経細胞リプログラミングTFの転写影響を空間的にマッピングするために設定された。神経細胞リプログラミングは、失われた神経細胞を置き換える必要がある場合、神経変性の状態に最も効率的であり得ることが推論された。したがって、神経細胞リプログラミングベクターを、A L Sのモデルであるh S O D 1 ^{G93A}マウスの運動皮質に送達させた。ここで、運動皮質の深層錐体神経細胞が1か月齢までに変性したことが報告されている³⁷。神経細胞喪失を確認するために、C t i p 2を使用して、皮質層V及びVIの突起神経細胞を免疫標識した⁴⁰。C 5 7対照脳と比較して、3か月齢及び5か月齢の両方で、h S O D 1 ^{G93A}運動皮質において、3つの前後位置（ブレグマ1 . 3 4、1 . 8 5、2 . 1 5）でC t i p 2⁺神経細胞はほとんど検出されなかった（図41A～図41I）。

30

40

【0255】

神経細胞変性はしばしばグリア活性化と関連するため、活性化したミクログリア及びアストロサイトを同定ならびに定量化するために通例の機械学習ソフトウェアパッケージであるMORPHIOUSを使用した⁴¹。この方法を用いた場合、3か月齢及び5か月齢の時点で、I b a 1⁺ミクログリアの数、それらの密度、細胞体サイズ及び分岐数は、C 5 7とh S O D 1 ^{G93A}マウスの間で同じであった（図41J）。実際、MORPHIOUSベースの調整を使用して活性化細胞を最適に識別することにより、多くの「活性化」は、h S O D 1 ^{G93A}マウスと比較して、ベースライン制御データセット（C 5 7 B 6 / 6）で明らかであり、h S O D 1 ^{G93A}皮質で活性化ミクログリアクラスタが増加

50

しないことを示す（図41N、図41O）。以前の報告でも同様に、hSOD1^{G93A}マウスではミクログリア数の増加は見られなかったが⁴²、MORPHIOUSを使用して検出されなかった形態学的変化が見られた⁴¹。反応性グリオシスも評価したが、3か月齢及び5か月齢の両方で、C57対照及びhSOD1^{G93A}運動皮質において同様の数のSox9⁺アストロサイトが検出されたため、増殖応答の徴候は明らかではなかった（図42A～図42H）。更に、活性化細胞を最適に識別するためのMORPHIOUSベースの調整を使用したGFAP染色の検査により、hSOD1^{G93A}マウスと比較して、ベースライン対照マウス（C57BL/6）でより多くの「活性化」が明らかになり、hSOD1^{G93A}皮質で活性化アストロサイトのクラスター化が実質的に増加していないことを示唆している（図42I～図42K）。したがって、3か月齢及び5か月齢でのhSOD1^{G93A}運動皮質におけるCtip2⁺錐体神経細胞の変性にもかかわらず、ベースラインレベルを上回るグリア反応性は検出されなかった。

10

【0256】

神経細胞リプログラミングベクターを用いたhSOD1^{G93A}運動皮質のターゲティング

in vivoでアストロサイトにリプログラミングTFを発現させる転写の影響を評価するために、短いヒトGFAPプロモーターを保有するアデノ随伴ウイルス（AAV）を使用して、天然型Ascl1または変異型Ascl1^{SA6}（両方ともt2a-iCreカセットに係留されている）の発現を駆動した。特に、実施例5では、これらのコンストラクトを使用して、Ascl1^{SA6}、及び程度は低いAscl1が、神経細胞変性を起こさないRosa-zsGreenレポーターマウスにおいて運動皮質アストロサイトで発現される場合に神経細胞マーカー発現を増加できることが実証された。この実施例では、AAVを代わりに、4か月齢のhSOD1^{G93A}；Rosa-zsGreenマウスに注入し、この段階で、神経変性を既に起こっており、行動症状は始まったばかりだった⁴²（図43A）。Ascl1^{SA6}は胚皮質神経前駆細胞を神経細胞に変換し¹⁹、in vivoで成体脳アストロサイト²⁶において、ならびにin vitroでグリオブラストマ²³及び神経芽腫細胞²⁵において神経細胞マーカー発現を誘導し、グリアマーカー発現を減少させる、このbHLH TFの能力を強化する6つのセリンからアラニンへの変異を保有する。Ascl1及びAscl1^{SA6}をt2a-iCre配列に連結させることにより、形質導入細胞をRosa-zsGreenレポーターマウスで検出することが可能になった。配列をクローン化し、AAV5にパッケージングすることで、以下の3つの遺伝子送達ベクター：AAV5-GFAP-iCre（以下、iCre対照）、AAV5-GFAP-Ascl1-t2a-iCre（以下、Ascl1）及びAAV5-GFAP-Ascl1^{SA6}-t2a-iCre（以下、Ascl1^{SA6}）を生成した。

20

30

【0257】

3つのAAVのそれぞれを、定位固定座標を使用して、4か月齢のhSOD1^{G93A}；Rosa-zsGreenマウスの運動皮質（AP：+2.15、L/M：±1.7、DV：-1.7）に送達した。28日後、5か月齢で脳が収穫され、新鮮凍結脳が切片化され、zsGreen発現について調べられた（図43A）。運動皮質で最大zsGreen発現が検出された場合、各脳からの単一の切片（未注入、iCre、Ascl1、Ascl1^{SA6}）を、Visium空間トランスクリプトーム（ST）スライドの4つのキャプチャ窓のうちの1つに収集した（図43A）。スライドガラスを透過処理して、ポリアデニル化mRNAを放出させ、それを、キャプチャ窓でバーコード化オリゴdTプライマーによってキャプチャした（図43B）。ヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色により、4つの脳のそれぞれから収集された切片が、わずかに異なる吻側尾側位置ではあるが運動皮質内にあることが確認された（図43C、図43E、図43G、図43I）。このレベルの解像度では、AAV注入部位は、H&E染色組織では容易には見られなかったが、zsGreen発現が明らかであったため（図44Cを参照）、ウイルス形質導入は成功した。

40

50

【0258】

空間トランスクリプトームデータの計算分析及び品質チェック

STライブラリを生成してシーケンシングし、未注入（0.508）、対照*iCre*（0.523）、*Ascl1*（0.606）及び*Ascl1^{SA6}*（0.703）注入脳から同様のレベルの生配列読み取り飽和度を明らかにした（図45A”～図45D”）。配列決定された読み取りを選別し、アノテーションを付けて正規化したところ、それぞれ、2,079、2,348、2,334及び2,285の個々の捕捉位置（スポット）にわたって発現した19,925、20,200、20,485及び20,241つの遺伝子が、未注入、*iCre*、*Ascl1*及び*Ascl1^{SA6}*注入脳で同定された（図45）。組織で覆われていない空のスポットは分析から除外した。データ品質の予備分析は、空間グラフベースのマップ及び2D T分布型確率的近傍埋め込み（tSNE）投影を作成する、自動化された10X Visiumクラスタリングアルゴリズムを使用して実行した（図45A～図45D、図45A’～図45D’）。固有の分子識別子（UMI）数は、すべての細胞クラスタ（10,000～30,000範囲／スポット）で高く、シーケンシングの深さが高いことを確認した（図45A～図45D）。このレベルの解像度では、7～8つの転写的に固有細胞クラスタが識別され、配列決定された脳のそれぞれにおける対応する空間位置に色分けしてマッピングされた。未注入の脳では、7つの異なる細胞クラスタが、それらの転写物の類似性に基づいて検出された（図45A’）。対照的に、*iCre*注入脳では、8つの転写的に異なる細胞クラスタが検出され、運動皮質のAAV注入部位に一致する空間位置を有する追加の「新しい」クラスタが存在していた（クラスタ7として注釈付け；図45B’）。驚くべきことに、注射部位に適合する追加のクラスタは、*Ascl1*（6つのクラスタ；図45C’）及び*Ascl1^{SA6}*（7つのクラスタ；図45D’）注入脳では同様には観察されず、これらの配列決定された「スポット」の細胞の転写物は、*iCre*導入細胞よりも内因性脳組織に類似していたことを示唆する。

【0259】

クラスタ識別子の割り当て及びAAV変換の空間分布の定義

STデータにおける細胞クラスタをいっそう良好に識別するために、Seuratを使用して、下流クラスタリング解析のために高度に変化する遺伝子を選択した。このために、*iCre*及び*zsGreen*を参照マウスゲノム（refdata-gex-mm10-2020-A__zsGreen__iCre）に加えたことで、AAV形質導入に関連する細胞クラスタを割り当てることが可能になった。すべてのクラスタ間で上位2000の可変遺伝子を使用して、高次元の一樣多様体近似と投影（UMAP）プロットを生成し、各脳について10～11の固有の細胞クラスタを識別した（図43C、図43E、図43G、図43I）。UMAP投影中の細胞集団の分解能及び層別化が増加すると、*iCre*形質導入領域に対応する細胞クラスタが、3つの形質導入脳において現れた（図43F、図43H、図43J）。Allenマウス脳アトラスを使用して解剖学的位置を特定し、各クラスタに領域同一性割り当てた（www.brain-map.org）。

【0260】

予想どおり、高*iCre*発現クラスタを、*iCre*（クラスタ3、図43F）、*Ascl1*（クラスタ3及び部分クラスタ5；図43H）ならびに*Ascl1^{SA6}*（クラスタ4、図43J）形質導入脳の運動皮質内に配置した。実際、*iCre*は、導入された脳のそれぞれのヒートマップに表示されるように、組織にわたり最も変化する50の遺伝子の一番上にあった（図43F、図43H、図43J）。驚くべきことに、mRNA配列が参照ゲノムに追加されたとしても、*zsGreen*転写物は検出されず、AAV注入された3つの脳のそれぞれにおいて*zsGreen*の落射蛍光が見られた（図44Cを参照）。したがって、*iCre*発現は、AAVベクターで形質導入された細胞クラスタを同定するためにのみ依存していた。

【0261】

分子データの正確さの独立した尺度として、発現変動遺伝子（DEG）を、それぞれの所与のクラスタ内で、分子脳アトラスに定義された266の遺伝子の脳パレットと比較し

た（他のすべてのクラスタと比較したように）³⁹。解剖学的割り当てから予想されるように、4つの脳セクションすべてにおけるほとんどのクラスタは、分子的に「大脳新皮質」、「嗅覚野」または「線維路」として識別された。いくつかの誤認された後脳クラスタと未同定（NA）割り当てが得られたが、一般に、転写プログラムは収集した組織の解剖学的脳領域に対応していた。特に、iCre対照及びAscl1形質導入脳における高iCre発現クラスタについては、分子割り当ては「線維路」であったが、Ascl1^{SA6}形質導入脳におけるiCreクラスタは「後脳同一性」を割り当て、誤割り当てを反映するか、またはこのTFによって開始される転写プログラムの固有の性質を反映する場合があった（図43D、図43F、図43H、図43I）。

【0262】

まとめると、これらのデータにより、収集されたSTデータが高品質であり、脳細胞の転写を*in situ*で良好に表すことが確認される。

【0263】

*in vivo*でのiCre、Ascl1及びAscl1^{SA6}形質導入に対する別個の転写応答

iCre対照が形質導入された脳では、教師なしクラスタ化が合計10個のクラスタを識別し、iCre発現マッピングで富化されたクラスタ3を用いて、運動皮質の標的注入部位上に空間的にマッピングした（図43E、図43F）。驚くべきことに、iCre形質導入された脳における上位50の可変発現遺伝子の多くは、以下で更に説明するように、炎症応答及び／または神経変性応答と関連していた（例えば、Apod、Trf、B2m、Ifi27l2a、Ccl5、C4b、Serpina3n、Gfap、Vim、C1qb、H2-K1、H2-D1）（図43F）。比較として、対照の未注入脳は11つの細胞クラスタを有し、iCre注入脳よりも1つ多く、この脳セクションのわずかに吻側の位置を反映している（図43C）。実際、非注入脳において最も多様に発現した遺伝子は、主に空間マップの嗅覚領域にあり（クラスタ5～7、9、10；図43D）、これは、iCre形質導入脳においてあまり一般的ではなかった（図43F）。神経変性状態にあるにもかかわらず、非注入hSOD1^{G93A}運動皮質では、iCre形質導入脳で観察される炎症性遺伝子のうち2つだけが上位50の可変遺伝子であった；アポリポタンパク質d（Apod）（多くの神経変性疾患の脳でアップレギュレートされた脂質担体）^{43、44}及びトランスフェリン（Trf）（鉄の取り込みに関与し、炎症誘発性シグナル伝達に応答してミクログリアで上方制御される）⁴⁵。したがって、AAV対照ベクターは、未注入5か月齢SOD1^{G93A}運動皮質に見られる任意の変性シグナルを上回る炎症性転写応答を誘導した（図43D）。

【0264】

次に、Ascl1及びAscl1^{SA6}形質導入脳の空間的転写物を分析し、それぞれ11及び10の細胞クラスタに層別化した（図43G、図43I）。Ascl1形質導入脳では、iCre発現に富む配列決定スポットが2つのクラスタ（クラスタ3及び5）内に収まり、転写的に異なる2つの領域にまたがり、どちらも運動皮質の異なるドメインに空間的にマッピングされている（図43G）。Ascl1^{SA6}形質導入脳では、高iCre発現が単一のクラスタ4内に収まった（図43I）。2つの注入部位の空間的差異にかかわらず、Ascl1またはAscl1^{SA6}形質導入後の上位50の可変的に発現する遺伝子中で、炎症性遺伝子発現の顕著な欠如が観察された（図43H、図43J）。実際に、Gfapと同様に、非注入対照hSOD1^{G93A}脳でも上昇したApod及びTrfのみが、Ascl1またはAscl1^{SA6}形質導入に関連する可変遺伝子セットの中に含まれていた（図43H、図43J）。その代わりに、Mbp及びPvalbのようないくつかの神経細胞特異的遺伝子は、Ascl1及びAscl1^{SA6}形質導入脳においてiCre発現細胞クラスタで富んだ上位50の可変発現遺伝子の中に含まれていた（図43H、図43J）。

【0265】

まとめると、これらのデータは、Ascl1またはAscl1^{SA6}を発現するAAV

10

20

30

40

50

が、iCre対照ベクターと比較して、標的組織において明確な転写応答を誘発することを示している。

【0266】

AAV形質導入細胞クラスタ内の発現変動遺伝子の同定

AAV形質導入スポットのDEGのより広い比較を行うために、本実験の次の工程では、対照iCre、Asc11及びAsc11^{SA6}形質導入脳のiCre発現に富んだ細胞クラスタに焦点を当てた。iCre発現の空間マッピングにより、iCreが実際に3つのベクターで形質導入された脳の運動皮質で発現していたことが確認された(図44A)。更に、iCre転写物を機能的タンパク質に翻訳した。これは、注入された3つの脳でzsGreenが発現されるため、Rosa-zsGreenの座が再結合されたことを示している(図44B、図44C)。特に、下流の計算分析では、iCre mRNAがAsc11転写物の代用尺度として使用された。これは、2つの遺伝子が、2つのタンパク質のリボソームスキッピング及び効果的な翻訳を促進するt2aペプチド配列によって分離された単一のバイシストロニックメッセージから転写されるためである⁴⁶(図44D)。本実験で3'末端シーケンシングを行ったところ、シーケンシングデータセットではiCre(3'遺伝子)のみが検出された。

10

【0267】

次に、遺伝子発現を正規化し、iCre形質導入細胞に特異的に関連するDEGを単離するために調整した(図44E)。一連のVennダイアグラムを使用して、3つの形質導入脳のiCre⁺細胞でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされたDEGを比較した(図44F)。Asc11またはAsc11^{SA6}対iCre形質導入脳でアップレギュレートされたDEGを比較した場合、Asc11(69遺伝子)またはAsc11^{SA6}(32遺伝子)形質導入脳中の独自にアップレギュレートされたDEGと比較して、iCre形質導入された対照脳(137~152遺伝子)では2~3倍多くのDEGが独自にアップレギュレートされていた(図44F)。同様の偏りは、注入状態のそれぞれにおいてダウンレギュレートされたDEGを比較した場合に観察され、対照iCre形質導入脳では、Asc11(39の遺伝子)またはAsc11^{SA6}(32の遺伝子)形質導入後のはるかに低いDEG数に対して90~118の遺伝子がダウンレギュレートされた(図44F)。DEGの数のこれらの差にかかわらず、各状態において、形質導入iCre⁺細胞は、周囲組織に対して遺伝子の固有のセットを明確に発現した。

20

30

【0268】

iCre対照形質導入細胞は、高レベルの炎症マーカーを発現する

in vivoでのAAV形質導入の影響をより詳細に特徴付けるために、各試料について、組織の残りの部分では発現していないがiCreクラスタ内で高度に発現している上位50のDEGのヒートマップを生成した(図44G)。iCre対照ベクターの形質導入に関連する分子シグネチャを、DEGの遺伝子オントロジー(GO)分析を実施することによって最初に評価した(図44H)。意味類似性に基づくtreemapプロットを使用して、GOスコアに比例する空間のサイズで階層構造の可視化を可能にする、GO項を撮像した。驚くべきことに、対照iCre形質導入と関連する上位GOカテゴリには、「他の生物に対する防御応答」、「免疫系の積極的調節」、「免疫系プロセス」、「抗原プロセッシング及びペプチド抗原の提示」、「マクロファージ活性化」及び「ミクログリア細胞活性化」を含む、いくつかの免疫系特異的項が含まれていた(図44H)。加えて、アップレギュレートされたGO項の別の分岐は、「トランスシナプスシグナル伝達の調節」、「化学的シナプス伝達の制御」、「神経形成の調節」、「神経発生の制御」、「軸索発達」及び「シナプス剪定」などの神経細胞の発生、機能及び成熟に関連していた(図44H)。

40

【0269】

この炎症反応を更に評価するために、シグナル伝達遺伝子の発現を空間マップにマッピングした(図44I)。Gfap及びビメンチン(いずれも、注入された3つのすべての脳のiCre形質導入部付近で明らかにアップレギュレートされている)を含む反応性ア

50

ストロサイトマーカーを調べた⁴⁷。注射部位における同様の豊富な発現は、*Ly z 2*⁴⁸及び*Ty r o b p*⁴⁹、活性化ミクログリア、*M p e g 1*⁵⁰及び*C d 5 2*⁵¹のマーカー、マクロファージマーカー、ならびに*C 4 b*、補体因子⁵²について観察された。いずれの場合も、豊富な遺伝子発現は、未注入対照脳では見られず、*i C r e*に関しては両側注射部位で最も顕著であり、*A s c l 1*及び*A s c l 1^{S A 6}*に関しては程度は低かった（図44I）。*A s c l 1*及び*A s c l 1^{S A 6}*注入と比較した*i C r e*形質導入脳における炎症性遺伝子の相対発現の増加は、*i C r e*形質導入クラスターを脳内の他の配列決定されたスポットと比較して、遺伝子発現における $\log 2$ 倍率変化（FC）をプロットすることによって確認された（図44J）。

【0270】

10

まとめると、これらのデータは、神経細胞機能を妨害し得る神経細胞遺伝子の調節解除と併せて、*i C r e*形質導入細胞に顕著な炎症促進免疫応答があることを示している。

【0271】

*A s c l 1*及び*A s c l 1^{S A 6}*形質導入細胞は、神経細胞特異的遺伝子オントロジーカテゴリに関連した遺伝子を発現する

次に、遺伝子発現の空間マップを、組織の残りの部分と比較して、*A s c l 1*及び*A s c l 1^{S A 6}*形質導入スポット（すなわち、*i C r e⁺*）の高いレベルで発現した上位50 DE Gのサブセットに関して生成した（図44G）。最も多様に発現する遺伝子の1つは、ストレス反応⁵³として*P G D 2*、つまりアストロサイト及び骨髄化疾患におけるオリゴデンドロサイトでアップレギュレートされる神経保護性プロスタグランジン合成するプロスタグランジンD2シンターゼ（*P t g d s*）であった。加えて、生後アストログリアでの*i n v i t r o*での*A s c l 1*発現によって誘導されるGABA作動性神経マーカー、例えば、*P v a l b*、*G a d 1*及び*S s t*は¹³、上位50のDE Gの中にあった（図44G）。しかしながら、*P t g d s*、*P v a l b 1*、*G a d 1*及び*S s t*の空間マッピングは、各遺伝子の固有の豊富な発現パターンを明らかにしたが、組織の残りと比較した注入部位の発現差は、おそらく皮質組織一般におけるこれらの各遺伝子の比較的高い発現のために、未注入、*i C r e*、*A s c l 1*及び*A s c l 1^{S A 6}*注入脳のそれぞれでは容易には識別できなかった（図46A）。実際、これらの空間マップは、実際の遺伝子発現を反映するのではなく、むしろ、他のすべての部位に対する組織の一部における遺伝子発現の増加を反映する。遺伝子発現の定量的尺度を提供するために、遺伝子発現に $\log 2$ FCをプロットしたところ、*P t g d s*、*S s t*及び*M b p*がすべて、対照の*i C r e*注入脳と比較して、*A s c l 1*または*A s c l 1^{S A 6}*形質導入脳において高いレベルで発現したことが明らかになった。

20

30

【0272】

次に、早期生後アストロサイトを標的とする、以前の*i n v i t r o*での神経細胞リプログラミング実験で同定された少量のDE Gの発現を¹⁰、同様に空間的にマッピングした。神経的に発現した遺伝子の大部分は、AAV形質導入脳では顕著には変化しなかったが（データは示されず）、塩基性ドメインを欠き、bHLH因子に結合して、bHLH因子の活性を阻害するHLLH TFをコードする*I d 3*を含む、AAV形質導入部位で豊富な発現を示した、少量の遺伝子が同定された（図46B）。特に、*I d 3*は、調節性T細胞プールを維持するが⁵⁴、それはまた神経発生の重要な制御因子でもある⁵⁵。更に、補体カスケードの2つの成分*C 1 q b*及び*C 1 q a*を、*i n v i t r o*での神経細胞リプログラミング中に、3つのすべての脳の注入部位でアップレギュレートした（図46B）。遺伝子発現の定量的尺度を提供するために、遺伝子発現に $\log 2$ FCをプロットしたところ、対照の*i C r e*注入脳と比較して、*I d 3*は、*A s c l 1*または*A s c l 1^{S A 6}*形質導入脳において高いレベルで発現し、一方で、*C 1 q b*及び*C 1 q a*レベルは、*i C r e*形質導入脳では比較的高いレベルで発現されたことが明らかになった（図46C）。これらの発見は、対照*i C r e*ベクターと関連した炎症性応答の上昇と一致していた。

