

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-540971
(P2024-540971A)

(43)公表日 令和6年11月6日(2024.11.6)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/30 (2015.01)	A 6 1 K	35/30		4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735	Z N A	4 C 0 8 7
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全128頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-523828(P2024-523828)				
(86)(22)出願日	令和4年10月19日(2022.10.19)				
(85)翻訳文提出日	令和6年6月4日(2024.6.4)				
(86)国際出願番号	PCT/US2022/078344				
(87)国際公開番号	WO2023/069979				
(87)国際公開日	令和5年4月27日(2023.4.27)				
(31)優先権主張番号	63/257,767				
(32)優先日	令和3年10月20日(2021.10.20)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	508144129 ユニバーシティ オブ ロチェスター アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 6 4 2, ロチェスター, エルムウッド ア ベニュー 6 0 1, ボックス ユーアールブイ (71)出願人 513004906 ユニバーシティ・オブ・コペンハーゲン UNIVERSITY OF COPEN HAGEN デンマーク国 コペンハーゲン ケイ 1 1 6 5 ノールガード1 0 (74)代理人 110002077 園田・小林弁理士法人 (72)発明者 ゴールドマン, スティーヴン アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 4 5 8 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 加齢性白質喪失の競合治療における使用のための単離されたグリア前駆細胞

(57)【要約】

本出願は、対象の脳における、加齢性乏突起膠細胞喪失、加齢性星状膠細胞喪失、又は加齢性白質喪失を含む、乏突起膠細胞喪失、星状膠細胞喪失、又は白質喪失の有害作用を軽減することに関する。本出願はまた、グリア前駆細胞若しくはその子孫を若返らせること、又はグリア前駆細胞若しくはその子孫の発達可能性を高めることに関する。

【選択図】 図 4 F

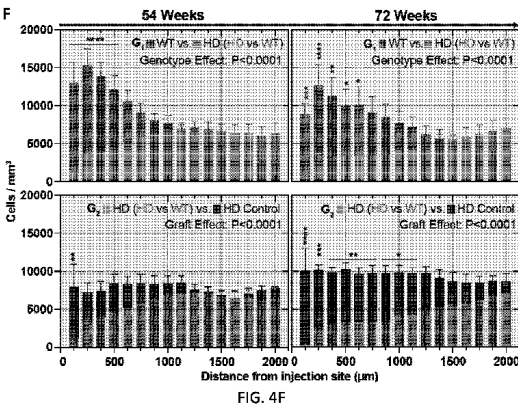


FIG. 4F

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

加齢性乏突起膠細胞喪失によって媒介される状態を対象において治療する方法であって、前記方法が、治療有効量の単離されたグリア前駆細胞の集団を、その治療を必要とする前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記状態が、血管性白質脳症、成人発症性自己免疫性脱髄状態、慢性放射線後誘発性脱髄状態、成人発症性リソソーム蓄積症、成人発症性白質ジストロフィー、又は脳性麻痺である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

加齢性星状膠細胞喪失によって媒介される状態を対象において治療する方法であって、前記方法が、治療有効量の単離されたグリア前駆細胞の集団を、その治療を必要とする前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 4】

前記状態が、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、統合失調症、ハンチントン病、アレクサンダー病、又は白質消失病である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

加齢性白質喪失によって媒介される状態を対象において治療する方法であって、前記方法が、治療有効量の単離されたグリア前駆細胞の集団を、その治療を必要とする前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 6】

前記状態が、

血管性白質脳症、成人発症性自己免疫性脱髄状態、慢性放射線後誘発性脱髄状態、成人発症性リソソーム蓄積症、成人発症性白質ジストロフィー、脳性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、統合失調症、ハンチントン病、アレクサンダー病、又は白質消失病である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記状態が、ハンチントン病又は皮質下認知症である、請求項 1、3、及び 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記血管性白質脳症が、皮質下脳卒中、糖尿病性白質脳症、又は高血圧性白質脳症である、請求項 2 又は 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記成人発症性自己免疫性脱髄状態が、再発寛解型多発性硬化症、慢性若しくは進行性多発性硬化症、視神経脊髄炎、横断脊髄炎、又は視神経炎である、請求項 2 又は 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記単離されたグリア前駆細胞の前記集団が、前記対象におけるグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞よりも若い、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記単離されたグリア前駆細胞又はその子孫の集団が、前記対象におけるグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞のうちの少なくともいくつかを置き換える、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記単離されたグリア前駆細胞又はその子孫の前記集団が、前記対象におけるグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞よりも速く成長又は増殖又は分裂する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記単離されたグリア前駆細胞又はその子孫の前記集団が、前記対象におけるグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞よりも高いレベルの MYC 及び YAP1 経路活性

10

20

30

40

50

を有する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記対象が、ヒトである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記単離されたグリア前駆細胞の前記集団が、多能性幹細胞に由来する、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記多能性幹細胞が、胚性幹細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞である、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記投与することが、実質内、脳梁内、脳室内、くも膜下腔内、脳内、大槽内、又は静脈内移植によって行われる、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

単離されたグリア前駆細胞の前記集団が、前脳、線条体、及び／又は小脳に投与される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記単離されたグリア前駆細胞が、前記対象に対して異種 (heterologous)、異種 (xenogenic)、同種異系、同種同系、又は自己である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年10月20日に出願された米国仮出願第63／257,767号に対する優先権を主張する。本出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、加齢性乏突起膠細胞喪失、加齢性星状膠細胞喪失、又は加齢性白質喪失を含む、乏突起膠細胞喪失、星状膠細胞喪失、又は白質喪失の治療に関する。

30

【背景技術】

【0003】

白質、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞の加齢性喪失は、一般的に高齢者に発生し、認知障害、認知症、尿失禁、歩行障害、うつ病、並びに脳卒中及び死亡のリスクの増加を含む、不良な転帰につながる可能性がある。この喪失は、ミエリン、軸索、及び乏突起膠細胞の部分的な喪失、軽度の反応性星状膠細胞膠細胞症、まばらに分布するマクロファージ、並びに小動脈及びより小さい血管のヒアリン線維症に起因する狭窄を伴う。加齢性白質喪失は、主に脳小血管動脈硬化症に関連する不完全虚血の形態と一般にみなされている。そのような小さな血管の変化は、血液脳関門の損傷、並びに白質中の液体及びマクロ分子の慢性的な漏出をもたらす。実際、脳脊髄液アルブミン及びIgG値の濃度の増加が、加齢性白質喪失を有する患者において見られた。加齢性白質喪失は臨床的に重大な問題であったが、この状態の治療を評価するために実施された研究は比較的少ない。

40

【0004】

Epidemiology of Vascular Ageing MRI 研究では、血圧と加齢性白質喪失の重症度との間に正の線形関係が示されている。スタチンは、冠状動脈患者における心血管イベント及び虚血性脳卒中を低減するために長い間使用されてきた。しかしながら、スタチンが加齢性白質喪失の治療において有用であるかどうかは不明である。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ドネペジル、ガランタミン、及びリバスティグミン) 及びN-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体拮抗薬 (メマンチン) は、アルツハイマー病の治療のために承認されている。高ホモシステイン血症が加齢

50

性白質喪失と関連付けられるという証拠もある。しかしながら、ホモシステイン低下療法が、そのような白質喪失を遅らせるのに有用であるかどうかは不明確である。

【0005】

白質、乏突起膠細胞、若しくは星状膠細胞の喪失によって媒介されるか、又はそれを特徴とする障害及び状態を治療するための治療法及び方法に対する必要性が存在する。本開示は、当該技術分野におけるこれら及び他の欠陥を克服することを対象としている。

【発明の概要】

【0006】

本開示は、いくつかの態様において上記の必要性に対処する。

【0007】

いくつかの態様では、本開示は、加齢性乏突起膠細胞喪失によって媒介される状態を対象において治療する方法を提供する。この方法は、治療有効量の単離されたグリア前駆細胞集団を、その治療を必要とする対象に投与することを含む。この状態は、血管性白質脳症、成人発症性自己免疫性脱髄状態、慢性放射線後誘発性脱髄状態、成人発症性リソソーム蓄積症、成人発症性白質ジストロフィー、又は脳性麻痺であり得る。

【0008】

別の態様では、本開示は、加齢性星状膠細胞喪失によって媒介される状態を対象において治療する方法を提供する。この方法は、治療有効量の単離されたグリア前駆細胞集団を、その治療を必要とする対象に投与することを含む。この状態は、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、統合失調症、ハンチントン病、アレクサンダー病、又は白質消失病であり得る。

【0009】

更に別の態様では、本開示は、加齢性白質喪失によって媒介される状態を対象において治療する方法を提供する。この方法は、治療有効量の単離されたグリア前駆細胞集団を、その治療を必要とする対象に投与することを含む。この状態の例としては、血管性白質脳症、成人発症性自己免疫性脱髄状態、慢性放射線後誘発性脱髄状態、成人発症性リソソーム蓄積症、成人発症性白質ジストロフィー、脳性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、統合失調症、ハンチントン病、アレクサンダー病、及び白質消失病を挙げることができる。

【0010】

上述の各方法において、状態は、ハンチントン病又は皮質下認知症であり得る。血管性白質脳症の例としては、皮質下脳卒中、糖尿病性白質脳症、及び高血圧性白質脳症が挙げられる。成人発症性自己免疫性脱髄状態の例としては、再発寛解型多発性硬化症、慢性又は進行性多発性硬化症、視神経脊髄炎、横断脊髄炎、及び視神経炎が挙げられる。

【0011】

上述の方法の各々についてのいくつかの実施形態では、単離されたグリア前駆細胞の集団は、対象におけるグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞よりも若い。いくつかの実施形態では、単離されたグリア前駆細胞又はその子孫の集団は、対象におけるグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞のうちの少なくともいくつかを置き換える。いくつかの実施形態では、単離されたグリア前駆細胞又はその子孫の集団は、対象のグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞よりも速く成長又は増殖又は分裂する。いくつかの実施形態では、単離されたグリア前駆細胞又はその子孫の集団は、対象におけるグリア前駆細胞、乏突起膠細胞、又は星状膠細胞よりも高いレベルのMYC及びYAP1経路活性を有する。

【0012】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒトなどの哺乳動物である。単離されたグリア前駆細胞の集団は、多能性幹細胞に由来し得る。多能性幹細胞の例としては、胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、グリア前駆細胞は、本明細書に開示されるグリア細胞（グリア前駆細胞、星状膠細胞、又は乏突起膠細胞など）から若返った細胞であり得る。

10

20

30

40

50

【0013】

上述の方法の各々について、投与することは、実質内、脳梁内、脳室内、くも膜下腔内、脳内、大槽内、又は静脈内移植によって実行することができる。いくつかの例では、単離されたグリア前駆細胞又は子孫の集団は、前脳、線条体、及び／又は小脳に投与することができる。単離されたグリア前駆細胞又は子孫は、対象に対して異種（heterologous）、異種（xenogenic）、同種異系、同種同系、又は自己であり得る。

【0014】

いくつかの他の態様では、本開示は、グリア前駆細胞若しくはその子孫を若返らせるか、又はその発達可能性を高める方法を提供する。この方法は、グリア前駆細胞又は子孫において、E2F6、ZNF274、MAX、及びIKZF3からなる群から選択される転写リプレッサーを抑制することを含む。グリア前駆細胞は、老化したグリア前駆細胞であり得る。子孫は、乏突起膠細胞又は星状膠細胞であり得る。抑制ステップは、グリア前駆細胞又は子孫において、転写リプレッサーのサプレッサーを発現又は導入することを含む得る。

10

【0015】

別の態様では、本開示は、上述の方法に従って調製された細胞又はその子孫を提供する。本開示はまた、E2F6、ZNF274、MAX、及びIKZF3からなる群から選択される転写リプレッサーのサプレッサーを含む単離されたグリア前駆細胞又はその子孫を提供する。いくつかの実施形態では、単離されたグリア前駆細胞又は子孫は、外因性サプレッサーを含む。すなわち、サプレッサーは、細胞又は子孫に対して外因性である。

20

【0016】

更なる態様では、本開示は、白質喪失、乏突起膠細胞喪失、又は星状膠細胞喪失によって媒介される状態を治療する方法を提供する。この方法は、(i)治療有効量の、E2F6、ZNF274、MAX、及びIKZF3からなる群から選択される転写リプレッサーのサプレッサー、並びに／又は(ii)治療有効量の、上述の方法に従って調製される細胞又はその子孫、並びに／又は(iii)治療有効量の、上述のサプレッサー含有グリア前駆細胞又は子孫を、その治療を必要とする対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、白質喪失、乏突起膠細胞喪失、又は星状膠細胞喪失は、加齢性である。

【0017】

対象は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、サプレッサーは、低分子化合物、オリゴヌクレオチド、核酸、ペプチド、ポリペプチド、CRISPR/Casシステム、又はその抗体若しくは抗原結合部分を含む。いくつかの例では、サプレッサーは、miRNA若しくはsiRNA分子、又はCRISPR/Casシステム、又はアンチセンス核酸であり得る。

【0019】

いくつかの実施形態では、核酸は、miRNA又はsiRNA分子を含むか、又はコードする。いくつかの例では、miRNA又はsiRNA分子は、miR-125b-5p、miR-106a-5p、miR-17-5p、miR-130a-3p、miR-130b-3p、miR-379-5p、miR-93-3p、miR-1260b、miR-767-5p、miR-30b-5p、miR-9-3p、miR-9-5p、及びmiR-485-5pからなる群から選択されるものと少なくとも70%（例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%）同一である配列を含む。好ましくは、miRNA又はsiRNA分子は、miR-125b-5p、miR-106a-5p、miR-17-5p、miR-130a-3p、miR-130b-3p、miR-379-5p、及びmiR-485-5pからなる群から選択されるものの配列と少なくとも70%（例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%）同一である配列を含む。

40

【0020】

50

いくつかの実施形態では、サプレッサーは、C R I S P R - C a s システムを含む。

【0021】

上述の方法では、サプレッサーは、その状態を有する対象に、実質内、脳梁内、脳室内、くも膜下腔内、脳内、大槽内、又は静脈内投与によって投与することができる。その状態の例としては、リソソーム蓄積症、自己免疫性脱髄状態（例えば、多発性硬化症、視神経脊髄炎、横断脊髄炎、及び視神経炎）、血管性白質脳症（例えば、皮質下脳卒中、糖尿病性白質脳症、高血圧性白質脳症、加齢性白質疾患、及び脊髄損傷）、放射線誘発性脱髄状態、白質ジストロフィー（例えば、ペリザイウス・メルツバッハー病、テイ・サック病、サンドホフスガングリオシドーシス、クラッペ病、異染色性白質ジストロフィー、ムコ多糖症、ニーマン・ピック病、アドレノールキッドジストロフィー、カナバン病、白質消失病、及びアレクサンダー病）、又は周辺性白質マラシア又は脳性麻痺が挙げられる。いくつかの実施形態では、その状態は、ハンチントン病又は皮質下認知症である。

10

【0022】

投与することは、実質内、脳梁内、脳室内、くも膜下腔内、脳内、大槽内、又は静脈内移植によって実行することができる。いくつかの実施形態では、細胞又は単離されたグリア前駆細胞若しくはその子孫は、前脳、線条体、及び／又は小脳に投与され得る。細胞又は単離されたグリア前駆細胞若しくはその子孫は、対象に対して異種（heterologous）、異種（xenogenic）、同種異系、同種同系、又は自己であり得る。

【0023】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細は、以下の説明に記載される。本開示の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

特許又は出願ファイルは、カラーで実施された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面（複数可）付きのこの特許又は特許出願公開のコピーは、要求及び必要な手数料の支払いに応じて局によって提供されるであろう。

【0025】

【図1A】WT-mCherryの発現の代表的な画像を示す。AAVS1セーフハーバー遺伝子座へのトランスジェニックレポーターカセットのCRISPR媒介による統合は、mCherryを発現するカラータグ付きWTをもたらす。E1-3、エクソン1-3；LHA、左相同性アーム；SA、スプライスアクセプター部位；T2A、2A自己切断ペプチド；Puro、ピューロマイシン耐性遺伝子；pA、ポリアデニル化配列；CAG、CAGプロモーター；RHA、右相同性アーム。スケール：500µm。

30

【図1B】HD-EGFPの発現の代表的な画像を示す。AAVS1セーフハーバー遺伝子座へのトランスジェニックレポーターカセットのCRISPR媒介による統合は、EGFPを発現するカラータグ付きHD hESCをもたらす。

【図1C】操作されたWT及びHD hESC系統のHTT CAG長及びそれぞれのトランスジェニック挿入を示す。

【図1D】プライマーdna 803、dna 804、及びdna 1835（配列番号1〜3）を使用して導入遺伝子カセットの統合及び接合性を評価するためのPCRスクリーニング戦略を示す。PCRスクリーニングは、WT-EGFP、WT-mCherry、及びHD-EGFPがトランスジェニックカセットを正しい部位に統合し、WT-mCherry及びWT-EGFPは、ホモ接合性の統合を保有し、HD-EGFPは、ヘテロ接合性の統合を保有することを示す。E1-3、エクソン1-3；LHA、左相同性アーム；RHA、右相同性アーム。

40

【図1E】脳におけるWT-mCherry及びHD-EGFP発現の代表的な画像を示す。OCT4についての免疫染色は、導入遺伝子挿入後に多能性が維持されることを示す。

【図2A】獲得したコピー数変異体（CNV）及びヘテロ接合性喪失領域（LOH）を評価するための、WT-mCherry及びHD-EGFPからの代表的な核型を示す。核

50

型分析は、導入遺伝子統合プロセス中に染色体異常が得られなかったことを示す。

【図 2 B】hESC に選択的成長優位性を付与することが知られている、hESC（破線内）に一般的に見られる増幅を担持するヒト染色体 20 の aCGH プロファイリングの例を示す。そのような変異は、WT-EGFP、WT-mCherry、又は HD-EGFP hESC では検出されなかった。

【図 2 C】比較の aCGH プロファイルを示し、正常範囲内外で、操作された株において複数の変異を検出した。実験結果に影響を及ぼすと予想されるものはない。

【図 3 A】実験的グラフト前の HD キメラマウスの作成、分化プロセス、及び表現型特性評価を図示する。

【図 3 B】WT-mCherry 及び HD-EGFP グリア培養物の位相コントラスト画像を示し、両方とも 150 DIV で双極 hGPC において高濃縮された。スケール：50 μm 。

【図 3 C】150 DIV の細胞調製物（WT-mCherry、 $n=10$ ；HD-EGFP、 $n=6$ ）のフローサイトメトリーは、CD140a (PDGFR α)⁺/CD44⁺ hGPC の高濃縮を明らかにし、残りの部分は、成熟度の低い A2B5⁺ hGPC 及び PDGFR α ⁻/CD44⁺ 星状膠細胞からなる。蛍光レポーターの発現は、グリア分化を通して一貫していた。対応のない両側 t 検定；データは、平均 $\pm$ SEM として示される。

【図 3 D】免疫細胞化学が、WT-mCherry 及び HD-EGFP hESC の両方から生成された培養物における PDGFR α ⁺ hGPC の濃縮を確認したことを示す。これらの hGPC のほんの一部が、GFAP⁺ 星状膠細胞に分化している。スケール：100 μm 。

【図 3 E-3 G】それぞれ、HD キメラマウスにおいて、(A) レポーター、(B) PDGFR α ⁺、及び (C) GFAP を発現する細胞のパーセンテージを示す。

【図 4 A】ヒト野生型グリアが、以前に統合された HD グリアを打ち負かし、移動させることを実証する代表的な画像である。HD キメラの線条体への WT グリア (mCherry⁺、赤) の生着により、HD グリア (EGFP⁺、緑) の漸進的な置換がもたらされ、その前進において広範な排他的ドメインが作成された。破線の輪郭 (白) は、ヒト細胞がマッピングされ、定量化された線条体の輪郭を区切る。STR-線条体 (尾状-プタメン)；LV-外側脳室；CTX-皮質。破線の長方形 (オレンジ色) は、72 週目での挿入を表す。左スケールバー：500 μm 、右スケールバー：100 μm 。

【図 4 B-4 C】ヒト野生型グリアが、以前に統合された HD グリアを打ち負かし、移動させることを実証する代表的な画像である。図 4 B は、これらの排他的ドメインが、WT GPC (Olig2⁺、白) がそれらの HD 対応物を移動させるにつれて形成されることを実証する。スケールバー：50 μm 。図 4 C は、WT グリアによって支配される領域内では、HD 星状膠細胞 (hGFAP⁺、白) が見られ得るため、GPC 置換が星状膠細胞置換に先行することを示す。スケールバー：10 μm 。

【図 4 D-4 E】以前に統合された HD グリアを打ち負かし、移動させるヒト野生型グリアを示す。図 4 D は、線条体におけるヒトグリアの経時的な分布を定量化するために使用される戦略を示す素描である。ヒトグリアを、マウス線条体の 15 個の等距離断面 (5 を例として示す) にマッピングし、分析のために 3D で再構築した。それらの分布を、注射部位までの距離の関数として半径方向に測定した。図 4 E は、WT グリアが経時的にそれらの空間的支配を増加させることを示す；WT 対 HD (HD 対 WT 群) - 54 $n=8$ で 54 週間、 $n=7$ で 72 週間。それらの前進は、HD キメラ対照と比較して HD グリアの漸進的な根絶を伴った；HD (HD 対 WT 群)。

【図 4 F】ヒト野生型グリアが、以前に統合された HD グリアを打ち負かし、移動させることを示す。容積定量は、WT グリアが経時的に空間的支配を増加させることを示す；WT 対 HD (HD 対 WT 群) - 54 $n=8$ で 54 週間、 $n=7$ で 72 週間。それらの前進は、HD キメラ対照と比較して HD グリアの漸進的な根絶を伴った；HD (HD 対 WT 群) - $n=8$ で 54 週間、 $n=7$ で 72 週間対 HD 対照 - $n=4$ で両方の時点；Sidak

10

20

30

40

50

の多重比較検定を用いた二元配置分散分析；主な効果は数値P値として示され、事後比較は以下のとおり示される：**** $P < 0.0001$ 、*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ ；データは、平均±s.e.mとして提示される。

【図5】HD対WTマウス及びHD対照マウスの実験設計を図示する。

【図6A-6C】ヒト野生型グリアが、以前に統合されたヒトHDグリアを打ち負かすことを示す。

【図6A】立体学的推定を提供し、WTグリアがヒト化線条体内で拡大するにつれて、HDグリアの総数がHDキメラ対照と比較して漸進的に減少することを実証する；Sidakの多重比較検定を用いた二元配置分散分析。

【図6B-6C】両方の集団におけるGPC (Olig2+、図6B) 及び星状膠細胞 (GFAP+、図6C) の割合が、線条体支配に関して競うにつれて維持されたことを示す；HD対照-両方の時点で $n = 4$ ；WT対照- $n = 4$ (54週間)、 $n = 3$ (72週間)；HD対WT- $n = 5$ (54週間)、 $n = 3$ (72週間)；オレンジ色の矢印は、共標識細胞を指す。データは、平均±s.e.mとして示され、個々のデータ点を有する。

【図6D-6E】Olig2+ (白) GPCがそれらのHD対応物を移動させるにつれて拡大したWTグリアのHDグリア (図6D) 及びWTグリア (図6E) の代表的な画像を示す。それらが支配的になった領域内で、それらは、更にhGFAP+ (白) 星状膠細胞に分化した。

【図7A】WT対照群の実験設計及び分析時点を図示する。

【図7B】Rag1 (-/-) マウスの成体線条体へのWTグリア (mCherry+、赤) の生着の代表的な画像を示し、経時的にマウス線条体の実質的なヒト化をもたらす。

【図7C-7D】体積定量であり、WTグリアが経時的にマウス線条体全体に浸潤し、分散することを示し、それらは、HDキメラにグラフトされたものよりも広範囲に浸潤する。WT (HD対WT群) - $n = 8$ で54週間、 $n = 7$ で72週間対WT対照- $n = 7$ で54週間、 $n = 5$ で72週間；Sidakの多重比較検定による二元配置分散分析；主な効果は数値P値として示される；データは平均±s.e.mとして示される。図7Cは、WT対照を示す。図7Dは、細胞/mm³を示す。

【図8】mCherryタグ付き (WT-mCherry) 及びタグなし (WT-タグなし) のWTグリアの1:1の混合物を受けたマウスの実験設計を図示する。

【図9A-9D】HDグリアを移動させながら、野生型グリアの共生着された同種同系クローンが繁栄し、混合することを示す。

【図9A】ヒト核抗原 (hN) に対する免疫標識は、WT-mCherry (mCherry+hN+、赤、白) 及びWTタグなし (mCherry-EGFP-hN+、白) グリアの両方が、以前にヒト化された線条体内で拡大し、HDグリア (EGFP+hN+、緑、白) を漸進的に移動させることを示す。スケールバー：500 µm。

【図9B】膨大な同型ドメインが、混合したWTグリアが拡大し、常在HDグリアを移動させるにつれて形成されたことを示す。スケールバー：100 µm。

【図9C】同種同系WT-mCherry及びWT-タグなしが混合していることが見られたことを示す。スケールバー：100 µm。

【図9D】WTグリアが支配するドメイン内で、典型的には白質路内で、より複雑な星状膠細胞様HDグリアのみが見られ得ることを示す。スケールバー：10 µm。

【図10】線条体内のWT-mCherry及びWT-タグなしグリアの割合の定量化が、いずれかの定量化された時点で2つの集団間に有意差を示さなかったことを示す (各時点について $n = 6$)；Sidakの多重比較検定を用いた二元配置分散分析；平均±s.e.m。

【図11】新生児マウスにおけるWTとHTグリアとの共生着のための実験設計を図示する。

【図12A-12C】WTとHTグリアとで共生着されたマウスにおける線条体内のWT及びHDグリアの割合の代表的な画像を示す。画像は、いずれの細胞集団に対しても著しい成長優位性を示さない； $n = 5$ ；対応のある両側t検定。

10

20

30

40

50

【図13A-13B】等しく増殖する $Ki67^+$ （白）グリアプールによって、新生児に生着されたWT及びHDグリアの等しい成長が持続することを実証する；HD対照- $n=3$ ；WT対照- $n=4$ ；HD対WT- $n=5$ ；Tukeyの多重比較試験を用いた一元配置分散分析。図13Aは、線条体占有率を示す。図13Bは、 $Ki67^+$ 細胞の相対量を示す。

【図14A】細胞年齢の差がヒトグリア再増殖を駆動するのに十分であることを実証するための実験設計を示す。

【図14B】細胞年齢の差がヒトグリア再増殖を駆動するのに十分であることを示す。

【図15A-15D】HDグリアによって実質的にヒト化された線条体を有するマウスキメラを生成して、健常な対応物による罹患したヒトグリアの置換を評価するためのインビボモデルを提供することを示す。EGFPを発現するように操作されたmHtt発現hESCに由来するhGPCを、免疫不全のRag1 $^{-/-}$ マウスの新線条体に移植し、それらの拡大を組織学的に監視した。

10

【図15A】実験設計及び分析エンドポイントを示す。

【図15B】新生児に生着したHDグリア（EGFP $^{+}$ 、緑）がマウス線条体内で拡大し、経時的に組織の実質的なヒト化をもたらすことを示す。破線は、ヒト細胞がマッピングされ、定量化された線条体の境界を区切る。スケール：500 μ m。STR、新線条体。

【図15C】それらの拡大は、マウス線条体に保有されるHDグリアの数を経時的な増加に伴うことを示す。データは、平均 $\pm$ s.e.mとして提示され、個々のデータ点を有する（ $n=4$ ）。Tukeyの多重比較検定を用いた一元配置分散分析；12週（ $n=3$ ）、24週（ $n=3$ ）、36週（ $n=4$ ）。

20

【図15D】それらの拡大は、それらの $Ki67^+$ 増殖細胞プールを犠牲にして、マウス線条体に保有されるHDグリアの数を経時的な増加に伴うことを示す。

【図15E-15J】HDグリアによって実質的にヒト化された線条体を有するマウスキメラを生成して、健常な対応物による罹患したヒトグリアの置換を評価するためのインビボモデルを提供することを示す。EGFPを発現するように操作されたmHtt発現hESCに由来するhGPCを、免疫不全のRag1 $^{-/-}$ マウスの新線条体に移植し、それらの拡大を組織学的に監視した。

【図15E】HD GPCの新生児での移植の36週後の線条体ヒト化の程度を評価するために用いられる戦略を示す。HD細胞分布を15個の等距離矢状断面（例えば、5つを示す）にマッピングし、分析のために3Dで再構築した。

30

【図15F】体積分析のための、マッピングされ、再構築された線条体のレンダリングされた例を示す。

【図15G】体積定量化を示し、36週までに、HDグリアが均一な分布を想定して全線条体全体に拡大していたことを示す；データは、平均（線）及び個々のデータ点（ $n=4$ ）として示される。データは、平均 $\pm$ s.e.mとして提示され、個々のデータ点を有する（ $n=4$ ）。

【図15H-J】マウス線条体にコロニーを形成するにつれて、HDグリアが、Olig2 $^{+}$ GPC（矢印は、Olig2 $^{+}$ /EGFP $^{+}$ （赤/緑）細胞を指す）として拡大及び持続したか、又はhGFAP $^{+}$ （赤）星状膠細胞に分化したかのいずれかであることを示す。増殖する（ $Ki67^+$ 、赤）HDグリアは、数が減少しているにもかかわらず、36週間の拡大後であっても見られ得る（D）。スケール：10 μ m。データは、平均 $\pm$ s.e.mとして提示され、個々のデータ点を有する（ $n=4$ ）。

40

【図16A-16C】増殖上の優位性が、ヒト化HD線条体を通して前進するようにWTグリアを駆動することを示す。

【図17A-17I】細胞年齢の差が、競合グリア再増殖を駆動するのに十分であることを示す。

【図17A】実験設計及び分析エンドポイントを示す。

【図17B】WTキメラの線条体へのより若いWTグリア（EGFP $^{+}$ 、緑）の生着が、それらの老化した対応物（mCherry $^{+}$ 、赤）の選択的置換をもたらしたことを示す

50

。破線は、ヒト細胞がマッピングされ、定量化された線条体領域を区切る。S T R、線条体（尾状ブタメン）；L V、外側脳室；C T X、皮質。スケール：500 μ m。

【図17C】出生時にのみ生着された、W Tキメラ対照を示す。スケール：100 μ m。

【図17D】マッピングされた線条体のレンダリングされた例を示す。容積定量は、注射部位から拡大するにつれて、より若いW Tグリアがより古い同種同系対応物を置き換えることを示す。

【図17E】老化した対若い（アイソグラフト）の結果を示す、 $n = 3$ 。それらの前進は、対照のW Tキメラ（老化した対照）と比較して、組織からの老化したW Tグリアの進歩的排除を追跡した。スケール：100 μ m。

【図17F】老化した（アイソグラフト）対老化した（対照）の結果を示す；各々、 $n = 3$ ；S i d a kの多重比較検定を用いた二元配置分散分析；相互作用又は主な効果は数値P値として示され、事後比較は以下のとおり示される：**** $P < 0.0001$ 、*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 、データは、平均 $\pm$ S E Mとして提示される。

【図17G】若いW Tグリアと老化したW Tグリアとの間の界面において、より若い集団内でより高いK i 6 7⁺（白）細胞の発生率が見られることを示す。破線の正方形は、挿入色分割を表す（図17H）。スケール：50 μ m。

【図17I】K i 6 7⁺細胞の定量を示し、より若いW Tグリアがそれらの老化した対応物よりも著しく増殖性が高いことを示した；全ての実験群について $n = 3$ ；S i d a kの多重比較検定による一元配置分散分析；データは、平均 $\pm$ S E Mとして示され、個々のデータ点を有する。

【図18A】W T-mCherry h E S C株のゲーティング戦略フローサイトメトリー分析を示す。

【図18B】H D-E G F P h E S C株のゲーティング戦略フローサイトメトリー分析を示す。解離したグリア培養物から、生細胞は、それらのD A P I組み込みの欠如によって識別された。これらのうち、P D G F R α 、C D 4 4、P D G F R α /C D 4 4、及びA 2 B 5について染色された細胞は、それらのそれぞれの非染色ゲーティング対照と比較して、抗体特異的蛍光強度に基づいて識別された。本質的に、全ての細胞は、インビトロでのグリア分化を通してそれらのそれぞれのレポーター発現を保持した。

【図19A】W TとH Dグリアとの境界では、W Tグリア集団内でのみK i 6 7⁺（白）細胞の高い発生率が見られることを示す。I'、高倍率の競合境界の端にある2つのW T娘細胞。

【図19B】時間の関数としての各集団内のK i 6 7⁺グリアの定量化が、実験全体を通して持続する、W Tグリアによる著しい増殖上の優位性を示すことを示す。H D対照：54週（ $n = 4$ ）、72週（ $n = 4$ ）；W T対照：54週（ $n = 5$ ）、72週： $n = 3$ ；W T対H D同種移植片：54週（ $n = 5$ ）、72週（ $n = 3$ ）。S i d a kの多重比較試験を用いた二元配置分散分析による比較；平均 $\pm$ S E M。

【図20A-20I】W Tグリアが常在H Dグリアに直面して支配的な競合体転写プロファイルを獲得することを示す。

【図20A】実験設計を示す。

【図20B】6つの主要な細胞集団を識別する、統合されたs c R N A-s e qデータの均一多様体近似投影（U M A P）視覚化を示す。

【図20C】6つの主要な細胞集団を識別する、群のs c R N A-s e qデータによる分割のU M A P視覚化を示す。

【図20D】各群における細胞型の積み重ねたバープロットの割合を示す。

【図20E】G 2/M期における循環G P C及びG P Cの細胞周期分析ノッチボックスプロットを示す。ボックスは四分位間の範囲を示し、ノッチはノッチの中央に中央値がある95%信頼区間を示し、エラーバーは最小値と最大値の非外れ値を表す。群間の比較は、B e n j a m i n i-H o c h b e r g法を介して調整された多重比較を用いたK r u s k a l-W a l l i s検定後にD u n n検定を利用した。*= < 0.05 、**= < 0.0

10

20

30

40

50

1、***=<0.001、****=<0.0001の調整されたp値。

【図20F】対で差次的に発現されたGPC遺伝子のVenn図を示す(Log2倍率変化>0.15、調整されたp値<0.05)。

【図20G】GPC群間で差次的に発現される遺伝子のキュレートされたingenuity pathway analysisを示す。円のサイズはp値を表し、陰になっている部分は活性化Zスコアを示し、赤は上位の群でより活性であり、緑は下位の群でより活性である。

【図20H】キュレートされた、対で差次的に発現されたGPC遺伝子のヒートマップを示す。

【図20I】対に差次的に発現されたGPCリボソーム遺伝子log2倍率変化のバイオリンプロットを示す。

【図21A-21I】WTグリアが、それらの老化した対応物に直面するとき支配的な転写プロファイルを獲得することを示す。

【図21A】実験設計を示す。

【図21B】6つの主要な細胞集団を識別する、統合されたscRNA-seqデータのUMAP可視化を示す。

【図21C】6つの主要な細胞集団を識別する、群のscRNA-seqデータによる分割のUMAP視覚化を示す。

【図21D】各群における細胞型の積み重ねたバープロットの割合を示す。

【図21E】G2/M期における循環GPC及びGPCの細胞周期分析ノッチボックスプロットを示す。ボックスは四分位間の範囲を示し、ノッチはノッチの中央に中央値がある95%信頼区間を示し、エラーバーは最小値と最大値の非外れ値を表す。群間の比較は、Benjamini-Hochberg法を介して調整された多重比較を用いたKruskal-Wallis検定後にDunn検定を利用した。*=<0.05、**<0.01、***=<0.001、****=<0.0001の調整されたp値。

【図21F】対で差次的に発現されたGPC遺伝子のVenn図を示す(Log2倍率変化>0.15、調整されたp値<0.05)。

【図21G】GPC群間で差次的に発現された遺伝子のキュレートされたIngenuity Pathway analysisを示す。円のサイズはp値を表し、陰になっている部分は活性化Zスコアを示し、赤は上位の群でより活性であり、緑は下位の群でより活性である。

【図21H】キュレーションされた対で差次的に発現されたGPC遺伝子のヒートマップを示す。

【図21I】対に差次的に発現されたGPCリボソーム遺伝子log2の倍率変化のバイオリンプロットを示す。

【図22A-22F】競合上の優位性の転写シグネチャを示す。

【図22A】転写因子候補の識別の概略図を示す。

【図22B】条件ごとの識別されたWGCNAモジュールのeigengeneのバイオリンプロットを示す。メンバーが(図22E)の5つの転写因子の下流標的について濃縮されている、重要なモジュール(黒、緑、青、茶色、赤、シアン)が表される。

【図22C】各モジュールのeigengeneへの各生物学的因子(年齢対遺伝子型)の差次的寄与を推定するための相対的重要性分析を示す。

【図22D】遺伝子セット濃縮分析(GSEA)が、それらの優先順位付けされた転写因子を強調したことを示し、それらのレギュロンは、支配的な若いWT細胞における上方調節された遺伝子について濃縮された。

【図22E】競合上の優位性を確立するためにSCENICを介して予測される重要な転写因子、及びそれらの群間の相対的な活動を示す。

【図22F】表される下流標的及びそれらの機能的シグナル伝達経路を有する調節ネットワークを示す。標的は、図22Bの協調されたモジュールに属し、それらの発現は、図22Eの少なくとも1つの他の重要な転写因子によって制御される。NES:ネットワーク

10

20

30

40

50

濃縮スコア。

【図23A-23C】老化したヒトグリアが、誘導性アポトーシスによってそれらのより若い対応物によって排除されることを示す。

【図23A】若いWTグリア（EGFP⁺、緑）と老化したWTグリア（mCherry⁺、赤）との境界において、アポトーシスTUNEL⁺（白）細胞のより高い発生率が、老化した集団において明らかであることを示す。スケール：100 μm。

【図23B】これらの異なる集団間の競合界面のより高い倍率が、選択的にアポトーシスを受ける常在グリアを示すことを図示する。スケール：50 μm。

【図23C】TUNEL⁺細胞の定量化が、それらのより若い同種同系対応物と、かつより若い細胞でチャレンジされていない老化したWTキメラ対照と比較して、老化した常在WTグリア間でのTUNEL⁺細胞の著しく高い発生率を示すことを示す。定量化は、60週時点及び80週時点からプールされた試料に対して行った（全ての実験群についてn=5）。Sidakの多重比較検定を用いた一元配置分散分析；データは、平均値±SEMとして示され、個々のデータ点を有する。

【図24A-24B】キメラ宿主からの移植されたヒト細胞の単離を示す。

【図24A】キメラ宿主の線条体からのヒト細胞の単離に関する実験ワークフローを示す概略図である。

【図24B】解離したキメラ線条体から抽出されたヒト細胞のFACS濃縮に用いられるゲーティング戦略の例を示す。生細胞は、DAPI組み込みの欠如によって識別された。これらのうち、ヒト細胞を、それらのそれぞれの蛍光レポーター（EGFP⁺又はmCherry⁺）のそれらの発現に基づいて選別し、単一細胞配列決定及び下流分析のために採取した。

【図25A-25F】ヒト胎児GPCのバルクRNA-Seq特性評価を示す。

【図25A】CD140a⁺、CD140a⁻、及びA2B5⁺/PSA-NCAM⁻選択された妊娠第2期のヒト胎児脳単離物のバルク及びscRNA-配列決定のワークフローを示す。

【図25B】2つのバッチにわたる全ての試料の主成分分析を示す。

【図25C】CD140a⁺対CD140a⁻及びCD140⁺対A2B5⁺/PSA-NCAM⁻差次的発現遺伝子セット（p<0.01及び絶対log2倍率変化>1）のVenn図を示す。

【図25D】両方の遺伝子セットについての重要なIngenuity Pathway Analysisの用語を示す。サイズは-log10p値を表し、色は活性化Zスコア（青、CD140a⁺；赤、A2B5⁺又はCD140a⁻）を表す。

【図25E】両方の遺伝子セットの重要な遺伝子のlog2倍率変化を示す。欠落しているバーは、重要ではなかった。

【図25F】1Eにおける選択された遺伝子の100万当たりの形質転換転写物（TPM）のヒートマップを示す。

【図26A-26H】CD140a及びA2B5選択されたヒト胎児GPCの単一細胞RNA配列決定を示す。

【図26A】20週齢のヒト胎児VZ/SVZに由来するFACS単離hGPCのscRNA-Seq分析中に識別された一次細胞型のUMAPプロットを示す。

【図26B】PSA-NCAM⁻/A2B5⁺ヒト胎児細胞のみのUMAPを示す。

【図26C】CD140a⁺ヒト胎児細胞のみのUMAPを示す。

【図26D】細胞型選択的マーカー遺伝子のバイオリンプロットを示す。

【図26E】GPC対pre-GPC集団の火山プロットを示す。

【図26F】GPCとpre-GPCとの間の選択された、差次的に発現された遺伝子の特徴プロットを示す。

【図26F】選択された、著しく濃縮されたGPC及びpre-GPCのIPA用語を示し、それらの-log10p値及び活性化Zスコアを示す。

【図26H】胎児hGPCにおいて著しく活性化されると予測される転写因子の選択され

10

20

30

40

50

た特徴プロットを示す。相対的な転写因子レギュロン活性化は、SCENICパッケージを使用して計算されたとおりに表示される。

【図27A-27F】成体ヒトGPCが、転写的及び機能的に胎児GPCとは異なることを示す。

【図27A】ヒト成体及び胎児GPCのバルクRNA-Seq分析のワークフローを示す。

【図27B】3つのバッチにわたる全ての試料の主成分分析を示す。

【図27C】成体対胎児の両方の差次的発現遺伝子セットのVenn図を示す。

【図27B】キュレートされた用語及び遺伝子のIPAネットワークを示す。ノードサイズは、ノードの程度に比例する。ラベルの色は、成体（赤）又は胎児（青）集団のいずれかにおける濃縮に対応する。

【図27E】モジュールごとの重要なIPA用語のバープロットを示す。Zスコアは、胎児（青）又は成体（赤）hGPCにおける予測される活性化を示す。

【図27F】ネットワーク遺伝子のTPMのlog2倍率変化及びヒートマップのバープロットを示す。

【図28A-28G】転写因子活性の推論が、成体hGPC同一性の確立における一連の転写リプレッサーを関与させることを示す。

【図28A】胎児及び成体GPCにおいて活性であると予測される著しく濃縮された転写因子の正規化された濃縮スコアプロットを示す。各ドットは、モチーフであり、そのサイズは、そのモチーフが活性であると予測される遺伝子の数を示し、色は、そのモチーフが濃縮されていることがわかったプロモーターの周りのウィンドウを表す。

【図28B】濃縮されたTF TPMのヒートマップを示す。

【図28C】両方の胎児hGPC単離物について、成体GPCとの対数倍の変化を示す。

【図28D-G】以下に分けられた、キュレートされた遺伝子の予測される直接転写因子活性を示す：（図28D）胎児活性化因子、（図28E）胎児リプレッサー、（図28F）成体活性化因子、及び（図28G）成体リプレッサー。色は、成体（赤）又は胎児（青）のhGPCのいずれかでの差次的発現を示し、形状は、ノードのタイプ（八角形、リプレッサー；長方形、活性化因子；楕円形、他の標的遺伝子）を決定する。四角で囲まれた遺伝子、及び丸で囲まれた遺伝子は、グリア前駆細胞／乏突起膠細胞同一性、老齢／増殖標的、又は活性化されたともみなされた上流若しくは下流TFのいずれかに寄与する機能関連遺伝子を示す。

【図29A-29D】成体hGPC濃縮リプレッサーを介した、老化したGPCトランスクリプトームの誘導を示す。

【図29A】4つの異なるドキシサイクリン（DOX）誘導性EGFPレンチウイルス発現ベクターの構造を概説する概略図を示し、各々が以下の転写リプレッサーのうちの1つをコードする：E2F6、IKZF3、MAX、又はZNF274。

【図29B】人工多能性幹細胞（iPSC）由来のhGPC培養物（株C27）を、単一のレンチウイルス又はビヒクルで1日間形質導入し、次いで実験の残りの部分をDOXで処置したことを示す。DOX誘導された導入遺伝子発現の開始の3、7、及び10日後に、hGPCを、qPCRのためにFACSを介して単離した。

【図29C】マッチした時点対照と比較して、各転写因子の発現を示す、DOX処置細胞のqPCRを示す。

【図29D】選択された老化関連遺伝子のqPCR倍率変化ヒートマップを示す。時点内に、対照との比較を、細胞バッチ効果の回帰に続く線形モデルの事後最小二乗平均試験を介して計算した。FDR調整p値：* < 0.05、** < 0.01、*** < 0.001。

【図30A-30E】miRNAが、転写因子活性と並行して成体GPC転写分岐を駆動することを示す。

【図30A】ヒトA2B5+成体及びCD140a+胎児GPCからのmiRNAマイクロアレイ試料の主成分分析を示す。

10

20

30

40

50

【図 3 0 B】差次的に発現された *miRNA* の $\log_2$ 倍率変化バープロット及びヒートマップを示す。

【図 3 0 C】予測された遺伝子標的の平均 $\log_2 FC$ と比較した、*miRNA* の濃縮の特性評価バブルプロットを示す。

【図 3 0 D】胎児濃縮 *miRNA* 及びそれらの予測された標的の、キュレートされたシグナル伝達ネットワークを示す。

【図 3 0 E】成体濃縮 *miRNA* 及びそれらの予測された標的の、キュレートされたシグナル伝達ネットワークを示す。

【図 3 1 A - 3 1 E】 $CD140a+$ 又は $A2B5+ / PSA-NCAM$ - 選択によるヒト胎児 GPC の濃縮を示す。

【図 3 1 A】 $CD140a+$ 及び $A2B5+$ 胎児 GPC の主成分分析を示す。

【図 3 1 B】著しい $A2B5$ (緑) 及び $CD140a$ (青) 濃縮遺伝子を示す火山プロットを示す。

【図 3 1 C】 $CD140a+$ 及び $CD140a-$ 胎児細胞の主成分分析を示す。

【図 3 1 D】著しい $CD140a-$ (マゼンタ) 及び $CD140a$ (ブルー) 濃縮遺伝子を示す火山プロットを示す。

【図 3 1 E】両方の遺伝子セットにおける著しい上方調節遺伝子及び下方調節遺伝子の攪乱プロットを示す。

【図 3 2 A - 3 2 D】単一細胞 RNA-Seq 品質フィルタリングを示す。

【図 3 2 A】フィルターされていない $A2B5+ / PSA-NCAM$ - キャプチャのバイオリンプロットを示す。

【図 3 2 B】フィルターされていない $CD140a$ scRNA-seq キャプチャのバイオリンプロットを示す。

【図 3 2 C】 $A2B5+ / PSA-NCAM$ - キャプチャの品質濾過 (15% 未満のミトコンドリア遺伝子発現パーセント及び 500 個を超える固有の遺伝子) に続くバイオリンプロットを示す。

【図 3 2 D】品質濾過 (15% 未満のミトコンドリア遺伝子発現パーセント及び 500 個を超える固有の遺伝子) $CD140a+$ キャプチャ後のバイオリンプロットを示す。

【図 3 3 A - 3 3 C】 $A2B5+ / PSA-NCAM$ - 対 $CD140a+$ 胎児 hGPC の単一細胞 RNA 配列決定を示す。図 3 3 A は、 $A2B5+$ 及び $CD140a+$ 胎児 hGPC の UMAP プロットを示す。図 3 3 B は、各選別パラダイム単離物における細胞型の頻度を示す。図 3 3 C は、 $CD140a+$ 胎児 hGPC 単離物と $A2B5+$ 胎児 hGPC 単離物との間の、擬似バルク $\log_2$ 倍率変化に対する、差次的に発現されたバルク RNA-Seq $\log_2$ 倍率変化の散布プロットを示す。

【図 3 4】胎児又は成体 hGPC における活性転写因子の共有モチーフを示す。胎児及び成体 GPC における全ての予測される活性転写因子のマトリックス。サイズ及び色は、転写因子間で共有されるモチーフの程度を示す。

【図 3 5】成体リプレッサーアイソフォーム発現を示す。各 GPC 群における成体リプレッサーアイソフォームをコードする全てのタンパク質の 100 万当たりの転写物 (TPM) のバープロット。

【図 3 6】iPSC 由来の hGPC のバルク RNA-Seq が、加齢関連遺伝子の調和した豊富さを示す。iPSC 由来の hGPC (C27) を、 $CD140a+$ FACS を介して単離し、バルク RNA 配列決定を介してアッセイした。活性転写因子コホート内のものを含む、関連するグリア加齢関連遺伝子の豊富さは、胎児及び成体 hGPC データとともに表示される。

【図 3 7 A - 3 7 B】*miRNA* の転写因子調節が、グリア老化遺伝子発現の転写後調節を提供することを示す。図 3 7 A は、差次的に発現された成体対胎児 GPC *miRNA* の上流であると予測される、重要な成体対胎児 GPC 転写因子の $\log_2 FC$ バイオリンプロットを示す。図 3 7 B は、図 2 6 からの識別された転写因子のネットワーク、及び差次的に発現された成体対胎児 hGPC *miRNA* のそれらの予測された調節を示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0026】

