

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6309450号  
(P6309450)

(45) 発行日 平成30年4月11日 (2018. 4. 11)

(24) 登録日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K 31/7105</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 K 31/7105
<b>A 6 1 K 48/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 K 48/00
<b>A 6 1 P 25/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 P 25/00
<b>A 6 1 P 25/18</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 P 25/18
<b>A 6 1 P 25/20</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 P 25/20

請求項の数 14 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-523434 (P2014-523434)  
 (86) (22) 出願日 平成24年8月2日 (2012. 8. 2)  
 (65) 公表番号 特表2014-530803 (P2014-530803A)  
 (43) 公表日 平成26年11月20日 (2014. 11. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/053971  
 (87) 国際公開番号 W02013/018060  
 (87) 国際公開日 平成25年2月7日 (2013. 2. 7)  
 審査請求日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)  
 審判番号 不服2016-19614 (P2016-19614/J1)  
 審判請求日 平成28年12月28日 (2016. 12. 28)  
 (31) 優先権主張番号 61/514, 954  
 (32) 優先日 平成23年8月4日 (2011. 8. 4)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502379147  
 イェダ リサーチ アンド デベロップメ  
 ント カンパニー リミテッド  
 イスラエル国 7 6 1 0 0 レホヴォト  
 ビー. オー. ボックス 95 アット ザ  
 ワインツマン インスティテュート オ  
 ブ サイエンス  
 (74) 代理人 100103816  
 弁理士 風早 信昭  
 (74) 代理人 100120927  
 弁理士 浅野 典子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セロトニン関連の医学的状態、アドレナリン関連の医学的状態、ノルアドレナリン関連の医学的状態、グルタミン酸関連の医学的状態および副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン関連の医学的状態

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状態を処置する必要のあるヒト対象において、前記セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状態を処置するための、mi R - 1 3 5、mi R - 1 3 5の前駆体、または前記mi R - 1 3 5もしくは前記mi R - 1 3 5の前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 2】

前記mi R - 1 3 5または前記mi R - 1 3 5の前駆体をコードする前記外因性ポリヌクレオチドが核酸構築物中に含まれており、前記外因性ポリヌクレオチドが、シス作用調節要素の転写制御下にある、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記シス作用調節要素は神経膠細胞中で特異的に活性である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記mi R - 1 3 5は、配列番号 6 1 ~ 6 2 に示される通りである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記mi R - 1 3 5前駆体は、配列番号 5 8 ~ 6 0 に示される通りである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

前記 mi R - 135 前駆体は、修飾された骨格、修飾されたヌクレオシド間連結、および修飾された塩基からなる群から選択される修飾を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

前記修飾された骨格は、ホスホロチオアート；キラルなホスホロチオアート；ホスホロジチオアート；ホスホトリエステル；アミノアルキルホスホトリエステル；メチルホスホナート；アルキルホスホナート；キラルなホスホナート；ホスフィナート；ホスホルアミダート；アミノアルキルホスホルアミダート；チオノホスホルアミダート；チオノアルキルホスホナート；チオノアルキルホスホトリエステル；ボラノホスフェート、ホスホジエステル、ペプチド核酸（PNA）、および 2' - O - メトキシエチルからなる群から選択される修飾を含む、請求項 6 に記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 8】

前記 mi R - 135 は、糖およびヌクレオシド間連結の両方に修飾を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

前記医学的状态は、うつ病、不安、ストレス、疲労、損なわれた認知機能、パニック発作、脅迫行動、嗜癖、社会恐怖、睡眠障害、食品関連障害、成長障害および生殖障害からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

前記医学的状态は気分障害である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

20

## 【請求項 11】

mi R - 135 または mi R - 135 の前駆体をコードする核酸配列を含む核酸構築物と、医薬的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物であって、前記核酸配列が、神経膠細胞中で特異的に活性であるシス作用調節要素の転写制御下にあり、前記医薬組成物が、セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状态を処置する必要のあるヒト対象において、前記セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状态を処置するためのものである、医薬組成物。

## 【請求項 12】

前記 mi R - 135 は、配列番号 61 ~ 62 に示される通りである、請求項 11 に記載の医薬組成物。

30

## 【請求項 13】

前記 mi R - 135 前駆体は、配列番号 58 ~ 60 に示される通りである、請求項 11 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 14】

前記 mi R - 135 は、糖およびヌクレオシド間連結の両方に修飾を含む、請求項 11 に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はそのいくつかの実施形態において、マイクロRNAに関連し、より具体的には、しかし、限定ではなく、疾患を診断し、処置し、また、処置をモニターするための該マイクロRNAの使用に関連する。

40

## 【0002】

気分障害（例えば、大うつ病など）は、人口の約 10% が世界中で襲われる最も一般的かつ急増している健康問題の一部を占める。何十年の研究にもかかわらず、うつ病発症の背後に潜む機構、罹病性および利用可能な治療法は一部が理解されているにすぎない。現在、約 1/3 の患者だけが、利用可能な処置に応答しており、したがって、その病理学をより良く理解することが非常に求められている。うつ病の病因に関する現在の定説は、環境的要因と遺伝学的素因との間における複雑な相互作用からなり、これにより、エピジェネティックプロセスについての機構的役割が示唆されている。

50

## 【0003】

セロトニン(5HT)は、様々な認知機能、情動機能および生理学的機能を調整するために脳全体に広範囲に突き出る縫線核(RN)によって脳内で産生されるモノアミン型神経伝達物質である。調節不全のセロトニン作動性活性と、うつ病とのつながりが十分に立証されている[Michelsen KA他、Brain Res Rev、(2007)55(2):329~42]。5HTのレベル、同様にまた、その産生、分泌、再取り込みおよび不活性化に関わる遺伝的回路網がうつ病では調節不全となっている。さらに、ほとんどの現在利用可能な抗うつ剤は、5HT系に関連づけられるタンパク質の機能を標的としており、これにより、増大した5THレベルをシナプスにおいてもたらしめている[Krishnan VおよびNestler EJ、Nature、(2008)455:894~902]。利用可能な治療剤は、症状の緩和が認められるまでに長期間の投与を必要とする。

10

## 【0004】

ミクロRNA(miR)は、遺伝子発現を転写後に抑制する内因性の小さい(およそ22ヌクレオチドの)RNA分子のサブセットである。miRは、ステムループ構造を有する前駆体miRに細胞の核においてプロセッシングされる一次miR分子として転写され、その後、この前駆体miRが、活性な成熟型miRにさらにプロセッシングされる細胞質に排出される。成熟型miRは続いて、RNA誘導サイレンシング複合体に取り込まれ、主に、特定のmRNA分子の3'末翻訳領域(3'UTR)に結合することによって機能する。結合が、標的mRNAの3'UTRにおける相補的なシード一致配列に対して対形成するシード配列(miRの5'末端における6~8ヌクレオチド配列)を介して生じる。miRの結合は、直接的なmRNA脱安定化または翻訳抑制を引き起こし、最終的には、標的遺伝子の低下したタンパク質レベルをもたらす。

20

## 【0005】

miRは神経系に多量に存在しており、初期の研究は主に、発達、癌および神経変性障害、ならびに、正常なプロセス(例えば、可塑性など)との関連においてニューロンに集中している[Kosik KS、Nat Rev Neurosci、(2006)7:911~20]。加えて、miRは、ヒトおよびマウスモデルの両方で、精神医学的障害、例えば、統合失調症、自閉症、また同様に、うつ病および不安においてある一定の役割を果たすことが示唆されている[Miller BHおよびWahlestedt C、Brain Res、(2010)1338:89~99]。いくつかの研究では近年、5HT系の調節におけるmiRの新たに明らかになりつつある役割、ならびに、うつ病関連障害とのそれらの潜在的関連を明らかにする、5HT関連遺伝子を調節することにおけるmiRの関与が明らかにされている[Millan MJ、Curr Opin Pharmacol、(2011)11(1):11~22]。

30

## 【0006】

米国特許出願公開第20100222413号(Stoffel M.他)は、ミクロRNAの発現を調整するための化学修飾されたオリゴヌクレオチドを開示する。米国特許出願公開第20100222413号はさらに、ミクロRNA(例えば、miR-122、miR-16、miR-192およびmiR-194)のサイレンシングを、中枢神経系の疾患を処置するために行うための方法を開示する。

40

## 【発明の概要】

## 【0007】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状態を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、miR-135、miR-335、miR-26およびmiR-182からなる群から選択される少なくとも1つのミクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させ、それにより、上記医学的状態を処置することを含む方法が提供される。

## 【0008】

50

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-135、miR-335、miR-26およびmiR-182からなる群から選択される少なくとも1つのマイクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドの使用であって、セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状態を処置するために特定される医薬を製造するための使用が提供される。

【0009】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、セロトニンレベルをその必要性のある対象のシナプス間隙において増大させる方法であって、miR-135、miR-335、miR-26およびmiR-182からなる群から選択される少なくとも1つのマイクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象のセロトニン作動性ニューロンに投与し、または、上記対象のセロトニン作動性ニューロンにおいて発現させ、それにより、セロトニンレベルを上記シナプス間隙において増大させることを含む方法が提供される。

10

【0010】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-135、miR-335、miR-26およびmiR-182からなる群から選択される少なくとも1つのマイクロRNAまたはその前駆体をシス作用調節要素の転写制御下において発現する核酸構築物を含む単離された神経膠細胞が提供される。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状態を処置するための、miR-135、miR-335、miR-26およびmiR-182からなる群から選択される少なくとも1つのマイクロRNAまたはその前駆体をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

20

【0012】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、アドレナリンまたはノルアドレナリンの低いレベルが治療上有益である医学的状態を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、miR-19またはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させ、それにより、上記医学的状態を処置することを含む方法が提供される。

【0013】

30

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-19またはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドの使用であって、アドレナリンまたはノルアドレナリンの低いレベルが治療上有益である医学的状態を処置するために特定される医薬を製造するための使用が提供される。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-19またはその前駆体をシス作用調節要素の転写制御下において発現する核酸構築物を含む単離された細胞が提供される。

【0015】

40

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、アドレナリンまたはノルアドレナリンの低いレベルが治療上有益である医学的状態を処置するための、miR-19またはその前駆体をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)の低いレベルが治療上有益である医学的状態を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、miR-15またはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させ、それにより、上記医学的状態を処置することを含む方法が提供される。

【0017】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-15またはその前駆体を

50



コードする外因性ポリヌクレオチドの使用であって、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置するために特定される医薬を製造するための使用が提供される。

【0018】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-15またはその前駆体をシス作用調節要素の転写制御下において発現する核酸構築物を含む単離された細胞が提供される。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置するための、miR-15またはその前駆体をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

10

【0020】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、グルタミン酸受容体の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、miR-181またはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させ、それにより、上記医学的状态を処置することを含む方法が提供される。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-181またはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドの使用であって、グルタミン酸受容体の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置するために特定される医薬を製造するための使用が提供される。

20

【0022】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-181またはその前駆体をシス作用調節要素の転写制御下において発現する核酸構築物を含む単離された細胞が提供される。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、グルタミン酸受容体の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置するための、miR-181またはその前駆体をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

30

【0024】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-135、miR-335、miR-26、miR-27、miR-181、miR-182、miR-19およびmiR-15からなる群から選択されるミクロRNAまたはその前駆体をコードする核酸配列を含み、上記核酸配列がシス作用調節要素の転写制御下にある核酸構築物が提供される。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、本発明の核酸構築物と、医薬的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物が提供される。

【0026】

40

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、トリプトファンヒドロキシラーゼ2（Tph2）遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-181およびmiR-27からなる群から選択されるミクロRNAまたはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記Tph2遺伝子の発現を調節することを含む方法が提供される。

【0027】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、グルタミン酸受容体遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-181またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記グルタミン酸受容体遺伝子の発現を調節することを含む方法が提供される。

50

## 【 0 0 2 8 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、mi R - 1 8 1、mi R - 2 7またはその前駆体の発現をダウンレギュレーションするための核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

## 【 0 0 2 9 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、mi R - 1 8 1およびmi R - 2 7からなる群から選択されるマイクロRNAまたはその前駆体の発現をダウンレギュレーションするための核酸配列を含み、上記核酸配列がシス作用調節要素の転写制御下にある核酸構築物が提供される。

## 【 0 0 3 0 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、セロトニン輸送体 ( S l c 6 a 4 ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、mi R - 1 3 5およびmi R - 3 3 5からなる群から選択されるマイクロRNAまたはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記 S l c 6 a 4 遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

10

## 【 0 0 3 1 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、セロトニン阻害受容体 1 a ( H t r 1 a ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、mi R - 1 3 5、mi R - 3 3 5、mi R - 1 8 1、mi R - 1 8 2およびmi R - 2 6からなる群から選択されるマイクロRNAまたはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記 H t r 1 a 遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

20

## 【 0 0 3 2 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ダウン症候群細胞接着分子 ( D s c a m ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、mi R - 1 8 2またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記 D s c a m 遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

## 【 0 0 3 3 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、細胞接着分子 L 1 ( L 1 c a m ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、mi R - 1 8 2またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記 L 1 c a m 遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

30

## 【 0 0 3 4 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、トランスリン会合タンパク質 X ( T s n a x ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、mi R - 1 8 2またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記 T s n a x 遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

## 【 0 0 3 5 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、モノアミンヒドロキシラーゼ ( M a o A ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、mi R - 2 7の活性または発現を調整し、それにより、上記 M a o A 遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

40

## 【 0 0 3 6 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ベータアドレナリン作動性受容体 1 ( A d r b 1 ) 遺伝子の発現を神経膠細胞または心臓細胞において調節する方法であって、mi R - 1 9の活性または発現を調整し、それにより、上記 A d r b 1 遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

## 【 0 0 3 7 】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、カナビノイド受容体 1 ( C B 1 ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、mi R - 1 9またはその前駆

50

体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記C B 1遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

【0038】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、C R H 1型受容体遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、m i R - 1 5の活性または発現を調整し、それにより、上記C R H 1型受容体遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、F K 5 0 6結合タンパク質5 ( F K B P 5 ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、m i R - 1 5またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記F K B P 5遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

10

【0040】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、シンタキシン1 a ( S t x 1 a ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、m i R - 1 5またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記S t x 1 a遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

【0041】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、血清 / グルココルチコイド調節キナーゼ ( S g k 1 ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、m i R - 1 5またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記S g k 1遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

20

【0042】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ベータ2型アドレナリン作動性受容体 ( A d r b 2 ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、m i R - 1 5またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整し、それにより、上記A d r b 2遺伝子の上記発現を調節することを含む方法が提供される。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、抗うつ剤の処置をモニターする方法であって、( a ) 処置の必要性のある対象を抗うつ剤により処置すること、および、( b ) 上記対象の血液におけるm i R - 1 3 5の発現レベルを上記処置の前後で測定することを含み、上記抗うつ剤による上記処置の前における上記m i R - 1 3 5の発現レベルと比較して、上記抗うつ剤による上記処置の後における上記m i R - 1 3 5のより低い発現レベルにより、上記処置が効率的であることが示される、方法が提供される。

30

【0044】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、セロトニン関連の医学的状态を診断の必要性のある対象において診断する方法であって、m i R - 1 3 5の発現レベルを上記対象の血液において測定することを含み、健康な対象の血液試料の場合上記と比較して上記m i R - 1 3 5の高い発現レベルが、上記セロトニン関連の医学的状态を示すものである、方法が提供される。

40

【0045】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は神経膠細胞である。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経膠細胞はセロトニン作動性ニューロンである。

【0047】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記m i R - 1 3 5は、配列番号58 ~ 62に示される通りである。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記m i R - 3 3 5は、配列番号63 ~ 64に

50

示される通りである。

【 0 0 4 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 *miR* - 26 は、配列番号 65 ~ 69 に示される通りである。

【 0 0 5 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 *miR* - 182 は、配列番号 70 ~ 71 に示される通りである。

【 0 0 5 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記医学的状態は、うつ病、不安、ストレス、疲労、損なわれた認知機能、パニック発作、脅迫行動、嗜癮、社会恐怖、睡眠障害、食品関連障害、成長障害および生殖障害からなる群から選択される。

10

【 0 0 5 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記マイクロRNAが *miR* - 135 であるとき、上記医学的状態はうつ病または不安である。

【 0 0 5 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は神経膠細胞または心臓細胞である。

【 0 0 5 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 *miR* - 19 は、配列番号 72 ~ 76 に示される通りである。

【 0 0 5 5 】

20

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記医学的状態は、ストレス、不安、記憶障害および心臓の病気からなる群から選択される。

【 0 0 5 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 *miR* - 15 は、配列番号 77 ~ 80 に示される通りである。

【 0 0 5 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記医学的状態は、うつ病、不安、ストレス、疲労、損なわれた認知機能、パニック発作、脅迫行動、嗜癮、社会恐怖、睡眠障害、食品関連障害、成長障害および生殖障害からなる群から選択される。

【 0 0 5 8 】

30

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ポリヌクレオチドは、神経膠細胞において活性であるシス作用調節要素の転写制御下にある。

【 0 0 5 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ポリヌクレオチドは、心臓細胞において活性であるシス作用調節要素の転写制御下にある。

【 0 0 6 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 *miR* - 181 は、配列番号 85 ~ 94 に示される通りである。

【 0 0 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記医学的状態は、てんかん発作、ハンチントン病、統合失調症、脆弱X症候群、全般性不安障害および癌からなる群から選択される。

40

【 0 0 6 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記シス作用調節要素は神経膠細胞または心臓細胞において活性である。

【 0 0 6 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記対象はヒト対象である。

【 0 0 6 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記 *Tph2* 遺伝子の発現をアップレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 *miR* - 181 および / または上記 *miR* - 27 を上記神経膠細胞においてダウンレギュレーション

50

することを含む。

【0065】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記 *Tph2* 遺伝子の発現を上記 *miR-181* および / または上記 *miR-27* の上記神経膠細胞における上記ダウンレギュレーションの後で測定することを含む。

【0066】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記グルタミン酸受容体遺伝子は、グルタミン酸受容体代謝型1 (*Grm1*)、グルタミン酸受容体イオンチャネル型カイニン酸3 (*Grik3*)、グルタミン酸受容体代謝型5 (*Grm5*)、グルタミン酸受容体イオンチャネル型カイニン酸2 (*Grik2*) およびグルタミン酸受容体代謝型7 (*Grm7*) からなる群から選択される。

10

【0067】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記 *Slc6a4* 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 *miR-135* および / または *miR-335* を上記神経膠細胞においてアップレギュレーションすることを含む。

【0068】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記 *Slc6a4* 遺伝子の発現を上記 *miR-135* および / または *miR-335* の上記神経膠細胞における上記アップレギュレーションの後で測定することを含む。

20

【0069】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記 *Htr1a* 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 *miR-135*、*miR-335*、*miR-181*、*miR-182* および / または *miR-26* を上記神経膠細胞においてアップレギュレーションすることを含む。

【0070】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記 *Htr1a* 遺伝子の発現を、上記 *miR-135*、*miR-335*、*miR-181*、*miR-182* および / または *miR-26* の上記神経膠細胞における上記アップレギュレーションの後で測定することを含む。

30

【0071】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記 *MaOA* 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 *miR-27* を上記神経膠細胞においてアップレギュレーションすることを含む。

【0072】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記 *MaOA* 遺伝子の発現を上記 *miR-27* の上記神経膠細胞における上記アップレギュレーションの上記アップレギュレーションの後で測定することを含む。

【0073】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記 *Adrb1* 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 *miR-19* を上記神経膠細胞または上記心臓細胞においてアップレギュレーションすることを含む。

40

【0074】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記 *Adrb1* 遺伝子の発現を上記 *miR-19* の上記神経膠細胞または上記心臓細胞における上記アップレギュレーションの後で測定することを含む。

【0075】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記 *CB1* 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 *miR-19*

50

を上記神経膠細胞においてアップレギュレーションすることを含む。

【0076】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記CB1遺伝子の発現を上記CB1の上記神経膠細胞における上記アップレギュレーションの後で測定することを含む。

【0077】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記CRH1型受容体遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記miR-15を上記神経膠細胞においてアップレギュレーションすることを含む。

【0078】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記CRH1型受容体遺伝子の発現を上記miR-15の上記神経膠細胞における上記アップレギュレーションの後で測定することを含む。

【0079】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記調節することが、上記FKBP5遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記miR-15を上記神経膠細胞においてアップレギュレーションすることを含む。

【0080】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、上記FKBP5遺伝子の発現を上記miR-15の上記神経膠細胞における上記アップレギュレーションの後で測定することを含む。

【0081】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、血液試料を上記処置に先立って上記対象から得ることを含む。

【0082】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗うつ剤は、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)、三環系抗うつ剤およびノルアドレナリン再取り込み阻害剤(NRI)からなる群から選択される。

【0083】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記セロトニン関連の医学的状態は精神医学的状態である。

【0084】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記精神医学的状態は、うつ病、不安、ストレス、疲労、損なわれた認知機能、パニック発作、脅迫行動、嗜癮、社会恐怖、睡眠障害および食品関連障害からなる群から選択される。

【0085】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記miR-135はmiR-135aまたはmiR-135bを含む。

【0086】

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的用語および/または科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および/または材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【図面の簡単な説明】

【0087】

本明細書では本発明のいくつかの実施形態を単に例示し添付の図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の実施形態を例示考察することだけを目的としていることを強調するものである。この点について、図面につ

10

20

30

40

50

いて行う説明によって、本発明の実施形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

#### 【0088】

【図1A - 1E】図1A - 1Eは、セロトニン(5HT)ニューロンにおけるマイクロRNAの発現を示す。図1Aは、5HTニューロンにおける示差的に発現したmiRNAのグラフ例示である。Lowess正規化値が、平均対数強度に対してプロットされるスポット強度の $\ln 2$ 倍率変化として示される(MAプロット)；図1Bは、対照と比較して、5HTニューロンにおけるmiR-375の増大したレベルを示す、miRのリアルタイムPCRにおけるアレイ結果の検証である。 $n = 5$ 個の5HT細胞、 $n = 4$ 個の非5HT。バーは平均 $\pm s.e.m.$ を表す。 $**P = 0.0071$ ；図1Cは、対照と比較して、5HTニューロンにおけるmiR-135aの低下したレベルを示す、miRのリアルタイムPCRにおけるアレイ結果の検証である。 $N = 5$ 個の5HT細胞、 $n = 4$ 個の非5HT。 $**P = 0.0075$ ；図1Dは、Slc6a4についての生物情報学予測を5HTマイクロアレイ結果と組み合わせることを表し、かつ、インビトロ試験のために選ばれるmiRを列挙するバンドダイアグラムである；図1Eは、Htr1aについての生物情報学予測を5HTマイクロアレイ結果と組み合わせることを表し、かつ、インビトロ試験のために選ばれるmiRを列挙するバンドダイアグラムである。

10

【図1F - 1I】図1F - 1Iは、セロトニン(5HT)ニューロンにおけるマイクロRNAの発現を示す。図1Fは、Tph2についての生物情報学予測を5HTマイクロアレイ結果と組み合わせることを表し、かつ、インビトロ試験のために選ばれるmiRを列挙するバンドダイアグラムである；図1Gは、MaOAについての生物情報学予測を5HTマイクロアレイ結果と組み合わせることを表し、かつ、インビトロ試験のために選ばれるmiRを列挙するバンドダイアグラムである；図1Hは、miR-181cおよびmiR-27bがTph2の3'UTRを標的とし得ることを示すルシフェラーゼレポーターアッセイ結果を例示するグラフである；図1Iは、miR-27bがHtr1a MaOAを標的とし得ることを示すルシフェラーゼレポーターアッセイ結果を例示するグラフである。

20

#### 【0089】

【図2A - 2D】図2A - 2Dは、マイクロRNAがSlc6a4の3'UTR(配列番号25)およびHtr1aの3'UTR(配列番号27)を標的とすることを示す。図2Aは、miR-135aおよびmiR-135b(それぞれ、配列番号24および26)がSlc6a4の3'UTRを標的とすることの例示である；図2Bは、miR-135aおよびmiR-135b(それぞれ、配列番号24および26)がHtr1aの3'UTRを標的とすることの例示である；図2Cは、miR-135aおよびmiR-135bがSlc6a4の3'UTRを標的とし得ることを示すルシフェラーゼレポーターアッセイ結果を例示するグラフである。ルシフェラーゼアッセイのデータは、記載された遺伝子の3'UTRおよび空ベクター、または、特定のmiRを過剰発現するベクターによりトランスフェクションされたHEK293細胞における共トランスフェクションされたホタルルシフェラーゼレポーターの活性に対して正規化されるウミシイタケルシフェラーゼ活性を示す。バーは平均 $\pm s.e.m.$ を表す。 $*P = 0.014$ 、 $***P = 0.0002$ 、miR-16については $\#p < 0.0535$ 、miR-27については $\#P = 0.0967$ ；図2Dは、miR-135a、miR-135b、miR-335、miR-181cおよびmiR-26aがHtr1aの3'UTRを標的とし得ることを示すルシフェラーゼレポーターアッセイ結果を例示するグラフである。 $***P < 0.0001$ 、 $*P = 0.0029$

30

40

【図2E - 2H】図2E - 2Hは、マイクロRNAがSlc6a4の3'UTR(配列番号25)およびHtr1aの3'UTR(配列番号27)を標的とすることを示す。図2Eは、miR-135についてのシード一致部(配列番号27~41)の、slc6a4の3'UTRでの保存を例示するものである；図2Fは、miR-135についてのHtr1aの3'UTRシード一致部(配列番号42~54)を例示するものであり、シード1がマウスの3'UTRにおいてのみ現れ、シード2が高度に保存されていることを示して

50

いる。図 2 G は、s l c 6 a 4 の 3' U T R における m i R - 1 3 5 のシード一致部での変異が m i R - 1 3 5 a および m i R - 1 3 5 b の抑制因子効果を阻止したことを例示するグラフである。\*\*\*  $P < 0.0001$ 、\*\*  $P = 0.0032$ ；図 2 H は、H t r 1 a の 3' U T R における m i R - 1 3 5 のシード一致部での変異を個々に行った場合および両方を一緒に行った場合を例示するグラフであり、m i R - 1 3 5 b が両方のシード一致部を介して H t r 1 a を標的とし、m i R - 1 3 5 a はシード 2 によってのみ標的とすることを示している。\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

#### 【0090】

【図 3 A - 3 D】図 3 A - 3 D は、m i R - 1 3 5 a および m i R - 1 3 5 b のレベルを種々の条件のもとで示す。図 3 A は、急性ストレスの後での R N における m i R - 1 3 5 a レベルのダウンレギュレーションを例示するグラフである。バーは平均  $\pm$  s . e . m . を表す。(  $n = 8$ 、群 0 において； $n = 10$ 、群 9 0 において； $n = 9$ 、群 2 4 において )。\*\*\*  $P < 0.0001$ 、\*  $P = 0.0357$ ；図 3 B は、急性ストレスの後での R N における m i R - 1 3 5 b レベルのダウンレギュレーションを例示するグラフである。\*\*\*  $P < 0.0001$ 、\*\*  $P = 0.0055$ ；図 3 C は、マウスが社会的敗北にさらされたかどうかに関係なく、イミプラミンの急性投与および長期投与の後での R N における m i R - 1 3 5 a レベルのアップレギュレーションを例示するグラフである。(  $n = 8$ 、対照の長期生理的食塩水および対照の長期イミプラミン； $n = 7$ 、急性イミプラミン； $n = 11$ 、社会的敗北での長期生理的食塩水； $n = 9$ 、社会的敗北での長期イミプラミン )。\*  $P = 0.003$ ；図 3 D は、マウスが社会的敗北にさらされたかどうかに関係なく、イミプラミンの急性投与および長期投与の後での R N における m i R - 1 3 5 b レベルのアップレギュレーションを例示するグラフである。\*  $P = 0.0093$ 。

【図 3 E - 3 J】図 3 E - 3 J は、m i R - 1 3 5 a および m i R - 1 3 5 b のレベルを種々の条件のもとで示す。図 3 E は、N R I または生理的食塩水ではなく、S S R I の急性投与または長期投与の後での R N での m i R - 1 3 5 a レベルにおける増大を例示するグラフである；(  $n = 8$ 、急性生理的食塩水 (  $n = 7$  ) を除く各群 )。\*\*\*  $P < 0.0001$ ；図 3 F は、S S R I または N R I の急性投与または長期投与の後での R N における変化しない m i R - 1 3 5 b レベルを例示するグラフである；図 3 G は、対照と比較して、長期 S S R I または急性 S S R I を受けるマウスの血漿中での m i R - 1 3 5 a レベルにおける低下を例示するグラフである。(  $n = 8$ 、長期 S S R I および長期 N R I (  $n = 7$  ) を除く各群 )。急性生理的食塩水と比較して急性 S S R I については\*  $P = 0.0004$ 、長期生理的食塩水と比較して長期 S S R I については\*  $P = 0.0006$ ；図 3 H は、対照と比較して、長期 S S R I または急性 S S R I を受けるマウスの血漿における変化しない m i R - 1 3 5 b レベルを例示するグラフである；図 3 I は、血漿と比較して、R N における個々のマウスの m i R - 1 3 5 a レベルを明らかにする散乱プロットグラフであり、S S R I または生理的食塩水の処置を受けるマウスでは逆の相関を示している。図 3 J は、対照と比較して、S S R I 処置を受けるマウスでは、血漿に対する R N における m i R - 1 3 5 b レベルの間には相関がないことを明らかにする散乱プロットグラフである。

#### 【0091】

【図 4 A - 4 B】図 4 A - 4 B は、m i R - 1 3 5 b のインビボ過剰発現を示す。図 4 A は、m i R - 1 3 5 b の過剰発現のためのレンチウイルスの概略的例示である；図 4 B は、成体マウスの背側縫線核 ( D R N ) におけるインビボでの m i R - 1 3 5 b の過剰発現を示すリアルタイム P C R 結果を例示するグラフである。バーは平均  $\pm$  s . e . m . を表す。(  $n = 5$ 、G F P 注入； $n = 3$ 、m i R - 1 3 5 O E )。\*  $P = 0.0032$ 。

【図 4 C - 4 D】図 4 C - 4 D は、m i R - 1 3 5 b のインビボ過剰発現を示す。図 4 C ~ 図 4 D は、注入部位における G F P 染色を明らかにすることによる D R N 注入部位の例示である。( P a x i n o s から借用される区分マップ )。

【図 4 E - 4 H】図 4 E - 4 H は、m i R - 1 3 5 b のインビボ過剰発現を示す。図 4 E は、対照マウスと比較して、R N において m i R - 1 3 5 b を過剰発現するマウスにお

10

20

30

40

50



るフォレスト水泳試験での低下した不動時間を例示するグラフである。(  $n = 9$ 、対照 ;  $n = 9$ 、 $miR - 135$  )。  $P = 0.0088$  ( 3 分の時点で ) および  $P = 0.0033$  ( 4 分の時点について ) ; 図 4 F は、対照マウスと比較して、RNにおいて $miR - 135b$ を過剰発現するマウスにおける尾懸垂試験での低下した不動時間を例示するグラフである。  $P < 0.07351$  ; 図 4 G ~ 図 4 H は、対照と比較して、RNにおいて $miR - 135b$ を過剰発現するマウスのホームケージでの自発運動における差がないことを例示するグラフである。

【 0 0 9 2 】

【図 5】図 5 は、ルシフェラーゼ遺伝子の後にクローン化される  $ADRB1$  の 3' UTR を示す。  $PsiCHECK2$  プラスミドにおいてルシフェラーゼ遺伝子の下流側にクローン化される、4 つの  $miR - 19$  結合部位を有する無傷 ( 上段 ) の  $ADRB1$  3' UTR、および、4 つすべての  $miR - 19$  結合部位を欠いている変異型 ( 下段 ) 形態の  $ADRB1$  3' UTR の例示。

【 0 0 9 3 】

【図 6 A - 6 E】図 6 A - 6 E は、 $miR - 19b$  が、 $ADRB1$  の 3' UTR を、その 3' UTR におけるシード一致部を介して標的とすることを示す ; 図 6 A ~ 図 6 B は、低い内因性  $miR - 19$  レベルを発現する HT22 細胞において測定される正規化されたルシフェラーゼレベルを、( 図 6 A ) GFP プラスミドまたは ( 図 6 B ) プレ- $miR - 19b$  過剰発現 ( OE ) プラスミドによるトランスフェクションの後において例示するグラフである ; 図 6 C ~ 図 6 E は、高い内因性  $miR - 19$  レベルを発現する HEK293T 細胞において測定される正規化されたルシフェラーゼレベルを例示するグラフである。( 図 6 C ) 対照プラスミドによるトランスフェクション、( 図 6 D ) 対照として  $miR - 19b$  ノックダウン ( KD ) プロブまたはスクランブル化プロブによるトランスフェクション、および、( 図 6 E )  $miR - 19b$  の  $miArrest$  プラスミドまたは対照の  $miArrest$  プラスミドによるトランスフェクション。 \* \* \*  $P < 0.005$ 。ウミシタケルシフェラーゼ活性をホタルルシフェラーゼの発現レベルによって正規化し、対照処置の存在時における変異型形態の  $ADRB1 - 3' UTR$  (  $ADRB1 - mut$  ) によって達成される活性の比率として示した。

【 0 0 9 4 】

【図 7 A - 7 B】図 7 A - 7 B は、扁桃体における  $miRNA$  の示差的発現を示す。図 7 A ~ 図 7 B は、急性ストレス後 90 分での扁桃体における  $miRNA$  の示差的発現を例示するグラフである。図 7 A は  $agilent$  アレイの結果を例示する。図 7 B は  $affymetrix$  アレイの結果を例示する。正規化された値が、条件の全体にわたる平均強度に対してプロットされるスポット強度の  $\log_2$  比率 ( ストレス対対照 ) として示される (  $N = 2, 2$  )。それぞれの  $miRNA$  の強度を生物学的反復の全体にわたる平均正規化強度として計算した。 $miR - 15a$  および  $miR - 15b$  が赤色で示される。 $miR - 124$ 、すなわち、ストレスプロトコルによって影響されない十分に確立されたニューロンマーカーが、白色で示される。

【図 7 C - 7 D】図 7 C - 7 D は、扁桃体における  $miRNA$  の示差的発現を示す。図 7 C は、 $miR - 15a$  および  $miR - 15b$  が半保存的なシード一致部を副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン 1 型受容体の 3' UTR に有することを例示する [  $CRHR1$ 、 $targetscan(dot)org$  からの改編 ] ; 図 7 D は、 $miR - 15b - EGFP$  過剰発現プラスミドまたは GFP 発現プラスミドと、 $CRFR1 - 3' UTR$  によって制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドとにより共トランスフェクションされた HEK293T 細胞において測定されるルシフェラーゼ活性を例示するグラフである。ウミシタケルシフェラーゼ活性をホタルルシフェラーゼの発現レベルによって正規化した。

【 0 0 9 5 】

【図 8】図 8 は、 $miR - 182$  がおそらくは  $Htr1a$  の 3' UTR を標的とすることを示すルシフェラーゼレポーターアッセイ結果を例示するグラフである。ルシフェラーゼアッセイのデータは、記載された遺伝子の 3' UTR および空ベクター、または、特定の

10

20

30

40

50

mi Rを過剰発現するベクターによりトランスフェクションされたHEK293細胞における共トランスフェクションされたホタルルシフェラーゼレポーターの活性に対して正規化されるウミシイタケルシフェラーゼ活性を示す。

【0096】

【図9】図9は、長期の社会的敗北の後における低下した発現についての傾向を示す、成体マウスのDRNにおけるmi R-182発現レベルのリアルタイムPCR結果を例示するグラフである。データは平均±SEMを表す。n=7(対照)および18(社会的敗北群におけるマウス)、#=p=0.1。

【0097】

【図10】図10は、2つのアルゴリズムにおけるmi R-182の標的についてのインシリコ生物情報学予測を表すバンドダイアグラム、ならびに、この予測において現れる正常なニューロン機能および病理学的ニューロン機能について大きな関連性がある潜在的な標的遺伝子のリストである。

10

【0098】

【図11A-11C】図11A-11Cは、mi R-182の過剰発現またはノックダウンを示す。図11Aは、mi R-182の過剰発現のためのレンチウイルスの概略的例示である；図11Bは、N2A細胞株におけるインビトロでのmi R-182の過剰発現を示すリアルタイムPCR結果を例示するグラフである；図11Cは、mi R-182のノックダウンのためのレンチウイルスの概略的例示である。

【0099】

20

【図12A-12D】図12A-12Dは、NRI投与後のPFCにおけるmi R-19レベルを示す。NRIのレボキセチンを急性(1回)または長期(18日間)のどちらかで投与した。注目すべきことに、mi R-19aおよびmi R-19bのレベルがNRIの急性投与の後ではPFCにおいて低下し(それぞれ、図12Aおよび図12B)、しかし、NRIの長期投与の後では増大した(それぞれ、図12Cおよび図12D)。