40

【0273】

50

最後に、リプログラミングTFの転写の影響を良好に理解するために、A s c l 1 及び A s c l 1^{SA6}形質導入脳におけるDEGのGO分析を行った。A s c l 1 形質導入脳のアップレギュレートしたGO項には、「カリウムイオン輸送」、「樹状突起形態形成の制御」及び「化学的シナプス伝達の調節」を含む、いくつかの神経細胞項が含まれていた（図46D）。驚くべきことに、異なるセットのGO項はA s c l 1^{SA6}形質導入脳で富化され、これらの2つのTFが異なる効果を有することが示唆された。神経細胞のカテゴリ、例えば「軸索及び接合アセンブリへのタンパク質の局在化」が一般的なGO項、例えば「細胞分化の陰性制御」と共に含まれる（図46D）。

【0274】

また、グリア同一性の潜在的な喪失と一致する「グリア細胞増殖」を含む、A s c l 1 形質導入時にダウンレギュレートされたGO項も興味深かった。更に、「代謝プロセス」は、A s c l 1 発現と関連するダウンレギュレートされたGO項であった（図46D）。この発見は、神経前駆細胞の分化中に代謝遺伝子発現が変化し⁵⁶、更には、A S C L 1^{low}及びA S C L 1^{High}と分類される神経内分泌腫瘍において、いくつかの代謝遺伝子が差動的に発現する⁵⁷ことを考えると、潜在的に興味深いものである。最後に、A s c l 1^{SA6}形質導入脳では、異なるセットの遺伝子がダウンレギュレートされ、A s c l 1^{SA6}形質導入細胞が増強された生存表現型であることを示唆する「細胞死の陽性制御」及び「細胞分化」を含む、GOカテゴリに属していた（図46D）。

【0275】

まとめると、GO分析は、分化経路の変化、ならびにアストロサイト及び神経細胞特異的遺伝子発現におけるA s c l 1 及びA s c l 1^{SA6}誘発変化と一致しており、誘導される転写物のより詳細な分析を促す。

【0276】

対照AAV形質導入に関連する遺伝子制御回路網の炎症性シグネチャ

遺伝子制御回路網（GRN）は、遺伝子がどのように相互作用して細胞運命及び／または状態を付与するかをシステムレベルの見解を提供し、重要なTFハブを同定するのに使用することができる。各iCre⁺細胞クラスタ内の発現遺伝子リストを使用して、対照、A s c l 1 及びA s c l 1^{SA6}形質導入細胞についてGRNを推測した。3つのGRNは異なるトポロジーを有し、それぞれは、互いと比較して、有意にアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子を含んでいた（調節されたp値<=0.05）。iCre、及びA s c l 1 またはA s c l 1^{SA6}の一方または両方によって誘導される遺伝子は、特定の遺伝子カーゴではなくAAV送達に関連している可能性が高い。一般的にアップレギュレートされた遺伝子には、炎症性アストロサイトマーカーであるG f a p、G f a p 発現に必要なTFであるN f i c⁵⁸、層特異的神経細胞マーカーであるS a t b 2 及びT b r 1⁵⁹、神経変性疾患において低下したレベルで発現するミエリン形成のマーカーであるM b p⁶⁰、神経炎症に関連するミクログリア及びアストロサイトで発現するリソソームプロテアーゼであるC t s b⁶¹が含まれる（図47A～図47C）。しかしながら、図2Jに示されるように、G f a p などの炎症性遺伝子のlog₂FCは、iCre形質導入細胞で最も高かった。同様に、一部のDEGは、H o p x⁶²、I d 4⁶³、B h l e h 2 2⁶⁴及びM e i s⁶⁵を含むiCre、ならびにA s c l 1 またはA s c l 1^{SA6}ベクターのうちの少なくとも1つによって特異的にダウンレギュレートされた（図47A～図47C）。

【0277】

まとめると、これらのデータは更に、AAV形質導入のみによってカーゴとは無関係に遺伝子発現を変化させることができるという考えを裏付けている。しかしながら、目標は、カーゴ（すなわち、b H L H TF）特異的な効果を特定することであったが、本実験では、代わりに、iCreまたはA s c l 1 及び／またはA s c l 1^{SA6}によって独特にアップレギュレートされた遺伝子に焦点を当てた。

【0278】

iCre GRNでは、炎症促進性遺伝子（S t a t 1）、サイトカイン調節制御TF

⁶⁶ (*Irf7*)、1型インターフェロンと陽性フィードバックループを形成するTF制御因子⁶⁶ (*Cxcl1*)、好中球誘引サイトカイン⁶⁷ (*Ccl5*)、炎症促進性ケモカイン⁶⁸ (*Nr4a1*)、虚血性傷害後の活性化ミクログリアでアップレギュレートされた核内受容体⁶⁹ (*Egr1*)、酸化ストレス応答性TF⁷⁰、*Fabp5* (血液脳関門の透過性を制御する)⁷¹、*Litaf* (炎症反応のTF調節因子)⁷²、及び*Cepbd* (アストロサイトの*Sod1*発現及び酸化ストレスを増加させるTF)⁷³を含む、いくつかの遺伝子が独特にアップレギュレートされた (図47A)。興味深いことに、細胞耐性を付与することによって酸化ストレスから保護するbHLH遺伝子である*Neurod6*もまた、*iCre*形質導入によってアップレギュレートされ⁷⁴、これは、AAV形質導入によって誘発される炎症促進状態への応答であり得る (図47A)。A*sc*l1及びA*sc*l1^{SA6}形質導入に対する遺伝子発現のこれらの差異を、log2FCsをプロットすることによって確認した (図47D)。これとは逆に、DEGのセットを、神経幹細胞及び前駆細胞 (NSPC) マーカー*Lhx2*⁷⁵、*Hes5*⁷⁶及び*Cux2*⁷⁷を含む*iCre7*で特異的にダウンレギュレートし、*Ptprz1* (統合失調症7の感受性遺伝子^{25, 78}) (図47A) も、log2FCプロットで検証した (図47D)。

【0279】

10

まとめると、これらのデータは、対照*iCre*ベクターの形質導入に関連する炎症促進性GRNと一致しており、神経細胞機能に対する他の潜在的な有害な効果を示唆しており、これは、*in vivo*でのAAV形質導入が樹状突起パターン形成⁷⁹及び海馬神経新生⁸⁰を変化させるという以前の報告と一致している。

20

【0280】

A*sc*l1及びA*sc*l1^{SA6}形質導入に関連する遺伝子制御回路網には、アップレギュレートされた神経細胞遺伝子及びダウンレギュレートされたグリア遺伝子が含まれる。A*sc*l1及びA*sc*l1^{SA6}GRNは、*iCre* GRNとは実質的に異なったが、*Zbtb18*及び*Id2*と共に、A*sc*l1自体の増強された発現を含む互いにいくらか類似することも示した (図47B、図47C)。*Zbtb18*は、BTB/POZドメイン、ジンクフィンガー転写抑制因子であり、その変異は、小頭症または大頭症、知的障害及びてんかんを含む異常な新皮質発生に関連している⁸¹。特に、*Zbtb18*は、*Id*ファミリーTF (*Id1*~4)の発現を制御し⁶³、*Id3*の発現もA*sc*l1^{SA6}GRNにおいて上昇していた (図47C)。*iCre*形質導入に対する遺伝子発現のこれらの差異を、log2FCsをプロットすることによって確認した (図47D)。

30

【0281】

その後、2つのGRNは異なり、遺伝子は、*Egr3* (神経突起伸長で役割を果たす⁸²)、*Pcsk2* (神経ペプチド生合成に必要なプロホルモン変換酵素⁸³)、*Bhlhe40* (bHLH TF、その喪失は皮質興奮性亢進をもたらす⁸⁴)、及び*Pou4f1* (成熟有糸分裂後神経細胞を維持するのに必要)を含むA*sc*l1 GRNにおいて上昇した (図4B、図4D)。対照的に、A*sc*l1^{SA6}、log2FCプロットで確認されるように、*Ptgds* (神経保護因子⁵³)及び*Olig1* (オリゴデンドロサイト分化を促進するbHLH TF⁸⁶)の発現を更に増加させた (図4C、図4D)。したがって、A*sc*l1及びA*sc*l1^{SA6}の両方は、いくつかの共通のTFノード (*Zbtb18*、*Id3*)を共有するが、いくつかの点で異なるGRNを有する。

40

【0282】

ダウンレギュレートされたA*sc*l1またはA*sc*l1^{SA6}GRNsの次の遺伝子発現 (図4B、図4C)を調べた。両方のデータセットには、これには、*Npas4* (神経保護性bHLH-PASドメインTF、その損失により皮質ミクログリア及びアストロサイトが活性化される⁸⁷)、*Thra* (甲状腺ホルモン核受容体、ノックアウト時に早発性神経形成を促進する⁸⁸)、*Junb* (即時初期遺伝子、その発現は短期神経細胞活動に関連する⁸⁹)、及び*Clu* (ApoJとしても知られるクラスタリン、アストロサイト及びシナプス前末端で発現する遺伝子、その過剰発現は興奮性神経伝達を促進し、ADリスクを低下させる⁹⁰)を含む、神経細胞及び／またはグリアで発現される遺伝子が含まれる。

50

まれた。Pbx1（末端セクター遺伝子⁹¹）もAscl1 GRNでダウンレギュレートされ（図47B、図47E）、Fos（同様に即時初期遺伝子⁸⁹）、及びNr4a1（活性化ミクログリアに関連）は、Ascl1^{SA6} GRNで更にダウンレギュレートされた（図47C、図47E）。これらの変化の重要性がすぐに明らかになるわけではないが、Ascl1とAscl1^{SA6}の間の転写応答の重複は、対照ベクターのみによって誘導されたものとは異なる、in vivoで転写変化を誘導するこれらのTFに関する支持を提供する。

【0283】

まとめると、このデータは、hSOD1^{G93A}マウスの運動皮質で異所発現した場合に、Ascl1及びAscl1^{SA6}によって活性化されるGRNの共通する特徴と異なる特徴の両方が存在することを実証している。

10

【0284】

in vivoでAscl1及びAscl1^{SA6}で形質導入されたアストロサイトは、in vitro標的遺伝子のサブセットを活性化する

in vivoでの脳アストロサイトにおけるAscl1及びAscl1^{SA6}の発現に関連する遺伝子発現の変化の重要性をより深く理解するために、本ST解析からのDEGを、2つのin vitroリプログラミング実験から以前に同定されたDEGと比較した。比較は、4-ヒドロキシタモキシフェン誘導性Ascl1^{ERT2}レトロウイルスコンストラクトを、生後（P）6～7日目の皮質から単離した増殖アストロサイトにin vitroで形質導入し、続いて、形質導入後4、24及び48時間でRNA-seq解析をした研究に対して行った¹⁰。研究では、2つのヒトASCL1及び変異型ASCL1^{SA5}（ヒト遺伝子は5つのSP部位のみを有する）を、ドキシサイクリン誘導性レンチウイルス系を用いて神経芽腫細胞株（SH-SY5Y）中で過剰発現させ、遺伝子発現は、導入後24時間でのみ評価した²⁵。いずれの系も本実験の標的である成体アストロサイトを正確に模倣しなかったが、いずれの場合も神経細胞分化が誘発された。

20

【0285】

驚くべきことに、in vivoでのALSマウスの運動皮質でのAAV5-GFAP-iCre形質導入（本実験）によって誘導される炎症促進遺伝子のいくつかは、同様に4時間の時点で、Irf7、Hmox1、Cxcl1、Ccl5、Stat1、Litaf、Xaf1及びEgr1を含むin vitroでのレトロウイルス形質導入によって一過性にアップレギュレートされた（図48A）。しかしながら、この応答は一過性であり、Hmox1発現のみが形質導入後24時間及び48時間で持続し、Neflもこれらの後の時点で発現が増加した（図48A）。NEFLは、神経中間線維を形成する神経線維軽鎖タンパク質をコードし、機能喪失変異は、シャルコー・マリー・トゥース病の神経変性に関連している⁹²。したがって、Neflのアップレギュレートは、脳（本実験）及びシャーレで培養された脳アストロサイトにおけるin vitroでのウイルス形質導入に対する神経保護応答であり得る¹⁰。ヘムオキシゲナーゼ1（Hmox1）も同様に神経保護をもたらし、通常はALSでダウンレギュレートされる⁹³。より少数のこれらの遺伝子はまた、神経芽腫細胞の形質導入後の24時間でASCL1（EGR1、NR4A1、LITAF、NEFL）及びASCL1^{SA5}（EGR1、NR4A1、LITAF）によって誘導された²⁵（図47D、図47G）。

30

40

【0286】

遺伝子サブセットも、in vivoでの本ST解析の対照AAVによって、ならびにin vitroでの神経細胞リプログラミング実験で使用されたレトロウイルス及びレンチウイルスベクターによって、ダウンレギュレートされた。生後アストロサイトでのAscl1^{ERT2}発現によりダウンレギュレートされたPtprz1が含まれていた¹⁰。Ptprz1は、ニューロン及びグリアで発現する多機能受容体タンパク質チロシンホスファターゼをコードし、統合失調症の感受性遺伝子である⁷⁸。Ptprz1は、炎症促進性サイトカインであるインターロイキン34（IL-34）の受容体として機能するため⁹⁴、免疫応答にも関与する可能性がある⁹⁵。加えて、神経原性遺伝子Cux2及

50

び *Gucy1b3* (グアニリルシクラーゼサブユニット) は、脳でまだ研究されていない (図 47 G、図 47 J)。

【0287】

したがって、対照ウイルス形質導入は、*in vitro* または *in vivo* で形質導入されるか否かにかかわらず、及びウイルスベクターの供給源に関係なく、共通の転写プロファイルを有する。

【0288】

Zbtb18 は、*Ascl1* GRN における必須ノード TF である

次に、*in vivo* で本実験の *Ascl1* 及び *Ascl1^{SA6}* GRN で同定された DEG を、*in vitro* での神経細胞リプログラミング実験と比較した。驚くべきことに、生後アストロサイトにおける *Ascl1^{ERT2}*、または神経芽腫細胞における *ASCL1* 及び *ASCL1^{SA5}* の発現はすべて、*Zbtb18* 及び *Id3* の発現をアップレギュレートさせた (図 47 G、図 47 J、図 48 B、図 48 C)。加えて、*Egr3* 及び *Pcsk2* は、P5 アストロサイトで *Ascl1^{ERT2}* (図 48 B、図 48 C) によって、ならびに神経芽腫細胞で *ASCL1* 及び *ASCL1^{SA5}* (図 47 G、図 47 H、図 47 J、図 47 K) によってアップレギュレートされた。対照的に、*Id3* 発現は、*in vivo* で本実験の *Ascl1^{SA6}* によって、及び *in vitro* では神経芽腫細胞の *ASCL1^{SA5}* のみによって誘発された (図 47 H、図 47 K)。 *Zbtb18* 及び *Id2* は、両方の実験において *Ascl1* 及び *Ascl1^{SA}* 変異によって一般的にアップレギュレートされる 2 つの遺伝子であるが、*ZBTB18* 変異と皮質形成異常の間のリンクを考慮して⁸¹、本実験では、この TF に更に焦点を当てた。

【0289】

ASCL1 の下流での神経細胞変換の駆動における *ZBTB18* の潜在的な重要性を更に調査するために、皮質 GRN は、胚性ヒト皮質からの *scRNA-seq* データを使用して推論し⁹⁶、グリオブラストーマ細胞中の *ASCL1^{SA5}* 過剰発現の 24 時間後にアップレギュレート (暗灰色の枠) またはダウンレギュレート (明灰色の枠) のいずれかをした遺伝子を²³、この GRN 上にマッピングした (図 47 L)。この回路網分析を使用して、*ZBTB18* は *ASCL1* の転写標的として同定され、これらの 2 つの *bHLH* TF の間の交差抑制相互作用と一致して⁴、*NEUROG2* の発現は抑制された (図 47 L)。 *ZBTB18* 発現の重要性を評価するために、*in silico* ノックアウト (KO) 分析を行い、82 の TF ノードのうち、22 の TF (または、全 TF の 26.8%) が、本実験の *Ascl1* 過剰発現によっても誘導される、*ID3* 及び *EGR3* を含む変化した発現を投影することが明らかになった (図 47 M)。

【0290】

同じ皮質 GRN 内の *Ascl1*、*Neurog2* 及び *Zbtb18* の存在についての更なる裏付けを得るために、胎生期 (E) 12.5 から以前に産生された GRN、*Neurog2* 及び *Ascl1* 発現皮質神経前駆細胞 (NPC)⁹⁷ を再分析し、*Zbtb18* が実際にこの転写回路網の一部であったことを明らかにした (図 47 N)。 *Ascl1*、*Neurog2* 及び *Zbtb18* 機能間の関係に対する更なる洞察は、系統及び分化軌道の評価を可能にした E12.5 終脳組織から生成された検索可能な *scRNA-seq* データセット (https://apps.institutimagine.org/mouse_pallium/) を使用して得られた⁹⁸。配列決定された細胞を背側のグルタミン酸作動性系統と腹側 GABA 作動性系統の軌跡に階層化した E12.5 終脳 *scRNA-seq* データから生成した SPRING プロットから⁹⁸、予想どおり、*Ascl1* 及び *Neurog2* が、それぞれ反対側で GABA 作動性系統及びグルタミン酸作動性系統において発現していたことが明らかになった (図 47 O)。特に、*Zbtb18* は、グルタミン酸作動性系統でより高いレベルで発現されたが、GABA 作動性細胞にも同様にいくつかの陽性細胞があった⁹⁸。このデータセットにおける転写物変動性の主なソースは、背腹側 (DV) 位置に対応し、これは、擬似 DV プロットにおいて図表で表すことができる (図 47 P)。予想どおり、*Ascl1* 及び *Neurog2* は、それぞれ腹側及び

背側の偏りを有していたが、*Zbtb18*は、D/V軸にわたって均一に発現した（図47P）。最後に、このデータセットを用いて、背側（暗灰色）及び腹側（明灰色）の線における*Ascl1*、*Neurog2*及び*Zbtb18*の擬似時系列比較を行った（図47Q）。これらのプロットでは、前駆細胞で発現された遺伝子はプロットを中心にピークを迎え、分化遺伝子はプロットの最後にピークを迎える。この分析から、*Ascl1*及び*Neurog2*プロットは、神経前駆細胞遺伝子として同定されたそれらの役割とより一致しており、一方で、細胞が時間の経過と共に分化するにつれて*Zbtb18*の発現が増加した（図47Q）。これらの実験は、*Zbtb18*が皮質発生の間の神経細胞遊走及び形態学的成熟に必須であるという以前の報告と一致している⁹⁹。

【0291】

まとめると、これらの実験は、神経細胞リプログラミングの間の*Ascl1*の下流（本実験）及び発達している新皮質の*Neurog2*と*Ascl1*の両方の下流に作用する、重要な神経分化因子としての*Zbtb18*の重要性を裏付けている。

【0292】

考察

本実施例の目標は、STアプローチを使用して*in vivo*神経細胞系統変換の証拠を提供することであった。具体的には、10X Visiumプラットフォームを使用して、深層神経変性が始まった時点での*hSOD1^{G93A}*運動皮質のアストロサイトにおけるTF、*Ascl1*及び*Ascl1^{SA6}*の発現の全体的な効果を調べた。送達パラダイムは、*Rosa-zebrafish*レポーターを使用してウイルス伝達の可視化を可能にする*tg2a-cre*配列と共に、アストロサイト特異的GFAPプロモーターを保有するAAV5ウイルスベクターに基づいた。このアプローチは以前に、*Ascl1*と比較して、*Ascl1^{SA6}*が成体運動皮質においてアストロサイトで発現された場合、神経細胞マーカー発現（及び、グリアマーカーのダウンレギュレート）をより効果的に誘導できることを示すために使用されていた（実施例5）。しかしながら、その実験では、GFAPプロモーターに対する神経原性TF配列のシス効果のために、神経細胞系統変換を直接主張することは困難であった²⁷。本明細書で使用されるSTアプローチにより、*in vivo*での*Ascl1*及び*Ascl1^{SA6}*によって誘発されるトランスクリプトームは、共通の転写標的を*in vitro*で行われたリプログラミング実験と共有する¹⁰、²⁵。更に、新規のTF、*Zbtb18*を中心とする神経原性プログラムが、*in vivo*及び*in vitro*で*Ascl1*及び*Ascl1^{SA6}*によって活性化されることを証明した。

【0293】

ZBTB18（別名RP58）は、この遺伝子における突然変異が、小頭症または大頭症、知的障害及びてんかんを含む異常な新皮質発生に関連しているため、興味深い⁸¹。更に、胚皮質における*Zbtb18*のノックダウンは、神経細胞遊走を妨害するだけでなく、新生児神経細胞の形態学的成熟も妨害し、このTFを必須の神経分化遺伝子として位置付ける⁹⁹。本実験における擬似時系列分析も同様に、*Zbtb18*の神経分化遺伝子としての役割を裏付けるが、このTFが背側系統と腹側系統の両方で機能し得ることを示唆している。興味深いことに、*Zbtb18*は、すべてのId TFの発現を阻害することが報告されている⁶³。対照的に、Id2及びId3は、*Zbtb18*と共に、*Ascl1*及び*Ascl1^{SA6}*によってアップレギュレートされていることがわかった。このことは、この抑制関係が、すべての細胞状況において同じではないことを示唆している。

【0294】

際だったことに、GBMでは、SP部位での*Ascl1*リン酸化とId2発現のアップレギュレートは、神経分化に対する2つの特定された障害であった²³。本*in vivo*実験では、*Ascl1*と*Ascl1^{SA6}*の両方は、従来の*in vitro*実験と同様に、脳アストロサイトで発現した場合にId TFの発現を誘発した¹⁰。一見、この誘発は、非機能性ヘテロ二量体を形成することによって、またはI型Eタンパク質補因子を停止することによって、Id転写因子は*Ascl1*などのII型bHLH TFをプロ

10

20

30

40

50

ックするので、抑制的であるとみなされる可能性があった。しかしながら、I d 2 は、神経細胞の発芽を誘導する海馬のカイニン酸損傷によって誘導され、成体脳で I d 2 が異所性発現されると表現型模写される可能性があり、I d 2 は、成体海馬で苔状線維の発芽を促進することもできる¹⁰⁰。本実験では、I d 2 により、J A K / S T A T 及びインターフェロニンシグナル伝達を活性化した¹⁰⁰。転写レベルでは、I d 2 は B h l h e 4 0 及び E g r 1 を含む下流の T F の発現を誘導し¹⁰⁰、興味深いことに、この実験では、A s c l 1 が成体アストロサイトでアップレギュレートされると両方の T F が誘導される。補足的な実験では、I d 2 はまた、胚性ニワトリ脊髄における A s c l 1 駆動神経形成に必要であることが示された¹⁰¹。興味深いことに、I d 2 に依存していることは、N e u r o g 2 に依存する背側脊髄前駆子よりも、A s c l 1 に依存する腹側脊髄前駆子に関してより強かった¹⁰¹。