本開示は、加齢性乏突起膠細胞喪失、加齢性星状膠細胞喪失、又は加齢性白質喪失を含む、乏突起膠細胞喪失、星状膠細胞喪失、又は白質喪失によって媒介される状態を治療するための組成物及び方法に関する。本開示はまた、（a）グリア前駆細胞若しくはその子孫を若返らせること、又は（b）グリア前駆細胞若しくはその子孫の発達可能性を高めることに関する。

【0027】

白質／乏突起膠細胞／星状膠細胞の喪失、及び関連障害によって媒介される状態

本開示のある特定の態様は、乏突起膠細胞喪失、星状膠細胞喪失、又は白質喪失によって媒介される状態又は障害を治療するための組成物及び方法に関する。そのような状態は、しばしば、中枢神経系（「CNS」）におけるミエリンの欠乏を伴う。そのような状態又は障害の例としては、対象における脱髄、不十分な髄鞘形成及び再髄鞘形成、又は髄鞘形成不全に関連する任意の疾患又は状態が挙げられる。そのような状態又は障害は、遺伝、獲得、又は加齢プロセス、すなわち、加齢性であり得る。いくつかの実施形態では、この状態は、正常、そうでなければ健常な加齢の環境において、乏突起膠細胞喪失、星状膠細胞喪失、又は白質萎縮として定義されるか、又はそれを特徴とする加齢性白質疾患の状態である。

【0028】

人間では、加齢は経時的な人間の変化が蓄積されることを表し、身体的、心理的、及び社会的な変化を包含し得る。加齢は、様々な神経変性疾患にしばしば見られるCNSにおける脱髄を含む、がん、糖尿病、心血管疾患、脳卒中などのヒト疾患のリスクを増加させる。したがって、本開示のいくつかの実施形態では、この状態又は障害は、加齢性乏突起膠細胞喪失、加齢性星状膠細胞喪失、又は加齢性白質喪失によって媒介される。

【0029】

CNSにおける脱髄は、遺伝子変異（白質ジストロフィー）、自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症）、又は外傷（例えば、外傷性脳損傷、脊髄損傷、又は虚血性脳卒中）にตอบสนองして生じ得る。ミエリン機能の混乱は、自閉症スペクトラム障害（ASD）、アルツハイマー病、ハンチントン病、多系統萎縮症、パーキンソン病、脆性X症候群、統合失調症、及び様々な白質ジストロフィーなどの神経障害及び精神障害において重要な役割を果たし得る。

【0030】

白質ジストロフィーは、ミエリンの異常な産生、処理、又は発達に起因し、遺伝的欠陥（変異）の結果である、まれな、主に遺伝性の神経障害の群である。一部の形態は、出生時に存在するが、他の形態は、子供が年をとるまで症状を引き起こさない場合がある。いくつかは、主に成体に影響を及ぼす。白質ジストロフィーには、カナバン病、ペリザイウス・メルツバッハー病、基底神経節及び小脳の萎縮を伴う低髄鞘形成、クラッペ病（グロボイド細胞白質ジストロフィー）、X連鎖性副腎白質ジストロフィー、異染色性白質ジストロフィー、ペリザイウス・メルツバッハー様疾患（又は低髄鞘形成性白質ジストロフィー2）、ニーマン・ピック病C型（NPC）、自律神経疾患を伴う常染色体優性白質ジストロフィー（ADLD）、4H白質ジストロフィー（POL I E I E I 関連白質ジストロフィー）、ゼルウェガススペクトラム障害（ZSD）、中枢神経系低髄鞘形成又はCACHを伴う小児失調症（白質消失病又はVWMDとも呼ばれる）、セレブレテンディン性黄色腫症（CTX）、アレクサンダー病（AXD）、SOX10関連末梢脱髄性神経症、中枢性脱髄性白質ジストロフィー、ワーデンバーグ症候群、ヒルシュング病（PCWH）、成体ポリグルコサン小体病（APBD）、神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症（HDL S）、エカルディ・グティエール症候群（AGS）、及び成体レフサム病が含まれる。

【0031】

本明細書に記載の方法による治療に好適な対象としては、加齢性乏突起膠細胞喪失、加

10

20

30

40

50

齢性星状膠細胞喪失、又は加齢性白質喪失によって表され得る、ミエリンの欠乏によって媒介される状態を有する任意のヒト対象が挙げられる。

【0032】

別の実施形態では、ミエリンの欠乏によって媒介される状態は、小児白質ジストロフィー、リソソーム蓄積症、先天性脱髄、脳性麻痺、炎症性脱髄、感染後及びワクチン接種後の白質脳炎、放射線療法又は化学療法による脱髄、及び血管脱髄からなる群から選択される。

【0033】

更なる実施形態では、ミエリンの欠乏によって媒介される状態は、髄鞘形成を必要とする。別の実施形態では、ミエリンの欠乏によって媒介される状態は、再髄鞘形成を必要とする。いくつかの実施形態では、再髄鞘形成を必要とする状態は、多発性硬化症、視神経脊髄炎、横断脊髄炎、視神経炎、皮質下脳卒中、糖尿病性白質脳症、高血圧性白質脳症、加齢性白質病、白質認知症、ピンスワンガー病、脊髄損傷、放射線療法又は化学療法による脱髄、感染後及びワクチン接種後の白質脳炎、脳室周囲白質軟化症、及び脳性麻痺からなる群から選択される。

【0034】

更なる実施形態では、ミエリンの欠乏によって媒介される状態は、神経変性疾患である。いくつかの実施形態では、神経変性疾患は、ハンチントン病である。ハンチントン病は、壊滅的な精神医学的及び認知的悪化を伴う容赦ない漸進的な運動障害を特徴とする常染色体優性神経変性疾患である。ハンチントン病は、線条体の主要な出力ニューロンである、GABA作動性中型棘突起ニューロンの著しい喪失に関連する、一貫した重度の新線条体の萎縮に関連する。ハンチントン病は、ハンチンチン遺伝子の第1のエクソンにおける異常に長いCAG反復拡大を特徴とする。変異型ハンチンチンタンパク質のコードされたポリグルタミン拡大は、その正常な機能及びタンパク質-タンパク質相互作用を破壊し、最終的には、新線維症で最も急速に明らかになる広範な神経病理をもたらす。

【0035】

本出願に従って治療可能な他の神経変性疾患としては、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、多系統萎縮、及び筋萎縮性側索硬化症が挙げられる。

【0036】

一実施形態では、ミエリンの欠乏によって媒介される状態は、神経精神疾患である。いくつかの実施形態では、神経精神疾患は、統合失調症である。統合失調症は、人の思考、感情、行動に影響を与える深刻な精神疾患である。統合失調症の症状は、一般に以下の3つのカテゴリーに分類される：(1)知覚の変化を含む精神病症状、(2)動機付けの喪失、無関心、楽しみの欠如を含む陰性症状、及び(3)注意力、集中力、及び記憶力の問題を含む認知症状。本出願に従って治療可能な他の神経精神疾患としては、自閉症スペクトラム障害及び双極性障害が挙げられる。

【0037】

上記のミエリン関連障害は、遺伝性又は後天性又は加齢性であり、何百万人もの人々に影響を及ぼし、罹患した個人及びその家族に重い負担を課している。これらの障害の多くの根底にある病理学的プロセスは、依然としてほとんど理解されておらず、疾患修飾療法はほとんど存在しない。これらの障害を治療するための治療学に対する満たされていないニーズがある。本開示は、脳内の老化した又はより古いグリア前駆細胞の競合置換、及びグリア前駆細胞又はそれらの子孫細胞の若返りなど、いくつかの方法でこれらのニーズに対処する。

【0038】

成体の脳におけるグリア前駆細胞の競合置換

本開示のいくつかの態様は、グリア前駆細胞の競合置換に関する。発達及び腫瘍発生における細胞集団間の競合は、十分に確立されているが、成体の脳における細胞間の競合はほとんど研究されていない。特に、同種移植されたヒトグリアが、成体ヒト脳における治療用置換を達成するために、罹患した細胞を打ち負かすことができるかどうかは不明であ

る。

【0039】

本明細書に開示されるように、本発明者らは、ヒト胚性幹細胞（hESC）から産生される健常な蛍光色素分子タグ付きの野生型（WT）hGPCを、ハンチントン病（HD）由来のhESCから産生されるスペクトル的に異なる変異型HTT発現hGPCで新生児にキメラ化された成体マウスの線条体に生着させた。WT hGPCは、それらのヒトHDの対応物を打ち負かし、最終的に排除し、健全なグリアで宿主線条体を再増殖させた。単一細胞RNA-Seqにより、WTドナーhGPCが、常在HD由来のグリアとの相互作用時に、YAP1/MYCで定義された支配的な競合表現型を獲得したことが明らかになった。競合的な成功は、主に、成体で移植されたWT hGPCが、新生児に移植されており、したがってより古かった常在同種同系WT細胞を打ち負かすという点で、競合集団間の年齢差に依存していた。これらのデータは、老化した及び罹患したヒトグリアが、より若い健常なhGPCによって成体の脳で広く置き換えられ得ることを示し、新しく生成されたグリア前駆細胞の移植が、老化した並びに罹患したヒトグリアの置換のための広範な治療用プラットフォームとして使用され得ることを示唆している。

10

【0040】

グリア機能不全は、広範囲の神経学的状態の原因となる要因である。星状膠細胞性及び乏突起膠細胞性病理は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）及びハンチントン病（HD）、並びに統合失調症及び双極性疾患などの多様な状態を含むいくつかの神経変性障害及び神経精神障害の両方の発生及び進行に関連付けられている。そのような状態では、健常なグリア前駆細胞（hGPC）による罹患したグリアの置換は、新しい星状膠細胞及び乏突起膠細胞を生じさせると同時に、それらの宿主を分散させ、コロニーを形成する能力を考慮すると、実際の治療的利益をもたらし得る。しかしながら、ヒトGPCは、様々な実験的治療用モデルにおいてそれらのマウスの対応物を打ち負かし、置き換えることができるが、同種移植されたヒトGPCが、罹患しているか、又はしていない他のヒト細胞を置き換えることができるかどうかは不明である。

20

【0041】

以下の実施例に開示されるように、ヒトグリアキメラマウスを使用して、HDを有する対象に由来するhGPCで新生児にキメラ化された成体マウスの線条体に健常なhGPCを生着させることによって、インビボで健常なヒトグリアと罹患したヒトグリアとの間の競合をモデル化した。HDは、変異型CAG反復拡大ハンチンチン（mHTT）遺伝子の発現に起因する、プロトタイプの単発性神経変性疾患である。

30

【0042】

グリア病理は、HDのシナプス機能不全に因果的に関与している。移植された健常なhGPCによるmHTT発現マウスグリアの置換は、トランスジェニックマウスモデルにおけるHD表現型の態様を救出するのに十分であった。本明細書に開示されるように、本発明者らは、ヒト胚性幹細胞（hESC）の同胞株に由来する、遺伝的にタグ付けされた野生型（WT）及びmHTT発現hGPCを使用して、健常なWT hGPCがインビボで罹患したHD hGPCを置き換えることができるかどうかを尋ねた。健常なhGPCが、HD hGPCでキメラ化された成体マウスの線条体に送達されたとき、健常なhGPCは、既に常在するHD hGPCを打ち負かし、移動させることが見出された。しかしながら、WTドナー細胞は、それらが置き換えようとしていた常在宿主グリアよりも効果的により若かったため、細胞年齢の差が競合結果にも寄与する可能性があるかどうかを尋ねた。これは、同じ健常な株に由来する別々にタグ付けされたグリアを新生児に生着された成体マウスに移植された健常な若いhGPCが、容赦なくそれらのより古い同種同系対応物を置き換えたという点で、そうであることがわかった。より若い勝ったhGPC集団及びより古い負けたhGPC集団の単一細胞RNA配列分析（scRNA-seq）は、勝ったWT hGPC及び負けたHD hGPCの差次的に発現された経路と重複する一連の差次的に発現された経路を明らかにし、競合的に支配的なGPCSの共通の転写シグネチャを示唆した。これらのデータは、クローン的に異なるグリア集団間の動的競合が成

40

50

熟した成体の脳で生じる可能性があり、それによって、既存のグリアと罹患したグリアの両方の置換が、若い健常な h G P C の導入によって達成される可能性があることを示している。

【 0 0 4 3 】

多種多様な神経変性障害及び神経精神障害へのグリア病理の寄与に照らして、本発明者らは、ここで、治療戦略としての同種異系グリア置換の可能性を評価するために、インビボでの野生型及び罹患したヒト G P C の相対的適合性を確立しようとした。本開示のいくつかの部分は、H D におけるグリア病理の十分に説明された役割を考慮して、ハンチントン病に焦点を当てた。H D h G P C で既にキメラ化された脳に W T h G P C を導入すると、W T 細胞が競合的に支配し、最終的に既に常在する H D グリア前駆細胞を置き換えることがわかった。健常な細胞の選択的拡大は、組織からの常在 H D グリアの能動的排除と関連しており、既に常在する罹患した対応物と比較して健常なドナー細胞の持続的な増殖上の優位性によって裏付けられた。

10

【 0 0 4 4 】

単一細胞 R N A 配列分析は、インビボで H D グリアに遭遇する健常な W T h G P C の支配が、成功した細胞間競合の典型的なシグネチャの発現と関連していることを明らかにした。しかし、驚くべきことに、既に常在する（より古い）及び新しく導入された（より若い）ドナー h G P C の相対年齢に対して制御すると、新生児でキメラ化された成体ネオ線条体に移植された W T h G P C が、別々にタグ付けされているがそうでなければ同種同系 W T h G P C とともに、同様に既に常在する h G P C を支配し、置き換えることが見出された。この観察は、細胞の若さが競合的な成功の重要な決定因子であり、かつドナー h G P C 集団が宿主の h G P C 集団に置き換える能力の重要な決定因子であることを示唆した。したがって、移植された若い W T h G P C は、既に常在するより古い H D 又は同種同系 W T h G P C によってチャレンジされたかどうかにかかわらず、インビボで支配的な競合体表現型の遺伝子発現シグネチャを獲得し、実際、本明細書に記載の分析は、細胞の若さが疾患遺伝子型よりも競合適合性の更により強い決定因子であることを示唆した。

20

【 0 0 4 5 】

これらの観察は、このプロセスが、より適合性の低いクローンがそれらのより適合性の高い近隣によって感知され、組織から排除されるが、ここでは成体の脳で動的に現れる、進化的に保存された選択プロセスである発達細胞競合の再現によって駆動されたことを示唆している。このプロセスは、より速く成長し、より競合的に適合する近隣による、比較的ゆっくりと成長する細胞の積極的な排除を含むことが、様々なシステムで示されている。成体の脳において、W T h G P C は、典型的には、進行中の増殖波においてそれらの移植部位から拡大したことが認められた。これらのより若い h G P C は、後者が m H T T 発現 H D 細胞であるか、又は数ヶ月前に移植された同種同系 W T 細胞であるかにかかわらず、これまで安定して常在していた、したがってより古い対応物を大幅に排除した。どちらの場合も、より若い細胞は、最終的に健常な新しい h G P C で宿主の脳にコロニーを再形成し（図 4 及び 17）、どちらの場合も、より若いドナー細胞は、競合支配に関連する遺伝子セットを差次的に発現した（図 20 ~ 22）。特に、より若い、成体で移植された h G P C の競合支配は、予測される M Y C 及び Y A P 1 経路活性のレベルの増加と関連していた。これらのデータは、マウス胚における細胞間競合に顕著な平行性を提供し、ここでは、欠陥細胞は、競合チャレンジ中の差次的 M Y C 発現の獲得に続いて近隣によって排除され、Y A P 及び M Y C は、相互作用して、細胞間競合中の競合結果を決定する。実際、Y A P 1 の上流及び下流の両方の転写物を含む、「勝者」W T h G P C における Y A P 1 経路メンバーの同時濃縮は、H i p p o 経路が成体ヒト脳におけるグリア置換の調節のための特に有望な標的であり得ることを示唆している。実際、これらの観察は、肝臓再増殖研究の結果と並行しており、ここでは、マウス胎児肝前駆体が、より若い宿主よりも古い宿主に同種移植されたとき、より速く、より広範囲の置換を駆動することが見出され、M Y C 及び Y A P 1 活性は、競合的な成功の主要な決定因子であった。したがって、Y

30

40

50

A P 1 及び M Y C を h G P C 間の競合の重要な調節因子として識別することにより、これらの細胞を脳に送達した後のドナー細胞のコロニー形成の競合上の優位性、速度、及び程度を更に増強するための戦略を可能にし得る。

【 0 0 4 6 】

観察されたより若い h G P C による常在グリアの競合置換は、マウス脳内でのそれらの拡大もまた相対的な増殖上の優位性によって維持され、接触時にそれらのマウス対応物を排除することで進行するため、移植されたヒト G P C によるマウスグリア置換の競合置換に類似する。異種移植の環境と同様に、若い W T h G P C の勝った集団は、アポトーシス死、及びより古い同種同系 W T 又は同胞 H D 細胞から構成されるかどうかにかかわらず、常在する負けた集団の局所的な排除を誘発するように見える。より若い W T 細胞の進行波面に対する垂死宿主細胞の相対的な局在は、後者が、接触依存的手段を介して既に常在する h G P C の死を誘発することを示唆している。相対的な細胞適合性のそのような接触依存の発現のための潜在的なメカニズムは、様々なモデルで記載されており、Y A P の P i e z o 1 依存の調節により形質導入される可能性のある、F w r アイソフォームの選択的発現、並びに機械的シグナルを含む。加えて、より若い h G P C に直面したときの H D 及び同種同系 h G P C の両方の選択的排除は、細胞競合中の「敗者」細胞によるリボソーム転写物の喪失と一致し、細胞適合性の調節へのリボソームタンパク質転写の寄与を強調する、リボソームコード転写物のそれらの枯渇と並行していた。まとめると、これらのデータは、翻訳機構の転写制御が、それが発達中であるのと同じくらい、成体の脳における細胞間競合において重要であることを示唆する。

【 0 0 4 7 】

これらの観察は、脳が、以前に認識されているよりもはるかに動的な構造環境であり、グリア前駆細胞間の細胞間競合、そして潜在的にそれらの由来する星状膠細胞が、発達中と同様に成体の脳の維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。実際、本発明者らが気付いた、より古い常在細胞と比べた若い常在細胞のこの競合上の優位性は、大きく発達を模倣しているようであり、G P C の連続した波が互いに競合し、最も古いものは出生によって脳から大部分根絶され、より若い後継者に置き換えられている。成体期では、分裂するグリア前駆細胞間の体細胞変異が、一方の娘系統又は他方に選択的なクローン優位性をもたらし、支配的な娘の子孫による集団の容赦ない競合置換をもたらす可能性があることを同様に想定し得る。このシナリオは、発がんの発症及び潜在的なグリア腫形成の典型であるが、より適合した非腫瘍性の近隣による腫瘍細胞の競合的排除を介して、腫瘍抑制にも関与し得る。差次的に適合した h G P C 間のそのような動的競合のプロセスが、いくつかの統合失調症などのグリアが関与する非腫瘍性成人発症性脳障害、及び H D 自体の発症と同様に関与し得るかどうかを検討することは特に興味深い。実際、そのようなメカニズムは、グリア病理が関与するそれらの神経変性障害及び神経精神障害の中でしばしば注目される疾患進行の後期段階での加速に寄与し得る。広い意味で、これらのデータは、常在する、そのためより古い罹患したヒトグリアが、より若くより健常な h G P C の導入後に置き換えられる可能性があることを示唆する。実際、そのようなグリア置換は、グリア細胞が因果的に関与しているヒト脳のそれらの疾患の細胞ベースの治療に向けた実行可能な戦略を提供し得る。

【 0 0 4 8 】

グリア前駆細胞又はその子孫の若返り

本開示のいくつかの態様は、グリア前駆細胞又はその子孫細胞の若返りに関する。ヒトグリア前駆細胞は、妊娠第 2 期中に出現して、成体期を通して実質プールが残る脳にコロニーを形成する。胎児 h G P C は、高度に移動性及び増殖性であるが、それらの拡大能力は、年齢とともに、並びに脱髄関連転換に続いて減少する。

【 0 0 4 9 】

本明細書に開示されるように、それらの動員能力の低下の基礎を決定するために、バルク及び単一細胞 R N A 配列決定を使用して、胎児及び成体 h G P C の転写プログラムを比較した。その目的のために、分化の開始及び老齢に関連する転写プログラムと同時に、増

殖能力の喪失を示唆する遺伝子発現における加齢に関連する変化を識別した。より具体的には、成体hGPCは、MYCを中心とし、ZNF274、MAX、IKZF3、及びE2F6によって調節される抑制的転写因子ネットワークを発達させた。これらのリプレッサーのいくつかの例示的な核酸配列及びアミノ酸配列を以下に示す。

E 2 F 6

c D N A（配列番号4）：

```
ATGAGTCAGCAGCGGCCGGCGAGGAAGTTACCCAGTCTCCTCCTGGACCCGACGGAGGAGACGGTTTCGCC
GTCGGTGCCGAGACCCCATCAACGTGGAGGGCCTGCTGCCATCAAAAAATAAGGATTAATTTAGAAGATAA
TGTACAATATGTGTCCATGAGAAAAGCTCTAAAAGTGAAGAGACCTCGTTTTGATGTATCGCTGGTTTAT
TAACTCGAAAATTTATGGATCTTGTCTAGATCTGCTCCCGGGGTATTCTTGACTTAAACAAGGTTGCAA
CGAACTGGGAGTCCGAAAGCGGAGAGTGTATGACATCACCAATGTCTTAGATGGAATCGACCTCGTTGA
AAAGAAATCCAAGAACCATTATTAGATGGATAGGATCTGATCTTAGCAATTTTGGAGCAGTTCCCCAACAA
AAGAAGCTACAGGAGGAACCTTCTGACTTATCAGCAATGGAAGATGCTTTGGATGAGTTAATTAAGGATT
GTGCTCAGCAGCTGTTTGAGTTAACAGATGACAAAGAAAATGAAAGACTAGCATATGTGACCTATCAAGA
CATTTCATAGCATTTCAGGCCTTCCATGAACAGATCGTCATTGCAGTTAAAGCTCCAGCAGAAACCAGATTG
GATGTTCCAGCTCCCAGAGAAGACTCTATCACAGTGCACATAAGGAGCACCAACGGACCTATCGATGTCT
ATTTGTGTGAAGTGGAGCAGGGTCAGACCAGTAACAAAAGGTCTGAAGGTGTCGGGACCTCTTCATCTGA
GACACTCATCCAGAAGGCCCTGAGGAAGAAGAAAATCCTCAGCAAAGTGAAGAATTGCTTGAAGTAAGC
AACTGA
```

10

アミノ酸（配列番号5）：

```
MSQORPARKLPSSLDDPTEETVRRRCRDPINVEGLLPISKIRINLEDNVQYVSMRKALKVKRPRFDVSLVY
LTRKFMDLVRSAPEGILDLNKVATKLGVRRRVYDITNVLDGIDLVEKKSKNHIRWIGSDLNFGAVPQQ
KKLQEELSDLSAMEDALDELIKDAQQLFELTDDKENERLAYVTYQDIHSIQAFHEQIVIAVKAPAETRL
DVPAPREDSITVHIRSTNGPIDVYLCEVEQQTSTNKRSEGVGTSSSESTHPEGPEEEENPQQSEELLEVS
N
```

20

I K Z F 3

c D N A（配列番号6）：

```
ATGGGAAGTGAAAGAGCTCTCGTACTGGACAGATTAGCAAGCAATGTGGCAAAACGAAAAAGCTCAATGC
CTCAGAAATTCATTGGTGAGAAGCGCCACTGCTTTGATGTCAACTATAATTCAAGTTACATGTATGAGAA
AGAGAGTGAGCTCATACAGACCCGCATGATGGACCAAGCCATCAATAACGCCATCAGCTATCTTGGCGCC
GAAGCCCTGCGCCCTTGGTCCAGACACCGCCTGCTCCACCTCGGAGATGGTTCCAGTTATCAGCAGCA
TGTATCCCATAGCCCTCACCCGGGCTGAGATGTCAAACGGTGCCCTCAAGAGCTGGAAAAGAAAAGCAT
CCACCTTCCAGAGAAGAGCGTGCCTTCTGAGAGAGGCCTCTCTCCCAACAATAGTGGCCACGACTCCACG
GACACTGACAGCAACCATGAAGAACGCCAGAATCACATCTATCAGCAAAATCACATGGTCCTGTCTCGGG
CCCGAATGGGATGCCACTTCTGAAGGAGGTTCCCGCTCTTACGAACTCCTCAAGCCCCCGCCCATCTG
CCCAAGAGACTCCGTCAAAGTGATCAACAAGGAAGGGGAGGTGATGGATGTGTATCGGTGTGACCACTGC
CGCGTCTCTTCTGGAATATGTGATGTTACGATTACATGGGCTGCCACGGCTTCCGTGACCCCTTTCG
AGTGTAACATGTGTGGATATCGAAGCCATGATCGGTATGAGTTCTCGTCTCACATAGCCAGAGGAGAAC
CAGAGCCCTGCTGAAGTGA
```

30

アミノ酸（配列番号7）：

```
MGSERALVLDRLASNVAKRKSSMPQKFIDGEKRHCFDVNYNSSYMEKESELIQTRMMDQAINNAISYLGA
EALRPLVQTPPAPTSEMVPVISSMYPIALTRAEMSNGAPQELEKKSIIHLPEKSVPSERGLSPNNSGHDST
DTDSNHEERQNHIIYQQNHMVLSRARNGMPLLKEVPRSYELLKPPPICPRDSVKVINKEGEVMDVYRCDHC
RVLFLDYVMFTIHMGCGRFRDPFECNMGYRSHDRYEFSSHIARGEHRALLK
```

40

M A X

c D N A（配列番号8）：

50

ATGAGCGATAACGATGACATCGAGGTGGAGAGCGACGAAGAGCAACCGAGGTTTCAATCTGCGGCTGACA
AACGGGCTCATCATAATGCACTGGAACGAAAACGTAGGGACCACATCAAAGACAGCTTTCACAGTTTGCG
GGACTCAGTCCCATCACTCCAAGGAGAGAAGCTCTATTTCTCTTTTGGAATTGTGTACTCCTGTCCTT
CATCGTCAAAGTTTGATGCAGAAATGCCACACCTTCATTTCAAGCTACCAAGTGCACAAGAAAAAAGAAT
GCAAGATTTAA

アミノ酸（配列番号 9）：

MSDNDDIEVESDEEQPRFQSAADKRAHHNALERKRRDHIKDSFHSLRDSVPSLQGEKLYFLFWKLCTPVL
HRQSLMQKCHTFISSYQVHKKKECKI

10

Z N F 2 7 4

c D N A（配列番号 10）：

ATGCTGGAGAACTACAGGAACCTGGTCTCAGTGGAACATCAGCTTTCCAAACCAGATGTGGTATCTCAGT
TAGAGGAGGCAGAAGATTTCTGGCCAGTGGAGAGAGGAATTCCTCAAGACACCATTCAGAGTATCCTGA
GCTCCAGCTGGACCCTAAATTGGATCCTCTTCTGCTGAGAGTCCCCTAATGAACATTGAGGTTGTTGAG
GTCCTCACACTGAACCAGGAGGTGGCTGGTCCCCGGAATGCCAGATCCAGGCCCCATATGCTGAAGATG
GAAGCCTGAGTGCAGATGCCCCAGTGAAGCAGGTCCAACAGCAGGGCAAGCATCCAGGTGACCCTGAGGC
CGCGCGCCAGAGGTTCCGGCAGTTCGGTTATAAGGACATGACAGGTCCCCGGGAGGCCCTGGACCAGCTC
CGAGAGCTGTGTACCAGTGGCTACAGCCTAAGGCACGCTCCAAGGAGCAGATCCTGGAGCTGCTGGTGC
TGGAGCAGTTCTAGGTGCACTGCCTGTGAAGCTCCGGACATGGGTGGAATCGCAGCACCCAGAGAACTG
CCAAGAGGTGGTGGCCCTGGTAGAGGGTGTGACCTGGATGTCTGAGGAGGAAGTACTTCTGCAGGACAA
CCTGCCGAGGGCACCACCTGCTGCCTCGAGGTCACTGCCAGCAGGAGGAGAAGCAGGAGGATGCAGCCA
TCTGCCCAGTGACAGTGTCTCCCTGAGGAGCCAGTGACCTTCAGGATGTGGCTGTGGACTTCAGCCGGGA
GGAGTGGGGGCTGCTGGGCCCCGACACAGAGGACCGAGTACCGCATGTGATGCTGGAGACCTTTGGGCAC
CTGGTCTCTGTGGGGTGGGAGACTACACTGGAAAATAAAGAGTTAGCTCCAAATTCTGACATTCCTGAGG
AAGAACCAGCCCCCAGCCTGAAAGTACAAGAATCCTCAAGGGATTGTGCCTTGTCTCTACATTAGAAGA
TACCTTGCAGGGTGGGGTCCAGGAAGTCCAAGACACAGTGTTGAAGCAGATGGAGTCTGCTCAGGAAAA
GACCTTCTCAGAAGAAGCACTTTGACAACCGTGAGTCCCAGGCAAACAGTGGTGTCTTGCACAAACC
AAGTTTCGCTCCAGAAAATTGACAACCCCTGAGTCCCAGGCAAACAGTGGCGCTCTTGACACAAACCAAGT
TTTGCTCCACAAAATTCTCCTAGAAAACGATTGCGCAAACGTGACTCACAAGTTAAAAGTATGAAACAT
AATTCACGTGTAAAATTATCAGAAAGAGCTGTGAAAGGCAAAGGCCAAGGAAGGCAATGGTTGTAGGA
AAACCTTCAGTCGGAGTACTAAACAGATTACGTTTATAAGAATTCACAAGGGGAGCCAAGTTTGCCGATG
CAGTGAATGTGGTAAAATATTCCGGAACCCAAGATACTTTTCTGTGCATAAGAAAATCCATACCGGAGAG
AGGCCCTATGTGTGTCAAGACTGTGGGAAAGGATTTGTTTCAAGAGCTCTTCCCTCACACAGCATCAGAGAG
TTCATTCTGGAGAGAGACCATTTGAATGTCAGGAGTGTGGGAGGACCTTCAATGATCGCTCAGCCATCTC
CCAGCACCTGAGGACTCACACTGGCGCTAAGCCCTACAAGTGTGAGGACTGTGGAAAAGCCTTCCGCCAG
AGCTCCACCTCATCAGACATCAGAGGACTCACACCGGGGAGCGCCCATATGCATGCAACAAATGTGGAA
AGGCCTTCACCCAGAGCTCACACCTTATTGGGCACCAGAGAACCCACAATAGGACAAAGCGAAAGAAGAA
ACAGCCTACCTCATAG

20

30

アミノ酸（配列番号 11）：

MLENYRNLVSVEHQLSKPDVVSQLEEAEDFWPVERGIPQDTIPEYPELQLDPKLDPLPAESPLMNIEVVE
VLTNLQEVAGPRNAQIQALYAEDGSLADAPSEQVQQQKHPGDPEAARQRFQFRYKDMTGPREALDQL
RELCHQWLQPKARSKEQILELLVLEQFLGALPVKLRTWVESQHPENCQEVVALVEGVWMSSEEVLPAGQ
PAEGTTCLEVTAAQQEEKQEDAAICPVTVLPEEPVTFQDVAVDFSRREEWGLLGPTQRTEYRDVMLETFGH
LVSVGWETTLENKELAPNSDIPEEEPAPSLKVQESSRDCALSSSTLEDTLQGGVQEVQDVTVLKQMESAQEK
DLPQKKHFDNRESQANSALDNTQVSLQKIDNPESQANSALDNTQVLLHKIPPRKRLRKRSQVKSMKH
NSRVKIHQKSCERQKAKEGNGCRKTFSRSTKQITFIRIHKGSQVCRSECGKIFRNPRYFSVHKKIHTGE
RPYVCQDCGKGFVQSSSLTQHQRVHSGERPFECEGGRFTNDRSAISQHLRTHTGAKPYKCQDCGKAFRQ
SSHILIRHQRTHTGERPYACNKGCAFTQSSHLIGHQRTHNRTKRKKKQPTS

40

【0050】

ヒト i P S C 由来 G P C におけるこれらの因子の各々の個々の過剰発現は、グリア老化
中に生じた転写変化を複製した、増殖性遺伝子発現の喪失及び老齢のマーカーの誘導をも
たらした。平行 m i R N A プロファイリングは、成体選択的 m i R N A 発現シグネチャを

50

識別し、その標的は、老化したGPCの拡大能力を更に制約し得る。これらの観察は、hGPCがMYC抑制環境を獲得することによって老化することを示し、グリア拡大及び転換のこれらのリプレッサーの抑制が老化したhGPCの効果的な若返りを可能にすることを示唆している。

【0051】

グリア前駆細胞（GPC、乏突起膠細胞前駆細胞及びNG2細胞とも称される）は、発達中にヒト脳にコロニーを形成し、成体期を通して豊富に存在する。開発中、ヒトGPC（hGPC）は、高度に増殖する二重電位細胞であり、新しい乏突起膠細胞及び星状膠細胞を産生する（French-Constant and Raff, 1986; Raff et al., 1983）。げっ歯類では、この能力は、正常な老化中に低下し、老化したGPCでは増殖、移動、及び分化能力が全て低下する（Chari et al., 2003、Gao and Raff, 1997、Moyon et al., 2021、Segel et al., 2019、Tang et al., 2000、Temple and Raff, 1986、Wolswijk and Noble, 1989、Wren et al., 1992）。同様に、成体ヒトGPCは、先天性髄鞘形成不全マウス宿主に移植された場合、それらの胎児対応物よりも増殖性が低く、移動性が低く、分化が容易である（Windrem et al., 2004）。しかしながら、胎児及び成体hGPCの明らかに異なる能力、並びにげっ歯類の老化モデルにおけるGPC転写に関する豊富なデータにもかかわらず、ヒト老化中のGPC遺伝子発現の変化に対処する（Perlman et al., 2020、Sim et al., 2006）、又は胎児及び成体ヒトGPCによる転写の明確な対面比較を提供するデータはほとんど利用できない。したがって、本開示のある特定の部分は、胎児hGPCと成体hGPCの転写パターンを比較し、そのデータを使用して、これらの細胞の成熟及び老化に因果関係のある制御経路を識別する。

【0052】

この目的のために、本発明者らは、最初に、ヒト胎児の前脳から単離されたA2B5+及びCD140a/PDGFRa+ hGPCのバルク及び単一細胞RNA配列決定（scRNA-Seq）を利用して、それらの転写シグネチャ及び不均一性を定義した。本発明者らは次いで、これらのデータを単離された成体hGPCの遺伝子発現と比較し、後者が、増殖能力の喪失、早期表現型分化プロファイルの開始、及び老齢の誘導を示唆する転写パターンを呈したことを見出した。次いで、差次的に発現された遺伝子のプロモーターの転写因子モチーフ濃縮分析は、ヒトグリア老化プログラムの主な促進因子として、成体誘導性転写リプレッサーE2F6、ZNF274、MAX、及びIKZF3を関与させた。ネットワーク分析は、群として、これらの遺伝子が、胎児hGPCで比較的過剰に発現したMYC及びその近位標的の阻害を介して機能したことを強く示唆した。重要なことに、次いで、新しく産生されたヒトiPSC由来のGPCにおけるこれらの成体リプレッサーの過剰発現は、それらの発現シグネチャにおいて胎児hGPCに類似しており、実際には、成体GPCのものを実質的に再現する転写シグネチャの誘導をもたらしたことが見出された。次いで、本発明者らは、胎児GPC遺伝子発現を転写後に阻害すると予測された（特に成体獲得リプレッサーネットワークと協調して阻害する）、成体hGPCによって選択的に発現されるmiRNAのコホートを識別した。まとめると、これらのデータは、成体ヒトGPCの老化中に、リプレッサーのコホートが現れることを示唆し、その活性は、MYC及びMYC依存性転写を中心とする。したがって、これらのリプレッサーは、実現可能な治療用標的を含み得、その調節は、老化したか、又はそうでなければ有糸分裂が消耗したGPCの有糸分裂及び分化能力の顕著な特徴を復元し得る。

【0053】

サプレッサー／若返り療法

一態様では、本開示は、E2F6、ZNF274、MAX、及びIKZF3からなる群から選択される転写リプレッサーを抑制することによる療法の方法を提供する。いくつかの例では、転写リプレッサーの抑制は、その抑制を必要とする対象又はその抑制を必要と

する標的細胞に、転写リプレッサーのうちの1つ以上のサプレッサー又は阻害因子を投与することによって達成することができる。そのようなサプレッサー又は阻害剤は、小分子化合物、オリゴヌクレオチド、核酸、ペプチド、ポリペプチド、CRISPR/Casシステム、又はその抗体若しくは抗原結合部分を含むか、又はそれらであり得る。サプレッサー／阻害剤の例としては、関連するYAP又はMYC経路シグナル伝達経路（例えば、Hippoシグナル伝達経路）の活性化因子、アゴニスト、又は増強剤が挙げられる。このシグナル伝達経路のための様々な活性化因子は、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、サプレッサーは、阻害性核酸若しくは干渉核酸、例えばsiRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、及び／又は1つ以上の修飾核酸残基を含む核酸である。

10

【0054】

阻害性核酸

本開示のある特定の態様は、1つ以上の阻害性核酸（例えば、阻害性RNA分子）、そのような阻害性核酸をコードするポリヌクレオチド、及びそのような阻害性核酸を発現するように操作された導入遺伝子を提供する。1つ以上の阻害性核酸は、同じ遺伝子（例えば、同じmRNA配列又は同じ遺伝子の異なるmRNA配列にハイブリダイゼーションするか、又は特異的に結合する）又は異なる遺伝子（例えば、異なる遺伝子のmRNAにハイブリダイゼーションするか、特異的に結合する）を標的とし得る。したがって、本明細書に記載の方法は、E2F6、ZNF274、MAX、若しくはIKZF3遺伝子、又はmRNAを標的とする阻害性核酸を使用して、E2F6、ZNF274、MAX、又はIKZF3遺伝子の発現を低減させることを含み得る。

20

【0055】

阻害性核酸は、細胞内の標的核酸（例えば、標的RNA）に結合し、細胞内の標的核酸のレベル又は機能を低下又は阻害することができる核酸を指す。阻害性核酸の例としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド、低分子干渉（si）RNA化合物、一本鎖又は二本鎖RNA干渉化合物、修飾塩基／ロック核酸（LNA）、アンタゴミル、ペプチド核酸（PNA）、及び標的核酸（例えば、E2F6、ZNF274、MAX、又はIKZF3 mRNA）の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズし、そのレベル又は機能を調節する他のオリゴマー化合物又はオリゴヌクレオチド模倣物が挙げられる。

30

【0056】

いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、アンチセンスRNA、アンチセンスDNA、キメラアンチセンスオリゴヌクレオチド、修飾結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、干渉RNA（iRNA）、短鎖若しくは低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA若しくはマイクロ干渉RNA（miRNA）、低分子時間型RNA（stRNA）、短ヘアピン型RNA（shRNA）、低分子RNA誘導性遺伝子活性化因子（RNAa）、低分子活性化RNA（saRNA）、又はこれらの組み合わせであり得る。阻害性核酸は、例えば、修飾されたヌクレオチド（例えば、ロック核酸）又は骨格（例えば、その中にリン原子を含まない骨格）を含むように修飾され得るか、又はミックスマー又はギャップマーによって修飾され得、例えば、オリゴヌクレオチドの修飾に関連する教示について参照により本明細書に組み込まれるWO2013/006619を参照されたい。

40

【0057】

いくつかの例では、阻害性核酸は、細胞が遺伝子発現を調節するプロセスである、RNA干渉（RNAi）を媒介する阻害RNA分子である。細胞質中の二本鎖RNA（dsRNA）は、二本鎖RNAが、RNAse III様酵素DICERによっておよそ21～23個のヌクレオチド長の小さな二本鎖断片に処理されるRNAi経路を誘発する。これらの二本鎖断片は、RNA誘導性サイレンシング複合体（RISC）と呼ばれる多サブユニットタンパク質に統合される。RISCは、二本鎖断片を、複合体から除去されるパッセンジャー鎖と、特定のmRNA内の標的配列に相補的であり、RISC複合体に、特定の標的mRNA分子の翻訳を切断又は抑制するように指示するガイド鎖と、に巻き戻すア

50

ルゴノートタンパク質を含有する (K o t o w s k a - Z i m m e r e t a l . , 2021)。このようにして、mRNA分子をコードする遺伝子は、本質的に不活性又は「サイレンシング」される。

【0058】

RNAi技術は、合成siRNA、ベクターベースのshRNA、及び人工miRNA (amiRNA)を含むいくつかのツールを用いてもよい。合成siRNAは、細胞内に送達されなければならない、安定性及び薬物動態学的課題を克服しなければならない外因性二本鎖RNAである。shRNAは、プラスミド又はウイルス発現ベクターを使用して細胞に送達されるタイトなヘアピンループ構造を有する人工RNA分子である。shRNAは、典型的には、強いpol IIプロモーター (例えば、U6又はH1) から転写され、ヘアピンとしてRNAi経路に入る。しかしながら、強いpol IIプロモーターによって駆動される転写は、内因性miRNA生体発生機構を飽和させる超生理学的レベルのshRNAを産生し得、毒性をもたらす。amiRNAは、天然一次miRNA (pri-miRNA)に基づいて足場に標的特異的shRNA挿入物を埋め込む。これにより、内因性miRNAと同様の適切な処理及び輸送が保証され、毒性が低下する (K o t o w s k a - Z i m m e r e t a l . , 2021)。

10

【0059】

本開示のいくつかの実施形態では、阻害性RNA分子は、siRNA、miRNA (amiRNAを含む)、又はshRNAであり得る。siRNAは、細胞内でRNAiを誘導するおよそ19~25 (例えば、19~23) 個の塩基対の長さの二本鎖RNA分子として当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、siRNA配列はまた、人工miRNA足場 (「shmiRNA」) に挿入することができる。shRNAは、細胞内でRNAiを誘導する短いループ (例えば、約4~11個のヌクレオチド) によって連結された二本鎖RNAのおよそ19~25 (例えば、19~23) 個の塩基対を含むRNA分子として当該技術分野で既知である。miRNAは、ループによって連結された二本鎖RNAの短い (例えば、19~25個の塩基対) 配列を含み、1つ以上のバルジ (例えば、誤対合又は非対合塩基対) を含む2本鎖RNAの1つ以上の追加の配列を含有する、細胞内でRNAiを誘導するRNA分子として当該技術分野で既知である。

20

【0060】

本明細書で使用される場合、「miRNA」という用語は、内因性miRNA、並びに外因性又は異種のmiRNAを包含する。いくつかの実施形態では、「miRNA」は、pri-miRNA又はpre-miRNAを指すことができる。miRNA処理中に、pri-miRNA転写物が産生される。pri-miRNAは、Drosha-DGC R8によって処理され、1つ以上の配列を切除して、5' 隣接領域、ガイド鎖、ループ領域、非ガイド鎖、及び3' 隣接領域を有するpre-miRNA、又は5' 隣接領域、非ガイド鎖、ループ領域、ガイド鎖、及び3' 隣接領域を残すことによって、pre-miRNAを産生する。次いで、pre-miRNAを細胞質に輸出し、Dicerによって処理して、ガイド鎖及び非ガイド (又は乗客) 鎖を有するsiRNAを得る。次いで、ガイド鎖は、例えば、ガイド鎖に相補的な標的RNA配列を認識することによって、遺伝子サイレンシングを触媒するために、RISC複合体によって使用される。miRNAの更なる説明は、例えば、WO2008/150897に見ることができる。miRNAによる標的配列の認識は、主に、標的とmiRNAシード配列、例えば、ガイド鎖のヌクレオチド1~8 (5' ~ 3') との間の対合によって決定される (例えば、Boudreau, R. L. et al. (2013) Nucleic Acids Res. 41:e9を参照されたい)。

30

40

【0061】

以下に示すのは、E2F6、ZNF274、MAX、及びIKZF3のうちの1つ以上を標的とし、抑制するいくつかの例示的なサプレッサーmiRNAである。
表。サプレッサーmiRNAの配列

50

名称	核酸配列	受入番号	配列番号
hsa-miR-125b-5p	ucccugagaccuaacuuguga	MIMAT0000423	12
hsa-miR-106a-5p	aaaagugcuuacagugcagguag	MIMAT0000103	13
hsa-miR-17-5p	caaagugcuuacagugcagguag	MIMAT0000070	14
hsa-miR-130a-3p	cagugcaauguuaaaagggauc	MIMAT0000425	15
hsa-miR-130b-3p	cagugcaaugaugaaagggauc	MIMAT0000691	16
hsa-miR-379-5p	ugguagacuauuggaacguagg	MIMAT0000733	17
hsa-miR-93-3p	acugcugagcuagcacuucccg	MIMAT0004509	18
hsa-miR-1260b	aucccaccacugccaccu	MIMAT0015041	19
hsa-miR-767-5p	ugcaccaugguugucugagcaug	MIMAT0003882	20
hsa-miR-30b-5p	uguuaacauccuacacucagcu	MIMAT0000420	21
hsa-miR-9-3p	auaaagcuagauaacggaaugu	MIMAT0000442	22
hsa-miR-9-5p	ucuuugguuauacuagcuguauga	MIMAT0000441	23
hsa-miR-485-5p	agaggcuggccgugaugaaauuc	MIMAT0002175	24

10

20

30

40

50

【0062】

本開示のいくつかの実施形態では、阻害性RNA分子は、ヘアピン構造を形成する。一般に、ヘアピン形成RNAは、ループ配列によってアンチセンス鎖（例えば、ガイド鎖）に接続されたセンス鎖（例えば、パッセンジャー鎖）を含む二本鎖を有するステム部分をコードする単一の核酸を含む自己相補的な「ステムループ」構造内に配置される。パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、相補性を共有している。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、100%の相補性を共有する。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%の相補性を共有する。パッセンジャー鎖及びガイド鎖は、塩基対のミスマッチのために相補性を欠く場合がある。いくつかの実施形態では、ヘアピン形成RNAのパッセンジャー鎖及びガイド鎖は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は少なくとも10個のミスマッチを有し得る。一般に、（ループに対する）幹の最初の2～8個のヌクレオチドは、「シード」残基と称され、標的の認識及び結合において重要な役割を果たす。（ループに対して）ステムの第1の残基は、「アンカー」残基と称される。いくつかの実施形態では、ヘアピン形成RNAは、アンカー残基においてミスマッチを有する。

【0063】

いくつかの実施形態では、阻害性RNA分子は、細胞（又は対象）内で処理されて、「成熟miRNA」を形成する。成熟miRNAは、miRNAをもたらす生物学的経路において最初の前駆体分子を生成するRNAポリメラーゼII又はIIIによって、そのmiRNA遺伝子又はイントロンからの一次miRNAの転写を通して開始される多段階経路の結果である。一度転写されると、pri-miRNA（しばしばヘアピン構造を有する1000個を超えるヌクレオチド長）は、ヘアピン構造とssRNAとの間の接合部の近くでpri-miRNAを切断するDrosha酵素によって処理され、前駆体miRNA（pre-miRNA）をもたらす。pre-miRNAは、細胞質にエクスポートされ、pre-miRNAループでDicer酵素によって更に還元され、二本になったmiRNA鎖をもたらす。

【0064】

miRNA二本鎖の2本鎖のうち、1つのアーム、ガイド鎖（miR）は、典型的には、より高い濃度で見られ、最終的にRNA誘導サイレンシング複合体に装填されるアルゴノートタンパク質に結合し、会合する。ガイド鎖miRNA-RISC複合体は、しばしばmRNAの3'UTRにおいて、mRNAのその相補的な配列に結合することによって遺伝子発現を調節するのを助ける。miRNA二本鎖の非ガイド鎖は、パッセンジャー鎖として既知であり、しばしば分解されるが、持続してもよく、無傷又は部分的分解後のい

ずれかで作用して、遺伝子発現において機能的役割を有する。

【0065】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、ヒト遺伝子を標的とするガイド鎖を有する阻害性核酸（例えば、*miRNA*）を発現するように操作される。「標的とすること」は、標的遺伝子（例えば、標的遺伝子の*mRNA*転写物）上のその同族（例えば、相補的）配列への阻害性核酸のハイブリダイゼーション又は特異的結合を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子転写物を標的とする阻害性核酸は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30個のヌクレオチド長である標的遺伝子と、相補性の領域を共有する。いくつかの実施形態では、相補性の領域は、30個以上のヌクレオチド長である。

10

【0066】

典型的には、ガイド鎖は、ミエリンの疾患又は障害に関連するヒト遺伝子転写物を標的にし得る。例としては、*ZNF274*、*MAX*、*IKZF3*、又は*E2F6*のためのガイド鎖が挙げられる。いくつかの実施形態では、これらの遺伝子転写物のうちのいずれかを標的とするガイド鎖は、上述の配列の好適なセグメントを含む単離された核酸によってコードされる。

【0067】

したがって、阻害性核酸を使用して、*RNA*転写物との相互作用を介してか、又は代替として特定の遺伝子配列との相互作用によって、遺伝子サイレンシング、具体的には*ZNF274*、*MAX*、*IKZF3*、及び*E2F6*のうちの1つ以上を媒介するために使用することができ、そのような相互作用は、転写レベル若しくは転写後レベル、例えば、限定されないが、*RNAi*のいずれかで、又は標的のヌクレオチド配列を用いて、標的のクロマチン構造若しくはメチル化パターンを調節し、標的遺伝子の転写を防止する細胞プロセスにより遺伝子サイレンシングをもたらす、それによってサイレンシングを媒介する。