【0100】

【図13A-13D】図13A-13Dは、社会的敗北に供されたマウスのPFCおよび扁桃体におけるmi R-19レベルを示す。mi R-19aおよびmi R-19bのレベルを、社会的敗北パラダイムに供されたマウスから採取される扁桃体からの試料において測定した。注目すべきことに、PFCにおけるmi R-19aおよびmi R-19bのレベルが、対照マウスに対して、社会的敗北に対する「感受性あり」として分類されるマウスにおいて上昇した(それぞれ、図13Aおよび図13B)。mi R-19のレベルはまた、対照マウスに対して、社会的敗北に対する「感受性あり」として分類されるマウスの扁桃体において上昇した(それぞれ、図13Cおよび図13D)。

30

【0101】

【図14】図14は、miRNA-19bがCB1の3'UTRを標的とすることを示す。CB1の3'UTR、および、mi R-19bまたはGFP対照のどちらかを過剰発現するプラスミドによるHT-22細胞のトランスフェクションは、正規化されたルシフェラーゼレベルにおける50%の低下を引き起こした。

【0102】

40

【図15A】図15Aは、マウス脳の冠状切片の概略的例示である。図15Aは、BLAを含む脳におけるいくつかの核を示す(PaxinosおよびFranklinによるマウス脳からの改編)。

【図15B】図15Bは、マウス脳の冠状切片の概略的例示である。図15Bは脳におけるCB1分布を示す(Allen Brain Atlasからの改編、www.mouse.brain-map.org/)。注目すべきことに、CB1がBLAに多く存在することがこの分布によって明らかである。

【0103】

【図16】図16は、扁桃体の基底外側核(BLA)における記憶固定についての提案された機構の概略的例示である。コルチコステロン(CORT)が、内在性カンナビノイド

50

( e C B ) の合成を誘導するために G s - c A M P / P K A 経路を活性化する未だ特徴確認されていない膜結合型グルコシルコイド受容体 ( m b G R ) に結合する。内在性カンナビノイドが、G A B A 作動性終末部における C B 1 受容体に結合し、これにより、G A B A 放出を阻害するシナプスの中に放出される。G A B A 放出のこの阻害がノルエピネフリン ( N E ) 放出を脱抑制し、シナプス後の - アドレナリン受容体の N E 活性化を増大させ、これにより、情動的嫌悪記憶の固定を増大させる。

【 0 1 0 4 】

【図 1 7 A - 1 7 B】図 1 7 A - 1 7 B は、R I S C 複合体における A g o 2 を例示する。図 1 7 A は、m i R N A と m R N A との相互作用を伝達する R I S C 複合体における A g o 2 の概略例示である；図 1 7 B は、抗 A g o 2 抗体を用いて行われたウエスタンブロット分析を例示する。この I P は、A g o 2 抗体により 1 回、I g G 1 対照により 1 回沈殿させられた全脳試料を比較したときに認められ得るように、A g o 2 タンパク質に対して特異的であった。注目すべきことに、A g o 2 タンパク質は、I g G 1 対照により沈殿させられた試料においては検出されなかった。

10

【 0 1 0 5 】

【図 1 8 A - 1 8 D】図 1 8 A - 1 8 D は、社会的回避試験を示す。マウスを、慣らすために単独で 3 分間迷路に置き ( 図 1 8 A および図 1 8 B )、マウスの動きを記録し、プロットした。3 分後、ノーバル ( n o v a l ) I C R マウスを、被験マウスの隣のチャンバーに置き ( 図 1 8 C および図 1 8 D )、被験マウスの動きを再び記録し、プロットした。

【 0 1 0 6 】

20

【図 1 9 A】図 1 9 A は、アレイでアップレギュレーションされる選択された m i R N A のヒートマップ例示を示す。

【 0 1 0 7 】

【図 1 9 B】図 1 9 B は、アレイでダウンレギュレーションされる選択された m i R N A のヒートマップ例示を示す。

【 0 1 0 8 】

【図 2 0 A】図 2 0 A は、マイクロアレイ結果からの m i R - 1 5 a の l o g 2 発現を示す。それぞれの赤色ドットがアレイの 1 回の反復を示す。対照群 ( C N T ) は 4 回の反復を有し、「感受性あり」群 ( S U S C ) は 3 回の反復を有し、「立ち直りが速い」群 ( R E S I L ) は 3 回の反復を有した。黒色線により、それぞれの群における反復の平均を示した。

30

【図 2 0 B】図 2 0 B は、マイクロアレイ結果からの F K B P 5 の l o g 2 発現を示す。それぞれの赤色ドットがアレイの 1 回の反復を示す。対照群 ( C N T ) は 4 回の反復を有し、「感受性あり」群 ( S U S C ) は 3 回の反復を有し、「立ち直りが速い」群 ( R E S I L ) は 3 回の反復を有した。黒色線により、それぞれの群における反復の平均を示した。

【 0 1 0 9 】

【図 2 0 C】図 2 0 C はマウス F K B P 5 の 3 ' U T R 配列を示す ( t a r g e t s c a n . o r g から採用 ) 。

【 0 1 1 0 】

40

【図 2 1 A - 2 1 B】図 2 1 A - 2 1 B は、社会的敗北後の対照に対して、「感受性あり」マウスにおける扁桃体の m i R - 1 5 a のレベル ( 図 2 1 A ) および F K B P 5 のレベル ( 図 2 1 B ) を示す。注目すべきことに、m i R - 1 5 a のレベルが、社会的敗北に供され、かつ、「感受性あり」として特徴づけられるマウスの扁桃体において上昇した ( 図 2 1 A ) 。F K B P 5 のレベルが、社会的敗北に供され、かつ、「感受性あり」として特徴づけられるマウスの扁桃体において低下した ( 図 2 1 B ) 。

【 0 1 1 1 】

【図 2 2】図 2 2 は、S t x 1 a、S g k 1 および A d r b 2 の 3 ' U T R の概略的例示である ( これらはそれぞれが単一の m i R N A - 1 5 結合部位を有する ) 。

【 0 1 1 2 】

50

【図23】図23は、対照マウスに対して、社会的敗北に供されたマウスにおける扁桃体のmiR-181のレベルを示す。注目すべきことに、miR-181のレベルが、社会的敗北に供されたマウスの扁桃体において上昇した。

【0113】

【図24】図24は、miR-181およびグルタミン酸受容体についての生物情報学予測を組み合わせたことを表すバンドダイアグラムを示す。

【0114】

【図25】図25は、miR-181の6個の潜在的標的の完全な3'UTRの概略的例示である。

【0115】

【図26】図26は、ストレス後の縫線核におけるmiR182の発現レベルを示す。注目すべきことに、急性30分不動ストレスは、リアルタイムPCRによって測定されるように、ストレス後24時間で試験されたとき、RNにおけるmiR182の低下した発現レベルを引き起こした。 $** = P < 0.01$ ;  $n = 8$  (各群)。

【0116】

【図27A-27C】図27A-27Cは、miR182が、DSCAM、L1CAMおよびTSNAXの3'UTRを標的とすることを示す、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を示す。図27Aは、記載された遺伝子の3'UTRおよび空ベクター、または、特定のmiRを過剰発現するベクターによりトランスフェクションされたN2a細胞における共トランスフェクションされたホタルルシフェラーゼレポーターの活性に対して正規化されるウミシイタケルシフェラーゼ活性を示す、ルシフェラーゼアッセイのデータを例示する。L1cam (図27B) およびTsnax (図27C) の3'UTRにおけるmiR182シード一致部での変異はmiR182の抑制効果を阻止した。バーは平均±s.e.m.を表す。 $* P < 0.05$ ;  $** P < 0.01$ ;  $*** P < 0.001$ 。

【0117】

【図28A-28D】図28A-28Dは、扁桃体(AMY)および前頭前皮質(PFC)におけるmiR135の発現を示す。図28Aは、急性SSRIおよびNRIがmiR135aレベルをAMYにおいて増大させたことを例示する; 図28Bは、AMYにおけるmiR135bレベルが、生理的食塩水と比較して、SSRIまたはNRIの急性投与によってアップレギュレーションされたことを例示する; 図28Cは、長期SSRIがmiR135aレベルをPFCにおいて低下させたことを例示する; 図28Dは、PFCにおけるmiR135bレベルが急性SSRIまたはNRIによってアップレギュレーションされ、長期SSRI処置によって低下したことを例示する。 $n = 7 \sim 8$  (各群)。 $* = P < 0.05$ 、 $** = P < 0.01$ ;  $*** = P < 0.0001$ 。

【0118】

【図29A-29B】図29A-29Bは、社会的敗北後のマウスの循環系における増大したmiR135レベルを示す。社会的敗北後2週間でのマウスの血漿におけるmiR135aレベル(図29A)およびmiR135bレベル(図29B)が、対照マウスと比較して著しく増大した( $** = P < 0.01$ 、 $n = 7 \sim 16$  (各群))。

【0119】

【図30A-30B】図30A-30Bは、インビトロおよびインビボにおけるmiR135KDの検証を示す。図30A~図30Bは、miR135がHtr1a(図30A)またはslc6a4(図30B)を標的とすることがmiR135bのKD構築物によって阻止されたことを示す、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を例示する。

【図30C-30E】図30C-30Eは、インビトロおよびインビボにおけるmiR135KDの検証を示す。図30Cは、miR135bKDウイルスベクターおよび対照ウイルスベクターの概略的例示である; 図30D~図30EはDRN注入部位の例示である(図30DはPaxsinosからの採用である); 図30Eは、miR135KDレンチウイルスを感染させたDRNのGFAP染色である。

【0120】

10

20

30

40

50

【図31A - 31B】図31A - 31Bは、miR135KDマウスにおける増大した不安様行動およびSSRIに対する弱化した応答を示す。図31Aは、miR135KDマウスの行動がオープンフィールド試験において対照マウスと類似していたことを例示する；図31Bは、高架式十字迷路において、対照マウスと比較して、miR135KDマウスにおける増大した不安様行動を例示する。不動時間が両方の群においてSSRIによって減少し、しかしながら、その減少が、試験の最後の2分において、対照と比較して、miR135KDマウスでは弱まった。 $\sim = p < 0.1$  \*  $= p < 0.05$  ; \*\*  $= p < 0.01$  ; \*\*\*  $= p < 0.001$ 。n = 10 ~ 11 (各群)。

【図31C - 31E】図31C - 31Eは、miR135KDマウスにおける増大した不安様行動およびSSRIに対する弱化した応答を示す。図31Cは、明暗所移動試験において、miR135KDマウスが、急性ストレスの後ではなく、基礎的ストレス条件のもとでは、対照マウスと比較して、明るいチャンバーにおいてより多くの時間を過ごしたことを例示する；図31Dは、miR135KDマウスが、急性ストレスの後ではなく、基礎的ストレス条件のもとでは、対照マウスと比較して、明るいチャンバーをより多く訪れたことを例示する；図31Eは、miR135KDマウスが、急性ストレスの後ではなく、基礎的ストレス条件のもとでは、対照マウスと比較して、明るいチャンバーにおいてそれほど多くの距離を移動しなかったことを例示する。不動時間が両方の群においてSSRIによって減少し、しかしながら、その減少が、試験の最後の2分において、対照と比較して、miR135KDマウスでは弱まった。 $\sim = p < 0.1$  \*  $= p < 0.05$  ; \*\*  $= p < 0.01$  ; \*\*\*  $= p < 0.001$ 。n = 10 ~ 11 (各群)。

【図31F - 31G】図31F - 31Gは、miR135KDマウスにおける増大した不安様行動およびSSRIに対する弱化した応答を示す。図31Fは、基礎的条件およびSSRI投与後の両方で尾懸垂試験において、miR135KDマウスと対照マウスとの間に差がないことを例示しており、それにもかかわらず、不動時間の減少が、両方の群において、基礎的条件と比較して、SSRI処置の後で認められた。(図31F ~ 図31G)。不動時間が両方の群においてSSRIによって減少し、しかしながら、その減少が、試験の最後の2分において、対照と比較して、miR135KDマウスでは弱まった。 $\sim = p < 0.1$  \*  $= p < 0.05$  ; \*\*  $= p < 0.01$  ; \*\*\*  $= p < 0.001$ 。n = 10 ~ 11 (各群)。

#### 【0121】

【図32】図32は、miR135マウスの誘導可能な過剰発現系の概略的例示である。miR135a配列の前のloxP化トランザクショナル停止およびGFレポーターを発現するトランスジェニックマウス。変異トランスジェニックマウスはmiR135aを5-HTのePet陽性細胞においてのみ発現する。

#### 【0122】

【図33A - 33C】図33A - 33Cは、miR135を5-HTニューロンにおいて過剰発現するマウス系統の検証を示す。図33Aは、miR135が、対照マウスと比較して、miR135OEマウスのRNにおいて過剰発現されたことを例示する。図33B ~ 図33Cは、miR135標的遺伝子のmRNAが、Slc6a4 (図33B) およびHtr1a (図33C) の両方について、miR135OEマウスのRNにおいてダウンレギュレーションされたことを例示する。 $\# = p < 0.1$  \*  $= p < 0.05$  ; n = 4 (各群)。

#### 【0123】

【図34A - 34C】図34A - 34Cは、miR135OEマウスにおける社会的敗北後の低下した不安およびうつ病様行動を示す。図34Aは、miR135OEマウスが、低下した不安様行動をオープンフィールド試験において有することを示す；図34Bは、明暗所移動試験におけるmiR135OEマウスの、対照と比較してより少ない不安様行動を示す；図34Cは、miR135OEマウスの高架式十字迷路における、対照と比較して低下した不安様行動を示す。 $\# = p < 0.1$  \*  $= p < 0.05$  ; \*\*  $= p < 0.01$ 。n = 7 ~ 11 (各群)。

【図34D - 34E】図34D - 34Eは、miR135OEマウスにおける社会的敗北後での低下した不安およびうつ病様行動を示す。図34Dは、尾懸垂試験において、対照と比較して、miR135OEマウスの不動時間の減少に向かう傾向を示す；図34Eは、強制水泳試験において、対照と比較して、miR135OEマウスにおける減少した不動時間を示す。 $\# = p < 0.1$  \*  $= p < 0.05$  ; \* \*  $= p < 0.01$ 。n = 7 ~ 11 (各群)。

【発明を実施するための形態】

【0124】

本発明はそのいくつかの実施形態において、マイクロRNAに関連し、より具体的には、しかし、限定ではなく、疾患を診断し、モニターし、また、処置するための該マイクロRNAの使用に関連する。

【0125】

本発明の原理および操作は、図面および付随する説明を参照してより良く理解されることができる。

【0126】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明に示される細部、または、実施例によって例示される細部に必ずしも限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、あるいは、様々な方法で実施、または、実行される。また、本明細書中において用いられる表現法および用語法は説明のためであって、限定として見なされるべきでないことを理解しなければならない。

【0127】

調節不全のセロトニン作動性活性と、精神医学的障害（例えば、不安およびうつ病など）とのつながりがこれまでに立証されており、それにもかかわらず、これらの病理の根底にある分子的機構は完全には理解されていない。マイクロRNA (miR) は、遺伝子発現を転写後に調節し、脳に多く存在する小さいRNA分子のサブセットである。

【0128】

本発明を実施に移しているとき、本発明者らは、特定のマイクロRNA (miR) が、セロトニン (5HT) 神経膠関連遺伝子の調節に関与していること、したがって、異常なセロトニンレベルに伴う医学的状態（例えば、精神医学的障害など）を調整することに關与していることを発見した。

【0129】

本明細書中下記および下記の実施例の節において例示されるように、本発明者らは、5HTレポーターマウス (ePET-YFP) の縫線核 (RN) から得られる5HTニューロンにおけるmiR発現パターンを、miRマイクロアレイを使用して明らかにした (下記の実施例の節における表2A ~ 表2B参照)。アレイから得られるセロトニン作動性ニューロンの特異的なmiR発現プロファイルを生物情報学的に分析して、重要なセロトニン作動性関連遺伝子 (例えば、セロトニン輸送体 (Slc6a4、図1D)、セロトニン自己受容体 (Htr1a、図1E)、トリプトファンヒドロキシラーゼ2 (Tph2、図1F) およびモノアミンヒドロキシラーゼ (MaOA、図1G) など) を標的とすることが推定されるmiRを特定した。これらの遺伝子についての3'UTRのmiRNA標的化をさらに、5HTニューロン遺伝子の特異的に標的とし、これらを調節する特定のmiR (例えば、miR-135) を例示してインビトロで試験した (図1H ~ 図1Iおよび図2C ~ 図2D参照)。本発明者らはさらに、miR135の発現レベルが、急性ストレスの後で (図3A ~ 図3D)、また、抗うつ剤による処置の後で (図3E ~ 図3J)、RNおよび血漿において改変されることを例示している。成体マウスのRNにおけるインビボでのmiR-135の過剰発現は社会的敗北の後におけるうつ病様行動を低下させた (図4A ~ 図4H)。そのうえ、本発明者らは、(Htr1aの直接的な抑制を介した) ニューロン活性の調節因子としてのmiR-182の活性 (図8)、および、精神病理学的行動の調節因子としてのmiR-182の活性 (図9)、ならびに、[CRH1R (図7A ~

10

20

30

40

50

図7B)、FK506結合タンパク質5(FKBP5)(図21A~図21B)、ならびに、Stx1a、Sgk1およびAdrb2(図22)の直接的な抑制を介した]ストレス応答の調節因子としてのmiR-15の活性を例示している。本発明者らはまた、miR-19によるベータアドレナリン作動性受容体(Adrb1)およびカナビノイド受容体1(CB1)の特異的な標的化を例示している。miR-19の過剰発現はAdrb1を抑制し(図6A~図6C)、一方、miR-19のノックダウンはAdrb1の発現を高めた(図6D~図6E)。miR-19の過剰発現はまた、CB1を抑制した(図14)。本発明者らはまた、miR-181についての標的を発見している。具体的には、本発明者らは、miR-181がグルタミン酸受容体の特異的に調節することを例示している(図24および図25)。まとめると、これらの結果は、miR-135、miR-335、miR-181、miR-182、miR-26、miR-27、miR-15およびmiR-19などのmiRNAまたは当該miRNAを調節する配列の、治療様式としての使用を実証するものである。

10

#### 【0130】

従って、本発明の1つの局面によれば、セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状态を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、少なくとも1つのマイクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させることを含む方法が提供される。

#### 【0131】

特定の実施形態によれば、セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状态を処置するために、マイクロRNAはmiR-135、miR-335、miR-26およびmiR-182を含む。

20

#### 【0132】

本発明の別の局面によれば、アドレナリンまたはノルアドレナリンの低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、マイクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させることを含む方法が提供される。

#### 【0133】

特定の実施形態によれば、アドレナリンまたはノルアドレナリンの低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置するために、マイクロRNAはmiR-19を含む。

30

#### 【0134】

本発明の別の局面によれば、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、マイクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させることを含む方法が提供される。

#### 【0135】

特定の実施形態によれば、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置するために、マイクロRNAはmiR-15を含む。

#### 【0136】

本発明の別の局面によれば、グルタミン酸受容体の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置の必要性のある対象において処置する方法であって、マイクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを上記対象の細胞に投与し、または、上記対象の細胞において発現させることを含む方法が提供される。

40

#### 【0137】

1つの具体的な実施形態によれば、グルタミン酸受容体の低いレベルが治療上有益である医学的状态を処置するために、マイクロRNAはmiR-181を含む。

#### 【0138】

用語「処置(治療)する」は、疾患、障害もしくは状態の発症を阻害すること、もしくは停止させること、および/または、疾患、障害もしくは状態の軽減、寛解もしくは退行を生じさせること、あるいは、疾患、障害もしくは医学的状态を、当該疾患、障害もしくは

50

は状態について危険性があるかもしれないが、当該疾患、障害もしくは状態を有すると未だ診断されていない対象において生じさせないことを示す。当業者は、様々な方法論およびアッセイが、疾患、障害もしくは状態の発症を評価するために使用され得ること、また、同様に、様々な方法論およびアッセイが、疾患、障害もしくは状態の軽減、寛解もしくは退行を評価するために使用され得ることを理解するであろう。

【0139】

本明細書中で使用される場合、用語「対象」には、哺乳動物、好ましくは、どのような年齢であれ、上記病理に苦しむヒトが含まれる。好ましくは、この用語は、上記病理を発現する危険性がある個体を包含する。

【0140】

本明細書中で使用される場合、表現「セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状态」は、セロトニンのレベルを増大させることにより、（本明細書中下記でさらに詳述されるように）、それに伴う疾患または医学的症状の発生が妨げられ得るか、あるいは、それに伴う疾患進行または医学的症状が停止され得る疾患または障害を示す。

【0141】

本明細書中で使用される場合、用語「セロトニン」は、[5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)]としても示されるモノアミン神経伝達物質を示す。セロトニンは、例えば、CAS番号50-67-9で示される。

【0142】

1つの実施形態によれば、セロトニンレベルをシナプス間隙において増大させる方法であって、少なくとも1つのミクロRNAまたはその前駆体をコードする外因性ポリヌクレオチドを対象の神経膠細胞（例えば、セロトニン作動性ニューロン）に投与するか、または、対象の神経膠細胞（例えば、セロトニン作動性ニューロン）において発現させることを含む方法が提供される。

【0143】

本明細書中で使用される場合、用語「シナプス間隙」は、電氣的または化学的なシグナルが通過する2つのニューロンの間の領域を示す。

【0144】

「神経膠細胞」は、ニューロンまたはグリア細胞（例えば、乏突起膠細胞または星状膠細胞）を示す。

【0145】

本明細書中で使用される場合、用語「セロトニン作動性ニューロン」は、セロトニンを分泌するか、または、セロトニンの再取り込み（すなわち、その細胞表面に発現されるセロトニン輸送体による）が可能であるニューロンを示す。

【0146】

セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状态は、例えば、うつ病、不安、ストレス、疲労、損なわれた認知機能、パニック発作、脅迫行動、嗜癖、社会恐怖を含むあらゆる気分障害、睡眠障害、食品関連障害、成長障害および生殖障害を含み得る。

【0147】

1つの具体的な実施形態によれば、セロトニンレベルの上昇が治療上有益である医学的状态はうつ病を含む。

【0148】

1つの実施形態によれば、医学的状态がうつ病または不安であるとき、ミクロRNAはmiR-135である。

【0149】

うつ病または不安は必ずしもセロトニンに関連づけられない可能性があるものとする。

【0150】

本明細書中で使用される場合、表現「アドレナリンまたはノルアドレナリンの低いレベルが治療上有益である医学的状态」は、アドレナリンまたはノルアドレナリンの発現または活性を低下させることにより、（本明細書中下記でさらに詳述されるように）、それに

10

20

30

40

50



伴う疾患または医学的症状の発生が妨げられ得るか、あるいは、それに伴う疾患進行または医学的症状が停止され得る疾患または障害を示す。

【0151】

本明細書中で使用される場合、用語「アドレナリン」は、(エピネフリンとしても知られている)ホルモンおよび神経伝達物質を示す。アドレナリンは、例えば、C A S 番号 5 1 - 4 3 - 4 で示される。

【0152】

本明細書中で使用される場合、用語「ノルアドレナリン」は、(ノルエピネフリンとしても知られている)ホルモンおよび神経伝達物質として作用するカテコールアミンを示す。ノルアドレナリンは、例えば、C A S 番号 ( 1 ) 5 1 - 4 1 - 2 ( 1 ) および同 1 3 8 - 6 5 - 8 ( d 1 ) で示される。

10

【0153】

アドレナリンまたはノルアドレナリンの低いレベルが治療上有益である医学的状态は、例えば、ストレス関連障害、不安、記憶障害、心臓の病気(例えば、動悸、頻脈、不整脈)、頭痛、振戦、高血圧および急性肺水腫を含み得る。

【0154】

本明細書中で使用される場合、表現「副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)の低いレベルが治療上有益である医学的状态」は、CRHの発現または活性を低下させることにより、(本明細書中下記でさらに詳述されるように)、それに伴う疾患または医学的症状の発生が妨げられ得るか、あるいは、それに伴う疾患進行または医学的症状が停止され得る疾患または障害を示す。

20

【0155】

本明細書中で使用される場合、用語「副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)」は、(副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)またはコルチコリベリンとしても知られている)ポリペプチドホルモンおよび神経伝達物質を示す。CRHは、例えば、N P \_ 0 0 0 7 4 7 . 1 で示される。

【0156】

CRHの低いレベルが治療上有益である医学的状态は、例えば、ストレス、うつ病、不安、疲労、損なわれた認知機能、パニック発作、脅迫行動、嗜癮、社会恐怖、睡眠障害、食品関連障害、成長障害、生殖障害および肥満を含み得る。

30

【0157】

本明細書中で使用される場合、表現「グルタミン酸受容体の低いレベルが治療上有益である医学的状态」は、グルタミン酸受容体の発現または活性を低下させることにより、(本明細書中下記でさらに詳述されるように)、それに伴う疾患または医学的症状の発生が妨げられ得るか、あるいは、それに伴う疾患進行または医学的症状が停止され得る疾患または障害を示す。

【0158】

本明細書中で使用される場合、用語「グルタミン酸受容体」は、典型的にはニューロン細胞の膜に位置するシナプス受容体を示す(例えば、G r m 1、G r i k 3、G r m 5、G r i a 2、G r i k 2 および G r m 7)。グルタミン酸受容体は、例えば、N P \_ 0 0 0 8 2 2 . 2 [グルタミン酸受容体イオンチャンネル型カイニン酸3(G r i k 3)] ; N P \_ 0 0 0 8 1 7 . 2、N P \_ 0 0 1 0 7 7 0 8 8 . 1、N P \_ 0 0 1 0 7 7 0 8 9 . 1 [グルタミン酸受容体イオンチャンネル型A M P A 2 ( G r i a 2 ) ] ; N P \_ 0 0 1 1 5 9 7 1 9 . 1、N P \_ 0 6 8 7 7 5 . 1、N P \_ 7 8 6 9 4 4 . 1 [グルタミン酸受容体イオンチャンネル型カイニン酸2(G r i k 2)] ; N P \_ 0 0 0 8 3 3 . 1、N P \_ 0 0 1 1 3 7 3 0 3 . 1 [グルタミン酸受容体代謝型5(G r m 5)] ; N P \_ 0 0 0 8 3 5 . 1、N P \_ 8 7 0 9 8 9 . 1 [グルタミン酸受容体代謝型7(G r m 7)] ; N P \_ 0 0 0 8 2 9 . 2、N P \_ 0 0 1 1 0 7 8 0 1 . 1 [グルタミン酸受容体代謝型1(G r m 1)] で示される。

40

【0159】

50

グルタミン酸受容体の低いレベルが治療上有益である医学的状態は、例えば、てんかん発作（例えば、てんかん）、ハンチントン病、統合失調症、脆弱X症候群、全般性不安障害および癌（例えば、メラノーマ）を含み得る。

#### 【0160】

本明細書中で使用される場合、用語「マイクロRNAまたはその前駆体」は、転写後の調節因子として作用するマイクロRNA (miRNA) 分子を示す。マイクロRNAは典型的には、プレ-miR (プレ-マイクロRNA前駆体) からプロセッシングされる。プレ-miRは、例えば、培養細胞にトランスフェクションされたとき、機能的なmiRNAに効率よくプロセッシングされる、RNAポリメラーゼIIIによって転写される一組の前駆体miRNA分子である。プレ-miRを使用して、特異的なmiRNA活性を、このmiRNAを通常は発現しない細胞型において誘発することができ、したがって、その標的の機能を、その発現を「(miRNA)機能獲得」実験においてダウンレギュレーションすることによって検討することができる。様々なプレ-miR設計が、miRNA Registryにおいて列挙されている公知miRNAのすべてに対して存在しており、また、どのような研究のためにでも容易に設計され得る。マイクロRNAは、本明細書中下記でさらに記載するように、細胞自体に投与されるか、または、核酸構築物中に連結される前駆体分子からコードされる場合がある。

10

#### 【0161】

本教示のマイクロRNAは、どのようなマイクロRNA標的であれ、標的との結合、標的への結合、標的の調節、標的のプロセッシング、標的の妨害、標的の増強、標的の安定化および/または標的の脱安定化をもたらし得るものとする。そのような標的は、DNA分子、RNA分子およびポリペプチド（これらに限定されない）を含む、いかなる分子でもあり得、例えば、セロトニン関連遺伝子、例えば、セロトニン輸送体（すなわち、SERTまたはSLC6A4）、セロトニン阻害受容体1a (Htr1a)、トリプトファンヒドロキシラーゼ2 (Tph2) およびモノアミンヒドロキシラーゼ (MAOA) など；アドレナリンまたはノルアドレナリン受容体（アドレナリン作動性受容体、例えば、Adr1など）；アデニル酸シクラーゼ1型 (ADCY1)；CRH受容体、例えば、Crh1Rなど；または、任意の他の分子、例えば、FK506結合タンパク質5 (FKBP5)、カナビノイド受容体1 (CB1)、ダウン症候群細胞接着分子 (Dscam)、トランスリン会合タンパク質X (Tsnax) および細胞接着分子L1 (L1cam) など（これらに限定されない）が可能である（すべてが本明細書中下記でさらに詳しく記載される）。

20

30

#### 【0162】

本発明のマイクロRNAが、例えば、マイクロRNA登録 (<http://www.dots.sangerdot.acdot.uk/Software/Rfam/mirna/indexdot.shtml>) を含めて、様々なデータベースを介して同定され得るものとする。

#### 【0163】

本発明の方法は、マイクロRNAをコードする外因性ポリヌクレオチドを対象に投与することによって、または、対象の細胞において発現させることによって達成され得る。

40

#### 【0164】

用語「ポリヌクレオチド」は、リボ核酸 (RNA)、デオキシリボ核酸 (DNA) またはそれらの模倣体の一本鎖または二本鎖のオリゴマーまたはポリマーを示す。この用語には、自然界に存在する核酸分子（例えば、RNAまたはDNA）に由来するポリヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチド、自然界に存在する塩基、糖および共有結合性のヌクレオシド間連結（例えば、骨格）から構成される合成ポリヌクレオチド分子および/またはオリゴヌクレオチド分子、同様にまた、自然界に存在するそれぞれの部分と同様に機能する自然界に存在しない部分を有する合成ポリヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチドが含まれる。

#### 【0165】

50

本発明のポリヌクレオチドの長さは、必要に応じて100ヌクレオチド以下、必要に応じて90ヌクレオチド以下、必要に応じて80ヌクレオチド以下、必要に応じて70ヌクレオチド以下、必要に応じて60ヌクレオチド以下、必要に応じて50ヌクレオチド以下、必要に応じて40ヌクレオチド以下、必要に応じて30ヌクレオチド以下（例えば、29ヌクレオチド、28ヌクレオチド、27ヌクレオチド、26ヌクレオチド、25ヌクレオチド、24ヌクレオチド、23ヌクレオチド、22ヌクレオチド、21ヌクレオチド、20ヌクレオチド、19ヌクレオチド、18ヌクレオチド、17ヌクレオチド、16ヌクレオチド、15ヌクレオチド）、必要に応じて12ヌクレオチド～24ヌクレオチドの間、必要に応じて5ヌクレオチド～15ヌクレオチドの間、必要に応じて5ヌクレオチド～25ヌクレオチドの間、最も好ましくは約20～25ヌクレオチドである。

10

**【0166】**

本発明の教示に従って設計されるポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチドを含む）は、酵素的合成または固相合成の両方を含めて、当技術分野で知られている任意のオリゴヌクレオチド合成法に従って作製することができる。固相合成を実行するための様々な設備および試薬が、例えば、Applied Biosystemsから市販されている。そのような合成のための他の手段があれば、それらもまた用いることができる；オリゴヌクレオチドの実際の合成は十分に当業者の能力の範囲内であり、固相化学（例えば、シアノエチルホスホルアミダイト）、その後、脱保護、脱塩および精製（例えば、自動化されたトリチル-オン法またはHPLCによる）を利用して、例えば、下記において詳しく記載されるような確立された方法論により達成することができる：Sambrook, J. およびRussell, D.W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R.M. 他編 (1994, 1989), "Current Protocols in Molecular Biology", 第I巻～第III巻, John Wiley & Sons, ボルチモア、メリーランド; Perbal, B. (1988), "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, ニューヨーク; およびGait, M.J. 編 (1984), "Oligonucleotide Synthesis".