10

【0295】

予想外にも、転写プロファイリングにより、i C r e 対照ベクターが、全体的な遺伝子発現に最も大きな影響を及ぼし、反応性アストロサイト、活性化されたミクログリアとマクローファージ、及び補体系のマーカーを含む、炎症促進性転写反応を開始させることが明らかになった。特に、A s c l 1 または A s c l 1^{S A 6} 過剰発現に関連する i C r e クラスタにおいて、対照ベクターによって誘発される免疫応答遺伝子の同じ増強された発現は観察されなかった。i C r e 形質導入細胞の炎症性シグネチャは、特に A A V が 11 の F D A 承認を受けて臨床現場に浸透していることを考えると、予想外だった¹⁰²。本実験の有望な結果の1つは、A s c l 1 または A s c l 1^{S A 6} を保有する A A V の炎症効果が i C r e 対照ベクターと比較して大幅に減少したことであり、これに限定されないが、これらの T F が炎症性応答を妨害し得ることが示唆されている。

20

【0296】

要約すると、本実施例は、i n v i v o で脳アストロサイトに発現させた場合に神経細胞系列変換を促進する b H L H 転写因子、特に本明細書に記載された変異型 b H L H 転写因子の使用をサポートする空間的に分解されたトランスクリプトームデータを提供する。本データは更に、Z b t b 1 8 が、任意選択で、本明細書に記載される変異型 b H L H 転写因子と共に、新規の神経細胞変換因子として有用であることを同定する。

【0297】

したがって、本出願は更に、対象におけるグリア細胞の神経細胞形質転換で使用するための Z B T B 1 8 転写因子、または Z B T B 1 8 転写因子をコードする核酸を提供する。いくつかの実施形態では、Z B T B 1 8 転写因子は、配列番号 3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 または 5 4 のうちの 1 つに対して少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % または 9 7 % 同一であるアミノ酸配列を有する。

30

【0298】

配列番号 3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6 及び 4 8 のアミノ酸配列は、それぞれ、マウス Z B T B 1 8 変異型転写因子 1 ~ 7 の配列に対応する。これらの配列は、N a t i o n a l L i b r a r y o f M e d i c i n e, N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (N C B I) データベースから取得され、対応する m R N A 転写物、すなわち、N M _ 0 0 1 0 2 3 3 0、N M _ 0 1 3 9 1 5、N M _ 0 0 1 3 5 5 0 9 8、N M _ 0 0 1 3 5 5 0 9 9、N M _ 0 0 1 3 5 5 1 0 0、N M _ 0 0 1 3 5 5 1 0 1 及び N M _ 0 0 1 3 5 5 1 0 2 それぞれの N C B I 参照配列と一致する。m R N A 配列は、本出願では配列番号 3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7 及び 4 9 としてそれぞれ列記されている。

40

【0299】

配列番号 5 0、5 2 または 5 4 のアミノ酸配列は、それぞれ、ヒト Z B T B 1 8 転写因子変異体 1、2 及び 3 の配列に対応する。これらの配列は、N a t i o n a l L i b r a r y o f M e d i c i n e、N C B I データベースから取得され、対応する m R N A 転写物、すなわち、N M _ 2 0 5 5 7 6 8、N M _ 0 0 6 3 5 2 及び N M _ 0 0 1 2 7 8 1 9 6 それぞれの N C B I 参照配列に対応する。m R N A 配列は、本出願では配列番号

50

51、53及び55としてそれぞれ列記されている。

【0300】

ヒト、マウス及び他の種（ラット、イヌ、ニワトリ及びチンパンジーを含む）におけるZBTB18転写因子遺伝子の間には高い保存性がある。

【0301】

本明細書において更に、配列番号36、38、40、42、44、46、48、50、52もしくは54のうちの1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%もしくは97%同一であるアミノ酸配列を有するZBTB18転写因子、またはウイルスまたは非ウイルスベクター内にあり得る、配列番号36、38、40、42、44、46、48、50、52もしくは54のうちの1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%もしくは97%同一であるアミノ酸配列を有するZBTB18転写因子をコードする核酸を含む、医薬組成物が提供される。

10

【0302】

本出願は更に、配列番号36、38、40、42、44、46、48、50、52もしくは54のうちの1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%または97%同一であるアミノ酸配列を有するZBTB18転写因子をコードする核酸配列を含む、ベクターを提供する。適切なベクターは、変異型bHLH転写因子発現ベクターに関連して上に詳細に記載されている。核酸配列は、任意選択で、配列番号37、39、41、43、45、47、49、51、53もしくは55のうちの1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%または97%同一である配列である。

20

【0303】

更に、上記で定義された、ZBTB18転写因子、コード核酸、ベクターまたは医薬組成物を投与することによる、対象におけるグリア細胞の神経細胞形質転換のための使用方法が提供される。

【0304】

参考文献

1 Bocchi, R., Masserdotti, G. & Gotz, M. Direct neuronal reprogramming: Fast forward from new concepts toward therapeutic approaches. *Neuron*, doi:10.1016/j.neuron.2021.11.023 (2021).

30

2 Vasan, L., Park, E., David, L. A., Fleming, T. & Schuurmans, C. Direct Neuronal Reprogramming: Bridging the Gap Between Basic Science and Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* 9, 681087, doi:10.3389/fcell.2021.681087 (2021).

3 Heins, N. et al. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5, 308–315, doi:10.1038/nn828 (2002).

40

4 Oproescu, A. M., Han, S. & Schuurmans, C. New Insights Into the Intricacies of Proliferative Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* 14, 642016, doi:10.3389/fnmol.2021.642016 (2021).

5 Casarosa, S., Fode, C. & Guillemot, F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126, 525–5

50

34 (1999) .

6 Fode, C. et al. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons . *Genes Dev* 14, 67–80 (2000) .

7 Schuurmans, C. et al. Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *Embo J* 23, 2892–2902 (2004) .

8 Parras, C. M. et al. Divergent functions of the proneural genes *Mash1* and *Ngn2* in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16, 324–338, doi:10.1101/gad.940902 (2002) . 10

9 Kovach, C. et al. *Neurog2* simultaneously activates and represses alternative gene expression programs in the developing neocortex. *Cereb Cortex* 23, 1884–1900, doi:10.1093/cercor/bhs176 (2013) .

10 Masserdotti, G. et al. Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* 17, 74–88, doi:10.1016/j.stem.2015.05.014 (2015) . 20

11 Gascon, S. et al. Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell* 18, 396–409, doi:10.1016/j.stem.2015.12.003 (2016) .

12 Berninger, B., Guillemot, F. & Gotz, M. Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci* 25, 2581–2590, doi:EJN5509 [pii] 10.1111/j.1460-9568.2007.05509.x (2007) . 30

13 Heinrich, C. et al. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 8, e1000373, doi:10.1371/journal.pbio.1000373 (2010) . 40

14 Heinrich, C., Gotz, M. & Berninger, B. Reprogramming of postnatal astroglia of the mouse neocortex into functional, synapse-forming neurons. *Methods Mol Biol* 814, 485–498, doi:10.1007/978-1-61779-452-0_32 (2012) .

15 Chouchane, M. et al. Lineage Reprogramming of Astroglial Cells from Different Origins into Distinct Neuronal Subtypes. *Stem Cell Reports* 9, 162–176, doi:10.1 50

016/j.stemcr.2017.05.009 (2017).

16 Rao, Y. et al. NeuroD1 induces microglial apoptosis and cannot induce microglia-to-neuron cross-lineage reprogramming. *Neuron* 109, 4094–4108. e4095, doi:10.1016/j.neuron.2021.11.008 (2021).

17 Russo, G. L. et al. CRISPR-Mediated Induction of Neuron-Enriched Mitochondrial Proteins Boosts Direct Glia-to-Neuron Conversion. *Cell Stem Cell* 28, 584, doi:10.1016/j.stem.2020.11.017 (2021). 10

18 Ali, F. R. et al. Dephosphorylation of the Proneural Transcription Factor ASCL1 Re-Engages a Latent Post-Mitotic Differentiation Program in Neuroblastoma. *Mol Cancer Res* 18, 1759–1766, doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0693 (2020).

19 Li, S. et al. RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* 34, 2169–2190, doi:10.1523/JNEUROSCI.4077-13.2014 (2014). 20

20 Li, S. et al. GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *J Neurosci* 32, 7791–7805, doi:10.1523/JNEUROSCI.1309-12.2012 (2012).

21 Ali, F. et al. Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138, 4267–4277, doi:10.1242/dev.067900 (2011). 30

22 Azzarelli, R., Hardwick, L. J. & Phipps, A. Emergence of neuronal diversity from patterning of telencephalic progenitors. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 197–214, doi:10.1002/wdev.174 (2015).

23 Azzarelli, R. et al. ASCL1 phosphorylation and ID2 upregulation are roadblocks to glioblastoma stem cell differentiation. *Sci Rep* 12, 2341, doi:10.1038/s41598-022-06248-x (2022). 40

24 Hindley, C. et al. Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation. *Development* 139, 1718–1723, doi:10.1242/dev.077552 (2012).

25 Woods, L. M. et al. Elevated ASCL1 ac 50

tivity creates de novo regulatory elements associated with neuronal differentiation. BMC Genomics 23, 255, doi:10.1186/s12864-022-08495-8 (2022).

26 上記の実施例5

27 Wang, L. L. et al. Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing in vivo. Cell 184, 5465–5481 e5416, doi:10.1016/j.cell.2021.09.005 (2021).

28 Bayraktar, O. A. et al. Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. Nat Neurosci 23, 500–509, doi:10.1038/s41593-020-0602-1 (2020). 10

29 Lanjakornsiripan, D. et al. Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. Nat Commun 9, 1623, doi:10.1038/s41467-018-03940-3 (2018). 20

30 Matias, I., Morgado, J. & Gomes, F. C. A. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. Front Aging Neurosci 11, 59, doi:10.3389/fnagi.2019.00059 (2019).

31 de Carvalho, M. & Swash, M. Lower motor neuron dysfunction in ALS. Clin Neuropathol 127, 2670–2681, doi:10.1016/j.clinph.2016.03.024 (2016).

32 Turner, M. R. et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet Neurol 12, 310–322, doi:10.1016/S1474-4422(13)70036-X (2013). 30

33 Pasinelli, P. & Brown, R. H. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. Nat Rev Neurosci 7, 710–723, doi:10.1038/nrn1971 (2006).

34 Rosen, D. R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 364, 362, doi:10.1038/364362c0 (1993). 40

35 Gurney, M. E. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. Science 264, 1772–1775, doi:10.1126/science.8209258 (1994).

36 Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Boghaert, E. & Robberecht, W. The role of exc 50

itotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762, 1068–1082, doi:10.1016/j.bbadis.2006.05.002 (2006).

37 Ozdinler, P. H. et al. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3) transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31, 4166–4177, doi:10.1523/JNEUROSCI.4184-10.2011 (2011).

10

38 Qian, K. et al. Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* 8, 843–855, doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.003 (2017).

39 Ortiz, C. et al. Molecular atlas of the adult mouse brain. *Sci Adv* 6, eabb3446, doi:10.1126/sciadv.abb3446 (2020).

40 Arlotta, P. et al. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207–221, doi:10.1016/j.neuron.2004.12.036 (2005).

20

41 Silburt, J., Lipsman, N. & Aubert, I. Disrupting the blood–brain barrier with focused ultrasound: Perspectives on inflammation and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6735–E6736, doi:10.1073/pnas.1710761114 (2017).

42 Hatzipetros, T. et al. A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *J Vis Exp*, doi:10.3791/53257 (2015).

30

43 Terrisse, L. et al. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem* 71, 1643–1650, doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71041643.x (1998).

44 Muffat, J., Walker, D. W. & Benzer, S. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7088–7093, doi:10.1073/pnas.0800896105 (2008).

40

45 McCarthy, R. C. et al. Inflammation-induced iron transport and metabolism by brain microglia. *J Biol Chem* 293, 7853–7863, doi:10.1074/jbc.RA118.001949 (2018).

50

46 Trichas, G., Begbie, J. & Srinivas, S. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol* 6, 40, doi:10.1186/1741-7007-6-40 (2008).

47 Clarke, L. E. et al. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1896-E1905, doi:10.1073/pnas.1800165115 (2018).

48 DePaula-Silva, A. B. et al. Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 16, 152, doi:10.1186/s12974-019-1545-x (2019).

49 Kiialainen, A., Hovanes, K., Paloneva, J., Kopra, O. & Peltonen, L. Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS. *Neurobiol Dis* 18, 314-322, doi:10.1016/j.nbd.2004.09.007 (2005).

50 Bayly-Jones, C., Pang, S. S., Spicer, B. A., Whisstock, J. C. & Dunstone, M. A. Ancient but Not Forgotten: New Insights Into MPEGL1, a Macrophage Perforin-Like Immune Effector. *Front Immunol* 11, 581906, doi:10.3389/fimmu.2020.581906 (2020).

51 Turner, M. J. et al. Reduction of inflammation and preservation of neurological function by anti-CD52 therapy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 285, 4-12, doi:10.1016/j.jneuroim.2015.05.018 (2015).

52 Scharztz, N. D. & Tenner, A. J. The good, the bad, and the opportunities of the complement system in neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 17, 354, doi:10.1186/s12974-020-02024-8 (2020).

53 Kagitani-Shimono, K. et al. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is upregulated in the alphaB-crystallin-positive oligodendrocytes and astrocytes in the chronic multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32, 64-73, doi:10.1111/j.1365-2990.2005.00690.x (2006).

54 Miyazaki, M. et al. Id2 and Id3 maintain the regulatory T cell pool to suppress inflammatory disease. *Nat Immunol* 15, 7

10

20

30

40

50

67–776, doi:10.1038/nr.2928 (2014).

55 Tzeng, S. F. Inhibitors of DNA binding in neural cell proliferation and differentiation. *Neurochem Res* 28, 45–52, doi:10.1023/a:1021691911011 (2003).

56 Hanna J, D. L., Fleming T, Screatton R A, Schuurmans C. . Beyond genetics: the role of metabolism in photoreceptor survival, development and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. in press (2022).

57 Cargill, K. R., Hasken, W. L., Gay, C. M. & Byers, L. A. Alternative Energy: Breaking Down the Diverse Metabolic Features of Lung Cancers. *Front Oncol* 11, 757323, doi:10.3389/fonc.2021.757323 (2021).

58 Wilczynska, K. M. et al. Nuclear factor I isoforms regulate gene expression during the differentiation of human neural progenitors to astrocytes. *Stem Cells* 27, 1173–1181, doi:10.1002/stem.35 (2009).

59 Dennis, D. J. et al. Neurog2 and Ascl1 together regulate a postmitotic derepression circuit to govern laminar fate specification in the murine neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E4934–E4943, doi:10.1073/pnas.1701495114 (2017).

60 Hoch-Kraft, P., Trotter, J. & Gonsior, C. Missing in Action: Dysfunctional RNA Metabolism in Oligodendroglial Cells as a Contributor to Neurodegenerative Diseases? *Neurochem Res* 45, 566–579, doi:10.1007/s11064-019-02763-y (2020).

61 Ni, J. et al. Increased expression and altered subcellular distribution of cathepsin B in microglia induce cognitive impairment through oxidative stress and inflammatory response in mice. *Aging Cell* 18, e12856, doi:10.1111/accel.12856 (2019).

62 Penisson, M., Ladewig, J., Belvindrah, R. & Francis, F. Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. *Front Cell Neurosci* 13, 381, doi:10.3389/fncel.2019.00381 (2019).

63 Okado, H. Regulation of brain development and brain function by the transcriptional repressor RP58. *Brain Res* 1705, 15–23, doi:10.1016/j.brainres.2018.02.042 (2019).

10

20

30

40

50

64 Srinivasan, K. et al. A network of genetic repression and derepression specifies projection fates in the developing neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19071–19078, doi:10.1073/pnas.1216793109 (2012).

65 Manuel, M. N., Mi, D., Mason, J. O. & Price, D. J. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci* 9, 70, doi:10.3389/fncel.2015.00070 (2015).

66 Mogensen, T. H. IRF and STAT Transcription Factors – From Basic Biology to Roles in Infection, Protective Immunity, and Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol* 9, 3047, doi:10.3389/fimmu.2018.03047 (2018).

67 Zhang, Z. J., Jiang, B. C. & Gao, Y. J. Chemokines in neuron–glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74, 3275–3291, doi:10.1007/s00018-017-2513-1 (2017).

68 Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C. & Teixeira, M. M. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 17, 1439–1460, doi:10.1517/14728222.2013.837886 (2013).

69 Zhang, Y. J., Song, J. R. & Zhao, M. J. NR4A1 regulates cerebral ischemia-induced brain injury by regulating neuroinflammation through interaction with NF- κ B/p65. *Biochemical and biophysical research communications* 518, 59–65, doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.008 (2019).

70 Yu, Q. et al. Early activation of Egr-1 promotes neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 302, 145–154, doi:10.1016/j.expneurol.2018.01.009 (2018).

71 Paskevicius, T. et al. The Fabp5/calnexin complex is a prerequisite for sensitization of mice to experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34, 16662–16675, doi:10.1096/fj.202001539RR (2020).

72 Tang, X. et al. Novel transcriptional

10

20

30

40

50

regulation of VEGF in inflammatory processes. *J Cell Mol Med* 17, 386–397, doi:10.1111/jcmm.12020 (2013).

73 Wang, S. M. et al. Astrocytic CCAAT/Enhancer-binding protein delta contributes to reactive oxygen species formation in neuroinflammation. *Redox Biol* 16, 104–112, doi:10.1016/j.redox.2018.02.011 (2018).

74 Tutukova, S., Tarabykin, V. & Hernandez-Miranda, L. R. The Role of Neurodevelopmental Genes in Brain Development, Function, and Disease. *Front Mol Neurosci* 14, 662774, doi:10.3389/fnmol.2021.662774 (2021).

75 Kinare, V. et al. An evolutionarily conserved Lhx2-Ldb1 interaction regulates the acquisition of hippocampal cell fate and regional identity. *Development* 147, doi:10.1242/dev.187856 (2020).

76 Ohtsuka, T. & Kageyama, R. Regulation of temporal properties of neural stem cells and transition timing of neurogenesis and gliogenesis during mammalian neocortical development. *Semin Cell Dev Biol* 95, 4–11, doi:10.1016/j.semcdb.2019.01.007 (2019).

77 Weiss, L. A. & Nieto, M. The crux of Cux genes in neuronal function and plasticity. *Brain Res* 1705, 32–42, doi:10.1016/j.brainres.2018.02.044 (2019).

78 Buxbaum, J. D. et al. Molecular dissection of NRG1-ERBB4 signaling implicates PTPRZ1 as a potential schizophrenia susceptibility gene. *Mol Psychiatry* 13, 162–172, doi:10.1038/sj.mp.4001991 (2008).

79 Suriano, C. M. et al. Adeno-associated virus (AAV) reduces cortical dendritic complexity in a TLR9-dependent manner. *bioRxiv*, 2021.2009.2028.462148, doi:10.1101/2021.09.28.462148 (2021).

80 Johnston, S. et al. AAV ablates neurogenesis in the adult murine hippocampus. *Elife* 10, doi:10.7554/eLife.59291 (2021).

81 Heng, J. I., Viti, L., Pugh, K., Marshall, O. J. & Agostino, M. Understanding the impact of ZBTB18 missense variation on transcription factor function in neurodevelopment and disease. *J Neurochem* 161, 219–235, doi:10.1111/jnc.15572 (2022).

82 Nie, F. et al. Schizophrenia risk candidate EGR3 is a novel transcriptional r

10

20

30

40

50

regulator of RELN and regulates neurite outgrowth via the Reelin signal pathway in vitro. *J Neurochem* 157, 1745–1758, doi:10.1111/jnc.15225 (2021).

83 Chang, S. Y. et al. Hippocampal changes in mice lacking an active prohormone convertase 2. *Hippocampus* 30, 715–723, doi:10.1002/hipo.23195 (2020).

84 Hamilton, K. A. et al. Mice lacking the transcriptional regulator Bhlhe40 have enhanced neuronal excitability and impaired synaptic plasticity in the hippocampus. *PLoS One* 13, e0196223, doi:10.1371/journal.pone.0196223 (2018). 10

85 Serrano-Saiz, E., Leyva-Diaz, E., De La Cruz, E. & Hobert, O. BRN3-type POU Homeobox Genes Maintain the Identity of Mature Postmitotic Neurons in Nematodes and Mice. *Curr Biol* 28, 2813–2823 e2812, doi:10.1016/j.cub.2018.06.045 (2018). 20

86 Li, H. & Richardson, W. D. Evolution of the CNS myelin gene regulatory program. *Brain Res* 1641, 111–121, doi:10.1016/j.brainres.2015.10.013 (2016).

87 Choy, F. C., Klaric, T. S., Leong, W. K., Koblar, S. A. & Lewis, M. D. Reduction of the neuroprotective transcription factor Npas4 results in increased neuronal necrosis, inflammation and brain lesion size following ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 36, 1449–1463, doi:10.1177/0271678X15606146 (2016). 30

88 Krieger, T. G. et al. Mutations in thyroid hormone receptor alpha1 cause premature neurogenesis and progenitor cell depletion in human cortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 22754–22763, doi:10.1073/pnas.1908762116 (2019).

89 Tischmeyer, W. & Grimm, R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55, 564–574, doi:10.1007/s000180050315 (1999). 40

90 Chen, F. et al. Clusterin secreted from astrocyte promotes excitatory synaptic transmission and ameliorates Alzheimer's disease neuropathology. *Mol Neurodegener* 16, 5, doi:10.1186/s13024-021-00426-7 (2021).

91 Remesal, L. et al. PBX1 acts as termi 50

nal selector for olfactory bulb dopamine rgic neurons. *Development* 147, doi:10.1242/dev.186841 (2020).

92 Sainio, M. T. et al. Absence of NEFL in patient-specific neurons in early-onset Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neurol Genet* 4, e244, doi:10.1212/NXG.0000000000000244 (2018).

93 Minj, E., Yadav, R. K. & Mehan, S. Targeting Abnormal Nrf2/HO-1 Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Current Insights on Drug Targets and Influences on Neurological Disorders. *Curr Mol Med* 21, 630–644, doi:10.2174/1566524021666210111104920 (2021).

94 Nandi, S. et al. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34. *J Biol Chem* 288, 21972–21986, doi:10.1074/jbc.M112.442731 (2013).

95 Munoz-Garcia, J. et al. The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics* 11, 1568–1593, doi:10.7150/thno.50683 (2021).

96 Pollen, A. A. et al. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat Biotechnol* 32, 1053–1058, doi:10.1038/nbt.2967 (2014).

97 Han, S. et al. Proneural genes define ground-state rules to regulate neurogenic patterning and cortical folding. *Neuron* 109, 2847–2863 e2811, doi:10.1016/j.neuron.2021.07.007 (2021).