20

【0068】

これらの阻害性核酸は、*RNA*の短い二本鎖領域を含み得る。二本鎖*RNA*分子は、対称又は非対称であり得、相補的であり得る2つの異なる別個の鎖、すなわち、2つの一本鎖*RNA*分子を含むことができるか、又は2つの相補的な部分、例えば、センス領域及びアンチセンス領域が塩基対合され、かつ1つ以上の一本鎖「ヘアピン」領域（すなわち、ループ）によって共有結合され、例えば、一本鎖短ヘアピンポリヌクレオチド又は環状一本鎖ポリヌクレオチドをもたらす1つの一本鎖分子を含み得る。

30

【0069】

リンカーは、ポリヌクレオチドリンカー又は非ヌクレオチドリンカーであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、非ヌクレオチドリンカーである。いくつかの実施形態では、ヘアピン又は環状阻害性核酸分子は、1つ以上のループモチーフを含有し、分子のループ部分の少なくとも1つは、生分解性である。例えば、一本鎖ヘアピン分子は、インビボでの分子のループ部分の分解が、1、2、3、又は4つのヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチドオーバーハングなどの3'末端オーバーハングを有する二本鎖*siRNA*分子を産生できるように、設計され得る。又は代替として、環状阻害性核酸分子は、インビボでの分子のループ部分の分解が、例えば、約2つのヌクレオチドを含む3'末端オーバーハングなどの3'末端オーバーハングを有する二本鎖*siRNA*分子を産生することができるように、設計され得る。

40

【0070】

対称な阻害性核酸分子において、各鎖、センス（パッセンジャー）鎖、及びアンチセンス（ガイド）鎖は、独立して、約15～約40（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40）個のヌクレオチド長であり得る。

【0071】

50

非対称な阻害性核酸分子では、分子のアンチセンス領域又は鎖は、約 15～約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は 30）個のヌクレオチド長であり得、センス領域は、約 3～約 25（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は 25）個のヌクレオチド長である。

【0072】

更に他の実施形態では、本明細書に記載の阻害性核酸分子は、一本鎖ヘアピン s i R N A 分子を含むことができ、分子は、約 25～約 70（例えば、約 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、40、45、50、55、60、65、又は 70）個のヌクレオチド長であり得る。

10

【0073】

なおも他の実施形態では、分子は、一本鎖環状 s i R N A 分子を含んでもよく、分子は、約 38～約 70（例えば、約 38、40、45、50、55、60、65、又は 70）個のヌクレオチド長である。

【0074】

様々な対称な実施形態では、本明細書に記載の阻害性核酸二本鎖は、独立して、約 15～約 40 個の塩基対（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は 40）を含み得る。

20

【0075】

本明細書に記載の阻害性核酸分子が非対称である更に他の実施形態では、分子は、約 3～25（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は 25）個の塩基対を含み得る。

【0076】

阻害性核酸分子がヘアピン又は環状構造である更に他の実施形態では、分子は、約 3～約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は 30）個の塩基対を含み得る。

【0077】

阻害性核酸分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖、又はセンス領域及びアンチセンス領域は、相補的であり得る。また、アンチセンス鎖又はアンチセンス領域は、標的 R N A のヌクレオチド配列又はその一部（例えば、Z N F 2 7 4、M A X、I K Z F 3、及び E 2 F 6 のヌクレオチド配列又はその一部）に相補的であり得る。阻害性核酸のセンス鎖又はセンス領域は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部を含み得る。

30

【0078】

いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、目的の組織への送達前及び／又は送達時に分解を最小限に抑えるように最適化（配列に基づいて）又は化学修飾することができる。これらの干渉核酸の市販の供給源としては、限定されないが、T h e r m o - F i s h e r S c i e n t i f i c / A m b i o n、O r i g e n e、Q i a g e n、D h a r m a c o n、及び S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y が挙げられる。いくつかの実施形態では、そのような最適化及び／又は修飾は、阻害性核酸の十分なペイロードが目的の組織に送達されることを保証するために行われ得る。他の実施形態には、遺伝子の D N A に結合して発現、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを制限することか、又は標的転写物若しくは遺伝子産物若しくは 1 つ以上の他のタンパク質に、当該遺伝子の発現が低減されるような方法で直接結合することを含むが、これらに限定されないメカニズムを通して転写後遺伝子サイレンシング（P T G S）を課すことのいずれかによって、E 2 F 6、Z N F 2 7 4、M A X、若しくは I K Z F 3 遺伝子の発現を低下させるように設計された小分子、アプタマー、若しくはオリゴヌクレオチドの使用、又は特定の遺伝子の発現を低減させる他の小分子デコイの使用が含まれる。

40

50

【0079】

本明細書に記載の任意の阻害性核酸分子又は構築物は、1つ以上の化学修飾を含み得る。修飾を使用して、安定性、活性、毒性、免疫応答（例えば、インターフェロン応答、炎症性若しくは炎症誘発性サイトカイン応答、又はトール様受容体（TLF）応答の刺激を防止する）、及び／又は生物学的利用能などのインビボ又はインビボ特徴を改善することができる。

【0080】

化学修飾分子は、対応する非修飾又は最小限に修飾された分子と比較して改善されたRNAi活性を示す。本明細書に開示される化学修飾モチーフは、治療用途における使用に好適なヌクレアーゼ耐性及び薬物動態特性を提供すると同時に、未修飾又は最小限に修飾された活性siRNAと実質的に同様のRNAi活性を維持する能力を提供する。

10

【0081】

様々な実施形態では、本明細書に記載の阻害性核酸分子は、センス及び／又はアンチセンス鎖に存在する任意の（例えば、1つ以上又は全ての）ヌクレオチドが、修飾されたヌクレオチドである修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、分子は、化学修飾によって部分的に修飾することができる（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80個のヌクレオチドが修飾される）。他の実施形態では、分子は、化学修飾によって完全に修飾することができる（例えば、100%修飾）。

20

【0082】

単一の分子内の化学修飾は、同じであるか又は異なり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの鎖は、少なくとも1つの化学修飾を有する。他の実施形態では、各鎖は、糖、塩基、又は骨格（すなわち、ヌクレオチド間結合）修飾など、同じであるか又は異なり得る少なくとも1つの化学修飾を有する。他の実施形態では、分子は、少なくとも2、3、4、5、又はそれ以上の異なる化学修飾を含有し得る。

【0083】

好適な化学修飾の非限定的な例としては、例えば、米国特許第8202979号及びUS2005/0266422に開示されるものが挙げられ、糖、塩基、及びリン酸塩、非ヌクレオチド修飾、並びに／又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

30

【0084】

様々な実施形態では、二本鎖阻害性核酸分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分は、糖修飾を含む。更に他の実施形態では、二本鎖分子中に存在するプリンヌクレオチドの大部分は、糖修飾を含む。ある特定の例では、プリン及びピリミジンは、2'糖位置で差次的に修飾される（すなわち、少なくとも1つのプリンは、2'糖位置で同じ又は異なる鎖中の少なくとも1つのピリミジンとは異なる修飾を有する）。

【0085】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、又は2'-O-アルキル（例えば、2'-O-メチル）ヌクレオチドである。更に他の実施形態では、少なくとも1つのヌクレオチドは、リボ様、ノーザン、又はA型ヘリックス構成を有する（例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照されたい）。ノーザン構成を有するヌクレオチドの非限定的な例としては、ロック核酸（LNA）ヌクレオチド（例えば、2'-O, 4'-C-メチレン-（D-リボフラノシル）ヌクレオチド）；2'-メトキシエトキシ（MOE）ヌクレオチド；2'-メチルチオエチルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド、2'-アジドヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシエトキシヌク

40

50

レオチド、4'-チオヌクレオチド、及び2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。
【0086】

本明細書に記載の阻害性核酸は、当該技術分野の当業者に既知のいくつかの技法を使用して得ることができる。例えば、阻害性核酸は、化学的に合成され得るか、又はプラスミドによってコードされ得る（例えば、ヘアピンループを有する二本鎖に自動的に折り畳まれる配列として転写される）。siRNAはまた、より長いdsRNAの切断によって産生され得る。

【0087】

いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、化学的に合成される。オリゴヌクレオチド（例えば、リボヌクレオチドを欠くある特定の修飾オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの一部）は、例えば、Caruthers et al., 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19、Thompson et al., 国際特許出願第99/54459号、Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684、Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59、Brennan et al., 1998, *Biotechnol Bioeng.*, 61, 33-45、及びBrennan, 米国特許第6,001,311号に記載される、当該技術分野で既知のプロトコルを使用して合成され得る。オリゴヌクレオチドの合成は、5'末端のジメトキシトリチル、及び3'末端のホスホラミダイトなどの共通の核酸保護基及びカップリング基を利用する。

【0088】

代替として、阻害性核酸は、別々に合成し、例えば、ライゲーションによって（Moore et al., 1992, *Science* 256, 9923、Draper et al., 国際特許出願第93/23569号、Shabarova et al., 1991, *Nucleic Acids Research* 19, 4247、Bellon et al., 1997, *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 951、Bellon et al., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204）か、又は合成及び／若しくは脱保護後のハイブリダイゼーションによって、合成後に一緒に接合することができる。

【0089】

いくつかの実施形態では、阻害性核酸は、発現し、組換えDNA又はRNAベクターに挿入された転写単位から送達され得る。組換えベクターは、DNAプラスミド又はウイルスベクターであり得る。ウイルスベクターは、限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、又はアルファウイルスに基づいて構築することができる。

【0090】

CRISPR/Casシステム

一態様では、本明細書に記載の遺伝子のうちの1つ以上の抑制又はノックダウンは、CRISPR/Casシステム及び当該技術分野で既知の関連方法を使用して、CRISPR-Cas誘導ヌクレアーゼを介して達成され得る。例えば、US11225659B2、WO2021/168799A1、WO2022/188039A1、WO2022/188797A1、WO2022/068912A1、及びWO2022/047624A1を参照されたい。Gimenez et al., "CRISPR-on System for the Activation of the Endogenous human INS gene," *Gene Therapy* 23:543-547 (2016)、Wiedenheft et al., "RNA-Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea," *Nature* 482:331-338 (2012)、Zhang et al., "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems," *Science* 339(6121):819-23

(2013)、及び Gaj et al., “ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based Methods for Genome Engineering,” Cell 31 (7): 397–405 (2013) も参照されたく、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0091】

CRISPR-Cas システムは、誘導ヌクレアーゼ二本鎖DNA切断による原核細胞及び真核細胞における遺伝子発現の配列特異的制御を可能にする遺伝子技術である。これは、細菌免疫系由来のCRISPR（クラスター化された規則的な間隔の回文反復）経路に基づく。

【0092】

別の態様では、本出願は、(i) Cas タンパク質、又はそのオーソログ、ホモログ、誘導体、コンジュゲート、機能的断片、そのコンジュゲート、若しくはその融合物を含むタンパク質組成物と、(ii) CRISPR RNA と、標的RNA又はDNAの少なくとも一部に相補的なプログラム可能なスペーサー配列又はガイド配列と、を含むポリヌクレオチド組成物と、を含む複合体を提供する。プログラム可能なガイドRNA、CRISPR RNA、及びCas タンパク質はともに、配列標的化及び認識のためのCRISPR/Cas ベースのモジュールを形成する。

【0093】

標的RNAは、天然に存在するRNA分子及び操作されたRNA分子を含む、目的の任意のRNA分子であり得る。標的RNAは、mRNA、tRNA、リボソームRNA (rRNA)、マイクロRNA (miRNA)、干渉RNA (siRNA)、リボザイム、リボスイッチ、サテライトRNA、マイクロスイッチ、マイクロザイム、又はウイルスRNAであり得る。

【0094】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、白質／乏突起膠細胞／星状膠細胞の喪失、及び本明細書に記載される関連する障害によって媒介される状態又は障害などの状態又は疾患と関連する。したがって、いくつかの実施形態では、これらの核酸を標的化することによってそのような状態又は疾患を治療するために、本明細書に記載のシステムを使用することができる。

【0095】

例えば、状態又は疾患に関連する標的核酸は、罹患した細胞、古い若しくはより古い細胞、又は老齢細胞において過剰発現されるRNA分子であり得る。標的核酸はまた、毒性RNA及び／又は変異RNA（例えば、スプライシング欠損又は変異を有するmRNA分子）であり得る。標的核酸はまた、miRNAであり得る。

【0096】

例えば、標的核酸は、図28、30、及び37に例示されるように、活性の増加が老齢に連結されている遺伝子、例えば、STAT、及び転写リプレッサー（例えば、E2F6、ZNF274、MAX、又はIKZF3）のものであり得る。標的核酸は、図28、30、及び37に例示されるように、miR-584-5p、miR-330-3p、miR-23b-3p、及びmiR-140-3pなどの成体GPCにおける老齢を促進するmiRNAのものであり得る。

【0097】

様々なCas タンパク質を本発明で 사용할 ことができる。互換的に使用されるCas タンパク質、CRISPR 関連タンパク質、又はCRISPR タンパク質は、RNA 誘導DNA 結合を有する、I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型、又はVI 型系を含む、CRISPR-Cas クラス1 又はクラス2 のタンパク質又はそれに由来するタンパク質を指す。好適なCRISPR/Cas タンパク質の非限定的な例としては、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e（又はCasD）、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas13、Cas13e、Cas13f、CasF、CasG、Ca

10

20

30

40

50

s H、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1（又はC a s A）、C s e 2（又はC a s B）、C s e 3（又はC a s E）、C s e 4（又はC a s C）、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s z 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4、及びC u 1 9 6 6が挙げられる。例えば、U S 1 1 2 2 5 6 5 9 B 2、W O 2 0 2 1 / 1 6 8 7 9 9 A 1、W O 2 0 2 2 / 1 8 8 0 3 9 A 1、W O 2 0 2 2 / 1 8 8 7 9 7 A 1、W O 2 0 2 2 / 0 6 8 9 1 2 A 1、W O 2 0 2 2 / 0 4 7 6 2 4 A 1、W O 2 0 1 4 / 1 4 4 7 6 1、W O 2 0 1 4 / 1 4 4 5 9 2、W O 2 0 1 3 / 1 7 6 7 7 2、U S 2 0 1 4 / 0 2 7 3 2 2 6、及びU S 2 0 1 4 / 0 2 7 3 2 3 3を参照されたく、これらの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0098】

発現カセット及び発現ベクター

本開示はまた、上述の阻害性核酸又はC R I S P R / C a s システムをコードする組換え核酸を含むか、又はそれからなる発現カセットも提供する。そのような組換え核酸がまだプロモーターを含んでいない場合、発現カセットは、更にプロモーターを含んでもよい。したがって、本発明による発現カセットは、5'から3'の方向に、プロモーター、コード配列、及び任意選択でターミネーター又は他のエレメントを含む。発現カセットは、生物、好ましくは細胞、好ましくは罹患細胞への、目的の核酸配列の容易な移入を可能にする。

20

【0099】

本開示の発現カセットは、好ましくはベクターに含まれる。したがって、本開示のベクターは、目的の核酸配列を有する細胞を形質転換することを可能にする。対応して、本開示は、本開示による発現カセット又は本開示による組換え核酸を含む宿主細胞を提供する。組換え核酸はまた、目的の核酸配列の発現を可能にするようなプロモーター又はエンハンサーを含んでもよい。

【0100】

外因性遺伝物質（例えば、核酸、発現カセット、又は1つ以上の治療用若しくは阻害性RNAをコードする発現ベクター）を、遺伝子組換え細胞を提供するために、トランスフェクション又は形質導入などの遺伝子移入方法によって、インビボで目的の標的細胞に導入することができる。様々な発現ベクター（すなわち、標的細胞への外因性遺伝物質の送達を容易にするためのビヒクル）は、当業者に既知である。本明細書で使用される場合、「外因性遺伝物質」は、細胞内に天然に見られない、天然若しくは合成のいずれかの核酸又はオリゴヌクレオチドを指すか、又はそれが細胞内に天然に見られる場合、それは、細胞によって生物学的に著しいレベルで転写又は発現されない。したがって、「外因性遺伝物質」は、例えば、RNAに転写され得る天然に存在しない核酸を含む。

30

【0101】

本明細書で使用される場合、「細胞のトランスフェクション」は、ウイルス送達ビヒクルを使用せずに、付加された核酸（DNA、RNA、又はそのハイブリッド）の組み込みによって、細胞による新しい遺伝物質の獲得を指す。したがって、トランスフェクションは、物理的又は化学的方法を使用して核酸を細胞に導入することを指す。いくつかのトランスフェクション技術は、当業者に既知であり、リン酸カルシウム核酸共沈殿、リン酸ストロンチウム核酸共沈殿、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクション、及びタングステン粒子促進マイクロ粒子衝撃を含む。対照的に、「細胞の形質導入」は、DNA又はRNAウイルスを使用して核酸を細胞に移入するプロセスを指す。核酸を細胞に移入するためのRNAウイルス（例えば、レトロウイルス）は、本明細書において形質導入キメラウイルスと称される。ウイルス内に含有される外因性遺伝物質は、形質導入細胞のゲノムに組み込むことができる。キメラDNAウイルス（例えば、治療剤をコードするDNAを担持するアデノウイルス）で形質導

40

50

入された細胞は、そのゲノムに組み込まれた外因性遺伝物質を有し得ないが、細胞内に染色体外に保持された外因性遺伝物質を発現することが可能であり得る。

【0102】

典型的には、外因性遺伝物質は、新しい遺伝子の転写を制御するプロモーターとともに異種遺伝子（治療用RNA又はタンパク質をコードする）を含み得る。プロモーターは、転写を開始するために必要な特異的なヌクレオチド配列を特徴的に有する。任意選択で、外因性遺伝物質は、所望の遺伝子転写活性を得るために必要な追加の配列（すなわち、エンハンサー）を更に含む。外因性遺伝物質は、プロモーターとコード配列が作動可能に連結されて、コード配列の転写を可能にするように、プロモーターのすぐ下流の細胞ゲノムに導入され得る。レトロウイルス発現ベクターは、挿入された外因性遺伝子の転写を制御するための外因性プロモーターエレメントを含んでもよい。そのような外因性プロモーターには、構成的プロモーター及び誘導性プロモーターの両方が含まれる。

10

【0103】

天然に存在する構成的プロモーターは、必須の細胞機能の発現を制御する。その結果、構成的プロモーターの制御下にある遺伝子は、細胞成長の全ての条件下で発現される。例示的な構成的プロモーターとしては、ある特定の構成的又は「ハウスキーピング」機能をコードする以下の遺伝子のプロモーターが挙げられる：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、アデノシンデアミナーゼ、ホスホグリセロールキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセロールムターゼ、アクチンプロモーター、ユビキチン、伸長因子-1、及び当該技術分野の当業者に既知である他の構成的プロモーター。加えて、多くのウイルスプロモーターは、真核細胞において構成的に機能する。これらには、とりわけ、SV40の初期及び後期プロモーター、モロニー白血病ウイルス及び他のレトロウイルスの長い末端反復（LTR）、並びに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターが含まれる。したがって、戦術の構成的プロモーターのうちのいずれかを使用して、異種遺伝子挿入の転写を制御することができる。

20

【0104】

誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤の存在下でのみ発現されるか、又はそれによって大いに制御される（例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下での転写は、ある特定の金属イオンの存在下で大幅に増加する）。誘導性プロモーターには、それらの誘導因子が結合したときに転写を刺激する応答性エレメント（RE）が含まれる。例えば、血清因子、ステロイドホルモン、レチノイン酸、及び環状AMPのREがある。特定のREを含有するプロモーターは、誘導性応答を得るために選択することができ、ある場合には、RE自体を異なるプロモーターに結合させ、それによって組換え遺伝子に誘導性を付与することができる。したがって、適切なプロモーター（構成的対誘導性、強い対弱い）を選択することによって、遺伝子組換え細胞における治療剤の存在及び発現のレベルの両方を制御することが可能である。治療剤をコードする遺伝子が誘導性プロモーターの制御下にある場合、例えば、薬剤の転写を制御する誘導性プロモーターの特異的誘導剤を注射することによって、治療剤の転写を可能にするための条件に遺伝子組換え細胞をインサイチュで曝露することによって、治療剤のインサイチュでの送達が発現される。例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下で遺伝子によってコードされる治療剤の遺伝子組換え細胞によるインサイチュ発現は、インサイチュで遺伝子組換え細胞を適切な（すなわち、誘導する）金属イオンを含有する溶液と接触させることによって増強される。

30

40

【0105】

したがって、インサイチュで送達される治療剤の量は、以下のような要因を制御することによって調節される：（1）挿入された遺伝子の転写を指示するために使用されるプロモーターの性質（すなわち、プロモーターが構成的であるか又は誘導性であるか、強い又は弱い）、（2）細胞に挿入される外因性遺伝子のコピーの数、（3）患者に投与される（例えば、移植される）形質導入／トランスフェクトされた細胞の数、（4）インプラント（例えば、グラフト又はカプセル化された発現系）のサイズ、（5）インプラント

50

の数、(6) 形質導入／トランスフェクトされた細胞又はインプラントが所定の位置に残される時間の長さ、及び(7) 遺伝子組換え細胞による治療剤の産生速度。治療有効用量の特定の治療剤の送達のためのこれらの因子の選択及び最適化は、上記で開示された因子及び患者の臨床プロファイルを考慮に入れて、過度の実験なしに当業者の範囲内であるとみなされる。

【0106】

治療剤をコードする少なくとも1つのプロモーター及び少なくとも1つの異種核酸に加えて、発現ベクターは、発現ベクターでトランスフェクト又は形質導入された細胞の選択を容易にするための、選択遺伝子、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子又は蛍光タンパク質遺伝子を含み得る。代替として、細胞は、2つ以上の発現ベクターでトランスフェクトされ、少なくとも1つのベクターは、治療剤(複数可)をコードする遺伝子(複数可)を含有し、他方のベクターは、選択遺伝子を含有する。好適なプロモーター、エンハンサー、選択遺伝子、及び／又はシグナル配列の選択は、過度の実験なしに、当業者の範囲内であるとみなされる。

10

【0107】

本開示のコード配列は、任意の型の標的細胞又は宿主細胞に挿入することができる。発現ベクターの関連において、ベクターは、当該技術分野の任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳類、細菌、酵母、又は昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、又は生物学的手段によって宿主細胞に移入することができる。

20

【0108】

ポリヌクレオチドの担体／送達

本明細書に開示されるように、上述のポリヌクレオチド又は核酸分子は、対象における障害を治療するために使用することができる。したがって、本開示は、標的細胞又は対象にポリヌクレオチドを送達するためのシステム及び方法を提供する。

【0109】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを含む。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を産生するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al. (2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)を参照されたい。

30

【0110】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物、例えば、ヒト細胞に挿入するための最も広く使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第5,350,674号及び同第5,585,362号を参照されたい。

【0111】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、及び水中油型エマルション、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質系などのコロイド分散系が挙げられる。インビトロ及びインビボで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム(例えば、人工膜小胞)である。

40

【0112】

本明細書に記載のポリヌクレオチド又は核酸(例えば、阻害性核酸、CRISPR-Cas系をコードするもの、発現カセット、及び発現ベクター)は、直接付加することができるか、又は陽イオン性脂質と複合体化し、リポソーム内にパッケージングすることができるか、又は組換えプラスミド若しくはウイルスベクターとして、又はそうでなければ標

50

的細胞若しくは組織に送達することができる。核酸分子を送達するための方法は、当該技術分野で既知である。例えば、米国特許第6,395,713号、WO94/02595、Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995、Maurer et al., 1999, Mol. Membr. Biol., 16, 129-140、Hofland and Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192、及びLee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192を参照されたい。これらのプロトコルは、実質的に任意の核酸分子の送達のために利用することができる。核酸分子は、様々な当業者に既知の方法によって細胞に投与することができ、イオン泳動によるか、又は生分解性ポリマー、ヒドロゲル、シクロデキストリン（例えば、Gonzalez et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074、WO03/47518及びWO03/46185を参照されたい）、ポリ（乳酸-コグリコール）酸（PLGA）及びPLCAマイクロスフェア（例えば、米国特許第6,447,796号及びUS2002/130430を参照されたい）、生分解性ナノカプセル、及び生体接着性マイクロスフェアなどの他のビヒクルへの組み込みによってか、又はタンパク質性ベクター（例えば、WO00/53722を参照されたい）によって、リポソーム内でのカプセル化を含むが、これらに限定されない。

10

【0113】

一態様では、本出願は、本明細書に記載の核酸分子を含有する担体系を提供する。いくつかの実施形態では、担体系は、脂質ベースの担体系、陽イオン性脂質、又はリポソーム核酸複合体、リポソーム、ミセル、ビロソーム、脂質ナノ粒子、又はそれらの混合物である。他の実施形態では、担体系は、カチオン性ポリマー核酸複合体などのポリマーベースの担体系である。追加の実施形態では、担体系は、シクロデキストリンポリマー核酸複合体などのシクロデキストリンベースの担体系である。更なる実施形態では、担体系は、カチオン性ペプチド核酸複合体などのタンパク質ベースの担体系である。好ましくは、担体系は、脂質ナノ粒子製剤である。本明細書に記載の脂質ナノ粒子（「LNP」）製剤は、任意の核酸分子（例えば、RNA分子）又は本明細書に記載の核酸分子の組み合わせに適用することができる。

20

30

【0114】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子は、米国特許第7514099号及び同第7404969号に記載のような脂質ナノ粒子組成物として製剤化される。いくつかの実施形態では、本出願は、LNP-051、LNP-053、LNP-054、LNP-069、LNP-073、LNP-077、LNP-080、LNP-082、LNP-083、LNP-060、LNP-061、LNP-086、LNP-097、LNP-098、LNP-099、LNP-100、LNP-101、LNP-102、LNP-103、又はLNP-104などのUS2012/0029054に記載される製剤のいずれかとして製剤化される核酸分子を含む組成物を特徴とする。

【0115】

他の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の核酸分子のコンジュゲート及び／又は複合体を特徴とする。そのようなコンジュゲート及び／又は複合体を使用して、細胞などの生体系への核酸分子の送達を容易にすることができる。本明細書によって提供されるコンジュゲート及び複合体は、治療用化合物を細胞膜にわたって移入し、薬物動態を変化させ、及び／又は本発明の核酸分子の局在を調節することによって、治療活性を付与することができる。そのようなコンジュゲートの非限定的な例は、例えば、米国特許第7,833,992号、同第6,528,631号、同第6,335,434号、同第6,235,886号、同第6,153,737号、同第5,214,136号、同第5,138,045号に記載されている。

40

【0116】

50

様々な実施形態では、ポリエチレングリコール（PEG）は、本明細書に記載の核酸分子に共有付着することができる。付着したPEGは、任意の分子量、好ましくは約100～約50,000ダルトン（Da）であり得る。したがって、本開示は、ポリ（エチレングリコール）脂質（PEG修飾又は長循環リポソーム又はステルスリポソーム）及び本明細書に記載の核酸分子を含有する表面修飾リポソームを含む組成物又は製剤を特徴とする。例えば、WO96/10391、WO96/10390、及びWO96/10392を参照されたい）。

【0117】

いくつかの実施形態では、核酸分子はまた、ポリエチレンイミン及びその誘導体、例えば、ポリエチレンイミン-ポリエチレングリコール-N-アセチルガラクトサミン（PEI-PEG-GAL）又はポリエチレンイミン-ポリエチレングリコール-トリ-N-アセチルガラクトサミン（PEI-PEG-トリガル）誘導体と製剤化又は複合体化され得る。一実施形態では、核酸分子は、US2003/0077829に記載される方法で製剤化することができる。

10

【0118】

他の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子は、US2001/0007666号に記載されるものなどの膜破壊剤と複合体化され得る。更に他の実施形態では、膜破壊剤及び分子は、米国特許第6,235,310号に記載される脂質などの陽イオン性脂質又はヘルパー脂質分子と複合体化され得る。

20

【0119】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子は、米国特許出願公開第2003/077829号、同第2005/0287551号、同第2005/0164220号、同第2005/0191627号、同第2005/0118594号、同第2005/0153919号、同第2005/00854886号、及び第2003/0158133号、並びにIWO00/03683及びWO02/087541に記載されるような送達系と複合体化させることができる。

30

【0120】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリポソーム製剤は、米国特許第6,858,224号、同第6,534,484号、同第6,287,591号、同第6,835,395号、同第6,586,410号、同第6,858,225号、同第6,815,432号、同第6,586,001号、同第6,120,798号、同第6,977,223号、同第6,998,115号、同第5,981,501号、同第5,976,567号、同第5,705,385号、並びに米国特許出願公開第2006/0019912号、同第2006/0019258号、同第2006/0008909号、同第2005/0255153号、同第2005/0079212号、同第2005/0008689号、同第2003/0077829号、同第2005/0064595号、同第2005/0175682号、同第2005/0118253号、同第2004/0071654号、同第2005/0244504号、同第2005/0265961号、及び第2003/0077829号に記載の化合物及び組成物と製剤化又は複合体化した、本明細書に記載の核酸分子（例えば、阻害性核酸）を含み得る。

40

【0121】

本明細書に開示されるように、上述の核酸分子は、対象における障害を治療するために使用することができる。上述のベクター（組換えプラスミド及びウイルスベクターなど）を使用して、本明細書に記載の阻害性核酸又はCRISPR-Casシステムなどの治療剤を送達することができる。ベクターの送達は、例えば、静脈内又は筋肉内投与によってか、対象から外植された標的細胞への投与、続いて対象への再導入によってか、又は所望の標的細胞への導入を可能にするであろう任意の他の手段によって、全身的であり得る。そのような組換えベクターはまた、直接、又は例えば、Mirus Transit LT1親油性試薬；リポフェクチン；リポフェクタミン；セルフェクチン；ポリカチオン（例えば、ポリリジン）、若しくはリポソーム脂質ベースの担体系、カチオン性脂質、若し

50

くはリボソーム核酸複合体、ミセル、ピロソーム、脂質ナノ粒子を含む好適な送達試薬と併せて、投与することができる。

【0122】

ウイルスベクター

いくつかの実施形態では、RNA分子をコードするポリヌクレオチドは、プラスミド又はウイルスベクターなどのベクターに挿入され得るか、又はそれによってコードされ得る。好ましくは、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターに挿入されるか、又はウイルスベクターによってコードされる。ウイルスベクターは、ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクターなどであり得る。いくつかの具体的な実施形態では、ウイルスベクターは、AAVベクターである。いくつかの実施形態では、RNAは、レトロウイルスベクターによってコードされてもよい（例えば、米国特許第5,399,346号、同第5,124,263号、同第4,650,764号、及び同第4,980,289号を参照されたく、これらの各々の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【0123】

レンチウイルスベクター

HIVなどのレンチウイルスは、「遅いウイルス」である。レンチウイルスに由来するベクターは、例えば、エキスピボ形質導入幹細胞又は前駆細胞を介して、患者に数回投与した後、宿主細胞において長期間発現することができる。遺伝性疾患、がん、及び神経学的疾患を含むほとんどの疾患及び障害について、長期的な発現は、治療を成功させるために不可欠である。レンチウイルスベクターの安全性に関して、レンチウイルスベクターの複製能力を排除するためのいくつかの戦略は、現在、当該技術分野で既知である。例えば、US2021/0401868及びUS2021/0403517を参照されたく、これらは各々、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、長い末端反復（LTR）のU3領域からのプロモーター及びエンハンサーエレメントの欠失は、LTR指示された転写を有しないと考えられる。結果として得られるベクターは、「自己不活性化」（SIN）と呼ばれる。

20

【0124】

レンチウイルスベクターは、導入遺伝子の長期的で安定した統合及び娘細胞におけるその増殖を可能にするため、長期的な遺伝子移入を達成することに特に好適である。レンチウイルスベクターは、CNS細胞などの非増殖性細胞を形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルスに由来するベクターよりも追加的な優位性を有する。また、それらは、免疫原性が低いという追加的な優位性もある。一般に、好適なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限ヌクレアーゼ部位、及び1つ以上の選択マーカー（例えば、WO01/96584及びWO01/29058、並びに米国特許第6,326,193号）を含有する。いくつかのベクタープロモーター配列は、導入遺伝子の発現のために利用可能である。好適なプロモーターの一例は、即時初期サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列である。このプロモーター配列は、強力な構成的プロモーター配列であり、それに作用可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することが可能である。好適なプロモーターの別の例は、EF1aである。しかしながら、他の構成的プロモーター配列も使用することができ、限定されないが、シミアンウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳がんウイルス（MMTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）長末端反復（LTR）プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタインバーウイルス即時初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、並びに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを含む。誘導性プロモーターには、限定されないが、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンプロモーターが含まれる。

30

40

50

【0125】

本開示は、分裂細胞及び非分裂細胞、そのような乏突起膠細胞、星状膠細胞、又はグリア前駆細胞に感染することができる組換えレンチウイルスを提供する。ウイルスは、インビボ及びエクスピボでの核酸配列の移入及び発現に有用である。本開示のレンチウイルスベクターは、レンチウイルストランスファープラスミド又は感染性レンチウイルス粒子であり得る。レンチウイルス移入系で使用するためのレンチウイルスベクター、ヘルパーの構築物、エンベロープ構築物などの構築は、例えば、US 2021/0401868及びUS 2021/0403517に記載されており、これらは各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0126】

アデノウイルス

アデノウイルスは、インビボで核酸を様々な細胞型に効率的に送達するように修飾され得る真核生物DNAウイルスであり、遺伝子を神経細胞及びグリア細胞に標的化することを含む、遺伝子治療プロトコルにおいて広く使用されている。様々な複製欠陥アデノウイルス及び最小アデノウイルスベクターが、核酸治療剤について記載されている（例えば、PCT特許公開第1994/26914号、同第1995/02697号、同第1994/28152号、同第1994/12649号、同第1995/02697、及び同第1996/22378号を参照されたく、これらの各々の内容は、参照によりそれらの全体が組み込まれる）。そのようなアデノウイルスベクターを使用して、本開示の治療用分子を細胞に送達することもできる。

【0127】

アデノ随伴ウイルス

アデノ随伴ウイルスは、その臨床的安全性記録、非病原性、非分裂細胞（ニューロンなど）に感染する能力、及び単回投与後に長期的な遺伝子発現を提供する能力により、広く使用されている遺伝子治療ベクターである。現在、多くのヒト及び非ヒト霊長類AAV血清型が特定されている。AAVベクターは、世界中の何百もの臨床試験で安全性を実証しており、臨床有効性は、血友病B、脊髄性筋萎縮、アルファ1抗トリプソン、及びLeber先天性無脊髄症の試験で示されている。

【0128】

それらの安全性、非病原性、及びニューロンに感染する能力のために、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、及びAAV9などのAAVは、CNS適用のための一般的に使用される遺伝子治療ベクターである。しかしながら、直接CNS注射後、これらの血清型は、特に遺伝子発現が構成的プロモーターによって駆動される場合、支配的なニューロン指向性を呈し、乏突起膠細胞における発現は低く、これは、白質疾患の治療におけるそれらの使用の可能性を制限する。AAV1/2、AAV2、及びAAV8は、形質導入乏突起膠細胞を示している。発現特異性のための細胞特異的プロモーターへの依存は、非乏突起膠細胞系統細胞における潜在性プロモーター活性を介した非選択的な細胞取り込み及び漏出性導入遺伝子の発現の可能性を可能にする。

【0129】

これらの問題を軽減するための本明細書に記載のアプローチは、乏突起膠細胞又は星状膠細胞又はグリア前駆細胞に対して高い指向性を有するAAV血清型を使用することを含む。最近、DNAシャッフリング及び指向性進化法を使用して、乏突起膠細胞に対する強い選択性を有するキメラAAVカプシド、AAV/Olig001が記載されている（Powell et al., 2016, Gene Ther 23:807-814）。その後、AAV/Olig001は、カナバン病のマウスモデルにおいて新生児乏突起膠細胞を形質導入することが示された（Francis et al., 2021, Mol Ther Methods Clin Dev 20:520-534）。ランダムな変異誘発及びペプチドライブラリ挿入などの他のアプローチを使用して、乏突起膠細胞又は星状膠細胞又はグリア前駆細胞に対する指向性及び選択性についてスクリーニングされ得るカプシドライブラリを生成することができる。

【0130】

前述のように、「アデノ随伴ウイルス」及び／又は「AAV」という用語は、直鎖一本鎖DNAゲノムを有するパルボウイルス及びその変異体を指す。この用語は、別様に必要とされる場合を除いて、全ての亜型、並びに天然に存在する形態及び組換え形態の両方を包含する。AAVを含むパルボウイルスは、細胞に進入し、核酸（例えば、導入遺伝子）を核に導入することができるため、遺伝子治療ベクターとして有用である。いくつかの実施形態では、導入された核酸（例えば、rAAVベクターゲノム）は、形質導入細胞の核内にエピソームとして持続する環状コンカテマーを形成する。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、宿主細胞ゲノムの特定の部位に挿入される。部位特異的統合は、ランダム統合とは対照的に、予測可能な長期発現プロファイルをもたらす可能性が高いと考えられる。ヒトゲノムへのAAVの挿入部位は、AAVS1と称される。細胞に導入されると、核酸によってコードされるRNA又はポリペプチドは、細胞によって発現され得る。AAVは、ヒトにおけるいかなる病原性疾患とも関連しないため、AAVによって送達される核酸を使用して、ヒト対象における疾患、障害、及び／又は状態の治療のための治療用RNA又はポリペプチドを発現することができる。

10

【0131】

AAVの複数の血清型が自然界に存在し、少なくとも15の野生型血清型が、これまでにヒトから同定されている（すなわち、AAV1～AAV15）。天然に存在する及び変異体血清型は、他のAAV血清型と血清学的に異なるタンパク質カプシドを有することによって区別される。例としては、とりわけ、AAV1、AAV2、AAV、AAV3（AAV3A及びAAV3Bを含む）、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV12、AAVrh10、AAVrh74（WO2016/210170を参照されたい）、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヒツジAAV、及び組換えにより産生された変異体（例えば、挿入、欠失、及び置換などを有するカプシド変異体）、例えば、AAV2i8、NP4、NP22、NP66、DJ、DJ/8、DJ/9、LK3、RHM4-1と称される変異体などが挙げられる。例えば、「霊長類AAV」は、霊長類に感染するAAVを指し、「非霊長類AAV」は、非霊長類哺乳動物に感染するAAVを指し、「ウシAAV」は、ウシ哺乳動物に感染するAAVを指す。

20

【0132】

血清型独自性は、別のAAVと比較して、あるAAVに対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて決定される。そのような交差反応性の差は、通常、カプシドタンパク質配列及び抗原決定因子の差に起因する（例えば、AAV血清型のVP1、VP2、及び／又はVP3配列の差に起因する）。しかしながら、一部の天然に存在するAAV又は人工のAAV変異（例えば、組換えAAV）は、現在既知の血清型のいずれとも血清学的差異を示さない場合がある。次いで、これらのウイルスは、対応するタイプのサブグループ、又はより単純に変異体AAVとみなされ得る。したがって、本明細書で使用される場合、「血清型」という用語は、血清学的に異なるウイルス、並びに血清学的には異ならないが、所与の血清型のサブ群又は変異体内にあり得るウイルスの両方を指す。

30

【0133】

既知のAAV血清型のカプシドのアミノ酸配列の包括的なリスト及び整列は、Marsic et al. (2014) Molecular Therapy 22(11): 1900-1909によって提供される。様々な血清型のAAVのゲノム配列、並びにネイティブITR、repタンパク質、及びカプシドサブユニットの配列が、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献中に、又はGenBankなどの公的データベース中に見出され得る。例えば、GenBank受託番号NC_002077（AAV1）、AF063497（AAV1）、NC_001401（AAV2）、AF043303（AAV2）、NC_001729（AAV3）、NC_001863（AAV3B）、NC_001829（AAV4）、U89790（AAV4）、NC_006152（AAV5）、NC_001862（AAV6）、AF513851（AAV7）、AF51

40

50

3852 (AAV8)、及びNC__006261 (AAV8)を参照されたく、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。例えば、Srivistava et al. (1983) J. Virology 45:555、Chiorini et al. (1998) J. Virology 71:6823、Chiorini et al. (1999) J. Virology 73:1309、Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virology 73:939、Xiao et al. (1999) J. Virology 73:3994、Muramatsu et al. (1996) Virology 221:208、Shade et al. (1986) J. Virol. 58:921、Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854、Moris et al. (2004) Virology 33:375-383、国際特許公開第00/28061号、同第99/61601号、同第98/11244号、同第2013/063379号、同第2014/194132号、同第2015/121501号、及び米国特許第6,156,303号、及び同第7,906,111号も参照されたい。

10

20

30

40

50

【0134】

上述のように、「組換えアデノ随伴ウイルス」又は「rAAV」は、内因性ウイルスゲノムの全て又は一部を非天然配列で置き換えることによって、野生型AAVから区別される。ウイルス内に非天然配列を組み込むことは、ウイルスベクターを「組換え」ベクター、したがって「rAAVベクター」として定義する。rAAVベクターは、所望のRNA又はタンパク質又はポリペプチド（例えば、本明細書に開示されるRNA分子）をコードする異種ポリヌクレオチドを含み得る。組換えベクター配列は、AAVカプシドにカプシド化又はパッケージングされてもよく、「rAAVベクター」、「rAAVベクター粒子」、「rAAVウイルス粒子」、又は単に「rAAV」と称される。

【0135】

本開示は、AAV起源ではないポリヌクレオチド配列（例えば、AAVとは異種のポリヌクレオチド）を含むrAAVベクターを提供する。異種ポリヌクレオチドは、少なくとも1つ、場合によっては2つのAAV末端反復配列（例えば、逆方向末端反復）に隣接し得る。本明細書において「ベクターゲノム」とも称される、ITRに隣接する異種ポリヌクレオチドは、典型的には、目的のRNA若しくはポリペプチド、又は目的の遺伝子、例えば、治療処置のための標的をコードする。対象（例えば、患者）へのrAAVベクターの送達又は投与は、コードされたRNA／タンパク質／ペプチドを対象に提供する。したがって、rAAVベクターを使用して、例えば、様々な疾患、障害及び状態を治療するための発現のための異種ポリヌクレオチドを転写／送達することができる。

【0136】

rAAVベクターゲノムは概して、ウイルスrep及びcap遺伝子を置き換えた異種核酸配列に対してcisで145個の塩基のITRを保持する。そのようなITRは、組換えAAVベクターを産生するために有用であるが、しかしながら、修飾AAV ITR、及び部分的又は完全に合成された配列を含む非AAV末端反復もまた、この目的に役立つことができる。ITRは、ヘアピン構造を形成し、例えば、感染後の相補的DNA鎖の宿主細胞媒介性合成のためのプライマーとして機能する。ITRはまた、ウイルスパッケージング、統合などにおいて役割を果たす。ITRは、AAVゲノム複製、及びrAAVベクターへのパッケージングのためにcisで必要とされる唯一のAAVウイルスエレメントである。rAAVベクターゲノムは、任意選択で、異種配列（例えば、関心のある遺伝子をコードする導入遺伝子、又はアンチセンス及びsiRNAを含むがこれらに限定されない関心のある核酸配列、並びに多くの他のものの中でもCRISPR分子）を含むベクターゲノムの5'及び3'末端に一般的に存在する2つのITRを含む。5'及び3' ITRは、両方とも同じ配列を含んでもよく、又は各々が異なる配列を含んでもよい。AAV ITRは、血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくは11、又は任意の他のAAVを含むがこれらに限定されない、任意のAAVに由来し得る。

【0137】

本開示の rAAV ベクターは、カプシドの血清型（例えば、AAV8、Oligo001）とは異なる AAV 血清型（例えば、野生型 AAV2、その断片又は変異体）からの ITR を含み得る。1つの血清型からの少なくとも1つの ITR を含むが、異なる血清型からのカプシドを含むそのような rAAV ベクターは、ハイブリッドウイルスベクターと称され得る（米国特許第7,172,893号を参照されたい）。AAV ITR は、野生型 ITR 配列全体を含んでもよく、又はその変異体、断片、若しくは修飾であってもよいが、機能性を保持する。

【0138】

いくつかの実施形態では、rAAV ベクターゲノムは、直鎖の一本鎖であり、AAV ITR に隣接している。異種遺伝子の転写及び翻訳の前に、自己プライミング ITR のうちの1つの遊離 3'-OH を使用して、DNA ポリメラーゼ（例えば、形質導入細胞内の DNA ポリメラーゼ）によって、およそ 4700 ヌクレオチドの一本鎖 DNA ゲノムを二本鎖形態に変換して、第2の鎖合成を開始しなければならない。いくつかの実施形態では、完全長一本鎖ベクターゲノム（すなわち、センス及びアンチセンス）はアニールして、完全長二本鎖ベクターゲノムを生成する。これは、反対の極性（すなわち、センス又はアンチセンス）のゲノムを担持する複数の rAAV ベクターが同時に同じ細胞を形質導入する場合に生じ得る。それらがどのように産生されるかにかかわらず、二本鎖ベクターゲノムが形成されると、細胞は、二本鎖 DNA を転写及び翻訳し、異種遺伝子を発現することができる。

【0139】

rAAV ベクターからの導入遺伝子発現の効率は、発現前に一本鎖 rAAV ゲノム（ssAAV）を二本鎖 DNA に変換する必要性によって妨げられ得る。このステップは、DNA 合成又は複数のベクターゲノム間の塩基対合を必要とせず、二本鎖 DNA に折り畳むことができる反転反復ゲノムをパッケージングすることができる自己相補的 AAV ゲノム（scAAV）を使用することによって回避され得る。例えば、米国特許第8,784,799号；McCarty, (2008) Molec. Therapy 16(10):1648-1656、及び McCarty et al., (2001) Gene Therapy 8:1248-1254、McCarty et al., (2003) Gene Therapy 10:2112-2118 を参照されたい。

【0140】

rAAV ベクターのウイルスカプシドは、野生型 AAV 又は変異体 AAV、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAVrh74 (WO 2016/210170 を参照されたい)、AAV12、AAV2i8、AAV1.1、AAV2.5、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV9.45、RHM4-1 (WO 2015/013313)、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4、RHM15-6、AAV hu.26、AAV1.1、AAV2.5、AAV6.1、AAV6.3.1、AAV9.45、AAV2i8、AAV29G、AAV2.8G9、AAV-LK03、AAV2-TT、AAV2-TT-S312N、AAV3B-S312N、AAVトリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヘビAAV、ヤギAAV、エビAAV、ヒツジAAV、及びそれらの変異体からのものであり得る（例えば、Fields et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers) を参照されたい）。カプシドは、米国特許第7,906,111号、Gao et al. (2004) J. Virol. 78:6381、Morris et al. (2004) Virol. 33:375、WO 2013/063379、WO 2014/194132 に開示されているいくつかの AAV 血清型に由来し得、WO 2015/121501 に開示されている真型 AAV (AAV-TT) 変異体、並びに WO 2015/013313 に開示されている RHM4-1、RHM15-1~RHM15-6、及びそれらの変異体を含み得る。AAV capタ

ンパク質の完全な補体には、VP1、VP2、及びVP3が含まれる。AAV VPカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むORFは、完全な補体AAV Capタンパク質未満を含んでもよく、又はAAV capタンパク質の完全な補体が提供されてもよい。

【0141】

いくつかの実施形態では、2つ以上のAAV血清型（例えば、野生型AAV血清型、変異体AAV血清型）に由来するヌクレオチド配列によってコードされるカプシドタンパク質を含むrAAVベクターは、「キメラベクター」又は「キメラカプシド」と称される（その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,491,907号を参照されたい）。いくつかの実施形態では、キメラカプシドタンパク質は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれよりも多くのAAV血清型に由来する核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、組換えAAVベクターは、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAVrh74、AAVrh10、AAV2i8、又はそれらの変異体に由来するカプシド配列を含み、前述のAAV血清型のうちのいずれかからのアミノ酸の組み合わせを含むキメラカプシドタンパク質をもたらし（Rabinowitz et al. (2002) J. Virology 76 (2): 791-801を参照されたい）。代替として、キメラカプシドは、1つの血清型由来のVP1、異なる血清型由来のVP2、更に異なる血清型由来のVP3、及びそれらの組み合わせの混合物を含み得る。例えば、キメラウイルスカプシドは、AAV1capタンパク質又はサブユニット、並びに少なくとも1つのAAV2capタンパク質又はサブユニットを含み得る。キメラカプシドは、例えば、1つ以上のB19capサブユニットを有するAAVカプシドを含むことができ、例えば、AAVcapタンパク質又はサブユニットは、B19capタンパク質又はサブユニットによって置き換えられ得る。例えば、一実施形態では、AAVカプシドのVP3サブユニットは、B19のVP2サブユニットによって置き換えられ得る。いくつかの実施形態では、キメラカプシドは、参照により本明細書に組み込まれるWO2021/221995及びWO2014/052789に記載されるOligo001カプシドである。