20

**【0167】**

RNA分子を含むポリヌクレオチドは、本明細書中下記でさらに記載されるような発現ベクターを使用して作製され得るものとする。

30

**【0168】**

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは修飾ポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、当技術分野で知られている様々な方法を使用して修飾することができる。

**【0169】**

例えば、本発明のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、3' から5' へのホスホジエステル連結で結合する、プリン塩基およびピリミジン塩基からなる複素環式ヌクレオシドを含み得る。

**【0170】**

好ましく使用されるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、本明細書中下記で幅広く記載されるように、骨格、ヌクレオシド間連結または塩基のいずれかにおいて改変されるものである。

40

**【0171】**

本発明のこの局面に従って有用である好ましいオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの具体的な例には、修飾された骨格または非天然型ヌクレオシド間連結を含有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドには、下記において開示されるように、リン原子を骨格に保持するものが含まれる：米国特許第4469863号、同第4476301号、同第5023243号、同第5177196号、同第5188897号、同第5264423号、同第5276019号、同第5278302号、同第5286717号、同第53

50

2 1 1 3 1 号、同第 5 3 9 9 6 7 6 号、同第 5 4 0 5 9 3 9 号、同第 5 4 5 3 4 9 6 号、同第 5 4 5 5 2 3 3 号、同第 5 4 6 6 6 7 7 号、同第 5 4 7 6 9 2 5 号、同第 5 5 1 9 1 2 6 号、同第 5 5 3 6 8 2 1 号、同第 5 5 4 1 3 0 6 号、同第 5 5 5 0 1 1 1 号、同第 5 5 6 3 2 5 3 号、同第 5 5 7 1 7 9 9 号、同第 5 5 8 7 3 6 1 号および同第 5 6 2 5 0 5 0 号。

#### 【0172】

好ましい修飾オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド骨格には、例えば、ホスホリチオアート；キラルなホスホリチオアート；ホスホリジチオアート；ホスホトリエステル；アミノアルキルホスホトリエステル；メチルホスホナートおよび他のアルキルホスホナート（3' - アルキレンホスホナートおよびキラルなホスホナートを含む）；ホスフィナート；ホスホルアミダート（3' - アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含む）；チオノホスホルアミダート；チオノアルキルホスホナート；チオノアルキルホスホトリエステル；ならびに、通常の 3' - 5' 連結を有するボラノホスホナート、これらの 2' - 5' 連結類似体、および、逆の極性を有するもの（この場合、ヌクレオシド単位の隣接対が、3' - 5' から 5' - 3' に、または、2' - 5' から 5' - 2' に連結される）が含まれる。上記修飾体の様々な塩、混合塩および遊離酸形態もまた使用することができる。

#### 【0173】

別法として、リン原子を骨格に含まない修飾オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルのヌクレオシド間連結、ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルの混合型ヌクレオシド間連結、あるいは、1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子ヌクレオシド間連結または複素環ヌクレオシド間連結によって形成される骨格を有する。これらには、下記の米国特許において開示されるように、（部分的にはヌクレオシドの糖部分から形成される）モルホリノ連結；シロキサン骨格；スルフィド骨格、スルホキシド骨格およびスルホン骨格；ホルムアセチル骨格およびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル骨格およびメチレンチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファマート骨格；メチレンイミノ骨格およびメチレンヒドラジノ骨格；スルホナート骨格およびスルホンアミド骨格；アミド骨格を有するもの；ならびに、N、O、S および C H<sub>2</sub> の混合成分部分を有する他のものが含まれる：米国特許第 5 0 3 4 5 0 6 号、同第 5 1 6 6 3 1 5 号、同第 5 1 8 5 4 4 4 号、同第 5 2 1 4 1 3 4 号、同第 5 2 1 6 1 4 1 号、同第 5 2 3 5 0 3 3 号、同第 5 2 6 4 5 6 2 号、同第 5 2 6 4 5 6 4 号、同第 5 4 0 5 9 3 8 号、同第 5 4 3 4 2 5 7 号、同第 5 4 6 6 6 7 7 号、同第 5 4 7 0 9 6 7 号、同第 5 4 8 9 6 7 7 号、同第 5 5 4 1 3 0 7 号、同第 5 5 6 1 2 2 5 号、同第 5 5 9 6 0 8 6 号、同第 5 6 0 2 2 4 0 号、同第 5 6 1 0 2 8 9 号、同第 5 6 0 2 2 4 0 号、同第 5 6 0 8 0 4 6 号、同第 5 6 1 0 2 8 9 号、同第 5 6 1 8 7 0 4 号、同第 5 6 2 3 0 7 0 号、同第 5 6 6 3 3 1 2 号、同第 5 6 3 3 3 6 0 号、同第 5 6 7 7 4 3 7 号および同第 5 6 7 7 4 3 9 号。

#### 【0174】

本発明に従って使用される場合がある他のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、糖およびヌクレオシド間連結の両方において修飾されるものであり、すなわち、ヌクレオチド単位の骨格が新規な基により置き換えられる。塩基単位は、適切なポリヌクレオチド標的との相補のために維持される。そのようなオリゴヌクレオチド模倣体の一例には、ペプチド核酸（PNA）が含まれる。PNAオリゴヌクレオチドは、糖 - 骨格がアミド含有骨格（特に、アミノエチルグリシン骨格）により置き換えられるオリゴヌクレオチドを示す。塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する米国特許には、米国特許第 5 5 3 9 0 8 2 号、同第 5 7 1 4 3 3 1 号および同第 5 7 1 9 2 6 2 号が含まれるが、これらに限定されない（これらのそれぞれが参照によって本明細書中に組み込まれる）。本発明において使用される場合がある他の骨格修飾が米国特許第 6 3 0 3 3 7 4 号に開示されている。

#### 【0175】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはまた、塩基修飾または塩基置換を含む場合がある。本明細書中で使用される場合、「非修飾」塩基または「天然型」塩基には、プリン塩基のアデニン（A）およびグアニン（G）、ならびに、ピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）が含まれる。「修飾（された）」塩基には、他の合成塩基および天然型塩基（これらに限定されない）が含まれ、例えば、5 - メチルシトシン（5 - me - C）；5 - ヒドロキシメチルシトシン；キサンチン；ヒポキサンチン；2 - アミノアデニン；アデニンおよびグアニンの6 - メチル誘導体および他のアルキル誘導体；アデニンおよびグアニンの2 - プロピル誘導体および他のアルキル誘導体；2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび2 - チオシトシン；5 - ハロウラシルおよびシトシン；5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシン；6 - アゾウラシル、6 - アゾシトシンおよび6 - アゾチミン；5 - ウラシル（プセウドウラシル）；4 - チオウラシル；8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシおよび他の8 - 置換されたアデニンおよびグアニン；5 - ハロ、特に5 - プロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換されたウラシルおよびシトシン；7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン；8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン；7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニン；ならびに、3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニンなどが含まれる。さらなる修飾塩基には、米国特許第3687808号；Kroschwitz, J. I. 編（1990）、「The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」、858頁～859頁、John Wiley & Sons；Englisch他（1991）、「Angewandte Chemie」、International Edition、30、613；および、Sanghvi, Y. S.、「Antisense Research and Applications」、第15章、289頁～302頁、S. T. CrookeおよびB. Lebleu編、CRC Press、1993に開示されているものが含まれる。そのような修飾塩基は、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるために特に有用である。これらには、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびに、N - 2 - 置換プリン、N - 6 - 置換プリンおよびO - 6 - 置換プリン（2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを含む）が含まれる。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6～1.2 増大させることが示されており（Sanghvi, Y. S. 他（1993）、「Antisense Research and Applications」、276頁～278頁、CRC Press、ボカラトン）、現時点では好ましい塩基置換であり、より一層具体的には、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わされた場合である。

#### 【0176】

1つの具体的な実施形態によれば、本発明のmiRNAポリヌクレオチドは、配列番号58～94で示される核酸配列を有する（表1A参照）。

表1A:miRNAポリヌクレオチド配列

配列	<i>miRNA</i>
配列番号 77-80	miR-15
配列番号 72-76	miR-19
配列番号 65-69	miR-26
配列番号 81-84	miR-27
配列番号 58-62	miR-135
配列番号 85-94	miR-181
配列番号 70-71	miR-182
配列番号 63-64	miR-335

10

20

## 【0177】

本明細書中上記で述べられるように、また、下記の実施例の節において示されるように、ミクロRNAは、特定の前駆体（すなわち、プレ-miRNA）に由来するプロセッシングされた分子であり、特異的なmiRNA機能のアップレギュレーションを、特定のmiRNA前駆体分子を使用して達成することができる。

## 【0178】

同様に意図されるものが、miRNAおよびその前駆体に対して相同的な配列である。相同性のレベルは、成熟型miRNAについては比較的高いものとするべきであるが、より大きな自由度が、配列変化が、成熟型miRに対応する核酸セグメントではなくヘアピン配列においてである限り、前駆体レベルでは許容される（例えば、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上）。

30

## 【0179】

そのような前駆体ポリヌクレオチド作用物質は典型的には、発現構築物の一部として標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）に投与される。この場合、ポリヌクレオチド作用物質は、標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）におけるミクロRNAの発現を構成的または誘導可能な様式で行わせることができるシス作用調節要素（例えば、プロモーター）の制御下で核酸構築物において連結される。

## 【0180】

本発明のミクロRNAポリヌクレオチド作用物質の例には、miR-15（例えば、GenBank受入番号NR\_029485RNA）、miR-19（例えば、GenBank受入番号NR\_029489.1）、miR-26（例えば、GenBank受入番号NR\_029500および同NR\_029499）、miR-27（例えば、GenBank受入番号NR\_029501RNA）、miR-135（例えば、GenBank受入番号NR\_029677.1）、miR-335（例えば、GenBank受入番号NR\_029899.1）、miR-181（例えば、GenBank受入番号NR\_029611.1）およびmiR-182（例えば、GenBank受入番号NR\_029614）が含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【0181】

ニューロン細胞特異的プロモーターの例には、ニューロン特異的エノラーゼ遺伝子プロモーター、シナプシンプロモーター、強化シナプシンプロモーター、カルシウムカルモジ

50

ユリンプロモーターおよびThy 1プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【0182】

心臓細胞特異的プロモーターの例には、心臓NCX1プロモーターおよび - ミオシン重鎖 (MHC) プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【0183】

本発明の発現構築物はまた、当該ベクターを真核生物における複製および組み込みについて好適にするさらなる配列を含む場合がある (例えば、シャトルベクター)。典型的なクローニング用ベクターは、転写開始配列および翻訳開始配列 (例えば、プロモーター、エンハンサー)、ならびに、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター (例えば、ポリアデニル化シグナル) を含有する。本発明の発現構築物はさらに、エンハンサーを含むことができ、これは、プロモーター配列に対して近位または遠位に位置することができ、プロモーター配列からの転写をアップレギュレーションすることにおいて機能することができる。

10

【0184】

エンハンサー要素は、転写を連結されている同種プロモーターまたは異種プロモーターから1000倍にまで刺激することができる。エンハンサーは、転写開始部位の下流側または上流側に置かれたときに活性である。ウイルスに由来する多くのエンハンサー要素は広範な宿主範囲を有しており、また、様々な組織において活性である。例えば、SV40初期遺伝子エンハンサーが多くの細胞型について好適である。本発明のために好適である他のエンハンサー/プロモーターの組合せには、ポリオマウイルスまたはヒトもしくはマウスのサイトメガロウイルス (CMV)、および、様々なレトロウイルス (例えば、マウス白血病ウイルス、マウス肉腫ウイルスまたはラウス肉腫ウイルス、および、HIVなど) から得られる長い縦列反復 (LTR) に由来する組合せが含まれる。Gluzman, Y. および Shenk, T. 編 (1983)、Enhancers and Eukaryotic Gene Expression (Cold Spring Harbor Press、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク) 参照 (これは参照によって本明細書中に組み込まれる)。

20

【0185】

ポリアデニル化配列もまた、検出可能な部分の発現効率を増大させるために本発明の発現構築物に加えることができる。2つの異なった配列要素が、正確かつ効率的なポリアデニル化のために要求される: ポリアデニル化部位の下流側に位置するGUリッチ配列またはUリッチ配列、および、この部位の11~30ヌクレオチド上流側に位置する6ヌクレオチドの高度保存配列、すなわち、AAUAAA。本発明のために好適である終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルには、SV40に由来するシグナルが含まれる。

30

【0186】

既に記載された実施形態に加えて、本発明の発現構築物は典型的には、クローン化された核酸の発現レベルを増大させるために、または、組換えDNAを有する細胞の特定を容易にするために意図される他の特化された要素を含有し得る。例えば、いくつかの動物ウイルスは、許容細胞型におけるウイルスゲノムの染色体外複製を促進するDNA配列を含有する。これらのウイルスレプリコンを有するプラスミドは、適切な因子が、プラスミドで運ばれる遺伝子、または、宿主細胞のゲノムとともに運ばれる遺伝子のどちらかによって提供される限り、エピソームとして複製される。

40

【0187】

本発明の発現構築物は真核生物レプリコンを含む場合も、または含まない場合もあり得る。真核生物レプリコンが存在するならば、ベクターは、真核生物細胞における増幅を、適切な選択マーカーを使用して行うことができる。構築物が真核生物レプリコンを含まないならば、エピソーム増殖を行うことができない。代わりに、組換えDNAが、操作された細胞のゲノムに一体化し、この場合、その細胞において、プロモーターにより、所望される核酸の発現が導かれる。

【0188】

50

核酸構築物は、適切な遺伝子送達ビヒクル／方法（トランスフェクション、形質導入など）および適切な発現系を使用して本発明の標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）に導入され得る。

#### 【0189】

哺乳動物発現ベクターの例には、p c D N A 3、p c D N A 3 . 1 ( + / - )、p G L 3、p Z e o S V 2 ( + / - )、p S e c T a g 2、p D i s p l a y、p E F / m y c / c y t o、p C M V / m y c / c y t o、p C R 3 . 1、p S i n R e p 5、D H 2 6 S、D H B B、p N M T 1、p N M T 4 1およびp N M T 8 1（これらはI n v i t r o g e nから入手可能である）、p C I（これはP r o m e g aから入手可能である）、p M b a c、p P b a c、p B K - R S Vおよびp B K - C M V（これらはS t r a t e g e n eから入手可能である）、p T R E S（これはC l o n t e c hから入手可能である）、ならびに、それらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0190】

真核生物ウイルス（例えば、レトロウイルスなど）から得られる調節要素を含有する発現ベクターもまた使用することができる。S V 4 0系ベクターには、例えば、p S V T 7およびp M T 2が含まれる。ウシパピローマウイルスに由来するベクターには、p B V - 1 M T H Aが含まれ、エプスタイン・バーウイルスに由来するベクターには、p H E B Oおよびp 2 0 5が含まれる。他の例示的なベクターには、p M S G、p A V 0 0 9 / A <sup>+</sup>、p M T O 1 0 / A <sup>+</sup>、p M A M n e o - 5およびパキウイルスp D S V Eが含まれる。

20

#### 【0191】

脂質に基づく系が、これらの構築物を本発明の標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）に送達するために使用される場合がある。

#### 【0192】

リポソームには、一定量を包む脂質二重層から構成されるあらゆる合成（すなわち、自然界に存在しない）構造が含まれる。リポソームは、エマルション、フォーム、ミセル、不溶性単層物、液晶、リン脂質分散物およびラメラ層などを含む。リポソームは、当技術分野における公知方法のいずれかによって調製され得る [ M o n k k o n e n , J . 他、1 9 9 4、J . D r u g T a r g e t、2 : 2 9 9 ~ 3 0 8 ; M o n k k o n e n , J . 他、1 9 9 3、C a l c i f . T i s s u e I n t .、5 3 : 1 3 9 ~ 1 4 5 ; L a s i c D D .、L i p o s o m e s T e c h n o l o g y I n c .、E l s e v i e r、1 9 9 3、6 3 ~ 1 0 5（第3章）；W i n t e r h a l t e r M、L a s i c D D、C h e m P h y s L i p i d s、1 9 9 3（9月）、6 4（1 - 3）：3 5 ~ 4 3 ]。リポソームは、正荷電、中性または負荷電であり得る。単核食細胞系（M P S）取り込みのために、リポソームは疎水性とすることができ、これは、リポソーム膜の（例えば、ポリエチレングリコール結合脂質および親水性粒子の使用による）親水性での遮蔽がM P S取り込みを受けにくくする場合があるからである。リポソームが、立体的に遮蔽された脂質（例えば、ガングリオシド - G M <sub>1</sub> およびホスファチジルイノシトールなど）を含まないこともまた好ましく、これは、これらの脂質がM P S取り込みを妨げるからである。

30

40

#### 【0193】

リポソームは単一脂質層であり得、または、多層状であり得る。治療剤が親水性であるならば、その送達、大きい単層小胞を使用してさらに改善される場合があり、これは、それらの内部体積がより大きいからである。逆に、治療剤が疎水性であるならば、その送達、多層小胞を使用してさらに改善される場合がある。別法として、治療剤（例えば、オリゴヌクレオチド）は脂質二重層を透過することができないことがあり得、結果として、リポソーム表面に吸着されたままとなる。この場合には、リポソームの表面積を増大することにより、治療剤の送達、さらに改善される場合がある。本発明による好適なリポソームは非毒性のリポソームであり、例えば、ホスファチジルコリンホスホグリセロールおよびコレステロールから調製されるリポソームなどである。使用されるリポソームの直径

50



は0.1～1.0ミクロンの範囲であり得る。しかしながら、食作用細胞による食作用に好適である他のサイズ範囲もまた使用される場合がある。リポソームのサイズ調整を行うために、均質化が使用される場合があり、これは、大きいリポソームをより小さいリポソームに細分化するための剪断エネルギーに依拠する。都合よく使用され得るホモジナイザーには、Microfluidics (ボストン、マサチューセッツ) によって製造されるマイクロフルイダイザーが含まれる。典型的な均質化手順において、リポソームは、選択されたリポソームサイズが観測されるまで、標準的な乳化ホモジナイザーに通して再循環される。粒子サイズ分布を慣用的レーザービーム粒子サイズ識別によってモニターすることができる。小細孔のポリカルボナート膜または非対称セラミック膜に通したリポソームの押出しが、リポソームサイズを比較的十分に規定されたサイズ分布にまで小さくするための効果的な方法である。典型的には、懸濁物が、所望されるリポソームサイズ分布が達成されるまで1回または複数回、そのような膜に通して循環される。リポソームが、リポソームサイズを徐々に減少させるために、細孔が順次小さくなる膜に通して押し出される場合がある。

10

#### 【0194】

当技術分野で知られている方法はどれも、マイクロRNAポリヌクレオチド作用物質をリポソームに取り込ませるために使用することができる。例えば、マイクロRNAポリヌクレオチド作用物質がリポソーム内にカプセル化される場合がある。別法として、マイクロRNAポリヌクレオチド作用物質がリポソームの表面に吸着される場合がある。薬剤を本発明のリポソームに取り込ませるために使用される場合がある他の方法には、Alfonso 他 [The science and practice of pharmacy, Mack Publishing、イーストン、ペンシルベニア、第19版(1995)] によって記載された方法、および、Kulkarni 他 [J. Microencapsul. 1995, 12(3): 229~46] によって記載された方法がある。

20

#### 【0195】

本発明の方法において使用されるリポソームは好ましくは、血液関門を越える。したがって、本発明のリポソームは好ましくは、血液関門を標的とする多糖(例えば、マンノース)をその膜部分に含まない。好ましくは、本発明のリポソームは、リポソームを血液関門上の受容体に対して標的化するペプチドをその膜部分に含まない。そのようなペプチドの例には、トランスフェリン、インスリン、IGF-1、IGF-2、抗トランスフェリン受容体抗体、抗インスリン受容体抗体、抗IGF-1受容体抗体および抗IGF-2受容体抗体が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0196】

本発明に従ってとりわけ好適であるリポソームを決定するために、例えば、米国特許出願公開第20040266734号および米国特許出願公開第20040266734号、ならびに、Danenberg 他、Journal of cardiovascular pharmacology、2003、42: 671~9; Circulation、2002、106: 599~605; Circulation、2003、108: 2798~804に記載されたアッセイなどのスクリーニングアッセイを行うことができる。

40

#### 【0197】

本発明のこの局面に従って使用することができる他の非脂質型ベクターには、ポリリシンおよびデンドリマーが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0198】

発現構築物はまた、ウイルスであり得る。ウイルス構築物の例には、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ポリオーマウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよびヘルペスウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0199】

50

レトロウイルスベクターは、本発明との使用のために特に好適である一群のベクターを表す。欠陥レトロウイルスベクターが、遺伝子を哺乳動物細胞に移入することにおいて常用されている（総説については、Miller, A. D. (1990)、Blood、76、271参照）。本発明のポリヌクレオチドを含む組換えレトロウイルスを、よく知られている分子技術を使用して構築することができる。レトロウイルスのゲノムの一部を、レトロウイルス複製装置を欠陥にするために除くことができ、その後、この複製欠陥レトロウイルスをビリオンにパッケージングすることができ、このビリオンを、標準的な技術を用いながら、ヘルパーウイルスの使用により標的細胞に感染させるために使用することができる。組換えレトロウイルスを作製するため、および、細胞にウイルスをインビトロまたはインビボで感染させるためのプロトコルを、例えば、Ausubel他(1994) 10  
(Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates, Inc. および John Wiley & Sons, Inc.))において見出すことができる。レトロウイルスは、様々な遺伝子を多くの異なる細胞型（ニューロン細胞、上皮細胞、内皮細胞、リンパ球、筋芽細胞、肝細胞および骨髄細胞を含む）に導入するために使用されている。

#### 【0200】

1実施形態によれば、レンチウイルスベクター（レトロウイルスベクターの1つのタイプ）が本教示に従って使用される。レンチウイルスベクターは、分裂中の細胞と同様に、非分裂細胞のゲノムに組み込むそれらの能力のためにベクターとして広範囲に使用されている。ウイルスのゲノム（これはRNAの形態である）が、ウイルスが細胞に進入したときに逆転写されて、DNAを産生し、このDNAがその後、ウイルスインテグラーゼ酵素によってランダムな位置においてゲノムに挿入される。ベクター（プロウイルス）はゲノムに留まり、細胞が分裂するとき、細胞の子孫に伝えられる。安全性の理由から、レンチウイルスベクターは、その複製に要求される遺伝子を決して有しない。レンチウイルスを作製するために、いくつかのプラスミドが、いわゆるパッケージング細胞株（一般にはHEK293）にトランスフェクションされる。1つまたは複数のプラスミド（これらは一般にパッケージングプラスミドとして示される）により、ビリオンタンパク質（例えば、カプシドおよび逆転写酵素など）がコードされる。別のプラスミドが、ベクターによって送達されるための遺伝物質を含有する。遺伝物質は、一本鎖のRNAウイルスゲノムを産生するために転写され、また、（プサイ）配列の存在によって印が付けられる。この配列が、ゲノムをビリオンにパッケージングするために使用される。 20 30

#### 【0201】

本発明のポリヌクレオチド配列を神経膠細胞または心臓細胞に導入し、当該細胞において発現させるための好適なレンチウイルスベクターの具体的な一例が、レンチウイルスpLKO.1ベクターである。

#### 【0202】

本発明のこの局面に従って使用される場合がある別の好適な発現ベクターがアデノウイルスベクターである。アデノウイルスは、広範囲に研究され、かつ、常用されている遺伝子移入ベクターである。アデノウイルスベクターの重要な利点には、分裂細胞および休止細胞の比較的大きい形質導入効率、広範囲の上皮組織に対する天然の指向性、ならびに、高力価物の容易な製造が含まれる（Russell, W. C. (2000)、J Gen Virol、81、57～63）。アデノウイルスDNAは核に輸送されるが、そこに組み込まれることはない。したがって、アデノウイルスベクターによる変異誘発の危険性が最小限に抑えられ、一方で、短期間の発現が、癌細胞を処置するために特に適している。実験的な癌処置において使用されるアデノウイルスベクターが、Seth他(1999) 40  
、“Adenoviral vectors for cancer gene therapy” (103～120頁)；P. Seth編、Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy (ランダス、オースチン、テキサス)によって記載されている。

#### 【0203】

好適なウイルス発現ベクターはまた、レトロウイルス成分およびアデノウイルス成分を組み合わせるキメラアデノウイルス/レトロウイルスベクターであり得る。そのようなベクターは、腫瘍細胞を形質導入するための従来型の発現ベクターよりも効率的であり得る (Pan 他 (2002)、Cancer Letts、184、179~188)。

【0204】

本発明の発現構築物をウイルス感染によって標的細胞 (例えば、神経膠細胞または心臓細胞) に導入するとき、感染のためのウイルス用量は、少なくとも  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$  またはそれ以上の p f u またはウイルス粒子である。

【0205】

用いられる方法または構築物にかかわらず、上記で詳述されたように、ミクロRNAをコードする核酸構築物を含む単離された細胞が提供される。

【0206】

本明細書中で使用される場合、用語「単離 (された)」は、天然の環境から、例えば、人体から少なくとも部分的に分離されたことを示す。

【0207】

1つの実施形態によれば、miR-135、miR-335、miR-15、miR-19、miR-26、miR-27、miR-181およびmiR-182からなる群から選択される少なくとも1つのミクロRNAまたはその前駆体を発現する核酸構築物を含み、上記核酸構築物がシス作用調節要素の転写制御下にある単離された細胞が提供される。

【0208】

特定の実施形態によれば、miR-135、miR-335、miR-26およびmiR-182からなる群から選択される少なくとも1つのミクロRNAまたはその前駆体を発現する核酸構築物を含み、上記核酸構築物がシス作用調節要素の転写制御下にある単離された神経膠細胞が提供される。

【0209】

特定の実施形態によれば、miR-19またはその前駆体を発現する核酸構築物を含み、上記核酸構築物がシス作用調節要素の転写制御下にある単離された細胞が提供される。

【0210】

特定の実施形態によれば、miR-15またはその前駆体を発現する核酸構築物を含み、上記核酸構築物がシス作用調節要素の転写制御下にある単離された細胞が提供される。

【0211】

特定の実施形態によれば、上記細胞は神経膠細胞または心臓細胞である。

【0212】

特定の実施形態によれば、上記神経膠細胞はセロトニン作動性ニューロンなどのニューロンである。

【0213】

ミクロRNAまたはその前駆体は、細胞、すなわち、本発明の標的細胞 (例えば、神経膠細胞または心臓細胞にインピボで (すなわち、生物または対象の体内に)、または、エクスピボで (例えば、組織培養において) 与えられるためのものである。細胞がエクスピボで処理される場合、方法は好ましくは、そのような細胞を個体に投与して戻す段階を含む (エクスピボ細胞治療)。

【0214】

エクスピボ治療のために、細胞が好ましくは、本発明の作用物質 (例えば、ミクロRNAをコードするポリヌクレオチド) により処理され、その後、その細胞が、その必要性のある対象に投与される。

【0215】

本発明のエクスピボ処理細胞の投与を、任意の好適な導入経路 (例えば、静脈内、腹腔内、腎臓内、胃腸管内、皮下、経皮、筋肉内、皮内、クモ膜下腔内、硬膜外および直腸な

10

20

30

40

50

ど)を使用して達成することができる。現在好ましい実施形態によれば、本発明のエキスビボ処理細胞は、静脈内、腎臓内、胃腸管内および/または腹腔内投与を使用して個体に導入される場合がある。

【0216】

本発明の細胞(例えば、神経膠細胞または心臓細胞)は、自己供給源または同種供給源(例えば、ヒト死体またはヒトドナー)のどちらからでも得ることができる。非自己細胞は、身体に投与されたときには免疫反応を誘導する可能性があるため、いくつかの取り組みが、非自己細胞を拒絶する可能性を軽減するために開発されている。これらには、レシピエントの免疫系を抑制すること、または、非自己細胞を移植前に、免疫隔離する半透過性膜でカプセル化することのどちらかが含まれる。

10

【0217】

カプセル化技術は一般には、小さい球状ビヒクルを伴うマイクロカプセル化として、また、より大きい平坦シートおよび中空繊維膜を伴うマクロカプセル化として分類される(Uludag, H. 他(2000)、Technology of mammalian cell encapsulation、Adv Drug Deliv Rev、42、29~64)。

【0218】

マイクロカプセルの調製方法は、当技術分野では知られており、例えば、下記の文献において開示されている方法が含まれる: Lu, M. Z. 他(2000)、Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine)、Biotechnol Bioeng、70、479~483; Chang, T. M. および Prakash, S. (2001) Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms、Mol Biotechnol、17、249~260; および Lu, M. Z. 他(2000)、A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate)、J Microencapsul、17、245~521。

20

30

【0219】

例えば、マイクロカプセルは、修飾コラーゲンを、メチルアクリル酸2-ヒドロキシエチル(HEMA)、メタクリル酸(MAA)およびメタクリル酸メチル(MMA)のターポリマー殻との複合体(これは2~5 μmのカプセル厚さをもたらす)で使用する調製される。そのようなマイクロカプセルはさらに、負荷電の滑らかな表面を与えるために、かつ、血漿タンパク質の吸収を最小限に抑えるために、さらに2~5 μmのターポリマー殻によりカプセル化することができる(Chia, S. M. 他(2002)、Multi-layered microcapsules for cell encapsulation、Biomaterials、23、849~856)。

【0220】

40

他のマイクロカプセルは、海洋多糖であるアルギン酸塩(Sambanis, A. (2003)、Encapsulated islets in diabetes treatment、Diabetes Technol Ther、5、665~668)またはその誘導体に基づく。例えば、マイクロカプセルを、ポリアニオンのアルギン酸ナトリウムおよびセルロース硫酸ナトリウムと、ポリカチオンのポリ(メチレン-コ-グアニジン)塩酸塩との間における塩化カルシウム存在下での高分子電解質複合体化によって調製することができる。

【0221】

細胞のカプセル化は、より小さいカプセルが使用されるときには改善されるものとする。したがって、例えば、カプセル化された細胞の品質管理、機械的安定性、拡散特性およ

50

びインビトロ活性が、カプセルサイズが1mmから400μmに縮小されたときに改善した(Canaple, L. 他(2002)、Improving cell encapsulation through size control、J Biomater Sci Polym Ed 13、783~96)。そのうえ、7nmもの小さい十分制御された細孔サイズ、調整された表面化学、および、精密な微細構造様式を有するナノ多孔性バイオカプセルは、細胞のための微小環境を首尾良く免疫隔離することが見出された(Williams, D. (1999)、Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices、Med Device Technol、10、6~9; およびDesai, T. A. (2002)、Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation、Expert Opin Biol Ther、2、633~646参照)。

10

#### 【0222】

エクスピボ処置と併せて使用され得る免疫抑制剤の例には、メトトレキサート、シクロホスファミド、シクロスポリン、シクロスポリンA、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン(スルファサラゾピリン)、金塩、D-ペニシラミン、レフルノミド、アザチオプリン、アナキンラ、インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))、エタネルセプト、TNFアルファ遮断剤、炎症性サイトカインを標的とする生物製剤、および、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)が含まれるが、これらに限定されない。NSAIDの例には、アセチルサリチル酸、サリチル酸コリンマグネシウム、ジフルニサル、サリチル酸マグネシウム、サルサラート、サリチル酸ナトリウム、ジクロフェナク、エトドラク、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、ケトロラク、メクロフェナマート、ナプロキセン、ナブメトン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、トルメチン、アセトアミノフェン、イブプロフェン、Cox-2阻害剤およびトラマドールが含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0223】

インビボ治療のために、作用物質(例えば、マイクロRNAをコードするポリヌクレオチド)が、それ自体で、または、医薬組成物の一部として対象に投与される。好ましくは、そのような組成物は、血液脳関門(BBB)の通過を可能にするように配合される。

30

#### 【0224】

中枢神経系(CNS)への薬物送達のための従来の取り組みには、下記のことが含まれる: 神経外科的戦略(例えば、脳内注射または脳室内注入); BBBの内在性輸送経路の1つを利用するための試みでの、作用物質の分子的操作(例えば、内皮細胞表面分子に対する親和性を有する輸送ペプチドを、自身でBBBを越えることができない作用物質との組合せで含むキメラな融合タンパク質の製造); 作用物質の脂質溶解性を増大させるために設計される薬理学的戦略(例えば、水溶性作用物質を脂質担体またはコレステロール担体にコンジュゲート化すること); および、BBBの一体性の、(頸動脈内へのマンニトール溶液の注入または生物学的活性剤(例えば、アンギオテンシンペプチドなど)の使用から生じる)高浸透圧破壊による一時的な破壊。

40

#### 【0225】

BBBの背後への薬物送達のための方法には、脳内埋め込み(例えば、針によるものなど)および対流強化分布が含まれる。マンニトールを、BBBを迂回することにおいて使用することができる。同様に、粘膜投与(例えば、鼻腔投与)を、BBBを迂回するために使用することができる。

#### 【0226】

本発明のマイクロRNAポリヌクレオチド作用物質はまた、当該作用物質が好適な担体または賦形剤と混合される医薬組成物において生物に投与することができる。

#### 【0227】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される有効成分の1つま

50

たは複数と、他の化学的成分（例えば、生理学的に好適な担体および賦形剤など）との調製物を示す。医薬組成物の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。

【0228】

本明細書中において、用語「有効成分」は、生物学的効果を説明することができるペプチドを示す。

【0229】

本明細書中以降、表現「生理学的に許容される担体」および表現「医薬的に許容される担体」は、交換可能に使用され得るが、生物に対する著しい刺激を生じさせず、かつ、投与された化合物の生物学的な活性および性質を妨げない担体または希釈剤を示す。アジュバントはこれらの表現に包含される。

10

【0230】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0231】

薬物の配合および投与のための技術が「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版)に見出されることができ、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

20

【0232】

好適な投与経路には、例えば、経口送達、直腸送達、経粘膜送達、特に経鼻送達、腸管送達、または非経口送達（これには、筋肉内注射、皮下注射および髄内注射、ならびに、クモ膜下注射、直接的な脳室内注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射または眼内注射が含まれる）が含まれることができる。

【0233】

あるいは、例えば、患者の組織領域に直接的に医薬組成物の注射をすることによって、全身的な方法よりも局所的に医薬組成物を投与することができる。

【0234】

本発明の医薬組成物は、この分野で十分に知られているプロセスによって、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥のプロセスによって製造されることができる。

30

【0235】

従って、本発明に従って使用される医薬組成物は、医薬品として使用されることができる調製物への有効成分の加工を容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容され得る担体を使用して従来の様式で配合されることができる。適正な配合は、選ばれた投与経路に依存する。

【0236】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合する緩衝液（例えば、ハanks溶液、リンゲル溶液、または生理学的な食塩緩衝液など）において配合されることができる。経粘膜投与の場合、浸透されるバリエーに対して適切な浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤はこの分野では一般に知られている。

40

【0237】

経口投与の場合、医薬組成物は、活性化合物をこの分野でよく知られている医薬的に許容され得る担体と組み合わせることによって容易に配合されることができる。そのような担体は、医薬組成物が、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤および懸濁物などとして配合されることを可能にする。経口使用される薬理学的調製物は、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎し、錠剤または糖衣錠コアを得るために、望ましい好適な補助剤を添加した後、顆粒

50

の混合物を加工して作製されることができる。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；および／またはポリビニルピロリドン（PVP）などの生理学的に許容され得るポリマーである。もし望むなら、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウムなど）などの崩壊剤が加えられることができる。

#### 【0238】

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有しうる。色素または顔料は、活性化合物の量を明らかにするために、または活性化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに加えられることができる。

10

#### 【0239】

経口使用されうる医薬組成物としては、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびに、ゼラチンおよび可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトールなど）から作製された軟いシールされたカプセルが挙げられる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（例えば、ラクトースなど）、結合剤（例えば、デンプンなど）、滑剤（例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど）、および場合により安定化剤との混合で有効成分を含有することができる。軟カプセルでは、有効成分は、好適な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィンまたは液状のポリエチレングリコールなど）に溶解または懸濁されることができる。さらに、安定化剤が加えられることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路について好適な投薬形態でなければならない。

20

#### 【0240】

口内投与の場合、組成物は、従来の方法で配合された錠剤またはトローチの形態を取ることができる。

#### 【0241】

鼻吸入による投与の場合、本発明による使用のための有効成分は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素）の使用により加圧パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投与量は、計量された量を送達するためのバルブを備えることによって決定されることができる。ディスペンサーにおいて使用される、例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジは、化合物および好適な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプンなど）の粉末混合物を含有して配合されることができる。

30

#### 【0242】

本明細書中に記載される医薬組成物は、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口投与のために配合されることができる。注射用配合物は、場合により保存剤が添加された、例えば、アンプルまたは多回用量容器における単位投薬形態で提供されることができる。組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルにおける懸濁物または溶液剤またはエマルジョンにすることができ、懸濁化剤、安定化剤および／または分散化剤などの配合剤を含有することができる。

40

#### 【0243】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態の活性調製物の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁物は、適切な油性または水性の注射用懸濁物として調製されることができる。好適な親油性の溶媒またはビヒクルとしては、脂肪油（例えば、ゴマ油など）、または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）、トリグリセリドまたはリポソームが挙げられる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば

50

、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランなどを含有することができる。場合により、懸濁物はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために、有効成分の溶解性を増大させる好適な安定化剤または薬剤を含有することができる。

【0244】

あるいは、有効成分は、好適なビヒクル（例えば、無菌の、パイロジェン不含水溶液）を使用前に用いて構成される粉末形態であることができる。

【0245】

本発明の医薬組成物はまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来の座薬基剤を使用して、座薬または停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合されることができる。

【0246】

本発明に関連した使用のために好適な医薬組成物として、有効成分が、その意図された目的を達成するために有効な量で含有される組成物が含まれる。より具体的には、「治療有効量」は、処置されている対象の障害（例えば、糖尿病）の症状を予防、緩和あるいは改善するために効果的であるか、または、処置されている対象の生存を延ばすために効果的である、有効成分（ペプチド）の量を意味する。

【0247】

本発明の1つの実施形態によれば、miR-135の過剰発現が抗うつ効果を有する。

【0248】

治療有効量の決定は、特に本明細書中に与えられる詳細な開示に鑑みて、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0249】

本発明の方法において使用されるいかなる調製物についても、投与量または治療有効量は、インビトロおよび細胞培養アッセイから最初に推定されることができる。例えば、投与量は、所望の濃度または力価を達成するために動物モデルにおいて決定されることができ、そのような情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用されることができる。

【0250】

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、インビトロ、細胞培養物、または実験動物における標準的な薬学的手法によって決定されることができる。これらのインビトロ、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量範囲を定めるために使用されることができる。投与量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して変化しうる。正確な配合、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択されることができる（例えば、Fingler, (1975) 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p. 1を参照のこと）。

【0251】

投薬量および投薬間隔を、生物学的効果を誘導または抑制するために活性な成分の十分な血漿レベル（これは最小有効濃度（MEC）と呼ばれる）を提供するために個々に調節することができる。MECはそれぞれの調製物について変化するが、インビトロデータから推定することができる。MECを達成するために必要な投薬量は個々の特性および投与経路に依存する。検出アッセイを使用して、血漿中濃度を求めることができる。

【0252】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬は、単回または複数回投与で行われることができ、この場合、処置期間は、数日から数週間まで、または治療が達成されるまで、または疾患状態の軽減が達成されるまで続く。

【0253】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている対象、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存するだろう。投与量および投与時期は、個体の変化する状態の注意深い連続した観察に応じて変わるであろう。

【0254】



本発明の作用因がヒトの処置に先立って試験され得る様々な動物モデルが存在することが理解されるであろう。例えば、うつ病、ストレス、不安の動物モデル、例えば、学習性無力モデル（LH）、慢性的軽度ストレス（CMS）モデル、社会的敗北ストレス（SDS）モデルおよび母性略奪モデルなどが使用され得る。

#### 【0255】

本発明の組成物は、所望されるならば、有効成分を含有する1つまたは複数の単位投薬形態物を含有し得るパックまたはディスペンサーデバイス（例えば、FDA承認キットなど）で提供され得る。パックは、例えば、金属ホイルまたはプラスチックホイルを含むことができる（例えば、プリスターパックなど）。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が付随し得る。パックまたはディスペンサーデバイスはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府当局によって定められた形式で、容器に関連した通知によって適応させることがあり、この場合、そのような通知は、組成物の形態、あるいはヒトまたは動物への投与の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物について米国食品医薬品局によって承認されたラベル書きであり得るか、または、承認された製品添付文書であり得る。適合し得る医薬用担体に配合された本発明の調製物を含む組成物もまた、上でさらに詳述されたように、示された状態を処置するために調製され、適切な容器に入れられ、かつ標識され得る。