98 Moreau, M. X., Saillour, Y., Cwetsch, A. W., Pierani, A. & Causeret, F. Single-cell transcriptomics of the early developing mouse cerebral cortex disentangle the spatial and temporal components of neuronal fate acquisition. *Development* 148, doi:10.1242/dev.197962 (2021).

99 Clement, O. et al. Rp58 and p27(kip1) coordinate cell cycle exit and neuronal migration within the embryonic mouse cerebral cortex. *Neural Dev* 12, 8, doi:10.1186/s13064-017-0084-3 (2017).

100 Luo, W. et al. Recurrent rewiring of the adult hippocampal mossy fiber system

10

20

30

40

50

by a single transcriptional regulator, Id2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, doi:10.1073/pnas.2108239118 (2021).

101 Le Dreau, G. et al. E proteins sharpen neurogenesis by modulating proneural bHLH transcription factors' activity in an E-box-dependent manner. *Elife* 7, doi:10.7554/eLife.37267 (2018).

102 Gene therapy at the crossroads. *Nat Biotechnol* 40, 621, doi:10.1038/s41587-022-01346-7 (2022).

103 Ferla, R. et al. Low incidence of hepatocellular carcinoma in mice and cats treated with systemic adeno-associated viral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 20, 247–257, doi:10.1016/j.omtm.2020.11.015 (2021).

104 Irie, T. et al. Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke. *bioRxiv*, 2021.2009.2026.461831, doi:10.1101/2021.09.26.461831 (2021).

105 Matsuda, T. et al. Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion. *Neuron* 101, 472–485 e477, doi:10.1016/j.neuron.2018.12.010 (2019).

106 Matsuda, T. & Nakashima, K. Clarifying the ability of NeuroD1 to convert mouse microglia into neurons. *Neuron* 109, 3912–3913, doi:10.1016/j.neuron.2021.11.012 (2021).

107 Sun, Y. et al. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365–376, doi:10.1016/s0092-8674(01)00224-0 (2001).

108 Livingston, J. et al. Direct reprogramming of astrocytes to neurons leads to functional recovery after stroke. *bioRxiv*, 2020.2002.2002.929091, doi:10.1101/2020.02.02.929091 (2020).

109 Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 36, 411–420, doi:10.1038/nbt.4096 (2018).

110 Ulgen, E., Ozisik, O. & Sezerman, O.

U. pathfindR: An R Package for Comprehensive Identification of Enriched Pathways in Omics Data Through Active Subnetworks. *Front Genet* 10, 858, doi:10.3389/fgene.2019.00858 (2019).

111 Kuleshov, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44, W90–97, doi:10.1093/nar/gkw377 (2016).

112 Okawa, S., Angarica, V., Lemischka, I. et al. A differential network analysis approach for lineage specifier prediction in stem cell subpopulations. *npj Syst Biol Appl* 1, 15012 (2015).
[0305]

実施例7：運動皮質アストロサイトを標的とした神経細胞系列変換により、ALSマウスモデルでの運動症状の進行が遅延される

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動皮質の深層にある上位運動神経細胞の死、ならびにそれらの神経支配の標的、脳幹及び脊髄にある下位運動神経細胞の死にも関連している。脊髄運動神経細胞は、骨格、内臓及び心筋を神経支配し、それらの喪失は、筋肉の脱神経及び萎縮を引き起こし、これは最終的に呼吸筋不全による死に至る¹。死の背景となる仮説は、ALSの病理が脊髄の下位運動神経細胞で始まることを示唆しており、これは、運動皮質の深層における上位運動神経細胞の進行性神経変性につながる^{2、3}。より最近では、グルタミン酸興奮毒性が運動皮質で始まり、脊髄に広がって下位運動神経細胞の死を引き起こすことを代わりに示唆する、死順行性モデルが提案されている^{4～6}。実際、ALS患者では、経頭蓋磁気刺激（TMS）により、皮質興奮性亢進が臨床運動症状の前に生じることが明らかになる⁷。同様に、hSOD1^{G93A}トランスジェニック動物では、樹状突起退行、脊椎喪失及び過剰興奮性が、運動症状の発現の前に運動皮質で観察される⁸。特に、UMN死は、疾患の進行を開始させる可能性がある。実際、症状発症前のSOD1^{G93A}ラットの運動皮質における変異型SOD1のノックダウンは、疾患の進行を遅延させ、生存期間を延長させ、LMNと神経筋接合部変性を遅延させる⁹。また、hSOD1^{G93A}のトランスジェニックにおける新皮質神経細胞のAAV媒介性逆行性標識により、P60での上位MN変性及び層II/IIIの尖端樹状突起の喪失が明らかになった¹⁰。最後に、hSOD1^{G93A}マウスの基底前脳でコリン作動性神経細胞の喪失の証拠も存在するが、これが上位MN変性の前または後に起こるかどうかは明らかではない¹¹。

[0306]

死順行性モデルはまた、運動皮質における病理が脊髄疾患に先行するだけでなく、死順行性も推進させ得ることも提示した。このモデルとの相関として、上位運動神経細胞の死を防ぐことによって、疾患の進行が失速する可能性があることが示唆されている。この発見と一致して、症状発症前のhSOD1^{G93A}ラットの運動皮質における変異SOD1のノックダウンは、疾患の進行を遅延させ、生存期間を延長させ、下位運動神経細胞と神経筋接合部変性を遅延させる⁹。更に、SOD1^{G93A}ラットの運動皮質に移植されたNPCは、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）を分泌するアストロサイトに分化し、UMN及びLMNの両方の死を遅延させる¹²。最後に、hSOD1^{G93A}マウスにおいて低活性である皮質Pvalb⁺GABA作動性神経細胞の化学遺伝学的刺激は、運動神経細胞の興奮毒性死を減少させ、運動機能を保存する¹³。

[0307]

ALSにおける神経変性がアストロサイトにおける病原性変化の非細胞自律的な結果であるという考えへの支持が高まっている^{14、15}。正常な恒常性状態では、アストロサ

10

20

30

40

50

イトは、ニューロンの健康を維持するために栄養素及び神経保護分子を提供する¹⁶。しかしながら、病理学的な炎症促進状態では、アストロサイトは反応性形質転換を起こし、神経変性を引き起こす神経毒性分子を生成し始める¹⁷。神経炎症は、まずA1アストロサイトを活性化するサイトカインを分泌する、炎症促進性ミクログリアによって引き起こされる^{14、15、18}。逆に、A2アストロサイトは、抗炎症サイトカインによって活性化され、応答して、神経栄養因子を分泌し、神経細胞生存をサポートする^{17、19}。興味深いことに、ALS患者由来のヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)は、炎症誘発性の合図がない場合でも自発的に反応性を高め、補体成分3(C3)遺伝子発現を誘導する、アストロサイトに分化する²⁰。最後に、アストロサイトは、健康な宿主脳に移植されると、ALS動物モデルで神経細胞死を誘導し¹⁶、治療介入のためのこれらの細胞の重要性を強調した。

10

【0308】

ALSアストロサイトに関連する毒性を防ぎ、失われた上位運動神経細胞を置き換える可能性を高めるために、本実施例では、前神経転写因子(TF)Ascl1を使用して運動皮質アストロサイトを誘導神経細胞(iNeurons)にリプログラミングする、神経細胞系統変換法を採用した²¹。具体的には、プロリン(SP部位)に隣接する6つのセリンがアラニンに変換されAscl1^{SA6}を生成する、変異型のAscl1を使用した。環境での抑制制御が少なかった。アストロサイトからiNeuronへの変換は、アストロサイトの毒性及び皮質の興奮性亢進を低下させることによって、及び／または失われた神経細胞を置き換えることによって、神経修復を促進することができる。ここで、hSOD1^{G93A}マウスの運動皮質においてAscl1^{SA6}によって誘導された神経細胞変換が、寿命及び運動機能に有益な効果を有することが示されている。

20

【0309】

材料及び方法

動物モデル。いずれの実験も、齢及び性別の一致したマウスを使用した。ホモ接合型zsGreenマウスを、zsGreen(Jackson Laboratory:B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J)雄及び雌を飼育することにより作製した。hSOD1^{G93A}(Jackson Laboratory:B6;Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J)雄及び雌同腹仔マウスを、C57BL/6J遺伝子バックグラウンドで維持した。これらのモデルは、実施例6で上述したように飼育及び検証された。

30

【0310】

AAV頭蓋内注射。AAV5-GFAP-iCreプラスミドは、Dr. Faiz's Labから寄贈された。AAV5-GFAP-iCre及びAAV5-GFAP-Ascl1/SA6-t2a-iCreを、VectorBuilder Incによってパッケージ化した。AAV5-CAG-Flex-EGFP(カタログ#51502-AAV5)をAddgeneから購入した。マウスを、イソフルラン(2%、1L/分;Fresenius Kabi、CP0406V2)を用いて麻酔し、ベイトリル(2.5mg/kg;Bayer、02249243)と共に鎮痛性ブプレノルフィン(0.1mg/kg;Vetergesic、02342510)またはトラマドール-HCL(20mg/kg;Chiron、RxN704598)のいずれかを、生理食塩水(0.5ml、Braun、L8001)と皮下注射した。皮質上の頭蓋骨に穿頭孔を穿孔し、定位固定器を使用して、層V領域(AP:+2.15、L/M:±1.7、DV:-1.7)での注入のためにプレグマ及びラムダを識別した。特定のアストロサイト及び変換されたニューロン集団を標識するために、Creドライバ-AAVとCre依存型AAVとを組み合わせた。AAV5-GFAP-iCre及びAAV5-CAG-Flex-EGFPまたはAAV5-GFAP-Ascl1/SA6-t2a-iCreの全容量1µL中の4.8×10⁹GCを、AAV5-CAG-Flex-EGFPと共に、16週齢のSOD1^{G93A}トランスジェニックマウスに注入した。マウスは、21dpi後に殺された。

40

50

【0311】

AAV5-GFAP-iCre及びAAV5-GFAP-Asc11/SA6-t2a-iCreウイルスベクターを、30ゲージの針を備えた5 μ lハミルトンシリンジを用いて10分にわたり1 μ l容量で、運動皮質V領域（AP：+2.15、L/M：±1.7、DV：-1.7）に両側的に注入した。手術を16週目のC57BL/6Jマウスで行い、21dpiで殺し、神経細胞変換率を計数した。同じ注入プロトコルを、対照用の16週齢zsGreenマウス、及び16週齢zsGreen/hSOD1^{G93A}トランスジェニックALSマウスに対して実施した。また、19週齢zsGreen/hSOD1^{G93A}トランスジェニックALSマウスを試験した。これらすべてのマウスについて、実験終点まで、体重、NS、運動行動試験（ロータロッド、握力、及び歩行分析またはcatwalk）を調べることで、疾患の進行を監視した。マウスを横向きに置いた後、30秒以内に起き上がることができなかった場合、マウスを殺した。

10

【0312】

組織の収集、処理、及び切片化。マウスを、灌流の前に、ケタミン（75mg/kg、Narketan、0237499）及びキシラジン（10mg/kg、Rompun、02169592）で麻酔した。心臓内灌流は、氷冷生理食塩水（0.9%NaCl、Braun、L8001）を用いて10ml/分の流量で蠕動ポンプを使用して約20 $\times$ 血液量で行い、続いて、リン酸緩衝生理食塩水（PBS、Wisent、311-011-CL）中の4%パラホルムアルデヒド（PFA、Electron Microscopy Sciences、19208）で約5分間行った。脳を回収し、PBS中の4%PFAに一晩後固定し、次いで、凍結保護のために20%スクロースに移した。脳をLeica CM3050クライオスタット（Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, Ontario, Canada）内で-26℃で凍結させ、Fisherbrand（商標）Superfrost（商標）プラス顕微鏡スライド（Thermo Fisher Scientific、12-550-15）上に収集することにより、30 μ mの冠状切片に切断した。

20

【0313】

体重及び神経細胞スコア（NS）。体重は頭蓋内注射の前に測定し、エンドポイントまで毎週体重を測定し続けた。SOD1に対するNS（0~4）は、以下の4つの条件（a）尾で吊り下げられる、b）歩く、c）横向きにマウスを置いたときに起き上がるのかかる時間を調べる、の下でマウスを観察することによって週1回割り当てられた。NS0は、発症前段階であった。NS1は、ALS表現型を開始した。症候性段階は、マウスは正常に歩行しているが、後肢が正中線に向かって縮められたているか、または部分的に縮められている場合であった。NS2は、不全麻痺の発症であった。動物は歩くことができるが、歩くときに趾が下方に丸まる。NS3では、マウスは歩くことができるが、後肢は前進運動のために使用されなかった。NS4は、動物が10秒間で立ち上がることができない、人道的なエンドポイントであった。

30

【0314】

運動協調解析。運動協調、強度及びバランスをロータロッド装置で評価した。データを記録する1週間前に、マウスはロータロッドでの訓練を開始した。マウスをシリンダー上に置き、2rpmで回転を開始した。180秒以内に、回転速度は1分間18rpmまで上昇した。運動神経細胞の症状の発生と共に、動物は弱くなり、センシングプラットフォーム上に落下した。落下時間は、磁気スイッチにより検知され、実験の最後にディスプレイに表示される。ロータロッドでの各週の3回の試験の平均を評価し、グループ成績を比較した。

40

【0315】

握力。握力計（Bioseb（商標））を使用して神経筋機能を調べた。マウスを、20°のグリッドホルダの角度で100 $\times$ 80mmにわたって尾で保持した。マウスがグリッドをしっかりと把持したら、グリッドを離すまで力センサの軸に沿って引っ張った。握力試験を、ラウンド間にホームケージに5分間置き、1回の試験を3回にわけて行った。

50

すべての握力試験を、体重に対して正規化した。

【0316】

歩行分析。歩行異常を、マウスが長さ50cm、幅10cmの通路を歩行している間に、マウスのフットプリントのパターンを分析することにより評価した。前肢に赤色染料を塗り、後肢に青色染料を塗った。フットプリントのパターンを、3つのステップパラメータ、1) ストライド長、各ストライド間の前方移動の平均距離の測定、2) スウェイ距離、左右の後フットプリントの間の平均距離の測定、3) スタンス長、左右の前フットプリントから右または左後ろフットプリントまでの平均距離の測定について分析した。

【0317】

CatWalk XT (登録商標)。今回の実験では、CatWalk (登録商標) (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) バージョン11を歩行評価に使用した。歩行パラメータを捕捉するために使用したCatWalk (登録商標) 歩行分析システムは、照明を当てたフットプリントを使用する。マウスのペインティングされた肢とは異なり、ALSマウスは、ガラス床通路の開始点に配置され、ホームケージに向かって自発的に自由に歩く。ほとんどの場合、最大6回の試験が実施され、60%の最大速度変動である3回の試験が、分析のために選択された。同じ左肢及び右肢の連続する配置間の距離を分析して、マウスが試験を継続できなくなるまで歩行パラメータを毎週捕捉する。

【0318】

結果

AAV神経細胞リプログラミングベクターのin vivo送達は、ALSマウスの運動機能を保存する

アストロサイトの神経細胞へのリプログラミングは、in vitroではAscl1などの前神経TFによって容易に誘発されるが、in vivoでの神経細胞変換は非効率的なままである。本発明者らは以前、天然型Ascl1と比較して、神経細胞変換を誘導するのにより効率的な変異型Ascl1^{SA6}を使用することにより、運動皮質アストロサイトにおいて神経細胞マーカー発現を誘導するAscl1の能力を高めることができることを示した。グリア原線維酸プロモーター (GFAP) を保有するアデノ随伴ウイルス (AAV) 5を使用して、運動神経細胞アストロサイトでAscl1^{SA6}を発現させた。Rosa-zsGreenレポーターを用いて形質導入された細胞を検出できるように、(v2a)-iCreカセットを含めた。本研究では、以下の2つのコンストラクトを使用した：iCreのみを発現する対照AAV (AAV5-GFAP-iCre、以後iCre)、及びAscl1^{SA6}を発現する試験ベクター (AAV5-GFAP-Ascl1^{SA6}-t2a-iCre、以後Ascl1^{SA6})。2つのAAVを、それぞれ4組のマウスのコホートの運動皮質 (AP: +2.15、L/M: ±1.7、DV: -1.7) に、雄及び雌のRosa-zsGreen (対照) ならびに雄及び雌のhSOD1^{G93A}; Rosa-zsGreen (ALSモデル) マウスに注入した。

【0319】

ALSは消耗性疾患であるため、体重及び運動行動の毎週の測定を使用して、運動皮質アストロサイトにおいて神経原性TFであるAscl1^{SA6}の発現の影響を評価した。ベースライン測定を、4つの動物コホートにおける各試験について15週齢で、16週齢でのAAV注射の1週間前に行い、28週間を実験の最終ポイントとして設定した。対照の雄及び雌動物は、実験の期間を通して徐々に体重が増加した (図49)。その一方で、ほとんどのhSod1^{G93A}雄マウス及び雌マウスは、20週齢から体重を減らし始め、この傾向は、動物が人道的エンドポイントに達し、殺される約24週間の時点まで続いた (図1)。驚くべきことに、Ascl1^{SA6}注射後、hSod1^{G93A}マウスは、対照と比較して体重を経時的に維持することがより良好であった。実際に、注射された雄のiCreとAscl1^{SA6}との比較によって、19週間及び22週間で有意差が明らかになり、体重の保持がより良好であることが示された (二元配置ANOVA、それぞれ $p = 0.0470$ 及び $p = 0.0370$)。しかしながら、雌は体重を改善することが

できず、治療効果の差異はこの分野ではよく理解されていない（図49）。最後に、野生型 *Rosa-⁺zsGreen* マウスコホートにおいて、*Ascl1^{SA6}* 注入動物も、測定各週で対照マウスよりも体重が重かった（図49）。しかしながら、出発点の *iCre* マウスのベースライン測定値も低く、体重変化の割合は大きく異ならなかった。

【0320】

まとめると、このデータは、動物の健康に良い影響を及ぼす *Ascl1^{SA6}* 誘導神経細胞変換の能力を裏付ける。

【0321】

NS0（無症候性）からNS4（動物が自ら立ち上がることができなくなり、人道的に殺される）の範囲の値を割り当てる神経細胞スコア（NS）スケールを使用して、動物は、全体的な運動機能の変化を観察された。（図50）。NSは、尾で吊り下げたマウスが歩き、横向きに置いたときに立ち上がるのにどれくらい時間がかかるかを観察することによって毎週評価された。その大部分は28週間の実験の終点の前にNS4に達した *hSOD1^{G93A}* マウスとは対照的に、すべての野生型雄マウス及び雌マウスは、実験を通じてNS0で留まっていた。NSスコアに基づく、雄 *hSOD1^{G93A}* マウスは、雌よりも長く運動機能を保持した。なぜならば、雄は、通常、NS1に37日間留まり、一方、雌 *hSOD1^{G93A}* マウスは、NS1に28日間留まったからである。しかしながら、一旦症状の発現が観察されると、雄雌両方の動物は急速に悪化し、雄及び雌マウスは、NS2では5日間しか過ごさず、NS3では5日間未満しか過ごさず、その後NS4に進み、人道的な殺が生じた²。重要なことに、*Ascl1^{SA6}* 注入コホート内で、2匹の雄マウスが生存し、28週間の実験エンドポイントまでNS0に留まり（図50A）、1匹の雌マウスは26週間までNS1に留まった（図50B）。したがって、*Ascl1^{SA6}* は、16週齢で運動皮質アストロサイトで発現した場合、雄 *hSOD1^{G93A}* マウスの生存時間を改善する。

【0322】

次に、皮質アストロサイトの *Ascl1^{SA6}* 誘導神経細胞リプログラミングが、生存時間を改善するかどうかを尋ねた。驚くべきことに、*iCre* で処置した *hSOD1^{G93A}* 雄マウスの10%のみが28週間の実験のエンドポイントまで生存したが、*Ascl1^{SA6}* で処置した40%は28週間まで生存した（図50C）（*iCre* では生存期間の中央値24日、*Ascl1^{SA6}* では26日、ログランク検定、 $p=0.031$ ）。対照的に、1匹の *Ascl1^{SA6}* で治療した *hSOD1^{G93A}* 雌マウスは、運動性能が改善して28週齢まで生存したが、生存期間の中央値は、*iCre*（26週間）及び *Ascl1^{SA6}*（25週間）で治療した *hSOD1^{G93A}* 雌マウスと同様であった（ログランク検定、 $p=0.465$ ）（図50D）。

【0323】

次いで、ロータロッド試験を使用して、運動協調、バランス、及び運動学習を測定した。ベースライン（15週間）、及び注入後17週間～28週間（実験エンドポイント）で、マウスを18rpmで180秒間にわたって回転させたシリンダー上に置いた。対照マウスは180秒間にわたってシリンダー上に残ったのに対し、*hSOD1^{G93A}* マウスは運動能力が経時的に低下し、対照マウスと比較して、転倒するまでの時間が年齢に依存して減少することを示した。*Ascl1^{SA6}* を注射した *hSOD1^{G93A}* 雄マウスは、対照マウスと比較して、ロータロッド上に留まる能力が経時的に増加し、*iCre* を注射したマウスと比較して19、20及び21で有意な差を示した（図51A）（シダック多重比較試験、それぞれ $p=0.0471$ 、 $p=0.0379$ 及び $p=0.0329$ ）。同様に、*Ascl1^{SA6}* で処置した雌マウスも、対照 *iCre* 処置動物よりも長く、23週齢及び25週齢までロータロッド上に留まることができた（図51B）（シダック多重比較試験、それぞれ $p=0.0359$ 及び $p<0.0001$ ）。

【0324】

握力は、体重に対して正規化されたワイヤーホルダを握るときにかかる最大ピーク力を測定することによって神経筋機能を評価する。*Ascl1^{SA6}* を注射した *hSOD1^G*

9³A雄マウスは、加齢に伴い対照マウスと比較して握力が増加したが、これらの測定値は統計的有意性に達しなかった（図51C）。雌マウスでは、iCreとAsc11^{SA6}の注射後のマウスの間でも握力の有意差は見られなかった（図51D）。

【0325】

運動障害の重要な結果は、歩行の変化であり、これは、長さ50cm、幅10cmの通路に沿ってマウスが歩いた際のフットプリントの 패턴の分析によって評価された。Asc11^{SA6}を注射したhSOD1^{G93A}雄マウスは、iCre処置マウスと比較して歩幅が長くなる明らかな傾向を示したが、統計的有意差には達せず、主な理由は、対照動物の方が早く死亡したため、対照動物を比較に利用できなかったためである（図52A）。逆に、iCreを注射したhSOD1^{G93A}雌マウスは、15週目及び21週目でAsc11^{SA6}で処置した動物と比較して、歩幅が増加した（図52B）（シダック多重比較試験、それぞれ $p=0.0319$ 及び $p=0.0057$ ）。これらの結果は、運動皮質におけるAsc11^{SA6}発現が、16週齢のhSOD1^{G93A}雌マウスにおいて有害である可能性があることを示唆している。しかしながら、野生型雄（図52A）または雌（図52B）野生型マウスにおいて、有害な影響は観察されず、iCreまたはAsc11^{SA6}処置を受けたかどうかにかかわらず、同様の歩幅長を示した。