【0142】

いくつかの実施形態では、キメラベクターは、変更された指向性又は特定の組織若しくは細胞型に対する指向性を示すように操作されている。「指向性」という用語は、ある特定の細胞（例えば、乏突起膠細胞）若しくは組織型へのウイルスの優先的な進入、及び／又はある特定の細胞若しくは組織型への進入を促進する細胞表面との優先的な相互作用を指す。AAV指向性は、一般に、異なるウイルスカプシドタンパク質とそれらの同族細胞受容体との間の特異的相互作用によって決定される（Lykken et al. (2018) J. Neurodev. Disord. 10:16）。好ましくは、ウイルス又はウイルスベクターが細胞に入ると、ベクターゲノム（例えば、rAAVベクターゲノム）によって担持される配列（例えば、導入遺伝子などの異種配列）が発現する。

【0143】

「指向性プロファイル」は、様々な組織及び／又は器官における1つ以上の標的細胞の形質導入のパターンを指す。例えば、キメラAAVカプシドは、ニューロン及び他のCNS細胞の低い形質導入のみを伴う乏突起膠細胞、星状膠細胞、又は乏突起膠細胞前駆細胞の効率的な形質導入を特徴とする指向性プロファイルを有し得る。参照により本明細書に組み込まれる、WO2014/052789を参照されたい。そのようなキメラカプシドは、乏突起膠細胞又は星状膠細胞又はグリア前駆細胞に指向性を呈する乏突起膠細胞又は星状膠細胞又はグリア前駆細胞に特異的であると考えられ得、本明細書では「グリアルトロピズム」と呼ばれ、CNSに直接投与される場合、ニューロン及び他のCNS細胞型よりも乏突起膠細胞又は星状膠細胞又は乏突起膠細胞前駆細胞を優先的に形質導入する。いくつかの実施形態では、乏突起膠細胞又は乏突起膠細胞前駆細胞に特異的なカプシドによって形質導入される細胞の少なくとも約80%が乏突起膠細胞又は乏突起膠細胞前駆細胞

であり、例えば、形質導入細胞の少なくとも約 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又はそれ以上が乏突起膠細胞又は乏突起膠細胞前駆細胞である。

【0144】

細胞置換療法

本出願の一態様は、成体対象の CNS（例えば、脳）における加齢性乏突起膠細胞喪失、星状膠細胞喪失、又は白質喪失の有害作用を軽減する方法に関する。この方法は、CNS（例えば、脳）における加齢性乏突起膠細胞喪失、星状膠細胞喪失、又は白質喪失の有害作用を受ける対象、例えば、成体対象を識別することと、単離されたグリア前駆細胞の集団を提供することと、を含む。次いで、単離されたグリア前駆細胞の集団を、選択された対象の CNS（脳及び／又は脳幹など）に導入して、加齢性白質喪失の有害作用を受ける位置における対象の脳内の細胞を少なくとも部分的に置き換える。

10

【0145】

本明細書で使用される場合、「グリア細胞」という用語は、支持及び栄養を提供し、恒常性を維持し、ミエリンの形成又は髄鞘形成の促進のいずれかを行い、神経系におけるシグナル伝達に参加する非ニューロン細胞の集団を指す。本明細書で使用される「グリア細胞」は、グリア系統の完全に分化した細胞、例えば、乏突起膠細胞又は星状膠細胞、並びにグリア前駆細胞を包含する。グリア前駆細胞は、乏突起膠細胞及び星状膠細胞などのグリア系統の細胞に分化する可能性を有する細胞である。

【0146】

本明細書に記載のグリア前駆細胞は、以下により詳細に記載されるように、例えば、限定するものではないが、ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）及び胚性幹細胞などの多能性幹細胞の任意の好適な供給源に由来し得る。一実施例では、グリア前駆細胞は、本明細書に記載のグリア前駆細胞又はその子孫から若返った細胞であり得る。

20

【0147】

いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象においてそれを行うために、グリア前駆細胞又は若返らせた細胞は、若いグリア又はグリア前駆細胞であるか、又は治療される対象の対応物より若い。

【0148】

本明細書で使用される場合、「若い」グリア又はグリア前駆細胞という用語は、インビトロ環境でグリア前駆細胞への分化を開始するように誘導される細胞を指す（胎児ドナー組織からの細胞単離から約 105 日）。いくつかの実施形態では、「若いグリア細胞」という用語は、動物への移植の準備ができていた分化したグリア前駆細胞を指す（胎児ドナー組織からの細胞単離から約 160 日）。いくつかの実施形態では、「若いグリア細胞」という用語は、移植から 1～20 週間以内のグリア前駆細胞又はそれらの子孫を指す。「より古いグリア細胞」という用語は、「若いグリア細胞」と比較して使用される。より古いグリア細胞と比較して、若いグリア細胞は、以下の特徴のうちの 1 つ以上を有し得る：（i）より速く成長又は増殖又は分裂する、（ii）CDKN1A（p21Cip1）及び CDKN2 / p16（INK4）及び p14（ARF）をコードする老齢に関連する転写物の古いもののレベルよりも低いレベルを有する、及び（iii）より長いテロメア又はより高いテロメラーゼ活性又はその両方。

30

40

【0149】

いくつかの実施形態では、より古いグリア細胞は、宿主に 5、10、20、30、又は 40 週間移植されたグリア前駆細胞に由来するグリア細胞である。いくつかの実施形態では、より古いグリア細胞は、分化したグリア前駆細胞から更に 5、10、20、30、又は 40 週間培養されたグリア細胞である（例えば、最初の組織収穫から約 160 日）。いくつかの実施形態では、より古いグリア細胞は、分化の導入から更に 5、10、20、30、又は 40 週間培養されたグリア細胞である（例えば、最初の組織収穫から約 105 日間）。

【0150】

iPSC は、体細胞などの非多能性細胞に由来する多能性細胞である。例えば、限定さ

50

れないが、iPSCは、組織、末梢血、臍帯血、及び骨髓に由来し得る（例えば、Cai et al., J. Biol. Chem. 285 (15) : 112227-11234 (2010)、Giorgetti et al., Nat. Protoc. 5 (4) : 811-820 (2010)、Streckfuss-Bomeke et al., Eur. Heart J. doi:10.1093/eurheartj/ehs203 (July 12, 2012)、Hu et al., Blood doi:10.1182/blood-2010-07-298331 (Feb. 4, 2011)、Sommer et al., J. Vis. Exp. 68:e4327 doi:10.3791/4327 (2012)を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。体細胞は、遺伝子操作を使用して、胚性幹細胞様状態にリプログラムすることができる。iPSCの形成に好適な例示的な体細胞としては、線維芽細胞（例えば、Streckfuss-Bomeke et al., Eur. Heart J. doi:10.1093/eurheartj/ehs203 (2012)を参照されたく、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、例えば、皮膚試料又は生検によって得られた真皮線維芽細胞、滑膜組織からの滑膜細胞、ケラチノサイト、成熟B細胞、成熟T細胞、膵β細胞、メラニン細胞、肝細胞、包皮細胞、頬細胞、又は肺線維芽細胞などが挙げられる。

10

【0151】

人工多能性幹細胞を産生する方法は、当該技術分野で既知であり、典型的には、体細胞においてリプログラミング因子の組み合わせを発現することを伴う。iPSCの生成を促進及び誘導する好適なリプログラミング因子としては、Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc、Nanog、C/EBPα、Esrrb、Lin28、及びNr5a2の1つ以上が挙げられる。ある特定の実施形態では、体細胞において、少なくとも2つのリプログラミング因子を発現させて、体細胞を正常にリプログラミングする。他の実施形態では、体細胞において、少なくとも3つのリプログラミング因子を発現させて、体細胞を正常にリプログラミングする。

20

【0152】

iPSCは、使用統合ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、誘導性レンチウイルスベクター、及びレトロウイルスベクター）、切除可能なベクター（例えば、トランスポゾン及びフロキシドレンチウイルスベクター）、並びに細胞リプログラミングを促進する遺伝子を送達する非統合ベクター（例えば、アデノウイルス及びプラスミドベクター）を含む、当該技術分野で既知の方法によって誘導され得る（例えば、Takahashi and Yamanaka, Cell 126:663-676 (2006)、Okita et al., Nature 448:313-317 (2007)、Nakagawa et al., Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2007)、Takahashi et al., Cell 131:1-12 (2007)、Meissner et al., Nat. Biotech. 25:1177-1181 (2007)、Yu et al., Science 318:1917-1920 (2007)、Park et al., Nature 451:141-146 (2008)、及び米国特許出願公開第2008/0233610号を参照されたく、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。IPS細胞を生成するための他の方法には、WO2007/069666、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852、WO2008/118820、Ikeda et al. への米国特許出願公開第2011/0200568号、Egusa et al. への同第2010/0156778号、Musicへの同第2012/0276070号、及びNakagawaへの同第2012/0276636号、Shi et al., Cell Stem Cell 3 (5) : 568-574 (2008)、Kim et al., Nature 454:646-650 (2008)、Kim et al., Cell 136 (3) : 411-419 (2009)、Huangfu et al., Nat. Biotechnol. 26:1269-1275 (2008)、Zh

30

40

50

ao et al., Cell Stem Cell 3:475-479 (2008)、Feng et al., Nat. Cell Biol. 11:197-203 (2009)、及びHanna et al. Cell 133(2):250-264 (2008)に開示されるものが含まれ、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0153】

上述のiPSC生成の方法は、リプログラミング効率を高めるか、又はリプログラミング因子に置き換えりさえる小分子を含むように修正され得る。これらの小分子には、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤5'-アザシチジン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤VPA、及びBayK8644と一緒にG9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤BIX-01294、並びにL型カルシウムチャネルアゴニストなどのエピジェネティックモジュレーターが挙げられるが、これらに限定されない。他の小分子リプログラミング因子としては、TGF- β 阻害剤及びキナーゼ阻害剤（例えば、ケンパウロン）などのシグナル変換経路を標的とするものが挙げられる（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるSommer and Mostoslavsky, Stem Cell Res. Ther. 1:26 doi:10.1186/scrt26 (August 10, 2010)によるレビューを参照されたい）。

【0154】

本明細書に記載の非ヒト哺乳動物モデルを作製するのに好適なiPSCからグリア前駆細胞の高濃縮調製物を得る方法は、Goldman and WangへのWO2014/124087、及びWang et al., Cell Stem Cell 12(2):252-264 (2013)を参照されたく、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0155】

本出願の別の実施形態では、グリア前駆細胞は、胚性幹細胞に由来する。胚性幹細胞は、早期哺乳類胚の全能性細胞に由来し、インビトロで無制限の未分化増殖が可能である。本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞」という用語は、胚、胎盤、若しくは臍帯から単離された細胞、又はそのような細胞の不死化バージョン、すなわち、胚性幹細胞株を指す。好適な胚性幹細胞株には、株WA-01(H1)、WA-07、WA-09(H9)、WA-13、及びWA-14(H14)が含まれるが、これらに限定されない(Thomson et al., Science 282(5391):1145-47 (1998)及びThomson et al.への米国特許第7,029,913号を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。他の好適な胚性幹細胞株としては、HAD-C100細胞株が挙げられる（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるTannenbaum et al., PLoS One 7(6):e35325 (2012)、WIBR4、WIBR5、WIBR6細胞株（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるLengner et al., Cell 141(5):872-83 (2010)）、及びヒト胚性幹細胞株(HUES)株1~17（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるCowan et al., N. Engl. J. Med. 350:1353-56 (2004)を参照されたい）。

【0156】

ヒト胚性幹細胞は、組織置換療法に潜在的に有用なクローン／遺伝子組換え細胞の実質的に無制限の供給源を提供する。本開示の非ヒト哺乳動物モデルを作製するのに好適な胚細胞からのグリア前駆細胞の高濃縮調製物を得る方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Wang et al., Cell Stem Cell 12:252-264 (2013)に開示されるように本明細書に記載される。

【0157】

手短に言えば、グリア前駆細胞は、神経及びグリア前駆細胞分化の連続的な段階を通じて多能性細胞を導くプロトコルを使用して、多能性細胞集団、すなわち、iPSC又は胚性幹細胞に由来する。系統制限の各段階は、ある特定の細胞タンパク質の発現によって特

徴付けられ、識別される。このプロセスの段階1は、多能性細胞集団を、胚様体形成を誘導するのに有効な条件下で培養することを伴う。本明細書に記載されるように、多能性細胞集団は、胚性幹細胞（ESC）培地（例えば、好適な血清置換物及びbFGFを含有するDMEM/F12）中で、胚性線維芽細胞などの他の細胞との共培養で維持され得る。多能性細胞は、コロニーが直径およそ250～300μmであるとき、100%コンフルエンス、例えば、80%コンフルエンスに達する前に継代される。細胞の多能性状態は、SSEA4、TRA-1-60、OCT-4、NANOG、及び／又はSOX2に対するマーカーを使用して容易に評価される。

【0158】

多能性幹細胞の複雑な三次元細胞凝集体である胚様体（EB）（段階2）を生成するために、多能性細胞培養物は、それらが250～300μm、又は約250～300μmのコロニー直径で約80%のコンフルエンスを達成すると、解離される。EBを最初に、bFGFを含まないESC培地中で懸濁して培養し、次いでbFGF及びヘパリンを補充した神経誘導培地に切り替える。神経上皮分化を誘導するために（段階3）、EBをプレートし、bFGF、ヘパリン、ラミニンを補充した神経誘導培地中で培養し、次いで、レチノイン酸を補充した神経誘導培地に切り替える。神経上皮分化は、中枢神経幹細胞及び前駆細胞を特徴付けるPAX6及びSOX1の共発現によって評価される。

【0159】

pre-乏突起膠細胞前駆細胞（「pre-OPC」）の分化を誘導するために、神経上皮細胞コロニーを、レチノイン酸、B27サプリメント、及び音波ハリネズミ（shh）アゴニスト（例えば、パルモファミン）を含む追加の因子の存在下で培養することができる。pre-OPCコロニーの出現は、OLIG2及び／又はNKX2.2発現の存在によって評価される。OLIG2及びNKX2.2は両方とも、中央乏突起膠細胞前駆細胞によって発現されるが、NKX2.2は、乏突起膠細胞分化のより特異的な指標である。したがって、初期のpre-乏突起膠細胞前駆細胞の段階は、OLIG⁺/NKX2.2⁻細胞コロニーによって特徴付けられる。OLIG⁺/NKX2.2⁻の初期のpre-OPCは、レチノイン酸をbFGFで置き換えることによって、後期のOLIG⁺/NKX2.2⁺pre-OPCに分化される。段階5の最後では、細胞のかなりの割合が、OLIG2⁺/NKX2.2⁺発現プロファイルによって示されるように、pre-OPCである。

【0160】

pre-OPCは、トリヨードチロニン（T3）、ニューロトロフィン3（NT3）、インスリン成長因子（IGF-1）、及び血小板由来成長因子-AA（PDGF-AA）（段階6）などの成長因子を補充したグリア誘導培地中で培養することによって、二電位グリア前駆細胞に更に分化させることができる。これらの培養条件は、所望の場合、ミエリノーゲン性グリア前駆細胞の産生を最大化するために、3～4ヶ月以上延長することができる。適切な対象への移植に好適な細胞調製物は、PDGFRα⁺グリア前駆細胞を含有するものとして識別される。

【0161】

本出願の方法の実施に使用されるグリア前駆細胞の集団は、例えば、約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%のグリア細胞を含む、少なくとも約80%のグリア前駆細胞を含み得る。グリア前駆細胞の選択された調製物は、ニューロン及びニューロン前駆細胞などの他の細胞型を比較的欠く（例えば、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1%未満含有する）ことができる。任意選択で、細胞集団は、グリア前駆細胞の実質的に純粋な集団であってもよい。

【0162】

本出願の方法に従って治療される対象は、脳における加齢性白質／乏突起膠細胞／星状膠細胞喪失に罹患している成体であり得る。この方法は、通常の老化プロセスの一部として生じ得るこの状態の有害作用を軽減する。

【0163】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「治療すること」又は「治療」は、任意の客観的又は主観的パラメータ、例えば、軽減；寛解；症状の減少、又は傷害、病理、若しくは状態を患者にとってより忍容性のあるものにすること；変性の速度を遅らせること若しくは低下；変性の最終的なポイントを衰弱させにくくすること；又は対象の身体的又は精神的健康を改善することを含む、傷害、病理、又は状態の改善における成功の任意の指標を指す。症状の治療又は寛解は、身体検査、神経学的検査、及び／又は精神医学的評価の結果を含む、客観的又は主観的パラメータに基づいてもよい。

【0164】

「治療すること」は、疾患、状態、又は障害に関連する症状又は状態の発症を予防若しくは遅延、軽減、又は停止若しくは阻害するためのグリア前駆細胞又は／及び他の薬剤（複数可）の投与を含み得る。「治療効果」は、疾患、疾患の症状、又は対象の疾患、状態、若しくは障害の副作用の軽減、排除、又は予防を指す。治療は、予防的（疾患、状態、若しくは障害の発症又は悪化を予防又は遅延させるため、又はその臨床的若しくは亜臨床的発症の発現を予防するため）、又は疾患、状態、若しくは障害の発現後の症状の治療的抑制若しくは軽減であり得る。

【0165】

本明細書で使用される場合、「白質」という用語は、脳及び浅脊髄における中枢神経系の構成要素に関連し、これは、大脳のある領域から別の領域へ、並びに大脳と下部脳中枢との間でシグナルを伝達するグリア細胞及び髄鞘性軸索から大部分が構成される。

【0166】

本出願の方法によって治療することができる、脳における加齢関連白質喪失、乏突起膠細胞喪失、又は星状膠細胞喪失に起因する状態のうちの1つは、皮質下認知症である。

【0167】

膠質前駆細胞は、様々な既知の技術によって有害作用の軽減を必要とする対象に導入され得る。これらには、限定されないが、本明細書に記載される注射、堆積、及びグラフトが含まれる。

【0168】

一実施形態では、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Goldmanへの米国特許第7,524,491号、Windrem et al., Cell Stem Cell 2:553-565 (2008)、Han et al., Cell Stem Cell 12:342-353 (2013)、及びWang et al., Cell Stem Cell 12:252-264 (2013)に記載されるように、対象の複数の部位へ両側に移植され得る。神経組織及び細胞を宿主の脳に移植するための方法は、Bjorklund and Stenevi (eds), Neural Grafting in the Mammalian CNS, Ch. 3-8, Elsevier, Amsterdam (1985)、Gage et al.への米国特許第5,082,670号、及びWeiss et al.への同第6,497,872号によって記載され、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。典型的な手順としては、実質内、脳梁内、脳室内、くも膜下腔内、及び静脈内移植が挙げられる。

【0169】

実質内移植は、移植時に脳実質に対置されるように、宿主脳内の組織の注射又は堆積によって達成することができる。実質内移植の2つの主な手順は以下のとおりである：（1）宿主脳実質内にドナー細胞を注射すること、又は（2）宿主脳実質を曝露するように外科的手段によって空洞を調製し、次いで移植片を空洞に堆積させること（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Bjorklund and Stenevi (eds), Neural Grafting in the Mammalian CNS, Ch. 3, Elsevier, Amsterdam (1985)）。両方の方法は、移植時にドナー細胞と宿主脳組織との間の実質的な付着を提供し、両方とも移植片と宿主脳組織との間の解剖学的統合を促進する。これは、ドナー細胞が宿主の脳の不可欠な部分になり、宿主の生涯にわたって生存することが必要である場合に重要である。

【0170】

グリア前駆細胞はまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Goldmanへの米国特許出願公開第2003/0223972号に記載されるように、脳梁内に送達することができる。グリア前駆細胞は、前脳皮質下、具体的には、脳梁の前部及び後部原基に直接送達することもできる。グリア前駆細胞はまた、小脳柄白質に送達して、主要な小脳及び脳幹へのアクセスを得ることができる。グリア前駆細胞は、脊髄にも送達することができる。

【0171】

代替として、細胞は、室(ventricle)、例えば、脳室(cerebral ventricle)に配置されてもよい。室内で細胞をグラフトすることは、ドナー細胞を注射することによってか、又は30%コラーゲンなどの基質中で細胞を成長させて、後にグラフト細胞の転位を防ぐために室内に移植されてもよい固形組織のプラグを形成することによって達成されてもよい。硬膜下グラフトの場合、細胞は、硬膜にスリットを作った後、脳の表面の周りに注射されてもよい。

【0172】

細胞送達のための好適な技術は、上記に記載されている。一実施形態では、当該グリア前駆細胞の調製物は、対象の線条体、前脳、脳幹、及び／又は小脳に投与される。

【0173】

対象への細胞の送達は、神経系への直接的な単一ステップ又は複数のステップ注射のいずれかを含み得る。視神経の脱髄などの限局性障害については、単回注射を使用することができる。成体及び胎児の乏突起膠細胞前駆細胞は、移植レシピエントの脳内に広く分散するが、広範囲の障害については、治療を最適化するために複数の注射部位を行うことができる。注射は、任意選択で、中枢神経系の領域、例えば、脳梁のような白質路(例えば、前部及び後部原基)、背側柱、小脳脚、大脳脚などに向けられる。そのような注射は、任意選択で、付随する撮像方法(例えば、高解像度MRI撮像)とともに、定位固定手術などの正確な局在化方法を使用して、片側又は両側に行うことができる。当業者は、脳領域が種によって異なることを認識するが、しかしながら当業者はまた、哺乳類種にわたって同等な脳領域を認識する。

【0174】

細胞移植は、任意選択で解離細胞として注射することができるが、非解離細胞の局所的配置によって提供することもできる。いずれの場合も、細胞移植は、任意選択で、許容される溶液を含む。そのような許容される溶液としては、望ましくない生物学的活性及び汚染を回避する溶液が挙げられる。好適な溶液には、製剤を等張にするための、適切な量の薬学的に許容可能な塩が含まれる。薬学的に許容される溶液の例としては、限定されないが、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、及び培地が挙げられる。溶液のpHは、好ましくは約5～約8であり、より好ましくは約7～約7.5である。

【0175】

解離した細胞移植の注射は、注射デバイス(例えば、カニューレ、針、又はチューブ)の入口経路、出口経路、又は入口経路と出口経路の両方を横切って行われるストリーミング注射であり得る。自動化を使用して、均一な出入り速度並びに注射速度及び注射量を提供することができる。

【0176】

対象に投与されるグリア前駆細胞の数は、レシピエントのサイズ及び種、並びに細胞置換を必要とする組織の体積に応じて、各投与(例えば、注射部位)において約 10^2 ～ 10^8 の範囲であり得る。単回投与(例えば、注射)用量は、移植レシピエント患者について、 10^3 ～ 10^5 、 10^4 ～ 10^7 、及び 10^5 ～ 10^8 個の細胞、又は合計で任意の量の範囲に及ぶことができる。

【0177】

CNSは免疫学的に特権的な部位であるため、異種を含む投与された細胞は、生存することができ、任意選択で、免疫抑制薬又は免疫抑制剤の典型的なレジメンは、治療方法に

10

20

30

40

50

使用されない。しかしながら、任意選択で、免疫抑制剤も対象に投与してもよい。免疫抑制剤及びそれらの投与レジメンは、当業者に既知であり、アザチオプリン、アザチオプリンナトリウム、シクロスポリン、ダルトロバン、グスペリムス三塩酸塩、シロリムス、及びタクロリムスなどの薬剤を含む。レジメンの用量範囲及び持続時間は、治療される障害、拒絶の程度、使用される特定の免疫抑制剤の活性、対象の年齢、体重、全般的な健康、性別、及び食生活、投与時間、投与経路、使用される特定の免疫抑制剤の排泄速度、治療の持続時間及び頻度、並びに併用される薬物によって変化し得る。当業者は、免疫抑制のための許容用量及び持続時間を決定することができる。投与レジメンは、禁忌又は対象の状態の変化の場合に、個々の医師によって調整することができる。

【0178】

一実施形態では、1つ以上の免疫抑制剤を、細胞投与の10週間前から開始して対象に投与することができる。一実施形態では、1つ以上の免疫抑制剤は、細胞投与の9週間、8週間、7週間、6週間、5週間、4週間、3週間、2週間、1週間、7日、6日、5日、4日、3日、2日、1日、24時間未満前から開始して対象に投与される。一実施形態では、1つ以上の免疫抑制剤を、細胞投与日から開始し、投与後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月間継続して対象に投与される。一実施形態では、1つ以上の免疫抑制剤は、投与後1年超にわたって対象に投与される。

【0179】

本明細書に記載の方法による治療に好適な対象としては、加齢性白質喪失に罹患している任意の哺乳類の対象が挙げられる。例示的な哺乳動物対象としては、ヒト、マウス、ラット、モルモット、及び他の小げっ歯類、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、及びサルが挙げられる。一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0180】

上記のサプレッサー／若返り療法と細胞療法とを併用することができる。例えば、上述の阻害性分子、CRISPR／Casシステム、発現カセット、又は発現ベクターは、エクスピボでの用途において治療用試薬として使用することができる。その目的のために、試薬を、治療効果のために対象に移植される組織又は細胞に導入することができる。細胞及び／又は組織は、後で外植体を受容する生物若しくは対象（例えば、同種同系又は自己）に由来し得るか、又は移植（例えば、異種（heterologous）、異種（xenogenic）、同種異系、又は同種同系）前に別の生物又は対象（例えば、親戚、兄弟、又はHLAマッチングドナー）に由来し得る。試薬を使用して、細胞若しくは組織が所望の表現型を得るか、又はインビボで移植されたときに機能を果たすことができるように、細胞若しくは組織における1つ以上の遺伝子の発現を調節することができる。一実施形態では、患者からのある特定の標的細胞が抽出又は単離される。これらの単離された細胞は、これらの細胞による試薬の取り込みに好適な条件下で（例えば、カチオン性脂質、リポソームなどの送達試薬を使用するか、又は細胞への試薬の送達を容易にするためのエレクトロポレーションなどの技術を使用して）、細胞内の特定のヌクレオチド配列を標的とする試薬と接触させる。次いで、細胞を同じ患者又は他の患者に再導入する。

【0181】

治療用途のために、薬学的に有効な用量の治療試薬又は医薬組成物を対象に投与することができる。薬学的に有効な用量は、疾患状態の発生の予防、阻害、又は治療（ある程度の症状、好ましくは症状の全てを軽減する）に必要な用量である。当業者であれば、対象のサイズ及び体重、疾患の進行又は浸透の程度、対象の年齢、健康、及び性別、投与経路、並びに投与が局所的であるか全身であるかなどの因子を考慮することによって、所与の対象に投与される試薬の治療有効用量を容易に決定することができる。一般に、0.1mg/kg～100mg/kg体重／日の量の活性成分を、負荷電ポリマーの効力に応じて投与する。治療用試薬又は医薬組成物は、単回用量又は複数回用量で投与することができる。

【0182】

医薬組成物

本開示は、ミエリンの遺伝性又は後天性障害を予防又は治療するための医薬組成物又は薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、上記のタンパク質分子、ポリヌクレオチド、発現カセット、発現ベクター（例えば、ウイルスベクターゲノム、発現ベクター、rAAVベクター）、システム（例えば、CRISPR/Casシステム、又はシステムの構成要素をコードする核酸（複数可））、及び宿主細胞のうちの1つ以上を含む。

【0183】

医薬組成物は、薬学的に許容される担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤、及び／又は他の薬学的薬剤を更に含む。薬学的に許容される担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤又は他の薬剤は、生物学的に又は別様に望ましくないものではなく、例えば、材料は、材料の有利な生物学的効果を上回る望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく対象に投与され得る。任意の好適な薬学的に許容される担体又は賦形剤は、本発明による医薬組成物の調製に使用され得る（例えば、Remington The Science and Practice of Pharmacy, Adebaye Adejare (Editor) Academic Press, November 2020を参照されたい）。

【0184】

医薬組成物は、典型的には、製造及び貯蔵条件下で無菌であり、発熱原を含まず、かつ安定である。医薬組成物は、溶液（例えば、水、食塩水、デキストロース溶液、緩衝溶液、又は他の薬学的に滅菌された流体）、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高い生成物（例えば、ウイルスベクター粒子、微粒子、又はナノ粒子）濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。

【0185】

いくつかの実施形態では、本開示の上述のタンパク質、ポリヌクレオチド、発現カセット、発現ベクター、ベクターゲノム、又はrAAVベクターを含む医薬組成物は、水又は緩衝生理食塩水中で製剤化される。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合は必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。いくつかの実施形態では、等張化剤、例えば、糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトールなど、又は塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい場合がある。注射用組成物の持続的吸着は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを含めることによってもたすことができる。いくつかの実施形態では、本開示の核酸、ベクター、及び／又は宿主細胞は、例えば、インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含む、徐放性ポリマー、又は生成物を急速放出から保護する他の担体を含む組成物における制御放出製剤で投与され得る。

【0186】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、静脈内、動脈内、皮下、皮内、腹腔内、筋肉内、関節内、実質内（IP）、髄腔内（IT）、脳室内（ICV）及び／又は大槽内（ICM）投与に好適な組成物を含む非経口医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、ICV注射による投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、AAVなどのウイルスベクター）は、PBS中の350mMのNaCl及び5%D-ソルビトール中に製剤化され得る。

【0187】

投与方法

上記の分子、又はポリヌクレオチド、又はベクター（例えば、ベクターゲノム、rAAVベクター）、又はシステム（例えば、CRISPR/Casシステム、又はシステムの構成要素をコードする核酸（複数可））、又は細胞は、対象を治療するために対象（例えば、患者）又は標的細胞に投与されてもよい。治療を必要とするヒト対象又は動物へのベ

10

20

30

40

50

クターの投与は、ベクターを投与するための当該技術分野で既知の任意の手段によって行うことができる。標的細胞の例としては、CNSの細胞、好ましくは乏突起膠細胞、星状膠細胞、又はそれらの前駆細胞が挙げられる。

【0188】

ベクターは、標準的なケア治療に加えて、及びその補助として投与することができる。すなわち、ベクターは、慣例的な方法を使用して当業者によって決定されるように、同時に、同時期に、又は所定の投薬間隔で、別の薬剤、化合物、薬物、治療又は治療レジメンと同時に投与することができる。本明細書に開示される使用は、当該技術分野で既知の疾患のための標準的なケアに加えて、及び／又はそれと同時の投与スケジュールに基づいて、本開示のrAAVベクターの投与を含む。

10

【0189】

いくつかの実施形態では、併用組成物は、1種以上の免疫抑制剤を含む。いくつかの実施形態では、併用組成物は、導入遺伝子を含むrAAVベクター（例えば、本明細書に開示されるRNA分子をコードするポリヌクレオチド）と、1つ以上の免疫抑制剤と、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、導入遺伝子を含むrAAVベクターを対象に投与又は送達することと、ベクターの投与前に予防的に、又はベクターの投与後に（すなわち、ベクター及び／又はタンパク質が提供され、それによって、それらに対する応答の症状が明らかになる前又は後に）、免疫抑制剤を対象に投与することと、を含む。

【0190】

一実施形態では、本開示のベクター（例えば、rAAVベクター）は、全身投与される。全身投与の例示的な方法としては、限定されないが、静脈内（例えば、門脈）、動脈内（例えば、大腿動脈、肝動脈）、血管内、皮下、皮内、腹腔内、経粘膜、肺内、リンパ内、及び筋肉内投与など、並びに直接的な組織又は器官への注射が挙げられる。当業者であれば、全身投与により、全ての組織に核酸を送達することができることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、直接的な組織又は器官への投与は、乏突起膠細胞欠乏症によって直接的な影響を受けるエリア（例えば、脳及び／又は中枢神経系）への投与を含む。いくつかの実施形態では、本開示のベクター及びその医薬組成物は、脳実質に（すなわち、実質内投与によって）、脳脊髄液（CSF）に到達するように脊柱管若しくはくも膜下腔に（すなわち、髄腔内投与によって）、脳の脳室に（すなわち、脳室内投与によって）、及び／又は脳の大槽に（すなわち、大槽内投与によって）投与される。

20

30

【0191】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示のベクターは、ミエリンの疾患を治療するために、脳に（例えば、実質、室（ventricle）、大槽などに）及び／又はCSFに（例えば、脊柱管又はくも膜下腔に）直接注射することによって投与される。本開示のベクターの標的細胞には、皮質、脳梁の皮質下白質、線条体及び／又は小脳に位置する細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、本開示のベクターの標的細胞は、乏突起膠細胞又はその前駆細胞である。追加の投与経路はまた、直接可視化下でのベクターの局所適用、例えば、表面皮質適用、又は他の定位固定適用を含み得る。

【0192】

いくつかの実施形態では、本開示のベクターは、少なくとも2つの経路によって投与される。例えば、ベクターは全身投与され、脳にも直接投与される。少なくとも2つの経路を介して投与される場合、ベクターの投与は、同時又は同時期であることができるが、そうである必要はない。代わりに、異なる経路を介した投与は、各投与間にある時間間隔置いて別個に行うことができる。

40

【0193】

上述のタンパク質、又はタンパク質をコードするポリヌクレオチド、又はベクターゲノム、又はポリヌクレオチドを含むベクター（例えば、rAAVベクター）は、細胞のエクスピボの形質導入、又は対象への直接投与（例えば、疾患を有する患者のCNSへの直接投与）のために使用され得る。いくつかの実施形態では、形質導入細胞（例えば、宿主細胞）は、疾患、障害、又は状態を治療又は予防するために対象に投与される（例えば、疾

50

患のための細胞療法)。例えば、治療用核酸(例えば、タンパク質をコードする)を含む r A A V ベクターは、好ましくは、乏突起膠細胞、星状膠細胞、又はそれらの前駆細胞に、生物学的に有効な量で投与することができる。

【0194】

r A A V ベクターの投薬量は、例えば、投与様式、治療される疾患若しくは状態、疾患の病期及び／若しくは侵襲性、個々の対象の状態(年齢、性別、体重など)、特定のウイルスベクター、発現されるタンパク質の安定性、ベクターに対する宿主免疫応答、並びに／又は送達される遺伝子に依存する。一般に、用量は、治療効果を達成するために、対象の体重(kg)当たり少なくとも 1×10^8 又はそれ以上、例えば、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 又はそれ以上のベクターゲノム(vg)の範囲である。

10

【0195】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、標的細胞(例えば、乏突起膠細胞、星状膠細胞、又はそれらの前駆細胞)における発現に適切な調節エレメント(例えば、プロモーター)を有するDNA分子(例えば、組換え核酸)の構成要素として投与され得る。ポリヌクレオチドは、プラスミド又はウイルスベクター、例えば、r A A V ベクターの構成要素として投与され得る。r A A V ベクターは、治療を必要とする患者にベクターを直接(例えば、CNSに直接)送達することによってインビボで投与され得る。r A A V ベクターは、治療を必要とするドナー患者からの細胞へのベクターのインビトロ投与、続いて形質導入された細胞のドナーへの再導入(例えば、細胞治療)によってエクスビボで患者に投与されてもよい。

20

【0196】

キット

本開示は、包装材料、及びその中で説明される1つ以上の構成要素を含むキットを提供する。キットは、典型的には、構成要素の説明、又はその中の構成要素のインビトロ、インビボ、若しくはエクスビボでの使用説明を含むラベル又は添付文書を含む。キットは、そのような構成要素、例えば、上述のポリヌクレオチド、核酸、発現カセット、発現ベクター(例えば、ウイルスベクターゲノム、発現ベクター、r A A V ベクター)、及び宿主細胞、並びに任意選択で第2の活性剤、例えば、化合物、治療剤、薬物、又は組成物の集合体を含むし得る。

30

【0197】

キットは、キットの1つ以上の構成要素を含有する物理的構造を指す。包装材料は、構成要素を無菌的に維持することができ、そのような目的に一般的に使用される材料(例えば、紙、ガラス、プラスチック、箔、アンプル、バイアル、チューブなど)で作製することができる。

【0198】

ラベル又は添付文書は、その中の1つ以上の構成要素の識別情報、用量、作用機序、薬物動態及び薬力学を含む活性成分(複数可)の臨床薬理学を含み得る。ラベル又は添付文書は、製造、ロット番号、製造場所及び日付、有効期限を特定する情報を含み得る。ラベル又は添付文書は、キット構成要素が使用され得る疾患(例えば、HDなどのミエリンの遺伝性又は後天性又は加齢性障害)に関する情報を含み得る。ラベル又は添付文書は、方法、使用、又は治療プロトコル若しくは治療レジメンにおけるキット構成要素のうちの1つ以上を使用するための臨床医又は対象に対する指示を含み得る。指示は、投薬量、持続時間の頻度、及び本明細書に記載される方法、使用、治療プロトコル、又は予防若しくは治療レジメンのいずれかを実践するための指示を含み得る。

40

【0199】

ラベル又は添付文書は、潜在的な副作用、合併症又は反応に関する情報、例えば、特定の組成物を使用することが適切でない状況に関する対象又は臨床医への警告を含み得る。

【0200】

定義

50

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、本発明を限定することを意図するものではない。本発明の説明及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」及び「the」は、文脈により明らかにそうではないと指示されない限り、複数の形態も同様に含むことが意図される。以下の用語は以下のような意味を有する。

【0201】

本明細書で使用される場合、「約」又は「およそ」という用語は、生物学的活性の量、ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の相同性又は長さ、用量、時間、温度などの測定可能な値を指し、別段の指定がない限り、文脈から明らかでない限り、又はそのような数が可能な値の100%を超える場合を除いて、指定された量のいずれかの方向（超又はそれ未満）で、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、又は更に0.1%の変動を包含することを意図する。

【0202】

「導入遺伝子」という用語は、細胞に導入され、RNAに転写され、任意選択で、適切な条件下で翻訳及び／又は発現することができる異種ポリヌクレオチドを指す。態様では、それは、それが導入された細胞に所望の特性を付与するか、又はそれ以外の場合、所望の治療的又は診断的結果をもたらす。別の態様では、それは、miRNA、siRNA、又はshRNAなどのRNA干渉を媒介する分子に転写され得る。

【0203】

本明細書で使用される場合、「相同」又は「相同性」という用語は、所与の領域又は部分にわたって少なくとも部分的同一性を共有する2つ以上の参照エンティティ（例えば、核酸又はポリペプチド配列）を指す。例えば、2つのペプチドにおけるアミノ酸位置が同一のアミノ酸によって占められている場合、ペプチドはその位置で相同である。特に、相同ペプチドは、非修飾ペプチド又は参照ペプチドに関連する活性又は機能を保持し、修飾ペプチドは、一般に、非修飾配列のアミノ酸配列と「実質的に相同」であるアミノ酸配列を有する。ポリペプチド、核酸又はその断片を指す場合、「実質的な相同性」又は「実質的な類似性」とは、別のポリペプチド、核酸（又はその相補鎖）又はその断片と適切な挿入又は欠失に関して最適に整列した場合、配列の少なくとも約70%～99%に配列同一性が存在することを意味する。2つの配列間の相同性（同一性）の程度は、当該技術分野で既知のコンピュータプログラム又は数学アルゴリズムを使用して確認することができる。パーセント配列相同性（又は同一性）を計算するそのようなアルゴリズムは、概して、比較領域又はエリアにわたる配列ギャップ及びミスマッチを説明する。

【0204】

核酸又はポリヌクレオチドは、DNA分子（例えば、cDNA又はゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、又はDNA若しくはRNA類似体を指す。DNA又はRNA類似体は、ヌクレオチド類似体から合成することができる。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0205】

単離又は組換え核酸は、その構造が、任意の天然に存在する核酸の構造又は天然に存在するゲノム核酸の任意の断片の構造と同一ではない核酸を指す。したがって、この用語は、例えば、（a）天然に存在するゲノムDNA分子の一部の配列を有するが、それが天然に存在する生物のゲノム内の分子のその部分に隣接する両方の配列に隣接していないDNA、（b）得られる分子が任意の天然に存在するベクター又はゲノムDNAと同一ではないような様式で、ベクターにか、又は原核生物若しくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれる核酸、（c）cDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって産生される断片、又は制限断片などの別個の分子、及び（d）ハイブリッド遺伝子、すなわち、融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組換えヌクレオチド配列、を包含す

る。上述の核酸を使用して、本開示のタンパク質を発現させることができる。この目的のために、核酸を好適な調節配列に作動可能に連結させて、発現ベクターを生成することができる。

【0206】

「組換え核酸」は、組換え技術、及び一緒に核酸配列を接合するために使用される手順を使用して一緒に接合される核酸配列の組み合わせである。

【0207】

「異種」DNA分子及び「異種」核酸という用語は、本明細書で使用される場合、各々、特定の宿主細胞にとって外来の源に由来するか、又は同じ源に由来する場合、その元の形態から修飾される分子を指す。したがって、宿主細胞内の異種遺伝子は、特定の宿主細胞にとって内因性であるが、例えば、シャッフル又は組換えの使用によって修飾された遺伝子を含む。2つの核酸セグメントを説明するために使用される場合、これらの用語は、2つの核酸セグメントが同じ遺伝子からではないか、又は同じ遺伝子を形成する場合、それらの一方又は両方が元の形態から修飾されていることを意味する。これらの用語はまた、天然に存在するDNA分子の非天然に存在する複数のコピーを含む。したがって、これらの用語は、細胞にとって外来又は異種であるか、又は細胞にとって相同であるが、そのエレメントが通常見られない宿主細胞核酸内の位置にある核酸セグメントを指す。外因性DNAセグメントを発現させて、外因性RNA又はポリペプチドを産生する。「相同DNA分子」は、それが導入される宿主細胞と自然に会合するDNA分子である。

【0208】

「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。調節配列には、ヌクレオチド配列、並びに組織特異的調節配列及び／又は誘導性配列の構成的発現を指示する配列が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質又はRNAの発現のレベルなどの要因に依存し得る。発現ベクターを宿主細胞に導入して、目的のRNA又はポリペプチドを産生することができる。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させ、RNA合成を開始させるDNA配列として定義される。強力なプロモーターは、RNAを高頻度で開始させるものである。

【0209】

「プロモーター」は、ポリヌクレオチドの転写を開始及び調節するヌクレオチド配列である。プロモーターは、誘導性プロモーター（プロモーターに操作可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現が、分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される）、抑制可能なプロモーター（プロモーターに操作可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現が、分析物、補因子、調節タンパク質などによって抑制される）、及び構成的プロモーターを含み得る。「プロモーター」又は「制御エレメント」という用語は、完全長プロモーター領域及びこれらの領域の機能的（例えば、転写又は翻訳を制御する）セグメントを含むことが意図されている。

【0210】

「操作可能に連結された」は、そのように説明された構成要素がそれらの通常の機能を実行するように構成されるエレメントの配置を指す。したがって、核酸配列に操作可能に連結された所与のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、その配列の発現に影響を及ぼすことができる。プロモーターは、その発現を指示するように機能する限り、配列と連続している必要はない。したがって、例えば、介在する翻訳されていないが転写された配列は、プロモーター配列と核酸配列との間に存在することができ、プロモーター配列は、依然としてコード配列に「操作可能に連結された」とみなされることができる。したがって、「操作可能に連結された」という用語は、転写複合体によるプロモーターエレメントの認識時に、目的のDNA配列の転写の開始を可能にする、目的のプロモーターエレメント及びDNA配列の任意の間隔又は方向を包含することが意図される。

【0211】

ここで使用される場合、「遺伝子構築物」又は「核酸構築物」という用語は、組換えD

10

20

30

40

50

NA 技術（例えば、組換え核酸）の使用から生じる非天然の核酸分子を指す。遺伝子又は核酸構築物は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの核酸分子であり、自然界には見られない様式で組み合わせられ、配置される核酸配列のセグメントを含有するように修飾されている。核酸構築物は、「カセット」又は「ベクター」（例えば、プラスミド、rAAVベクターゲノム、発現ベクターなど）、すなわち、外因的に作成されたDNAを宿主細胞に送達するように設計された核酸分子であり得る。

【0212】

本明細書で使用される「発現カセット」は、適切な宿主細胞における特定のヌクレオチド配列の発現を指示することができる核酸配列を意味し、これは、終結シグナルに操作可能に連結され得る目的のヌクレオチド配列に操作可能に連結されたプロモーターを含み得る。それはまた、ヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要な配列を含み得る。コード領域は、通常、目的のRNA又はタンパク質をコードする。目的のヌクレオチド配列を含む発現カセットは、キメラであってもよい。発現カセットはまた、天然に存在するが、異種発現に有用な組換え形態で得られたものであってもよい。発現カセットにおけるヌクレオチド配列の発現は、宿主細胞が何らかの特定の刺激に曝露されたときにのみ転写を開始する構成的プロモーター又は調節可能なプロモーターの制御下にあってもよい。多細胞生物の場合、プロモーターはまた、特定の組織若しくは器官、又は発達段階に特異的であり得る。

【0213】

ベクターは、核酸分子を指し、それが連結されている別の核酸を輸送することができる。ベクターは、自律複製が可能であってもそうでなくてもよい、又は宿主DNAに統合することができてもできなくてもよい。例としては、核酸（例えば、組換え核酸）の挿入又は組み込みによって操作され得るプラスミド、ウイルス（例えば、rAAV）、コスミド、又は他のビヒクルが挙げられる。ベクターは、例えば、遺伝子操作（例えば、クローニングベクター）を含む様々な目的のために使用して、細胞に核酸を導入／移入し、細胞内の挿入された核酸を転写又は翻訳することができる。いくつかの実施形態では、ベクター核酸配列は、細胞における増殖のための少なくとも複製起点を含有する。いくつかの実施形態では、ベクター核酸は、異種核酸配列、発現制御エレメント（複数可）（例えば、プロモーター、エンハンサー）、選択可能マーカー（例えば、抗生物質耐性）、ポリアデノシン（polyA）配列、及び／又はITRを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞に送達されると、核酸配列が伝播される。いくつかの実施形態では、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達される場合、細胞は、異種核酸配列によってコードされるポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、宿主細胞に送達される場合、核酸配列又は核酸配列の一部は、カプシドにパッケージングされる。宿主細胞は、単離された細胞又は宿主生物内の細胞であり得る。RNA又はポリペプチド又はタンパク質をコードする核酸配列（例えば、導入遺伝子）に加えて、追加の配列（例えば、調節配列）が、同じベクター内（すなわち、遺伝子に対してシスで）に、及び遺伝子に隣接して存在し得る。いくつかの実施形態では、調節配列は、遺伝子の発現を調節するためにtransで作用する別個の（例えば、第2の）ベクター上に存在し得る。プラスミドベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称され得る。

【0214】

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」という用語は、rAAVベクターを形成するようにパッケージング又はカプシド化される組換え核酸配列を指す。典型的には、ベクターゲノムは、異種ポリヌクレオチド配列、例えば、導入遺伝子、調節エレメント、カプシドに元々存在しないITRを含む。組換えプラスミドを使用して組換えベクター（例えば、rAAVベクター）を構築又は製造する場合、ベクターゲノムは、プラスミド全体を含まず、むしろウイルスベクターによる送達を意図する配列のみを含む。組換えプラスミドのこの非ベクターゲノム部分は、典型的には「プラスミド骨格」と称され、これは組換えウイルスベクター産生の伝播に必要とされるプロセスであるプラスミドのクローニング、選択及び増幅に重要であるが、それ自体はrAAVベクターにパッケージング又はカプシド化されない。

【0215】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター」という用語は、概して、核酸送達ビヒクルとして機能し、ウイルス粒子（すなわち、カプシド）内にパッケージングされたベクターゲノム（例えば、AAV rep及びcapをコードする核酸の代わりに導入遺伝子を含む）を含み、例えば、AAV血清型及び変異体（例えば、rAAVベクター）を含むレンチウイルス及びパルボウイルスを含むウイルス粒子を指す。組換えウイルスベクターは、rep及び／又はcap遺伝子を含むベクターゲノムを含まない。

【0216】

本明細書で使用される場合、「過剰発現すること」、「過剰発現する」、「過剰発現された」、又は「過剰発現」という用語は、宿主細胞における核酸又はタンパク質の産生を指す場合、その核酸又はタンパク質が、その天然に存在する環境で産生される量よりも多い量で産生されることを意味する。この用語は、内因性、並びに外因性又は異種の核酸及びタンパク質の過剰発現を包含することが意図されている。したがって、本用語などは、細胞における核酸又はタンパク質の発現を、細胞が自然に含有するレベルよりも高いレベルに増加させることを包含することを意図する。ある特定の実施形態では、細胞内の核酸又はタンパク質の発現レベル又は量が、細胞が自然に含有するレベル又は量と比較して少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、又は1000%増加する。

10

20

【0217】

変異型細胞又は罹患した細胞との関連において、「過剰発現すること」、「過剰発現する」、「過剰発現された」、及び「過剰発現」などの用語は、核酸又はタンパク質の発現を、変異型細胞、罹患した細胞、野生型細胞、又は罹患していない細胞が含有するレベルよりも高いレベルに増加させることを包含することを意図する。ある特定の実施形態では、変異型細胞又は罹患した細胞における核酸又はタンパク質の発現レベル又は量が、変異型細胞、罹患した細胞、野生型細胞、又は罹患していない細胞が含有するレベル又は量と比較して少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、又は1000%増加する。

30

【0218】

「アンチセンス」とは、長さにかかわらず、核酸配列のコード鎖又はmRNAに相補的である核酸配列を指す。アンチセンスRNAは、個々の細胞、組織、又はオルガノイドに導入することができる。アンチセンス核酸は、修飾骨格、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、又は当該技術分野で既知の他の修飾骨格を含有し得るか、又は非天然ヌクレオシド間結合を含有し得る。