#### 【0256】

本発明の治療組成物は、マイクロRNAポリヌクレオチド作用物質に加えて、うつ病、ストレス、不安、断眠などの処置のための他の公知薬物を含む場合があるものとする：そのような薬物は、例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）、セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（SNRI）、ノルアドレナリン作動性かつ特異的なセロトニン作動性抗うつ剤（NaSSA）、ノルエピネフリン（ノルアドレナリン）再取り込み阻害剤（NRI）、ノルエピネフリン-ドパミン再取り込み阻害剤、選択的セロトニン再取り込み強化剤、ノルエピネフリン-ドパミン脱抑制剤、三環系抗うつ剤（例えば、イミプラミン）、モノアミンオキシダーゼ阻害剤（MAOI）であり、これらに限定されない。これらの薬物は、単一の包装物または別個の包装物で製品に含まれる場合がある。

#### 【0257】

本発明者らは、miR-27の過剰発現がMaOAの抑制をもたらすこと（実施例1（本明細書中下記）参照）、miR-135の過剰発現がSLC6A4の抑制をもたらすこと（実施例1（本明細書中下記）参照）、miR-135、miR-335、miR-26、miR-181またはmiR-182の過剰発現がHTR1Aの抑制をもたらすこと（実施例1（本明細書中下記）参照）、miR-19の過剰発現がADR1の抑制をもたらすこと（実施例2（本明細書中下記）参照）、また、CB1の抑制をもたらすこと（実施例3B（本明細書中下記）参照）、および、miR-15の過剰発現がCRHR1の抑制をもたらすこと（実施例4（本明細書中下記）参照）、また、FKBP5の抑制をもたらすこと（実施例4B（本明細書中下記）参照）を示している。

#### 【0258】

従って、本発明の1つの実施形態によれば、セロトニン輸送体（SLC6A4）遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-135およびmiR-335からなる群から選択されるマイクロRNAまたはその前駆体の活性または発現を調整することを含む方法が提供される。

#### 【0259】

本明細書中で使用される場合、用語「セロトニン輸送体（SLC6A4）」は、シナプス間隙からのセロトニンの再取り込みに関与する（SERTとも呼ばれる）モノアミン輸送体タンパク質を示す。例示的なSLC6A4がNP\_001036.1で示される。

#### 【0260】

別の実施形態によれば、セロトニン阻害受容体1a（HTR1A）遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-135、miR-335、miR-18

10

20

30

40

50

1、miR-182およびmiR-26からなる群から選択されるマイクロRNAまたはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

【0261】

本明細書中で使用される場合、用語「セロトニン阻害受容体1a(Htr1a)」は、シナプス前ニューロンにおいて自己受容体として機能し、セロトニン放出の阻害を伝達するGタンパク質共役受容体を示す。例示的なHtr1aがNP\_\_000515.2で示される。

【0262】

別の実施形態によれば、モノアミンヒドロキシラーゼ(MaoA)遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-27またはその前駆体の活性または発現を調整することを含む方法が提供される。

10

【0263】

本明細書中で使用される場合、用語「モノアミンヒドロキシラーゼ(MaoA)」は、アミン系神経伝達物質(例えば、ドパミン、ノルエピネフリンおよびセロトニンなど)を分解する酵素を示す。例示的なMaoAがNP\_\_000231.1で示される。

【0264】

本発明の1つの実施形態によれば、トリプトファンヒドロキシラーゼ2(Tph2)遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-181およびmiR27からなる群から選択されるマイクロRNAまたはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

20

【0265】

本明細書中で使用される場合、用語「トリプトファンヒドロキシラーゼ2(Tph2)」は、セロトニンの生合成における最初の律速段階を触媒する酵素を示す。例示的なTph2がNP\_\_NP\_\_775489.2で示される。

【0266】

別の実施形態によれば、ベータアドレナリン作動性受容体1(Adrb1)遺伝子の発現を神経膠細胞または心臓細胞において調節する方法であって、miR-19またはその前駆体の活性または発現を調整することを含む方法が提供される。

【0267】

30

本明細書中で使用される場合、用語「ベータアドレナリン作動性受容体1(Adrb1)」は、アドレナリンおよびノルアドレナリンの生理学的影響を伝達する受容体を示す。例示的なAdrb1がNP\_\_000675.1で示される。

【0268】

別の実施形態によれば、ベータ2型アドレナリン作動性受容体(Adrb2)遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-15またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

【0269】

本明細書中で使用される場合、用語「ベータ2型アドレナリン作動性受容体(Adrb2)」は、クラスCのL型カルシウムチャネルCa(V)1.2と直接会合する受容体を示す。Adrb2が、例えば、NP\_\_000015.1で示される。

40

【0270】

別の実施形態によれば、CRH1型受容体遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-15またはその前駆体の活性または発現を調整することを含む方法が提供される。

【0271】

本明細書中で使用される場合、用語「CRH1型」は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)と結合する受容体を示す。CRH1型が、例えば、NP\_\_001138618.1、NP\_\_001138619.1、NP\_\_001138620.1およびNP\_\_004373.2で示される。

50

## 【0272】

別の実施形態によれば、グルタミン酸受容体遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-181またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

## 【0273】

別の実施形態によれば、上記グルタミン酸受容体遺伝子は、さらに上述されるように、グルタミン酸受容体代謝型1 (Grm1)、グルタミン酸受容体イオンチャネル型カイニン酸3 (Grik3)、グルタミン酸受容体代謝型5 (Grm5)、グルタミン酸受容体イオンチャネル型カイニン酸2 (Grik2)およびグルタミン酸受容体代謝型7 (Grm7)を含む。

10

## 【0274】

別の実施形態によれば、ダウン症候群細胞接着分子 (Dscam) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-182またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

## 【0275】

本明細書中で使用される場合、用語「ダウン症候群細胞接着分子 (Dscam)」は、ニューロンの自己回避においてある一定の役割を果たす細胞接着分子を示す。Dscamが、例えば、NP\_\_001380.2で示される。

## 【0276】

別の実施形態によれば、細胞接着分子L1 (L1cam) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-182またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

20

## 【0277】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞接着分子L1 (L1cam)」は、ニューロンの細胞接着分子を示す。L1camが、例えば、NP\_\_000416.1、NP\_\_001137435.1、NP\_\_076493.1で示される。

## 【0278】

別の実施形態によれば、トランスリン会合タンパク質X (Tsnax) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-182またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

30

## 【0279】

本明細書中で使用される場合、用語「トランスリン会合タンパク質X (Tsnax)」は、トランスリンと特異的に相互作用するタンパク質を示す。Tsnaxが、例えば、NP\_\_005990.1で示される。

## 【0280】

別の実施形態によれば、カナビノイド受容体1 (CB1) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-19またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

## 【0281】

本明細書中で使用される場合、用語「カナビノイド受容体1 (CB1)」は、(CNR1としても知られている)細胞膜受容体を示す。CB1が、例えば、NP\_\_001153698.1、NP\_\_001153730.1、NP\_\_001153731.1、NP\_\_057167.2、NP\_\_149421.2で示される。

40

## 【0282】

別の実施形態によれば、FK506結合タンパク質5 (FKBP5) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、miR-15またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

## 【0283】

本明細書中で使用される場合、用語「FK506結合タンパク質5 (FKBP5)」は、免疫抑制剤FK506およびラパマイシンに特異的に結合するタンパク質を示す。FK

50

B P 5 が、例えば、N P \_ 0 0 1 1 3 9 2 4 7 . 1、N P \_ 0 0 1 1 3 9 2 4 8 . 1、N P \_ 0 0 1 1 3 9 2 4 9 . 1、N P \_ 0 0 4 1 0 8 . 1 で示される。

【 0 2 8 4 】

別の実施形態によれば、シンタキシン 1 a ( S t x 1 a ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、m i R - 1 5 またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

【 0 2 8 5 】

本明細書中で使用される場合、用語「シンタキシン 1 a ( S t x 1 a )」は、神経系特異的タンパク質を示す。S t x 1 a が、例えば、N P \_ 0 0 1 1 5 9 3 7 5 . 1、N P \_ 0 0 4 5 9 4 . 1 で示される。

10

【 0 2 8 6 】

別の実施形態によれば、血清 / グルココルチコイド調節キナーゼ ( S g k 1 ) 遺伝子の発現を神経膠細胞において調節する方法であって、m i R - 1 5 またはその前駆体の活性または発現を上記神経膠細胞において調整することを含む方法が提供される。

【 0 2 8 7 】

本明細書中で使用される場合、用語「血清 / グルココルチコイド調節キナーゼ ( S g k 1 )」は、セリン / トレオニンプロテインキナーゼを示す。S g k 1 が、例えば、N P \_ 0 0 1 1 3 7 1 4 8 . 1、N P \_ 0 0 1 1 3 7 1 4 9 . 1、N P \_ 0 0 1 1 3 7 1 5 0 . 1、N P \_ 0 0 5 6 1 8 . 2 で示される。

【 0 2 8 8 】

20

本教示は、上記遺伝子の発現レベルをアップレギュレーションすること（すなわち、増大させること）またはダウンレギュレーションすること（すなわち、低下させること）を意図する。

【 0 2 8 9 】

本教示に従う遺伝子発現のダウンレギュレーションが典型的には、（本明細書中上記でさらに詳しく示されるような）ミクロRNAポリヌクレオチドを標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）に投与することによって、または、標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）において発現させることによって行われる。

【 0 2 9 0 】

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記 S l c 6 a 4 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 m i R - 1 3 5 および / または m i R - 3 3 5 をアップレギュレーションすることを含む。

30

【 0 2 9 1 】

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記 H t r 1 a 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 m i R - 1 3 5、m i R - 3 3 5、m i R - 1 8 1、m i R - 1 8 2 および / または m i R - 2 6 をアップレギュレーションすることを含む。

【 0 2 9 2 】

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記 M a o A 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 m i R - 2 7 をアップレギュレーションすることを含む。

40

【 0 2 9 3 】

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記 A d r b 1 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 m i R - 1 9 をアップレギュレーションすることを含む。

【 0 2 9 4 】

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記 C R H 1 型受容体遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 m i R - 1 5 をアップレギュレーションすることを含む。

【 0 2 9 5 】

50

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記 C B 1 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 m i R - 1 9 をアップレギュレーションすることを含む。

【 0 2 9 6 】

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記 F K B P 5 遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記 m i R - 1 5 をアップレギュレーションすることを含む。

【 0 2 9 7 】

別法として、本発明の別の実施形態によれば、遺伝子発現をアップレギュレーションすることが、ミクロRNAの発現をダウンレギュレーションすることができる作用物質を標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）に投与することによって、または、標的細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）において発現させることによって影響される。

【 0 2 9 8 】

ミクロRNAのダウンレギュレーションを、転写および/または翻訳を妨害する様々な分子（例えば、RNAサイレンシング作用因、リボザイム、DNAザイムおよびアンチセンス）を使用してゲノムレベルおよび/または転写物レベルで達成することができる。

【 0 2 9 9 】

ミクロRNAの発現をダウンレギュレーションする方法は、当該技術分野で公知である。

【 0 3 0 0 】

m i Rの活性をダウンレギュレーションする核酸作用因には、標的模倣物、ミクロRNA抵抗性遺伝子およびm i RNA阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 3 0 1 】

標的模倣物またはミクロRNA抵抗性標的は、下記の不マッチの1つまたは複数があるならば、ミクロRNAに対して本質的に相補的である：

（ a ）ミクロRNAの5'末端におけるヌクレオチドと、標的模倣物またはミクロRNA抵抗性標的における対応するヌクレオチド配列との間における1つの不マッチ；

（ b ）ミクロRNAの1位～9位におけるヌクレオチドのいずれか1つと、標的模倣物またはミクロRNA抵抗性標的における対応するヌクレオチド配列との間における1つの不マッチ；あるいは

（ c ）ミクロRNAの12位～21位におけるヌクレオチドのいずれか1つと、標的模倣物またはミクロRNA抵抗性標的における対応するヌクレオチド配列との間における3つの不マッチ、ただし、この場合、連続する不マッチは最大でも2つである。

【 0 3 0 2 】

標的模倣RNAは、例えば、不マッチをもたらすm i RNAの10番目または11番目のヌクレオチドに対して相補的である標的配列のヌクレオチドに変化をもたらすように配列を改変することによってm i RNA誘導の切断に対して抵抗性になるように改変された標的RNAと本質的に類似している。

【 0 3 0 3 】

代替において、ミクロRNA抵抗性標的が実行される場合がある。したがって、DNA配列および生じたRNA配列が、ミクロRNAの結合を妨げる様式で変化し、しかし、タンパク質のアミノ酸配列は変化しないように、サイレント変異が標的遺伝子のミクロRNA結合部位に導入される場合がある。したがって、新しい配列を既存の結合部位に代わって合成することができ、ただし、この場合、新しい配列において、DNA配列が変化し、それにより、m i RNAがその標的に結合しなくなることが生じる。

【 0 3 0 4 】

1つの具体的な実施形態によれば、標的模倣物またはミクロRNA抵抗性標的は、標的遺伝子を認識するプレm i RNAと生来的に会合するプロモーターに連結され、植物細胞内に導入される。このようにして、m i RNA標的模倣物またはミクロRNA抵抗性標的RNAが、m i RNAと同じ環境のもとで発現されるであろうし、また、標的模倣物また

10

20

30

40

50

はマイクロRNA抵抗性標的RNAが、miRNA誘導の切断によって分解される非標的模倣物/マイクロRNA抵抗性標的RNAの代わりになるであろう。

【0305】

非機能的miRNA対立遺伝子またはmiRNA抵抗性標的遺伝子もまた、miRNAコード対立遺伝子またはmiRNA感受性標的遺伝子を代用するために相位的組換えによって導入される場合がある。

【0306】

組換え発現は、目的とする核酸（例えば、miRNA、標的遺伝子、サイレンシング作用因など）を植物プロモーターの発現のもとでの核酸発現構築物にクローン化することによって達成される。

【0307】

本発明の他の実施形態において、一本鎖の合成核酸がmiRNA阻害剤として使用される。miRNA阻害剤は、典型的には長さが約17ヌクレオチド~25ヌクレオチドの間であり、成熟型miRNAの5'端から3'端への配列に対して少なくとも90%相補的である5'端から3'端への配列を含む。特定の実施形態において、miRNA阻害剤分子は、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチドまたは25ヌクレオチドの長さであり、あるいは、それらにおいて導かれ得る任意の範囲である。さらに、miRNA阻害剤は、成熟型miRNA、特に、成熟型の天然に存在するmiRNAの5'端から3'端への配列に対して、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%または100%相補的であるか、あるいは、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%または100%相補的であるか、あるいは、それらにおいて導かれ得る任意の範囲である（5'端から3'端への）配列を有する。

【0308】

miRNA阻害剤を、一過性トランスフェクション技術を使用して細胞と接触させる場合がある。miRNA阻害剤は、Applied Biosystemsなどの企業から市販されている。

【0309】

別法として、miRNA阻害剤は、本明細書中上記で記載されるように発現ベクターの一部である場合がある。この場合、細胞がベクターにより一過性または安定的にトランスフェクションされる場合がある。

【0310】

特定の実施形態によれば、上記調節することが、上記Tp h 2 遺伝子の発現をアップレギュレーションすることを含むとき、上記調整することは、上記mi R - 181および/または上記mi R - 27をダウンレギュレーションすることを含む。

【0311】

1つの実施形態によれば、マイクロRNAの発現をダウンレギュレーションすることが、マイクロRNAと特異的に結合し、その発現をダウンレギュレーションする核酸配列の使用によって達成される。本発明に従って使用され得る例示的な核酸配列は、いずれかの製造者から、例えば、Genecopoeiaから購入することができる（mi Arrest、マイクロRNAベクターに基づく阻害剤）。

【0312】

従って、別の実施形態によれば、mi R - 181、mi R - 182、mi R - 26、mi R - 27、mi R - 135、mi R - 335、mi R - 15およびmi R - 19またはその前駆体の発現をダウンレギュレーションするための核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

## 【0313】

miR-181の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号134～配列番号137、および配列番号154～配列番号157において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0314】

miR-182の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号138～配列番号141、および配列番号147において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0315】

miR-26の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号126～配列番号129、および配列番号145～配列番号146において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0316】

miR-27の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号130～配列番号133、および配列番号152～配列番号153において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0317】

miR-135の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号110～配列番号113、および配列番号142～配列番号143において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0318】

miR-335の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号114～配列番号117、および配列番号144において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0319】

miR-15の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号118～配列番号121、および配列番号150～配列番号151において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0320】

miR-19の発現をダウンレギュレーションするために本発明に従って使用され得る例示的なポリヌクレオチドには、配列番号122～配列番号125、および配列番号148～配列番号149において示されるポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0321】

そのような核酸配列はさらに、本明細書中上記でさらに詳しく記載されるような発現ベクターに含まれる場合がある。

## 【0322】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現（例えば、転写物またはポリペプチド）を、マイクロRNAレベルを当該細胞（例えば、神経膠細胞または心臓細胞）においてダウンレギュレーションまたはアップレギュレーションした後で評価することを意図する。

## 【0323】

したがって、標的遺伝子（例えば、Slc6a4、Htr1a、MaoA、Adrb1、Adrb2、CRH1型受容体、CB1、FKBP5、Tph2、Grm1、Grik3、Grm5、Grik2、Grm7、Gria2、Dscam、L1cam、Tsna x、Sgk1および/またはStx1a）核酸配列（例えば、転写物）の存在および/ま

10

20

30

40

50

たはレベルを、（例えば、下記のような）標的遺伝子の核酸配列にハイブリダイゼーションすることができる単離されたポリヌクレオチド（例えば、ポリヌクレオチドプローブ、オリゴヌクレオチドプローブ/プライマー）を使用して求めることができる（例えば、NM\_\_001045.4で示されるようなSlc6a4またはその一部；例えば、NM\_\_000524.3で示されるようなHtr1aまたはその一部；例えば、NM\_\_000240.3またはNM\_\_001270458.1で示されるようなMaobまたはその一部；例えば、NM\_\_000684.2で示されるようなAdrb1またはその一部；例えば、NM\_\_000024.5で示されるようなAdrb2またはその一部；例えば、NM\_\_001145146.1、NM\_\_001145147.1で示されるようなCRH1型受容体またはその一部；例えば、NM\_\_001160226.1、NM\_\_033181.3で示されるようなCB1またはその一部；例えば、NM\_\_001145775.1、NM\_\_001145777.1で示されるようなFKBP5またはその一部；例えば、NM\_\_173353.3で示されるようなTph2またはその一部；例えば、NM\_\_000838.3、NM\_\_001114329.1で示されるようなGrm1またはその一部；例えば、NM\_\_000831.3で示されるようなGrk3またはその一部；例えば、NM\_\_000842.3、NM\_\_001143831.2で示されるようなGrm5またはその一部；例えば、NM\_\_001166247.1、NM\_\_021956.4で示されるようなGrk2またはその一部；例えば、NM\_\_000844.3、NM\_\_181874.2で示されるようなGrm7またはその一部；例えば、NM\_\_000826.3、NM\_\_001083619.1で示されるようなGria2またはその一部；例えば、NM\_\_001389.3で示されるようなDscamまたはその一部；例えば、NM\_\_000425.3、NM\_\_001143963.1、NM\_\_024003.2で示されるようなL1camまたはその一部；例えば、NM\_\_005999.2で示されるようなTsnaXまたはその一部；例えば、NM\_\_001143676.1、NM\_\_001143677.1、NM\_\_001143678.1で示されるようなSgk1またはその一部、および/あるいは、例えば、NM\_\_001165903.1、NM\_\_004603.3で示されるようなStx1aまたはその一部）。そのようなポリヌクレオチドはどのようなサイズも可能である；例えば、短いポリヌクレオチド（例えば、15～200塩基）および中間的なポリヌクレオチド（例えば、200～2000塩基）、または、2000塩基より大きい長いポリヌクレオチド。

#### 【0324】

本発明によって使用される単離されたポリヌクレオチドプローブは、本発明の標的遺伝子RNA転写物に対して特異的である直接的または間接的に標識されたRNA分子（例えば、RNAオリゴヌクレオチド、インビトロ転写されたRNA分子）、DNA分子（例えば、オリゴヌクレオチド、cDNA分子、ゲノム分子）および/またはそれらの類似体〔例えば、ペプチド核酸（PNA）〕のいずれもが可能である。

#### 【0325】

本発明の教示に従って設計されるオリゴヌクレオチドは、本明細書中上記で詳しく記載されるように、この技術分野で知られている任意のオリゴヌクレオチド合成法に従って作製することができる。

#### 【0326】

本発明のオリゴヌクレオチドは、本明細書中上記で記載される配列変化体との特異的なハイブリダイゼーションが可能である少なくとも17塩基、少なくとも18塩基、少なくとも19塩基、少なくとも20塩基、少なくとも22塩基、少なくとも25塩基、少なくとも30塩基、または、少なくとも40塩基のものである。

#### 【0327】

本発明のオリゴヌクレオチドは、3'から5'へのホスホジエステル連結で結合する、プリン塩基およびピリミジン塩基からなる複素環式ヌクレオシドを含む場合がある。

#### 【0328】

好ましく使用されるオリゴヌクレオチドが、本明細書中上記で広範に記載されるように

10

20

30

40

50



、骨格、ヌクレオシド間連結または塩基のいずれかにおいて修飾されるオリゴヌクレオチドである。

【0329】

本発明によって使用される単離されたポリヌクレオチドは、タグ分子または標識分子を使用して直接的または間接的にそのどちらでも標識することができる。そのような標識として、例えば、蛍光性分子（例えば、フルオレセインまたはテキサスレッド）、放射性分子（例えば、 $^{32}\text{P}$  - - ATPまたは $^{32}\text{P}$  - - ATP）および発色性基質〔例えば、ファストレッド、BCIP/INT、ABCAm（ケンブリッジ、マサチューセッツ）から入手可能である〕が可能である。直接的な標識化を、標識分子を（例えば、固相合成を使用して）ポリヌクレオチドに共有結合によりコンジュゲート化することによって、または、（例えば、インビトロ転写反応またはランダムプライム化標識化を使用する）重合を介した取り込みによって達成することができる。間接的な標識化を、標識されていないタグ分子（例えば、ジゴキシゲニンまたはビオチン）をポリヌクレオチドに共有結合的にコンジュゲート化し、または取り込み、続いて、このポリヌクレオチドを、その標識されていないタグを特異的に認識することができる標識された分子（抗ジゴキシゲニン抗体またはストレプトアビジン）に供することによって達成することができる。

10

【0330】

上記のポリヌクレオチドは様々なRNA検出方法において用いることができ、例えば、ノーザンブロット分析、逆転写PCR（RT-PCR）〔例えば、半定量的RT-PCR、定量的RT-PCR、例えば、Light Cycler（商標）（Roche）を使用〕、RNAインサイチュハイブリダイゼーション（RNA-ISH）、インサイチュ-RT-PCR染色〔例えば、Nuovo GJ他、1993、Intracellular localization of polymerase chain reaction（PCR）- amplified hepatitis C cDNA、Am J Surg Pathol、17：683～90、および、Komminoth P他、1994、Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction（RT-PCR） and in situ RT-PCR、Pathol Res Pract.、190：1017～25に記載〕、および、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析〔例えば、Affymetrixマイクロアレイ（Affymetrix（登録商標）、サンタクララ、カリフォルニア）を使用〕などにおいて用いることができる。

20

30

【0331】

標的遺伝子（例えば、Slc6a4、Htr1a、MaoA、Adrb1、Adrb2、CRH1型受容体、CB1、FKBP5、Tph2、Grm1、Grik3、Grm5、Grik2、Grm7、Gria2、Dscam、L1cam、Tsnax、Sgk1および/またはStx1a）アミノ酸配列（例えば、タンパク質）の存在および/またはレベルを、例えば、免疫複合体〔すなわち、生物学的試料に存在する標的遺伝子抗原（アミノ酸配列）と、特異的抗体との間で形成される複合体〕の形成を介して、特異的抗体を使用して求めることができる。

40

【0332】

本発明の免疫複合体は、使用される方法および生物学的試料に依存して変化する場合がある様々な温度、塩濃度およびpH値において形成させることができ、当業者は、それぞれの免疫複合体の形成のために好適な条件を調節することができる。

【0333】

本明細書で使用される用語「抗体」は、完全な抗体分子、並びにその機能的なフラグメント、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>及びFv、又は単ドメイン分子、例えば抗原のエピトープに対するVH及びVLを含む。これらの機能的な抗体フラグメントは次のよう

50

に定義される：(1) Fab は、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントを含有するフラグメントであり、完全な抗体を酵素パパイニンで消化して、無傷の軽鎖と、一方の重鎖の一部とを生じさせることによって作製することができる；(2) Fab' は、完全な抗体をペプシンで処理し、その後、還元して、無傷の軽鎖と、重鎖の一部とを生じさせることによって得ることができる抗体分子のフラグメントである；2つの Fab' フラグメントが1つの抗体分子あたり得られる；(3) (Fab')<sub>2</sub> は、その後の還元を行うことなく、完全な抗体を酵素ペプシンで処理することによって得ることができる抗体のフラグメントである；F(ab')<sub>2</sub> は、2つのジスルフィド結合によって一緒にされた2つの Fab' フラグメントのダイマーである；(4) Fv は、2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される；(5) 単鎖抗体(「SCA」)は、遺伝子的に融合された単一鎖分子として好適なポリペプチドリinkerによって連結されて、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子である；そして(6) 単ドメイン抗体は、抗原に対して十分な親和性を示す単一の V<sub>H</sub> 又は V<sub>L</sub> ドメインからなる。

#### 【0334】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、及びそのフラグメントの生成方法は、この技術分野では広く知られている(例えば、Harlow 及び Lane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、New York、1988を参照のこと。これは参照により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0335】

本発明による抗体フラグメントは、抗体のタンパク質分解的加水分解によって調製することができる、あるいは、フラグメントをコードするDNAの大腸菌又は哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養又は他のタンパク質発現システム)における発現によって調製することができる。抗体フラグメントは、従来の方法による完全な抗体のペプシン消化又はパパイニン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントを、抗体をペプシンで酵素切断して、F(ab')<sub>2</sub> として示される5Sフラグメントを得ることによって製造することができる。このフラグメントは、3.5SのFab'一価フラグメントを製造するために、チオール還元剤、及び場合により、ジスルフィド連結の切断から生じるスルフヒドリル基に対する保護基を使用してさらに切断することができる。あるいは、ペプシンを使用する酵素切断により、2つの一価Fab'フラグメント及びFcフラグメントが直接的に得られる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4036945号及び同第4331647号、並びにそれらに含まれる参考文献に記載されている(それらの特許は本明細書によりその全体が参照により組み込まれる)。また、Porter, R. R., Biochem. J., 73: 119~126、1959も参照のこと。抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽鎖-重鎖フラグメントを形成させるための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、又は他の酵素的、化学的もしくは遺伝学的な技術などもまた、フラグメントが、無傷の抗体によって認識される抗原に結合する限り、使用することができる。

#### 【0336】

FvフラグメントはV<sub>H</sub>鎖及びV<sub>L</sub>鎖の会合を含む。この会合は、Inbar 他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、69: 2659~62、1972に記載されているように非共有結合性であり得る。あるいは、可変鎖を、分子間ジスルフィド結合によって連結することができ、又は、グルタルアルデヒドなどの化学剤によって架橋することができる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリinkerによってつながれたV<sub>H</sub>鎖及びV<sub>L</sub>鎖を含む。これらの単鎖抗原結合タンパク質(scFv)は、オリゴヌクレオチドによりつながれたV<sub>H</sub>ドメイン及びV<sub>L</sub>ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。この構造遺伝子は発現ベクターに導入され、続いて、発現ベクターは大腸菌などの宿主細胞に導入される。組換え宿主細胞により、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一ポリペプチド鎖が合成さ

れる。scFvを製造するための様々な方法が、例えば、Whitlow及びFilpula、Methods、2：97～105、1991；Bird他、Science、242：423～426、1988；Pack他、Bio/Technology、11：1271～77、1993；Ladner他、米国特許第4946778号（これは本明細書によりその全体が参照により組み込まれる）によって記載されている。

#### 【0337】

抗体フラグメントの別の形態は、単一の相補性決定領域（CDR）をコードするペプチドである。CDRペプチド（「最小認識ユニット」）は、目的とする抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される。例えば、Larrick及びFry、Methods、2：106～10、1991を参照のこと。

#### 【0338】

抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー[Hoogenboom及びWinter、J. Mol. Biol.、227：381（1991）；Marks他、J. Mol. Biol.、222：581（1991）]を含む、この分野で知られている様々な技術を使用して製造することができる。Cole他及びBoerner他の技術もまた、ヒトモノクローナル抗体を調製するために利用することができる[Cole他、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁（1985）；Boerner他、J. Immunol.、147（1）：86～95（1991）]。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されている遺伝子組換え動物（例えば、マウス）に導入することによって作製することができる。抗原投与したとき、ヒト抗体の産生が認められ、この場合、その産生は、遺伝子再配置、組み立て及び抗体レパートリーを含むすべての点に関してヒトにおいて見られる産生と非常に似ている。この方法は、例えば、米国特許第5545807号、同第5545806号、同第5569825号、同第5625126号、同第5633425号、同第5661016号、及び下記の科学的刊行物：Marks他、Bio/Technology、10、779～783（1992）；Lonberg他、Nature、368：856～859（1994）；Morrison、Nature、368：812～13（1994）；Fishwild他、Nature Biotechnology、14：845～51（1996）；Neuberger、Nature Biotechnology、14：826（1996）；Lonberg及びHuszar、Intern. Rev. Immunol.、13：65～93（1995）に記載されている。

#### 【0339】

本発明に従って使用され得る例示的な抗体には、例えば、下記の抗体が含まれる：例えば、Abnova Corporation、AbgentおよびMBL Internationalから入手可能な抗Slc6a4抗体；例えば、Novus Biologicals、Acris Antibodies GmbHおよびAbnova Corporationから入手可能な抗Htr1a抗体；例えば、Abnova Corporation、Proteintech Group, Inc. およびAbgentから入手可能な抗MaoA抗体；例えば、Biorbyt、Abgent、および、antibodies-onlineから入手可能な抗Adrb1抗体；例えば、Tocris Bioscience、Abnova Corporationおよびantibodies-onlineから入手可能な抗Adrb2抗体；例えば、MyBioSource.com、AbcamおよびNovus Biologicalsから入手可能な抗CRH1型受容体抗体；例えば、Santa Cruz Biotechnology, Inc. およびEpitomics, Inc. から入手可能な抗CB1抗体；例えば、BD BiosciencesおよびAbnova Corporationから入手可能な抗FKBP5抗体；例えば、Novus BiologicalsおよびAcris An

10

20

30

40

50

t i b o d i e s G m b Hから入手可能な抗 T p h 2 抗体 ; 例えば、N o v u s B i o l o g i c a l s および B i o r b y t から入手可能な抗 G r m 1 抗体 ; 例えば、A c r i s A n t i b o d i e s G m b H および A t l a s A n t i b o d i e s から入手可能な抗 G r i k 3 抗体 ; 例えば、B i o r b y t および A c r i s A n t i b o d i e s G m b H から入手可能な抗 G r m 5 抗体 ; 例えば、P r o t e i n t e c h G r o u p , I n c . 、 A v i v a S y s t e m s B i o l o g y および A b g e n t から入手可能な抗 G r i k 2 抗体 ; 例えば、A c r i s A n t i b o d i e s G m b H および a n t i b o d i e s - o n l i n e から入手可能な抗 G r m 7 抗体 ; 例えば、P r o t e i n t e c h G r o u p , I n c . および A b n o v a C o r p o r a t i o n から入手可能な抗 G r i a 2 抗体 ; 例えば、N o v u s B i o l o g i c a l s および R & D S y s t e m s から入手可能な抗 D s c a m 抗体 ; 例えば、G e n e T e x 、 N o v u s B i o l o g i c a l s および A c r i s A n t i b o d i e s G m b H から入手可能な抗 L 1 c a m 抗体 ; 例えば、B D B i o s c i e n c e s および G e n W a y B i o t e c h , I n c . から入手可能な抗 T s n a x 抗体 ; 例えば、E p i t o m i c s , I n c . および A c r i s A n t i b o d i e s G m b H から入手可能な抗 S g k 1 抗体 ; ならびに / または、例えば、M B L I n t e r n a t i o n a l および S p r i n g B i o s c i e n c e から入手可能な抗 S t x 1 a 抗体。

#### 【 0 3 4 0 】

様々な方法を、本発明の免疫複合体の形成を検出するために使用することができ、当業者は、どの方法が、それぞれの免疫複合体のために、および / または、診断のために使用される細胞の型のために好適であるかを決定することができる。

#### 【 0 3 4 1 】

本発明の免疫複合体において使用される特異的抗体 ( 例えば、抗 S l c 6 a 4 抗体 ; 抗 H t r 1 a 抗体 ; 抗 M a o A 抗体 ; 抗 A d r b 1 抗体 ; 抗 A d r b 2 抗体 ; 抗 C R H 1 型受容体抗体 ; 抗 C B 1 抗体 ; 抗 F K B P 5 抗体 ; 抗 T p h 2 抗体 ; 抗 G r m 1 抗体 ; 抗 G r i k 3 抗体 ; 抗 G r m 5 抗体 ; 抗 G r i k 2 抗体 ; 抗 G r m 7 抗体 ; 抗 G r i a 2 抗体 ; 抗 D s c a m 抗体 ; 抗 L 1 c a m 抗体 ; 抗 T s n a x 抗体 ; 抗 S g k 1 抗体および / または抗 S t x 1 a 抗体 ) は、当技術分野で知られている方法を使用して標識することができる。標識された抗体は、一次抗体 ( すなわち、特定の抗原、例えば、標的遺伝子特異的抗原に結合する抗体 ) 、または、一次抗体に結合する二次抗体 ( 例えば、標識されたヤギ抗ウサギ抗体、標識されたマウス抗ヒト抗体 ) のどちらも可能であるものとする。抗体は標識に直接にコンジュゲート化することができ、または、酵素にコンジュゲート化することができる。

#### 【 0 3 4 2 】

本発明の抗体は、( 抗体にコンジュゲート化された蛍光性色素を使用して ) 蛍光標識することができ、または、( 例えば、放射能標識された例えば、<sup>125</sup>I 抗体を使用して ) 放射能標識することができ、または、酵素 ( 例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ ) にコンジュゲート化することができ、比色反応を生じさせるための発色性基質と一緒に使用することができる。本発明の酵素コンジュゲート化抗体によって利用される発色性基質には、A E C 、ファストレッド、E L F - 9 7 基質 [ 2 - ( 5 ' - クロロ - 2 - ホスホリルオキシフェニル ) - 6 - クロロ - 4 ( 3 H ) - キナゾリノン ] 、p - ニトロフェニルホスファート ( P N P P ) 、フェノールフタレインジホスファート、および E L F 3 9 - ホスファート、B C I P / I N T 、V e c t o r R e d ( V R ) 、アルカリホスファターゼ酵素のためのサーモン・マゼンダホスファート ( A v i v i C . 他、1994、J H i s t o c h e m . C y t o c h e m 、1994、42 : 551 ~ 4 ) 、および、N o v a R e d 、ジアミノベンジジン ( D A B ) 、V e c t o r ( R ) S G 基質、ペルオキシダーゼ酵素のためのルミノール型化学発光基質が含まれるが、これらに限定されない。これらの酵素基質は、S i g m a ( セントルイス、ミズーリ、米国 ) 、M o l e c u l a r P r o b e s I n c . ( ユージーン、オレゴン、米国 ) 、V e c t o r L a b o r a t o r i e s I n c . ( バーリングヘム、カリフォルニ

ア、米国)、Zymed Laboratories Inc. (サンフランシスコ、カリフォルニア、米国)、Dako Cytomation (デンマーク) から市販されている。

#### 【0343】

可溶性の(例えば、分泌された、排出された)標的遺伝子ポリペプチドを含有するかもしれない生物学的試料(例えば、血液試料または血清など)における免疫複合体の検出を、蛍光活性化細胞分取(FACS)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウエスタンブロット分析および放射免疫アッセイ(RIA)分析、免疫沈殿(IP)を使用して行うことができ、または、分子量に基づく取り組みによって行うことができる。

#### 【0344】

ウエスタンブロットのために、タンパク質が細胞試料から抽出され、電気泳動(例えば、SDS-PAGE)および膜(例えば、ナイロンまたはPVDF)へのブロッティングに供される。その後、膜は、直接に標識され得るか、または、二次標識抗体にさらに供され得る特異的抗体(例えば、抗Slc6a4抗体;抗Htr1a抗体;抗MaOA抗体;抗Adrb1抗体;抗Adrb2抗体;抗CRH1型受容体抗体;抗CB1抗体;抗FKBP5抗体;抗Tph2抗体;抗Grm1抗体;抗Grk3抗体;抗Grm5抗体;抗Grk2抗体;抗Grm7抗体;抗Gria2抗体;抗Dscam抗体;抗L1cam抗体;抗Tsnax抗体;抗Sgk1抗体および/または抗Stx1a抗体)と相互作用させられる。検出が、オートラジオグラフィ、比色反応または化学発光によって行われる場合がある。この方法は、基質の量の定量化と、電気泳動期間中のアクリルアミドゲルにおける移動距離を示す膜上の相対的位置によるその同一性の決定との両方を可能にする。