【0326】

Catwalkは、より多くの歩行異常を自動化された方法で評価するために使用することができる歩行分析システムである。分析は進行中であり、Nの数は依然として低いが、分析の最初のセットでは、16週間で、iCre及びAsc11^{SA6}を注射した対照ならびにhSOD1^{G93A}雄マウスは、右（図53A）及び左（図53B）の後肢の歩幅距離に有意差は示されなかった。同様に、16週間で、iCre及びAsc11^{SA6}を注射した対照ならびにhSOD1^{G93A}雌マウスは、右（図53C）及び左（図53D）の後肢の歩幅距離に有意差は示されなかった。

【0327】

19週目でのiCre（対照）及びAsc11^{SA6}での処置後の行動試験

最初の一連の運動行動評価では、iCre及びAsc11^{SA6}を、症状発症の開始時である16週齢で投与した。治療目的のためのより関連する質問は、疾患過程の後期段階で送達されたときに、Asc11^{SA6}が運動機能を改善することができるかどうかである。実際、ALSの患者は、初期症状の発現から正式な診断まで平均で10～16か月の遅延を経験しており²³、このことは、神経学的症状が明確に明らかになるまで病気が進行した場合にのみ、治療介入が可能になることを意味する。したがって、19週間でhSOD1^{G93A}マウスにAsc11^{SA6}を投与すると、運動症状の進行を改善または予防できるかどうかの問題となる。ベースライン評価を、hSOD1^{G93A}マウスにおいて18週齢で行い、重量測定及び行動試験を、運動皮質へのiCre及びAsc11^{SA6}の注入後に毎週に行った。

【0328】

16週間の注射で示されるように、19週目で注射されたhSOD1^{G93A}雄（図54A）及び雌（図54B）マウスは、疾患の進行と共に経時的に体重を連続的に失った。Asc11^{SA6}で処置した雄マウスは、iCre対照と比較して、経時的に体重が増加する傾向を示した（図54A）。実際には、Asc11^{SA6}注射雄マウスは28週間で60%の生存率を示したが、iCre注射雄マウスでは0%であった。しかしながら、iCre対照の動物の数がまだ少なすぎるため、統計試験を行うことはできなかった（ $N=2$ ；図6A）。一方では、iCreまたはAsc11^{SA6}のいずれかを注射した雌hSOD1^{G93A}マウスは、体重を変化させなかったが、Asc11^{SA6}注射雌マウスは26週間までの生存率が35%を示したのに対し、iCre注射雌マウスは0%だった（図54B）。

【0329】

19週間の注射が運動機能に及ぼす影響を評価するために、神経細胞スコアアッセイを再度適用した。hSOD1^{G93A}雄及び雌マウスでは、運動症状の重症度が徐々に上昇

し、神経細胞スコアとの相関が、18週目のベースライン測定から疾患または実験のエンドポイントまで増加する(図55)。A s c l 1^{SA6}及びi C r eで処置した動物のいずれにおいても、h S O D 1^{G93A}雄マウスは、23週目までNS1に留まり、雌マウスは24週目までNS1に留まった。1匹のA s c l 1^{SA6}で処置した雄マウスは、殺されるまでNS0に留まり、他のマウスはNS2により長く留まった(図55A)。更に、1匹の雌のh S O D 1^{G93A}マウスは、26週目までNS2に留まった(図55B)。これらの結果は、h S O D 1^{G93A}マウスにおける神経細胞スコアの進行に関してA s c l 1^{SA6}送達による機能的な有益性のいくつかの証拠を提供している。

【0330】

19週目で送達した際のh S O D 1^{G93A}マウスの生存に対するi C r e及びA s c l 1^{SA6}の影響も評価した。i C r e及びA s c l 1^{SA6}で処置した雄マウスの寿命の統計分析では、有意差は明らかではなかった(図55C)。特に、A s c l 1^{SA6}で治療した雄マウスの60%は24週目まで生存し、他の雄マウスは28週目に殺されるまで症状なく生存し、通常の生存期間はh S O D 1^{G93A}マウスを上回った(図55C)。19週目で注射されたh S O D 1^{G93A}マウスの雌コホートにおいて、A s c l 1^{SA6}を注射した1匹の動物は27週目まで生存したが、全体としての生存中央値は、i C r eでは25週間であり、A s c l 1^{SA6}では24週間であり、生存時間の統計学的な差は認められなかったことに留意されたい(ログランク検定、 $p = 0.3503$)(図55C)。

【0331】

次に、運動機能のより鋭敏な尺度としてロータロッド上に落ちるまでの待ち時間を調べた。h S O D 1^{G93A}雄マウスにおける19週目のA s c l 1^{SA6}による処置は、i C r e群と比較してロータロッド上で過ごす時間が長くなる傾向を示した(図56A)。対照的に、C r eまたはA s c l 1^{SA6}で19週目に処置された雌h S O D 1^{G93A}マウスは、ロータロッド上でまったく同じ時間を過ごし、2つの群において運動に差がないことが示唆された(図56B)。

【0332】

握力も、体重に対して正規化された神経筋機能の評価として測定した。19週目でA s c l 1^{SA6}を注射したh S O D 1^{G93A}雄マウスは、対照マウスと比較して、年齢が上がるにつれて握力が増加する傾向にあったが、これらの測定値は、対照群の試料サイズが小さいため、統計的有意性に達しなかった(図56C)。雌マウスでも、19週のi C r eとA s c l 1^{SA6}で処置したh S O D 1^{G93A}マウスの間に握力の有意差は見られなかった(図56D)。

【0333】

最後に、C a t w a l kシステムを用いて歩行を分析した。19週でA s c l 1^{SA6}を注射したh S O D 1^{G93A}雄マウスでは、i C r e対照と比較して左右後肢の歩幅長が増加する傾向があったが、対照群のサイズが小さいため、統計的有意性に達しなかった(図57A、図57B)。同様に、A s c l 1^{SA6}を注射した雌マウスのh S O D 1^{G93A}では、左右の歩幅長が19週目でi C r eに対して増加する傾向が示されたが、統計的有意性は達成されなかった(図57C、図57D)。

【0334】

考察

皮質のUMNがALSを変性することを示す証拠が増えていることを考慮すると、疾患の進行を遅らせるために、失われたUMNを置換して、反応性アストロサイト及び興奮毒性の運動神経細胞死を最小限に抑えること²⁴が重要である。本実験では、神経細胞系列変換アプローチを、短いh G F A Pプロモーターを保有するA A V 5を運動皮質に注入して²⁵、変異型A s c l 1 (A s c l 1^{SA6})の発現を駆動することによって使用した。A s c l 1のSP部位のセリンをアラニンに変換すると抑制性リン酸化が阻害され、神経形成電位が上昇し^{26、27}、十分に機能的なG A B A作動性神経細胞が再生される。加えて、最近の実験では、女性及び男性のALS患者が疾患の進行に相関する異なるレ

10

20

30

40

50

ベルの好中球を示すことが判明した²⁸。

【0335】

この実施例のデータは、運動皮質アストロサイトの神経細胞系統変換が、ALSのマウスモデルであるhSOD1^{G93A}トランスジェニックマウスにおける疾患の進行を遅延させ得ることを示している。アストロサイトから神経細胞への変換を促進するために、GFAPを使用して、運動皮質アストロサイトにおいて前神経遺伝子A^{sc}l1 (A^{sc}l1^{SA6})の変異型を発現させた。遺伝子送達には、16週齢のマウスにおいて運動皮質に注入されたアデノ随伴ウイルス5 (AAV5)を用いて、運動症状の発症時、及び運動症状が既に非常に重篤な19週目に達成された。A^{sc}l1^{SA6}を受けた雄マウスは、より良好な（すなわち、より低い）神経細胞スコア及びロータロッドに落下する待ち時間の増加によって明らかのように、体重を維持し、運動機能を維持することがより良好であった。まとめると、これらのデータは、運動皮質のアストロサイトを標的とした神経細胞系統変換が、ALSのマウスモデルにおいて運動症状の発症を遅延させ、寿命を延ばすことができることを示す。

10

【0336】

参考文献

- 1 Turner, M. R. et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 12, 310–322 (2013).
- 2 Dadon-Nachum, M., Melamed, E. & Offen, D. The “dying-back” phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43, 470–477 (2011).
- 3 Fischer, L. R. et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185, 232–240 (2004).
- 4 Eisen, A. et al. Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 917–924 (2017).
- 5 Eisen, A. The Dying Forward Hypothesis of ALS: Tracing Its History. *Brain Sci* 11 (2021).
- 6 Talbot, K. Amyotrophic Lateral Sclerosis: network vulnerability and monosynaptic connections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91, 906 (2020).
- 7 Vucic, S., Nicholson, G. A. & Kiernan, M. C. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540–1550 (2008).
- 8 Ozdinler, P. H. et al. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1^{G93A} transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31, 4166–4177 (2011).
- 9 Thomsen, G. M. et al. Delayed disease

20

30

40

50

onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 34, 15587–15600 (2014).

10 Jara, J. H., Villa, S. R., Khan, N. A., Bohn, M. C. & Ozdinler, P. H. AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. *Neurobiol Dis* 47, 174–183 (2012).

11 Crochemore, C., Pena-Altamira, E., Virgili, M., Monti, B. & Contestabile, A. Disease-related regressive alterations of forebrain cholinergic system in SOD1 mutant transgenic mice. *Neurochem Int* 46, 357–368 (2005).

12 Thomsen, G. M. et al. Transplantation of Neural Progenitor Cells Expressing Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor into the Motor Cortex as a Strategy to Treat Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cells* (2018).

13 Khademullah, C. S. et al. Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 143, 800–810 (2020).

14 Nagai, M. et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10, 615–622 (2007).

15 Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T. & Egan, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608–614 (2007).

16 Qian, K. et al. Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* 8, 843–855 (2017).

17 Kwon, H. S. & Koh, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9, 42 (2020).

18 Liddelow, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487 (2017).

19 Guttenplan, K. A. et al. Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nat Commun* 11, 3753 (2020).

- 20 Taha, D. M. et al. Astrocytes display cell autonomous and diverse early reactive states in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* (2022).
- 21 Masserdotti, G., Gascon, S. & Gotz, M. Direct neuronal reprogramming: learning from and for development. *Development* 143, 2494–2510 (2016).
- 22 Hatzipetros, T. et al. A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *J Vis Exp* (2015). 10
- 23 Richards, D., Morren, J. A. & Pioro, E. P. in *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ed T. Araki) (Exon Publications Copyright: The Authors., 2021).
- 24 Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E. & Robberecht, W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762, 1068–1082 (2006). 20
- 25 Lee, Y., Messing, A., Su, M. & Brenner, M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56, 481–493 (2008). <http://doi.org:10.1002/glia.20622>
- 26 Li, S. et al. RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* 34, 2169–2190 (2014). 30
- 27 Li, S. et al. GSK3 Temporally Regulates Neurogenin 2 Proneural Activity in the Neocortex. *Journal of Neuroscience* 32, 7791–7805 (2012).
- 28 Murdock, B. J., Goutman, S. A., Boss, J., Kim, S. & Feldman, E. L. Amyotrophic Lateral Sclerosis Survival Associates With Neutrophils in a Sex-specific Manner. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 8 (2021).
- 29 Wang, L. L. et al. Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing in vivo. *Cell* 184, 5465–5481. e5416 (2021). 40
- 30 Fischer, K. B., Collins, H. K. & Callaway, E. M. Sources of off-target expression from recombinase-dependent AAV vectors and mitigation with cross-over insensitive ATG-out vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 27001–27010 (2019).
- 31 Basso, M. et al. Mutant copper-zinc s 50

uperoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 288, 15699–15711 (2013).

32 Fruhbeis, C., Frohlich, D., Kuo, W. P. & Kramer-Albers, E. M. Extracellular vesicles as mediators of neuron–glia communication. *Front Cell Neurosci* 7, 182 (2013). 10

33 Wang, L.-L., Garcia, C. S., Zhong, X., Ma, S. & Zhang, C.-L. (2020).

34 Gong Chen, Wen Li, Zongqin Xiang, Liang Xu, Minhui Liu, Qingsong Wang, Wenliang Lei, *bioRxiv* 2020.09.02.279273. DOI: 10.1101/2020.09.02.279273

35 Hol, E. M. et al. Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol Psychiatry* 8, 786–796 (2003). 20

36 Wang, L. L. et al. The p53 Pathway Controls SOX2-Mediated Reprogramming in the Adult Mouse Spinal Cord. *Cell Rep* 17, 891–903 (2016).

37 Gascon, S. et al. Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell* 18, 396–409 (2016). 30

38 Hachem, L. D., Mothe, A. J. & Tator, C. H. Effect of BDNF and Other Potential Survival Factors in Models of In Vitro Oxidative Stress on Adult Spinal Cord-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Biores Open Access* 4, 146–159 (2015).

39 Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24 (2019). 40

40 Arlotta, P. et al. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207–221 (2005).

41 Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. & Macklis, J. D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8, 427–437 (2007).

42 Fogarty, M. J., Noakes, P. G. & Bellingham, M. C. Motor cortex layer V pyramid 50

al neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci 35, 643–647 (2015).

43 Alkaskas, M. R. et al. Poor Corticospinal Motor Neuron Health Is Associated with Increased Symptom Severity in the Acute Phase Following Repetitive Mild TBI and Predicts Early ALS Onset in Genetically Predisposed Rodents. Brain Sci 11 (2021).

10

44 Khademullah, C. S. et al. Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. Brain 143, 800–810 (2020).

45 Liu, Y. et al. Ascl1 Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo. J Neurosci 35, 9336–9355 (2015).

20

46 Chouchane, M. et al. Lineage Reprogramming of Astroglial Cells from Different Origins into Distinct Neuronal Subtypes. Stem Cell Reports 9, 162–176 (2017).

47 Hogg, M. C., Halang, L., Woods, I., Coughlan, K. S. & Prehn, J. H. M. Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 19, 438–445 (2018).

30

【0337】

実施例8：形質導入皮質細胞における Sox9 発現の Ascl1-SA7 抑制。

この実施例は、Ascl1-SA6 変異体による形質導入と比較して、Ascl1-SA7 変異体による形質導入によって直接的系統リプログラミングに、もしあれば、どのような差異が生じるかを決定するために実施した。いずれも、リン酸受容体部位変異の組み込みにより、通常は活性でない可能性がある細胞の状況でも変異型 bHLH 転写因子 Ascl1 が活性を維持できるため、Ascl1 転写因子に対する利点をもたらすことが期待された。

【0338】

Rosa-zsGreen マウスの皮質を、AAV8-GFAPshort-iCre、AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre、AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCre 及び AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA7-t2a-iCre で形質導入し、ここで、上記の実施例に記載されているように、パッケージ化された AAV は、定位手術を使用して Rosa-zsGreen マウスの大脳皮質に注射された。形質導入後 21 日目に、更に上記で説明したように、マウスを 殺にし、皮質組織を分析した。

40

【0339】

図 58 及び図 59 に提供されたデータは、Ascl1-SA7 が、反応性アストロサイトを神経細胞に直接的に系統リプログラミングする際に Ascl1-SA6 と同等に効率的であることを確認する。

50

【0340】

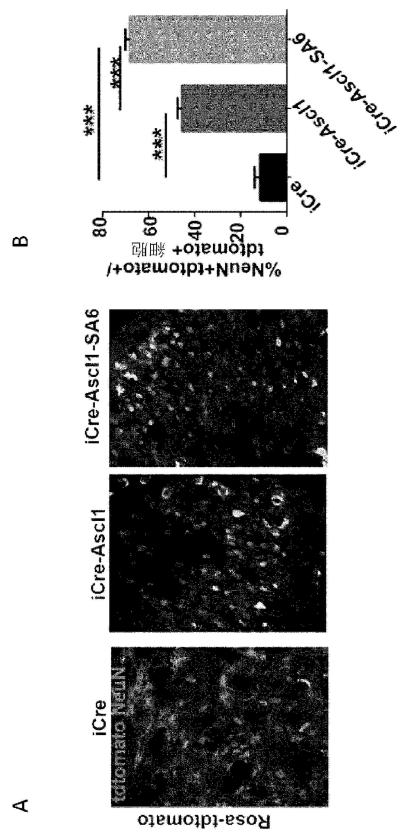
この本明細書に記述されるすべての刊行物、特許及び特許出願は、本発明が関連する当業者の技術レベルを示すものであり、各個別の刊行物、特許、または特許出願は、明確かつ個別に参照により組み込まれることが示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0341】

本発明は説明されたように、同等物が様々に変更されてもよいことは明らかである。そのような変更は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱するとはみなされず、当業者であれば明らかかなすべてのそのような変更は、以下の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【図面】

【図1】



【図2】

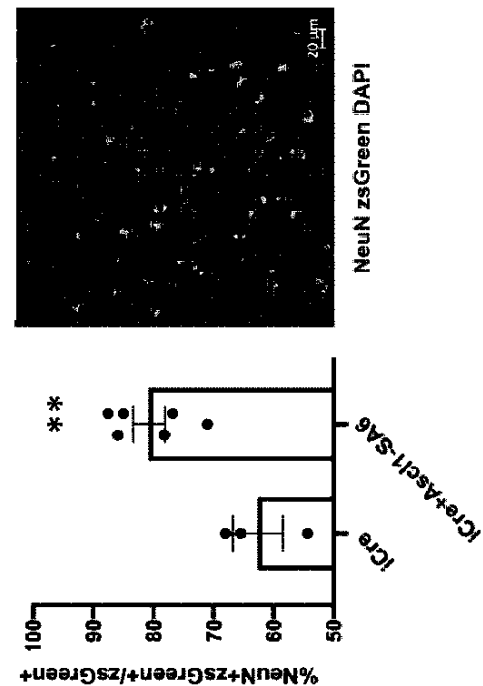


Figure 2

10

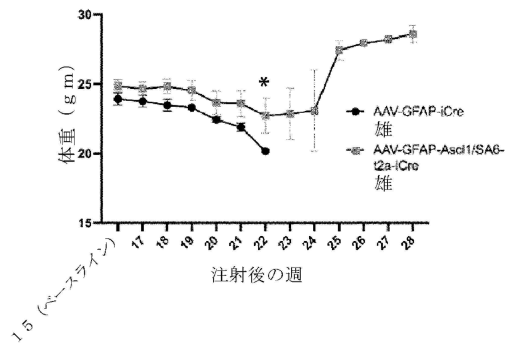
20

30

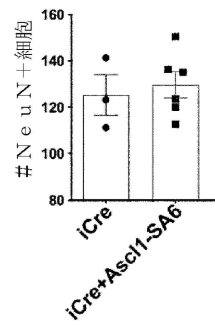
40

50

【図 3】

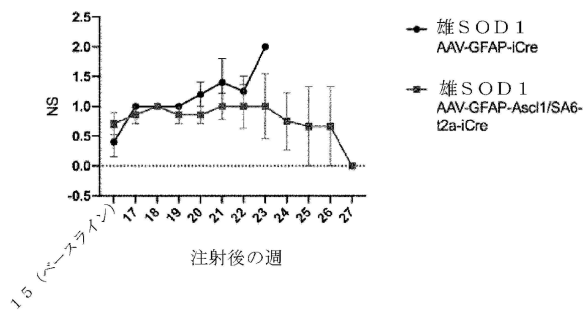


【図 4】

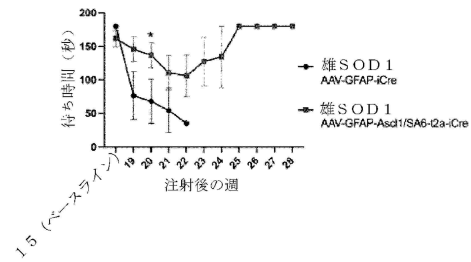


10

【図 5】



【図 6】



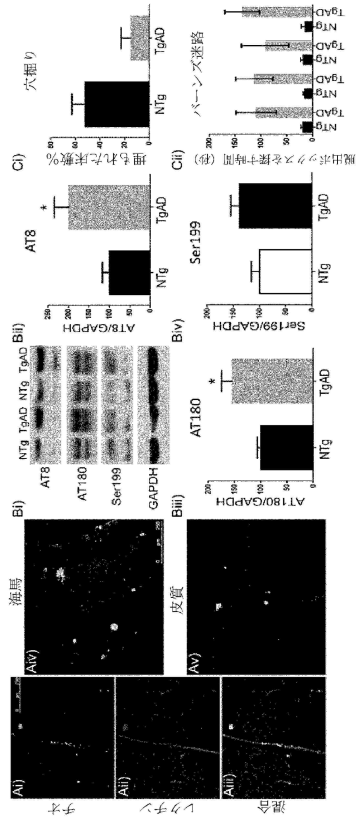
20

30

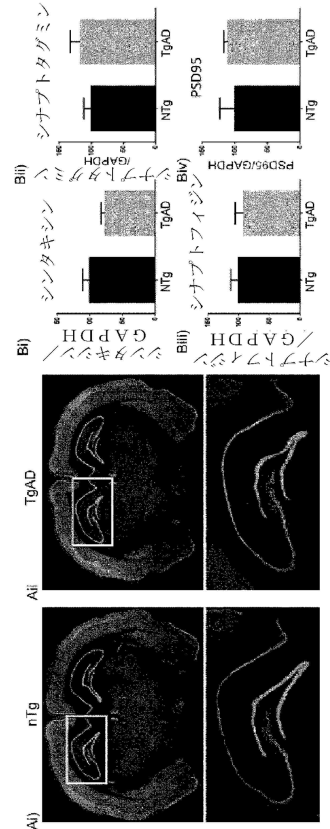
40

50

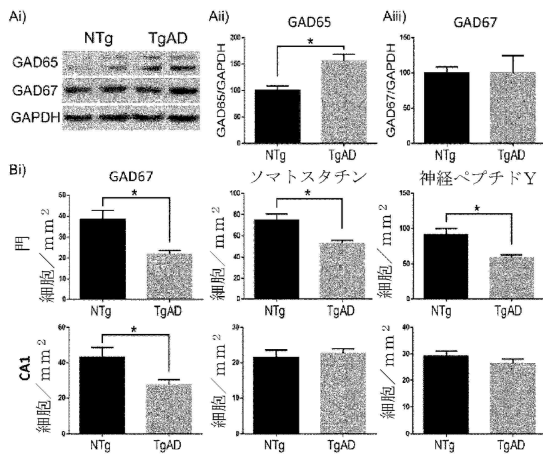
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】