40

【0219】

本明細書で言及されるように、「相補的核酸配列」は、相補的ヌクレオチド塩基対からなる別の核酸配列とハイブリダイズすることができる核酸配列である。「ハイブリダイズする」とは、好適な厳格な条件下で、相補的なヌクレオチド塩基間に二本鎖分子を形成する対を意味する（例えば、DNAにおいて、アデニン（A）は、チミン（T）と塩基対を形成し、グアニン（G）は、シトシン（C）と塩基対を形成する）。（例えば、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399、Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507を参照されたい）。

50

【0220】

「サプレッサー」又は「阻害剤」は、それぞれ、標的遺伝子又はタンパク質の発現又は活性の低下を引き起こす薬剤を指す。

【0221】

「阻害する」、「下方調節する」、又は「低減させる」という用語は、遺伝子の発現、又は1つ以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットをコードするRNA分子若しくは同等のRNA分子のレベル、又は1つ以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットの活性の、本明細書に記載の阻害性核酸分子（例えば、siRNA）などの阻害剤、サプレッサー、又はリプレッサーの非存在下で観察される発現又はレベル以下の低減を指す。下方調節は、転写後サイレンシング、例えば、RNAi媒介性切断、又はDNAメチル化パターン若しくはDNAクロマチン構造の変化と関連付けられ得る。

10

【0222】

本明細書で使用される場合、「阻害性核酸」は、哺乳動物細胞に投与されたときに標的遺伝子の発現の低下をもたらす二本鎖RNA、RNA干渉、miRNA、siRNA、shRNA、若しくはアンチセンスRNA、又はそれらの一部分、若しくはそれらの模倣物である。典型的には、核酸阻害剤は、標的核酸分子の少なくとも一部分若しくはそのオーソログを含むか、又は標的核酸分子の相補鎖の少なくとも一部分を含む。典型的には、標的遺伝子の発現は、10%、25%、50%、75%、又は更に90~100%低減する。

【0223】

本明細書で使用される場合、「siRNA」という用語は、転写後の特定の遺伝子又は複数の遺伝子の発現を干渉する二本鎖RNA分子を意図する。いくつかの実施形態では、siRNAは、RNA干渉経路を使用して遺伝子発現を干渉又は阻害するように機能する。同様の干渉又は阻害効果は、1つ以上の修飾核酸残基、例えば、ペプチド核酸（PNA）、ロック核酸（LNA）、アンロック核酸（UNA）、又はトリアゾール連結DNAを含む短いヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、及び／又は核酸（siRNA、shRNA、又はmiRNAなど）のうちの1つ以上で達成され得る。最適には、siRNAは、18、19、20、21、22、23、又は24個のヌクレオチドの長さであり、その3'末端に2塩基のオーバーハングを有する。これらのdsRNAは、個々の細胞又は培養系に導入することができる。そのようなsiRNAは、miRNAレベル又はプロモーター活性を下方調節するために使用される。

20

【0224】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、又は「治療」という用語は、特定の疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状、特徴、及び／又は原因を部分的又は完全に軽減する、寛解する、緩和する、阻害する、その発症を遅延させる、その重症度を低減する、及び／又はその発生率を低減する療法を施すことを指す。

【0225】

本明細書で使用される場合、「寛解」という用語は、対象の疾患、障害若しくは状態、又はその症状、又は基礎となる細胞応答の検出可能又は測定可能な改善を意味する。検出可能又は測定可能な改善には、疾患、障害又は状態の発生、頻度、重症度、進行若しくは持続時間、それらによる若しくはそれらに関連する合併症の原因の主観的若しくは客観的な減少、低減、阻害、抑制、制限若しくは制御、それらの症状の改善、又はそれらの逆転が含まれる。

30

40

【0226】

本明細書で使用される場合、「に関連する」という用語は、一方の存在、レベル及び／又は形態が他方の存在、レベル及び／又は形態と相関している場合、互いに関連付けられていることを指す。例えば、特定の实体（例えば、ポリペプチド、遺伝子サイン、代謝産物、微生物など）は、その存在、レベル及び／又は形態が（例えば、関連する集団全体にわたって）疾患、障害、又は状態の発生率及び／又は感受性と相関する場合、特定の疾患、障害、又は状態と関連すると考えられる。

50

【0227】

本明細書で使用される場合、「予防する」又は「予防」という用語は、特定の疾患、障害、若しくは状態（例えば、ミエリン疾患）の1つ以上の兆候若しくは症状の発症の遅延、並びに／又は頻度及び／若しくは重症度の低減を指す。いくつかの実施形態では、疾患、障害又は状態に感受性のある集団において、疾患、障害又は状態の1つ以上の兆候又は症状の発症、頻度及び／又は強度の統計的に有意な減少が観察される場合、薬剤が特定の疾患、障害又は状態を「予防する」とみなされるように、予防が集団ベースで評価される。予防は、疾患、障害、又は状態の発症が所定の期間遅延している場合、完全であるとみなされ得る。

【0228】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、投与の目的となる所望の治療効果を生み出す量を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、疾患、障害又は状態に罹患しているか、又はそれに感受性のある集団に治療的投与レジメンに従って投与される場合に、疾患、障害又は状態を治療するのに十分な量を指す。いくつかの実施形態では、治療有効量は、疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状の発生率及び／若しくは重症度を低減する、並びに／又は発症を遅延させる量である。当業者は、「治療有効量」という用語が、実際には、特定の個体において治療の成功が達成されることを必要としないことを理解するであろう。むしろ、治療有効量は、そのような治療を必要とする患者に投与された場合、有意な数の対象において特定の所望の薬理学的応答を提供する量であり得る。

【0229】

細胞の「集団」は、1を超える任意の数の細胞を指すが、少なくとも 1×10^3 個の細胞、少なくとも 1×10^4 個の細胞、少なくとも 1×10^5 個の細胞、少なくとも 1×10^6 個の細胞、少なくとも 1×10^7 個の細胞、少なくとも 1×10^8 個の細胞、少なくとも 1×10^9 個の細胞、又は少なくとも 1×10^{10} 個の細胞である。

【0230】

本明細書で使用される場合、「幹細胞」という用語は、それ自体を置き換え、かつより特化した細胞に分化する両方の能力を有する細胞を指す。それらの自己再生能力は、概して、生物の生存期間、持続する。多能性幹細胞は、身体のような細胞型の全てを生じさせ得る。多分化能性幹細胞は、細胞型の限定されたサブセットを生じさせ得る。例えば、造血幹細胞は、血液に見出される様々な型の細胞を生じさせることができるが、他の型の細胞を生じさせることはできない。多分化能性幹細胞はまた、体性幹細胞、組織幹細胞、系統特異的幹細胞、及び成体幹細胞とも称され得る。多分化能性幹細胞の非幹細胞子孫は、前駆細胞（制限された前駆細胞とも称される）である。前駆細胞は、完全に分化した細胞を生じさせるが、幹細胞よりも細胞型のより制限されたセットを生じさせる。前駆細胞はまた、比較的限定された自己再生能力を有し、それらは分裂及び分化するにつれて、最終的に消耗し、それらの上流多分化能性幹細胞に由来する新しい前駆細胞に置き換えられる。

【0231】

iPS細胞又はiPSCとして一般的に略される「人工多能性幹細胞」は、リプログラミング因子と呼ばれるある特定の因子を導入することによって、非多能性細胞、典型的には成体体細胞、又は線維芽細胞、造血細胞、筋細胞、ニューロン、上皮細胞などの末端分化細胞から人工的に調製された一種の多能性幹細胞を指す。

【0232】

「多能性」とは、1つ以上の組織又は臓器、特に、内胚葉（胃内臓、胃腸管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）、又は外胚葉（表皮組織及び神経系）の3つの胚葉のうちのいずれかを構成する全ての細胞に分化する可能性を有する幹細胞を指す。本明細書で使用される「多能性幹細胞」は、3つの胚葉のうちのいずれかに由来する細胞、例えば、全能性細胞又は人工多能性細胞の直系子孫に分化することができる細胞を指す。

【0233】

本明細書で使用される場合、「治療用細胞」は、患者の状態、疾患、及び／又は傷害を寛解する細胞集団を指す。治療用細胞は、自己（すなわち、患者に由来する）、同種異系（すなわち、患者とは異なる同じ種の個体に由来する）、又は異種異系（すなわち、患者とは異なる種に由来する）であり得る。治療用細胞は、均質（すなわち、単一細胞型からなる）であっても、不均一（すなわち、複数の細胞型からなる）であってもよい。「治療用細胞」という用語は、治療用活性細胞及び治療用活性細胞に分化することができる前駆細胞の両方を含む。

【0234】

「自己」という用語は、任意の材料を指し、それが後で再導入される同じ対象又は個体に由来する。例えば、本明細書に記載の自己細胞療法の方法は、ドナー、例えば、患者からのグリア細胞又はその前駆細胞の収集を伴い、それらは、次いで、例えば、導入遺伝子を発現するように操作され、次いで、同じドナー、例えば、患者に再投与される。

10

【0235】

「異種 (heterologous)」という用語は、異なる対象又は個体に由来する任意の材料（例えば、細胞又は組織足場）を指す。本明細書で使用される場合、「異種」又は「非内因性」又は「外因性」はまた、宿主細胞若しくは宿主対象にとって天然ではない任意の材料（例えば、遺伝子、タンパク質、化合物、分子、細胞、又は組織若しくは組織成分）若しくは活性を指すか、又は宿主若しくは宿主細胞にとって天然であるが、構造、活性、若しくはその両方が天然のバージョンと変異したバージョンとの間で異なるように変更若しくは変異された任意の遺伝子、タンパク質、化合物、分子、細胞、組織、若しくは組織成分である。

20

【0236】

「同種異系」という用語は、1つの個体に由来する任意の材料（例えば、細胞又は組織）を指し、それは、次いで、同種の別の個体に導入される、例えば、同種異系細胞移植である。例えば、細胞は、第1の対象から得られ、本明細書に記載の方法に従ってエクスピボで修飾され、次いで、疾患を治療するために第2の対象に投与され得る。そのような実施形態では、対象に投与される細胞は、同種異系及び異種 (heterologous) 細胞である。

【0237】

「異種 (xenogenic)」という用語は、異なる種の個体に由来する任意の材料（例えば、細胞又は組織）を指す。

30

【0238】

「同種同系」という用語は、本質的に同じ遺伝子によって特徴付けられる任意の材料（例えば、細胞又は組織）を指す。

【0239】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、生物、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト哺乳動物、非ヒト霊長類、霊長類、実験動物、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、ネコ、イヌ）を指す。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト疾患モデルである。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、成人、青年、又は小児対象である。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害又は状態、例えば、本明細書に提供されるように治療され得る疾患、障害又は状態に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、アスパルトアシラーゼ活性の欠損又は機能不全に関連する疾患、障害、又は状態に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態に感受性である。いくつかの実施形態では、感受性の対象は、疾患、障害又は状態を発症する（参照対象又は集団において観察される平均リスクと比較して）増加したリスクを有しやすい、及び／又はそれを示す。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害又は状態の1つ以上の症状を呈する。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態の特定の症状（例えば、疾患の臨床的症状）又は特徴を示さない。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態の任意の症状又は特徴を示さない。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト患者である。いくつかの実施形態では、対象は、診断及び／又は療法が施される個体

40

50

及び／又は施された個体である。

【0240】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、投与の目的となる所望の治療効果を生み出す量を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、疾患、障害又は状態に罹患しているか、又はそれに感受性のある集団に治療的投与レジメンに従って投与される場合に、疾患、障害又は状態を治療するのに十分な量を指す。いくつかの実施形態では、治療有効量は、疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状の発生率及び／若しくは重症度を低減する、並びに／又は発症を遅延させる量である。当業者は、「治療有効量」という用語が、実際には、特定の個体において治療の成功が達成されることを必要としないことを理解するであろう。むしろ、治療有効量は、そのような治療を必要とする患者に投与された場合、有意な数の対象において特定の所望の薬理学的応答を提供する量であり得る。

10

【0241】

以下の実施例は、本開示の実施形態の実施を例示することを意図しているが、決してその範囲を限定することを意図していない。実施例パートAは、グリア細胞の競合置換に関する。実施例パートBは、グリア前駆細胞の若返りに関する。

【実施例】

【0242】

実施例パートA：成体の脳におけるグリア前駆細胞の競合置換

材料及び方法

20

ヒト胚性幹細胞株及び培養条件

同胞ヒト胚性幹細胞(hESC)株GENEA019(WT:18;15CAG)及びGENEA020(HD:48;17CAG)。hESCを、mTeSR1培地(STEMCELL Technologies、カタログ番号85850)を用いて、0.55ug/cm²のヒト組換えラミニン521(BIOLAMINA、カタログ番号LN521)でコーティングされた細胞培養フラスコ上で、フィーダーフリーで定期的に培養した。毎日培地の変更を行った。hESCを、80%コンフルエンスで定期的に、新鮮にコーティングされたフラスコに継代させた。継代は、ReLeSR(STEMCELL TECHNOLOGIES、カタログ番号05872)を使用して行った。全てのhESC及び分化培養物を、37℃の5%CO₂インキュベータ内に維持し、定期的に汚染及びマイコプラズマがない状態を確認した。

30

【0243】

蛍光レポーターhESCの生成

WT及びHD細胞の普遍的な異なる蛍光標識について(図1)、mCherry又はEGFPのいずれかの発現を駆動するレポーター構築物を、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるOceguera-Yanez, F., et al., Methods 101, 43--55に以前に記載されるCRISPR-Cas9媒介戦略の修正版を使用して、それぞれ、WT GENEA019及びHD GENEA020hESCのAAVS1セーフハーバー遺伝子座に挿入した。エレクトロポレーションによるプラスミド送達のためのhESCを調製するために、hESCを、Accutase(StemCell Technologies、カタログ番号07920)での解離後に単一細胞懸濁物として採取し、培地中で洗浄し、自動化細胞カウンターNucleoCounter NC-200(ChemoMetec)でカウントした。エレクトロポレーションごとに、合計1.5×10⁶個の細胞を、5μgのCRISPR-Cas9プラスミド(pXAT2)を標的とするAAVS1及び5μgのレポータードナープラスミド(pAAVS1-P-CAG-mCh又はpAAVS1-P-CAG-EGFP)と混合した。pXAT2(Addgeneプラスミド番号80494)、pAAVS1-P-CAG-mCh(Addgeneプラスミド番号80491)、及びpAAVS1-P-CAG-EGFP(Addgeneプラスミド番号80492)は、Knut Woltjenからの贈り物であった。エレクトロポレーションは、Amaxa 4D-Nucleofector(Lo

40

50

nza)とP3一次細胞キット(Lonza、カタログ番号V4XP-3024)を製造業者のガイドラインに従って使用して行った。核酸切除後、エレクトロポレートされたhESC懸濁物を10cm細胞培養皿に移し、最初の24時間、10 μ MのY-27632(Tocris、カタログ番号1254)を補充したmTeSR1で培養した。エレクトロポレートされたhESCを48~72時間成長させ、次いで0.5 μ g/ μ Lのピューロマイシンで処理した(ThermoFisher、カタログ番号A1113803)。個々のコロニーが手動で採取されるのに十分な大きさになるまで、エレクトロポレートされたhESC培養物をピューロマイシン下に保持した。コロニーを蛍光顕微鏡によって評価し、蛍光タンパク質発現の均一性に基づいて96ウェルプレートに移した。それらの拡大後、各クローンを更なる拡大及び遺伝子型決定のために分割した。遺伝子型決定のために、prepGEM Tissue DNA抽出キット(Zygem)を使用してDNAを抽出した。AAVS1遺伝子座における正確に標的化されたトランスジェニック統合を、以下のプライマーを使用してPCRによって検出し:dna803:TCGACTTCC CCTCTTCCGATG(配列番号1)、及びdna804:CTCAGGTTC TGGGAGAGGGTAG(配列番号2)、一方で、統合の接合性は、以下の追加のプライマーを使用してWT対立遺伝子の存在又は不在によって決定した:(dna803及びdna183:GAGCCTAGGGCCGGGATTCTC(配列番号3))。正確に標的化された挿入を有するhESCクローンを、Pro-Freeze CDM培地(Lonza、カタログ番号BEBP12-769E)で凍結保存し、実験適用前に、核型決定及びアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)特性評価のために拡大した。

10

20

【0244】

核型決定及びaCGH

生成されたレポーターhESC株の核相図を、G分染法(Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universitätsklinikum Tübingen)によって中間期スプレッド上で分析した。この研究で使用した全てのhESC株は、正常な核型を保有する。更に、取得したコピー数変異体(CNV)及びヘテロ接合性喪失領域(LOH)を、aCGH(Cell Line Genetics)によって評価した。正常範囲内外の様々なCNV及びLOHを識別したが(図2)、クローン間の競合相互作用の結果に影響を与えると予想されるものはなかった。

30

【0245】

レポーターWT及びHD hESCからのhGPCの誘導

ヒトGPCは、胚様体(EB)生成ステップへのわずかな修正を伴う、出願者らの確立されたプロトコル(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Wang et al., Cell Stem Cell 12, 252-264)を使用して、レポーターWT及びHD hESCの両方に由来した(Wang et al., Cell Stem Cell 12, 252-264を参照されたい)。EB生成ステップの詳細は、補足情報に含まれている。細胞を、150~200DIVの間で異種移植のために収集し、その時点で、WT-mCherry及びHD-EGFP hESCの両方に由来する培養物は、PDGFR α ⁺/CD44⁺二電位グリア前駆細胞が豊富であった。フローサイトメトリ及び免疫細胞化学による生成された培養物の詳細な特性評価は、図3並びに図18A及び18Bに見ることができる。

40

【0246】

異種移植のための細胞調製物

異種移植のための細胞を調製するために、グリア培養物をCa²⁺/Mg²⁺フリーのハンス平衡塩溶液(HBSS(-/-)、THERMOFISHER、カタログ番号14170112)中に収集し、穏やかなピペッティングによって機械的に小さなクラスターに解離し、血球計でカウントした。次いで、細胞懸濁液をスピンし、10⁵個の細胞/ μ Lの最終濃度で冷たいHBSS(-/-)中に再懸濁し、移植するまで氷上に保った。

50

【0247】

宿主及び異種移植のパラダイム

ヒトグリア線条体再増殖のインビボモデリング：mHtt発現ヒトグリア（HDキメラ）を保有するヒトマウスキメラを生成するために、新生児免疫不全のRag1（-/-）子犬（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Mombaerts, P. et al., Cell 68, 869-877, 1991, 1016/0092-8674 (92) 90030-g）を凍結麻酔し、カスタム焼成粘土台に固定し、出生から48時間以内に推定線条体に100,000のHD-EGFPグリア（1つの脳半球当たり50,000）を両側に注射した。細胞を、1.2~1.4mmの深さで、ガラスピペットを引っ張った状態で10µLのシリンジ（HAMILTON、カタログ番号7653-01）を使用して送達した。その後、子犬は、離乳するまで母親の元に戻した。ヒトグリア線条体再増殖をモデル化するために、36週齢のHDキメラをケタミン/キシラジンによって麻酔し、定位固定フレームに固定した。200,000のWTグリアを、10µLのシリンジ及び金属針を使用して、ヒト化線条体に両側で送達した（AP：+0.8mm；ML：±1.8mm；DV：-2.5~-2.8mm）。損傷を最小限に抑えるために、制御マイクロポンプシステム（World Precision Instruments）を使用して、175nL/分の制御速度で細胞を注射した。針を更に5分間所定の位置に残しておくことで逆流を防止した。実験動物を、WTグリアを受けなかったHDキメラ同腹仔、及びこの正確な手順に従って36週齢でWTグリアを受けた非キメラRag1（-/-）マウスと比較した。

10

20

【0248】

新生児線条体共生着

ヒトグリア間の競合の結果に対するmHtt発現の細胞固有の効果をモデル化するために、新生児Rag1（-/-）マウスを、上述の同じ新生児線条体異種移植プロトコルに従って注射したが、代わりに、WT-mCherry及びHD-EGFP hESCに由来するグリアの1：1混合物からなる合計200,000のヒトグリア（1つの半球当たり100,000）を送達した。対照の同腹仔は、WT-mCherry又はHD-EGFPヒトグリアのいずれかからなる注射を受けた。

【0249】

全ての異種移植に無菌技術を使用した。全てのマウスを、食物及び水への自由なアクセスを伴う病原体のない環境に収容し、全ての手順を、ロチェスター大学動物資源委員会（the University of Rochester Committee on Animal Resources）によって承認されたプロトコルに合意して実施した。

30

【0250】

組織処理

実験動物をHBSS（-/-）、続いて4%PFAで灌流した。脳を除去し、4%PFA中で2時間、後固定し、PBSで3回すすいだ。次いで、それらを30%スクロース溶液（SIGMA-ALDRICH、カタログ番号S9378）中で、平衡化するまでインキュベートし、その時点で、それらを矢状方向（Sakura、カタログ番号4583）でOCT中に埋め込み、-60~-70℃の温度で2-メチルブタン（Fisher Scientific、カタログ番号11914421）中で凍結し、-80℃の冷凍庫に移した。次いで、得られたブロックをCM1950クライオスタット（Leica）上で20µmの切片に切断し、連続的に接着スライド上に収集し、更に使用するまで-20℃で保管した。

40

【0251】

免疫染色

ヒト細胞の表現型決定は、以下の特異的表現型マーカーとともに、それらのそれぞれの蛍光レポーターの免疫染色によって達成した：Olig2（乏突起膠細胞転写因子、GPCをマークする）及びGFAP（グリア線維性酸性タンパク質、星状膠細胞をマークする）。蛍光レポーターは、その発現が動物の生涯を通して遍在したままであったため、ヒト

50

細胞のマーカーとして使用した（図4）。WT-mCherryとWT-タグなしヒトグリアの1:1の混合物を受けた動物において、後者を、ヒト核抗原の発現及び蛍光レポーター発現の欠如によって識別した。免疫標識するために、切片をPBSで再水和させ、次いで透過性化／遮断緩衝液（PBS+0.1% Triton-X（SIGMA-ALDRICH、カタログ番号T8787）+10% Normal Goat Serum（THERMOFISHER、カタログ番号16210072））を使用して2時間、透過性化及び遮断した。次いで、切片を、表現型マーカーを標的とする一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。翌日、一次抗体をPBSで切片から完全に洗浄し、二次抗体を切片に1時間適用した。PBSで二次抗体を完全にすすいだ後、2回目の一次抗体を、今度は蛍光レポーターに対して、4℃で一晩切片に適用した。これらを翌日にPBSですすぎ、切片を二次抗体で1時間インキュベートした。スライドを再びPBSで完全に洗浄し、VECTASHIELD VIBRANCE（Vector Labs、カタログ番号H-1800）で取り付けた。

10

【0252】

異種移植マッピング及び3D再構築

マウス線条体内のヒト細胞分布をマッピングするために、10倍の倍率のDS-Fi1カメラを備えたNIKON NIE ECLIPSE顕微鏡を用いて、線条体全体にまたがる15個の等間隔の160µmの矢状断面の全脳モンタージュを取得し、NIS-Elementsイメージングソフトウェア（NIKON）で処理した。各断面内の線条体の輪郭を描き、免疫標識されたヒト細胞を識別し、Stereo Investigatorソフトウェア（MICROBRIGHTFIELD Bioscience）を使用して輪郭を描いた線条体内にマッピングした。該当する場合、WTグリアの注射部位を、ヒト細胞分布の更なる体積定量化のための基準点としてマッピングした。次いで、マッピングされた断面を、参照として外側脳室を使用して整列させて、ヒト化マウス線条体の3D再構築モデルを生成した。3D再構築後、各ヒト細胞マーカー、注射部位、及び線条体輪郭のデカルト座標を更なる分析のためにエクスポートした。

20

【0253】

線条体内の各ヒト細胞集団における増殖性細胞の分布及び割合を評価するために、3D再構築を実施する際に、Ki67を発現する免疫標識されたヒト細胞を15個の断面の3番目の断面ごとにマッピングした。

30

【0254】

容積定量

HDカメラにおけるHDグリアの空間分布を定量化するために、各定量化された線条体断面の体積を、断面の厚さ（20µm）に断面の面積を乗じることによって計算した。次いで、各断面におけるマークされた細胞の数をそれぞれの体積で割ることによって、各断面の細胞密度を計算した。

【0255】

競合するWT及びHDグリアの空間時間動態を定量化するために、3D再構築データセットにおけるWTグリア送達部位までの距離の関数としての各細胞集団の体積分布を計算するプログラムを開発した（図4）。その目的のために、各定量化された断面は、線条体の輪郭を、断面の厚さ（20µm）によって互いに分離された2つの同一のポリゴンとして表すことによって、上限及び下限の境界 z_u 、 z_l を与えられた。次いで、各個々の断面内の各細胞マーカーの深さ方向の位置が不明であるため、各断面内のマークされた細胞を、断面にわたって一定の確率で均一な点確率関数として表した。すなわち、 z_l から z_u までの断面における各細胞マーカーは、確率関数を有する：

40

$$P(z) = \begin{cases} \frac{1}{z_u - z_l}, & z_l \leq z < z_u \\ 0, & \text{それ以外の場合} \end{cases} .$$

50

【0256】

次いで、各細胞集団の空間分布を、 $125\mu\text{m}$ の半径方向の増分でWTグリタ送達部位から放射状に広がる同心円球形シェル内のマークされた細胞の数をカウントすることによって測定した（対照HDキメラについては、WTグリタ送達部位の座標の平均を使用した）。マークされた細胞は、それぞれの代表的な線分が、完全に内側にある場合か、完全に外側にある場合か、又は上限若しくは下限のいずれかで球形シェルと交差している場合にカウントした。次いで、各細胞集団 $\rho_{a,b}$ （ a, b は、球形シェルの最小半径と最大半径を表す）の密度を、球形シェル内のマークされた細胞の数をシェル内の合わせた断面積で割ることによって計算し、

$$\rho_{a,b} = \frac{N_{a,b}}{V_{a,b}}$$

10

式中、 $N_{a,b}$ は、各点の各断面にわたる積分された点確率関数の合計であり、 $V_{a,b}$ は、球形シェル内の合わせた断面積である。その後の分析は、 2mm の球面半径に制限した。このコードは、Python 3.8とパッケージShapely 1.7で実装されて、ポリゴンを表し、ポリゴンの円の交差を計算した。

【0257】

立体学的推定及び表現型決定

ヒト細胞の総量の推定及びそれらのそれぞれの表現型決定は、光学分画法（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、West, M. J. (1999). Trends in Neurosciences 22, 51–61)を使用して、線条体全体にまたがる5つの等距離に $480\mu\text{m}$ 離れたの断面において立体学的に行った。まず、20倍の倍率のDS-Fi1カメラを備えたNikon Ni-E Eclipse顕微鏡を使用して、全体の線条体z積層モンタージュを取得し、NIS-Elementsイメージングソフトウェア（Nikon）で処理した。各z積層タイルを、 $0.9\mu\text{m}$ のステップサイズを使用して取得した。次いで、モンタージュをStereoInvestigatorにロードし、線条体の輪郭を画定した。一連の $200 \times 200\mu\text{m}$ のカウントフレームを、各断面の輪郭を描いた線条体を覆う $400 \times 400\mu\text{m}$ のグリッド内に、ソフトウェアによって体系的にランダムに配置した。カウントは、全体の断面高さ（ガードゾーンなし）で実施し、細胞は、それらが最初に焦点を当てた光学断面におけるそれらの免疫標識に基づいてカウントした。

20

30

【0258】

統計分析及び再現性

ミスターゲット注射、明白な外科的損傷、又は膠症性病巣への注射などの実験手順からの技術的問題に関連するアーチファクトを呈する試料は、この研究から除外した。統計学的試験は、GraphPad Prism 9を使用して行った。2つ以上の群間の比較について、一元配置分散分析（Tukeyの多重比較検定）を適用した。2つ以上の因子を有する2つの群間の比較について、二元配置分散分析（Sidakの多重比較検定）を適用した。2つのマッチングされた群間を比較する場合、正規分布データセットには対応のある両側t検定を適用したが、マッチングされていない群には、対応のない両側t検定を適用した。有意性を $P < 0.05$ として定義した。可能な場合はいつでも、それぞれのP値を図に記載し、そうでなければ、**** $P < 0.0001$ 、*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ である。反復の数は、図の凡例に示され、nは、独立した実験の数を示す。データは、平均±標準誤差（s.e.m）として表される。

40

【0259】

アポトーシスアッセイ

ヒト細胞集団内のアポトーシス細胞の識別は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ-dUTPニックエンド標識（TUNEL）と、それらのそれぞれの蛍光レポーターについての免疫染色によって達成した。試料をプロテイナーゼK溶液中で、室温で2

50

0 分間インキュベートしたことを除き、製造業者の指示に従って、Click-iT TUNEL Alexa Fluor 647 Imaging Assay (Invitrogen、カタログ番号C10247)を使用してTUNELを行った。固定凍結脳冷凍切片における効率的なTUNEL染色を確認するために、陽性対照切片を、製造業者の指示に従ってDNase Iで処理した。TUNELに続いて、前述の免疫染色プロトコルに従って、蛍光レポーターについて切片を免疫標識した。

【0260】

TUNEL⁺ヒト細胞の定量

各ヒト細胞プール内のアポトーシス細胞の分布及び割合を評価するために、10倍の倍率のDS-Fi3カメラを備えたNikon Ni-E Eclipse顕微鏡を使用して、線条体全体にまたがる5つの等間隔で480μm離れた矢状断面の線条体全体の線条体モンタージュを取得し、NIS-Elementsイメージングソフトウェアで貼り合わせた。線条体は、各断面内に輪郭を描き、免疫標識されたヒト細胞は、Stereo Investigatorを使用して、輪郭を描いた線条体内のそれらのTUNEL標識に基づいて識別し、マッピングした。

【0261】

全体のヒト化された線条体を示す代表的な画像は、NIS-Elementsイメージングソフトウェアの「クロップ」機能を使用し、「最小／最大」レベルを調整して、以前に取得した全脳モンタージュから生成した。次いで、488nm、561nm、及び640nmのレーザー線を備えたNikon Ti-E C2+共焦点顕微鏡、並びに標準的なPMT検出器を使用して、ヒトグリア競合界面の代表的な画像を、大視野z積層モンタージュとして取得した。油浸対物レンズを用いて40倍又は60倍の倍率で画像を取得し、NIS-Elementsで貼り合わせた。次いで、最大強度予測を生成し、NIS-Elementsで「最小／最大」レベルを調整した。同様に、ヒト細胞表現型の代表的な画像を、Nikon Ti-E C2+共焦点及び同じレーザー線を使用して、zスタックとして取得し、撮像し、処理した。

【0262】

キメラマウスからのヒトグリアの蛍光活性化細胞選別 (FACS)

scRNA-seq用にヒト細胞を単離するために、以前に記載されたように (Mariani, J. N., Zou, L. & Goldman, S. A. in Oligodendrocytes. Methods in Molecular Biology Vol. 1936 (eds David Lyons & Linde Kegel) 311-331 (Humana Press, 2019)、かつ図24Aに例示されるように、実験キメラをHBSSで心内灌流し、それらの線条体を解剖し、組織を解離した。BD FACSAria Fusion (BD Biosciences) を使用して、mCherry、EGFPの発現、又はそれらの不在に基づいて、単一の細胞懸濁物を単離した。死細胞を除外するために、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; ThermoFisher、カタログ番号D1306) を1μg/mlで添加した。ゲーティング戦略を図24Bに示す。

【0263】

単一細胞RNA配列決定分析

一次データ獲得 単離された細胞を、10X Genomicsクロムコントローラー (v3.1 chemistry) 上でscRNA-seqのために取得した。ライブラリを製造業者の指示に従って生成し、ロチェスター大学ゲノミクスセンターのIllumina NovaSeq 6000上で配列決定した。scRNA-seqライブラリを、カスタム2パス戦略を使用してSTARsoloと整列させた。まず、アノテーション付きのキメラGRCh38及びGRCm38参照を、mCherry及びEGFPを追加して、Ensembl 102のヒト及びマウスのアノテーションを使用して生成した。次いで、STARsoloを、twopassMode=basic、limitSjdbInsertNsjs=3000000、及びsoloUMIfiltering=Mu

l t i G e n e U M I のパラメータで実行した。次いで、B A M ファイルを種ごとに分割し、クロス種マルチマッピングリードをヒト B A M 又はマウス B A M の両方に割り当てた。F A S T Q ファイルは、マウス又はヒト B A M ファイルのいずれかから再生成し、単一の種の参照に再整理した。

【0264】

差次的発現分析 ヒトデータを、S e u r a t を使用して R にインポートした。細胞をフィルターした（固有の遺伝子 > 250 及びミトコンドリア遺伝子率 < 15）。次いで、細胞を m C h e r r y 又は E G F P の発現について更にフィルターした。カウントは、4,000 個の最も可変的な機能が使用された s c v i を使用して、統合のために P y t h o n にインポートした。モデルは、固有の遺伝子の数及びミトコンドリア遺伝子発現率に加えて、マウス試料及び細胞株を使用して統合のために訓練した。次いで、潜伏表現を、U M A P 及び L o u v a i n コミュニティ検出を介した次元削減に使用した。より小さい細胞の集団を、マーカー発現に基づいて 6 つの主要なタイプのグリアに分類した。次いで、データを S e u r a t に再インポートし、M A S T を使用して差次的発現を実行した。遺伝子の発現が全ての少なくとも 3 % の G P C で検出された場合、差次的発現を考慮した。差次的発現のためのモデル設計は、細胞における固有の遺伝子の数及び実験群を利用した（細胞株／細胞の年齢、及び細胞が、対立するクローンの存在下にあったか否か）。差次的発現の有意性は、 $P < 0.05$ であり、 $\log 2$ 倍率変化は、少なくとも 0.15 であった。各差次的に発現された遺伝子リストの機能分析のために、I n g e n u i t y P a t h w a y A n a l y s i s (Q I A G E N) を使用した。

【0265】

細胞周期分析 各実験群の G 2 M スコアを、S e u r a t の C e l l C y c l e S c o r i n g 関数を使用して計算した。次いで、各モデルの実験群間の統計的比較を、B e n j a m i n i - H o c h b e r g 多重比較調整を用いた D u n n 検定を使用して計算した。

【0266】

転写因子関連レギュロンの識別 遺伝子を最初にフィルターして、少なくとも 1 % の細胞において少なくとも 3 カウントを発現するもののみを保持した。この分析では、9,579 個の細胞全てを使用した。次いで、フィルターされた生マトリックスを、p y S C E N I C の標準パイプラインの入力として使用して、データセット内の各転写因子及びその推定下流標的を識別した。これらの遺伝子セットは、レギュロンと称され、各細胞におけるそれらの活性を表すために「曲線下面積」(A U C) 値が割り当てられ、より高い値は、そのようなレギュロンのより強い濃縮を示す。次いで、得られた A U C マトリックスを使用して、重要な転写因子を探した。アイソグラフトモデル及び同種移植片モデルの両方における G P C 亜集団内で、若い W T 試料からの細胞に 1 を割り当て、老化した W T 試料又は老化した H D 試料からの細胞に 0 を割り当てた。次いで、g l m n e t を使用して、全ての T F の A U C を予測因子として、所定の 0 / 1 の結果に対してラッソロジスティック回帰を行った。ロジスティック回帰のラムダは、c v . g l m n e t で自動的に定義された。

【0267】

本発明者らは、正の係数を有する T F を単離し、若い W T における T F 平均活性が老化した対応物の T F 平均活性よりも高いはずであるように、1 つの群当たりのそれらの平均活性に基づいて更にフィルターした。最後のステップは、これまでに識別されたレギュロンに対して遺伝子セット濃縮分析 (G S E A) を実施して、それらが、老化した H D 細胞及び W T 細胞と比較して、若い W T 細胞において差次的に上方調節された遺伝子について濃縮されたかどうかを決定することであった（調整された $P < 10^{-2}$ 、 $N E S > 0$ ）。

【0268】

競合上の優位性を有する共発現遺伝子セットの識別 本発明者らは、全ての細胞にわたって 1 カウント未満の遺伝子を除外するようにフィルターし、得られたマトリックスを使用して、D C A でデータをノイズ除去した。重み付け遺伝子共発現ネットワーク分析 (W

G C N A) を、G P C サブセットのノイズ除去されたデータに対して行った。シグネチャ付きネットワーク隣接を、9 の `soft thresholding power` で計算した。モジュールは、トポロジー重なり行列に基づく相違上の遺伝子の階層的クラスタリング及び動的木カット後に検出した。次いで、本発明者らは、GeneOverlap (調整された $P < 10^{-2}$) を使用して、遺伝子メンバーが上記で識別された重要なTF標的との著しい重複を表すモジュールを識別した。`relaimpo` パッケージに実装された、`lm` 法によって、各モジュール `eigengene` (例えば、ME ~ 年齢 + 遺伝子型) についての追加的説明への線形非依存的共変量、年齢 (若い、老化した) 及び遺伝子型 (HD、WT) の相対的寄与を計算した。

【0269】

ネットワーク表現：転写因子の遺伝子標的の機能的アノテーションを、IPA を用いて行った。代表的なネットワークを作成するために、本発明者らは、MYC レギュロン、及び他の重要なTFとの、その共有された標的に焦点を当てた。`Cytoscape` を用いてネットワークを構築した。

【0270】

胚様体 (EB) の生成

均一なEBを生成するために、hESC を、ReLeSR を用いて小さなクラスターに解離させ、採取し、自動化細胞カウンター `NucleoCounter NC-200` でカウントした。AGGREWELL-800 プレート (`StemCell Technologies`、カタログ番号34815) の1ウェルあたりに合計 3×10^6 個のhESC を添加し、遠心分離して、個々のマイクロウェル中にhESC を凝集させた。凝集したhESC を、 $10 \mu\text{m}$ のY-27632 を補充したmTeSR 1 で一晩培養して、EB の形成を可能にした。凝集の24時間後、切断された先端を有するP1000 ピペットを使用して各ウェル内の培地を穏やかにピペットすることによって各マイクロウェルからEB を放出し、更に指示された分化のために超低付着組織培養フラスコ (`Corning`、カタログ番号3815) に移した。凝集の前に、AGGREWELL-800 プレートを製造業者のガイドラインに従って調製した。

【0271】

hESC 由来グリア培養物のフローサイトメトリー

グリア培養物を、Accutase 中で5分間解離させた後、単一細胞懸濁物として収集し、血球計でカウントし、 10^6 個の細胞 / mL で、MILTENYI 洗浄緩衝液中に再懸濁した (MWB ; PBS + 0.5% BSA 画分V (`ThermoFisher`、カタログ番号15260037) + $2 \mu\text{M}$ のEDTA (`ThermoFisher`、カタログ番号15575020))。次いで、各細胞懸濁物をMWB 中で、 4°C で15分間インキュベートして、非特異的抗体結合をブロックし、免疫標識のために $100 \mu\text{L}$ の画分に分割した。次いで、非染色ゲーティング対照を除き、各画分をフルオロフォア抱合抗体とともに 4°C で15分間インキュベートした。抗体源及び濃度を以下の表に列挙する。

10

20

30

40

50

型	抗原	宿主種	希釈	製造業者	カタログ番号
一次	Olig2	マウス	1:200	MILLIPORE	MABN50
一次	hGFAP	マウス	1:200	BIOLEGEND	SMI-21
一次	hN	マウス	1:200	ABCAM	ab254080
一次	Ki67	ウサギ	1:200	INVITROGEN	MA5-14520
一次	EGFP	ニワトリ	1:500	INVITROGEN	A10262
一次	mCherry	ラット	1:500	INVITROGEN	M11217
一次	PDGFRa	ウサギ	1:200	CELL SIGNALLING	5241S
一次	Oct-4	マウス	1:100	MILLIPORE	MAB4401
二次	ラット IgG(H+L)- Alexa Flour 568	ヤギ	1:400	INVITROGEN	A-11077
二次	ニワトリ IgY(H+L)- Alexa Flour Plus 488	ヤギ	1:400	INVITROGEN	A32931
二次	ウサギ IgG(H+L)- Alexa Fluor Plus 647	ヤギ	1:400	INVITROGEN	A32733
二次	マウス IgG(H+L)- Alexa Fluor Plus 647	ヤギ	1:400	INVITROGEN	A32728
抱合	CD140a-FITC	マウス	1:10	BD HORIZON	564594
抱合	CD140a-PE	マウス	1:10	BD PHARMINGEN	556002
抱合	CD44-APC	マウス	1:500	MILTENYI BIOTEC	130-113-331
抱合	A2B5-APC	マウス	1:50	MILTENYI BIOTEC	130-093-582

10

20

30

40

50

【0272】

次いで、細胞をMWBで洗浄し、 $200 \times g$ で10分間回転させ、MWBに再懸濁し、 $35 \mu m$ の細胞ストレーナーキャップを有する5mlのポリスチレンチューブに濾過した（Corning、カタログ番号352235）。死細胞を除外するために、4', 6-ジアミジノー2-フェニルインドール（DAPI; ThermoFisher、カタログ番号D1306）を $1 \mu g / mL$ で添加した。次いで、グリア培養物のフローサイトメトリ分析を、CYTOFLEX Sプラットフォーム（Beckman Coulter）上で行い、データをCYTEXPERT（Beckman Coulter）及びFLOWJO（BD Biosciences）ソフトウェアを用いて分析した。ゲーティング戦略及びデータ分析を図18に例示する。

【0273】

hESC及びグリア培養物の免疫細胞化学

培養物を4%パラホルムアルデヒド（PFA）で7分間固定し、リン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄し、次いで、透過性化し、透過性化／ブロック緩衝液（PBS+0.1% Triton-X（Sigma-Aldrich、カタログ番号T8787）+1% BSA画分V）で1時間ブロックした。次いで、培養物を一次抗体とともに $4^{\circ}C$ で一晩インキュベートし、PBSで洗浄し、次いで、二次抗体とともに室温で2時間インキュベートした。抗体源及び濃度を上の表に列挙した。次いで、核の対比染色を、 $1 \mu g / mL$ のDAPIとともに室温で5分間インキュベートすることによって行った後、撮像前に更に3回PBSで洗浄した。

【0274】

hESCの代表的な画像を、10倍の倍率のDS-Fi3カメラを装備したNikon Eclipse Ti顕微鏡上で獲得すると同時に、グリア培養物の代表的な画像を、20倍の倍率のDS-Qi2カメラで取得し、両方について、NIS-Elementsイメージングソフトウェア（Nikon）で「最小／最大」レベルを調整した。

【0275】

マッピングされた細胞カウント及び断面体積推定（体積定量）

前述の方法の項で述べたように、マッピングされた細胞は、それらのそれぞれの代表的な線分が完全に内側にある場合は1、それらが完全に外側にある場合は0、放射球形シェルと交差している場合は部分的にカウントされる。その目的のために、本発明者らは、球形シェル上へのマッピングされた細胞の投影に対応する放射球形シェルの表面上の点を計算する。ここで本発明者らは、注射部位より下の点と同様に扱われるため、注射部位の上の点の計算のみを考慮する。球形シェル上の対応する点は、以下によって与えられ、

$$z_d(r) = \sqrt{r^2 - d_{xy}^2}$$

10

式中、シェルが外面又は内面の点と交差するかどうかに応じて、 r は、 a 又は b のいずれかである。 $z_l > z_d(b)$ の場合、点は、シェルの外側にあるため、カウントされず、 $z_u < z_d(a)$ の場合、シェルは、ポイントを超えて通過し、カウントされない。 $z_d(a) < z_u$ 及び $z_d(b) > z_l$ の場合、線分は、完全に球形シェル内にあり、それは、1としてカウントされる。更に、本発明者らは、球形シェルが線分と交差する2つの極限の場合を有し得る。これらの2つの例は、類似しているため、本発明者らは、線分が球形シェルの上面と交差する場合のみを扱う。すなわち、 $z_d(a) > z_u$ 及び $z_u < z_d(b) < z_l$ の場合である。この場合、球形シェルの内側の線分の部分は、長さ $z_u - z_d(b)$ を有し、マッピングされた細胞は、その点確率関数を以下のとおり積分することによってカウントされ、

20

$$(z_u - z_d(b)) / w$$

式中、 w は、断面の幅である。

【0276】

マッピングされた細胞がカウントされた対応する断面体積を計算するために、本発明者らはまず、各断面の解剖学的境界を表す各ポリゴンを経路測定する。次いで、本発明者らは、断面の厚さに一致する高さの三角形からプリズムを形成する。本発明者らは、各プリズムを3つの四面体として表し、半径 r の球と各四面体との間の総重複体積として球内の累積体積を測定する。

30

【0277】

深度座標 z_l の断面の場合、各三角形は、座標 (x_1, y_1, z_l) 、 (x_2, y_2, z_l) 、及び (x_3, y_3, z_l) を有する3つの点 v_1 、 v_2 、 v_3 で表される。これらの三角形は、一緒になって、ドメインの2D表現を作製する。各断面の3D表現を得るために、本発明者らは、既知の厚さの dz （ここでは20nm）を使用し、三角形を、座標 (x_1, y_1, z_u) 、 (x_2, y_2, z_u) 、及び (x_3, y_3, z_u) の断面の上の境界上で、 dz によって断面に垂直並進された3つの新しい点 w_1 、 w_2 、 w_3 を有するプリズム形状に厚くした。3Dポリゴンと球体との正確な重複体積を計算することは、簡単ではないが、本発明者らは、球体と四面体との重複体積を計算することができる。その目的のために、本発明者らは、各プリズムドメインを、座標セット $\langle v_1, v_2, v_3, w_1 \rangle$ 、 $\langle v_2, v_3, w_1, w_2 \rangle$ 、及び $\langle v_3, w_1, w_2, w_3 \rangle$ によって与えられる3つの四面体によって覆った。半径 r の球体を与えられた場合、球体との各断面の交点体積は、半径 r の球体 S と各四面体 T の交差の体積の和によって与えられる。

40

$$V(r) = \sum_T |S_r \cap T|$$

50

【0278】

実施例 A 1 – WT 及び HD hESC からのはっきりとカラータグ付けされたヒトグリアの生成

インビボで罹患した対応物を置き換える健常なグリアの能力を評価するために、本発明者らはまず、後にインビボでの成長が独立して監視することができる、各遺伝子型のスペクトル的に異なる GPC の産生を可能にするように、WT 及び HD ヒト胚性幹細胞 (hESC) の蛍光タグ付きレポーター株を生成した。CRISPR-Cas9 媒介性ノックイン戦略 (Oceguera-Yanez, F. et al. Methods 101, 43–55 (2016)) を最初に使用して、EGFP 及び mCherry レポーターカセットを、マッチした雌の同胞野生型 (WT, GENE A019) 及び mHtt 発現 (HD, GENE A020) hESC (Dumevska, B. et al. Stem Cell Research 16, 430–433 (2016) 及び Dumevska, B. et al. Stem Cell Research 16, 397–400 (2016)) の AAVS1 遺伝子座に統合した (図 1)。次いで、本発明者らは、レポーターカセットがこれらのクローンの各々に安定的に統合したこと (図 1D)、及び編集が、タグ付けされた hESC の自己更新性、多能性、又は核型安定性に影響を与えていないことを検証した (図 1E 及び 2A)。これらのタグ付けされたスペクトル的に異なる株から、本発明者らは、前述の分化プロトコル (Benraiss, A. et al. Nature Communications 7, 11758 (2016)) を使用して、各株から色分けされたヒトグリア前駆細胞 (hGPC) を産生し、そのインビボでの挙動は、単独でも競合でも比較することができる。本発明者らは、成熟後に EGFP 又は mCherry 発現を星状膠細胞又は乏突然変異細胞として維持する各系統の能力、並びに成長にバイアスを与え得る任意の著しい差次的に発現した発がん性変異、又はコピー数変異体 (CNV) の欠如を検証し (図 2B 及び 2C)、本発明者らはまた、WT 及び mHtt 発現 hGPC の両方が、単独で注射された場合、マウス宿主脳にコロニー形成したことを検証した (図 15 及び 6)。

10

20

【0279】

次いで、本発明者らは、hGPC を生成するための確立されたプロトコル (Wang, S. et al. Cell Stem Cell 12, 252–264 (2013)) を使用して、WT-mCherry hESC と HD-EGFP hESC の両方を分化させ、グリアに分化するそれらの能力、及びグリアの運命の獲得時のそれらのレポーター発現の安定性の両方を評価した (図 3)。インビトロで 150 日 (DIV) までに、WT-mCherry 及び HD-EGFP の両方に由来するグリア培養物は、培養物中の細胞の約半分を含む、PDGFR α ⁺/CD44⁺ 二電位 GPC (P=0.78) について等しく濃縮され、残りは、未成熟 A2B5⁺ GPC 及び PDGFR α ⁻/CD44⁺ 星状膠細胞、並びにそれらの前駆細胞であった (図 3 及び図 18)。重要なことに、成熟星状膠細胞並びに GPC を含む、WT-mCherry 及び HD-EGFP hESC に由来する実質的に全ての免疫表現型細胞は、それぞれの蛍光レポーターを発現し続け、末端グリア同一性の獲得時に導入遺伝子発現が安定したままであったことを示した (図 3D)。

30

40

【0280】

実施例 A 2 – ヒト HD グリアキメラマウスの確立

HD グリアによって実質的にヒト化された線条体を有するマウスキメラ (HD キメラ、図 15) を生成して、罹患したヒトグリアの、それらの健常な対応物による置換を評価するためのインビボモデルを提供した。EGFP を発現するように操作された mHtt 発現 hESC 由来の hGPC (図 1、図 2、及び図 3、以下、HD と称する) を、免疫不全の Rag1^(-/-) マウスの新線条体に移植し、それらの拡大を組織学的に監視した (図 15A)。