#### 【0345】

生物学的試料における抗原の濃度が低い場合、抗原(標的遺伝子アミノ酸配列)の検出を免疫沈殿(IP)によって行うことができる。免疫沈殿分析のために、特異的抗体(例えば、抗Slc6a4抗体;抗Htr1a抗体;抗MaOA抗体;抗Adrb1抗体;抗Adrb2抗体;抗CRH1型受容体抗体;抗CB1抗体;抗FKBP5抗体;抗Tph2抗体;抗Grm1抗体;抗Grk3抗体;抗Grm5抗体;抗Grk2抗体;抗Grm7抗体;抗Gria2抗体;抗Dscam抗体;抗L1cam抗体;抗Tsnax抗体;抗Sgk1抗体および/または抗Stx1a抗体)が、標的遺伝子ポリペプチドを含む試料(例えば、細胞溶解物)と直接に相互作用する場合があります、形成された複合体をさらに、ビーズにコンジュゲート化された二次抗体を使用して検出することができる(例えば、特異的抗体がマウスモノクローナル抗体であるならば、二次抗体は、例えば、Sepharoseビーズにコンジュゲート化された抗マウス抗体であり得る)。ビーズはその後、遠心分離によって沈殿させることができ、その後、沈殿したタンパク質(例えば、標的遺伝子ポリペプチドおよび特異的抗体)を、(例えば、95 °Cでの変性を使用して)ビーズから引き離し、さらに、抗体を使用するウエスタンブロット分析に供することができる。別法として、特異的抗体およびビーズコンジュゲート化二次抗体が、抗原(標的遺伝子ポリペプチド)を含有する生物学的試料に加えられ、それにより、免疫複合体を形成させる場合がある。別法として、標的遺伝子ポリペプチドが高グリコシル化タンパク質であるならば、標的遺伝子ポリペプチドはまた、ビーズに同様にコンジュゲート化され得るグリコシル化ポリペプチドと結合することができる基質(例えば、コンカバリンA(GE Healthcare Bio-Sciences、ウプサラ、スウェーデン)など)を使用して沈殿させることができ、その後、上記で記載されるような特異的抗体を使用するウエスタンブロット分析を行うことができる。

#### 【0346】

FACS分析は、細胞膜上に存在する抗原の検出を可能にする。簡単に記載すると、上記のような特異的抗体が蛍光団に連結され、検出が、細胞が光ビームを通過する際にそれぞれの細胞から放射される光の波長を読み取る細胞分取装置によって行われる。この方法では、2つ以上の抗体が同時に用いられる場合がある。

## 【0347】

標的遺伝子ポリペプチドの存在および/またはレベルはまた、E L I S Aを使用して求めることができる。簡単に記載すると、標的遺伝子抗原を含有する試料が表面（例えば、マイクロタイタープレートのウェルなど）に固定される。酵素にカップリングされた抗原特異的抗体（例えば、抗 S l c 6 a 4 抗体；抗 H t r 1 a 抗体；抗 M a o A 抗体；抗 A d r b 1 抗体；抗 A d r b 2 抗体；抗 C R H 1 型受容体抗体；抗 C B 1 抗体；抗 F K B P 5 抗体；抗 T p h 2 抗体；抗 G r m 1 抗体；抗 G r i k 3 抗体；抗 G r m 5 抗体；抗 G r i k 2 抗体；抗 G r m 7 抗体；抗 G r i a 2 抗体；抗 D s c a m 抗体；抗 L 1 c a m 抗体；抗 T s n a x 抗体；抗 S g k 1 抗体および/または抗 S t x 1 a 抗体）が適用され、抗原に結合させられる。抗体の存在がその後、抗体にカップリングされた酵素を用いる比色反応によって検出され、定量される。この方法において一般に用いられる酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが含まれる。十分に校正され、かつ、応答の直線範囲の範囲内であるならば、試料に存在する基質の量が、生じる色の量に比例している。基質標準物が一般に、定量精度を改善するために用いられる。

10

## 【0348】

標的遺伝子ポリペプチドの存在および/またはレベルはまた、放射免疫アッセイ（R I A）を使用して求めることができる。1つの形式において、この方法は、所望の抗原（標的遺伝子ポリペプチド）を、特異的抗体と、沈殿可能な担体（例えば、アガロースビーズなど）に固定化されている放射能標識された抗体結合タンパク質（例えば、 $I^{125}$ により標識されたプロテインA）とにより沈殿させることを伴う。沈殿したペレットにおけるカウント数が抗原の量に比例している。

20

## 【0349】

R I Aの代替形式において、標識された抗原と、標識されていない抗体結合タンパク質とが用いられる。未知量の抗原を含有する試料が様々な量で加えられる。標識された抗原から得られる沈殿したカウント数の減少が添加試料における抗原の量に比例している。

## 【0350】

標的遺伝子ポリペプチドの存在および/またはレベルはまた、分子量に基づく取り組みを使用して求めることができる。免疫複合体は、その成分よりも大きい分子量を示すので、分子量におけるそのような変化を検出することができる方法もまた用いることができる。例えば、免疫複合体をゲル遅延アッセイによって検出することができる。簡単に記載すると、非変性アクリルアミドゲルに、試料が負荷される。その成分と比較した場合のタンパク質産物のサイズ（分子量）における変化により、免疫複合体の存在が示される。高分子量側へのそのような変化を、非特異的タンパク質染色（例えば、銀染色またはC o m m a s s i e ブルー染色）を使用して見ることができる。

30

## 【0351】

生物学的試料（例えば、組織切片（例えば、パラフィン包埋物または凍結切片）など）における標的遺伝子ポリペプチドのインサイチュー検出を、細胞上の抗体の結合をその位置で検出する免疫学的染色方法を使用して行うことができる。免疫学的染色手順の例には、蛍光標識された免疫組織化学（抗体にコンジュゲート化された蛍光色素を使用する）、放射能標識された免疫組織化学（放射能標識された（例えば、 $I^{125}$ ）抗体を使用する）、および、免疫細胞化学〔酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）と、比色反応を生じさせるための発色性基質とを使用する〕が含まれるが、これらに限定されない。抗体にコンジュゲート化された酵素は、本明細書中上記で記載されるような様々な発色性基質を利用できるものとする。

40

## 【0352】

好ましくは、本発明によって使用される免疫学的染色は免疫組織化学および/または免疫細胞化学である。

## 【0353】

免疫学的染色の後には好ましくは、細胞の対比染色が、染色されなかった細胞区画に結合する色素を使用して行われる。例えば、標識された抗体が、細胞の細胞質に存在する抗

50

原に結合するならば、核染色（例えば、ヘマトキシリン - エオシン染色）が適切な対比染色である。

【 0 3 5 4 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 181および/または上記miR - 27をダウンレギュレーションした後に上記Tp h 2遺伝子の発現を測定することを含む。

【 0 3 5 5 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 135および/または上記miR - 335をアップレギュレーションした後に上記Sl c 6 a 4遺伝子の発現を測定することを含む。

10

【 0 3 5 6 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 135、miR - 335、miR - 181、miR - 182および/または上記miR - 26をアップレギュレーションした後に上記H t r l a遺伝子の発現を測定することを含む。

【 0 3 5 7 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 27をアップレギュレーションした後に上記M a o A遺伝子の発現を測定することを含む。

【 0 3 5 8 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 19をアップレギュレーションした後に上記A d r b 1遺伝子の発現を測定することを含む。

20

【 0 3 5 9 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 19をアップレギュレーションした後に上記C B 1遺伝子の発現を測定することを含む。

【 0 3 6 0 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 15をアップレギュレーションした後に上記C R H 1型受容体遺伝子の発現を測定することを含む。

【 0 3 6 1 】

1つの実施形態によれば、上記方法は、上記miR - 15をアップレギュレーションした後に上記F K B P 5遺伝子の発現を測定することを含む。

【 0 3 6 2 】

30

本発明者らはさらに、miR 135が、（上記で記載される）セロトニン関連の医学的状态を有する対象においてアップレギュレーションされることを実現している。

【 0 3 6 3 】

従って、本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、セロトニン関連の医学的状态を診断の必要性のある対象において診断する方法であって、miR - 135の発現レベルを上記対象の血液において測定することを含み、健康な対象の血液試料の場合上記と比較して上記miR - 135の高い発現レベルが、上記セロトニン関連の医学的状态を示すものである、方法が提供される。

【 0 3 6 4 】

miRを血液試料において分析する様々な方法が当技術分野では広く知られており、本明細書中下記において記載される。

40

【 0 3 6 5 】

診断はさらに、G o l d標準法を使用して評価し、確立することができる。典型的には、患者の全病歴、理学的検査、および、症状の徹底的評価のうちの少なくとも1つが、うつ病の原因を決定することに役立つ。標準化された質問表が有益であり得る（例えば、ハミルトンうつ病評価尺度およびベック抑うつ質問表など）。

【 0 3 6 6 】

本発明者らはさらに、miR - 135 aの血漿中レベルが、抗うつ剤（例えば、フルオキセチン（S S R I部類の抗うつ剤）など）により処置される対象において低下し、一方、脳のmiR - 135 aレベルがこれらの同じ対象において増大することを示している（

50

図 3 E ~ 図 3 J 参照)。

【 0 3 6 7 】

したがって、本発明の別の実施形態によれば、抗うつ剤の処置をモニターする方法であって、(a) 処置の必要性のある対象を抗うつ剤により処置すること、および(b) 上記対象の血液におけるmiR - 135の発現レベルを上記処置の前後で測定することを含み、上記抗うつ剤による上記処置の前における上記miR - 135の発現レベルと比較して、上記抗うつ剤による上記処置の後における上記miR - 135のより低い発現レベルにより、処置が効率的であることが示される、方法が提供される。

【 0 3 6 8 】

本明細書中で使用される場合、用語「抗うつ剤」は、気分障害(例えば、大うつ病および気分変調など)および不安障害(例えば、社会不安障害など)を緩和するために使用される薬物を示す。例示的な抗うつ剤には、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI、例えば、シタロプラム、エスシタロプラム、フルオキセチン、フルボキサミン、パロキセチンおよびセルトラリンなど)、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI、例えば、デスベンラファキシン、デュロキセチン、ミルナシプランおよびベンラファキシンなど)、ノルアドレナリン作動性かつ特異的なセロトニン作動性抗うつ剤(例えば、ミアンセリンおよびミルタザピンなど)、ノルエピネフリン(ノルアドレナリン)再取り込み阻害剤(NRI、例えば、アトモキセチン、マジンドール、レボキセチンおよびピロキサジンなど)、ノルエピネフリン - ドパミン再取り込み阻害剤(例えば、ブプロピオンなど)、選択的セロトニン再取り込み強化剤(例えば、チアネプチンなど)、ノル

10

20

【 0 3 6 9 】

1つの具体的な実施形態によれば、抗うつ剤は選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)またはノルアドレナリン再取り込み阻害剤(NRI)を含む。

【 0 3 7 0 】

miR - 135の発現レベルを測定することが典型的には、対象から得られる血液試料において達成される。

【 0 3 7 1 】

本明細書中で使用される場合、用語「血液試料」は、新鮮な全血、分画化された全血、および、血漿を示す。血液試料は典型的には、抗うつ剤による処置の後の対象から得られ、しかしながら、血液試料はまた、miR - 135レベルのさらなる比較のために処置前の対象から得られる場合がある。

30

【 0 3 7 2 】

効率的な抗うつ処置が、miR - 135のより低い発現レベルが、処置前のmiR - 135の発現レベルと比較して処置後に得られるときに明らかにされる。

【 0 3 7 3 】

別の実施形態によれば、精神医学的状态をその必要性のある対象においてモニターする方法であって、miR - 135の発現レベルを上記対象の血液において測定することを含み、健康な対象と比較して上記miR - 135の高い発現レベルにより、上記精神医学的状态が示される、方法が提供される。

40

【 0 3 7 4 】

別の実施形態によれば、精神医学的状态は、うつ病、不安、ストレス、疲労、損なわれた認知機能、パニック発作、脅迫行動、嗜癖、社会恐怖、睡眠障害および食品関連障害を含む。

【 0 3 7 5 】

1つの具体的な実施形態によれば、miR - 135はmiR - 135aを含む。

【 0 3 7 6 】

miR - 135の発現レベルを測定することが、当業者に知られているいずれかの方法

50



によって、例えば、ノーザン分析、RNAse 保護アッセイおよびPCR（例えば、リアルタイムPCR）によって行われる場合がある。

【0377】

処置をモニターすることはまた、患者の幸せを評価することによって、また、加えて、あるいは、代替として、対象を、行動試験、MRI、または、当業者に知られているいずれかの他の方法に供することによって達成される場合がある。

【0378】

本出願から成熟する特許の存続期間の期間中には、多くの関連するmiRNAの阻害剤または代替的にmiRNAの改変が開発されることが予想され、マイクロRNAの用語の範囲は、すべてのそのような新しい技術を先験的に包含することが意図される。

10

【0379】

本明細書中で使用される用語「約」は、 $\pm 10\%$ を示す。

【0380】

用語「含む／備える（comprises、comprising、includes、including）」、「有する（having）」、およびそれらの同根語は、「含むが、それらに限定されない（including but not limited to）」ことを意味する。

【0381】

用語「からなる（consisting of）」は、「含み、それらに限定される（including and limited to）」ことを意味する。

20

【0382】

表現「から本質的になる（consisting essentially of）」は、さらなる成分、工程および／または部分が、主張される組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にだけ、組成物、方法または構造がさらなる成分、工程および／または部分を含み得ることを意味する。

【0383】

本明細書中で使用される場合、単数形態（「a」、「an」および「the」）は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照物を包含する。例えば、用語「化合物（a compound）」または用語「少なくとも1つの化合物」は、その混合物を含めて、複数の化合物を包含し得る。

30

【0384】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、1～6などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲（例えば、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6など）、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値（例えば、1、2、3、4、5および6）を有すると見なさなければならない。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

【0385】

40

数値範囲が本明細書中で示される場合には常に、示された範囲に含まれる任意の言及された数字（分数または整数）を含むことが意味される。第1の示された数字および第2の示された数字「の範囲である／の間の範囲」という表現、および、第1の示された数字「から」第2の示された数「まで及ぶ／までの範囲」という表現は、交換可能に使用され、第1の示された数字と、第2の示された数字と、その間のすべての分数および整数とを含むことが意味される。

【0386】

本明細書中で使用される用語「方法（method）」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術および手順、または

50

、知られている様式、手段、技術および手順から、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術および手順が含まれるが、それらに限定されない。

【0387】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴が、単一の実施形態に組み合わせて提供されることもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施形態で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで、あるいは本発明の他の記載される実施形態において好適なように提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であると見なされるべきではない。

10

【0388】

本明細書中上記に描かれるような、および、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

【実施例】

【0389】

次に下記の実施例が参照されるが、下記の実施例は、上記の説明と一緒に、本発明を非限定様式で例示する。

【0390】

20

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学および組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」I~II巻、Ausubel, R. M. 編(1994)；Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、米国メリーランド州バルチモア(1989)；Perbal「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、米国ニューヨーク(1988)；Watson 30  
ら、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク；Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク(1998)；米国特許の第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第5192659号および同第5272057号に記載される方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻、Cellis, J. E. 編(1994)；「Current Protocols in Immunology」I~III巻、Coligan, J. E. 編(1994)；Stitesら 40  
編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク(1994)；MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク(1980)；利用可能な免疫アッセイ法は、特許と科学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば：米国特許の第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号および同第5281521号；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J. 編(1984)；「 50

Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編 (1985); 「Transcription and Translation」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編 (1984); 「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編 (1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press (1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B. (1984) および 「Methods in Enzymology」1~317 巻、Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ (1990); Marshakら、 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press (1996); これらの文献の全ては、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その他の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

10

## 【0391】

## 実施例 1

セロトニンニューロンにおける mi R の示差的発現

20

## 材料および実験手順

## 5HT ニューロンのマイクロRNA マイクロアレイ

ePET YFP マウスの 12 日目の胎児から得られる後脳細胞を培養し、選別して、5HT ニューロンを周りの非 5HT ニューロンから区別した。miRNA 集団を含む総 RNA を製造者の説明書に従って精製し、標識し、Sanger miRBase (リリース 12.0) に基づく Agilent マウス miRNA マイクロアレイ (Agilent Tech、ミシサガ、オンタリオ、カナダ) 設計番号 021828 に対してハイブリダイゼーションした。マイクロアレイを走査し、データを、Feature Extraction Software (Agilent Technologies) を使用して取り出し、処理した。走査後、GeneView.txt ファイルの強度出力データを分析して、マイクロRNA の差のある相対的発現を、Partek (登録商標) Genomics Suite (Partek Inc.、セントルイス、ミズーリ) を使用して定量化した。データを  $\log_2$  変換し、分位正規化し、GeneView ファイルにおけるフラグ “gIsGeneDetected” に従って選別した。666 個のマウス miR のうち、198 個が、この選別工程を行ったとき、さらなる分析のために残った。その後、示差的に発現した mi R を、1.5 倍の変化の閾値を ANOVA に従って有意性により使用することによって同定した。コントラストを ANOV 検定の範囲内で計算した。Benjamini / Hochberg 補正を偽陽性削減のために使用した (多重検定補正)。

30

## 【0392】

## Psichack 2 ルシフェラーゼ発現プラスミドへの 3' UTR のクローン化

40

Slc6a4、Htr1a、Maoad および Tph2 の 3' UTR 配列をマウスのゲノム DNA または全脳 cDNA から PCR 増幅した。3' UTR の PCR フラグメントを製造者の指針に従って pGEM-Teasy ベクター (Promega) に連結し、さらに、Psichack 2 レポータープラスミド (Promega) におけるルシフェラーゼの 3' 末端での単一 Not I 部位にサブクローン化した。変異させた 3' UTR 配列 (これは miR-135 シード配列を欠いている) を、シード一致配列全体にわたるプライマー突出とともに合成した。クローン化配向を診断的切断および配列決定によって確認した。

## 【0393】

トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ

50

H E K 2 9 3 T細胞を70%～85%の集密度にまで48ウェル形式でポリ-L-リシン上で成長させ、下記のプラスミドとともにポリエチレンジイミンを使用してトランスフェクションした：5 ngのP s i c h e c k 2 - 3 ' U T R プラスミドおよび特定のm i R N Aのための、215 ngの過剰発現ベクター、または空のm i R - v e c 過剰発現プラスミド。トランスフェクションの24時間後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼレポーター活性を以前の記載のようにアッセイした[Chen A. 他、Mol Endocrinol (2005) 19: 441～58]。ウミシイタケルシフェラーゼの値を、(同じベクターから転写されるが、試験されている3' UTRによって影響されない) 対照のホタルルシフェラーゼのレベルに対して正規化し、1条件あたり6回のウェル反復にわたって平均化した。

10

#### 【0394】

##### 動物および収容

成体のC57BL/6Jオスマウス(10週齢)(ハーラン、エルサレム、イスラエル)を逆の12時間明暗周期で温度制御部屋(22±1)に収容した。食物および水を自由に摂取させた。すべての実験プロトコルがWeizman科学研究所の施設内動物管理使用委員会によって承認された。

#### 【0395】

##### 急性不動化ストレスパラダイム

成体マウスをそれらの暗期周期中に50 mlの通気されたチューブに30分間入れた。

#### 【0396】

##### 長期社会的敗北

マウスを、以前に記載されたような社会的敗北プロトコルに供した[Krishnan V. 他、Cell (2007) 131: 391～404]。簡単に記載すると、マウスを攻撃的ICRマウスのホームケージに入れ、これらのマウスは5分間にわたって物理的に触れ合った。この期間中に、ICRマウスは侵入者マウスを攻撃し、侵入者は従属的態度を示した。その後、穴の開いた透明なプレキシガラス仕切り板を動物の間に置き、マウスを、感覚的接触を許すために24時間にわたって同じケージに留めた。その後、この手順を、その後の10日のそれぞれについて、見慣れないICRマウスを用いて繰り返した。

20

#### 【0397】

##### 抗うつ処置

マウスは、三環系のイミプラミンまたはSSRIのフルオキセチンまたはNRIのレボキセチン(生理的食塩水において20 mg/kg)または生理的食塩水のi.p.注射を受けた。長期注射を18日間～21日間連続して行い、急性注射を脳の顕微解剖の24時間前に行った。

30

#### 【0398】

##### 縫線核の顕微解剖および血漿収集

脳試料を、脳を取り出し、アクリル脳マトリックス(Stoelting)に置いた後で、マウスの縫線核(RN)から採取した。スライス片を、指定の解剖学的マーカーに基づいて、標準的なカミソリ刃(GEM)を使用して採取した。先を鈍くした14 G注射器を使用して、RN領域を、マトリックスから取り出された3 mmのスライス片から抜き取った。加えて、体幹の血液を、凝固を避けるためにEDTA含有チューブに集めた。遠心分離を3500 gで4 において30分間行った後、血漿を分離し、RNA精製まで-70 で保った。

40

#### 【0399】

##### マイクロRNAの精製および定量的RT-PCR発現分析

mRNA(マイクロRNAを含む)を、miRNeasyミニキット(Qiagen)を製造者の説明書に従って使用して、選別されたニューロン、凍結された脳打ち抜き物および血漿から単離し、miScript逆転写キットmiRNAを使用して処理し、cDNAを作製した。その後、cDNA試料を、SYBR(登録商標)Green PCRキッ

50

ト ( Q i a g e n ) を製造者の指針に従って使用して、A B 7 5 0 0 サーマサイクラー ( A p p l i e d B i o s y s t e m s ) で分析した。それぞれのmiRのための特異的プライマーを市販のユニバーサルプライマーと一緒に使用し、一方、U6のsnRNAを内部対照として使用した。

表1B:リアルタイムPCRのために使用されるプライマー配列

配列番号	プライマー配列	遺伝子
1	TATGGCTTTTATTCCTATGTGA	miR135a
2	TATGGCTTTTCATTTCCTATGTGA	miR135b
3	TTTGTTCGTTCCGGCTCGCGTGA	miR375
4	GATGACACGCAAATTCGTGAA	U6
5	TAAGGCACGCGGTGAATGCC	miR124

10

表1C:分子クローニングのために使用されるプライマー配列

プライマー配列	配向	生成物の 大きさ	遺伝子	
AGTTCTGCCGCTGATGATG (配列番号6)	センス	2600 <sup>2</sup> と共に	Htr1a 3' UTR	1
GCACAAATGGAGAGTCTGATT AAA (配列番号7)	アンチセンス		Htr1a 3' UTR	2
TGCCTTTAATGCAAAACAGC (配列番号8)	センス	2000 <sup>4</sup> と共に	MaoA 3'UTR	3
CCAAGTTTACAACCATCAAGC A (配列番号9)	アンチセンス		MaoA 3'UTR	4
ATCCGCATGAATGCTGTGTA (配列番号10)	センス	760 <sup>6</sup> と共に	Slc6a4 3'UTR	5
GTGGGTGGTGGGAAGAGACAC (配列番号11)	アンチセンス		Slc6a4 3'UTR	6
CCTACACGCAGAGCATTGAA (配列番号12)	センス	870 <sup>8</sup> と共に	Tph2 3' UTR	7
ACATCCCTGTGGGATTTGAG (配列番号13)	アンチセンス		Tph2 3' UTR	8
TGTCTTGCTTATATTTTCTCAGT AG (配列番号14)	センス	320 <sup>6</sup> と共に	Slc6a4 3'UTR 変異型	9
GAAAATATAAGCAAGACATCC CTGTT (配列番号15)	アンチセンス	440 <sup>5</sup> と共に	Slc6a4 3'UTR 変異型	10
AAAGATCCCTTTCCCAATG (配列番号16)	センス	1400 <sup>12</sup> と共に	Htr1a 3' UTR 短い	11
CAGTGCCTCTTCTCCACAGA (配列番号17)	アンチセンス		Htr1a 3' UTR 短い	12
ATAAGCAAGGGCCCAAAAGGA AGA (配列番号18)	センス	1300 <sup>12</sup> と共に	Htr1a 3' UTR シード変異型 1	13
TTTTGGGCCCTTGCTTATAAGT CC (配列番号19)	アンチセンス	120 <sup>11</sup> と共に	Htr1a 3' UTR シード変異型 1	14
CTGCCCTGCCACATGTGTTTT AT (配列番号20)	センス	170 <sup>12</sup> と共に	Htr1a 3' UTR シード変異型 2	15
TAACAAATAAAAAACACATGTG GCA (配列番号21)	アンチセンス	1260 <sup>11</sup> と共に	Htr1a 3' UTR シード変異型 2	16
ACCGGTCATATGATTCCCCAGT TTCCTGCTTT (配列番号22)	センス	199 <sup>18</sup> と共に	プレ-mmu- miR135b	17
ACCGGTCCTCTGTGGCTGGTCC TTAG (配列番号23)	アンチセンス		プレ-mmu- miR135b	18

20

30

40

#### miR135b過剰発現ウイルスベクターのクローン化

プレ-miR-135bを、制限酵素のAgeI部位を加えるプライマーとともにマウスのゲノムDNAからPCRによって増幅し、その後、pGEM-T Easyベクター (Promega、マディソン、ウィスコンシン) に挿入した。pGEM-T Easyの配列決定、ならびに、AgeIによるpGEM-T EasyおよびpEGFPベクター (Clontech laboratories Inc.、マウンテンビュー、カリフォルニア) の両方の消化の後、未成熟miR-135b配列をpEGFPベクターに連結して、発現プラスミドpEGFP-miR-135bを構築した。その後で、pEGFP-miR-135bを、pCSC-E/Syn-eGFPプラスミドを同じ酵素で切断するのと並行してBamHIおよびBsrGIによって切断し、miR-135b-eGFP配列をpCSC-E/Synに連結して、pCSC-eSNY-pre-miR-135b-eGFPプラスミドを構築し、これを制限エンドヌクレアーゼ分析およびDNA配列決定によって確認した。

10

#### 【0401】

##### レンチウイルスベクターの作製

組換えレンチウイルスを、以前の記載のように[Naldini L他、Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93:11382~8]、HEK293T細胞における一過性トランスフェクションによって作製した。簡単に記載すると、感染性レンチウイルスをトランスフェクション後48時間および72時間で集め、0.45 µm細孔の酢酸セルロースフィルターでろ過し、超遠心分離によって濃縮した。

20

#### 【0402】

##### レンチウイルスの脳内注入

定位手術およびレンチウイルス送達部位の精密な制御を提供するために、本発明者らは、コンピューター誘導定位機器およびモーター駆動ナノインジェクター (Angle Two (商標) Stereotaxic Instrument、myNeurolab) を使用した。以前に記載されたように[Singer O.他、Nat Neurosci (2005)、8、1343~9]、マウスを全身麻酔下で定位装置に置き、座標を、FranklinおよびPaxinosの図譜によって定義されるように決定した。レンチウイルス調製物を、モーター駆動のナノインジェクターシステムにつながるHamilton注射器を使用して送達し、溶液を1分毎に0.2 µlの速度で注入した。2週間の回復期間の後、マウスを行動研究および生理学的研究に供し、その後で麻酔し、リン酸塩緩衝化4%パラホルムアルデヒドにより灌流した。固定された脳を、免疫組織化学を使用して注入部位の正確さを確認するために30 µmのスライス片に連続切片化した。

30

#### 【0403】

##### 免疫組織化学

免疫組織化学のために使用される手順を以前の記載のように行った[Chen A他、J Neurosci (2006) 26:5500~10]。GFP免疫染色のために、本発明者らは、一次抗体としての、ウサギにおいて惹起されるビオチン化抗GFP抗体 (Abcam、ケンブリッジ、英国)、および、二次抗体としてのストレプトアビジンコンジュゲート化Cy2 [Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc、ウエスト・グロブ、ペンシルベニア、米国] を使用した。

40

#### 【0404】

##### 行動評価

すべての行動評価を、試験部屋に各試験の前の2時間慣らした後で暗期の期間中に行った。

#### 【0405】

##### 尾懸垂試験

尾懸垂試験をTSE尾懸垂モニター (TSE Systems、バドホンプルグ、ドイツ) で行った。それぞれのマウスをその尾の先端によってテープ固定し、力センサーから10分間ぶら下げた。不動で過ごした時間と、もがいて過ごした時間とを、事前設定され

50

た閾値に基づくソフトウェアによって計算し、記録した。

#### 【0406】

##### 改変強制水泳試験

尾懸垂試験を以前の記載のように行った [K r i s h n a n V および N e s t l e r E J、N a t u r e ( 2 0 0 8 ) 4 5 5 : 8 9 4 ~ 9 0 2 ]。手短に言えば、使用された装置は、25 の水が15 cmの深さにまで満たされたプラスチックバケツ(18 cmの直径)であった。それぞれのマウスをバケツの中心に置いて、6分間のビデオ記録された試験期間を開始した。2~6分の試験期間中において不動で過ごした時間の継続期間を、E t o V i s i o n X T ( N o l d u s、ヴァーヘニンゲン、オランダ)を使用して自動的にスコア化した。

10

#### 【0407】

##### 自発運動活性

歩行運動における差から生じる行動的影響の可能性について制御するために、マウスの自発運動活性を、馴化に数日先立つ48時間の期間にわたって調べた。マウスを、特殊化されたホームケージに1匹ずつ収容し、自発運動を、I n f r a M o t システム ( T S E S y s t e m s、パドハンプルグ、ドイツ)を使用して測定した。

#### 【0408】

##### 統計学的解析

データを平均 + / - S E Mとして表した。統計学的有意性について検定するために、スチューデントt検定を、2つの群のみが比較される場合には使用した(例えば、マイクロアレイ検証qPCRの間など)。1元配置ANOVAを使用して、多数の群の間を比較した(例えば、ルシフェラーゼアッセイにおける異なる処置の間など)。2元配置ANOVAを、2つの独立変数の場合には使用した(例えば、SSRIおよびNRIの注入、急性および長期の両方の継続期間において)。ポストホックt検定を必要なときには使用して、統計学的有意性を明らかにした。群間の差は、 $p < 0.05$ であるとき、有意であると見なした。

20

#### 【0409】

##### 結果

5HTニューロンを、eP E T Y F Pの胚のRNから単離し、それらのmiR発現プロファイルを、miRマイクロアレイを使用して、同じ核から得られる非5HTニューロンと比較した(図1A)。14個のmiRが、非5HTニューロンと比較して5HTニューロンにおいて、2倍を超えてアップレギュレーションされることが見出され、27個が、2倍を超えてダウンレギュレーションされることが見出された(表2A~表2B(下記)参照)。アレイ結果の代表的な検証を、5HTニューロンにおいてアップレギュレーションされるmiR(例えば、miR-375( $P = 0.0071$ ; 図1B)など)について、また、ダウンレギュレーションされるmiR(例えば、miR-135a( $P = 0.0075$ ; 図1C)など)についてリアルタイムPCRを使用して行った。5HTニューロンの調節因子としてのmiRの役割をさらに研究するために、広範囲の生物情報学的分析を仮説に基づいた様式で行った。精神病理に伴うことがこれまでに明らかにされた既知セロトニン関連遺伝子の標的化予測をマイクロアレイ結果と組み合わせた。RNにおける5HTニューロンにおいて発現される下記の4つのタンパク質コード標的遺伝子を試験のために選定した: セロトニン輸送体(これは5HT再取り込に関わっている)(これはまた、S E R TまたはS l c 6 a 4として知られている)、セロトニン阻害受容体1a(これはまた、H t r 1 aとして知られている)、トリプトファンヒドロキシラーゼ2(T p h 2)(これは脳における5HT合成の律速酵素である)、および、モノアミンヒドロキシラーゼ(M a o A)(これは5HTを不活性化する)。これらの遺伝子についてのマイクロRNA標的化予測を、T a r g e t S c a n [ w w w ( d o t ) t a r g e t s c a n ( d o t ) o r g ] およびM i r a n d a [ w w w ( d o t ) m i c r o r n a ( d o t ) o r g ] の2つの異なるウェブ型アルゴリズムを使用して行い、非5HT細胞と比較して、5HTニューロンのmiRアレイにおいて少なくとも $\pm 1.5$ の差で変化している9

30

40

50

1 個の mi R のリストと組み合せた。mi R アレイデータおよび生物情報学的分析に基づいて、8 個の mi R をさらなるインビトロ研究のために選定した ( 図 1 D ~ 図 1 G ) 。

表2A: 非セロトニン作動性と比較して5HTニューロンにおいて  
(2倍を越えて)アップレギュレーションされるmiRのリスト

倍率変化	マイクロRNA名
20.72	mmu-miR-375
11.73	mmu-miR-376c
4.44	mmu-miR-7a
2.87	mmu-miR-137
2.79	mghev-miR-M1-2
2.61	mmu-miR-709
2.51	mmu-miR-291b-5p
2.40	mmu-miR-1224
2.37	mmu-miR-1892
2.31	mmu-miR-702
2.25	mmu-miR-139-3p
2.24	mmu-miR-762
2.10	mmu-miR-671-5p
2.04	mmu-miR-483*

10

20

表2B: 非セロトニン作動性と比較して5HTニューロンにおいて  
(2倍を越えて)ダウンレギュレーションされるmiRのリスト

倍率変化	マイクロRNA名
-5.10	mmu-miR-691
-4.11	mmu-miR-466l
-3.95	mmu-miR-17
-3.18	mmu-miR-376b
-3.13	mmu-miR-124
-3.08	mmu-miR-218
-2.99	mmu-miR-128
-2.92	mmu-miR-140*
-2.86	mmu-miR-148a
-2.86	mmu-miR-340-5p
-2.82	mmu-miR-181c
-2.72	mmu-miR-210
-2.69	mmu-miR-135a
-2.66	mmu-miR-27a
-2.45	mmu-miR-452
-2.20	mmu-miR-370
-2.19	mmu-miR-300
-2.17	mmu-miR-376a
-2.13	mmu-miR-127
-2.12	mmu-miR-15b
-2.07	mmu-miR-101a
-2.06	mmu-miR-16
-2.05	mmu-miR-324-5p
-2.05	mmu-miR-434-5p
-2.03	mmu-miR-92a
-2.00	mmu-miR-669i

30

40

50



## 【0410】

インビトロルシフェラーゼアッセイを、試験された5HT関連遺伝子の3'UTRと、それを標的とすることが推定により予測されるmiRとの間におけるmiR-標的相互作用を調べるために行った。本発明者らは、Tph2の3'UTRがmiR-27b ( $P = 0.0051$ ) およびmiR-181c ( $P = 0.0305$ 、図1H) によって少し(およそ20%)抑制され、かつ、Maoadの3'UTRもまた、miR-27b ( $P = 0.0008$ 、図1I) によって抑制されることを見出した。miR-135がSlc6a4の3'UTRを標的とすること(図2Aおよび図2C) およびHtr1aの3'UTRを標的とすること(図2Bおよび図2D) により、これらの転写物の翻訳の強固な抑制が生じた。miR-135aは、およそ30%の抑制をSlc6a4 ( $P = 0.014$ ) およびHtr1a ( $P < 0.0001$ ) に対してもたらしたが、miR-135bは、およそ50%の抑制をSlc6a4 ( $P = 0.0002$ ) およびHtr1a ( $P < 0.0001$ ) に対して引き起こした。加えて、Htr1aの3'UTRの著しい抑制が、miR-335 ( $P < 0.0001$ )、miR-181c ( $P = 0.0029$ ) およびmiR-26a ( $P < 0.0001$ ) によってもたらされた(図2D)。さらなるゲノムの取り組みの生物情報学的分析により、miR-135シード一致部の強い保存がslc6a4の3'UTRにおいて明らかにされ(図2E)、また、Htr1aの3'UTRにおける2つの特定されたシード一致部のうちの1つにおいて明らかにされた(図2F)。Slc6a4転写物の3'UTRにおける変異研究では、miR-135のmiRシード一致部を除去した場合、Slc6a4のmiR-135a標的化およびmiR-135b標的化の両方がそのシード一致配列により伝達されたことが明らかにされた。miR-135によって誘導される抑制が、Slc6a4の3'UTRにおける変異によって完全に阻止された(図2G)。Htr1aのmiR-135シード一致部を個々に、または、ともに変異させることにより、miR-135aが、Htr1aの3'UTRを、近位側ではなく、遠位側のシード一致部を介して抑制したこと、一方、miR-135bは両方の予測された部位を介して作用することが明らかにされた(図2H)。