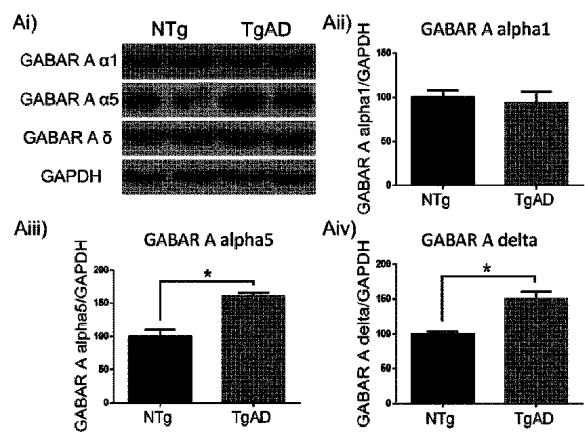
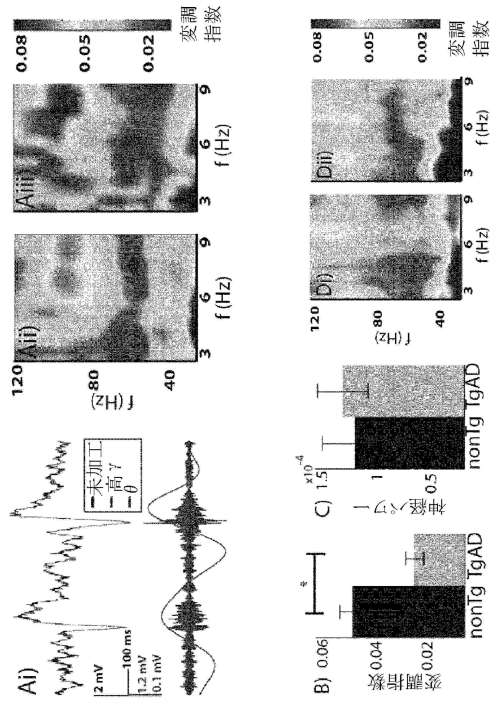
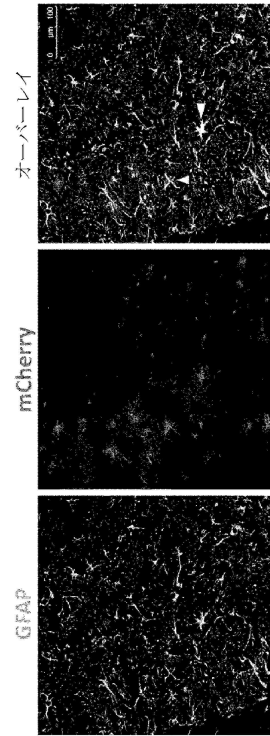


Figure 10

【図 1 1】



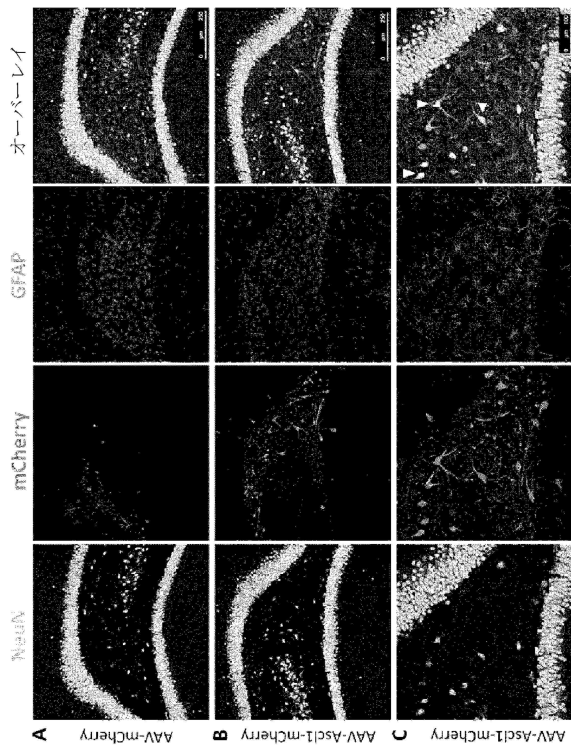
【図 1 2】



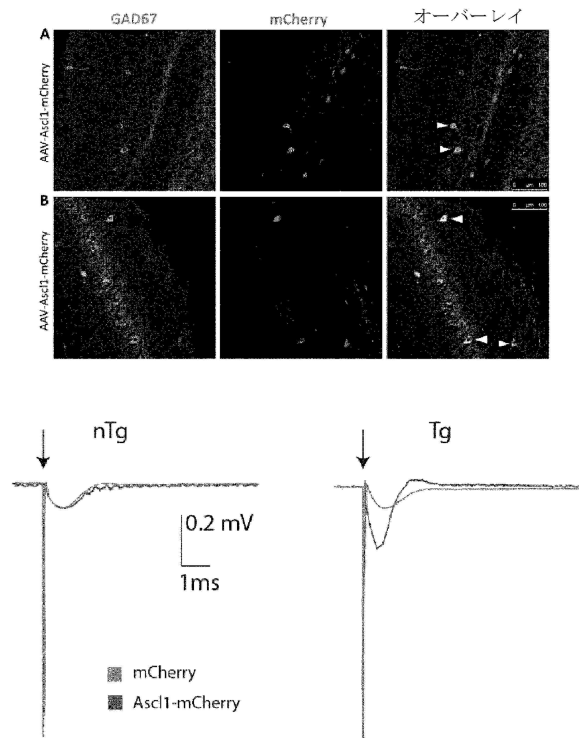
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】