【0281】

移植後、HD グリアは、マウス線条体に急速に浸潤し、最初に線条体白質路内で移動及び拡大した (図 15B)。徐々に、これらの細胞は、外側に拡大し、線条体神経網からそ

50

これらのマウス対応物を漸進的に移動させ、その結果、36週間までに、マウス線条体は、HDグリアによって実質的にヒト化された（図15B、15F、及び15G）。HDグリアの進行は、それらの有糸分裂拡大によって駆動され、それらの総数は、12～36週間に倍増した（図15C、 $P=0.0032$ ）。逆に、それらが、新たに確立されたドメイン内で拡大及び成熟するにつれて、それらの増殖細胞プール（ $Ki67^+$ ）は、漸進的に枯渇し（図15D、及びI、 $P=0.0036$ ）、経時的にそれらの拡大速度を遅くした。

【0282】

HDグリアの大部分は、 $Olig2^+GPC$ （ $72.7 \pm 1.9\%$ ）として拡大し、これは、それらのマウスの対応物を置き換えた後も新しい常在プールとして存続した。これらのほんの一部（ $4.8 \pm 0.9\%$ ）は、更に GFA^+ 星状膠細胞に分化した（図15I及び15J）。星状膠細胞の分化は、主に線条体白質路内で観察された。これらの罹患星状膠細胞は、以前に報告されたように、健常な対応物で典型的に観察される構造的複雑性を欠き、異常な繊維構成を示した（図15J、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Osipovitch, M. et al., "Human ESC-Derived Chimeric Mouse Models of Huntington's Disease Reveal Cell-Intrinsic Defects in Glial Progenitor Cell Differentiation," Cell Stem Cell 24:107-122 (2019)）。

【0283】

実施例A3—健常なWT hGPCは、HDキメラ成体線条体に浸潤し、常在グリアを打ち負かす

線条体グリアが主にmHTT発現であり、ヒトである確立されたキメラを使用して、常在HDヒトグリアが健常なhGPCの導入にどのように応答するか、及び常在グリア集団がある程度置き換えられる可能性があるかどうかを決定した。mCherryを発現するように操作されたWT hESCに由来するhGPC（図1、図2、及び図3、以下、WTと称する）を、36週齢のHDキメラの線条体に生着させ、それらが線条体優位性を競う際に、組織学を使用して拡大を監視した（図5）。

【0284】

生着後、WTグリアは、以前にヒト化された線条体に浸透し、それらの移植部位から拡大するにつれて、それらのHD対応物を徐々に移動させた（図4）。このプロセスはゆっくりであったが持続し、経時的にHD線条体の実質的な再増殖をもたらした（図4、54週間、 $p<0.0001$ 、72週間、 $p<0.0001$ ）。注目すべきことに、WTグリアの拡大は、（それらの空間的再配置とは対照的に）組織からのHDグリアの同時排除と並行しており（図4、54週— $P<0.0001$ 、72週— $P<0.0001$ ）、典型的には、個別の前進する前線の特徴とし、その後ろにはHDグリアがほとんど見られなかった（図4）。

【0285】

相互排他的ドメインは、 $Olig2^+GPC$ 間の競合にすぐ続いて形成された（図4）。これらは、WTグリア集団の大部分（72週間で $80.1 \pm 4.7\%$ ）を構成し、これらは、それらのHD対応物を置き換えた後も新しい常在GPCプールとして存続した。星状膠細胞を生成するそれらの可能性は、これらのほんの一部（72週間で $4.0 \pm 1.5\%$ ）が、それらの新たに確立されたドメイン内で GFA^+ 星状膠細胞（図6）に更に分化したために維持された。不思議なことに、WTグリアによって支配される領域内では、主に白質路内にHD星状膠細胞（ GFA^+ ）が残っていた（図4）。それにもかかわらず、 $Olig2^+$ と GFA^+ グリアとの間の全体的な比率は、両方の集団において実験を通して安定したままであり（図6）、GPC置換が星状膠細胞置換に先行するが、比例した表現型再増殖は経時的に達成されることを示している。

【0286】

興味深いことに、実験に使われていない成体Rag1（-/-）マウスに移植されたW

ThGPCが、新生児にキメラ化された成体Rag1^(-/-)マウスにグラフトされたものよりも広範囲に宿主線条体全体に拡大するにつれて、ヒト-ヒトグリア置換は、ヒト-マウスグリア置換よりも遅い速度で発達した(図7、54週:P=0.14、72週:P=0.0009)。これらの結果は、競合グリア置換が、異種(xenogeneic)移植片と同種異系移植片との間で異なる種特有の動態で発達することを示している。
【0287】

これらの結果は、WT-mCherry及びそれらの修飾されていない対応物(WT-タグなし)に由来する共生着されたhGPC(図8)が、HDキメラの線条体内で等しく拡大し、類似のグリア再増殖をもたらした(図9及び図10、54週-P=0.5227、72週-P=0.1251)ため、遺伝子編集又は蛍光レポーター発現毒性に由来するオフターゲット効果のアーチファクトではない。そのため、(図4)及び(図6及び図7)で行われた分析は、両方の実験パラダイムからの試料を報告する。注目すべきことに、WT及びHDグリアは互いに強く分離されているが、WTグリアの2つの同種同系クローンは、混合していることが見られ(図9)、組織からのHDグリアの競合的排除に先立って能動的認識が行われることが示唆される。
【0288】

実施例A4-ヒトWTグリアは、常在HDグリアと比較して増殖上の優位性を享受する

HDグリアによる線条体ヒト化は、それらが組織内で拡大し、成熟するにつれて、それらの増殖性細胞プールの漸進的な枯渇とともに進行した(図15D)。したがって、HD線条体内の若いWTグリアの選択的拡大が、2つの集団間の増殖能力の差によって持続したかどうかを試験した。WT及びHDグリア集団の両方におけるKi67の時間的発現を、競合的な線条体再増殖が展開する際に評価した。
【0289】

54週齢及び72週齢の両方で、移植されたWTグリアの有糸分裂のほんの一部は、常在HDグリアのそれより著しく大きかった(図16A~C、54週-P<0.0001、72週-P=0.0120)。これらのデータは、WTグリアによるHD線条体の再増殖が比較的濃縮された増殖性細胞プールによって促進されたことを示す。細胞が老化するにつれて、この増殖上の優位性はそれほど顕著ではなくなったが、それが実験全体を通して維持されたことに留意することが重要である。これを念頭に置いて、HD対応物に対する、移植されたWTグリアの持続的な増殖上の優位性は、観察された実験時点を越えて連続的な線条体再増殖のための推進力を提供するはずである(図16A~16C)。
【0290】

実施例A1~A4の考察:

HD由来グリアを有するヒトグリアキメラマウスの線条体は、WTヒトGPCの移植後に、それらの健常な対応物によって再増殖される(図4)。上記に提示されるデータは、このプロセスが、成体の脳において動的に影響される、発達細胞-細胞競合の反復発生(参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、Amoyel, M. & Bach, E. A., Development 141:988-1000(2014)及びBaker, N. E., Nat Rev Genet 21, 683-697(2020))によって駆動されたことを示唆する。そのような細胞-細胞競合は、従来、より速く成長している近隣との相互作用に応じた、組織からの比較的ゆっくりと成長している細胞の能動的なパージによって定義されてきた(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Morata, G. & Ripoll, P., Dev Biol 42:211-221(1975)、Simpson, P., Dev Biol 69:182-193(1979)、及びSimpson, P. & Morata, G., Dev Biol 85, 299-308(1981))。したがって、WTヒトGPCは、典型的には、接触すると、それらのこれまで安定して常在していたHD由来の対応物を反発し、排除する前進波において、それらの移植部位から拡大した(図4)。このHDグリア環境におけるWT hGPCの拡大は、これらの若い健常なGPCの一部に対する持続的な増殖上の優位性によって推進され、これは、経時的に、宿主脳の広範なコロニー形成をもたらした。

10

20

30

40

50

【0291】

細胞競合の最もよく説明された調節因子のうちの1つである、転写シグネチャにおけるMYC標的の濃縮（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Cova, C. de la, et al. Cell 117:107-116 (2004)、Moreno, E. & Basler, K. Cell 117:117-129 (2004)、及びVilla del Campo, C., et al., Cell Reports 8:1741-1751 (2014)）は、HD hGPCの排除におけるこのメカニズムの保存を更に示した。特に、それらの喪失は、リボソーム転写物の枯渇と平行し、発達中のマウス胚（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Lima, A. et al. Nat Metabolism 1-18 (2021)）及び皮膚（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ellis, S. J. et al. Nature 569:497-502 (2019)）における細胞競合中の推定される「敗者」細胞の転写プロファイルと一致する。この観察は、翻訳及びタンパク質合成の調節が、発達中だけでなく成体の脳における細胞競合の決定因子であることを示唆する。

10

【0292】

興味深いことに、このプロセスは、mHtt発現の有害な影響によって完全に説明することはできず、それは、共生着されたとき、両方のクローンが、評価された時点でマウス線条体のヒト化に寄与したからである（図11、図12、図13）。HDキメラの再増殖は、むしろ、新たに移植されたより増殖性のWT GPCと、より成熟した比較的静止した常在HDグリアとの間の年齢差によって駆動された。この概念は、より古いが、そうでなければ健全な宿主へのマウス胎児肝前駆体の同種異系生着が、より若い宿主への生着よりも速く、より広範囲の組織置換と関連付けられる肝臓再増殖研究からの観察と並行している（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Menthena, A. et al. Gastroenterology 140:1009-1020.e8 (2011)）。

20

【0293】

HDの重症度及び発症年齢の両方がCAG反復長と密接に相関しているため、より多くのCAG反復を有するmHttを保有する細胞株を用いることは、これらのキメラの短い寿命内でその影響をよりよくモデル化し得る。それにもかかわらず、常在と新しく移植されたGPCの間の年齢の差、したがって有糸分裂能力の差によってもたらされる競合上の優位性は、常在プールの置換に著しく貢献しているようである。

30

【0294】

ここに記載の競合置換は、マウス脳内でのそれらの拡大もまた相対的な増殖上の優位性によって維持され、接触時にそれらのマウス対応物の排除とともに進行するため、移植されたhGPCによるマウスグリア置換のそれに類似する。更に、この競合行動は、GPCの連続した波が互いに競合する発達を主に模倣しているようであり、最も古いものは、出生によって脳からほぼ完全に根絶され、それらのより若い後継者に置き換えられている。これらの共通点は、細胞間競合が、新しく若いGPCの導入後に成体の脳環境で再開することができる本質的な発達プログラムを明らかにする可能性があることを示唆している。

【0295】

大まかに言えば、本発明者らの観察は、脳が以前に認識されているよりもはるかに動的な構造環境であり得、グリア前駆細胞とそれら由来する星状膠細胞との間の細胞間競合は、発達中と同様に成体の脳の維持において重要であることを示唆している。グリアとその前駆体との間の体細胞変異が、一方の娘系統又は他方に選択的なクローン優位性をもたらし、支配的な娘の子孫による集団の容赦ない置換をもたらし得ることを容易に想像することができる。そのようなメカニズムは、ゲノムの不安定性及び体細胞の変異が、異なる競合上の優位性を有する細胞をもたらし得る障害の疾患進行の加速に寄与し得、これは次いで、それらの同胞クローンよりも競合上の優位性を有し得る。このシナリオは、脳内の広範囲の発がんの発症及びグリア腫形成の典型であるが、いくつかの小児発症性統合失調症及びHD自体などの、グリア細胞が因果関係にある非腫瘍性成人発症性障害の発症に同様

40

50

に関与し得る。

【0296】

この研究は、様々な状況でのヒトグリア間のインビボでの細胞間競合相互作用の基礎となるメカニズムの開発、並びに研究の基礎を築く。実用的には、本データは、罹患したヒトグリアが、より若く、より健常なhGPCの導入後に置き換えられる可能性があることを示唆している。実際、そのようなグリア置換は、様々な神経疾患の細胞ベースの治療に向けた実行可能な戦略を提供することができる。この研究は、プロトタイプの神経変性疾患に罹患したヒトグリアが、健常なヒトGPCの移植後、インビボで健常な対応物に置き換えられ得ることを実証する。置換が起こるメカニズムを同時に尋問しながら、様々な疾患状況におけるヒトグリア置換の可能性のある効率を予測することを可能にする新しいヒト化プラットフォームが確立された。この研究で得られたメカニズム的な洞察は、hGPC送達後のヒトグリア置換の速度と程度を更に増強するための戦略を可能にし得る。まとめると、これらのデータは、グリア細胞が因果的に関与するヒトCNSのそれらの疾患の治療のための細胞ベクターとしてのhGPCの可能性を強調する。

10

【0297】

実施例A5—ヒトWTグリアは、HDグリアに遭遇したときに、支配的な競合体のプロファイルを想定する

移植されたWT hGPCが、常在mHTT発現グリアを犠牲にしてHDグリアキメラ線条体に効果的にコロニー形成することを確認した後、本発明者らは次に、それらの競合上の優位性の根底にある分子シグナルを定義しようとした。その目的のために、本発明者らは、2つの細胞集団が共常在し、競合していたキメラの線条体から、並びに一方又は他方が他方なしで移植されたそれらのそれぞれの対照から単離されたWT及びHDヒトグリアの転写プロファイルを、単一細胞RNA配列決定(scRNA-seq、10X Genomics、v3.1 chemistry)を使用して分析した(図20A)。全てのキャプチャの統合及びヒト配列に対して整列させた後、Louvainコミュニティ検出は、ヒトグリアの6つの主要な集団を明らかにし、これらには、hGPC、循環hGPC、未成熟乏突起膠細胞(iOL)、神経前駆細胞(NPC)、星状膠細胞、及びそれらの中間前駆細胞(星状膠細胞前駆細胞、APC)が含まれた(図20B~D)。これらの集団内で、細胞周期分析は、組織学的観察(図19)と一致して、競合するWT細胞における能動的に増殖するG2/M期細胞の割合が、それらのHD対応物と比較して高いことを予測した(図20E)。進めるために、本発明者らは、本発明者らのモデルにおける主要な競合集団としてhGPCに焦点を当てた。対での差次的発現は、群にわたって差次的に発現された遺伝子の個別のセットを明らかにし(図20F)、hGPC集団内のIngenuity pathway analysis(IPA)を用いたその後の機能分析は、それらの競合に関連する多数の顕著な用語を明らかにした(図20G)。

20

30

【0298】

競合中に、WT GPCがタンパク質合成を駆動する経路を活性化させることが見出されたが、HD GPCは、それらを下方調節すると予測された。予測された上流転写因子活性化は、YAP1、MYC、及びMYCN—細胞成長及び増殖の保存されたマスター調節因子を、実験群にわたって著しく調節されたものとして識別した。重要なことに、本発明者らは、YAP1及びMYC標的が、それらの対照と比較して、競合するHD GPCにおいて選択的に下方調節されることを見出した(図20G)。注目すべきことに、この下方調節には、リボソームをコードする遺伝子の顕著な抑制が伴っていた(図20I)。逆に、競合するWT hGPCは、対照と比較して、YAP1及びMYC標的の両方、並びにリボソームをコードする遺伝子の発現の上方調節を示した(図20G~H)。したがって、これらのデータは、移植されたWT hGPCが、HD対応物と接触すると、競合的に支配的な表現型を積極的に想定して、後者の局所的な排除を駆動しながら、自らの拡大及びコロニー形成を促進したことを示唆している。

40

【0299】

実施例A6—年齢差が競合的なヒトグリアの再増殖を駆動する

50

成体宿主に移植されたWT細胞は、それらが移動させ、置き換えた常在宿主細胞よりも根本的に若かったため、本発明者らは次に、疾患状態に加えて、細胞年齢の差が後期ドナー細胞の競合的な成功に寄与した可能性があるかどうかを尋ねた。その目的のために、本発明者らは、40週齢の成体グリアキメラの線条体に、EGFPを発現するように操作されたWT hESCから新たに産生されたhGPCを生着させ、このキメラは、mCherryタグ付けされたか、そうでなければ同種同系WT hESCに由来するhGPCを用いて周産期に生着されていた(図17A)。次いで、本発明者は、移植された細胞の拡大を組織学的に監視して、これらの同種同系であるが、そうでなければ明確に老化したhGPCのプールの相対的な適合性及び競合的性能をマッピングした。

【0300】

我々は、WTキメラの線条体内の移植されたWTグリアの拡大は、HDキメラの線条体におけるそれらの拡大と著しく類似していることに留意した(図4)。生着後、より若いWTグリアは、以前にヒト化された線条体に急速に浸潤し、それらが移植部位から拡大するにつれて、それらの老化した対応物を漸進的に移動させ、最終的に組織の実質的な再コロニー形成をもたらした(図17B~D及びE、 $P < 0.0001$)。それらの拡大は、老化したWTグリアの局所的な排除と並行しており(図17B~D及びF、 $P < 0.0001$)、これはまた、個別の前進する前線の特徴とし、その後ろには既に常在するWTグリアがほとんど見られなかった(図17C)。したがって、本発明者らはまた、移植されたWTグリアの有糸分裂の割合が、それらの常在する老化した対応物の有糸分裂の割合よりも著しく大きいことに留意した(図17G~I、 $P = 0.018$)。まとめると、これらのデータは、より若い同種同系hGPCによるヒトWTグリアキメラ線条体の再増殖には、より若い対応物によるより古い細胞の置換が伴い、より若い、より有糸分裂が活発な細胞集団の相対的な拡大によって一部促進されたことを示した。

【0301】

実施例A7—若い細胞は、アポトーシスの誘導を介してそれらの古い対応物を置き換える

より若いグリアは、それらのより古い対応物に対して明らかな競合上の優位性を発揮するように見えたので、本発明者らは次に、より若い細胞によるより古いグリアの排除が、より若い細胞の高い増殖率の結果として受動的に生じ、正常な代謝回転中により古い常在対応物の相対的な消耗につながったのか、又は置換が、より適合性のあるより若い細胞による、より古い細胞におけるプログラムされた細胞死の誘導によって積極的に駆動されたのかを尋ねた。この質問に対処するために、本発明者らは、TUNELアッセイを使用して、それらが宿主線条体、並びに単一移植対照におけるそれぞれのベースラインで競合した際の、老化した及び若いWTグリア集団におけるアポトーシスの速度を比較した。競合的な再増殖が展開されるにつれて、老化したWTグリアは、それらの若い対応物よりも著しく高い速度でアポトーシスを受けたことが見出された(図23A~C、 $P < 0.0001$)。重要なことに、より古い常在するグリアのアポトーシスの増加は、より若い細胞との相互作用によって駆動されるように見え、それは、より若い細胞を成体として移植されたキメラにおいて、後の成体注射を受けなかった対照においてよりも、著しく高い割合の老化したグリアがアポトーシスであることを見出したからである(図23A~C、 $P = 0.0013$)。これらのデータにより、より若い対応物に直面した老化した常在するグリアが、少なくとも部分的に、より若いhGPCとの遭遇によって誘発されるアポトーシスを介して積極的に排除されることが示唆され、hGPCのより高い相対的適合性がキメラ宿主線条体の再増殖を可能にした。

【0302】

実施例A8—若いhGPCは、より古い同種同系細胞でチャレンジしたときに優位性のシグネチャを獲得する

老化したWTグリアに対するより若いWTグリアの競合上の優位性の根底にある分子シグナルが、HDグリアに対するそれらの優位性の根底にある分子シグナルと同様であるかどうかを確認するために、本発明者らは、scRNA-seqを使用して、競合する若い

10

20

30

40

50

及び老化したWTグリア及びそれらのそれぞれの対照の転写シグネチャを分析した（図21A）。配列決定された集団内（図21B～D）では、組織学的データ（図17I）と一致して、細胞周期のG2/M期における競合する老化したWT細胞の割合が、それらのより若い対応物よりも著しく低いことが認められた（図21E）。差次的発現分析は、競合する若いWT GPCと老化したWT GPCとの間で差次的に発現される遺伝子の個別のセットを明らかにし（図21F及びH）、それらの遺伝子セットのその後のIPA分析は、競合する同種移植片モデル（図21G）において、ドナー（若い）のWTと既に常在する（老化した）HD GPCとの間で観察されたものと同様のシグネチャを明らかにした。特に、リボソーム遺伝子、並びに上流YAP1、MYC、及びMYCNシグナル伝達を含む、タンパク質合成に機能的に関連付けられた遺伝子は全て、それらの老化した対応物と比較して、競合する若いWT GPCにおいて活性化された（図21G）。しかし、これらの類似性にもかかわらず、他の観点では、老化したWT GPCは、新たに移植されたWT GPCに対して、HD GPCとは異なる反応を示した。HD GPCとは対照的に、より若い同種同系競合体に直面した老化したWT細胞は、それらの競合していない対照（図21G）と比較して、YAP1及びMYC標的の両方を上方調節し、同時に起こるリボソーム遺伝子の上方調節を伴った（図21I）。それらのプロファイルのこの差は、チャレンジされたときに競合的に応答する本質的な能力を表す可能性があり、mHTTを発現するHD hGPCはこれを欠いている。それにもかかわらず、この上方調節は、より若い対応物のより大きな適合性に一致するには不十分であり、これは、同様に（しかし比較的大きな程度に）、それらの競合していない対照と比較して、YAP1及びMYC標的並びにリボソーム遺伝子の選択的上方調節を明らかにした（図21G～H）。まとめると、これらのデータは、相対的な細胞適合性の決定因子が、異なるチャレンジのシナリオにわたって保存され得ること、かつ結果として生じる競合の結果が競合集団の相対的な年齢によって大きく影響されることを示す。

10

20

【0303】

実施例A9－競合上の優位性は、転写因子の個別のセットに連結されている

次に、我々は、どのような遺伝子シグネチャが、常在細胞に対する新たに移植されたヒトGPCの競合上の優位性を定義するかを尋ねた。その目的のために、本発明者らは、lasso調節ロジスティック回帰（図22A）を使用して、5つのTF（CEBPZ、MYBL2、MYC、NFYB、TFDP1）を特定した多段階分析を適用し、これらのTFの活動は、老化したHD及び老化したWT GPCの両方に対する若いWT GPCの優位性を大幅に説明することができる。これらの5つのTF及びそれらの推定標的は、同種移植片及びアイソグラフトモデルの両方において、若いWT細胞で上方調節された遺伝子セット（レギュロン）（正規化濃縮スコア[NES] > 0、調整 $p < 10^{-2}$ ）を確立した（図22D）。また、それらの活性は、競合環境（老化したHD、老化したWT、若いWT単独）ではないときに変化したが、それらの平均活性は、同種移植片（対HD）及びアイソグラフト（対より古い同種同系自己）の両方のパラダイムにおいて、支配的な若いWT細胞において高く、特にMYC（図22E）において高かったことに気付いた。

30

【0304】

次に、本発明者らは、定義された発現パターン、並びに上記の5つの優先されたレギュロンとの重要な重複を有する遺伝子のコホートを識別することに着手した。本発明者らはまず、重み付け遺伝子共発現ネットワーク分析（WGCA）を用いて、GPCデータセット内の合計19個のモジュールを検出した（図22A）。6つのモジュールは、CEBPZ、MYBL2、MYC、NFYB、及びTFDP1の標的に対して著しい重複を有する遺伝子を保有した（図22B）。次いで、本発明者らは、優先されたモジュールの発現パターンが、細胞の年齢（若い対古い）、それらの遺伝子型（HD対WT）、又はその両方によって説明できるかどうかを尋ねた。WGCAは、遺伝子コホートの第1の主成分としてモジュールeigengeneを定義し、それによって、そのモジュール内の全ての遺伝子の一般的な発現パターンを表す。そのため、本発明者らは、モジュールeigengeneが年齢と遺伝子型の両方によって記述された応答である線形モデルを構築した

40

50

。褐色、赤、及びシアンのモジュールは、主に年齢の影響を受け、黒、青、及び緑のモジュールは、年齢と遺伝子型の両方の影響を受けたことが観察された（図22C）。

【0305】

調節された経路活性化が既に競合上の優位性を与えると推測されていたMYC（図20及び21）もまた、5つの優先されたTFのうちの1つであった。したがって、本発明者らは、MYCレギュロン及びその下流標的を更に特性評価し、これらの下流標的が他の優先されたTFによってもどのように調節されたかに留意した（図22F）。興味深いことに、MYCは、褐色のモジュールに局在化したが、その標的の大部分は、青のモジュールに属していた。青いモジュール遺伝子は、競合していない対照パラダイムにおいて同様に発現されたが、それらの発現レベルは、WT対HD同種移植片パラダイムにおける老化したHDと比較して若いWTにおいて高く（図22B）、このパターンは、細胞が競合環境にない限り、青いシグネチャが活性化されなかったことを示唆している。更に、本発明者らは、老化したWT hGPCと比較して、老化したHDにおけるこれらの遺伝子の発現が低いことに留意し（図22E～F）、これは、WT細胞の本質的により大きな競合能力を強調し得、新しく生着されたWT GPCでチャレンジされたときに、老化したWT hGPCがHD hGPCとは異なる反応をするという以前の観察と一致する。重要なことに、青いモジュール*eigen gene*は、遺伝子型と年齢の両方によって記述することができ、MYCシグナル伝達に関連する競合上の優位性がこれらの変動の両方によって駆動されたことを実証する。したがって、このネットワーク内の標的は、細胞増殖を調節する経路（TP53、RICTOR、YAP）、遺伝子転写（MYCN、MLXIP1）、及びタンパク質合成（LARP1）について濃縮され、これらの各々は、各競合シナリオ（図20及び図21）で差次的に発現されたものとして以前に言及されている。したがって、この競合が誘発する規制ネットワークの出力は、より古いHD由来又は同種同系hGPCに直面しているかどうかにかかわらず、成体の脳に導入されたときに若いWT hGPCに競合上の優位性を与えるように見えた。

10

20

【0306】

実施例ーパートB グリア前駆細胞又はその子孫の若返り

実験モデル及び対象の詳細

ヒト対象

胎児及び成体の脳試料の詳細は、方法の項「細胞単離のための成体及び胎児の脳処理」で詳述される。胎児試料の性別は、組織取得中に提供されなかった。

30

【0307】

細胞株

ヒトiPSC株C27を使用して、目的の予測された転写物が検証されたhGPCを生成した。C27株は雄であり、Lorenz Studerから得た。細胞を、方法の項で詳述したように、GPCに分化させた（ヒトiPSC由来のGPCの産生を参照されたい）（Chambers et al., 2009）。

【0308】

方法の詳細

細胞単離のための成体及び胎児の脳処理

40

ヒトの脳試料は、ロチェスター大学ストロング記念病院の同意を得た患者から、承認された治験審査委員会のプロトコルに基づいて取得した。脳組織は、正常なGW18～24の皮質及び／若しくはVZ／SVZ解離又は成体白質／皮質てんかん切除術（mRNAについては18F、19M、及び27F歳、miRNAについては8M、20F、43M、及び54F歳）から得た。A2B5⁺／PSA-NCAM⁻細胞の胎児GPC獲得、解離、及び免疫磁性選別は、記載されるとおりであった（Windrem et al., 2004）。GPCは、記載されるように（Windrem et al., 2004、Windrem et al., 2008）、二重免疫磁気選別戦略を使用して、解離された組織から単離し、マイクロビーズでタグ付けされたラット抗マウスIgM（Miltenyi Biotec）を使用してマウス抗PSA-NCAM⁺（Millipore

50

、DSHB)細胞を枯渇させた後、A2B5⁺(クローン105、ATCC、Manassas, VA)細胞をPSA-NCAM-プールから選択した。選別後、細胞を、10 ng/mlのbFGF及び20 ng/mlのPDGF-AAを含むDMEM-F12/N1中で1~14日間維持した。代替として、CD140a/PDGF α Rで定義されるGPCを、記載されるように(Sim et al., 2011b)MACSを使用して単離及び選別し、CD140⁺グリア前駆細胞の濃縮集団を得た。

【0309】

バルクRNA配列決定

RNAをQiagen RNeasyキットを介して単離物から精製し、バルクRNA配列決定ライブラリを構築した。試料を、ロチェスター大学ゲノミクスリサーチセンターのIllumina HiSeq 2500で深く配列決定した。生のFASTQファイルをトリミングし、アダプターを、fastpを使用して除去し(Chen et al., 2018)、Ensembl 95遺伝子アノテーションを使用して全ての試料にわたって2パスモードでのSTARを介してGRCh38に整列させ(Dobin et al., 2013)、RSEMバージョンで定量化した(Li and Dewey, 2011)。その後の分析を、RSEM遺伝子レベルの結果がtximportを介してインポートされたR(R Core Team, 2017)で実施した(Soneson et al., 2015)。DE分析は、DESeq2(Love et al., 2014)で実施し、対応のある分析(胎児A2B5⁺対CD140a⁺、胎児CD140a⁺対CD140a⁻)は、対応のある情報をモデルに追加した。成体対胎児のDE分析については、年齢をソートマーカー(CD140a⁻試料は含まれていない)と連結して、技術的なばらつきを考慮して、配列決定バッチもモデルに追加した群変動を定義した。調整された0.01未満のp値及び1超の絶対log₂倍率変化を有する遺伝子を有意とみなした。次いで、これらのデータを、少なくとも1つの群中の1の中央値TPM(RSEMを介して計算される)として定義される意義のある存在量によって更にフィルターした(20,663個の遺伝子が、DEの前にこの基準を満たした)。

【0310】

scRNA-Seq分析

単一細胞がCD140a⁺又はPSA-NCAM⁻/A2B5⁺表面発現のいずれかについてFACSを介して選別されるまで、バルクrna-seqのために上記のように処理された胎児脳試料。次いで、単一細胞を、V2 chemistry、及び製造業者の指示に従って生成されたライブラリを利用して10X genomicsクロムコントローラー上で取得した。試料をIllumina HiSeq 2500システム上で配列決定した。次いで、多重分離された試料を、整列させ、タンパク質コード、lncRNA、又はmiRNAバイオタイプのみを使用して、GRCh38及びEnsembl95遺伝子アノテーションから生成されたインデックスに対して、Cell Rangerを使用して定量化した。scRNA-Seq試料の分析は、R内でSeurat(Butler et al., 2018)を介して実施した。両方の試料をマージし、15%を超えるミトコンドリア遺伝子発現を有するか、又は500個未満の固有の遺伝子を有することによって定義されるように、低品質の細胞を除去した。次いで、各細胞のUMIの総数、ミトコンドリア遺伝子含有率、又はS期及びG2M期スコアの差による寄与を後退させるように配慮したSCTransformを利用して、試料を正規化した。次いで、PCAを計算し、n.neighbors=60及びrepulsion.strength=0.8で最初の30次元を使用してUMAPを実行した。その後、FindNeighborsを実行し、続いて、解像度を0.35に設定したFindClustersを実行した。各クラスターの発現プロファイルに基づいて、いくつかの類似したクラスターをより広い細胞型クラスターにマージした。クラスターの静的差次的発現は、MASTテスト(Finak et al., 2015)を使用して計算し、0.01未満の調整されたp値及び0.5超の絶対log₂倍率変化は、有意であるとみなした。活性転写因子レギュロンの予測は、resources.aertslab.org/cistarge

t／にあるhg38データベースを使用して、R (Aibar et al., 2017) のSCENICパッケージを用いて実施した。遺伝子が少なくとも1%の細胞で発現された場合、遺伝子を共発現分析に含めた。

【0311】

Ingenuity Pathway Analysis及びネットワーク構築

差次的に発現された遺伝子をIngenuity Pathway Analysis (Qiagen) に供給して、重要な正準的、機能的、及び上流のシグナル伝達用語を決定した。IPAネットワークの構築のために、用語を0.001未満の調整されたp値についてフィルターした。無関係なIPA用語は、iGraphパッケージ (Csardi、2006) を使用してjaccard類似性インデックスを介して評価された非常に冗長な機能用語とともに削除した。モジュール性をGephi内で確立し (Bastian et al., 2009)、最終的なネットワークを、Cytoscapeを使用して可視化した (Shannon, 2003)。遺伝子及び目的の用語は、視覚化目的のために保持した。モジュールは互いに分割され、yFilesオーガニクレイアウトを使用して整理した。

10

【0312】

転写因子活性の推論

成体及び胎児に富んだ遺伝子リストをRcisTarget (Aibar et al., 2017) に別々に供給して、遺伝子のプロモーターの周りのウィンドウ (500bpアップ／100bpダウン及び10kbアップ及び10kbダウン) におけるモチーフの過剰表現を識別した。次いで、著しく濃縮されたモチーフ (NES>3) に関連付けられた転写因子を、入力遺伝子リストにおけるそれらの著しい差次的発現によってフィルターした。各ウィンドウ及び遺伝子リスト内で、適切なTF遺伝子相互作用 (遺伝子を下方調節するリプレッサー及び遺伝子を上方調節する活性化因子) のみを保持した。次いで、スキャンウィンドウをマージして、予測される胎児／成体リプレッサー／活性化因子のTF遺伝子エッジリストを生成した。本発明者らは、最終的に、関心のあるTFを、文献において単独の活性化因子又は抑制因子として主に報告されているものに絞り込んだ。

20

【0313】

miRNAマイクロアレイ分析

A2B5⁺成体 (n=3) 及びCD140a⁺胎児 (n=4) 細胞懸濁物を、上述のようにMACSを介して単離し、それらのmiRNAを、製造業者の指示 (QIAGEN) に従ってmiRNeasyキットを使用して単離した。次いで、精製されたmiRNAを調製し、それらの標準プロトコルによって指示されるように、Affymetrix GeneChip miRNA3.0アレイでプロファイルした。次いで、生のCELファイルをoligo (Carvalho and Irizarry, 2010) パッケージを介してRに読み取り、試料を堅牢なマルチアレイ平均化 (RMA) を介して正規化した。次いで、Affymetrixのアノテーションに従って、プローブをヒトmiRNAのみについてフィルターし、有意性が0.01未満の調整されたp値で確立されたlimma (Ritchie et al., 2015) で差次的発現を行った。最後に、差次的に発現されたmiRNAを、min_srcを2に設定し、methodを「geom」に設定したMI RNATAP (Pajak M, 2020) を使用して、5つの独立したmiRNA予測データベースにわたって調査した。miRNAの転写因子調節は、TrasmiR V2.0データベースの照会を介して行った (Tong et al., 2019)。

30

40

【0314】

探索的分析及び可視化

バルクRNA-Seq又はマイクロアレイ試料のPCAは、DESeq2オブジェクトの分散安定化値のデフォルト設定を用いてprcompを介して計算した。PCAを、ggfortifyパッケージ内のオートプロットを介してプロットした。火山プロットを、EnhancedVolcanoを使用して生成した。グラフを、ggplot2を使

50

用して更に編集又は新たに生成し、patchworkを使用して整列させた。

【0315】

ヒトiPSC由来のGPCの産生

ヒト人工多能性幹細胞(C27 (Chambers et al., 2009))は、以前に記載されたプロトコル(Osipovitch et al., 2019、Wang et al., 2013、Windrem et al., 2017)を使用してGPCに分化させた。簡潔に述べると、細胞は、最初に神経上皮細胞、次いでpre-GPC、最後にGPCに分化させた。GPCを、T3、NT3、IGF1、及びPDGF-Aを補充したグリア培地に維持した。

【0316】

レンチウイルス過剰発現

E2F6、ZNF274、IKZF3、又はMAXの過剰発現について、本発明者らはまず、成体hGPCデータセットからこれらの遺伝子の各々の最も豊富なタンパク質をコードする転写物を識別した。各転写物のcDNAを、pTANK-TRE-EGFP-CAG-rtTA3G-WPREベクター内のテトラサイクリン応答エレメントプロモーターの下流にクローンした。水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質で偽型化されたウイルス粒子を、HEK293FT細胞の一過性トランスフェクションによって産生し、超遠心分離によって濃縮し、QPCR(qPCR Lentivirus Titer Kit、ABM-Applied Biological Materials Inc)によって滴定した。iPSC(C27)由来のGPC培養物(インビトロで160~180日)をグリア培地中で、1.0MOIで24時間感染させた。細胞をHBSSで洗浄し、実験の残りの期間、1µg/mlのドキシサイクリン(Millipore-Sigma St. Louis, MO)を補充したグリア培地中で維持した。形質導入されたhGPCを、ドキシサイクリンの最初の添加の3、7、及び10日後にDAPI-/EGFP+発現上のFACSを介して単離した。ドキシサイクリン対照細胞をDAPI-単独で選別した。

【0317】

定量的PCR

過剰発現実験からのRNAを、RNeasyマイクロキット(Qiagen、ドイツ)を使用して抽出した。第一鎖cDNAをTaqMan Reverse Transcription Reagents(Applied Biosystems, USA)を使用して合成した。qPCR反応を、FASTSTART UNIVERSAL SYBR GREEN MASTERMIX(Roche Diagnostics、ドイツ)と混合した1ngのRNAを装填することによって3連で実行し、リアルタイムPCR機器(CFX Connect Real-Time System thermocycler、Bio-Rad)で分析した。結果を、各試料からの18Sの発現に正規化した。

【0318】

定量化及び統計分析

qPCR実験のために、各遺伝子のデルタCTの有意差を、細胞バッチ共変量の追加との過剰発現条件及び時点の相互作用によって構築された線形モデルにおいて分析した。事後対比較は、lsmeansパッケージを使用して、時点内のDox対照に対する最小二乗平均テストを介して試験した(Lenth, 2016)。偽発見率法を使用して複数の比較についてP値を調整し、それによって、0.05未満のp値を有意とみなした。

【0319】

追加のリソース

本論文及び関連する以前の出版物からのバルク及びscRNA配列決定データは、GliaExplorer.org又はctngoldmanlab.genialis.comの本発明者のShinyアプリで探索することができる。

【0320】

実施例B1--CD140aの選択は、A2B5よりもヒト胎児グリア前駆細胞について

より効率的に濃縮する

GPC老化に対する随伴物を識別するために、まず、バルク及び単一細胞RNA-Seqを使用して、PDGFR α のCD140aエピトープ、又はモノクローナル抗体A2B5によって認識されるグリアグングリオシドを標的にすることによって単離されたかどうかにかかわらず、妊娠第2期の胎児ヒト組織に由来するhGPCを特徴付けた。その目的のために、2つの試料マッチング実験を実施し、それによって、18~22週の在胎期間(g.a.)の胎児脳の脳室帯/脳室下帯(VZ/SVZ)を解離し、同じ胎児脳(n=3)から単離されたCD140a+及びA2B5+/PSA-NCAM-(A2B5+)GPC、又はCD140a+GPC、並びにCD140a枯渇残渣(n=5、図25A)のいずれかについて、蛍光活性化細胞選別(FACS)を介して選別した。

10

【0321】

次いで、バルクRNA-Seqライブラリを生成し、両方の実験について深く配列決定した。主成分分析(PCA)は、CD140a+及びA2B5+細胞の分離、並びにCD140a枯渇試料からの両方の更なる分離を示した(図25B、図31A~B)。両方の対のコホートにおける差次的発現($p < 0.01$ 、絶対log2倍率変化 > 1)は、CD140a+とA2B5+GPCとの間で差次的に発現されたとして723個の遺伝子を識別した(CD140aで435個、A2B5で288個)。対照的に、2,629個の遺伝子は、CD140a+GPCをCD140a-細胞から区別した(図25C及び図31C~D)。CD140+をA2B5+又はCD140-細胞のいずれかと比較した場合、差異遺伝子発現の方向性は、非常に一貫しており、4つを除く全ての遺伝子が一致していた(図31E)。

20

【0322】

これらの遺伝子セットの両方のIngenuity Pathway Analysis(IPA)を使用した経路濃縮分析は、CD140+GPCにおいて比較的活性であるとして類似の経路を識別し、これらの経路には、細胞運動、乏突起膠細胞分化、脂質合成、及び下流PDGF、SOX10、及びTCF7L2シグナル伝達が含まれた(図25)。予想どおり、CD140a+GPCをA2B5+GPCではなくCD140a-細胞と比較したときに、より強い活性化Zスコアが典型的に観察された。興味深いことに、CD140a+細胞はまた、おそらく、ミクログリア表面上のPDGF α Rエピトープの再発現の結果としての少量のミクログリア汚染に起因して、免疫系に関連するいくつかの経路を差次的に発現した。A2B5+試料は更に、A2B5合成に関与する酵素である上方調節されたST8SIA1、並びに前神経経路を示した。

30

【0323】

CD140a+単離物において差次的に上方調節された遺伝子の中には、PDGFR α 自体、並びにOLIG1、OLIG2、NKX2-2、SOX10、及びGPR17を含むいくつかの初期乏突起膠細胞遺伝子があった(図25E~F)。更に、CD140a+画分はまた、MBP、GAL3ST1、及びUGT8を含む後期骨髄形成に関連する遺伝子の発現の増加を呈した。乏突起膠細胞系統の濃縮を超えて、典型的にはミクログリアに関連する多くの遺伝子も、CD68、C2、C3、C4、及びTREM2を含むCD140a単離物において濃縮された。対照的に、A2B5+単離物は、星状膠細胞(AQ4、CLU)及び早期ニューロン(NEUROD1、NEUROD2、GABRG1、GABRA4、EOMES、HTR2A)遺伝子の濃縮を呈し、未成熟星状膠細胞及びニューロン並びにGPC及び乏突起膠細胞系統細胞によるA2B5の発現を示唆した。次いで全体として、乏突起膠細胞の濃縮は、各々を枯渇画分と比較した場合、A2B5で定義されたGPCよりもCD140a+GPCにおいて著しく大きく、CD140a単離物がhGPCにおいてより濃縮されており、したがってCD140aが成体hGPCとの直接比較のためのより適切な表現型であることが示唆された。

40

【0324】

実施例B2--単一細胞RNA配列決定は、ヒト胎児GPC単離物内の細胞の不均一性を明らかにする

50

単一細胞分解能での胎児 h G P C 単離物の組成を更に描写するために、本発明者らは、F A C S を介して 20 週 g . a . の胎児 V Z / S V Z から C D 1 4 0 a + 及び A 2 B 5 + h G P C の両方を単離し、次いで単一細胞 R N A - S e q によって各々のトランスクリプトームをアッセイした (図 2 5 A、10X G e n o m i c s V 2)。本発明者らは、各々の 1, 000 個超の細胞を取得しようとし、低品質の細胞 (500 個未満の固有の遺伝子、15 % 超のミトコンドリア遺伝子パーセンテージ) のフィルター後、本発明者らには、1, 053 個の P S A - N C A M - / A 2 B 5 + 及び 957 個の C D 1 4 0 a + 高品質の細胞 (1 つの細胞当たり中央値 6, 845 個の固有の分子識別子及び 2, 336 個の固有の遺伝子、図 3 2) が残った。均一多様体近似及び投影 (U M A P) による次元縮小、続いて S e u r a t (B u t l e r e t a l . , 2018) を使用した全ての細胞の共有された最も近い隣接するモジュール性ベースのクラスタリングは、マーカー遺伝子の差次的濃縮によって定義されるように、8 つの一次細胞型を有する 11 個のクラスターを明らかにした。これらの一次細胞型には、G P C、p r e - G P C、神経前駆細胞 (N P C)、未成熟ニューロン、ニューロン、ミクログリア、並びに内皮細胞及び周細胞からなるクラスターが含まれる。C D 1 4 0 a + F A C S 単離物は、胎児 A 2 B 5 + / P S A - N C A M - 細胞よりも G P C 及び p r e - G P C 集団についてより濃縮されていることが見出された (図 2 6 A ~ D、図 3 3 A ~ C)。更に、C D 1 4 0 a で選別された細胞は、散在したミクログリア汚染のみを伴って、主に G P C 及び p r e - G P C に限定されていたが、A 2 B 5 + / P S A - N C A M - 単離物もまた、星状膠細胞、及びニューロン性 P S A - N C A M の先行枯渇にもかかわらずニューロン系統細胞を含んだ (図 3 3 A ~ C)。これらのデータは、A 2 B 5 ベースの G P C 単離よりもむしろ C D 1 4 0 a のより選択的で表現型的に制限された性質を支持した。

10

20

30

40

50

【0325】

それに基づいて、本発明者らは次に、C D 1 4 0 a + 胎児単離体、G P C、及び p r e - G P C における支配的な細胞集団の遺伝子発現プロファイルを探索した (図 3 3 B)。これらの 2 つのプール間の差次的発現は、269 個をもたらした (上方調節された 143、下方調節された 126、 $p < 0.01$ 、 $\log 2$ 倍率変化 > 0.5 、図 2 6 E)。p r e - G P C から G P C への移行中、初期の乏突起膠細胞系統遺伝子は、急速に上方調節された (O L I G 2、S O X 10、N K X 2 - 2、P L L P、A P O D) が、p r e - G P C で発現されたものは、効果的に消失した (V I M、H O P X、T A G L N 2、T N C)。興味深いことに、H L A - A、H L A - B、H L A - C、及び B 2 M を含む、ヒト白血球抗原系に関連する遺伝子は全て、細胞が G P C 段階に移行するにつれて下方調節された (図 2 6 F)。I P A 分析は、p r e - G P C が、移動、増殖、及び星状膠細胞同一性 (B M P 4、A G T、及び V E G F シグナル伝達) に関連する用語について比較的濃縮されていたのに対し、G P C は、M Y C 及び M Y C N 経路の活性化に加えて、乏突起膠細胞同一性の獲得に関連する用語 (P D G F - A A、F G F R 2、C C N D 1) について濃縮を示したことを示した (図 2 6 G)。S C E N I C パッケージを使用したプロモーターモチーフ濃縮とともに単一細胞共発現データを使用して (A i b a r e t a l . , 2017)、本発明者らは次いで、G P C 対 p r e - G P C において相対的に活性化されると予測された 262 個の転写因子を識別した (W i l c o x o n の順位和検定、 $p < 0.01$)。これらには、S A T B 1、並びに初期の G P C 仕様因子 O L I G 2、S O X 10、及び N K X 2 - 2 が含まれた (図 2 6 H)。

【0326】

実施例 B 3 - ヒト成体 G P C 及び胎児 G P C は、転写的に異なる

次に、我々は、成体 h G P C が転写において胎児 h G P C とどのように異なる可能性があるかを尋ねた。この目的のために、A 2 B 5 + h G P C を、外科的に切除された成体ヒト側頭新皮質 (19 ~ 21 歳、 $n = 3$) から単離し、4 つの追加の胎児 C D 1 4 0 a + 試料と合わせて、それらのバルク R N A 発現を評価した。A 2 B 5 選択は、成体ヒト脳から G P C を単離するのに十分であり、成体 h G P C における P D G F R A 発現の成熟に関連する下方調節を考慮すると、その点において C D 1 4 0 a よりも感度が高いことが以前

に指摘された (Sim et al., 2006, Windrem et al., 2004)。その事前観察を確認すると、ここでは、A2B5+成体GPCにおけるPDGFR α が、胎児A2B5+細胞の47.56の中央値TPMと比較して、0.55の中央値TPMで発現したことが見出された。配列決定及び分析を胎児CD140a選択細胞と対にすることによって、本発明者らは、同時にパワーを増加させながら、配列決定バッチ効果の回帰を可能にした (図27A)。PSA-NCAM+細胞の枯渇は、PSA-NCAMの発現が成体の皮質及び白質で停止するため、成体のhGPC試料には必要ではなかった (Seki and Arai, 1993)。その結果、ヒト成体及び胎児GPCのPCAは、両方の分別された胎児hGPCプールから鋭く分離された成体GPCのタイトなクラスタリングを示した (図27B)。A2B5+又はCD140a+胎児GPC集団のいずれかと比較した成体GPCの差次的発現は、それぞれ3,142個及び5,282個の著しい遺伝子をもたらした ($p < 0.01$ 、絶対log2倍率変化 > 1) (図27C)。差次的発現を定義する精度を高めるために、交差する2,720個の遺伝子について下流分析を行った (図27D、胎児hGPCと比較して、成体GPCにおいて1,060個の上方調節及び1,660個の下方調節)。意外なことに、これらの2つの差次的に発現された遺伝子セット内では、遺伝子の100%が方向的に一致していた。

10

20

30

40

50

【0327】

成体GPCと胎児GPCとの間の差をよりよく理解するために、本発明者らは次に、非冗長な著しいIPA用語及びそれらの寄与する差異的に発現された遺伝子の遺伝子オントロジーネットワークを構築した (図27D~E)。このネットワークのスピニングラス群集検出は、高度に接続された機能用語 (図27E) 及び遺伝子 (図27F) の3つのモジュール (モジュールM1~M3) を明らかにした。M1には、グリア発生、増殖、及び運動に関連する用語及び遺伝子が含まれていた。特に、GPC個体発生に関連するいくつかの遺伝子は、成体GPCで下方調節され、これらには、CSPG4/NG2、PCDH15、CHRD1、LMNB1、PTPRZ1、及びST8SIA1が含まれた。対照的に、MAG、MOG、MYRF、PLP1、CD9、CLDN11、CNP、ERBB4、GJB1、PMP22、及びSEMA4Dを含む、出現が乏突起膠細胞分化及び髄鞘形成に先行し、継続する多数の遺伝子が、成体GPCにおいて上方調節された。