## 【0411】

本発明者らはさらに、種々の環境的攻撃または薬理的処置の後におけるインビボでのRN-miR-135発現の調節を調べた。マウスの操作(すなわち、急性不動ストレス)の後、RNを取り出し、RNAを抽出し、miR-135レベルを、リアルタイムPCRを使用して調べた。5HTレベルは、急性ストレスによって警報となることが知られているので、本発明者らは、miR-135のレベルを急性拘束ストレス後の種々の時点で調べ、miR-135aおよびmiR-135bの両方が急性ストレス後90分でダウンレギュレーションされることを見出した( $P < 0.0001$ )。これらのmiRの低下したレベルは、対照マウスと比較して、ストレス後24時間でも依然としてそのままであった(miR-135aについては $P = 0.0357$ 、図3A; miR-135bについては $P = 0.0055$ 、図3B)。そのうえ、5HTニューロン機能、ならびに、Slc6a4およびHtr1aの発現レベルは、うつ病患者において、また、抗うつ剤の薬物治療の後で強く影響されることが知られているので、本発明者らは、うつ病様行動の誘導のための環境モデル(長期社会的敗北モデル)にさらされたマウス、および、三環系抑うつ剤のイミプラミンにさらされたマウスにおいてこれら2つのmiR変化体のレベルを調べた。興味深いことに、長期社会的敗北のストレスはmiR-135のレベルを縫線核において変化させなかったが、急性投与または長期投与されたイミプラミンは、ストレス負荷マウスおよびストレス非負荷マウスの両方で、RNにおいてmiR-135aの発現レベルを増大させ( $P = 0.003$ ; 図3C)、miR-135bの発現レベルを増大させた( $P = 0.0093$ ; 図3D)。イミプラミンは特異的な5HT再取り込み阻害剤ではないので、本発明者らはさらに、急性および長期の両方の選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)(フルオキセチン)およびノルアドレナリン再取り込み阻害剤(NRI)(レボキセチン)の影響を調べ、急性および長期の両方のSSRI処置の後ではmiR-135aレベルにおける強固な増大をRNにおいて見出し( $P < 0.0001$ 、図3E)、

10

20

30

40

50

miR-135bレベルにおける増大は見出せなかった(図3F)。SSRI処置後のRNにおけるmiR-135レベルにおける変化によって興味があったので、本発明者らはマウスの血漿における循環miR-135のレベルを調べ、miR-135aレベルにおける強固な低下を急性および長期の両方のSSRI投与の後で見出し(薬物についての主影響、 $P < 0.0001$ 、図3G)、また、循環miR-135bレベルにおける影響は何ら無いことを見出した(図3H)。このことは、SSRI投与後のRNおよび血漿におけるmiR-135aレベルの間での強い逆の相関を示唆している(図3Iおよび図3J)。

#### 【0412】

動物状況全般におけるmiR-135レベルの重要性をさらに調査するために、本発明者らは、miR-135のレベルをインビボで、特に成体マウスのRNにおいて操作し、マウスのうつ病様行動に対するその影響を調べた。この目的のために、本発明者らは、強化型シナプシンプロモーター(これはまた、GFPRポーターを共発現させた)を使用して、miR-135bをニューロンにおいて特異的に過剰発現する組換えレンチウイルスを構築した(材料および実験手順の節(上記)および図4Aを参照)。本発明者らは、このレンチウイルスを成体マウスのRNに注入することによってこのレンチウイルスをインビボで調べ、RNにおけるmiR-135bレベルを対照レンチウイルス注入マウスに対して比較した。miR-135bレベルのリアルタイムPCR分析では、10倍の誘導が、対照レンチウイルス注入マウスと比較して明らかにされた( $P = 0.0032$ 、図4B)。miR-135b過剰発現を伴う注入された成体マウスを、うつ病様行動を開始させるために長期社会的敗北に供し、続いて行動について試験した。行動試験の後、マウスを灌流処置し、脳を、注入部位を突き止めるために分析した(図4C~図4D)。RNでmiR-135を過剰発現するマウスは、ホームケージでのそれらの自発運動における変化を何ら認めることなく(図4G~図4H)、低下した不動時間を強制水泳において示し( $P = 0.0088$ (3分の時点で)、 $P = 0.00330$ (4分の時点について); 図4E)、また、尾懸垂試験において示した( $P = 0.07356$ (試験の最後の5分で)、図4F)。このことは、miR-135の過剰発現についての抗うつ効果を示唆している。

#### 【0413】

まとめると、本発明者らは、RNのセロトニン作動性ニューロンおよびセロトニン非作動性ニューロンの特異的なmiR発現フィンガープリントを明らかにした。本発明者らは、この特異なデータセットを、5HT関連遺伝子のmiR標的化のための生物情報学予測と組み合わせた。本発明者らは、Tph2、MaOA、Slc6a4およびHtr1aについての標的化予測を、3'UTRルシフェラーゼアッセイを使用して、また、変異研究においてインビトロで調べ、他のmiR-標的相互作用のなかでもとりわけ、Slc6a4およびHtr1aの両方の3'UTRに対するmiR-135についての強い阻害影響を明らかにした。さらに、本発明者らは、RNにおけるmiR-135が急性ストレスによってダウンレギュレーションされ、抗うつ剤投与(具体的にはSSRI剤)によってアップレギュレーションされることを明らかにした。さらに、本発明者らは、SSRI投与後のRNにおけるmiR-135aレベルと、血漿におけるそのレベルとの間での逆の相関を確認した。最後に、本発明者らは、成体マウスのRNにおけるmiR-135の部位特異的な過剰発現が社会的敗北後の低下したうつ病様行動をもたらすことを明らかにした。

#### 【0414】

##### 実施例2

miR-19は1型ベータアドレナリン作動性受容体(Adrb1)を特異的に標的とする

##### 材料および実験手順

Psicheck2ルシフェラーゼ発現プラスミドへの3'UTRのクローン化

ADRB1の3'UTR配列をマウスのゲノムDNAからPCR増幅した。変異させた

10

20

30

40

50

3' UTR 配列 (これは4つすべてのmiR-19シード一致部を欠いている) が、Epoch Biolabs, Inc. (テキサス、米国) によって合成された。3' UTR のPCRフラグメントを製造者の指針に従ってpGEM-Teasyベクター (Promega) に連結し、さらに、Psischeck2レポータープラスミド (Promega) におけるルシフェラーゼの3' 末端での単一NotI部位にサブクローン化した。クローン化配向を診断的切断および配列決定によって確認した。

#### 【0415】

##### トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ

HEK293T細胞またはHT22ニューロン細胞を70%~85%の密集度まで48ウェル形式でポリ-L-リシン上で成長させ、下記のプラスミドとともにポリエチレンジオキサンを使用してトランスフェクションした: Psischeck2-3' UTRプラスミド、pEGFPプラスミドでのpre-mmu-miR-19b過剰発現またはpEGFPプラスミド単独 (clontech)、miR-19bノックダウン (KD) プラスミド (Genecopoeia) または対照KDプラスミド (Genecopoeia)。トランスフェクションの24時間後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼレポーター活性を以前の記載のようにアッセイした [Chen A. 他、Mol Endocrinol (2005) 19: 441~58]。ウミシイタケルシフェラーゼの値を、(同じベクターから転写されるが、試験されている3' UTRによって影響されない) 対照のホタルルシフェラーゼのレベルに対して正規化し、1条件あたり6回のウェル反復にわたって平均化した。

#### 【0416】

##### 結果

いくつかの反復体をその3' UTRに含有する別個の進化的に保存されたmiRNA標的配列を用いたストレス関連遺伝子についての生物情報学的分析により、miR-19が、1型ベータアドレナリン作動性受容体 (Adrb1) の標的化のための強い候補として明らかにされた (この場合、3つの強く保存されたmiR-19シード一致部と、1つのそれほど保存されていないmiR-19シード一致部とがArrb1の3' UTRに存在する)。Adrb1は、扁桃体、海馬および室傍核 (PVN) を含めて脳の様々な領域において発現されるアドレナリン作動性受容体である。扁桃体のAdrb1は以前には、影響を不安様行動 [Fu A 他、Brain Res (2008) 1211: 85~92; Rudoy CA および Van Bockstaele EJ、Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry (2007) 31: 1119~29] および恐怖記憶 [Rooszendaal B 他、J Neurosci (2004) 24: 8161~9; Rooszendaal B 他、Neuroscience (2006) 138: 901~10] に及ぼすとして記載された。興味深いことに、Adrb1は、扁桃体のCRF陽性細胞の表面に見出されたものであり、Gを介してその影響を発揮し、それにより、アデニル酸シクラーゼ (AC) をさらに活性化するGタンパク質共役受容体 (GPCR) である。ACをコードする10個の遺伝子 (すなわち、ADCY1~10) が知られている。これらのうちの3つ (ADCY1、ADCY7およびADCY9) が、miR-19によって標的とされることが生物情報学的に予測された。ADCY1は脳特異的な発現を有しており、マウス前脳におけるその過剰発現が認知記憶およびLTPを高めることが以前に示された [Wang H 他、Nat Neurosci (2004) 7: 635~42]。

#### 【0417】

miR-19が実際に、Adrb1またはADCY1の発現を、Adrb1-3' UTRまたはADCY1-3' UTRにおけるその推定される標的配列を介して調節するかどうかを調べるために、無傷型形態または変異型形態のAdrb1-3' UTR (図5) またはADCY1-3' UTRをPsischeck2発現プラスミドにおいてルシフェラーゼ遺伝子の下流側にクローン化した。変異型形態のAdrb1-3' UTRには、miR-19bのための4つすべてのシード一致部が存在しなかった (図5)。変異型形態の部

分的ADCY1-3'UTRには、(3つのうちの)保存されたシード一致部のみが存在しなかった。

#### 【0418】

ルシフェラーゼアッセイを、miR-19とAdrb1-3'UTRとの間における相互作用、および、同様に、miR-19とADCY1-3'UTRとの間における相互作用の性質を明らかにするために使用した。HT22細胞(これは低レベルのmiR-19を内因的に発現する)では、差が、無傷型形態または変異型形態のどちらかのADRB1-3'UTRによって制御されるルシフェラーゼレベルの間に見出されなかった(図6A)。しかしながら、miR-19bをHT22細胞において過剰発現させたとき、ルシフェラーゼレベルが、(正規化されたルシフェラーゼ発現における一般的な、非特異的と思われる低下に加えて)、変異型形態のADRB1-3'UTRに対して、無傷型形態によって駆動されるときには著しく低くなった(およそ2分の1)(図6B)。高レベルのmiR-19を内因的に発現するHEK293T細胞では、ADRB1-3'UTRによって調節されるルシフェラーゼ発現レベルが、変異型形態のADRB1-3'UTRによって調節されるときに発現されるルシフェラーゼ発現レベルの1/2~1/4であった(図6C)。

#### 【0419】

miRのノックダウン(KD)系を、miR-19レベルをHEK293T細胞において操作するために使用した。すなわち、(1)miRCURY LNA KDプローブ(Exiqon、マサチューセッツ、米国;図6D)、および、(2)プラスミドに基づくノックダウン配列miArrest(Genecopoeia、ロックビル、メリーランド、米国;図6E)。LNA-抗miR-19bは、ADRB1-3'UTR下で調節されるときに発現されるルシフェラーゼ活性を対照のスクランブル型KDプローブに対して約20%高め、また、変異型形態のADRB1-3'UTRに対する影響を何ら有していなかった(図6D)。これに対して、プラスミドに基づくmiR-19bKDは、対照KD配列に対して、無傷型形態のADRB1-3'UTRによって調節されるルシフェラーゼ発現における2倍までの増強を引き起こした(図6E)。変異型形態のADRB1-3'UTRによって駆動されるルシフェラーゼ活性に対するルシフェラーゼレベルの完全なレスキューが何ら達成されなかった。このことは、プローブ/ゲノム配列のmiR-19b特異性(スピアリングmiR-19a調節)、完全にダウンレギュレーションすることが困難であるかもしれないHEK293T細胞における高いmiR-19レベル、または、ADRB1-3'UTRにおける同じシード一致配列に結合するかもしれないHEK293T細胞で発現される他の可能なmiRNAの影響のいずれかによって説明されるかもしれない。

#### 【0420】

##### 実施例3A

miR-19aおよびmiR-19bは慢性的ストレスの後のPFCおよび扁桃体に於いてアップレギュレーションされる

##### 材料および実験手順

##### 動物および収容

miR17~92flx/flxマウス[Ventura 他、Cell(2008)875~86:(5)132;7]をCamKIIa-Creマウス[Dragatsis 他、Genesis、(2000)26(2):133~5]と交雑する。トランスジェニックマウスまたは成体C57BL/6J雄マウスを逆の12時間の明暗周期で温度制御部屋(22±1)に収容する。食物および水を自由に摂取させる。すべての実験プロトコルがWeizmann科学研究所の施設内動物管理使用委員会によって承認された。

#### 【0421】

##### 成体脳におけるmiR-19b操作のためのレンチウイルスの作製

miR-19bのKD配列をRNAポリメラーゼIII-H1プロモーターの後におい

レンチウイルスプラスミドにクローン化した。加えて、プレ-miR-19b配列をレンチウイルスプラスミドにおいてニューロン特異的プロモーター（強化型シナプシン、E Syn）の後にクローン化した。レンチウイルスをインビボでのmiR-19-KD実験およびプレ-miR-19b過剰発現発現（OE）実験の両方のために作製する。これらのレンチウイルスを使用して、miR-19bのレベルを、miR-19のレベルが行動的／薬理学的攻撃の後で変化することが見出される標的領域において操作する。

#### 【0422】

miR-19を前脳において欠いているマウスの作製

miR-19を前脳において欠いているマウスを作製するために、本発明者らは、miRクラスターmiR17~92の条件的形態を有するマウスを用いて、CreリコンビナーゼをCamKIIaプロモーターの下にコードする遺伝子を有するマウスを育種中である。miR-19ファミリーはmiR-19aおよびmiR-19bを含む。マウスゲノムにおいて、miR-19bは2つの同一コピー（miR-19b-1およびmiR-19b-2）を有する。miR19aおよびmiR-19b-1は、同じmiRNAクラスターに、すなわち、miR17~92に位置し、これに対して、miR-19b-2は、異なるゲノム遺伝子座（miR106a~363）に位置する。後者は、マウス組織における発現をほとんど、または全く有していないようであり、したがって、miR17~92クラスターのノックアウトは、前脳におけるmiR-19aおよびmiR-19b発現レベルに対する非常に大きな影響を可能にするために十分であることが予想される。

#### 【0423】

行動的／薬理学的攻撃

miR17~92クラスターを前脳において欠いているマウス、または、miR-19が特異的に操作されたマウス（特定の脳領域において過剰発現またはダウンレギュレーション（KD）されたマウス）が、ADRB1、ADCY1ならびに他の転写物および遺伝子産物の発現レベルについて調べられるであろう。これらの動物はまた、不安様行動、自発運動活性および記憶成績について試験されるであろう。さらに、miR-19aおよびmiR-19bの発現レベルが、WT型マウスにおけるノルアドレナリン再取り込み阻害剤のレボキセチンによる急性および長期の全身的処置の後で興味の対象である種々の領域（例えば、海馬、扁桃体および前脳）において調べられる。

#### 【0424】

結果

miRNA-19とAdrb1との間における生理学的つながりを、レボキセチン（ノルアドレナリン再取り込み阻害剤（NRI））が急性または長期のどちらかで注射されたマウスの前頭前皮質（PFC）におけるmiR-19a/bのレベルを評価することによって研究した（図12A~図12D）。図12A~図12Dに示されるように、miR-19a/bレベルがレボキセチンの急性投与の後ではダウンレギュレーションされ（図12、図12B）、レボキセチンの長期投与の後ではアップレギュレーションされた（図12C、図12D）。

#### 【0425】

次に、miR-19のレベルを、miR-19aおよびbのレベルを、社会的敗北プロトコルに供されたマウスのPFCおよび扁桃体において測定することによってストレス後に評価した（図13A~図13D）。図13A~図13Dに示されるように、miR-19aおよびbのレベルが慢性的ストレスの後ではPFCおよび扁桃体の両方において増大した。これらの結果は、中枢ストレス応答の調節におけるmiR-19の関与を例示している。

#### 【0426】

実施例3B

miRNA-19およびカナビノイド受容体1（CB1）

材料および実験手順

動物および収容

実施例 3 A ( 上記 ) において記載される通り。

【 0 4 2 7 】

成体脳における m i R N A - 1 9 b 操作のためのレンチウイルスの作製

実施例 3 A ( 上記 ) において記載される通り。

【 0 4 2 8 】

結果

C B 1 は、脳における最も豊富に発現される G P C R の 1 つであり、皮質、扁桃核、海馬、脳幹神経節および小脳において特に多い ( 図 1 5 A ~ 図 1 5 B ) [ H e r k e n h a m M . 他、The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience ( 1 9 9 1 ) 1 1 : 5 6 3 ~ 5 8 3 ; M a c k i e , K . , H a n d b o o k o f e x p e r i m e n t a l p h a r m a c o l o g y ( 2 0 0 5 ) 2 9 9 ~ 3 2 5 ] 。 C B 1 受容体が、神経伝達を調整するために C B 1 受容体がうまく配置される軸索および軸索終末において高度に発現される。本発明者らは、C B 1 が、m i R N A - 1 9 との適合性を有する 2 つのシード部位を含有することを見出した。

10

【 0 4 2 9 】

ルシフェラーゼアッセイを、m i R N A - 1 9 と C B 1 - 3 ' U T R との間における相互作用の性質を明らかにするために使用した。m i R N A - 1 9 b を C B 1 の 3 ' U T R と一緒に H T 2 2 細胞において過剰発現させたとき、ルシフェラーゼレベルが、同じ 3 ' U T R により過剰発現される G F P と比較したときには著しく低くなった ( 5 0 % ) ( 図 1 4 ) 。このことは、C B 1 レベルの調節における m i R - 1 9 についての可能な役割を裏付けている。さらなる変異実験が、( A d r b 1 について上記で記載されるような ) 観測された調節に対する予測された m i R - 1 9 シード配列の役割を確認するために行われる。

20

【 0 4 3 0 】

興味深いことに、以前の研究は、嫌悪記憶の固定が、扁桃核の基底外側核 ( B L A ) における、グルココルチコイド、ノルアドレナリン作動性およびカンナビノイドシグナル伝達の間におけるクロストークによって促進されることが説得力をもって明らかにされている [ R o o z e n d a a l , B . 他、Neurobiology of learning and memory ( 2 0 0 6 ) 8 6 : 2 4 9 ~ 2 5 5 ] 。 H i l l および M c E w e n によって提案されるモデル [ H i l l M . N . および M c E w e n B . S . , P r o c o f t h e N a t A c a d o f S c i o f t h e U S A ( 2 0 0 9 ) 1 0 6 : 4 5 7 9 ~ 4 5 8 0 ] は、記憶固定のための B L A における可能な作用機構を示す ( 図 1 6 ) 。

30

【 0 4 3 1 】

今回の結果において示されるように、M i R N A - 1 9 は A d r b 1 および C B 1 の両方をインビトロで調節するようである。例えば、A d r b 1 および C B 1 のレベルが変化させられるかもしれない B L A に特異的に送達されるレンチウイルスを使用する m i R - 1 9 の過剰発現およびノックダウンが、学習パラダイムおよび記憶パラダイム ( 例えば、ストレスに満ちた攻撃にさらされることを伴う、または伴わない恐怖条件づけなど ) におけるマウスの成績を調べる試験と同様に行われる。

40

【 0 4 3 2 】

実施例 3 C

慢性的ストレスに供されたマウスにおける示差的に発現される m i R N A の同定

材料および実験手順

A g o 2 タンパク質の免疫沈殿

同じ群 ( 「感受性あり」、 「立ち直りが速い」 または対照 ) の一部である 3 匹の動物から得られた 3 個の扁桃核のプールを、R N a s e 阻害剤、プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害が補充された N P 4 0 緩衝液において均質化した。試料を、4 で 2 時間、絶えず攪拌しながら維持した。その後、試料を、1 2 0 0 0 r p m で 2 0 分間、微量遠

50

心分離器において4 で遠心分離し、上清を、氷上に保たれた新しいチューブに入れ、ペレットを捨てた。磁気プロテインGビーズ (Dyna beads、Invitrogen) を、室温で10分間、回転とともに Ago2 モノクローナル抗体 (WAKO) とインキュベーションした。数回の洗浄の後、試料を Ago2 被覆のプロテインGビーズに加え、攪拌下、4 で一晩インキュベーションした。翌日、ビーズを PBS により3回洗浄した。RNA 精製のために、ビーズを RLT 緩衝液において均質化した (RNeasy キット、miRNA 補助プロトコル)。ウエスタンブロット分析のために、ビーズを、タンパク質をビーズから遊離させるために試料緩衝液において煮沸した。

#### 【0433】

RNA 精製およびマイクロアレイ

10

Ago2 免疫沈殿試料からの RNA を、Qiagen の補助プロトコル 1 : miRNA 含有総 RNA の調製に従って、RNeasy プラスキット (Qiagen) を使用して単離した。すべての他の目的のための RNA を、miRNeasy ミニキット (Qiagen) を製造者の推奨法に従って使用して、凍結された脳打ち抜き物から単離し、RNA の完全性を、Agilent 2100 バイオアナライザーを使用して評価した。Ago2 免疫沈殿の後の、ストレス負荷マウスの組織に由来する RNA を、Affymetrix miRNA 2.0 アレイ (濃縮 RNA プロトコル) および Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST アレイでさらに分析した。

#### 【0434】

結果

20

慢性的ストレスパラダイムに供されたマウスの扁桃体から単離される示差的に発現される miRNA、および/または、「立ち直りが速い」もしくは「感受性あり」の行動表現型に伴う示差的に発現される miRNA を同定し、かつ、研究するために、社会的敗北プロトコルを使用した (方法の節を参照)。

#### 【0435】

社会的敗北パラダイムの後での miRNA とそれらの標的遺伝子の 3' UTR との間における真の結びつきを確認するために、Ago2 複合体の免疫沈殿 (IP) を行い、共沈殿した miRNA および mRNA の集団を分析した。成熟型 miRNA が形成されたとき、成熟型 miRNA が RISC 複合体に取り込まれた。RISC 複合体に存在する間は、Ago2 は、特定の miRNA とその標的 mRNA の 3' UTR との間での相互作用を容易にする [Meister G. 他、Molecular cell (2004) 15 : 185 ~ 197] (図 17A)。

30

#### 【0436】

Ago2 複合体が実際に、その結合した RNA と一緒に沈殿され得ることを確認するために、IP を、実験未使用マウスの扁桃体に対して行った。IP を、モノクローナル Ago2 抗体と反応させられるプロテインG磁気ビーズを使用して行った。図 17B に示されるように、特異的な Ago2 バンドが、NIH 3T3 細胞の抽出物 (図 17B、レーン 1)、または、扁桃体組織の抽出物 (図 17B、レーン 2) から沈殿した。

#### 【0437】

IP の特異性を明らかにするために、全脳試料を 2 つに分け、1 つを抗 Ago2 により沈殿させ、他方を対照の IgG 1 非特異的抗体により沈殿させた。特異的な Ago2 バンドが Ago2 沈殿物にのみ存在した (図 17B、レーン 3、4)。

40

#### 【0438】

したがって、Ago2 複合体を沈殿させ、沈殿物における miRNA 集団ならびに mRNA 集団を分析することによって、所与の miRNA とその標的となった mRNA の 3' UTR との間における正しい結びつきを特定の脳領域において発見するためのより大きな機会があった。

#### 【0439】

社会的敗北パラダイムに供されたマウスの扁桃体からの Ago2 会合 RNA の単離

次に、Ago2 の IP 実験の具体的な結果に基づいて、同じ戦略を、社会的敗北プロト

50

コルに供されたマウスの脳での *miRNA* およびそれらの標的 *mRNA* における潜在的な違いを明らかにするために実行した。

【0440】

10 日間の社会的敗北パラダイムの後、マウスを、対照、「感受性あり」および「立ち直りが速い」の3つの群に分類した。マウスを、このマウスが社会的敗北パラダイムの期間中に攻撃を受けた同じ系統に由来する新しいマウスと遭遇したときに社会的回避を示したときには「感受性あり」として特徴づけた。マウスを、このマウスが新しい攻撃的マウスを避けず、そのマウスと触れ合うならば、「立ち直りが速い」として特徴づけた。社会的敗北に供されたマウスの大部分が典型的には、社会的回避を示し、したがって、「感受性あり」として類別されることになる。実験におけるマウスのおよそ10%~20%のみが、「立ち直りが速い」と予想される。下記に示されるのは、行われた社会的回避試験の一例である。

10

【0441】

図18Aにおいて明らかにされるように、マウスを、慣らすために3分間、特別な迷路に単独で置いた。カメラが、迷路全体にわたるマウスの動きを感知した。図18Cにおいて、同じマウスが、仕切り板の向こう側に置かれた新たなICRマウスにさらされた。カメラは、マウスを、新たなマウスの場所から遠位側の活動領域の最も遠い隅に感知した。この応答は社会的回避と見なされ、したがって、このマウスは「感受性あり」として類別された。対照的に、図18Bおよび図18Dにおいて、マウスは社会的回避を示さず、したがって、「立ち直りが速い」として類別された。

20

【0442】

40匹のマウスが社会的敗北パラダイムを受け、40匹のマウスが対照としての役割を果たした。社会的回避試験のあと、9匹の「立ち直りが速い」マウス、9匹の「感受性あり」マウスおよび12匹の対照マウスを脳の顕微解剖のために選択した。脳の試料を、体幹の血液と一緒に、扁桃体、BNST、PFC、背側縫線核および海馬から、社会的回避試験の8日後に集めた。

【0443】

3匹の異なるマウスから得られる3つの扁桃体打ち抜き物のプールを一緒にし、抗Ag2との免疫沈殿を行った。IP後、RNAを沈殿物から抽出した。3つの扁桃体をそれぞれの群から取り出した後、「立ち直りが速い」マウスからの3つのRNA試料、「感受性あり」マウスからの3つのRNA試料、および、対照マウスからの4つのRNA試料、すなわち、合計で10個のRNA試料が存在した。それぞれの試料をマウスSTマイクロアレイで、同様にまた、*miRNA* アレイで調べた(ともにAffymetrix)。対照群に対する2つの群のそれぞれ(「感受性あり」または「立ち直りが速い」)においてアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされた遺伝子および*miRNA* を調べた。ある特定の*miRNA* と標的遺伝子との間での相互作用が生じるならば、本発明者らは、それらの総レベルにおける正反対の相関を予想した。しかしながら、(抗Ag2により沈殿させられる)RISC複合体に存在する*mRNA* は、未だフラグメント化されていないので、高レベルにあることが予想された。したがって、アレイデータを検査している間、本発明者らは、対照試料に対して上昇またはダウンレギュレーションのどちらかをともに示す*miRNA* および潜在的*mRNA* 標的を調べた。これは、このことが、それらがRISC複合体において相互作用することを示すものであったからである。

30

40

【0444】

マイクロアレイ結果

表3(本明細書中下記)は、従来のフィルターを使用して分析された予備的アレイ結果を例示した。



表3A～表3B: Ago2とのIPの後における、アップレギュレーション(表3A)または  
ダウンレギュレーション(表3B)される扁桃体miRNAのリスト

アップレギュレーション	倍率変化－ 感受性あり	倍率変化－ 立ち直りが速い
mmu-miR-301a_st	1.96	2.11
mmu-miR-15a_st	1.66	1.87
mmu-miR-29a_st	1.42	1.82
mmu-miR-19b_st	1.97	2.34
mmu-miR-146b_st	1.55	1.94
mmu-miR-181d_st	1.54	1.64
mmu-miR-146a_st	1.41	1.60
mmu-miR-27b_st	1.45	1.91
mmu-miR-20a_st	1.57	1.52
mmu-miR-30a_st	1.34	1.65
mmu-miR-100_st	1.41	1.55
mmu-miR-153_st	1.44	1.92
mmu-miR-194_st	1.57	1.78
mmu-miR-30c_st	1.40	1.66
mmu-miR-23a_st	1.51	1.70
mmu-miR-106a_st	1.62	1.61
mmu-miR-30b_st	1.43	1.70
mmu-miR-195_st	1.59	1.98
mmu-miR-30e_st	1.36	1.56
mmu-miR-126-3p_st	1.58	1.76
mmu-let-7i_st	1.49	1.57
mmu-miR-434-5p_st	1.30	1.55
mmu-miR-376b_st	1.64	1.99
mmu-miR-495_st	1.45	1.82
mmu-miR-369-5p_st	1.60	1.77
mmu-miR-421_st	1.71	1.53
mmu-miR-543_st	1.52	1.69
mmu-miR-410_st	1.44	1.76
mmu-miR-34b-5p_st	2.18	1.53

(表3A)

10

20

30

40

ダウンレギュレーション	倍率変化－ 感受性あり	倍率変化－ 立ち直りが速い
mmu-miR-210_st	-1.59	-2.13
mmu-miR-298_st	-1.75	-2.08
mmu-miR-423-5p_st	-1.68	-1.94
mmu-miR-346_st	-1.74	-1.96
mmu-miR-139-3p_st	-1.71	-2.13
mmu-miR-320_st	-1.74	-2.03
mmu-miR-485_st	-1.53	-1.88
mmu-miR-491_st	-1.53	-2.01
mmu-miR-31_st	-1.30	-1.53
mmu-miR-92b_st	-1.20	-1.53
mmu-miR-93_st	-1.36	-1.50
mmu-miR-125a-3p_st	-1.32	-1.55
mmu-miR-134_st	-1.47	-1.63
mmu-miR-323-5p_st	-1.43	-1.76
mmu-miR-345-5p_st	-1.30	-1.62
mmu-miR-341_st	-1.36	-1.89
mmu-miR-370_st	-1.33	-2.04
mmu-miR-433_st	-1.49	-1.75
mmu-miR-455_st	-1.40	-1.61

(表3B)

\* 表3A～表3Bの両方について、データは、対照と比較して、「感受性あり」マウスまたは「立ち直りが速い」マウスについての倍率変化として示した。太字での数字は有意な変化である。

【 0 4 4 5 】

いくつかのmiRNA（これらは、「感受性あり」群および「立ち直りが速い」群のマウスにおいて著しくアップレギュレーションされているものである）が選択され、ヒートマップで例示されている（図19A～図19B参照）。

【 0 4 4 6 】

遺伝子発現アレイ（mRNA）

10

20

30

表4: Ago2とのIPの後における、アップレギュレーションされる扁桃体mRNA  
のリスト

アップレギュ レーション	倍率変化－ 感受性あり	倍率変化－ 立ち直りが速い
Tnrc18	1.36	1.23
Ifi30	1.34	1.21
Adamts9	1.79	1.52
Fkbp5	1.35	1.26
Adhl	1.42	1.05
Pxdn	1.32	1.19
Impdh2	1.41	1.02
Pdzd2	1.31	1.31
Csmc3	1.33	1.44
Usf1	1.33	1.20
A2m	1.71	1.09
Ccnd3	1.34	1.10
Rrh	1.33	1.02
Wfikkn2	1.40	1.07
Fras1	1.48	1.34
Notch2	1.50	1.22
Fam38a	1.33	1.18
Hist1h3f	1.31	1.19
Fam167a	1.31	1.05
Calml4	1.68	1.11
Tspan4	1.30	1.21
Dnahc6	1.38	1.07
Jag2	1.31	1.19
Shank2	1.60	1.42
Dock6	1.33	1.10
Mamdc2	1.30	1.20
Sgms2	1.39	1.13
Iqub	1.51	1.11
Ubxn11	1.36	1.06
Wfdc2	1.53	1.11
Spef2	1.33	1.16
Fggy	1.31	1.14
Pcolce2	1.37	1.16
Thbs1	1.32	1.13
Dnahc7b	1.40	1.13
Nt5dc2	1.41	1.12
Slc4a2	1.34	1.07

10

20

30

40

Adamts17	1.40	1.35
Plscr2	1.34	1.21
Clic6	1.43	1.13
St6galnac2	1.38	1.08
Amigo2	1.33	1.06
Trio	1.33	1.15
Lamb1-1	1.35	1.20
Sema3b	1.40	1.01
Fap	1.39	1.10
Frem1	1.51	1.20
Pon1	1.34	1.03
Plin4	1.43	1.24
Stcap1	1.36	1.10
Rdh5	1.52	1.13
Cldn2	1.56	1.11
Frrs1	1.37	1.10
Spef2	1.36	1.07
Slco1a5	1.31	1.13
Ltc4s	1.35	1.17
Mfsd7c	1.37	1.14
Acss3	1.32	1.16
Hif3a	1.36	1.17
Serpinb8	1.40	1.18
Pcolce	1.36	1.16
Dnmt3a	1.20	1.19
GILZ (Tsc22d3)	1.19	1.15
Sdk2	1.29	1.36
Prg4	1.16	1.72
Fbn1	1.24	1.10
Slitrk6	1.11	1.28
Plxna1	1.30	1.16
Plxnb2	1.25	1.10
Sema4b	1.29	1.14

10

20

30

40

(表4、続き)

\* データは、対照と比較して、「感受性あり」マウスまたは「立ち直りが速い」マウスについての倍率変化として示される。太字での数字は有意な変化である。

表5: Ago2とのIPの後における、ダウンレギュレーションされる扁桃体 mRNA のリスト

ダウンレギュレーション	倍率変化— 感受性あり	倍率変化— 立ち直りが速い
Cyp2d10	-1.22	-1.34
Lonrf1	-1.32	-1.31
Btnl5	-1.64	-1.54
B2m	-1.33	-1.20
Tekt5	-1.36	-1.10
Prp2	-1.51	-1.02
Krtap5-1	-1.34	-1.10
Krtap5-4	-1.33	-1.10
Klhl38	-1.38	-1.07
Th	-1.42	-1.03
Pcsk9	-1.33	-1.20
Dnahc3	-1.39	-1.22
Sgpp2	-1.37	-1.03
Opalin	-1.49	-1.28

#### 【 0 4 4 7 】

脳におけるいくつかの潜在的 m i R N A およびそれらの推定標的が分析される。

#### 【 0 4 4 8 】

##### 実施例 4 A

ストレス応答の調節因子としての m i R - 1 5 a および m i R - 1 5 b

材料および実験手順

総 R N A 抽出

扁桃体組織を急性ストレス手順の 9 0 分後に解剖した。総 R N A を、m i R N A を保存するために m i R N e a s y キット ( Q i a g e n ) を使用して単離した。凍結された脳打ち抜き物を溶解緩衝液に移し、直ちに均質化した。ニューロン一次培養物または N 2 a 細胞培養物を氷上においてウエル内で溶解した。さらなる処理を製造者の推奨法に従って行った。R N A 抽出物を使用まで - 8 0 で貯蔵した。

#### 【 0 4 4 9 】

m i R N A アレイ

m i R N A の示差的発現を製造者の説明書に従って A g i l e n t ( A g i l e n t 、サンタクララ、カリフォルニア、米国) または A f f y m e t r i x ( A f f y m e t r i x 、サンタクララ、カリフォルニア、米国) の m i R N A マイクロアレイによってアッセイした。m i R N A の示差的発現を、A g i l e n t アレイを使用して評価するために、1 試料あたり 1 0 0 n g の総 R N A ( 3 つの対照試料および 2 つの急性ストレス試料) をそれぞれ、製造者の説明書に従って標識し、ハイブリダイゼーションさせた。アレイを、A g i l e n t マイクロアレイスキャナーを使用して走査した。データを、A g i l e n t F e a t u r e E x t r a c t i o n ソフトウェア v 9 を使用して抽出し、P a r t e k (登録商標) G e n o m i c s S u i t e ( P a r t e k I n c . 、セントルイス、ミズーリ、米国) を使用して分析した。GeneView . t x t ファイルからのデータを対数変換および分位正規化に供した。m i R N A の示差的発現を、A f f y m e t r i x アレイを使用して評価するために、1 試料あたり 1 μ g の総 R N A ( 2 つの対

10

20

30

40

50

照試料および2つの急性ストレス試料)をそれぞれ、製造者の説明書に従って標識し、ハイブリダイゼーションさせた。アレイを、Affymetrixマイクロアレイスキャナーを使用して走査した。データを、Affymetrixスキャナーソフトウェアを使用して抽出し、Affymetrix miRNAQC toolソフトウェアのデフォルトパラメータを使用して正規化した(バックグラウンド調節、分位正規化、対数変換および閾値決定)。4つのファイルからの正規化データを、Partek Genomicsソフトウェアにインポートした。これらのマイクロアレイのいずれにも提示されない遺伝子は除いた。miRNA分布における違いのために、(それぞれのアレイについて約1の標準誤差に対応する)異なる対数比カットオフをそれぞれのアレイについて選定した: Agilentについては0.2、Affymetrixについては0.4。対数比がカットオフよりも大きいmiRNAをアレイ間で比較した。共通するmiRNAを記録する。