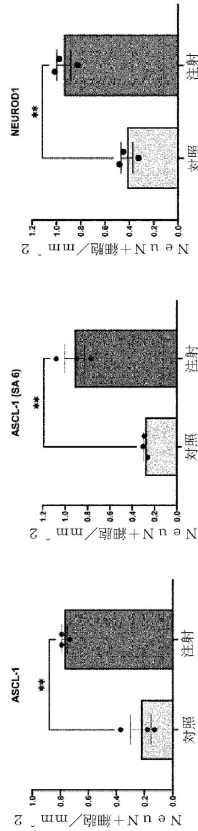


30

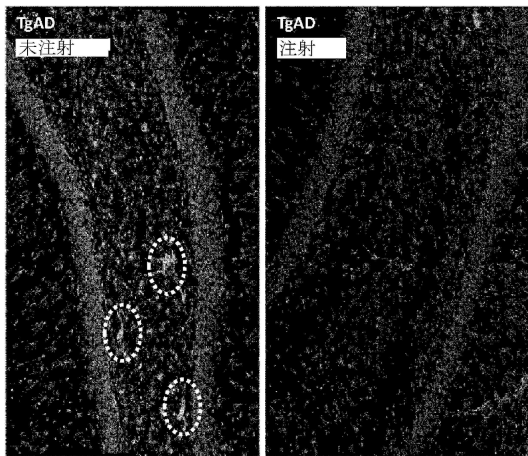
40

50

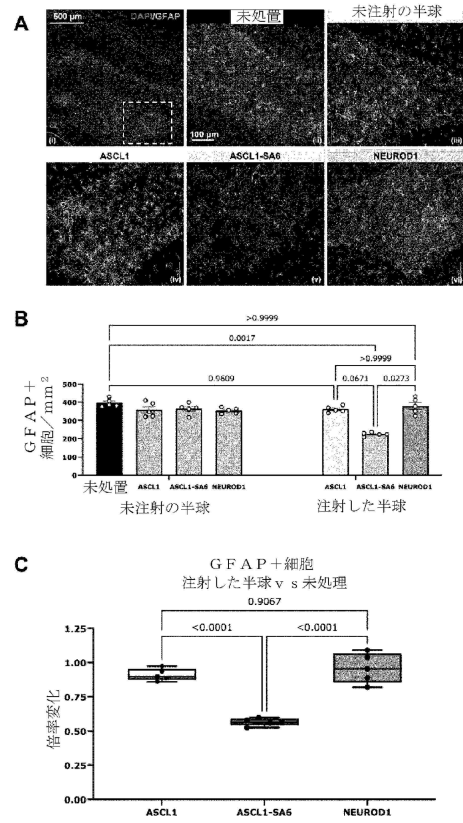
【図 15】



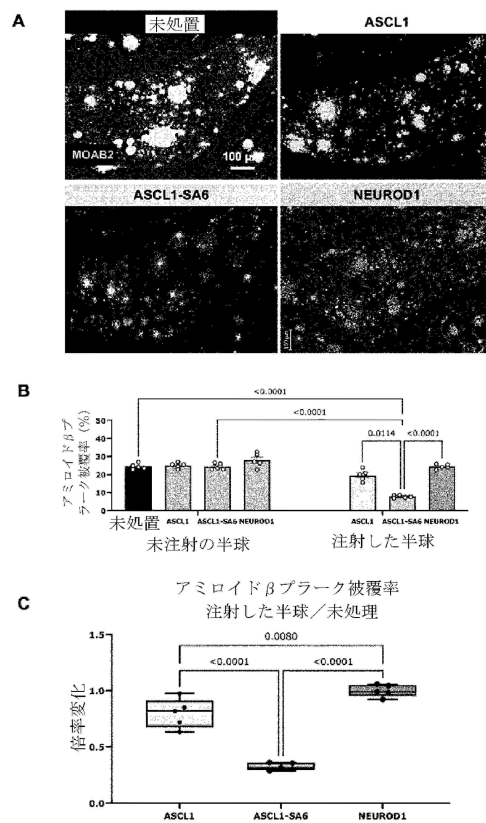
【図 17】



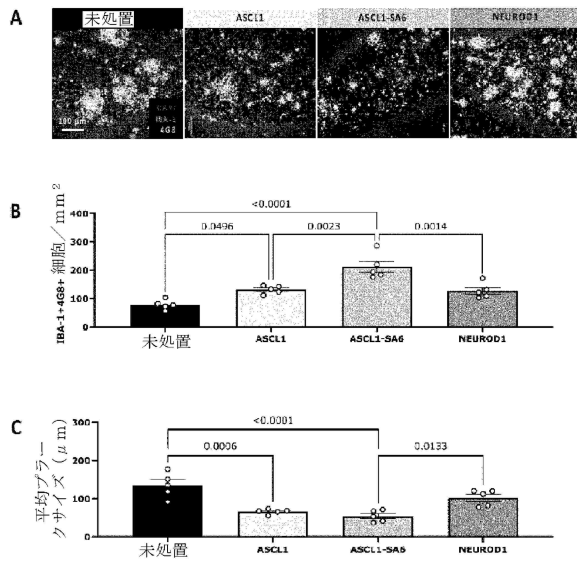
【図 16】



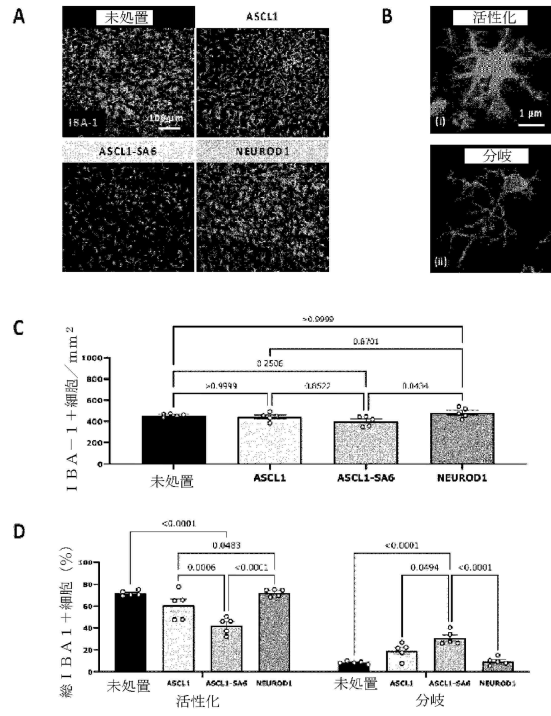
【図 18】



【図 19】



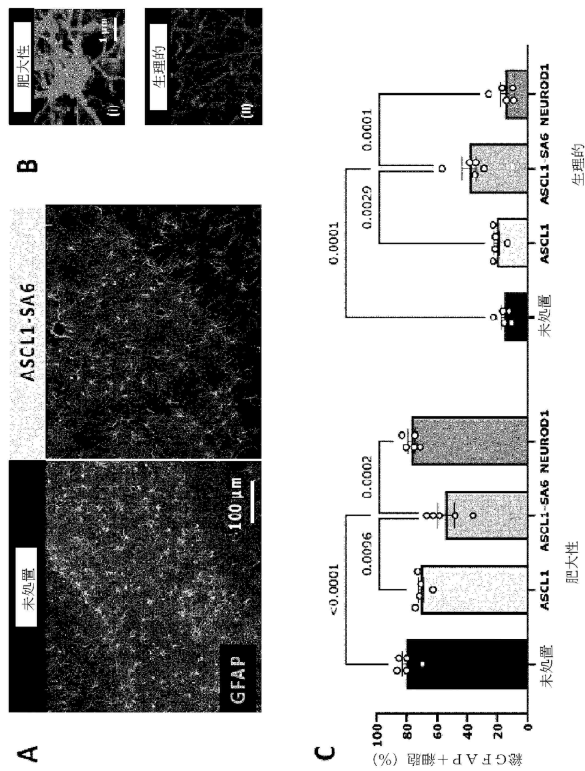
【図 20】



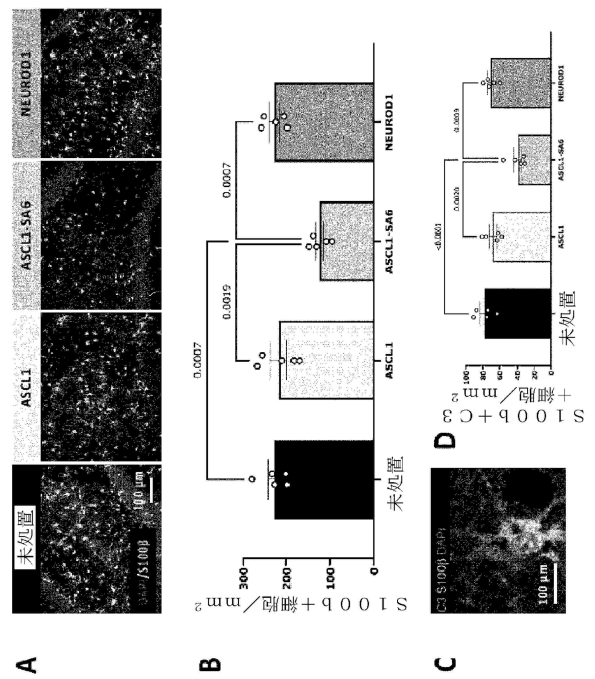
10

20

【図 21】



【図 22】

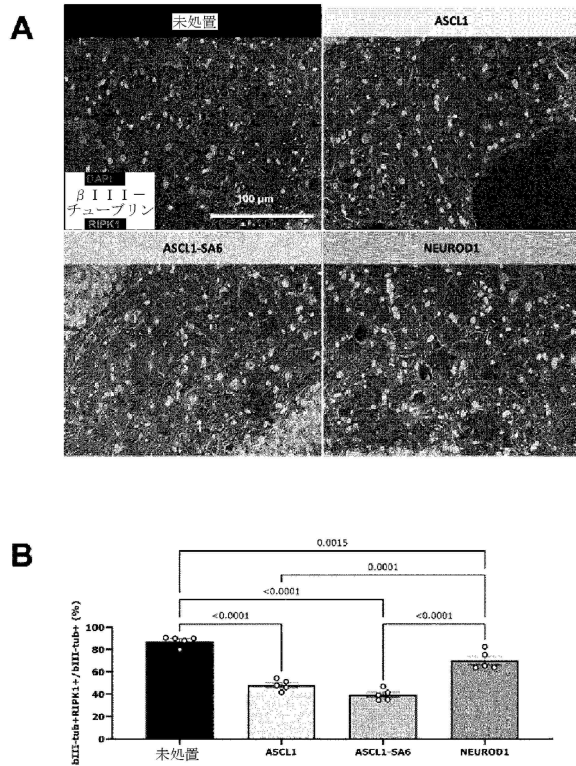


30

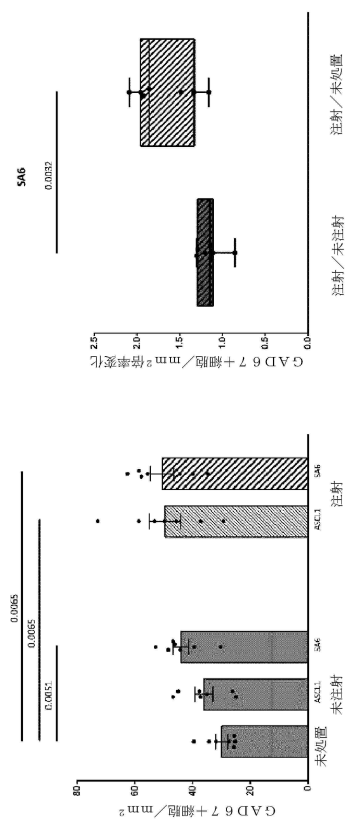
40

50

【図 2 3】



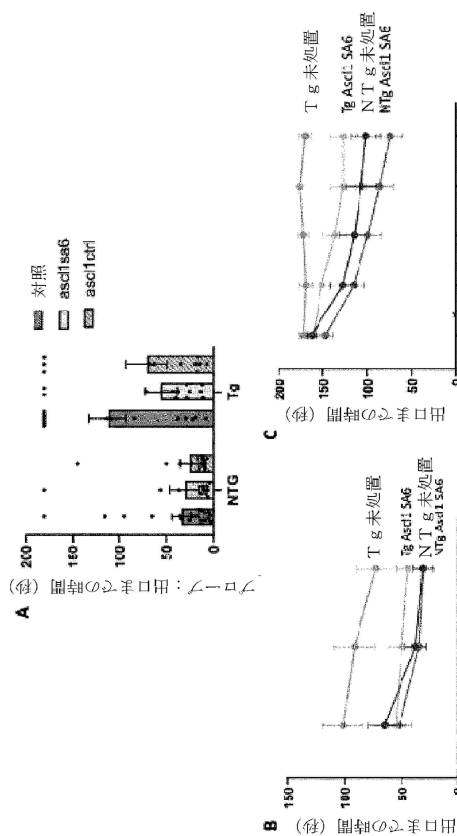
【図 2 4】



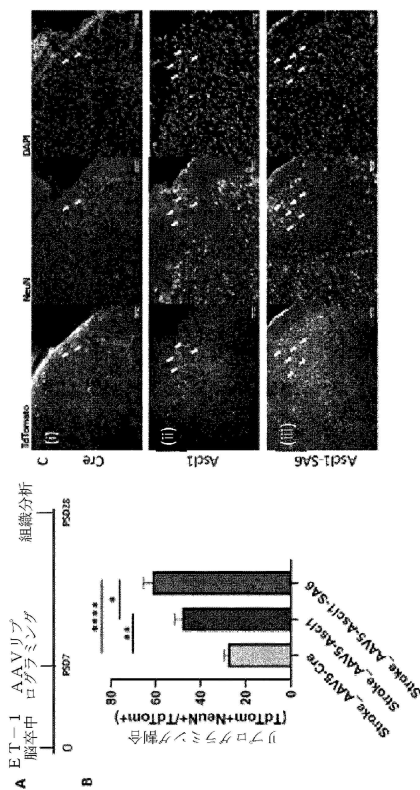
10

20

【図 2 5】



【図 2 6】

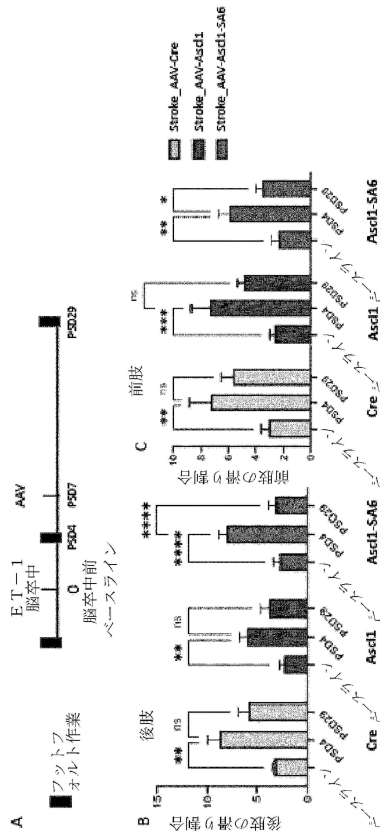


30

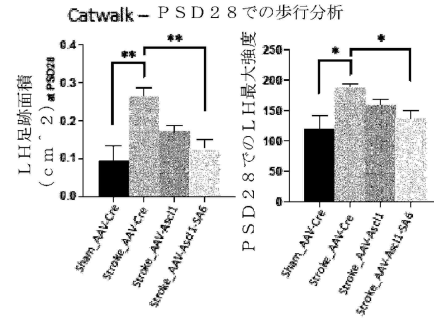
40

50

【図 27】



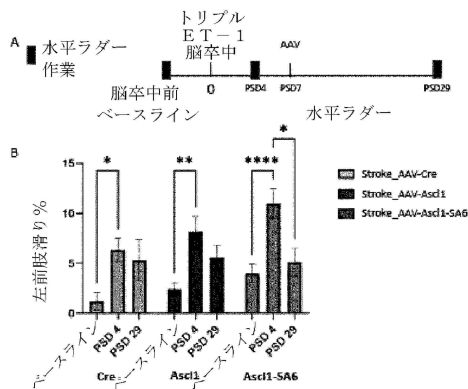
【図 28】



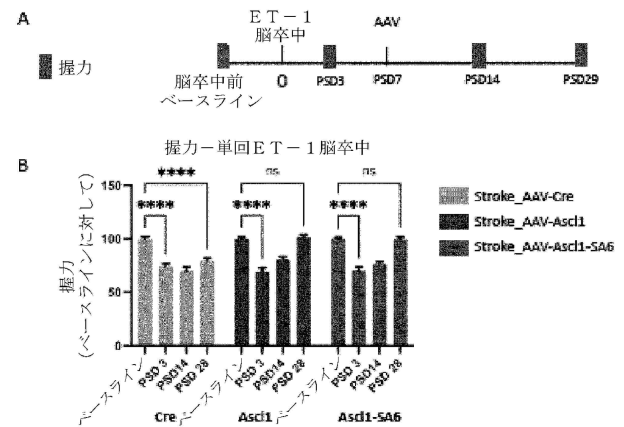
10

20

【図 29】



【図 30】

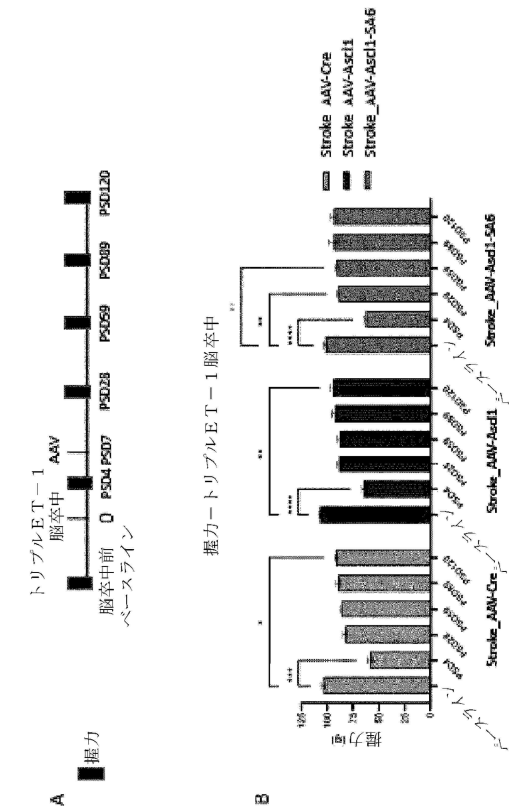


30

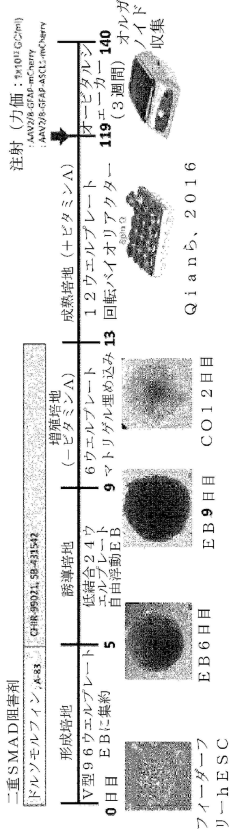
40

50

【図 3 1】



【図 3 2】



【図 3 3】

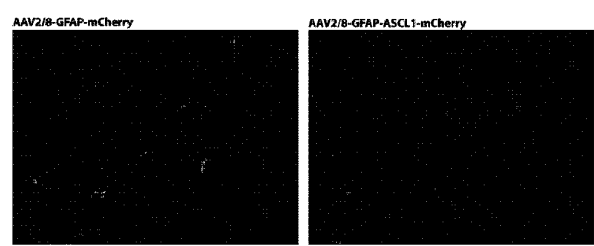


Figure 33

【図 3 4】

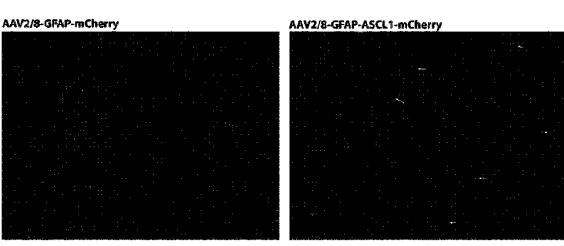


Figure 34

10

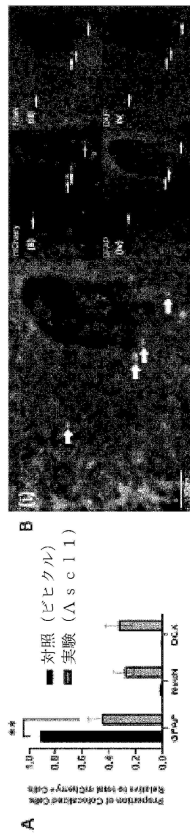
20

30

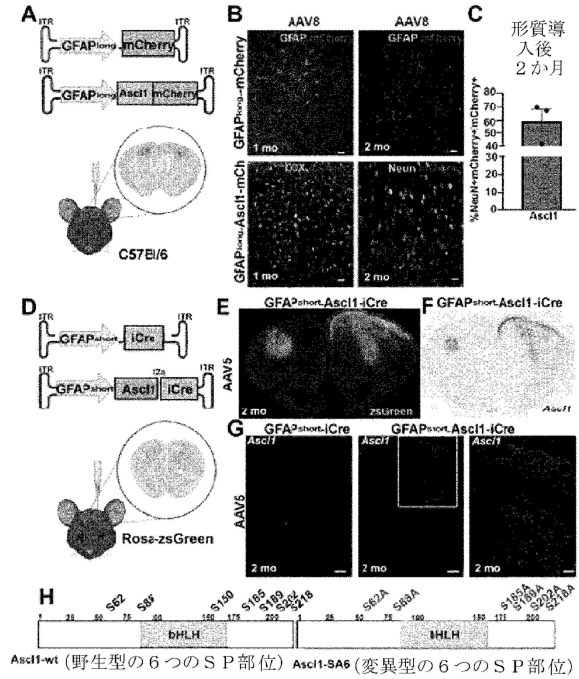
40

50

【図 3 5】



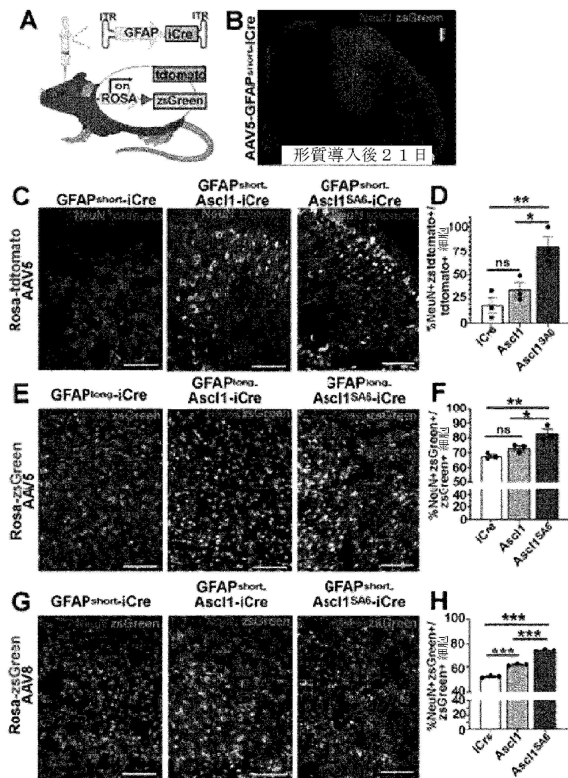
【図 3 6】



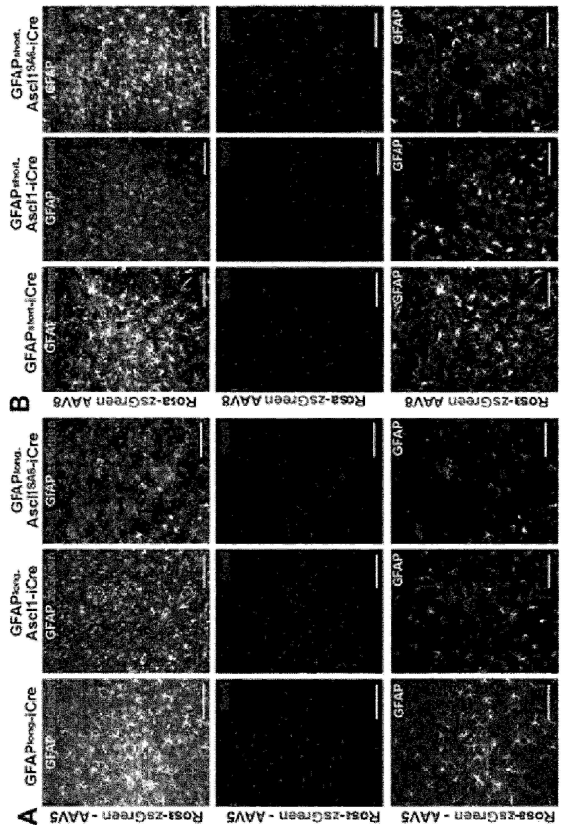
10

20

【図 3 7】



【図 3 8 - 1】

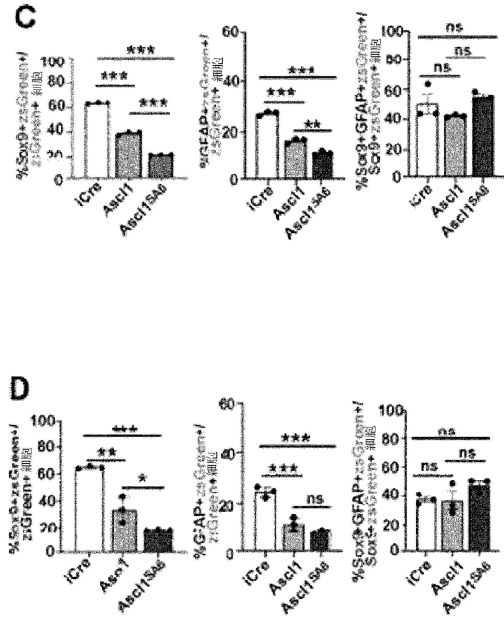


30

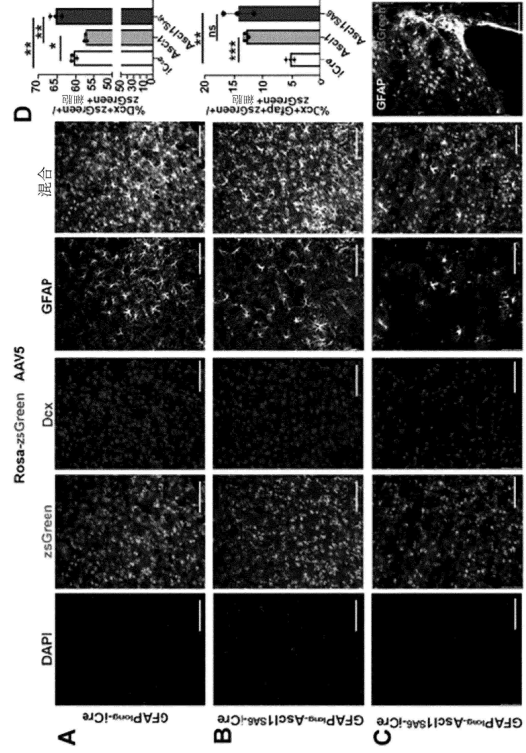
40

50

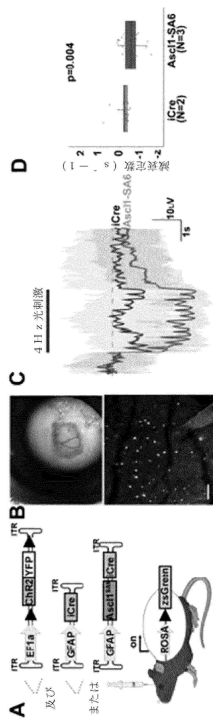
【図 38-2】



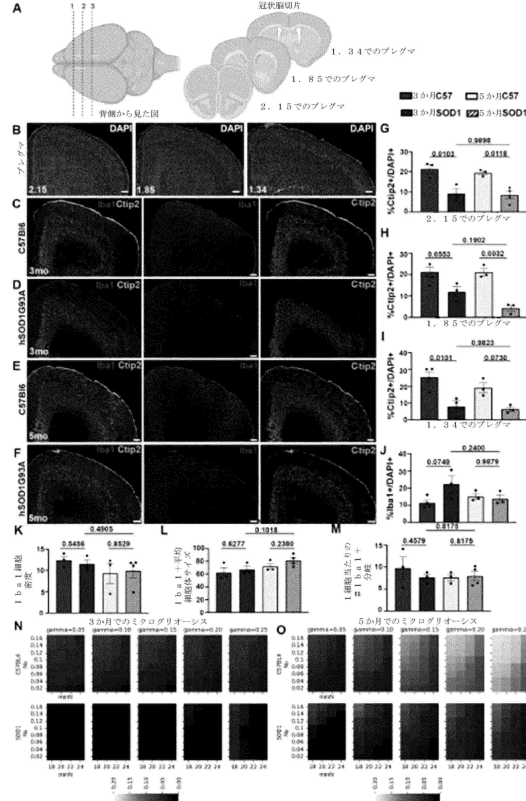
【図 39】



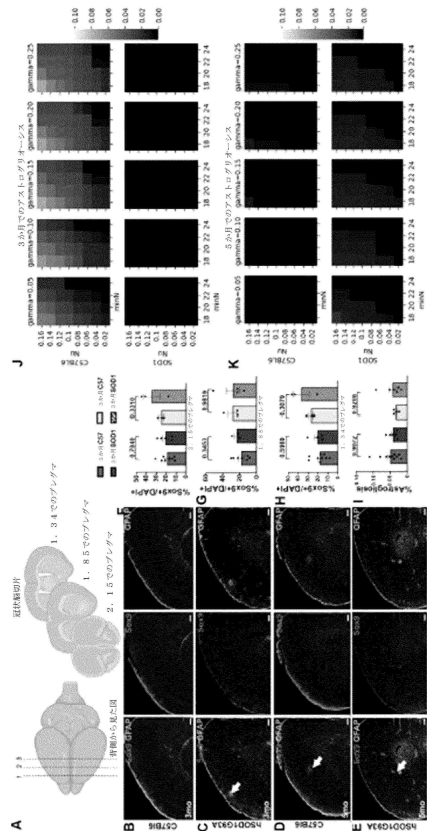
【図 40】



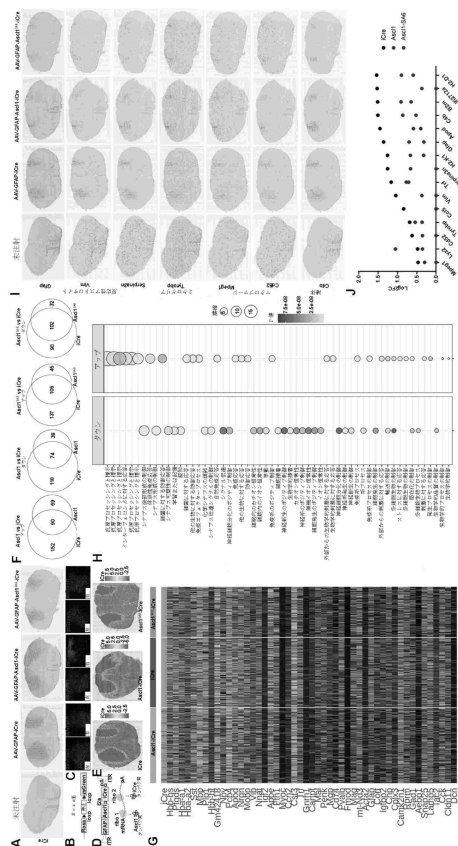
【図 41】



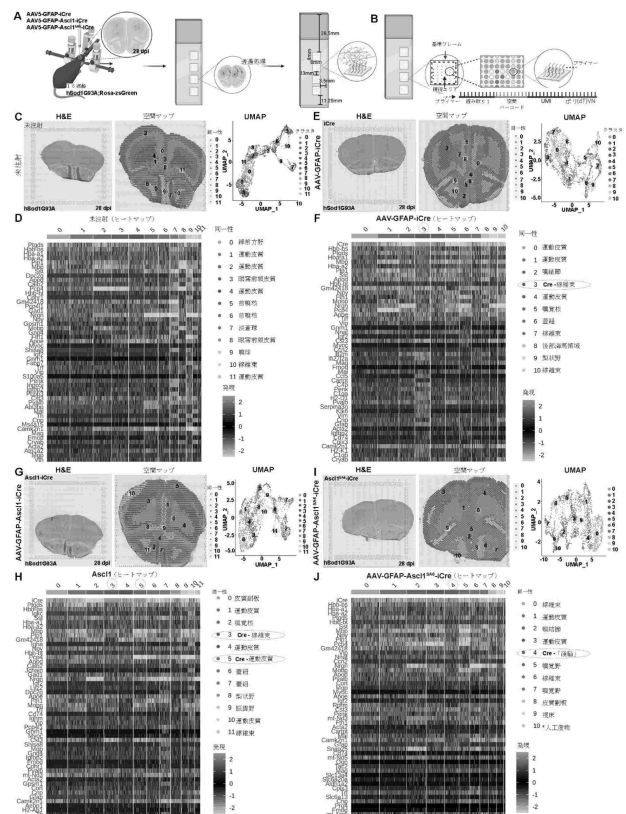
【図 4 2】



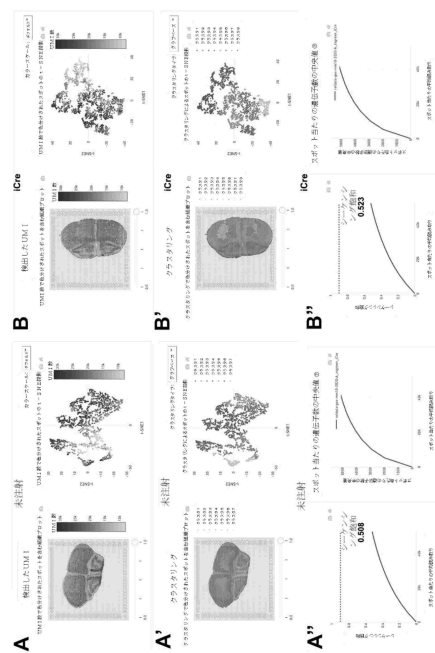
【図 44】



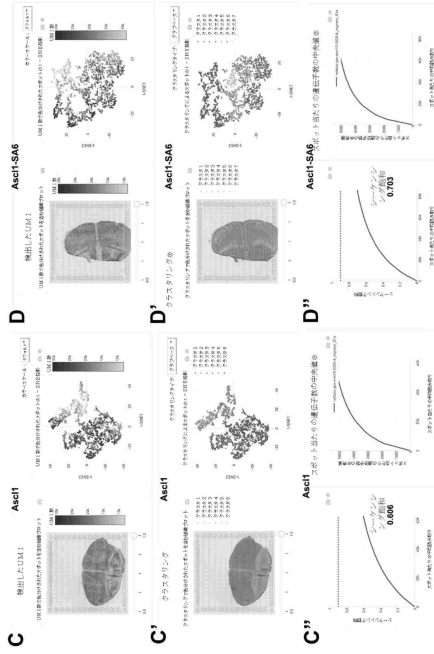
【圖 43】



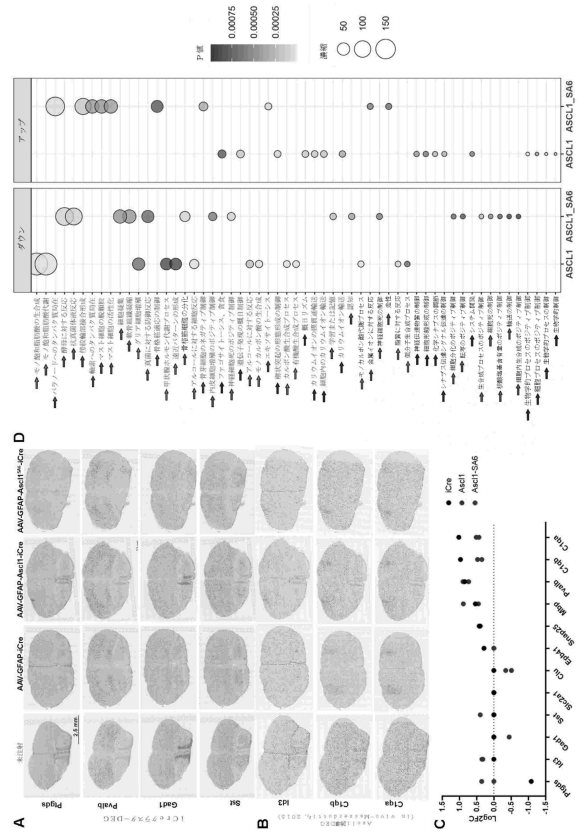
【圖 45-1】



【図 45-2】



【図 46】



10

20

【図 47】

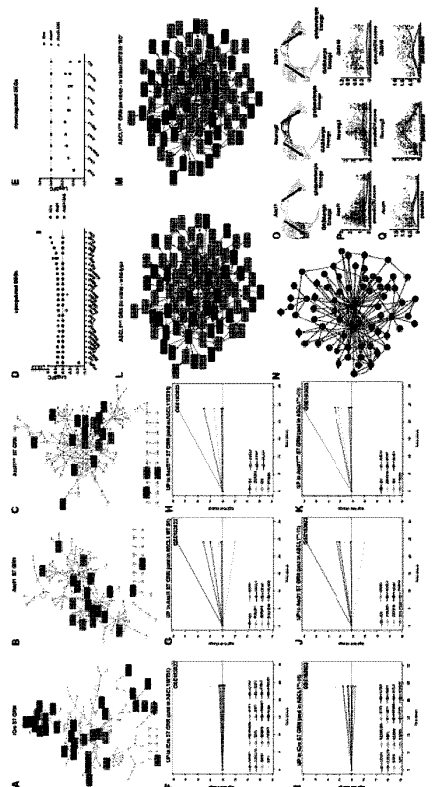
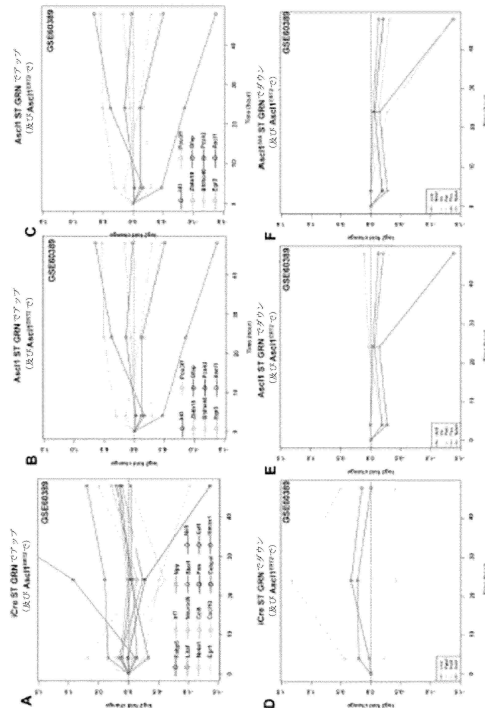