【0328】

モジュール2は、細胞老化並びに増殖及び老齢の調節に関連する多数の用語を保有した。細胞周期の進行及び有糸分裂は、MKI67、TOP2A、CENPF、CENPH、CHEK1、EZH2、並びにCDK1及びCDK4を含む多数のサイクリンを含む増殖因子の強力な濃縮により、胎児GPCにおいて活性化されると予測された。更に、増殖誘導経路も活性化されると推測され、これらには、MYC、CCND1、及びYAP1シグナル伝達が含まれ、そのうちのYAP1及びMYC転写物の両方が同様に上方調節された。この点において、老化したげっ歯類GPCにおけるMYCの一過性過剰発現は、最近、増殖及び分化の両方に対するそれらの能力を回復することが示されている。逆に、成体GPCは、E2F6、MAP3K7、DMTF1/DMP1、OGT、AHR、RUNX1、及びRUNX2を含む、老齢に関連する転写物の上方調節を呈した。同時に、成体hGPCは、LMNB1、PATZ1、BCL11A、HDAC2、FN1、EZH2、及びYAP1、並びにその補因子TEAD1を含む胎児転写物の下方調節を呈した。結果として、成体hGPCにおいて活性であると予測される機能用語は、老齢、ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群で観察される急速な老化の開始、及びCDKN1A/p21及びCDKN2A/p16の下流のサイクリン依存性キナーゼ阻害経路を含む。更に、MYCの阻害を介して老齢を駆動することに関与しているAHR及びそのシグナル伝達経路は、成体GPCにおいて同様に上方調節された。

【0329】

モジュール3は、主に、老化にも関連付けられている発達及び疾患連結シグナル伝達経路から構成されていた。これには、胎児hGPCにおけるASCL1及びBDNFシグナル伝達の予測される活性化、並びに成体GPCにおけるMAPT/Tau、APP、及び

R E S T シグナル伝達が含まれる。全体として、成体 G P C の転写及び機能プロファイリングは、増殖能力に関連する転写物の低減、及び老齢及びより成熟した表現型へのシフトを明らかにした。

【0330】

実施例 B 4 — 転写因子活性の推論は、成体 G P C 転写リプレッサーを関与させる

成体 G P C と胎児 G P C との間の著しい転写格差を考慮して、本発明者らは次に、どの転写因子がそれらの同一性を指示するかを本発明者らが推測できるかどうかを尋ねた。これを達成するために、本発明者らはまず、成体又は胎児の濃縮 G P C 遺伝子セットの2つのプロモーターウィンドウ (500 b p アップ / 100 b p ダウン、10 k b アップ / 10 k b ダウン) を走査して、著しく濃縮された T F モチーフを推論した。これにより、走査された交差データセット (図 3 4) においても差次的に発現された 48 個の T F が識別された。これらの中で、本発明者らは、DNA 相互作用の主要な手段がもっぱら抑制的又は刺激的のいずれかであった T F に焦点を当てたが、同時にそれらの既知の補因子の濃縮も考慮した。この分析は、探索すべき 12 個の潜在的な上流調節因子をもたらした (図 2 8 A ~ C)、それらは、4 つの成体リプレッサー、E 2 F 6、Z N F 2 7 4、M A X、及び I K Z F 3；1 つの成体活性化因子、S T A T 3；3 つの胎児リプレッサー、B C L 1 1 A、H D A C 2、及び E Z H 2；並びに 4 つの胎児活性化因子、M Y C、H M G A 2、N F I B、及び T E A D 2 であった。興味深いことに、これらの予測された T F のうち、1) E 2 F 6、Z N F 2 7 4、M A X、及び M Y C、2) S T A T 3 及び B C L 1 1 A、並びに 3) E Z H 2 及び H D A C 2、の 3 つの群は、それらの標的プロモーター内でモチーフ類似性の高い一致を共有し、それらが共有された遺伝子座で DNA 結合のために協力又は競合し得ることを示唆した (図 2 8 A 及び図 3 4)。

【0331】

次に、我々は、キュレートされた転写相互作用に基づいて 4 つの潜在的なシグナル伝達経路を構築して、T F のセットによって標的とされるこれらの遺伝子を予測した (図 2 8 D ~ G)。胎児 G P C が濃縮された活性化因子 (図 2 8 D) の中で、増殖因子である M Y C、グリア新生の重要な決定因子である N F I B、Y A P / T A Z エフェクターである T E A D 2、及び別の増殖因子である H M G A 2 は各々、有糸分裂関連転写物、及び老齢の開始を阻害することが実証されたものの両方を含む、前駆期遺伝子のコホートを活性化すると予測された。直接的正の調節はまた、これらの 4 つの胎児活性化因子間で予測され、N F I B は、H M G A 2 及び T E A D 2 によって駆動され、M Y C は、T E A D 2 及び N F I B によって駆動され、H M G A 2 は、M Y C 及び T E A D 2 によって駆動され、T E A D 2 は、M Y C によって相互に駆動される (図 2 8 D)。これらの胎児活性化因子とは対照的に、C 2 H 2 型ジンクフィンガー B C L 1 1 A、ポリコーム抑制複合体サブユニット E Z H 2、及びヒストンデアセチラーゼ H D A C 2 を含む胎児期リプレッサーは各々、この段階でより成熟した乏突起膠細胞遺伝子発現を抑制すると予測された (図 2 8 E)。更に、これらの 3 つ全ての T F は、老齢に関与する標的を阻害すると予測された。したがって、これらの因子は、循環前駆体状態の維持につながる下流の転写イベントを直接調整するように見える。

【0332】

次に、我々は、これらの予測された成体 G P C シグナル伝達ネットワークを、それらの加齢性遺伝子発現変化に関与する潜在的なメカニズムについて評価した。S T A T 3 は、早期分化及び髄鞘形成に関連する乏突起膠細胞遺伝子の大規模なコホートの上方調節を介して、G P C 同一性をグリア成熟にシフトすると予測された (図 2 8 F)。加えて、S T A T 3 は、B I N 1、R U N X 1、R U N X 2、D M T F 1、C D 4 7、M A P 3 K 7、C T N N A 1、及び O G T を含む、一連の老齢に関連する遺伝子を活性化するようにも推定された。同時に、成体 G P C における抑制は、I k a r o s ファミリーのジンクフィンガー I K Z F 3 / A i o l o s、K R A B (クルッペル関連ボックス (k r u p p e l a s s o c i a t e d b o x)) ジンクフィンガー Z N F 2 7 4、M Y C 関連因子 M A X、及び細胞周期調節因子 E 2 F 6 により影響を受けると予測された (図 2 8 G)。この

転写因子のセットによる標的化は、胎児GPCシグネチャに寄与するこれらの遺伝子セットの抑制を予測し、これは、早期前駆遺伝子PDGFR A及びCSPG 4、並びに細胞周期遺伝子CDK 1、CDK 4、及びMKI 6 7の下方調節で実際に観察された。YAP 1、LMNB 1、及びTEAD 1の抑制も予測され、それらの発現は、老齢の発症を遅らせるか、又は予防する。興味深いことに、この4つの成体リプレッサーのセットは、胎児濃縮リプレッサーBCL 1 1 A、EZH 2、及びHDAC 2に加えて、胎児濃縮活性化因子NFI B、MYC、TEAD 2、及びHMGA 2の各々の下方調節された発現を予測した。

【0333】

実施例B5—成体濃縮リプレッサーの発現は、GPCにおける加齢性転写変化を誘導する

10

次に、我々は、図28Gで本発明者らが識別した4人の成体濃縮転写リプレッサー、E2F 6、IKZF 3、MAX、及びZNF 2 7 4が、そうでなければ若いGPCによる遺伝子発現における加齢性変化の態様を誘導するのに十分であったかどうかを尋ねた。これを達成するために、本発明者らは、各転写因子についてドキシサイクリン(Dox)誘導性過剰発現レンチウイルスを設計した(図29A)。

【0334】

簡単に言えば、本発明者らは、内因性の加齢性の上方調節を最もよく模倣するために、各リプレッサーの成体GPCにおいてどのタンパク質をコードするアイソフォームが最も豊富であるかを最初に特定し、これらの候補は、E2F 6-202、IKZF 3-217、MAX-201、及びZNF 2 7 4-201であった(図35)。これらのcDNAを、テトラサイクリン応答エレメントプロモーターの下流、及びT2A自己切断EGFPレポーターの上流でクローンした(図29A)。次いで、Wang et al., 2013, Cell Stem Cell 12, 252-264に以前に記載されているように、C27株から調製されたヒトヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来のhGPC培養物を24時間感染させ、次いで、Doxで処置して、導入遺伝子の過剰発現を誘導した。C27 iPSC由来のGPCは、それらのトランスクリプトームが胎児GPCのそれに類似しているために選択され(図36)、それらは、同様に、移植時に髄鞘異形成マウスを生着及び髄鞘形成することができる。過剰発現細胞を、Dox添加の3、7、及び10日後に、EGFP発現のためにFACSを介して選択した(図29B、n=3~5)。Dox

20

30

【0335】

RNAを抽出し、対象の加齢関連遺伝子をqPCRによって分析した。各成体濃縮リプレッサーの著しい誘導が、Dox補充後の各時点において観察された(図29C)。上方調節が活性細胞分裂と関連している遺伝子であるMKI 6 7及びCDK 1は、各過剰発現パラダイムの2つ以上の時点で著しく抑制された(図29D)。これは、成体GPCにおけるそれらの減少した発現(図27F)と一致し、E2F 6、MAX、及びZNF 2 7 4(MKI 6 7)、又は4つ全て(CDK 1)によるそれらの直接的な抑制を示唆した。PDGFR Aの同族受容体であるGPC段階マーカーPDGFR Aもまた、正常な成体GPCにおけるその抑制と一致して、IKZF 3形質導入GPC、並びに3日目のE2F 6形質導入GPCにおいて2つの時点で著しく抑制された。興味深いことに、老齢に関連するサイクリン依存性キナーゼ阻害剤CDKN 1 A/p 2 1は、試験されたリプレッサーの各々に応答して、全ての時点で上方調節されたが、CDKN 2 A/p 1 6は、ZNF 2 7 4形質導入hGPCにおいて、並びに7日目のE2F 6過剰発現GPCにおいて、全ての時点で同様に上方調節された(図29D)。加えて、MBP及びIL 1 Aは、いずれも胎児と比較して成体hGPCで強く上方調節されており、両方ともリプレッサー形質導入に

40

50

ームの複数の特徴を誘導するのに十分であるという予測を支持した。

【0336】

実施例 B 6 — 胎児 hGPC の miRNA 発現パターンは、それらの老齢の抑制を予測する

遺伝子発現の潜在的な転写後調節因子を識別するために、本発明者らは、Affymetrix GeneChip miRNA 3.0 アレイを利用して、成体 GPC と胎児 GPC (n=4) との間の miRNA 発現の差を評価した。PCA は、それらの miRNA 発現プロファイルによって定義されるように、両方の GPC 集団の分離を示した (図 30A)。両方の年齢間の差別的発現 (調整された p 値 < 0.01) は、56 個の遺伝子 (成体 GPC で濃縮された 23 個、胎児 GPC で濃縮された 33 個、図 30B~C) をもたらした。特に、これらの差別的に発現された miRNA の中には、胎児前駆期 miRNA、miR-9-3p、miR-9-5p (Lau et al., 2008)、及び miR-17-5p (Budde et al., 2010) に加えて、成体乏突起膠細胞調節因子、miR-219a-3p 及び miR-338-5p (Dugas et al., 2010、Wang et al., 2017) があった。

10

【0337】

次に、我々は、この miRNA のコホートを利用して、miRNA の上方調節を介して発現が抑制されると予想される遺伝子を予測し、成体及び胎児 GPC プールの両方を別々に分析した。これを達成するために、miRNA target を使用して、以下の 5 つの miRNA 遺伝子標的データベースをクエリした: DIANA (Maragkakis et al., 2011)、Miranda (Enright et al., 2003)、PicTar (Lall et al., 2006)、TargetScan (Friedman et al., 2009)、及び miRDB (Wong and Wang, 2015)。精度を最大化するために、遺伝子は、それらが少なくとも 2 つのデータベースに出現した場合にのみ標的とみなした。胎児濃縮 miR において、このアプローチは、miRNA 1 つ当たり平均 36.3 (SD=24.5) 個の抑制遺伝子を予測した。対照的に、成体 hGPC 濃縮 miRNA において、平均 46.4 (SD=37.8) 個の遺伝子が miRNA 1 つ当たりの標的として予測された (図 30C)。全体として、これは、胎児 miRNA を介した成体 GPC 濃縮遺伝子の 48.8% の潜在的な抑制、及び成体 miRNA による胎児 GPC 濃縮遺伝子の 39.9% の抑制を識別した。

20

30

【0338】

これらの miRNA 依存性転写後調節メカニズムの機能的な重要性を評価するために、本発明者らは、機能的に関連のある差別的に発現された遺伝子の miRNA 標的化に従って、胎児及び成体のネットワークをキュレートした (図 30D~E)。提案された上流の成体転写調節因子 STAT3、E2F6、及び MAX は、胎児 GPC における 7 つの miRNA を介して阻害されると予測され (図 30D)、これらには、miR-126b-5p、miR-106a-5p、miR-17-5p、miR-130a-3p、及び miR-130b-3p による他の細胞型における STAT3 の既に検証された抑制が含まれた (Du et al., 2014 a、Jiang et al., 2020、Zhang et al., 2020、Zhang et al., 2013、Zhao et al., 2013)。並行して、いくつかの早期及び成熟乏突起膠細胞遺伝子は、全て前駆体状態の維持と一致して、同時に阻害の標的とされ、これらには、MBP、UGT8、CD9、PLP1、MYRF、及び PMP22 が含まれた (Goldman and Kuypers, 2015)。重要なことに、老齢の誘導若しくは又は増殖の阻害、又はその両方のいずれかに連結する遺伝子のコホートも、胎児 GPC において積極的に抑制されると予測された。これらには、RUNX1、RUNX2、BIN1、DMTF1/DMP1、CTNNA1、SERPINE1、CDKN1C、PAK1、IFI16、EFEMP1、MAP3K7、AHR、OGT、CBX7、及び CYLD が含まれる (Eckers et al., 2016、Elliot et al., 1999、Ferran et al., 2015、Hu et al., 2019、Inoue and S

40

50

herr, 1998、Jiang et al., 2017、Kilbey et al., 2007、Lee and Zhang, 2016、Li et al., 2015、Mademtzoglu et al., 2018、Mikawa et al., 2014、Ni et al., 2017、Wotton et al., 2004、Xin et al., 2004、Zhang and Guo, 2018)。老齡の阻害又は増殖の活性化も、miR-17-5p、miR-93-3p、miR-1260b、miR-106a-5p、miR-767-5p、miR-130a-3p、miR-9-3p、miR-9-5p、及びmiR-130b-3p (Borgdorff et al., 2010、Gao et al., 2019、Meng et al., 2017、O'Loghlen et al., 2015、Shen et al., 2015、Su et al., 2018、Tai et al., 2020、Wang et al., 2020 a、Xia et al., 2019、Zhang and Guo, 2018)を含む、ここで識別されるいくつかのmiRNAによって認められている。まとめると、これらのデータは、胎児hGPCがその特徴的な前駆体転写状態及びシグネチャを維持し得る相補的なメカニズムを提供する。

【0339】

実施例B7－成体miRNAシグナル伝達は、増殖性前駆体状態を抑制し、老齡を予兆し得る

次に、我々は、成体hGPC内の潜在的なmiRNA調節ネットワークを調査した(図30E)。これは、miR-4651を介したサイレンシングが以前に増殖を阻害することが示されている、HDAC2、NFIB、BCLL1A、TEAD2、及びHMGA2を含む5つの識別された活性胎児転写調節因子を制御する5つのmiRNAを関与させた(Han et al., 2020)。このmiRNAコホートは、PDGFRA、PTPRZ1、ZBTB18、SOX6、EGFR、及びNRXN1を含む、GPC前駆体状態の維持に関与する遺伝子の発現を阻害する際の成体の転写リプレッサーと並行して機能すると予測された。更に、成体miRNA環境は、増殖状態を誘導するか、又は老齡を遅らせることが知られている多数の遺伝子を抑制すると予測され、LMNB1 (Freund et al., 2012)、PATZ1 (Cho et al., 2012)、GADD45A (Hollander et al., 1999)、YAP1及びTEAD1 (Xie et al., 2013)、CDK1 (Diril et al., 2012)、TPX2 (Rohrberg et al., 2020)、S1PR1 (Liu et al., 2019)、RRM2 (Aird et al., 2013)、CCND2 (Bunt et al., 2010)、SGO1 (Murakami-Tonami et al., 2016)、MCM4及びMCM6 (Mason et al., 2004)、ZNF423 (Hernandez-Segura et al., 2017)、PHB (Piper et al., 2002)、WLS (Poudel et al., 2020)、並びにZMAT3 (Kim et al., 2012)が含まれる。より直接的には、老齡の誘導又は増殖の阻害は、miR-584-5p (Li et al., 2017)、miR-193a-5p (Chen et al., 2016)、miR-548ac (Song et al., 2020)、miR-23b-3p (Campos-Viguri et al., 2020)、miR-140-3p (Wang et al., 2020b)、及びmiR-330-3p (Wang et al., 2020b)の上方調節に連結している。まとめると、これらのデータは、胎児hGPCにおける前駆体状態の維持における積極的な参加者としてのこれらのmiR、及び成体hGPCがそれらのシグネチャ遺伝子発現プロファイルを想定する、可能性のあるメカニズムとしてのそれらの調節を関与させる。

【0340】

実施例B8－miRNAの転写因子調節は、GPC同一性を確立し、強化する

次に、我々は、TransmiR転写因子miRNA調節データベース (Tong et al., 2019) をクエリすることによって、胎児及び成体GPCにおける差次的

に発現されたmiRNAの上流調節を予測しようとした。このアプローチは、胎児GPCと成体GPCとの間で著しく差別的に発現することが同様に決定された66個の転写因子を介して、56個の年齢特異的GPC miRNAのうち54の調節を予測した(図37A)。興味深いことに、予測された上位4つのmiRNA調節TFは全て、MYC関連因子であり、MAX、MYC自体、E2F6、及びそれぞれ36、33、30、及び28個の固有の差次的発現miRNAを標的とする胎児濃縮MYC関連ジンクフィンガータンパク質MAZを含んだ。

【0341】

12個のTF候補(図28)の文脈における提案された関係の調査は、胎児活性化因子及び成体リプレッサーの両方によって標的化されると予測された多数の胎児hGPC濃縮miRNAを示したが、成体GPCで濃縮されたそれらのmiRNAは、より一意的に標的化された(図37B)。MYCは、胎児GPCにおける多数のmiRNAの発現を駆動すると予測され、その多くは、E2F6、MAX、又はその両方を介して成体期に抑制されると予測された。特に、miR-130a-3pは、TEAD2を介した活性化に加えて、MYC、MAX、及びE2F6によって標的化されると予測された。特に、他の細胞型における検証されたTF-miRNA相互作用の中で、MYCによる若返りmiR-17-5pの上方調節、及びMAXによるその抑制(Duet et al., 2014b、Hackl et al., 2010、Ji et al., 2011、O'Donnell et al., 2005)が報告されている。同様に、MYC又はTEAD2及びYAP1による増殖性miR-130-3pの平行活性化(Shen et al., 2015、Wang et al., 2020a、Yang et al., 2013)が報告されており、MYCによるmiR-9の両方のアームの活性化(Ma et al., 2010a)も報告されており、これは、乏突起膠細胞の成熟とともに減少する(Lau et al., 2008)。

【0342】

成体GPCにおいて、著しく濃縮されたTFコホートによって調節されると予測される濃縮miRNAは、それぞれBCL11A及びEZH2に対してSTAT3によって反対に標的化される、HMGA2の予測される阻害剤であるmiR-151a-5p及びmiR-4687-3pのみを有する胎児リプレッサーの成体活性化因子によってのみ標的化される可能性がより高かった。これを超えて、miR-1268bは、EZH2及びHDAC2の両方によって並行して阻害されると予測された。特に、重要な乏突起膠細胞マイクロRNA、miR-219a-2-3pは、EZH2を介して胎児GPCにおいて阻害されたままであると予測されたが、STAT3は、他の7つのmiRの発現を独立して駆動する可能性が高い。興味深いことに、活性の増加が老齢に連結しているSTAT3(Kojima et al., 2013)もまた、miR-584-5p、miR-330-3p、miR-23b-3p、及びmiR-140-3pを含む、老齢の誘導に独立して関連するmiRNAのコホートの発現を駆動すると予測された。

【0343】

転写及びmiRNAプロファイリング、経路濃縮分析、及び標的予測の統合を通じて、本発明者らは、ヒトGPC老化のモデルを提案し、それによって、胎児hGPCは、microRNAを介して転写によって、及び転写後の両方で乏突起膠細胞及び老齢遺伝子プログラムを抑制しながら、前駆遺伝子発現を維持し、増殖プログラムを活性化させ、老齢を防止する。成体の成熟及び時間の経過、並びに集団の二重化の経過により、hGPCは、これらの胎児前駆細胞連結ネットワークのリプレッサーを上方調節し始め、同時に、漸進的により分化され、最終的には老齢の表現型を前進させるためのプログラムを活性化する。

【0344】

実施例B9—Glia Explorer: ヒトグリア転写発現をクエリするためのインタラクティブデータベース

他の研究者へのリソースとして、本発明者らは、Shinyアプリを開発し(Chan

10

20

30

40

50

get al.) (Glial Explorer.orgでアクセス可能)、これは、本明細書及び本発明者らの以前の研究の両方で網羅されているように、バルク及びscRNA配列決定データセットの両方を含む、ヒトグリア遺伝子発現を記述するデータベースを含む。これには、健常なヒト胚性幹細胞(hESC)由来のGPC及び星状膠細胞、並びにハンチントン病細胞からのもの(Osipovitch et al., 2019)、健常な人工多能性幹細胞(iPSC)由来のGPC及び星状膠細胞、加えて、統合失調症患者からのもの(Windrem et al., 2017)、並びに免疫不全性キメラマウスから選別された再髄鞘形成又は静止胎児由来のGPC(Windrem et al., 2020)のプロファイルが含まれる。簡単に言えば、Glial Explorerは、(前述の全てのデータセットにわたって)遺伝子の豊富さの単純なクエリを可能にする。更に、スプライス変異体の豊富さも探索することができる。最後に、scRNA-Seqデータは同様に、特徴プロット及びバイオリンプロットの生成によって詳細化することができる。このアプリ及びその含まれるデータベースは、関心のある研究者が対象の遺伝子を迅速に調査し、ヒトグリアの個体発生及び老化におけるそれらの調節及び役割をインタラクティブに評価できるようにすることを目的としている。より詳細な発現プロファイリング情報は、ctngoldmanlab.genialis.comで入手可能なゲノクスデータベースでホストされている。

10

【0345】

考察

ヒトグリア前駆細胞は、ヒト発達の妊娠第2期に最初に現れ、その後、生涯を通じてプールが残る。初期の発達及び若さでは、これらの前駆細胞は、高度に増殖し、自己再生する。しかし、失われたミエリンを分割及び補充する能力は、加齢、並びに先行する脱髄及び白質疾患の環境において大幅に低下する。マウスとヒトのグリアの間の進化的な相違を考えると、治療的に最も関連性の高い標的を識別ために、この拡大可能性の喪失の基礎を評価するときに、ヒトのグリアを調べることが重要である。そのため、本発明者らは、ヒト脳から直接単離された胎児GPCのscRNA配列決定とともに、FACS及びMACSで単離された胎児及び成体ヒトGPCのバルクRNA配列決定戦略を採用して、潜在的なオフターゲット細胞型汚染物質と戦うと同時に、対象の集団における発散的な転写変化をより正確に追跡した。これは、発現がヒト胎児GPCをそれらの老化した後継者から区別し、早期及び末期の乏突起膠細胞分化に向かう漸進的なバイアスを示唆する、一連の遺伝子を提供した。この観察は、CSPG4、PDGFRA、及びPTPRZ1などの前駆体マーカーの下方調節、並びに平等にMBP、CNP、及びMOGなどの初期の乏突起膠細胞マーカーの上方調節を留意する、以前のげっ歯類GPC遺伝子発現及びプロテオームデータと一致する。重要なことに、これらの同じ成体GPCは、老齢に連結する遺伝子の集合体の上方調節と連結される増殖能力の喪失を示す発現シグネチャを獲得することが見出された。

20

30

【0346】

我々の分析は、発現が胎児GPCにおいて濃縮されたMYCが、有糸分裂能力及び細胞周期性を協調的かつ積極的に調節する一連の下流遺伝子及びmiRNAの転写調節を通じて、ヒトGPCの増殖能力の中心的な調節因子であると予測した。MYCは、CDK1の活性化を介して、マウスGPCのエピジェネティックランドスケープ及び増殖の両方の重要な調節因子として以前に特定されている。更に、MYCは、最近、成体マウスGPCに対する有糸分裂原性及びそれらの老齢の阻害剤として広く研究されており、本発明者らがヒトGPCにおいて識別した抑制ネットワークのMYC調節標的と一致して機能する。実際、本明細書に記載のモデルは、成体GPCにおけるMYCだけでなく、その標的の多くの直接的な抑制も示唆している。興味深いことに、IKZF3は、pre-B細胞においてMYCを直接抑制し、それらの増殖能力を制限することが報告されている。その部分では、MAXは、MYCと複合体化して、その機能を阻害し、その転写標的を変化させることができる。更に、MAX及びE2F6は両方とも、E2F6が典型的に抑制するE2F部位に加えて、MYC結合部位を競合的に標的とすることができる。MYCの下方調節は

40

50

、AHR及びBIN1の上流活性化に続くことも報告されており、その各々が成体GPCデータセットで上方調節された。MYCはまた、胎児GPC中のmiRNAの集合体を活性化すると予測され、その多くは、成体GPC中のE2F6及びMAXによって相殺調節されると予測された。これらの中には、miR-9、並びにmiR-130a-3pがあり、これらは各々、以前に老齢を遅らせることに関連していた。

【0347】

興味深いことに、miR-130a-3pはまた、発現がグリア発生、再髄鞘形成に必要である別の高活性成体GPC転写活性化因子であるSTAT3を抑制すると予測されており、老齢の駆動因子として関与している。実際、STAT3のmiRNA-130a-3p抑制は、老化したラットGPCによる再髄鞘形成を増強することが同様に示されている薬物であるメトホルミンによって駆動されるように、腎小管上皮細胞における老齢を遅らせる。更に、STAT3発現は、原発性進行性多発性硬化症の患者から生成されたiPSC由来の神経前駆細胞の培養物から採取された馴化培地に曝露した後、GPCにおいて増加し得る。これを超えて、本発明者らは、老齢間葉系幹細胞において最も高く上方調節されたmiRであるmiR-23b-3pを含むmiRNAのコホートのSTAT3活性化を予測した。

【0348】

miR差次的発現データの更なる評価は、胎児及び成体GPC転写を調節するように準備されたいくつかの転写後調節メカニズムを明らかにした。これには、成体GPCのより成熟した乏突起膠細胞転写シグネチャと一致する、乏突起膠細胞の成熟のよく研究された調節因子であるmiR-219及びmiR-338の成体hGPCにおける上方調節が含まれた。この点において、成体のGPC濃縮miRNAであるmiR-338-5p、miR-219a-2-3p、及びmiR-584-5pは全て、健常な対照と比較して、多発性硬化症(MS)患者の白質において最も高く上方調節されたmiRであることが以前に報告されている。したがって、MS白質中で下方調節されていることが判明したmiRNA、miR-130a-3p、miR-9-3p、miR-9-5pも成体hGPC miRNAパネルで下方調節された。miR-17-5p及びmiR-93-3pを含むいくつかの追加のmiRNAもまた、本明細書の分析によって、胎児GPCの前駆体状態の維持に参加すると予測され、一方、miR-584-5p、miR-330-3p、miR-23b-3p、及びmiR-140-3pは、成体GPCにおける老齢を促進すると予測された。

【0349】

成体hGPCの不均一性は、領域特異的な方法で成体の脳内で増加すると仮定されており、したがって、空間トランスクリプトミクスと対合される複数の領域からのscRNA配列決定を組み込む将来の研究は、正常なグリア老化の地域地理、並びにニューロン活性及び血管の健康とのその関係をよりよく理解するために必要とされるであろう。次いで、神経変性及び髄鞘異常の両方の疾患の環境におけるグリア老化との転写要因が、正常な老化との病理学の相互作用、並びにそれらが曝露され得る広範な疾患プロセスに対する老化細胞の応答を評価するために必要とされる。この点で、局所的な血管灌流の減少や星状膠細胞のサポートなど、GPC老化の非細胞自律促進因子の影響を考慮することが重要である。まとめると、若いhGPCと老化したhGPCとの間の明確な区別、及びそれらのトランスクリプトームが、本発明者らが記載したメカニズムを介して調節され得る程度を考慮すると、老化したヒトGPCをより拡大可能で表現型的に順応性がある表現型に安全に若返らせ、それらが老化及び成体白質疾患の悪影響をより効果的に補償することを可能にすることが、今や実現可能な目標と思われる。

【0350】

上記で開示された特徴及び機能、及び他の特徴及び機能の変形例、又はそれらの代替は、多くの他の異なるシステム又は適用に組み合わせられ得ることを理解されたい。その中の様々な現在予想されないか、又は予期されない代替、修正、変形、若しくは改善は、後に当業者によって行われてもよく、それらは、以下の特許請求の範囲によっても包含される

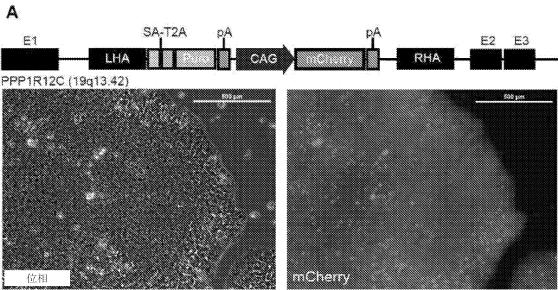
ことが意図される。

【0351】

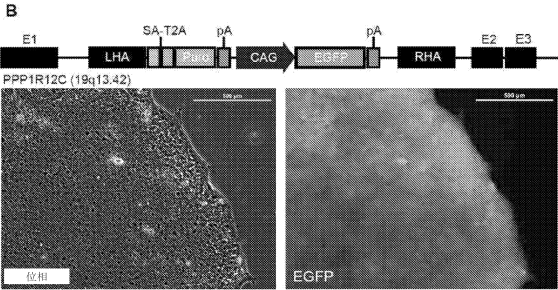
好ましい実施形態の前述の実施例及び説明は、特許請求の範囲によって定義される本開示を限定するものではなく、例示するものとして理解されるべきである。容易に理解されるように、上記の特徴の多数の変形及び組み合わせは、特許請求の範囲に記載される本開示から逸脱することなく利用され得る。そのような変形例は、本開示の範囲から逸脱したものとはみなされず、全てのそのような変形例は、以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。本明細書で引用される全ての参照は、それらの全体が、参照により組み込まれる。

【図面】

【図1A】



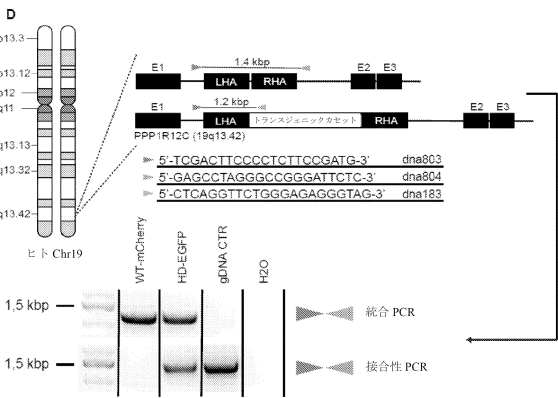
【図1B】



【図1C】

細胞株	HTT CAG 長さ	トランスジェニック挿入	同胞マッチ
GENEA019 (WT-mCherry)	18:15	Puro-CAG-mCherry	
GENEA020 (HD-EGFP)	48:17	Puro-CAG-EGFP	

【図1D】



10

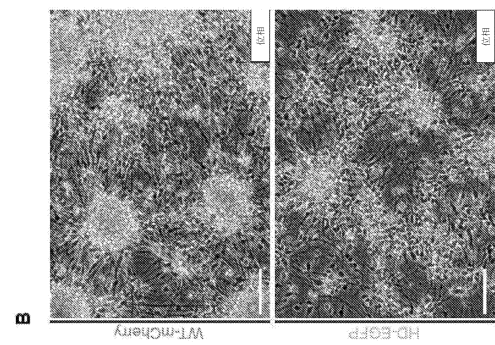
20

30

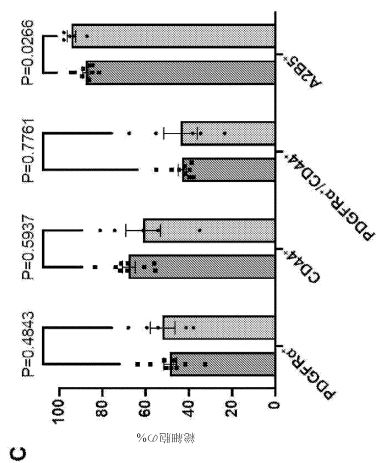
40

50

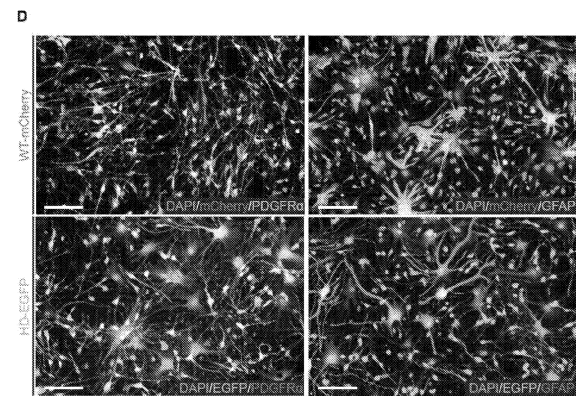
【図 3 B】



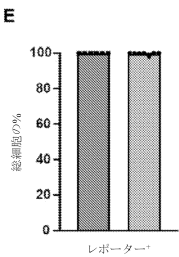
【図 3 C】



【図 3 D】



【図 3 E】



10

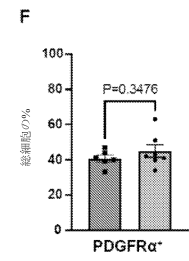
20

30

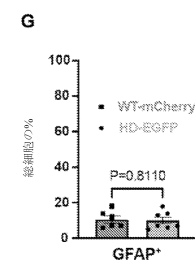
40

50

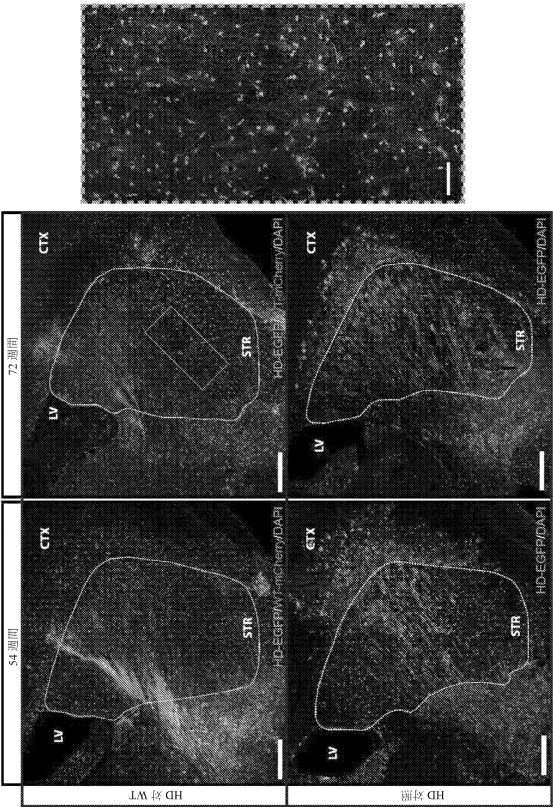
【図 3 F】



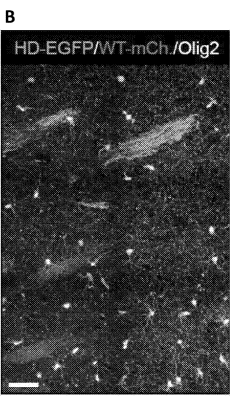
【図 3 G】



【図 4 A】



【図 4 B】



10

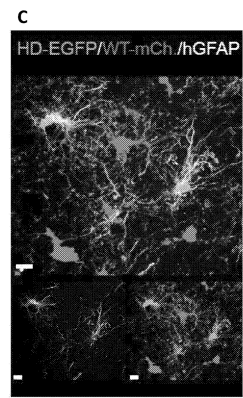
20

30

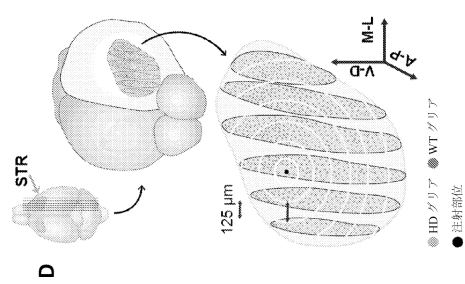
40

50

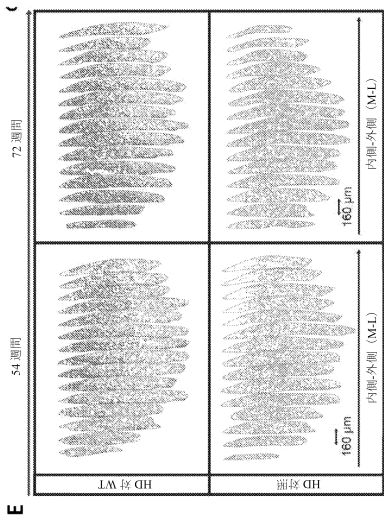
【図 4 C】



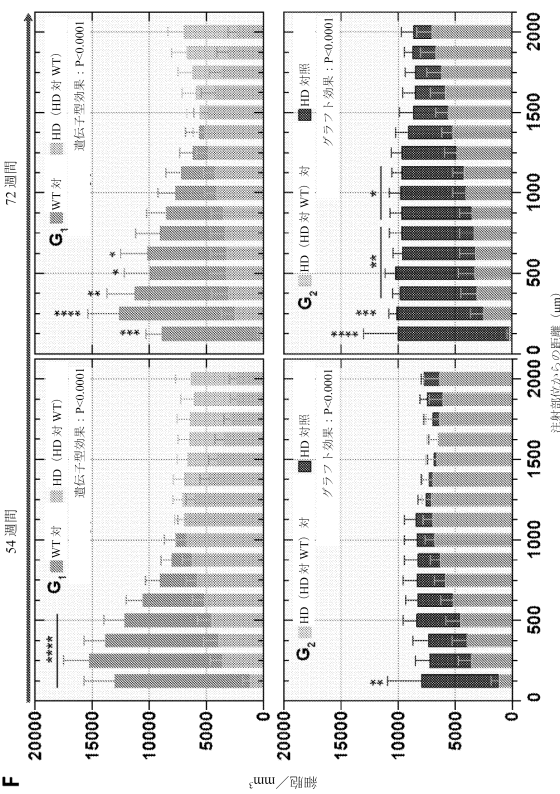
【図 4 D】



【図 4 E】



【図 4 F】



10

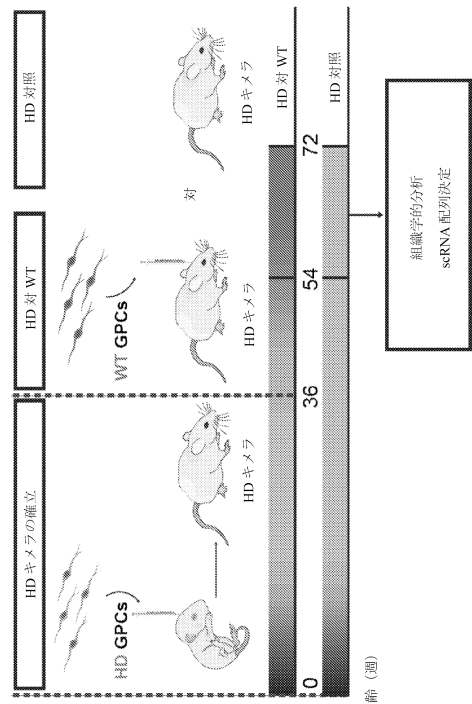
20

30

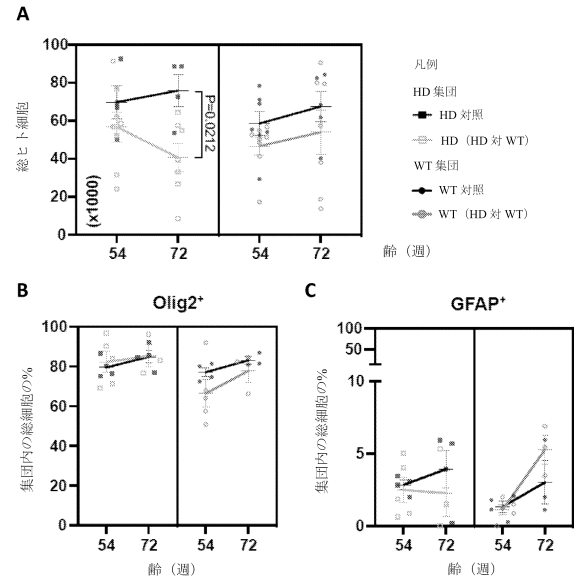
40

50

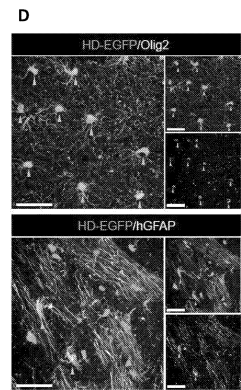
【図 5】



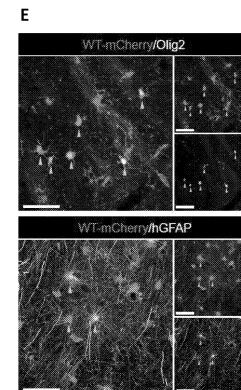
【図 6 A - 6 C】



【図 6 D】



【図 6 E】



10

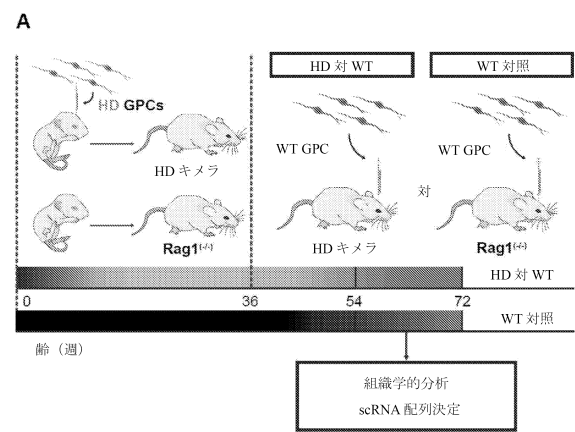
20

30

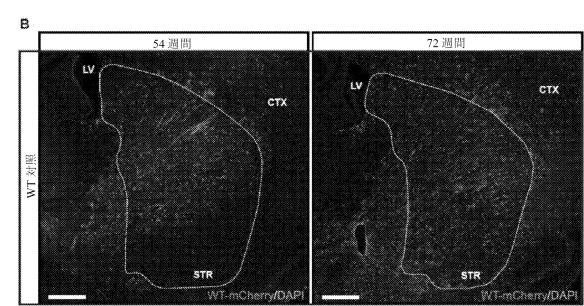
40

50

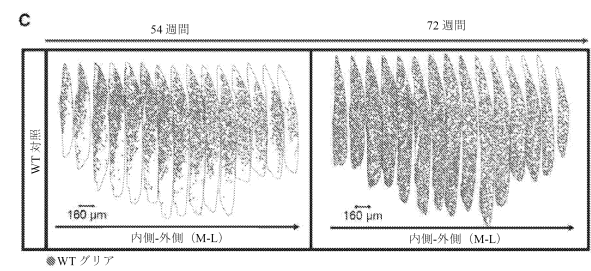
【図 7 A】



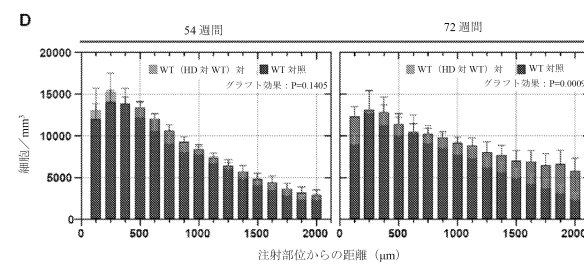
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 7 D】