10

#### 【0450】

Psichек 2ルシフェラーゼ発現プラスミドへの3'UTRのクローン化  
CRFR1の3'UTR配列をマウスのゲノムDNAからPCR増幅した。3'UTRのPCRフラグメントを製造者の指針に従ってpGEM-Teasyベクター(Promega)に連結し、さらに、Psichек 2レポータープラスミド(Promega)におけるルシフェラーゼの3'末端での単一NotI部位にサブクローン化した。クローン化配向を診断的切断および配列決定によって確認した。

#### 【0451】

トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ  
HEK293T細胞を70%~85%の密集度まで48ウェル形式でポリ-L-リシン上で成長させ、下記のプラスミドとともにポリエチレンジオキサンを使用してトランスフェクションした:Psichек 2-3'UTRプラスミド、pEGFPプラスミドでのpre-mmu-miR-15過剰発現またはpEGFPプラスミド単独(clone vector)。トランスフェクションの24時間後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼレポーター活性を以前の記載のようにアッセイした[Chen A.他、Mol Endocrinol(2005)19:441~58]。ウミシイタケルシフェラーゼの値を、(同じベクターから転写されるが、試験されている3'UTRによって影響されない)対照のホタルルシフェラーゼのレベルに対して正規化し、1条件あたり6回のウェル反復にわたって平均化した。

20

30

#### 【0452】

##### 結果

miR-15aおよびmiR-15bが、急性拘束ストレス後90分でアップレギュレーションされるように出現した(図7A~図7B)。miR-15aおよびmiR-15bの両方がCRFR1-3'UTRを標的とすることが生物情報学的に予測された(図7C)。HEK293T細胞におけるmiR-15bのインビトロ過剰発現は、CRFR1-3'UTRによって制御されるルシフェラーゼ発現のレベルを著しく低下させた(図7D)。

#### 【0453】

##### 実施例4B

##### FKBP5に対するmiR15の影響

##### 材料および実験手順

実施例4A(本明細書中上記)において例示される通り。

40

#### 【0454】

##### 結果

アレイの結果に基づいて、miR-15aおよびFK506結合タンパク質5(これはまたFKBP5として知られている)はともに、対照群と比較して、「感受性あり」マウスおよび「立ち直りが速い」マウスにおいてアップレギュレーションされた(図20A~図20B)。このことは、慢性的ストレスの結果としてのRISC複合体におけるそれらのアップレギュレーションを示唆している。

50

## 【0455】

遺伝子研究では、外傷後ストレス障害、うつ病および不安におけるFKBP5についてのある一定の役割が確認されている。例えば、FKBP5における一ヌクレオチド多型(SNP)が、成人の外傷後ストレス障害(PTSD)の重篤度を予測させる小児期の外傷と相互作用することが見出されている[Binder, E. B. 他、Nature genetics (2004) 36: 1319~1325]。これらの知見により、小児として虐待される、これらのSNPを有する個体は、成人としてPTSDに対する感受性がより大きいことが示唆される。FKBP5はまた、現在PTSDを患っている個体ではそれほど発現されないことが見出されている[Yehuda, R. 他、Biological psychiatry (2009) 66: 708~711]。FKBP5遺伝子は、多数のポリアデニル化部位を有することが見出されており、また、うつ病性障害のより大きい割合と統計学的に関連する[Binder 他、上掲]。

10

## 【0456】

FKBP5の3'UTRのさらなる分析により、FKBP5の3'UTRが、miR-15に対する1つの保存されたシード一致部を有することが明らかにされた(図20C)。

## 【0457】

実際、miR-15aがFKBP5のmRNAを調節するならば、miR-15aおよびFKBP5の両方が、(マイクロアレイの結果(図20B)によって示されるように)Agonist沈殿物においてアップレギュレーションされるであろうが、扁桃体試料におけるFKBP5のmRNAまたはタンパク質のどちらかの全体的レベルが低下するであろうことが予想された。

20

## 【0458】

miR-15aとFKBP5との間での相互作用が扁桃体において生じているかどうかを調べるために、「感受性あり」マウスおよび対照マウスの扁桃体から得られる総RNA試料に対するリアルタイムPCR分析を行った。図21A~図21Bに示されるように、miR-15aのレベルが、感受性ありのマウスから採取された総RNA抽出物において増大し、これに対して、FKBP5のレベルが低下した。これらの結果は、miR-15aが慢性的ストレス条件の後の扁桃体においてFKBP5のレベルを抑制することを示していた。

30

## 【0459】

FKBP5の無傷型および変異型の3'UTR形態をルシフェラーゼアッセイ分析のためにクローン化することが、miR-15aとFKBP5との間における直接的な相互作用がインビトロで生じるかどうかを見出すために行われる。

## 【0460】

FKBP5に加えて、miR-15は、Stx1a(シンタキシン1a)、Sgk1(血清/グルココルチコイド調節キナーゼ)およびAdrb2を含めて、ストレス応答に関連する数多くの遺伝子を潜在的に調節することができる(図22)。

## 【0461】

## 実施例4C

miR-181はグルタミン酸受容体を調節する

## 材料および実験手順

Psich2ルシフェラーゼ発現プラスミドへの3'UTRのクローン化

Grm1、Grik3、Grm5、Grik2およびGrm7の3'UTR配列をマウスのゲノムDNAからPCR増幅した。3'UTRのPCRフラグメントを製造者の指針に従ってpGEM-Teasyベクター(Promega)またはpJET1.2ベクター(Fermentas)のどちらかに連結し、さらに、Psich2レポータープラスミド(Promega)におけるルシフェラーゼの3'末端での単一NotIまたはXhoI部位にサブクローン化した。クローン化配向を診断的切断および配列決定によって確認した。

40

50

## 【 0 4 6 2 】

## 長期社会的敗北

マウスを、以前に記載されたような社会的敗北プロトコルに供した [ K r i s h n a n V . 他、C e l l ( 2 0 0 7 ) 1 3 1 : 3 9 1 ~ 4 0 4 ]。簡単に記載すると、マウスを攻撃的 I C R マウスのホームケージに入れ、ホームケージにおいてマウスは 5 分間にわたって物理的に触れ合った。この期間中に、I C R マウスは侵入者マウスを攻撃し、侵入者は従属的態度を示した。その後、穴の開いた透明なプレキシガラス仕切り板を動物の間に置き、マウスを、感覚的接触を許すために 2 4 時間にわたって同じケージに留めた。その後、この手順を、その後の 1 0 日のそれぞれについて、見慣れない I C R マウスを用いて繰り返した。

10

## 【 0 4 6 3 】

## 結果

m i R - 1 8 1 d のレベルが、慢性的ストレスに苦しむマウスにおいて著しく増大した ( 図 2 3 )。m i R - 1 8 1 と潜在的な m R N A 標的との間における相互作用を見出そうとする試みにおいて、本発明者らは、m i R - 1 8 1 が多くの型のグルタミン酸受容体を潜在的に調節し得ることを発見した。一般に、グルタミン酸受容体は下記の 2 つのグループに分けることができる：イオンチャネル型グルタミン酸受容体 ( i G l u R )、これは、グルタミン酸がこの受容体が結合するときに活性化するイオンチャネル細孔を形成する；および、代謝型グルタミン酸受容体 ( m G l u R )、これは、G タンパク質を伴うシグナル伝達カスケードを介して原形質膜上のイオンチャネルを間接的に活性化する。

20

## 【 0 4 6 4 】

多くの特異的サブタイプのグルタミン酸受容体のなかで、グルタミン酸よりも選択的に受容体に結合する化学物質によって一次サブタイプを示すことが慣例的である。だが、様々なサブタイプが特定され、化学的親和性が測定されるので、本研究は進行中である。いくつかの化合物がグルタミン酸受容体の研究では常用されており、受容体サブタイプと会合される：

表6: サブグループに分類されるグルタミン酸受容体

名称	タイプ
NMDA 受容体	イオンチャネル型
カイニン酸受容体	
AMPA 受容体	
mGluR	代謝型

30

## 【 0 4 6 5 】

図 2 4 および図 2 5 に例示されるように、m i R - 1 8 1 の保存されている予測された標的のすべてのなかで、6 つのグルタミン酸受容体 ( G r m 1、G r i k 3、G r m 5、G r i a 2、G r i k 2 および G r m 7 ) が存在する。

40

## 【 0 4 6 6 】

m i R - 1 8 1 a が海馬ニューロンにおける G r i a 2 の表面発現を制御することが以前に示されている [ S a b a . R . 他、M o l e c u l a r a n d C e l l u l a r B i o l o g y ( 2 0 1 2 ) 3 2 ( 3 ) : 6 1 9 ~ 3 2 ]。ルシフェラーゼアッセイが、m i R N A - m R N A 相互作用を確認するために実施中である。さらに、条件的な m i R - 1 8 1 K O マウス系統が特定の c r e 系統と交雑され、それにより、特定の脳核における m i R - 1 8 1 の欠失を得ている。

## 【 0 4 6 7 】

## 実施例 5 A

m i R - 1 8 2 a は、正常なニューロン活性の微調整因子であり、また、精神病理学的

50



行動の微調整因子である

材料および実験手順

P s i c h e c k 2 ルシフェラーゼ発現プラスミドへの3' UTRのクローン化

H t r 1 a の3' UTR 配列をマウスのゲノムDNAからPCR増幅した。3' UTR のPCRフラグメントを製造者の指針に従ってpGEM - T e a s y ベクター ( P r o m e g a ) に連結し、さらに、P s i c h e c k 2 レポータープラスミド ( P r o m e g a ) におけるルシフェラーゼの3' 末端での単一N o t I 部位にサブクローン化した。クローン化配向を診断的切断および配列決定によって確認した。

【0468】

トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ

H E K 2 9 3 T 細胞を70%~85%の密集度まで48ウエル形式でポリ-L-リシン上で成長させ、下記のプラスミドとともにポリエチレンジオキサンを使用してトランスフェクションした：P s i c h e c k 2 - 3' UTR プラスミド、pE GFP プラスミドでのp r e - m m u - m i R - 1 8 2 過剰発現またはpE GFP プラスミド単独 ( c l o n t e c h ) 。トランスフェクションの24時間後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼレポーター活性を以前の記載のようにアッセイした [ C h e n A . 他、M o l E n d o c r i n o l ( 2 0 0 5 ) 1 9 : 4 4 1 ~ 5 8 ] 。ウミシイタケルシフェラーゼの値を、( 同じベクターから転写されるが、試験されている3' UTR によって影響されない ) 対照のホタルルシフェラーゼのレベルに対して正規化し、1条件あたり6回のウエル反復にわたって平均化した。

【0469】

長期社会的敗北

マウスを、以前に記載されたような社会的敗北プロトコルに供した [ K r i s h n a n V . 他、C e l l ( 2 0 0 7 ) 1 3 1 : 3 9 1 ~ 4 0 4 ] 。簡単に記載すると、マウスを攻撃的ICRマウスのホームケージに入れ、これらのマウスは5分間にわたって物理的に触れ合った。この期間中に、ICRマウスは侵入者マウスを攻撃し、侵入者は従属的態度を示した。その後、穴の開いた透明なプレキシガラス仕切り板を動物の間に置き、マウスを、感覚的接触を許すために24時間にわたって同じケージに留めた。その後、この手順を、その後の10日のそれぞれについて、見慣れないICRマウスを用いて繰り返した。

【0470】

縫線核の顕微解剖および血漿収集

脳試料を、脳を取り出し、アクリル脳マトリックス ( S t o e l t i n g ) に置いた後で、マウスの縫線核 ( R N ) から採取した。スライス片を、指定の解剖学的マーカーに基づいて、標準的なカミソリ刃 ( G E M ) を使用して採取した。先を鈍くした14 G 注射器を使用して、R N 領域を、マトリックスから取り出された3 mm のスライス片から抜き取った。

【0471】

マイクロRNAの精製および定量的RT - PCR 発現分析

mRNA ( ミクロRNA を含む ) を、m i R N e a s y ミニキット ( Q i a g e n ) を製造者の説明書に従って使用して、選別されたニューロン、凍結された脳打ち抜き物および血漿から単離し、m i S c r i p t 逆転写キット m i RNA を使用して処理し、cDNA を作製した。その後、cDNA 試料を、S Y B R ( 登録商標 ) G r e e n P C R キット ( Q i a g e n ) を製造者の指針に従って使用して、A B 7 5 0 0 サーマサイクラー ( A p p l i e d B i o s y s t e m s ) で分析した。それぞれの m i R のための特異的プライマーを市販のユニバーサルプライマーと一緒に使用し、一方、U 6 の s n RNA を内部対照として使用した。

【0472】

m i R 1 8 2 過剰発現ウイルスベクターのクローン化

プレ - m i R - 1 8 2 を、制限酵素の A g e I 部位を加えるプライマーとともにマウス

10

20

30

40

50

のゲノムDNAからPCRによって増幅し、その後、pGEM-T Easyベクター（Promega、マディソン、ウィスコンシン）に挿入した。pGEM-T Easyの配列決定、ならびに、Age IによるpGEM-T EasyおよびpEGFPベクター（Clontech laboratories Inc.、マウンテンビュー、カリフォルニア）の両方の消化の後、未成熟miR-182配列をpEGFPベクターに連結して、発現プラスミドpEGFP-miR-182を構築した。その後で、pEGFP-miR-182を、pCSC-E/Syn-eGFPプラスミドを同じ酵素で切断するのと並行してBamHIおよびBsrGIによって切断し、miR-182-eGFP配列をpCSC-E/Synに連結して、pCSC-eSNY-pre-miR-182-eGFPプラスミドを構築し、これを制限エンドヌクレアーゼ分析およびDNA配列決定によって確認した。

10

#### 【0473】

レンチウイルスベクターの作製

組換えレンチウイルスを、以前の記載のように[Naldini L他、Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93:11382~8]、HEK293T細胞における一過性トランスフェクションによって作製した。簡単に記載すると、感染性レンチウイルスをトランスフェクション後48時間および72時間で集め、0.45 μm細孔の酢酸セルロースフィルターでろ過し、超遠心分離によって濃縮した。

#### 【0474】

結果

20

現在に至るまで、miR-182は、主に癌関連の研究（例えば、ヒト肺腺癌細胞、神経膠腫、乳癌、膀胱癌、メラノーマおよびDNA修復など）において報告されていた。加えて、miR-182は、発達過程（例えば、内耳および網膜の発達など）に関与すること、Tリンパ球の活性化において免疫系に関与すること、また、狼瘡疾患に関与することが見出された。神経系においては、miR-182が、感覚器官特異的なラット後根神経節において、また、概日時計調整因子として暗示され、一方で、pre-miR-182の遺伝子変化型の間における相関が大うつ病患者において見出された[Saus E他、Hum Mol Genet (2010) 19(20):4017~25]。加えて、miR-182が、立ち直りが速い行動から学習性無力行動までの雄ラットの前頭前皮質においてダウンレギュレーションされるとして他の12個のmiRの中に列挙された[Smalheiser NR他、Int J Neuropsychopharmacol、(2011) 1~11]。

30

#### 【0475】

5HT miRマイクロアレイ分析の一部として行われたHtr1a 3'UTRの生物情報学的分析では、miR-182によるこの遺伝子の起こり得る標的化が暗示された。したがって、本発明者らは、ルシフェラーゼアッセイを介したインビトロ試験を行い、これにより、miR-182によるHtr1a 3'UTRの強い抑制が明らかにされた（図8）。miR-182についての2つの保存されたシード一致配列がHtr1aのマウス3'UTRに現れた。

#### 【0476】

40

調節研究では、対照と比較して、長期社会的敗北にさらされた成体雄マウスのRNにおけるmiR-182発現レベルのダウンレギュレーションの強い傾向が示された（図9）。このことは、うつ病様行動を誘導することが知られている環境刺激因子に対する分子応答におけるmiR-182の関与を示唆している。

#### 【0477】

miR-182についての標的化予測を2つのデータベースにおいてもたらすさらなる生物情報学分析では、正常な状態および病理学的な状態の両方におけるニューロン活性に関連づけられる遺伝子を含めて、潜在的な標的の長いリストが明らかにされた（図10）。

#### 【0478】

50

miR-182を特異的なmiR標的相互作用の特定についてインビトロでさらに試験するために、また、正常な行動および病理学的な行動の調節におけるmiR-182の役割をインビボで明らかにするために、miR-182を操作するためのプラスミドおよびレンチウイルス系を開発した。ニューロン特異的過剰発現のレンチウイルスを製造し(図11A)、ニューロン細胞株N2aにおいてインビトロ試験した。これらの結果により、増大したmiR-182レベルが、対照と比較して、miR-182過剰発現レンチウイルスを感染させた細胞において明らかにされた(図11B)。miArrestと名づけられた、miR-182に特異的なノックダウンプラスミド配列(Genecopia、ロックビル、メリーランド、米国、図11C)を購入し、ウイルス構築物にサブクローン化した(図11C)。これらの系が、細胞培養において、また、成体マウス脳への部位特異的注入によって試験される。

10

#### 【0479】

miR-182についてのヌルマウスが、網膜の発達におけるmiRの役割を調査するために開発される。近年、本発明者らは、この系統のための育種用雌雄を得た。コロニーが生じると、miR-182KOおよびそれらのWT型の同腹子が行動的および生理学的に表現型分類されている。

#### 【0480】

##### 実施例5B

##### 急性ストレスによるmiR182発現レベルの調節

##### 材料および実験手順

実施例5A(本明細書中上記)において記載される通り。

20

#### 【0481】

##### 結果

miR182レベルに対する急性ストレスの影響を調べた。図26に例示されるように、急性不動ストレスは、低下したmiR182発現レベルをストレス誘導後24時間でマウスの縫線核(RN)において引き起こした( $P < 0.01$ )。miR182は、低下した発現レベルを急性ストレスの後および慢性的ストレスの後の両方で縫線核において明らかにした。このことは、miR182が、5-HTレベルをシナプスにおいて調整するその標的遺伝子Htr1aにおそらくは影響することによって、ストレスに対する分子応答の縫線核における調整においてある一定の役割を有することを示唆している。

30

#### 【0482】

##### miR182の予測された標的遺伝子についてのmiR-標的相互作用アッセイ

ルシフェラーゼアッセイを使用して、miR182の11個の予測された標的遺伝子(これらは広範囲の生物情報学の後で選定された)を調べた(図27A)。標的遺伝子の3'UTRをインビトロ試験して、miR182が、コンジュゲート化されたレポーター遺伝子ルシフェラーゼの活性によって測定されるような抑制効果を有するかを調べた。試験された11個の遺伝子のうち、3つの遺伝子、すなわち、Dscam(ダウン症候群細胞接着分子)、L1cam(細胞接着分子L1)およびTsnax(トランスリン会合タンパク質X)により、ルシフェラーゼアッセイの場合のようにmiR182による抑制効果が明らかにされた(図27A)。miR182の上記標的遺伝子の3'UTRを試験したとき、miR182についての保存されたシード一致配列が、Tsnax、L1camおよびDscamにおいて両方で認められ、このことは、このmiR-標的相互作用が機能的役割を有することを示唆した(データは示されず)。

40

#### 【0483】

次に、これら3つの遺伝子に対するmiR182の直接的な抑制効果を確認した。したがって、3'UTRを、miR182のシード一致配列を除くために変異させ、通常の3'UTRをルシフェラーゼアッセイによってインビトロで変異型3'UTRと比較した。L1camの3'UTRに対するmiR182の抑制効果が、そのシード一致配列を変異させたときにはなくなり(図27B)、また、同様に、Tsnaxに対するmiR182の影響が、変異させた3'UTRではなくなった(図27C)。このことは、miR18

50

2がこの遺伝子を直接的に標的としたことを示している。変異させた3'UTRを用いるDscamおよびHtr1aについての同様な確認が行われる。

#### 【0484】

miR182を欠いているマウスモデルが、miR182とその標的遺伝子との間での相互作用をインビボで研究するために使用される。本発明者らは、miR182KOマウスの行動表現型を、社会的行動、学習および記憶、ならびに、統合失調症様行動についての試験において試験中である。

#### 【0485】

##### 実施例6

成体マウスの血漿および脳におけるmiR135レベルの調節

10

材料および実験手順

miR135過剰発現ウイルスベクターおよびmiR135KDウイルスベクターのクローニング

miR135b KDプラスミドのpEZ X-H1-miR135KD-CMV-mCherryおよび対照のpEZ X-H1-対照KD-CMV-mCherryをGeneCopeia(米国)から購入した。H1プロモーターおよびKD配列を、隣接NheI部位を有するプライマーを使用して増幅し、pGEM-T Easyに連結した。pGEM-T Easyを配列決定し、pGEM-T Easyおよびp156-pRRL-CMV-GFPの両方をNheI部位により消化した後、H1-KD miRと、ニック導入のp156とを連結して、p156-pRRL-H1-miR135bKD-CMV-GFPおよびp156-pRRL-H1-対照KD-CMV-GFPを作製した。

20

#### 【0486】

##### 行動評価

すべての行動評価を、試験部屋に各試験の前の2時間慣らした後の暗期の期間中に行った。

#### 【0487】

##### 明暗移動試験

明暗移動試験装置および実験条件は以前に記載された通りであった。簡単に記載すると、装置は、マウスが試験開始時に入れられた暗い覆い付きチャンバーと、マウスが5分の試験の期間中に自由に移動することができる明るく照明されたチャンバーとの2つのチャンバーを含んでいた。明るい区画で過ごした時間、明所で移動した距離、明るいチャンバーを訪れるまでの待ち時間、および、明暗移動の回数を、ビデオ録画追跡システム(VideoMot2; TSE Systems、バドハンプルグ、ドイツ)を用いて定量化した。

30

#### 【0488】

##### オープンフィールド試験

オープンフィールド試験を、マウスが10分の試験のために入れられる120luxで照明された50x50x22cmの白色箱において行った。中心で過ごした時間、中心における訪問回数、中心を訪れるまでの待ち時間、後ろ足立ち回数、および、移動した総距離を、ビデオ録画追跡システム(VideoMot2; TSE Systems、バドハンプルグ、ドイツ)を使用して定量化した。

40

#### 【0489】

##### 高架式十字迷路試験

この試験装置は十字形状を有し、2つの障壁と、2つの開放されている非常に低い照明された(6lux)アームとを含んでいた。進入回数、移動した距離、および、開放アームで過ごした時間が、5分の試験の期間中、ビデオ録画追跡システム(VideoMot2; TSE Systems、バドハンプルグ、ドイツ)を使用して自動的にスコア化された。

#### 【0490】

##### 結果

miR135レベルに対する抗うつ剤投与の影響を、RNからセロトニン作動性ニュー

50

ロンによって神経支配され、かつ、気分調節に関与することが知られている脳部位、すなわち、扁桃体（AMY）および前頭前皮質（PFC）において試験した。AMYにおいて、miR135の両方の変化体が急性セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）およびノルアドレナリン再取り込み阻害剤（NRI）によってアップレギュレーションされたが、これらの薬物の長期投与による場合にはアップレギュレーションされなかった（miR135aについて、SSRIについては $P = 0.0001$ 、NRIについては $p = 0.003$ 、図28A；miR-135bについて、SSRIについては $p = 0.0001$ 、NRIについては $p = 0.003$ 、図28B）。PFCにおいて、miR135bのレベルが急性でのSSRIおよびNRIによってアップレギュレーションされ（SSRIについては $P = 0.0183$ 、NRIについては $p = 0.0013$ 、図28c）、しかし、miR135aのレベルは有意に変化しなかった（図28D）。加えて、長期SSRIはmiR135aおよびmiR135bの低下したレベルをPFCにおいて引き起こした（miR135aについては $P = 0.0241$ 、図28C；miR135bについては $P = 0.0067$ 、図28D）。

#### 【0491】

加えて、循環系におけるmiR135レベルを社会的敗北パラダイムの後で試験した。miR135aのレベル（ $P = 0.0089$ ；図29A）およびmiR135bのレベル（ $P = 0.0033$ ；図29B）が、リアルタイムPCRで測定される場合、対照マウスと比較して、長期社会的敗北にさらされたマウスの血漿において増大した。したがって、今回の結果は、血漿におけるmiR135が、うつ病様行動をマウスにおいて誘導することが知られている慢性的ストレスの後でアップレギュレーションされ、抗うつ剤の投与によって頑強に低下したことを明らかにした。これらの発見は、血漿におけるmiR135レベルをセロトニン作動性関連のうつ病状態のためのバイオマーカーとして示唆している。

#### 【0492】

##### 実施例7

miR135ノックダウン系の確立；クローン化、レンチウイルス作製、ならびに、インピトロおよびインピボでの検証

##### 材料および実験手順

##### miR135KDウイルスベクターのクローン化

miR135b KDプラスミドのpEZ X-H1-miR135KD-CMV-mCherryおよび対照のpEZ X-H1-対照KD-CMV-mCherryをGeneCopeia（米国）から購入した。H1プロモーターおよびKD配列を、隣接NheI部位を有するプライマーを使用して増幅し、pGEM-T Easyに連結した。pGEM-T Easyを配列決定し、pGEM-T Easyおよびp156-pRRL-CMV-GFPの両方をNheI部位により消化した後、H1-KD miRと、ニック導入のp156とを連結して、p156-pRRL-H1-miR135bKD-CMV-GFPおよびp156-pRRL-H1-対照KD-CMV-GFPを作製した。

#### 【0493】

##### 結果

マウスの5-HT関連行動に対するRNにおける低下したmiR135レベルの影響を評価するために、プラスミドに基づくmiR135b阻害剤を利用し、その効率をルシフェラーゼアッセイで試験した。このアッセイでは、HEK293T細胞が、miR135OEプラスミド、miR135KDプラスミドおよび3'UTRプラスミドにより共トランスフェクションされ、miR135bKDプラスミドが、Slc6a4およびHtr1aの3'UTRに対するmiR135の抑制効果を阻止し得るかが試験された。Htr1aの3'UTRのmiR135b抑制効果がmiR135KDプラスミドによって阻止された（図30A）。同様に、Slc6a4の3'UTRに対するmiR135bの影響がmiR135KDによって阻止された（図30B）。これらの結果は、miR135KDプラスミドが実際にmiR135の生物学的活性を阻止することを示している。

## 【0494】

miR135KD配列および対照配列をウイルスベクターにサブクローン化し(図30C)、異なるノックダウン(KD)配列を発現するレンチウイルスを作製した。脳組織に感染するレンチウイルスの能力を試験するために、マウスのRNにレンチウイルスのいずれか1つを感染させた。実際、感染はGFPの発現を誘発し(図30D~図30E)、これにより、miR135bKDレンチウイルスは脳組織に感染し得ることが明らかにされた。

## 【0495】

## 実施例8

成体マウスのRNにおけるmiR135ノックダウンの行動的影響

10

材料および実験手順

行動評価

マウスを、実施例6(上記)で記載されるような不安およびうつ病様行動についての試験を使用することによって行動的に特徴づけした。

## 【0496】

## 結果

miR135KDレンチウイルスのインビトロおよびインビボ検証の後で、miR135KDレンチウイルスを使用して、miR135のレベルをRNにおいて操作し、また、マウスの行動に対するそれらの影響を試験した。成体マウスに、miR135KDレンチウイルスまたはKD対照レンチウイルスのどちらかをRNに対して注入し、回復期間の後、マウスを不安およびうつ病様行動について試験した。miR135は5-HTの負の調節因子を抑制するので、本発明者らは、miR135KDがシナプスにおける5-HTレベルを低下させ、それによって、増大した不安およびうつ病様行動を引き起こすことを予想した。

20

## 【0497】

オープンフィールド試験において、差が群間に何ら認められず(図31A)、しかしながら、高架式十字迷路試験では、miR135KDマウスが、開放アームにおいて時間をあまり費やさない傾向( $P = 0.0644$ )および開放アームにおいてあまり訪問しない傾向( $P = 0.0572$ )を明らかにすることによって(図31B)、より大きい不安様行動を明らかにした。加えて、miR135KDマウスは、開放アームにおいて有意に少ない距離を歩行し( $P = 0.0433$ )、開放アームにおけるより長い訪問傾向を有した( $P = 0.0124$ )(図31B)。同様に、基礎的ストレス条件のもとで行われた明暗試験において、miR135KDマウスは、明所において時間をあまり過ごさないこと( $P = 0.0454$ 、図31C)、明るいチャンバーにおいてあまり訪問しないこと( $P = 0.0107$ 、図31D)、および、明るいチャンバーにおいてより小さい距離を歩行すること( $P = 0.0402$ s、図31E)によって、対照と比較して、著しい増大した不安様行動を明らかにした。これらの結果は、急性ストレス後40分および24時間でのmiR135レベルにおける低下を例示した(図30A~図30B)。したがって、現在の理論は、ストレスを受けたmiR135KDマウスは、急性ストレスの後で試験されたとき、不安様行動がそれらの対照と異ならないであろうということであった。これは、対照マウスはまた、ストレスに起因する低下したmiR135レベルを有するであろうからである。実際、明暗移動試験で再試験されたときの群間には、どのような差も、急性ストレス後40分または24時間で試験されたときの両方でパラメーターのいずれにおいても認められなかった(図31C~図31E)。

30

40

## 【0498】

miR135KDのうつ病様行動を、基礎的条件下および薬理学的操作後の両方で試験した。miR135のレベルは、SSRI投与後、RNにおいて増大することが示されたので(図31E)、推測は、miR135レベルの低下は、SSRIに対する低下した応答をもたらすかもしれないということであった。基礎的レベルおよびSSRI投与後の両方で行われた尾懸垂試験では、miR135bKDマウスと、対照KDマウスとの間に

50

は、不動時間において差が無く（図31F）、SSRI処置に起因する不動時間の予想された減少が観測された（ $P < 0.0008$ ）。しかしながら、強制水泳試験では、SSRI注射についての主影響に加えて（ $P < 0.0001$ ）、SSRIが注射されたmiR135KDマウスの方が、対照KDマウスと比較して、試験の最後の2分において不動であった（ $P = 0.0141$ 、5分； $P = 0.0404$ 、6分；図31G）。このことは、SSRIの抗うつ効果が、miR135のレベルをRNにおいて低下させることによって弱まることを示唆している。この結果は、miR135が、SSRIによって引き起こされる行動変化をもたらす内在的变化の一部であることを暗示している。

#### 【0499】

##### 実施例9

##### 5-HTニューロンにおけるmiR135の過剰発現

##### 材料および実験手順

miR135aを5-HTニューロンにおいて過剰発現するマウスを、miR135およびその標的遺伝子の発現レベルと行動的なものの両方で、それらの同腹子対照に対して比較した。

#### 【0500】

##### 結果

miR135のレベルを特異的にマウスのRNにおける5-HTニューロンにおいて操作することの影響を不安およびうつ病様行動について試験した。その目的のために、遺伝子系を、Cre-loxP系を使用して開発した。具体的には、5-HT特異性を、Creリコンビナーゼを5-HT RN陽性ニューロンにおいて特異的に発現するePET Creマウスを使用して得、miR135の過剰発現を、5-HT特異的Cre系統（ePET Cre）を、miR135aについての条件的過剰発現を有するトランスジェニックマウス系統と交雑することによって行った（図32）。

#### 【0501】

miR135を5-HTニューロンにおいて特異的に過剰発現するマウス（miR135OE）のRNにおけるmiR135発現レベルを、miR135についてリアルタイムPCRによって試験し、miR135の条件的過剰発現対立遺伝子について陽性であるが、ePet CREについて陰性である対照マウスと比較した。miR135OEマウスは、対照マウスと比較して、2倍近い過剰発現を明らかにした（図33A； $P < 0.05$ ）。miR135の過剰発現レベルは、SSRI投与後のマウスのRNにおいて測定されるレベルと類似していた。このことは、このマウス系統が、miR135の抗うつ特徴を研究するための良好なモデルであったことを示唆している。加えて、miR135標的遺伝子のmRNA、すなわち、Slc6a4（図33B； $P < 0.05$ ）およびHtr1a（図33C； $P < 0.1$ ）が、対照と比較して、miR135OEマウスのRNにおいてダウンレギュレーションされ、このことにより、miR135またはその標的遺伝子によるインビボ抑制が明らかにされた。

#### 【0502】

miR135の過剰発現を特異的に5-HTニューロンにおいて試験するために、miR135OEマウスおよびそれらの同腹子対照を長期社会的敗北パラダイム（うつ病および不安様行動を誘導することが知られている手順）に供し、続いて、不安およびうつ病様行動について試験した。

#### 【0503】

miR135OEマウスは、対照の同腹子と比較して、増大した不安様行動を社会的敗北の後で明らかにした。オープンフィールドでは、増大した不安についての傾向が、miR135OEマウスの、中心への時間および中心訪問回数において観測された（ $P < 0.1$ 、図34A）。一方、明暗移動試験では、miR135OEマウスはより多くの時間を明所において過ごし（ $P < 0.05$ 、図34B）、明るいチャンバーにおいてあまり時間を過ごさなかった（ $P < 0.01$ 、図34B）。類似する結果が高架式十字迷路において観測され（ $P < 0.05$ 、図34B）、一方、miR134OEマウスは、より多くの時

10

20

30

40

50

間を開放アームにおいて過ごし (  $P < 0.05$ 、図 3 4 C )、より長い距離を開放アームにおいて移動した (  $P < 0.05$ 、図 3 4 C )。

【 0 5 0 4 】

社会的敗北後の *miR1350E* マウスのうつ病様行動が、対照同腹子のうつ病様行動よりも少なかった。対照と比較して、*miR1350E* マウスの減少した不動時間への傾向が、強制水泳試験における著しく減少した不動時間 ( $P < 0.05$ 、図34E)と一緒に、尾懸垂試験において観測された ( $P < 0.1$ 、図34D)。

**【 0 5 0 5 】**

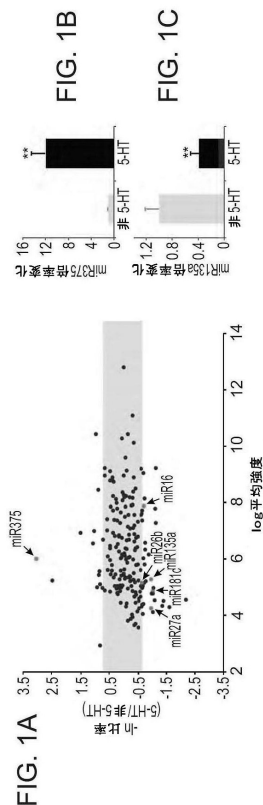
本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更および変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更および変形すべてを包含するものである。

**【 0 5 0 6 】**

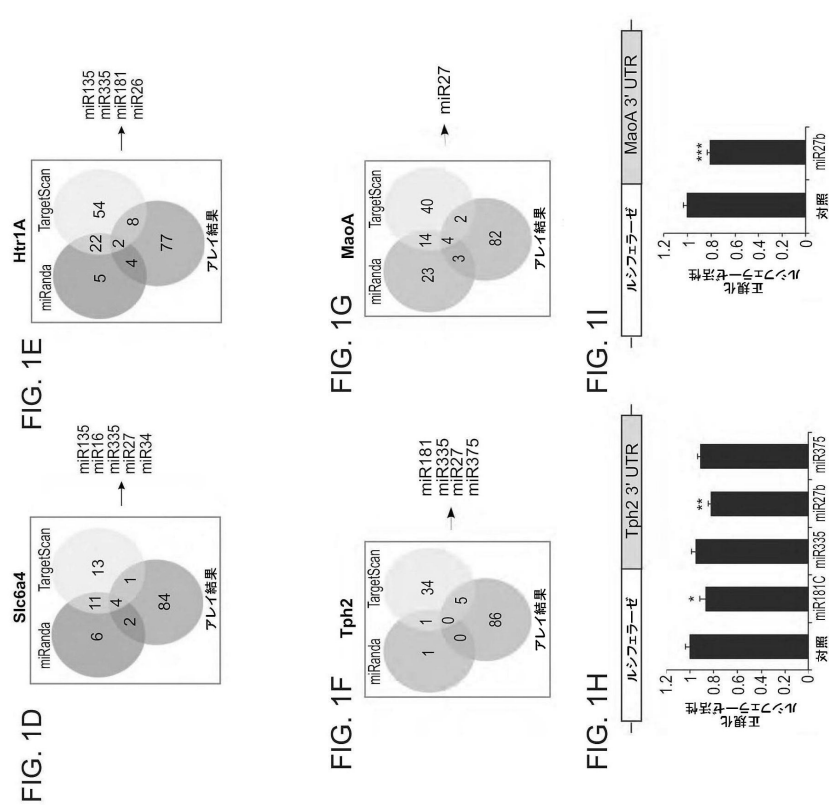
本明細書で挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、個々の刊行物、特許および特許出願が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用または確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。節の見出しが使用されている程度まで、それらは必ずしも限定であると解釈されるべきではない。