Figure 47

【図 48-1】

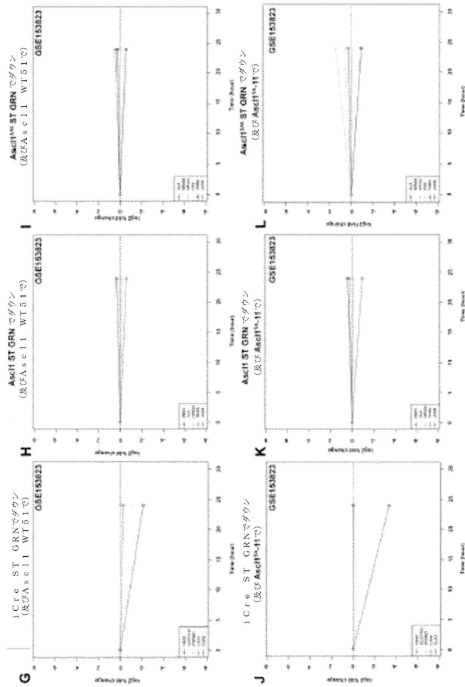


30

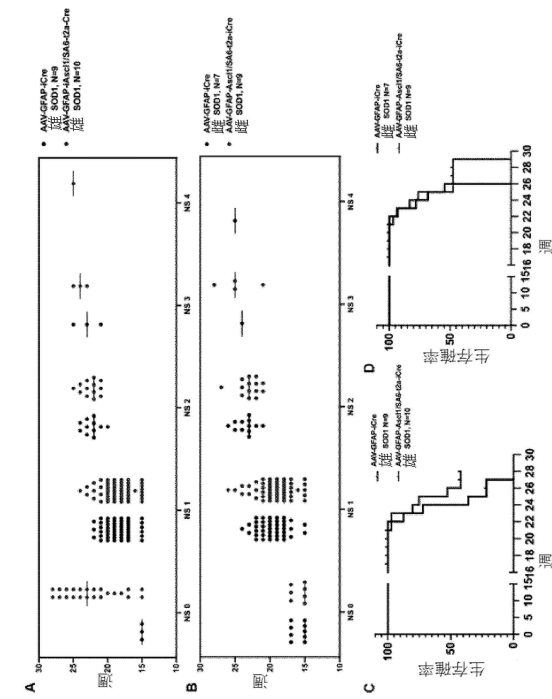
40

50

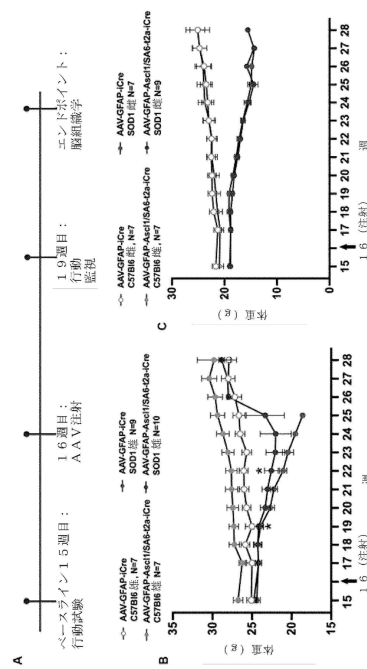
【図 48-2】



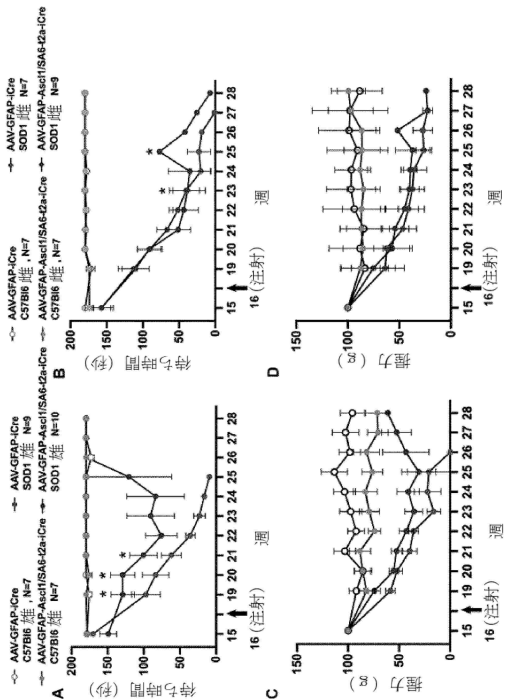
【図 50】



【図 49】



【図 51】



10

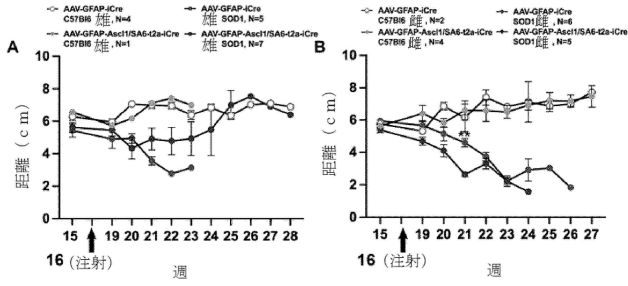
20

30

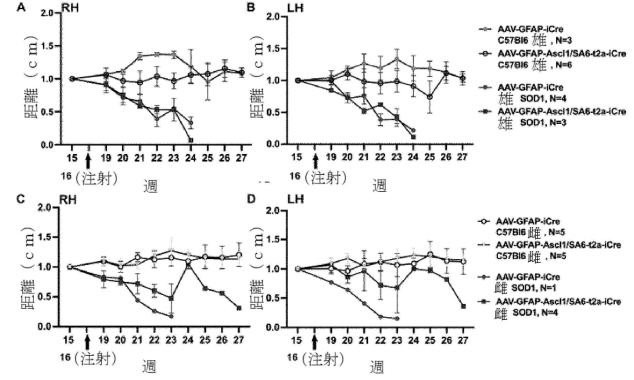
40

50

【図 5 2】

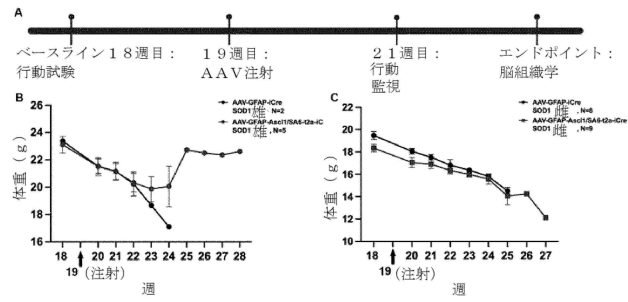


【図 5 3】

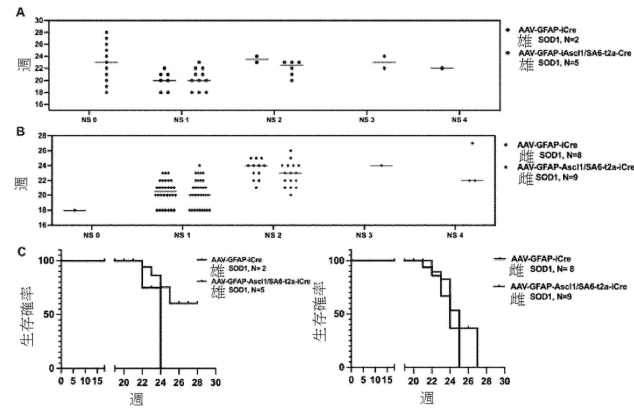


10

【図 5 4】



【図 5 5】



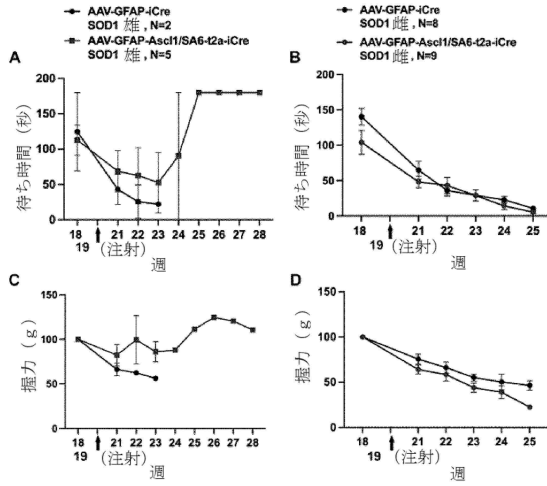
20

30

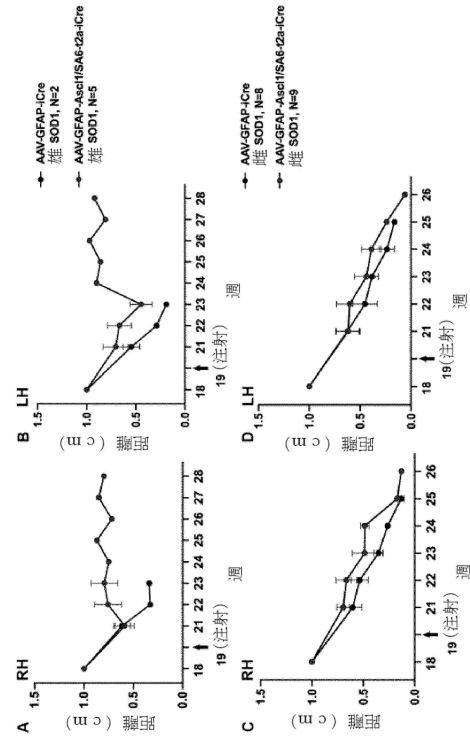
40

50

【図 5 6】



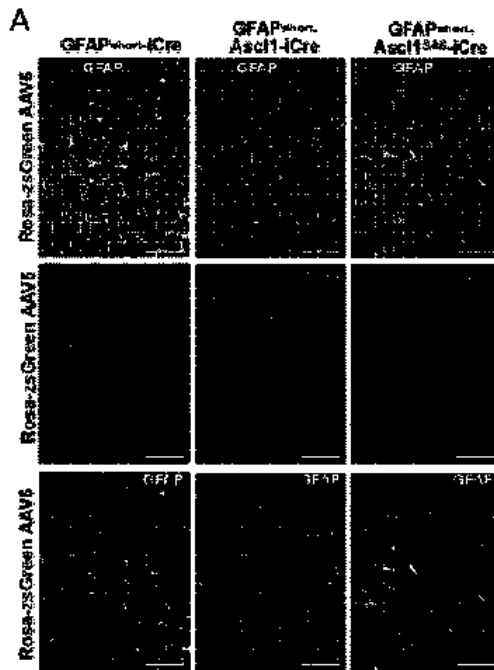
【図 5 7】



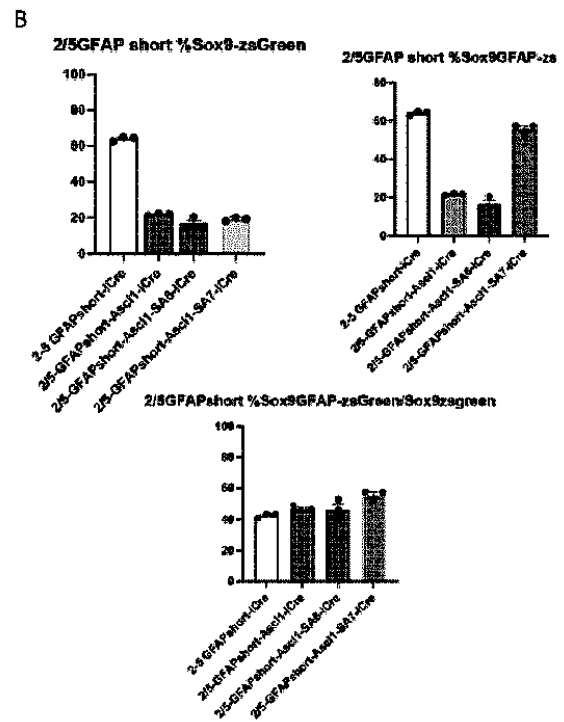
10

20

【図 5 8 A】



【図 5 8 B】

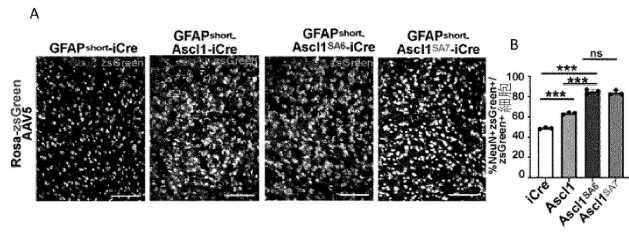


30

40

50

【図 59】



10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年2月22日(2024.2.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2024521401000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2022/050923
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 14/47</i> (2006.01), <i>A61K 38/17</i> (2006.01), <i>A61P 25/00</i> (2006.01), <i>A61P 25/28</i> (2006.01), <i>C12N 15/12</i> (2006.01), <i>C12N 15/85</i> (2006.01), <i>C12N 15/864</i> (2006.01) CPC: , <i>A61K 38/1709</i> (2020.05), <i>A61P 25/00</i> (2020.01), <i>A61P 25/28</i> (2020.01), <i>C07K 14/47</i> (2020.01), <i>C07K 14/4702</i> (2020.01), <i>C12N 15/10</i> (2022.05), <i>C12N 15/85</i> (2020.01), <i>C12N 15/864</i> (2020.01) 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) IPC: <i>C07K 14/47</i> (2006.01), <i>A61K 38/17</i> (2006.01), <i>A61P 25/00</i> (2006.01), <i>A61P 25/28</i> (2006.01), <i>C12N 15/12</i> (2006.01), <i>C12N 15/85</i> (2006.01), <i>C12N 15/864</i> (2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Google Patents, Scopus, Canadian Patent Database, Genome Quest Nucleotide and Protein, Genbank, Protein Data Bank, Genpept. Keywords: basic-helix-loop-helix, bHLH, transcription factor, mutant, NEUROG2, Sunnybrook Research Institute, University of Toronto, SCHUURMANS, MCLAURIN, MORSHEAD, PARK, KEHTARI, VASAN, FAIZ, ENBAR, SEQ ID NOs: 19 and 20		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARDWICK et al., "Multi-site phosphorylation controls the neurogenic and myogenic activity of <i>E47</i> ". Biochemical and Biophysical Research Communications, E-pub: 14 February 2019 (14-02-2019), Vol. 511, pp. 111-116, [online] [retrieved on 23 June 2022 (23-06-2022)]. Retrieved from the Internet: < https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.045 >	1-7, 11-13, 16, 21 & 22
X, Y	HARDWICK & PHILPOTT, "Interaction between opposing modes of phospho-regulation of the proneural proteins <i>Ascl1</i> and <i>Ngn2</i> ". Wellcome Open Research, 1 October 2018 (01-10-2018), Vol. 3(129), pp. 1-12, [online] [retrieved on 23 June 2022 (23-06-2022)]. Retrieved from the Internet: < https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14848.1 >	1-7, 11-13, 16, 21 & 22
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 03 August 2022 (03-08-2022)		Date of mailing of the international search report 14 September 2022 (14-09-2022)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Serisha Moodley (819) 353-9056

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/CA2022/050923

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DENNIS et al., " <i>bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming</i> ". Brain Research, 12 March 2018 (12-03-2018), Vol. 1705, pp. 48-65, [online] [retrieved on 27 July 2022 (27-07-2022)]. Retrieved from the Internet: < https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.013 >	1-7, 11-14 & 16-29
Y	BRENNER et al., " <i>GFAP Promoter Directs Astrocyte-specific Expression in Transgenic Mice</i> ". The Journal of Neuroscience, 1 March 1994 (01-03-1994), Vol. 14(3), pp. 1030-1037, [online] [retrieved on 3 August 2022 (03-08-2022)]. Retrieved from the Internet: < https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01030.1994 >	14-22
A	DENNIS et al., " <i>Neurog2 and Ascl1 together regulate a postmitotic</i> ". PNAS, 5 June 2017 (05-06-2017), Vol. 114(25), pp. E4934-E4943, [online] [retrieved on 11 July 2022 (11-07-2022)]. Retrieved from the Internet: < https://doi.org/10.1073/pnas.1701495114 >	1-7, 11-13, 16, 21 & 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2022/050923
Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments: Applicant provided a WIPO Standard ST.25 compliant sequence listing. SEQ ID NOs: 19 and 20 were searched.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050923

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.: 1-4 and 11-29 (partially)
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:
Said claims lack support with respect to all bHLH TFs having one or more mutations at a phospho-acceptor site for a proline-directed serine-threonine kinase and the use of all of said mutants for neuronal transformation of glial cells and/or the treatment of CNS diseases, disorders or injuries. The search is established for neural-specific bHLH TFs recited in paragraph [0004] of the instant application comprising a mutation of one or more phospho-acceptor sites for proline-directed serine-threonine kinases relative to the wild-type bHLH TF and related subject matter.

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

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 extra 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 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 claim 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 claim Nos.:
Claims 1-7 and 11-29 (partially) are directed to a mutant Neurog2 (also known as Ngn2) basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor (TF) comprising a mutation of one or more phospho-acceptor sites for proline-directed serine-threonine kinases relative to the wild-type Neurog2 and related subject matter.

- 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/CA2022/050923

Continuation of: Box No. III

Reference is made to the following documents:

D1 HARDWICK et al., "Multi-site phosphorylation controls the neurogenic and myogenic activity of E47". Biochemical and Biophysical Research Communications, E-pub: 14 February 2019 (14-02-2019), Vol. 511, pp. 111-116, [online] [retrieved on 23 June 2022 (23-06-2022)]. Retrieved from the Internet: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.045>>

D2 HARDWICK & PHILPOTT, "Interaction between opposing modes of phospho-regulation of the proneural proteins Ascl1 and Ngn2". Wellcome Open Research, 1 October 2018 (01-10-2018), Vol. 3(129), pp. 1-12, [online] [retrieved on 23 June 2022 (23-06-2022)]. Retrieved from the Internet: <<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14848.1>>

D1 discloses basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors (TFs), such as Ascl1, Ngn2 and NeuroD, direct differentiation during development and in cellular reprogramming and are controlled by phosphorylation on multiple conserved serine/threonine proline (SP/TP) sites by cyclin-dependent kinases (Cdks) (abstract and pages 111-112). D1 further discloses the use of phospho-mutants 13T/S-A E47, 12T/S-A E47 and 6S-A Ascl1 that cannot be phosphorylated by Cdks but has enhanced neurogenic activity (pages 112-116). Further, 6S-A Ascl1 has previously been shown to have enhanced ability to convert mammalian fibroblasts into mature neurons, increased protein stability and increased DNA binding affinity compared to the wild-type Ascl1 protein (pages 113 and 115-116).

D2 discloses that bHLH TFs, such as Ascl1 and Ngn2, are involved with both generic neuronal determination and context-dependent neuronal subtype selection (page 3). D2 further discloses models of bHLH TF phospho-regulation, wherein it has been demonstrated that Cdks phosphorylate these proteins on multiple Serine-Proline sites located in the N- and C-termini proximal to the bHLH domain that regulates DNA binding and dimerization (page 3). It has been demonstrated that serine to alanine phospho-mutant bHLH TFs cannot be phosphorylated and promote differentiation during development and cellular reprogramming (page 3). D2 discloses the use of phospho-mutants 6S-A Ascl1, S150D Ascl1, 6S-A/S150D Ascl1, 9S-A Ngn2, T149D Ngn2 and 9S-A/T149D Ngn2 (Figure 1A and Figure 2A and pages 3-7). D2 all discloses the differences and potential uses of single phosphorylation versus multi-site phosphorylation in controlling different temporal events during neurogenesis and differentiation (page 7).

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1-7 and 11-29 (partially) are directed to a mutant Neurog2 (also known as Ngn2) basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor (TF) comprising a mutation of one or more phospho-acceptor sites for proline-directed serine-threonine kinases relative to the wild-type Neurog2 and related subject matter;

Group B - Claims 1-7 and 11-29 (partially) are directed to a mutant Ascl1 bHLH TF comprising a mutation of one or more phospho-acceptor sites for proline-directed serine-threonine kinases relative to the wild-type Ascl1 and related subject matter;

Group C - Claims 1-7 and 11-29 (partially) are directed to mutant Neurod4 bHLH TF comprising a mutation of one or more phospho-acceptor sites for proline-directed serine-threonine kinases relative to the wild-type Neurod4 and related subject matter;

Group D - Claims 8-10 (wholly) and 1-4 and 11-29 (partially) are directed to mutant Neurod1 bHLH TF comprising a mutation of one or more phospho-acceptor sites for proline-directed serine-threonine kinases relative to the wild-type Neurod1 and related subject matter;

Groups E1-E11 - Claims 1-4 and 11-29 (partially) are directed to any one neural-specific bHLH TF (other than Neurog2, Ascl1, Neurod 4 and Neurod1) comprising a mutation of one or more phospho-acceptor sites for proline-directed serine-threonine kinases relative to the wild-type bHLH TF and related subject matter; and

Group F - Claims 30-33 (wholly) are directed to use of a ZBTB18 TF or a nucleic acid encoding the ZBTB18 TF for neuronal transformation of glial cells and related subject matter.

The application is directed to bHLH TFs having proneural activity and/or neuronal differentiation activity for treatment of central nervous system (CNS) diseases, disorders or injuries (pages 1-3 of instant application). Thus, groups E1-E11 have been restricted to neural-specific bHLH TFs other than Neurog2, Ascl1, Neurod4 and Neurod1; specifically, Nhlh1, Nhlh2, Neurog1, Neurod2, Neurod6, Atoh1, Atoh7, Olig1, Olig2, Olig3 and Bhlhe22 as recited in paragraph [0004] of the instant application.

Groups A, B, C, D, E1-E11 and F relate to structurally distinct TFs. Further phospho-mutant bHLH TFs that cannot be phosphorylated by proline-directed serine-threonine kinases for neuronal/ glial cell transformation and their related subject matter are known (see D1 or D2), and the subject-matter of the claims is not linked as to form a single general inventive concept that defines a contribution over the prior art. Therefore the claims lack unity *a priori* and *a posteriori*.

Group A (as the first mentioned invention) will be searched and examined.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13.

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)

4 H 0 4 5

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02
A 6 1 K	38/45 (2006.01)	A 6 1 K	38/45

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,N
E,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,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,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,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 スチャーマンズ, キャロル

カナダ国, オンタリオ州 エム1ジー 3ピー8, スカーパロー, 17 マイノス クレセント

(72)発明者 マクローリン, ジョアン

カナダ国, オンタリオ州 エム4エル 3エックス4, トロント, 156 ボードウォーク ドライブ

(72)発明者 マーズヘッド, シンディー

カナダ国, オンタリオ州 エム6エス 3ティー9, トロント, 274 サウス キングスウェイ

(72)発明者 パク, ユンジェ

カナダ国, オンタリオ州 エム2エヌ 7ジー7, ノース ヨーク, 1109-26 オリーブ アベ
ニュー

(72)発明者 ケタリ, ターラン

カナダ国, オンタリオ州 エム2ケイ 1エス9, トロント, 97 サイテーション ドライブ

(72)発明者 ヴァサン, ラクシュミー

カナダ国, オンタリオ州 エム4ワイ 2ピー3, トロント, アパートメント512, 77 ハント
レー ストリート

(72)発明者 ファイズ, マリアム

カナダ国, オンタリオ州 エム6エイチ 3ピー8, トロント, 231 ハブロック ストリート

(72)発明者 エンバー, トム

カナダ国, オンタリオ州 エル4ジェイ 9ジェイ1, ソーンヒル, 27 シスレイ クレセント

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24

CA44

F ターム (参考)	4C076	AA31 AA65 AA95 BB13 BB14 BB21 BB40 CC01 CC09 FF70
	4C084	AA02 AA13 BA01 DC25 DC50 MA56 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA15 ZA16 ZA22 ZA94
	4C086	AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA56 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA15 ZA16 ZA22 ZA94
	4C087	AA01 AA02 BC83 CA12 MA56 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA15 ZA16 ZA22 ZA94
	4H045	AA10 AA30 BA09 CA40 EA20 FA74