10

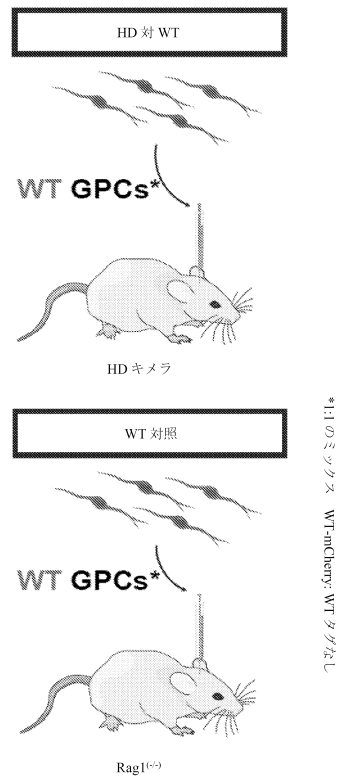
20

30

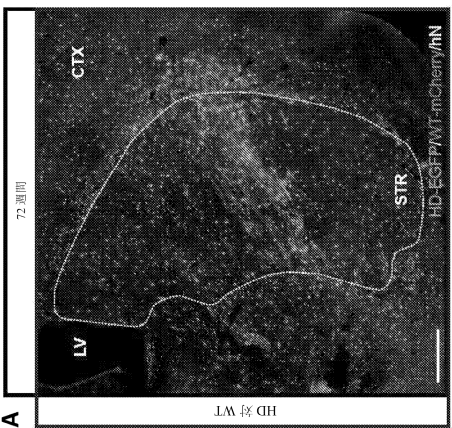
40

50

【図 8】



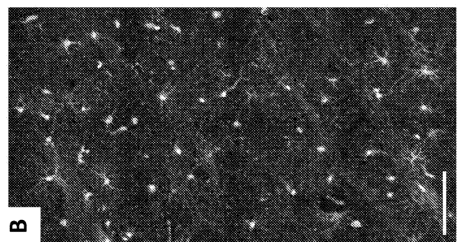
【図 9 A】



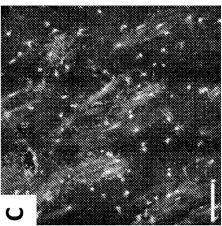
10

20

【図 9 B】



【図 9 C】

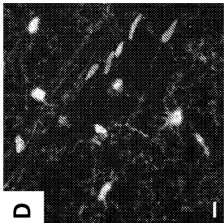


30

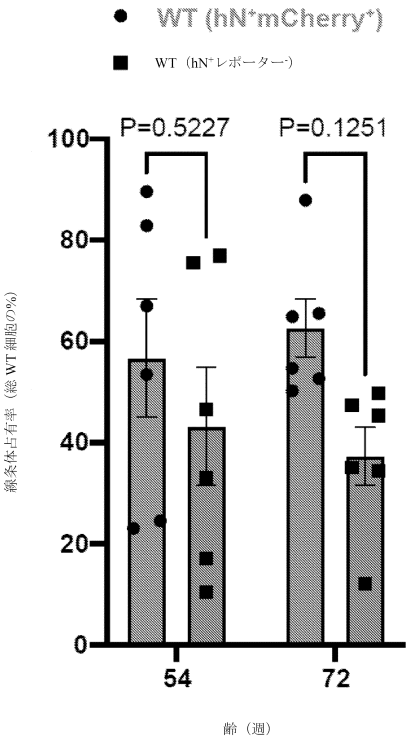
40

50

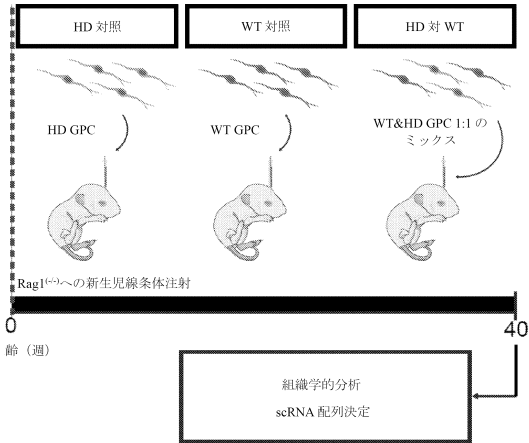
【図 9 D】



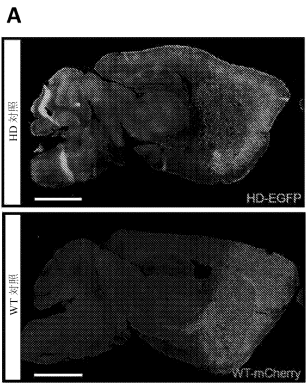
【図 1 0】



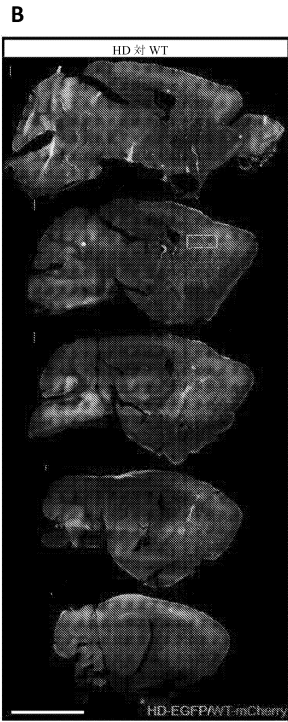
【図 1 1】



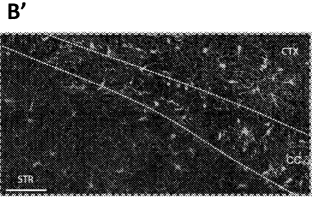
【図 1 2 A】



【図 1 2 B - 1】



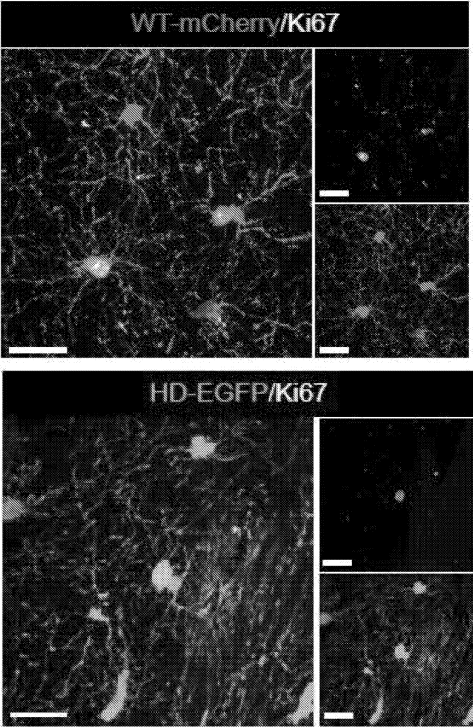
【図 1 2 B - 2】



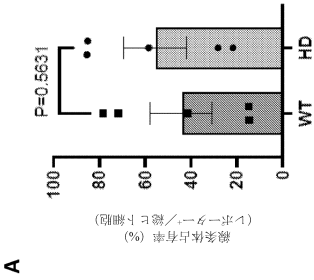
10

20

【図 1 2 C】



【図 1 3 A】

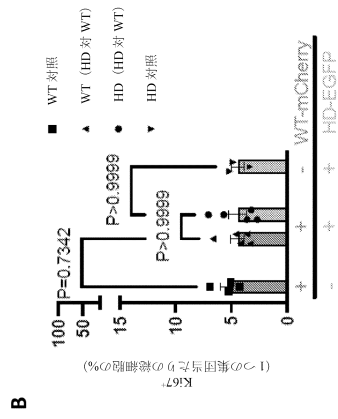


30

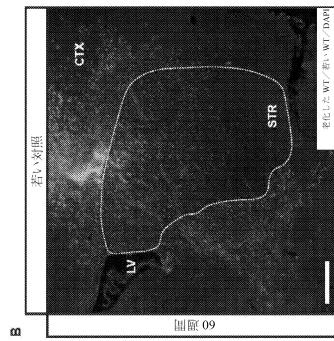
40

50

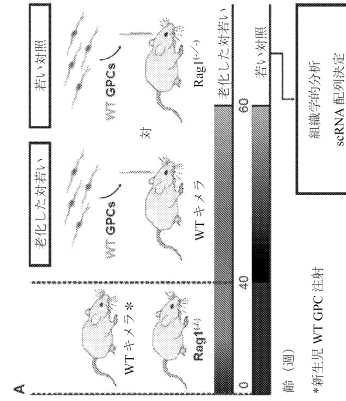
【図 1 3 B】



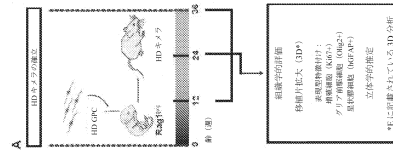
【図 1 4 B】



【図 1 4 A】



【図 1 5 A】



10

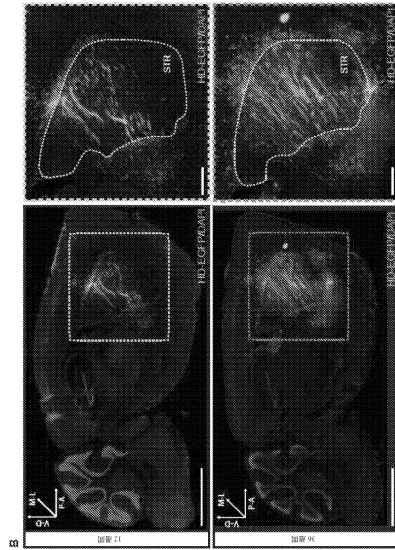
20

30

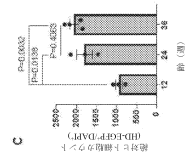
40

50

【図 15 B】

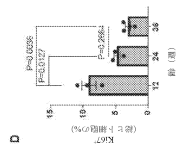


【図 15 C】

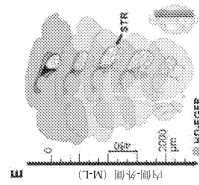


10

【図 15 D】



【図 15 E】



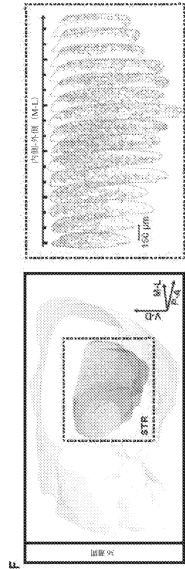
20

30

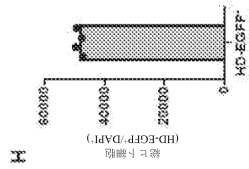
40

50

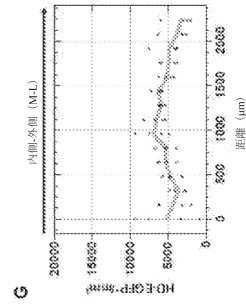
【図 15 F】



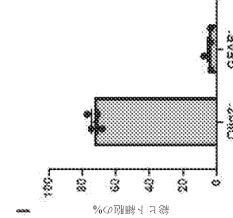
【図 15 H】



【図 15 G】



【図 15 I】



10

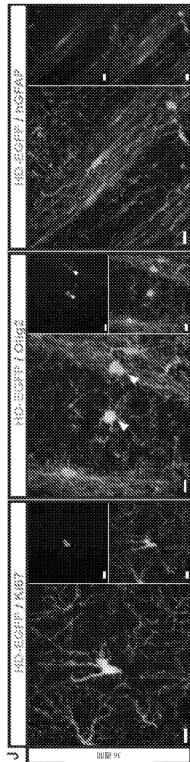
20

30

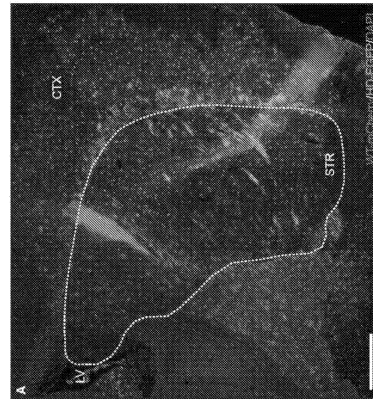
40

50

【図 15 J】



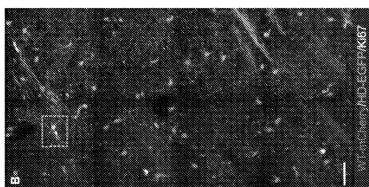
【図 16 A】



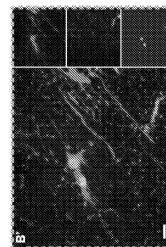
10

20

【図 16 B - 1】



【図 16 B - 2】

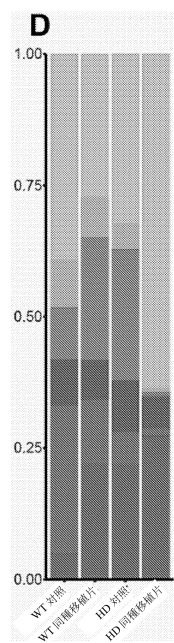


30

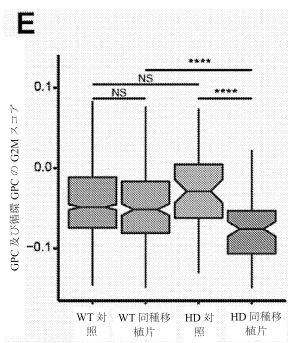
40

50

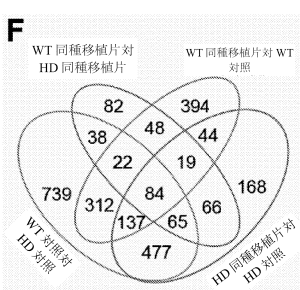
【図 20 D】



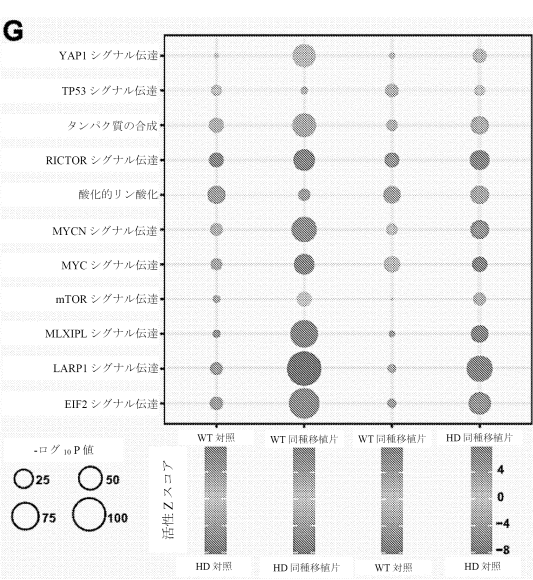
【図 20 E】



【図 20 F】



【図 20 G】



10

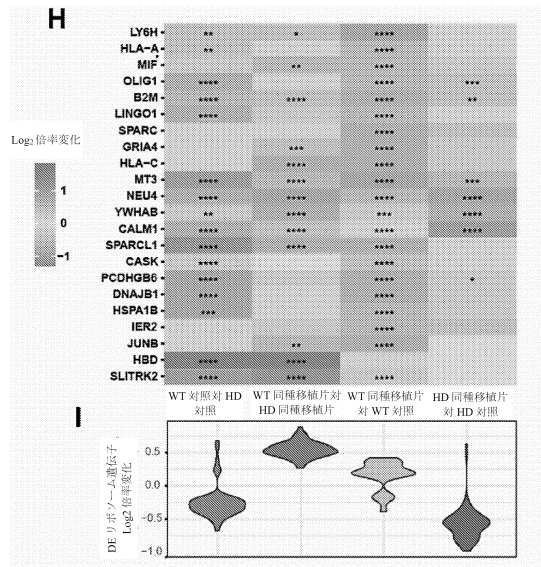
20

30

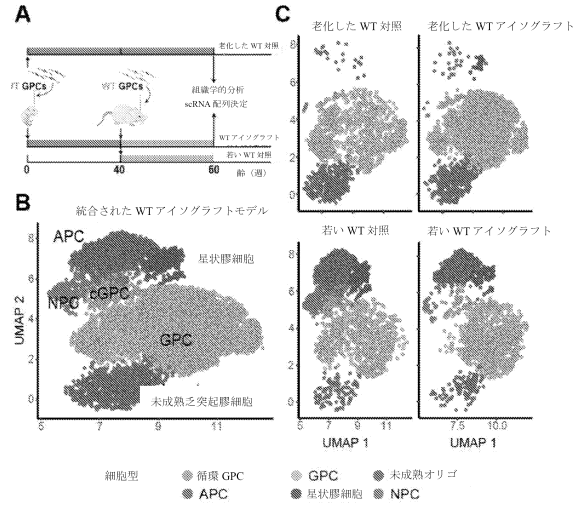
40

50

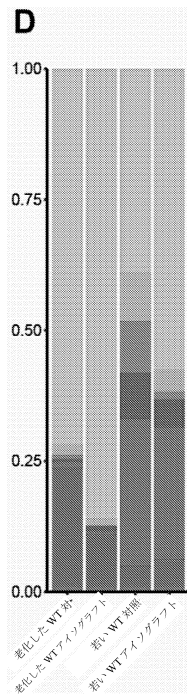
【図 20 H - 20 I】



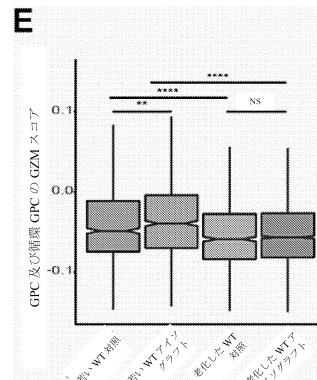
【図 21 A - 21 C】



【図 21 D】



【図 21 E】



10

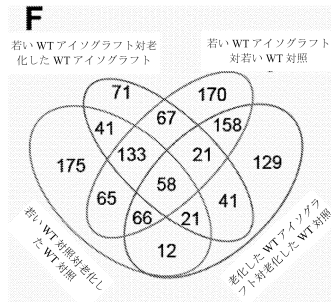
20

30

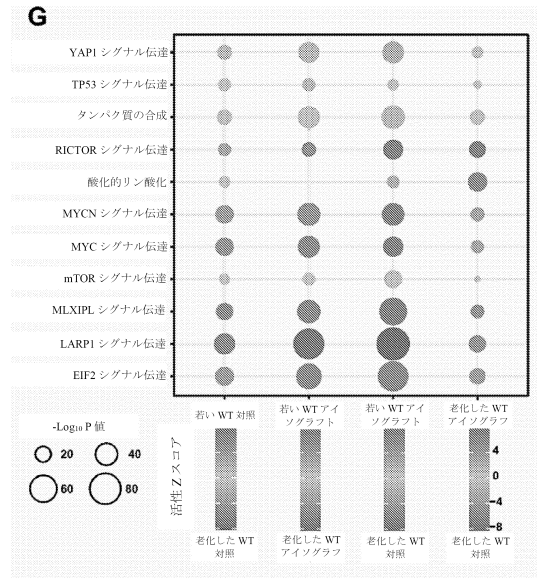
40

50

【図 2 1 F】



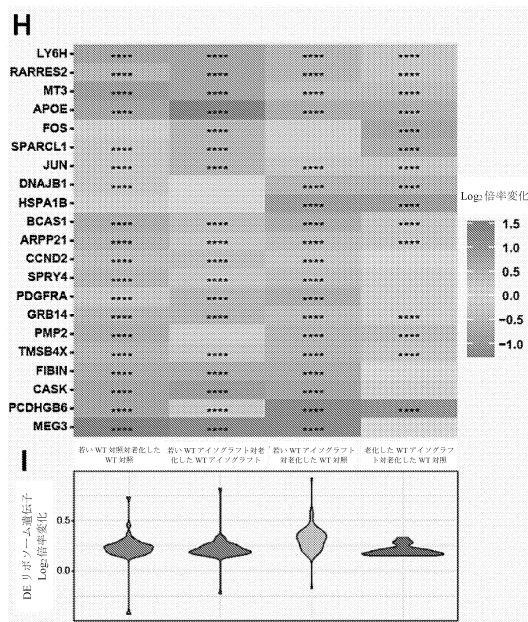
【図 2 1 G】



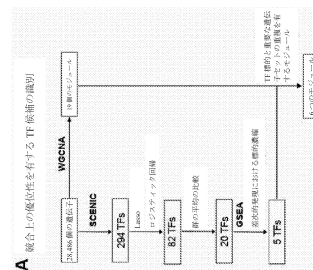
10

20

【図 2 1 H - 2 1 I】



【図 2 2 A】

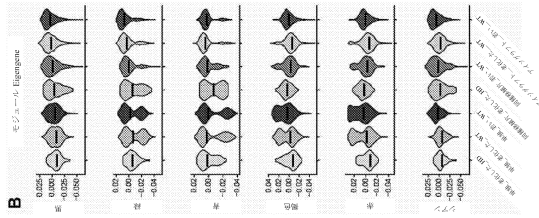


30

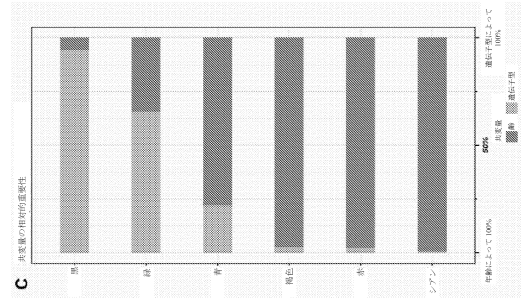
40

50

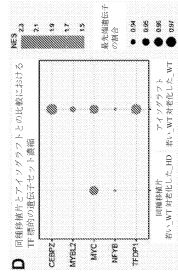
【図 2 2 B】



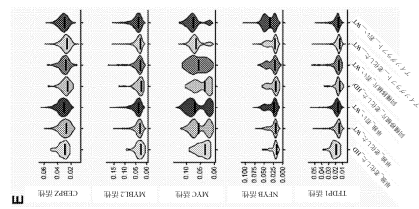
【図 2 2 C】



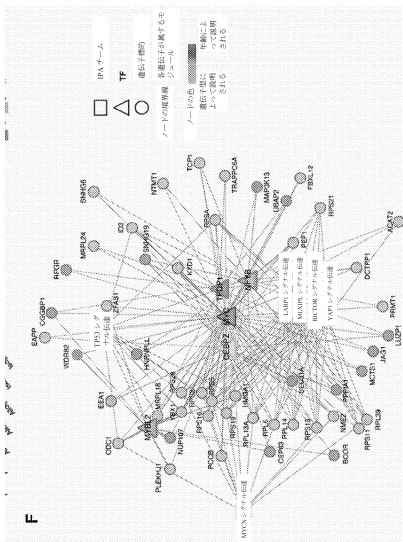
【図 2 2 D】



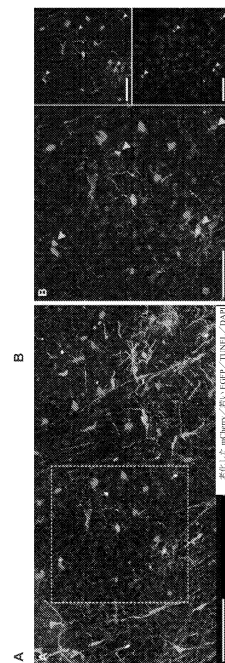
【図 2 2 E】



【図 2 2 F】



【図 2 3 A – 2 3 B】



10

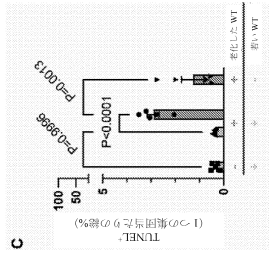
20

30

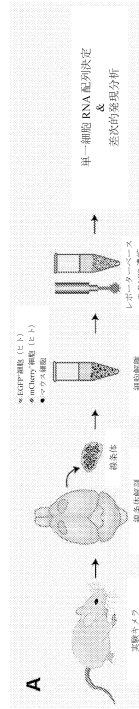
40

50

【図 2 3 C】



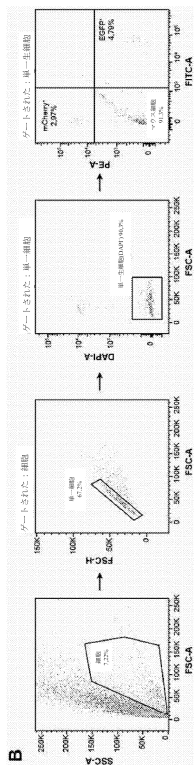
【図 2 4 A】



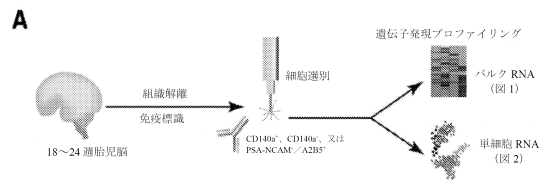
10

20

【図 2 4 B】



【図 2 5 A】

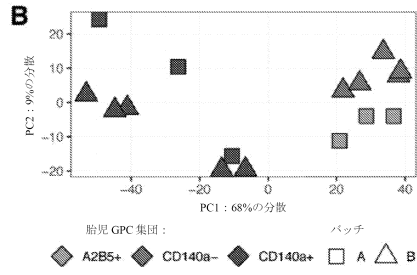


30

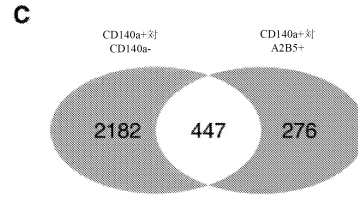
40

50

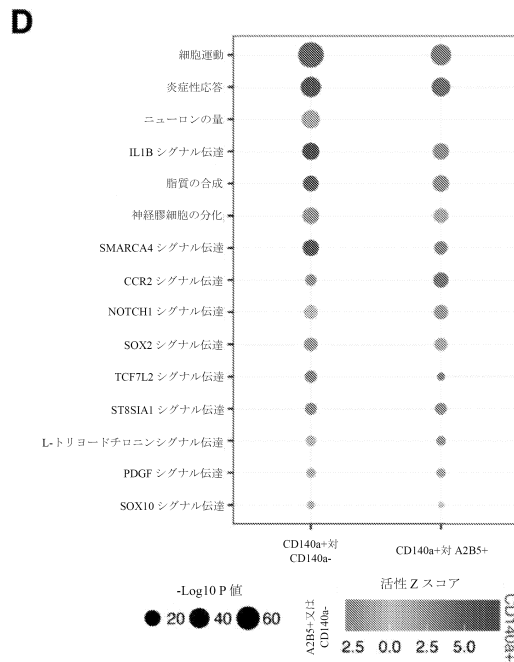
【図 2 5 B】



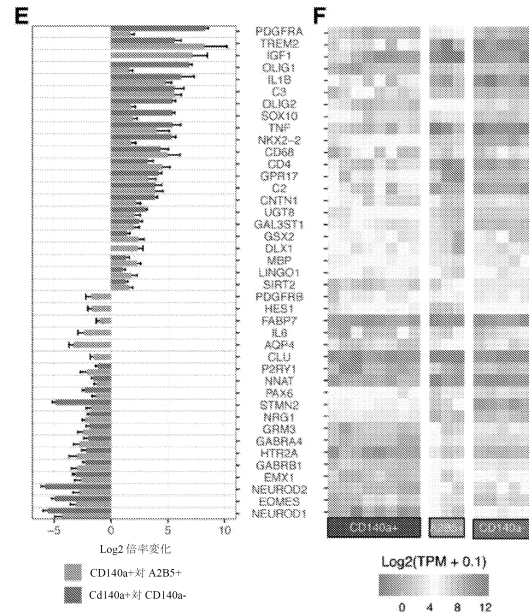
【図 2 5 C】



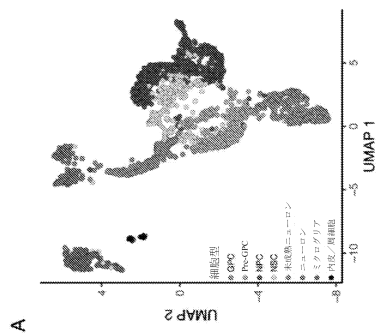
【図 2 5 D】



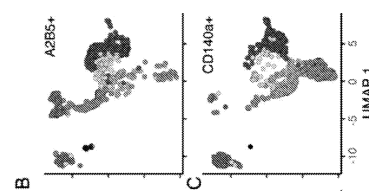
【図 2 5 E - 2 5 F】



【図 2 6 A】



【図 2 6 B - 2 6 C】



10

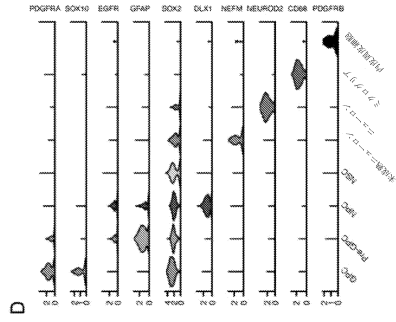
20

30

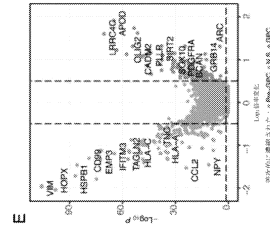
40

50

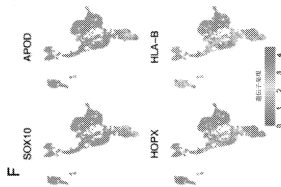
【図 26 D】



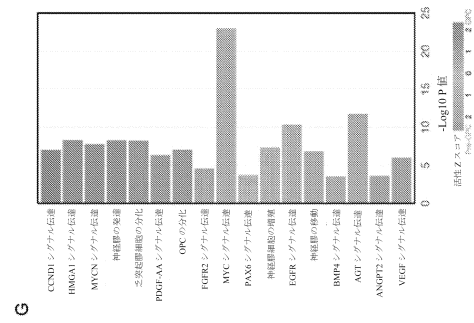
【図 26 E】



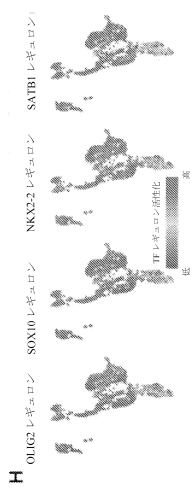
【図 26 F】



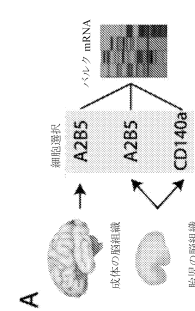
【図 26 G】



【図 26 H】



【図 27 A】



10

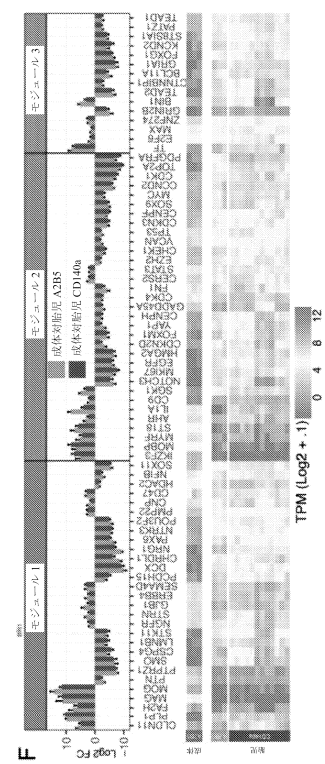
20

30

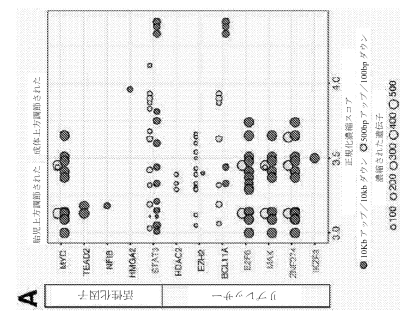
40

50

【図 27 F】

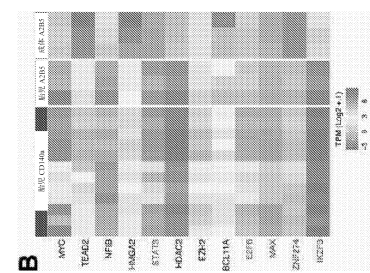


【図 28 A】

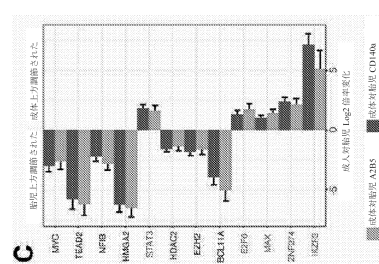


10

【図 28 B】



【図 28 C】

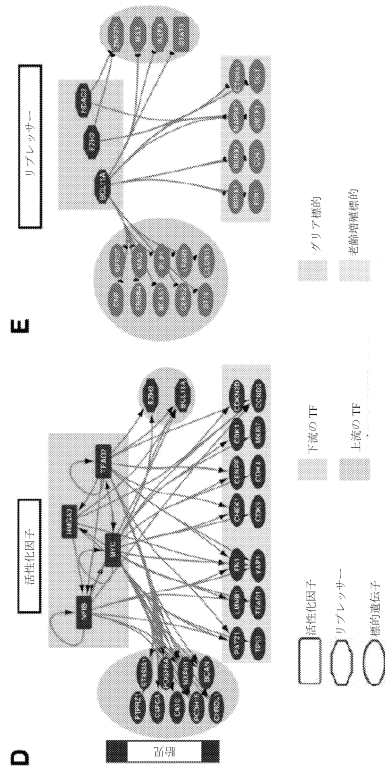


30

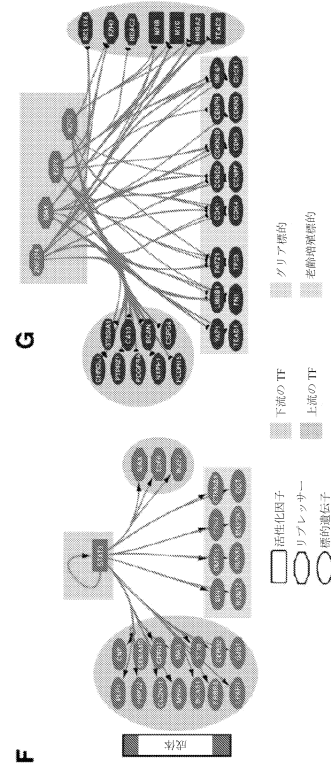
40

50

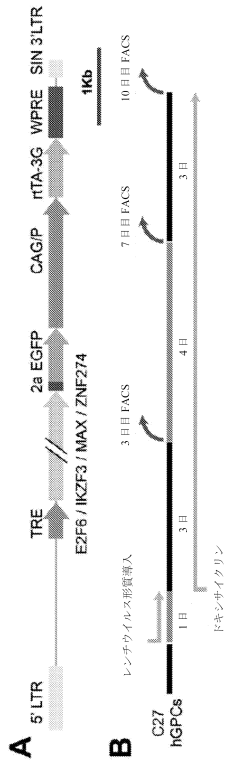
【図 28 D - 28 E】



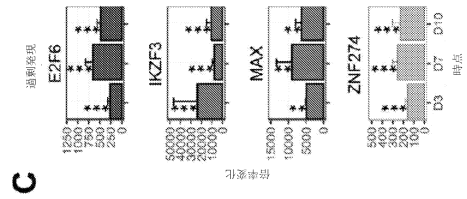
【図 28 F - 28 G】



【図 29 A - 29 B】



【図 29 C】



10

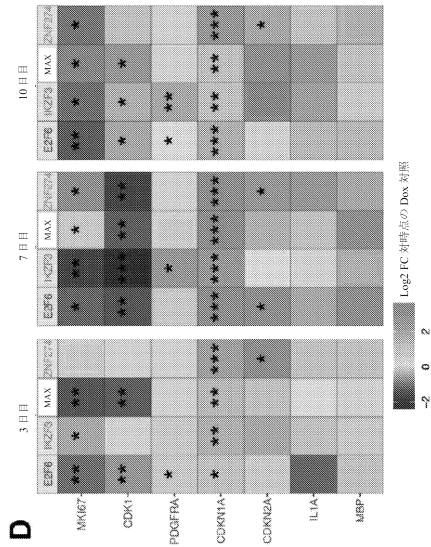
20

30

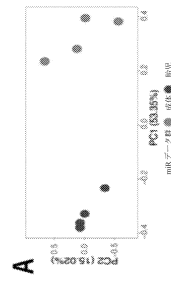
40

50

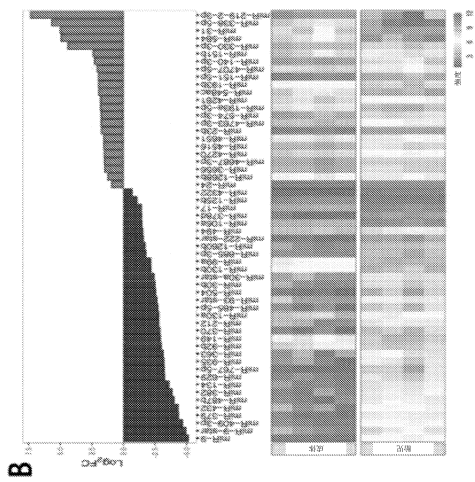
【図 29 D】



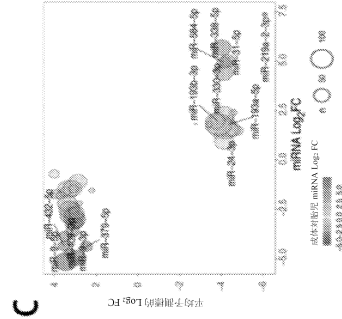
【図 30 A】



【図 30 B】



【図 30 C】



10

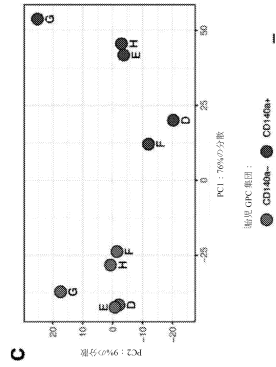
20

30

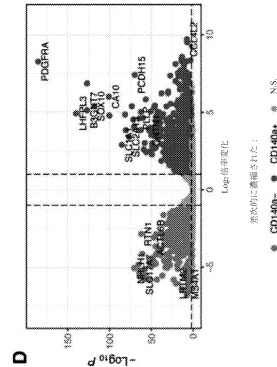
40

50

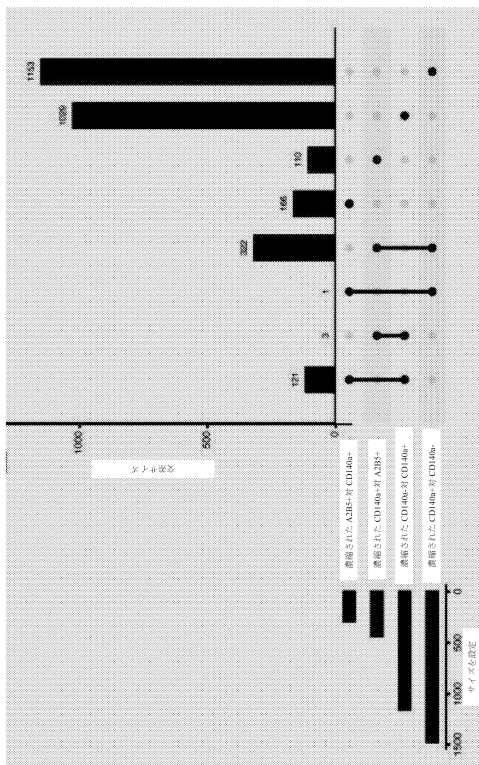
【図 3 1 C】



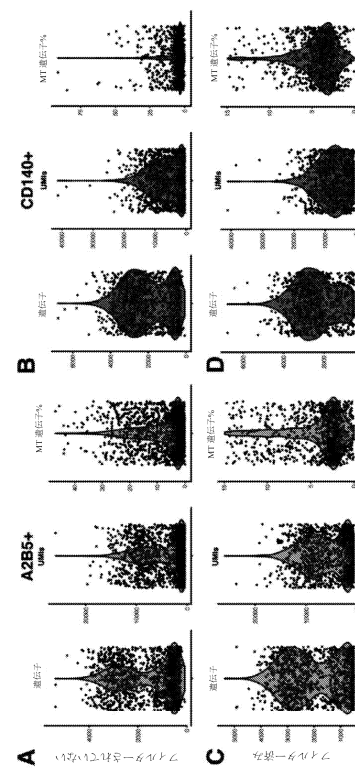
【図 3 1 D】



【図 3 1 E】



【図 3 2 A - 3 2 D】



10

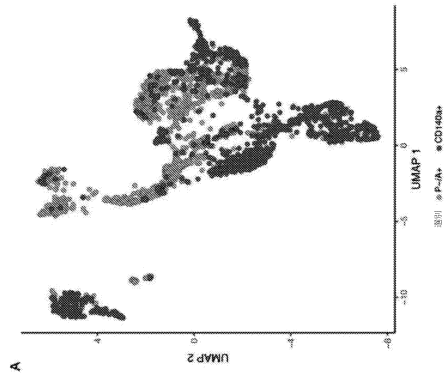
20

30

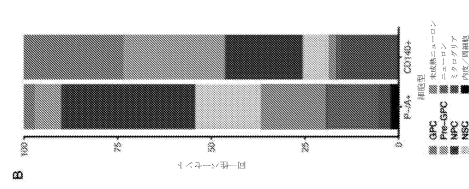
40

50

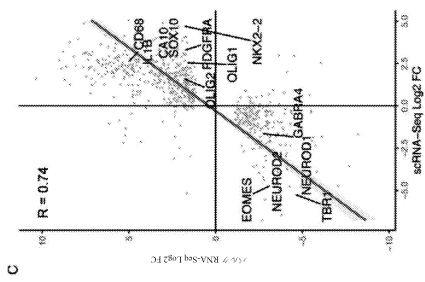
【図 3 3 A】



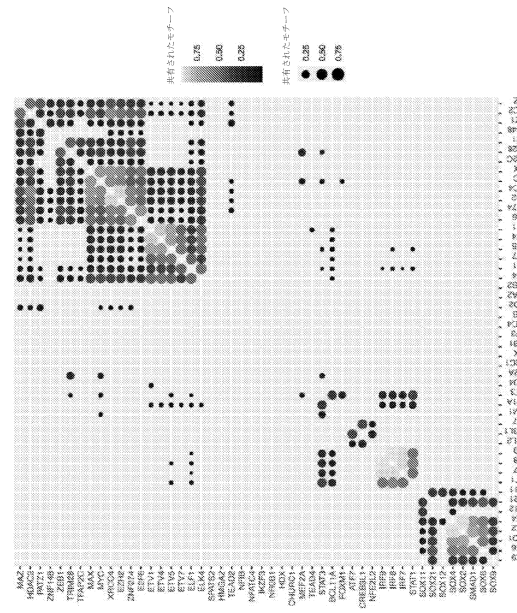
【図 3 3 B】



【図 3 3 C】



【図 3 4】



10

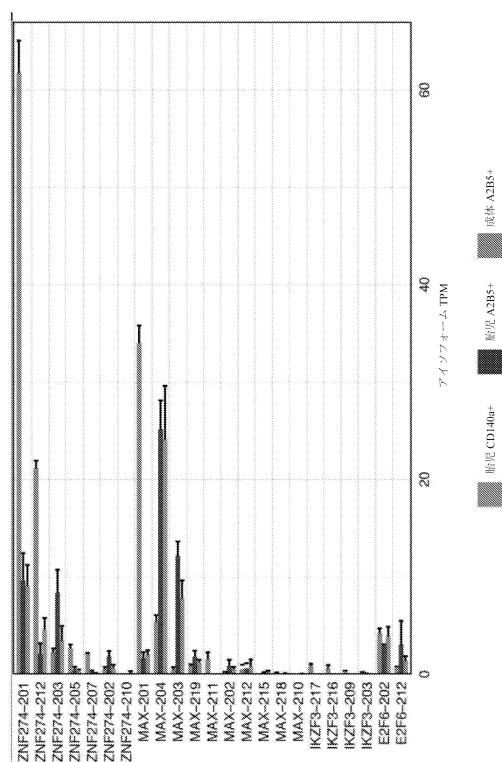
20

30

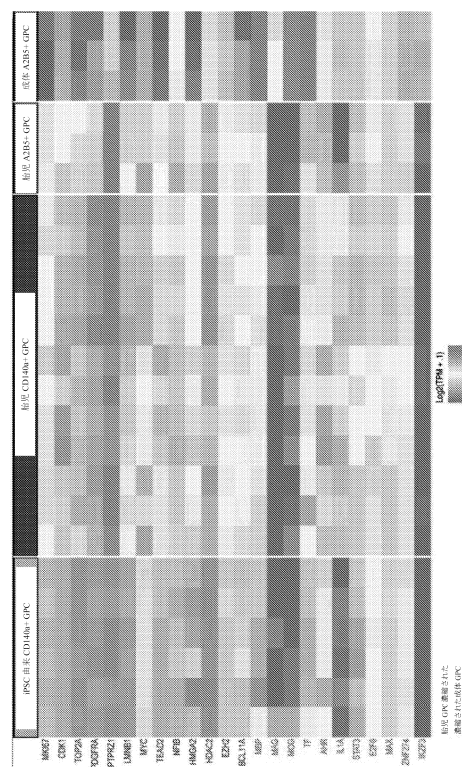
40

50

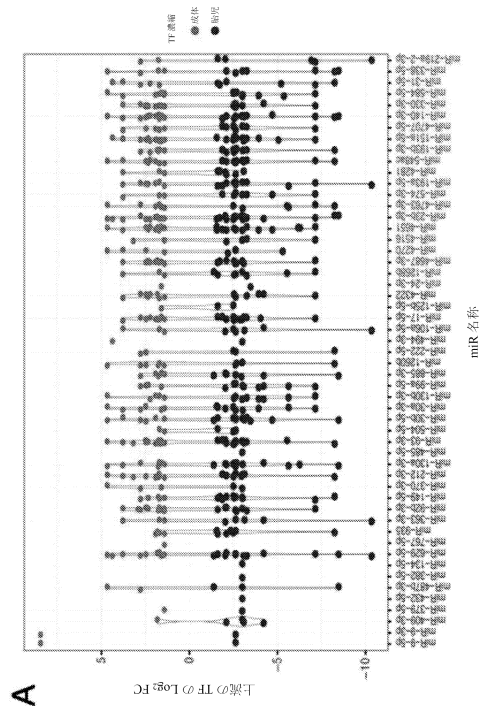
【圖 3 5】



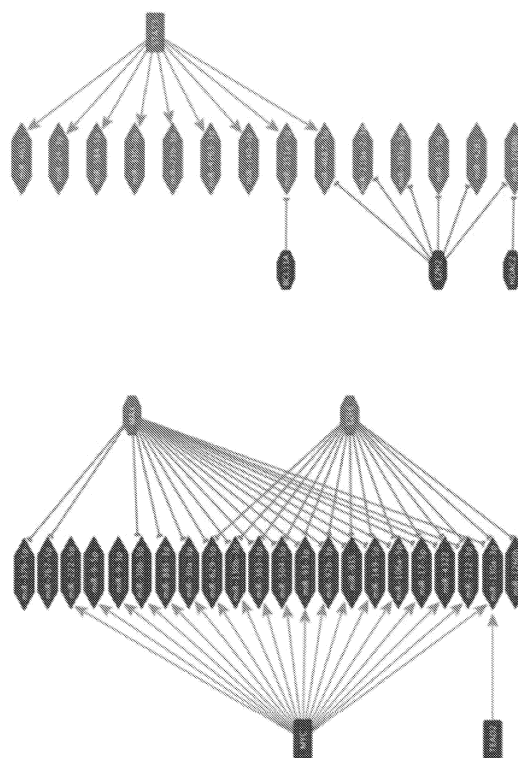
【圖 3 6】



【図 3 7 A】



【図 3 7 B】



【配列表】
2024540971000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K35/30 A61P25/28 A61P25/02 A61P27/00 A61P37/00	
	A61K35/545 A61K9/00	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/124087 A1 (UNIV ROCHESTER [US]; GOLDMAN STEVEN A [US]; WANG SU [US]) 14 August 2014 (2014-08-14) cited in the application the whole document	1-6, 8-20
X	GOLDMAN STEVEN A. ET AL: "Glial progenitor cell-based repair of the dysmyelinated brain: Progression to the clinic", SEMINARS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY., vol. 116, 1 August 2021 (2021-08-01), pages 62-70, XP093011534, GB ISSN: 1084-9521, DOI: 10.1016/j.semcdb.2020.12.004 the whole document	1-20
----- -/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 February 2023		16/02/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Greif, Gabriela

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/078344

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078344

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WINDREM MARTHA S. ET AL: "Human Glial Progenitor Cells Effectively Remyelinate the Demyelinated Adult Brain", CELL REPORTS, vol. 31, no. 7, 1 May 2020 (2020-05-01), page 107658, XP093011542, US ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107658 the whole document -----	1-20
X	WO 03/070171 A2 (CORNELL RES FOUNDATION INC [US]) 28 August 2003 (2003-08-28) page 8; claims 3,5,15 -----	1,2,5,6, 8-11
X	ABDELLATIF BENRAISS ET AL: "Human glia can both induce and rescue aspects of disease phenotype in Huntington disease", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 7, no. 1, 7 June 2016 (2016-06-07), XP055751013, DOI: 10.1038/ncomms11758 the whole document -----	1,3-8, 10-12, 16,17
X	S. A. GOLDMAN ET AL: "How to make an oligodendrocyte", DEVELOPMENT, vol. 142, no. 23, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 3983-3995, XP055512509, GB ISSN: 0950-1991, DOI: 10.1242/dev.126409 the whole document -----	1-20
X	Mariani: "Chapter 18: Human glial chimeric mice to define the role of glial pathology in human disease" In: "Oligodendrocytes", 1 March 2019 (2019-03-01), Springer New York, XP093013088, ISBN: 978-1-4939-9072-6 pages 311-331, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30820907> the whole document -----	1-20
Y	US 2012/100113 A1 (TESAR PAUL J [US] ET AL) 26 April 2012 (2012-04-26) the whole document -----	1-20
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078344

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STEVEN A GOLDMAN ET AL: "Modeling cognition and disease using human glial chimeric mice", GLIA, WILEY-LISS, INC, US, vol. 63, no. 8, 24 May 2015 (2015-05-24), pages 1483-1493, XP071740191, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/GLIA.22862 page 1491, right-hand column, paragraph 1 -----	6
A	US 2016/317681 A1 (GOLDMAN STEVEN A [US]) 3 November 2016 (2016-11-03) the whole document -----	1-20
Y	US 8 227 247 B2 (ZHANG SU-CHUN [US]; HU BAOYANG [US] ET AL.) 24 July 2012 (2012-07-24) the whole document -----	1-20
A	DUMEVSKA BILJANA ET AL: "Derivation of Huntington disease affected Genea020 human embryonic stem cell line", STEM CELL RESEARCH, vol. 16, no. 2, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 430-433, XP093021024, NL ISSN: 1873-5061, DOI: 10.1016/j.scr.2016.02.009 Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/ article/pii/S1873506116000519/pdf?md5=0a b79cef61a5397ad0be2ce85f1ba0a4&pid=1-s2.0- S1873506116000519-main.pdf> the whole document -----	1-20
A	US 2008/184378 A1 (GOLDMAN STEVEN A [US] ET AL) 31 July 2008 (2008-07-31) the whole document -----	1-20
A	HE F ET AL: "Glial cells more than support cells?", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 4, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 661-665, XP026865674, ISSN: 1357-2725 [retrieved on 2007-03-13] See p. 1, "cell facts" -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/078344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014124087 A1	14-08-2014	EP 2954046 A1	16-12-2015
		EP 3766962 A1	20-01-2021
		JP 6541577 B2	10-07-2019
		JP 6894941 B2	30-06-2021
		JP 2016507568 A	10-03-2016
		JP 2019167375 A	03-10-2019
		JP 2021121644 A	26-08-2021
		US 2015352154 A1	10-12-2015
		US 2017198255 A1	13-07-2017
		US 2020048604 A1	13-02-2020
		US 2020048605 A1	13-02-2020
		US 2022290099 A1	15-09-2022
		WO 2014124087 A1	14-08-2014
WO 03070171 A2	28-08-2003	AU 2003211063 A1	09-09-2003
		CA 2476376 A1	28-08-2003
		EP 1480521 A2	01-12-2004
		EP 2532241 A1	12-12-2012
		JP 2005517717 A	16-06-2005
		KR 20040084911 A	06-10-2004
		US 2003223972 A1	04-12-2003
		US 2008206209 A1	28-08-2008
		US 2013004467 A1	03-01-2013
		US 2016264937 A1	15-09-2016
		US 2017159015 A1	08-06-2017
		WO 03070171 A2	28-08-2003
US 2012100113 A1	26-04-2012	CA 2815223 A1	19-07-2012
		CN 103429734 A	04-12-2013
		EP 2633036 A1	04-09-2013
		SG 189269 A1	31-05-2013
		US 2012100113 A1	26-04-2012
		US 2016075994 A1	17-03-2016
		WO 2012096705 A1	19-07-2012
US 2016317681 A1	03-11-2016	US 2016317681 A1	03-11-2016
		US 2017182097 A1	29-06-2017
		US 2017182098 A1	29-06-2017
US 8227247 B2	24-07-2012	US 2010159595 A1	24-06-2010
		US 2013011917 A1	10-01-2013
US 2008184378 A1	31-07-2008	DK 2114167 T3	17-09-2018
		EP 2114167 A1	11-11-2009
		EP 3400800 A1	14-11-2018
		US 2008184378 A1	31-07-2008
		WO 2008089267 A1	24-07-2008

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 25/14 (2006.01)**A 6 1 P 25/14****A 6 1 P 21/00 (2006.01)****A 6 1 P 21/00**

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. P Y T H O N

0, ウェブスター, サンセット トレイル 1 0 3 4

(72)発明者 ダ コスタ バルベード ヴィエイラ, リカルド

デンマーク国 ディーケー-1 1 6 5 コペンハーゲン, ノレゲード 1 0

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 CA44

4C087 AA01 AA02 BB45 NA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA15 ZA22 ZA94