10

【 図 1 A - 1 E 】

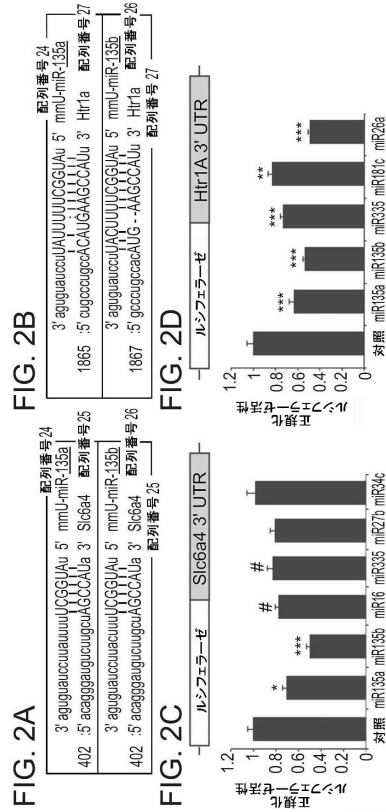


【圖 1 F - 1 I】

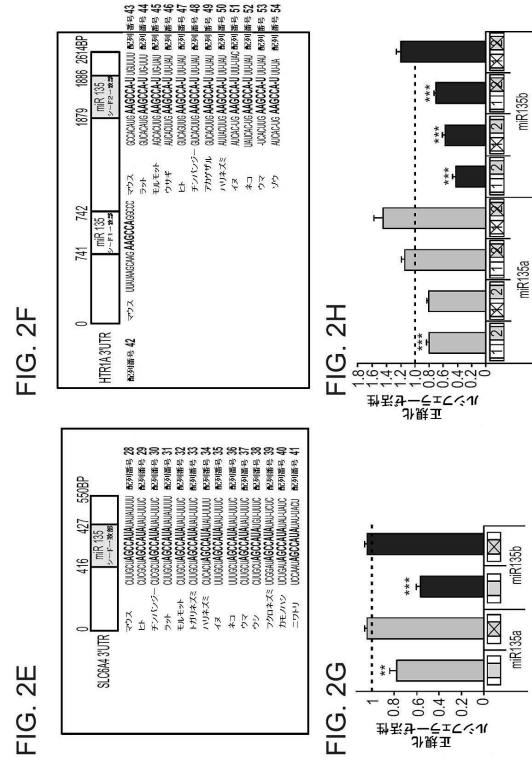




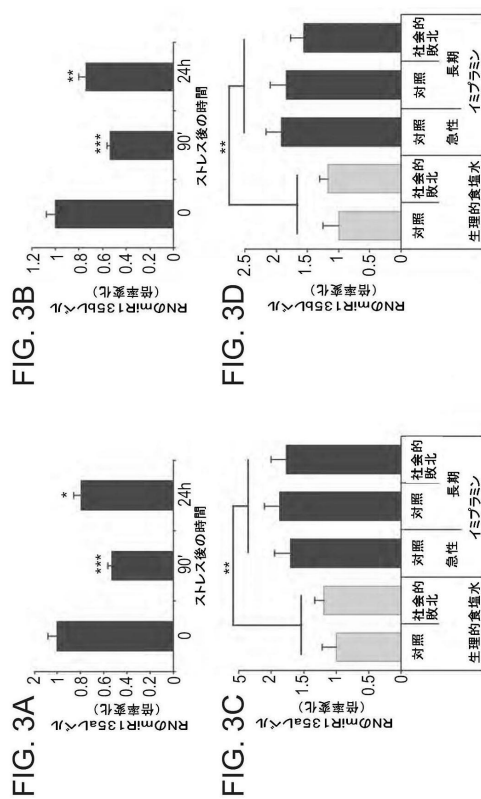
【図 2 A - 2 D】



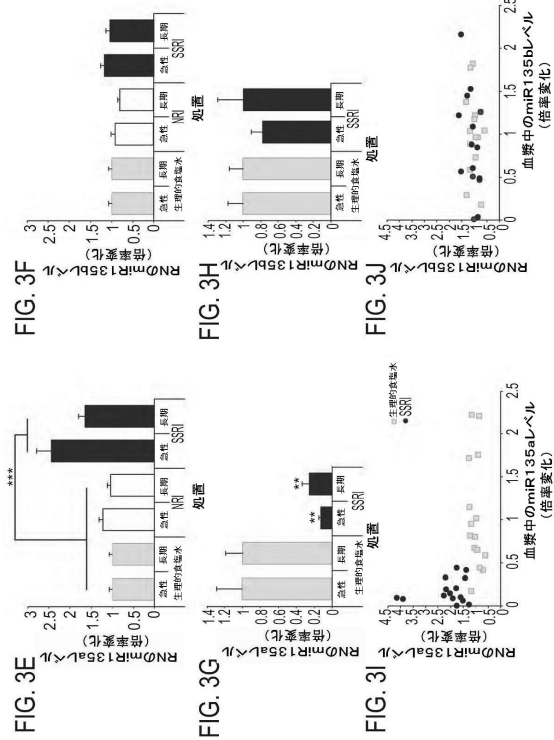
【図 2 E - 2 H】



【図 3 A - 3 D】

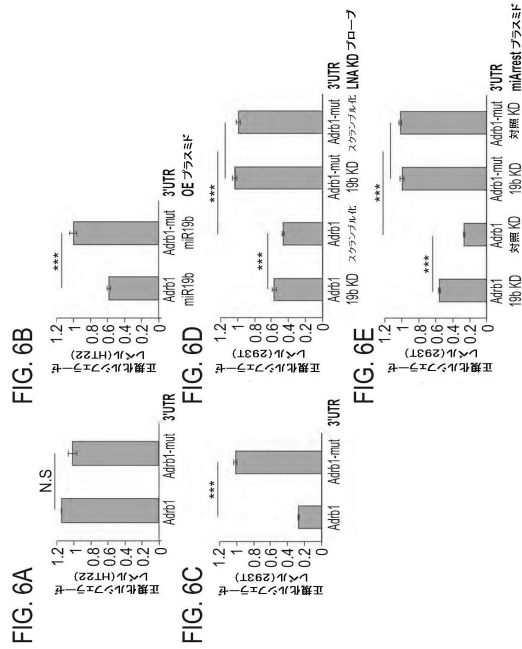


【図 3 E - 3 J】

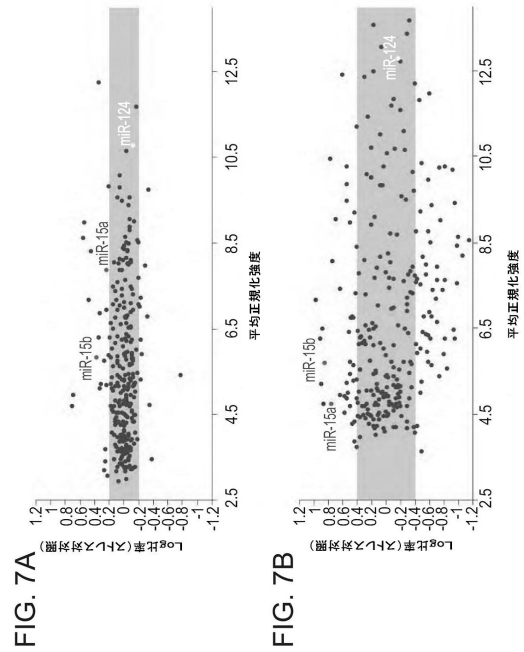




【図 6 A - 6 E】



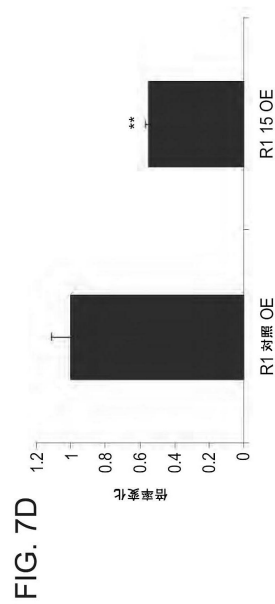
【図 7 A - 7 B】



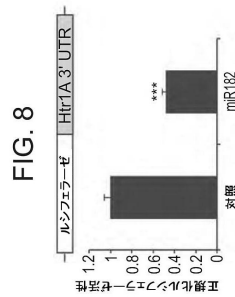
【図 7 C - 7 D】

FIG. 7C

Chr1の3' UTRの554位~560位	5' ... UGAAAGCCCGCCUUGCUGCUU ...	配列番号 55
mmu-miR-15a	3' GUGUUUGGUUACACGACG	配列番号 56
Chr1の3' UTRの554位~560位	5' ... UGAAAGCCCGCCUUGCUGCUU ...	配列番号 55
mmu-miR-15b	3' ACAUUUGGUUACACGACG	配列番号 57



【図 8】



【図 9】

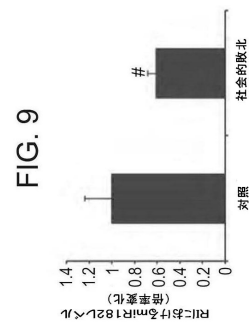


FIG. 10

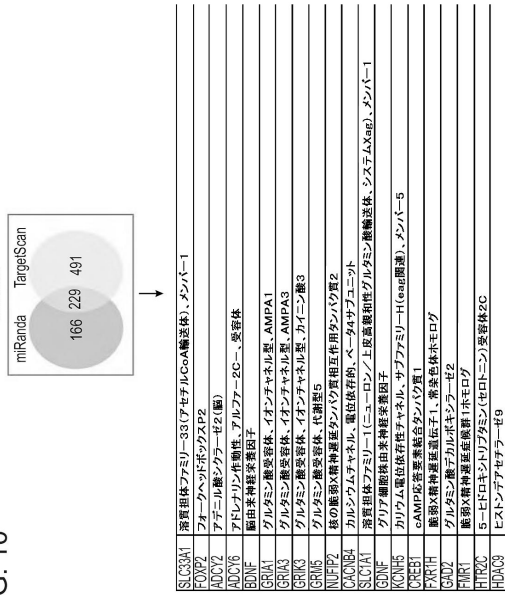


FIG. 12A

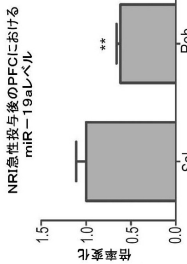


FIG. 12B

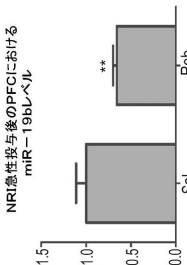


FIG. 12C

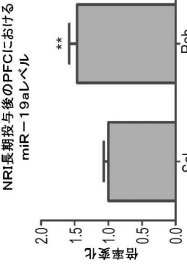


FIG. 12D

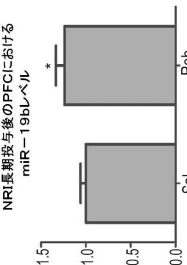


FIG. 11A



FIG. 11B

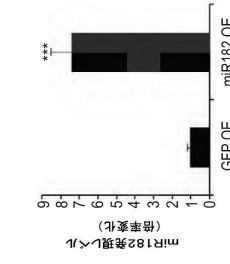


FIG. 11C



FIG. 13A

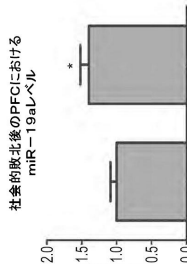


FIG. 13B

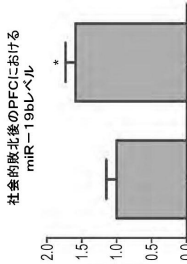


FIG. 13C

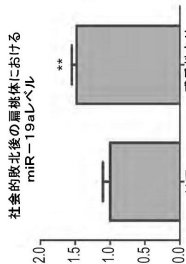
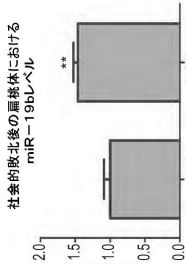
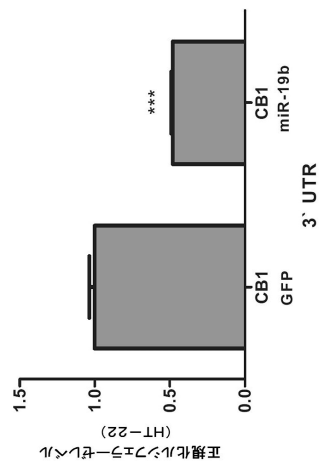


FIG. 13D



【図 14】

FIG. 14



【図 15 B】

FIG. 15B



【図 15 A】

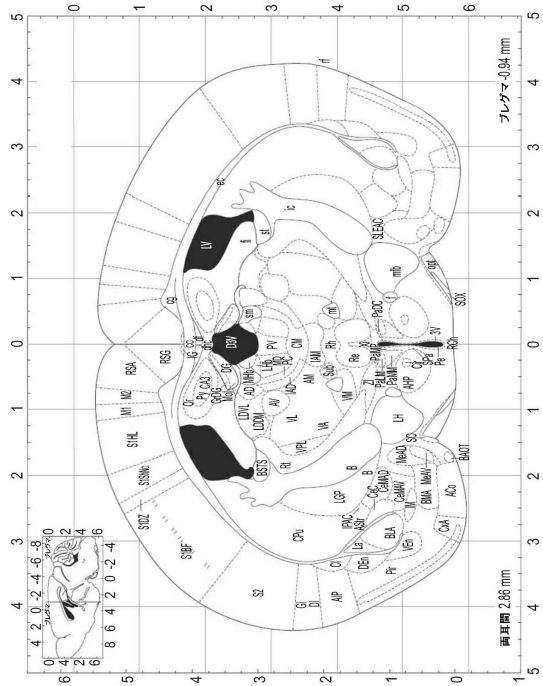
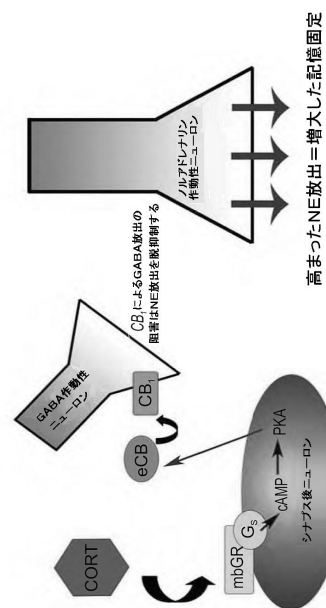


FIG. 15A

【図 16】

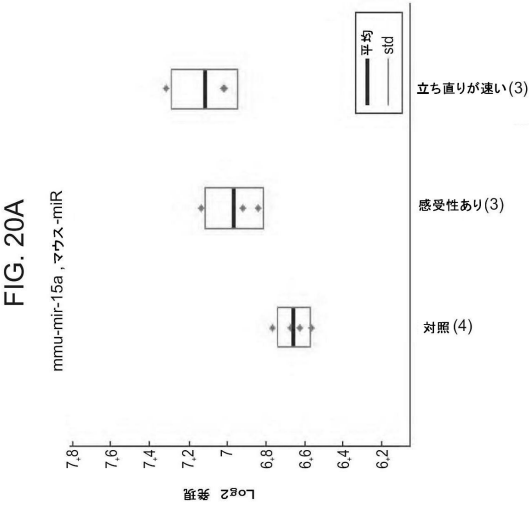
FIG. 16



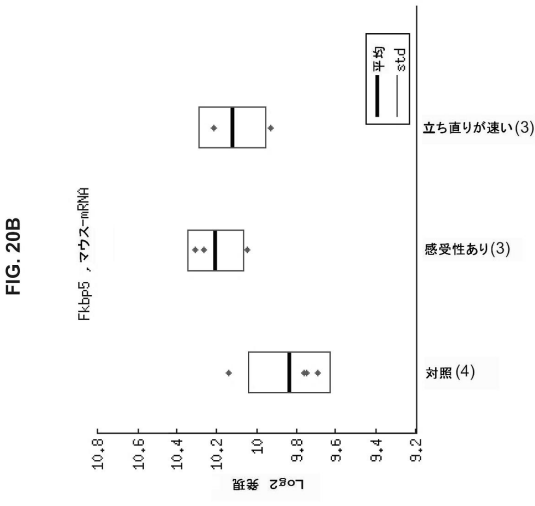
出典: Hill M.N. and McEwen B.S. Proc of the Nat Acad of Sci of the USA (2009) 106:4579-4580



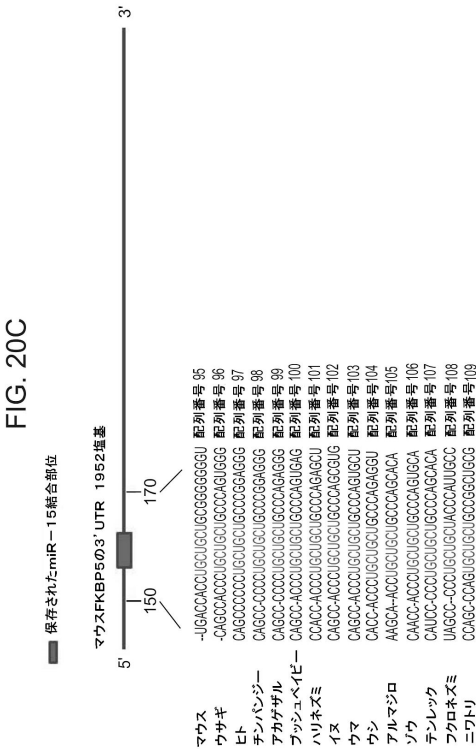
【図 20 A】



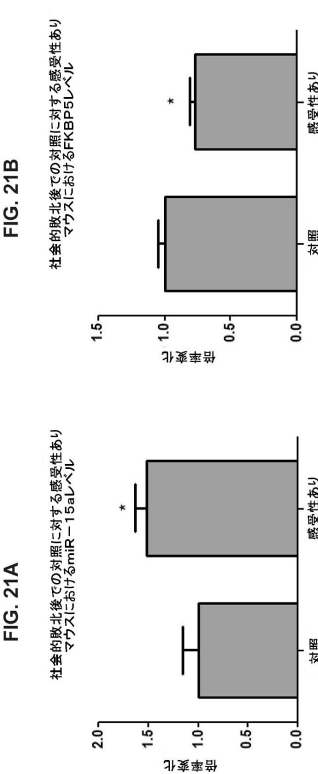
【図 20 B】



【図 20 C】

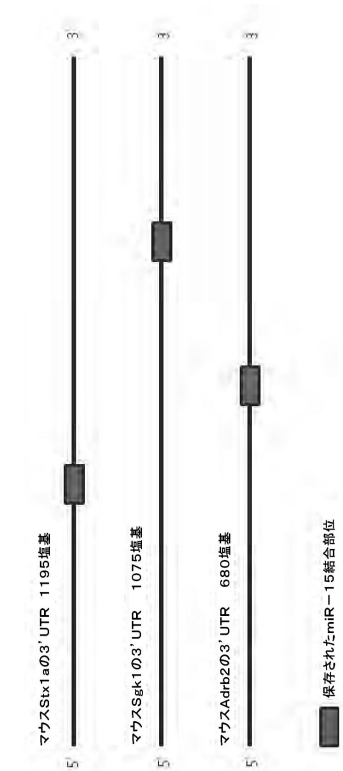


【図 21 A - 21 B】



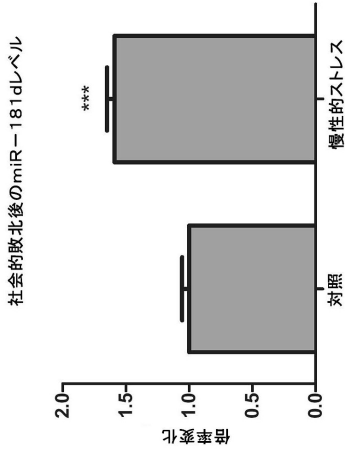
【 図 2 2 】

FIG. 22



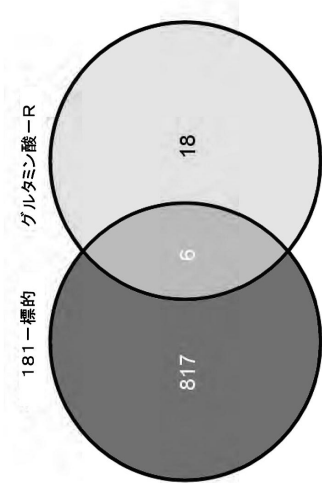
【 図 2 3 】

FIG. 23



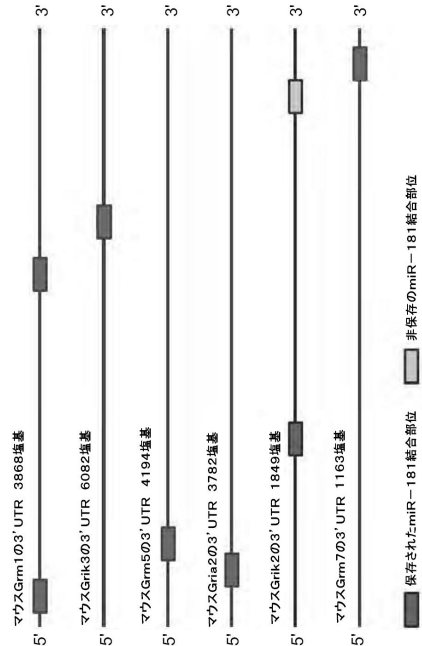
【 図 2 4 】

FIG. 24



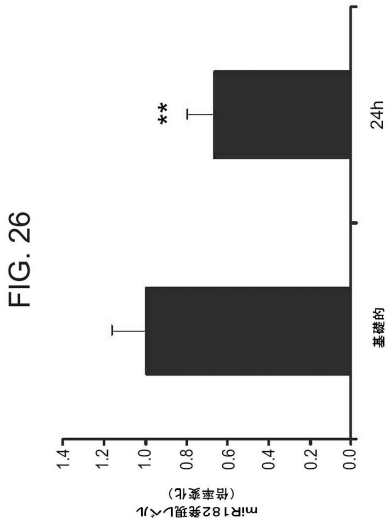
【 図 2 5 】

FIG. 25

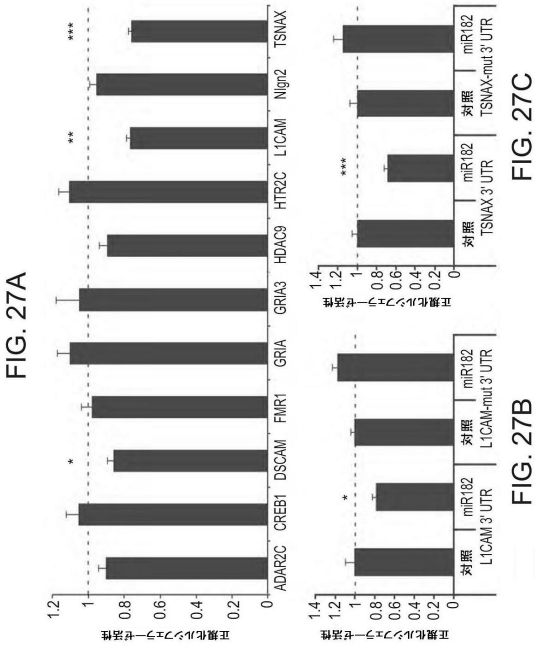




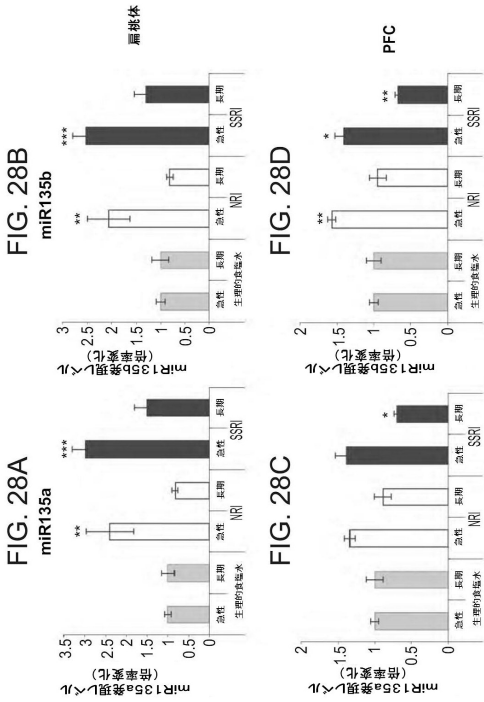
【 図 2 6 】



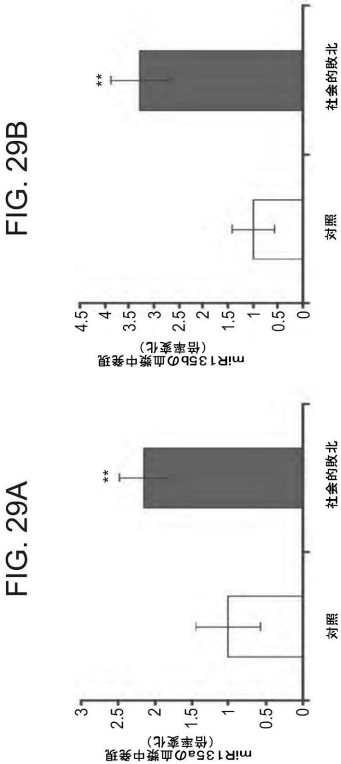
【 図 2 7 A - 2 7 C 】



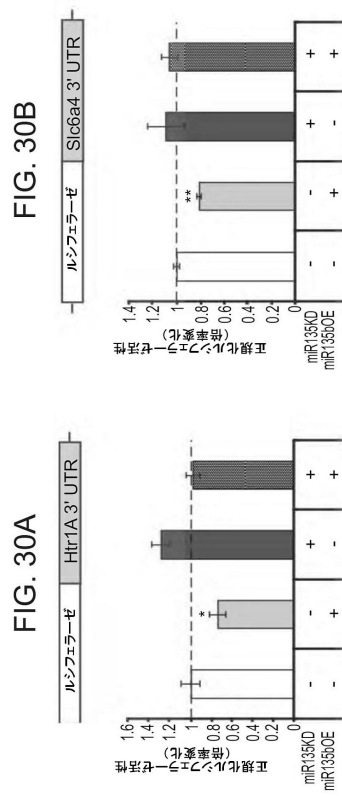
【 図 2 8 A - 2 8 D 】



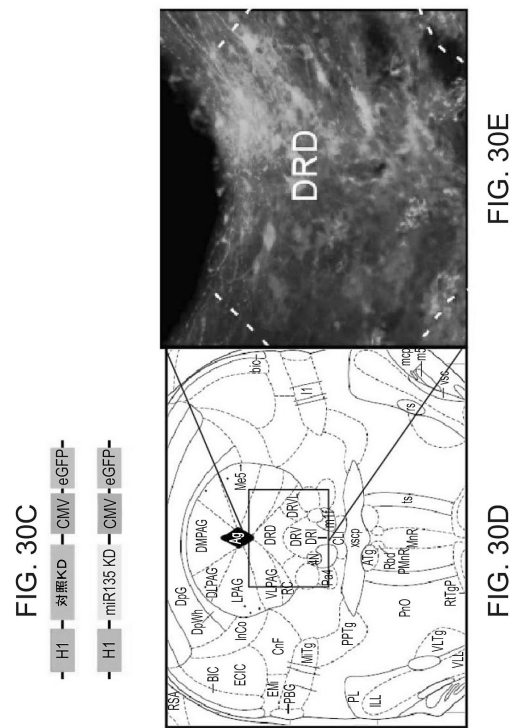
【 図 2 9 A - 2 9 B 】



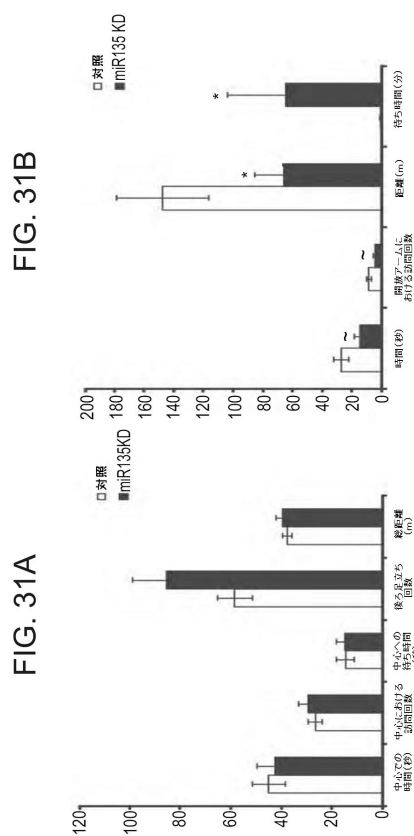
【図30A - 30B】



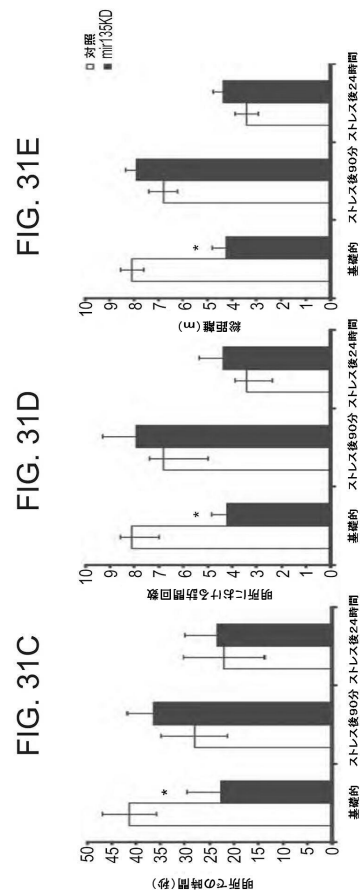
【図30C - 30E】



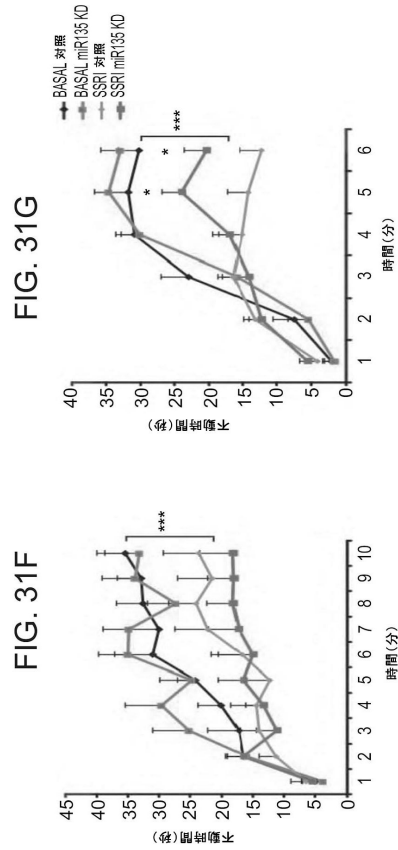
【図31A - 31B】



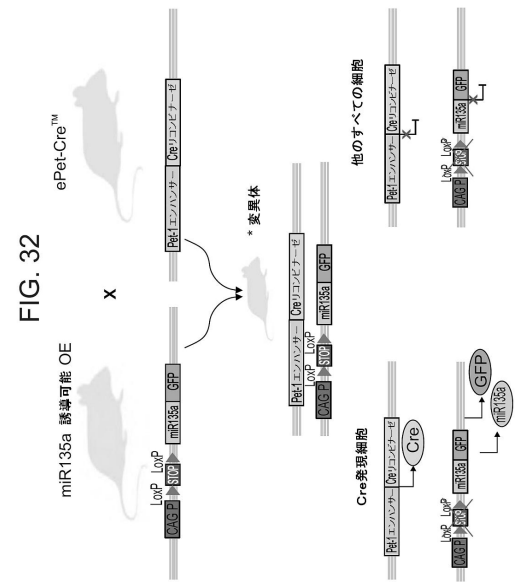
【図31C - 31E】



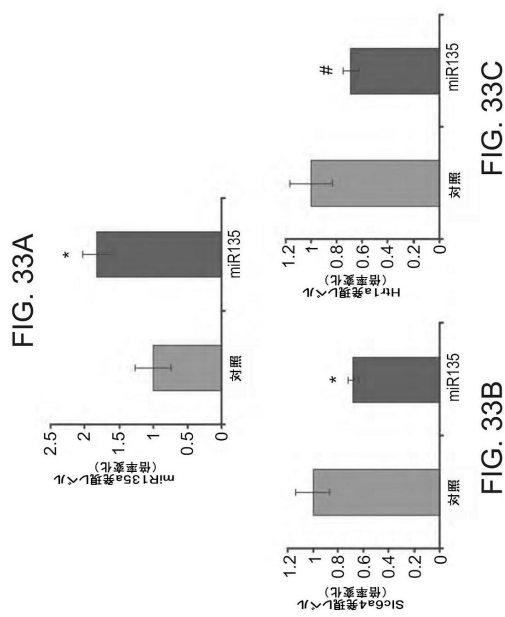
【図 3 1 F - 3 1 G】



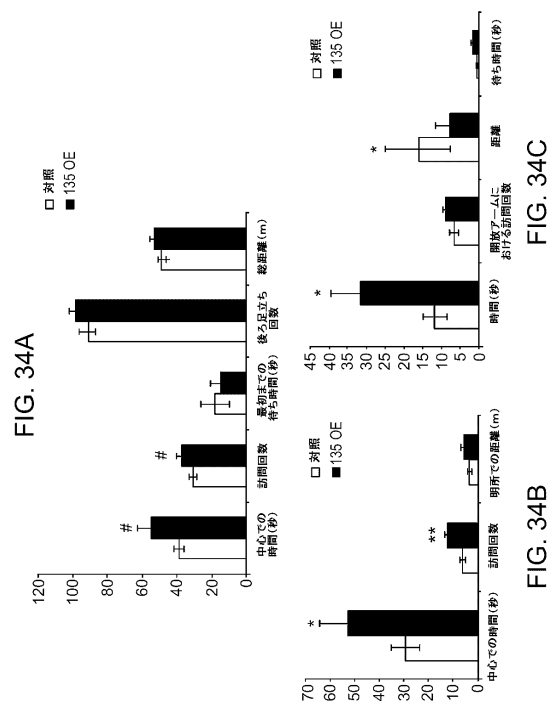
【図 3 2】



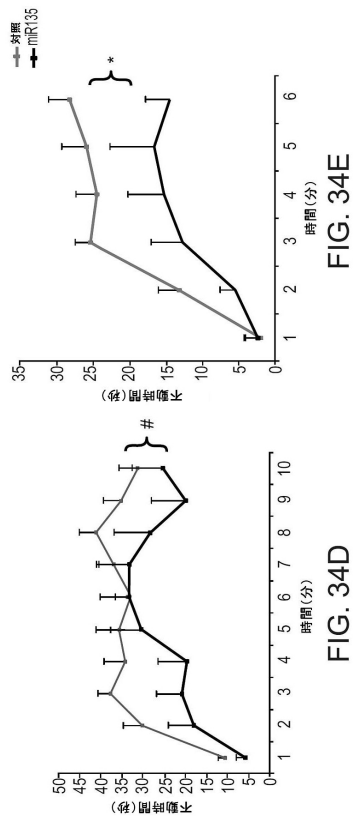
【図 3 3 A - 3 3 C】



【図 3 4 A - 3 4 C】



【図 3 4 D - 3 4 E】



【配列表】

0006309450000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 25/22 (2006.01)		A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)		A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 5/0793 (2010.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/0793	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 5/10	
		C 1 2 N 15/00	Z N A G

- (72)発明者 チェン, アロン  
イスラエル, 7610002 レホヴォト, ザ ワインツマン インスティテュート オブ  
サイエンス, アシュバル ストリート 3
- (72)発明者 ホルンステイン, エラン  
イスラエル, 7630243 レホヴォト, ハナッシ ハリション ストリート 54
- (72)発明者 イスラー, オルナ  
イスラエル, 7610002 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ  
ワインツマン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド デベロッ  
プメント カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 ハラマチ, シャロン  
イスラエル, 7610002 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ  
ワインツマン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド デベロッ  
プメント カンパニー リミテッド内
- (72)発明者 ヴォルク, ナアマ  
イスラエル, 7610002 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ  
ワインツマン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド デベロッ  
プメント カンパニー リミテッド内

## 合議体

審判長 村上 騎見高

審判官 蔵野 雅昭

審判官 山本 吾一

- (56)参考文献 国際公開第2009/148137号  
米国特許出願公開第2009/0075258号明細書  
国際公開第2007/147409号  
HOLLEMAN, A. et al, miR-135a contributes to p  
aclitaxel resistance in tumor cells both in  
vitro and in vivo, Oncogene, 2011年5月9日, Vol. 3  
0, p. 4386-4398

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K

C12N

REGISTRY/CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

- (54)【発明の名称】セロトニン関連の医学的状態、アドレナリン関連の医学的状態、ノルアドレナリン関連の医学的  
状態、グルタミン酸関連の医学的状態および副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン関連の医学的状

態の処置および診断のためのマイクロRNAおよび該マイクロRNAを含む組成物